

## NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG TÁI SINH CÂY LÚA TỪ PHÔI CỦA TẬP ĐOÀN CÁC GIỐNG LÚA VIỆT NAM NHẪM PHỤC VỤ CHO CÔNG TÁC CHUYỂN GIEN

CAO LÊ QUYÊN, LÊ KIM HOÀN,  
LÊ HUY HÀM, PHẠM XUÂN HỘI

*Viện Di truyền nông nghiệp*

Trong tình hình dân số ngày càng gia tăng, diện tích đất canh tác ngày càng thu hẹp và sự thay đổi khí hậu toàn cầu đang diễn biến theo chiều hướng xấu cho việc phát triển nông nghiệp. Định hướng chuyển gen thực vật đang là giải pháp duy nhất nhằm tăng năng suất, chất lượng, sức chống chịu cây trồng; giảm công lao động, chi phí sử dụng thuốc trừ sâu hóa học, cải thiện môi trường và tăng cường sức khoẻ loài người [5]. Một trong những trở ngại đang làm giảm hiệu quả trong định hướng chuyển gen thực vật là chúng ta chưa có nhiều quy trình nuôi cấy in vitro trên các giống và các đối tượng cây trồng khác nhau. Ngay cả trên cây lúa được xem là đối tượng cây trồng dễ tái sinh thì hầu hết các nghiên cứu hoàn thiện quy trình nuôi cấy in vitro trên thế giới cũng chỉ tập trung vào một số giống như Nipponbare, Tainung 67, Azucena, Kasalath, IR8, IR24, IR36, IR64, IR72, Nan Jin, Xin Qing, Pusa Basmati 1 [3, 4, 6, 8, 9]. Ở Việt Nam, ngay từ những năm cuối của thế kỷ 20 đã có khá nhiều nghiên cứu nuôi cấy in vitro trên các giống lúa với mục đích tạo dòng thuần và ứng dụng cho định hướng chuyển gen bằng phương pháp bắn gen [1, 2]. Tuy nhiên, các nghiên cứu đó không tiếp tục phát triển và đặc biệt những năm gần đây, khi mà định hướng chuyển gen vào lúa thông qua vi khuẩn đang phát huy hiệu quả thì không có nhiều nghiên cứu chuyên sâu về lĩnh vực này. Chưa có nghiên cứu thăm dò tổng thể về khả năng tái sinh của tập đoàn các giống lúa Việt Nam. Vì vậy, việc hoàn thiện các quy trình nuôi cấy in vitro của các giống lúa Việt Nam có khả năng tái sinh cao sẽ rất có ý nghĩa giúp chúng ta chuyển trực tiếp các gen quý vào các đối tượng giống cây trồng mà không cần các phép lai sau quá trình chuyển gen và từ đó tăng cường hiệu quả trong định hướng chuyển gen thực vật. Xuất

phát từ thực tế trên, chúng tôi tiến hành nghiên cứu tiềm năng tái sinh của các giống lúa Việt Nam và tiến tới hoàn thiện các quy trình nuôi cấy in vitro trên các giống lúa có khả năng tái sinh cao phục vụ công tác chuyển gen thực vật.

### I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

#### 1. Vật liệu

##### a. Giống lúa

Để thực hiện nghiên cứu này chúng tôi tiến hành nghiên cứu tiềm năng tái sinh của tập đoàn 59 giống lúa Việt Nam. Tất cả các giống có lý lịch được cung cấp bởi Trung tâm Tài nguyên Thực vật Viện Khoa học nông nghiệp Việt Nam và được chia thành 3 nhóm: nhóm giống phổ biến trong sản xuất (từ 1 đến 26), nhóm giống chịu hạn (từ 27 đến 53), nhóm giống chất lượng cao (từ 54 đến 59). Danh sách giống cụ thể được trình bày ở bảng 1.

