

## 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  $26^{\circ}\text{C}$  của phòng thí nghiệm. Cây lúa sau khi xử lý được đưa ra ô thí nghiệm trồng và xác định cây nhị bội hóa.

##### **Phương pháp xác định cây lúa nhị bội hóa:**

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

hạt phần bằng dung dịch KI-I<sub>2</sub> 0,1%. Hạt phần của cây nhị bội sẽ nhuộm màu KI-I<sub>2</sub> 0,1% ta sẽ quan sát thấy rõ trên kính hiển vi. Hạt phần của cây đơn bội không bắt màu thuốc nhuộm KI-I<sub>2</sub> hoặc cây có bao phần rỗng không hình thành hạt phần.

- Tính số hạt kết: Sau giai đoạn lúa trổ xác định cây lúa nhị bội hóa thông qua việc xác định cây kết hạt.

- Xác định mức bội thể bằng máy Flow cytometry PA (ploidy analyzer).

Thí nghiệm được thực hiện tại Phòng Thí nghiệm Trọng điểm Viện Di truyền nông nghiệp. Xử lý và phân tích số liệu theo phương pháp Dospekhov (1985) bằng phần mềm Microsoft Office Excel.

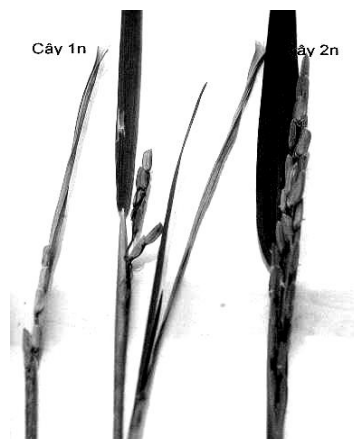


Hình 1. Cây (1n) và (2n)

### III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 1. Đặc điểm hình thái của cây lúa đơn bội (haploid) và cây lúa nhị bội (dihaploid)

Từ những cây lúa tái sinh từ nuôi cấy bao phần lúa lai hai dòng trồng trên ruộng thí nghiệm, chúng tôi đã tiến hành xác định mức bội thể và đặc điểm hình thái của chúng. Kết quả cho thấy: Trong tổng số 432 dòng cây bao phần có 110 dòng cây có mức bội thể là 1n và 322 dòng cây có mức bội thể là 2n. Biểu hiện về mặt hình thái (hình 1 và 2): Các cây đơn bội có dạng hình nhỏ bé, lá thường không có tai lá và lưỡi lá, đôi khi có thì bằng mắt thường cũng khó phát hiện, ngoài ra hạt phần không bắt màu KI-I<sub>2</sub> 0,1%.



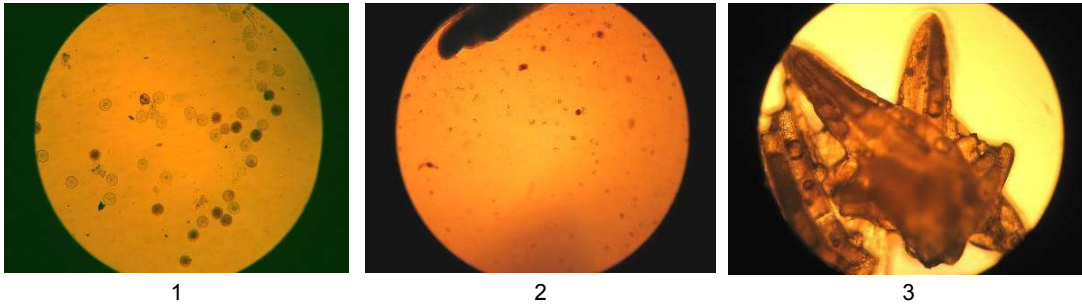
Hình 2. Bông lúa cây (1n) và (2n)

Kết quả về đặc điểm hình thái cây lúa được trình bày tại bảng 1.

Bảng 1. Đặc điểm hình thái giữa các cây đơn bội và cây nhị bội

CT	Dòng cây tái sinh *	Mức bội thể	Chiều cao cây (cm)	Chiều dài lá đòng (cm)	Hạt phần nhuộm	Khả năng kết hạt
1	LC 212	1n	20 - 32	8 - 13	Không	Không
		2n	40 - 55	15 - 20	Có	Có
2	HYT 102	1n	18 - 28	7 - 14	Không	Không
		2n	42 - 60	16 - 22	Có	Có
3	Vietlai 50	1n	18 - 30	8 - 15	Không	Không
		2n	38 - 50	16 - 23	Có	Có

