

## THIẾT LẬP ĐIỀU KIỆN TẠO VÀ NUÔI CẤY CALLUS *IN VITRO* CHO NGHIÊN CỨU STRESS MẶN Ở GIỐNG LÚA KHANG DÂN 18

Hà Thu Trang, Vương Thị Quỳnh Hương, Điều Thị Mai Hoa,  
Đào Thị Sen, Vũ Thị Dung và Nguyễn Văn Quyền

*Khoa Sinh học, Trường Đại học Sư phạm Hà Nội*

**Tóm tắt.** Giống Khang Dân 18 là một trong những giống lúa được trồng phổ biến ở Việt Nam, nơi đang bị đe dọa bởi sự xâm nhập mặn. Nghiên cứu này được tiến hành nhằm thiết lập điều kiện nuôi cấy callus và đánh giá khả năng chịu stress mặn *in vitro* ở giống lúa Khang Dân 18. Đầu tiên, các điều kiện khác nhau bao gồm hàm lượng chất điều hòa sinh trưởng (chất ĐHST) bổ sung, thời gian nuôi cấy và điều kiện chiếu sáng được khảo sát nhằm tạo và nuôi cấy được callus *in vitro* phù hợp. Môi trường thích hợp tạo để callus là môi trường  $\frac{1}{4}$ -MS bổ sung 10 - 40  $\mu$ M 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). Khảo sát các khoảng thời gian nuôi cấy callus 1 tuần, 2 tuần và 4 tuần cho thấy khoảng thời gian nuôi cấy ảnh hưởng rõ rệt đến hình thái và chất lượng callus. Callus được tạo ra từ hạt sau 1 tuần nuôi cấy có tính chất và hình thái thích hợp để nghiên cứu tính chống chịu stress mặn hơn callus sau 1 tháng. Điều kiện chiếu sáng 10 h/ngày và điều kiện tối hoàn toàn là điều kiện thích hợp để tạo callus. Môi trường bổ sung 10  $\mu$ M 2,4-D cho chất lượng callus tốt hơn các môi trường bổ sung cả 1-Naphthylacetic acid (NAA) và 2,4-D. Tỷ lệ tạo rễ và chồi của callus ở ba điều kiện chiếu sáng 10 h/ngày, 24 h/ngày và tối hoàn toàn có sự sai khác có ý nghĩa thống kê. Điều kiện nuôi cấy callus *in vitro* được sử dụng cho nghiên cứu về khả năng chịu mặn của callus. Sự sinh trưởng của callus suy giảm đáng kể khi nồng độ NaCl tăng lên 3 - 6‰ ( $P = 0,05$ ), đặc biệt điều kiện 9‰ NaCl gây suy giảm mạnh về khối lượng và thay đổi rõ nét về mặt hình thái callus. Điều kiện nuôi cấy tối ưu ở nghiên cứu này có thể được áp dụng cho các nghiên cứu *in vitro* về stress và khả năng chịu mặn của giống lúa Khang Dân 18 và các giống lúa tương tự.

**Từ khóa:** tạo callus, nhân callus, *in vitro*, Khang Dân 18, stress mặn.

### 1. Mở đầu

Lúa (*Oryza sativa* L.) là loại cây lương thực có nguồn gốc nhiệt đới được trồng chủ yếu ở Châu Á, đặc biệt là khu vực Đông Nam Á, trong đó có Việt Nam. Ở nước ta, lúa chiếm 70% diện tích gieo trồng và 85% tổng sản lượng lương thực [1]. Hiện nay, thực trạng xâm nhập mặn tại các vùng trồng lúa nước ta đang là vấn đề nghiêm trọng đối với nền nông nghiệp nói chung và ngành sản xuất lúa gạo nói riêng. Cục Thông tin khoa học và Công nghệ quốc gia đã thống kê đến đầu năm 2016, xâm nhập mặn làm cho khoảng 170.000 ha lúa và hoa màu thiệt hại và nếu xâm nhập mặn tiếp diễn thêm 2 tháng nữa thì sẽ có khoảng 500.000 ha bị ảnh hưởng [2]. Vì vậy, việc tạo ra giống lúa có khả năng chống chịu điều kiện môi trường mặn có ý nghĩa đặc biệt quan trọng góp phần ổn định và gia tăng năng suất, giúp duy trì nền kinh tế nước ta vốn còn phụ thuộc nhiều vào lúa gạo.

---

Ngày nhận bài: 7/9/2021. Ngày sửa bài: 19/10/2021. Ngày nhận đăng: 27/10/2021.

Tác giả liên hệ: Nguyễn Văn Quyền. Địa chỉ e-mail: quyennv@hnue.edu.vn

Ở nước ta, công nghệ nuôi cấy mô tế bào đã trở nên phổ biến và được nghiên cứu trên nhiều loài thực vật khác nhau như: cây khoai sọ [3], cây cẩm chướng [4], lan thạch hộc tía [5] hay trên cả cây lúa. Nhưng việc nghiên cứu giống lúa dựa trên công nghệ nuôi cấy mô tế bào áp dụng cho các giống hiện trồng phổ biến còn ít và chưa có điều kiện nuôi cấy cụ thể. Khang Dân 18 là giống lúa thuần Trung Quốc được gieo trồng ở hầu khắp các tỉnh phía Bắc nước ta từ năm 1996 và đến nay vẫn chiếm một diện tích gieo trồng khá lớn với nhiều ưu điểm như ngắn ngày, năng suất tương đối cao, khả năng thích ứng rất rộng [6]. Đã có một số nghiên cứu trong nước thực hiện trên đối tượng này như: đánh giá khả năng tích lũy chất khô và vận chuyển hydrat carbon của các dòng lúa Khang Dân 18 cải biến của Lê Văn Khánh và cs (2015) [7] hay tích hợp gen QTL bằng phương pháp chọn giống nhờ chỉ thị phân tử kết hợp lai trở lại của Lê Hùng Lĩnh và cs (2016) [8]. Tuy nhiên, chưa có nghiên cứu tìm hiểu về điều kiện nuôi cấy *in vitro* hay tính chống chịu stress mặn trên giống lúa Khang Dân 18. Bên cạnh đó, tình hình xâm nhập mặn ở nhiều vùng trồng lúa ven biển hiện nay đã và đang gây ảnh hưởng lớn đến sức sống và sinh trưởng của cây lúa nói chung và của giống lúa Khang Dân 18 nói riêng.

