



Giáo trình

Công nghệ sinh học thực vật



LỜI MỞ ĐẦU

E họn giống và nhân giống cây trồng là ngành khoa học xuất hiện từ rất lâu đời, từ khi con người biết trồng trọt. Những cá thể ưu tú được tách ra, bảo quản và nhân lên để nhanh chóng để tạo nên một quần thể thuần có năng suất hoặc phẩm chất cao hơn quần thể cũ. Ngày nay cùng với những tiến bộ của công nghệ gen, công nghệ tế bào, những thiết bị hiện đại, khoa học nhân giống và chọn giống đã phát triển vượt bậc, tiến lên một vị thế mới đó là khoa học công nghệ sinh học về thực vật.

Công nghệ sinh học thực vật từ khi ra đời đã tạo nên những bước chuyển biến quan trọng, không chỉ trong lĩnh vực nhân giống và chọn giống cây trồng mà còn về các lĩnh vực khác như: di truyền biến dị thực vật, sản xuất các chợp chất có hoạt tính sinh học từ thực vật, chuyển gen vào thực vật, tạo cây trồng mới...

Có thể nói công nghệ sinh học thực vật đã đưa năng suất của tất cả các loại cây trồng vượt xa mức năng suất mà bằng các phương pháp canh tác tốt nhất có thể đạt được. Công nghệ sinh học thực vật thực sự đã tạo nên một cuộc cách mạng trong năng suất, chất lượng cây trồng, tạo những loại cây trồng có đặc tính mới mà trong thiên nhiên không bao giờ có được.

Công nghệ sinh học thật sự phát triển rõ nét với những phát hiện:

- Tính toàn thể của mô và tế bào thực vật cho phép tái sinh được cây hoàn chỉnh, thậm chí từ một tế bào tách rời.

- Khả năng tạo cây đơn bội qua nuôi cấy túi phấn và hạt phấn, từ đó tạo các dòng đồng hợp tử tuyệt đối và nhờ đó rút ngắn được chu trình lai tạo.

- Khả năng hấp thu DNA ngoại lai vào tế bào thực vật và khả năng gây biến tính ở thực vật do DNA ngoại lai nhờ công nghệ gen.

- Khả năng nuôi cấy các tế bào thực vật như nuôi cấy vi sinh vật và qua đó khả năng ứng dụng di truyền phân tử vào thực vật bậc cao phục vụ công tác tạo giống.

- Kỹ thuật nuôi cấy protoplast và khả năng dung hợp protoplast, tái sinh cây hoàn chỉnh từ các protoplast lai.

- Khả năng loại trừ virus bằng phương pháp nuôi cấy đỉnh sinh trưởng, tạo các dòng vô tính sạch bệnh ở các cây nhân giống vô tính.

- Khả năng dùng chồi nách, các thể chồi protocorm vào nhân giống vô tính với tốc độ cực nhanh một số cây trồng nông nghiệp.

- Khả năng sử dụng phương pháp nuôi cấy phôi để khắc phục hiện tượng bất thụ khi lai xa.

- Khả năng bảo quản các nguồn gen bằng nuôi cấy trong ống nghiệm. Khả năng trao đổi quốc tế các nguồn gen sạch bệnh dưới dạng cây nuôi trong ống nghiệm.

- Khả năng tồn trữ các tế bào thực vật sống trong thời gian dài ở nhiệt độ thấp mà không mất tính toàn thể của tế bào.

Hiện nay, khoa học chọn giống mới chỉ bắt đầu khai thác các khả năng này. Vì vậy, công nghệ sinh học thực vật còn mở ra một chân trời mới trong nghiên cứu di truyền thực vật, các cơ chế sinh tổng hợp ở thực vật, sinh lý dinh dưỡng của tế bào thực vật, sinh lý phát triển, vai trò của các chất điều tiết sinh trưởng trong đời sống thực vật và nhiều vấn đề sinh học cơ bản khác.

Với ý nghĩa to lớn như vậy, tập bài giảng này không mong muốn truyền tải hết được những tiến bộ vượt bậc của công nghệ sinh học thực vật. Tuy nhiên cũng hy vọng rằng đây là một tài liệu làm nền tảng, phục vụ đắc lực cho nhu cầu học tập, nghiên cứu cũng như ứng dụng vào công việc thực tiễn sau này của các em học sinh sinh viên.

-----oOo-----

CHƯƠNG 1

LỊCH SỬ PHÁT TRIỂN CỦA CÔNG NGHỆ SINH HỌC THỰC VẬT

1 - LỊCH SỬ PHÁT TRIỂN CÔNG NGHỆ SINH HỌC THỰC VẬT

Công nghệ sinh học nói chung, công nghệ sinh học thực vật nói riêng là ngành khoa học mũi nhọn được thế giới và trong nước quan tâm nhiều trong hai thập kỷ gần nay.

Lý do của sự quan tâm đó thật dễ hiểu. Công nghệ sinh học với tốc độ phát triển nhanh không kém sự bùng nổ tin học, đang tạo ra một cuộc cách mạng sinh học, không chỉ trong nông nghiệp và công nghiệp thực phẩm mà còn gây sự đảo lộn cả các lý thuyết truyền thống lẫn phương thức sản xuất trong các ngành y dược, vật liệu mới, năng lượng, khai khoáng và bảo vệ môi trường.

Cuộc Cách mạng Xanh của những năm 70, làm tăng sản lượng lương thực đáng kể ở các nước đang phát triển trên cơ sở thâm canh và sử dụng giống mới. Cách mạng công nghệ sinh học tác động đến không chỉ cây lương thực mà tất cả các cây, không chỉ các vùng đất phì nhiêu thuận lợi cho thâm canh mà cả đất trống đồi trọc hay giải cát ven biển, không chỉ tăng chất bột mà tác động tích cực đến mọi mặt của nông nghiệp nói riêng và kinh tế nói chung.

Để có được những bước phát triển to lớn như hiện nay và hứa hẹn những tiến bộ nhảy vọt trong tương lai, công nghệ sinh học thực vật đã trải qua một quá trình hình thành phát triển khá dài.

1.1 - Giai đoạn sơ khai của công nghệ sinh học thực vật

Năm 1838, hai nhà sinh vật học Đức Schleiden và Schwann đã đề xướng thuyết tế bào và nêu rõ: mọi cơ thể sinh vật phức tạp đều gồm nhiều đơn vị nhỏ, các tế bào hợp thành. Các tế bào đã phân hóa đều mang thông tin di truyền có trong tế bào đầu tiên, đó là trứng sau khi thụ tinh và là những đơn vị độc lập, từ đó có thể xây dựng lại toàn bộ cơ thể.

Năm 1902, Haberlandt là người đầu tiên đưa các giả thuyết của Schleiden và Schwann vào thực nghiệm. Ông viết trong một tác phẩm như sau: “Để kết luận, tôi tin tưởng rằng tôi đã không đưa ra một tiên đoán quá táo bạo nếu cho rằng bằng cách nuôi cấy, người ta có khả năng tạo thành công các phôi nhân tạo từ các tế bào sinh dưỡng”. Haberlandt gặp thất bại trong nuôi cấy các tế bào đã phân hóa tách từ là một số cây một lá mầm như: *Erythronium*, *Ornithogalum*, *Tradescantia*. Ngày nay, chúng ta biết rất rõ nguyên nhân thất bại của Haberlandt vì các cây một lá mầm là đối tượng rất khó nuôi cấy, hơn nữa, ông lại dùng các tế bào đã mất hết khả năng tái sinh.

Năm 1922, Kotte (học trò của Haberlandt) và Robbins, người Mỹ, lập lại thí nghiệm của Haberlandt với đỉnh sinh trưởng tách từ đầu một cây hoà thảo. Trong

môi trường lỏng gồm có muối khoáng và glucose, đầu rễ sinh trưởng khá mạnh, tạo nên một hệ rễ nhỏ có cả rễ phụ. Tuy nhiên, sự sinh trưởng như vậy chỉ tồn tại một thời gian, sau đó chậm dần và ngừng lại, mặc dù các tác giả đã chuyển sang môi trường mới.

1.2 - Giai đoạn thứ hai của công nghệ sinh học thực vật

Năm 1934, bắt đầu giai đoạn thứ hai trong công nghệ sinh học thực vật, khi White, người Mỹ, nuôi cấy thành công trong thời gian dài đầu rễ cà chua (*Lycopersicum esculentum*) với một môi trường lỏng chứa muối khoáng, glucose và nước chiết nấm men. Sau đó ít lâu, White chứng minh là có thể thay thế nước chiết nấm men bằng hỗn hợp ba loại vitamin nhóm B: thiamin (B₁), piridoxin (B₆) và nicotinic acid (PP hay B₃). Từ đó, việc nuôi cấy đầu rễ trong thời gian vô hạn đã được tiến hành ở nhiều cây khác nhau.

Cũng thời gian này, Gautheret ở Pháp đã tiến hành các nghiên cứu nuôi cấy mô phân sinh một số cây gỗ. Sau khi Went và Thimann phát hiện chất sinh trưởng thực vật đầu tiên, axit β – indol acetic (IAA), và kết tinh được chất này, Gautheret xác nhận tác dụng kích thích sinh trưởng mô sẹo của IAA và nhóm 3 vitamin do White đề nghị. Cùng với Nobécourt, năm 1939 Gautheret đã thành công trong việc duy trì sự sinh trưởng của mô sẹo cà rốt (*Daucus carota*) trong thời gian vô hạn trên môi trường rắn, bằng cách cấy truyền đều đặn 6 tuần một lần.

Năm 1941, Overbeck ở Mỹ chứng minh tác dụng kích thích sinh trưởng của nước dừa trong nuôi cấy phôi một số cây họ cà (*Datura*). Sau đó năm 1948, Steward xác nhận tác dụng của nước dừa trên mô sẹo cà rốt. Trong thời gian này, nhiều chất sinh trưởng nhân tạo thuộc nhóm auxin đã được nghiên cứu và tổng hợp thành công. Chất α – naphthylacetic acid (NAA) và chất 2,4-dichlorphenoxyacetic acid (2,4 - D) được bắt đầu sử dụng để trừ cỏ lá rộng trong nông nghiệp. Nhiều tác giả nhận thấy cùng với nước dừa, 2,4 - D và NAA đã giúp tạo mô sẹo, kích thích phân chia tế bào ở nhiều đối tượng thực vật rất khó nuôi cấy trước đó.

Năm 1954, Skoog ở Mỹ trong một số thí nghiệm của mình đã nhận thấy nếu thêm một ít chế phẩm của acid desoxyribonucleic (DNA) đã để lâu (lấy từ tinh dịch cá Mòi) vào môi trường nuôi cấy các mảnh mô thân cây thuốc lá thì tác dụng kích thích sinh trưởng trở nên rõ rệt. Phòng thí nghiệm Skoog cố tìm bản chất hiện tượng kích thích sinh trưởng của DNA. DNA mới chiết ly từ tinh dịch cá Mòi không có tác dụng nhưng nếu đem hấp trong hơi acid thì mẫu DNA mới cũng có hoạt tính như mẫu DNA cũ. Skoog cho rằng chất có hoạt tính là một sản phẩm phân giải của DNA. Năm 1955, chất này được xác lập là chất 6 – furfury – aminopurine và được Skoog đặt tên là kinetin do tác dụng kích thích sự phân bào. Sau này, người ta chứng minh rằng sự phân bào ở thực vật trong tự nhiên cũng do các chất hóa học tương tự như kinetin điều khiển và gộp chung các chất này vào nhóm cytokinin. Chất cytokinin đầu tiên được tách từ thực vật bậc cao là zeatin lấy từ mầm ngô.

Việc phát hiện vai trò của IAA, NAA, 2,4-D và kinetin cùng với phát hiện vai trò của các vitamin và nước dừa là những bước tiến rất quan trọng trong giai đoạn thứ hai của lịch sử công nghệ sinh học thực vật, đó là tiền đề kỹ thuật cho việc xây dựng các môi trường xác định về mặt hóa học và làm các thí nghiệm ổn định dẫn đến các giai đoạn tiếp theo của ngành khoa học này.

1.3 - Giai đoạn thứ ba, giai đoạn của những bước phát triển nhảy vọt của công nghệ sinh học thực vật

Năm 1957, Skoog và Miller công bố các kết quả nghiên cứu về ảnh hưởng của tỉ lệ kinetin/auxin trong môi trường nuôi cấy đối với sự hình thành cơ quan của mô sẹo thuốc lá. Khi giảm thấp tỉ lệ kinetin/auxin, mô sẹo có khuynh hướng phát triển rễ, ngược lại nếu tỉ lệ kinetin/auxin tăng thì dẫn đến khuynh hướng tạo chồi ở mô sẹo. Hiện tượng này được xác nhận trên nhiều cây khác nhau đã đóng góp rất lớn vào điều khiển sinh trưởng, phát triển, phát sinh cơ quan của mô tế bào trong nuôi cấy. Thành công của Skoog và Miller dẫn đến nhiều phát hiện quan trọng khác, mở đầu cho giai đoạn thứ ba của lịch sử công nghệ sinh học thực vật.

Trong thời gian từ 1954 đến 1959, kỹ thuật tách và nuôi cấy tế bào đơn, các tế bào sống độc lập không dính với các tế bào khác, đã được phát triển. Muir, Hildebrandt và Riker đã tách các tế bào của mô sẹo thành một huyền phù các tế bào đơn bằng cách đưa lắc trên máy lắc. Nickell (1956) nuôi liên tục được một huyền phù tế bào đơn cây đậu (*Phaseolus vulgaris*). Melchers và Berkman (1959) đã nuôi liên tục tế bào đơn trong các bình dung tích khá lớn bằng cách sục khí liên tục và thỉnh thoảng thu hoạch tế bào, thêm dung dịch dinh dưỡng mới. Kỹ thuật nuôi cấy tế bào đơn đã phát triển cao độ với các thiết bị tinh vi phức tạp (bioreactor) do Street và những người cộng tác đề nghị.

Năm 1960, Bergman công bố có thể dùng phương pháp lọc đơn giản để thu được một huyền phù tế bào không có các tế bào kết cụm mà gồm hầu hết là tế bào đơn. Các tế bào đơn có thể gieo trên môi trường, trong các đĩa Petri, tiếp tục sống, phân chia và tái tạo lại mô sẹo. Cùng với kỹ thuật gieo tế bào của Bergman, nhiều tác giả khác đã thành công trong việc tạo được cây hoàn chỉnh từ một tế bào, chứng minh một cách tốt đẹp tính toàn thể của tế bào thực vật. Khả năng nuôi cấy tế bào thực vật trong các bình lên men dùng trong công nghiệp vi sinh vật và khả năng tái tạo lại cây hoàn chỉnh từ tế bào đã mở ra những triển vọng mới trong việc tạo các dòng tế bào đột biến, các dòng tế bào siêu sản xuất (over-production) một sản phẩm thứ cấp nào đó có khả năng tăng tần suất đột biến trong di truyền đột biến ở thực vật bậc cao.

Năm 1960, Cocking ở trường Đại học Nottingham (Anh) công bố có thể dùng enzym cellulase để phân hủy vỏ cellulose của tế bào thực vật, kết quả thu được các tế bào tròn, không có vỏ bọc, gọi là protoplast. Người ta thực sự chú ý đến triển vọng của protoplast vào đầu những năm 1970, khi các tác giả Nhật Nagata và Takebe thành công trong việc làm cho các protoplast tách từ mô thuốc lá tái tạo vỏ cellulose, phân chia và tạo nên một quần thể tế bào trong môi trường

lông. Đồng thời Takebe, Labib và Melchers đã sử dụng kỹ thuật gieo tế bào của Bergman vào protoplast và đã tạo được cây hoàn chỉnh từ protoplast. Do protoplast có khả năng dung hợp với nhau trong các điều kiện nhất định và hấp thu các phân tử lớn hoặc thậm chí các cơ quan tử từ bên ngoài, các nhà nuôi cấy mô thực vật đặt hy vọng lớn vào kỹ thuật protoplast để chọn giống có kết quả hơn. Hy vọng này đến nay hoàn toàn được thực tế xác nhận sau khi nhiều nhóm khác nhau trên thế giới đã công bố lai thành công giữa hai loài nhờ kỹ thuật protoplast, một công việc không thể thực hiện được bằng lai hữu tính cổ điển. Về mặt lý luận di truyền học, protoplast là công cụ không thay thế được để nghiên cứu hiện tượng nhiễm sắc thể hòa hợp của các tế bào khác loài sau khi dung hợp, vai trò của DNA trong các cơ quan tử và quan hệ của chúng với DNA trong nhân bào.

Vấn đề biến tính của tế bào thực vật được Ledoux và cộng tác viên đề xướng vào năm 1965. Ông cho rằng tế bào, thậm chí hạt giống thực vật, có khả năng hấp thụ DNA ngoại lai vào trong tế bào. DNA ngoại lai có thể gắn với DNA nội bào và có hoạt động biểu hiện tính di truyền, gây nên sự biến tính ở thực vật như đã chứng minh ở vi sinh vật. Các thí nghiệm của Ledoux được tranh cãi rất nhiều, đến nay hầu hết các nhà khoa học có liên quan đều xác nhận khả năng xâm nhập của DNA ngoại lai vào tế bào, nhất là vào protoplast thực vật, khả năng tồn tại và biểu hiện các thông tin di truyền của chúng. Vấn đề quan trọng là làm thế nào bảo vệ phân tử DNA ngoại lai chống lại hệ phân hủy acid nucleic có trong tế bào chủ.

Năm 1966, Guha và Maheswari (1966) công bố tạo thành công cây đơn bội từ nuôi cấy túi phấn cà độc dược (*Datura innoxia*). Điều này gây chú ý rất lớn đối với các nhà nuôi cấy mô thực vật. Một năm sau, nhóm Bourgin và Nitsch (1967) tạo thành công cây đơn bội từ túi phấn thuốc lá. Đến nay, việc tạo cây đơn bội thông qua nuôi cấy túi phấn và hạt phấn đã thành công ở rất nhiều cây và đã đóng góp vô cùng lớn vào việc tăng thêm các kiến thức di truyền thực vật và thực tiễn chọn giống.

Từ năm 1980 đến 1992 hàng loạt các thành công mới trong lĩnh vực công nghệ gen thực vật được công bố. Nhờ các plasmid, phân tử DNA vòng thường có trong tế bào vi khuẩn, được lắp ghép, cấu trúc lại sao cho trong plasmid có gắn thêm một gen xác định, hàng loạt công trình chuyển gen ngoại lai vào nhiều họ thực vật đã thực hiện thành công. Chỉ trong một thời gian rất ngắn các thành công này đã được các công ty giống cây trồng siêu quốc gia khai thác triệt để. Các phương pháp để đưa gen ngoại lai vào tế bào thực vật cũng trở nên đa dạng. Ngoài phương pháp chuyển gen thông qua vi khuẩn *Agrobacterium*, các phương pháp chuyển gen trực tiếp như kỹ thuật sử dụng điện (electroporation), kỹ thuật vi tiêm (microinjection), sử dụng siêu âm (ultrasonic gene transfer), sử dụng súng bắn gen (gene gun) đang được các phòng thí nghiệm trên thế giới phát triển mạnh và đạt kết quả rất chắc chắn.

Khả năng ứng dụng công nghệ sinh học tế bào thực vật dễ thấy nhất là trong lĩnh vực nhân giống và phục tráng cây trồng. Ngay từ năm 1960, Morel đã nhận thấy đỉnh sinh trưởng của các loài địa lan (*Cymbidium*) khi đem nuôi cấy sẽ hình thành các protocorm. Khi chia cắt các protocorm và nuôi cấy tiếp thì lại thu được các protocorm mới. Khi để trong các điều kiện nhất định thì protocorm có thể phát triển thành cây lan con. Hơn nữa, các tế bào ở đỉnh sinh trưởng của thực vật chứa rất ít hoặc hoàn toàn không chứa virus, do đó với phương pháp nuôi cấy này Morel có thể phục tráng, tạo các dòng vô tính không bị nhiễm virus. Kỹ thuật này đặc biệt có giá trị với khoai tây, dâu tây, cây ăn quả và nhiều cây nhân giống vô tính khác.

Quá trình nhân giống thực vật được Nozeran nâng lên một mức mới khi ông nhận thấy sự trẻ hoá của các chồi nách cây nho và cây khoai tây đem nuôi cấy và cấy chuyển nhiều lần trong ống nghiệm. Việc ứng dụng công nghệ sinh học thực vật trong nhân giống trên quy mô lớn không còn hạn chế ở các cây cảnh mà đã được thực hiện ở quy mô thương mại đối với hàng loạt cây trồng có ý nghĩa kinh tế cao như chuối, cà phê, cọ dầu, sắn, khoai tây, cây ăn quả có múi... và đã có những đóng góp to lớn cho nông nghiệp thế giới.

Chúng ta đang bước vào giai đoạn phát triển thứ tư của công nghệ sinh học tế bào thực vật. Đó là giai đoạn công nghệ sinh học thực vật được ứng dụng mạnh mẽ vào thực tiễn chọn giống, cải tạo giống, nhân giống, vào việc sản xuất các chất thứ cấp có hoạt tính sinh học và vào nghiên cứu lý luận di truyền thực vật bậc cao. Các hiểu biết cơ bản về đời sống của mô và tế bào đơn độc trong môi trường nhân tạo, nhu cầu về khoáng, vitamin, chất sinh trưởng, nguồn carbon của chúng, các kỹ thuật cơ bản để tách, nuôi cấy, điều khiển sự phân hóa từ các bộ phận khác nhau của cây trồng là những tiền đề được chuẩn bị trong các giai đoạn trước.

Công nghệ sinh học tế bào thực vật hiện nay được đưa vào trong các chương trình chọn giống, nhân giống hiện đại. Mặc dù còn rất nhiều vấn đề phải đi sâu nghiên cứu để giải quyết trong những năm tới, công nghệ sinh học tế bào thực vật ở Việt Nam đã thoát khỏi giai đoạn phôi thai của nó và đang chuẩn bị những đóng góp tích cực vào lý luận sinh học cây trồng và vào thực tiễn nông nghiệp.

2 - CÔNG NGHỆ SINH HỌC THỰC VẬT Ở VIỆT NAM

2.1 - Quá trình hình thành và phát triển

Hai mục tiêu chính của công nghệ thực vật của Việt Nam là:

1. Tạo ra giống mới
2. Nhân nhanh các giống đã chọn lựa

Trong khi mục tiêu thứ nhất cố gắng tạo ra tính đa dạng sinh học, thì mục tiêu thứ hai tìm đến tính đồng nhất cao.

Để thực hiện hai mục tiêu này, từ năm 1976 nước ta đã bắt đầu chương trình đào tạo cán bộ, xây dựng nhiều phòng thí nghiệm từ Bắc đến Nam để làm chủ kỹ

thuật nuôi cấy mô, tế bào thực vật, kỹ thuật chủ yếu của công nghệ sinh học tế bào thực vật.

Mặc dù chưa được sử dụng rộng rãi, công nghệ tế bào đến nay đã được ngành nông nghiệp thừa nhận là một biện pháp hữu hiệu trong công tác giống. Các mô hình tổng kết và nghiệm thu trên một số ít các đối tượng cây trồng khác nhau cho thấy triển vọng có thể nhanh chóng mở rộng việc ứng dụng công nghệ sinh học tế bào thực vật – không chỉ ở các Viện nghiên cứu mà còn ở các doanh nghiệp, các địa phương... Năm 1996 – 2000 là giai đoạn thử thách trong thương mại hóa các kết quả nghiên cứu của công nghệ sinh học tế bào thực vật ở Việt Nam.

Thế giới biết đến công nghệ sinh học thực vật ở nước ta ở chỗ đã thực hiện rất thành công việc chuyển giao công nghệ trong sản xuất, luôn luôn gắn bó với sản xuất nông nghiệp, đi vào giải quyết các vấn đề của thực tiễn nông nghiệp.

2.2 - Công nghệ sinh học tế bào thực vật trong kế hoạch 1996 – 2000 và đến 2010

Công nghệ sinh học tế bào thực vật, đặc biệt lĩnh vực nhân giống, đã ở mức sẵn sàng hoà nhập với thế giới và khu vực, đủ sức tham gia và cạnh tranh trong lĩnh vực này. Trước mắt công nghệ vi nhân giống phải được mở rộng để đáp ứng nhu cầu về giống mía, giống cam, quýt sạch bệnh, giống cây ăn quả, cây làm thuốc và cây rừng. Cần thực hiện được:

- Sản xuất bằng vi nhân giống các giống lai F_1 mà cho đến nay vẫn phải phụ thuộc (đặc biệt rau, quả) vào nước ngoài.

- Nhân nhanh các giống cây ăn trái sạch bệnh được tuyển chọn hoặc nhập nội, chủ yếu các giống thích hợp với thị trường.

- Bằng con đường chọn lọc cá thể tốt nhất (thí dụ: cà phê vối) tạo những quần thể có năng suất cao, hoặc kháng sâu, bệnh.

- Nhân nhanh các cây lâm nghiệp, cây cảnh và cây thuốc quý.

3 - CÁC PHƯƠNG PHÁP NUÔI CẤY MÔ TẾ BÀO THỰC VẬT

3.1 - Nuôi cấy đỉnh sinh trưởng

Một phương thức dễ dàng nhất đạt được mục tiêu trong nuôi cấy mô tế bào thực vật là nuôi cấy đỉnh sinh trưởng (bao gồm nuôi cấy chóp đỉnh và chồi bên). Sau khi vô trùng mẫu, mẫu được nuôi cấy trên môi trường thích hợp. Môi trường thích hợp thay đổi theo từng loại cây trồng được đưa vào nuôi cấy nhưng cơ bản, môi trường chứa đầy đủ chất dinh dưỡng khoáng vô cơ, hữu cơ và được bổ sung chất kích thích sinh trưởng thích hợp. Từ một đỉnh sinh trưởng sau một thời gian nuôi cấy nhất định phát triển thành một chồi hay nhiều chồi. Sau đó chồi tiếp tục phát triển vươn thân, ra lá, ra rễ và trở thành một cây hoàn chỉnh. Cây con được chuyển ra đất có điều kiện phát triển bình thường. Đây là một chu trình ngắn nhất

và tiện lợi hơn các phương thức nhân giống thông thường được thực hiện bằng kỹ thuật nhân giống vô tính *in vitro* thông qua nuôi cấy đỉnh sinh trưởng.

3.2 - Nuôi cấy mô sẹo

Trong điều kiện sự cân bằng các chất kích thích sinh trưởng trong thực vật thay đổi, cụ thể trong tế bào đỉnh sinh trưởng hay nhu mô được tách ra nuôi cấy riêng rẽ trên môi trường giàu auxin, thì mô sẹo được hình thành. Mô sẹo là một khối tế bào phát triển vô tổ chức và có màu trắng. Khối mô sẹo có khả năng tái sinh thành cây hoàn chỉnh trong điều kiện môi trường không có chất kích thích sinh trưởng tạo mô sẹo. Nuôi cấy mô sẹo được thực hiện đối với các loài thực vật không có khả năng nhân giống thông qua nuôi cấy đỉnh sinh trưởng. Cây tái sinh từ mô sẹo có đặc tính giống như cây mẹ và từ một cụm tế bào mô sẹo có thể tái sinh cùng một lúc cho nhiều chồi hơn là nuôi cấy đỉnh sinh trưởng, tuy nhiên mức độ biến dị tế bào soma lại cao hơn.

3.3 - Nuôi cấy tế bào đơn và thu nhận các chất có hoạt tính sinh học

Khối mô sẹo được nuôi cấy trong môi trường lỏng và được đặt trên máy lắc có tốc độ được điều chỉnh thích hợp. Khối mô sẹo dưới tác dụng cơ học và các hóa chất hỗ trợ tách ra thành nhiều tế bào riêng rẽ gọi là tế bào đơn. Tế bào đơn được lọc và nuôi cấy trong môi trường đặc biệt và tăng sinh khối. Hệ thống nuôi cấy tế bào đơn giống như hệ thống nuôi cấy vi sinh vật. Với các cơ chất thích hợp được bổ sung vào trong môi trường, tế bào có khả năng sản xuất các chất có hoạt tính sinh học (alkaloid, steroid...). Sau một thời gian nuôi cấy kéo dài trong môi trường lỏng, tế bào đơn được tách ra và trải trên môi trường thạch, tế bào đơn phát triển thành từng cụm tế bào mô sẹo khi môi trường có auxin, hay tế bào đơn có khả năng tái sinh thành cây hoàn chỉnh trên môi trường có tỷ lệ cytokinin/auxin thích hợp. Ngoài ra, tế bào đơn được xử lý đột biến bằng tia phóng xạ hay bằng hoá chất, có ý nghĩa trong tạo giống cây trồng.

3.4 - Nuôi cấy protoplast – chuyển gen

Protoplast (tế bào trần) thực chất là tế bào đơn được tách lớp vỏ cellulose, có sức sống và duy trì đầy đủ các chức năng sẵn có. Protoplast có thể tách trực tiếp từ các bộ phận của thực vật (lá, rễ...) bằng cơ học (nghiền mẫu + enzym) hay từ tế bào đơn sẵn có (enzym). Trong điều kiện nuôi cấy thích hợp, protoplast có khả năng tái sinh màng tế bào, tiếp tục phân chia và tái sinh thành cây hoàn chỉnh (tính toàn thể ở thực vật). Khi mất thành tế bào, hai protoplast có khả năng dung hợp với nhau tạo ra tế bào lai, đặc tính này cho phép cải thiện cây trồng. Quá trình dung hợp protoplast có thể thực hiện trên hai đối tượng cùng loài (lúa) hay khác loài (khoai tây, cà chua). Và ở trạng thái không có màng tế bào bao bọc, protoplast dễ dàng hấp thu các DNA ngoại lai cải thiện đặc tính kháng bệnh, năng suất và chất lượng cây trồng. Hiện nay kỹ thuật tách và nuôi cấy protoplast vẫn còn đang được nghiên cứu và hoàn thiện.

3.5 - Nuôi cấy hạt phấn đơn bội

Hạt phấn của thực vật được nuôi cấy trên những môi trường thích hợp tạo thành mô sẹo. Mô sẹo này được tái sinh thành cây hoàn chỉnh có 1n gọi là cây đơn bội. Trong quá trình nuôi cấy mô sẹo hay tái sinh tế bào đơn bội được xử lý hoá chất (colchicin...) để tạo cây đơn bội kép sử dụng trong quá trình lai tạo.

4 - ỨNG DỤNG KỸ THUẬT NUÔI CẤY MÔ TẾ BÀO THỰC VẬT TRONG NÔNG NGHIỆP

Kỹ thuật nuôi cấy *in vitro* có nhiều ứng dụng trong cải thiện giống cây trồng, theo Sasson (1988) thời gian tối thiểu để sử dụng kỹ thuật nuôi cấy *in vitro* trong các kế hoạch nghiên cứu nông nghiệp như sau:

- Thời gian ngắn (1-3 năm): vi nhân giống, sản xuất và bảo quản cây sạch bệnh.
- Thời gian trung bình (3-8 năm): biến dị di truyền, nuôi cấy phôi soma, cứu phôi và lai tạo giống qua nuôi cấy đơn bội.
- Thời gian dài (8-15 năm): lai tế bào soma và siêu sản xuất các chất thứ cấp có hoạt tính sinh học.

4.1 - Vi nhân giống

Nhân giống vô tính bằng kỹ thuật nuôi cấy *in vitro* được áp dụng phổ biến. Kỹ thuật nhân nhanh *in vitro* khác với các kỹ thuật do sử dụng các thể nhân giống nhỏ *in vitro*, được nuôi cấy trong điều kiện ổn định và môi trường nuôi cấy nhân tạo và có hệ số nhân nhanh hơn hẳn so với phương thức thông thường, các hướng ứng dụng kỹ thuật nhân nhanh *in vitro* được kể như:

- Nhân nhanh các dòng lai mới trong một thời gian ngắn với điều kiện đầu tư thấp.
- Phục tráng các giống cây trồng bị bệnh.
- Nhân nhanh các giống cây trồng mà khả năng nhân giống thông thường khó khăn.
- Nhân nhanh số lượng trong thời gian ngắn và đảm bảo đặc tính di truyền bố mẹ.

4.2 - Sản xuất và bảo quản cây sạch bệnh

Công nghệ vi nhân giống có khả năng sản xuất hàng loạt cây sạch bệnh từ những cây bị virus mà bằng biện pháp hoá học không phòng chống được. Kỹ thuật nuôi cấy đỉnh sinh trưởng *in vitro* được áp dụng, nơi mà có khả năng sản xuất > 40% cây sạch bệnh. Cây sạch bệnh có khả năng nhân nhanh, trao đổi giống và bảo quản *in vitro*.

4.3 - Bảo quản giống *in vitro*

Phương thức duy nhất an toàn cho lai giống mới là phải có ngân hàng giống. Giữ tập đoàn giống cho đến nay là một vấn đề nan giải cho những cây trồng nhân

vô tính hay đa bội. Bảo quản *in vitro* trong thời gian dài bằng phương pháp sinh trưởng chậm bước đầu đã giải quyết được một phần, nhưng những biến đổi di truyền có khả năng xảy ra qua thời gian nuôi cấy kéo dài, để hạn chế những biến dị này Withers & Street (1977) đã đề nghị bảo quản giống bằng phương pháp lạnh sâu. Cơ sở của phương pháp này là làm chậm hay ngăn chặn khả năng trao đổi chất của mô ở nhiệt độ -196°C . Có khoảng 40 loài thực vật đã được bảo quản theo phương pháp lạnh sâu như nuôi cấy tế bào, mô sẹo, phôi, tế bào trần hay đỉnh sinh trưởng (Karth, 1987).

4.4 - Biến dị tế bào soma

Cây được tái sinh *in vitro* từ nuôi cấy cơ quan, mô sẹo và protoplast thường có những thay đổi về hình thái hay một cách khác có thể nói là biến dị tế bào soma (Larkin & Scowsroft, 1981). Duy nhất chỉ nuôi cấy đỉnh sinh trưởng cho thấy có sự ổn định về mặt di truyền. Có hơn 20 loài thực vật có thể thay đổi về những đặc tính đã được ghi nhận (Scowcroft & Larkin, 1985). Những thay đổi qua nuôi cấy *in vitro* có thể do tình trạng sinh lý mẫu nuôi cấy, thể bội của cây trồng, trao đổi chéo DNA, những nhân tố hình thành cơ quan (như tinh bột, RNA và protein) cấu trúc nhân, thời gian nuôi cấy, điều kiện nuôi, môi trường nuôi cấy... Những biến dị tế bào soma thu được này có thể dẫn đến hình thành giống mới qua con đường chọn dòng. Những giống mía kháng bệnh mắt én, fiji, bệnh rươi và rầy sáp được chọn lọc qua nuôi cấy tế bào *in vitro* (Heinz và cộng sự., 1977) và phương thức chọn dòng này có thể thu ngắn một nửa thời gian tạo giống mới.

4.5 - Cứu phôi

Đối với thực vật tồn tại qua con đường hạt, thì sự nảy mầm của hạt phụ thuộc rất nhiều vào tình trạng sinh lý của hạt, đặc tính ngủ, khả năng tái sinh kém của những thể lai không tương hợp, hay thông qua sự thuần khiết của hạt giống... Kỹ thuật nuôi cấy *in vitro* cho phép cứu phôi của những hạt này. Kỹ thuật nuôi cấy phôi đã thành công trên các loài thực vật như phong lan, cà chua, đậu, lúa mạch, chuối và dứa.

4.6 - Lai đơn bội

Những tế bào trứng và bào tử được tái sinh *in vitro* để tạo ra những cây đơn bội. Như vậy cây đơn bội được tạo ra qua nuôi cấy hạt phấn và túi phấn. Cây đơn bội thể hiện được đặc tính thuần khiết của giống và là nguyên liệu hoàn hảo được sử dụng trong lai giống. Đặc tính ưu việt của cây bố mẹ được chứa đựng trong cây thu nhận qua nuôi cấy túi phấn và trong vòng một thế hệ có thể tạo những thể lai thuần khiết, thu ngắn thời gian lai tạo. Kỹ thuật nuôi cấy đơn bội đã thành công trên các loài thực vật như ngô, lúa, yến mạch, lúa mì, nho, cao su...

4.7 - Lai tế bào soma

Tế bào trần với đặc tính có khả năng lai cùng loài hay khác loài, có khả năng tiếp nhận các DNA ngoại lai, khắc phục tình trạng bất dục đực tế bào. Từ khi PEG

(polyethylen glycol) một chất có khả năng kết dính tế bào được sử dụng trong dung hợp protoplast, kỹ thuật lai tế bào soma đã đạt những bước tiến dài.

4.8 - Sản xuất các chất thứ cấp qua nuôi cấy tế bào

Các chất thứ cấp được thực vật sản xuất ra trong suốt chu kỳ sinh trưởng và phát triển, theo phương pháp cổ điển các chất thứ cấp được chiết xuất theo quy trình được xác định như vanilla từ cây *Vanillin* hay quynone chiết xuất từ cây *Cinchona*. Thực nghiệm đã chứng minh rằng các chất thứ cấp có khả năng sản xuất qua nuôi cấy tế bào trong bình lên men như nuôi cấy vi sinh vật. Hơn nữa, nghiên cứu quá trình sản xuất các chất thứ cấp *in vitro* còn cho phép nghiên cứu cơ chế sinh tổng hợp các chất này qua sự tác động của enzyme, từ đó cải thiện quá trình sinh tổng hợp giúp tăng hiệu quả sản xuất *in vitro*. Cho đến nay chỉ có một vài hệ thống hoạt động trên quy mô thương mại hay thử nghiệm quy mô nhỏ, có lý do là hiệu suất tổng hợp *in vitro* thường thấp so với đặc tính thực vật của nó. Nghiên cứu đặc tính nông học chọn dòng thực vật có hiệu suất cao, chọn dòng tế bào có năng suất cao khi nuôi cấy *in vitro*... là một trong những phương pháp cải thiện hiệu suất chiết suất.

Tóm tắt

Công nghệ sinh học thực vật đã trải qua 3 thời kỳ phát triển lớn:

- Thời kỳ sơ khai với các phát hiện tình cờ trong nuôi cấy các bộ phận của thực vật.
- Thời kỳ thứ hai với việc tìm ra các môi trường nuôi cấy, các chất điều hòa sinh trưởng thực vật đã góp phần thúc đẩy công nghệ sinh học thực vật phát triển mạnh mẽ.
- Thời kỳ thứ ba đánh dấu sự phát triển vượt bậc với sự hiểu biết sâu sắc về vai trò của các chất điều hòa sinh trưởng thực vật. Đã có rất nhiều phương pháp nhân giống thực vật mới được đề xuất và các phương pháp nhằm cải tạo chất lượng của cây trồng thông qua biến đổi hệ thống di truyền của thực vật.

Trải qua các giai đoạn phát triển, công nghệ sinh học thực vật đã đánh dấu bằng việc tìm ra hàng loạt các phương pháp vi nhân giống mới góp phần làm gia tăng nhanh chóng số lượng, chất lượng cây trồng:

- Nuôi cấy đỉnh sinh trưởng.
- Nuôi cấy mô sẹo.
- Nuôi cấy tế bào đơn và thu nhận các chất có hoạt tính sinh học.
- Nuôi cấy protoplast – chuyển gen.
- Nuôi cấy đơn bội bao phấn, hạt phấn.

Câu hỏi ôn tập

1. Trình bày các giai đoạn phát triển của công nghệ sinh học thực vật? Đặc điểm chính của các giai đoạn?
2. Nêu các phương pháp của công nghệ sinh học thực vật trong vi nhân giống cây trồng?
3. Ứng dụng của công nghệ sinh học thực vật trong nông nghiệp?

CHƯƠNG II

NHÂN GIỐNG TRUYỀN THỐNG THỰC VẬT

1 - NHÂN GIỐNG HỮU TÍNH BẰNG HẠT

Hạt là noãn đã chín, gồm có phôi và thực phẩm dự trữ cho phôi được bao bọc trong lớp vỏ hạt. Các hoạt động của cơ chế biến dưỡng ở phôi dẫn đến sự xuất hiện cây mới. Hiện tượng này gọi là sự nảy mầm.

1.1 - Quá trình nảy mầm

1.1.1 - Để hạt nảy mầm cần phải có ba điều kiện

- Hạt phải còn khả năng nảy mầm tức là phôi của hạt còn sống và có khả năng nảy mầm.

- Hạt phải được đặt trong môi trường có điều kiện thuận lợi: đủ nước, nhiệt độ thích hợp, có nguồn cung cấp oxygen và đôi khi phải có ánh sáng thích hợp.

- Phải vượt qua được bất cứ điều kiện tạo sự ngủ sơ cấp nào hiện diện bên trong hạt. Tránh các điều kiện ngoại cảnh bất lợi dẫn đến sự ngủ thứ cấp sau khi sự ngủ sơ cấp đã được tháo gỡ.

1.1.2 - Các giai đoạn của sự nảy mầm

- *Giai đoạn 1 - Sự hoạt hóa*

Sự hút ẩm (quá trình vật lý): sự hấp thu nước của hạt khô làm tăng hàm lượng nước trong hạt, làm mềm vỏ hạt. Hạt trương phồng lên và vỏ hạt bị nứt ra.

Sự tổng hợp các enzym: hoạt động enzym bắt đầu trong vòng vài giờ sau khi xảy ra sự hấp thu nước của hạt. Hoạt động của các enzym một phần từ sự tái hoạt hóa các enzym dự trữ được hình thành từ sự phát triển của phôi và một phần từ sự tổng hợp các enzym mới khi hạt bắt đầu nảy mầm.

Sự kéo dài tế bào và xuất hiện rễ: những dấu hiệu đầu tiên của sự nảy mầm là sự xuất hiện rễ xảy ra vài giờ hoặc vài ngày sau khi sự nảy mầm bắt đầu.

- *Giai đoạn 2 – Sự phân giải các chất dự trữ và vận chuyển*

Các chất dự trữ (chất béo, protein, hợp chất có carbon) được thủy phân thành các chất hữu cơ đơn giản và sau đó được chuyển đến các vị trí tăng trưởng của trục phôi.

Các hoạt động sinh tổng hợp của tế bào sẽ được kích hoạt. Sự hấp thu nước và hô hấp tiếp tục diễn ra ở một tốc độ đều đặn.

- *Giai đoạn 3 – Sự tăng trưởng của cây mầm*

Sự phân chia tế bào xảy ra ở hai đầu của trục phôi. Một đầu phát triển thành chồi mầm, một đầu phát triển thành rễ mầm trên trục phôi có mang 1 hoặc 2 lá mầm được gọi là tử diệp. Thân mầm bên trên tử diệp là trục thượng diệp, bên dưới

tử diệp gọi là trực hạ diệp. Sự sinh trưởng của cây con lúc đầu có khác nhau giữa đơn tử diệp và song tử diệp (hình II.1).

Khi cây mầm bắt đầu tăng trưởng, trọng lượng tươi và khô của cây mầm bắt đầu tăng trong khi trọng lượng mô dự trữ giảm.

Cường độ hô hấp tăng đều đặn cùng với sự tăng trưởng của cây mầm. Mô dự trữ của hạt ngừng tham gia các hoạt động biến dưỡng khi cây mầm có tử diệp nhô lên khỏi mặt đất và bắt đầu tham gia vào quá trình quang hợp.

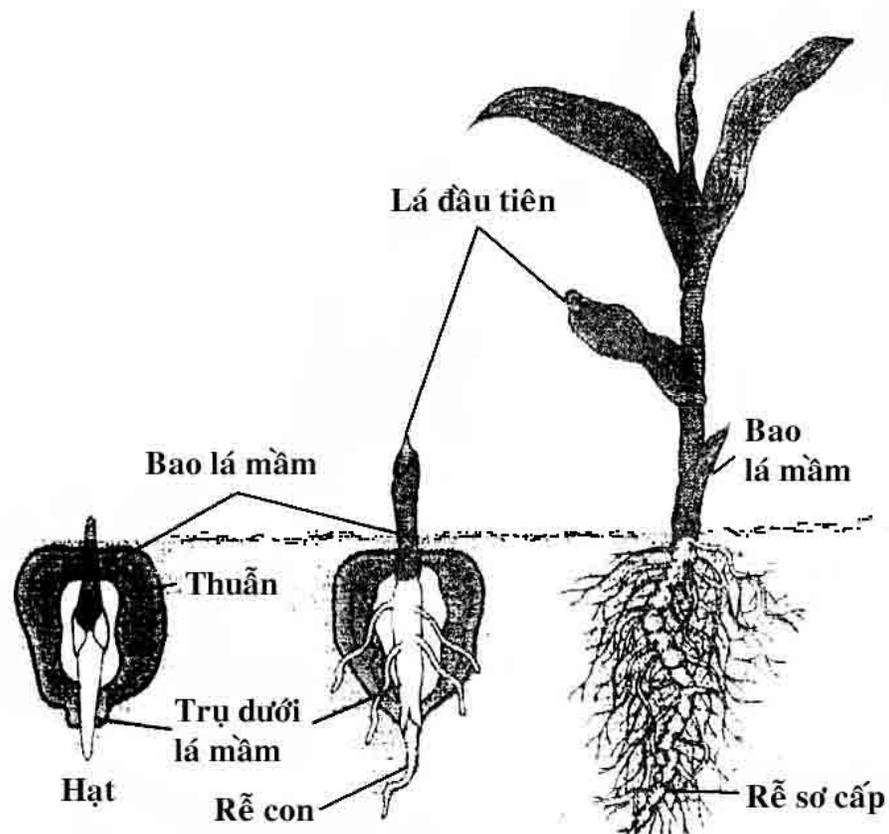
1.2 - Chất lượng hạt

Khả năng nảy mầm của hạt được biểu hiện bởi phần trăm hạt nảy mầm, nghĩa là số lượng cây nảy mầm được tạo ra từ số hạt đã biết trong một khoảng thời gian nhất định.

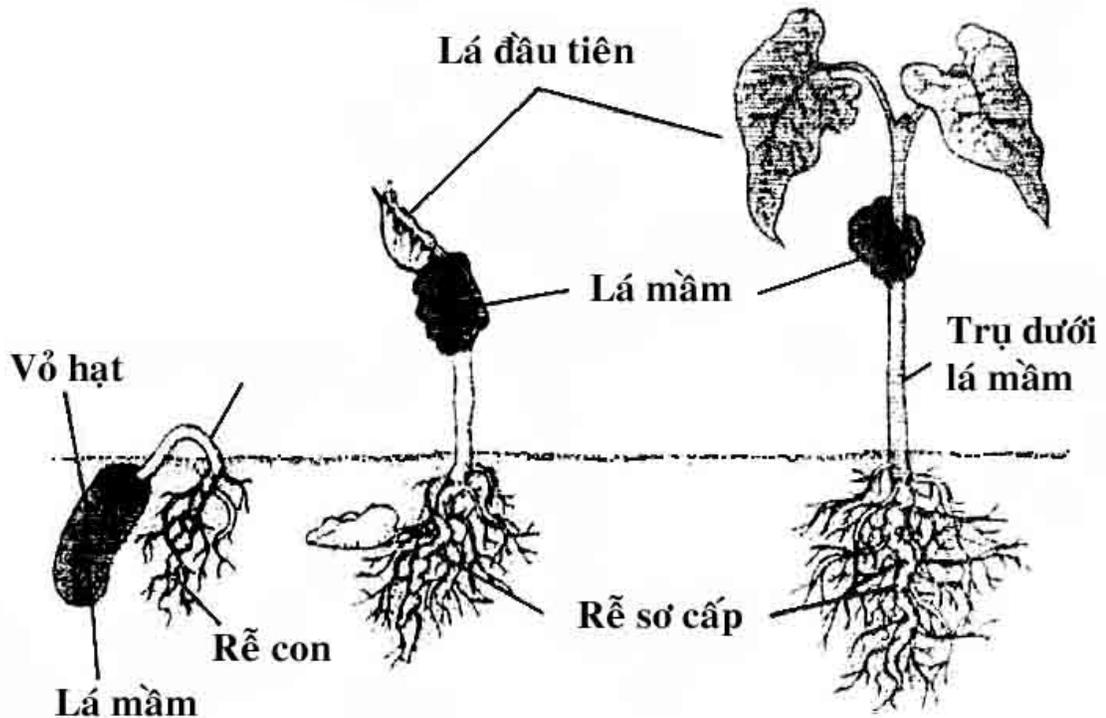
Sức sống mạnh mẽ của hạt và cây mầm là một yếu tố quan trọng về chất lượng hạt, nhưng lại khó xác định.

Đường cong nảy mầm cho thấy có sự chậm trễ khi hạt khởi đầu sự nảy mầm, sau đó số lượng hạt nảy mầm gia tăng nhanh chóng rồi giảm dần.

Hiệu suất nảy mầm có thể được xác định bằng ngày cần để đạt được phần trăm hạt nảy mầm nhất định.



A. Cây một lá mầm



B. Cây 2 lá mầm

Hình II.1 - Quá trình nảy mầm của hạt

1.3 - Điều chỉnh sự nảy mầm của hạt

Các kích thích tố thực vật (KTTTV) tham gia vào sự thúc đẩy hay cản sự nảy mầm ở hạt gồm các KTTTV nhóm gibberellin như GA3, acid abscisic (ABA), các cytokynins như kinetin, khí ethylen, v.v.

Một số ví dụ về sự tương tác giữa các KTTTV và sự ngủ của hạt:

- Ở *Trollius* các chất cản nằm ở vỏ hạt (testa). Các chất cản này có thể được loại bỏ khi hạt hút nước và khi tách bỏ lớp vỏ hạt, hoặc xử lý với gibberellin.
- Các hạt cải 'Grand Rapids' nảy mầm khi xử lý với ABA thì ức chế.

1.4 - Các yếu tố ảnh hưởng lên sự nảy mầm của hạt

1.4.1 - Nước

Hàm lượng nước (water content) là yếu tố kiểm soát chính điều khiển chương trình từ phôi đến giai đoạn cây mầm non trẻ, kiểm soát tuổi thọ của hạt, khởi đầu sự nảy mầm và bảo đảm sự sống và sự khỏe mạnh của cây con. Trong quá trình bảo quản hạt, nước được biết đến trên cơ sở trọng lượng tươi (hàm lượng nước/trọng lượng tươi của hạt). Trong quá trình nảy mầm thì dựa trên cơ sở trọng lượng khô (hàm lượng nước/trọng lượng khô của hạt).

Thế nước (water potential) được dùng để đo sức hấp thu nước của hạt khô trong giai đoạn 1 (giai đoạn hoạt hóa). Hạt khô có thế nước thấp (-100 MPa). Thế nước âm do thế nhớt (matric potential) nước (hiện diện ở thể keo của phôi, các vùng mô dự trữ và vỏ hạt) và thế thẩm thấu (osmotic potential) của nước (nồng độ hòa tan) của các tế bào sống trong hạt. Ngược với hai thế trên là thế trương nước (pressure potential) của vách tế bào, đây là thế nước dương. Nước di chuyển vào trong hạt theo biên độ từ thế cao (bên ngoài hạt) đến thế thấp (bên trong hạt).

Sự di chuyển của nước đo bằng đơn vị áp lực gọi là *bar*, nhưng sau này lại dùng đơn vị *megapascal* (Mpa), với $-1 \text{ Mpa} = -10 \text{ bar}$. Nước tinh khiết có thế nước = 0, trong khi nước có chất hòa tan có thế nước âm tính. Nước chuyển từ chỗ có thế nước cao (ít âm tính) đến chỗ có thế nước thấp (nhiều âm tính).

Sự thái quá về hàm lượng nước (water stress) sẽ làm giảm tỉ lệ nảy mầm do sự hoạt động của các chất cản. Sự thái quá về ẩm độ sẽ làm giảm sự xuất hiện cây mầm trên luống gieo trồng.

Để tăng tốc độ nảy mầm của hạt, hạt có thể được xử lý bằng cách ngâm (soaking) trong nước khoảng 8 tiếng trước khi trồng. Hạt sẽ bị tổn thương nếu ngâm quá lâu trong nước vì nước có thể bị giữ lại giữa các tử diệp và làm phôi bị ngộp. Nếu ngâm hạt lâu hơn 24 tiếng thì phải thay nước ít nhất 24 giờ/lần. Trong phương pháp tạo mầm cảm thẩm thấu, hạt được xử lý trước khi gieo bằng một dung dịch có áp suất thẩm thấu cao nhằm làm giảm áp suất thẩm thấu trong hạt. Các hoạt động biến dưỡng bên trong hạt vẫn xảy ra cho phép hạt nảy mầm nhưng ngăn chặn hay làm chậm trễ sự xuất hiện rễ mầm. Người ta thường sử dụng một hợp chất trơ như polyethylen glycol (PEG 6000) hay một số dung dịch muối như NaCl hay KNO_3 .

1.4.2 - Nhiệt độ

Nhiệt độ có lẽ là yếu tố môi trường quan trọng nhất điều chỉnh thời gian nảy mầm, một phần là do nhiệt độ kiểm soát và tháo bỏ cơ chế ngủ của hạt và một phần do sự thích ứng với khí hậu. Sự kiểm soát nhiệt độ cũng thiết yếu cho tăng trưởng của cây mầm sau đó.

Nhiệt độ ảnh hưởng đến cả phần trăm hạt nảy mầm và hiệu suất nảy mầm. Hiệu suất nảy mầm luôn luôn thấp ở nhiệt độ thấp và tăng dần lên khi nhiệt độ tăng. Ở mức tối ưu, hiệu suất này nhanh nhất và giảm xuống thấp nhất khi nhiệt độ tiến gần đến ngưỡng tử vong khi mà hạt đã bị tổn thương.

Nhiệt độ tối thiểu (minimum), tối đa (maximum) và tối ưu (optimum) cho hạt nảy mầm thay đổi tùy theo loài thực vật. Nhiệt độ tối thiểu là nhiệt độ thấp nhất có hiệu quả nảy mầm. Nhiệt độ tối đa là nhiệt độ cao nhất mà sự nảy mầm còn diễn ra. Vượt qua nhiệt độ này, hạt hoặc bị tổn thương hoặc đi vào trạng thái ngủ. Nhiệt độ tối ưu là nhiệt độ mà phần trăm cây con được tạo thành là lớn nhất ở hiệu suất cao nhất. Nhiệt độ tối ưu đối với các hạt không có trạng thái ngủ ở đa số các loài thực vật từ $25 \div 30^\circ\text{C}$.

Sự thay đổi nhiệt độ ngày và đêm đem đến kết quả tốt cho sự nảy mầm của hạt và sự tăng trưởng của cây con hơn là nhiệt độ ổn định. Khoảng cách nhiệt độ ngày đêm nên là 10⁰C. Vì vậy những hạt đã hút ẩm không thể nảy mầm nếu vùi dưới đất vì sự thay đổi nhiệt độ của đất không còn khi chiều sâu của đất tăng.

Sự tăng trưởng của cây mầm cần nhiệt độ khác với nhiệt độ cho hạt nảy mầm. Vì vậy tại vườn ươm, cần di chuyển cây mầm đến nơi có nhiệt độ thấp hơn sau khi nảy mầm để chuẩn bị đem cây ra trồng và tránh các vấn đề bệnh xảy ra trên luống mạ.

1.4.3 - Sự thông khí

Sự trao đổi khí giữa môi trường gieo hạt và phôi là thiết yếu cho hạt nảy mầm nhanh và đồng loạt. Oxygen (O₂) rất cần cho các quá trình hô hấp trong hạt đang nảy mầm. Sự hấp thu O₂ có thể đo được ngay sau khi hạt bắt đầu thu nước. Sự hấp thu O₂ tỷ lệ thuận với các hoạt động biến dưỡng xảy ra trong hạt. Nếu đất chứa quá nhiều nước thì việc cung cấp oxygen cho hạt bị hạn chế. Lượng oxygen trong môi trường nảy mầm bị ảnh hưởng bởi khả năng hòa tan oxygen trong nước thấp và khả năng khuếch tán oxygen trong môi trường chậm. Nồng độ oxygen trong không khí là 20% và bị giảm đi rõ rệt theo độ sâu của đất.

CO₂ là sản phẩm của quá trình hô hấp và trong điều kiện kém thông khí sẽ được tích tụ lại trong đất. Nồng độ CO₂ cao có thể có hiệu quả trong việc gỡ bỏ sự ngủ của hạt ở một số loài thực vật.

1.4.4 - Ánh sáng

Ánh sáng được xem là một yếu tố kiểm soát sự nảy mầm. Ánh sáng vừa có hoạt động cảm ứng sự ngủ vừa tháo gỡ sự ngủ của hạt. Ánh sáng còn là một cơ chế giúp thực vật thích ứng với các điều kiện ngoại cảnh đặc biệt thích hợp dưới sự tương tác thường xuyên của nhiệt độ. Tác động của ánh sáng có thể kể cả chất lượng ánh sáng (bước sóng – wavelength) và quang kỳ (thời gian chiếu sáng – photoperiod).

Các thực vật khí sinh (epithytic plants) tuyệt đối cần ánh sáng. Chúng sẽ mất khả năng nảy mầm trong vài tuần nếu không có ánh sáng.

Hầu hết các loài thực vật nhạy cảm với ánh sáng rơi vào nhóm ngủ sinh lý. Hạt của chúng thường nhỏ và cần trồng cạn. Nếu trồng sâu quá, diệp tiêu khó chui lên khỏi mặt đất.

Số loài thực vật có sự nảy mầm bị ức chế bởi ánh sáng thường không nhiều lắm. Một số loài sống ở sa mạc cần hạt được vùi sâu nơi có độ ẩm được đảm bảo. Một số loài hoa đòi hỏi nảy mầm trong tối hoàn toàn như hoa pansy.

Hạt của các loài tùng bách có sự ngủ trung gian cũng nhạy sáng.

Cơ chế của sự nhạy sáng ở hạt là do sự phản ứng của phytochrom. Hạt ẩm đặt dưới ánh sáng đỏ (600-760 nm) sẽ biến phytochrom thành phytochrom P_{fr} kích

thích hạt nảy mầm. Ngược lại nếu đặt hạt ảm dưới ánh sáng đỏ xa (far red) (760-800 nm) thì sẽ biến đổi thành P_r và ức chế sự nảy mầm. Hiện tượng được lập đi lập lại vô hạn và lần cuối cùng là lần có hiệu quả nhất.

Các lớp màng của vỏ hạt hay nội nhũ được xem như các đầu dò ánh sáng (light sensor), vì vậy nếu tách bỏ lớp hạt thì việc kiểm soát ánh sáng sẽ biến mất.

Việc sử dụng ánh sáng nhân tạo có hiệu quả trong việc kiểm soát sự nảy mầm của hạt. Ánh sáng trắng (neon neon) có nhiều tia đỏ thuận lợi cho việc nảy mầm, trong khi ánh sáng nển có nhiều tia hồng ngoại (infrared) hay đỏ xa có thể dẫn đến sự ngủ của hạt.

1.4.5 - Sự kiểm soát sâu bệnh trong quá trình hạt nảy mầm

Các điều kiện môi trường trong quá trình nảy mầm của hạt sẽ ảnh hưởng đến sự tăng trưởng của cả nấm bệnh và cây mầm, nhất là nhiệt độ. Để ngăn ngừa hiện tượng cây con chết do nấm bệnh, có thể sử dụng 2 biện pháp:

- Loại trừ hoàn toàn nấm bệnh trong suốt quá trình nhân giống.
- Kiểm soát chặt chẽ sự tăng trưởng của cây mầm và các điều kiện môi trường.

2 - NHÂN GIỐNG VÔ TÍNH THỰC VẬT

2.1 - Nhân giống vô tính bằng giâm cành

Giâm cành là kỹ thuật tạo cây mới từ một nhánh, cành tách từ cây mẹ. Nhánh, cành tách ra được giâm vào đất sẽ ra rễ, ra chồi, sống độc lập như một cây hoàn chỉnh. Cây giâm cành có đặc tính hoàn toàn giống cây mẹ.