##### b. Môi trường tạo callus

Sử dụng hai loại môi trường cơ bản: N6-D (Chu và cs., 1975) và MS (Murashige and Skoog, 1962) [7] với nồng độ 2,4-D dao động từ 1,5 - 2,5 mg/l, tỉ lệ muối MS dao động từ 0,5 - 1,5. Cụ thể như sau: **N6-D**: N6-D + 2 mg/l 2,4-D + 0,8% aga + 3% saccharose; **MS1**: MS + 1,5 mg/l 2,4-D + 0,8% aga + 3% saccharose; **MS2**: MS + 1,7 mg/l 2,4-D + 0,8% aga + 3% saccharose; **MS3**: MS + 2 mg/l 2,4-D + 0,8% aga + 3% saccharose; **MS4**: 1xMS + 2,5 mg/l 2,4-D + 0,8% aga + 3% saccharose; **MS5**: 1/2xMS + 2 mg/l 2,4-D + 0,8% aga + 3% saccharose; **MS6**: 3/2xMS + 2mg/l 2,4-D + 0,8% aga + 3% saccharose.

##### c. Môi trường tái sinh cây

Sử dụng môi trường MS bổ sung BAP,

kinetine (0,5; 2 mg/l), casein (0,1 mg/l), cụ thể như sau: **MS7:** MS + 2 mg/l BAP + 0,5 mg/l kinetine + 0,7% aga + 3% saccharose + 15% nước dừa; **MS8:** MS + 2mg/l BAP + 0,5 mg/l kinetine+ 0,7% aga + 3% saccharose + 15%

nước dừa + 0,1 mg/l casein; **MS9:** MS + 0,5 mg/l BAP + 2mg/l kinetine + 0,7% aga + 3% saccharose + 15% nước dừa; **MS10:** MS + 0,5 mg/l BAP + 0,5 mg/l kinetine + 0,7% aga + 3% saccharose + 15% nước dừa.

Bảng 1

Danh sách tập đoàn các giống lúa của Việt nam được khảo sát trong nghiên cứu

STT	Giống	STT	Giống	STT	Giống
1	IR 64	21	C70	41	Cu cong
2	VN 10	22	C71	42	Khấu chàm lượng
3	Q5	23	ĐV108	43	Khí gia
4	Tám áp bẹ	24	Nếp 9603	44	Pê đở
5	Xi23	25	ĐB 6	45	Lốc nghê
6	Khang dân 18	26	ĐB06	46	Lúa đỏ Nghệ An
7	Nếp IR 352	27	Khấu le	47	AC5
8	LT 2	28	Tẻ đỏ	48	Cườm dạng 1
9	LC 93-1	29	Lúa tẻ nướng	49	Cườm dạng 2
10	LC 93-4	30	Lúa đôi	50	Lúa ngoi
11	1 Bp	31	Lúa lốc đỏ (tẻ)	51	Ngoi tía
12	Nếp 87	32	Héo dạng 1	52	Gz-1368
13	Nếp 97	33	Trì trì đỏ	53	Chành trụi
14	DT10	34	Lúa đá dạng 2	54	Hương Thơm số 1
15	DT13	35	Mi pò lê la	55	Bắc thơm số 7
16	X21	36	Ble mạ mùa	56	Tám xoan 1
17	NX30	37	Ble xá	57	Tám tiêu
18	13/2	38	Mông lu	58	Tám xoan 2
19	Mộc tuyến	39	Ngộ nương môi	59	Bao thai lùn

## 2. Phương pháp

Hạt lúa bóc vỏ được xử lý bằng cách rửa nước cất 2 lần, ngâm và lác nhẹ trong cồn 70% thời gian 1 phút, trong H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 15% thời gian 15 phút, sau đó rửa bằng nước cất khử trùng 4-5 lần. Hạt khử trùng được đưa nuôi trên môi trường tạo callus trong tối ở 28°C. Sau 2 tuần nuôi cấy, các callus được chuyển sang môi

trường tái sinh và nuôi trong điều kiện nhiệt độ 25°C, độ ẩm 50-70%, thời gian chiếu sáng 16 h/ngày ở cường độ 3000 lux.