Mục tiêu của nghiên cứu này nhằm đánh giá tác động của chất ĐHST, thời gian nuôi cấy và điều kiện chiếu sáng đến quá trình tạo callus và nuôi cấy *in vitro* giống lúa Khang Dân 18. Sản phẩm này được dùng làm vật liệu khởi đầu cho nghiên cứu về tính chống chịu stress mặn.

## 2. Nội dung nghiên cứu

### 2.1. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

#### 2.1.1. Vật liệu

Hạt giống lúa Khang Dân 18 được cung cấp bởi Công ty Cổ phần Tập đoàn giống lúa cây trồng Việt Nam. Đây là một trong những giống lúa được đánh giá là không có khả năng chịu mặn được trồng phổ biến ở Việt Nam [6]. Những hạt giống lúa chín, có sức nảy mầm tốt và sạch bệnh được sử dụng làm vật liệu nghiên cứu.

#### 2.1.2. Phương pháp nghiên cứu

##### \* Môi trường dinh dưỡng và điều kiện nuôi cấy cơ bản

Môi trường dinh dưỡng MS [9] sử dụng trong thí nghiệm có thành phần giảm một phần tư (¼-MS) được bổ sung thêm 20 g/L sucrose, 8,5 g/L agar và pH khoảng 5,6-5,8. Nồng độ chất ĐHST bổ sung vào từng môi trường được trình bày tại Bảng 1.

Điều kiện nuôi cấy cơ bản: thí nghiệm được nuôi cấy trong điều kiện chiếu sáng 10 h/ngày bằng hệ thống đèn LED ánh sáng trắng ở cường độ ánh sáng 1250 LUX.

**Bảng 1. Các loại môi trường dinh dưỡng sử dụng**

| Kí hiệu môi trường | Chất ĐHST bổ sung (µM) |       |
|--------------------|------------------------|-------|
|                    | NAA                    | 2,4-D |
| M1                 | 10                     | 10    |
| M2                 | 20                     | 10    |
| M3                 | 10                     | 20    |
| M4                 | 10                     | 0     |
| M5                 | 0                      | 0     |
| M6                 | 0                      | 10    |
| M7                 | 0                      | 20    |
| M8                 | 0                      | 40    |

### **\* Phương pháp tạo callus**

Hạt lúa được bóc vỏ và rửa với xà phòng rồi rửa sạch bằng nước cất khoảng 3 - 5 lần. Khử trùng với ethanol 70% trong 1 phút, 5% NaClO trong 30 phút. Rửa sạch lại bằng nước cất vô trùng khoảng 5-7 lần. Thấm hạt gạo trên giấy thấm vô trùng. Tiến hành đánh giá ảnh hưởng của chất ĐHST, thời gian nuôi cấy và điều kiện chiếu sáng đến khả năng tạo callus theo mô tả tóm tắt như dưới đây.

*Ảnh hưởng của chất ĐHST:* Hạt gạo được nuôi trong các môi trường M6, M7 và M8 ở điều kiện nuôi cấy cơ bản.

*Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy:* Hạt gạo được nuôi trong môi trường M6, thời gian nuôi cấy 1 tuần, 2 tuần và 4 tuần ở điều kiện nuôi cấy cơ bản.

*Ảnh hưởng của điều kiện chiếu sáng:* Hạt gạo được nuôi trong môi trường M6 ở hai điều kiện chiếu sáng là 10 h/ngày bằng hệ thống đèn LED ánh sáng trắng, cường độ ánh sáng 1250 LUX và điều kiện tối hoàn toàn trong 1 tuần.

### **\* Phương pháp nghiên cứu ảnh hưởng của điều kiện nuôi cấy đến sự phát triển của callus**

*Ảnh hưởng của chất ĐHST:* Callus phát triển từ phôi hạt gạo sau 1 tuần nuôi cấy được chuyển sang các môi trường bổ sung chất ĐHST với hàm lượng khác nhau ở điều kiện nuôi cấy cơ bản (Bảng 1).

*Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy:* Callus được tạo ra từ hạt gạo sau 1 tuần và callus được tách khỏi hạt gạo sau 30 ngày nuôi cấy. Hai loại callus được nuôi cấy trong môi trường M6 ở điều kiện nuôi cấy cơ bản.

*Ảnh hưởng của điều kiện chiếu sáng:* Callus phát triển từ phôi hạt gạo sau 1 tuần nuôi cấy được chuyển sang môi trường M6 ở điều kiện chiếu sáng 10 h/ngày bằng hệ thống đèn LED ánh sáng trắng, cường độ ánh sáng 1250 LUX và điều kiện tối hoàn toàn.

Sau 30 ngày, chỉ tiêu đánh giá dựa trên tính chất và màu sắc callus.

### **\* Phương pháp đánh giá khả năng chống chịu stress mặn của callus**

Callus phát triển từ phôi hạt gạo sau 1 tuần nuôi cấy được chuyển sang môi trường M6 bổ sung NaCl với nồng độ 3‰, 6‰ và 9‰. Đối chứng là môi trường không bổ sung NaCl. Sau 30 ngày, chỉ tiêu đánh giá dựa trên khối lượng tươi, tính chất và màu sắc của callus.

