



Giáo trình

Nuôi cấy mô tế bào thực vật



MỞ ĐẦU

Công nghệ sinh học là sự ứng dụng tổng hợp của sinh hóa học, vi sinh vật học và các khoa học về công nghệ để đạt đến sự ứng dụng công nghiệp các năng lực của vi sinh vật, của các tế bào, các tổ chức nuôi cấy và các thành phần của chúng.

Công nghệ sinh học như một thân cây mà những rễ chính của cây này là vi sinh vật học, di truyền học, sinh hóa học, điện tử học, nông học, công nghệ học... và trên vòm lá với hàng nghìn quả đó là các loại sản phẩm phục vụ trồng trọt, chăn nuôi, y học, năng lượng mới, vật liệu mới, tuyển khoáng, bảo vệ môi trường...

Nhờ ứng dụng các thành tựu mới mẽ của công nghệ sinh học như kỹ thuật nuôi cấy mô tế bào, kỹ thuật tái tổ hợp di truyền, người ta có thể tạo ra được những giống cây trồng không những có năng suất cao mà còn chống chịu được với sâu bệnh, hạn hán và điều kiện nghèo phân bón. Nhờ bỏ qua được việc lai chéo và khắc phục được sự tương khắc sinh sản mà việc lai tạo giống rút ngắn được nhiều thời gian. Kỹ thuật tái tổ hợp AND và các kỹ thuật *in vitro* mở ra khả năng lai khác loài và làm tăng nhanh tính đa dạng di truyền.

Đối với các loại cây trồng có giá trị thương mại lớn, kỹ thuật nuôi cấy mô đã đem lại những hiệu quả kinh tế hết sức rõ rệt.

Hiện nay, người ta đã bắt đầu ứng dụng khả năng nuôi cấy tế bào thực vật tách rời ở qui mô công nghiệp để thu nhận các sản phẩm, các hoạt chất sinh học có giá trị kinh tế cao.

Nuôi cấy mô tế bào thực vật là một ngành khoa học trẻ có nhiều triển vọng, được ứng dụng nhiều trong các lĩnh vực kinh tế. Ý thức được triển vọng to lớn của ngành khoa học hiện đại này, chúng tôi xin giới thiệu quyển sách công nghệ nuôi cấy mô tế bào thực vật nhằm phục vụ sinh viên, học viên sau đại học và các cơ quan có liên quan .

Nội dung cuốn sách bao hàm toàn bộ những vấn đề cơ bản trong nội dung công nghệ nuôi cấy mô thực vật.

Chúng tôi xin cảm ơn GS. Trần Văn Minh đã cung cấp cho chúng tôi nhiều tài liệu chính để biên soạn.

Chúng tôi chân thành cảm ơn nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật và ban biên tập cho xuất bản để cuốn sách được sớm đến với bạn đọc.

Phần 1. NUÔI CÂY TẾ BÀO

Chương 1. GIỚI THIỆU CHUNG VÀ LỊCH SỬ PHÁT TRIỂN

1.1. Giới thiệu chung

Khái niệm biotechnology - công nghệ sinh học đã được đề xuất năm 1917 bởi một kỹ sư người Hungari tên là Karl Erky để mô tả quá trình chế biến củ cải đỏ làm nguồn thức ăn phục vụ sản xuất lợn với qui mô lớn. Theo Karl Erky, Biotechnology là từ dùng để chỉ "Tất cả những công việc trong đó các sản phẩm được sản xuất ra từ các nguyên liệu thô với sự giúp đỡ của các vật chất sống". Năm 1961 một nhà vi sinh vật học người Thụy Điển là Carl Goren Hedén đề nghị đổi tên tạp chí khoa học Journal of microbiological and Biochemical Engineering and technology thành Biotechnology and Bioengineering để đăng tải các nghiên cứu trong lĩnh vực vi sinh học ứng dụng và lên men công nghiệp. Từ đó, Biotechnology đã trở nên rõ ràng và luôn gắn liền với những nghiên cứu về "sự sản xuất công nghiệp các loại hàng hoá và dịch vụ thông qua các quá trình có sử dụng các cơ thể, hệ thống sinh học và chế biến". Các nghiên cứu về công nghệ sinh học đã được phát triển dựa trên các lĩnh vực chuyên môn như vi sinh, hoá sinh và công nghệ hóa học. Công nghệ sinh học theo W.H Stone (1987) có thể định nghĩa: "Là những công nghệ sử dụng các cơ thể sống hoặc các phần của cơ thể như tế bào, để tạo ra hoặc thay đổi các sản phẩm nhằm cải tiến các cây trồng và vật nuôi, hoặc phát triển các vi sinh vật vào các ứng dụng đặc hiệu". Theo liên đoàn công nghệ sinh học châu Âu (EFB): "Công nghệ sinh học là ứng dụng tổng hợp của sinh hoá học, vi sinh vật và các khoa học về công nghệ để đạt tới sự ứng dụng công nghiệp các năng lực của vi sinh vật, của các tế bào, các tổ chức nuôi cấy và các thành phần của chúng." Đến nay, định nghĩa về công nghệ sinh học được nhiều nhà khoa học cũng như nhiều nước trên thế giới thống nhất như sau: Công nghệ sinh học là các quá trình sản xuất ở quy mô công nghiệp có sự tham gia của các tác nhân sinh học (ở mức độ cơ thể, tế bào hoặc dưới tế bào) dựa trên các thành tựu tổng hợp của nhiều bộ môn khoa học, phục vụ cho việc tăng của cải vật chất của xã hội và bảo vệ lợi ích của con người. Theo quan điểm hiện đại, các tác nhân sinh học tham gia vào quá trình sản xuất ở trên là những giống sinh vật mới hoặc các sản phẩm của chúng được tạo ra bằng kỹ thuật di truyền hiện đại (công nghệ gen).

Từ định nghĩa cô đọng này có thể thấy:

+ Công nghệ sinh học không phải là một bộ môn khoa học như toán, lý, hoá, sinh học phân tử... mà là một phạm trù sản xuất.

+ Công nghệ sinh học không chỉ tạo ra thêm của cải vật chất, mà còn hướng vào việc bảo vệ và tăng cường chất lượng cuộc sống con người.

+ Thực tế, công nghệ sinh học mang tính ứng dụng, tuy nhiên hàng loạt kỹ thuật của công nghệ sinh học đang là những công cụ sắc bén để nghiên cứu khoa học sinh học và làm sáng tỏ các cơ chế của các hiện tượng sống ở mức phân tử. ở nước ta, theo Nghị định số 18/CP của Chính phủ ngày 11/3/1994 về phát triển công nghệ sinh học thì: “Công nghệ sinh học là một tập hợp các ngành khoa học (sinh học phân tử, di truyền học, vi sinh vật học, sinh hóa học và công nghệ học) nhằm tạo ra các công nghệ khai thác ở quy mô công nghiệp các hoạt động sống của vi sinh vật, tế bào thực vật và động vật”

- Khái niệm về công nghệ sinh học nông nghiệp (Agriculture Biotechnology)

Theo Nghị định số 18/CP của Chính phủ ngày 11/3/1994 về phát triển công nghệ sinh học ở Việt nam thì: “Công nghệ sinh học là một tập hợp các ngành khoa học (sinh học phân tử, di truyền học, vi sinh vật học, sinh hóa học và công nghệ học) nhằm tạo ra các công nghệ khai thác ở quy mô công nghiệp các hoạt động sống của vi sinh vật, tế bào thực vật và động vật.” Vậy, “Công nghệ sinh học nông nghiệp là một tập hợp các ngành khoa học (sinh học phân tử, di truyền học, vi sinh vật học, sinh hoá học và công nghệ học) nhằm tạo ra các công nghệ sản xuất sản phẩm nông nghiệp ở quy mô công nghiệp.” Chúng ta có thể hiểu, công nghệ sinh học nông nghiệp là một nhánh của công nghệ sinh học mà đối tượng phục vụ là sản xuất nông nghiệp; cụ thể là ứng dụng các thành tựu chung của công nghệ sinh học để phục vụ cho sản xuất nông nghiệp của con người

Dựa vào việc ứng dụng thành tựu của công nghệ sinh học để phục vụ các chuyên ngành khác nhau trong sản xuất nông nghiệp mà người ta có thể chia công nghệ sinh học nông nghiệp thành 2 loại sau:

- Công nghệ sinh học trong trồng trọt (bao gồm cả trồng cây lâm nghiệp, cây dược liệu) gồm nuôi cấy mô tế bào thực vật, nuôi cấy hạt phấn, chuyển gen vào tế bào thực vật chủ...

- Công nghệ sinh học trong chăn nuôi (bao gồm cả chăn nuôi thủy sản) gồm nuôi cấy mô tế bào động vật, sản xuất tế bào gốc, cấy chuyển phôi, nhân bản vô tính...

Hiện nay, từ những thành tựu của công nghệ sinh học trong nuôi cấy mô tế bào, nuôi cấy hạt phấn và chuyển gen có thể ứng dụng rất nhiều vào lĩnh vực trồng trọt, như:

- Nhân nhanh vô tính các giống cây quý: từ một mẫu nuôi cấy người ta có thể tạo ra hàng triệu cây con như nhau nếu đủ thời gian cấy chuyển. Tuy nhiên, hệ số cấy chuyển phụ thuộc tùy giống, càng cấy chuyển nhiều lần càng tạo nhiều biến dị. Ví dụ, các nhà khoa học đã kết luận từ một chồi dưa đưa vào nuôi cấy trong ống nghiệm có thể nhân ra hàng triệu cây dưa giống; từ một chồi chuối đưa vào nuôi cấy có thể nhân ra 2.000 cây

chuối giống, nếu qua số này sẽ có tỷ lệ biến dị cao.

- Cải lương giống cây trồng bằng nuôi cấy đỉnh sinh trưởng (meristem): để phục tráng những giống cây quý đã nhiễm *virus* người ta có thể nuôi cấy đỉnh sinh trưởng để nhân nhanh. Qua một số lần nuôi cấy theo kiểu này sẽ tạo ra được những cây hoàn toàn sạch bệnh từ cây đã nhiễm *virus*.

- Tạo dòng đơn bội từ nuôi cấy bao phấn và nuôi cấy tế bào hạt phấn: Người ta đã ứng dụng kỹ thuật nuôi cấy bao phấn và hạt phấn để tạo những cây đơn bội từ bao phấn hoặc hạt phấn, sau đó lưỡng bội hoá và tạo thành dòng đồng hợp tử. Kỹ thuật này đã thành công nhiều ở những cây họ cà.

- Khắc phục lai xa bằng cách thụ phấn trong ống nghiệm nhờ kỹ thuật nuôi cấy phôi: Nhờ nuôi cấy trong ống nghiệm đã khắc phục tính bất hợp giao tử trước và sau khi thụ tinh đối với lai giữa các cây khác nhau khá xa về mặt di truyền.

- Lai vô tính còn gọi là dung nạp tế bào trần (Protoplast): Nhờ kỹ thuật nuôi cấy mô tế bào thực vật mà người ta đã tạo thành cây lai từ 2 giống khác nhau khá xa về mặt di truyền bằng cách dùng các enzym để hoà tan màng tế bào rồi cho các tế bào trần (không còn màng) vào nuôi cấy chung trong môi trường nhân tạo và chúng phát triển thành khối mô sẹo (callus), từ đó chuyển khối callus này sang các môi trường phân hoá chức năng tế bào và để nuôi cấy thành cây lai.

- Tạo giống cây trồng mới bằng kỹ thuật chuyển gen: Trên cơ sở xác định được tính trạng quý mà gen quy định, người ta có thể chuyển những gen đó vào những cây trồng khác với mong muốn tạo được những giống mới mang đặc tính mong muốn.

1.2. Sơ lược lịch sử phát triển

Năm 1665, Robert Hooke quan sát thấy tế bào sống dưới kính hiển vi và đưa ra khái niệm "tế bào - Cell". Anton Van Leuwen Hoek (1632-1723) thiết kế kính hiển vi khuếch đại được 270 lần, lần đầu tiên quan sát thấy vi khuẩn, tế bào tinh trùng trong tinh dịch người và động vật. Năm 1838, Matthias Schleiden và Theodore Schwann đề xướng học thuyết cơ bản của sinh học gọi là Học thuyết tế bào:

- + Mọi cơ thể sống được cấu tạo bởi một hoặc nhiều tế bào.
- + Tế bào là đơn vị cấu trúc và chức năng cơ bản của cơ thể sống, là hình thức nhỏ nhất của sự sống.
- + Tế bào chỉ được tạo ra từ tế bào tồn tại trước đó.

Năm 1875, Oscar Hertwig chứng minh bằng quan sát trên kính hiển vi rằng sự thụ thai là do sự hợp nhất của nhân tinh trùng và nhân trứng. Sau đó, Hermann P., Schneider F.A và Butschli O. đã mô tả chính xác quá trình phân chia tế bào. Năm 1883, Wilhelm Roux lần đầu tiên lý giải về phân bào giảm nhiễm ở cơ quan sinh dục. Từ một tế bào thực vật nuôi cấy in vitro có thể tái sinh thành một cơ thể sống hoàn chỉnh. Khả năng này của

tế bào thực vật được gọi là tính toàn năng. Năm 1902, Haberlandt lần đầu tiên thí nghiệm nuôi cấy mô cây một lá mầm nhưng không thành công. Năm 1934, Kogl lần đầu tiên xác định được vai trò của IAA, 1 hoocmon thực vật đầu tiên thuộc nhóm auxin có khả năng kích thích sự tăng trưởng và phân chia tế bào. Năm 1939, ba nhà khoa học Gautheret, Nobecourt và White đã đồng thời nuôi cấy mô sẹo thành công trong thời gian dài từ mô thượng tầng (cambium) ở cà rốt và thuốc lá, mô sẹo có khả năng sinh trưởng liên tục. Năm 1941, Overbeek và cs đã sử dụng nước dừa trong nuôi cấy phôi non ở cây cà rốt *Datura*. Năm 1955, Miller và cs đã phát minh cấu trúc và sinh tổng hợp của kinetin - một cytokinin đóng vai trò quan trọng trong phân bào và phân hoá chồi ở mô nuôi cấy. Đến năm 1957, Skoog và Miller đã khám phá vai trò của tỷ lệ nồng độ các chất auxin: cytokinin trong môi trường đối với sự phát sinh cơ quan (rễ hoặc chồi). Khi tỷ lệ auxin/cytokinin (ví dụ: nồng độ IAA/ nồng độ kinetin) nhỏ hơn 1 và càng nhỏ, mô có xu hướng tạo chồi. Ngược lại khi nồng độ IAA/ nồng độ kinetin lớn hơn 1 và càng lớn, mô có xu hướng tạo rễ. Tỷ lệ nồng độ auxin và cytokinin thích hợp sẽ kích thích phân hoá cả chồi và rễ, tạo cây hoàn chỉnh.

Năm 1949, Limmasets và Cornuet đã phát hiện rằng *virus* phân bố không đồng nhất trên cây và thường không thấy có *virus* ở vùng đỉnh sinh trưởng. Năm 1952, Morel và Martin đã tạo ra cây sạch bệnh *virus* của 6 giống khoai tây từ nuôi cấy đỉnh sinh trưởng. Ngày nay, kỹ thuật này với một số cải tiến đã trở thành phương pháp loại trừ bệnh *virus* được dùng rộng rãi đối với nhiều loài cây trồng khác nhau. Năm 1952, Morel và Martin lần đầu tiên thực hiện vi ghép in vitro thành công. Kỹ thuật vi ghép sau đó đã được ứng dụng rộng rãi trong tạo nguồn giống sạch bệnh *virus* và tương tự *virus* ở nhiều cây trồng nhân giống bằng phương pháp vô tính khác nhau, đặc biệt là tạo giống cây ăn quả sạch bệnh. Năm 1960, Morel đã thực hiện bước ngoặt cách mạng trong sử dụng kỹ thuật nuôi cấy đỉnh sinh trưởng trong nhân nhanh các loại địa lan *Cymbidium*, mở đầu công nghiệp vi nhân giống thực vật.

Năm 1960, Cocking lần đầu tiên sử dụng enzym phân giải thành tế bào và đã tạo ra số lượng lớn tế bào trần. Kỹ thuật này sau đó đã được hoàn thiện để tách nuôi tế bào trần ở nhiều cây trồng khác nhau. Năm 1971, Takebe và cs đã tái sinh được cây từ tế bào trần mô thịt lá (mesophyll cell) ở thuốc lá. Năm 1972, Carlson và cs lần đầu tiên thực hiện lai tế bào soma giữa các loài, tạo được cây từ dung hợp tế bào trần của 2 loài thuốc lá *Nicotiana glauca* và *N. langsdorfii*. Năm 1978, Melchers và cs tạo được cây lai soma "Cà chua Thuốc lá" bằng lai xa tế bào trần của 2 cây này. Đến nay, việc tái sinh cây hoàn chỉnh từ tế bào trần hoặc từ lai tế bào trần đã thành công ở nhiều loài thực vật.

Năm 1964, Guha và Maheshwari lần đầu tiên thành công trong tạo được cây đơn bội từ nuôi cấy bao phấn của cây cà Datura. Kỹ thuật này sau đó đã được nhiều tác giả phát triển và ứng dụng rộng rãi trong tạo dòng đơn bội (1x), dòng thuần nhị bội kép (2x), cố định ưu thế lai (nuôi cấy bao phấn hoặc hạt phấn của dòng lai F1 để tạo giống thuần mang tính trạng ưu thế lai).

Năm 1959, Tulecke và Nickell đã thử nghiệm sản xuất sinh khối mô thực vật quy mô lớn (134 lít) bằng nuôi cấy chìm. Năm 1977, Noguchi và cs đã nuôi cấy tế bào thuốc lá trong bioreactor dung tích lớn 20,000 lít. Năm 1978, Tabata và cs đã nuôi tế bào cây thuốc ở quy mô công nghiệp phục vụ sản xuất shikonin. Họ đã chọn lọc được dòng tế bào cho sản lượng các sản phẩm thứ cấp (shikonin) cao hơn. Năm 1985, Flores và Filner lần đầu tiên sản xuất chất trao đổi thứ cấp từ nhân nuôi rễ tơ ở *Hyoscyamus muticus*. Những rễ này sản xuất nhiều hoạt chất hyoscyamine hơn cây tự nhiên. Hiện nay, công nghệ nuôi cấy tế bào và mô (ví dụ, mô rễ của nhân sâm) trong các bioreactor dung tích lớn đã được thương mại hoá ở mức công nghiệp để sản xuất sinh dược.

Năm 1981, trên cơ sở quan sát các biến dị xảy ra rất phổ biến trong nuôi cấy mô và tế bào với phổ biến dị và tần số biến dị cao, Larkin và Scowcroft đã đưa ra thuật ngữ "biến dị dòng soma" (Somaclonal Variation) để chỉ các thay đổi di truyền tính trạng xảy ra do nuôi cấy mô và tế bào in vitro. Từ các dòng tế bào hoặc cây biến dị di truyền ổn định có thể nhân nhanh, tạo ra các dòng và giống đột biến có năng suất, hàm lượng hoạt chất hữu ích cao, kháng một số các điều kiện bất lợi như bệnh, mặn, hạn,...

Đến nay các nhà khoa học đã khẳng định rằng mức độ thành công của chuyển gen vào cây trồng phụ thuộc rất nhiều vào hệ thống nuôi cấy và tái sinh tế bào thành cây in vitro sau chuyển gen. Năm 1974, Zaenen và cs đã phát hiện plasmid Ti đóng vai trò là yếu tố gây u (crown gall) ở cây trồng. Năm 1977, Chilton và cs đã chuyển thành công T-DNA vào thực vật. Năm 1979, Marton và cs đã xây dựng quy trình chuyển gen vào tế bào trần bằng đồng nuôi cấy tế bào trần và *Agrobacterium*. Năm 1982, Krens đã chuyển thành công DNA vào tế bào trần. Năm 1985, Fraley và cs thiết kế vector plasmid Ti đã loại bỏ các gen độc gây hại để sử dụng cho việc thiết kế vector chuyển gen vào thực vật. Cùng trong năm, Horsch và cs đã chuyển gen vào mảnh lá bằng *Agrobacterium tumefaciens* và tái sinh cây chuyển gen. An và cs (1985) đã phát triển hệ thống hai vector cho chuyển gen thực vật. Năm 1987, Klein và cs đã sử dụng súng bắn gen (particle gun) mang vi đạn trong chuyển gen và tái sinh được cây biểu hiện gen chuyển. Năm 1994, thương mại hoá giống cà chua chuyển gen 'FlavrSavr' Các bước phát triển trong lịch sử công nghệ tế bào thực vật được tóm tắt ở bảng 1.1.

Bảng 1.1. Những mốc chính trong lịch sử phát triển của công nghệ tế bào thực vật

Năm	Những phát minh và sự kiện quan trọng
1665	Robert Hooke quan sát được tế bào sống dưới kính hiển vi và đưa ra khái niệm tế bào.
1838	Matthias Schleiden và Theodore Schwann đề xướng học thuyết tế bào. Schleiden M. J., Arch. Anat., Physiol. U. wiss. Med. (J. Muller), 1838: 137-176; Schwann T., W. Engelman, No. 176 (1910).
1902	Haberlandt lần đầu tiên thí nghiệm nuôi cấy mô cây một lá mầm nhưng không thành công. Haberlandt G., Sitzungsber Akad. Wiss. Wien, Math.-Naturwiss. Kl., 111: 69-92.
1904	Hannig tiến hành các thí nghiệm nuôi cấy phôi đầu tiên ở các loài họ cải Crucifers. Hannig B., Bot. Zeitung, 62: 45-80.
1922	Cho hạt phong lan nảy mầm in vitro. Knudson L., Bot. Gaz., 73: 1-25.
1924	Hình thành callus từ rễ cà rốt trong môi trường có acid lactic. Blumenthal F. and Meyer P. Z. Krebsforsch. 21: 250-252.
1925	Làm hạt phong lan nảy mầm in vitro. Knudson L., Bot. Gaz., 29: 345-379.
1929	Laibach sử dụng nuôi cấy phôi để khắc phục hiện tượng bất hoà hợp khi lai ở <i>Linum</i> spp. Laibach F., J Hered., 20: 201-208.
1934	White đã thành công khi nuôi cấy mô rễ cà chua trong thời gian dài. White P. R., Plant Physiol., 9: 585-600.
1934	Kogl lần đầu tiên xác định được vai trò của IAA, 1 hoocmon thực vật đầu tiên có khả năng kích thích sự tăng trưởng và phân chia tế bào. Kogl F. et al., Z. Physiol. Chem., 228: 90-103.
1936	Nuôi cấy phôi các loài cây hạt trần khác nhau. LaRue C. R., Bull. Torrey Bot. Club, 63: 365-382
1939	Gautheret, Nobecourt và White lần đầu tiên nuôi cấy mô sẹo thành công trong thời gian dài từ mô thượng tầng (cambium) ở cà rốt và thuốc lá. Gautheret R. J., C. R. Acad. Sci. (Paris), 208: 118-120; Nobecourt P., C. R. Soc. Biol. (Paris), 130: 1270-1271; White P. R., Am. J. Bot., 26: 59-64.
1941	Overbeek và cs đã sử dụng nước dừa trong nuôi cấy phôi non ở cà rốt. Overbeek

- J. van et al., Science, 94: 350-351.
- 1942 Gautheret lần đầu tiên theo dõi sự hình thành chất trao đổi thứ cấp trong nuôi cấy mô sẹo thực vật. Gautheret R. J. Bull. Soc. Chim. Biol. 41: 13..
- 44 Skoog lần đầu tiên nghiên cứu sự hình thành chồi phụ từ nuôi cấy mô thuốc lá in vitro. Skoog F., Am. J. Bot., 31: 19-24.
- 1946 Sự tạo cây đầu tiên từ đỉnh chồi ở *Lupinus* và *Tropaeolum*. Ball E., Am. J. Bot., 33: 301-318.
- 1948 Hình thành chồi phụ và rễ ở thuốc lá. Skoog F. and Tsui C., Am. J. Bot., 355: 782-787.
- 1950 Lần đầu tiên nuôi cấy thành công cây một lá mầm bằng nước dừa. Morel G. C. R. Acad. Sci., 230: 2318-2320.
- 1951 Nitsch lần đầu tiên nghiên cứu nuôi cấy noãn tách rời in vitro. Nitsch J. P., Am. J. Bot., 38: 566-577.
- 1951 Skoog nghiên cứu sử dụng các hoá chất điều hoà sinh trưởng và phát sinh cơ quan. Skoog F., Annee Biol., 26: 545-562.
- 1952 Morel và Martin lần đầu tiên tạo được cây *Dahlia* sạch *virus* bằng nuôi cấy đỉnh sinh trưởng. Morel G. and Martin C., C. R. Hebd. Seances Acad. Sci. (Paris), 235: 1324-1325.
- 1952 Morel và Martin lần đầu tiên thực hiện vi ghép in vitro thành công. Morel G. and Martin C., C. R. Acad. Sci. (Paris), 235: 1324-1325.
- 1953 Tulecke lần đầu tiên thành công trong nuôi cấy bao phấn và tạo mô sẹo đơn bội từ hạt phấn *Ginkgo biloba*. Tulecke W. R., Science, 117: 599-600.
- 1954 Muir và cs lần đầu tiên tạo được mô sẹo từ mô nuôi dưỡng (nurse culture). Muir W. H. et al., Science, 119: 877-878.
- 1955 Miller và cs đã phát minh cấu trúc và con đường sinh tổng hợp kinetin. Miller C. et al., J. Am. Chem. Soc., 77: 1392 & 2662-2663.
- 1957 Skoog và Miller đã khám phá vai trò tỷ lệ nồng độ các chất auxin : cytokinin trong môi trường đối với sự phát sinh cơ quan (rễ hoặc chồi). Skoog F. and Miller C. O., In vitro Symp. Soc. Exp. Biol., No. 11: 118-131.

- 1957 Vasil nghiên cứu nuôi cấy bao phấn tách rời ở *Allium cepa*. Vasil I. K., *Phytomorph.*, 7: 138-149.
- 1958 Maheshwari thực hiện nuôi cấy noãn tách rời in vitro ở cây anh túc *Papaver somniferum*. Maheshwari N., *Science*, 127: 342.
- 58 Maheshwari đã tái sinh thành công phôi soma từ phôi tâm (nucella) trong nuôi cấy noãn *Citrus*. Maheshwari P. and Rangaswamy N. S., *Ind. J. Hort.*, 15: 275-281.
- 1959 Tulecke và Nickell thử nghiệm sản xuất sinh khối thực vật quy mô lớn (134 L) bằng nuôi cấy chìm. Tulecke W. and Nickell L. G., *Science*, 130: 863-864.
- 1959 Reinert và Steward lần đầu tiên tạo được phôi vô tính từ nuôi cấy mô cà rốt.
- 1960 Kanta lần đầu tiên thực hiện thụ tinh trong ống nghiệm ở *Papaver rhoeas*. Kanta K., *Nature*, 188: 683-684.
- 1960 Cocking lần đầu tiên đã sử dụng enzym phân giải thành tế bào để tạo ra số lượng lớn tế bào trần. Cocking E. C., *Nature*, 187: 927-929.
- 1960 Morel lần đầu tiên thành công trong nuôi cấy mô đỉnh sinh trưởng để nhân nhanh phong lan. Morel G., *Am. Orchid Soc. Bull.*, 29: 495-497.
- 1962 Murashige và Skoog phát minh môi trường nuôi cấy mô tế bào thực vật- môi trường MS. Murashige T. and Skoog F., *Physiol. Plant.*, 15: 473-497.
- 1964 Guha và Maheshwari lần đầu tiên thành công trong tạo được cây đơn bội từ nuôi cấy bao phấn của cây cà rốt. Guha S. and Maheshwari S. C., *Nature*, 204: 497 and *Nature*, 212: 97-98 (1966).
- 1967 Bourgin và Nitsch tạo cây đơn bội từ hạt phấn thuốc lá. Bourgin J. P. and Nitsch J. P., *Ann. Physiol. Veg.*, 9: 377-382 & 10: 69-81.
- 1969 Phân lập tế bào trần từ nuôi cấy tế bào dịch lỏng (huyền phù) của *Hapopappus gracilis*. Ericksson T. and Jonassen K., *Planta*, 89: 85-89
- 1970 Chon lọc đột biến sinh hoá ở thuốc lá. Carlson P. S., *Science*, 168: 487-489.
- 1971 Takebe và cs đã tái sinh được cây từ tế bào trần mô thịt lá ở thuốc lá. Takebe I. et al., *Naturewiss.*, 58: 318-320.
- 1972 Carlson và cs tạo được cây từ lai xa tế bào trần đầu tiên nhờ dung hợp tế bào trần của 2 loài thuốc lá *Nicotiana glauca* và *N. langsdorfii*. Carlson P. S. et al., *P. N. A. S. (USA)*, 69: 2292-2294.

- 1973 Phát hiện cytokinin có khả năng phá ngủ ở Gerberas. Pierik R. L. M. et al., *Sci. Hort.*, 1: 117-119.
- 1974 Zaenen và cs phát hiện plasmid Ti đóng vai trò là yếu tố gây u (crown gall) ở cây trồng. Zaenen I. et al., *J. Molec. Biol.*, 86: 109-127; Larebeke N. van et al., *Nature*, 252: 169-170.
- 1974 Melchers và Lalib tạo được cây đa bội từ dung hợp tế bào trần đơn bội. Melchers G. and Lalib G., *Mol. Gen. Genet.* 135: 277-294.
- 1975 Gengenbach và Green chọn lọc dòng tế bào kháng bệnh nấm *Helminthosporium maydis* trong nuôi cấy mô sẹo ngô. Gengenbach B. G. and Green C. E., *Crop Sci.*, 15: 645-649.
- 1977 Chilton và cs chuyển thành công T-DNA vào thực vật. Chilton M. D. et al., *Cell*, 11: 263-271.
- 1977 Noguchi và cs nuôi cấy tế bào thuốc lá trong bioreactor 20,000 L. Noguchi M. et al., *Plant Tissue Culture & its Biotechnological Application*, Springer Verlag, Berlin,,: 85-94.
- 1978 Melchers và cs tạo được cây lai soma cà chua- thuốc lá bằng dung hợp tế bào trần. Melchers G. et al., *Carlsburg Res. Comm.*, 43: 203-218.
- 1978 Tabata và cs nuôi tế bào thực vật ở quy mô công nghiệp phục vụ sản xuất shikonin (chọn lọc dòng tế bào cho sản lượng các sản phẩm thứ cấp cao hơn). Tabata M. et al., *Frontiers of Plant Tissue Culture 1978*, Univ. Calgary Press, Calgary,,: 213-222.
- 1979 Marton và cs xây dựng quy trình chuyển gen vào tế bào trần bằng đồng nuôi cấy tế bào và *Agrobacterium*. Marton L. et al., *Nature*, 277: 129-131
- 1980 Alfermann và cs sử dụng các tế bào nuôi cấy trong chuyển hoá sinh học digitoxin thành digoxin. Alfermann A. W. et al., *Planta Medica*, 40: 218.
- 1981 Larkin và Scowcroft đưa ra thuật ngữ "biến dị soma" để chỉ các thay đổi di truyền tính trạng xảy ra do nuôi cấy mô và tế bào in vitro. Larkin P. J. and Scowcroft W. R., *Theor. Appl. Gen.*, 60: 197-214.
- 1982 Krens đã chuyển DNA vào tế bào trần. Krens F. A. et al., *Nature*, 296: 72-74.

- 1982 Zimmerman sử dụng kỹ thuật xung điện trong dung hợp tế bào trần. Zimmermann U., Biochim. Biophys. Acta, 694: 227-277.
- 1983 Công ty Mitsui Petrochemicals lần đầu tiên đã sản xuất chất trao đổi thứ cấp trên quy mô công nghiệp bằng nuôi cấy tế bào dịch lỏng *Lithospermum* spp. Mitsui Petrochemicals.
- 1983 Zambryski và cs thiết kế các vector chuyển gen thông qua *Agrobacterium*. Zambryski P. et al., EMBO J., 2: 2143-2150.
- 1984 Chuyển gen vào tế bào trần thuốc lá *Nicotiana* bằng ADN plasmid và tái sinh cây chuyển gen. Paszkowski J. et al., EMBO J., 3: 2717-2722.
- 1985 Fraley và cs thiết kế vector Ti plasmid đã loại bỏ các gen độc gây hại cho việc chuyển gen vào thực vật. Fraley R. T. et al., Bio/Technol., 3: 629-635.
- 1985 Horsch và cs chuyển gen vào mảnh lá bằng *Agrobacterium tumefaciens* và tái sinh cây chuyển gen. Horsch R. B. et al., Science, 227: 1229-1231.
- 1985 An và cs đã phát triển hệ thống hai vector cho chuyển gen thực vật. An G. et al., EMBO J., 4: 277-284.
- 1985 Chuyển gen vào tế bào trần cây một lá mầm và hai lá mầm bằng phương pháp điện thấm. Fromm M. E., P. N. A. S. (USA), 82: 5824-5828.
- 1985 Flores và Filner lần đầu tiên sản xuất chất trao đổi thứ cấp từ nhân nuôi rễ tơ ở *Hyoscyamus muticus*. Những rễ này sản xuất nhiều hoạt chất hyoscyamine hơn cây tự nhiên. Flores H. E. and Filner P., Primary & Secondary Metabolism of Plant Cell Cultures. Springer Verlag, (Eds. Neumann K. H., Barz W. and Reinhard E.): 174-186.
- 1986 Crossway và cs chuyển gen vào tế bào trần thuốc lá bằng vi tiêm AND trực tiếp. Crossway A. et al., Mol. Gen. Genet., 202: 179-185.
- 1987 Klein và cs đã sử dụng súng bắn gen (Particle gun) mang vi đạn trong chuyển gen và tái sinh cây biểu hiện gen chuyển. Klein T. M. et al., Nature, 327: 70-73.
- 1987 Bytebier và cs lần đầu tiên đã chuyển gen vào cây một lá mầm (*Asparagus*) bằng *Agrobacterium tumefaciens*. Bytebier B. et al., P. N. A. S. (USA), 84: 5345-5349.
- 1988 Klein và cs tái sinh cây chuyển gen ổn định thông qua phương pháp bắn gen. Klein T. M. et al., P. N. A. S. (USA), 85: 4305-4309.

- 1991 Sản xuất cây mang gen đầu tiên ở thông *Larix decidua* bằng chuyển gen qua *Agrobacterium rhizogenes*. Huang Y. et al., *In vitro Cell Dev. Biol.*, 27: 201-207.
- 1992 Lúa kháng chất diệt cỏ nhờ chuyển gen vào tế bào trần thông qua PEG. Dutta S. K. et al., *Plant Mol. Biol.*, 20: 619-629.
- 1993 Kranz và Lorz thực hiện thụ tinh in vitro tạo ra và nuôi cấy phôi hợp tử ở ngô. Các quá trình phát triển và phân hoá của phôi sau đó đã được quan sát dưới kính hiển vi và phân tích biểu hiện của gen nhằm xác định các gen tham gia trong từng giai đoạn phát triển của phôi. Kranz E. and Lorz H., *The Plant Cell*, 5: 739-746.
- 1994 Thương mại hoá giống cà chua chuyển gen 'Flavr-Savr'
- 1998 Hamilton và cs đã phát triển vector mang NST nhân tạo của hai vi khuẩn (BBIC) cho chuyển gen thông qua *Agrobacterium* (khả năng chuyển 150 kb). Hamilton C. M. et al., *P. N. A. S. (USA)*, 93: 9975-9979
-

1.3 Sơ lược các kỹ thuật dùng trong nuôi cấy mô

1.3.1. Nuôi cấy phôi.

Sự ghi nhận đầu tiên về nuôi cấy phôi là công trình của Charles Bonnet ở thế kỷ XVIII. Ông tách phôi *Phascolus* và *Fagopyrum* trong trong đất và nhận được cây nhưng là cây lùn. Từ đầu thế kỷ XX các công trình nuôi cấy phôi dần được hoàn thiện hơn. Từ các công trình nghiên cứu trước đó, Knudson (1922) đã nuôi cấy thành công phôi cây lan trong môi trường chứa đường và khám phá ra một điều là nếu thiếu đường thì phôi không thể phát triển thành protocorm.

Raghavan (1976, 1980) đã công bố rằng phôi phát triển qua hai giai đoạn dị dưỡng và tự dưỡng. Ở giai đoạn dị dưỡng (tiền phôi) cần có các chất điều hoà sinh trưởng để phát triển. Trong giai đoạn tự dưỡng sự phát triển của phôi không cần chất điều hoà sinh trưởng.

Đối với nuôi cấy phôi, như đã biết đường đóng vai trò rất quan trọng. Trong nhiều trường hợp thì đường sucrose cho kết quả tốt hơn các đường khác. Ngoài ra một số chất tự nhiên như nước dừa, nước chiết malt, casein thuỷ phân, là những chất rất cần trong nuôi cấy phôi. Các chất kích thích sinh trưởng như GA₃, auxin, cytokinine thường được

dùng nhiều trong nuôi cấy phôi. Auxin thường dùng ở nồng độ thấp. Kinetin có vai trò đặc biệt cho sự phát triển của phôi.

Các yếu tố ngoại cảnh như nhiệt độ, ánh sáng cũng ảnh hưởng đến sự phát triển của phôi nuôi cấy in vitro. Thường phôi nuôi cấy cần nhiệt độ và ánh sáng thấp hơn phôi phát triển tự nhiên.

1.3.2. Nuôi cấy mô và cơ quan tách rời

Wetmore (1946) nuôi cấy đỉnh chồi cây nho dại, cùng với một số tác giả khác, ông đã chứng minh các bộ phận của cây đều có thể nuôi cấy khi gặp điều kiện thuận lợi. Lon và Ball (1946) với thí nghiệm nuôi cấy đỉnh chồi cây măng tây đã cho thấy khi nuôi các bộ phận của cây như lá, thân, hoa thì khả năng tạo mô sẹo nhiều hơn.

Nhu cầu dinh dưỡng khi nuôi cấy các bộ phận khác nhau của cây là khác nhau nhưng có thể thấy một số yêu cầu chung như nguồn cacbon dưới dạng đường và các muối của các nguyên tố đa lượng (nito, phospho, kali, calci) và vi lượng (Mg, Fe, Mn, Co, Zn,...). Ngoài ra cần một số chất đặc biệt như vitamin (B₁, B₆, B₃, ...) và các chất điều hoà sinh trưởng. Muốn duy trì sinh trưởng và phát triển của cơ quan nuôi cấy cần thường xuyên cấy chuyển qua môi trường mới.

Đối với nuôi cấy mô, ngoài những thành phần dinh dưỡng như đối với nuôi cấy cơ quan tách rời, cần bổ sung thêm các chất hữu cơ chứa ít nitơ dưới dạng acide amine, đường và inositol. Trong trường hợp nuôi cấy mô, các chất điều hoà sinh trưởng có vai trò quan trọng hơn vì các mô tách rời không có khả năng tổng hợp các chất này.

1.3.3. Nuôi cấy mô phân sinh

Mô phân sinh thường là các mô đỉnh chồi và cành có kích thước 0,1mm÷ 1cm. Các mô phân sinh dùng để nuôi cấy thường tách từ các mầm non, các chồi mới hình thành hoặc các cành non.

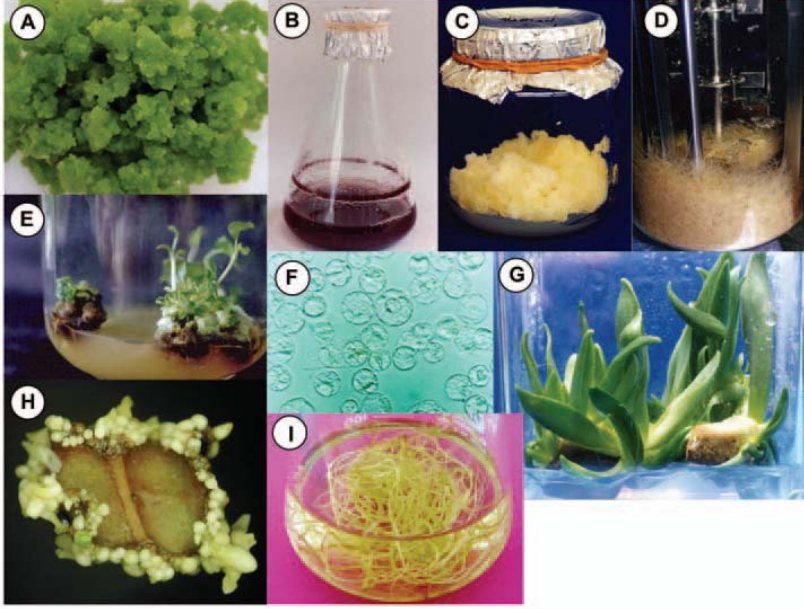
Đối với nuôi cấy mô phân sinh sự cân bằng giữa các chất điều hoà sinh trưởng rất quan trọng. Muốn kích thích tạo chồi cần bổ sung cytokinine hoặc tổ hợp cytokinine với auxin. Muốn tạo rễ thì bổ sung các auxin như NAA, IAA,...

Nuôi cấy mô phân sinh được sử dụng để loại virus tạo cây sạch virus và nhân giống in vitro. Nuôi cấy mô phân sinh còn được sử dụng để nghiên cứu quá trình hình thành cơ quan, tạo cây đa bội qua xử lý colchicin.

1.3.4. Nuôi cấy bao phấn

Kỹ thuật nuôi cấy bao phấn đã phát triển và hoàn thiện nhờ công trình nghiên cứu của Bourgin và Nitsch (1967) trên cây thuốc lá, Niizeki và Oono (1968) trên lúa. Từ cuối

những năm 1970 đã nhận được cây đơn bội từ nuôi cấy bao phấn trên 30 loại cây. Kết quả nghiên cứu của nhiều tác giả cho thấy hạt phấn nuôi cấy có thể phát triển thành cây đơn bội hoàn chỉnh trong điều kiện nuôi cấy in vitro bằng con đường tạo phôi trực tiếp hoặc gián tiếp thông qua tạo mô sẹo và tạo cơ quan.



Hình 1.1 Một số kỹ thuật dùng trong nuôi cấy mô tế bào thực vật

A. Mô sẹo từ *Catharanthus roseus*. (B) Nuôi cấy dịch tế bào từ *Coryphantha* spp. (C) Nốt sần *C. roseus*. (D) Đầu rễ từ *C. roseus*. (E) Tái sinh cây từ *C. roseus* callus. (F) Protoplasts từ *Coffea arabica* (G) Vi nhân giống của *Agave tequilana*. (H) Phôi vô tính của cây *Coffea canephora*. (I) Nuôi cấy rễ cây *Psacalium decompositum*.

1.3.5. Nuôi cấy tế bào đơn

Ngoài khả năng nuôi cấy các cơ quan và mô thực vật, tế bào thực vật có thể được tách và nuôi riêng rẽ trong môi trường phù hợp. Những công trình về nuôi cấy tế bào đơn được tiến hành từ những năm 50 của thế kỷ XX.

Tế bào đơn có thể nhận được bằng con đường nghiền mô, hoặc xử lý enzym. Mỗi loại cây, mỗi loại tế bào khác nhau đòi hỏi những kỹ thuật nuôi cấy khác nhau.

Nuôi cấy tế bào đơn được sử dụng để nghiên cứu cấu trúc tế bào, nghiên cứu ảnh hưởng của các điều kiện khác nhau lên các quá trình sinh trưởng, phát triển và phân hoá của tế bào. Nuôi cấy tế bào đơn còn được sử dụng trong chọn dòng tế bào.

1.3.6. Nuôi cấy protoplast

Nuôi cấy protoplasts được phát triển nhờ công trình của Cocking (1960). Ông là người đầu tiên dùng enzym để thủy phân thành tế bào và tách được protoplast từ tế bào rễ cà chua. Trong điều kiện nuôi cấy phù hợp protoplast có thể tái sinh thành tế bào mới, phân chia và tái sinh thành cây hoàn chỉnh.

Do không có thành tế bào nên protoplast trở nên một đối tượng lý tưởng trong nghiên cứu biến đổi di truyền ở thực vật. Bằng phương pháp dung hợp hai protoplast có thể tạo ra các cây lai soma. Ngoài ra còn có thể sử dụng kỹ thuật dung hợp protoplast để chuyển các bào quan và chuyển gene.

Chương 2. NHỮNG KHÁI NIỆM CƠ BẢN

2.1. Học thuyết tế bào

Năm 1662, Robert Hooke đã thiết kế kính hiển vi đơn giản đầu tiên và quan sát được cấu trúc của miếng bấc bần bao gồm nhiều hạt nhỏ, ông gọi các hạt nhỏ đó là tế bào (cells). Năm 1675, Anton Van Leeuwenhoek xác nhận cơ thể động vật cũng bao gồm các tế bào. Ông quan sát dưới kính hiển vi thấy máu động vật có chứa các hồng cầu và ông gọi đó là các tế bào máu. Nhưng mãi đến năm 1838, Matthias Jacob Schleiden (nhà thực vật học) và 1839, Theodor Schwann (nhà động vật học) mới chính thức xây dựng học thuyết tế bào. Schleiden và Schwann khẳng định rằng: Mỗi cơ thể động thực vật đều bao gồm những thể tồn tại hoàn toàn độc lập, riêng rẽ và tách biệt, đó chính là tế bào. Có thể nói Schleiden và Schwann là hai ông tổ của học thuyết tế bào. Tuy nhiên, cả hai ông không phải là các tác giả đầu tiên phát biểu một nguyên tắc nào đó, mà chỉ là diễn đạt nguyên tắc ấy rõ ràng và hiển nhiên tới mức nó được phổ biến rộng rãi và cuối cùng đã được đa số các nhà sinh học thời ấy thừa nhận.

2.1.1. Tính toàn thể của tế bào (*cell totipotency*).

Haberlandt (1902) là người đầu tiên đề xướng ra phương pháp nuôi cấy tế bào thực vật để chứng minh cho tính toàn thể của tế bào. Theo ông mỗi một tế bào bất kỳ của một cơ thể sinh vật đa bào đều có khả năng tiềm tàng để phát triển thành một cá thể hoàn chỉnh. Như vậy mỗi tế bào riêng rẽ của một cơ thể đa bào đều chứa đầy đủ toàn bộ lượng thông tin di truyền cần thiết của cả sinh vật đó và nếu gặp điều kiện thích hợp thì mỗi tế bào có thể phát triển thành một cơ thể sinh vật hoàn chỉnh. Hơn 50 năm sau, các nhà thực nghiệm về nuôi cấy mô và tế bào thực vật mới đạt được thành tựu chứng minh cho khả năng tồn tại và phát triển độc lập của tế bào. Tính toàn thể của tế bào thực vật đã được từng bước chứng minh. Nổi bật là các công trình: Miller và Skoog (1953) tạo được rễ từ mảnh mô cắt từ thân cây thuốc lá, Reinert và Steward (1958) đã tạo được phôi và cây cà rốt hoàn chỉnh từ tế bào đơn nuôi cấy trong dung dịch, Cocking (1960) tách được tế bào trần và Takebe (1971) tái sinh được cây hoàn chỉnh từ nuôi cấy tế bào trần của lá cây thuốc lá. Kỹ thuật tạo dòng (cloning) các tế bào đơn được phân lập trong điều kiện *in vitro* đã chứng minh một thực tế rằng các tế bào soma, dưới các điều kiện thích hợp, có thể phân hóa để phát triển thành một cơ thể thực vật hoàn chỉnh. Sự phát triển của một cơ thể trưởng thành từ tế bào đơn (hợp tử) là kết quả của sự hợp nhất sự phân chia và phân

hóa tế bào. Để biểu hiện tính toàn thể, các tế bào phân hóa đầu tiên trải qua giai đoạn phản phân hóa (dedifferentiation) và sau đó là giai đoạn tái phân hóa (redifferentiation). Hiện tượng tế bào trưởng thành trở lại trạng thái phân sinh và tạo ra mô callus không phân hóa (undifferentiation) được gọi là phản phân hóa, trong khi khả năng để các tế bào phân phân hóa tạo thành cây hoàn chỉnh (whole plant) hoặc các cơ quan thực vật được gọi là tái phân hóa. Ở động vật, sự phân hóa là không thể đảo ngược trở lại. Như vậy, sự phân hóa tế bào là kết quả cơ bản của sự phát triển ở những cơ thể bậc cao, nó thường được gọi là *cytodifferentiation*.

2.1.2. Thể bội và gen

Gen quyết định các tính trạng ở thực vật. Có tính trạng tương ứng với một gen nhưng cũng có nhiều tính trạng liên quan đến nhiều gen, các tính trạng đó gọi là tính trạng đơn gen và tính trạng đa gen.

Hai gen nằm trên một vị trí nhất định trên nhiễm sắc thể tương đồng gọi là allel. Tuy cùng tham gia quyết định một tính trạng nhưng mỗi allel qui định một đặc điểm riêng. Ví dụ màu hoa, một allel có thể mang thông tin di truyền cho hoa màu đỏ, allel kia cho hoa màu trắng. Trường hợp này ta có cá thể dị hợp tử về tính trạng màu hoa, nếu cả 2 allel đều mang thông tin di truyền cho màu đỏ thì ta có cá thể đồng hợp tử. Đối với cá thể dị hợp tử, một allel có thể là allel trội, allel còn lại là allel lặn. Allel trội quyết định tính trạng. Có trường hợp trội hoàn toàn và trội không hoàn toàn. Trội không hoàn toàn khi tổ hợp 2 allel sẽ cho tính trạng trung gian.

Thể bội là danh từ chỉ số bộ nhiễm sắc thể có trong tế bào, mô, cá thể thực vật với qui định chung là ở các tế bào sinh sản có 1 bộ nhiễm sắc thể được gọi là thể đơn bội. Hợp tử, sản phẩm dung hợp của 2 giao tử đơn bội, có thể là nhị bội với số nhiễm sắc thể $2n$. Tất cả các tế bào soma hình thành do sự phân chia hợp tử đều là nhị bội. Trên thực tế có thể tìm thấy cùng lúc nhiều mức bội thể khác nhau ở các mô khác nhau của cơ thể thực vật. ($4n, 8n$) Đó là hiện tượng đa bội hóa do nội giảm phân. Khoảng một nửa thực vật bậc cao ở mức đa bội thể. Số nhiễm sắc thể cơ bản của loài là X (là số đơn bội nhỏ nhất trong dãy đa bội), các cá thể có X nhiễm sắc thể được gọi là thể nhất bội để phân biệt với thể đơn bội.

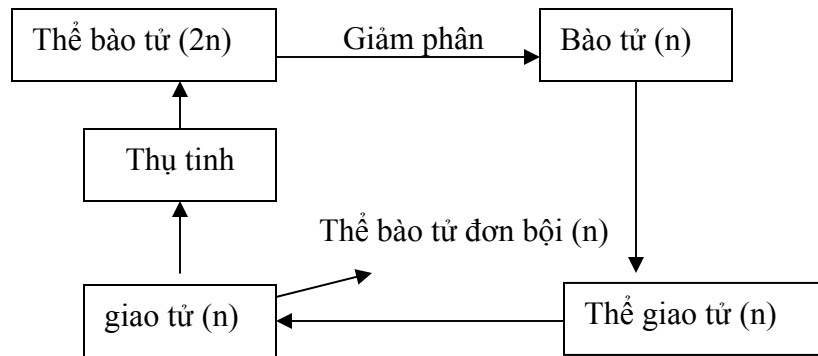
Ví dụ : cây lúa mì có $2n=42$. Trên thực tế nó là thể lục bội $6X$, trong đó số nhiễm sắc thể cơ bản của loài là $X=7$. Thể đơn bội của cây lúa có $n=3X=21$ nhiễm sắc thể.

2.1.3. Thể bào tử và thể giao tử

Thể bào tử gồm có hợp tử và tất cả các tế bào sản sinh từ hợp tử kể cả hạt phấn trong túi phấn và noãn.

Thể giao tử gồm có hạt phấn đã nảy mầm và tất cả các tế bào do nó sản sinh ra, bao gồm các giao tử. Khi 2 giao tử khác giống dung hợp, thể bào tử $2n$ được tái lập. Ở thực vật bậc cao, thể giao tử thường không quá 3 tế bào trong đó 2 tế bào là các giao tử.

Ở các loài thực vật mức thể bội dao động theo chu trình sau:



Sơ đồ 2.1. Chu trình dao động mức bội thể

Ở thực vật bậc cao, thể giao tử (trong các trường hợp đặc biệt, có thể phát triển thành bào tử đơn bội) chứa n nhiễm sắc thể. Thể bào tử đơn bội có thể ra hoa nhưng các bào tử hình thành không có sức sống. Tạo thể bào tử đơn bội và những cây đơn bội kép là mục đích của nuôi cấy túi phấn và hạt phấn.

2.1.4. Sinh sản hữu tính và sinh sản vô tính

Sinh sản vô tính là hiện tượng 1 cơ thể tạo ra các cơ thể mới từ một phần cơ quan sinh dưỡng của mình, không hề có sự tham của các yếu tố quy định giới tính, cơ thể con sinh ra hoàn toàn giống hệt cơ thể mẹ. Sinh sản vô tính có rất nhiều hình thức. Ở sinh vật đơn bào có phân đôi tế bào. Một số cơ thể đa bào bậc thấp thì một tế bào sinh dưỡng phân chia tạo ra một nhánh mới và sau đó tách ra khỏi cơ thể chính như ở thủy tức chẳng hạn, cũng có thể một mẫu của cơ thể mẹ đứt ra rồi nó mọc ra một cơ thể khác kiểu như tảo lam. Một số khác thì có hẳn một loại tế bào sinh sản riêng nhưng mà vẫn hoàn toàn không có tính chất giới tính gì cả mà chỉ là từ cơ thể mẹ tạo ra mà thôi. Đó chính là hiện tượng sinh sản vô tính bằng bào tử. Bào tử ở các cơ thể đơn bào có thể là khi môi trường bất lợi thì chúng tự rút nước ra khỏi tế bào, trở thành dạng tiềm sinh đợi thời cơ để sống lại. Ở sinh vật đa bào thì túi đựng các tế bào gọi là bào tử vô tính. Đến mùa sinh sản chúng sẽ phát tán các tế bào đó ra môi trường xung quanh. Khi gặp điều kiện thuận lợi thì mỗi bào tử tạo ra một cơ thể mới. Ở thực vật thì khác, nó tồn tại cả hai kiểu sinh sản vô

tính và hữu tính. Sinh sản vô tính ở đây cũng là từ một phần của cơ thể mẹ tách ra và tạo ra một cơ thể mới.

Sinh sản hữu tính phải có sự tham gia của các yếu tố quy định giới tính, bao gồm đực và cái. Các yếu tố này có thể ở trên cùng một cơ thể hay khác cơ thể, bản chất của các yếu tố đó là do các nhiễm sắc thể giới tính quy định. Sinh sản hữu tính cũng có nhiều kiểu. Kiểu sơ khai nhất là tiếp hợp, là hiện tượng hai tế bào đực, cái trao đổi nhân cho nhau. Sau đó là sinh sản hữu tính bằng bào tử như ở rêu, dương xỉ,... Lên tới những lớp ở trên thì là thụ tinh với sự tham gia của các giao tử đực và cái, mỗi loại giao tử nằm ở các tế bào khác nhau.

2.2. Tế bào thực vật.

Cơ thể sống cấu tạo từ một tế bào đơn độc hoặc một phức hợp các tế bào. Tế bào rất đa dạng, khác nhau về hình thái, kích thước, cấu trúc và chức năng. Tế bào động vật và tế bào thực vật là những biến đổi của cùng một kiểu cơ sở của đơn vị cấu trúc. Trên cơ sở đó học thuyết tế bào đã được hình thành do Mathias Schleiden và Theodor Schwann vào nửa đầu thế kỉ XIX. Thuật ngữ tế bào lần đầu tiên được Robert Hooke đặt ra vào năm 1665 dựa trên những quan sát các khoang nhỏ có vách bao quanh của nút bần và về sau ông còn quan sát thấy trên mô của nhiều cây khác. Nội chất của tế bào về sau mới được phát hiện và được gọi là chất nguyên sinh, còn thuật ngữ “thể nguyên sinh” là do Hanstein đề xướng năm 1880 để chỉ chất nguyên sinh có trong 1 tế bào đơn độc. Nhân được Robert Brown phát hiện năm 1831.

Mỗi tế bào là một hệ thống mở, tự duy trì và tự sản xuất: tế bào có thể thu nhận chất dinh dưỡng, chuyển hóa các chất này thành năng lượng, tiến hành các chức năng chuyên biệt và sản sinh thế hệ tế bào mới nếu cần thiết. Mỗi tế bào chứa một bản mật mã riêng hướng dẫn các hoạt động trên.

Mọi tế bào đều có một số khả năng sau:

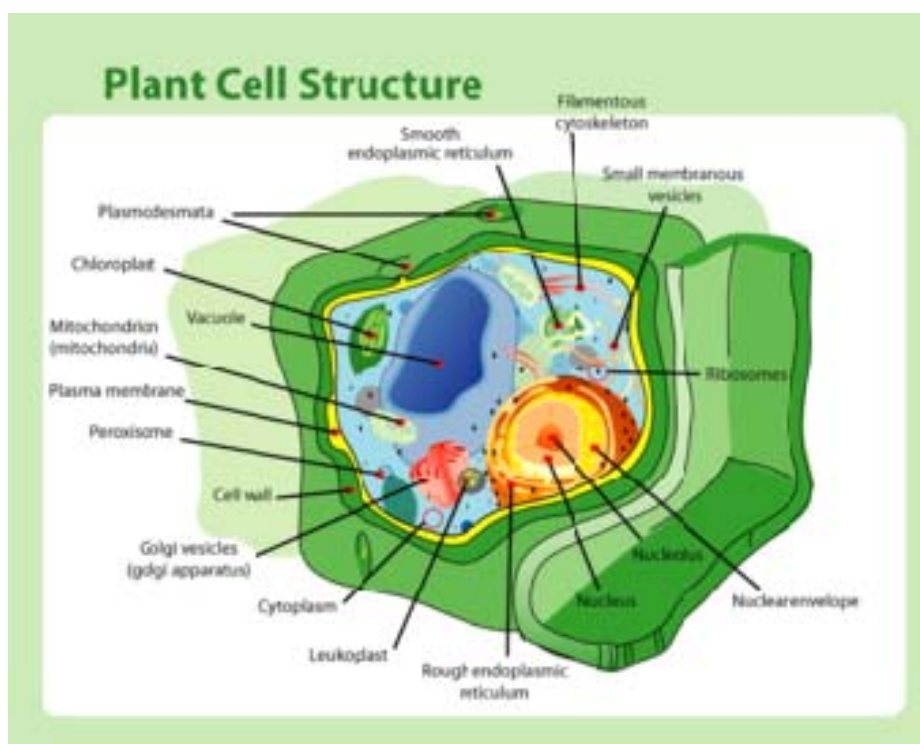
- Sinh sản thông qua phân bào
- Trao đổi chất tế bào bao gồm thu nhận các vật liệu thô, chế biến thành các thành phần cần thiết cho tế bào, sản xuất các phân tử sinh năng lượng và các sản phẩm phụ. Để thực hiện được các chức năng của mình, tế bào cần phải hấp thu và sử dụng được nguồn năng lượng hóa học dự trữ trong các phân tử hữu cơ. Năng lượng này được giải phóng trong các con đường trao đổi chất
- Tổng hợp các protein, đây là những phân tử đảm nhiệm những chức năng cơ bản của tế bào, ví dụ như enzyme. Một tế bào động vật thông thường chứa khoảng 10,000 loại protein khác nhau.

- Đáp ứng với các kích thích, hoặc thay đổi của môi trường bên trong và bên ngoài như những thay đổi về nhiệt độ, pH hoặc nguồn dinh dưỡng.
- Di chuyển các túi tiết.

2.2.1. Cấu trúc của tế bào thực vật

Các tế bào thực vật ở các cơ thể khác nhau, hoặc ở các mô, các cơ quan khác nhau của cùng một cơ thể sẽ không giống nhau về hình dạng, kích thước và cấu trúc nhưng về bản chất cơ bản các tế bào đều có một số đặc điểm chung.

Tế bào thực vật chia làm 2 phần chính: Thành tế bào và phần nguyên sinh chất, đây là phần quyết định những đặc tính sống chủ yếu của tế bào thực vật.



Hình 2.1. Mô hình cấu trúc tế bào thực vật điển hình

Mọi tế bào đều có màng tế bào, dùng để bao bọc tế bào, cách biệt thành phần nội bào với môi trường xung quanh, điều khiển nghiêm ngặt sự vận chuyển vào và ra của các chất, duy trì điện thế màng và nồng độ các chất bên trong và bên ngoài màng. Bên trong màng là một khối tế bào chất đặc (dạng vật chất chiếm toàn bộ thể tích tế bào). Mọi tế bào đều có các phân tử DNA, vật liệu di truyền quan trọng và các phân tử RNA tham gia trực tiếp quá trình tổng hợp nên các loại protein khác nhau, trong đó có các enzyme. Bên

trong tế bào, vào mỗi thời điểm nhất định tế bào tổng hợp nhiều loại phân tử sinh học khác nhau.

2.2.1.1. Thành tế bào

Thành tế bào là cấu trúc thiết yếu đối với nhiều quá trình sinh lí và phát triển của thực vật. Là lớp vỏ bao bọc, thành tế bào có vai trò như bộ khung xương qui định hình dạng tế bào. Thành tế bào có mối quan hệ mật thiết đến thể tích và áp suất của tế bào do đó rất cần thiết cho quá trình trao đổi nước bình thường ở thực vật. Thành tế bào thực vật tham gia xác định độ dài cơ học của cấu trúc thực vật, cho phép chúng sinh trưởng đến một độ cao khá lớn.

Sự đa dạng về chức năng của thành tế bào bắt nguồn từ sự đa dạng và phức tạp trong cấu trúc của chúng. Nhìn chung các thành tế bào được chia thành hai nhóm chính: thành sơ cấp và thành thứ cấp. Thành sơ cấp hình thành bởi các tế bào đang tăng trưởng và thường được coi là tương đối chưa biệt hóa. Thành thứ cấp được hình thành sau khi tế bào đã ngừng tăng trưởng, có mức độ chuyên hóa cao cả về thành phần và cấu trúc. Trong thành tế bào sơ cấp các vi sợi xeluloza được gắn chặt trong một mạng lưới hydrat hóa cao. Mạng lưới này bao gồm số các nhóm polisaccarit thường là hemixenluloza và pectin cùng 1 lượng nhỏ protein cấu trúc.

Bộ khung tế bào là một thành phần quan trọng, phức tạp và linh động của tế bào. Nó cấu thành và duy trì hình dáng tế bào; là các điểm bám cho các bào quan; hỗ trợ quá trình thực bào (tế bào thu nhận các chất bên ngoài); và *cử động* các phần tế bào trong quá trình sinh trưởng và vận động. các protein tham gia cấu thành bộ khung tế bào gồm nhiều loại và có chức năng đa dạng như định hướng, neo bám, phát sinh các tấm màng.

2.2.1.2. Các bào quan

- **Không bào**

Không bào là một khoang lớn nằm trong trung tâm chất nguyên sinh của tế bào. Những tế bào thực vật trưởng thành thường có một không bào lớn chứa đầy nước và chiếm từ 80-90% thể tích tế bào. Không bào được bọc trong một lớp màng gọi là màng không bào (tonoplast). Trong không bào chứa nước, các muối vô cơ, đường, các enzym và nhiều chất trao đổi thứ cấp.

- **Màng sinh chất**

Ranh giới giữa thành tế bào với chất nguyên sinh cũng như giữa chất nguyên sinh với không bào được hình thành bởi các màng. Màng sinh chất ngăn cách chất nguyên sinh với môi trường xung quanh nhưng cũng cho phép chất nguyên sinh có thể hấp thụ hay đào thải các chất khác ra khỏi tế bào.

- **Màng tế bào - Tấm áo ngoài**

Vỏ bọc bên ngoài của một tế bào eukaryote gọi là màng sinh chất (*plasma membrane*). Màng này cũng có ở các tế bào prokaryote nhưng được gọi là màng tế bào (*cell membrane*). Màng có chức năng bao bọc và phân tách tế bào với môi trường xung quanh. Màng được cấu thành bởi một lớp lipid kép và các protein. Các phân tử protein hoạt động như các kênh vận chuyển và bơm được nhúng vào lớp lipid một cách linh động (có thể di chuyển tương đối). Vỏ bọc bên ngoài của một tế bào eukaryote gọi là màng sinh chất (*plasma membrane*).

- **Mạng lưới nội chất**

Mạng nội chất là một hệ thống màng phức tạp, thể hiện trên bản cắt ngang là hệ thống các túi dẹp hoặc các ống nhỏ gồm hai lớp màng và ở giữa là một khoảng hẹp

- **Tế bào chất**

Bên trong các tế bào là một không gian chứa đầy dịch thể gọi là tế bào chất (*cytoplasm*). Nó bao hàm cả hỗn hợp các ion, chất dịch bên trong tế bào và cả các bào quan. Các bào quan bên trong tế bào chất đều có hệ thống màng sinh học để phân tách với khối dung dịch này. Chất nguyên sinh (*cytosol*) là để chỉ riêng phân dịch thể, chứ không có các bào quan. Đối với các sinh vật prokaryote, tế bào chất là một thành phần tương đối tự do. Tuy nhiên, tế bào chất trong tế bào eukaryote thường chứa rất nhiều bào quan và bộ khung tế bào. Chất nguyên sinh thường chứa các chất dinh dưỡng hòa tan, phân cắt các sản phẩm phế liệu, và dịch chuyển vật chất trong tế bào tạo nên hiện tượng dòng chất nguyên sinh. Nhân tế bào thường nằm bên trong tế bào chất và có hình dạng thay đổi khi tế bào di chuyển. Tế bào chất cũng chứa nhiều loại muối khác nhau, đây là dạng chất dẫn điện tuyệt vời để tạo môi trường thích hợp cho các hoạt động của tế bào. Môi trường tế bào chất và các bào quan trong nó là yếu tố sống còn của một tế bào.

- **Nhân tế bào - trung tâm tế bào:** Nhân tế bào là bào quan tối quan trọng trong tế bào eukaryote. Nó chứa các nhiễm sắc thể của tế bào, là nơi diễn ra quá trình nhân đôi DNA và tổng hợp RNA. Nhân tế bào có dạng hình cầu và được bao bọc bởi một lớp màng kép gọi là màng nhân. Màng nhân dùng để bao ngoài và bảo vệ DNA của tế bào trước những phân tử có thể gây tổn thương đến cấu trúc hoặc ảnh hưởng đến hoạt động của DNA. Trong quá trình hoạt động, phân tử DNA được phiên mã để tổng hợp các phân tử RNA chuyên biệt, gọi là RNA thông tin (mRNA). Các mRNA được vận chuyển ra ngoài nhân, để trực tiếp tham gia quá trình tổng hợp các protein đặc thù. Ở các loài

prokaryote, các hoạt động của DNA tiến hành ngay tại tế bào chất (chính xác hơn là tại vùng nhân).

- **Ribosome - bộ máy sản xuất protein:** Ribosome có cả trong tế bào eukaryote và prokaryote. Ribosome được cấu tạo từ các phân tử protein và RNA ribosome (rRNA). Đây là nơi thực hiện quá trình sinh tổng hợp protein từ các phân tử mRNA. Quá trình này còn được gọi là dịch mã vì thông tin di truyền mã hóa trong trình tự phân tử DNA truyền qua trình tự RNA để quyết định trình tự amino acid của phân tử protein. Quá trình này cực kỳ quan trọng đối với tất cả mọi tế bào, do đó một tế bào thường chứa rất nhiều phân tử ribosome—thường hàng trăm thậm chí hàng nghìn phân tử.

- **Ty thể và lục lạp - các trung tâm năng lượng:** Ty thể là bào quan trong tế bào eukaryote có hình dạng, kích thước và số lượng đa dạng và có khả năng tự nhân đôi. Ty thể có genome riêng, độc lập với genome trong nhân tế bào. Ty thể có vai trò cung cấp năng lượng cho mọi quá trình trao đổi chất của tế bào. Lục lạp cũng tương tự như ty thể nhưng kích thước lớn hơn, chúng tham gia chuyển hóa năng lượng mặt trời thành các chất hữu cơ (trong quá trình quang hợp). Lục lạp chỉ có ở các tế bào thực vật.

- **Mạng lưới nội chất và bộ máy Golgi - nhà phân phối và xử lý các đại phân tử:** Mạng lưới nội chất (ER) là hệ thống mạng vận chuyển các phân tử nhất định đến các địa chỉ cần thiết để cải biến hoặc thực hiện chức năng, trong khi các phân tử khác thì trôi nổi tự do trong tế bào chất. ER được chia làm 2 loại: ER hạt (rám) và ER trơn (nhẵn). ER hạt là do các ribosome bám lên bề mặt ngoài của nó, trong khi ER trơn thì không có ribosome. Quá trình dịch mã trên các ribosome của ER hạt thường để tổng hợp các protein tiết (*protein xuất khẩu*). Các protein tiết thường được vận chuyển đến phức hệ Golgi để thực hiện một số cải biến, đóng gói và vận chuyển đến các vị trí khác nhau trong tế bào. ER trơn là nơi tổng hợp lipid, giải độc và bề chứa calcium.

- **Lysosome và peroxisome - hệ tiêu hóa của tế bào:** Lysosome và peroxisome thường được ví như *hệ thống xử lý rác thải* của tế bào. Hai bào quan này đều dạng cầu, màng đơn và chứa nhiều enzyme tiêu hóa. Ví dụ, lysosome có thể chứa vài chục enzyme phân huỷ protein, nucleic acid và polysaccharide mà không gây hại cho các quá trình khác của tế bào khi được bao bọc bởi lớp màng tế bào.

- **Vật liệu di truyền - Yếu tố duy trì thông tin giữa các thế hệ:** Vật liệu di truyền là các phân tử nucleic acid (DNA và RNA). Hầu hết các sinh vật sử dụng DNA để lưu trữ dài hạn thông tin di truyền trong khi chỉ một vài *virus* dùng RNA cho mục đích này. Thông tin di truyền của sinh vật chính là mã di truyền quy định tất cả protein cần thiết

cho mọi tế bào của cơ thể. Tuy nhiên, một nghiên cứu mới đây cho thấy có thể một số RNA cũng được sử dụng như là một bản lưu đối với một số gene để phòng sai hỏng.

Ở các sinh vật prokaryote, vật liệu di truyền là một phân tử DNA dạng vòng đơn giản. Phân tử này nằm ở một vùng tế bào chất chuyên biệt gọi là vùng nhân. Tuy nhiên, đối với các sinh vật eukaryote, phân tử DNA được bao bọc bởi các phân tử protein tạo thành cấu trúc nhiễm sắc thể, được lưu giữ trong nhân tế bào (với màng nhân bao bên ngoài). Mỗi tế bào thường chứa nhiều nhiễm sắc thể (số lượng nhiễm sắc thể trong mỗi tế bào là đặc trưng cho loài). Ngoài ra, các bào quan như ty thể và lục lạp đều có vật liệu di truyền riêng của mình (xem thêm thuyết nội cộng sinh).

Ví dụ, một tế bào người gồm hai genome riêng biệt là genome nhân và genome ty thể. Genome nhân (là thể lưỡng bội) bao gồm 46 phân tử DNA mạch thẳng tạo thành các nhiễm sắc thể riêng biệt. Genome ty thể là phân tử DNA mạch vòng, khá nhỏ và chỉ mã hóa cho một vài protein quan trọng.

2.2.2. Các quá trình chức năng của tế bào

2.2.2.1. Sinh trưởng và trao đổi chất của tế bào

Giữa những lần phân bào, các tế bào thực hiện hàng loạt quá trình trao đổi chất nội bào nhằm duy trì sự tồn tại cũng như sinh trưởng của mình. Trao đổi chất là các quá trình mà tế bào xử lý hay chế biến các phân tử dinh dưỡng theo cách riêng của nó. Các quá trình trao đổi chất được chia làm 2 nhóm lớn:

- Quá trình dị hóa (catabolism) nhằm phân huỷ các phân tử hữu cơ phức tạp để thu nhận năng lượng (dưới dạng ATP) và lực khử;
- Quá trình đồng hóa (anabolism) sử dụng năng lượng và lực khử để xây dựng các phân tử hữu cơ phức tạp, đặc thù và cần thiết.

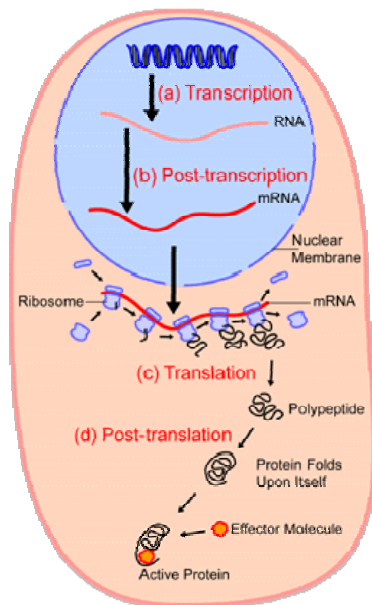
Một trong các con đường trao đổi chất quan trọng là đường phân (glycolysis), con đường này không cần oxy. Mỗi một phân tử glucose trải qua con đường này sẽ tạo thành 4 phân tử ATP và đây là phương thức thu nhận năng lượng chính của các vi khuẩn kỵ khí.

Đối với các sinh vật hiếu khí, các phân tử pyruvat, sản phẩm của đường phân, sẽ tham gia vào chu trình Krebs (hay còn gọi là chu trình TCA) để phân huỷ hoàn toàn thành CO₂, đồng thời thu nhận thêm nhiều ATP. Ở sinh vật eukaryote, chu trình TCA tiến hành trong ty thể trong khi sinh vật prokaryote lại tiến hành ở ngay tế bào chất.

2.2.2.2. Sinh tổng hợp protein

Sơ đồ quá trình sinh tổng hợp protein:

Trong vùng chất nhân, các gene được phiên mã thành những phân tử RNA. Sau khi thực hiện các sửa đổi sau phiên mã, phân tử mRNA trưởng thành được vận chuyển ra tế bào chất để tiến hành tổng hợp protein tại đây. Các ribosome tiến hành dịch mã của mRNA nhờ mối liên kết hydro theo nguyên tắc bổ sung giữa bộ ba mã sao trên mRNA với bộ ba đối mã trên tRNA tương ứng. Những phân tử protein sau khi được tổng hợp thường được tiến hành một số sửa đổi cho phù hợp với chức năng, ví dụ gắn thêm các gốc đường



Hình 2.2. Quá trình sinh tổng hợp protein

Sinh tổng hợp protein là quá trình tế bào tổng hợp những phân tử protein đặc trưng và cần thiết cho hoạt động sống của mình. Quá trình phiên mã là quá trình tổng hợp những phân tử RNA thông tin dựa trên trình tự khuôn của DNA. Trên khuôn mRNA mới được tạo ra, một phân tử protein sẽ được tạo thành nhờ quá trình dịch mã.

Bộ máy tế bào chịu trách nhiệm thực hiện quá trình tổng hợp protein là những ribosome. Ribosome được cấu tạo từ những phân tử RNA ribosome và khoảng 80 loại protein khác nhau. Khi các tiểu đơn vị ribosome liên kết với phân tử mRNA thì quá trình dịch mã được tiến hành. Khi đó, ribosome sẽ cho phép một phân tử RNA vận chuyển (tRNA) mang một loại amino acid đặc trưng đi vào. tRNA này bắt buộc phải có bộ ba đối mã có trình tự bổ sung với bộ ba mã sao trên mRNA. Các amino acid lần lượt tương ứng với trình tự các bộ ba nucleotide trên mRNA sẽ liên kết với nhau để tạo thành một chuỗi polypeptide.

2.2.2.3. Hình thành các tế bào mới

Phân bào là quá trình sinh sản từ một tế bào (gọi là tế bào mẹ) phân chia thành hai tế bào non. Đây là cơ chế chính của quá trình sinh trưởng của sinh vật đa bào và là hình thức sinh sản của sinh vật đơn bào. Những tế bào prokaryote phân chia bằng hình thức phân cắt (binary fission) hoặc nảy chồi (budding). Tế bào eukaryote thì sử dụng hình thức

phân bào là nguyên phân (mitosis) (một hình thức phân bào có tơ). Những tế bào lưỡng bội thì có thể tiến hành giảm phân để tạo ra tế bào đơn bội. Những tế bào đơn bội đóng vai trò giao tử trong quá trình thụ tinh để hình thành hợp tử (lưỡng bội). Trong phân bào, quá trình nhân đôi DNA (dẫn đến nhân đôi nhiễm sắc thể) đóng vai trò cực kỳ quan trọng và thường diễn ra tại kỳ trung gian giữa các lần phân chia.

Các pha trong chu kỳ tế bào:

Pha G₀ là một giai đoạn của chu kỳ tế bào cell cycle mà tế bào ở trạng thái lạng yên.

Pha G₁ là pha phát triển đầu tiên của chu kỳ.

Pha S, trong pha này DNA được sao chép, chữ S xuất phát từ *synthesis of DNA* có nghĩa là tổng hợp DNA (còn gọi là axit nhân ADN: Axit Deoxy riboNucleic).

Pha G₂ là pha phát triển thứ hai, cũng là pha chuẩn bị cho tế bào phân chia.

Pha M, hay pha phân bào mitosis, và trạng thái hoạt động của tế bào (*cytokinesis*), sự phân chia tế bào thực sự đã diễn ra để tạo thành hai tế bào mới giống nhau.

Hệ thống kiểm soát, còn gọi là các điểm kiểm soát, kiểm tra các tổn thương của DNA và các sai sót trong các quá trình quan trọng của chu kỳ tế bào. Trong trường hợp có sự không tương thích nào đó, các điểm kiểm soát có thể chặn quá trình luân chuyển qua các pha của chu kỳ tế bào. Chẳng hạn như, điểm kiểm soát điều khiển sao chép DNA và giữ cho tế bào sao chép hoàn toàn DNA trước khi bước vào quá trình phân bào (*mitosis*). Cũng vậy, điểm kiểm soát con thoi (*spindle checkpoint*) sẽ ngăn cản quá trình chuyển dịch từ pha biến kỳ (*metaphase*) sang pha hậu kỳ trong (*anaphase*) trong quá trình phân bào nếu như không có đủ tất cả các nhiễm sắc thể (*chromosomes*) tập trung dính vào thoi phân bào.

Nếu hệ thống này phát hiện có điều gì bất thường, thì một mạng lưới các phân tử dẫn truyền thông tin (*signal transduction*) sẽ hướng dẫn tế bào ngưng phân chia ngay. Chúng còn có thể giúp cho tế bào biết được có thể sửa chữa tổn thương hay không hay là khởi động quá trình tế bào chết được lập trình, một dạng của nó được gọi là apoptosis. Quá trình tế bào chết được lập trình giúp hạn chế các tế bào tổn thương phát triển. Ví dụ như, một protein, được gọi là p53, nhận cảm các tín hiệu xuất phát từ các DNA tổn thương. Nó đáp ứng bằng cách kích thích sản xuất ra các protein ức chế để dừng quá trình sao chép DNA lại. Nếu chức năng của p53 không hoạt động đúng thì dẫn đến việc ứ đọng

các DNA tổn thương không được kiểm tra. Hậu quả trực tiếp của điều đó là các gene tổn thương sẽ phát triển sang các dạng ung thư. Ngày nay, những thăm dò cho thấy p53 được phối hợp với nhiều loại ung thư khác nhau như là một vài dạng ung thư vú và ung thư đại tràng.

Một vài tế bào như là tế bào thần kinh, không bao giờ phân chia khi đó nó luôn dừng lại ở pha G_0 . Tuy nhiên, các nghiên cứu gần đây cho thấy ở những trường hợp tổn thương chết tế bào thì tế bào thần kinh vẫn có thể đi vào lại chu kỳ tế bào. Ngoài ra các chất ức chế chu kỳ tế bào ngăn cản tế bào khỏi cái chết được lập trình được biết như là apoptosis.

2.3. Thực vật

Cơ thể thực vật được cấu tạo từ những đơn vị hình thái được gọi là tế bào, mỗi tế bào được liên kết với những tế bào khác bởi chất kết dính gian bào bao quanh. Trong khối liên kết đó có những nhóm tế bào khác biệt về hình thái hoặc về chức năng hoặc cả hai với những nhóm khác. Những nhóm như thế được gọi là mô. Một số mô cấu tạo đơn giản, chỉ gồm một loại tế bào, những mô khác phức tạp hơn gồm nhiều hơn một kiểu tế bào

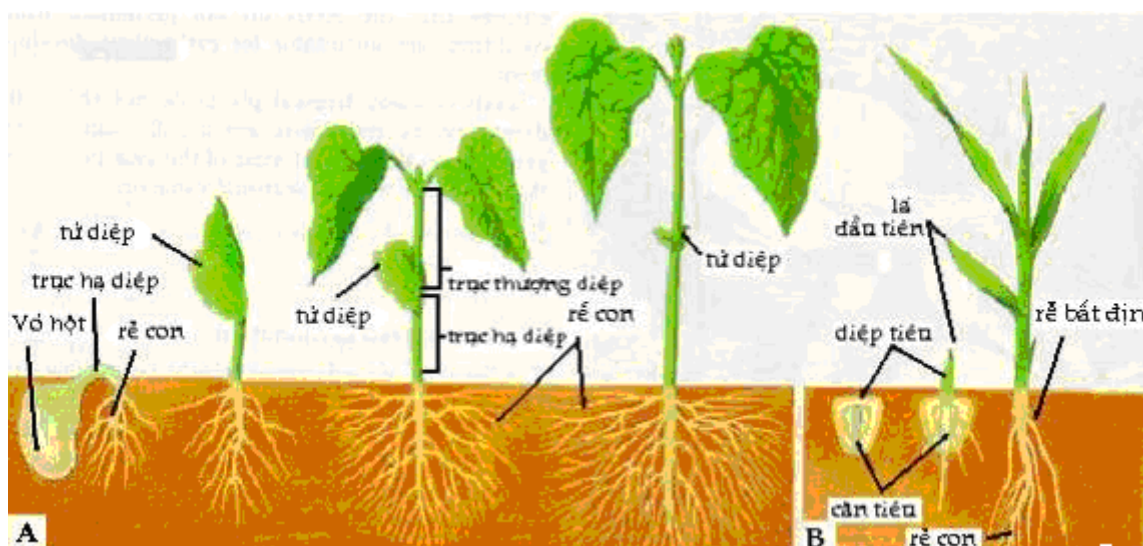
Các mô tế bào trong cơ thể thực vật đều có nguồn gốc từ hợp tử tức là từ tế bào trứng đã thụ tinh qua các giai đoạn phát triển của phôi và sau đó phát triển thành cơ thể trưởng thành. Cơ thể thực vật sinh trưởng nhờ có mô phân sinh. Mô phân sinh ngọn phân chia và phân hóa thành các phần mới của chồi và rễ. Đó là sự sinh trưởng sơ cấp. Sự sinh trưởng thứ cấp ở thực vật hai lá mầm và hạt trần là do hoạt động của mô phân sinh thứ cấp được gọi là tầng phát sinh. Trong sự sinh trưởng thứ cấp còn có tầng phân sinh bản là mô phân sinh thứ cấp hình thành nên chu bì. Tầng phát sinh và tầng sinh bản được gọi là mô phân sinh bên vì nó ở vị trí bên của thân và rễ để phân biệt với mô phân sinh sơ cấp là mô phân sinh ngọn.

Cơ thể thực vật có phôi phát triển kể từ khi hạt nảy mầm gồm rễ phát triển xuống đất và chồi gồm thân mang lá phát triển trong khí quyển. Sự phát triển của chồi và rễ là từ các tế bào của mô phân sinh ngọn. Thân lá và rễ được gọi là cơ quan dinh dưỡng. Khi trưởng thành thì hoa được hình thành. Sau sự thụ phấn là sự thụ tinh và sự hình thành phôi, hạt và quả. Những cơ quan đó được gọi là cơ quan sinh sản. Chu trình phát triển của cơ thể thực vật có thể kể từ khi hợp tử hình thành và kết thúc trước khi xảy ra sự thụ tinh của các giao tử để tạo nên thế hệ sau.

2.3.1. Sự nảy mầm của hạt và sự phát triển của cây con

a. Sự nảy mầm của hạt

Sự nảy mầm của hạt bắt đầu khi hạt hấp thu rất nhiều nước và tăng thể tích lên một cách đáng kể, có khi đến 200%. Kết quả của sự hấp thu nước này làm cho phôi giải phóng gibberellin, và đây là yếu tố cảm ứng để tổng hợp một số các enzym thủy giải trong đó có cả amylaza. Những enzym này thủy phân những chất dự trữ trong phôi nhũ, cung cấp năng lượng cho sự tăng trưởng của phôi. Tế bào bắt đầu phân cắt, tổng hợp thêm tế bào chất mới, gia tăng kích thước nhờ sự hấp thu nước. Phôi tăng trưởng làm bung vỏ hạt ra và nhanh chóng hình thành một cây con, có rễ và thân phân biệt.



Hình 2.3. Sự nảy mầm của hạt

Khi hạt nảy mầm, trục hạ diệp được mọc ra trước tiên. Trục hạ diệp mọc xuống theo chiều trọng lực, dù hạt nằm theo hướng nào. Cùng lúc đó trục thượng diệp bắt đầu phát triển nhanh chóng, rễ mầm ở phần cuối của trục hạ diệp, tạo ra một hệ thống rễ con để gắn vào trong đất và hấp thu nước và muối khoáng. Ở một số cây song tử diệp, phần trên của trục hạ diệp mọc dài ra thành dạng hình vòm, mọc ngược lên và chui ra khỏi mặt đất. Khi trục hạ diệp lộ ra ngoài không khí, nó mọc thẳng lên, tử diệp và trục thượng diệp được đưa ra khỏi mặt đất. Sau đó trục thượng diệp bắt đầu mọc dài ra. Đây là kiểu nảy mầm thượng địa.

Những cây Song tử diệp khác, thí dụ như đậu Hà lan, Nhân có một kiểu nảy mầm hơi khác, ở những cây này, trục hạ diệp không mọc thành hình vòm và tử diệp không

được đưa lên khỏi mặt đất. Thay vào đó là trục thượng diệp bắt đầu mọc dài ra ngay sau khi hệ thống rễ con bắt đầu được hình thành; nó luôn luôn mọc thẳng đứng và chẳng bao lâu nhô ra khỏi mặt đất. Kiểu nảy mầm này tương tự như ở hạt Lúa, Bắp... thuộc các cây đơn tử diệp, chỉ có một tử diệp, nhưng giàu phôi nhũ. Đây là kiểu nảy mầm hạ địa. Ở Bắp trục thượng diệp bắt đầu dài ra ngay sau khi hệ thống rễ được thành lập. Thân non được diệp tiêu (lá đầu tiên hình ống) bao bọc.

b. Sự phát triển của cây con

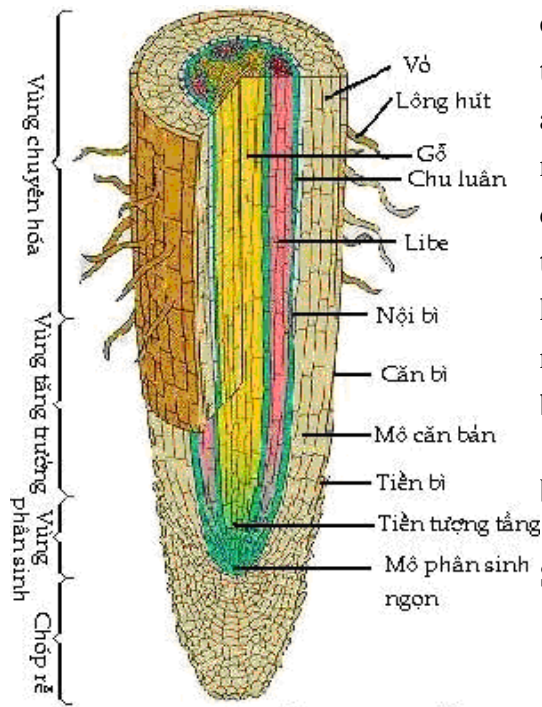
Đầu tiên cây con tăng trưởng hơi chậm, nhưng sau đó tăng trưởng với một tốc độ nhanh hơn trong một thời gian dài hơn và cuối cùng chậm lại và có thể dừng tăng trưởng khi cây sắp trưởng thành. Ở những cây đa niên, sự tăng trưởng tiếp tục xảy ra trong suốt đời sống của cây, trong khi ở những cây nhất niên như các cây Đậu, cây Củ cải... tăng trưởng ngừng lại khi cây trưởng thành và cây chết đi sau một mùa sinh trưởng. Sự tăng trưởng của rễ và thân của cây con có được là nhờ sự phân cắt và sự tăng dài của tế bào. Hai hoạt động này chịu ảnh hưởng của nhiều hormon sinh trưởng khác nhau, đặc biệt là auxin, gibberellin và cytokinin. Ở những cây chỉ có mô sơ cấp thì sự phân cắt tế bào và sự tăng dài của tế bào tùy thuộc vào sự hoạt động của hai mô phân sinh ngọn rễ và ngọn thân.

2.3.2. Sự tăng trưởng của rễ và thân

a. Sự tăng trưởng của rễ

Sự hoạt động của mô phân sinh ngọn rễ làm cho rễ tăng trưởng. Mô phân sinh rễ được bảo vệ bởi một chóp rễ hình nón, gồm một khối tế bào không phân cắt được. Khi rễ mọc dài ra và đầu rễ mọc sâu vào trong đất thì một số tế bào ở mặt ngoài của chóp rễ có thể bị tổn thương và sau đó được thay thế bằng những tế bào mới do sự phân cắt tế bào của mô phân sinh ngọn. Ngay sau của chóp rễ là vùng mô phân sinh ngọn rễ, vùng này ngắn và gồm những tế bào nhỏ có khả năng phân chia tích cực. Phần lớn các tế bào mới được tạo ra nằm xa chóp rễ. Mô phân sinh tiếp tục phân cắt cho tế bào mới và đầu rễ tiếp tục mọc sâu vào trong đất. Chính các tế bào được tạo ra từ mô phân sinh này sẽ thành lập mô sơ cấp cho rễ.

Khi các tế bào được mới được đẩy ra khỏi vùng mô phân sinh ngọn, do số lượng tế bào tăng lên sự phân cắt chậm lại thì sự gia tăng kích thước tế bào là quá trình chính.



Hình 2.4 Cấu tạo của rễ

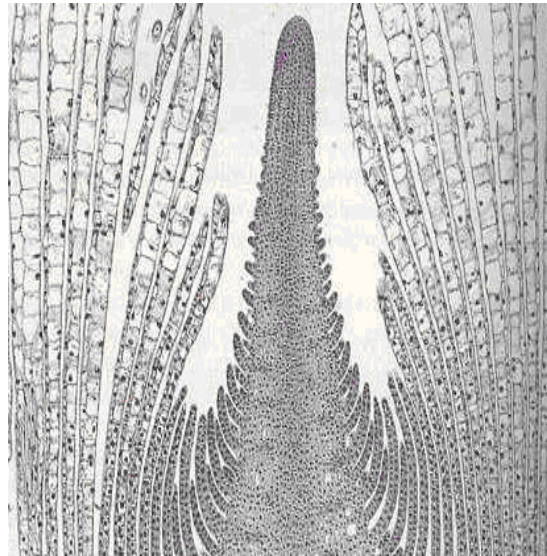
ngọn thân tạo ra mô sơ cấp của thân và khối sơ khởi của lá. Các tế bào mới được tạo ra từ mô phân sinh ngọn thân gần đỉnh ngọn, mọc dài đẩy ngọn thân thẳng đứng lên. Sự tăng trưởng của thân khác với sự tăng trưởng của rễ là có sự tạo ra lá ở phía bên của đỉnh ngọn thân. Cách khoảng đều

đạn mô phân sinh ngọn thân tạo ra những khối sơ khởi của lá (leaf primordia), sau này sẽ tạo ra những lá mới. Nơi lá mọc ra từ thân gọi là mắt (node) và khoảng giữa hai mắt là lóng (internode). Phần lớn thân dài ra là do sự tăng dài của tế bào ở những lóng còn non.

Phần lớn sự tăng kích thước làm rễ tăng trưởng chiều dài nhiều hơn là chiều rộng. Sự tăng dài của tế bào chịu tác động của các hormon mà đặc biệt là auxin và gibberellin. Vùng tế bào tăng dài nhiều nhất là vùng ngay sau vùng mô phân sinh và thường dài chỉ vài milimet. Kế tiếp là vùng tế bào trưởng thành, nơi đây tế bào bắt đầu trưởng thành và có hình thành dạng đặc trưng. Vùng này dễ nhận biết nhờ các lông hút được mọc dài ra từ những tế bào biểu bì.

b. Sự tăng trưởng của thân

Sự phân cắt tế bào ở mô phân sinh



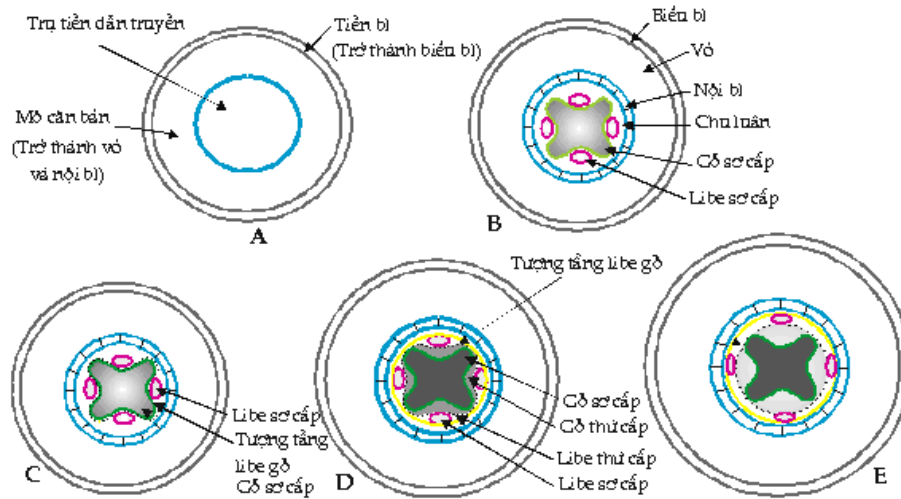
Hình 2.5. Ảnh cắt dọc của chồi ngọn

Ở đỉnh của thân là một chuỗi những lóng chưa được mọc dài ra. Những khối sơ khởi của lá rất nhỏ ngăn cách các lóng uốn cong; các khối sơ khởi già hơn, to hơn của lá bao lấy các khối sơ khởi trẻ hơn, nhỏ hơn ở bên trong. Cấu trúc gồm mô phân sinh ngọn và các lóng chưa được tăng dài được bao bọc trong các khối sơ khởi của lá được gọi là chồi (bud). Ở những cây tăng trưởng theo mùa thì chồi được bảo vệ bởi những vảy, là những lá biến đổi mọc từ dưới đáy của chồi. Vào mùa xuân, khi các chồi ngủ này nở ra, thì các vảy che chở rụng đi và những lóng chứa bên trong các chồi bắt đầu tăng dài một cách nhanh chóng. Do đó các lóng sẽ dần dần được tách xa nhau ra, sự phân cắt tế bào xảy ra ở khối sơ khởi của lá và tạo ra lá non. Trước khi lá được hình thành một cách hoàn chỉnh, một u nhỏ của mô phân sinh thường mọc ra ở giữa đáy lá và lóng. Mỗi một vùng mô phân sinh mới này sẽ tạo ra một chồi bên (lateral, axillary bud) có đặc điểm tương tự như chồi ngọn. Sự tăng dài của các lóng của chồi bên trong mùa sinh trưởng kế tiếp sẽ tạo ra nhánh.

2.3.3. Sự chuyên hóa của tế bào

Tất cả những tế bào mới được sinh ra từ mô phân sinh thì cơ bản giống nhau, chúng sẽ trở thành các loại mô khác nhau. Quá trình tế bào thay đổi từ những hình dạng chưa trưởng thành đến trưởng thành gọi là sự chuyên hóa (differentiation).

Trong sự tăng trưởng của rễ và thân, tế bào bắt đầu chuyên hóa thành các loại mô khác nhau khi chúng vẫn còn ở trong vùng mô phân sinh. Sau khi sự phân cắt tế bào và sự tăng dài của tế bào đã hoàn tất, tế bào bắt đầu trưởng thành có hình dạng nhất định. Ở lát cắt ngang có thể phân biệt được ba vùng đồng tâm ngay sau mô phân sinh của rễ đó là lớp tiền bì (protoderm), kế tiếp là một vùng mô căn bản dày nằm ngay dưới tiền bì và trong cùng là mô tiền dẫn truyền (provascular tissue) gồm những tế bào. Ngay trong phôi, tiền bì ngoài trở thành biểu bì, mô căn bản trở thành vỏ và nội bì, phần trong cùng tạo ra mô dẫn truyền sơ cấp, chu luân và tượng tầng libe gỗ. Sự chuyên hóa trong thân đang tăng trưởng cũng theo cách tương tự ngoại trừ có hai vùng mô căn bản, một vùng nằm giữa tiền bì và trụ tiền dẫn truyền sẽ tạo ra vỏ và nội bì, và một vùng thứ hai nằm trong trụ tiền dẫn truyền sẽ trở thành lõi. Sự tăng trưởng theo đường kính của rễ và thân tùy thuộc vào sự thành lập mô thứ cấp do sự hoạt động của những mô phân sinh bên, đặc biệt là tượng tầng libe gỗ. Dưới ảnh hưởng của auxin, những tế bào mới được tạo ra ở phía ngoài của tượng tầng sẽ chuyên hóa thành mô libe thứ cấp, trong khi đó những tế bào mới được tạo ra ở phía trong của tượng tầng sẽ tạo nên mô gỗ thứ cấp.



Hình 2.6. Sự chuyên hoá của rễ non

Thực vật có xu hướng mọc về hướng có ánh sáng. Đặt một chậu cây trong phòng, cây sẽ mọc cong hướng về phía cửa sổ, nếu xoay cây hướng vào trong, sau một thời gian ngắn cây lại mọc hướng về phía cửa sổ. Hiện tượng cây đáp ứng lại với ánh sáng bởi sự xoay này được gọi là quang hướng động (phototropism) của thực vật. Thực vật còn có các tính hướng động khác như địa hướng động (gravitropism) là đáp ứng của cây hướng theo chiều của trọng lực, thủy hướng động (hydrotropism) đáp ứng với nước.

Đáp ứng này là do sự sinh trưởng chuyên hóa; một phía của thân cây hay rễ mọc nhanh hơn phía bên kia, làm cho cây cong đi. Thân có quang hướng động dương, xoay về hướng có ánh sáng; rễ thì ngược lại, có quang hướng động âm, xoay tránh ánh sáng. Ý nghĩa thích nghi của quang hướng động ở thân là xoay thân để lá nhận được ánh sáng tối đa cần thiết cho sự quang hợp.

2.4. Phòng thí nghiệm

2.4.1. Các thiết bị, dụng cụ cần thiết của phòng thí nghiệm nuôi cấy mô

Một phòng thí nghiệm nuôi cấy mô tế bào thường bao gồm:

- Phòng rửa dụng cụ
- Phòng chuẩn bị môi trường, hấp tiệt trùng và chứa dụng cụ

- Phòng cấy vô trùng
- Phòng nuôi mẫu
- Phòng quan sát và thu nhận số liệu

Sơ đồ tổng quan như sau:

1	2	3	4	5
				6
10		9	8	7

1. Phòng rửa và sản xuất nước cất
2. Phòng sấy hấp, kho thủy tinh sạch
3. Phòng chuẩn bị môi trường
4. Phòng chuẩn bị mẫu
5. Phòng cấy vô trùng
6. Phòng ảnh
7. Phòng kính hiển vi
8. Phòng nuôi
9. Phòng nuôi
10. Phòng sinh hóa

Bên cạnh phòng thí nghiệm cần có hệ thống nhà lưới và vườn ươm để trồng cây lấy nguyên liệu nuôi cấy và trồng cây tái sinh trong quá trình chọn lọc invitro.

a. Phòng rửa và cất nước:

Phòng rửa dụng cụ phải có bồn rửa lớn, có đường thoát nước riêng cho axit, có kệ để các thiết bị:

- Máy cất nước một lần
- Máy cất nước hai lần
- Máy sản xuất nước khử ion

b. Phòng sấy hấp:

- Tủ sấy 60-600⁰C (loại có dung tích lớn)
- Nồi áp suất loại nhỏ (20-30 lít)
- Nồi áp suất loại lớn (70-100 lít)

c. Phòng chuẩn bị môi trường:

- pH meter
- Máy khuấy từ
- Cân phân tích 10^{-4} g
- Cân kỹ thuật 100^{-2} g
- Máy rót môi trường
- Bếp điện
- Microwave
- Tủ lạnh 100-200 l
- Tủ lạnh sâu (-20 đến -80°C)

d. Phòng cấy vô trùng

Phòng cấy vô trùng nên là một phòng nhỏ, kín, sàn và tường cần được lát gạch men hoặc sơn để lau chùi và khử trùng thường xuyên. Cửa phòng cấy nên là cửa kính vì trong khi thao tác cấy rất dễ bị phụt đèn còi do đó cần phải dễ liên lạc với bên ngoài trong lúc cần thiết. Trên tường gắn đèn UV để khử trùng phòng.

Có hai loại tủ cấy thường được sử dụng: tủ cấy tĩnh và tủ cấy thổi khí vô trùng. Trong tủ cấy phải có đèn trắng để dễ làm việc và có đèn UV để khử trùng trước khi làm việc

- Laminar
- Quạt thông gió
- Đèn tử ngoại treo trần hoặc treo tường
- Thiết bị lọc không khí
- Giá và bàn để môi trường
- Bộ dụng cụ cấy, đèn còi...

e. Phòng nuôi mẫu cấy:

Tất cả các mẫu cấy đều được nuôi trong điều kiện nhiệt độ ánh sáng, độ ẩm, độ dài chiếu sáng, độ thông khí thích hợp.

Phòng nuôi có nhiệt độ $15-30^{\circ}\text{C}$ tùy theo mẫu cấy và mục đích của thí nghiệm. Nhiệt độ phải được phân bố đều trong toàn phòng nuôi, phải có đầy đủ ánh sáng huỳnh quang và có thể điều khiển được cường độ và thời gian chiếu sáng. Phòng nuôi phải được thổi khí đồng nhất và biên độ độ ẩm được điều chỉnh từ 20-98%.

- Phòng nuôi sáng: tường nên sơn màu trắng. Các giá đèn được lắp đèn ống để chiếu sáng. Trong phòng cần gắn các máy móc kiểm tra chính xác nhiệt độ, độ ẩm.

- Phòng nuôi tối để nuôi mô sẹo và các xử lý đặc biệt. Phòng cần tất cả các điều kiện như phòng sáng chỉ khác là không cần lắp đèn chiếu sáng cho cây, cửa sổ cần được che kín bằng vải đen.

- Các giàn đèn huỳnh quang nhiều ngăn, có độ chiếu sáng ở chỗ để bình nuôi cấy từ 2000-3000 lux.

- Máy điều hòa nhiệt độ
- Máy lắc nằm ngang 100-200 vòng/phút
- Các thiết bị và dụng cụ nuôi cấy tế bào đơn
- Tủ ẩm.

f. Phòng sinh hóa :

Phòng này dùng để tiến hành các phân tích sinh hóa, phân tử và di truyền.

- Tủ hút, tủ ẩm
- Cân các loại
- Máy cắt tiêu bản
- Máy đo pH
- Ly tâm lạnh
- Máy điện di, máy soi AND
- Máy PCR, máy sắc kí, quang phổ
- Tủ lạnh thường, tủ lạnh sâu
- Lò vi sóng
- Pipet tự động các loại
- Máy soi và chụp ảnh gel
- Các tủ đựng hóa chất, tủ hút khí độc.

* Các nhân tố đảm bảo thành công trong nuôi cấy mô tế bào thực vật: có 3 nhân tố chính:

- Đảm bảo điều kiện vô trùng.
- Chọn đúng môi trường và chuẩn bị môi trường đúng cách
- Chọn mô cây và xử lí mô cây thích hợp trước và sau khi cấy.

2.4.2. Các thủ tục cơ bản trong phòng thí nghiệm:

2.4.2.1. Cân

Việc chuẩn bị môi trường đòi hỏi thao tác cân phải chính xác. Trước hết cân phải được đặt ở vị trí ổn định, không bị rung, không khí không bị dao động nhiều. Cân và đĩa cân phải được giữ gìn sạch sẽ. Quan trọng nhất là không được cân quá trọng lượng cho phép và nên sử dụng các vật đựng hóa chất có trọng lượng nhỏ hoặc bằng giấy khi cân. Không được để hóa chất tiếp xúc trực tiếp với mặt cân.

2.4.2.2. Đong chất lỏng

Các dụng cụ thủy tinh có chia vạch (ống hút có chia độ, cốc thủy tinh có chia vạch, ống đong) cần thiết để pha môi trường. Ống đong có thể tích 10,20,100 và 1000ml

được sử dụng để đông những chất lỏng có thể tích lớn còn ống hút có chia độ, bình định mức dung để đông những thể tích cần chính xác. Đông các dung dịch chỉ chính xác khi đáy của không khí ngang với vạch đánh dấu.

2.4.2.3. Xác định độ pH

Độ pH của môi trường cấy hầu hết được chỉnh ở 5,5 \pm 0,1 trước khi hấp khử trùng. Độ pH ảnh hưởng đến khả năng hòa tan của các ion trong môi trường khoáng, khả năng đông tụ agar và sự tăng trưởng của tế bào. Vì vậy xác định chính xác độ pH là cần thiết. Murashige và Shoog nhận thấy rằng pH 5,7-5,8 thích hợp để duy trì sự hòa tan các chất khoáng trong môi trường MS. Nếu môi trường MS được sử dụng ở dạng lỏng thì có thể chỉnh pH ở 5, môi trường cấy huyền phù có pH thấp phần nào giảm bớt tính trạng nhiễm.

Độ pH của môi trường thường được điều chỉnh bằng NaOH hoặc HCl sau khi đã pha xong môi trường và chuẩn bị đưa và hấp khử trùng. Có thể chỉnh pH bằng pH kế để bàn, pH kế cầm tay hoặc giấy đo pH. Thường thì nhiệt độ cao sẽ làm tăng tính axit của môi trường. Mann và cộng sự nhận thấy rằng nếu trước khi hấp pH=5,7 thì sau khi hấp pH =5, Nếu muốn pH =5,7-5,9 thì trước khi hấp khử trùng cần điều chỉnh pH đến 7.

2.4.2.4. Rửa dụng cụ thủy tinh và bình nuôi cấy bằng plastic

Thông thường bình nuôi cấy sau khi sử dụng cần phải được rửa kỹ bằng xà bông bột cho hết các chất bám trên thành chai rồi tráng lại nhiều lần bằng nước sạch cuối cùng tráng lại bằng nước cất. Các dụng cụ thủy tinh bị quá bẩn cần phải được ngâm trong axit HCl hoặc sulfuric sau đó rửa sạch bằng nước máy và tráng bằng nước cất. Các bình môi trường bị nhiễm trùng trong quá trình nuôi cấy cần phải được hấp tiệt trùng trước khi rửa. Các dụng cụ thủy tinh sau khi rửa phải được sấy khô trong tủ sấy và được cất cẩn thận.

2.5. Đảm bảo điều kiện vô trùng

2.5.1. Ý nghĩa của vô trùng trong nuôi cấy mô và tế bào thực vật

Môi trường để nuôi cấy mô và tế bào thực vật có chứa đường, muối khoáng, vitamin..rất thích hợp cho các loại nấm và vi khuẩn phát triển. Do tốc độ phân bào của nấm và vi khuẩn lớn hơn nhiều so với các tế bào thực vật, nếu trong môi trường nuôi cấy bị nhiễm bào tử nấm hoặc vi khuẩn thì sau vài ngày sẽ phủ đầy vi khuẩn hoặc nấm,khi đó mô nuôi cấy sẽ chết dần thí nghiệm phải bỏ đi.

Thông thường một chu kì nuôi cấy mô và tế bào thực vật dài từ 1-5 tháng, trong khi thí nghiệm vi sinh vật có thể kết thúc trong một vài ngày. Như vậy mức độ vô trùng trong thí

nghiệm nuôi cấy mô và tế bào thực vật đòi hỏi rất nghiêm ngặt, điều kiện này đặc biệt quan trọng trong nuôi cấy tế bào đơn trong các bioreactor.

Có 3 nguồn nhiễm tạp chính:

- Dụng cụ thủy tinh, môi trường và nút đậy không được vô trùng tuyệt đối.
- Trên bề mặt hoặc bên trong mô nuôi cấy tồn tại các sợi nấm, bào tử vi khuẩn.
- Trong quá trình thao tác làm rơi nấm hoặc vi khuẩn theo bụi lên môi trường.

2.5.2. Khử trùng

2.5.2.1. Khử trùng phòng cấy và tủ cấy

Phòng cấy thường là phòng có diện tích hẹp, rộng từ 10-15m², có hai lớp cửa để tránh không khí chuyển động từ bên ngoài trực tiếp đưa bụi vào. Sàn và tường được lát gạch men để dễ lau chùi. Trước khi đưa vào sử dụng buồng cấy cần được xử lí bằng hơi Formol bằng cách rót formaldehyde (formalin) 4% ra một số đĩa petri để rải rác vài nơi trong phòng cho bốc hơi tự nhiên. Đóng kín cửa phòng cấy trong 24 giờ, sau đó bỏ formaldehyde đi và khử hơi formaldehyde dư bằng dung dịch NH₃ 25% trong 24 giờ. Các dụng cụ mang vào buồng cấy đều vô trùng trước: tủ quần áo choàng, mũ vải, khẩu trang, dao kéo.. Trên bàn cấy thường xuyên có một đèn cồn để sử dụng khi cấy và một cốc đựng cồn 95% để nhúng dụng cụ làm việc

Trước khi cấy, thí nghiệm viên cần rửa tay bằng xà phòng và lau kỹ đến khuỷu tay bằng cồn 90⁰. Để đảm bảo mức độ vô trùng cao cần có một đèn tử ngoại treo trên trần.

Phòng cấy lớn được khử trùng tiện nhất là bằng đèn cực tím. Thời gian khử trùng tùy theo kích thước của phòng và đèn cực tím chỉ được sử dụng khi không có người. Phòng cũng có thể được khử trùng bằng cách lau rửa hai lần/tháng với các dung dịch chống nấm. Phòng nhỏ hơn và tủ cấy cũng được khử trùng bằng tia cực tím hay các dung dịch khử trùng. Tủ cấy thổi gió được khử trùng bằng cách mở quạt gió và lau tất cả các bề mặt bằng cồn 95% trong 15 phút trước khi bắt đầu làm việc.

Phòng nuôi cũng được khử trùng trước hết là bằng xà bông bột. Sau đó lau bằng dung dịch hypochlorit sodium 2% hoặc bằng cồn 95%. Tất cả sàn, trần đều được lau như vậy mỗi tuần. Cần thận không nên khuấy động những nơi bị nhiễm để tránh phát tán bào tử. Cần giảm sự chuyển động của không khí trong buồng cấy đến mức tối thiểu vì vậy tất cả các dụng cụ phục vụ việc cấy đều phải chuẩn bị đầy đủ để trong khi cấy tránh đi lại ra vào buồng cấy nhiều lần.

2.5.2.2. Khử trùng bình cấy và các dụng cụ khác

a. Dụng cụ:

Dụng cụ thủy tinh dùng cho nuôi cấy mô và tế bào thực vật phải là bình thủy tinh trong suốt để ánh sáng qua được ở mức tối đa và trung tính để tránh kiềm từ bình thủy tinh gây ảnh hưởng đến sự phát triển của mô nuôi cấy.

Cần rửa sạch dụng cụ thủy tinh trước khi đưa vào sử dụng. Thông thường chỉ cần xử lý bằng sulfochromate một lần đầu khi đưa vào sử dụng về sau chỉ cần rửa sạch bằng xà phòng, tráng nhiều lần bằng nước máy cuối cùng tráng bằng nước cất. Sau khi để ráo nước dụng cụ thủy tinh cần được vô trùng bằng cách sấy ở 160⁰C/giờ. Sau khi nguội được lấy ra cất vào chỗ ít bụi.

Dụng cụ kim loại, giấy nhôm... cần được khử trùng bằng không khí nóng (130-170⁰C) trong 2-4 giờ trong tủ sấy. Tất cả các vật dụng này phải được gói kín trước khi khử trùng nhưng không được gói bằng giấy vì giấy bị phân rã ở 170⁰C. Không nên hấp khử trùng dụng cụ kim loại vì điều kiện nóng ẩm sẽ làm cho kim loại bị rỉ sét và bị ăn mòn.

Trước khi sử dụng các dụng cụ đã được khử trùng bằng không khí nóng, các dụng cụ được lấy ra khỏi giấy gói, nhúng vào cồn 95⁰ và đốt trên ngọn lửa đèn cồn. Sau khi dùng xong, dụng cụ này phải được đốt lại bằng cồn trước khi sử dụng tiếp. Khi sử dụng cồn cần lưu ý đến sự an toàn tối đa vì rất dễ bị phụt.

Autoclave là phương pháp khử trùng bằng hơi nước dưới áp suất nhất định. Nút gòn, vải, các dụng cụ thủy tinh, bình nuôi cấy bằng plastic, nút cao su, pipet, nước, môi trường khoáng... đều có thể khử trùng bằng nồi hấp. Gần như tất cả vi sinh đều bị chết bởi hơi nước trong nồi hấp trong 10-15 phút ở 121⁰C.

b. Nút đậy:

Thường dùng nhất là nút đậy làm bằng bông không thấm nước. Nút phải tương đối chặt để đảm bảo bụi không đi qua được, đồng thời nước từ môi trường không bị bốc hơi quá dễ dàng trong quá trình nuôi cấy. Bông không thấm nước là loại nút đơn giản nhất nhưng có nhược điểm sau:

+ Nếu khi hấp nút bông bị ướt hoặc dính môi trường thì về sau sẽ bị nhiễm nấm nhất là các thí nghiệm nuôi cấy trong thời gian dài.

+ Thao tác làm nút bông chậm, không thuận tiện khi nuôi cấy trên qui mô lớn.

+ Chỉ dùng được một vài lần sau phải bỏ.

Hiện nay người ta sử dụng nhiều loại nắp đậy khác nhau để thay thế nút bông. Các hãng sản xuất dụng cụ nuôi cấy mô cung cấp loại nắp ống nghiệm và bình tam giác bằng nhựa chịu nhiệt có thể hấp ở 120⁰C mà không bị biến dạng. Một số phòng thí nghiệm sử dụng nắp inox hoặc cao su rất thuận tiện cho việc vô trùng.

Các dung dịch mẹ dùng để pha chế môi trường (dung dịch muối khoáng, vitamin...) cần được bảo quản trong tủ lạnh. Dung dịch vitamin nên chia thành nhiều loại

nhỏ và bảo quản trong ngăn đá của tủ lạnh. Không nên pha một lượng quá lớn dung dịch mẹ các chất sinh trưởng, thường chỉ nên dùng các lọ có dung tích 100-200 ml.

c. Khử trùng môi trường khoáng:

Để khử trùng môi trường khoáng thường sử dụng hai phương pháp hấp tiệt trùng và lọc bằng màng lọc vô trùng. Môi trường nuôi cấy, nước cất và các hóa chất ổn định khác có thể chứa trong bình thủy tinh và đậy bằng nút gòn, giấy nhôm hoặc nắp nhựa. Tuy nhiên môi trường có các chất không bền nhiệt thì cần sử dụng phin lọc milipore. Nói chung môi trường khoáng được hấp tiệt trùng ở 121⁰C, 1 atm. Với những thể tích nhỏ (100 ml hoặc ít hơn) thời gian khử trùng là 15-20 phút. Với lượng môi trường lớn thì phải khử trùng trong 30-40 phút. Áp suất không nên cao quá 1 atm vài áp suất cao sẽ làm phân hủy carbohydrate và các phức hợp nhạy cảm với nhiệt độ

Bảng 2.1 . Thời gian tối thiểu để hấp khử trùng môi trường nuôi cấy mô ở 121⁰C (Burgerr, 1988)

Thể tích môi trường (ml)	Thời gian khử trùng tối thiểu (phút)
20-25	24
50	26
100	28,5
250	31,5
500	35
1000	40
2000	48
3000	55
4000	63

Nhiều loại protein, vitamin, amino axit, hormone..không bền nhiệt vì vậy nên dùng phin lọc micropore để khử trùng. Phin lọc milipore hoặc phin lọc seitz đều có thể sử dụng với kích thước lỗ không lớn hơn 0,2 µm. Các bình đựng thủy tinh cần phải được hấp tiệt trùng trước khi lọc.

Môi trường khoáng có chất không bền nhiệt có thể được tiến hành chuẩn bị theo các bước sau: đầu tiên các chất khoáng bền với nhiệt độ được hấp tiệt trùng, sau đó làm lạnh xuống còn 50-60⁰C trong điều kiện vô trùng khi đó những chất không bền với nhiệt độ sẽ được lọc vô trùng. Dung dịch đã khử trùng này sẽ phối hợp với nhau trong điều kiện vô trùng để tạo ra một môi trường hoàn chỉnh

2.5.2.3. Khử trùng mẫu cấy thực vật

Các loại mẫu cấy thường được sử dụng trong nuôi cấy mô

Về mặt nguyên tắc, các tế bào còn sống đã phân hóa đều có khả năng phản phân hóa trở lại trạng thái trẻ hóa và tái lập khả năng phân chia. Tuy nhiên có thể nhận xét chung là các mô đang phát triển mạnh (mô phân sinh ngọn, tượng tầng...) khi đặt vào môi trường có chứa một lượng chất sinh trưởng thích hợp đều có khả năng tạo mô sẹo cao. Để bắt đầu nghiên cứu nhân giống vô tính một cây nhất định, trước tiên người ta chú ý đến chồi nách và mô phân sinh ngọn. Các mô thực vật thường được sử dụng để nuôi cấy là:

- Đỉnh sinh trưởng thân, rễ
- Chồi bên
- Tượng tầng
- Vảy củ
- Chồi ngọn
- Nhu mô lá, nhu mô vỏ thân
- Chồi nảy từ củ

Cần biết là tuy mang một lượng thông tin di truyền như nhau, các mô khác nhau trên cùng một cây có thể cho các mô sẹo phát triển khác nhau với khả năng tái sinh chồi, rễ hay cây hoàn chỉnh rất khác nhau. Vì vậy khi khởi đầu chọn giống, nhân giống một cây cụ thể trước hết cần tìm hiểu phản ứng của các bộ phận khác nhau của cây trong nuôi cấy ở các nồng độ chất sinh trưởng khác nhau.

Khử trùng mẫu cây là việc làm khó vì mẫu sống không thể khử bằng nhiệt độ cao mà phải giữ được bản chất sinh học của nó. Do đó mẫu cấy thực vật phải được khử trùng bằng các dung dịch khử trùng. Các dung dịch khử trùng thường dùng là hypochlorit calcium, hypochlorit sodium, chlorua thủy ngân, oxi già... Tỷ lệ vô trùng thành công phụ thuộc thời gian khử trùng và nồng độ các chất khử trùng và khả năng xâm nhập của chúng vào các kẽ lách lõi lõm trên bề mặt mô nuôi cấy, khả năng đẩy hết các bọt khí bám trên bề mặt mô nuôi cấy. Các dung dịch dùng để khử trùng mẫu phải bảo vệ được mô thực vật nhưng thời gian khử trùng phải đủ để tiêu diệt nguồn gây nhiễm là nấm và vi khuẩn.

Các mẫu cấy khi chọn lựa phải được rửa trước bằng xà phòng dưới dòng nước chảy rồi mới cho vào ngâm trong dung dịch khử trùng. Để tăng tính linh động và khả năng xâm nhập của chất diệt khuẩn, thông thường người ta xử lý mô nuôi cấy trong cồn 70% trong 30 giây, sau đó mới xử lý trong dung dịch diệt khuẩn. Trong thời gian xử lý, mô cấy phải được ngập hoàn toàn trong dung dịch diệt khuẩn. Khi xử lý xong mô cấy được rửa nhiều lần trong nước cất vô trùng (3-5 lần).

Những phân trên mô cấy bị tác nhân vô trùng làm cho trắng phải cắt bỏ trước khi đặt mô cấy lên môi trường. Để tránh ảnh hưởng trực tiếp của tác nhân vô trùng lên mô

cây, nên chú ý để lại một lớp bọc ngoài khi ngâm mô vào dung dịch diệt khuẩn. Lớp cuối cùng này sẽ được cắt bỏ hoặc bóc đi trước khi đặt mô cấy lên môi trường.

Đối với những mẫu khó khử trùng thì việc xử lý mẫu phải được lặp lại sau 24-48 h trước khi cấy. Điều này cho phép những vi sinh vật chưa chết có thời gian phát triển đến giai đoạn nhạy cảm với thuốc khử trùng.

Bảng 2.2. Nồng độ và thời gian sử dụng 1 số chất diệt khuẩn xử lý mô cấy thực vật

Stt	Chất khử trùng	Nồng độ	Thời gian khử trùng (phút)	Hiệu quả
1	Hypochlorite calcium	9-10%	5-30	Rất tốt
2	Hypochlorite sodium	0,5-5%	5-50	Rất tốt
3	Nước bromine	1-2%	2-10	Rất tốt
4	Oxy già	3-12%	5-15	Tốt
5	Chlorua thủy ngân	0,1-1%	2-10	Tốt
6	Nitrate bạc	1%	5-30	Tốt
7	Kháng sinh	4-50mg/l	30-60	khá

Các chất kháng sinh trên thực tế ít được sử dụng vì tác dụng không triệt để và có ảnh hưởng xấu ngay lên sự sinh trưởng của mô cấy.

Việc xử lý thành công nguồn gây nhiễm phần lớn phụ thuộc vào kỹ thuật xử lý trong nuôi cấy vô trùng. Các nguồn gây nhiễm là bụi tóc, tay, quần áo vì vậy trong khi cấy phải rửa tay, lau bằng cồn 70⁰ tới khủy tay, tay áo phải xoắn cao lên, kẹp tóc gọn.. Không nói chuyện hoặc nhảy mũi trong khi đang cấy. Khi cấy không nên chạm tay vào mặt trong của bình cấy cũng như các dụng cụ cấy. Không đưa vào tủ cấy các bình cấy đã bị nhiễm vì bào tử có thể phát tán trong tủ cấy.

2.6. Môi trường

Một trong những yếu tố quan trọng nhất trong sự tăng trưởng và phát triển hình thái của tế bào và mô thực vật trong nuôi cấy mô là thành phần môi trường nuôi cấy.

