

## CHỌN TẠO CÁC DÒNG THUẦN ƯU TÚ TỪ CÁC DÒNG LÚA ƯU THỂ LAI BẰNG PHƯƠNG PHÁP NUÔI CẤY BAO PHẦN

### PHẦN 1: NUÔI CẤY BAO PHẦN CỦA CÁC DÒNG LÚA ƯU THỂ LAI

NGHIÊM NHƯ VÂN, LÊ XUÂN ĐẮC,  
LÊ TRẦN BÌNH, LÊ THỊ MUỘI

*Viện Công nghệ sinh học*

Tạo ra các giống lúa thuần mới có các đặc tính nông, sinh học và kinh tế tốt hơn so với các giống đã được phổ biến trong sản xuất là nhiệm vụ của công tác chọn giống mà trong đó lai giống rất thường được sử dụng và nó có ý nghĩa như là một phương pháp tạo ra vật liệu khởi đầu cho chọn giống.

Kết quả của lai là tạo ra cây lai F1 có chứa vật chất di truyền của cả hai giống bố mẹ mà bao phần của chúng là nguyên liệu rất tốt cho chọn giống vì có chứa một quần thể các tiểu bào tử rất đa dạng và phong phú về kiểu gen. Trong số đó, có các tiểu bào tử kết hợp được các đặc điểm tốt bổ sung của cả hai giống bố mẹ. Khi áp dụng kỹ thuật nuôi cấy bao phần vào giai đoạn này để gây phát sinh hình thái ở các tế bào phần đơn bội và nhân đôi số lượng nhiễm sắc thể ở các cây đơn bội tái sinh, sẽ lập tức nhận được các cây lưỡng bội đồng hợp tử. Trên cơ sở quần thể các dòng đồng hợp tử phong phú và đa dạng về kiểu gen đó, có thể tiến hành đánh giá chọn lọc ra các dòng thuần ưu tú có năng suất cao, chất lượng tốt, có khả năng chịu bệnh để đưa vào thực tiễn sản xuất. Chính vì những ưu điểm của phương pháp nuôi cấy bao phần, hiện nay các nhà nghiên cứu chọn giống [1-5] đang cố gắng sử dụng kết hợp kỹ thuật này để rút ngắn thời gian và làm giảm công sức trong quá trình chọn giống.

Bài báo này trình bày kết quả nghiên cứu nuôi cấy bao phần của một số dòng lúa ưu thế lai hiện đang dùng trong sản xuất và F1 của một số tổ hợp lai nhằm mục đích nhanh chóng tạo ra các dòng thuần đa dạng và phong phú về kiểu gen. Trên cơ sở đó chọn ra các dòng thuần mong muốn và các dòng thuần ưu tú có năng

suất và tính chống chịu có thể kém hơn các dòng ưu thế lai ban đầu đôi chút nhưng bỏ qua được khâu phải sản xuất hạt giống lai hàng năm.

### I. PHƯƠNG PHÁP NUÔI CẤY

#### 1. Nguyên liệu

Nguyên liệu sử dụng để nuôi cấy bao phần gồm có bốn dòng ưu thế lai đang được dùng trong sản xuất là VL902, Sấn ưu 63, Sấn ưu quế 99, Chi ưu hương; hai dòng lai nhân bằng vô tính Dt<sub>1</sub>C và Dt<sub>1</sub>T; F1 của hai tổ hợp lai (TeAx CR203), (BoA x CR203) và một dòng bất dục đột biến bào chất IR62829A.

#### 2. Phương pháp

##### a) Thu và xử lý dòng

Đã thu thập các dòng lúa có khoảng cách giữa tai lá dòng và tai lá thứ nhất từ 1-5 cm. Dòng được lấy vào buổi sáng (từ 8-10 giờ) và cắm vào bình nước (nếu cấy ngay) hoặc bọc trong các túi polyetylen rồi cắm trong bình nước và đặt trong tủ lạnh. Thời gian xử lý lạnh từ 1-6 ngày ở 6-8°C.

