

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.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Vật liệu nghiên cứu

LVN154 là giống ngô lai giữa 2 dòng thuần V64 và V152N được tạo ra từ công nghệ nuôi cấy bao phấn, có khả năng tái sinh cây cao.

Dòng ngô thuần V152N (dòng bố của giống ngô lai LVN154).

Vật tư, hóa chất cần thiết dùng cho các công thức môi trường nuôi cấy phôi non.

2. Phương pháp nghiên cứu

Các thí nghiệm được bố trí 3 lần lặp lại, các phôi ở tuổi 12 ngày sau khi thụ phấn được thu mẫu và cấy 300 phôi/công thức. Theo dõi và đánh giá sau 15 ngày nuôi cấy ở 27°C, trong điều kiện tối. Các yếu tố ảnh hưởng tới khả năng tạo mô sẹo được nghiên cứu bao gồm:

Ảnh hưởng của nồng độ 2,4-D: Sử dụng nền môi trường N6, MS với sự biến động của nồng độ 2,4-D từ 0, 1, 2 và 3 mg/l.

Ảnh hưởng của nồng độ AgNO₃: Sử dụng công thức N6 có bổ sung AgNO₃ ở các nồng độ: 0, 5, 10, 15 và 20 mg/l.

Ảnh hưởng của hàm lượng sucrose: Sử dụng môi trường N6 bổ sung sucrose ở các nồng độ 10, 20, 30, 40 và 50 g/l.

Ảnh hưởng của giá thể: Sử dụng công thức N6 bổ sung 2,5g/l phytigel hoặc 7g/l agar.

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

Số liệu được thu thập và xử lý thống kê bằng phần mềm IRRISTAT 4 hoặc 5.0.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng nhóm auxin (2,4-D) trên nền môi trường MS và N6 đến khả năng tạo mô sẹo từ phôi ngô non

Trong công nghệ nuôi cấy mô tế bào nói chung và nuôi cấy phôi non ở ngô, hai loại môi trường thường được sử dụng có hiệu quả là MS và N6 thì việc bổ sung chất điều hòa sinh trưởng thuộc nhóm auxin (2,4-D) là một trong các yếu tố cần thiết cho sự hình thành và phát triển mô sẹo. Nhiều nghiên cứu chỉ ra rằng 2,4-D là yếu tố không thể thiếu được đối với sự hình thành mô sẹo từ phôi ngô, mô sẹo được hình thành trên nền môi trường có bổ sung 2,4-D và đạt hiệu quả tối ưu ở nồng độ 1-3 mg/l, nếu nồng độ 2,4-D cao sẽ làm ức chế sự tạo thành mô sẹo (Armstrong & Phillip, 1988). Vì vậy, chúng tôi sử dụng phôi non của 2 nguồn vật liệu (LVN154 và V152N) nuôi cấy trên 2 nền môi trường (N6 và MS) bổ sung 2,4-D ở các nồng độ khác nhau. Kết quả đánh giá khả năng tạo mô sẹo của 2 nguồn vật liệu này được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Ảnh hưởng của nồng độ 2,4-D đến khả năng tạo mô sẹo từ phôi ngô non

Nguồn vật liệu	Nền môi trường	Công thức môi trường	2,4-D (mg/l)	Mô sẹo tạo thành		Mô sẹo phôi hóa	
				Trung bình	%	Trung bình	%
LVN154	N6	CT1	0	0	0	-	-
		CT2	1	190,3	63,4	90,3	47,5
		CT3	2	210,3	70,1	114,3	54,4
		CT4	3	192,7	64,2	90,0	46,7
	MS	CT5	0	0	0	0	0
		CT6	1	145,7	48,6	59,4	40,8
		CT7	2	191,0	63,7	94,3	49,4
		CT8	3	159,7	53,2	68,4	42,8
TB			136,2	-	64,5	-	
V152N	N6	CT1	0	0	0	-	-
		CT2	1	170,3	56,8	76,8	45,1
		CT3	2	203,7	67,9	103,3	50,7
		CT4	3	171,7	57,2	73,0	42,5
	MS	CT5	0	0	0	-	-
		CT6	1	118,0	39,3	44,6	37,8

		CT7	2	182,7	60,9	78,2	42,8
		CT8	3	146,7	48,9	50,8	34,6
TB				124,1	-	53,3	-
CV(%)				8,3		10,6	
LSD _{0,05} (G)				8,3		4,6	
LSD _{0,05} (MT)				16,5		9,3	
LSD _{0,05} (G×MT)				18,1		10,4	

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

(G): Giống; (MT); Môi trường; (G×MT): Tương tác giữa giống và môi trường.