Việc đánh giá khả năng hình thành callus của tập đoàn giống lúa khảo sát được tiến hành sau 2 tuần nuôi cấy trên môi trường tạo callus. Từng giống lúa được đánh giá định lượng theo các chỉ tiêu sau:

$$\text{Tỷ lệ tạo callus (\%)} = \frac{\Sigma \text{ callus tạo thành}}{\Sigma \text{ mẫu đưa vào}} \times 100\%$$

Từ kết quả đánh giá định lượng khả năng hình thành callus của từng giống, chúng tôi chia khả năng hình thành callus thành 5 cấp độ khác nhau: không tạo callus (-), tỷ lệ tạo callus dưới 30% (+), tỷ lệ tạo callus dưới 60% (++) , tỷ lệ tạo callus dưới 80% (+++) và tỷ lệ tạo callus

trên 80% (++++).

Việc đánh giá khả năng tái sinh của tập đoàn giống khảo sát được tiến hành sau 3 - 4 tuần nuôi cấy trên môi trường tái sinh. Từng giống lúa được đánh giá định lượng theo công thức sau:

$$\text{Tỷ lệ hình thành chồi (\%)} = \frac{\Sigma \text{ hình thành chồi}}{\Sigma \text{ callus đưa vào}} \times 100\%$$

Từ kết quả đánh giá định lượng khả năng tái sinh cây của từng giống, chúng tôi đưa ra 3 cấp độ khác nhau của khả năng tái sinh cây: tỷ lệ tái sinh cây trên 30% (+), tỷ lệ tái sinh cây trên 60% (++) , tỷ lệ tái sinh cây trên 80% (+++).

## II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 1. Khả năng hình thành callus của tập đoàn 59 giống lúa Việt Nam

Kết quả thí nghiệm đánh giá khả năng tạo callus của tập đoàn giống lúa Việt Nam trên môi trường N6-D và các môi trường MS được trình bày cụ thể ở bảng 2.

Bảng 2

Khả năng hình thành callus của tập đoàn 59 giống lúa Việt Nam

MT Giống	N6-D	MS1	MS2	MS3	MS4	MT Giống	N6-D	MS1	MS2	MS3	MS4
1	-	-	-	-	-	31	-	-	-	-	-
2	-	+	+	++	+	32	-	-	-	-	-
3	-	+	+	++	+	33	-	-	-	+	-
4	-	-	-	-	-	34	-	-	-	+	-
5	-	+	+	++	+	35	-	-	-	-	-
6	-	+	+	++	+	36	-	-	-	+	-
7	-	+	+	++	+	37	-	+	+	++	+
8	-	-	-	-	-	38	-	-	-	++	-
9	-	-	-	-	-	39	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	40	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	41	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	42	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	43	-	-	-	-	-
14	-	+	+	++	+	44	-	-	-	-	-
15	-	+	+	++	+	45	-	+	+	++	+
16	-	+	+	++	+	46	-	+	+	++	+
17	-	-	-	+	-	47	-	-	-	+	-
18	-	-	-	+	-	48	-	-	-	+	-
19	-	-	-	-	-	49	-	-	-	+	-
20	-	+	+	++	+	50	-	+++	+++	++++	++
21	-	+	+	++	+	51	-	+++	++	++	++
22	-	+	+	++	+	52	-	-	-	-	-
23	-	-	-	+	-	53	-	++++	+++	+++	+
24	-	-	-	-	-	54	-	+	+	++	+
25	-	-	-	-	-	55	-	+	+	++	+
26	-	+	+	++	+	56	-	-	-	-	-
27	-	+	+	++	+	57	-	-	-	-	-
28	-	-	-	-	-	58	-	-	-	-	-
29	-	-	-	+	-	59	-	-	-	-	-
30	-	-	-	-	-						

Trong tổng số 59 giống được nghiên cứu có 32 giống có khả năng hình thành callus và 27 giống không hình thành callus. Trong số 32 giống có khả năng hình thành callus, 19 giống có tỷ lệ hình thành callus từ 30 - 60%, một tỷ lệ

