

## TẠO CÂY CẢI ĐÔNG DƯ (*Brassica juncea*) ĐƠN BỘI *IN VITRO* BẰNG NUÔI CẤY BAO PHẦN

Nguyễn Thanh Hải<sup>\*</sup>, Đặng Thị Thanh Tâm

*Khoa Công nghệ Sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam*

*Email<sup>\*</sup>: nthaicnsh@vnua.edu.vn*

Ngày gửi bài: 13.10.2014

Ngày chấp nhận: 22.07.2015

### TÓM TẮT

Tạo cây đơn bội *in vitro* dựa trên cơ sở sinh sản đơn tính đực là sử dụng hạt phấn (tiểu bào tử tách rời) hay các bao phấn có chứa các hạt phấn đơn nhân trên môi trường dinh dưỡng nhân tạo để kích thích các hạt phấn phát triển thành cây hoàn chỉnh mà không thông qua sự thụ tinh. Nuôi cấy bao phấn, hạt phấn có rất nhiều ứng dụng trong thực tế như tạo các dòng cây đơn bội, chọn lọc đột biến, chuyển gen và nghiên cứu quá trình tạo phôi vô tính. Bài báo trình bày những kết quả nghiên cứu về nuôi cấy bao phấn có chứa các hạt phấn đơn nhân của giống cải Đông dư truyền thống nhằm tạo dòng đơn bội (5 dòng cải đơn bội). Kết quả nghiên cứu chỉ ra nền môi trường cũng như nồng độ, tỷ lệ các chất điều tiết sinh trưởng có ảnh hưởng đến sự sinh sản đơn tính đực của bao phấn hạt phấn. Nền môi trường B5 là nền môi trường thích hợp nhất cho việc nuôi cấy. Khả năng hình thành phôi vô tính cao nhất (2,33%) trong môi trường B5 có bổ sung 0,5 mg/l  $\alpha$ -NAA, 1 mg/l Kinetin, 10% đường và 8 g/l agar. Phôi vô tính có thể tạo cây hoàn chỉnh trong môi trường MS có bổ sung 0,5 mg/l IAA, 0,5 mg/l BA, 3% đường và 8 g/l agar. Chồi đỉnh của cây tái sinh từ phôi vô tính có khả năng nhân nhanh tốt nhất khi sử dụng môi trường MS có bổ sung 1 mg/l BA với hệ số nhân đạt 3,94 sau 4 tuần nuôi cấy. Môi trường MS có bổ sung 0,5 mg/l  $\alpha$ -NAA là môi trường thích hợp cho việc tạo rễ cho chồi đạt trung bình 6,54 rễ/chồi, độ dài trung bình là 3,68cm sau 3 tuần nuôi cấy.

Từ khóa: Bao phấn, *Brassica juncea*, dòng đơn bội, Đông dư, hạt phấn, sinh sản đơn tính đực, tạo phôi.

### ***In Vitro* Haploid Production by Anther Culture of Dong Du Mustard (*Brassica juncea*)**

#### ABSTRACT

Androgenesis is a phenomenon in which microspores are made to bypass the sexual pathway and follow the sporophytic mode of development to generate new plants without the intervention of fertilization under *in vitro* conditions. Microspore culture provides an ideal system, with a large, relatively uniform population of haploid cells, for use mutant selection, genetic transformation and in studies on the molecular mechanism of induction of androgenesis and embryogenesis. This paper aimed at establishing a protocol for anther microspore embryogenesis in traditional variety of *Brassica juncea* (Dong Du mustard). Five haploid lines was created from anther microspore culture. The results showed that, medium and plant growth regulator concentration had a pronounced effect on androgenic response in anther microspore cultures of *Brassica juncea* (Dong Du mustard). The medium B5 is the most suitable for morphogenesis of anther microspores culture. The highest percent of embryogenesis (2,33%) was obtained B5 medium supplemented with  $\alpha$ -NAA 0,5 mg/l and Kinetin 1 mg/l. MS medium supplemented with IAA 0,5 mg/l, BA 0,5 mg/l, 3% sugar and 8 g / l agar was capable of regenerating seedling from embryos. MS medium supplemented with 1,0 mg/l BA was optimal for shoot multiplication with a rate of 3.94 after four weeks. MS medium with 0,5 mg/l  $\alpha$ -NAA was appropriate for root induction in terms of root number per shoot (6.54 root/shoot) and average length of root (3.68 cm) after three weeks.

Keywords: Androgenesis, anther microspore culture, *Brassica juncea*, Dong du mustard, embryogenesis, haploid line.

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Tạo cây đơn bội *in vitro* dựa trên cơ sở sinh sản đơn tính đực là sử dụng hạt phấn (tiểu bào tử tách rời) hay các bao phấn có chứa các hạt phấn đơn nhân trên môi trường dinh dưỡng nhân tạo để kích thích các hạt phấn phát triển thành cây hoàn chỉnh mà không có sự thụ tinh. Các dạng đồng hợp tử tuyệt đối thông qua lưỡng bội hóa thể đơn bội là nguồn vật liệu có giá trị cao trong việc chọn giống (Vũ Đình Hòa và cs., 2005; Nguyễn Quang Thạch và cs., 2005; Ibrokhim, 2012). Theo quyết định số 4924/QĐ-UBND ngày 24/09/2014 của Ủy ban Nhân dân thành phố Hà Nội, cải Đông dư là một trong số những nguồn gen quý, đặc sản có giá trị kinh tế cao cần được bảo tồn và phát triển.