Trên cả 2 nền môi trường N6 và MS mô sẹo đã không được tạo thành khi không bổ sung 2,4-D (công thức môi trường CT1 và CT5). Ở các công thức còn lại có bổ sung 2,4-D đều cho khả năng tạo mô sẹo và mô sẹo phôi hóa ở mức độ khác nhau và đạt cao nhất ở nồng độ 2,4-D là 2mg/l đối với cả 2 nguồn vật liệu. Giống LVN154 có số mô sẹo và mô sẹo phôi hóa trung bình tạo thành (136,2 mô sẹo và 64,5 mô sẹo phôi hóa) cao hơn so với dòng V152N (124,1 mô sẹo; 53,3 mô sẹo phôi hóa) ở mức tin cậy $P \geq 0,95$. Khi xét tương tác giữa công thức môi trường với giống cho thấy: 2 nguồn vật liệu nuôi cấy trên nền môi trường N6 cho khả năng tạo mô sẹo và mô sẹo phôi hóa cao hơn nền môi trường MS ở mức tin cậy $P \geq 0,95$. Kết quả nghiên cứu này cũng tương tự như nghiên cứu của tác giả Manivannan và cộng

sự (2010). Vì vậy, chọn môi trường có chứa thành phần 2,4-D là N6 + vitamin + 20g/l sucrose + 2mg/l 2,4-D +25mM L-proline + 100mg/l casein hydrolysate + 7g/l agar (1) cho các bước thử nghiệm nuôi cấy phôi non tiếp theo.

2. Nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ AgNO₃ đến khả năng tạo mô sẹo từ phôi ngô non

Nghiên cứu ảnh hưởng của bạc nitrate đến khả năng hình thành mô sẹo từ phôi non ở ngô, bằng việc lựa chọn phôi non có kích thước 1-1,5mm và nuôi cấy trên môi trường cảm ứng tạo mô sẹo N6(1) có bổ sung 2mg/l 2,4-D và AgNO₃ với nồng độ khác nhau từ 0mg/l; 5mg/l; 10mg/l; 15mg/l; 20mg/l. Kết quả thu được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. Ảnh hưởng của bạc nitrat đến khả năng tạo mô sẹo từ phôi non ngô

Nguồn vật liệu	Công thức môi trường	AgNO ₃ (mg/l)	Mô sẹo tạo thành		Mô sẹo phôi hóa		
			Trung bình	%	Trung bình	%	
LVN154	CT9	0	210,3	70,1	111,7	53,1	
	CT10	5	215,0	71,7	138,0	64,2	
	CT11	10	242,3	80,8	169,7	70,0	
	CT12	15	212,0	70,7	132,7	62,6	
	CT13	20	203,0	67,7	105,3	51,9	
TB			216,5	72,2	131,5	64,0	
V152N	CT9	0	202,3	67,4	99,7	49,3	
	CT10	5	209,3	69,8	118,3	56,5	
	CT11	10	231,0	77,0	132,3	57,3	
	CT12	15	204,3	68,1	101,7	49,8	
	CT13	20	166,3	55,4	75,0	45,1	
TB			202,7	67,6	105,4	51,6	
CV(%)				5,2		6,7	
LSD _{0,05} (G)				8,2		6,0	
LSD _{0,05} (MT)				13,3		9,6	
LSD _{0,05} (G×MT)				18,8		13,5	

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

(G): Giống; (MT); Môi trường; (G×MT): Tương tác giữa giống và môi trường.

