

KHẢ NĂNG TẠO CALLUS VÀ TÁI SINH CÂY CỦA TẬP ĐOÀN 31 GIỐNG LÚA NƯƠNG MIỀN BẮC VIỆT NAM PHỤC VỤ CÔNG TÁC CHUYỂN GEN

Phan Thị Thu Hiền

Khoa Sinh - Kỹ thuật nông nghiệp, Trường Đại học Sư phạm Hà Nội 2

Email: Hienphandt87@gmail.com

Ngày gửi bài: 15.02.2012

Ngày chấp nhận: 16.07.2012

TÓM TẮT

Để đánh giá khả năng tạo callus và tái sinh của tập đoàn lúa nương nhằm hoàn thiện các quy trình nuôi cấy *in vitro* trên các giống lúa có khả năng tái sinh cao phục vụ công tác chuyển gen, 31 giống lúa nương đã được sử dụng cho nghiên cứu này. Trong 31 giống lúa, 25 giống có khả năng tạo callus cao nhất trong môi trường thích hợp với tỷ lệ trên 50% và 4 giống có tiềm năng rất cao từ tỷ lệ 76,3% (giống Kháu trặm hòm) đến 85% (Kháu công ton). Môi trường thích hợp cho sự hình thành callus của các giống Kháu kè đề trặm và Kháu công ton là môi trường có bổ sung 1,5mg/l 2,4D. Trong lúc đó, đối với 2 giống còn lại là môi trường có bổ sung 2mg/l 2,4-D. Xác định được khả năng tái sinh của tập đoàn lúa nương trên các môi trường khác nhau trong số 25 giống lúa có khả năng tạo callus tốt nhất trên môi trường MS có bổ sung 2mg/l BAP, 0,5mg/l kinetine và 0,1mg/l casein. Đồng thời đã xác định được khả năng tạo callus và tái sinh cây của các giống lúa bị ảnh hưởng bởi yếu tố môi trường và di truyền, hai yếu tố này có sự tương tác làm ảnh hưởng các khả năng trên ở các giống lúa khác nhau và bước đầu đã chuyển thành công gen OsDREB2ACA vào giống Kháu trặm hòm.

Từ khóa: Chuyển gen, lúa nương, tạo callus, tái sinh cây từ phôi hạt.

Study on Plant Regeneration from Embryo of a Group Varieties of Upland Vietnamese Rice for Transformation Approach

ABSTRACT

A total of 31 upland rice varieties with low yield but good drought tolerance potential was used to examine their culturability *in vitro* (callus induction and plant regeneration) and to preliminarily establish genetic transformation protocol. Of 31 rice varieties, 25 have good callus formation with a induction rate of more than 50% and four of them have very high callus formation rate, varying from 76.3% (Kha tram hom variety) to 85% (Kha cong ton variety). The MS medium supplement with 1.5-2mg/l 2,4D seemed to be optimal for callus induction while supplement with 2mg/l BAP, 0.5mg/l kinetin and 0.1mg/l casein was optimal for plant regeneration. Analysis of variance (ANOVA) showed that the callus forming potency and plant regeneration capacity of these rice accessions were influenced by culture media and genetic background (genotype). The gene OsDREB2ACA was successfully transformed using *Agrobacterium tumefaciens* into Kha tram hom variety.

Keywords: Callus induction, culturability, plant regeneration, transformation, upland rice.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây lúa đã xuất hiện lâu đời trong nhiều xã hội trên thế giới nên đã gắn liền với đời sống và văn minh của nhiều dân tộc. Cây lúa có tầm quan trọng rất lớn cho vấn đề an ninh lương thực, sức khoẻ con người và tình trạng môi trường địa cầu từ 5, 6 ngàn năm trước cho đến

các thế hệ sau này. Hiện nay, lúa gạo là thức ăn chính và cung cấp nhiều năng lượng trong bữa ăn hàng ngày của hơn 3 tỉ người trên thế giới. Sự biến đổi khí hậu toàn cầu hiện nay đã kéo theo các hiện tượng thời tiết bất lợi như hạn hán, lũ lụt, băng giá xuất hiện thường xuyên trên diện rộng, vượt qua tầm kiểm soát của con người. Có những năm điều kiện thời tiết bất lợi

đã làm giảm 50% năng suất mùa màng trong đó hạn hán chiếm 15%, thậm chí ở một số diện tích đất canh tác có mực nước ngầm thấp, hạn hán làm giảm 100% năng suất mùa màng (Hsieh & cs., 1994).

