

Ngày nhận bài: 11/3/2013

ngày 20/3/2013

Người phản biện: TS. Mai Xuân Triệu,

Ngày duyệt đăng: 15/4/2013

NGHIÊN CỨU ẢNH HƯỞNG CỦA CHẤT ĐIỀU HÒA SINH TRƯỞNG ĐẾN KHẢ NĂNG TÁI SINH CÂY TỪ PHÔI SOMA PHÁT SINH THÔNG QUA NUÔI CÂY PHÔI NON Ở NGÔ (*ZEA MAYS L.*)

Nguyễn Văn Trường, Bùi Mạnh Cường,
Nguyễn Văn Hải, Đoàn Thị Bích Thảo

SUMMARY

Affection of growth regulators to regeneration ability of soma embryos from maize (*Zea mays L.*) immature embryos culture

The plant regeneration of soma embryos decides the success of immature embryos culture and transformation of maize. *In vitro* the rate of regeneration of maize was low and depended on genotypes, culture conditions and growth regulators that were added on culture medium, specially. The objective of this study was to determine the affection of growth regulators (BAP, kinetin and α -NAA) to regeneration ability of maize soma embryos. The results showed that the concentration of BAP and kinetin in the culture medium were increased the rate of shoot induction, in which the medium containing BAP was more efficient than that containing kinetin. The optimized concentration of BAP was 0.5mg/l of media. The suggested components of regeneration medium are: MS + 25mM/L-prolin + 100 mg/l casein + 10 mg/l AgNO_3 + 30g/l sucrose + 2.5g/l phytagen + 100ml/l coconut water + 0,5mg/l BAP. The results also documented that α -NAA promoted to root formation and roots elongation of LVN154 and V152N. The suitable concentration of α -NAA was determined is 1mg/l of media. The components of medium using for root induction of plant are MS + 100mg/l myo-inostol + 100mg/l casein+ 30g/l sucrose + 2,5g/l actived charcoal + 2,5g/l phytagen + 1 mg/l α -NAA.

Keywords: Growth regulators, immature embryo culture, BAP, kinetin, α -NAA, maize.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong nghiên cứu chuyển gen ở ngô, quá trình tái sinh cây từ phôi soma phát sinh thông qua nuôi cấy phôi non là một vấn đề mấu chốt quyết định thành công và hiệu quả chuyển gen. Khả năng tái sinh cây *in vitro* ở ngô thấp, phụ thuộc nhiều vào nền di truyền của nguồn vật liệu và điều kiện nuôi cấy, đặc biệt phụ thuộc vào các chất điều hòa sinh trưởng bổ sung vào môi trường nuôi cấy.

Các chất điều hòa sinh trưởng đóng vai trò quan trọng trong việc xác định hướng phát triển của tế bào thực vật, sử dụng phổ biến nhất là các hormon thực vật hoặc các chất tổng hợp tương tự như nhóm auxins và cytokinin (Gebologlu và cs, 2011). Auxin kích thích sự tăng trưởng của chồi non và khởi phát cho sự tạo mới. Ở nồng độ thấp và thường dùng kết hợp với cytokinin thì auxin

khởi phát mô phân sinh ngọn, vượt quá nồng độ giới hạn thì auxin ngăn cản sự phát triển của lá mới hay của mô phân sinh bên (Bùi Trang Việt, 2000). Các cytokinin kích thích mạnh sự phân chia tế bào với điều kiện có sự hiện diện của auxin. Cytokinin cũng giúp sự gia tăng kích thước tế bào và sinh tổng hợp protein. Cytokinin ngăn cản sự lão hóa mô, thúc đẩy sự hình thành chồi non nhưng lại ức chế sự tạo rễ (Đương Công Kiên, 2002).