Trong kỹ thuật giâm cành, một nhánh, cành bị tách rời khỏi cây mẹ, cần trở lại một cây nguyên vẹn tương tự với cây mẹ, có nghĩa là có khả năng sống tự lập. Như vậy, đoạn thực vật được cô lập không nhận một sự cung cấp nào về nước và các chất dinh dưỡng, nó chịu một cái “stress” về sinh lý quan trọng. Vấn đề cần phải giải quyết là làm giảm tối đa cái “stress” này. Người ta thường tạo điều kiện cho đoạn thực vật này tự lập nhanh chóng về tăng trưởng bằng cách làm thuận lợi cho sự phát triển hệ rễ.

Mục đích của phương pháp giâm cành nói chung là tạo các cây lùn, nhanh cho thu hoạch nhưng vẫn đảm bảo hiệu quả. Phương pháp này ngoài ra còn giúp nâng cao hệ số nhân giống và trẻ trung hoá cây giống.

2.1.1 – Tách cành giâm

Độ tuổi của cành giâm không quá già hoặc không quá non, cành non hoặc già đều giâm được nhưng mọc rất yếu. Cành giâm phải có ít nhất ba mắt trở lên, dài trung bình 10 – 15 cm. Cây chọn để lấy cành giâm phải là cây khoẻ mạnh. Thường chọn những cành ở lưng chừng tán, ngoài bìa tán, những cành không mang hoa, quả và mới ổn định sinh trưởng chưa lâu.

Khi cắt cành giâm, nếu giâm nghiêng thì phải cắt vuông góc với cành, nếu giâm thẳng đứng thì phải cắt xiên nhằm tránh đọng nước ở vết vết dễ gây nấm bệnh. Cành giâm trước khi đem giâm để kích thích ra rễ nhanh có thể xử lý với NAA hoặc 2,4 – D.

2.1.2- Tạo rễ bất định (adventitious root) ở cành giâm

Rễ bất định gồm hai loại: rễ được hình thành tự nhiên (preformed root) và rễ hình thành từ vết thương (wound root) khi cắt đoạn. Loại rễ hình thành tự nhiên được phát triển ngay trên thân cây khi chưa bị cắt rời ra khỏi thân mẹ. Loại rễ được hình thành từ vết thương chỉ phát triển sau khi cắt đoạn. Đây là sự phản ứng của các tế bào sống ở bề mặt của vết cắt trong quá trình làm lành vết thương. Quá trình này gồm 3 bước:

- Bước 1: bề mặt vết cắt sẽ được bảo vệ bằng một lớp gum giống như chất bần (suberin) bảo vệ đoạn cắt khỏi sự mất nước và các tác nhân gây bệnh.

- Bước 2: Các tế bào sống đang sau lớp gum này bắt đầu phân chia vài ngày sau khi sự cắt đoạn xảy ra và một lớp tế bào nhu mô tạo ra nhu bì ở vết thương

- Bước 3: Các tế bào ở vùng tầng phân chia và khởi đầu hình thành các rễ bất định.

Sự thành lập rễ bất định do phương pháp cắt đốt (cutting) có thể được chia làm 4 giai đoạn:

- Sự phản phân hóa của các tế bào đã phân hóa chuyên biệt.

- Sự hình thành ban đầu của rễ từ các tế bào bó mạch. Các tế bào này trở thành các tế bào sinh mô do quá trình phản phân hóa.

- Sự phát triển tiếp theo của các tế bào rễ ban đầu thành tổ chức mô rễ sơ khởi.

- Sự tăng trưởng và xuất hiện của mô rễ sơ khởi ra ngoài vượt qua các mô tế bào khác ở thân. Đồng thời có sự hình thành bó mạch nối liền mô rễ sơ khởi với các mô mạch của đoạn cắt.

Rễ bất định có thể bắt nguồn từ phía ngoài hay giữa các bó mạch từ các tế bào nhu mô như nhu mô libe, biểu bì... Rễ bất định có nguồn gốc nội sinh, ngay phía bên ngoài trung tâm của các mô mạch.

Các tế bào ban đầu của rễ hình thành tự nhiên thường nằm chờ cho đến khi thân được cắt đoạn và đặt vào môi trường có các điều kiện thuận lợi cho sự phát triển mô rễ sơ khởi.

2.1.3 – Các yếu tố của môi trường trong quá trình ra rễ của cành giâm..

Nước: mặc dù sự hiện diện của lá là cần thiết cho sự tạo rễ nhưng sự mất nước từ lá có thể làm giảm hàm lượng trong đoạn cắt tới mức làm chết chúng. Mục

tiêu của hệ thống nhân giống là làm thế nào bảo quản sự bốc hơi nước trong không khí ở mức thấp nhất để làm giảm tối thiểu sự thoát hơi nước từ đoạn cắt tránh sự thiếu nước nghiêm trọng trong mô tế bào. Nhiệt độ trong hệ thống này cũng phải được duy trì ở mức chấp nhận được để đảm bảo sự chuyển hoá tại gốc của đốt cắt. Ánh sáng trong hệ thống này cũng phải phù hợp cho sự quang hợp và tạo các hydrat carbon cho cây sử dụng trong quá trình tạo rễ.

Nhiệt độ của môi trường nhân giống không cần phải tối ưu trong quá trình tạo rễ, chỉ cần điều kiện nhiệt độ giữ ấm cho các luống nhân giống thay vì cả nhà ươm trong mùa đông. Đối với cây ôn đới nhiệt độ tối ưu từ 18-25°C, cây nhiệt đới thì cao hơn 7°C.

Ánh sáng góp phần vào việc tạo rễ và chồi bất định cho đoạn cắt. Chỉ cần ánh sáng yếu cho sự tạo rễ vì cường độ ánh sáng cao quá sẽ ngăn cản sự tạo rễ. Đối với một số loài, quang kỳ có thể ảnh hưởng tới sự ra rễ. Chất lượng ánh sáng như màu đỏ cam thích hợp cho sự ra rễ hơn màu xanh da trời.

2.2 – Nhân giống vô tính bằng kỹ thuật ghép

Ghép cây là là phương pháp nhân giống truyền thống, theo đó, người ta lấy một hoặc nhiều cây mẹ, giống tốt, đang sinh trưởng, những phần như đoạn cành, khúc rễ, mầm ngủ... lắp đặt vào vị trí thích hợp trên cây khác, gọi là gốc ghép. Phần ghép và gốc ghép được tạo điều kiện cho liền với nhau. Phần ghép tiếp tục sống và tăng trưởng trên gốc ghép.

Nếu gốc ghép và phần ghép hay còn gọi là mắt ghép thuộc cùng một cá thể thì quá trình ghép gọi là tự ghép. Nếu chúng từ các cá thể khác nhau của cùng một loài thì gọi là đồng ghép. Nếu sự kết ghép giữa các loài hoặc các giống khác nhau thì gọi là sự dị ghép.

Gốc ghép và phần ghép đều có những khả năng sinh tồn khác nhau, bổ sung hỗ trợ lẫn nhau tạo thành một tổ hợp cộng sinh hữu cơ, dựa vào nhau cùng tồn tại, tạo thành một thể thống nhất. Bộ rễ của gốc ghép cung cấp nước và muối khoáng cho thân, cành, lá của phần ghép phía trên. Ngược lại, chất hữu cơ do phần ghép tổng hợp sẽ cung cấp cho gốc ghép. Cây ghép thường mang những đặc tính của cây lấy mắt ghép ở phần mắt ghép và mang những đặc tính của cây làm gốc ghép ở phần gốc.

2.2.1 – Cơ chế liên kết giữa mắt ghép và gốc ghép

Khi bị tổn thương, thực vật có thể tự làm lành vết thương do chúng có những vùng mô phân sinh có thể tạo những tế bào lấp kín vết thương. Quá trình ghép tận dụng đặc điểm này của thực vật. Trong quá trình ghép, mặt cắt của phần ghép phải tiếp hợp chặt chẽ với vùng phân sinh trên mặt cắt của gốc ghép. Khi ghép ở hai mặt cắt hình thành một lớp màng mỏng chất hữu cơ ngăn cách hai phần với nhau. Sau một thời gian mô phân sinh của gốc ghép sẽ tạo những tế bào mới lấp đầy chỗ trống giữa hai mặt cắt, màng hữu cơ bị loại bỏ. Hệ thống mạch dẫn giữa gốc ghép và phần ghép dần được liên kết do quá trình biệt hoá của các tế bào mới được tạo

thành. Chồi ghép được cung cấp chất dinh dưỡng, nước từ gốc ghép và bắt đầu tăng trưởng. Thời gian để hệ mạch dẫn được liên kết hoàn toàn khoảng 15 – 25 ngày.

Khả năng hoà nhập giữa gốc ghép và phần ghép phụ thuộc rất lớn vào đặc tính sinh lý, di truyền... của chúng. Sự khác biệt càng lớn thì khả năng hoà nhập càng khó.

2.2.2 – Đặc tính của gốc ghép, mắt ghép

Gốc ghép thường được chọn là những cây bản địa, thích nghi cao với các điều kiện sinh thái của địa phương. Gốc ghép sinh trưởng phát triển tốt, tuổi thọ kéo dài, có bộ rễ phát triển tốt thích nghi với điều kiện đất của địa phương. Gốc ghép thường gần về mặt di truyền với phần ghép thì hiệu suất ghép cao.

Để có những gốc ghép tốt, thường chọn những cây tốt, tiến hành thu quả, hạt giống để làm giống. Hạt giống được bảo quản, khi cần thiết được gieo để tạo gốc ghép. Cây non làm gốc ghép phải được chăm sóc cẩn thận. Cây cao 25 - 30 cm thường được cắt ngọn để làm to gốc, dễ ghép.

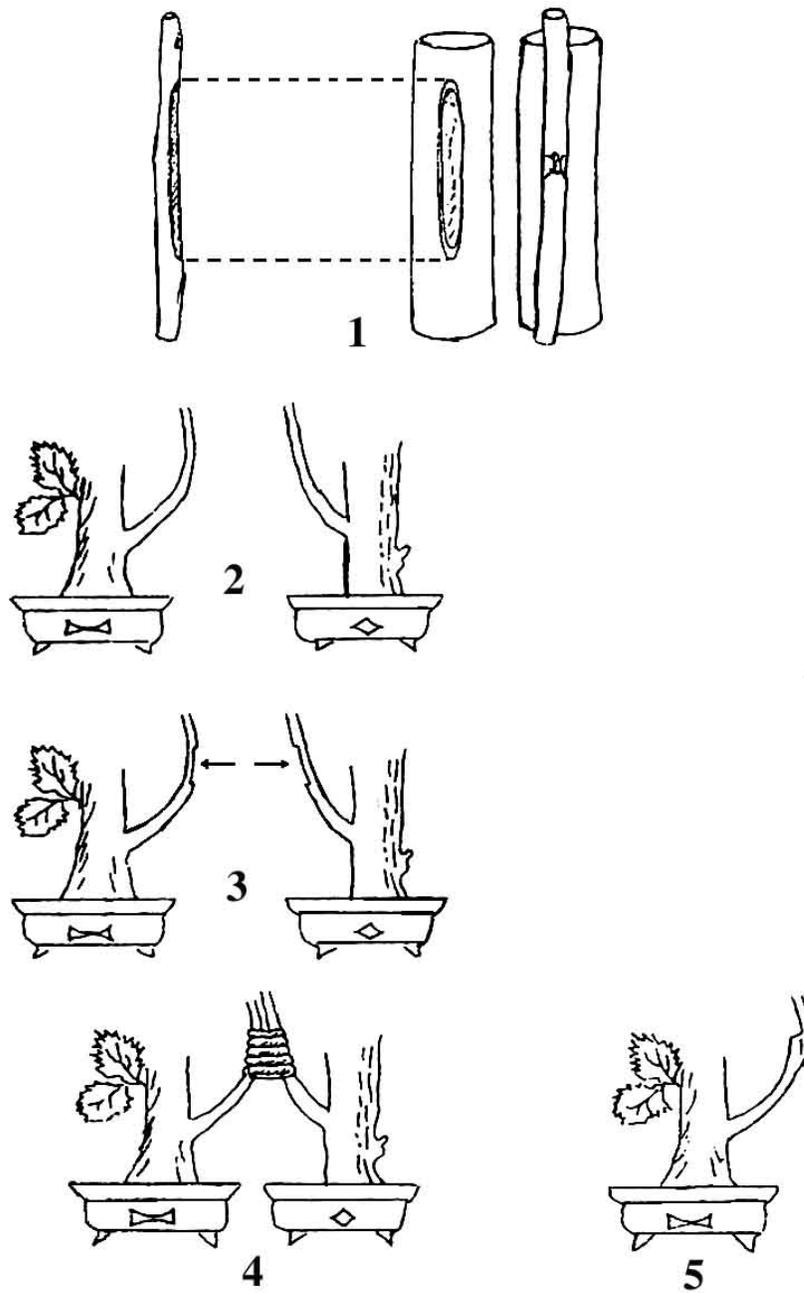
Phần ghép là những cành có chất lượng tốt. Cành được chọn từ những cây có năng suất, chất lượng quả cao. Cành lấy ở ngoài mặt tán, trên độ cao 1/3 tán, ở đây các cành có sức sống tốt nhất, có tính di truyền ổn định, có khả năng duy trì tính trạng của cây mẹ, có khả năng ra quả sớm.

2.2.3 – Các phương pháp ghép

- Ghép áp nhánh (hình II.2)

Chọn 2 nhánh cây có kích thước gần bằng nhau của hai cây khác nhau. Bóc vỏ hai mép cây kề nhau rồi áp chúng lại. Dùng dây nilon buộc chặt nơi tiếp xúc. Hai nhánh này được cung cấp chất dinh dưỡng bởi hệ thống mạch dẫn của cả hai cây cho đến khi sự kết hợp của chúng được hoàn toàn. Sau đó, có thể cắt bỏ phần ngọn của 1 cành và cắt bỏ dần phần thân của cây kia cho đến sát điểm ghép.

Phương pháp này có thể áp dụng ở nhiều cây. Ví dụ: thực hiện ghép áp giữa 2 cây hoa hồng, một cây có hoa đẹp và một cây hoa không tốt nhưng khoẻ mạnh. Sau khi thực hiện xong phần ghép, cắt bỏ phần ngọn của cành hồng cho hoa xấu và phần thân của cây cho hoa đẹp. Kết quả sẽ là một cây hồng khoẻ mạnh cho hoa đẹp. Một cây hồng có thể ghép áp được nhiều nhánh cho nhiều giống hoa màu sắc khác nhau.

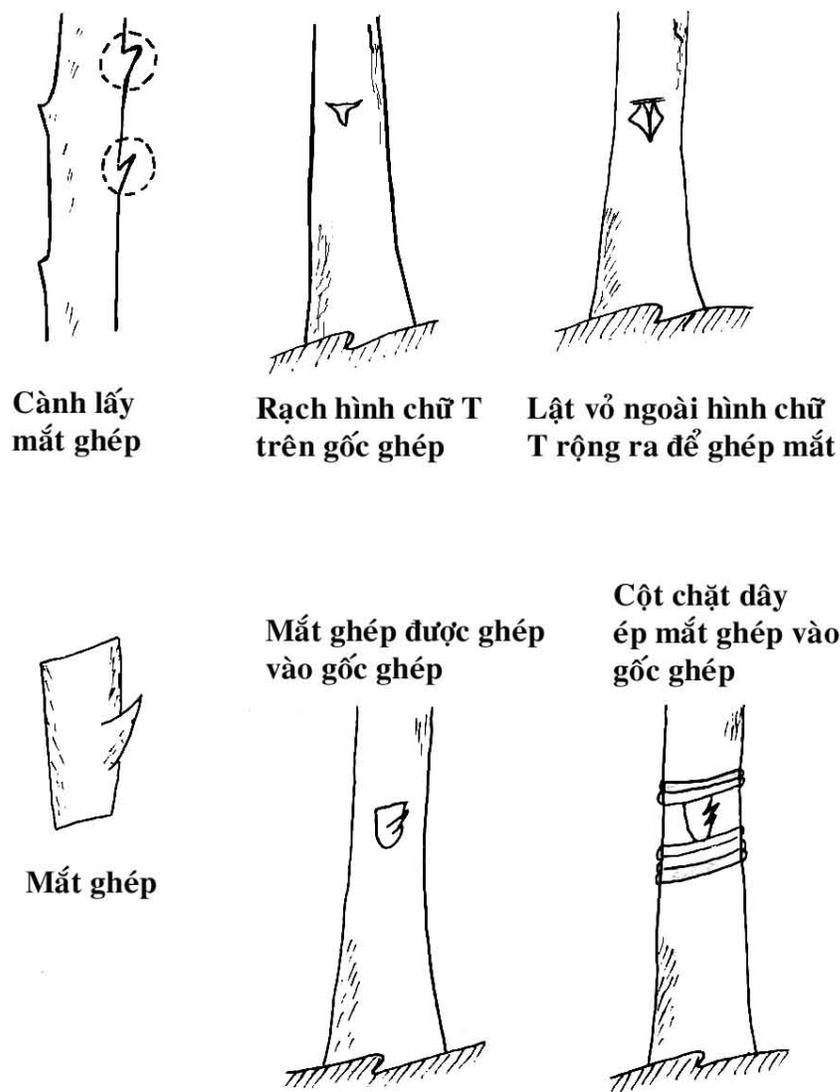


Hình II.2 - Phương pháp ghép áp

1.Cách ép giữa cành gốc ghép và cành ghép, 2.Chuẩn bị gốc ghép và cành cần ghép, 3. Vị trí hai cành ghép áp phải vạt bỏ, 4. Đặt hai chậu sát nhau để hai cành áp sát. 5. Sau khi ghép xong chỗ ghép nổi cộm lên.

- Ghép mắt (hình II.3)

Mắt ghép là một đoạn thân cô lập hoặc chỉ là một chồi trên một mảnh vỏ hoặc nhiều chồi trên một mảnh vỏ. Đưa mắt ghép vào trong thân của cây đã được cắt ngọn, bóc vỏ vừa với mắt ghép. Các mắt ghép phù hợp sẽ tạo chồi mang đặc tính của cây cho mắt ghép.



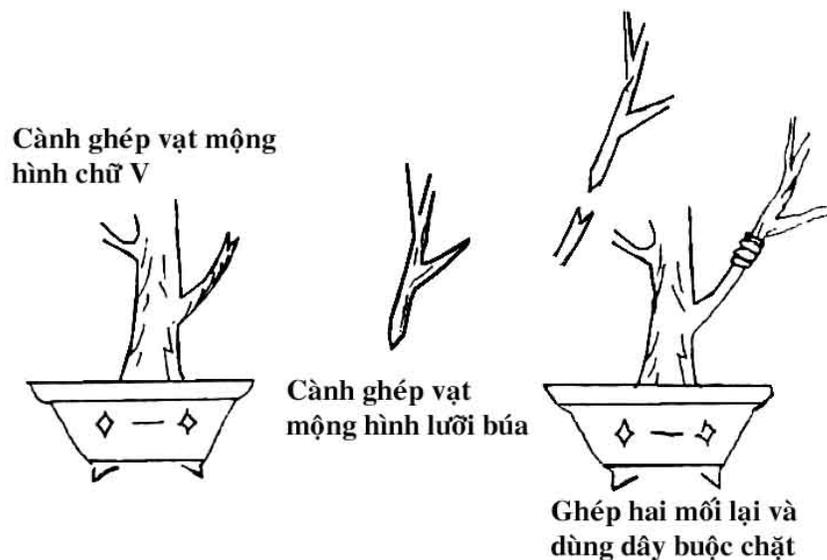
Hình II.3 - Phương pháp ghép mắt

- Ghép xuyên thân

Chọn gốc ghép là những cây có sức sống tốt. Đặt 2 cây có gốc ghép và cành ghép gần nhau, chọn 2 cành có độ lớn bằng nhau. Bên gốc ghép, đâm xuyên thủng ngay giữa lõi gỗ của cành. Bên cành ghép, bỏ hết lá, chọn nơi định ghép vạt bỏ một đoạn vỏ khoảng 0,5 cm dọc hai bên cành. Xỏ cành ghép xuyên qua thân cành gốc ghép sao cho chỗ vạt nằm gọn trong thân của cành gốc ghép. Dùng dây nilon buộc chặt chỗ ghép. Sau khi gốc ghép và cành ghép hoà hợp, cắt rời cành ghép khỏi cây cho cành ghép.

- Ghép nêm (hình II.4)

Chọn gốc ghép là những cây có sức sống tốt, cắt vát phần vỏ hay phần thân nơi chọn ghép. Nhánh ghép được vát sao cho phù hợp với gốc ghép, nêm vào gốc ghép rồi buộc chặt lại.



Hình II.4 - Phương pháp ghép nêm

2.3 – Nhân giống vô tính bằng phương pháp chiết cành

Chiết cành là phương pháp nhân giống cổ điển. Chiết là lấy đất bọc quanh một đoạn thân hay cành đã bóc bỏ lớp vỏ. Khi chỗ cắt mọc rễ, cành chiết sẽ được cắt rời khỏi cây mẹ và đem trồng thành cây mới. Cây chiết cành có các đặc tính di truyền hoàn toàn giống cây mẹ. Chiều dài cành chiết tốt nhất khoảng 40 – 60 cm, có hai nhánh, đường kính gốc nhánh từ 0,1 – 1,5 cm. Cành nhỏ thường có khả năng ra rễ tốt hơn, sinh trưởng mạnh.

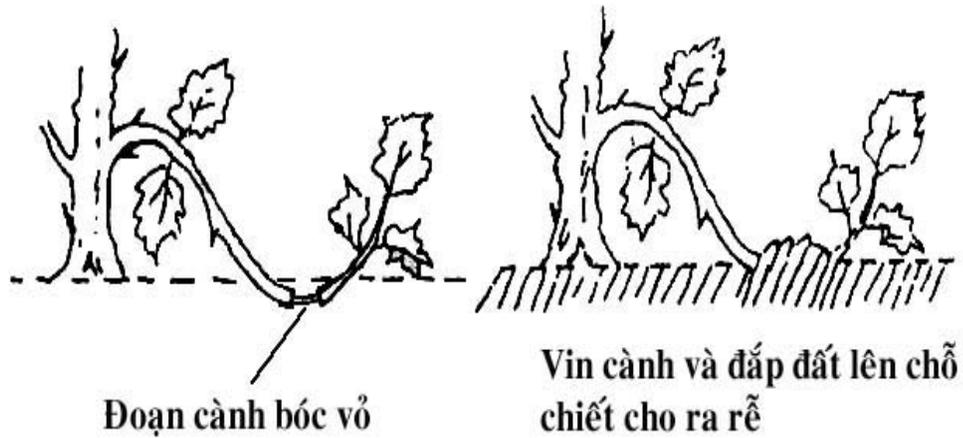
Có hai phương pháp chiết cành:

- Phương pháp 1 (hình II.5 – A)

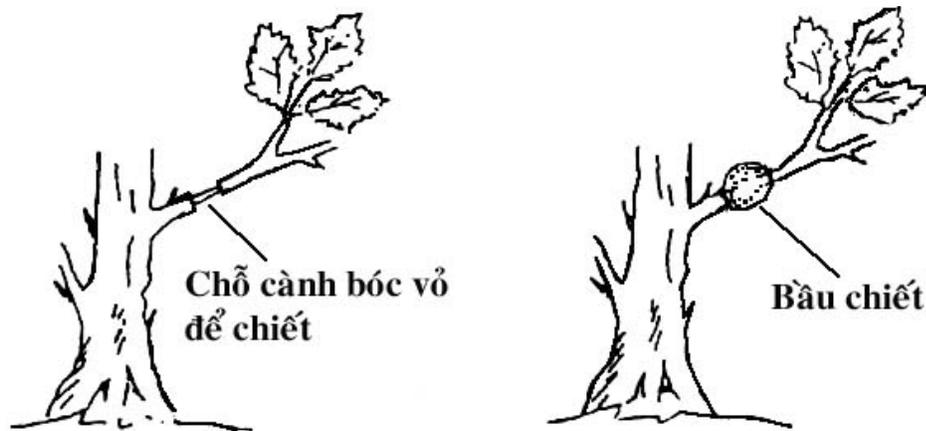
Thường dùng cho những cây bụi nhỏ, cành nằm gần mặt đất hoặc những cây thân bò, dây leo. Chọn một cành dài gần sát gốc, lấy đoạn cuối cành có chiều dài khoảng 40 cm, cắt 1 khoanh vỏ dài chừng 2 cm. Bóc vỏ và cạo sạch hết lớp vỏ. Đối với các loại dây leo và cây có rễ bất định thì không bóc vỏ. Uốn cong cành xuống sao cho nơi bị bóc vỏ tiếp sát xuống mặt đất, đắp đất phủ lên trên, rồi dùng que tre cắm xuống đất gài chặt cành chiết lại.

- Phương pháp 2 (hình II.6 – B)

Chọn cây có cành khỏe mạnh, dạng bánh tẻ, đường kính cành khoảng 0,7 cm, chiều dài của cành chiết khoảng 40 cm. Cắt khoanh vỏ, nạo vỏ và cạo sạch. Dùng rễ lục bình, bụi sơ dừa hoặc rơm mục... bó quanh đoạn cắt. Dùng túi nilon bó chặt bên ngoài, dùng dây nilon quấn chặt hai đầu hoặc có thể để hở đầu trên.



A. Chiết cành bằng cách vin cành và đắp đất



B. Ghép bầu đất

Hình II.5 - Kỹ thuật chiết cành

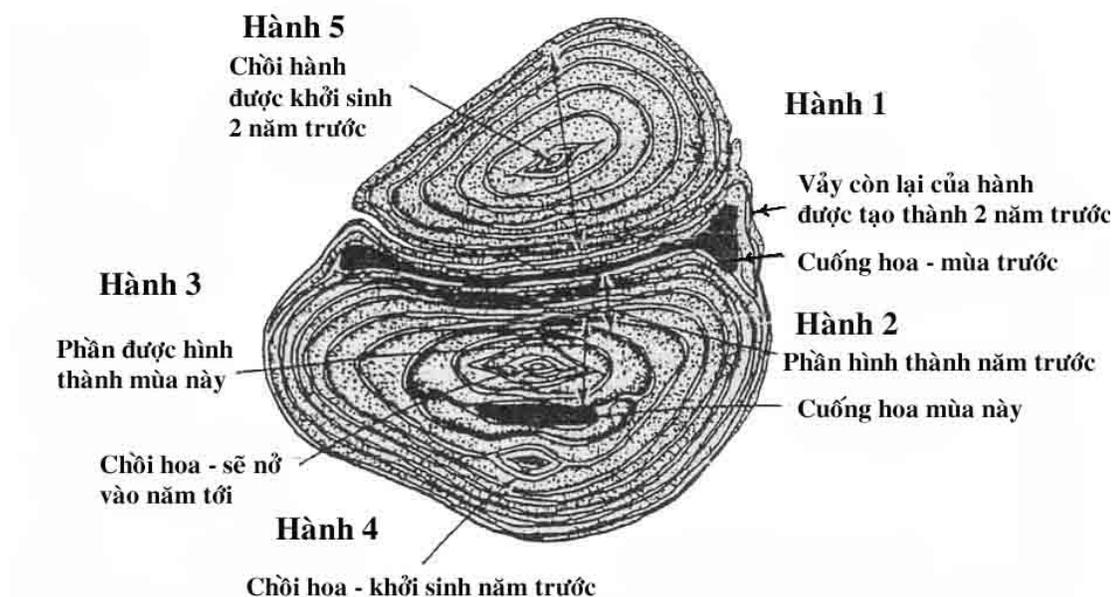
2.3 - Nhân giống vô tính từ các thân hay rễ đặc biệt

Các cấu trúc thực vật như hành, thân hành, thân củ, rễ củ, củ hành... đều là những cấu trúc dinh dưỡng đặc biệt làm nhiệm vụ dự trữ thức ăn để giúp cho thực vật có thể tồn tại khi gặp điều kiện không thuận lợi. Các loài thực vật tạo ra các bộ phận đặc biệt này thường là các cây thân thảo lâu năm mà thân sẽ chết đi vào cuối mùa. Thực vật sẽ sống sót trong đất như một cơ quan ở trạng thái ngủ. Cơ quan này sẽ mang sẵn các chồi và sẽ tạo ra thân mới vào mùa sang năm. Hai chu kỳ khí hậu chính tham gia trong hiện tượng này: chu kỳ nóng lạnh của vùng ôn đới và chu kỳ khô ẩm của khí hậu nhiệt đới và cận nhiệt đới.

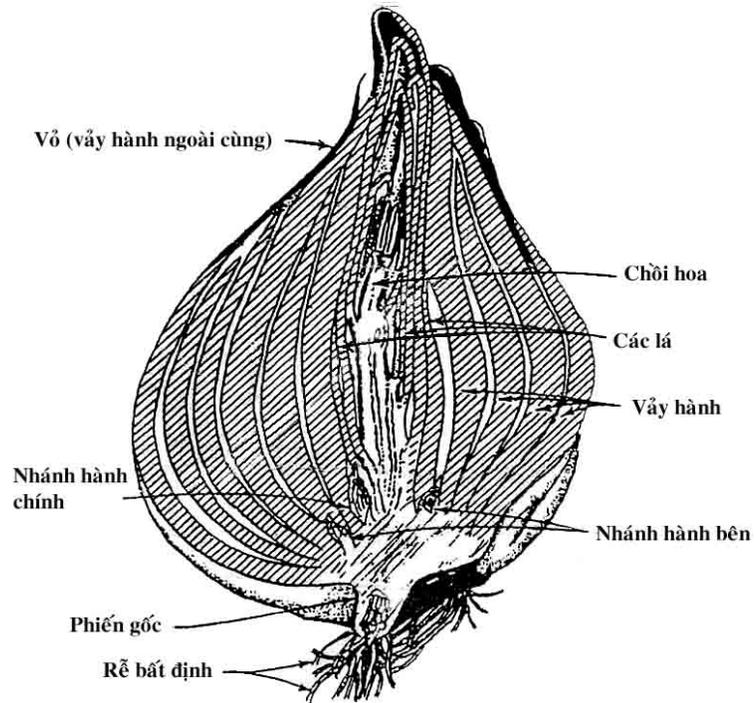
2. 3.1 - Nhân giống từ hành

Nhân giống từ hành (bulb) (như đối với lily, thủy tiên, tulip) sử dụng cơ quan đặc biệt nằm dưới đất của thân. Hành là một thân ngắn, có thịt, thường theo trục thẳng đứng, mang ở chồi ngọn một điểm tăng trưởng hay một chồi hoa. Các hành thường của các loài cây một lá mầm mà thân bình thường đã được biến đổi thành nơi dự trữ hay cơ quan sinh sản. Hành được cấu tạo bởi các lớp vảy trông như các lớp lá. Các lớp bên ngoài có nhiều thịt và chứa các chất dinh dưỡng hay chồi hoa chưa phát triển.

Sự hình thành hành khởi đầu bằng mô phân sinh và trải qua hai giai đoạn: sinh dưỡng và sinh sản. Trong giai đoạn sinh dưỡng, các hành nhỏ phát triển đến kích thước ra hoa và đạt trọng lượng tối đa. Trong giai đoạn tiếp theo bao gồm sự cảm ứng và khởi đầu ra hoa, sự biệt hóa các phần của hoa, sự kéo dài cành hoa và cuối cùng là sự tạo phấn hoa. Đôi khi có sự hình thành hạt. Mỗi loài hành cần điều kiện môi trường riêng biệt cho mỗi giai đoạn trong vòng đời của mỗi loài, nêu lên những đặc trưng về mùa, sự thích ứng với môi trường và các phương pháp xử lý.

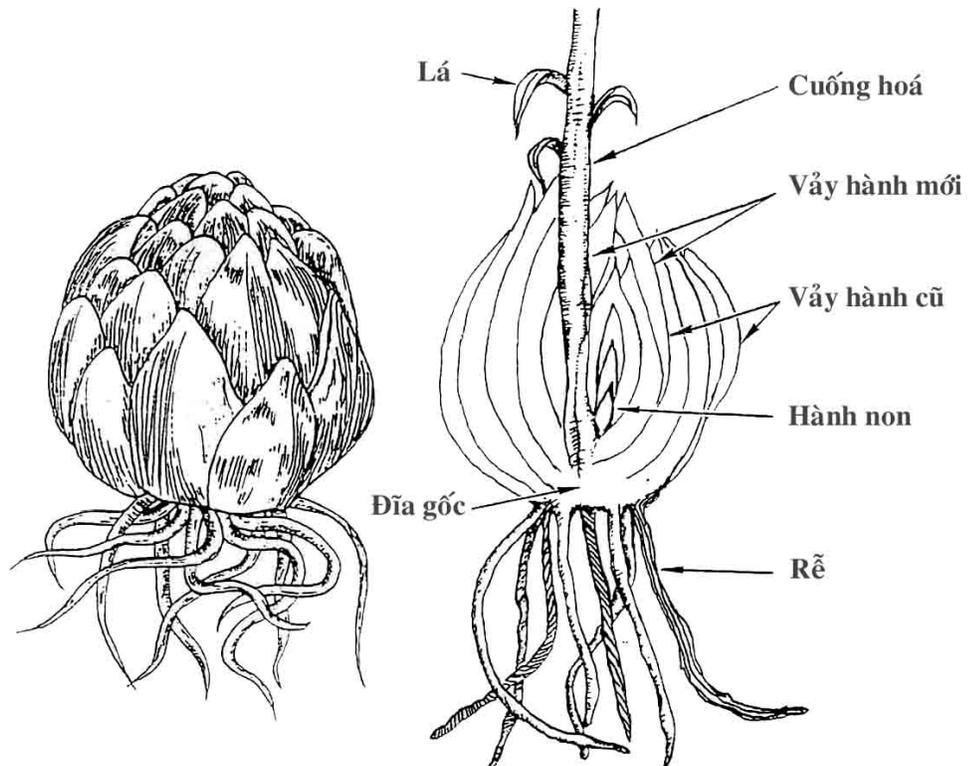


A . Cắt ngang hành



B. Cắt dọc hành

Hình II.6 - Cấu trúc của hành Tulip



Hình II.7 - Cấu trúc của hành hoa Ly Ly

- Hành cho hoa vào mùa xuân như loài tulip (hình II.6), thủy tiên hình thành hành nhỏ từ phiến trong trục của hành chính. Vì kích thước và chất lượng hoa tùy vào kích thước của hành nên hành phải đạt được một kích thước tối thiểu để hình thành chồi nguyên thủy của hoa. Nhiệt độ có thể kéo dài giai đoạn sinh sản bắt đầu. Quang kỳ gần như không có ảnh hưởng đến sự tạo hành ở đa số các loài. Khi bắt đầu giai đoạn tạo chồi và nở hoa, người ta nhận thấy các hiện tượng khô lá, các hành trưởng thành và không gia tăng kích thước cũng như trọng lượng. Trong 3-4 tháng này, hành thường được đào lên và đem cất giữ. Nhiệt độ tối ưu cho hành nở hoa tùy thuộc từng loại cây trồng. Nhiệt độ quá cao (30-32°C) hoặc gần 0°C đều ngăn cản sự ra hoa.

- Hành cho hoa vào đầu mùa hè như lily (hình II.8) thường tạo hành con bên trong hành mẹ, khởi đầu từ mùa thu hoặc mùa đông năm trước. Trong suốt mùa xuân hành con hình thành những vảy mới và phác thể lá sơ khởi tại đỉnh ngọn. Sau khi hành mẹ ra hoa, hành con gia tăng kích thước và trọng lượng. Hành sẽ được đào lên để đem trồng sau khi trưởng thành vào mùa thu. Hành phải được vận chuyển cẩn thận tránh bị thương và mất nước, vì vậy ẩm độ của môi trường bảo quản hành hết sức quan trọng.

- Hành cho hoa vào mùa đông như hoa loa kèn (amaryllis) bắt đầu giai đoạn sinh dưỡng vào cuối đông kéo dài đến hết mùa hè năm sau. Hành mới trưởng thành vào mùa thu và bắt đầu giai đoạn miên trạng từ 2÷3 tháng. Trong thời gian này hành phải được bảo quản khô. Khi được tưới nước, hành sẽ ra hoa vào giữa mùa đông.

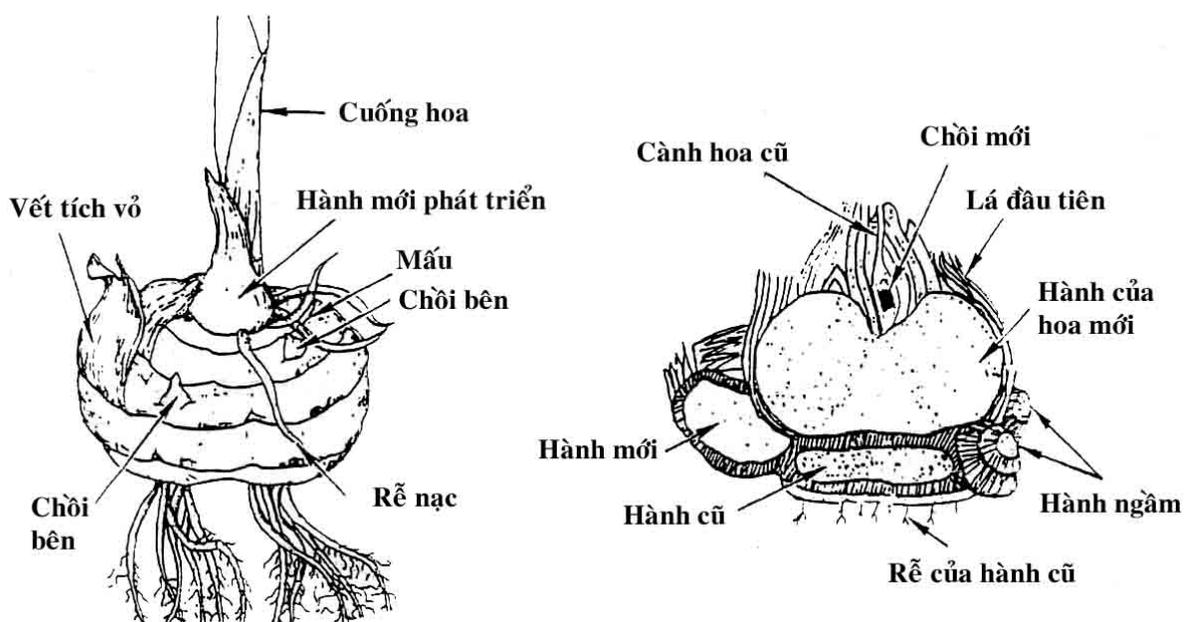
Sự tạo hành chồi (offset) là biện pháp nhân giống của nhiều loại hành. Các hành chồi có thể gắn với hành mẹ trong nhiều năm hoặc tách rời khỏi hành mẹ và đem trồng lại trên luống cho đến khi chúng đạt kích thước ra hoa. Để đạt được điều này người ta có khi cần một thời gian dài tùy theo loài.

2.3.2 - Nhân giống từ thân hành

Thân hành (corm) là phần đế của trục thân phồng lên mang một số lá khô dạng vảy. Thân hành có cấu trúc đặc chắc, có lông và đốt rõ rệt. Củ thân hành là một khối mô dự trữ cấu tạo bởi các tế bào nhu mô. Đỉnh của thân hành là một thân có mang lá và chồi hoa. Các chồi bên được hình thành ở mỗi đốt. Hai loại rễ được hình thành từ thân hành: loại rễ có nhiều lông hút được tạo ra từ gốc của thân hành mẹ và một loại rễ mập được tạo ra từ thân hành mới.

- Thân hành hoa lay ơn (hình II.8) mềm hoặc hơi cứng và được bảo quản suốt mùa đông và trồng lại vào mùa xuân. Khi đem trồng thân hành là một cơ quan sinh dưỡng, rễ mới được hình thành từ đáy thân. Một số chồi bắt đầu có lá. Phác hoa sẽ bắt đầu vài tuần sau khi thân bắt đầu mọc, đồng thời thân hành mới chuẩn bị cho năm sau bắt đầu được thành lập. Ở huệ tây có sự cạnh tranh giữa sự phát triển hoa và thân hành về các chất đồng hóa. Sự phát triển này được điều chỉnh bởi quang kỳ.

- Sự nhân giống các thực vật thân hành chủ yếu là sự gia tăng tự nhiên của các thân hành mới. Cũng giống như ở củ hành, sự sản xuất hoa từ thân hành tùy thuộc vào thực phẩm dự trữ trong thân hành từ mùa trước. Đối với huệ tây, đêm mát và thời gian tăng trưởng dài là các điều kiện thuận lợi cho sự tạo các thân hành rất lớn. Phân bón và các biện pháp kỹ thuật khác trong suốt thời kỳ ra hoa sẽ ảnh hưởng đến mùa ra hoa năm sau. Thân hành được phân loại dựa trên kích thước, sâu bệnh. Người ta còn có thể nhân giống các thân hành bằng cách cắt thân hành lớn ra nhiều mảnh nhỏ, mỗi mảnh có chứa một chồi. Mỗi chồi này có thể phát triển thành một thân hành mới.



Hình II.8 - Cấu trúc của thân hành hoa lay ơn

2.3.2 - Nhân giống từ thân củ

Thân củ (tuber) là loại cơ quan đặc biệt do thân phồng lên và nằm ngầm dưới đất với chức năng dự trữ. Trên củ có nhiều “mắt”, tương trưng cho các đốt thân. Mỗi mắt mang một hoặc nhiều chồi nhỏ, đối diện với một vết sẹo lá. Các đốt này sắp xếp theo hình xoắn ốc đi từ đỉnh nằm ở một cực đối diện với nơi gắn vào thân. Củ khoai tây (hình II.9) cấu tạo bởi nhiều loại tế bào nhu mô lớn có chứa một lượng lớn tinh bột. Cấu trúc bên trong của củ cũng giống như các loại thân khác gồm có phần lõi, bó mạch và vỏ.

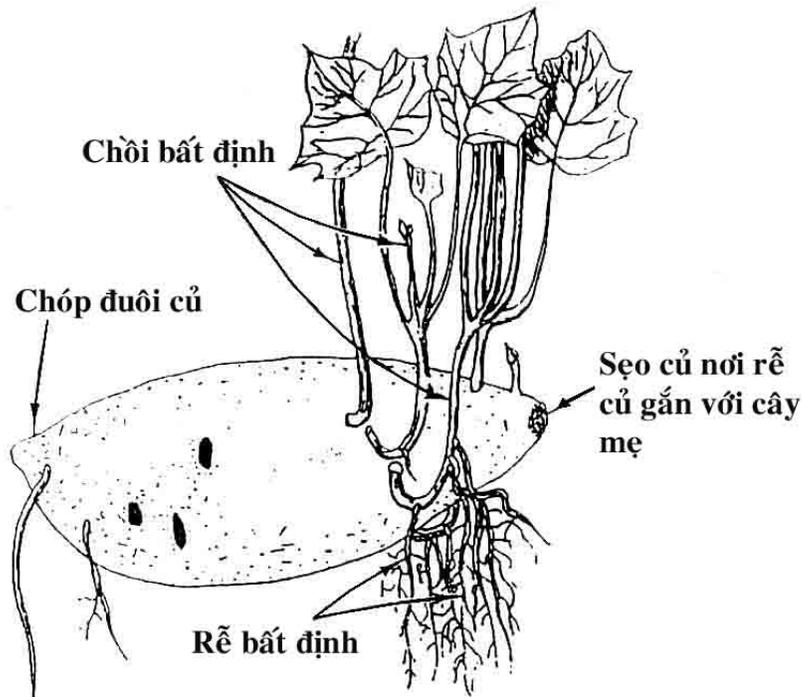
- Củ là cơ quan dự trữ được hình thành trong một mùa, duy trì trạng thái ngủ qua mùa đông và thực hiện nhiệm vụ tái sinh chồi mới trong mùa xuân sang năm. Các chồi mới sẽ sử dụng thực phẩm dự trữ nằm trong củ cũ.

- Sự tạo củ bắt đầu bằng sự ức chế sự tăng trưởng của ngọn các thân bò và sự phình to của tế bào. Sự tạo củ là do bởi một chất tạo củ liên kết với một protein điều chỉnh sự tạo củ được thành lập từ lá và củ mẹ.

- Sự nhân giống ở cây thân củ bằng nhiều cách:

+ Cắt củ ra nhiều mảnh nhỏ có chứa một hoặc nhiều mắt. Cách này được gọi là nhân giống từ “hạt”.

+ Trồng cả củ.



Hình II.9 - Cấu trúc thân củ khoai tây

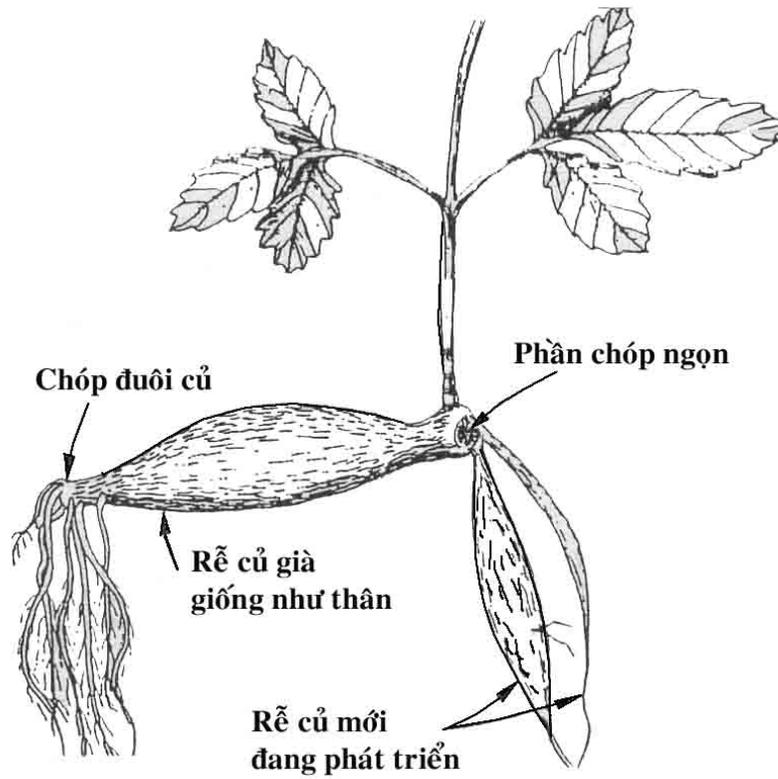
2.3.3 - Nhân giống từ rễ củ

Rễ củ (tuberous root) là sự phồng to lên của các rễ thứ cấp mang nhiều chồi và rễ bất định như trường hợp khoai lang, khoai mì, thu hải đường, thực dục. Thực vật cho rễ củ là cây lưỡng niên. Củ được tạo ra trong một mùa, sau đó rơi vào trạng thái ngủ khi thân cây chết đi. Nhờ chức năng dự trữ mà cây có thể kéo dài trạng thái ngủ.

Thực vật tạo rễ củ nhân giống bằng cách cắt củ nơi có chứa chồi ra làm nhiều mảnh. Người ta còn có thể nhân giống bằng cách cắt đoạn thân hay cắt dây (khoai lang).



Hình II.10 - Cấu trúc rễ củ Thu Hải Đường



Hình II.11 - Cấu trúc rễ củ Thuộc Dược

2.3.4 - Nhân giống từ căn hành (tre, mía)

Căn hành (rhizome) là loại thân đặc biệt mà thân chính của chúng mọc nằm ngang ngay dưới mặt đất. Đây là trường hợp của nhiều cây kinh tế quan trọng như tre, mía, chuối. Thân nằm dưới mặt đất gồm đốt và lóng. Ở mỗi đốt có mang một phiến lá ôm lấy thân. Các căn hành có thể phát triển mọc thẳng lên khỏi mặt đất hay mọc lan rộng dưới mặt đất.

Các loài thực vật tạo căn hành có thể nhân giống bằng cách tách các đoạn nối tiếp nhau và đem trồng riêng lẻ, hoặc tách riêng chồi vừa mới bật lên hoặc huỷ đỉnh sinh trưởng để gia tăng hệ số nhân chồi (thiên điều).

2.3.5 - Nhân giống từ giả hành (lan)

Giả hành (pseudobuib) là cơ quan dự trữ đặc biệt thường thấy ở các loài phong lan. Đây là phần thân phồng lên do một hoặc nhiều đốt tạo thành.

Việc nhân giống bằng cách tách thân mới phát triển từ các đốt này. Việc tách thường được thực hiện trong thời gian ngủ của cây hoặc khi bắt đầu giai đoạn sinh trưởng mới.

2.4 - Hệ số nhân giống

Trong nhân giống cây trồng, người ta quan tâm nhất đến hệ số nhân giống. Hệ số nhân giống biểu thị số lượng cây giống được tạo nên từ một cây ban đầu trong một thời gian nhất định, có thể là một tháng, một mùa vụ, một năm hay nhiều năm. Thông thường, để tính hệ số nhân giống, người ta thường tính theo thời gian một năm.

Ví dụ:

- Một cây giống ban đầu, sau một tháng từ cây này bằng các phương pháp nhân giống cho ra 4 cây giống mới. Như vậy hệ số nhân giống của cây ban đầu này trong một năm được tính như sau:

$$\text{Hệ số nhân giống} = 4^{12}$$

- Sau ba tháng từ một cây giống ban đầu, bằng các phương pháp nhân giống cho ra 5 cây mới. Như vậy, hệ số nhân giống của cây này trong một năm được tính như sau:

$$\text{Hệ số nhân giống} = 5^4$$

Tóm tắt

Trong nông nghiệp lâm nghiệp, để nhân giống thực vật, các phương pháp truyền thống thường được sử dụng là:

- Nhân giống hữu tính bằng hạt.
- Nhân giống vô tính bằng các dạng thân hay rễ đặc biệt.

Việc nhân giống bằng hạt phụ thuộc rất nhiều vào các điều kiện giúp cho hạt có thể nảy mầm:

- Phôi hạt phải còn sống.
- Hạt phải được đặt trong môi trường có các điều kiện phù hợp cho sự nảy mầm của hạt: nước, nhiệt độ, độ ẩm, ánh sáng.
- Hạt phải vượt qua được các yếu tố gây sự ngủ của hạt.

Bên cạnh phương pháp nhân giống hữu tính bằng hạt, đối với một số loài thực vật có thể thực hiện nhân giống bằng phương pháp vô tính:

- Nhân giống bằng cắt đốt thân, đoạn rễ, mảnh lá.
- Nhân giống vô tính bằng các loại thân hay rễ đặc biệt.

Câu hỏi ôn tập

1. Các điều kiện giúp cho hạt giống có thể nảy mầm? Các giai đoạn nảy mầm của hạt? Các yếu tố ảnh hưởng đến sự nảy mầm của hạt?
2. Đặc điểm của phương pháp nhân giống hữu tính bằng cắt đốt thân, đoạn rễ, mảnh lá?
3. Các kiểu nhân giống bằng thân hay rễ đặc biệt?
4. Từ một cây giống ban đầu, sau 3 tuần bằng các phương pháp nhân giống cho ra 6 cây mới. Tính hệ số nhân giống của cây ban đầu này trong thời gian một năm?

CHƯƠNG III

KỸ THUẬT PHÒNG THÍ NGHIỆM NUÔI CẤY MÔ THỰC VẬT

Hiện nay, hầu hết các cơ sở nghiên cứu sinh lý hoặc di truyền thực vật ở các nước đều tổ chức các phòng thí nghiệm. Các phòng thí nghiệm này từ đơn giản đến phức tạp hay rất hiện đại, do đó, việc mô tả một phòng thí nghiệm nuôi cấy mô chỉ có ý nghĩa tương đối. Điều quan trọng hơn cả là cần nắm vững các nguyên tắc, tùy theo điều kiện cụ thể của cơ sở mà tổ chức làm việc để đảm bảo các nguyên tắc đó.

Có ba nhân tố đảm bảo thành công trong nuôi cấy mô thực vật là:

- Bảo đảm điều kiện vô trùng.
- Chọn đúng môi trường và chuẩn bị môi trường đúng cách.
- Chọn và xử lý mô cấy thích hợp trước và sau khi cấy.

1 - BẢO ĐẢM ĐIỀU KIỆN VÔ TRÙNG

1.1 - Ý nghĩa của vô trùng

Môi trường để nuôi cấy thực vật có chứa đường, muối khoáng, vitamin. Đó cũng là môi trường thích hợp cho các loại nấm và vi khuẩn phát triển. Do tốc độ phân bào của nấm, vi khuẩn lớn hơn rất nhiều so với tế bào thực vật, nếu trong môi trường nuôi cấy chỉ nhiễm bào tử nấm hoặc vài vi khuẩn, thì sau vài ngày đến một tuần, toàn bộ bề mặt môi trường và mô cấy sẽ phủ đầy một hoặc nhiều loại nấm, vi khuẩn. Thí nghiệm phải bỏ đi vì trong điều kiện này mô cấy không thể tiếp tục phát triển và chết dần.

Thông thường một chu kỳ nuôi cấy mô thực vật dài từ 1 đến 5 tháng, khác với thí nghiệm vi sinh vật, có thể kết thúc trong vài ngày. Nói cách khác, mức độ vô trùng trong thí nghiệm nuôi cấy mô thực vật đòi hỏi rất nghiêm khắc. Điều này đặc biệt quan trọng khi nuôi cấy tế bào đơn thực vật trong các bình lên men, điều kiện vô trùng phải rất cao mới có hy vọng thành công được.



Hình III.1 Thao tác gieo cấy mô thực vật

Do đó, hầu hết các thao tác kỹ thuật tiến hành trong nuôi cấy mô thực vật thường phải thực hiện các các hệ thống tủ cấy vô trùng. Hệ thống các tủ cấy vô trùng này được trang bị thiết bị lọc khí vô trùng để đảm bảo một không gian làm việc an toàn không tạp nhiễm vi sinh vật.



Hình III.2. Tủ cấy vô trùng

1.2 - Nguồn tạp nhiễm

Ba nguồn tạp nhiễm chính là:

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

1.3 - Vô trùng mô cấy

Nguyên tắc và phương pháp vô trùng nơi làm việc, dụng cụ thí nghiệm, môi trường nuôi cấy chúng ta có thể tìm hiểu trong các giáo trình thực tập Vi sinh vật. Ở đây, chỉ đề cập đến việc vô trùng mẫu cấy.

Mô cấy có thể là hầu hết các bộ phận khác nhau của thực vật như hạt giống, phôi, noãn, đế hoa, lá, đầu rễ, thân củ... tùy theo sự tiếp xúc với môi trường bên ngoài, các bộ phận này chứa nhiều hay ít vi khuẩn và nấm. Đòng lúa non khi còn trong bẹ, mô thịt trong quả... thường ít bị nhiễm vi sinh vật, ngược lại, lá, thân, đặc biệt trong các bộ phận nằm trong đất như rễ, củ có lượng nấm khuẩn nằm sâu ở các tế bào bên trong mô chứ không hạn chế ở bề mặt. Lá khoai lang có thể vô trùng dễ dàng trong mùa khô nhưng không thể làm được trong mùa mưa.

Phương pháp vô trùng mô cấy thông dụng nhất hiện nay là dùng các chất hóa học có hoạt tính diệt nấm khuẩn. Hiệu lực diệt nấm khuẩn của các chất này phụ thuộc vào thời gian xử lý, nồng độ và khả năng xâm nhập của chúng vào các kẽ ngách lồi lõm trên bề mặt mô cấy, khả năng đẩy hết các bọt khí bám trên bề mặt mô cấy. Để tăng tính linh động và khả năng xâm nhập của chất diệt khuẩn, thông thường người ta xử lý mô cấy trong vòng 30 giây trong rượu ethanol 70%, sau đó mới xử lý dung dịch diệt khuẩn. Đồng thời người ta thêm các chất giảm sức căng bề mặt như tween 80, fotoflo, teepol vào dung dịch diệt nấm khuẩn.

Để có khái niệm về nồng độ và thời gian sử dụng các chất diệt nấm khuẩn để xử lý mô cấy, xin dẫn tài liệu nghiên cứu của Street (1974) ở bảng sau:

Tác nhân vô trùng	Nồng độ (%)	Thời gian xử lý (phút)	Hiệu quả
Canxi hypoclorid	9 ÷ 10	5 ÷ 30	Rất tốt
Natri hypoclorid	2	5 ÷ 30	Rất tốt
Hydro peroxid	10 ÷ 12	5 ÷ 15	Tốt
Nước Brom	1 ÷ 2	2 ÷ 10	Rất tốt
HgCl ₂	0,1 ÷ 1	2 ÷ 10	Trung bình
Chất kháng sinh	4 ÷ 50	30 ÷ 60	Khá tốt

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.

Trong thời gian xử lý, mô cấy phải ngập hoàn toàn trong dung dịch diệt khuẩn. Đối với các bộ phận có nhiều bụi cát, trước khi xử lý nên rửa kỹ bằng xà phòng bột và rửa sạch lại bằng nước máy. Khi xử lý xong, mô cấy được rửa nhiều lần bằng nước cất vô trùng (tối thiểu là 3 lần). Những phần trên mô cấy bị tác nhân vô trùng làm cho trắng ra cần phải cắt bỏ trước khi đặt mô cấy lên môi trường. Để tránh ảnh hưởng trực tiếp của các tác nhân vô trùng lên mô cấy, 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.

Vô trùng mẫu là một thao tác khó, ít khi thành công ngay lần đầu tiên. Tuy vậy, nếu kiên trì tìm nồng độ và thời gian vô trùng thích hợp thì sau vài lần thử chắc chắn sẽ đạt kết quả.

Quy trình cơ bản để vô trùng một số mẫu nuôi cấy có thể trình bày như sau:

1.3.1 - Vô trùng hạt

- Rửa hạt bằng xà phòng, lắc đều 2÷3 phút. Với hạt nhỏ thường đựng hạt trong túi nylon hay túi vải.

- Rửa sạch xà phòng.

- Vô trùng sơ bộ bằng cồn 70%, lắc đều trong 2 phút.

- Rửa sạch lại bằng nước cất vô trùng.

- Cho hạt vào dung dịch khử trùng chlorox (20÷40%), Na-hypochlorite (1÷15%). Thêm vào vài giọt bả dính tween 80. Khử trùng trong 15÷20 phút tùy mẫu.

- Rửa sạch lại bằng nước cất vô trùng 4÷5 lần.

- Hạt vô trùng đã có thể nuôi cấy trên môi trường tạo mẫu vô trùng.

- Môi trường nuôi cấy có agar hay trên cầu giấy.

1.3.2 - Các phương pháp khác vô trùng hạt

- Khử trùng lần thứ nhất với Na-hypochlorite (5,25%).

- Khử trùng lần thứ nhì với HgCl_2 (0,1÷1%), thêm vài giọt HCl (0,5%), trong 10 phút.

- Rửa mẫu với H_2O_2 (6%) vô trùng trước khi rửa lại bằng nước cất vô trùng.

- Có thể khử trùng sơ bộ hạt bằng acid sulfuric trong 2÷10 phút.

- Khí clorin có thể dùng để khử trùng hạt, củ, hành và mẫu cây thân gỗ.

- Với hạt có vỏ cứng thường làm cho nứt hạt trước khi khử trùng.

- Có những hạt nảy mầm khó, thường cho nảy mầm trước khi lấy mẫu nuôi cấy. Thường đặt trong phòng tối có nhiệt độ 4°C.

1.3.3 - Vô trùng chồi non, lá và thân cỏ

- Vô trùng sơ bộ bằng cách ngâm mẫu vào cồn 70%, trong 1-3 phút, thời gian xử lý có thể ngắn hơn do lá dễ mất cảm với cồn.

- Vô trùng mẫu với chất khử trùng (20%) hay Na-hypochlorite (1%), trong 5 phút.

- Rửa lại bằng nước cất vô trùng 3 lần.

1.3.4 - Vô trùng củ, rễ và hành

- Mẫu nuôi cấy được rửa bằng xà phòng và nước.

- Vô trùng sơ bộ bằng cồn 70% trong 1-3 phút.