##### b) Khử trùng dòng và tách bao phần để cấy

Dùng bông có tấm cồn 96° lau kỹ toàn bộ bề mặt dòng, tách bỏ các lớp bẹ lá bên ngoài và lớp vỏ lụa bên trong. Dùng kéo cắt bỏ các phần dòng quá già hoặc quá non, chỉ lấy các hoa có chứa hạt phần ở giai đoạn đơn nhân. Tách bao phần cấy vào các ống nghiệm nhỏ kích thước 1 cm x 20 cm có chứa môi trường đặt nghiêng. Môi trường tạo mô sẹo là N<sub>6</sub> cơ bản có bổ sung 2 mg/l 2,4-D, 60 g/l đường saccaroza. Nuôi trong tối ở nhiệt độ 26° ± 2°C.

c) *Tái sinh cây và tách dòng cây tái sinh*

Sau 4-5 tuần nuôi cấy, từ một số bao phấn xuất hiện các khối mô sẹo màu trắng, nhỏ ly ty. Khi các khối mô sẹo đạt đường kính chừng 1-2 mm, chúng được cấy chuyển sang môi trường tạo cây. Môi trường tạo cây cũng là N<sub>6</sub> nhưng hàm lượng đường saccharoza giảm xuống còn 30 g/l, các chất điều hoà sinh trưởng là IAA 0,5 mg/l và kinetin 2 mg/l. Nuôi dưới ánh sáng đèn huỳnh quang cường độ 2000 lux, nhiệt độ 26<sup>o</sup>±2<sup>o</sup>C. Các cụm chồi được hình thành sau 2-3 tuần nuôi, tách thành từng dòng riêng biệt dựa vào mức độ liên kết giữa các chồi trong cụm.

d) *Nhân dòng cây tái sinh và tạo cây hoàn chỉnh*

Để đảm bảo cho việc đưa thành công các dòng cây tái sinh ra trồng ngoài ruộng, đã tiến hành nhân vô tính thành khoảng 10-20 cụm chồi đối với mỗi dòng, sau đó cấy chồi sang môi

trường mới không có chất điều hoà sinh trưởng để cho ra rễ tạo cây hoàn chỉnh.

## II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 1. Ảnh hưởng của xử lý lạnh lên khả năng tạo mô sẹo từ phấn

Trong nuôi cấy bao phấn, có nhiều yếu tố gây ảnh hưởng lên khả năng hình thành mô sẹo như kiểu gen của cây cho phấn, thành phần môi trường dinh dưỡng, thành phần và nồng độ các chất điều hoà sinh trưởng, nồng độ đường, điều kiện nuôi cấy,... trong đó xử lý lạnh cũng là một yếu tố đáng chú ý.

Trước khi đưa các bao phấn vào nuôi cấy, chúng tôi đã tiến hành xử lý ở nhiệt độ 6-8<sup>o</sup>C để xác định thời gian tối ưu cho tỷ lệ tạo mô sẹo cao đối với từng dòng lai, đối chứng là các bao phấn được cấy ngay không qua xử lý.

Bảng 1

Ảnh hưởng của thời gian xử lý lạnh (6-8<sup>o</sup>C) lên tỷ lệ tạo mô sẹo từ phấn

Tên dòng lai	Số bao phấn cấy	Tỷ lệ mô sẹo hình thành từ bao phấn xử lý lạnh (%) Thời gian xử lý (ngày)						
		ĐC	1	2	3	4	5	6
Sán ưu 63	12.581	3,44	2,99	2,24	0,34	1,14	-	-
Sán ưu quế 99	16.084	0,84	1,42	2,09	2,52	2,33	-	-
Dt,T	6.111	1,74	1,48	1,58	-	2,07	-	-
BoA x CR203	8.254	1,37	2,51	0,32	0,42	0,40	0,35	0,11

Kết quả trình bày trên bảng 1 cho thấy nhìn chung các bao phấn sau khi được xử lý lạnh đã hình thành mô sẹo với tỷ lệ cao hơn so với các bao phấn không qua xử lý. Tỷ lệ tạo mô sẹo cao hơn cả ở các bao phấn được xử lý trong vòng 1-4 ngày, tùy theo từng dòng lai, cụ thể: tỷ lệ tạo mô sẹo đạt cao nhất ở Sán ưu quế 99 là sau 3 ngày (tỷ lệ là 2,52%, cao gấp khoảng 4 lần so với đối chứng); ở Dt,T là sau 4 ngày (tỷ lệ là 2,07% và cao hơn đối chứng); ở F1 của (BoA x CR203) là sau 1 ngày (tỷ lệ là 2,51% và cao gấp gần 2 lần so với đối chứng). Trong khi đó, riêng Sán ưu 63 tỷ lệ cao nhất lại là ở bao phấn không qua xử lý lạnh (tỷ lệ là 3,44% và cao hơn so với

