

# **BÀI GIẢNG CÔNG NGHỆ SINH HỌC**

Giảng viên: Phạm Văn Thân  
Dành cho lớp: Sinh KTNN

## Chương I

# NHẬP MÔN CÔNG NGHỆ SINH HỌC

## I. KHÁI NIỆM CHUNG CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Thuật ngữ này được hình thành từ tiếng La tinh - "Bios", sinh học và "Technology"- công nghệ. Sự ra đời của công nghệ sinh học (CNSH) thể hiện sự phát triển nhanh chóng về tri thức khoa học, sinh học và các ngành liên quan đến sinh học như hoá học, vật lý học, đồng thời nói lên ý nghĩa thực tiễn to lớn của ngành sinh học. Nhiều nguyên lý, quá trình sinh học mới được khám phá và ứng dụng trong sản xuất, giải quyết nhiều khó khăn trong cuộc sống của loài người trong nhiều lĩnh vực. Các nhà khoa học đã có những ý kiến khác nhau về CNSH. Có người cho rằng nó là một sự phát triển tiếp theo của công nghệ vi sinh, hoặc của sinh học phân tử và kỹ thuật gene.

*CNSH là quá trình nghiên cứu, khai thác, sử dụng các nguyên lý và quá trình sinh học để giải quyết các vấn đề thực tiễn sản xuất phục vụ đời sống con người ở quy mô công nghiệp.* Xuất phát từ quan điểm trên, người ta phân biệt CNSH làm hai loại:

- CNSH cổ truyền: Khai thác các nguyên lý và quá trình sinh học dựa trên cơ sở những hiểu biết sơ đẳng và kinh nghiệm sống của con người. Chúng ta có thể liệt kê một số hoạt động như: thuần hoá, tuyển chọn vật nuôi và cây trồng, lên men nấu rượu, làm bánh mỳ, sữa chua, làm tương, dấm, muối dưa và chũra, chẩn đoán bệnh bằng phương pháp y học cổ truyền.

- CNSH hiện đại: là quá trình nghiên cứu, khai thác các nguyên lý sinh học trên cơ sở những kiến thức khoa học tiên tiến và bằng những phương pháp nghiên cứu hiện đại. Kết quả và sản phẩm của CNSH hiện đại có thể mang lại những cuộc cách mạng, thúc đẩy phát triển sản xuất, đáp ứng nhu cầu cuộc sống của loài người.

CNSH đã phát triển qua ba giai đoạn:

+ Trước hết nó được hình thành từ khi con người chưa hiểu biết nhiều về sinh học. Bằng những kinh nghiệm, quy định sản xuất thủ công, họ tạo nên những sản phẩm từ vi sinh, động vật và thực vật. Ví dụ: làm dưa, làm dấm, nấu rượu, lai tạo giống mới, nhân giống...

+ Giai đoạn hai: Bắt đầu từ cuối thế kỷ 19 khi con người đã hiểu biết về các quá trình sinh lý, sinh hoá, di truyền của sinh vật và có nhiều kết quả sử dụng chúng phục vụ nhu cầu con người. Trước hết sử dụng vi sinh vật trong sản xuất sinh khối, chiết xuất một số hoá chất như butanol, acetone và các loại nấm men có lợi khác, như làm sạch nước cho thành phố.

Công tác nuôi cấy phân lập các chủng vi sinh mới phát triển. Nhiều quy trình công nghệ sử dụng những nổi lên men với công suất lớn ra đời và tạo ra những sản phẩm mới như thuốc kháng sinh, phân bón, chế phẩm vi sinh...

+ Giai đoạn ba: Từ những năm 60, 70 trở lại đây, CNSH phát triển mạnh mẽ nhờ những tiến bộ vượt bậc của sinh học phân tử, điều chế enzyme, kỹ thuật gene, công nghệ nuôi cấy mô và tế bào thực vật....

Ngày nay người ta có thể khai thác tương đối đầy đủ nội dung cũng như phạm trù hoạt động của CNSH. Nó được xây dựng dựa trên nền tảng của sự hợp các công nghệ cơ bản:

- Công nghệ vi sinh.
- Công nghệ enzyme.
- Công nghệ lên men (Fennenlation)
- Công nghệ nuôi cấy tế bào động vật và miễn dịch học
- Công nghệ nuôi cấy tế bào thực vật.
- Kỹ thuật gene di truyền.

CNSH ngày càng phát triển và hoàn thiện, đi sâu thâm nhập vào mọi lĩnh vực, ngành khoa học khác nhau như công nghiệp mỏ, địa chất, chế biến thực phẩm, y tế, môi trường và các ngành sản xuất nông, lâm, ngư nghiệp... Thực sự, CNSH đã đóng vai trò hết sức quan trọng, tạo ra nhiều sản phẩm, đáp ứng được nhu cầu phát triển ngày một đa dạng và phong phú của con người:

*Lương thực thực phẩm:* sản phẩm cá, thịt, tinh bột, đường ; thực phẩm bổ trợ,

chất màu, hương vị; các loại vitamin và acid amin quan trọng.

*Nông nghiệp:* thức ăn gia súc, thuốc trừ sâu, vi khuẩn, vi rút, chế phẩm vi

sinh, nhân giống vô tính, cấy hợp tử, sản xuất phôi, vaccin.

*Hoá học:* acid hữu cơ, rượu, men, chất cao phân tử, metal extraction, bioaccumulation.

*Dược học:* các chất kháng sinh, các chất chẩn đoán bệnh, men ức chế,

vaccin, steroids, alcaloids.

*Lên men:* bia rượu, chất kích thích, lương thực, bánh mỳ, bơ, protein tế bào, cồn công nghiệp, men, chất kháng sinh, thuốc, vitamin, vaccin.

*Năng lượng:* sinh chất, ethanol, methane.

*Môi trường:* xử lý chất thải, làm sạch nước, tinh chế, phân giải dầu gây ô

nhiễm.

## **II. VAI TRÒ CỦA THỰC VẬT**

Thực vật là chìa khoá của cuộc sống trên trái đất. Thực vật là sinh vật sản xuất đầu tiên trong tất cả các chuỗi thức ăn trong hệ thống tự nhiên và là nguồn cung cấp năng lượng vì chúng có khả năng tái sinh. Thực vật là cơ thể tự dưỡng, có nhu cầu sinh dưỡng rất đơn giản, sử dụng nước, muối khoáng, CO<sub>2</sub> và năng lượng ánh sáng mặt trời để tổng hợp các đường đơn. Đây là sản phẩm

sinh tổng hợp đầu tiên để từ đó chúng được chuyển hoá tổng hợp các phức chất khác.

Đường được sử dụng ngay hoặc dự trữ để đưa vào cùng với muối vô cơ và nước, tổng hợp nên những đại phân tử cần thiết cho sự sinh trưởng, phát triển và tồn tại của thực vật. Như vậy thực vật có khả năng duy nhất chuyển hoá năng lượng mặt trời thành năng lượng sinh học. Trong số toàn bộ năng lượng thực vật chuyển hoá

được chúng chỉ để lại 10% cho mình, còn 90% được sử dụng bởi động vật và con người, đồng thời chúng còn cung cấp 80% lượng protein có trong tự nhiên (20% được sản xuất từ nguồn sinh vật khác).

Theo Simmonds (1976), chúng ta có khoảng 120-130 cây trồng chính, thuộc 64 họ và 180 giống (genera). Rõ ràng nguồn cây trồng của chúng ta rất đa dạng và phong phú. Tuy vậy chúng chỉ chiếm một phần rất nhỏ trong số 300 họ và 3000 giống (genera) thực vật tồn tại hiện nay.

Sự đa dạng này phản ánh sự đa dạng về nhu cầu sản phẩm của con người. Đồng thời

chúng còn có sự đa dạng về vị trí địa lý mà ở đó chúng được thuần hoá

(Simmonds 1989).

### **III. CÔNG NGHỆ SINH HỌC VÀ THỰC TIỄN CẢI TẠO CÂY TRỒNG NÔNG NGHIỆP**

Giai đoạn đầu, con người tồn tại và phát triển được nhờ săn bắn và hái lượm, sau đó chuyển sang một dạng vận động cao hơn: Trồng trọt và thuần hoá vật nuôi, cây trồng. Trong quá trình đó, cây trồng đã thay đổi rất lớn. Sự thay đổi này xảy ra qua sự chọn lọc có ý thức theo những đặc tính có lợi cho con người. Quá trình thực tiễn đó làm cho con người và cây trồng liên kết chặt chẽ với nhau, tạo nên mối quan hệ mật thiết phụ thuộc lẫn nhau.

Từ ngày đầu trồng trọt cho tới cuối thế kỷ 19, tất cả những cải tạo cây trồng là do chính người nông dân thực hiện. Vào cuối thế kỷ 19 đến giữa thế kỷ 20, tốc độ cải tiến cây trồng diễn ra càng nhanh. Dưới đây là một số khám phá sinh học và ảnh hưởng của nó đối với lĩnh vực này:

Sự khám phá lại định luật của Mendel cung cấp cho các nhà khoa học những cơ sở khoa học trong công tác lai tạo và làm sáng tỏ cơ chế của sự phân ly và quy luật di truyền các tính trạng.

- Những định luật di truyền của Mendel, quy luật biến dị của Darwin và nhiều khám phá sinh học khác giúp người ta tiên đoán được nhanh và chính xác các tính trạng, làm cho công tác lai tạo giống tiến nhanh và hiệu quả hơn.

- Morgan và cộng sự đã xây dựng được bản đồ gene ở ruồi dấm. Nó giải thích được sự liên kết và tái tổ hợp của các đặc tính.

- Sự thu thập nguồn gene giống cây trồng, cây đã thuần hoá và cây dại thành lập ngân hàng gene, cung cấp thực liệu cho chương trình lai tạo.

- Sự phát triển di truyền tế bào giúp những người tạo giống hiểu biết về cấu trúc chức năng và cơ chế tái tổ hợp.

- Khám phá ra colchicine, nhờ đó tạo những giống mới bằng sự đa bội hoá.

- Vai trò của tia X trong việc tạo ra những biến dị mới, ra đời các kỹ thuật gây đột biến khác là công cụ tích cực cho những người làm công tác giống.

- Những phát triển trong di truyền số lượng giúp các nhà tạo giống hình thành được chiến lược chọn giống và phân tích tính ổn định của tính trạng.

Nhờ những thành tựu trên, người ta ước tính chỉ trong thế kỷ 20 năng

suất  
sản lượng cây trồng đã tăng 50%.

Ví dụ nổi bật về sự thành công của những người làm công tác giống và ảnh hưởng của nó đến việc cung cấp lương thực thế giới là cuộc cách mạng Xanh ở Bắc Mỹ 1950-1960.

Công tác nghiên cứu khoa học dẫn đến cách mạng Xanh được bắt đầu vào những năm 1940, nhưng thực sự cách mạng Xanh có ảnh hưởng và được người ta đặt tên cho nó vào năm 1960, do William S. Gang - người Mỹ đề xướng. Nội dung nghiên cứu của cách mạng Xanh là sự chuyển giao công nghệ tổng hợp nhiều mặt: Lai tạo giống, canh tác, tưới tiêu., phân bón, bảo vệ thực vật từ các nước phát triển sang các nước nghèo - đối tượng áp dụng cho cây khoai tây và lúa mì. Trong hai cây đó sau này việc chuyển giao sản xuất cây lúa mì thu được nhiều thành quả, có tác dụng lớn tạo ra cuộc cách mạng. Còn cây khoai tây khó áp dụng triển khai hơn.

Năm 1947 giống lúa mì lùn (Norin dwarf) từ Nhật Bản được chuyển sang nghiên cứu ở Mỹ và năm 1954 Borlaug đã mang nó sang Mexico và ông đã chọn tạo được những dòng giống lúa mì lùn có thời gian sinh trưởng ngắn, thích nghi rộng, năng suất cao, trồng được hai vụ/năm, chịu nóng, có thể phát triển được ở vùng nhiệt đới. Những năm 1960- 1970, các giống lúa mì này đã phát triển nhanh chóng ở Ấn Độ, Pakistan và sản lượng lúa mì ở đây tăng gấp 2 lần, diện tích trồng lúa mì lên tới 10 triệu hecta.

Ít năm sau (1956) Viện IRRI bắt đầu thực hiện chương trình nghiên cứu theo mô hình cây lúa mì, áp dụng cho cây lúa nước và năm 1962 người ta đã tạo ra những giống lúa nước thấp cây, thời gian sinh trưởng ngắn, có bộ lá đứng, dễ khỏe, cho năng suất cao. Vào năm 1970, những giống lúa này cũng phát triển nhanh, đạt diện tích 10 triệu ha ở Pakistan, Ấn Độ, Indonesia và Trung Quốc (giống đầu tiên là IR8). Tiếp theo, các giống lúa được trồng và khảo sát ở Việt Nam năm 1975, 1976 và giống lúa IR8 đã nhanh chóng phát huy tác dụng hình thành thêm 1 vụ lúa xuân ở miền Bắc nước ta, cho năng suất tới 3 tấn/ha, sau đó lên 4-5 tấn/ha. Hiện nay chúng ta trồng chủ yếu là các giống mới thấp cây, ngắn ngày, năng suất, chất lượng của chúng luôn luôn được cải thiện.

Viện Nghiên cứu lúa Quốc tế đang chuẩn bị đưa ra những giống lúa mới có kiểu hình đặc biệt gọi là "Superrice". Superrice có những đặc điểm ưu việt sau (bảng 1.1):

**Bảng 1.1. Một số giống lúa ưu việt nổi bật**

Tên giống	Sinh khối (tấn/ha)	Chỉ số thu hoạch	Năng suất (tấn/ha)	Thời gian sinh trưởng
Modernrice	20	0,5	8	100 – 120
Supenrice	22	0,6	12	100 – 120
Localrice	12	0,3	3	160

*Giống này có nguồn gốc lai tạo từ Indica và Tropical Javania (Kush 1966  
chưa  
công bố).*



## Chương II NUÔI CẤY MÔ VÀ TẾ BÀO THỰC VẬT

### I. LỊCH SỬ PHÁT TRIỂN

#### 1. Giai đoạn khởi xướng (1898 - 1930)

Bắt đầu từ những thí nghiệm đầu tiên của Haberlandt (1898) khi ông để xướng ra tính toàn thể của tế bào và tìm cách nuôi cấy tế bào phân lập từ tầng tế bào lược, tế bào tầng nhu mô, tầng biểu bì và lông hút của thực vật để chứng minh cho luận điểm của ông nhưng không thành công. Tiếp theo Haberlandt, còn có một số phòng thí nghiệm khác như Winkler (1902), Thielmann (1924) và Kuster (1928) cũng đã tiến hành thí nghiệm tương tự nhưng không nhận được tế bào phân chia nào. Winkler lúc bấy giờ đã có những quan sát rất tinh tế. Ông nhận thấy: tế bào noãn trương lên khi hạt phấn nảy mầm và đề nghị nuôi tế bào dinh dưỡng phân lập cùng với ống phấn trong một giọt treo để bắt ống phấn kích thích tế bào dinh dưỡng phân chia. Ngoài ra ông còn đề nghị bổ sung vào môi trường dinh dưỡng dịch chiết từ các phần mô dinh dưỡng khác, ví dụ như dịch lấy từ túi phôi và ông tin rằng bằng con đường đó có thể nuôi thành công một tế bào dinh dưỡng phân lập thành phôi mà ông định gọi là phôi nhân tạo (artificial embryo).

Phải đến những năm 30 của thế kỷ 20 người ta mới đạt được những tiến bộ thực sự: Schmucker (1929), Scheitterer (1931), Pfeiffer (1931, 1933), Larue (1933) thông báo về nuôi cấy thành công đoạn đầu rễ riêng rẽ. Tro ng môi trường nhân tạo các đoạn rễ này phát triển thành những chiếc rễ hoàn chỉnh. Đây là tiến bộ đánh dấu một giai đoạn phát triển mới.

#### 2. Giai đoạn nghiên cứu sinh lý (1930 - 1950)

Bắt đầu bằng thành công của White (1934) nuôi cấy được một dòng rễ cà chua sinh trưởng mạnh và liên tục.

Cùng năm, Gautheret thông báo thành công trong việc nuôi cấy mô tách từ tượng tầng (cambium) của cây *Salix apraea* và cây *Populus nigra*. Mô nuôi cấy đã liên tục phân chia trong nhiều tháng trên môi trường Knop bổ sung glucose và cysteinhydrochloride.

Tro ng thời kỳ này Went và Thimann (1937) đã phát hiện ra IAA là một auxin tồn tại tự nhiên trong cơ thể thực vật. IAA được công nhận là một loại hormon thực vật, có chức năng như một chất điều khiển sinh trưởng tác động lên quá trình phân chia tế bào và hình thành rễ. IAA lập tức được Gautheret sử dụng vào môi trường nuôi cấy, kết quả thu được mới chỉ hạn chế ở mô tượng tầng của cây *Salix*.

Tiếp đó năm 1938 Nobecourt nhận được phân bào ở mô củ cà rốt *Daucus carota*.

Cùng năm 1938, White nuôi cấy được mô tượng tầng của cây thuốc lá

*Nicotiana glauca* x *N.langsdorffi*.

Vào cuối thời kỳ này đã có những quan sát về sự phân hoá cơ quan rễ, lá

trong mô nuôi cấy của cây cà rốt hoặc cây thuốc lá lai.

Thành công quan trọng của thời kỳ này là đã xây dựng và sử dụng có kết quả một số loại môi trường bán nhân tạo, đồng thời phát hiện được vai trò của một số vitamin đảm bảo sự thành công đối với việc nuôi cấy cơ quan (rễ) và mô (tượng tầng) ở thực vật.

### 3. Giai đoạn nghiên cứu phát sinh hình thái (1950 - 1960)

Đại diện cho giai đoạn này là Miller, Skoog, Steward, Reinert.

Giai đoạn phát sinh hình thái bắt đầu bằng công trình của Camus (1949) ghép chồi lên khối mô nuôi cấy và thấy quá trình phân hoá ống mạch xảy ra trong khối mô. Đây là tiền đề để nghiên cứu về sự điều khiển quá trình phân hoá tế bào trong khối mô nuôi cấy.

Tiếp theo là công trình của Miller và Skoog (1956) tạo chồi thành công từ mô thuốc lá nuôi cấy.

Tro ng giai đoạn này, Skoog đã phát hiện ra kinetin là một chất điều khiển quá trình phân bào (thuộc nhóm cytokinin) và phân hoá mầm chồi. 1958-1959 Steward à Reinert đã sử dụng nước dừa (có chứa các chất nhóm cytokinin) vào nuôi cấy tế bào cà rốt (*Daucus carota*) và đã thu được phôi từ nuôi cấy tế bào cà rốt.

Kỹ thuật nuôi cấy tế bào đơn trong dịch lỏng được Muir (1953) xây dựng đối với tế bào của cây *Tagetes erecta* và *Nicotiana tabacum* và Nickell (1956) nuôi được tế bào đơn của *Phaseolus vulgaris* trong dịch lỏng thông qua cấy truyền 4 năm liên tục.

Như vậy, sau 50 năm giả thiết của Haberlandt được Muir chứng minh là đúng trong luận văn tiến sĩ của ông, Muir đã sử dụng tế bào Crown-gall một loại tế bào khối u thực vật và đã nuôi cấy thành công tế bào đơn.

1960 Bergmann đã phát triển kỹ thuật tế bào đơn lên một bước mới tạo được khối mô sẹo từ một tế bào đơn bằng kỹ thuật gieo trải tế bào thực vật trên đa thạch (cell plating) như trải tế bào vi sinh vật.

### 4. Giai đoạn triển khai nuôi cấy mô vào công nghệ sinh học thực vật

1959 Melchers sử dụng mô đơn bội của *Antirrhinum majus* nghiên cứu tính biến động mức bội thể trong nuôi cấy và gây đột biến.

1967 Nitsch, 1968 Nakata và Tanaka tạo được cây đơn bội từ bao phấn

thuốc lá, mở ra một triển vọng ứng dụng đơn bội vào công tác giống và nghiên cứu di truyền.

1960 Cocking tách được tế bào trần protoplast.

1964 Guha và Maheswari tạo được cây cà độc dược (*Datura innoxia*) có bộ nhiễm sắc thể đơn bội từ nuôi cấy bao phấn.

1968 Niieki và Ono nuôi cấy thành công bao phấn và tạo được cây đơn bội ở lúa (*Oryza sativa*).

1971 Takebe tái sinh được cây thuốc lá hoàn chỉnh từ protoplast thuốc lá giống *Xan thi*.

1977 Melchers lai sôma thành công cây cà chua và cây khoai tây.

1985 cây thuốc lá mang gene biến nạp đầu tiên được công bố. Khái niệm

transgenic plant trở thành phổ cập trong thuật ngữ công nghệ sinh học thực vật.

1994 giống củ cải đường mang gene kháng bệnh virus biến nạp được đưa vào sản xuất đại trà tại Na Uy. Ở Mỹ có hàng trăm giống cây mang gene biến nạp đã được sản xuất chấp nhận. Thế nhưng cho đến nay những quan niệm và qui định về an toàn sinh học của các nước đang còn rất khác nhau, vì thế việc đưa cây trồng mang gene biến nạp vào sản xuất đại trà còn phụ thuộc vào trình độ khoa học và chính sách của từng nước.

## II. YÊU CẦU CƠ BẢN CỦA KỸ THUẬT NUÔI CẤY MÔ VÀ TẾ BÀO THỰC VẬT

### 1. Phòng thí nghiệm

a)

b) **Buồng chuẩn bị:**

Được bố trí liên hoàn cho các khâu pha chế và bảo quản lạnh các dung dịch chất khoáng, vitamin...; pha chế và khử trùng (hấp ở nhiệt độ và áp suất cao) môi trường nuôi cấy; chuẩn bị sơ bộ mẫu vật trước khi cấy. Các thiết bị tối thiểu cần thiết là cân phân tích ( $10^{-3}$ g), cân kỹ thuật (1 kg), tủ hoá chất, tủ lạnh có ngăn lạnh sâu, máy đo pH, nồi khử trùng.

c) **Buồng cấy:** Có thể lựa chọn các phương án sau:

*Buồng vô trùng*

Điều kiện tối thiểu là phải kín gió, được phủ kính hoặc ốp gạch men kính.

Hàng ngày sau giờ làm việc tiến hành tiệt trùng bằng:

- Dung dịch formol 5-10% phun thành sương mù.

- Chiếu UV (254nm) trong 2-3 giờ.

Như thế cũng chỉ đảm bảo cho thao tác 2-3 giờ, sau đó lại phải khử trùng từ

đầu.

*Tủ cấy vô trùng*

Có thể tự thiết kế và đóng lấy theo dạng tủ cấy vi sinh, có 2 lỗ để luồn tay vào thao tác. Tủ cũng được khử trùng như buồng vô trùng bằng formol và đèn cực tím.

*Bàn cấy vô trùng*

Thiết bị lý tưởng là bàn cấy vô trùng làm việc theo nguyên tắc lọc không khí vô trùng qua màng và thổi không khí vô trùng về phía người ngồi thao tác. Hiện nay

trên thế giới có rất nhiều hãng sản xuất loại bàn cấy vô trùng này để dùng trong nhiều lĩnh vực nghiên cứu, dịch vụ và sản xuất như y dược học, sinh học, điện tử... Giá tùy theo chất lượng từng loại, nằm trong phạm vi 1.000 – 10.000 USD.

#### **d) Buồng nuôi cây**

##### **Nhiệt độ**

Yêu cầu chính đối với buồng để đặt các bình nuôi cây là phải đảm bảo nhiệt độ ổn định trong khoảng 25°C. Có những loài cây yêu cầu nhiệt độ cao hơn, tùy theo mà bố trí thêm những tủ nuôi có chế độ nhiệt độ khác nhau cho thích hợp.

Ở nước ta, để giữ được nhiệt độ 25°C nhất thiết phải sử dụng máy điều hoà nhiệt độ. Thông thường 1 máy công suất 1,5 KW đủ để giữ mát cho 15m<sup>2</sup> hoặc 50m<sup>3</sup> buồng nuôi.

##### **Ánh sáng**

Theo chế độ chiếu sáng mà chia ra thành:

1. Buồng tối liên tục (nuôi tạo mô sẹo, giữ mô sẹo).
2. Buồng sáng theo chu kỳ quang 12-16 giờ/ngày.
3. Buồng sáng liên tục.

Tùy theo yêu cầu cụ thể của nuôi cấy mà bố trí việc chiếu sáng cho thích hợp ánh sáng trên dàn nuôi phải là loại ánh sáng có phổ gần như ánh sáng tự nhiên (230- 780 nm). Các loại đèn huỳnh quang ánh sáng trắng nói chung đều đáp ứng được yêu cầu trên. Cũng có những phát hiện cho thấy ánh sáng vùng cận tím (350-400 nm) có tác dụng kích thích sinh trưởng của thực vật nói chung, trong đó có cây nuôi cấy invitro.

Cường độ ánh sáng trên dàn nuôi cây tối thiểu phải đạt 2000 lux (đo ở cự ly 25 - 30cm, tương đương mặt đáy của bình nuôi cây).

Có hai cách bố trí nguồn sáng:

1. Trực tiếp trên mỗi tầng của giá hoặc tủ nuôi cây. Đèn mắc song song với mặt phẳng cần chiếu sáng.

2. Bên cạnh, đèn mắc vuông góc với mặt phẳng cần chiếu sáng. Cách này tránh được hiện tượng dàn nuôi bị đốt nóng do đèn vì nhiệt lượng do đèn sinh ra có lối thoát lên trên theo luồng khí đối lưu, nhưng cách mắc đèn này có nhược điểm là ánh sáng phân bố không đều, các bình nuôi phía ngoài nhận được cường độ chiếu sáng yếu hơn.

##### **Giá nuôi cây**

Được đóng bằng gỗ hay hàn bằng kim loại (sắt góc) thành khung. Kích thước thông dụng của khung cao 2000 mm, dài 1500-2000 mm, rộng 450 mm, chia thành 4 tầng, mỗi tầng cao 500 mm. Được lót bằng kính 4-5mm cho tiện lau chùi và không cản ánh sáng.

## **2. Một số thiết bị chính dùng cho nuôi cấy mô và tế bào thực vật**

### ***a) Bình nuôi cấy***

Phải được sản xuất bằng thủy tinh trung tính, có khả năng chịu nhiệt tốt

200°C và áp suất 1,5 at.

**Ống nghiệm nuôi cấy:** Đáy tròn hay phẳng, kích thước tối ưu là 24 x 160mm hoặc 32 x 160mm. Miệng không có gờ.

**Đĩa petri:** đường kính 70mm, cao 15mm hay đường kính 95mm, cao 15mm. Hiện nay đĩa petri chất liệu plastic đủ các chủng loại đường kính từ 30mm đến 150mm đang được sử dụng thay thế chất liệu thủy tinh. Các loại đĩa này thường không chịu nhiệt, được tiệt trùng bằng chiếu xạ và chỉ dùng một lần.

**Bình tam giác:** Loại 50, 100 và 250ml, miệng rộng hoặc miệng hẹp.

**Các loại bình nuôi dịch lỏng:**

- Bình cầu
- Bình cầu chuyên dụng có nhiều nhánh phụ

**Hộp nuôi cấy:** Một số hãng sản xuất loại hộp (kích thước 75x75x100 mm) bằng nhựa trong chịu nhiệt có nắp đậy chuyên dụng để nuôi cấy invitro. Dùng loại hộp này rất tiện lợi trong khi thao tác cấy và chuyển cây ra ngoài đất.

Hiện nay đang lưu hành loại hộp nhựa hình khối lập phương 100x100x100 mm, miệng tròn, rộng ở bên hông. Khi nuôi có thể xếp chồng lên nhau, đỡ không gian và che chắn nhau. Trong nhân giống công nghiệp các loài cây rất tiện lợi.

**Chai nuôi cấy:** Một số loại chai miệng rộng thường dùng trong công nghiệp thực phẩm, có nắp đậy xoay bằng hợp kim nhôm không rỉ hoặc gắn dây người ta cải tiến dùng nắp nhựa trong suốt và chịu nhiệt có thể khử trùng. Loại chai này chủ yếu được đưa vào làm bình nhân giống cây invitro theo qui mô công nghiệp.

#### **b) Nút đậy**

Bông không thấm nước là loại nguyên liệu làm nút tốt nhất. Ở nước ta điều kiện vệ sinh phòng nuôi cấy cao nên dùng giấy quấn thành nắp đậy ngoài để chống bụi và chống ẩm.