Thành phần môi trường nuôi cấy tế bào và mô thực vật thay đổi tùy theo loài và bộ phận nuôi cấy. Đối với cùng một mẫu cây nhưng tùy theo mục đích thí nghiệm thì thành phần môi trường cũng sẽ thay đổi tùy theo giai đoạn phân hóa của mẫu cây.

2.6.1. Thành phần hoá học của các môi trường nuôi cấy mô, tế bào thực vật

Môi trường nuôi cấy mô và tế bào thực vật tuy rất đa dạng nhưng đều gồm một số thành phần cơ bản sau:

- Các muối khoáng đa lượng và vi lượng
- Các vitamin
- Các amino axit
- Nguồn các- bon: một số các loại đường
- Các chất điều hoà sinh trưởng
- Các chất hữu cơ bổ sung: nước dừa, dịch chiết nấm men, dịch chiết khoai tây, bột chuối khô...
- Chất làm thay đổi trạng thái môi trường: các loại thạch (agar)

Tất cả các hợp chất này đều tham gia vào một hoặc nhiều chức năng trong sự sinh trưởng và phân hoá của thực vật nuôi cấy in vitro.

Các nhà khoa học sử dụng các môi trường nuôi cấy rất khác nhau. Việc lựa chọn môi trường nuôi cấy với thành phần hoá học đặc trưng phụ thuộc vào một số yếu tố:

- Đối tượng cây trồng hoặc mô nuôi cấy khác nhau có nhu cầu khác nhau về thành phần môi trường.
- Mục đích nghiên cứu hoặc phương thức nuôi cấy khác nhau (nuôi cấy tạo mô sẹo, phân hoá hoặc phân biệt vô tính, nuôi cấy tế bào trần hoặc dịch lỏng tế bào, vi nhân giống...)
- Trạng thái môi trường khác nhau (đặc, lỏng, bán lỏng...).

2.6.1.1. Các chất khoáng

Đối với cây trồng, các chất vô cơ đóng vai trò rất quan trọng. Ví dụ, Mg là một phần của phân tử diệp lục, Ca là thành phần của màng tế bào, N là thành phần quan trọng của amino axit, vitamin, protein và các axit nucleic. Tương tự, Fe, Zn và Mo cũng là thành phần của một số enzym.

Các môi trường khác nhau có hàm lượng và thành phần chất khoáng khác nhau, ví dụ thành phần và nồng độ khoáng của môi trường White hoặc Knop khá nghèo nàn, nhưng lại rất giàu ở môi trường MS và B5.

Muối khoáng là thành phần không thể thiếu trong các môi trường nuôi cấy mô và tế bào thực vật:

- Muối khoáng là các vật liệu (nguồn N, S, P....) cho sự tổng hợp các chất hữu cơ. Nitơ, lưu huỳnh, phot-pho là các thành phần không thể thiếu của các phân tử protein, các axit nucleic và nhiều chất hữu cơ khác. Canxi và axit boric được tìm thấy chủ yếu ở thành tế bào, đặc biệt là canxi có nhiệm vụ quan trọng giúp ổn định màng sinh học.

- Đóng vai trò như một thành phần không thể thiếu của nhiều enzym (là các co-factor): Magie, kẽm, sắt... và nhiều nguyên tố vi lượng là những phần quan trọng của các enzym.

- Các ion của các muối hoà tan đóng vai trò quan trọng ổn định áp suất thẩm thấu của môi trường và tế bào, duy trì thế điện hoá của thực vật. Ví dụ, K và C rất quan trọng trong điều hoà tính thẩm lọc của tế bào, duy trì điện thế và tham gia hoạt hoá nhiều enzym.

Trong môi trường, các muối khoáng được chia thành các nguyên tố vi lượng và đa lượng:

- Các chất dinh dưỡng đa lượng bao gồm sáu nguyên tố: nitrogen (N), phosphorus (P), potassium (K), calcium (Ca), magnesium (Mg) và sulphur (S) tồn tại dưới dạng muối khoáng, là thành phần của các môi trường dinh dưỡng khác nhau. Tất cả các nguyên tố này là rất cần thiết cho sinh trưởng của mô và tế bào thực vật. Môi trường nuôi cấy phải chứa ít nhất 25 mmol/L nitrate và potassium. Tuy nhiên, hầu hết các nghiên cứu đều cho thấy nguồn N cung cấp trong môi trường dưới cả 2 dạng nitrate và amonium (2-20 mmol/L) là tốt hơn cả. Trong trường hợp chỉ dùng amonium, thì cần phải bổ sung thêm một acid dạng mạch vòng (cycle acids), tricarboxylic acid hoặc một số acid khác nữa (dạng muối), như: citrate, succinate, hoặc malate sao cho mọi ảnh hưởng độc do nồng độ của amonium vượt quá 8 mmol/L trong môi trường được giảm bớt. Khi các ion nitrate và amonium cùng hiện diện trong môi trường nuôi cấy, thì ion sau được sử dụng nhanh hơn. Các nguyên tố chính khác, như: Ca, P, S và Mg, nồng độ thường dùng trong khoảng 1-3 mmol/L.

2.6.1.2. Các nguyên tố đa lượng

a. Nguồn carbon (C)

Đường sucrose (saccharoza) là nguồn cacbon chủ yếu và được sử dụng thường xuyên trong hầu hết các môi trường nuôi cấy mô, kể cả khi mẫu nuôi cấy là các chồi xanh có khả năng quang hợp. Khi khử trùng, đường sucrose bị thủy phân một phần, thuận lợi hơn cho cây hấp thụ. Trong một số trường hợp, ví dụ nuôi cấy mô cây một lá mầm, đường glucose tỏ ra tốt hơn so với sucrose. Mô thực vật có khả năng hấp thụ một số

đường khác như maltose, galatose, lactose, mannose, thậm chí tinh bột, nhưng các loại đường này hầu như rất ít được sử dụng trong nuôi cấy tế bào và mô thực vật.

Mô và tế bào thực vật nuôi cấy *in vitro* 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 carbon hữu cơ là điều bắt buộc. Nguồn carbon thông dụng nhất đã được kiểm chứng là sucrose, nồng độ thích hợp phổ biến là 2-3%, song cũng còn phụ thuộc vào mục đích nuôi cấy mà thay đổi có khi giảm xuống tới 0,2% (chọn dòng tế bào) và tăng lên đến 12% (cảm ứng stress nước).

Tiếp đến là glucose cũng thường được đưa vào môi trường nuôi cấy và cho hiệu quả tương đương sucrose (glucose thường dùng cho nuôi cấy protoplast), còn fructose cho hiệu quả kém hơn. Sucrose, trong khi khử trùng môi trường, bị biến đổi thành glucose và fructose. Trong tiến trình này, đầu tiên glucose sẽ được sử dụng và sau đó là fructose. Các carbohydrate khác, như: lactose, galactose, raffinose, maltose, cellobiose, melibiose và trehalose cũng đã được thí 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 cho nuôi cấy, tuy nhiên những loại tế bào được nuôi trên môi trường có chứa một trong các polysaccharide trên nhất định phải thể hiện khả năng thủy phân thông qua các enzyme chẳng hạn như amylase. 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 sucrose lượng amylase thải ra sẽ giảm ngay.

Glycerin cũng có thể được tế bào sử dụng. Mannitol 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, hoặc tương tự sucrose chúng cũng được dùng để cảm ứng stress nước. Các loại rượu như ethanol, methanol ít hiệu quả, còn propanol và butanol thì rất độc.

Acid hữu cơ thường không phải là nguồn carbon thích hợp cho tế bào nuôi cấy. Thí nghiệm với các acid: folic, succinic, pyruvic và keto-glutaric chỉ đạt 15% sinh trưởng so với sucrose.

Các mô và tế bào thực vật trong môi trường nuôi cấy ít có khả năng tự dưỡng và vì thế cần thiết phải bổ sung nguồn carbon bên ngoài để cung cấp năng lượng. Thậm chí các mô bắt đầu lục hóa hoặc hình thành diệp lục tố dưới các điều kiện đặc biệt trong suốt quá trình nuôi cấy đã không tự dưỡng carbon. Việc bổ sung nguồn carbon bên ngoài vào môi trường làm tăng phân chia tế bào và tái sinh các chồi xanh.

Sự thủy phân từng phần sucrose xuất hiện khi môi trường được khử trùng. Các tế bào và mô nuôi cấy đã sinh trưởng trên môi trường có sucrose được khử trùng bằng autoclave tốt hơn trên môi trường có sucrose được khử trùng bằng màng lọc (filter). Điều này cho thấy các tế bào thích hợp với nguồn dự trữ có sẵn của glucose và fructose do thủy phân sucrose khi khử trùng bằng autoclave. Sử dụng fructose được khử trùng bằng autoclave không được đề cập đến vì nó có thể gây bất lợi cho sinh trưởng của mô.

b. Nitơ (N):

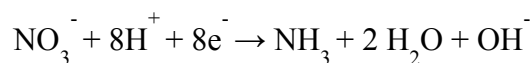
Thành phần chính của hầu hết các môi trường là nitơ vô cơ dưới dạng nitrat (NO_3^-) hoặc amonium (NH_4^+). Các muối được dùng phổ biến là kali nitrat (KNO_3), nitrat amon (NH_4NO_3) và canxi nitrat ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$). Những hợp chất này cung cấp nitơ vô cơ cho thực vật để tổng hợp các phân tử chất hữu cơ phức tạp.

Mô, tế bào thực vật trong nuôi cấy có thể sử dụng nitrogen khoáng như aminonium và nitrate, đồng thời cũng sử dụng các dạng nitrogen hữu cơ như amino acid. Tỷ lệ amonium và nitrate thay đổi tùy theo loài và trạng thái phát triển của mô.

Nitrate được cung cấp dưới dạng muối $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, KNO_3 , NaNO_3 hoặc NH_4NO_3 . Amonium được cung cấp dưới dạng $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ hoặc NH_4NO_3 . Trong một số ít trường hợp có thể cung cấp dưới dạng urea. Tổng nồng độ của NO_3^- và NH_4^+ trong môi trường nuôi cấy thay đổi tùy theo đối tượng nuôi cấy và mục đích nghiên cứu.

Amonium chủ yếu được dự trữ ở rễ như nguồn nitơ hữu cơ. Nitrat có thể được vận chuyển theo mạch xylem đến các bộ phận của cây, tại đó nó sẽ tham gia vào quá trình đồng hoá nitơ. Nitrat có thể được dự trữ ở không bào và thực hiện chức năng quan trọng trong việc điều chỉnh sự thẩm thấu và cân bằng ion của cây trồng.

Sự biến đổi nitrat: Nitrat không thể sử dụng ngay lập tức để sinh tổng hợp các chất hữu cơ phức tạp mà trước tiên cần phải được khử thành amoniac. Phản ứng diễn ra như sau:



Phản ứng này được thực hiện qua 2 bước nhờ hai enzym: nitrat- và nitrit reductaza. Trước tiên, nitrat được biến đổi thành nitrit nhờ nitrat reductaza. Tiếp theo, nitrit bị khử thành amoniac nhờ enzym nitrit reductaza. Sự biến đổi của nitrat thành nitrit diễn ra trong tế bào chất. Trong hầu hết các cây trồng, sự khử nitrat có thể diễn ra ở cả lá và đỉnh chồi. Sự khử nitrat diễn ra ở mức độ nào phụ thuộc rất lớn vào các nhân tố như:

loài, tuổi cây, nồng độ nitrat. Cụ thể, các loài cây thân gỗ có khả năng khử nitrat rất cao. Khi nồng độ nitrat thấp, sự khử hầu như diễn ra ở rễ. Ngược lại, nếu nồng độ nitrat cao thì quá trình này diễn ra cả ở lá. Các cation kết hợp với nitrat có vai trò quan trọng trong việc hấp thu nitrat. Nếu cation là K^+ thì hoạt động của enzym nitrat reductaza ở rễ thấp và nitrat sẽ được vận chuyển lên các đỉnh chồi của cây. Trong trường hợp cation là Ca^{2+} thì sự khử ở rễ lại diễn ra mạnh hơn.

Sự khử nitrit thành NH_3 nhờ enzym nitrit reductaza diễn ra trong lá cây, trong đó điện tử cần thiết cho phản ứng này được cung cấp từ sự khử các hợp chất sắt trong hệ thống quang hợp.

Sự khử nitơ chứa trong các hợp chất: Amonium và amoniac là những chất độc đối với thực vật ngay ở nồng độ thấp. Do đó chúng cần được chuyển hoá thật nhanh thành các hợp chất phân tử lượng nhỏ có chứa N như: asparagin, arginin, allantoin và betain. Sinh tổng hợp glutamin và glutamat diễn ra cả ở rễ và đỉnh chồi là các quá trình cơ bản trong sự chuyển hoá amonium.

Bên cạnh sự khử độc tính của amonium và amoniac, các hợp chất chứa nitơ phân tử lượng thấp còn có một số chức năng khác. Chức năng quan trọng nhất là cung cấp N trong các liên kết hữu cơ và $-NH_2$ được thực vật hấp thụ như nguồn N hữu cơ cho quá trình sinh tổng hợp các amino axit và protein. Các hợp chất phân tử lượng nhỏ này còn được sử dụng làm chất mang cation như Mn, Cu để vận chuyển các cation qua hệ thống mạch dẫn trong cây. Ngoài ra, chúng còn như một kho dự trữ nitơ dư thừa. Ngược lại với con người và động vật, thực vật không thể bài tiết các hợp chất nitơ hữu cơ như urê nhưng nhờ cơ chế này đã cho phép thực vật dự trữ được nitơ hữu cơ.

c. Phospho (P):

Photpho là nguyên tố quan trọng trong đời sống thực vật. Nó tham gia vào việc vận chuyển năng lượng, sinh tổng hợp protein, acid nuclêic và tham gia cấu trúc của màng.

Trong môi trường nuôi cấy, Photpho được cung cấp dưới dạng mono hay dihydrogenphosphate potassium hay sodium. Ion photphate hóa trị 1 và 2 có thể chuyển đổi lẫn nhau tùy theo pH. Ion $H_2PO_4^-$ chiếm ưu thế ở pH nhỏ hơn 7, đây là đặc tính của hầu hết môi trường nuôi cấy mô tế bào thực vật cũng là ion dễ được thực vật hấp thụ nhất. Photpho thường được cung cấp dưới dạng photphate hòa tan hạn chế.

Nồng độ photphate hòa tan cao trong môi trường sẽ làm giảm sự tăng trưởng của mô, có thể do calcium và một số nguyên tố vi lượng bị kết tủa trong môi trường hoặc bị giảm hấp thu vào trong mô. Nồng độ ion photphate cho vào môi trường cao nhất là 18,9 mM, trung bình là 1,7 mM, hầu hết các môi trường chứa photphate khoảng 1.3 mM.

Phospho ở dạng HPO_4^{2-} được hấp thụ nhờ hệ thống rễ của thực vật và ngược lại với nitrat, sunfat, nó không bị khử. Nó có thể có mặt trong thực vật dưới dạng P vô cơ hoặc dạng hợp chất este (R-O-P). Năng lượng thu được khi giải phóng một nguyên tử P khỏi các liên kết (cao năng lượng) là rất quan trọng đối với quá trình trao đổi chất của tế bào.

Axit nucleic : P là một nguyên tố thiết yếu trong cấu tạo của DNA và RNA để nối các đơn phân tử axit ribonucleic để tạo thành đại phân tử.

Phospholipid: Phospholipid của màng sinh học cũng có chứa một lượng lớn P. Trong những phospholipid này, P (qua liên kết este) tạo nên cầu nối giữa diglyxerit với một amin, axit amin hoặc một rượu. Phospholipid có một đầu háo nước, phân tử diglyxerit và một đầu kỵ nước có chứa PO_4^{3-} . Cả hai đều có chức năng quan trọng trong việc giữ ổn định màng tế bào. Màng tế bào bao gồm hai lớp phospholipid đơn ghép lại tạo thành lớp màng kép lipid. Đầu ưa nước của lớp phospholipid quay ra ngoài hướng về phía các phân tử nước trong khi đuôi kỵ nước lại quay vào phía trong giữa hai lớp của màng tế bào và tương tác lẫn nhau.

Quá trình chuyển hoá năng lượng: Phospho ở dạng liên kết este cao năng (C-P) rất quan trọng đối với quá trình chuyển hoá năng lượng và tổng hợp sinh học ở thực vật. Đóng vai trò quan trọng hơn nữa là các liên kết cao năng giữa hai nguyên tử P như trong phân tử ATP ($\text{P-P} = 30 \text{ kJ}$). Năng lượng giải phóng trong suốt quá trình thủy phân glucoza, quá trình oxi hoá, phosphoryl hoá hoặc quang hợp được sử dụng để tổng hợp ATP. Ngược lại năng lượng này khi cần lại được giải phóng ra qua phản ứng thủy phân ATP thành ADP và P vô cơ. Vì vậy ATP được chuyển hoá và tổng hợp mới liên tục. Một gram đỉnh rễ đang trong giai đoạn trao đổi chất mạnh có thể tổng hợp 5g ATP/ ngày với tốc độ tổng hợp trung bình là 30 giây.

Vùng dự trữ P (phosphat): Trong tế bào bao gồm hai vùng dự trữ phosphat khác nhau. Vùng trao đổi, chủ yếu phosphat ở dạng este, nằm trong tế bào chất và ty thể. Vùng không trao đổi, chủ yếu là dạng P vô cơ, nằm trong không bào. Nếu ngừng cung cấp P cho cây, nồng độ P vô cơ trong không bào ngay lập tức sẽ giảm trong khi ở vùng trao đổi tốc độ giảm chậm hơn nhiều. Khi tăng cường cung cấp P, nồng độ P chứa trong các cơ quan của tế bào cũng tăng theo, tuy nhiên khi tăng quá mức bình thường thì chỉ có P vô cơ trong không bào tăng lên. Vì vậy có thể nói, P dư thừa được dự trữ ở không bào dưới dạng P vô cơ.

Các enzym: P vô cơ cũng có khả năng điều chỉnh tốt trong nhiều quá trình trao đổi chất của thực vật. Vì vậy nên sự phân bố P là cần thiết để điều chỉnh quá trình trao đổi

chất của tế bào. Ở cà chua, sự giảm P vô cơ ở không bào trong tế bào chất kích thích hoạt tính của enzym phosphofructokinaza. Enzym này là enzym quan trọng trong sự phân giải cơ chất của phản ứng thủy phân glyco và làm tăng sự hô hấp của tế bào trong quá trình chín. Cũng trong thời gian này, sự thiếu hụt P có thể làm chậm quá trình chín của quả.

Trong quá trình tổng hợp tinh bột của lục lạp, P cũng đóng một vai trò quan trọng. Chỉ với nồng độ thấp, P vô cơ đã có thể gây ức chế quá trình tổng hợp tinh bột. Sở dĩ như vậy là do ADP-gluco-pyrophosphorylaza, enzym quan trọng nhất trong quá trình tổng hợp tinh bột, bị kìm hãm bởi P vô cơ và được kích thích nhờ các triosephosphat. Vì thế, sự cân bằng giữa các hợp chất có chứa P là rất quan trọng trong điều hoà tổng hợp tinh bột ở lục lạp. Ngoài ra, P vô cơ cũng tham gia quá trình này theo một con đường khác. Các phân tử vận chuyển phosphat ở màng tế bào sẽ mang P vô cơ vào tế bào và các triosephosphat ra ngoài tế bào, làm nồng độ P vô cơ trong lục lạp tăng, triosephosphat giảm. Điều này lại tác động đến quá trình tổng hợp tinh bột theo cơ chế đã trình bày ở trên. Ribuloza biphosphat (RuBP), với vai trò như một chất nhận CO_2 , là hợp chất quan trọng trong sự cố định CO_2 . Sự tái tổng hợp này đòi hỏi phải có các triosephosphat. Khi nồng độ P vô cơ cao sẽ kích thích giải phóng các triosephosphat ra khỏi lục lạp, gây thiếu hụt các chất này, do đó làm kìm hãm quá trình cố định CO_2 . Ngoài ra, phospho còn quan trọng trong việc điều khiển hoạt động của nhiều enzym khác. Nồng độ phospho tối ưu cho sự sinh trưởng của thực vật là 0,3 – 0,5 g/ kg trọng lượng khô. Sự thiếu P làm cây chậm lớn, lá cây có màu xanh thẫm do trong thời gian bị thiếu P, sự phát triển của lá chậm hơn sự tổng hợp diệp lục tố nên làm tăng nồng độ diệp lục tố trong lá cây.

d. Lưu huỳnh (S):

Lưu huỳnh như SO_4^{2-} được hấp thụ ở rễ cây với tốc độ chậm. Giống như nitrat, lưu huỳnh phải được khử trước khi sử dụng để sinh tổng hợp các hợp chất có chứa lưu huỳnh như amino axit, protein và enzym. Lưu huỳnh ở dạng chưa khử được kết hợp trong các sulpholipid và các polysaccharid.

Sự đồng hoá lưu huỳnh: Bước đầu tiên trong quá trình đồng hoá lưu huỳnh là sự hoạt hoá gốc SO_4^{2-} nhờ enzym ATP sulfurylaza. Phản ứng này tạo ra adenosine phosphosulfate (APS) và P vô cơ. Tiếp theo là hai quá trình hoá học hoàn toàn khác nhau. Một quá trình không diễn ra sự khử lưu huỳnh mà tạo liên kết với các polysaccharide trong sulpholipid. Trong quá trình thứ hai, lưu huỳnh được khử thành nhóm –SH (nhóm thiol) và nhóm sulfuryl của APS được vận chuyển tới glutathione (Glut-SH). Sau đó nhóm –SH được vận chuyển tới cho acetylserine và phân tách thành acetat và cystein.

Cystein là sản phẩm bên đầu tiên trong quá trình đồng hoá và là tiền chất của tất cả các hợp chất hữu cơ có chứa lưu huỳnh trong thực vật, ví dụ như: protein, co-enzym, các hợp chất trao đổi chất thứ cấp... Quá trình đồng hoá lưu huỳnh chủ yếu diễn ra ở lục lạp. Khi thiếu lưu huỳnh, sinh tổng hợp protein bị kim hãm, lượng diệp lục tố trong lá cây bị giảm sút.

Các protein: Lưu huỳnh có mặt trong các protein có chứa cystein và methionin. Cả hai axit amin này đều là tiền chất của tất cả các hợp chất có chứa lưu huỳnh trong thực vật. Lưu huỳnh, cấu tử hợp thành của nhiều coenzym và các nhóm prosthetic, có chức năng quan trọng trong rất nhiều phản ứng oxy hoá khử, được biểu diễn như sau:



Gốc R có thể là phần còn lại của phân tử cystein nhưng cũng có thể là tripeptit glutathione. Glutathione tan được trong nước và do đó, nó đóng vai trò như một hệ oxy hoá khử ở lục lạp và dịch bào. Cầu lưu huỳnh giữa hai phân tử cystein rất quan trọng trong cấu trúc bậc ba của phân tử protein và hoạt động của enzym. Nhóm –SH, như đã đề cập ở trên có trong thành phần của các coenzym và APS, tạo thành một phần của nhóm chức năng trong phân tử enzym.

Các metallothionein: Các hợp chất phân tử lượng thấp có chứa lưu huỳnh-metallothionein, thường hay được tìm thấy trong thực vật. Hầu hết các chất này đều có chứa cystein. Đặc biệt, các kim loại như: đồng, cadimi và kẽm thường liên kết trong metallothionein. Gần như chắc chắn những phân tử protein nhỏ này tham gia vào sự bài tiết các ion kim loại trên khi chúng dư thừa, trước khi liên kết với nhóm chức năng –SH của các enzym.

Lưu huỳnh chưa bị khử: Lưu huỳnh ở dạng chưa bị khử là thành phần cấu tạo sulpholipid, là phân tử tạo thành cấu trúc của màng sinh học. Lưu huỳnh thường có mặt ở dạng hợp chất este của lưu huỳnh và đường 6 cacbon, ví dụ như glucoza. Sulpholipid có nhiều trên màng thylakoid của lục lạp và tham gia vào quá trình vận chuyển ion qua màng sinh học. Hơn nữa, sự có mặt của sulpholipid trên màng tế bào chắc chắn liên quan đến khả năng chịu muối của thực vật. Mùi vị đặc trưng của một số loài như: hành, tỏi chủ yếu có liên quan đến sự có mặt của các hợp chất có chứa lưu huỳnh dễ biến đổi.

e. Kali (K):

K^+ là một cation chủ yếu trong cây, giúp cho cây cân bằng các anion vô cơ và hữu cơ. Ion K^+ được chuyển qua màng tế bào dễ dàng và có vai trò chính là điều hòa pH và áp suất thẩm thấu của môi trường nội bào. Sự thiếu hụt K^+ trong môi trường nuôi cấy mô thực vật sẽ dẫn đến tình trạng thiếu nước.

K^+ được cung cấp dưới dạng muối KNO_3 , KCl , $6H_2O$, KH_2PO_4

Trong thực vật, K^+ là một cation có tính linh động cao, ở cả mức độ tế bào cũng như trong quá trình vận chuyển qua các khoảng cách dài trong mạch xylem hoặc mạch libe. Trong tất cả các nguyên tố, kali là nguyên tố có mặt với nồng độ cao nhất, ở tế bào chất từ 100 – 200 mM, ở lục lạp từ 20 – 200 mM.

Muối kali có vai trò quan trọng trong việc điều chỉnh tính thấm của tế bào. Đối với sự giãn tế bào cũng như các quá trình khác được điều chỉnh nhờ sức trương của tế bào, K^+ có vai trò như một ion trung hoà các ion vô cơ và hữu cơ hoà tan trong dung dịch, đồng thời duy trì pH trong khoảng 7 – 8 là pH thích hợp cho hoạt động của hầu hết các enzym.

Vai trò của K^+ đối với các enzym: K^+ cần thiết cho hoạt động của nhiều enzym. Trên 50 enzym của thực vật hoạt động với sự tham gia của K^+ hoặc bị kích thích bởi K^+ . Sự liên kết của K^+ với enzym gây ra sự thay đổi cấu hình không gian của enzym, do đó làm tăng ái lực của enzym với cơ chất. Khi thiếu K^+ người ta thấy có sự tăng nồng độ đường hoà tan và các hợp chất chứa nitơ, kèm theo sự giảm nồng độ tinh bột, chủ yếu do vai trò thiết yếu của kali đối với việc điều khiển hoạt động enzym trong quá trình trao đổi cacbon. Enzym ATPaza màng tế bào cũng chịu sự tác động của K^+ . ở cây trưởng thành, K^+ cần cho quá trình tổng hợp protein. K^+ còn cần thiết trong quá trình dịch mã và tổng hợp tRNA ở ribosome. Sự tổng hợp ribuloza biphosphat cacboxylaza cũng phụ thuộc rất mạnh vào nồng độ K^+ . Đây còn là ion cần thiết cho hoạt động và tổng hợp enzym nitrat reductaza.

Bên cạnh vai trò trong hoạt động của nhiều enzym, K^+ còn điều chỉnh sự cân bằng ion và pH của lục lạp trong quang hợp. K^+ là ion trung hoà quan trọng nhất cho sự đưa dòng H^+ qua màng thylakoid. Ion này cũng có mặt trong sự tạo thành gradien pH màng tế bào cần thiết cho quá trình tổng hợp ATP. Sự tăng nồng độ K^+ dẫn đến sự tăng cường quá trình quang hợp, hô hấp và hoạt động của enzym ribuloza biphosphat cacboxylaza.

Sự giãn của tế bào: Sự tăng kích thước của không bào trung tâm trong tế bào là một quá trình quan trọng trong sự giãn tế bào. Để hình thành không bào, đầu tiên là sự tăng kích thước đủ lớn của thành tế bào, tiếp theo khả năng thấm thấu của không bào tăng lên. Điều này có thể đạt được nhờ sự tích tụ K^+ gây ra sự tăng mạnh về thể tích của không bào do tính thấm. GA3 và K^+ dường như có tác dụng hỗ trợ nhau trong vai trò làm tăng chiều cao cây.

Sự cân bằng ion: K^+ có vai trò quan trọng cho việc duy trì cân bằng ion. Nó trung hoà các anion kém linh động trong tế bào chất và rất nhiều các anion linh động trong mạch xylem, libe và không bào. Trong quá trình trao đổi nitrat, K^+ có chức năng chủ yếu là vận chuyển ion NO_3^- qua những khoảng cách dài trong mạch xylem hoặc dự trữ trong không bào. Sau quá trình khử nitrat trong lá cây, lượng K^+ còn lại được sử dụng để tổng hợp các axit hữu cơ trung hoà ion K^+ . Các muối kali của các axit hữu cơ như kali malat được vận chuyển tới rễ, sau đó K^+ có thể nhận ion nitrat ở tế bào rễ và vận chuyển chúng qua mạch xylem.

f. Canxi (Ca):

Calcium cũng là một cation chủ yếu giúp cân bằng các anion trong cây nhưng cách thức không giống như K^+ và Mg^{2+} vì Ca^{2+} không phải là ion linh động. Calcium có thể liên kết các phân tử sinh học lại với nhau do đó nó góp phần vào trong cấu trúc và hoạt động sinh lí của màng tế bào và ở phần giữa của thành tế bào. Sự hoạt động của nhiều enzym khác của thực vật cũng phụ thuộc vào Ca^{2+} vì calcium là đồng yếu tố với những enzym phân giải ATP.

Trong nuôi cấy tế bào, Ca^{2+} có vai trò trong sự phát sinh hình thái đồng thời với sự cảm ứng của các chất điều hòa sinh trưởng đặc biệt là auxin và cytokinin.

Ca^{2+} là thành phần quan trọng của thành tế bào và màng tế bào. Số lượng lớn Ca^{2+} gắn trên thành tế bào đóng vai trò chủ yếu trong củng cố độ vững chắc cho thành tế bào và điều hoà cấu trúc màng tế bào.

Ion Ca^{2+} tự do có mặt trong tế bào ở nồng độ rất thấp, khoảng $1\mu M$ có tác dụng ngăn chặn sự kết tủa P vô cơ. Do hàm lượng ion Ca^{2+} trong tế bào thấp nên không có sự cạnh tranh với ion Mg^{2+} về vị trí gắn cation và tránh làm bất hoạt enzym. Ion Ca^{2+} chỉ có thể di chuyển qua màng tế bào theo một chiều (Ca^{2+} chỉ ra ngoài tế bào được nhưng không vào được), do đó đảm bảo được nồng độ ion Ca^{2+} nội bào thấp. Đặc biệt trong các tế bào lá, có một lượng lớn canxi liên kết với các không bào. Canxi cần thiết cho sự thiết lập cân bằng ion nhờ trung hoà các anion hữu cơ và vô cơ. Hầu như canxi ở dạng liên kết tạo muối oxalat. Mặc dù hợp chất này khó tan nhưng nó có vai trò duy trì nồng độ ion Ca^{2+} thấp trong lục lạp và tế bào chất. Muối canxi oxalat còn có chức năng điều chỉnh sự thẩm thấu của tế bào. Canxi có vai trò quan trọng trong quá trình nhân lên của tế bào và rễ. Ngoài ra sự phát triển của ống phẫn cũng phụ thuộc vào canxi, đây là quá trình được định hướng nhờ canxi ngoại bào. IAA tham gia vào quá trình vận chuyển canxi. Chất ức

ché auxin như TIBA cũng ức chế sự phân phối Ca^{2+} trong thực vật làm xuất hiện sự thiếu hụt canxi.

Vai trò của Ca đối với thành tế bào: Pectin là thành phần quan trọng của màng liên kết giữa các tế bào với nhau và được phân huỷ nhờ enzym polygalacturonase. Tuy nhiên, Ca ức chế mạnh hoạt động của polygalacturonaza. Hoạt động mạnh của enzym này được ghi nhận khi thiếu Ca. Nếu nồng độ Ca có đủ thì hầu hết các pectin sẽ tồn tại dưới dạng muối canxipectat. Nhờ vậy, thành tế bào có khả năng chống chịu tốt đối với hoạt động phá huỷ của enzym polygalacturonaza. Sự có mặt của ion Ca^{2+} cũng có vai trò quan trọng trong việc ngăn chặn sự xâm nhiễm nấm.

Ion Ca^{2+} có tác động lớn đến sự ổn định của màng tế bào. Sự thiếu ion Ca^{2+} sẽ làm tăng khả năng thoát ra ngoài màng tế bào của các hợp chất phân tử lượng nhỏ. Màng tế bào có thể sẽ bị phân huỷ hoàn toàn khi thiếu hụt nghiêm trọng ion Ca^{2+} . Ion Ca^{2+} có khả năng làm ổn định màng tế bào thông qua sự tương tác với các nhóm phosphat, cacboxyl của hợp chất phospholipid và protein có mặt trong màng tế bào.

Các enzym: Khác với magie là nguyên tố tham gia vào quá trình hoạt hoá của rất nhiều enzym, canxi chỉ có tác động lên một vài enzym như: amilaza và ATPaza. Ca chủ yếu kích thích các enzym màng tế bào, mà hoạt động của những enzyme này được qui định nhờ cấu trúc màng. Tuy nhiên, ion Ca^{2+} cũng có tác dụng kìm hãm một số enzym của tế bào chất. Calmodulin trong tế bào có khả năng hoạt hoá các enzym như phospholipaza bằng cách tạo thành phức của Ca^{2+} - calmodulin với enzym. Ngoài ra, người ta còn cho rằng calmodulin có vai trò trong việc vận chuyển ion Ca^{2+} tới không bào.

g. Magiê (Mg):

Magnesium là nguyên tố cần thiết cho sự sinh tổng hợp diệp lục tố và đồng thời nó cũng tham gia vào cấu trúc của một số enzym vận chuyển photphate. Ion Mg^{+} là một ion linh động, có thể khuếch tán vào trong tế bào như K^{+} vì vậy có vai trò như một cation có thể trung hòa các cation và các acid hữu cơ. Môi trường nuôi cấy mô thực vật thường chứa Mg với nồng độ không thay đổi nhiều trung bình là 6,8mM. MgSO_4 là nguồn bổ sung ion Mg^{+} duy nhất cho mô cấy.

Mg^{2+} là một ion rất linh động có khả năng hình thành phức với các nhóm chức năng khác nhau.

Vai trò Mg^{2+} của đối với quang hợp: Mg^{2+} là nguyên tử trung tâm trong phân tử chlorophyll của hệ quang hợp I và II. Trong phân tử chlorophyll, các photon được hấp thụ tạo ra dòng điện tử, từ đó tạo ra ATP và NADPH đóng vai trò quan trọng đối với cố định CO_2 . Nếu Mg^{2+} có mặt với nồng độ tối ưu thì khoảng 10 - 20% ion Mg^{2+} trong lá được cố định ở lục lạp. Nồng độ cao các ion Mg^{2+} và K^+ là cần thiết để duy trì pH khoảng 6,5 – 7,5 trong lục lạp và tế bào chất, trái với ở không bào pH chỉ vào khoảng 5- 6. Trong một chừng mực nào đó, pH xác định cấu trúc của protein và enzym nên nó ảnh hưởng đến quá trình sinh tổng hợp protein và chức năng của lục lạp.

Vai trò Mg^{2+} đối với hoạt tính của các enzym: Mg^{2+} là ion cần thiết cho cấu trúc bậc ba của nhiều phức enzym-cơ chất vì nó tạo ra dạng cấu trúc không gian phù hợp giữa enzym và cơ chất. Mg^{2+} tham gia vào quá trình tổng hợp protein với nhiều cấp độ khác nhau. Mg^{2+} tạo thành cầu nối giữa các dưới đơn vị của ribosome. Khi thiếu Mg^{2+} , các dưới đơn vị sẽ bị tách ra và quá trình tổng hợp protein bị ngừng lại. Sự hoạt động của các enzym như: RNA polymeraza tham gia vào quá trình sinh tổng hợp RNA đòi hỏi phải có mặt Mg^{2+} , do đó thiếu Mg^{2+} sẽ kìm hãm sinh tổng hợp RNA. ở lá cây, 25% protein tổng số nằm trong lục lạp, nếu thiếu Mg^{2+} thì ngay lập tức cấu trúc và chức năng của lục lạp bị ảnh hưởng.

Mg^{2+} còn quan trọng trong hoạt động của enzym ribulose biphosphat cacboxylaza. Đây là một enzym phụ thuộc nhiều vào pH và Mg^{2+} . Liên kết của Mg^{2+} với enzym làm tăng ái lực với cơ chất CO_2 và V_{max} .

Vai trò Mg^{2+} đối với chuyển hoá năng lượng: Mg là một chất không thể thiếu trong quá trình chuyển hoá năng lượng của thực vật do vai trò quan trọng của nó đối với sinh tổng hợp ATP ($ADP + P \text{ vô cơ} = ATP$), đặc biệt là ở lục lạp. Trong quá trình này, Mg^{2+} tạo thành cầu nối giữa enzym và ADP. Ngoài ra, Mg^{2+} còn có khả năng tạo phức với ATP. Enzym ATPaza vận chuyển các nhóm phosphoryl cao năng, cung cấp cho protein hoặc đường. Mặc dù Mg^{2+} có nhiều chức năng như vậy nhưng hầu như nó lại tồn tại ở dạng dự trữ trong không bào. Tại đây, nó đóng vai trò như một ion trung hoà với các anion hữu cơ và vô cơ trong việc cân bằng ion.

2.6.1.3. Các nguyên tố vi lượng (Fe, B, Cl, Co, Cu, Mn, Mo, Zn...)

Các nguyên tố vô cơ cần một lượng nhỏ nhưng không thể thiếu cho sinh trưởng của mô và tế bào thực vật được gọi là các nguyên tố vi lượng. Đó là các ion: iron (Fe),

manganese (Mn), zinc (Zn), boron (B), copper (Cu), và molybdenum (Mo). Fe dường như thích hợp hơn khi được cung cấp dưới dạng chelate Fe, và Zn được dùng bình thường trong các môi trường nuôi cấy. Các dạng muối tatrata và citrate Fe khó hòa tan và thường hay kết tủa trong môi trường. Vấn đề này có thể khắc phục bằng cách dùng diaminetetraacetic acid (EDTA)-chelate Fe thay cho citrate Fe, đặc biệt đối với quá trình tạo phôi. Tuy nhiên, các dạng chelate EDTA không hoàn toàn ổn định trong môi trường nuôi cấy dạng lỏng.

Một số môi trường nuôi cấy được làm giàu bằng cobalt (Co), iodine (I) và sodium (Na), nhưng các yêu cầu nghiêm ngặt về các nguyên tố này cho sinh trưởng của tế bào đã không được thiết lập. Nói chung, nồng độ thường được sử dụng đối với Cu và Co là 0,1 $\mu\text{mol/L}$, Fe và Mo là 1 $\mu\text{mol/L}$, I là 5 $\mu\text{mol/L}$, Zn là 5-30 $\mu\text{mol/L}$, Mn là 20-90 $\mu\text{mol/L}$ và B là 2-5100 $\mu\text{mol/L}$ được bổ sung vào môi trường nuôi cấy tùy thuộc vào yêu cầu của từng thí nghiệm.

Việc chia thành các nguyên tố vi lượng và đa lượng chủ yếu dựa trên nhu cầu của thực vật đối với các chất này. Nhu cầu của thực vật đối với các nguyên tố đa lượng là lớn hơn, với nồng độ > 0.5 mM. Các nguyên tố vi lượng được sử dụng trong môi trường ở nồng độ < 0.5 mM.

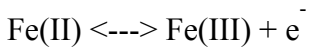
Nhu cầu của cây đối với nguyên tố vi lượng là rất thấp. Do vậy những nguyên tố này cũng có mặt trong môi trường ở các nồng độ tương ứng. Hầu hết các nguyên tố vi lượng sử dụng ở lượng nmol. Một số nguyên tố vi lượng có nhu cầu nhỏ hơn có thể thay thế dễ dàng bằng sự lẫn tạp ngẫu nhiên của chúng trong các thành phần của môi trường như agar, các chất bổ sung như nước dừa, dịch chiết nấm men (yeast extract), các muối và nước. Tầm quan trọng của một số nguyên tố vi lượng trong thành phần môi trường còn chưa được hiểu một cách rõ ràng. Co, Al, Ni... có thể có lợi đối với thực vật nhưng cũng có thể là không cần thiết. Trong thực tế, hầu hết các nguyên tố vi lượng chỉ có phần khoáng của muối (cation) là quan trọng, còn vai trò các anion có thể là không cần thiết. Ion SO_4^{2-} dư thừa trong môi trường và chủ yếu phát sinh từ các muối MgSO_4 , K_2SO_4

Nhu cầu của thực vật đối với các nguyên tố đa lượng lớn hơn. Nguyên tố đa lượng có nồng độ cao nhất trong các môi trường nuôi cấy mô và tế bào thực vật. Nhìn chung cả phần anion và cation của các nguyên tố đa lượng đều quan trọng đối với tế bào thực vật. Ví dụ như KNO_3 , cả K^+ và NO_3^- là cần thiết. Trong nhóm các nguyên tố đa lượng, các muối có chứa nitơ chủ yếu ở dạng kali nitrat, amonium hoặc calci nitrat.

a. Sắt (Fe):

Trong cây, sắt chủ yếu được gắn với các phức chất. Hàm lượng Fe^{2+} , Fe^{3+} tự do rất thấp (10^{-10} mM). Hầu hết thực vật chỉ hấp thu Fe^{2+} . Do đó, Fe^{3+} cần được khử thành Fe^{2+} ở bề mặt rễ trước khi nó được chuyển vào trong tế bào chất (chỉ một số loại cỏ là hấp thu sắt chủ yếu dưới dạng Fe^{3+}).

Trong khi vận chuyển đi xa, qua mạch xylem của cây, sắt chủ yếu được di chuyển dưới dạng hợp chất sắt-carbonhydrate (ở dạng Fe^{3+} -citrate hay dạng phức hợp sắt-peptide). Chức năng chính của sắt trong thực vật là tạo các liên kết sắt. Các chức năng cơ bản như một hệ thống oxi hoá khử thuận nghịch được biểu diễn trong phản ứng dưới đây:



Các hemoprotein (các protein chứa sắt): Các hemoprotein được biết đến nhiều nhất là các cytochrome, có chứa một phức hệ sắt-porphyrin. Các cytochrome tạo thành một phần hệ thống oxi hoá trong chuỗi truyền điện tử ở lục lạp và ty thể của tế bào thực vật.

Chức năng của các cytochrome như chất trung gian cho điện tử, cần cho quá trình khử nitrat thành nitrit nhờ enzym nitrat reductase trong quá trình đồng hoá nitơ. Trong quá trình cố định nitơ ở cây họ đậu, các cytochrome là trung gian trong chuỗi truyền điện tử qua đó các điện tử được truyền đi để cuối cùng khử N_2 thành NH_3 .

Các catalase và peroxidase tham gia vào quá trình quang hô hấp, thuỷ phân đường và khử độc của hydrogen peroxid, theo cân bằng sau:



Hydrogen peroxid được tạo ra trong quá trình khử superoxid nhằm trung hoà các gốc superoxid. Hydrogen peroxid, đến lượt nó lại được trung hoà nhờ enzym catalase.

Các peroxidase có rất nhiều trong tế bào thực vật. Thành tế bào gắn peroxidase xúc tác cho quá trình trùng hợp của phenol với lignin. Rễ chứa lượng lớn peroxid và có vai trò hấp thu sắt của cây. Lượng phenol dư thừa khi thiếu sắt sẽ được tiết ra ngoài.

Các protein sắt-lưu huỳnh: Nhóm protein chứa sắt thứ hai là các protein sắt- lưu huỳnh. Sắt được gắn trong nhóm thiol (-SH) của cystein và lưu huỳnh vô cơ. Ferridoxin là protein chứa sắt lưu huỳnh phổ biến nhất và là chất mang trong các phản ứng truyền điện tử được xúc tác bởi nitrit reductaza, sulphat reductaza, quá trình tổng hợp NADP^+ trong quang hợp và khử nitơ được thực hiện nhờ phức hệ nitrogenaza. Ba loại protein sắt

lưu huỳnh khác nhau, hoạt động liên tiếp nhau, đều nằm trong chuỗi truyền điện tử của phức hệ nitrogenaza.

Bên cạnh hai nhóm này, thực vật còn có những enzym khác có chứa sắt. Nguyên tố này cần cho các phản ứng oxi hoá khử và sự định vị của các phức hợp enzym - cơ chất.

Sắt rất quan trọng trong sinh tổng hợp chlorophyl: Trong lá xanh 80% sắt nằm trong lục lạp. Khi thiếu sắt, toàn bộ sắt sẽ tập trung ở lá.

Trong lá non, thiếu sắt sẽ dẫn đến sự giảm nhanh nồng độ chlorophyl do quá trình tổng hợp protein bị ngưng lại. Số lượng ribosom cũng giảm mạnh.

Thiếu sắt ở rễ kéo theo những thay đổi hình thái. Sự dài rễ giảm nhưng diện tích và số lượng lông rễ tăng.

b. Bo (B):

Vai trò của nguyên tố B trong sinh hóa học và sinh lí học thực vật chưa được biết nhiều. B cần thiết cho sự hoạt động của đỉnh sinh trưởng bởi vì nó có mặt trong sự sinh tổng hợp các base nitơ đặc biệt là uracil, cũng như cần thiết cho sự sinh tổng hợp lignin và acid phenolic.

Người ta có thể sử dụng nhiều nồng độ B khác nhau trong môi trường nuôi cấy từ 50-100 μ m. Thiếu B sẽ làm giảm sự sinh tổng hợp cytokinin. Sự phân chia tế bào bị kìm hãm do có sự giảm sinh tổng hợp ARN trong nhân.

Bo được hấp thu bởi rễ và được chuyển tới các bộ phận của cây nhờ các xylem. ở các màng tế bào, Bo có mặt chủ yếu ở dạng liên kết este. Không có bất cứ một enzym đã biết nào có chứa hoặc được hoạt hoá bởi Bo.

Có những chỉ dẫn cho biết Bo có mặt ở trên hoặc bên trong các màng, có thể ảnh hưởng tới hoạt động của các enzym liên kết màng. Các chức năng chủ yếu của Bo là ở ngoại bào, được phát sinh trong quá trình hoá gỗ của thành tế bào và sự phân hoá xylem.

Thành tế bào: Những liên kết este đường- Bo là một phần cấu trúc của các hemicellulose trong thành tế bào. Hầu hết Bo trong thực vật tồn tại ở dạng este trong thành tế bào của cây. Yêu cầu về Bo đối với cây hai lá mầm cao hơn so với cây một lá mầm. Có thể giả định rằng B, cũng giống như calci, có chức năng điều hoà quá trình tổng hợp thành tế bào cũng như ổn định các thành phần của thành và màng tế bào.

Sự thiếu hụt Bo ngay lập tức ức chế quá trình phát triển chiều dài của các rễ sơ cấp và thứ cấp. Hơn thế, Bo góp phần điều hoà quá trình trao đổi phenol và tổng hợp lignin.

c. Đồng (Cu):

Đồng hiện diện trong hệ thống enzym cytochrome oxidase của chuỗi vận chuyển điện tử hô hấp. Trong thực vật, đồng tồn tại dưới dạng ion hóa trị 1 và 2. Nồng độ đồng cao sẽ gây độc cho mô. Hầu hết các môi trường nuôi cấy có Cu^{2+} với hàm lượng 0,1-10 μm . Các ion đồng được bổ sung vào dưới dạng sulfate đồng, đôi khi người ta cũng có thể bổ sung đồng dưới dạng CuCl_2 hoặc CuNO_3 .

Thực vật hấp thu Mo dưới dạng MoO_4^{2-} , thường được bổ sung vào môi trường nuôi cấy với nồng độ đến 1 μm .

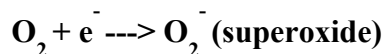
Đồng là một cation hoá trị 2 và được hấp thu vào cây dưới dạng Cu^{2+} hay dưới dạng phức chất của nó. Nếu nồng độ Cu^{2+} và phức đồng tương đương nhau, cây dường như ưa ion đồng tự do hơn.

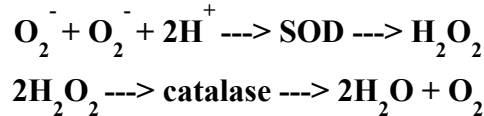
Trong xylem và phloem, đồng hầu như tồn tại dưới dạng phức, và chủ yếu là dạng một phức amino axit- đồng. Trong tế bào, đồng chủ yếu là thành phần của phức hệ enzym và rất quan trọng trong các phản ứng oxi hoá khử $[(\text{Cu}^{2+})/(\text{Cu}^+)]$ được thực hiện nhờ những enzym này. Thiếu đồng lập tức dẫn đến sự giảm hoạt độ của các enzym chứa đồng.

Vai trò của đồng đối với quang hợp: Khoảng 50% đồng trong lục lạp được gắn với plastocyanin, ở giữa chuỗi truyền điện tử, giữa quang hệ I và quang hệ II, có chứa 1 nguyên tử đồng trên 1 phân tử. Trong trường hợp thiếu đồng, nồng độ các plastocyanin sẽ bị giảm. Cũng giống như plastocyanin, các plastoquinone đóng vai trò quan trọng trong truyền điện tử giữa quang hệ I và quang hệ II. Khi đồng bị thiếu, màng lục lạp sẽ thiếu 2 protein điều hoà chuyển động của các plastoquinone. Để tổng hợp các plastoquinone cần phải có enzym laccase, đây là một enzym chứa đồng và hoạt động của nó sẽ bị giảm ngay khi thiếu đồng. Do đó, hiện tượng thiếu đồng nhanh chóng kéo theo hiện tượng giảm quang hợp.

Enzym super oxide dismutase: Cu cùng kẽm là một phần của enzym super oxide dismutaza (Cu-Zn.SOD), đóng vai trò quan trọng trong quá trình trung hoà gốc anion superoxide O_2^- hoạt tính mạnh được tạo thành trong quá trình quang hô hấp. Bên cạnh Cu-Zn.SOD, một SOD chứa mangan cũng có trong tế bào.

SOD hoá giải độc của gốc O_2^- hoạt động thành H_2O_2 và O_2 , nhờ đó bảo vệ tế bào trước khả năng phá huỷ của gốc này. SOD cùng với catalase phản ứng như sau:





Superoxide được giải độc nhờ SOD và ngay sau đó giải phóng H_2O_2 thành oxi và nước nhờ catalase.

Các enzym SOD chứa đồng - kẽm chủ yếu được tìm thấy ở chất nền stroma của lục lạp. Trong lá non, 90% SOD tập trung ở lục lạp và chỉ có 4-5 % ở ti thể. Thiếu đồng sẽ xảy ra những thay đổi trong cấu trúc lục lạp, điều này thể hiện rõ chức năng bảo vệ của đồng.

Đồng cũng đóng vai trò quan trọng trong chuỗi truyền điện tử của ti thể như cytochrome oxidase có chứa 2 nguyên tử đồng và 2 nguyên tử sắt.

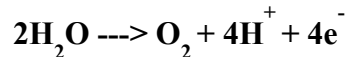
d. Mangan (Mn):

Manganese là một trong những nguyên tố vi lượng quan trọng nhất, gần như luôn có mặt trong môi trường nuôi cấy. Nồng độ của Mn trong môi trường tương đương với Fe và B. Mn có tác động hóa học tương tự như Mg^{2+} nên có thể thay thế cho Mg^{2+} trong một số hệ thống enzym.

Mangan tồn tại trong thực vật ở dạng ion Mn^{2+} không liên kết, hoá trị hai và ở dạng này nó được chuyển từ rễ qua mạch xylem đến các phần khác của cây.

Nguyên tố này liên kết chặt với một số loại protein chứa kim loại (metalloprotein), hoặc như một thành phần cấu trúc của enzym hoặc như một phần trong hệ oxi hoá khử [Mn(II)/Mn(III)].

Phản ứng Hill: Mangan có hai chức năng quan trọng trong thực vật. Ion này liên quan đến phản ứng ban đầu được gọi là phản ứng Hill của quang hệ II, trong đó nước được phân ly thành oxy và các photon, theo phương trình sau:



Có giả thiết cho rằng 4 phân tử mangan là thành phần của một protein, xúc tác cho quá trình quang phân ly nước. Các electron được giải phóng ra tiếp tục chuyển tới magie chứa trong phức hệ 680, trung tâm của quang hệ II.

Enzym super oxide dismutase: Cho đến nay mới chỉ có một vài loại enzym chứa mangan được phân lập. Enzym có chứa mangan quan trọng nhất là Mn-SOD. (Xem phần về đồng để biết thêm thông tin về SOD). Cũng giống như đồng, nếu thiếu mangan, sẽ xảy ra các thay đổi trong cấu trúc của lục lạp, thể hiện rõ nhất ở hệ thống bảo vệ của mangan.

e. Coban (Co):

Cobalt có mặt trong khoảng một nửa số lượng môi trường nuôi cấy mô tế bào thực vật. nồng độ sử dụng là 1 μm , đôi khi người ta có thể sử dụng nồng độ Cobalt cao gấp 10 lần. Cobalt là thành phần kim loại trong vitamin B12 có liên quan đến sự sinh tổng hợp acid nucleic nhưng chưa có bằng chứng nào về tác động của nó lên sự tăng trưởng và phát sinh hình thái của mô trên môi trường nuôi cấy.

Một trong những mục đích của việc bổ sung cobalt vào môi trường nuôi cấy có lẽ là chống lại sự gây độc của các chelat kim loại và có thể ngăn cản các phản ứng oxi hóa gây ra bởi đồng và sắt.

Coban đóng vai trò quan trọng trong quá trình cố định nitơ ở rễ cây họ đậu. Coban là thành phần cần thiết của enzym cobalamin. Co (III) là thành phần kim loại định vị giữa 4 nguyên tử nitơ trong cấu trúc porphyrin. Ba hệ thống enzym của vi khuẩn *Rhizobium* được biết tới có chứa Co. Người ta thấy rằng có mối liên hệ giữa nồng độ Co với sự cố định nitrogen và sự phát triển rễ củ. Co có vai trò trong quá trình tổng hợp methyonine ở vi khuẩn, tổng hợp ribonucleotide và enzym methymalonyl-coenzyme A mutaza, một enzym cần thiết cho sự tổng hợp leghemoglobin.

Không ai biết chắc rằng liệu Co có giữ vai trò gì ở thực vật bậc cao hay không. Chỉ có một enzym phụ thuộc cobalamin đã được biết tới là leucine-2,3-aminomutase ở khoai tây. Đối với thực vật bậc thấp, Co là yếu tố cần thiết và có mặt trong một số cấu trúc dưới tế bào và thylakoid ở lục lạp.

f. Molybden (Mo):

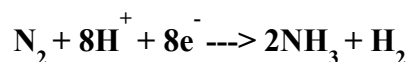
Thực vật hấp thu Mo dưới dạng MoO_4^{2-} . Molybdate thường được bổ sung vào môi trường nuôi cấy với nồng độ đến 1 μm .

Molybden chủ yếu tồn tại ở dạng MoO_4^{2-} , một dung dịch giống như nước. Trong môi trường axit yếu, ion molybden tùy thuộc vào độ axit có thể nhận 1 hoặc 2 proton theo phương trình sau:



Molybden có khả năng chuyển vận qua mạch xylem và phloem như ion MoO_4^{2-} .

Nitrogenase: Một số enzym sử dụng Mo như một co-factor. Hai loại enzym có molybden được mô tả nhiều nhất là nitrogenase và nitrate reductase. Nitrogenase liên quan đến quá trình cố định nitơ trong nốt sần ở rễ cây họ đậu nhờ vi khuẩn *Rhizobium*:



Molybden liên quan trực tiếp đến quá trình khử N_2 . Phân tử nitơ được gắn với nguyên tử molybden trong phức hệ nitrogenase. Mỗi phân tử nitơ gắn với hai nguyên tử molybden mà chính chúng lại là một phần của phân tử protein sắt-molybden. Sau quá trình hoạt hoá phức hệ enzym nitrogenase sử dụng ATP, phức hệ sắt-molybden thay đổi cấu trúc của nó. Dựa trên sự thay đổi hợp lý này, quá trình khử N_2 xảy ra.

Nitrate reductase: Nitrate reductase khử nitrat thành nitrit trong quá trình đồng hoá nitơ ở tế bào thực vật. Nitrate reductase chứa 1 phân tử heme-sắt và 2 nguyên tử molybden. Enzym này xúc tác cho quá trình khử nitrat thành nitrit. Sự hoạt động của nitrat reductase bị giảm mạnh khi thiếu molybden nhưng có thể khôi phục nhanh chóng ngay khi thêm molybden vào môi trường.

g. Kẽm (Zn):

Thiếu kẽm thì sự sinh tổng hợp protein, acid nucleic và diệp lục tố sẽ bị giảm đi. Thực vật có đọt thân ngắn, lá nhỏ, đồng thời tế bào trần cũng kém phát triển.

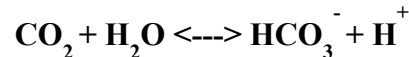
Trong thực vật có mối quan hệ gần gũi giữa Zn và nồng độ auxin nội sinh. Người ta cho rằng, kẽm là một thành phần trong enzym có liên quan đến sự tổng hợp tiền chất của IAA là tryptophan. Nồng độ của kẽm bổ sung vào trong môi trường nuôi cấy thay đổi từ 0,1-70 μm , như vậy sự dư kẽm trong môi trường nuôi cấy ít gây độc cho mô.

Kẽm được hệ rễ hấp thu dưới dạng Zn^{2+} . Trong mạch xylem nó được chuyển vận dưới dạng ion Zn^{2+} hoặc muối kẽm của một axit hữu cơ. Nguyên tố này là một hợp phần kim loại của một số enzym. Nó có thể là một cofactor cấu trúc cũng như cofactor điều hoà của phức hệ enzym.

Các enzym: Thực vật có một số loại enzym chứa kẽm, bao gồm cả enzym dehydrogen hoá rượu trong vùng mô phân sinh của cây.

Trong phức hệ enzym SOD, Zn liên kết với Cu thay cho nguyên tử nitơ từ histidine (xem thêm về SOD trong phần đồng).

Enzym cacbon anhydrase cố định CO_2 , theo cân bằng sau:



Phản ứng này giúp thực vật có thể dự trữ CO_2 dưới dạng HCO_3^- một cách thuận nghịch. Sau khi chuyển thành CO_2 , HCO_3^- có thể sử dụng làm cơ chất cho enzym ribulose biphosphate carboxylase. Enzym này có 6 tiểu phần dưới đơn vị, mỗi tiểu phần có 1 nguyên tử kẽm gắn vào và có thể tìm thấy trong lục lạp và tế bào chất.

Tổng hợp protein: Kẽm rất quan trọng trong quá trình tổng hợp protein. Thiếu kẽm gây ảnh hưởng lớn đến quá trình tổng hợp protein. Sự tập trung ribosom và sự tích lũy các tiền chất của protein như các amino axit và các amin, có thể xảy ra nhờ kẽm. Zn cần cho hoạt động của RNA polymeraza. Dưới điều kiện thông thường, RNA polymeraza chứa 2 nguyên tử Zn, tạo ra cấu trúc điển hình của enzym. Hơn nữa, có 1 mối quan hệ nghịch tương ứng giữa nồng độ Zn và hoạt động của RNase. Nồng độ Zn thấp sẽ làm tăng hoạt động của RNase.

Tổng hợp IAA: Thiếu kẽm cũng phá hỏng quá trình tổng hợp indol acetic acid trong cây (Indol ---> Tryptophan ---> Indol Acetic Acid)

Kẽm đóng vai trò quan trọng trong tổng hợp tryptophan, một tiền chất của IAA. Ví dụ, thiếu kẽm trong ngô có thể thay thế bằng cách bổ sung tryptophan.

h. Chlor (Cl):

Ion Cl^- cần thiết cho sự tăng trưởng của thực vật nhưng nó ít có mặt trong các phản ứng sinh học và có vai trò với một lượng rất nhỏ. Thông thường trong môi trường nuôi cấy mô, nồng độ Cl^- cần thiết là 3mM trung bình là 6mM. Một số loài thực vật nhạy cảm với Cl^- .

Chlor có ở thực vật dao động từ 70 đến 700 mM trong 1 kg trọng lượng khô (2000 đến 20000 mg/kg trọng lượng khô). Chlor được hấp thu dưới dạng Cl^- và rất cơ động trong cây. Chức năng chính của ion này là điều hoà thẩm thấu và bổ sung các chất mang.

Trong lục lạp có chứa hàm lượng chlor lớn. Người ta cho rằng chlor đóng vai trò hết sức quan trọng trong quang hợp.

Các lục lạp của rau chân vịt và củ cải đường chứa chlor ở nồng độ xấp xỉ 100mM nhưng trong lá, chỉ có dưới 10mM, cho thấy ưu thế rõ ràng của chlor tập hợp trong lục lạp.

Năng lực thẩm thấu: Ion Cl^- điều hoà sự đóng, mở khí khổng. Tình trạng thiếu chlor làm khí khổng mở mãi, có thể gây tình trạng mất nước nghiêm trọng.

Chlor rất quan trọng trong điều hoà năng lực thẩm thấu của các không bào và với các quá trình liên quan đến sức trương.

Sự trao đổi nitơ: Chlor hoạt hoá enzym tổng hợp asparagin, một enzym quan trọng trong quá trình trao đổi nitơ. Enzym này chuyển hoá glutamin thành asparagin và axit glutamic. Trong điều kiện có Cl^- , tốc độ của phản ứng tăng lên gấp 7 lần. Bởi thế, chlor đã thực hiện một chức năng quan trọng trong quá trình trao đổi nitơ ở các loài thực vật sử dụng asparagin như chất mang.

2.6.1. 4. Các vitamin

Tất cả các tế bào được nuôi cấy đều có khả năng tổng hợp tất cả các loại vitamin cơ bản nhưng thường là với số lượng dưới mức yêu cầu. Để mô có sức sinh trưởng tốt phải bổ sung thêm vào môi trường một hay nhiều loại vitamin. Các vitamin là rất cần thiết cho các phản ứng sinh hoá.

Thông thường thực vật tổng hợp các vitamin cần thiết cho sự tăng trưởng và phát triển của chúng. Thực vật cần vitamin để xúc tác các quá trình biến dưỡng khác nhau. Khi tế bào và mô được nuôi cấy *in vitro* thì một vài vitamin trở thành yếu tố giới hạn sự phát triển của chúng. Các vitamin được sử dụng nhiều nhất trong nuôi cấy mô là: thiamine (B1), acid nicotinic (PP), pyridoxine (B6) và myo-inositol. Thiamin là một vitamin cần bản cần thiết cho sự tăng trưởng của tất cả các tế bào. Thiamin thường được sử dụng với nồng độ biến thiên từ 0,1-10 mg/l. Acid nicotinic và pyridoxine thường được bổ sung vào môi trường nuôi cấy nhưng cũng không cần thiết cho sự tăng trưởng của tế bào nhiều loài thực vật. Acid nicotinic thường được sử dụng với nồng độ 0,1-5 mg/l, pyridoxine được sử dụng với nồng độ 0,1-10 mg/l. Myo-inositol thường được pha chung với dung dịch mẹ của vitamin. Mặc dù đây là một carbohydrate chứ không phải là vitamin, nó cũng được chứng minh kích thích cho sự tăng trưởng của tế bào đa số loài thực vật. Người ta cho rằng myo-inositol được phân tách ra thành acid ascorbic và peptine và được đồng hóa thành phosphoinositide và phosphatidylinositol có vai trò quan trọng trong sự phân chia tế bào. Myo-inositol thường được sử dụng trong môi trường nuôi cấy mô và tế bào thực vật ở nồng độ 50-5000 mg/l.

Các vitamin khác như biotin, acid folic, acid ascorbic, panthothenic acid, vitamin E (tocopherol), riboflavin và p-aminobenzoic acid cũng được sử dụng trong một số môi trường nuôi cấy. Nhu cầu vitamin trong môi trường nuôi cấy nói chung không quan trọng và chúng cũng không cản trở sự tăng trưởng của tế bào. Nói chung các vitamin này được thêm vào môi trường chỉ khi nồng độ thiamin thấp hơn nhu cầu cần thiết hoặc để cho huyền phù tế bào có thể tăng trưởng khi mật độ tế bào khởi đầu thấp.

Các vitamin sau đây được sử dụng phổ biến: inositol, thiamine HCl (B1), pyridoxine HCl (B6), nicotinic axit, trong đó vitamin B1 là không thể thiếu và được sử dụng trong hầu hết những môi trường nuôi cấy mô và tế bào thực vật. Linsmaier và Skoog đã khẳng định vitamin B1 là cần thiết cho sự sinh trưởng của cây sau khi nghiên cứu kỹ lưỡng về sự có mặt của nó trong môi trường MS. Các tác giả khác cũng khẳng định vai trò rất quan trọng của B1 trong nuôi cấy mô.

Inositol thường được nói đến như là một vitamin kích thích một cách tích cực đối với sự sinh trưởng và phát triển của thực vật, mặc dù nó không phải là vitamin cần thiết

trong mọi trường hợp. Các vitamin khác, đặc biệt là nicotinic axit (vitamin B₃), canxi pantothenate (vitamin B₅) và biotin cũng được sử dụng để nâng cao sức sinh trưởng của mô nuôi cấy.

ảnh hưởng của các vitamin lên sự phát triển của tế bào nuôi cấy in vitro ở các loài khác nhau là khác nhau hoặc thậm trí còn có hại (gây độc).

a. Vitamin B1 (Thiamine.HCl, Aneurin)

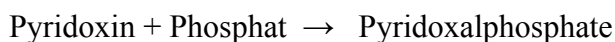
Là một chất bổ sung rất cần cho môi trường nuôi cấy. Khi khử trùng bằng cách hấp ở nhiệt độ cao vit B1 bị nhiệt phân thành pyrimidin và thiazol là hai cấu tử của vit B1, nhưng tế bào nuôi cấy có khả năng tổng hợp lại chúng thành phân tử vit B1. Vì vậy không nhất thiết phải khử trùng bằng phương thức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

b. Vitamin B2 (Riboflavin, Lactoflavin)

Có thể khử trùng bằng 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 (Pyridoxine, Adermin)

Là tiền chất của pyridoxal-phosphate-cofactor của các nhóm enzyme như carboxylase và transaminase. Khi khử trùng ở nhiệt độ cao phản ứng xảy ra như sau:



d. Myo-Inositol (Bios I)

Có vai trò trong sinh tổng hợp thành tế bào, cụ thể là sinh tổng hợp acid polygalacturonic 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 sự phân bào của một số loại mô. Chỉ sử dụng ở nồng độ rất thấp từ 0,001-0,01 ppm.

f. Acid pantothenic (Bios III, Vit B5)

Được sử dụng để làm thành phần của coenzyme A .

g. Nicotinic acid và pyridoxine thường được bổ sung vào môi trường nuôi cấy nhưng có thể thay thế bằng các vitamin khác cho sự sinh trưởng của tế bào ở nhiều loài. Các vitamin khác như folic acid, ascorbic acid, vitamin E (tocophenol), và p -aminobenzoic acid cũng được sử dụng trong nuôi cấy mô và tế bào, đặc biệt khi tế bào sinh trưởng ở mật độ quần thể rất thấp. Nói chung, các vitamin này được bổ sung trong khoảng 0,1-10,0 ppm.

2.6.1.5. Các chất bổ sung vào môi trường cấy mô

a. Amino acid và các nguồn cung cấp nitrogen khác

Mặc dù tế bào có khả năng tổng hợp tất cả các amino acid cần thiết nhưng sự bổ sung các amino acid vào môi trường nuôi cấy là để kích thích sự tăng trưởng của tế bào. Việc sử dụng amino acid đặc biệt quan trọng trong môi trường nuôi cấy tế bào và nuôi cấy tế bào trần. Amino acid cung cấp cho tế bào thực vật nguồn amino acid sẵn sàng cho nhu cầu của tế bào và nguồn nitrogen này được tế bào hấp thu nhanh hơn nitrogen vô cơ.

Các nguồn nitrogen hữu cơ thường sử dụng trong môi trường nuôi cấy tế bào thực vật là hỗn hợp amino acid như casein hydrolysate, L-glutamine, L-asparagine và adenine. Casein hydrolysate nói chung được sử dụng với nồng độ 0,05-0,1%. Khi amino acid được cung cấp riêng rẽ thì cần phải cẩn thận vì nó có thể cản trở sự tăng trưởng của tế bào. Một ví dụ về amino acid trong môi trường nuôi cấy làm tăng sự tăng trưởng của tế bào là glycine 2 mg/l, glutamine đến 8 mM, asparagine 100 mg/l, L-arginine và cysteine 10 mg/l và L-tyrosine 100 mg/l. Tyrosine cũng được sử dụng để kích thích sự phát sinh hình thái trong nuôi cấy tế bào nhưng chỉ nên sử dụng trong môi trường có agar. Cung cấp adenine sulfate vào môi trường nuôi cấy có thể kích sự tăng trưởng của tế bào nuôi cấy và kích thích mạnh sự tạo chồi.

Các mô được nuôi cấy vẫn có khả năng tổng hợp các amino acid cần thiết cho các quá trình trao đổi chất khác nhau. Mặc dù thế, việc bổ sung các amino acid vào môi trường vẫn cần thiết để kích thích sinh trưởng tế bào trong nuôi cấy protoplast và để hình thành các dòng tế bào. Không giống như các N vô cơ, các amino acid được các tế bào thực vật hấp thụ nhanh hơn. Casein hydrolysate (0,05-0,1%), L-glutamine (8 mmol/L), L-asparagine (100 mmol/L), L-glycine (2 mmol/L), L-arginine và L-cystein (10 mmol/L) là nguồn N hữu cơ thích hợp được dùng trong các môi trường nuôi cấy. Tyrosine (100 mmol/L) chỉ được dùng khi có bổ sung agar vào môi trường. Các amino acid được bổ sung riêng lẻ thường hạn chế sự sinh trưởng của tế bào trong khi hỗn hợp của chúng lại có hiệu quả hơn. Bổ sung vào môi trường adenine sulphate có thể kích thích sinh trưởng của tế bào hoặc làm tăng khả năng tạo chồi.

b. Than hoạt tính

Bổ sung than hoạt tính vào trong môi trường nuôi cấy sẽ có lợi ích và có tác dụng khử độc. Khi bổ sung than hoạt tính vào môi trường nuôi cấy thì sẽ kích thích sự tăng trưởng và biệt hóa phong lan, hành, cà rốt, cà chua, cây trường xuân nhưng lại có tác dụng cản đối với thuốc lá, đậu nành, trà mi. Than hoạt tính nói chung ảnh hưởng trên 3 mặt: hút các hợp chất cản, hút các chất điều hòa sinh trưởng hoặc làm đen môi trường. Người ta cho rằng tác dụng cản sự tăng trưởng của mô cấy khi có sự hiện diện của than hoạt tính trong môi trường là do nó hút chất điều hòa sinh trưởng có trong môi trường. NAA, kinetine, IAA, BAP, 2iP liên kết với than hoạt tính. Khả năng kích thích sự tăng trưởng của than hoạt tính là do nó kết hợp với các hợp chất phenol độc tiết ra trong thời gian nuôi cấy. Than hoạt tính thường được bổ sung vào môi trường với nồng độ 0,5-3% (w/v).

Bổ sung AC vào môi trường nuôi cấy đã kích thích sinh trưởng và phân hóa ở các loài hoa lan, cà rốt, dây trường xuân và cà chua. Ngược lại, nó gây ức chế ở thuốc lá, đậu tương và các loài thuộc chi *Camellia*. Nói chung AC được rửa acid và trung hòa trước khi bổ sung nó ở nồng độ 0,5-3% vào môi trường nuôi cấy. AC cũng giúp làm giảm độc tố bằng cách đào thải các hợp chất độc (ví dụ: phenol) được tạo ra trong quá trình nuôi cấy và cho phép tế bào sinh trưởng mà không bị trở ngại gì.

c. Nước dừa

Công bố đầu tiên về sử dụng nước dừa trong nuôi cấy mô thuộc về Van Overbeek và cộng sự (Van Overbeek cs, 1941,1942). Sau đó, tác dụng tích cực của nước dừa trong môi trường nuôi cấy mô, tế bào thực vật đã được nhiều tác giả ghi nhận. Nước dừa đã được xác định là rất giàu các hợp chất hữu cơ, chất khoáng và chất kích thích sinh trưởng (George, 1993; George, 1996). Nước dừa đã được sử dụng để kích thích phân hóa và nhân nhanh chồi ở nhiều loài cây. Nước dừa thường được lấy từ quả của các giống và cây chọn lọc để sử dụng tươi hoặc sau bảo quản. Nước dừa được một số công ty hoá chất bán dưới dạng đóng chai sau chế biến và bảo quản. Thông thường nước dừa được xử lý để loại trừ các protein, sau đó được lọc qua màng lọc để khử trùng trước khi bảo quản lạnh. Tồn dư protein trong nước dừa không gây ảnh hưởng đến sinh trưởng của mô hoặc tế bào nuôi cấy, nhưng có thể dẫn tới kết tủa dung dịch khi bảo quản lạnh. Chất cặn có thể được lọc bỏ hoặc để lắng dưới đáy bình rồi gạn bỏ phần cặn.

Nước dừa thường được sử dụng ở nồng độ từ 5 đến 20 % (v/v).

d. Bột chuối

Bột chuối khô hoặc bột nghiền từ quả chuối xanh được sử dụng trong nuôi cấy mô một số cây trồng như phong lan. Hàm lượng sử dụng vào khoảng 40g bột khô/l. Để tránh đóng cục, cần bổ sung bột vào dung dịch một cách từ từ rồi khuấy đều. Nước chiết từ khoảng 100 g thịt quả chuối xanh cũng được sử dụng bổ sung vào môi trường.

e. Một số hỗn hợp dinh dưỡng hữu cơ phức tạp khác

Nước cốt cà chua, dịch chiết khoai tây nghiền, dịch chiết mạch nha, dịch chiết nấm men (yeast extract), casein thủy phân (casein hydrolysate) cũng được sử dụng để làm tăng sự phát triển của mô sẹo hay cơ quan nuôi cấy.

f. 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 hóa học của dịch nấm men ít được chú ý phân tích. Chủ yếu chứa: đường, nucleic acid, amino acid, vitamin, auxin, muối khoáng. Tác dụng của YE với rễ rất tốt nhưng với callus thì không rõ ràng.

g. Dịch thủy phân casein (casein hydrolysate-CH)

Được sử dụng rộng rãi trong kỹ thuật vi sinh vật, ở nuôi cấy mô và tế bào thực vật chủ yếu được sử dụng làm nguồn bổ sung amino acid.

h. Hỗn hợp amino acid nhân tạo

Dựa vào những kết quả phân tích các hỗn hợp chất tự nhiên nói trên nhiều tác giả đã đề ra những công thức pha chế hỗn hợp amino 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 do yêu cầu amino acid của từng loại tế bào là không giống nhau. Trong môi trường lỏng để nuôi callus lúa và môi trường tái sinh cây lúa từ callus thì proline là một thành phần quan trọng.

i. Agar

Đối với nuôi cấy tĩnh, nếu sử dụng môi trường lỏng, mô có thể bị chìm và sẽ chết vì thiếu oxy. Để tránh tình trạng này, môi trường nuôi cấy được làm đặc lại bằng agar; một loại tinh bột được chế từ rong biển và mô được cấy trên bề mặt của môi trường. Agar thường được sử dụng ở nồng độ 0,6 đến 1%.

2.6.1.6. Các chất điều hòa sinh trưởng

Bên cạnh các chất cung cấp dinh dưỡng cho mô nuôi cấy, việc bổ sung một hoặc nhiều chất điều hòa sinh trưởng như auxin, cytokinin và gibberellin là rất cần thiết để kích thích sự sinh trưởng, phát triển và phân hoá cơ quan, cung cấp sức sống tốt cho mô và các

tổ chức. Tuy vậy, yêu cầu đối với những chất này thay đổi tùy theo loài thực vật, loại mô, hàm lượng chất điều hòa sinh trưởng nội sinh của chúng. Các chất điều hòa sinh trưởng thực vật được chia thành các nhóm chính sau đây:

a. Nhóm các auxin

Môi trường nuôi cấy được bổ sung các auxin khác nhau như: 1H- indole-3-acetic acid (IAA), 1-naphthaleneacetic acid (NAA), 1H-indole-3-butyric acid (IBA), 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) và naphthoxyacetic acid (NOA). IAA là auxin tự nhiên có trong mô thực vật; còn lại NAA, IBA, 2,4-D và NOA là các auxin nhân tạo, thường thì các auxin nhân tạo có hoạt tính mạnh hơn vì do đặc điểm phân tử của chúng nên các enzyme oxy hóa auxin (auxin-oxylase) không có tác dụng. Những auxin có hiệu lực riêng biệt trong nuôi cấy tế bào thực vật là 4-chlorophenoxyacetic acid (4-CPA) hoặc p-chlorophenoxyacetic acid (PCPA), 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid (2,4,5-T), 2-methyl-4-chlorophenoxyacetic acid (MCPA), 4-amino-3,5,6-trichloropicolinic acid (picloram), và 3,6-dichloro-2-methoxybenzoic acid (dicamba). Đặc điểm chung của các auxin là tính chất phân chia tế bào. Các hormone thuộc nhóm này có các hoạt tính như: tăng trưởng chiều dài thân, lông (giống), tính hướng (sáng, đất), tính ưu thế ngọn, tạo rễ, và phân hóa mạch dẫn. Nói chung, các auxin được hòa tan hoặc trong ethanol hoặc trong NaOH loãng.

Mặc dù, những chi tiết ở mức độ phân tử về hoạt động của auxin vẫn chưa được biết nhiều, nhưng một số nghiên cứu về di truyền và phân tử đã cung cấp những kết quả mới thú vị. Trong những năm qua, một số gen mã hóa cho các protein liên kết auxin (auxin binding proteins) đã được tạo dòng (cloning) và khảo sát các đặc điểm của chúng, và thông tin mới về gen cảm ứng auxin (auxin-induced gene) cũng đã thu được. Auxin có tác dụng hoạt hóa các ion H^+ trực tiếp hoặc gián tiếp (thông qua sự ảnh hưởng lên các enzyme) làm tăng tính đàn hồi của thành tế bào, tăng tính giãn nở của tế bào trong phản ứng với áp suất trương. Auxin cũng có ảnh hưởng ở mức độ biểu hiện gen và kích thích quá trình tạo rễ.

Các auxin có thể là auxin tự nhiên hoặc tổng hợp, thường được dùng trong nuôi cấy mô và tế bào để kích thích sự phân bào và sinh trưởng của mô sẹo, đặc biệt là 2,4-D, tạo phôi vô tính, tạo rễ,...

Auxin là nhóm chất điều hòa sinh trưởng thực vật được sử dụng thường xuyên trong nuôi cấy mô tế bào thực vật. Auxin kết hợp chặt chẽ với các thành phần khác của môi trường dinh dưỡng để kích thích sự tăng trưởng của mô sẹo, huyền phù tế bào và điều hòa sự phát sinh hình thái, đặc biệt là khi nó được phối hợp sử dụng với các cytokinin. Sự áp dụng loại và nồng độ auxin trong môi trường nuôi cấy phụ thuộc vào:

- Kiểu tăng trưởng hoặc phát triển cần nghiên cứu
- Hàm lượng auxin nội sinh của mẫu cấy

- Khả năng tổng hợp auxin tự nhiên của mẫu cây
- Sự tác động qua lại giữa auxin ngoại sinh và auxin nội sinh
- Đặc tính của auxin: Auxin có vai trò kích thích sự tăng trưởng và kéo dài tế bào.

Auxin có khả năng khởi đầu sự phân chia tế bào.. Đặc điểm chung của các auxin là tính chất phân chia tế bào. Các hormone thuộc nhóm này có các hoạt tính như: tăng trưởng chiều dài thân, long (gióng), tính hướng (sáng, đất), tính ưu thế ngọn, tạo rễ và phân hóa mạch dẫn. Nói chung các auxin được hòa tan hoặc trong ethanol hoặc trong NaOH loãng (Razdan 1994)

Các auxin liên quan tới độ dài của thân, đốt, chồi chính, rễ... Đối với nuôi cấy mô, auxin đã được sử dụng cho việc phân chia tế bào và phân hóa rễ. Những auxin dùng rộng rãi trong nuôi cấy mô là IBA (3-indolebutyric acid), IAA (3-indole acetic acid), NAA (Naphthaleneacetic acid), 2,4-D (2,4-D-Dichlorophenoxyacetic acid) và 2,4,5-T (Trichlorophenoxyacetic acid). Trong số các auxin, IBA và NAA chủ yếu sử dụng cho môi trường ra rễ và phối hợp với cytokinin sử dụng cho môi trường ra chồi. 2,4-D và 2,4,5-T rất có hiệu quả đối với môi trường tạo và phát triển callus. Auxin thường hòa tan trong ethanol hoặc NaOH pha loãng.

Vai trò của các chất thuộc nhóm auxin được khái quát dưới đây:

- Kích thích phân chia và kéo dài tế bào
 - Chồi đỉnh cung cấp auxin gây ra ức chế sinh trưởng của chồi bên. Ưu thế chồi đỉnh làm ức chế sinh trưởng của chồi nách. Nếu ngắt bỏ chồi đỉnh sẽ dẫn đến sự phát chồi nách. Nếu thay thế vai trò của chồi đỉnh (đã bị ngắt bỏ) bằng một lớp chất keo có chứa IAA thì chồi nách vẫn bị ức chế sinh trưởng. Cơ chế ức chế của chồi đỉnh liên quan đến một chất điều hòa sinh trưởng khác là ethylene. Auxin (IAA) kích thích chồi bên sản sinh ra ethylene làm ức chế sinh trưởng của chồi đỉnh.
- IAA đóng vai trò kích thích sự phân hoá của các mô dẫn (xylem and phloem).
- Auxin kích thích sự mọc rễ ở cành giâm và kích thích sự phát sinh chồi phụ trong nuôi cấy mô.
- Auxin có các ảnh hưởng khác nhau đối với sự rụng lá, quả, sự đậu quả, sự phát triển và chín của quả, sự ra hoa trong mối quan hệ với điều kiện môi trường.
- Tạo và nhân nhanh mô sẹo (callus)
- Kích thích tạo chồi bất định (ở nồng độ thấp)
- Tạo phôi soma (2,4-D)

b. Nhóm các cytokinin

Các cytokinin là dẫn xuất của adenine, đây là những hormone liên quan chủ yếu đến sự phân chia tế bào, sự thay đổi ưu thế ngọn và phân hóa chồi trong nuôi cấy mô. Các cytokinin được sử dụng thường xuyên nhất là 6-benzylaminopurine (BAP) hoặc 6-benzyladenin (BA), 6- γ - γ -dimethyl-aminopurine (2-iP), N-(2-furfurylamino)-1-H-purine-6-amine (kinetin), và 6-(4-hydroxy-3-methyl-trans-2-butanylamino)purine (zeatin). Zeatin và 2-iP là các cytokinin tự nhiên, còn BA và kinetin là các cytokinin nhân tạo. Nói chung, chúng được hòa tan trong NaOH hoặc HCl loãng.

Một số hợp chất được phát hiện trong thời gian gần đây có hoạt tính giống cytokinin là N,N'-diphenylurea (DPU), thidiaziron, N-2-chloro-4-puridyl-N-phenyl urea (CPPU) và một số dẫn xuất khác của diphenyl urea. Hiệu quả đặc biệt của các hợp chất gốc urea lên sự sinh trưởng của mô thực vật cần phải được nghiên cứu thêm.

Tỷ lệ auxin/cytokinin rất quan trọng đối với sự phát sinh hình thái (morphogenesis) trong các hệ thống nuôi cấy. Đối với sự phát sinh phôi (embryogenesis), để tạo callus và rễ cần có tỷ lệ auxin/cytokinin cao, trong khi ở trường hợp ngược lại sẽ dẫn đến sự sinh sản chồi và chồi nách. Vấn đề quan trọng không kém là nồng độ của hai nhóm chất điều khiển sinh trưởng này. Chẳng hạn 2,4-D cùng với BA ở nồng độ 5,0 ppm kích thích sự tạo thành callus ở *Agrostis* nhưng nếu dùng ở nồng độ 0,1 ppm chúng sẽ kích thích tạo chồi mặc dù trong cả 2 trường hợp tỷ lệ auxin/cytokinin là bằng 1. Cơ chế hoạt động của cytokinin là chưa được biết rõ ràng mặc dù có một số kết quả về sự có mặt của các hợp chất mang hoạt tính cytokinin trong RNA vận chuyển (transfer RNA). Các cytokinin cũng có hoạt tính tổng hợp RNA, tăng hoạt tính enzyme và protein trong các mô nhất định.

- Kinetin được phân lập từ chế phẩm DNA cũ hoặc nucleic acid mới sau khi khử trùng ở nhiệt độ cao hay đun sôi. Trong cơ thể sống 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) ở các mô không phân hóa.

Trong tự nhiên cũng tồn tại một hormone phân bào khác, Letham là người đầu tiên đã phân lập, tinh chế và cho kết tinh thành công hormone 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).

- Tương tự các cytokinin khác, zeatin cũng là một dẫn xuất của adenin. Trong thực tiễn nuôi cấy mô người ta chỉ dùng zeatin trong những trường hợp đặc biệt vì giá thành rất đắt, thường thay thế zeatin bằng kinetin hoặc một sản phẩm tổng hợp nhân tạo khác, đó là:

- 6-Benzylaminopurine (BAP): Hoạt lực của BAP cao hơn nhiều so với kinetin và bản thân BAP bền vững hơn zeatin dưới tác động của nhiệt độ cao. BAP có khả năng làm

tăng hình thành các sản phẩm thứ cấp và tăng kích thước của tế bào ở các lá mầm, kích thích sự nảy mầm của hạt và quá trình trao đổi chất.

Cytokinin liên quan tới sự phân chia tế bào, phân hóa chồi v.v... Trong môi trường nuôi cấy mô, cytokinin cần cho sự phân chia tế bào và phân hóa chồi từ mô sẹo hoặc từ các cơ quan, gây tạo phôi vô tính, tăng cường phát sinh chồi phụ.

Chức năng chủ yếu của các cytokinin được khái quát như sau:

- Kích thích phân chia tế bào
- Tạo và nhân callus
- Kích thích phát sinh chồi trong nuôi cấy mô
- Kích thích phát sinh chồi nách và kìm hãm ảnh hưởng ưu thế của chồi đỉnh
- Làm tăng diện tích phiến lá do kích thích sự lớn lên của tế bào
- Có thể làm tăng sự mở của khí khổng ở một số loài
- Tạo chồi bất định (ở nồng độ cao)
- Ức chế sự hình thành rễ
- Ức chế sự kéo dài chồi
- Ức chế quá trình già (hoá vàng và rụng) ở lá, kích thích tạo diệp lục

c. Gibberellin

Gibberellin được phát hiện vào những năm 1930. Lịch sử phát hiện nhóm hormone này bắt đầu từ 1895 khi người Nhật nói về bệnh lúa von. Năm 1926, xác định được bệnh đó là do loài nấm *Gibberella fujikuroi* gây ra. Đến những năm 30, mới phân lập và tinh chế được hoạt chất, được gọi là gibberellin. Mãi sau chiến tranh thế giới thứ II năm 1950, người Anh và người Mỹ mới biết đến công trình này của người Nhật. Tới nay, người ta đã phát hiện được trên 60 loại thuộc nhóm gibberellic acid. Loại gibberellic acid thông dụng nhất trong nuôi cấy mô thực vật là GA₃.

Trong 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, sinh lý phát triển của hoa, làm tăng sinh trưởng chiều dài của thực vật.

Nhưng trong nuôi cấy mô và tế bào thực vật tác dụng 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.

Trong số hơn 20 chất thuộc nhóm gibberellin, GA₃ là chất được sử dụng nhiều hơn cả trong thực tiễn. GA₃ kích thích kéo dài chồi và nảy mầm của phôi vô tính. So với auxin và cytokinin, gibberellin hiếm khi được dùng. GA₃ có tính hoà tan trong nước.

Gibberellin có các chức năng cơ bản sau:

- Các mô phân sinh trẻ, đang sinh trưởng, các phôi non, tế bào đầu rễ, quả non, hạt chưa chín hoặc đang nảy mầm đều có chứa nhiều gibberellic axit.
- Kích thích kéo dài chồi do tăng cường phân bào và kéo dài tế bào, ví dụ kéo dài thân và đòng lúa sau khi phun GA3, kéo dài đốt thân. Các cây lùn thường bị thiếu gibberellin.
- Phá ngủ hạt giống hoặc củ giống, ví dụ phá ngủ khoai tây sau thu hoạch.
- Kiểm soát sự ra hoa của các cây 2 năm tuổi. Năm đầu thân mầm nằm in, sau mùa đông mầm hoa kéo dài đốt rất nhanh và phân hoá hoa
- Ức chế sự hình thành rễ bất định
- Kích thích sinh tổng hợp của α -amylase ở hạt cây ngũ cốc nảy mầm, giúp tiêu hoá các chất dự trữ trong nội nhũ để nuôi mầm cây
- Các chất ức chế tổng hợp kích thích quá trình tạo củ (thân củ, thân hành và củ)
- Kích thích sự nảy mầm của phấn hoa và sinh trưởng của ống phấn
- Có thể gây tạo quả không hạt hoặc làm tăng kích thước quả nhỏ không hạt
- Có thể làm chậm sự hoá già ở lá và quả cây có múi

e. Abscisic axit (ABA)

ABA thuộc nhóm các chất ức chế sinh trưởng tự nhiên gây ra sự ngủ nghỉ của chồi, làm chậm sự nảy mầm của hạt và sự ra hoa, đóng khí khổng. ABA còn 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 nuôi cấy và mang lại hiệu quả nhất định

Trong nuôi cấy mô và tế bào, ABA có tác dụng tạo phôi vô tính, kích thích sự chín của phôi, kích thích sự phát sinh chồi ở nhiều loài thực vật. Các tác dụng cơ bản của ABA là:

- Tham gia vào sự rụng lá, hoa, quả ở hầu hết các cây trồng và gây ra sự nứt quả
- ABA thường được sản sinh khi có các yếu tố ức chế cây trồng như mất nước và nhiệt độ thấp đóng băng
- Tham gia vào sự ngủ nghỉ, kéo dài thời gian ngủ nghỉ và làm chậm sự nảy mầm của hạt
- Ức chế sự kéo dài thân và được sử dụng để kiểm soát sự kéo dài thân cành
- Gây ra sự đóng khí khổng

f. Ethylene

Các chức năng cơ bản của ethylene:

- Gây già hoá lá, kích thích sự rụng lá và quả
- Làm chín quả

- Sinh tổng hợp ethylene được tăng cường khi quả đang chín, cây đang bị úng, lão hoá, tổn thương cơ giới và bị nhiễm bệnh
- Điều khiển sự chín của một số loại quả
- Ethylene kìm hãm sự ra hoa của đa số cây. Tuy vậy, sự ra hoa của xoài, dứa, một số cây cảnh lại được kích thích bởi ethylene.
- Kích thích nở hoa, kích thích sự lão hoá của hoa và lá

Bảng 2.3. Các chất thuộc nhóm Auxin

Tên các chất	Phân tử lượng và tương đương			Chuẩn bị dung dịch, bảo quản và sử dụng				
	Phân tử lượng	Số \square M = 1mg /L	Dung môi	Pha loãng	Bảo quản khô	Bảo quản lỏng	Khử trùng	Nồng độ sử dụng (mg/L)
p-Chlorophenoxyacetic acid (4-CPA)	186.6	5.36	EtOH	—	RT	2-8 ⁰ C	CA	0.1-10.0
2,4-Dichlorophenoxyacetic acid	221	4.53	—	—	RT	2-8 ⁰ C	CA	0.01-6.0
2,4-Dichlorophenoxyacetic acid Sodium salt	243	4.12	Nước	—	RT	2-8 ⁰ C	CA	0.01-6.0
Indole-3-acetic acid Free acid (IAA)	175.2	5.71	EtOH/1N NaOH	Nước	-0 ⁰ C	-0 ⁰ C	CA/F	0.01-3.0
Indole-3-acetic acid Sodium salt	197.2	5.07	Nước	Nước	2-8 ⁰ C	-0 ⁰ C	CA/F	0.01-3.0
Indole-3-acetic acid methyl ester	189.2	5.29	—	—	2-8 ⁰ C	2-8 ⁰ C	—	—
Indole-3-acetyl-L-	290.3	3.45	0.5N	Nước	-0 ⁰ C	-0 ⁰ C	F	0.01-

aspartic acid			NaOH	c				5.0
Indole-3-butyric acid (IBA)	203.2	4.90	EtOH/ 1N NaOH	Nước c	2- 8 ⁰ C	- 0 ⁰ C	CA/ F	0.1- 10.0
Indole-3-butyric acid Potassium salt (K-IBA)	241.3	4.14		Nước	—	2- 8 ⁰ C	- 0 ⁰ C	CA/F 10.0
Alpha-Naphthalene-acetic acid Free acid (NAA)	186.2	5.37	1N NaOH	Nước	RT	2- 8 ⁰ C	CA	0.1- 10.0
Beta-Naphthoxy-acetic acid Free acid (NOA)	202.2	4.95	1N NaOH	Nước	RT	2- 8 ⁰ C	CA	0.1- 10.0
Phenylacetic acid (PAA)	136.2	7.34	EtOH	—	RT	2- 8 ⁰ C	CA/F	0.1- 50.0
Picloram	241.5	4.14	DMSO	—	RT	2- 8 ⁰ C	CA	0.01- 10.0
2,4,5-Trichlorophenoxy acetic acid (2,4,5-T)	255.5	3.91	EtOH	—	RT	2- 8 ⁰ C	CA	0.01- 5.0
2,3,5-Triiodobenzoic acid Free acid (TIBA)	499.8	2.00	1N NaOH	Nước	- 0 ⁰ C	- 0 ⁰ C	F	0.05- 5.0

Ký hiệu: CA = coautoclavable (Khử trùng cùng với các chất khác trong môi trường)

F = filter sterilize: Khử trùng bằng lọc qua phin lọc

CA/F: Khử trùng cùng với các thành phần khác của môi trường nhưng có khả năng bị mất hoạt tính ít nhiều, có thể bù đắp bằng cách bổ sung thêm hoặc khử trùng bằng lọc qua phin lọc.

Bảng 2.4. Các chất thuộc nhóm cytokinin

Tên hóa chất	Phân tử lượng và tương	Chuẩn bị dung dịch, bảo quản
---------------------	-------------------------------	-------------------------------------

	đương			và sử dụng				
	Phân tử lượng g	Số = 1mg/L	μ M Dung môi	Pha loãn g	Bảo quản	Bảo quản	Khử trùng g	Nồng độ sử dụng (mg/L)
Adenine Free base	135.1	7.40	1.0 HCl	Nước	RT	2-8 ⁰ C	CA	50-250
Adenine hemisulfate Hemisulfate salt	184.2	5.43	Nước	—	RT	2-8 ⁰ C	CA	50-250
6-Benzylaminopurine (BA)	225.3	4.44	1N NaOH	Nước	RT	2-8 ⁰ C	CA/F	0.1-5.0
6-Benzylaminopurine Hydrochloride	261.7	3.82	Nước	—	RT	2-8 ⁰ C	CA/F	0.1-5.0
6-Benzylaminopurine (BA hoặc BAP)	225.3	4.44	1N NaOH	Nước	RT	2-8 ⁰ C	CA/F	0.1-5.0
N-Benzyl-9-(2-tetrahydropyranyl)adenine (BPA)	309.4	3.23	EtOH	—	-0 ⁰ C	-0 ⁰ C	CA/F	0.1-5.0
N-(2-Chloro-4-pyridyl)-N'-phenylurea (4-CPPU)	247.7	4.04	DMSO	—	2-8 ⁰ C	2-8 ⁰ C	F	0.00-1-1.0
6-(gamma,gamma-Dimethylallylamino)purine (2iP)	203.2	4.92	1N NaOH	Nước	-0 ⁰ C	-0 ⁰ C	CA/F	1.0-30.0
6-(γ , γ -Dimethylallylamino)	203.2	4.92	1N NaOH	Nước	-0 ⁰ C	-0 ⁰ C	CA/F	1.0-30.0

purine (2iP)						C			
1,3-Diphenylurea (DPU)	212. 3	4.71	DMSO	—	RT	2- 8 ⁰	F	0.1- 1.0	
Kinetin	215. 2	4.65	1N NaOH	Nước	-0 ⁰ C	- 0 ⁰	CA/ F	0.1- 5.0	
Kinetin	215. 2	4.65	1N NaOH	Nước	-0 ⁰ C	- 0 ⁰	CA/ F	0.1- 5.0	
Kinetin	215. 2	4.65	1N NaOH	Nước	-0 ⁰ C	- 0 ⁰	CA/ F	0.1- 5.0	
Kinetin Hydrochloride	251. 7	3.97		Nước	—	-0 ⁰ C	- 0 ⁰	CA/ F	0.1- 5.0
1-Phenyl-3-(1,2,3- thiadiazol-5-yl) urea	220. 2	4.54	DMSO	—	RT	2- 8 ⁰	CA/ F	0.001 -0.05	
Trans-Zeatin base	Free 219. 2	4.56	1N NaOH	Nước	-0 ⁰ C	- 0 ⁰	CA/ F	0.01- 5.0	
Zeatin	219. 2	4.56	1N NaOH	Nước	-0 ⁰ C	- 0 ⁰	CA/ F	0.01- 5.0	
Trans-Zeatin Hydrochloride	255. 7	3.91		Nước	—	-0 ⁰ C	- 0 ⁰	CA/ F	0.01- 5.0
Trans-Zeatin riboside	351. 4	2.85	1N NaOH	Nước	-0 ⁰ C	- 0 ⁰	F	0.01- 5.0	

Ký hiệu: CA = coautoclavable (Khử trùng cùng với các chất khác trong môi trường)

F = filter sterilize: Khử trùng bằng lọc qua phin lọc .

CA/F : Khử trùng cùng với các thành phần khác của môi trường nhưng có khả năng bị mất hoạt tính ít nhiều, có thể bù đắp bằng bổ sung thêm hoặc khử trùng bằng lọc qua phin lọc.

Bảng 2.5. Nhóm các chất điều hoà sinh trưởng khác

Tên hóa chất	Phân tử lượng và tương đương			Chuẩn bị dung dịch, bảo quản và sử dụng				
	Phân tử lượng	Số μ M	Dung môi	Pha loãng	Bảo quản	Bảo quản lỏng	Khử trùng	Nồng độ sử dụng (mg/L)
(+)-cis,trans-Abscisic acid (ABA)	264.3	3.78	1N NaOH	Nước	-0 ⁰ C	-0 ⁰ C	CA/F	0.1-10.0
Ancymidol	256.3	3.90	DMSO	—	2-8 ⁰ C	-0 ⁰ C	CA/F	1.0-10.0
Chlorocholine chloride (CCC)	158.1	6.33	Nước	—	RT	2-8 ⁰ C	F	up to 500
3,6-Dichloro-o-anisic acid (Dicamba)	221.0	4.52	EtOH/Nước	—	2-8 ⁰ C	2-8 ⁰ C	F	0.01-10.0
Gibberellic acid (GA ₃)	346.4	2.89	EtOH	—	RT	2-8 ⁰ C	CA/F	0.01-5.0
Gibberellic acid Potassium salt (K-GA ₃)	384.5	2.60	Nước	—	2-8 ⁰ C	-0 ⁰ C	CA/F	0.01-5.0
Gibberellin A ₄ Free acid (GA ₄)	332.4	3.01	EtOH	—	-0 ⁰ C	-0 ⁰ C	F	0.01-5.0
(+)-Jasmonic acid	210.3	4.76	EtOH	—	2-8 ⁰ C	-0 ⁰ C	F	0.01-100.0
Phloroglucinol	126.1	7.93	Nước	—	RT	2-8 ⁰ C	CA/F	> 162

N-(Phosphonomethyl)glycine (Glyphosate)	169.	5.9	1N NaOH	Nước	RT	2-8 ⁰ C	F	—
Succinic acid dimethylhydrazide	2,2-160.	6.2	2	4	Nước	—	2-8 ⁰ C	2-8 ⁰ C CA/F 0.1-10.0

Ký hiệu: CA = coautoclavable (Khử trùng cùng với các chất khác trong môi trường)

F = filter sterilize: Khử trùng bằng lọc qua phin lọc .

CA/F : Khử trùng cùng với các thành phần khác của môi trường nhưng có khả năng bị mất hoạt tính ít nhiều, có thể bù đắp bằng bổ sung thêm hoặc khử trùng bằng lọc qua phin lọc.

Bảng 2.6. Giới thiệu tóm tắt về một số chất điều hoà sinh trưởng chính ở thực vật

A	Nhóm auxin	Chức năng trong hệ thống nuôi cấy mô
1	Indole-3-acetic acid (IAA)	- Phân chia tế bào - Tạo và nhân callus
2	Indole-3-butyric acid (IBA)	- Tạo rễ bất định(ở nồng độ cao) - Tạo chồi bất định(ở nồng độ thấp)
3	1-naphthaleneacetic acid (NAA)	- Tạo phôi soma (2,4-D) - ức chế chồi nách
4	2,4-dichlorophenoxy-acetic acid (2.4D)	
5	(2,4,5-T)	
6	Picloram	
7	Dicamba	
8	p-chlorophenoxy-acetic acid (CPA)	
9	Phenylacetic acid (PAA)	
B	Nhóm cytokinin	Chức năng trong hệ thống nuôi cấy mô
1	Kinetin	- Phân chia tế bào
2	6-Bezylamino-purine (BAP)	- Tạo và nhân callus - Kích thích bật chồi nách.
3	Zeatin (Z)	- Tạo chồi bất định (ở nồng độ cao)

4	Zeatinriboside (ZR)	- ức chế sự hình thành rễ
5	Isopentenyladenosine (iPA)	- ức chế sự kéo dài chồi. - ức chế quá trình già (hoá vàng) ở lá.
6	Isopentenyladenine (iP)	
7	Thidiazuron (TDZ)	
8	N-(2-chloro-4-pyridyl) - N-phenylurea (CPPU)	
C	Nhóm gibberellin	Chức năng trong hệ thống nuôi cấy mô
1	Gibberellic acid (GA3)	- Kéo dài chồi
2	Gibberellin 1 (GA1)	- Phá ngủ ở hạt giống.
3	Gibberellin 4 (GA4)	- ức chế sự hình thành rễ bất định.
4	Gibberellin 7 (GA7)	- Các chất ức chế tổng hợp kích thích quá trình tạo củ (thân củ, thân hành và củ).
D	Nhóm các chất ĐHST khác	Chức năng trong hệ thống nuôi cấy mô
1	<u>Ethylene</u>	- Gây già hoá lá - Làm chín quả
2	<u>Abscisic acid</u>	- Sự chín của thể phôi - Kích thích sự hình thành thân hành và thân củ - Thúc đẩy sự phát triển của tình trạng ngủ
3	<u>Nhóm Polyamine</u>	- Kích thích sự tự hình thành rễ
a	Putrescin	- Kích thích sự hình thành chồi
b	Spermidine	- Đẩy mạnh sự phát sinh thể phôi.
c	Spermine	
4	<u>Jasmonic acid (Ja)</u> <u>Methyl jasmonate (MeJa)</u>	- Kích thích sự hình thành thân củ và thân hành - Đẩy nhanh sự hình thành đỉnh sinh trưởng.

Bảng 2.7. Hướng dẫn các phương pháp pha hoá chất, khử trùng và bảo quản các chất dùng trong nuôi cấy mô và tế bào thực vật

Tên hoá chất	Dung môi hoà tan	Cách khử trùng	Nhiệt độ bảo quản
--------------	------------------	----------------	-------------------

AUXIN

2,4-D	50% EtOH	Hấp khử trùng	Nhiệt độ phòng
IAA	1N NaOH	Hấp khử trùng	-0 ⁰ C
IBA	1N NaOH	Hấp khử trùng	0-5 ⁰ C
NAA	1N NaOH	Hấp khử trùng	Nhiệt độ phòng
NAA Solution		Hấp khử trùng	0-5 ⁰ C

CYTOKININ

Adenine	H ₂ O	Hấp khử trùng	Nhiệt độ phòng
BA	1N NaOH	Hấp khử trùng	Nhiệt độ phòng
BA Commercial Grade	1N NaOH	Hấp khử trùng	Nhiệt độ phòng
Ba solution	-	Hấp khử trùng	0-5 ⁰ C
1,3-Diphenylurea	DMSO	Hấp khử trùng	Nhiệt độ phòng
2Ip	1N NaOH	Hấp khử trùng	-0 ⁰ C
2iP Solution	-	Hấp khử trùng	-0 ⁰ c
2iP Riboside		Phin lọc	-0 ⁰ c
Kinetin		Hấp khử trùng	-0 ⁰ c
Kinetin thương mại		Hấp khử trùng	-0 ⁰ c
Dung dịch kinetin		Hấp khử trùng	-0 ⁰ c
Kinetin Riboside		Phin lọc	-0 ⁰ c
Zeatin Riboside (trans)		Phin lọc	-0 ⁰ c

Các chất ĐHST khác

(±) ABA	1N NaOH	Phin lọc	-0 ⁰ c
GA ₃	50%EtOH	Hấp khử trùng	Nhiệt độ phòng
Phloroglucinol	EtOH/H ₂ O	Hấp khử trùng	Nhiệt độ phòng
Succinic Acid			

2,2-Dimethydraside	H ₂ O	Hấp khử trùng	0-5 ⁰ C
--------------------	------------------	---------------	--------------------

Kháng sinh (ANTIBIOTIC)

Amphotericin B	DMF/H ₂ O	Phin lọc	0-5 ⁰ C
----------------	----------------------	----------	--------------------

Tên hoá chất Dung môi hoà tan Cách khử trùng Nhiệt độ bảo quản

Carbenicillin	H ₂ O	Phin lọc	0-5 ⁰ C
Cefotaxime	H ₂ O	Phin lọc	0-5 ⁰ C
Chloramphenicol	EtOH/H ₂ O	Phin lọc	Nhiệt độ phòng
Gentamicin sulfate	H ₂ O	Phin lọc	0-5 ⁰ C
Kanamycin monosulfate	H ₂ O	Phin lọc	Nhiệt độ phòng
Nystatin	Insoluble	Phin lọc	-0 ⁰ C
Rifampicin	EtOH/H ₂ O/ DMSO	Phin lọc	-0 ⁰ C
Vancomycin. HCL	H ₂ O	Phin lọc	0-5 ⁰ C

Các hoá chất khác

Colchicine	H ₂ O	Phin lọc	Nhiệt độ phòng
Folic Acid	1N NaOH	Hấp khử trùng	0-5 ⁰ C
Riboflavin	H ₂ O	Phin lọc	Nhiệt độ phòng
Mannitol	H ₂ O	Hấp khử trùng	Nhiệt độ phòng
Sorbitol	H ₂ O	Hấp khử trùng	Nhiệt độ phòng
L-Tryptophan	1N NaOH	Phin lọc	Nhiệt độ phòng
MES	H ₂ O	Hấp khử trùng	Nhiệt độ phòng
Ca-Pantothenate	H ₂ O	Phin lọc	0-5 ⁰ C
Pepton	H ₂ O	Hấp khử trùng	Nhiệt độ phòng
l-Ascorbic Acid	H ₂ O	Phin lọc	Nhiệt độ phòng
Biotin	H ₂ O	Hấp khử trùng	-0 ⁰ C
Citric Acid	H ₂ O	Hấp khử trùng	Nhiệt độ phòng

EDTA (Na ₂)	H ₂ O/ Nhiệt	Hấp khử trùng	Nhiệt độ phòng
EDTA (FeNa ₂)	H ₂ O/ Nhiệt	Hấp khử trùng	Nhiệt độ phòng
Ferric Sulfate	H ₂ O/ Nhiệt	Hấp khử trùng	Nhiệt độ phòng
Ferric Tartrate	H ₂ O/ Nhiệt	Hấp khử trùng	Nhiệt độ phòng
Ferrous Sulfate	H ₂ O/ Nhiệt	Hấp khử trùng	Nhiệt độ phòng
Manganese	H ₂ O/ Nhiệt	Hấp khử trùng	Nhiệt độ phòng
Potassium Phosphate	H ₂ O/ Nhiệt	Hấp khử trùng	Nhiệt độ phòng

Bảng 2.8. Phương pháp tính tương đương giữa nồng độ phần triệu (ppm= part per million= 1 mg/l) và nồng độ phân tử gam của một số chất

Nồng độ ppm = mg/l	Nồng độ phân tử gam (x 10 ⁻⁶ M)					
	2,4-D	NAA	IAA	BA	kinetin	GA ₃
1	5. 371	4. 524	5. 708	4. 439	4. 439	2. 887
2	10. 741	9. 048	11. 417	8. 879	9. 293	5. 774
3	16. 112	13. 572	17. 125	13. 318	13. 940	8. 661
4	21. 483	18. 096	22. 834	17. 757	18. 586	11. 548
5	26. 853	22. 620	28. 542	22. 197	23. 231	14. 435
6	32. 223	27. 144	34. 250	26. 636	27. 880	17. 323
7	37. 594	31. 668	39. 959	31. 075	32. 526	20. 210
8	42. 965	36. 193	45. 667	35. 515	37. 173	23. 097
9	48. 339	40. 717	51. 376	39. 954	41. 820	25. 984
Phân tử lượng (mol Wt)	186.20	211.04	175.18	225.26	215.21	346.37

Ví dụ, cách tra bảng nồng độ của 5 ppm (5 mg/l) của IAA sẽ tương đương với nồng độ phân tử gam trên bảng là 28.542 x 10⁻⁶ M:

Nồng độ IAA: 5 ppm = 28,542 x 10⁻⁶ M

Nồng độ BA: 8 ppm = 35,515 x 10⁻⁶ M

Nồng độ NAA: 10 ppm = 10 x 5,371 x 10⁻⁶ M = 53,71 àM

Chuyển đổi đơn vị đo: $10^{-6} \text{ M} = 10^{-3} \text{ mM} = 1 \mu\text{M}$ 53

Bảng 2.9. Cách tra cứu từ nồng độ phân tử gam tính sang nồng độ phân triệu (ppm) hoặc (1 mg/l) của một số chất (ppm = 1 mg/l)

Nồng độ phân tử gam (10^{-6} M)	Nồng độ ppm = mg/l					
	NAA	2,4-D	IAA	BA	Kinetin	GA ₃
1	0.1862	0.2210	0.1752	0.2253	0.2152	0.3464
2	0.3724	0.4421	0.3504	0.4505	0.4304	0.6927
3	0.5586	0.6631	0.5255	1.6758	0.6456	1.0391
4	0.7448	0.8842	0.7007	0.9010	0.8608	1.3855
5	0.9310	1.2052	0.8759	1.1263	1.0761	1.7319
6	1.1172	1,3262	1.0511	1.3516	1.2913	2.0782
7	1.3034	1.5473	1.2263	1.5768	1.5065	2.4246
8	1.4896	1.7683	1.4014	1.8021	1.7217	2.7710
9	1.6758	1.9894	1.5766	1.0273	19369	3.1173
Mol Wt	186.20	211.04	175.18	225.26	215.21	346.37

Ví dụ:

Nồng độ kinetin $3 \times 10^{-6} \text{ M} = 0.6456 \text{ ppm}$

Nồng độ IAA $9 \times 10^{-6} \text{ M} = 1.5766 \text{ ppm}$

Cách chuyển đổi đơn vị đo khi nồng độ phân tử gam là một số lẻ:

Ví dụ: Nồng độ BA $4.5 \times 10^{-6} \text{ M} = 0.9010 \text{ ppm} + \underline{1.1263 - 0.9010} \text{ ppm}$

$= 0.9010 \text{ ppm} + 0.1127 \text{ ppm}$

$= 1.0137 \text{ ppm}$

$= \text{ppm}$

2.6.1.7. Các chất kháng sinh

Chất kháng sinh là chất được sản xuất bởi các loài vi sinh vật khác nhau, hoặc là các chất kháng sinh tổng hợp. Chúng có khả năng ngăn chặn sự sinh trưởng của các vi sinh vật khác và cuối cùng làm tiêu huỷ chúng.

Các kháng sinh (antibiotics)

Bổ sung các kháng sinh vào môi trường nuôi cấy nói chung thường được tránh do sự hiện diện của chúng trong môi trường làm chậm sinh trưởng của mô và tế bào. Tuy nhiên, một số tế bào thực vật bị nhiễm một cách hệ thống các vi sinh vật. Để ngăn chặn sinh trưởng của bọn vi sinh vật này, điều không thể thay thế là làm giàu môi trường bằng kháng sinh. Streptomycin hoặc kanamycin ở nồng độ thấp kiểm soát hiệu quả hiện tượng nhiễm có tính hệ thống và môi trường được bổ sung các kháng sinh này không gây bất lợi cho sự sinh trưởng của tế bào nuôi cấy.

Vai trò của các loại thuốc kháng sinh trong nuôi cấy mô và tế bào thực vật:

- Ngăn chặn sự lây nhiễm của các vi khuẩn vào môi trường nuôi cấy tế bào và mô thực vật
- Ngăn chặn nấm mốc và nấm men lây nhiễm vào mô, tế bào nuôi cấy
- Loại trừ các chủng vi khuẩn *Agrobacterium* dùng trong chuyển gen ra khỏi môi trường và mô nuôi cấy (sau nuôi cấy, hỗn hợp *Agrobacterium* với tế bào thực vật để chuyển gen hoàn thành).
- Sử dụng kháng sinh trong môi trường chọn lọc để chọn các tế bào hoặc mô đã được chuyển gen (mang gen chỉ thị kháng kháng sinh). Các tế bào không được chuyển gen sẽ bị chết trong môi trường có kháng sinh ở nồng độ thích hợp.

2.6.1.8. Các chất khử trùng

Sự phát triển của nấm và vi khuẩn rất bất lợi cho quá trình nuôi cấy. Để tránh điều này mẫu cấy phải được khử trùng bề mặt bằng chất khử trùng trước khi cấy. Những dung dịch dùng để khử trùng vật liệu được kê ở bảng 15 với nồng độ và thời gian thích hợp vừa đủ để tiêu diệt sự nhiễm nấm khuẩn đồng thời không làm chết mô nuôi cấy.

Quy trình khử trùng bề mặt

1. Rửa mẫu bằng chất tẩy nhẹ trước khi thao tác với dung dịch khử trùng.
2. Rửa mẫu dưới vòi nước chảy từ 10 - 30 phút.
3. Nhúng ngập mẫu vào dung dịch khử trùng trong điều kiện vô trùng. Đậy nắp lọ rồi lắc nhẹ trong thời gian khử trùng.
4. Chắt dung dịch khử trùng đi rồi rửa vài lần bằng nước cất vô trùng.

Quy trình khử trùng có thể được tăng cường thêm bằng cách:

1. Tráng vật liệu trong dung dịch cồn 70% trước khi khử trùng bằng một loại dung dịch khử trùng khác. Phương pháp hai bước (hai nguồn) này tỏ ra có hiệu quả với một số loài.

2. Sử dụng thêm dung dịch xúc tác như Tween 20 hay 80 vào dung dịch khử trùng để làm giảm trạng thái căng bề mặt và làm bề mặt mẫu có khả năng tiếp xúc tốt hơn với chất khử trùng.
3. Khử trùng trong điều kiện chân không có tác dụng đối với việc khử bọt khí và tăng thêm hiệu quả cho quá trình khử trùng.

Quy trình khử trùng thường được áp dụng:

1. Rửa mẫu dưới vòi nước chảy khoảng 30 phút.
2. Nhúng ngập mẫu trong cồn 70%.
3. Ngâm mẫu trong dung dịch CLOROX 10% cộng với 2 - 3 giọt Tween 20 trong 15 phút.
4. Ngâm mẫu trong dung dịch CLOROX 5% cộng với 2 - 3 giọt Tween 20 trong 10 phút.
5. Rửa lại mẫu 3 lần với nước cất vô trùng.

Bảng 2.10. Những dung dịch khử trùng phổ biến dùng cho nuôi cấy mô tế bào thực vật

Chất khử trùng	Nồng độ (%)	Thời gian khử trùng (phút)
Calcium hypochlorite	9 - 10	5 - 30
Sodium hypochlorite	0.5 - 5	5 - 30
Hydrogen peroxide	3 - 12	5 - 15
Bromine water	1 - 2	2 - 10
Ethyl alcohol	70 - 95	0.1 - 5.0
Silver nitrate	1	5 - 30
Murcuric choloride	0.1 - 1.0	2 - 10
Benzalkonium choloride	0.01 - 0.1	5 - 20
Antibiotics	4 - 50 mg/l	30 - 60

2.6.2. Độ pH môi trường

Tế bào và mô thực vật đòi hỏi pH tối ưu cho sinh trưởng và phát triển trong nuôi cấy. Trong khi chuẩn bị môi trường, pH có thể được điều chỉnh đến giá trị cần thiết của thí nghiệm. Độ pH ảnh hưởng đến sự di chuyển của các ion và đối với hầu hết các môi trường nuôi cấy pH 5,0-6,0 trước khi khử trùng được xem là tối ưu. Độ pH cao hơn sẽ làm cho môi trường rất rắn trong khi pH thấp lại giảm khả năng đông đặc của agar. Hầu hết các môi trường nuôi cấy nghèo đệm, vì thế chúng làm dao động giá trị pH, sự giao

động này có thể gây bất lợi cho thí nghiệm nuôi cấy dài ngày và sự sinh trưởng của các tế bào đơn hoặc các quần thể tế bào ở mật độ thấp.

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 từng môi trường nhất định và từng trường hợp cụ thể của các loài cây phải chỉnh độ pH của môi trường về mức ổn định ban đầu. Nuôi cấy callus của nhiều loài cây, pH ban đầu thường là 5,5-6,0 sau 4 tuần nuôi cấy pH đạt được giá trị từ 6,0-6,5. Đặc biệt khi sử dụng các loại phụ gia có tính kiềm hoặc tính acid cao như amino acid, vitamin thì nhất định phải phải dùng NaOH hoặc HCl loãng để chỉnh pH môi trường về từ 5,5-6,5.

Những thí nghiệm nuôi cấy tế bào đơn hay tế bào trần thì việc chỉnh độ pH là bắt buộc.

Độ pH môi trường thường được điều chỉnh từ 5,8 - 6,0 trước khi khử trùng. Nhìn chung nếu độ PH cao hơn 6 sẽ làm môi trường bị cứng và nếu thấp hơn 5 thì agar khó đông.

2.6.3. Các tác nhân làm rắn môi trường

Các tác nhân làm rắn hoặc tạo gel được sử dụng phổ biến để chuẩn bị các môi trường nuôi cấy mô dạng rắn (solid) hoặc dạng sệt (semi-solid). Trong nuôi cấy dịch lỏng mô hoặc tế bào bị ngập trong môi trường và chết do thiếu oxy. Các gel tạo một giá đỡ cho mô sinh trưởng trong điều kiện tĩnh (static conditions).

Agar là một loại polysaccharide thu được từ một số loài tảo (ngành tảo đỏ-Rhodophyta), chúng có ưu điểm hơn các tác nhân tạo gel khác. Trước tiên, gel của agar không phản ứng với các thành phần của môi trường. Thứ hai, chúng không bị thủy phân bởi các enzyme thực vật và duy trì sự ổn định ở tất cả các nhiệt độ nuôi cấy được tiến hành. Bình thường, từ 0,5-1% agar được dùng trong môi trường để tạo gel rắn chắc ở pH đặc trưng cho môi trường nuôi cấy mô và tế bào thực vật. Trong những nghiên cứu về dinh dưỡng, việc sử dụng agar được tránh bởi vì agar thương phẩm không sạch do có chứa một số ion Ca, Mg, K, Na và một số nguyên tố khác ở dạng vết. Tuy nhiên, các chất bẩn nói trên cũng có thể được loại bỏ bằng cách rửa agar với nước cất hai lần ít nhất là 24 giờ, tráng trong cồn và làm khô ở 60°C trong 24 giờ. Nói chung, ở 80°C agar ngậm nước chuyển sang trạng thái sol và ở 40°C trở về trạng thái gel. Khả năng ngậm nước của agar cao từ 6-12 g/L nước.

Gelatin ở nồng độ cao (10%) cũng có hiệu quả tạo gel nhưng bị hạn chế sử dụng bởi vì nó nóng chảy ở nhiệt độ thấp (25°C). Các hợp chất khác đã được thử nghiệm thành công bao gồm methacel, alginate, phytigel và gel-rite. Công ty FMC Corp. gần đây đã

phát triển một loại agarose được tinh sạch cao gọi là Sea Plaque(*k*), loại này có thể được dùng để phục hồi các protoplast đơn (single protoplast) trong nuôi cấy. Cellophane đục lỗ (perforated cellophane), cầu giấy lọc (filter paper bridge), bắc giấy lọc (filter paper wick), bọt polyurethane (polyurethane foam) và xấp polyester (polyester fleece) là các phương thức thay đổi giá thể được dùng trong môi trường nuôi cấy mô hoặc tế bào.

Điều thuận lợi khi làm việc với các hợp chất tạo gel nhân tạo là chúng tạo ra các gel sạch ở các nồng độ tương đối thấp (1,25-2,5 g/L) và nó có thể giúp phát hiện sự nhiễm bẩn được phát triển trong suốt thời gian nuôi cấy. Các mẫu vật sinh trưởng tốt hơn trên agar hoặc các tác nhân tạo giá thể khác phụ thuộc vào loại mô và từng loài khác nhau.

2.7. 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 2.1. 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. Môi trường B5 được thiết kế đầu tiên cho nuôi cấy callus hoặc nuôi cấy dịch huyền phù tế bào, sau đó được cải tiến và trở thành môi trường thích hợp cho nuôi cấy protoplast. Môi trường này cũng được sử dụng để tái sinh cây từ protoplast. Môi trường Chu (N6) là loại môi trường rất hiệu quả trong nuôi cấy bao phấn của lúa, được phát triển đặc biệt cho nuôi cấy bao phấn các loài hòa thảo, mặc dù trong các thí nghiệm nuôi cấy bao phấn môi trường được phát minh bởi Nitsch (1969) vẫn được dùng phổ biến hơn. Môi trường Nitsch ngày càng thích hợp và phổ biến trong nuôi cấy cây đậu tương, cỏ ba lá đỏ (red clover) và các loài legume khác. Thành phần dinh dưỡng của môi trường này đã giúp tăng sinh trưởng của tế bào trong quá trình phát sinh phôi và nuôi cấy protoplast.