Có nhiều yếu tố ảnh hưởng đến sự phát sinh phôi vô tính từ hạt phấn đối với các cây họ cải, như kiểu gen cây cho hạt phấn, cách lấy bao phấn, cách tách hạt phấn, cách tiền xử lý trước khi nuôi cấy, giai đoạn phát triển của hạt phấn và thành phần dinh dưỡng của môi trường nuôi cấy (Muravlev, 2007; Touraev et al., 2009). Thomas và Wenzel (1975) là tác giả đầu tiên thu nhận được dòng cải đơn bội (dòng 307 - Rosenhof) từ nuôi cấy bao phấn thông qua sự hình thành phôi vô tính. Tỷ lệ hình thành phôi vô tính chỉ đạt 1% trong môi trường MS không bổ sung chất điều tiết sinh trưởng. Môi trường B5 được sử dụng để tái sinh cây từ phôi vô tính,  $\alpha$ -NAA ở nồng độ 0,2 mg/l được dùng để tạo rễ cho chồi. Tỷ lệ hình thành phôi vô tính không chỉ phụ thuộc vào kiểu gen cây cho hạt phấn (Thurling, 1984) mà còn phụ thuộc vào quá trình tiền xử lý cây trước khi nuôi cấy. Theo Domblides (2002), chỉ có 8/45 giống cây họ cải sử dụng trong nghiên cứu có khả năng tái sinh phôi từ nuôi cấy bao phấn. Xử lý cây cho hạt phấn trong giai đoạn ra hoa ở nhiệt độ 32,5°C kéo dài 24h có tác dụng làm tăng tỷ lệ hình thành phôi khi nuôi cấy (Telmer, 1995). Hạt phấn đang ở giai đoạn cuối một nhân là tốt nhất để hình thành phôi vô tính (Davydova, 2008). Thành phần dinh dưỡng là một trong những yếu tố ảnh hưởng đến quá trình hình thành phôi vô tính (Kalashnikova et al., 2012). B5 là nền môi trường tốt nhất khi nuôi cấy bao phấn các cây họ cải *Brassica* (Kuginuki et al., 1997; Phippen,

Ockendon, 1990). Ngược lại, một số công bố cho thấy nền môi trường MS hay NLN là tối ưu (Gland, 1995; Deepak et al., 2008; Ferrie and Caswell, 2011; Wan et al., 2011). Ở Việt Nam, theo những tài liệu có thể tiếp cận được của nhóm nghiên cứu, chưa có công bố chính thức nào về lĩnh vực tạo cây đơn bội họ cải nói chung và cải Đông dư nói riêng. Nghiên cứu này với mục đích lựa chọn nền môi trường, hàm lượng chất điều tiết sinh trưởng để tạo phôi vô tính từ bao phấn, hạt phấn và các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình nhân nhanh cây tái sinh từ phôi vô tính nhằm tạo các dòng cây cải Đông dư (*Brassica juncea*) *in vitro*.

## 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### 2.1. Vật liệu

Nụ hoa của giống cải Đông Dư (hạt giống thu thập từ Văn Lâm - Hưng Yên) được trồng tại nhà lưới Bộ môn Công nghệ Sinh học Thực vật, Khoa Công nghệ Sinh Học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam. Mô cấy là bao phấn của nụ hoa trên chùm chính có kích thước 0,40 - 0,45cm mang hạt phấn đa số ở giai đoạn cuối một nhân.

### 2.2. Phương pháp

Các thí nghiệm sử dụng phương pháp nuôi cấy mô tế bào thực vật. Môi trường sử dụng trong nghiên cứu là MS (Murashige and Skoog, 1962), Gamborg (B5) (Gamborg, 1968), NLN (N6) (Lichter, 1989) tùy từng giai đoạn nghiên cứu có bổ sung các chất điều tiết sinh trưởng có nồng độ khác nhau (Bảng 1). Thí nghiệm được tiến hành tại phòng nuôi có nhiệt độ 22 - 25°C, cường độ chiếu sáng 2000 lux, thời gian chiếu sáng 16 h/ngày. Bao phấn vô trùng được thu nhận theo phương pháp sau: Nụ hoa được ngâm trong cồn 70% 30 giây, tiến hành khử trùng bằng NaOCl nồng độ 10% trong 8 phút, rửa lại bằng nước cất vô trùng 5 lần. Nụ hoa được thấm khô trên giấy thấm vô trùng, tách lấy bao phấn đưa vào môi trường nuôi cấy. Độ bội của cây tái sinh từ bao phấn được xác định thông qua đo hàm lượng ADN bằng máy Flow cytometry, sử dụng cây nhị bội (cây cho hạt phấn) làm đối chứng, theo quy trình của Ollitrault và Michaux Ferriere (1992).