Ở Việt Nam, trong điều kiện môi trường xuống cấp như hiện nay thì hạn hán đang là một trong những vấn đề thách thức cho chiến lược xây dựng nền nông nghiệp phát triển bền vững. Vấn đề càng trở nên trầm trọng khi hầu hết diện tích đất lúa bị hạn đều tập trung ở những vùng đất khó canh tác, vùng sâu, vùng xa nơi mà những người dân chủ yếu dựa vào sản xuất nông nghiệp. Cùng với đó, quá trình công nghiệp hóa đất nước làm diện tích đất canh tác nông nghiệp dần nhường chỗ cho các khu công nghiệp và dịch vụ. An ninh lương thực đang từng ngày bị đe dọa. Những vấn đề trên đặt ra cho chúng ta một bài toán là phải nghiên cứu chọn, tạo các giống cây lương thực có khả năng chống chịu điều kiện thời tiết bất lợi bằng kỹ thuật sinh học hiện đại nhằm tăng năng suất lúa trong cùng một diện tích canh tác. Muốn làm được điều đó, ta phải chuyển được những gen quy định tính kháng bệnh, chống chịu với bất lợi của ngoại cảnh hoặc năng suất cao lên các giống lúa canh tác bằng công nghệ chuyển gen thực vật, đây là lĩnh vực đang được thương mại hóa ở quy mô nhỏ hoặc đang thử nghiệm tại nhiều phòng thí nghiệm trên thế giới (James, 2005).

Các giống lúa nương phần lớn là cây trồng bản địa (landraces) được nông dân các địa phương miền Bắc Việt Nam lưu truyền từ thế hệ này sang thế hệ khác và chọn lọc theo nhiều cách khác nhau. Lúa nương có thời gian sinh trưởng ngắn, từ 156 đến 158 ngày, khối lượng 100 hạt thường thấp, dao động trong khoảng 2,07-4,05g, thời vụ gieo trồng vào tháng 5, sau mưa đầu hạ. Cây lúa có sức chống chịu tốt với môi trường, nhất là hạn và sâu bệnh, thích hợp với chân đất trung bình, trồng trên các sườn núi, các vùng đất cằn cỗi miền núi phía Bắc. Một đặc trưng khác biệt của lúa nương là tuy năng suất thấp nhưng có hàm lượng dinh dưỡng cao, thơm ngon và là đặc sản của các vùng núi khác nhau. Lúa nương vừa mang nét đẹp văn

hóa, vừa là sản phẩm có giá trị kinh tế cao. Vì vậy, việc chuyển các gen quý làm tăng năng suất vào các giống lúa nương địa phương hoặc phân lập, chuyển các gen quy định tính chịu hạn từ lúa nương sang các giống có tiềm năng năng suất hay phẩm chất tốt là một vấn đề cấp thiết hiện nay (Trung tâm tài nguyên di truyền thực vật, 2003). Hàng loạt nghiên cứu chuyển gen liên quan đến tính chịu hạn vào cây trồng nhằm tăng cường tính kháng hạn ở thực vật đã được tiến hành trong những năm vừa qua và kết quả là tạo ra các cây chuyển gen có tính chống chịu với điều kiện hạn (Bartels và Sunkars, 2005). Cho đến nay, chuyển gen gián tiếp thông qua *Agrobacterium tumefaciens* là phương pháp có tần số biến nạp cao hơn cũng như có thể xác định được sự xâm nhập ổn định hơn bất cứ phương pháp chuyển gen nào (Cheng & cs., 1992; Hsieh & cs., 2002).

