

MỘT SỐ KẾT QUẢ NUÔI CẤY BAO PHẦN LÚA LAI F1 TẠO DÒNG BẤT DỤC ĐỰC MANG GEN TGMS

Đoàn Duy Thanh, Đỗ Năng Vịnh,
Doãn Thị Hoà

SUMMARY

Some results of creation new sterile lines rice by anther culture

This paper presents the results of the research on creation sterile lines rice (Thermo - sensitive genic male sterility) by anther culture of F1 two - lines hybrids rice.

The study indicated that a successful haploid technology must depend on a high-efficiently *in vitro* callus-anther inducing and plant regeneration medium. The highest frequency of callus producing (up to 27,9%) from cultured anther in four hybrids of two-lines varieties CVT 68, LC 212, HYT 102, TH 7-2, was found in Q medium (2mg/l 2,4D + 0,5mg/l Ki + 0,4g CH + 15% (v/v) CW) with 25-30g/l sucrose combine with 15-20g/l maltose. Medium MS with 1mg/l Ki + (1-2)mg/l BAP + 0,5mg/l NAA + 30g/l sucrose + 15% CW was proved the best green regeneration medium with a mean frequency of 15,9%.

Green plant was carried out the trial. There are several new TGMS lines carry some good characters that can used for production and research of hybrid rice.

Keywords: two-line hybrid rice, rice anther culture

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Lúa là cây lương thực cơ bản của thế giới, với hơn 90% lúa của thế giới tập trung và sản xuất ở châu Á. Sản xuất lúa của thế giới tăng chậm hơn mức tăng dân số. Việc tăng tiếp theo trong sản xuất lúa là cần thiết để thỏa mãn nhu cầu của áp lực tăng dân số. Sản xuất lúa hàng năm của thế giới tăng từ 527 triệu tấn tới 556 triệu tấn vào năm 2000 và yêu cầu là 758 triệu tấn vào năm 2020 (Khush *et al.*, 1999). Do vậy công tác chọn tạo giống mới có năng suất cao, chất lượng tốt và chống chịu sâu bệnh nhằm thỏa mãn nhu cầu và an ninh lương thực của mỗi quốc gia đang là nhiệm vụ cấp thiết đối với các nhà khoa học.

Hiện nay xu hướng cơ bản của các nhà chọn tạo giống để tạo giống lúa vượt trần là: Sử dụng ưu thế lai, tạo cây lúa theo mô hình lý tưởng và cải thiện hoạt động bộ máy quang hợp ở lúa theo con đường quang hợp C4 bằng kỹ thuật di truyền. Trong đó sử dụng ưu thế lai ở lúa là hướng nghiên cứu đang được ứng dụng có hiệu quả ở nhiều

nước châu Á. Để tạo ra số lượng lớn con lai sử dụng ưu thế lai ở lúa, các nhà khoa học đã tạo ra lúa bất dục đực. Tuy nhiên bằng phương pháp truyền thống, việc đó tốn rất nhiều công sức và thời gian.

Kỹ thuật tạo cây lúa đơn bội qua nuôi cấy bao phấn có ứng dụng quan trọng trong chọn tạo giống lúa do có ưu điểm là rút ngắn được thời gian chọn tạo giống. Việc áp dụng kỹ thuật đơn bội vào nghiên cứu lúa lai xuất phát từ cách tiếp cận: đặc điểm bất dục đực di truyền cảm ứng với nhiệt độ (Thermo-sensitive Genic Male Sterility) giống lúa được quy định bởi một cặp gen đơn lặn và khi đó cây lúa ở giai đoạn cảm ứng với điều kiện nhiệt độ phù hợp lúa sẽ bất dục đực, dẫn tới không kết hạt. Con lai F1 có cặp gen này ở trạng thái dị hợp tử do vậy mà các cá thể lai đều kết hạt. Bằng kỹ thuật đơn bội người ta nhanh chóng tách được 50% số cá thể có chứa gen gây bất dục và 50% số cá thể kết hạt, do không có gen gây bất dục. Bằng phương pháp truyền thống, đối với cơ thể có gen dị hợp, để tách được tính trạng do gen ẩn và các tính trạng

khác ở trạng thái đồng hợp là một quá trình chi phí rất nhiều thời gian và công sức.