Thành phần hoá học của môi trường đóng vai trò quyết định đối với thành công của nuôi cấy tế bào và mô thực vật. Mỗi loài cây, thậm chí mỗi kiểu gen, các kiểu nuôi cấy khác nhau (nuôi cấy mô sẹo, huyền phù tế bào, tế bào trần, bao phấn, hạt phấn...) có những đòi hỏi khác nhau về thành phần môi trường. Khi bắt đầu nuôi cấy mô một loài mới hoặc một giống mới, cần phải lựa chọn cho đối tượng nghiên cứu một loại môi trường cơ bản phù hợp. Cho đến nay, các nhà khoa học đã tạo ra một số lượng rất lớn các môi trường thích hợp với từng đối tượng và mục tiêu nghiên cứu. Lịch sử ra đời của các môi trường nuôi cấy mô và tế bào thực vật được liệt kê ở bảng 2, trong đó có một số môi

trường cơ bản được sử dụng rất phổ biến (bảng 3), đặc biệt là các môi trường như MS, LS, B5 và WP. Thành phần hoá học của các môi trường này được thể hiện ở các bảng 4, 5, 6 và 7. Các chất điều hoà sinh trưởng đóng vai trò quyết định đối với phát sinh hình thái, phân chia và phân hoá tế bào, hình thành mô và cơ quan như phát chồi và tạo rễ. Đôi khi thay đổi nồng độ các chất khoáng của môi trường cũng đóng vai trò quan trọng trong việc điều khiển các giai đoạn phát triển khác nhau của quá trình nuôi cấy.

Bảng 2.11. Một số môi trường cơ bản thường được sử dụng trong nuôi cấy mô và tế bào thực vật

Thành phần	Murashige & Skoog (1962)	White(1963)	Gamborg(1968)	Nitsch (1951)	Heller (1953)	Schenk & Hildeb (1972)	Nitsch & Nitsch (1967)	Kohlenba & Schmi (1975)
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	-	-	134	-	-	-	-	-
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370	720	500	250	250	400	125	185
Na_2SO_4	-	200	-	-	-	-	-	-
KCl	-	65	-	1,500	750	-	-	-
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440	-	150	25	75	200	-	166
NaNO_3	-	-	-	-	600	-	-	-
KNO_3	1,900	80	3,000	2,000	-	2,500	125	950
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	-	300	-	-	-	-	500	-
NH_4NO_3	1,650	-	-	-	-	-	-	720
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	-	16.5	150	250	125	-	-	-
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	-	-	-	-	-	300	-	-
KH_2PO_4	170	-	-	-	-	-	125	68

FeSO _{4i} 7H ₂)	27.8	-	27.8	-	-	15	27.85	27.85
Na ₂ EDTA	1	-	37.3	-	-	20	37.25	37.25
MnSO _{4i} 4H ₂ O	22.3	7	10 (1 H ₂ O)	3	0.1	10	25	25
ZnSO _{4i} 7H ₂ O	8.6	3	2	0.5	1	0.1	10	10
CuSO _{4i} 5H ₂ O	0.025	-	0.025	0.025	0.03	0.2	0.025	0.025
H ₂ SO ₄	-	-	-	0.5	-	-	-	-
Fe ₂ (SO ₄) ₃	-	2.5	-	-	-	-	-	-
NiCl _{2i} 6H ₂ O	-	-	-	-	0.03	-	-	-
CoCl _{2i} 6H ₂ O	0.025	-	0.025	-	-	0.1	0.025	-
AlCl ₃	-	-	-	-	0.03	-	-	-
FeCl _{3i} 6H ₂ O	-	-	-	-	1	-	-	-
FeC ₆ O ₅ H _{7i} 5H ₂ O	-	-	-	10	-	-	-	-
K1	0.83	0.75	0.75	0.5	0.01	1.0	-	-
H ₃ BO ₃	6.2	1.5	3	0.5	1	5	10	10
Na ₂ M ₀ O _{4i} 2H ₂ O	0.25	-	0.25	0.25	-	0.1	0.25	0.25

Bảng 2.12. Môi trường MS (Murashige & Skoog, 1962)

Murashige T. and Skoog F., 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 15, 473-497.

Muối khoáng	Nồng độ	Nồng độ	
Đa lượng	(mg/l)	Vi lượng	(mg/l)
Potassium nitrate (KNO ₃)	1,900	Manganese sulfate (MnSO ₄ .4H ₂ O)	22.3
Amonium nitrate (NH ₄ NO ₃)	1,650	Boric Acid (H ₃ BO ₃)	6.2
Calcium chloride (CaCl ₂ .H ₂ O)	440	Colbalt chloride (CoCl ₂ .6H ₂ O)	0.025
Magnesium sulfate (MgSO ₄ .7H ₂ O)	370	Cupric Sulfate (CuSO ₄ .5H ₂ O)	0.025
Potassium phosphate (KH ₂ PO ₄)	170	Ferrous sulfate (FeSO ₄ .7H ₂ O)	27.8
Potassium Iodine (KI)			0.83
Sodium molybdate (Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O)			0.25
Zinc Sulfate (ZnSO ₄ .7H ₂ O)			8.6
Na ₂ EDTA.2H ₂ O			37.2
Các chất hữu cơ			
Myo-inositol	100 mg/l	Nicotinic aAcid	0.5 mg/l
Pyridoxine HCl	0.5 mg/l	Thiamine HCl	0.1 mg/l
IAA	1-30 mg/l	Kinetin	0.04-10
Glycine (recrytallized)	2.0 g/l	Edamine	1.0 g/l
Sucrose	20 g/l	Agar	10 g/l

Bảng 2.13. Môi trường LS (Linsmaier & Skoog, 1965)

Linsmaier, E.M. and Skoog, F., 1965. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 18,100-127.

Muối khoáng		Nồng độ	Nồng độ	
Đa lượng		(mg/l)	Vi lượng	
			(mg/l)	
Amonium (NH ₄ NO ₃)	nitrate	1,650	Boric acid (H ₃ BO ₃)	6.2
Calcium (CaCl ₂ .H ₂ O)	chloride	440	Colbalt (CoCl ₂ .6H ₂ O)	chloride 0.025
Magnesium (MgSO ₄ .7H ₂ O)	sulfate	370	Cupric (CuSO ₄ .5H ₂ O)	sulfate 0.025
Potassium nitrate (KNO ₃)		1,900	Ferrous (FeSO ₄ .7H ₂ O)	sulfate 27.8
Potassium (KH ₂ PO ₄)	phospate	170	Manganese (MnSO ₄ .4H ₂ O)	sulfate 22.3
Potassium iodine (KI)				0.83
Sodium (Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O)	molybdate			0.25
Zinc sulfate (ZnSO ₄ .7H ₂ O)				8.6
Na ₂ EDTA				37.3
Các chất hữu cơ				
myo-Inositol		100 mg/l	Thiamine.HCl	0.4 mg/l
IAA		1-30 mg/l	Kinetin	0.001-10 mg/l
Sucrose		30g/l	Agar	10g/l

Các chất bổ sung (thay đổi tùy theo mục đích và đối tượng nghiên cứu)

Aminobenzoic acid	0.1 mg/l	Tyrosine	100 mg/l
Gibberellic acid	1.0 mg/l	Casein hydrolysate	1-3 g/l
Adenine sulfate	40 mg/l	Cytidylic acid	200 mg/l
Guanylic acid	200 mg/l	L-Asparagine	500 mg/l
L-Glutamine		500 mg/l	

Bảng 2.14. Môi trường B5 (Gamborg cs., 1976)

Gamborg, O.L., Murashige, T., Thorpe, T.A., and Vasil, I.K., 1976. Plant tissue culture media in vitro, 12, 473-478.

Muối khoáng	Nồng độ	Nồng độ	Nồng độ
<u>Đa lượng</u>	mg/l	<u>Vi lượng</u>	mg/l
Amonium sulfate ((NH ₄) ₂ SO ₄)	134	Boric acid (H ₃ BO ₃)	3.0
Calcium chloride (CaCl ₂ .H ₂ O)	150	Colbalt chloride (CoCl ₂ .6H ₂ O)	0.025
Magnesium sulfate (MgSO ₄ .7H ₂ O)	246	Cupric Sulfate (CuSO ₄ .5H ₂ O)	0.025
Potassium nitrate (KNO ₃)	2,528	Ferrous sulfate (FeSO ₄ .7H ₂ O)	27.8
Manganese sulfate, monohydrate (MnSO ₄ .H ₂ O)	10		
Potassium iodine (KI)		0.75	
Sodium molybdate (Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O)		0.25	
Sodium phosphate (NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O)		150	

Zinc sulfate ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$)	2.0		
$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	37.2		
Các chất hữu cơ			
myo-Inositol	100 mg/l	Nicotinic Acid	1.0 mg/l
PyridoxineHCl	1.0 mg/l	ThiamineHCl	10 mg/l
2,4-D	0.1-1.0 mg/l	Kinetin	0.1 mg/l
Sucrose	20 g/l		

Bảng 2. 15. Môi trường WPM - Woody Plant Medium

(Lloyd and McCown, 1980)

Lloyd, G. B. and McCown, B. H., 1980. Commercial Feasible Micropropagation of Mountain Laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. Proceeding of Int. Plant. Propagators Society, 30, 421-427.

Muối khoáng	Nồng độ	Nồng độ	
<u>Đa lượng</u>	mg/l	<u>Vi lượng</u>	mg/l
Amonium nitrate (NH_4NO_3)	400	Boric Acid (H_3BO_3)	6.2
Calcium nitrate ($Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$)	556	Zinc sulfate ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$)	8.6
Calcium chloride ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	96	$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	37.2
Magnesium sulfate ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	370	Cupric Sulfate ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$)	0.25
Potassium sulfate (K_2SO_4)	990	Ferrous sulfate ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$)	27.8
Potassium phosphate (KH_2PO_4)	170	Manganese sulfate ($MnSO_4 \cdot 4H_2O$)	22.3

Sodium molybdate ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 0.25

Các chất hữu cơ			
Myo-inositol	100 mg/l	Nicotinic acid	0.5 mg/l
PyridoxineHCl	0.5 mg/l	Thiamine HCl	1.0 mg/l
Glycine	2.0 mg/l	Agar	6.0 g/l
Sucrose	20 g/l		

2.8. Một số thuật ngữ cơ bản trong nuôi cấy mô và tế bào thực vật

- *Nuôi cấy mô (tissue culture)* là thuật ngữ dùng để chỉ quá trình nuôi cấy vô trùng *in vitro* các bộ phận tách rời khác nhau của thực vật. Kỹ thuật nuôi cấy mô dùng cho cả hai mục đích nhân giống và cải thiện di truyền (ví dụ: giống cây trồng), sản xuất sinh khối các sản phẩm hóa sinh, bệnh học thực vật, duy trì và bảo quản các nguồn gen quý... Các hoạt động này được bao hàm trong thuật ngữ công nghệ sinh học (biotechnology).

- *Thuật ngữ nhân giống in vitro (in vitro propagation)* hay còn gọi là vi nhân giống (micropropagation) được sử dụng đặc biệt cho việc ứng dụng các kỹ thuật nuôi cấy mô để nhân giống thực vật, bắt đầu bằng nhiều bộ phận khác nhau của thực vật có kích thước nhỏ, sinh trưởng ở điều kiện vô trùng trong các ống nghiệm hoặc trong các loại bình nuôi cấy khác.

Trong thực tế, các nhà vi nhân giống (micropropagators) dùng thuật ngữ nhân giống *in vitro* và nuôi cấy mô thay đổi cho nhau để chỉ mọi phương thức nhân giống thực vật trong điều kiện vô trùng. Thuật ngữ đồng nghĩa (synonymous) là nuôi cấy *in vitro* (*in vitro culture*).

Nhân giống *in vitro* và nuôi cấy mô bắt đầu bằng các mảnh cắt nhỏ của thực vật, sạch vi sinh vật, và được nuôi cấy vô trùng. Thuật ngữ đầu tiên dùng trong quá trình nhân giống là explant (mẫu vật) tương đương với các phương thức nhân giống khác là cutting (cành giâm), layer (cành chiết), scion (cành ghép) hoặc seed (hạt).

Năm thuật ngữ khác được dùng để chỉ các loại tái sinh sinh dưỡng (vegetative or somatic regeneration) cơ bản trong nhân giống *in vitro* và nuôi cấy mô:

- *Nuôi cấy đỉnh phân sinh (meristem-tip culture)*

Phương thức nhân giống bằng cách dùng các bộ phận rất nhỏ của đỉnh chồi (shoot-tip) bao gồm mô phân sinh đỉnh riêng rẽ (single apical meristem) và mầm lá non (young leaf primordia) để kéo dài chồi (shoot elongation) ngay sau đó. Kiểu nuôi cấy này được dùng lần đầu tiên để làm sạch *virus* (*virus-free*) ở thực vật. Nếu dùng đỉnh phân sinh không thể sống sót và tạo rễ một cách độc lập, thì có thể thay thế bằng phương thức vi ghép (micrografting).

- Sinh sản chồi nách (axillary shoot proliferation)

Kiểu nuôi cấy này sử dụng chồi của các điểm sinh trưởng bên và ngọn nơi mà sự kéo dài của chồi ngọn (elongation of terminal shoot) bị kìm hãm và sự sinh sản chồi nách được đẩy mạnh. Sự điều khiển này cho phép nhân nhanh được các chồi *in vitro* (microshoots), là các chồi có thể tách ra và tạo rễ *in vitro* để hình thành cây trong ống nghiệm (microplants), hoặc nó có thể được cắt ra riêng biệt tạo thành các cành giâm *in vitro* (microcuttings) để tạo rễ bên ngoài *in vitro*.

- Tạo chồi bất định (adventitious shoot induction)

Loại nuôi cấy này cho phép hình thành các chồi bất định hoặc trực tiếp trên mẫu vật hoặc gián tiếp từ mô callus, mà mô callus này hình thành trên bề mặt vết cắt của mẫu vật.

- Phát sinh cơ quan (organogenesis)

Thuật ngữ này dùng để mô tả quá trình phát triển các chồi, rễ bất định từ các khối tế bào callus. Quá trình này xảy ra sau thời điểm mà mẫu vật được đặt vào môi trường nuôi cấy và sự bắt đầu cảm ứng tạo callus.

- Phát sinh phôi vô tính (somatic embryogenesis)

Thuật ngữ này dùng cho sự phát triển của các phôi hoàn chỉnh từ các tế bào sinh dưỡng được sản xuất từ các nguồn mẫu vật khác nhau sinh trưởng trong nuôi cấy *in vitro*. Thuật ngữ tương đương đối với sự phát triển phôi ở thực vật sinh trưởng trong điều kiện tự nhiên là phát sinh phôi hữu tính (zygotiic embryogenesis) và phát sinh phôi vô tính (apomitiic embryogenesis).

- Bảo quản lạnh sâu (cryopreservation): Bảo quản tế bào, mô, phôi, hạt ở nhiệt độ siêu lạnh, thường là -100°C .

- Biến nạp bằng điện (electroporation): Kỹ thuật dùng dòng điện tạo những lỗ thủng trên màng tế bào để chuyển nạp những vật lạ, đặc biệt là DNA từ ngoài vào trong tế bào.

- *Biến đổi dòng giao tử (gametoclonal variation)*: Biến đổi kiểu hình không do kiểu nhân hoặc ngoại biến mà do nguồn gốc giao tử gây nên.

- *Biến nạp (transformation)*: Quá trình đưa vào và dung nạp một cách chắc chắn DNA lạ vào trong tế bào thực vật bất luận bằng cách gì để có được một biến đổi di truyền thì đều được coi là biến nạp thành công.

- *Biến nạp in vitro (in vitro transformation)*: Biến đổi di truyền ở tế bào nuôi cấy trong điều kiện *in vitro* dưới tác động của các tác nhân khác nhau như chất gây ung thư, chiếu xạ, *virus*, vi khuẩn gây biến đổi di truyền.

- *Bội thể đúng (euploid)*: Trạng thái bội thể mà tế bào có số lượng nhiễm sắc thể đúng bằng bội số của số nhiễm sắc thể đơn bội.

- *Cảm ứng (induction)*: Hormone gây tạo một loại cấu trúc, bộ phận hay một quá trình nào đó trong điều kiện *in vitro*.

- *Cấy chuyền (passage hoặc subculture)*: Chuyển tế bào, mô hay mẫu vật nuôi cấy sang bình nuôi có chứa môi trường mới pha kết hợp với tách nhỏ hoặc làm loãng mật độ để nhân số lượng.

- *Chồi hoặc rễ bất định (adventitious roots or shoots)*: Là những chồi hoặc rễ phát sinh từ những vùng khác thường, không phải là hợp tử.

- *Chủng phụ (substrain)*: Được tách và nhân từ một nhóm tế bào của một chủng với những tính trạng mà chủng bố mẹ đó không có.

- *Chủng tế bào (cell strain)*: Chủng tế bào gồm những tế bào có đặc điểm riêng biệt được chọn từ nuôi cấy khởi sinh hay dòng tế bào có trước. Thường phải nêu rõ nguồn gốc của chủng tế bào trong các công bố khoa học nhất là khi các chủng đó có nguồn gốc từ các phòng thí nghiệm khác.

- *Con lai tế bào soma (somatic cell hybrid)*: Tế bào hoặc cây hoàn chỉnh tạo được do lai tế bào trần (protoplast) với đặc tính di truyền khác nhau.

- *Dị bội (heteroploid)*: Tình trạng các tế bào trong một thí nghiệm nuôi cấy có bộ nhiễm sắc thể ở nhiều mức bội thể khác nhau. Khái niệm này dùng cho một cơ thể đa bào hay nuôi cấy gồm nhiều tế bào.

- *Dị nhân (heterokaryon)*: Một tế bào có hai hay nhiều nhân khác nhau ở trong một tế bào chất chung, thông thường là do dung hợp tế bào tạo thành.

- *Di truyền tế bào chất (cytoplasmic inheritance)*: Hiện tượng di truyền do các gen ở ngoài nhân quyết định, ví dụ: gen của lục lạp, ty thể hay plasmid.

- *Di truyền học tế bào soma (somatic cell genetics)*: Ngành khoa học chuyên nghiên cứu về di truyền của tế bào soma, phần lớn là tế bào trong nuôi cấy *in vitro*.

- *Đỉnh sinh trưởng chồi ngọn (shoot apical meristem)*: Mô chưa phân hóa hình chóp nằm trong các mầm lá ở chồi ngọn, khi tách không lớn quá 0,1 mm.

- *Độ xốp lỏng (friability)*: Tình trạng không liên kết của các tế bào thực vật trong khối mô sẹo. Mô sẹo xốp lỏng rất khó tái sinh cây hoàn chỉnh.

- *Dòng (clone)*: Tập hợp các cá thể nhân được bằng phương thức nhân giống vô tính từ một cá thể duy nhất.

- *Dòng giao tử (gametoclone)*: Những thực vật được tạo ra từ giao tử, bào tử giảm nhiễm hoặc thể giao tử.

- *Dòng tế bào (cell line)*: Khái niệm để chỉ sự nuôi cấy của những tế bào có nguồn gốc chung từ lần cấy chuyển đầu tiên.

- *Dung hợp tế bào trần (protoplast fusion)*: Kỹ thuật làm cho hai hay nhiều protoplast dung hợp với nhau thành một tế bào.

- *Đột biến (mutation)*: Biến đổi kiểu hình do thay đổi gen hay do gen mới.

- *Đồng nhân (homokaryon)*: Tế bào có chứa hai hay nhiều nhân đồng nhất về mặt di truyền ở trong một tế bào chất chung. Thường là sản phẩm hình thành sau dung hợp tế bào.

- *Già hóa (senescence)*: Biểu hiện mất khả năng phân chia của tế bào và mô trong nuôi cấy.

- *Giai đoạn I (stage I)*: Trong nhân giống *in vitro* giai đoạn I là thời kỳ khởi đầu tạo nguyên liệu vô trùng cho nuôi cấy.

- *Giai đoạn II (stage II)*: Trong nhân giống *in vitro* giai đoạn II là thời kỳ nhân nhanh về số lượng mô, phôi, rễ trong bình nuôi.

- *Giai đoạn III (stage III)*: Trong nhân giống *in vitro* giai đoạn III là thời kỳ chuẩn bị cho cây giống đủ điều kiện chuyển ra ngoài đất. Thời kỳ này bao gồm việc tạo rễ cho cây, thích nghi điều kiện ngoại cảnh và bắt đầu chuyển từ trạng thái dị dưỡng sang trạng thái tự dưỡng.

- *Giai đoạn IV (stage IV)*: Trong nhân giống *in vitro* đây là giai đoạn chuyển cây từ điều kiện bình nuôi sang điều kiện tự nhiên trồng trên đất. Có nhiều loại cây có thể chuyển trực tiếp từ giai đoạn II sang giai đoạn IV.

- *Hiện tượng bổ sung di truyền (complementation)*: Hiện tượng hai khuyết tật di truyền có khả năng hỗ trợ lẫn nhau làm cho tính trạng khiếm khuyết đó mất đi.

- *Hiệu suất bám (attachment efficiency)*: Phần trăm số tế bào bám được lên bề mặt môi trường nuôi cấy trong một thời gian nhất định.

- *Hiệu suất nuôi cấy (plating efficiency)*: Khái niệm này đồng nghĩa với hiệu suất tạo dòng, nói lên phần trăm số tế bào phát triển thành dòng khi nuôi cấy trên bề mặt môi trường.

- *Hiệu suất tạo dòng (cloning efficiency)*: Phần trăm số tế bào đã tạo được dòng khi nuôi cấy trên bề mặt môi trường.

- *Hợp bào sinh chất (cybrid)*: Tế bào sống tạo được khi dung hợp thể sinh chất (không có nhân) với một tế bào. Đó là thể lai tế bào chất.

- *Hợp bào recon (recon, reconstituted cell hay reconstructed cell)*: Hợp bào sống bình thường được tạo khi dung hợp thể nhân của tế bào này với thể nguyên sinh chất của tế bào khác.

- *Kỹ thuật vô trùng (aseptic technique)*: Qui trình ngăn ngừa sự nhiễm nấm, vi khuẩn, siêu vi khuẩn hoặc các loại vi sinh vật khác đối với nuôi cấy mô và tế bào.

- *Lai tế bào (cell hybridization)*: Sự dung hợp hai hay nhiều tế bào không giống nhau để tạo một thể tế bào hỗn hợp (synkaryon).

- *Lai tế bào soma (somatic cell hybridization)*: Quá trình dung hợp protoplast của tế bào soma động vật hay thực vật có đặc tính di truyền khác nhau.

- *Lần cấy chuyên (passage number)*: Số lần tế bào, mô hay mẫu vật nuôi cấy được cấy chuyên, qua đó có thể tính tuổi và hệ số đẳng trương của chúng.

- *Lệch bội (aneuploidy)*: Tình trạng bộ nhiễm sắc thể của tế bào mang số lượng nhiễm sắc thể khác với bội số của bộ nhiễm sắc thể đơn bội. Có thể là dư hoặc thiếu một hay nhiều nhiễm sắc thể.

- *Lưỡng bội giả (pseudodiploid)*: Lưỡng bội hay nhị bội giả là thể nhị bội, nhưng do sắp xếp mỗi nhiễm sắc thể mất khả năng tạo đôi trong khi phân bào.

- *Mật độ quần thể (population density)*: Số lượng tế bào trên đơn vị diện tích nuôi cấy hay trên đơn vị thể tích nuôi cấy.

- *Mẫu vật (explant)*: Mô được tách từ nguyên liệu ban đầu dùng để duy trì hoặc nuôi cấy.

- *Môi trường nhân tạo (chemically defined medium)*: Dung dịch dinh dưỡng dùng để nuôi cấy chỉ chứa những thành phần mà cấu trúc hóa học đã được biết.

- *Mô sẹo (callus)*: Khối mô thực vật gồm những tế bào không phân hóa, có khả năng phân chia, được phát sinh từ các tế bào đã phân hóa ít nhiều. Khi thực vật bị thương tổn thường tạo loại mô này trên vết sẹo, vì thế có tên gọi là mô sẹo.

- *Ngoại biến (epigenetic variation)*: Hiện tượng biến đổi kiểu hình, nhưng không biến đổi kiểu gen. Ngoại biến có thể do sự thay đổi của quá trình methyl hóa DNA trong quá trình phiên mã và dịch mã hay sự biến đổi sau dịch mã.

- *Nhân dòng (clonal propagation)*: Nhân giống vô tính những dòng thực vật có nguồn gốc từ một cá thể hay một mảnh cắt duy nhất, đảm bảo hoàn toàn đồng nhất về di truyền.

- *Nhân giống in vitro (in vitro propagation)*: Nhân giống một loài thực vật trong ống nghiệm (bình thủy tinh, bình plastic, hộp plastic,...) trên môi trường nhân tạo và trong điều kiện vô trùng. Đồng nghĩa với khái niệm micropropagation.

- *Nhân giống vô tính (vegetative propagation)*: Nhân giống không thông qua quá trình sinh sản hữu tính, bao gồm các kỹ thuật như: nhân giống *in vitro*, giâm các bộ phận cành, mảnh lá, đoạn rễ, chiết, ghép, tách gốc,...

- *Nhị bội (diploid)*: Tình trạng bội thể mà tế bào có từng đôi tất cả các nhiễm sắc thể, trừ nhiễm sắc thể giới tính và hoàn toàn giống bộ nhiễm sắc thể của loài đó ở ngoài tự nhiên.

- *Nhiễm biến (transfection)*: Khái niệm này trước đây được dùng trong vi sinh vật học để chỉ quá trình biến nạp gen trực tiếp bằng DNA của *virus* vào tế bào. Tới nay khái niệm này được mở rộng để chỉ quá trình biến nạp gen bằng DNA tinh khiết không phân biệt nguồn gốc.

- *Nuôi cấy đỉnh ngọn (shoot tip (apex) culture)*: Sử dụng đỉnh sinh trưởng chồi ngọn cùng với một hai mầm lá với tổng kích thước từ 0,1 đến 1,0 mm.

- *Nuôi cấy cơ quan (organ culture)*: Duy trì và phát triển toàn bộ hay một phần cơ quan động, thực vật trong điều kiện *in vitro*.

- *Nuôi cấy đỉnh sinh trưởng (meristem culture)*: Nuôi cấy mẫu mô hình chóp không lớn hơn 0,1 mm. Thường được tách từ rễ ngọn dưới kính hiển vi.

- *Nuôi cấy huyền phù (suspension culture)*: Phương thức nuôi tế bào đơn hay cụm nhiều tế bào (cell aggregate) ở trạng thái lơ lửng trong môi trường lỏng.

- *Nuôi cấy mô tissue culture*: Duy trì và sinh trưởng các loại mô trong điều kiện *in vitro* nhằm điều khiển phân hóa về hình thái và chức năng của chúng.

- *Nuôi cấy mô thực vật (plant tissue culture)*: Duy trì và nuôi dưỡng tế bào, mô, cơ quan, hay cây hoàn chỉnh của thực vật trong điều kiện *in vitro*.

- *Nuôi cấy khởi đầu, nuôi cấy sơ cấp (primary culture)*: Nuôi cấy đầu tiên khi tách tế bào, mô hoặc mẫu vật từ cơ thể ban đầu tính đến khi cấy chuyển hữu hiệu lần đầu, từ đó sẽ thu được dòng tế bào.

- *Nuôi cấy phôi (embryo culture)*: Duy trì và phát triển phôi non hoặc đã trưởng thành được phân lập từ hạt.

- *Nuôi cấy tế bào (cell culture)*: Khái niệm chỉ những nuôi cấy trong ống nghiệm (*in vitro*) của những tế bào kể cả tế bào đơn không phân hóa thành mô.

- *Phát sinh phôi vô tính (somatic embryogenesis)* : Thuật ngữ này dùng cho sự phát triển của các phôi hoàn chỉnh từ các tế bào sinh dưỡng được sản xuất từ các nguồn mẫu vật khác nhau sinh trưởng trong nuôi cấy *in vitro*. Thuật ngữ tương đương đối với sự phát triển phôi ở thực vật sinh trưởng trong điều kiện tự nhiên là phát sinh phôi hữu tính (zygotic embryogenesis) và phát sinh phôi vô tính (apomitic embryogenesis).

- *Phân hóa (differentiation)*: Quá trình chuyên môn hóa các tế bào về chức năng và hình thái để tạo ra các loại mô, cơ quan và cơ thể hoàn chỉnh.

- *Phân hóa hình thái (morphogenetic differentiation)*: Phân hóa riêng về mặt hình thái, chủ yếu nói đến sự hình thành chồi và rễ từ mô sẹo. Đồng nghĩa với phát sinh hình thái.

- *Phân hóa phôi (embryogenesis)*: Quá trình hình thành phôi (phôi hóa) và phát triển phôi.

- *Phát sinh cơ quan (organogenesis)*: Hiện tượng các cơ quan riêng biệt như chồi, lá, rễ hình thành trong nuôi cấy tế bào, mô sẹo hoặc mô khác. Hiện tượng này cũng xảy ra trong nuôi cấy tế bào động vật. Đây là kết quả của quá trình phân hóa hình thái hay phân hóa chức năng hay cả hai.

- *Phát sinh hình thái (morphogenesis)*: Hiện tượng phát sinh và phát triển các cấu trúc giống hay không giống các cơ quan như chồi, rễ, lá từ tế bào, mô sẹo hay mẫu vật nuôi cấy.

- *Sạch bệnh (pathogen free)*: Được kiểm định là không mang mầm bệnh.

- *Sạch virus (virus free)*: Được kiểm tra bằng phép thử đặc hiệu chứng tỏ không mang loại virus đặc trưng cần phát hiện.

- *Sinh sản chồi nách (axillary shoot proliferation)*: Kiểu nuôi cấy này sử dụng chồi của các điểm sinh trưởng bên và ngọn nơi mà sự kéo dài của chồi ngọn (elongation of terminal shoot) bị kìm hãm và sự sinh sản chồi nách được đẩy mạnh. Sự điều khiển này cho phép nhân nhanh được các chồi *in vitro* (microshoots), là các chồi có thể tách ra và tạo rễ *in vitro* để hình thành cây trong ống nghiệm (microplants), hoặc nó có thể được cắt ra riêng biệt tạo thành các cành giâm *in vitro* (microcuttings) để tạo rễ bên ngoài *in vitro*.

- *Tái sinh (regeneration)*: Hiện tượng tế bào hoặc mô nuôi cấy chịu tác động kích thích phân hóa thành mô, cơ quan hoặc cây hoàn chỉnh.

- *Tầng nuôi dưỡng (feeder layer) hoặc tế bào nuôi dưỡng (nurse cells)*: Lớp tế bào có thể đã bị chiếu xạ làm mất khả năng phân bào được trải bên dưới để cung cấp một số chất cần thiết cho lớp tế bào khác nuôi bên trên.

- *Tạo phôi soma (somatic embryogenesis)*: Quá trình hình thành phôi từ tế bào không phải là tế bào sinh sản hay giao tử thể trong nuôi cấy *in vitro*.

- *Tạo chồi bất định (adventitious shoot induction)*: Loại nuôi cấy này cho phép hình thành các chồi bất định hoặc trực tiếp trên mẫu vật hoặc gián tiếp từ mô callus, mà mô callus này hình thành trên bề mặt vết cắt của mẫu vật.

- *Tế bào lai (hybrid cell)*: Là tế bào có một nhân được hình thành sau dung hợp hai tế bào dẫn đến sự hình thành một nhân hỗn hợp (synkaryon).

- *Tế bào tiểu phần (microcell)*: Một phần nhỏ tế bào chứa vài ba nhiễm sắc thể, xuất hiện trong khi tiến hành kỹ thuật phá bỏ nhân tế bào.

- *Tế bào trần (protoplast)*: Tế bào bị làm mất toàn bộ thành tế bào. Khái niệm này dùng cho cả thực vật, vi khuẩn và nấm, đương nhiên ở hai trường hợp cuối khi thành tế bào chưa bị loại hoàn toàn người ta dùng khái niệm "tế bào trụ" (spheroplast).

- *Thể bào chất (cytoplast)*: Tế bào nguyên vẹn sau khi làm mất nhân.

- *Thế lai tế bào chất (cytoplasmic hybrid)*: Đồng nghĩa với hợp bào sinh chất (cybrid).

- *Thế nhân (karyoplast)*: Nhân tế bào thu được khi phân lập, được bọc bởi một lớp nguyên sinh chất rất mỏng và màng nguyên sinh.

- *Thời gian tăng đôi quần thể (population doubling time)*: Thời gian mà số lượng tế bào của dòng hay chủng nuôi cấy tăng đến gấp đôi kể từ khi bắt đầu nuôi. Số lần gấp đôi quần thể trong một đợt nuôi cấy được tính bằng công thức sau:

$$n = \log\left(\frac{N}{N_0}\right) \times 3,33$$

Trong đó, N: số tế bào trong bình nuôi cấy khi kết thúc đợt nuôi, N_0 : số tế bào trong bình khi bắt đầu nuôi. Lưu ý nên lấy số lượng tế bào sống hay bám được để tính. Thời gian tăng đôi quần thể là thời gian cần thiết để số lượng tế bào của quần thể đó tăng gấp đôi, ví dụ: từ 1.106 thành ra 2.106.

- *Tính toàn năng (totipotency)*: Một đặc tính của tế bào là có khả năng phát triển thành mọi kiểu tế bào có trong cơ thể trưởng thành mà từ đó nó được tách ra, tức là có khả năng tái sinh thành một cơ thể hoàn chỉnh.

- *Trạng thái non trẻ (juvenile)*: Một giai đoạn phát triển trong chu trình sinh sản hữu tính của thực vật, phân biệt với giai đoạn trưởng thành là không phản ứng với các tác nhân kích thích ra hoa.

- *Trạng thái tự sinh (habituation)*: Trạng thái phát triển không cần bổ sung chất điều khiển sinh trưởng ngoại sinh của một quần thể tế bào. Phân biệt với tự dưỡng.

- *Tự dưỡng (autotrophy)*: Khả năng phát triển nhờ quang hợp không cần cung cấp một nguồn dưỡng chất chứa carbon hữu cơ. Ngược với dị dưỡng là bắt buộc phải bổ sung nguồn dưỡng chất hữu cơ vào môi trường sống.

- *Tuổi thế hệ tế bào (cell generation time)*: Thời gian giữa hai lần phân chia của tế bào. Khái niệm này không đồng nghĩa với thời gian gấp đôi quần thể.

- *Ức chế sinh trưởng phụ thuộc mật độ (density-dependent inhibition of growth)*: hiện tượng ức chế sinh trưởng bởi mật độ tế bào tăng lên.

- *Vô trùng (asepsis)*: Không bị tạp nhiễm các loại vi khuẩn khác.

- Vi nhân giống (micropropagation) hay nhân giống (*in vitro* propagation) được sử dụng đặc biệt cho việc ứng dụng các kỹ thuật nuôi cấy mô để nhân giống thực vật, bắt đầu bằng nhiều bộ phận khác nhau của thực vật có kích thước nhỏ, sinh trưởng ở điều kiện vô trùng trong các ống nghiệm hoặc trong các loại bình nuôi cấy khác.

Trong thực tế, các nhà vi nhân giống (micropropagators) dùng thuật ngữ nhân giống *in vitro* và nuôi cấy mô thay đổi cho nhau để chỉ mọi phương thức nhân giống thực vật trong điều kiện vô trùng. Thuật ngữ đồng nghĩa (synonymous) là nuôi cấy *in vitro* (*in vitro* culture).

Nhân giống *in vitro* và nuôi cấy mô bắt đầu bằng các mảnh cắt nhỏ của thực vật, sạch vi sinh vật, và được nuôi cấy vô trùng. Thuật ngữ đầu tiên dùng trong quá trình nhân giống là explant (mẫu vật) tương đương với các phương thức nhân giống khác là cutting (cành giâm), layer (cành chiết), scion (cành ghép) hoặc seed (hạt).

Chương 3. THU NHẬN VÀ NUÔI CÂY PHÔI IN VITRO

3.1. Phôi soma

Được hình thành không thông qua quá trình tạo mô sẹo được gọi là phôi vô tính, tế bào phôi vô tính có thể được tạo ra trực tiếp và nhân sinh khối bằng hệ thống nuôi cấy thích hợp. Những tế bào phôi vô tính này có khả năng tái sinh thành cây hoàn chỉnh hoặc được dùng làm nguyên liệu sản xuất hạt giống nhân tạo với lớp bao alginate. Phôi vô tính được xem như kỹ thuật mang lại nhiều hiệu quả cao trong nhân giống cây trồng.

3.1.1. Sự phát sinh phôi soma

Những tế bào trong phôi hợp tử biểu hiện được gen cần thiết cho chương trình phát triển phôi. Giai đoạn trước khi hình thành tế bào phôi soma được gọi là tế bào tiền phôi. Tế bào tiền phôi phân chia để hệ thống tế bào phôi trực tiếp gọi là sự phát sinh tế bào phôi trực tiếp.

Có nhiều tế bào phát sinh tế bào phôi không cần chất kích thích st, có nhiều tế bào cần Auxin để tiến hành phân bào trước khi phát sinh tế bào phôi. Có nhiều tế bào hình thành phôi từ mô sẹo, trong trường hợp này sự phát sinh phôi soma được tiến hành gián tiếp.

Hai danh từ tế bào tiền phôi PEDC (Preembryogenic determined cell) và tế bào phát sinh phôi IEDC (induced embryogenic determined cell) dùng để phân loại mô, nhưng thực chất là 1 quá trình tiếp nối nhau, kết thúc sự phát triển là sự hệ thống những tế bào phôi (EC- Embryogenic cell).

Những tế bào ở những mô có quan hệ với sự sinh sản như hạt phấn, chồi mầm có khả năng hệ thống tế bào phôi dễ dàng hơn những tế bào ở những mô trưởng thành. Khi mô có chứa tế bào phôi, kích thích sự phân chia tế bào trong giai đoạn này là cần thiết để duy trì tình trạng phôi và hình thành tế bào phôi soma.

Tế bào sinh phôi có thể hệ thống ở những tế bào bình thường được nuôi cấy trên môi trường có auxin và có thể không có cytokinin. Lượng cytokinin có trong tế bào cao thường phát sinh phôi thấp. Khi một tế bào phôi được thu nhận, sự có mặt của auxin sẽ gây tổn hại đến sự pt bt của phôi. Những nhân tố khác ảnh hưởng đến sự pt của phôi như tỉ lệ đạm amonium và nitrate trong môi trường và pH thấp .. Hay sự lặp đi lặp lại chu kì phát sinh phôi có thể bị phá vỡ do sự giảm hay bỏ hẳn auxin ra khỏi môi trường.

Sự hình thành phôi thông qua 2 con đường PEDC và IEDC. Con đường PEDC là con đường phát sinh phôi không qua quá trình tạo mô sẹo và IDEC là con đường thông qua quá trình tạo mô sẹo.

Có 2 bước dẫn đến sự hệ thống phôi:

1. Sự biệt hoá của tế bào có khả năng phát sinh phôi
2. Sự phát triển của những tế bào phôi mới hệ thống.

Như vậy có hai môi trường cần thiết cho nuôi cấy phôi:

1. Môi trường cần cho sự phát sinh tế bào phôi
2. Môi trường cần cho sự phát triển những tế bào này thành những tế bào có khả năng phát sinh phôi.

Bước 1 cần có mặt auxin và bước 2 phải giảm thấp hay không có mặt của auxin. Có hai yếu tố quan trọng trong phát sinh phôi: Auxin và nitrogen.

Phát sinh phôi soma là kiểu mẫu của tính toàn thể, có thể khảo sát toàn bộ tiến trình biệt hoá của tế bào cũng như cơ chế thể hiện tính toàn năng của tế bào thực vật.

3.1.2. Thiết lập hệ thống phát sinh phôi đồng nhất và hiệu suất cao

Một hệ thống thích hợp đã được thiết lập cho mục đích nghiên cứu trên qua việc dùng tế bào dung dịch huyền phù cà rốt. Những cụm tế bào phôi được chọn lọc sau khi lọc qua lưới để loại bỏ những cụm tế bào to và được ly tâm trong dung dịch Ficoll và được cấy chuyển sang môi trường không có auxin và có zeatin ($10^{-7}M$). Phát sinh phôi đồng nhất xảy ra từ những cụm tế bào có tần suất khoảng 90% phát sinh phôi. Hệ thống này cho thấy thích hợp để nghiên cứu tiến trình phát sinh phôi từ những cụm tế bào có khả năng phát sinh phôi, được gọi là những cụm tế bào giai đoạn 1. Tuy nhiên từ những cụm tế bào này có thể biệt hoá tạo phôi trong môi trường có auxin và không có chất nào khác, phát sinh phôi có thể ghi nhận được thông qua xác định những cụm tế bào có khả năng phát sinh phôi ở giai đoạn 1. Như vậy tiến trình hình thành những cụm tế bào giai đoạn 1 từ những tế bào đơn rất quan trọng để phân tích tiến trình phát sinh phôi. Một hệ thống được yêu cầu là có tần suất phát sinh phôi cao từ những tế bào đơn.

Những tế bào đơn có kích thước nhỏ, tròn và tế bào chất đậm đặc được gọi là những tế bào giai đoạn 0, thu nhận được qua lọc, rây. Những tế bào giai đoạn 0 được nuôi cấy trên môi trường có 2,4 D ($5.10^{-8}M$) trong 6 ngày và được chuyển sang môi trường không có auxin, tế bào phôi hình thành với tần suất cao. Xử lý tế bào trước với auxin cho thấy là cần thiết và zeatin ($10^{-6}M$), Manitol ($10^{-3} M$) và O_2 cao (40%) có tác dụng thúc đẩy phát sinh phôi. Hệ thống này là một hệ thống có hiệu quả cho phép nghiên cứu tiến trình phát sinh phôi soma từ những tế bào đơn. Những tế bào giai đoạn 0 được nuôi cấy trên môi trường không có auxin cho thấy mất khả năng thể hiện tính toàn thể, trong khi

ngược lại; những tế bào giai đoạn 0 được nuôi cấy trên môi trường có auxin được cấy chuyển sang môi trường không có auxin và biệt hóa hình thành phôi với tần suất cao, thể hiện được tính toàn thể.

3.2. Tính bất hợp của giao tử trước và sau khi thụ tinh

3.2.1. Tính bất hợp của giao tử trước khi thụ tinh

- Thụ phấn (pollination): Là sự tiếp nhận các hạt phấn từ bao phấn tới núm nhụy để thực hiện thụ tinh ở hoa. Ở thực vật hạt kín có hai phương thức thụ phấn là thụ phấn chéo và tự thụ phấn.

- Thụ tinh (fertilization): Ở thực vật, thụ tinh là sự kết hợp của hai giao tử đực và cái (tinh trùng và noãn) thành hợp tử (phôi, bào tử hoặc hạt) là đặc trưng cơ bản của sinh sản hữu tính, sinh sản lưỡng tính. Ở thực vật hạt kín có phương thức thụ tinh kép.

Trong tự nhiên quá trình thụ phấn của thực vật thường xảy ra theo trình tự sau: hạt phấn chín rơi lên núm nhụy, nảy mầm và tạo ra ống phấn. Ống phấn xuyên dọc theo nhụy và tiếp cận tới noãn. Lúc này hai tinh tử đơn bội ($1n$) của hạt phấn vào tới noãn và thực hiện quá trình thụ tinh kép: Một tinh tử kết hợp với tế bào noãn đơn bội tạo thành hợp tử nhị bội ($2n$) sau phát triển thành phôi, tinh tử còn lại kết hợp với tế bào nội nhũ nhị bội tạo ra hợp bào nội nhũ tam bội ($3n$) để nuôi phôi.

Nếu một hạt phấn lạ (khác loài) rơi lên núm nhụy thì lập tức nhụy sẽ tạo ra một chất ức chế sự phát triển của ống phấn hoặc làm biến dạng ống phấn ngăn cản sự thụ tinh. Đó chính là tính bất hợp giao tử trước khi thụ tinh.

3.2.2. Tính bất hợp giao tử sau khi thụ tinh

Trong một số trường hợp khác, khi hạt phấn của loài lạ rơi lên núm nhụy, ống phấn vẫn mọc bình thường và quá trình thụ tinh xảy ra, nhưng hạt không phát triển được. Nguyên nhân chủ yếu là giữa nội nhũ và phôi đã hình thành một cơ chế ức chế sự phát triển của phôi. Đây là trường hợp hay gặp khi tiến hành lai xa (lai khác loài và khác chi).

3.3. Thụ phấn *in vitro*

Tính bất hợp của giao tử có thể khắc phục bằng kỹ thuật thụ phấn trong ống nghiệm. Điều kiện cơ bản là phải nuôi cấy thành công bầu quả hay noãn phân lập và chủ động điều khiển quá trình nảy mầm của hạt phấn trong môi trường nuôi cấy vô trùng.

Thụ phấn và thụ tinh ở điều kiện *in vitro* tạo ra cơ hội sản xuất các phôi lai giữa các loài thực vật không thể lai bằng các phương pháp gây giống cây trồng truyền thống.

Trong tự nhiên, lai khác chi (intergeneric) và lai khác loài (interspecific) rất khó thành công do có các hàng rào gây trở ngại cho sự sinh trưởng của ống phấn trên núm nhụy hoặc vòi nhụy. Trong những trường hợp như thế cả vòi nhụy hoặc một phần của nó có thể được tách ra và hạt phấn hoặc được đặt trên bề mặt vết cắt bầu quả hoặc chuyển qua lỗ trên thành vòi nhụy đến bầu quả. Kỹ thuật này được gọi là thụ phấn bên trong bầu (intraovarian pollination) và được ứng dụng thành công ở nhiều loài như *Papaver somniferum*, *Eschscholtzia californica*, *Argemone mexicana* và *A. ochroleuca*. Một hướng khác nhằm vượt qua các hàng rào để ống phấn sinh trưởng là thụ phấn trực tiếp các noãn *in vitro* (*in vitro* ovular pollination) hoặc các noãn được tách cùng giá noãn (placenta) gọi là thụ phấn giá noãn *in vitro* (*in vitro* placental pollination). Thụ phấn giá noãn cũng đã được ứng dụng thành công để vượt qua tính tự bất hợp (self-incompatibility) ở *Petunia axillaris*. Các kỹ thuật khác được phát triển nhằm loại bỏ các hàng rào của giai đoạn tiền hợp tử để thụ tinh, bao gồm: thụ phấn nụ (bud pollination), thụ phấn gốc (stub pollination), xử lý nhiệt vòi nhụy, chiếu xạ và thụ phấn tổ hợp.

Phát triển hạt thông qua thụ phấn *in vitro* các noãn trần được mô tả như là “thụ tinh trong ống nghiệm” (test-tube fertilisation), trong khi quá trình tạo hạt nhờ thụ phấn núm nhụy của nhụy hoa hoàn chỉnh nuôi cấy *in vitro* được xem như là “thụ phấn *in vitro*” (*in vitro* pollination). Ở hai quá trình này, sự thụ tinh của trứng xuất hiện bên trong noãn bởi các giao tử được phân phối nhờ ống phấn. Ngược lại, hiện tượng “thụ tinh trong ống nghiệm” ở các hệ thống động vật đòi hỏi sự dung hợp *in vitro* của các trứng tách rời nhờ các tinh tử bơi tự do (free floating sperms) còn gọi là giao tử đực. Thực tế, các giao tử đực ở thực vật không bơi tự do mà được phân phối nhờ ống phấn. Thuật ngữ chung “thụ phấn *in vitro*” được dùng cho thụ phấn noãn (ovular pollination-gắn hạt phấn vào các noãn tách rời), thụ phấn bầu quả (ovarian pollination-gắn hạt phấn vào các bầu tách rời), thụ phấn giá noãn (placental pollination-gắn hạt phấn vào các noãn dính trên giá noãn) và thụ phấn núm nhụy (stigmatic pollination-gắn hạt phấn vào núm nhụy) dưới các điều kiện *in vitro*.

Thụ phấn trong ống nghiệm nghĩa là thực hiện quá trình tạo hợp tử không phụ thuộc vào cơ thể mẹ. Công việc này bao gồm các bước sau:

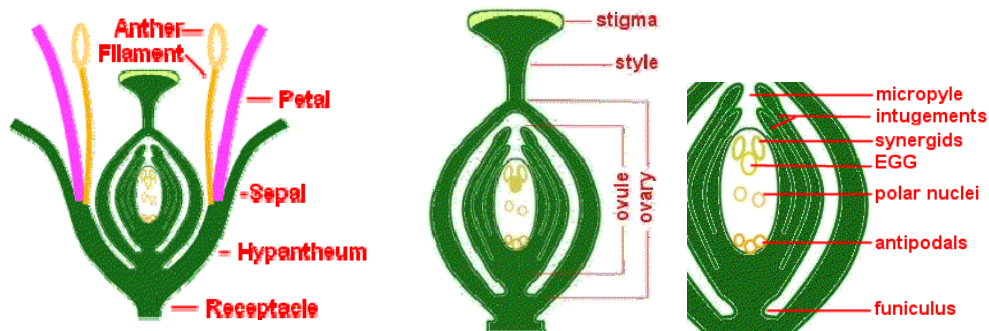
- Kích thích hạt phấn nảy mầm.
- Kích thích sinh trưởng ống phấn.
- Nuôi noãn và thụ tinh noãn.
- Nuôi hợp tử thành hạt.

Một thời gian dài phương pháp thụ phấn *in vitro* chỉ thành công ở một số đối tượng thuộc họ thuốc phiện (Papaveraceae), họ cẩm chướng (Caryophyllaceae) và họ cà (Solanaceae). Ở các họ này do bầu quả chứa nhiều noãn nên tương đối dễ nuôi cấy.

Ở họ Hòa thảo (Poaceae) bầu quả chỉ có một noãn rất khó nuôi cấy, đồng thời hạt phần cũng khó kích thích nảy mầm. Tuy nhiên, sau gần mười năm tập trung nghiên cứu người ta cũng đã thu được một số kết quả trên các đối tượng hòa thảo; Sladkas và Havel (1976) bước đầu nghiên cứu trên cây ngô (*Zea mays*); Nitzsche và Hennig (1976) nuôi thành công bầu quả của *Lobium* thụ phấn với *Festuca*; Glunewald (1976) thụ phấn *in vitro* thành công noãn đại mạch bằng hạt phần của mạch đen (*Hordeum*) và lúa mì (*Triticum*).

3.3.1. Phương pháp thụ phấn *in vitro*

3.3.1.1. Nguyên liệu



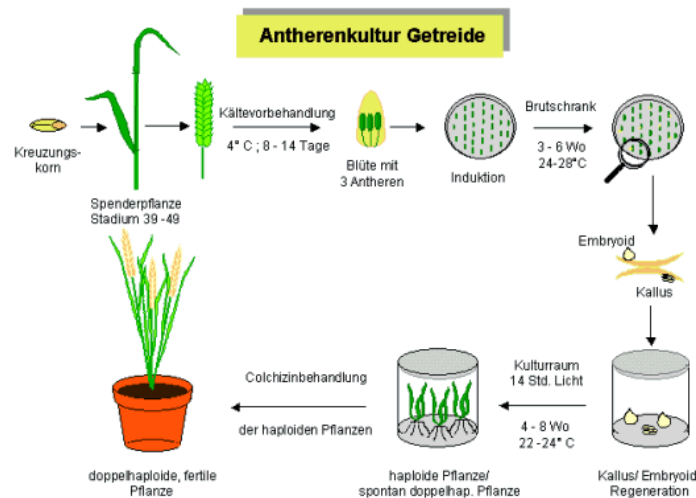
Hình 3.1. Cấu tạo của hoa, bầu quả và phôi

Các bầu quả (ovaries) có nhiều noãn (ovules) là nguyên liệu thực nghiệm tốt nhất. Ở các loài thuộc họ Solanaceae (*Nicotiana tabacum*, *N. alata*, *N. rustica*, *Petunia hybrida*), họ Papaveraceae (*Papaver somniferum*, *Eschscholtzia californica*, *Argemone mexicana*) và họ Caryophyllaceae (*Melandrium album*, *M. rubrum*, *Agrostemma githago*, *Dianthus caryophyllus*), giá noãn được bao phủ bởi hàng trăm noãn. Do có một số lượng lớn noãn không bị tổn thương khi phân lập giá noãn, nên đã góp phần vào thành công trong thụ phấn *in vitro* của chúng và sự phát triển cơ bản của hạt. Một nguyên liệu không thể thay thế khác là hạt phần (pollen), cần phải tạo ra sự sinh trưởng tốt của ống phấn trong nuôi cấy, sự nảy mầm của hạt phần *in vitro* có thể gặp khó khăn ở một số họ nhưng có thể khắc phục bằng cách ngâm noãn (ví dụ: *Brassica oleracea*) một ngày trước khi thụ phấn trong CaCl_2 1% là nhân tố thích hợp cho sinh trưởng của ống phấn.

Một số vấn đề quan trọng không thể bỏ qua trong thụ phấn trong ống nghiệm là: tuổi bao phấn, cách giải phẫu bao phấn, sự nảy mầm của ống phấn trong noãn, khả năng sống sót của noãn và sự thụ tinh bên trong túi phôi. Sự xâm nhập hoàn toàn của ống phấn vào lỗ noãn có thể quan sát được bằng kính hiển vi.

3.3.1.2. Khử trùng nguyên liệu

Các nụ hoa chỉ sử dụng cho nuôi cấy trước khi bao phần ở giai đoạn nứt ra. Các nhụy hoa (pistils) sau khi loại bỏ đài và tràng hoa, hoặc các bầu quả riêng rẽ, được khử trùng sơ bộ bằng cách rửa nhanh với EtOH 70%, khử trùng bề mặt bằng các tác nhân thích hợp, và cuối cùng rửa sạch bằng nước cất vô trùng. Bầu quả sau đó được bóc vỏ cẩn thận bằng dao mổ, forcep, hoặc kim để lộ phần noãn gắn vào giá noãn. Giá noãn hoàn toàn, hoặc một phần của nó có mang noãn, được dùng trong thụ phấn giá noãn. Để thực hiện thụ phấn núm nhụy *in vitro*, các nhụy được tách rời và khử trùng cẩn thận bề mặt bằng dung dịch khử trùng và sau đó thấm khô núm nhụy.



Hình 3.2. Quy trình nuôi cấy bao phần cây lúa

Phân lập hạt phần ở điều kiện vô trùng, bao phần được loại bỏ khỏi nụ hoa hoặc các hoa đã mở được giữ trong các đĩa petri có giấy lọc vô trùng cho tới khi nứt ra, các hạt phần sau đó được đặt trong các noãn nuôi cấy, giá noãn hoặc núm nhụy tùy thuộc vào bản chất thí nghiệm. Nói chung, hạt phần được đặt trực tiếp lên bộ phận nhụy nuôi cấy tốt hơn khi dàn trải trên môi trường chung quanh noãn.

3.3.1.3. Nuôi cấy noãn và bầu quả

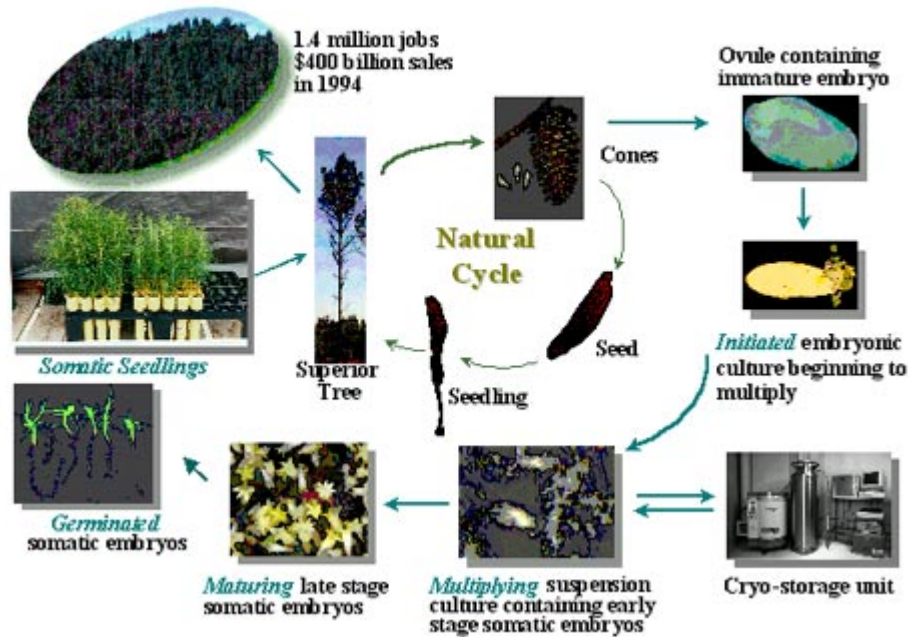
- **Noãn.** Sinh trưởng của ống phần gắn trên noãn trần (bare ovules) thường bị ức chế bởi sự có mặt của nước trên bề mặt của noãn. Màng nước này phải được làm khô bằng giấy lọc và sau đó, noãn khô ráo được phủ bằng hạt phần. Các hạt phát triển từ các noãn có phôi hình cầu hoặc phôi giả có thể dễ dàng phân biệt, một số kết quả đã đạt được

ở *Gynandrophát sinhis gynandra*, *Impatiens balsamina*, *Nicotiana tabacum* và *Allium cepa*. Tuy nhiên, các noãn sau khi thụ phần *in vitro* mang hợp tử đơn bào (single-celled zygote) cần các điều kiện sinh trưởng phức tạp hơn. Kỹ thuật cho các noãn tự thụ phần hoặc thụ phần chéo là giống nhau. Trong sự phát triển ở các giai đoạn phát sinh phôi tiếp theo thì noãn tự thụ phần thường được giữ trên giá noãn cho tới khi tạo thành hạt, trong khi ngược lại noãn thụ phần chéo cần giá noãn chỉ từ 6-8 ngày nuôi cấy đầu tiên. Sau đó, chúng có thể được chuyển tới môi trường nuôi không có giá noãn.

- **Bầu quả.** Kỹ thuật nuôi cấy bầu quả được phát triển bởi Nitsch (1951), ông đã nuôi thành công bầu quả tách từ các hoa thụ phần *in vitro* để phát triển thành quả chín (*Cucumis* và *Lycopersicum*). Các quả này mang hạt có thể nảy mầm được nhưng chúng có kích thước nhỏ hơn các quả phát triển ở điều kiện tự nhiên. Các tác giả khác cũng đã nuôi cấy thành công các noãn tách rời từ một số loài (*Linaria macroccana*, *Tropaeolum majus*, *Iberis amara*, *Hyoscyamus niger*) trên môi trường chứa muối khoáng và sucrose. Bổ sung vitamin B vào môi trường giúp quả đạt kích thước bình thường và các hạt có thể nảy mầm được. Các môi trường nuôi cấy ngày càng giàu dinh dưỡng hơn do bổ sung IAA hoặc nước dừa, thậm chí cho quả có kích thước lớn hơn các quả hình thành trong điều kiện *in vivo* (*Anethum graveolens*).

Thành phần bao hoa như mày hoa và lá bắc có vai trò quan trọng trong sự phát triển của quả và phôi ở cây một lá mầm. Các bầu quả tách rời sớm sau khi đã thụ phần của *Triticum aestivum* và *T. spelta* chỉ phát triển trong quá trình nuôi cấy khi bao hoa được duy trì nguyên vẹn. Nếu thiếu nhân tố này, sự tổng hợp DNA và kéo dài tế bào của các tế bào phôi lúa mạch có thể xảy ra nhưng sự phân chia tế bào không xuất hiện.

Reforestation & Somatic Embryogenesis



Hình 3.3 Quy trình nhân nhanh giống cây rừng bằng nuôi cấy phôi từ hạt

3.3.2. Các nhân tố ảnh hưởng sự hình thành hạt sau khi thụ phấn *in vitro*

3.3.2.1. Trạng thái sinh lý của mẫu vật

Trạng thái sinh lý của nhụy ở thời điểm tách rời noãn ảnh hưởng đến sự hình thành hạt sau khi thụ phấn *in vitro*. Bề mặt noãn hoặc núm nhụy (trong thụ phấn núm nhụy) ẩm ướt có thể ảnh hưởng xấu đến nảy mầm của hạt phấn hoặc phát triển của ống phấn và tiếp theo đó là hình thành hạt kém. Sự nảy mầm của hạt phấn trên núm nhụy và sự sinh trưởng của ống phấn dọc theo vòi nhụy có ảnh hưởng đến sự tổng hợp các protein, là các nhân tố đôi khi có thể ức chế hoàn toàn ống phấn trong bầu quả. Do đó, cần phải xác định bộ phận nào của nhụy tồn tại hàng rào ngăn cản. Để cải thiện khả năng thụ phấn *in vitro*, mức độ bất hợp phải được giảm xuống bằng cách tách bộ phận tổng hợp các protein ức chế và thụ phấn trực tiếp phần còn lại của nhụy dưới các điều kiện thí nghiệm.

Thời gian tách noãn khỏi nhụy ảnh hưởng đến sự hình thành hạt sau khi thụ phấn *in vitro*. Các noãn được tách ra sau khi nở hoa từ 1-2 ngày cho khả năng hình thành hạt cao hơn khi tách noãn vào ngày ra hoa. Ở ngô và bông, thụ phấn *in vitro* sau khi xuất hiện râu tơ từ 3-4 ngày cho kết quả tạo hạt tốt hơn.

3.3.2.2. Môi trường nuôi cấy

Maheshwari (1958) đã nuôi cấy thành công noãn trên môi trường dinh dưỡng bao gồm muối khoáng theo Nitsch, vitamin theo White, và 5% sucrose. Noãn của *Papaver rhoeas* và *P. somniferum* được tách 6 ngày sau khi thụ phấn (DAP- days after pollination) và thu được hợp tử hoặc tiền phôi có hai tế bào (two-celled proembryo) chứa một vài nhân nội nhũ (endosperm nuclei). Sinh trưởng của phôi ở giai đoạn đầu thấp hơn nhưng ngay sau đó ở giai đoạn hình cầu sinh trưởng nhanh hơn và đạt kích thước 0,93 mm so với 0,65 mm của phôi *in vivo*. Bổ sung kinetin và CH là cần thiết để kích thích sinh trưởng ban đầu của phôi. Một số noãn của hoa lan (orchids) được phân lập từ các bầu quả đã thụ phấn sinh trưởng tốt trên dung dịch đơn giản có sucrose 10%, nhưng noãn của *Zephyranthes* (mang một hợp tử và một nhân nội nhũ sơ cấp) cần bổ sung nước dừa hoặc casamino acid vào môi trường Nitsch. Ở *Trifolium repens*, noãn (1-2 DAP) phát triển thành hạt trưởng thành chỉ khi môi trường nuôi cấy được bổ sung dịch chiết các loại quả non như dưa chuột hoặc dưa hấu.

Trong nuôi cấy *in vitro* các noãn đã được thụ phấn ở hầu hết các loài thì môi trường Nitsch có cải biến được sử dụng rộng rãi. Tuy nhiên, môi trường Steward và Hsu (S-H) thích hợp hơn cho nuôi cấy các thể lai cùng loài hoặc khác loài sau khi thụ tinh các noãn non. Môi trường nuôi cấy chứa IAA 10 µg/L hoặc kinetin 0,1 µg/L làm tăng số lượng hạt được tạo thành từ noãn. Nồng độ cao hơn của kinetin thường gây ức chế. Nguồn nitrogen (hỗn hợp các amino acid hoàn chỉnh) không ảnh hưởng đến tần số thụ tinh của các bầu quả của ngô được thụ phấn *in vitro*, nhưng cần thiết cho sự sinh trưởng và phát triển tối thích của hạt.

Áp lực thẩm thấu của môi trường cũng ảnh hưởng đến sự phát triển của noãn tách rời, noãn chứa các phôi hình cầu phát triển thành hạt trưởng thành trên môi trường chứa sucrose từ 4-10%, nhưng các noãn non đã được thụ tinh có một hợp tử và một vài nhân nội nhũ, hoặc các noãn vừa mới thụ tinh cần 6% và 8% sucrose.

3.3.2.3. Điều kiện nuôi cấy

Nói chung, nhiệt độ và ánh sáng có ảnh hưởng đến quá trình thụ tinh trong ống nghiệm. Thông thường bước một của quá trình này xảy ra ở nhiệt độ phòng và không cần sự chiếu sáng đặc biệt. Chỉ ở giai đoạn sau, nuôi cấy bầu quả cần được duy trì ở 22-26°C và các điều kiện thích hợp khác có lợi cho phát sinh phôi. Sau khi thụ phấn trong ống nghiệm một vài ngày, một số noãn mở rộng, và ống phấn chui hoàn toàn vào trong túi phôi, cả phôi lẫn nội nhũ đều phát triển. Hiện tượng này có thể xác minh bằng các thí nghiệm tế bào-phôi học (cytoembryology).

Bảng 3.1. Môi trường Nitsch-sử dụng phổ biến trong nuôi cấy các noãn thụ phần *in vitro*

Thành phần	Nồng độ (mg/L)	Thành phần	Nồng độ (mg/L)
CaNO ₃	500	FeC ₆ O ₅ H ₇ .5H ₂ O	10
KNO ₃	125	Glycine	7,5
KH ₂ PO ₄	125	Ca-pantothenate	0,25
MgSO ₄ .7H ₂ O	125	Pyridoxine HCl	0,25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	Thiamine HCl	0,25
Na ₂ MoO ₄	0,025	Niacin	1,25
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,5	Sucrose	50000
MnSO ₄ .4H ₂ O	3	Agar	7000
H ₃ BO ₃	0,5		

Bảng 3.2. Môi trường Steward và Hsu (S-H)-nuôi cấy các thể lai cùng loài và khác loài từ các noãn non được thụ tinh

Thành phần	Nồng độ (mg/L)	Thành phần	Nồng độ (mg/L)
KH ₂ N ₂ GO ₃	5055	KI	8,6
NH ₄ NO ₃	1200	MnSO ₄ .4H ₂ O	0,83
KH ₂ PO ₄	272	H ₃ BO ₃	16,9
MgSO ₄ .7H ₂ O	493	Acid nicotinic	6,18
CaCl ₂ .2H ₂ O	441	Pyridoxine HCl	0,49
FeSO ₄ .7H ₂ O	8,3	Thiamine HCl	0,82
Na ₂ -EDTA	11	Inositol	1,35

CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	D-Fructose	180
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,024	Sucrose	3600
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,24	IAA	40000
ZnSO ₄ .7H ₂ O			5×10^{-5} mol/L

Bảng 3.3. Môi trường Gengenbach có hỗn hợp các amino acid hoàn chỉnh-cần thiết cho sinh trưởng và phát triển tối thích của hạt ngô

Thành phần	Nồng độ	Thành phần	Nồng độ
KH ₂ PO ₄	3750*	Threonine	198**
MgCl ₂ .6H ₂ O	1500*	Serine	347**
CaCl ₂ .2H ₂ O	1200*	Glutamate	1761**
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,1*	Proline	621**
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,1*	Alanine	476**
Fe-EDTA	50*	Cystein	160**
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	1*	Valine	330**
ZnSO ₄ .7H ₂ O	10*	Methionine	117**
KI	5*	Isoleucine	237**
MnSO ₄ .4H ₂ O	100*	Leucine	1009**
H ₃ BO ₃	100*	Tyrosine	262**
Glycine	168**	Phenylalanine	387**
Thiamine HCl	0,4**	Lysine	88**
Acid folic	0,044**	Histidine	164**
Niacin	1,2**	Arginine	150**
Sucrose	150***	Asparagine	300**
IAA		Glutamine	292**
Agar	5,5***	Tryptophan	204**
Aspartate	500**		

Chú thích: * : $\mu\text{mol/L}$, ** : mg/L , *** : g/L

3.3.2.4. Kiểu gen

Phản ứng của bầu quả *in vitro* trong môi liên quan với sự hình thành hạt tùy thuộc vào từng loài. Hạt phấn của các loài họ cải khó nảy mầm trong nuôi cấy và người ta phải cải tiến kỹ thuật nuôi cấy cho phù hợp bằng cách nhúng noãn của *Brassica oleracea* trong dung dịch CaCl_2 1%, sau đó gieo chúng trên một lớp gelatin 10% mỏng (10 μm) rồi thụ phấn với hạt phấn. Lớp gelatin mỏng được bảo quản trong đĩa petri có phủ giấy lọc gắn vào nắp hộp. Sau 24 giờ nuôi, noãn được thụ tinh và chuyển lên môi trường Nitsch có agar cho tới khi tạo hạt.

3.3.3. Ứng dụng của thụ phấn *in vitro*

Được ứng dụng ít nhất ở 3 lĩnh vực: vượt qua sự tự bất hợp (self-in compability), vượt qua sự bất hợp khi lai (cross-inuôi câyompability) của các giao tử và sản xuất thể đơn bội thông qua trình sản (parthenogenesis).

Các loài *Petunia axillaris* và *P. hybrida* là tự bất hợp. Hạt phấn nảy mầm tốt trên nhụy được tự thụ phấn nhưng tồn tại một hàng rào ngăn cản ở trong bầu quả đã cản trở sự phát triển của ống phấn, làm cho ống phấn không thể thụ tinh với noãn. Các hàng rào trong các taxon này có thể được vượt qua bằng sự thụ phấn *in vitro* và sự hình thành hạt xuất hiện bình thường. Ở loài *P. axillaris* tính bất hợp cũng có thể vượt qua nhờ sự thụ phấn nụ hoa *in vivo* (*in vivo* bud pollination).

Nuôi cấy thành công các noãn được thụ phấn *in vitro* đã tăng khả năng sản xuất các thể lai. Lai cùng loài (intraspecific), khác loài (interspecific), khác chi (intergeneric) và khác họ (interfamilia) cũng đã được tiến hành thông qua sự thụ phấn giá noãn và noãn *in vitro*. Một ứng dụng khác của thụ phấn *in vitro* là sản xuất các thể đơn bội của *Mimulus luteus* cv. Tigrinus grandiflorus bằng cách thụ phấn các noãn tách tòi của nó với *Torenia fournieri*. Thể đơn bội của *M. luteus* phát triển bằng trình sản. Sự phát triển bằng trình sản như thể của các thể đơn bội trong nuôi cấy từ các noãn được thụ phấn nhưng không thụ tinh đã được thông báo ở các loài *Hordeum vulgare*, *Nicotiana tabacum* và *Triticum aestivum*.

3.4. Nhân giống cây trồng qua nuôi cấy phát sinh phôi

3.4.1. Các kiểu nuôi cấy phôi

3.4.1.1. Nuôi cấy phôi non

Kiểu nuôi cấy này được dùng chủ yếu cho các phôi non có nguồn gốc từ các hạt lai hoặc hạt non không thể nảy mầm. Tách các phôi như thế là rất khó khăn và môi trường nuôi cấy chúng rất phức tạp. Cơ hội thành công của loại nuôi cấy này phụ thuộc rất lớn vào giai đoạn phát triển của phôi phân lập.

3.4.1.2. Nuôi cấy phôi trưởng thành

Các phôi trưởng thành được tách ra từ các hạt chín và nuôi cấy, chủ yếu để tránh sự ức chế trong hạt đối với sự nảy mầm. Kiểu nuôi cấy này tương đối dễ dàng vì phôi chỉ cần môi trường dinh dưỡng đơn giản chứa muối khoáng, đường và agar để sinh trưởng và phát triển.

Để thu được phôi ở tuổi đặc biệt, thì sự thụ phấn nhân tạo các hoa là rất cần thiết và người ta có khả năng xây dựng mối quan hệ giữa các giai đoạn sinh trưởng khác nhau của sự phát triển phôi với DAP.

3.4.2. Kỹ thuật nuôi cấy

3.4.2.1. Khử trùng bề mặt

Phôi của thực vật có hạt thường phát triển bên trong noãn được bao bọc bởi bầu quả. Vấn đề ở chúng đã tồn tại sẵn một môi trường vô trùng do đó khử trùng bề mặt phôi là không cần thiết trừ khi vỏ hạt bị tổn thương hoặc xuất hiện sự nhiễm hệ thống. Vì thế các hạt trưởng thành, noãn nguyên vẹn, hoặc quả được khử trùng bề mặt và các phôi vô trùng tách khỏi các mô chung quanh. Khử trùng bề mặt được tiến hành bằng cách ngâm nguyên liệu vào trong dung dịch khử trùng thương mại có hypochlorite (Clorox 5-10%, sodium hoặc calcium hypochlorite 0,45%) trong 5-10 phút hoặc EtOH (70-75%) trong 5 phút. Nồng độ thấp của các chất hoạt dịch (surfactant) như Tween 20, Tween 80, Teepol, hoặc Mannoxol được bổ sung vào dung dịch khử trùng làm tăng tính thấm của mô. Đối với hạt ngô, và các phôi tách rời: ngâm trong EtOH 70% cộng với 5-10 phút khử trùng bằng sodium hypochlorite 2,6%.

3.4.2.2. Phân lập phôi

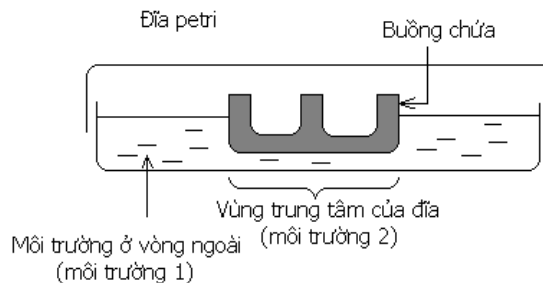
Phân lập phôi phải thực hiện ở điều kiện vô trùng dưới laminar (laminar air flow hood). Phôi trưởng thành phân lập tương đối dễ bằng cách giải phẫu hạt. Ngâm hạt có vỏ cứng (Iris, Cyclamen) trong nước từ một vài giờ đến một vài ngày trước khi khử trùng để

giải phẫu nó được dễ dàng hơn. Phân lập các phôi nhỏ hơn hoặc phôi non đòi hỏi giải phẫu phải đặc biệt cẩn thận nếu chúng được bọc trong nội nhũ dạng lỏng. Trong trường hợp như thế cần mở rãnh ở đầu lỗ noãn của noãn non và gây áp lực gây ở đầu đối diện để thu được phôi thông qua rãnh nứt.

3.4.2.3. Môi trường dinh dưỡng

Nhu cầu dinh dưỡng của phôi trong quá trình phát triển *in vivo* chia làm hai pha: pha dị dưỡng (heterotrophic phase)-pha sớm, ở pha này phôi nhận chất dinh dưỡng từ nội nhũ và pha tự dưỡng (autotrophic phase)-pha muộn, ở pha này phôi có khả năng tổng hợp các chất cần thiết cho sinh trưởng của chúng. Giai đoạn phôi chuyển từ trạng thái dị dưỡng sang trạng thái tự dưỡng khác nhau tùy loài.

Thành phần môi trường cho sinh trưởng của phôi non hoặc chưa trưởng thành khác với phôi trưởng thành. Monnier (1976), đã xây dựng phương pháp cho phép phát triển hoàn chỉnh phôi non ở *Caphát sinhella* (giai đoạn hình cầu sớm) cho đến khi nảy mầm mà không cần chuyển chúng khỏi vị trí nuôi cấy đầu tiên trong đĩa petri. Theo hướng này, Không và cs (1983) cũng thu được sự sinh trưởng liên tục của các phôi chưa trưởng thành ở lúa.



Hình 3.4. Phương pháp nuôi cấy phôi non cho đến khi nảy mầm mà không cần chuyển chúng khỏi vị trí nuôi cấy đầu tiên trong đĩa petri.

a. Muối khoáng

Các chất dinh dưỡng của môi trường MS, B5 và White có cải biến nhất định được sử dụng cho hầu hết các thí nghiệm nuôi cấy phôi. Chẳng hạn, môi trường nuôi cấy phôi của *Caphát sinhella* có nồng độ potassium cao hơn (bổ sung 350 mg/L KCl) và nồng độ calcium (CaCl_2) gấp đôi, nồng độ của NH_4NO_3 và Fe-EDTA giảm gần một nửa, còn nồng độ các muối vi lượng theo MS là gấp đôi.

b. Nguồn carbon

Sucrose là nguồn carbon chủ yếu được sử dụng để cung cấp năng lượng cho phôi nuôi cấy *in vitro*. Trong nuôi cấy phôi của một số loài (ví dụ: ngô) có thể cần bổ sung maltose, lactose, raffinose, hoặc mannitol. Một số loài thuộc họ Rosaceae và các loài lai thuộc chi *Lilium* bổ sung glucose tỏ ra có ưu thế hơn sucrose. Phôi của *Heracleum spondylium* sinh trưởng hiệu quả trên môi trường chứa glucose, fructose, galactose, mannose, hoặc mannitol. Glucose cũng cần thiết cho sinh trưởng của rễ ở phôi *Ginkgo* trưởng thành.

Glucose và sucrose ngoài vai trò dinh dưỡng, còn có khả năng duy trì áp suất thẩm thấu của môi trường (phải lưu ý đến tuổi phôi). Phôi trưởng thành sinh trưởng khá tốt ở nồng độ sucrose thấp nhưng các phôi non hơn thường đòi hỏi nồng độ của carbohydrate cao hơn. Nói chung, các nồng độ khác nhau của sucrose dùng trong nuôi cấy phôi phụ thuộc vào loài và kích thước/tuổi của phôi.

c. Nguồn nitrogen

Phôi có một hệ thống enzyme rất tốt có thể biến đổi nitrite thành nitrate và sau đó thành amonium. Amonium nitrate có ưu thế quan trọng hơn so với KNO_3 , NaNO_3 và $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$. Sự có mặt của ion NH_4^+ rất cần thiết cho sinh trưởng và phân hóa của phôi.

Các amino acid khác nhau và các amide của chúng đã được thử nghiệm cho nuôi cấy phôi. Một số tác giả cho rằng asparagine tăng khả năng sinh trưởng của phôi, nhưng những tác giả khác lại thấy glutamine là nguồn nitrogen có ưu thế sinh trưởng cho phôi của một số loài (ví dụ: *Caphát sinhella bursa-pastoris*, *Arabidophát sinhis thaliana*, *Reseda odorata*) còn asparagine lại ức chế mạnh sự sinh trưởng của chúng. Các amino acid khác có tác dụng kích thích hoặc ức chế.

Dịch thủy phân casein (CH), một phức hợp amino acid, được sử dụng rộng rãi để bổ sung vào các môi trường nuôi cấy phôi. Nồng độ CH tối ưu cho *Hoderum vulgare* khoảng 500 mg/L, trong khi phôi *Datura tatula* sinh trưởng ở nồng độ CH 50 mg/L. Các amino acid, CH và các amide có thể được khử trùng bằng autoclave và cùng với các chất dinh dưỡng của môi trường.

d. Dịch chiết thực vật tự nhiên

Nếu môi trường được bổ sung thêm nước dừa không khử trùng bằng autoclave, các phôi này sẽ tăng chiều dài nhưng không có dấu hiệu nảy mầm sớm. Nhiều tác giả gợi ý rằng sự có mặt của “nhân tố phôi” (embryo factor) trong nội nhũ dạng lỏng của nước dừa có thể thay thế cho sự thiếu hụt đường, amino acid, các hormone sinh trưởng và các

chất khác trong môi trường nuôi cấy. Nước dừa có hiệu quả kích thích sinh trưởng của phôi non tách rời của mía đường, lúa mạch, cà chua, cà rốt và các loài dương xỉ.

Các dịch chiết tự nhiên từ các phần của mô ở các loài thực vật có thể kích thích sinh trưởng phôi và ức chế nảy mầm sớm của phôi lúa mạch chưa trưởng thành bằng cách bổ sung vào môi trường nuôi cấy dịch chiết chuối, dịch chiết quả chà là, dịch thủy phân lúa mì-gluten và dịch chiết cà chua. Các dịch chiết này có hiệu quả tương tự nước dừa. Dịch chiết của *Datura* và *Sechium* cũng có hiệu quả như nước dừa, nhưng dịch chiết từ hạt *Lupinus* lại có hiệu quả gấp đôi.

Người ta đã cố gắng thay thế các “nhân tố phôi” của nước dừa bằng các hóa chất xác định. Để kích thích sự sinh trưởng của tiền phôi lúa mạch, nước dừa có thể được thay thế bằng môi trường White giàu phosphate bổ sung thêm hai amino acid chính là glutamine và alanine và năm amino acid khác có vai trò như là nguồn cung cấp nitrogen, ở pH 4,5. Tỷ lệ sống sót của phôi tăng lên khi nồng độ của KCl, KNO₃ và các thành phần hữu cơ nhất định tăng lên từ 5-10 lần.

e. Các chất điều khiển sinh trưởng

Auxin và cytokinin không được sử dụng nhiều trong nuôi cấy phôi do chúng cảm ứng tạo callus. Ở nồng độ rất thấp (0,01 mg/L) GA kích thích phát sinh phôi của phôi non lúa mạch mà không cần cảm ứng nảy mầm sớm, và kích thích sinh trưởng ở các phôi tách rời dạng hình tim của *Phaseolus*. Cũng có một số kết quả cho rằng ABA có hiệu quả tương tự trên phôi lúa mạch và *Phaseolus*.

f. pH môi trường

Các phôi tách rời sinh trưởng tốt trên môi trường có pH 5,0-7,5. Đây là phạm vi pH của dịch noãn (6,0). Nói chung pH môi trường được điều chỉnh 0,5 đơn vị cao hơn giá trị pH mong muốn để bù đắp cho sự thay đổi không thể điều chỉnh trong quá trình khử trùng.

g. Điều kiện nuôi cấy

Nói chung nhiệt độ $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ thích hợp cho sinh trưởng và nảy mầm của phôi. Một đôi khi nhiệt độ tối ưu cho nuôi cấy phôi có thể khác nhau giữa các genotype trong cùng một loài. Các loài *Zamia*, *Phaseolus*, bông thích hợp với nhiệt độ ấm ($27-30^{\circ}\text{C}$), trong khi nhiệt độ nuôi cấy phôi của các loài lai ở *Brassica*, lúa, lúa mạch thích hợp từ $17-22^{\circ}\text{C}$.

Trước đây, nhiều tác giả cho rằng ánh sáng không ảnh hưởng nhiều đến sinh trưởng của phôi *in vitro*, nhưng những nghiên cứu gần đây khi nuôi cấy phôi chưa trưởng

thành của lúa mạch, lanh, loài lai *Aegilopst × Hordeum*, và các cá thể lai khác loài của *Allium* lại tiến hành trong tối trước khi chuyển chúng sang điều kiện sáng để nảy mầm. Các phôi sơ cấp dạng hình tim của các loài Ilex mẫn cảm với ánh sáng. Các phôi thứ cấp rất khó sinh trưởng đã hoạt động khi chúng được tách rời và nuôi ở điều kiện chiếu sáng 4.000 lux hoặc hơn trong 4 giờ chiếu sáng trong suốt 4 ngày nuôi đầu tiên. Nhiều tác giả cho rằng nuôi trong tối ở giai đoạn ban đầu (bốn ngày) là rất cần thiết theo đó chúng có thể sinh trưởng tới giai đoạn trưởng thành thậm chí dưới điều kiện chiếu sáng liên tục.

3.4.3. Một số khó khăn trong nuôi cấy phôi

3.4.3.1. Môi trường dinh dưỡng

Các môi trường dinh dưỡng đang sử dụng hiện nay thường có áp suất thẩm thấu thấp hơn dịch noãn được nuôi cấy trên môi trường đó. Rất có thể môi trường không hoàn toàn thích hợp. Vì vậy, người ta đã tìm cách sử dụng dịch chiết xuất từ nội nhũ để đưa ra một công thức môi trường thích hợp hơn, chẳng hạn:

- Môi trường dinh dưỡng.
- Nội nhũ khỏe.
- Phôi lai.

Nội nhũ khỏe có thể cung cấp cho phôi lai những chất cần thiết. Cây cho nội nhũ có thể là những loài khác nhau của cùng một chi.

3.4.3.2. Phát sinh callus

Khi nuôi phôi non của tổ hợp lai: *Hordedum vulgare × Secale cereale*, người ta đã thấy phôi phát triển thành khối callus. Điều này chỉ có thể giải thích được rằng mỗi tương tác giữa phôi và môi trường dinh dưỡng không bình thường như giữa phôi và nội nhũ. Dù sau đó có thể tái sinh được cây hoàn chỉnh từ khối callus thì cây tái sinh cũng sẽ mang nhiều thay đổi vì callus thường không ổn định về mặt di truyền.

Ternovsky và cs (1976) đạt được một kết quả lý thú là thu được cây thuốc lá có tính chống chịu mới khi nuôi phôi từ hạt lai không nảy mầm.

3.5. Nuôi cấy tế bào phôi tâm (nucellar)

Rangaswamy (1959) là người đầu tiên công bố nuôi cấy mô phôi tâm- nucellar ở Citrus. Khi nuôi cấy trên môi trường bổ sung casein, tế bào nucellar *C. microcarpa* đã tạo mô sẹo, phân hoá mạnh thành “pseudobulbils” (dạng giả củ) và từ đó phát triển thành cây (Rangaswamy, 1959). Randhawa và cộng sự (1960) cũng tạo phôi thành công ở cây có

múi đơn phôi *C. grandis*, *C. limon* và *C. reticulata* x *C. sinensis*. Không giống như *C. microcarpa* và *C. reticulata*, những cây con có nguồn gốc nucellar đã hình thành phôi một cách trực tiếp. Bitter và cộng sự (1963) đã mở rộng những nghiên cứu này sang các cây có múi không hạt, các cây đơn phôi và đa phôi như *C. temple*, *C. reticulata*, *C. limon* (chanh Meyer), *C. maxima*, *C. sinensis* (Robertson navel), *C. latipes* và *C. latifolia* (chanh không hạt).

3.5.1. Sự phát triển của phôi nucellar

Ở một số giống Citrus, ngoài phôi hữu tính còn có các phôi không sinh ra từ tế bào túi phôi mà từ những tế bào soma của phôi tâm (nucellus) là lớp tế bào bao quanh túi phôi của hạt non. Sau khi tế bào trứng nằm trong túi phôi được thụ tinh và phân chia lần thứ nhất, ở phôi tâm có một số tế bào lớn với nhân to và nguyên sinh chất đậm đặc. Một số tế bào này bắt đầu phân chia, tạo khối nhỏ rồi dần dần hình thành phôi vô tính. Phôi vô tính phát triển song song với phôi hữu tính và còn được gọi là phôi nucellar (Toxopeus, 1930).

Phôi nucellar phát triển bằng phân bào nguyên phân bình thường của tế bào nucellus, không có sự tham gia của tế bào sinh dục và không xảy ra phân bào giảm nhiễm như tế bào mẹ. Vì vậy, những cây con phát triển từ phôi nucellar thường giống hệt với cây mẹ về cấu trúc di truyền. Sự sinh sản vô tính này có ý nghĩa quan trọng đối với tiến hoá, chọn và tạo giống cây có múi.

3.5.2. Nuôi cấy tế bào nucellar và sự hình thành phôi từ nucellar trong điều kiện in vitro

Các bước chuẩn bị nuôi cấy mô tế bào phôi tâm - nucellar in vitro như sau:

1. Bao kín nụ hoa vào ngày hoa nở để tránh sự pha tạp di truyền của mẫu cây.
2. Khử đực và thụ phấn với phấn của cam ba lá (*P. trifoliata*). Lý do của việc thụ phấn có kiểm soát này là tạo ra sự đánh dấu khác biệt dễ nhận biết sau này. Vì tất cả cây con từ hợp tử (phôi hữu tính) sẽ mang lá ba thùy giống cây mẹ, khác với những cây có nguồn gốc nucellar.
3. Thu hạt từ quả non ở những thời điểm khác nhau (tuần) để xác định giai đoạn thích hợp nhất cho nuôi cấy. Việc lựa chọn thời gian thu mẫu thay đổi tùy theo từng giống.
4. Sau khi xác định thời điểm tối ưu nhất, hái những quả đang phát triển, rửa sạch, khử trùng bề mặt bằng hypoclorit canxi trong 10-15 phút, rửa lại bằng nước cất vô trùng ba lần.

5. Cắt đôi quả trong điều kiện vô trùng. Tách hạt non, bỏ vỏ lụa, lấy phần còn lại của hạt đem nuôi cấy hoặc cắt hạt non theo chiều dọc và quan sát dưới kính hiển vi soi nổi. Loại bỏ phôi hợp tử và nội nhũ. Gấp nucellus và đặt vào môi trường nuôi cấy.
6. Môi trường nuôi cấy tế bào nucellar là môi trường cơ bản MS bổ sung thêm auxin, cytokinin và các phụ gia khác như casein hydrolysate hay dịch chiết malt nếu cần, tùy thuộc vào loài được nuôi cấy (Bảng 16).
7. Mẫu cấy được giữ trong điều kiện nhiệt độ 25 °C, độ ẩm 50-60% và chế độ ánh sáng 16h sáng/ 8h tối trong ánh sáng khuếch tán (1000 - 1500 lux).
8. Khi mô sẹo hình thành, cấy chuyển sang môi trường (Murashige và Tucker, 1969). Thời gian giữa các lần cấy chuyển là 3- 4 tuần/ lần.
9. Các chồi hình thành sẽ được cấy chuyển sang môi trường chứa axit gibberellic (1- 5 mg/l).
10. Để kích thích sự hình thành rễ, có thể nuôi chồi trong môi trường lỏng thông qua cầu giấy lọc.
11. Cấy chuyển cây con có rễ phát triển tốt ra bầu (chậu) với hỗn hợp đất vô trùng và che túi nhựa để giữ ẩm.
12. Tùy thuộc vào sự phát triển của cây, cấy chuyển cây con ra nhà kính và đảm bảo độ ẩm cao trong 4 - 7 ngày và dần dần bỏ túi nhựa giữ ẩm ra.

Bảng 3.4. Các chất bổ sung trong môi trường sử dụng để kích thích sự tạo phôi từ tế bào nucellar trong điều kiện in vitro

Giống	Chất bổ sung (mg/l)
C. microcarpa	Casein hydrolysate (400)
C. reticulata x C. sinensis (Temple orange)	Adenin sulfat (25), NAA (0.5)
C. grandis (Pong yau pummello)	Casein hydrolysate (500)
C. limon (Ponderosa lemon)	Chiết xuất malt (500)

C. sinensis (Washington navel)	Axit ascorbic (40), nước dừa (15%), Adenin sulfat (40), chiết xuất malt (400), casein hydrolysate (400)
C. sinensis (Valencia, Shamouti)	Chiết xuất malt (500), kinetin (0,1-1,0), IAA (0,1-1,0), nước dừa (15%), GA3 (1)
C. aurantifolia	NAA (0,1)
C. sinensis	Adenin sulfat (25-50), kinetin (0,5-2,0), casein hydrolysate (200 -600), chiết xuất malt (100-300), nước dừa (15%).
C. sinensis (Hamlin, Pell navel, Pineapple)	Chiết xuất malt (500), 2,4-D (0,01)
C. paradissi (Marsh seedless)	BAP (0,1)
C. reticulata (Owari)	Daminozide (0,1)

3.6. Chọn tạo giống sạch bệnh từ phôi vô tính (trường hợp cây ăn quả có múi Citrus)

3.6.1. Hiện tượng đa phôi và ứng dụng trong chọn tạo giống sạch bệnh

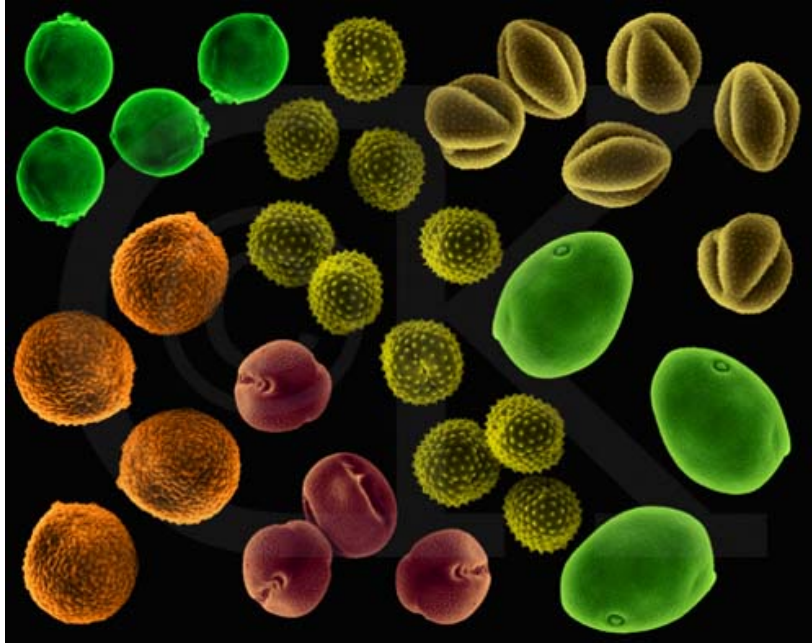
Đa phôi là hiện tượng có từ hai phôi trở lên trong một hạt, ở Citrus có hai kiểu đa phôi:

- Nhiều phôi vô tính hình thành từ lớp tế bào nucellar của noãn cây mẹ;
- Hai hoặc nhiều phôi hữu tính hình thành do sự phân chia một trứng đã thụ tinh (hiện tượng đa phôi cùng trứng) hoặc do có nhiều trứng cùng được thụ tinh trong một noãn (đa phôi khác trứng).

3.6.2. Phôi vô tính

Phôi vô tính là phôi được hình thành từ tế bào soma của nucellar (không có sự tham gia của giảm phân và thụ tinh giữa các giao tử đực, cái). Do vậy, cây từ phôi vô tính giống hệt với cây mẹ về cấu trúc di truyền và các tính trạng sinh học khác (trừ trường hợp

có biến dị tế bào soma). Phôi vô tính còn gọi là phôi soma (somatic embryo), hay phôi sinh dưỡng (vegetative embryo), ở cây có múi còn gọi là phôi nucellar hay phôi tâm.



Hình 3.5 Hình dạng hạt phần của một số loại cây trồng.

Hơn 200 loài cây trồng đã được nhân giống bằng phôi vô tính (Nishimura cs, 1993). Phôi vô tính được tái sinh từ các tế bào mô sẹo phôi hoá in vitro. Phôi vô tính sau khi làm khô có thể bảo quản lâu dài và cho nảy mầm vào thời vụ thích hợp. Hạt nhân tạo có thể hình thành từ phôi vô tính và gieo bằng máy gieo hạt. Nhân giống một số cây lá nhọn như thông từ hạt nhân tạo đã đạt quy mô công nghiệp (Attree and Fowke, 1993).

Nhân giống bằng phôi vô tính có các ưu điểm chính sau:

- Hệ số nhân giống cao. Các mô và tế bào sinh dưỡng nuôi cấy in vitro có thể tạo ra phôi vô tính một cách trực tiếp hoặc thông qua giai đoạn trung gian là mô sẹo. Tế bào mô sẹo có thể phân chia theo cấp số nhân và khi phân hoá thành phôi vô tính sẽ tạo ra số lượng phôi vô tính khổng lồ trong thời gian ngắn. Ví dụ, ở cà phê người ta có thể tạo được 600.000 phôi vô tính từ 1 gram sinh khối ban đầu trong vài tháng với tỷ lệ tái sinh cây từ phôi vô tính đạt 47% (Ducos cs, 1993).
- Phôi vô tính chứa một lượng chất dinh dưỡng tương tự với nội nhũ của phôi hữu tính, có mầm chóp rễ và chồi đỉnh, do vậy có thể nảy mầm trực tiếp thành cây (Ammirato, 1983).
- Phôi vô tính sau khi tạo hạt nhân tạo có thể bảo quản và lưu giữ dài hạn.

- Khả năng công nghiệp hoá và tự động hoá quá trình nhân giống quy mô lớn, đặc biệt là nhân giống bằng bioreactor (Takayama and Akita, 1994).

Các yếu tố di truyền, đặc tính của mô nuôi cấy, thành phần môi trường và các yếu tố hoá lý khác nhau có tác động mạnh mẽ lên quá trình phân hoá tế bào thành phôi vô tính. Thidiazuron là một chất có hoạt tính cực mạnh đối với tạo phôi vô tính ở một số cây trồng, đặc biệt là cây lâm nghiệp và cây ăn quả (Huetteman và Preece, 1993), cây chè (Sandal cs., 2001). Kỹ thuật tạo phôi vô tính đã được áp dụng thành công trong nhân nhanh hàng loạt cây trồng, ví dụ: nhân giống xoan ấn Độ (*Azadirach thaindica* A. Jus.) (Murthy and Saxena, 1998), thông (Garin cs., 1998), đu đủ (Jordan and Velozo, 1996; Castillo cs, 1998), loa kèn (*Tribulato* cs. 1997)...

3.6.3. Phôi hữu tính

Phôi được tạo ra do thụ tinh giữa tế bào trứng và giao tử đực (do lai hoặc tự thụ). Phôi hữu tính có các tên gọi phôi sinh sản (generative), phôi hợp tử (zygotic) hay phôi giao tử (gametic). Tên thông dụng hiện nay là phôi hợp tử.

Hiện tượng đa phôi ở cây có múi đã được nhiều tác giả nghiên cứu. Số phôi trung bình trên một hạt phụ thuộc chặt chẽ vào giống (genotype) và điều kiện nuôi cấy. Do vậy, các giống cây có múi được chia thành giống đơn phôi và giống đa phôi. Các giống đa phôi cũng rất khác nhau, ở một vài giống hầu hết hạt có từ hai phôi trở lên, nhưng ở đa số giống chỉ có một tỷ lệ nhỏ hạt là đa phôi. Các phôi trong cùng một hạt đa phôi thường có kích thước và hình dạng lá mầm rất khác nhau. Số lượng phôi trung bình trên một hạt thường lớn hơn nhiều so với số cây nảy mầm từ một hạt. Cây thường hình thành từ các phôi lớn hơn.

Nhiều thí nghiệm cho thấy phôi vô tính trong hạt tuy không hình thành do thụ tinh nhưng sự thụ phấn vẫn có ý nghĩa kích thích hình thành phôi vô tính. Trong một số trường hợp, ở các giống bất tự hoà hợp, có thụ phấn nhưng do ống phấn không mọc được nên thụ tinh không xảy ra. Kết quả là vài hạt lép được tạo thành. Các hạt lép này có thể được tạo ra từ lớp tế bào nucellar do sự kích thích của ống phấn và do không có thụ tinh nên nội nhũ hạt không phát triển dẫn đến lép (Nagai và Tanikawa, 1928). Trong nuôi cấy *in vitro*, các phôi vô tính của hạt lép có thể dễ dàng tái sinh thành cây.

Frost và Soost (1968) đã tổng hợp nghiên cứu về hiện tượng đa phôi trên 53 giống cây có múi khác nhau và cho biết đa phôi là hiện tượng phổ biến ở đa số giống và loài cây có múi, riêng ở 11 giống thuộc nhóm bưởi pumelo không thấy hiện tượng đa phôi. Tính đa phôi được xem như một đặc điểm phân biệt bưởi pummelo với nhóm bưởi grapefruit. Trong nhóm quýt *C. reticulata*, rất nhiều giống bao gồm Ponkan, Satsuma... có

nhiều phôi và tỷ lệ phôi vô tính cao. Giống quýt King (nguồn gốc châu á - một dạng cam Sành) có tỷ lệ hạt đa phôi và tỷ lệ cây từ phôi vô tính thấp, giống Kunenbo tương tự giống King (có nguồn gốc từ Nhật Bản) lại có tỷ lệ đa phôi cao (Tanaka, 1954) hay giống Kinnow và Kara (giống King là bố hoặc mẹ của hai giống này) lại có rất nhiều phôi trong hạt và tỷ lệ cây mọc từ phôi hữu tính rất thấp, thậm chí không có phôi hữu tính. Giống Wilking và Kinuôi cây (giống King là bố hoặc mẹ của 2 giống này) lại là giống đơn phôi và không có phôi vô tính. Giống Temple và Clementine (là 2 giống lai không rõ bố mẹ) cũng là giống đơn phôi và chỉ có phôi hữu tính. Rất nhiều giống quýt là đơn phôi (monoembryonic). Trong nhóm cam *C. sinensis*, số phôi trong hạt thường trung bình hoặc cao. Số phôi vô tính thường khá cao ở đa số các giống, không có giống đơn phôi ở nhóm này. Các giống bưởi quý ở nước ta chủ yếu thuộc nhóm pummelo đơn phôi.

3.6.4. Sự tương tác giữa phôi vô tính và phôi hữu tính

Trong cùng một hạt có thể có đến từ 1 đến 3, đôi khi 4 phôi thậm chí 7 phôi, nhưng số phôi này mầm thành cây con thường thấp. Trong quá trình phát triển, phôi vô tính và phôi hữu tính có thể cạnh tranh với nhau. Đối với nhiều giống, một hạt thường nảy mầm thành một đến vài cây từ phôi vô tính, trong khi đó không thấy phôi hữu tính tái sinh thành cây. Phôi hữu tính tỏ ra yếu hơn so với phôi vô tính. Kết quả là tất cả các cây mọc từ hạt đều là phôi vô tính. Ngược lại, nhiều khi hạt đa phôi nhưng lại không có phôi vô tính. Khi tiến hành thí nghiệm lai ba giống đơn phôi Clementine, Wilking và Siamese với phần hoa của giống cam ba lá, trong đó tính trạng lá ba chẽ là tính trạng trội, Ozsan và Cameron (1963) đã nhận được nhiều hạt đa phôi, nhưng tất cả các phôi đều hữu tính (mang tính trạng trội của cam ba lá). Trong rất nhiều trường hợp, hai hoặc ba phôi trong cùng một hạt đều là phôi hữu tính.

3.6.5. Những đặc tính cơ bản của cây từ phôi vô tính

- Giống cây mẹ ban đầu về mặt di truyền và các đặc tính nông học khác. Phôi vô tính bảo tồn mọi đặc tính ưu thế lai của cây mẹ nếu mẹ có ưu thế lai cao.

- Không mang theo các bệnh *virus* chủ yếu mà cây mẹ nhiễm phải. Do vậy, cây từ phôi vô tính gần như sạch bệnh hoàn toàn. Cho đến nay, rất ít loại bệnh *virus* lây truyền qua hạt, ở cây có múi chỉ thấy có hai loại bệnh *virus*, đó là blind pocket và chảy gôm (concave gum) có khả năng truyền qua hạt (Tucker, 1993). Trong thực tiễn sản xuất, tạo cây từ phôi vô tính vẫn là một phương pháp truyền thống có giá trị trong tạo giống sạch bệnh ở cây có múi.

3.6.6. Các phương pháp nhận biết cây từ phôi vô tính

1. Có sự giống hệt nhau giữa cây con và cây mẹ ngay cả trong các trường hợp sau:

- + Cây mẹ là cây lai dị hợp tử
- + Cây mẹ được thụ phấn chéo với một giống cho phấn khác
- + Cây mẹ là giống tam bội, lệch bội...

2. Khi so sánh các cây con từ một dòng lai F1 (lai với bố mẹ khác nhau), không thấy có sự phân ly tính trạng hoặc biến đổi di truyền rất ít trong quần thể cây F2:

+ Không thấy có đặc tính trội ở cây con khi lai cây mẹ mang gen lặn với cây bố mang gen trội (gen chỉ thị). Ví dụ, trong trường hợp bố là cam ba lá mang gen trội là lá có ba chẽ lai với các cây mẹ khác nhau, con sinh ra không có tính trạng lá ba chẽ sẽ là cây từ phôi vô tính.

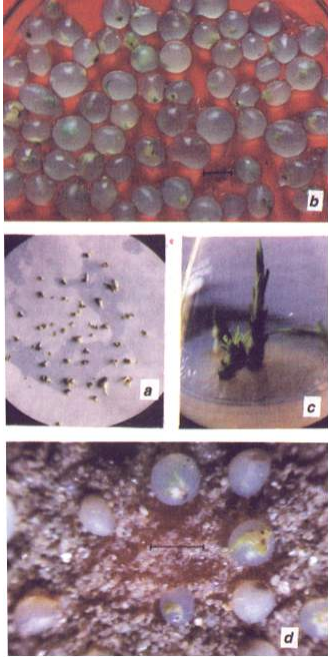
+ Có hiện tượng hữu thụ cao không bình thường ở các cây lệch bội (aneuploid), cây tam bội hoặc cây lai xa khác loài. Các cây này thông thường là bất dục, không tạo được hạt bằng con đường hữu tính do các giao tử đực và cái đều vô sinh.

3. Để phân biệt phôi vô tính hoặc cây từ phôi vô tính, ngày nay người ta sử dụng các phương pháp sinh hoá và sinh học phân tử khác nhau như phân tích isozyme, chỉ thị phân tử (DNA-hybridization, DNA-fingerprinting...), để thu được kết quả nhanh, nhạy và chính xác.

3.6.7. Nghiên cứu hạt nhân tạo

Murashige là người đầu tiên đề xuất khái niệm hạt nhân tạo tại Hội thảo quốc tế lần thứ IV về Nuôi cấy mô và tế bào năm 1978.

Hạt nhân tạo (artificial seed) là một khái niệm khá rộng. Hạt nhân tạo chủ yếu được tạo ra từ phôi vô tính với cấu trúc tương tự như phôi hữu tính. Tuy nhiên, hạt nhân tạo có thể là chồi mầm, chồi đỉnh, đốt lá, củ siêu nhỏ, protocorm (ở phong lan) được bọc bằng màng nhân tạo với khả năng lưu giữ, bảo quản và nảy mầm thành cây hoàn chỉnh trong điều kiện thích hợp (Ara *cs.*, 2000; Brischia *cs.*, 2002; Kosky *cs.*, 2002). Màng nhân tạo được làm bằng các chất chiết tự nhiên từ rong biển (agar, caragreenan, alginate), cây trồng, chất gom (chất dính) của hạt hoặc sinh khối vi sinh như dextran, gellan gum. Dịch lỏng của các chất trên được làm cứng hoá khi trộn hoặc nhỏ giọt vào dung môi điện ly thích hợp của sulphat đồng, chlorit canxi hoặc amonium chlorit. Bổ sung một số chất khoáng, chất kích thích sinh trưởng, các chất diệt nấm khuẩn... vào mô sống bên trong màng có thể mang lại kết quả tốt (Wendy Shu, 2001). Thêm polyethylene glycol (PEG),



**Hình 3. Hạt nhân tạo
cây cà phê**

một số chất điều hoà sinh trưởng GA_3 , zeatin vào môi trường nuôi cấy đã làm tăng đáng kể phân hoá phôi, số lượng và chất lượng phôi hạt nhân tạo ở một số cây trồng (Jones and Van Staden, 2001; Fiegert cs., 2000).

Các bước cơ bản trong tạo hạt nhân tạo từ phôi vô tính:

- Tạo mô sẹo phôi hoá (somatic embryogenic callus)
- Nuôi và nhân cụm tế bào dịch lỏng (Suspension - huyền phù tế bào) trong bình tam giác hoặc bioreactor
- Lọc lấy các cụm tế bào phôi hoá nhỏ hay cụm tế bào tiền phôi, có kích thước đồng nhất bằng lưới lọc (Lọc bỏ các cụm quá lớn hoặc quá nhỏ bằng các mắt lưới khác nhau)
- Đưa các cụm tế bào vào môi trường chín của phôi (Phôi phát triển, tích lũy các chất dự trữ và thuần thực)

- Làm khô, bọc bằng màng nhân tạo
- Bảo quản hạt nhân tạo

- Làm cho hạt nhân tạo nảy mầm. Người ta thấy rằng phôi vô tính cũng trải qua các giai đoạn phát triển như phôi hữu tính: bắt đầu từ khối tế bào hình cầu, chuyển sang dạng hình tim, hình thuỷ lôi (hình thuôn dài có rãnh), sau đó xuất hiện dạng lá mầm, tích lũy các chất tương tự nội nhũ, đạt trọng lượng khô khoảng 1-2 mg/ phôi (Lai and McKersie, 1994). Tỷ lệ phôi nảy mầm phụ thuộc vào một số yếu tố như chất lượng phôi, nồng độ sodium alginate; nồng độ chất khoáng trong vỏ bọc nhân tạo, thường là các chất khoáng với thành phần và hàm lượng hoạt chất như ở môi trường nuôi cấy; thời gian xử lý hạt trong dung dịch $CaCl_2$... (Castillo cs., 1998).

Trong việc sản xuất các hạt nhân tạo thông qua phôi vô tính từ nuôi cấy dịch lỏng, thì nồi phản ứng sinh học (bioreactor) là thiết bị không thể thay thế được.

Do phôi vô tính cũng có thể nảy mầm và phát triển thành cây hoàn chỉnh, nên kỹ thuật hạt nhân tạo đã được nghiên cứu và ứng dụng thành công ở nhiều nước.

Có nhiều loại polymer tự nhiên đã được thử nghiệm dùng cho công nghệ phôi vô tính, trong đó alginate được coi là tốt nhất. Alginate là một polymer sinh học, được chiết từ rong biển mà chủ yếu là các loài thuộc chi *Sargassum*. Alginate do các phân tử manuronic acid gắn với nhau tạo thành, giống như các phân tử glucose tạo nên cellulose.

Đặc điểm quan trọng nhất của alginate là chúng ở dạng hòa tan trong nước khi kết hợp với các ion hóa trị một (monovalent) như: Na^+ , K^+ , NH_4^+ ... và lập tức chuyển sang dạng không tan trong nước khi kết hợp với các ion hóa trị hai (divalent) hoặc đa hóa trị (polyvalent) như: Ca^{2+} , Mg^{2+} , Al^{3+} , ... Nếu nhỏ một giọt dung dịch sodium alginate vào dung dịch CaCl_2 thì sodium alginate ở phần diện tích ngoài của giọt sẽ chuyển hóa ngay thành calcium alginate và tạo nên một màng không thấm nước. Các viên alginate được hình thành.

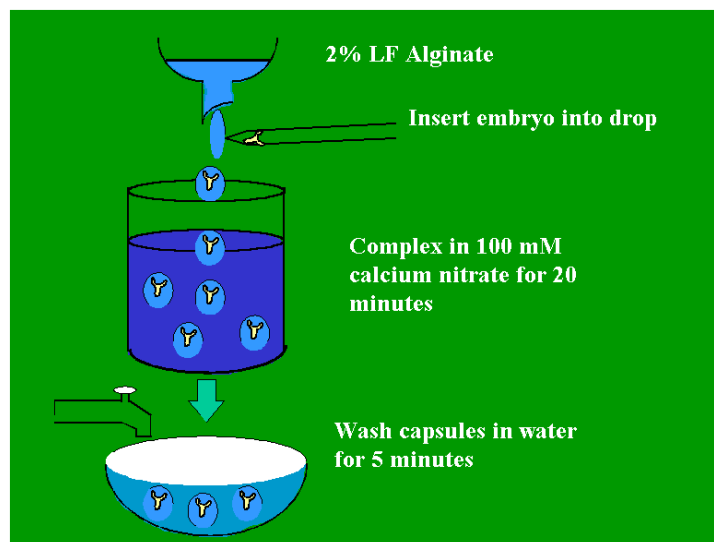
***Nghiên cứu áo bao hạt nhân tạo**

Những nghiên cứu hạt giống nhân tạo bắt đầu 1985, Drew (1979) tạo hạt có chứa phôi bằng nhiều giọt và tái sinh thành cây khi đưa vào môi trường không có carbohydrate, Kitto (1981) bao phôi hay từng cụm tế bào. Redenbang (1986) thành công khi dùng các giá thể hòa tan trong nước như Ca-alginate hay Na-alginate để tạo hạt.

Dùng hệ thống SEM hay tia X nghiên cứu cấu tạo của hạt tự nhiên cho thấy có 3 lớp: lớp nhu mô giậu, lớp chịu áp lực và lớp nhu mô mềm. Ba lớp này được cấu tạo bởi K, Ca, S và P... Nhiều chất liệu đã được nghiên cứu để có thể tạo ra lớp vỏ hạt tương tự như trong tự nhiên.

*** Bao hạt và làm khô hạt nhân tạo**

Có nhiều máy cơ giới có thể bao hạt 10 hạt/giây, sẽ có nhiều cải tiến khi sản xuất trên qui mô lớn. Hiện tại người ta nhỏ hạt bằng tay. Na- alginate được làm tan trong nước với nồng độ 2-4 %, dùng pipet nhỏ giọt vào dung dịch CaCl_2 (2,5%) sẽ sinh ra phản ứng trao đổi ion Na-Ca.

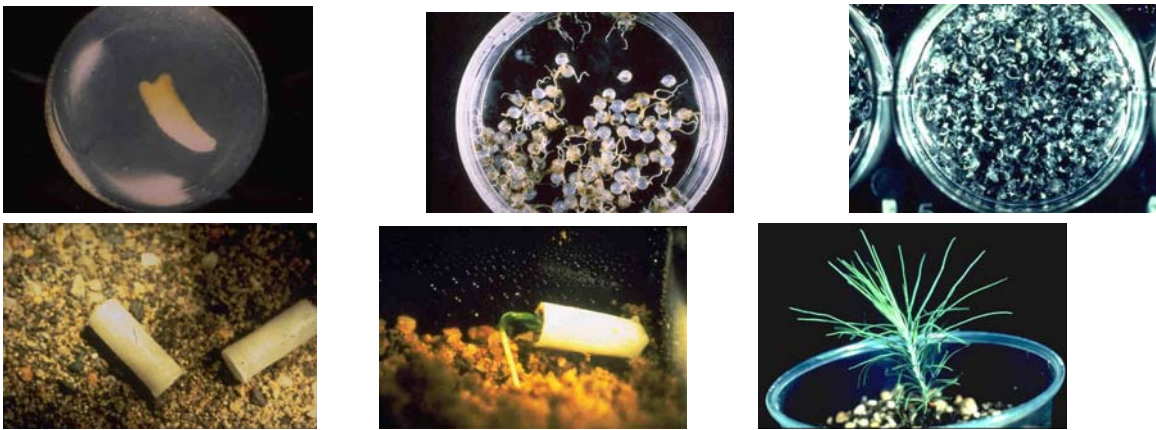


Hình.3.6 Quy trình bao hạt bằng Na- alginate

Sau đó hạt hình thành và đủ độ cứng thích hợp rồi chuyển qua ngâm trong nước làm cứng hạt và ngăn chặn phản ứng. Dùng Ca-alginate thì thường hạt luôn ẩm ướt bề mặt, hiện nay người ta dùng 1 loại polymer Elavax 4360 để bao cứng lớp alginate. Giai đoạn kế tiếp là làm khô hạt để giúp hạt nhân tạo dễ dàng tồn trữ và nảy mầm khi cần thiết. Người ta đặt hạt cây caroot trên khay có chứa 25% polyoxyethylene để làm mất nước, khi làm ướt lại thì hạt được tái sinh và phát triển thành cây hoàn chỉnh.

* Tồn trữ và nảy mầm hạt nhân tạo

Chưa phát hiện được phương pháp hoàn chỉnh nhất, thường được tồn trữ trong lạnh, nhưng với thời gian dài thì khả năng nảy mầm giảm đáng kể. Có báo cáo cho thấy tồn trữ 6 tháng trong parafilm thì hạt nảy mầm với tỉ lệ cao.



Hình 3.7 Nhân giống cây thông bằng hạt giống nhân tạo

Hạt giống cây cà rốt, được làm khô và tồn trữ trong 4⁰C, w= 67%, trong suốt thời gian hai tháng tồn trữ hạt không nảy mầm, sau hai tháng đưa ra điều kiện bình thường hạt nảy mầm gần 100%.

Hầu hết khả năng nảy mầm của hạt đều thấp do:

- Phôi được nuôi cấy kéo dài trong dung dịch lỏng, tế bào mất khả năng tái sinh.
- Vật liệu dung để tạo vỏ bao có khả năng trao đổi khí và cung cấp dinh dưỡng.

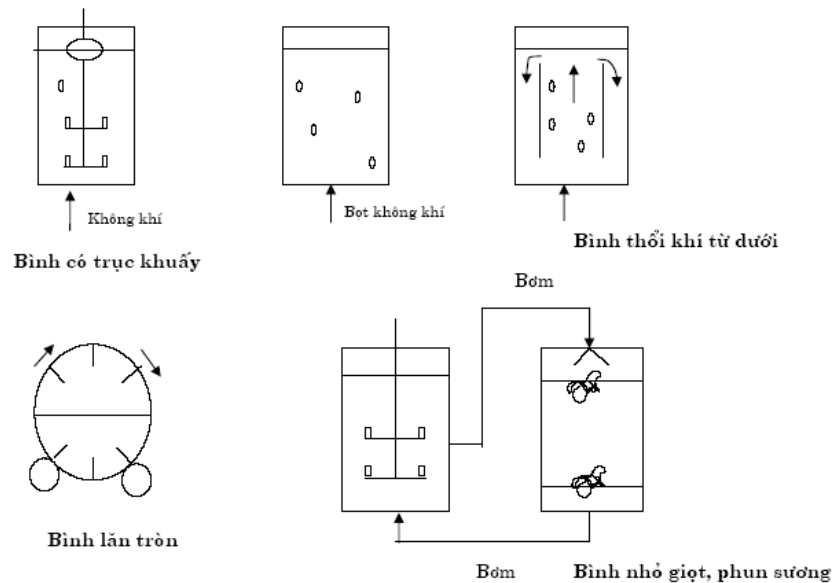
* Hệ thống cấy chuyển hạt nhân tạo

Ngày nay hầu hết các hệ thống tái sinh phôi đều yêu cầu những bước trung gian trước khi tái sinh thành cây hoàn chỉnh và cấy chuyển ra ruộng.

Speigel (1984) phát triển một hệ thống nuôi cấy tái sinh Citrus đòi hỏi phải nuôi cấy chuyển nhiều lần từ môi trường Agar sang môi trường lỏng. Sau khi đạt chiều cao thích hợp sẽ cấy chuyển vào trong ống nghiệm và được đặt trên 1 cầu giấy để tiếp tục phát triển trước khi chuyển ra đất. Như vậy phải mất 16-18 tuần để từ phôi soma phát triển thành cây đạt yêu cầu nuôi cấy trên vườn ươm.

3.6.8. Công nghệ bioreactor và tạo phôi hạt nhân tạo trong nhân giống công nghiệp

Công nghệ bioreactor đã được ứng dụng trong sản xuất tế bào quy mô lớn để chiết rút được chất chống ung thư. Các bioreactor quy mô trên 20.000 lít đã được sử dụng trong sản xuất công nghiệp ở một số nước (Robert and Shuler, 1997). Hai nhà khoa học Nhật Bản Takayama và Misawa là những người đầu tiên công bố việc sử dụng bioreactor vào nhân giống thực vật. Kỹ thuật nhân giống này sau đó đã được áp dụng cho hàng loạt cây trồng như khoai tây, Lilium (loa kèn), Gladiolus (lay ơn), Anthurium (hồng môn), Dioscorea (củ mài), Asparagus (măng tây), cà phê và nhiều cây khác trong bioreactor dung tích từ 1 đến 2.000 lít. Bioreactor có thể ứng dụng để nhân nhanh phôi vô tính, chồi, củ, thân ngầm v.v... (Takayama and Akita, 1994), ví dụ nhân củ siêu nhỏ khoai tây, nhân củ giống loa kèn ở Nhật Bản (Akita and Takayama 1988), nhân giống cỏ ngọt với công suất khoảng 200.000 chồi cây trong bioreactor 500 lít (Takayama and Akita, 1994). Bên cạnh đó, bioreactor đã được sử dụng để nhân nhanh hoa lan hồ điệp *Phalaenopsis* thông qua các thể cấu trúc (protocorm- like body) tạo ra từ mảnh lá (Young cs., 2000; Datta cs., 1999).



Hình 3.8 Một số dạng Bioreactor

Có thể nói nhân giống bằng phôi vô tính, hạt nhân tạo kết hợp với công nghệ bioreactor có khả năng tạo ra số lượng cây giống vô hạn từ một cây ban đầu, đáp ứng sản xuất thương mại.

Chương 4. NHÂN GIỐNG VÔ TÍNH *IN VITRO*

4.1. Sinh sản vô tính và hữu tính

4.1.1 Nhân giống theo cấu trúc tự nhiên của thực vật

1. Dạng căn hành (bull) lá được sắp xếp chồng lên nhau, bên ngoài có lớp lá bảo vệ, lá là nhu mô dự trữ dày và xốp. Dạng căn hành thường được thấy ở họ hoa tulip, họ hành...
2. Dạng giò (corm) : nhu mô dự trữ lớn, dày có cấu tạo giống như căn hành, nằm dưới gốc thân, dạng giò thường được thấy ở hoa gladiolus.
3. Dạng củ (rhizome): dày có cấu tạo như thân rễ nằm chìm dưới mặt đất, phía trên là vòm tầng trưởng chứa chồi thân dạng này thường được thấy ở họ hoa iris.
4. Thân bò (stolom): nhánh hay thân mỏng manh, thường là dạng thân bò, chóp ngọn là một cây hoàn chỉnh thấy ở cây dâu tây.
5. Dạng căn hành nhỏ (bulbil): giống như căn hành, tròn nằm ở nách lá thấy ở hoa lily.

4.1.2. Nhân giống theo phương thức nông học

1. Giâm cành
2. Chiết cành
3. Ghép hay tháp cành

4.2. Mục đích của nhân giống *invitro*

4.2.1. Ưu điểm của vi nhân giống

- Đưa ra sản phẩm nhanh hơn: Từ một cây ưu việt bất kỳ đều có thể tạo ra một quần thể có độ đồng đều cao với số lượng không hạn chế, phục vụ sản xuất thương mại, dù cây đó là dị hợp về mặt di truyền.

- Nhân nhanh với hệ số nhân giống cao: Trong hầu hết các trường hợp, công nghệ vi nhân giống đáp ứng tốc độ nhân nhanh cao, từ 1 cây trong vòng 1-2 năm có thể tạo thành hàng triệu cây.

- Sản phẩm cây giống đồng nhất: Vi nhân giống về cơ bản là công nghệ nhân dòng. Nó tạo ra quần thể có độ đồng đều cao dù xuất phát từ cây mẹ có kiểu gen dị hợp hay đồng hợp.

- Tiết kiệm không gian: Vì hệ thống sản xuất hoàn toàn trong phòng thí nghiệm, không phụ thuộc vào thời tiết và các vật liệu khởi đầu có kích thước nhỏ. Mật độ cây tạo

ra trên một đơn vị diện tích lớn hơn rất nhiều so với sản xuất trên đồng ruộng và trong nhà kính theo phương pháp truyền thống.

- Nâng cao chất lượng cây giống: Nuôi cấy mô là một phương pháp hữu hiệu để loại trừ *virus*, nấm khuẩn khỏi các cây giống đã nhiễm bệnh. Cây giống sạch bệnh tạo ra bằng cấy mô thường tăng năng suất 15 - 30% so với giống gốc.

- Khả năng tiếp thị sản phẩm tốt hơn và nhanh hơn: Các dạng sản phẩm khác nhau có thể tạo ra từ hệ thống vi nhân giống như cây con in vitro (trong ống nghiệm) hoặc trong bầu đất. Các cây giống có thể được bán ở dạng cây, củ bi hay là thân củ.