- Vô trùng với chất khử trùng (20%) hay Na-hypochlorite (1%) trong 20 phút.

- Rửa lại bằng nước cất vô trùng 3 lần.

2 - MÔI TRƯỜNG VÀ PHƯƠNG PHÁP PHA CHẾ MÔI TRƯỜNG NUÔI CẤY MÔ TẾ BÀO THỰC VẬT

2.1 - Các thành phần môi trường

Mức độ thành công của các kỹ thuật nuôi cấy mô tế bào thực vật liên quan đến một số nhân tố. Một nhân tố quan trọng nhất là chọn lọc thành phần dinh dưỡng và các chất hormon. Trong 20 ÷ 30 năm qua, có nhiều báo cáo bổ sung lẫn nhau cho thấy có khoảng 24 môi trường được sử dụng trong nuôi cấy mô tế bào thực vật.

Thành phần môi trường nuôi cấy mô thực vật thay đổi tùy theo loài và bộ phận nuôi cấy. Đối với cùng một mô cấy là lá khoai tây, môi trường để nuôi tạo mô sẹo, môi trường nuôi cấy tế bào đơn và môi trường nuôi protoplast có những khác nhau khá cơ bản. Môi trường còn thay đổi theo sự phát triển phân hoá của mô cấy, tùy theo ta muốn duy trì mô ở trạng thái mô sẹo, muốn tạo rễ, tạo mầm hay muốn tái sinh cây hoàn chỉnh, môi trường nuôi cấy phải thay đổi nhiều hay ít. Tuy vậy, tất cả các môi trường nuôi cấy bao giờ cũng bao gồm 5 thành phần:

- Đường làm nguồn carbon
- Các muối khoáng đa lượng
- Các muối khoáng vi lượng
- Các vitamin
- Các chất sinh trưởng

Ngoài ra các tác giả còn thêm một số chất hữu cơ có thành phần hoá học xác định (acid amin, EDTA...) hoặc không xác định (nước dừa, cao nấm men...) vào môi trường tùy vào những mục tiêu nghiên cứu.

2.1.1 - Đường

Trong nuôi cấy nhân tạo, nguồn carbon để mô, tế bào thực vật tổng hợp nên các chất hữu cơ giúp cho tế bào phân chia, tăng sinh khối của mô không phải do quá trình quang hợp cung cấp mà do đường trong môi trường. Hai dạng đường thường sử dụng nhất là sucrose và glucose nhưng hiện nay sucrose được dùng phổ biến hơn. Tùy theo mục đích nuôi cấy, nồng độ sucrose trong môi trường biến đổi từ 1 ÷ 6% thông dụng nhất là 2% tương ứng với 58,4 mM (1 mM = 1 milimol/l).

Một số tác giả đã thành công trong việc nuôi cấy các tế bào đơn chứa diệp lục có khả năng quang hợp. Nhờ vậy, nồng độ đường trong môi trường có thể giảm xuống rất thấp hoặc loại bỏ hẳn. Nuôi cấy các tế bào thực vật tự dưỡng là một hướng quan trọng trong nuôi cấy tế bào đơn.

2.1.2 - Các muối khoáng đa lượng

Nhu cầu muối khoáng của mô tế bào thực vật tách rời không khác nhiều so với cây trồng trong điều kiện tự nhiên. Các nguyên tố đa lượng cần phải cung cấp là nitrogen, phospho, kali, calci, magne, sắt.

- Nguồn nitrogen

Mô tế bào thực vật trong nuôi cấy có thể sử dụng nitrogen khoáng như ammonium và nitrat, đồng thời có thể sử dụng các dạng nitrogen hữu cơ như acid amin. Tỷ lệ nitrogen dạng ammonium và nitrat thích hợp tùy theo loài cây và trạng thái phát triển của mô.

Nitrat được cung cấp dưới dạng muối nitrat $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, KNO_3 , NaNO_3 hoặc NH_4NO_3 . Ammonium cung cấp dưới dạng muối $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 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 thay đổi từ 3 đến 6 mM, thông thường khoảng 20 mM.

- Nguồn phospho

Hai dạng muối phospho thường dùng nhất là $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ và KH_2PO_4 . Nồng độ phospho trong môi trường biến thiên từ 0,15 đến 4 mM, thường dùng khoảng 1 mM.

- Nguồn potasium

Người ta cung cấp kali cho mô nuôi cấy dưới dạng KNO_3 , KCl , KH_2PO_4 . Nồng độ K^+ trong môi trường biến thiên từ 2÷25 mM, trung bình khoảng 10 mM.

- Nguồn calcium

Calci được cung cấp dưới dạng muối $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ hoặc $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Nồng độ Ca^{2+} trong môi trường nuôi cấy từ 1 đến 3,5 mM, trung bình là 2 mM.

- Nguồn magnesium

Magne được cung cấp dưới dạng $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, với nồng độ trong môi trường từ 0,5 đến 3 mM.

- Nguồn ferric

Những môi trường cổ điển dùng sắt dưới dạng clorua sắt FeCl_2 , $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$, $\text{Fe}(\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6)$. Hiện nay, hầu hết các phòng thí nghiệm đều dùng sắt ở dạng chelat kết hợp với Na_2 -Ethylen diamin tetraacetat (Na_2 -EDTA). Ở dạng này sắt không bị kết tủa và giải phóng dần dần ra môi trường theo nhu cầu của mô thực vật.

2.1.3 - Các muối khoáng vi lượng

Nhu cầu muối khoáng vi lượng của mô thực vật trong nuôi cấy là lĩnh vực còn ít được nghiên cứu. Rất ít các nguyên tố vi lượng đã được chứng minh là không thể thiếu được đối với sự phát triển của mô và tế bào. Tuy vậy, vấn đề này đã được sinh lý thực vật giải quyết đối với các cây hoàn chỉnh. Để an toàn, các tác giả đã cung cấp hầu hết các nguyên tố vi lượng cần thiết đối với cây cho nuôi cấy trong

môi trường nhân tạo, vì vậy sự cung cấp này có tính chất kinh nghiệm chủ nghĩa, trong những trường hợp cụ thể có thể là không cần thiết. Trong thạch chế biến từ rau câu biển chắc chắn còn tồn dư một lượng iode đáng kể, thừa đủ để thỏa mãn nhu cầu iode của mô thực vật. Tuy vậy, nhiều tác giả vẫn đề nghị thêm iode dưới dạng KI vào môi trường. Giá trị của việc thêm muối $AlCl_3$ hoặc $NiCl_2$ cũng chưa được chứng minh. Sau đây là các vi lượng thông dụng ($1\mu M=1$ micromol/lít).

Tên vi lượng	Dạng sử dụng	Nồng độ μM
Mangan (Mn)	$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	15 ÷ 100
Bo (B)	H_3BO_3	6 ÷ 100
Kẽm (Zn)	$Zn(SO_4) \cdot 7H_2O$	15 ÷ 30
Đồng (Cu)	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,04 ÷ 0,08
Coban (Co)	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0,1 ÷ 0,4
Iode (I)	KI	2,5 ÷ 20
Molybden (Mo)	$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$	0,007 – 1

1.2.4 - Các vitamin

Các vitamin thường được pha hỗn hợp trong dung dịch mẹ có nồng độ cao gấp 500 hoặc 1000 lần dung dịch làm việc. Các dung dịch vitamin dễ hỏng do nấm khuẩn nhiễm tạp, vì vậy cần giữ trong điều kiện lạnh dưới $0^\circ C$. Nên chia sẵn dung dịch mẹ vitamin ra nhiều lọ nhỏ, mỗi lọ đủ dùng cho vài lít môi trường, và bảo quản trong ngăn đá tủ lạnh.

Tên vitamin	Nồng độ (ppm)
Myo – Inositol	100
Acid nicotinic (Vitamin B ₅ hay PP)	0,5 ÷ 1
Pyridoxin HCl (Vitamin B ₆)	0,005 ÷ 0,5
Thiamin HCl (Vitamin B ₁)	10 ÷ 50
Panthenate calci (Vitamin B ₃)	1 ÷ 5
Riboflavin (Vitamin B ₂)	1 ÷ 5
Biotin (Vitamin H hay B ₈)	0,1 ÷ 1
Acid folic (Vitamin B _c)	0,1 ÷ 1

1.2.5- Các chất sinh trưởng

Chất điều hòa sinh trưởng thực vật có 5 nhóm chất hoạt động chính: auxin, cytokinin, gibberellin, acid abscisic và ethylen. Auxin cần thiết cho kích thích phân chia tế bào, phát triển tế bào và ra rễ. Dicamba và picloram có tác động tương tự như auxin. Dicamba thường sử dụng cho nuôi cấy cây đơn tử diệp, trong khi picloram được sử dụng cho cây rau.

Những phân tử auxin thường sử dụng kết hợp với cytokinin. Hầu hết những cytokinin đều là dẫn xuất của adenine. Cytokinin cần thiết cho phát sinh chồi và tái sinh ở hầu hết các loài thực vật và đôi khi kích thích phân chia tế bào. Thidiazuron cần thiết cho nuôi cấy tái sinh cây thân gỗ (Huetteman & Preece, 1993).

Gibberellin kích thích vươn thân chồi và được bổ sung vào môi trường sau khi lá đầu tiên xuất hiện. Acid abscisic, được dùng với nồng độ thấp, có thể điều hòa sinh trưởng và phát triển, và có lẽ tác động mang tính quy luật trong giai đoạn đầu phát sinh phôi soma. Dùng ở nồng độ cao, abscisic acid ức chế sinh trưởng và ngăn cản nảy mầm. Ethylen được sản sinh ra từ tế bào nuôi cấy, nhưng quy luật tác động của ethylen hiện nay chưa được hiểu rõ. Ethylen có lẽ kích thích sinh trưởng tế bào và phát sinh hình thái trong một vài trường hợp nuôi cấy. Bạc nitrat có thể được sử dụng để ức chế quá trình sinh tổng hợp ethylen trong nuôi cấy mô.

Thường người ta pha các dung dịch mẹ chất điều hoà sinh trưởng có nồng độ cao gấp 1000 lần dung dịch làm việc. Do một số chất sinh trưởng ít tan trong nước cần phải pha như sau: cân lượng chất sinh trưởng đủ pha 100 ml dung dịch mẹ vào một ly khô. Đối với 2,4D, GA₃ pha trong cồn 50% cho đến 100 ml. Đối với NAA, IAA, IBA, 2iP, BA trước hết thêm 2-3 ml NaOH 1N và lắc cho đến khi tan hết, sau đó thêm nước đến thể tích 100ml. Dung dịch mẹ chất điều hoà sinh trưởng được bảo quản trong lọ kín (riêng IAA cần lọ màu nâu), cất giữ lạnh. 2,4D, NAA tương đối bền, có thể bảo quản như vậy trong một năm. BA, 2iP, IBA, kinetin, GA bảo quản 2-5 tháng. IAA cần pha lại hàng tháng để bảo đảm hoạt tính.

1.2.6 - Các chất hữu cơ khác

- Nước dừa

Chất có hoạt tính trong nước dừa hiện đã được chứng minh là myo-inositol (m-inositol) và một số acid amin khác. Lượng nước dừa dùng trong môi trường cấy thường khá lớn từ 15÷20% thể tích môi trường. Lấy nước dừa ở các trái dừa già, lọc trong, đựng vào các túi nhựa và bảo quản trong lạnh sâu cho đến khi dùng. Thời gian bảo quản không quá vài tháng. Tốt nhất nên sử dụng tươi.

- Dịch thủy phân casein

Dung dịch thủy phân casein – đây là các chế phẩm thường dùng trong nuôi cấy vi sinh vật, mô tế bào động vật, đã được tiêu chuẩn hoá và bán dưới dạng thương phẩm. Thành phần hoá học không xác định. Dung dịch thủy phân casein cung cấp một số amino acid. Lượng thường dùng là 1 g/lít môi trường.

2.2 - Vấn đề lựa chọn môi trường

Khi khởi sự công tác nuôi cấy mô đối với một số đối tượng nhất định, vấn đề đặt ra là chọn môi trường nào, trên cơ sở nào để phối hợp các chất dinh dưỡng. Cách thường làm là qua các tài liệu đã xuất bản, xem các tác giả nuôi cấy mô trên cùng đối tượng ấy đã dùng loại môi trường nào. Bước đầu có thể giữ nguyên môi trường của tác giả đó hoặc trên cơ sở đó mà cải tiến cho phù hợp qua một số thí nghiệm thăm dò. Trong hàng trăm môi trường do rất nhiều tác giả đề nghị cho nhiều loại cây khác nhau, có thể phân ra 3 loại môi trường:

- Môi trường nghèo chất dinh dưỡng: môi trường White, Knop.
- Môi trường có hàm lượng chất dinh dưỡng trung bình: môi trường B5, Gamborg.
- Môi trường giàu chất dinh dưỡng: môi trường MS (Murashige – Skoog).

Vì vậy khi bắt đầu nghiên cứu nuôi cấy mô một số đối tượng mới, chưa có tài liệu trước thì nên thăm dò so sánh 3 loại môi trường trên xem đối tượng nghiên cứu thích hợp với loại môi trường nào nhất.

Sau đó, cần tìm tỷ lệ $\text{NO}_3^- / \text{NH}_4^+$ thích hợp. Các tác giả phương Tây làm việc với cây trồng cạn thường không đưa NH_4^+ vào môi trường. Nhưng đối với những cây dinh dưỡng NH_4^+ mạnh như cây lúa, việc thêm vào môi trường nuôi cấy một tỷ lệ NH_4^+ thích hợp chắc chắn sẽ có lợi.

Việc sử dụng mang tính kinh nghiệm đối với một số môi trường đã cản trở khá nhiều sự tiến bộ của công tác ở một số phòng thí nghiệm nuôi cấy mô thực vật. Thuốc lá và cà rốt là 2 loại cây kinh điển của nuôi cấy mô thực vật. Môi trường nuôi cấy 2 loại cây này đã được xây dựng khá hoàn chỉnh. Tuy vậy, không thể dùng nguyên các môi trường đó để nghiên cứu các cây hòa thảo hoặc cây họ đậu mà không có sự cải tiến sửa đổi. Điều này giải thích sự tiến bộ chậm chạp của nuôi cấy mô một số cây hòa thảo so với cây hai lá mầm.

Hiện nay, môi trường MS được coi như là một môi trường thích hợp với nhiều loại cây, do giàu và cân bằng về chất dinh dưỡng.

2.3 - Phương pháp pha chế môi trường

Để thuận tiện cho việc pha các môi trường nuôi cấy (môi trường làm việc), người ta không cân hoá chất mỗi lần pha môi trường mà chuẩn bị trước dưới dạng dung dịch đậm đặc từ X10 ÷ X100, chỉ cần pha với nước cất hai lần hay nước vô khoáng khi sử dụng. Các dung dịch này gọi là dung dịch mẹ (stock). Dung dịch mẹ được bảo quản dài ngày trong tủ lạnh thường hoặc tủ lạnh sâu. Thông thường pha các dung dịch mẹ: stock đa lượng, stock vi lượng, Fe – EDTA, stock vitamin, stock chất sinh trưởng, và các stock cần thiết khác.

Hiện nay, một số hãng sản xuất hoá chất đã có bán loại môi trường chuẩn bị sẵn thành gói gồm đủ các thành phần thích hợp với một mục đích nhất định. Thí dụ:

môi trường MS để nhân giống cây cảnh. Khi dùng chỉ cần hòa một gói vào một thể tích nước cất nhất định, đun sôi là có ngay môi trường làm việc.

Nếu tổ chức tốt vấn đề chuẩn bị môi trường thì sẽ giảm một số thời gian đáng kể cho công tác nuôi cấy. Dưới đây, xin nêu chi tiết phương pháp chuẩn bị hai môi trường thông dụng là MS và White theo Kapesbauer và Collins (1972).

2.3.1 - Môi trường MS

* Pha stock khoáng đa lượng môi trường MS nồng độ đậm đặc 20 lần (x20)

Cân chính xác bằng cân phân tích các muối khoáng đa lượng. Dùng ống đong, đong khoảng 400 ml nước cất hai lần vào becher 1000 ml. Cho lần lượt các muối đa lượng vào **theo trình tự nhất định** sau:

Tên hoá chất	Nồng độ môi trường nuôi cấy (mg/lít)	Nồng độ dung dịch stock (x20) (mg/lít)
- MgSO ₄ .7H ₂ O	370	7.400
- KH ₂ PO ₄	170	3.400
- KNO ₃	1.900	38.000
- NH ₄ NO ₃	1.650	33.000
- CaCl ₂ .2H ₂ O	440	8.800

Mỗi lần cho một loại khoáng vào phải khuấy tan hoàn toàn và bổ sung thêm 100 ml nước cất hai lần trước khi bổ sung các khoáng khác vào (phương pháp pha thể tích tăng dần). Do CaCl₂.2H₂O có thể phản ứng tạo kết tủa với MgSO₄.7H₂O nên hai chất này phải pha tách rời nhau theo đúng trình tự ở trên, cho CaCl₂.2H₂O vào sau cùng.

Cho tất cả vào bình định, dùng nước cất hai lần chuẩn lại cho đúng 1000 ml. Như vậy ta có 1000 ml dung dịch mẹ khoáng đa lượng đậm đặc 20 lần. Dung dịch này được bảo quản để dùng dần trong chai màu ở nhiệt độ 4 ÷ 10°C, dùng 50 ml cho một 1000 ml môi trường nuôi cấy.

* Pha stock khoáng vi lượng nồng độ đậm đặc 1000 lần (x1000)

Do hàm lượng một số loại khoáng vi lượng trong stock khoáng vi lượng rất nhỏ, khó có thể cân đong chính xác như một số các khoáng vi lượng khác. Vì vậy ở đây, ta phải tiến hành pha riêng dung dịch các khoáng này (CuSO₄.5H₂O, CoCl₂.6H₂O) có nồng độ đậm đặc hơn 100 lần so với dung dịch mẹ và gọi là dung dịch “bà ngoại”.

Sau khi pha xong các dung dịch “bà ngoại”, tiến hành pha 100 ml stock khoáng vi lượng X1000 tương tự như ở phần trên. Thành phần các khoáng như sau:

Tên hoá chất	Nồng độ môi trường nuôi cấy (mg/lít)	Nồng độ dung dịch stock (x1000) (mg/lít)	Nồng độ dung dịch “bà ngoại” (x100) (mg/lít)
H ₃ PO ₃	6,2	6200	
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3	22300	
ZnSO ₄ .4H ₂ O	8,6	8600	
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25	250	
KI	0,83	830	
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	25	2500
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	25	2500

*** Pha dung dịch mẹ Fe-EDTA nồng độ đậm đặc 200 lần (x200)**

Sắt là yếu tố rất cần thiết cho thực vật. Tuy nhiên, nhu cầu của thực vật đối với sắt rất nhỏ và lượng liên tục. Vì vậy, để cung cấp đủ lượng sắt cho thực vật ta thường dùng sắt dưới dạng hợp chất Fe-DETA. Hợp chất Fe-EDTA được hình thành do sự ngậm Fe của EDTA dưới tác dụng của nhiệt độ. Ở dưới dạng hợp chất này, sắt sẽ được phóng thích ra môi trường tùy theo nhu cầu của thực vật. Phương pháp pha như sau:

Tên hoá chất	Nồng độ môi trường nuôi cấy (mg/lít)	Nồng độ dung dịch stock (x200) (mg/lít)
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8	5560
Na ₂ EDTA	37,3	7460

Chuẩn bị hai becher 500 và 1000 ml. Cho vào mỗi becher 400 ml nước cất hai lần. Đun nóng hai becher trong bể ổn nhiệt khoảng 80°C. Cân chính xác 5,56 g FeSO₄.7H₂O cho vào becher 500 ml có 400 ml nước trên, khuấy tan hoàn toàn. Cân chính xác 7,46 g Na₂ EDTA cho vào becher 1000 ml trên, khuấy tan hoàn toàn.

Cho từ từ dung dịch FeSO₄.7H₂O vào dung dịch Na₂ EDTA, vừa đổ vừa khuấy đều. Cuối cùng bổ sung nước cho đủ 1000 ml. Như vậy, ta có 1000 ml dung dịch stock Fe-EDTA đậm đặc 200 lần có màu vàng nhạt, trong suốt. Dung dịch này được bảo quản để dùng dần trong chai màu ở nhiệt độ 4 ÷ 10°C, dùng 5ml cho một 1000 ml môi trường nuôi cấy.

*** Pha stock hormon**

Các hormon khác nhau sẽ tan trong các dung môi khác nhau. IAA, NAA, BA pha trong NaOH 1N (thêm 2-3 ml NaOH 1N và lắc cho đến khi tan hết, sau đó thêm nước đến thể tích cần). GA₃, 2,4-D pha trong cồn 50° cho đủ thể tích.

Để pha các chất sinh trưởng, có hai cách khác nhau:

+ Cách 1: pha theo hệ mol

Ví dụ: Pha 100 ml dung dịch stock IAA (M=176,19) có nồng độ 1 mmol (milimol) từ IAA tinh khiết.

176,19 g IAA pha trong 1000 ml nước → 1000 ml dung dịch có nồng độ 1 mol/lít. Để pha dung dịch có nồng độ 1 mmol/lít cần 0,17619 g IAA. Như vậy, muốn có 100 ml dung dịch IAA nồng độ 1 mmol/lít cần 0,017619 g IAA. (M_{NAA}: 186,2; M_{2,4-D}: 221,04; M_{BA}: 225,2)

+ Cách 2: pha theo hệ mg/lít: làm tương tự như cách pha khoáng.

Các dung dịch stock hormon sau khi pha xong được bảo quản trong các chai màu ở nhiệt độ lạnh 4-10°C.

* Pha stock vitamin môi trường MS nồng độ đậm đặc 500 lần (x500)

Dùng ống đong, đong 50 ml nước cất hai lần vào một becher 100 ml. Bổ sung các vitamin vào theo trình tự sau:

Tên hoá chất	Nồng độ môi trường nuôi cấy (mg/lít)	Nồng độ dung dịch stock (x500) (mg/lít)
Acid nicotinic	0,5	250
Thiamin HCl	0,1	50
Pyridoxin HCl	0,5	250
Myo-inositol	100	50.000
Glycine	2	1.000

Cho tất cả dung dịch vào bình định mức, dùng nước cất bổ sung cho đủ 100 ml. Như vậy, ta có 100 ml stock vitamin MS x500. Dung dịch này được bảo quản để dùng dần trong chai màu ở nhiệt độ dưới 0°C, dùng 2ml cho một 1000 ml môi trường nuôi cấy.

* Pha môi trường làm việc (môi trường nuôi cấy)

Pha 1 lít môi trường MS cơ bản:

- Dùng ống đong, đong 500 ml nước cất hai lần vào becher.
- Bổ sung 30 g đường sucrose vào, khuấy tan hoàn toàn
- Bổ sung 50 ml dung dịch stock đa lượng x20, khuấy đều.
- Bổ sung 1 ml dung dịch stock vi lượng x1000, khuấy đều.
- Bổ sung 5 ml dung dịch stock Fe-EDTA x200, khuấy đều.
- Bổ sung 2 ml dung dịch stock vitamin x500.

- Bổ sung stock hormon với lượng tùy mục đích nuôi cấy.
- Chuyển tất cả dung dịch vào bình định mức, dùng nước cất chuẩn lại cho đủ 1000 ml
- Chỉnh pH của dung dịch bằng NaOH 1N hay HCl 1N về pH=5,8.
- Bổ sung 6-8 g agar.
- Đun sôi cho tan agar, khuấy đều. Chia hỗn hợp môi trường vào các bình nuôi cấy, cần chia xong trước khi dung dịch môi trường MS nguội xuống 50°C. Hấp khử trùng (đối với các thành phần bị biến tính ở nhiệt độ cao sẽ được lọc vô trùng và bổ sung vào môi trường sau khi hấp). Môi trường sau khi hấp được bảo quản ở 25°C.

2.3.1 - Môi trường White

Dung dịch mẹ	Hoá chất	Nồng độ (g/lít)	Số ml dung dịch mẹ/1000 ml dung dịch làm việc
A	Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	3,0	100
	Na ₂ SO ₄	2,0	
	KNO ₃	0,80	
	KCl	0,65	
	NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	0,19	
B	MgSO ₄ .7H ₂ O	75,00	10
C	MnSO ₄ .H ₂ O	0,50	10
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,30	
	H ₃ PO ₃	0,15	
	KI	0,075	
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,001	
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,025	
D	Fe ₂ (SO ₄) ₃	0,25	10
E	Thiamine HCl	0,01	10
	Pyridocine HCl	0,01	

Các bước pha chế môi trường làm việc giống với môi trường MS.

3 - CHỌN MÔ CẤY VÀ XỬ LÝ MÔ CẤY

Không có những hướng dẫn cụ thể trong việc chọn mô cấy. Về nguyên tắc, trừ những mô đã hoá gỗ, các mô khác trong cơ thể thực vật đều có thể dùng làm mô cấy. Tuy vậy, có thể nhận xét chung là các mô đang phát triển mạnh (mô phân sinh ngọn, mô phân sinh bên, đầu rễ, phôi đang phát triển, thịt quả non, lá non, cuống hoa, đế hoa, mô phân sinh đốt...) khi đặt vào môi trường có chứa một lượng hormon thích hợp đều có khả năng phát triển. Để bắt đầu nghiên cứu nhân giống vô tính một cây nhất định, người ta chú trọng đến các chồi bên và mô phân sinh ngọn.

Cần chú ý rằng 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 hoàn toàn khác nhau với khả năng tái sinh chồi, rễ hay toàn cây rất khác nhau. Vì vậy, khi khởi sự một cây cụ thể, trước hết cần thí nghiệm tìm hiểu phản ứng các bộ phận khác nhau trong nuôi cấy ở các nồng độ chất sinh trưởng khác nhau. Thí dụ đối với cây mía, theo kết quả công bố của nhóm HSPA (Hawaiian Sugar Planter's Association), lá non còn đang bọc trong bẹ và đòng hoa non là mô cấy thích hợp hơn cả cho việc tạo mô sẹo và tái sinh cây hoàn chỉnh.

Sau khi cấy, mô cấy cần được đặt trong các điều kiện nhiệt độ và ánh sáng ổn định. Tuy việc tạo mô sẹo có thể cần bóng tối hoặc ánh sáng, quá trình tái sinh và nhân giống vô tính nhất thiết cần ánh sáng. Nhiệt độ phòng để mô nên giữ ổn định bằng các máy điều hoà. Trong phòng nuôi cấy nên có các ôn kế tự ghi theo ngày hoặc tuần.

Trong nuôi cấy mô, các cơ quan của thực vật thường được sử dụng có thể liệt kê dưới đây:

Nguồn gốc mẫu cấy	Kích thước mẫu	Mẫu được tách
Đỉnh sinh trưởng (Meristem)	0,5 ÷ 1 mm	Tế bào đỉnh sinh trưởng
Chồi đỉnh (Shoot tips)	0,5 ÷ 1 cm	Chóp đỉnh có chứa một phần thân
Chồi bên (Axillary bud)	0,5 ÷ 1 cm	Chồi bên có chứa một phần thân, lá và chồi nách
Mẫu lá (Leaf partioles)	0,2 ÷ 0,3 cm	Mẫu lá được cắt nhỏ, phân nửa được cấy chìm vào môi trường
Phiến lá (Leaf blades)	0,2 ÷ 1 cm	Phiến lá non được đặt trên môi trường, mặt dưới đặt trên mặt thạch
Rễ (Roots)	0,5 ÷ 1 cm	Mẫu rễ được đặt trên mặt thạch

Dạng hành (Bulbs)	1 ÷ 2 cm	Mẫu được đặt trên mặt hay được cấy chìm phân nửa vào môi trường
Hạt nảy mầm (Seedings)	2 ÷ 3 mm	Chồi non
Hạt phấn (Anthers)	0,1 ÷ 0,5 mm	Hạt phấn trong túi phấn

Tóm tắt

Thông thường một chu kỳ nuôi cấy mô thực vật dài từ 1 đến 5 tháng, khác với thí nghiệm vi sinh vật, có thể kết thúc trong vài ngày. Nói cách khác, mức độ vô trùng trong thí nghiệm nuôi cấy mô thực vật đòi hỏi rất nghiêm khắc nếu muốn thành công. Điều này đặc biệt quan trọng khi nuôi cấy tế bào đơn thực vật trong các nồi lên men, điều kiện vô trùng phải rất cao mới có hy vọng thành công được.

Muốn việc vô trùng diễn ra thuận lợi, trước hết cán bộ phòng thí nghiệm phải có ý thức và sự hiểu biết về công tác vô trùng:

- Hiểu biết về các nguồn nhiễm trùng.
- Hiểu biết về các cách khử trùng dụng cụ, thiết bị thí nghiệm.
- Và một việc vô cùng quan trọng, chiếm 1/3 kết quả nghiên cứu đó là vô trùng mô thực vật nuôi cấy. Việc vô trùng mô thực vật thường được thực hiện với các chất hoá học có hiệu quả diệt trùng. Loại chất, nồng độ, thời gian tác động tùy thuộc vào từng cơ quan, từng loại thực vật được nuôi cấy.

Sau khi thực hiện sự vô trùng mô thực vật, một công việc quan trọng nhất, quyết định sự thành công của quá trình nuôi cấy mô thực vật đó là lựa chọn môi trường nuôi cấy. Việc lựa chọn môi trường nuôi cấy phải bao gồm các yếu tố:

- Lựa chọn các khoáng đa lượng.
- Lựa chọn các khoáng vi lượng,
- Lựa chọn các vitamin
- Lựa chọn các chất hormon tăng trưởng thực vật.

Sự phối hợp các thành phần này sẽ được môi trường nuôi cấy. Thông thường, để thuận tiện các thành phần trên thường được pha đậm đặc gấp nhiều lần (100÷1000 lần) so với môi trường nuôi cấy gọi là dung dịch mẹ (stock).

Câu hỏi ôn tập

1. Ý nghĩa của sự vô trùng? Các phương pháp vô trùng mô cấy?
2. Các chất khử trùng? Cách tác động của các chất khử trùng?
3. Nguyên tắc chung của việc pha chế môi trường nuôi cấy mô thực vật?
4. Phương pháp pha chế dung dịch mẹ khoáng đa lượng?

5. Phương pháp pha môi trường MS, White?

6. Từ BA tinh khiết, trình bày cách pha 100 ml dung dịch BA có nồng độ 1,5 $\mu\text{mol/lít}$. Biết $M_{\text{BA}} = 225,2$.

CHƯƠNG IV

CHẤT ĐIỀU HÒA SINH TRƯỞNG THỰC VẬT

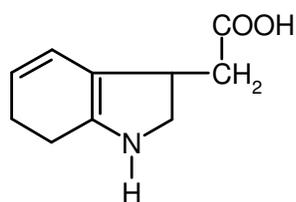
1 - KHÁI NIỆM CHUNG VỀ CHẤT ĐIỀU HÒA SINH TRƯỞNG THỰC VẬT - HORMON THỰC VẬT.

1.1 - Lịch sử phát hiện các hormon thực vật

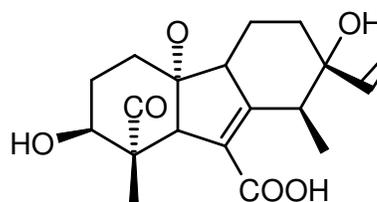
Sự hiện diện của các hormon thực vật đã được khám phá ra từ cuối thế kỷ qua. Có nhiều công trình nghiên cứu tiếp nối nhau làm nổi bật sự hiện diện của chúng nhưng chỉ được nhận dạng một thời gian sau. Mở đầu cho các nghiên cứu về hormon tăng trưởng thực vật được đánh dấu bởi các thí nghiệm của Darwin (1880) về hiệu ứng của ánh sáng trên sự cong của diệp tiêu *Avena*, và sự phát hiện của Went (1928) về vai trò kích thích sự kéo dài tế bào của auxin.

Các hormon thực vật khác lần lượt được khám phá sau đó là gibberellin trên sự tăng trưởng của cây mạ lúa (Kurosawa, 1926; Yabuta, 1935), cytokinin trên sự phân chia tế bào mô lõi thuốc lá (Skoog và Miller, 1950), acid abscisic trên sự rụng trái bông vải (Addicott và cộng sự., 1963). Vai trò của ethylen trên sự chín trái được biết từ rất lâu, nhưng phải cho tới những năm 60 của thế kỷ XX, chất khí này mới được xem là một hormon thực vật thực sự.

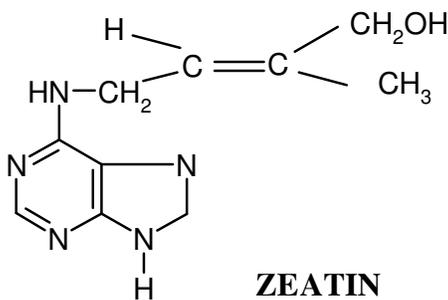
Như vậy, cho tới nay, các nhà sinh lý học thừa nhận năm nhóm hormon tăng trưởng thực vật chính: auxin (AIA), gibberellin (GA), cytokinin, acid abscisic (AAB) và ethylen.



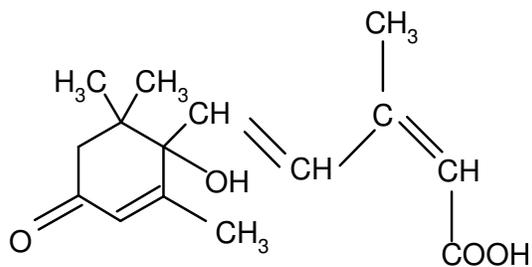
AIA



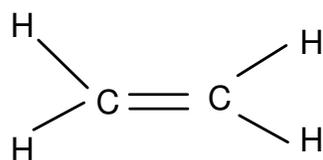
GA₁



ZEATIN



AAB



ETHYLEN

Hình IV.1 - Cấu trúc của các hormon thực vật

1.2 - Định nghĩa

Hormon (kích thích tố), là thuật ngữ do các nhà sinh lý động vật Baylis và Starling gọi vào năm 1904. Phần lớn các nhà khoa học hiện nay chấp nhận định nghĩa hormon thực vật dựa vào định nghĩa hormon thực vật: “một chất hữu cơ do tế bào của một bộ phận cơ thể tạo ra và được chuyển tới một bộ phận khác, ở đó, với nồng độ rất thấp, chất ấy gây ra một phản ứng sinh lý”.

Người ta thường phân biệt các hormon thực vật, tức các sản phẩm thiên nhiên của thực vật, với các chất điều hòa tăng trưởng thực vật (plant growth regulators), bao gồm các hormon thực vật và các chất hữu cơ nhân tạo có hoạt tính điều hòa. Chúng không phải là các chất dinh dưỡng, các sinh tố hay những nguyên tố khoáng cần thiết cho thực vật.

Các hormon và chất điều hoà ở thực vật thường được dùng cùng với tên của quá trình mà chúng tác động: chất điều hoà (hay hormon) tăng trưởng thực vật, chất điều hoà (hay hormon) ra hoa (nếu có).

1.3 - Các đặc tính chính của chất điều hoà sinh trưởng thực vật

Bản chất của năm nhóm hormon tăng trưởng thực vật đã được chứng minh, tuy nhiên, hormon ra hoa (frorigen) vẫn còn là giả thuyết. Sự tổng hợp, vận chuyển và các hiệu ứng sinh lý của năm nhóm hormon tăng trưởng thực vật chính được tóm tắt như sau:

1.3.1. Sinh tổng hợp

- Auxin: acid indol-3-acetic (AIA), từ tryptophan hay indol, tổng hợp trong sơ khởi lá, lá non, hạt đang phát triển.

- Gibberellin: có cấu trúc gibberellan (quan trọng nhất: GA₁), từ acid mevalonic, tổng hợp trong các mô non của chồi và hạt đang phát triển và rễ.

- Cytokinin: là dẫn xuất của adenin (thường nhất là zeatin) từ adenin, tổng hợp trong ngọn rễ và hạt đang phát triển.

- Acid abscisic: còn gọi là serquiterpen (3 đơn vị isoterpen), tạo thành từ acid mevalonic, tổng hợp trong rễ và lá trưởng thành (nhất là khi chịu stress nước), hạt.

- Ethylen: C_2H_4 , tạo thành từ methionin, trong các mô chịu stress, đặc biệt là các mô vào trạng thái lão suy và chín trái.

1.3.2 - Vận chuyển

- Auxin: di chuyển từ tế bào này sang tế bào khác, trong libe.
- Gibberellin: vận chuyển trong mạch và libe.
- Cytokinin: vận chuyển trong mạch (từ rễ tới chồi).
- Acid abscisic: xuất hiện từ rễ trong mạch và từ lá trong libe.
- Ethylen: khuếch tán từ nơi tổng hợp.

1.3.3 - Vai trò sinh lý

- Auxin: có tác dụng kéo dài, phân chia tế bào, có tính hướng động và ưu tính ngọn, gây lão suy, rụng, đậu và tăng trưởng trái, chín trái, quy định tính cái của hoa.

- Gibberellin: Có tác dụng kéo dài lông thân, gây nảy mầm hạt, đậu và tăng trưởng trái, quy định tính đực của hoa.

- Cytokinin: gây phân chia tế bào, tạo chồi trong nuôi cấy mô, tăng trưởng nụ nách, tăng rộng lá, chậm lão suy.

- Acid abscisic: gây đóng khí khổng, cản tăng trưởng chồi, cảm ứng tổng hợp protein hạt, cảm ứng và duy trì sự ngủ.

- Ethylen: Gỡ hưu miên, tăng trưởng và phân hóa (chồi và rễ), tạo rễ bất định, gây rụng lá và trái, quy định tính cái của hoa, lão suy (hoa và trái), chín trái.

2 - AUXIN

Auxin được khám phá ra do các thí nghiệm thực hiện trên các phản ứng về đường cong của loài *Coleoptiles* (họ Graminees). Tên của nó như vậy vì nó cần thiết cho hoạt động kéo dài tế bào (auxèse).

Auxin là một hợp chất có nhân indol tương đối đơn giản: acid indol-3-acetic (AIA), có công thức nguyên là $C_{10}H_9O_2N$. Đây là một hợp chất được tổng hợp từ tryptophan trong mô phân sinh (ngọn và lông) và lá non (tức các nơi có phân chia tế bào nhanh). Tiền chất tryptophan được tổng hợp từ các lá trưởng thành hơn, dưới ánh sáng. Từ nơi tổng hợp, auxin di chuyển tới rễ và tích tụ trong rễ

2.1 - Tính chất sinh lý của auxin

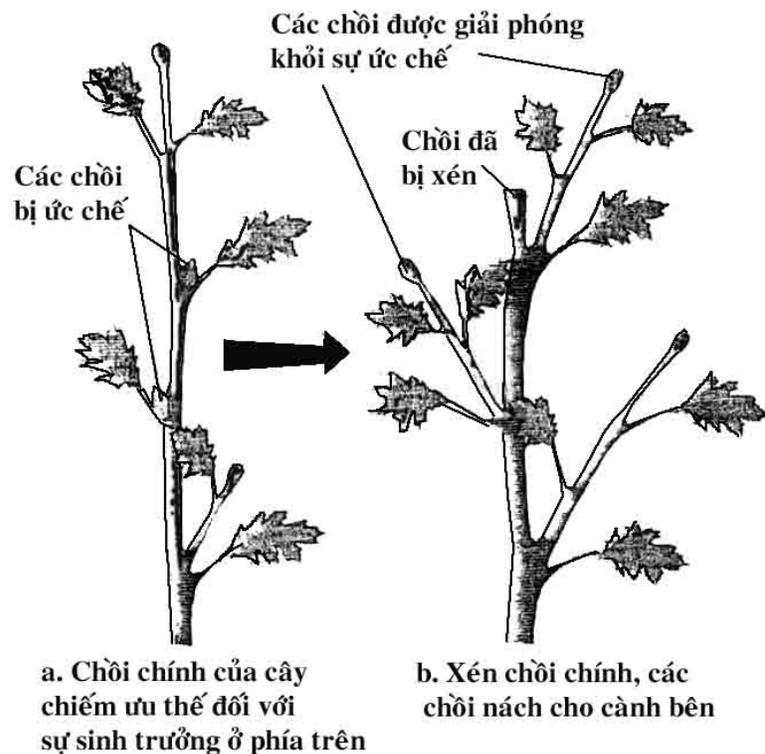
Auxin can thiệp vào nhiều hiện tượng sinh lý, hoạt động của nó tùy thuộc vào sự hiện diện, nồng độ của chúng trong mô hay trong môi trường thực nghiệm và sự tương hỗ qua lại của chúng với các chất điều hòa khác. Hiệu quả tác động của auxin có thể biểu hiện:

- Trong sự kéo dài tế bào. Auxin kích thích mạnh sự kéo dài tế bào diệp tiêu và tế bào vùng kéo dài dưới ngọn của thân. Sự kéo dài tế bào rễ cần những

nồng độ thấp hơn nhiều so với thân và chồi. Sự kéo dài tế bào là một quá trình phức tạp, kết hợp nhiều hiện tượng: hấp thu nước, kéo dài vách dưới sức trương, đặt các hợp chất mới của vách giữa các mạng vi sợi cellulose và các sinh tổng hợp khác nhau.

- Kích thích sự phân chia tế bào đối với các tế bào có nguồn gốc tầng tầng (chính vì tác động này mà nó cho phép những thành công đầu tiên của nuôi cấy mô thực vật *in vitro*). Ở nồng độ cao, auxin kích thích sự tạo mô sẹo.

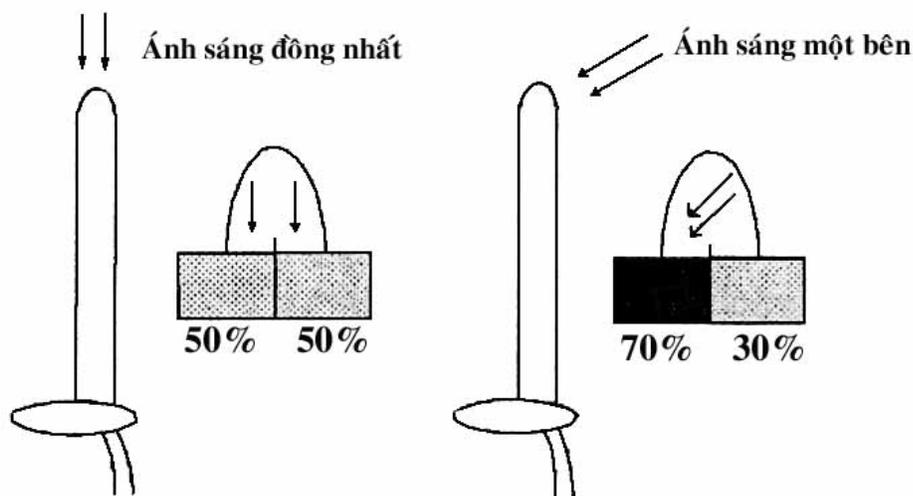
- Tạo các phản ứng về tăng trưởng và trong sự tương hỗ giữa các cơ quan với nhau, đặc biệt là hiện tượng về tính ưu thế của chồi non (hình IV.2). Auxin chẳng những kích thích sự tăng trưởng chồi non, mà còn khởi phát sự tạo mới chồi. Ở nồng độ cao, auxin cản sự phát triển của phát thể vừa được tạo mới hay của mô phân sinh nách (chồi nách).



Hình IV.2 - Hiện tượng ưu thế ngọn do tác động của auxin

- Trong hiện tượng quang hướng động: Quang hướng động do sự phân phối auxin không đều (hình IV.3), dẫn tới sự sai biệt tăng trưởng giữa mặt sáng và mặt tối.

- Auxin ở nồng độ cao kích thích tạo sơ khởi rễ nhưng cản sự tăng trưởng của các sơ khởi này.



Hình IV.3 - Hiện tượng phân phối auxin không đồng đều do ánh sáng

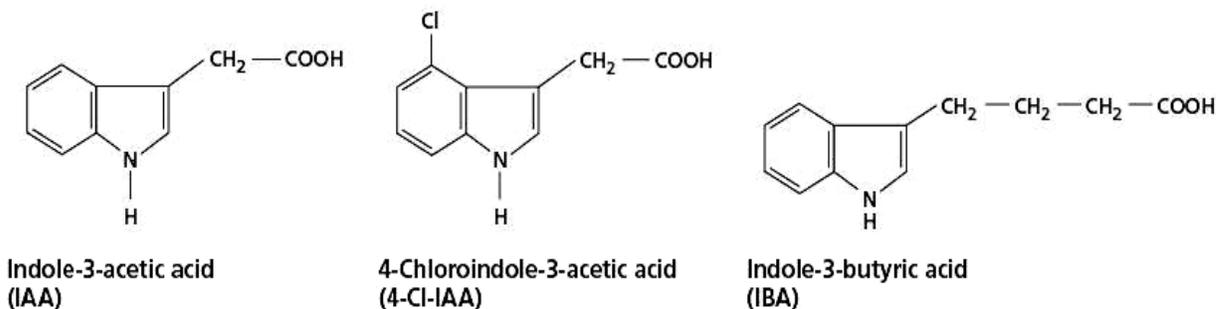
2.2 - Các chất auxin tổng hợp

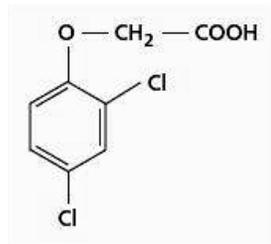
Ngay từ khi auxin được nhận dạng, có nhiều chất có cấu trúc gần nhau và giống nhau về mặt hoá học với auxin đã được nghiên cứu tổng hợp. Auxin thường không bền (bị oxy hoá trong vài ngày dưới ánh sáng), nên trong ứng dụng, người ta dùng nhiều các chất auxin tổng hợp không bị phân hủy. Thông dụng nhất là:

- Các hợp chất indolic như: acid indolpropionic và nhất là acid indolbutyric (AIB).
- Acid α -naphtalenacetic (NAA) (liều dùng thấp hơn AIA 2-5 lần).
- Acid phenoxiacetic và các dẫn xuất (hiệu ứng rất cao hơn AIA và độc hơn nhiều ở liều cao): acid 2,4-diclorophenoxiacetic (2,4-D).

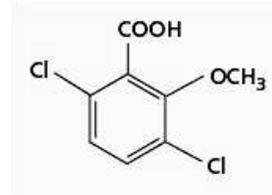
Trong những ứng dụng thực tiễn, các chất có cấu trúc auxin được sử dụng để giảm cành, chúng cũng được ứng dụng quan trọng trong các ngành cây ăn quả để tăng sự đậu quả (ở cà chua), để làm chậm sự thu hoạch quả, tạo trái không hạt (cam, quýt), kích thích sự ra rễ ở cành giâm, cản sự phát triển chồi (mất khoai tây).

Trong lĩnh vực nuôi cấy mô *in vitro*, những chất giống auxin được sử dụng và đã chiếm một vị trí quan trọng. Hiệu quả của các chất này được áp dụng trong quá trình tạo mô sẹo như thuốc lá (sử dụng 2,4 - D), kích thích tạo rễ (sử dụng NAA) ở hầu hết các loại mô thực vật nuôi cấy.





2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)



2-Methoxy-3,6-dichlorobenzoic acid (dicamba)

Hình IV.4 . Cấu trúc một số dạng auxin

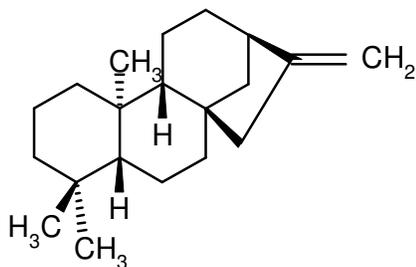
3 - GIBBERELLIN

Gibberellin, cũng như auxin, đã nổi bật rất lâu trước khi được nhận dạng. Năm 1926, Kurosawa chứng minh sự tăng trưởng quá mức của cây lúa được cảm ứng bởi chất trích từ nấm *Gibberella fujikuroi* (tức *Fusarium heterosporum*). Năm 1983, Yabuta và Sumili cô lập từ *Gibberella* một hỗn hợp của các chất mà họ gọi là *gibberellin*.

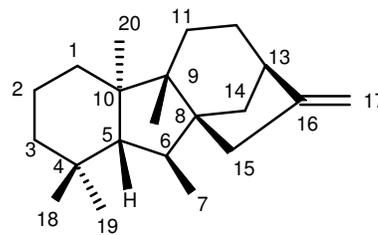
Năm 1950, các nhà khoa học Anh và Mỹ cô lập và tinh khiết, từ môi trường nuôi cấy nấm, một chất mà họ gọi là acid gibberellic.

Năm 1958, các chất giống gibberellin được cô lập từ thực vật.

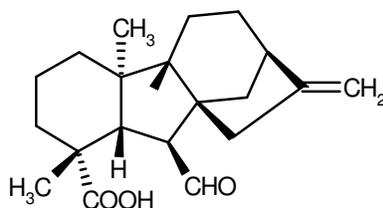
Gibberellin là một nhóm lớn, được biết tới trên 80 chất, đó là các gibberellin A_x hay GA_x theo thứ tự khám phá. Hiệu ứng chính của các gibberellin là kéo dài thân. Phần lớn các GA là tiền chất của các GA hoạt động. GA_3 ít gặp ở thực vật nhưng là chất có hoạt tính và được xem như chất chuẩn cho các GA.



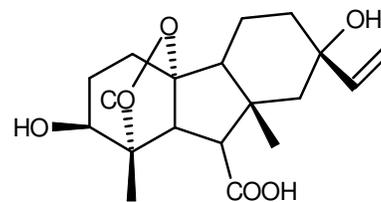
KAUREN



NHÂN GIBBERELLAN



GA_{12} - ALDEHYD



GIBBERELLIN (GA_1)

Hình IV.5 - Cấu trúc của một số gibberellin

3.1 - Tính chất sinh lý của gibberellin

Nhiều tính chất khác nhau của gibberellin đã được ghi nhận, trong đó tiêu biểu là:

3.1.1 - Kéo dài tế bào

GA kiểm soát hướng đặt các vi sợi cellulose mới được tổng hợp trong các tế bào, hiện tượng có tầm quan trọng hàng đầu trong sự tăng trưởng hữu cực của tế bào. Hướng đặt các vi sợi cellulose do hướng đặt các vi ống ngoại vi quyết định. GA cảm ứng sự đặt theo hướng ngang của các vi ống ở nhiều tế bào khác nhau (kể cả các tế bào GA không kích thích sự kéo dài). Sự điều hoà hướng của các vi ống tùy thuộc các auxin, nhưng bản chất của sự phối hợp hoạt động giữa GA và auxin trong hiện tượng này chưa được biết.

3.1.2 - Trong sự kéo dài lóng và tăng trưởng lá

Kích thích sự kéo dài lóng là đặc điểm nổi bật của GA. Hoạt động này vừa do sự kéo dài vừa do sự phân chia tế bào thân. GA kích thích mạnh sự phân chia tế bào mô vỏ và biểu bì. Xử lý GA làm tăng năng suất mía cây và đường (do kích thích sự kéo dài lóng).

GA liều cao (hay phối hợp với các cytokinin) kích thích sự tăng trưởng lá (diện tích có thể gấp đôi bình thường, như ở Trèfle, Radis). Trên lá yếm mạch hay diệp tiêu lúa, GA chỉ có vai trò làm tăng hiệu ứng auxin.

Dù auxin và gibberellin đều kích thích sự tăng dài của thân nhưng ảnh hưởng của chúng trên cây khá khác biệt. Vì gibberellin được vận chuyển qua mô mộc và mô libe, trong khi auxin được di chuyển từ tế bào này sang tế bào khác một chiều. Gibberellin có ảnh hưởng trên toàn bộ của cây chứ không phải trên từng vùng như ở auxin.

Gibberellin được tạo ra trong những mô còn non của thân và trong Hạt đang phát triển. Có nhiều loại gibberellin nhưng tất cả đều có cùng một con đường sinh tổng hợp như những hormon steroid của động vật có xương sống như estrogen và testosterol, và cũng giống như chúng gibberellin hòa tan trong lipid. Do đó chúng dễ dàng đi xuyên qua màng tế bào và có lẽ làm cho gen đặc biệt nào đó hoạt động hay ngưng hoạt động.



Hình IV.6 - Ảnh hưởng của acid gibberelic

3.1.3 - Trong sự phát triển hoa và trái

Sự kéo dài cuống hoa ở các cây ngày dài, đặc biệt các cây có dạng hoa hồng (giúp sự ra hoa) là tác dụng đặc sắc của GA. GA giúp sự tạo hoa đực (cây lưỡng tính như dưa chuột hay cây phân tính như spinach) trong khi auxin giúp sự tạo các hoa cái.

Giống như auxin, GA có tác động trên quả bì, giúp sự đậu trái (táo *Malus sylvestris*) hay tạo trái trinh quả. Trong sự đậu trái, GA kích thích sự nảy mầm của hạt phấn và sự tăng trưởng của ống phấn.

GA kích thích sự tăng trưởng của trái, thí dụ như : kích thích trái nho không hạt (bao gồm sự kéo dài cuống trái) là một ứng dụng thương mại quan trọng. GA làm chậm sự lão suy trái cam quýt, giúp các trái dính lâu trên cây hơn để chờ được hái bán.

3.1.4 - Trong sự phát triển chồi cây và nảy mầm của hạt

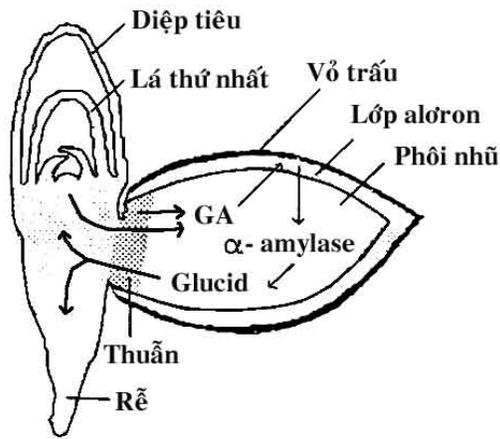
GA làm chậm sự vào hiện tượng ngủ của chồi do ngày ngắn cảm ứng (mùa thu), và gỡ sự ngủ của các chồi cây gỗ (đối kháng với AAB).

GA gỡ *sự ngủ nhạy sáng* ở vài loại hạt. Thí dụ : sự ngủ của tế bào quả sa lách được gỡ bởi GA (ở nồng độ khá cao : 10^{-3}gml^{-1}), giống như bởi ánh sáng đỏ.

Tuy nhiên, GA không đẩy lùi hiệu ứng của đở xa (hoạt động của GA không hoàn toàn giống ánh sáng).

GA có thể gỡ sự cản nẩy mầm do AAB trong phôi đậu; ngược lại, AAB đẩy lùi hiệu ứng kích thích của GA. Tuy nhiên, GA không gỡ sự cản do AAB ở phôi cây bông (*Gossypium*).

Trong quá trình nẩy mầm của hạt ngũ cốc, GA được tổng hợp trong phôi (diệp tiêu và thuấn), và di chuyển (khuếch tán qua phôi nhũ) tới lớp aloron để cảm ứng sự tổng hợp các α -amylase (hình IV.5). Các enzym này được tiết ra phôi nhũ để thủy giải tinh bột và phóng thích các đường cần cho phôi đang tăng trưởng trong sự nẩy mầm.



Hình IV.7 - Hoạt động của GA trong sự nẩy mầm của hạt

3.2 - Sự liên hệ với auxin

Trong phần lớn các trường hợp, GA có hoạt động bổ sung cho auxin:

- Auxin kích thích mô phân sinh, GA kích thích mô phân sinh lóng.
- Auxin kích thích sự kéo dài tế bào của các tế bào dẫn xuất từ mô phân sinh ngọn (vùng dưới ngọn, vùng kéo dài); GA kích thích sự kéo dài của các tế bào có nguồn gốc từ mô phân sinh lóng.
- Auxin cản chồi nách; GA kích thích sự tăng trưởng chồi và gỡ vài sự ngủ của chồi và phôi.
- Auxin kích thích sự tạo rễ; GA không có hiệu ứng này (đôi khi có hiệu ứng nghịch).

Hiệu ứng của auxin và GA không luôn luôn tách biệt nhau, cả hai có thể kích thích vài hiện tượng theo cùng cách (phát triển bầu noãn, tạo trái trinh sản). Vài hiện tượng cần đồng thời cả hai: GA kích thích các lóng trong nuôi cấy nếu được cung cấp auxin (bình thường, auxin được cung cấp từ ngọn).

Thông thường, GA làm tăng hàm lượng auxin trong các mô mà nó kích thích. Tuy nhiên, hai chất này có hoạt động độc lập: GA không phải là tác nhân làm tăng khả năng hoạt động của auxin.

Trong nuôi cấy invitro mô thực vật, gibberellin ít được sử dụng. Khi sử dụng thường là ở dạng hỗn hợp với một chất điều hoà sinh trưởng khác như acid abscisic (ví dụ: GABA là một phức hợp chất điều hoà sinh trưởng của GA₃ và acid abscisic).

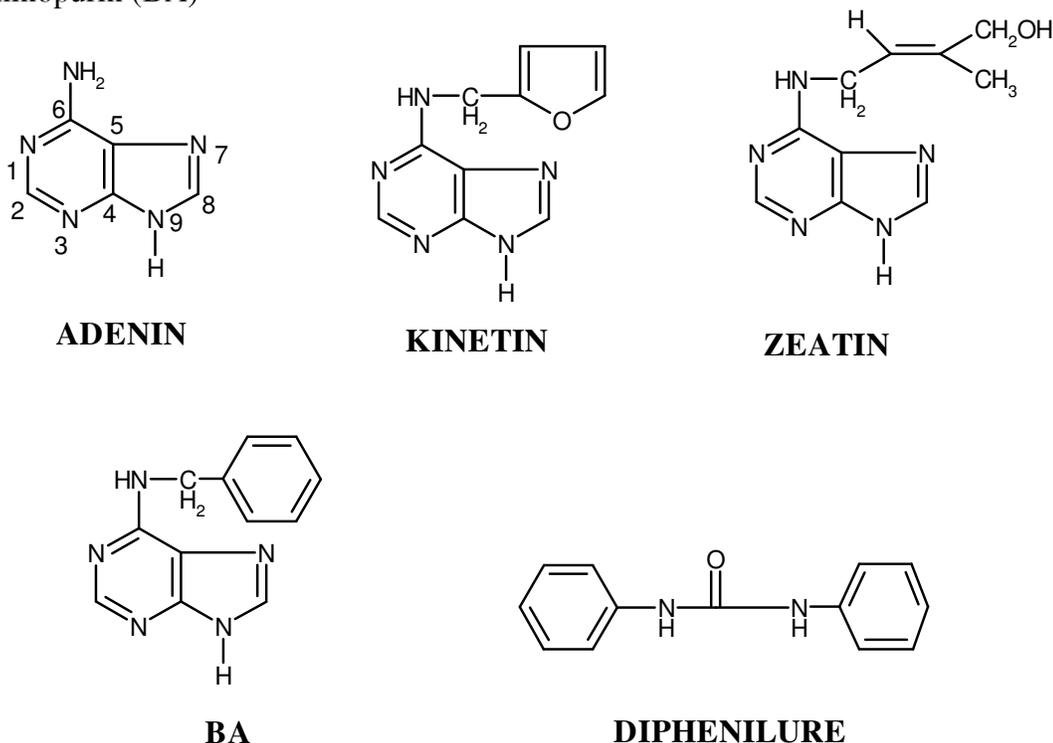
4 - CYTOKININ

Các cytokinin được khám phá do những cố gắng tìm kiếm yếu tố kích thích sự phân chia tế bào thực vật. Skoog thực nghiệm nhiều chất trên mô lõi thuốc lá được nuôi cấy *in vitro*, và đã ngạc nhiên khi thấy DNA của tinh trùng cá Mòi được hấp vô trùng có hiệu ứng rất mạnh. Từ đó, chất có hoạt tính được cô lập: 6-furfuril aminopurin, tức kinetin (*kinesis*: phân chia tế bào). Kinetin chỉ hoạt động khi có auxin hiện diện (không có auxin, sự phân chia tế bào do cytokinin không xảy ra).

