

DEVELOPMENT OF GYNOGENIC HAPLOIDS THROUGH EMBRYO SAC CULTURE IN *HEVEA BRASILIENSIS*

Divya U.K., Rekha K., Maria Jose, Sobha S. and Sushamakumari S.

Advanced Centre for Molecular Biology and Biotechnology,
Rubber Research Institute of India, Kottayam 686 009, Kerala, India
E-mail address: unnikrishnandivya503@gmail.com

TÓM TẮT

Cây cao su *Hevea brasiliensis*, thuộc họ Euphorbiaceae, được canh tác với mục đích chính là lấy mủ, nguồn thương phẩm cao su thiên nhiên duy nhất. Các thể đơn bội có ý nghĩa rất lớn trong công tác chọn tạo giống cây trồng. Chúng được ứng dụng trong nhiều lĩnh vực nghiên cứu thực vật cơ bản khác nhau như chọn tạo giống cây trồng truyền thống, công nghệ sinh học thực vật, di truyền học tế bào và các nghiên cứu về hệ gen bao gồm việc lập bản đồ di truyền. Phát triển các thể đơn bội/lưỡng bội đồng hợp tử là thách thức lớn trong công tác chọn tạo giống cây cao su. Việc tạo ra những cây đồng hợp tử bằng các phương pháp truyền thống đòi hỏi phải trải qua vài chu trình lai ngược, làm cho toàn bộ quy trình chọn tạo giống diễn ra khá dài và gây mệt mỏi trong trường hợp cây lâu năm có chu trình tạo tuyến giống dài như cây cao su. Phát triển các thể đơn bội trong điều kiện *in vitro* là một cách tiếp cận có thể thay thế cho phương pháp nhân giống truyền thống. Sự hiện diện của các nhiễm sắc thể ở dạng đơn bội trong giao tử (n) và khái niệm về tính toàn năng đã dẫn đến sự phát triển các thể đơn bội ở điều kiện *in vitro* ở nhiều loài thực vật. Báo cáo này miêu tả việc tối ưu các qui trình phân lập và nuôi cấy các túi phôi nguyên vẹn của dòng vô tính cao su RR II 414 để tạo các thể đơn bội bằng phương pháp trinh sinh cái. Noãn được tách ra khỏi hoa cái trưởng thành trước khi hoa nở được sử dụng làm nguồn vật liệu phân lập các túi phôi. Tiền nuôi cấy các noãn trong hai môi trường dinh dưỡng khác nhau (MS và K&M) có bổ sung đường ở các nồng độ khác nhau (2 - 15%) trong các khoảng thời gian khác nhau (2 - 14 ngày) được thử nghiệm để tách thành công các túi phôi nguyên vẹn và có khả năng phát triển với số lượng lớn. Cả hai loại môi trường đặc và lỏng đều được sử dụng trong bước tiền nuôi cấy. Từ các noãn đã được tiền nuôi cấy, các túi phôi được phân tách và cấy vào các môi trường cơ bản khác nhau (MS cải tiến, K&M, WPM và Nitsch) có bổ sung hỗn hợp các chất điều hòa sinh trưởng 2,4D, BA và kinetin ở các mức nồng độ khác nhau (0,92 - 9,2 μ M). Mô sẹo sinh ra từ các túi phôi đã được chuyển sang môi trường MS cải tiến có bổ sung GA và BA ở các mức nồng độ khác nhau để biệt hóa phôi, cụ thể GA ở mức nồng độ từ 0,57 - 2,8 μ M, BA ở mức nồng độ từ 0,92 - 9,2 μ M. Tiền nuôi cấy noãn trong môi trường MS lỏng bổ sung 10% đường từ 8 - 10 ngày được xem là điều kiện lý tưởng nhất để phân lập các túi phôi nguyên vẹn. Mô sẹo được phát sinh từ túi phôi nuôi cấy trên môi trường K&M bổ sung 4,6 μ M 2,4D và 1,8 μ M kinetin. Dạng mô sẹo có khả năng biệt hóa phôi sau đó là sự hình thành các phôi hình cầu được thấy ở môi trường có bổ sung BA (7,3 μ M) và GA (1,7 μ M). Phân tích sinh học tế bào mô sẹo theo qui trình chuẩn và đếm số lượng nhiễm sắc thể của tế bào n=18 đã khẳng định các thể thu được là thể đơn bội. Mô sẹo/phôi này có thể được dùng để phát triển thành các cây đơn bội và lưỡng bội đồng hợp tử ở cao su. Đây là báo cáo đầu tiên về tạo thể đơn bội bằng con đường trinh sinh cái và khẳng định số bội thể ở cây cao su.

ABSTRACT

Hevea brasiliensis, belonging to the family Euphorbiaceae, is cultivated mainly for its latex, which is the sole commercial source of Natural Rubber (NR). Haploids are of great significance in plant breeding. They find many applications in various basic plant research disciplines like traditional plant breeding, plant biotechnology, cytogenetics and genomic studies including gene mapping. Development of haploids/ homozygous diploids poses a major challenge in *Hevea* breeding. Conventional techniques for the production of homozygous plants require several backcrosses, thus rendering the whole process quite lengthy and tedious in the case of a perennial tree crop like *Hevea* with a long breeding cycle. *In vitro* development of haploids is a viable alternate approach to conventional breeding. Presence of chromosomes in single copy in gametes (n) and the concept of totipotency together have led to the *in-vitro* development of haploids in many plant species. This paper

describes optimization of protocols for the isolation and culture of intact embryo sacs in *Hevea* clone RR11 414 for the generation of gynogenic haploids. Ovules dissected out from mature female flowers prior to anthesis were used as the source of embryo sacs. Pretreatment of the ovules in two different nutrient media (MS and K&M) enriched with various levels of sucrose (2-15%) for different time intervals (2 - 14 days) was attempted for the successful isolation of intact and viable embryo sacs in good numbers. Pretreatment was carried out using both solid and liquid media. From the pretreated ovules, embryo sacs were isolated mechanically and cultured into different basal media (modified MS, K&M, WPM and Nitsch) fortified with combinations of the growth regulators 2,4-D, BA & Kinetin (0.92 -9.2 μM). Proliferated callus was transferred to modified MS fortified with different concentrations of GA (0.57 μM -2.8 μM) and BA (0.92 -9.2 μM) for embryo induction. Pretreatment of ovules for 8-10 days in liquid MS medium containing 10 % sucrose was found to be most ideal for isolation of intact embryo sacs. Callus initiation was observed from the embryo sacs cultured in K&M medium supplemented with 4.6 μM 2,4-D and 1.8 μM Kinetin. Emergence of embryogenic callus followed by the development of globular proembryos was observed in the presence of BA (7.3 μM) and GA (1.7 μM). Cytological analysis of the callus was carried out using the standard procedure and a chromosome count of $n=18$ was obtained thereby confirming haploidy. These calli/ embryos can be used for the development of haploids and homozygous diploids in *Hevea*. This is the first report of development of gynogenic haploids and ploidy confirmation in *Hevea brasiliensis*.