các lô có xử lý lạnh). Như vậy, hầu hết các dòng lúa thí nghiệm đều cho tỷ lệ tạo mô sẹo cao khi các bao phấn được xử lý lạnh, nhưng thời gian xử lý tối ưu ở các dòng khác nhau là khác nhau. Khi xử lý bao phấn ở thời gian lâu hơn thì khả năng tạo mô sẹo giảm dần và tỷ lệ thấp nhất đã nhận được ở các bao phấn sau 6 ngày xử lý. Sự giảm dần khả năng tạo mô sẹo sau khi đã đạt tỷ lệ tối đa có thể do nguyên nhân hạt phấn bị giảm sức sống do giữ lâu trong tủ lạnh. Kết quả đó cũng cho thấy, nếu bảo quản bao phấn như trong điều kiện của chúng tôi thì, để đạt được tỷ lệ tạo mô sẹo cao, chỉ nên dùng bao phấn xử lý lạnh sau 1-4 ngày để nuôi cấy. Gosal và cs

(1996) cho biết khi xử lý lạnh ở nhiệt độ ôn hoà (10°C) lên bao phần trong 11 ngày đã nâng tỷ lệ tạo mô sẹo từ 12,5% (ở đối chứng) lên 32,8% [2]. Như vậy, kết quả chúng tôi nhận được phù hợp với kết quả của các tác giả trên về việc xử lý lạnh làm tăng tỷ lệ tạo mô sẹo ở hầu hết các giống lúa và các giống lúa khác nhau có khả năng chịu đựng nhiệt độ xử lý khác nhau.

## 2. Khả năng tạo mô sẹo và tái sinh cây ở các dòng lúa lai khác nhau

Để tìm hiểu khả năng tạo mô sẹo và tái sinh cây ở các dòng lai khác nhau, đã tiến hành nuôi cấy các bao phần không xử lý lạnh. Tính tỷ lệ tạo mô sẹo từ phần, tỷ lệ tạo cây (cả cây xanh và cây bạch tạng) từ mô sẹo và tỷ lệ cây xanh trong quần thể cây tái sinh.

Bảng 2

Khả năng tạo mô sẹo và tái sinh cây ở các dòng lúa lai khác nhau

Thứ tự	Tên dòng lai	Số bao phần cấy tạo mô sẹo	Tỷ lệ bao phần tạo mô sẹo (%)	Tỷ lệ mô sẹo tái sinh cây xanh và bạch tạng (%)	Tỷ lệ cây xanh trong quần thể cây tái sinh (%)
1	VL902	2.737	1,46	15,0	16,7
2	Sán ưu 63	320	3,44	45,5	80,0
3	Sán ưu quốc 99	3.695	0,84	29,0	55,6
4	D <sub>1</sub> T	1.549	1,74	18,5	60,0
5	BoA x CR203	802	1,37	9,1	0,0

Ghi chú:

$$\text{Tỷ lệ bao phần tạo mô sẹo} = \frac{\text{Số mô sẹo tạo được}}{\text{Số bao phần cấy}} \times 100$$

$$\text{Tỷ lệ tái sinh cây (xanh và bạch tạng)} = \frac{\text{Số mô sẹo tái sinh cây}}{\text{Số mô sẹo cấy}} \times 100$$

$$\text{Tỷ lệ tái sinh cây xanh} = \frac{\text{Số mô sẹo tái sinh cây xanh}}{\text{Số mô sẹo tái sinh cây}} \times 100$$

Kết quả nhận được ở bảng 2 cho thấy khả năng tạo mô sẹo của các dòng lai khác nhau là khác nhau và thay đổi từ 0,84-3,44%. Tỷ lệ tạo mô sẹo cao hơn cả ở Sán ưu 63 (3,44%) và thấp nhất ở Sán ưu quốc 99 (0,84%). Khả năng tái sinh cây từ mô sẹo của các dòng lai nói trên cũng khác nhau và thay đổi từ 9,1-45,5%: thấp nhất ở F<sub>1</sub> của tổ hợp BoA x CR203 (9,1%) và cao hơn cả ở Sán ưu 63 (45,5%). Tỷ lệ cây xanh trong quần thể cây tái sinh cũng rất khác nhau: Sán ưu 63 cho tỷ lệ cây xanh rất cao (80%), trong khi đó ở (BoA x CR203) các cây tái sinh đều bị bạch tạng. Kết quả đó cho thấy kiểu gen có ảnh hưởng rất nhiều lên khả năng tạo mô sẹo và tái sinh cây xanh trong nuôi cấy bao phần.