- Lợi thế về vận chuyển: Các cây con kích thước nhỏ có thể vận chuyển đi xa dễ dàng và thuận lợi, đồng thời cây con tạo ra trong điều kiện vô trùng được xác nhận là sạch bệnh. Do vậy, bảo đảm an toàn, đáp ứng các qui định về vệ sinh thực vật quốc tế.

- Sản xuất quanh năm: Quá trình sản xuất có thể tiến hành vào bất kỳ thời gian nào, không phụ thuộc mùa vụ.

4.2.2. Hạn chế của vi nhân giống

- Hạn chế về chủng loại sản phẩm: Trong điều kiện kỹ thuật hiện nay, không phải tất cả cây trồng đều được nhân giống thương phẩm bằng vi nhân giống. Nhiều cây trồng có giá trị kinh tế hoặc quý hiếm vẫn chưa thể nhân nhanh để đáp ứng nhu cầu thương mại hoặc bảo quản nguồn gen. Nhiều vấn đề lý thuyết liên quan đến nuôi cấy và tái sinh tế bào thực vật in vitro vẫn chưa được giải đáp.

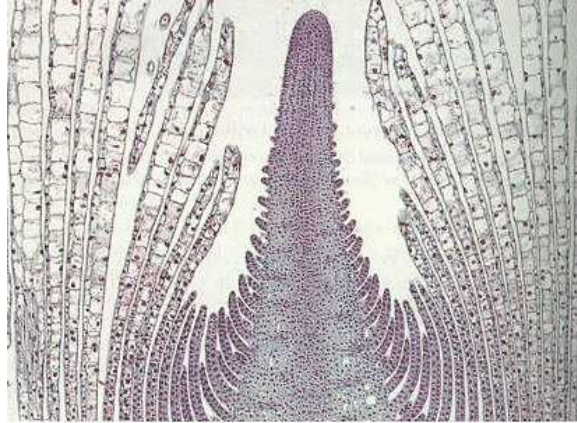
- Chi phí sản xuất cao: Vi nhân giống đòi hỏi nhiều lao động kỹ thuật thành thạo. Do đó, giá thành sản phẩm còn khá cao so với các phương pháp truyền thống như chiết, ghép và nhân giống bằng hạt.

- Hiện tượng sản phẩm bị biến đổi kiểu hình: Cây con nuôi cấy mô có thể sai khác với cây mẹ ban đầu do hiện tượng biến dị tế bào soma. Kết quả là cây con không giữ được các đặc tính quý của cây mẹ. Tỷ lệ biến dị thường thấp ở giai đoạn đầu nhân giống, nhưng sau đó có chiều hướng tăng lên khi nuôi cấy kéo dài và tăng hàm lượng các chất kích thích sinh trưởng. Hiện tượng biến dị này cần được lưu ý khắc phục nhằm đảm bảo sản xuất hàng triệu cây giống đồng nhất về mặt di truyền.

4.3. Các phương pháp nhân giống *invitro*

4.3.1. Nuôi cấy mô phân sinh đỉnh hay đỉnh phân sinh

4.3.1.1. Đỉnh sinh trưởng



Hình 4.1. Đỉnh sinh trưởng

Mô phân sinh đỉnh chứa những tế bào đỉnh sinh trưởng và được bao bọc bởi một lớp vỏ bề mặt có cấu tạo cutin hạn chế thấp nhất quá trình thoát nước và lớp cutin này bao bọc cả chồi đỉnh.

Ở thực vật, sự hình thành các cơ quan bắt đầu trong các mô phân sinh đỉnh, các mô này phân hóa ngay từ những giai đoạn phát triển đầu của phôi và giữ lại trong suốt đời sống của cây. Điều này xảy ra là do mô phân sinh có sự phân hóa của những tế bào khởi sinh. Tất cả những tế bào còn lại xuất phát từ những tế bào khởi sinh. Mô phân sinh có thể tích tương đối ổn định, nên các tế bào sinh ra từ tế bào khởi sinh sau một vài lần phân chia sẽ rời khỏi mô phân sinh.

Quá trình sinh trưởng của đỉnh sinh trưởng chia làm 3 giai đoạn

- Giai đoạn phôi sinh: trong các điểm sinh trưởng xảy ra sự hình thành mầm cơ quan và sự phân chia đầu tiên của nó thành các mô riêng biệt. Giai đoạn dài ra do sự sinh trưởng nhanh chóng, mầm cơ quan đạt kích thước tối đa và có hình dạng nhất định.

Kết thúc sự phân hóa tế bào, bắt đầu sự phân hóa gỗ. Các thành tế bào không còn khả năng sinh trưởng. Trước hết các u lõi dần được tạo thành gọi là u lá. Thể tích u lá lớn rất nhanh và kéo theo nó một phần lớn của đỉnh sinh trưởng. Dần dần u lõi chuyển thành mầm lá. Mầm lá phát triển nhanh theo chiều dài. Sự sinh trưởng tiên hành không đồng đều nên lá mầm cong dần lên phía đỉnh. Sau khi lá mới tách ra xảy ra sự phân chia tế bào kết quả là thể tích đỉnh sinh trưởng được phục hồi nhanh chóng và sự hình thành lá lại bắt đầu.

Ở mỗi nách lá đều có chồi nách. Chồi nách thực chất không khác đỉnh sinh trưởng. Do hiện tượng ưu thế ngọn nên các chồi nách không phát triển nhưng khi được đánh thức và bắt đầu sinh trưởng chúng có cấu tạo đầy đủ như thân chính.

Mô đỉnh sinh trưởng là mô duy nhất sạch *virus*. Do đó đây là một vật liệu nuôi cấy mô tế bào được sử dụng trong tạo giống cây sạch bệnh. Do kích thước quá nhỏ nên kỹ thuật nuôi cấy mô đỉnh sinh trưởng thường được tiến hành dưới kính lúp hay bao gồm cả chồi đỉnh.

4.3.1.2. Nuôi cấy đỉnh sinh trưởng

Limmasets và Cornuet (1949) đã phát hiện rằng ở các cây nhiễm bệnh *virus*, *virus* phân bố không đồng nhất trên cây và thường không thấy chúng ở vùng đỉnh sinh trưởng. Phát hiện đó là cơ sở để Morel và Martin (1952) chứng minh giả thuyết trên bằng cách tạo được cây sạch bệnh *virus* từ 6 giống khoai tây qua nuôi cấy đỉnh sinh trưởng.

Năm 1960, Morel đã thực hiện bước ngoặt khi áp dụng thành công kỹ thuật này trong nhân nhanh các loài địa lan *Cymbidium* thông qua protocorm. Sau đó, việc phát hiện ra cytokinin và môi trường nuôi cấy mô cải tiến (Murashige và Skoog, 1962) đã tạo sức sống mới để ứng dụng nuôi cấy đỉnh sinh trưởng trong nhân giống thương mại ở thực vật.

Ngày nay, kỹ thuật này cùng với một số cải tiến đã trở thành phương pháp loại trừ bệnh *virus* được sử dụng rộng rãi đối với nhiều loài cây trồng khác nhau.

4.3.1.3. Mẫu mô thực vật dùng trong nuôi cấy đỉnh sinh trưởng

Kết quả nuôi cấy đỉnh sinh trưởng phụ thuộc vào vật liệu khởi đầu, nguồn gốc và kích thước của mẫu. Để đạt được hiệu quả cao, cần lấy mẫu nuôi cấy từ chồi đang sinh trưởng mạnh (Gupta và CS, 1981) hoặc chồi của cây mới ghép (Jones và cs, 1985). Nuôi cấy đỉnh sinh trưởng cây non dễ dàng hơn cây trưởng thành, tỷ lệ ra rễ trong trường hợp này đạt 83%, trong khi với cây trưởng thành chỉ đạt 63% (Vieitez và cs, 1985). Điều kiện nuôi cấy, thời điểm lấy mẫu cũng ảnh hưởng rất lớn đến kết quả tái sinh cây từ đỉnh sinh trưởng. Một số loài có ưu thế chồi đỉnh mạnh, nuôi cấy đỉnh sinh trưởng từ chồi đỉnh dễ dàng hơn từ chồi nách, đối với một số loài khác lại thu được kết quả ngược lại.

Kích thước mẫu nuôi cấy càng lớn, tỷ lệ tái sinh và sống sót của mẫu càng cao, tuy nhiên mẫu càng nhỏ thì khả năng sạch bệnh *virus* lại cao hơn. Do vậy, kích thước mẫu nuôi cấy cần phải xác định bằng thực nghiệm đối với mỗi loài. Mẫu nuôi cấy nhỏ nhất chỉ có chóp sinh trưởng và 2 - 3 mầm lá sẽ là lý tưởng để tạo giống sạch bệnh do mô phân sinh đỉnh nằm ở chóp đỉnh chồi, là trung tâm hoạt động sinh trưởng, phân hoá và phát

triển của thực vật. Ngay dưới mô phân sinh này là các mầm lá. Đôi khi kích thước mẫu lớn hơn vẫn đảm bảo sạch bệnh *virus* (Vine và Jones, 1969) song một số trường hợp khác lại đòi hỏi mẫu nhỏ hơn (Hunter và cs, 1984).

Phương thức này sử dụng các bộ phận nhỏ nhất của đỉnh chồi hay đỉnh sinh trưởng làm mẫu vật nuôi cấy. Nó bao gồm mô phân sinh đỉnh và các mầm lá non. Khái niệm mô phân sinh đỉnh (ngọn) chỉ đúng khi mẫu vật được tách từ đỉnh sinh trưởng có kích thước trong vòng 0,1-0,15 mm tính từ chóp sinh trưởng. Trong thực tế mẫu vật được tách với kích thước như vậy chỉ khi nào người ta tiến hành nuôi cấy với mục đích làm sạch *virus* cho cây trồng. Thường sẽ gặp khó khăn lớn trong việc nuôi thành công các mô phân sinh đỉnh riêng rẽ có kích thước nhỏ như vậy. Do đó, trong khuôn khổ nhân giống *in vitro* người ta thường nuôi cấy cả đỉnh chồi hoặc đỉnh sinh trưởng. Phổ biến nhất ở các đối tượng như phong lan, dứa, mía, chuối... đỉnh sinh trưởng được tách với kích thước từ 5-10 mm, nghĩa là toàn bộ mô phân sinh đỉnh và một phần mô xung quanh.

Tương quan giữa độ lớn của chồi nuôi cấy, tỷ lệ sống và mức độ ổn định về mặt di truyền của chồi được biểu hiện như sau: Nếu độ lớn tăng thì tỷ lệ sống và tính ổn định tăng, nếu độ lớn giảm thì tỷ lệ sống và tính ổn định giảm. Nhưng xét về hiệu quả kinh tế nuôi cấy (thể tích bình nuôi, lượng dung dịch môi trường dinh dưỡng): Nếu độ lớn tăng thì hiệu quả kinh tế giảm, nếu độ lớn giảm thì hiệu quả kinh tế tăng. Do đó, phải kết hợp hài hòa được các yếu tố trên để tìm ra phương thức lấy mẫu tối ưu.

Một đỉnh sinh trưởng nuôi cấy ở điều kiện thích hợp sẽ tạo một hay nhiều chồi và mỗi chồi sẽ phát triển thành một cây hoàn chỉnh. Xét về nguồn gốc của các cây đó có ba khả năng:

- Cây phát triển từ chồi đỉnh (chồi ngọn).
- Cây phát triển từ chồi nách phá ngủ.
- Cây phát triển từ chồi mới phát sinh, ví dụ: nuôi cấy đoạn trụ dưới mầm của cây măng cầu (*Annona squamosa*) sẽ cho xuất hiện rất nhiều mầm trên mô nuôi cấy, một số mầm sau đó sẽ phát triển thành chồi và trở thành cây *in vitro* hoàn chỉnh. Tuy nhiên, thông thường khó phân biệt được chồi phá ngủ và chồi phát sinh mới. Các phương thức phát triển cây hoàn chỉnh từ đỉnh sinh trưởng nuôi cấy như sau:

- Phát triển cây trực tiếp

Chủ yếu ở các đối tượng hai lá mầm (dicotyledon) như khoai tây, thuốc lá, cam chanh, hoa cúc... Ví dụ: Khoai tây (*Solanum tuberosum*):

Đỉnh sinh trưởng → Chồi nách → Cây

- Phát triển cây thông qua giai đoạn protocorm

Chủ yếu gặp ở các đối tượng một lá mầm (monocotyledon) như phong lan, dứa, huệ... Cùng một lúc đỉnh sinh trưởng tạo hàng loạt protocorm (proembryo) và các protocorm này có thể tiếp tục phân chia thành các protocorm mới hoặc phát triển thành cây hoàn chỉnh. Bằng phương thức này trong một thời gian ngắn người ta có thể thu được hàng triệu cá thể.

Đỉnh sinh trưởng → Protocorm → Cây

Các đối tượng hoa lan đã mang lại hiệu quả kinh tế đặc biệt cao. Sau những kết quả đầu tiên ở chi *Cymbidium* của Morel (1966) người ta đã thu được kết quả rất tốt ở 22 chi khác nhau của họ này. Sở dĩ nhân giống vô tính hoa lan đạt được thành công lớn và được ứng dụng rộng rãi như vậy là vì hoa lan có phương thức sinh sản qua protocorm.

Lĩnh vực ứng dụng mới đây nhất cũng đã bắt đầu có kết quả là các cây ăn quả và cây lâm nghiệp, trong đó có các cây quý như cà phê, táo, lê, thông, bồ đề... Tổng số có trên 30 chi khác nhau đã được nuôi cấy thành công. Vì rằng, các cây trồng rừng và các cây ăn quả là những cây trồng lâu năm nên mọi chi phí ban đầu trong nhân giống *in vitro* đều có thể chấp nhận được.

4.3.1.4. Ghép chồi đỉnh (shoot apex grafting) hay vi ghép

Phương pháp phổ biến để tạo cây Citrus sạch bệnh là chọn lọc cây con có nguồn gốc từ tế bào nucellar. Tuy nhiên, những cây này có giai đoạn chưa thành thực kéo dài trước khi bước vào giai đoạn sinh sản. Việc xử lý nhiệt để loại trừ bệnh như exocortis và xyloporosis thường không hiệu quả. Hiện nay, vi ghép chồi là kỹ thuật tạo cây sạch bệnh được sử dụng thành công ở nhiều phòng thí nghiệm. Murashige và cs (1972) là những người đầu tiên tạo được cây Citrus sạch bệnh bằng kỹ thuật vi ghép chồi đỉnh *in vitro*. Sau đó, Navarro (1975) cũng sử dụng kỹ thuật này trên nhiều cây Citrus khác và thu được kết quả khả quan.

Kỹ thuật vi ghép chồi bao gồm các bước sau:

1. Chuẩn bị gốc ghép và mắt ghép trong ống nghiệm: cây gốc ghép thường được dùng trong vi ghép là Troyer citrange hoặc một vài gốc ghép khác có khả năng tương hợp cao với mắt ghép. Tách chồi đỉnh gồm đỉnh sinh trưởng và 3 lá mầm từ các cây mẹ (hình), chồi đỉnh ở dạng ngủ hoặc dạng đang sinh trưởng đều có thể sử dụng được.

2. Ghép và cấy cây ghép vào ống nghiệm: Hạt dùng làm gốc ghép được gieo trong môi trường lỏng, ghép chồi đỉnh lên đoạn thân non của gốc ghép.

3. Sau 4 - 6 tuần, chuyển cây ghép ra đất.

Hiện nay phương pháp vi ghép chồi đỉnh đang được sử dụng rộng rãi để tạo các dòng Citrus sạch bệnh phục vụ cho nhân giống thương mại.

***.Vi ghép kết hợp với xử lý nhiệt hoặc hoá chất**

Murashige và cộng sự (1972) dùng vi ghép đỉnh sinh trưởng để tạo vật liệu sạch bệnh ở Citrus, cây con tái sinh đã sạch các tác nhân gây bệnh micoplasma và exocortis. Năm 1975, Navarro và cộng sự đã hoàn thiện quy trình vi ghép chồi đỉnh cây có múi in vitro. Bằng kỹ thuật này, khoảng 90 loại cây có múi khác nhau được làm sạch bệnh (Navarro và cs, 1988). Kỹ thuật vi ghép đã loại trừ được hàng loạt bệnh khởi nguồn gen cây có múi, ví dụ:

- Virus gây bệnh tristeza, psorosis
- Stubborn spiroplasma
- Exocortis viroid
- Tác nhân gây bệnh chảy gôm, cristacortis, impietratura

Quy trình vi ghép:

- Gốc ghép được chuẩn bị từ hạt nuôi cấy in vitro trên môi trường cơ bản MS có 1% agar. Troyer citrance thường được dùng làm gốc ghép, còn gốc ghép Etrog citron được dùng để ghép tất cả các loại chanh.

- Cây giống đã nhiễm bệnh dùng làm mắt ghép được chuẩn bị như sau: bỏ lá, giữ cây ở nhiệt độ 32^oC từ 12-15 ngày. Sau đó, tách đỉnh sinh trưởng kích thước 0,1- 0,2 mm từ chồi mới hình thành và vi ghép theo kiểu chữ T lộn ngược trên gốc ghép.

- Nuôi cây sau vi ghép trên môi trường MS có 100 mg/l myo-inositol, đường 4%, thiamin HCl 0,2 mg/l, pyridoxine HCl 1mg/l, nicotinic 1mg/l, đặc biệt sử dụng nồng độ đường sucrose, các vitamin B cao với hàm lượng BA, IAA và GA₃ khác nhau để kích thích bật chồi từ đỉnh sinh trưởng vi ghép. Tỷ lệ vi ghép thành công là 60-70% và cây chuyển ra đất đã sống 90%.

Chương trình vi ghép tạo giống sạch bệnh ở cây có múi đã được triển khai ở hầu hết các nước.

Về nguyên tắc, vi ghép là nuôi cấy đỉnh sinh trưởng, nhưng thông qua dinh dưỡng tự nhiên của gốc ghép. Đỉnh sinh trưởng dùng làm mắt ghép có kích thước khoảng từ 0,2-0,5 mm, được tách từ búp non đang sinh trưởng mạnh của cây mẹ trưởng thành, gốc

ghép là mầm giá mới nảy mầm từ hạt của giống hoang dại, toàn bộ cây ghép được nuôi dưỡng trong điều kiện ống nghiệm vô trùng. Phương thức này thường dùng để tạo ra các giống cây ăn quả sạch bệnh *virus* nhằm cung cấp mắt ghép và cành chiết đầu dòng làm nguyên liệu nhân giống cho sản xuất đại trà. Phương thức này cho phép thu được cây hoàn toàn sạch bệnh và mang đặc điểm di truyền của cây mẹ cho mắt ghép.

4.3.2. Tái sinh cây hoàn chỉnh từ các bộ phận khác của cây

4.3.2.1. Nuôi cấy chồi bất định

Đỉnh chồi bất định mới có thể phát triển hoặc trực tiếp trên mẫu vật hoặc gián tiếp từ mô callus, mà mô callus này hình thành trên bề mặt vết cắt của mẫu vật. Một số loại mẫu vật được dùng như sau:

- Đoạn thân: thuốc lá, cam, chanh, cà chua, bắp cải...
- Mảnh lá: thuốc lá, cà chua, bắp cải, cà phê, ca cao...
- Cuống lá: thủy tiên...
- Các bộ phận của hoa: súp lơ, lúa mì, thuốc lá...
- Nhánh củ: họ hành, họ lay ơn, họ thủy tiên...
- Đoạn mầm: măng tây.

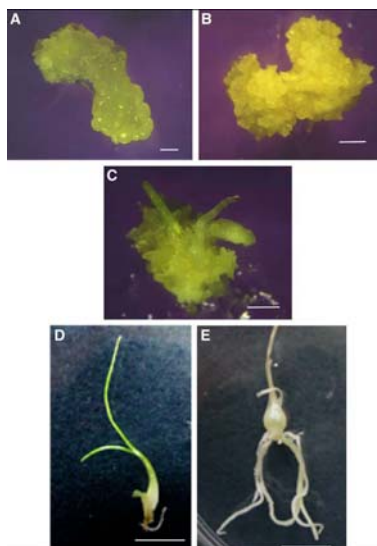
Sự phát sinh chồi bất định trực tiếp bắt đầu bằng các tế bào nhu mô nằm ở trong biểu bì hoặc ngay phía dưới bề mặt của thân; một số tế bào này trở thành mô phân sinh và các túi nhỏ gọi là thể phân sinh phát triển. Các thể phân sinh này rõ ràng có nguồn gốc từ các tế bào đơn. Tuy nhiên, chiều hướng phản ứng của thực vật cũng tùy thuộc vào nồng độ phytohormone. Nghiên cứu sự tạo chồi ở mô nuôi cấy của cây linh sam Douglas cho thấy cytokinin (BAP 5 μM) cần thiết cho sự phát sinh chồi bất định, nhưng có ba kiểu phản ứng khác nhau có kết quả tùy thuộc vào nồng độ của auxin được cung cấp. Nồng độ auxin thấp (NAA < 5 μM) chỉ có chồi phát triển. Khi nồng độ auxin cao hơn (NAA > 5 μM) lá mầm tạo ra cả callus và nhiều chồi. Khi cung cấp chỉ riêng auxin (NAA = 5 μM) thì chỉ có callus được tạo thành.

Sự phát triển các chồi bất định gián tiếp đầu tiên qua giai đoạn hình thành callus cơ sở từ các chồi được tách trong nuôi cấy. Các chồi sau đó phát triển từ ngoại vi mô callus và không có quan hệ ban đầu với các mô có mạch dẫn của mẫu vật.

4.3.2.2. Nhân giống thông qua giai đoạn callus

Trong nhân giống *in vitro* nếu tái sinh được cây hoàn chỉnh trực tiếp từ mẫu vật nuôi cấy ban đầu thì không những nhanh chóng thu được cây mà các cây cũng khá đồng nhất về mặt di truyền. Tuy nhiên, nhiều trường hợp mô nuôi cấy không tái sinh cây ngay

mà phát triển thành khối callus. Tế bào callus khi cấy chuyển nhiều lần sẽ không ổn định về mặt di truyền. Để tránh tình trạng đó nhất thiết phải sử dụng loại callus vừa phát sinh, tức là callus sơ cấp để tái sinh cây thì hy vọng sẽ thu được cây tái sinh đồng nhất. Thông qua giai đoạn callus còn có thể thu được những cá thể sạch *virus* như trường hợp của Kehr và Schaffer (1976) thu được ở tỏi.



Hình 4.2. Nhân giống thông qua giai đoạn tạo mô sẹo

- A. Mô sẹo cây tỏi sau 2 tuần nuôi cấy
- B. Mô sẹo sau 4 tuần nuôi cấy
- C. Tạo chồi từ mô sẹo
- D. Cây tái sinh từ mô sẹo
- E. Củ tỏi thu được từ cây con nuôi cấy mô thông qua tạo mô sẹo

4.3.3. Nhân giống thông qua phát sinh phôi vô tính

4.3.3.1. Phôi vô tính

Năm 1958, Street và Reinert là hai tác giả đầu tiên mô tả sự hình thành phôi vô tính từ các tế bào đơn của cà rốt (*Daucus carota*). Đến năm 1977, Murashige cho rằng phôi vô tính có thể trở thành một biện pháp nhân giống *in vitro*. Ở một số loài, sự phát sinh phôi vô tính hình thành trực tiếp từ những phôi bất định nằm trong phôi tâm. Đến

nay, công nghệ phôi vô tính được coi là công nghệ rất có triển vọng cho nông nghiệp trong thế kỷ 21.

Phôi vô tính là các cá thể nhân giống có cực tính bắt nguồn từ các tế bào soma. Chúng rất giống phôi hữu tính ở hình thái, quá trình phát triển và sinh lý, nhưng do không phải là sản phẩm của sự thụ tinh giữa giao tử đực và giao tử cái, và vì vậy không có quá trình tái tổ hợp di truyền các phôi vô tính có nội dung di truyền giống hệt với các tế bào soma đã sinh ra chúng.

Ở trường hợp phôi hữu tính, sự kết hợp giao tử đực và cái cho ra hợp tử (zygote). Hợp tử phân chia nhiều lần tạo nên phôi hữu tính có cấu trúc hai cực: rễ và ngọn. Khi hợp tử phát triển, miền sinh trưởng rễ và miền sinh trưởng ngọn cùng phát triển và cuối cùng tạo thành cây hoàn chỉnh, qua các giai đoạn phôi học như sau:

- Trường hợp cây hai lá mầm:

Dạng cầu → dạng thủy lôi → dạng có lá mầm

- Trường hợp cây một lá mầm:

Dạng cầu → dạng scutellar → dạng diệp tiêu

Ở rất nhiều cây, người ta nhận thấy các tế bào đang phân chia vô tổ chức đã tạo nên callus khi nuôi cấy. Có thể thay đổi hướng phát triển của chúng để tạo ra các phôi vô tính với các bước phát sinh hình thái rất giống với trường hợp phôi hữu tính. Điểm khác nhau cơ bản giữa phôi hữu tính và phôi vô tính là phôi hữu tính luôn luôn đi kèm với nội nhũ là cơ quan dự trữ năng lượng và chất dinh dưỡng phục vụ cho quá trình nảy mầm, còn ở phôi vô tính hoàn toàn không có nội nhũ. Khả năng tạo phôi vô tính trong nuôi cấy mô thực vật, ngoài các điều kiện vật lý, hóa học thuận lợi cho sự tạo phôi, còn phụ thuộc rất lớn vào loài, vào các giống, dòng trong cùng một loài.

4.3.4. Nhân giống trong các nồi phản ứng sinh học

Trước đây, các nồi phản ứng sinh học hay còn gọi là nồi lên men (fermentor) chủ yếu được dùng cho công nghệ vi sinh. Trên cơ sở các thiết bị đó, với một số cải tiến, nhiều tác giả đã nhân giống thành công nhiều loại phôi vô tính và các thể chồi, cụm chồi hoặc củ nhỏ.

Phôi vô tính cà phê được sản xuất thành công ở Brasil trên các nồi phản ứng sinh học dung tích từ 2-4 lít. Mỗi mẻ có thể thu được 4-5 triệu phôi vô tính cà phê. Ở Indonesia, cụm chồi dứa được đưa vào sản xuất thành công với nồi lên men 10 lít. Dịch lỏng nuôi cấy (môi trường mới) được bơm vào nồi và hút ra (môi trường cũ) theo chu kỳ ngắn, nhờ vậy mô và tế bào thực vật có đủ oxy và chất dinh dưỡng để phát triển mạnh. Phương thức nuôi cấy này được gọi là nuôi cấy thể ổn định hóa tính (chemostat culture).

4.3.5. Hệ thống hình thành chồi

Sự hình thành chồi có tương quan với hàm lượng etylen và CO₂. Chồi phát sinh nhiều nhất khi trong bình nuôi cấy tích lũy 5-8 μ m C₂H₄ và 10% CO₂ trong 15 ngày nuôi cấy. Khi 2 chất này được phóng thích ra khỏi bình nuôi cấy thì quá trình biệt hóa bị ức chế. Sau 15 ngày các chất này thoát ra ngoài thì cũng không ảnh hưởng đến quá trình biệt hóa. Trong 10 ngày đầu tiên C₂H₄ và CO₂ ảnh hưởng đến quá trình biệt hóa phù hợp với giai đoạn tăng trưởng và phân chia tế bào dẫn đến sự hình thành vòm đỉnh sinh trưởng. Như vậy tác động kích thích của C₂H₄ trong sự phát sinh hình thái có sự tác động bổ sung của quá trình phân bào.

Sự tác động tương hỗ của C₂H₄ và CO₂ cho thấy qui luật tác động của CO₂:

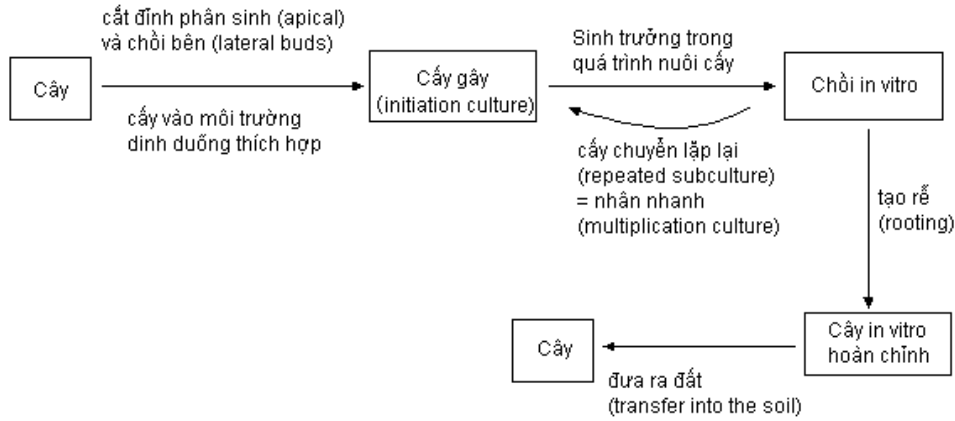
Trong 10 ngày đầu CO₂ kích thích quá trình sinh tổng hợp C₂H₄

Sau 10 ngày có tác động tương phản với C₂H₄

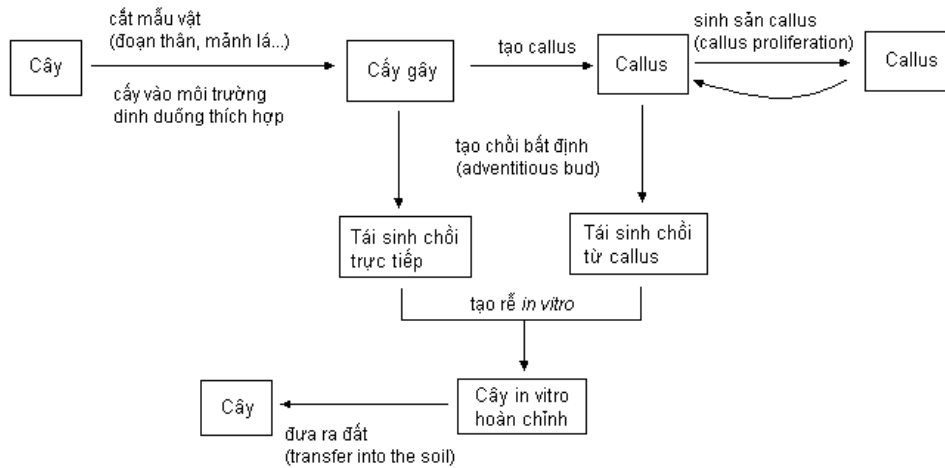
Sau cùng CO₂ tham gia vào quá trình trao đổi chất. tỉ lệ tác động C₂H₄/CO₂ chỉ có hiệu quả khi có mặt O₂ và CO₂ duy trì quá trình trao đổi oxihóa ở mô SF và SNF (SF: shoot forming: chồi mầm được nuôi cấy trên môi trường không có BA, phát sinh chồi sau 3 ngày thì tiến hành phân chia tế bào và không phân chia trong khi trong môi trường có BA thì sự hình thành chồi không xảy ra: NSF: non shoot forming)

Tóm lại, có 3 phương thức tạo cây con trong nhân giống *in vitro*:

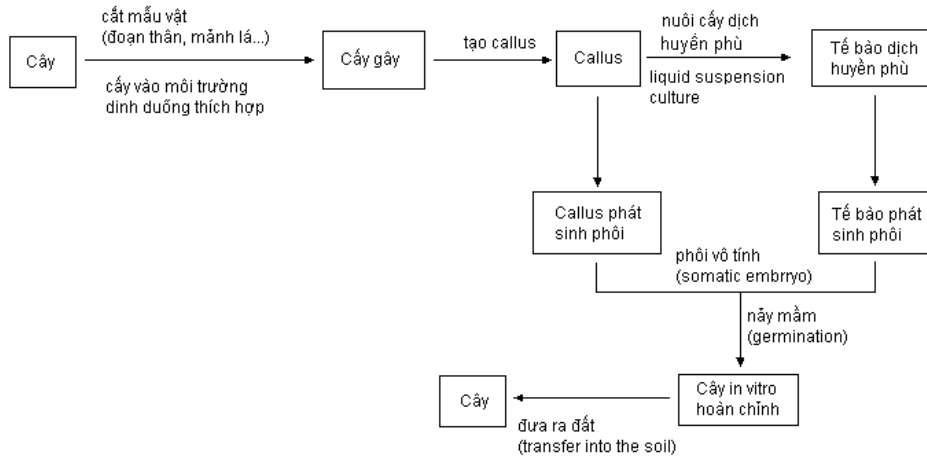
- Mẫu mô trực tiếp tạo chồi và cây hoàn chỉnh (Sơ đồ 4.1).
- Mẫu mô phát sinh callus và callus tạo chồi (Sơ đồ 4.2).
- Mẫu mô phát sinh callus, callus phát triển phôi (hoặc nuôi cấy dịch huyền phù tế bào phát sinh phôi) và từ phôi thu được cây hoàn chỉnh (Sơ đồ 4.3).



Sơ đồ 4.1. Mẫu mô trực tiếp tạo chồi và cây hoàn chỉnh (thông qua phương thức tăng khả năng phát sinh chồi nách)



Sơ đồ 4.2. Mẫu mô phát sinh callus, callus tạo chồi và phát triển cây hoàn chỉnh (thông qua phương thức phát sinh chồi bất định)



Sơ đồ 4.3. Mẫu mô phát sinh callus, callus phát sinh phôi soma (hoặc nuôi cấy dịch huyền phù tế bào phát sinh phôi soma) và từ phôi thu được cây hoàn chỉnh

4.4. Các giai đoạn trong quy trình nhân giống vô tính *in vitro*

4.4.1. Quá trình sản xuất cây cấy mô

Quá trình vi nhân giống thông thường gồm năm giai đoạn chính, mỗi một giai đoạn có những yêu cầu riêng.

Giai đoạn 1: Chuẩn bị cây làm vật liệu gốc

- Chọn cây mẹ để lấy mẫu, thường là cây ưu việt, khỏe, có giá trị kinh tế cao.
- Chọn cơ quan để lấy mẫu thường là chồi non, đoạn thân có chồi ngủ, hoa non, lá non v.v...

- Mô chọn để nuôi cấy thường là các mô có khả năng tái sinh cao, sạch bệnh, giữ được các đặc tính sinh học quý của cây mẹ và ổn định. Tùy điều kiện, giai đoạn này có thể kéo dài 3 - 6 tháng.

Giai đoạn 2: Thiết lập hệ thống nuôi cấy vô trùng

- Khử trùng bề mặt mẫu vật và chuẩn bị môi trường nuôi cấy.

- Cấy mẫu vô trùng vào môi trường nhân tạo trong ống nghiệm hoặc bình nuôi.

Giai đoạn nuôi cấy này gọi là cấy mẫu *in vitro*.

- Các mẫu nuôi cấy nếu không bị nhiễm khuẩn, nấm hoặc *virus* sẽ được lưu giữ trong phòng với điều kiện nhiệt độ, ánh sáng phù hợp. Sau một thời gian nhất định, từ mẫu nuôi cấy bắt đầu xuất hiện các cụm tế bào hoặc cơ quan (chồi, cụm chồi, rễ) hoặc phôi vô tính có đặc tính gần như phôi hữu tính. Giai đoạn 2 thường yêu cầu 2 - 12 tháng hoặc ít nhất 4 lần cấy chuyển.

Đưa mẫu vật từ bên ngoài vào nuôi cấy vô trùng phải đảm bảo những yêu cầu sau:

- Tỷ lệ nhiễm thấp.

- Tỷ lệ sống cao.

- Tốc độ sinh trưởng nhanh.

Kết quả bước cấy gây này phụ thuộc rất nhiều vào cách lấy mẫu. Quan trọng nhất vẫn là đỉnh sinh trưởng, chồi nách, sau đó là đoạn hoa tự, hoa, đoạn thân, mảnh lá, rễ...

Chọn đúng phương pháp khử trùng sẽ đưa lại tỷ lệ sống cao và môi trường dinh dưỡng thích hợp sẽ đạt được tốc độ sinh trưởng nhanh.

Giai đoạn 3: Nhân nhanh chồi

- Thành phần và điều kiện môi trường phải được tối ưu hóa nhằm đạt mục đích nhân nhanh.

- Quy trình cấy chuyển để nhân nhanh chồi khoảng 1- 2 tháng tùy loại cây. Hệ số nhân nhanh là 2 - 8 lần/ 1 lần cấy chuyển. Nhìn chung giai đoạn 3 thường yêu cầu 10- 36 tháng và cũng không nên kéo dài quá lâu. Ví dụ từ đỉnh sinh trưởng của 1 cây chuối chọn lọc ban đầu, người ta chỉ nên nhân khoảng 2000 - 3000 chồi sau 7 - 8 lần cấy chuyển để tránh biến dị soma. Đối với các cây khác như mía, hoa cúc, phong lan sau 1 năm có thể nhân được trên 1 triệu chồi từ 1 cây mẹ ban đầu.

Những khả năng tạo cây đó là:

- Phát triển chồi nách.

- Tạo phôi vô tính.

- Tạo đỉnh sinh trưởng mới.

Trong giai đoạn này cần nghiên cứu các tác nhân kích thích phân hóa cơ quan, đặc biệt là chồi như:

- Bổ sung tổ hợp phytohormone mới (tăng cytokinin giảm auxin). Tăng tỷ lệ auxin/cytokinin sẽ kích thích mô nuôi cấy tạo rễ và ngược lại sẽ kích thích phát sinh chồi.

- Tăng cường thời gian chiếu sáng 16 giờ/ngày, tối thiểu 1.000 lux. Trong thực tế nghiên cứu, người ta nhận thấy khó tách biệt ảnh hưởng của chu kỳ chiếu sáng khỏi ảnh hưởng của cường độ chiếu sáng. Ánh sáng tím là thành phần quan trọng kích thích phân hóa mạnh. Ánh sáng đỏ có ảnh hưởng giống cytokinin (cytokinin-like effect), nó tạo nên sự tích lũy cytokinin trong mô của một số loài, chính lượng cytokinin này đã góp phần kích thích quá trình phát sinh cơ quan và tạo chồi từ những mô nuôi cấy *in vitro*.

- Bảo đảm chế độ nhiệt độ trong khoảng 20-30°C. Trường hợp những loài có nguồn gốc nhiệt đới, nhiệt độ nuôi cấy thích hợp vào khoảng từ 32-35°C. Ngược lại, đối với những loài hoa ở vùng ôn đới nhiệt độ thích hợp cho quá trình tạo cụm chồi phải < 30°C.

Mục tiêu quan trọng nhất của giai đoạn này là xác định được phương thức nhân nhanh nhất bằng môi trường dinh dưỡng và điều kiện khí hậu tối thích.

Giai đoạn 4: Tạo rễ

- Các chồi hình thành trong quá trình nuôi cấy có thể phát sinh rễ tự nhiên, nhưng thông thường các chồi này cần phải cấy chuyển sang một môi trường khác để kích thích tạo rễ. ở một số loài khác, các chồi sẽ tạo rễ khi được chuyển trực tiếp ra đất. Giai đoạn 4 thông thường cần 2 - 8 tuần.

Giai đoạn 5: Chuyển cây ra đất trồng

- Đây là giai đoạn đầu tiên, trong đó cây được chuyển từ điều kiện vô trùng của phòng thí nghiệm ra ngoài tự nhiên. Đối với một số loài có thể chuyển chồi chưa có rễ ra đất, nhưng đa số chỉ sau khi chồi đã ra rễ và tạo cây hoàn chỉnh mới được chuyển ra vườn ươm. Quá trình thích nghi với điều kiện bên ngoài của cây cần sự chăm sóc đặc biệt. Vì cây chuyển từ môi trường bão hòa hơi nước sang vườn ươm với những điều kiện khó khăn hơn, nên vườn ươm cần phải đáp ứng các yêu cầu:

+ Cây được che phủ bằng nilon, tưới phun sương đảm bảo cung cấp độ ẩm và làm mát

+ Giá thể trồng cây có thể là đất mùn hoặc các hỗn hợp nhân tạo không chứa đất, mùn cưa và bọt biển. Giai đoạn 5 thường đòi hỏi 4 - 16 tuần

Thời gian tối thiểu cho sự thích nghi là 2-3 tuần, trong thời gian này cây phải được chăm sóc và bảo vệ trước những yếu tố bất lợi sau:

- Mất nước nhanh làm cho cây bị héo khô.
- Nhiễm vi khuẩn và nấm gây nên hiện tượng thối nhũn.
- Cháy lá do nắng

4.4.2. Các bước vi nhân giống

Nhân giống vô tính các cây trồng thường trải qua các bước sau:

- Nuôi cây đỉnh sinh trưởng
- Tạo thể nhân giống invitro
- Nhân giống invitro
- Tái sinh thành cây hoàn chỉnh invitro
- Chuyển cây ra vườn ươm để thuần hóa
- Nhân giống invitro
- Tạo cây con bầu đất.
- Đưa các cây ra đồng ruộng
- Chọn lọc cây đầu dòng.

4.4.2.1. Nuôi cây đỉnh sinh trưởng

Mẫu được nuôi cấy thường còn ở giai đoạn non, quá trình phân chia và phân hóa mạnh. Đỉnh sinh trưởng và chồi bên được sử dụng ở hầu hết các loại cây trồng. Ngoài ra, chồi đỉnh và chồi non của hạt mới nảy mầm cũng được sử dụng. Đỉnh sinh trưởng nhỏ được tách bằng kính lúp. Môi trường được sử dụng rộng rãi trong nhân giống hiện nay là môi trường MS. Đối với mẫu dễ bị hóa nâu môi trường thường được bổ sung than hoạt tính hay ngâm mẫu với hỗn hợp ascorbic acid và citric acid (25-150 mg/l)

4.4.2.2. Tạo thể nhân giống in vitro

Mẫu nuôi cấy được cấy trên môi trường chọn lọc đặc biệt nhằm mục đích tạo thể nhân giống *in vitro*. Có hai thể nhân giống *in vitro*: thể chồi (multiple shoot) và thể cắt (cutting) đột ngoài ra còn có thể giò (protocorm). Tạo thể nhân giống *in vitro* dựa vào đặc điểm nhân giống ngoài tự nhiên của cây trồng. Tuy nhiên có những cây trồng không có khả năng nhân giống người ta thường nhân giống bằng cách tạo cụm chồi bằng mô sẹo. Để tạo thể nhân giống trong môi trường thường bổ sung Cytokinin, Auxin, GA₃ và các chất hữu cơ khác.

4.4.2.3. Nhân giống in vitro

Là giai đoạn quan trọng trong việc nhân giống cây trồng bằng phương pháp nuôi cấy mô tế bào thực vật nhằm mục đích tăng sinh khối thể nhân giống. vật liệu nuôi cấy là những thể chồi, đôi khi nồng độ chất sinh trưởng giảm thấp cho phù hợp với quá trình nuôi cấy kéo dài. Điều kiện nuôi cấy thích hợp giúp cho quá trình tăng sinh được nhanh chóng. Cây nhân giống *in vitro* có trạng thái sinh lý trẻ và được duy trì trong thời gian vô hạn.

4.4.2.4. *Tái sinh cây hoàn chỉnh in vitro*

Đây là giai đoạn tạo cây con hoàn chỉnh có đầy đủ thân lá và rễ chuẩn bị chuyển ra vườn ươm. Cây con phải khỏe mạnh nhằm nâng cao sức sống khi ra ngoài môi trường bên ngoài. Các chất có tác dụng tạo chồi được loại bỏ thay vào đó là các chất kích thích quá trình tạo rễ. Điều kiện nuôi cấy tương tự với quá trình nuôi cấy ngoài tự nhiên, một bước thuần hóa trước khi được tách ra khỏi điều kiện *in vitro*. Thường dung các chất thuộc nhóm auxin kích thích ra rễ.

4.4.2.5. *Chuyển cây in vitro ra vườn ươm.*

Đây là giai đoạn khó khăn nhất trong quá trình nhân giống vô tính. Cây *in vitro* được nuôi cấy trong điều kiện ổn định về dinh dưỡng ánh sáng nhiệt độ. Khi chuyển ra đất với điều kiện tự nhiên hoàn toàn khác hẳn cây con dễ bị mất nước, mau bị héo. Để tránh tình trạng này, vườn ươm nuôi cấy mô phải mát, cường độ chiếu sáng thấp, nhiệt độ không khí mát, độ ẩm cao... Cây con thường được cấy trong luống ươm có cơ chất dễ thoát nước, tơi xốp giữ được ẩm. Trong những ngày đầu cần được phủ nilon để giảm quá trình thoát hơi nước. Rễ được tạo ra trong quá trình nuôi cấy mô sẽ dần lụi đi và rễ mới xuất hiện. Cây con thường được xử lý với chất kích thích ra rễ bằng cách ngâm hay phun lên lá để rút ngắn thời gian ra rễ.

4.4.2.6. *Nhân giống in vitro*

Cây con sau khi được chuyển ra luống ươm hay cấy vào bầu đất sau 7-10 ngày thì bắt đầu ra rễ. sau đó được phun dinh dưỡng với hỗn hợp N,P,K (1g/l cho mỗi loại). Tuy nhiên do quá trình nhân giống *in vitro* có nhiều tổn kém thì cây con được sử dụng như là cây mẹ và được tiếp tục nhân giống trên luống ươm. Điều kiện nhân giống trên luống ươm phải tiếp tục đảm bảo cây mẹ ở trạng thái bằng cách điều kiện khống chế bằng cách giảm dinh dưỡng, duy trì độ ẩm cao, nhiệt độ không khí thấp... Hệ số nhân giống trên luống ươm phải tiếp tục đảm bảo cây mẹ ở trạng thái bằng cách điều kiện khống chế bằng cách giảm dinh dưỡng, duy trì độ ẩm cao, nhiệt độ không khí thấp... Hệ số nhân giống trên luống ươm càng cao giúp cho việc giảm giá thành càng có ý nghĩa.

4.4.2.7. *Cây con bầu đất*

Cây con từ ống nghiệm hay được nhân giống trên luống ươm được cấy trên luống đất 15-20 ngày cho cây ra rễ và phát triển khỏe, sau đó được cấy vào bầu đất (cây chuối). Bầu đất có cơ chất xốp đầy đủ chất dinh dưỡng tỉ lệ đất/ phân là 1/1, ngoài ra hàng tuần được phun dinh dưỡng khoảng 1-2 lần/tuần thường dùng phân khoáng có tỉ lệ N- P- K: 20-20-20. Thời gian cây con ở giai đoạn bầu đất phụ thuộc đặc điểm cây trồng khoảng 20 ngày (khoai tây) đến 2,5 tháng (cây chuối). Cây bầu đất được đặt ở nơi có nhiều ánh sáng, độ ẩm cao, nhiệt độ không khí mát để cây phát triển nhanh và khỏe.

4.4.2.8. Trồng cây ra ruộng.

Cây con sau khi đạt được kích thước về chiều cao, số lá đường kính thân thích hợp sẽ được chuyển ra trồng ở đồng ruộng. Duy trì độ ẩm cao trong giai đoạn này giúp cây thích nghi dần với điều kiện tự nhiên, các nhân tố nông học khác được tác động giống như cây trồng tập quán.

4.4.2.9. Chọn lọc cây đầu dòng

Là vấn đề quan trọng đối với cây ăn trái nhằm tạo ra một quần thể đồng đều có năng suất cao và ổn định. Những cây được chọn đầu dòng được đưa vào nhân giống trở lại bằng nuôi cấy mô.

Hiện tại công nghiệp nhân giống được ứng dụng nhiều trong kinh tế để giải quyết nhu cầu về giống cho sản xuất, giống cho cây lâm nghiệp, trồng rừng, rau, ngũ cốc, cây ăn trái, hoa và cây dược liệu.

4.5. Các vấn đề liên quan đến nhân giống *in vitro*

4.5.1. Ảnh hưởng của môi trường và các chất kích thích sinh trưởng đến nhân giống *in vitro*.

4.5.1.1. Mẫu nuôi cấy

Có thể chia làm hai nhóm: lựa chọn mẫu cây và xử lý mẫu cây chọn mẫu:

Các nhân tố khi chọn mẫu bao gồm kiểu gen, cơ quan được chọn, tuổi sinh lý, mùa vụ, giai đoạn sinh trưởng, độ khỏe của mẫu và nguồn mẫu.

+ Kiểu gen: ảnh hưởng sâu sắc đến quá trình nuôi cấy, số lượng chồi tạo được, sự khác nhau về tăng sinh chồi, sự khác nhau về khả năng phát sinh phôi. Người ta cũng ghi nhận kiểu di truyền ảnh hưởng đến số lượng và đường kính của mô sẹo qua nuôi cấy hạt phấn cà chua, ghi nhận sự khác nhau giữa các genome qua nuôi cấy đỉnh sinh trưởng mô lõi.

+ Chọn cơ quan:

Hầu hết các loại cơ quan và mô đều có khả năng sử dụng nuôi cấy *in vitro*. Cho rằng mẫu nuôi cấy khác nhau ở các loài khác nhau có thể dùng chồi đỉnh để nuôi cấy, chồi mầm thích hợp làm mẫu nuôi cấy ở các cây nảy mầm từ hạt. Dùng mô cây tỏi để nuôi cấy tạo thể bulb. Nuôi cấy thân mầm cây để tạo protoplast có khả năng phát sinh phôi. Nuôi cấy lát cắt mỏng ở mô lá cây thuốc lá có thể tái sinh các cơ quan khác nhau như hoa chồi và rễ phụ thuộc vào lớp mỏng tế bào ở bộ phận nào của cây được nuôi cấy và các hormone. Có thể thu nhận những cây chồi có kiểu hoa và màu hoa khác với cây mẹ khi nuôi cấy những phần của mẫu hoa.

+ Tuổi và sinh lý:

Tuổi thực của mẫu nuôi cấy và tuổi theo mùa trong năm của mẫu nuôi cấy có ảnh hưởng quan trọng đến sự biệt hóa tế bào và tuổi sinh lý. Thành phần cơ quan có cấu tạo thấp không thể nuôi cấy *in vitro* do không thể sử dụng thành phần khoáng trong môi trường. Rễ phát sinh trên lá non *lunaria* và không phát sinh trên lá già. Khả năng tái sinh cao ở lá cây trưởng thành so với lá cây còn non. Ngược lại mẫu non cắt cành của *Hedera helix* dễ ra mẫu hơn so với mẫu trưởng thành và nuôi cấy lá non phát sinh cơ quan tốt hơn so với nuôi cấy lá trưởng thành.

+ Mẫu *in vitro*:

Mẫu *in vitro* có khả năng tái sinh cao hơn mẫu lấy từ cây mẹ trên đồng ruộng hay trong vườn ươm. Nuôi cấy mẫu *in vitro* cho thấy nâng cao khả năng nhân giống cắt đốt. Nuôi cấy túi phấn đạt tỉ lệ thành công cao khi nuôi cấy túi phấn cây trên đồng ruộng.

+ Sức sống của mẫu:

Mẫu cây mẹ có ảnh hưởng rất quan trọng đến nuôi cấy *in vitro*. Nuôi cấy đỉnh sinh trưởng để loại *virus* sản xuất ra cây sạch bệnh. Những cây bị nhiễm *virus* cũng có thể tạo ra cây sạch bệnh nhờ nuôi cấy đỉnh sinh trưởng.

+ Duy trì mẫu:

Xử lý và vận dụng quản lý mẫu nuôi cấy cho phép nhà vi nhân giống luôn có nguồn nguyên liệu để sử dụng trong nhân giống. Nguyên liệu của nuôi cấy cần phải sạch bệnh. Có nhiều nhân tố kiểm tra và cải thiện những điều kiện sinh lý và vật lý mẫu cây mẹ như dinh dưỡng, nhiệt độ, cường độ ánh sáng mà mẫu cây mẹ sinh trưởng và những xử lý vật lý và hóa học trực tiếp trên mẫu cây mẹ.

+ Dinh dưỡng:

Sử dụng vật liệu nuôi cấy khỏe và dinh dưỡng cây mẹ cho thấy rất quan trọng để có mẫu nuôi cấy khỏe. Đoạn cắt cành cây cà chua mẹ được chăm bón đậm cao khó ra rễ hơn cây mẹ được chăm sóc đậm thấp. Khả năng tăng sinh chồi kém ở những lá cây mẹ được chăm bón đậm cao. Mức bón đậm thấp cho thấy khả năng tăng sinh chồi mất đi, và mức độ đậm trong lá có liên quan đến khả năng phát sinh chồi từ lá *in vitro*.

+ Nhiệt độ:

Có sự ảnh hưởng trong nuôi cấy mô khi thể bulb mẹ được bảo quản ở các nhiệt độ khác nhau và thời gian bảo quản khác nhau.

+ Ánh sáng:

Khả năng nuôi cấy túi phấn cao khi cây mẹ sinh trưởng với cường độ ánh sáng cao. Khả năng tạo protoplast cao ở cây lúa mạch khi cây mẹ sinh trưởng ở cường độ ánh sáng thấp. Khi cây mẹ sinh trưởng ở cường độ ánh sáng thấp cho thấy cành cắt *in vitro* dễ

dàng ra rễ hơn à những cây mẹ sinh trưởng với cường độ ánh sáng cao hơn. Cường độ ánh sáng trung gian cho thấy số lượng chồi phát sinh nhiều hơn và khả năng tạo rễ tốt.

Khả năng tăng sinh chồi *in vitro* tốt khi nuôi cấy chồi cây mẹ trong bóng râm so với chồi ngoài trời. Tạo rễ cành cắt *in vitro* được thúc đẩy khi nuôi cấy mẫu cây mẹ 2 tuần với ánh sáng cao hơn ánh sáng đỏ sau đó nuôi cấy 2 tuần với ánh sáng đỏ. Sự tăng sinh chồi qua nuôi cấy mẫu lá sau khi cây mẹ được xử lý dưới ánh sáng đỏ. Ánh sáng đỏ kích thích tăng khả năng tổng hợp Cytokinin và làm giảm tổng hợp Auxin.

+ Hóa học và vật lý:

Có sự tăng sinh chồi khi nuôi cấy mẫu lá cà chua *in vitro* bằng cách phun chất ức chế sinh trưởng lên cây mẹ. Khi phun Daminozide (B9) sẽ tăng khả năng phát sinh mô sẹo. Tiền xử lý mẫu nuôi cấy *in vitro* có những ảnh hưởng đến khả năng tăng sinh cơ quan *in vitro*. Khi ngâm mẫu lá hay các bộ phận khác trong dung dịch Cytokinin như BA trước khi nuôi cấy, trong khi xử lý chồi tách rời với ABA hay NAA cho thấy có ý nghĩa tạo phôi trong nuôi cấy protoplast. Sử dụng các dung dịch xử lý là phương pháp mới có hiệu quả trong nuôi cấy thân gỗ. Xử lý đoạn chồi tách rời cây thân gỗ bằng cách ngâm vào dung dịch tương tự như xử lý duy trì chất lượng và thời gian bảo quản cắt cành. Dung dịch thường sử dụng: 55-60 μm sucrose 600μm 8-hydroxyquiniline citrate có tác dụng trên chồi tách rời và trong *in vitro* có thể sử dụng thêm GA₃ và Cytokinin hay Auxin trong phát sinh cơ quan.

4.5.1.2. Ảnh hưởng của môi trường.

Môi trường MS (Murashige và Skoog, 1962) được sử dụng phổ biến nhất trong nuôi cấy đỉnh sinh trưởng. Nhưng các loài khác nhau có thể đòi hỏi môi trường nuôi cấy khác nhau. Samartin (1989) đã sử dụng 6 công thức muối đa lượng khác nhau đối với cây trà *Camelia japonica* và thấy rằng môi trường MS cho tốc độ sinh trưởng nhanh nhất khi thu mẫu từ cây non. Môi trường MS đã chứng tỏ không thích hợp cho mẫu lấy từ cây già, trong khi môi trường muối loãng hơn (Heller, 1953) lại cho kết quả khá.

Tính độc của môi trường MS cũng được quan sát ở một số loài (Sommer, 1982; Vieitez, 1983) do môi trường này chứa hàm lượng muối đa lượng cao, có thể gây độc cho tế bào *in vitro*, nhất là protoplast. Phương pháp đơn giản nhất là giảm nồng độ muối khoáng xuống 1/3 hoặc 1/2 (Grosser, 1994). Môi trường cơ bản MS có hàm lượng NH₄NO₃, KNO₃ giảm một nửa, bổ sung thêm glutamine 1,550 mg/l, KCl 750 mg/l rất tốt cho nuôi cấy mô sẹo phôi hoá và giảm tích lũy tinh bột ở một số giống Citrus (Grosser và Gmitter, 1990).

Trong số các muối đa lượng, muối nitơ có ý nghĩa quyết định đến sự tái sinh chồi. Welander (1985) cho biết khi nồng độ NH₄NO₃ và KNO₃ trong MS giảm đi 1/2, đỉnh sinh

trường của dậu tây phát triển khá hơn, rễ tái sinh mạnh hơn. Giảm muối khoáng trong một số trường hợp có tác dụng tốt đối với sự ra rễ ở một số loài (Murashige, 1977; Hasegawa, 1980; Drew, 1987) như trường hợp chồi hoa hồng ra rễ tốt hơn khi nồng độ nitơ tổng số giảm (Hyndman cs., 1982).

Nguồn carbon cũng rất quan trọng đối với nuôi cấy đỉnh sinh trưởng. Nồng độ đường 1- 3 % được sử dụng phổ biến. Nồng độ đường sucrose cao hơn 3 % tỏ ra độc ở một số trường hợp (Rublee và Kartha, 1985). Chong và Pua (1985) đã sử dụng sucrose, glucose, fructose and sorbitol nồng độ từ 1-7 % trong nuôi cấy đỉnh sinh trưởng giống táo Ottawa 3 và thấy rằng nồng độ sucrose 3% là tối ưu cho sinh trưởng, 100% chồi tạo rễ và chất lượng cây con khoẻ mạnh.

Trạng thái vật lý của môi trường cũng có ý nghĩa quan trọng trong nuôi cấy đỉnh sinh trưởng. Đa số các trường hợp người ta sử dụng môi trường agar nhưng khi nuôi cấy đỉnh sinh trưởng một số loài, môi trường lỏng tỏ ra tốt hơn (Mellor và Stace Smith, 1969).

Nồng độ các chất kích thích sinh trưởng thấp trong môi trường có thể làm giảm các biến dị tế bào soma (Grosser và Gmitter, 1990). Tế bào mô sẹo phôi hoá ở cây có múi có thể nuôi cấy và bảo quản lâu dài trong môi trường không có chất kích thích sinh trưởng.

+ Nhiệt độ:

Nhiệt độ thích hợp nuôi cấy mô 20-27⁰C. Nhiệt độ ảnh hưởng sâu sắc đến sinh trưởng và phát triển cây *in vitro* qua những tiến trình sinh lý như hô hấp hay hình thành tế bào và cơ quan.

Trong nuôi cấy mô Nhiệt độ thích hợp nhất từ 32-35⁰C. Tuy nhiên ở 24 ⁰C Cytokinin kích thích hình thành chồi bị ức chế. Sự hình thành các cơ quan *in vitro* phụ thuộc vào nhiệt độ.

Xử lý cây mẹ trước khi đưa vào nuôi cấy *in vitro* là một phương pháp xử lý cơ bản để sản xuất cây sạch bệnh. Xử lý nhiệt trước khi nuôi cấy *in vitro* cho thấy đỉnh sinh trưởng đã được khử *virus*.

+ Ánh sáng

Cường độ ánh sáng: cường độ ánh sáng là một nhân tố quan trọng trong quang hợp, ảnh hưởng đến khả năng nuôi cấy *in vitro* cây có lá xanh. Tuy nhiên ảnh hưởng đầu tiên đến sự quang hợp là ảnh hưởng đến sinh lý. Ảnh hưởng quan trọng đến chồi, nhưng lại tối cần thiết cho sự tạo rễ. cường độ ánh sáng cao hay thấp quá cũng đều ảnh hưởng đến sự tăng sinh chồi.

+ Quang kì và chất lượng ánh sáng

Thời gian chiếu sáng ảnh hưởng sâu sắc đến những đáp ứng sinh lý ở cây trồng. Ở những cây ngày ngắn, ra hoa ngày ngắn, điều này cũng xảy ra tương tự đối với cây dài ngày (đêm ngắn), thời gian chiếu sáng 12-15 giờ thích hợp cho loại cây thân gỗ.

Chất lượng ánh sáng ảnh hưởng trực tiếp đến cây *in vitro* vì ánh sáng cao hơn ánh sáng đỏ hay ánh sáng đỏ có ảnh hưởng đến những biến đổi sinh lý trên cây như ra hoa, chế độ dinh dưỡng và những hiện tượng khác như tăng sinh chồi *in vitro* bằng cách xử lý cây mẹ với ánh sáng đỏ. ánh sáng đỏ và cao hơn ánh sáng đỏ ảnh hưởng đến khả năng ra rễ của cành cắt *in vitro*. Có loài xử lý 2 tuần với ánh sáng đỏ cho thấy hiệu quả cao hơn ánh sáng trắng. ánh sáng xanh có khả năng kích thích và ức chế. Ngoài ra có ảnh hưởng của bước sóng đến phản ứng cây *in vitro* và có mối tương tác giữa bước sóng ánh sáng và môi trường dinh dưỡng.

+ Các chất khí:

Thành phần chất khí trong bình nuôi cấy có ảnh hưởng đến sinh trưởng của cây *in vitro*. O₂, CO₂ và etylen là những chất được khảo sát nhiều. CO₂ có thể bị giới hạn trong bình nuôi cấy và sử dụng nắp bình có lỗ thông khí, sử dụng bình có bộ sung CO₂ và làm giàu CO₂ trong phòng dưỡng cây có thể cho vi nhân giống giá thành hạ.

Giàu CO₂ và cường độ ánh sáng cao giúp cho quá trình quang hợp xảy ra nhanh hơn và nâng cao tốc độ vi nhân giống. Không sử dụng đường sucrose làm giảm sự hoại mẫu trong nuôi cấy do vi sinh vật gây ra.

O₂ có giới hạn trong nuôi cấy mô. Etylen xem như là chất làm giảm sinh trưởng trong nuôi cấy mô. Auxin hưởng đến sự phóng thích etylen. Nâng cao hàm lượng etylen làm giảm sinh trưởng mô sẹo.

+ Hormon

Người ta nhấn mạnh tầm quan trọng của việc sử dụng auxin và Cytokinin trong hệ thống vi nhân giống. sự phối hợp của 2,4 D và NAA có ảnh hưởng đến sự hình thành mô sẹo cũng như tái sinh cây. GA₃ được sử dụng trong môi trường nuôi cấy để kích thích vươn thân, đặc biệt trong trường hợp có hàm lượng Cytokinin cao dẫn đến hình thành các cụm chồi có cấu trúc đặc.

4.5.2. Tính bất định về mặt di truyền

Mặc dù kỹ thuật nhân giống vô tính được sử dụng nhằm mục đích tạo ra quần thể cây trồng đồng nhất với số lượng lớn nhưng phương pháp cũng tạo ra những quần thể biến dị tế bào soma qua nuôi cấy mô sẹo và nuôi cấy tế bào đơn. Những biến dị này được nghiên cứu vận dụng vào cải thiện giống cây trồng nhưng rất ít những biến dị có lợi được báo cáo.

Tần số biến dị hoàn toàn khác nhau và không lặp lại. nuôi cấy mô sẹo và tế bào đơn có sự biến dị nhiều hơn nuôi cấy chồi đỉnh.

Cây trồng biến dị tế bào soma qua nuôi cấy thường là biến dị về chất lượng, số lượng và năng suất, và biến dị này không di truyền. Nguyên nhân gây ra biến dị chưa được làm sáng tỏ chủ yếu là do những biến đổi trong vật chất di truyền như đứt gãy, chuyển đoạn ADN hoạt đảo đoạn. Những nguyên nhân gây biến dị tế bào soma là:

- + kiểu di truyền
- + thể bội : cây đa bội thể tần số biến dị cao hơn cây nhị bội
- + số lần cấy truyền: số lần cấy truyền càng cao thì tần số biến dị càng lớn
- + loại mô

4.5.3. Mẫu đưa vào nuôi cấy

- Sự hoại mẫu:

Có hai tác nhân làm hư mẫu nuôi cấy *in vitro*:

+ Bị *virus* hay thể giống như *virus* xâm nhiễm, không hoại mẫu nhưng có ảnh hưởng về sau. Có sự xâm nhiễm của nhiều vi sinh vật như: *Agrobacterium*, *bacillus*, *erwinia* và *pseudomonas* vào nhu mô sẽ dẫn truyền sự hoại mẫu khi tế bào bắt đầu phân chia. Để làm giảm tác nhân gây nhiễm sử dụng mẫu nuôi cấy là nhu mô phân sinh đỉnh.

+ Bị vi sinh vật hủy hoại, có thể khử trùng mẫu trước khi cấy vào môi trường. Những loại khi đưa vào nuôi cấy thường bị vi sinh vật hoại mẫu nên đưa vào trồng trong môi trường mát và khô vài tuần trước khi lấy mẫu nuôi cấy sẽ giảm sự hoại mẫu.

Sử dụng thuốc kháng sinh

Nhằm hạn chế sự hoại mẫu của vi sinh vật như amphotericin B, nystelin, kanamicin, vancomycin và penicillin khử được vi khuẩn Gram (-) Gram(+) nấm mốc... sử dụng từng đơn chất hay phối hợp. Nồng độ khử trùng 5-100 g/l phụ thuộc vào vật liệu nuôi cấy và loại kháng sinh sử dụng. Mô thực vật rất nhạy cảm với tác động của kháng sinh và có những phản ứng khác nhau lên kiểu di truyền do đó nên cẩn thận khi sử dụng.

4.5.4. Việc sản xuất các chất gây độc từ mẫu cấy

Hiện tượng hóa mẫu hóa nâu hay bị đen là chết mẫu hay làm giảm sự tăng trưởng. Nguyên nhân của hiện tượng này là do mẫu nuôi cấy có chứa nhiều tannin hay hydroxyphenol có nhiều trong mô già hơn mô sẹo

Một số phương pháp làm giảm sự hóa nâu mẫu:

- tách các phân tử phenol ra khỏi môi trường
- bổ sung các chất khử redox (oxidation-reduction) phenol vào môi trường
- ngăn chặn sự hoạt động của enzym phenolase

- giảm lượng phenol có sẵn trong mẫu bằng môi trường lỏng giống môi trường rắn
- mẫu chuẩn bị có vết cắt nhỏ, để ngoài vài giờ trước khi cấy, hay nơi cấy trong môi trường không có ánh sáng.

Than hoạt tính được đưa vào môi trường để hấp thụ chất kìm hãm phenol, ngăn chặn quá trình hóa nâu hay đen, đặc biệt có hiệu quả trên các loại phong lan, nồng độ thường 0,1-0,3%. Tuy nhiên than hoạt tính sẽ làm chậm quá trình phát triển của mô do hấp thụ chất kích thích sinh trưởng và các chất khác. Polyvinylpyrrolidone (pvp), một chất thuộc loại polyamide, hấp thụ phenol qua vòng hydrogen, ngăn chặn sự hóa nâu, hiệu quả phụ thuộc vào các loài cây trồng khác nhau.

Giảm sự hóa nâu bằng cách cho các chất khử quá trình oxi hóa vào môi trường ngăn chặn sự oxi hóa phenol. Chất khử thường dùng: vitamin C, axit citric, L-cystein hydrochlorit, glutathione, và mecaptoproethanol. Phương pháp quan trọng là phối hợp vitamin C và axit citric.

Phương pháp đề nghị:

- + sử dụng mẫu cấy nhỏ từ mô sẹo
- + gây vết thương trên mẫu nhỏ nhất khi khử trùng
- + ngâm mẫu vào dung dịch vitamin C và axit citric vài giờ trước khi cấy
- + Nuôi cấy mẫu trong môi trường lỏng, O₂ thấp không có đèn 1-2 tuần chuyển mẫu từ môi trường có nồng độ chất kích thích sinh trưởng thấp sang môi trường có nồng độ cao.

4.5.5 Hiện tượng thủy tinh thể

Nhân giống vô tính *in vitro* chỉ có hiệu quả khi cây con được nhân giống chuyển ra đồng ruộng có tỉ lệ sống cao. Có hiện tượng trong nuôi cấy mô là xuất hiện cây *in vitro* thủy tinh thể. Khi chuyển ra khỏi bình nuôi cấy, cây con dễ dàng bị mất nước và tỉ lệ sống thấp. Đây là một dạng bệnh sinh lý. Dạng này thường thấy khi nuôi cấy trên môi trường lỏng hay môi trường thạch có hàm lượng thạch thấp, đặc biệt khi sự trao đổi khí thấp, quá trình thoát hơi nước tập trung trong cây.

- Đặc điểm cây thủy tinh thể

Nhận thấy là có sự khác nhau về hình thành lớp sáp ở cây nuôi cấy mô và cây ngoài tự nhiên. Lượng sáp chứa trong cây ngoài vườn ươm cao hơn hẳn cây *in vitro*. Tế bào có chứa nhiều phân tử có cực dễ dàng nhận phân tử nước gắn trên nó, gia tăng độ mất nước và tốc độ hô hấp của tế bào trong nhân vô tính và đưa đến sự chết của mô trong nuôi cấy.

- Ngăn chặn quá trình thủy tinh thể

- + giảm sự hút nước bằng cách tăng nồng độ đường
- + giảm sự tăng hấp thụ nước bằng cách tăng nồng độ đường trong nuôi cấy và dùng các chất có áp suất thẩm thấu cao, nhưng phương pháp này làm thay đổi sự tổng hợp cấu trúc không gian của diệp lục và ức chế hình thành chồi.
- + giảm gây vết thương trên mẫu qua chất khử trùng và tiếp xúc với môi trường cấy ít nhất. ABA ngăn chặn được sự hóa thủy tinh thể ở một số loài cây trồng.
- + giảm nồng độ đạm trong môi trường nuôi cấy
- + chuyển cây *in vitro* thuần hóa ngoài vườn ươm không ảnh hưởng đến cây bị thủy tinh thể.
- + giảm etylen trong bình nuôi cấy bằng cách thông khí tốt
- + tăng nồng độ ánh sáng và giảm nhiệt độ phòng cấy.

4.5.6. Khống chế điều kiện môi trường

Chứng minh được rằng nuôi cấy có diệp lục hay cây con *in vitro* có khả năng quang hợp tự dưỡng. Để nâng cao tối đa khả năng quang hợp *in vitro*, cải thiện điều kiện vật lí của môi trường nuôi cấy như nhiệt độ, cường độ và thời gian chiếu sáng, sự trao đổi khí...

Nhân giống *in vitro* trong điều kiện quang tự dưỡng có ưu thế hơn các phương pháp thông thường:

- + sinh trưởng và phát triển cây *in vitro* có thể được thúc đẩy bằng cách tăng cường độ ánh sáng của phòng nuôi cấy từ 30-35 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ đến ít nhất 100 và tăng nồng độ CO_2 lên gấp 2-3 lần. Quá trình ra rễ được gia tăng. Có thể dùng một lượng nhỏ chất kích thích sinh trưởng hay chất dinh dưỡng trong môi trường nuôi cấy. Bình nuôi cấy có thể được đậy kín nối tiếp với hệ thống cung cấp khí, điều này dẫn đến sự giảm độ ẩm tương đối và khí etylen trong môi trường, ảnh hưởng đến khả năng hình thành khí khổng bình thường và sập bảo vệ. Dẫn đến sự thuần hóa cây con *in vitro* được thuận lợi, tăng tỉ lệ cây sống, tiết kiệm chi phí sản xuất cây con.
- + sử dụng môi trường nuôi cấy *in vitro* không đường làm giảm đáng kể cây chết do những nguyên nhân sinh học
- + ngăn chặn hay tránh được các quá trình phát sinh hình thái hay các hiện tượng sinh lý không thuận lợi và sản xuất ra những cây *in vitro* đồng nhất.
- + bình nuôi cấy *in vitro* có thể sử dụng những bình có thể tích lớn, dễ dàng trong kiểm soát môi trường nuôi cấy, thực hiện tự động hóa.

4.5.7. Những trở ngại khi thương mại hóa

Có nhiều loài cây phải dùng phương pháp thông thường, có loại cây dùng nuôi cấy mô tốt nhưng có loài không có hiệu quả về kinh tế

+ Giảm chi phí sản xuất: chi phí lao động chiếm 60-80 % nên hạn chế kỹ thuật nuôi cấy mô trong nhân giống cây trồng. Đặc biệt đối với các cây có hệ số nhân giống thấp.

+ Ở những phòng thí nghiệm thương mại thí nghiệm cấy truyền trong 1 thời gian dài là một vấn đề. Có những cây mất 1-2 năm mới trưởng thành

+ Khi nhân giống *in vitro* có 1 số cây thay đổi kiểu di truyền

4.5.8. Nhân giống *in vitro* và việc sử dụng giống ưu thế lai

Ở ngành trồng trọt, giống ưu thế lai mới chỉ được ứng dụng ở một số đối tượng như: ngô, cà chua, lúa, cải đầu, bắp cải, hành tây, măng tây, đặc biệt là các giống hoa...

Sử dụng ưu thế lai không những làm tăng năng suất từ 20-40%, mà giống lai còn có đặc điểm là rất đồng đều so với giống bố mẹ. Tính đồng đều của giống là tiền đề quan trọng cho sản xuất theo phương thức công nghiệp. Ở súp-lơ chẳng hạn, phương thức sản xuất công nghiệp đòi hỏi phải thu hoạch toàn bộ diện tích bằng cơ giới vào một thời điểm. Điều này chỉ được thực hiện khi sử dụng giống ưu thế lai F_1 . Nếu dùng giống thuần chủng theo phương thức tự phối thì không đảm bảo, vì ở các giống rau họ cải (Brassicaceae) thường xuất hiện hiện tượng bất tự thụ. Vì vậy, phương pháp nhân giống và bảo quản giống trong ống nghiệm đối với một số giống rau và giống hoa có một ý nghĩa kinh tế cao.

Vấn đề đặt ra hiện nay là phải nghiên cứu các quy trình nhân giống *in vitro* tối ưu cho từng loài cây trồng và cải tiến quy trình đó để giảm tới mức tối đa các tổn kém về nhân công lao động trong các công đoạn nuôi cấy và đưa cây con ra ngoài đất.

4.6. Quy trình nhân giống một số cây trồng phổ biến

4.6.1. Cây khoai tây *Solanum tuberosum* L

* Phục tráng giống khoai tây bằng phương pháp nuôi cấy đỉnh sinh trưởng

Phương pháp tiến hành:

4.6.1.1. Xử lý nhiệt:

Trồng khoai tây trong chậu đất trong điều kiện nhiệt độ, ánh sáng bình thường. Khi chồi nảy ra từ củ cao khoảng 15 cm thì cắt phần ngọn dài 6-8 cm, bỏ bớt 2 lá dưới cùng và cắm vào một ly thủy tinh đựng đất mùn vô trùng. Dùng một ly thủy tinh khác

đậy trên ly đất để tránh cho chồi và đất bị mất nước trong vòng 10 ngày để chồi ra rễ (điều kiện nhiệt độ, ánh sáng không thay đổi). Sau 3-4 tuần chuyển cây sang điều kiện chiếu sáng 3000-4000 lux, thời gian chiếu sáng 12 giờ/ngày, nhiệt độ 36°C ban ngày và 33°C ban đêm. Sau 2 tuần cắt bỏ chồi ngọn để các chồi bên phát triển. Sau 6 tuần xử lý nhiệt, chồi bên được thu để tách đỉnh sinh trưởng.

4.6.1.2. Tách đỉnh sinh trưởng:

Chồi được cắt bỏ bớt lá và đặt trên giấy thấm ẩm trong hộp petri kín để tránh bị mất nước. Nếu trong giai đoạn tạo chồi, cây được nuôi cẩn thận thì việc khử trùng chồi cũng không cần thiết lắm. Nếu cần thì cũng có thể khử trùng mẫu trong dung dịch khử trùng có nồng độ thấp, trong khoảng thời gian ngắn. Mẫu được rửa sạch dung dịch khử trùng nhiều lần bằng nước cất vô trùng. Thao tác tách đỉnh sinh trưởng được thực hiện trong tủ cấy vô trùng, dưới kính lúp có độ phóng đại x25. Dùng kim nhọn hay đầu dao mổ nhọn gạt bỏ các lá bao bên ngoài đến khi còn đỉnh sinh trưởng và 2 phác thể lá. Cắt đỉnh sinh trưởng với độ dài khoảng 0,6 mm và cấy lên mặt môi trường MS đặc có bổ sung IAA 0,5 mg/l, GA₃ 0,1 mg/l và inositol 100 mg/l. Đỉnh sinh trưởng được nuôi ở 23°C, thời gian chiếu sáng 16 giờ/ngày. Sau vài tuần, khi cây cao khoảng 3 cm có thể cấy sang môi trường mới. Khi cây có nhiều lá thì có thể nhân lên bằng cách cắt đốt, mỗi đốt mang một lá. Mỗi đốt được cấy vào trong 1 ống nghiệm 12 x 100 mm có chứa 3,5 ml môi trường. Nếu khoai tây khó ra rễ thì bổ sung than hoạt tính vào trong môi trường. Cây khoai tây tạo thành sẽ được chẩn đoán bệnh trên các cây chỉ thị như *Gomphrena globosa* (virus X), *Chenopodium amaranticolor* (virus S và X), *Solanum demissum* (virus Y). Khi chắc chắn không còn virus trong khoai tây thì những cây khoai tây sạch bệnh được đưa vào nhân giống đại trà.

4.6.1.3. Nhân giống trên khay cát

Cây khoai tây trên ống nghiệm được cắt thành từng đốt, mỗi đốt mang một lá, và cắm vào khay cát ẩm. Khoảng cách cắm 3 x 3 cm. Che nắng, giữ ẩm cho đốt giâm trong 7 ngày đầu. Khi đốt giâm ra rễ, tưới bằng dung dịch NPK loãng 1 lần/ngày. Phun thuốc trừ sâu bệnh thường xuyên. Sau 1 tháng, cắt ngọn cây và giâm vào luống đất. Phần còn lại vẫn được chăm sóc như cũ. Sau khi cắt ngọn 5-7 ngày, chồi bên sẽ bật lên và tiếp tục tăng trưởng. Các chồi bên này cũng sẽ được cắt và trồng trên đất. Khay cát này sẽ được giữ khoảng 12 tháng để thu chồi.

4.6.1.4. Nhân trên luống đất

Chồi ngọn trên khay cát được cấy vào luống đất. Đất và phân đã hoại được trộn theo tỷ lệ 3 phần đất: 1 phần phân. Hỗn hợp đất và phân được khử trùng sơ bộ để khử bớt các mầm gây bệnh. Luống đất được trải rộng 80cm, dài 5-10m, chiều cao luống 6-8 m.

Khoảng cách cắm chồi 5x5 cm. Sau 20 ngày bắt đầu cắt ngọn để cấy vào bầu đất. Chồi bên này cũng được thu và cấy vào bầu đất. Có thể cắt liên tục trong 6-7 tháng đến khi mạ hóa già.

4.6.1.5. Cây trong bầu đất

Bầu đất được làm bằng lá chuối, kích thước 5x 12 cm, bên trong có chứa đất. Chồi ngọn và chồi bên thu từ luống mạ sẽ được cắm vào bầu đất. Che nắng và giữ ẩm trong 4-5 ngày đầu. Khi chồi ra rễ và tăng trưởng thì bỏ lưới che và tưới bằng dung dịch NPK loãng mỗi ngày. Sau 15-20 ngày (kể từ khi cấy chồi vào bầu) thì cây khoai tây đã phát triển mạnh, thân mập, có bộ rễ hoàn chỉnh, sẵn sàng được đưa ra trồng ngoài ruộng.

4.6.1.6. Trồng cây ngoài ruộng để tạo củ giống:

Cây khoai tây bầu đất được trồng ngoài ruộng với mật độ rất cao (100.000 cây/ha) để hạn chế sự tăng trưởng của củ. Với mật độ trồng này có thể thu được nhiều củ nhỏ trọng lượng 15-50 g/củ. Khi củ này mầm sẽ được đem trồng với mật độ 30.000-40.000 cây/ha. Sau khi thu hoạch, củ khoai tây lớn sẽ được bán cho người tiêu thụ, củ nhỏ và trung bình được bán để làm giống.

4.6.2. Vi nhân giống cây chuối

4.6.2.1. Nuôi cấy đỉnh sinh trưởng

Đỉnh sinh trưởng chuối được nuôi cấy bằng phương pháp hủy đỉnh. Củ chuối thu từ cây chuối con 4 tháng tuổi, được cắt gọn, vỏ ngoài được tách bỏ, chỉ chừa lại khoảng 5 lớp bên trong. Củ chuối được ngâm trong dung dịch khử trùng hypochlorit sodium trong tủ cấy vô trùng. Sau đó mẫu được lau sạch bằng bông gòn có thấm nước cất vô trùng và được tách bớt các lớp vỏ bên ngoài bằng dao nhọn và sắc đến khi còn lại 3 lớp vỏ trong cùng thì ngưng tách. Hủy đỉnh sinh trưởng để bỏ ưu thế ngọn, các chồi ở nách các bao có thể phát sinh thành nhiều chồi. Kích thước mẫu được tách có đường kính 1-1,5 cm, dày 0,7-1,3 cm. Mẫu sau khi tách được cấy vào bình tam giác thể tích 300 ml chứa môi trường MS đặc có bổ sung BA 5 ppm, IAA 0,5 ppm, tyrosine 100 ppm và nước dừa 15%. Mẫu được nuôi trong điều kiện nhiệt độ 25-28°C, cường độ chiếu sáng 3.000 lux, độ ẩm 70-80% và thời gian chiếu sáng 8 giờ/ngày. Sau 45 ngày, chồi xuất hiện và cao khoảng 3 cm, trung bình trên mỗi mẫu cấy có 5-8 chồi.

4.6.2.2. Tạo cụm chồi

Các chồi trên mẫu được tách riêng rẽ từng chồi một. Mỗi chồi đơn lại được tách bao lá và hủy đỉnh tương tự như trên và cấy vào bình tam giác có chứa môi trường tạo

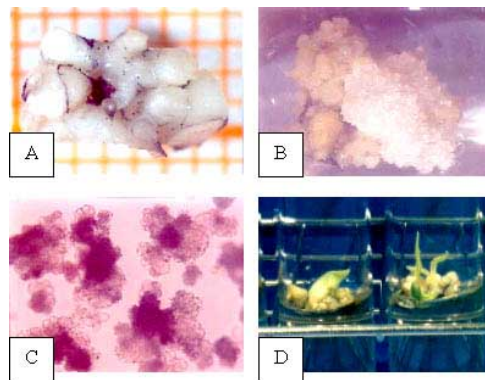
chồi. Môi trường tạo chồi và điều kiện nuôi cấy giống như bước một. Sau 30 ngày từ một chồi đơn phát triển thành cụm chồi gồm 3-4 chồi nhỏ.

4.6.2.3. Nhân cụm chồi

Cụm chồi được nuôi cấy vào môi trường nhân chồi. Môi trường nhân chồi cũng giống như môi trường tạo chồi nhưng nồng độ BA và IAA giảm xuống (BA là 2-3 ppm, IAA 0,2-0,3 ppm). Cụm chồi được cấy chuyển sau mỗi 3 tuần. Số lần cấy chuyển tổng cộng là 7. Trong mỗi lần cấy chuyển, chồi lớn vẫn được hủy đỉnh chồi và chồi nhỏ được giữ thành từng cụm có từ 2-3 chồi. Sau 7 lần cấy chuyển nhân chồi, từ 1 củ chuối ban đầu có thể cho 2000 cây chuối *in vitro*.

4.6.2.4. Tái sinh cây *in vitro*

Sau 7 lần cấy chuyển, chồi chuối được chuyển sang môi trường tái sinh. Môi trường tái sinh là môi trường MS có bổ sung NAA 0,1 ppm và than hoạt tính 1 g/l. Sau 30 ngày, cây chuối con có thân lá phát triển mạnh sẽ được chuyển ra luống ươm.



Hình 4.4 Nuôi cấy mô cây chuối thông qua nuôi cấy phát sinh phôi

(A) Đỉnh chồi (B) Cụm tế bào phôi (C) Dịch lỏng tế bào phôi (D) Cây tái sinh thông qua nuôi cấy phát sinh phôi



Hình 4.5 Nuôi cấy phát sinh hình thái cây chuối

Từ trái sang phải: Nuôi cấy phát sinh sau 1,2, 3 và 7 chu kỳ

4.6.2.5. Thuần hóa

Cây chuối con sau khi đưa ra khỏi bình sẽ được cấy trên luống ươm có cơ chất là xơ dừa. Cây con được giữ ẩm và phun thuốc kích thích ra rễ. Sau 15-20 ngày, cây con ra rễ, phát triển thân lá khỏe mạnh, cao 5-7 cm.

4.6.2.6. Chăm sóc trên vườn ươm

Sau giai đoạn thuần hóa, cây con được chuyển ra trồng trên luống đã được xử lý bằng thuốc trừ nấm bệnh. Cây con được bổ sung dinh dưỡng bằng dung dịch NPK (20-20-20) loãng 2 lần một tuần. Sau 20 ngày cây con được chuyển đến các nông trường trồng chuối.

4.6.2.7. Cây bầu đất

Cây con được cấy vào bầu đất trước khi chuyển đi. Bầu đất có chứa phân hữu cơ với đất với tỉ lệ 1:5. Cây con được phun ure 5g/l 2 lần một tuần, phun thuốc phòng bệnh, đặt nơi ánh sáng mạnh, tưới giữ ẩm. Sau 45 ngày chuẩn bị đưa ra ruộng. Các cây tăng trưởng yếu ớt và không bình thường sẽ bị loại bỏ.

4.7. Nhân giống cây thân gỗ

4.7.1. Vi nhân giống cây thân gỗ còn non

Cây còn non là cây trồng từ hạt được một năm tuổi. Nhân giống thông qua hai con đường nuôi cấy cơ quan và nuôi cấy phôi. Thông dụng là nuôi cấy cơ quan. nuôi cấy cơ quan và nuôi cấy phôi khác nhau ở chỗ phát sinh chồi ngọn hay chồi bên đầu tiên và sau đó phát triển rễ, cây hoàn chỉnh được tái tạo.

Trong nuôi cấy phôi thì phôi phát sinh đầu tiên sau đó hình thành lá mầm và rễ, là giai đoạn nảy mầm thành cây hoàn chỉnh.

4.7.1.1. Nuôi cấy cơ quan

Các bước nhân giống và môi trường

4 bước

- Hình thành chồi từ mẫu cây đưa vào nuôi cấy
- Vươn thân và nhân giống
- Tạo rễ
- Thuần hoá cây con in vitro

Chọn môi trường nuôi cấy cho từng bước phụ thuộc vào từng loại cây, từ nồng độ thấp đến cao. Thường người ta bổ sung môi trường cơ bản được chọn lựa trước phù hợp cho từng loại cây và từng bước nhân giống.

+ Tạo chồi:

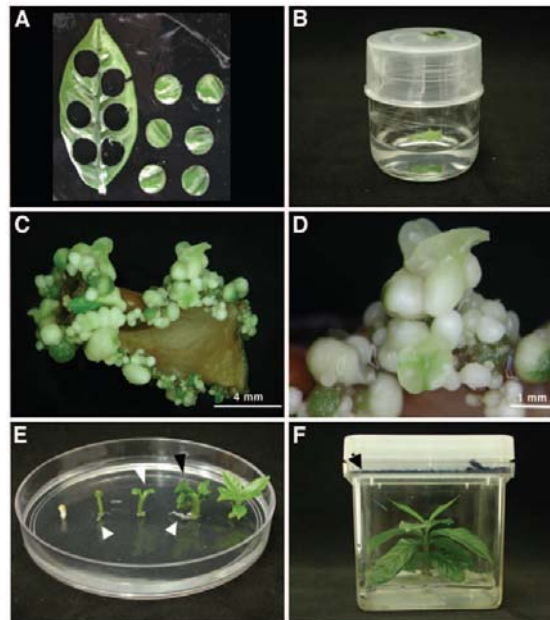
Mẫu đang phát triển cho khả năng tạo chồi cao

Mẫu non và chứa nhiều dinh dưỡng có nhu mô phân sinh có khả năng tạo chồi cao. chồi mầm cây từ hạt còn non có khả năng tạo chồi nhiều hơn cây già. Phôi hợp tử trưởng thành, lá mầm, phần trên lá mầm và chồi bên của lá, các bộ phận này chứa nhiều mô phân sinh, tạo được chồi ngọn hay chồi bên.

Chồi thường được tạo trên môi trường có Cytokinin với nồng độ 0,5-5 phương pháp, trên 5 phương pháp chồi ngọn và chồi bên xuất hiện chậm lại sau 4-6 tháng.

+ Vươn thân và nhân giống

Môi trường cho vươn thân giống môi trường nhân giống nhưng không có cytokinin. Sử dụng than hoạt tính (0,5-1%) rất cần thiết cho sự vươn thân. Đường Sacarosa 3% thích hợp cho sự vươn thân và nhân giống, 2% cho tạo rễ. Môi trường lỏng hay môi trường lỏng trên lớp agar thích hợp cho vươn thân.



Hình 4.6. Vi nhân giống cây caphe

Nhân giống được thực hiện bằng hai phương pháp:

1. Phương pháp cắt đốt có thể có hay không có cytokinin
2. Phương pháp nhân theo cụm chồi, có sử dụng cytokinin kích thích chồi phát sinh và phát triển. phương pháp này thường dùng đối với cây thân gỗ.

+ Tạo rễ và thuần hoá

Sự tạo rễ chịu ảnh hưởng của Auxin, cách xử lí Auxin, chất lượng chồi. tuổi sinh lý, giống cây và nhiệt độ. Để tạo rễ cây thường được cấy vào môi trường có Auxin như

IBA, NAA hay cả hai loại với nồng độ 0,1-5 phương pháp cho IBA và 0,1-5 phương pháp cho NAA. Nồng độ và thời gian sử dụng phụ thuộc vào giống. Tạo rễ và thuần hoá thường đi đôi với nhau. Trong thời gian thuần hoá cây non cần được duy trì ở tình trạng tự dưỡng, giảm độ ẩm từ 90% đến xuống 30-50%, lá dày lên và rễ phát triển.

4.7.1.2. Nuôi cấy phôi

+ Các bước nhân giống và môi trường

Tạo cây từ phôi trải qua 5 bước

1. Tạo phôi
2. Nhân phôi
3. Phát triển và trưởng thành phôi
4. Nảy mầm của phôi
5. Thuần hoá cây con in vitro

Môi trường nuôi cấy giống như môi trường nuôi cấy cơ quan. Thêm ABA vào trong môi trường cho sự phát triển phôi trưởng thành là cần thiết

+ Phát sinh phôi và nhân phôi:

Phôi hợp tử chưa trưởng thành, 3-5 tuần được dùng làm nguyên liệu tạo phôi. BA (0,5-5 phương pháp) và 2,4D (1-10 phương pháp) được dùng để tạo phôi. Auxin rất cần thiết cho sự phát sinh và phát triển phôi trưởng thành đồng nhất. Nhân phôi bằng môi trường lỏng được sử dụng phổ biến hiện nay.

+ Sự phát triển và trưởng thành của phôi

Để phôi phát triển và trưởng thành cần có ABA (10-20 phương pháp). ABA kích thích sự hình thành nơi dự trữ lipit, protein, và carbohydrat trong sự phát triển phôi là cần thiết cho phôi nảy mầm. môi trường có áp suất thẩm thấu cao, sự trao đổi tốt O₂ và CO₂ cải thiện chất lượng và số lượng phôi được tạo ra. Dùng đường Saccarosa 12% tạo áp suất thẩm thấu lớn, tăng sự trưởng thành và làm khô phôi. Đối với cây thân gỗ, sự hình thành phôi trên môi trường không có Auxin.

+ Sự nảy mầm của phôi.

Sự nảy mầm của phôi thường được thực hiện trên môi trường agar, nhưng khả năng tái sinh cây từ phôi cây thân gỗ là thấp. Tái sinh phôi trên cầu giấy đặt trên môi trường lỏng có ẩm độ cao cải thiện được khả năng tái sinh.

Đưa cây ra đồng ruộng

Thể nhân giống được tái sinh từ chồi hay in vitro phải được đưa ra thử nghiệm trên đồng ruộng so sánh với cây từ hạt và giâm cành. Nhưng sinh trưởng và phát triển của thể nhân giống đôi khi khác về sinh lý và di truyền xuất hiện trong quá trình nhân

giống. Nên rất cẩn thận khi nuôi cấy thể nhân giống trên đồng ruộng trước khi nhân hàng loạt.

+ Nhân thể nhân giống qua phát sinh cơ quan
 - Nhân giống cây thân gỗ sinh trưởng như cây từ hạt
 - Thể nhân giống từ những chồi non có trạng thái chín cây tốt và có khuynh hướng tạo những chồi ngọn sát nhau, có chiều cao giống nhau, đường kính cây hơi nhỏ hơn.

- Cây từ giâm cành thường tốt hơn thể nhân giống.
 + Nhân thể nhân giống qua phát sinh phôi:
 Sự hình thành thể nhân giống qua phát sinh phôi vẫn chưa được thử nghiệm hoàn chỉnh.

4.7.2. Vi nhân giống cây thân gỗ trưởng thành

Nhân giống vô tính cây trưởng thành khó hơn cây còn non
 Có hai loại mẫu được dùng:

1. Mô non ở gần gốc
2. Chồi trưởng thành ở đỉnh cây

4.7.2.1. Nuôi cấy cơ quan:

+ Xử lý cây mẹ
 Cây mẹ có tuổi trưởng thành lớn tuổi được đem đi giâm cành, chiết cành trước khi đưa vào nuôi cấy in vitro nhằm để tạo mô non hoá.

- + Có 4 bước nhân giống
1. Tạo chồi
 2. Vươn thân và nhân giống
 3. Tạo rễ
 4. Thuần hoá cây in vitro

Môi trường nhân giống như nuôi cấy cây còn non. Trên môi trường bổ sung than hoạt tính giúp vươn thân

+ Tạo chồi:

Chọn mẫu đang tăng trưởng, có nhu mô đỉnh hay chồi bên được kích thích tạo chồi, trên mẫu cây có sẵn 1-2 mm. Chọn những chồi non vươn ra ánh sáng thì khả năng tạo chồi cao.

+ Vươn thân và nhân giống

Môi trường chồi vươn thân không có chất kích thích sinh trưởng và bổ sung than hoạt tính (0,5-2%), khi vươn thân có rễ thì đem nhân giống. Đối với nhiều cây thân gỗ, khi chồi xuất hiện, thường được tách ra và cấy trên môi trường có nồng độ chất sinh

trường thấp như BA (0,202 ppm) BA+IBA, BA+IBA+GA₃. Tuy nhiên mẫu được nuôi cấy trên môi trường có cytokinin+ than hoạt tính hay không có cytokinin thì cây được trẻ hoá.

+ Tạo rễ và thuần hoá

Đối với mẫu già, Auxin cần thiết cho tạo rễ thường dùng IBA hay IBA+ NAA để tạo rễ. Nhân tố quyết định đến sự ra rễ: Dùng chồi có chất lượng, cơ chất xốp, phun sương giữ ẩm và giảm nhiệt độ ban ngày, tách mô sẹo ở gốc và môi trường nuôi cấy tạo rễ có 6% đường Sacarosa.

+ Thử nghiệm trên đồng ruộng và trẻ hoá:

Khả năng làm trẻ lại có thể được thực hiện khi xử lý cây mẹ bằng các kỹ thuật nông học, chọn mẫu nuôi cấy, nuôi cấy in vitro và môi trường hay những xử lý mang tính chất vật lý khác

Phụ thuộc vào mục tiêu sử dụng thể nhân giống:

1. Trẻ lại hay trẻ lại ở mức độ nào đó, cây có tc hình thái trẻ hơn cho thấy cần thiết trồng trên các khu rừng.
2. Các thể nhân giống chín hơn cần thiết để ra hoa kết hạt.

+ Chỉ thị hoá sinh:

Để tránh nhiều tháng chờ đợi và đôi khi hàng nhiều năm để quan sát những ảnh hưởng của các xl khác nhau trên hình thái, sinh lý, tập tính tái sinh của những thể nhân giống từ cây trưởng thành, những phương pháp chỉ thị hoá sinh được sử dụng để nghiên cứu.

Nghiên cứu tỉ lệ K/Ca trong mô chịu ảnh hưởng của cytokinin và mức độ trẻ của chồi trong nuôi cấy.

Sử dụng phương pháp sinh học phân tử để nghiên cứu những ảnh hưởng của trường thành đến những đặc tính hình thái và quang hợp ở cây trưởng thành giúp ta phát hiện những chỉ thị trẻ lại.

4.8. Thực hành nuôi cấy đỉnh sinh trưởng

4.8.1. Nuôi cấy phát triển thành cây trực tiếp

a. Nguyên liệu thực vật

- Đỉnh sinh trưởng của cây hồng (*Paulownia fortunei*)
- Đỉnh sinh trưởng cây keo lai (*Acacia hybrid*)

b. Môi trường nuôi cấy

- MS đầy đủ

- Saccharose 3%
- Agar 0,8%
- BAP 2 mg/L
- NAA 1 mg/L
- pH_{môi trường} ~ 5,8

c. Tiến hành

▫ Pha môi trường dinh dưỡng (1 L). Chia môi trường vào trong 20 hoặc 40 bình tam giác loại 250 hoặc 100 mL, tương ứng. Nút miệng bình bằng giấy nhôm, sau đó đem khử trùng ở 121°C (1 atm)/15-30 phút (*môi trường chuẩn bị trước từ 2 ngày trở lên*).

▫ Rửa sạch đỉnh sinh trưởng bằng xà phòng dưới dòng nước chảy, cắt bỏ những lá chung quanh chỉ để lại một vài lá, cho vào lọ thủy tinh vô trùng để chuẩn bị khử trùng mẫu vật.

▫ Trước khi cấy, laminar phải được bật đèn khử trùng 30 phút. Các dụng cụ cần thiết cho quá trình cấy (forceps, kéo, dao, bình khử trùng, cùn, giấy thấm...) được đặt trong laminar trước khi bật đèn.

▫ Khử trùng sơ bộ bằng cồn 90% từ 30 giây đến 1 phút, sau đó bằng HgCl₂ 0,1 % trong 5 phút, cuối cùng rửa sạch HgCl₂ bằng nước cất vô trùng từ 4-5 lần (*các thao tác này thực hiện trong laminar*).

▫ Lấy mẫu vật ra thấm khô trên giấy thấm vô trùng bóc bỏ những lá chung quanh, chỉ giữ lại đỉnh sinh trưởng (những phần mô thấm dung dịch khử trùng cũng cần phải cắt bỏ). Sau đó, cấy mẫu vào các bình tam giác chứa môi trường dinh dưỡng đã được chuẩn bị sẵn. Các bình môi trường đã cấy mẫu được đặt trong phòng nuôi với nhiệt độ 25 ± 2°C, thời gian chiếu sáng 8-10 giờ/ngày với cường độ 2000-3000 lux.

Sau 3-4 tuần, đỉnh sinh trưởng sẽ phát triển thành cây nhờ quá trình kéo dài chồi .

4.8.2. Nuôi cấy phát triển cây thông qua giai đoạn protocorm

a. Nguyên liệu thực vật

- Đỉnh sinh trưởng hoặc chồi nách của hoa lan *Dendrobium*

b. Môi trường nuôi cấy

- Lan: MS đầy đủ
 - Saccharose 2%
 - Agar 0,8%
 - Nước dừa 15%

NAA 0,1 mg/L

BAP 1,0 mg/L

pH_{môi trường} ~ 5,8

c. Tiến hành

Các bước tiến hành tương tự như trường hợp nuôi cấy phát triển thành cây trực tiếp. Nhưng lưu ý thêm:

- Đỉnh sinh trưởng của các loài lan thường rất bền nên phải rửa thật kỹ bằng xà phòng dưới dòng nước chảy.

- Lan là cây có khả năng sinh trưởng khá mạnh nên thời gian khử trùng đỉnh sinh trưởng của chúng có thể lâu hơn các đối tượng khác (khoảng 7-10 phút) để đảm bảo tỷ lệ nhiễm bản thấp.

Các bình môi trường đã cấy mẫu được đặt trong phòng nuôi với thời gian chiếu sáng 8-10 giờ/ngày, cường độ ánh sáng 2000-3000 lux, nhiệt độ phòng $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Chương 5. NUÔI CÂY GIAO TỬ, TẠO CÂY ĐƠN BỘI IN VITRO

5.1. Vấn đề 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 cá thể này đều bị hai hay nhiều allele của một gen chi phối. Nếu đó là những cá thể dị hợp tử, tức là các gen trong mỗi hệ gen nhị bội hay tứ bội khác nhau thì biểu hiện tính trạng (phenotype) của gen 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 (1n) hoặc các mức đa bội khác nhưng chúng phải đồng nhất tuyệt đối.

Giá trị của cây đơn bội trong các nghiên cứu di truyền và chọn giống đã được phát hiện từ lâu. Kể từ khi Blakeslee (1921) mô tả cây đơn bội tự nhiên đầu tiên ở *Datura stramonium*, cây đơn bội tự nhiên đã được tìm thấy ở rất nhiều loài cây khác nhau. Tuy vậy, các cây đơn bội tự nhiên xuất hiện một cách ngẫu nhiên với tần suất rất thấp không thể đáp ứng yêu cầu của nghiên cứu và chọn giống.

Năm 1964, lần đầu tiên trên thế giới, hai nhà khoa học Ấn Độ Guha và Maheshwari thành công trong việc tạo cây đơn bội từ nuôi cấy bao phấn in vitro cây cà *Datura innoxia*. Ngay sau đó, cây đơn bội đã được tạo ra bằng nuôi cấy bao phấn ở hàng loạt cây trồng khác nhau. Các nhà khoa học đã tìm ra những yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến thành công của quá trình nuôi cấy như ảnh hưởng của kiểu gen, giai đoạn phát triển của hạt phấn và các điều kiện môi trường nuôi cấy. Ngoài nuôi cấy bao phấn, các nhà khoa học còn có những thành công rất lớn trong nuôi cấy noãn chưa thụ tinh, nuôi cấy hạt phấn tách rời. Kỹ thuật tạo cây đơn bội in vitro thông qua kích thích tiểu bào tử hoặc đại bào tử trong nuôi cấy hạt phấn và noãn cho phép tạo ra nhanh chóng hàng loạt cây đơn bội, phục vụ đắc lực cho mục đích nghiên cứu di truyền và tạo giống cây trồng.

Hai phương pháp cơ bản của kỹ thuật đơn bội hiện nay là:

- Nuôi cấy bao phấn hay tiểu bào tử tách rời hay còn gọi là như phương pháp trình sinh đực trong ống nghiệm (in vitro androgenesis).

- Nuôi cấy tế bào trứng chưa thụ tinh hay còn gọi là phương pháp trình sinh cái trong ống nghiệm (in vitro gynogenesis).

Vật liệu ban đầu cho quá trình nuôi cấy in vitro tạo cây đơn bội thường là:

- Bao phần, hạt phần tách rời, cụm hoa (phương pháp này hay được áp dụng cho những loài có hoa nhỏ).

- Cứu phôi sau lai xa. Khi lai xa giữa hai loài lúa mạch *Hordeum vulgare* và *H. bulbosum*, quá trình thụ phấn phôi đơn bội xảy ra do nhiễm sắc thể của *H. bulbosum* bị loại trừ, nhưng nội nhũ của phôi đơn bội lại không phát triển. Sử dụng phương pháp nuôi cấy phôi đã cứu được những phôi này và tạo ra hàng loạt cây đơn bội (Jensen, 1977).

- Thụ tinh giả. Đây là quá trình thụ phấn nhưng không xảy ra sự thụ tinh. Mặc dù vậy, tế bào trứng vẫn được kích thích phát triển thành cây đơn bội. Hess và Wagner (1974) đã tiến hành thụ phấn *in vitro* giữa *Mimulus luteus* với *Torenia fournieri* và kết quả là đã tạo được cây đơn bội.

- Noãn chưa thụ tinh.

Trong số các vật liệu trên, bao phần, hạt phần tách rời và noãn chưa thụ tinh là những nguồn nguyên liệu quan trọng, được sử dụng phổ biến hơn để tạo cây đơn bội.

Kể từ thành công đầu tiên của Guha và Meheshinari (1996, 1967), các cây đơn bội của hơn 247 loài thuộc 88 chi và 34 họ thực hạt kín đã được tạo ra từ nuôi cấy bao phần và hạt phần (Bajaj, 1990). Cây đơn bội từ nuôi cấy noãn hình thành theo kiểu trinh sinh cái.

Tại Trung Quốc, công nghệ đơn bội đã được triển khai có hệ thống trên quy mô lớn và có định hướng chiến lược rõ ràng trong tạo giống mới. Hơn một nghìn cơ sở nuôi cấy bao phần đã hoạt động trên toàn quốc từ những năm 1970, kết quả đã tạo được trên 100 giống lúa mới trong một thời gian ngắn. Trong đó, giống lúa nước và lúa mì mới tạo ra từ kỹ thuật đơn bội đã mở rộng sản xuất trên diện tích vài triệu ha. Tại Triều Tiên, kỹ thuật nuôi cấy bao phần đã tạo ra 42 giống lúa mới (Sasson, 1993; Jain *cs.*, 1997). Ưu thế của các phương pháp nuôi cấy này là tất cả các cây tạo thành đều có nguồn gốc từ tiểu bào tử hoặc đại bào tử, vì vậy cây con nhận được sẽ là cây đơn bội hoặc cây nhị bội đồng hợp tử tuyệt đối với các cặp nhiễm sắc thể tương đồng hoàn toàn giống nhau (trừ trường hợp đột biến). Cây nhị bội thu được là do quá trình nhị bội hoá tự nhiên của hạt phần đơn bội trong nuôi cấy hoặc xử lý đa bội hoá bằng thực nghiệm.

Từ lâu, các nhà di truyền và chọn giống cây trồng đã sử dụng trạng thái đơn bội của cây trồng để tiến hành nghiên cứu và thông qua đa bội hóa thể đơn bội đó để thu được các dạng đồng hợp tử tuyệt đối. Tuy nhiên, các phương pháp kinh điển để thu nhận cây đơn bội cho hiệu quả rất thấp. Kỹ thuật tạo cây đơn bội *in vitro* thông qua kích thích tiểu bào tử phát triển thành cây trong nuôi cấy bao phần và hạt phần cho phép nhanh chóng tạo ra hàng loạt cây đơn bội đã là một biện pháp hữu hiệu đối với lĩnh vực ứng

dụng đơn bội vào nghiên cứu di truyền và tạo giống cây trồng. Với các thể đơn bội của thực vật bậc cao người ta có thể sử dụng vào các mục đích:

- Nghiên cứu di truyền về mối tương tác của các gen.
- Tạo đột biến ở mức độ đơn bội.
- Tạo dạng đồng hợp tử tuyệt đối.

5.2. Phương pháp tạo thể đơn bội *in vivo*

Kể từ khi Bergner phát hiện ra cây đơn bội ở *Datura stramonium* vào năm 1921, các nhà tạo giống thực vật đã tập trung nghiên cứu và thu được nhiều cây đơn bội hoặc trong điều kiện *in vitro* hoặc trong điều kiện *in vivo*. Trong tự nhiên, các dạng đơn bội tăng lên do kết quả của sự trinh sản và các cây này hiếm khi mang các đặc điểm của cây bố. Các kỹ thuật *in vivo* được ứng dụng để sản xuất cây đơn bội như sau:

5.2.1. Sinh sản đơn tính cái (*gynogenesis*)

Sản xuất các thể đơn bội riêng rẽ bằng cách phát triển các tế bào noãn bất thụ (unfertilised egg-cell) trong trường hợp sự thụ phấn xảy ra chậm. Gynogenesis được tìm thấy khi lai khác loài giữa *Solanum tuberosum* ($2n = 4x$) × *S. phureja* ($2n = 2x$) kết quả tạo ra dạng song đơn bội (dihaploid) là khoai tây ($2n = 2x$).

5.2.2. Sinh sản đơn tính đực (*androgenesis*)

Sản xuất các thể đơn bội riêng rẽ bởi sự phát triển của tế bào noãn mang nhân của bố. Trong trường hợp này, sự đào thải hoặc bất hoạt của nhân noãn (egg-nucleus) xuất hiện trước khi thụ tinh.

5.2.3. Sự đào thải hệ gen bằng lai xa

Hiện tượng này xảy ra khi lai khác chi và khác loài do sự đào thải chọn lọc của một trong những hệ gen của bố mẹ trong quá trình phát triển sau khi thụ tinh. Vì thế, phôi được tạo thành chỉ với một hệ gen và cây phát triển từ phôi như thế có thể là cây đơn bội. Chẳng hạn: lai khác loài giữa *Hordeum vulgare* và *H. bulbosum* cho ra cây đơn bội *H. vulgare*.

5.2.4. Sự giao phối không hoàn toàn (*semigamy*)

Quá trình lai mà ở đó nhân của tế bào noãn và nhân sinh sản (generative nucleus) của hạt phấn nảy mầm phân chia độc lập, cho kết quả tạo ra thể khảm đơn bội (haploid chimera).

5.2.5. Xử lý hóa chất

Một số hóa chất, như chloramphenicol và parafluorophenylalanine có thể cảm ứng đào thải một bộ nhiễm sắc thể ở các tế bào hoặc mô soma, làm tăng các thể đơn bội. Xử lý bằng toluene blue, maleic hydrazide, nitrous oxide và colchicine cũng có thể cho các kết quả tương tự.

5.2.6. Shock nhiệt

Xử lý nhiệt độ cao hoặc nhiệt độ thấp có thể có tác dụng trong việc ngăn cản sinh sản hữu tính (syngamy) và cảm ứng thể đơn bội.

5.2.7. Ảnh hưởng của chiếu xạ

Tia X hoặc ánh sáng UV gián tiếp cảm ứng làm đứt gãy nhiễm sắc thể và đào thải chúng, tạo ra các thể đơn bội.

Nhìn chung, các phương pháp *in vivo* có hiệu suất sản xuất cây đơn bội thấp. Các phương pháp *in vitro* cho hiệu quả cao hơn nhờ kỹ thuật nuôi cấy hạt phấn (pollen culture) hoặc nuôi cấy bao phấn (anther culture) ở khoảng 250 loài và loài lai. Các loài đặc trưng của họ Solanaceae cho kết quả tốt hơn cả, mặc dù ở các họ Cruciferae, Poaceae, Ranunculaceae và một số họ khác cũng có khả năng cảm ứng tạo cây đơn bội bằng sinh sản đơn tính bao phấn hoặc từ nuôi cấy hạt phấn phân lập.

5.3. Phương pháp tạo đơn bội *in vitro*

Đơn bội xuất hiện trong nuôi cấy *in vitro* vào giữa những năm 60. Guha và Maheshawari (1964-1966) đã phát hiện được những cấu trúc giống phôi trong nuôi cấy bao phấn của cà độc dược (*Datura*) và chứng minh được rằng cây đơn bội này xuất hiện từ hạt phấn đơn bội.

Năm 1967, Bourgin và Nitsch đã nuôi thành công cây thuốc lá *Nicotiana* đơn bội từ bao phấn tới lúc ra hoa.

Cho đến nay, người ta đã thành công trong nuôi cấy bao phấn của nhiều loài như: lúa, lúa mì, ngô, cải, tiêu...

5.3.1. Các phương pháp phát sinh cây đơn bội *in vitro*

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 đực:

5.3.1.1. Sinh sản đơn tính trực tiếp từ tiểu bào tử

Tiểu bào tử trong bao phấn → Phôi → Cây đơn bội ($n = 1$)

Cấu trúc dạng phôi (embryoid) phát triển trực tiếp từ hạt phấn. Quá trình này thường xảy ra trong bao phấn, điển hình là: *Datura*, *Nicotiana*, *Atropa*.

5.3.1.2. Sinh sản vô tính qua callus

Tiểu bào tử trong bao phấn → Callus → Chồi → Cây đơn bội ($n = 1$)

Cây hoàn chỉnh phát triển từ khối callus, khối mô này thường phát triển ra ngoài bao phấn, ví dụ: *Oryza*, *Brassica*, *Lolium*, *Hordeum*.

5.3.1.3. Sinh sản đơn tính hỗn hợp

Giai đoạn phát triển callus xảy ra rất ngắn và khó nhận biết, ví dụ: *Datura*, *Lycopersicum* (chưa chắc chắn).

5.3.2. Các bước phát triển phôi của hạt phấn

Bình thường sau khi được giải phóng từ túi phấn chứa một nhân, giai đoạn này được gọi là giai đoạn hạt phấn đơn nhân. Sau đó nhân chia đôi tạo thành một nhân dinh dưỡng và một nhân sinh sản. Nhân sinh sản lại chia đôi tạo thành hai tinh tử (giai đoạn nảy mầm tạo thành ống phấn) làm nhiệm vụ thụ tinh kép cho noãn và nội nhũ của túi phôi.

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

Cũng có ý kiến ngược lại, chẳng hạn Raghavan (1977) cho rằng phần lớn phôi *Hyoscyanus niger* mà ông thu được bằng nuôi cấy bao phấn có nguồn gốc nhân sinh sản.

Về nguyên tắc, thì kỹ thuật nuôi cấy *in vitro* cho phép tạo được đơn bội bằng nhiều phương thức khác nhau, nhưng phương thức bắt đầu từ tiểu bào tử vẫn là tiện lợi nhất.

5.3.3. Các nhân tố ảnh hưởng đến nuôi cấy bao phấn

5.3.3.1. Kiểu gen của cây cho bao phấn

Kiểu gen của cây mẹ có vai trò rất quan trọng trong việc xác định tần số sản xuất cây hạt phấn. ở lúa mì, tần số cảm ứng của callus hạt phấn và sự tạo thành cây xanh tiếp sau đó được điều khiển bởi nhiều gen. Mỗi kiểu gen khác nhau tương ứng với phản ứng sinh sản đơn tính khác nhau trong nuôi cấy bao phấn. Vì thế, đây là vấn đề cần lưu ý để chọn lọc chỉ các kiểu gen có phản ứng cao, còn hơn là tập trung chú ý đến việc cải thiện các điều kiện cho hệ thống nuôi cấy (một vấn đề phức tạp) trong nuôi cấy bao phấn.

5.3.3.2. Nhân tố thành bao phấn

Hạt phấn của một giống thuốc lá sẽ phát triển thành phôi ngay cả khi chuyển vào bao phấn của một giống khác. Chính kết quả này đã đưa ra khái niệm “nhân tố thành” (wall factor) và nó giúp đỡ cho nhiều nhà nghiên cứu sử dụng “hiệu ứng bảo mẫu” (nursing effect) của bao phấn hoàn chỉnh để phát triển sinh sản đơn tính ở các hạt phấn phân lập của nhiều loài. Dịch chiết của bao phấn cũng có tác dụng kích thích sản xuất phôi hạt phấn (pollen-embryo production).

Các nghiên cứu về mô học (histology) đã xác định vai trò của nhân tố thành bao phấn trong việc phát triển phôi hạt phấn. Một số kết quả nghiên cứu cho thấy glutamine riêng rẽ hoặc phối hợp với serine và myo-inositol có thể thay thế nhân tố thành bao phấn trong các thí nghiệm nuôi cấy hạt phấn phân lập.

5.3.3.3. Môi trường nuôi cấy

Thành phần môi trường nuôi cấy thay đổi tùy thuộc vào kiểu gen và tuổi của bao phấn cũng như các điều kiện mà ở đó cây cho bao phấn sinh trưởng. Sinh sản đơn tính tiểu bào tử ở *Nicotiana tabacum* và *Datura innoxia* có thể được cảm ứng trên môi trường agar đơn giản chỉ chứa sucrose. Hạt phấn tiếp tục phát triển trên môi trường như thế cho đến giai đoạn hình cầu (globular stage). Quá trình sinh trưởng về sau của phôi hạt phấn đòi hỏi bổ sung các muối khoáng vào môi trường. Tuy nhiên, hầu hết các loài thuộc họ Solanaceae chỉ phát triển sinh sản đơn tính trên môi trường nuôi cấy hoàn chỉnh (complete nutrient medium) bao gồm các loại muối khoáng, vitamin và sucrose của

Nitsch hoặc MS. Muối Fe (40 $\mu\text{mol/L}$ Fe-EDTA hoặc Fe-EDDHA) dùng như quyết định chủ yếu cho sự phát triển phôi của hạt phấn 3 hoặc 4 tuần tuổi trong quá trình nuôi cấy.

Ở các loài không thuộc họ Solanaceae, thành phần môi trường bao gồm: các chất điều khiển sinh trưởng và các hỗn hợp dinh dưỡng phức tạp (như dịch chiết nấm men, dịch thủy phân casein, nước dừa). Môi trường N6 sau đó cũng được sử dụng cho nuôi cấy bao phấn của các loại ngũ cốc khác như lúa, lúa mạch đen. Trong khi nhiều loài cần có auxin và/hoặc cytokinin để cảm ứng sinh sản đơn tính thì đa số các loài thuộc họ Solanaceae chỉ cần môi trường cơ bản. Sucrose là một thành phần không thể thay thế của môi trường, thông thường người ta sử dụng ở nồng độ 2-4% nhưng các loài như *Brassica* cần nồng độ cao hơn (10%). Thay thế sucrose bằng cách bổ sung glutathione, ascorbic acid và glucose cũng có tác dụng tương tự, kích thích sinh sản đơn tính ở lúa mạch đen. Bổ sung than hoạt tính hoặc 2-chloroethyl-phosphate vào môi trường nuôi cấy cũng có tác dụng kích thích sinh sản đơn tính ở một số hệ thống nuôi cấy.

5.3.3.4. Ảnh hưởng của nhiệt độ và ánh sáng

Gây shock nhiệt sẽ tăng tần số sinh sản đơn tính tiểu bào tử. Các nụ được xử lý lạnh ở 3°C hoặc 5°C/72 giờ kích thích hạt phấn phát triển thành phôi (xấp xỉ 58%) ở một số loài thuộc họ Solanaceae (*Datura*, *Nicotiana*), ngược lại bao phấn được duy trì ở 22°C trong cùng thời gian chỉ cho khả năng phát triển phôi khoảng 21%. Nói chung, gây shock nhiệt từ 2-5°C/72 có tác dụng kích thích sự phát triển không bình thường của giao tử đực và tích lũy hạt phấn đơn nhân (ức chế sự phát triển tiếp ở các giai đoạn sau).

Cụm hoa hình chùy (panicles) được tách rời của lúa khi xử lý ở 13°C/10-14 ngày cho tần số hạt phấn tạo callus cao nhất. Cảm ứng sinh sản đơn tính sẽ có hiệu quả cao nếu bao phấn của các loại ngũ cốc khác (lúa, ngô, pennisetum) được bảo quản ở nhiệt độ thấp trước khi nuôi cấy. Một số kết quả nghiên cứu cho thấy tiền xử lý bao phấn ở nhiệt độ 35°C đã kích thích sinh sản đơn tính ở một số loài *Brassica* và *Capsicum*.

Tần số phát sinh cây đơn bội và sinh trưởng của cây nói chung sẽ tốt hơn nếu chúng được nuôi trong điều kiện chiếu sáng, mặc dù cây hạt phấn của một số kiểu gen sinh trưởng trong cả hai điều kiện có chiếu sáng và trong tối. Tuy nhiên, các hạt phấn phân lập dùng như mẫu cảm với ánh sáng hơn so với bao phấn. Ánh sáng trắng cường độ thấp (low intensity white light) hoặc ánh sáng huỳnh quang đỏ (red fluorescent light) kích thích phát triển nhanh hơn của phôi trong nuôi cấy hạt phấn thuộc lá phân lập so với với ánh sáng trắng cường độ cao.

5.3.3.5. *Trạng thái sinh lý của cây cho bao phấn*

Bao phấn tách từ cây sinh trưởng trong điều kiện ngày ngắn (8 giờ/ngày) và ở vùng có cường độ ánh sáng cao cho phản ứng tương đối tốt hơn so với cây dài ngày (16 giờ/ngày) có cùng cường độ chiếu sáng. Sự phát sinh phôi hạt phấn có thể được cải thiện nhiều hơn nếu nhiệt độ dưới điều kiện ngày ngắn duy trì ở 18°C. Sự thay đổi mùa vụ thích hợp và tuổi cây cho bao phấn ảnh hưởng lớn đến phản ứng của các hạt phấn. Xử lý cây bằng cách bơm thuốc trừ sâu hoặc các chất độc khác cần phải được tránh. Cây thiếu nitrogen có thể ảnh hưởng xấu đến bao phấn hơn so với cây được cung cấp đủ nitrogen. Vì thế, có thể khuyến cáo rằng chỉ có những nguyên liệu sinh trưởng ở các điều kiện môi trường được điều chỉnh tốt chẳng hạn như nhà kính (greenhouse) mới có thể dùng cho việc sinh sản đơn tính tiêu bào tử.

5.3.4. *Một số chỉ số kết quả nuôi cấy*

Kết quả nuôi cấy bao phấn được tính theo các chỉ số sau:

a. Tỷ lệ bao phấn tạo callus và phôi

$$CR = \frac{NAC + NAE}{NA} \times 100$$

CR : Tỷ lệ tạo callus 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 %)

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

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

$$SE = \frac{NC + NE}{NA \times f} \times 100$$

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

d. Hiệu suất tạo callus hay tạo phôi (PE)

$$PE = \frac{NC + NE}{NA}$$

Quan sát của nhiều tác giả cho thấy sử dụng những cây mẹ có nguồn gốc bao phấn (ví dụ những cây được đồng hợp tử hóa bằng nuôi cấy bao phấn *in vitro*) 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 cho CR = 1,45%
- Giống hỗn hợp cho CR = 0,55%
- Dòng lưỡng đơn bội CR = 4-20

5.3.5. Những tồn tại trong nghiên cứu đơn bội

Việc kích thích hạt phấn phát triển thành cây đơn bội là một đóng góp rất lớn cho công tác cải thiện giống cây trồng. Nuôi cấy bao phấn hiện nay vẫn chưa đáp ứng được yêu cầu to lớn của công tác giống cây trồng, vì rằng kỹ thuật này mới thành công ở khoảng trên 30 loài của trên 20 chi, chủ yếu ở các chi và loài thuộc họ cà (Solanaceae).

Thời gian qua, người ta đã tiến hành các thí nghiệm với qui mô lớn trên các đối tượng cây trồng ngũ cốc thuộc họ hòa thảo (Poaceae), nhưng kết quả mới hạn chế ở lúa mì và lúa nước.

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 trong môi trường nuôi cấy.