**Bảng 1. Thành phần môi trường trong các giai đoạn thí nghiệm**

Giai đoạn	Vật liệu ban đầu	Thành phần môi trường	Chỉ tiêu theo dõi
1	Bao phẩn	MS/B5/N6 + 10% đường + 1 mg/l α-NAA (Kalashnikova et al., 2012)	Tỷ lệ tạo callus, tỷ lệ tạo phôi sau 4 tuần nuôi cấy
2	Bao phẩn	B5 + 10% đường + α-NAA/2,4D (0,5 mg/l; 1 mg/l) + BA/Kinetin (0,5 mg/l; 1,0 mg/l và 2,0 mg/l)	Tỷ lệ tạo callus, tỷ lệ tạo phôi sau 4 tuần nuôi cấy
3	Phôi vô tính	MS + 2% đường + 0,5mg/l BA + 0,5mg/l IAA (Mai, 2010).	Tỷ lệ tái sinh cây hoàn chỉnh
4	Chồi đỉnh và trụ dưới lá mầm của cây tái sinh từ phôi vô tính	MS + 3% đường + Kinetin/BA (0,5mg/l; 1,0 mg/l; 1,5mg/l)	Hệ số nhân, số lá trung bình, chiều cao trung bình sau 4 tuần nuôi cấy
5	Chồi có chiều cao 1,5 - 1,6cm được tách ra từ cụm chồi.	MS + 3% đường + α-NAA (0,25 mg/l; 0,5 mg/l; 1,0 mg/l)	Tỷ lệ tạo rễ, số rễ trung bình, chiều dài rễ trung bình, ngày phát sinh rễ sau 3 tuần nuôi cấy

Ghi chú: 1 - Lựa chọn nền môi trường; 2- Lựa chọn tỷ lệ và hàm lượng các chất điều tiết sinh trưởng để tạo phôi vô tính; 3- Tạo cây hoàn chỉnh từ phôi vô tính; 4- Nhân nhanh cây tái sinh từ phôi; 5- Ra rễ cho chồi.

### 2.3. Bố trí thí nghiệm và xử lý số liệu

Các công thức thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên, mỗi công thức thí nghiệm tiến hành 3 lần nhắc lại, một lần nhắc lại 30 bình, mỗi bình cấy 5 mẫu. Số liệu được xử lý thống kê sinh học bằng phần mềm IRRISTAT 4.0 và Excel 2007.

## 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1. Ảnh hưởng của nền môi trường đến sự phát sinh hình thái mẫu cấy

Cả 3 nền môi trường đều có khả năng hình thành callus với tỷ lệ dao động từ 12,33 - 30,70% (Bảng 2). Tỷ lệ hình thành callus khi sử dụng nền môi trường B5 cao gấp hai lần (đạt 30,7%) so với nền môi trường MS và N6.

Trong 3 nền môi trường, duy nhất B5 có khả năng hình thành phôi vô tính, nhưng tỷ lệ hình thành phôi rất thấp. Kết quả của chúng tôi phù hợp với một số công bố khác cho rằng B5 là nền môi trường tốt nhất khi nuôi cấy bao phẩn các cây họ cải *Brassica* (Kuginuki et al., 1997; Phippen and Ockendon, 1990). Ngược lại, một số nghiên cứu khác lại cho thấy nền môi trường MS hay NLN là tối ưu (Gland, 1995; Deepak et al., 2008; Ferrie and Caswell, 2011; Wan et. al, 2011). Theo Domblides (2002), trên 17 môi trường khảo sát chỉ có 8/45 giống cây họ cải có khả năng tái sinh phôi từ nuôi cấy bao phẩn. Sở dĩ có kết quả như vậy, theo chúng tôi một trong những nguyên nhân chính là sự phụ thuộc vào bản chất của giống thí nghiệm.

**Bảng 2. Ảnh hưởng của nền môi trường đến sự phát sinh hình thái của bao phẩn**

Môi trường sử dụng	Tỷ lệ tạo callus,%	Tỷ lệ tạo phôi, %
MS	14,67	0,00
B5	30,70	1,00
N6	12,33	0,00

Ghi chú: Các môi trường đều bổ sung 10% đường; 0,8% agar và 1 mg/l α-NAA

### 3.2. Ảnh hưởng của chất điều tiết sinh trưởng đến sự phát sinh hình thái của bao phấn

Nồng độ, tỷ lệ giữa auxin và xytokinin bổ sung vào môi trường nuôi cấy là một trong những yếu tố quyết định ảnh hưởng đến khả năng phát sinh hình thái của các giống cây họ *Brassica* (Bhattacharya, 1980; Klimaszewska, Keller, 1985). Một số tác giả cho rằng, sự phát sinh hình thái chỉ xảy ra trong môi trường có bổ sung xytokinin, còn khi bổ sung auxin lại làm giảm khả năng phát sinh hình thái của bao phấn. Auxin (2,4 D,  $\alpha$ -NAA) và xytokinin (BA, kinetin) là những chất điều tiết sinh trưởng thường được bổ sung vào môi trường ở các nồng độ khác nhau nhằm kích thích khả năng phát sinh hình thái của bao phấn (Dias and Martins, 1999; Domblides, 2002; Semova, 2002). Deepak et al. (2008) cho rằng khi bổ sung than hoạt tính vào môi trường nuôi cấy kích thích khả năng tạo phôi của *Brassica juncea*.

