

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU TÁI SINH CÂY BÔNG THÔNG QUA PHÔI SOMA

Trịnh Minh Hợp, Nguyễn Thị Nhã*, Nguyễn Thị Dung*, Bùi Thùy Linh*,
Đặng Minh Tâm*, Lê Quang Quyền*, Lê Trần Bình***

Results on studying plant regeneration via somatic embryogenesis in cotton

(Summary)

Three cotton cultivars (*Gossypium hirsutum* L.) SSR60, Coker310 and Coker312 were studied for ability of regeneration via somatic embryogenesis. Callus was induced from hypocotyl explants on MSB (MS basal salt with B5 vitamins) medium containing 2,4-D and kinetin. The optimal 2,4-D and kinetin concentrations for callus induction were 0.1 mg/L. Hormone-free MSB medium promoted the proliferation of embryogenic callus. The best medium for the differentiation, maturation and germination of somatic embryos was MSB with 1.9 g/L KNO₃, MSB supplemented with 1.0 g/L glutamine and 0.5 g/L asparagine and 1/2 MSB, respectively. An efficient protocol for the production of high frequency somatic embryogenesis and plant regeneration of three cotton varieties has been developed. Completed plant could be regenerated through somatic embryogenesis from hypocotyl explants in 8 months.

I - ĐẶT VẤN ĐỀ

Bông là cây trồng kinh tế và lấy sợi tự nhiên trên thế giới và Việt Nam. Tuy nhiên, cây bông dễ bị tổn hại bởi các yếu tố vô sinh (hạn, mặn...) và hữu sinh (sâu, bệnh hại...). Mặc dù, phương pháp chọn giống truyền thống đã cải tiến được một số đặc tính nông học của cây bông, nhưng do thiếu nguồn đa dạng di truyền nên kết quả thu được còn hạn chế. Các kỹ thuật chuyển gen là phương pháp mới và rất hiệu quả để tạo tính đa dạng di truyền thông qua việc chuyển và biểu hiện của gen lạ tồn tại ở loài khác [6]. Hiện nay, để chuyển gen vào cây bông, người ta sử dụng cả 2 phương pháp gián tiếp thông qua vi khuẩn *Agrobacterium* và bắn gen [7]. Song cả hai phương pháp này đều phụ thuộc vào hệ thống tái sinh cây từ mô sẹo [6, 7]. Tái sinh cây bông thông qua phôi soma được xem là khó khăn so với một số cây trồng khác, vì thời gian tái sinh dài, tỷ lệ tái sinh thấp và bị giới hạn bởi kiểu gen bông [1, 8, 9]. Nhằm phục vụ nghiên cứu chuyển gen vào cây bông trong nước, trong 2 năm 2004 và 2005, tại Phòng Công nghệ Sinh học, Viện Nghiên cứu và Phát triển cây bông, chúng tôi tiến hành nghiên cứu tái sinh cho một số giống bông thông qua phôi soma.

* Viện Nghiên cứu và Phát triển cây bông

** Viện Công nghệ Sinh học.

II - NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Vật liệu nghiên cứu: Giống bông tham gia nghiên cứu gồm SSR60, Coker310 và Coker312. Đây là những giống bông nhập nội và đã được thuần hóa trong điều kiện Việt Nam. Hoá chất cần thiết gồm các muối đa và vi lượng của môi trường MS [5], vitamin B5 [3], hormon sinh trưởng (2,4-D và kinetin)...

2. Nội dung và phương pháp nghiên cứu: (+) Nội dung nghiên cứu: Khử trùng - gieo hạt tạo cây bông con vô trùng; cảm ứng mô sẹo; nhân mô sẹo; cảm ứng phân hoá phôi; phát triển và chín phôi; nảy mầm - tái sinh cây; huấn luyện và trồng cây tái sinh. (+) Phương pháp nghiên cứu: Các nội dung nghiên cứu được tiến hành theo Trolinder N., & cs (1988, 1989) [8, 9], R. Kumrma & cs (2003) [6], và B. Chaudhary & cs (2003) [1].

III - KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Khử trùng - gieo hạt tạo cây bông con vô trùng: Với mục đích tạo ra cây bông con to khỏe và vô trùng để làm nguyên liệu tái sinh, 2 phương pháp khử trùng và gieo hạt được thử nghiệm (bảng 1). Kết quả cho thấy, cả 2 phương pháp đều tạo được cây vô trùng, nhưng chất lượng cây có khác nhau. Phương pháp 1 cho cây có chất lượng kém (cây sinh trưởng kém, thân mảnh và lá mầm bị trầy xước). Phương pháp 2 cho cây có chất lượng tốt,

sau 7 ngày nuôi trên môi trường 1/2MSB (1/2MS + 1/2B5 + 20 g/l sucrose + 2,5 g/l gelrite, pH=6,0) đã thu được cây bông con cao 8 -10 cm, đường kính thân 2 -3 mm, màu xanh nhạt và hoàn toàn vô trùng, đủ tiêu chuẩn làm vật liệu cảm ứng mô sẹo (ảnh 1).

Bảng 1. Chất lượng cây bông con ở các phương pháp khử trùng khác nhau

Phương pháp	% nhiễm	Ngoại hình
1- Bóc vỏ hạt, khử trùng bằng cồn 70% trong 2 phút, bằng HgCl ₂ 0,1% trong 5 phút	0	Cây sinh trưởng kém, lá trắng xước
2- Đốt lông áo bằng H ₂ SO ₄ đậm đặc, khử trùng bằng cồn 70% trong 2 phút, bằng HgCl ₂ 0,1% trong 7 phút, ngâm hạt 12 giờ và tách vỏ hạt	0	Cây phát triển tốt

2. Cảm ứng mô sẹo: Để cảm ứng mô sẹo bông, các nghiên cứu trên thế giới thường sử dụng môi trường MSB (MS + B5 + 30 g/l glucose + 2,5 g/l gelrite, pH=5,8) bổ sung các tổ hợp hormon 2,4-D và kinetin [1, 6, 8, 9], NAA và kinetin [4], zeatin [2]... Trong đó, tổ hợp 2,4-D và

Bảng 2. Tỷ lệ (%) và mức độ cảm ứng mô sẹo sau 4 tuần trên môi trường MST

Công thức	Hormon (mg/l)		SSR60		Coker310		Coker312	
	2,4D	Kinetin	Tỷ lệ	Mức độ	Tỷ lệ	Mức độ	Tỷ lệ	Mức độ
MST1	0,05	0,1	100	+++	100	+	100	++++
MST2	0,05	0,3	100	++	100	+	100	+++
MST3	0,05	0,5	100	+	100	+	100	++
MST4	0,10	0,1	100	+++++	100	++++	100	+++++
MST5	0,10	0,3	100	++++	100	++++	100	+++++
MST6	0,10	0,5	100	++++	100	++++	100	+++++
MST7	0,30	0,1	100	+++++	100	++++	100	++++
MST8	0,30	0,3	100	+++++	100	++++	100	++++
MST9	0,30	0,5	100	++++	100	++++	100	++++

kinetin được sử dụng phổ biến hơn cả, nên chúng tôi sử dụng tổ hợp này để nghiên cứu. Kết quả sau 4 tuần nuôi cho thấy, tất cả các đoạn thân ở các công thức đều cảm