### **\* Phương pháp phân tích số liệu**

Mỗi thí nghiệm được lặp lại ba lần, mỗi công thức nghiệm ở một lần thí nghiệm gồm 20 callus có khối lượng khoảng 0,4 g. Dữ liệu từ thí nghiệm nhân callus và tạo stress mặn được phân tích bằng phương pháp phân tích phương sai, sử dụng phần mềm Microsoft Excel (2016) và IBM SPSS Statistics (ver.20). Sự khác biệt giữa các giá trị được phân tích theo Duncan ở mức ý nghĩa ( $P = 0,05$ ). Hình ảnh được xử lý bằng phần mềm ImageJ.

## **2.2. Kết quả và thảo luận**

### **2.2.1. Khả năng tạo callus**

#### **\* Ảnh hưởng của chất ĐHST**

Auxin 2,4-D là một chất ĐHST thường được bổ sung trong các nghiên cứu tạo callus trên nhiều đối tượng cây trồng. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành đánh giá khả năng tạo callus từ phôi hạt giống lúa Khang Dân 18 trên môi trường  $\frac{1}{4}$ -MS bổ sung 2,4-D với dải nồng độ từ 10 đến 40  $\mu$ M. Ba loại môi trường M6, M7 và M8 bổ sung 2,4-D có tỉ lệ tạo callus khá cao khoảng từ 93,6% đến 95%. Callus tạo ra trên 3 loại môi trường này đều có đặc tính tương tự nhau, không có sự khác biệt về mặt hình thái hay tính chất (Hình 1). Nhìn chung, callus ở 3 môi trường có dạng bông xốp, mềm ẩm, màu vàng tươi. Bề mặt của callus phát sinh chồi, đỉnh chồi hóa xanh khi tiếp xúc với ánh sáng (Hình 1). Dựa vào kết quả thí nghiệm, nồng độ 2,4-D từ 10

đến 40  $\mu\text{M}$  có thể sử dụng để phục vụ cho những nghiên cứu tiếp theo về khả năng tạo callus in vitro trên giống lúa Khang Dân 18.



**Hình 1. Callus phát triển trong các môi trường**

M6, M7, M8: các môi trường dinh dưỡng Thanh tỉ lệ 1 cm

Kết quả nghiên cứu được thực hiện trước đó trên 6 giống lúa *Indica* ở Pakistan trong môi trường MS bổ sung (1-5 mg/L) 2,4-D cho thấy không có sự khác biệt có ý nghĩa đối với tần số tạo callus. Tần số tạo callus ở 6 giống lúa đạt trên 75% [10]. Mặt khác, một số giống lúa của Ấn Độ lại cho thấy sự khác biệt rõ ràng tỉ lệ tạo callus ở các nồng độ 2,4-D khác nhau được thử nghiệm. Ở nồng độ 2,5 mg/L tỉ lệ tạo callus cao nhất đạt 74,2%, trong khi ở nồng độ 2,0 mg/L là 66,1% và 3,0 mg/L là 54,9%. Ngoài ra, nồng độ (4-4,5 mg/L) 2,4-D cao gây tạo màu nâu ở hầu hết các callus và ảnh hưởng đến quá trình tăng sinh tiếp theo [11].

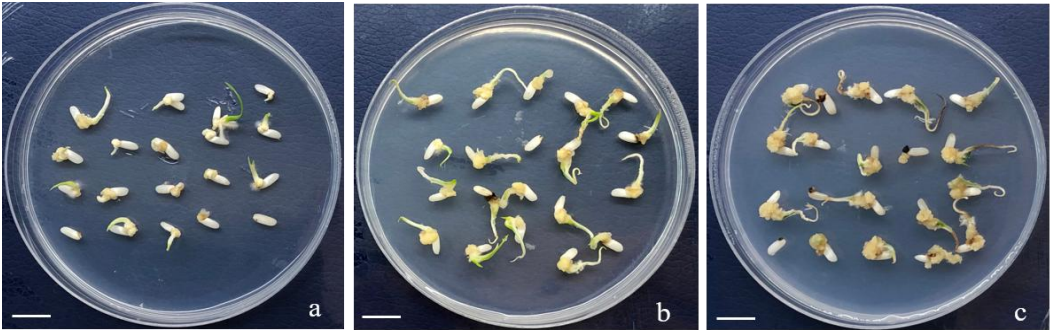
**\* Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy**

Xác định được thời gian nuôi cấy thích hợp để có callus khỏe mạnh giúp tạo tiền đề đánh giá khả năng chống chịu của callus khi nuôi cấy trong điều kiện stress hay vật liệu khởi đầu phục vụ chuyển gen. Trong thí nghiệm này, nghiên cứu ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến việc tạo callus từ hạt giống lúa Khang Dân 18 ở các khoảng thời gian 1 tuần, 2 tuần và 4 tuần. Kết quả cho thấy, tỉ lệ tạo callus ở các khoảng thời gian nuôi cấy rất cao ( $\geq 95\%$ ) (Bảng 2) và có sự khác biệt rõ ràng về mặt hình thái và tính chất của callus ở từng khoảng thời gian.

**Bảng 2. Tỉ lệ tạo và đặc điểm callus chịu ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy**

| Thời gian     | Tỉ lệ tạo callus (%) | Đặc điểm callus                                                                       |
|---------------|----------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>1 tuần</b> | 95,00                | Bông xốp; màu vàng tươi; đỉnh chồi hóa xanh, dài vừa phải                             |
| <b>2 tuần</b> | 97,50                | Hơi cứng; màu vàng nhạt; cả chồi hóa xanh, có khả năng tạo callus                     |
| <b>4 tuần</b> | 95,50                | Cứng, một số chuyển đen hoặc màu vàng đậm; một số chồi chết hoặc tạo thành callus mới |

Ở tuần nuôi cấy đầu tiên, callus có dạng bông xốp, màu vàng tươi, có khả năng tăng sinh mạnh mẽ. Chồi bắt đầu phát triển trên bề mặt callus, một số đỉnh chồi hóa xanh (Hình 2a). Với tuần nuôi cấy thứ hai, tính chất và màu sắc callus bắt đầu có sự thay đổi, callus cứng và có màu vàng đậm hơn callus một tuần, phần callus tiếp xúc với chồi có màu nâu nhạt (Hình 2b). Đến tuần nuôi cấy thứ tư, callus chuyển màu vàng đậm, một số ít khô lại và chuyển đen. Chồi tiêu biến hoặc chuyển đổi trạng thái tạo thành callus mới dính liền với callus cũ phát sinh từ hạt (Hình 2c).