Với mục đích tăng tỷ lệ tạo phôi, tăng khả năng tạo cây hoàn chỉnh cho phôi được tạo ra, chúng tôi bố trí 24 công thức thí nghiệm có bổ sung auxin (2,4 D,  $\alpha$ -NAA) và xytokinin (BA, Kinetin) ở các nồng độ khác nhau trên nền môi trường B5. Kết quả thí nghiệm cho thấy, trong môi trường có bổ sung cả xytokinin và auxin, tỷ lệ tạo callus từ mẫu cấy ban đầu đều lớn hơn

khi chỉ bổ sung  $\alpha$ -NAA như thí nghiệm trên, đặc biệt khả năng tạo callus ở một số môi trường lên đến 76,66%. Khi sử dụng auxin (2,4D và  $\alpha$ -NAA) phối hợp với xytokinin ở nồng độ 0,5 mg/l lại cho khả năng tạo callus cao hơn ở nồng độ 1 mg/l. Kết quả thí nghiệm phù hợp với nhận định của Dietert (1982), nồng độ 2,4D cao kìm hãm sự phát triển callus. Khi sử dụng xytokinin (BA và Kinetin) ở nồng độ càng cao phối hợp với auxin, tỷ lệ tạo callus càng giảm, riêng trong hai môi trường có bổ sung Kinetin và 2,4D có xu thế ngược lại (Bảng 3).

Hai môi trường khi bổ sung Kinetin và  $\alpha$ -NAA ngoài việc phát sinh callus còn quan sát thấy khả năng tạo phôi, tỷ lệ mẫu cấy hình thành phôi rất thấp 1,0 - 2,33%. Các phôi được hình thành có cấu trúc tương đối rõ, màu xanh và các phôi này theo nhận định có khả năng tạo thành cây hoàn chỉnh cao (Hình 1B). Kết quả nghiên cứu của chúng tôi phù hợp với các nghiên cứu đã công bố trước đây là tỷ lệ tạo phôi tùy từng giống của họ cải chỉ khoảng 1 - 4%. Do số lượng phôi tạo ra không nhiều để bố trí thí nghiệm, theo tham khảo tài liệu chúng tôi lựa chọn môi trường MS có bổ sung 3% đường và IAA 0,5 mg/l BA 0,5 mg/l và 8 g/l agar để tạo cây hoàn chỉnh cho phôi (Mai, 2010). Kết quả chúng tôi thu được 8 cây hoàn chỉnh phát sinh từ phôi.

**Bảng 3. Ảnh hưởng của tổ hợp chất điều tiết sinh trưởng đến sự phát sinh hình thái**

Chất điều tiết sinh trưởng			Tỷ lệ phát sinh hình thái: callus (C*) và phôi (E*),%					
			Xytokinin					
			BA, mg/l			Kinetin, mg/l		
			2,0	1,0	0,5	2,0	1,0	0,5
Auxin	NAA, mg/l	1,0	C* 26,66	C* 53,33	C* 60,00	C* 10,00	C* 26,66 E* 1,00	C* 56,66
		0,5	C* 23,33	C* 73,33	C* 66,66	C* 40,0	C* 53,33 E* 2,33	C* 66,66
	2,4D, mg/l	1,0	C* 16,66	C* 43,33	C* 66,66	C* 76,66	C* 36,66	C* 33,33
		0,5	C* 10,00	C* 43,44	C* 70,00	C* 46,66	C* 26,66	C* 53,33

Ghi chú:

Nền môi trường B5 bổ sung 10% đường; 0,8% agar;

C\* - tỷ lệ tạo callus; E\* - tỷ lệ tạo phôi;

Trong cột không có ký hiệu E\* - không có khả năng tạo phôi.

### 3.3. Ảnh hưởng của chất điều tiết sinh trưởng và mẫu cấy ban đầu đến khả năng nhân nhanh và tạo rễ cho chồi

Để nhân nhanh các dòng cây tái sinh từ phôi vô tính, chúng tôi lựa chọn trụ dưới lá mầm và chồi đỉnh để tiến hành nhân nhanh và tạo chồi bất định. Với số lượng mẫu ban đầu nhỏ chúng tôi tiến hành nhân nhanh sơ bộ để tạo các dòng cây sử dụng môi trường MS + 0,5 mg/l BA + 3% đường là môi trường nhân nhanh thích hợp cho cây họ cải *Brassica* đã được công bố bởi Kalashnikova và cộng sự (2012). Kết quả cho thấy, chỉ có các chồi đỉnh có khả năng nhân nhanh, còn trụ dưới lá mầm trong môi trường nghiên cứu không có khả năng tạo chồi bất định. Từ chồi đỉnh của 8 cây tạo ra từ phôi vô tính thu được 8 dòng cây được ký hiệu là D1, D2, D3, D4, D5, D6, D7, D8.