Bảng 3. Mức độ lớn lên của các mô sẹo sau 8 tuần trên môi trường nhân mô sẹo

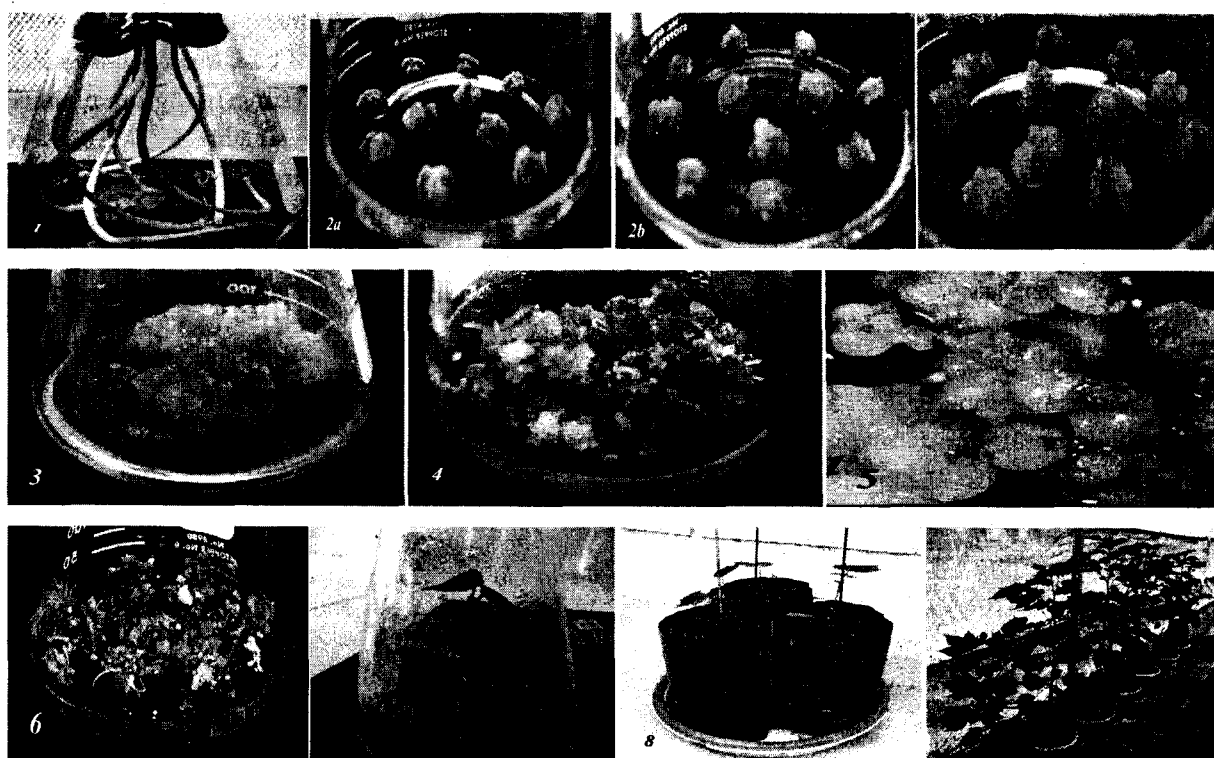
Công thức	Giống		
	SSR60	Coker 310	Coker312
MST1	++	++	++++
MST2	+	++	++++
MST3	+	++	++++
MST4	++++	+++++	+++++
MST5	++++	+++++	+++++
MST6	++++	+++++	+++++
MST7	++	+++++	++
MST8	++	++++	++
MST9	++	++++	++

ứng mô sẹo với tỷ lệ 100%. Tuy nhiên, giữa các giống và công thức khác nhau có mức độ cảm ứng mô sẹo khác nhau, tùy thuộc vào nồng độ 2,4-D (bảng 2). Cụ thể, ở 2 giống SSR60 và Coker310, các nồng độ 0,1 và 0,3 mg/l có mức độ cảm ứng cao hơn nồng độ 0,05 mg/l; còn ở

giống Coker312, nồng độ 0,1 mg/l có mức độ cảm ứng mô sẹo cao nhất và cao hơn các nồng độ 0,05 và 0,3 mg/l. Trong cùng một nồng độ 2,4-D, khi nồng độ kinetin thay đổi không có sự khác nhau về mức độ cảm ứng mô sẹo. Về màu sắc mô sẹo cảm ứng, ở nồng độ 2,4-D 0,05 mg/l thường có màu xanh hoặc trắng (ảnh 2a), nồng độ 0,3 mg/l thường có màu nâu (ảnh 2b), còn ở nồng độ 2,4-D 0,1 mg/l thường có màu vàng nhạt hơi xanh hoặc màu kem (ảnh 2c). Mô sẹo màu xanh và trắng thường cứng, màu nâu thì ướt. Các dạng mô sẹo này thường chậm lớn, không có khả năng tái sinh và bị loại bỏ ở các lần cấy chuyển sau. Qua đánh giá tỷ lệ, mức độ và màu sắc của mô sẹo cảm ứng, nhận thấy, nồng độ 2,4-D 0,1 mg/l và kinetin 0,1-0,5 mg/l thích hợp cho cảm ứng mô sẹo bông.