Khảo sát ảnh hưởng của một số chất điều hòa sinh trưởng tới khả năng tái sinh cây, tạo cây hoàn chỉnh từ nuôi cấy phôi non của một số vật liệu ngô Việt Nam nhằm xác định loại môi trường thích hợp, tăng cường khả năng tái sinh cây *in vitro* ở ngô phục vụ nghiên cứu chuyển gen vào một số nguồn vật liệu ngô Việt Nam là cần thiết trong giai đoạn hiện nay.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Vật liệu nghiên cứu

- Phôi soma phát sinh từ nuôi cấy phôi non các nguồn vật liệu LVN154 và V152N.

- Vật tư, hóa chất cần thiết cho môi trường nuôi cấy:

+ Môi trường tái sinh (M₁): MS + 25mM L-prolin/l + 100mg casein/l + 10mg AgNO₃/l + 30g sucrose/l + 2,5g/l phytagen + 100ml nước dừa/l, pH = 5,8, điều kiện chiếu sáng 16 giờ/ngày.

+ Môi trường tạo cây hoàn chỉnh (M₂): MS + 1 mg α-NAA/l + 100mg/l myo-inostol/l + 100mg/l casein/l + 30g/l sucrose + 2,5g/l than hoạt tính + 2,5g/l phytagen, pH=5,8, điều kiện chiếu sáng 16 giờ/ngày.

+ Các chất điều hòa sinh trưởng: Kinetin (K), 6-Benzyl Aminopurin (BAP) và 1-Naphthaleneacetic Acid (α-NAA)

2. Phương pháp nghiên cứu

- Thí nghiệm đánh giá ảnh hưởng của Kinetin và BAP đến khả năng tái sinh cây: Thí nghiệm được bố trí 3 lần nhắc lại, 50 phôi soma/lần nhắc, môi trường tái sinh M₁ bổ sung Kinetin và BAP theo các nồng độ:

+ Kinetin: 0,2 mg/l; 0,5 mg/l; 1,0 mg/l; 1,5 mg/l; 2 mg/l

+ BAP: 0 mg/l; 0,5 mg/l; 1,0 mg/l; 1,5 mg/l; 2 mg/l

Thu thập số liệu sau 10 - 15 ngày nuôi cấy. Các chỉ tiêu đánh giá gồm: Tỷ lệ mô sẹo tái sinh (%), tỷ lệ tạo chồi (%) và tỷ lệ chồi hoàn thiện (%)

- Thí nghiệm đánh giá ảnh hưởng của α-NAA đến khả năng tạo cây hoàn chỉnh: Phôi soma xuất hiện chồi xanh nhỏ được tách ra và cấy vào môi trường tạo cây hoàn chỉnh M₂ có bổ sung α-NAA với các nồng độ: 0 mg/l; 0,5 mg/l; 1,0 mg/l; 1,5 mg/l; 2 mg/l. Thí nghiệm được bố trí 3 lần nhắc lại, 30 chồi/lần nhắc. Thu thập số liệu sau 10 - 15 ngày nuôi cấy. Các chỉ tiêu theo dõi gồm: Số rễ/chồi và tỷ lệ tạo cây hoàn thiện.

- Các thí nghiệm được tiến hành tại Viện Nghiên cứu Ngô trong năm 2012

- Số liệu được xử lý thống kê bằng phần mềm IRRISTAT 4 hoặc IRRISTAT 5.0.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Đánh giá ảnh hưởng của Kinetin và BAP đến khả năng tái sinh cây

Đánh giá khả năng tái sinh của các nguồn vật liệu được nuôi cấy trên nền môi trường M₁ có bổ sung kinetin và BAP với các nồng độ khác nhau sau 10 - 15 ngày nuôi cấy. Kết quả được trình bày trong bảng 1.