Phôi vô tính có thể phát sinh từ hạt phấn cũng như tế bào chuyên hóa (Kalashnikova et al., 2012), chính vì vậy 8 dòng cây tái sinh từ phôi vô tính cần phải được xác định độ bội để tìm ra dòng cây đơn bội. Kết quả đo hàm lượng ADN bằng máy Flow cytometry cho thấy, ở mẫu đối chứng cây mẹ 2n và 3/8 dòng cây (D2, D3, D7) thu được xuất hiện đỉnh ở vị trí có cường độ huỳnh quang gần 50, trong khi đó 5/8 dòng cây còn lại xuất hiện đỉnh ở vị trí có cường độ huỳnh quang gần 25 (Hình 1F). Đỉnh cường độ huỳnh quang hay chỉ số hàm lượng ADN giảm bằng một nửa so với mẫu đối chứng, do đó có thể xác nhận 5/8 dòng cây (D1, D4, D5, D6, D8) tạo ra là cây đơn bội. Ba dòng cây tái sinh còn lại là cây lưỡng bội, sở dĩ có kết quả như vậy là do 3 dòng cây này tái sinh từ các phôi vô tính không

phát triển từ hạt phấn mà phát sinh từ tế bào chuyên hóa là bao phấn.

Với mục đích nhằm tăng hệ số nhân cũng như tạo cây hoàn chỉnh, sử dụng dòng D1 để tiến hành nghiên cứu. Kết quả cho thấy, chồi đỉnh có khả năng nhân nhanh trong môi trường có bổ sung Kinetin và BA sau 4 tuần nuôi cấy. Hệ số nhân nhanh giao động khá lớn từ 1,5 (trong môi trường có bổ sung Kinetin 0,5 mg/l) đến 3,94 (trong môi trường có bổ sung BA 1mg/l) (Hình 1D). Trong 4 công thức thí nghiệm còn lại hệ số nhân thấp (từ 2,30 - 2,53), không có sự sai khác về mặt thống kê (Bảng 4).

Ở khía cạnh chất lượng chồi, hai chỉ số được theo dõi là số lá trung bình trên chồi và chiều cao trung bình của chồi. Chiều cao của chồi có xu thế giảm dần khi tăng nồng độ chất điều tiết sinh trưởng. Chiều cao chồi biến đổi không nhiều từ 2,08cm (khi bổ sung 1,5 mg/l BA) đến 2,51cm (khi bổ sung 0,5 mg/l Kinetin).

Tương tự, số lá trung bình trên chồi cũng biến đổi không nhiều, sự sai khác giữa các công thức thí nghiệm cũng không rõ ràng, sai khác có ý nghĩa về mặt thống kê chỉ tồn tại giữa công thức bổ sung 1,5 mg/l Kinetin (2,56 lá/chồi) và công thức bổ sung 0,5 mg/l BA (2,23 lá/chồi).

Tạo rễ cho chồi là khâu cuối cùng trong quá trình nhân giống *in vitro*. Kết quả thí nghiệm cho thấy,  $\alpha$ -NAA có ảnh hưởng tích cực đến việc tạo rễ cho chồi *in vitro* sau 3 tuần nuôi cấy. Ở các công thức có  $\alpha$ -NAA đều cho số chồi ra rễ đạt 100% và số rễ trung bình/chồi lớn hơn nhiều lần so với đối chứng. Thời gian xuất hiện rễ đầu tiên ở các công thức có bổ sung  $\alpha$ -NAA sớm hơn so