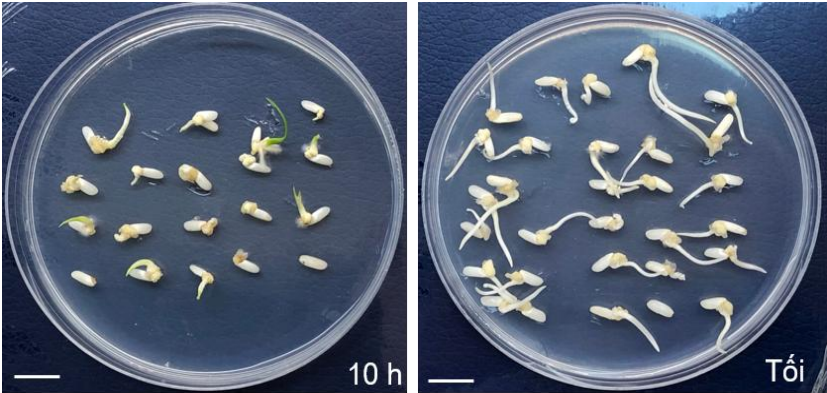
**Hình 2. Ảnh hưởng thời gian nuôi cấy đến khả năng tạo callus.**

*a, b, và c lần lượt là thời gian nuôi cấy 1 tuần, 2 tuần và 4 tuần. Thanh tỉ lệ 1 cm*

Dựa vào kết quả, callus ở thời gian 1 tuần nuôi cấy có tính mềm và xốp, dinh dưỡng tập trung chủ yếu nuôi callus giúp tăng khả năng tăng sinh. Lựa chọn callus ở khoảng thời gian 1 tuần nuôi cấy là thích hợp cho sự phát triển của callus được tạo ra từ hạt giống lúa Khang Dân 18.

**\* Ảnh hưởng của điều kiện chiếu sáng**

Nhìn chung, callus ở điều kiện chiếu sáng 10 h/ngày và điều kiện tối hoàn toàn đều khỏe mạnh, có khả năng tăng sinh cao. Tỷ lệ tạo callus ở hai điều kiện chiếu sáng là không có sự khác biệt, nhưng lại có sự khác biệt lớn về mặt hình thái callus. Ở điều kiện chiếu sáng 10 h/ngày, tỷ lệ tạo callus đạt 95 % (Bảng 3), callus mềm, xốp, có màu vàng tươi (Hình 3). Trên bề mặt callus phát sinh chồi dài, to và khỏe, đỉnh chồi có màu xanh lá do được tiếp xúc với ánh sáng. Phần callus gần chồi có màu trắng hơi trong suốt và sần sùi.



**Hình 3. Ảnh hưởng của điều kiện chiếu sáng đến khả năng tạo callus.**

*10 h và Tối: điều kiện chiếu sáng. Thanh tỉ lệ 1 cm*

Bên cạnh đó, ở điều kiện tối hoàn toàn, tỉ lệ tạo callus khá cao (96,4%) (Bảng 3) song hình thái callus có sự khác biệt so với điều kiện chiếu sáng 10h/ngày. Callus có kích thước nhỏ hơn, có dạng mềm ướt, màu vàng nhạt, phần callus tiếp xúc với chồi mỏng và có màu trắng đục. Chồi vươn dài, đầu thuôn nhọn và có màu trắng trong (Hình 3).

**Bảng 3. Tỷ lệ tạo và đặc điểm của callus chịu ảnh hưởng của điều kiện chiếu sáng**

| Điều kiện chiếu sáng/ngày | Tỷ lệ tạo callus (%) | Đặc điểm callus                                                |
|---------------------------|----------------------|----------------------------------------------------------------|
| 0 h (tối)                 | 96,40                | Mềm, ướt, màu vàng nhạt; chồi dài màu trắng                    |
| 10 h                      | 95,00                | Bông xốp; màu vàng tươi; chồi dài vừa phải, đỉnh chồi hóa xanh |

Như vậy ở hai điều kiện nuôi chiếu sáng 10 h/ngày và tối, callus được tạo ra với tỉ lệ cao và sinh trưởng tốt. do đó, có thể được sử dụng làm vật liệu khởi đầu để nghiên cứu khả năng chống chịu stress mặn của giống lúa Khang Dân 18.

## 2.2.2. Ảnh hưởng của điều kiện nuôi cấy đến sự phát triển của callus

### \* Ảnh hưởng của chất ĐHST

Auxin được biết là chất ĐHST đóng vai trò quan trọng trong việc tạo và tăng sinh callus [12]. Đối với callus lúa, sự tác động làm biến đổi đặc tính callus của một hay nhiều chất ĐHST còn tùy thuộc vào từng giống lúa. Đã có nghiên cứu chỉ ra, callus có dạng mềm, bông và xốp, có màu vàng tươi là loại callus có khả năng sinh mạnh và rất dễ tái sinh [13]. Trong thí nghiệm này, hai loại auxin là NAA và 2,4-D được sử dụng để nghiên cứu đánh giá khả năng duy trì và tăng sinh của callus giống lúa Khang Dân 18, trong điều kiện nuôi cấy cơ bản. Kết quả được trình bày tại Bảng 4.