Bảng 1. Ảnh hưởng của nồng độ kinetin và BAP đến khả năng tái sinh cây

Chất điều hòa sinh trưởng	Nồng độ (mg/l)	Nguồn vật liệu					
		LVN154			V152N		
		Tỷ lệ phôi tái sinh (%)	Tỷ lệ tạo chồi (%)	Tỷ lệ chồi hoàn thiện (%)	Tỷ lệ phôi tái sinh (%)	Tỷ lệ tạo chồi (%)	Tỷ lệ chồi hoàn thiện (%)
Kinetin	0,2	12,2	50,4	20,2	10,1	60,1	50,7
	0,5	17,2	75,3	54,0	11,0	75,3	60,5
	1,0	23,0	85,0	75,4	19,2	70,6	70,6
	1,5	19,2	60,5	65,8	19,5	45,3	40,3
	2,0	10,1	30,3	5,2	15,3	30,3	5,3
BAP	0	12,2	50,2	40,2	10,1	40,5	50,5
	0,5	26,2	85,7	95,0	17,0	70,5	75,0
	1,0	23,8	80,5	70,2	16,2	50,3	65,0
	1,5	18,4	60,4	40,1	17,5	45,2	30,3
	2,0	12,2	30,1	0,0	15,3	20,1	0,0

TB		17,5	60,8	46,6	14,4	50,8	44,8
CV(%)		6,3	4,7	4,0	6,3	4,7	4,0
LSD _{0,05}		3,108	3,221	2,127	3,108	3,221	2,127

Nguồn: Bộ môn Công nghệ Sinh học - Viện Nghiên cứu Ngô

- Trên cùng nền môi trường, khi bổ sung các chất điều hòa sinh trưởng khác nhau thu được tỷ lệ phân tái sinh và chồi hoàn thiện khác nhau. Đặc biệt khi quan sát cây tái sinh thì ở môi trường có bổ sung BAP cây xanh bền hơn so với trong môi trường có kinetin.

- Xét riêng loại môi trường có bổ sung kinetin thì tỷ lệ tái sinh có sự biến động cao và khác biệt rõ ràng ở các nồng độ khác nhau, đạt cao nhất ở môi trường bổ sung 1 mg/l kinetin cho các chỉ tiêu: Tỷ lệ phân tái sinh, tỷ lệ tạo chồi và tạo chồi hoàn thiện ở cả 2 nguồn vật liệu.

- Tương tự, khi sử dụng các nồng độ BAP khác nhau trong môi trường nuôi cấy cũng thu được các kết quả về tỷ lệ phân tái sinh, tỷ lệ tạo chồi, tạo chồi hoàn thiện rất khác nhau, đạt cao nhất ở công thức có nồng độ 0,5mg/l BAP cho cả 2 nguồn vật liệu.

- Kết quả thu được ở bảng 1 cũng chỉ rõ khi bổ sung 0,5 mg/l BAP vào môi trường thì tỷ lệ phân tái sinh, tỷ lệ tạo chồi, tạo chồi

hoàn thiện thu được cao hơn trong môi trường có bổ sung 1 mg/l kinetin ở mức tin cậy $P \geq 0,95$.

- Trong 2 nguồn vật liệu nghiên cứu thì phân soma phát sinh từ nuôi cấy phân non nguồn LVN154 có khả năng tái sinh cây và tạo chồi hoàn thiện cao hơn nguồn V152N ở cả 2 loại môi trường.

Như vậy, đối với nguồn vật liệu LVN154 và V152N khi nuôi cấy phân soma ở môi trường có bổ sung 0,5 mg/l BAP thì cho khả năng tái sinh cây và số chồi hoàn thiện cao nhất so với các công thức còn lại.

2. Nghiên cứu ảnh hưởng của α -NAA đến khả năng tạo cây hoàn thiện

Các chồi đủ thân, lá, cao từ 2 - 4cm được cấy chuyển sang môi trường tạo rễ có bổ sung α -NAA nồng độ từ 0 đến 2mg/l môi trường để tạo cây hoàn thiện. Kết quả thu được sau 10 - 15 ngày nuôi cấy trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. Ảnh hưởng của α -NAA đến khả năng tạo cây hoàn thiện