## 3. Ảnh hưởng của xử lý lạnh lên tỷ lệ tái sinh cây xanh

Khi nuôi cấy bao phần, đã nhận được cả cây xanh và cây bạch tạng, trong khi đó chỉ sử dụng được các cây xanh trong thực tiễn chọn giống. Việc xử lý lạnh các bao phần trước khi nuôi cấy nhằm làm tăng tỷ lệ tạo mô sẹo, nghĩa là làm tăng khả năng nhận cây tái sinh, nhưng nhiệt độ thấp có ảnh hưởng tới chất lượng của mô sẹo được hình thành hay không? (tỷ lệ tái sinh cây từ mô có tăng lên không và tỷ lệ cây xanh có cao hơn ở mô không qua xử lý hay không?).

Để tìm hiểu vấn đề này, chúng tôi đã tính tỷ

lộ cây xanh tái sinh từ phần xử lý lạnh với thời gian khác nhau (từ 1-4 ngày). Kết quả nhận được cho thấy, trừ Sán ưu quế 99, còn ở tất cả các dòng lai dùng trong thí nghiệm đều thấy cùng một hiện tượng là mô sẹo được tạo thành từ phần không qua xử lý đã tái sinh cây xanh với tỷ lệ cao hơn cả (từ 43,8-80,0%). Trong khi đó, ở mô sẹo từ bao phần xử lý lạnh, tỷ lệ cây xanh bị giảm đi rõ rệt (chỉ bằng một nửa hoặc một phần ba so với đối chứng). Đồng thời kết quả này cũng cho thấy không có quy luật rõ rệt nào về tỷ lệ cây xanh từ phần xử lý lạnh với thời gian khác nhau (trong vòng 1-4 ngày). Các mô sẹo nhận từ phần xử lý lạnh với thời gian khác nhau đã cho tỷ lệ cây xanh gần như nhau, điều này gợi cho chúng tôi ý nghĩ rằng có lẽ chính

sốc lạnh mới ảnh hưởng tới phẩm chất của mô sẹo hình thành, làm giảm khả năng phân hóa cây xanh chứ không do thời gian xử lý dài hay ngắn. Một bằng chứng nữa cũng cố cho ý nghĩ này, đó là khi phân biệt một cách chi tiết màu sắc của các cụm cây tái sinh trên cùng một khối mô, đã thấy hầu như tất cả các khối mô được cấy hoặc tạo toàn cây xanh hoặc tạo toàn cây bạch tạng. Chỉ có trường hợp ở Dt<sub>1</sub>C, có 2 trên tổng số 111 khối mô sẹo (1,8%) đã phân hóa cả chồi xanh và chồi bạch tạng trên cùng một khối mô. Như vậy, trong quá trình phân hóa cơ quan, đột biến bạch tạng có thể xảy ra nhưng với tỷ lệ rất thấp, vậy rõ ràng sốc lạnh đã ảnh hưởng tới phẩm chất của hạt phấn, làm tăng tỷ lệ mô sẹo tạo cây bạch tạng.