Có thể thấy sự khác biệt về mặt hình thái của callus khi được nuôi cấy ở các môi trường bổ sung nồng độ NAA và 2,4-D khác nhau. Sau 30 ngày, callus ở các môi trường có màu vàng đậm, dần chuyển sang màu nâu, không duy trì được đặc tính ban đầu. Callus ở các môi trường M1-M4 và M7-M8 có màu vàng đậm, một số khô cứng và chuyển sang màu nâu, một số lại phát sinh rễ hoặc chồi. Môi trường M3 có nồng độ 2,4-D gấp đôi NAA không thấy có sự tạo rễ và chồi của callus, callus có màu vàng đậm và dính liền với nhau thành khối khô cứng. Môi trường M5 không bổ sung chất ĐHST có tỉ lệ callus tạo rễ và chồi cao nhất đạt 47,5% và 42,5%. Các callus ở môi trường M5 gần như không có khả năng tăng sinh và chuyển chất dinh dưỡng sang nuôi chồi và tạo rễ. Môi trường M7 và M8 với nồng độ 2,4-D cao hơn so với các môi trường còn lại, callus bắt đầu có hiện tượng chuyển màu nâu, nhiều callus khô và cứng lại, thậm chí một số ít chuyển màu đen, khả năng tăng sinh rất kém. Bên cạnh đó, môi trường M6, chứa 10 µM 2,4-D và không bổ sung NAA cho thấy đặc tính callus mềm, bông xốp, màu vàng tươi, sự chuyển mà nâu là không đáng kể. Tỉ lệ tạo rễ và chồi ở M6 lần lượt đạt 8% và 14%. Mặt khác, trong một nghiên cứu trên một số giống lúa nương Malaysia cho thấy khi cùng kết hợp (3 mg/L) 2,4-D và (2,5 mg/L; 5,0 mg/L; 7,5 mg/L; 10 mg/L) NAA, lại không cho thấy bất kỳ sự khác biệt nào về sự tăng sinh callus giữa các giống lúa. Ngoài ra, nồng độ 5 mg/L NAA trở lên làm giảm tỉ lệ tạo callus ở một giống lúa. Nghiên cứu cũng chỉ ra tỉ lệ tăng sinh callus thấp hơn khi sử dụng nồng độ auxin cao [14].

**Bảng 4. Tỉ lệ tạo rễ/chồi và đặc điểm callus chịu ảnh hưởng của chất ĐHST**

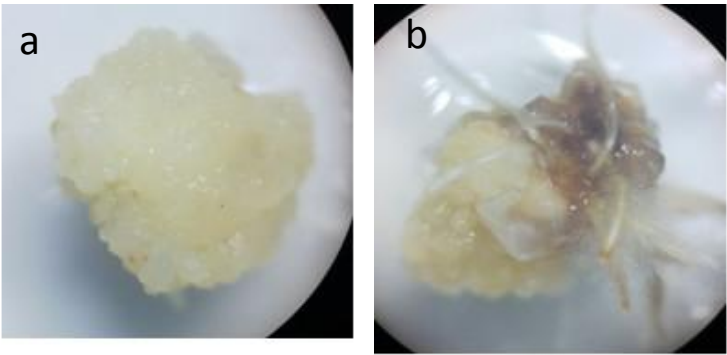
| Kí hiệu môi trường | Chất ĐHST bổ sung (µM) |       | Tỉ lệ callus tạo rễ (%) | Tỉ lệ callus tạo chồi (%) | Đặc điểm callus            |
|--------------------|------------------------|-------|-------------------------|---------------------------|----------------------------|
|                    | NAA                    | 2,4-D |                         |                           |                            |
| M1                 | 10                     | 10    | 3,75                    | 5,00                      | Khô, chuyển màu nâu        |
| M2                 | 20                     | 10    | 6,25                    | 0,00                      | Khô, cứng, nâu nhiều       |
| M3                 | 10                     | 20    | 0,00                    | 0,00                      | Vón cục, ít chuyển màu nâu |
| M4                 | 10                     | 0     | 45,00                   | 0,00                      | Màu vàng đậm               |
| M5                 | 0                      | 0     | 47,50                   | 42,50                     | Tạo nhiều rễ và chồi       |
| M6                 | 0                      | 10    | 8,00                    | 14,00                     | Mềm, xốp, màu vàng tươi    |
| M7                 | 0                      | 20    | 0,00                    | 12,50                     | Hơi khô, cứng              |
| M8                 | 0                      | 40    | 0,00                    | 7,50                      | Chuyển màu nâu nhiều       |

Callus ở môi trường M6 được lựa chọn làm vật liệu nghiên cứu để tiến hành theo dõi tính chống chịu stress mặn ở thí nghiệm tiếp theo.



**\* Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến sự phát triển của callus**

Thí nghiệm này đánh giá ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến sự phát triển của callus nhằm nhân nhanh callus. Mặc dù được nuôi cấy trong cùng môi trường M6 nhưng, đặc tính và hình thái của callus tạo ra từ hạt sau 1 tuần và callus sau 30 ngày nuôi cấy lại khác nhau hoàn toàn. Callus được tạo từ hạt sau 1 tuần (Hình 4a) có dạng mềm, xốp và màu vàng nhạt. Lớp callus mới sinh ra có màu trắng trong, hơi ướt, kết cấu rời rạc và có khả năng tăng sinh lớn. Qua kết quả nghiên cứu, thời gian nuôi cấy dài hơn sẽ làm thay đổi đến hình thái callus, các cấu trúc hầu như đã bị biến đổi. Sau khi được tách ra khỏi hạt, callus 30 ngày tuổi có cấu trúc rắn, dính liền với nhau thành khối và thường có màu vàng đậm (Hình 4b). Một số callus có thể phát sinh chồi hoặc rễ hay tự thoái hóa dẫn đến teo lại và chuyển sang màu đen nhưng một số khác vẫn còn có khả năng tiếp tục tăng sinh như bình thường.