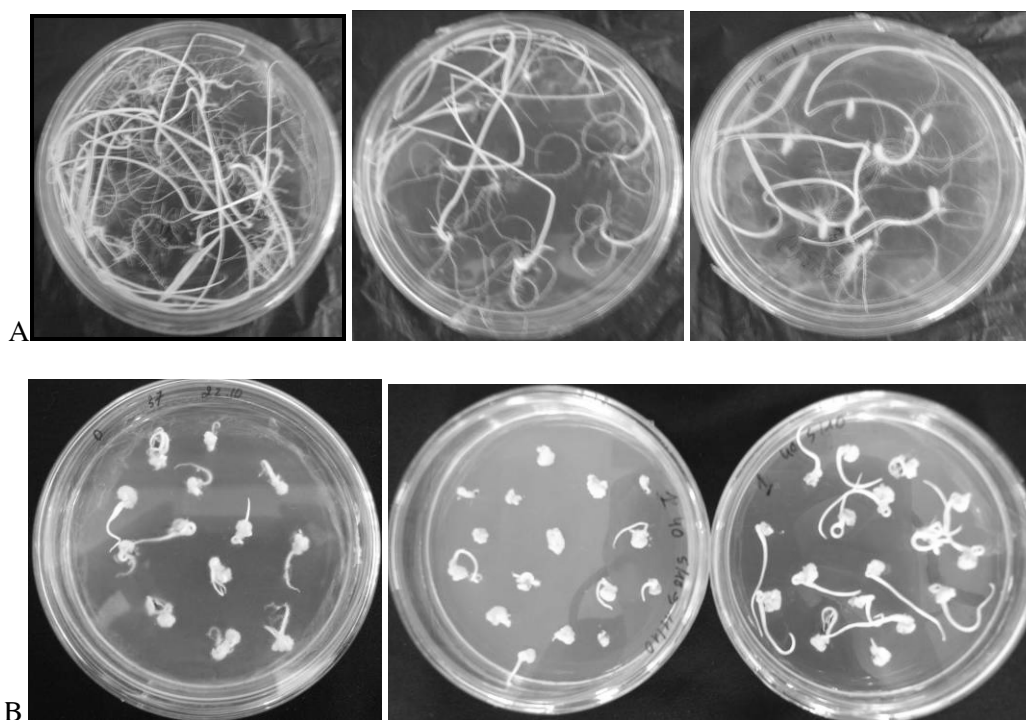
hoàn toàn có thể tối ưu hóa thành quy trình nuôi cấy *in vitro* để chuyển gen trực tiếp; đặc biệt có 2 giống (Lúa ngoi và Chành trụi) có tỷ lệ hình thành callus tương ứng là 98% và 91%, một tỷ lệ được xem là rất cao so với các tỷ lệ được công

bố. Điều thú vị là tỷ lệ giống có khả năng hình thành callus được phân bố khá đồng đều ở cả 3 nhóm giống. Cụ thể, nhóm giống phổ biến trong sản xuất là 15 trong số 26 giống, nhóm chịu hạn là 15 trong số 27 giống và nhóm chất lượng cao là 2 trong 6 giống. Với tỷ lệ hơn 52% số giống trong tập đoàn giống khảo sát có khả năng hình thành callus và sự phân bố tỷ lệ ở 3 nhóm như trên cho ta đi đến kết luận: Genotype ảnh hưởng trực tiếp đến khả năng hình thành callus và việc nghiên cứu quy trình nuôi cấy *in vitro* cho từng giống lúa phục vụ định hướng chuyển gen sẽ rất có ý nghĩa trong việc tăng cường hiệu quả của định hướng chuyển gen thực vật.

Rất nhiều nghiên cứu ở nước ngoài sử dụng môi trường N6-D cho việc hình thành callus, đặc biệt với các giống lúa Japonica [6, 8, 9].

Trong nghiên cứu này, mặc dầu tập đoàn giống lúa khảo sát có cả giống Japonica và Indica nhưng trong thí nghiệm khảo sát không có một giống nào có khả năng hình thành callus trên môi trường N6-D. Từ kết quả ở nghiên cứu này kết hợp với kết quả các nghiên cứu trước đây ở Việt Nam về môi trường sử dụng trong nghiên cứu tạo callus, chúng tôi đi đến khuyến cáo sử dụng môi trường MS trong việc tạo callus với các giống lúa Việt Nam.