Bảng 3

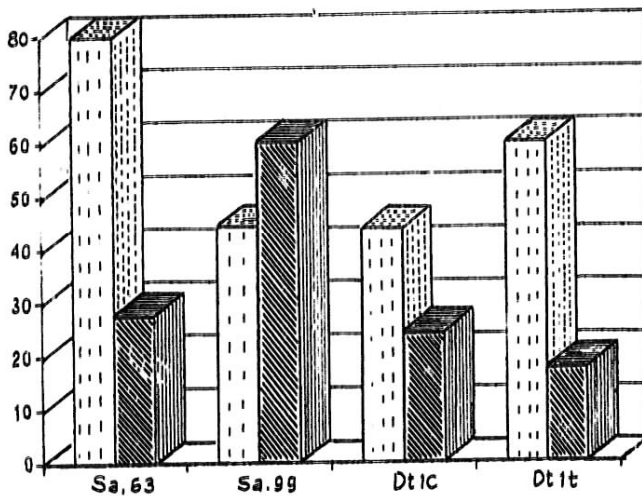
Ảnh hưởng của xử lý lạnh bao phần lên tỷ lệ tái sinh cây xanh

Tên dòng lai	Số mô sẹo có tái sinh cây	Tỷ lệ tái sinh cây xanh (%) từ mô sẹo nhận từ xử lý lạnh bao phần ở nhiệt độ 6-8°C theo thời gian (ngày)					
		ĐC	1	2	3	4	Trung bình*
Sán ưu 63	195	80,0	26,0	28,6	28,6	27,7	27,7
Sán ưu quế 99	105	44,4	100,0	60,3	25,0	55,8	60,3
Dt <sub>1</sub> C	290	43,8	21,4	21,7	25,0	30,0	24,5
Dt <sub>1</sub> T	103	60,0	33,3	20,0	17,8	0,0	17,7

Ghi chú: Tỷ lệ tái sinh cây xanh trung bình ở mô sẹo nhận từ phần xử lý lạnh trong thời gian 1-4 ngày

Từ các kết quả nêu trên, cho thấy việc xử lý lạnh tuy có tác dụng làm tăng tỷ lệ tạo mô sẹo song đồng thời lại làm giảm tỷ lệ phân hóa cây xanh. Hình cho thấy, trong đa số trường hợp (3/4 dòng lai), các bao phần không qua xử lý

lạnh đã cho khả năng tái sinh cây xanh cao gấp 2-3 lần so với khi có xử lý. Vì vậy, khi tiến hành nuôi cấy bao phần, trong từng trường hợp cụ thể, cần cân nhắc đến hiệu quả của việc xử lý lạnh.



Hình. Ảnh hưởng của xử lý lạnh bao phần lên tỷ lệ cây xanh trong quần thể cây tái sinh

Ghi chú: ĐC: đối chứng, TN: thí nghiệm; trục X: tên các dòng lai; trục Y: tỷ lệ cây xanh



#### 4. Kết quả tạo mô sẹo và tái sinh cây xanh từ nuôi cấy bao phấn các dòng lúa lai khác nhau

Để nhận các dòng lưỡng bội đồng hợp tử phong phú và đa dạng về kiểu gen, chúng tôi đã tiến hành nuôi cấy bao phấn các dòng ưu thế lai hiện đang dùng trong sản xuất, các con lai F1 của một số tổ hợp lai (bảng 4).

Bảng 4

Kết quả tạo mô sẹo và tái sinh cây xanh từ nuôi cấy bao phấn các dòng lúa lai

Thứ tự	Tên dòng lai	Thế hệ	Số bao phấn cấy tạo mô sẹo	Số mô sẹo cấy tạo cây	Số dòng cây xanh nhận được
1	VL902	F1	2.737	40	5
2	Sán ưu 63	F1	12.581	195	67
3	Sán ưu quê 99	F1	16.084	294	197
4	Chi ưu hương	F1	11.297	146	30
5	D <sub>t</sub> C	F1	10.896	301	114
6	D <sub>t</sub> T	F1	6.111	97	20
7	TeA x CR203	F1	11.669	309	0
8	BoA x CR203	F1	8.254	33	0
9	IR62829A	CMS	3.041	13	0
Tổng cộng:			82.670	1.428	433

Đã nuôi cấy 82.670 bao phấn của các dòng lai để tạo mô sẹo, đã cấy 1.428 khối mô sẹo sang môi trường tái sinh cây và đã thu được 433 dòng cây xanh từ phấn. Các dòng này hiện đang được duy trì và nhân trong điều kiện in vitro để vụ tới đưa ra trồng trong các chậu đất và thu hạt dùng cho việc phân tích di truyền, đánh giá các đặc điểm nông sinh học, các yếu tố cấu thành năng suất và chọn ra các dòng thuần ưu tú có năng suất cao, chất lượng tốt và chịu bệnh có thể đưa vào sản xuất.