Giấy nhôm (hay gọi nhầm là giấy bạc) là vật liệu làm nắp đậy phổ biến nhất hiện nay. Ưu điểm của loại vật liệu này là không bắt bụi, tránh được hiện tượng nhiễm trùng do nút bông gây ra đối với những nuôi cấy dịch lỏng. Vật liệu nhôm có thể hơ trên lửa trực tiếp để khử trùng trong khi cấy.

Gần đây loại vật liệu nhựa trong suốt, chịu được nhiệt độ cao, có thể khử trùng đang được sử dụng nhiều.

#### **c) Phương tiện và hoá chất khử trùng**

- Tủ sấy cho dụng cụ thủy tinh và dụng cụ sấy bảo đảm 160-200°C.

- Nồi hấp tiệt trùng cổ khả năng chịu 1,2-1,5 at và nhiệt độ 120-130°C, sử dụng cho việc khử trùng môi trường nuôi cấy bằng hơi nước áp suất và nhiệt độ cao.

- Dung dịch khử trùng hoá học để khử trùng bề mặt mẫu vật sẽ được nuôi cấy, thường dùng: Ca-hypochloride, Na-hypochloride, clorua thủy ngân (HgCl), nước brom, oxy già (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), cồn để khử trùng sơ bộ và đốt dụng cụ khi



nuôi cấy.

- Phễu lọc vô trùng loại microspore (0,2  $\mu\text{m}$ ) dùng cho những trường hợp bông được khử trùng bằng nhiệt độ cao. Ví dụ: môi trường nuôi cấy protoplast, dung dịch enzym hay dung dịch  $\text{GA}_3$

### III. THÀNH PHẦN MÔI TRƯỜNG DINH DƯỠNG

Vào thời kỳ Haberlandt tiến hành các thí nghiệm nuôi cấy tế bào phân lập, những hiểu biết về nhu cầu dinh dưỡng khoáng của mô và tế bào thực vật còn rất hạn chế, đặc biệt là vai trò của các chất điều hòa sinh trưởng hầu như chưa được khám phá. Chính vì vậy mà Haberlandt đã không thành công.

Đến nay có hàng trăm loại môi trường dinh dưỡng nhân tạo đã được xây dựng và thử nghiệm có kết quả. Hầu hết các loại môi trường đều bao gồm những nhóm chất chính sau đây:

1. Các loại muối khoáng
2. Nguồn carbon
3. Vitamin
4. Các chất điều hòa sinh trưởng
5. Các nhóm chất bổ sung
6. Chất độn

#### 1. Các loại muối khoáng

Các nguyên tố khoáng dùng trong môi trường dinh dưỡng nuôi cấy mô và tế bào thực vật được phân chia thành 2 nhóm theo hàm lượng sử dụng: nhóm đa lượng và nhóm vi lượng.

##### a) Các nguyên tố khoáng đa lượng

Bao gồm các nguyên tố khoáng được sử dụng ở nồng độ trên 30 ppm (phần triệu = part per million), tức là trên 30 mg/l. Những nguyên tố đó là: N, S, P, K, Mo và Ca. Riêng Na và Cl cũng được sử dụng trong một vài loại môi trường, nhưng chưa rõ vai trò của chúng.

*Nitơ (N)*: Được sử dụng ở hai dạng  $\text{NO}_3^-$  và  $\text{NH}_4^+$  riêng rẽ hoặc phối hợp với nhau. Hầu hết các thực vật đều có khả năng khử nitrat thành ammonium thông qua hệ thống nitrat reductase (NR). Ammonium được tế bào thực vật đồng hoá trực tiếp

để sinh tổng hợp nên các chất đạm hữu cơ như amino acid. Điều đáng lưu ý là nếu chỉ dùng ammonium (không có nitrat) thì sinh trưởng của tế bào giảm, thậm chí ngừng hoàn toàn. Nguyên nhân chính là do quá trình trao đổi lớn của tế bào xảy ra lệch dẫn đến tình trạng thay đổi độ pH của môi trường. Cụ thể: Khi chỉ dùng nitrat, độ pH của môi trường tăng dần và khi chỉ dùng riêng ammonium, độ pH của môi trường giảm dần do tế bào hấp thu  $\text{NO}_3^-$  hoặc  $\text{NH}_4^+$  và thải ra môi trường loại lớn có hoá trị tương đương. Khi pH giảm thì quá trình trao đổi Fe của tế bào kém đi, kết quả là tế bào sinh trưởng chậm lại. Vì vậy hầu hết các loại môi trường đều dùng nitrat và ammonium dạng phối hợp, nhưng tùy theo đặc tính hấp thu nhỏ của loài cây đó mà phối hợp theo tỷ lệ thích hợp.

*Lưu huỳnh (S)*: Chủ yếu và tốt nhất là muối  $\text{SO}_4^{2-}$ . Các dạng ion khác

như

$\text{SO}_3$  hoặc  $\text{SO}_2$  thường kém tác dụng, thậm chí còn độc.

*Phospho (P)*: Mô và tế bào thực vật nuôi cấy có nhu cầu về phospho rất cao. Phospho là một trong những thành phần cấu trúc của phân tử acid nucleic. Ngoài ra

khi phospho ở dạng  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  và  $\text{HPO}_4^{2-}$  còn có tác dụng như một hệ thống đệm

(buffer) làm ổn định pH của môi trường trong quá trình nuôi cấy.

b) Các nguyên tố vi lượng

Là những nguyên tố được sử dụng ở nồng độ thấp hơn 30 ppm. Đó là Fe, B,

Mo, Cu, Zn, Ni, Co.

*Sắt (Fe)*: Thiếu sắt, tế bào mất khả năng phân chia. Thí nghiệm với sắt đánh dấu bằng đồng vị phóng xạ  $^{59}\text{Fe}$  cho thấy Fe được dự trữ trong nhân rất nhiều. Thiếu Fe làm giảm lượng RNA và giảm sinh tổng hợp protein nhưng làm tăng

lượng DNA và amino acid tự do. Kết quả là giảm phân bào Fe thường tạo phức hợp với các thành phần khác và khi pH môi trường thay đổi, phức hợp này thường mất khả năng giải phóng Fe cho các nhu cầu trao đổi chất trong tế bào. Tốt nhất là nên sử dụng Fe ở dạng phức chelat với citrat hoặc với EDTA (Ethylen Diamin Tetraacetic Acid). Từ các phức chất này Fe được giải phóng trong một phạm vi pH khá rộng.

*Mangan (Mn)*: Thiếu Mn cũng làm cho hàm lượng các amino acid tự do và DNA tăng lên, nhưng lượng RNA và sinh tổng hợp protein giảm dẫn đến kém phân bào.

*Bo (B)*: Thiếu B trong môi trường gây nên biểu hiện như thừa auxin vì thực tế B làm cho các chất ức chế auxin oxydase trong tế bào giảm. Mô nuôi cấy có biểu hiện mô sẹo hoá mạnh, nhưng thường là loại mô sẹo xốp, mọng nước, kém tái sinh.

*Molybden (Mo)*: Là ion đóng vai trò co-factor trong hệ thống nitrat reductase, như vậy Mo tác động trực tiếp lên quá trình trao đổi đạm trong tế bào thực vật.

## 2. Nguồn cacbon

Mô và tế bào thực vật nuôi cấy invitro sống chủ yếu theo phương thức dị dưỡng mặc dù ở nhiều trường hợp chúng có thể sống bán dị dưỡng nhờ điều kiện ánh sáng nhân tạo và lục lạp có khả năng quang hợp. Vì vậy việc đưa vào môi trường nuôi cấy nguồn cacbon hữu cơ là điều bắt buộc. Nguồn cacbon thông dụng nhất đã được kiểm chứng là saccharose. Nồng độ thích hợp phổ biến là 2-3 %, cũng còn phụ thuộc vào mục đích nuôi cấy mà thay đổi, có khi xuống tới 0,2% (chọn dòng) và tăng lên đến 12% (nhằm gây cảm ứng stress nước).

Tiếp đến là glucose và maltose cũng hay được đưa vào môi trường nuôi cấy (glucose cho nuôi cấy protoplast và maltose cho nuôi cấy bao phấn lúa). Các loại đường khác như fructose, raffinose, lactose, galactose cũng đã được thử nghiệm nhưng tỏ ra kém hiệu quả và chỉ được dùng trong những trường hợp đặc biệt.

Các dạng polysaccharide như tinh bột, pectine, dextrine cũng có thể dùng nuôi cấy. Tuy nhiên, những loại tế bào được nuôi trên môi trường chỉ có chứa một trong các polysaccharide trên nhất định phải thể hiện khả năng thủy phân thông qua các enzyme như amylase chẳng hạn. Có những chủng tế bào nuôi cấy giải phóng ra môi trường chứa tinh bột khá nhiều amylase. Chuyển chúng lên môi trường chỉ chứa saccharose, lượng amylase thải ra giảm ngay, nguyên nhân chính do các promotor của gen amylase chịu tác động khống chế của saccharose.

Các loại rượu như glycerin cũng có thể được tế bào sử dụng. Manitol hoặc sorbitol hoàn toàn trung tính vì không thâm nhập vào bên trong tế bào, nhưng chúng được sử dụng rộng rãi trong nuôi cấy huyền phù và nuôi cấy protoplast với chức năng là chất ổn định áp suất thẩm thấu. Các loại rượu một lần rượu ethanol, methanol ít hiệu quả, còn propanol và butanol thì rất độc.

Axit hữu cơ thường không phải là nguồn cacbon thích hợp cho tế bào thực vật nuôi cấy. Thí nghiệm với folic acid, succinic acid, pyruvic acid và keto glutaric acid chỉ đạt 15% sinh trưởng so với saccharose.

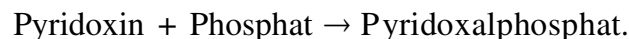
### 3. Vitamin

Mặc dù tất cả các loại mô và tế bào thực vật nuôi cấy invitro có khả năng tự tổng hợp được hầu hết các loại vitamin, nhưng thường không đủ về lượng, do đó phải bổ sung thêm từ bên ngoài vào, đặc biệt là các vitamin thuộc nhóm B.

*a) Vitamin B1 (Thiamin):* Là một chất bổ sung rất cần cho môi trường nuôi cấy. Khi khử trùng bằng cách hấp ở nhiệt độ cao, B1 bị nhiệt phân thành pyrimidin và thiazol là hai cấu tử của B1, nhưng tế bào nuôi cấy có khả năng tổng hợp chúng lại thành phân tử B1. Vì vậy không nhất thiết phải khử trùng bằng phương thức khác như lọc.

*b) Vitamin B2 (Riboflavin):* Có thể tiệt trùng bằng phương pháp nhiệt, nhưng lại dễ bị ánh sáng phân huỷ. Đối với nuôi cấy sáng chỉ dùng nồng độ 0,01 ppm, nhưng đối với nuôi cấy trong tối có thể tăng lên 10-50 ppm.

*c) Vitamin B6 (Pyridoxin, Adernin):* Là tiền chất của pyridoxalphosphat - cofactor của các nhóm enzym như carboxylase và transaminase. Khi hấp ở nhiệt độ cao, phản ứng xảy ra:



*d) Myo Inositol (Bios I):* Có vai trò trong sinh tổng hợp thành tế bào, cụ thể là sinh tổng hợp polygalacturonic acid và pectine. Inosit là chất bền vững khi khử trùng. Thường được sử dụng ở nồng độ cao 100 ppm. Khi phân tích thành phần của nước dừa, người ta thu được inosit trong một phân đoạn trung tính.

*e) Biotin (Bios II):* Cần thiết cho phân bào của một số loại mô. Chỉ sử dụng ở nồng độ rất thấp 0,001-0,01.

*f) Pantothenic acid (Bios III, Vit. B5):* Được sử dụng để làm thành phần của coenzym A.

### 4. Các hỗn hợp chất tự nhiên

Các nhà sáng lập của ngành nuôi cấy mô thường sử dụng môi trường dinh dưỡng rất đơn giản gồm muối khoáng và đường. Ngày nay người ta khẳng định rằng lại môi trường đơn giản như vậy không đủ để cho tế bào sinh trưởng bình thường. Vì vậy thành phần môi trường ngày càng phong phú, đầy đủ và phức tạp hơn. Người ta đã sử dụng một số hỗn hợp dinh dưỡng tự

nhien như:

a) *Nước dừa*: Từ 1941 được sử dụng để nuôi phôi của *Datura* và 1949 nuôi của *Daucus*. Kết quả phân tích thành phần của nước dừa từ non đến già của Tulecke và ctv (1961) cho thấy, trong nước dừa có:

- *Amino acid tự do*: Đạt nồng độ từ 190,5 ppm đến 685 ppm trong nước dừa tùy theo tuổi của quả tính từ non đến già. Khi hấp ở nhiệt độ cao chỉ còn 70 ppm.

- *Amino acid dạng liên kết* có trong protein và peptid

- *Axit hữu cơ*

- *Đường*

- *RNA và DNA*

Ngoài ra nước dừa còn chứa các hợp chất quan trọng đối với tế bào nuôi phân lập như:

- *Myo Inositol*

- *Các hợp chất có hoạt tính auxin*

- *Các cytokinin dạng glycoside*

**b) Dịch chiết mầm lúa mỳ (*mạch nha*):** Thành phần hoá học chưa được phân tích kỹ, chủ yếu chứa một số đường, vitamin và một số chất có hoạt tính điều khiển sinh trưởng.

**c) Dịch chiết nấm men (*Yeast Extract: YE*):** Với dịch nấm men, White (1934) lần đầu tiên nuôi thành công rễ cà chua trong ống nghiệm kéo dài vô thời hạn. Thành phần hoá học của dịch nấm men ít được chú ý phân tích. Chủ yếu chứa: đường, nucleic acid, amino acid, vitamin, auxin, khoáng. Tác dụng của YE với rễ tốt, nhưng với mô sẹo không rõ ràng.

**d) Dịch thủy phân casein [*Casein Hydrolysae (CH)*]:** Được sử dụng rộng rãi trong kỹ thuật vi sinh vật, ở nuôi cấy mô tế bào thực vật, chủ yếu được sử dụng làm nguồn bổ sung acid amin.

**e) Hỗn hợp amino acid nhân tạo:** Dựa trên những kết quả phân tích các hỗn hợp chất tự nhiên trên, nhiều tác giả đã đề ra những công thức pha chế hỗn hợp acid nhân tạo để bổ sung vào môi trường dinh dưỡng.

Kết quả sử dụng các hỗn hợp này còn rất khác nhau: Có thể yêu cầu acid amin của từng loại tế bào rất khác nhau. Tro ng môi trường lỏng để nuôi mô sẹo lúa và môi trường tái sinh cây lúa từ mô sẹo prolin là một thành phần quan trọng.

## 5. Các chất điều hòa sinh trưởng

Tro ng môi trường nuôi cấy mô và tế bào thực vật, thành phần phụ gia quan trọng nhất quyết định kết quả nuôi cấy là các chất điều hòa sinh trưởng. Những chất điều hòa sinh trưởng đó thuộc các nhóm sau:

### a) *Auxin*

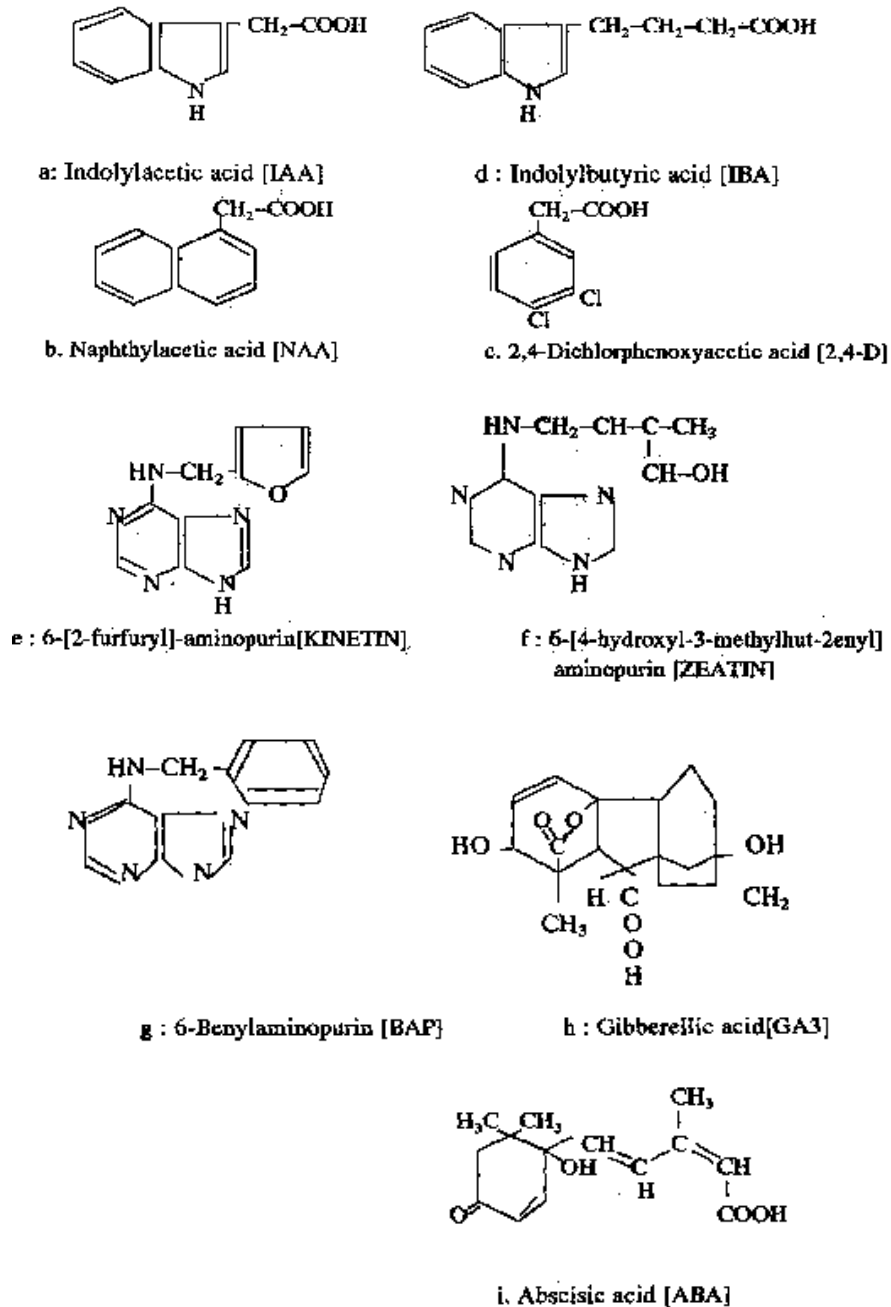
Được gọi là hoóc môn sinh trưởng do Went và Thimann (1937) phát hiện, chủ yếu kích thích sinh trưởng của tế bào, nhưng cũng làm tăng phân bào. Có 4 loại auxin thường được sử dụng trong nuôi cấy mô là:

1. Indolylacetic acid (IAA) tồn tại trong tự nhiên
2. Naphthylacetic acid (NAA)



3. 2,4-Dichlorphenoxyacetic acid (2,4-D)
4. Indolylbutyric acid (IBA)

Riêng IAA là auxin tự nhiên, còn lại NAA, IBA và 2,4-D là các auxin nhân tạo. Thường thì các auxin nhân tạo có hoạt tính mạnh hơn do đặc điểm phân tử của chúng nên các enzym oxy hoá auxin (auxinoxidase) không có tác dụng. Kinh nghiệm sử dụng auxin trong nuôi cấy mô: lúc đầu sử dụng nồng độ cao, sau thấp hơn để tránh tình trạng mô bị "say" và nhiễm độc.



Hình 1: Cấu trúc phân tử các loại auxin tự nhiên (IAA, H.5.1a) và tổng hợp (IBA, H.5.1b ; IBA, H.5.1d và 2,4-D, H.5.1c); các loại cytokinin (KIN, H.5.1e; BAP, H.5.1g; Zeatin, H.5.1f; gibberellic acid (GA3, H.5.1h) và abscisic acid (H.5.1i) dùng trong nuôi cấy mô tế bào thực vật

**b, Cytokinin (hormone phân bào):** Lần đầu tiên được Skoog (khoảng 1950) phát hiện trong một thí nghiệm chiết xuất acid nucleic bị sơ suất. Đó là những cấu tử của nucleic acid bị phân huỷ thành. 3 loại cytokinin chính thường được dùng trong nuôi cấy mô là:

*Kinetin* là sản phẩm được phát hiện đầu tiên, có cấu trúc phân tử là: 6-(2- furfuryl)-aminopurin (H.5.1e). Kinetin được phân lập từ chế phẩm DNA cũ hoặc Inucleic acid mới sau khi hấp ở nhiệt độ cao hay đun sôi. Trong cơ thể sống có thể không có kinetin tồn tại. Sản phẩm này kích thích sự phát sinh chồi của cây thuốc lá nuôi cấy, nhưng nếu phối hợp xử lý cùng auxin ở tỷ lệ nồng độ thích hợp thì sẽ kích thích quá trình phân chia tế bào (do đó có tên là kinetin).

Kinetin thực chất là một dẫn xuất của base hữu cơ adenin, như vậy có thể coi đây là một chất "nhân tạo". Tro ng tự nhiên có tồn tại một hoóc môn phân bào không? Letham là người đầu tiên đã phân lập tinh chế và cho kết tinh thành công hoóc môn phân bào tự nhiên đó từ nội nhũ đang ở dạng sữa của hạt ngô. Hợp chất cytokinin tự nhiên đó được gọi là zeatin (zea = ngô).

*Zeatin* cũng là một dẫn xuất của adenin. Công thức hoá học của zeatin là: 6-(4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl) aminopurin (H.5.1f).

Tro ng thực tiễn nuôi cấy, người ta chỉ dùng zeatin trong những trường hợp đặc biệt vì quá đắt mà thường sử dụng kinetin hoặc một sản phẩm tổng hợp nhân tạo. Đó là: 6-Benzylaminopurin (BAP)

Hoạt lực của BAP (H.5.1 g) cao hơn nhiều so với kinetin và bản thân BAP bền vững hơn zeatin dưới tác động của nhiệt độ cao.

**c) Gibberellic acid:** Được phát hiện vào những năm 1930. Lịch sử phát hiện nhóm hoóc môn này bắt đầu từ 1895 khi người Nhật nói về bệnh lúa von. 1926 thì phát hiện được bệnh đó là do loài nấm *Gibberlla fujikuroi* gây ra. Đến những năm 30 thì mới phân lập và tinh chế được hoạt chất, được gọi là gibberellin. Mãi sau Chiến tranh thế giới thứ hai, năm 1950 người Anh và người Mỹ mới biết đến công trình này của người Nhật.

Tới nay đã phát hiện được trên 60 loại thuộc nhóm gibberellic acid. Loại gibberellic acid thông dụng nhất trong nuôi cấy mô là GA3 (H.5.1h). Tro ng đời sống thực vật, gibberellin đóng vai trò quan trọng đối với nhiều quá trình sinh lý như:

- Sinh lý ngủ nghỉ của hạt và chồi
- Phát triển của hoa
- Làm tăng sinh trưởng chiều dài của thực vật

Nhưng trong nuôi cấy mô và tế bào thực vật, tác động của gibberellic acid chưa thật rõ ràng. Nhiều tác giả có sử dụng và coi đó là thành phần không thể thiếu của một loại môi trường chuyên dụng nào đó.

**d, Absicic acid (ABA)**

ABA thuộc nhóm các chất ức chế sinh trưởng có công thức hoá học nêu trong hình 5.1i. Abscisic acid có tác dụng tăng cường khả năng chống chịu của tế bào thực vật đối với điều kiện ngoại cảnh bất lợi, vì vậy ABA được đưa vào môi trường tái sinh cây và mang lại hiệu quả nhất định.

## 6. Chất độn - Thạch (Agar)

Là một loại polysaccharid thu được từ một số loài tảo (chủ yếu là tảo hồng

Rhodophyta), trong đó có rau câu mọc ở vùng đầm phá Việt Nam (Glacia súp.). Được sử dụng làm chất đệm cho môi trường dinh dưỡng rắn lại. Ở 80°C thạch ngâm nước chuyển sang trạng thái sol và ở 40°C trở về trạng thái gel. Khả năng ngâm nước của thạch là 6- 12g thạch/lít nước.

## 7. Nước

Nước pha môi trường cấy phải là loại nước hoàn toàn sạch ion. Thông thường người ta sử dụng nước cất 2 lần và tốt nhất là sử dụng hệ thống cất nước thuỷ tinh.

## 8. Độ pH của môi trường

Độ pH của môi trường dinh dưỡng ảnh hưởng trực tiếp tới quá trình thu nhận các chất dinh dưỡng từ môi trường vào tế bào. Vì vậy đối với mỗi loại môi trường nhất định và đối với từng trường hợp cụ thể của các loài cây phải chỉnh độ pH của môi trường về mức ổn định ban đầu.

Đối với mô sẹo của nhiều loài cây, pH ban đầu thường là 5,5-6,0. Sau 4 tuần nuôi cấy đạt được 6,0-6,5.

Đặc biệt khi sử dụng các loại phụ gia có tính kiềm hoặc tính axit cao như axit amin, vitamin thì nhất định phải dùng NaOH (dùng 1 M Tris càng an toàn để làm tăng hoặc HCl loãng để làm giảm pH môi trường về 5,5-6,5.

Những thí nghiệm nuôi cấy tế bào đơn hay tế bào trần trọng lượng môi trường nhỏ

thì việc chỉnh độ pH là bắt buộc.

## IV. MỘT SỐ LOẠI MÔI TRƯỜNG CƠ BẢN

Thành phần cơ bản của một số loại môi trường nuôi cấy mô và tế bào thực vật được trình bày trong bảng 5.1. Sau đây là một vài gợi ý mang tính nguyên tắc trong khi sử dụng các loại môi trường khác nhau

- **Môi trường MURASHIGE-SKOOG (MS):** Là một trong những loại môi trường được sử dụng rộng rãi nhất trong nuôi cấy mô và tế bào thực vật. Môi trường MS thích hợp cho cả thực vật hai lá mầm và một lá mầm. Tới nay có rất nhiều công thức cải tiến môi trường MS trên cơ sở công thức gốc do Murashige

và Skoog công bố năm 1962 (bảng 5.1, cột MS).

- **Môi trường ANDERSON:** Là loại môi trường chuyên dùng cho việc nhân giống vô tính các cây thuộc họ Rhododendron (Mẫu đơn). Nồng độ các loại muối

khoáng dùng trong môi trường này chỉ thấp bằng nửa so với trong môi trường MS (bảng 5.1, cột A). Loại môi trường này cũng được dùng cho một số loài cây thân gỗ nhỏ.

- **Môi trường GAMBORG:** Là loại môi trường được thử nghiệm đầu tiên cho cây đậu tương, nhưng cũng được dùng nhiều trong nhân giống vô tính và đặc biệt là trong tách và nuôi tế bào trần (bảng 5.1, cột G).

- **Môi trường nuôi cấy phong lan:** Trên cơ sở các công thức môi trường VACIN và WENT, môi trường KNUDSON hoặc LINDEMANN, hãng Sigma đã đưa ra một số công thức môi trường nuôi cấy phong lan, ví dụ môi trường V (bảng

5.1 cột V) cho các loài Cymbidium hoặc môi trường Phytamax cho phong lan nói chung (bảng 5.1, cột P).

- **Môi trường CHU (N6):** Là loại môi trường rất hiệu quả trong nuôi cấy  
bao

phấn của lúa và cây hoà thảo (bảng 2.1, cột N6).