Mặt khác, cây F1 trong quá trình phát sinh giao tử do tái tổ hợp mà hình thành các kiểu di truyền khác nhau và thông qua kỹ thuật đơn bội có thể tách được các kiểu di truyền này. Điều đó đã tạo điều kiện thuận lợi cho việc tìm kiếm ưu thế lai, do thay vì trước đây với số lượng giống bố dự tuyển xác định chỉ với 1 dòng mẹ bất dục thì bây giờ có nhiều dòng mẹ bất dục với các nền di truyền khác nhau.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Vật liệu nghiên cứu

Sử dụng các giống lúa lai hai dòng mang gen TGMS sau: TH 7-2, HYT 102, LC 212, CVT 68 do Trung tâm Khảo kiểm nghiệm giống cây trồng TW cung cấp làm vật liệu cho nuôi cấy bao phấn.

2. Phương pháp nghiên cứu

Sử dụng kỹ thuật *in vitro* tạo dòng đơn bội thông qua nuôi cấy bao phấn theo phương pháp của Chu *et al.* (1998):

- Chọn và khử trùng dòng lúa: Dòng của các tổ hợp lúa lai F1 chứa hạt phấn ở giai đoạn đơn nhân được xử lý lạnh 7-10 ngày ở nhiệt độ 8-10°C sau đó dòng lúa được khử trùng bằng cồn 70, tiếp là bằng HgCl₂ 0,1% trong 10 phút, rửa dòng bằng nước cất vô trùng 3- 4 lần. Tiến hành tách bao phấn trong box cấy vô trùng bằng panh, kéo nhỏ và cấy vào môi trường tạo callus. Bao phấn trong môi trường tạo mô sẹo (callus) được nuôi trong buồng tối với nhiệt độ nuôi 24-26°C khoảng 30 - 35 ngày.

- Môi trường nuôi cấy: Môi trường tạo callus là các môi trường khoáng MS (Murashige and Skoog, 1962), N6 (Chu *et al.*, 1978) và Q (Quang *et al.* 1986) có bổ sung 2mg/l 2,4D; 0.5 mg/l kinetine; 0.4g/l casein hydrolysate; 4,5% đường sucrose;

15% (v/v) nước dừa. Môi trường nhân callus có thành phần như sau: MS + 0.5 mg/l 2-4D + 0.5 mg/l kinetine + 100mg/l tryptophan + 3% đường sucrose + 15% nước dừa. Môi trường tái sinh chồi (TS) là môi trường khoáng MS có bổ sung 0.5 mg/l NAA, 3% đường sucrose và 15% (v/v) nước dừa, các chất kinetine và BAP được bổ sung vào tùy theo yêu cầu của thí nghiệm. Các môi trường trên được chỉnh pH = 5,8 và khử trùng bằng autoclave ở nhiệt độ 121°C trong vòng 25 phút.

Khi callus hình thành trong môi trường tạo đạt kích thước 1- 2 mm sẽ được chuyển sang môi trường nhân và sau 15 ngày callus sẽ được chuyển sang môi trường tái sinh chồi. Trong môi trường tái sinh chồi, callus được nuôi ở nhiệt độ 25°C dưới đèn huỳnh quang với cường độ chiếu sáng 3000- 4000 lux và thời gian chiếu khoảng 12 giờ/ngày. Các cây xanh tái sinh được chuyển ra chậu đất để theo dõi.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Ảnh của môi trường khoáng đến tỷ lệ tạo callus

Để nghiên cứu chọn được môi trường khoáng thích hợp cho nuôi cấy bao phấn lúa lai hai dòng mang gen TGMS, chúng tôi sử dụng môi trường nuôi cấy tạo callus có thành phần khoáng là MS, N6, Q. Môi trường MS là môi trường giàu dinh dưỡng có hàm lượng nitơ là 60 mM/l. Hai môi trường còn lại có hàm lượng nitơ xấp xỉ nhau nhưng thấp hơn môi trường MS nhiều, trong đó môi trường N6 có hàm lượng amon cao hơn môi trường Q. Các môi trường khoáng này được bổ sung 2mg/l 2,4D; 0.5 mg/l Kinetine; 0.4g/l Casein hydrolysate; 4,5% đường sucrose; 15% (v/v) nước dừa.