Mục tiêu của nghiên cứu này nhằm tiến hành khảo sát khả năng tạo callus và tái sinh cây từ phôi hạt của 31 giống lúa nương miền Bắc Việt Nam do Viện Khoa học Nông Lâm nghiệp miền núi phía Bắc cung cấp, từ đó hoàn thiện các quy trình nuôi cấy *in vitro* trên các giống lúa có khả năng tái sinh cao phục vụ công tác chuyển gen. Sau đó, bước đầu thực hiện chuyển một gen quy định tính chịu hạn vào giống lúa nương có tiềm năng tạo callus và tái sinh cao nhất trong tập đoàn thông qua *Agrobacterium tumefaciens*. Đây là một trong các bước quan trọng để nghiên cứu, chọn tạo thành công các giống lúa chịu hạn từ các giống lúa nương miền Bắc Việt Nam.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Giống lúa: Để thực hiện nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành nghiên cứu tiềm năng tạo callus và tái sinh của tập đoàn 31 giống lúa nương đang được trồng phổ biến ở các tỉnh miền núi phía Bắc Việt Nam. Các giống lúa này được cung cấp bởi Viện Khoa học kỹ thuật Nông Lâm nghiệp Miền núi phía Bắc (Bảng 1).

Bảng 1. Tập đoàn 31 giống lúa nương miền Bắc Việt Nam được khảo sát trong nghiên cứu

TT	Giống	TT	Giống
1	DR4	17	Kháu Mòn trặm (Lúa hạt tròn)
2	DR5	18	Kháu tói
3	IR74371-3-1-1	19	LB-2M
4	Kháu trặm pom	20	Kháu trặm hơm (tê thơm)
5	IR78878-5-1-3-3	21	Kháu mòn niệu (Lúa mòn nếp)
6	Kháu hạng đôn	22	Kháu Lào
7	Kháu đặm cá (Nếp quạ)	23	IR81430-B-B-94
8	Kháu khinh	24	Kháu noon
9	LC93-1	25	Kháu khèo khoai
10	Kháu trặm khảo (Lúa vỏ trắng)	26	IR80416-B-152-4
11	IR78875-131-B-1-4	27	Kháu trặm sai (Tê cát)
12	Kháu kê đề trặm	28	Kháu đặm cá (Nếp quạ)
13	Nếp thầu dầu	29	IR81413-B-B-75-2
14	Kháu quầng	30	Kháu cai hóc (Kháu đọ)
15	IR79913-B-176-4	31	Kháu mạng mau (Lúa đại trà)
16	Kháu công ton		

Môi trường tạo callus: Sử dụng môi trường cơ bản MS (Murashige and Skoog, 1962), với nồng độ 2,4-D, dao động từ 1,5 đến 2,5 mg/l, tỉ lệ muối MS dao động từ 0,5 đến 1,5. Cụ thể như sau:

MS1: MS + 1,5mg/l 2,4-D + 0,8% aga + 3% saccharose

MS2: MS + 2mg/l 2,4-D + 0,8% aga + 3% saccharose

MS3: MS + 2,5mg/l 2,4-D + 0,8% aga + 3% saccharose

Môi trường tái sinh cây: Sử dụng môi trường MS bổ sung BAP, kinetine (0,5; 2mg/l), casein (0,1 mg/l), cụ thể như sau:

MS4: MS + 2mg/l BAP + 0,5mg/l kinetine + 0,7% aga + 3% saccharose

MS5: MS + 2mg/l BAP + 0,5mg/l kinetine + 0,7% aga + 3% saccharose + 0,1mg/l casein

MS6: MS + 0,5mg/l BAP + 2mg/l kinetine + 0,7% aga + 3% saccharose

MS7: MS + 0,5mg/l BAP + 0,5mg/l kinetine + 0,7% aga + 3% saccharose

2.2. Phương pháp nghiên cứu

- Hạt lúa bóc vỏ được xử lý bằng cách rửa nước cất 2 lần, ngâm và lắc nhẹ trong cồn 70%

thời gian 1 phút, trong H₂O₂ 15% thời gian 20 phút, sau đó rửa bằng nước cất khử trùng 4-5 lần. Hạt khử trùng được nuôi trên môi trường tạo callus trong bóng tối ở nhiệt độ 28°C. Sau 2 tuần nuôi cấy, các callus được chuyển sang môi trường tái sinh và nuôi trong điều kiện nhiệt độ 25°C, độ ẩm 50-70%, thời gian chiếu sáng 16h/ngày ở cường độ 3000lux.