### III. KẾT LUẬN

1. Việc đưa các bao phấn vào xử lý ở nhiệt độ 6-8°C trước khi nuôi cấy, trong đa số trường hợp, đã làm tăng rõ rệt tỷ lệ tạo mô sẹo lên 2-3 lần so với đối chứng. Tùy theo từng dòng, thời gian xử lý có hiệu quả là trong khoảng từ 1-4 ngày. Khi thời gian xử lý dài hơn thì tỷ lệ tạo mô sẹo giảm.

2. Các dòng lai khác nhau cho khả năng tạo mô sẹo và tái sinh cây khác nhau, tỷ lệ tạo mô

sẹo từ 0,84-3,44%, tỷ lệ tái sinh cây (xanh và bạch tạng) từ 9,1-45,4%, tỷ lệ cây xanh trong quần thể cây tái sinh từ 0-80%.

3. Việc xử lý lạnh các bao phấn trước khi cấy có ảnh hưởng tới phẩm chất của mô sẹo được hình thành, tỷ lệ tái sinh cây xanh ở các mô sẹo từ phấn không xử lý lạnh cao gấp 2-3 lần so với ở mô từ phấn xử lý lạnh. Vậy sốc lạnh chính là nguyên nhân làm giảm tỷ lệ tái sinh cây xanh.

4. Đã nuôi cấy 82.670 bao phấn của các dòng lai khác nhau để tạo mô sẹo. Đã tái sinh cây và tách được 433 dòng cây xanh tái sinh; các dòng cây này hiện đang được nhân và đưa ra trồng để thu hạt dùng trong việc đánh giá, chọn lọc.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bong BB and Swaminathan MS., 1996: Variation in some quantitative characters in doubled haploid lines derived from a

- heterotic rice hybrid. In "Rice Genetics III". Proceedings of the third International Rice Genetics Symposium, IRRI, Philippines, Edited by G.S. Khush: 499-504.
2. Gosal et al., 1996: Haploidy in rice. In "In vitro Haploid Production in higher plants". Edited by S. Mohan Jain, S. K. Sopory, R. E. Veilleux: 1-35.
  3. Moon HP. et al., 1996: Genetic variation of a single pollen-derived doubled haploid population in rice. In "Rice Genetics III" Proceedings of the third International Rice Genetics Symposium, IRRI, Philippines, Edited by G.S. Khush: 491-498.
  4. Raina S. K. et al., 1996. Haploid, somaclone and transformation studies in basmati rice. In "Rice Genetics III" Proceedings of the third International Rice Genetics Symposium, IRRI, Philippines, Edited by GS. Khush: 487-491.
  5. Sanint L. R. et al., 1996: Anther culture as a rice breeding tool: a profitable investment. In "Rice genetics III" Proceedings of the third International Rice Genetics Symposium, IRRI, Philippines. Edited by G.S. Khush: 511-518.

## PRODUCTION OF HOMOZYGOUS LINES BY ANTHHER CULTURE OF HETEROSIS LINES OF RICE.

### I. ANTHHER CULTURE OF HETEROSIS LINES OF RICE

NGHIEM NHU VAN et al.

#### SUMMARY

Hybrid rices possess good genetic background, so their anthers are excellent breeding materials, in which the good complementary characteristics of two parents can be combined. In general, the production of desirable dihaploid plants by anther culture is the way of shortening the conventional breeding cycle.

Anthers of eight hybrid lines of rice were culture on N6 medium supplemented with 2.4 D (2 mg/l) to produce callus. The frequency of the callus induction was distinctly higher when the anthers were cold-treated at 6-8°C for 1-4 days. After 3-4 weeks, on the callus induction medium, calli were appeared and then they were lifted out of the anthers and placed on the plant regeneration medium. The plant regeneration frequency and the percentage of green plantlets were differed in different hybrid lines: the range of the regeneration frequency (green and albino plants) among the hybrids was from 9.1 to 45.5 % and Shanyou 63 had the highest frequency of the green plant regeneration (80%). The cold shock also affected the callus quality: the frequency of the regeneration of green plants was decreased 2-3 times in the calli derived from cold-treated anthers.

433 regenerated plant lines were obtained and were grown for grains using for the following evaluation and the selection.

*Ngày nhận bài: 1-4-2000*