Kết quả thí nghiệm tạo callus với ba môi trường khoáng MS, N6 và môi trường Q được trình bày tại bảng 1.

Bảng 1. Ảnh hưởng của môi trường khoáng đến tỷ lệ tạo Callus bao phần nuôi cấy

STT	Giống	Môi trường khoáng	Số lượng bao phần cấy	Số lượng bao phần tạo callus	Tỷ lệ bao phần tạo callus (%)
1	TH 7-2	MS	240	9	3,8
		N6	240	28	11,7
		Q	240	65	27,1
2	HYT 102	MS	240	14	5,8
		N6	240	45	18,8
		Q	240	67	27,9
3	LC 212	MS	240	7	2,9
		N6	240	19	7,9
		Q	240	37	15,4
4	CVT 68	MS	240	5	2,1
		N6	240	16	6,7
		Q	240	30	12,5

Kết quả thí nghiệm cho thấy tỷ lệ tạo callus từ nuôi cấy bao phần tùy thuộc vào mỗi giống lúa. Tỷ lệ tạo callus bình quân trên cả ba môi trường của hai giống TH 7-2 và HYT 102, tương ứng là 14,2% và 17,5%, cao hơn so với hai giống LC 212, CVT 68, tương ứng là 8,8% và 7,1%. Trong ba môi trường tạo callus, môi trường Q cho tỷ lệ tạo callus cao nhất (từ 12,5 tới 27,9%) tiếp đến là môi trường N6, còn môi trường MS cho tỷ lệ tạo callus thấp nhất. Như vậy: Môi trường tạo Callus có thành phần khoáng cơ bản Q cho tỷ lệ tạo calus trung bình ở cả bốn giống lúa là cao nhất (20,7%).

2. Ảnh của đường trong môi trường nuôi đến tỷ lệ tạo callus

Thành phần đường của môi trường nuôi cấy là một trong các yếu tố ảnh hưởng đến tỷ lệ tạo callus bao phần lúa. Để nghiên cứu ảnh hưởng của đường trong môi trường nuôi cấy đến tỷ lệ tạo Callus bao phần, chúng tôi sử dụng môi trường Q có bổ sung 2mg/l 2,4D; 0.5 mg/l kinetine; 0.4g/l Casein hydrolysate; 15% (v/v) nước dừa. Môi trường được bổ sung đường với lượng 45g cho mỗi lít môi trường gồm sucrose đơn lẻ hay sucrose phối hợp với đường Maltose. Kết quả thí nghiệm sau 30 ngày nuôi cấy được trình bày tại bảng 2.

Bảng 2. Ảnh hưởng của đường trong môi trường nuôi đến tỷ lệ tạo callus

STT	Giống	Công thức đường	Số lượng bao phần cấy	Số lượng bao phần tạo callus	Tỷ lệ bao phần tạo callus (%)
1	TH 7-2	45g/l Sucrose	240	65	27,1
		30g/l Sucrose + 15g/l Maltose	240	71	29,6
		25g/l Sucrose + 20g/l Maltose	240	75	31,3
2	HYT 102	45g/l Sucrose	240	67	27,9
		30g/l Sucrose + 15g/l Maltose	240	78	32,5
		25g/l Sucrose + 20g/l Maltose	240	81	33,8
3	LC 212	45g/l Sucrose	240	37	15,4
		30g/l Sucrose + 15g/l Maltose	240	49	20,4
		25g/l Sucrose + 20g/l Maltose	240	47	19,6
4	CVT 68	45g/l Sucrose	240	30	12,5
		30g/l Sucrose + 15g/l Maltose	240	36	15,0
		25g/l Sucrose + 20g/l Maltose	240	41	17,1

Từ kết quả nghiên cứu nhận thấy: Các công thức môi trường có bổ sung đường sucrose phối hợp với đường maltose thì tỷ lệ bao phần tạo callus ở tất cả các giống tham gia thí nghiệm đều tăng hơn công thức chỉ bổ sung đơn lẻ đường sucrose. Trong các công thức môi trường có sự phối hợp sucrose và maltose, thì công thức có hàm lượng đường Maltose 20g/l có tỷ lệ bao phần tạo callus tương đương hoặc cao hơn công thức có maltose 15g/l, mặc dù sự khác biệt là chưa lớn.