- Việc đánh giá khả năng hình thành callus của tập đoàn giống lúa khảo sát được tiến hành sau 2 tuần nuôi cấy trên môi trường tạo callus. Từng giống lúa được đánh giá định lượng theo các chỉ tiêu sau:

$$\text{Tỷ lệ tạo callus (\%)} = \frac{\sum \text{callus tạo thành}}{\sum \text{mẫu đưa vào}} \times 100\%$$

- Việc đánh giá khả năng tái sinh của tập đoàn giống khảo sát được tiến hành sau 3 - 4 tuần nuôi cấy trên môi trường tái sinh. Từng giống lúa được đánh giá định lượng theo công thức sau:

$$\text{Tỷ lệ hình thành chồi (\%)} = \frac{\sum \text{hình thành chồi}}{\sum \text{callus đưa vào}} \times 100\%$$

- Khảo sát khả năng tiếp nhận gen của giống tiềm năng nhất trong tập đoàn 31 giống lúa nương miền Bắc, Việt Nam

2.2.1. Tạo callus

Nhiễm callus với Agrobacterium EHA105:

- Tế bào *Agrobacterium* EHA105 mang gen *OsDREB2ACA* nuôi qua đêm OD₆₀₀ đạt trên 0,8, sau đó pha loãng tới nồng độ OD₆₀₀ = 0,05 với môi trường AAM có sung Acetosyringone ở nồng độ 100µg/ml.

- Các callus được chuyển lên tấm lưới đã khử trùng và được ngâm trong dung dịch AAM có chứa *Agrobacterium* EHA105 đã được chuẩn bị ở bước trên trong thời gian 90 giây, lắc nhẹ.

- Callus được làm khô bằng việc đặt lên giấy thấm khử trùng, sau đó được chuyển lên môi trường MS - AS. Các callus sau khi được nhiễm *Agrobacterium* EHA105 mang gen *OsDREB2ACA* được nuôi trong tối ở nhiệt độ 28°C trong thời gian 3 ngày.

Chọn lọc và tái sinh:

- Sau quá trình lây nhiễm, các callus được rửa nhiều lần bằng nước cất khử trùng chứa 500mg/l cabernicillin, làm khô bằng việc đặt lên giấy thấm khử trùng.

- Chuyển callus sang môi trường chọn lọc MS-S có chứa 50mg/l hygromycin và nuôi trong tối ở 28°C trong thời gian 2 tuần.

2.3. Phương pháp phân tích, xử lý số liệu

- Số liệu được phân tích, xử lý thống kê theo phương pháp ANOVA trong chương trình Microsoft excel (Chu Văn Mẫn, 2003).

- Khảo sát khả năng tiếp nhận gen của giống tiềm năng nhất trong tập đoàn 31 giống lúa nương miền Bắc Việt Nam: Tạo callus, nhiễm callus với *Agrobacterium* EHA105 và chọn lọc, tái sinh.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Khả năng hình thành callus của tập đoàn giống lúa nương miền Bắc Việt Nam

Trên thế giới cũng như ở Việt Nam đã có rất nhiều nghiên cứu về ảnh hưởng của hàm lượng

2,4-D đến khả năng hình thành callus. Trong nghiên cứu này, thí nghiệm tiến hành với dải hàm lượng 2,4-D từ 1 đến 2,5mg/l. Kết quả thí nghiệm tạo callus của 31 giống lúa nương ở miền Bắc Việt Nam được trình bày tại bảng 2.

Kết quả phân tích ANOVA (Bảng 3) cho thấy khả năng hình thành callus bị ảnh hưởng bởi môi trường (nồng độ 2,4D) và giống (bản chất di truyền). Kết quả phân tích biến sai của yếu tố môi trường $F = 316,16$ lớn hơn rất nhiều lần $F_{crit} = 3,04$ chứng tỏ sự sai khác về tỷ lệ tạo callus bị ảnh hưởng mạnh của yếu tố môi trường. Khả năng tạo callus của các giống lúa trong các công thức thí nghiệm khác nhau có ý nghĩa thống kê (kết quả tạo callus trung bình trên môi trường MS1 có bổ sung 1,5mg 2,4-D là 50,9%, MS2 có bổ sung 2mg 2,4-D là 56,3% và MS3 có bổ sung 2,5mg 2,4-sD là 52,9%). Tương tự, giá trị F của yếu tố giống là 506,69 cũng lớn hơn nhiều lần giá trị $F_{crit} = 1,52$, chứng tỏ bản chất di truyền có ảnh hưởng đến việc tạo callus của từng giống lúa, có giống lúa có khả năng tạo callus cao (trên 85%) trái lại có giống lúa có khả năng tạo callus kém (dưới 30%) và sự khác nhau này là bản chất và có ý nghĩa thống kê. Khi xét sự tương tác đồng thời của yếu tố môi trường và bản chất di truyền lên khả năng hình thành callus của từng yếu tố. Với kết quả phân tích thu được $F_{mt-g} = 53,44 > F_{crit} = 1,39$, chứng tỏ khả năng hình thành callus cũng phụ thuộc vào sự tương tác giữa môi trường và giống.