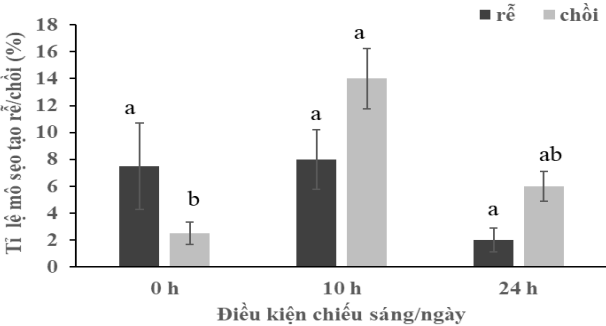
**Hình 4. Hình thái callus qua các thời gian nuôi cấy**

*a: callus 1 tuần, b: callus 1 tháng. Thanh tỉ lệ 1 cm*

Từ kết quả trên, khi tiến hành nghiên cứu tính chống chịu stress mặn của callus giống lúa Khang Dân 18, callus được tạo ra từ hạt sau 1 tuần nuôi cấy được đánh giá là phù hợp để làm vật liệu khởi đầu hơn là callus được tách ra khỏi hạt sau 30 ngày nuôi cấy trong cùng điều kiện môi trường.

**\* Ảnh hưởng của điều kiện chiếu sáng**

Ánh sáng là một yếu tố vật lí rất quan trọng đối với callus, sự tăng trưởng của tế bào và quá trình sản xuất các chất chuyển hóa thứ cấp. Tuy nhiên, mức độ phản ứng với ánh sáng phụ thuộc vào loại tế bào và loài thực vật [15]. Từ kết quả nghiên cứu (Hình 5) cho thấy thời gian chiếu sáng ảnh hưởng đến đặc điểm hình thái của callus giống lúa Khang Dân 18.



**Hình 5. Tỷ lệ callus tạo rễ/chồi ở các điều kiện chiếu sáng**

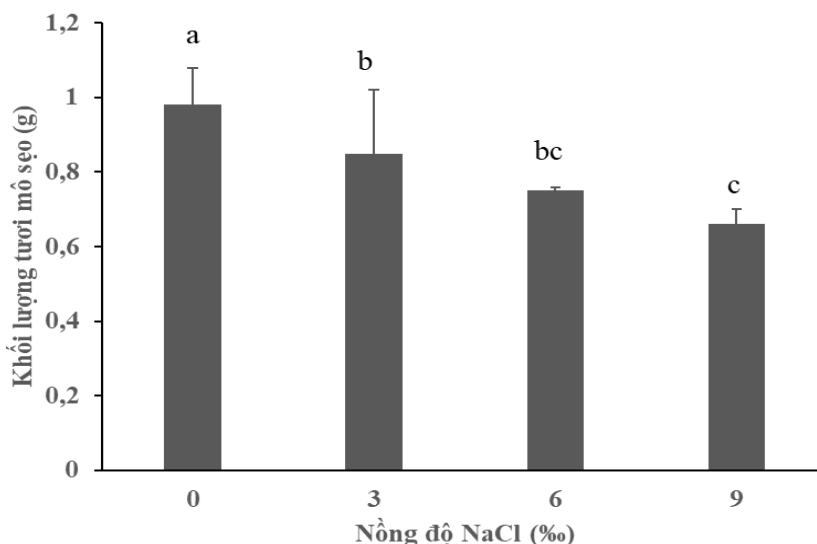
*Các chữ cái khác nhau thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê ( $P = 0,05$ )*

Sau 30 ngày, với các điều kiện chiếu sáng khác nhau, tỉ lệ callus tạo rễ của giống lúa Khang Dân 18 khá thấp ( $< 10\%$ ) và không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở các điều kiện chiếu sáng được thiết lập. Ở điều kiện 10 h/ngày, tỉ lệ tạo rễ đạt 8%, tỉ lệ tạo chồi đạt 14%, callus bông xốp, liền khối và có màu vàng tươi. Tỉ lệ tạo rễ của callus ở điều kiện 24 h/ngày đạt 2%, tỉ lệ tạo chồi đạt 6%, callus khô cứng lại, và chuyển màu nâu, ít có khả năng tăng sinh. Điều kiện tối hoàn toàn có tỉ lệ tạo chồi thấp nhất đạt 2,5% và tỉ lệ tạo rễ là 7,5%. Do không được tiếp xúc với ánh sáng, callus nuôi trong điều kiện này có chồi kém phát triển, chuyển màu nâu hoặc tiêu biến. Ngoài ra, callus khô cứng và có màu vàng đậm.

Sử dụng điều kiện chiếu sáng 10 h/ngày để tiến hành các thí nghiệm tiếp theo về nghiên cứu khả năng tăng sinh callus giống lúa Khang Dân 18.

### 2.2.3. Khả năng chống chịu stress mặn của callus

Dựa vào kết quả thí nghiệm, khối lượng tươi của callus của giống lúa Khang Dân 18 trong điều kiện stress mặn có sự sụt giảm đáng kể và hình thái mô sẹo cũng thay đổi khi nồng độ NaCl tăng cao. Sự sai khác của khối lượng callus tại các nồng độ NaCl là có ý nghĩa thống kê ( $P = 0,05$ ) (Hình 6).