Chú thích: \* để chỉ nguồn gốc các dòng tái sinh



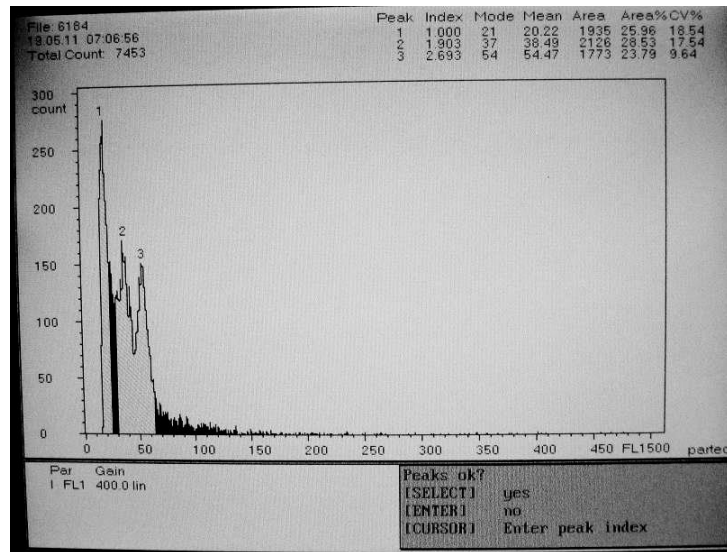
Hình 3. Kết quả quan sát trên kính hiển vi đối với hạt phấn và bao phấn của cây đơn bội và nhị bội.

- 1: Hạt phấn bắt màu KI-I<sub>2</sub> của cây nhị bội; 2: Hạt phấn không bắt màu KI-I<sub>2</sub> của cây đơn bội;  
3: Bao phấn rỗng của cây đơn bội.

Những cây đơn bội này không có khả năng kết hạt. Chúng phát triển đến giai đoạn ra hoa nhưng bông lúa bé, hạt lép. Cây nhị bội phát triển tốt, khi ra hoa bông lúa có thể dài đến 17 - 20cm, bông to và nhiều hạt chắc. Những cây đơn bội không có mảy trấu, các cây nhị bội khi xử lý tuy có mảy trấu nhưng ngắn không dài như các dòng lúa (2n) bình thường. Kết quả quan sát trên kính hiển vi khi tiến hành nhuộm hạt phấn cây đơn bội và cây nhị bội thấy rằng bao

phấn của cây (1n) rỗng, hoặc có hạt phấn bắt thụ không bắt màu thuốc nhuộm KI-I<sub>2</sub>, do đó cây đơn bội (1n) không có khả năng kết hạt. Hạt phấn của cây (2n) bắt màu thuốc nhuộm KI-I<sub>2</sub> được quan sát rõ trên kính hiển vi, (hình 3).

Kết quả xác định số lượng nhiễm sắc thể của tế bào trên máy phân tích mức bội thể cho thấy cây (2n) có số lượng nhiễm sắc thể lớn gấp 2 lần bộ nhiễm sắc thể của cây (1n) (hình 4).



Hình 4. Hình ảnh xác định bộ NST trên máy Flow cytometry

1. Đường pic 1 chỉ số lượng NST của cây (1n)  
2. Đường pic 2 chỉ số lượng NST của cây (2n)  
3. Đường pic 3 chỉ số lượng NST của cây (3n)

**2. Ảnh hưởng của nồng độ xử lý Colchicine tới khả năng nhị bội hoá**

Để nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ xử lý Colchicine các dòng lúa đơn bội tới khả năng tạo cây nhị bội, chúng tôi sử dụng

mầm cây lúa tái sinh của giống LC 212 có mức bội thể  $1n$  để xử lý. Nồng độ của dung dịch Colchicine được chuẩn bị từ 0,025% tới 0,15% với thời gian xử lý là 16 giờ. Kết quả thí nghiệm được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. Ảnh hưởng của nồng độ xử lý Colchicine tới khả năng tạo cây nhị bội.

STT	Công thức	Nồng độ (%)	Số cây xử lý	Tỷ lệ cây chết (%)	Số hạt chắc thu được	Tỷ lệ đậu hạt/cây
1	1 (đ/c)	0	20	10	0	0
2	2	0,025	20	60	8	1,1
3	3	0,05	20	65	11	1,4
4	4	0,1	20	70	12	2,0
5	5	0,15	20	75	17	4,3

Kết quả nghiên cứu cho thấy:

Ở công thức đối chứng, cây không xử lý Colchicine thì không xảy ra hiện tượng nhị bội hoá, do vậy không có hiện tượng kết hạt, tỷ lệ đậu hạt/cây và số hạt chắc thu được là 0. Ngược lại các công thức xử lý Colchicine đều dẫn đến nhị bội hoá, với các mức độ kết hạt khác nhau. Công thức xử lý Colchicine nồng độ 0,025% cho tỷ lệ đậu hạt/cây thấp nhất (1,1). Khi tăng nồng độ xử lý Colchicine lên 0,05% - 0,1% - 0,15% thì tỷ lệ đậu hạt trên cây tăng.