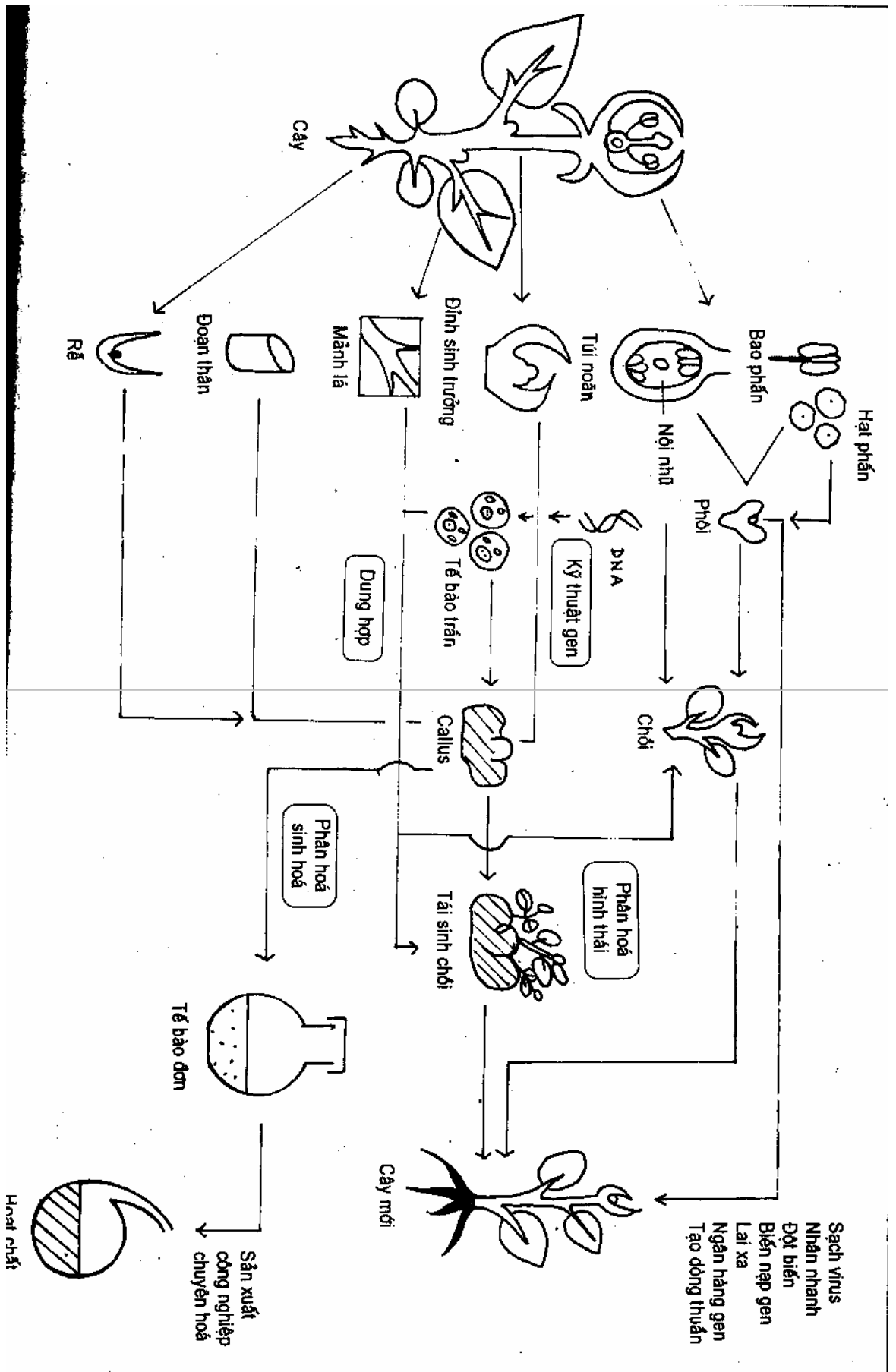
Bảng 2.1: Thành phần một số loại môi trường thông dụng dùng trong nuôi cấy mô và tế bào thực vật

T T	Thành phần (mg/l)	MS	A	G	V	P	N6	K
--------	-------------------	----	---	---	---	---	----	---

	<i>Muối</i>							
1	<i>khoáng</i>	1650,	400,	134,0	-	825,0	-	600,0
2	Ammonium	0	0	-	500,	-	463,0	-
3	nitrate	-	-	3,0	0	3,1	1,6	3,0
4	Ammonium	6,2	6,2	113,2	-	166,0	125,3	453,0
5	sulfate	332,2	332,	-	-	-	-	-
6	Boric acid	- 0,025	2	0,025	200,	0,012	-	0,025
7	Calcium	0,025	- 0,02	0,025	0	5	-	0,025
8	chloride		5		-	0,012		
	Calcium phosphate	37,26	0,02	37,26	-	5	37,26	37,26
9	tribasic Cobalt	- 27,8	5	-			-	-
10	Chloride.6H <sub>2</sub> O	180,7		27,8	-	37,26	27,8	27,8
11	Cupric sulfate.5H <sub>2</sub> O	16,9	74,5	122,1	28,0	-	90,35	146,5
12	Ethylene	0,25	- 55,7	10,0	-	27,8	3,33	10,0
13	diaminetetraacetic	0,83	180,	0,25	122,	90,35	-	0,25
14	acid, 2Na.2H <sub>2</sub> O	1900,	7	0,75	1	8,45	0,8	0,75
15	Ferric	0	16,9	2500,	5,07	0,125	2830,	1900,
16	tatrate.2H <sub>2</sub> O	-	0,25	0	8	0,415	0	0
17	Ferrous	-	0,3	130,5	-	950,0	400,0	170,0
18	sulfate.7H <sub>2</sub> O	8,6	480,	-	-	85,5	-	300,0
	Magnesium		0	2,0	525,	-	1,5	2,0
	sulfate		330,		0	5,5		
	Manganese		6		250,			
	sulfate Molyptic		-		0			
	acid (Na <sub>2</sub> ).H <sub>2</sub> O		8,6		-			
	Potassium iodide				-			
	<i>Các chất hữu cơ và</i>							
19	Glycine	2,0	-	-	-	-	2,0	-
20	Thiamine.HCl	0,4	0,4	10,0	0,4	1,0	1,0	-
21	myo Inositol	100,0	100,	100,0	-	100,0	100,0	-
22	Pyridoxine HCl	0,5	0	1,0	-	0,5	0,5	-
23	Nicotinic acide	0,5	-	1,0	-	0,5	0,5	-
24	MES	-	-	-	-	1000	-	-
25	Peptone	-	-	-	-	2000	-	-
	<i>Các chất điều</i>							
26	<i>khiển sinh</i>							
27	Adenine Hemisulfate			80,0				
28	6-Dimethylaminopurine			2,0				
29	2,4-Dichlorphenoxyacetic acid						2,0	
30	Indole-3-acetic acid			0,5				

	alpha-Naphthaleneacetic acide 6-Benzylaminopurine					2,0		
32	Saccharose (g/l)	30,0	30,0	30,0	20,0	20,0	20,0	20,0
33	Agar (g/l)	8,0	8,0	8,0			8,0	
	pH	5,6	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8





## V. KHẢ NĂNG NUÔI CẤY CỦA CÁC LOẠI MÔ VÀ TẾ BÀO

Về nguyên tắc, mọi loại tế bào của một cơ thể thực vật đều còn lưu giữ được tính toàn năng, có nghĩa là vẫn còn khả năng nuôi cấy thành công. Tuy nhiên trong thực tiễn các loại tế bào và loại mô khác nhau thì có biểu hiện rất khác nhau về triển vọng, nuôi cấy thành công. Một nguyên tắc cơ bản được tổng kết là *càng gần trạng thái tế bào phôi bao nhiêu, khả năng nuôi cấy thành công càng cao bấy nhiêu*. Như vậy, tế bào và mô của phôi non là có triển vọng nhất, sau đến là tế bào của các đỉnh sinh trưởng ở trạng thái hoạt động (chồi đỉnh ngọn, đầu rễ) hay ở trạng thái ngủ nghỉ (chồi nách). Cũng rất gần phôi là các tế bào sinh dục như noãn bào và tế bào hạt phấn ở giai đoạn non. Các tế bào của mô tượng tầng (cambium) cũng là nguồn mẫu vật nuôi cấy rất lý tưởng.

Hình 5.2. Trình bày sơ đồ sử dụng các loại mô và tế bào vào các kỹ thuật nuôi cấy khác nhau và triển vọng ứng dụng thực tiễn của chúng.

### **Chương III**

## **PHỤC TRÁNG VÀ TẠO CÂY SẠCH BỆNH**

### **I. THIẾT HẠI KINH TẾ DO BỆNH VIRUS THỰC VẬT**

Tro ng sản xuất nông nghiệp, thiệt hại kinh tế hàng năm do các nguồn bệnh nói chung (nấm, vi khuẩn, tuyến trùng...) và virus nói riêng rất lớn. Ví dụ, bệnh virus Tungro phát triển trên cây lúa, năm 1971 đã cướp đi nửa triệu tấn thóc của nhân dân Philipine. Bệnh virus khảm đã làm cho năng suất lúa mì, đại mạch ở các nước châu Âu (Anh, Pháp) và Mỹ giảm tới 20-30%. Nhìn chung mức độ gây hại và tính nghiêm trọng của bệnh virus thể hiện ở các nhóm cây khác nhau.

Đối với cây hàng năm, sự thiệt hại thể hiện qua việc giảm năng suất hoặc gây mất mùa toàn bộ trong một vụ. Đối với các cây lâu năm, thân gỗ (cam, chanh, mận, lê, táo...), bệnh virus không những làm giảm chất lượng và năng suất ngay đối với cây bị nhiễm bệnh, mà còn là nguy cơ cho các cây khỏe những năm sau. Đặc biệt, đối với các cây nhân giống vô tính, bệnh virus lây lan nhanh, dễ phát triển thành dịch gây hại nghiêm trọng hơn cả.

Virus không thể phòng chống, tiêu diệt bằng xử lý các chất hoá học như những bệnh vi khuẩn, nấm và sâu bọ. Cách duy nhất để loại bỏ virus là phải tách chúng ra khỏi cây bị bệnh, trả lại cho cây trồng một cuộc sống bình thường khỏe mạnh.

### **II. NGUYÊN LÝ LÀM SẠCH VIRUS VÀ DUY TRÌ TÍNH SẠCH BỆNH**

Danh từ làm sạch virus chỉ đúng về nội dung của công việc. Đó là việc phải giải phóng các thực vật bị nhiễm virus khỏi virus. Ở đây chỉ đề cập tới các cây trồng nhân giống vô tính vì phương thức nhân giống này là nguyên nhân truyền bệnh từ thế hệ này sang thế hệ khác. Vì vậy biện pháp làm sạch bệnh virus luôn phải kết hợp với biện pháp duy trì tính sạch bệnh.

Cả hai biện pháp nằm trong phạm vi phục tráng giống, người ta gọi là biện pháp giữ sạch bệnh. Bên cạnh hai nhiệm vụ là duy trì đặc tính giống và tính đồng đều của giống, nhiệm vụ chủ yếu của công tác phục tráng giống là cung cấp được tập đoàn cây bố mẹ và hạt giống sạch virus. Kết quả việc làm sạch virus thu được là sạch hay ít virus phụ thuộc rất nhiều vào ý thức trách nhiệm của người nghiên cứu. Kinh nghiệm thực tế cho hay, những biện pháp phục tráng giống có hiệu quả là biện pháp được thực hiện một cách triệt để và có trách nhiệm. Do vậy làm virus được coi là mục tiêu của công tác phục tráng giống.

Bên cạnh xử lý nhiệt và xác định tính sạch bệnh, các phương pháp để thu được cây sạch virus bao gồm chủ yếu vẫn là nuôi cấy đỉnh sinh trưởng.

Đương nhiên kỹ thuật nuôi cấy đỉnh sinh trưởng ở đây được thực hiện theo một mục đích khác nên phức tạp và tốn kém hơn là trong nhân giống vô tính. Vì thế người ta phân biệt rõ giữa nuôi cấy đỉnh sinh trưởng trong công tác phục tráng giống nói chung và làm sạch virus nói riêng. Mục đích của người bảo vệ thực vật trong nuôi cấy đỉnh sinh trưởng và nuôi cấy mô, phân biệt rõ với những người làm công tác duy trì giống. Đối với người làm công tác bảo vệ thực vật, yêu cầu lớn nhất là làm sạch virus. Trong thực tế điều đó hầu như không thể đạt được. Vì vậy phải kết hợp nhiều biện pháp để đảm bảo kết quả. Xử lý nhiệt nuôi cấy đỉnh sinh trưởng và xác định (thử) virus phải được thực hiện theo một chu trình kín. Các nhà duy trì giống đòi hỏi phải có những cá thể thực sự sạch virus, để rồi thông qua phương pháp nhân invitro có thể nhân thành số lượng cây bất kỳ mà không bị tái nhiễm. Các nhà sinh lý thực vật rất quan tâm đến phương pháp nhân giống invitro (Murashige, 1974. Pierik, 1975). Ở đây lý do chính khiến các nhà sinh lý thực vật quan tâm là việc làm sạch virus đối với cây trồng. Vì lý do kinh tế người ta chỉ giới hạn việc nhân giống invitro ở những cây trồng mà đối với chúng các phương pháp cổ điển để nhân nhanh những giống mới hoặc làm sạch virus không thực hiện được. Phương pháp nhân giống invitro loại trừ được nguy cơ tái nhiễm và vì thế nó tỏ ra ưu việt hơn các phương pháp cổ điển. Tuy vậy theo kinh nghiệm thực tiễn, các cây trồng được nhân giống invitro vẫn còn mang ít nhiều tác nhân gây bệnh. Gần đây có nhiều công trình nghiên cứu xử lý hoá chất để góp phần nâng cao hiệu quả sản xuất cây sạch bệnh (Tomlinson, 1982). Như vậy để loại bỏ virus, người ta kết hợp các giải pháp:

- Xử lý nhiệt và hoá chất
- Nuôi cấy đỉnh sinh trưởng và chọn lọc bằng phương pháp thử virus.

### **III. KỸ THUẬT LÀM SẠCH VIRUS**

#### **1 Xử lý nhiệt**

Đây là biện pháp làm sạch bệnh có cơ sở thực tiễn. Những cây mía bị bệnh cho năng suất cao hơn khi ngâm trong nước nóng. Nhiều nghiên cứu cho thấy dùng khí nóng thuận lợi hơn đối với đa số cây trồng vì chúng chịu đựng tốt hơn và virus bị loại dần dần. Nhưng hiểu biết về cơ chế làm sạch bệnh bằng xử lý nhiệt còn chưa đầy đủ. Giả thiết chung là virus bị ức chế sinh sản ở 39 – 40°C. Quá trình sinh trưởng của thực vật ở nhiệt độ cao cũng bị ức chế nhưng ở mức độ thấp hơn và vì vậy những bộ phận sinh trưởng nhanh thường là sạch bệnh hoặc nghèo virus. Nhiều nghiên cứu cho thấy, cơ thể thực vật được bảo tồn ở trạng thái tối thích trong thời gian dài ở nhiệt độ cao. Chu kỳ quang thích hợp cho xử lý nhiệt cao là

16<sup>h</sup>/ngày. Tuy vậy cần thận trọng và chọn thời gian thích hợp cho từng loại cây,

nhiệt độ cần được kiểm tra liên tục, ẩm độ cần giữ ở 50%.

Cơ chế của quá trình này (theo Kassamis, 1957) là khi ở nhiệt độ cao, quá trình tổng hợp bị ngừng nhưng vẫn diễn ra sự phân giải chất trong virus. Như vậy, khi xử lý ở nhiệt độ 40°C, mô phân sinh ở cây vẫn phát triển trong khi virus ngừng sinh sản do sự sao chép nhân RNA và DNA của chúng bị phá vỡ. Các đỉnh meristem do vậy có khả năng không chứa virus.

Do việc xử lý ở nhiệt độ cao có ảnh hưởng đến cây và mẫu cây, thời gian và nhiệt độ xử lý phải được chọn lọc thích hợp cho từng loại cây và từng loại virus. Ví dụ: Để loại virus cuốn lá ở khoai tây, củ khoai tây được xử lý ở 40°C, 4 giờ. Đôi khi kết hợp 2 loại xử lý mang lại hiệu quả cao hơn. Chẳng hạn với virus khảm ở thuốc lá, đầu tiên xử lý ở nhiệt độ 40°C, 16 tiếng, sau đó ở 22°C, 8 tiếng. Tỷ lệ cây sạch bệnh thu được trong trường hợp này cao hơn so với khi xử lý 40°C với thời gian 20h (Walkey và Freeman, 1977).

Ngoài ra nhiệt độ thấp cũng có tác dụng ức chế loại bỏ một số virus. Mosko vers (1973) đã thu được cây khoai tây sạch virus A và Y bằng cách nuôi cấy đỉnh sinh trưởng có xử lý ở nhiệt độ 5 - 15°C.

Ở điều kiện thích hợp hoa cúc có khả năng chịu nhiệt 38°C trong thời gian nửa năm; tiếp theo là hoa anh túc cũng chịu được thời gian khá dài, hoa thuỷ tiên chịu được nhiệt độ 34°C trong thời gian 4 - 6 tuần.

## 2. Nuôi đỉnh sinh trưởng

Limasset và Cornnel (1949) chứng minh được rằng, nồng độ virus trong thực vật giảm dần ở bộ phận gần đỉnh sinh trưởng, riêng đỉnh sinh trưởng thì hoàn toàn sạch virus (Morel và Martin, 1952). Thực tế này đã được ứng dụng để làm sạch virus bằng cách tách đỉnh sinh trưởng ở điều kiện vô trùng rồi nuôi cấy chúng thành cây hoàn chỉnh. Việc phân lập đỉnh sinh trưởng có kích thước 0,01 - 0,1mm rất khó khăn (Hollings và Storie, 1964). Qua đó tính sạch bệnh của mẫu vật nuôi cấy bị

giảm xuống nhưng tốc độ tái sinh cây tăng lên và đó chính là phương pháp được ứng dụng trong thực tiễn.

Để thu được cây sạch bệnh không nhất thiết phải có đỉnh sinh trưởng hoàn toàn sạch các phần tử virus mà nó được hoàn thiện trong quá trình phân hoá của các tế bào chưa phân hoá. Vì vậy trong thực tiễn phải giới hạn nồng độ virus và khối lượng mô phân hoá ở mức nhất định nếu cần có cây sạch virus. Việc phối hợp xử lý nhiệt với nuôi cấy đỉnh sinh trưởng là phương pháp thuận lợi bởi vì thông qua xử lý nhiệt, quá trình sinh sản của virus trong chồi ngọn bị ức chế mạnh và thông qua quá trình phân hoá đỉnh sinh trưởng, tính sạch virus sẽ được đảm bảo với xác suất cao. đây không đề cập tới vấn đề chọn các môi trường thích hợp. Thông thường người ta sử dụng môi trường của Murashige và Skoog, Buys, White và Heller. Theo quan điểm lý thuyết và kinh nghiệm thực

tiền, người ta thu được những kết quả khác nhau. Trong từng phòng thí nghiệm nếu việc nuôi cấy đỉnh sinh trưởng được thực hiện trên quan điểm sản xuất lớn thì cần chú ý những điểm sau đây: đảm bảo độ đồng nhất của giống trong tất cả các khâu nuôi cấy, đảm bảo tốc độ sinh trưởng nhanh và đều đối với số lượng đỉnh sinh trưởng lớn, đồng thời kết quả đưa cây ra đất cũng cần phải được đảm bảo. Các đỉnh sinh trưởng cần được nuôi sau khi phân lập ở các buồng nuôi cấy hoàn toàn khống chế từ mặt khí hậu ở nhiệt độ 22°C và 6h

Chiếu sáng ở 1.000 - 3.000 lux.

Ngoài mô phân sinh đỉnh, một số mô và tế bào khác cũng được nuôi cấy để

tạo cây sạch bệnh, bao gồm mô sẹo, protoplast và mô cơ quan sinh sản.

Một số công trình nghiên cứu đã thu được những cây khoẻ mạnh từ mô sẹo thuốc lá bị nhiễm bệnh khảm virus (Mori, 1977). Nếu đem khối mô sẹo tế bào thuốc lá kiểm tra xét nghiệm thì thấy có khoảng 30 - 40% tế bào bị nhiễm bệnh. Như vậy trong khối mô sẹo nhiễm bệnh xuất hiện những vùng mô sạch bệnh. Điều này có thể giải thích là sự nhân, sao chép virus chậm hơn sự phân chia tế bào (Svoboda, 1965).

Nuôi cấy tế bào trần để thu cây sạch bệnh được Shepard (1975) thực hiện trên cây khoai tây. Từ protoplast của lá bị nhiễm virus X, ông đã tái sinh được các cây khoai tây sạch bệnh virus X; trong tổng số 4140 cây, có 7,5% là cây sạch bệnh.

Việc nuôi cấy mô từ hoa để tạo cây sạch bệnh được áp dụng có kết quả đối với cây có múi, vì có một số virus không lan truyền qua hạt. Phôi tâm và túi phôi đã được sử dụng có kết quả trong việc tạo ra những cây cam sạch bệnh (Navarro và Juarez, 1977).

### 3. Xử lý hoá chất .

Nói chung xử lý hoá chất không thể coi như một phương tiện để loại bỏ virus khỏi cây trồng. Các chất hoá học thường dùng để ức chế phát triển các triệu chứng và sự nhân nhanh, lây lan của virus (Tomlinson, 1982). Chúng không trực tiếp kìm hãm hoạt động của virus mà làm tăng khả năng đề kháng của cơ thể thực vật (Antonin và ctv, 1981). Các chất riboside (virazole hoặc ribavirin) có công thức 2,4

Triazole - 3 - carboxamide đã làm tăng tỷ lệ cây sạch bệnh lên đáng kể, giúp ích thực sự cho các kỹ thuật khác loại bỏ virus có hiệu quả hơn.

Chất ribavirin là đồng phân của guanosin có phổ hoạt động kháng virus rộng đối với cả hai loại virus (virus chứa RNA và DNA) (Sidwell và ctv, 1972). Ngoài ra, nó còn có những hoạt động ức chế quá trình sao chép, nhân nhanh của virus trong toàn bộ cơ thể của cây trồng.

Tất cả các chất hoá học có tác dụng kìm hãm sự hoạt động của virus đã

được Kartha (1986) tập hợp trong bài tổng quan và ông chỉ ra rằng chúng là đồng phân của purine và pirimidine, amino acid, hóoc môn sinh trưởng thực vật và các kháng sinh. Trong quá trình nuôi cấy mô, tế bào, sự có mặt của các chất này (virazole) có thể duy trì trạng thái vô trùng lâu hơn, giúp cho việc loại bỏ virus có hiệu quả hơn (Hansen và Lane, 1985).

Gần đây người ta còn sử dụng một nhóm các chất khác, như arabinoside hoặc vidarabine để làm sạch virus trong quá trình nuôi cấy mô phân sinh ở khoai lang và cho kết quả tốt (Stone và ctv, 1978).

#### **IV. KIỂM TRA, XÉT NGHIỆM VIRUS**

Không phải tất cả các loại cây sau quá trình xử lý phối hợp nhiệt và nuôi cấy đỉnh sinh trưởng đều sạch virus, vì vậy cần phải tiến hành xét nghiệm. Khoảng thời gian từ lúc tái sinh cây cho đến khi xét nghiệm cần đạt được 4 đến 6 tháng để các thể virus còn tồn lại trong thực vật đạt được nồng độ cần thiết cho việc xét nghiệm đảm bảo độ chính xác. Xét nghiệm virus trong khuôn khổ của qui trình làm sạch virus hoàn toàn khác quá trình phân tích virus ở một cây trồng. Đối với việc làm sạch virus thì độ chính xác của phương pháp thử virus trong mỗi loại xét nghiệm mang ý nghĩa quyết định, cho nên mỗi một cây cần được xét nghiệm theo nhiều phương pháp khác nhau, trong đó cần chú ý tới các phương pháp xét nghiệm nhưng loại virus phổ biến và có ý nghĩa kinh tế. Đối với việc phân tích virus một loại cây trồng, người ta chỉ chú ý tới số lượng cũng như sự phân loại của chúng. Độ nhạy cảm của mỗi phương pháp xét nghiệm có vai trò thứ yếu. Sau đây là một số phương pháp xét nghiệm virus được ứng dụng cho các loại cây hoa:

##### **1. Xét nghiệm bằng cây chỉ thị**

Dùng dịch ép của thực vật cần được xét nghiệm gây nhiễm trên một cây chỉ thị thích hợp hoặc dùng phương pháp ghép có thể chứng minh được sự có mặt của virus. Chỉ sau khi thực hiện phương pháp thử này, kết luận về bệnh virus mới thực sự đảm bảo tính chính xác của nó. Phương pháp thử bằng cây chỉ thị luôn được coi là phương pháp xác định đầu tiên và cũng là phương pháp nhạy cảm nhất, tuy nhiên kết quả xét nghiệm cũng còn phụ thuộc các yếu tố khác nữa.

Tro ng trường hợp xét nghiệm hàng loạt, công việc gây bệnh nhân tạo đối với

số lượng cây chỉ thị là 10.000 đến 100.000 trong thời gian nhiều tháng thì độ chính xác của phương pháp giảm đi và không thể tiến hành các thí nghiệm lặp lại. Tuổi của cây trồng cũng như trạng thái sinh lý của chúng trong các mùa khác nhau của 1 năm ảnh hưởng rất nhiều đến tính chính xác của phương pháp xét nghiệm. Vì lý do đó trong trường hợp phải xét nghiệm hàng loạt, phương pháp dùng cây

chỉ thị không đảm bảo bằng phương pháp miễn dịch. Nếu chỉ xét nghiệm một số lượng cây vừa phải, ví dụ một nghìn cá thể thì phương pháp dùng cây chỉ thị không cần thay bằng phương pháp khác vì công việc có thể tiến hành trong một thời vụ thích hợp. Triệu chứng bệnh lý có thể quan sát được sau 3 đến 5 ngày song thông thường là sau hai tháng, vì vậy cần một diện tích nhà kính khá rộng trong một thời gian tương đối dài, chi phí cho xét nghiệm bằng phương pháp cây chỉ thị thường đắt gấp 3 lần so với phương pháp huyết thanh.

## 2. Phương pháp thử huyết thanh

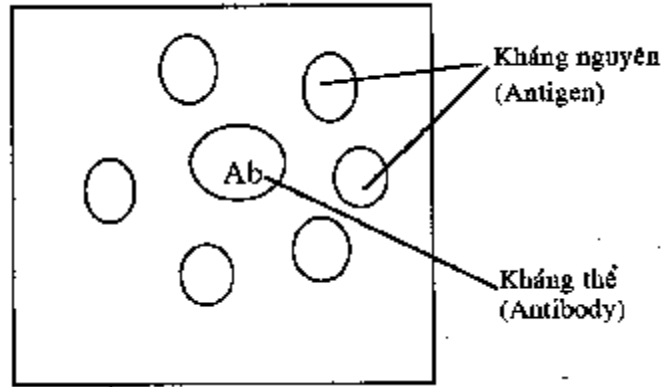
Phương pháp xét nghiệm này dựa trên cơ sở khả năng liên kết giữa các kháng thể với kháng nguyên đặc trưng riêng của nó. Kháng nguyên là một chất protein có khả năng tạo ra một phản ứng miễn dịch khi chúng được đưa vào cơ thể động vật. Hầu hết virus thực vật đều có tác dụng như những kháng nguyên. Khi chúng được đưa vào một cơ thể động vật thích hợp (như thỏ), chúng sẽ kích thích sản xuất ra những kháng thể. Những kháng thể này có thể được dùng trong các xét nghiệm huyết thanh (Van Regenmontel, 1982).

Phản ứng kết tủa xảy ra khi có sự kết hợp giữa một kháng nguyên và một kháng thể thích hợp. Trong các phản ứng như vậy, kháng nguyên và kháng thể liên kết với nhau tạo thành những thể huyền phù không tan (latex). Phản ứng miễn dịch này chính là nguyên lý của những phương pháp xét nghiệm huyết thanh. Dựa vào hình dạng, kích thước, sự phân bố của sản phẩm phản ứng, người ta có thể phân biệt được các loại xét nghiệm sau:

- Xét nghiệm căn cứ vào sự kết tủa của các thành phần kháng nguyên và kháng thể xảy ra trong môi trường lỏng. Phương pháp thử này thường được dùng để so sánh sự khác nhau của các virus. Mối quan hệ giữa các virus được xác định thông qua mức độ pha loãng của kháng huyết tương trong phản ứng kết tủa. Chuẩn độ cho một kháng huyết tương là mức độ pha loãng cao nhất của kháng huyết tương đó đủ để thực hiện phản ứng miễn dịch với một loại virus đồng dạng.

a) *Xét nghiệm miễn dịch khuếch tán*, được thực hiện trong thạch. Sản phẩm phản ứng liên kết giữa kháng nguyên và kháng thể sẽ khuếch tán đều qua thạch (Akers và Steere, 1967). Miễn dịch khuếch tán dùng để nhận biết một loại virus gọi là Radial diffusion (Mancini và ctv, 1965). Trong miễn dịch khuếch tán kép (gel double-difusion), kháng nguyên và kháng thể được chứa trong những hố thạch và chúng sẽ khuếch tán lẫn vào nhau (Ouerlory, 1968), hình 6.1.





### ***b, Phản ứng ngưng kết (Agglutination test)***

Tro ng phản ứng này, kháng thể hoặc kháng nguyên được bám vào những tiểu phần lớn hơn. Do vậy khi phản ứng xảy ra, phức chất giữa Ab- Ag có kích thước lớn hơn, dễ quan sát. Phương pháp này sử dụng để phát hiện nhanh virus lây nhiễm khoai tây trên đồng ruộng (Van Slogteren, 1955). Giá thể để kháng nguyên hoặc kháng thể bám có thể là Polystyrene hoặc vi khuẩn (*Staphylococcus aureus*).