Đối với thuốc lá, môi trường dinh dưỡng để nuôi bao phần rất đơn giản gồm muối khoáng và sucrose, không cần các chất hữu cơ khác cũng như hormone sinh trưởng.

Thế nhưng để nuôi cấy bao phần 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 phần các loài ngũ cốc được nuôi cấy cũng chỉ tạo callus, để có cây hoàn chỉnh phải tiến hành tạo chồi từ callus đó. Và thông thường thì tỷ lệ bạch tạng rất cao, chẳng hạn: Mix và cs (1977) nhận được 3.400 cây bạch tạng trong số 4.000 cây yếm mạch tái sinh từ callus bao phần.

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

Trong nuôi cấy bao phần, việc xuất hiện những phôi lưỡng bội từ tế bào lưỡng bội của vỏ bao phần 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 phần. Môi trường nuôi hạt phấn *Petunia* có chứa auxin, cytokinin và boric acid.

Thường là người ta phải nuôi cả bao phần 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 1.000 phôi/ đĩa petri. Thông qua quá trình nuôi trước đó, môi trường dinh dưỡng được bổ sung thêm những chất cần thiết do bao phần tiết ra. Glutamine là một thành phần quan trọng, nhưng còn nhiều chất khác vẫn chưa được biết tới.

5.3.6. 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 phần 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 mì (*Triticum*)... cây hoàn chỉnh phát sinh thông qua giai đoạn callus thì tần số cây bị bạch tạng chiếm khá cao (20-30 % hoặc cao hơn nữa). Tần số cây bạch tạng phụ thuộc vào các yếu tố sau:

- Tuổi callus cây chuyển từ môi trường tạo mô sẹo sang môi trường tái sinh cây. Càng cây chuyển muộn tần số bạch tạng càng cao.

- 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 ribosome, 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 lập 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 sản 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 lập cũng rất ít. Khi nuôi những tế bào này thành những cá 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 lập.

5.4. Ứng dụng của thể đơn bội

5.4.1. 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 phát sinh phôi đơn tính, còn gọi là sinh sản đơn tính đực (androgensis).

5.4.2. 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 mối 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 trồng (*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 cấy 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 + 12T. 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:

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.

5.4.3. Nghiên cứu đột biến và di truyền

Trong hệ gen (genome) của thể đơn bội không có quan hệ tính trội mà chỉ có quan hệ bổ sung giữa các gen, do đó các thể đơn bội là những nguyên liệu lý tưởng trong chọn dòng đột biến cũng như trong những nghiên cứu về mối tương tác của các gen.

5.4.4. Cải thiện giống cây trồng

5.4.4.1. Tạo dòng thuần

Thông thường bằng phương thức tự phối nếu muốn thu được dòng đồng hợp tử của hệ gen $2x$ thì phải qua 10 thế hệ và bộ gen $4x$ thì phải qua 30 thế hệ. Bằng nuôi cấy đơn bội và đa bội chỉ cần một thế hệ.

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

- Cây tự thụ :

$$F_1 : Aa$$

$$F_2 : 1/4 AA; 1/2 Aa; 1/4 aa$$

- Nuôi cấy đơn bội :

$$F_1 : Aa \text{ sẽ cho } 1/2 A \text{ và } 1/2 a \text{ giao tử đực}$$

$$F_{\text{ĐH}} : 1/2 AA \text{ và } 1/2 aa$$

Nếu số locus là 10 thì tự phối cần 410 cá thể mới có một cá thể đồng hợp (ĐH) ở F_2 . Trong khi đó đơn bội chỉ cần 210 cây đã có một cá thể đồng hợp.

Nếu số locus là n thì đơn bội cho phép đồng hợp tử xuất hiện theo tần số $(1/2)^n$ và phương pháp cổ điển sẽ là $(1/4)^n$. Đưa thêm các hệ số:

$$P_1: \text{tần số tạo đơn bội} = \frac{NE + EC}{NA \times f}$$

P_2 : tần số nhị bội hóa thành công, ta sẽ có tần số:

$$E = \frac{P_1 \times P_2 \times (1/2)^n}{(1/4)^n}$$

Tỷ số này biểu thị kết quả so sánh giữa phương pháp đơn bội và phương pháp cổ điển.

Nếu $E \geq 1$ phương pháp đơn bội hiệu lực hơn. Để được như vậy thì:

$$P_1 \times P_2 \geq (1/2)^n$$

n càng lớn thì $P_1 \times P_2$ càng nhỏ và như vậy hiệu lực của phương pháp càng lớn.

Nhưng vì giữa các gen có sự liên kết với nhau cho nên phải tính:

$$P_1 \times P_2 \geq (1/2)^{(n+n')}$$

n' : biểu thị sự liên kết.

- Có thể thông qua tính toán để chọn phương pháp thích hợp, ví dụ: có 20 gen độc lập hoặc liên kết theo phương thức trội, siêu trội, bằng tính toán cho thấy phương pháp đơn bội có ưu thế khi:

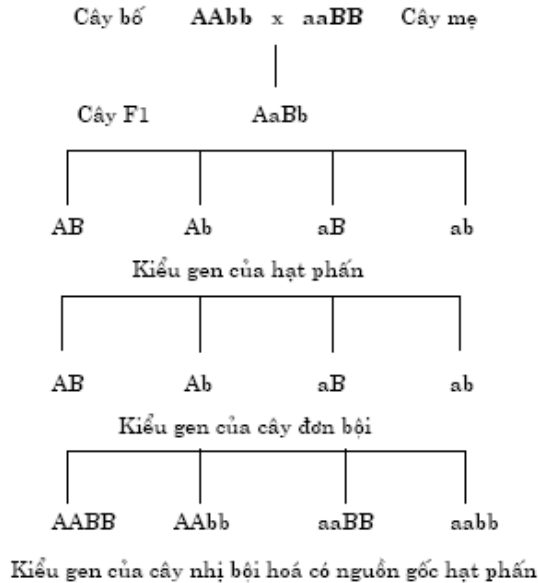
- Gen có tương tác di truyền.
- Bộ nhiễm sắc thể rất dị hợp.

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.

5.4.4.2. Tạo cây từ hạt phấn của các dòng lai F1

Kỹ thuật nuôi cấy bao phấn và hạt phấn trên môi trường tổng hợp đã được sử dụng rộng rãi vào nhiều mục đích khác nhau. Kết quả công bố gần đây trên thế giới cũng như trong nước cho thấy: phương pháp tạo cây từ hạt phấn của các dòng lai F1 không chỉ rút ngắn thời gian tạo giống mà còn đơn giản hóa quá trình chọn giống.



Ví dụ: Một giống mang gen A chống chịu một bệnh nấm lai với một giống mang gen B cũng chống chịu bệnh do một loại nấm khác gây ra .

Theo sơ đồ, bằng phương pháp tạo cây từ hạt phấn sẽ nhận được bốn kiểu gen (genotype) đồng hợp khác nhau, trong đó xác suất xuất hiện kiểu gen chống được cả hai loại bệnh nấm (AABB) là 1/4. Nếu so với phương pháp chọn lọc thông thường thì xác suất xuất hiện kiểu gen AABB là 1/16

Mặt khác, nhà chọn giống sẽ không thể phân biệt được cây đồng hợp AABB với các cây dị hợp như AABb, AaBb vì chúng đều giống nhau về kiểu hình (phenotype). Do đó bắt buộc nhà chọn giống phải tiếp tục chọn lọc ở các thế hệ tiếp theo. Kinh nghiệm cho thấy bằng phương pháp chọn lọc thông thường cho đến đời thứ năm, người ta vẫn chưa chọn được các dòng đồng hợp tử mong muốn ở các giống tự thụ phấn.

Bảng 5.1 Các kiểu gen của cây F2

Kiểu gen giao tử cái	AB	Ab	aB	ab
Kiểu gen giao tử đực				
AB	AABB	AABb	AaBB	AaBb
Ab	AABb	AAbb	AaBb	Aabb
aB	AaBB	AaBb	aaBB	aaBb
ab	AaBb	Aabb	aaBb	aabb

Trường hợp tổng quát, nếu kiểu gen của cây F1 là dị hợp từ một gen đến n gen (các gen này không nằm trên cùng một nhóm liên kết) thì ở cây F2 sẽ phân ly tính trạng theo bảng

Bảng 5.2. Sự phân ly tính trạng của các cây F2 dị hợp

N	2^n	3^n	4^n
1	2	3	4
2	4	9	16
3	8	27	64
4	16	81	256
...
12	4.096	531.441	16.777.216
...

n: số gen có chứa các alen khác nhau ở hai nhiễm sắc thể đồng dạng

2^n : số giao tử khác nhau về hệ gen (genome); hoặc số kiểu gen đồng hợp nhận được ở F₂;
hoặc số kiểu gen đồng hợp có thể nhận được bằng phương pháp tạo cây từ hạt phân ở F2.

3^n : Số kiểu gen khác nhau nhận được ở F2

4^n : Tổng số kiểu gen nhận được ở F2 theo lý thuyết

Ví dụ ở lúa có 12 cặp nhiễm sắc thể $2n = 24$. Nếu tất cả các nhiễm sắc thể đồng dạng đều không giống nhau từng đôi một thì ở F2 người ta sẽ thu được 531.441 kiểu gen khác nhau, trong đó có 4.096 kiểu gen đồng hợp. Vì vậy, trong phương pháp truyền thống, nhà chọn giống phải rất tinh tế và phải qua nhiều thế hệ mới có thể chọn lọc được một vài dạng đồng hợp mang những đặc điểm mong muốn. Xác suất chọn lọc trong trường hợp này ở F2 sẽ là: $X = 1/16.777.216$ (X là số dòng đồng hợp tử cần chọn) so với trường hợp cây từ hạt phân có thể thu được 4.096 dòng thuần khác nhau: thì xác suất là $X = 1/4.096$.

Ngoài ra, người chọn giống có thể dễ dàng phân biệt các kiểu gen khác nhau vì ở trạng thái đồng hợp, các đặc tính kiểu hình được biểu hiện rõ rệt. Như vậy, bằng phương pháp tạo cây từ hạt phân có thể rút ngắn thời gian và đơn giản hóa quá trình chọn giống.

Cho tới nay người ta đã biết hai trường hợp phát triển khác nhau của cây từ hạt phần nuôi cấy in vitro:

1. Cây xuất hiện thẳng từ hạt phần không qua giai đoạn mô sẹo

Ví dụ: ở các loại cây cà *Datura innoxia*, thuốc lá *Nicotinna tabacum*, cải dầu *Brassica napus* ...

2. Cây xuất hiện từ hạt phần qua giai đoạn mô sẹo

Ví dụ: ở các loài bắp cải *Brassica oleracea*, lúa *Oryza sativa*, lúa mạch *Hordeum vulgare*, ngô *Zea mays*, lúa mì *Triticum satium*...

Cây thuốc lá là ví dụ điển hình cho trường hợp thứ nhất: các cây đồng hợp tử phát triển từ dòng lai F1 theo sơ đồ sau:

Xử lý colchicine → Bao phần hoặc hạt phần → Cây đơn bội → Cây nhị bội
Mô sẹo

Ở thuốc lá, người ta có thể tạo cây nhị bội bằng hai phương pháp xử lý cây đơn bội bằng colchicine (Tanaka M., Nakata, 1969) hoặc:

1. Tạo mô sẹo từ các bộ phận khác nhau của cây đơn bội

2. Tạo cây từ mô sẹo trên môi trường thích hợp

Phương pháp này dựa trên hiện tượng tự đa bội hóa của tế bào trong quá trình nuôi cấy in vitro. Lần đầu tiên Nitsch và cộng sự (1969) ứng dụng để nhận được cây thuốc lá nhị bội từ mô sẹo đơn bội. Sau đó nhiều nhà khoa học khác cũng ứng dụng phương pháp của Nitsch để nhận các dòng nhị bội đồng hợp tử (Kasperbauer và Collins, 1972; Iman và Ternovski, 1975). Nisch và Mitsuoka (1969), Niizeki và Oono (1971), Woo và Chen (1982) đã quan sát thấy mô sẹo và cây lúa tái sinh từ hạt phần in vitro tồn tại ở các mức bội thể rất khác nhau. Kết quả nghiên cứu trên cây lúa qua nhiều lần quan sát cho thấy mức bội thể ở mô sẹo mới xuất hiện dưới 5 ngày như sau: đơn bội 78,38%; nhị bội 11,74%, số còn lại là mô sẹo ở các mức đa bội khác từ 3n đến 5n. Cây lúa xuất hiện từ mô sẹo cũng có mức đa bội thể khác nhau, trong số 168 cây nhận được từ hạt phần có 62% là cây nhị bội, 35% cây đơn bội, số còn lại là tam bội. Một số tác giả khác cũng đã nhận được hơn 50% cây nhị bội tự nhiên từ hạt phần khi nuôi cấy bao phần in vitro. Các cây nhị bội này là đồng hợp, các thế hệ sau đó rất đồng đều, giống nhau và giống cây mẹ ở mọi đặc điểm quan sát.

Kết hợp với Viện Cây lương thực và Cây thực phẩm (Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn), Viện Di truyền Nông nghiệp đã tiến hành nghiên cứu tạo cây lúa từ hạt phần của các dòng lai F1 vụ mùa năm 1977, hạt của các cây này đã được thu hoạch và gieo vào vụ mùa năm sau cũng cho ra các cây rất đồng đều. Như vậy, chỉ sau một năm

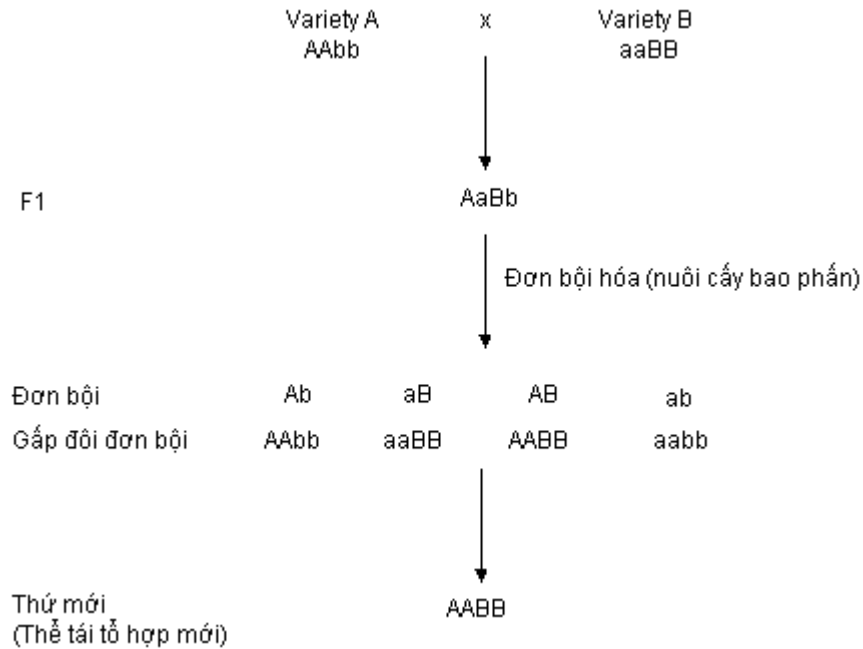
chúng tôi đã nhận được nhiều dòng đồng hợp tử từ các dòng lai (Đỗ Năng Vịnh và CS, 1979).

5.4.4.3. Nghiên cứu tạo cây từ hạt phấn của các giống thuần

Kết quả nghiên cứu gần đây cho thấy một số giống lúa mặc dù đã được thuần hóa lâu năm và sinh sản bằng tự phối vẫn có thể tồn tại ở mức dị hợp tử nhất định. Đã nhận được các dòng lúa khác nhau từ hạt phấn của cùng một giống: giống cườm và giống 63 - 83. Nuôi cấy bao phấn giống cườm chúng tôi đã Bao phấn nuôi cấy in vitro Mô sẹo 1n, 2n, 3n, 4n, 5n, ... Cây 1n: Xử lý colchicine Cây 2n Cây đa bội khác nhận được một số dòng cườm khác nhau về chiều cao cây và thời gian sinh trưởng, có dòng cườm hạt có râu rất dài. Nuôi cấy bao phấn giống 63 - 83 chúng tôi đã nhận được dòng 63 - 83 lùn, ra hoa kết hạt bình thường, chiều cao cây chỉ bằng một nửa so với chính giống 63 - 83. Như vậy, bằng phương pháp tạo cây từ hạt phấn các dòng lai hoặc từ các giống thuần, người ta có thể nhận được các dòng đồng hợp tử khác nhau (do phân ly hoặc do đột biến). Các dòng này có thể làm nguyên liệu cho nghiên cứu di truyền chọn giống. Nhiều tác giả nước ngoài cũng thông báo nhận được kết quả tương tự.

Các kỹ thuật giống cây trồng đơn bội thường bao gồm chỉ một chu kỳ tái tổ hợp giảm nhiễm. Tuy nhiên, nhiều phẩm chất nông học như năng suất được điều khiển bởi đa gen. Một chu kỳ tái tổ hợp thường không đủ cho sự cải thiện các tính trạng chất lượng như thế vì lẽ mỗi liên kết giữa các đa gen sẽ không giải phóng tất cả biến dị tiềm tàng trong khi lai. Để vượt qua sự bất lợi này, ở Trung Quốc người ta đã phát triển phương pháp nuôi cấy bao phấn tổ hợp bằng cách lai hữu tính giữa các kiểu gen khác nhau của các cây có nguồn gốc bao phấn. Bao phấn của thể lai thế hệ F_1 sẽ là nguyên liệu tạo giống lý tưởng để phát triển số lượng các cây đồng hợp tử có nguồn gốc từ hạt phấn (thể đơn bội kép-double haploid) trong đó các đặc điểm bổ sung của bố mẹ được tổ hợp trong một thể hệ.

Các thể đơn bội kép cũng rất hữu ích trong nghiên cứu di truyền của các tính trạng thuộc về phẩm chất. Trong các lĩnh vực tạo giống cây trồng, các cá thể song đơn bội có nguồn gốc từ nuôi cấy hạt phấn biểu hiện khả năng biến động di truyền (genetic variability) trong một phạm vi tương đối rộng. Bằng phương thức cảm ứng đơn bội theo cách gấp đôi nhiễm sắc thể, người ta có khả năng thu được các cây đực riêng biệt ở các loài khác gốc (dioecious species)



Sơ đồ 5.1. Ứng dụng của hệ thống gấp đôi đơn bội F_1 trong việc giải phóng các thể tái tổ hợp mới.

5.4.4.4. Nghiên cứu đột biến, gây đột biến ở các dạng đơn bội và chọn lọc

Nuôi cấy và tái sinh cây từ các dạng đơn bội khác nhau (hạt phấn, tế bào đơn, tế bào trần, mô sẹo đơn bội) kết hợp với kỹ thuật đột biến và chọn dòng có thể cung cấp nguyên liệu quý cho nghiên cứu trao đổi chất và di truyền chọn giống. Vì tế bào đơn bội chỉ chứa một đơn vị gen nên kỹ thuật đột biến có thể làm thay đổi hoặc mất chức năng gen không có sự hỗ trợ của các alen khác. Các đột biến lặn do vậy cũng được biểu hiện ngay từ đầu. Bên cạnh đó cây nhị bội tái sinh từ các tế bào đơn bội sẽ hoàn toàn đồng hợp và không bị khảm như trong trường hợp xử lý đột biến các dạng nhị bội và đa bội. Bằng kỹ thuật gây đột biến các dạng đơn bội, có thể chọn ra các dòng tế bào và cây chống chịu độc tố do nấm và vi khuẩn gây bệnh tiết ra, các dòng tế bào và cây có đột biến sinh hóa hoặc các dòng tế bào có khả năng sản xuất một lượng lớn sản phẩm thứ cấp quan trọng như alkaloid, chất thơm, các loại nhựa và enzym sử dụng trong công nghiệp, y học.

Người ta đã chọn ra các dòng tế bào chống chịu được các chất kháng sinh, độc tố nấm và vi khuẩn gây bệnh. Binding H., Bingding K., và Straub J. (1970) đã nhận được mô sẹo chống chịu streptomycine khi nuôi cấy *Petunia hybrida* đơn bội. Carlson (1973) cũng đã tạo được dòng tế bào chống chịu chất tương tự methionine (methionine

analogue) là methionine sulphocimine, có cấu trúc gần với độc tố của vi khuẩn gây bệnh *Pseudomonas tabaci*. Cây từ dòng tế bào chống chịu này đã có khả năng chống bệnh tốt hơn cây bình thường. Maliga và cộng sự (1973) cũng công bố tạo được cây chống chịu streptomycine từ mô sẹo đơn bội thuốc lá.

Người ta cũng đã tạo được các dòng đột biến sinh hóa. Tulecke (1960) lần đầu tiên tách được các dòng đột biến hạt phần dị dưỡng arginine bằng nuôi cấy hạt phần cây Ginkgo trên môi trường có chứa arginine. Wildholm (1972) đã tách ra các dòng tế bào cà rốt và thuốc lá chống chịu một vài đồng đẳng của axit amin. Các dòng thuốc lá chọn được có khả năng tổng hợp L - tryptophane gấp 18 lần tế bào bình thường.

Như chúng ta đã biết hạt của đa số các cây lương thực thường thiếu một hay vài axit amin như tryptophane, lysine, threonine, methionine là các axit amin rất quan trọng đối với người và động vật (Nelson, 1969). Vì vậy, việc chọn ra các dòng đột biến sinh hóa giàu axit amin ở các cây lương thực là rất quan trọng và có thể thực hiện được bằng phương pháp gây đột biến và chọn dòng tế bào (S. C. Woo và C. C. Chen, 1982). Kỹ thuật này đã được ứng dụng rộng rãi trong nuôi cấy tế bào cây dược liệu.

Phương pháp nuôi cấy mô và tế bào đơn bội kết hợp với kỹ thuật gây đột biến và chọn dòng hứa hẹn nhiều ứng dụng quan trọng trong nghiên cứu di truyền chọn giống. Song phương pháp này còn vấp phải một số khó khăn như tỷ lệ tái sinh cây từ hạt phần nói chung thấp và nhiều dòng tế bào chọn lọc được với những đặc tính quý nhưng chưa tái sinh thành cây. Một khi những khó khăn đó được giải quyết thì giá trị thực tiễn của phương pháp này sẽ rất khả quan.

Chọn lọc các đột biến kháng bệnh là một hướng nghiên cứu quan trọng trong cải thiện giống cây trồng. Cây đơn bội cung cấp một hệ thống tương đối dễ dàng cho việc tạo ra các đột biến. Vì thế, chúng được ứng dụng để chọn lọc nhanh các đột biến mang tính kháng bệnh. Người ta đã nuôi cấy bao phấn để chọn đột biến kháng bệnh đen cuống hoa (black shank) ở thuốc lá và kháng bệnh nấm vẩy (*Fusarium graminearum*) ở lúa mì.

5.4.4.4. Phát triển các dòng vô tính ở các loài cây thân gỗ lâu năm

Một số tác giả Trung Quốc đã thu được cây cao su có nguồn gốc hạt phần cao hơn 6 m là những cây sau đó có thể nhân bằng phương thức nhân giống vô tính. Ví dụ tương tự là cây bạch dương, cây mâm đơn bội được dùng để chọn lọc các kiểu gen mong muốn, và được gấp đôi tự nhiên thành cây nhị bội sau 7-8 năm. Các cây đơn bội nguồn gốc hạt phần cũng đã thu được ở một loài cây thân gỗ lâu năm như *Aesculus hippocastatum*, *Citrus microcarpa*, *Vitis vinifera*, *Malus prunifolia*, *M. pumila*, *Litchi chinensis*, *Euphoria longan*, *Ponicirus trifoliata*, *Lycium halinifolium*, *L. barbarium*, *L. chinensis* và *Camellia sinensis*.

5.4.4.5. Chuyển các gen ngoại lai mong muốn

Thông qua quá trình lai và nuôi cấy bao phấn, phương thức tạo giống cây trồng hạt phấn tiêu chuẩn có thể được phát triển ở lúa để chuyển các gen cho năng suất cao và kháng bệnh khô héo

5.4.4.6. Thiết lập các dòng tế bào đơn bội và nhị bội của cây hạt phấn

Kỹ thuật nuôi cấy bao phấn được sử dụng để tạo dòng tế bào soma đơn bội và nhị bội của cây hạt phấn ở lúa mì và ngô. Tương tự, dòng thuốc lá đơn bội kháng methionine sulfoxomide (MSO) đã được chọn lọc, dòng này đồng nhất kiểu hình và có hiệu lực đối với độc tố được sản xuất do tác nhân gây bệnh *Pseudomonas tabaci*.

5.5. Ứng dụng kỹ thuật đơn bội trong tạo giống mới và dòng thuần ở ngô, lúa

5.5.1. Cây lúa

Nhờ kỹ thuật nuôi cấy bao phấn lúa có thể rút ngắn thời gian chọn giống mới xuống từ 4 đến 6 thế hệ và tạo ra hàng loạt các dòng thuần mới. Trung Quốc là một trong những nước đầu tiên triển khai công nghệ đơn bội trong tạo giống lúa với quy mô lớn. Vào những năm 1976, những giống lúa đầu tiên từ chọn giống đơn bội kép đã được sản xuất thương phẩm (Yin cs., 1976). Hàng trăm giống lúa mới được tạo ra và trồng trên diện tích hàng triệu hecta (Jia S.R., 1992). Tại Triều Tiên, kỹ thuật nuôi cấy bao phấn đã tạo ra 24 giống lúa lùn mới (Jain cs., 1997; Sasson, 1993).

Thành tựu nuôi cấy mô hứa hẹn nhiều triển vọng đối với chọn tạo giống lúa là tái sinh cây lúa từ nuôi cấy hạt phấn tách rời ở cả hai dạng lúa nước Japonica và Indica do Raina và Irfan công bố gần đây (Raina và Irfan, 1998). Trên 500 phôi đã được tái sinh từ khoảng 80.000 hạt phấn nuôi cấy trong đĩa petri đường kính 3,5 cm. Rất nhiều cây đã được tái sinh từ hạt phấn. Đây là một tiến bộ kỹ thuật đặc biệt quan trọng ở cây ngũ cốc, có thể mở ra triển vọng mới trong chọn tạo giống lúa bằng kỹ thuật đơn bội và kỹ thuật gen. Theo lý thuyết, từ một cặp lúa lai F1 có thể tạo ra 4.096 kiểu gen đồng hợp khác nhau tái sinh từ hạt phấn in vitro (Đỗ Năng Vịnh và Phan Phải, 1996). Kỹ thuật nuôi cấy hạt phấn tách rời hứa hẹn có thể tạo ra vô số các nguồn gen đa dạng cho chọn giống.

ở nước ta, công nghệ đơn bội được áp dụng với hai mục tiêu chính sau:

- Cố định ưu thế lai thông qua việc rút ngắn thời gian tạo giống thuần chủng bằng phương pháp nuôi cấy bao phấn con lai F1
- Tạo dòng thuần có những đặc tính thích nghi với thụ phấn chéo và mang gen kết hợp rộng

Tại Viện Di truyền Nông nghiệp, phương pháp nuôi cấy bao phấn kết hợp với chọn dòng biến dị đã tạo ra 50 dòng bất dục đực cảm ứng nhiệt độ (TGMS) mới, trong đó 5 dòng đã được xác định là có tính bất dục ổn định, có ưu thế lai cao khi lai tạo và đang được sử dụng trong chọn giống lúa lai hai dòng.

Bằng phương pháp nuôi cấy bao phấn đã tạo ra 12 dòng giống thuần có ưu thế lai gần tương đương con lai F1. Các dòng giống có triển vọng gồm: DT26, DT29, DT32, J1, AC22, AC23, AC24, AC25... đang được khảo nghiệm. Nhờ nuôi cấy bao phấn lúa có thể rút ngắn thời gian chọn giống mới xuống từ 4 - 6 thế hệ. Kỹ thuật đơn bội in vitro cũng đang được triển khai mạnh trong chọn giống ở Viện lúa Đồng bằng Sông Cửu Long, Viện Công nghệ sinh học, vv...

Hiện nay, công nghệ nuôi cấy bao phấn và hạt phấn tách rời được dùng phổ biến cho các mục đích sau:

- Cố định ưu thế lai và các gen hữu ích

Thông qua kỹ thuật nuôi cấy bao phấn, người ta có thể cố định ưu thế lai và các gen hữu ích từ con lai F1 có ưu thế lai cao, làm tăng năng suất lúa (M.S. Swaminathan, 1995; Chen cs., 1978; Narayanan cs., 1996; Siddiq cs., 1994; Rangasamy, 1994, 1996; Zhu De Yao, 1998). Nuôi cấy bao phấn lúa lai Indica/Indica đã thu được các dòng có năng suất cao hơn bố mẹ và bằng 93,2% so với con lai F1 (Batachandran cs., 1994).

- Tạo các dòng bất dục đực mới và các dòng mang gen kết hợp rộng cho tạo giống lúa lai

Duy trì tính trạng bất dục đực và khả năng kết hợp của dòng thuần là yếu tố tiên quyết trong tạo giống lúa lai. Hiện nay, sản xuất lúa lai ở nước ta vẫn phải phụ thuộc rất lớn vào nhập khẩu giống lai từ Trung Quốc. Để tạo ra các dòng bất dục đực mới, các dòng B tiềm năng và rút ngắn quá trình tạo giống, người ta đã kết hợp lai, lai xa với nuôi cấy bao phấn (Dalmacio cs., 1995; Quing and Han, 1990). Kết quả nhiều công trình cho thấy kỹ thuật nuôi cấy bao phấn của con lai Japonica/Indica, Javanica/Indica là con đường nhanh và có hiệu quả để phát triển các dòng phục hồi mang gen kết hợp rộng trong tạo giống lúa lai (Yan J. Q cs., 1996; Virmani, 1996).

Để chọn tạo các dòng bất dục đực nhân với các nền di truyền khác nhau, nuôi cấy bao phấn con lai F1 mang gen bất dục đực nhân sẽ cho phép tạo ra các dòng thuần bất dục đực nhân mới chỉ sau một lần nuôi cấy bao phấn (Nin Jin cs., 1997; Q.R. Chu cs., 1998a, 1998b).

- Lai xa kết hợp với nuôi cấy mô tế bào trong chọn tạo các dòng kháng sâu bệnh và các điều kiện bất thuận của môi trường:

Người ta đã tạo được các con lai khác loài để chuyển gen kháng từ lúa dại vào lúa trồng. Tuy nhiên, khó khăn gặp phải khi lai là tính không tương hợp. Phương pháp cứu phôi và nuôi cấy bao phấn đã có hiệu quả trong việc tạo ra cây từ các cặp lai khác loài. Bằng phương pháp này người ta đã tạo được giống lúa có gen kháng chuyển từ lúa dại *O. officianlis* và *O. austrasiensis*, kháng với ba biotype của rầy nâu (Jena and Khush, 1997; Multani, 1994). Tương tự, các gen kháng bệnh đạo ôn, bạc lá đã được chuyển từ *O. minuta* để cải thiện nguồn gen kháng bệnh đạo ôn, bạc lá đã được chuyển từ *O. minuta* để cải thiện nguồn gen của lúa (Brar and Khush, 1977; Batachandran cs., 1994).

- Tối ưu hoá môi trường nuôi cấy bao phấn chọn tạo giống lúa hạt dài chất lượng cao:

Tại trường tổng hợp Louisiana (Mỹ), người ta đã xây dựng "Chiến lược chọn giống lúa hạt dài ưu việt cho miền Nam nước Mỹ" bằng nuôi cấy bao phấn lúa. Các giống lúa hạt dài có khả năng tái sinh yếu, tỷ lệ 0,5%. Bằng tối ưu hoá môi trường nuôi cấy, hàng năm họ đã tạo được trên 8.000 dòng thuần đơn bội kép từ nuôi cấy bao phấn của các cặp lai F1 hạt dài. Mục tiêu là chọn ra các giống lúa hạt dài có giá trị thương mại cao. Nhiều dòng tỏ ra có chất lượng hạt cao, chống chịu bệnh đạo ôn tốt hơn và tăng năng suất so với đối chứng, có dòng tăng 25% năng suất (Chu và CS, 1998; 2000).

- Kỹ thuật nuôi cấy hạt phần tách rời ở lúa

Hiện nay nuôi cấy hạt phần tách rời đang thu hút sự chú ý của các nhà nghiên cứu do hiệu quả cao. Quy trình có thể là tái sinh cây trực tiếp từ hạt phần (Mahdal cs, 1996; Zhuo cs, 1996) hay tái sinh cây thông qua giai đoạn mô sẹo (Wang cs, 1995). Raina và Irrffran (1998) cho biết từ một đĩa petri đường kính 3,5 cm đã tạo được 500 phôi từ các hạt phần lúa nuôi cấy hạt phần tách rời. Kỹ thuật nuôi cấy hạt phần tách rời kết hợp với phương pháp tạo phôi vô tính trong các bioreactor chắc chắn sẽ mở ra triển vọng lớn cho kỹ thuật chọn giống trên quy mô lớn.

- Nuôi cấy bao phấn kết hợp với các chỉ thị phân tử (CTPT) để tạo dòng thuần và chọn dòng, giống mang gen kháng sâu bệnh:.

Phương pháp chọn giống nhờ các chỉ thị phân tử (marker-assisted selection-MAS) là một phương pháp chọn giống mới đang áp dụng khá rộng rãi ở nhiều cây trồng. Phương pháp này cho phép xác định nhanh, chính xác sự có mặt của các gen mong muốn, do vậy có thể hỗ trợ cho chọn giống. Chọn giống nhờ chỉ thị phân tử khắc phục được hạn chế của các phương pháp truyền thống, tiết kiệm công sức và rút ngắn đáng kể thời gian tạo giống mới. Nó đặc biệt có hiệu quả khi ta phải quy tụ nhiều gen (kể cả các gen lặn) vào một giống mà các phương pháp chọn dòng theo kiểu hình truyền thống gặp rất nhiều khó khăn, thậm chí đôi khi không thể thực hiện được.

Bệnh bạc lá gây ra bởi *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) là một trong các bệnh nguy hại nhất ở lúa. Người ta đã xác định được ít nhất 18 gen kháng bệnh bạc lá lúa (Konoshita, 1991). Gen kháng bạc lá Xa 21 là một gen trội, có nguồn gốc từ giống lúa dại *O. longistaminata* được chuyển vào các giống lúa Japonica (Song cs., 1995) và các giống Indica (Tu cs., 1998). Huang và cộng sự đã quy tụ bốn gen kháng bạc lá Xa4, Xa5, Xa13 và Xa21 vào giống lúa NH 56. Kết quả giống này đã tỏ ra kháng bệnh bạc lá tốt hơn so với giống IRBB21 chỉ mang một gen Xa21. Gen kháng bệnh đạo ôn ở lúa và số chủng nấm gây bệnh đạo ôn hết sức đa dạng. Konoshita (1991), Mackill và Bonman (1992) cho biết có 30 locus gen kháng đạo ôn ở lúa, trong đó 20 locus kháng bệnh chính và 12 locus chính không liên quan với nhau. Nhiều giống kháng bệnh đạo ôn đã được xác định và tạo ra như giống tẻ tếp của nước ta mang bốn gen kháng bệnh đạo ôn, giống 5173 chứa gen Pi-2(t) kháng bệnh đạo ôn; giống IR20 có gen Pi-20, giống IR64 có gen Pi-20 và gen Pi-ta. Các giống này đã góp phần ngăn chặn bệnh đạo ôn ở nhiều nơi. Để phát triển các giống lúa chịu hạn, việc nghiên cứu các đặc điểm của rễ lúa: mật độ, độ sâu (Fukai và Cooper, 1995), khả năng điều tiết áp suất thẩm thấu là rất quan trọng. Việc lập bản đồ phân tử lúa liên quan đến các đặc điểm có lợi cho tính chịu hạn của rễ đã được tiến hành ở một số phòng thí nghiệm (Yadav cs., 1997; Champoux cs., 1995). Từ những công trình này, bước đầu đã xác định một số chỉ thị phân tử liên quan đến đặc điểm rễ có lợi cho tính chịu hạn, đặc biệt là độ dày, độ ăn sâu, tỷ lệ rễ ăn sâu/thân... Các chỉ thị này có thể dùng trong chọn giống với sự trợ giúp của marker phân tử.

Các bước chọn giống có thể tiến hành theo trình tự sau:

- Lai giống có các đặc tính nông học và chất lượng ưu việt với giống mang gen kháng để tạo ra dòng lai F1
- Nuôi cấy bao phấn con lai F1, tạo ra dòng thuần với các đặc tính khác nhau
- Sử dụng kỹ thuật chỉ thị phân tử để chọn các dòng thuần mang gen kháng bệnh
- Khảo nghiệm các dòng thuần chọn lọc trong những điều kiện sản xuất khác nhau để chọn giống tốt, kháng bệnh.

5.5.2. Cây ngô

Ở ngô, việc ứng dụng kỹ thuật đơn bội trong thực tiễn chọn tạo giống còn đang gặp nhiều khó khăn và hạn chế:

- Khả năng tái sinh cây từ bao phấn và noãn nuôi cấy *in vitro* nói chung còn thấp và phụ thuộc rất nhiều vào kiểu gen (genotype). Một số giống có phản ứng trong nuôi cấy rất cao, nhưng hầu hết các giống đều có phản ứng thấp hoặc không phản ứng. Hiệu quả tái sinh cũng đạt thấp, chỉ 3-5% phôi có thể tái sinh thành cây.

- Tần suất các cây đơn bội kép thu được từ nuôi cấy bao phấn rất thấp (chỉ 20% số cây thu được là đơn bội kép). Khả năng làm nhị bội hoá các cây đơn bội để thu nhận các dòng nhị bội đồng hợp còn rất thấp.

- Phương pháp nuôi cấy noãn chưa thụ tinh có thể là một phương pháp thay thế khắc phục được một số hạn chế trong nuôi cấy bao phấn, nhưng còn rất ít nghiên cứu theo hướng này.

Mặc dù vậy, kỹ thuật nuôi cấy bao phấn ngô để thu nhận các dòng đơn bội kép đã được ứng dụng thành công ở một số nước. ở Trung Quốc, hơn 100 dòng thuần đã thu được từ 30 tổ hợp khác nhau (Wu và cs., 1983), một số giống được áp dụng trong tạo giống lai và đã được sử dụng trong sản xuất như AC 4115, Elite DK 524... (Genovesi, 1987).

Kỹ thuật nuôi cấy bao phấn cây ngô:

5.5.2.1. Các giai đoạn phát triển khác nhau của hạt phấn ngô

Ở mức độ in vivo, tiếp theo sau quá trình phân chia giảm nhiễm của tế bào, các hạt phấn đơn bội đơn nhân được giải phóng ra khỏi tứ tử rồi trải qua hai lần phân bào nguyên phân để thu được một hạt phấn ba nhân (Pescitelli và Petolino. 1988). Giai đoạn đơn nhân sớm có đặc điểm kích thước nhân tương đối lớn chiếm 1/3 đến 1/2 thể tích tế bào. Đến giữa giai đoạn đơn nhân các hạt phấn có kích thước lớn hơn, nhân nhỏ hơn với sự hình thành của không bào trung tâm lớn, nhân bị đẩy về phía đối diện với lỗ hạt phấn (pollen pore). Đến cuối giai đoạn đơn nhân tế bào hạt phấn có thể tích tăng lên và trải qua lần phân bào nguyên phân lần thứ nhất. Đến đầu giai đoạn hai nhân, các nhân giống nhau về kích thước nhưng ngay sau đó bắt đầu biệt hoá, nhân sinh dưỡng có kích thước lớn hơn. Tới cuối giai đoạn hai nhân, nhân này di trú đến phía đối diện và nằm gần lỗ hạt phấn, nhân sinh sản di trú về phía lỗ hạt phấn rồi trải qua sự phân bào nguyên phân lần thứ hai để thu được một hạt phấn ba nhân.

5.5.2.2. Phát triển của hạt phấn trong nuôi cấy bao phấn in vitro

Trong kỹ thuật nuôi cấy in vitro, các cây đơn bội có thể hình thành trực tiếp thông qua phát sinh phôi hoặc gián tiếp qua hình thành mô sẹo.

Trong quá trình nuôi cấy bao phấn in vitro, chỉ một tỷ lệ nhỏ các hạt phấn trải qua quá trình phát triển thể giao tử in vivo bình thường. Trong những giờ đầu tiên của nuôi cấy bao phấn các hạt phấn bắt đầu trương lên, sau đó một phần lớn hạt phấn bắt đầu chết. Trong tuần đầu tiên, tỷ lệ hạt phấn sống sót giảm đi từ 80 - 90% xuống 10% thấp hơn (Pescitelli và cs, 1990). Trong số các hạt phấn sống sót, một số hạt bắt đầu trải qua sự phân chia nguyên phân. Sau nhiều lần nguyên phân liên tiếp, các hạt phấn phát triển

thành các cấu trúc đa bào mà vẫn nằm trong vỏ hạt phần những cấu trúc này được gọi là "những hạt phần phát sinh phôi thuần túy" (Pace và cs 1992). Sau giai đoạn này các cấu trúc tế bào đa nhân tăng trưởng về kích thước và tách khỏi vỏ hạt phần. Các cấu trúc phát sinh phôi được tách ra hoàn toàn và được bao bọc bởi lớp tế bào ngoại vi. Cuối cùng là các cấu trúc tương tự phôi (embryo like structure ES) đa bào hình thành.

Nuôi cấy bao phấn phải chọn đúng giai đoạn phát triển thích hợp của hạt phần để có thể thu nhận tỷ lệ tái sinh và số lượng cá thể tự nhị bội hoá (dòng đơn bội kép) cao. Giai đoạn nuôi cấy hiệu quả nhất là giai đoạn tế bào hạt phần từ tế bào đơn nhân sớm đến đầu giai đoạn hai nhân. Các hoa đực được tách khỏi cây cho bao phấn (donor plants) khi phần lớn các hạt phần đang phát triển từ giữa đến cuối giai đoạn đơn nhân (mid- to late uninucleate stage). Thông thường các bao phấn được xử lý nhiệt độ lạnh trước khi nuôi cấy. Sau giai đoạn xử lý lạnh các bao phấn chứa các hạt phần ở giai đoạn giữa hoặc cuối giai đoạn đơn nhân đến đầu giai đoạn hai nhân được tách khỏi hoa và cấy lên môi trường tạo cấu trúc phôi (induction medium - ký hiệu IM). Các bao phấn chứa các hạt phần ở những giai đoạn này được xem là thích hợp nhất cho quá trình sinh sản đơn tính đực *in vitro*. Sau khoảng 4 - 6 tuần những cấu trúc phôi đầu tiên xuất hiện và xuất hiện nhiều. Các cấu trúc phôi này khi đạt kích thước khoảng 2 - 3 mm được chuyển thẳng sang môi trường tái sinh để phát triển thành cây hoàn chỉnh (tái sinh trực tiếp). Một cách khác, các cấu trúc phôi có thể dùng để tạo mô sẹo có khả năng tái sinh cây hoàn chỉnh (tái sinh gián tiếp qua giai đoạn mô sẹo). Để tạo nên các cấu trúc mô sẹo có khả năng tái sinh cây, các cấu trúc phôi có thể được chuyển sang môi trường chứa 2,4D và một lượng BAP thích hợp. Sau khi chuyển sang môi trường tái sinh các mô sẹo phát triển thành cây hoàn chỉnh. Tái sinh gián tiếp dễ dàng tạo ra sự phát triển của nhiều cây non từ cùng một mô sẹo có nguồn gốc từ một hạt phần.

Một quy trình nuôi cấy bao phấn hay hạt phần tách rời về cơ bản có thể chia làm ba giai đoạn:

1. Giai đoạn tạo cấu trúc phôi từ các hạt phần nuôi cấy. Các cấu trúc phôi này sau đó có khả năng phân chia tế bào và biệt hoá cơ quan hình thành cây hoàn chỉnh trong những điều kiện thích hợp.
2. Giai đoạn biệt hoá cơ quan và tái sinh cây đơn bội từ các cấu trúc phôi (giai đoạn tái sinh).
3. Giai đoạn lưỡng bội hoá bộ nhiễm sắc thể của các cây đơn bội tạo thành cây đơn bội kép (doubled haploids) đồng hợp tử cùng nguồn gen.

Các phương pháp nhằm giảm tỷ lệ chết của hạt phấn thường góp phần nâng cao tần số tạo cấu trúc phôi. Thông thường một hạt phấn đơn lẻ sẽ hình thành một cấu trúc phôi nhưng cũng có trường hợp một hạt phấn hình thành nhiều cấu trúc phôi.

Việc nghiên cứu và ứng dụng kỹ thuật nuôi cấy bao phấn ở ngô cũng đã thu hút được mối quan tâm của các nhà khoa học trong nước (Lê Huy Hàm và cs, 1995, 1998, 1999). Trên cơ sở đó, việc nghiên cứu tối ưu hoá các điều kiện nuôi cấy là cần thiết đối với chương trình nghiên cứu chọn và cải tạo giống, nghiên cứu di truyền và kỹ thuật gen đối với cây ngô ở Việt Nam trong thời gian tới, phục vụ đặc lực cho việc tạo giống ngô mới, đặc biệt là ngô lai.

Vào năm 1998, trên cơ sở các giống ngô CM2, CM8, Viện Di truyền Nông nghiệp đã hoàn thiện quy trình nuôi cấy bao phấn với tần số tái sinh cao (30-80%). Với quy trình này, thời gian tạo dòng thuần rút ngắn từ 5 - 8 thế hệ ngoài đồng ruộng xuống còn 8 tháng trong phòng thí nghiệm. Viện đã tiếp tục nghiên cứu áp dụng quy trình này để sản xuất các dòng thuần cho sản xuất. Các nghiên cứu tập đoàn ngô Việt Nam đã chỉ ra rằng: các giống ngô Việt Nam nhìn chung có phản ứng thấp trong nuôi cấy bao phấn, do đó cần phải cải tiến quy trình và nâng cao phản ứng của các giống ngô Việt Nam (Lê Huy Hàm, Đỗ Năng Vịnh và cs, 1995, 1996, 1997). Các nghiên cứu tiếp theo tiến hành tại Viện Di truyền Nông nghiệp cho thấy có thể nâng cao hiệu quả nuôi cấy bao phấn bằng các phương pháp sau:

- **Nâng cao hiệu quả của nuôi cấy bao phấn bằng cải tiến quy trình nuôi cấy:** như xử lý nhiệt bao phấn trước và sau khi cấy, xử lý mannitol, cải tiến quy trình tái sinh cây từ phôi trong nuôi cấy bao phấn...), cải tiến thành phần môi trường muối khoáng, các bổ sung hữu cơ...). Một trong các công trình này đã được trao giải của Hội các nhà sinh học Châu á Thái Bình Dương trong hội thảo tại Hồng Kông tháng 7/1996, sau đó được đánh giá xuất sắc tại Hội nghị Nông nghiệp toàn quốc ở Thành phố Hồ Chí Minh tháng 9/2000. Đặc biệt, các nghiên cứu gần đây nhất tiến hành tại Viện Di truyền Nông nghiệp đã phát hiện tác dụng của từ trường có thể tăng hiệu quả nuôi cấy bao phấn ngô lên 3 lần. Đây cũng là một trong những nghiên cứu đầu tiên trên thế giới trong lĩnh vực ứng dụng từ trường vào công nghệ tế bào thực vật (Lê Huy Hàm, Đỗ Năng Vịnh và CS, 2001: “Nghiên cứu hoạt tính sinh học của nước nhiễm từ, dung dịch hoạt chất sinh học trong môi trường nhiễm từ và ứng dụng trong sản xuất phục vụ ngành nông nghiệp” - đề tài phối hợp Viện Vật lý ứng dụng & Thiết bị khoa học và Viện Di truyền Nông nghiệp tháng 1/2001). Các nghiên cứu này đã khẳng định tiềm năng cải tiến và nâng cao hiệu quả của quy trình nuôi cấy bao phấn ngô, ứng dụng có hiệu quả cho chọn giống ở Việt Nam .

- **Nâng cao hiệu quả của nuôi cấy bao phấn bằng phương pháp di truyền:** Các nghiên cứu tiến hành tại Viện Di truyền Nông nghiệp trên một số giống ngô cho thấy lai hữu tính giữa các giống ngô có phản ứng thấp với giống ngô có phản ứng cao trong nuôi cấy bao phấn có thể tạo ra giống ngô và các cặp lai F1 có phản ứng cao, nâng hiệu quả nuôi cấy bao phấn lên hàng chục lần (Lê Huy Hàm, Đỗ Năng Vịnh và cs 1999, 2000; Hoàng Thùy Dương, 1999). Viện đã sử dụng sơ đồ lai để tạo ra một loạt các dòng ngô Việt Nam có phản ứng cao trong nuôi cấy bao phấn.

5.5.2.3. Tạo dòng thuần bằng sử dụng dòng kích tạo đơn bội:

Bên cạnh việc nghiên cứu tạo dòng thuần bằng nuôi cấy bao phấn, Viện Di truyền Nông nghiệp đã sưu tập và nghiên cứu các dòng kích tạo đơn bội sau:

+ Các dòng kích tạo đơn bội đực: Line Ig1 Ri- nj/ig 1 Ri-nj; Line Ig Maitainer ; Line 1873-7 fertile Ig/ig X (N) ig/ig; Line 182 F1 Ig/ig X (N) ig/ig (ACR-nj/ACR-nj); Line Kindiger Ig Maitainer: ig1 ig1 B-3Ld IgI - Ri-nj.

+ Các dòng kích tạo đơn bội cái: Stock 6 Rig-col.sant; Stock 6 Ri-nj B1P11/same; Coe Stock 6 ACR-g Colored scutelum; (Coe Stock 6 C/C-I wx AR) X same.

Các nghiên cứu tiến hành trong năm 1999 - 2000 cho thấy các dòng kích tạo đơn bội trong những điều kiện thích hợp có thể tạo ra 3-5% hạt đơn bội. Hiện nay, Viện Di truyền Nông nghiệp đang kết hợp với nhà khoa học Mỹ - Bryan Kindiger - tác giả của một số dòng kích tạo đơn bội để chuyển các gen kích tạo đơn bội vào các giống ngô có nguồn gốc nội địa.

5.5.2.4. Nuôi cấy noãn chưa thụ tinh:

Vào đầu năm 1932, White đã tiến hành nuôi cấy noãn của cây *Antirrhinum*. Tiếp đó, một số nghiên cứu nuôi cấy noãn chưa thụ tinh ở một vài cây trồng khác như *Cooperia pedunculata* cũng được tiến hành nhưng không thu được kết quả (Maheshwari, 1958; Maheshwari và Lal, 1969). Đến năm 1964, Tulecke mới thu được mô sẹo đơn bội từ nuôi cấy noãn của cây *Ginkgo biloba*. Song đến thời điểm này, nghiên cứu thành công tạo cây đơn bội từ bao phấn ở cây cà *Datura innoxia* (Guha và Maheshwari, 1964) đã hướng sự chú ý của nhiều nhà khoa học vào tạo cây đơn bội bằng trình sinh đực trong suốt hơn một thập kỷ. Cho mãi đến đầu những năm 70, nghiên cứu tạo cây đơn bội thông qua nuôi cấy noãn chưa thụ tinh vẫn còn bỏ ngõ. Tuy nhiên, ở một số loài cây trồng, việc tạo cây đơn bội bằng trình sinh đực không đạt kết quả như: hành, lúa mì, củ cải đường, hoa hướng dương... (Keller, 1990). Điều này một lần nữa làm hồi sinh sự quan tâm vào tạo cây đơn bội trình sinh cái. Uchimiya và cs (1971) đã nuôi cấy noãn chưa thụ tinh ở ngô và cây *Solanum melongena*. Họ đã thu được mô sẹo trên môi trường bổ sung IAA và

kinetin, mặc dù nguồn gốc của những mô sẹo này chưa được xác định song kết quả kiểm tra tế bào học đã khẳng định là đơn bội. Đồng thời họ cũng quan sát được sự phân chia tế bào đơn bội của các mô sẹo này. Đến cuối những năm 70, đã có hơn 100 báo cáo về phôi tạo ra từ nuôi cấy túi phôi. Những kết quả nghiên cứu bước đầu về kỹ thuật nuôi cấy noãn chưa thụ tinh để tạo cây đơn bội đã được Yang và Zhou (1982) tổng kết: "Nuôi cấy noãn có thể là một trong những phương pháp hiệu quả để tạo cây đơn bội".

Tuy nhiên kỹ thuật nuôi cấy noãn chưa thụ tinh còn gặp nhiều khó khăn và phức tạp do việc tách tế bào trứng đối với thực vật hạt kín là rất khó và rất dễ gây thương tổn đến mô thực vật (Keller, 1996).

Bằng nuôi cấy noãn chưa thụ tinh, tỷ lệ tạo cây đơn bội ở một số cây trồng như hành, củ cải đường biến động từ 5-20%, lúa 1,5-12% và ở dâu tằm tỷ lệ tạo cây đơn bội cũng đạt 3-6%. Nhằm làm tăng thêm hiệu quả tạo cây đơn bội trình sinh cái, cần tập trung nghiên cứu các yếu tố ảnh hưởng đến khả năng tái sinh tế bào nuôi cấy in vitro như: kiểu gen, giai đoạn phát triển của túi phôi, xử lý nhiệt trước và sau nuôi cấy, môi trường và điều kiện nuôi cấy... (Sita, 1997).

Quy trình nuôi cấy noãn ngô đã thành công ở nước ta và đạt được trình độ quốc tế. Các nghiên cứu tiến hành tại Viện Di truyền Nông nghiệp cho thấy có thể dùng phương pháp nuôi cấy noãn chưa thụ tinh để tạo dòng thuần ở ngô. Hai phương pháp nuôi cấy noãn đã được áp dụng:

1. Nuôi cấy noãn chưa thụ tinh tách rời: cho hệ số tái sinh trực tiếp thấp. Đại đa số noãn hình thành mô sẹo, tỷ lệ tái sinh cây và tỷ lệ sống sót khi đưa ra ngoài thấp.

2. Nuôi cấy cùng lúc nhiều noãn trên một phần của lõi bắp ngô: Các nghiên cứu tiến hành với mô nuôi là một phần của lõi bắp ngô và noãn chưa thụ tinh đã khẳng định ưu thế vượt trội so với nuôi cấy noãn tách rời. Quy trình nuôi cấy đơn giản, noãn phát triển trực tiếp thành hạt, số hạt đơn bội in vitro đạt 4 - 5%, tỷ lệ hạt tự nhị bội hoá đạt 45%, tỷ lệ nảy mầm cao, cây con trong ống nghiệm phát triển khoẻ, dễ chuyển ra bầu đất với tỷ lệ biến dị thấp. Các nghiên cứu tại Viện Di truyền Nông nghiệp đã khẳng định khả năng nâng cao hiệu quả tạo dòng thuần ở ngô thông qua mô nuôi cấy noãn chưa thụ tinh và tiềm năng ứng dụng cho chọn giống là rất hiện thực. Trong các hội thảo quốc tế về chọn tạo giống ngô gần đây tại Băng Cốc (11/1999), Bắc Kinh (10/2000), Hamburg (3/2001), các công trình này đã được đánh giá là một trong những nghiên cứu cơ bản nhất về ứng dụng phương pháp nuôi cấy noãn chưa thụ tinh cho chọn tạo giống ngô.

5.6. Nguồn gốc của các biến dị tế bào soma

5.6.1. Những thay đổi di truyền xảy ra trước khi nuôi cấy mô in vitro:

Trong quá trình phát triển cá thể, phân hoá và già hoá của mô và tế bào một số các thay đổi di truyền đã xảy ra và được tích lũy trong các tế bào soma (D'amato, 1985). Nhờ kỹ thuật nuôi cấy mô, cây được tái sinh từ tế bào soma sẽ là các đột biến. Các nhà khoa học đưa ra khái niệm automutagenesis - tự đột biến (đột biến xảy ra không do các tác nhân từ bên ngoài gây nên hay là đột biến tự nó - automutagenesis). De Vries (1901) - người khởi xướng Học thuyết về đột biến cho rằng cây bị đột biến do được tái sinh từ hạt già (có nhiều đột biến đã tiềm ẩn từ trước trong hạt già). Ba mươi năm sau, Nawacin chứng minh đột biến ở hạt già là do các chất tham gia quá trình trao đổi chất và các sản phẩm cặn bã có trong hạt gây nên. Các chất này có thể là: hợp chất chứa lưu huỳnh, amin, amino axit, amids, aldehyde, alkloide, phenol, quinone, axit nucleic và các sản phẩm khác. Nguyên nhân gây đột biến có thể do cấu trúc bình thường của hạt và tế bào bị phá vỡ - các enzym tiếp xúc với các chất và tạo ra sản phẩm đột biến.

Tuỳ theo phương thức nuôi cấy tế bào soma, người ta phân biệt các loại biến dị dưới đây:

- Biến dị dòng tế bào mô sẹo (callusoclonal variation): khi cây biến dị tái sinh từ mô sẹo (callus)

- Biến dị dòng tế bào trần (protoclonal variation) - khi cây biến dị tái sinh từ tế bào trần.

Ngoài ra Evans và cộng sự (1984) còn đưa ra khái niệm "biến dị giao tử" (gameto-clonal Variation) khi cây được tái sinh từ các tế bào sinh dục (gamete). Những biến dị di truyền xảy ra và được phát hiện trong quá trình nuôi cấy in vitro gọi chung là đột biến tế bào dòng.

5.6.2. Những thay đổi di truyền xảy ra trong quá trình in vitro:

Một nguồn biến dị tế bào soma quan trọng là thay đổi trong bộ máy di truyền xảy ra khi nuôi cấy tạo mô sẹo và phân hoá cơ quan in vitro. Chroqui và Bercetch (1985) cho biết auxin gây ra đa bội hoá bên trong tế bào nuôi cấy (endopolyploidization). Oono (1982) nuôi cấy mô sẹo từ hạt lúa và tái sinh cây từ mô sẹo cho biết BAP có nồng độ 30 mg/l tạo ra tần số đột biến lớn gấp 50 lần so với BAP ở nồng độ 2 mg/l. Mức độ đột biến tế bào soma lớn đến mức tần số đột biến do các chất đột biến gây ra cũng không cao hơn (Larkin and Scowcroft, 1981).

Orton (1984) cho biết trong thời gian nuôi cấy trên môi trường dinh dưỡng, hệ gen của các tế bào thực vật đã trải qua quá trình cải tổ nhanh chóng và đã phát hiện những thay đổi số lượng, cấu trúc nhiễm sắc thể, đột biến gen. Tần số đột biến gen nhiều

khi rất cao (10^{-2} - 10^{-1}) tính theo locus trên cây. Thay đổi di truyền phổ biến nhất xảy ra trong tế bào nuôi cấy là đa bội thể. Sau khi mô được nuôi cấy, nhân tế bào có thể trải qua quá trình nội phân (endoreduplication) làm số lượng nhiễm sắc thể trong tế bào tăng lên gấp đôi hoặc hơn nữa nhưng không xảy ra phân chia tế bào. Kết quả số lượng nhiễm sắc thể của tế bào tăng lên. Quá trình nội phân của nhiễm sắc thể trước khi phân bào đã cho phép người ta nhận được cây lưỡng bội đồng hợp (dihaploid) từ hạt phấn đơn bội trong nuôi cấy bao phấn. Phổ rộng các biến đổi nhiễm sắc thể đã được quan sát thấy ở nhiều loài cây trồng khác nhau (Murashige và Nakano, 1967; Sacristan và Melchers, 1960; Sunderland 1973; Nishi và Mitsuoka, 1969). Nghiên cứu tế bào học cho thấy 10% số loài phân hoá cơ quan không kèm theo hiện tượng nội phân nhiễm sắc thể, 90% số loài phân hoá cơ quan có kèm theo nội phân nhiễm sắc thể.

Đột biến tế bào soma xảy ra ở các gen trong tế bào chất đã được chứng minh bằng phương pháp tách ADN ty thể và lục lạp nhờ enzyme cắt (Kemble R.T cs, 1984). Đột biến tế bào soma đã ứng dụng vào chọn giống hiệu quả ở nhiều cây trồng như mía, khoai tây, cà chua, thuốc lá, lúa và lúa mì. ở Petunia đã nhận được giống mới gọi là Velevetrose, giống mía Q47 (Larkin and Scrowcroft, 1981).

5.6.3. Biến dị di truyền trong nuôi cấy mô lúa

Đột biến tế bào soma đã được phát hiện bởi nhiều công trình nuôi cấy tế bào lúa. Nhà khoa học Nhật bản Oono (1978) đã tái sinh cây qua mô sẹo có nguồn gốc từ hạt của cây nhị bội đồng hợp gồm 75 hạt và đã chứng minh đầy sức thuyết phục về sự tồn tại của đột biến tế bào soma và di truyền đột biến đó. Oono đã phân tích 800 dòng cây nhận được từ tế bào soma và thế hệ con cái tự thụ. Kết quả cho biết chỉ có 28,1 % số cây là giống với cây mẹ về các đặc điểm phân tích. Phổ biến dị di truyền rộng đã quan sát thấy ở các đặc điểm như độ hữu thụ của hạt, chiều cao cây, thời gian trổ bông. Đột biến sắc tố chlorophyll thấy ở 8,4% số dòng. Phân tích cây tái sinh từ mô sẹo cho biết đa số các biến đổi di truyền xảy ra trong quá trình nuôi cấy. Phân tích di truyền cho biết đột biến đã xảy ra ở năm tính trạng và biểu hiện với tần số 0,03 - 0,7% trên một phân chia tế bào. Oono (1975) cho biết các cây nhận được từ mô sẹo của bao phấn nuôi cấy cũng có các biến dị khác nhau. Sau đó Oono (1982) đã tách các đột biến đồng hợp chiều cao cây, đột biến các tính trạng số lượng và chất lượng, đột biến lặn và đột biến trội xảy ra ở các dòng nhận được qua nuôi cấy mô lúa. Một nhà khoa học Nhật Bản khác là Fukui (1983) đã nhận được 12 cây tái sinh qua mô sẹo có nguồn gốc từ 1 hạt lúa, trong đó đã tách được các đột biến khác nhau như đột biến chín sớm, đột biến bạch tạng, đột biến thấp cây và bất dục.

Dabarh (1983) cũng nhận được các dạng đột biến lúa có ý nghĩa thực tiễn từ một mô sẹo ban đầu. Tần số đột biến tỷ lệ thuận với tuổi mô sẹo.

Các công trình nghiên cứu trên chứng tỏ tần số biến dị cao và phổ biến dị rộng trong nuôi cấy mô ở lúa có ý nghĩa quan trọng đối với chọn giống. Phân tích biến dị trong quá trình nuôi cấy giao tử đơn bội thường phức tạp hơn do khó phân biệt biến dị di truyền với phân ly tính trạng xảy ra trong giảm phân. Những biến dị số lượng nhiễm sắc thể ở mô sẹo và cây lúa nhận được trong nuôi cấy bao phần là rất phổ biến và được ghi nhận bởi rất nhiều tác giả (Nishi và Mitsuoka, 1969; Oono, 1975; Đỗ Năng Vịnh cs, 1979; Đỗ Năng Vịnh cs, 1987; Qiren chu cs, 1985...). Trong các công trình trên, tần số cây có mức độ bội thể khác nhau (1x, 2x, 3x, 4x, 5x, x = 12 nhiễm sắc thể) và lệch bội rất cao. Raina S.K (1983) đã nhận được 347 cây từ bao phần của bốn con lai F₁, trong đó 7 cây nhận được từ mô sẹo có biểu hiện biến dị di truyền. Tác giả đã chứng tỏ biến dị tế bào dòng giao tử (gametoclone) xảy ra trong nuôi cấy bao phần. Schlaeffer (1982) nhận được các đột biến thấp cây (thấp hơn 15- 30% so với giống ban đầu calrose 76) qua nuôi cấy bao phần. Phân tích đa hình độ dài đoạn phân cắt ADN ở các cây lúa tái sinh từ nuôi cấy mô cho thấy 23% số cây tạo được từ nuôi cấy in vitro dài hạn đã thể hiện các biến đổi trong cấu trúc ADN, so với tỷ lệ 6,3 % cây tái sinh từ nuôi cấy ngắn hạn. Như vậy, thời gian nuôi cấy tế bào kéo dài ở trạng thái chưa phân hoá (mô sẹo) là một yếu tố quan trọng làm phát sinh các đột biến gen và sau đó là đột biến ở cây tái sinh (Moller E. cs, 1990).

5.6.4. Biến dị tế bào soma trong quá trình nuôi cấy phôi ở ngô và khả năng ứng dụng thực tiễn:

Quan sát cây con nhận được từ mô sẹo phôi non và thể hệ con cái cho thấy phổ biến dị di truyền rất rộng. Green C. E. cs (1977) lần đầu tiên mô tả các cây nhận được từ mô sẹo phôi hoá (embryogenic callus) ở ngô với nhiều biến dị đặc điểm hình thái (thân, lá) và độ hữu thụ. Phân tích tế bào cho thấy có một cây khảm đa bội với nhiễm sắc thể số 5 trong tế bào được nhân lên nhiều lần và một cây có đoạn tứ bội. Tiếp theo các công trình nghiên cứu đầu tiên này, một loạt các công bố khác đã khẳng định tần số biến dị cao xảy ra với các tính trạng hình thái và nông học quan trọng như cao cây, độ dài bắp, số hàng trên bắp, độ chín sớm (Nesticky M. cs 1984; Glaser V.P,1984; Glaser V.P,1984). Một số dòng ngô mới có nhiều ưu việt so với giống ban đầu đã nhận được từ cây tái sinh. Một vài giống lai tạo ra với sự tham gia của các dòng mới này có năng suất cao hơn nhiều so với giống lai đối chứng (Earle E.D. và Gracen V. E, 1985; Gracen V.E. và Earle E. D,1985). Các nhà di truyền và chọn giống đặc biệt quan tâm tới các biến dị xảy ra trong nội bào quan (tế bào chất). Các polypeptid tham gia vào quá trình hô hấp, quang hợp,

tổng hợp ATP được mã hoá bởi các gen ty thể và lục lạp. Các tính trạng khác như bất dục đực tế bào chất, khả năng chống chịu các chất kháng sinh và độc tố cũng do ADN nội bào quan, trong đó có ADN ty thể quy định (Cornu A. cs, 1981; Kool A. T. cs, 1986). Cornu (1981) cho biết khi nuôi cấy phôi non của các dòng ngô bất dục đực kiểu T đã nhận được cây hữu thụ và kháng độc tố nấm *Drechslera maydis* gây bệnh. Phân tích cho hay đã có những thay đổi cấu trúc ở ADN ty thể dẫn đến khôi phục khả năng hữu dục ở dòng bất dục. Quá trình khôi phục khả năng hữu thụ và khả năng chống chịu không phụ thuộc vào sự có hay không có độc tố gây bệnh của nấm *Drechslera maydis* trong môi trường chọn lọc (Brettell cs 1979; Brettell cs 1980). Những biến dị tế bào soma đã xảy ra trong nuôi cấy mô, mặc dù không có sự can thiệp của tác nhân gây đột biến và môi trường chọn lọc (Brettall và Ingram, 1979). Tính trạng bất dục đực tế bào chất và cảm ứng với độc tố T có thể xảy ra do một thay đổi di truyền độc nhất trong tế bào chất và thay đổi này có thể được phục hồi lại với tần số cao. Vậy có thể tạo ra các dòng bất dục đực kiểu T chống chịu độc tố gây bệnh T bằng nuôi cấy mô hay không? Kết quả lai tạo cho thấy sự khôi phục khả năng hữu thụ của các dòng bất thụ đực tế bào chất in vitro là do những thay đổi trong tế bào chất (Gracen V. E. và Earle E. D., 1985). Sự phục hồi liên quan đến sự mất ADN tương tự như plasmid S_1 và S_1 ở ty thể (Escorte cs, 1985). Sự biến mất của các plasmid tự do S_1 và S_2 trong ty thể có thể do chúng lại gắn vào ADN ty thể. Quá trình hồi phục quan sát thấy trong nuôi cấy phôi non ở ngô đã mở ra mô hình mới cho việc nghiên cứu cơ chế phân tử của hiện tượng bất dục đực tế bào chất. Một thay đổi lý thú khác là sự chuyển ngược lại từ hữu thụ thành bất thụ tế bào chất. Gracen và Earle (1985) thông báo đã nhận được một dạng bất dục đực kiểu C mới hoặc một loại bất dục đực tế bào chất hoàn toàn mới nhờ nuôi cấy mô phôi non. Phát hiện này mở ra triển vọng sử dụng nuôi cấy phôi non để tạo ra các dạng bất dục đực tế bào chất cho sản xuất hạt lai.

5.6.5. Biến dị ở các cây nhân vô tính:

Những thay đổi di truyền ở gen nhân, lục lạp, ty thể xảy ra trên cây tạo ra các cây khảm di truyền. Bằng phương pháp nhân vô tính có thể tạo các dòng vô tính đột biến từ các bộ phận khác nhau trên các cây đột biến khác nhau.

Bảng 5.3. Sự khác nhau về biến dị di truyền ở các cây sinh sản vô tính và hữu tính

Cây sinh sản vô tính

Cây sinh sản hữu tính

- Bảo tồn đa dạng về số lượng nhiễm sắc thể - các mức lệch bội và tam bội khác nhau. Ví dụ, các giống mía có số lượng NST rất khác nhau, dao động từ 40, 48, 55, 64, 72, 77, 78, 80, 96... đến 130 NST.

- Có thể tách được các dạng đột biến từ mô và tế bào sinh dưỡng - tế bào soma (Thân, củ, rễ, chồi, mắt ghép...), ví dụ các giống đa bội hoá hoặc các giống bất dục đực không hạt thu nhận được từ các đột biến tự nhiên ở mắt ghép cam chanh.

- Trong điều kiện in vitro , có thể tách ra các tế bào đơn riêng biệt, cụm tế bào, mô và cơ quan có đột biến →? tái sinh chúng thành cây đột biến hoàn chỉnh - Nhân tiếp bằng phương pháp vô tính →? Tạo dòng vô tính đột biến

- Bảo tồn và di truyền số nhiễm sắc thể là chẵn (quá trình meiosis không bị phá vỡ)

- Chỉ các đột biến xảy ra trong giao tử mới di truyền được

- Trong điều kiện in vitro , có thể tách ra các tế bào đơn riêng biệt, cụm tế bào, mô và cơ quan có đột biến →? tái sinh chúng thành cây đột biến hoàn chỉnh - Nhân tiếp bằng phương pháp vô tính →? Tạo dòng vô tính đột biến.

5.6.6. Các hướng ứng dụng của hiện tượng biến dị tế bào soma

Như đã phân tích ở trên, việc gây tạo và chọn lọc các đột biến tế bào soma xảy ra trong nuôi cấy in vitro có nhiều ứng dụng đa dạng:

- Tạo ra dòng tế bào nuôi cấy có khả năng sản xuất các chất hoạt tính sinh học với năng suất cao (xem công nghệ bioreactor)
- Tạo ra các giống cây trồng mang những đặc tính biến dị quý, ví dụ, các nhà khoa học ở Đài Loan đã chọn tạo được giống chuối thấp cây, chống chịu bệnh

thối rũ do nấm Fusarium gây ra. ở nước ta, Viện Công nghệ sinh học đã tạo được giống lúa mới DR2 có khả năng chịu hạn, chịu lạnh bằng phương pháp chọn lọc các biến dị tế bào soma in vitro từ một giống lúa không có khả năng chống chịu. Giống này đã được công nhận là giống quốc gia.

5.7. Quy trình tạo cây đơn bội

5.7.1. Quy trình tạo cây đơn bội thuốc lá từ hạt phấn phân lập

5.7.1.1. Cầm ứng

a. Tạo cây đơn bội

Nụ hoa được xử lý bằng ly tâm 2.000 vòng/phút trong thời gian 30 phút ở nhiệt độ 5-10°C sau khi cắt để 48 giờ ở 2-5°C.

b. Tạo cây nhị bội

Nụ hoa được ngâm trong dung dịch colchicine 0,04% và dimethyl sulfoxide (chất dẫn nạp) 2% trong thời gian 24 giờ ở 2-5°C và hút chân không. Sau đó rửa sạch dung dịch colchicine và xử lý lạnh tiếp 24 giờ.

5.7.1.2. Nuôi bao phấn

Bao phấn được tách từ nụ, nuôi 3 ngày trong môi trường khoáng Halperin chứa đường sucrose 2% và Fe-EDTA (5mL/L: Na₂EDTA 754mg + FeSO₄.7H₂O 557 mg pha trong 100 mL nước sôi), pH 5,8. Nuôi 50 bao phấn trong 5 mL môi trường lỏng.

5.7.1.3. Tách và nuôi hạt phấn

Ép bao phấn bằng đũa thủy tinh, lọc hạt phấn bằng lưới có mắt ($\Phi = 48 \mu\text{m}$) 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 phấn với nồng độ 104 hạt phấn/mL, mỗi đĩa petri đường kính 5 cm nuôi 2,5 mL dung dịch, dán giấy parafilm và để ở nơi có ánh sáng nhạt. Sau 30 ngày sẽ xuất hiện phôi non.

5.7.2. Nuôi cấy hạt phấn lúa

5.7.2.1. Phương pháp

a. Thiết kế thí nghiệm:

Trong thí nghiệm có thể dùng các dòng lúa có kiểu di truyền khác nhau, nuôi cấy túi phấn của các loài lúa khác nhau, khảo sát tần suất tạo mô sẹo và tái sinh. Nuôi cấy trên đĩa petri là chủ yếu và mỗi đĩa petri là mỗi lần lặp lại, có ít nhất 4 lần lặp lại.

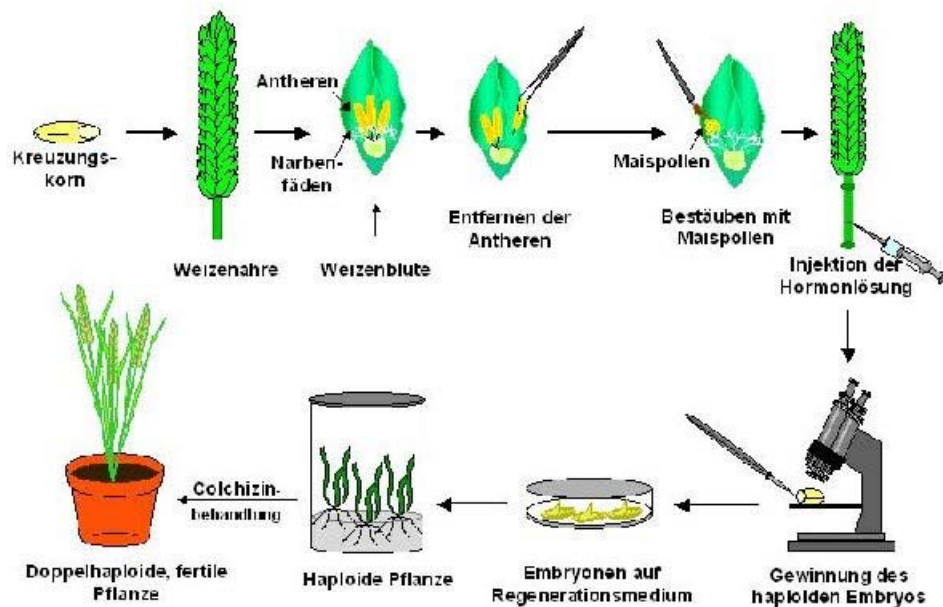
b. Xử lý vật liệu:

Các giống lúa được trồng trên vườn ươm. Thu hạt của các giống trên. Các dòng lúa này được trồng trong chậu và được đặt trong vườn ươm. Túi phấn được thu nhận vào ngày thứ 60 hoặc 90 sau trồng. Các dòng lúa được gieo trồng cách khoảng nhau 1 tuần và tiến hành trong 5 lần để tránh các giống có thời gian chín khác nhau. Mỗi dòng cần 1-2 tép có mang tước hoa thụ phấn ở giai đoạn chín.

c. Quy trình

- Thu thập và xử lý vật liệu (túi phấn)

- Giai đoạn chín của cây lúa ở ngay thời điểm thích hợp cho nuôi cấy túi phấn là giai đoạn phân tử có nhân phân chia đồng nhất trước khi hạt phấn đi vào quá trình phân chia giảm nhiễm. Mẫu được lấy là đoạn thân giữa lá cờ và lá đòng (2-5 cm). Đoạn thân được đặt trong bao nylon và dán kín lại và giữ trong lạnh trong suốt thời gian thu thập mẫu và vận chuyển.



Hình 5.1 Nuôi cấy bao phấn lúa

- Xử lý lạnh túi phần trước khi đưa vào nuôi cấy để tăng hiệu suất tạo mô sẹo. Trước khi xử lý, bẹ lá được tách rời khỏi thân tránh gây thương tổn hay dập đoạn thân.
 - Đoạn thân được giữ trong túi nylon và dán kín lại cùng ghi chú cẩn thận. Túi nylon được đặt trong bao giấy nhôm và đặt trong tối để tiến hành xử lý lạnh với ánh sáng giảm hẳn. Đoạn thân xử lý ở 5°C trong 5-7 ngày trước khi nuôi cấy túi phần.
- Sự hình thành mô sẹo và tái sinh
- Sau khi xử lý lạnh đoạn thân có chứa túi phần, đoạn thân được khử trùng với Natrihypoclorit 2,5 % trong 20 phút.
 - Đoạn thân được lấy ra sau khi khử trùng và được rửa lại bằng nước cất vô trùng.
 - Chùm hoa lúa được tách ra khỏi thân và được đặt trên đĩa petri.
 - Dùng kéo được vô trùng cắt phần chân hoa lúa.
 - Dùng que inox vô trùng có đầu móc vô trùng để tách túi phần bên trong hoa lúa ra.
 - Túi phần được cấy trên môi trường N₆ tạo mô sẹo. Cấy khoảng 120 túi phần trên 1 đĩa petri (100 x 15 mm). Mỗi giống cấy ít nhất 3 đĩa petri. Đĩa được ghi chú cẩn thận về ngày cấy, giống, môi trường và người cấy.
 - Đĩa petri được dán kín bằng parafilon. Dán 2-3 lớp parafilon để tránh mất mát môi trường.
 - Đĩa được đặt trong phòng dưỡng cây ở 27°C.
 - Trong 2 tuần đầu tiên thì cứ cách 5 ngày ghi nhận số liệu về sự phát sinh mô sẹo. Khi mô sẹo phát triển đến đường kính 2 mm thì tách mô sẹo và cấy trên môi trường tái sinh MS. Túi phần còn lại chưa hình thành mô sẹo hay mô sẹo chưa phát triển đến mức tối thiểu (D = 2 mm) còn lại trong đĩa petri được dán kín lại. Tiếp tục theo dõi trong 3 tháng.
 - Cấy 5-10 mẫu mô sẹo trên 1 đĩa petri (100 x 15 mm) có chứa môi trường tái sinh MS. Đĩa petri được dán kín và đặt trong phòng dưỡng cây có cường độ chiếu sáng 50-60 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ở 27°C có quang chu kỳ 16 giờ sáng và 8 giờ tối.
 - Cụm cây tái sinh được tách rời từng cây riêng biệt khi cây cao 1 cm và được cấy trên môi trường tái sinh MS.

- Cây tái sinh được cấy chuyển sang chậu trong vườn ươm cây khi cây cao 5 cm, cây được đánh dấu.
- Duy trì cây tái sinh trong chậu có lớp nước mỏng phủ 1 mặt cho đến khi cây chín.
- Khi cây lúa chín, thu hạt đặt trong bao giấy và được đặt trong 1 bao kín và làm khô ở 40°C với độ ẩm còn lại 12%. Thời gian làm khô 1-3 ngày. Hạt khô có thể tồn trữ nhiều năm ở -20°C. Nếu làm khô ở 50°C và kéo dài 5 ngày thì sẽ làm mất khả năng nảy mầm của hạt.

d. Quan sát và đo đếm

- Sự hình thành mô sẹo

Sau 2 tuần nuôi cấy, theo dõi sự hình thành mô sẹo cách khoảng 5 ngày ghi ngày phát sinh mô sẹo và số lượng mô sẹo được cấy chuyển sang môi trường tái sinh trên mỗi giống trong vòng 90 ngày nuôi cấy. Xác định tổng số túi phân được nuôi cấy hình thành mô sẹo trên mỗi giống ở thời điểm 30, 60 và 90 ngày nuôi cấy. Xác định sự hình thành mô sẹo bằng tỉ lệ túi phân nuôi cấy phát sinh mô sẹo và phân tích ANOVA để đánh giá:

1. Tổng số lượng mô sẹo hình thành của các loài
2. Sự hình thành mô sẹo ở giai đoạn 30, 60 và 90 ngày sau cấy

Phân tích sự khác nhau giữa các giống và các loài phụ,



Hình 5.2 *Mô sẹo từ bao phấn lúa*

- Tái sinh

Kiểm tra việc nuôi cấy mô sẹo hàng tuần. Ghi nhận ngày cấy và số lượng mô sẹo tái sinh thành cây trong 8 tuần, ghi nhận cây có lá xanh hay cây bạch tạng... Ghi nhận tổng số lượng mô sẹo của mỗi giống hình thành cây xanh hay cây bạch tạng ở các thời điểm 2, 4, 6 và 8 tuần sau khi cấy chuyển sang môi trường tái sinh. Ghi nhận tỉ lệ tái sinh cây từ mô sẹo, thống kê số lượng mô sẹo tái sinh được trong 1 đĩa. Thống kê số cây xanh tái

sinh và cây bạch tạng và tổng lượng cây tái sinh được ở thời điểm 2, 4, 6 và 8 tuần sau cấy. Dùng ANOVA phân tích kết quả. Phân tích sự khác nhau và giống nhau giữa các giống và các loài phụ. Vẽ hình mô tả.

5.7.3. Nuôi cấy bao phấn cây thuốc lá

5.7.3.1. Nguyên liệu thực vật

Sử dụng bao phấn của cây thuốc lá (*Nicotiana tabacum*) để nuôi cấy đơn bội.

5.7.3.2. Môi trường nuôi cấy

Bảng 5.4. Thành phần các môi trường nuôi cấy bao phấn thuốc lá

Thành phần môi trường (1)	Tạo cây 1n (2)	Tạo callus 1n (3)	Tạo chồi 1n (4)	Tạo rễ 1n (5)
Nitsch đầy đủ (Nt ₁ , Nt ₂ , Nt ₃ , Nt ₄ và Nt ₅)	+	+	+	+
Saccharose (%)	2	2	2	2
Agar (%)	0,8	0,8	0,8	0,8
IAA (mg/L)	0,1	-	-	0,1
2,4-D (mg/L)	-	0,1-0,5	-	-
KIN (mg/L)	0,1	0,1	0,1-1	-
BAP (mg/L)	-	-	0,1-1	-

Chú ý

Môi trường được chuẩn bị trong ống nghiệm (làm thạch nghiêng).

5.7.3.3. Nuôi cấy bao phấn

Nụ thuốc lá hái ở giai đoạn cánh hoa sắp ló ra khỏi lá đài (nụ dài khoảng 10-15 mm) được khử trùng theo thứ tự: 2 phút trong cồn 70%, 5 phút trong dung dịch HgCl₂ 0,05% và rửa bằng nước cất vô trùng từ 4-5 lần. Trong điều kiện vô trùng, dùng forceps và dao mổ tách nụ lấy các bao phấn cây vào ống nghiệm chứa môi trường dinh dưỡng đã

chuẩn bị sẵn (Bảng 4.1, cột 2). Mỗi ống nghiệm cấy 5-10 bao phần và đặt ở nhiệt độ 25-27°C, chiếu sáng từ 10-12 giờ/ngày với cường độ chiếu sáng 2000-3000 lux.

Sau 6-8 tuần nuôi, vỏ bao phần sẽ nứt ra và xuất hiện các cây thuốc lá đơn bội, cấy chuyển những cây thuốc lá này sang những bình tam giác loại 250 mL chứa 50 mL của cùng một loại môi trường để cây đơn bội phát triển.

Chú ý: Các thí nghiệm nuôi cấy đơn bội chỉ thành công với điều kiện hạt phấn phải ở giai đoạn tứ tử hoặc đơn nhân, do đó thường người ta phải làm tiêu bản hiển vi để quan sát sự phát triển của hạt phấn, chọn giai đoạn thích hợp rồi mới tiến hành nuôi cấy.

5.7.3.4. *Nhị bội hóa thông qua giai đoạn callus*

Thân của cây thuốc lá đơn bội nuôi cấy trong ống nghiệm được cắt thành từng đoạn dài 5 mm và cấy lên môi trường tạo callus (Bảng 4.1, cột 3). Sau 7-10 ngày, từ đoạn thân cây thuốc lá 1n sẽ hình thành một khối callus nhỏ được gọi là callus sơ cấp. Tế bào callus sơ cấp thường dễ tái sinh thành chồi khi gặp điều kiện thuận lợi. Các cây tái sinh từ tế bào callus nuôi cấy trên môi trường ở bảng 4.1, cột 4 có độ biến động về số lượng nhiễm sắc thể rất lớn.

- Phương pháp kiểm tra nhiễm sắc thể

Mảnh lá non (1-2 mm) hoặc đầu rễ (2 mm) được tách ra từ cây thuốc lá đơn bội nuôi cấy trong ống nghiệm, cố định bằng hỗn hợp cồn: acetic (3:1) trong 24 giờ. Mẫu được bảo quản ở cồn 70%, nhuộm nhiễm sắc thể bằng acetocarmin. Đếm số lượng nhiễm sắc thể dưới kính hiển vi.

Kết quả phân tích số lượng nhiễm sắc thể của các cây tái sinh từ quần thể tế bào callus đơn bội là không đồng nhất, cho thấy: cây 1n chiếm tỷ lệ khoảng 21,9 %, cây 2n khoảng 61,5 % và khoảng 11,5 % là những cây có mức bội thể cao hơn nhị bội.

Chương 6. NUÔI CÂY TẾ BÀO TRẦN

6.1. Giới thiệu chung về nuôi cấy tế bào trần

Việc giới thiệu về quy trình sử dụng enzyme để cô lập tế bào trần thực vật (Cooking 1960) đã đưa ra một bộ mặt mới đầy hứa hẹn cho tế bào thực vật và nuôi cấy mô và mở ra một lĩnh vực mới trong sinh học tế bào thực vật. Điều làm cho tế bào trần có tác động mạnh như một hệ thống thí nghiệm đó là hệ enzyme phân hủy vách tế bào làm lộ ra bề mặt màng tế bào như là một rào cản giữa môi trường bên ngoài và thành phần bên trong tế bào. Sự tiếp cận đến màng sinh chất có ý nghĩa là thí nghiệm có thể được thiết lập để nghiên cứu và thao tác trên các thuộc tính của màng tế bào điều mà không thể thực hiện được khi bị bao phủ bởi vách tế bào. Tế bào trần được sử dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực thí nghiệm từ nghiên cứu những tính chất vật lý của màng sinh chất (Ruesink 1973) đến những nghiên cứu nhập bào và hấp thu các phân tử (Willison et al. 1971), các bào quan (Potrykus 1975) và vi sinh vật (Davey và Power 1975). Hơn thế nữa, do tính sẵn sàng có thể sử dụng tế bào trần cho các phương pháp phá vỡ tế bào để nhanh chóng thu nhận các bào quan và các đại phân tử mà không gặp phải sự biến dạng hư hỏng như các phương pháp ly trích thông thường (Howland et al. 1975). Rất dễ nhanh chóng nhận thấy rằng các tính chất của màng sinh chất dưới một số điều kiện thuận lợi nào đó có thể chịu sự dung hợp và có khả năng hình thành tế bào lai, cuối cùng dẫn đến sự tạo ra tế bào lai sinh dưỡng liên quan đến sự cải thiện năng suất thu hoạch mùa vụ (Nickell và Torey 1969). Do mỗi một tế bào cách ly với tế bào khác trong quần thể tế bào trần và là một hệ thống đơn bào nên có thể thao tác tương tự như quần thể vi sinh vật. Tính chất này được khai thác thành công trong thí nghiệm cho nhiễm đồng loạt bởi *virus* (Takebe 1975), nuôi cấy nhân giống vô tính tế bào và phân lập các tế bào đột biến.

Giai đoạn chính trong sự phục hồi trở lại của tế bào trần trong môi trường nuôi cấy tế bào nguyên vẹn là quá trình tổng hợp và phát sinh trở lại vách tế bào. Tế bào trần phân lập từ mô quả cà chua được khảo sát chi tiết đầu tiên quá trình cung cấp enzym để phục hồi trở lại vách tế bào (Pojnar et al. 1967). Mặc dầu báo cáo đầu tiên về enzyme phân lập của tế bào trần được công bố vào năm 1960 (Cooking 1960) nhưng mãi đến 10 năm sau sự phân chia tế bào đầu tiên từ tế bào trần mới được báo cáo (Nagata và Takebe 1970) thí nghiệm khảo sát trên tế bào thịt lá thuốc lá tái tạo nhanh chóng vách tế bào mới và khoảng 60-80% số tế bào có vách mới đã phân cắt tế bào trong môi trường nuôi cấy. Mô sẹo được hình thành thúc đẩy sự tạo thành cành non rồi sau đó là cây thuốc lá nguyên vẹn (Takebe et al. 1971). Cùng thời gian ấy Kao et al. (1970) quan sát sự tái tạo và phân

chia ở tế bào trần cây đậu nành trong môi trường nuôi cấy. Cuối năm 1970 đã chứng minh rõ nuôi cấy tế bào trần để tạo tập đoàn tế bào và cuối cùng là cây hoàn chỉnh đã trở nên là quy trình trong nhiều phòng thí nghiệm, và có nhiều loài đã được nhân bội ổn định. Tuy nhiên, còn có một số vấn đề cần khắc phục được nêu ra do Evans và Cocking (1978) đó là môi trường nuôi cấy, yếu tố vật lý môi trường, và yếu tố di truyền.

Một trong những lý do protoplast không rời nhau ra là bề mặt tế bào có tích điện và chúng có khuynh hướng kết dính với nhau. Nghiên cứu bằng điện di có thể xác định bề mặt tế bào có tích điện (Grout and Coutts 1974) và có thể trong một số điều kiện thông thường nào đó điện tích này là âm. Một trong những điều kiện tất yếu của yếu tố làm tan rã các tế bào là làm giảm thiểu điện tích này xuống làm cho tế bào tập hợp lại và màng tế bào sát lại gần nhau hơn. Một trong những hợp chất đầu tiên được ghi nhận gây ra sự tan rã là nitrate sodium (Power et al. 1970). Tế bào bóc trần để vào dung dịch muối này sẽ nhanh chóng đưa đến sự kết tập lại, và thông qua việc khảo sát sự chuyển động của tế bào trần trong buồng điện di cho thấy rõ nitrate sodium giảm thiểu điện âm của tế bào trần (Grout và Coutts 1974). Polyethylene glycol (PEG) được chấp nhận rộng rãi như một tác nhân gây ra sự tan rã (Kao và Michayluk 1974, Wallin et al. 1974); xử lý tế bào trần với PEG gây ra một sự kết tập nhanh chóng với tế bào trần thực sự tan rã xảy ra trong thời gian hydrat hoá trở lại kết hợp với sự gỡ bỏ của PEG. Sự sử dụng nitrate sodium để thúc đẩy sự hoà nhập dẫn đến sự tạo thành tế bào lai thực vật về mặt di truyền, ví dụ khối u lai giữa *Nicotiana glauca* và *Nicotiana langsdorfii* do Carlson và cộng sự (Carlson et al. 1972). Những tiến bộ nổi bật về yêu cầu phát triển những quy trình chọn lọc các tế bào lai sinh dưỡng độc lập của các thuộc tính bất kỳ đã biết của lai hữu tính. Do vậy những nỗ lực hướng trực tiếp đến việc sử dụng các đột biến, và sử dụng những chọn lọc trên căn bản sự khác biệt xảy ra giữa tăng trưởng thực vật tự nhiên và đáp ứng với môi trường dinh dưỡng và thuốc. Ở Nottingham *Petunia* được chọn cho những đánh giá này bởi vì đáp ứng của chúng đối với mô nuôi cấy và sự di truyền màu sắc cánh hoa được ổn định. Thực vật lai sinh dưỡng của *Petunia hybrida* và *P. parodii* đã được tạo ra thành công vào năm 1976 (Power et al. 1976). Như đã được thảo luận bởi Cocking (1989), những thành công khi sử dụng các đối tượng của họ cà Solanaceae không tiến hành song song với thành công trong nuôi cấy tế bào trần ngũ cốc. Điều đáng nói là hơn hai mươi năm sau không một ai đạt được sinh sản ổn định tế bào trần lá ngũ cốc. Thành công chỉ đạt được trong mười năm gần đây trong việc tái tạo cây nguyên vẹn từ tế bào trần lúa, cô lập không phải từ lá nhưng từ dịch treo nuôi cấy tế bào (Abdullah et al. 1986). Thành công ban đầu khi lấy tế bào trần của cây thuốc lá và cây *Petunia* để tái tạo vách tế bào rồi trải

qua sự phân chia để tạo thành mô sẹo, sau đó phân hóa thành cơ quan để tạo thành rễ và chồi non, làm lộ ra con đường nghiên cứu sai về các loại cây ngũ cốc.

Năm 1980 đã nhìn thấy được phương pháp tinh vi mở rộng trong tái tạo lại cây nguyên vẹn từ gia tăng vững chắc số các loài cây và trong sản xuất tế bào lai sinh dưỡng và cybrids, bao gồm ví dụ như các cá thể khác loài không có khả năng giao phối, *Petunia parodii* và *Petunia parviflora* (Powder et al. 1980). Quy trình được phát triển để tái tạo lại cây nguyên vẹn từ tế bào trần cô lập, không chỉ cho cây lúa, nhưng còn ở cà chua, đậu nành, hạt lanh, cải bắp, rau diếp và các cây lai sinh dưỡng giữa các loài khác nhau, có bộ máy di truyền khác nhau của *Lycopersicon*, *Nicotiana*, *Solanum*, *Glycine*, *Citrus*, *Brassica*, *Medicago* và *Trifolium spp* (Bajaj 1989a). Thêm vào đó các quy trình được phát triển xa hơn cho các kỹ thuật vi tiêm, dung hợp bằng điện, flow cytometry, hấp thu và tích hợp DNA, cô lập nhân và nhiễm sắc thể từ tế bào trần (Bajaj 1989b).

Việc khám phá ra tế bào trần có thể bị nhiễm bởi *virus* khảm thuốc lá (Cocking and Pojnar 1969) kích thích sự quan tâm về vấn đề hấp thu vào hệ thống tế bào trần, mà đỉnh điểm là sự biểu hiện của plasmid Ti trong vi khuẩn *Agrobacterium* gây khối u, được đưa và tế bào trần để biến đổi tế bào trần, cung cấp bằng chứng đầu tiên về vai trò độc lập của plasmid Ti ở khía cạnh này (Davey et al. 1980). Điều này mở đường cho việc sử dụng plasmid chuyển nạp trực tiếp cho tế bào trần dẫn đến việc tạo ra được các loại rau và ngũ cốc chuyển gen và các vụ thu hoạch cây trồng bằng chuyển nạp trực tiếp DNA cho tế bào trần, bao gồm các loại lúa chuyển gen có khả năng sinh sản theo phương cách chuyển nạp bằng điện xung vào tế bào trần lúa plasmids chimaeric (Zang et al. 1988).

Những nghiên cứu trên cây lúa chuyển gen minh họa vai trò của tế bào trần trong việc biến đổi tế bào ngũ cốc và làm cho vấn đề phân tử và tế bào tiếp cận nhau hơn. Khảo sát trên một vài chi tiết minh họa các nghiên cứu này đã phát triển như thế nào trong thập niên 1980. Sự tương tác giữa *virus* với tế bào trần cô lập minh chứng poly-L-ornithine kích thích sự lây nhiễm, trong khi các nghiên cứu tiếp theo xác nhận rằng PEG cũng gia tăng sự thu hút *virus* và acid nhân của *virus* vào trong tế bào trần (Davey và Kumar 1983). Rồi sau đó những năm cuối thập niên 1970 đầu thập niên 1980 đây là thời gian phối hợp giữa các kỹ thuật xác định plasmid Ti có thể chuyển nạp hay không vào tế bào trần thực vật. Như đã đề cập trước đây các nghiên cứu bao gồm sự tương tác của cấu trúc siêu xoắn của plasmid Ti từ dòng octopine của *A. tumefaciens* với dịch treo tế bào trần *Petunia hybrida* với sự có mặt của PLO, kết quả tạo ra một tập đoàn tế bào trần có biểu hiện tính chất có vị đắng của đỉnh tăng trưởng trong môi trường có hormone tự do và sự tổng hợp octopine, cả hai đều mã hoá bởi gen Ti T-DNA (Davey et al. 1980). Deshayes et

al (1985) đóng gói pGV23 NEO, đây là một plasmid mang gen aminoglycoside phosphotransferase type II (APH II; neomycin phosphotransferase, NTP II) từ Tn5 có khả năng kháng kanamycin trong tế bào thực vật, vào trong thể tích chất béo (liposome) và dung hợp với plasmid có chứa túi của tế bào trần thuốc lá sử dụng PEG. Tập đoàn tế bào kháng kanamycin được cô lập ở $4.0 \cdot 10^5$. Mẫu cắt hạn chế DNA được chèn vào trong quá trình chuyển gen vào tế bào thực vật được chỉ định theo cách tích hợp kế nhau trong trình tự của plasmid, bao hàm sự tái tổ hợp đồng dạng giữa các trình tự trong khi chuyển nạp.

Tiến bộ chính trong chuyển nạp trực tiếp DNA vào tế bào trần đạt được khi nó được chứng minh rằng trình tự T-DNA là không cần thiết cho sự chuyển nạp ổn định và biểu hiện của DNA lạ trong tế bào thực vật. Một gen lai có thể chọn lọc bao gồm vùng giải mã của gen Tn5 NPII dưới sự kiểm soát của gen promoter CaMV VI được đưa vào tế bào trần thuốc lá như là một phần của E. coli (pABCD1) bằng cách xử lý hỗn hợp tế bào trần – plasmid bằng PEG 6000. Tập đoàn đã chuyển nạp sẽ được chọn lọc trong môi trường có chứa 7 mg/ml kanamycin. Gen lạ sẽ được truyền qua cho thế hệ cây con bằng phép lai Mendel.

Trong khi tế bào trần thuốc lá được sử dụng rộng rãi như một hệ thống tiêu biểu cho các nghiên cứu DNA, các hệ thống tế bào trần khác, bao gồm lúa, cũng được quan tâm rộng rãi. Chuyển nạp gen hữu thụ cho *Brassica napus* được chuyển gen bởi pABD1 vào trong tế bào trần thịt lá bằng phương pháp xung điện (Guerche et al. 1987). Tính kháng kanamycin được truyền qua thế hệ cây con qua con đường hữu tính bởi lai một tính Mendel. Chuyển gen trực tiếp cũng chứng minh khả năng tạo hạt rau *Vigna aconitifolia* kháng kanamycin mô sẹo tái tạo từ tế bào trần sốc nhiệt xử lý bởi PEG và pLGV NEO 2103 (Kuhler et al. 1987). Các nghiên cứu chuyển gen trực tiếp vào tế bào trần thực vật cũng cung cấp một hệ thống để quan sát sự biểu hiện gen trong khoảng thời gian vài giờ xử lý chuyển nạp. Các nghiên cứu biểu hiện gen tạm thời (ngắn ngủi) như vậy có ích trong việc đánh giá cấu trúc và gen khởi động khi gen reporter sẵn sàng có thể thử nghiệm ví dụ như CAT và b-glucuronidase.

Rất hữu ích khi so sánh một vài tính chất chuyển nạp của tế bào trần thực vật và tế bào động vật. Thật vậy sự thúc đẩy để lượng định tính khả chuyển DNA trực tiếp vào tế bào thực vật, đặc biệt là tế bào thực vật đã được loại bỏ vách tế bào bằng enzym như trong trường hợp tế bào trần thực vật, từ các báo cáo nuôi cấy mô tế bào động vật cho thấy có khả năng chọn và biểu hiện một nhóm gen và hệ gen DNA. Bây giờ cơ hội xuất hiện các thế hệ đột biến do đưa các đột biến gen vào tế bào trần thực vật tương tác với

DNA; đó là các bằng chứng chứng tỏ rằng các mẫu DNA lớn có thể đưa vào và biểu hiện ở tế bào động vật (Allshire et al. 1987).

Tế bào trần có thể cô lập bằng enzyme từ một số nhóm tế bào ví dụ như từ tế bào biểu bì lá của thuốc lá rồi có thể tái tạo lại thành cây nguyên vẹn (Davey et al. 1974). Lông hút của rễ là sản phẩm tự nhiên của tế bào biểu bì rễ, và nó đã được chứng minh xử lý bằng enzyme có thể làm tiêu hủy đỉnh sinh trưởng của lông hút và phóng thích tế bào trần (Cooking 1985). Tế bào trần cô lập từ rễ cây con, thân lá mầm, và lá mầm của *Lotus corniculatus* (sen) sẵn sàng phân chia trong môi trường nuôi cấy để tạo ra mô sẹo và từ đó có thể sinh ra tế bào trần (Ahuja et al. 1983) điều đáng quan tâm là xác định tế bào trần từ lông hút rễ còn giữ tính chất nguyên thủy hay không. Xử lý rễ của cây con *Lotus corniculatus* với cellulase và pectinase phóng thích các tế bào trần của đầu rễ lông hút khi ủ trong môi trường có enzym khoảng 1 phút. 10% của tế bào trần phân chia để tạo ra một tập đoàn tế bào mà sau đó tạo được chồi non. Cây tái tạo có kiểu hình và tế bào bình thường. Các nghiên cứu trong tương lai sẽ có thể làm cho một hệ thống như vậy được sử dụng để xác định nguồn gốc của tế bào trần có ảnh hưởng hay không đến con đường phát triển sau đó. Trong các tế bào trần cô lập từ dịch nuôi cấy để tái tạo cây nguyên vẹn cho thấy xảy ra qua sự phát sinh phôi dinh dưỡng (Abdullah et al. 1986). Có thể chẳng thay đổi con đường phát triển này bằng kỹ thuật điện cao thế trong quá trình phân bào của dẫn suất tế bào trần thực vật như đã quan sát bởi Rech et al. (1987). Gần đây, Chand et al. (1988) quan sát thấy sự bóc trần tế bào cây dược liệu thân gỗ *Solanum dulcamara* ở điện áp 250 đến 1250 vol/cm² trong ba xung điện kế tiếp nhau mỗi xung kéo dài 10 – 50 ms đã kích thích sự tăng trưởng của mô dẫn suất từ tế bào trần và cho thấy có gia tăng khả năng biệt hóa (Chand et al. 1988). Sẽ rất quan trọng để mở rộng các nghiên cứu này trên hệ thống tế bào trần. Sẽ có ích khi tế bào trần *Physcomitrella* tái tạo chỉ sản sinh một khối u khi đáp ứng với ánh sáng đơn cực, và tế bào phân cực này phân chia sau 24 giờ từ tế bào trần cô lập, từ hai tế bào con có hai mặt phát triển khác nhau (Jenkin và Cove 1983). Biến đổi con đường phát triển có thể cung cấp đầu mối giải mã về sự phát triển tế bào thực vật, tế bào của nó và điều khiển phân tử.

Có lẽ vấn đề quan tâm chính là sự tương tác mới lạ giữa các đại phân tử, *viruses* và vi sinh vật và màng tế bào của tế bào trần. Điện xung để hình thành các lỗ trên màng tế bào có thể được dùng để khảo sát theo hướng này. Hơn nữa, điều chủ yếu không phải là tất cả vách tế bào phải được bỏ đi; một lợi ích của nghiên cứu trên nhiều mảng. Như đã khám phá ở hoa sen *Lotus* rất dễ bỏ đi vách tế bào một cách nhanh chóng ở đầu lông hút của rễ bằng xử lý rễ cây con với một hỗn hợp cellulase và pectinase. Gần đây chúng ta đã

quan sát cấu trúc nốt sần tạo ra ở rễ lúa, rễ cây con của cây cải cho đầu khi xử lý rễ với hỗn hợp enzyme cellulase và pectinase và cho nhiễm *Rhizobium* hay *Bradyrhizobium* (Al-Mallah et al. 1989 và 1990). Các nghiên cứu này bao gồm sự phân hủy một phần vách tế bào làm lộ ra một phần màng sinh chất của tế bào biểu mô có ý nghĩa quan trọng cho việc nghiên cứu sự cộng sinh của *Rhizobium* đối với các cây trồng không phải họ đậu (Cooking và Davey 1991).

6.2. Phương pháp tách protoplast

Có 3 phương thức phân lập protoplast, đó là:

- Cơ học (không dùng các enzyme).
- Sử dụng enzyme tuần tự (qua hai bước).
- Sử dụng hỗn hợp enzyme (xử lý đồng thời).

Phương pháp cơ học tiến hành dựa trên cơ sở phá các mối liên kết của mô bằng các dao sắc nhọn (sharp-edged knife) và giải phóng các protoplast riêng rẽ. Phương pháp này cho hiệu suất thấp. Nói chung, các protoplast thường được phân lập từ các tế bào không bào hóa cao của các mô dự trữ như chồi hành và vảy hành (bulbs and scales) của các loài thân hành, rễ củ cải (radish root), vỏ quả giữa của dưa chuột (mesocarp of cucumber), và rễ củ cải đường (beet root).

Phương pháp dùng enzyme có hiệu quả cao hơn rất nhiều so với phương pháp cơ học, phương pháp enzyme cho phép tách được hàng gram protoplast. Các enzyme được sử dụng là cellulase hoàn toàn không độc hại đối với tế bào.. Do vách tế bào có thành phần gồm pectin, cellulose, hemicellulose cho nên phải sử dụng hỗn hợp enzyme:

- Pectinase phân hủy pectin.
- Cellulase phân hủy cellulose.
- Hemicellulase phân hủy hemicellulose.

Ngoài ra, để protoplast không bị vỡ sau khi thành cellulose bị phân hủy người ta phải bổ sung những chất tăng áp lực thẩm thấu vào dung dịch enzyme để duy trì cân bằng thẩm thấu giữa nội bào và môi trường bên ngoài. Thành phần dịch enzyme (trên lít) gồm có:

- Các enzyme (pectinase, cellulase, hemicellulase) từ 0,1-2%
- Sorbitol (0,15 M) 27,3 g
- Mannitol (0,15 M) 27,3 g
- Glucose (0,1 M) 18 g

- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (6 mM) 441 mg
- KH_2PO_4 (0,7 mM) 95 mg
- Đệm MES¹ (3 mM) 650 mg
- Điều chỉnh pH 5,6 và khử trùng dung dịch enzyme bằng màng lọc Millipore.

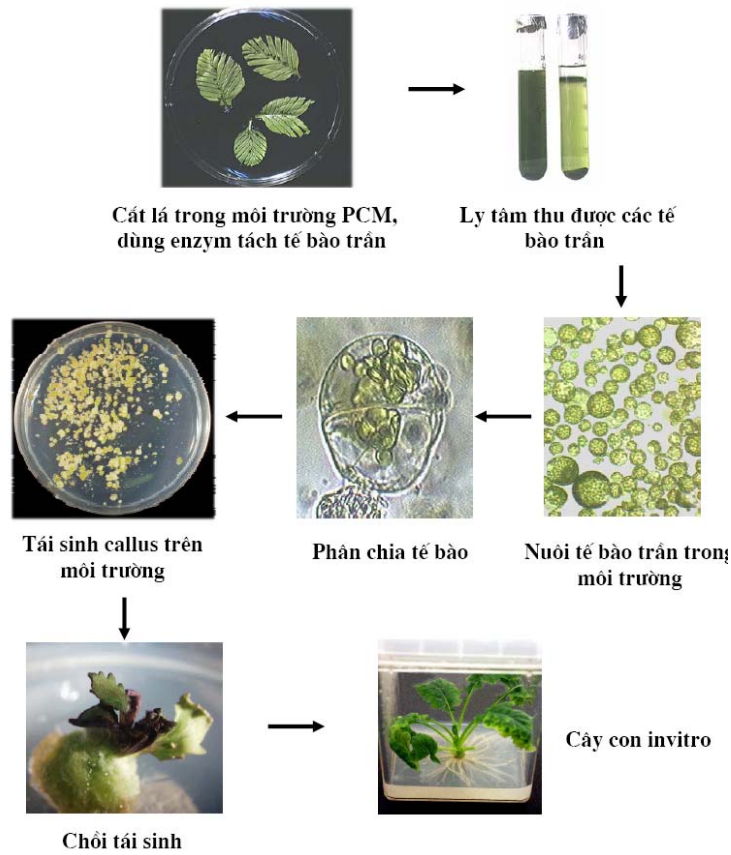
Tùy theo từng đối tượng và từng loại mô có thể thay đổi nồng độ của các enzyme trên cho thích hợp. Vì protoplast thực chất là tế bào trần không có thành cho nên có thể tách được từ nhiều nguồn khác nhau như: các bộ phận của cây (lá, rễ, hạt phấn), callus, tế bào đơn...

Khác với tế bào vi sinh và tế bào động vật, tế bào thực vật có thành tế bào cứng được tạo ra bởi nhiều loại polime khác nhau. Thành tế bào có chức năng cơ học, tạo khung xương tế bào và hệ màng liên kết giữa các tế bào với nhau. Thành phần hoá học của tế bào rất phức tạp. Cellulose là thành phần chủ yếu của màng tế bào thực vật. Công thức hoá học tổng quát của cellulose là $(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5)_n$. Phân tử cellulose có hình sợi dài, thậm chí rất dài với sự liên kết của hàng nghìn các phân tử đường đơn với nhau. Ngoài cellulose còn có hemicellulose, pectin, lignin, một số chất béo và chất khoáng, pectin còn đóng vai trò quan trọng liên kết giữa các tế bào với nhau.

Tế bào trần (protoplast) là tế bào đã được tách khỏi màng tế bào (một lớp polyme bao bọc tế bào) và màng liên kết giữa các tế bào. Các enzym đóng vai trò chủ yếu trong phân huỷ màng tế bào và tạo ra tế bào trần là cellulase và pectinase. Tế bào sau khi bị mất lớp màng cứng sẽ có dạng hình cầu dưới áp suất thẩm thấu phù hợp của môi trường. Tế bào trần có thể được tách ra từ các mô hoặc cơ quan khác nhau ở cây như lá, rễ, mô sẹo nuôi cấy in vitro .

Ưu thế của kỹ thuật tách và nuôi cấy tế bào trần là tế bào không có màng cứng, ở trạng thái đơn bào, mật độ tế bào thu được trên 1 đơn vị thể tích môi trường có thể rất cao (đạt 10^6 tế bào/ml môi trường). Tế bào trần ở một số cây trồng có khả năng tái sinh rất mạnh, ví dụ tế bào mô thịt lá ở thuốc lá, cải dầu, ... Bằng thao tác di truyền ở tế bào trần có thể dễ dàng tạo ra các tế bào biến đổi gen. Tế bào với kiểu gen biến đổi sẽ được bảo tồn khi tái sinh tế bào thành cây hoàn chỉnh.

¹ MES: 2-(N-Morpholino)ethanesulfonic acid

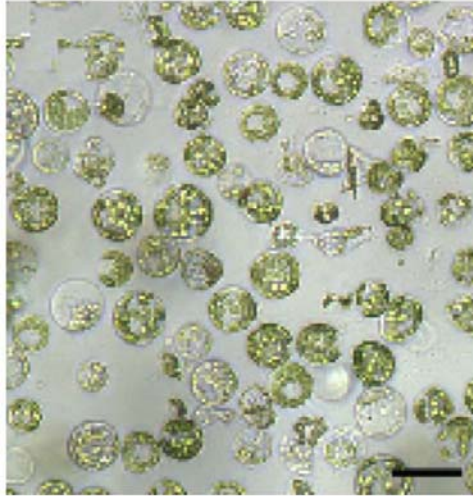


Hình 6.1 Các bước nuôi cấy tế bào trần cây hồng.

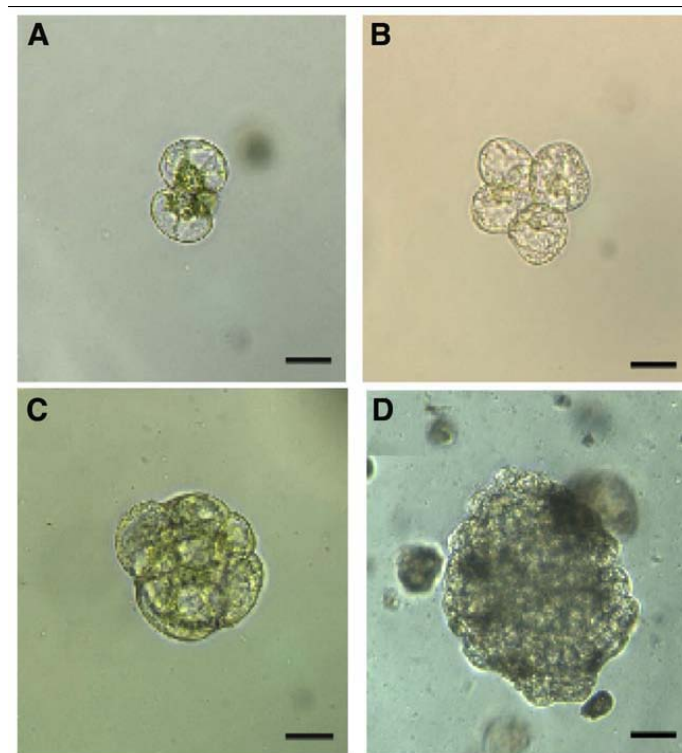
Lá cây

Lá là nguồn nguyên liệu thông dụng và truyền thống cho kỹ thuật protoplast thực vật, do nó cho phép phân lập được một số lớn các tế bào tương đối đồng nhất (relatively uniform cells). Protoplast phân lập từ lá qua năm bước:

- Khử trùng lá.
- Loại bỏ lớp tế bào biểu bì (epidermal cell layer).
- Tiền xử lý enzyme.
- Ủ enzyme.
- Phân lập protoplast bằng phương pháp lọc và ly tâm



Hình 6.3. Phân lập protoplasts của *Echinacea purpurea* (bar = 50 mm).



Hình 6.4. Sự phân chia tiếp theo của protoplasts. *Echinacea purpurea* (A) Phân chia protoplast- sau 6 giờ

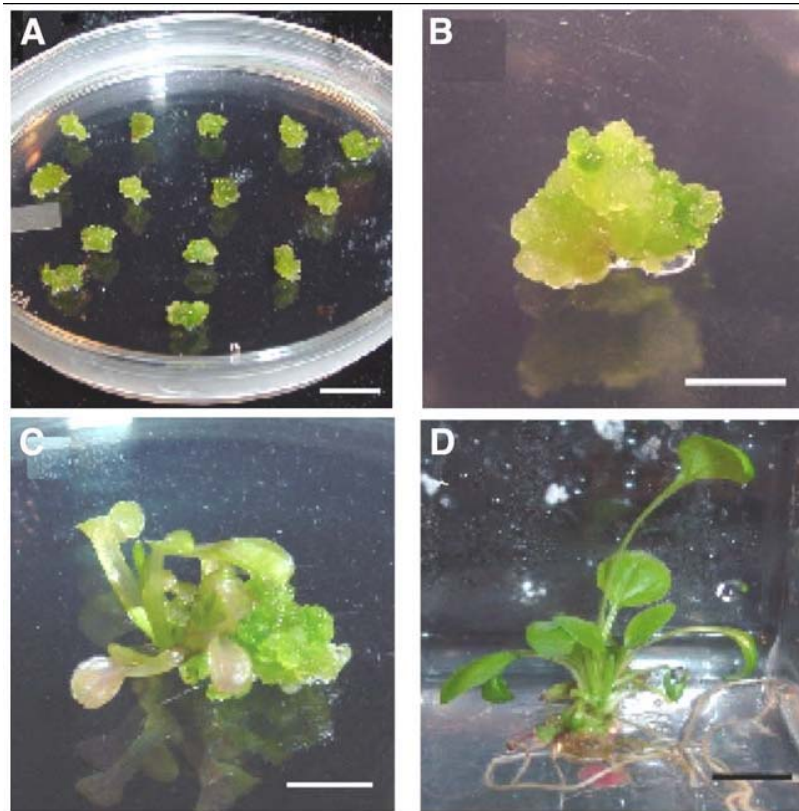
(bar = 25 mm). **(B,C) Sự phân chia thứ hai và thứ 3 của protoplast (bar = 25 mm). (D) Cụm Protoplast-nhận được sau 6 ngày nuôi cấy (bar = 100 mm).**

Bảng 6.1. Các enzyme thương phẩm thích hợp cho phân lập protoplast

STT	Enzyme	Nguồn thu nhận
1	<i>Các enzyme cellulase</i> Cellulase Onozuka R-10 Cellulase Onozuka RS Cellulase YC Cellulase CEL Cellulysin Meicelase P-1 Driselase	Trichodema viride T. viride <i>T. viride</i> <i>T. viride</i> <i>T. viride</i> <i>T. viride</i> <i>Irpex lacteus</i>
2	<i>Các enzyme Hemicellulase</i> Helicase Hemicellulase Hemicellulase H-2125 Rhozyme HP 150	<i>Helix pomatia</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Rhizopus sp.</i> <i>Aspergillus niger</i>
3	<i>Các enzyme Pectinase</i> Macerase Macerozyme R-10 PATE Pectinol Pectolyase Y-23 Zymolyase	<i>Rhizopus arrhizus</i> <i>R. arrhizus</i> <i>Bacillus polymyxa</i> <i>Aspergillus sp.</i> <i>Aspergillus japonicus</i> <i>Arthrobacter luteus</i>

b. Nuôi cấy callus

Các callus non nuôi cấy *in vitro* cũng là nguyên liệu lý tưởng để thu được một lượng lớn protoplast. Nuôi cấy các callus già hơn thường cho các tế bào có kích thước lớn hơn và vách tế bào dày, điều này sẽ gây khó khăn cho sự thủy phân bằng enzyme. Vì thế, người ta thường sử dụng các callus non sau hai tuần cấy chuyển để phân lập protoplast.



Hình 6.5. Tạo mô sẹo, Tái sinh cây và sự phát triển của cây con từ protoplasts

của *Echinacea purpurea*. (A) Tạo mô sẹo từ cụm protoplast thu nhận được (bar = 1 cm). (B) sự phát sinh cơ quan từ mô sẹo (bar = 1 cm). (C) Tái sinh chồi từ mô sẹo (bar = 1 cm). (D) cây con hoàn chỉnh (bar = 1 cm).

Các cây tái sinh từ quần thể tế bào đơn (single cells) có thể duy trì đầy đủ các đặc tính bảo toàn cao của giống hoặc dòng nhưng vẫn có thể thay đổi một số tính trạng như mong muốn. Ví dụ: Các cây mía đường có nguồn gốc từ các tế bào callus mang đầy đủ các đặc điểm của bố mẹ, nhưng một vài tính trạng đã được cải thiện như kháng bệnh, tăng sản lượng và hàm lượng đường cao hơn. Gần đây, người ta thường phân lập protoplast từ callus để tạo ra các tế bào đơn, dẫn đến kết quả là thu được các protoclonal

khác nhau (protoplast propagated clones) ở các loài cây trồng quan trọng trong nông nghiệp.

c. Nuôi cấy dịch huyền phù tế bào

Nuôi cấy dịch huyền phù tế bào (cell suspension cultures) cũng cung cấp nguồn nguyên liệu rất tốt cho phân lập protoplast. Dịch huyền phù tế bào có mật độ cao được ly tâm, sau đó loại bỏ thể nổi (supernatants). Các tế bào được ủ trong hỗn hợp enzyme (cellulase + pectinase) và lắc từ 6 giờ tới qua đêm tùy thuộc vào nồng độ của các enzyme. Sử dụng nồng độ thấp của các enzyme mục đích ngăn cản sự kết dính trong dịch huyền phù tế bào để thu được hiệu suất phân lập protoplast cao hơn.

Các protoplast có nguồn gốc từ nuôi cấy dịch huyền phù tế bào có tiềm năng tái sinh cây hơn hẳn ở các loài mà trước đó đã không thành công khi thử tái sinh từ các protoplast có nguồn gốc tế bào thịt lá. Những thành công gần đây khi tái sinh cây *in vitro* hoàn chỉnh từ protoplast của các loài ngũ cốc (kê, lúa miến, lúa mạch giống Golden Promise) đã chứng minh nuôi cấy dịch huyền phù tế bào là nguồn nguyên liệu lý tưởng cung cấp các protoplast toàn vẹn.

d. Tái sinh cây từ tế bào trần

Các bước:

Từ 1 tế bào trần khi nuôi cấy trong môi trường tái sinh thì màng tế bào hình thành, sau đó tế bào phát triển thành cụm tế bào (mô sẹo). Từ mô sẹo sẽ hình thành phôi rồi tái sinh thành cây hoàn chỉnh.

6.3. Nuôi cấy protoplast

6.3.1. Môi trường nuôi cấy

a. Thành phần dinh dưỡng

Nói chung, môi trường nuôi cấy protoplast tương tự với môi trường nuôi cấy dịch huyền phù tế bào và callus. Tuy nhiên, nồng độ của Fe, Zn và amonium dùng trong môi trường nuôi cấy mô thực vật có thể là quá cao đối với nuôi cấy protoplast. Hầu hết muối của môi trường B5 và MS có cải biến một ít là thích hợp. Tăng nồng độ Ca^{2+} trong môi trường nuôi cấy protoplast từ 2-4 lần so với bình thường có lợi cho việc duy trì tính toàn vẹn của màng tế bào. Nồng độ sucrose thích hợp thường từ 3-5%, nhưng ở một số loài (ví

dụ: thuốc lá) sucrose được sử dụng ở nồng độ thấp hơn (1,5%). Môi trường nuôi cấy protoplast sử dụng nitơ hữu cơ dạng CH và nitơ vô cơ NH_4NO_3 (20 mmol/L).