Đi sâu chi tiết hơn cho thấy tập đoàn 31 giống lúa nương miền Bắc Việt Nam đều có khả năng hình thành callus trên các môi trường MS có bổ sung 2,4-D. Trên môi trường MS1 cho tỷ lệ tạo callus trung bình thấp nhất là 50,9%, trong đó có 16 giống có tỷ lệ tạo callus trên 50%, có 4 giống cho tỷ lệ tạo callus trên 60% là: giống 12 (78,7%), giống 20 (64,7%), giống 24 (71,7%) và giống 16 cho tỷ lệ tạo callus cao nhất 85%. Môi trường MS2 cho tỷ lệ tạo callus trung bình đạt 56,3%, có 23 giống cho tỷ lệ tạo callus trên 50% và có 10 giống cho tỷ lệ tạo callus trên 60%. Môi trường này, các giống tạo tỷ lệ callus cao nhất là giống số 5 (71,7%), giống 12 (75,3%), giống 16 (74,7%), giống 20 (76,3%), giống 24 (80%). Như

Bảng 2. Tỷ lệ tạo callus của 31 giống lúa khi sử dụng các môi trường với dải nồng độ 2,4-D từ 1,5mg/l đến 2,5mg/l

Giống	MS1		MS2		MS3	
	Trung bình	Phương sai	Trung bình	Phương sai	Trung bình	Phương sai
1	47,7	0,3	56,7	2,3	51,7	2,3
2	44,0	1,0	56,7	0,3	52,0	3,0
3	45,3	2,3	57,3	0,3	54,3	3,0
4	47,7	0,3	50,7	0,3	67,7	3,0
5	45,3	2,3	71,7	0,3	57,7	3,0
6	46,3	2,3	56,7	0,3	60,7	3,0
7	57,7	0,3	52,7	0,3	51,7	2,3
8	57,0	1,0	54,7	1,3	53,7	3,0
9	54,3	0,3	51,3	0,3	41,0	1,0
10	43,7	0,3	57,7	0,3	41,7	1,3
11	51,3	0,3	60,0	37,0	52,7	1,3
12	78,7	0,3	75,3	0,3	67,0	1,0
13	57,3	0,3	53,7	0,3	49,0	1,0
14	47,7	0,3	45,7	4,3	58,7	3,0
15	53,3	0,3	50,3	0,3	62,7	1,3
16	85,0	1,0	74,7	2,3	71,3	3,0
17	57,3	0,3	63,3	0,3	48,3	2,3
18	53,3	0,3	68,7	0,3	58,7	3,0
19	50,7	1,3	53,3	0,3	64,7	3,0
20	64,7	0,3	76,3	0,3	68,3	3,0
21	51,7	0,3	64,3	0,3	54,7	4,3
22	38,3	0,3	56,3	0,3	45,7	4,3
23	47,7	0,3	47,7	1,3	51,3	3,0
24	71,7	0,3	80,0	1,0	57,7	3,0
25	55,7	2,3	58,3	0,3	56,7	3,0
26	30,7	0,3	31,7	0,3	28,3	3,0
27	58,7	72,3	65,7	0,3	63,7	1,3
28	29,3	0,3	32,3	0,3	37,3	3,0
29	36,3	0,3	37,7	0,3	36,0	1,0
30	42,7	12,3	41,7	0,3	47,0	1,0
31	28,3	0,3	41,3	0,3	29,0	1,0

Bảng 3. Bảng phân tích ANOVA hai nhân tố 3 lần lặp lại với mức ý nghĩa $\alpha = 0,005$ theo chương trình Microsoft Excel (2007) về khả năng tạo callus của 31 giống lúa nương

Nguồn biến sai	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Môi trường	1346,24	2,00	673,12	316,16	1,45E-60	3,04
Giống	32362,62	30,00	1078,75	506,69	4,7E-162	1,52
Tương tác giữa môi trường và giống	6826,87	60,00	113,78	53,44	1,02E-90	1,39
Trong nhóm	396,00	186,00	2,13			
Tổng	40931,73	278,00				

vậy, môi trường MS2 là tối ưu nhất cho việc tạo callus từ phôi hạt của 31 giống lúa nương miền Bắc Việt Nam. Đây là bằng chứng cho kết luận có sự tác động qua lại giữa yếu tố môi trường và bản chất di truyền lên sự hình thành callus của các giống lúa khác nhau ở trên, điều này có nghĩa là với mỗi giống lúa cần có môi trường tối ưu cho sự hình thành callus của chúng.