### ***c) Miễn dịch liên kết với enzyme [Enzyme linked immuno sorbent assay (ELISA)]***

Tro ng phương pháp này độ nhạy cảm của phản ứng miễn dịch để phát hiện được virus tăng lên do sự liên kết của phức chất Ab - Ag với enzyme nền. Do sự bổ sung thêm chất enzyme nền, màu của phản ứng thể hiện rõ hơn, cho phép người ta định lượng được phản ứng miễn dịch và phát hiện virus ở nồng độ rất thấp (Voller và ctv 1976). Ngày nay người ta đã sử dụng ELISA để nhận biết nhiều loại virus thực vật khác nhau (Koenig và Paul, 1983). Một số trung tâm nghiên cứu nông nghiệp quốc tế đã điều chế những bộ xét nghiệm ELISA khác nhau: CIP sản xuất bộ ELISA để nhận biết các virus X, Y, M ở khoai tây, virus chân chim ở cây khoai lang và virus da cóc ở cây sắn.

Tổ chức nghiên cứu chuỗi thế giới (INBAP) đã nghiên cứu sản xuất chế phẩm ELISA để phát hiện virus chùm ngọn ở cây chuối.

Rõ ràng phương pháp xét nghiệm huyết thanh ngày càng được cải tiến và sử dụng để phân biệt nhiều loại virus. Những ưu điểm chính của phương pháp là: chính xác, nhanh (kết quả thu được chậm nhất sau 48 giờ), chi phí cho xét nghiệm thấp nhu cầu về hoá chất, điều kiện thực nghiệm đơn giản, dễ kiểm.

## **3. Xét nghiệm bằng lai phân tử**

Lai phân tử acid nucleic là một kỹ thuật mới phát triển gần đây, được áp dụng để nhận biết, phát hiện vật liệu di truyền của virus.

Đây là phương pháp phân tích có độ nhạy, tính đặc trưng cao để nhận

biết

RNA hoặc DNA của virus (Abu, Samah và Raudles. 1983).

Kỹ thuật bao gồm những nội dung sau: sản xuất DNA tương đồng dựa trên các chế phẩm acid nucleic của virus. DNA tương đồng này sẽ được gắn với các

đồng vị phóng xạ  $^3\text{H}$  hoặc  $^{32}\text{P}$ , và sau đó cho kết hợp với dịch chiết từ cây bị nhiễm bệnh. Trước đó, acid nucleic trong dịch chiết được tách ra và phân giải qua sắc ký trên thạch và cố định trên màng nitrocellulose. Biểu đồ chất đồng vị phóng xạ được sử dụng để phát hiện các cặp lai dương tính.

DNA tương đồng được sản xuất đặc trưng cho từng loại virus và kỹ thuật

này cho phép sàng lọc một số lượng lớn mẫu bệnh.

#### **4. Xét nghiệm bằng kính hiển vi điện tử**

Kính hiển vi điện tử với sự hoàn chỉnh về kỹ thuật và sau khi ứng dụng phương pháp nhúng (Brandes, 1957) có thể đưa vào xét nghiệm hàng loạt với số lượng mẫu vừa phải. Khi chứng minh virus hình đĩa và hình sợi ở hoa phong lan (Corbert, 1974), ở hoa huệ (Asges và ctv, 1974) kính hiển vi điện tử đã mang lại những kết quả đáng tin cậy đối với xét nghiệm hàng loạt. Khó khăn chủ yếu hiện nay là chi phí cho thiết bị và số lượng mẫu được xét nghiệm bị hạn chế, đồng thời loại virus được chứng minh cũng chỉ là loại hình đĩa và hình sợi.

Nếu virus tồn tại dạng cầu thì rất khó phát hiện vì nó khá giống các cơ quan

tử của tế bào thực vật bình thường.

#### **5. Kiểm định là phương pháp duy nhất để duy trì tính sạch bệnh.**

Trồng vật liệu sạch bệnh thu được bằng phương pháp chọn lọc qua kiểm định có thể coi là giải pháp tối thiểu chóng mang lại kết quả nếu không tiến hành các phương pháp khác được.

Virus stunt của hoa cúc không mất đi hoặc hạn chế dần khi xử lý nhiệt. Vì vậy chỉ dùng phương pháp chọn lọc bằng xét nghiệm ghép lên cây chỉ thị. Để bảo đảm số lượng giống cần thiết, hàng năm ở Đức phải xét nghiệm 100000 cây ghép. Để sử dụng một cách tối ưu chi phí lớn này, người ta đưa xét nghiệm bằng phương pháp ghép vào một qui trình khép kín. Với việc thực hiện một cách liên tục biện pháp này trong vòng 6 năm người ta đã hạ tỷ lệ nhiễm virus stunt của hoa cúc từ 30% xuống 0% (Oertel, 1976).

#### **6. Kiểm định là khâu cuối cùng trong qui trình làm sạch bệnh**

Nếu trong qui trình làm sạch virus có thể áp dụng được kỹ thuật xử lý nhiệt và nuôi cấy đỉnh sinh trưởng thì việc xét nghiệm virus chỉ còn là biện pháp kiểm tra cuối cùng của quá trình làm sạch virus. Như vậy sẽ có mâu thuẫn với mục đích làm sạch virus nếu người ta sử dụng 50% cây trong tập đoàn cây trồng bị bệnh làm vật liệu ban đầu và coi chúng là những cây có phẩm chất tốt. Một mặt thông qua cải tiến phương pháp xét nghiệm đưa độ chính xác của phương pháp lên cao, người ta phải luôn tính đến số lượng virus bảo tồn ở nồng độ tối thiểu mà phương pháp xét

nghiệm không chứng minh được. Vì vậy theo kinh nghiệm thực tế cần tiến hành xét nghiệm theo phương thức sau:

Đưa vật liệu ban đầu vào xử lý nhiệt trong một thời gian dài để làm sạch những virus miễn cảm nhiệt độ, sau đó dùng phương pháp nuôi cấy đỉnh sinh trưởng. Sau từ 4 đến 6 tháng kể từ ngày nuôi cấy mới bắt đầu xét nghiệm. Thời gian này đủ để tạo virus bảo tồn trong cây đủ nồng độ cho phép chứng minh được. Người ta hạn chế xét nghiệm ở số lượng 20000 - 30000 cây, ở hoa cúc đó là loại virus stunt, virus khảm, virus asperenie, virus B. Những cá thể được xác định là sạch bệnh là nguồn vật liệu ban đầu để cung cấp cây mẹ cho sản xuất. Khoảng 5 - 10% số cá thể này được tách riêng ra thành tập đoàn nhân để các nhà tạo giống cải tiến tính chất theo ý muốn và độ thuần chủng (đồng nhất) của giống. Người ta kiểm tra những cá thể này bằng tất cả các phương pháp xét nghiệm virus hiện có. Với hoa cẩm chướng người ta đã kiểm tra bằng phương pháp huyết thanh các loại virus carnation wilt, carnation latent và bằng cây chỉ thị nhằm loại trừ những virus hiểm sinh sản không có biểu hiện nhận biết được. Những cây xác minh được là khỏe, người ta tiến hành ươm cành rồi sau đó đưa vào xử lý nhiệt, tiếp theo người ta nuôi cấy đỉnh sinh trưởng và cuối cùng kiểm tra bằng xét nghiệm virus. Đó là toàn bộ qui trình làm sạch virus khép kín.

Phương pháp làm sạch virus trong qui trình khép kín đã được thực hiện nhiều năm ở xí nghiệp cây con thuộc tỉnh Dresden của Đức đối với hoa cúc, cẩm chướng (Oertel, 1978).

## **V. DUY TRÌ TÍNH SẠCH VIRUS**

Vấn đề có tầm quan trọng đáng kể và cũng là vấn đề quyết định cuối cùng đối với thực tiễn nông nghiệp liên quan tới thời gian duy trì được cây trồng sạch virus đối với thực tiễn sản xuất thì cây coi là bị bệnh chỉ khi nào năng suất giảm xuống.

Hiện nay trong sản xuất nông nghiệp và trồng cây ăn quả, vấn đề này còn chưa được giải quyết thỏa đáng. Việc sản xuất dòng elite trong qui trình sản xuất khoai tây giống kéo dài nhiều năm, trong khi đó nguy cơ tái nhiễm thông

qua yếu tố truyền bệnh luôn tồn tại và phụ thuộc vào điều kiện khí hậu. Trong ngành trồng hoa tình hình thuận lợi hơn nhiều. Hiện nay ở CHLB Đức, với tập đoàn nhân của hoa cúc và cấy chướng người ta duy trì được tính sạch bệnh trong một năm rưỡi, trong khi chỉ cần một năm là có thể thay được hoàn toàn tập đoàn giống. Vì vậy vấn đề nêu ra ở trên có thể được trả lời tóm tắt như sau: Khối lượng và chất lượng vật liệu có sẵn ban đầu xác định khả năng sản xuất một vụ không bị giảm năng suất do bệnh virus.

Giảm năng suất có thể xuất hiện nếu nguồn giống sạch virus bị nhiễm sớm. Đối với khoai tây thì nhiễm chủ yếu do các yếu tố truyền bệnh sống ở điều kiện tự nhiên. Đối với cây hoa thì tái nhiễm xảy ra khi đưa cây giống sạch bệnh vào các xí nghiệp sản xuất bị nhiễm sẵn. Có thể nói rằng, trong ngành trồng hoa qui trình làm

sạch virus được coi như mô hình phương pháp. Cũng qua đó chúng ta nhận thấy phương pháp làm sạch virus không phải là biện pháp chữa bệnh một lần mà là một quá trình phức tạp đối với cây trồng đã bị bệnh từ trước.

Người ta có thể so sánh bệnh virus của thực vật nhân giống vô tính như bệnh xã hội của con người, không thể chữa bằng thuốc men mà phải thay đổi cả thói quen sinh hoạt. Ở các xí nghiệp công nghiệp sản xuất giống cây trồng có thể gọi các tiến bộ khoa học kỹ thuật là một loại stress, khi mà từ một cây cúc mẹ một năm cho 100 cây ươm, trước kia chỉ thu được 15 và một cây ươm chỉ cần 11 ngày để ra rễ, trước đây cần 21 ngày. Để tạo điều kiện cho các xí nghiệp sản xuất công nghiệp cây giống thu được những thành tích to lớn hơn nữa thì việc đầu tư hàng năm cho công tác chống bệnh virus trở nên cần thiết.

Trong trường hợp nhân giống vô tính invitro thì việc làm sạch virus càng phải được coi là điều kiện trước tiên.

## **VI. QUY TRÌNH PHỤC TRÁNG**

Phục tráng, sản xuất cây sạch bệnh bao gồm nhiều giai đoạn, sử dụng kết hợp nhiều công nghệ. Để vật liệu sạch bệnh phân bố đến người nông dân phải qua nhiều công đoạn, chúng cần được thực hiện một cách nghiêm ngặt (hình 6.1).

## **VII. MỘT SỐ KẾT QUẢ PHỤC TRÁNG, TẠO CÂY SẠCH BỆNH**

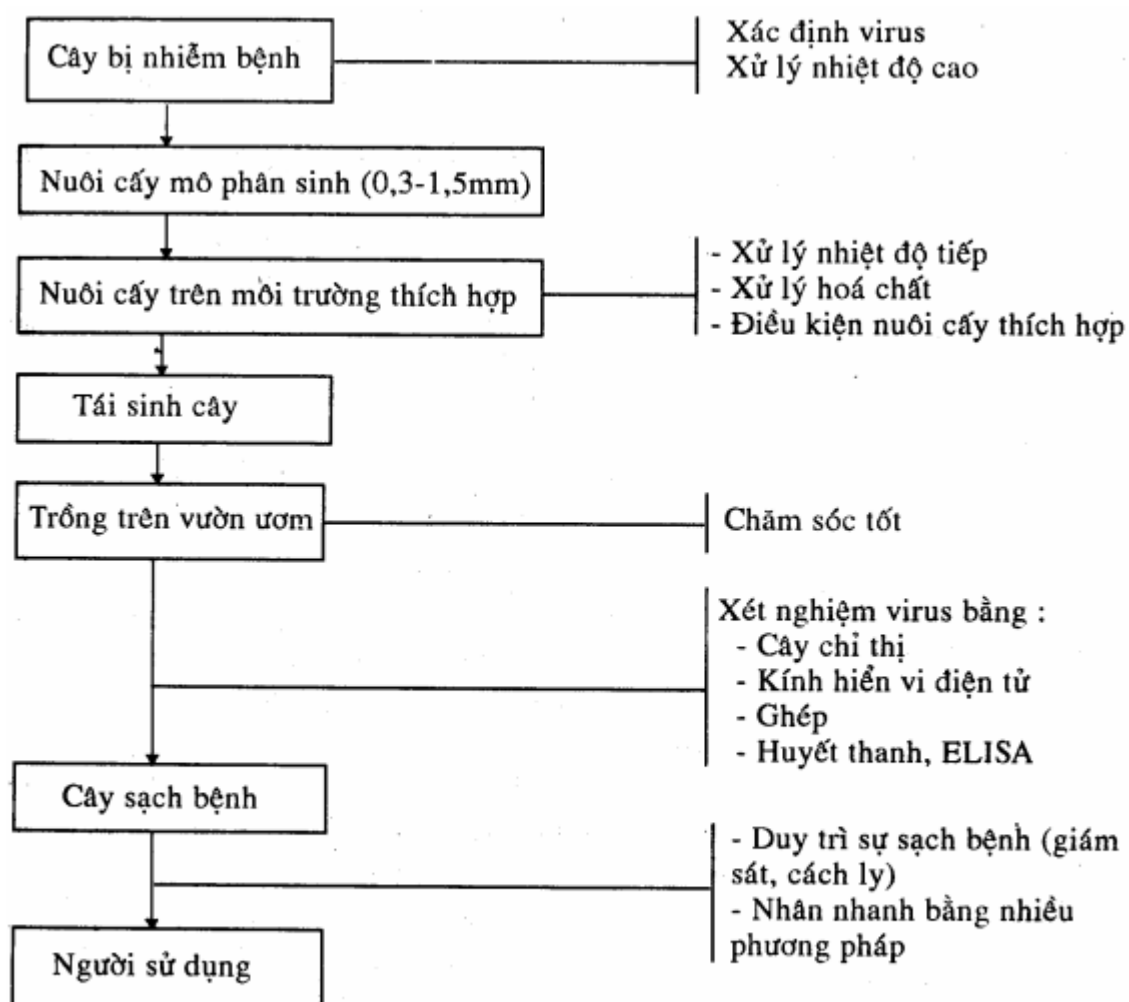
### **1. Cây lương thực**

#### **- Khoai tây:**

Khoai tây là cây trồng ở châu Âu, được nhân giống vô tính và bị virus

phá hoại nhiều nhất. Trong thời gian qua việc làm sạch virus ở khoai tây mới được ứng dụng một cách chậm chạp trong quá trình duy trì giống. Người ta chú ý nhiều nhất tới việc tạo ra các cây giống sạch bệnh bằng qui trình thử virus và trồng ở các khu vực sạch bệnh để tránh tái nhiễm thông qua các loại rệp lá. Qui trình được sử dụng chủ yếu là giết các cây cỏ có thể truyền bệnh vào củ khoai tây (Klinkowski và Schmelzer, 1974). Tài liệu cho biết qui trình này có thể nâng cao hiệu suất thông qua xử lý nhiệt và nuôi cấy đỉnh sinh trưởng. Quá trình xử lý nhiệt ở nhiệt độ giữa

32 và 38°C trong thời gian 7 ngày đến 7 tuần và sau đó nuôi cấy đỉnh sinh trưởng có thể loại trừ được virus A, xoắn lá, x và y trong khi virus M và S cũng được giảm đi một cách đáng kể (Kassanis, 1950; Thomson, 1956-1958; Quak, 1961; Kassanis và Varna, 1967; Stace-Smith và Mellor, 1968; Mc Donald, 1973; Pett, 1974a; Wang và Huang, 1975).



(Theo Walbey, 1980)

Hình 3.1

Các ảnh hiển vi điện tử của đỉnh sinh trưởng khoai tây có độ lớn từ 80- 100mm cho thấy chúng vẫn còn chứa trong tiêu bản tới 12 thể virus x (Krylo và ctv, 1973). Tuy vậy sau quá trình phân loại từ các đỉnh sinh trưởng đó vẫn

thu được một tỷ lệ phần trăm nhất định các cây sạch virus.

## 2. Cây thức ăn gia súc

Để sản xuất hạt giống cây trồng làm thức ăn gia súc, ví dụ cỏ Tam Diệp, cần phải có cây bố mẹ sạch bệnh virus để tránh sự lây bệnh thông qua hạt giống và đảm bảo thu được năng suất hạt cao. Người ta nghiên cứu nhiều phương pháp làm sạch virus khác nhau. Xử lý lạnh và nuôi chồi ngọn mang lại tốc độ sinh trưởng cao, nhưng chỉ sạch virus từng phần. Nếu xử lý nhiệt kết hợp với nuôi cấy đỉnh sinh trưởng thì thu được phần lớn các cây sạch virus (Frosheiser, 1969. Barnett và ctv, 1975).

## 3. Hoa huplông

Các loại bệnh virus ở hoa huplông thường làm giảm năng suất một cách đáng kể (Schmidt, 1966). Tiến hành chọn lọc bằng mắt thường (Schmidt và ctv, 1972) xử lý nhiệt và nuôi cấy đỉnh sinh trưởng (Gipperp và ctv, 1974) cải tiến dần tình trạng sạch bệnh. Adams (1975) giải phóng 66% cây khỏi virus hop - mosaic và latent bằng nuôi cấy đỉnh sinh trưởng, sau đó làm sạch virus prunis necrotic ringspot bằng xử lý nhiệt trong thời gian 10 ngày.

## 4. Cây thực phẩm

### - Cây rau:

Hầu hết các loại rau, trừ một vài trường hợp ngoại lệ, đều được nhân giống bằng hạt. Truyền bệnh virus qua hạt vừa mới được chứng minh ở loại virus gây bệnh khảm ở xà lách và đậu (đậu ăn quả trắng hoặc xanh), vì vậy ở những cây trồng này cần phải chọn lọc những cây làm giống và thông qua biện pháp trồng trọt cách ly để tạo ra hạt giống sạch virus. Đối với các loại virus gây bệnh ở cây rau khác thì quá trình lây lan thường xảy ra do cơ học hoặc do rệp lá, vì vậy cần có biện pháp vệ sinh đồng ruộng và phòng trừ tác nhân truyền bệnh. Ở một số cây rau nhân giống vô tính (nấm rơm...), cần sử dụng phương pháp nuôi cấy đỉnh sinh trưởng hoặc xử lý nhiệt để giải phóng virus (Holmes, 1965. Paludan, 1971. Mori, 1971. Walkey, 1968). Đối với nấm rơm, có thể làm sạch bệnh bằng phương pháp xử lý nhiệt (Gandy và Hollings, 1962) và trong thời gian gần đây người ta đã tạo được phương pháp miễn dịch trong agar gel (Meyer và Smith, 1976).

Ngoài ra ở những cây trồng dùng để sản xuất hạt của chúng, có thể nhân giống vô tính qua nhiều năm, ví dụ như súp lơ người ta cũng cần phải có vật liệu sạch bệnh virus ban đầu. Thông qua nuôi cấy mô, người ta tạo được

một vài trăm cây và thông qua biện pháp thử virus đã thu được 3220 cây sạch bệnh (Walkey và ctv, 1974).

## 5. Cây ăn quả

Cây ăn quả thường bị virus phá hoại một cách mạnh nhất. Các thể virus gây bệnh không những lan truyền khi nhân giống vô tính mà cả khi nhân giống bằng hạt. Ngoài ra cây ăn quả thường là cây lâu năm, luôn luôn chịu tác động của các tác nhân truyền bệnh, vì thế chúng rất dễ bị nhiễm bệnh. Việc chứng minh virus nhiễm ở cây ăn quả gặp nhiều khó khăn. Hơn nữa thời gian ủ bệnh dài và khả năng chống chịu cao gây nhiều khó khăn cho việc làm sạch virus cây ăn quả, vì vậy cần tiến hành công tác chống virus gây bệnh ở cây ăn quả một cách liên tục.

Vì việc xử lý nhiệt đối với các cây thân gỗ và việc nuôi cấy đỉnh sinh trưởng của chúng khó khăn hơn nhiều so với các loại cây thân cỏ cho nên từ lâu người ta đã sử dụng phương pháp thử để tìm ra các vật liệu sạch bệnh ban đầu (Kegler, 1964a).

Quá trình xử lý nhiệt đối với cây ăn quả đến nay thường được tiến hành chủ yếu ở những đoạn cành mà các mắt của chúng sẽ được sử dụng để ghép sau này. Theo tài liệu tổng hợp của Nyland và Coheen (1969) về vấn đề xử lý nhiệt ở các cây thân gỗ có thể loại trừ được 4 loại virus ở cây anh đào, 1 loại virus ở cây mận, 7 loại virus ở cây táo, 2 virus ở cây nho đất (nho tây), 6 virus ở cây đào và 2 virus ở phúc bồn tử. Thành công trong xử lý nhiệt ở cây ăn quả không bao giờ đạt được 100% ở mỗi đối tượng ít nhất còn lại một, thậm chí một số loài còn tới 4 virus không bị mất hoạt tính khi xử lý nhiệt.

Nuôi cấy đỉnh sinh trưởng ở cây ăn quả tới nay mới chỉ được sử dụng ở những đối tượng sau: Dâu chua (Putz, 1974), dâu chua quả đỏ (Yones và Vine, 1968), dâu chua quả đen (Zatyko và ctv, 1974-1975) và cây táo (Walkey, 1972). Thực tiễn cho thấy, đối với cây ăn quả (cây thân gỗ) việc nuôi cấy đỉnh sinh trưởng còn gặp khó khăn hơn bởi vì khả năng tái sinh của chúng yếu hơn so với cây thân cỏ. Các thí nghiệm trong những năm sắp tới chắc chắn sẽ nêu ra những kết quả mới, ví dụ: người ta đang nghiên cứu ở đối tượng *Promis amygdalor* (Mehra, 1974) và *Promis serrulata* (Boxus và Quoirin, 1974).

## 6. Cây hoa

Ở đối tượng cây hoa chỉ gặp những cây nhân giống vô tính thường bị bệnh virus Oertel, 1962) trong khi bước đầu người ta chỉ tập trung làm sạch ở những cây hoa có nghĩa kinh tế quan trọng (ví dụ: hoa cúc, hoa anh túc, hoa thủy tiên...). Hiện nay người ta bắt đầu nuôi cấy các loại hoa khác, ví dụ như hải vệ nữ, hoa huệ, hoa layơn... Xử lý nhiệt kết hợp với nuôi cấy đỉnh sinh trưởng được sử dụng để làm sạch virus đối với hoa anh túc (Quak, 1957) và hoa cúc

(Houings và Kassanis, 1957).

Việc tạo cây sạch bệnh trong các xí nghiệp chuyên sản xuất hoa đã trở thành quen thuộc, trong những năm gần đây ở Hà Lan có những cơ sở của tổ chức trồng hoa chuyên môn nhận các loại vật liệu để làm sạch virus. Ở Anh cũng mới tổ chức một cơ quan như vậy gọi tắt là NTD (Lane, 1968). Ở Đức, xí nghiệp ươm cây con ở thành phố Dresden cũng nhận các loại hoa như cúc, hoa anh túc, hoa thủy tiên để xử lý nhiệt và làm sạch virus.

Các điều kiện được nêu ở chương V để làm sạch virus đối với cây hoa thường được thực hiện dễ dàng, vì thế ở những loại cây trồng này việc làm sạch virus thường được thực hiện có kết quả nhất.



## Chương IV

# NUÔI CẤY BAO PHẤN VÀ TẠO DÒNG THUẦN

### 1. Hiện tượng đơn bội của thực vật

Hầu hết các loài cây trồng của chúng ta đều có mức bội thể lớn hơn 1, phổ biến là nhị bội  $2n$  và tứ bội  $4n$ . Như vậy mỗi đặc điểm di truyền ở những cơ thể này đều bị hai hay nhiều allel của một gene chi phối. Nếu đó là những cơ thể dị hợp tử, tức là các gene trong mỗi bộ gene nhị bội hay tứ bội khác nhau thì biểu hiện tính trạng (phenotyp) của gene đó hoàn toàn tùy thuộc vào tính trạng lặn hay trội của chúng quyết định.

Vì vậy mức bội thể lý tưởng để tiến hành nghiên cứu di truyền các tính trạng phải là mức đơn bội hoặc các mức đa bội khác nhưng chúng phải đồng nhất tuyệt đối.

Haploidy là bộ nhiễm sắc thể đặc trưng của trạng thái bào tử của chu kỳ phát triển của cây khoả tử. Nó thể hiện sự sinh sản hữu tính bình thường.

Thỉnh thoảng các tế bào đơn bội có thể phân chia và sinh trưởng tạo thành cây hoàn chỉnh, có số nhiễm sắc thể bằng  $1/2$  cây mẹ. Cây đơn bội thu được từ cây nhị bội gọi là monohaploid, từ cây đa bội được gọi đơn giản là haploid. Thực tế có sự khác biệt về bản chất, ví dụ nếu xuất phát từ tetraploid thì được gọi là dihaploid, ở mức độ bội thể cao hơn gọi là polyhaploid (khác với polyplid).

Ở thực vật, cây đơn bội được hình thành từ nhiều cách khác nhau. Hiện tượng parthenogenesis ở hoa cái, khi tế bào cái không được thụ phấn vẫn phát triển thành cây. Tương tự, ở hoa đực hiện tượng như vậy cũng xảy ra. Cây đơn bội còn xuất hiện khi phân hoá phôi. Trường hợp này có tần số quá thấp trong tự nhiên.

Từ lâu các nhà di truyền và chọn giống cây trồng đã biết sử dụng trạng thái đơn bội của cây trồng để tiến hành nghiên cứu và thông qua đa bội hoá thể đơn bội đó để thu được các dạng đồng hợp tử tuyệt đối.

Thông thường người ta có thể thu được đơn bội bằng hai cách:

- Chọn lọc đơn bội xuất hiện ngẫu nhiên với tỷ lệ rất thấp.
- Lai xa và sau khi một bộ nhiễm sắc thể thoái biến sẽ còn lại bộ nhiễm sắc

thể đơn bội.

Cả hai cách này mới chỉ thành công nhiều ở các cây trồng thuộc họ hoà thảo (Gramineae).

Kỹ thuật tạo cây đơn bội invitro thông qua kích thích tiểu bào tử phát

triển thành cây trong nuôi cấy bao phấn và hạt phấn cho phép nhanh chóng tạo ra hàng loạt cây đơn bội đã là một lối thoát kỳ diệu đối với lĩnh vực ứng dụng đơn bội vào nghiên cứu di truyền và tạo giống cây trồng.

Với các thể bội của thực vật bậc cao người ta có thể sử dụng vào các nghiên

cứu

:

- Nghiên cứu di truyền về mối tương tác của các gene.

- Tạo đột biến ở mức đơn bội.
- Tạo dạng đồng hợp tử tuyệt đối.

## 2. Phương pháp tạo cây đơn bội *in vitro*

### a) Kỹ thuật nuôi cấy

Nuôi cấy hạt phấn: Nuôi cấy hạt phấn thành công đầu tiên vào năm 1950 đối

với hạt phấn cây khoả tử ở đáy ống phấn và tế bào sinh sản tạo thành mô sẹo.

Guha Maheshawari ( 1964, Ấn Độ) đã nuôi cấy thành công hạt phấn cây bí tử tạo phôi và từ các phôi này đã cho cây con hoàn chỉnh.

Đặc biệt năm 1968, Nizecki và Ocno đã nuôi cấy thành công hạt phấn lúa, thu được cây đơn bội, tạo ra một khả năng ứng dụng rất lớn cho công tác chọn tạo giống lúa.

Có 3 phương thức nuôi cấy hạt phấn sau đây:

1. Nuôi cấy hạt phấn trưởng thành trên môi trường nửa cứng. Callus và cây

con được phát sinh trực tiếp từ túi phấn.