Vài năm sau, Miller (Mỹ) và Lethan (Úc) đồng thời chứng minh rằng chất trích từ phôi nhũ bắp non chứa một chất có cùng hiệu ứng và cấu trúc gần giống kinetin, đó là zeatin.

Nước dừa (phôi nhũ lỏng) từ lâu được dùng trong nuôi cấy mô thực vật vì được khám phá ra là có chứa zeatin. Môi trường chứa auxin và 10-20% nước dừa giúp sự phân chia của các tế bào thân đã phân hoá tạo mô sẹo.

Hai loại cytokinin được dùng phổ biến nhất hiện nay là: Kinetin , 6- Benzyl aminopurin (BA)



Hình IV.8 - Cấu trúc của vài cytokinin

Tính chất sinh lý của cytokinin được tóm tắt như sau:

4.1 - Trong sự tăng trưởng tế bào

Các cytokinin kích thích sự phân chia tế bào với điều kiện có sự hiện diện của auxin. Cytokinin tác động trên cả hai bước của sự phân chia tế bào: phân nhân và phân bào. Trong các mô sẹo cytokinin như mô lõi thuốc lá hay vỏ rễ đậu, sự áp dụng auxin kích thích nhân đôi nghiêm sắc thể, thậm chí tạo tế bào hai nhân, nhưng không có sự phân vách, hiện tượng này chỉ xảy ra khi có cytokinin ngoại sinh.

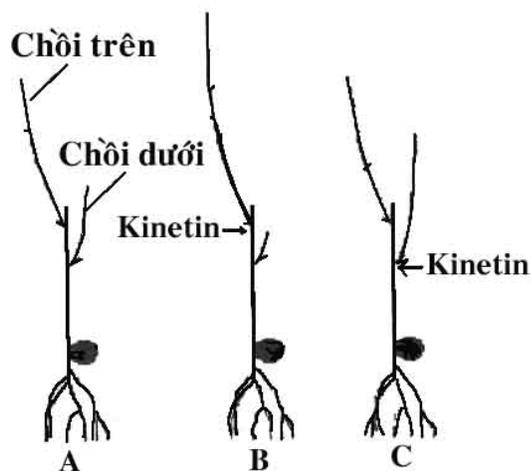
Cytokinin kích thích sự kéo dài tế bào, quá trình do auxin cảm ứng, nhưng cũng kích thích sự gia tăng kích thước của các tế bào mà auxin không tác động, ví dụ các tế bào lá trưởng thành. Cytokinin cản sự kéo dài tế bào theo chiều dọc, nhưng kích thích sự tăng rộng (sự tăng trưởng củ).

4.2 - Trong sự tạo cơ quan

Skoog và Miller (1965) chứng minh khúc cắt lõi hay mô sẹo thuốc lá có thể tạo rễ hay chồi tùy theo tỷ lệ auxin/cytokinin trong môi trường nuôi cấy: tỷ lệ cao giúp sự tạo rễ (thí dụ 2/ 0,02), tỷ lệ thấp giúp sự tạo chồi (thí dụ 2/ 0,5). Như vậy có sự đối kháng giữa auxin, hormone giúp sự tạo rễ, và cytokinin, hormone giúp sự tạo chồi. Cytokinin khi thì hỗ trợ auxin (tăng trưởng), khi thì đối kháng (phân hoá chồi và rễ). Do đó, sự cân bằng giữa hai kiểu hormone này là một trong những yếu tố kiểm soát sự phát triển.

4.3 - Trong ưu tính ngọn

Cytokinin có khả năng gỡ ưu tính ngọn ở các chồi nách (do auxin được tiết từ ngọn): chích BA hay kinetin vào một gốc chồi nách sẽ hạn chế tác động của auxin từ trên xuống, và giúp sự tăng trưởng của chồi này (hình IV.7).

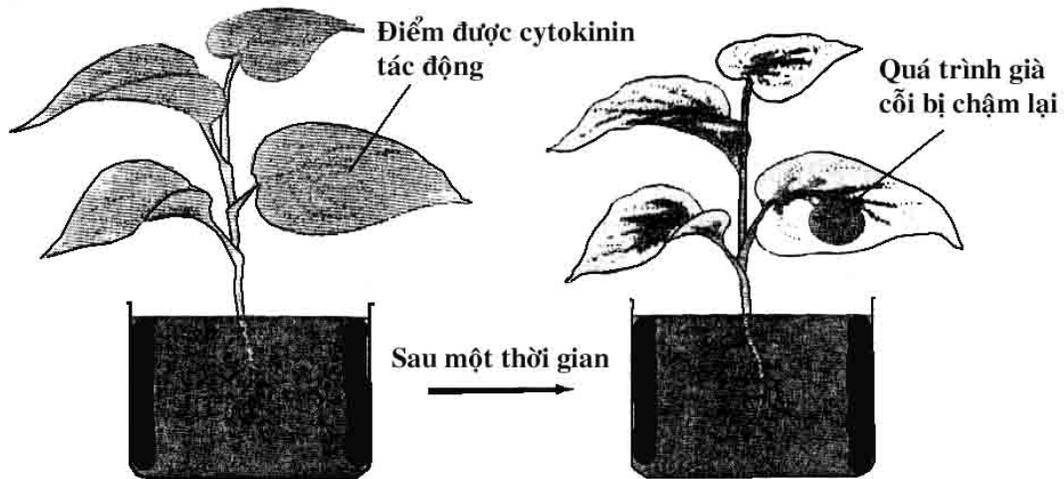


Hình IV.9 - Ảnh hưởng của kinetin trên sự phát triển chồi của cây mầm *Cicer arietinum* được cắt ngọn

A. Chuẩn: chồi trên cản nhẹ chồi dưới, B. Chích kinetin ở gốc chồi trên: kích thích chồi trên, cản mạnh chồi dưới, C. Chích kinetin ở gốc chồi dưới: chồi dưới tăng trưởng

4.4 - Làm chậm lão suy và kích thích sự huy động chất dinh dưỡng

Một giọt cytokinin nhỏ trên lá tạo nên một vùng còn xanh, trong khi các mô xung quanh bắt đầu lão suy. Người ta chứng minh có sự huy động chất dinh dưỡng về vùng mô được xử lý cytokinin. Như vậy, cytokinin không cản hoàn toàn mà làm chậm rõ rệt sự lão suy lá (hình IV.8).



Hình IV.10 - Vai trò của Cytokinin trong việc làm chậm sự lão suy

4.5 - Giúp sự trưởng thành của diệp lục

Trong tối, mặc dù hạt có thể nảy mầm, nhưng cây mầm bị hoàng hóa: lông dài hơn, lá không tăng rộng và diệp lục không trưởng thành. Nếu lá hoàng hoá được xử lý với cytokinin trong điều kiện có ánh sáng, diệp lục tố và các enzyme quang hợp được tổng hợp ở tốc độ mạnh (sự kích thích không xảy ra trong tối).

Như vậy, cytokinin với các tính chất tiêu biểu đó giúp giải quyết được rất nhiều khó khăn trong lĩnh vực nuôi cấy mô: duy trì sự sống của mô, kích thích sự phân chia tế bào và định hướng tế bào trong con đường phân hoá, quan trọng trong sự tạo chồi ở mô nuôi cấy.

5 - ACID ABSCISIC

Acid abscisic (AAB) được khám phá trong các nghiên cứu trên sự rụng (abscission) trái bông vải. Chất này dường như được tổng hợp mỗi khi thực vật đang ở trong giai đoạn khó khăn (cây thiếu nước, bị chấn thương, thời tiết quá nóng...); điều này là một trong những phương tiện tự vệ, cây làm chậm lại sự hoạt động của chúng. Sự làm chậm này có thể chỉ thoáng qua, nếu sự chấn động stresses

chỉ kéo dài trong một thời gian ngắn hoặc sẽ dẫn đến hiện tượng ngủ nếu như các điều kiện xấu cho cây kéo dài.

Tính chất sinh lý của acid abscisic được tóm tắt như sau:

5.1 - Trong tăng trưởng và phát triển

AAB kích thích sự rụng, nhưng không phải là chất chủ yếu (so với ethylen và auxin). Ngược lại, cản tăng trưởng và phát triển là vai trò quan trọng hàng đầu của AAB.

Là chất đối kháng mạnh của các GA, nên AAB làm chậm sự tăng trưởng của các nhánh do cản sự kéo dài của các lóng. AAB kéo dài sự ngủ của chồi và hạt và cản sự tăng trưởng của diệp tiêu và các mô nuôi cấy.

Vì hàm lượng AAB tăng đáng kể dưới hiệu ứng của ngày ngắn, nên người ta có khuynh hướng xem AAB như thông tin cảm ứng sự ngủ của hạt và chồi và sự hoá củ bởi các ngày ngắn (mùa thu).

5.2 - Đóng khí khẩu

Ở nồng độ $10^{-7}M$, AAB làm đóng khí khẩu sau vài phút. Khi cây thiếu nước, hàm lượng AAB trong lá tăng mạnh. Nếu lá tái hấp thu nước, hàm lượng AAB sẽ trở lại giá trị ban đầu. Nhiều người cho rằng, AAB là dấu hiệu của sự “khô hạn”, kích thích sự đóng khí khẩu.

5.3 - Trong sự sinh phôi và trưởng thành của hạt

AAB làm chậm sự nảy mầm (ngược với GA), nhưng có liên quan tới sự sinh phôi và trưởng thành của hạt.

Nhìn chung, trong nuôi cấy mô *in vitro*, AAB ít được sử dụng. Một phần tùy theo loại cây và phần khác tùy theo điều kiện nuôi cấy, chất này sẽ gây nên các phản ứng rất khác nhau.

6 - ETHYLEN

Ethylen là một chất khí được nhận dạng từ lâu, thường tồn tại nhiều trong các kho dự trữ quả. Ethylen với chức năng giống như chất điều hòa tăng trưởng thì mới được biết gần đây. Người ta đã chứng minh được rằng, tất cả các bộ phận của cây đều có khả năng sản sinh ra ethylen.

Các hiệu ứng sinh lý của ethylen đạt được ở các nồng độ $0,01 \div 10 \mu l l^{-1}$

Tính chất sinh lý của ethylen như sau:

6.1 - Cảm ứng các ứng động

Ethylen và các nồng độ cao của auxin cảm ứng các ứng động. Các điều kiện ngập nước hay kỵ khí xung quanh rễ cà chua kích thích sự tổng hợp ethylene trong chồi, dẫn tới sự cong ứng động ở chồi (sự cong xuống của các lá khi mặt trên của cuống tăng trưởng nhanh hơn so với mặt dưới).

6.2 - Trong sự tăng trưởng cây mầm và tạo móc

Ở nồng độ trên $0,1 \mu\text{l l}^{-1}$, ethylen làm thay đổi kiểu tăng trưởng của cây mầm: giảm sự kéo dài, nhưng giúp sự tăng trưởng rộng, dẫn tới sự phình to của vùng dưới móc của cây mầm của thực vật hai lá mầm.

Ethylen được sản xuất trong vùng móc, trong tối, nên cây mầm hoàng hoá có dạng móc đặc trưng ở phần tận cùng của chồi ngọn. Giống như ứng động, phản ứng tạo móc do sự tăng trưởng không cân xứng (mặt ngoài tăng trưởng nhanh hơn mặt trong). Như vậy, trong tối và dưới tác dụng của các vật cản vật lý trong đất, ethylen được sản xuất và cảm ứng sự cong (tạo móc), cho phép cây mầm lú ra khỏi đất mà không bị hư hỏng mô phân sinh ngọn.

Ngược lại, dưới ánh sáng, móc mở ra (tốc độ tăng trưởng của mặt trong gia tăng), giúp lá thu nhận ánh sáng. Ánh sáng đỏ cản sự thành lập ethylen và cảm ứng sự mở móc.

6.3 - Trong sự tăng trưởng và tạo rễ

Ở vài cây đơn tử diệp (lúa), ethylen kích thích sự kéo dài thân, ngược với hiệu ứng cản thông thường ở phần lớn cây mầm. Khi đặt cây mầm lúa vào ethylen hay điều kiện ngập nước (môi trường kỵ khí), sự tăng trưởng lóng tăng đột ngột. Trong điều kiện thiếu oxy, sự tổng hợp ethylen giảm, nhưng ethylen khuếch tán rất chậm trong đất ngập nước.

Ethylen có khả năng cảm ứng sự thành lập rễ ở lá, thân, cuống hoa và ngay cả trên rễ (ở nồng độ cao, thí dụ $10 \mu\text{l l}^{-1}$).

6.4 - Trong sự ngủ của chồi và hạt

Ethylen gỡ sự ngủ của chồi (áp dụng trong sự nảy chồi ở khoai tây). Khi áp dụng vào hạt ngũ cốc, ethylen phá vỡ sự ngủ và khởi phát sự nảy mầm.

6.5 - Trong sự ra hoa

Mặc dù cản sự ra hoa ở nhiều loài, nhưng ethylen cảm ứng sự ra hoa ở vài loài, như thơm và xoài (được ứng dụng trong thực tế để làm đồng nhất sự ra hoa, đậu trái). Ở các loài có hoa đực riêng, ethylen kích thích sự thành lập hoa cái trên các hoa đang phát triển (dưa chuột).

6.6 - Kích thích sự lão suy của lá và hoa

Sự lão suy lá và hoa bị thúc nhanh bởi ethylen nhưng bị cản mạnh bởi các chất cản sinh tổng hợp ethylen hay cản hoạt động ethylen (Ag^+ hay CO_2). Ag^+ được dùng rộng rãi để làm tăng tuổi thọ của vài loại hoa.

6.7 - Khởi phát sự rụng lá

Dần dần theo sự lão suy của lá, tế bào cuống ở phía ngoài vùng rụng, cạnh phiến lá, sản xuất ngày càng nhiều ethylen. Ethylen khuếch tán vào vùng rụng và

cảm ứng sự tổng hợp các enzyme phân hủy vách tế bào. Các tế bào này trở nên tròn, rời rạc (tế bào trần), dẫn tới sự rụng lá.

6.8 - Trong sự chín trái

Thông thường, auxin rút ngắn, trong khi cytokinin kéo dài thời gian cần để chín trái. GA đối nghịch với ethylen, và do đó, cũng kéo dài thời gian cần để chín trái. Khi trái trưởng thành, GA giảm và AAB tăng, trong khi ethylene hầu như duy trì ở mức không đổi trong trái. Mức ethylen này hầu như duy trì ở mức không đổi trong trái. Mức ethylen này đủ để kích thích sự chín trái.

Tóm tắt

Sự phát triển của công nghệ vi nhân giống thực vật gắn liền với vai trò của các chất điều hoà sinh trưởng thực vật (hormon thực vật). Có thể nói, tất cả các hiện tượng sinh lý của cơ thể thực vật đều liên quan đến bản chất của các hormon thực vật. Chúng kiểm soát mọi quá trình từ khởi phát, sinh trưởng, sinh sản, đến sự già cỗi và chết đi của thực vật. Hiểu được vai trò của các hormon thực vật để góp phần nâng cao hiệu quả của các phương pháp vi nhân giống thực vật.

Có năm loại chất điều hoà sinh trưởng thực vật, phân thành 2 nhóm chính:

- Các chất kích thích sự phát triển: auxin, gibberellin, cytokinin.
- Các chất kìm hãm sự phát triển: acid abscisic, ethylen.

Các chất điều hoà sinh trưởng thực vật đều có bản chất:

- Tác động hiệu quả chỉ với một lượng rất thấp.
- Được tổng hợp ở một nơi và tác động ở một nơi khác
- Hiệu quả kích thích hay kìm hãm đối với từng chất còn phải tùy thuộc vào bản chất của mô đích, đối tượng và tình trạng sinh lý của thực vật.
- Được tổng hợp trong mô thực vật tùy theo yêu cầu của thực vật.

Hiện nay, trong công nghệ vi nhân giống, thường sử dụng các loại chất hormon thực vật tổng hợp hoá học có nồng độ cao.

Câu hỏi ôn tập

1. Trình bày định nghĩa, lịch sử phát hiện, tính chất chung của các hormon thực vật.
2. Trình bày sự tổng hợp và tính chất của auxin
3. Trình bày sự tổng hợp và tính chất của gibberellin
4. Trình bày sự tổng hợp và tính chất của cytokinin
5. Trình bày sự tổng hợp và tính chất của acid abscisic
6. Trình bày sự tổng hợp và tính chất của ethylen

CHƯƠNG V

CÁC PHƯƠNG PHÁP VI NHÂN GIỐNG THỰC VẬT

A - CÁC PHƯƠNG PHÁP VI NHÂN GIỐNG TRUYỀN THỐNG THỰC VẬT

1- NUÔI CẤY ĐỈNH SINH TRƯỞNG

1.1 - Đặc điểm sinh học đỉnh sinh trưởng

Mô phân sinh đỉnh chứa những tế bào đỉnh sinh trưởng, được bao bọc bởi một lớp vỏ bề mặt có cấu tạo cutin hạn chế thấp nhất quá trình mất nước và lớp cutin này bao bọc cả chồi đỉnh (hình V.1).

Ở thực vật, sự hình thành mới các cơ quan bắt đầu trong các mô phân sinh đỉnh, các mô này phân hoá 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 hoá của những tế bào khởi sinh. Tất cả các tế bào còn lại đều xuất phát từ các tế bào khởi sinh.

Vì mô phân sinh có thể tích tương đối ổn định, nên các tế bào sinh ra từ các tế bào khởi sinh sau một vài lần phân chia sẽ rời khỏi mô phân sinh.

Quá trình sinh trưởng của cơ quan diễn ra theo 3 giai đoạn:

- Giai đoạn thứ nhất: thường được gọi là giai đoạn phôi sinh. Trong các điểm sinh trưởng (trong các mô phân sinh đỉnh) xảy ra sự hình thành mầm cơ quan và sự phân chia đầu tiên của nó thành các mô riêng biệt.

- Giai đoạn thứ hai: giai đoạn dài ra do sự sinh trưởng nhanh chóng, mầm cơ quan đạt đến kích thước tối đa và trở nên có hình dạng nhất định.

- Giai đoạn thứ ba: giai đoạn kết thúc sự phân hóa tế bào, bắt đầu sự hoá gỗ các thành tế bào, xuất hiện ở trên đó những chỗ dày lên có cấu tạo và kết quả là không còn khả năng tiếp tục sinh trưởng. Trước hết, các u lõi dần dần được tạo thành và người ta gọi là các u lá. Thể tích của u lá lớn rất nhanh và kéo theo nó một phần lớn của đỉnh sinh trưởng. Dần dần u lõi chuyển thành mầm lá (thể nguyên thủy). Mầm lá phát triển nhanh theo chiều dài. Sự sinh trưởng tiến hành không đều cho nên lá mầm tự cong lên phía đỉnh. Sau khi lá được tách ra lại xảy ra sự phân phối lại sự phân chia tế bào, kết quả là thể tích của đỉnh sinh trưởng được khôi phục nhanh chóng và sự hình thành lá mới lại bắt đầu.

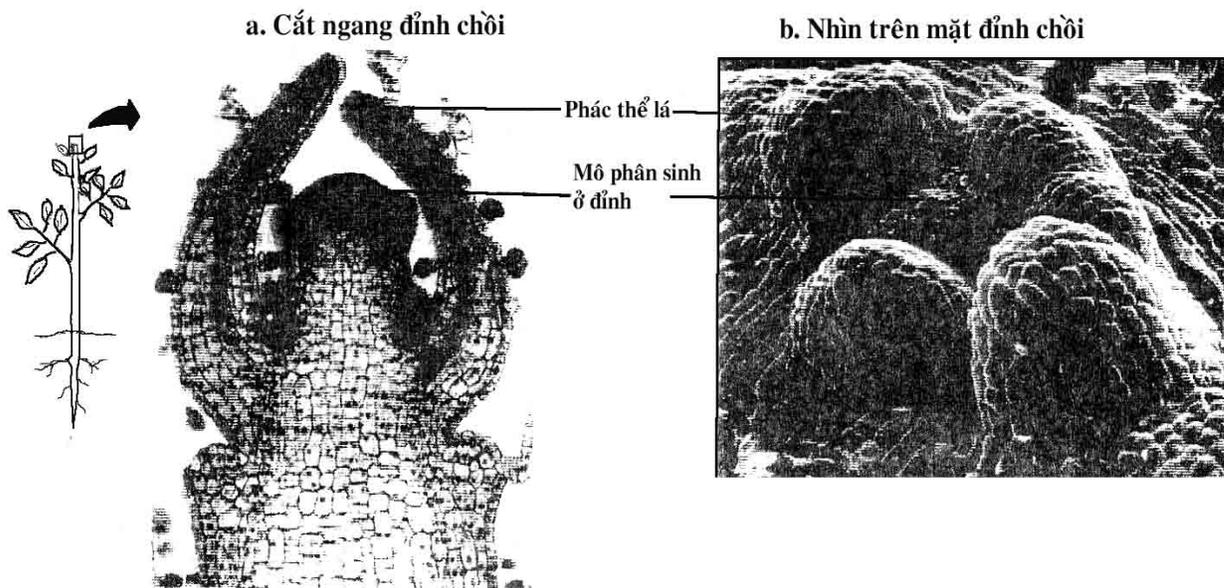
Ở mỗi nách lá đều có chồi nách. Chồi nách thực chất có cấu tạo không khác đỉnh sinh trưởng của thân. Do hiện tượng ưu thế ngọn, chồi nách không phát triển, nhưng khi được đánh thức và bắt đầu sinh trưởng, chúng có cấu tạo lá đầy đủ như thân chính.

Quá trình sinh tổng hợp DNA của virus thực vật không xảy ra trong tế bào đỉnh sinh trưởng do một cơ chế hiện nay không rõ. Vì vậy mô đỉnh sinh trưởng là

mô duy nhất sạch virus. Do đó trong kỹ thuật nuôi cấy mô tế bào, mô đỉnh sinh trưởng được sử dụng là vật liệu nuôi cấy mô tế bào nhằm tạo các cây không nhiễm virus và các loại vi khuẩn hay nấm gây bệnh.

Phương pháp nuôi cấy đỉnh sinh trưởng sử dụng phần nhỏ nhất ở chồi đỉnh của thân làm mẫu nuôi cấy. Phần này gồm mô phân sinh và vài phác thể lá. Việc tách và nuôi cấy đỉnh sinh trưởng nhằm tạo các cây sạch bệnh. Mẫu cấy càng nhỏ khả năng tạo cây sạch bệnh càng cao. Ví dụ, mô phân sinh từ 0,1 đến 0,15 mm có thể có 100% sạch virus. Tuy nhiên mẫu càng nhỏ khả năng sống sót càng thấp. Người ta thường sử dụng mẫu cấy từ 0,25 đến 1 mm. Xử lý nhiệt (từ 35°C đến 40°C tùy loài) trước khi tách đỉnh sinh trưởng là một biện pháp nhằm tăng cường khả năng sạch virus.

Phương pháp này được sử dụng thành công với cây thân thảo như cúc, cẩm chướng, khoai tây, khoai lang, chuối... Đối với cây thân gỗ, phương pháp vi ghép thường được sử dụng.



Hình V.1 - Đỉnh sinh trưởng

1.2 - Nuôi cấy đỉnh sinh trưởng khoai tây

Lấy một củ khoai tây trồng vào một chậu đất trong điều kiện nhiệt độ và ánh sáng bình thường. Khi mầm cao khoảng 15 cm, lấy phần ngọn dài 6÷8 cm, cắt bỏ hai lá dưới, cắm vào một cái ly đựng đất mùn đã vô trùng, đặt một ly khác để tránh bị héo trong vòng 10 ngày cho ra rễ. Sau 3 đến 4 tuần, chuyển ly có cây vào điều kiện chiếu sáng 3000 ÷ 4000 lux, chế độ chiếu sáng 16 giờ/ngày, nhiệt độ không khí khoảng 36°C ban ngày và 33°C ban đêm. Sau đó 2 tuần cắt bỏ ngọn mầm để thúc các chồi nách phát triển.

Sau khi xử lý nhiệt 6 tuần, lấy phần ngọn chồi nách để tách đỉnh sinh trưởng. Cắt bỏ bớt lá và đặt chồi trên một tờ giấy lọc ẩm trong một đĩa petri để tránh bị

héo. Không cần thiết phải vô trùng chồi nách trước khi làm thao tác tách đỉnh sinh trưởng, nhưng cần tách trong điều kiện vô trùng và dụng cụ tách cần phải được vô trùng bằng cồn và nước cất vô trùng. Dưới kính lúp có độ phóng đại X25, dùng kim nhọn để gạt bỏ các lá ngoài, để lộ đỉnh sinh trưởng với hai lá nguyên thủy. Dùng dao mổ có lưỡi nhọn cắt lấy mô đỉnh sinh trưởng có chiều dài khoảng 0,6 mm. Dùng kim nhọn đưa đỉnh sinh trưởng lên mặt môi trường thạch, giữ ở 23°C trong điều kiện chiếu sáng 16 giờ/ ngày.

Sau vài tuần khi cây đã lớn được 3 cm và có rễ có thể chuyển qua môi trường mới. Khi cây có nhiều lá, cắt đoạn và nhân lên nhiều cây, đồng thời đưa chuẩn đoán virus.

Môi trường dùng để cấy đỉnh sinh trưởng của khoai tây là môi trường MS chất sinh trưởng cần thêm IAA 0,5 mg/lít, GA 0,1 mg/l và inositol 100 mg/lít. Nếu thấy cây khoai tây khó có rễ, cần thêm 10 mg than hoạt tính vào một ống nghiệm trước khi vô trùng. Dùng ống nghiệm nhỏ 12x100 mm, mỗi ống nghiệm 3,5 ml môi trường.

Sau khi chắc chắn không còn virus trong cây khoai tây, các ống nghiệm được đưa vào nhân giống và bảo quản.

2 - VI GHÉP

2.1 - Ý nghĩa của vi ghép trong làm sạch bệnh cây trồng

Làm sạch bệnh virus cho vườn cây ăn quả thuộc họ cam chanh đang là nhu cầu lớn đối với nhiều nơi trên thế giới. Trong khi chưa tạo được những giống kháng virus thì việc tạo ra những khu vực cây mẹ sạch virus để cung cấp mắt ghép và cành chiết đầu dòng là cần thiết.

Bên cạnh những biện pháp tẩy virus như cấy mô xử lý nhiệt, tạo cây trong nuôi cấy phôi tâm phương pháp nuôi cấy đỉnh sinh trưởng đang được áp dụng rộng rãi và có hiệu quả vào việc làm sạch virus đối với nhiều cây trồng khác nhau.

Trong trường hợp cây ăn quả lâu năm, kỹ thuật ghép đang chiếm vị trí hàng đầu trong nhân giống vì kết hợp được khả năng chống chịu của gốc cây hoang dã với ưu điểm năng suất và phẩm chất của mắt ghép. Tuy nhiên, trong lúc ghép theo kỹ thuật truyền thống do thời gian trồng gốc ghép kéo dài và kích thích mắt ghép khá lớn, nên bệnh virus có thể lây truyền.

Để khắc phục những nhược điểm trên, kỹ thuật ghép đỉnh sinh trưởng gọi tắt là vi ghép được thử nghiệm và mang lại kết quả tốt. Về nguyên tắc, vi ghép là nuôi cấy đỉnh sinh trưởng, nhưng thông qua dinh dưỡng tự nhiên của gốc ghép. Đỉnh sinh trưởng làm mắt ghép có kích thước 0,2÷0,5 mm, được tách từ búp non đang sinh trưởng mạnh của cây mẹ trưởng thành, gốc ghép là mầm gia mới nảy từ hạt của giống hoang dại, toàn bộ cây ghép được nuôi dưỡng trong điều kiện ống nghiệm vô trùng. Những cây ghép thu được bằng phương pháp này hoàn toàn sạch bệnh và mang đặc điểm di truyền của cây mẹ cho mắt ghép.

Kỹ thuật vi ghép sẽ góp phần tạo nên những tập đoàn giống cây có múi hoàn toàn sạch bệnh làm nguyên liệu nhân giống cho sản xuất đại trà.

2.2 - Vi ghép cam chanh

2.2.1 - Gieo hạt lấy cây mầm làm gốc ghép

Tách hạt từ quả chín, rửa sạch và để khô trong vòng 24 giờ, cất giữ trong tủ lạnh ở 4°C, dùng dần. Khi gieo, bóc vỏ trấu, vỏ lụa, khử trùng 5÷10 phút bằng dung dịch HgCl 0,1%, gieo trên môi trường MS chứa 2% đường và 0,8% agar để ở 25°C nơi tối hoàn toàn, sau 10 ngày cây mầm dài 5÷8 cm được chọn làm gốc ghép.

2.2.2 - Tách đỉnh sinh trưởng

Chọn cây mẹ trưởng thành có năng suất và phẩm chất tốt, hái búp non dài 1,5 ÷ 3 cm, cho vào chai hay túi nilon kín, chuyển về phòng thí nghiệm. Cắt bỏ bớt lá, khử trùng bằng NaOCl 0,5% trong 5 phút. Dùng kim nhọn gạt bỏ những lá non, sau đó dùng lưỡi dao mổ nhọn cắt đỉnh sinh trưởng 0,5 mm để nguyên trên lưỡi dao để chuyển vào vị trí ghép.

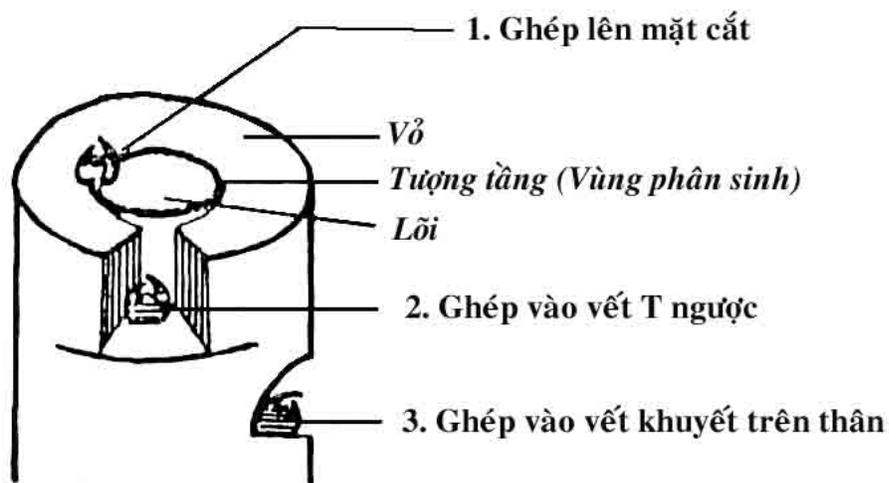
2.2.3 - Tiến hành ghép

Dùng dao mổ cắt bỏ đầu rễ, trụ trên lá mầm và hai lá mầm, để lại ở phần rễ chừng 2÷3 cm và phần thân chừng 2 cm. Có 3 cách ghép (hình V.2):

- Ghép lên mặt cắt: đặt mắt ghép trực tiếp lên bề mặt nhất ghép, trên vòng mô phân sinh.

- Ghép chữ T ngược: với đầu nhọn của lưỡi dao mổ, cắt ghép hình chữ T ngược, chân chữ T là mặt cắt của nó tiếp xúc với mô phân sinh.

- Ghép hàm ếch: khoét trên thân mầm cách mặt cắt 5 mm một vết lõm hình hàm ếch, chiều sâu vết lõm bằng chiều dày lớp vỏ. Đặt mắt ghép vào đất hàm ếch.



Hình V.2 - Vị trí mắt ghép trong 3 kiểu vi ghép

2.2.4 - Nuôi cây ghép

Cây ghép được đặt vào ống nghiệm lớn (200 x 25 mm) chứa 6 ml môi trường MS lỏng có hàm lượng đường cao là 7,5%. Để cây không chạm vào thành ống, dùng một mảnh giấy sắc ký 4,5 x 4,5 cm gấp thành hình lượn sóng. Để nuôi trong phòng 25°C, chiếu sáng 12 giờ/ ngày

3 - NUÔI CÂY CHỒI NGỌN

3.1 - Các giai đoạn nuôi cấy chồi ngọn

Nuôi cấy chồi ngọn là một kỹ thuật vi nhân giống quan trọng nhất. Kích thước chồi ngọn lớn hơn đỉnh sinh trưởng, thường dài từ 5 mm đến 1 hay 2 cm. Việc nuôi cấy chồi ngọn có thể loại trừ được nấm hay vi khuẩn từ mẫu cấy nhưng không loại bỏ được virus. Vì vậy trước khi đem nuôi cấy cần phải kiểm tra xem mẫu có bị mầm bệnh bên trong hay không. Hệ thống nhân giống bằng chồi ngọn gồm 4 giai đoạn (hình V.3):

- Giai đoạn khử trùng mẫu cấy
- Giai đoạn nhân nhanh
- Giai đoạn tạo rễ *in vitro*
- Giai đoạn thuần hóa cây *in vitro* ở vườn ươm.

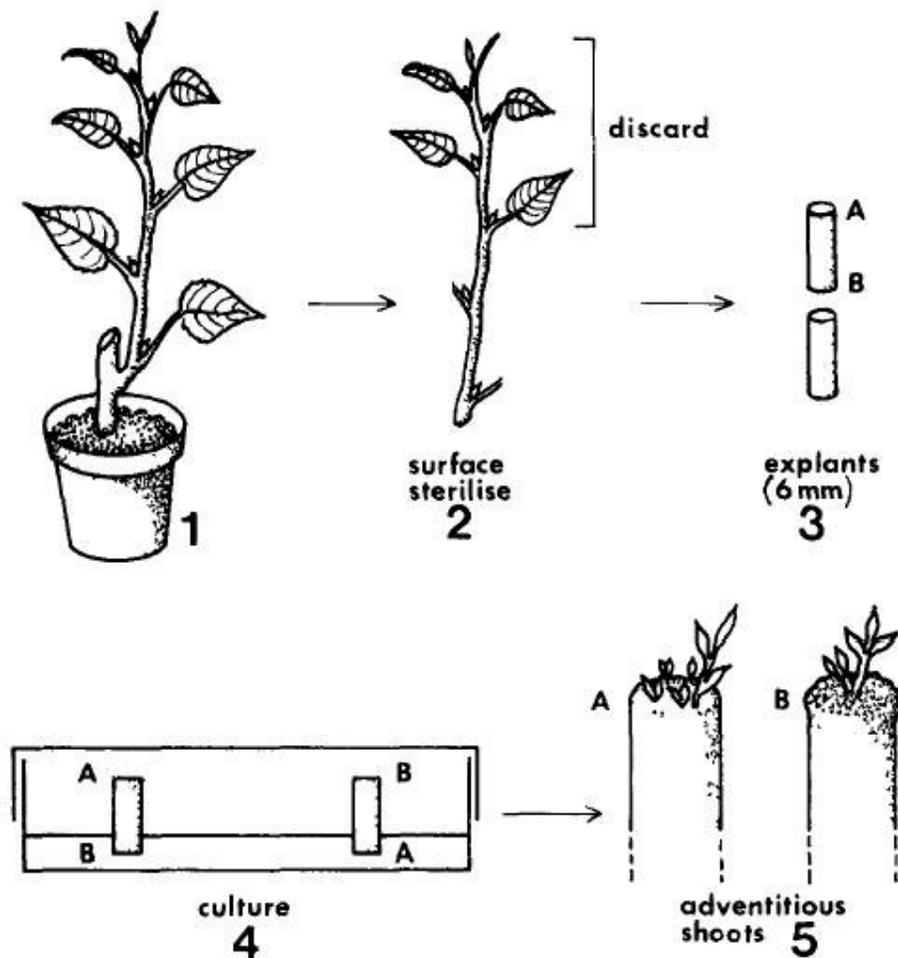
3.1.1. Giai đoạn khử trùng mẫu

Tùy theo loài thực vật mà chồi ngọn có các kích thước khác nhau. Chồi ngọn thường được cắt với kích thước 0,5÷1 cm. Phần chồi đỉnh này bao gồm một đỉnh sinh trưởng và một phần thân. Chồi ngọn được khử trùng bằng các tác nhân và thời gian khử trùng thích hợp.

Các chồi ngọn sau khi khử trùng được đặt vào môi trường nuôi cấy cơ bản đã hấp khử trùng. Môi trường nuôi cấy có thể lỏng hoặc đặc, chứa các muối khoáng đa lượng và vi lượng, đường sucrose và các vitamin. Các chất điều hoà tăng trưởng thực vật như cytokinin và auxin có thể được sử dụng ở nồng độ và tỷ lệ khác nhau tùy loài thực vật. Mục đích của giai đoạn này là đưa được mẫu cây sạch vào hệ thống nuôi cấy, tạo sự có mặt của mẫu cấy trong môi trường. Số lượng chồi bên được tạo ra tùy thuộc vào tính ưu thế của mỗi loài thực vật. Việc cấy truyền sang môi trường mới được thực hiện sau từ hai đến bốn tuần lễ.

3.1.2 - Giai đoạn nhân nhanh

Các cụm chồi được chia thành nhiều mảnh và cấy truyền lại. Số lượng vi chồi gia tăng theo cấp số nhân. Việc nhân nhanh các chồi bên do ức chế sự kéo dài lóng thân và kích thích việc tăng trưởng các chồi bên, chính là nhờ sự kiểm soát nồng độ và tỷ lệ cytokinin và auxin. Việc nhân nhanh và cấy truyền được tiếp tục để đáp ứng chương trình sản xuất cây giống.



Hình V.3. Sự tạo chồi bất định từ khúc cắt thân trong nuôi cấy *in vitro*. (1) Chuẩn bị đoạn cành. (2) Tách cành nuôi cấy. (3) Cắt khúc cắt nuôi cấy. (4) Nuôi cấy khúc cắt trên môi trường dinh dưỡng. (5) Chồi bất định tạo từ khúc cắt

Tính đồng nhất của các chồi sản xuất bằng vi nhân giống có những đặc điểm như sau:

- Tình trạng sinh lý của các chồi này thuận lợi cho việc tăng trưởng của các chồi bên, giảm sự kéo dài của chồi đỉnh và khả năng tạo rễ kém. Hệ số nhân giống có thể được tính dựa trên số lượng chồi mới hình thành ở mỗi lần cấy truyền.

- Hầu hết các chồi nuôi cấy *in vitro* là dị dưỡng, nghĩa là năng lượng không cần đến từ sự quang hợp mà đến từ đường trong môi trường nuôi cấy. Vì vậy, khí khổng có thể không hoạt động bình thường.

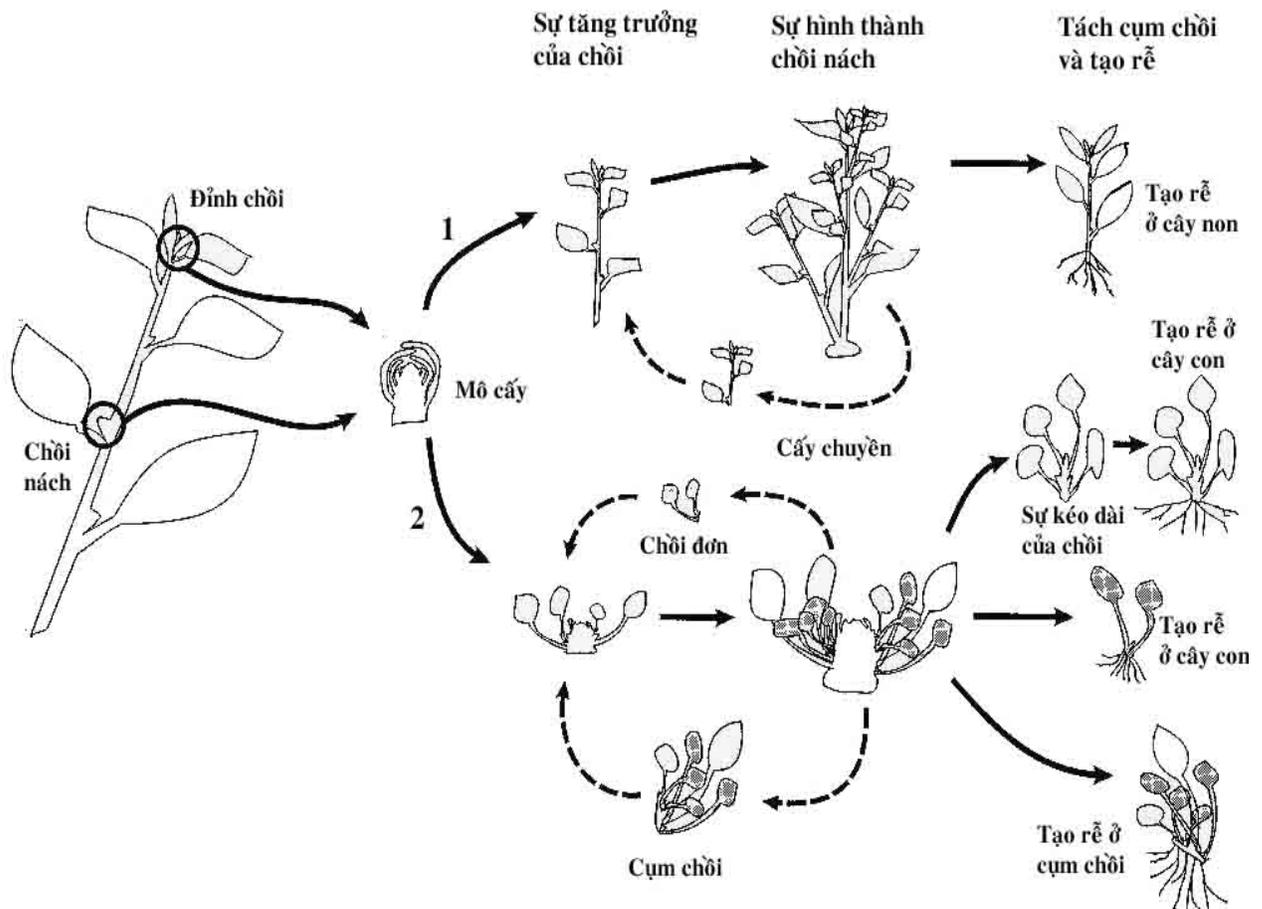
- Các chồi *in vitro* thường trương lên, nhạy cảm với ẩm độ và nhiệt độ, mẫn cảm với sâu bệnh hiện diện bên ngoài ống nghiệm. Lớp cutin ở lá mỏng và nhu mô diệp lục sắp xếp không bình thường.

3.1.2 - Giai đoạn tạo rễ cây *in vitro*

Ở giai đoạn này, cây *in vitro* được chuẩn bị đưa từ môi trường vô trùng ra môi trường vườn ươm. Các chồi sẽ được tách rời và cấy chuyển sang môi trường mới có nồng độ auxin cao hơn và cytokinin thấp hơn hay cả hai đều bị loại khỏi môi trường. Trong giai đoạn này, rễ cây *in vitro* được kích thích phát triển. Độ dài và khoẻ của bộ rễ cây là một yếu tố quan trọng giúp cho cây không bị stress khi được chuyển từ môi trường *in vitro* ra môi trường đất. Và yếu tố này cũng quyết định phần nào tỷ lệ cây con sống ngoài vườn ươm.

3.1.3 - Giai đoạn thuần hóa cây *in vitro* ở vườn ươm

Cây *in vitro* được chuyển ra vườn ươm và được làm thuần hóa cho phù hợp điều kiện khí hậu bên ngoài ống nghiệm. Ở giai đoạn này, cây *in vitro* chuyển từ điều kiện tăng trưởng dị dưỡng sang tự dưỡng, vì vậy, làm thế nào để chồi tiếp tục tăng trưởng là điều hết sức quan trọng. Thường thì khi chuyển, cây con được rửa sạch rễ. Việc rửa sạch rễ làm giảm yếu tố hai cây như côn trùng, vi khuẩn... Ngoài ra, mỗi lá của cây non cũng được cắt bớt đi một nửa để làm giảm sự thoát hơi nước. Việc cắt này sẽ không cần thiết nếu cây con được giâm trong các nhà kính có độ ẩm không khí cao.



Hình V.4 - Quy trình nuôi cấy chồi ngọn

1. Đối với các cây có chồi ngọn dài. 2. Đối với các cây có chồi ngọn điểm hoa thị

3.2 - Nhân giống bằng nuôi cấy chồi ngọn cây cà phê

3.2.1 - Vô trùng mô cấy

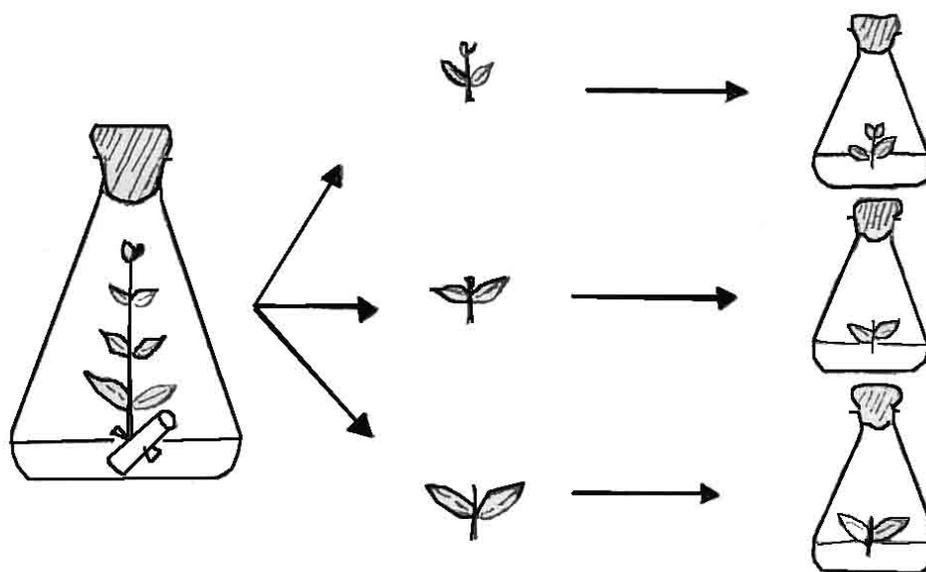
Cây cà phê mang nhiều chồi mọc thẳng và hai chồi bên ở mỗi đốt thân. Các đoạn chồi mọc thẳng dài 1,5÷2 cm, được cắt bỏ lá, rửa sạch dưới vòi nước máy. Tiến hành vô trùng các đoạn chồi bằng HClO 10% trong 15 phút, rửa sạch bằng nước cất vô trùng. Tiếp tục xử lý cồn 70° trong 30 giây, rửa lại bằng nước cất vô trùng nhiều lần. Thấm khô, sau đó đặt vào môi trường nuôi cấy.

Môi trường nuôi cấy có thành phần khoáng đa lượng bằng ½ khoáng đa lượng của môi trường MS, vi lượng MS, vitamin Morel, sắt-EDTA theo MS, đường sucrose 30 g/lít, nước dừa 10%, 5 mg/lít BA và 0,1 mg/lít IBA.

Các mẫu được đưa vào phòng nuôi cấy có nhiệt độ 28÷30°C, độ chiếu sáng 2500÷3000 lux, 8 giờ/ngày.

3.2.2 - Giai đoạn nhân nhanh

Trong điều kiện nuôi cấy trên, các chồi ngủ bắt đầu phát triển sau 15 ngày. Sau hơn 60 ngày chồi đã được 4 cặp lá có thể cấy truyền lần 1 theo hình sau:



Hình V.5 - Phương pháp cấy truyền cây cà phê *in vitro*

Sau 60 ngày có thể cấy truyền lần 2, 3, 4... theo đúng thao tác ở lần cấy truyền thứ nhất.

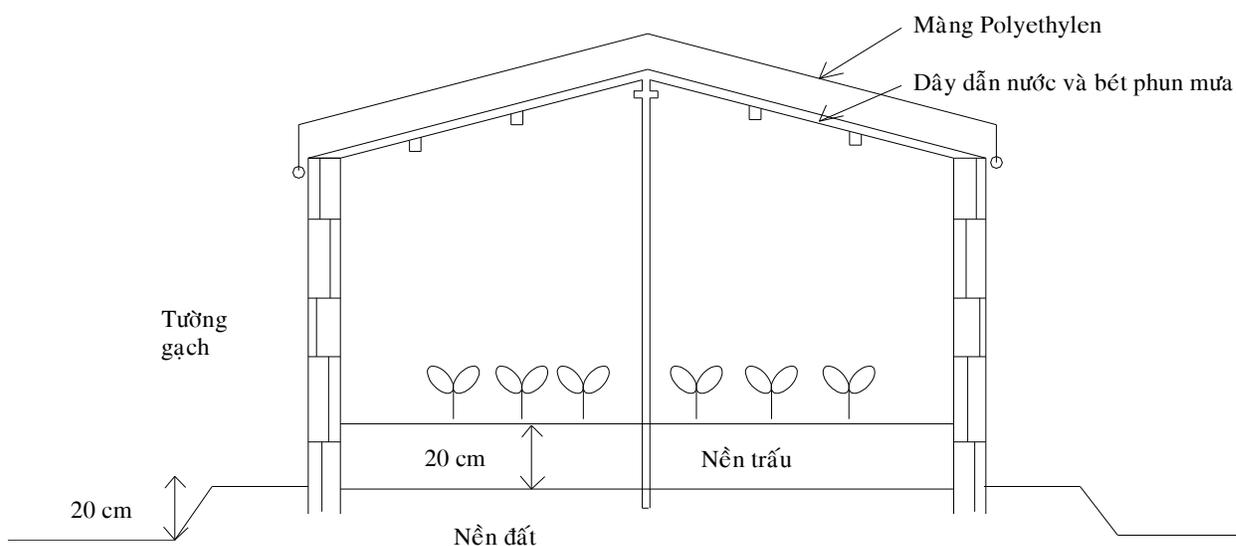
3.2.3- Giai đoạn tạo rễ

Các cây con cà phê dễ dàng hình thành rễ nếu được cấy truyền sang môi trường MS không có BA. Sau khoảng 15 ngày hệ rễ bắt đầu xuất hiện và phát triển. Tuy nhiên bộ rễ này thường được cắt bỏ khi cây được chuyển ra ngoài vườn ươm.

3.2.4 - Chuyển cây con ra vườn ươm

Cây cà phê con có chiều cao khoảng từ 5÷6 cm, thu được từ phương pháp nhân giống *in vitro* được cắt bỏ bộ rễ hình thành trong ống nghiệm. Cắm các cây này trên mặt trấu ở bể giâm (hình V.5) thành hàng có khoảng cách 5÷5 cm, tưới phun nhân tạo 4 lần/ngày, mỗi lần 1 giờ trong suốt 7 ngày. Sau đó giảm xuống 3 lần/ngày, mỗi lần 30 phút. Trong điều kiện như vậy, cây cho rễ mới sau khi cấy vào bể giâm từ 7÷10 ngày.

Sau 20 ngày, cây có bộ rễ phát triển được đem ra trồng ở luống đất.



Hình V.6 - Cấu tạo của bể giâm trong nhà ươm



Hình V.7. Hệ thống bể giâm và nhà ươm cây khoai tây cấy mô

4 - NUÔI CẤY TẠO MÔ SỢ

4.1 - Sự hình thành mô sẹo

Mô sẹo là một khối tế bào phát sinh vô tổ chức, có hình dạng không nhất định, do không có lớp nhu mô. Mô sẹo được hình thành từ mặt cắt của thân hay rễ, bao gồm tế bào nhu mô và thành phần tế bào sàng. Mô sẹo hình thành ở hầu hết các bộ phận của cây (thân, lá, rễ) khi nơi đó có vết cắt. Điều quan trọng được nhận thấy ở đặc tính của mô sẹo là mô sẹo phát triển không theo quy luật nhưng có khả năng biệt hoá thành chồi, rễ và phôi để có thể hình thành cây hoàn chỉnh.

Đặc điểm sinh trưởng của mô sẹo có quan hệ với cơ quan hình thành mô sẹo, thành phần môi trường nuôi cấy và điều kiện nuôi cấy. Sự hình thành mô sẹo chia ra 3 giai đoạn: phát sinh mô sẹo, phân chia tế bào và biệt hóa.

4.1.1 - Giai đoạn phát sinh mô sẹo

Trong giai đoạn này, sự trao đổi chất kích thích tế bào chuẩn bị phân chia. Giai đoạn này dài hay ngắn phụ thuộc vào tình trạng sinh lý của mô được đưa vào nuôi cấy và điều kiện nuôi cấy.

4.1.2 - Giai đoạn phân chia tế bào

Tế bào trong giai đoạn này phân chia tăng sinh khối rất nhanh tạo thành những khối tế bào lồi lên. Khối tế bào này là mô sẹo.

4.1.3 - Giai đoạn biệt hoá

Tế bào đi vào quá trình biệt hoá, xuất hiện sự biệt hoá tế bào và sự xuất hiện các con đường trao đổi chất dẫn đến sự sản xuất các chất thứ cấp có hoạt tính sinh học. Mô sẹo thường có màu vàng, trắng, xanh hay màu sắc tố anthocyanin. Sự biệt hoá của tế bào hình thành những chất liệu cấu tạo nhu mô các loại, các tế bào sàng... hơn nữa hình thành vùng mô phân sinh, trung tâm của sự tạo chồi và rễ.

Để tạo mô sẹo, trong môi trường nuôi cấy có bổ sung chất sinh trưởng. Phụ thuộc vào từng loại mô nuôi cấy mà chất sinh trưởng thêm vào có khác nhau. Để tạo mô sẹo thường sử dụng nhất là auxin (2,4-D).

Sau khi mô sẹo được hình thành, mô sẹo được cấy chuyên. Môi trường cấy truyền cũng giống như môi trường tạo mô sẹo nhưng chất sinh trưởng được giảm nồng độ. Kích thước tách mô sẹo nhỏ vừa phải để tế bào phát triển mạnh nhất, thường cụm mô sẹo có kích thước 5÷10 mm và có trọng lượng 20÷100 mg, thời gian giữa hai lần cấy truyền là 20÷30 ngày phụ thuộc vào từng loại mô sẹo. Trong quá trình phát triển mô sẹo thường xuất hiện 2 loại tế bào:

- Loại tế bào xốp, có không bào to, nhân to và tế bào chất loãng. Loại tế bào này rất khó tái sinh thành cơ quan.

- Loại tế bào chặt, có không bào nhỏ, nhân to và tế bào chất đậm đặc. Loại tế bào này dễ tái sinh thành cơ quan.

Mô sẹo cấy truyền càng nhiều lần khả năng tái sinh càng giảm.

4.2 - Sự hình thành chồi từ mô sẹo

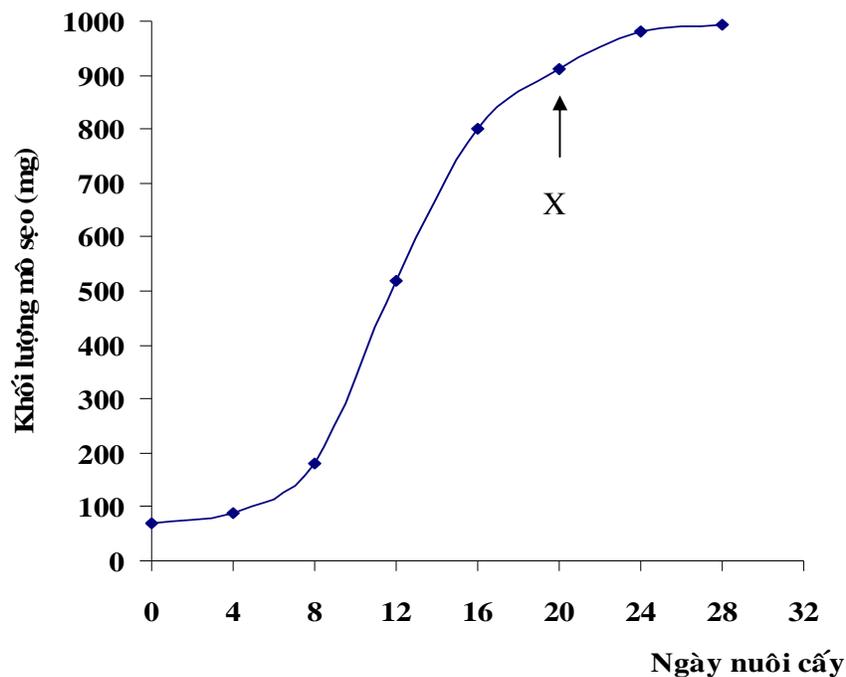
Sự hình thành chồi từ mô sẹo được kích thích bởi:

- Các chất sinh trưởng đưa vào môi trường.
- Chất được sản sinh ra trong nuôi cấy mô sẹo.
- Các chất có chứa sẵn trong mẫu nuôi cấy.

Khả năng hình thành chồi từ mô sẹo phụ thuộc vào số lần cấy truyền mà các chất có trong mẫu không có khả năng tổng hợp trong thời gian dài và sự hình thành tế bào xốp. Ngoài ra, sự hình thành chồi được điều khiển bằng hoá chất:

- Tỷ lệ cytokinin/auxin từ 10÷100.
- Carbohydrate như sucrose và các chất hữu cơ như casein hydrolysate (casein thuỷ phân).
- Điều kiện nuôi cấy.

Quá trình tạo rễ cần auxin, đường, khoáng, nhiệt độ, ánh sáng... Adenin sulfate có tác dụng cản trở auxin. GA₃ cản trở sự sinh tổng hợp và tích lũy hạt tinh bột, cần thiết trong hình thành chồi. Sự hình thành chồi nhiều khi lại xảy ra trên môi trường không chất sinh trưởng, hay có cytokinin và không có auxin. Để tạo rễ thường dùng phloroglucinol + IBA có hiệu quả hơn chỉ dùng auxin.



Hình V.8 - Sinh trưởng và phát triển của mô sẹo
(X): thời điểm cấy truyền mô sẹo

4.3 - Nhân giống thuốc lá bằng nuôi cấy mô sẹo

4.3.1 - Tạo nguyên liệu dùng cho nuôi cấy mô sẹo

- Hạt thuốc lá được rửa dưới vòi nước máy cho sạch bụi đất. Lắc hạt trong cồn 70° trong 1 phút. Rửa sạch cồn bằng nước cất vô trùng 5÷6 lần. Cấy hạt lên môi trường MS.

- Trong điều kiện *in vitro*, cây thuốc lá được cấy truyền trong môi trường MS. Cây sau 20÷25 ngày (cây khoẻ và trên thân chưa mọc các rễ bất định), cao 10÷12 cm, có 8÷10 lá, nhiều rễ mọc sâu trong môi trường. Cây thuốc lá này được dùng làm nguyên liệu để tạo mô sẹo.