Như vậy: Bổ sung 25-30g/l đường Sucrose kết hợp 15-20g/l đường Maltose vào môi trường nuôi cấy Q có 2 mg/l 2,4D; 0,5 mg/l Kinetine; 0,4g/l Casein hydrolysate; 15% (v/v) nước dừa cho hiệu quả tạo callus cao hơn (bình quân ở cả bốn giống là 24,4-25,4%).

3. Tỷ lệ tái sinh chồi xanh từ callus nuôi cấy

Trong giai đoạn tái sinh chồi xanh *in vitro*, môi trường nuôi cấy thường được bổ sung các chất điều tiết sinh trưởng thuộc nhóm Cytokinin. Đối với thí nghiệm chất được bổ sung vào môi trường tái sinh (TS) là Kinetin với nồng độ 2 mg/l, còn khi kết hợp với BAP thì nồng độ Kinetin là 1mg/l. BAP bổ sung vào môi trường tái sinh theo các công thức thí nghiệm sau:

- TS1: Kinetin 2,0 mg/l (đ/c)
- TS2: Kinetin 1,0 mg/l + 1mg/l BAP
- TS3: Kinetin 1,0 mg/l + 2mg/l BAP
- TS4: Kinetin 1,0 mg/l + 3mg/l BAP
- TS5: Kinetin 1,0 mg/l + 4mg/l BAP

Kết quả thí nghiệm về ảnh hưởng của nồng độ BAP trong môi trường nuôi cấy được trình bày tại bảng 3.

Bảng 3. Ảnh hưởng phối hợp của Kinetin và BAP đến tỷ lệ tái sinh cây xanh

STT	Giống	Môi trường tái sinh	Số Callus nuôi cấy	Số cây xanh tái sinh	Tỷ lệ cây xanh tái sinh (%)
1	TH 7-2	TS1	100	3	3
		TS2	100	12	12
		TS3	100	5	5
		TS4	100	1	1
		TS5	100	-	-
2	HYT 102	TS1	100	11	11
		TS2	100	9	9
		TS3	100	6	6
		TS4	100	-	-
		TS5	100	-	-
3	LC 212	TS1	100	22	22
		TS2	100	55	55
		TS3	100	49	49
		TS4	100	25	25
		TS5	100	6	6
4	CVT 68	TS1	100	32	32
		TS2	100	39	39
		TS3	100	27	27
		TS4	100	14	14
		TS5	100	2	2
Trung bình					15,9

Kết quả thí nghiệm cho thấy tỷ lệ tái sinh cây xanh tùy thuộc vào giống và môi trường nuôi cấy. Giống LC 212 và CVT 68 cho tỷ lệ tái sinh cây xanh cao nhất trong

môi trường TS2, tương ứng là 55 và 39%. Hai giống TH 7-2 và HYT cho tỷ lệ tái sinh thấp, thậm chí trong môi trường TS4 và TS5 đã không hình thành cây xanh. Tỷ lệ tái sinh

cây xanh trung bình cho tất cả các giống và môi trường đạt 15,9%. Nếu tính bình quân theo từng loại môi trường không phân biệt giống thì môi trường TS2 (MS có 0.5 mg/l NAA, 3% đường sucrose và 15% nước dừa, bổ sung 1 mg/l Kinetin cùng với 1mg/l BAP cho tỷ lệ tái sinh cây xanh cao nhất (23%). Khi tăng nồng độ của BAP trong môi trường, tỷ lệ tái sinh cây xanh giảm, tỷ lệ hình thành cây bạch tạng tăng lên.