2. Nuôi cấy túi phấn trong môi trường nước, hạt phấn giải phóng ra ngoài, phôi cây con tái sinh từ hạt phấn.

3. Nuôi cấy hạt phấn non.

Kết quả thu được qua nuôi cấy túi phấn có thể là: mô sẹo, phôi, cây con. Nhiều khi trên cùng một thí nghiệm nuôi cấy một loại hạt phấn có thể thu được cả ba loại. Kết quả phụ thuộc vào giai đoạn phát triển của hạt phấn và trạng thái sinh lý của cây cho phấn. Nhìn chung tỷ lệ hạt phấn, túi phấn cho kết quả rất thấp, khoảng 1-2% số hạt phấn, túi phấn được cấy. Dĩ nhiên là tỷ lệ này phụ thuộc vào bản chất kiểu gene và các chất điều hòa sinh trưởng được bổ sung vào môi trường, nhất là nhóm cytokinin BA, zeatin, kinetin, hoặc nguồn carbon cung cấp, glucoza, maltosa v.v...

Những môi trường chính sử dụng cho nuôi cấy túi phấn và phấn được tập

hợp trong hai nhóm (xem phần phụ lục)

Nhóm 1: Bao gồm muối khoáng, vitamin và đường. Thành phần môi trường

này dùng chung cho cả hai giai đoạn: tạo mô sẹo và tái sinh cây con.

Nhóm 2: Ngoài những thành phần trên, môi trường phải được bổ sung thêm các chất điều hòa sinh trưởng auxin, cytokinin với một tỷ lệ thích hợp, hoặc than hoạt tính và các axit amin khác như: glutamin, serin và asparagin. Những loài thực vật sử dụng môi trường nhóm 1 là: thuốc lá và cây họ cà độc được.

Những thực vật sử dụng môi trường nhóm hai là: lúa, lúa mì. Các phấn và túi phấn ở cây này tạo mô sẹo sau đó mới tái sinh cây đơn bội, hoặc  $2n$ .

***b, Phương thức phát sinh cây đơn bội***

Hiện tượng phát sinh cây đơn bội từ các tế bào giao tử đực của thực vật được gọi là sinh sản đơn tính đực (Androgenesis).

Người ta phân biệt 3 phương thức sinh sản đơn tính được:

*Sinh sản đơn tính trực tiếp từ tiểu bào tử:*

Tiểu bào tử trong bao phấn hay phân lập // Phôi // Cây đơn bội.

Cấu trúc dạng phôi (embryoid) phát triển trực tiếp từ hạt phấn. Quá trình này

thường xảy ra trong bao phấn.

Ví dụ điển hình là: Cà độc dược *Datura*, Thuốc lá *Nicotiana*

*Sinh sản vô tính qua mô sẹo:*

Tiểu bào tử trong bao phấn hay tự do // Mô sẹo // Chồi // Cây hoàn chỉnh (n=l)

Cây hoàn chỉnh phát triển từ khối mô sẹo, khối mô này thường phát triển ra

ngoài bao phấn.

Ví dụ: Lúa (*Oryza*, Cải (*Brassica*), Hoa huê (*Lolium*), Lúa mạch (*Hordeum*).

*Sinh sản đơn tính hỗn hợp:*

Giai đoạn phát triển mô sẹo xảy ra rất ngắn và khó nhận biết.

Ví dụ: Cà độc dược (*Datura*); Cà chua (*Lycopersicon*).

### **c) Các bước phát triển bình thường và phát triển phôi của hạt phấn**

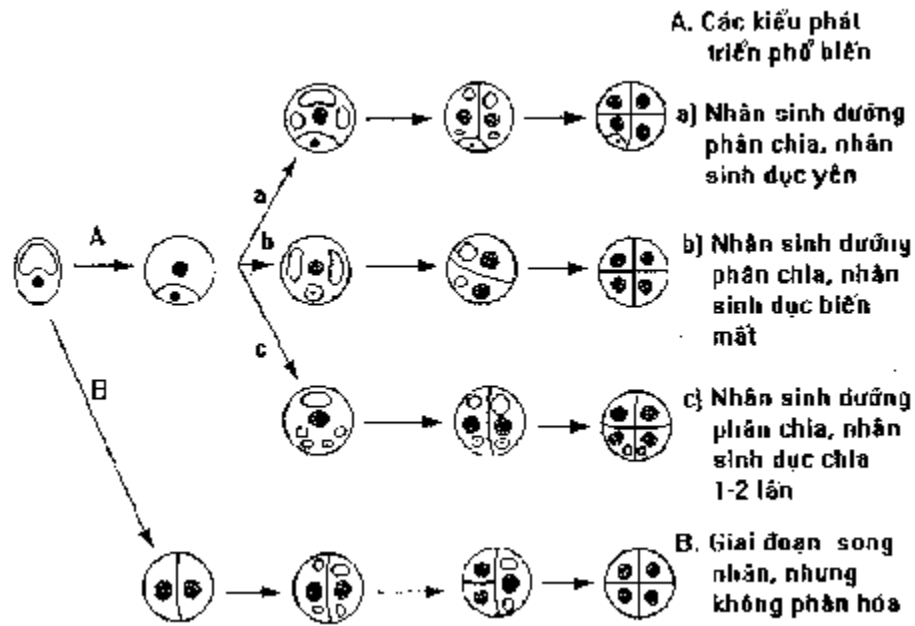
Bình thường sau khi được giải phóng từ tứ tử hạt phấn chứa một nhân, giai đoạn này được gọi là giai đoạn hạt phấn đơn nhân. Sau đó nhân chia đôi tạo thành 1 nhân dinh dưỡng và 1 nhân sinh dục. Nhân sinh dục lại chia đôi và 2 nhân này sẽ làm nhiệm vụ thụ tinh kép cho noãn và nội nhũ của túi phôi.

Sunderland (1970) cho rằng: Tro ng nuôi cấy invitro, bước phát triển đầu tiên của hạt phấn vẫn xảy ra như bình thường cho tới giai đoạn 2 nhân. Quá trình tạo phôi thường bắt đầu từ nhân sinh dục, nhân dinh dưỡng hay cả hai nhân, song chủ yếu là nhân dinh dưỡng, trong khi nhân sinh dục chỉ phân chia một vài lần rồi ngừng hẳn. Có trường hợp ngoại lệ cây đơn bội phát triển từ nhân sinh dục nhưng thường rất yếu.

Cũng có ý kiến ngược lại: Raghavan (1977) cho rằng phần lớn phôi

*Hyocyanus niger* thu được bằng nuôi cấy bao phấn có nguồn gốc nhân sinh dục.

Về nguyên tắc kỹ thuật, nuôi cấy invitro cho phép tạo được đơn bội bằng nhiều con đường khác nhau, nhưng con đường bắt đầu từ tiểu bào tử vẫn là tiện lợi nhất.



Hình 6.1: Các con đường phát triển của tiểu bào tử trong nuôi cấy bao phấn và hạt phấn dẫn đến sự hình thành phôi đơn bội

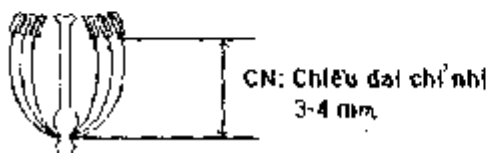
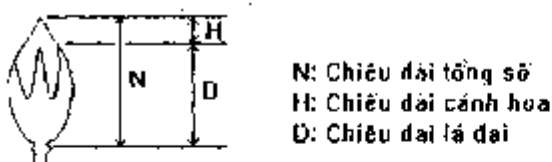
**d, Nhận biết về các giai đoạn phát triển của tiểu bào tử**

Muốn nuôi cấy thành công trước hết phải nắm vững 3 giai đoạn phát triển

của các giao tử đực trong túi phấn.

Ở cây thuốc lá và các cây hai lá mầm có thể sử dụng các chỉ tiêu như

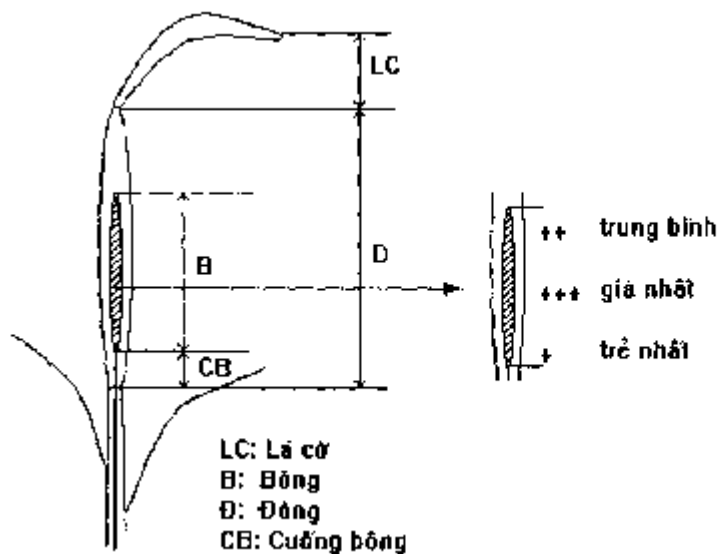
dài nụ, chiều dài lá đài, chiều dài cánh hoa và chiều dài chỉ nhị (hình 9.2).



Hình 9.2 : Một số thông số hình thái của các bộ phận hoa liên quan đến tuổi sinh lý của hạt phấn trong các bao phấn cây hai lá mầm

**N :** Chiều dài tổng số của nụ.  
**H :** Chiều dài cánh hoa như khoai tây.  
**D :** Chiều dài lá đài.  
 Khi chọn nên sử dụng loại nơ có Đ:N  
 Chiều dài chỉ nhị CN = 3-4mm khi tiến hành cấy.

Ở cây một lá mầm như lúa mỳ hay lúa nước có thể sử dụng các chỉ tiêu như nêu trong hình dưới đây. Mức độ phát triển của bao phấn rất phụ thuộc vào vị trí hoa trên bông. Do đó khi tiến hành lấy hoa để tách bao phấn phải chú ý đến vị trí hoa trên bông (hình 6.3)



Hình 9.3 : Một số thông số hình thái của hoa liên quan đến mức độ già sinh lý của hạt phấn ở cây một lá mầm

CL : Lá cờ  
 B : Bông  
 CB : Cường bông  
 Đ : Đòng  
 Tìm tỷ lệ  $CL/Đ$  thích hợp khi hái đòng hoặc tỷ lệ  $B+CB/Đ$  trong khi tiến hành cấy.

### e) Xử lý trước khi nuôi cấy

Nụ hoặc đòng trước khi nuôi cấy được xử lý gây shock bằng cách cắt khỏi cây và để ở 2- 5°C trong thời gian 24-72 giờ sẽ có hiệu quả. Bản chất của hiệu quả kích thích là do tác động của lạnh:

- Kích thích sự phát triển không bình thường của giao tử đực.
- Tích lũy hạt phấn đơn nhân (ức chế sự phát triển tiếp ở các giai đoạn sau).

### 3. Tính toán hiệu quả nuôi cấy đơn bội

Kết quả nuôi cấy được tính theo một số tỷ số sau:

#### a) Tỷ lệ bao phấn tạo callus và phôi:

$$CR = \frac{(NAC + NAE)}{NA} \cdot 100$$

CR : Tỷ lệ tạo mô sẹo tính theo %

NAC : Số bao phấn có callus.

NAE : Số bao phấn có phôi

NA : Tổng số bao phấn được cấy.

#### b, Tỷ lệ bao phấn có phôi (CE tính theo %):

$$CE = \frac{NAE}{NA} \cdot 100$$

#### c) Tỷ lệ callus và phôi trên số hạt phấn nuôi cấy (SE tính theo %):

$$(NC + NE)$$

$$SE = \frac{\quad}{Na.f} 100$$



- NC : Số callus.  
 NE : Số phôi.  
 f : Số hạt phấn/Bao phấn.

**d, Năng suất tạo callus hay tạo phôi**

**(PE):**

NC + NE

$$PE = \frac{\quad}{NA}$$

Quan sát của nhiều tác giả cho thấy, dùng những cây mẹ có nguồn gốc bao phấn (ví dụ những cây được đồng hợp tử hoá bằng nuôi cấy bao phấn invitro) để thu bao phấn cho nuôi cấy tiếp theo thì năng suất tạo callus và tạo phôi tăng lên đáng kể.

- |           |                                  |            |
|-----------|----------------------------------|------------|
| Lúa mỳ:   | - Giống lùn Cesar (2n=42) cho    | CR = 1%    |
|           | - Dòng lưỡng đơn bội (2n=42) cho | CR = 10%   |
| Thuốc lá: | - Giống thuần cho                | CR = 0,27% |
|           | - Giống lai                      | CR = 1,45% |
|           | - Giống hỗn hợp                  | CR = 0,55% |
|           | - Dòng lưỡng đơn bội             | CR: 4-20 % |

#### **4. Hiện tượng bạch tạng trong nuôi cấy đơn bội**

Ở các đối tượng cây hai lá mầm như *Datura*, *Atropa*, *Nicotiana*, *Brassica*... khi nuôi cấy bao phấn cây đơn bội thường phát triển trực tiếp từ tiểu bào tử và ít khi xuất hiện cây bạch tạng. Nhưng ở những đối tượng cây một lá mầm như lúa nước (*Oryza*), lúa mỳ (*Triticum*)... cây hoàn chỉnh phát sinh thông qua giai đoạn mô sẹo thì tỷ lệ cây bị bạch tạng chiếm khá cao (20-30 % hoặc cao hơn nữa).

Tỷ lệ cây bạch tạng phụ thuộc vào:

- a) Tuổi mô sẹo cấy chuyển từ môi trường tạo mô sẹo sang môi trường tái

sinh cây. Càng cấy chuyển muộn tỷ lệ bạch tạng càng cao.

- b, Nhiệt độ nuôi cấy: Nhiệt độ cao thường làm tăng số lượng cây bạch tạng.

Nghiên cứu về siêu cấu trúc tế bào lá cây bạch tạng cho thấy trong tiền lập thể của cây bạch tạng không có ribosom. Như vậy quá trình sinh tổng hợp các protein hoặc các tiểu phần protein của lập thể này không hoàn chỉnh, dẫn đến tình trạng lập vô sắc không phát triển thành lục lạc được.

Cũng có giả thuyết giải thích hiện tượng bạch tạng là kết quả của hiệu ứng mẹ: Hiệu ứng mẹ biểu hiện rõ ở một số đặc điểm di truyền tế bào chất: Khi thụ phấn chỉ có nhân của tế bào sinh dục đực được chuyển sang tế bào noãn. Vì vậy các tính trạng di truyền tế bào chất chỉ di truyền theo đường mẹ. Hạt phấn là tế bào chứa rất ít nguyên sinh chất, tức là số lượng ty thể và tiền lục lạc cũng rất

ít. Khi nuôi những tế bào này thành những cơ thể thực vật hoàn chỉnh có thể xảy ra hiện tượng mất cân đối trong tương tác di truyền giữa nhân và cơ quan tử, dẫn đến sai lệch trong quá trình phát sinh cơ quan tử, đặc biệt là lục lạp.

## 5. Ứng dụng đơn bội

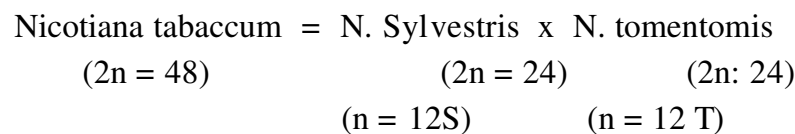
Thể đơn bội thực vật được sử dụng trong các lĩnh vực sau:

a) **Nghiên cứu về phôi học thực nghiệm:** chủ yếu trên các đối tượng mà phôi phát triển trực tiếp từ tiểu bào tử trong nuôi cấy bao phấn thông qua quá trình sinh phôi đơn tính (androgensis).

b, **Nghiên cứu về tế bào học:** Cây đơn bội có thể sinh trưởng và phát triển

tới giai đoạn ra hoa, nhưng bất dục. Khi nghiên cứu quá trình phân bào giảm nhiễm đầu tiên của tế bào mẹ hạt phấn cây đơn bội, có thể phát hiện được nhiều điều lý thú về quan hệ tương tác giữa các nhiễm sắc thể, bởi vì bộ nhiễm sắc thể đơn bội không thể giảm nhiễm bình thường được.

Ví dụ: Nghiên cứu bộ nhiễm sắc thể cây thuốc lá (*Nicotiana tabaccum*) nhị bội người ta thấy có 48 NST, lúc phân chia giảm nhiễm chúng sắp thành 2 dãy, gọi là dãy S và dãy T. Mỗi dãy gồm 24 NST. Nuôi cây đơn bội của nó có số lượng NST  $n=24$  và theo dõi phân chia giảm nhiễm của tế bào mẹ hạt phấn cũng thấy các NST xếp thành cặp: 12S + 12 T. Điều này chứng tỏ bộ NST đơn bội của cây thuốc lá có những biểu hiện như một bộ NST lưỡng bội, vì các NST trong dãy S đều tìm thấy NST tương đồng trong dãy T. Đây là kết quả rất phù hợp với lịch sử phát sinh chủng loại của cây thuốc lá trồng:



□

Hợp bào



□

Lưỡng bội hoá



(=bộ NST của cây thuốc lá trồng)

Như vậy cây thuốc lá trồng là một dạng tứ bội, nhưng không hoàn chỉnh (allotetraploid), biểu hiện là cây đơn bội  $n = 12S + 12T$  bất thụ do không phải tất cả NST của bộ S đều có NST tương đồng ở bộ T.

Cây khoai tây (*Solanum tuberosum*) cũng là một thể tứ bội không hoàn chỉnh.

### c) Nghiên cứu đột biến và di truyền

Tro ng bộ gene đơn bội không có quan hệ tính trội lặn mà chỉ còn quan hệ

bổ

sung giữa các gene, vì vậy việc nghiên cứu chức năng và mối tương tác gene được đơn giản hoá đáng kể.

### d, Tạo giống thuần

*\*Tạo dòng đồng hợp tử:*

Thông thường bằng con đường tự phối, nếu muốn đạt được dòng đồng hợp tử của bộ gene 2x thì phải qua 10 thế hệ và bộ gene 4x thì phải qua 30 thế hệ. Bằng nuôi cấy đơn bội và đa bội chỉ cần 1 thế hệ.

so sánh hiệu quả chọn giống bằng các phương pháp khác nhau:

+ Cây tự thụ

F1 Aa

F2 1/4 AA ; 1/2 Aa ; 1/4 aa

+ Nuôi cấy đơn bội

F1 Aa sẽ cho 1/2 A và 1/2 a giao tử đực

F ĐH 1/2 AA và 1/2 aa

Nếu số locus là 10 thì tự phối cần 410 cá thể mới có một cá thể đồng hợp ở F2. Trong khi đó đơn bội chỉ cần  $2^{10}$  cây ĐH đã có một cá thể đồng hợp.

Nếu số locus là n thì đơn bội cho phép dòng đồng hợp xuất hiện theo tần số

$(1/2)^n$  và phương pháp cổ điển sẽ là  $(1/4)^n$ . Đưa thêm các hệ số:

NE + EC

P1: tần số tạo đơn bội  $\frac{\text{NE} + \text{EC}}{\text{NA} \cdot f}$

P2: tỷ lệ nhị bội hoá thành công

Ta có tỷ số:

$$E = \frac{P1 \cdot P2 \cdot (1/2)^n}{(1/4)^n}$$

Biểu thị hiệu quả so sánh giữa phương pháp đơn bội và phương pháp cổ điển

Nếu E = 1 phương pháp đơn bội hiệu lực hơn

Để được như vậy thì:  $P1 \cdot P2 > (1/2)^n$ , nếu n càng lớn thì  $P1 \cdot P2$  càng nhỏ và

như vậy hiệu lực của phương pháp càng lớn.

Nhưng vì giữa các gene có sự liên kết với nhau cho nên phải

tính:  $P1 \cdot P2 = (1/2)^{n+n}$  n: biểu thị sự liên kết

+ Có thể thông qua tính toán để chọn phương pháp thích hợp

Ví dụ: Có 20 gene độc lập hoặc liên kết theo phương thức trội, siêu trội, bằng

tính toán cho thấy phương pháp đơn bội có ưu thế khi:

- Gene có tương tác di truyền

- Bộ nhiễm sắc rất di hợp

Ở những trường hợp tính di truyền ổn định thì hai phương pháp như nhau.

Ở những trường hợp tính di truyền không ổn định thì phương pháp đơn

bội  
có hiệu quả hơn.

*\* Phân tích so sánh hiệu quả chọn lọc trên đồng ruộng.*

Trong quá trình đánh giá và chọn lọc giống, hiệu quả của chúng thường bị

những yếu tố sau đây cản trở:

- Khả năng xuất hiện các biến dị do gene có hiệu ứng cộng thấp.
- Các đặc tính gene trội thể hiện mạnh lấn át các đặc tính có lợi khác.

- Phân ly trong dòng cao.

Qua thực tế lai tạo, so sánh chọn lọc giữa hai phương pháp cho thấy, qua nuôi cấy, tạo cây nhị bội từ cây đơn bội có những ưu điểm, khắc phục được các thiếu sót trên.

**Bảng 6.1: Những dạng kiểu hình (phenotype) ở các thế hệ khác nhau**

Thế hệ	Các biến dị
F2 (giữa các cá thể)	VA + VD + VE1
F3 (giữa các dòng)	VA + 1/2 VD + VEP
F1 (những cây nhị bội từ cây đơn bội)	2A + VEP

Như vậy chọn lọc từ quần thể các cây nhị bội từ cây đơn bội đã loại trừ được sự ảnh hưởng của gene trội, đồng thời làm tăng được khả năng tích lũy các gene có hiệu ứng cộng lên gấp đôi. .

- Khi ta xét các biến dị con lai của các thế hệ trong phạm vi các lô, dòng, chúng ta cũng thấy các ưu điểm của các phương pháp tạo cây đơn bội.

Những biến đổi xuất hiện trong lô:

Thế hệ	Biến dị
Tro ng các lô F3	1/2 VA + 1/2 VD + VE1
Tro ng các lô F4	1/4 VA + 1/4 VD + VE1
Tro ng quần thể cây nhị bội từ đơn bội VE1	

Rõ ràng trong quần thể con lai ở F3 và F4 qua tự phối, tần số xuất hiện các biến dị do gene trội và gene tính cộng vẫn còn. Nhưng ở quần thể cây nhị bội hoá cây đơn bội chỉ chịu một yếu tố tác động lên quá trình chọn lọc là môi trường.

Kasha, Reinberg và Fedak (Canada)

Đại mạch x Kiều mạch

*Avena*                      *Hordeum*

Chọn lọc theo 3 phương pháp (bảng 9.2):

- Chọn dòng Generalogic G
- Chọn cá thể Single Seed Desent (SSD)
- Đơn bội (DH)

**Bảng 6 .2.**

Phương pháp	SSD(FG)	G(FG)	DH
Chỉ tiêu			
Cặp lai: Paragon x Zephyr			
Ngày trổ	53,6	54,6	55,8
Năng suất khóm	18,8	18,1	17,2
Cặp lai OB73 x Champlain			

Ngày trở Năng suất khóm	21,5	20,4	22,1
----------------------------	------	------	------



So sánh 60 dòng DH với các dòng tự phối canada có:  
17 dòng DH > dòng tự phối về sản lượng  
16 dòng DH > dòng tự phối về kích thước hạt  
14 dòng DH chín sớm hơn

## 6. Sức sống của các cá thể lưỡng nhị bội

Nhìn chung sức sống của các cá thể DH kém hơn các cá thể dị hợp.

Tính dị hợp bảo lưu tăng dần lên vì những thay đổi và đứt khúc NST (chromosome) không sửa chữa được. Trong trường hợp cây DH phải tiến hành tự thụ phấn để tích lũy trị số di hợp bảo lưu - tăng sức sống. Hiện tượng tăng giảm sức sống liên quan tới tính dị hợp được giải thích như sau:

Crick (1974) cho rằng những đoạn ADN không tạo sợi kép mà tạo các dạng

sợi đơn. Đoạn phân tử đơn này miễn cảm với các phân tử của môi trường.

Giả thiết về sự sắp xếp gene trên phân tử ADN có vòng khuyên

S i: gene cảm ứng

R i: gene điều khiển

S ij: gene cấu trúc

Wallace (1975-1976) ứng dụng mô hình này giải thích hiện tượng siêu trội ở *Drosophilla* - đột biến làm tăng sức sống:

A 1   A 1   A 2  
A 2   A 1   A 2

Hiện tượng siêu trội không thể do một đột biến gây ra được.

Ở I thứ tự các gene miễn cảm S được sắp xếp theo thứ tự S 1, S 2, S 3, S 4, nhưng do 2 đột biến mà thứ tự đó thay đổi thành I. với trật tự S 1, S 3, S 4, S 2.

Nếu xét theo thời gian thì sau khi đảo trật tự các gene cảm ứng sản phẩm gene đó sẽ xuất hiện nhanh hơn, sức sống của cơ thể cao hơn.

## 7. Những tồn tại trong nghiên cứu đơn bội

Mặc dù việc kích thích hạt phấn phát triển thành cây đơn bội là niềm hy vọng to lớn cho công tác cải lương giống cây trồng, Melchers (1977) đã đề nghị ứng dụng phương pháp này kết hợp với các phương pháp cổ điển khác, nuôi cấy bao phấn hiện nay vẫn chưa đáp ứng được yêu cầu to lớn của công tác giống cây trồng, vì kỹ thuật này mới thành công ở khoảng trên 30 loài của trên 20 chi. Điều nổi bật là thành công này mới chủ yếu ở các chi và loài thuộc họ cà (Solanaceae), họ cải (Brassicaceae) và hoà thảo (Graminaceae).

Thời gian qua người ta đã tiến hành các thí nghiệm với qui mô lớn trên

đối tượng cây trồng ngũ cốc thuộc họ hoà thảo, nhưng kết quả mới hạn chế ở lúa mì (Piquard, 1978) và lúa nước (Niiseki và Oono, 1971, các tác giả Trung Quốc, Ấn Độ, Việt Nam ...).

Muốn ứng dụng phương pháp đơn bội có hiệu quả đòi hỏi phải có số lượng đơn bội lớn. Nhưng đến nay có thể nói chúng ta chưa nắm được chính xác yêu cầu dinh dưỡng cần thiết.

Đối với thuốc lá, môi trường dinh dưỡng để nuôi bao phấn rất đơn giản gồm muối khoáng và đường saccharose, không cần các chất hữu cơ khác và hoặc môn sinh trưởng (Vasil và Nitsch, 1975).

Thế nhưng để nuôi cấy bao phấn lúa nước và lúa mì thành công, các tác giả Trung Quốc phải dùng thêm dịch chiết khoai tây mà thành phần chưa được biết tới. Mặc dù vậy bao phấn các loại ngũ cốc được nuôi cấy cũng chỉ tạo mô sẹo, để có cây hoàn chỉnh phải tiến hành tạo chồi từ mô sẹo đó. Thông thường thì tỷ lệ bạch tạng rất cao. Ví dụ Mix và ctv (1977) nhận được 3400 cây bạch tạng trong số 4000 cây yếm mạch tái sinh từ mô sẹo bao phấn.

Ngoài ra trong số cá thể thu được thông qua bước tái sinh từ mô sẹo một tỷ lệ đáng kể đã là cây nhị bội (60%).

Tro ng nuôi cấy bao phấn, việc xuất hiện những phôi lưỡng bội từ tế bào lưỡng bội của vỏ bao phấn chưa thể loại trừ được. Vì vậy người ta đang thí nghiệm tạo cây đơn bội từ hạt phấn phân lập. Đương nhiên môi trường nuôi cấy hạt phấn phân lập đòi hỏi phức tạp hơn môi trường dinh dưỡng nuôi cấy bao phấn. Môi trường nuôi hạt phấn *Petunia* có chứa auxin, cytokinin và acid boric.

Thường là người ta phải nuôi cả bao phấn 4- 16 ngày trên một môi trường dinh dưỡng rồi sau đó mới tách riêng hạt phấn để nuôi tiếp tục trên môi trường cũ đó. Hiệu quả của phương pháp này rất cao, đã đạt tới 1000 phôi/đĩa petri. Thông qua quá trình nuôi trước đó môi trường dinh dưỡng được bổ sung thêm những chất cần thiết do bao phấn tiết ra. Glutamin là một thành phần quan trọng, nhưng còn nhiều chất khác vẫn chưa được biết tới.

Sau đây trình bày sơ lược qui trình tạo cây đơn bội thuốc lá từ hạt phấn phân

lập (theo Nitsch, 1976).

#### **a) Chăm sóc**

+ Tạo cây đơn bội: Nụ hoa được xử lý bằng ly tâm 2000 vòng phút trong thời gian 30 phút ở nhiệt độ 5- 10°C, sau khi cắt để 48 giờ ở 2-5°C

+ Tạo cây nhị bội: Nụ hoa được ngâm trong dung dịch 0.04% colchicin và 2% dimethyl sulfoxide (chất dẫn nạp) trong thời gian 24 giờ ở 2-5°C và hút chân không. Sau đó rửa sạch dung dịch colchicin và xử lý lạnh tiếp 24 giờ.