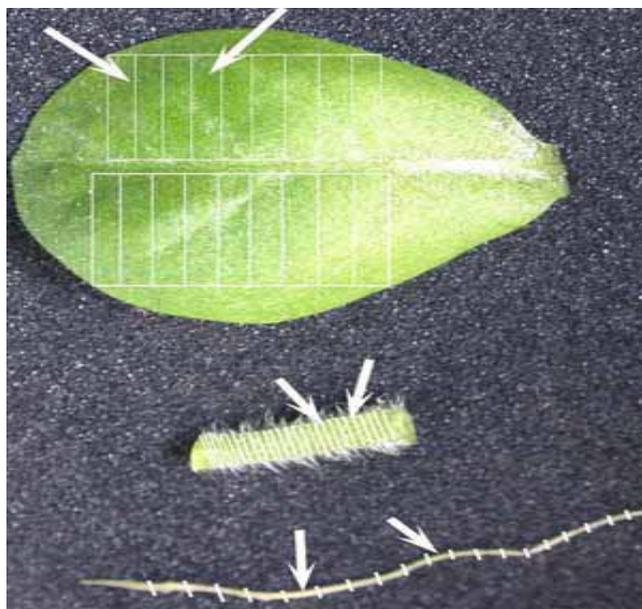
4.3.2 - Tạo mô sẹo

Các bộ phận của cây thuốc lá: lá, thân, rễ được sử dụng để tạo mô sẹo (hình V.7):

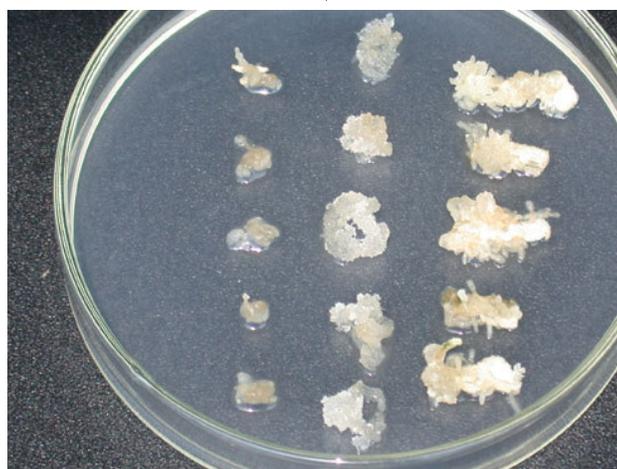
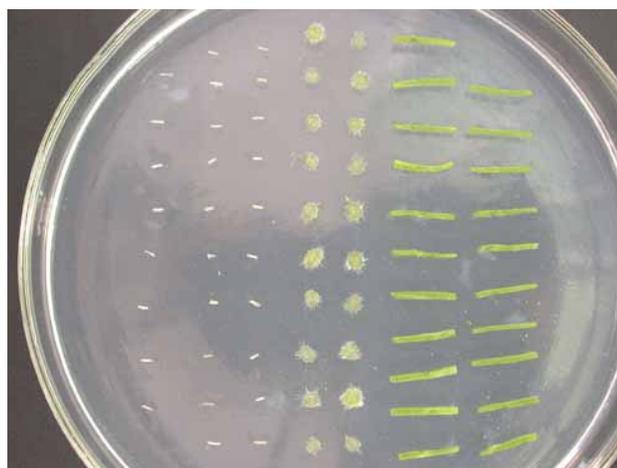
- Lá được cắt bỏ gân và rìa lá. Phần lá còn lại được cắt thành nhiều mảnh nhỏ với kích thước 0,8÷1mm x 8÷10mm. Các mảnh lá này được nuôi trên môi trường bổ MS bổ sung hormon 2,4-D có nồng độ 1µmol cho sự tạo mô sẹo.

- Lóng thân có đường kính 2÷2,5 mm được cắt lát mỏng 0,5÷1 mm bằng lưỡi dao mổ sắc. Các lát này được đặt nuôi trên môi trường MS có bổ sung hormon nồng độ 1µmol cho sự tạo mô sẹo.

- Rễ được rửa sạch agar bằng nước cất vô trùng, cắt nhỏ thành đoạn 1÷1,5 mm đặt lên môi trường MS có bổ sung hormon nồng độ 0,1µmol.



Hình V.9 - Cách cắt mẫu từ các bộ phận cây thuốc lá



Hình V.10 - Sự hình thành mô sẹo từ các bộ phận của cây thuốc lá

Các mẫu được nuôi cấy 3÷5 ngày, mô sẹo bắt đầu sùi lên xung quanh mẫu cấy. Tuy nhiên, thời gian mô sẹo sùi lên khác nhau ở các loại mô khác nhau. Từ ngày thứ 5 đến ngày thứ 20 mô sẹo tăng nhanh về kích thước. Mô sẹo có màu trắng trong, đặc (hình V.8).

4.3.3 - Tái sinh cây từ mô sẹo

- Sau 4 tuần chuyển mẫu từ môi trường tạo mô sẹo sang môi trường tái sinh có bổ sung BA, nhận thấy mô sẹo biệt hoá thành chồi. Ở giai đoạn đầu tiên, mô sẹo tiếp tục phát triển (kích thước tăng nhanh) và hoá xanh lục trong điều kiện nuôi có chiếu sáng. Đến cuối tuần thứ 3, qua kính lúp có thể thấy chồi hình thành từ những tế bào mô sẹo (hình V.9).

- Sau thời gian 20÷25 ngày các cụm chồi tăng trưởng mạnh có kích thước lớn, dùng dao tách riêng các chồi. Cấy truyền sang môi trường tái sinh cây. Từ các chồi, các rễ xuất hiện ăn sâu vào môi trường.

- Khoảng 60 ngày, các cây thuốc lá hình thành từ chồi tái sinh cao khoảng 10÷12 cm, có khoảng 8 lá, được chuyển ra vườn ươm.



Hình V.11 - Chồi tái sinh từ mô sẹo

B - VI NHÂN GIỐNG QUANG TỰ DƯỠNG

1 - LỊCH SỬ HÌNH THÀNH PHƯƠNG PHÁP VI NHÂN GIỐNG QUANG TỰ DƯỠNG

Vi nhân giống quang tự dưỡng (photoautotrophic micropropagation) là một phương pháp mới do giáo sư Toyoki Kozai và các cộng sự (Đại học Chiba, Nhật Bản) khởi xướng từ năm 1986 và tập trung nghiên cứu trong suốt thập niên cuối thế kỷ 20 đến ngày nay nhằm giúp hạ giá thành cây con và tự động hóa quá trình nuôi cấy.

Phương pháp vi nhân giống quang tự dưỡng là một phương pháp vi nhân giống sử dụng môi trường không có đường, mà sự tăng trưởng hay tích lũy các hydratcarbon tùy thuộc vào sự quang hợp và sự hấp thu khoáng vô cơ của thực vật được nuôi cấy. Vì vậy, phương pháp này còn được gọi là phương pháp vi nhân giống không đường (sugar-free micropropagation).

Những ý tưởng về vi nhân giống quang tự dưỡng xuất phát từ những nghiên cứu gần đây phơi bày khả năng quang hợp khá cao của thực vật nuôi cấy có chứa diệp lục tố như những mẫu nuôi cấy có mang lá, các phôi vô tính ở giai đoạn có lá mầm và các cây *in vitro*. Các nghiên cứu này cũng đã chứng minh sự tăng trưởng của những mẫu nuôi cấy này và tỷ lệ sống sót của cây cấy mô ở vườn ươm được cải thiện đáng kể khi tốc độ vận chuyển khí trong bình nuôi cấy được gia tăng. Điều này cho thấy tầm quan trọng của các thành phần khí trong bình nuôi cấy. Các mẫu thực vật có diệp lục tố có thể tăng trưởng mạnh mẽ trong môi trường nuôi cấy

không đường khi mà các yếu tố của môi trường không khí (cường độ ánh sáng, thời lượng chiếu sáng, thành phần không khí, ẩm độ, nhiệt độ, sự khuếch tán khí hòa tan và tốc độ luân chuyển của không khí trong bình nuôi cấy...) được cải thiện nhằm thúc đẩy sự quang hợp, thoát hơi nước và hấp thu khoáng vô cơ của mẫu nuôi cấy. Trong vi nhân giống quang tự dưỡng sử dụng mẫu nuôi cấy có diệp lục tố, các hợp chất hữu cơ như các chất điều hoà tăng trưởng thực vật thường dùng cho sự ra rễ, các vitamin và các acid amin không cần thiết sử dụng trong hầu hết các trường hợp.

2 - CÁC NHƯỢC ĐIỂM CỦA PHƯƠNG PHÁP NUÔI CẤY MÔ TRUYỀN THỐNG (CONVENTIONAL MICROPROPAGATION)

- Hiệu suất quang hợp cây *in vitro* thấp. Cây thiếu khả năng tự dưỡng. Tỷ lệ thoát hơi nước cao do lớp tế bào cutin mỏng cùng với hoạt động không bình thường của khí khổng.

- Tỷ lệ nhiễm nấm khuẩn cao do sự hiện diện của đường và vitamin trong môi trường nuôi cấy.

- Bình nuôi cấy thường quá nhỏ và kín (để tránh nhiễm nấm khuẩn) khiến cho việc tự động hoá quá trình nuôi cấy khó thực hiện, đồng thời công lao động cao.

- Không khí bên trong bị bão hoà hơi nước.

- Chất điều hoà sinh trưởng thường xuyên được sử dụng.

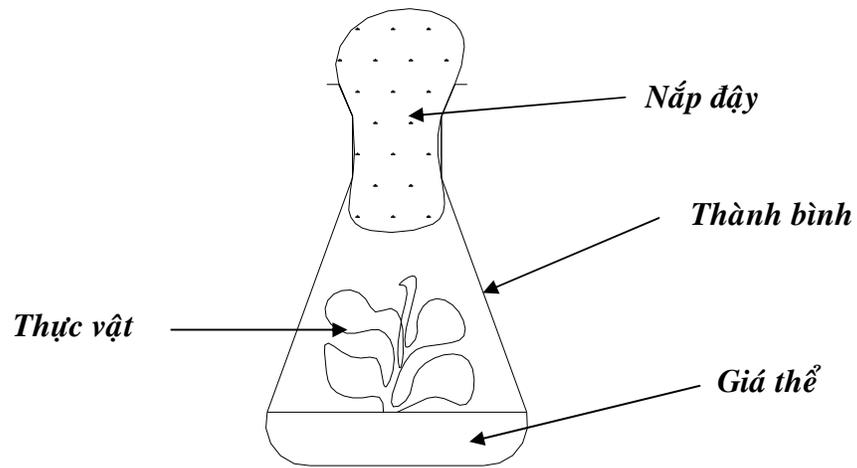
- Xảy ra các hiện tượng bất thường về sinh lý chẳng hạn sự hóa thủy tinh thể (vitrification) hoặc phát sinh hình thái dẫn đến chậm phát triển hoặc biến dị (soma variation) của cây cấy mô.

- Cây ra rễ không hoàn chỉnh. Trong một số trường hợp còn có sự hình thành mô sẹo ở gốc.

3 - KHÁI NIỆM PHƯƠNG PHÁP VI NHÂN GIỐNG QUANG TỰ DƯỠNG

3.1 - Khái niệm bình nuôi cấy

Bình nuôi cấy (hình V.10) được xem là một hệ thống trồng cây con trong điều kiện vô trùng. Bình nuôi cấy được làm từ thủy tinh hay nhựa trong suốt cho phép ánh sáng truyền từ ngoài môi trường vào trong bình. Với ý nghĩa như thế, bình nuôi cấy mô được xem là một nhà kính thu nhỏ.



Hình V.12 - Bình nuôi cấy



Hình V.13 - Nhà kính

Sự khác biệt giữa bình nuôi cấy mô và nhà kính trong khái niệm sản xuất cây trồng: nhà kính (hình V.11) là một hệ thống có các điều kiện môi trường được kiểm soát còn bình nuôi cấy thì không. Đến nay đã có rất nhiều nghiên cứu về môi trường liên quan đến việc kiểm soát môi trường ở nhà kính, nhưng có rất ít nghiên cứu về môi trường nuôi cấy *in vitro* (môi trường trong bình nuôi cấy). Việc kiểm soát môi trường nhà kính làm chất lượng và số lượng cây trồng tăng đáng kể. Liệu sự tăng trưởng và chất lượng cây *in vitro* có được gia tăng khi có sự kiểm soát môi trường *in vitro* hay không? Cây trong tự nhiên có khả năng sử dụng CO₂ của không khí. Vậy phải chăng cây nuôi cấy *in vitro* cũng có thể sử dụng CO₂ của không khí và không cần đường trong môi trường nuôi cấy?

Xuất phát từ mục đích muốn khắc phục các hạn chế của phương pháp nuôi cấy mô *in vitro* truyền thống và trả lời những câu hỏi đặt ra như trên, đã có rất nhiều phương pháp được thực hiện trong đó một phương pháp có tính đột phá là phương pháp “vi nhân giống quang tự dưỡng”.

Vi nhân giống quang tự dưỡng là một phương pháp nhân giống mới do giáo sư Toyoki Kozai và các cộng sự (Đại học Chiba, Nhật Bản) khởi xướng từ năm 1986 và tập trung nghiên cứu trong suốt thập niên cuối của thế kỷ XX đến ngày nay.

3.2 - Khái niệm vi nhân giống quang tự dưỡng

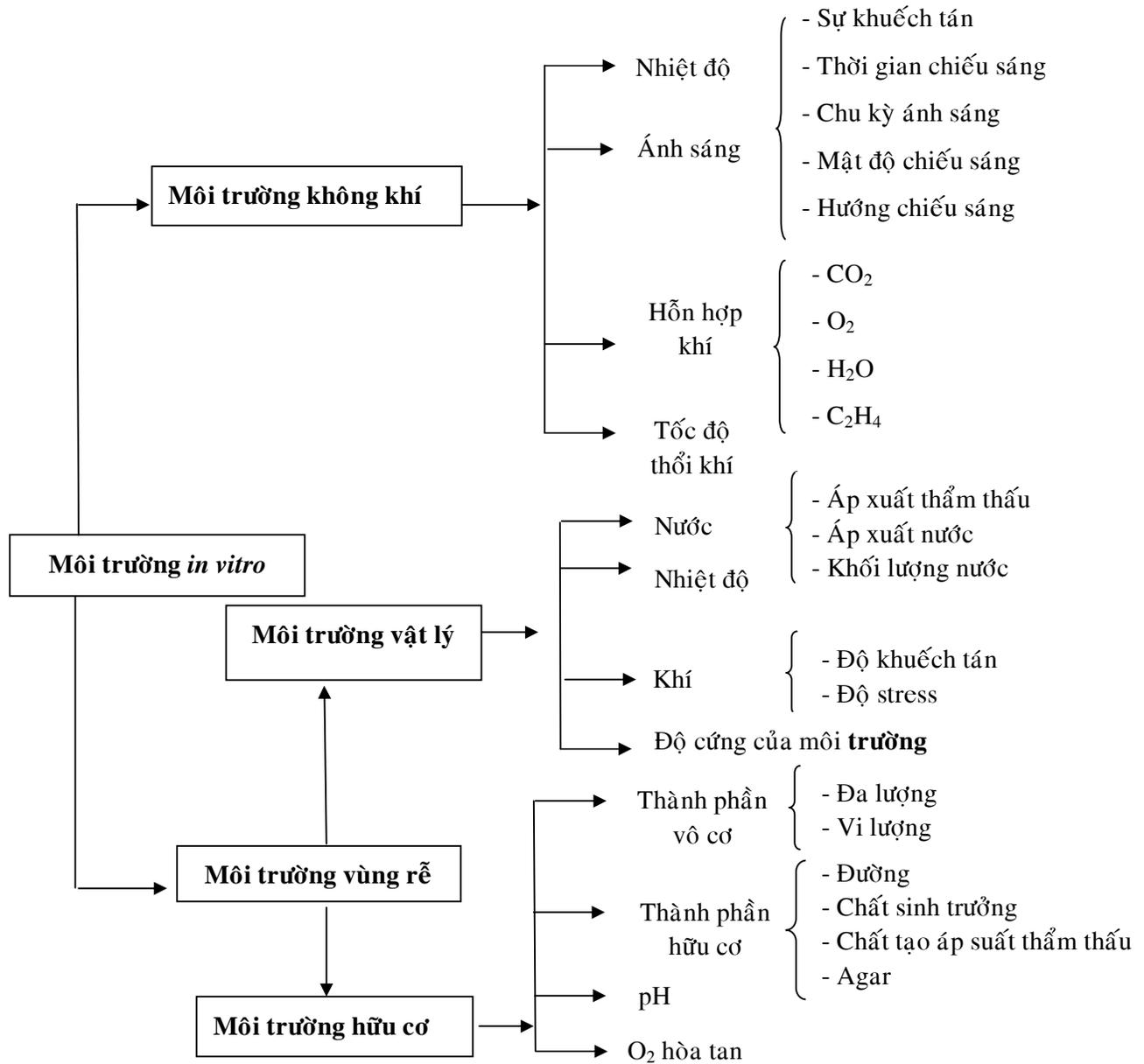
Phương pháp vi nhân giống quang tự dưỡng là một phương pháp nhân giống sử dụng môi trường không có đường, mà sự tăng trưởng hay tích lũy các hydratcarbon tùy thuộc vào sự quang hợp và sự hấp thu khoáng vô cơ của thực vật được nuôi cấy. Vì vậy, phương pháp này còn được gọi là phương pháp vi nhân giống không sử dụng đường.

3.3 - Cơ sở của phương pháp vi nhân giống quang tự dưỡng

Phương pháp vi nhân giống quang tự dưỡng đã được tập trung nghiên cứu trong suốt thập niên vừa qua nhằm thúc đẩy sự tăng trưởng của cây nuôi cấy *in vitro*, rút ngắn thời gian nuôi cấy và hạ giá thành cây *in vitro*.

Phương pháp mới này chú trọng đến các tác nhân vật lý, hóa học của môi trường nuôi cấy (các ion khoáng, sự khuếch tán khí hòa tan) và các yếu tố ảnh hưởng đến sự phát triển cây con trong bình nuôi cấy (cường độ ánh sáng, thời lượng chiếu sáng, thành phần không khí, ẩm độ, nhiệt độ và tốc độ luân chuyển của không khí trong bình nuôi cấy...) (hình V.12). Thay vì chỉ nghiên cứu thành phần hóa học của môi trường nuôi cấy như nồng độ đường, muối khoáng, vitamin hay việc sử dụng các chất kích thích tăng trưởng thực vật mà các nhà nghiên cứu vẫn thường quan tâm. Đặc điểm chính của phương pháp mới này là: không sử dụng đường, vitamin và hạn chế sử dụng các chất kích thích sinh trưởng thực vật trong môi trường nhân giống. Điều này được dựa trên cơ sở là trong tự nhiên tất cả các cây xanh chứa diệp lục tố đều có khả năng tự quang hợp để tồn tại và phát triển.

Như vậy, những nghiên cứu về môi trường tự nhiên, sinh lý môi trường tự nhiên, sinh lý môi trường *in vitro* và kiểm soát môi trường *in vitro* trong nhân giống vô tính là rất quan trọng. Do đó, nghiên cứu những tác nhân môi trường *in vitro* ảnh hưởng đến sinh trưởng và phát triển cây *in vitro* là rất cần thiết để nâng cao chất lượng cây *in vitro* cũng như giá thành cây *in vitro*.



Hình V.14 – Sơ đồ các nhân tố môi trường *in vitro* ảnh hưởng đến sinh trưởng và phát sinh hình thái cây *in vitro*

4 - KIỂM SOÁT CÁC ĐIỀU KIỆN MÔI TRƯỜNG NUÔI CẤY *IN VITRO*

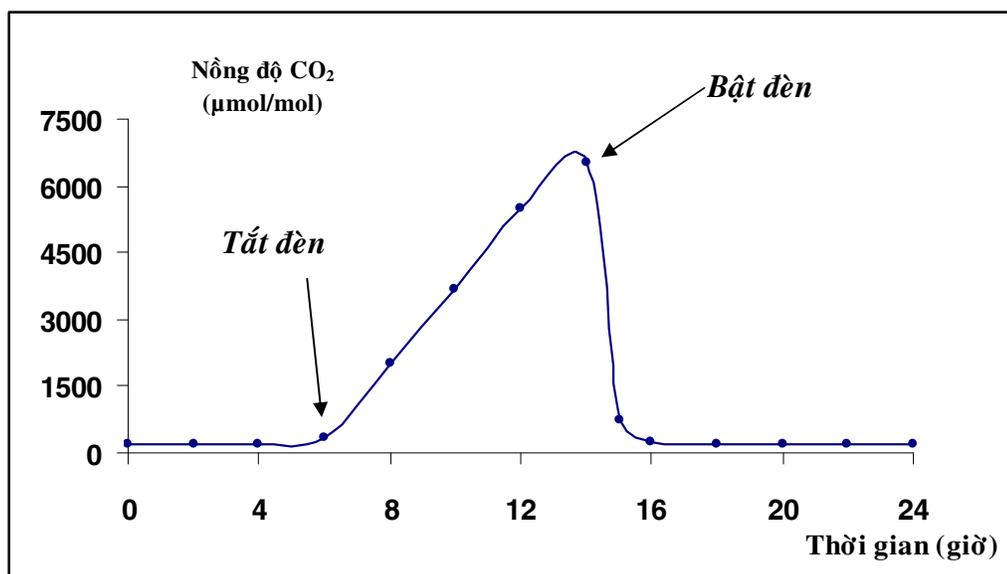
4.1 - Điều khiển nồng độ CO₂ trong bình nuôi cấy

Nồng độ CO₂ trong bình nuôi cấy cây có diệp lục thường giảm xuống rất thấp trong điều kiện được chiếu sáng. Mức CO₂ này thấp hơn điểm bù CO₂ (50÷100μmol/mol). Tuy nhiên, nồng độ CO₂ lại gia tăng khi cây được đặt trong tối. Điều này ảnh hưởng rất lớn đến khả năng và hiệu suất quang hợp của cây *in vitro*.

Trên cơ sở các thực nghiệm về nồng độ CO₂ trong các bình nuôi cấy (hình V.13) và đặc tính quang hợp của thực vật, cho thấy :

- Thực vật có lá xanh đều có khả năng quang hợp.

- Khả năng quang hợp bị hạn chế do nồng độ CO₂ thấp trong suốt chu kỳ ánh sáng.
- Thực vật sẽ sinh trưởng theo phương thức dị dưỡng hay dinh dưỡng ánh sáng.
- Thực vật sẽ sinh trưởng nhanh khi quang tự dưỡng ở nồng độ CO₂ cao.



Hình VI.15 - Sự thay đổi nồng độ CO₂ trong bình nuôi cấy cây có diệp lục tố (quang kỳ là 0-6 giờ và 14-24 giờ)

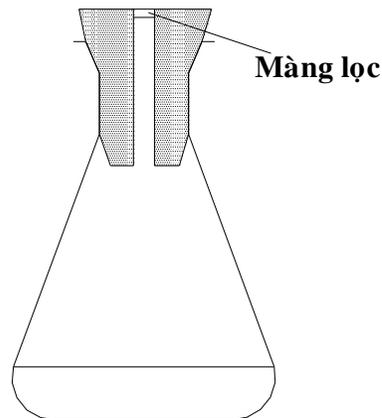
Phương thức quang tự dưỡng tạo điều kiện tối đa cho cây trong bình nuôi cấy sử dụng khí CO₂ có sẵn trong không khí làm nguồn carbon chính cho quá trình tăng trưởng và phát triển của cây. Nồng độ CO₂ trong bình nuôi cấy có thể tăng bằng 3 cách:

- Các bình nuôi cấy có các nắp đậy có khả năng trao đổi khí dễ dàng giữa trong và ngoài bình thông qua các lỗ có đường kính 0,8÷1cm được tạo ra trên nắp bình (hình V.14). Mỗi lỗ được dán kín bằng một màng lọc với các lỗ li ti có đường kính từ 0,2÷0,5μm để ngăn bụi và vi khuẩn. Sự gia tăng trao đổi khí trong và ngoài bình nuôi cấy ngoài việc làm gia tăng nồng độ khí CO₂ trong bình còn giúp giảm bớt các thành phần khí có tác dụng ức chế sự tăng trưởng của cây con như ethylen (C₂H₄) được tạo ra trong quá trình tăng trưởng của cây nuôi cấy *in vitro*.

- Do hạn chế sử dụng đường và các chất hữu cơ (tỷ lệ nhiễm nấm khuẩn giảm), các bình nuôi cấy có diện tích lớn có thể được sử dụng nhằm tăng lượng khí trong bình.

- Việc sử dụng các bình lớn sẽ đạt hiệu quả cao khi áp dụng phương pháp bơm không khí có nồng độ CO₂ tối hảo đối với thực vật khoảng 0,1 % (nồng độ CO₂ trong không khí là 0,034% μmol/mol) vào thẳng bình nuôi cấy để cây *in vitro*

luôn trong tình trạng không bị thiếu CO₂ trong suốt quá trình tăng trưởng và phát triển của cây.



Hình VI.16 - Bình nuôi cấy với nút đậy có các lỗ thông khí gắn màng lọc

4.2 - Kiểm soát chế độ chiếu sáng

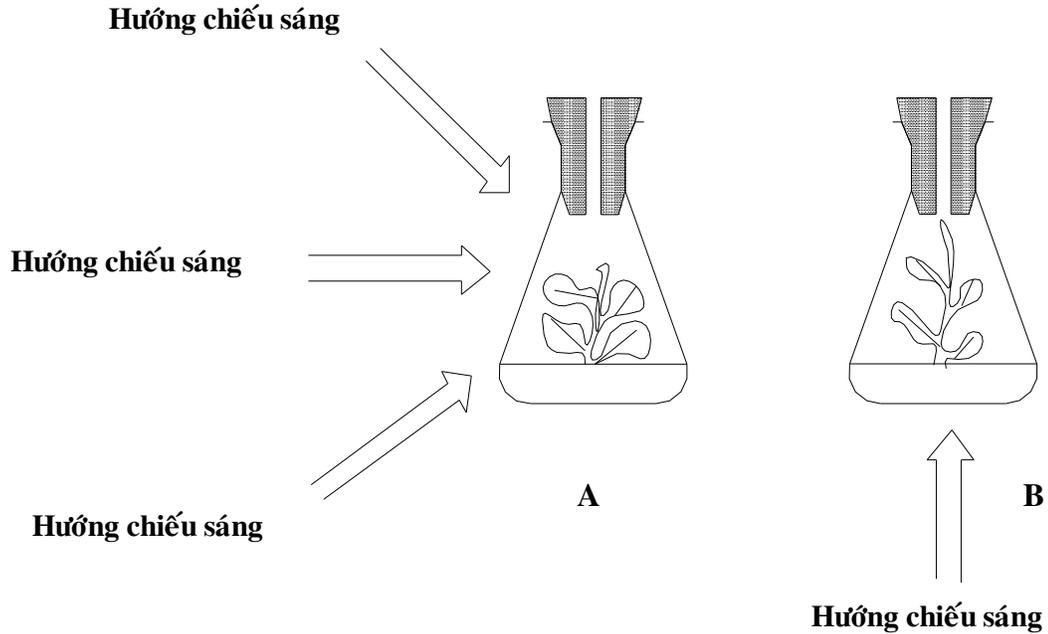
Đơn vị đo cường độ ánh sáng trong các nghiên cứu về thực vật hiện nay là lux. Tuy nhiên, lux không diễn tả được môi trường ánh sáng do ánh sáng được đo dựa trên cơ sở mắt nhìn thấy. Do vậy, để diễn tả môi trường ánh sáng ảnh hưởng đến quang hợp, thường dùng đơn vị mật độ quang tử ($\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) và năng lượng ánh sáng (W/m^2).

Cường độ ánh sáng mà thực vật sử dụng trong các phản ứng quang hợp có dải bước sóng từ 400÷700 nm, với đỉnh từ 600÷680 nm. Sự phát sinh hình thái do ánh sáng (sự nảy mầm, kéo dài đốt thân...) xảy ra ở những dải bước sóng từ 400÷500 nm (xanh lục), 600÷700 nm (đỏ) và 700÷800 (siêu đỏ).

Hiệu quả quang hợp của thực vật *in vitro* phụ thuộc rất nhiều vào chất lượng ánh sáng, quang kỳ, và hướng chiếu sáng.

4.2.1 - Hướng chiếu sáng

Cây khoai tây được nuôi cấy trong bình nuôi cấy. Dùng hệ thống chiếu sáng mặt bên (ở phần trên, phần giữa và phần dưới) (hình V.15), ngoài ra còn chiếu sáng từ dưới đáy hộp lên. Sau 28 ngày nhận thấy, cây khoai tây được chiếu sáng mặt bên thấp hơn cây được chiếu sáng từ dưới đáy hộp lên khoảng 3,5 cm, nhưng ngược lại trọng lượng tươi và diện tích lá lớn hơn 1,8 lần. Không có sự khác biệt nào về sinh trưởng và phát triển ở các phần chiếu sáng mặt bên (trên, giữa, dưới). Ngoài ra, tỷ lệ sống sót của cây chiếu sáng mặt bên cao hơn hẳn cây chiếu từ đáy lên ở giai đoạn thuần hóa.



Hình VI.17 - Ảnh hưởng của hướng chiếu sáng đến thực vật *in vitro*.

A: chiếu mặt bên, B: chiếu dưới đáy

4.2.2 - Chu kỳ chiếu sáng

Ở cây ăn trái, thực nghiệm với nhiều chu kỳ chiếu sáng (sáng/tối) trong một ngày 24 giờ như sau: 16/8, 8/4, 4/2, 2/1 giờ, với thời gian chiếu sáng tổng cộng trong một ngày là 16 giờ. Kết quả cho thấy chu kỳ chiếu sáng 6 giờ (4/2), tổng thời gian chiếu sáng 16 giờ/ngày cho chồi thân sinh trưởng tốt nhất. Việc xen kẽ các thời gian tối giúp tích lũy CO₂ trong bình nuôi cấy. Lượng CO₂ tích lũy này sẽ cung cấp cho thực vật trong thời gian chiếu sáng.

4.2.3 - Chất lượng và cường độ ánh sáng

Cây nuôi cấy ở ánh sáng đỏ và xanh lục gia tăng chiều cao chồi thân có ý nghĩa so với ánh sáng trắng. Sự ảnh hưởng của các yếu tố bước sóng ánh sáng này liên quan trực tiếp đến sự nhận ánh sáng của các sắc tố quang hợp trong hạt diệp lục. Các sắc tố diệp lục có khả năng thu nhận các bước sóng của ánh sáng đỏ tốt nhất.

Khác với phương pháp vi nhân giống truyền thống (cường độ ánh sáng dùng để chiếu sáng thường từ 2000÷2500 lux), phương pháp vi nhân giống quang tự dưỡng sử dụng ánh sáng dùng để chiếu sáng có cường độ rất cao 80÷170 μmol/m²/s tương đương 6,1÷13 Klux tùy từng loại cây. Ở các cường độ chiếu sáng cao, hiệu suất quang hợp của thực vật được gia tăng đáng kể.

4.3 - Nhiệt độ không khí (air temperature)

Ứng dụng nhiệt độ cách biệt trong giai đoạn chiếu sáng và giai đoạn tối để điều khiển sự tăng trưởng của cây *in vitro*. Đồng thời sử dụng nhiệt độ thấp để bảo quản cây *in vitro*.

4.4 - Ẩm độ tương đối (relative humidity)

Đây là một yếu tố môi trường quan trọng ảnh hưởng đến mối quan hệ giữa nước và cây *in vitro*. Nếu ẩm độ trong bình quá cao sẽ dẫn đến sự chậm phát triển cây *in vitro* hoặc cây *in vitro* phát triển không bình thường về sinh lý và hình thái chẳng hạn hiện tượng thủy tinh thể.

4.5 - Cải tiến giá thể nuôi cấy

Thạch vẫn được xem như là các tác nhân tương đồng với đất ở vùng rễ và đã được sử dụng phổ biến làm giá thể trong nuôi cấy mô từ nhiều năm nay. Nhưng các nghiên cứu gần đây trên thế giới đã chứng minh vai trò kìm hãm của thạch đối với sự phát triển của cây nuôi cấy mô. Sự hiện diện của thạch làm cho môi trường thiếu độ thông thoáng và cản trở việc khuếch tán các khí hoà tan như O₂ cũng như việc hấp thu nước và các chất khoáng của tế bào và cây nuôi cấy mô. Rễ của cây nuôi cấy trên giá thể thạch có hệ thống bó mạch thường phát triển yếu, do đó cây nuôi cấy mô trong những ngày đầu ở vườn ươm phát triển chậm và có tỷ lệ chết cao.

Hiện nay, có thể thay thế giá thể thạch (agar hay gelrit) bằng các loại giá thể có cấu trúc xốp và có nhiều lỗ thông khí như vermiculite, sợi cellulose, rockwool hay floritalit (hỗn hợp vermiculit và cellulose). Việc sử dụng các giá thể có cấu trúc xốp sẽ giúp cho môi trường xung quanh hệ rễ được thông thoáng, nhờ vậy rễ sẽ phát triển mạnh mẽ hơn giúp cho cây hấp thu nước và muối khoáng trong môi trường nuôi cấy dễ dàng hơn.

5 - KẾT LUẬN

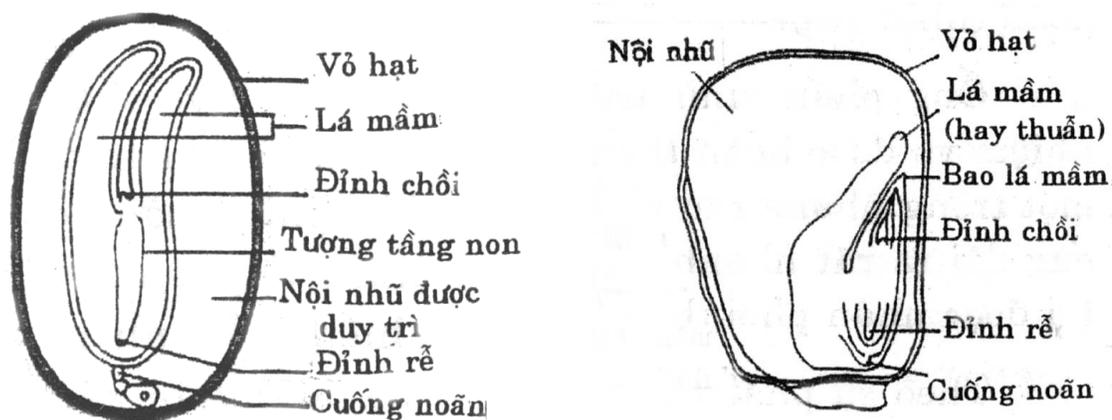
Như vậy, so với các phương pháp vi nhân giống truyền thống, khi áp dụng phương pháp vi nhân giống quang tự dưỡng có một số ưu điểm:

- Tỷ lệ cây chết do nhiễm nấm khuẩn thấp vì môi trường nuôi cấy không có đường.
- Cây tăng trưởng và phát triển tốt hơn.
- Chất điều hòa tăng trưởng và các chất hữu cơ khác có thể giảm ở mức tối thiểu.
- Cải thiện được chất lượng và giảm sự biến dị của thực vật được nuôi cấy *in vitro*.
- Vì tỷ lệ nhiễm giảm nên có thể sử dụng các loại bình nuôi cấy lớn.

C - CÔNG NGHỆ HẠT NHÂN TẠO TRONG NHÂN GIỐNG THỰC VẬT

1 - CẤU TẠO HẠT GIỐNG TỰ NHIÊN

Các loại thực vật hiển hoa bí tử có hai loại hạt khác nhau: hạt một lá mầm và hạt hai lá mầm (hình V.16). Chính vì vậy những loài thực vật này được phân thành hai nhóm là thực vật một lá mầm và thực vật hai lá mầm. Tuy hạt giống của hai nhóm này có hình dạng và cấu trúc rất phong phú nhưng cấu trúc chủ yếu vẫn bao gồm những thành phần cơ bản: vỏ, nội nhũ và phôi.



Hạt song tử diệp

Hạt đơn tử diệp

Hình V.18 - Cấu tạo hạt song tử diệp và đơn tử diệp

1.1 - Vỏ

Vỏ là bộ phận bảo vệ phôi và nội nhũ khỏi bị tác động bởi những tác nhân hoá học, cơ học từ bên ngoài. Thành phần chủ yếu của vỏ là cellulose, hemicellulose, lignin.

Dùng hệ thống chiếu xạ tia X nghiên cứu cấu tạo vỏ của hạt tự nhiên, cho thấy có cấu tạo 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, P... Lớp nhu mô đậu là lớp tế bào có kích thước lớn, sắp xếp theo chiều dọc. Lớp chịu áp lực gồm những tế bào tương tự như lớp nhu mô đậu nhưng xếp theo chiều ngang. Khi hạt còn non, lớp tế bào chịu áp lực có chứa diệp lục tố nhưng khi hạt già lớp tế bào chịu áp lực rỗng. Lớp trong cùng gọi là lớp vỏ quả gồm những tế bào xếp khít nhau, thường chứa chất màu (vàng hay nâu tùy từng loại hạt).

1.2 - Nội nhũ

Nội nhũ là thành phần dự trữ chất dinh dưỡng cho phôi. Nội nhũ được cấu tạo từ những tế bào có thành mỏng, có hình dáng và kích thước khác nhau, sắp xếp không có trật tự. Các tế bào nội nhũ chứa nhiều tinh bột, protein, lipid, muối khoáng và sinh tố.

1.3 - Phôi

Phôi là thành phần sẽ phát triển thành cây con khi hạt nảy mầm. Một phôi trưởng thành bao gồm: các mô phân sinh chồi, mô phân sinh rễ, hệ thống mô phân sinh non và tử diệp (lá mầm). Ở thực vật song tử diệp thường có hai tử diệp, còn ở đơn thực vật đơn tử diệp chỉ có một lá mầm.

Hầu hết hiện nay những loại cây trồng được nhân giống bằng hạt. Việc nhân giống bằng hạt vừa tiết kiệm được thời gian, vừa có tính đại trà, dễ bảo quản... Tuy nhiên đối với một số cây trồng không tạo được hạt giống thì việc nhân giống bằng hạt là không thể thực hiện được. Những loại cây trồng này, thường phải nhân giống bằng phương pháp vô tính. Bên cạnh một số phương pháp như nhân giống vô tính truyền thống, phương pháp nuôi cấy mô *in vitro* thì hiện nay có một phương pháp mới đang mang lại hiệu quả cao khi tiến hành nhân giống những loại cây này đó là phương pháp tạo hạt nhân tạo.

2 - Ý NGHĨA CỦA HẠT NHÂN TẠO

Như đã nói ở trên, ở một số loại thực vật như mía, khoai tây, khoai mì, dâu tây, các loại cây thân gỗ... đều không có khả năng nhân giống bằng hạt. Bên cạnh đó có nhiều loại thực vật tạo được hạt giống nhưng hạt giống kém chất lượng (thực vật thân gỗ lá kim) hay hạt giống rất đắt (hạt giống của những cây lai như cà chua, dưa hấu không hạt, dưa chuột...). Để giải quyết tất cả các vấn đề trên, một phương pháp nhân giống mới được nghiên cứu và ứng dụng đó là phương pháp tạo hạt nhân tạo.

Hạt nhân tạo có thể bảo quản, tồn trữ và trồng trọt bằng những kỹ thuật canh tác truyền thống. Và đặc biệt là có thể chủ động trong sản xuất, trồng trọt, canh tác không phụ thuộc vào các điều kiện thời tiết, mùa vụ.

3 – CẤU TẠO HẠT GIỐNG NHÂN TẠO

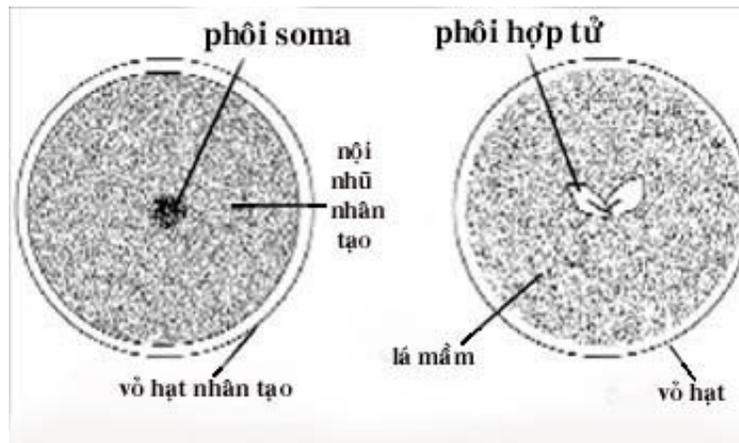
Gray (1987, 1990) định nghĩa hạt nhân: như công nghệ sản xuất phôi được sử dụng để sản xuất giống cây trồng trên quy mô thương mại

Hạt giống nhân tạo về cơ bản giống như hạt giống tự nhiên. Chỉ có sự khác nhau là hạt giống nhân tạo có cấu tạo là phôi được bao bọc bởi lớp áo bên ngoài thay cho nội nhũ, vỏ và phôi ở hạt nhân tạo là phôi vô tính (phôi soma) (hình V.19). Hạt giống nhân tạo có khả năng nảy mầm như hạt giống tự nhiên. Hạt giống nhân tạo gồm 3 phần (hình V.20):

- Phôi vô tính
- Vỏ bọc polyme như alginat
- Màng ngoài: được cấu tạo từ alginat canxi

Phôi soma ở hạt nhân tạo giống như phôi hợp tử ở hạt tự nhiên là có hai cực (đỉnh chồi và đỉnh rễ), như thế có thể phát triển thành một cây hoàn chỉnh tương tự

như hạt nảy mầm. Cấu trúc phôi soma giống như phôi hợp tử nhưng phôi soma của hạt giống nhân tạo không có vỏ bao hạt cũng như mô dự trữ.



Hình VI.19 - So sánh cấu trúc hạt tự nhiên và hạt nhân tạo



Hình VI.20 - Cấu tạo hạt nhân tạo

4 - SẢN XUẤT HẠT NHÂN TẠO

4.1 – Tạo phôi vô tính (phôi soma)

Phôi vô tính có nội dung di truyền giống hệt với các tế bào soma đã sinh ra chúng. Phôi soma rất giống với phôi hữu tính (phôi hợp tử) ở đặc tính sinh lý và quá trình phát triển. Chúng cũng trải qua các giai đoạn phát triển như ở cây hai lá mầm phôi phát triển qua hình cầu, tim, thủy lồi và giai đoạn lá mầm. Như vậy, công nghệ sản xuất hạt nhân tạo cũng có thể hiểu là công nghệ sản xuất phôi soma.

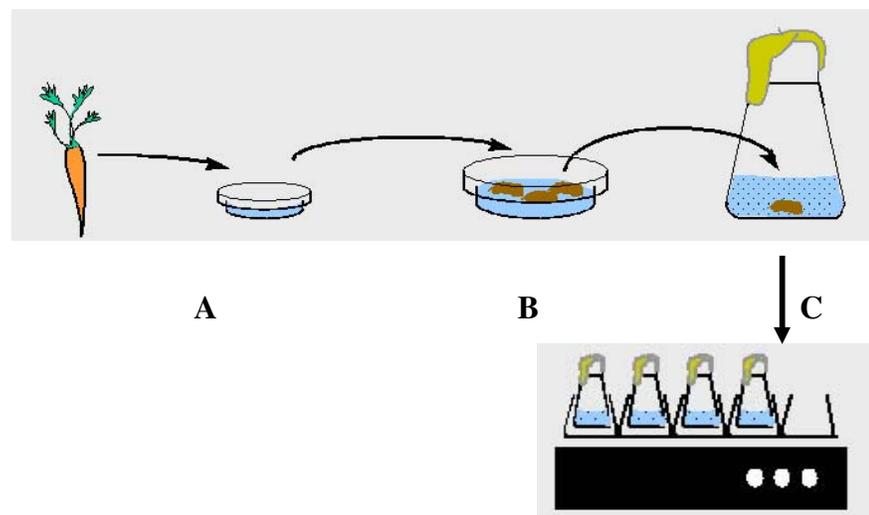
Quá trình tạo phôi vô tính gồm các bước sau (hình V.21):

- Mô thực vật (đỉnh sinh trưởng, lát mỏng tế bào, mảnh lá) được nuôi cấy trên môi trường MS (Murashige & Skoog) bổ sung 2,4-D từ 30 – 40 μM để tạo mô sẹo.

- Sự tăng sinh mô sẹo được cấy chuyển và thực hiện nuôi cấy trên môi trường có bổ sung $10 \mu\text{M}$ 2,4-D và $1\mu\text{M}$ BA, hay môi trường lỏng có $5\mu\text{M}$ 2,4-D. Những đơn vị phôi sinh trưởng nhanh trong môi trường lỏng. Tăng sinh của những phần tử có khả năng sinh phôi gắn liền với những khối mô sẹo lớn.

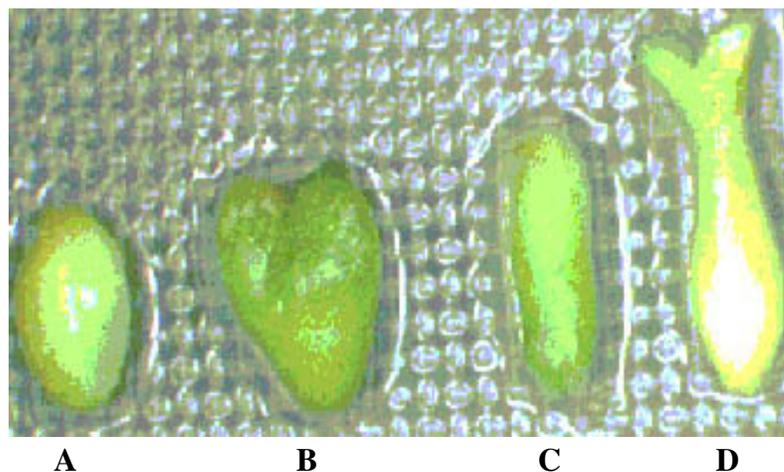
- Phôi được sản sinh ra được tái sinh thành cây hoà chỉnh thông việc cấy chuyển những khối tế bào mô sẹo lớn từ môi trường có 2,4-D sang lắc môi trường lỏng không có 2,4-D. Từ những khối mô sẹo này sẽ hình thành nên những phôi đầu tiên ở dạng thuỷ lồi. Dạng thuỷ lồi này tiếp tục phát triển và trở thành các dạng phôi chín, phôi trưởng thành (hình V.22).

Các phôi trưởng thành được phân tách và chuyển sang các công đoạn tạo áo phôi.



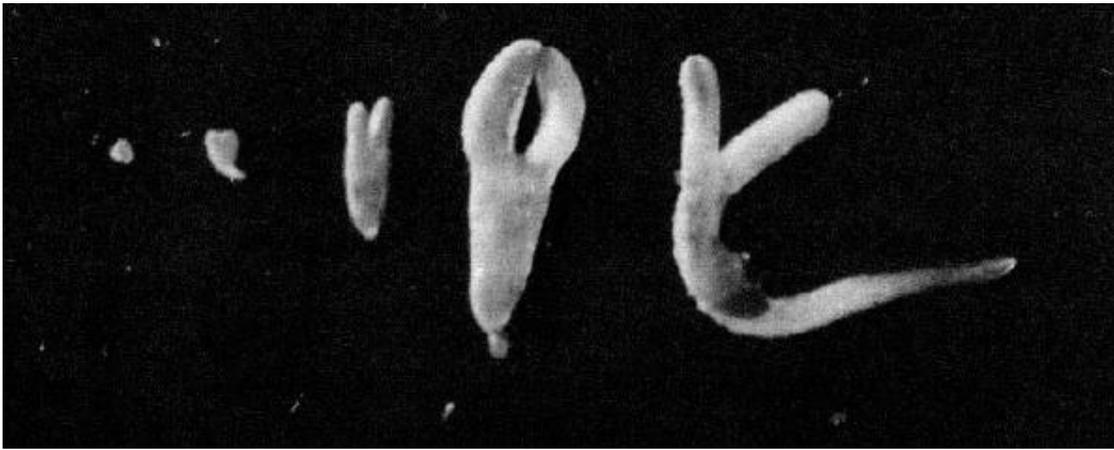
Hình VI.21 - Quá trình tạo phôi vô tính

A: Nuôi cấy tạo mô sẹo, B: Nuôi cấy tăng sinh mô sẹo, C: Nuôi cấy lắc tạo phôi



Hình V.22 - Các giai đoạn phát triển của phôi

A: Hình cầu, B: Hình tim, C: Hình trụ, D: Hình thuỷ lồi



Hình V.23. Các giai đoạn phát triển của phôi khoai tây

4.2 – Tạo áo bao hạt nhân tạo

Những nghiên cứu hạt giống nhân tạo bắt đầu năm 1985. Người ta tạo hạt có chứa phôi bằng cách nhiều giọt (hình V.24) và tái sinh lại thành cây khi đưa vào môi trường không có carbonhydrat. Hạt nhân tạo thường có áo bao làm bằng alginat Na và alginat Ca hay B-hydrogel.

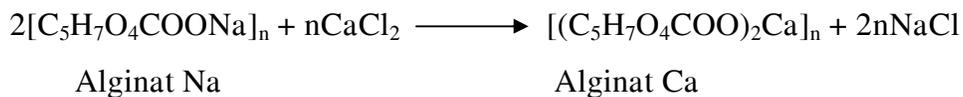
Alginat Na là một chất cao phân tử được chiết suất từ rong biển (rong Mơ *Sargassum* sp là một loại rong nâu). Trong rong Mơ alginat Na tồn tại dưới dạng alginit không tan là hợp chất của các acid manuronic. Để chiết tách alginat, thường tiến hành nấu rong với Na_2CO_3 .



Alginat Na là dạng tan trong nước.

Hoà tan 100 ml Alginat Na 4% vào 1 lít môi trường MS có chứa các muối khoáng, đường, vitamin, các chất sinh trưởng. Tiến hành nhỏ từng giọt nhẹ nhàng hỗn hợp này vào một cốc dung dịch CaCl_2 2,5% hay CaNO_3 100mM. Mỗi lần nhỏ dùng một ống hút chuyển vào trong giọt đó một phôi soma.

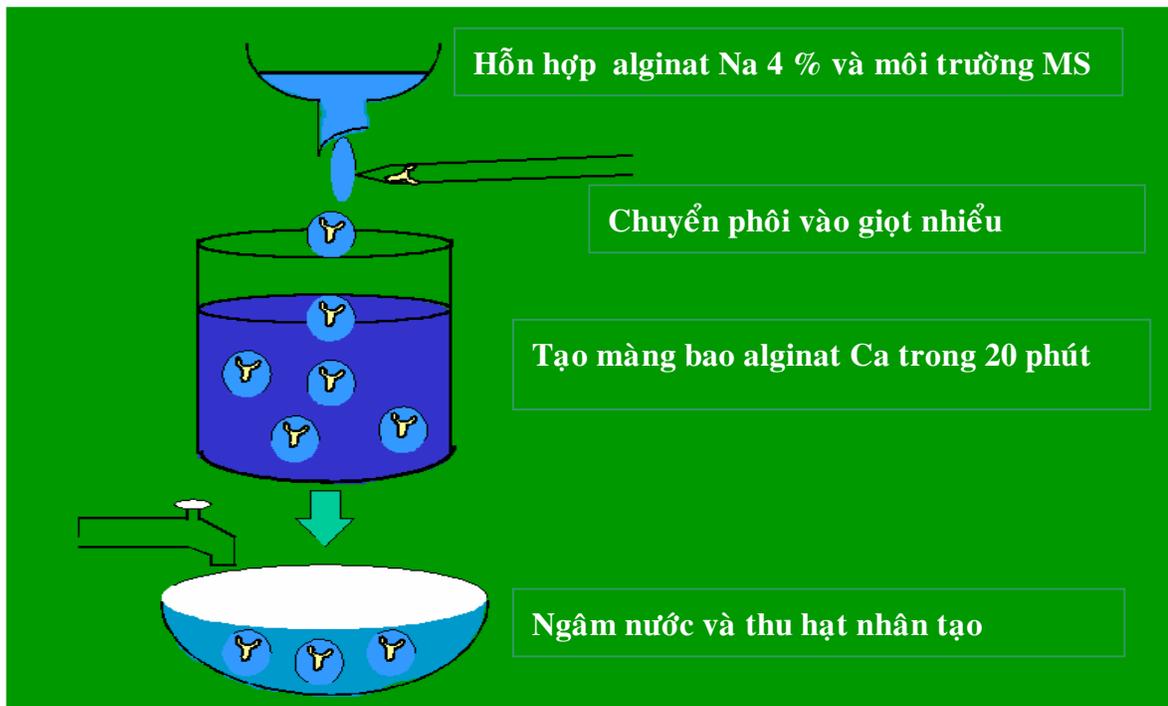
Khi Alginat Na tiếp xúc với dung dịch CaCl_2 , xảy ra phản ứng trao đổi ion giữa hai dung dịch này theo phản ứng:



Ở dạng này, alginat Ca kết tủa, trở thành dạng không tan, tạo thành màng không thấm nước. Toàn bộ bề mặt của giọt hỗn hợp trên sẽ được bao bọc bằng một lớp áo alginat Ca không thấm nước và tạo thành một hạt. Phần hỗn hợp alginat Na và môi trường MS ở bên trong vẫn ở trạng thái tan và có mang một phôi. Hạt này được tiếp tục ngâm trong dung dịch CaCl_2 và gọi là hạt nhân tạo.

Sau 20 phút hạt nhân tạo được chuyển qua ngâm trong nước 5 phút để làm cứng và ngăn chặn phản ứng.

Vớt hạt ra và làm khô hạt ta được hạt nhân tạo (hình V.25). Hạt này có thể được bảo quản hay sử dụng cho gieo trồng trực tiếp.



Hình V.24 - Quy trình sản xuất hạt nhân tạo



Hình V.25 - Hạt nhân tạo

5 – BẢO QUẢN VÀ GIEO TRỒNG HẠT NHÂN TẠO

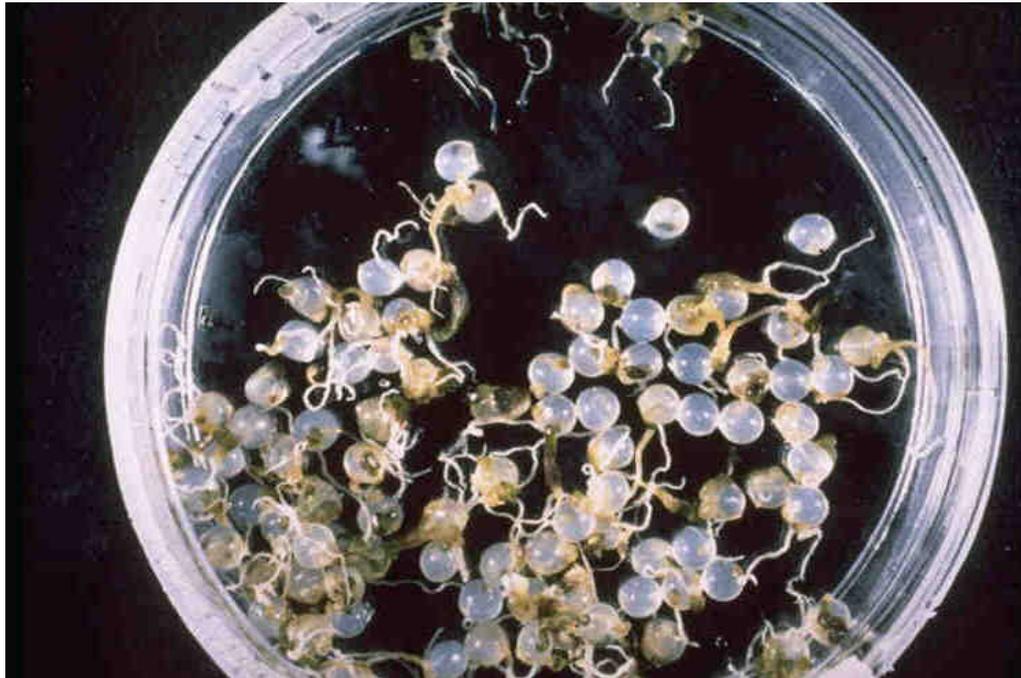
5.1 – Bảo quản hạt nhân tạo

- Hạt nhân tạo sau khi tạo thành được làm khô.
- Hạt được bảo quản trong nhiệt độ lạnh khoảng 4°C
- Thời gian bảo quản thường chỉ trong vòng 2 đến 4 tháng. Nếu tồn trữ quá lâu sẽ ảnh hưởng tới khả năng nảy mầm của hạt do phôi bị ức chế.

5.2 - Gieo trồng hạt nhân tạo

Hạt nhân tạo có thể đưa ra sản xuất bằng cách làm cho hạt nảy mầm. Trãi hạt nhân tạo trên khay cát sạch, được làm ẩm, nhiệt độ khoảng 30°C. Sau thời gian khoảng 4 ngày phôi bắt đầu phát triển.

Lượng đường còn lại trong hạt nhân tạo giúp cho phôi mọc ra khỏi hạt và tạo nguồn năng lượng cho sinh trưởng ban đầu. Lượng đường này thay thế cho vai trò của nội nhũ chứa tinh bột trong tự nhiên. Một hạn chế của phương pháp hạt nhân tạo là chúng dễ bị nhiễm khuẩn. Vì vậy, hiện nay thay vì trộn alginat với môi trường MS có đường, người ta sử dụng các hạt tinh bột đã qua xử lý thích hợp. Phôi vô tính cũng tiết ra amylase để phân hủy tinh bột dùng làm năng lượng này mầm.



Hình V.26 - Hạt nhân tạo nảy mầm

5.3 - Sản xuất hạt cà phê nhân tạo

Quy trình sản xuất hạt cà phê nhân tạo được tiến hành như sau:

- Thu hoạch phôi cà phê đang nuôi trong dịch lỏng trên máy lắc. Phôi tốt nhất có kích thước khoảng $0,5 \div 1$ mm.

- Hòa 100 ml dung dịch alginat Na 4% trong môi trường MS có chứa khoáng đa lượng, vi lượng, nước dừa, chất sinh trưởng... giống như môi trường nuôi phôi đã nói như trên.

- Dùng một ống nhỏ giọt hút lấy một ít dịch alginat có chứa 1 phôi cà phê trong đó.

- Nhỏ giọt dịch alginat có chứa phôi một cách nhẹ nhàng vào một dung dịch chlorua canxi đựng trong một cốc lớn. Dung dịch chlorua canxi được khuấy đều bằng khuấy từ ở tốc độ thấp.

- Quan sát và thu hoạch hạt nhân tạo sau khi ngâm trong chlorua canxi 30 phút.

- Rửa sạch hạt nhân tạo bằng nước cất và bảo quản ở nhiệt độ 4°C trong nước cất vô trùng.

- Khi sử dụng, hạt được gieo trên đĩa petri có lót giấy lọc ướt ở nhiệt độ 30°C . Hạt mọc mầm và ra rễ bằng cách tự phá vỡ màng alginat canxi. Sau đó cây cà phê từ hạt nhân tạo được đưa ra gieo cấy trên cát sạch và khi đã bắt đầu phát triển, chúng được chuyển vào các túi nilong chứa đất giàu mùn và chất dinh dưỡng.

Tóm tắt

Một trong những lĩnh vực quan trọng nhất, bao hàm gần như toàn bộ ý nghĩa của công nghệ sinh học thực vật đó là các công nghệ vi nhân giống. Công nghệ vi nhân giống đã và đang trở thành một hướng nhân giống thực vật chủ yếu. Công nghệ này bao gồm những phương pháp:

- Nuôi cấy đỉnh sinh trưởng
- Vi ghép
- Nuôi cấy chồi ngủ
- Nuôi cấy mô sẹo

Tất cả các phương pháp này đều nhằm mục đích:

- Nhân nhanh số lượng thực vật
- Tạo những cây giống sạch bệnh
- Cây phát triển mạnh, trẻ trung hoá

Tuy nhiên, bên cạnh các ưu điểm trên của các phương pháp vi nhân giống, nhược điểm lớn nhất của các phương pháp này là tỷ lệ nhiễm nấm khuẩn trong môi trường nuôi cấy cao, vì vậy làm giá thành cây con giống khá cao. Để khắc phục

những hạn chế này, có nhiều phương pháp được đề xuất, trong đó có phương pháp vi nhân giống quang tự dưỡng.

Phương pháp vi nhân giống là phương pháp phát triển từ các phương pháp vi nhân giống truyền thống. Phương pháp này có những cải tiến để khắc phục các hạn chế của các phương pháp khác:

- Hạn chế đến mức tối thiểu hay không sử dụng đường, các chất điều hoà sinh trưởng trong môi trường nuôi cấy.

- Cải tiến các điều kiện nuôi cấy *in vitro* như :hàm lượng CO₂, điều kiện chiếu sáng, nhiệt độ độ ẩm phòng nuôi cấy, cải tiến giá thể nuôi cấy...

- Thực vật được tăng cường khả năng tự quang hợp tổng hợp chất hữu cơ để sinh trưởng và phát triển.