**Bảng 4. Ảnh hưởng của chất điều tiết sinh trưởng khả năng nhân nhanh của chồi dòng D1, sau 4 tuần nuôi cấy**

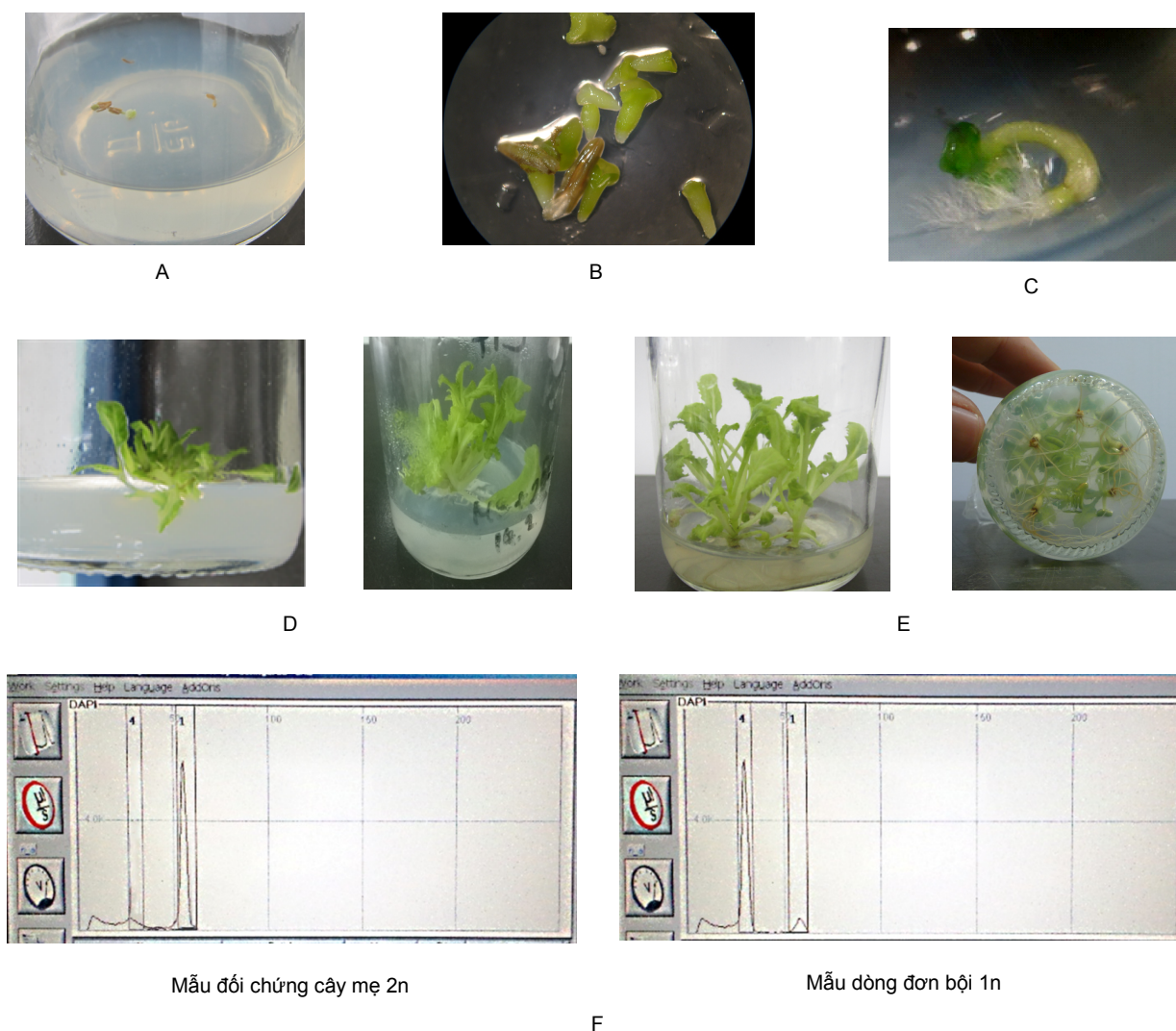
Chỉ tiêu theo dõi	Nồng độ chất kích thích sinh trưởng					
	Kinetin, mg/l			BA, mg/l		
	0,5	1,0	1,5	0,5	1,0	1,5
Hệ số nhân	1,50 <sup>a</sup>	2,51 <sup>b</sup>	2,30 <sup>b</sup>	2,53 <sup>b</sup>	3,94 <sup>c</sup>	2,36 <sup>b</sup>
Số lá /chồi	2,30 <sup>b</sup>	2,19 <sup>a</sup>	2,56 <sup>c</sup>	2,23 <sup>a,b</sup>	2,25 <sup>a,b</sup>	2,42 <sup>b</sup>
Chiều cao của chồi	2,51 <sup>d</sup>	2,24 <sup>b,c</sup>	2,15 <sup>b</sup>	2,34 <sup>c,d</sup>	2,09 <sup>a,b</sup>	2,08 <sup>a</sup>

Ghi chú: a,b,c,d trên cùng một hàng có sai khác về mặt thống kê  $P < 0,05$ ; Nền môi trường MS bổ sung 3% đường; 0,8% agar

## Tạo cây cải Đông dư (*Brassica juncea*) đơn bội *in vitro* bằng nuôi cấy bao phần

với đối chứng, ở công thức đối chứng rễ đầu tiên xuất hiện ở 10 ngày sau nuôi cấy, trong khi các công thức có bổ sung  $\alpha$ -NAA ở các nồng độ 0,25; 0,5 và 1 mg/l thì rễ đầu tiên xuất hiện lần lượt ở ngày 8, ngày 6 và ngày 6. Trong các công thức bổ sung  $\alpha$ -NAA, công thức sử dụng 0,5 mg/l  $\alpha$ -NAA cho kết quả tốt nhất với số rễ trung bình/chồi là 6,54 và chiều dài rễ trung bình đạt 3,68cm (Hình 1E). Ở công thức này, chiều dài rễ tuy có xu thế thấp hơn so với công thức có bổ

sung  $\alpha$ -NAA ở nồng độ 0,25 mg/l, nhưng không có sự sai khác về mặt thống kê (Bảng 5). Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Gerszberg et al. (2014). Sanjida et al. (2011) đã công bố, tỷ lệ tạo rễ cho chồi của 2 giống cải *Brassica juncea* trong môi trường MS không bổ sung chất điều tiết sinh trưởng đạt 80 - 95%. Tuy nhiên, chồi cải Đông dư (*Brassica juncea*) trong nghiên cứu này chỉ đạt tỷ lệ tạo rễ 19,8% trên môi trường MS không bổ sung chất điều tiết sinh trưởng.