3. Nhân mô sẹo: Mô sẹo soma sau khi cảm ứng mô sẹo cần được nhân lên đủ số lượng và kích thước trước khi bước vào cảm ứng phân hoá phôi. Để nhân mô sẹo bông, hầu hết các nghiên cứu trên thế giới đều sử dụng môi trường MSB không có hormon [1, 6, 8, 9]. Sở dĩ như vậy là do mô sẹo sau khi được cảm ứng bằng 2,4-D và kinetin vẫn còn chứa đủ lượng hormon giúp cho nó nhân lên. Trong nghiên cứu này, chúng tôi cũng sử dụng môi trường MSB để nhân mô sẹo soma. Kết quả sau 8 tuần nuôi (1 lần cấy chuyển), các mô sẹo ở các công thức MST4, MST5 và MST6 trên cả 3 giống đều lớn lên nhanh; ở các công thức còn lại, mức độ lớn lên chậm hơn (bảng 3). Về màu sắc mô sẹo, ở giai đoạn này, mô sẹo thường mềm và hơi ướt, có màu vàng nhạt, vàng xanh và kem, mô sẹo tiếp tục lớn nhanh (ảnh 3). Một số mô sẹo chuyển hoá thành màu trắng và xanh (cứng) hoặc nâu (ướt). Các mô sẹo này thường chậm lớn và bị loại bỏ ở các lần cấy chuyển.

4. Cảm ứng phân hoá phôi: Mô sẹo sau khi có đủ số lượng và kích thước sẽ được cảm ứng phân hóa thành phôi. Để cảm ứng phân hóa phôi bông, các tác giả trên thế giới thường sử dụng môi trường MSB bổ sung KNO₃ [1, 6, 8, 9] hoặc than hoạt tính [2]... Trong thí nghiệm này, chúng tôi sử dụng môi trường MSB có bổ sung 1,9 g/l



Ghi chú: Ảnh 1. Cây bông con; 2. Mô sẹo cảm ứng - cảm ứng ở nồng độ 2,4-D 0,05 mg/l (2a), 0,3mg/l (2b) và 0,1 mg/l (2c); 3. Mô sẹo nhân; 4. Phôi cảm ứng; 5. Phôi chín; 6. Phôi nảy mầm; 7. Cây tái sinh trong ống nghiệm; 8. Cây tái sinh trồng trong nhà kính; 9. Cây tái sinh trồng trong nhà.

KNO₃. Kết quả sau 8 tuần (1 lần cấy chuyển) nuôi trên môi trường này cho thấy, các mô sẹo đã phân hóa thành tiền phôi bông (phôi bông chưa chín), với tỷ lệ 30 - 100%. Trong đó, giống Coker310 có tỷ lệ hoá phôi cao nhất (85-100%), tiếp đến là giống Coker312 (52-87%) và kém nhất là giống SSR60 (30-61%). Trên cả 3 giống, các công thức MST4, MST5 và MST6 đều có tỷ lệ phân hoá phôi cao hơn các công thức còn lại. Về màu sắc tiền phôi bông, qua đánh giá chúng tôi nhận thấy có các màu kem, kem vàng và vàng nhạt. Tiền phôi có dạng viên tròn, tơi xốp và rời rạc nhau (ảnh 4).

Bảng 4. Tỷ lệ phân hoá phôi (%) sau 8 tuần trên môi trường cảm ứng phân hoá phôi

Giống SSR60		Giống Coker310		Giống Coker312	
Công thức	Tỷ lệ	Công thức	Tỷ lệ	Công thức	Tỷ lệ
MST4	57	MST4	100	MST1	73
MST5	61	MST5	100	MST2	66
MST6	48	MST6	100	MST3	52
MST7	38	MST7	100	MST4	87
MST8	30	MST8	85	MST5	72
MST9	33	MST9	85	MST6	75

5. Phát triển - chín phôi: Sau 6 tuần nuôi trên môi trường cảm ứng phôi, tiền phôi bông được phân tách và cấy chuyển lên môi trường phát triển phôi (MSB bổ sung

1g/l glutamine và 0,5 g/l asparagine) để phát triển thành phôi bông chín. Qua đánh giá chúng tôi thấy, hầu hết tiền phôi bông đã thành phôi bông chín. Phôi bông chín có hình quả thủy lôi và thường có màu vàng nhạt hoặc vàng xanh (ảnh 5).