Qua nghiên cứu này, sơ bộ cho thấy hầu hết các giống lúa trong thí nghiệm này (25/31 giống) có khả năng tạo callus tốt. Khả năng tạo callus của các giống này bị ảnh hưởng bởi cả yếu tố môi trường và yếu tố bản chất di truyền, hai yếu tố này tác động đồng thời lên khả năng tạo callus của các giống lúa tuy nhiên yếu tố môi trường (nồng độ 2,4D) có tác dụng rõ nét hơn. Qua khảo sát, 4 giống có tiềm năng tạo callus tốt nhất trên môi trường thích hợp là Kháu kè đề trạm (78,7%), Kháu công ton (85%), giống Kháu trạm hơm (tẻ thơm) (76,3%) và Kháu noon (80%) và môi trường thích hợp cho sự hình thành callus của các giống Kháu kè đề trạm và Kháu công ton là môi trường có bổ sung 1,5mg/l 2,4-D còn với 2 giống còn lại là môi trường có bổ sung 2mg/l 2,4-D.

3.2. Khả năng tái sinh cây từ callus của tập đoàn các giống lúa nương miền Bắc Việt Nam

Từ việc khảo sát khả năng tạo callus và có kết luận ban đầu, đã chọn ra 25 giống lúa (các kí hiệu từ 1 đến 22, giống 24, 25 và 27) có khả năng tạo callus tốt nhất trên môi trường thích hợp để tiến hành đánh giá khả năng tái sinh cây từ callus của tập đoàn lúa nương miền Bắc Việt Nam.

Tập đoàn 25 giống có khả năng tạo callus tốt nhất trên môi trường thích hợp này sau khi hình thành callus được tiếp tục nghiên cứu khả năng tái sinh trên các môi trường MS có bổ sung BAP, kinetine, casein. Kết quả thí nghiệm được trình bày ở bảng 4.

Kết quả phân tích ANOVA với mức ý nghĩa $\alpha = 0,005$ cho thấy khả năng tái sinh của 25 giống lúa trong thí nghiệm này đều bị ảnh hưởng bởi môi trường và giống (Bảng 5). Cụ thể, với yếu tố môi trường giá trị F trong nhóm là 837,19 lớn hơn rất nhiều so với giá trị $F_{crit} = 2,65$, chứng tỏ khả năng tái sinh của các giống lúa phụ thuộc vào môi trường. Tương tự, về việc ảnh hưởng của yếu tố giống lên khả năng tái sinh của các giống lúa, cũng cho thấy một sự khác biệt rất lớn giữa giá trị F và F_{crit} xấp xỉ 127 lần (lần lượt là 192,31 và 1,51). Khi phân tích ảnh hưởng đồng thời của yếu tố môi trường và yếu tố bản chất di truyền lên khả năng tái sinh của từng giống ta cũng nhận thấy giá trị F lớn hơn giá trị F_{crit} (lần lượt là 38,22 và 1,36), chứng tỏ khả năng tái sinh của các giống lúa bị ảnh hưởng bởi sự tương tác đồng thời giữa yếu tố môi trường và bản chất di truyền của chúng. Như vậy, khả năng tái sinh của mỗi giống lúa bị ảnh hưởng bởi yếu tố môi trường và bản chất di truyền của giống cũng như sự tác động đồng thời của 2 yếu tố này.