Cũng nằm trong mục đích cải tiến các phương pháp vi nhân giống truyền thống, nhân nhanh số lượng cây giống, có một phương pháp khác cũng được đề xuất và hiện đang được tập trung nghiên cứu. Phương pháp này là sản xuất hạt giống nhân tạo.

Hạt giống nhân tạo mô phỏng lại hạt giống thực vật. Các chồi ngọn được thu nhân và được bao trong các lớp áo (cung cấp chất dinh dưỡng) như những hạt giống thực thụ. Ưu điểm của hạt giống nhân tạo là chủ động được mùa vụ, không bị tác động bởi các yếu tố tự nhiên, tốc độ nhân giống nhanh, cây có tốc độ phát triển mạnh. Tuy nhiên, hạn chế của phương pháp này là giá thành của hạt nhân tạo vẫn còn rất cao so với hạt giống thông thường.

Câu hỏi ôn tập

1. Trình bày nguyên tắc và cách thực hiện của phương pháp nuôi cấy đỉnh sinh trưởng.
 2. Trình bày nguyên tắc và cách thực hiện của phương pháp nuôi cấy mô sẹo.
 3. Trình bày nguyên tắc, ý nghĩa và cách thực hiện của phương pháp vi ghép.
 4. Trình bày nguyên tắc và cách thực hiện của phương pháp nuôi cấy chồi ngủ.
 5. Trình bày khái niệm và ưu điểm của phương pháp vi nhân giống quang tự dưỡng.
 6. Trình bày những cải tiến để điều khiển điều kiện môi trường *in vitro* của phương pháp vi nhân giống quang tự dưỡng.
 7. Trình bày khái niệm, ý nghĩa của công nghệ hạt giống nhân tạo.
 8. Trình bày quy trình sản xuất hạt nhân tạo.
-

CHƯƠNG VI

SỰ CHUYỂN GEN Ở THỰC VẬT BẬC CAO

1 - GENOM Ở THỰC VẬT BẬC CAO

1.1 - 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 không có ý nghĩa thực tiễn.

Khả năng tái sinh cũng có thể hiểu là sự biệt hoá. Khi nuôi cấy mô thực vật trong điều kiện kích thích nhân tạo để tạo mô sẹo, ta đã thực hiện quá trình phản biệt hoá: khi ngưng các tác động kích thích, mô thực vật có khuynh hướng tự biệt hoá trở lại thành các mô có chức năng như rễ, thân, lá...

Các phòng thí nghiệm tái sinh cây hoàn chỉnh từ một tế bào đơn hoặc từ một protoplast được thực hiện cuối những năm 60 đã chứng minh đầy đủ tính toàn thể của thực vật bậc cao. Đồng thời các thí nghiệm này 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 một tế bào, một mảnh lá, một khối mô sẹo... đã được thực hiện trên hàng trăm loài thực vật, tập trung hầu hết vào các cây trồng quan trọng.

Khả năng tái sinh như vậy hoàn toàn phụ thuộc vào kiểu gen của thực vật và thời gian, hầu hết các thực vật đều có thể tái sinh được sau khi đã xác định được đúng mô nuôi cấy tốt nhất và môi trường nuôi cấy thích hợp nhất.

1.2 - 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 có chứa một lượng DNA lớn gấp nhiều lần ở vi khuẩn và nhiều trường hợp còn gấp bội so với lượng DNA của tế bào người, một động vật ở bậc cao nhất của thang tiến hoá.

Ở DNA thực vật, khác với DNA vi khuẩn, người ta phát hiện các dãy mã lặp đi lặp lại nhiều lần. Hiện nay chưa rõ vai trò của sự lặp lại này là gì, nó có liên quan như thế nào với quá trình phát triển hệ thống và phát triển cá thể thực vật, với các phản ứng của thực vật với ngoại cảnh...

Không phải tất cả DNA trong bộ máy di truyền thực vật đều mã hoá cho các protein hoặc enzyme mà chỉ có một bộ phận nhỏ. Các gen di truyền được phân cách nhau bằng các đoạn DNA không mã hoá gọi tên là introns.

Các thành phần chức năng của một gen cũng phức tạp hơn cơ chế operon của vi khuẩn rất nhiều. Những hiểu biết về cơ chế biểu hiện của gen thực vật cực

kỳ quan trọng đối với công nghệ gen ở thực vật. Các nhóm gen ở thực vật cũng không nằm cố định trên các nhiễm sắc thể. Một số gen có thể nhảy qua lại trong quá trình phát triển của thực vật và chúng được gọi tên là gen nhảy.

Tóm lại, sự phức tạp của bộ máy di truyền ở thực vật làm cho việc ứng dụng công nghệ sinh học để giải quyết các mục tiêu với đối tượng thực vật không dễ dàng.

1.3 - Sinh sản của tế bào thực vật

- Sinh sản hữu tính: là kiểu sinh sản mang lại cho thực vật sự phong phú về gen, tăng khả năng tồn tại của loài trong các điều kiện ngoại sinh 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, căn hành, thân bò, phôi vô tính... Nhờ sự phát triển của công nghệ sinh học, 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/ 1 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 đặc tính di truyền giống nhau.

1.4 - Đặc tính DNA ở thực vật bậc cao

DNA thực vật là một chuỗi xoắn kép dài do 4 dNTP tạo thành:

- dATP: deoxyadenosin triphosphat
- dTTP: deoxythymidin triphosphat
- dGTP: deoxyguanidin triphosphat
- dCTP: deoxycytosin triphosphat

Bốn dNTP này thuộc hai nhóm kiểu là purin (A,G) và pirimidin (C,T). Lõi của chuỗi DNA là các phân tử đường deoxyribose gắn với nhau bằng các cầu phosphodiester.

Khác với vi khuẩn, DNA thực vật rất lớn. Ở E.Coli, toàn bộ DNA với 4 triệu nucleotide nằm trong một phân tử duy nhất có chiều dài liên tục 1,4 mm (14×10^6 A^o). Ở thực vật chiều dài tổng cộng của các phân tử DNA có thể lên đến nhiều mét, tùy loại cây. Các sợi DNA này trong cấu trúc của nhiễm sắc thể, chúng liên kết với các protein histon.

Một đặc điểm khác của DNA thực vật là chúng có hệ DNA lục lạp và DNA ty thể riêng biệt, phần nào độc lập với DNA nhân bào. DNA lục lạp chiếm 10-20% DNA tổng số trong lá. Giống như DNA vi khuẩn, DNA lục lạp ở dạng vòng không kết hợp với histon, với trọng lượng phân tử cỡ 90.10^6 , tương ứng với 135 kb. DNA

lục lạp có khoảng 100 gen hoạt động. DNA ty thể thực vật cũng có cấu trúc vòng, kích thước thay đổi tùy theo loài, có thể từ 200÷2000 kb (DNA ty thể nấm men là 75 kb, DNA ty thể người là 16 kb)

Tên thực vật	Lượng DNA (picogram/tế bào)
- <i>Arabidopsis thaliana</i>	$0,2 \times 10^{-12}$
- Đậu nành	$0,9 \times 10^{-12}$
- Bông	3×10^{-12}
- Cà chua	$0,75 \times 10^{-12}$
- Thuốc lá	$3,9 \times 10^{-12}$
- Lúa	1×10^{-12}
- Lúa mì	$17,3 \times 10^{-12}$
- Ngô	$3,9 \times 10^{-12}$
- Hoa huệ	$43,2 \times 10^{-12}$
- Virut khảm suplor	$0,84 \times 10^{-17}$
- Lục lạp cây đậu cove	$1,3 \times 10^{-16}$
- Vi khuẩn <i>E. coli</i>	4×10^{-15}
- Tế bào người	6×10^{-12}

Bảng hàm lượng DNA của một số loại tế bào (đơn bội)

1 picogram DNA = $0,965 \times 10^9$ cặp nucleotide

2 - XÁC ĐỊNH VÀ DÒNG HÓA GEN

2.1 - Chiết suất và tinh sạch DNA từ mô thực vật

Có rất nhiều phương pháp chiết suất DNA từ đơn giản đến phức tạp tùy theo mục đích sử dụng hoặc chiết suất từ loại mô nào. Khuynh hướng chung hiện nay là tìm các 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 kb cần thiết cho các thao tác tiếp theo trong công nghệ gen thực vật. Muốn thu DNA có chiều dài 100÷5.000 kb phải dùng phương pháp điện di có điện trường không liên tục (PFGE – pulsed field gel electrophoresis)

2.1.1 - Chiết xuất và tinh sạch DNA tổng số

Tế bào thực vật được nghiền vỡ trong điều kiện lạnh làm cho DNA được hoà vào đệm chiết. SDS (sodium docecyl sulfate) hoặc CTAB (cetytrimethyl amonium bromide) được thêm vào để giúp DNA hoà 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

nuclease phân hủy DNA trong quá trình chiết. Protein được tách khỏi DNA bằng phenol hoặc cloroform.

Nếu tránh được chấn động xé, xoay quá mạnh, có thể thu được DNA với chiều dài 50÷100kb. Ngoài ra, CTAB còn có tác dụng tách các polysaccharide ra khỏi DNA, do chúng có độ hoà tan khác nhau trong môi trường có mặt CTAB.

2.1.2 - Chiết xuất DNA từ mô thực vật

Lá nghiền với đệm chiết CTAB có chứa mercapthoethanol. DNA được chiết bằng hỗn hợp chloroform-isoamyl alcohol, kết tủa bằng isopropanol, sau đó qua một số bước để rửa và tinh khiết DNA.

2.2 - Cắt DNA bằng enzym giới hạn

Enzym giới hạn (Restriction enzym) là nhóm endonuclease chỉ cắt phân tử DNA ở những vị trí có dãy mã nucleotide nhất định mà chúng có khả năng nhận ra (điểm nhận biết). 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, vì vậy cần phải cung cấp một dung dịch đệm tương ứng cho mỗi enzym.

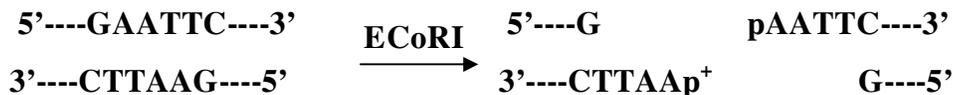
Các phản ứng với enzym giới hạn thường chỉ thực hiện với một lượng DNA tối thiểu, trong một thể tích phản ứng tối thiểu. Kết quả hoạt động của enzym giới hạn phụ thuộc rất nhiều vào độ tinh sạch của DNA. Các chế phẩm DNA còn lẫn đệm chiết, phenol hoặc ethanol làm giảm chất lượng hoạt động của enzym.

Enzym giới hạn được bảo quản trong lạnh -20 °C, hạn chế tối đa việc đặt enzym ở các nhiệt độ không thích hợp. Nếu lấy khỏi tủ lạnh trong thời gian ngắn, enzym phải được để trên đá.

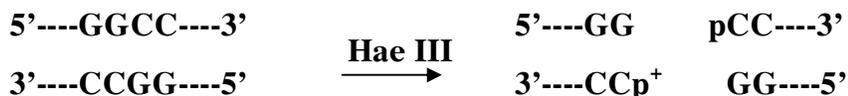
Các đoạn cắt DNA do enzym giới hạn có thể có các đầu so le (sticky end) hoặc đầu bằng (blunt end).

Thí dụ:

+ *ECoRI* nhận biết mã kép AATT, vì vậy nó sẽ cắt DNA thành 2 đoạn có đầu so le như sau:



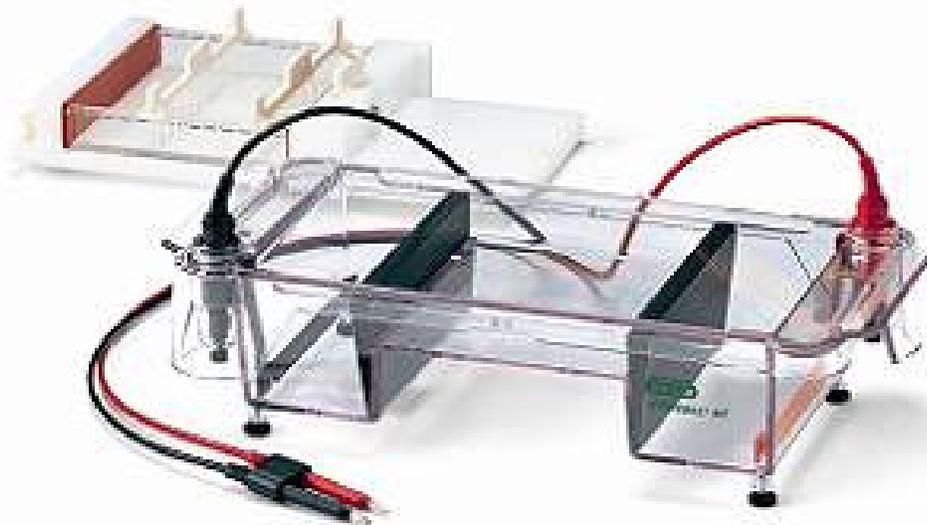
+ *Hae III* nhận biết mã kép GGCC, vì vậy nó sẽ cắt phân tử DNA thành 2 đoạn có đầu bằng như sau:



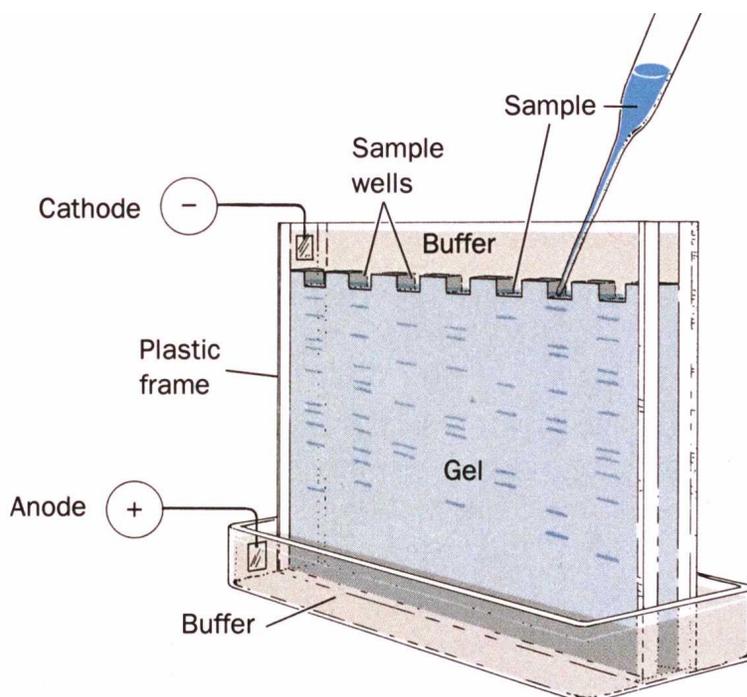
Các methylase có khả năng làm thay đổi tính chất của sợi DNA ở điểm tác động bằng cách gắn một gốc methyl vào đó (methyl hoá), qua đó vô hiệu hoá sự nhận biết của các enzym giới hạn. Thí dụ dãy mã đặc trưng (điểm nhận biết) của enzym *ECORI* là GAATTC. Nếu methyl hoá xảy ra ở một số vị trí như: GAmATTC, GAATTmC, GmAATTC thì *ECORI* không cắt được sợi DNA. Hai methylase thông dụng nhất là dam methylase và dcm methylase, đều tinh chế từ E.Coli. Ứng dụng chủ yếu của methylase là để bảo vệ một số vị trí trên DNA mà người ta không muốn bị cắt bởi các enzym giới hạn.

2.3 - Điện di DNA và các sản phẩm cắt DNA trên gel

Các đoạn DNA được cắt từ phân tử DNA có khối lượng khác nhau và điện tích khác nhau được tách ra khi di chuyển từ cực âm sang cực dương của máy điện di trong một điện trường có hiệu điện thế và cường độ thích hợp. Quá trình điện di được thực hiện trên gel agarose hoặc polyacrylamide hay hỗn hợp của hai chất trên tùy kích thước của DNA. Một gel agarose 0,3% dày 0,5 cm có kích thước lỗ tương đối rộng có thể phân chia DNA từ 5÷60 kb. Một gel polyacrylamide 40% mỏng 0,3 mm có thể phân chia từ 1÷300 bp và có thể phân chia phân tử để có thể phân biệt được tới 1 nucleotide.



Hình VI.1. Máy điện di ngang



Hình VI.2. Sơ đồ máy điện di đứng

2.4 - Nối các đoạn DNA bằng DNA ligase

DNA ligase là các enzym nối 2 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:



Đối với các đoạn DNA có đầu so le hoặc đầu bằng, DNA ligase đều có thể nối được nếu các nucleotide ở hai đầu so le của hai đoạn DNA có tính chất tương hợp nhau. DNA ligase được dùng nhiều nhất là T₄ DNA ligase, chiết từ thực khuẩn thể T₄. Ứng dụng quan trọng nhất của các ligase là trong cấu trúc các vector plasmid và các cấu trúc DNA khác để có đủ các dãy mã cần thiết cho việc chuyển gen, biểu hiện gen, sàng lọc các tế bào đã chuyển gen...

2.5 - Dòng hoá gen

Trình tự nucleotide của gen thường được biết thông qua tìm hiểu trình tự amino acid của sản phẩm của nó, các protein. Các phương pháp chiết suất, tinh sạch ngày nay đã được phát triển ở mức độ cao nhờ vậy có thể dễ dàng có được các protein tinh khiết ở số lượng đủ để giải mã trình tự amino acid của chúng. Công việc này hiện thường được các thiết bị tự động làm với mức độ chính xác cao. Từ trình tự amino acid của một protein, có thể suy ra trình tự của gen sản sinh ra nó.

Khi đã biết trình tự gen, người ta dùng các thiết bị tự động để tổng hợp nhân tạo tạo ra các gen hoặc các phiên bản có dãy mã bổ sung, gọi là c-DNA (complementary DNA). Với các thiết bị hiện đại nhất hiện nay cũng phải mất vài giờ mới gắn thêm được một nucleotide, vì vậy tổng hợp nên một gen có chiều dài nhiều kb là một công việc đồ sộ.

2.5.1 - Các bước cơ bản trong sự tạo dòng

- Một gen (đoạn DNA) có thể được tạo dòng khi đưa vào trong một phân tử DNA vòng còn gọi là vector để sản xuất một phân tử DNA tái tổ hợp.

- Các vector sẽ tác động như một phương tiện vận chuyển đưa gen tới tế bào chủ như bacterium và các tế bào thực vật khác.

- Trong tế bào chủ, vector sẽ nhân lên độc lập hay liên kết với nhiễm sắc thể của tế bào chủ.

- Khi tế bào chủ phân chia thì các gen hay vector tiếp tục phân chia và truyền đến các thế hệ sau theo sự phân chia của tế bào chủ.

- Trong một quần thể lớn của tế bào phân chia, một dòng của các tế bào mang gen mới được sản xuất. Mỗi cá thể của tế bào này sẽ chứa một hay nhiều bản sao của phân tử DNA tái tổ hợp thì được gọi là một dòng.

2.5.2 - Các bước thực nghiệm cơ bản của sự tạo dòng

- Điều chế và tinh khiết phân tử DNA.

- Cắt phân tử DNA bằng enzym cắt hạn chế.

- Phân tích các phân đoạn DNA.

- Nối các phân tử DNA với nhau.

- Đưa DNA vào trong tế bào chủ.

- Nhận diện tế bào chủ chứa phân tử DNA tái tổ hợp.

3 - NHỮNG PHƯƠNG PHÁP CHUYỂN GEN NGOẠI LAI VÀO TẾ BÀO THỰC VẬT

3.1 - Phân loại phương pháp chuyển gen

Công nghệ gen thực hiện chuyển các gen ngoại lai vào tế bào, mô thực vật. Có hai phương pháp chuyển gen: chuyển gen nhờ vi sinh vật (gián tiếp) và chuyển gen trực tiếp.

- Chuyển gen nhờ vi sinh vật

+ Nhờ Agrobacterium

+ Nhờ virus

- Chuyển gen trực tiếp

+ Hấp thu DNA

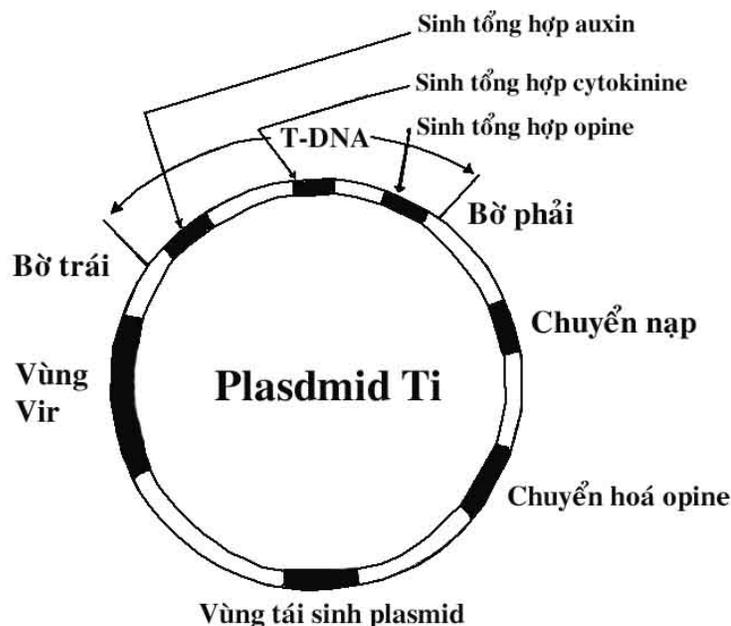
- + Siêu âm
- + Liposome
- + Dùm xung điện
- + Tia laser
- + Vi tiêm
- + Súng bắn gen
- + Qua ống phần
- + Dùm silicon carbide

3.2 - Chuyển gen nhờ vi sinh vật

Agrobacterium tumefaciens là một loại trực khuẩn, gram âm thuộc họ Rhizobiaceae gây bệnh tạo khối u ở thực vật. Các nghiên cứu cho thấy có một plasmid dài khoảng 200 kb được chuyển từ vi khuẩn sang thực vật quyết định đặc tính gây u gọi là plasmid Ti (hình VI.3). Một phần DNA của plasmid Ti được gọi là đoạn T-DNA được gắn vào bộ gen thực vật làm xuất hiện các khối u.

Muốn tạo được một sự chuyển đoạn gen T-DNA này thì cần một số yếu tố cần thiết như tạo vết thương trên thực vật và có sự hiện diện của các hợp chất phenol (acetosyringone), phân tử đường. Nhờ vào các yếu tố này mà vi khuẩn *Agro* (*Agrobacterium tumefaciens*) sẽ hoạt hóa các gen cần thiết cho sự chuyển T-DNA như gen vir (virulence). Mặc dù các gen vir này không truyền trực tiếp vào tế bào thực vật nhưng nó kiểm soát sự truyền và gồm 9 operons từ vir A đến vir J chiếm một đoạn khoảng 40 kb trên plasmid Ti. Sự tạo vết thương trên thực vật không những làm kích thích và cảm ứng *Agro* mà còn có tác dụng hoạt hóa hệ gen vir nhờ các protein thụ quan gen vir A cùng với gen vir G là hai cấu tử kiểm soát gen vir. Sau khi gen vir được cảm ứng tín hiệu được truyền để mở vùng T. Sự mở này tùy thuộc vào hoạt động của hai protein vir D1 và vir D2, chính chúng sẽ xúc tác sự mở nút trên phân tử T-DNA để đưa vào nhiễm sắc thể tế bào thực vật với sự cộng tác của các protein vir C1, vir E2...

Chính nhờ vào cơ chế này mà người ta có thể tạo dòng các vector để chuyển DNA vào thực vật nhờ vào vi khuẩn *Agro* (hình VI.4). Các vector được cấu tạo bằng cách loại bỏ vùng T-DNA tạo khối u và sau đó đưa vào các gen cần thiết. Có hai phương pháp để đưa một đoạn DNA vào trong tế bào nhờ vào các vector của plasmid Ti: vector hai nguồn và vector đồng nhập.



Hình VI.3 - Bản đồ của plasmid Ti

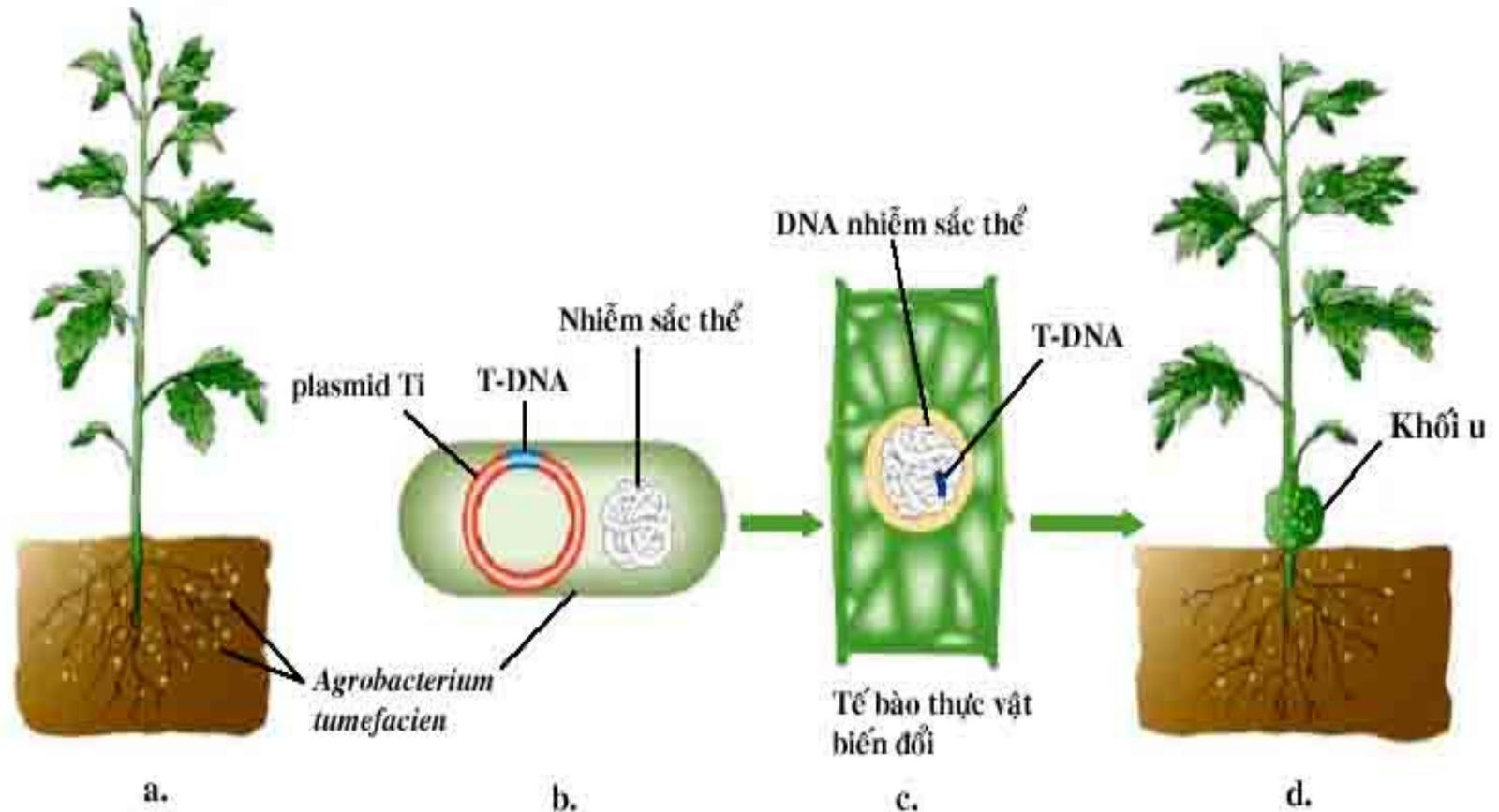
Phương pháp dùng *Agro* hiệu quả thường cho cây hai lá mầm nhiều hơn là một lá mầm và hiện nay nó là một phương tiện được các phòng thí nghiệm dùng để nghiên cứu sự chuyển gen vào thực vật.

3.3 - Phương pháp chuyển gen dùng súng bắn gen

3.3.1 - Nguyên tắc

Phương pháp này được công bố lần đầu tiên bởi Klein và các cộng sự vào năm 1987. Từ đó đến nay, đã có khá nhiều cải tiến để có thể làm cho dễ dàng hóa cho sự chuyển gen trên cả hai hướng là phương pháp và thiết bị. Nguyên tắc chung của phương pháp là sử dụng các viên đạn có kích thước nhỏ (1-1,5 μm), tỷ trọng cao (thường là tungsten hay vàng) để đạt được một gia tốc cao khi xuyên qua vỏ và màng tế bào và đưa lớp DNA bọc ngoài của viên bi tiếp cận với bộ máy di truyền của tế bào (hình VI.8). Cây chuyển gen đầu tiên được Klein và các cộng tác viên thực hiện thành công vào năm 1988 trên cây thuốc lá. Thành công của phương pháp bắn gen đã tạo sự dễ dàng hóa của chuyển gen vào trong thực vật.

Hạt tungsten hoặc vàng có đường kính 1-1,5 μm 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 0,5-0,8cm. Đĩa kim loại được gắn vào đầu một viên đạn lớn 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 hạt 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 chuyển gen.



Hình VI.4 -Tương tác giữa tế bào thực vật và *Agrobacterium tumefaciens*

a. Hệ rễ thực vật với các tế bào *A. tumefaciens*, b. Tế bào *A. tumefaciens* với plasmid Ti, c. Tế bào thực vật được chuyển gen, d. Thực vật với khối u do *A. tumefaciens*

3.3.2 - Các mẫu súng bắn gen

- Súng bắn gen PDS-1000 (hình VI.5, VI.6)

PDS-1000 (Particle delivery system 1000) là mẫu thiết kế đầu tiên súng bắn gen và do hãng Biorad sản xuất. Áp lực đẩy viên đạn lớn (bằng nhựa) được tạo ra bằng thuốc súng, vận tốc đầu nòng đạt 800 m/giây. Tốc độ vi đạn có thể đạt trên 1300m/s ở cách lưới chặn 2 cm.

- Súng bắn gen PDS-1000 He (hình VI.7)

PDS-1000 He là một bước cải tiến của PDS-1000, trong đó helium nén được dùng để gia tốc viên đạn lớn thay cho thuốc súng. Một lưới chặn bằng kim loại được đặt trên bộ chặn. Vi đạn được trộn với DNA và làm khô trên một đĩa kim loại nhỏ, sau đó gắn lên đầu viên đạn lớn. PDS-1000 He được dùng phổ biến hiện nay trên thế giới và cho kết quả chuyển gen tốt hơn PDS-1000. Ngoài kiểu súng bắn gen PDS trên, còn hai kiểu súng bắn gen khác:

- Kiểu súng bắn gen chế tạo từ súng hơi: kiểu này dựa vào một loại súng hơi để tác động trên viên đạn. Lợi thế của phương pháp này là giá thành thiết bị thấp như kiểu của Oard và các cộng tác viên (1990).

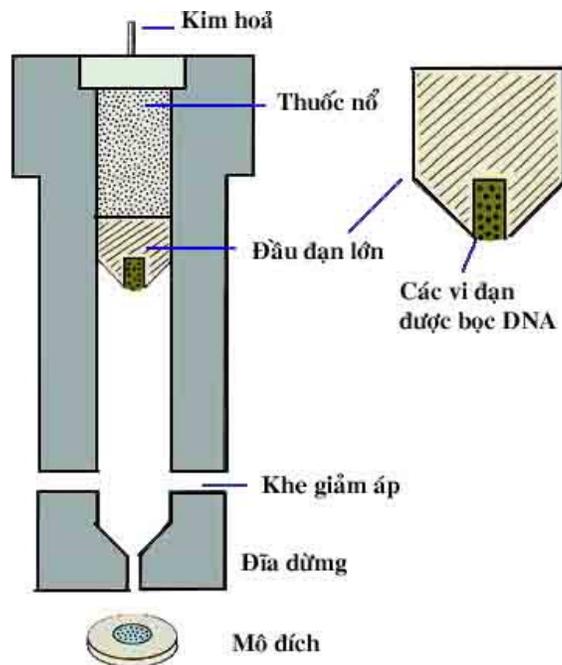
- Kiểu thứ ba dựa vào một luồng khí Helium để thổi các vi đạn bọc DNA gắn trên một màng lọc xuyên vào tế bào. Kiểu này do Takeuchi và các cộng tác viên thiết kế (1992), được phát triển và mô hình hóa thiết bị bởi Finer và các cộng tác viên (1992) trên máy PIG (Particle inflow gun) đã dùng thành công cho đậu nành và bắp.

- Dùng tế bào vi khuẩn làm vi đạn

Tế bào vi khuẩn *E.Coli* và *Agrobacterium tumefaciens* có thể được sử dụng thay cho vi đạn trong kỹ thuật bắn gen để thực hiện chuyển gen ngoại lai vào tế bào. Trước khi sử dụng, dùng phenol để giết vi khuẩn. Hiệu suất chuyển gen tăng nếu trộn lẫn tế bào vi khuẩn với vi đạn tungsten hoặc vàng.



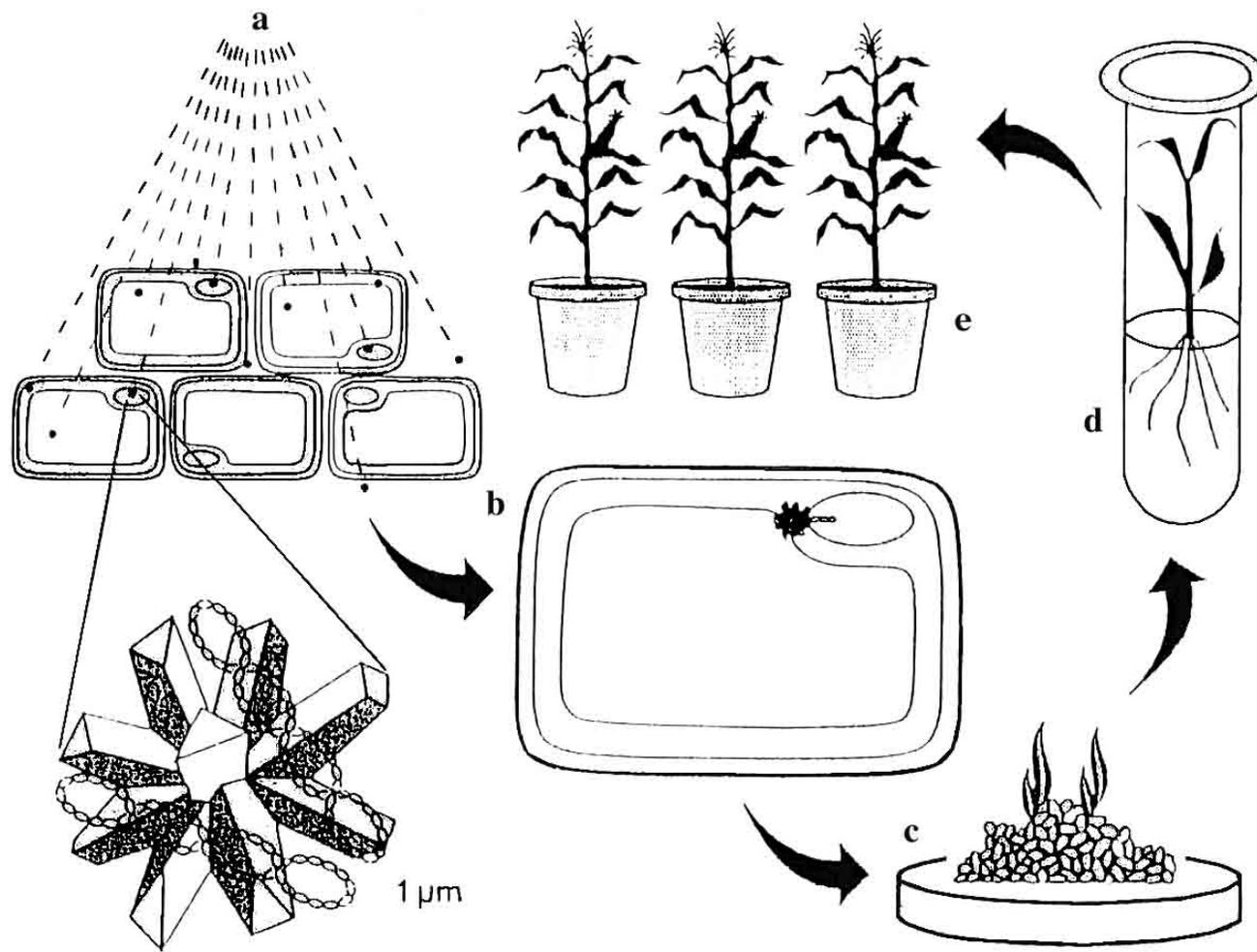
Hình VI.5. Súng bắn gen PSD – 1000 cầm tay



Hình VI.6 - Cấu tạo súng bắn gen PDS-1000



Hình VI.7. Súng bắn gen PSD – 1000 He



Hình VI.8 - chuyển gen bằng súng bắn gen ở ngô, (a) súng bắn gen với vi đạn tungsten bao bọc DNA, (b) vi đạn DNA vào tế bào, (c) khối mô hình thành từ tế bào được chuyển gen, (d) tái sinh cây chuyển gen

3.4 - Phương pháp dùng sợi silicon carbide

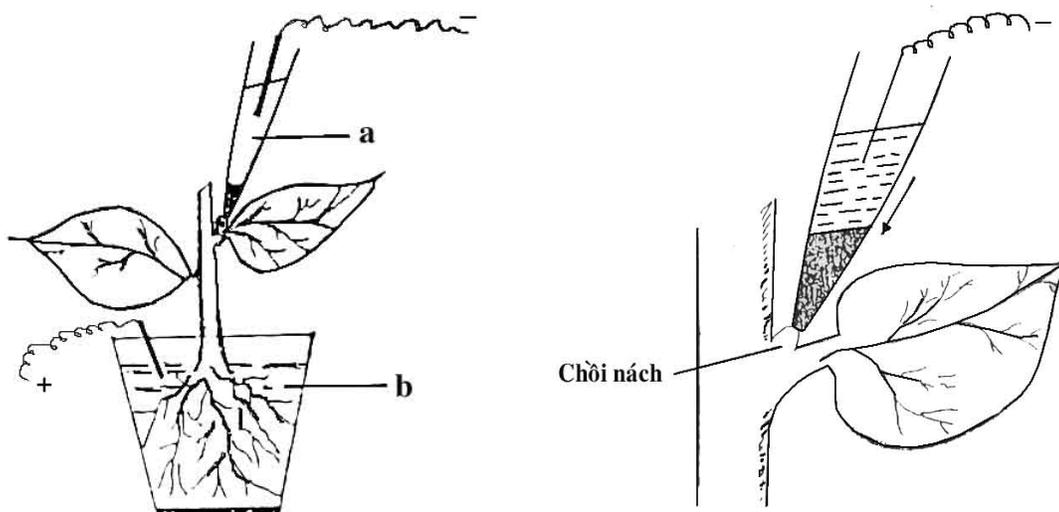
Phương pháp này được phát triển bởi Kaeppler và các cộng sự (1990). Đây là phương pháp rất đơn giản. Hỗn hợp DNA plasmid chứa các gen chỉ thị và chọn lọc được lắng với các sợi silicon carbide. Kết quả là tế bào thực vật đã được chuyển gen. Biểu hiện GUS cũng đã được quan sát sau khi lắng các huyền phù tế bào đơn của thuốc lá hay bắp với sợi silicon carbide.

Quan sát hiển vi cho thấy, các sợi silicon carbide có độ cứng rất cao, khi lắng với tế bào có tác dụng như những mũi kim nhỏ giúp DNA dễ xâm nhập vào trong tế bào. Sợi silicon carbide là những tinh thể đơn giản có đường kính khoảng 0,6 μm và chiều dài thay đổi từ 10-80 μm . Các sợi này có độ cứng rất cao và tạo thành các vật liệu cứng chắc có tính chất lý hoá tương tự như sợi amiant. Lợi thế của phương pháp này là đơn giản, dễ thích ứng, tần số biến nạp gen khá cao.

3.5 - Phương pháp điện di

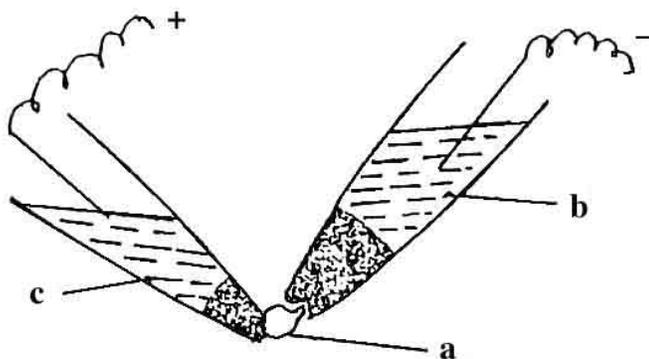
Phương pháp chuyển gen trực tiếp vào mô thực vật bằng điện di do Ahokas (1989) đề xuất và Griesbach (1994) cải tiến. Mô thực vật, thường là đỉnh sinh trưởng, được đặt giữa 2 cực của một hệ điện di. DNA ngoại lai được hòa sẵn trong gel agarose, di chuyển theo điện trường xâm nhập vào mô thực vật (qua vách và màng tế bào) tiếp cận với bộ máy di truyền của tế bào, nhờ vậy gen ngoại lai được chuyển và biểu hiện (hình VI.9). Cải tiến quan trọng của Griesbach là toàn bộ quá trình chuyển gen thực hiện trong điều kiện không vô trùng, hoàn toàn không cần thiết phải sử dụng các thao tác cấy mô tế bào thực vật.

Phương pháp chuyển gen bằng điện di đã thực hiện thành công ở phôi lúa mì đang nảy mầm (Ahokas, 1989) và protocorm phong lan, cúc (Griesbach, 1994).



A. Chuyển gen vào chồi nách.

a. Gel agarose chứa ADN, b. Chậu trồng cây



B: chuyển gen vào protocorm hoa lan

Hình VI.9 - Chuyển gen trực tiếp bằng phương pháp điện di

a. Protocorm, b. Gel agarose chứa ADN, c. Gel agaose

3.6 - Phương pháp dùng siêu âm

Siêu âm là một phương pháp mới dựa trên cách tác động của sóng siêu âm có khả năng tạo ra những biến động của màng tế bào. Sự biến động này gây ra sự xáo trộn ở màng tế bào dẫn đến tới một sự xâm nhập các phân tử lạ vào trong tế bào.

Hiện nay, cơ chế tác động của siêu âm chưa rõ nhưng người ta cũng đã ứng dụng phương pháp này cho chuyển gen. Protoplast, tế bào đơn hay các mô thực vật được trộn trong vài ml dung dịch dùng cho siêu âm. Phân tử DNA cần chuyển được thêm vào hỗn hợp. Dưới tác động của siêu âm ở cường độ và thời gian thích hợp, DNA đi vào tế bào và biểu hiện.

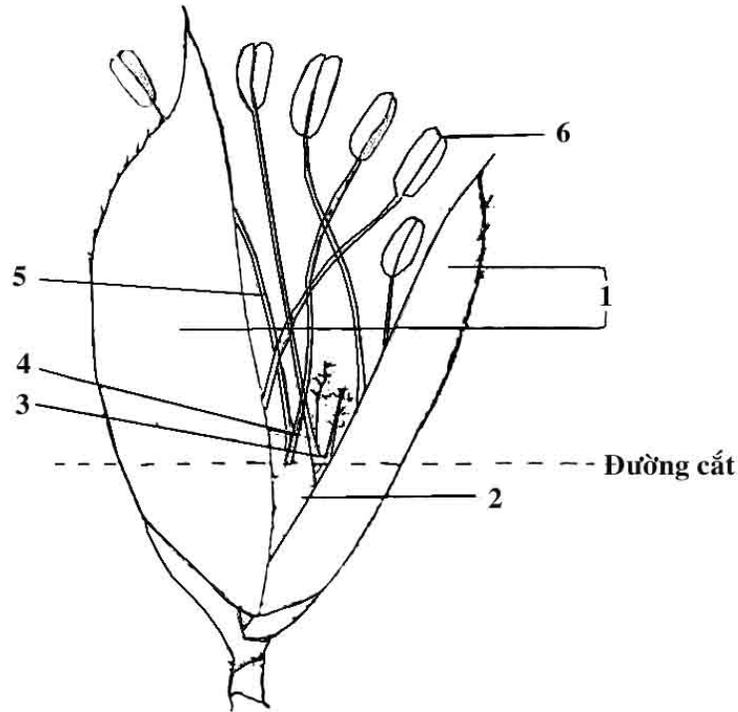
Phương pháp này thường dùng kết hợp với các phương pháp chuyển gen dùng *Agrobacterium* để tăng hiệu quả của sự tiếp xúc của vi khuẩn vào trong tế bào thực vật. Phương pháp này cho thấy làm gia tăng hiệu quả của sự chuyển gen lên từ 100÷1400 lần trong các mô của đậu nành, lúa mì và bắp.

3.7 - Chuyển gen trực tiếp qua ống phấn cây lúa

Chuyển gen trực tiếp qua ống phấn được nhóm Ray Wu, đại học Cornett (Hoa Kỳ) thực hiện thành công ở cây lúa. DNA theo đường ống phấn chui vào bầu nhị cái và tạo nên sự chuyển gen ngay sau khi hạt phấn mọc qua vòi nhị và sự thụ tinh xảy ra (hình VI.10). Về nguyên tắc, phương pháp này có thể được áp dụng cho nhiều loài cây không chỉ ở lúa.

Sự chuyển gen qua ống phấn tốt nhất thực hiện ngay sau quá trình thụ tinh xảy ra ở noãn, nhưng tế bào sinh dục cái chưa kịp phân chia. Nếu làm được như vậy, sự chuyển gen sẽ được thực hiện đối với một số tế bào sinh sản cái duy nhất và sau khi tái sinh cây sẽ tránh được xuất hiện thể khảm. Cần lưu ý, khi cắt hoa lúa không được gây tổn thương bầu nhị, nhưng chỗ cắt trên trên vòi nhị cái phải tương

đối gần với noãn sào để DNA có thể xâm nhập dễ dàng. Thời gian từ lúc hoa nở đến lúc cắt phải đủ để hạt phấn mọc, phát triển qua vòi nhị và thụ tinh. Thường khoảng 1÷2 giờ.



Hình VI.10 - Chuyển gen qua ống phấn

1: Vỏ trấu, 2: Bầu nhị cái, 3: vòi nhị cái, 4: nhị cái, 5: cuống túi phấn, 6: túi phấn

4 - NHỮNG THÀNH TỰU CHUYỂN GEN Ở THỰC VẬT

Việc tạo ra thực vật chuyển gen có khả năng biểu hiện gen lạ là vấn đề được đặt ra để phục vụ cho các mục tiêu khác nhau của ngành nông nghiệp. So với các phương pháp lai tạo và chọn giống cổ điển, kỹ thuật chuyển gen có một số ưu thế: nó cho phép đưa vào thực vật một gen lạ thậm chí không hề có nguồn gốc thực vật. Ngoài việc cải thiện giống người ta còn đặt trọng tâm vào việc chuyển các gen có khả năng kháng với những điều kiện ngoại cảnh bất lợi cũng như các hoá chất sử dụng trong nông nghiệp.

4.1 - Cây chuyển gen kháng thuốc diệt cỏ, virus và côn trùng

4.1.1 - Cây chuyển gen kháng thuốc diệt cỏ

Các loại thuốc diệt cỏ (ví dụ thuốc diệt cỏ Basta) thường tấn công vào các hệ thống chuyển hoá chủ yếu của thực vật như:

- Cản hoạt động hệ thống quang hợp: chất triazine
- Cản sự sinh tổng hợp acid amin: chất glyphosate, phosphinotricine

Sự tấn công này không kể thực vật là cây trồng hay cỏ dại. Do vậy, cần phải tạo ra những giống cây trồng kháng được với nhiều loại thuốc diệt cỏ. Hai chiến lược đề kháng chính là:

- Phân tử “đích” của chất diệt cỏ trong tế bào sẽ được biến đổi sao cho không còn phản ứng với chất diệt cỏ hoặc phân tử này sẽ được tổng hợp với hàm lượng cực lớn để làm giảm tính nhạy cảm đối với thuốc diệt cỏ. Ví dụ: Gen *aroA* mã hoá cho enzym 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphat synthase (EPSP) được chuyển vào cây thuốc lá tạo dòng thuốc lá kháng glyphosate. EPSP là đích tấn công của loại thuốc diệt cỏ này sẽ được tổng hợp vượt mức để làm giảm tính nhạy cảm đối với glyphosate trong thuốc lá chuyển gen.

- Chuyển vào thực vật một gen mã hoá cho một enzym khử độc hay phân huỷ thuốc trừ sâu. Ví dụ như việc chuyển gen mã hoá cho enzym phosphinothricin acetyltransferase có khả năng khử độc phosphinothricin (PPT) sẽ tạo ra cây kháng được với PPT và Bialaphos.

4.1.2 - Cây chuyển gen kháng virus, côn trùng gây bệnh

Biện pháp để cải tạo các thực vật kháng virus gây bệnh là tạo dòng và cho thể hiện trong thực vật các gen mã hóa cho một số trình tự ở virus như gen mã hóa cho protein capsid của virus. Chính sự biểu hiện các gen của một chủng virus sẽ bảo vệ cây khỏi sự xâm nhiễm của một chủng khác có quan hệ gần. Biện pháp này dựa trên một hiện tượng xảy ra trong tự nhiên có tên là “bảo vệ chéo”. Các thí nghiệm đã được tiến hành trên cây thuốc lá, dưa chuột, khoai tây đã xác nhận điều này.

Các thực vật kháng sâu bệnh thu hút được mối quan tâm lớn của người làm nông nghiệp. Một mặt vì chi phí dành cho thuốc trừ sâu cao nhất là khi tình hình sâu bệnh kháng thuốc trở nên phổ biến. Mặt khác việc tăng hàm lượng thuốc trừ sâu có tác động xấu đến sinh thái môi trường và làm hại đến cả những côn trùng có ích. Biện pháp đầu tiên được sử dụng là tạo dòng gen mã hoá cho nội độc tố của vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* và chuyển vào thực vật. Cà chua chuyển gen này đã kháng sâu của nhiều loài bướm. Nhược điểm của phương pháp này là phổ kháng tương đối hẹp. Một biện pháp khắc phục được nhược điểm này dựa vào việc tạo dòng và chuyển gen mã hoá cho các chất ức chế trypsin đã thành công trên cây thuốc lá. Gen này vốn có ở đậu bò (cowpea), sản sinh các chất ức chế trypsin có khả năng kháng lại với rất nhiều loại côn trùng.

4.2 - Tạo cây chuyển gen sản xuất các hợp chất mới

Với mức sống ngày càng được nâng cao, yêu cầu về protein trong thực phẩm ở người càng gia tăng. Điều này dẫn đến sự phát triển mạnh của ngành chăn nuôi và nhu cầu về thức ăn gia súc. Một số thức ăn gia súc hiện nay ở nhiều nước trên thế giới (bột bắp, bột đậu nành...) có hàm lượng amino acid chứa sulphur quá thấp. Người ta đã thử nghiệm chuyển gen mã hóa cho một protein giàu methionin vào

cây thuốc lá và đã đạt được một hàm lượng trên 8% protein này trên tổng hàm lượng của hạt. Kết quả này mở ra triển vọng sản xuất các thực vật chuyển gen có giá trị thực phẩm cao.

Thaumatococin là những protein được chiết xuất từ thịt quả của cây *Thaumatococcus daniellii*, có độ ngọt gấp 10.000 lần đường saccharose. Người ta đã thành công trong việc chuyển một gen mã hoá cho một thaumatococin (thaumatococin II) vào cây khoai tây, tạo một cây khoai tây có lá, thân, rễ, củ đều ngọt. Điều này mở ra một triển vọng rất lớn đối với cây ăn quả ngọt.

Một ứng dụng khác là chuyển gen tạo cây có khả năng sản xuất những loại protein mới. Người ta đã tạo thành công hai loài thuốc lá, mỗi loài có khả năng sản xuất một trong hai mạch immunoglobulin nhẹ và nặng. Thế hệ con sinh ra từ sự lai hai loại cây trên biểu hiện được một kháng thể hoạt động gồm cả hai mạch với hàm lượng cao (1,3% tổng protein của lá) và có tất cả các đặc tính của một kháng thể đơn dòng sản sinh từ hybridoma.

4.3 - Tạo cây chuyển gen có những đặc tính quý

4.3.1 - Tính bất thụ đực ở cây hoa màu

Các cây hoa màu đạt năng suất cao hiện nay đều được trồng từ hạt lai qua một quá trình chọn lọc khắt khe. Các hạt này có ưu thế lai cao vì là kết quả của những quá trình lai xa. Do đó, ở những cây tự thụ phấn như bắp chẳng hạn, trước kia người ta dùng công lao động để loại bỏ cờ bắp (cụm hoa đực) nhằm tránh hiện tượng tự thụ phấn. Những công trình thử nghiệm chuyển một phức hợp gồm gen *rolC* của *Agrobacterium tumefaciens* và promoter 35S CaMV (Cauliflower Mosaic Virus- virus gây bệnh đốm ở cải hao) vào cây thuốc lá đã tạo được cây chuyển gen bất thụ. Kết quả này đang được nghiên cứu áp dụng trên những loại hoa màu khác.

4.3.2 - Tính chịu hạn

Khi nghiên cứu cây *Crasterostigma plantagineum* có khả năng chịu hạn, người ta đã phát hiện được một số gen chỉ biểu hiện ở các mô có tính chịu hạn. Phát hiện này mở ra những triển vọng tạo dòng, phân tích và chuyển gen vào thực vật tạo các cây có tính chịu hạn cao.

4.3.3 - Màu sắc hoa

Cây hoa Dã yên (*Petunia*) tự nhiên có màu tím. Khi người ta chuyển gen mã hoá cho chalcone synthase (CHS), một enzym chủ yếu trong con đường tổng hợp các sắc tố anthocyanin, vào cây hoa thì thu nhận được những cây cho hoa màu trắng hoặc đỏ. Nguyên nhân là do gen CHS được chuyển gắn xen vào một vị trí bất kỳ trên bộ gen sẽ gây ra hiện tượng "đồng loại bỏ" (co-suppression), ức chế sự biểu hiện của gen CHS nội bào dẫn đến sự hình thành các màu mới.

Tóm tắt

Với những biến động xấu về điều kiện tự nhiên, sự gia tăng dân số, diện tích đất nông nghiệp dùng cho trồng trọt ngày một thu hẹp như hiện nay, một yêu cầu có tính cấp bách là phải tạo ra những loại thực vật có tốc độ phát triển cao, năng suất vượt trội, khả năng chống chịu với các điều kiện tự nhiên vượt xa các loại cây trồng truyền thống. Một trong những cách để thực hiện được điều đó là dựa vào công nghệ gen.

Công nghệ gen thực vật dựa vào tính toàn thể của tế bào thực vật. Từ một vài tế bào có thể tái sinh thành cây hoàn chỉnh. Điều này rất có ý nghĩa đối với công nghệ gen.

Bằng các phương tiện chuyển gen: gián tiếp (plasmid, vi khuẩn, virus...), trực tiếp (dùng súng bắn gen, vi tiêm, vi sợi silicon carbide, siêu âm...) các gen quy định các đặc tính quý, mong muốn được chuyển vào thực vật. Các thực vật chuyển gen này có các đặc tính quý vượt xa các thế hệ cha mẹ của chúng.

Sản phẩm từ các thực vật chuyển gen này có ảnh hưởng xấu đến sức khỏe con người không?, hiện nay vẫn còn đang là một câu hỏi. Chính vì vậy, các sản phẩm từ cây chuyển gen có được tiêu thụ rộng rãi hay không thì vẫn đang là đề tài gây nhiều tranh cãi.

Tuy nhiên, với bất cứ sự cấm đoán, ngăn chặn nào, thực vật chuyển gen vẫn không ngừng phát triển cả về số lượng lẫn chất lượng. Trong tương lai, thực vật chuyển gen sẽ là một giải pháp hiệu quả cho các khó khăn của thế giới loài người về lương thực, diện tích trồng trọt, diễn tiến xấu của các điều kiện tự nhiên...

Câu hỏi ôn tập

1. Trình bày các đặc tính của tế bào, hệ DNA thực vật.
 2. Trình bày phương pháp chiết tách DNA tế bào thực vật
 3. Trình bày các phương pháp chuyển gen ở thực vật
 4. Trình bày những thành tựu chuyển gen ở thực vật
-

CHƯƠNG VII

CÁC PHƯƠNG PHÁP CHỌN GIỐNG THỰC VẬT

A - NUÔI CẤY ĐƠN BỘI

1 - Ý NGHĨA CỦA NUÔI CẤY ĐƠN BỘI TRONG DI TRUYỀN CHỌN GIỐNG

Từ năm 1942, các nhà khoa học đã chứng minh các dòng nhị bội thuần đồng hợp có thể thu được bằng cách nhị bội hóa các thể đơn bội. Nhờ vậy rút ngắn rất nhiều thời gian tạo các dòng thuần so với các phương pháp cổ điển dựa trên sự thụ phấn. Vấn đề cũng tương tự khi ta muốn có các dòng đa bội đồng hợp tử. Do không có tính trội lặn ở thể đơn bội, kiểu hình của cây phản ánh trung thực kiểu gen. Bởi vậy, chúng là những nguyên liệu lý tưởng để sử dụng trong chọn giống bằng phương pháp đột biến. Thể đơn bội còn giúp cho di truyền học tìm hiểu được vai trò của DNA nhân và DNA tế bào chất, xác định được các tính trạng liên quan nhiều đến di truyền tế bào chất. Chúng còn có thể sử dụng trực tiếp trong trồng trọt, thí dụ ở một số cây cảnh do có hoa nhỏ hơn và thời gian sống lâu hơn thể nhị bội nhờ có tính bất dục.

Bởi phải kiên trì tìm kiếm trong một khối lượng cá thể vô cùng lớn để phát hiện ra thể đơn bội tự nhiên xuất hiện với tần suất vô cùng nhỏ ($10^7 \div 10^8$). Các phương pháp cổ điển để nhận cây đơn bội như đi tìm và chọn những phôi kép, những cây sinh đôi $n-2n$, $n-3n...$ đều rất tốn công và kém hiệu quả. Phương pháp nuôi cấy túi phấn và hạt phấn ra đời đã làm giảm hẳn thời gian và công sức, đồng thời tăng vọt số lượng thể đơn bội thu được. Hiện nay hơn 65 loại cây đã được trồng thành công bằng nuôi cấy túi phấn và hạt phấn. Phương pháp này đã được nhiều phòng thí nghiệm trên thế giới quan tâm, thậm chí được đưa và chương trình chọn giống cây trồng như ở Pháp, Trung Quốc... và đã cho kết quả khả quan.