Bảng 5. Tỷ lệ cây tái sinh (%) phát triển bình thường trên môi trường nảy mầm - tái sinh cây

Giống	Tỷ lệ
1- SSR60	29
2- Coker310	33
3- Coker312	44
Trung bình	37

6. Nảy mầm - tái sinh cây: Sau khi phôi bông chín, chúng được cấy chuyển lên môi trường nảy mầm và tái sinh cây - MSB. Kết quả sau khoảng 3-4 tuần, chúng bắt đầu nảy mầm thành mầm cây (ảnh 6). Những mầm cây được thu hoạch và cấy chuyển lên môi trường MSB để cho tiếp tục phát triển thành cây hoàn chỉnh có rễ, thân và lá thật (ảnh 7).

Tái sinh cây bông thường khó khăn ở giai đoạn nảy mầm - tái sinh cây, vì ở giai đoạn này thường có tỷ lệ nảy mầm và tỷ lệ cây phát triển bình thường rất thấp, cây dị hình thường có tỷ lệ cao. Số liệu trong bảng 5 cho thấy, tỷ

Bảng 6. Tỷ lệ cây bông sống (%) trong nhà kính sau 3 tuần

Phương pháp ra cây	Tỷ lệ sống
1- Không làm quen môi trường, chuyển ra trồng trực tiếp vào bầu (khử trùng ướt)	0
2- Làm quen môi trường 1 ngày, chuyển ra trồng bầu cát (khử trùng ướt) không phủ nilon	0
3- Làm quen môi trường 1 ngày, chuyển ra trồng bầu cát (khử trùng ướt) phủ nilon 1 tuần	67
4- Làm quen môi trường 1 ngày, chuyển ra trồng bầu cát (khử trùng khô và ướt) phủ nilon 1 tuần	100

lệ cây phát triển trung bình là 37%, sở dĩ có hiện tượng này có thể cây bông rất mẫn cảm với các hormon sinh trưởng, nên khi nuôi cấy trong điều kiện in-vitro thường phát sinh các biến dị soma.

7. Huấn luyện và trồng cây tái sinh: Nhằm xây dựng phương pháp ra cây tái sinh đạt tỷ lệ sống cao nhất, chúng tôi đã tiến hành thử nghiệm 4 phương pháp làm quen và ra cây khác nhau (bảng 6). Kết quả sau 3 tuần, ở các phương pháp ra cây 1 và 2, cây bông tái sinh đều bị chết; phương pháp ra cây 3 có tỷ lệ sống 67%; trong khi đó, phương pháp ra cây thứ 4 có tỷ lệ cây sống 100%. Kết quả này cho thấy, việc cho cây làm quen môi trường, khử trùng đất làm bầu triệt để và bao phủ nilon cho cây trong tuần là rất cần thiết. Sau 3 tuần trồng trong nhà kính, khi cây tái sinh ra thêm 2-3 lá thì chuyển cây ra trồng và chăm sóc trong bầu đất trong nhà lưới. Kết quả theo dõi cho thấy, các cây này sống hoàn toàn với tỷ lệ 100% và đã ra hoa và kết quả bình thường (ảnh 8).