Như vậy: Môi trường tái sinh thích hợp là MS + 1 mg/l Kinetin + (1-2mg/l) BAP + 0.5 mg/l NAA, bổ sung 3% đường Sucrose và 15% nước dừa.

4. Đánh giá cây tái sinh

Toàn bộ số cây xanh tái sinh được trồng ra đất để theo dõi. Để đánh giá cây hữu thụ kết hạt và cây bất thụ không kết hạt

của các cây tái sinh từ bao phần, ở giai đoạn trở các cây này được bao lại tránh hiện tượng truyền phấn, đồng thời xác định mức độ hữu thụ hay bất thụ của hạt phần bằng phương pháp nhuộm màu KI-I₂0,1% và soi trên kính hiển vi. Các cây hữu thụ có hạt phần nhuộm màu, còn các cây bất thụ có hạt phần nhỏ không nhuộm màu. Ngoài ra còn xác định mức bội thể các cây bao phần bằng máy Flow cytometry. Kết quả thí nghiệm được trình bày ở bảng 4.

Kết quả nghiên cứu cho thấy tỷ lệ hình thành cây hữu thụ và bất thụ của các cây tái sinh không phụ thuộc vào môi trường nuôi cấy mà phụ thuộc vào giống. Đối với giống TH 7-2 chỉ thu được các cây tái sinh bất thụ, còn đối với giống LC 212 thì tỷ lệ cây bất thụ (82 cây) lớn hơn cây hữu thụ (57 cây), nhưng đối với giống

Bảng 4. Đánh giá cây xanh tái sinh từ môi trường nuôi cấy

STT	Giống	Môi trường tái sinh	Chất điều tiết sinh trưởng	Số cây đưa ra đất	Số cây sống	Số cây hữu thụ	Số cây bất thụ
1	TH 7-2	TS1	Kinetin 2,0 mg/l	3	3	-	3
		TS2	Kinetin 1,0 mg/l + 1mg/l BAP	12	8	-	8
		TS3	Kinetin 1,0 mg/l + 2mg/l BAP	5	5	-	5
		TS4	Kinetin 1,0 mg/l + 3mg/l BAP	1	1	-	1
		TS5	Kinetin 1,0 mg/l + 4mg/l BAP	-	-	-	-
2	HYT 102	TS1	Kinetin 2,0 mg/l	11	10	4	6
		TS2	Kinetin 1,0 mg/l + 1mg/l BAP	9	9	1	8
		TS3	Kinetin 1,0 mg/l + 2mg/l BAP	6	6	3	3
		TS4	Kinetin 1,0 mg/l + 3mg/l BAP	-	-	-	-
		TS5	Kinetin 1,0 mg/l + 4mg/l BAP	-	-	-	-
3	LC 212	TS1	Kinetin 2,0 mg/l	22	19	7	12
		TS2	Kinetin 1,0 mg/l + 1mg/l BAP	55	50	19	31
		TS3	Kinetin 1,0 mg/l + 2mg/l BAP	49	46	25	21
		TS4	Kinetin 1,0 mg/l + 3mg/l BAP	25	22	6	16
		TS5	Kinetin 1,0 mg/l + 4mg/l BAP	6	2	0	2
4	CVT 68	TS1	Kinetin 2,0 mg/l	32	31	27	4
		TS2	Kinetin 1,0 mg/l + 1mg/l BAP	39	34	32	2
		TS3	Kinetin 1,0 mg/l + 2mg/l BAP	27	24	21	3
		TS4	Kinetin 1,0 mg/l + 3mg/l BAP	14	8	7	1
		TS5	Kinetin 1,0 mg/l + 4mg/l BAP	2	2	0	2
Tổng số				318	280	152	128

CVT 68 thì ngược lại tỷ lệ cây hữu thụ (87 cây) lại lớn hơn cây bất thụ (12 cây). Ngoài ra còn xác định khoảng phân bố của một số chỉ tiêu nông học như chiều cao cây,

thời gian từ trồng đến trở và năng suất hạt của quần thể cây bao phần so với cây cho giống gốc F1 của chúng. Kết quả được trình bày ở bảng 5.