Ngoài ra, các giống lúa đều có khả năng tái sinh trên cả bốn loại môi trường, tuy nhiên tỷ lệ tái sinh lại khác nhau ở cùng một giống. Trên môi trường MS4, MS6 cho tỷ lệ tái sinh trung bình thấp nhất (43,0% và 43,2%). Hai môi trường MS5

Bảng 4. Tỷ lệ tái sinh của 25 giống lúa trên các môi trường tái sinh

Giống	MS4		MS5		MS6		MS7	
	Trung bình	Phương sai	Trung bình	Phương sai	Trung bình	Phương sai	Trung bình	Phương sai
1	47,3	4,3	54,0	12,0	44,7	0,3	52,3	0,3
2	35,7	4,3	46,0	1,0	42,0	1,0	51,3	1,3
3	25,0	25,0	37,7	6,3	22,3	4,3	31,7	2,3
4	47,3	4,3	55,0	1,0	31,3	2,3	45,3	0,3
5	43,7	10,3	70,3	4,3	55,7	0,3	67,7	0,3
6	39,0	103,0	45,7	0,3	34,3	1,3	50,3	2,3
7	48,7	10,3	58,3	2,3	47,0	7,0	65,0	1,0
8	25,3	25,3	54,7	2,3	38,3	1,3	56,3	1,3
9	61,7	4,3	48,3	4,3	37,0	1,0	66,3	1,3
10	30,7	2,3	60,3	0,3	42,7	4,3	66,0	3,0
11	43,0	9,0	58,0	1,0	44,3	1,3	53,3	4,3
12	45,0	19,0	67,0	7,0	47,3	0,3	62,7	0,3
13	17,3	4,3	33,3	0,3	26,3	2,3	47,0	1,0
14	48,7	2,3	60,0	1,0	38,0	3,0	51,7	2,3
15	33,0	7,0	47,3	0,3	43,3	2,3	43,3	0,3
16	34,3	1,3	70,3	1,3	58,3	1,3	67,7	0,3
17	56,3	4,3	63,7	2,3	46,0	1,0	40,3	1,3
18	53,3	2,3	70,3	0,3	57,3	1,3	49,3	20,3
19	33,3	4,3	47,0	1,0	31,3	0,3	36,3	1,3
20	62,3	4,3	75,3	17,3	53,7	0,3	72,3	4,3
21	49,0	1,0	65,0	1,0	54,3	1,3	34,7	0,3
22	36,7	2,3	57,3	1,3	44,0	4,0	53,7	0,3
24	50,3	4,3	53,7	1,3	45,3	2,3	65,3	6,3
25	56,3	4,3	66,3	1,3	47,7	0,3	58,0	1,0
27	52,3	10,3	67,7	0,3	48,3	0,3	40,0	13,0

và MS7, tỷ lệ tái sinh trung bình các giống lúa cao hơn (57,3% và 53,1%). Trong đó môi trường MS5 là môi trường MS có bổ sung 2mg/lBAP + 0,5mg/lkinetine + 0,7% aga + 3% saccharose + 0,1mg/lcasein cho tỷ lệ tái sinh trung bình cao nhất. Đặc biệt, các giống có tỷ lệ tái sinh cao nhất đều tập

trung trên môi trường này, có đến 11 giống có khả năng tái sinh trên 60%. Trong số 11 giống này, giống 20 có khả năng tái sinh đạt cao nhất (75,3%). Như vậy, trong 4 loại môi trường khảo sát, môi trường MS5 là môi trường thích hợp nhất cho tái sinh các giống lúa nương miền Bắc Việt Nam.

Bảng 5. Bảng phân tích ANOVA hai nhân tố 3 lần lặp lại với mức ý nghĩa $\alpha = 0,005$ theo chương trình Microsoft Excel (2007) khả năng tái sinh của 25 giống lúa nương

Nguồn biến sai	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Môi trường	11603,5	3	3867,8	837,19	7E-113	2,65
Giống	21324,2	24	888,5	192,32	2E-124	1,51
Tương tác giữa môi trường và giống	12713,3	72	176,6	38,22	3,1E-86	1,36
Trong nhóm	924,0	200	4,6			
Tổng	46565,0	299				

Xét riêng từng giống trên các loại môi trường khác nhau, tỷ lệ tái sinh trung bình của các giống cũng rất khác nhau. Cụ thể, giống 20 cho tỷ lệ tái sinh ở môi trường MS4 là 62,3%, môi trường MS6 là 53,7%, môi trường MS7 là 72,3%, tỷ lệ tái sinh cao nhất đạt 75,3% trên môi trường MS5. Ngoài ra, các giống số 5, 16, 18 cũng là các giống có khả năng tái sinh cao trên môi trường MS5 (cùng đạt tỷ lệ tái sinh 70,3%). Trên cơ sở đó, giống 20 (kháu trặm hòm) được chọn là giống có triển vọng để nghiên cứu tiếp khả năng tiếp nhận gen lạ.