Phản ứng tạo mô sẹo được cải thiện khi bổ sung AgNO₃ vào môi trường nuôi cấy. Tỷ lệ mô sẹo phôi hóa tạo thành của giống LVN154 và dòng V152N tăng từ 53,1% và 49,3% (đối với môi trường CT9 không có AgNO₃) lên tương ứng 70,0% và 57,3% khi bổ sung 10mg/l AgNO₃ vào môi trường nuôi cấy (CT10). Giống LVN154 có tỷ lệ mô sẹo và mô sẹo phôi hóa trung bình tạo thành ở các công thức đạt 72,2% và 64,0% cao hơn so với dòng V152N đạt trung bình 67,6%, trong đó mô sẹo phôi hóa là 51,6% ở mức tin cậy P ≥ 0,95. Cả 2 nguồn vật liệu đạt hiệu quả tạo mô sẹo và mô sẹo phôi hóa cao nhất ở công thức môi trường CT11 có bổ sung 10mg/l AgNO₃ (tần suất tạo mô sẹo của LVN154 là 80,8%, trong đó mô sẹo phôi hóa chiếm 70,0%; V152N đạt 77,0%, trong đó mô sẹo phôi hóa chiếm 57,3%. Tuy nhiên, ở nồng độ AgNO₃ cao (20mg/l) khả năng tạo mô sẹo phôi hóa giảm xuống còn 51,9% với giống LVN154 và 45,1% với dòng V152N. Kết quả nghiên cứu thu nhận được cũng tương tự với kết quả nghiên cứu các tác giả khi đánh giá tác dụng kích thích của AgNO₃ đến sự hình thành mô sẹo của các dòng ngô (Carvalho và cs, 1997; Phạm Thị Lý Thu và cs, 2003).

Tóm lại, bạc nitrate đóng một vai trò quan trọng trong việc ảnh hưởng đến khả năng tạo mô sẹo. Tuy nhiên, ở nồng độ bạc nitrate cao sẽ làm giảm khả năng tạo mô sẹo và mô sẹo phôi hóa, điều này có thể do ion

bạc đã gây ngộ độc cho mô sẹo. Qua kết quả đạt được, môi trường có thành phần bạc nitrate như sau: N6 + vitamin + 20g/l sucrose + 2mg/l 2,4-D + 10mg/l AgNO₃ + 25mM L-proline + 100mg/l casein hydrolysate + 7g/l agar được lựa chọn cho các thí nghiệm nuôi cấy phôi ngô non ở bước tiếp theo.

3. Nghiên cứu ảnh hưởng của hàm lượng đường sucrose đến khả năng tạo mô sẹo từ nuôi cấy phôi non ở ngô

Đường với vai trò cung cấp nguồn cacbon, cung cấp năng lượng cho quá trình chuyển hóa của mô nuôi cấy để hình thành mô sẹo. Trong đó, sucrose là nguồn carbon được sử dụng rộng rãi nhất trong nuôi cấy mô. Việc sử dụng hàm lượng đường thích hợp tùy thuộc vào từng loại môi trường và mục đích nghiên cứu, đôi khi còn phụ thuộc vào cả kiểu gen (gentotype) nghiên cứu. Theo Yu (1994), tần suất tạo mô sẹo, mô sẹo phôi hóa tăng cùng với sự tăng nồng độ đường sucrose sử dụng trong môi trường nuôi cấy từ 0-30%. Nhằm đánh giá được ảnh hưởng của hàm lượng đường đến khả năng tạo mô sẹo trong môi trường nuôi cấy phôi non, thí nghiệm đánh giá khả năng tạo mô sẹo được tiến hành trên môi trường cảm ứng N6 + 2mg/l 2,4-D + 10mg/l AgNO₃ có bổ sung nồng độ đường sucrose khác nhau. Kết quả được trình bày bảng 3.