Bảng 5. Một số đặc điểm quần thể của cây bao phấn

STT	Quần thể	Chiều cao cây (cm)	Thời gian từ trồng đến trổ (ngày)	Số hạt/bông cây hữu thụ	Số hạt/bông cây bất thụ
1	Cây bao phấn	23 - 75	35 - 89	76 - 425	43 - 232
2	Cây F1	90 - 114	95 - 105	132 - 348	-

Về chiều cao cây, các cây bao phấn có chiều cao thấp hơn cây F1 (cây cung cấp nguồn hạt phân cho nuôi cấy tạo cây bao phấn), tuy nhiên sự phân bố về chiều cao của cây bao phấn lại nằm trong khoảng rộng hơn so với cây F1. Tương tự như vậy, thời gian từ trồng đến trổ của cây bao phấn cũng ngắn hơn so với ở cây F1, từ rất ngắn 35 ngày cho đến tương đối dài là 89 ngày, trong khi đó ở cây F1 khoảng thời gian từ trồng đến trổ là khá dài nhưng biên độ lại rất hẹp. Như vậy đối với các dòng bất thụ đực có khoảng thời gian từ mạ đến trổ là 60 - 80 ngày thì thích hợp cho việc tạo con lai F1 chín sớm đến trung ngày. Về năng suất hạt, cả cây hữu và bất thụ giá trị năng suất hạt/bông đều nằm trong khoảng rộng và cho thấy tiềm năng về năng suất hạt/cây.

Trong số các cây bất thụ bước đầu chúng tôi đã chọn được một số dòng bất thụ đực. Qua đánh giá bước đầu và so với Pei ai 64s các dòng bất thụ này có đặc điểm cấu trúc hoa phù hợp với thụ phấn chéo như: vòi nhụy thò khi nở hoa có đặc điểm chuyển hóa hữu dục và bất thụ theo nhiệt độ và một số đặc điểm khác. Hiện các dòng này đang được tiếp tục nghiên cứu.

IV. KẾT LUẬN

1. Đã xác định được môi trường tạo cây đơn bội từ nuôi cấy bao phấn lúa lai F1 mang gen TGMS

- Môi trường tạo callus: Q + 2mg/l 2,4D + 0.5 mg/l Kinetine.

+ 0.4g/l CH + 15% (v/v) CW + Sucrose (25 - 30g/l).

+ Maltose (15-20g/l) cho tỷ lệ tạo Callus cao (24,4 - 25,4%).

- Môi trường tái sinh: MS + 1mg/l Kinetin + 1mg/l BAP + 0,5 mg/l NAA +

30g/l sucrose + 15% (v/v) CW cho tỷ lệ tái sinh cây xanh cao (23%)

2. Bằng phương pháp nuôi cấy bao phấn lúa lai hai dòng mang gen TGMS đã tạo được các dòng bất thụ đực mới có những đặc điểm nông học đáng chú ý về thời gian sinh trưởng, năng suất hạt của cây và các đặc điểm như: cấu trúc hoa, nở hoa, cảm ứng hữu dục và bất thụ tương tự như dòng Pei ai 64s.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Đoàn Duy Thanh, Bùi Huy Thủy, Hoàng Tuyết Minh, Đỗ Năng Vịnh, Trần Duy Quý. *Khảo sát dòng thuần hữu thụ và các dòng TGMS mới tạo được từ nuôi cấy lúa lai hai dòng*. Tạp chí NN và CNTP, 2001. 8. 529-530.
- Nguyễn Công Tân, Ngô Thế Dân, Hoàng Tuyết Minh, Nguyễn Thị Trâm, Nguyễn Trí Hoàn, Quách Ngọc Ân (2002). *Lúa lai ở Việt Nam*. NXB Nông Nghiệp. Hà Nội 2002. pp 326.
- Chu, Q.R., Linscombe, S. and Jodari, F., 1998. *Rice anther culture of F1 crosses between photosensitive genetic male sterile lines and the leading U.S. varieties*. RBQ, Vol. 35: 16 - 17.
- Lopez. M.T. and S.S. Virmani. 2000. *Development of TGMS lines for developing two-line rice hybrids for the tropics*. Euphytica; Volume 114, Number 3 /August, 2000, page 211-215.
- Virmani. S.S., Z.X. Sun, T.M. Mou, A. Jauhar Ali, C.X Mao. 2003. *Two-Line Hybrid Rice Breeding Manual*. IRRI (International Rice Research Institute).