Các vitamin dùng trong nuôi cấy protoplast cũng giống trong môi trường nuôi cấy mô tiêu chuẩn. Auxin và cytokinin sử dụng ở các tổ hợp nồng độ khác nhau để cảm ứng tạo vách tế bào và kích thích phân chia trong các protoplast phân lập. Protoplast của ngũ cốc đòi hỏi cung cấp 2,4-D riêng rẽ hoặc tốt hơn là phải phối hợp với cytokinin. Tuy nhiên 2,4-D cũng như các auxin khác (NAA, IAA) được sử dụng riêng rẽ thường làm mất tiềm năng phát sinh hình thái ở các callus có nguồn gốc protoplast. Các cytokinin thường được sử dụng là BAP, kinetin, 2-iP, hoặc zeatin. Mặc dù, tổ hợp hai loại phytohormone nói trên thay đổi tùy loài, nhưng nói chung trong nuôi cấy protoplast tỷ lệ auxin/kinetin cao thích hợp cho phân chia tế bào, trong khi các protoplast có nguồn gốc từ những tế bào phân hóa cao lại cần tỷ lệ kinetin/auxin cao để tái sinh cây.

b. Áp lực thẩm thấu của môi trường

Trong quá trình phân lập và nuôi cấy, các protoplast cần được duy trì cân bằng áp lực thẩm thấu giữa môi trường và nội bào cho tới khi tái sinh được vách tế bào vững chắc. Trong cả hai trường hợp chênh lệch áp lực thẩm thấu giữa môi trường và nội bào theo hướng môi trường nhược trương hoặc ưu trương sẽ dẫn đến tình trạng protoplast bị vỡ hoặc teo lại. Các chất điều chỉnh áp lực thẩm thấu (thông thường là để tăng áp lực thẩm thấu) trong môi trường nuôi cấy protoplast và trong hỗn hợp enzyme là sorbitol, mannitol, glucose, hoặc sucrose. Các protoplast sẽ sinh trưởng ổn định hơn trong dung dịch được tăng nhẹ áp lực thẩm thấu. Đối với các protoplast thịt lá của ở ngũ cốc và đậu thì mannitol hoặc sorbitol là các nhân tố ổn định áp lực thẩm thấu thích hợp hơn cả, trong khi sucrose lại thích hợp hơn glucose hoặc mannitol trong nuôi cấy protoplast của khoai tây, đậu hoa (sweet pea), tước mạch (brome grass) và sắn. Trong nuôi cấy dịch huyền phù thuốc lá, galactose và fructose đã được sử dụng để điều chỉnh áp lực thẩm thấu.

Các chất phân ly ion (KCl 335 mmol/L và $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 40 mmol/L) cải thiện tốt khả năng sống sót của protoplast. Thông thường các dung dịch enzyme được bổ sung các muối nhất định (CaCl_2 5-100 mmol/L) song song với các nhân tố ổn định thẩm thấu không phân ly ion. Cocking và Peberdy (1974) đã phát triển dung dịch rửa protoplast (cell-protoplast washing, CPW) chứa muối và các nhân tố ổn định thẩm thấu thích hợp. Dung dịch CPW có thể được dùng trong suốt quá trình ủ enzyme và rửa protoplast. Thời gian ủ enzyme tùy thuộc vào nồng độ của nó trong dung dịch và loại nguyên liệu được sử dụng.

c. Mật độ dàn trải protoplast

Mật độ protoplast tối ưu là từ 1×10^4 đến 1×10^5 /mL. Tuy nhiên, các thí nghiệm lai soma (somatic hybridization) và phát sinh đột biến (mutagenesis) cần tạo dòng tế bào riêng rẽ, do đó phải dàn trải protoplast ở mật độ thấp hơn (100-500 protoplast/mL). Nuôi cấy ở mật độ thấp giúp dễ dàng phân lập và xác định các khuẩn lạc lai khi có mặt của hệ thống chọn lọc. Kao và Michayluk (1975) đã xây dựng môi trường nuôi cấy protoplast (KM 8p) (Bảng 6.2) trong đó các protoplast được nuôi cấy riêng rẽ (ví dụ: *Vicia hajastana*) có khả năng phân chia cho tới khi tạo thành callus. Môi trường này còn kích thích phân chia nhanh hơn ở các protoplast thịt lá của cỏ linh lăng (alfalfa), đậu (pea), khoai tây, và sản phẩm dung hợp potato + tomato được nuôi cấy dàn trải ở mật độ thấp. Các protoplast nuôi cấy trên môi trường này được đặt trong tối vì môi trường KM 8p sẽ trở nên độc đối với tế bào dưới điều kiện ánh sáng mạnh.

Bảng 6.2. Môi trường KM 8p dùng cho nuôi cấy protoplast ở mật độ thấp (khử trùng bằng phương pháp lọc)

Thành phần	Nồng độ (mg/L)	Thành phần	Nồng độ (mg/L)
<i>Muối khoáng</i>		<i>Các acid hữu cơ</i>	
NH ₄ NO ₃	600	(chỉnh pH tới 5,5 bằng NH ₄ OH)	
KNO ₃	1900	Sodium pyruvate	5
CaCl ₂ .2H ₂ O	600	Citric acid	10
MgSO ₄ .7H ₂ O	300	Malic acid	10
KH ₂ PO ₄	170	Fumaric acid	10
KCl	300		
Sequestrence 330 Fe	28	<i>Các vitamin</i>	
KI	0,75	Inositol	100
H ₃ BO ₃	3	Nicotinamide	1
MnSO ₄ .H ₂ O	10	Pyridoxine-HCl	1
ZnSO ₄ .7H ₂ O	2		

Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25	Thiamine-HCl	10
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	D-Calcium	0,5
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	pantothenate	0,2
		Folic acid	0,01
		p-Aminobenzoic acid	
<i>Đường</i>		Biotin	0,005
Glucose	68400	Choline chloride	0,5
Sucrose	125	Riboflavin	0,1
Fructose	125	Ascorbic acid	1
Ribose	125	Vitamin A	0,005
Xylose	125	Vitamin D ₃	0,005
Mannose	12	Vitamin B ₁₂	0,01
Rhamnose	125		
Cellobiose	125		
Sorbitol	125		
Mannitol	125		
<i>Các phytohormone</i>	Đậu tương × lúa mạch	Đậu tương × đậu Hà Lan	
2,4-D		hoặc <i>N. glauca</i>	
Zeatin	1	0,2	
NAA	0,1	0,5	
Vitamin-free casamino acid	- 125	1 -	
Nước dừa (lấy từ quả già xử lý 60°C/30 phút rồi lọc)	10 ml/L	-	

- Kỹ thuật tầng nuôi dưỡng

Một hướng khác trong nuôi cấy protoplast ở mật độ thấp là kỹ thuật tầng nuôi dưỡng (feeder layer technique). Raveh và cs (1973) đã chuẩn bị tầng tế bào nuôi dưỡng

bằng cách chiếu xạ tia X (2×10^3 R) lên các protoplast dịch huyền phù tế bào của thuốc lá, khi đó sự phân chia của tế bào bị ức chế nhưng vẫn cho phép chúng duy trì các hoạt động trao đổi chất. Các protoplast bị chiếu xạ sẽ được rửa sạch ba lần và sau đó dàn trải chúng trên môi trường có agar mềm ở mật độ $2,4 \times 10^4$ /ml. Nuôi cấy trải các protoplast không qua chiếu xạ ở mật độ thấp (10-100 protoplast/ml) trên tầng nuôi dưỡng này.

- Đồng nuôi cấy các protoplast

Các protoplast của 2 loài khác nhau cũng được đồng nuôi cấy để kích thích sự sinh trưởng của chúng hoặc của tế bào lai. Phương pháp đồng nuôi cấy được sử dụng trong những thí nghiệm mà các callus hình thành từ 2 loại protoplast có thể phân biệt hình thái được. Ví dụ: Các tế bào lai phân lập một cách cơ học (mechanically isolated hybrid cells) được đồng nuôi cấy với các protoplast phân lập từ chủng bạch tạng (albino strain) sẽ phát triển thành các khuẩn lạc màu xanh là loại khuẩn lạc dễ phân biệt với các khuẩn lạc không có màu xanh của chủng bạch tạng.

- Nuôi cấy vi giọt

Kỹ thuật nuôi cấy vi giọt (microdrop culture) đã thành công ở trường hợp nuôi cấy các tế bào lai của *Nicotiana glauca* (+) *Glycine max* và *Arabidopsis thaliana* (+) *Brassica campestris*. Kỹ thuật này cần đĩa nuôi cấy Cuprak được thiết kế đặc biệt gồm có một ngăn bên ngoài nhỏ và một ngăn bên trong lớn hơn. Các protoplast riêng rẽ hoặc các thể dị nhân trong giọt môi trường dinh dưỡng (khoảng 0,25-25 μ l) được chuyển bằng pipette Drummond vào mỗi ngăn bên trong của đĩa Cuprak. Ngăn bên ngoài chứa đầy nước vô trùng để duy trì độ ẩm bên trong đĩa. Sau khi đậy nắp, đĩa được quấn giấy parafilm, giữ ở điều kiện ánh sáng và nhiệt độ tối thích. Tỷ lệ tế bào/dung tích môi trường nuôi cấy thích hợp tương đương mật độ $2-4 \times 10^3$ /ml. Nếu tăng kích thước giọt ($\sim 25 \mu$ l), tức là giảm mật độ dàn trải sẽ cho hiệu quả nuôi cấy kém hơn.

6.3.2. Tái sinh cây từ protoplast

6.3.2.1. Tạo vách tế bào

Quá trình hình thành vách tế bào có thể hoàn chỉnh trong vòng hai đến một vài ngày mặc dù các protoplast trong nuôi cấy thường bắt đầu tái sinh vách tế bào ngay sau khi phân lập một vài giờ. Vách tế bào được tạo thành bao gồm các vi sợi (microfibrils) sắp xếp lỏng lẻo, quá trình này đòi hỏi cung cấp nguồn carbon (sucrose) trong môi trường dinh dưỡng. Các chất phân ly ion để ổn định thẩm thấu trong môi trường đã ngăn cản sự phát triển vách tế bào. Các protoplast phát triển vách kém thường phân chia tế bào cũng rất kém.

6.3.3.2. *Phát triển callus và tạo cây hoàn chỉnh*

Ngay sau khi tạo vách tế bào chung quanh protoplast, các tế bào được tái cấu trúc đã tăng kích thước và sau một tuần xuất hiện sự phân chia tế bào đầu tiên. Sau 2-3 tuần, các khuẩn lạc tế bào có kích thước lớn được tạo thành và có thể cấy chuyển chúng lên môi trường không có sự điều chỉnh áp lực thẩm thấu để phát triển callus. Các callus này được cảm ứng để phân hóa cơ quan, hoặc tái sinh cây hoàn chỉnh.

6.4. Protoplast và vấn đề chọn dòng tế bào

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

Bằng 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 đã cho phép tiến hành kỹ thuật chọn dòng vi sinh vật đối với thực vật bậc cao. Một đĩa petri đường kính 5-7 cm cho phép nuôi tới 5×10^6 protoplast thuốc lá trong khi muốn trồng 5×10^6 cây thuốc lá cần có 106 m^2 tức là 100 ha đất canh tác.

Ngoài ra, cơ thể thực vật bậc cao là cơ thể đa bào được phân hóa thành các tổ chức khác nhau. Nếu tiến hành xử lý đột biến cả tổng thể đó rất khó đạt được tần số cần thiết. Sử dụng tế bào trần riêng rẽ cho phép loại bỏ môi trường tác với các tế bào bên cạnh và những thay đổi di truyền có điều kiện biểu hiện rõ ràng hơn.

6.5. Dung hợp protoplast

6.5.1 *Xử lý bằng NaNO_3*

Năm 1970, Power và cs đã dùng NaNO_3 (0,25 M) kích thích dung hợp hai protoplast. Carlson và cs (1972) cũng dùng phương pháp này để sản xuất cây lai soma đầu tiên (*Nicotiana glauca* \times *N. langsdorffii*). Tuy nhiên, phương pháp này cho hiệu suất thấp vì NaNO_3 không thích hợp với tế bào bị không bào hóa mạnh như protoplast từ nhu mô lá.



Hình 6.6 Dung hợp tế bào trần bằng xử lý PEG

6.5.2. Xử lý bằng PEG

Tác nhân kích thích dung hợp là PEG (polyethylen glycol). Khoảng 0,6 ml dung dịch PEG (hòa tan 1 g PEG mol. wt. 1500 trong 2 ml glucose 0,1 M, CaCl_2 10 mM, và KH_2PO_4 0,7 mM) làm thành một giọt protoplast và chuyển lên đĩa petri. Sau khi đậy nắp, protoplast trong dung dịch PEG được nuôi ở nhiệt độ phòng trong 40 phút, pha loãng dung dịch PEG bằng cách bổ sung 0,5-1 ml môi trường nuôi cấy protoplast sau mỗi 10 phút. Rửa protoplast với dung dịch không có tác nhân dung hợp bằng cách ly tâm và các protoplast được treo trở lại trong môi trường nuôi cấy.

Nồng độ và trọng lượng phân tử của PEG quyết định sự thành công của thí nghiệm dung hợp. PEG có trọng lượng phân tử thấp (~ 100) không thể tạo ra một sự dính chặt chắc chắn, trong khi PEG trọng lượng phân tử 6000 cho hiệu quả dung hợp cao hơn. Xử lý PEG cùng với pH/ Ca^{2+} có hiệu quả tăng tần số dung hợp và khả năng sống của các protoplast.

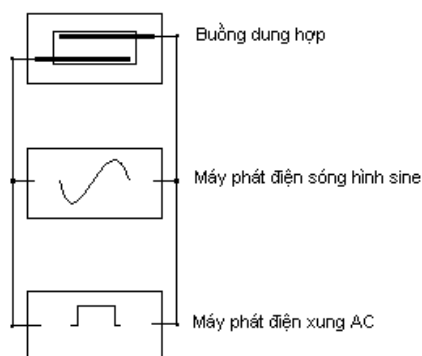
Sau khi xử lý bằng tác nhân dung hợp, các protoplast được nuôi cấy theo phương thức chuẩn. PEG có 2 tác dụng: hoặc cung cấp một cầu nối để Ca^{2+} có thể liên kết các bề mặt màng với nhau hoặc dẫn đến sự rối loạn tích điện bề mặt màng trong suốt quá trình rửa giải.

6.5.3. Dung hợp bằng điện

Phương pháp này đơn giản hơn, nhanh hơn và hiệu quả hơn dung hợp bằng hóa chất. Điều quan trọng hơn cả là dung hợp bằng điện (electrofusion) không gây độc đối với tế bào như thường thấy ở các protoplast hoặc các thể dị nhân được xử lý bằng PEG. Người ta đã dùng các xung điện (electric pulses) để đưa trực tiếp DNA ngoại lai vào trong tế bào thực vật, kỹ thuật này đã làm tăng sự quan tâm về việc ứng dụng dung hợp bằng điện vào lĩnh vực di truyền tế bào soma.

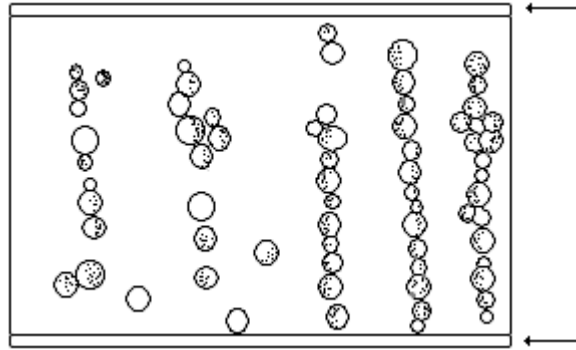
Senda và cs (1979) là những người đầu tiên nghiên cứu theo hướng dung hợp bằng điện ở *Rauwolfia*, quá trình dung hợp đã thực hiện thành công khi dùng xung điện 5-12 amp DC. Sau đó, Zimmermann và Scheurich (1981), cũng đã chứng minh rằng các protoplast có thể dung hợp bằng điện trường và đưa ra một protocol có thể sử dụng rộng rãi. Protocol này bao gồm 2 bước: Đầu tiên, các protoplast được đưa vào trong ngăn dung hợp nhỏ có 2 dây kim loại song song với nhau đóng vai trò là các điện cực. Tiếp đó, sử dụng điện áp thấp và trường điện từ AC dao động nhanh, kích thích các protoplast sắp thành từng chuỗi tế bào giữa các điện cực. Sau khi các tế bào xếp hàng hoàn chỉnh, quá trình dung hợp được thực hiện theo từng đợt ngắn của xung DC điện áp cao. Xung DC điện áp cao tạo ra sự phá vỡ thuận nghịch của màng nguyên sinh chất ở vị trí tiếp xúc của các tế bào, tạo ra sự dung hợp và tái tổ chức lại màng một cách hợp lý. Một quá trình hoàn chỉnh bắt đầu từ lúc đưa các protoplast vào bên trong ngăn và chuyển chúng lên môi trường nuôi cấy, có thể được hoàn chỉnh trong 5 phút hoặc ít hơn.

Các thể dị nhân hình thành nhờ dung hợp bằng điện đã phân chia trong môi trường nuôi cấy và có khả năng tái sinh chồi hoặc cây lai soma, bao gồm: *Nicotiana tabacum* (+) *N. tabacum*, *N. plumbaginifolia* (+) *N. tabacum*, *N. glauca* (+) *N. langsdorfii*, và *Solanum tuberosum* (+) *S. phureja*. Một số tổ hợp lai protoplast đã hình thành callus như: *Brassica napus* (+) *B. napus* và *Solanum brevidens* (+) *N. rustica*.



Hình 6.7. Sơ đồ dung hợp bằng điện

Buồng dung hợp có 2 điện cực song song được nối với máy dao động tần số cao (máy phát điện sóng hình sine hoặc trường AC) và máy phát điện xung DC.



Hình 6.8. Các protoplast thịt lá của cây thuốc lá xếp thành chuỗi ngọc trai dưới ảnh hưởng của trường AC (100 V/cm, 0,6 MHz)

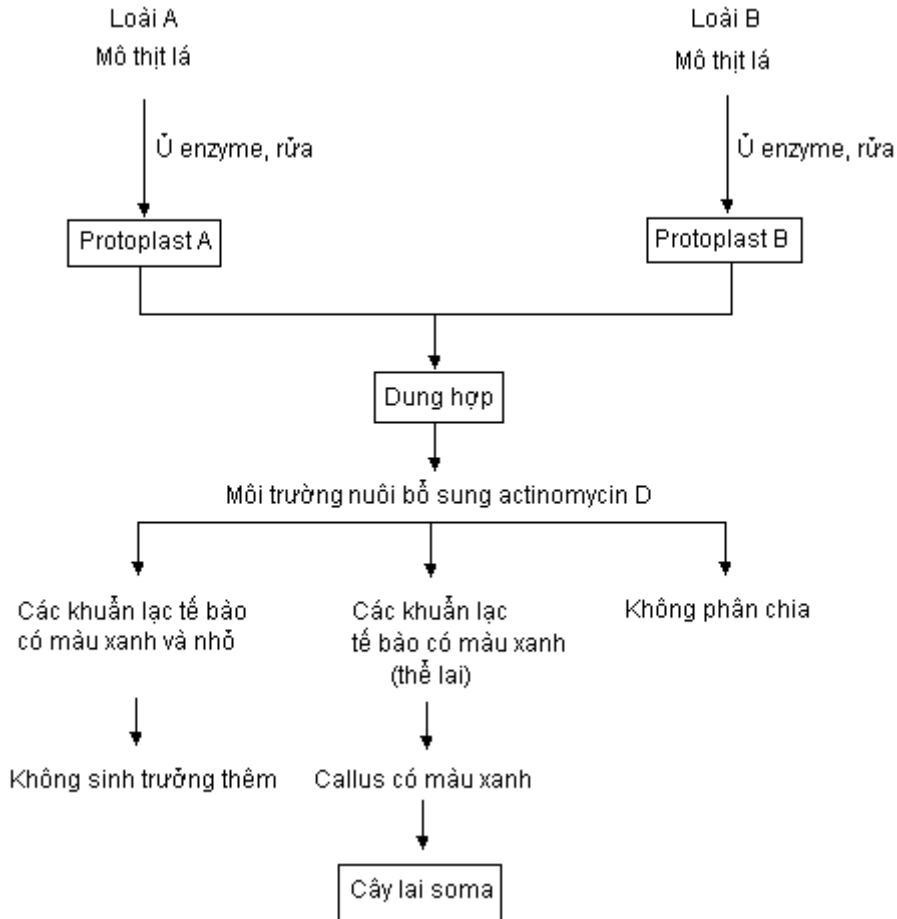
6.5.4. Chọn lọc các thể lai soma

- Phương pháp mẫn cảm dược phẩm

Có thể ứng dụng sự mẫn cảm khác nhau của các protoplast phân lập từ các loài khác nhau. Ví dụ: *Petunia hybrida* và *P. Parodii* đối với actinomycin D. Trên môi trường MS, các protoplast tế bào thịt lá của của *P. hybrida* phát triển mạnh tạo thành khối callus lớn trong khi ở *P. parodii* các protoplast chỉ tạo thành các khuẩn lạc tế bào nhỏ. Bổ sung actinomycin D vào môi trường nuôi cấy có hiệu quả đối với khả năng tái sinh của protoplast *P. parodii*, nhưng ở *P. hybrida* các protoplast lại mất khả năng phân chia. Mặc dù môi trường nuôi có bổ sung dược phẩm, các thể dị nhân vẫn có thể sinh trưởng và sau cùng phân hóa thành các cây lai soma.

- Các đột biến khuyết dưỡng

Chọn lọc các thể lai soma nhờ sự bổ sung di truyền của các đột biến khuyết dưỡng. Mặc dù phương pháp này ứng dụng cho các thực vật bậc cao có gặp một số khó khăn, nhưng người ta cũng đã thành công trong việc chọn lọc một số lượng lớn các thể lai soma bằng cách dùng các protoplast khuyết tật enzyme nitrate-reductase (không sử dụng nitrate) và các dòng đột biến thuốc lá kháng chlorate. Các protoplast của hai đột biến khác nhau này đã được dung hợp và nuôi cấy trên môi trường chứa nitrate (nguồn nitrogen chính). Trong thí nghiệm đối chứng các protoplast bố mẹ không sinh trưởng khi có mặt nitrate trong khi các sản phẩm dung hợp đã tái sinh cây.

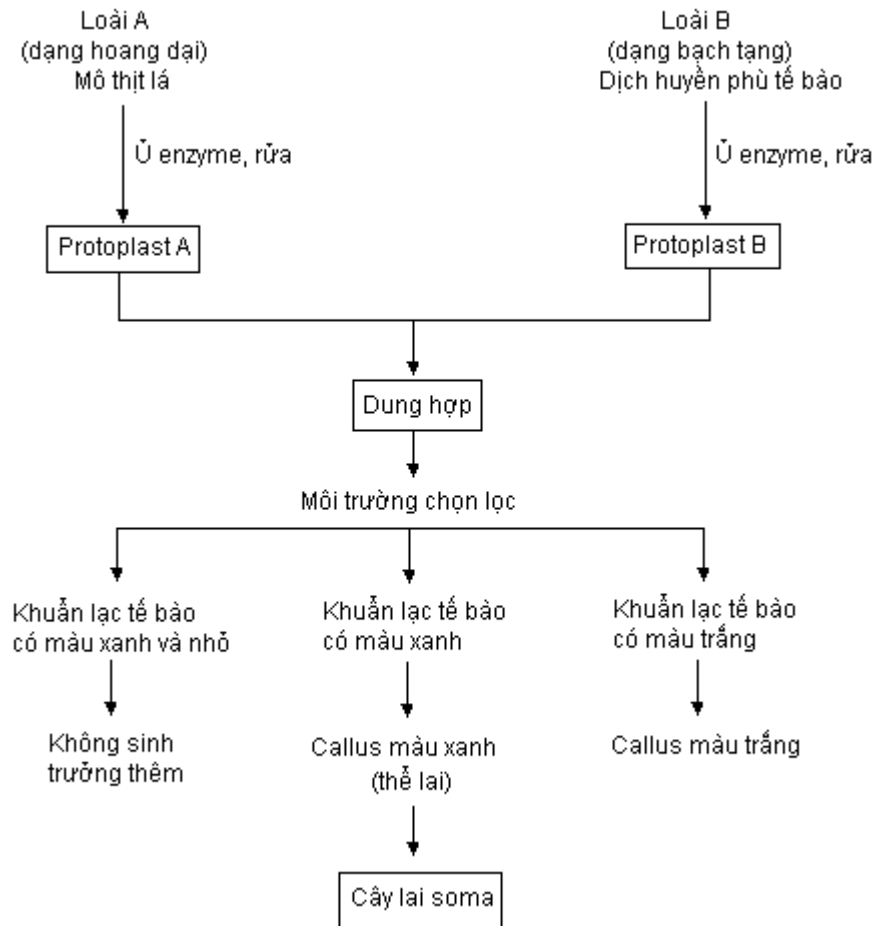


Sơ đồ 6.1. Sơ đồ chọn lọc các thể lai soma bằng cách ứng dụng sự miễn cảm khác nhau của các protoplast thịt lá đối với actinomycin D

- Chọn lọc bổ sung di truyền

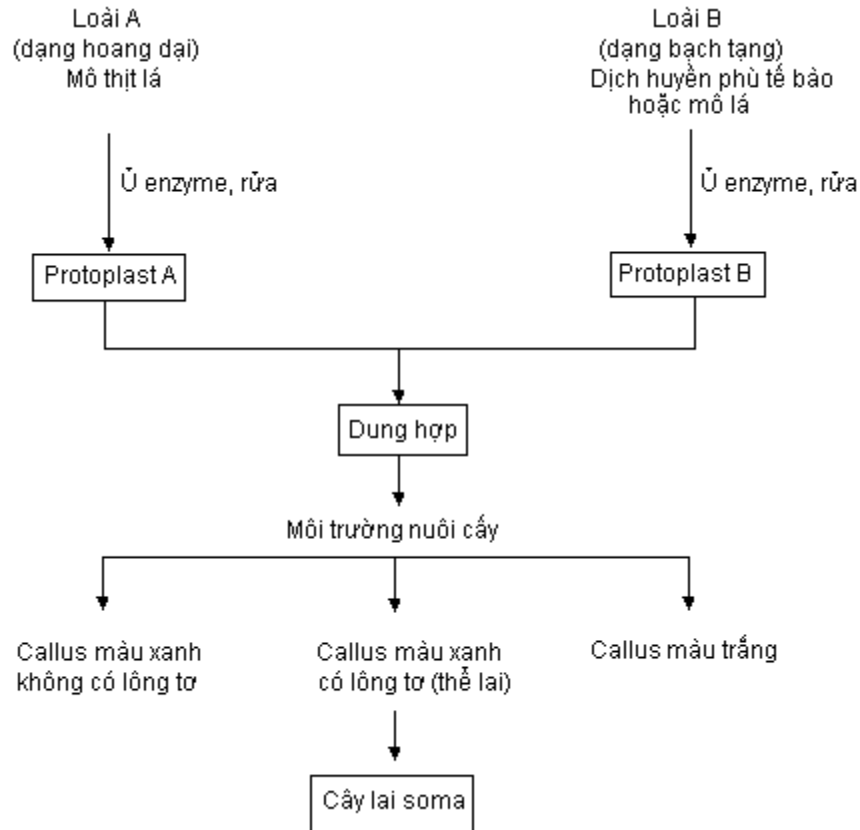
Dùng phương thức chọn lọc bằng mắt để phân lập các tế bào lai phát triển trên môi trường nuôi cấy có thành phần gây miễn cảm đối với các protoplast bố mẹ. Thí nghiệm điển hình là dùng protoplast dạng hoang dại (mô thịt lá) của *Petunia parodii* dung hợp với protoplast bạch tạng phân lập từ nuôi cấy dịch huyền phù tế bào của *P. hybrida*, *P. inflata* và *P. parviflora* trong các thí nghiệm riêng rẽ. Ở trong tất cả các tổ hợp này protoplast màu xanh của *P. parodii* bị đào thải ở giai đoạn khuẩn lạc có kích thước nhỏ, trong khi các protoplast của các loại bố mẹ khác phát triển thành các khuẩn lạc không màu. Ngược lại, các thể lai sinh sản thành các callus màu xanh và sau đó thành

cây lai soma. Phương thức này cũng dùng để lai soma khác loài ở các chi *Daucus*, *Datura* và các chi khác.



Sơ đồ 6.2 Phương thức chọn lọc bổ sung di truyền chỉ có callus lai tái sinh cây

Tuy nhiên, trong các thí nghiệm lai soma khác chi, người ta đã dùng phương thức trong đó các protoplast bố mẹ và các thể lai dị nhân được phép phát triển callus trong nuôi cấy. Kết quả tạo ra ba loại callus khác nhau về hình thái, và có thể xác định được các mô lai, là các mô sau đó được phân lập ra để tái sinh thành cây lai soma



Sơ đồ 6.3. Phương thức dùng cho lai soma khác chi của *Atropa belladonna*

- Sử dụng các đột biến bạch tạng có các gen không allele cho chọn lọc bổ sung di truyền

Melchers và Labib (1974) đã tiến hành thí nghiệm bằng cách sử dụng protoplast của hai giống 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 (10.000 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 10.000 lux cho kết quả chỉ những hợp bào sống và phát triển thành khối

callus xanh, trong khi các loại tế bào bố mẹ đều chết. Cây tái sinh từ khối callus 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 gen bổ sung đó.

6.5.5. Chọn lọc các tế bào lai

Bình thường, các tế bào lai được tạo thành trong quá trình dung hợp protoplast từ hai loài xa nhau về quan hệ họ hàng. Cây tái sinh từ tế bào lai như thế sẽ có plastome từ cả 2 loài bố mẹ nhưng hệ gen chức năng chỉ của một loài do có sự đào thải một bộ nhiễm sắc thể. Vì thế, cây có nguồn gốc từ những cây tái sinh đó sẽ là thể lai di truyền chỉ cho các tính trạng tế bào chất.

Để chuyển gen tế bào chất một cách hiệu quả, các tế bào của loài cho tế bào chất sẽ được chiếu xạ. Chiếu xạ bằng tia X hoặc γ từ 50-300 Gy có hiệu quả từng phần hoặc bất hoạt hoàn toàn các tế bào cho. Xử lý theo phương thức này ngăn chặn hoàn toàn sự phân chia của các tế bào không dung hợp và có vai trò như một nhân tố chọn lọc để sàng lọc các tế bào lai. Phương thức dung hợp dùng tia γ được ứng dụng thành công trong lai khác loài và, thỉnh thoảng, khác chi ở cả 2 mức độ nhân và cơ quan tử. Tác động qua lại giữa nhân và tế bào chất có thể xuất hiện ngay cả trong những sản phẩm dung hợp dùng tia γ khi chúng được xuất phát từ những protoplast thuộc những loài hữu tính không tương hợp nhau. Sự phân chia ở các sản phẩm dung hợp, và các tế bào tiếp theo sau, sẽ làm tăng khuẩn lạc tế bào mà ở đó sự đào thải không định hướng nhiễm sắc thể đã xuất hiện từ phần cho. Tuy nhiên, giới hạn đào thải tùy thuộc vào hệ gen cho và các điều kiện nuôi cấy xác định.

Maliga và cs (1982) chứng minh rằng tính kháng streptomycin được mã hóa bởi chloroplast có thể được chuyển thông qua tế bào chất. Tương tự, Tan (1987) thu được các tế bào lai bằng cách dung hợp tế bào chất của *Petunia hybrida* và protoplast của *Lycopersicum peruvianum*.

6.6. Tồn tại của kỹ thuật protoplast

Kỹ thuật protoplast đã thu được thành công ở các loài thuộc họ cà (Solanaceae) và một số họ khác, nhưng thành công ở họ hòa thảo (Poaceae) là họ của các cây trồng ngũ cốc chính còn rất hạn chế.

Potrykus (1980) đã thảo luận rất kỹ về vấn đề này. Theo Potrykus có những chỉ tiêu sau liên quan đến kết quả nuôi cấy và tái sinh từ protoplast tiềm lực *in vitro*.

1. Phân lập

- Cơ sở di truyền của tế bào (khả năng tiềm tàng của tế bào trong nuôi cấy *in vitro*).
- Tương tác tế bào trong cây.
- Cơ chế phân hóa trong quá trình phát triển cơ thể.
- Nguồn gốc cơ quan và cây hoàn chỉnh.
- Trạng thái sinh lý của tế bào.
- Tác động của quá trình phân lập.
- Tác động của trạng thái phân lập.

2. Điều kiện nuôi cấy

- Nhu cầu dinh dưỡng.
- Nhu cầu về phytohormone.
- Điều kiện vật lý của nuôi cấy.
- Các yếu tố ức chế có thể xuất hiện.
- Tác động của mật độ quần thể tế bào

3. Sự phân bào

- Sinh tổng hợp thành tế bào.
- Điều khiển sinh tổng hợp thành tế bào.
- Chức năng của thành tế bào đối với phân bào.
- Điều khiển sự phản phân bào.
- Điều khiển sự phân chia nhân.
- Điều khiển phân bào.

4. Sự phân hoá

- Điều khiển phân hóa tế bào.
- Tương tác tế bào trong nuôi cấy.
- Điều khiển và cơ chế tạo kiểu mô.
- Điều khiển quá trình tạo cơ quan, phôi.

6.7. Thực hành nuôi cấy Protoplast

6.7.1. Nguyên liệu thực vật

Lá của cây thuốc lá *in vitro* được chọn dùng làm nguyên liệu tách protoplast. Sử dụng các lá được tách trong ngày.

6.7.2. Chuẩn bị môi trường

Dung dịch enzyme tách protoplast:

+ Onozuka cellulase R10	0,5 %
+ Onozuka macerozyme R10	0,1 %
+ Mannitol	13,0 %
+ pH _{môi trường} ~ 5,8	

Dung dịch này được khử trùng bằng màng lọc Millipore loại có đường kính lỗ lọc 0,2-0,25 μm .

6.7.3. Tiến hành

* Ngày thứ nhất

▫ Các mẫu lá thuốc lá *in vitro* được loại bỏ hết gân lá và đặt lên đĩa petri thủy tinh vô trùng. Dùng dao cắt nhỏ các mảnh lá.

▫ Cho các mảnh lá đã băm nhỏ vào cốc đong vô trùng loại 50 ml bổ sung 10 ml dung dịch enzyme tách protoplast. Bọc cốc đong bằng giấy parafilm, ghi nhãn và đặt trong tối qua đêm trên máy lắc ở tốc độ thấp (khoảng 40 vòng/phút).

* Ngày thứ hai

▫ Dùng micropipette chuyển dịch protoplast lên lưới lọc vô trùng ($\Phi = 65\mu\text{m}$) đặt trong cốc loại 50 ml.

▫ Bổ sung thêm 3 ml dung dịch rửa (PI + 10% mannitol) vào cốc chứa các mảnh lá vụn, lắc mạnh, và lọc tiếp trên lưới lọc rồi chuyển vào hỗn hợp protoplast-enzyme của bước trên.

▫ Bổ sung thêm 2 ml dung dịch rửa để rửa protoplast hết khỏi lưới lọc l. Chuyển hỗn hợp protoplast-enzyme (tổng cộng 15 ml) vào tube ly tâm loại 15 ml và ly tâm 50×g trong 10 phút.

▫ Loại bỏ phần dịch nổi phía trên, tái huyền phù tiểu thể bằng 10ml dung dịch tách (PI + 20% sucrose), thêm 1ml dung dịch rửa lên trên bề mặt dung dịch tách và

protoplast sao cho không làm hòa lẫn hai dung dịch, tốt nhất là tạo thành hai pha (nhỏ từ từ dung dịch rửa bên thành tube tránh bắn tung toé lên dịch rửa bên dưới), ly tâm 50×g trong 10 phút. Các protoplast sống sót sẽ nằm ở trên bề mặt dung dịch .

▫ Dùng micropipette hút lớp protoplast màu xanh lục nổi trên tube ly tâm và chuyển nó sang một tube ly tâm sạch, thêm 10 ml dung dịch rửa và ly tâm lại. Protoplast sẽ lắng xuống đáy tube và có dạng viên.

▫ Rửa protoplast thêm một lần nữa trong 10 ml dung dịch rửa. Loại bỏ phần nổi trên mặt và tái huyền phù protoplast trong khoảng chừng 1 ml môi trường nuôi cấy protoplast (PC).

▫ Đặt một giọt protoplast trên buồng đếm hồng cầu và ước lượng mật độ protoplast (số lượng tế bào/số ô đếm $\times 10.000$). Nuôi cấy protoplast bằng cách pha loãng 50.000 tế bào/ml môi trường nuôi cấy protoplast và chuyển sang một đĩa petri vô trùng.

▫ Bọc lại, ghi nhãn và nuôi cấy qua đêm trong tối ở 28°C.

* Ngày thứ ba

Chuyển sang nuôi cấy ở ánh sáng yếu ($10-20 \mu\text{mol}\cdot\text{sec}/\text{m}^2$ hoặc bọc một lớp vải thưa dưới đèn huỳnh quang ánh sáng trắng, với chu kỳ chiếu sáng 16 giờ, nuôi trong 2 ngày.

* Ngày thứ năm

Chuyển sang nuôi cấy ở cường độ ánh sáng cao hơn ($50-75 \mu\text{mol}/\text{sec}/\text{m}^2$) trong 2 ngày bằng cách bỏ lớp vải thưa ra.

* Ngày thứ bảy

Ghi lại kết quả của bài học nuôi cấy protoplast, số tế bào phân chia từ tổng số tế bào nuôi cấy ban đầu, trong một mẫu có 100-200 protoplast nuôi cấy. Có dấu hiệu của sự nhiễm bẩn không.

Chương 7. NUÔI CÂY TẾ BÀO VÀ CHỌN DÒNG TẾ BÀO

7.1. Nuôi cấy tế bào đơn

Bản thân mỗi tế bào thực vật là một đơn vị độc lập, nó chứa đựng tất cả những thông tin di truyền đặc trưng của cơ thể từ đó nó sinh ra. Cho nên mỗi tế bào có thể xây dựng lại toàn bộ cơ thể mới nhờ tính toàn thể. Thực vật bậc cao là một nguồn cung cấp các hợp chất hóa học và dược liệu rất quan trọng. Tuy nhiên trong những năm gần đây sản lượng các thực vật đó rất khó đảm bảo ở mức ổn định do hậu quả của một số yếu tố như:

- Điều kiện tự nhiên không thuận lợi.
- Chi phí lao động ngày càng tăng.
- Khó khăn kỹ thuật và kinh tế trong trồng trọt.

Phương pháp nuôi cấy tế bào dịch huyền phù (dịch lỏng) của thực vật có khả năng góp phần giải quyết những khó khăn trên. Những tế bào trải qua quá trình nuôi cấy và sinh trưởng trong dịch huyền phù gọi là dòng tế bào. Dòng tế bào có những đặc điểm sau:

- Khả năng tách tế bào cao
- Phát sinh hình thái đồng nhất
- nhân to và tế bào chất đậm đặc
- Nhiều hạt tinh bột
- Có những dẫn liệu tạo cơ quan
- Có khả năng nhân đôi trong 24-72 giờ
- Mất tính toàn thể
- Tăng mức đa bội thể

Dịch huyền phù được tạo ra do sự nuôi cấy một mảnh mô sẹo không có khả năng biệt hóa, trong môi trường lỏng và được chuyển động trong suốt thời gian nuôi cấy. Có thể nuôi cấy một mảnh mô biệt hóa vào trong môi trường mặc dù thời gian nuôi cấy sẽ kéo dài nhưng những tế bào nuôi cấy sẽ ở trạng thái tự do. Tuy nhiên không có dịch huyền phù nào chỉ có những tế bào đơn. Các tế bào liên kết với kích thước khác nhau, các tế bào đang phân chia và những tế bào chết. Danh từ xốp (friability) dùng để chỉ những tế bào tách rời nhau sau khi phân chia.

Mức độ tách rời tế bào phụ thuộc khả năng tạo nhiều tế bào xốp và được điều khiển bởi môi trường. Tăng tỉ lệ Cytokinin/ Auxin sẽ sản xuất nhiều tế bào xốp.

Cần có một lượng mô sẹo ban đầu thích hợp là 2-3 g/cm³. Khi mô sẹo được cấy vào dịch lỏng ta có ngay giai đoạn Lag-phase. Đây là giai đoạn đầu tiên cho đến khi có tín hiệu phân chia đầu tiên, sau đó là giai đoạn Exponential-phase và Linear-phase; là giai đoạn tế bào phân chia, tế bào tăng số lượng và tăng quần thể nhanh. Sau cùng là giai đoạn Stationary-phase là giai đoạn tế bào không phân chia, lượng tế bào sinh ra và chết đi bằng nhau. Sau cùng là giai đoạn suy vong.

Những tiến bộ của kỹ thuật này trong những năm gần đây đã được nhiều công trình tổng kết. Nuôi cấy tế bào thực vật trong điều kiện *in vitro* để sản xuất các chất tự nhiên có một số ưu điểm sau:

- Các tế bào thực vật có thể được nuôi cấy trong các điều kiện nhân tạo mà không phụ thuộc vào thời tiết và địa lý. Không cần phải vận chuyển và bảo quản một số lượng lớn các nguyên liệu thô.

- Có thể kiểm soát chất lượng và hiệu suất của sản phẩm bằng cách loại bỏ các trở ngại trong quá trình sản xuất thực vật, như là chất lượng của nguyên liệu thô và sự đồng nhất giữa các lô sản xuất.

- Một số sản phẩm trao đổi chất có thể được sản xuất từ nuôi cấy dịch huyền phù có chất lượng cao hơn trong cây hoàn chỉnh.

- Một số sản phẩm trao đổi chất có thể được sản xuất từ nuôi cấy dịch huyền phù có chất lượng cao hơn trong cây hoàn chỉnh.

Thách thức lớn nhất đối với công nghệ tế bào thực vật là sự ổn định cho phép nuôi cấy tế bào thực vật trên quy mô lớn và đạt hiệu suất tối đa cho sự tích lũy và sản xuất các hợp chất tự nhiên (hay còn gọi là các sản phẩm thứ cấp). Điều này có thể thực hiện bằng cách chọn lọc các kiểu gen thích hợp và các dòng tế bào có sản lượng cao, xây dựng các công thức môi trường dinh dưỡng hợp lý để nuôi cấy tế bào, thiết kế và vận hành các hệ thống nuôi cấy tế bào (bioreactor) hiệu quả. Chúng ta cũng có thể sử dụng kinh nghiệm và kiến thức có được từ nuôi cấy vi sinh vật để áp dụng cho nuôi cấy tế bào thực vật. Tuy nhiên, tế bào thực vật và vi sinh vật có một số đặc điểm khác nhau, vì thế cần phải cải biến và điều chỉnh các điều kiện nuôi cấy cũng như cấu hình của nôi phản ứng (bioreactor) để tìm được các yêu cầu đặc thù của nuôi cấy tế bào thực vật.



Hình 7. 1 Thiết bị nuôi cấy tế bào đơn

7.2 Chọn dòng tế bào

Kỹ thuật chọn dòng tế bào đã ra đời rất sớm trong nghiên cứu vi sinh vật. Nhưng ở thực vật bậc cao, kỹ thuật này mới được ứng dụng cách đây khoảng hơn 20 năm. Người ta có thể tiến hành xử lý và chọn lọc tế bào thực vật ở ba mức độ chính:

- Mô sẹo (callus).
- Tế bào đơn (single cell).
- Tế bào trần (protoplast).

Mục đích chọn lọc *in vitro* có thể khái quát ở những điểm sau :

- Chọn dòng tế bào chống chịu các điều kiện bất lợi của ngoại cảnh, ví dụ: chống chịu nóng, lạnh, phèn, mặn, khô hạn...
- Chọn dòng tế bào kháng các độc tố: độc tố do nấm bệnh tiết ra, các loại kháng sinh.
- Chọn dòng tế bào sản xuất dư thừa (over production) các loại sản phẩm chủ yếu là amino acid.
- Chọn các đặc điểm chỉ thị để nghiên cứu di truyền (genetic markers)...

Hiện tượng biến dị di truyền xuất hiện ở các tế bào không phân hóa (undifferentiation), các protoplast phân lập, các callus và các mô nuôi cấy *in vitro*. Nguyên nhân của biến dị chủ yếu là do những thay đổi về số lượng và cấu trúc của nhiễm sắc thể. Tính không đồng nhất của tế bào trong nuôi cấy tăng lên do các nhân tố sau:

(a) Nhiễm sắc thể ở trạng thái khảm hoặc có rối loạn di truyền ở các tế bào của mẫu vật cấy gây.

(b) Các đặc tính mới không theo quy luật do các điều kiện nuôi cấy gây ra. Trong nuôi cấy mô, các kiểu thay đổi như thế thường bị loại bỏ khi mục đích chính là tăng các quá trình nuôi cấy ổn định di truyền.

Những nghiên cứu gần đây cho thấy các thí nghiệm nuôi cấy mô hoặc tế bào thường trải qua những thay đổi di truyền (đa bội-polyploidy, lệch bội-aneuploidy, đứt gãy nhiễm sắc thể-chromosomal breakage, khuyết đoạn-deletion, chuyển đoạn-translocation, khuếch đại gen-gene amplifications, và đột biến-mutations), và những thay đổi này biểu hiện ở mức độ sinh hóa hoặc phân tử. Như vậy, nuôi cấy mô và tế bào thực vật có khả năng tạo biến dị di truyền tương đối nhanh và không cần phải ứng dụng các kỹ thuật phức tạp khác. Biến dị di truyền trong nuôi cấy mô biểu hiện ở sự thay đổi tính trạng của các cây tái sinh và sau đó truyền sang thế hệ sau bằng phương thức nhân giống hữu tính (ví dụ: rau diếp, thuốc lá) hoặc dinh dưỡng (ví dụ: mía, khoai tây).

Các biến dị chọn lọc được trong nuôi cấy mô có nhiều cách gọi khác nhau như: dòng callus (calliclones-từ nuôi cấy callus) hoặc dòng protoplast (protoplasts-từ nuôi cấy protoplast). Năm 1981, Larkin và Scowcroft dùng một thuật ngữ chung là biến dị dòng vô tính (somaclonal variation), mặc dù Evans và cs (1984) lại dùng thuật ngữ biến dị dòng giao tử (gametoclonal variation) cho các dòng bị biến đổi di truyền phát triển từ các tế bào giao tử hoặc thể giao tử. Sự đa dạng của biến dị ở các dòng vô tính làm nổi bật một thực tế rằng biến dị dòng vô tính có thể là một công cụ rất hữu hiệu cho việc cải thiện di truyền cây trồng.

7.2.1. Đặc tính của tế bào thực vật được nuôi cấy

Sự ổn định của các dòng tế bào được nuôi cấy là sự thể hiện tốc độ sinh trưởng và sinh tổng hợp các hợp chất thứ cấp có giá trị kinh tế, đặc biệt nhất là ứng dụng kỹ thuật nuôi cấy tế bào trên qui mô công nghiệp. Biến dị di truyền của tế bào nuôi cấy là cơ sở để thu nhận những thể biến dị soma có những đặc tính quý. Sự ổn định là yêu cầu cần thiết cho việc vi nhân giống các dòng tế bào và chọn lọc ổn định trong tạo giống. Một vấn đề khác được đề cập tới trong thông báo về nuôi cấy tế bào *Catharanthus* là tính không ổn định của các dòng tế bào đối với việc tạo sản phẩm thứ cấp. Một vài dòng mất khả năng tạo alkaloid ngay cả khi tiến hành bảo quản chúng.

Vì thế, hiện tượng giảm năng suất không thể hoàn toàn loại trừ được. Khó khăn ngày càng trở nên lớn hơn khi đưa qui mô sản xuất lên dạng công nghiệp. Như vậy trước

hết là phải tiến hành chọn lọc những dòng tế bào tỏ ra tương đối ổn định và tiến hành nghiên cứu cơ chế và nguyên nhân dẫn đến tính bất ổn định. Hiện nay, người ta cần tuân theo qui trình được ứng dụng trong ngành vi sinh vật học nhằm thu được những dòng tế bào có năng suất ổn định trong tất cả các giai đoạn nuôi cấy đồng thời để tránh mất hoàn toàn những dòng sản xuất này. Một số nghiên cứu cho thấy có những dòng tế bào chuyên tạo ra sắc tố có tính ổn định đặc biệt là những điều rất quan trọng trong vấn đề năng suất. Thế nhưng, xét về nghiên cứu di truyền cho đến nay thì chỉ mới có một công trình duy nhất phân tích số lượng nhiễm sắc thể của dòng tế bào tạo nhiều caroten và dòng không tạo caroten của cây *Daucus carota* và tác giả không tìm thấy sự sai khác giữa hai dòng này. Sự ổn định năng suất ở đây có thể do quá trình cấy chuyên, người ta chỉ cấy chuyên những khối callus có màu sắc đậm nhất, mặc dù việc làm đó hoàn toàn vô ý thức. Ngoài ra, người ta sẽ còn phát triển kỹ thuật bảo quản đông lạnh đạt tới trình độ cho phép tránh hoàn toàn sự xuất hiện những thay đổi do chính kỹ thuật đông lạnh gây ra. Phương pháp bảo quản bằng cách giảm phân chia tế bào trong nuôi cấy ở nhiệt độ 0°C là phương pháp có hiệu quả.

Việc tái thiết được năng suất của dòng tế bào *Catharanthus* nêu ở trên có thể được giải thích bằng hiện tượng tái biến song toàn bộ vấn đề mất đi và tái thiết năng suất sẽ được giải thích nếu những dòng tế bào được nghiên cứu là dòng epigenetic chứ không phải là những dòng genetic. Sự thật rằng tế bào thực vật nuôi cấy mang nhiều đặc điểm không di truyền đã được biết khá kỹ. Chỉ có một số ít trường hợp người ta chứng minh được rằng những thay đổi của dòng tế bào là do những đột biến cụ thể trong genome và plastome hoặc người ta chứng minh được có những sản phẩm gen thay đổi, ví dụ như enzyme thay đổi được tạo ra. Như vậy, việc sử dụng những dòng tế bào epigenetic hoặc không di truyền làm phức tạp hóa mục tiêu sản xuất các hợp chất thứ cấp bằng nuôi cấy tế bào. Thật không may mắn vì rất khó chọn được dòng tế bào không mang những thay đổi không di truyền vì rằng muốn chứng minh điều đó phải tái sinh cây hoàn chỉnh từ những dòng tế bào này và sau đó tiến hành kiểm tra nuôi cấy mô từ hạt hoặc cây thu được từ những cây hoàn chỉnh đó.

Loại tế bào chính dung trong nuôi cấy là những tế bào mô sẹo là kết quả của những tế bào soma phân biệt hóa và những tế bào lai hữu tính. Tính đa dạng của những dòng tế bào là sự thuận lợi cho các nghiên cứu sinh học. Những mô sẹo đầu tiên, hình thành qua sự phân chia những tế bào ở mô thường không đồng nhất. Những tế bào mô nuôi cấy khác nhau là nguyên nhân tính không đồng nhất của tế bào mô sẹo tiên khởi.

Sự phân bào nguyên nhiễm bất thường trong suốt quá trình phát sinh và duy trì phát sinh dẫn đến sự hình thành những tế bào đa bội, lệch bội và tái sắp xếp lại nhiễm

sắc thể. Dùng tốc độ sinh trưởng trong điều kiện nuôi cấy thích hợp dẫn đến việc chọn lọc nhanh chóng những tế bào không đi vào giai đoạn biệt hóa; mô sẹo không đồng nhất tiền khởi chuyển hóa thành tế bào mô sẹo chặt và sau đó chuyển hóa thành tế bào mô sẹo xốp, cả hai loại tế bào này không có cấu trúc mô học.

Thành phần dinh dưỡng của môi trường nuôi cấy và hormone xác định đặc tính sinh lí và phát sinh biểu sinh của những tế bào phụ thuộc vào những phần khác nhau của mô sẹo. Kiểu di truyền của một loại thực vật chịu ảnh hưởng bởi các quá trình biến đổi xác định cấu trúc và tốc độ sinh trưởng của mô sẹo.

Để có sự phân bào ở tế bào đơn, cần phải sử dụng môi trường giàu dinh dưỡng hay môi trường điều kiện bằng cách nuôi cấy chung với mô dinh dưỡng hay một lớp mô cung cấp dinh dưỡng.

Mật độ tế bào đơn cao và sự giảm thể tích môi trường thúc đẩy tế bào chuyển qua phân chia, đây là những điều kiện định trước để phát sinh phân bào ở những tế bào không có khả năng phân chia.

Nuôi cấy tế bào thực vật bậc cao có tính hai mặt trong di truyền:

1- Nó mang tính sở hữu thông tin di truyền cần thiết thể hiện ở mức độ tế bào. Thông tin di truyền này được thực hiện trên chức năng của tế bào.

2- Tế bào nuôi cấy vẫn duy trì thông tin bổ sung xác định khả năng sản xuất các cơ chất.

Nguyên nhân gây chết trong quần thể tế bào *invitro* có thể được phân chia theo các kiểu sau đây:

- Có sự chết của tế bào ở tất cả các phase trong chu kì tế bào
- Sự chết xuất hiện ở một phase của giai đoạn giảm dần trong nuôi cấy do giới hạn dưỡng chất hay sự ức chế của các sản phẩm độc tố trong quá trình trao đổi chất.
- Sự chết thể hiện trước khi tế bào phân chia.

7.2.2. Nguyên liệu và điều kiện nuôi cấy

7.2.2.1. Kiểu gen và mẫu vật

Kiểu gen ảnh hưởng lên tần số tái sinh cây và tần số biến dị dòng soma. Sun và cs (1983) khi nghiên cứu khả năng tái sinh ở các thể đa bội của 18 thứ (variety) khác nhau của lúa thì chỉ tái sinh được nhiều dạng bội thể khác nhau ở thứ *indica* mà không tái sinh được ở thứ *japonica*.

Mẫu vật được sử dụng từ nhiều nguồn mô khác nhau như lá, rễ, lóng (internodes), bầu quả (ovaries) và hoa tự (inflorescences). Nguồn mẫu vật được xem là rất quan trọng trong việc xuất hiện biến dị dòng soma. Nghiên cứu ở cây phong lữ (geranium) cho thấy các biến dị soma có thể thu được từ cành giâm cuống lá (petiole cuttings) hoặc rễ *in vivo*, nhưng không thể từ cành giâm của thân (stem cuttings). Cây dứa (*Ananas cosmosus*) phát triển từ callus của hom giâm (slip), chồi đỉnh và chồi nách (crown and axillary bud) cho thấy chỉ có sự biến đổi ở đặc điểm của gai (spine), trong khi các cây phát triển từ callus của quả tụ (syncarp) cho thấy có sự biến dị ở màu lá, gai, lớp sáp (wax) và tán lá (foliage) (Wakasa 1979). Van Harten và cs (1981) quan sát thấy có sự thay đổi hình thái ở 12,3% cây khoai tây tái sinh từ mảnh lá (leaf discs), ngược lại có tới 50,3% các cây biến dị có nguồn gốc từ callus của cuống bông (rachis) và cuống lá. Các tác nhân chọn lọc khác nhau được sử dụng dựa vào các nguồn mẫu vật khác nhau trong nuôi cấy, tạo ra một dãy biến dị dòng soma giữa các cây tái sinh.

7.2.2.2. Ảnh hưởng của phytohormone

Nồng độ cao của các nhân tố điều khiển sinh trưởng ảnh hưởng đến sự thay đổi của kiểu nhân trong các tế bào nuôi cấy. 2,4-D cảm ứng biến dị nhiễm sắc thể ở các cây tái sinh trong nuôi cấy mô của lúa mạch (Deambrogio and Dale 1980) và khoai tây (Shepard 1981) khi hiện diện ở nồng độ cao trong môi trường. Tương tự, các biến dị dòng soma của các loài *Nicotiana* cảnh (ornamental nicotiana) thu được từ mẫu lá trên môi trường có cung cấp BAP từ 5-10 mmol/L (Bravo and Evans 1985). Các phytohormone rất cần thiết cho cảm ứng phát sinh cơ quan và phân hóa chồi; tuy nhiên, nồng độ cao của các chất này không cho phép tái sinh thành cây hoàn chỉnh trong nuôi cấy mô và tỷ lệ phytohormone trong môi trường cần được điều chỉnh cẩn thận trong các hệ thống nuôi cấy nhân giống *in vitro* cho các biến dị dòng soma.

7.3 Biến dị dòng tế bào

7.3.1. Cơ sở phân tử của biến dị

Các biến dị cũng có thể xuất hiện như là kết quả của những thay đổi tinh vi hơn do các đột biến đơn gen xuất hiện trong nuôi cấy, và các đột biến này biểu hiện rõ ràng không có những thay đổi thuộc nhân (karyological changes). Các đột biến lặn không phát hiện được trong những cây R_0 (các cây tái sinh *in vitro* từ các tế bào hoặc mô bất kỳ), nhưng biểu hiện ở thế hệ R_1 (thế hệ thu được sau khi tự thụ phấn (selfing) của cây R_0).

Thế hệ F_1 phân ly tính trạng quan tâm theo quy luật Mendel với tỷ lệ 3:1. Những phân tích sâu hơn đã xác định bản chất của biến dị. Biến dị dòng soma của các đột biến lặn đơn gen cũng đã được tìm thấy ở ngô, *Nicotiana sylvestris*, lúa và lúa mì. Trong một số trường hợp đặc biệt, các dòng chỉ thị di truyền (thiếu chlorophyll) đã giúp đánh giá các cây tái sinh từ nuôi cấy tế bào

Những thay đổi trong hệ gen (genome) của tế bào chất cũng được quan sát ở các dòng soma. Ở cây ngô có hai tính trạng thuộc tế bào chất: (a) mẫn cảm với độc tố chiết từ *Drechslera maydis* nội T-tác nhân gây bệnh rụi lá (leaf blight) ở giống ngô Southern, và (b) tế bào chất bất dục dục Texas (cms-T). Cả hai tính trạng này được điều khiển bởi mtDNA (DNA ty thể).

Một hướng khác của đột biến đơn gen trong biến dị dòng soma liên quan với các nhân tố gen nhảy (transposable elements). Chourey và Kemble (1982) đã phát hiện sự biến dị như là kết quả của sự xen đoạn của các DNA giống plasmid (plasmid-like DNA) trong hệ gen ty thể của nuôi cấy tế bào ngô cms-s. Những thay đổi cảm ứng bằng gen nhảy được thông báo chi tiết hơn ở các dòng thuốc lá, alfalfa và lúa mì.

Biến dị dòng soma xuất hiện cũng có thể do những thay đổi phân tử gây ra do hiện tượng trao đổi chéo nguyên phân (mitotic crossing over-MCO) ở các cây tái sinh. Hiện tượng này bao gồm hai trường hợp biến dị đối xứng và bất đối xứng. Các đột biến đơn gen bởi MCO có thể hình thành một cơ chế thống nhất các biến dị di truyền mới. Những thay đổi nhỏ trong cấu trúc của các nhiễm sắc thể có thể dẫn đến những thay đổi về sự biểu hiện và chuyển giao di truyền (sang thế hệ sau) của các gen đặc trưng, như là khuyết đoạn (deletion) và nhân đoạn (duplication) của một bản sao (hoặc nhiều bản sao) của một gen, hoặc sự biến đổi gen trong các quá trình sửa chữa. Sự tái tổ hợp về sau, hoặc đứt gãy nhiễm sắc thể ở vùng ưu tiên hoặc các “điểm nóng” di truyền (hot spots) của các nhiễm sắc thể đặc biệt ảnh hưởng đến hệ gen dẫn đến thay đổi biểu hiện phenotype.

Các nghiên cứu gần đây đã chứng minh rằng những thay đổi trong DNA cơ quan tử, các profiles của protein và isoenzyme liên quan với sự xuất hiện của biến dị dòng soma ở thực vật (lúa mì, lúa, khoai tây, ngô, lúa mạch và lanh). DNA cơ quan tử được tinh sạch tương đối dễ và có chuỗi nucleotide phức tạp. Một số enzyme cắt hạn chế có thể dễ dàng phân biệt giữa các kiểu cytosine-methylation (thay đổi trong các biến dị dòng soma) bên ngoài và bên trong ở vị trí cắt hạn chế. Các dòng soma của lúa mì có những biến đổi ở mặt bên của gliadin. Ở lúa mạch, các biến dị thường có nguồn gốc từ nuôi cấy callus; những biến dị có liên quan tới các đoạn spacer 1 của rDNA và các hordein cũng đã được tìm thấy.

7.3.2. Bản chất của biến dị dòng giao tử

Nguyên liệu di truyền trong các tế bào và mô soma được phân bố một cách bình thường như nhau thông qua quá trình nguyên phân (mitosis). Ngược lại ở các giao tử, chúng là sản phẩm của quá trình giảm phân (meiosis), nhận một nửa của sự bổ sung di truyền với các allele theo các quy luật phân ly độc lập theo Mendel. Để phân biệt các dòng soma có nguồn gốc soma và các dòng giao tử có nguồn gốc giao tử, người ta dùng 3 thông số khác nhau. Thứ nhất, cả hai loại gen đột biến lặn và trội cảm ứng bởi biến dị dòng giao tử sẽ biểu hiện trực tiếp ở các cây đơn bội tái sinh từ tiểu bào tử (microspores) của các bao phấn nhị bội (từ đó chúng sẽ có chỉ một bản sao của mỗi gen). Điều này cho phép phân tích trực tiếp các dòng giao tử (R_0) để xác định các thể biến dị mới. Thứ hai, các thể tái tổ hợp phát triển trong các dòng giao tử sẽ là kết quả của tổ hợp chéo giảm phân (meiotic crossing over). Thứ ba, dòng giao tử có thể được dùng chỉ sau khi có được sự ổn định nhờ gấp đôi số lượng nhiễm sắc thể của nó.

Giá trị của biến dị dòng giao tử trong cải thiện di truyền rõ ràng từ sự phát triển của các dòng đơn bội kép (double-haploid) bằng cách nuôi cấy bao phấn của các cây lai F_1 của lúa mì và lúa. Nuôi cấy bao phấn đã được sử dụng để phát triển các cây tái tổ hợp của thể lai F_1 của lúa mì giữa giống Xian nog 5675 (một thứ có mày trắng, râu ở đầu hạt thóc, cụm hoa hình chùy và cuống hoa ngắn) và giống Jili (một thứ có mày màu đỏ, có râu, cụm hoa hình thoi và cuống hoa cao). Một số cây đơn bội kép đã được phát triển biểu hiện các đặc điểm hỗn hợp của cả hai bố mẹ.

Biến dị ở cây tái sinh từ mô của thể giao tử đã được thông báo ở một số trường hợp do khám phá ra “dị hợp tử dư” (residual heterozygosity, thường có ở vi khuẩn). Hướng nghiên cứu khám phá các dị hợp tử dư ở thực vật là nuôi cấy bao phấn từ các thể đơn bội kép và kiểm tra biến dị xuất hiện ở các chu trình tiếp theo của sinh sản đơn tính (androgenesis). Kiểm tra các cây có nguồn gốc từ chu trình thứ hai của nuôi cấy bao phấn đơn bội kép cây thuốc lá đã tìm ra được các biến dị về năng suất, chiều cao cây, ngày ra hoa, và hàm lượng alkaloid tổng số. Các biến dị tương tự đã được thông báo ở các cây từ thể đơn bội kép của *N. sylvestris* phát triển sau một số chu trình sinh sản đơn tính. Các biến dị dòng giao tử là kết quả của các nhân tố gây ra sự tái tổ hợp giảm phân và các đột biến trước khi nuôi cấy bao phấn.

7.3.3. Đột biến hay thay đổi hoạt tính gen

Đột biến phải là kết quả rõ ràng của sự thay đổi cấu trúc bậc một của DNA có di truyền dẫn đến những biến đổi về tính trạng, đột biến phải là thay đổi lâu dài và di truyền cấu trúc bậc một của DNA dẫn đến những biến đổi tính trạng.

Thông thường trong nuôi cấy tế bào thực vật đột biến được chọn lọc thông qua thay đổi tính trạng của tế bào. Những thay đổi về tính trạng tế bào có thể là kết quả của thay đổi hoạt tính gen. Ví dụ: Dòng tế bào thuốc lá kháng cycloheximide của Maliga (1976) nếu cấy chuyển 1-2 lần sang môi trường không chứa cycloheximide thì khả năng kháng cycloheximide mất đi. Điều đó chứng tỏ tính kháng cycloheximide do một gen bình thường không thể hiện.

- Tương tự như vậy người ta cũng gặp ở dòng tế bào cà rốt chống chịu 2,4-D của Widholm (1977).

- Dòng tế bào cà rốt kháng colchicine là kết quả thay đổi tính chất màng tế bào.

Các dạng biến đổi như vậy do một cơ chế không di truyền (epigenetic mechanism) điều khiển. Thay đổi tính trạng do đột biến phải là những tính trạng chuyển qua thế hệ sau bằng sinh sản hữu tính được. Đột biến của DNA nhân sẽ phân ly theo định luật Mendel sau khi lai, còn đột biến ở DNA cơ quan tử như lục lạp và ty thể thì có thể di truyền theo đường mẹ. Cho tới lúc lai xong, tốt nhất chỉ nên gọi các dòng vừa phân lập được là các dòng tế bào (hoặc các dạng thay đổi tính trạng). Khi tái sinh cây từ một dòng tế bào cũng có thể xuất hiện những cây không di truyền tính trạng đã chọn. Điều đó có thể giải thích như sau: lúc chọn một số tế bào mẫn cảm được bảo vệ bởi các tế bào chống chịu xung quanh bằng cách cung cấp các sản phẩm trao đổi chất hoặc enzyme qua các khe tế bào, những tế bào mẫn cảm cũng có thể xuất hiện thông qua hiện tượng tách tế bào vô tính, hiện tượng tạo khảm hoặc những biến đổi di truyền (back mutation-thoái biến) và không di truyền (epigenetic).

Các dạng biến đổi chọn được trong nuôi cấy *in vitro* thường xuất hiện với tần số 10^{-5} - 10^{-8} khi không xử lý đột biến. Nếu xử lý sẽ tăng được tần số đó lên 10 lần.

Các tác nhân gây đột biến thường được sử dụng là:

- Ethylmethane sulphonate (EMS).
- N-methyl-N-nitro-N-nitroso guanidine (MNNG).
- N-ethyl-nitrosourea (ENU).
- Tia X hoặc tia UV.

Chưa có số liệu cụ thể về nồng độ, phổ và tần số đối với từng loại tác nhân bởi vì độ lớn của khối tế bào được xử lý, mật độ tế bào gieo trên đĩa petri và số nhiễm sắc thể

cũng như karyotype của tế bào bị xử lý. Sử dụng protoplast thực vật bậc cao có thể là phương pháp tốt nhất để tiếp cận vấn đề này.

7.4. Nguyên tắc chọn dòng tế bào

7.4.1. Chọn trực tiếp

Thông qua ưu thế về sinh trưởng hay sự khác biệt thấy được về màu sắc có thể chọn được dòng tế bào từ quần thể tế bào. Một số dòng có khả năng kháng kháng sinh, kháng các chất đồng đẳng của amino acid hoặc chống chịu muối cũng có thể chọn trực tiếp từ quần thể tế bào. Hệ thống tế bào hay được sử dụng là các tế bào dịch huyền phù hoặc khối callus. Điều kiện chọn lọc ở đây là các độc tố với nồng độ khác nhau gây tác động trực tiếp lên sinh trưởng của tế bào. Những tế bào có khả năng phân chia trong môi trường chứa độc tố với nồng độ tăng dần từ lần cấy chuyển này đến lần cấy chuyển khác được sàng lọc dần (chọn lọc kiểu bậc thang). Hoặc có thể đưa cả quần thể tế bào vào điều kiện môi trường ức chế sinh trưởng hoàn toàn để chọn ra những tế bào sống sót, tuy nhiên ngưỡng tối đa của mức độ hoặc nồng độ tác nhân chọn lọc cần phải được thăm dò trước nếu không có thể ức chế sự phát triển của các tế bào đột biến trong quần thể tế bào nuôi cấy. Thông thường, người ta trộn tế bào vào môi trường thạch chứa được tố và chọn những tế bào sống sót phân chia thành khuẩn lạc mô sẹo, cũng có thể cấy trực tiếp lên môi trường chọn lọc chứa độc tố. Dòng chống chịu thường xuất hiện từ một phần của khối tế bào nuôi cấy.

7.4.2. Chọn gián tiếp

Trong trường hợp này đặc điểm của dòng được chọn là kết quả biểu hiện khuyết tật của tế bào. Thí dụ điển hình là chọn dòng thiếu enzyme nitrate reductase (NR). Trên môi trường chứa ClO_3^- những tế bào có NR sử dụng ClO_3^- như NO_3^- và khử thành ClO_2^- , ClO_2^- tác dụng như một độc tố cho nên chỉ có những tế bào không có NR mới sống sót trên môi trường chọn lọc.

7.4.3. Chọn tổng thể

Các tế bào dị dưỡng thực vật thường được chọn bằng phương thức xử lý đột biến và nuôi trên môi trường có chứa yếu tố dinh dưỡng cần thiết có khi lại chính là yếu tố gây

đột biến, ví dụ: đột biến lặn chịu được S-2-aminoethyl cysteine xuất hiện sau khi xử lý đột biến phôi nuôi cấy.

7.5. Cách chọn dòng tế bào

7.5.1. Không có tác nhân chọn lọc

Các tế bào và callus không tổ chức (unorganised), sinh trưởng trong nuôi cấy *in vitro* ở các thời kỳ khác nhau trên môi trường không chứa tác nhân chọn lọc (độc tố hoặc các chất ức chế), được cảm ứng để phân hóa các cây hoàn chỉnh. Các cây tái sinh sẽ được trồng trên đồng ruộng để chọn lọc các biến dị. Bằng phương thức này người ta đã thu được các biến dị dòng soma của các loài cây trồng khác nhau.

7.5.1.1. Cây mía đường (*Saccharum officinarum*)

Cây biến dị phân lập từ nuôi cấy mô và tế bào được xác nhận đầu tiên ở mía. Công việc bắt đầu ở đảo Fiji (Nhật), phân lập các dòng phụ (subclones) ở giống mía Pindar để kháng bệnh Fiji (do *virus* aphid-transmitted) và bệnh mốc sương (downey mildew) (do *Scelerospora sacchari*). Tính kháng được duy trì ở các dòng soma qua một vài thế hệ trồng trên đồng ruộng. Ở Australia, Larkin và Scowcroft (1981), đã khai thác khả năng tạo các biến dị của nuôi cấy mô để cải thiện một số giá trị nông học của giống mía Q101 kháng bệnh đốm mắt (do *Helminthosporium sacchari*). Tương tự, Liu (1981) đã xác định các dòng callus mía cho cây ưu thế hơn giống (thứ) địa phương tốt nhất (F-160, Taiwan) về năng suất, hàm lượng đường và khả năng kháng bệnh than (do *Ustilago scitaminea*).

7.5.1.2. Cây khoai tây (*Solanum tuberosum*)

Shepard và cs (1980) đã tái sinh một số lớn cây từ protoplast tế bào thịt lá của giống “Russet Burbank” và thông báo các biến dị thu được trong quần thể protoclonal. Một số trong chúng kháng được bệnh thối sớm (early blight-do *Alternaria solani*) hoặc thối muộn (late blight-do *Phytophthora infestans*). Các protoclonal kháng *virus* Y và xoắn lá (leaf-roll) cũng đã xuất hiện trên đồng ruộng (Thomson và cs 1986).

Biến dị di truyền ở khoai tây phát triển từ cây tái sinh trong nuôi cấy mô có thể di truyền sang thế hệ sau thông qua sinh sản sinh dưỡng (Sree Ramulu 1986). Các biến dị phân lập trong các cây tái sinh từ callus giống Bintje, cho các dòng-sản xuất bằng phương thức sinh dưỡng-mang các tính trạng về năng suất, kháng bệnh thối muộn và nấm vảy (scab) trên đồng ruộng tốt hơn.

7.5.1.3. Cây cà chua (*Lycopersicon esculentum*)

Evans và cs (1987), đã phân lập các dòng soma của cà chua bằng các biến dị hình thái, là các đột biến lặn của tính bất dục đực kháng nấm *Fusarium oxysporium* ở mắt của cuống lá, khả năng lục hóa của lá, màu sắc của quả và hoa. Một số biến dị về hình thái nói trên là do những thay đổi về số lượng nhiễm sắc thể. Các nhà khoa học ở DNA Plant Technology Co. (USA) đã phát triển các biến dị dòng soma của cà chua cho quả có vị ngọt tăng, cấu tạo (texture) quả tốt hơn, màu và hàm lượng chất khô cao (20%). Một trong những biến dị như thế đã được đăng ký bản quyền là giống (thứ) thương mại vào năm 1986 (Marty 1988).

7.5.1.4. Cây phong lữ (*geranium*)

Skirvin và Janick (1976) đã phát triển một loài geranium (*Pelargonium*) từ các biến dị soma có mùi hương được cải thiện và đặt tên là “Velvet Rose”. Điều này cho thấy giống cây trồng thương mại (commercial crop plants) đầu tiên bắt nguồn từ các biến dị dòng soma. Giống mới này có hoa đối xứng mang các nhị hữu thụ lớn, núm nhụy chẻ 5, trồng bằng hạt. Trong khi ở giống bố mẹ thì ngược lại, hoa bất đối xứng mang các bao phấn bé và bất thụ, núm nhụy chẻ 2, và không bao giờ trồng bằng hạt.

7.5.1.5. Các loài ngũ cốc và hòa thảo (*cereals and grasses*)

Các cây ngũ cốc và hòa thảo có nguồn gốc callus có thể là nguồn nguyên liệu cung cấp các biến dị dòng soma. Cây của các dòng này khác nhau về chiều cao, kích thước, dạng lá, chiều dài của râu (ở đầu hạt thóc), khả năng hữu thụ của cụm hoa, hoặc màu của hạt. Các biến dị chọn lọc có giá trị thương mại là dòng bất dục đực (male sterility), điều chỉnh protein gliadin, kháng bệnh sương giá ở lúa mì (Galiba và Sutka 1988), tăng năng suất ở lúa và chín sớm ở ngô (Evans 1989), kháng bệnh cháy rụi (fireblight) ở cây lê (*Pyrus communis*) (Viseur 1989). Trong số các loài hòa thảo, các loài thuộc chi *Lolium*, *Panicum* và *Pennisetum* cũng cho nhiều hứa hẹn về tiềm năng biến dị dòng soma.

7.5.2. Có nhân tố chọn lọc (with selection pressure)

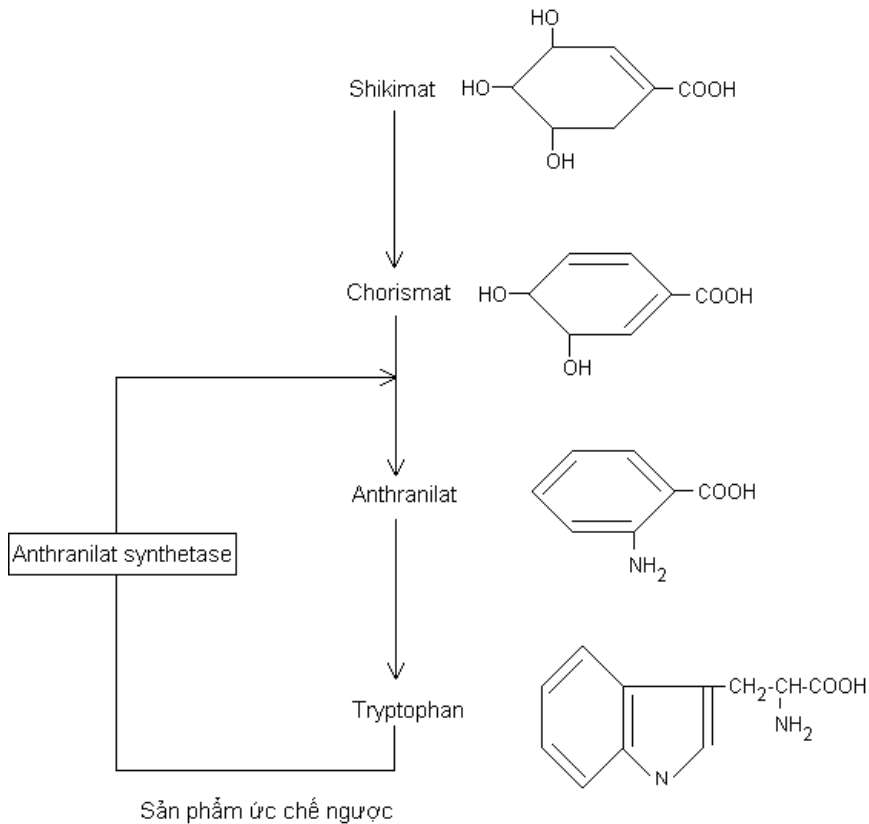
Theo phương pháp này, các dòng tế bào biến dị được sàng lọc từ nuôi cấy nhờ vào khả năng sống sót của chúng khi có mặt các độc tố/chất ức chế trong môi trường dinh

dưỡng, hoặc dưới các điều kiện stress của môi trường. Các biến dị có thể thu được bằng cách chọn lọc trực tiếp, gián tiếp. Sự phân lập được tiến hành trong nuôi cấy dịch huyền phù hoặc bằng cách dàn trải tế bào đơn/protoplast.

7.5.2.1. Kháng amino acid và các đồng đẳng của amino acid

Một số amino acid trong đó có valine và threonine ức chế sinh trưởng tế bào khi đưa chúng vào môi trường dùng đường nuôi cấy, vì chúng ức chế tế bào sử dụng NO_3^- hoặc ngăn cản amino acid cùng nguồn gốc. Ngoài ra, nếu bổ sung các chất đồng đẳng của amino acid vào môi trường nuôi cấy chúng có thể được sử dụng như amino acid vào việc tổng hợp ra các phân tử protein, kết quả các phân tử này bị mất hoạt tính. Hiện tượng ức chế này có thể khắc phục bằng cách cung cấp cho tế bào thêm các amino acid khác hoặc các hợp chất dẫn xuất bình thường khác của chúng.

Đối với tế bào, chúng có thể tự khắc phục bằng cách tăng cường tổng hợp các amino acid thích ứng. Và đây là nguyên nhân vì sao các dòng tế bào kháng được các chất đồng đẳng của amino acid lại sản xuất dư thừa amino acid. Cơ chế của hiện tượng sản xuất dư thừa là quá trình ức chế ngược (feed-back inhibition) kém mẫn cảm hơn. Trong dòng tế bào kháng 5-methyl-tryptophan cơ chế ức chế sản phẩm ngược này kém mẫn cảm vì vậy hoạt tính của anthranilat synthetase vẫn cao và lượng Tryp được tạo ra cao gấp năm lần so với bình thường. Ở các dòng kháng p-fluorophenyl alanine cơ chế ức chế sản phẩm ngược hoạt động của enzyme chorismat mutase kém mẫn cảm với phenylalanine và tyrosine. Vì vậy lượng phenyl được tạo ra rất cao.



Sơ đồ 7.1. Cơ chế ức chế ngược đối với tryptophan

Trong thực tế hiện tượng kiểm tra lỏng lẻo các quá trình sinh tổng hợp amino acid vẫn tồn tại không cần sự có mặt các chất đồng đẳng của amino acid. Các amino acid tự do này (Phe, Tyr, Met, Lys) sẽ được tích lũy lại hoặc chuyển hóa tiếp (ví dụ: thành các hợp chất phenol). Hiện tượng thải amino acid tự do ra môi trường chỉ gặp đối với proline (Pro).

Ngoài ra, khả năng kháng các chất đồng đẳng của amino acid còn có thể do những cơ chế khác gây ra, ví dụ như:

- Tế bào hạn chế thu nhận các chất đồng đẳng của amino acid. Hoạt động thu nhận các chất đó rất yếu.
- Tế bào có khả năng chọn các amino acid bình thường để tổng hợp protein trong khi các chất đồng đẳng của amino acid bị bỏ lại.
- Trường hợp kháng threonine thì tế bào có những thay đổi trong hệ thống enzyme sử dụng NO_3^- .

Nghiên cứu về tính kháng các đồng đẳng của amino acid có ý nghĩa thực tiễn rất lớn. Người ta hy vọng sẽ tạo được các giống cây có giá trị dinh dưỡng cao. Chẳng hạn: Widholm (1977) đã chọn được một dòng tế bào cà rốt có thể sản xuất 27 lần tryptophan tự do nhiều hơn bình thường và tổng 25% lượng Tryp tổng số (tự do + trong protein). Ở một dòng tế bào cà rốt khác cùng một lúc kháng được 4 chất đồng đẳng của amino acid, và hàm lượng các amino acid tương ứng là Lys, Phe, Met và Tryp tăng từ 6-34 lần. Tuy nhiên, biểu hiện sự sản xuất dư thừa này có còn giữ được sau khi tái sinh cây hay không đó là điều cho đến nay vẫn chưa được kết luận.

Vấn đề tái sinh cây từ dòng tế bào kháng 5-methyltryptophan là vấn đề sinh lý khá lý thú. Kháng 5-methyltryptophan sẽ sản xuất dư thừa tryptophan mà tryptophan lại là tiền chất của IAA nên tế bào sẽ sản xuất dư thừa IAA và như vậy tế bào sẽ sinh trưởng tự dưỡng auxin nghĩa là không cần auxin ngoại sinh đưa vào môi trường. Lượng IAA tăng cũng làm cho tế bào mất khả năng tạo phôi và tạo chồi. Chỉ có 10^{-6} tế bào có thể tạo cây, và có thể do một đột biến thứ hai xảy ra trong trao đổi chất Tryp hay IAA. Cho tới nay đã có một số kết quả như sau:

- 2 trường hợp cây tái sinh từ mô sẹo-*Nicotiana tabacum* kháng methionine sulfoximine và valine.

- 1 trường hợp chọn từ nuôi phôi-*Hordeum vulgare* và *Zea mays* kháng lysine + threonine, *Nicotiana tabacum* kháng 5-methyl tryptophan.

- 1 trường hợp chọn cả cây-*Triticum* kháng 5-methyl tryptophan.

Những dòng này có khả năng di truyền tính trạng này cho thế hệ sau qua sinh sản hữu tính.

Bảng 7.1. Các dòng tế bào kháng các amino acid và các đồng đẳng của nó chọn lọc được trong nuôi cấy *in vitro*

Tác nhân chọn lọc	Loài	Tác nhân đột biến	Tái sinh cây
S-(aminoethyl)-L-cysteine	<i>Arabidopsis thaliana</i>	EMS	Có
		Không	Không
	<i>Daucus carota</i>	Azide	Có

	<i>Hordeum vulgare</i>	EMS	Không
	<i>Nicotiana tabacum</i>	UV/EMS	Không
	<i>Nicotiana tabacum</i>	Không	Không
	<i>Nicotiana sylvestris</i>		
Aminopterin	<i>Oryza sativa</i>	EMS	Không
	<i>Datura innoxia</i> (1n)	Không	Có
Azaguanine	<i>Acer</i>	NTG	Không
	<i>pseudoplatanus</i>	EMS	Không
	<i>Glycine max</i>	EMS	Không
	<i>Haplopappus gracilis</i>	EMS	Không
	<i>Medicago sativa</i>		
Azauracil	<i>Haplopappus gracilis</i>	EMS	Không
	<i>Zea mays</i>	EMS	Không
Azetidine-2-carboxylic acid	<i>Daucus carota</i>	Không	Không
Bromodeoxy-uridine	<i>Glycine max</i>	NG	Không
	<i>Medicago sativa</i>	EMS	Không
	<i>Nicotiana tabacum</i>	Không	Có
Ethionine	<i>Daucus carota</i>	EMS	Không
	<i>Daucus carota</i>	Không	Không
	<i>Medicago sativa</i>	EMS	Không
p-Fluorophenyl alanine	<i>Acer pseudoplatanus</i>	Không	Không
	<i>Daucus carota</i>	Không	Có
	<i>Datura innoxia</i>	UV/EMS	Không
	<i>Nicotiana tabacum</i>	Không	Không
	<i>Nicotiana tabacum</i>	Không	Có
	<i>Nicotiana tabacum</i>		

6-Fluorotryptophan	<i>Petunia hybrida</i>	NG	Không
5-Fluorouracil	<i>Daucus carota</i>	Không	Có
Glycine hydroxamate	<i>Nicotiana tabacum</i>	Không	Có
Δ -Hydroxyproline	<i>Nicotiana tabacum</i>	EMS	Không
	<i>Nicotiana tabacum</i>	UV/EMS	Không
Hydroxyproline	<i>Daucus carota</i>	EMS	Không
	<i>Hordeum vulgare</i>	Azide	Có
Hydroxyurea	<i>Nicotiana tabacum</i>	Không	Có
Lysine plus threonine	<i>Zea mays</i>	Azide	Có
	<i>Zea mays</i>	Không	Có
Methionine sulfoximin	<i>Nicotiana tabacum</i>	Không	Có
Methyltryptophan	<i>Catharanthus roseus</i>	Không	Không
	<i>Daucus carota</i>	Không	Không
	<i>Nicotiana tabacum</i>	UV/EMS	Không
	<i>Nicotiana tabacum</i>	Không	Không
	<i>Nicotiana tabacum</i>	Không	Có
	<i>Nicotiana sylvestris</i>	Không	Không
Seleno-amino acids	<i>Nicotiana tabacum</i>	Không	Không
Thienylalanine	<i>Nicotiana sylvestris</i>	Không	Không
Threonine	<i>Nicotiana tabacum</i>	Không	Có
Valine	<i>Nicotiana tabacum</i> (1n)	UV	Có
	<i>Nicotiana tabacum</i> (1n)	NG hoặc chiếu xạ	Không

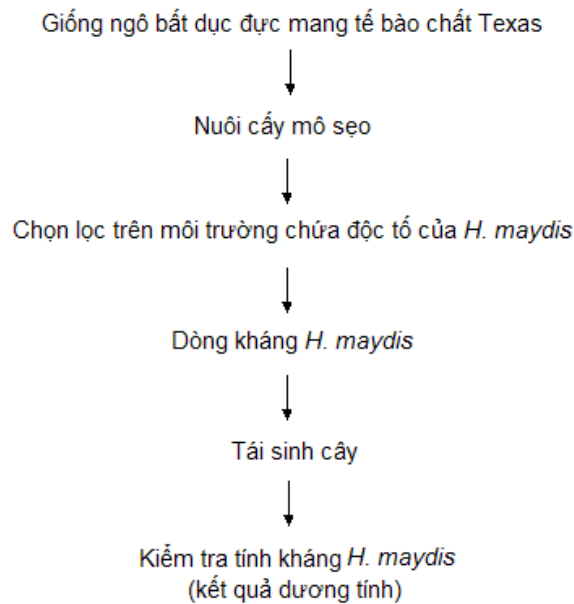
Chú thích

NG: N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine.

7.5.2.2. Kháng bệnh

Các tế bào đơn hoặc protoplast phân lập được nuôi cấy dưới tác dụng của các tác nhân gây đột biến vật lý hoặc hóa học để cảm ứng cho tính kháng phytoxin. Carlson (1973) tái sinh cây từ protoplast thuốc lá được xử lý ethylmethane sulphonate (EMS)-chọn lọc cho tính kháng methionine sulphoximide (MSO)-nhận thấy tính chống chịu tăng lên đối với *Pseudomonas tabacci*. Tính kháng được di truyền như một tính trạng đơn nửa trội (single semi-dominant trait).

Gegenbach và Green (1975-1977), chọn lọc tính kháng T-toxin của *Helminthosporium* (độc tố đặc trưng vật chủ) ở nuôi cấy *in vitro* ngô, đã thu được dòng ngô bất dục đực có khả năng kháng bệnh rỉ sắt do nấm *Helminthosporium maydis* gây ra bằng kỹ thuật chọn dòng tế bào nuôi cấy bằng phương thức sau:



Sơ đồ 7.2. Chọn dòng kháng *Helminthosporium maydis* ở ngô

Kháng độc tố của nấm bệnh rỉ sắt và tính bất dục đực di truyền đường mẹ do đột biến trong một gen gây nên, hoặc do trong tế bào chất có cả một quần thể genome của các cơ quan tử, chọn lọc tính chịu bệnh tức là chọn gen thích hợp trong quần thể đó. Tính kháng thường do mtDNA quyết định, và tính bất dục đực trong trường hợp này cũng do mtDNA quyết định.

Ở thuốc lá, người ta chọn lọc được đột biến kháng methionine sulfoximine, độc tố do *Pseudomonas tabacci* tiết ra (*P. tabaci* gây bệnh cháy rụi ở thuốc lá).

7.5.2.3. Kháng chất diệt cỏ

Sinh trưởng của cỏ dại trong quần thể các cây trồng quan trọng trong nông nghiệp thường được điều chỉnh bằng các chất diệt cỏ. Vì các chất diệt cỏ (herbicide) có thời gian sống dư ngắn (short residual life), nên chúng được ứng dụng lặp lại nhiều lần trên cây trồng. Một số cây trồng đã trở nên nhạy cảm với chất diệt cỏ do việc sử dụng lặp lại của nó trên cây. Hơn nữa, phương pháp điều chỉnh cỏ dại như thế này là không kinh tế vì các chất diệt cỏ hầu hết là đắt tiền. Phương pháp nuôi cấy *in vitro* cho phép thu được các cây biểu hiện tính chống chịu đối với các chất diệt cỏ. Nuôi cấy protoplast trên môi trường có các chất diệt cỏ khác nhau đã cảm ứng đột biến tạo các dòng tế bào chống chịu sau đó có thể tái sinh thành cây. Các cây kháng các chất diệt cỏ tái sinh từ tế bào nuôi cấy bao gồm *Nicotiana tabacum* (kháng amitrole, bentazone, chlorosulphon, isopropyl N-carbamate, phenmedifarm, picloram và paraquat), *Corydallis* (kháng glyphosphate), và *Medicago sativa* (kháng glufosinate). Một số tính trạng chống chịu được di truyền như là các đơn allele (monogenic alleles) trội hoặc lặn (Bảng 7.2). Khả năng chống chịu chất diệt cỏ cũng có thể được biến nạp vào tế bào bằng cách lai soma (xem chương 5) hoặc thông qua công nghệ chuyển gen (xem chương 6).

Bảng 7.2. Các dòng tế bào đột biến mang tính trạng hữu ích trong nông nghiệp thu được từ nuôi cấy *in vitro*.

Tác nhân chọn lọc	Loài	Tác nhân đột biến	Tái sinh cây
1. Chịu lạnh	<i>Daucus carota</i>	EMS	Có ^(e)
	<i>Nicotiana sylvestris</i>	Không	Có
2. Kháng các chất diệt cỏ	<i>Apium graveolens</i>	Asulam	Không
		Bentazone	<i>Nicotiana tabacum</i> Tia γ

	(1n)		
2,4-D	<i>Lotus corniculatus</i>	Không	Có
2,4-D; 2,4,5-T; 2,4-DB	<i>Trifolium repens</i>	Không	Không
Isopropyl-N-phenyl-carbamate	<i>Nicotiana tabacum</i>	EMS	Có ^(c, d)
Paraquat	<i>Nicotiana tabacum</i>	Tia X	Có ^(c)
Phenmedifarm	<i>Nicotiana tabacum</i> (1n)	Tia γ	Có ^(c)
Picloram	<i>Nicotiana tabacum</i>	Không	Có ^(c)
3. Kháng các pathotoxins			
Fusarium oxysporum	<i>Solanum tuberosum</i>	Không	Có
<i>Helminthosporium maydis</i>	<i>Zea mays</i> T-cms	Không	Có ^(c)
Phytophthora infestans	<i>Solanum tuberosum</i>	Không	Có ^(c)
4. Chống chịu muối			
	<i>Capsicum annum</i>	Không	Không
	<i>Datura innoxia</i>	Không	Có
	<i>Kickxia ramosissima</i>	Không	Có
	<i>Medicago sativa</i>	Không	Không
	<i>Oryza sativa</i>	Không	Không
	<i>Nicotiana sylvestris</i>	Không	Không
	<i>Nicotiana sylvestris</i>	EMS	Có
	<i>Nicotiana tabacum</i>	Không	Có ^(c)
	<i>Nicotiana tabacum</i>		

Chú thích

^(c) Cây kháng.

^(d) Cây bất thụ.

^(e) Không biểu hiện trong cây.

7.5.2.4. *Chống chịu các stress của môi trường*

Stress của môi trường do nồng độ muối cao ở trong đất là nhân tố chính kìm hãm phát triển nông nghiệp. Từ kết quả đầu tiên là tái sinh cây thuốc lá *in vitro* chống chịu NaCl (Nabors 1980), đến nay người ta đã phát triển một số lượng lớn các dòng tế bào và cây trồng có thể chống chịu nồng độ muối cao (Nguyễn Hoàng Lộc 1992). Dix (1977) đã phát triển các dòng chống chịu lạnh bằng cách nuôi cấy tế bào của *Nicotiana sylvestris* ở điều kiện nhiệt độ thấp. Tuy nhiên, phenotype của các cây tái sinh từ những dòng này không được chuyển sang thể hệ sau bằng phương thức hữu tính. Lê Trần Bình (1992) cũng đã thu được các dòng lúa chịu nhiệt độ thấp thông qua nuôi cấy mô callus. Các kết quả tương tự theo hướng biến dị dòng soma mang tính trạng chống chịu stress nước được cảm ứng bằng PEG hoặc mannitol (mannitol or PEG-induced water stress) trong nuôi cấy mô callus thuốc lá, mía và lúa cũng đã được thông báo (Nguyễn Hoàng Lộc 1992, 2003; Razdan 1994; Trương Thị Bích Phượng 2004).

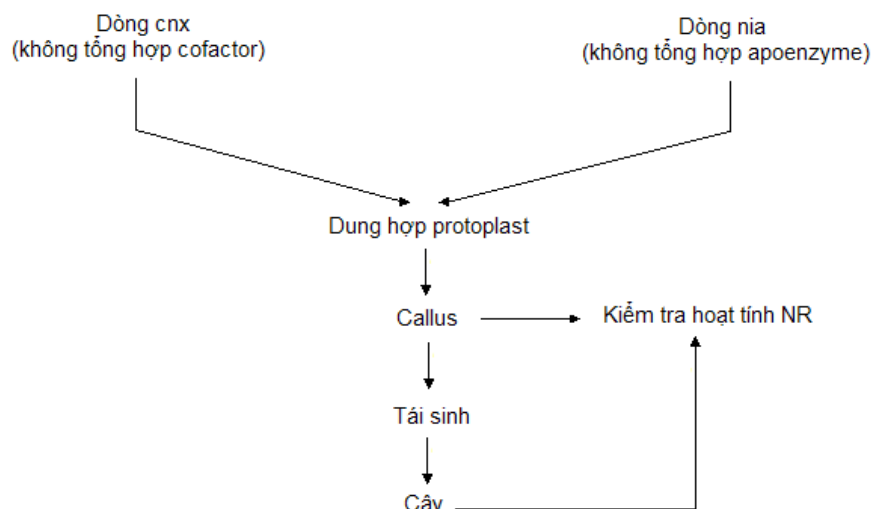
7.5.2.5. *Các dòng khuyết dưỡng*

Các dạng khuyết dưỡng được sử dụng cho biến nạp DNA, lai soma và nghiên cứu các quá trình trao đổi chất. Sử dụng nuôi cấy tế bào đơn bội và xử lý đột biến gen tiện lợi cho phát triển một số lớn các loại khuyết dưỡng. Các dòng tế bào khuyết dưỡng đầu tiên được Carlson (1970) thông báo là cây thuốc lá đơn-nhị bội (dihaploid) sinh trưởng chậm trên môi trường tối thiểu và đòi hỏi sự trao đổi chất đặc biệt để hồi phục lại sự sinh trưởng bình thường. Các dòng khuyết dưỡng phân lập được trong nuôi cấy *in vitro* các loài thực vật khác nhau bao gồm các yêu cầu: (a) pathotenate, adenin và isoleucine + valine ở *Datura innoxia*; (b) histidine, tryptophan và nicotinic acid ở *Hyoscyamus muticus*; và (c) isoleucine, leucine, và uracil ở *Nicotiana plumbaginifolia*. Các dòng *Datura* được phân lập trong nuôi cấy dịch huyền phù tế bào. Thông qua dung hợp bổ sung (fusion-complementation), các dòng khuyết dưỡng của *N. plumbaginifolia* và *H. muticus* được xác định là ở trạng thái lặn.

Chlorate (ClO_3^-)-một dạng tương tự nitrate-được biến đổi nhờ enzyme nitrate reductase trở thành chlorite (ClO_2^-), một loại độc tố của tế bào. Vì vậy, ở môi trường được bổ sung chlorate các tế bào dạng hoang dại có hoạt tính của enzyme nitrate reductase sẽ bị chết, trong khi các tế bào không có enzyme này sẽ sống sót. Các thể hồi biến (revertants) của dạng hoang dại có thể được kiểm tra bằng khả năng sử dụng NO_3^- trong môi trường nuôi cấy của các tế bào này. Các dòng thiếu nitrate reductase được

phân lập từ các tế bào nuôi cấy của *N. tabacum*, *N. plumbaginifolia*, *H. muticus*, *D. innoxia*, *Rosa damascena* và *Petunia*.

Người ta có thể sử dụng các loại dòng tế bào và các đặc tính của chúng như những đặc điểm chỉ thị trong nghiên cứu điều khiển di truyền và kỹ thuật gen. Hai loại dòng tế bào như thế đã được xác định: một loại là đột biến (nia) không tổng hợp apoenzyme, trong khi loại kia (cnx) không tổng hợp cofactor. Các phenotype này được sử dụng như là các marker bổ sung trong việc chọn lọc các thể lai soma.



Sơ đồ 7.3. Dòng cnx và nia về gen NR trong thuốc lá.

Bảng 7.3. Các đột biến khuyết dưỡng chọn lọc được trong nuôi cấy *in vitro*.

Nhu cầu dinh dưỡng/ kiểu hình	Loài	Tác nhân đột biến	Tái sinh cây
Adenine	<i>Datura innoxia</i> (1n)	EMS	Không
p-aminobenzoic acid	<i>Nicotiana tabacum</i> (1n)	EMS	Có
Arginine	<i>Nicotiana tabacum</i> (1n)	EMS	Có

Biotin	<i>Nicotiana tabacum</i> (1n)	EMS	Có
Histidine	<i>Hyoscyamus muticus</i> (1n)	NTG	Có
Hypoxanthine	<i>Nicotiana tabacum</i> (1n)	EMS	Có

7.5.2.6. Kháng kháng sinh (antibiotic resistance)

Maliga (1973) chọn lọc thành công dòng tế bào thuốc lá kháng streptomycin di truyền đường mẹ. Streptomycin ức chế sinh tổng hợp protein ở lục lạp, ty thể nhưng không ảnh hưởng đến sinh tổng hợp protein trong ribosome tế bào chất. Dòng tế bào kháng streptomycin có màu xanh được chọn bằng cách tách những cụm tế bào xanh trên môi trường chứa streptomycin. Dòng tế bào có màu trắng được chọn thông qua khả năng sinh trưởng trên môi trường chứa streptomycin. Khả năng kháng này có thể do cả lục lạp và ty thể nhưng cũng có thể chỉ do một cơ quan tử quyết định. Ngoài ra, người ta còn phát hiện được tính kháng tổ hợp nghĩa là chọn lọc tính kháng một loại kháng sinh này nhưng cũng kháng được một số kháng sinh khác. Ví dụ: dòng *N. sylvertris* kháng kanamycin vẫn có thể kháng được streptomycin và neomycin.

7.5.2.7. Kháng các đồng đẳng base của DNA

Trong nuôi cấy mô tế bào động vật người ta dùng: 5-bromodeoxy uridin (BUdR) và 8-azaguanidin (AG) để chọn những dòng tế bào đột biến thiếu thymidinkinase (TK) và hypoxanthin guanidin phosphoribosyl transferase (HGPRT). Cơ chế chọn lọc đó như sau:

- Các tế bào có TK và HGPRT bình thường sẽ sử dụng BUdR và AG như các nucleotide cho sinh tổng hợp DNA. DNA mang BUdR và AG sẽ không bình thường và tế bào sẽ chết.

- Những tế bào thiếu TK và HGPRT không sử dụng BUdR và AG chúng sẽ sống được.

Các nhà nuôi cấy mô thực vật cũng sử dụng mô hình này đối với tế bào thực vật và bước đầu thu được một số kết quả. Ví dụ: chọn được dòng tế bào thuốc lá có hoạt tính HGPRT giảm 50%, song các dòng kháng BUdR vẫn có hoạt tính enzyme lại phụ thuộc TK khá lớn. Điều đó được giải thích như sau: trong tế bào thực vật có hai loại TK, như vậy phải chọn được hai tế bào đột biến đồng thời mới mất hoàn toàn hoạt tính TK. Mặt

khác dòng tế bào đậu tương kháng BUdR của Okyana (1976) lại do tế bào có khả năng sản xuất dư thừa thymidin. Cũng thể có tế bào có cơ chế sửa chữa DNA tốt cho phép chúng sửa được những sai lệch do BUdR hay AG gây ra và như vậy chúng có khả năng kháng BUdR và AG.

7.6. Nuôi cấy tế bào trong sản xuất các hợp chất tự nhiên

7.6.1. Phương hướng chiến lược trong sản xuất các sản phẩm thứ cấp bằng nuôi cấy tế bào

Mặc dù trong nhiều trường hợp các hợp chất có giá trị chữa bệnh hoàn toàn thu được hoặc được sản xuất nhưng với hàm lượng rất nhỏ thì người ta vẫn có thể tổng kết chung được rằng: *Mỗi tế bào đều có khả năng biểu hiện tính toàn thể hóa học cũng như hình thái học.*

Một vài ví dụ chứng minh cho chiến lược chung mà chúng ta cần phải tuân theo để có thể có được các dòng tế bào có năng suất cao. Đầu tiên là cấy gây nuôi cấy tế bào của loài thực vật sản sinh ra hợp chất chúng ta cần có (nên chọn loài có năng suất cao) và sau đó tiến hành chọn tính ổn định của những dòng tế bào khác nhau từ những cơ thể khác nhau để tìm ra dòng có năng suất cao. Theo phương thức này những dòng tế bào có năng suất alkaloid cao được chọn từ nuôi cấy mô của *Catharanthus* hoặc những dòng tế bào với hoạt tính hydroxyd hóa cao được chọn từ nuôi cấy của cây *Digitalis*. Tuy nhiên, những dòng tế bào *Digitalis* này cho đến thời điểm hiện tại vẫn không sản sinh ra cardiac glycoside. Kỹ thuật chọn dòng này cũng đã được ứng dụng để chọn ra dòng tế bào sản xuất ra nhiều nicotin từ một dòng tế bào của *Nicotiana rustica* đã mất hoàn toàn khả năng tổng hợp alkaloid.

Phương pháp chọn dòng này đã được cải tiến bằng cách kết hợp với những phương pháp phân tích có độ nhạy và tính đặc thù cao hơn, ví dụ miễn dịch phóng xạ. Mặc dù đó không phải là tiền đề cần thiết trong mỗi trường hợp. Đương nhiên, con đường tối ưu nhất vẫn là tìm ra được những phương pháp cho phép xác định những sản phẩm thứ cấp ở ngay trong tế bào sống, chẳng hạn thông qua các chất huỳnh quang UV hay chất có màu sắc nhận thấy được. Thế nhưng trong thực tế rất khó tìm ra chất màu có khả năng thâm nhập vào không bào là nơi các sản phẩm thứ cấp được tích trữ để vẫn tạo ra phản ứng màu mà không làm chết tế bào.

Sự phân lập các dòng tế bào chịu p-fluorphenylalanine, trong đó có một dòng có hoạt tính enzyme tăng lên và hàm lượng cao các hợp chất fenol tan trong etanol cho thấy một triển vọng khác trong việc chọn dòng tế bào. Đó là cách sử dụng các chất đặc biệt

gây áp lực chọn lọc để phân lập những tế bào sản xuất dư thừa các sản phẩm thứ cấp thực vật điều đó có thể kiểm nghiệm với những nuôi cấy tế bào tạo alkaloid có nguồn gốc là các acid amin. Tuy nhiên, người ta cần thấy rằng việc sản xuất các amino acid đặc thù này không phải là yếu tố hạn chế duy nhất đối với quá trình sinh tổng hợp các sản phẩm thứ cấp trong tế bào mà ở đây còn có nhiều yếu tố khác cần đề cập tới.

Một bước tiếp theo là phải cải tiến qui trình nuôi cấy bằng cách thay đổi hợp lý môi trường, cũng như nhiều tài liệu đã thông báo người ta thay đổi hàm lượng hormone, đường, vitamin, nhiệt độ... Hàng loạt những biến đổi môi trường, điều kiện nuôi cấy hoặc thay đổi cả dòng tế bào cũng mới chỉ được kiểm nghiệm trong hệ thống kiểm định như phương pháp giọt nhỏ kết hợp với phương pháp miễn dịch phóng xạ. Nghiên cứu thay đổi môi trường nuôi cấy được cải tiến thêm một bước khi kỹ thuật nuôi chemostat (thể ổn định hóa tính) được ứng dụng.

7.6.2. Nuôi cấy tế bào năng suất cao

Nuôi cấy tế bào của nhiều cây dược liệu đã được tiến hành nhưng trong nhiều trường hợp người ta không tìm thấy hoặc thấy với lượng rất nhỏ (dạng vết) các hợp chất muốn có. Tuy nhiên, tới nay thực tế đã cho thấy có những thí nghiệm nuôi cấy tế bào thực vật có khả năng sản xuất các sản phẩm thứ cấp thực vật với hàm lượng lớn hơn cả hàm lượng của các chất đó ở chính những bộ phận thực vật có nhiệm vụ tích trữ các hợp chất đặc biệt này.

Nuôi cấy đầu tiên được phân lập có chứa hàm lượng cao các sản phẩm thứ cấp đó là các nuôi cấy sản xuất ra các hợp chất sắc tố như anthocyanin trong tế bào *Haplopappus*, betalain trong callus của củ cải đường hoặc anthraquinon trong tế bào của *Lithospermum erythrorhizon*, *Morinda citrifolia* và các loài *Galium*. Trong trường hợp của cây *Morinda* và *Galium*, người ta đã nâng được hàm lượng anthraquinon trong nuôi cấy tế bào lên 20 lần so với rễ là cơ quan tích trữ các hợp chất này của các cây nói trên. Kể cả khi người ta so sánh hàm lượng các chất trong tế bào và là tế bào chuyên sản sinh ra các chất đó thì hàm lượng ở tế bào nuôi cấy vẫn lớn hơn từ 2-4 lần.

Hàm lượng tương đối cao của ubiquinon-10 được tìm thấy trong tế bào thuốc lá và L-dopa trong môi trường nuôi cấy tế bào *Mucuna pruriens*. Nhiều công trình cho thấy nuôi cấy callus và tế bào của cây *Catharanthus roseus* có hàm lượng serpentin ngang với cây dược liệu bình thường. Người ta đã phân lập được các dòng tế bào *Catharanthus* sản xuất serpentin ajmalicin từ nuôi cấy *in vitro*. Bằng loại môi trường sản xuất đặc biệt họ đã đưa được sản lượng alkaloid của hai dòng tốt nhất lên một mức cao hơn nữa, trong đó một dòng tạo được 162 mg/L serpentin, còn dòng kia tạo được 72 mg/L serpentin cùng

với 264 mg/L ajmalicin. Cũng rất đáng chú ý là nuôi cấy tế bào cây *Panax pseudoginseng* cho hàm lượng saponin khá cao và nuôi cấy tế bào của cây *Glycyrrhiza glabra* đạt được hàm lượng glycyrrhizin từ 3-4% trọng lượng khô. Hàm lượng chất thứ cấp cao nhất được xác định trong nuôi cấy tế bào của cây *Coleus blumei*, đó là 13-15% trọng lượng khô chất rosmarinic acid trong chu kỳ nuôi 13 ngày. Nồng độ rosmarinic acid trong tế bào nuôi cấy lớn hơn năm lần so với trong cây.

Trên lĩnh vực steroid và chuyển hóa steroid các dòng tế bào có năng suất cao đã được nghiên cứu. Một số công trình đã nuôi cấy thành công tế bào của cây *Dioscorea deltoidea* với sản lượng diogenin là nguyên liệu thô chính để sản xuất các steroid chống thụ thai và các hormone thượng thận. Quá trình chuyển hóa các steroid được khá nhiều phòng thí nghiệm nghiên cứu. Chẳng hạn, nghiên cứu quá trình sinh chuyển hóa các hợp chất glycoside cardiac bằng nuôi cấy tế bào của *Digitalis lanata* mặc dù tế bào *Digitalis lanata* ngừng sản xuất glycoside cardiac nhưng chúng vẫn có khả năng hydroxyd hóa digitoxin ở nguyên tử C¹² để tạo ra digoxin. Digoxin là một hợp chất có ý nghĩa y học lớn hơn digitoxin. Quá trình hydroxyd hóa xảy ra trong nuôi cấy tế bào rất nhanh và rất hiệu quả khi đưa vào môi trường nuôi cấy chất β -methyl-digitoxin. Sau 12 ngày người ta thu được 4 g β -methyl-digoxin trong một bình nuôi dung tích 20 lít.

Ngoài ra, người ta còn có thể thu được các chất như caffein từ nuôi cấy tế bào cây *Coffea arabica*, berberin từ tế bào cây *Coptis japonica* (loài cây này phải trồng từ 4-6 năm mới thu được hàm lượng đáng kể berberin trong rễ, song hàm lượng này có thể thu được sau 4 tuần bằng phương pháp nuôi cấy tế bào)... Những chất này được sử dụng rộng rãi trong công nghệ hương liệu và trong y học. Chất reserpin là chất có tác dụng chữa bệnh cao huyết áp và các bệnh rối loạn tuần hoàn khác cũng được sản xuất bằng phương pháp nuôi cấy tế bào cây *Rauwolfia serpentina*. Nuôi cấy tế bào cây này trong 30 ngày có thể sản xuất được 3500 kg reserpin, tương đương với lượng hàng năm của cả thế giới thu được từ rễ cây đó. Chất naptathoquinones chiết từ rễ cây cỏ rết máu (puccoon) được dùng để chữa bong và bệnh ngoài da. Chất này cũng được sản xuất bằng phương pháp nuôi cấy mô, sản lượng chất này được tạo ra từ mô nuôi cấy cao hơn tám lần so với cây tự nhiên. Các nhà nghiên cứu thuộc tổ hợp dược phẩm Gibageigy (Based, Thụy Sĩ) đã sản xuất được loại alkaloid scopolanin từ tế bào cây *Hyoscyamus aegypticus* nuôi cấy trong hệ lên men không có cánh khuấy. Bằng cách chọn lọc các dòng tế bào cao sản nhờ kỹ thuật đột biến tế bào trần, biến dị đơn dòng và kỹ thuật gen, người ta đã làm tăng sản lượng scopolamin gấp ngàn lần.

Tóm lại, nuôi cấy mô và tế bào thực vật có khả năng sản xuất các hợp chất thứ cấp với năng suất cao và trong một vài trường hợp cao hơn hẳn so với những cây hoàn chỉnh có năng suất cao nhất.

Bảng 7.4. Sự tích lũy các chất trao đổi thứ cấp trong nuôi cấy mô và tế bào

Các chất trao đổi thứ cấp	Loại nuôi cấy	Nguồn thực vật
- Anthocyanins		
Cyanidin	C	<i>Dimorphothica auriculata</i>
	C	<i>Haplopappus gracilis</i>
Delphinidin	C	<i>D. auriculata</i>
- Anthraquinones		
Alizartin	C	<i>Morinda citrifolia</i>
Digitolutein	C	<i>Digitalis lanata</i>
4-hydroxydigitolutein	C	<i>D. lanata</i>
3-methyl purpurin	C	<i>D. lanata</i>
Rhein	C	<i>Cassia angustifolia</i>
- Carotenoids		
Antheraxanthin	C	<i>Ruta graveolens</i>
Beta-carotene		
Lutein		
Lutein-5, 6 epoxide		
Neoxanthin		
Voilaxanthin		
Zeaxanthin		
- Chalcones and Deoxyflavones		
Daidzein	C, SC	<i>Phaseolus aureus</i>

	C, SC	<i>Glycine max</i>
2',4,4'-trihydroxy chalcone	C	<i>P. aureus</i>
- Coumestanes và Coumarino chromans		
Coumestrol	C, SC	<i>P. aureus</i>
Pisatin	C	<i>Pisum sativum</i>
Soyagol	C, SC	<i>P. aureus</i>
- Flavones và Flavanoids		
Apigenin	SC	<i>G. max</i>
	C	<i>Solanum dulcamara</i>
	C	<i>Trigonella corniculata</i>
Artemissinine	C	<i>Artemisia scoparia</i>
Chrysoerion	SC	<i>Petroselinum hortense</i>
Isorhamnetin	SC	<i>Argemone mexicana</i>
	SC	<i>P. hortens</i>
Keempferol	C	<i>Agave wightii</i>
	C	<i>Allium sativum</i>
	C	<i>A. scoparia</i>
	C	<i>Dolichos lablab</i>
	C	<i>G. max</i>
	C	<i>P. sativum</i>
	C	<i>Lycopersicon esculentum</i>
Luteolin	C	<i>Datura pinnata</i>
	SC	<i>Papaver hortense</i>
Negretin	SC	<i>Solanum tuberosum</i>

Nobeletin	C	<i>Citrus aurantium</i>
Quercetin	C	<i>A. wightii</i>
	SC	<i>Crotalaria juncea</i>
	C	<i>Datura metel</i>
	C	<i>D. taluta</i>
	C	<i>L. esculentum</i>
	C	<i>P. hortense</i>
	C	<i>S. aviculare</i>
Sinensetin	C	<i>C. aurantium</i>
- Naphthoquinones		
Plumbagin	C	<i>Plumbago zeylanica</i>
- Sapogenins		
Chlorogenin	C	<i>Yucca aloifolia</i>
Hecogenin		
Sarsasapogenin		
Smilagenin		
Tiggenin		
Diosgenin	C	<i>S. aviculare</i>
	C	<i>S. dulcamara</i>
	C	<i>S. nigrum</i>
	C	<i>S. xanthocarpum</i>
Gitogenin	C	<i>A. wightii</i>
Hecogenin	C	<i>A. wightii</i>
Tiggenin	SC	<i>S. nigrum</i>
- Sesquiterpenes		
Cryophyllenebisabolene	SC	<i>Andrographis paniculata</i>
	C	<i>Lindra strychnifolia</i>
Lindenenol	C	<i>L. strychnifolia</i>

Linderane		<i>L. strychnifolia</i>
- Steroidal alkaloids		
Solasonine	C	<i>S. xanthocarpu</i>
Tomatin	C	<i>L. esculentumm</i>
- Sterols và Triterpenes		
Beta-amyrin	C	Paul's Scarlet Rose
	C	<i>Tylophora indica</i>
Beta-sitosterol	C	<i>Nicotiana tabacum</i>
Campesterol	C	<i>Withania sommifera</i>
	C	<i>D. metel</i>
	C	<i>Helianthus annuus</i>
	C	Paul's Scarlet Rose
	C	<i>Trigonella indica</i>
	C	<i>T. foenum-graceum</i>
Cholesterol	C, SC	<i>H. annuus</i>
	C, SC	<i>S. indicum</i>
Cycloartinol	C, SC	<i>N. tabacum</i>
Isofucosterol	C, SC	<i>H. annuus</i>
Lanosterol	C	<i>S. nigrum</i>
Obtusifoliol	C, SC	<i>N. tabacum</i>
Stigma sterol	C	<i>Dioscorea tokora</i>
- Tannins		
Catechin	C	<i>Camellia sinensis</i>
	SC	Paul's Scarlet Rose
Epicatechin	C	<i>C. sinensis</i>

Chữ viết tắt

C: callus, SC: nuôi cấy dịch huyền phù (suspension culture)

7.6.3. Sản xuất bằng nuôi cấy tế bào ở những nước công nghiệp

Kỹ thuật tiên bộ về nuôi cấy tế bào đang được triển khai ngày càng rõ ràng ở các nước công nghiệp tiên tiến. Sản phẩm công nghiệp đầu tiên từ nuôi cấy tế bào là shikonin được tập đoàn công nghiệp hóa dầu Mitsui (Nhật) sản xuất. Shikonin cũng là một vị thuốc dân tộc Nhật Bản dùng làm thuốc chống viêm. Năm 1983, Mitsui thông báo về quá trình phát triển kỹ nghệ sản xuất công nghiệp chất shikonin bằng nuôi cấy tế bào trong thùng lên men loại nhỏ 750 lít. Thành công bước đầu là chọn được một dòng tế bào tích lũy shikonin gấp mười lần nhiều hơn so với nguồn nguyên liệu tự nhiên ở cây *Lithospermum erythrozihizon* (koshikon) và xây dựng phương pháp hai giai đoạn để sản xuất shikonin từ nuôi cấy tế bào.

Tuy nhiên, có năm vấn đề quan trọng hạn chế kỹ thuật nuôi cấy tế bào cho mục tiêu thương phẩm đối với một số chất có giá trị cao:

- Chọn được dòng thực sự có năng suất cao.
- Điều khiển được tế bào tạo ra chất quan tâm. Gen mã hóa các sản phẩm hóa học đó thường chỉ hoạt động ở những điều kiện rất đặc biệt.
- Nhiễm khuẩn và nhiễm nấm vì tế bào thực vật sinh trưởng chậm, xử lý kháng sinh cũng gây ra hậu quả cho sinh trưởng và tạo hoạt chất.
- Sản phẩm không tập trung vì tế bào thực vật không tổng hợp chuyên một sản phẩm thứ cấp mà thường là kèm một số chất khác nữa.
- Nuôi cấy tế bào thay đổi vì những biến động trong tương tác các gen khác nhau và dòng năng suất kém có thể lấn át toàn bộ nuôi cấy.

Mặc dù vậy, những đột phá trong kỹ thuật nuôi cấy tế bào (ví dụ nuôi cấy rễ tơ) cho thấy trong tương lai gần bất cứ hóa chất công nghiệp nào có nguồn gốc thực vật cho dù đó là dược liệu, thuốc nhuộm hay chất màu thực vật đều có thể sản xuất trong các nồi phản ứng sinh học.

7.6.4. Nuôi cấy rễ tơ (hair roots) và sinh tổng hợp

Những vấn đề tồn tại trong nuôi cấy tế bào công nghiệp có thể được giải quyết thông qua kỹ thuật nuôi cấy rễ tơ, cơ sở khoa học của giải pháp này là việc nhiễm callus với giống vi khuẩn đất *Agrobacterium rhizogenes* khiến cho tế bào callus đồng nhất phân hóa thành rễ. Vi khuẩn này chuyển DNA của nó vào trong bộ gen của tế bào thực vật và khiến cho những gen tạo chất điều khiển sinh trưởng của rễ hoạt động. Hệ thống rễ đa bội bào là nơi lý tưởng để sản sinh ra hóa chất thực vật và chúng rất ổn định về di truyền, sinh trưởng nhanh (từ một đầu rễ nuôi cấy rễ lông có thể tăng trọng lượng từ 2500 - 5000

lần trong 3 tuần) mang lại cho nuôi cấy tế bào khá nhiều ưu điểm trong đó đáng kể là khả năng tránh nhiễm khuẩn.

Các công ty Nhật Bản đã sử dụng kỹ thuật này để mở rộng nuôi cấy rễ nhân sâm, loại nuôi cấy này tỏ ra dễ điều khiển hơn.

Công ty Escagenetics (California, Mỹ) cũng đã thông báo thành công trong việc sản xuất taxol bằng nuôi cấy rễ lông. Taxol là chất tách chiết từ vỏ và lá kim của cây thủy tùng (*Taxus brerifolia*) đang được dùng thử có kết quả trong điều trị nhiều loại ung thư. Việc cung cấp taxol gặp khó khăn vì bản thân cây thủy tùng khan hiếm và hàm lượng taxol trong chúng rất thấp. Escagenetics đã có thể sản xuất taxol với nồng độ cao hơn nồng độ tự nhiên thấy trong vỏ và lá cây thủy tùng.

Hiện nay, hãng Phyton Catalytic (New York, Mỹ) đã mua bản quyền sản xuất taxol hoặc chất đồng đẳng của taxol ở qui mô pilot. Giá bán taxol hiện nay được xác định là 200.000 - 300.000 USD/kg. Theo Escagenetics việc sản xuất vanillin bằng nuôi cấy tế bào công nghiệp đã là bộ phận tốt để họ đi tới nuôi cấy tế bào taxol. Thông qua mối quan tâm về sản xuất taxol hiểu biết về quá trình sinh tổng hợp được chất được mở rộng. Tới nay mới có 10 trong số các dược chất có nguồn gốc thực vật đang được sử dụng rộng rãi (khoảng 300.000 loài) được tổng hợp nhân tạo trong phòng thí nghiệm, số còn lại đều được chiết trực tiếp từ cây cỏ. Thế nhưng mới đây Văn phòng thương mại và bản quyền Mỹ đã cấp quyền tác giả cho ĐH Quốc gia Florida về qui trình công nghệ bán tổng hợp thuốc chống ung thư. Công nghệ này kết hợp một chất gọi là baccatin III và một chuỗi tổng hợp để thu được một chất có cấu trúc giống chất taxol tự nhiên. Baccatin III được tách chiết từ thủy tùng nước Anh, họ hàng với thủy tùng Địa Trung Hải. Công ty dược Bristol-Myers Squibb, nơi cung cấp taxol tự nhiên chính vừa ký hợp đồng bản quyền với ĐH Quốc gia Florida để đưa công nghệ sản xuất taxol vào sản xuất.

Srinivasan và cs. (1997) đã nuôi cấy dịch huyền phù tế bào của 2 loài thủy tùng là *Taxus chinensis* và *T. baccata* trong hệ thống nuôi cấy mô hình (model system) nhằm chứng minh khả năng tương tự trong tích lũy sinh khối (biomass) và sản xuất các chất trao đổi thứ cấp (taxane) thu từ nuôi cấy trong các đĩa polystyrene 6 ngăn (six-well polystyrene plates) và các bình thủy tinh (loại 25 ml và 125 ml, lắc 120 vòng/phút).

Merkli và cs. (1997) đã nuôi cấy rễ tơ của cây *Trigonella foenum-graecum* với sự gây nhiễm chủng A4 của *Agrobacterium rhizogenes*. Các rễ tơ này đã sản xuất diosgenin, một spirostanol quan trọng cho sự bán tổng hợp (semi-synthesis) của các hormone steroid. Hàm lượng diosgenin thu được cao nhất là 0,040% trọng lượng khô (trên môi trường nuôi cấy thích hợp nhất-McCown's woody plant medium có 1% sucrose) gần gấp 2 lần so với các rễ không biến nạp chủng A4 8 tháng tuổi (0,024%). Các tác giả này cũng

đã nghiên cứu ảnh hưởng của cholesterol, pH môi trường và chitosan đến khả năng sản xuất diosgenin. Bổ sung 40 mg/l chitosan vào môi trường nuôi cấy sẽ nâng hàm lượng diosgenin lên gấp 3 lần so với đối chứng.