2 - ỨNG DỤNG PHƯƠNG PHÁP NUÔI CẤY TÚI PHẤN TRONG CÔNG TÁC CHỌN GIỐNG LÚA

2.1 - Chọn vật liệu khởi nguyên

Để chọn những kiểu gen thích hợp dùng làm vật liệu khởi nguyên, chúng ta chú trọng đến các tính trạng chính là năng suất cao, chịu phèn, chịu mặn, kháng rầy, chín sớm. Đó cũng là những tính trạng mong muốn nhất đối với nhiều vùng trồng lúa Việt Nam, đặc biệt ở các tỉnh phía Nam. Có thể đối với tính trạng trên, đã dùng những giống sau làm vật liệu khởi nguyên:

- Năng suất cao: TN 737, IR 36
- Chịu phèn: Trắng lùn, Sa quay
- Chịu mặn: Nàng co đỏ
- Kháng rầy: IR 36, IR 2307

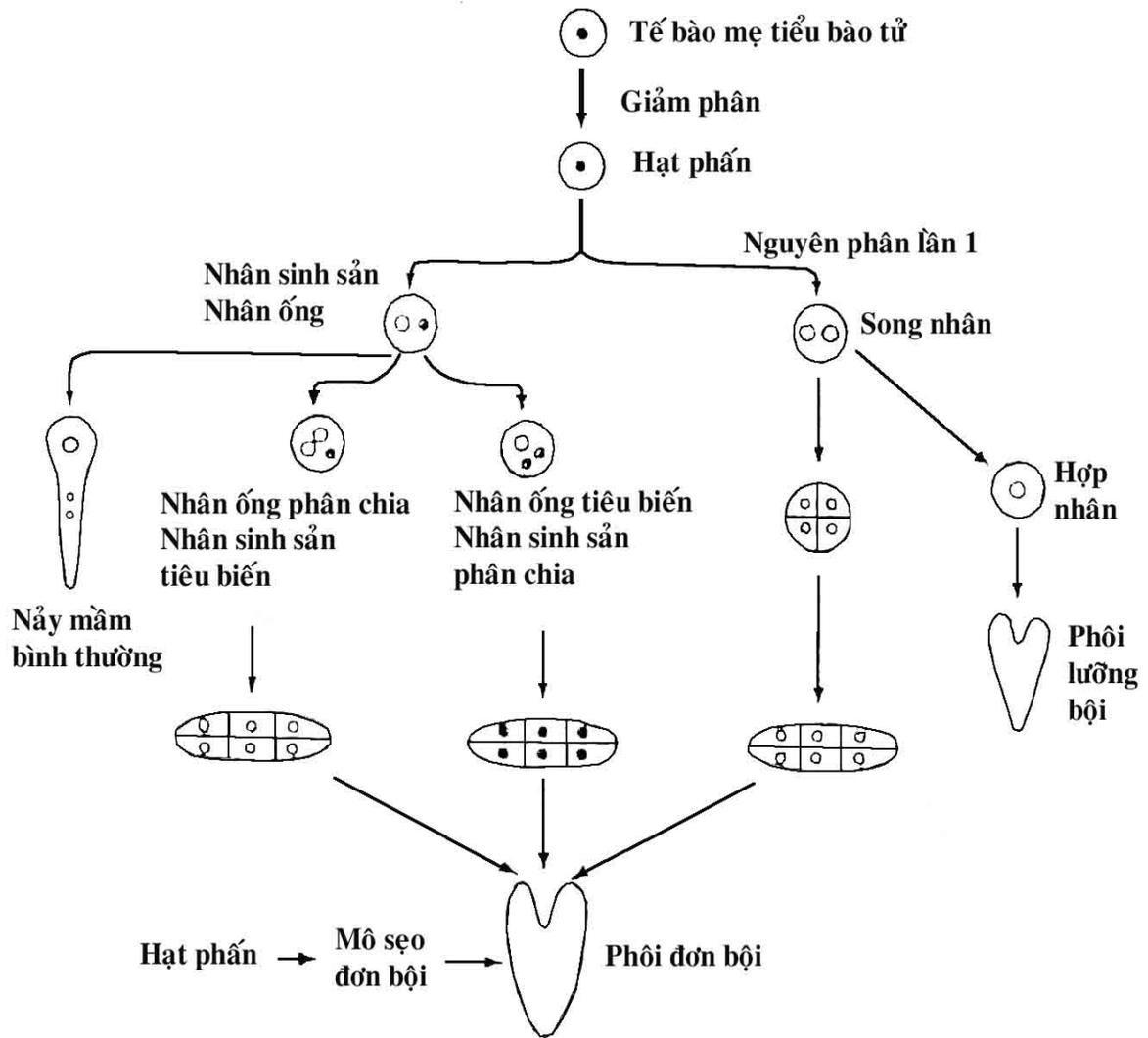
- Ngắn ngày: Lúa sớm

Một số tính trạng trên là đơn gen (do một gen quyết định) như tính kháng rầy nâu, tính chịu phèn, một số khác là đa gen (chẳng hạn năng suất lúa do một tập hợp của nhiều gen quyết định). Ngoài ra, để tăng khả năng tạo cây từ túi phấn cây lai, dùng các dòng đơn bội kép (ký hiệu D) thu được từ IR 1717, một giống có hiệu suất tạo cây từ túi phấn cao. Tuy nhiên, công tác tạo giống lúa cũng gặp những khó khăn nhất định như: các gen quyết định các tính trạng trên thường phân bố rải rác ở các giống lúa khác nhau và tác động kìm hãm của các gen ức chế. Thí dụ, tính kháng rầy nâu được quyết định bởi gen *Bph 2* tìm thấy ở giống TKM 6 (đã được dùng để lai tạo giống lúa kháng rầy do tác động của một gen ức chế). Nhưng trong việc lai tạo chỉ có gen *Bph 2* được chuyển sang dòng lai cải thiện. Vì vậy, các dòng lai có khả năng kháng rầy mạnh. Trong khi phương pháp lai vô tính như qua dung hợp protoplast và tái sinh cây lúa chưa được hoàn thiện, lai hữu tính vẫn là phương pháp duy nhất và tốt nhất để tạo ra những tổ hợp gen mong muốn, tập hợp được các tính trạng trên vào cùng một cá thể, đồng thời góp phần khử tác động của các gen ức chế ở mức độ nhất định.

Những tổ hợp gen mới được tạo ra bằng phương pháp lai hữu tính:

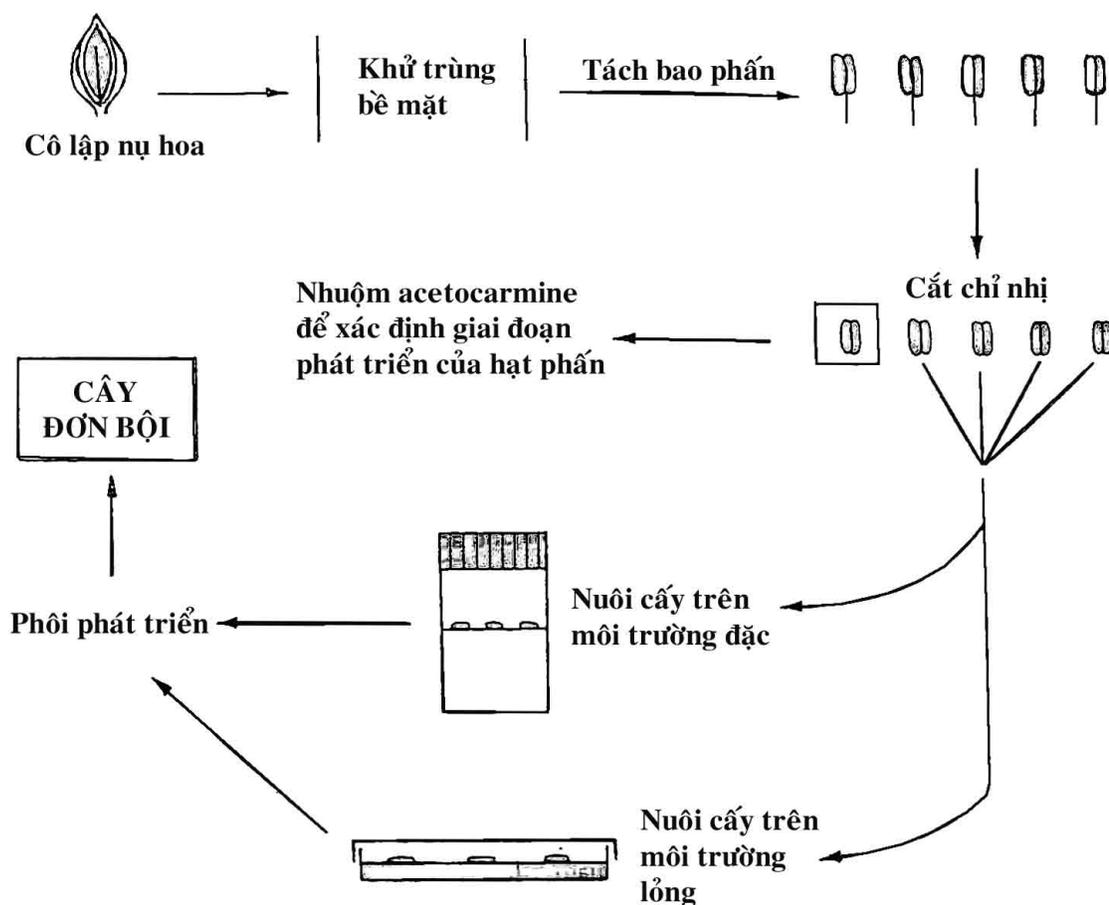
Bảng . Các tổ hợp gen mới và các tổ hợp bố mẹ

Tổ hợp gen	Tổ hợp bố mẹ	
III	Trắng lùn	x IR 2307
V	Trái mây dài	x IR 36
VI	Trắng lùn	x D 6
VIII	(IR 36 x Sa quay)	x D 29
XX	IR 36	x D 58
XXII	IR 36	x D 31
XXVIII	Sa quay	x Lúa sớm



Hình VII.1 - Sự phát triển của hạt phấn trong điều kiện *in vivo* và *in vitro*.

Trong điều kiện *in vivo*, hình thành 2 giao tử, tế bào nhân hình ống và ống chứa hạt phấn. Trong điều kiện *in vitro*, hạt phấn tiến hành phân chia tạo thể đơn bội, sự giảm phân lần đầu tiên có thể tạo 2 nhân tương đồng và sự phân chia lặp lại tạo phôi đơn bội, tuy nhiên nhân tương đồng có thể dung hợp tạo thành thể phôi nhị bội. Mô sẹo của hạt phấn đơn bội có thể được tạo ra từ hạt phấn đơn bội trong tự nhiên (hình VII.1).



Hình VII.2 - Phương pháp cơ bản tạo cây đơn bội từ nuôi cấy hạt phấn *in vitro*.

Khử trùng bề mặt chồi ngọn có chứa phát hoa và tách hạt phấn ra khỏi phát hoa. Nhuộm hạt phấn bằng acetocarmine để xác định giai đoạn phát triển của hạt phấn. Hạt phấn được nuôi cấy trên môi trường rắn (có agar hay lỏng). Hạt phấn phát triển thành phôi đơn bội từ mô sẹo đơn bội. Và tái sinh mô sẹo đơn bội thu được cây đơn bội (hình VII.2).

2.2 - Nuôi cấy túi phấn hạt lai

2.2.1 - Kỹ thuật nuôi cấy túi phấn (hình VII.3)

Túi phấn nuôi cấy chỉ cho cây đơn bội khi chứa hạt phấn ở những giai đoạn phát triển thích hợp (đa số các loài giai đoạn này từ đơn nhân đến mitosis 1). Ở lúa có sự tương quan rõ rệt giữa giai đoạn phát triển của hạt phấn với hình thái bên ngoài của hoa và đòng. Giai đoạn phát triển của túi phấn thích hợp cho nuôi cấy tương ứng với lúc khoảng cách giữa tai lá đòng và lá thứ 2 khoảng 2÷3 cm. Bóc vỏ lá đòng lúc này sẽ thấy đầu vỏ hạt lúa có màu xanh lá mạ nhạt, các túi phấn bên trong vỏ có màu vàng nhạt và chiếm hơn 1/3 chiều dài hạt lúa. Gié lúa càng thấp, hiệu suất tạo cây đơn bội càng cao.

Đòng lúa sau khi chọn được bọc trong bao nylon kín giữ ẩm và để ở 10°C trong tối 48÷72 giờ trước khi nuôi cấy. Khác với những nụ hoa thông thường được

khử trùng bằng dung dịch Ca-hypoclorite 1÷5% trong 5÷15 phút, ở lúa do bông được bọc kín trong lá đồng ít bị nhiễm bẩn nên chỉ cần rửa nước và lau qua đồng lúa bằng cồn 70°. Bóc vỏ bẹ lá đồng, chọn những gié lúa thích hợp và khử trùng chúng trong dung dịch Ca-hypoclorite 2% trong khoảng 5 phút. Có thể dùng những chất khử trùng khác như HgCl₂ 0,2% hay H₂O₂ và tăng hiệu quả khử trùng bằng những chất có hoạt tính bề mặt như tween 80, fotoflo, teepol (0,2%). Môi trường và dụng cụ nuôi cấy được khử trùng. Việc cấy được thực hiện trong tủ cấy vô trùng.

Sau khi khử trùng, hoa lúa được rửa kỹ 5-7 lần bằng nước cất vô trùng. Dùng kéo cong cắt đầu và một cạnh của vỏ hoa lúa cho lộ rõ các túi phấn, sau đó dùng pince tách cẩn thận các túi phấn và đặt nhẹ lên môi trường thạch nghiêng trong ống nghiệm. Chú ý, tránh gây tổn thương các túi phấn làm giảm khả năng phát sinh mô sẹo và dễ gây nhiễm. Sau khi cấy dùng parafilm dán kín nắp ống nghiệm lại. Nên dùng loại ống nghiệm 25x100 mm, có nắp thuỷ tinh với mật độ cấy là 18 túi phấn trên một ống nghiệm. Sau khi thí nghiệm, cho thấy môi trường thích hợp cho tạo mô sẹo ở lúa là N₆ cải tiến.

Tùy theo yêu cầu của từng loại cây, người ta chọn những điều kiện nuôi cấy thích hợp. Thông thường các túi phấn được nuôi ở nhiệt độ 24÷27°C, cường độ ánh sáng 2000 lux, chu kỳ chiếu sáng 14 giờ/ngày. Ở lúa cũng như các loài tạo cây qua mô sẹo, nói chung thời kỳ tạo mô sẹo có thể nuôi trong tối, nhưng qua giai đoạn tái sinh cây từ mô sẹo nhất định phải được chiếu sáng đầy đủ. Chất lượng ánh sáng cũng ảnh hưởng đến khả năng tạo mô sẹo và cây từ nuôi cấy túi phấn. Trong các thí nghiệm, ánh sáng thường được sử dụng có cường độ 2000 lux với thời gian chiếu sáng 9 giờ/ngày. Quan sát sự phát triển của hạt phấn cây lúa sau khi nuôi cấy 3-5 ngày nhận thấy hạt phấn phát triển theo hai hướng:

- Phần lớn các hạt phấn tiếp tục phát triển và phân chia bình thường, tạo thành 2 nhân sinh trưởng và sinh sản. Nhân sinh trưởng to, nhân sinh sản nhỏ hơn nằm sát vách tế bào.

- Một số ít hạt phấn phát triển và phân chia thành 2 nhân bằng nhau. Sau 5÷7 ngày, chúng tiếp tục phân chia nhanh để tạo nên 4÷8 nhân, vào khoảng 10 ngày sau, các tiền phôi dạng cầu có kích thước lớn với 32 nhân hình thành.

Sau khi cấy được 20÷30 ngày, từ một số túi phấn xuất hiện các mô sẹo hình cầu nhỏ màu trắng, chúng phá vỡ vỏ túi phấn và phát triển rất nhanh. Điều này chứng tỏ bản thân mô sẹo của các túi phấn lúa nuôi cấy cũng hình thành từ các tiền phôi. Mô sẹo đạt 0,5÷1 mm (tương ứng 10÷15 ngày tuổi) được cấy chuyển sang môi trường tái sinh, chứa 60 ml môi trường trong các bình tam giác 250 ml. Mỗi bình cấy 5÷6 mô. Mô sẹo non hơn (khoảng 0,5 mm, dưới 10 ngày tuổi) khi cấy chuyển thường chết nhiều và cho số chồi xanh từ một mô ít hơn. Cũng không nên cấy chuyển muộn hơn, vì mô sẹo càng già khả năng tái sinh càng kém.

Môi trường tái sinh cây lúa từ mô sẹo:

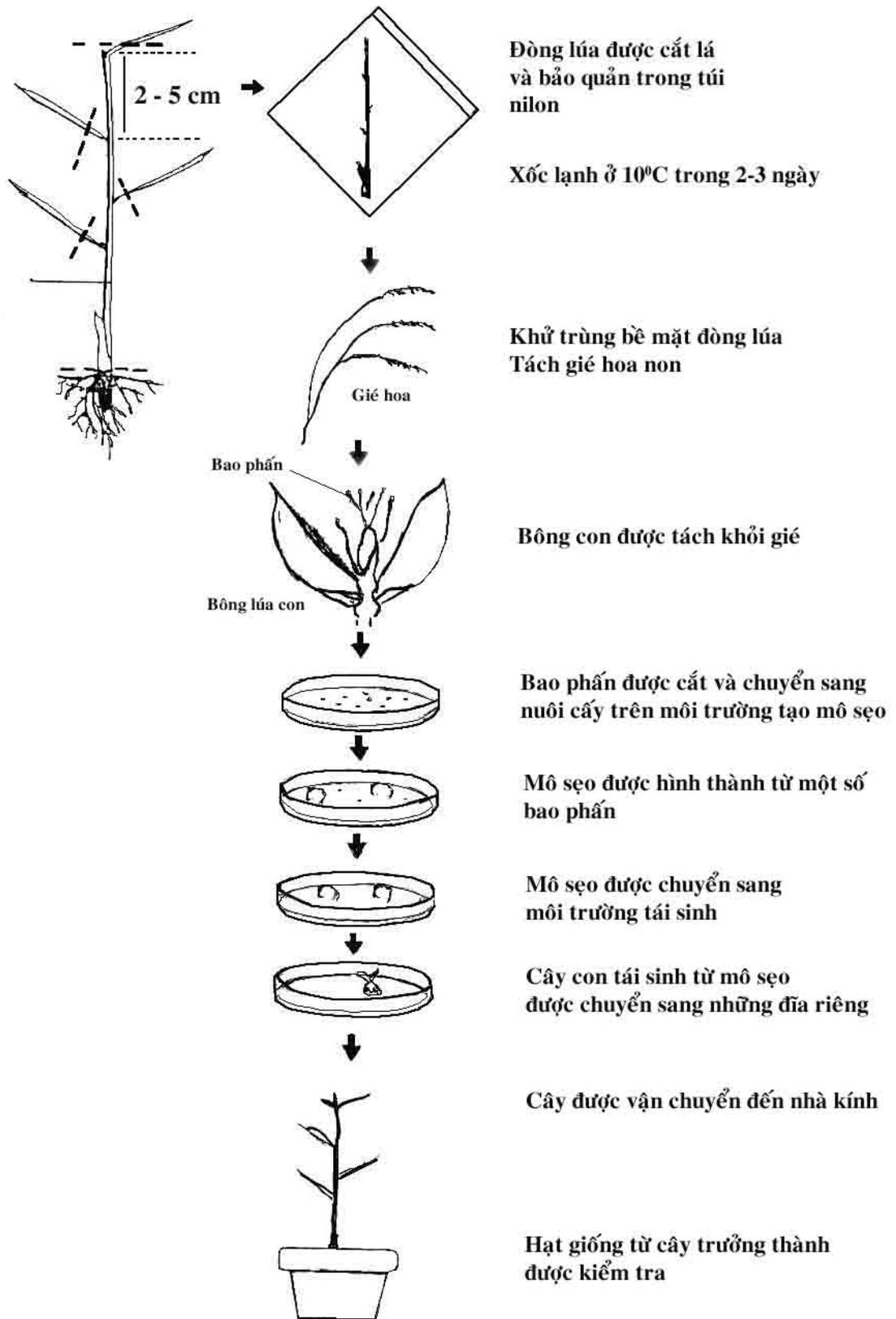
Thành phần	Hàm lượng
Đa lượng	môi trường N ₆
Vi lượng	môi trường N ₆
Vitamin	môi trường N ₆
Sucrose	30 g/lít
Agar:	30g/lít
Yeast extract	1g/lít
Than hoạt tính	1 g/lít
IAA	0,2 ppm
Kinetin	1 ppm

pH môi trường tái sinh: pH 5,8

Trên môi trường tái sinh, kích thước mô sẹo tăng khá nhanh. Sau vài tuần một số mô xuất hiện những điểm xanh, từ chúng hình thành chồi, sau phát triển thành cây, đồng thời những rễ trắng xuất hiện ăn lan vào môi trường thạch.

Một mô có thể cho nhiều cây. Những mô không tái sinh được, sau một thời gian sẽ đen dần và rồi chết. Khi cây cao khoảng 8-10 cm, có thể cấy chuyển sang môi trường White là bước trung gian trước khi chuyển cây ra đất. Thời gian này, cây tăng trưởng mạnh, nên mỗi cấy được cấy vào một ống nghiệm 25x200 mm, cường độ chiếu sáng 3000 lux. Những cây nhỏ hơn được tiếp tục nuôi trên môi trường tái sinh.

Ngoài cây xanh (có diệp lục) còn có những cây bạch tạng, ở lúa đạt đến 50% hoặc hơn. Nguyên nhân tạo cây bạch tạng chưa rõ, có thể hạt phấn chứa ít diệp lục hoặc do điều kiện nuôi cấy làm giảm số lượng lục lạp trong tế bào mô sẹo.



Hình VII.3 - Những bước nuôi cấy túi phấn lúa

2.2.2 - Những yếu tố ảnh hưởng đến khả năng tạo cây trong nuôi cấy túi phấn

- Tuổi phát triển của hạt phấn

Cây đơn bội chỉ có thể thu được khi cấy túi phấn ở giai đoạn phát triển thích hợp, bắt đầu từ bộ 4 cho đến ngay sau mitosis. Tuy nhiên, không phải tất cả các loài đều cho hiệu suất tối ưu ở giai đoạn trước hoặc sau mitosis 1. Về mặt này, các loài hoà thảo có nhiều điểm khác nhau, ở đại mạch hiệu suất tạo cây cao nhất ở giai đoạn đơn nhân muộn.

- Tình trạng sinh lý của cây cho túi phấn

Hiệu suất tạo cây đơn bội từ nuôi cấy túi phấn phụ thuộc nhiều vào tình trạng sinh lý của cây cho túi phấn. Hiệu suất này phụ thuộc vào mùa vụ khi cây được trồng trong điều kiện tự nhiên. Ở Trung Quốc, thời gian nuôi cấy túi phấn có hiệu quả cao nhất là tháng 4 và 5. Ở Tp. Hồ Chí Minh là tháng 10÷12. Khả năng cho mô sẹo cao nhất ở túi phấn lấy trong lần trở hoa đầu tiên và giảm dần trong những lần lấy mẫu sau.

- Kiểu gen

Nhiều tác giả cho rằng, điều kiện ngày dài, cho khả năng tạo cây từ túi phấn kém hơn so với ngày ngắn. Ngay trong cùng một loài, khả năng tạo cây từ túi phấn cũng khác nhau rõ rệt tùy theo kiểu gen. IR 1717 có khả năng cho mô sẹo và cây cao hơn hẳn những giống lúa khác trong các thí nghiệm. Giống lúa hạt to có hiệu suất tạo mô sẹo cao, nhưng hiệu suất tái sinh còn thấp. Tuy nhiên không loại trừ khả năng, mỗi kiểu gen cần một tập hợp những điều kiện tối ưu để thể hiện khả năng tạo mô sẹo và cây của mình. Túi phấn cây lúa mì đơn bội kép cho tỷ lệ mô sẹo cao 3÷10 lần so với cây lúa bình thường. Ở các cây lai, việc tạo cây từ nuôi cấy túi phấn dễ dàng hơn.

- Tác nhân hoá lý

Hiệu suất tạo cây từ túi phấn cũng có thể tăng, nếu xử lý cây cho túi phấn bằng một số các tác nhân hoá lý. Hiệu suất tạo mô sẹo tăng khi xử lý cây cho túi phấn bằng ethrel (2-chloroethyl phosphoric acid) ở 10°C trong 48 giờ. Nụ hoa thuốc lá sau khi ủ lạnh 4°C từ 2 đến 4 ngày trong điều kiện ẩm cho tỷ lệ tạo cây cao. Hiện nay người ta cho rằng, xử lý lạnh trước khi cấy làm tăng tỷ lệ tạo cây từ túi phấn ở hầu hết các loại cây. Ở lúa mì có thể giữ các loại hoa trong lạnh 4°C trong 2÷20 ngày. Nhiệt độ thấp làm ngừng chu trình phân bào ở nhiều tiểu bào tử vào giai đoạn đơn nhân muộn, làm thay đổi phân bào nguyên nhiễm (tạo hạt phấn với hai nhân giống nhau) hoặc kéo dài thời gian để hạt phấn phát triển theo hướng sinh dưỡng. Cả hai cách trên đều làm tăng khả năng tạo mô sẹo và cây từ túi phấn. Phương pháp ủ lạnh mẫu trước khi đưa vào nuôi cấy túi phấn, không những làm tăng tỷ lệ tạo cây mà còn cho phép giữ mẫu lâu hơn giúp ta chủ động hơn, trong

khi tiến hành các thí nghiệm. Tuy nhiên nếu thời gian ủ lạnh quá lâu sẽ làm ảnh hưởng xấu lên hiệu suất tạo cây. Ở lứa thời gian ủ lạnh không nên kéo dài quá 5 ngày.

2.3 - Nhị bội hoá cây đơn bội từ nuôi cấy túi phấn

Không phải tất cả các cây từ nuôi cấy túi phấn đều là đơn bội. Về hình thái có thể phát hiện cây đơn bội theo một vài tính trạng của chúng như thấp cây, lá nhỏ, màu nhạt hơn cây nhị bội. Theo dõi và kiểm tra nhiễm sắc thể các cây con từ túi phấn cho thấy tỷ lệ gia bội tự nhiên của chúng khá cao, khoảng 20÷50% là cây đơn bội. Thực nghiệm cho thấy, có mức bội thể khác nhau (1-4n) và kiểm tra bộ nhiễm sắc thể của chúng. Sự gia bội tự nhiên không chỉ xảy ra ở mô sẹo, mà cả ở tế bào soma của cây con có tái sinh, do đó xuất hiện những cây khảm với những đám tế bào có mức bội thể khác nhau. Bởi vậy cần phải kiểm tra kịp thời cây con đơn bội để có biện pháp nhị bội hoá.

2.3.1- Phương pháp kiểm tra mức bội thể

Các cây con sau khi đưa ra chậu 20÷30 ngày có khoảng 10÷15 nhánh. Lấy ngẫu nhiên ở mỗi cây 2÷3 nhánh, cắt bỏ hết các bẹ lá ngoài, chỉ lấy 1 đoạn non trong cùng và đánh dấu thứ tự cho từng cây. Mẫu được có định theo carnua (75ml cồn tuyệt đối + 25ml acid acetic đậm đặc) từ 6 đến 12 giờ. Rửa mẫu vài lần bằng cồn 70°, sau đó rửa bằng nước cất. Nhuộm mẫu bằng dung dịch carmin 2% hay bằng carbon fuchsin. Dung dịch carbon fuchsin được pha như sau:

- Dung dịch A (ddA): fuchsin basic (3g) + cồn 70° (100 ml)
- Dung dịch B (ddB): ddA (1ml) + phenol 5% (90ml)
- Dung dịch C (ddC): ddB (45ml) + acetic acid (6ml) + formaldehyde 37% (6ml)

Ép mẫu trong acid acetic 45%, kiểm tra mức độ bội thể dưới kính hiển vi.

2.3.2 -Phương pháp nhị bội hoá

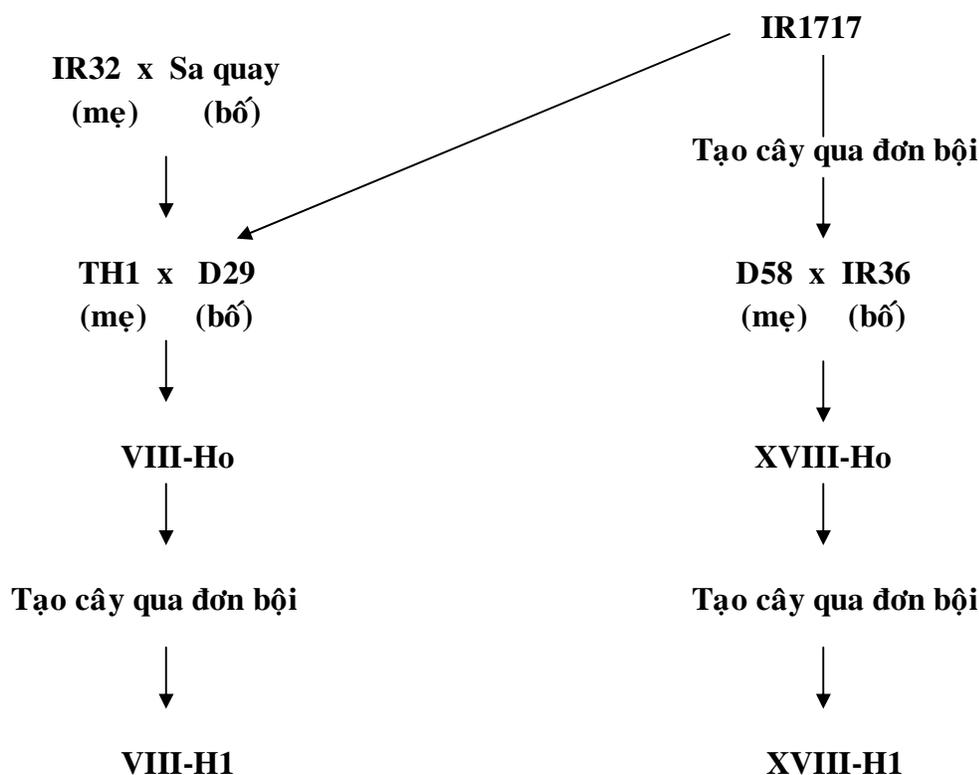
Cây lúa đơn bội sau khi kiểm tra nhiễm sắc thể, được xử lý colchicin, để tạo cây nhị bội đồng hợp tử. Có 3 phương pháp cùng nồng độ colchicin và thời gian 24 ÷48 giờ. Phương pháp 2 và 3, có thể pha colchicin trong dung dịch glycerin 2% để tránh bay hơi.

- Nhỏ, rửa và ngâm rễ lúa trong dung dịch colchicin khi cây bắt đầu đẻ nhánh mạnh, sau đó rửa sạch và cấy lại.
- Cắt bỏ phần trên cây lúa (sát trên đồng non) và bao chổ cắt của phần dưới bằng bông tẩm dung dịch colchicin.
- Dùng dao lam rạch nhẹ từ trên xuống 1 đoạn dọc theo thân khoảng 2 cm ngay trên ngọn bông lúa chưa trở thành một khe nhỏ và đặt vào đó một miếng bông tẩm dung dịch colchicin.

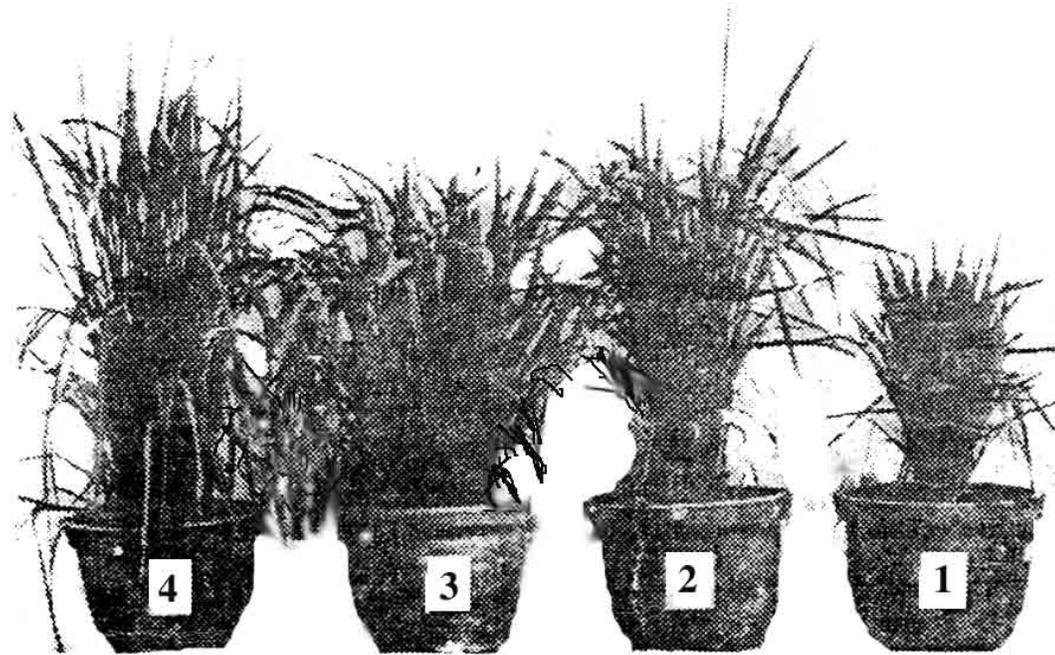
Ở cây đơn bội do chỉ chứa 1 trong 2 nhiễm sắc thể của mỗi cặp, nên phân bào giảm nhiễm bị rối loạn, tạo nên những giao tử không có sức sống, cây chỉ toàn hạt lép có kích thước xấp xỉ 1/2 hạt lúa bình thường. Những cây đã qua xử lý colchicin và cả một số cây không qua xử lý song nhờ nhị bội hoá tự nhiên có thể cho những thể khảm trên đó các nhánh đơn bội (chiếm đa số) có một số nhánh nhị bội cho 2÷10 hạt chắc trên bông. Có những cây cho toàn bông và hạt chắc. Những hạt này có sức nảy mầm cao và được ký hiệu là Ho. Bởi thu được nhờ nuôi cấy túi phấn cây lai, chúng chính là tiền thân của những dòng đơn bội kép mang trong mình nhiều tổ hợp gen khác nhau nhờ các cây bố mẹ (trong đó có những tổ hợp gen có ý nghĩa kinh tế) và cả tính đồng hợp tử rất cao do đã qua đơn bội.

2.4 - Tạo và đánh giá các dòng đơn bội kép

Mỗi hạt lai là khởi thủy của một dòng lai Ho. Trong số 8 tổ hợp lai thu được, đã tạo thành công 25 dòng đơn bội kép H1 từ các dòng của 2 tổ hợp lai VIII-Ho và XVIII-Ho. Để tập trung nuôi cấy túi phấn ở những dòng lai có triển vọng, đã tiến hành tuyển chọn qua đánh giá một số tính trạng ngay ở Ho. Kết quả thử tính kháng rầy nâu cho thấy, dòng XVIII-Ho có tính kháng cao hơn dòng VIII-Ho, điều này chứng tỏ dòng XVIII-Ho đã nhận được các gen kháng rầy nâu từ cây bố mẹ IR 36 (cấp hạt 0- tính kháng rầy nâu rất tốt, cấp hạt 9- tính kháng rầy nâu rất kém).



Hình VII.4 - Sơ đồ lai tạo các dòng đơn bội kép



Hình VII.5 - 1. Cây lúa đơn bội, 2. Cây lúa nhị bội, 3. Cây lúa tam bội, 4. Cây lúa tứ bội

B - BIẾN DỊ TẾ BÀO SOMA VÀ CHỌN GIỐNG THỰC VẬT

1 - LỊCH SỬ XUẤT HIỆN BIẾN DỊ TẾ BÀO SOMA QUA NUÔI CẤY *IN VITRO*

1.1 - Định nghĩa

Larkin và Scowcroft (1981) cho rằng biến dị tế bào soma là do sự thay đổi về kiểu hình và kiểu gen ở những cây tái sinh qua nuôi cấy invitro. Mặc dù trước đó 14 năm Butenko (1967) đã đưa ra khái niệm này khi quan sát những cây thuốc lá (*Nicotiana tabacum*) tái sinh từ mô sẹo qua nuôi cấy *in vitro*. Sự biến dị được thu nhận qua chu kỳ nuôi cấy *in vitro*, chu kỳ này được hình thành qua sự biệt hóa của tế bào hay mô được đưa vào nuôi cấy trong những điều kiện xác định và thu được cây tái sinh *in vitro*, và sự biến dị này xuất hiện khi đem so sánh với cây nguyên thủy trước khi đưa vào chu kỳ nuôi cấy. Và từ đó về sau có nhiều công trình nghiên cứu về tính biến dị tế bào soma của những cây qua nuôi cấy *in vitro*.

Qua biến dị tế bào soma đã cải thiện được nhiều giống cây trồng như blackberry (*Robus laciniatus*), rau cần tây (*Apium graveolens*), geranium (*Pelargonium graveolens*), lisiathus (*Eustoma grandiflorum*), longganberry (*Robus sp.*) và khoai lang (*Impomea batatas*). Mức độ biến dị phụ thuộc vào mô nuôi cấy, sự biến dị này càng gia tăng khi thời gian nuôi cấy *in vitro* kéo dài và xuất hiện ở những cây *in vitro* được xử lý bằng các chất gây đột biến.

1.2 - Những thay đổi kiểu hình

Những thay đổi về kiểu hình được ghi nhận ở những cây *in vitro*. Có nhiều báo cáo cho thấy đặc điểm hình thái có thể bị ảnh hưởng như:

- Sự sinh trưởng và phát triển, màu củ, sự ra trái, sản lượng, và sự biến dạng củ khoai tây.
- Sự thay đổi chiều cao thân, chiều dài chồi ngọn, số nhánh và năng suất cỏ alfalfa (*Medicago sativa*).
- Màu hoa ở cây cúc chướng (*Chrysanthemum morifolium*).
- Tính kháng bệnh do *Helminthosporium sacchari* gây ra ở cây mía (*Saccharum officinarum*).
- Tính kháng bệnh do nấm *Fusarium oxysporum* gây ra ở cây cà chua.

1.3 - Những thay đổi về kiểu di truyền

Mặc dù có nhiều kiểu biến dị di truyền được biết đến qua sự biến dị tế bào soma, những thay đổi trong biểu hiện kiểu gen và sự khử virus có thể dẫn đến những thay đổi nhận thấy được. Sự quen thuộc với cytokinin và sự kháng lạnh là những thí dụ về sự biến dị trên cơ sở biểu hiện gen. Vì có những cây trồng dễ bị nấm bệnh gây hại trước khi có sự nhiễm virus, một số nhà nghiên cứu cho rằng sự khử virus cây trồng làm cho cây trồng nhiễm một số nấm bệnh nhất định.

Cải thiện tính di truyền qua sự biến dị tế bào soma đã được nhiều nhà khoa học ghi nhận. Những sự cải thiện này chứng minh được rằng cơ sở của tính biến dị tế bào soma là:

- Những thay đổi về số lượng nhiễm sắc thể
- Có sự sắp xếp lại của nhiễm sắc thể
- Những thay đổi trên một nucleotide
- Có sự thay đổi trong sao chép gen
- Có sự hoán chuyển một số phân tử thành phần
- Có sự thay đổi một đoạn DNA

1.4 - Chọn lọc ở mức độ tế bào

1.4.1 - Chọn lọc *in vitro*

Những chương trình và sự kiểm soát sự chọn lọc ở mức độ tế bào với những cây tái sinh không chọn lọc trong *in vitro* được thảo luận về chiều cao cây. Một trong những thuận lợi trong việc chọn lọc *in vitro* là nó cho phép chọn lọc trực tiếp những kiểu hình mới từ một quần thể lớn những tế bào đồng nhất, trong điều kiện được xác định, trong một không gian giới hạn và trong một thời gian ngắn. Một thuận lợi khác là dễ dàng xử lý với chất gây đột biến và những tế bào hạt phấn

được sử dụng cho việc chọn lọc một tính kháng nào đó. Tuy nhiên, cũng có những bất lợi trong việc chọn lọc *in vitro*:

- Mất thời gian cho một khối lượng lớn nghiên cứu cần phải chọn lọc. Có những vấn đề cần phải thực hiện trước khi tiến hành chọn lọc *in vitro*:

+ Yếu tố chọn lọc cần phải xác định trước để thực hiện dễ dàng trong *in vitro*. Nếu yếu tố chọn lọc là độc tố, thì những nghiên cứu cần phải được thiết lập để xác định nếu độc tố tiết ra trong sự phát triển bệnh và tác động dưới mức độ tế bào.

+ Một hệ thống tái sinh protocol hoàn hảo trước khi thực hiện nuôi cấy tế bào. Hệ thống protocol này cho phép tái sinh thành công sau khi qua nhiều chu kỳ chọn lọc, vì đặc tính phát sinh hình thái sẽ mất đi khi tế bào và mô trải qua nhiều lần cấy chuyển.

+ Một mối tương quan cần thiết lập trước, giữa sự thể hiện đặc tính chọn lọc ở mức độ tế bào với sự thể hiện ở mức độ cây con.

- Sự không thuận lợi thứ hai trong chọn lọc *in vitro* là những thay đổi về di truyền có thể xuất hiện trong suốt chu kỳ lặp lại chọn lọc. Đa bội, đơn bội và những thay đổi chéo được nhận thấy ở những cây tái sinh từ *in vitro* và những thay đổi này gia tăng khi kéo dài thời gian nuôi cấy. Nếu có thể, qua những bước chọn lọc số lượng cá thể tăng khả năng phục hồi kiểu gen mà nó biểu hiện qua kiểu hình. Hơn nữa, sự ổn định về mặt di truyền trong nuôi cấy tế bào được duy trì và các bước chọn lọc sẽ thu được một số ít cá thể có sự thay đổi ở mức độ tế bào. Thường thì rất khó khăn và mất thời gian để xác định thể bội của tế bào được nuôi cấy, tuy nhiên có thể xác định được trong thời gian ngắn các giai đoạn phát triển trong chu kỳ tế bào bằng phương pháp cytofluorometry.

1.4.2 - Chọn lọc trên cây tái sinh

Chọn lọc các đột biến trên cơ sở là cây hoàn chỉnh thì dễ dàng hơn chọn lọc *in vitro*. Sự chọn lọc này có thể thực hiện được khi nhân tố chọn lọc không có sẵn (như độc tố của nấm bệnh...), một khi nhân tố chọn lọc không tác động ở mức độ tế bào, hay khi sự thể hiện tính kháng ở tế bào và cây hoàn chỉnh không có liên hệ nhau. Điều giới hạn lớn là chỉ có vài cây hoàn chỉnh tái sinh từ nhiều tế bào được sử dụng; tuy nhiên, tần số biến dị thực tế cao hơn tần số dự đoán do đó cần nhiều cây được tái sinh. Trong vài trường hợp, tần số biến dị vào khoảng 30÷40% trên tổng số cây cho thấy vài loại biến dị và khoảng 0,2÷0,3% biến dị có tính kháng. Điều ghi nhận được là, có vài nghiên cứu chứng minh rằng số lượng biến dị phát sinh thì phụ thuộc vào kiểu gen. Điều này giải thích tại sao trong các nghiên cứu, ngay cả một lượng lớn cá thể được dùng, mà dòng biến dị không thu nhận được. Như thế, để sự chọn lọc trên cây tái sinh mang lại nhiều kết quả, cây tái sinh thu được qua nuôi cấy nhiều genotype khác nhau, và để thu được dòng đột biến cần phải có một lượng lớn cá thể tái sinh.

1.5 - Kiểm soát sự thay đổi tế bào soma

Sự kiểm soát này rất quan trọng để có thể kìm hãm hay nâng cao sự thay đổi đó dựa vào mục đích nuôi cấy mô. Những yếu tố quyết định mức độ sự thay đổi này là do trong những mảnh cây ban đầu và mức tổ chức của mô nuôi cấy.

Sự thay đổi tế bào soma có thể giảm tối thiểu bằng cách phân lập mảnh cấy từ loài không nhiều thể nhiễm sắc đa bội (tế bào chủ yếu lưỡng bội). Việc này được thực hiện bằng cách phân lập mảnh cấy càng gần các vùng phân sinh càng tốt, dùng mô trẻ hoá hơn chủ yếu là các cấu thể không biệt hoá như lá.

Ở mức nuôi cấy mô. Người ta thấy rằng mức tổ chức trong mô nuôi cấy càng cao, sự thay đổi càng thấp. Do đó, sự thay đổi tối đa, được ghi nhận thấy trong vật nuôi cấy xuất phát từ tế bào trần và thấp nhất ở mức mô phân sinh hay nuôi cấy mẫu chồi.

Thời gian nuôi cấy tối thiểu cũng sẽ giảm tỷ lệ tế bào biến đổi (vì khởi đầu mô nuôi cấy xảy ra cắt ngang vòng phát triển tế bào, có thể vì tế bào phân chia quá nhanh và làm cho nhiễm sắc thể phân mảnh). Sự giảm tốc độ phân bào như bằng giảm nhiệt độ hay thay chất điều hoà sinh trưởng, có thể giảm những thay đổi trong mô nuôi cấy. Khi cần tăng sự biến đổi tế bào soma, những sự hạn chế này được loại bỏ.

2 - CHỌN LỌC CÁC DÒNG TẾ BÀO SOMA

Phương pháp chọn lọc dựa trên cả phương pháp thực hiện *in vivo* hay *in vitro*. Lợi ích của việc chọn lọc *in vivo* là trực tiếp ít có khả năng xảy ra đột biến không thích hợp. Điều bất lợi là số lượng cây rất lớn, khó có thể điều tiết. Phương pháp sàng lọc *in vitro* khi số lượng lớn cá thể có thể được kiểm tra rất thuận lợi, chỉ số nhỏ cây cái sinh còn sống sót.

Phương pháp chọn lọc được dùng dựa trên chọn lọc sức đề kháng, chọn lọc bằng mắt và bằng hoá chất. Khi chọn sức đề kháng, mục đích là tăng sức đề kháng với bệnh tật, kim loại nặng, muối, thuốc trừ cỏ hoặc chịu lạnh của một kiểu gen đặc biệt.

2.1 - Chọn lọc *in vivo*

Dựa trên các đặc tính đáng chú ý nhất của mô thực vật như màu sắc, hình dạng, kích thước, chiều cao, số phân nhánh cũng như số bông, hình dạng và màu sắc. Cũng có thể dựa trên sự thay đổi một trạng thái sinh lý như tính đề kháng bệnh hoặc chất diệt cỏ.

Sự thật cho thấy, sự thay đổi này được duy trì cho tới trạng thái trở hoa hàng năm như một chỉ dẫn thường trực của sự biểu hiện. Nguồn gốc của sự thay đổi này chưa rõ ràng nhưng phần lớn không do di truyền và duy trì trong suốt đời sống của cây thường niên và cây lưu niên thân gỗ.

Sinh sản sinh dưỡng của cây tái sinh được chọn lọc sẽ chỉ dẫn tính trạng nào bên suốt sự sinh sản sinh dưỡng. Ở cây lưu niên, vài sự đảo lộn hình thái của cây tái sinh xảy ra qua một vài năm (ví dụ sự biến đổi cây và dạng quả tìm thấy trong vài mô nuôi cấy xuất phát từ cây đầu cọ cho thấy có sự đảo lộn ở tuổi cây). Tuy nhiên, dù cho một khoảng rộng khả năng biến đổi xuất hiện trong thế hệ tái sinh biến dị này chừng mực nào đó biến mất trong thế hệ con của thế hệ hạt giống đầu tiên.

Sản sinh hạt giống dường như hoạt động giống sự chọn lọc biến dị của thế hệ hạt giống. Chỉ những biến đổi gen được truyền vào hạt phấn, noãn. Và trong những cá thể này, những biến đổi lớn về gen và nhiễm sắc thể của hạt phấn và noãn sản sinh sẽ không xảy ra. Những hạt này cung cấp một nguồn nguyên liệu đồng dạng để kiểm nghiệm sự biểu hiện của biến đổi bên trong hình thái và sinh lý dưới điều kiện lặp lại tốt.

2.2 - Chọn lọc *in vitro*

Có những nguyên nhân sinh ra dòng đột biến qua nhân giống vô tính *in vitro*:

- Tính ổn định về di truyền của chồi đỉnh.
- Trong nhân vô tính, chồi bên được liên tục nhân sinh khối.
- Thể khảm ở cây trồng là đặc tính có sẵn trong tự nhiên.
- Cấy mô không hình thành cơ quan của đỉnh sinh trưởng.

Biến dị soma là vấn đề quan trọng trong nhân vô tính và phôi vô tính. Tuy nhiên, cũng có những loại cây trồng ổn định về hình thái khi nhân vô tính cây đào, cây thornless longanberry hay trong nuôi cấy mô sẹo cây táo (*Muluss spp*), cây lúa mạch (*Hordeum vulgare*), cây cherry.

Phương pháp nghiên cứu chọn lọc dòng *in vitro* được thực hiện như sau: độc tố vi khuẩn *X. campetris pv. pruni* được lọc vô trùng và mô sẹo giống Sunhigh được sử dụng để chọn lọc. Có 400 mô sẹo được nuôi cấy trên môi trường có chứa độc tố, 2 mô sẹo chịu được nồng độ CF cao. Hai cây đào *in vitro* được tái sinh, mỗi cây *in vitro* được nhân vô tính, sau đó cây con hoàn chỉnh được phun độc tố để thử tính kháng. Kết quả cho thấy, 2 trong 4 cây tái sinh nâng cao được khả năng kháng độc tố hơn cây mẹ là Sunhigh và 1 cây có tính kháng cao hơn giống kháng Redhaven.

Một phương pháp khác được thực hiện: độc tố vi khuẩn (CF) và mô sẹo được tạo từ hai phôi giống Sunhigh và 3 phôi giống Redhaven. Cây tái sinh *in vitro* của hai giống này được so sánh với cây mẹ (Sunhigh và Redhaven) ban đầu. Kết quả cho thấy tính kháng được nâng cao. Cây có tính kháng độc tố được nhân vô tính *in vitro* và được chuyển ra trồng trên đồng ruộng. Sau 3 năm, thử lại tính kháng cho thấy, mặc dù đặc tính kháng được chuyển vào cây và biểu hiện kiểu gen, phương pháp này đang được sử dụng để chọn dòng kháng độc tố *Pseudomonas syringae pv. syringae* ở cây đào.

Trong nghiên cứu trên cho thấy, chọn lọc dòng đột biến kháng bệnh, thì độc tố được chiết xuất (CF) và được sử dụng như môi trường chọn lọc. Độc tố tinh sạch và vô trùng được sử dụng có hiệu quả cao hơn CF do những phân tử tạp còn sót lại trong CF. Điều này được ghi nhận trên cây họ *Citrus*, trong *in vitro* cho thấy kháng độc tố CF nhưng trên đồng ruộng lại không biểu hiện. Sự bổ sung IAA vào môi trường chọn lọc kích thích sinh trưởng mô sẹo và hạn chế sự chọn lọc.

Chọn lọc dòng đột biến có ý nghĩa lớn trong cải thiện giống chuối (*Musa sp*). Nhiều giống chuối mắc cảm với bệnh Panama do *Fusarium oxysporum* gây bệnh. Vào giữa thế kỷ này, race 1 gây hại gần 10% diện tích giống chuối ở Trung và Nam Mỹ. Bệnh này đã được khắc phục khi giống Gross Michel được thay thế bởi các giống kháng bệnh dòng Cavendish. Tuy nhiên, các giống chuối thuộc dòng Cavendish này lại nhiễm bệnh *Fusarium* race 4. Làm thuần giống các giống chuối trồng đại trà hiện nay đang được tiến hành nhằm mục đích cải thiện giống. Có khoảng 3% cây chuối từ nuôi cấy đỉnh sinh trưởng dòng Giant Cavendish là những dòng đột biến và những cây chuối này kháng được race 4. Khi trồng những dòng đột biến này trên đồng ruộng đã nhiễm *Fusarium* race 4, cho thấy đặc tính kháng biểu hiện rõ rệt trên nhiều điều kiện môi trường khác nhau.

Có 2 nghiên cứu khác về tính kháng mặn và kháng hạn được thực hiện. Trong nghiên cứu tính kháng mặn, đối tượng chọn lọc là phôi cây cam Shamouti (*Citrus sisensis*). Mô sẹo được nuôi cấy trên môi trường chọn lọc có nồng độ muối 0,17M NaCl qua 10 lần chọn lọc. Dòng tế bào chọn lọc, được nuôi cấy 3 lần liên tục trên môi trường không có NaCl, trước khi nuôi cấy trở lại trên môi trường có NaCl. Dòng tế bào chống chịu được chọn lọc và phôi được hình thành. Cây tái sinh cho thấy khả năng chống chịu được nồng độ 0,085÷0,12M NaCl so với đối chứng. Mô sẹo từ cây kháng mặn, có khả năng sinh trưởng trên môi trường mặn.

Trong nghiên cứu về tính kháng hạn, đối tượng chọn lọc là mô sẹo của protoplast từ lá hay protoplast từ tế bào đơn, của rễ cây cherry. Nuôi cấy mô sẹo trên môi trường có 25÷200 mM NaCl, Na₂SO₄, KCl hay mannitol (1÷15%). Sau khi cấy chuyển 6 lần trên môi trường chọn lọc, dòng tế bào được cấy truyền trên môi trường cơ bản môi trường chọn lọc có chứa một trong các chất chọn lọc trên (3 chu kỳ). Dòng tế bào chọn lọc cho thấy được tính kháng và kháng nhẹ với các nhân tố chọn lọc còn lại. Tuy nhiên, khi cây tái sinh từ mô sẹo có tính kháng mặn hay mannitol và mô sẹo được tạo nên từ những cây này có tính kháng mặn và mannitol.

2.3 - Chọn lọc dòng đột biến qua nuôi cấy mô và tế bào

Ứng dụng nuôi cấy mô tế bào và chọn lọc dòng đột biến có liên hệ đến tính chống chịu của dòng đó trên cây hoàn chỉnh được trồng trên đồng ruộng. Môi quan hệ tính kháng và thử tính kháng trên đồng ruộng hiện nay được xây dựng thành hệ thống chọn lọc dòng đột biến *in vitro*, vì đối với cây ăn trái, thử tính kháng trên đồng ruộng phải mất thời gian lâu 3÷5 năm. Hệ thống chọn lọc này, được thực hiện trên cây táo và cây lê kháng bệnh *Erwinia amylovora*.

Trên cây lê, chồi đỉnh được nhúng vào trong dịch huyền phù của *E. amylovora* và sau đó một hay nhiều lá được cắt bỏ, các chồi bên xuất hiện được đánh giá mức độ nhiễm bệnh. Phương pháp này được phát triển bằng cách dùng kim chích vào lá, sau đó nhúng vào dịch huyền phù *E. amylovora*. Mức độ nhiễm bệnh được đánh giá kể từ ngày thứ 2 cho đến ngày thứ 14. Phương pháp trên rất khó đánh giá khả năng kháng bệnh của các giống đưa vào thử nghiệm *in vitro*, nhưng lại cho kết quả rõ ràng, phân biệt được giống kháng và giống mẫn cảm với bệnh. Tuy nhiên, sự thử tính kháng *in vitro* lại không cho kết quả tương quan trên đồng ruộng.

Trên cây đào, nhúng chồi đỉnh của cây kháng và cây mẫn cảm với bệnh vào dịch huyền phù vi khuẩn *X. campestris pv. pruni*. Sau 2÷3 tuần nuôi cấy, trên 1 cm của đoạn thân, được xác định khả năng xuất hiện các đơn vị colony.

Những thuận lợi của phương pháp thử *in vitro*:

- Có thể thực hiện quanh năm.
- Có thể sử dụng cùng một lúc nhiều chồi đỉnh để thử.
- Phương pháp cho kết quả nhanh.

Những điều không thuận lợi của phương pháp thử *in vitro*:

- Phải sử dụng phương pháp nhân vô tính *in vitro* để tạo quần thể lớn cho việc thực hiện thử tính kháng.
- Các nhân tố trong môi trường một phần nào đó ảnh hưởng đến tính kháng.
- Những chồi đỉnh/ cá thể không bình thường (cây thủy tinh thể, biến dị) xuất hiện trong nuôi cấy *in vitro* ảnh hưởng đến khả năng phản ứng của cây với tính kháng.

3 - TIỀM NĂNG SỬ DỤNG DÒNG ĐỘT BIẾN TRONG VIỆC CẢI THIỆN GIỐNG CÂY TRỒNG

Qua chọn lọc dòng đột biến *in vitro*, nhiều giống cây trồng đã được cải thiện tính kháng như: chuối, blackberry, olive, dứa, dâu, lê, đào, họ cam quýt... và các tính kháng này ổn định khi được khảo sát trên đồng ruộng. Những vấn đề cơ bản hiện nay trong chọn dòng đột biến cần được nghiên cứu sâu sắc:

- Trong nuôi cấy *in vitro*, dòng đột biến được hình thành như thế nào, để có thể duy trì được tính kháng?
- Kiểu gen được hình thành như thế nào trong *in vitro* mà sự thể hiện bên ngoài rõ ràng hơn các phương pháp khác?
- Điều gì trong các nhân tố chọn lọc (toxin...) và sự tác động như thế nào dưới mức tế bào hay cây hoàn chỉnh cho phép chọn lọc được cá thể có tính kháng.

- Là do sự ổn định về thể bội (như sử dụng phôi vô tính) hay do sự trao đổi chéo mà độ biến dị gia tăng?

Nghiên cứu sự phát sinh biến dị tế bào trong tiến trình hình thành cơ quan và phát sinh hình thái qua nuôi cấy *in vitro*, cho phép một phần nào đó hiểu được sự hình thành dòng đột biến, mà hiện nay kiến thức con người chưa hiểu được một cách đầy đủ:

- Nhân vô tính từ mô phân sinh và phôi soma.
- Nuôi cấy tế bào đơn và protoplast.
- Nuôi cấy túi phấn và hạt phấn.
- Phân tích trên khía cạnh phân tử.

C - NUÔI CẤY TẾ BÀO TRẦN VÀ DUNG HỢP TẾ BÀO TRẦN

1 - TẾ BÀO TRẦN

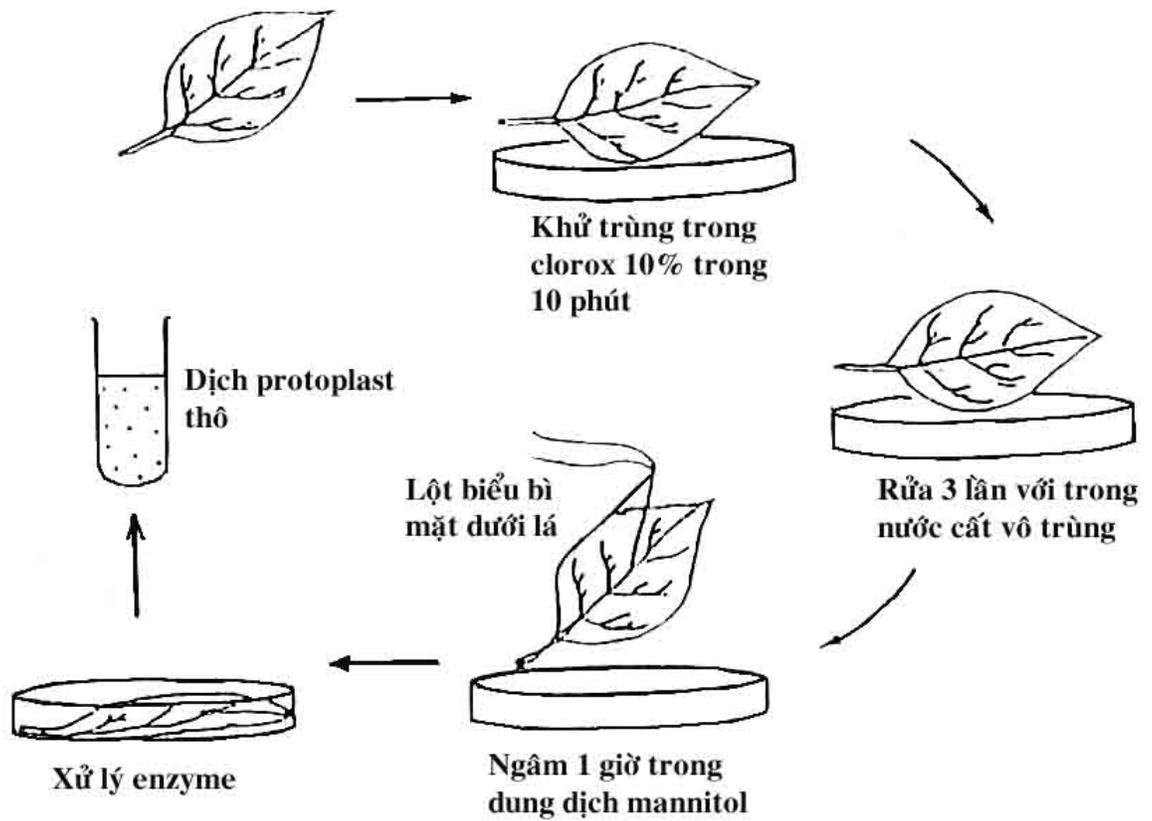
Tế bào trần là tế bào đã được tách lớp vỏ chỉ còn màng tế bào chất bao bọc và bên trong là tế bào chất, các cơ quan tử và nhân tế bào. Màng tế bào chất duy nhất phân chia ranh giới bên trong và bên ngoài tế bào.