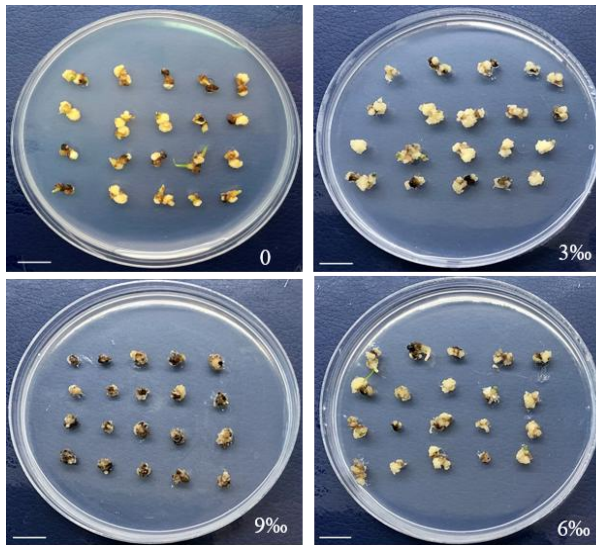


**Hình 6. Khối lượng tươi của callus ở các nồng độ NaCl**

Các chữ cái khác nhau thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê ( $P = 0,05$ )

Sau 30 ngày, callus giống lúa Khang Dân 18 vẫn có khả năng sinh trưởng ở nồng độ 3‰ NaCl. Khối lượng tươi của mô sẹo tăng 2,1 lần so với ban đầu nhưng đã có sự giảm so với đối chứng. Callus có kết cấu rắn chắc, màu vàng đậm, một số ít chuyển màu nâu (Hình 7). Với nồng độ 6‰ NaCl, khối lượng tươi của callus tiếp tục giảm và giảm 1,31 lần so với đối chứng nhưng không giảm nhiều so với nồng độ 3‰ NaCl. Tuy callus vẫn có màu vàng đậm nhưng số lượng callus bắt đầu chuyển màu nâu nhiều hơn, hầu hết ở trạng thái khô cứng, một số chồi và rễ phát sinh từ callus có dấu hiệu thoái hóa (Hình 7). Kết quả ở nồng độ 9‰ hình thái callus thay đổi so với đối chứng. Các quá trình trao đổi ion khoáng và nước hay hấp thu dinh dưỡng từ môi trường đều bị cản trở khiến khối lượng tươi giảm 1,48 lần so với đối chứng. Callus có kích thước nhỏ, teo lại do mất nước, gần như khô cứng và chuyển màu đen hoàn toàn (Hình 7). Một số callus giữ được màu vàng đậm nhưng theo thời gian cũng bắt đầu chuyển đen và ít có khả năng tái sinh.





**Hình 7. Ảnh hưởng của các nồng độ NaCl đến callus**  
Thanh tỉ lệ 1 cm

Callus giống lúa Khang Dân 18 có khả năng sinh trưởng ở điều kiện độ mặn 3‰ và 6‰. Khối lượng tươi của callus vẫn tăng sau 30 ngày nuôi cấy như đối chứng. Ở nồng độ 3‰ NaCl, callus có màu vàng đậm, một số phát sinh rễ hoặc chồi, nhưng ở nồng độ 6‰ NaCl callus đã bắt đầu teo lại và chuyển nâu nhiều hơn. Tuy nhiên, một số callus ở hai nồng độ vẫn có hình thái giống với callus trong điều kiện không bổ sung NaCl. Nồng độ 9‰ NaCl có thể gây chết hoàn toàn callus giống lúa Khang Dân 18. Callus không giữ được đặc tính ban đầu, suy giảm mạnh về khối lượng so với đối chứng, teo lại do mất nước và chuyển màu đen.

Kết quả này thống nhất với kết quả nghiên cứu trên hai giống lúa Ấn Độ ở dải nồng độ 30 đến 150 mM NaCl cho thấy khi nồng độ NaCl tăng lên thì khối lượng tươi callus giảm xuống. Sau 1 tháng, sự suy giảm khối lượng ở nồng độ 30 mM và 60 mM là không đáng kể. Trong khi ở nồng độ 90 mM NaCl, khối lượng tươi hai giống giảm lần lượt là 42,7% và 40,3% và giảm mạnh hơn, xuống còn 83,68 mg và 87,82 mg khi ở 150 mM NaCl [16]. Mặt khác, nghiên cứu ở nồng độ 50 mM và 100 mM NaCl, callus giống lúa Malaysia có màu vàng, mềm và bở, một số vẫn thích nghi với NaCl xuất hiện màu xanh lục, callus tăng sinh tốt khi chuyển sang môi trường tái sinh. Tuy nhiên, khi tăng NaCl lên 200 mM và 300 mM callus cứng dần và chuyển sang màu nâu đen [17].

### 3. Kết luận

Điều kiện nuôi cấy thích hợp để tạo callus *in vitro* từ hạt giống lúa Khang Dân 18 là môi trường 1/4-MS bổ sung từ 10 đến 40  $\mu$ M 2,4-D, thời gian nuôi cấy 1 tuần với điều kiện chiếu sáng 10 h/ngày và điều kiện tối hoàn toàn. Điều kiện nuôi cấy phù hợp cho sự tăng sinh callus là môi trường có bổ sung 2,4-D (10  $\mu$ M), 10 h chiếu sáng/ngày, thời gian nuôi cấy 1 tuần. Ở nồng độ 3‰ và 6‰ NaCl, callus giống lúa Khang Dân 18 vẫn có khả năng tăng sinh, nhưng hình thái callus bắt đầu thay đổi ở nồng độ 6‰. Ở nồng độ 9‰, khối lượng tươi callus suy giảm đáng kể so với callus đối chứng, phần lớn callus chuyển màu đen hoàn toàn và khả năng tăng sinh kém.