Sevón và cs. (1997) đã tái sinh cây từ protoplast của rễ cây *Hyoscyamus muticus* được gây nhiễm *Agrobacterium rhizogenes* và sau đó phân tích hóa học trên 34 cây riêng rẽ đã trưởng thành. Kết quả nghiên cứu cho thấy các cây này có sản xuất hyoscyamine, scopolamine, và nhiều loại calystegin, và điều đáng kể là đã tìm thấy các biến dị dòng soma trong các cây này. Tuy nhiên, sự có mặt của các gen *rol* (A, B và C) của *A. rhizogenes* gây bất lợi cho việc tích lũy các alkaloid trong các cây chuyển gen ngược lại với ưu điểm của nuôi cấy rễ tơ.

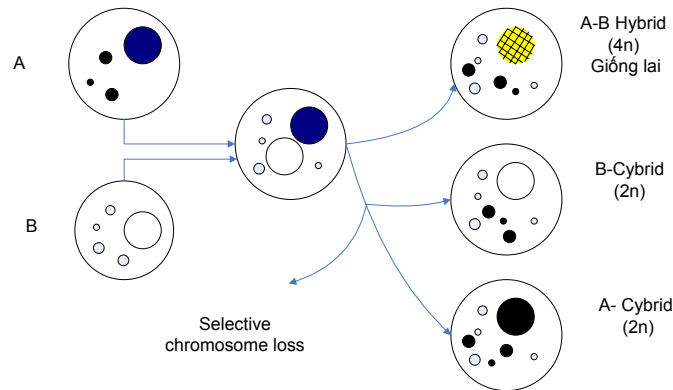
Sikuli và cs. (1997), đã nghiên cứu ảnh hưởng của tuổi mô nuôi cấy đến sự tích lũy sinh khối và sản lượng alkaloid của rễ tơ thu được sau khi gây nhiễm cây *Datura stramonium* với chủng *Agrobacterium* ATCC 15834. Hàm lượng hyoscimine ở rễ đạt cực đại sau 6 tuần nuôi cấy khoảng 100mg/l. Bên cạnh đó, các tác giả này còn nghiên cứu ảnh hưởng của sự cân bằng ion (NO_3^- , SO_4^{2-} , H_2PO_4^- , K^+ , Ca^{2+} và Mg^{2+}) đến sản lượng sinh khối và sự tích lũy hyoscyamine. Nồng độ NO_3^- và K^+ cao cho sinh khối cao nhất, còn sản lượng hyoscyamine cao nhất khi SO_4^{2-} và K^+ cao.

7.7. Ứng dụng của biến dị dòng soma và dòng giao tử trong công tác giống cây trồng

Các đột biến đơn gen trong hệ gen của nhân hoặc cơ quan tử có thể tạo ra một thứ *in vitro* (*in vitro* variety) thích hợp nhất có các đặc tính đặc trưng được cải thiện. Trong khuôn khổ tạo giống cây trồng, biến dị dòng soma có thể được sử dụng để khám phá ra các thể biến dị mới duy trì tất cả các đặc tính tốt và có bổ sung tính trạng hữu ích, như kháng các bệnh hoặc chất diệt cỏ. Các biến dị này sau đó có thể được thử nghiệm trên đồng ruộng để xác định chắc chắn sự ổn định di truyền của chúng. Lai thuận nghịch (reciprocal cross) giữa thể hệ F_1 mang tính trạng mong muốn với đối chứng có nguồn gốc từ hạt sẽ ổn định xa hơn (further stabilise) các thể biến dị và giúp đỡ tạo hạt giữa các dòng hứa hẹn. Biến dị dòng giao tử, được cảm ứng hầu hết bởi sự tái tổ hợp giảm phân trong chu trình hữu tính của thể lai F_1 , tạo ra sự phân ly vượt quá giới hạn để khám phá ra các tổ hợp gen duy nhất.

Các dòng tế bào khác nhau chọn lọc trong điều kiện *in vitro* có thể chứng minh năng lực ứng dụng cho nông nghiệp và công nghiệp. Các cây tái sinh biểu hiện các tính

trạng kháng chất diệt cỏ, pathotoxin, muối hoặc phen. Hơn nữa, khả năng biến dị trong nuôi cấy tế bào đã thể hiện một vai trò hữu ích trong việc tổng hợp các chất thứ cấp liên quan đến phạm vi thương mại.



Hình 7.2 Biểu đồ khai thác hiệu quả tác động giữa nhân và tế bào chất

Các kỹ thuật ứng dụng cho việc cảm ứng biến dị dòng soma và dòng giao tử dễ dàng hơn công nghệ DNA tái tổ hợp. Đặc biệt, cải thiện cây trồng mang các tính trạng đa gen (polygenic traits) bằng các phương pháp tạo giống cây trồng truyền thống và không truyền thống đã được chứng minh là rất khó khăn. Biến dị dòng soma có thể là một kỹ thuật thích hợp cho công nghệ di truyền các cây trồng này.

7.8. Thực hành nuôi cấy dịch huyền phù

1. Nguyên liệu thực vật

- Hạt lúa (*Oryza sativa*): nuôi cấy tạo callus.
- Cây nghệ đen (*Curcuma zedoaria*) *in vitro*: nuôi cấy tạo callus.

2. Môi trường nuôi cấy tạo callus

a. Lúa

- MS đầy đủ
- Saccharose 3 %
- Agar 0,8 %
- 2,4-D 5 mg/L
- KIN 0,1 mg/L
- pH_{môi trường} ~ 5,8

3. Môi trường nuôi cấy tế bào dịch lỏng

Thành phần môi trường tương tự môi trường tạo callus nhưng không bổ sung agar.

4. Tiến hành

* LÚA: chuẩn bị môi trường theo các bước tương tự các bài trước.

- Tạo callus



Hình 7.3. Nuôi cấy tạo mô sẹo lúa

▫ Hạt lúa bóc vỏ, rửa sạch bằng xà phòng dưới dòng nước chảy. Cho hạt lúa vào bình khử trùng, khử trùng sơ bộ bằng cồn 70% trong 1 phút. Sau đó khử trùng bằng HgCl_2 0,1 % trong 6 phút. Rửa lại bằng nước cất vô trùng 4-5 lần trước khi cấy.

▫ Cấy hạt lúa đã khử trùng vào môi trường đã chuẩn bị và nuôi ở nhiệt độ $25 \pm 2^\circ\text{C}$, thời gian chiếu sáng 8-10 giờ/ngày, cường độ chiếu sáng 2000-3000 lux .

▫ Sau 4-5 tuần các callus màu trắng sữa xuất hiện trên các hạt lúa.

- Nhân callus

Dùng dao mổ tách lấy các khối callus nhỏ có đường kính 1-2 mm cấy chuyển lên môi trường nhân callus (thành phần môi trường tương tự như môi trường tạo callus). Sau 3-4 tuần, các callus sẽ phát triển nhanh chóng thành các khối callus lớn (đường kính khoảng 3-5 mm).

- Nuôi cấy tế bào dịch huyền phù

▫ Chuẩn bị môi trường nuôi cấy dịch huyền phù. Các bước tiến hành và khử trùng tương tự môi trường có agar. Mỗi bình tam giác loại 250 mL chứa 50 mL môi trường.

▫ Chọn các khối callus có màu trắng ngà, rớt từ môi trường nhân để chuyển vào môi trường lỏng. Một gam callus cho vào 1 bình tam giác loại 250 mL chứa 50 mL môi trường (*các thao tác tiến hành trong điều kiện vô trùng*).

Đặt các bình môi trường chứa callus trên máy lắc ở trong phòng nuôi cấy (nhiệt độ $25 \pm 2^\circ\text{C}$) với tốc độ khoảng 100-150 vòng/phút

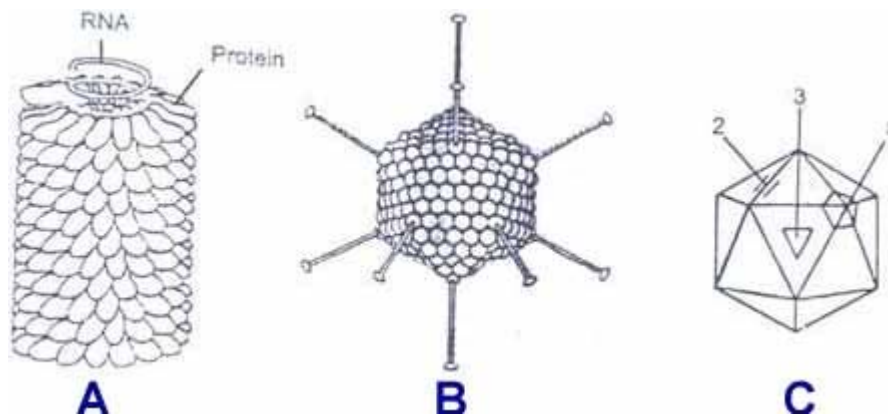
Cứ 2 ngày lấy ra một bình nuôi cấy, lọc sinh khối tế bào bằng máy hút chân không, cân lượng mẫu tươi thu được. Sau đó, đem sấy mẫu ở 65°C trong 2 giờ để cân trọng lượng khô. So sánh với kết quả ban đầu để theo dõi tốc độ sinh trưởng của callus

Chương 8. NUÔI CÂY MÔ THỰC VẬT VÀ VẤN ĐỀ

LÀM SẠCH *VIRUS* Ở THỰC VẬT

8.1. Tầm quan trọng

Tạo giống chống chịu các bệnh *virus* là một hướng nghiên cứu khả quan. Nhưng trong thực tế, chọn tạo giống gặp nhiều khó khăn do thiếu nguồn gen có khả năng chống chịu với các loại bệnh *virus* khác nhau. Bên cạnh đó, việc tạo giống cây lưu niên còn gặp trở ngại hơn do mất nhiều thời gian và công sức. Gần đây, kỹ thuật gen đã mở ra triển vọng tạo giống miễn dịch di truyền với một số loại *virus* bằng cách chuyển gen protein vỏ *virus* hoặc gen iARN vào cây trồng, làm cây có khả năng bất hoạt gen và mRNA *virus*. Tuy nhiên, nhiều vấn đề kỹ thuật và lý luận vẫn còn khá nan giải.



Hình 8.1. Các dạng cấu tạo ngoài của virus

Do vậy, phương pháp có hiệu quả nhất hiện nay vẫn là tạo ra các vật liệu nhân giống sạch bệnh *virus* qua nuôi cây đỉnh chồi, đỉnh sinh trưởng hoặc kết hợp với xử lý hoá chất, nhiệt độ. Những phương pháp này đã giúp loại trừ các bệnh *virus* khác nhau khỏi vật liệu nhân giống và tạo giống sạch bệnh ở một loạt cây trồng, chủ yếu là khoai tây, khoai lang, sắn, tỏi, cây ăn quả có múi, chuối, nho, mơ, mận, cây hoa như cúc, cẩm chướng... Phương pháp này cho phép loại bỏ hầu hết các bệnh *virus*, viroid và các tác nhân gây bệnh tương tự *virus* (Vasil và Thorpe, 1994).

Chóp đỉnh sinh trưởng được coi là sạch bệnh *virus*. Mẫu mô nuôi cây càng nhỏ và càng gần đỉnh sinh trưởng thì khả năng sạch bệnh càng lớn. Dường như có tương quan tỷ lệ thuận giữa kích thước mẫu với khả năng cây tái sinh sạch bệnh (Stone, 1982; Green và Lo, 1989). Nhưng trong một vài trường hợp, việc loại trừ *virus* rất khó khăn và không phụ thuộc vào kích thước mẫu do một số *virus* có khả năng sinh sản và chuyển dịch

nhanh chóng đến vùng sinh trưởng (Theiley và cs, 1984). Người ta đã quan sát thấy mật độ *virus* khá cao ở vùng chóp đỉnh sinh trưởng của một số loài dưới kính hiển vi điện tử (Toussaint và cs, 1984). Do vậy, việc kết hợp kỹ thuật nuôi cấy này với các yếu tố kìm hãm *virus* như hoá chất, nhiệt độ có thể tăng cường khả năng loại trừ bệnh *virus* và tạo giống sạch bệnh ở cây trồng.



Hình 8.2. Cà chua bị bệnh virus đốm vàng

Hầu hết các cây trồng nông-lâm nghiệp đều bị nhiễm các hệ thống gây bệnh như nấm, *virus*, vi khuẩn, mycoplasma và nematodes. Các tác nhân gây bệnh không phải luôn gây chết cây, nhưng nó thường xuyên làm giảm năng suất và chất lượng của cây trồng. Trong khi các tác nhân gây bệnh khác gần như luôn xâm nhiễm vào cơ thể thực vật qua nhân giống sinh dưỡng, thì các bệnh *virus* lại xuất hiện ở cả những cây trồng nhân giống bằng hạt cũng như nhân giống sinh dưỡng. Mặc dù các cây trồng bị nhiễm bệnh vi khuẩn và nấm có thể phản ứng với việc xử lý các hợp chất diệt khuẩn (bactericidal) và diệt nấm (fungicidal), nhưng người ta chưa thể sản xuất ra các hợp chất thương mại diệt *virus* để chữa bệnh cho các cây trồng nhiễm *virus*.

Để sản xuất cây sạch bệnh *virus*, thông thường người ta chọn ra một hoặc nhiều cây khỏe mạnh và sau đó nhân giống chúng bằng phương thức sinh dưỡng, tạo ra một quần thể cây khỏe mạnh. Nhưng tại nơi mà quần thể của một dòng hoàn toàn bị nhiễm bệnh *virus* thì chỉ có cách thu được cây sạch bệnh thông qua nuôi cấy mô. Các mô phân sinh đỉnh ở các cây bị nhiễm bệnh thường hoặc là sạch bệnh hoặc chứa nồng độ *virus* rất thấp. Tuy nhiên, nồng độ của *virus* trong cây tăng lên tương ứng với việc tăng khoảng cách tính từ các đỉnh phân sinh. Các lý do khác nhau để cho mô phân sinh không hoặc ít bị *virus* xâm nhiễm là: (a) các *virus* di chuyển dễ dàng trong cơ thể thực vật thông qua hệ thống mạch dẫn là cấu trúc mà ở đỉnh phân sinh không có, (b) hoạt tính trao đổi chất cao trong quá trình phân chia của các tế bào phân sinh ngăn cản sự chép *virus*, và (c) nồng độ auxin nội sinh cao ở trong các đỉnh chồi có thể ức chế sinh sản của *virus*.

Morel và Martin (1952) đã ứng dụng các kỹ thuật nuôi cấy mô để loại bỏ sự xâm nhiễm *virus* ở thực vật. Họ nuôi cấy các đỉnh phân sinh tách ra từ cây *Dahlia* bị nhiễm

virus và thu được các cây sạch bệnh. Sau đó, các tiến bộ trong loại bỏ *virus* bằng kỹ thuật nuôi cấy mô đã được ứng dụng rộng rãi trong nông nghiệp. Nuôi cấy đỉnh phân sinh cũng cho phép thu được các cây sạch những bệnh khác như bệnh viroid (dạng *virus*-tác nhân gây bệnh chỉ chứa một đoạn rất ngắn RNA), mycoplasma, vi khuẩn, và nấm.

8.2. Nguyên lý làm sạch *virus*

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*. Kinh nghiệm thực tế cho hay những biện pháp phục tráng giống có hiệu quả là những biện pháp được thực hiện một cách triệt để và có trách nhiệm. Làm sạch *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 phân sinh. Đương nhiên là kỹ thuật nuôi cấy đỉnh phân sinh ở đây được thực hiện theo một mục đích khác nên phức tạp và tốn kém hơn trong nhân giống vô tính. Vì thế, người ta phân biệt rõ giữa nuôi cấy đỉnh phân sinh trong công tác phục tráng giống nói chung và làm sạch *virus* nói riêng. Mục đích của công tác bảo vệ thực vật (trong nuôi cấy đỉnh phân sinh và nuôi cấy mô) phân biệt rõ với công tác duy trì giống. Trong công tác bảo vệ thực vật thì yêu cầu lớn nhất là làm sạch *virus*, nhưng 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 phân sinh và xác định (thử) *virus* phải được thực hiện theo một chu trình kín. Các nhà duy trì giống đòi hỏi phải có những cơ thể thực sự sạch *virus*, để rồi thông qua phương pháp nhân *in vitro* có thể nhân thành số lượng cây bất kỳ mà không bị tái nhiễm. Các nhà nuôi cấy mô thực vật rất quan tâm đến phương pháp nhân giống *in vitro*, mà lý do chính là việc làm sạch *virus* đối với cây trồng. Vì hiệu quả kinh tế, người ta chỉ giới hạn việc nhân giống *in vitro* 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 *in vitro* loại trừ được nguy cơ tái nhiễm và vì thế tỏ ra ưu việt hơn các phương pháp cổ điển. Tuy vậy theo kinh nghiệm thực tiễn, các cây trồng được nhân giống *in vitro* vẫn còn mang ít nhiều tác nhân gây bệnh.

Đa số các cây trồng thương mại (commercial crop plants), đặc biệt là các cây nhân giống vô tính đều chứa các *virus* nội hấp (systemic *virus*), các *virus* này ảnh hưởng xấu đến năng suất. Vì vậy, việc sản xuất ra các nguyên liệu thực vật sạch *virus* hoặc gần sạch *virus* là rất cần thiết trước khi chúng được nhân giống để đưa ra thị trường. Ở nhiều loài, phương thức cho hiệu quả cao là xử lý nhiệt các cơ quan khác nhau hoặc lúc cây đang sinh trưởng mạnh. Tuy nhiên, đối với một số *virus* phương thức này hoàn toàn không thích hợp vì thế phải sử dụng một số phương thức khác. Phương thức cho hiệu quả cao nhất là nuôi cấy đỉnh phân sinh, thường có thể kết hợp với xử lý hóa học hoặc xử lý nhiệt. Các phương pháp này cho phép có thể thu được các cá thể không những sạch *virus* mà còn sạch cả nấm và các nhân tố gây bệnh khác.

Từ năm 1952, 1953 Morel và Martin đã thành công trong việc loại trừ một số *virus* ở khoai tây và thược dược (*Dahlia variabilis*) bằng cách nuôi cấy đỉnh phân sinh, điều đáng tiếc là các chồi này đã không tạo rễ và người ta phải ghép lên các cây mầm khoẻ mạnh. Tuy nhiên, sau đó trên cơ sở các kết quả của Morel và Martin người ta đã đưa ra nhiều phương pháp sản xuất các cây trồng sạch *virus* có khả năng tạo rễ ở nhiều loài thực vật khác nhau và các dòng cây đó hiện nay đã được sử dụng rộng rãi trên thị trường.

Nuôi cấy đỉnh phân sinh là nuôi cấy các mẫu nhỏ của chồi đỉnh lên môi trường dinh dưỡng thích hợp để chúng sinh trưởng và tạo cây hoàn chỉnh. Phần mô thường được dùng là vòm phân sinh (meristem dome) cộng thêm cặp lá đầu tiên. Tùy thuộc vào từng loài khác nhau mà đỉnh phân sinh có thể có chiều dài từ 0,1-0,5 mm, một số tác giả yêu cầu chỉ nuôi cấy vòm phân sinh, tuy nhiên một số tác giả lại thu được cây sạch *virus* từ đỉnh sinh trưởng có chiều dài 0,5 mm. Chồi đỉnh hoặc đỉnh sinh trưởng sau khi cắt thường phải khử trùng bề mặt, nhưng giai đoạn này có thể không cần thiết. Các kỹ thuật nuôi cấy đỉnh sinh trưởng rất khác nhau tùy thuộc từng loài.

Môi trường agar thường không thích hợp cho cây sinh trưởng khi nuôi cấy, chỉ có các “cầu giấy lọc” (filter paper bridge) với phần chân được nhúng trong môi trường lỏng chứa trong ống nghiệm nuôi cấy là thích hợp hơn cả. Chỉ trên các cầu giấy lọc như thế rễ mới phát triển tốt, và cây có thể sẵn sàng để đưa ra đất. Rất nhiều loại môi trường đã được dùng trong nuôi cấy đỉnh phân sinh nhưng không có một môi trường chung thích hợp cho mọi loài. Môi trường chứa các nguyên tố đa lượng và vi lượng của Knop và Berthlot (không có beryllium và titanium), glucose 40 g/L, thiamine 10-5g/L và myo-inositol 10-3 g/L ở pH 5,5 có thể được dùng cho nhiều loài. NAA ở nồng độ 10-3 mg/L cần thiết cho sự hình thành các rễ ban đầu, nhưng sau đó phải cấy chuyển sang môi trường không có NAA.

Các số liệu về điều kiện chiếu sáng và nhiệt độ lý tưởng được công bố rất ít, mặc dù trước đây Hollings (1968) đã đưa ra nhiệt độ nuôi là 20°C dưới ánh sáng đèn huỳnh quang với thời gian chiếu sáng 22 giờ/ngày. Thời gian để đỉnh phân sinh tạo chồi và rễ là từ vài tuần đến vài tháng tùy loài.

Hiện nay, ba biện pháp làm sạch *virus* tỏ ra có hiệu quả đối với cây lương thực và cây thực phẩm, đó là xử lý nhiệt, nuôi cấy đỉnh phân sinh và chọn lọc bằng các phương pháp thử *virus*. Mỗi một biện pháp đều thu được kết quả nhất định, nhưng chỉ khi sử dụng một cách tổng hợp cả ba biện pháp người ta mới thu được kết quả sạch *virus* thực sự. Mức độ hữu hiệu của quá trình làm sạch *virus* đối với thực tiễn phụ thuộc vào những yếu tố sau:

- Khả năng xử lý nhiệt.
- Khả năng nuôi cấy đỉnh phân sinh.
- Phương pháp thử *virus* có độ chính xác cao.
- Hệ số nhân giống vô tính cây khá cao.
- Trồng các vật liệu sạch bệnh ban đầu dưới điều kiện cách ly tốt, tránh được tái nhiễm.
- Mức độ (diện tích) trồng trọt cho phép cung cấp đủ cây giống mới trong mỗi năm.

Những điều kiện trên đây được thực hiện ở các mức độ rất khác nhau đối với các loài cây trồng khác nhau. Việc làm sạch *virus* không thể thay bằng việc phân tích *virus* của một loài cây trồng, phân tích *virus* cần được thực hiện trước đó và để rồi từ đó mà tìm ra biện pháp thích hợp để bảo đảm cây trồng sạch bệnh.

8.3. Phương pháp làm sạch *virus*

8.3.1. Các phương pháp chuẩn đoán bệnh *virus*

Không phải tất cả các loài cây sau quá trình xử lý phối hợp nhiệt và nuôi cấy đỉnh sinh trưởng thì đều sạch *virus*, vì vậy cần phải tiến hành xét nghiệm khoảng thời gian từ lúc tái sinh cây cho tái khi xét nghiệm phải từ 4 đến 6 tháng để các thể *virus* còn tồn tại 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 loài 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 những loài *virus* phổ biến và có ý nghĩa kinh tế. Đối với việc phân tích *virus* một loài 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 trong trồng trọt các loài cây hoa:

8.3.1.1. Xét nghiệm bằng cây chỉ thị

Dùng dịch ép của thực vật cần được xét nghiệm gây bệnh trên một cây chỉ thị thích hợp hoặc dùng phương pháp ghép có thể chứng minh được bệnh *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.

Trong 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 ở một thời gian nhiều tháng thì độ chính xác của phương pháp giảm đi vì 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 một 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 1.000 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 3-5 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 ba lần so với phương pháp huyết thanh.

8.3.1.2. Phương pháp huyết thanh

Tính đặc hiệu cao của phương pháp huyết thanh là một đặc điểm quan trọng. Ngoài ra, phương pháp này còn cho phép xác minh nhanh sự tồn tại của *virus* và phân loại chúng. Kết quả thu được chậm nhất là sau 48 giờ. Chi phí cho xét nghiệm thấp, để chứng minh *virus* không cần có nhà kính trồng cây. Phương pháp huyết thanh lại có độ chính xác cao, tuy nhiên người ta chưa sản xuất được kháng thể đối với tất cả các loài *virus* và kể cả khi có huyết thanh rồi cũng chưa có thể nói rằng kết quả xét nghiệm hoàn toàn bảo đảm. Vì rằng với phương pháp này người ta không thể xác minh được đặc tính gây bệnh của từng loài *virus* đối với thực vật chủ, có nhiều phương pháp huyết thanh

khác nhau đã được ứng dụng trong xét nghiệm hàng loạt đối với cây hoa, trong đó có phương pháp kết tủa giọt, xét nghiệm khuếch tán agar gel hai chiều, xét nghiệm latex, xét nghiệm miễn dịch hướng tâm... Mỗi một phương pháp đều có ưu và nhược điểm đặc trưng thông số về độ chính xác thường thu được với dãy nồng độ dịch ép từ thực vật hoặc *virus* phân lập. Nhiều nghiên cứu cho thấy không thể coi độ nhạy cảm này thường thu được khi pha loãng dịch ép nhiều lần hoàn toàn cho phép tin tưởng vào kết quả xét nghiệm hàng loạt. Vì thế cần chọn phương pháp thích hợp cho xét nghiệm hàng loạt.

8.3.1.3. 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 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 và hoa huệ 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.

8.3.1.4. Xét nghiệm bằng phương pháp PCR

Hiện nay, một phương pháp được sử dụng phổ biến của công nghệ sinh học có rất nhiều tiềm năng ứng dụng đó là khuếch đại gen bằng phản ứng trùng hợp polymerase (polymerase chain reaction) trên máy PCR. Bằng cách thiết kế các cặp mồi (primers) đặc hiệu của các gen gây bệnh ở *virus*, người ta có thể khuếch đại các gen này (nếu có) từ DNA hệ gen của thực vật đã được xử lý làm sạch *virus*. Nếu không xuất hiện sản phẩm PCR đặc trưng của gen *virus* sau khi phân tích điện di agarose gel thì ta có thể kết luận là cây đã được làm sạch bệnh hoặc ngược lại, cây được xử lý vẫn còn mang *virus*. Phương pháp này có độ nhạy rất cao, chính xác và ít tốn kém hơn các phương pháp nói trên. Hiện nay, người ta đã sản xuất một thiết bị phân tích PCR có độ nhạy rất cao gọi là Realtime-PCR (PCR thời gian thực hay còn gọi là PCR định lượng) cho phép phân tích với một nồng độ *virus* vô cùng thấp ở những sinh vật mới bị nhiễm bệnh. Kỹ thuật này đã khắc phục được thời gian chờ đợi *virus* sinh sản tới một nồng độ đủ cao để đảm bảo độ chính xác của phương pháp xét nghiệm.

Phương pháp phân tích PCR đã được ứng dụng rất rộng rãi để chẩn đoán bệnh ở người như sốt xuất huyết Dengue, viêm gan B, viêm gan C, Chlamydia... Và rõ ràng nó rất hữu ích trong việc ứng dụng để xét nghiệm các thực vật bị nhiễm bệnh *virus*, vi khuẩn hoặc vi nấm...

8.3.2. Xử lý nhiệt

Quá trình xử lý nhiệt được coi như là biện pháp làm sạch bệnh có cơ sở thực tiễn. Những cây mía mắc bệnh có thể cho năng suất cao sau khi ngâm ở nước nóng, các nghiên cứu về vấn đề này cho thấy dùng không khí nóng thuận lợi hơn đối với hầu hết cây trồng bởi vì chúng có thể chịu đựng tốt hơn và *virus* bị loại trừ dần dần. Những hiểu biết của chúng ta về quá trình làm sạch bệnh thông qua xử lý nhiệt còn chưa đầy đủ. Người ta nêu ra giả thiết chung là *virus* bị ức chế sinh sản ở nhiệt độ từ 34-40°C. Quá trình sinh trưởng của thực vật trong khi xử lý nhiệt cũng bị ức chế nhưng ít hơn vì thế những bộ phận vừa được sinh trưởng thường sạch hoặc nghèo *virus*. Kết quả xử lý nhiệt còn cho thấy cơ thể thực vật có thể được bảo tồn ở trạng thái tối thích trong một thời gian dài ở nhiệt độ cao. Tốt nhất là nên xử lý với chu kỳ quang 16 giờ/ngày. Nhiệt độ phải được kiểm tra liên tục bằng máy ghi tự động để đảm bảo cung cấp lượng nhiệt năng cần thiết, độ ẩm tương đối phải đạt trung bình là 50%. Để đảm bảo sự phân bố nhiệt độ đồng đều trong phòng cần phải có quạt gió. Mỗi một loại cây hoa thường mẫn cảm rất khác nhau đối với nhiệt độ cao trong khi xử lý, ví dụ: hoa cúc có khả năng chịu đựng nhiệt rất lớn: 38°C trong thời gian nửa năm tiếp theo là hoa anh túc. Hoa thủy tiên thì chịu được nhiệt độ 34°C trong thời gian từ 4-6 tuần.

Trong một số trường hợp, người ta phải phối hợp xử lý nhiệt với nuôi cấy đỉnh sinh trưởng hoặc vi ghép để loại trừ bệnh *virus* (Walkey, 1980; Kartha, 1986; Brown và cs, 1988). Ưu thế của kỹ thuật này là sau khi cây đã qua xử lý nhiệt, mẫu nuôi cấy (hoặc vi ghép) thường có kích thước lớn hơn. Green và Lo (1989) đã tạo giống khoai lang sạch bệnh *virus* (bệnh vàng lụi) bằng nuôi cấy đỉnh sinh trưởng kích thước nhỏ (0,3 mm) hoặc nuôi cấy đỉnh chồi kích thước lớn hơn (1,0 - 2,5 cm) sau khi xử lý cây mẹ ở 37°C trong một đến hai tháng (hình 9). Kết quả tương tự cũng nhận được ở cây sắn (Kartha và Gambong, 1975).

Cây mẹ hoặc một phần cây mẹ được xử lý ở nhiệt độ cao bằng cách tăng nhiệt một cách từ từ cho đến khi đạt nhiệt độ tới hạn. Nhiệt độ này có thể ức chế hoặc loại trừ *virus* khỏi vùng sinh trưởng mạnh nhưng không ảnh hưởng đến sinh trưởng của cây. Cây được lưu giữ ở nhiệt độ tới hạn trong khoảng thời gian xác định, sau đó tách và nuôi cấy chồi đỉnh hoặc sử dụng trong vi ghép.

Tỷ lệ sạch bệnh của mẫu phụ thuộc vào thời gian xử lý nhiệt độ tới hạn và phụ thuộc vào khả năng chịu nhiệt của giống (Converse và Tanne, 1984; Lozoya-Saldana và Merlin -Lara, 1984). Xử lý nhiệt có tác dụng tốt với đa số trường hợp, song đôi khi mô tế bào của cây nhiễm *virus* nhưng không bị loại trừ ở nhiệt độ cao do chủng *virus* vẫn có khả năng sinh sản ở nhiệt độ này (Dawson, 1976).

Kết hợp xử lý nhiệt độ thấp với nuôi cấy đỉnh sinh trưởng đã được sử dụng thành công để loại trừ virus khỏi khoai tây và hoa cúc (Paduch-Cichal và Kryczynski, 1987). Bên cạnh đó, người ta sử dụng kết hợp một số hoá chất ức chế *virus* như ribavirin, vidarabine có gốc adenine để tạo giống sạch bệnh (Cassells và Long, 1980; Stone, 1982). Các hoá chất chống *virus* thường độc cho mô cây nên ứng dụng của kỹ thuật này vẫn còn hạn chế.

Bảng 8.1. Các môi trường dinh dưỡng nuôi cấy chồi đỉnh của một số cây trồng

Thành phần	Môi trường (mg/l) (a)								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9 (c)
NH ₄ NO ₃	-	-	-	-	-	60	60	-	1650
KNO ₃	125	125	125	200	125	-	-	125	1900
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	-	-	-	1000	-	-	-	-
KCl	-	-	-	-	1000	80	80	-	-
CaCl ₂ .2H ₂ O	-	500	500	-	-	-	-	-	440
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	500	-	-	800	500	170	170	500	-
O	125	125	125	200	125	240	240	125	370
MgSO ₄ .7H ₂ O	125	125	125	200	125	40	40	125	170
KH ₂ PO ₄	-	-	-	-	1	-	-	-	-
FeCl ₃ .6H ₂ O	-	-	-	-	5	5	-	-	-
Fe-citrate	-	25	-	-	-	-	27,8	25	-
Fe(SO ₄) ₃	-	-	-	-	-	-	-	-	27,8
FeSO ₄ .7H ₂ O	-	-	-	-	-	-	37,3	-	5
Na ₂ -EDTA	(b)	0,8	(b)	-	0,1	-	22,3	1	37,2
MnSO ₄ .4H ₂ O	(b)	0,04	(b)	0,2	1	0,05	8,6	0,05	5
ZnSO ₄ .H ₂ O	(b)	0,02	(b)	0,3	-	-	-	0,02	22,3
NiCl ₂ .6H ₂ O	(b)	5	(b)	1,8	-	0,4	-	5	0
MnCl ₂ .H ₂ O	(b)	-	(b)	-	-	-	0,02	0,02	8,60
CoCl ₂ .6H ₂ O	(b)	0,02	(b)	0,08	0,03	0,05	5	5	-
CuSO ₄ .5H ₂ O		5					0,02	0,02	-

AlCl ₃	(b)	0,02	(b)	-	0,03	-	5	5	0,02
H ₂ MoO ₄ .H ₂ O	(b)	5	(b)	0,02	-	0,02	-	0,02	5
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	(b)	-	(b)	-	-	-	-	5	0,02
O	(b)	-	(b)	-	0,01	-	0,02	-	5
KI	(b)	-	(b)	2,8	1	0,6	5	-	-
H ₃ BO ₃	0,1	0,25	0,1	-	100	0,1	0,83	-	-
Myo-inositol	10	0,02	10	-	1	10	6,2	0,25	0,25
Ca-pantothenate	-	5	-	-	-	-	0,1	0,02	0,83
Inositol	1	0,00	1	5	1	1	10	5	6,2
Nicotinic acid	1	1	1	1	1	1	-	-	-
Pyridoxine.HCl	-	0,00	-	1	1	1	1	-	-
Thiamine.HCl	-	1	-	-	-	-	1	-	100
Glycine	0,1	-	0,01	-	0,01	0,01	1	-	0,5
Biotin	-	-	10	-	1	10	-	-	0,5
Cystein	-	-	-	-	0,1	5	0,01	1	0,1
Adenine	-	0,00	-	-	-	-	10	-	2,0
AdSO ₄	-	1	1	-	-	1	5	-	-
Casein hydrolysate	2000	0,00	2000	3000	2000	-	-	-	-
Sucrose	0	1	0	0	0	1000	1	-	-
Glucose	-	0,00	-	-	-	0	-	8	-
		1					3000	-	-
		-					0	-	-
		-						4000	-
		-						0	-
		4000							
		0							

Chú thích:

(a). 1: Morel (1948), 2: Morel and Martin (1955), 3: Kassanis (1975), 4: Nielsen (1960), 5: Morel and Müller (1964); 6: Mori (1971), 7: Wang and Huang (1975), 8: Baker and Kinnaman (1973), 9: Mellor and Stace-Smith (1977).

(b). Dung dịch Berthelot (mg/L): MnSO_4 (2000), NiSO_4 (60), TiO_2 (40), CoSO_4 (60), ZnSO_4 (100), CuSO_4 (50), BeSO_4 (100), H_3BO_3 (50), $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_2$ (50000), KI (50), H_2SO_4 (sp. gr. 1,83) (1 ml).

(c). Môi trường sử dụng đặc biệt cho nuôi cấy đỉnh chồi khoai tây có các hormone sinh trưởng (mg/L): Kinetin (0,04), IAA (0,5), GA_3 (0,1), bổ sung than hoạt tính (2857). Các môi trường từ 1-8 có tỷ lệ các hormone sinh trưởng khác nhau tùy loài.

8.3.3. Nuôi cấy đỉnh phân sinh

Người ta đã chứng minh được rằng nồng độ *virus* trong thực vật giảm dần ở bộ phận gần đỉnh sinh trưởng riêng đỉnh phân sinh thì hoàn toàn sạch *virus*. 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 thực vật hoàn chỉnh. Việc phân lập đỉnh phân sinh có kích thước 0,01-0,1 mm rất khó khăn và việc tái sinh thành cây hoàn chỉnh cũng chỉ đạt được với tần số rất thấp (0,2-5%) vì vậy người ta thường phân lập cả chồi ngọn và gọi nó là đoạn đỉnh (shoot tips) có kích thước từ 0,1- 1 mm qua đó tính sạch bệnh của mẫu vật nuôi cấy bị giảm xuống nhưng tốc độ tái sinh cây được tăng lên và đó chính là phương pháp được ứng dụng trong thực tiễn.

Khái niệm sạch *virus* của thực vật không có nghĩa là cần phải có đỉnh phân sinh hoàn toàn sạch, các phần tử *virus* mà nó được hoàn thiện trong quá trình phân hóa của các tế bào chưa phân hóa. Vì vậy, trong thực tiễn phải giới hạn nồng độ *virus* và khối lượng mô phân hóa ở một mức nhất định nếu cần có thực vật sạch *virus*. Việc phối hợp xử lý nhiệt với nuôi cấy đỉnh phân sinh là phương pháp rất 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 hóa đỉnh phân sinh tính sạch *virus* sẽ được đảm bảo với độ xác suất cao, ở đây không đề cập đến vấn đề chọn các môi trường thích hợp. Thông thường người ta sử dụng môi trường Murashige-Skoog hoặc White. Theo quan điểm lý thuyết và kinh nghiệm thực tiễn người ta thu được những kết quả khác nhau trong từng phòng thí nghiệm, nếu việc nuôi cấy đỉnh phân sinh được thực hiện trên quan điểm sản xuất lớn thì cần phải chú ý những mặt sau đây: (a) đảm bảo độ đồng nhất của giống trong tất cả các khâu nuôi cấy, (b) đảm bảo tốc độ sinh trưởng nhanh và đều đối với một số lượng đỉnh phân sinh lớn đồng thời (c) kết quả đưa cây ra đất cũng cần phải được bảo đảm. Các

đỉnh sinh trưởng sau khi phân lập cần được nuôi ở các buồng nuôi cây hoàn toàn không chế về mặt khí hậu: nhiệt độ 22°C và 16 giờ chiếu sáng ở 1.000-3.000 lux .

Khi đưa cây tái sinh từ đỉnh phân sinh ra ngoài đất cần phải phủ nilon để chúng thích nghi dần với độ ẩm không khí thấp. Tốt nhất là nên trồng ở các buồng nuôi cây cách ly có thông khí và hoàn toàn sạch rệp lá. Từ tháng 10 đến tháng 3 cần phải chiếu sáng thêm, nhưng trong mùa hè lại phải che bớt ánh sáng.

8.4. Kết quả trong thực tiễn sản xuất

8.4.1. Tạo các giống cây sạch bệnh

8.4.1.1. Cây 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 loài rệp lá. Qui trình được sử dụng chủ yếu là giết các cây thảo có thể truyền bệnh vào củ khoai tây. 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 giữa 32 và 38°C trong thời gian 7 ngày đến 7 tuần và sau đó nuôi cấy đỉnh phân sinh 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.

Các ảnh hiển vi điện tử của đỉnh sinh trưởng khoai tây có độ lớn từ 80-100 μ m cho thấy chúng vẫn còn chứa trong tiêu bản tới 12 thể *virus* X. Tuy vậy, sau quá trình phân loại từ các đỉnh phân sinh đó vẫn thu được một tỷ lệ phần trăm nhất định các cây sạch *virus*.

8.4.1.2. Cây thức ăn gia súc

Để sản xuất hạt giống cây trồng làm thức ăn gia súc, ví dụ cỏ ba lá 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 phân sinh thì thu được phần lớn các cây sạch *virus*.

8.4.1.3. Cây hoa bia

Các loại bệnh *virus* ở hoa bia thường làm giảm năng suất đáng kể. Tiến hành chọn lọc bằng mắt thường, xử lý nhiệt và nuôi cấy đỉnh sinh trưởng, cải tiến dần tình trạng sạch bệnh người ta đã giải phóng 66% cây khỏi *virus* hop-mosaic (HMV) và latent bằng nuôi cấy đỉnh phân sinh, sau đó làm sạch *virus* prunis necrotic ringspot (PNRV) bằng xử lý nhiệt trong thời gian 10 ngày.

8.4.1.4. Cây rau

Hầu hết các loài 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 loài *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 loài *virus* gây bệnh ở các 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 phân sinh hoặc xử lý nhiệt để giải phóng *virus*. Đối với nấm rơm có thể làm sạch bệnh bằng phương pháp xử lý nhiệt và trong thời gian gần đây người ta đã tạo được phương pháp miễn dịch trong agar gel.

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 bằng biện pháp thử *virus* đã thu được 3.220 cây sạch bệnh.

8.4.1.5. 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 phân sinh của chúng khó khăn hơn nhiều so với các loài cây thân thảo cho nên từ lâu người ta đã sử dụng phương pháp thử để tìm ra các vật liệu sạch bệnh ban đầu. 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 xử 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 bốn loài *virus* ở cây anh đào, một loài *virus* ở cây mận, bảy loài *virus* ở cây táo, hai *virus* ở cây nho đất (nho tây), sáu *virus* ở cây đào và hai *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 bốn *virus* không bị mất hoạt tính khi xử lý nhiệt.

Nuôi cấy đỉnh phân sinh ở cây ăn quả tới nay mới chỉ được sử dụng ở những đối tượng sau: dâu chua, dâu chua quả đỏ, dâu chua quả đen và cây táo. Thực tiễn cho thấy đối với cây ăn quả (cây thân gỗ) việc nuôi cấy đỉnh phân sinh còn gặp khó khăn hơn bởi vì khả năng tái sinh của chúng yếu hơn so với cây thân thảo. Các thí nghiệm trong những năm sắp tới chắc chắn sẽ nêu ra những kết quả mới.

8.4.1.6. Cây hoa

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

Việc ứng dụng thực tiễn 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 nhận các loài vật liệu để làm sạch *virus*. Ở Anh, cũng tổ chức một cơ quan tương tự như vậy. Ở Đông Đức (cũ) có xí nghiệp ươm cây con ở thành phố Dresden cũng nhận các loài hoa như cúc, hoa anh túc, hoa thủy tiên... để xử lý nhiệt và làm sạch *virus*.

Các điều kiện để làm sạch *virus* đối với cây hoa thường được thực hiện dễ dàng, vì thế ở những loài cây trồng này việc làm sạch *virus* thường có kết quả nhất. Vì thế dưới đây một số biện pháp quan trọng như xử lý nhiệt, nuôi cấy đỉnh phân sinh và xét nghiệm *virus* được trình bày trên đối tượng cây hoa.

8.4.2. Kiểm định tính sạch bệnh *virus*

Nếu trong qui trình làm sạch *virus* có thể áp dụng được kỹ thuật xử lý nhiệt và nuôi cấy đỉnh phân sinh 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 để 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 phân sinh sau từ 4-6 tháng kể từ ngày nuôi cấy mới bắt đầu xét nghiệm thời gian này đủ để cho *virus* bảo tồn trong cây đủ nồng độ cho phép chứng minh được. Những cơ 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 cơ thể này được tách riêng ra thành tập đoàn nhân mạnh khoẻ (health nucleus clone) 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 cơ thể này bằng tất cả các phương pháp xét nghiệm *virus* hiện có. Với hoa nelken người ta đã kiểm tra bằng phương pháp huyết thanh các loài *virus* caruation woltle, caruation latent, caruation ringspot... và xét nghiệm bằng cây chỉ thị *Cheopodium quinoa* và *Vaccara pyramydata* nhằm loại trừ những *virus* ít sinh sản không có biểu hiện nhận biết được. Những cây xác minh được là khoẻ được tiến hành ương cành rồi sau đó đưa vào xử lý nhiệt, tiếp theo 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.

Ngoài phương pháp và quá trình xét nghiệm thì kết quả làm sạch *virus* phụ thuộc nhiều vào trạng thái của cây cần được xét nghiệm, nghĩa là nồng độ *virus* có trong các bộ phận khác nhau, tuổi khác nhau, mùa khác nhau. Muốn bảo đảm xét nghiệm hàng loạt chính xác thì cần phải có nhà nuôi cấy. Nhiệt độ ổn định, tương quan ánh sáng ổn định và cây xét nghiệm phải cùng độ tuổi nhất định với nồng độ *virus* thích hợp cho xét nghiệm, cho phép thu được kết quả xét nghiệm chính xác.

8.4.3. Duy trì tính sạch bệnh 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 được 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 (nucleus clone) của hoa cúc và nelken 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 có thể 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 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 uơm, trước kia chỉ thu được 15 và một cây uơm chỉ cần 11 ngày để ra rễ trong khi 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 *in vitro* thì việc làm sạch *virus* càng phải được coi là điều kiện trước tiên.

Chương 9. MỘT SỐ PHƯƠNG PHÁP CANH TÁC HIỆN ĐẠI

9.1 Thủy canh

9.1.1 Kỹ thuật thủy canh

Thủy canh là kỹ thuật trồng cây không dùng đất mà trồng trực tiếp vào dung dịch dinh dưỡng hoặc các giá thể mà không phải đất. Các giá thể có thể là cát, trấu, rân, vỏ xơ dừa, than bùn, vermiculite pertile...

Kỹ thuật thủy canh là một trong những kỹ thuật tiên bộ của nghề làm vườn hiện đại. Chọn lựa môi trường tự nhiên thích hợp cho cây phát triển là sự sử dụng những chất thích hợp cho sự sinh trưởng và phát triển của cây tránh được sự phát triển của cỏ dại, côn trùng và bệnh tật lây nhiễm từ đất.

9.1.2 Lịch sử phát triển và nghiên cứu kỹ thuật thủy canh

9.1.2.1 Ngoài nước

Kỹ thuật thủy canh đã có từ lâu. Nhưng khoa học hiện đại về thủy canh thực tế đã xuất hiện vào khoảng năm 1936 khi những thử nghiệm của tiến sỹ W.E.Gericke ở trường đại học california được công bố. Ông đã trồng những loại cây trong nước trong đó có cây cà chua trong 12 tháng có chiều cao 7,5 m Gericke công bố khả năng thương mại của ngành thủy canh và đặt tên cho nó là “hydroponics” trong tiếng Hy Lạp là nước và “ponics” có nghĩa là lao động. Vì vậy thủy canh hiểu theo nghĩa đen là làm việc với nước.

Theo những tài liệu ghi chép bằng chữ tượng hình của người Ai Cập trong vài trăm năm trước Công nguyên, đã mô tả lại sự trồng cây trong nước..Sự nghiên cứu trong những năm gần đây nhất cho thấy vườn treo Babilon và vườn nổi Kashmir và tại Aztec Indians của Mexico cũng còn những nơi trồng cây trên bè trong những hồ cạn. Hiện tại vẫn còn nhiều bè trồng cây được tìm thấy ở gần thành phố Mexicô. 1699 John Woodward (người Anh) đã trồng cây trong nước có chứa các loại đất khác nhau.Những năm 60 của thế kỷ 19 Sachs & Knop (Đức) đã sản xuất ra các dung dịch để nuôi cây. Trong những năm 30 của thế kỷ 20 TS.W.F.Gericke(California) đã phổ biến rộng rãi thủy canh ở nước Mỹ. Những nông trại thủy canh di động đã cung cấp thực phẩm rau tươi cho lính Mỹ trong suốt thời gian chiến tranh quân sự tại Nam Thái Bình Dương.

Trong số đó trang trại lớn nhất rộng 22 hecta ở Chofu Nhật Bản. Ngay tại Mỹ, thủy canh được dùng rộng rãi cho mục đích sản xuất kinh doanh hoa như: Cẩm Chướng, Layon, Cúc...

Các cơ sở lớn trồng hoa bằng thủy canh còn có ở Ý, Tây Ban Nha, Anh, Đức & Thụy Điển...

Trong khi đó ở các vùng khô cằn như Vịnh Ả rập, Israel, thủy canh được sử dụng rất phổ biến để trồng rau.

Ở các nước Châu Mỹ La Tinh rau sạch cũng là sản phẩm chính của thủy canh. Hà Lan có hơn 3600 cây trồng không cần đất, Nam Phi có khoảng 400 ha.

Ở Singapore liên doanh Areo green Technology là công ty đầu tiên ở châu Á áp dụng kỹ thuật thủy canh trồng rau trong dung dịch dinh dưỡng, không cần đất và không phải dùng phân hóa học có hại để sản xuất rau với quy mô lớn. Hàng năm Singapore tiêu thụ lượng rau trị giá 260 triệu USD. Vì đất có giới hạn nên hơn 90% rau xanh được nhập khẩu, hiện tại nông trại Areo Green ở Lim Chu Kang trị giá 5 triệu USD đang được thu hoạch khoảng 900 kg rau mỗi ngày.

Nhật Bản đẩy mạnh kỹ thuật thủy canh để sản xuất rau sạch. An toàn thực phẩm là một trong những vấn đề mà người Nhật rất quan tâm, họ luôn lo ngại và thận trọng đối với những phụ gia thực phẩm hay thuốc trừ sâu nông nghiệp. Hơn nữa vì diện tích đất canh tác quá hạn hẹp nên chính phủ Nhật rất khuyến khích và trợ giúp kiểu trồng này, rau sạch sản xuất bằng phương pháp này giá đắt hơn 30% so với rau trồng ở môi trường bên ngoài nhưng tiêu dùng vẫn chấp nhận.

9.1.2.2 Ở trong nước

Việc nuôi trồng thủy canh được biết khá lâu, nhưng chưa được nghiên cứu có hệ thống và được sử dụng để trồng các loại cây cảnh nhiều hơn.

Từ năm 1993, GS.Lê Đình Lương – khoa Sinh học ĐHQG Hà Nội phối hợp với viện nghiên cứu và phát triển Hồng Kông (R&D Hong Kong) đã tiến hành nghiên cứu toàn diện các khía cạnh khoa học kỹ thuật và kinh tế xã hội cho việc chuyển giao công nghệ và phát triển thủy canh tại Việt Nam.

Đến tháng 10 năm 1995 mạng lưới nghiên cứu và phát triển ở Hà Nội, TP.Hồ Chí Minh, Côn Đảo, Sở khoa học công nghệ và môi trường ở một số tỉnh thành. Công ty Golden Garden & Gino, nhóm sinh viên Đại học Khoa học Tự nhiên Thành Phố Hồ Chí Minh với phương pháp thủy canh vài loại rau thông dụng, cải xanh, cải ngọt, xà lách... Phân viện công nghệ sau thu hoạch, Viện Sinh học nhiệt đới cũng nghiên cứu và sản xuất. Nội dung chủ yếu là:

Thiết kế và phối hợp sản xuất các nguyên liệu dùng cho thủy canh.

Nghiên cứu trồng các loại cây khác nhau, cấy truyền từ nuôi cấy mô vào hệ thủy canh trước khi đưa vào đất một số cây ăn quả khó trồng trực tiếp vào đất.

Triển khai thủy canh ở quy mô gia đình, thành thị và nông thôn. Kết hợp thủy canh với dự án rau sạch của thành phố

9.1.3 Ưu điểm và nhược điểm của kỹ thuật thủy canh

9.1.3.1 Ưu điểm của kỹ thuật thủy canh

Kiểm soát dinh dưỡng cây trồng là ưu điểm nhất trong thủy canh vì môi trường dinh dưỡng đã được nghiên cứu kỹ trước khi trồng. Mọi chất dinh dưỡng trong thủy canh thiết cho sự phát triển và phát sinh cây trồng đều nhất thiết phải được kiểm soát ở nồng độ thích hợp cho từng loại cây trồng và từng loại môi trường hơn nữa một số nguyên tố gây hại cho cây khi ở mức dư lượng được khống chế ở giới hạn an toàn hoặc dùng nguyên tố khác loại bỏ.

Không cần đất, chỉ cần không gian đặt hộp dụng cụ trồng, do vậy có thể triển khai ở những vùng đất cằn cỗi như hải đảo, vùng núi xa xôi, cũng như tại gia đình trên sân thượng, balcon.

Trồng được nhiều vụ, có thể trồng trái vụ.

Không phải sử dụng thuốc trừ sâu bệnh và các hóa chất độc hại khác.

Năng suất cao vì có thể trồng liên tục.

Sản phẩm hoàn toàn sạch, giàu dinh dưỡng, đồng nhất và hoàn toàn tươi ngon.

Không tích lũy chất độc và gây ô nhiễm môi trường.

Không đòi hỏi lao động nặng nhọc, người già, trẻ em đều có thể tham gia hiệu quả do không phải làm đất, không có cỏ dại, không cần tưới.

Dễ dàng khử trùng vì các giá thể có tính trơ về mặt hóa học nên việc lưu giữ chất dinh dưỡng trong khi trồng không có nên khử trùng bằng formandehyt hoặc thuốc tẩy và rửa lại bằng nước sạch còn nếu giá thể là than bùn và các thì khử trùng bằng xông hơi và cho tái sử dụng.

Dễ dàng tưới tiêu là ưu điểm lớn nhất so với phương pháp trồng trọt truyền thống được áp dụng trong kỹ thuật màng dinh dưỡng và trồng cây trong nước nhờ sử dụng hệ thống ống phun và ống đục lỗ.

9.1.3.2 Nhược điểm của kỹ thuật thủy canh

Chỉ trồng các loại cây rau, quả ngắn ngày.

Giá thành sản xuất còn cao.

Vốn đầu tư ban đầu cao do chi phí về trang thiết bị. Tuy nhiên, chi phí này không cao so với những chi phí về thuốc trừ sâu bệnh và côn trùng, thêu công nhân. Hơn nữa các máy móc được tái sử dụng nhiều lần nên chỉ tốn chi phí đầu tư ban đầu.

Đòi hỏi trình độ chuyên môn kỹ thuật cao để sản xuất có hiệu quả. Điều này gây cản trở cho việc mở rộng phương pháp thủy canh đại trà.

Trong quá trình hấp thu chất dinh dưỡng thực vật làm thay đổi pH trong dịch thủy canh. Do đó cần phải điều chỉnh pH 2-3 lần/tuần. Giá trị pH thích hợp 5,8-6,5. Giá trị pH lệch khỏi khoảng này thì mức độ ảnh hưởng lớn đến sự hấp thu chất dinh dưỡng.

Khi cây hấp thu chất dinh dưỡng và nước từ dung dịch, độ dẫn điện (EC) thay đổi. Độ dẫn điện thể hiện độ đậm đặc của dung dịch dinh dưỡng. Giá trị EC tốt nhất khoảng 1,5-2,5 dS/m. Giá trị EC cao sẽ ngăn cản sự hấp thu dung dịch dinh dưỡng do áp suất thẩm thấu thấp. Giá trị EC thấp sẽ ảnh hưởng đến sức khỏe và sản lượng của cây.

Ngoài ra, những thay đổi đột ngột các yếu tố môi trường cũng như việc cung cấp dinh dưỡng và tưới nước không đúng có thể gây ra những rối loạn sinh lý ở cây.

9.1.4 Chất dinh dưỡng

9.1.4.1 Nhu cầu - nhiệm vụ của một số chất và khoáng chất quan trọng

Những nguyên tố cần thiết cho sự sinh trưởng và phát triển thích hợp là O, H, N, C, S, Mg, Mn, Fe, Cu, Zn, Bo, Mo. Một số nguyên tố thì chỉ cần với số lượng rất ít, tuy nhiên một trong các nguyên tố đó có thể trở thành một nhân tố giới hạn đối với sự lành mạnh của cây. Nhiều nguyên tố được tìm thấy trong các enzyme và co-enzymes (các chất này lại là nhân tố điều chỉnh các hoạt động sinh hóa), trong khi những chất khác thì quan trọng đối với sự tích trữ thức ăn. Sự thiếu hụt bất kỳ một nguyên tố nào đều thể hiện ra với những triệu chứng và đặc thù riêng, có thể cho ta biết cây đang thiếu loại nguyên tố nào.

Carbon và Oxy được cung cấp bởi không khí dạng CO₂. Mặc dầu, tỷ lệ khí CO₂ trong khí quyển thấp (0,03%) nhưng lượng này trong khí quyển cũng đã rất lớn. Ngay cả khi thực vật đã tiêu thụ một lượng lớn, nhưng lượng này vẫn luôn giữ không đổi. Khí CO₂ được xâm nhập vào cơ thể sinh vật qua quang hợp hay hòa tan trong nước.

9.1.4.2 Các nguyên tố

❖ Oxy (O₂)

O₂ đóng vai trò quan trọng đối với sự sinh trưởng và phát triển của cây, do chức năng tham gia vào quá trình hô hấp.

Chức năng sống có thể bị ngừng lại nếu như không có quá trình hô hấp. Cây hấp thụ O₂ từ khí quyển, qua lá, và từ nước thông qua rễ. Thông thường thì không có vấn đề

gì xảy ra trong quá khi hấp thụ O_2 từ lá nhưng khi hấp thụ qua rễ có thể bị giảm sút nếu như rễ mọc trong nước không được thoáng khí không thể vào được.

❖ Hydro (H_2)

Cây hấp thụ H_2 hầu hết là từ nước, thông qua quá trình thẩm thấu ở rễ. Nó rất quan trọng vì chất béo và cacbohydrat đều có thành phần chính là H, cùng với O và C. Những nhà thủy canh học sẽ nhanh chóng nhận thấy tầm quan trọng của H_2 , khi đo độ pH của dung dịch dinh dưỡng. Nó phải ở trong phạm vi cho phép, những giá trị này được xác định tùy theo nhu cầu từng loại cây trồng. Tính acid của môi trường phụ thuộc vào lượng ion H^+ , còn lượng tính kiềm tùy thuộc vào lượng ion OH^- .

9.1.4.3 Nguyên tố đa lượng

Hiện diện vài phần nghìn đến vài phần trăm ($10^{-3} - 10^{-2}$ g/gr trọng lượng khô).

Bao gồm: N:1-3%; K:2-4%; Ca:1-2%; Mg:0,1-0,7%; S:0,1-0,6%; P:0,1-0,5%

Có thể xếp Cl, Na, Si vào nhóm nguyên tố đa lượng vì chúng có hàm lượng rất thay đổi tùy thuộc vào loại thực vật.

❖ Nitơ (N_2)

Là thành phần bắt buộc của protit chất đặc trưng cho sự sống. Nó có trong thành phần men, trong màng tế bào, trong diệp lục tố mang chức năng cấu trúc.

Các hợp chất Nitơ còn cung cấp năng lượng cho cơ thể.

Nitơ có ý nghĩa rất quan trọng đối với sự sống thực vật. Nitơ tồn tại dưới hai dạng: dạng khí Nitơ tự do trong khí quyển (N_2) và dạng hợp chất Nitơ hữu cơ, vô cơ khác nhau. Nitơ là yếu tố dinh dưỡng đóng góp rất quan trọng trong việc điều tiết quá trình sinh lý, trao đổi chất của cây.

Nitơ còn là thành phần của nhiều vitamin B_1 , B_2 , B_6 , PP... đóng vai trò là nhóm hoạt động của nhiều hệ enzym oxy hóa khử, trong đó có sự tạo thành của adenin (Bonner, 1996).

Nitơ còn có tác động nhiều mặt đến sự đồng hóa CO_2 , khi thiếu Nitơ cường độ đồng hóa giảm làm giảm cường độ quang hợp. Khi cung cấp đầy đủ Nitơ cho cây làm tổng hợp auxin tăng lên (Phạm Đình Thái, 1980). Nitơ còn ảnh hưởng đến chỉ số hóa keo của chất sống như độ ưa nước, độ nhớt... từ đó ảnh hưởng đến cường độ quang hợp, hô hấp và các quá trình sinh lý trao đổi chất. Dạng sử dụng Urê (NH_4)₂, SO_4 , NH_4 , NO_3 ...

Nếu cây hấp thụ N_2 vượt quá nhu cầu thì thân cây sẽ mềm yếu và khó hình thành hoa. Tuy nhiên, nếu không cung cấp đủ lượng cần thiết cây sẽ bị cứng do thừa xenlulo và lignin ở thành tế bào.

Cây trồng hấp thụ N_2 từ môi trường dinh dưỡng và từ khí quyển. Ở cây cà chua

trong giai đoạn sinh trưởng sinh dưỡng cần một lượng N_2 vừa đủ (giai đoạn đầu tiên từ 2-3 tháng sau khi trồng), thân cây sẽ phát triển cứng cáp. Khi cây đã phát triển cành để đậu quả và khi trái chín thì nhu cầu N_2 sẽ cao.

Nitơ là nguyên tố duy nhất, mà cây trồng có thể hấp thụ ở cả dạng anion và cation. Một vài hỗn hợp dinh dưỡng tồn lẫn một lượng lớn NO_3^- và một lượng nhỏ NH_4^+ . Với NH_4^+ , ion H^+ được giải phóng ra từ rễ và làm tăng tính acid của môi trường. Đối với N_2 cung cấp từ NO_3^- , môi trường dinh dưỡng có tính kiềm, vì ion OH^- sẽ giải phóng ra từ rễ sẽ làm cho môi trường dinh dưỡng cân bằng tính điện.

Ở môi trường trồng cà chua khi bị giảm pH thì nguồn NH_4^+ được sử dụng, còn pH tăng khi tất cả các nguồn NO_3^- được sử dụng, độ pH sẽ được giữ không đổi khi người trồng điều chỉnh nguồn N_2 thích hợp. Tuy nhiên, cũng phải tiến hành chăm sóc để chắc chắn cân bằng giữa NO_3^- và NH_4^+ không đổi. Tỷ lệ 50/50 gây ngộ độc NH_4^+ . Tỷ lệ NO_3^- và 25% NH_4^+ thì được một số người trồng cây chấp nhận hơn, trong khi một số khác lại thích tỷ lệ 90%-10% hơn.

Khi thiếu Nitơ thì thân lá, bộ rễ sẽ kém phát triển, lá có màu xanh nhạt, phiến lá mỏng, ảnh hưởng đến quang hợp nên năng suất giảm rõ rệt.

❖ Photpho (P)

P là thành phần quan trọng trong sự sinh trưởng, P cần thiết cho sự phân chia tế bào, sự tạo hoa và trái, sự phát triển của rễ. P có liên quan đến trong sự tổng hợp đường, tinh bột vì P là thành phần của các hợp chất cao năng tham gia vào các quá trình tổng hợp hay phân giải các chất hữu cơ trong tế bào.

Sau khi P thâm nhập vào thực vật dưới dạng các hợp chất vô cơ (P_2O_5 , KH_2PO_4 ...) theo con đường đồng hóa sơ cấp P bởi hệ rễ đã tham gia vào hầu hết các quá trình trao đổi chất của cây. P đóng vai trò quyết định sự biến đổi vật chất và năng lượng mà mối liên quan tương hỗ của các biến đổi đó qui định chiều hướng, cường độ các quá trình sinh trưởng, phát triển của cơ thể thực vật và cuối cùng năng suất của chúng.

Khi thiếu P cây có biểu hiện rõ rệt về hình thái bên ngoài, là năng suất giảm. Đối với những cây họ hòa thảo khi thiếu P là mềm yếu, sự sinh trưởng của rễ, sự đẻ nhánh, phân cành kém. Lá cây có màu xanh đậm do sự thay đổi tỉ lệ diệp lục tố a và diệp lục tố b. Ở những lá già thì ở đầu mút lá và thân có màu đỏ, hàm lượng protein trong cây giảm, hàm lượng N_2 hòa tan tăng.

Đối với cây ăn quả, thì tỉ lệ đậu quả kém, quả chín chậm, trong quả có hàm lượng acid cao. Biểu hiện triệu chứng thiếu ở lá già trước.

Ở môi trường có pH thấp (acid) nhiều Fe thì dễ bị thiếu P vì làm P ít linh động.

Sự thiếu P thường đi đôi với sự thiếu N_2 và có triệu chứng gần tương tự nhau vì P

lên hệ đến sự biến dưỡng N_2 .

❖ **Kali (K):**

K làm thúc đẩy quá trình quang hợp và thúc đẩy sự vận chuyển glucid từ phiến lá vào các cơ quan. Kali còn tác động rõ rệt đến trao đổi protit, lipit, đến quá trình hình thành các vitamin.

K rất dễ xâm nhập vào tế bào, làm tăng tính thấm của thành tế bào đối với các chất khác, tăng quá trình thủy hóa, giảm độ nhớt, tăng lượng nước liên kết. K ảnh hưởng tích cực đến quá trình đẻ nhánh, hình thành bông và chất lượng hạt của cây ngũ cốc.

K rất cần thiết cho sự sinh trưởng và nó đóng vai trò quan trọng trong việc duy trì chất lượng quả. Ở cây cà chua có hàm lượng K cao sẽ làm cho quả rắn chắc, phần thịt quả sẽ được giữ cứng trong một thời gian dài, ngay cả khi hái quả vào giai đoạn chín. Với lượng K khoảng 300 ppm, thì quả bảo quản được 25 ngày, nếu lượng K khoảng 200 ppm thì chỉ bảo quản được 20 ngày.

Tuy nhiên, vấn đề là khi tăng hàm lượng K thì lại gây ảnh hưởng đến quá trình hấp thụ Mg. Nếu K quá cao, thì cần phải sử dụng phương pháp phun $MgSO_4$ trên lá. Nguồn K được sử dụng nhiều nhất là hợp chất KNO_3 , mặc dù K_2SO_4 đôi khi vẫn được sử dụng nhưng chỉ với mục đích là giảm nồng độ của nitơ.

Trong nhiều nghiên cứu của các nước có khí hậu bốn mùa rõ rệt thì trong suốt mùa đông, khi mà cả thời gian dài chỉ có mây, K có thể được sử dụng với nồng độ cao hơn mùa hè. Tuy nhiên, khi sử dụng KNO_3 , lượng N_2 dư thừa cần phải được tính toán. Nếu quá nhiều N_2 quá mức cho phép, nồng độ đường sẽ bị giảm và quả sẽ có vị nhạt.

Kali giúp cho việc tăng tính chống chịu của cây với nhiệt độ thấp, khô hạn và bệnh.

Khi thiếu K thì sự tích tụ amoniac cao gây độc hại cho cây, là biểu hiện ở lá có màu xanh dương sẫm, đọt bị cháy hay có đốm màu nâu, có khi lá cuộn lại, thường xuất hiện ở lá già trước. Có triệu chứng khác như chồi cần cỗi, cây chết, không trở hoa, rễ kém phát triển, lóng ngắn.

Sử dụng K dưới dạng KCl, $KHCO_3$, K_2HPO_4 , KNO_3 , K_2SO_4 ...

❖ **Canxi (Ca)**

Canxi là thành phần muối pectat của tế bào (pectat calcium) có ảnh hưởng trên tính thấm của màng. Trong tế bào Ca hiện diện ở không bào, mô già ở lá nhiều Ca hơn ở lá non.

Ca cần cho sự thâm nhập của NH_4^+ và NO_3^- vào rễ, khi môi trường đất có pH thấp (3-4) thì ion Al^{3+} thường bị keo đất hấp thụ sẽ phóng thích ra môi trường và đầu độc rễ.

Ca là ion kém linh động nên màng tế bào thực vật ngoại hấp thụ dễ dàng. Khi

nồng độ Ca cao trong môi trường thì Fe bị kết tủa cho nên các chất này giảm hoặc không di chuyển vào trong tế bào, kết quả lá bị vàng (vì Fe là thành phần cấu tạo của diệp lục tố). Ca còn là chất hoạt hóa của vài enzym nhất là ATPase. Ca cần với một khối lượng lớn cho thân và rễ. Ca cũng cần cho sự hút N_2 . Ca không được hấp thụ như những nguyên tố khác nên bất kỳ sự thiếu hụt nào cũng biểu hiện rất nhanh ở trên những lá non.

Lượng thấp Ca cũng gây ảnh hưởng đến kích thước của trái. Sản lượng thu hoạch sẽ bị giảm rất đáng kể nếu như lượng Ca xuống rất thấp dưới 100 ppm. Nồng độ trên 100 ppm sản lượng cũng không thấy tăng lên.

Khi thiếu Ca, đặc biệt trong môi trường thủy canh thì rễ sẽ bị nhầy nhụa đưa đến sự hấp thụ chất dinh dưỡng bị trở ngại, cây ngừng sinh trưởng phát triển và chết. Biểu hiện thiếu ở ngọn chồi lá non thường bị xoắn, lá bị tua cháy bìa lá, thân cuống hoa gãy, sinh trưởng bị chết.

Ca còn là chất đối kháng của ion K^+ . Sử dụng Ca^{2+} dưới dạng $Ca(NO_3)_2$, $CaCl_2$, $CaSO_4$...

❖ **Manhê (Mg)**

Là thành phần cấu trúc của diệp lục tố, có tác dụng sâu sắc và nhiều mặt đến quá trình quang hợp, phụ trợ cho nhiều enzym đặc biệt ATPase liên quan trong biến dưỡng carbohydrat, sự tổng hợp acid nucleic, sự bắt cặp của ATP với các chất phản ứng.

Khi thiếu Mg lá bị vàng, quang hợp kém dẫn đến năng suất giảm. Sử dụng Mg dưới dạng $MgSO_4$, H_2O , MgO .

9.1.4.4 Nguyên tố vi lượng

Các nguyên tố vi lượng có vai trò quan trọng trong đời sống thực vật. Hàm lượng các nguyên tố này trong mô thực vật biến động trong khoảng một phần nghìn đến một phần trăm nghìn. Các nguyên tố vi lượng tham gia vào quá trình oxy hoá khử, quang hợp, trao đổi chất nitơ và glucit của thực vật, tham gia vào Các trung tâm hoạt tính của enzym và vitamin, tăng tính chống chịu của cơ thể thực vật đối với các điều kiện môi trường bất lợi. Sự thiếu hụt của các nguyên tố vi lượng có thể gây ra nhiều bệnh và không hiếm những trường hợp cây chết ở tuổi cây non.

Các nguyên tố như Cu, Bo, Zn, và Mo cần thiết nhưng chỉ cần với lượng rất nhỏ. Những nguyên tố này có ảnh hưởng đến sinh trưởng và phát triển của cây.

❖ **Kẽm(Zn)**

Tham gia trong quá trình tổng hợp auxin, vì Zn có liên quan đến hàm lượng triptophan aminoaxit tiền thân của quá trình tổng hợp NAA.

Zn còn là chất hoạt hoá của nhiều enzym dehydrogenaza, có thể có vai trò trong quá trình tổng hợp protein.

Zn có tác dụng phối hợp với nhóm GA₃. Zn có liên quan đến sinh tổng hợp vitamin nhóm B₁, B₂, B₆, B₁₂. Ngoài ra còn ảnh hưởng tốt đến độ tổng hợp carotenoid.

Zn còn thúc đẩy sự vận chuyển các sản phẩm quang hợp từ lá xuống cơ quan dự trữ, tăng khả năng giữ nước, độ ngậm nước của mô do làm tăng quá trình tổng hợp các cao phân tử ưa nước như protein, axit nucleic.

Sử dụng Zn dưới dạng ZnSO₄.7H₂O.

❖ Lưu huỳnh (S)

Giữ vai trò đệm trong tế bào (trao đổi anion với các tế bào)

Sử dụng S dưới dạng (MgSO₄, 7H₂O, FeSO₄) amonium sulfat (NH₄)SO₄.

❖ Sắt (Fe)

Có vai trò quan trọng trong phản ứng oxi hoá khử, là nhân của pơoc phyrin, Fe tham dự trong chuyển điện tử ở quan hợp (Ferodoxin và khử nitric).

Sử dụng Fe ở dạng chelat Fe là tốt nhất hoặc FeSO₄.7H₂O hay Fe- EDTA (Etylendiamin tetra acetat) cung cấp khoảng 13,2% Fe. Một vài loại chelat có thể ở mức dưới 7%.

❖ Đồng (Cu)

Gần giống vai trò của Fe, là thành phần cấu trúc nhiều enzym xúc tác của phản ứng oxi hoá khử, can thiệp vào các phản ứng oxy hoá cần O₂ phân tử.

Sử dụng Cu dưới dạng CuSO₄.5H₂O.

❖ Mangan (Mn)

Ảnh hưởng của Mn đối với cây trồng khá giống Fe, ngoại trừ bệnh vàng lá không xuất hiện ở các lá non, như trong trường hợp. Có một vài dấu hiệu có sự ảnh hưởng lẫn nhau giữa các lượng khác nhau Fe và Mn và cần phải phòng ngừa trước để chắc chắn rằng sự cân đối giữa Mn và Fe là không đổi trong giới hạn để cây trồng phát triển tốt nhất.

❖ Silic (Si)

Chống lại sự tấn công trungcôn trùng và bệnh tật.

Chống lại tác dụng độc của kim loại.

Vì những lí do nêu trên nên việc thêm Si (khoảng 0.1mM) vào dung dịch thủy canh cho tất cả cây trồng là cần thiết.

Bảng 9.1 Các chất khoáng chủ yếu và vai trò của chúng đối với sự phát triển cây trồng, những dấu hiệu thiếu và dư thừa chất khoáng

Chất Khoáng chủ yếu	Dấu hiệu thiếu chất khoáng	Dấu hiệu thừa chất khoáng
Nitơ (nitrat, Amoni)	Cây mảnh khảnh, lá nhỏ và hơi vàng. Các phần của cây có thể có màu tím. Các lá non của cây cà chua dựng thẳng. Lá dâu già có màu đỏ	Cây trồng rất khỏe, lá rậm có màu xanh sẫm, quả chín chậm. Dễ bị mắc bệnh. Dư NH_3 có thể gây hỏng rễ nếu vi khuẩn cố định đạm không thích hợp.
Kali	Cây phát triển chậm, lá có đốm nâu. Hoa ít và cây có nấm	Bất thường hấp thụ chất độc. Sự thiếu mangan có thể xảy ra
Phospho	Cây trồng nhỏ và xanh xẫm. Lá ở phía dưới vàng và có màu hơi tím vì phospho ra khỏi lá để phát triển lá mới, Lá quăn lại và rủ xuống. Quả ít và hệ thống rễ giảm	Không độc. Có khả năng giảm lượng đồng và kẽm.
Canxi	Cây còi, lá nhăn. Các phần non chết và rụng hoa. Thiếu canxi cây cà chua có thể có vết nâu trên hoa. Các vết này có thể phân rã (hoa thối rữa), đặc biệt thời tiết nóng.	Không có sự thay đổi đặc biệt nào.
Lưu huỳnh	Lá non bị vàng và đổi thành màu tím ở các phần cơ bản của lá	Phát triển chậm và lá nhỏ
Sắt	Hạn chế sự phát triển các cành mới và rụng hoa. Ban đầu màu vàng ở giữa gân lá và lá có thể mất viền. Sự thiếu hụt sắt có thể xảy ra ở cây cà chua.	Rất hiếm. Thường thấy như các vết đen sau khu phun chất dinh dưỡng
Magie	Lá già quăn và xuất hiện màu vàng giữa các gân lá. Chỉ các lá non còn màu xanh.	Không được mô tả.
Bo	Thân cây giòn và chậm phát triển. Thân cây cà chua có thể bị quăn hoặc đôi khi bị nứt.	Đầu lá bị vàng và khô
Mangan	Xuất hiện vàng lá ở giữa các gân và các chồi.	Có khả năng giảm lượng sắt
Kẽm	Đôi khi lá nhỏ bị gấp mép	Có khả năng giảm lượng sắt

Molipđen	Lá nhỏ ngã màu vàng	Lá cà chua có thể có màu vàng
Đồng	Lá bị đốm vàng	Có khả năng giảm lượng sắt

9.1.5 Môi trường thủy canh

9.1.5.1. Sự pha chế dung dịch dinh dưỡng

Một khi giá thể không đóng vai trò gì vào sự sinh trưởng và sản lượng thu hoạch, thì tất cả các chất dinh dưỡng đều thêm vào trong nước. Bản thân nước cung cấp cho cây cũng có một vài chất khoáng hòa tan có ích cho cây. Các chất khoáng được sử dụng trong môi trường bắt buộc phải được hoà tan hoàn toàn trong nước, nếu thêm bất kì chất nào mà không tan trong nước thì không có tác dụng gì đối với cây.

Trong thủy canh tất cả các chất cần thiết cung cấp cho cây đều được sử dụng dưới dạng các muối khoáng vô cơ được hoà tan trong dung môi là nước.

Điều đáng chú ý là nếu sử dụng các môi trường dinh dưỡng với dạng nước thì phải nắm rõ nguyên tắc pha chế để chúng không bị kết tủa làm mất tác dụng của hoá chất. Ví dụ: Ca và P nằm gần nhau thì bị kết tủa, Fe phải được pha riêng. Trong thủy canh, các chất khoáng được sử dụng phải có độ hoà tan cao, tránh lẫn các tạp chất. Môi trường dinh dưỡng đạt yêu cầu cao khi có sự cân bằng về nồng độ ion khoáng sử dụng trong môi trường để đảm bảo độ pH ổn định từ 5.5-6.0 độ là độ pH mà đa số cây trồng sinh trưởng phát triển tốt.

Sự thành công hay thất bại của việc trồng thủy canh phụ thuộc vào việc xử lý chất dinh dưỡng, điều này có thể đạt được tùy thuộc độ pH, nhiệt độ và độ dẫn điện của môi trường ...

9.1.5.2 Nhiệt độ

Dao động về nhiệt độ trong môi trường dinh dưỡng ở thủy canh không chỉ tác động đến pH mà còn ảnh hưởng đến các chất hoà tan của các dưỡng chất.

Nghiên cứu về nhiệt độ của nước đối với sự hoà tan của các khoáng chất sử dụng thì nhiệt độ thích hợp là khoảng 20⁰C-22⁰C. Nếu nhiệt độ thấp hơn nhiệt độ trên thì các chất khó hoà tan được.

9.1.5.3 Bổ sung chất dinh dưỡng

Hai yếu tố cần được xem xét để nghiên cứu một dung dịch bổ sung :

- Thành phần dung dịch.
- Nồng độ dung dịch.

Trong thời gian sinh trưởng và phát triển của cây, sẽ sử dụng các chất dinh dưỡng theo nhu cầu đòi hỏi của chúng.

Đối với các loại cây có thời gian sinh trưởng tương đối dài thì việc bổ sung dinh dưỡng là rất cần thiết.

Trong nghiên cứu người ta có thể dựa vào giá trị dẫn điện (EC: electro\ conductivity); sự phân huỷ của muối khoáng (TDS: Total dissolved salts) hoặc nhân tố hoà tan (CF: conductivity factor) của các máy đo để điều chỉnh bổ sung chất dinh dưỡng vào môi trường thủy canh.

Trong suốt quá trình tăng trưởng, cây hấp thụ khoáng chất mà chúng cần, do vậy duy trì EC ở một mức là ổn định là rất quan trọng.

Nếu dung dịch có chỉ số EC cao thì sự hấp thụ nước của cây diễn ra nhanh hơn sự hấp thụ khoáng chất, hậu quả là nồng độ dung dịch sẽ rất cao và gây độc cho cây. Khi đó ta phải bổ sung thêm nước vào môi trường. Ngược lại, nếu EC thấp, cây sẽ hấp thụ khoáng chất nhanh hơn hấp thụ nước và khi đó ta phải bổ sung thêm khoáng chất vào dung dịch.

❖ **DO (Dissolved oxygen) :**

DO là đơn vị dùng để đo lượng oxigen hoà tan trong 1 lít nước, đơn vị (mg/l). Đo DO để biết độ thoáng khí của môi trường dinh dưỡng. Chỉ số DO cao thuận lợi cho hoạt động hô hấp và biến dưỡng của hệ rễ.

DO phụ thuộc vào nhiệt độ, áp suất và độ mặn của dung dịch.

Một số giới hạn EC và TDS đối với một số loại cây trồng:

	EC (mS/cm)	TDS (ppm)
Cẩm chướng	2.4 - 5.0	1400 - 2450
Địa lan (Cymbidium)	0.6 - 1.5	420 - 560
Hoa hồng	1.5 - 2.4	1051 - 1750
Cà chua	2.4 - 5.0	1400 - 3500
Xà lách	0.6 - 1.5	280 - 1260
Xà lách soong	0.6 - 1.5	280 - 1260
Cây chuối	1.5 - 2.4	1260 - 1540
Cây dứa	2.4 - 5.0	1400 - 1680
Dâu tây	1.5 - 2.4	1260 - 1540
Ớt	1.5 - 2.4	1260 - 1540

9.1.6 Các yếu tố môi trường ảnh hưởng trên sự sinh trưởng và phát triển của cây trồng thủy canh

9.1.6.1 Ảnh hưởng nồng độ CO₂

CO₂ cùng H₂O tham gia tổng hợp chất hữu cơ.

CO₂ tác dụng với nước cho H₂CO₃ trong nước giảm thì bicarbonat hoà tan trong nước phân giải thành carbonat kết tủa, CO₂ và H₂O.

Khi hàm lượng CO₂ cao hơn ngưỡng thì một phần CO₂ trở thành hoạt hoá và kết hợp với carbonat chuyển thành dạng bicarbonat hoà tan làm cho độ cứng của nước tăng lên.

Khi hàm lượng CO₂ trong nước tăng lên một ít thì làm tăng cường độ quang hợp, quá trình phát triển của bộ phận trên không thuận lợi nhưng khi CO₂ trong nước tăng thì ảnh hưởng lớn đến hô hấp của hệ rễ.

Hệ thống carbonat không chỉ nguồn dinh dưỡng mà là chất đệm để giữ nồng độ hydro trong môi trường nước ở gần với giá trị trung tính.

9.1.6.2 Ảnh hưởng của độ thoáng khí đến sự hút chất dinh dưỡng

Trừ nhóm sinh vật kị khí bắt buộc, còn lại các sinh vật khác đều cần oxy để hô hấp.

Trong thành phần khí quyển, oxy chiếm khoảng 21% thể tích, trong không khí và oxy có khối lượng lớn dễ được sinh vật hấp thu.

Trong khi đó trong đất và trong nước việc hấp thu O₂ khó hơn, nó phụ thuộc vào cấu trúc của đất, chế độ canh tác, hệ vi sinh vật...

Nguồn O₂ trong nước là do O₂ khuếch tán từ không khí (sự chuyển động của nước), nhưng bằng cách này O₂ khuếch tán vào nước chậm. Hoà tan ít vào trong nước là thuộc tính của O₂.

Các nghiên cứu đã thấy sự hút các chất khoáng đạt mức cao nhất ở môi trường có nồng độ O₂ từ 2 – 3%. Khi nồng độ O₂ dưới 2% tốc độ hút khoáng giảm. Nhưng nếu tăng nồng độ O₂ từ 3 – 10% thì tốc độ hút khoáng cũng không thay đổi.

Ảnh hưởng của nồng độ CO₂, N₂, H₂S và pH môi trường: Sự tích lũy N₂, H₂S và các khí khác trong đất ngập úng có tác động ức chế hoạt động hút khoáng của hệ rễ.

9.1.6.3 Ảnh hưởng của sự ngập úng đối với hệ rễ

Sự thiếu O₂ trong vùng rễ xảy ra khi đất thoát nước kém sau cơn mưa hoặc sau khi tưới, gây giảm tăng trưởng và giảm năng suất ở cây trên cạn.

Các tế bào vùng sinh mô ngọn rễ cần phải sống để có sự phát triển tiếp tục những thay đổi biến dưỡng trong điều kiện thiếu O₂ giúp di trì sự sống tế bào bằng cách sản sinh ATP trong điều kiện kị khí và giảm tối thiểu axit hoá tế bào chất.

Mặc dù mọi thực vật bậc cao cần có nước tự do, nhưng nếu quá nhiều nước trong môi trường, rễ cây trên cạn có thể bị tổn hại thậm chí gây chết vì nó ngăn cản sự trao đổi di chuyển của oxy và các khí khác, giữa đất và khí quyển.

Khi bị ngập thời gian ngắn, rễ cây bị thiếu O₂ do O₂ hoà tan vận chuyển chậm trong những khe đất đầy nước. Khi đất ẩm lên sự hô hấp của vi sinh vật được kích thích

thì O_2 có thể bị cạn kiệt hoàn toàn trong vòng 24 giờ và rễ chuyển từ điều kiện thông khí sang môi trường kỵ khí. Người ta đã biết về những ảnh hưởng bất lợi của sự ngập nước trên sự phát triển cũng như năng suất của nhiều cây trồng. Trong khi đó những loài ưa nước lại phát triển tươi tốt trong điều kiện thiếu O_2 như vậy. Phải chăng có một sự khác biệt căn bản về sinh hoá học giữa những loài “chịu ngập” và những loài “không chịu ngập”. Nên sự hiểu biết khác biệt này có thể khai thác qua con đường sinh học phân tử chọn cây trồng, phát triển nuôi trồng những thực vật mà nó có thể chịu được những thời gian thiếu O_2 lâu hơn.

9.1.6.4 Ảnh hưởng của nhiệt độ đến sự hút khoáng.

Tất cả mọi quá trình sống đều có sự phụ thuộc vào nhiệt độ cho nên không thể tách riêng tác dụng của nhiệt độ lên quá trình hút chất khoáng ở rễ. Theo wall, 1931 thì nhiệt độ ảnh hưởng đến quang chu kỳ, nếu nhiệt độ tăng từ $15.5 - 21.1^\circ C$ thì độ dài của quang chu kỳ cũng tăng lên. Nhiệt độ cao thường làm giảm khả năng đậu quả.

9.1.6.5 Ảnh hưởng của ánh sáng đến sự hút khoáng.

Ánh sáng ảnh hưởng mạnh đến sự hút khoáng. Nếu để cây bắp trong tối 4 ngày thì khả năng hấp thụ P không xảy ra, và khả năng này sẽ phục hồi dần khi đưa cây bắp ra ngoài ánh sáng. Ánh sáng ảnh hưởng mạnh đến khả năng hấp thụ NH_4^+ , SO_4^{2-} tăng mạnh trong khi đó sự hấp thụ Ca và Mg ít thay đổi. Nhìn chung tác động của ánh sáng liên quan đến quang hợp, trao đổi nước và tính thấm thấu của chất nguyên sinh.

9.1.6.6 Ảnh hưởng của nấm bệnh trong dung dịch thủy canh.

Nấm là loại bệnh nghiêm trọng mà chúng ta gặp trong hệ thống này, rất hiếm khi thấy bệnh, khi tất cả các phần trong hệ thống được giữ gìn sạch sẽ. Các nhà nghiên cứu bệnh lý học thực vật cho rằng điều kiện vệ sinh như là một phương thức điều khiển tốt nhất.

Nhiều tác giả cũng nhận thấy nếu lượng Mn bị thiếu hụt sẽ làm cây dễ bị nhiễm nấm. một thí nghiệm ngẫu nhiên đã sử dụng $MnCl_2$ thay cho $MgCl_2$ trong dung dịch vi lượng.

Trong suốt thời gian thí nghiệm có một vài hệ thống nhiễm nấm nhưng các hệ thống tương tự không bao giờ nhiễm khi có đủ Mn. Co (cobalt) cũng có khả năng đàn áp sự phát triển của vi khuẩn nhưng nếu tăng lượng Co sẽ gây độc tố cho cây. Mangan và Zn cũng có khả năng này nhưng ít gây độc hơn. Để giảm thiểu sự phát triển của nấm bệnh cần tăng lượng Mn cao hơn mức tối thiểu cần cho cây phát triển.

9.1.6.7 Ảnh hưởng của các giá thể nuôi trồng thủy canh.

Giá thể trồng cây phải có nhiều tính chất giống đất, phải có chỗ dựa cho hệ thống rễ, tạo điều kiện cho rễ mọc dài ra để tìm nước và chất dinh dưỡng cho sự sinh trưởng và phát triển của cây.

Có nhiều vật liệu thích hợp có thể sử dụng làm giá thể trong thủy canh. Việc lựa chọn một giá thể nào đó phụ thuộc vào các yếu tố bao gồm giá tiền, hiệu quả, cân nặng, tỉ lệ xốp, tính đồng đều và bền vững, tính vô trùng cao, bền và có khả năng tái sử dụng được. Giá thể phải không chứa các vật thể gây độc có thể gây ảnh hưởng tới môi trường dinh dưỡng, và độ pH của môi trường.

Khả năng hút nhiệt cũng là một tính quan trọng. Giá thể có màu đen bị nóng nhanh hơn khi phơi ngoài sáng, làm cho nhiệt độ tăng lên ở xung quanh rễ. Giá thể như Perlite, vermiculite và đất sét là những vật liệu cách nhiệt, tăng và giảm nhiệt độ chậm hơn so với sỏi.

Người ta sử dụng nhiều cơ chất khác nhau trong nuôi trồng thủy canh. Tuy nhiên một trong số những đòi hỏi duy nhất của việc nghiên cứu đó là rễ cây phải dễ dàng tách ra khỏi môi trường. Than bùn, perlite và vermiculite là những cơ chất tốt, nhưng rễ thường đâm sâu trong môi trường nên sẽ gặp khó khăn trong việc nghiên cứu kích thước, hình thái của rễ. Đối với môi trường cát, ta dễ dàng lấy rễ ra nhưng rễ phát triển trong cát thường ngắn và ốm hơn trong môi trường thủy canh vì cát chặt hơn. Cây phát triển trong cát ít tồn hơn trong những cơ chất khác, có lẽ vì sự phát triển kém. Trong nhiều năm qua, người ta thường dùng đất nung (hay còn gọi là Turface, Profil, Arcillite) Để nghiên cứu thủy canh vì loại nó ra khỏi đất rất dễ. Tuy nhiên đất có hai bất lợi:

Không có tính trơ về mặt hoá học. Những loại đất nung khác nhau cho ra những dinh dưỡng khoáng khác nhau và điều này làm cho kết quả nghiên cứu không còn chính xác. Có thể dùng dung dịch để rửa những chất không mong muốn, nhưng tồn kém.

Đất nung có kích cỡ không giống nhau và khả năng hấp thu nước tùy thuộc vào kích thước, cho nên tính đồng nhất không giống nhau.

Gần đây, một sản phẩm mới được đóng ép gọi là isolite. Isolite được khai thác ở vùng biển Nhật bản là nơi duy nhất có loại này, nó được trộn với đất sét 5% (đóng vai trò như chất kết dính). Ngoài ra trong thành phần của nó còn có SiO₂ (Dioxid Silic). SiO₂ có tính trơ cao về mặt vật lý và hoá học. Isolite có kích cỡ từ 1–10 mm đường kính. Các thí nghiệm cho thấy isolite có tính trơ cao về mặt hoá học và tính giữ nước tốt. Tuy nhiên, điểm bất lợi của nó là giá cả của nó khá cao.

Một số giá thể hữu cơ được sử dụng:

❖ Than bùn:

Đây là chất tốt nhất trong các giá thể hữu cơ có khả năng giữ nước và chất dinh dưỡng cao hơn các loại giá thể hữu cơ khác. Than bùn có chứa nhiều khoáng như: N, P, Ca, Mg và một số nguyên tố vi lượng trong đó có silic.

Thông thường trong nuôi trồng thủy canh, than bùn được dùng để nuôi trồng các loại cây cho quả như: cà chua, dưa leo, ớt tây, dâu tây...

Than bùn cần thanh trùng trước khi sử dụng.

❖ **Mùn cưa:**

Mùn cưa, cát và hỗn hợp hai vật liệu đó được dùng có kết quả để sản xuất dưa chuột. Một hỗn hợp có khoảng 25% cát có lợi là phân bố độ ẩm đồng đều hơn khi dùng mùn cưa.

Cần phải chú ý không phải mùn cưa nào cũng thích hợp như nhau, một số mùn cưa có chất độc khi còn tươi, có thể gây ảnh hưởng môi trường dinh dưỡng.

❖ **Vỏ cây, xơ dừa:**

Đây là vật liệu tương đối rẻ tiền, có khả năng chống phân huỷ do vi khuẩn cao. Phần lớn các nghiên cứu dùng vỏ cây hoặc xơ dừa, cần phải cho dòng nước chảy chậm để lôi cuốn hợp chất tanin có trong vỏ cây và xơ dừa.

❖ **Cát:**

Cát là một trong những giá thể rẻ nhất có thể sử dụng. Tuy nhiên, cần phải kiểm tra để chắc chắn rằng nó không bị ô nhiễm bởi đất và nó thích hợp khi trồng thủy canh. Cát không nên quá nhỏ cũng không nên quá thô, kích thích hạt thay đổi tốt nhất từ 0.1 – 1.00mm, với mức độ trung bình từ 0.25 – 0.50 mm. Cát có nguồn gốc từ biển, cần phải loại bỏ hoàn toàn muối. Vỏ sò nhỏ phần lớn chứa đá vôi và nếu bỏ trong dung dịch nó sẽ làm cho pH tăng lên. Độ kiềm tăng giữ chặt Fe lại trong dung dịch, gây hiện tượng thiếu hụt Fe cho cây.

❖ **Sỏi:**

Cũng giống như cát, hạt sỏi không chứa đá vôi, do đó không gây ảnh hưởng đến độ pH. Sử dụng sỏi có nhiều thuận lợi, vấn đề giữ nước có thể giảm đến mức tối thiểu bằng cách sử dụng hỗn hợp gồm 40% perlite và 60% sỏi về thể tích.

❖ **Scoria (xỉ nham thạch):**

Đây là một loại đá trên bề mặt núi lửa, có khả năng giữ nước rất tốt. Scoria có một số tính chất lý tưởng để làm giá thể như:

- So với sỏi và cát nó nhẹ hơn. Tỷ trọng khoảng 600 – 1000 kg/m³.
- Vì được hình thành nơi có nhiệt độ rất cao nên nó trơ, khô, có nhiều kích thước khác nhau.
- Rất xốp, có nhiều lỗ khí và túi khí.
- Khả năng giữ nước khoảng 250 – 350 kg/m³.
- Cách nhiệt tốt, không dẫn điện từ thành nhựa của vỏ chậu vào giá thể.

❖ **Vermiculite:**

Vermiculite là một loại magiê-nhôm silicate ngậm nước dưới dạng tinh thể dẹt. Sau khi được xử lý, vermiculite là một vật liệu nhẹ có tỷ trọng trung bình khoảng 80 kg/m³. Đôi khi nó phải ứng kiềm do sự có mặt của đá vôi magiê trong quặng nguyên

thủy. Có khả năng trao đổi lẫn khả năng giữ nước cao. Tuy nhiên, sau một thời gian kéo dài, cấu trúc của vermiculite có chiều hướng thoái hoá và vật liệu chuyên hoá về mặt vật lý để trở lại trạng thái ban đầu tạo thành.

❖ **Perlite:**

Perlite là một dẫn xuất của đá núi lửa chứa silic. Vật liệu có khoảng 2 – 5 % ẩm, và sau khi nghiền và gia nhiệt tới vào khoảng 1000⁰C, sẽ nở ra, tạo thành một vật liệu có tỷ trọng nhẹ theo thể tích 130 – 180 kg/m³. Vật liệu có một cấu trúc chặt chẽ, khả năng giữ nước tốt, có tính ổn định vật lý, và đối với phần lớn các sử dụng có tính trợ hoá học. Tuy nhiên, nó chứa 6.9 % nhôm và một phần nhôm có thể giải phóng trong dung dịch pH thấp gây ra những hậu quả bất lợi cho sự sinh trưởng của cây.

9.1.6.8 Chất lượng nước

Chất lượng nước thích hợp cho con người sử dụng thì sẽ thích hợp cho việc nuôi trồng thủy canh. Nước máy hay nước giếng thông thường có chứa một lượng lớn Ca và Mg được gọi là nước cứng. SO₄²⁺ và Na⁺ thường làm tăng tính dẫn điện.

Trước khi tiến hành thủy canh với một phạm vi rộng lớn, chúng ta phải biết được thành phần các chất khoáng có trong nước sử dụng. Phân tích chỉ ra rằng có một sự thay đổi rất lớn giữa các mùa trong năm. Giữa mùa khô và mùa mưa có một sự khác biệt rất lớn về lượng muối có trong nước.

Nước mưa cũng là một nguồn nước có thể sử dụng được. Tuy nhiên, nhiều phân tích cho thấy nước mưa từ mái nhà và được giữ trong những thùng mạ kẽm thì không tốt, Zn dần dần được giải phóng ra từ thành của thùng chứa sau một thời gian, nếu quá nhiều Zn gây ra triệu chứng như sự thiếu hụt Fe.

9.1.7 Các loại hình thủy canh

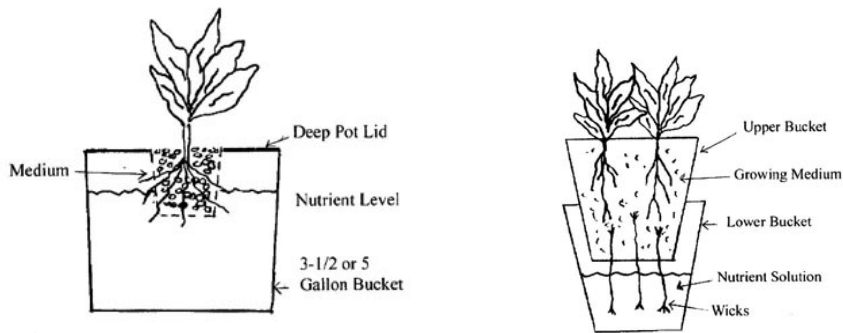
Hiện nay có nhiều loại hình thủy canh, nhưng qui tụ lại có 3 hệ thống thủy canh. Chủ yếu được sử dụng trên thế giới.

9.1.7.1. Hệ thống thủy canh không hồi lưu

Là hệ thống có dung dịch dinh dưỡng đặt trong hộp xốp hoặc các vật chứa cách nhiệt khác, dung dịch nằm nguyên trong hộp chứa từ lúc trồng cây đến khi thu hoạch.

Hệ thống này thích hợp với quy mô gia đình ở các nước kém phát triển, đòi hỏi phải có chất dinh dưỡng tự điều chỉnh được độ axit (pH) của dung dịch.

Kỹ thuật thủy canh đơn giản hiện đang triển khai tại nước ta là loại này.



Hình 9.1 Hệ thống thủy canh không hồi lưu

9.1.7.2. Hệ thống thủy canh hồi lưu

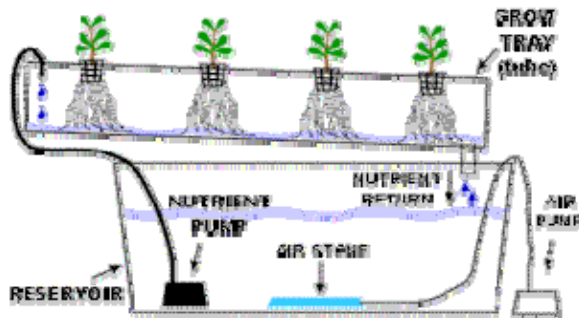
Là hệ thống có dung dịch dinh dưỡng bơm tuần hoàn từ một bình chứa có lắp đặt thiết bị điều chỉnh tự động các thông số của dung dịch để đưa tới các bộ rễ cây, sau đó quay lại bình chứa để điều chỉnh các thông số.

Hệ thống này có hiệu quả kinh tế cao hơn, không đòi hỏi chất dinh dưỡng có cơ chế tự điều chỉnh độ axit, thích hợp với quy mô sản xuất lớn ở những nơi có nguồn điện.

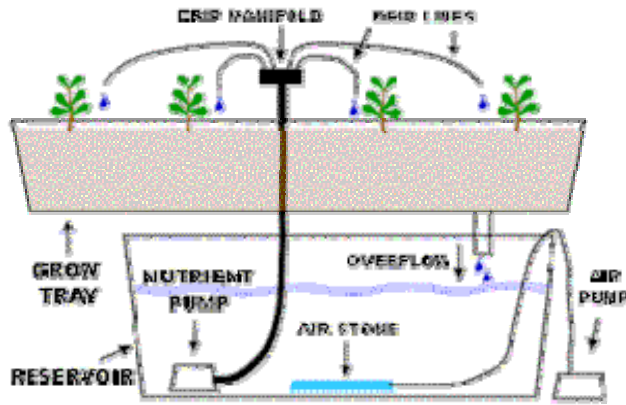
Kỹ thuật thủy canh màng mỏng dinh dưỡng NFT:

Dạng các hệ thống trồng thủy canh được phát triển cao nhất ngày nay là kỹ thuật màng mỏng dinh dưỡng (NFT – Nutrien Film Technique) được Doctor Allen Cooper phát triển vào những năm 1960 ở Anh. Nó là một biến thể của dòng chảy sâu. Nó cũng là dạng thủy canh hấp dẫn nhất đối với cộng đồng do tính chất và dáng vẻ bên ngoài của nó.

Chất dinh dưỡng được nó cho ăn vào các ống trồng (growtube) nơi mà các rễ rút nó lên. Phần dư rút xuống do trọng lực trở lại bể chứa. Một lớp màng mỏng dinh dưỡng cho phép các rễ có tiếp xúc ổn định với chất dinh dưỡng và lớp khí phía trên cùng lúc.



Hình 9.2 Hệ thống thủy canh hồi lưu



Hình 9.3. Hệ thống thủy canh theo phương pháp nhỏ giọt

9.1.8. Một số bệnh trong thủy canh

9.1.8.1 Bệnh rễ

*** Vấn đề sinh lý cơ bản của bệnh rễ**

Bệnh rễ rất ít khi được nói đến trong kỹ thuật thủy canh, tuy nhiên so với kỹ thuật trồng trong đất thì bệnh rễ trong kỹ thuật trồng trong dung dịch lại có được sự quan tâm nhiều hơn bởi trong kỹ thuật này rễ luôn được giám sát chặt chẽ. Một số căn bệnh rễ phát sinh từ quá trình già cỗi tự nhiên và sau đó là do quá trình phân hủy vật chất cặn đọng bởi vi sinh vật.

*** Nơi thường mắc bệnh**

Người ta thấy có sự liên quan rất rõ giữa bệnh rễ và thời kỳ phát triển của cây. Nhận thấy bệnh rễ trong kỹ thuật màng dinh dưỡng xuất phát từ các cây khẳng khiu già cỗi mà không phải từ các cây ban đầu gieo từ các hạt mầm khỏe, triệu chứng rễ chết luôn bắt đầu từ nơi rễ bị tổn thương và chính từ đó chỉ cần một mầm bệnh yếu cũng có thể dẫn đến nặng hơn. Do vậy, nếu công tác quản lý và kỹ thuật tốt thì có thể loại bỏ hoàn toàn vấn đề này.

9.1.8.2 Nấm bệnh trong hệ thống thủy canh

Nấm bệnh gây hại trong hệ thống thủy canh chủ yếu là các chủng vi sinh vật *Phytophthora* và *Pythium*. Việc loại trừ các vi sinh vật này rất khó khăn do một số hóa chất diệt nấm tỏ ra hạn chế hiệu quả bệnh rễ, ngoài ra do việc xác định nồng độ thuốc để phù hợp với cây trồng không gây độc cho cây trồng rất khó xác định, phạm vi sử dụng các chất hóa học bảo vệ cây trồng nói chung là quá ít nên việc điều chế các chất hóa học để đảm bảo cho quá trình thử nghiệm rất tốn kém.

9.1.8.3 Vi khuẩn trong hệ thống thủy canh

Căn bệnh vi khuẩn gây ra trong cây trồng thường là vấn đề nguy hiểm hơn so với do nấm, gần như là không kiểm soát được chúng bằng cách bổ sung thêm các chất hóa học vào dung dịch dinh dưỡng. Vi khuẩn chủ yếu là nhóm *Pseudomonas* gây bệnh héo và giảm năng suất sản lượng. Để hạn chế vi khuẩn người ta thường dùng phức sắt chelat trong dung dịch dinh dưỡng là Fe-EDDHA, phức chất Fe khá bền, tác động đến căn bệnh ít hơn là Fe-DTPA.

9.1.9 So sánh giữa cây trồng cần đất và thủy canh

Trồng cây cần đất	Thủy canh	Trồng cây cần đất
Trong đất trồng, các vi khuẩn phải phân cắt chất hữu cơ phức tạp thành các nguyên tố cơ bản như nitrogen, phosphor, potassium cũng như các nguyên tố vết (vi lượng).	Thức ăn cho cây được cân bằng (dung dịch dinh dưỡng) được hòa tan thẳng vào nước nên thực vật có thể nhận chất dinh dưỡng hoàn hảo mọi lúc.	Trong đất trồng, các vi khuẩn phải phân cắt chất hữu cơ phức tạp thành các nguyên tố cơ bản như nitrogen, phosphor, potassium cũng như các nguyên tố vết (vi lượng).
Đất trồng không thể sản sinh nhiều chất dinh dưỡng trên mỗi diện tích đủ cho hệ rễ có thể hấp thu.	Thủy canh mang lượng thức ăn được cần thẳng tới rễ hơn là bất rễ thực vật tìm kiếm nó.	Đất trồng không thể sản sinh nhiều chất dinh dưỡng trên mỗi diện tích đủ cho hệ rễ có thể hấp thu.
Đất trồng giảm sút giá trị dinh dưỡng của nó và khó đo các mục pH và độ màu mỡ.	Giá trị pH và dinh dưỡng của nước được đo và duy trì dễ dàng, vì vậy các thực vật luôn có đủ thức ăn.	Đất trồng giảm sút giá trị dinh dưỡng của nó và khó đo các mục pH và độ màu mỡ.
Chỉ khi các cây trồng trên đất được tưới, các nguyên tố cơ bản mới có thể hòa tan vào nước.	Trong một hệ thống thủy canh, độ ẩm hiện diện trong các khoảng thời gian được kéo dài hay trong mọi lúc.	Chỉ khi các cây trồng trên đất được tưới, các nguyên tố cơ bản mới có thể hòa tan vào nước.
Đất trồng đóng vai trò vật chủ đối với nhiều vi sinh vật có hại.	Các môi trường trồng thủy canh là trợ, vô trùng, một môi trường rất vệ sinh cho thực vật và người trồng.	Đất trồng đóng vai trò vật chủ đối với nhiều vi sinh vật có hại.
Đất trồng cần nhiều việc tưới, có một sự hiện diện các vi sinh vật gây hại cao hơn, thực vật lớn chậm hơn, cần nhiều không gian và chăm sóc hơn.	Thủy canh làm tăng sự tăng trưởng và sản lượng trên mỗi diện tích của thực vật, giảm các vi sinh vật gây hại, bệnh tật và nhu cầu tưới nước thực vật.	Đất trồng cần nhiều việc tưới, có một sự hiện diện các vi sinh vật gây hại cao hơn, thực vật lớn chậm hơn, cần nhiều không gian và chăm sóc hơn.

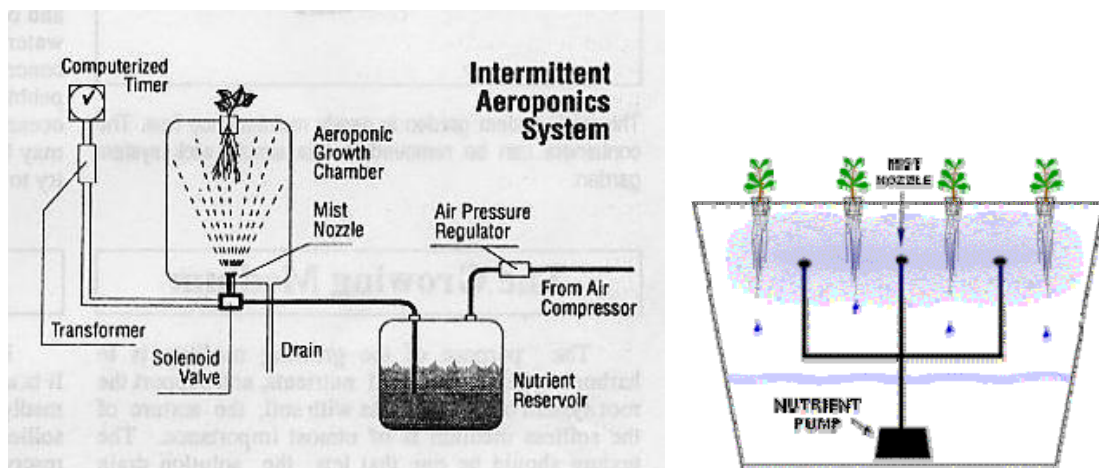
9.2 Khí canh

Đây là hệ thống thủy canh cải tiến khi rễ cây không được trực tiếp nhúng vào dung dịch dinh dưỡng mà phải qua hệ thống bơm phun định kỳ, nhờ vậy tiết kiệm được dinh dưỡng và bộ rễ được thở tối đa.

Trong kỹ thuật này các cây được trồng trong một thùng cách nhiệt, chỉ chứa sương mù và hơi nước. Sương mù (chất dinh dưỡng) được phun định kỳ vào những thời gian nhất định trong suốt quá trình trồng cây. Cây trồng được treo lơ lửng trong thùng, chúng được duy trì trong điều kiện độc lập. Vì không sử dụng đất hay môi trường tổng hợp (giá thể) nên môi trường có độ sạch cao, cây sạch bệnh. Nếu một cây trồng bị nhiễm bệnh thì có thể di chuyển nó ra khỏi hệ thống một cách dễ dàng mà không ảnh hưởng đến cây khác.

Dung dịch dinh dưỡng thừa sau khi sử dụng được thu lại, lọc, bổ sung để được tiếp tục sử dụng. Do không cần thường xuyên có một lớp nước dầy nên trọng lượng của toàn bộ hệ thống khí canh tương đối nhẹ, dễ bố trí trên nóc nhà hoặc sân thượng ở các thành phố.

Về nguyên tắc hệ thống này có hiệu quả kinh tế rất cao, hoàn toàn có thể ứng dụng để làm giảm giá thành cây giống trong công nghệ sinh học thực vật. Theo nghiên cứu của các nhà khoa học Sigopor, trong hệ thống khí canh nhiệt ở vùng rễ luôn luôn thấp hơn nhiệt độ ngoài trời khoảng 2°C do hiệu ứng bốc hơi, nhờ vậy cây sinh trưởng nhanh hơn trong đất thường hay trong hệ thống thủy canh không hồi lưu. Hệ thống này thích hợp cho qui mô sản xuất rau, hoa thương phẩm. Có thể trồng cây trái vụ.



Hình 9.3 Hệ thống khí canh

Phần 2. CHUYỂN GEN Ở THỰC VẬT BẬC CAO

Chương 1. MỞ ĐẦU

1.1. Genom ở thực vật bậc cao

1.1.1. Đặc điểm bộ máy di truyền tế bào thực vật

Các tính trạng của thực vật là biểu hiện của các gen di truyền. Có các tính trạng đơn gen (do 1 gen phụ trách) có những tính trạng đa gen (do tác động phối hợp của nhiều gen)

Về mặt hóa học, gen là 1 dãy nucleotit có số nucleotit và dãy mã tự đặc trưng, số nucleotit cấu tạo nên 1 gen, thường biểu thị theo KG (Kilobase = 1000 nucleotit). Biểu hiện trực tiếp hoạt động của gen là các protein này là các E, nhờ vậy quá trình trao đổi chất, sinh trưởng, phát triển của thực vật được thực hiện theo 1 chương trình xác định trong thông tin di truyền đặc trưng cho loài.

Tế bào thực vật khác xa với tế bào động vật và vi sinh vật:

1. Tế bào thực vật là một tế bào hữu nhân điển hình

Tế bào thực vật có cellulose bao bọc bên ngoài màng nguyên sinh. cellulose của các tế bào thực vật liên kết nhau bằng peclin và các dẫn xuất cellulose khác.

Vai trò của cellulose ở chỗ bảo vệ và giúp cho thực vật đứng thẳng mà còn giúp cho toàn bộ quá trình trao đổi chất.

Nếu xử lý mô thực vật bằng enzym peclinaza và cellulosa, phần lớn peclin và cellulosa bị phân hủy, các tế bào thực vật trần không có vỏ cellulosa bao bọc được giải phóng ra môi trường được gọi là protoplast. Protoplast có thể được nuôi sống và tái tạo lại thành tế bào, mô hay cây hoàn chỉnh. Trong bất kì môi trường nào hoạt động sống của photoplase cũng bắt đầu việc tái tạo lại cellulosa và khi vỏ cellulosa đã được tái tạo thì tế bào mới được phân chia và tiếp tục phát triển.

Qua vỏ cellulosa, các muối khoáng và nước có thể trao đổi dễ dàng, tuy vậy đối với các đại phân tử như protein, nucleic axit thì vỏ cellulosa cũng thể hiện 1 sự ngăn cách nhất định. DNA có thể xâm nhập tế bào qua cả vỏ cellulosa lẫn màng nguyên sinh.

Vỏ cellulosa được hình thành không chỉ khi nằm trên cây hoàn chỉnh mà khi nuôi chúng riêng rẽ dưới dạng các tế bào đơn và trong trường hợp này nó mang hình thái rất đa dạng.

Khi đã mất hẳn vỏ bọc cellulosa, các protoplast luôn ở dạng tròn

Lạp thể : bào quan đặc biệt của tế bào thực vật (tuy tế bào thực vật xanh)

Lục lạp : lạp chứa và diệp lục (diệp lục là chất màu xanh lục)

Bào quan : còn gọi cơ quan tử. Tế bào chất của tất cả tế bào nhân thực chứa một số cấu trúc có màng bao bọc, đảm nhiệm các chức năng chuyên hóa. Những cấu trúc này được gọi là bào quan.

Ti thể : Bào quan của các tế bào nhân thật, có kích thước tương tự tế bào vi khuẩn mỗi tế bào có hơn 1.000 ti thể.

2. Tế bào thực vật có các lạp thể đặc biệt là các lục lạp

Lục lạp có cấu trúc phân tử phức tạp, chứa toàn bộ diệp lục và làm nhiệm vụ quang hợp. Lục lạp chứa bộ máy di truyền riêng của chúng trong một môi quan hệ chặt với bộ máy di truyền của nhân bào. Một số khả năng chống chịu ở thực vật có liên quan đến các gen nằm trong lục lạp nhiều hơn các gen nằm trong nhân hoặc ti thể.

Bình quân mỗi tế bào thực vật có thể chứa khoảng 50 lục lạp. Bằng các phương pháp công nghệ gen hiện đại, có thể chuyển lục lạp và bộ máy di truyền của lục lạp từ tế bào cây này sang tế bào loài cây khác và giúp cây mang tính trạng di truyền mới. Các nguyên nhân theo hướng này đã hình thành ngành công nghệ cơ quan tử (plastid engineering) là nhánh quan trọng của CNSH thực vật ngày hôm nay.

3. Tế bào thực vật có tính toàn thể

Khả năng toàn thể được hiểu là khả năng tái sinh cây hoàn chỉnh từ mô hoặc tế bào đơn, thậm chí từ protoplast thực vật. Các tế bào động vật hoàn toàn không có khả năng này.

Khả năng phát sinh hình thái của tế bào thực vật là vấn đề quan trọng có tính chất quyết định đối với các ứng dụng công nghệ gen trong chọn tạo giống mới ở thực vật. Nếu sau khi chuyển gen, tế bào hoặc mô mất khả năng tái sinh, thì việc chuyển gen coi như có ý nghĩa thực tế.

Khả năng tái sinh cũng có thể hiện là sự kích hóa. Khi mới cấy mô thực vật trong điều kiện kích thích nhân tạo để tạo nên mô sẹo, ta đã thực hiện quá trình phân biệt hóa : Khi ngừng các tác động kích thích mô thực vật có khuynh hướng tự biệt hóa trở lại thành các mô có chức năng như rễ, thân, lá

Cuối những năm 60 đã chứng minh đầy đủ tính toàn thể của thực vật bậc cao, đồng thời đã chứng minh là mỗi tế bào thực vật đều chứa đầy đủ các thông tin di truyền của toàn bộ cơ thể.

Từ đó đến nay, khoa học cấy mô thực vật đã tiến những bước dài sự phát sinh hình thái, hoặc khả năng tái sinh cây hoàn chỉnh từ 1 tế bào, một mảnh lá, một khối mã sẹo

..... đã được thực hiện trên hàng trăm loài thực vật, tập trung vào hầu hết các cây trồng quan trọng.

4. Tế bào thực vật có bộ máy di truyền phức tạp

Các hiểu biết về di truyền phân tử ở vi sinh vật không đủ để lý giải nhiều hiện tượng di truyền ở thực vật bậc cao. Tế bào thực vật bậc cao chứa 1 lượng DNA lớn gấp nhiều lần ở vi khuẩn và nhiều trường hợp còn gấp bội so với lượng DNA ở tế bào người.

DNA thực vật khác với DNA vi sinh vật, phát hiện các dãy mã lặp đi lặp lại nhiều lần. Các gen di truyền được phân cách nhau bằng các đoạn DNA không mã hóa được gọi là introns.

Các nhóm gen ở thực vật cũng không nằm cố định trên các thể nhiễm sắc. Một số cơ thể nhảy qua lại trong quá trình của thực vật và chúng được gọi tên là gen nhảy (jumping gen)

Tóm lại sự phức tạp của bộ máy di truyền làm cho việc ứng dụng CNSH để giải quyết các mục tiêu không dễ dàng.

1.2. Sinh trưởng và sinh sản của tế bào thực vật

Thực vật sinh trưởng theo phương pháp phân bào, theo kiểu nguyên nhiễm sắc theo kiểu giảm nhiễm. Giảm phân là kiểu phân chia của các tế bào Soma, trong quá trình phân chia các cơ quan tử như lục lạp, ly thểđược chia đều ở 2 tế bào mới được hình thành. Ở nhân, các nhiễm sắc thể cũng được phân đôi, chính xác ở mức độ phân tử.

Giảm phân là kiểu phân bào chỉ xảy ra ở các giao tử đực và cái, chuẩn bị cho quá trình sinh sản hữu tính các thể nhiễm sắc tương đồng được gắn với nhau, sự trao đổi chéo xảy ra, hai tế bào con có số nhiễm sắc thể bằng $\frac{1}{2}$ số nhiễm sắc của tế bào mẹ.

Trong giai đoạn giảm phân II, các tế bào này được phân chia theo kiểu giảm phân nghĩa là số thể nhiễm sắc không thay đổi để tạo nên 4 tế bào mới gọi là bộ bốn. Mỗi tế bào chứa $\frac{1}{2}$ thể nhiễm sắc đặc trưng cho loài.

Tuy vậy, do trao đổi chéo, nội dung di truyền của 4 tế bào này không hoàn toàn giống nhau. Mức độ khác nhau về di truyền giữa các tế bào bộ bốn còn được gọi là độ dị hợp tử. Các hạt hình thành sau khi thụ tinh mang nội dung di truyền không đồng nhất, chúng tạo nên các quần thể cây không đồng nhất. Ở các cây tự thụ phần độ dị hợp thấp hơn nhiều. Mặc dù sự trao đổi chéo vẫn xảy ra, quá trình tự thụ phần qua nhiều thế hệ làm cho thực vật tiến đến chỗ có độ đồng hợp cao, trong nghề trồng trọt gọi là độ thuần.

Ở những cây có bản chất tự thụ phấn, nhưng do gió và côn trùng vẫn có 1 tỉ lệ nhất định thụ phấn chéo, không bao giờ có thể đạt được một độ thuần tuyệt đối (đồng hợp tử tuyệt đối)

Chỉ có các cây sản sinh ra từ các dòng đơn bội kép trong công nghệ nuôi cấy hạt phấn mới thực sự là đồng hợp tuyệt đối

Thực vật sinh sản theo nhiều cách nhưng đều có thể ghép vào cách chính sinh sản hữu tính và sinh sản vô tính.

- Sinh sản hữu tính :

Là kiểu sinh sản mang lại cho thực vật sự phong phú về gen, tăng khả năng tồn tại của các điều kiện ngoại cảnh không thuận lợi và giúp cho thực vật có khả năng phát tán rộng. Sinh sản hữu tính là yếu tố quan trọng nhất hình thành sự tiến hóa của thực vật, tạo nên sự đa dạng sinh học mà con người đang hủy hoại ngày nay.

- Sinh sản vô tính :

Là kiểu sinh sản không thông qua sự thụ tinh. Nhiều cơ quan thực vật có thể dùng để thực hiện sinh sản vô tính như : chồi bên, thân, cành rễ, củ, giò, thân bò, phôi vô tính Ngày nay các tế bào soma cũng được dùng vào sinh sản vô tính hàng loạt. Biện pháp thông dụng nhất là nuôi cấy các tế bào đơn (mật độ vài triệu tế bào/ml), sau đó kích thích để chúng hình thành các phôi vô tính. Từ các phôi vô tính, việc tái sinh lại cây hoàn chỉnh không có nhiều khó khăn.

Đặc điểm của sinh sản vô tính là tạo ra các dòng thuần, có các đặc tính di truyền giống nhau, có thể so sánh với việc tạo ra hàng triệu bản in bằng một máy photocopy. Đối với tiến hóa, sinh sản vô tính có lợi ở chỗ thực vật có thể sinh sản ngay trong các điều kiện bất lợi nhất cho sự thụ tinh. Tính không tương hợp về di truyền và tính bất thụ đặc biệt ở các tổ hợp lai xa, làm cho sự thụ tinh trở nên khó khăn, sự sinh sản hữu tính không còn là phương thức thích hợp nhất cho sự tồn tại và truyền bá của thực vật nữa. Con người biết khai thác các điểm của sinh sản vô tính để tạo ra các dòng thuần từ các cá thể chọn lọc, qua đó nâng cao dần năng suất và chất lượng của quần thể.

Chú ý : Sinh sản vô tính không làm tăng độ phong phú về di truyền của loài và có thể dẫn đến các thảm họa ở qui mô lớn nếu quần thể không có sức đề kháng với một hay nhiều loại sâu bệnh.

Quá trình nhằm giống vô tính thực vật trong điều kiện vô trùng với hệ số nhân cao được gọi là vi nhân giống được thực hiện nhờ 1 số kỹ thuật gọi tên chung là cấy mô thực vật.

Nói chung sinh sản vô tính đưa lại các quần thể có độ thuần cao, nhưng độ thuần này cũng không tuyệt đối. Có thể có những hiện tượng sau đây làm thay đổi ngoại hình hoặc các đặc trưng bên trong của thực vật trong quá trình nhân giống vô tính.

1. Sự thoái hóa do vi sinh xâm nhiễm

Hầu hết các cây nhân giống vô tính qua nhiều thế hệ, ít nhiều đều có sự xâm nhiễm của 1 hoặc nhiều loài vi sinh gây nên thoái hóa nhân giống vô tính theo phương pháp cổ điển trong điều kiện tự nhiên (chiết, ghép, giâm cành) không thể nào khắc phục được bệnh *virus*. Nhờ kỹ thuật nuôi cấy mô thực vật, người ta có thể tạo ra các dòng của nhiễm *virus*. Kỹ thuật tạo dòng sạch bệnh có tên chung là phục tráng giống

2. Hiện tượng đa hình thái

Là sự phát sinh các tính trạng hình thái đặc biệt trên 1 cá thể trong 1 quần thể thuần, mặc dù không có sự thay đổi gì trong nội dung các thông tin di truyền, mà có thể chế là sự thay đổi trong phương thức biểu hiện của gen.

3. Hiện tượng khảm

Là sự tồn tại đồng thời của các tế bào có thông tin di truyền khác nhau trong cùng 1 cá thể thực vật.

Các hiện tượng trên dẫn đến các biến dị vô tính, lợi dụng nó để tạo nên nhiều giống đặc sản phong phú.