Công thức xử lý ở nồng độ 0,15% số hạt chắc thu được nhiều nhất là 17 hạt với tỷ lệ đậu hạt trên cây cao nhất (4,3). Tuy nhiên khi tăng nồng độ xử lý thì tỷ lệ cây chết cũng tăng lên (75%).

Như vậy, đối với giống lúa đơn bội LC 212 khi xử lý Colchicine trong thời gian 16 giờ, nồng độ Colchicine trong khoảng (0,1% - 0,15%) cho tỷ lệ kết hạt cao và khi tăng nồng độ xử lý thì tỷ lệ hạt kết tăng nhưng đồng thời cũng làm tăng tỷ lệ cây chết.

**3. Ảnh hưởng của thời gian xử lý Colchicine tới khả năng nhị bội hoá**

Kết quả nghiên cứu khả năng nhị bội hóa mầm cây lúa tái sinh giống LC 212 khi xử lý Colchicine ở nồng độ 0,05% với thời gian xử lý thay đổi theo công thức: 6 giờ, 12 giờ, 16 giờ và 24 giờ được trình bày tại bảng 3 và hình 5.

Bảng 3. Ảnh hưởng của thời gian xử lý Colchicine tới khả năng tạo cây nhị bội

Công thức	Thời gian xử lý (giờ)	Số cây xử lý	Tỷ lệ cây chết (%)	Số hạt chắc thu được	Tỷ lệ đậu hạt/cây
1	6	20	30	2	0,14
2	12	20	40	5	0,42
3	16	20	60	11	1,40
4	24	20	65	11	1,57

Từ kết quả thu được nhận thấy khi tăng thời gian xử lý thì khả năng gây nhị bội hóa tăng lên: Ở công thức với thời gian xử lý thấp nhất là 6 giờ thì tỷ lệ cây chết thấp (30%) nhưng tỷ lệ đậu hạt trên cây cũng thấp (0,14). Khi tăng dần thời gian xử lý thì số hạt chắc tăng và đạt trị số cao nhất tại công thức xử lý 16 và 24 giờ với tỷ lệ đậu hạt trên cây tương ứng là 1,4 và 1,57.

Như vậy, việc nhị bội hóa giống lúa đơn bội LC 212 bằng Colchicine với thời gian xử lý từ 16 giờ cho đến 24 giờ cho kết quả cao.

#### 4. Khả năng nhị bội hóa của các giống lúa khi xử lý Colchicine

Để xác định khả năng nhị bội hóa của các giống lúa, chúng tôi xử lý mầm đơn bội (1n) các giống lúa LC 212, HYT 102, Việt lai 50 và japonica 33 bằng Colchicine có

nồng độ 0,05% với thời gian xử lý là 16 giờ và 24 giờ. Kết quả nghiên cứu được trình bày trong bảng 4.

Kết quả thí nghiệm cho thấy:

- Về mặt thời gian xử lý: Khi tăng thời gian xử lý từ 16 giờ lên 24 giờ, các giống lúa HYT 102, Việt lai 50 và japonica 33 đều có phản ứng tạo cây nhị bội hóa giống nhau, tức là: khi tăng thời gian xử lý thì tỷ lệ đậu hạt trên cây tăng, nhưng đồng thời tỷ lệ cây chết cũng tăng.

- Về mặt giống lúa:

+ Mức độ nhị bội hóa ở mỗi giống lúa là khác nhau khi tăng thời gian xử lý từ 16 giờ lên 24 giờ. Trong đó 2 giống lúa HYT 102 và Việt lai 50 có mức độ tăng tỷ lệ hạt đậu hạt trên cây là rất lớn từ 0,68 đến 4,88 và 0,5 đến 4,0.

Bảng 4. Kết quả thu được khi xử lý Colchicine ở các giống lúa

Công thức	Giống	Thời gian xử lý (giờ)	Số cây xử lý	Tỷ lệ cây chết (%)	Số hạt chắc thu được	Tỷ lệ đậu hạt/cây
1	LC 212	16	20	60	11	1,40
		24	20	65	11	1,57
2	HYT 102	16	20	5	13	0,68
		24	20	15	83	4,88
3	Việt lai 50	16	20	40	6	0,5
		24	20	60	32	4,0
4	Japonica 33	16	20	10	19	1,06
		24	20	15	52	2,88

Trong khi đó giống lúa japonica 33 có mức độ nhị bội hóa thấp, tỷ lệ đậu hạt trên cây chỉ tăng từ 1,06 lên 2,88.