Hầu hết các giống lúa có khả năng hình thành callus cho tỉ lệ hình thành callus cao nhất ở nồng độ 2,4-D là 2 mg/l. Tuy nhiên, một số giống trong nhóm giống lúa chịu hạn cho tỉ lệ hình thành callus cao nhất ở nồng độ 2,4-D là 1,5 mg/l (ví dụ giống Ngoi tía và giống Chành trụi - hình 1).



**Hình 1.** Sự hình thành Callus sau 12 ngày cấy trên hai loại môi trường N6-D và MS

A. Giống Lóc nghệ trên môi trường N6-D; B. Giống Lúa ngoi và Chành trụi trên môi trường MS.

Đối với cây trồng, các chất vô cơ đóng vai trò rất quan trọng. Muối khoáng là thành phần không thể thiếu trong các môi trường nuôi cấy mô tế bào thực vật. Hàm lượng khoáng trong môi trường ảnh hưởng tới các hoạt động sinh lý của mô. Để tìm hiểu công thức môi trường

khóang phù hợp cho sự hình thành callus của tập đoàn giống khảo sát, chúng tôi sử dụng 3 công thức môi trường khoáng với thành phần muối khoáng 1/2xMS, 1xMS và 3/2xMS. Kết quả được trình bày ở bảng 3.

Bảng 3

## Sự ảnh hưởng của hàm lượng muối đến sự hình thành callus của một số giống lúa Việt Nam

MT Giống	MS5	MS3	MS6	MT Giống	MS5	MS3	MS6
2	+	++	+	26	+	++	+
3	+	++	+	27	++	++	++
5	+	++	+	37	+	++	+
6	+	++	+	45	++	++	++
7	+	++	+	46	++	++	++
14	+	++	+	50	++	++++	++
15	+	++	+	51	++	++	++
16	+	++	+	53	++	+++	++
20	+	++	+	54	+	++	+
21	+	++	+	55	+	++	+
22	+	++	+				

Tất cả 32 giống có khả năng hình thành callus trong tập đoàn giống khảo sát cho tỉ lệ hình thành callus cao nhất ở nồng độ muối khoảng 1xMS. Vì vậy, môi trường tạo callus chứa 1xMS

được xem là tối ưu cho tập đoàn 59 giống lúa Việt Nam sử dụng trong nghiên cứu này.