- Ưu thế lai :

Là hiện tượng nâng cao sức sống của cây lai. Thể hiện mạnh nhất ở thế hệ F1 và mất dần qua các thế hệ sau nếu tiếp tục sinh sản hữu tính.

Vi nhân giống các dòng F1 có thể giữ vĩnh viễn được ưu thế lai mà cần hàng năm phải mua giống lai F1.

1.3. Đặc tính DNA ở thực vật bậc cao.

DNA thực vật là một chuỗi xoắn kép dài do 4dNTP lai :

1. dATP deoxyadenosin phosphate
2. dGTP deoxyguanidin phosphate
3. dCTP deoxycytosin phosphate
4. dTTP deoxyThymidin phosphate

Gọi tắt là 4 dNTP là A, G, C, T trong đó A,G thuộc nhóm kiêu purine còn C,T thuộc nhóm kiêu pirimidine. Lõi của chuỗi DNA là các phân tử đường deoxyriboze gắn với nhau bằng các cầu phosphodiester.

Khác với vi khuẩn, chiều dài DNA của thực vật rất lớn. Trong 1 tế bào thực vật chiều dài các phân tử DNA có thể đến nhiều mét trong khi vi khuẩn E.coli 1,4mm.

Kính hiển vi điện tử cho thấy DNA được nhồi nhét rất chặt nhờ chúng có dạng siêu xoắn và nằm trong các hạt nucleosome.

Cấu trúc siêu xoắn và nucleosome giúp nén thông tin di truyền ở mức độ cao nhưng không tĩnh lại mà vận động liên tục. Tốc độ thay đổi từ cấu trúc xoắn, siêu xoắn của chuỗi DNA sang dạng giãn ở cỡ 100 vòng /phút

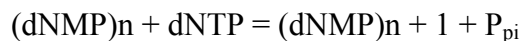
Một đặc điểm khác của DNA thực vật là chúng có hệ DNA lục lạp và DNA riêng biệt, ở dạng vòng độc lập với DNA nhân bào.

DNA của ti thể thực vật cũng ở dạng vòng.

1.4. Sinh tổng hợp DNA ở thực vật bậc cao

1.4.1. Quá trình sinh tổng hợp DNA ở thực vật bậc cao

Phản ứng sinh tổng hợp DNA được khái quát như sau :



$(dNMP)_n$ là đoạn DNA có sẵn do nhiều deoxy ribonucleotide monophosphate (dNMP) nối với nhau. Khi kết hợp với 1 deoxy ribonucleotide triphosphate (dNTP), đoạn DNA có thêm một nucleotide và làm (p) được phóng thích. Có 4 loại dNTP tham gia phản ứng : deoxy adenosine triphosphate (dATP), deoxy guanosine triphosphate (dGTP), deoxy cytosine Triphosphate (dCTP) và deoxy thimidine triphosphate (dTTP)

Sinh tổng hợp DNA xảy ra ở nhiệt độ, áp suất thường khi có mặt 4 dNTP và 1 đoạn DNA mẫu với sự xúc tác của 1 hệ nhiều E chiều sinh tổng hợp là 5' – 3'. Nơi bắt đầu sinh tổng hợp trên đoạn DNA mẫu là một vị trí trên đó có gắn 1 đoạn oligonucleotide mồi. Đoạn mồi là 1 dãy nucleotide ngắn (10 – 30 nucleotide). Dãy mã của đoạn mồi tương hợp với dãy mã một vị trí nào đó trên DNA và nhờ vậy có khả năng gắn vào vị trí đó, bắt đầu cho quá trình tổng hợp DNA. Vậy sinh tổng hợp DNA có thể xảy ra ngoài tế bào, trong thử nghiệm, nếu có mặt :

- Đoạn DNA polymeraza
- Đoạn DNA polymeraza

- Đoạn mồi ở 1 vị trí nào đó trên đoạn DNA mẫu
- Dung nạp đệm giàu Mg^{+}

Sinh tổng hợp DNA ngoài tế bào là cơ sở của phương pháp PCR, một phương pháp có áp dụng rất phổ biến trong công nghệ sinh học. Trong tế bào mồi là các đoạn RNA ngắn (10 – 20 nucleotit do E RNA polymeraza tổng hợp nên vào những thời điểm thích hợp trong quá trình phát triển cơ thể, sau khi sinh tổng hợp DNA đã hoàn tất, các đoạn mồi này bị 1 E DNA polymeraza phân hủy.

1.4.2. Các E chủ yếu trong sinh tổng hợp DNA

DNA polymeraza I : nhiệm vụ của nó là gắn các dNTP từng cái một vào đầu 3 tự do của đoạn mồi đang gắn trên đoạn DNA mẫu.

DNA polymeraze

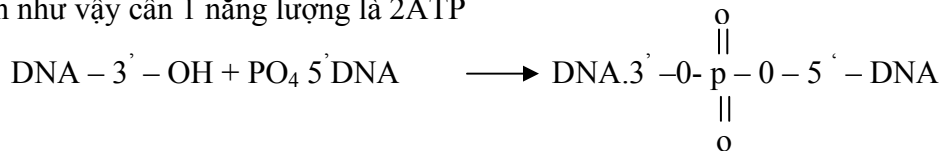


DNTPmồi= = = đoạn DNA mẫu = = =
3 '

Kết quả là sợi DNA mới sẽ dài dần về phía đầu 3 '

* DNA ligase :

Có nhiệm vụ nối 2 đầu 3' và 5' của 2 đoạn DNA rời thành 2 đoạn liên tục. Một mỗi hàn như vậy cần 1 năng lượng là 2ATP



Đặc điểm của DNA ligase là không làm việc với các sợi DNS đơn mà chỉ hàn nối các đoạn DNA ở dạng chuỗi xoắn kép. Khi nối DNA có thể gặp 2 trường hợp : đầu sole hay đầu bằng. Các nucleotit ở đầu sole nằm trên đoạn sole của 2 đoạn DNA phải tương hợp thì DNA polymerase mới hoạt động được.

Nhiệm vụ của // và /// giống như I nhưng chỉ khác chúng nhận biết và hoạt động sinh tổng hợp trên các đoạn DNA mẫu có các chỗ gãy ngắn (chỗ gãy : các vị trí của chuỗi kép ở đó chỗ có sợi đơn)

Về tốc độ làm việc của các polymerase rất khác nhau. Trong 1 giây I gắn được 10 dNTP, II chỉ 0,5, III gắn tới 150 dNTP.

* Helicase.

Có nhiệm vụ làm chuỗi DNA từ dạng siêu xoắn sang dạng giãn. Dạng giãn cần thiết ở các đoạn trên chuỗi DNS ở đó có nhu cầu sinh tổng hợp.

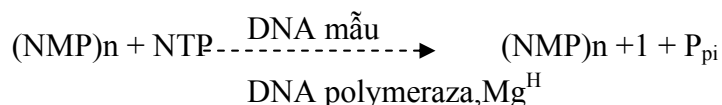
1.4.3. Các bước trong sinh tổng hợp DNA

Sinh tổng hợp DNA trong tế bào cùng 1 lúc diễn ra trên hàng ngàn chỗ trên suốt chiều dài không lồ của sợi DNA mẫu. Ở các vị trí đó, DNA helicase giúp DNA chuyển từ dạng siêu xoắn sang dạng giãn (2 sợi DNA tách ra) với tốc độ 10m/h. Chuỗi DNA xoắn kép được tách đôi ở các vị trí sẽ sinh ra tổng hợp, hình thành các chĩa 3. Ở chĩa 3 cả 2 sợi DNA đơn đều được sử dụng làm DNA mẫu một lúc. Trên 1 sợi sinh tổng hợp sẽ diễn ra theo chiều 5' ----> 3' gọi là sợi chủ. Trên sợi còn lại gọi tên là sợi thứ, STH vẫn diễn ra theo chiều 5'---->3' nhưng chỉ thực hiện được từng đoạn ngắn. Các đoạn ngắn gắn lại với nhau và DNA trở lại dạng xoắn kép chuỗi, một đoạn phân tử DNA mới được hình thành

1.5. Sự thể hiện của gen trong sao chép và dịch mã

1.5.1. Đọc mã :

Là quá trình tạo ra các phân tử RNA thông tin (messenger RNA) theo khuôn mẫu trên DNA, do enzym RNA polymerase xúc tác.



(NMP)_n là đoạn RNA có sẵn gồm n nucleotide monophotphat NTP các nucleotit triphotphat (nucleotide)

RNA polymeraza có khả năng nhận biết các điểm khởi đầu cho đọc mã trên chuỗi DNA

Ở vi khuẩn các điểm này là các dãy mã TATA, còn gọi là “hộp TATA”, hộp TATA ở thực vật phức tạp hơn, được mã bằng nhiều nucleotit hơn, đa dạng hơn (vẫn gọi chung là hộp TATA), ví dụ :



1 -3 : là số lần nhắc lại có thể có của ademin

Ngoài hộp TATA, ở thực vật còn có hộp CAAT nằm ở phía thượng lưu của hộp TATA, hộp CAAT có nhiệm vụ điều hòa mức độ đọc mã.

1. RNA polymeraza I đọc mã cho sinh tổng hợp

RNA ribosome (rRNA), chúng chỉ hoạt động bên trong nhân bào.

2. RNA polymeraza II đọc mã cho sinh tổng hợp mRNA, hoạt động chủ yếu ở bên ngoài nhân bào

3. RNA polymeraza III đọc mã cho sinh tổng hợp RNA ngắn như RNA vận chuyển (tRNA) hoặc tRNA 5S

Mỗi tế bào thực vật chứa đến vài triệu ribosome, vì vậy ở các mô thực vật đang tăng trưởng mạnh đều có hoạt động sinh tổng hợp rRNA rất cao. Ở đây sản phẩm hoạt động của RNA polymeraza chưa tạo ngay ra các RNA hoàn chỉnh mà chỉ tạo ra các tiền chất của chúng. Các tiền chất này còn phải qua “cắt gọt” bằng metyl hóa còn lại kích thước cỡ 3000 – 3500 nucleotit mới kết hợp với protein và tạo nên ribosome.

Mỗi mRNA khác nhau, tương ứng với khoảng 100.000 gen. Mỗi mRNA đều có một dãy mã để tổng hợp protein, ngoài ra còn có thêm các dãy mã nằm ở 2 đầu để làm nhiệm vụ điều khiển quá trình dịch mã. Đầu 5' của mRNA có một dãy mã ngắn gọi là mũ ở đầu 5' (5' cap). Mũ này thường là một gốc qua nosine), được chụp lên đầu 5' của phân tử mRNA ngay sau khi RNA polymeraza II kết thúc quá trình đọc mã. Mã có nhiệm vụ bảo vệ mRNA hoặc ra lệnh cho quá trình tổng hợp protein khởi sự.

Đầu 3' của mRNA thường là 1 dãy mã độ 200 nucleotit toàn là gốc adenosinem gọi tên là đuôi poly A. Cũng như mã 5', đuôi poly A được gắn vào mRNA ngay sau khi đọc mã, bằng E poly (A) polymerase.

1.5.2. Dịch mã

Là quá trình sinh tổng hợp các phân tử protein căn cứ vào dãy mã trên phân tử mRNA. Như thể sự thể hiện gen có thể chia ra 2 mức, mức đọc và mức dịch.

Để thấy rõ mức độ phức tạp của sự thể hiện một gen trong 100.000 gen của cây, hãy xem xét cấu trúc của gen mã hóa cho E polygalactorunaza ở cà chua và sản phẩm thể hiện ở gen này.

Trên gen mã hóa cho polygalactorunaza có 8 dãy số. Kích thước từ 99 đến 953 nucleotit. Hộp CAAT nằm ở nucleotit-31, thượng nguồn của tín hiệu bắt đầu đọc ATG. Quá trình đọc và dịch cho ra hai đoạn peptit 71 và 356 a.amin. Cuối cùng peptit 79 a.amin bị loại và hình thành phân tử E polygalactorunaza có 356 a.amin

Hiện tượng các dãy mã đọc xen lẫn với các dãy mã mù rất phổ biến trong cấu tạo các gen thực vật.

Chú ý chỉ 1 phần rất nhỏ DNA thực vật được biểu hiện thông qua đọc và dịch thành

các phân tử protein.

Các nghiên cứu mới đây cho thấy sự bảo thủ của tính di truyền ở thực vật chỉ là tương đối. Ngoại cảnh có thể ảnh hưởng đến tính di truyền một cách nhanh chóng, không cần hàng triệu năm tiến hóa và các ảnh hưởng này được di truyền qua các đời sau. Do ảnh hưởng bên ngoài, bộ máy di truyền thực vật có thể bị thay đổi do :

1. Sự xâm nhập của DNA ngoại lai (VK, *virus*)
2. Sự chuyển dịch các gen từ vị trí này qua các vị trí khác.
3. Sự chuyển dịch DNA từ lục lạp và ti thể vào nhân bào

Sự tồn tại của các gen nhảy (jumping gens) là nét đặc trưng, thể nhiễm sắc này sang thể nhiễm sắc khác hoặc ở các vị trí khác nhau trên cùng 1 thể nhiễm sắc. Chúng có thể nhảy vào giữa dãy mã của 1 gen đang hoạt động làm cho gen này bất hoạt hoặc ngược lại. M_c Clinlock (Hoa Kỳ) đã giả thiết sự có mặt của các gen nhảy từ 1948. Hơn 40 năm sau công trình của bà mới được công nhận, được tặng giải Nobel

1.6. Tính bảo thủ của gen về di truyền và biến dị

Hiện tượng di truyền và biến dị là 2 mặt mâu thuẫn thống nhất của sự sống, nhờ đó sự tiến hóa có thể thực hiện. Bản chất của 2 hiện tượng này có liên quan chặt chẽ với sự hình thành tồn tại axit deoxyribonucleic (DNA) . Vì vậy DNA là phân tử của sự sống, sợi chỉ của sự sống, chuỗi xoắn kép của sự sống. Cơ chế sinh tổng hợp DNA, vai trò khuôn mẫu của DNA trong tổng hợp protein (enzim) thông qua các phân tử axit ribonucleic (RNA) dần dần đã được khám phá để lí giải hiện tượng di truyền và biến dị, các p/p CN gen, hầu hết là các p/p xử lý DNA hoặc RNA.

Di truyền và biến dị nằm trong sự thể hiện của gen trong quá trình phát triển của sinh vật. Ngày nay gen đã được đo đạc, chụp ảnh và xác định chính xác ở mức phân tử , là 1 hay nhiều đoạn DNA tương ứng với 1 tính trạng.

Cơ chế sinh tổng hợp DNA theo khuôn mẫu đảm bảo tính bảo thủ của hiện tượng di truyền qua các thế hệ. Những thay đổi dù nhỏ, trên đoạn DNA tương ứng với 1 gen, ít nhiều cũng dẫn đến sự thay đổi tính trạng, cơ sở của hiện tượng biến dị.

Chương 2. CHUYỂN GEN Ở THỰC VẬT BẬC CAO

2.1. Xác định và dòng hóa gen

2.1.1. Chiết suất và tinh sạch DNA từ mô thực vật

Có rất nhiều phương pháp tùy theo mục đích sử dụng DNA để làm gì hoặc chiết xuất loại mô nào. Khuynh hướng chung hiện nay là tìm phương pháp đơn giản nhất, thời gian thao tác ngắn nhất nhưng DNA thu được vẫn có đủ độ tinh khiết và độ nguyên vẹn 50 – 100 KG cần thiết cho các thao tác tiếp theo trong công nghệ gen thực vật như cắt bằng E giới hạn, chạy phản ứng PCR Muốn thu DNA có chiều dài 100 – 5.000 KG phải dùng phương pháp điện di có điện trường không liên tục

***Chiết suất và tinh sạch DNA tổng số**

Tế bào thực vật được nghiền vỡ trong điều kiện lạnh làm cho DNA được hòa vào đệm chiết SDS (sodium dedecyl sulfatc) hoặc CTAB (celytrimethyl amonium bromide) được thêm vào để giúp DNA hòa dễ hơn, đầy đủ hơn vào dịch đệm. EDTA có tác dụng gắn chặt các ion Mg^{+} là yếu tố cần cho sự hoạt động của nucleotit phân huỷ DNA trong quá trình chiết. Protein được tách khỏi DNA bằng phenol hoặc chloroform

Nếu tránh được chấn động xé, xoáy quá mạnh, có thể thu được DNA với chiều dài 50 – 100 KG. Ngoài ra, CTAB còn có tác dụng tách các polysaccarit ra khỏi DNA, do chúng có độ hòa tan khác nhau trong môi trường có mặt CATB

1. Chiết suất DNA từ mô thực vật

Lá nghiền với đệm chiết CATB có chứa mercabthoethamol. DNA được chiết bằng hỗn hợp cloroform izoamila, kết tủa bằng izphopanol, sau đó qua 1 số bước để rửa và tinh khiết DNA.

2. Chiết xuất DNA thực vật để chạy PCR

Mẫu lá được sử dụng ở lượng rất ít. Quá trình chiết được đơn giản hóa nhiều để thao tác nhanh và làm cùng 1 lúc nhiều mẫu, tuy vậy DNA được chiết ra hoàn toàn đủ độ lớn và độ sạch để chạy PCR tiếp theo.

2.1.2 Cắt DNA bằng Enzim giới hạn

*** Các enzim giới hạn**

Enzim giới hạn là nhóm endonucleoaza chỉ cắt phân tử DNA ở những vị trí có dãy

mã nucleotit nhất định mà chúng có khả năng nhận ra. Thuộc tính rất quan trọng này của enzym giới hạn cho phép cắt phân tử DNA ở các vị trí chọn sẵn. Mỗi enzym giới hạn hoạt động tối thích trong các điều kiện khác nhau (cho nên các công ty cung cấp enzym thường cung cấp các dung dịch tương ứng)

1. Enzym giới hạn rất đắt tiền, vì vậy phản ứng cắt thường thực hiện với 1 lượng DNA tối thiểu, trong 1 thể tích phản ứng tối thiểu. Kết quả hoạt động của enzym giới hạn phụ thuộc vào độ sạch của DNA

2. Enzym giới hạn được chuyên chở và bảo quản lạnh (-20°C). Nếu lấy khỏi tủ lạnh trong thời gian ngắn cần phải để E trên đó.

3. Các đoạn cắt DNA do enzym giới hạn có thể có các đầu sole hoặc đầu bằng.

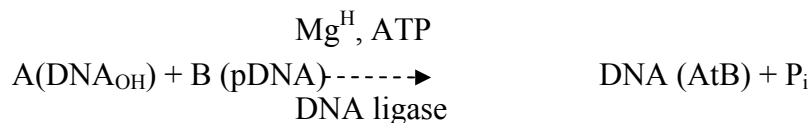
Các methylaza có khả năng làm thay đổi tính chất của sợi DNA ở điểm tác động bằng cách gắn 1 gốc methyl vào đó, Ứng dụng chủ yếu của methylaza là để bảo vệ 1 số vị trí trên DNA mà người ta không muốn bị cắt bởi enzym giới hạn.

2.1.3 Điện di DNA và các sản phẩm cắt DNA trên gel agarose

Các đoạn DNA được cắt từ phân tử DNA có khối lượng khác nhau và diện tích khác nhau được tách ra khi di chuyển từ cực âm sang cực dương của máy điện di trong 1 điện trường có điện thế và cường độ thích hợp

2.1.4 Nối các đoạn bằng DNA ligase

DNA ligase là các enzym nối đoạn DNA lại với nhau. Điểm nối lại là đầu 3' của một đoạn DNA và đầu 5' của đoạn còn lại. Năng lượng để nối là ATP



Ứng dụng quan trọng nhất của ligase là trong cấu trúc của các vector plasmid và các cấu trúc DNA khác đã có đủ các dây mã cần thiết cho việc chuyển gen, biểu hiện gen, sàng lọc các tế bào đã chuyển gen.

2.1.5. Dòng hóa gen

Dây mã tự nucleotit của gen thường được biết thông qua tìm hiểu dây mã tự axit amin của sản phẩm của nó, các protein. Sau khi chiết xuất, tinh sạch protein để giải mã, dây mã tự axit amin của chúng

*Nhân dòng gen

Nhân dòng gen là một tiến trình trong đó gen mục tiêu được định vị và nhân lên từ DNA được tách chiết từ một cá thể.

Khi tách chiết DNA khỏi một cá thể thì tất cả gen của nó cũng được tách ra khỏi cá thể. DNA này chứa đến hàng ngàn gen khác nhau nên nhà di truyền học phải tìm ra gen chuyên biệt mã hoá cho protein mục tiêu.

Một trong những hướng phát triển gần đây nhất của nuôi cấy mô và tế bào thực vật là biến nạp và biểu hiện các gen ngoại lai trong tế bào thực vật. Biến nạp của các tế bào vi khuẩn được thực hiện bằng cách chuyển DNA từ một vi khuẩn khác và sự hợp nhất sau đó của DNA ngoại lai này trong nguyên liệu di truyền của vật chủ đã được thiết lập tốt. Tuy nhiên, việc cải biến di truyền ở thực vật bậc cao bằng cách đưa DNA ngoại lai vào trong các tế bào của chúng là một quá trình rất phức tạp. Sử dụng enzyme hạn chế (restriction endonucleases) để cắt phân tử DNA sợi đôi thành những đoạn nhỏ riêng rẽ, phát triển kỹ thuật lai DNA-DNA và các gen chỉ thị (marker genes) cho phép chọn lọc các tế bào biến nạp có khả năng hợp nhất DNA ngoại lai trong tế bào ở *monera*, nấm, động vật, và thực vật bậc cao. Những nghiên cứu gần đây cho thấy thông tin di truyền mới được biến nạp vào các thực vật eukaryote biểu hiện không chỉ ở mức độ tế bào và sau đó mức độ cơ thể hoàn chỉnh mà còn có thể truyền lại cho các thế hệ sau của chúng.

Thành tựu nổi bật của công nghệ gen ở thực vật bậc cao là tái sinh được cây biến nạp gen đầu tiên vào đầu thập niên 1980. Đến nay, các kỹ thuật phân tử đã được ứng dụng thành công ở nhiều loài khác nhau. Lúc đầu người ta sử dụng các gen chỉ thị để biến nạp, nhưng nay đã thay thế bằng các gen quan trọng có giá trị kinh tế nhằm mục đích cải thiện phẩm chất cây trồng. Hai nhân tố then chốt thúc đẩy sự phát triển của công nghệ gen (gene transformation technology) ở thực vật bậc cao là: các phương pháp tái sinh cây hoàn chỉnh từ những tế bào biến nạp và các phương pháp đưa DNA ngoại lai vào các loài thực vật khác nhau. Muốn chuyển một gen thành công cần phải chứng minh hiệu quả của phương pháp biến nạp gen, nhưng đôi khi các loài được nghiên cứu hoặc không thể tái sinh được cây từ các mô không phân hóa, hoặc có thể tái sinh nhưng sau đó khó phát triển thành cây hoàn chỉnh. Do đó, hai nhân tố nói trên thường được nghiên cứu phát triển song song.

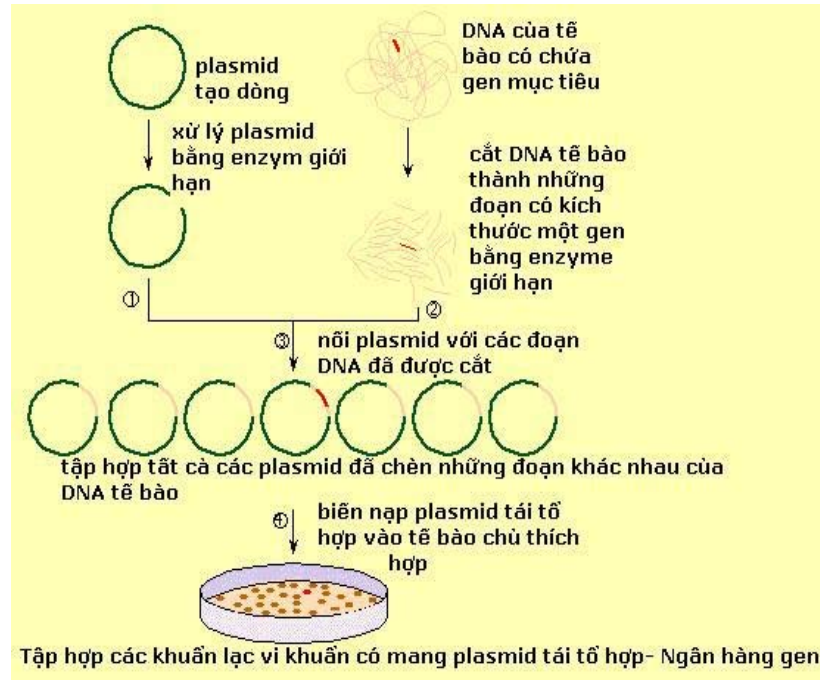
Các thí nghiệm biến nạp gen đầu tiên đã sử dụng *Agrobacterium tumefaciens* để đưa vào cây thuốc lá các gen kháng kháng sinh. *Agrobacterium* là vật truyền hữu hiệu để đưa các DNA ngoại lai vào trong các loài thuộc họ Solanaceae, nhưng ở một số cây trồng khác quan trọng hơn việc sử dụng nó còn gặp nhiều hạn chế. Trở ngại lớn nhất là tính đặc trưng vật chủ của *Agrobacterium*, mặc dù những tiến bộ gần đây đã cho phép ứng dụng

thành công trên một số giống cây trồng. Sự phát triển của các phương pháp tái sinh cây hoàn chỉnh từ callus và protoplast đã mở ra một hướng mới cho công nghệ di truyền thực vật thông qua các phương pháp biến nạp gen trực tiếp. Nhờ sự phát triển của phương pháp bắn gen (particle bombardment)-dựa trên cơ sở tăng gia tốc của các hạt kim loại nặng mang nguyên liệu di truyền vào trong mô thực vật-việc biến nạp ở các loài cây trồng đã gặp nhiều thuận lợi hơn. Các phương pháp biến nạp khác cũng có hiệu quả đối với từng trường hợp đặc biệt, nhưng khả năng ứng dụng rộng rãi của chúng bị hạn chế. Chẳng hạn: các phương pháp biến nạp gen bằng xung điện (electroporation) vào các mô được cắt nhỏ từng phần, phương pháp xử lý hóa học bằng PEG (polyethylene glycol), phương pháp vi tiêm (microinjection) đưa DNA ngoại lai trực tiếp vào tế bào, phương pháp dùng silicon carbide lắc với tế bào có tác dụng như các mũi kim nhỏ giúp DNA bên ngoài xâm nhập vào bên trong tế bào, phương pháp biến nạp gen qua ống phần...

Ngân hàng gen

Bởi vì không thể định vị gen trên DNA bằng mắt thường, các nhà khoa học phải tạo ngân hàng gen.

Ngân hàng gen là một tập hợp khuẩn lạc vi khuẩn sống có mang nhiều đoạn của DNA từ một cá thể. Đây chính là nguồn của gen mục tiêu.



Hình 2.1 Quy trình xây dựng ngân hàng gen

Xây dựng ngân hàng gen

Xây dựng ngân hàng gen cần DNA tách chiết, enzyme cắt giới hạn và plasmid.

Bước 1: DNA tách chiết từ cá thể có chứa gen mục tiêu được cắt bởi enzyme giới hạn thành nhiều mảnh có kích thước của một gen.

Bước 2: plasmid của vi khuẩn cũng được xử lý bởi cùng enzyme giới hạn.

Bước 3: DNA có kích thước một gen và plasmid đã được xử lý được trộn chung với nhau trong một tube. Một số các đoạn DNA đã được cắt bằng enzyme sẽ nối với plasmid và tạo thành plasmid tái tổ hợp.

Bước 4: plasmid tái tổ hợp sau đó được chuyển vào tế bào vi khuẩn bằng điện biến nạp hoặc hoá biến nạp.

Bước 5: vi khuẩn tăng trưởng trên đĩa môi trường và cho phép hình thành khuẩn lạc. Tất cả khuẩn lạc trên đĩa môi trường được gọi là ngân hàng gen.

Bước 6: ngân hàng gen được sàng lọc để tìm ra khuẩn lạc nào có chứa gen mục tiêu bằng cách phát hiện trình tự DNA của gen mục tiêu hay một protein mà gen đó mã hoá hay sử dụng mẫu dò. Vì vậy, trước khi sàng lọc ngân hàng gen, nhà khoa học phải biết được trình tự của gen mục tiêu hay gen gần giống nó nhất hay protein mà gen đó mã hoá hoặc một mẫu dò được thiết kế cho gen đó. Khi vi khuẩn được nhân lên sẽ tạo nhiều DNA tái tổ hợp dẫn đến số lượng bản sao của gen cũng tăng lên, nhờ đó việc phát hiện gen hay protein dễ dàng hơn.

Sau khi xác định được khuẩn lạc có chứa gen mục tiêu, vi khuẩn có thể được nhân dòng để tạo hàng triệu bản sao của plasmid tái tổ hợp có chứa gen đó.

Ứng dụng

Trong kỹ thuật gen, nhân dòng gen là một bước rất quan trọng vì tách chiết được một gen có thể giúp đánh giá trình tự nucleotide của nó. Từ đó có thể xác định được những giới hạn bên trong một gen, ví dụ như số intron và vị trí của chúng hay các yếu tố hoạt hóa.

Không chỉ vậy, với nguồn gen có được, nhà khoa học có thể so sánh trình tự DNA giữa các gen để làm rõ hơn tiến hoá của gen hoặc dịch trình tự DNA của một gen thành trình tự amino acid nhờ vào bảng mã di truyền qua đó có thể đoán được cấu trúc của protein được mã hoá cũng như chức năng của gen đó.

Bên cạnh đó, nhờ kỹ thuật gen, nhà khoa học có thể chuyển gen mục tiêu vào một cá thể tạo thành cá thể chuyển gen. Cá thể chuyển gen được dùng cả trong nghiên cứu về các tiến trình sinh học ở phòng thí nghiệm cũng như ứng dụng trong phát triển cây kháng côn trùng hoặc sản xuất insulin cho người từ vi khuẩn mang gen tương ứng với gen của người.

2.2. Các kỹ thuật chuyển gen

Thông tin di truyền acid deoxyribonucleic (DNA) tồn tại ở 3 dạng chính:

- DNA của cơ thể bậc cao trong đó có DNA nhân và DNA cơ quan tử.
- DNA của vi sinh vật.
- DNA của plasmid.

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

Để biến nạp hiệu quả nguyên liệu di truyền vào tế bào vật chủ, các cấu trúc di truyền cần được thiết kế thích hợp cho sự hợp nhất và biểu hiện của các gen ngoại lai. Cấu trúc di truyền phải mang một gen chỉ thị chọn lọc (selectable marker gen: gen mã hóa một protein khử độc của hóa chất bổ sung trong môi trường nuôi cấy, cho phép sinh trưởng ưu tiên của các tế bào có DNA ngoại lai được hợp nhất) hoặc sàng lọc (screenable marker gen: gen mã hóa một protein cho kết quả trong sản phẩm sống sót nhờ đó có thể xác định tế bào biến nạp thể hiện gen) để nhận biết hiệu quả biến nạp gen.

Một cấu trúc di truyền đặc trưng bao gồm: gen khởi đầu (promoter), gen mã hóa (coding gen) và gen kết thúc (terminator). Các gen mã hóa có thể được đưa vào mô thực vật nhờ vào các vector plasmid. Hai promoter chủ yếu thường được sử dụng cho biến nạp gen ở thực vật là: promoter CaMV 35S (cauliflower mosaic *virus*) thích hợp cho sự biểu hiện của DNA ngoại lai ở cây hai lá mầm và promoter ubiquitin của ngô thích hợp cho sự biểu hiện mạnh của DNA ngoại lai ở cây một lá mầm.

Các mẫu vật (các bộ phận của cây hoặc mô dùng để biến nạp) thích hợp nhất cho biến nạp gen là những mẫu vật đòi hỏi thời gian nuôi cấy trước và sau khi biến nạp ngắn nhất. Nhiều nghiên cứu cho thấy thời gian kéo dài của mô nuôi cấy thường tạo ra các đột biến di truyền làm mất khả năng tái sinh của các cây được biến nạp gen. Các mẫu vật được sử dụng trong chuyển gen thường là: protoplast, phôi non hoặc callus có nguồn gốc từ hạt (lúa mì), các mô nuôi cấy phát sinh cụm chồi, và trụ phôi (có nguồn gốc từ các hạt non hoặc hạt già) dùng để biến nạp trực tiếp DNA ngoại lai vào mô phân sinh ở cây hai lá mầm (legumes, bông...). Trong một số trường hợp, biến nạp thông qua nuôi cấy phát sinh phôi (embryogenic culture) cũng có thể thực hiện được, chẳng hạn ở các loài tùng bách, các loài cây ăn quả và một số loài khác.

Các phương pháp chuyển gen có thể bị hoặc không bị giới hạn bởi các genotype khác nhau của thực vật. Tùy thuộc vào mục đích ứng dụng, có thể thiết kế một phương thức biến nạp thích hợp cho từng genotype khác nhau. Trong những nghiên cứu cơ bản,

người ta thường tập trung tìm hiểu về cấu trúc và chức năng của các gen biến nạp, khảo sát các promoter và các cơ chế phân tử ở thực vật để có thể chuyển gen thành công vào các loài khác nhau.

Công nghệ chuyển gen (biến nạp gen) thực hiện việc chuyển các gen ngoại lai vào tế bào và mô thực vật. Có nhiều phương pháp chuyển gen khác nhau ở thực vật, nhưng ở đây chỉ trình bày một số phương pháp chủ yếu:

2.2. 1. Biến nạp gián tiếp thông qua *Agrobacterium*

2.2.1.1. *Agrobacterium*

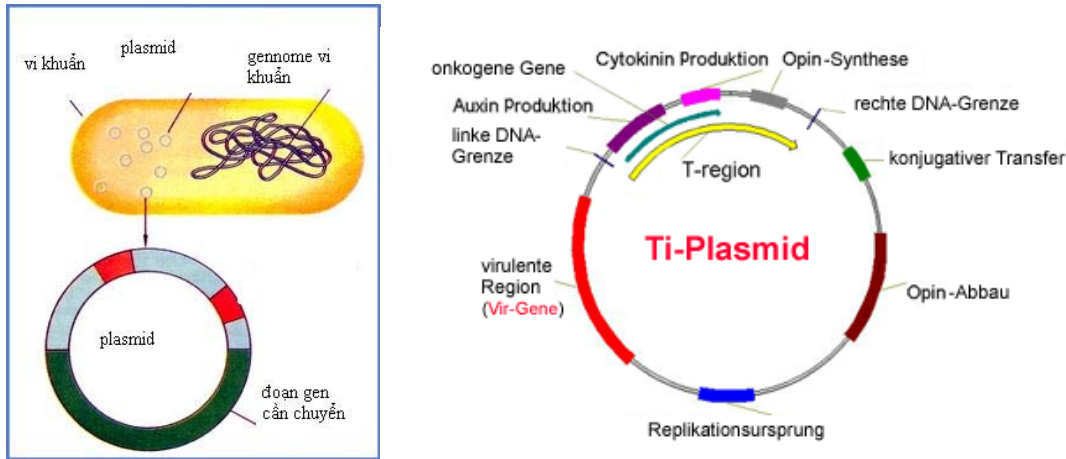
Agrobacterium tumefaciens và *Agrobacterium rhizogenes* là hai loài vi khuẩn gây bệnh cho thực vật được sử dụng như các vector tự nhiên để mang các gen ngoại lai vào mô và tế bào thực vật. *A. tumefaciens* có chứa một plasmid lớn kích thước khoảng 200 kb gọi là Ti-plasmid (tumor inducing plasmid) chính là tác nhân truyền bệnh cho cây. Khi cây bị nhiễm *A. tumefaciens* qua các vết thương, biểu hiện bệnh rõ nhất là các khối u được hình thành ở ngay chỗ lây nhiễm. Sự hình thành khối u sau đó có thể tiếp tục mà không cần thiết phải có sự hiện diện của vi khuẩn. Khả năng này có được do *A. tumefaciens* đã chuyển một đoạn DNA của Ti-plasmid (T-DNA) xâm nhập vào hệ gen của cây bị bệnh.



Hình 2.2. Vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*

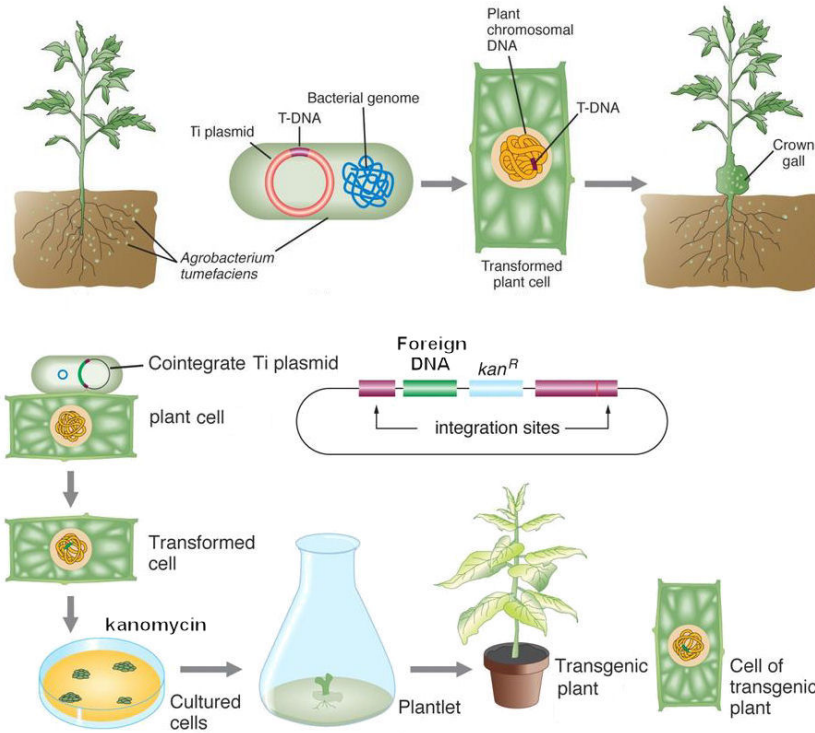
2.2.1.2. Ti-Plasmid

Trong thế giới động-thực vật đều tồn tại các thể plasmid, đó là các vòng DNA tự sinh sản độc lập. Ở vi khuẩn và động-thực 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.



Hình 2.3. Ti-Plasmid

Các plasmid của *Agrobacterium* được sử dụng vào công nghệ gen thực vật ở hai dạng vector *cis* và *trans*. Đây là hai dạng vector rất thuận lợi để tái tổ hợp gen ngoại lai và chuyển vào tế bào thực vật. Dạng *cis* chỉ sử dụng Ti-plasmid và tế bào vật chủ là *Agrobacterium tumefaciens* mà không có sự tham gia của plasmid và vi khuẩn khác. Vùng T-DNA của Ti-plasmid được thiết kế lại để gắn những gen ngoại lai mong muốn, các phần còn lại của Ti-plasmid vẫn được giữ nguyên. *Agrobacterium tumefaciens* được dùng làm tế bào vật chủ để nhân lên nhiều bản sao của Ti-plasmid và chuyển gen. Dạng *trans* hay *binary* là dạng sử dụng hai hay nhiều loại plasmid và vi khuẩn cùng lúc, ví dụ: vi khuẩn *E. coli* và *Agrobacterium*, plasmid trong trường hợp này thích ứng với cả *E. coli* và *Agrobacterium*. Trước tiên, plasmid của *E. coli* chứa đoạn T-DNA được giới hạn bởi bờ phải (right border-RB) và bờ trái (left border-LB) mang gen ngoại lai (gen đích) được thiết kế và nhân lên trong vi khuẩn *E. coli*. Tiếp đến plasmid mang gen ngoại lai được chuyển nạp vào vi khuẩn *Agrobacterium* nhờ một helper plasmid (quá trình triparental mating). Vi khuẩn *Agrobacterium* đã mang sẵn một loại plasmid khác chứa vùng *vir* (virulence region) có chức năng quan trọng trong quá trình chuyển gen ngoại lai. Sự tồn tại song song hai plasmid này đã tương tác lẫn nhau trong việc chuyển gen vào tế bào thực vật. Như vậy, gen ngoại lai và vùng DNA giúp quá trình chuyển gen (vùng *vir*) không nằm trên cùng một plasmid nên hệ chuyển gen này được gọi là hệ *trans*.



Hình 2.4. Quy trình chuyển gen bằng *Agrobacterium tumefaciens*

2.2.1.3. T-DNA

T-DNA được nghiên cứu rất kỹ. Đó là một đoạn DNA có kích thước 25 kb trong đó chứa gen mã hóa cho sinh tổng hợp auxin, cytokinin, opine và các gen gây khối u (oncogenes). Trong Ti-plasmid, vị trí của T-DNA được giới hạn bằng RB và LB. Ngoài T-DNA, trên Ti-plasmid còn có các vùng DNA mã hóa cho việc tái sinh plasmid (replication), cho khả năng lây nhiễm và tiếp hợp (vùng *vir*), cho việc tiêu hóa opine (opine catabolism)

Trong các vùng DNA của Ti-plasmid, ngoài T-DNA, được nghiên cứu nhiều hơn cả là vùng DNA phụ trách khả năng lây nhiễm còn gọi là vùng *vir*. Sản phẩm hoạt động của các gen nằm trong vùng *vir* dưới tác động kích thích của các hợp chất phenol tiết ra từ vết thương là một loạt các protein đặc hiệu như *virE2*, *virB*, *virD*, *virD2*, *virC1*... Các protein này nhận biết các vết thương ở các cây chủ thích hợp (hầu hết là cây hai lá mầm), kích thích sản sinh ra các đoạn T-DNA, bao bọc che chở các đoạn DNA này và giúp chúng tiếp cận với hệ gen của cây chủ một cách an toàn.

Khi cây nhiễm *A. tumefaciens*, do T-DNA nạp vào trong hệ gen của cây chủ bắt đầu hoạt động và sản sinh ra auxin, cytokinin và opine, toàn bộ sinh trưởng của cây bị rối loạn, các tế bào phân chia vô tổ chức và tạo ra các khối u. Opine được vi khuẩn sử dụng như một loại “thức ăn”. Nhờ gen chuyển hóa opine trên Ti-plasmid. Cơ chế lây nhiễm

của *A. rhizogenes* đối với cây hai lá mầm cũng tương tự, nhưng trong vùng T-DNA của *A. rhizogenes* chỉ có gen sản sinh ra auxin, vì thế sự thay đổi hình thái chính của thực vật là chúng tạo ra rất nhiều rễ tơ (hairy roots) khi bị nhiễm bệnh.

Trên thực tế bệnh cây, *Agrobacterium* chỉ gây hại ở cây hai lá mầm, vì vậy người ta cho rằng chúng chỉ có thể đưa T-DNA vào hệ gen các cây hai lá mầm. Gần đây, nhiều tác giả đã chứng minh khi nhiễm vi khuẩn, các cây một lá mầm cũng có thể sản xuất opine và có thể khai thác khả năng biến nạp gen của *Agrobacterium* vào cây một lá mầm.

2.2.1.4. Chuyển DNA ngoại lai vào tế bào và mô thực vật nhờ *Agrobacterium tumefaciens*

Cơ chế gây bệnh của các *Agrobacterium* là sau khi xâm nhiễm vào tế bào, chúng gắn đoạn T-DNA vào bộ máy di truyền của tế bào thực vật, dẫn đến sự rối loạn các chất sinh trưởng nội sinh, tạo ra khối u (trường hợp *A. tumefaciens*) hoặc rễ tơ (trường hợp *A. rhizogenes*). Khả năng chuyển gen này đã được khai thác để chuyển gen ngoại lai vào bộ máy di truyền của tế bào thực vật theo ý muốn.

Để gắn T-DNA vào tế bào thực vật, đầu tiên vi khuẩn *A. tumefaciens* phải tiếp xúc với thành tế bào thực vật bị tổn thương. Quá trình này được thực hiện nhờ các gen *chvA* và *chvB*. Gen *chvB* mã hoá một protein liên quan đến hình thành β -1,2 glucan mạch vòng, trong khi đó gen *chvA* xác định một protein vận chuyển, định vị ở màng trong của tế bào vi khuẩn. Protein vận chuyển giúp vận chuyển β -1,2 glucan vào khoảng giữa thành tế bào và màng sinh chất. β -1,2 glucan giữ vai trò quan trọng để vi khuẩn *Agrobacterium* tiếp xúc với thành tế bào thực vật. Nếu không có sự tiếp xúc này, sẽ không có sự dẫn truyền T-DNA.

Các sản phẩm protein của vùng *vir* có tác dụng cho việc dẫn truyền T-DNA từ vi khuẩn vào tế bào thực vật. Các loại protein đó rất cần thiết cho quá trình cắt T-DNA khỏi Ti-plasmid, cảm ứng thay đổi màng tế bào thực vật mà chúng tiếp xúc, tham gia di chuyển phần T-DNA qua màng vi khuẩn tới tế bào chất của tế bào thực vật, vận chuyển tới nhân rồi cuối cùng xâm nhập vào genome của cây chủ.

Thực chất chỉ riêng T-DNA của Ti-plasmid được chuyển vào genome tế bào thực vật, mà không còn phần nào khác. Quá trình dẫn truyền chỉ do sản phẩm của các gen *vir* (vùng *vir*) và gen *chv* quyết định mà không liên quan đến các gen khác trên T-DNA. Tuy nhiên, chuỗi DNA 25 bp (RB và LB của T-DNA) có vai trò là vị trí cảm ứng cho các sản phẩm của tổ hợp các gen vùng *vir*, đặc biệt là protein từ gen *virE* mang chúng dẫn truyền vào tế bào thực vật. Chúng hoạt động như các tín hiệu nhận biết và khởi động quá trình dẫn truyền. Trước hết gen *virA* trong tổ hợp gen vùng *vir* được phosphoryl hoá nhờ tác động của các hợp chất phenol như acetosyringone giải phóng ra từ các tế bào thực vật tổn

thương. Sản phẩm của quá trình này lại tiếp tục phosphoryl hóa gen *virG*. Sản phẩm của gen *virG* liên tiếp làm hoạt hóa toàn bộ các gen *vir* còn lại, mà hai gen cuối cùng được hoạt hóa là gen *virB* và *virE*. Trước đó, khi gen *virD* được hoạt hoá, sản phẩm của nó cảm ứng nhận biết RB và LB của T-DNA và làm đứt phần T-DNA ra khỏi DNA của Ti-plasmid thành các sợi đơn. Đồng thời quá trình phosphoryl hóa này cũng làm thay đổi thẩm xuất màng tế bào thực vật, màng tế bào bị mềm ra và bị thủng. Các sợi đơn T-DNA được gắn vào protein do gen *virE* tổng hợp và dịch chuyển về phía màng tế bào vi khuẩn. Ngay sau đó, sợi T-DNA được trượt từ vi khuẩn vào tế bào thực vật. Cầu nối chính là sự tiếp hợp (conjugation) giữa hai tế bào do cảm ứng sản phẩm gen *virB* mà thành. Khi T-DNA đã được chuyển giao vào tế bào thực vật, chúng nhanh chóng xâm nhập vào genome tế bào thực vật (integration) được ổn định và di truyền như các gen bình thường khác.

2. 2.1.5. Các gen chỉ thị chọn lọc và gen chỉ thị sàng lọc

Các gen chỉ thị chọn lọc chung nhất mã hóa các protein khử độc các nhân tố ức chế trao đổi chất như các kháng sinh hoặc chất diệt cỏ (herbicide). Các gen chỉ thị sàng lọc thường được sử dụng là các gen β -glucuronidase (*gusA*), luciferase và gần đây hơn là gen mã hóa protein phát huỳnh quang màu xanh lục (green fluorescent) của sứa.

Bằng các phương pháp sinh học phân tử có thể tạo ra các cấu trúc DNA plasmid, trong đó ngoài các gen khởi động (promoter gene), các gen của vi khuẩn *Agrobacterium* giúp cho DNA plasmid gắn được vào bộ gen thực vật, gen ngoại lai cần chuyển vào... còn có các gen giúp phân lập ra tế bào hoặc mô thí nghiệm. Các gen được lắp ghép vào DNA plasmid với mục đích này được gọi là gen chỉ thị chọn lọc hay gen chỉ thị sàng lọc.

Gen chỉ thị chọn lọc thường dùng nhất là các gen mã hóa cho một số enzyme chỉ có trong vi khuẩn ở điều kiện tự nhiên mà không có trong giới thực vật. Sau khi chuyển gen, nếu thấy enzyme vi khuẩn hoạt động thì có thể suy ra là toàn bộ DNA plasmid đã được gắn vào bộ gen của thực vật và gen ngoại lai mà ta cần chuyển đã trở thành một bộ phận của bộ máy di truyền thực vật.

Các gen chỉ thị thường dùng nhất là các gen *gus A* (β -glucuronidase), gen *npt II* (neomycin phosphotransferase), gen *lux* (luciferase), gen *cat* (chloramphenicol acetyltransferase), gen *nos* (nopaline synthase)

Bảng 2.1. Hệ thống các gen chỉ thị chọn lọc (selectable marker genes) và các gen chỉ thị sàng lọc (screenable marker genes)

A. Một số gen chỉ thị chọn lọc		
Kí hiệu gen	Enzyme tương ứng	Chất dùng để chọn lọc
<i>npt II</i>	Neomycin phosphotransferase	Kanamycin
<i>hyg</i>	Hygromycin phosphotransferase	Hygromycin
<i>gent</i>	Gentamycin acetyl transferase	Gentamycin
<i>aat</i>	Streptomycin phosphotransferase	Streptomycin
<i>bleo</i>	Enzyme kháng bleomycin	Bleomycin
<i>bar</i>	Phosphinothricin acetyltransferase	Phosphinothricin
<i>bxn</i>	Bromoxynil nitrilase	Bromoxynil
Một số gen chỉ thị sàng lọc		
Kí hiệu gen	Enzyme tương ứng	Chất dùng để phát hiện
<i>gus A</i>	β -glucuronidase	X-Gluc
<i>lacZ</i>	β -galactosidase	X-Gal
<i>luc</i>	Luciferase đom đóm	Lumis Phos
<i>lux</i>	Luciferase vi khuẩn	Lumi Phos
<i>cat</i>	Chloramphenicol acetyltransferase	Chloramphenicol đánh dấu
<i>nos</i>	Nopaline synthase	Nopaline

Gen *npt II*. Enzyme neomycin phosphotransferase (*npt II*) là một enzyme vi sinh vật có trọng lượng phân tử khoảng 25 kD, xúc tác cho phản ứng phosphoryl hóa một số kháng sinh gốc aminoglycoside như neomycin, kanamycin và G148. Trong phản ứng này, nhóm γ phosphate của ATP được gắn vào phân tử chất kháng sinh làm nó trở nên bất hoạt do ngăn trở sự liên kết của kháng sinh với ribosome.

Gen *bar*. Gen *bar* là tên gọi của gen mã hóa cho enzyme phosphinothricin acetyltransferase (PAT), có tác dụng làm mất độc tính của phosphinothricin (PPT), là hoạt chất chính của thuốc trừ cỏ như Bialaphos và Basta. Gen *bar* được tạo dòng đầu tiên từ một dòng vi khuẩn *Streptomyces hygroscopicus*. Phương pháp đơn giản nhất để kiểm tra sự có mặt của gen *bar* là phương pháp trực tiếp. Mô, tế bào hoặc cây chuyển gen được

đặt trên môi trường có các nồng độ phosphinothricin khác nhau (hoặc các thuốc trừ cỏ tương ứng) và so sánh sinh trưởng của mô, tế bào hoặc cây đối chứng đặt trên cùng môi trường.

Gen *gus A*. là gen mã hóa cho sinh tổng hợp enzyme β -glucuronidase. β -glucuronidase là một hydrolase xúc tác cho sự phân giải các β -glucuronide, sản phẩm phân giải có màu xanh chàm đặc trưng, dễ nhận biết. β -glucuronide thường dùng nhất trong phản ứng để nhận biết sự tồn tại của gen *gus A* là X-Gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide). Dung dịch X-Gluc không màu dưới tác động của enzyme β -glucuronidase sẽ chuyển sang màu xanh chàm rất đặc trưng.

Gen *lacZ*. Enzyme β -galactosidase (*lacZ*) trọng lượng phân tử 116 kD, pH tối thích 7-7,5 được mã hóa do gen *lacZ*. Gen *lacZ* ở *E. coli* được dùng rất phổ biến trong công nghệ gen vi sinh và đã có sẵn các hệ thống phương pháp kiểm tra rất nhạy với thuốc thử X-Gal. Sự tồn tại hoạt động của *lacZ* trong tế bào thực vật đã được khẳng định. Vì vậy trước khi kiểm tra sự có mặt của gen *lacZ* ngoại lai, cần phải bất hoạt gen *lacZ* nội sinh bằng glutaraldehyde.

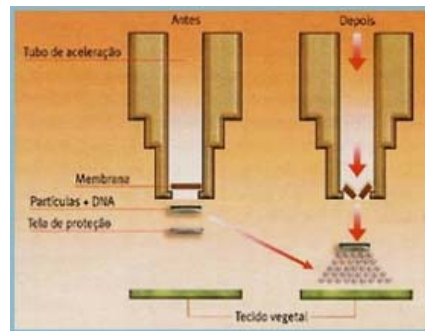
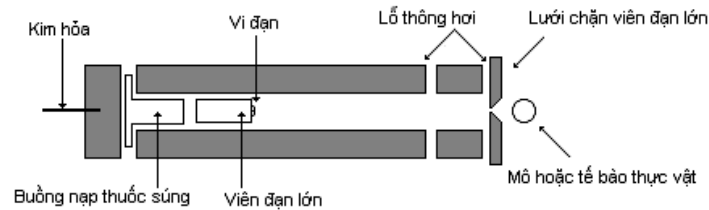
Gen *cat*. Được phân lập và tạo dòng từ dòng vi khuẩn Tn9, là gen gây khả năng kháng chloramphenicol ở vi khuẩn nói chung. Gen *cat* đã được dùng rộng rãi trong công nghệ gen động vật và thực vật vì gen *cat* mã hóa cho enzyme chloramphenicol acetyltransferase (CAT). Enzyme này xúc tác phản ứng acetyl hóa hai vị trí trên phân tử chloramphenicol và làm nó bất hoạt.

2.2.2. Chuyển gen bằng phương pháp bắn gen

Đây là phương pháp hiện đang được sử dụng phổ biến tại các phòng thí nghiệm công nghệ sinh học thực vật ở trong nước và trên thế giới. Phương pháp này được Sanford (Cornell University, USA) đề xuất lần đầu tiên vào năm 1987. Nguyên tắc của phương pháp này là sử dụng các viên đạn có kích thước hiển vi, có tỷ trọng cao để đạt gia tốc cao xuyên qua vỏ và màng tế bào, đưa lớp DNA bọc ngoài tiếp cận với bộ máy di truyền của tế bào.

Hạt tungsten hoặc vàng có đường kính 1-1,5 μm được dùng làm vi đạn (microprojectile). Vi đạn được trộn với DNA theo một tỷ lệ thích hợp cùng với các chất phụ gia và sau khi kết tủa DNA bao quanh vi đạn, hỗn hợp được làm khô trên một đĩa kim loại mỏng kích thước 0,5-0,8 cm. Đĩa kim loại được gắn vào đầu một viên đạn lớn (macroprojectile) vừa khít với nòng súng. Thường đạn lớn làm bằng nhựa hoặc bông nén hay các vật liệu nhẹ. Khi bắn, áp suất hơi đẩy viên đạn lớn đi với tốc độ cao. Ra khỏi đầu nòng, một lưới thép mịn cản viên đạn lớn lại, nhưng các vi đạn vẫn tiếp tục quỹ đạo

với gia tốc lớn đến đích và xuyên vào tế bào. Một tỷ lệ nhất định DNA ngoại lai hội nhập với DNA tế bào và biểu hiện, thực hiện quá trình biến nạp gen



Hình 2.5. Sơ đồ súng bắn gen.

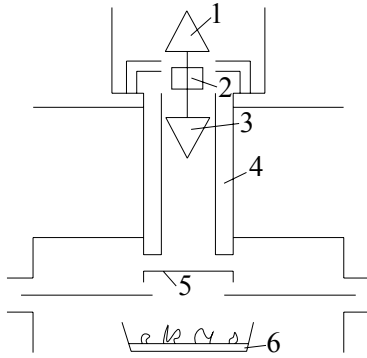
***Làm viên đạn.**

Viên đạn được trộn với DNA 1 tỷ lệ tích hợp cùng với các chất phụ gia và sau khi kết tủa DNA bao quanh viên đạn, hỗn hợp được làm khô trên 1 đĩa kim loại mỏng, kích thước 0,5 – 0,8 cm. Đĩa kim loại được gắn vào đầu một viên đạn lớn vừa khít với nòng súng. Thường đạn lớn làm bằng nhựa hay các vật liệu nhẹ. Khi bắn áp suất hơi đẩy viên đạn lớn đi với tốc độ cao ra khỏi đầu nòng súng một lưới thép mịn cản viên đạn lớn đạn lại, nhưng các hạt vi đạn vẫn tiếp tục quỹ đạo với gia tốc lớn đến đích và nguồn vào tế bào. Một tỷ lệ nhất định DNA ngoại lai hội nhập với DNA tế bào và biểu hiện, thực hiện quá trình chuyển gen.

*** Các mẫu súng bắn gen**

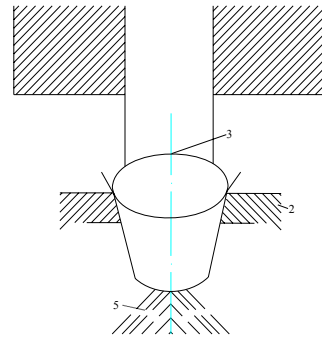
1. Súng bắn gen PDS-1000

Áp lực đẩy viên đạn lớn được tạo ra bằng thuốc súng, vận tốc đầu nòng đạt 800m/giây. Tốc độ viên đạn có thể đạt trên 1300m/giây ở cách lưới chắn 2cm.



Hình 2.6. Cấu tạo súng bắn gen PDS-1000

- 1.kim hoá
- 2.thuốc súng
- 3.viên đạn lớn
- 4.nòng súng
- 5.lưới chắn
- 6.mô thực vật.



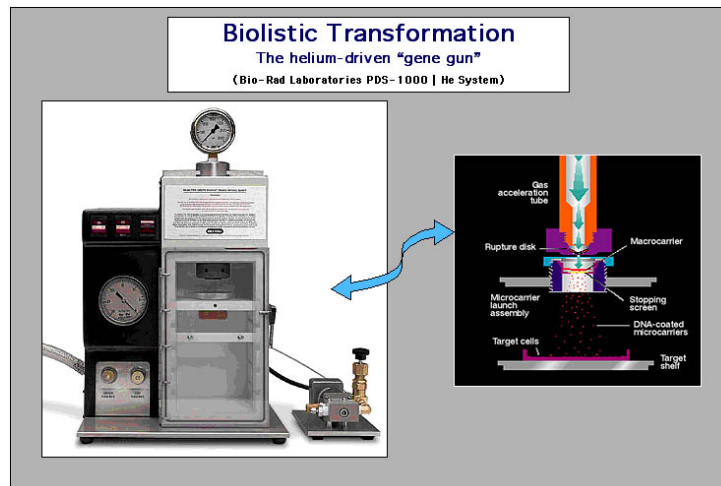
Hình 2.7. Phóng đại phần đầu nòng và lưới chắn

- 1.đầu nòng
- 2.bộ chặn
- 3.lưới chắn
- 4.viên đạn lớn
- 5.viên đạn.

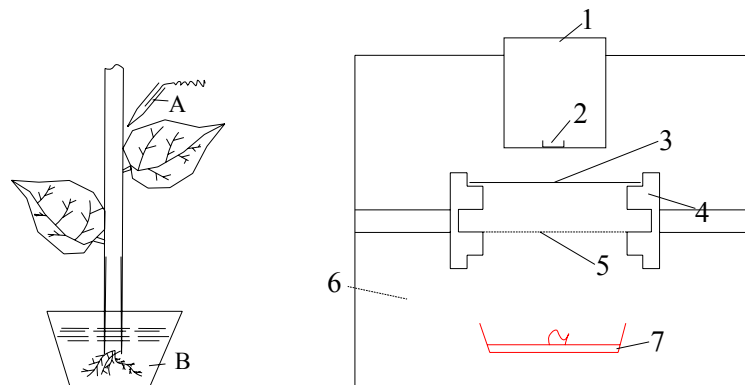
2. Súng bắn gen PDS-1000He.

Trong đó helum nén được dùng để gia tốc viên đạn lớn thay cho thuốc súng, một lưới chắn bằng kim loại được cài đặt trên bộ chặn. Viên đạn được trộn với DNA và làm khô trên 1 đĩa kim loại nhỏ, sau đó gắn lên đầu viên đạn lớn. Loại này được dùng phổ biến hiện nay.

A. Phần đầu pipeton bằng nhựa, thể tích khoảng 1ml. Đoạn đầu nhọn của pipeton chứa agarose (tô đen) có hoà DNA ngoại lai, áp vào đỉnh sinh trưởng của 1 chồi phụ bị chặn này chứa đất trồng, đất ẩm nối với cực dương của hệ điện di.



Hình 2.8. Cấu tạo PDS-1000He



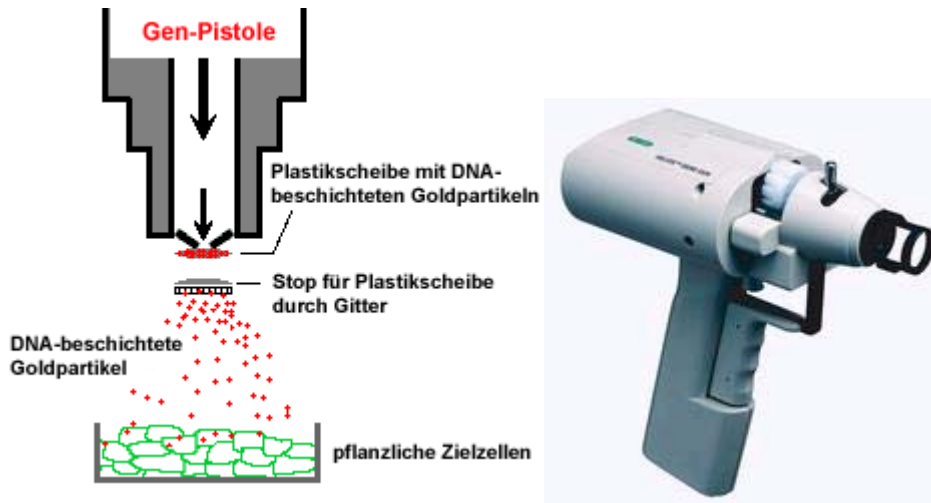
Hình 2.9. Cấu tạo PDS-1000HC

1. Bình chứa HC áp suất cao, 2. Màng giữ áp suất HC trong bình 1, màng này sẽ tách khí áp suất HC tăng vọt và cho khí HC thoát ra với tốc độ cao, 3. Viên đạn lớn, là đĩa kim loại mỏng, trên đó hỗn hợp DNA và vi đạn được kết tủa và làm khô, các vi đạn nằm ở mặt dưới nước đĩa, 4. Bộ bắn, 5. Lưới chắn, 6. Buồng bắn gen dưới áp chân không, 7. Mô thực vật.

2. Súng bắn gen Sautter 1991

Để tránh các yếu tố gây ra sự không đồng đều về vận tốc vi đạn. không dùng viên đạn lớn mà tạo ra các điều kiện để các hạt vi đạn lơ lửng trong không khí ngay trước khi chúng được gia tốc.

Ống pipton là 1 ống thép, trong có 1 ống nhỏ thẳng góc với trục đầu ống nhỏ nằm trên trục ống. Trong ống nhỏ chứa 20 μ l hỗn hợp vi đạn bằng vàng và DNA. Ở áp suất 60bar và tốc độ khí 2m/giây, hỗn hợp sẽ lán thành sương mù có kích thước cơ XMIRON, các hạt này được thổi qua ống vi quản bằng thủy tinh có $\phi=300\mu\text{m}-400\mu\text{m}$ và dài 10mm. Các hạt sương mù chứa vi đạn và DNA được gia tốc khi chuyển qua ống vi quản và dưới ảnh hưởng của chân không ở buồng 9. Lượng hỗn hợp vi đạn và DNA được đo chính xác bằng bơm vi tiêm 6.



Hình 2.10. Súng bắn gen của Biorad.

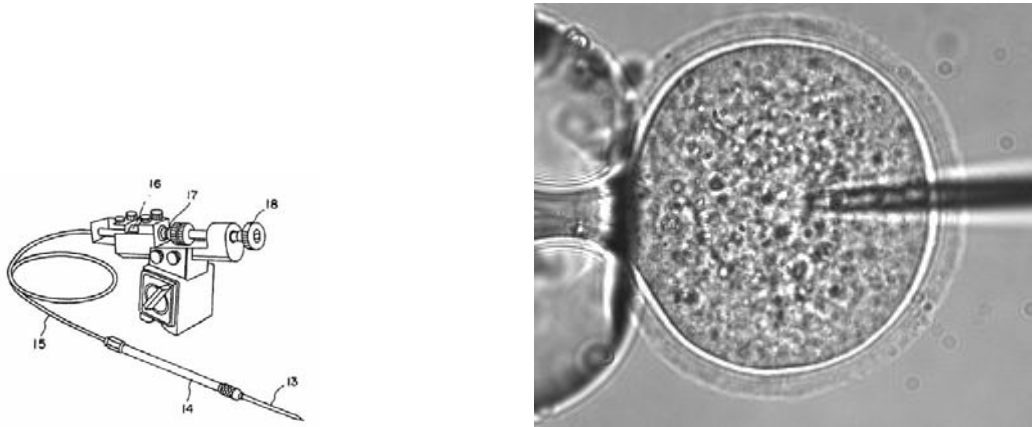
2.2.3. Chuyển nạp DNA ngoại lai vào protoplast bằng xung điện

Thiết bị điện xung (electroporator) là thiết bị có khả năng tạo ra các xung điện trong thời gian rất ngắn (5-6 phần nghìn giây) và ở điện thế (pulse strenght) chính xác (500 V/cm) với thời gian tắt dần (decay time) 20 ms. Protoplast được đặt giữa hai tấm kim loại cách nhau từ 1-4 mm trong một cuvette bằng nhựa. Ở điện thế cao, xung điện tạo các lỗ tạm thời (cỡ 30 nm) trên màng protoplast và DNA bên ngoài có thể xâm nhập vào chất nguyên sinh.

Xung điện được tạo ra khi giải phóng dòng điện chứa trong một điện dung (capacitor) từ điện cực này qua điện cực khác. Các vật nằm trong không gian giữa hai điện cực chịu tác động tắt dần của xung điện. Xung điện được xác định bởi hai giá trị là sự chênh lệch điện thế và thời gian tắt dần. Ở các thiết bị điện xung hiện đại, thời gian tắt dần được thu lại rất ngắn và trên biểu đồ xung điện được biểu diễn gần như một cột vuông. Nói chung, các thiết bị điện xung hoàn chỉnh được nhiều hãng cung cấp để thực hiện chuyển gen vào vi sinh vật, protoplast thực vật hoặc tế bào động vật.

2.2.4. Chuyển nạp DNA ngoại lai vào protoplast bằng kỹ thuật vi tiêm

Vi tiêm (microinjection) là kỹ thuật sử dụng phổ biến trong công nghệ tế bào động vật. Trên hiển vi thường, DNA plasmid có thể được tiêm vào protoplast và thực hiện biến nạp gen thành công ở khá nhiều đối tượng thực vật. Tuy nhiên, Kỹ thuật này hiện nay ít được các phòng thí nghiệm sử dụng, vì thao tác vi tiêm dưới kính hiển vi đòi hỏi thiết bị vi thao tác cực nhạy, thiết bị kéo và mài kim tiêm từ các ống thủy tinh. Ngoài ra, nó còn đòi hỏi kỹ năng thao tác và sự kiên nhẫn cao của kỹ thuật viên.



Hình 2.11. Chuyển gen bằng vi tiêm

2.2.5. Chuyển nạp DNA ngoại lai vào protoplast bằng PLO và PEG

PEG (polyethylene glycol) cùng với sự có mặt của Ca^{2+} là tác nhân dung hợp được sử dụng phổ biến nhất trong lai soma. Krens và cs (1982) là những người đầu tiên chứng minh có thể dùng PEG để chuyển trực tiếp DNA vào trong protoplast thực vật. Kỹ thuật này đòi hỏi phải nuôi protoplast với DNA trần có mặt PEG và CaCl_2 . Sau khi hòa tan dần dần hỗn hợp, các protoplast được phân lập, rửa và cuối cùng dàn trải trên môi trường chọn lọc. Tần số chuyển nạp trung bình ở protoplast thuốc lá khoảng từ 10^{-2} và 10^{-5} .

Cách tiến hành:

- Bổ sung PEG sau DNA
- Xử lý shock nhiệt protoplast ở 46°C rồi làm lạnh trên băng.

2.7. Sự hợp nhất và biểu hiện của DNA ngoại lai trong tế bào thực vật

Những nghiên cứu đầu tiên về biểu hiện của đoạn DNA ngoại lai chuyển vào trong tế bào thực vật đã không có kết quả lắm. Những nghiên cứu sau đó về sự biểu hiện của các gen kháng sinh được mã hóa nhờ các gen nhảy (transposons) ở prokaryote, gen dehydrogenase ở nấm men lên men rượu, gen β -globin ở động vật có vú và các gen interferon ở tế bào thực vật eukaryote cũng không thành công (Barton và cs 1983, Shaw và cs 1983). Sự không biểu hiện của gen (đối với cấu trúc vector plasmid có mang các đoạn mở đầu và kết thúc sao mã) được biết là thuộc về chức năng ở tế bào thực vật. Giữa hai đoạn này phải có vị trí tạo dòng để nạp đoạn mã hóa của DNA ngoại lai mong muốn.

Sự biểu hiện được thông báo lần đầu tiên của gen chuyển nạp ở tế bào thực vật dựa trên nguyên tắc này bao gồm promoter và đoạn 5' nằm bên cạnh của gen tổng hợp nopaline đã tái tổ hợp với đoạn mã hóa và đầu 3' của gen tổng hợp octopine. Sự hiện diện của octopine trong các mô thực vật được chuyển nạp bằng cách dùng cấu trúc này đã xác định rằng gen khảm *non-ocs* đã được biểu hiện. Tương tự, cấu trúc bao gồm sự dung hợp của đoạn mã hóa của gen CAT từ vi khuẩn plasmid pBR 325 đối với các đoạn 3' promoter tổng hợp nopaline cũng đã biểu hiện hoạt tính enzyme CAT ở các tế bào thực vật.

Những nghiên cứu gần đây cho thấy việc loại bỏ vùng lặp lại bên phải (25 bp) của T-DNA đào thải khả năng Ti plasmid chuyển DNA vào tế bào thực vật, trong khi sự khuyết đoạn của vùng lặp lại bên trái (25 bp) có ảnh hưởng ít hoặc không ảnh hưởng. Vì thế, vùng lặp lại bên phải 25 bp (nhân tố hoạt động cis) thể hiện một vai trò quan trọng trong cơ chế định hướng của việc chuyển T-DNA.

Chương 3. CHUYỂN GEN TRONG THỰC TẾ TRỒNG TRỌT

3.1. Tình hình cây trồng chuyển gen trên thế giới

Năm 2006, diện tích toàn cầu cây trồng chuyển gen tiếp tục tăng cao vượt ngưỡng 100 triệu ha, khi lần đầu tiên hơn 10 triệu nông dân (10,3 triệu) tại 22 nước canh tác cây chuyển gen, cao hơn so với 90 triệu ha và 8,5 triệu nông dân tại 21 nước năm 2005.

Diện tích cây chuyển gen toàn cầu tăng hơn 60 lần trong 11 năm đầu tiên thương mại hóa, làm cho cây trồng chuyển gen được coi là kỹ thuật cây trồng được chấp nhận nhanh nhất trong lịch sử hiện đại. Diện tích cây chuyển gen toàn thế giới năm 2006 là 102 triệu ha, tương đương 250 triệu mẫu Anh, cao hơn so với 90 triệu ha hay 220 triệu mẫu Anh năm 2005. Sự gia tăng 12 triệu ha hay 30 triệu mẫu Anh giữa năm 2005 và 2006, là sự gia tăng cao thứ hai trong 5 năm trở lại đây, tương đương với tỷ lệ tăng trưởng hàng năm là 13% trong năm 2006. Đáng ghi nhận là hơn một nửa (55% hay 3,5 tỷ người) dân số của 6,5 tỷ người sống tại 22 nước có canh tác cây chuyển gen trong năm 2006 đã tạo ra lợi nhuận một cách đáng kể. Cũng hơn một nửa (52% hay 776 triệu ha của 1,5 tỷ ha) diện tích đất trồng trên thế giới tại 22 nước năm 2006 đã canh tác cây chuyển gen.

Năm 2006, 22 nước trồng cây chuyển gen, có 11 nước đang phát triển và 15 nước công nghiệp, trong đó nếu tính theo thứ tự về diện tích, thì Hoa kỳ dẫn đầu, tiếp đến Aentina, Brazil, Canada, Ấn độ, Trung Quốc, Paraguay, Nam phi, Uruguay, Philippin, Úc, Rumani, Mê hi cô, Tây Ban nha, Côlômbia, Pháp, Iran, Honduras, Cộng hòa Czech, Bồ đào nha, Đức và Sloavakia.

Năm 2006, đứng sau Hoa kỳ là Aentina, Brazil, Canada, Ấn độ và Trung quốc là 6 nước chấp nhận trồng cây chuyển gen rộng rãi, với Ấn độ lần đầu tiên thay Trung quốc ở vị trí số 5 trên thế giới về cây bông BT. Hoa kỳ vẫn giữ vị trí dẫn đầu với 54,6 triệu ha (chiếm 53% diện tích cây chuyển gen toàn cầu), tiếp theo là Aentina với 18,0 triệu ha, Brazil – 11,5 triệu ha, Ấn độ - 3,8 triệu ha và Trung quốc 3,5 triệu ha.

Cây đậu nành chuyển gen vẫn giữ là cây chuyển gen chủ yếu năm 2005, đạt 58,6 triệu ha (chiếm 57% diện tích cây chuyển gen toàn cầu), tiếp theo là cây bắp (25,2 triệu ha – 25%), cây bông (13,4 triệu ha – 13%) và cây cải dầu (4,8 triệu ha – 5%). Giống cỏ alfafa kháng thuốc trừ cỏ, là loại cây chuyển gen lâu năm đầu tiên được đưa vào trồng với diện tích 80.000 ha ở Hoa kỳ và giống bông kháng thuốc trừ cỏ RR@ Flex được đưa ra với diện tích 800.000 ha ở Hoa kỳ và Úc. Giống đu đủ kháng *virus*, là loại cây ăn quả được Ủy ban An toàn Sinh học quốc gia Trung quốc khuyến cáo thương mại hóa vào quý

IV/2006.

Năm 2006, các giống đậu nành, bắp, cải dầu và cỏ alfalfa kháng thuốc trừ cỏ tiếp tục chiếm ưu thế với 68% hay 69,9 triệu ha, tiếp theo là giống kháng sâu BT với 19,0 triệu ha (19%) và các giống cây chuyển gen xếp chồng (chịu được cả thuốc trừ cỏ và kháng sâu) chiếm 13,1 triệu ha (13%). Các giống chuyển gen xếp chồng là nhóm giống tăng trưởng nhanh nhất tới 30% giữa năm 2005 và 2006, so với 17% đối với nhóm kháng sâu và 10% đối với nhóm kháng thuốc trừ cỏ.

Cây chuyển gen được trồng bởi 10,3 triệu nông dân tại 22 nước năm 2006, so với 8,5 triệu nông dân tại 21 nước năm 2005. Đặc biệt là 90% hay 9,3 triệu nông dân nghèo từ các nước đang phát triển, đã tăng được thu nhập từ cây chuyển gen. Trong đó chủ yếu từ Trung Quốc – 6,8 triệu nông dân và Ấn Độ - 2,3 triệu. Trong giai đoạn 1996 đến 2006, tỷ lệ diện tích trồng cây chuyển gen ở các nước đang phát triển tăng hàng năm. Hơn 1/3 diện tích (40%) cây chuyển gen năm 2006, tương đương với 40,9 triệu ha là tại các nước đang phát triển. Sự tăng trưởng giữa năm 2005 và 2006 là 7,0 triệu ha hay 20% tăng trưởng ở các nước này cao hơn so với các nước công nghiệp – 5,0 triệu ha hay 9% tăng trưởng.

Sự tác động tích lũy toàn cầu của cây chuyển gen từ năm 1996 đến 2005 đã đem lại lợi nhuận thuần cho nông dân trồng cây chuyển gen là 27 tỷ USD (13 tỷ USD đối với các nước đang phát triển và 14 tỷ USD đối với các nước công nghiệp). Đã làm giảm tổng lượng thuốc trừ sâu từ năm 1996 đến 2005 là 224.000 tấn hoạt chất, tương đương với việc giảm 15% trong tác động môi trường xung quanh của sử dụng thuốc trừ sâu đối với các loại cây trồng trên.

3.2. Chuyển gen ở các cây trồng chính

3.2.1. Cây ngô

Cây ngô biến nạp gen đầu tiên tái sinh từ protoplast được biến nạp bằng xung điện đã bắt thụ (Rhodes và cs 1988). Có thể dùng phôi ngô trong nuôi cấy dịch huyền phù phát sinh phôi để tái sinh các cây hữu thụ mang gen biến nạp, sử dụng phương pháp bắn gen và chọn lọc bằng chất diệt cỏ “bialaphos” đã cho kết quả là mô callus phát sinh các phôi được biến nạp gen. Các cây biến nạp gen hữu thụ đã được tái sinh, ổn định di truyền và biểu hiện gen *bar* (kháng chất diệt cỏ glufosinate không chọn lọc) cùng với hoạt tính chức năng của enzyme phosphinothricin acetyltransferase quan sát được trong những thế hệ sau. Hiện nay, biến nạp gen ở ngô bằng phương pháp bắn gen được sử dụng rộng rãi. Gần đây, các kết quả biến nạp gen gián tiếp ở ngô nhờ *Agrobacterium* cũng đã được thông báo. Các thể biến nạp gen của dòng ngô lai gần (inbredline) A188 đã được tái sinh

sau khi nuôi cấy chung (cocultivation) giữa vector “super-binary” với phiên non. Tần số được thông báo ở dòng A188 là khoảng 5-30%. Các thể lai thế hệ thứ nhất giữa dòng A188 và 5 dòng lai gần khác được biến nạp với tần số khoảng 0,4-5,3% (tính theo số cây biến nạp gen độc lập/phiên).

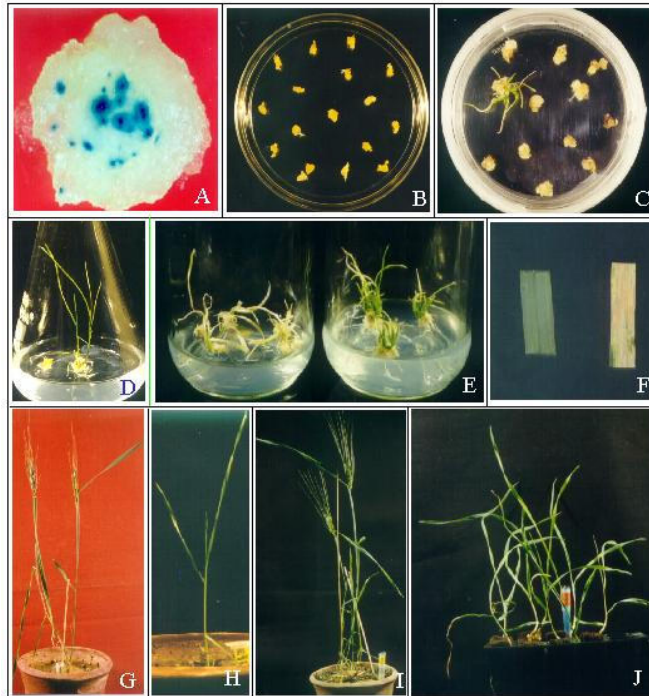
Bảng 3.1. Các cây trồng chính đã được biến nạp gen

Stt	Loài	Phương pháp biến nạp gen	Thử nghiệm trên đồng ruộng
1	Chuối	Bắn gen/ <i>Agrobacterium</i>	-
2	Luá mạch	Bắn gen	Kháng vi rus
3	Đậu tây	Bắn gen	-
4	Canola	Bắn gen/ <i>Agrobacterium</i>	Chống chịu chất diệt cỏ, điều khiển sự thụ phấn
5	Sắn	Bắn gen/ <i>Agrobacterium</i>	-
6	Ngô	Bắn gen/ <i>Agrobacterium</i>	Kháng côn trùng, chống chịu chất diệt cỏ
7	Bông	Bắn gen/ <i>Agrobacterium</i>	Kháng côn trùng, chống chịu chất diệt cỏ
8	Đu đủ	Bắn gen/ <i>Agrobacterium</i>	Kháng <i>virus</i>
9	Đậu phụng	Bắn gen/ <i>Agrobacterium</i>	Kháng <i>virus</i>
10	Bạch dương	Bắn gen/ <i>Agrobacterium</i>	Chống chịu chất diệt cỏ
11	Khoai tây	<i>Agrobacterium</i>	Kháng côn trùng, kháng <i>virus</i> , chống chịu chất diệt cỏ
12	Lúa	Bắn	Chống chịu chất diệt cỏ

13	Đậu tương	gen/ <i>Agrobacterium</i> Bản gen/ <i>Agrobacterium</i>	Chống chịu chất diệt cỏ
14	Bí	Bản gen/ <i>Agrobacterium</i>	Kháng <i>virus</i>
15	Củ cải đường	<i>Agrobacterium</i>	Chống chịu chất diệt cỏ
16	Mía	Bản gen	-
17	Hương dương	Bản gen	-
18	Cà chua	<i>Agrobacterium</i>	Quả chín muộn, kháng <i>virus</i>
19	Lúa mì	Bản gen	-

3.2.2. Cây lúa

Phương pháp bản gen cho phép thực hiện biến nạp gen hiệu quả ở lúa trong các kiểu gen độc lập, và hiện nay hơn 40 giống đã được biến nạp gen thành công. Mẫu vật sử dụng là phôi non và các callus có nguồn gốc từ hạt trường thành. Hygromycin B là marker chọn lọc thường được dùng cho lúa. Tần số biến nạp có thể cao tới 50% (tính theo số cây biến nạp gen có nguồn gốc độc lập/số mẫu được bản gen).



Hình 3.1. Chọn lọc giống lúa chịu hạn bằng cách chuyển gen chịu hạn cho lúa

Gần đây, kỹ thuật biến nạp gen ở lúa thông qua *Agrobacterium* cũng đã có những cải tiến quan trọng có hiệu quả tương đương với kỹ thuật bắn gen.

3.2.3. Cây lúa mì

Phương pháp bắn gen cũng được sử dụng để biến nạp gen ở lúa mì. DNA ngoại lai được bắn vào trong các vảy nhỏ (scutellum) của phôi non của hai giống mùa xuân và một giống mùa đông. Các callus chống chịu được chọn lọc bằng phosphinothricin hoặc các nhân tố ức chế trao đổi chất tương tự như basta, bialaphos hoặc glufosinate amonium. Chọn lọc bằng các hợp chất như thế không hiệu quả lắm và kết quả là một số lớn cây thoát. Phân tích di truyền và phân tử đã xác nhận sự hợp nhất ổn định của các gen biến nạp. Nói chung, công nghệ di truyền lúa mì vẫn còn tập trung ở một hoặc hai giống đặc trưng có khả năng tái sinh cây nhanh, thích hợp với phương pháp bắn gen.

3.2.4. Cây lúa mạch

Wan và Lemaux (1994), đã tái sinh một số lượng lớn các cây lúa mạch biến nạp gen độc lập, tự thụ phấn. Các phôi hợp tử non, các callus mới hình thành và các phôi có nguồn gốc từ tiểu bào tử hạt phấn đã được dùng để bắn gen với plasmid mang gen *bar* và *gusA* đơn độc hoặc phối hợp với plasmid khác mang gen protein vỏ của *virus* gây bệnh lùn vàng ở lúa mạch. Kiểm tra khả năng nảy mầm của phôi non để phân lập các cây biểu hiện hoạt tính *bar* bằng môi trường chứa bialaphos, mặc dù đây chưa phải là một chất chỉ thị tốt cho sự có mặt hoặc không của gen.

3.2.5. Cây đậu tương

Kết quả đầu tiên ở đậu tương là phục hồi thành công cây biến nạp gen nhờ *Agrobacterium*. Phương thức này dựa vào sự phát sinh chồi từ lá mầm của giống Peking chọn lọc cho tính miễn cảm với *Agrobacterium*. Các mẫu lá mầm được xâm nhiễm với *Agrobacterium* mang plasmid kháng kanamycin và có hoạt tính *gusA*, hoặc kháng kanamycin và chống chịu glyphosate. Có thể biến nạp gen hiệu quả vào protoplast đậu tương bằng các phương thức thông dụng nhưng rất khó tái sinh được cây.

Để biến nạp gen vào các giống đậu tương khác nhau người ta đã phối hợp hai yếu tố: genotype đơn giản - phương thức tái sinh cây độc lập (dựa trên cơ sở sự tăng sinh của cụm chồi từ vùng chung quanh mô phân sinh của trụ phôi) với sự tăng gia tốc của vi đạn (particle) có phóng điện để phân phối DNA ngoại lai. Hàng trăm cây đậu tương có nguồn gốc độc lập đã thu được và kết quả biến nạp đã cho nhiều phenotype khác nhau. Nói chung, ở các dòng đậu tương biến nạp gen có nhiều bản sao của các gen biến nạp (số bản sao khoảng từ 1-50 nhưng thường thay đổi từ 2-10). Phân tích DNA (southern blot) ở thế

hệ sau của các bản sao gen phức cho thấy tất cả các bản sao cùng tách rời, như thể mỗi thể biến nạp sơ cấp chỉ hiện diện một kết quả biến nạp độc lập và có thể sự tái tổ hợp thống nhất đã không xuất hiện thường xuyên.

3.2.6. Cây bông

Phương thức biến nạp gián tiếp thông qua *Agrobacterium tumefaciens* là kỹ thuật đầu tiên được sử dụng để biến nạp gen vào cây bông giống Coker 312 (Umbeck 1987). Cây bông biến nạp gen cũng của giống trên đã được phục hồi sau khi bắn gen vào dịch huyền phù nuôi cấy phát sinh phôi (Finer và McMullen 1990). Hầu hết các giống bông có giá trị kinh tế khác không thể tái sinh cây từ giai đoạn callus. Một số ít các giống đó có thể tái sinh cây nhưng quá trình này thiên về biến dị dòng vô tính.

3.3. Triển vọng và hướng phát triển

Hiện nay ở nước ta lĩnh vực nghiên cứu tạo sinh vật biến đổi gen, nghiên cứu chuyển gen vào cây trồng (GM) đang được tiếp cận, đầu tư và triển khai nghiên cứu, ứng dụng với sự chú trọng đặc biệt. Nhiều gen quý có giá trị ứng dụng như năng suất, chất lượng, khả năng chống chịu đã được phân lập và nghiên cứu nhằm chuyển vào cây trồng để tạo nên những giống lý tưởng. Nhiều phương pháp chuyển gen khác nhau như phương pháp bắn gen, phương pháp sử dụng vi khuẩn. *A.tumefaciens*... đã được áp dụng thành công trên hàng loạt cây trồng quan trọng như lúa, cà chua, cà tím, đậu xanh, cà-phê, thuốc lá, khoai lang. Những vấn đề thiết kế vector cũng như hoàn thiện các quy trình tái sinh cây khởi đầu cho nghiên cứu chuyển gen cũng nhận được sự quan tâm của nhiều nhà khoa học.

Các nhà khoa học đã tiến hành thu nhập và phân lập được nhiều nguồn gen quý có giá trị nông nghiệp như gen chịu hạn, lạnh ở lúa; gen cry, gen mã hóa protein bất hoạt hóa ở cây mướp đắng và gen mã hóa của cây đậu cô ve có hoạt tính diệt côn trùng; gen kháng bọt, hà khoai lang của vi khuẩn Bt; gen mã hóa protein vỏ của *virus* gây bệnh đốm vòng ở cây đu đủ... Hiện các nhà sinh học Việt Nam đang tiếp tục nghiên cứu để chuyển gen vào cây hoa, cây bông và cây lâm nghiệp, nhằm nâng cao sức chống chịu với sâu bệnh và điều kiện ngoại cảnh bất lợi.

Những nghiên cứu tăng cường tính chịu hạn và chịu mặn ở cây lúa bằng công nghệ GM, chuyển gen kháng *virus* đốm vòng vào cây đu đủ, chuyển gen chịu hạn vào cây bông... cũng đang được triển khai hiệu quả với một số loài cây GM.

Nhà nước ta đã xác định công nghệ sinh học là một ngành khoa học quan trọng. Từ năm 1990, Chương trình công nghệ sinh học quốc gia đã được cấp kinh phí cho các dự án nghiên cứu ứng dụng công nghệ sinh học, đặc biệt trong cải tiến giống cây trồng. Từ năm 2001, Chính phủ đã đầu tư nhiều dự án, đề tài nghiên cứu GM liên quan đến nhiều cây trồng quan trọng của Việt Nam. Một số phòng thí nghiệm công nghệ sinh học đã và đang được Nhà nước đầu tư trang thiết bị hiện đại và triển khai các kỹ thuật cơ bản của công nghệ gen như phân lập và xác định trình tự gen, thiết kế và biến nạp gen vào tế bào vi sinh vật, động vật, nghiên cứu biểu hiện gen... Nhờ các biện pháp và chính sách khuyến khích, đầu tư hiệu quả đó, công nghệ sinh học ở nước ta vài năm gần đây đã có những bước phát triển mạnh mẽ.

Công nghệ di truyền thực vật là một bước ngoặt quyết định. Một số cây trồng quan trọng đã được biến nạp gen; một vài vấn đề kỹ thuật vẫn đang còn tồn tại, nhưng chúng đang dần dần được giải quyết. Để có kết quả cần phải thay đổi dần dần sang một phạm vi khác, như là phát hiện và tạo dòng các gen mang các tính trạng đa gen (multigenic traits). Một điều không thể quên là vấn đề nhận thức của xã hội và dự báo nguy cơ tác động xấu đến môi trường do các sản phẩm có nguồn gốc từ công nghệ tái tổ hợp DNA mang lại.

Cây biến nạp gen đầu tiên thu được vào năm 1983. Điều này cho phép nhận xét rằng mới chỉ hơn hai thập niên, các công cụ của công nghệ DNA tái tổ hợp và sinh học tế bào đã giúp ích rất nhiều cho các nhà tạo giống thực vật. Việc lựa chọn phương thức sử dụng các cây trồng thu được từ công nghệ DNA tái tổ hợp có thể cung cấp thêm nguồn tài nguyên mới cho công nghiệp và người tiêu dùng, như vậy có thể mở rộng cơ sở kinh tế ở cả các nước công nghiệp lẫn các nước đang phát triển.

3.4. Thực hành chuyển gen vào cây thuốc lá bằng *Agrobacterium tumefaciens*

3.4.1. Dụng cụ

- Bình tam giác (250 ml), ống nghiệm có nắp vặn
- Giấy thấm vô trùng
- Forceps, kéo, dao mổ
- Que cấy vi sinh
- Đĩa petri (plastic và thủy tinh) vô trùng
- Giấy parafilm
- Giấy nhôm

- Tube eppendorf (1,5-2 ml)
- Cốc chịu nhiệt, ống đong, micropipette

3.4.2. Thiết bị

- Nồi khử trùng
- Tủ sấy
- Laminar
- Tủ lạnh
- Microwave
- Cân phân tích 10^{-4} g
- Cân kỹ thuật 10^{-2} g
- Máy cất nước 2 lần
- Máy ly tâm lạnh (14000 rpm) cho tube 1,5-2 ml

3.4.3. Hóa chất

- Môi trường cơ bản MS
- Môi trường nuôi cấy vi khuẩn LB
- Các loại kháng sinh: kanamycin, rifampicin và cefotaxim
- Agar
- $MgSO_4$ 10mM
- Dung dịch stock các chất kích thích sinh trưởng: NAA và BAP
- Cồn 90%
- Nước cất vô trùng

3.4.4. Phương pháp tiến hành

3.4.4.1. Nguyên liệu

- *E. coli* chủng TOP 10 có mang pRK 2013 (helper plasmid)
- *E. coli* chủng TOP 10 có mang vector pBI 121+ insert DNA (gen ngoại lai mang tính trạng mong muốn)
- *Agrobacterium tumefaciens* chủng LBA 4404.
- Cây thuốc lá *in vitro*.

3.4.4.2. Chuẩn bị môi trường

*Môi trường LB

- Bacto-tryptone 3 g
- Yeast-Extract 1,5 g
- NaCl 3 g
- Nước cất đến đủ 300mL.

* Môi trường LB đặc

Môi trường LB bổ sung 1,5 % agar/100 mL.

* Môi trường LB-R

Môi trường LB bổ sung 100 µg/mL rifampicin.

* Môi trường LB-K

Môi trường LB bổ sung 50 µg/mL kanamycin.

* Môi trường LB-RK

Môi trường LB bổ sung 100 µg/mL rifampicin và 50 µg/mL kanamycin.

* Môi trường MSO

- MS đầy đủ
- Agar 0,8 %
- Saccharose 3 %
- pH_{môi trường} ~ 5,8

* Môi trường nuôi cấy (MS 104)

- MS đầy đủ
- Agar 0,8 %
- Saccharose 3 %
- BAP 2 mg/mL
- NAA 0,2 mg/mL
- pH_{môi trường} ~ 5,8

* Môi trường chọn lọc (MS SEL)

- MS đầy đủ

- Agar 0,8 %
 - Saccharose 3 %
 - BAP 2 mg/mL
 - NAA 0,2 mg/mL
 - Kanamycin 1,5 mL
 - Cefotaxim 2 mL
 - pH_{môi trường} ~ 5,8
- * Môi trường tạo rễ (MSR)
- MS đầy đủ
 - Agar 0,8 %
 - Saccharose 3 %
 - Kanamycin 1,5 mL
 - Cefotaxim 2 mL
 - pH_{môi trường} ~ 5,8

Môi trường có bổ sung cefotaxim cần được bảo quản trong điều kiện không có ánh sáng. Chất kháng sinh được bổ sung sau khi đã khử trùng môi trường (đề nhiệt độ môi trường hạ xuống khoảng 55-60°C) ở điều kiện vô trùng của laminar.

3.4.5. Tiến hành

3.4.5.1. Triparental mating (giao phối bộ ba)

*** Nuôi cấy vi khuẩn**

Các môi trường LB lỏng được chuẩn bị trong các ống nghiệm có nắp vặn, khử trùng để tiến hành nuôi cấy các vi khuẩn. Các bước như sau:

▫ Nuôi *A. tumefaciens* trong môi trường LB-R trong tối, ở 28°C, thời gian 48 giờ (nuôi trước khi tiến hành triparental mating 2 ngày).

▫ Nuôi *E. coli* có mang plasmid helper (pRK 2013) và *E. coli* có mang vector pBI 121 + insert DNA trong môi trường LB-K (nuôi trước khi tiến hành lai bộ ba 1 ngày).

*** Nuôi cấy chung 3 loại vi khuẩn**

Các bước tiến hành:

▫ Lấy mỗi ống nghiệm nuôi các loại vi khuẩn 1 mL, ly tâm tốc độ khoảng 10.000 rpm, trong 5 giây.

▫ Loại bỏ thể nổi, thêm 1 mL môi trường LB, lắc nhẹ để trộn (để loại bỏ chất

kháng sinh).

- Lập lại 2 bước trên 2 lần. Thêm 300 μl môi trường LB.
- 3 loại vi khuẩn trên được cấy lên mặt đĩa chứa môi trường LB đặc (đã được chuẩn bị trước các đĩa petri chứa môi trường LB bổ sung 1,5 % agar) không bổ sung chất kháng sinh, mỗi loại vi khuẩn lấy 100 μl . Dàn đều trên bề mặt môi trường đến khi khô hoàn toàn.

Nuôi cấy từ 1-2 ngày tại 26-28°C, đến khi các “thảm” vi khuẩn được hình thành.

* Chọn lọc vi khuẩn nuôi cấy bằng cách trộn 3 loại vi khuẩn, sử dụng chất kháng sinh

Các bước tiến hành:

- Lấy 5 mL MgSO_4 10 mM cho lên đĩa petri mới, lấy một ít vi khuẩn trong “thảm” đã nuôi cấy ở trên cho vào để có một dịch lỏng.
- Chuẩn bị 4 tube eppendorf vô trùng, cho vào mỗi tube 900 μL MgSO_4 10 mM.
- Tiến hành pha loãng vi khuẩn thành các nồng độ pha loãng: 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} .
- Lấy 100 μl mỗi loại vi khuẩn đã pha loãng dàn đều lên 5 đĩa petri chứa môi trường LB-RK bổ sung 2 % agar.
- Nuôi trong 2-3 ngày tại 26-28°C trong điều kiện tối để phát triển khuẩn lạc.
- Nuôi cấy 1 khuẩn lạc trong 5 mL môi trường LB-RK tại 26-28°C từ 1-2 ngày để thu được sinh khối *E. coli*, xác định *Agrobacterium* đã được chuyển gen (nếu chưa sử dụng ngay, thêm vào 15% glycerin và bảo quản ở -70°C).

3.4.5.2. Chuyển gen vào cây thuốc lá thông qua *Agrobacterium*

Các bước tiến hành:

- Lấy 1 khuẩn lạc ở trên cấy chuyển vào 5 mL môi trường LB-K lỏng, nuôi cấy lác ở điều kiện tối, nhiệt độ từ 27-28°C trong 2-3 ngày.
- Thu tất cả các tế bào đã nuôi cấy ở trên bằng cách cho môi trường LB-K lỏng chứa khuẩn lạc vào tube eppendorf, ly tâm từ 0,5-1 phút, tốc độ 12.000 rpm. Lặp lại nhiều lần.
- Loại bỏ môi trường LB ở phía trên, các tế bào thu được hòa tan trong 1 mL môi trường MSO lỏng.
- Chuẩn bị 20 mL môi trường MSO trên đĩa petri.
- Lá thuốc lá *in vitro* cắt thành các mảnh lá có kích thước ước chừng khoảng 0,5-

0,7 cm × 0,5-0,7 cm (loại bỏ các gân lá), chuyển lên đĩa petri chứa môi trường MSO.

▫ Tế bào *Agrobacterium* hòa trong 1 mL môi trường MSO được cấy chuyển sang môi trường MSO có chứa các mảnh lá, lắc nhẹ bằng tay và ủ trong 10 phút.

▫ Sau khi đồng nuôi cấy, làm khô các mảnh lá bằng cách chuyển chúng lên giấy lọc vô trùng trong 0,5-1 phút. Các mảnh lá đó được nuôi trên môi trường nuôi cấy (MS 104) trong 2 ngày trong tối.

▫ Các mảnh lá sau đó được cấy chuyển sang môi trường chọn lọc (MS SEL) và nuôi cấy trong 3 tuần để tái sinh chồi ở điều kiện chiếu sáng.

▫ Các chồi tạo thành được cấy chuyển lên môi trường MSR để tạo rễ. Các cây hoàn chỉnh được chuyển sang nuôi cấy trong các bình. Các cây này là các cây đã được tiến hành chuyển gen. Để biết việc chuyển gen có thành công hay không cần phải tiến hành các thí nghiệm kiểm tra (tách chiết DNA của *Agrobacterium*, chạy PCR với cặp primer đặc hiệu cho insert DNA và điện di sản phẩm PCR trên agarose gel 1 %).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tài liệu tiếng việt:

1. Đái Duy Ban, 1998, *Công nghệ ADN trong điều trị gen và các bệnh hiếm nghèo*, Nhà xuất bản y học
2. Đái Duy Ban, 2004, *Công nghệ gen*, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật
3. Nguyễn Bá, 2006, *Hình thái học thực vật*, Nhà xuất bản Giáo dục.
4. Hồ Huỳnh Thùy Dương, 1996, *Sinh học phân tử*, Nhà xuất bản giáo dục
5. Nguyễn Đình Huyền, 1998, *Sinh học phân tử ADN*, Nhà xuất bản khoa học kĩ thuật
6. Lê Văn Hoàng, 2004, *Các quá trình và thiết bị Công nghệ sinh học trong Công nghiệp*, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật Hà Nội
7. Phạm Thành Hồ, 2000, *Di truyền học*, Nhà xuất bản giáo dục
8. Nguyễn Như Hiền.2002. *Di truyền và Công nghệ tế bào xoma*. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật
9. Võ Thị Hương Lan, 2002, *Sinh học phân tử*, Nhà xuất bản Đại học quốc gia Hà Nội
10. Nguyễn Thị Lang, 2002, *Phương pháp cơ bản trong nghiên cứu công nghệ sinh học*, Nhà xuất bản nông nghiệp
11. Lê Đình Lương, 1994, *Cơ sở di truyền học*, Nhà xuất bản giáo dục
12. Nguyễn Đức Lượng, Lê Thị Thủy Tiên, 2002, *Công nghệ tế bào*, Nhà xuất bản ĐHQG TP HCM
13. Trần Văn Minh, 1999, *Công nghệ tế bào thực vật*, Đại học quốc gia thành phố Hồ Chí Minh- Trường ĐH Nông Lâm.
14. Phan Cử Nhân, 1998, *Sinh học đại cương*, Nhà xuất bản Đại học quốc gia Hà Nội
15. Nguyễn Đức Thành, 2000, *Nuôi cấy mô tế bào thực vật nghiên cứu và ứng dụng*, Nhà xuất bản nông nghiệp Hà Nội
16. Lê Ngọc Tú, Đỗ Ngọc Liên, Đặng Thị Thu, 2002, *Tế bào và các quá trình sinh học*, Nhà xuất bản khoa học kĩ thuật Hà Nội
17. Khuất Hữu Thanh, 2003, *Cơ sở di truyền phân tử và kĩ thuật gen*, Nhà xuất bản khoa học kĩ thuật
18. Đặng Thị Thu, Lê Ngọc Tú, Tô kim Anh, Phạm Thu Thủy, Nguyễn Xuân Sâm, 2003, *Công nghệ Enzym*. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật
19. Quyền Đình Thi. 2005, *Những kỹ thuật cơ bản trong phân tích DNA*, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật
20. Trần Thị Xô, Nguyễn Thị Lan, 2004, *Cơ sở di truyền và công nghệ gen*, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật
21. Vũ Văn Vụ, Nguyễn Mộng Hùng, Lê Hồng Điệp, 2005, *Công Nghệ Sinh Học, Tập Hai Công Nghệ Sinh Học Tế Bào*, Nhà xuất bản Giáo Dục.
22. Vũ Văn Vụ, Vũ Thành Tâm, Hoàng Minh Tấn, 2001, *Sinh Lý Học Thực Vật*, Nhà xuất bản Giáo Dục
23. Đỗ Năng Vịnh. *Công nghệ sinh học cây trồng*, 2002, Nhà xuất bản Nông Nghiệp
24. Nguyễn Văn Uyên, 1995-1996, *Những phương pháp công nghệ sinh học thực vật*. Tập 1 (1995), Tập 2 (1996), Nhà xuất bản Nông nghiệp, TP Hồ Chí Minh

Tài liệu tiếng anh:

25. Ammirato PV, Evans DA, Sharp WR and Bajaj YPS. 1990. *Handbook of plant cell culture*. Vol.5, McGraw-Hill Publishing Company.
26. Chrispeels MJ and Sadava DE., 2003, *Plants, genes, and crop biotechnology*. 2nd. Jones and Bartlett Publishers, Sudbury, Massachusetts.
27. Dodds J.H và Robert L.W., 1999, *Experiment in plant tissue culture*. Cambridge University Press,
28. Gamborg OL. Kumar AS, Hanning GE and Nabors MW. ,1989, *Tissue culture and biotechnology applied to stress tolerance in plants*. In: Proceedings of the International Conference on *in vitro* Selection and Propagation of Economic Plants. Univ. of Peshawar, Pakistan.
29. Hartmann HT, Kester DE, Davies FT, 1993, *Plant propagation: Principles and Practices*. 5th Edition. Prentice-Hall of India Private Limited, New Delhi.
30. Heywood V.H., 1985. Flowering plants of the world, Croom Helm, London & Sydney.
31. James C. "Global Review of Commercialized Transgenic Crops 2001", ISAAA Briefs N'24
32. Jain SM, Gupta PK, Newton RJ, 1994, *Somatic embryogenesis in woody plants*. Vol 3. Forestry Sciences 44, Kluwer Academic Publishers.
33. Razan MK ., 1994, *An introduction to plant tissue culture*. Oxford & IBH Publishing Co. Pvt. Ltd. New Delhi.
34. Russell GE., 1988, *Biotechnology of higher plants*. Intercept Ltd. Wimborne, Dorset, England.
35. Ting I.P., 1985. Plant physiology. University of California.
36. Thomas E. Barman. Enzyme handbook. Supplement I Springer - Verlag Berlin Heidelberg New York, 1974
37. Trigiano R.N và Gray D.J., 1999, *Plant tissue culture concept and laboratory exercises*. CRC Press. Florida, America,.
38. Trigiano RN and Gray DJ., 2000, *Plant tissue culture concepts and laboratory exercises*. CRC Press, New York.
39. Razan MK. 1994. *An introduction to plant tissue culture*. Oxford & IBH Publishing Co. Pvt. Ltd. New Delhi.

MỤC LỤC

MỞ ĐẦU	1
Phần 1. NUÔI CÂY TẾ BÀO	2
Chương 1. GIỚI THIỆU CHUNG VÀ LỊCH SỬ PHÁT TRIỂN	2
1.1. Giới thiệu chung	2
1.3. Sơ lược các kỹ thuật dùng trong nuôi cấy mô	12
1.3.1. Nuôi cấy phôi	12
1.3.2. Nuôi cấy mô và cơ quan tách rời	13
1.3.3. Nuôi cấy mô phân sinh	13
1.3.4. Nuôi cấy bao phấn	13
1.3.5. Nuôi cấy tế bào đơn	14
1.3.6. Nuôi cấy protoplast	15
Chương 2. NHỮNG KHÁI NIỆM CƠ BẢN	16
2.1. Học thuyết tế bào	16
2.1.1. Tính toàn thể của tế bào (cell totipotency)	16
2.1.2. Thể bội và gen	17
2.1.3. Thể bào tử và thể giao tử	17
2.1.4. Sinh sản hữu tính và sinh sản vô tính	18
2.2. Tế bào thực vật	19
2.2.1. Cấu trúc của tế bào thực vật	20
2.2.2. Các quá trình chức năng của tế bào	24
2.3. Thực vật	27
2.4. Phòng thí nghiệm	32
2.4.1. Các thiết bị , dụng cụ cần thiết của phòng thí nghiệm nuôi cấy mô	32
2.4.2. Các thủ tục cơ bản trong phòng thí nghiệm:	35
2.5. Đảm bảo điều kiện vô trùng	36
2.5.1. Ý nghĩa của vô trùng trong nuôi cấy mô và tế bào thực vật	36
2.5.2. Khử trùng	37
2.6. Môi trường	41
2.6.1. Thành phần hoá học của các môi trường nuôi cấy mô, tế bào thực vật	42
2.6.2. Độ pH môi trường	84
2.6.3. Các tác nhân làm rắn môi trường	85
2.7. Một số loại môi trường cơ bản	86
2.8. Một số thuật ngữ cơ bản trong nuôi cấy mô và tế bào thực vật	93
Chương 3. THU NHẬN VÀ NUÔI CÂY PHÔI <i>IN VITRO</i>	102
3.1. Phôi soma	102
3.1.1. Sự phát sinh phôi soma	102
3.1.2. Thiết lập hệ thống phát sinh phôi đồng nhất và hiệu suất cao	103
3.2. Tính bất hợp của giao tử trước và sau khi thụ tinh	104
3.2.1. Tính bất hợp của giao tử trước khi thụ tinh	104
3.2.2. Tính bất hợp giao tử sau khi thụ tinh	104
3.3. Thụ phấn <i>in vitro</i>	104
3.3.1. Phương pháp thụ phấn <i>in vitro</i>	106
3.3.2. Các nhân tố ảnh hưởng sự hình thành hạt sau khi thụ phấn <i>in vitro</i>	109
3.3.3. Ứng dụng của thụ phấn <i>in vitro</i>	113

3.4. Nhân giống cây trồng qua nuôi cấy phát sinh phôi.....	113
3.4.1. Các kiểu nuôi cấy phôi.....	114
3.4.2. Kỹ thuật nuôi cấy.....	114
3.4.3. Một số khó khăn trong nuôi cấy phôi.....	118
3.5. Nuôi cấy tế bào phôi tâm (nucellar).....	118
3.5.1. Sự phát triển của phôi nucellar.....	119
3.5.2. Nuôi cấy tế bào nucellar và sự hình thành phôi từ nucellar trong điều kiện <i>in vitro</i>	119
3.6. Chọn tạo giống sạch bệnh từ phôi vô tính (trường hợp cây ăn quả có múi Citrus).....	121
3.6.1. Hiện tượng đa phôi và ứng dụng trong chọn tạo giống sạch bệnh.....	121
3.6.2. Phôi vô tính.....	121
3.6.3. Phôi hữu tính.....	123
3.6.4. Sự tương tác giữa phôi vô tính và phôi hữu tính.....	124
3.6.5. Những đặc tính cơ bản của cây từ phôi vô tính.....	124
3.6.6. Các phương pháp nhận biết cây từ phôi vô tính.....	125
3.6.7. Nghiên cứu hạt nhân tạo.....	125
3.6.8. Công nghệ bioreactor và tạo phôi hạt nhân tạo trong nhân giống công nghiệp.....	129
Chương 4. NHÂN GIỐNG VÔ TÍNH <i>IN VITRO</i>	130
4. 1. Sinh sản vô tính và hữu tính.....	130
4.1.1 Nhân giống theo cấu trúc tự nhiên của thực vật.....	130
4.1.2. Nhân giống theo phương thức nông học.....	130
4.2. Mục đích của nhân giống <i>invitro</i>	130
4.2.1. Ưu điểm của vi nhân giống.....	130
4.2.2. Hạn chế của vi nhân giống.....	131
4.3. Các phương pháp nhân giống <i>invitro</i>	131
4.3.1. Nuôi cấy mô phân sinh đỉnh hay đỉnh phân sinh.....	132
4.3.1.1. Đỉnh sinh trưởng.....	132
4.3.2. Tái sinh cây hoàn chỉnh từ các bộ phận khác của cây.....	137
4.3.3. Nhân giống thông qua phát sinh phôi vô tính.....	138
4.3.4. Nhân giống trong các nội phản ứng sinh học.....	139
4.3.5. Hệ thống hình thành chồi.....	140
4.4. Các giai đoạn trong quy trình nhân giống vô tính <i>in vitro</i>	142
4.4.1. Quá trình sản xuất cây cấy mô.....	142
4.4.2. Các bước vi nhân giống.....	145
4.5. Các vấn đề liên quan đến nhân giống <i>invitro</i>	147
4.5.1. Ảnh hưởng của môi trường và các chất kích thích sinh trưởng đến nhân giống <i>in vitro</i>	147
4.5.2. Tính bất định về mặt di truyền.....	151
4.5.3. Mẫu đưa vào nuôi cấy.....	152
4.5.4. Việc sản xuất các chất gây độc từ mẫu cấy.....	152
4.5.5. Hiện tượng thủy tinh thể.....	153
4.5.6. Không chế điều kiện môi trường.....	154
4.5.7. Những trở ngại khi thương mại hóa.....	155
4.5.8. Nhân giống <i>in vitro</i> và việc sử dụng giống ưu thế lai.....	155

4.6. Qui trình nhân giống một số cây trồng phổ biến	155
4.6.1. Cây khoai tây <i>Solanum tuberosum</i> L.....	155
4.6.2. Vi nhân giống cây chuối	157
4.7. Nhân giống cây thân gỗ	159
4.7.1. Vi nhân giống cây thân gỗ còn non	159
4.7.2. Vi nhân giống cây thân gỗ trưởng thành.....	162
4.8. Thực hành nuôi cây đỉnh sinh trưởng	163
4.8.1. Nuôi cây phát triển thành cây trực tiếp.....	163
4.8.2. Nuôi cây phát triển cây thông qua giai đoạn protocorm.....	164
Chương 5. NUÔI CÂY GIAO TỬ, TẠO CÂY ĐƠN BỘI <i>IN VITRO</i>	166
5.1. Vấn đề đơn bội của thực vật	166
5.2. Phương pháp tạo thể đơn bội <i>in vivo</i>	168
5.2.1. Sinh sản đơn tính cái (gynogenesis)	168
5.2.2. Sinh sản đơn tính đực (androgenesis).....	168
5.2.3. Sự đào thải hệ gen bằng lai xa	168
5.2.4. Sự giao phối không hoàn toàn (semigamy)	168
5.2.5. Xử lý hóa chất.....	169
5.2.6. Shock nhiệt.....	169
5.2.7. Ảnh hưởng của chiếu xạ	169
5.3. Phương pháp tạo đơn bội <i>in vitro</i>	169
5.3.1. Các phương pháp phát sinh cây đơn bội <i>in vitro</i>	170
5.3.2. Các bước phát triển phôi của hạt phấn.....	170
5.3.3. Các nhân tố ảnh hưởng đến nuôi cấy bao phấn	171
5.3.4. Một số chỉ số kết quả nuôi cấy.....	173
5.3.5. Những tồn tại trong nghiên cứu đơn bội.....	174
5.3.6. Hiện tượng bạch tạng trong nuôi cấy đơn bội.....	175
5.4. Ứng dụng của thể đơn bội.....	176
5.4.1. Nghiên cứu về phôi học thực nghiệm	176
5.4.2. Nghiên cứu về tế bào học.....	176
5.4.3. Nghiên cứu đột biến và di truyền.....	177
5.4.4. Cải thiện giống cây trồng.....	177
5.5. Ứng dụng kỹ thuật đơn bội trong tạo giống mới và dòng thuần ở ngô, lúa 5.5. 1.	
Cây lúa	185
5.5.2. Cây ngô.....	188
5.6. Nguồn gốc của các biến dị tế bào soma.....	193
5.6.1. Những thay đổi di truyền xảy ra trước khi nuôi cấy mô <i>in vitro</i> :	194
5.6.2. Những thay đổi di truyền xảy ra trong quá trình <i>in vitro</i> :.....	194
5.6.3. Biến dị di truyền trong nuôi cấy mô lúa	195
5.6.4. Biến dị tế bào soma trong quá trình nuôi cấy phôi ở ngô và khả năng ứng dụng thực tiễn:	196
5.6.5. Biến dị ở các cây nhân vô tính:.....	197
5.6.6. Các hướng ứng dụng của hiện tượng biến dị tế bào soma.....	198
5.7. Qui trình tạo cây đơn bội	199
5.7.1. Qui trình tạo cây đơn bội thuốc lá từ hạt phấn phân lập.....	199
5.7.2. Nuôi cấy hạt phấn lúa	199
5.7.3. Nuôi cấy bao phấn cây thuốc lá	203

Chương 6. NUÔI CÂY TẾ BÀO TRẦN.....	205
6.1. Giới thiệu chung về nuôi cấy tế bào trần.....	205
6.2. Phương pháp tách protoplast.....	210
6.3. Nuôi cấy protoplast.....	217
6.3.1. Môi trường nuôi cấy.....	217
6.3.2. Tái sinh cây từ protoplast.....	221
6.4. Protoplast và vấn đề chọn dòng tế bào.....	222
6.5. Dung hợp protoplast.....	222
6.5.1. Xử lý bằng NaNO_3	222
6.5.2. Xử lý bằng PEG.....	223
6.5.3. Dung hợp bằng điện.....	223
6.5.4. Chọn lọc các thể lai soma.....	225
6.5.5. Chọn lọc các tế bào lai.....	229
6.6. Tồn tại của kỹ thuật protoplast.....	229
6.7. Thực hành nuôi cấy Protoplast.....	231
6.7.1. Nguyên liệu thực vật.....	231
6.7.2. Chuẩn bị môi trường.....	231
6.7.3. Tiến hành.....	231
Chương 7. NUÔI CÂY TẾ BÀO VÀ CHỌN DÒNG TẾ BÀO.....	233
7.1. Nuôi cấy tế bào đơn.....	233
7.2. Chọn dòng tế bào.....	235
7.2.1. Đặc tính của tế bào thực vật được nuôi cấy.....	236
7.2.2. Nguyên liệu và điều kiện nuôi cấy.....	238
7.3. Biến dị dòng tế bào.....	239
7.3.1. Cơ sở phân tử của biến dị.....	239
7.3.2. Bản chất của biến dị dòng giao tử.....	241
7.3.3. Đột biến hay thay đổi hoạt tính gen.....	241
7.4. Nguyên tắc chọn dòng tế bào.....	243
7.4.1. Chọn trực tiếp.....	243
7.4.2. Chọn gián tiếp.....	243
7.4.3. Chọn tổng thể.....	243
7.5. Cách chọn dòng tế bào.....	244
7.5.1. Không có tác nhân chọn lọc.....	244
7.5.2. Có nhân tố chọn lọc (with selection pressure).....	245
7.6. Nuôi cấy tế bào trong sản xuất các hợp chất tự nhiên.....	257
7.6.1. Phương hướng chiến lược trong sản xuất các sản phẩm thứ cấp bằng nuôi cấy tế bào.....	257
7.6.2. Nuôi cấy tế bào năng suất cao.....	258
7.6.3. Sản xuất bằng nuôi cấy tế bào ở những nước công nghiệp.....	264
7.6.4. Nuôi cấy rễ tơ (hair roots) và sinh tổng hợp.....	264
7.7. Ứng dụng của biến dị dòng soma và dòng giao tử trong công tác giống cây trồng.....	266
7.8. Thực hành nuôi cấy dịch huyền phù.....	267
Chương 8. NUÔI CÂY MÔ THỰC VẬT VÀ VẤN ĐỀ.....	270
LÀM SẠCH <i>VI RUS</i> Ở THỰC VẬT.....	270
8.1. Tầm quan trọng.....	270

8.2. Nguyên lý làm sạch <i>virus</i>	272
8.3. Phương pháp làm sạch <i>virus</i>	274
8.3.1. Các phương pháp chuẩn đoán bệnh <i>virus</i>	274
8.3.1.1. Xét nghiệm bằng cây chỉ thị	275
8.3.2. Xử lý nhiệt	277
8.3.3. Nuôi cấy đỉnh phân sinh	280
8.4. Kết quả trong thực tiễn sản xuất	281
8.4.1. Tạo các giống cây sạch bệnh	281
8.4.2. Kiểm định tính sạch bệnh <i>virus</i>	283
8.4.3. Duy trì tính sạch bệnh <i>virus</i>	284
Chương 9. MỘT SỐ PHƯƠNG PHÁP CANH TÁC HIỆN ĐẠI	286
9.1 Thủy canh.....	286
9.1.1 Kỹ thuật thủy canh	286
9.1.2 Lịch sử phát triển và nghiên cứu kỹ thuật thủy canh	286
9.1.3 Ưu điểm và nhược điểm của kỹ thuật thủy canh	288
9.1.4 Chất dinh dưỡng.....	289
9.1.5 Môi trường thủy canh	296
9.1.6 Các yếu tố môi trường ảnh hưởng trên sự sinh trưởng và phát triển của cây trồng thủy canh	297
9.1.7 Các loại hình thủy canh.....	302
9.1.8. Một số bệnh trong thủy canh	304
9.2 Khí canh.....	305
Phần 2. CHUYỂN GEN Ở THỰC VẬT BẬC CAO.....	307
Chương 1. MỞ ĐẦU	307
1.1. Genom ở thực vật bậc cao.....	307
1.1.1. Đặc điểm bộ máy di truyền tế bào thực vật	307
1.2. Sinh trưởng và sinh sản của tế bào thực vật.....	309
1.3. Đặc tính DNA ở thực vật bậc cao.....	311
1.4. Sinh tổng hợp DNA ở thực vật bậc cao	312
1.4.1. Quá trình sinh tổng hợp DNA ở thực vật bậc cao.....	312
1.4.2. Các E chủ yếu trong sinh tổng hợp DNA	313
1.4.3. Các bước trong sinh tổng hợp DNA	314
1.5. Sự thể hiện của gen trong sao chép và dịch mã	314
1.5.1. Đọc mã :	314
1.5.2. Dịch mã.....	315
1.6. Tính bảo thủ của gen về di truyền và biến dị.....	316
Chương 2. CHUYỂN GEN Ở THỰC VẬT BẬC CAO.....	317
2.1. Xác định và dòng hóa gen.....	317
2.1.1. Chiết suất và tinh sạch DNA từ mô thực vật	317
2.1.2 Cắt DNA bằng Enzim giới hạn	317
2.1.3 Điện di DNA và các sản phẩm cắt DNA trên gel agaroze.....	318
2.1.4 Nối các đoạn bằng DNA ligase.....	318
2.1.5. Dòng hóa gen	318
2.2. Các kỹ thuật chuyển gen	322
2.2. 1. Biến nạp gián tiếp thông qua <i>Agrobacterium</i>	323
2.2.2. Chuyển gen bằng phương pháp bắn gen.....	329

2.2.3. Chuyển nạp DNA ngoại lai vào protoplast bằng xung điện	333
2.2.4. Chuyển nạp DNA ngoại lai vào protoplast bằng kỹ thuật vi tiêm	333
2.2.5. Chuyển nạp DNA ngoại lai vào protoplast bằng PLO và PEG	334
2.7. Sự hợp nhất và biểu hiện của DNA ngoại lai trong tế bào thực vật	334
Chương 3. CHUYỂN GEN TRONG THỰC TẾ TRỒNG TRỌT	336
3.1. Tình hình cây trồng chuyển gen trên thế giới	336
3.2. Chuyển gen ở các cây trồng chính	337
3.2.1. Cây ngô	337
3.2.2. Cây lúa	339
3.2.3. Cây lúa mì	340
3.2.4. Cây lúa mạch	340
3.2.5. Cây đậu tương	340
3.2.6. Cây bông	341
3.3. Triển vọng và hướng phát triển	341
3.4. Thực hành chuyển gen vào cây thuốc lá bằng <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	342
3.4.1. Dụng cụ	342
3.4.2. Thiết bị	343
3.4.3. Hóa chất	343
3.4.4. Phương pháp tiến hành	343
3.4.5. Tiến hành	345
TÀI LIỆU THAM KHẢO	348