Bảng 3. Ảnh hưởng của hàm lượng đường sucrose đến khả năng tạo mô sẹo từ phôi ngô non

Nguồn vật liệu	Công thức môi trường	Sucrose (g/l)	Mô sẹo tạo thành		Mô sẹo phôi hóa	
			Trung bình	%	Trung bình	%
LVN154	CT14	10	201,3	67,1	129,7	64,4
	CT15	20	239,0	79,7	165,3	69,2
	CT16	30	262,3	87,4	192,7	73,4
	CT17	40	236,0	78,7	152,7	64,7
	CT18	50	229,0	76,3	131,3	57,4
TB			233,5	77,8	154,3	66,1
V152N	CT14	10	201,7	67,2	107,0	53,1
	CT15	20	227,0	75,7	129,7	57,1
	CT16	30	246,7	82,2	159,3	64,6
	CT17	40	220,0	73,3	125,3	57,0
	CT18	50	206,3	68,8	106,3	51,5
TB			220,3	73,4	125,5	56,9
CV(%)			4,0		6,4	

<i>LSD</i> _{0,05} (G)		7,0	6,9
<i>LSD</i> _{0,05} (MT)		11,1	10,9
<i>LSD</i> _{0,05} (G×MT)		15,7	15,5

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

(G): Giống; (MT): Môi trường; (G×MT): Tương tác giữa giống và môi trường.

Khả năng tạo mô sẹo và mô sẹo phôi hóa đạt được tương đối cao, trung bình đạt 77,8% và 66,1% đối với giống lai LVN154; 73,4% và 56,9% đối với dòng V152N. Tàn suất tạo mô sẹo và mô sẹo phôi hóa của 2 nguồn vật liệu đạt cao nhất ở nồng độ đường 30g/l sucrose (CT16) ở mức tin cậy $P \geq 0,95$ (87,4% và 73,4% đối với giống lai LVN154; 82,2% và 64,6% đối với dòng V152N). Trên cơ sở kết quả đã đạt được, môi trường có chứa thành phần gồm: N6 + vitamin + 30g/l sucrose + 2mg/l 2,4-D + 10mg/l AgNO₃ + 25mM L-proline + 100mg/l casein hydrolysate + 7g/l agar được lựa chọn cho bước thử nghiệm sự ảnh

hưởng của giá thể tới khả năng tạo mô sẹo trong nuôi cấy phôi ngô non.

4. Nghiên cứu ảnh hưởng của giá thể môi trường nuôi cấy (agar và phytigel) đến khả năng tạo mô sẹo từ nuôi cấy phôi ngô non

Để lựa chọn được giá thể thích hợp cho nuôi cấy phôi non ở ngô, thí nghiệm đánh giá khả năng tạo mô sẹo được tiến hành trên môi trường cảm ứng N6 + 2mg/l 2,4-D + 10mg/l AgNO₃ + 30g/l sucrose và sử dụng 2 loại giá thể là phytigel (CT19) và agar (CT20). Kết quả được trình bày ở bảng 4.

Bảng 4. Ảnh hưởng của giá thể đến khả năng tạo mô sẹo từ phôi non ở ngô

Nguồn vật liệu	Công thức môi trường	Giá thể	Mô sẹo tạo thành		Mô sẹo phôi hóa	
			Trung bình	%	Trung bình	%
LVN154	CT19	2,5g/l phytigel	295,0	98,3	249,3	84,5
	CT20	7g/l agar	264,3	88,1	192,3	72,8
TB			279,7	93,2	220,8	78,6
V152N	CT19	2,5g/l phytigel	276,0	92,0	228,3	82,7
	CT20	7g/l agar	246,7	82,2	152,3	61,8
TB			261,3	87,1	190,3	72,2
CV(%)			5,0		6,0	
<i>LSD</i> _{0,05}	Khi so sánh giữa các giống					
	Khi so sánh giữa các công thức					
	Tương tác giữa giống và công thức					
<i>LSD</i> _{0,05} (G)			18,9		17,4	
<i>LSD</i> _{0,05} (MT)			18,9		17,4	
<i>LSD</i> _{0,05} (G×MT)			26,8		24,6	

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

(G): Giống; (MT): Môi trường; (G×MT): Tương tác giữa giống và môi trường.

Tỷ lệ tạo mô sẹo khi sử dụng giá thể là phytigel (tương ứng là 98,3% đối với LVN154 và 92,0% đối với V152N) cao hơn so với agar (88,1% LVN154; 82,2% V152N) trong thành phần môi trường ở mức tin cậy $P \geq 0,95$. Trong đó, tỷ lệ mô sẹo phôi hóa khi sử dụng giá thể phytigel là 84,5% trên giống LVN154 và 82,7% ở dòng thuần V152N. Khả năng tạo mô sẹo từ phôi non của giống lai LVN154 cao hơn so với dòng V152N ở mức tin cậy $P \geq 0,95$ trên

cả 2 loại giá thể agar và phytigel. Như vậy, trên cơ sở kết quả đã đạt được, lựa chọn phytigel làm chất tạo giá thể là tối ưu nhất trong môi trường nuôi cấy phôi ngô non.