## 2. Khả năng tái sinh callus của tập đoàn giống lúa Việt Nam

Bảng 4

## Khả năng tái sinh từ callus của tập đoàn giống lúa Việt Nam

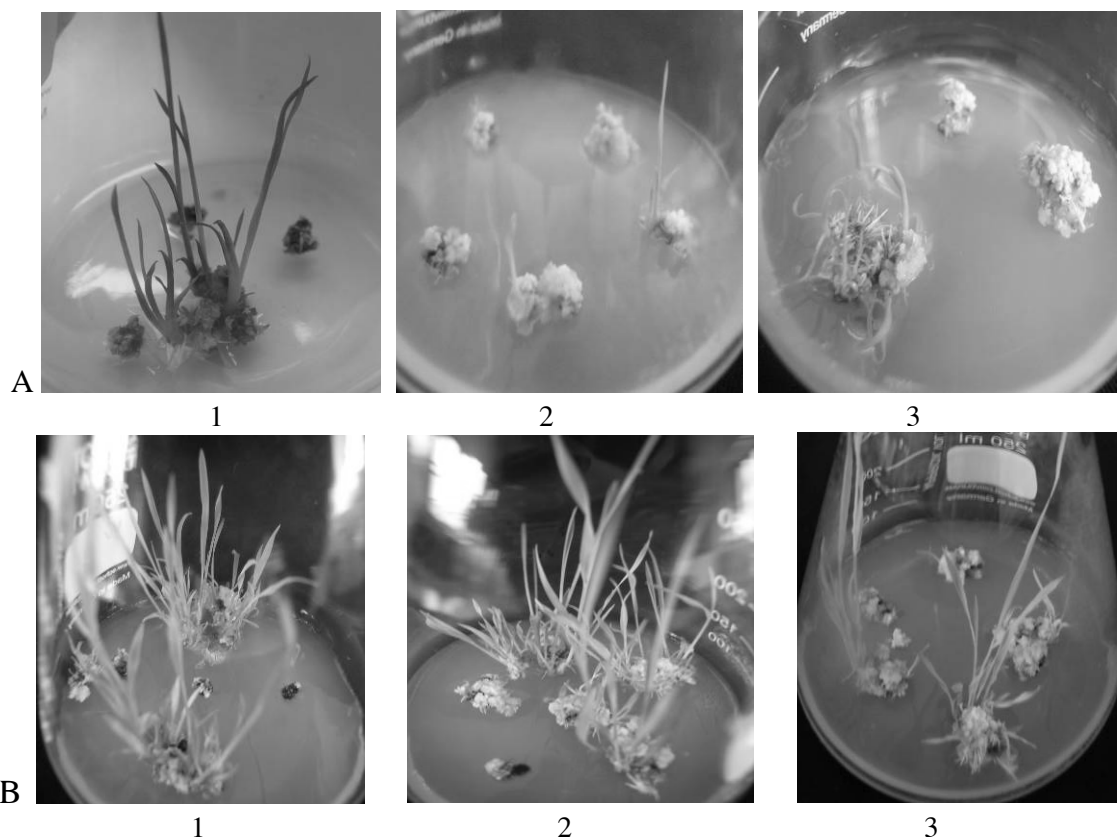
MT Giống	MS7	MS8	MS9	MS10	MT Giống	MS7	MS8	MS9	MS10
2	+	++	+	+	29	+	++	+	+
3	+	++	+	+	33	+	++	+	+
5	+	++	+	+	34	+	+	+	+
6	++	+	+	+	36	++	+	+	++
7	+	++	+	+	37	++	++	+	+
14	++	+	+	+	38	+	++	+	+
15	+	++	+	++	45	+	+	+	+
16	++	+	+	+	46	+	+	+	+
17	++	++	+	+	47	+	+	+	+
18	+	++	+	+	48	+	++	+	+
20	+	++	+	+	49	+	++	+	+
21	+	++	+	+	50	+	+	+	+
22	++	+	+	+	51	+++	++	+	++
23	++	++	+	+	53	++	+++	+	++
26	+	++	+	+	54	+	++	+	+
27	+	++	+	+	55	++	+++	+	+

Tập đoàn 32 giống lúa có khả năng hình thành callus được tiếp tục nghiên cứu khả năng tái sinh trên môi trường MS có bổ sung BAP, kinetine (0,5; 2 mg/l), casein (0,1 mg/l) ở các nồng độ khác nhau, kết quả trình bày ở bảng 4.

Tất cả các giống lúa có khả năng hình thành callus đều có khả năng tái sinh. Cụ thể trong tổng số 32 giống nghiên cứu, 24 giống cho khả năng tái sinh hơn 60%, đặc biệt có 3 giống: Ngoi tía, Chành trụi và Bắc thơm số 7 cho khả năng tái sinh tương ứng là 82%, 85% và 81%. Chúng tỏ định hướng tối ưu quy trình nuôi cấy *in vitro* cho

tùng giống lúa có khả năng tái sinh hoàn toàn có thể thực thi trong định hướng chuyển gen.

Cả 4 môi trường sử dụng trong nghiên cứu đều có khả năng tái sinh cây. Tuy nhiên, hầu hết các giống lúa (22/27 giống) cho tỉ lệ tái sinh cao nhất (trên 60%) với môi trường MS8 (MS + 2 mg/l BAP + 0,5 mg/l kinetine + 0,7% aga + 3% saccharose + 15% nước dừa + 0,1 mg/l casein). 5 trong tổng số 27 giống cho tỉ lệ tái sinh cao nhất (trên 60%) trên môi trường MS7 (MS + 2 mg/l BAP + 0,5 mg/l kinetine + 0,7% aga + 3% saccharose + 15% nước dừa).