**Hình 1. Một số hình ảnh trong quy trình tạo cây cải Đông dư (*Brassica juncea*) đơn bội *in vitro***

Ghi chú: **A** - Bao phần, hạt phần trong môi trường B5; **B** - Sự hình thành phôi vô tính của hạt phần trong môi trường B5 có bổ sung 10% đường, 8 g/l agar, 1 mg/l Kinetin và 0,5 mg/l  $\alpha$ -NAA; **C** - Cây hoàn chỉnh tạo từ phôi vô tính trong môi trường MS có bổ sung 3% đường, 8 g/l agar và 1 mg/l BA; **D** - Nhân nhanh chồi phát sinh từ chồi đỉnh của cây tái sinh từ phôi vô tính trong môi trường MS có bổ sung 3% đường, 8 g/l agar và 1 mg/l BA; **E** - Ra rễ cho chồi trong môi trường MS có bổ sung 3% đường, 8 g/l agar và 0,5 mg/l  $\alpha$ -NAA; **F** - Kiểm tra độ bội của cây bằng máy Flow cytometry.

**Bảng 5. Ảnh hưởng của  $\alpha$ -NAA đến khả năng tạo rễ cho chồi sau 3 tuần nuôi cấy**

Chỉ tiêu theo dõi	Đối chứng	Nồng độ $\alpha$ -NAA, mg/l		
		0,25	0,5	1,0
Tỷ lệ tạo rễ, %	19,80 <sup>a</sup>	100,00 <sup>b</sup>	100,00 <sup>b</sup>	100,00 <sup>b</sup>
Số rễ	0,38 <sup>a</sup>	4,67 <sup>b</sup>	6,54 <sup>d</sup>	5,56 <sup>c</sup>
Chiều dài rễ, cm	2,21 <sup>a</sup>	3,96 <sup>c</sup>	3,68 <sup>c</sup>	2,67 <sup>b</sup>
Ngày phát sinh rễ đầu tiên	10	8	6	6

Ghi chú: a, b, c, d trên cùng một hàng có sai khác về mặt thống kê  $P < 0,05$ ; Nền môi trường MS bổ sung 3% đường; 0,8% agar

#### 4. KẾT LUẬN

- Môi trường thích hợp để tạo phôi vô tính từ bao phấn cải Đông dư (*Brassica juncea*) là B5 + 10% đường + 1 mg/l Kinetin + 0,5 mg/l  $\alpha$ -NAA tỷ lệ tạo phôi vô tính đạt 2,33%

- Kết quả kiểm tra hàm lượng ADN bằng máy Flow cytometry thông qua cường độ huỳnh quang, xác nhận 5/8 dòng cây tái sinh từ nuôi cấy bao phấn là dòng cây đơn bội.

- Hệ số nhân chồi của dòng cải đơn bội D1 đạt cao nhất (3,94 lần) sau 4 tuần nuôi cấy trên môi trường MS + 3% đường + 1 mg/l BA.

- Môi trường MS + 3% đường + 0,5 mg/l  $\alpha$ -NAA là môi trường thích hợp tạo rễ cho chồi dòng D1 với số rễ trung bình là 6,54 rễ/chồi và chiều dài rễ trung bình đạt 3,68cm sau 3 tuần nuôi cấy.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

Bhattacharya N.M., Sen S.K. (1980). Production of plantlets through somatic embryogenesis in *Brassica campestris*. Zeitschrift für Pflanzenphysiologie, 99: 357-361.

Davydova N.N. (2008). Усовершенствование метода культуры пыльников для использования в селекционном процессе капусты (*Brassica oleracea* L.). Автореф. канд-т биол. наук. М.: 2008. - 25 с. "Improvement of anther culture method for use in the selection process of cabbage (*Brassica oleracea* L.)."

Dietert M.F., Barron S.A., Yoder O.C. (1982). Effects of genotypes on *in vitro* culture in the genus *Brassica*. Pl. Sei. Lett., 26: 233-240.

Dias J.S., Martins M.G. (1999). Effect of silver nitrate on anther culture embryo production of different *Brassica oleracea* morphotypes. Scientia Horticulturae, 82: 299-307.

Deepak Prem, Kadambari Gupta, Gautam Sarkar, Abha Agnihotri. (2008). Activated charcoal induced high frequency microspore embryogenesis and efficient doubled haploid production in *Brassica juncea*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 93(3): 269-282.

Domblides E.A., Shmykova H.A. (2002). Развитие пыльников капусты брокколи *in vivo* и при культивировании *in vitro*. Сб. науч. труд. Всероссийский НИИ селекции и семеноводства овощных культур. - Выпуск 37, с. 82-92. "Broccoli anther development *in vivo* and".