#### **b, Nuôi bao phấn**

Bao phấn được tách từ nụ, nuôi 3 ngày trong môi trường khoáng Halperin chứa 2% đường saccharoza và Fe - EDTA (5ml/l; Na<sub>2</sub> EDTA 754 mg + FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 557mg pha trong 100ml nước sôi), pH 5,8. Nuôi 50 bao phấn trong 5ml môi trường lỏng.

#### **c) Tách và nuôi hạt phấn**

Ép bao phẩn bằng đũa thuỷ tinh, lọc hạt phẩn bằng lưới có mắt 48 m và đưa vào ống ly tâm vô trùng có bông ở đáy. Ly tâm 850 vòng/phút và rửa hai lần bằng môi trường mới. Nuôi hạt phẩn với nồng độ 104 hạt phẩn/ml, mỗi đĩa petri đường

kính 5 cm nuôi 2,5 ml dung dịch, dán parafilm và để ở nơi có ánh sáng nhạt. Sau 30 ngày sẽ xuất hiện phôi non.

**Bảng 6.3: Một số đối tượng nuôi hạt phấn phân lập thành công**

SỐ TT	Đối tượng	Tác giả, năm
1	Cải ( <i>Brassica</i> )	Kameya và Hinata (1970)
2	Cà chua ( <i>Lycopersicon</i> )	Sharp và ctv (1972)
3	Cà độc dược ( <i>Datura</i> )	Nitsch và Noreel (1973)
4	Thuốc lá ( <i>Nicotiana</i> )	Nitsch (1976)
5	<i>Hyoscyanus</i>	Wernicke và Kohlenbach (1977)

## Chương V

### NUÔI CÂY TẾ BÀO TRẦN VÀ ỨNG DỤNG

Dựa trên những thành công trong dung hợp tế bào động vật và người (Honor Fell mô tả những thí nghiệm đầu tiên vào năm 1959) mà các nhà sinh lý thực vật nảy sinh ra ý tưởng ghép tế bào thực vật với nhau. Thông thường tế bào động vật không có vỏ nên dễ dàng ghép với nhau, trong khi tế bào thực vật có vỏ cellulose bao bọc không thể ghép với nhau được. Các nhà thực nghiệm phải mất nhiều năm mới phá bỏ được thành cellulose của tế bào thực vật. Hai biện pháp phá thành tế bào là biện pháp cơ học và biện pháp enzyme. Người có công lớn trong vấn đề này là Cocking (1960-1973). Tuy vậy kỹ thuật protoplast chỉ phát triển mạnh từ sau công trình của Takebe (1971) tái sinh cây hoàn chỉnh từ protoplast tách từ lá thuốc lá.

#### I. PHƯƠNG PHÁP TÁCH VÀ NUÔI CÂY TẾ BÀO TRẦN

Mặc dù tư liệu khoa học tổng kết rằng có hai cách tách protoplast. Đó là biện pháp cơ học và biện pháp men học. Nhưng trong thực tế, phương pháp men học có hiệu quả hơn rất nhiều phương pháp cơ học, phương pháp men học có thể tách được hàng gram protoplast. Các enzym được dùng là cellulase, pectinase hay hemicellulase hoàn toàn không độc hại đối với tế bào. Bởi vì thành tế bào có thành phần gồm pectin, cellulose, hemicellulose cho nên phải sử dụng hỗn hợp enzyme bao gồm:

Pectinase phá huỷ pectin.

Cellulase phá huỷ cellulose.

Hemicellulase phá huỷ hemicellulose.

Ngoài ra, để protoplast không bị vỡ sau khi thành cellulose bị phá huỷ, người ta phải sử dụng những chất làm tăng áp suất thẩm thấu vào dung dịch enzyme.

Thành phần dịch enzyme gồm có (theo Constabel, 1975):

- Pectinase
- Cellulase
- Hemicellulase
- Sorbitol
- Mannitol
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

-  $\text{CaH}_4(\text{PO}_4) \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

Tùy theo từng đối tượng và từng loại mô mà thay đổi nồng độ cho thích hợp.

- Sau khi xử lý enzyme cellulase, protoplast được thu nhặt lại bằng máy ly tâm, sau đó đem rửa sạch với môi trường không chứa men và cuối cùng protoplast chuyển sang dung dịch manitol:

- Tạo nhũ dịch protoplast với mật độ  $10^4 - 10^7/\text{ml}$  chất nguyên sinh được cấy trên đĩa trên môi trường mềm, hoặc trong môi trường lỏng:

- Sau khi cấy 5 - 10 ngày, chất nguyên sinh tổng hợp thành tế bào mới và bắt đầu phân chia. Trong giai đoạn này, khi tế bào phân chia, môi trường có thể được pha loãng với môi trường mới để duy trì sự sinh trưởng và phân chia của tế bào.

Vì protoplast thực chất là tế bào trần không có thành cho nên có thể tách được từ nhiều nguồn khác nhau như các bộ phận của cây (chủ yếu là mesophyll của lá, mô sẹo, tế bào đơn).

## II. ỨNG DỤNG TẾ BÀO TRẦN

Protoplast có thể được sử dụng để nghiên cứu ba vấn đề chính sau đây:

- Chọn dòng tế bào.
- Dung hợp protoplast để lai vô tính tế bào thực vật.
- Biến nạp di truyền, đưa các cơ quan tử virus và DNA ngoại lai vào tế bào thực vật.

### 1. Chọn dòng tế bào

Thực vật thượng đẳng thường có kích thước khá lớn cho nên các kỹ thuật xử lý và chọn dòng khó thực hiện với số lượng cá thể theo tính toán xác suất thống kê, chính vì vậy kỹ thuật chọn dòng thường được ứng dụng ở đối tượng vi sinh vật và đạt được kết quả rất khả quan.

Với biện pháp bỏ thành cellulose và đưa cơ thể thực vật về trạng thái từng tế bào riêng rẽ với kích thước không lớn hơn nhiều so với cơ thể vi sinh vật cho phép tiến hành kỹ thuật chọn giống vi sinh vật đối với thực vật thượng đẳng và hạ đẳng.

Một đĩa petri đường kính 5-7cm cho phép nuôi tới  $5 \cdot 10^6$  protoplast thuốc lá trong khi muốn nuôi trồng  $5 \cdot 10^6$  cây thuốc lá cần có trên  $5 \cdot 10^6 \text{ m}^2$ , tức trên là 100ha đất canh tác.

Ngoài ra cơ thể thực vật thượng đẳng là cơ thể đa bào được phân hoá thành các tổ chức khác nhau: Nếu tiến hành xử lý đột biến toàn cây thì rất khó đạt được tần số cần thiết. Sử dụng tế bào trần riêng rẽ cho phép loại bỏ mối tương tác với các tế bào bên cạnh và những thay đổi di truyền có điều kiện biểu hiện rõ ràng hơn.

Những kết quả cụ thể ứng dụng protoplast trong chọn giống tế bào sẽ được trình bày ở chương VII.

### 2. Dung hợp tế bào trần và lai vô tính



**a) Bản chất của lai sinh dưỡng (somatic hybridization)**

Là quá trình dung hợp hai tế bào trần sinh dưỡng (soma) để tạo thành một tế

bào lai hỗn hợp. Trong việc lai các tế bào soma xảy ra hai hiện tượng:

- Dung hợp chất nguyên sinh, các cơ quan tử.
- Dung hợp nhân.

Trường hợp lai sinh dưỡng trọn vẹn là trong đó cả hai quá trình dung hợp đều xảy ra, nhưng tần số xảy ra thấp. Thường thì chỉ xảy ra dung hợp nhân, còn tế bào chất sau khi dung hợp một thời gian ngắn có sự chọn lọc đào thải, và chỉ một trong hai tế bào phát triển. Cả hai hình thức đều cho ra những tế bào lai thực sự gọi là hybrids.

Ở một số trường hợp khác, dung hợp chỉ xảy ra với tế bào chất và cơ quan tử, còn nhân vẫn giữ nguyên, tạo nên các tế bào cybrids (hình 10.1).

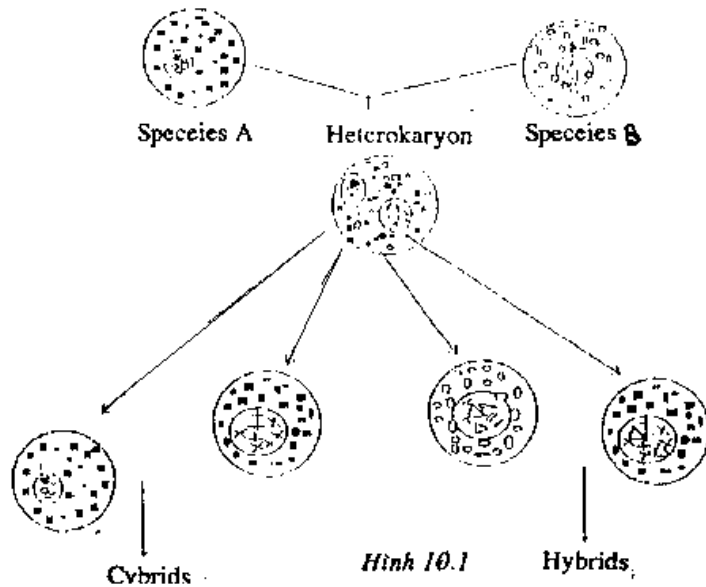
**b, Các phương pháp dung hợp tế bào TỬ**

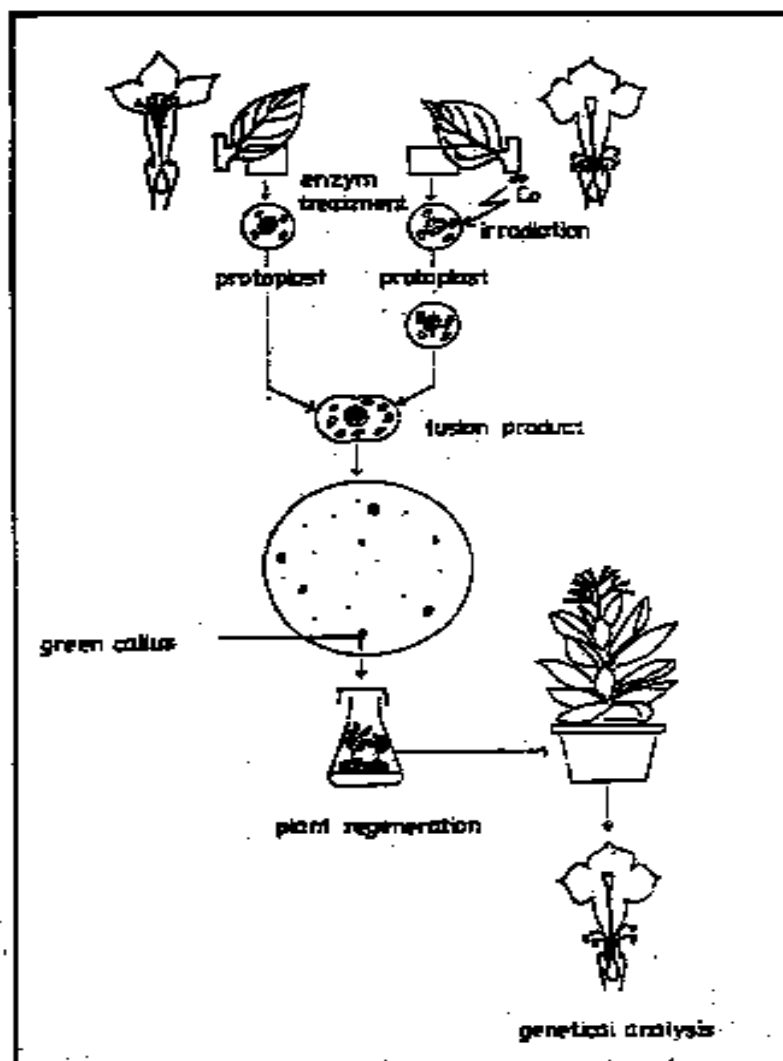
Việc lai hai tế bào trần thực vật có thể được thực hiện bằng hai phương pháp:

1. Hoá học: Các chất nguyên sinh có áp suất thẩm thấu giống nhau, để dung

hợp chúng chỉ cần sự có mặt của một số chất hoá học như:

-  $\text{NaNO}_3$  tạo điều kiện tế bào dung hợp được 25%.





Hình 7.2. Chuyển gene CMS bằng dung hợp tế bào trần ở cây thuốc lá

- Polyvinyl alcohol dextrant và PEG, cùng với  $Ca^{++}$  và ở pH=8 có thể gây một tỷ lệ kết hợp các tế bào từ 1 - 100% .

2. Lý học (Electro-fusion): Nhờ những xung điện của dòng điện trực tiếp làm thay đổi diện tích bề mặt của màng plasmalema, tạo ra sức hút giữa các tế bào trần. Bằng cách này tế bào dung hợp đạt tỷ lệ 100%.

Việc nhận biết, chọn lọc các tế bào lai được quan sát bằng mắt dưới kính hiển vi ngược. Thông qua những dấu hiệu chỉ thị như: tính phát quang hoặc nuôi cấy chúng trên môi trường có những enzyme, hoặc sản phẩm hoá học đặc trưng:

### c) Một số thí nghiệm và kết quả nghiên cứu

Năm 1972, Carlson đã tái sinh được cây thuốc lá lai từ sản phẩm dung hợp protoplast của hai loài: *Nicotiana glauca* + *N. langstonii*, bắt đầu một thời kỳ phát triển mới của kỹ thuật protoplast.

*Thí nghiệm của Melchers (1974):*

Ông dùng protoplast của hai loại thuốc lá *Nicotiana tabacum*:

- Giống s (sublethal) không tổng hợp được diệp lục bình thường nên rất mẫn

cảm với ánh sáng cường độ cao.

- Giống v (virescent) cũng không tạo được lục lạp bình thường lá non trắng

hoàn toàn và mẫn cảm với ánh sáng cường độ cao.

Hai giống này là hai dạng đột biến có thể bổ sung cho nhau được khi lai tạo, nghĩa là nuôi cấy ở ánh sáng 800 lux tới giai đoạn ra hoa, sau đó cho thụ phấn chéo sẽ thu được cây lai F1 có lá xanh bình thường và chịu ánh sáng cao (10000 lux).

Melchers đã tiến hành tách protoplast của cây đơn bội thu được từ nuôi cấy bao phấn của cây s và cây v rồi cho dung hợp. Sản phẩm dung hợp được chọn lọc trên môi trường chiếu 10000lux cho kết quả chỉ những hợp bào sống và phát triển thành khối mô sẹo xanh, trong khi các loại tế bào bố mẹ đều chết. Cây tái sinh từ khối mô sẹo xanh có lá xanh bình thường và chịu được ánh sáng cường độ cao.

Thành công của Melchers là đã sử dụng hai đột biến bổ sung và chứng minh được sản phẩm dung hợp mang gene bổ sung đó.

*Thí nghiệm của Schieder 1975:*

Schieder sử dụng 2 loại đột biến dinh dưỡng của loài rêu *Sphaerocarpos donollii*:

- Đột biến A không tổng hợp được axit nicotinic
- Đột biến B không tạo được glucose

Muốn nuôi A phải đưa axit nicotinic vào môi trường và muốn nuôi B phải đưa glucose vào môi trường.

Tách protoplast từ A và B sau đó tiến hành dung hợp. Nuôi toàn bộ ở môi trường thiếu glucose và axit nicotinic. Các loại protoplast bố mẹ hoặc sản phẩm dung hợp cùng loại chết vì thiếu glucose hoặc axit nicotinic. Chỉ có sản phẩm dung hợp chính thức giữa A và B có thể sống sót được, sau đó được tái sinh thành cây lai có khả năng tổng hợp axit nicotinic và glucose.

Phương thức tạo cây lai như vừa trình bày không bao giờ có trong thiên nhiên, mà chỉ thực hiện được bằng con đường lai protolast.

Thời gian qua người ta đã tiến hành lai một số cặp rất xa nhau. Ví dụ: Maliga (1976) lai tế bào trần của đỗ tương và lúa, nhưng sản phẩm dung hợp mất dần khả năng phân chia.

Cũng ở Hungari trong Trung tâm nghiên cứu sinh học Szeged người ta tiến hành lai tế bào cà rốt với tế bào người và sản phẩm dung hợp sống được một thời gian có phân bào và tổng hợp axit nucleic.

1976, Kao đã nhận được tế bào lai giữa đỗ tương với thuốc lá và nuôi được 4 tháng. Qua hàng ngàn thế hệ phân bào, hai bộ nhiễm sắc thể vẫn đồng thời hoạt động và thể hiện đủ tính chất của tế bào lai.

Kết quả của Melchers trong lai protoplast giữa cà chua và khoai tây đánh dấu

một mốc quan trọng trong lĩnh vực này.

Cây lai cà chua và khoai tây đầu tiên ra đời năm 1977 khi lai protoplast của cây cà chua *Lycopersicon esculentum* (Mill)/var.cerasiforme (Dunal) Alef (Đột biến xanh vàng Rich) với protoplast tế bào mô sẹo nuôi trong dịch lỏng của dòng khoai

tây lưỡng bội DH số HH 258. Sản phẩm dung hợp lúc đầu chỉ tái sinh rễ về sau thu được chồi nhưng không phân biệt được chồi cây lai hay chồi khoai tây có màu lá bất thường. Phân tích nhiễm sắc thể không kết quả vì nhiễm sắc thể khoai tây và cà chua rất khó phân biệt hình dạng. Nhờ có biện pháp của Holdn là giữa cà chua và khoai tây có sự khác nhau về băng protein của enzym ribulose-1,5- biphosphat carboxylase trên điện di SDS từ đó mà Melchers phân biệt được sản phẩm dung hợp với tế bào bố mẹ.

*Các dạng cây lai được phát hiện:*

- Cây lai có plastome(bộ gene lục lạp) khoai tây
- Cây lai có plastome cà chua

Dạng 1: potato + tomato có plastome của potato được gọi là p $\sigma$ matoes (tiếng Đức Karmaten ghép của hai từ kartoffel + tomaten).

Dạng 2: potato + tomato nhưng có plastome của tomato được gọi là topatoes (tiếng Đức tomoffeln ghép của hai từ tomaten + kartoffeln).

Tro ng hai dạng này, một số cây có khả năng tạo bộ phận giống củ nhưng hoa vẫn bất thụ. Vấn đề này đang được nghiên cứu, hy vọng sẽ tạo ra được cây rau có quả cà chua và củ khoai tây.

### 3. Biến nạp gen vào tế bào trần

Thông tin di truyền desoxyribonucleic acid DNA tồn tại ở 3 dạng chính:

- DNA cơ thể thượng đẳng trong đó có DNA nhân, DNA cơ quan tử
- DNA vi sinh vật
- DNA plasmid.

Biến nạp thông tin di truyền (transformation) là kỹ thuật sử dụng DNA tinh khiết đưa vào cơ thể hay tế bào khác và theo dõi biểu hiện của thông tin di truyền mới này.

Hiện tượng transformation được phát hiện lần đầu tiên ở vi khuẩn

*Pneumococcus* trong các thí nghiệm của Avery, Macleod và Mc Carty (1944).

#### *a) Các phương pháp đưa DNA vào cơ thể và tế bào khác*

1) Xử lý trực tiếp với dung dịch DNA: Phương pháp này được Ledoux và Hep áp dụng đối với hạt hoặc mầm cây. Hiệu quả không cao và không chắc chắn. Tần số  $10^{-5}$  -  $10^{-7}$ . Ngẫu nhiên  $10^{-6}$ . Một số tác giả đã cải tiến bằng cách xử lý DNA

+ protamin (một thành phần của protein histon trong nhiễm sắc thể) đưa được tần số biến nạp đạt 29,4% ở ngô. Đây là một kết quả bất ngờ vượt quá sức tưởng tượng. Phải kiểm tra lại.

Một số công trình sử dụng DNA dạng plasmid trộn với hạt phấn để thụ phấn

nhân tạo và hy vọng đồng thời thu được kết quả biến nạp.

Nhìn chung kỹ thuật xử lý trực tiếp với DNA không được phổ cập vì kém hiệu quả và khó lặp lại. Tuy nhiên nó được một số phòng thí nghiệm thực hiện trong thời kỳ sơ khai của kỹ thuật DNA tái tổ hợp vào những năm đầu của thập niên 70.



2) Sử dụng các vector tự nhiên: Chúng ta biết trong tự nhiên vẫn xảy ra hiện tượng biến nạp gene ở nhiều dạng khác nhau. Ví dụ như:

Thực khuẩn (Phage) khi bám vào thành tế bào thì chỉ đưa DNA vào tế bào chủ, ở đó DNA genom của thực khuẩn biểu hiện và tổng hợp thực khuẩn mới.

Siêu vi khuẩn - virus (ví dụ SV40). Cấu tạo gồm acid nucleic và protein (tương đương với nhiễm sắc thể) thâm nhập vào tế bào vật chủ và sử dụng bộ máy sinh tổng hợp acid nucleic và protein để tạo ra virus mới.

Plasmid: Tro ng tế bào của giới động vật và giới thực vật đều tồn tại các thể plasmid, đó là các vùng DNA tự sinh sản độc lập. Ở vi khuẩn, thực vật và động vật plasmid liên quan tới yếu tố giới tính của tế bào, đến khả năng chống chịu các loại kháng sinh....

Đặc điểm quan trọng của plasmid là chúng có thể liên kết vào nhiễm sắc thể nhưng cũng có thể tồn tại bên ngoài nhiễm sắc thể một cách độc lập.

Ngày nay người ta đang sử dụng nhiều loại vector có nguồn gốc tự nhiên khác nhau, kể cả nhân tạo hoàn toàn để đưa DNA lạ vào tế bào. Ví dụ: thực khuẩn virus SV40, plasmid pBR 322, virus khảm xuplơ CMV, plasmid Ti của vi khuẩn đất *Agrobacterium tumerfaciens*... Các loại plasmid đều được thiết kế có mang gene chọn lọc kháng kháng sinh như penicillin, tetracyclin, streptomycin, hygocillin, kanamycin...

### ***b) Biến nạp gene vào prooplast thực vật***

Kỹ thuật gene là lĩnh vực khoa học công nghệ nghiên cứu và triển khai các kỹ thuật về nucleic acid và gene nhằm chủ động trong việc phân lập, thiết kế, biến nạp và thể hiện chúng.

Ở đây chỉ nêu sơ lược các bước chính.

Trước hết nhận biết gene thông qua chức năng sinh học của nó, có thể là tính trạng liên quan đến đặc điểm hình thái (gene lùn, gene màu sắc hoa,...), đặc điểm chức năng (sinh tổng hợp cao, chống chịu...), nói chung là các đặc điểm chúng ta quan tâm.

Xác định điều kiện đặc trưng cho quá trình biểu hiện và kìm hãm gene.

Trên

cơ sở đó tiến hành các bước phân lập và xác định gene theo trình tự sau:

Phân lập RNA (mRNA) thông tin của gene A, chọn loại tế bào và giai đoạn

thích hợp mà ở đó quá trình sao mã transcription DNA  $\rightarrow$  mRNA xảy ra mạnh.

Ví dụ: 90% mRNA của tế bào tuỷ sống tạo máu là mRNA của hemoglobin

hoặc 95% mRNA của tế bào dạ con gà là mRNA của lòng trắng trứng.

Phân lập bằng các kỹ thuật:

- Điện di SDS

- Sắc ký cột poliU-cellulose hoặc oligo dT-cellulose

Tổng hợp gene invitro: Bằng enzym Reverse Transcriptase (do Baltimore, Timin và Dulbecco phân lập được từ virus RS khỉ và nhận giải Nobel, 1975):

Transferase thông thường xúc tác sinh tổng hợp RNA từ DNA còn transcriptase ngược lại xúc tác sinh tổng hợp DNA từ RNA (trong thiên nhiên là

phương thức tồn tại của các loại virus chứa RNA). Sản phẩm thu được là các phân tử cDNA (complementary DNA). Thiết lập thư viện cDNA để từ đó chọn lọc và nhân các dòng cDNA đặc trưng.

Sử dụng cDNA đặc trưng làm phân tử đánh dấu để phân lập ra đoạn gene tương đồng trong thư viện genom. Xác định toàn bộ gene cần thiết kèm các đoạn điều khiển.

Còn có cách khác là đi từ protein là sản phẩm do gene cần tìm tạo ra. Xác định trình tự acid amin của protein đó. Từ đó thiết lập trình tự nucleotid của gene. Tổng hợp một đoạn oligonucleotid bằng máy DNA synthesizer để làm phân tử đánh dấu cho lai phân tử để chọn lọc gene từ thư viện genom.

Gắn gene với vector: Thông thường người ta sử dụng các loại plasmid mang gene kháng sinh để tiện lợi cho việc chọn sản phẩm biến nạp sau này.

Ví dụ: Giai đoạn đầu plasmis pBR 322 chứa gene kháng pinicillin và tetracyclin thường được sử dụng. Về sau pUC 18 và pUC 19 trở nên thông dụng hơn đối với tế bào thực vật. Khi sử dụng phương pháp biến nạp qua *Agrobacterium*, nhất thiết phải dùng Ti dạng đã được cải biên.

Dùng một loại enzym cắt để mở vòng DNA plasmid. loại enzym cắt đó là restriction endonuclease (RE) tồn tại trong các tế bào có khả năng kháng phage và virus lạ theo phương thức chọn cắt sợi DNA vào những vị trí giữa các cặp bazơ nhất định. Ví dụ: EcoERI cắt ở giữa GA và AG biến vòng hay sợi DNA thành từng (mẫu) đoạn như làm mất khả năng sinh sản của thực khuẩn hoặc virus. Phát hiện ra RE được nhận giải Nobel, 1978.

Các đoạn DNA đóng vai trò gene lạ sẽ được ghép vào các vị trí cloning thích hợp của plasmid tùy theo mục đích chọn lọc và theo dõi sau này (xem phần sau).

Đưa vào tế bào: Xử lý với nồng độ tế bào và plasmid thích hợp để sau một thời gian nhất định tế bào chỉ chứa một plasmid (phần lớn tế bào sẽ không có plasmid). Có nhiều phương pháp biến nạp plasmid khác nhau:

- Biến nạp bằng hoá chất: chủ yếu dùng PGE
- Biến nạp bằng xung điện (trên máy chuyên dụng) - electroporation
- Biến nạp bằng súng bắn gene - particle gun
- Biến nạp thông qua *Agrobacterium*

Hiệu quả sử dụng của từng phương pháp sẽ được thảo luận kỹ ở chương

Công nghệ gene thực vật.

Chọn lọc sản phẩm biến nạp: Nuôi trên môi trường chọn lọc chứa kháng sinh đặc hiệu cho loại plasmid được biến nạp. Ví dụ: tetracyclin, kanamycin, hygromycin ... Chỉ những tế bào có plasmid mang gene kháng kháng sinh mới có thể sống sót và phát triển trên môi trường chọn lọc.

Đánh giá kết quả biến nạp và theo dõi số phận cả gene biến nạp: Đây là công đoạn còn gặp nhiều khó khăn, nhất là khi tế bào nhận là tế bào thương đẳng. Ở những tế bào vi khuẩn nhận gene lạ, hoạt động của gene lạ biểu

hiện tốt. Thông thường có những cách thức sau:

- Theo dõi biểu hiện của gene biến nạp

- Phân lập và nhân gene biến nạp bằng kỹ thuật PCR (polymerization chain reaction).
- Phân tích RFLP (restriction fragment length polymorphism).

#### IV. TỒN TẠI CỦA KỸ THUẬT PROTOPLAST

80% thức ăn của nhân loại đều do các cây trồng ngũ cốc tạo ra. Nếu một kỹ thuật mới ra đời phục vụ được công tác cải lương giống, những cây trồng quan trọng này sẽ mang lại hiệu quả vô cùng to lớn. Kỹ thuật protoplast đã thu được thành công ở các loài thuộc họ cà Solanaceae, họ Brassicaceae và một số họ khác nhưng thành công ở họ hoà thảo Gramineae - là họ của các cây trồng ngũ cốc chính còn hạn chế. Cây lúa nước (*Oryza sativa*) là một đối tượng ngũ cốc thành công nhất trong nuôi cấy protoplast, nhưng vẫn chỉ hạn chế ở các giống thuộc loài phụ Japonica. Các giống lúa thuộc dưới chi Indica vẫn khó tái sinh thành công và trong số cây tái sinh được, tỷ lệ bất thụ thường rất cao.