IV - KẾT LUẬN

Qua nghiên cứu đã tái sinh thành công 3 giống bông SSR60, Coker310 và Coker312 thông qua tạo phôi soma với tỷ lệ tạo phôi 33-61% (SSR60), 85-100% (Coker310) và 52-87% (Coker312). Xác định các môi trường tái sinh thích hợp, bao gồm cảm ứng mô sẹo (MSB bổ sung 0,1

mg/12,4-D và 0,1 mg/1 kinetin), nhân mô sẹo (MSB), cảm ứng phân hóa phôi (MSB bổ sung 1,9 g/l KNO₃), phát triển - chín phôi (MSB bổ sung 1g/l glutamine và 0,5 g/l asparagine), nảy mầm - tái sinh cây (MSB) và phương pháp làm quen - ra cây trong nhà kính (làm quen môi trường 1 ngày, chuyển ra trồng bầu cát được khử trùng khô - ướt, phủ nilon 1 tuần). Xây dựng được quy trình tái sinh cho 3 giống SSR60, Coker310 và Coker312 với thời gian từ 9 đến 10 tháng. □

TÀI LIỆU THAM KHẢO

(1) B. Chaudhary, S. Kuma, K. V. S. K. Prasad, G. S. Oinam, P. K. Burma, D. Pental (2003). Slow desiccation leads to high-frequency shoot recovery from transformed somatic embryos of cotton (*Gossypium hirsutum* L. cv. Coker310FR). *Plant Cell Rep* (2003) 21: 955-960. (2) Bao Hong Zhang, Rong Feng, Feng Liu and Qinglian Wang (2001). High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration of an elite Chinese cotton variety. *Bot. Bull. Sin.* (2001) 42: 6-16. (3) Gamborg, O. L., A. R. Millar and K. Ojima (1968). Nutrient requirement of suspension culture of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50, 151-158. (4) Hamidow F. Sakhanokho, Allan Zif, Kaniah Rajassekaran, Sukumar Sha and Govind C. Sharma (2001). Introduction highly embryogenic calli and plant regeneration in Upland (*Gossypium hirsutum* L.). and Pima (*Gossypium barbadense* L.). cottons. *Published in Crop Sci.* 41: 1235-1240 (2001). (5) Murashige, T., and F. Skoog (1962). A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15 473-497. (6) R. Kumria, V. G. Sunnichan, D. K. Das, S. K. Gupta, V. S. Reddy, R. K. Bhatnagar, S. Leelavathi (2003). High frequency somatic-embryo production and maturation in to normal plants in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) through metabolic tress. *Plant Cell Rep.* (2003) 21: 635-639. (7) Thea A. Wilkins, Kanniah Rajasekaran and David M. Anderson (2000). Cotton Biotechnology. *Critical Review in Plant Sciences*, 19 (6): 511-550 (2000). (8) Trolinder N., and C. Xhixian (1989). Genotype specificity of the somatic embryogenesis response on cotton. *Plant Cell Rep.* 8: 133-136. (9) Trolinder, N. and N.J. Goodin (1988). Somatic embryogenesis and plant regeneration in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Plant Cell Rep.* 8: 133-136.

NGHIÊN CỨU ẢNH HƯỞNG...

(Tiếp theo trang 82)

Tóm lại, với kết quả nghiên cứu đạt được, chúng ta có cơ sở để lựa chọn máy laser cũng như chế độ công nghệ phù hợp với khắc gỗ ứng dụng cho khâu khắc nền trong công nghệ mộc truyền thống. Gia công khắc nền các hình hoa văn trên gỗ bằng máy laser điều khiển tự động thuận lợi và kết quả gia công rất chính xác, năng suất và chất lượng cao. □

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Halliday, D., Resnick, R., Walker, J. Cơ sở vật lý. Tập 6 : Quang học và vật lý lượng tử. Nhà xuất bản giáo dục, Hà Nội, 1998. Nguy Hữu Tâm.2003. Những ứng dụng mới nhất của Laser. Nhà Xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội. Nguyễn Đắc lộc.2002. Điều khiển số & công nghệ trên máy điều khiển số CNC. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội. Vamos Robert. Lézerek alkalmazási lehetőségei a Faiparban. *Tạp chí Faipar*, 1982. số 1, trang 21-31. 5. Võ Thành Minh. 2004. Nghiên cứu chuyên đề nghiên cứu sinh: Tổng quan về laser và khả năng ứng dụng trong gia công cắt gọt gỗ. Viện khoa học Lâm nghiệp Việt Nam. Hà Nội. 6. Garmire, E. Ứng dụng của laser. Tiểu luận. Đại học Nam California(Phan Văn Thích dịch).