IV. KẾT LUẬN

Nồng độ 2,4-D cho hiệu quả tạo mô sẹo cao nhất ở cả 2 nguồn vật liệu là 2mg/l. Tỷ lệ tạo mô sẹo ở giống lai LVN154 cao hơn

dòng V152N. Môi trường N6 cho hiệu quả tạo mô sẹo cao hơn môi trường MS.

Các thành phần như: AgNO₃, đường và giá thể trong môi trường đều có ảnh hưởng tới tỷ lệ tạo mô sẹo. Xác định được công thức môi trường tạo mô sẹo từ nuôi cấy phôi ngô non tối ưu là: N6 + vitamin + 2mg/l 2,4-D + 10 mg/l AgNO₂ + 30 g/l sucrose + 100 mg/l casein hydrolysate + 25 mM L-prolin + 2,5 g/l phytigel, pH = 5,8; nhiệt độ nuôi cấy ở 27⁰C và trong điều kiện tối hoàn toàn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bùi Mạnh Cường (2007). *Công nghệ sinh học trong chọn tạo giống ngô*. NXB Nông nghiệp.
2. Phạm Thị Lý Thu, Phạm Minh Thơi, Lê Huy Hàm và Đỗ Năng Vịnh, (2003). *Ảnh hưởng của một số yếu tố môi trường và tuổi phôi đến khả năng tái sinh cây từ phôi non dòng ngô nhập nội HR8 và HR9*. Tạp chí Di truyền học và ứng dụng. Số 3/2003.
3. Carvalho C.H.S, Bohorova N.E, Bordallo P.N, Abreu L.L, Valicente F.H, Bressan W. and Paiva E., (1997). *Type II callus production and plant regeneration in tropical maize genotypes*. Plant Cell Rep. 17: 73-76.
4. Fahye J.W, Reed J.N, Ready T.L and Pace G.M., (1986). *Somatic embryogenesis from three commercially important inbreds of Zea mays L.*, Plant Cell Rep., 5: 35-38.
5. Fernandez S., Michaux-Ferriere N. and Coumans M., (1999). *The embryogenic response of immature embryo cultures of durum wheat (Triticum durum Desf.): histology and improvement by AgNO₃*. Plant Growth Regulation 28, 147-155.

Ngày nhận bài: 22/3/2013

Người phản biện: TS. Mai Xuân Triệu,
ngày 29/3/2013

Ngày duyệt đăng: 15/4/2013

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU NGUỒN VẬT LIỆU PHỤC VỤ CHỌN TẠO GIỐNG NGÔ LAI CHO VÙNG TÂY BẮC VIỆT NAM

Đào Ngọc Ánh

SUMMARY

The results of selecting maize inbredlines and maize hybrid development for the North Western region of Vietnam

The North Western agro-ecological zone including 4 provinces Lai Chau, Dien Bien, Son La and Hoa Binh is the large maize cultivated area and highly potential maize production of Vietnam. Breeding for high yield and quality maize hybrids which are suitable with climate and cultivating behavior of the ethnic people of this region bring the significant meaning of enhancing maize yield and production of the whole country in the near future (2013-2020). By 15 inbred lines from S5 and over including D1 to D15 and 2 potential inbred lines DF2 and IL9 which were tested in the the North Western condition 8 inbred lines were selected: D4, D8, D10, D11, D12, D13, D15 and D15. Futher more, the maize hybrid LVN81 and some potential hybrid combinations including (D10 × D12), (D12 × D13) and (D14 × D15) were developed and brought to VCU test.

Keywords: Maize hybrid, inbredlines, combination, yield, tolerance.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Vùng sinh thái nông nghiệp Tây Bắc gồm 4 tỉnh (Lai Châu, Điện Biên, Sơn La