Sau đây là những yếu tố có ảnh hưởng đến kết quả nuôi cấy và tái sinh từ protoplast trong nuôi cấy invitro:

Đối với việc tách protoplast:

1. Cơ sở di truyền đối với (khả năng tiềm tàng của tế bào trong nuôi cấy invitro).
2. Tương tác tế bào trong cây.
3. Cơ chế phân hoá trong quá trình phát triển cá thể.
4. Nguồn gốc cơ quan và cây hoàn chỉnh.
5. Trạng thái sinh lý của tế bào.
6. Tác động của quá trình phân lập.
7. Tác động trạng thái phân

lập. Đối với điều kiện nuôi cấy:

8. Nhu cầu dinh dưỡng.
9. Nhu cầu hoóc môn.
10. Điều kiện vật lý nuôi cấy.
11. Các yếu tố ức chế có thể xuất hiện.
12. Tác động mật độ quần thể tế bào

Đối với quá trình phân bào đầu tiên:

13. Sinh tổng hợp thành tế bào.
14. Điều khiển sinh tổng hợp thành tế bào.
15. Chức năng của thành tế bào đối với phân bào.
16. Điều khiển sự phân phân bào.
17. Điều khiển phân chia nhân.
18. Điều khiển phân bào.

Đối với quá trình phân

hoá:

19. Điều khiển phân hoá tế bào.
20. Tương tác tế bào trong nuôi cấy.

## CHƯƠNG VI: KỸ THUẬT CHUYỂN GEN

### I. CHUYỂN GEN GIÁN TIẾP THÔNG QUA VI KHUẨN

#### *Agrobacterium tumefaciens*

Trong thập niên của những năm 1880 mở ra kỷ nguyên của cây trồng chuyển gen khi con người đã phát hiện ra khả năng chuyển gen của vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*. *A. tumefaciens* là loại vi khuẩn gây bệnh khối u ở thực vật sống trong đất, trong lĩnh vực biến nạp gen nó được sử dụng làm vectơ đặc biệt để chuyển các gen ngoại lai vào thực vật nhằm tạo ra những thực vật mang gen có các đặc tính mong muốn.

Đây là phương pháp chủ yếu và thành công nhất trong chuyển gen thực vật: Đậu tương ; cà chua; khoai tây; bông.... Phương pháp này dựa trên cơ chế gây u vết thương của *A. tumefaciens*. Khi cây bị thương, vi khuẩn này đã nhập vào chỗ bị thương và gây u.

Tiến hành phân tích thành phần các chất trong khối u thì thấy có nhiều hợp chất lạ. Phân tích hoá sinh các hợp chất lạ thì phát hiện ra đó là các phức hợp axit amin arginin-xetoaxit, những hợp chất đó không có ở thực vật, vi khuẩn đã sử dụng những hợp chất đó trong quá trình đồng hoá. Như vậy vi khuẩn đã chuyển vào trong tế bào thực vật tác nhân gây u và những tác nhân đó tổng hợp lên những hợp chất mới. Nhờ những thành tựu của kỹ thuật ADN tái tổ hợp, những phương pháp nghiên cứu mới về ADN, người ta đã làm sang tỏ cơ chế gây bệnh của vi sinh vật đất.

Hiện nay có rất nhiều kỹ thuật chuyển gen khác nhau vào tế bào song kỹ thuật chuyển gen bằng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* vẫn được ứng dụng rộng rãi là nhờ những ưu điểm sau:

1. Không đòi hỏi dụng cụ đặc biệt
2. Số lượng bản copy thấp và ổn định ở thế hệ con cháu
3. Dễ thao tác invitro, dễ làm
4. Đây là kỹ thuật đơn giản, chi phí thấp

#### 1. Hoạt động của *Agrobacterium tumefaciens*

Bản chất tự nhiên của vi khuẩn *A. tumefaciens* là xâm nhập vào những vị trí tổn thương trên cây hai lá mầm và gây ra khối u tại những vị trí tổn thương đó. Những chất được tổng hợp và bài tiết ra từ tế bào khối u, được vi khuẩn sử dụng làm nguồn cacbon và nitơ duy trì sự tồn tại và phát triển của chúng. Bệnh khối u do vi khuẩn *A. tumefaciens* gây ra được phát hiện cách đây khoảng một thế kỷ và suốt thời gian dài, nhiều nghiên cứu tập

trung khám phá nhằm tìm ra cơ chế gây “ung thư” của chúng với mục đích dựa vào đó có thể tìm ra những phương sách chữa bệnh ung thư ở người cũng như ở động vật. Những ý tưởng đó đã bất thành và một loạt các nghiên cứu cũng bị dừng lại khi cơ chế gây khối u ở thực vật được khám phá chính là kết quả của quá trình chuyển gen từ vi khuẩn vào thực vật. Tuy nhiên, sự khám phá và hiểu biết về cơ chế gây khối u đó đã mở ra một hướng chuyển gen mới mà ở đó con người đã lợi dụng vi khuẩn để chuyển những gen mong muốn vào thực vật.

Vi khuẩn xâm nhiễm vào chỗ vết thương, kích thích hình thành các chất độc có bản chất phenolic (Acetosyringon, Hydroxyl acetosyringon). Chất này có tác dụng làm lành vết thương, vừa là kết hợp chất dẫn dụ vi khuẩn xâm nhập, lại có vai trò như một chất kích hoạt vùng gen vir thuộc Ti-plasmid kích thích cho sự cắt đoạn T-ADN (tại vùng bờ trái và bờ phải) để gắn vào genom thực vật.

Trong T-ADN có chứa 3 vùng gen quan trọng quy định sự hình thành khối u. Đó chính là vùng gen iaam và iaah kích thích cho sự hình thành IAA và vùng gen ipt kích thích cho sự hình thành xytokinin. Tỷ lệ auxin/xytokinin kích thích sự hình thành callus tạo lên các khối u.

## 2. Đặc điểm cấu trúc của *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid

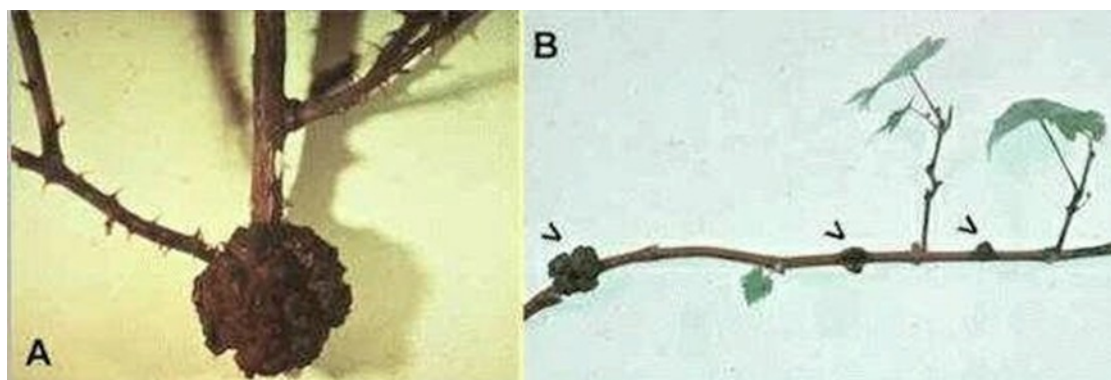
*Agrobacterium* là các vi khuẩn đất nhuộm gram (-) gây ra các triệu chứng bệnh ở cây khi xâm nhiễm qua vết thương. Trong chi *Agrobacterium* gồm các loài chính sau:

*A. tumefaciens* gây bệnh u sùi thân.

*A. rhisogenes* gây bệnh tóc rễ.

*A. rubi* gây u ở các loại dâu đất, mâm xôi.

*A. radiobacter* sản sinh kháng sinh đặc trưng (agrocin 84) ngăn cản tác hại của các loài *Agrobacterium* kể trên.



**Một số khối u do vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* tạo ra. A: một khối u rất lớn hình thành trên thân cây hoa Hồng, B: một dãy khối u nằm trên nhánh của cây Nho**



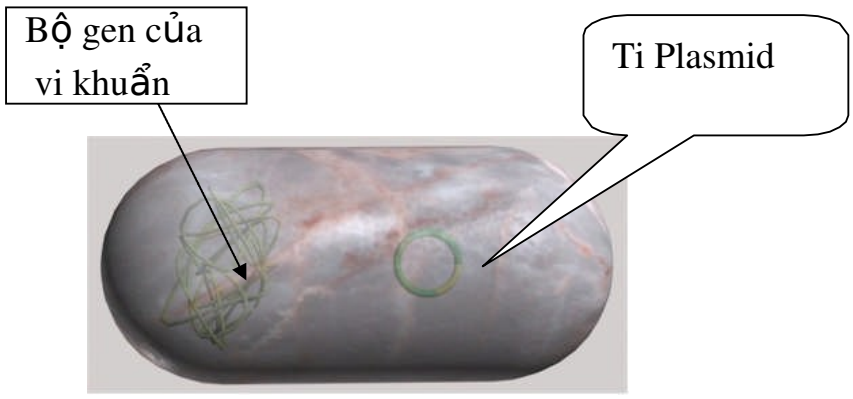
Trong đó nhóm *A. tumefaciens* được sử dụng nhiều nhất cho việc chuyển gen. Từ lâu người ta đã phát hiện hiện tượng hình thành các u ở thân khi cây bị nhiễm vi sinh vật đất *A. tumefaciens* qua các vết thương. Phân tích các u cho thấy trong u có sự hình thành một số vật chất mới như: nopaline, octoine gọi chung là opine. Các chất này không tồn tại ở các cây bình thường khác.

Điều đặc biệt là khối u không ngừng tăng trưởng kể cả khi đã diệt vi khuẩn. Điều này cho phép kết luận: vi khuẩn đã chuyển vào cây tác nhân gây khối u dưới dạng vật chất di truyền. Khi xem xét các vi khuẩn *A. tumefaciens* chúng cũng giống các loại vi khuẩn thông thường khác là đều chứa các plasmid (một dạng DNA vòng nằm ngoài nhiễm sắc thể vi khuẩn, có khả năng nhân bản độc lập). Nhưng plasmid của *A. tumefaciens* có kích thước rất lớn. Các thực nghiệm cho thấy, khi xử lý vết thương bằng vi khuẩn *A. tumefaciens* không mang plasmid thì không gây bệnh u và u chỉ xuất hiện khi xử lý vết thương bằng vi khuẩn có mang plasmid. Như vậy, plasmid của *A. tumefaciens* chính là tác nhân gây bệnh. Chắc chắn plasmid này đã chuyển vào tế bào thực vật các vật chất di truyền gây bệnh u cho cây, do vậy người ta gọi chúng là Ti-plasmid (Tumor inducing plasmid). Ti-plasmid đã chuyển một đoạn DNA của Ti-plasmid nhập vào gen của cây.

Ti-plasmid là một plasmid lớn với kích thước khoảng 200kb. Trên Ti-plasmid có đoạn T-DNA (tumor DNA) được giới hạn bằng bờ phải (right border) và bờ trái (left border). Trình tự nucleotid của bờ phải và bờ trái tương tự nhau. T-DNA là một đoạn có kích thước 25kb chứa các gen tổng hợp opine và đoạn này sẽ được chuyển vào tế bào thực vật gắn vào bộ nhiễm sắc thể của tế bào cây chủ và gây ra bệnh u.

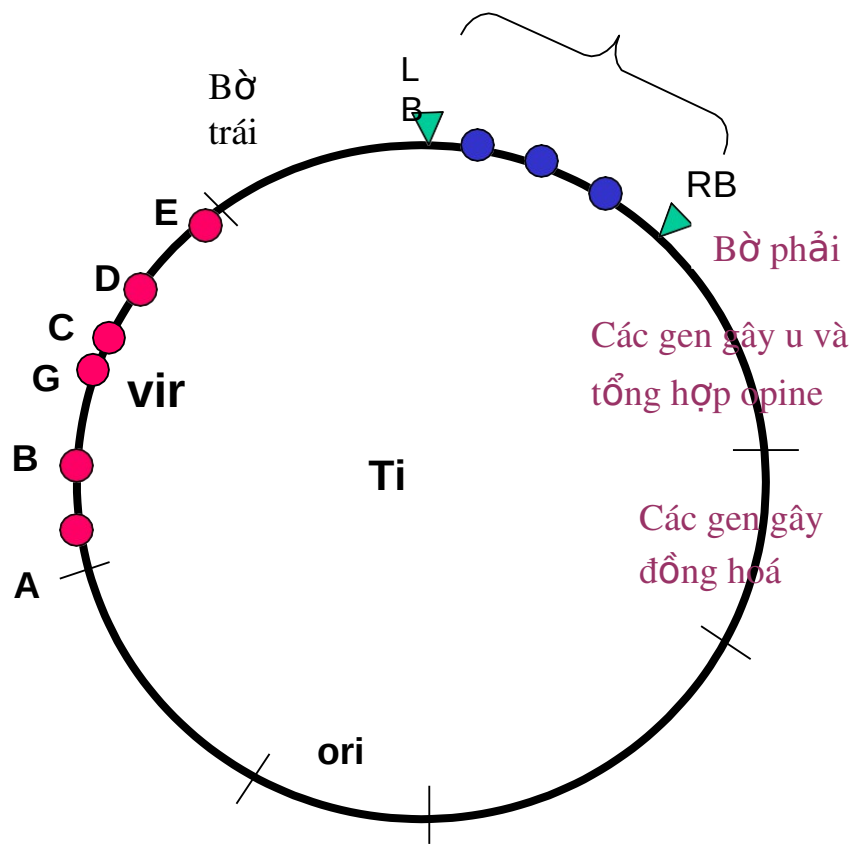
Ngoài T-DNA, trên Ti-plasmid còn có vùng vir (vir region) chịu trách nhiệm hoạt động lây nhiễm, chuyển nạp (conjugative transfer) và tiêu hóa opine (opine catabolism).

Quá trình chuyển nạp gen của vi khuẩn như sau: khi cây bị thương tiết ra chất độc vết thương thường là các chất có bản chất phenol: acetosyringone (AS) và hydroxyacetosyringone (OH-AS). Các chất này sẽ thu hút vi khuẩn tập trung vào vùng vết thương đồng thời chúng cũng hoạt hóa các gen ở vùng vir của plasmid hoạt động. Gen của vùng vir có nhiều loại tạo E, D, C, G, B, A và tạo ra các protein enzym tương ứng. Các protein này có hai chức năng chính: cắt đứt bờ trái và bờ phải để giải phóng đoạn T-DNA; bao bọc và vận chuyển T-DNA vào tế bào thực vật và tiếp cận với bộ gen của cây chủ một cách an toàn. Như vậy, thực chất đã có một hệ thống chuyển gen của vi khuẩn đất vào cây trồng tồn tại trong tự nhiên: acetosyringone Vi khuẩn đất *A. tumefaciens* T-DNA B A Vùng tái bản



Vi khuẩn đất *A.tumefaciens*

Bờ  
T-  
DN  
A



Vùng tái bản  
**Cấu trúc Ti-plasmid**

**3. Đặc điểm cấu trúc của Ti-plasmid cải tiến**

Dựa vào cơ chế này con người lợi dụng vi khuẩn đất để chuyển các gen mong muốn cho mình trên cơ sở thiết kế lại hệ thống Ti-plasmid của vi khuẩn sao cho vẫn đảm bảo được chức năng chuyển gen nhưng không mang các gen gây độc cho cây. Người ta đã tạo ra các dạng vector mới để chuyển gen là những vector liên hợp (co-integrate vector) và vector nhị thể (Binary vector).

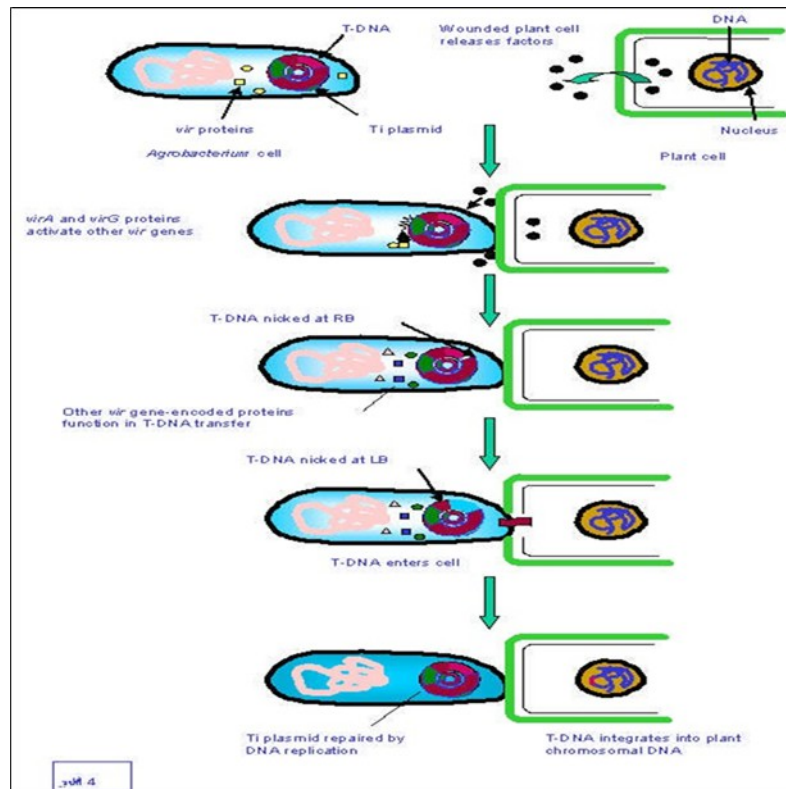
a. Hệ thống vector đồng liên hợp

Hệ thống vector liên hợp (co-integrate vector) là kết quả của sự liên hợp hai loại plasmid: Ti-plasmid đã loại trừ vùng gen gây khối u và gen tạo các hợp chất opine nhưng vẫn giữ lại vùng vir và vùng bờ trái, bờ phải. Thay vào những gen bị cắt bỏ là đoạn tương đồng với một đoạn trên plasmid thứ hai (plasmid trung gian) để phục vụ cho việc liên hợp hai loại plasmid. Plasmid trung gian là một plasmid tách dòng từ vi khuẩn E.coli và có thể tái sinh được ở *Agrobacterium*. Plasmid này có chứa vùng gắn gen cần chuyển nạp, các gen chỉ thị phục vụ việc chọn lọc và có mặt đoạn tương đồng. Khi cho tương tác hai loại plasmid này với nhau chúng sẽ liên hợp qua sự trao đổi chéo giữa hai đoạn tương đồng và hình thành nên vector liên hợp. Vector liên hợp này nằm trong vi khuẩn *A. tumefaciens* và hoạt động theo cơ chế chuyển gen thông thường của vi khuẩn đất. Do tần số đưa plasmid trung gian từ E.coli sang *Agrobacterium* rất thấp ( $10^{-7}$ - $10^{-5}$ ) nên vectornày ít được sử dụng (John Draper, 1982).

b. Hệ thống vector kép

Hệ thống vector nhị thể khác với vector liên hợp là chúng có hai vector (plasmid) cùng có mặt và hoạt động trong *Agrobacterium*. Một plasmid tách dòng từ E.coli trong đó có thiết kế vùng bờ trái và bờ phải, nằm giữa chúng là các gen chỉ thị và vùng gắn gen cần chuyển. Plasmid thứ hai là Ti-plasmid cải tiến: toàn bộ vùng T-DNA và vùng bờ trái và bờ phải bị cắt bỏ chỉ giữ lại vùng vir, plasmid này được gọi là plasmid hỗ trợ. Hệ thống vector này cũng hoạt động theo cơ chế chuyển gen của vi khuẩn đất *Agrobacterium* một cách rất hữu hiệu.

Cơ chế chuyển gen vào tế bào thực vật

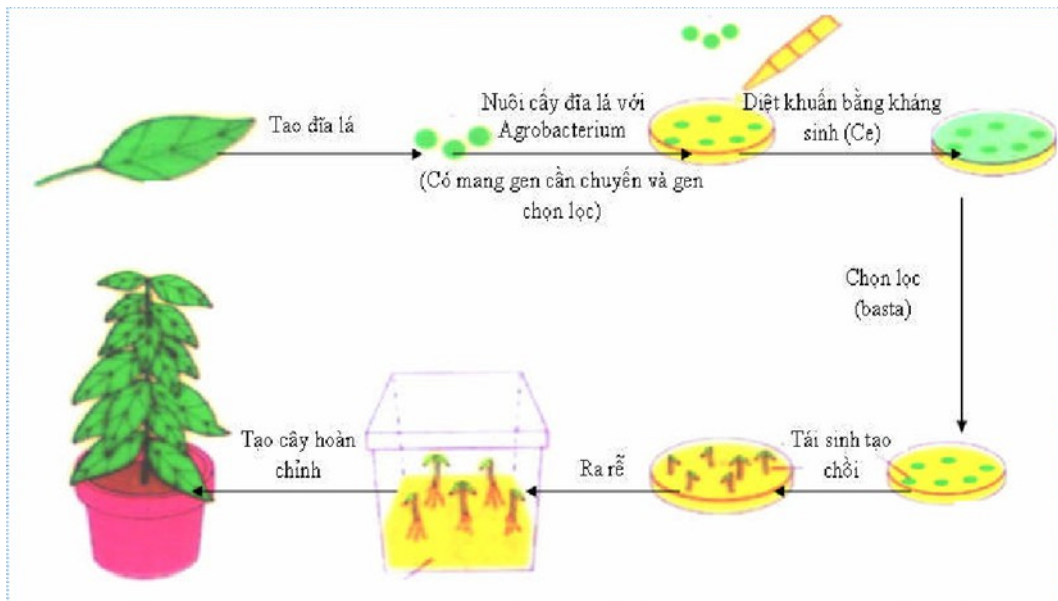


Cơ chế chuyển gen vào tế bào thực vật

#### 4. Kỹ thuật đĩa lá (Leaf disk technique)

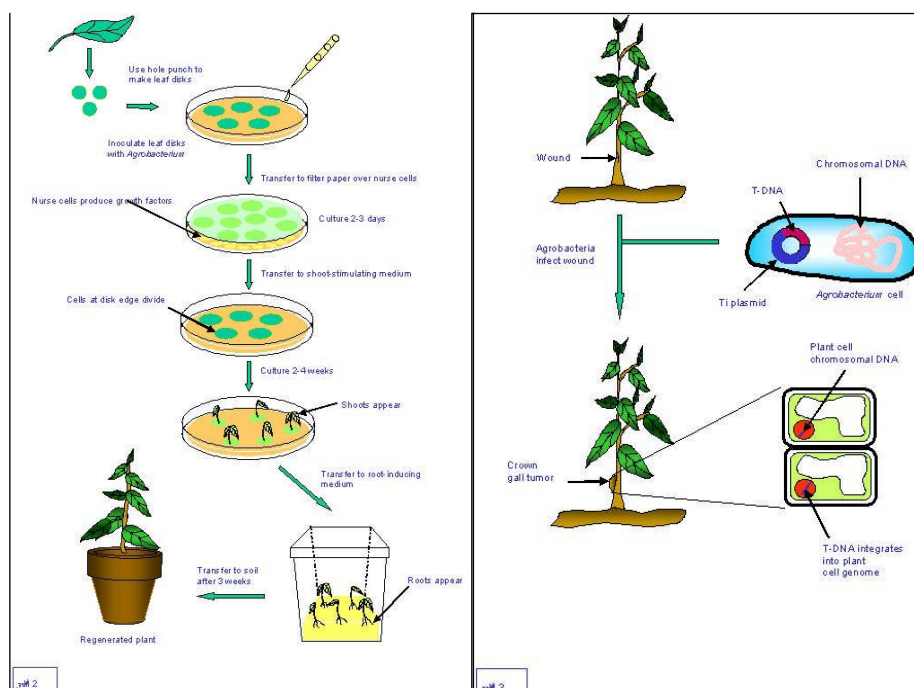
Để thực hiện việc chuyển gen nhờ vi khuẩn người ta sử dụng kỹ thuật đĩa lá. Tạo các đĩa lá của thực vật cần chuyển gen sau đó xử lý các đĩa lá trong dung dịch vi khuẩn *A. tumefaciens* mang các plasmid chứa gen mong muốn đã được thiết kế lại trong vài chục phút, trong dung dịch có bổ sung acetosyringone để tăng cường khả năng hoạt hoá gen vùng vir qua đó thúc đẩy thêm quá trình chuyển gen. Sau giai đoạn này rửa sạch lá bằng dung dịch kháng sinh cefotaxime để diệt hết khuẩn. Nuôi cấy đĩa lá trên môi trường tái sinh và tạo cây. Chọn lọc các cây mang gen chuyển vào qua sự phát hiện các gen bị chỉ thị. Phát hiện các gen chuyển vào qua phân tích ADN và đánh giá sự thể hiện của gen qua biotest.

Quy trình chuyển gen vào thực vật bằng kỹ thuật đĩa lá nhờ vi khuẩn *A. tumefaciens*



- 1- Thiết kế vector mang gen
- 2- Nhân dòng vector nhờ vi khuẩn E.coli.
- 3- Chuyển vector mang gen biến nạp từ E.coli sang A.tumefaciens.
- 4- Lây nhiễm A.tumefaciens chứa gen biến nạp với tế bào, mô thực vật để tiến hành quá trình chuyển gen sang mô, tế bào đích.
- 5- Chọn lọc các mô, tế bào được biến nạp thành công.
- 6- Tái sinh mô, tế bào biến nạp thành cây biến nạp hoàn chỉnh.

Sau đó, từ những cây chuyển gen thu được, cần đánh giá sự Ổn định di truyền qua các thế hệ, sử dụng phương pháp lai hữu tính để thu được con cái mang gen mong muốn. Đồng thời đánh giá tác động của môi trường đối với cây chuyển gen để đưa ra sản xuất và cung cấp cho thị trường.



Các bước nuôi cấy và chọn lọc  
cây chuyển gen

Chuyển gen nhờ Agrobacterium. T

## II. KỸ THUẬT CHUYỂN GEN TRỰC TIẾP

### 1. Kỹ thuật biến nạp qua protoplast

Phương pháp này ứng dụng tác động của sóng siêu âm để đưa các plasmid mang gen được thiết kế có thể xâm nhập vào tế bào chủ nhưng ở dạng tế bào trần.

Nguyên tắc: Sau khi tách, protoplast được xử lý nhẹ bằng siêu âm có hiện diện của DNA ngoại lai. Sóng siêu âm giúp DNA đi vào tế bào và thể hiện.

Quy trình:

1. Tách protoplast từ mô thịt lá. Treo protoplast đã tinh sạch trong môi trường có chứa 21% sucrose, mật độ 106/ml.

2. Cắm đầu siêu âm của máy phát siêu âm ngập độ 3mm trong huyền phù protoplast và cho máy siêu âm phát với tần số 20 KHz theo từng nhịp ngắn 110 millisecond. Năng lượng ra tương ứng với 15W và 0.32W/cm<sup>2</sup> (acoustic power), 5-10% năng lượng ra được chuyển qua nhiệt năng, làm cho huyền phù nóng thêm 2,3°C.

Tổng thời gian tác động siêu âm từ 500-900 millisecond.

3. Protoplast được nuôi trên đĩa Petri trong môi trường thích hợp để xác định tỷ lệ chết do siêu âm phá vỡ màng. Ở điều kiện nói trên, khoảng 30-50% protoplast bị chết. Số protoplast còn lại tiếp tục phân chia và tái sinh.

4. Thử các phản ứng với gen chỉ thị (ví dụ GUS) hoặc đặt protoplast tái sinh trên môi trường chọn lọc (kanamycine) để xác định các protoplast đã được chuyển gen.