Người phản biện:

GS. TSKH. Trần Duy Quý

MỘT SỐ KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU TẠO DÒNG LÚA NHỊ BỘỊ KÉP BẰNG XỬ LÝ COLCHICINE

Đoàn Duy Thanh

SUMMARY

Some results of induction doubled - haploid rice plant by Colchicine treatment

This paper presents the results of the research on induction doubled-haploid rice plant by Colchicine treatment. Rice tillers from four haploids after trimming of roots were treated with Colchicine solution involved different concentrations (0.025%, 0.05%, 0.1% and 0.15%) for different lengths of time (6 h, 12 h, 16 h and 24 h) in an attempt to induce diploidized seeds.

A higher Colchicine concentration in combination with longer hours of treatment increased ratio of diploidized seeds, at the same time induced the survival rate treated tillers. Production of diploidized seeds from haploid tillers were proved high effects with treated Colchicine concentrations (from 0.05 to 0.1%) and lengths of time (16 - 24 h) in dependent on varieties.

Keywords: doubled-haploid rice plant, Colchicine treatment

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hiện nay để giải quyết vấn đề tăng năng suất lúa người ta đang sử dụng nhiều kỹ thuật của công nghệ sinh học như kỹ thuật chuyên gen, sử dụng marker phân tử, kỹ thuật đơn bội, kỹ thuật lúa lai... nhằm tạo ra các giống lúa có năng suất cao, có tính thích ứng rộng...

Kỹ thuật đơn bội được xem là biện pháp hỗ trợ có khả năng tạo nhanh dòng thuần đồng hợp tử trong 1 vụ, nhanh hơn rất nhiều so với phương pháp chọn dòng thuần truyền thống mất 8 - 10 vụ. Tuy nhiên, bằng kỹ thuật này thường số cây đơn bội có mức bội thể ($1n$) được tạo ra chiếm tỷ lệ khá cao (30% tới 60%). Muốn tạo dòng thuần có bộ nhiễm sắc thể ($2n$) người ta cần nhị bội hóa chúng thành các cây nhị bội có khả năng kết hạt.

Một trong những biện pháp làm thay đổi mức bội thể tế bào thực vật là phương pháp xử lý bằng Colchicine. Để tăng cường hiệu quả tạo dòng đơn bội kép của kỹ thuật đơn bội cũng như tạo cơ sở cho nghiên cứu tạo giống lúa đa bội (polyploid rice) thì cần thiết phải nghiên cứu phương pháp đa bội hóa bằng Colchicine.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Vật liệu nghiên cứu

Mầm của các dòng lúa đơn bội ($1n$) tái sinh từ nuôi cấy bao phấn các giống lúa lai hai dòng HYT 102, LC 212, Việt lai 50 và giống japonica 33 dùng làm vật liệu cho thí nghiệm nghiên cứu đa bội hóa bằng xử lý Colchicine.

2. Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp xử lý Colchicine:

Ngâm phần gốc của mầm cây lúa đơn bội tái sinh từ nuôi cấy bao phấn đã cắt bỏ rễ vào dung dịch Colchicine với thời gian khác nhau tùy từng thí nghiệm (6, 12, 16 và 24 giờ) trong điều kiện ánh sáng 3000 lux và nhiệt độ 26°C của phòng thí nghiệm. Cây lúa sau khi xử lý được đưa ra ô thí nghiệm trồng và xác định cây nhị bội hoá.

Phương pháp xác định cây lúa nhị bội hoá:

- Xác định sự nhuộm màu của hạt phấn:
Khi lúa ra hoa có thể tiến hành nhuộm màu