Nồng độ α -NAA (mg/l)	Nguồn vật liệu			
	LVN154		V152N	
	Trung bình số rễ/chồi	Tỷ lệ tạo cây hoàn thiện (%)	Trung bình số rễ/chồi	Tỷ lệ tạo cây hoàn thiện (%)
0	1,2	50,5	1,0	50,2
0,5	1,75	75,5	1,5	50,0
1,0	2,5	75,5	1,75	60,5
1,5	1,2	25,0	1,0	50,5
2,0	1,0	20,5	0,5	25,0
TB	1,53	49,4	1,15	47,24

CV(%)	6,2	4,0	6,2	4,0
LSD _{0,05}	0,607	3,286	0,607	3,286

Nguồn: Bộ môn Công nghệ Sinh học - Viện Nghiên cứu Ngô

- Khi nồng độ α -NAA được bổ sung tăng dần từ 0 - 2 mg/l môi trường nuôi cấy thì các chỉ tiêu số rễ/chồi và tỷ lệ tạo cây hoàn thiện tăng dần và đạt cao nhất ở nồng độ 1mg/l (2,5 rễ/chồi; tỷ lệ tạo cây hoàn thiện 75,5% đối với nguồn LVN154 và 1,75 rễ/chồi; tỷ lệ tạo cây hoàn thiện 60,5% đối với nguồn V152N) sau đó giảm dần. Theo quan sát ở công thức không bổ sung α -NAA rễ ra muộn và số rễ/chồi ít còn ở nồng độ 2 mg/l số rễ/chồi thấp dẫn đến tỷ lệ tạo cây hoàn thiện là thấp nhất ở cả 2 nguồn vật liệu.

- Trong môi trường bổ sung 1 mg/l α -NAA, nguồn LVN154 có khả năng ra rễ tốt hơn và tỷ lệ tạo cây hoàn thiện cao hơn nguồn V152N ở mức tin cậy $P \geq 0,95$. Như vậy, nồng độ α -NAA bổ sung vào môi trường tạo rễ tối ưu nhất là 1mg/l, nồng độ này cũng phù hợp với nghiên cứu của Huang và Wei (2004).

IV. KẾT LUẬN

- Nồng độ BAP và kinetin bổ sung trong môi trường tái sinh có ảnh hưởng trực tiếp tới khả năng tái sinh cây của phôi soma ở ngô. Trong đó môi trường có bổ sung BAP cho tỷ lệ phôi tái sinh, tạo chồi và tạo chồi hoàn thiện và tốt nhất ở nồng độ 0,5mg/l. Môi trường MS + 25mM/l L-prolin + 100 mg/l casein + 10 mg/l AgNO₃ + 30g/l sucrose + 2,5g/l phytagen +100ml/l nước dừa có bổ sung 0,5mg BAP/l phù hợp cho bước tái sinh cây từ phôi soma phát sinh qua nuôi cấy

phôi non 2 nguồn vật liệu ngô LVN154 và V152N.

- Nồng độ α -NAA có ảnh hưởng đến tốc độ ra rễ và số rễ phát sinh trong quá trình tái sinh cây, nồng độ α -NAA sử dụng tối ưu nhất là 1mg/l. Môi trường MS + 100mg/l myo-inostol + 100mg/l casein+ 30g/l sucrose + 2,5g/l than hoạt tính + 2,5g/l phytagen có bổ sung 1 mg/l α -NAA cho tỷ lệ tạo cây hoàn thiện và số rễ/chồi cao nhất.

- Nguồn vật liệu LVN154 có khả năng tái sinh cây và tạo cây hoàn thiện tốt hơn nguồn V152N.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bùi Trang Việt, (2000). *Sinh lý thực vật đại cương*. NXB Đại học Quốc Gia TP. Hồ Chí Minh.
2. Dương Công Kiên, (2002). *Nuôi cấy mô thực vật*. NXB Đại học Quốc Gia TP. Hồ Chí Minh.
3. Gebologlu N., Bozmaz S., Aydin M. and Çakmak P., (2011). *The role of growth regulators, embryo age and genotypes on immature embryo germination and rapid generation advancement in tomato (Lycopersicon esculentum Mill.)*. African Journal of Biotechnology, Vol. 10(24), pp. 4895-4900.
4. Huang X.Q., Wei Z.M., (2004). *High-frequency plant regeneration through callus initiation from mature embryos*

of maize (*Zea mays* L.). Plant Cell Rep.,
22, 793-800.