Các bước:

**Tạo dung dịch tế bào huyền**

**phù**



## Tạo xung điện với hiệu điện thế

cao

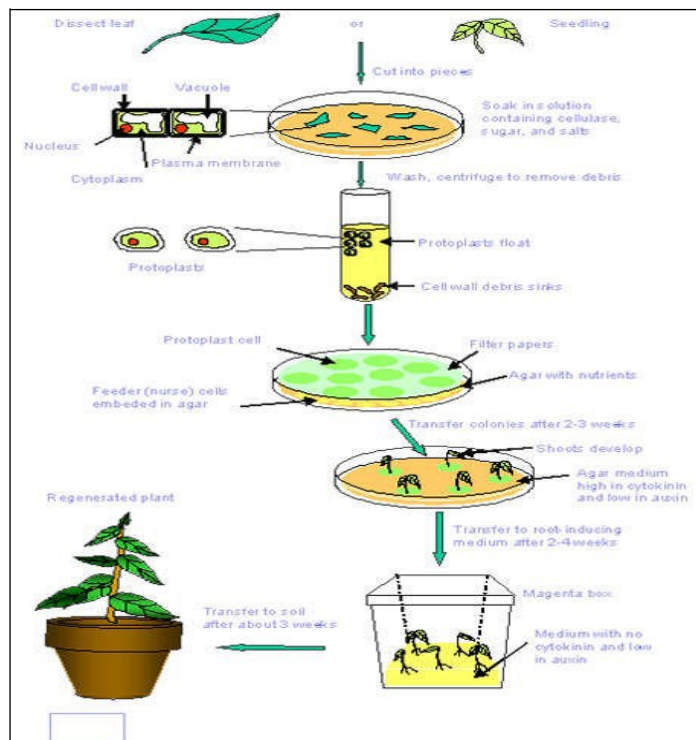
Protoplast bị thủng một số chỗ

ADN thâm nhập vào

Nuôi cấy protoplast

Tái sinh cây

Chọn lọc cây chuyển gen



## 2. Chuyển gen trực tiếp bằng phương pháp điện di

Nguyên tắc: Phương pháp chuyển gen trực tiếp vào mô thực vật bằng điện di do Ahokas(1989) đề xuất và Griesbach(1994) cải tiến.

Mô thực vật, thường là đỉnh sinh trưởng, được đặt giữa 2 cực của một hệ điện di. DNA ngoại lai được hoà sẵn trong agarose, di chuyển theo điện trường xâm nhập vào mô thực vật(qua vách và màng tế bào) tiếp cận với bộ máy di truyền của tế bào, nhờ vậy gen ngoại lai được chuyển và biểu hiện. Cải tiến quan trọng của Griesbach là toàn bộ quá trình chuyển gen

được thực hiện trong điều kiện vô trùng, hoàn toàn không cần thiết phải sử dụng các thao tác cấy mô tế bào thực vật.

Quy trình:

1. Protocorm kích thước khoảng 2mm, chồi nách kích thước tương tự, phôi hạt hay phôi soma có thể dùng để chuyển gen.

2. DNA ngoại lai hoà trong 0.5% agarose, đệm 0.1 × TAE. Nồng độ DNA là 1mg/ml. Khoảng 150ml hỗn hợp agarose – ADN đệm đã làm lỏng ở 100°C và để cho đông rắn trong một ống micropipette. Ống này nối với cực âm của nguồn điện.

Một ống micropipette tương tự được đổ 150µl hỗn hợp agarose - đệm, nhưng không chứa ADN và nối với cực dương của nguồn điện. Phần trống còn lại của hai ống được nạp gần đầy bằng đệm 0.1 × TAE.

3. Thời gian chuyển gen dưới 10 phút

Cường độ dòng điện 0.5 milliampe – 1.0 milliampe cho đỉnh sinh trưởng hay 1 protocorm.

4. Rửa các cation tích lũy với số lượng lớn ở đỉnh sinh trưởng hoặc protocorm bằng cách ngâm hoặc rửa một số lần trong nước cất sau khi kết thúc điện di.

5. Trường hợp protocorm và phôi soma cần giữ điều kiện vô trùng trong quá trình chuyển gen để sau đó tiếp tục nuôi cấy trên các môi trường chọn lọc, tái sinh cây hoàn chỉnh. Trường hợp đỉnh sinh trưởng cây đang trồng trong chậu: để đỉnh sinh trưởng lớn và theo dõi gen chuyển ở các lá hình thành sau đó hoặc các thế hệ sau.

### 3. Kỹ thuật sử dụng súng bắn gen

Đây là phương pháp phổ biến được áp dụng thành công để chuyển gen trực tiếp vào thực vật. Nguyên tắc là phải tạo một luồng khí để đẩy các viên đạn có kích thước nhỏ mang các gen mong muốn (các viên đạn này thường được làm bằng Au hoặc wolfram). Chúng có  $V = 1300\text{m/s}$  xuyên qua các lớp tế bào, mô để xâm nhập vào genom thực vật. Ưu điểm của phương pháp này là có thể chuyển gen vào nhiều đối tượng (tế bào, mô, mô sẹo), tần xuất thành công khá cao (ở cây một lá mầm). Hơn nữa việc thiết kế vector khá đơn giản. Tuy nhiên khi tái sinh cây lại dễ bị thể khảm.

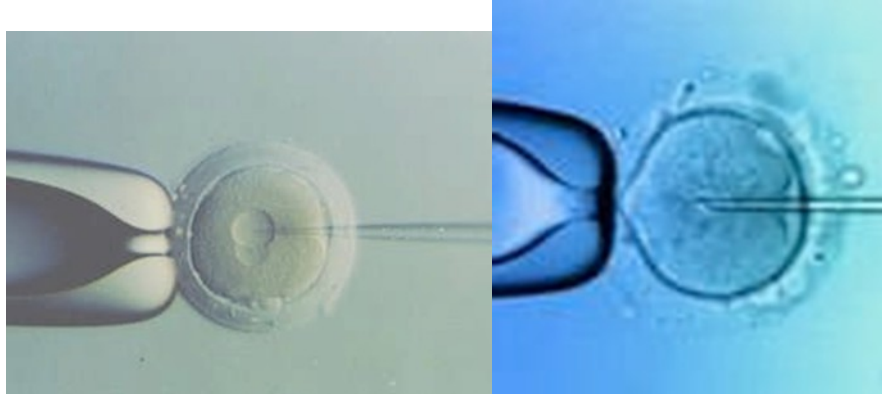
Hiện nay người ta đã chế tạo ra nhiều loại súng bắn gen mới, hiện đại (Sautter, 1991; Finter ở đại học Ohio của Mỹ). Những năm gần đây, ở Việt Nam nhiều tác giả thuộc viện CNSH, viện di truyền, viện lúa đồng bằng sông Cửu Long cũng đã sử dụng súng bắn gen Corb – PIG vào mô sẹo các plasmid pMOW, PRQ6 mang gen kháng rầy, chống nấm bạc lá



lúa thu được nhiều dòng lúa chuyển gen có nhiều đặc tính tốt. chuyển gen bằng súng bắn gen

#### 4. Kỹ thuật chuyển gen bằng vi tiêm (microinjection)

Phương pháp này sử dụng vi tiêm nhỏ, kính hiển vi và các vi thao tác. Các vi tiêm đó đã chuyển vector mang gen vào protoplas hoặc các tế bào đơn (chưa hình thành vỏ cứng). Phương pháp này có ưu điểm là đưa được các gen chính xác vào tế bào song phương pháp này mới chỉ thành công ở động vật.



#### 5. Kỹ thuật chuyển gen qua ống phấn (pollen tuber)

Phương pháp này còn được xem là phương pháp chuyển không qua nuôi cấy mô. Chuyển gen trực tiếp thông qua ống phấn được nhóm Ray Wu đại học Cornell (Mỹ) báo cáo thành công trên cây lúa, tiếp theo các công trình sơ bộ với ADN tổng hợp của hai tác giả Trung Quốc Duan và Chen (1985).

Đây là phương pháp lợi dụng ống phấn để chuyển vector mang gen đi cùng tế bào sinh dục đực ( tinh tử) để kết hợp với tế bào trứng tạo hợp tử mang gen ngoại lai được chuyển vào. Sau đó, hợp tử sẽ phát triển thành hạt. Hạt nảy mầm và phát triển thành cây chuyển gen và được di truyền cho các thế hệ sau.

Chuyển gen qua ống phấn tốt nhất thực hiện ngay sau khi quá trình thụ tinh xảy ra ở noãn, nhưng tế bào sinh dục cái chưa kịp phân chia. Nếu làm được như vậy sự chuyển gen sẽ được thực hiện đối với một tế bào sinh sản cái (trứng) duy nhất và sau khi tái sinh cây sẽ tránh xuất hiện thể khảm. Trong thí nghiệm của Ray Wu, tỷ lệ hạt chuyển gen/hạt thí nghiệm là 20%.

### III. CÁC HƯỚNG TẠO CÂY CHUYỂN GEN

#### 1/. Chuyển gen kháng sâu:

Cơ chế chung là chuyển các đoạn gen có tác dụng diệt sâu (VD: gen nội độc tố Bt từ vi khuẩn *Bacillus thuringiensis*); hoặc chuyển các gen

tạo ra chất ức chế enzyme phân giải protein làm hạn chế khả năng tiêu hoá thức ăn sâu hại (VD: chất ức chế tripsin)

### 1.1. **Đặc điểm vi khuẩn Bacillus thuringiensis và cơ sở khoa học của việc chuyển gen kháng sâu vào cây trồng:**

Từ hơn 30 năm nay con người đã sử dụng vi khuẩn Bacillus thuringiensis làm thuốc trừ sâu vi sinh. Vi khuẩn này sống trong đất và được tìm thấy ở hầu hết các nơi trên thế giới. Trong quá trình tạo bào tử, vi khuẩn này sản xuất ra các protein kết tinh (delta-endotoxin) rất độc với côn trùng nhưng không độc với động vật có xương sống. Tinh thể protein do vi khuẩn tạo ra sau khi xâm nhập vào côn trùng, trong điều kiện pH cao trong ruột giữa sẽ phân giải các tinh thể giải phóng các protein. Vào giai đoạn này protein chưa có hoạt tính độc, nhưng các protease đặc biệt trong dịch ruột phân huỷ protein chỉ còn lại bộ lõi kháng protease có khối lượng phân tử 68000 dalton chứa 1200 acid amin, bộ lõi này hoàn toàn có hoạt tính. Bộ lõi này kết hợp với chất nhận đặc thù ở tế bào biểu mô nằm dọc theo ruột giữa và tự lồng vào màng nguyên sinh của tế bào. Tích tụ các protein này làm cho tế bào bị rò rỉ chất dinh dưỡng và chết. Côn trùng ngừng ăn và chết đói trong vòng 24 tiếng đồng hồ.

Vi khuẩn này có thể sản sinh ra 4 loại độc tố hại côn trùng khác nhau: ngoại độc tố toxin và nội độc tố toxin. Trong đó, nội độc tố toxin là quan trọng nhất. Từ năm 1987, các nhà nghiên cứu ở Bỉ đã tách được gen mã hoá protein này (Bt toxin). Các gen này thường định vị trên vi khuẩn plasmit của vi khuẩn và được gọi tên chung là gen ICP (insecticidal crystal protein). Do vi khuẩn Bacillus thuringiensis là vi khuẩn phức tạp có hơn 30 serotype nên chúng có chứa các gen ICP khác nhau và tạo nên những độc tố khác nhau. Người ta sử dụng chữ Cry (crystal) để biểu thị cho gen sản xuất toxin diệt côn trùng của vi khuẩn Bacillus thuringiensis. Người ta phân nhóm gen delta endotoxin thành 6 nhóm chính, ký hiệu từ Cry I đến Cry VI. Trong mỗi nhóm phân thành các nhóm phụ ký hiệu từ A đến G. Mỗi nhóm gen có tác dụng diệt một nhóm côn trùng khác nhau.

Cry I Diệt ấu trùng bộ Cánh vẩy (Lepidoptera): sâu cuốn lá, sâu đo, sâu róm, sâu đục gân lá...

Cry II Diệt ấu trùng bộ Cánh vẩy (Lepidoptera) và bộ Hai cánh (Diptera): ruồi đục quả...

Cry III Gây độc cho ấu trùng bộ Cánh cứng (Coleoptera): châu chấu, xén tóc đục thân...

Cry IV Gây độc cho ấu trùng bộ Hai cánh (Diptera)

Cry V Diệt ấu trùng bộ Cánh vẩy (Lepidoptera) và bộ cánh cứng

(Coleoptera)

## Cry VI Diệt tuyến trùng

Các gen này được tách, xác định trình tự, tổng hợp, thiết kế vào các vectơ chuyển gen và chuyển vào nhiều loại cây trồng khác nhau, đặc biệt là bông, ngô, đậu tương, lúa... tạo ra các giống cây trồng kháng sâu có ý nghĩa. Các nhà khoa học còn tiếp tục nghiên cứu, cải tiến các gen Cry để nâng cao độc tính của gen bằng cách tinh giảm đoạn gen chuyển vào, chỉ chuyển đoạn mã hoá cho protein gây độc và thay thế các codon cho phù hợp với quá trình phiên mã và dịch mã ở thực vật. Kết quả làm cho tính độc tăng lên nhiều lần.

Gần đây người ta phát hiện các gen vip (vegetative insecticidal protein – các protein sinh dưỡng diệt côn trùng). Các gen vip 1, vip 2, vip 3 mã hoá cho các protein trong pha dinh dưỡng của chu trình phát triển vi khuẩn Bt và Bc (*Bacillus cereus*) đã được chiết tách, nhân bản, xác định trình tự và thử hoạt tính sinh học. Kết quả cho thấy protein do gen vip mã hoá có hoạt lực và phổ tác dụng mạnh hơn các protein do gen Cry mã hoá.

VD: gen vip 3 mã hoá cho protein vip 3 có hoạt tính kháng sâu xám cao gấp 260 lần so với gen Cry IA, có phổ hoạt động rộng diệt được cả sâu xanh hại ngô và sâu hại thuốc lá,

Phối hợp chuyển đồng thời gen Cry và vip vào thực vật có khả năng làm tăng hoạt tính, tăng phổ hoạt động diệt sâu, đồng thời duy trì độ ổn định kháng sâu của cây qua nhiều thế hệ.

Ngoài hướng kháng sâu bằng gen Cry, còn có hướng chuyển gen mã hoá cho các protein ức chế hoạt động của enzym protease làm hỏng quá trình tiêu hoá của côn trùng. Gen này được tách chiết từ cây khoai môn khổng lồ của vùng nhiệt đới, cây này tạo ra một lượng chất ức chế cao trong củ. Chất ức chế tinh khiết có tác dụng làm giảm khả năng sinh trưởng của sâu non do làm mất hoạt tính của protease nên sâu bị chết đói. Tương tự, gen mã hoá chất ức chế tripsin của đậu bò cũng được chuyển vào cây thuốc lá để phòng trừ sâu hại lá.

### **1. 2. Một số ví dụ cho cây trồng chuyển gen kháng sâu:**

a) Chuyển gen Bt vào lúa:

Có khoảng 5% sản lượng hạt lúa bị thất thu do sâu đục thân [IRRI, 1996] ở châu Á. Trên phạm vi toàn cầu, sự thất thu năng suất lúa trung bình hàng năm là khoảng 10 triệu tấn do các loài sâu đục thân *Scirpophaga incertulas*, *Chilo suppressalis* và sâu cuốn lá *Cnaphalocrocis medinalis* [Herdt, 1991]. Cây lúa chuyển gen kháng sâu đầu tiên được công bố vào năm 1993 [Fujimoto và ctv.]. Sau đó, nhiều cấu trúc gen Bt với các loại promoter khác nhau đã được chuyển thành công vào một số giống lúa

và đã có rất nhiều dòng lúa chuyển gen có khả năng kháng tốt đối với một số loài sâu hại, đặc biệt có một số dòng lúa kháng được đối với 8 loài sâu hại khác nhau thuộc 4 họ Pyralidae, Noctuidae, Stayridae, và HesperIIDae [Shu và ctv., 2000]. Theo ISAAA (2002), việc ứng dụng cây lúa Bt trong sản xuất nông nghiệp ở nước ta sẽ đem lại lợi ích nhiều trăm triệu USD trong thời gian 2000-2020.

Cách thức tiến hành chuyển gen kháng sâu vào cây lúa như sau: người ta tách đoạn gen tạo ra toxin từ tế bào vi khuẩn. Các đoạn gen này được biến đổi một chút để sử dụng được trong cây, lồng vào ADN của plasmide và nhân lên nhiều bản ở E.coli, sau đó ADN được bọc lên viên đạn vàng. Phôi hạt lúa được tách ra từ hạt, đặt lên môi trường dinh dưỡng trong đĩa petri, rồi đặt trực tiếp vào đầu súng và bắn. Các phôi này nuôi cấy trong môi trường chọn lọc để chọn những phôi có gen Bt và chuyển sang môi trường tái sinh cây.

b) Chuyển gen kháng sâu vào cây ăn quả (cây hồng):

Quy trình chuyển gen lấy từ website <http://saigonbiotech.com>

Cây Hồng ( *Paulownia fortunei* ) là cây có tiềm năng kinh tế lớn, tăng trưởng rất nhanh, cây thay lá hàng năm và có bộ rễ đâm sâu. Tuy nhiên, ngoài dịch sâu hại chính do bọ cánh cứng, nhận thấy sâu hại thuộc bộ Cánh phấn cũng là vấn đề nhất là cây ở giai đoạn còn nhỏ do một số tác nhân như *Agrotis ypsilon* , *Agrotis toxionis* , *Heliothis* , *Euxoa segetum* ... Vì vậy các tác giả Lê Tấn Đức, Phan Tường Lộc, Phạm Thị Hạnh, Nguyễn Hữu Hồ, Nguyễn Văn Uyển - Viện Sinh học Nhiệt đới đã nghiên cứu và chuyển gen cry IA(c) kháng sâu với đối tượng cây trồng này.

Chủng vi khuẩn sử dụng: Sử dụng chủng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* EHA 105 chứa plasmid ITB mang gen cryIA(c) (gen kháng sâu). Môi trường giữ giống là LB có kháng sinh Kanamycin 100 mg/l. Để nhân giống phục vụ nghiên cứu chuyển gen, vi khuẩn được nuôi cấy lắc qua đêm trong môi trường AB (Chilton và cộng sự, 1974)].

Quy trình chuyển gen: Sử dụng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* được lắc qua đêm để gây nhiễm mảnh lá, sau đó các mảnh lá được nuôi cấy trên môi trường tái sinh tạo chồi (môi trường MS có 0,1 mg/l NAA và 10 mg/l BA) có bổ sung chất Acetosyringone nồng độ 100  $\mu$ M trong hai ngày. Sau đó rửa và diệt vi khuẩn bằng dung dịch kháng sinh Cefotaxime 500 mg/l trong thời gian 30 phút, chuyển các mảnh lá sang môi trường tái sinh tạo chồi có chứa 4 mg/l chất chọn lọc là Phosphinothricin (PPT) và 500 mg/l Cefotaxime. Cấy truyền 2 tuần/ lần trên cùng loại môi trường. Sau 6 tuần, mẫu lá có chồi tái sinh được cấy truyền sang môi trường cho ra rễ có chứa 4 mg/l PPT. Một số cây ra rễ tốt được đưa ra trồng ở vườn ươm.

Môi trường nuôi cấy: Môi trường nuôi cấy tái sinh là môi trường MS (1962) chứa 30 g/l đường, 9 g/l Agar với chất kích thích sinh trưởng BA (1, 5, 10 mg/l) tổ hợp với NAA (0,1 - 0,5 - 1 mg/l). Mỗi bình tam giác chứa khoảng 6 - 8 mẫu và mỗi nghiệm thức có trung bình 30 mẫu. Các mẫu được đặt trong điều kiện 9 giờ chiếu sáng/ngày, nhiệt độ 27 - 28 C. Sau 3 tuần cấy truyền một lần

## **2/. Chuyển gen kháng nấm bệnh và virus:**

### **2.1.Chuyển gen kháng virus:**

Bệnh virus là bệnh gây hại cho cây trồng mà hiện nay vẫn chưa chữa trị được. Do đó, biện pháp hữu hiệu nhất để phòng ngừa bệnh virus là tạo ra loại cây trồng kháng được virus. Công nghệ chuyển gen là giải pháp hữu hiệu.

#### **a) Cơ chế chuyển gen kháng virus:**

Cơ chế chung là chuyển các đoạn gen có tác dụng cản trở sự truyền virus; hoặc cản trở sự nhân lên của virus trong tế bào; hoặc chống lại sự biểu hiện của bệnh. Hầu hết các gen được chuyển vào cây đều được phân lập từ virus.

Có nhiều đường hướng tạo cây kháng virus bằng kỹ thuật chuyển gen: chuyển các đoạn mã hoá protein vỏ; chuyển gen tạo các ribozyme (enzym phân giải virus); chuyển các gen đối bản (antisens) với ARN của virus, các đối bản này sẽ khoá lại sự sao chép và phiên mã của ARN virus. Trong đó việc chuyển gen mã hoá protein vỏ virus là kỹ thuật phổ biến nhất (cơ chế bảo vệ chéo). Bằng kỹ thuật này người ta đã tạo được giống kháng được 36 loại virus đại diện cho 16 nhóm khác nhau (Larkin 1995).

Chuyển gen mã hoá vỏ protein của virus: Virus có cấu tạo 2 phần, gồm lõi acidnucleic (ADN hoặc ARN) và vỏ protein. Khi có mặt gen mã hoá protein vỏ sẵn trong tế bào sẽ gây hiệu ứng ngăn chặn sự lột vỏ của virus khi xâm nhập tế bào chủ, kìm hãm sự nhân lên của virus. Dựa trên cơ chế này, người ta đã chuyển gen mã hoá vỏ protein của nhiều loại virus vào các đối tượng cây trồng khác nhau tạo nên các giống kháng virus như: đu đủ kháng bệnh đốm vòng PRSV, cây chống chịu virus khảm alfalfa (AMV), virus khảm dưa chuột (CMV), khoai tây kháng virus X, xoăn lá khoai tây, chuối kháng virus gây bệnh bó đọt...

Chiến lược tạo giống kháng virus thứ hai là sử dụng gen mã hoá replicase của virus. Replicase là một enzyme giúp virus tổng hợp acid nucleic trong tế bào vật chủ. Cây được chuyển gen chứa một đầu nhất định của gen replicase sẽ tổng hợp phân tử ARN nhỏ chứa một điểm nhận

biết để liên kết với replicase. Do đó phân tử này cạnh tranh với ARN của virus trong quá trình liên kết với enzyme replicase. Nếu tế bào thực vật sao mã đủ loại ARN này thì có khả năng ức chế quá trình nhân của virus.

Khả năng thứ ba là sử dụng các gen có trình tự ngược chiều (anti sense) với các gen nhất định của virus. Gen có trình tự ngược sao mã mARN có trình tự bổ sung với ARN của virus. ARN ngược chiều can thiệp trực tiếp vào sự biểu hiện gen của virus bằng cách kết hợp với ARN của virus tạo thành phân tử kép, ngăn cản quá trình dịch mã hay sự vận chuyển ARN từ nhân ra tế bào chất.

b) Ví dụ:

Những cây trồng chuyển gen kháng virus trồng diện tích lớn trên thế giới gồm thuốc lá, cà chua, bí đỏ và đu đủ (James và Krattiger, 1996; James, 1997)

Một số thành tựu khác trong chuyển gen kháng virus:

Cây trồng

Gen ngoại	Phương pháp chuyển gen	Tính trạng biểu hiện
Cà chua	CP-TMV Thông qua Agrobacterium	Kháng virus khảm thuốc lá

Lúa	CP-stripe	Xung điện protoplast	Kháng lại virus sọc
-----	-----------	----------------------	---------------------

### 3/. Chuyển gen kháng thuốc trừ cỏ:

Trong nền nông nghiệp hiện nay, việc sử dụng thuốc trừ cỏ đang trở nên phổ biến, thay thế cho các phương pháp làm cỏ truyền thống khác. Tuy nhiên chúng ta cũng phải đặt ra câu hỏi: “thuốc trừ cỏ tiêu diệt cỏ dại thì có tiêu diệt cả cây trồng hay không?” Để việc sử dụng thuốc trừ cỏ không làm ảnh hưởng đến cây trồng, chúng ta phải tạo ra các loại cây trồng có tính kháng thuốc trừ cỏ. Công nghệ chuyển gen đã có thể làm được điều này. Chúng ta sẽ đưa các gen kháng được thuốc trừ cỏ vào bộ gen của cây trồng.

#### 3.1.Cơ chế chuyển gen kháng thuốc trừ cỏ:

Trước hết, chúng ta phải hiểu cơ chế tác động của thuốc trừ cỏ. Thuốc trừ cỏ có thể kìm hãm sinh tổng hợp thực vật, kìm hãm sinh hô hấp, kìm hãm sự chuyển hoá acidnucleic, gây rối loạn phân chia tế bào, kìm hãm sinh tổng hợp lipid, kìm hãm sinh tổng hợp amino acid...

Cơ chế chung của việc chuyển gen kháng thuốc trừ cỏ đó là chuyển vào cây trồng những gen có khả năng sản xuất dư thừa loại protein (enzyme) miễn cảm với thuốc trừ cỏ, bảo đảm đủ lượng cần thiết cho các chức năng của tế bào khi có mặt của thuốc; hoặc làm giảm khả năng liên kết của protein miễn cảm với thuốc bằng cách thay đổi cấu trúc protein;

hoặc trang bị cho cây khả năng làm mất hoạt tính chuyển hoá của thuốc trừ cỏ.

Sản xuất dư thừa protein (enzyme) miễn cảm với thuốc trừ cỏ đã được áp dụng với nhiều cây trồng để tăng tính kháng thuốc trừ cỏ, Ví dụ Phosphinothricin (tên thương phẩm là Basta) và bialaphos. Phosphinothricin ức chế enzyme tổng hợp glutamin (glutamin synthetase – GS). Ức chế GS gây ra sự tích lũy amonia nhanh chóng trong cây làm cho cây chết. Tăng sự tổng hợp GS trong cây lên nhiều lần có thể khắc phục được tác động của thuốc trừ cỏ. De Block (1987) đề xuất một chiến lược liên quan tới một enzyme có khả năng khử độc của thuốc trừ cỏ Basta. Gen Bar phân lập từ *Streptomyces hygroscopicus* tham gia vào quá trình sinh tổng hợp bialaphos và mã hoá enzyme phosphinothricin acetyltransferase (PAT). Enzyme này acetyl hoá nhóm NH<sub>2</sub> tự do của phosphinothricin và làm cho cây không bị ngộ độc.

Đột biến của gen protein mục tiêu làm mất khả năng liên kết của thuốc trừ cỏ

cũng tăng khả năng kháng hay chịu thuốc trừ cỏ, chẳng hạn như thuốc trừ cỏ

glyphosate, atrazine và sulphonylurea.

### **3.2. Ví dụ:**

Một số cây trồng chuyển gen kháng thuốc trừ cỏ được trồng trên quy mô lớn: đậu tương, ngô, bông, cải dầu, thuốc lá....

Ví dụ về chuyển gen kháng thuốc trừ cỏ Glyphosate và Glufosinate: Glyphosate và Glufosinate là những loại thuốc diệt cỏ kiểm soát hầu hết các loại cây xanh khác. Hai loại thuốc diệt cỏ này rất hữu hiệu trong việc kiểm soát cỏ dại và ít ảnh hưởng trực tiếp lên vật nuôi cũng như không tồn tại lâu trong đất. Chúng có hiệu quả cao nhất và an toàn nhất trong số những hoá chất dùng trong nông nghiệp. Tuy nhiên chúng vẫn ảnh hưởng xấu tới cây trồng. Những loại thuốc diệt cỏ này nhắm vào một số enzyme chủ yếu trong quá trình trao đổi chất của cây trồng, phá vỡ quá trình sản xuất ra thức ăn cho cây và cuối cùng là tiêu diệt nó.

Cây trồng kháng thuốc diệt cỏ Glyphosate:

Cơ chế hại của thuốc là kìm hãm hoạt động của một enzyme enol pyruvat sikimat phosphat synthetase (EPSPS), biến đổi sản phẩm quang hợp thành acid mạch vòng sikimic. Khi acid này không hình thành sẽ gây rối loạn toàn bộ quá trình trao đổi chất ở thực vật, dẫn đến cây chết. Người ta tìm ra gen mã hoá EPSPS từ vi sinh vật hoặc từ một số thực vật có hoạt tính rất cao, sau đó cải biến chúng và chuyển nạp cho cây trồng. Kết quả

tạo ra cây có hàm lượng hoạt tính của enzyme EPSPS cao hơn gấp 4 lần so với cây bình thường và hoàn toàn chống chịu được với thuốc Glyphosate. Ngoài ra, người ta còn có thể đưa vào cây trồng một gen của vi sinh vật khác tạo ra enzyme làm suy biến Glyphosate.

Cây trồng kháng thuốc Glufosinate:

Thuốc diệt cỏ Glufosinate chứa thành phần kích hoạt phosphinothrcin tiêu diệt thực vật bằng cách phong tỏa enzyme chịu trách nhiệm trong quá trình chuyển hoá nitơ và giải phóng chất độc amoniac, một dẫn xuất của quá trình chuyển hoá của thực vật. Cây trồng biến đổi gen chịu được Glufosinate có chứa một gen của vi khuẩn tạo ra loại enzyme giải phóng chất phosphinothrcin và ngăn chặn chúng không bị phá huỷ.