Ferrie A.M.R., Caswell K.L. (2011). Isolated microspore culture techniques and recent progress for haploid and doubled haploid plant production. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 104(3): 301-309, ISSN 0167-6857.

Gamborg O.L., Miller R.A. and Ojima K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean cells. Exp. Cell Res., 50: 151-158.

Gerszberg A., Hnatuszko-Konka K., Kowalczyk T. (2014). *In vitro* regeneration of eight cultivars of *Brassica oleracea* var. Capitata. In Vitro Cell.Dev.Biol.Plant. DOI 10.1007/s11627-014-9648-7.

Gland- Zwerger A. (1995). Culture conditions affecting induction and regeneration isolated microspore cultures of different *Brassica* species. In "GCIRC Proceedings of the Ninth International Rapeseed Congress, p. 799-801. GCIRC, Cambridge, UK.

Vũ Đình Hòa, Vũ Văn Liết, Nguyễn Văn Hoan (2005). Giáo trình chọn giống cây trồng. Nhà xuất bản Nông nghiệp, Hà Nội,

Ibrokhim Abdurakhmonov (2012). Plant Breeding. ISBN 978-953-307-932-5, 364 pages, Publisher: InTech.

Kalashnikova E.A., Mai. D.T (2012). Теоретические и практические аспекты, получения гаплоидных и дигаплоидных растений *in vitro* различных видов *Brassica*. Издательство: LAP LAMBERT Academic Publishing, 2012г. "Theoretical and

- practical aspects, and obtaining haploid *in vitro* and dihaploid plants different *Brassica* species”.
- Klimaszewska K., Keller W.A. (1985). High frequency plant regeneration from thin cell layer explants of *Brassica napus*. *Plant Cell, Tissue and Organ culture*, 4: 183-197.
- Kuginuki Y., Nacamura K., Hida K.I., Yosicawa H. (1997). Varietal differences in embryogenic and regenerativ ability in microspore culture of Chinese cabbage (*Br. Camperstris* spp. pekinesis). *Breeding Science*, 47: 341-346.
- Lichter R. (1989). Efficient yield of embryoids by culture of isolated microspores of different *Brassicaceae* species. *Plant Breeding*, 103: 119-123.
- Mai. D.T. (2010). Совершенствование технологии получения гаплоидных и дигаплоидных растений рапса (*Brassica napus* L.) и белокочанной капусты (*Brassica oleracea* L.). Автореф. канд-т биол. наук.- Москва, 2010. 23с. “Obtaining haploid and dihaploid rape (*Brassica napus* L.) and cabbage (*Brassica oleracea* L.)”.
- Murashige T. and F. Skoog (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*, 15: 473-497.
- Muravlev A. A. (2007). Культура пыльников в селекции ярового рапса. Автореф. канд-т биол. наук. - Саратов, 2007. 29с. “Anther culture in breeding spring rape”.
- Ollitrault P. and N. Michaux-Ferriere (1992). Application of flow cytometry for citrus genetic study and breeding. *Proc. Int. Soc. Citricult.*, 1: 193-198.
- Phippen C., Ockendon D.J. (1990). Genotype plant, bud size and media factors affecting anther culture of cauliflowers (*B. Oleraceae* var. *botrytis*). *Theor. Appi.Genet.*, 79(1): 33-38.
- Sanjida R. M., Sarker R.H., Hoque M.I. (2011). *In vitro* Plant Regeneration in *Brassica* spp. *Plant Tissue Cult. & Biotech.*, 21(2): 127- 134.
- Semova H.Yu., Ushakova L.A. (1993). Андрогенез *in vitro* и получение гаплоидных растений белокочанной капусты с помощью культуры пыльников. Докл. ВАСХНИЛ, “Androgenesis *in vitro* and obtain haploid plants cabbage using anther culture”.
- Telmer T. A., Newcomb W., Simmonds D.H. (1995). Cellular changes During heat shock induction and embryo development of cultured microspores of *Brassica napus*. *Protoplasma*, 185: 106-112.
- Nguyễn Quang Thạch, Nguyễn Thị Lý Anh, Nguyễn Thị Phương Thảo (2005). Công nghệ sinh học nông nghiệp. Nhà xuất bản Nông nghiệp, Hà Nội.
- Thomas E., Wenzel G. (1975). Embryogenesis from microspores of *Brassica napus*. *Z. Pflanzenziichtg*, 74: 77-81.
- Thurling, Chay. (1984). The influence of donor plant genotype and environment on production of multicellular microspores in cultured anthers of *Brassica napus* ssp. *oleifera*. *Ann. Bot.*, 54: 681-693.
- Touraev A., Forster B.P., Jain S.M. (2009). Advances in haploid production in higher plants. Springer Science + Business Media B.V., The Netherlands, p. 1-208
- Wan G. L., Naeem M. S., Geng X.X. et al. (2011). Optimization of Microspore Embryogenesis and Plant Regeneration Protocols for *Brassica napus*. *International journal of agriculture & biology*, ISSN Print: 1560-8530; ISSN Online: 1814-9596 10-260/MMI/2011/13-1-83-88.