3.3. Kết quả bước đầu về chuyển gen vào giống lúa tiềm năng Kháu trặm hòm

Để nghiên cứu khả năng tiếp nhận gen OsDREB2ACA, gen OsDREB2ACA được chuyển vào giống lúa Kháu trặm hòm thông qua *Agrobacterium* EHA105. Từ 100 hạt lúa giống Kháu trặm hòm, thu được 73 callus sau 10 ngày nuôi cấy. Sau 2 tuần trên môi trường chọn lọc lần 1 có 56 callus sống sót, được chuyển sang môi trường chọn lọc lần 2. Sau 2 tuần trên môi trường chọn lọc lần 2 thì còn 25 callus sống sót. Các callus này được chuyển sang môi trường tái sinh và sau khoảng 3 tuần trên môi trường tái sinh, thu được 2 callus có chồi xanh xuất hiện. Các chồi xanh sinh trưởng bình thường trên môi trường chứa hygromycin. Sau 2 tuần nuôi cấy trên môi trường tái sinh, các cây lúa non phát triển tốt được chuyển sang môi trường ra rễ. 10 ngày sau cây được chuyển sang các cốc đất và nuôi trong điều

kiện phòng nuôi cấy có phủ nilon trong 2 tuần, rồi tiếp tục được chuyển sang các xô to được trồng ở điều kiện ngoài môi trường.

4. KẾT LUẬN

Xác định được 25/31 giống có khả năng tạo callus cao nhất trên môi trường thích hợp, trong đó 4 giống có tiềm năng tạo callus tốt nhất là Kháu kê đề trặm (78,7%), Kháu công ton (85%), Kháu trặm hòm (76,3%) và Kháu noọng (80%). Môi trường thích hợp cho sự hình thành callus của các giống Kháu kê đề trặm và Kháu công ton là môi trường có bổ sung 1,5mg/l 2,4D. Trong lúc đó, đối với 2 giống còn lại là môi trường có bổ sung 2mg/l 2,4-D.

Khả năng tái sinh của tập đoàn lúa nương trên các môi trường khác nhau trong số 25 giống lúa có khả năng tạo callus tốt nhất trên môi trường MS có bổ sung 2mg/lBAP, 0,5mg/l kinetine và 0,1mg/l casein thích hợp nhất ở các giống IR78878-5-1-3-3 (70,3%), Kháu công ton (70,3%), Kháu tói (70,3%), Kháu trặm hòm (75,3%).

Khả năng tạo callus và tái sinh cây của các giống lúa bị ảnh hưởng bởi yếu tố môi trường và di truyền, hai yếu tố này có sự tương tác làm ảnh hưởng các khả năng trên ở các giống lúa khác nhau.

Bước đầu đã chuyển thành công gen OsDREB2ACA vào giống Kháu trặm hòm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bartels D. and R. Sunkars (2005). "Drought and salt tolerance in plant". Critical review in plant science, 24, pp. 23-58.
- Cheng M. Fry J.E., S. Pang, I. Zhou, T.W.L. Conner, Y. Wang (1992). "Genetic transformation of the wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*". Plant. Physiol, 115, pp. 971-980.
- Chu Văn Mẫn (2003). Ứng dụng tin học trong sinh học. Nhà xuất bản Đại học Quốc gia Hà Nội.
- Hiei Y., T. Komari and T. Komari (1994). "Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and sequence analysis of the boundaries of the DNA". Plant Journal, 6, pp. 271-282.
- Hsieh T.H., J.T. Lee, P.T. Yang, L.H. Chiu, Y.Y. Charn, Y.C. Wang and M.T. Chan (2002). "Tomato plants ectopically expressing Arabidopsis CBF1 show enhanced resistance to water deficit stress". Plant Physiol, 129, pp.1086-1094 .
- James C. (2005). "Global status of commercialized biotech/MG crops". ISAAA Briefs 34. ISAAA: Ithaca, NY.
- Murashige T. and F. Skoog (1962). "A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures". Physiol. Plant, 15, pp. 473-497.
- Trung tâm tài nguyên di truyền thực vật. Giới thiệu nguồn gen giống lúa nương phục vụ bảo tồn in-situ (2003).