ngày 11/4/2013
Ngày duyệt đăng: 15/4/2013

Ngày nhận bài: 22/3/2013

Người phản biện: TS. Mai Xuân Triệu,

NGHIÊN CỨU ẢNH HƯỞNG CỦA MỘT SỐ YẾU TỐ MÔI TRƯỜNG ĐẾN KHẢ NĂNG TẠO MÔ SẸO TỪ NUÔI CẤY PHÔI NON TRÊN NGUỒN VẬT LIỆU NGŨ VIỆT NAM

Nguyễn Văn Trường, Bùi Mạnh Cường,
Nguyễn Văn Hải, Nguyễn Thị Thu Hoài,
Đoàn Thị Bích Thảo

SUMMARY

Study affection of some medium components on callus induction from immature embryos culture of maize germplasm of Vietnam

Study to optimize of regeneration system from immature embryos culture plays important role in gene transformation system using *Agrobacterium* to maize germplasm of Vietnam. The immature embryos (12 days after pollination) of two maize genotypes including hybrid variety LVN154 and inbred line V152N were used to estimate the callus and embryogenic callus induction ability on N6 or MS medium containing different concentration of medium components such as: 2,4-D, AgNO₃, sucrose and agar/phytagel. The results showed that callus induction capacity depended on genotype and cultured medium. The hybrid variety LVN154 has the rate of induced callus and embryogenic callus higher than inbred line V152N. The optimized cultural medium is N6 containing vitamin, 2mg/l 2,4-D, 10 mg/l AgNO₃, 30 g/l sucrose, 100 mg/l casein hydrolysate, 25 mM L-prolin, 2.5 g/l phytagel, (pH = 5.8). This is most effective medium to callus induction from immature embryos in both maize hybrid and inbred line.

Keywords: Cultural medium, callus induction, embryogenic callus, immature embryos.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Một trong những nội dung nghiên cứu làm cơ sở cho công nghệ chuyển gen vào tế bào thực vật nhờ vi khuẩn *Agrobacterium* là xây dựng hệ thống tái sinh cây. Vấn đề trên đã được nhiều tác giả nghiên cứu (Vasil, 1987; Fernandez và cs, 1999). Đối với hệ thống chuyển gen nhờ *Agrobacterium* ở cây ngô cũng đã được một số tác giả nghiên cứu (Tomes và Smith, 1985; Gordon và cs, 1990), xây dựng được hệ thống tái sinh, trên cơ sở xác định hệ thống môi trường, điều kiện nuôi cấy tối ưu, đặc biệt là xác định khả năng tái sinh cây của các vật liệu. Ở Việt Nam đã có một số công trình nghiên cứu, bước đầu đã đạt được một số kết quả (Phạm Thị Lý Thu và cs, 2003; Bùi Mạnh Cường,

2007...). Tuy nhiên, các công trình trên chỉ được tiến hành trên một số vật liệu nhập nội không chính thức từ nước ngoài. Mặt khác, để tiến tới hoàn thiện quy trình chuyển gen vào cây ngô nhờ *Agrobacterium*, tạo ra sản phẩm cây ngô chuyển gen của Việt Nam trên cơ sở điều kiện và nguồn vật liệu ngô Việt Nam, với mục đích chủ động được công nghệ và vật liệu.

Xuất phát từ lý do trên chúng tôi đã tiến hành một số nội dung nghiên cứu nhằm hoàn thiện hệ thống tái sinh cây ngô từ nuôi cấy phôi non trên một số nguồn/dòng ngô Việt Nam. Bài báo này trình bày kết quả đánh giá ảnh hưởng của một số yếu tố môi trường tới khả năng hình thành mô sẹo từ nuôi cấy phôi ngô non.