**Hình 3.** Cây tái sinh từ callus của một số giống lúa có tiềm năng

A. Sau 17 ngày tái sinh: 1. Giống Bắc thơm số 7; 2. Giống Lóc nghệ; 3. Giống Khang dân;

B. Sau 22 ngày tái sinh: 1. Giống Bắc thơm số 7; 2. Giống Lóc nghệ; 3. Giống Khang dân.

### III. KẾT LUẬN

Ngoại trừ hai giống trong nhóm giống lúa chịu hạn (Ngoi tía và Chành trụi) cho tỉ lệ hình thành callus cao nhất ở nồng độ 2,4-D là 1,5 mg/l. Còn với các giống khác, sử dụng môi trường muối 1xMS có bổ sung hàm lượng

2 mg/l 2,4-D cho khả năng tạo callus tối ưu nhất ở tập đoàn 59 giống lúa Việt Nam.

Môi trường MS có bổ sung 2 mg/l BAP; 0,5 mg/l kinetine; 0,1 g/l casein và 15% nước dừa cho khả năng tái sinh cây cao nhất đối với 59 giống lúa khảo sát. Mặt khác, có 4 giống trong nhóm giống lúa phổ biến trong sản xuất và

1 giống trong nhóm giống lúa chịu hạn cho khả năng tái sinh cao nhất với môi trường MS có bổ sung 2 mg/l BAP, 0,5 mg/l kinetine và 15% nước dừa.

Hai giống lúa chịu hạn (Lúa ngoi và Chành trụi) và một giống lúa chất lượng cao (Bắc thơm số 7) có tỉ lệ tạo callus và tái sinh cao đang được tiếp tục nghiên cứu để hoàn thiện quy trình chuyển gen trực tiếp vào các giống lúa này.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Đặng Thị Minh Trang và cs.**, 2000: Những vấn đề nghiên cứu cơ bản trong khoa học sự sống: 695-695. Nxb. Nông nghiệp, H□ Nội.
2. **Trần Bích Lan và cs.**, 1997: Kết quả nghiên cứu khoa học 1997-1998: 344-347. Nxb. Nông nghiệp, Hà Nội.
3. **Aldemita R. R. & Hodges T. K.**, 1996: Planta, 199: 612-617.
4. **Amitabh Mohanty, N.P. Sarma, Akhilesh K. Tyagi**, 1999: Plant Science, 147: 127-137.
5. **James C.**, 2005: Global status of commercialized biotech/MG crops. ISAAA briefs 34. ISAAA: Ithaca, NY.
6. **Seiichi Toki et al.**, 2006: The Plant Journal, 47: 969-976.
7. **Swapan K. et al.**, 1997: Production and molecular evaluation transgenic rice plants. International rice research institute.
8. **Yukoh Hiei and Toshihiko Komari**, 2006. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 85: 271-283.
9. **Yukoh Hiei, Toshihiko Komari & Kumashiro T.**, 1994: Plant J., 6: 271-282.

## STUDY ON PLANT REGENERATION FROM EMBRYO OF A GROUP INDICA AND JAPONICA VARIETIES OF VIETNAMESE RICE FOR TRANSFORMATION APPROACH

CAO LE QUYEN, LE KIM HOAN  
LE HUY HAM AND PHAM XUAN HOI

### SUMMARY

Although, a highly efficient gene transfer method mediated by *Agrobacterium tumefaciens* was developed for both Japonica and Indica rice. However, highly efficient transformation approach is now facing with difficulty in in vitro system as there are not many tissue culture protocols for different Vietnamese rice varieties. Here, we report the callus forming potency and plant regeneration capacity of 59 vietnamese rice varieties including 26 common varieties, 27 drought resistance varieties and 6 high quality varieties. At least, 32 rice varieties in a total of 59 surveyed varieties have callus forming potency. Among them, 19 rice varieties have callus formation rate of 40 - 60%, a variety has callus formation rate of 71% and two varieties have callus formation rate of above 90%. The 1xMS medium supplemented with a range of 1.5-2 mg/l 2,4D seem to be optimal for callus forming. All 32 callus forming rice varieties showed plant regeneration capacity. Out of which, 24 rice varieties have regeneration score above 60%, specially three rice varieties have regeneration score of above 80%. The 1xMS medium supplemented with 2mg/l BAP, 0.5 mg/l kinetine, 0.1mg/l casein seem to be optimal for plant regeneration. The result is opening a possibility for transformation protocol development for Vietnamese rice varieties.

*Ngày nhận bài: 11-12-2007*