**Lời cảm ơn:** Nghiên cứu được hỗ trợ kinh phí đề tài cấp Bộ Giáo dục và Đào tạo mã số B2020-SPH-06.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Võ Văn Chi, 2004. *Từ điển Thực vật thông dụng* (tập 2). Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội, tr. 2698.
- [2] Lê Xuân Định, Nguyễn Mạnh Quân, Phùng Anh Tiến, 2016. Xâm nhập mặn tại Đồng bằng sông Cửu Long: Nguyên nhân, tác động và các giải pháp ứng phó. Tổng luận 2/2016, Cục Thông tin Khoa học và Công nghệ Quốc gia, Bộ Khoa học và Công nghệ, tr. 28-36.
- [3] Đặng Thị Thanh Mai, Nguyễn Xuân Viêt, 2012. Nghiên cứu nhân nhanh 4 giống khoai sọ quý địa phương bằng phương pháp nuôi cấy mô in vitro. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Sư phạm Hà Nội*, 3, tr. 135-147.
- [4] Đào Thị Sen, Bùi Thị Thanh Hương, Nguyễn Thị Ngọc và cộng sự, 2019. Nghiên cứu ảnh hưởng của hạt nano kẽm oxit đến sự sinh trưởng và phát triển của cây cẩm chướng (*Dianthus caryophyllus* L.) in vitro - Effect of ZnO nanoparticles on growth and development of in vitro *Dianthus caryophyllus* L., *Tạp chí khoa học Trường Đại học Sư phạm Hà Nội*, 10, pp. 133-143.
- [5] Nguyễn Thị Hồng Thắm, Đào Thị Sen, Lê Thị Thủy, 2019. Ảnh hưởng của các loại giá thể, dung dịch dinh dưỡng, phân bón khác nhau đến sự sinh trưởng của lan thạch斛 tía (*Dendrobium officinale* Kimura et Migo) in vitro ở vườn ươm. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Sư phạm Hà Nội*, 10, tr. 166-174.
- [6] Thái Thị Kim Tuyền, 2016. Nghiên cứu một số giống lúa chịu mặn phục vụ cho sản xuất tại tỉnh Quảng Trị. Luận văn Thạc sĩ, Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế.
- [7] Lê Văn Khánh, Phạm Văn Cường, Tăng Thị Hạnh, 2015. Khả năng tích lũy chất khô và vận chuyển hydrat carbon của các dòng lúa Khang Dân 18 cải tiến. *Tạp chí Khoa học và Phát triển*, 13(4), tr. 534-542.
- [8] Lê Hùng Lĩnh, Chu Đức Hà, Đào Văn Khởi và cộng sự, 2016. Tích hợp gen/QTL trong cải tiến giống lúa ứng phó biến đổi khí hậu bằng phương pháp chọn giống nhờ chỉ thị phân tử kết hợp lai trở lại. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*, 15(4), tr. 59-64.
- [9] Murashige T. and Skoog F., 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*, 15(3), tr. 473-497.
- [10] Joyia F. and Khan M.S., 2013. Scutellum-derived Callus-based Efficient and Reproducible Regeneration System for Elite Varieties of Indica Rice in Pakistan. *Int. J. Agric. Biol.*, 15, pp. 1560-8530.
- [11] Karthikeyan A., Pandian S.T.K., and Ramesh M., 2009. High frequency plant regeneration from embryogenic callus of a popular indica rice (*Oryza sativa* L.). *Physiol. Mol. Biol. Plants*, 15(4), pp. 371.
- [12] Ikeuchi M., Sugimoto K., and Iwase A., 2013. Plant Callus: Mechanisms of Induction and Repression. *Plant Cell*, 25(9), pp. 3159-3173.
- [13] Ijaz B., Sudiro C., Hyder M.Z., et al., 2019. Histo-morphological analysis of rice callus cultures reveals differential regeneration response with varying media combinations. *Vitro Cell Dev. Biol. Plant*, 55(5), pp. 569-580.
- [14] Binte Mostafiz S. and Wagiran A., 2018. Efficient Callus Induction and Regeneration in Selected Indica Rice. *Agronomy*, 8(5), pp. 77.
- [15] Summart J., Panichajakul S., Prathepha P., et al., 2008. Callus induction and influence of culture condition and culture medium on growth of Thai Aromatic rice, Khao Dawk Mali 105, cell culture. *World Appl. Sci. J.*, 5(2), pp. 246-251.
- [16] Wani S.H., Sofi P.A., Gosal S.S., et al., 2010. In vitro screening of rice (*Oryza sativa* L.) callus for drought tolerance. *Commun Biometry Crop. Sci.*, 5(2), pp. 108-115.

- [17] Kalhori N., Nulit R., Go R., et al., 2016. Selection, Characterizations and Somatic Embryogenesis of Malaysian Salt-tolerant Rice (*Oryza sativa* L. cv. MR219) through Callogenesis. *Int. J. Agric. Biol.*, 19, pp. 157-163.

## ABSTRACT

### **Establishment of *in vitro* callus induction and multiplication for studying salt stress in the rice cultivar Khang Dan 18**

Ha Thu Trang<sup>1</sup>, Vương Thị Quỳnh Hương<sup>1</sup>, Điều Thị Mai Hoa<sup>1</sup>,  
Đào Thị Sen<sup>1</sup>, Vũ Thị Dung<sup>1</sup> and Nguyễn Văn Quyền<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Faculty of Biology, Hanoi National University of Education*

The Khang Dan 18 is one of the rice cultivars widely cultivated in Vietnam, which is threatened by saline intrusion. This study is conducted to establish an *in vitro* culture system for evaluate salt tolerance of the rice cultivar Khang Dan 18. First, different culture conditions, including plant growth regulator concentration, culture period, light regime, were optimized to induce and maintain callus *in vitro*. Culture media supplemented with 10 - 40  $\mu$ M 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) are suitable for inducing callus. Different culture periods (1, 2 and 4 weeks) significantly affected the callus morphology and nature. The 10-hour light photoperiod is the most effective condition for callus induction and multiplication. Callus cultured in the medium supplemented exclusively with 2,4-D showed higher quality compared to those in media supplemented with 1-Naphthylacetic acid (NAA) and 2,4-D. Different photoperiods also affected callus differentiation in terms of root/shoot induction. The established culture system was then employed to evaluate salt tolerance of the callus. The growth of callus was significantly decreased when the concentrations of NaCl increased (3, 6 and 9‰,  $P = 0.05$ ), especially at the concentration of 9‰ NaCl caused a strong decrease in callus weight and an obvious change in callus morphology. This culture system may be applied for *in vitro* salt stress studies on the cultivar Khang Dan 18 and similar rice cultivars.

**Keywords:** callus induction, callus multiplication, *in vitro*, Khang Dan 18, salt stress.