+ Mức độ mất cảm gây chết cây khi xử lý Colchicine ở các giống lúa là khác nhau khi tăng thời gian xử lý. Hai giống LC 212 và Việt lai 50 có tỷ lệ cây chết là rất lớn (là 60-65% và 40-60%). Hai giống còn lại HYT 102 và Japonica 33 có tỷ lệ cây chết thấp (là 5-15% và 10-15%).

Toàn bộ số hạt thu được từ thí nghiệm đa bội hóa đã được gieo vào môi trường tái sinh *in vitro* (MS/2 + 0,5mg/ml BAP + 6,5g Agar + 30g đường) và đánh giá khả năng nảy mầm, sinh trưởng của cây mầm so với cây mọc từ hạt cây nhị bội (2n) bình thường của các giống lúa đó. Kết quả thu được: Tỷ lệ nảy mầm, tỷ lệ sống của hạt nhị bội hóa đạt 100% và sự sinh trưởng của cây mầm là bình thường cũng tương tự

như cây mầm từ hạt nhị bội của cùng giống đó.

#### **IV. KẾT LUẬN**

Khi sử dụng phương pháp gây nhị bội hóa các dòng lúa đơn bội qua ngâm gốc chồi vào dung dịch Colchicine, việc tăng nồng độ và thời gian xử lý sẽ làm tăng tỷ lệ kết hạt trên cây nhưng đồng thời cũng làm tăng tỷ lệ cây chết.

Tùy thuộc vào nguồn gốc giống lúa khi tiến hành nhị bội hóa cây lúa đơn bội có thể lựa chọn nồng độ Colchicine thích hợp trong khoảng 0,05 - 0,15% và thời gian xử lý cho hiệu quả tạo hạt nhị bội cao là từ 16 giờ đến 24 giờ.

Hạt lúa thu được từ việc nhị bội hóa các dòng đơn bội sinh trưởng và phát triển tốt trong môi trường tái sinh như cây lúa có bộ nhiễm sắc thể 2n bình thường.

#### **TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. Trần Duy Quý (1997). *Các phương pháp mới trong chọn tạo giống cây*

*trồng*. NXB Nông Nghiệp Hà Nội, 1997. 347 tr.

2. Cai De Tian., Chen JianGou., Chen DongLing., Song ZhaoJian (2007). *The breeding of two polyploid rice lines with the characteristic of polyploid meiosis stability*. Sci. China Ser. C-life Sci. June 2007.vol.50 N.3, 356-366.

3. Ozkan H., Levy A.A., Feldman M. (2003). *Allopolyploidy induced rapid genom evolution in the wheat pairing among A and E genomes of Oryza through genomic in situ hybridization*. Rice Genet. Newsl. 16: 22-24.

4. Shuji Misoo., Taihei Hirabayashi., Osamu kamijima and Minoru Sawano (1991). *Efficient induction of diploidized plants in anther culture of rice by Colchicine pretreatment of col-preserved spikes*. Plant Tissue Culture Letters, 8(2), 82-86.

**Người phản biện:**  
**GS.TSKH. Trần Duy Quý**

## **KẾT QUẢ KHẢO NGHIỆM MỘT SỐ GIỐNG LÚA NGẮN NGÀY TẠI CÁC VÙNG SINH THÁI KHÁC NHAU TỈNH TRÀ VINH**

Trần Đình Giải, Lê Thị Dự

### **SUMMARY**

#### **Yield trail of some new early rice varieties in defferent ecosystem of Trà Vinh province**

Nineteen new rice varieties with short growth duration bred by Cuu Long Delta Rice Research Institute were used as materials for yield trail experiments in salt effected soil area of Da Loc, Chau Thanh and alluvial area with three rice crops per year of Binh Phu, Cang Long, Tra Vinh, in both dry and wet seasons of 2009-2010. These varieties were screened for resistant to Brown Plant Hopper (BPH), Leaf Blast and tolerant to saline condition. At least 2 rice varieties were found with very early maturity, high yield, resistant to BPH, Leaf Blast and suitable for 3 crops per year of Tra Vinh alluvial area, such as OM5451 and OM8923. Three other rice varieties were ditermined with early maturity, high yield, resistant to BPH, Leaf Blast, salt loterance and adaptation with salt effected soil area of Tra Vinh province. They were OM8928, OM6932 and OM5464.

Keywords: Yield trail, early rice variety, adaptation, salt effected soil