Tế bào trần được sử dụng trong nghiên cứu:

- Lai cùng loài hay lai khác loài.
- Tế bào trần có thể thu nhận DNA và các cơ quan như nhân, diệp lục, plasmid, bacteria, virus...
- Tế bào trần tái tạo màng tế bào nhanh chóng là cơ sở nghiên cứu quá trình sinh tổng hợp màng tế bào.
- Quần thể tế bào trần được nghiên cứu như một hệ thống tế bào đơn.

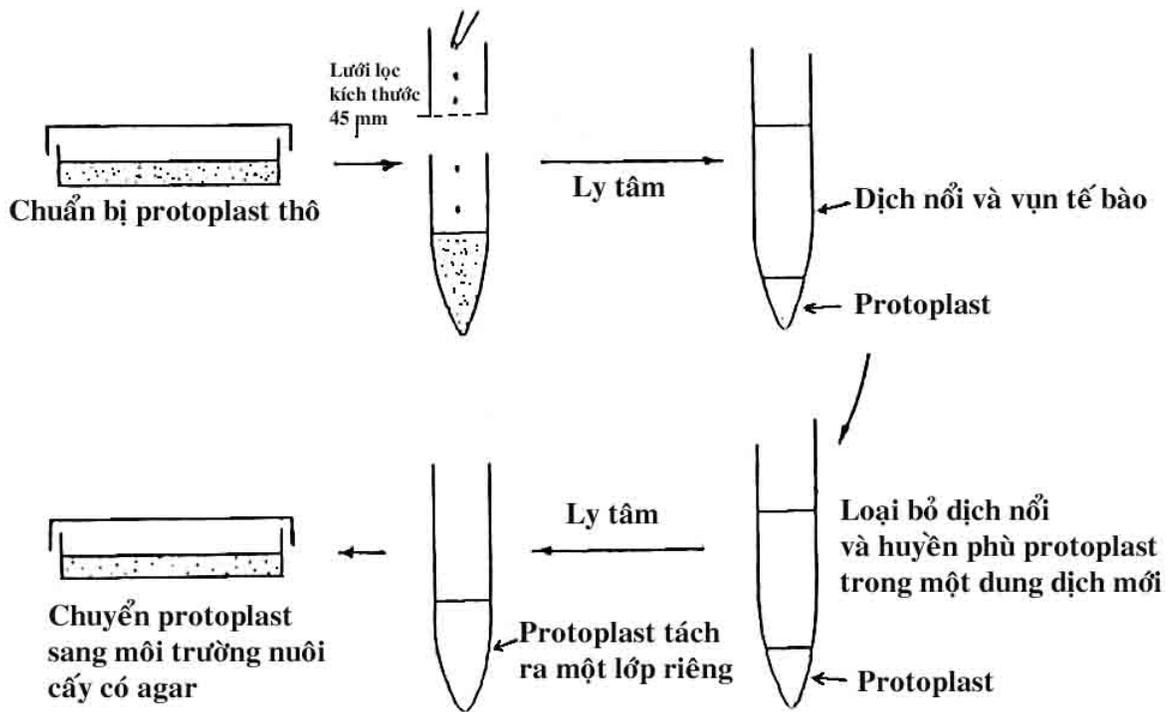
Tế bào trần được tách bằng phương pháp cơ học hay bằng phương pháp enzym. Phương pháp cơ học thường được sử dụng nghiền mẫu, loại bã và xử lý enzym tách vỏ tế bào. Phương pháp enzym thường xử lý trực tiếp mẫu tươi (lá) bằng enzym để tách tế bào trần. Bằng phương pháp enzym, có thể thu được $2 \div 5 \times 10^6$ tế bào trần/1 g lá đồng nhất. Phương pháp cơ bản để tách tế bào trần (hình VII.6):

- Khử trùng mẫu lá
- Ngâm mẫu trong dung dịch thẩm thấu để tế bào co nguyên sinh
- Tách lớp mặt dưới lá
- Ngâm mẫu trong hỗn hợp enzym
- Tinh sạch tế bào trần
- Nuôi cấy tế bào trần trong môi trường thích hợp



Hình VII.6 - Phương pháp cơ bản tách tế bào trần từ lá.

Lá được khử trùng, ngâm trong dung dịch nước khử trùng và tế bào cơ nguyên sinh trong dung dịch mannitol. Mặt dưới của lá được tách bỏ tăng sự tiếp xúc trực tiếp với enzym vào mô thịt lá. Cuối cùng xử lý với enzym tách tế bào trần.



Hình VII.7 - Tinh sạch tế bào trần

Tế bào trần được lọc qua miếng lọc có kích thước 45 μm , và tế bào được ly tâm 5 phút. Tách bỏ những phần tử như bã, vụn của màng tế bào... bằng pipett, sau đó thêm vào 10 ml môi trường rửa tế bào trần và tiếp tục ly tâm. Tiếp tục loại bã. Ly tâm loại bã 3 lần trước khi cấy chuyển tế bào trần vào môi trường nuôi cấy (hình VII.7).

2 - NUÔI CẤY PROTOPLAST

2.1 - Chọn mẫu tách protoplast

Có những nhân tố ảnh hưởng đến quá trình tách protoplast như: chọn cây trồng thích hợp tách protoplast, có trạng thái trẻ sinh lý, vị trí lấy mẫu và điều kiện môi trường thích hợp. Ngoài ra còn có thể sử dụng mô sẹo hay tế bào đơn để tách protoplast. Mẫu thường hay dùng tách protoplast là nhu mô thịt lá.

2.2 - Chọn enzym phân hủy màng tế bào

Có nhiều loại enzym phân hủy màng tế bào, phụ thuộc vào nguồn gốc thực vật và loại tế bào, có nhiều nồng độ cellulose, hemicellulose và pectinase được sử dụng riêng biệt hay phối hợp. Các loại enzym có sẵn trên thị trường như:

- Cellulase:
 - + Cellulase Onozuka (R-10, RS)
 - + Cellulysin

- + Meicelase (CESB, CMB)
- + Driselase
- Hemicellulase
 - + Rhyzyme HP-150
 - + Hemicellulase (Sigma)
- Pectinase
 - + Macease
 - + Macerozyme R-10
 - + Pectolyase Y-23
 - + Pectinase (Sigma)

Phối hợp các enzym phân hủy màng tế bào đã được thực hiện trên một số cây trồng như:

- *Hemerocallis*

Cellulysin (1%) + Rhozyme (1%) + Macease (0,5%) (Huyền phù tế bào)

- *Pisum sativum*

Onozuka R-10 (2%) + Driselase (2%) + Rhozyme (2%) + Pectinase (1%)
(Tế bào thịt lá)

- *Solanum sp.*

Onozuka R-10 (1%) + Macerozyme R-10 (0,02%) + Pectolyase Y-23
(0,013%) (Tế bào thịt lá)

- *Medicago sativa*

Meicelase (4%) + Rhozyme (2%) + Macerozyme R-10 (0,03%) (Rễ, lá mầm)

2.3 - Điều kiện nuôi cấy protoplast

- Agar-agar dưới 0,2%
- Nhiệt độ nuôi cấy 25÷28°C
- Cường độ ánh sáng 3000 lux sau 48 giờ hay trong tối phụ thuộc vào loại tế bào.
- Bổ sung chất hữu cơ: nước dừa, acid hữu cơ, casamino acid, carbohydrate.

2.4 - Tách protoplast

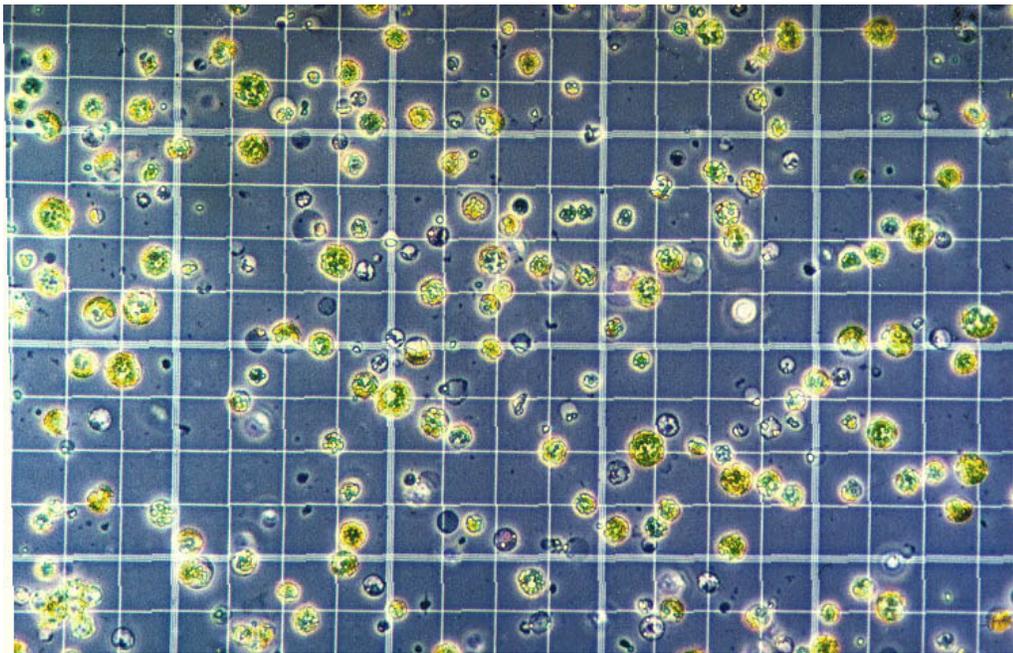
Mẫu lá non được rửa sạch trong nước máy. Sát trùng sơ bộ bằng cồn 70°, sau đó rửa lại bằng nước cất vô trùng 3 lần. Lá non được khử trùng bằng Na-hypoclorite hay Ca-hypoclorite, thời gian khử trùng phụ thuộc vào mẫu nuôi cấy, thường khử trùng 7÷15 phút. Có thể sử dụng nước chlorox (10%) để khử trùng trong 10 phút. Rửa sạch mẫu bằng nước cất vô trùng 3 lần. Mẫu vô trùng được chuẩn bị đưa vào tách protoplast.

Mẫu lá được ngâm vào dung dịch manitol (8÷15%) trong thời gian 45-60 phút để tế bào co nguyên sinh. Sau đó tách lớp biểu bì mặt dưới lá (tiếp xúc với

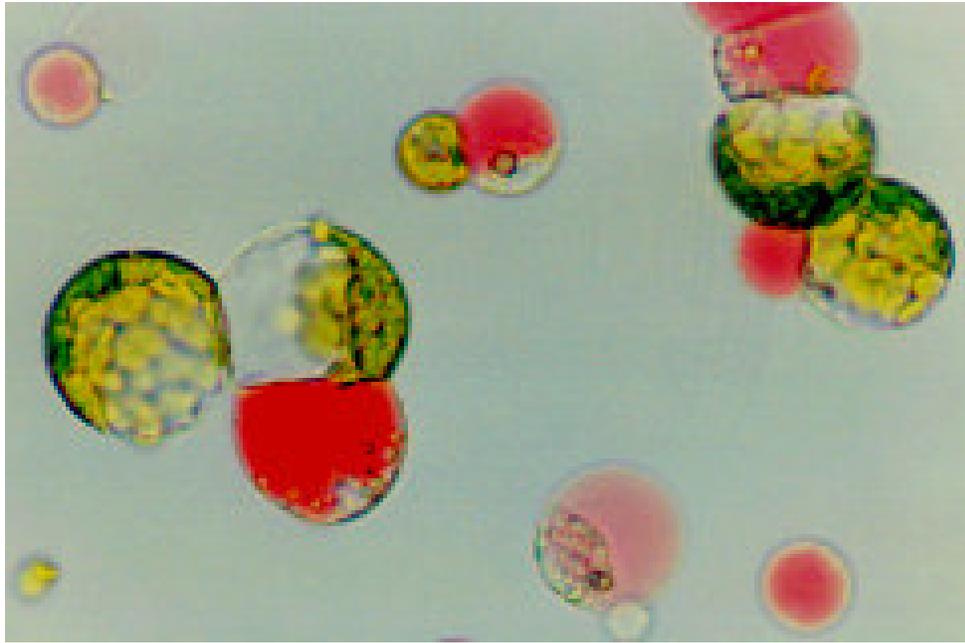
dung dịch) để cho sự tác động của enzym ngấm sâu vào nhu mô thịt lá. Lá được cắt ra thành từng mảnh nhỏ, ngâm 1g lá vào dung dịch enzym được chứa trong 1 đĩa petri (100x15mm). Dung dịch enzym được vô trùng bằng cách lọc qua màng lọc vô trùng có kích thước $45\mu\text{m}$. Dung dịch enzym là một hỗn hợp hay riêng lẻ của cellulose, hemicellulose và pectinase. Đặt đĩa petri có chứa mẫu vào trong tối qua đêm (12÷18 giờ, 25°C) thu được một hỗn hợp protoplast. Protoplast được lọc loại bã như các mô không bị enzym phân hủy hoàn toàn, cụm tế bào, và từng mảnh vỏ tế bào bị phân hủy bằng một màng lọc nylon. Dịch protoplast thu được lọc ly tâm trong 5 phút. Phần bã nổi lên trên được hút bằng pipett và dịch protoplast còn lại ở đáy được rửa bằng 10 ml dung dịch môi trường MS +13 % mannitol. Thao tác được thực hiện 3 lần.

2.5 - Xác định mật độ protoplast và khả năng sống sót

Protoplast được nhuộm bằng phẩm nhuộm fluorescein diacetate để xác định sự sống sót của protoplast. Đối với protoplast cây thuốc lá, mật độ gieo trong đĩa Petri là 5×10^4 protoplast/ml, dưới 10% số lượng này là protoplast không phân chia tế bào, tương tự với protoplast cây *Petunia* là $2,5 \times 10^4$. Số lượng protoplast được xác định bằng buồng đếm hồng cầu với thị trường 0,2 mm (hình VII.8).



Hình VII.8 - Thị trường buồng đếm hồng cầu với các protoplast



Hình VII.9 - Protoplast

2.6 - Nuôi cấy protoplast

Protoplast được nuôi cấy bằng nhiều phương pháp khác nhau, nhưng phương pháp cấy chìm sử dụng nhiều. Môi trường nuôi cấy có bổ sung 13% mannitol. Mật độ nuôi cấy 10^5 protoplast/ml và dùng pipett hút 5 ml cho vào hộp petri (100x15mm) có chứa sẵn 5 ml môi trường MS + 13% mannitol + 1,5% agar ở 40°C. Sau cùng trong đĩa Petri chứa 10 ml hỗn hợp chứa 5×10^4 protoplast/ml. Đĩa petri được đặt trong ánh sáng mờ, nhiệt độ 25°C.

2.7 - Tái sinh cây từ protoplast

Khi protoplast đã tái sinh được màng tế bào, tế bào tiến hành phân chia và hình thành mô sẹo. Mô sẹo được cấy truyền vào môi trường mới, nếu môi trường có auxin thì mô sẹo tăng sinh khối, nếu môi trường không có auxin và mannitol thì tế bào mô sẹo phát sinh phôi sau 3÷4 tuần và phôi phát triển thành cây hoàn chỉnh trên môi trường thích hợp.

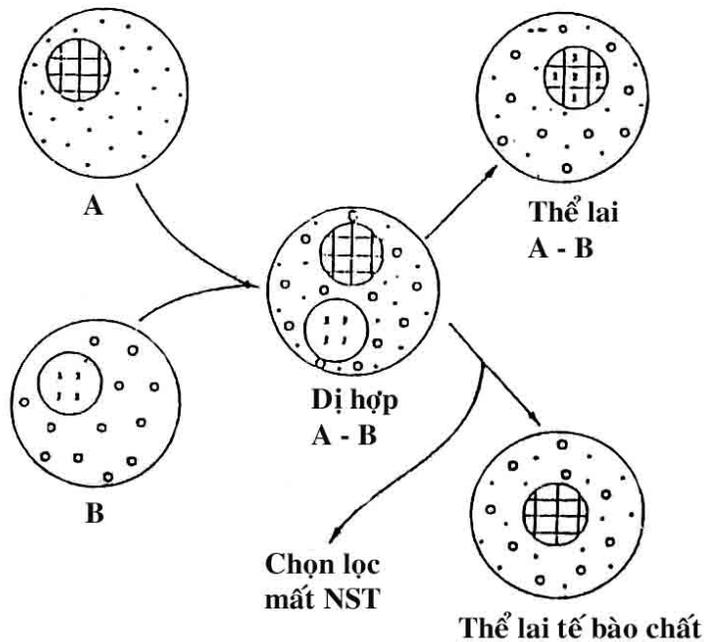
3 - DUNG HỢP PROTOPLAST

Power và Cocking (1971) lần đầu tiên chứng minh thành công sự dung hợp cùng loài và khác loài của protoplast từ chóp rễ cây bắp (*Zea mays*) và cây yến mạch (*Avena sativum*). Từ đó nhiều công trình nghiên cứu về kỹ thuật này, cho tần suất dung hợp thấp. Một số nhà khoa học phát hiện polyethylen glycol (PEG) gây ra sự kết dính và dung hợp tốt ở protoplast thực vật và xác định những điều kiện đạt tần suất cao tạo thể lai cao (hình VII.10). Một trong những vấn đề chính của kỹ thuật dung hợp protoplast là việc phân biệt và tách thể lai. Các sản phẩm dung hợp có thể phân biệt bằng mắt thường, bằng gen đánh dấu, dùng môi trường chọn lọc,

bằng cách dùng protoplast từ các loại mô khác nhau, hoặc được nhuộm bằng các chất phát huỳnh quang. Kỹ thuật này đã thành công và nhận được 33 thể lai khác loài trong các loài *Datura*, *Nicotiana*, *Petunia*, *Solanum*, 2 thể lai ở *Daucus*, 3 ở *Brassia* và các trường hợp khác ở *Medicago* và *Lycopersicon* và 13 thể lai khác giống.

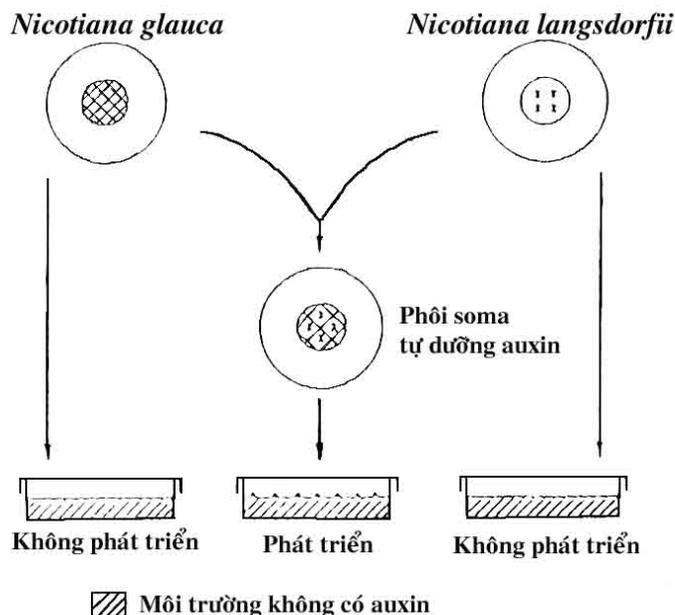
Sự lựa chọn kiểu đặc thù của tế bào chất có thể được hỗ trợ bằng cách dùng các chỉ định về mặt phân tử. Trong một hai trường hợp nó được dùng cho sự tổ hợp nhân của một giống hoặc một dòng với tế bào chất của một giống hay một dòng khác, khai thác hiệu quả tác động tương hỗ giữa nhân và tế bào chất.

Những kết quả đã đạt được về kỹ thuật nghiên cứu tế bào chất là nghiên cứu chuyển gen chống chịu lạnh ở khoai tây và đưa tính chống chịu atragine vào cây cải dầu. Ý nghĩa về mặt nông học qua con đường dung hợp là sự chống chịu đối với virus gây bệnh khảm thuốc lá (TMV) và bất thụ đực tế bào chất ở thuốc lá, tính kháng virus X ở cây khoai tây và tính kháng atragine ở khoai tây và bắp cải.



Hình VII.10 - Dung hợp 2 protoplast cây nhị bội (2n)

Hai nhân (mỗi nhân chứa 2n) dung hợp tạo thành thể lai tứ bội (4n). Nếu một nhân không tái tạo được thì tạo thành thể lai tế bào chất có chứa 2n.



Hình VII.11 - Lai hai tế bào soma có khả năng tự dưỡng auxin

Hai dòng tế bào thuốc lá *Nicotiana glauca* và *Nicotiana langsdorffii* không có khả năng sống trên môi trường thiếu auxin. Sản phẩm dung hợp có khả năng sống trên môi trường thiếu auxin (hình VII.11).

3.1 – Dung hợp protoplast bằng polyethylen glycol (PEG)

Phương pháp đơn giản nhất và ít tốn kém nhất để dung hợp tế bào trần thành công là bằng polyethylen glycol (PEG) 6000 (hình VII.12). Chức năng của PEG là làm thay đổi tính chất của màng để tế bào trần trở nên dính và nếu tế bào trần tiếp xúc nhau, chúng sẽ dán chặt với nhau và nội dung bên trong sẽ trao đổi với nhau. Cách thức thực hiện như sau:

Phức hợp đơn giản nhất để chứng tỏ sự dung hợp tế bào trần là dùng dạng bố mẹ phân lập từ lá xanh và một tử huyền phù tế bào không màu của cùng loại (như thuốc lá) hay khác loài. Theo cách này, dạng bố mẹ và thể dị nhân có thể phân biệt bằng màu của chúng.

- Tế bào trần phân lập từ mỗi nguồn bố mẹ cho 4 ml huyền phù tế bào trần với độ đặc tế bào xấp xỉ $2 \cdot 10^5$ trong môi trường vô cơ dùng để phân lập tế bào trần, có 13% mannitol được trộn rồi ly tâm ở 100 g trong 10 phút để còn lại tế bào trần trong khoảng 0,5 ml môi trường. Hỗn hợp này không cần ở tỷ lệ 1:1. Để dễ dàng nhận biết thể dị nhân giữa thịt lá và tế bào trần không màu, tỷ lệ có thể tăng lên 1:9 bằng cách thay đổi độ đậm đặc của huyền phù.

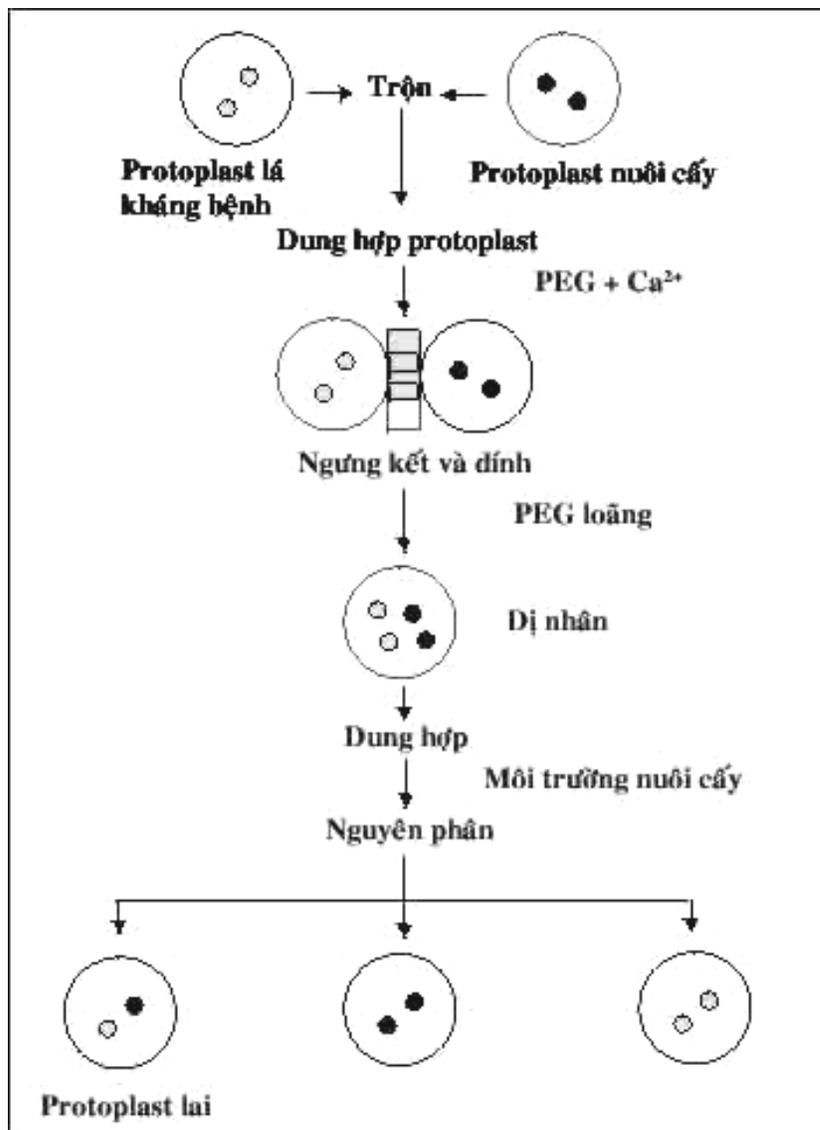
- Màng ngoài được làm mất cân bằng bằng cách thêm 2 ml PEG (30% w/v PEG mol.wt 6000, 4% w/v sucrose, 0,01M $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ và được hấp khử trùng) và để trong 10 phút.

- Tế bào trần được dung hợp bằng cách pha loãng PEG mỗi 5 phút bằng cách thêm môi trường nuôi cấy tế bào trần (môi trường MS 2,0mg/lít NAA và 0,5 mg/lít BA, 3% sucrose và 9% mannitol) với lượng tăng dần thể tích. Tế bào trần được cho tái lơ lửng sau mỗi lần pha loãng bằng cách lắc nhẹ.

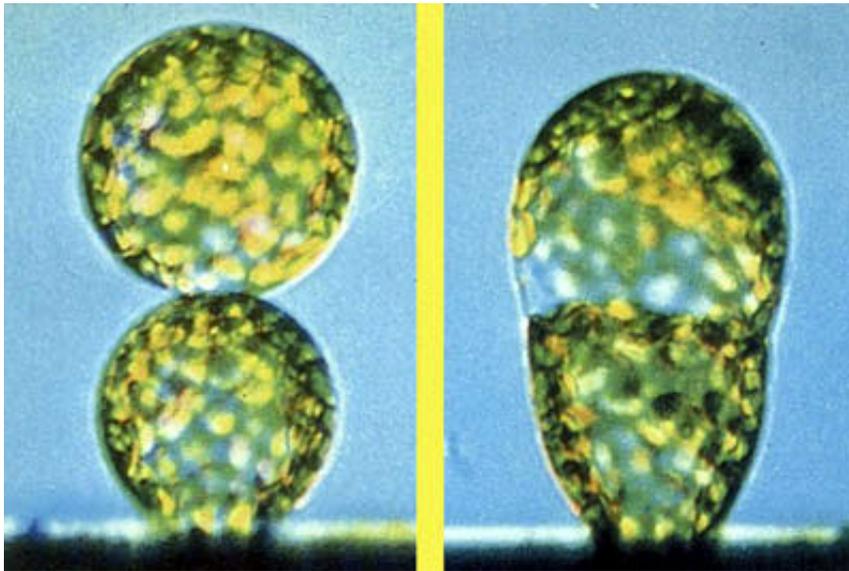
- Hỗn hợp được ly tâm ở 100 g trong 10 phút rồi tế bào trần được rửa trong môi trường nuôi cấy không PEG, ly tâm và làm tái lơ lửng trong cùng môi trường.

- Huyền phù tế bào trần được sấp lớp trên môi trường agarose hoặc trộn với lượng môi trường agarose tương đương, để kích thích sự tạo vách.

Sự bất lợi của phương pháp này là PEG thường độc đối với tế bào thực vật và tỷ lệ dung hợp có thể thấp khoảng 1%. Rất khó có thể tìm thấy dị nhân.



Hình VII.12 - Dung hợp protoplast bằng polyethylen glycol (PEG)



Hình VII.13. Tế bào trần dung hợp bằng PEG 6000

3.2 - Dung hợp protoplast bằng điện

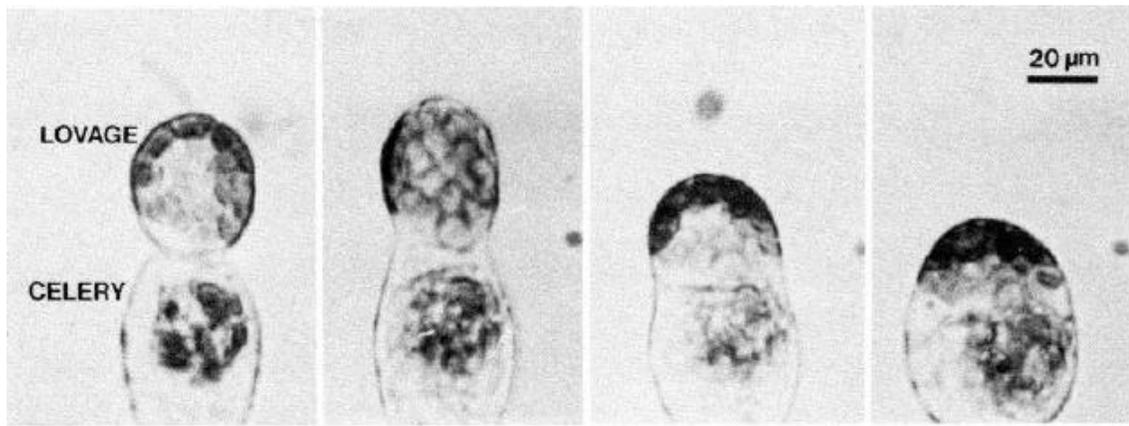
Tế bào trần được dung hợp ở tỷ lệ lớn bằng phương pháp điện dùng những buồng trong đó tế bào được phơi ra trước những dòng điện nhỏ. Chi tiết của phương pháp thay đổi tùy loài và phải được thiết lập từ lý thuyết hay kinh nghiệm.

- Huyền phù tế bào trần để dung hợp được đặt giữa hai điện cực. Một dòng AC yếu (400000 Hz, 1,5V) được cho qua điện cực làm cho tế bào trần tích điện dương dồn về một phía và tích điện âm về một phía khác. Như là kết quả của sự tích điện, tế bào trần xếp thành nhóm dọc theo hướng lực tác động, tiếp xúc với tế bào khác, tạo thành chuỗi ngọc. Số lượng trong mỗi chuỗi có thể thay đổi bằng cách thay đổi độ đậm đặc tế bào trần, tần số của trường AC và đỉnh điện áp.

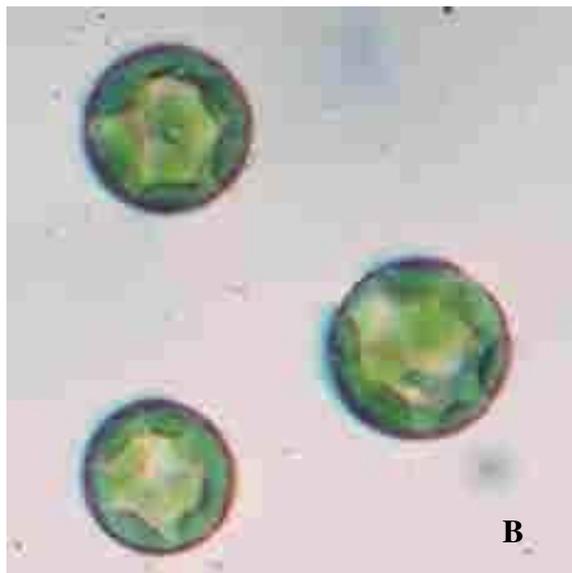
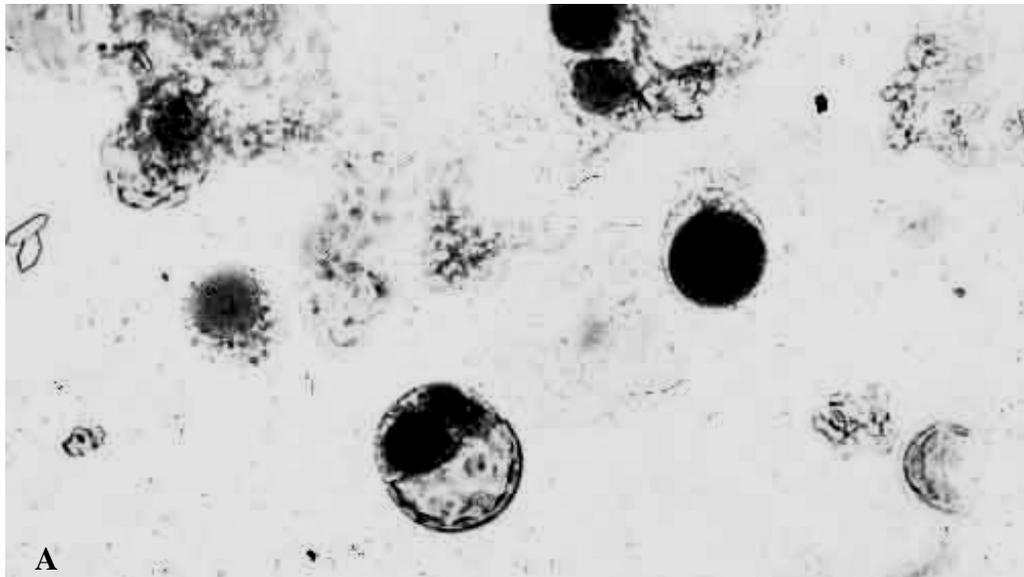
- Sau thời gian 90 giây, trường AC được thay thế bởi xung điện áp cao một chiều khoảng 1000V/cm. Khi những tế bào trần tiếp xúc với nhau, vách sinh chất vỡ và dung hợp lại tạo thành vách liên tục quanh chuỗi ngọc. Sau đó là sự dung hợp bào chất. Sự dung hợp nhiều lần xảy ra ở nồng độ cao tế bào trần nhưng điều này có thể tránh được bằng cách giảm nồng độ huyền phù tế bào trần.

- Huyền phù tế bào trần được dần mỏng như trước.

Khi so sánh, phương pháp điện di dung hợp cho năng suất cao hơn nhiều so với phương pháp hoá học vì có hơn 50% tế bào trần trở thành thể dị nhân.



Hình VII.14. Điện dung hợp tế bào trần



Hình VII.15 - Quá trình tái tạo vách của protoplast ở cây cà chua lai. A: protoplast tách từ mô thân cây cà chua lai. B: protoplast hình thành vách tế bào.

4 - CHỌN LỌC THỂ DUNG HỢP (DỊ NHÂN)

Sau khi dung hợp hỗn hợp bằng sự hoá dung hợp hay điện dung hợp, có những tế bào trần bố mẹ đơn lẻ không dung hợp, tế bào dung hợp cùng gốc, đa dung hợp cũng như thể dị nhân mong muốn. Phân lập thể dị nhân có thể thành công bằng một số kỹ thuật:

- Kỹ thuật đơn giản nhất là cho phép mọi tế bào trần tái sinh và rồi nhận dạng thể dị nhân ở cây con hay cây trưởng thành bằng sự khác biệt hình thái. Khi tỷ lệ lớn tế bào trần là thể dị nhân như trong phương pháp điện dung hợp, thì hữu hiệu nhất là tái sinh đơn giản mọi tế bào trần và nhận dạng thể dị nhân ở giai đoạn cây nguyên vẹn.

- Nếu chỉ một tỷ lệ nhỏ tế bào trần là thể dị nhân thì kỹ thuật chọn lọc *in vitro* được sử dụng. Một kỹ thuật không phức tạp nhưng vất vả là khi thể dị nhân được nhận dạng bề ngoài rồi được chuyển bằng tay với kính hiển vi và vi thao tác. Huyền phù chứa thể dị nhân được hút bằng pipette cho bên bề mặt của môi trường tế bào trần agarose rồi nhận dạng thể dị nhân và chuyển từng cá thể vào môi trường tế bào mới. Kỹ thuật này thích hợp cho dung hợp tế bào trần nguyên liệu bố mẹ dễ dàng đánh dấu nhìn thấy được, như trong sự dung hợp thịt lá xanh với tế bào nuôi cấy mô không có màu. Khi nguyên liệu bố mẹ không phân biệt được theo cách này, tế bào trần nguyên liệu ban đầu được nhuộm với thuốc nhuộm phát huỳnh quang như fluorescein diacetate (FDA) cho màu xanh hay rhodamine isothiocyanate cho màu đỏ. Thể dị nhân được nhận dạng bằng màu huỳnh quang kép trong tia UV

- Phương pháp phổ dụng khác nhưng đắt hơn dùng dòng flow cytometry. Ở đây tế bào trần đánh dấu được phóng thành vùng được rọi tia UV. Những giọt nhỏ này chứa thể dị nhân được nhận dạng và cho nghiêng vào một ống riêng. Quy trình hoàn toàn tự động và có thể sản sinh trên 2000 tế bào trần 1 giờ.

Tóm tắt

Công tác chọn lọc giống thực vật hiện nay, chủ yếu dựa vào sự đa dạng của quần thể ban đầu. Thí dụ: một tập đoàn giống thu thập từ nhiều địa phương khác nhau. Khi tính đa dạng của một quần thể ban đầu không đủ để thoả mãn, thì việc xử lý đột biến, lai xa, săn tìm các dạng hoang dại... là các biện pháp thường dùng để khuếch đại tính đa dạng.

- Nuôi cấy đơn bội (bao phấn, hạt phấn) nhằm tạo nguồn nguyên liệu các cây đơn bội cung cấp cho công tác chọn giống. Các cây đơn bội phản ánh trung thực các gen chúng chứa đựng. Từ các cây đơn bội này, có thể trồng trực tiếp, nhị bội hoá hay lai xa để tạo các loại cây có các tính trạng ưu thế.

- Từ một quần thể tế bào riêng rẽ hay từ các cá thể hoàn chỉnh, dùng các tác nhân chọn lọc như chất diệt cỏ, điều kiện khô hạn, nhiệt độ lạnh, để tìm ra các cá thể ưu tú, có khả năng chống chịu được với các điều kiện bất lợi đó. Từ các cá thể ban đầu này, sử dụng các biện pháp nhân giống, để nhân nhanh, tạo thành một tập đoàn các cá thể có mang những đặc tính tốt.

- Các biện pháp trên thường tạo ra các cá thể có mang một số đặc tính tốt nhưng riêng lẻ. Để tạo ra các cá thể có mang nhiều đặc tính tốt, thường phải dùng biện pháp lai tạo. Tuy nhiên, vấn đề trở ngại lớn nhất là sự không tương thích giữa hai loài dùng để lai tạo. Một giải pháp của vấn đề này là tạo ra các tế bào trần và dung hợp các tế bào trần đó. Các tế bào được làm mất lớp vách bên ngoài bằng các enzym. Các tế bào trần được dung hợp với nhau bằng các phương pháp hoá học, vật lý. Các tế bào lai thu được là sự tổng hợp của hai tế bào ban đầu với các đặc tính tổng hợp từ hai cá thể ban đầu đó.

Câu hỏi ôn tập

1. Ý nghĩa của nuôi cấy đơn bội
 2. Phương pháp nuôi cấy hạt phấn lúa
 3. Phương pháp nhị bội hoá cây đơn bội
 4. Nguồn gốc của sự thay đổi tế bào soma
 5. Phương pháp chọn lọc các dòng tế bào soma
 6. Khái niệm, cách phân lập và nuôi cấy tế bào trần
 7. Phương pháp dung hợp tế bào trần
 8. Phương pháp chọn lọc thể dung hợp
-

CHƯƠNG VIII

BẢO QUẢN NGUỒN GEN *IN VITRO*

1 - Ý NGHĨA CỦA VIỆC BẢO QUẢN NGUỒN GEN *IN VITRO*

Có một điều nhận định hiện nay được nhiều khoa học đồng ý là có sự đe dọa về việc lưu trữ các nguồn gen thực vật qua sự cấu trúc lại môi trường tự nhiên như chịu ảnh hưởng của các cơn mưa nhiệt đới, sự đô thị hoá và sự nóng lên của bầu khí quyển. Mất các nguồn gen trong tự nhiên, nguồn gốc cho sự lai tạo ra các giống mới và cung cấp nguồn nguyên liệu cho đời sống con người, sẽ dẫn đến những hậu quả nghiêm trọng mà con người không thể hình dung hết được. Do đó, ứng dụng công nghệ tế bào thực vật, trong việc lưu trữ các nguồn gen *in vitro* trong điều kiện ổn định là cần thiết.

2 - BẢO QUẢN NGUỒN GEN THEO PHƯƠNG PHÁP TRUYỀN THỐNG

Các phương pháp hiện nay dùng bảo quản nguồn gen như:

- Bảo quản trong điều kiện tự nhiên, phương pháp này chịu ảnh hưởng tác động của môi trường tự nhiên và nguồn bệnh.

- Bảo quản bằng hạt đối với những giống có độ đồng hợp tử cao như giống lúa. Riêng các giống có độ dị hợp tử cao thì không bảo quản bằng hạt được như giống khoai tây.

- Bảo quản trên đồng ruộng như giống chuối, tuy nhiên dễ dàng bị nguồn bệnh gây hại, thời tiết và tốn nhiều chi phí.

- Phương pháp khác, có độ an toàn cao hơn được nghiên cứu, bảo quản nguồn gen *in vitro* đã được phát triển và ứng dụng trong 15÷25 năm qua và thu được nhiều kết quả.

Một vấn đề quan trọng trong việc bảo quản nguồn gen là điều kiện bảo quản ổn định, không bị các nguồn bệnh gây hại, không bị ảnh hưởng của các điều kiện tự nhiên và chi phí bảo quản thấp. Bằng phương pháp nuôi cấy *in vitro*, các nguồn gen được bảo quản dưới nhiều dạng khác nhau như mô thực vật, tế bào, phôi, protoplast, hạt phấn hay DNA.

3 - BẢO QUẢN NGUỒN GEN BẰNG PHƯƠNG PHÁP NUÔI CẤY MÔ TẾ BÀO THỰC VẬT

3.1 - Thu thập và chuẩn bị nguồn gen

Nguồn gen được thu thập qua con đường trao đổi giống hay thu thập trong tự nhiên. Sau đó nguồn gen được chuẩn đoán bệnh, khử bệnh và được cách ly (quarantine). Giai đoạn kế, nguồn gen được đưa vào nhân giống cho đủ số lượng bảo quản *in vitro*. Phụ thuộc vào từng loại cây trồng mà sử dụng phương pháp bảo quản thích hợp. Có hai phương pháp bảo quản *in vitro*, phương pháp sinh trưởng

chậm và phương pháp lạnh sâu. Cho đến hiện nay, hầu hết các loài cây trồng được bảo quản theo phương pháp nhân vô tính *in vitro* sinh trưởng chậm. Trong phương pháp sinh trưởng chậm, mô và tế bào thực vật tiếp tục phân chia mặc dù chậm, và thời gian kéo dài từ 1 năm (ngắn) đến 3÷5 năm (trung bình). Để bảo quản nguồn gen trong thời gian dài hơn, phương pháp lạnh sâu được sử dụng, bằng những tác nhân gây ra lạnh sâu như nitrogen lỏng (-196°C), trong điều kiện này, sự phân chia tế bào hoàn toàn bị ngăn chặn.

3.2 - Ngân hàng gen *in vitro*

Trong những năm gần đây, nghiên cứu bảo quản nguồn gen *in vitro*, hay ngân hàng giống *in vitro*, cho thấy có thể bảo quản trong một phương thức như trên đồng ruộng được thu nhỏ, đảm bảo sạch bệnh, điều kiện ổn định, an toàn và có thể vận chuyển đi xa dễ dàng. Hiện nay, nhiều loài cây trồng được bảo quản thành công *in vitro* như khoai tây, khoai lang, ca cao, bơ, dứa, chuối, cam chanh... Trong việc bảo quản *in vitro*, cần phải bảo đảm sự thuần nhất về mặt di truyền và các yếu tố cần lưu ý có thể gây ra sự biến đổi là chất khử trùng, chất kìm hãm sinh trưởng, môi trường nuôi cấy, nồng độ đường và còn sót mầm bệnh... Đối với cây dứa, phôi được tách ra trên đồng ruộng và ngâm trong nước muối và chuyển về phòng thí nghiệm. Hay với cây ca cao, mẫu được khử trùng sơ bộ trên đồng ruộng với chất chống thấm và khuẩn.

3.3 - Trao đổi nguồn gen *in vitro*

Việc thu thập và trao đổi giống *in vitro* hiện nay được sử dụng phổ biến. Được sử dụng rộng rãi đối với các loài cây có củ, chuối, cọ dầu và các loài cây khác. Điều quan trọng trong việc bảo quản đi xa là:

- Chất liệu bao bì và vật chứa mẫu.
- Bao bì chống chịu được với sự thay đổi nhiệt độ và tránh vỡ.
- Môi trường chứa lượng dinh dưỡng nhiều hơn nuôi cấy bình thường.
- Phương tiện vận chuyển càng nhanh càng tốt.
- Phương pháp nuôi cấy thích hợp.

3.4 - Phương pháp bảo quản nguồn gen *in vitro*

Mô thực vật dùng để bảo quản thường là chồi, phôi hay cây non. Vật liệu thường được sử dụng nhiều nhất là chồi đỉnh do chồi đỉnh ổn định về mặt di truyền và hệ thống nuôi cấy (nhân giống vô tính, mô sẹo, phôi, nuôi cấy tế bào đơn, nuôi cấy protoplast, nuôi cấy hạt phấn và plasmid) tránh đột biến trong nuôi cấy *in vitro* so với cây mẹ. Thí dụ, cây chuối được bảo quản bằng chồi đỉnh qua hệ thống nuôi cấy đỉnh sinh trưởng trong nhân giống vô tính bảo đảm được tính ổn định về mặt di truyền. Điều này cho thấy, lưu trữ nguồn gen *in vitro* giống như trên đồng ruộng

nhưng trong điều kiện ổn định và có kiểm soát và sự khác biệt giữa các hệ thống nuôi cấy là mức độ biến dị trong nuôi cấy *in vitro* cần được quan tâm.

3.4.1 - Phương pháp sinh trưởng chậm *in vitro*

Sinh trưởng chậm thích hợp cho mọi loài cây trồng được nuôi cấy bằng đỉnh sinh trưởng hay chồi đỉnh. Có 3 loại sinh trưởng chậm:

- Nhân giống vô tính *in vitro* với thời gian giữa hai lần cấy chuyển được kéo dài ra
- Giảm sinh trưởng
- Ngừng tăng trưởng

Tốc độ sinh trưởng trong nuôi cấy *in vitro* có thể được làm chậm lại qua một số tác nhân tác động riêng biệt hay phối hợp với nhau. Phương pháp thông dụng là giảm nhiệt độ nuôi cấy, hầu hết các loài cây trồng sinh trưởng nhanh ở nhiệt độ 20÷25°C, khi giảm nhiệt độ xuống 6÷12°C thì tốc độ sinh trưởng giảm mạnh. Ở các loài cây trồng nhiệt đới, có nhiệt độ phát triển tốt nhất là 30°C, trong nuôi cấy sinh trưởng chậm, nhiệt độ giảm <20°C. Nuôi cấy chồi đỉnh khoai tây (*Solanum tuberosum*) ở 12°C ban ngày và 6°C ban đêm, đã kéo dài thời gian cấy truyền là 25÷52 tuần lễ. Đối với cây khoai lang (*Imopeae batata*) nuôi cấy ở 25÷28°C, kéo dài thời gian cấy truyền là 6÷55 tuần lễ. Hạn chế sự thoát hơi nước môi trường có thể kéo dài đến 89 tuần lễ.

Giảm thấp tốc độ sinh trưởng bằng cách sử dụng chất kìm hãm sinh trưởng và chất tạo áp suất thẩm thấu mạnh vào môi trường nuôi cấy. Nuôi cấy chồi đỉnh khoai tây, bổ sung vào môi trường ABA (5÷10 ppm), giữ ở 22°C, bảo quản được 12 tháng.

Chất kìm hãm sinh trưởng đi đôi với giảm nhiệt độ, như trong nuôi cấy cây khoai mì (*Manihot esculenta*) nuôi cấy ở 20°C, bổ sung vào môi trường sucrose (4%) và BA (0,01 ppm) hay sucrose (2%) và BA (0,005 ppm) kéo dài thời gian nuôi cấy 15 tháng.

Sau cùng là hàm lượng chất dinh dưỡng và thể tích môi trường nuôi cấy là những nhân tố kéo dài thời gian cấy truyền. Nuôi cấy cây khoai tây ở nhiệt độ 10°C, môi trường tăng 60 ml so với đối chứng là 20 ml, giữ được 18 tháng mới cấy chuyển, có khả năng tái sinh 100%. Với cây dâu tây (*Fragaria spp*) nuôi cấy ở 4°C, trong tối, cho thêm vào môi trường cách khoảng 3 tháng, đã bảo quản được 6 năm và cây tái sinh bình thường. Một số vấn đề cần lưu ý khi sử dụng phương pháp sinh trưởng chậm:

- Môi trường nuôi cấy và chất sinh trưởng BA.
- Sự thủy tinh thể và cây con yếu kém khi tái sinh.
- Giảm oxygen trong môi trường nuôi cấy, tối đa 1%.

- Giảm thấp nhiệt độ nuôi cấy và giảm sự thoát hơi nước.
- Sử dụng chất có áp suất thẩm thấu cao: mannitol, glucose, sucrose.
- Chất kìm hãm sinh trưởng: ABA, CCC.
- Giảm cường độ ánh sáng.
- Loại và thể tích ống nghiệm và thể tích môi trường nuôi cấy.
- Vật liệu chế tạo ống nghiệm: thủy tinh hay nhựa.
- Thời gian bảo quản dài tương đối, tránh gây rối loạn về mặt di truyền và sinh lý.

3.4.2 -Phương pháp lạnh sâu *in vitro*

Bảo quản theo phương pháp lạnh sâu là bảo quản trong nitrogen lỏng. Ở nhiệt độ lạnh sâu, quá trình trao đổi chất ngừng lại tuy nhiên kéo dài thời gian để dàng sinh ra biến dị và sự biến dị xảy ra liên quan đến nhiệt độ bảo quản. Rất khó có loài cây trồng nào chịu đựng được nhiệt độ thấp ngay, mà phải qua giai đoạn làm lạnh trung bình bằng hoá chất hay chất có áp suất thẩm thấu cao từ vài phút cho đến 1÷2 giờ. Chủ yếu là do nước trong tế bào bị lạnh đột ngột làm tế bào bị chết. Đôi khi cần phải xử lý bằng khí lạnh hay ngâm trong dung dịch hypertonic trước khi làm lạnh. Nhưng phương thức xử lý thường dùng là làm lạnh dần dần, chống sự mất nước sau đó xử lý lạnh nhanh bằng nitrogen lỏng. Trong một vài trường hợp làm lạnh nhanh không cần phải qua giai đoạn lạnh dần.

Bảo quản ở nhiệt độ thấp, tránh sự huỷ tế bào do sự đông đá bằng cách vớt nhanh tế bào ra khỏi môi trường lạnh và tránh hoại bào do các chất có áp suất thẩm thấu cao. Một phát hiện mới là, nghiên cứu khả năng thủy tinh thể hoá, tế bào cứng lại- không đông đá- tế bào chất trong, được vớt ra khỏi trạng thái lạnh. Trong dung dịch làm lạnh nhanh gồm có chất chống đông nồng độ cao, chất thẩm thấu tránh mất nước và làm lạnh nhanh. Trong dung dịch thủy tinh thể thường gây độc và thời gian xử lý được kiểm soát cẩn thận và xử lý nhiệt độ lạnh. Các giai đoạn trong bảo quản lạnh sâu:



Hình VIII.1. Dụng cụ bảo quản nguồn gen theo phương pháp lạnh sâu *in vitro*

Tách tế bào ở pha tăng trưởng



Xử lý chống đông tế bào



Xử lý lạnh tế bào



**Tách tế bào khỏi
môi trường lạnh**



**Cấy lại trên môi trường
phục hồi**

Hình VIII.2. Quy trình bảo quản nguồn gen theo phương pháp lạnh sâu *in vitro*

- **Giai đoạn 1:** Là giai đoạn tiền sinh trưởng (hay tế bào đang ở pha tăng trưởng nhanh) tỏ ra thích hợp cho môi trường nuôi cấy khi nhiệt độ giảm thấp nhanh. Thường được bổ sung vào môi trường nuôi cấy DMSO, nitrogen lỏng, malnitol (6%) hay proline (10%).

- **Giai đoạn 2:** là giai đoạn chống lạnh sâu, nhiệt độ giảm dưới điểm đóng băng của tế bào, cần bổ sung chất chống đông, chống lại sự kết tinh thể. Các chất chống đông thường được sử dụng kèm với các chất khác như glycerol... để giảm độc tính so với sử dụng riêng biệt. Trong nuôi cấy chồi đỉnh, DMSO kết hợp với glycerol có bổ sung thêm sucrose, mannitol, sorbitol hay proline sao cho khối lượng cuối cùng là 2M tỏ ra thích hợp và có hiệu quả.

- **Giai đoạn 3:** giai đoạn lạnh đông, tốc độ lạnh đông và vật liệu (mô/tế bào) làm lạnh quyết định. Tốc độ lạnh chậm $1 \div 2^{\circ}\text{C}/\text{phút}$, sự mất nước tế bào xảy ra, làm giảm sự kết tinh trong tế bào. Mỗi loại cây trồng có tốc độ làm lạnh khác nhau, ở cây dâu tây (*Fragaria spp*) là $0,85^{\circ}\text{C}/\text{phút}$, ở cây *Pisum* là $0,6^{\circ}\text{C}/\text{phút}$.

- **Giai đoạn 4:** bảo quản nguồn gen ở trạng thái lạnh đông được tồn trữ ở nhiệt độ thấp, để tránh tạo thể tuyết (kết tinh). Thời gian bảo quản ngắn hay trung bình, nhiệt độ từ -80°C đến -100°C , bảo quản trong thời gian dài thường nuôi cấy trong nitrogen lỏng (-196°C) hay trong khí lạnh (-150°C).

- **Giai đoạn 5:** giai đoạn thoát ra khỏi chế độ lạnh sâu. Hộp chứa mẫu nuôi cấy được ngâm trong nước ấm vô trùng (40°C), sau đó mẫu (mô, tế bào) được cấy vào môi trường phục hồi ở nhiệt độ 25÷30°C, ở điều kiện nhiệt độ phòng 28÷30°C. Môi trường nuôi cấy lỏng hay bán rắn.

- **Giai đoạn 6:** khảo sát khả năng tái sinh mô/tế bào sau thời gian dài trong lạnh sâu. Dùng một trong 3 phương pháp thử: Florscein diacetate staining, Evan's blue staining hay TTC. Thử bằng TTC có phổ rộng rãi. Với tế bào, thử khả năng sinh trưởng như số lượng tế bào và mật độ tế bào.

3.5 - Bảo quản nguồn gen: dịch huyền phù tế bào, mô sẹo và protoplast

Dịch huyền phù tế bào được bảo quản theo phương pháp lạnh sâu hơn 10 năm nay. Dịch huyền phù được nuôi trong điều kiện lạnh được tăng dần dần, nâng sức chịu lạnh của tế bào. Tách tế bào trong pha phát triển nhanh trong chu kỳ tế bào, chống lại sự đông đá bằng cách xử lý lạnh tế bào theo 3 bước làm chậm, tách tế bào ra khỏi môi trường lạnh và nuôi cấy bình thường trở lại trên môi trường phục hồi bán rắn. Đôi khi tế bào được nuôi trên cầu giấy lọc để làm giảm sự gây độc từ chất làm lạnh trong môi trường trước khi được cấy lại trên môi trường phục hồi. Môi trường phục hồi được bổ sung dạng đạm nitrat amonium và than hoạt tính hay được nuôi cấy trong tối trong giai đoạn phục hồi. Mô sẹo và protoplast được xử lý theo phương thức lạnh dần dần. Những kết quả nghiên cứu gần đây cho thấy có thể thủy tinh thể hoá dịch huyền phù, mô sẹo hay protoplast.

3.6 - Bảo quản nguồn gen: phôi soma

Trong quá trình nuôi cấy, tế bào phôi hay phát sinh phôi được bảo quản giống như dịch huyền phù tế bào, mô sẹo hay protoplast. Tuy nhiên cần phải chọn giai đoạn phôi thích hợp (hình cầu, tim, hay thủy lồi). Và trong quá trình bảo quản lạnh sâu có thể chọn lọc các dòng tế bào có tính chịu lạnh. Có thể thủy tinh thể hoá phôi soma. Phôi soma có thể được bọc trong áo alginat dễ dàng trong bảo quản lạnh sâu.

Ngoài ra còn dùng phương thức lạnh khô, mô tế bào được làm khô trong điều kiện vô trùng trước khi vào làm lạnh dần dần. Phương pháp này đã thành công trên phôi cam chanh, khoai mì và cọ dầu. Phôi cam-quýt có thể được xử lý lạnh dần không qua giai đoạn xử lý chống đông. Phôi cọ dầu, trong giai đoạn tiền sinh trưởng có thể được nuôi cấy trên môi trường có nồng độ sucrose cao, sau đó được xử lý lạnh nhanh hay chậm không qua giai đoạn chống đông. Nồng độ sucrose giảm và bổ sung 2,4-D trên môi trường nuôi cấy phục hồi kích thích quá trình hình thành phôi. Trong giai đoạn tiền sinh trưởng, phôi có dạng đặc biệt (có màu trắng sữa, dạng ngón tay và thường dính thành cụm). Phôi cà phê và cà chua được nuôi cấy trên môi trường có nồng độ sucrose cao, sau đó xử lý lạnh dần ở -20°C trước khi đưa vào nitrogen lỏng.

3.7 - Bảo quản nguồn gen: chồi đỉnh và đỉnh sinh trưởng

Chồi đỉnh và đỉnh sinh trưởng hiện nay thường được bảo quản bằng phương pháp sinh trưởng chậm. Các loài cây trồng khác nhau đều có thể thu được đỉnh sinh trưởng. Đây là phương thức được áp dụng cho hầu hết các loài cây trồng và cho hiệu quả cao.

Mô và tế bào thực vật được nuôi cấy trong những điều kiện thích hợp hay gần như thích hợp sẽ biểu hiện sự sinh trưởng khác nhau. Giai đoạn đầu là giai đoạn phát triển chậm gọi là lag phase (pha tiềm sinh), giai đoạn hai là giai đoạn phát triển nhanh gọi là exponential phase và giai đoạn cuối cùng là giai đoạn phát triển ổn định gọi là stationary phase.

Mô tế bào phát triển về số lượng chậm ở giai đoạn một, theo cấp số nhân ở giai đoạn hai và duy trì ổn định ở giai đoạn ba. Thời gian từ lag phase đến stationary phase kéo dài 1÷6 tuần, phụ thuộc vào cây trồng và nguyên liệu (mô/tế bào) nuôi cấy. Bổ sung vào môi trường nuôi cấy những tác nhân ảnh hưởng đến quá trình dinh dưỡng làm kéo dài thời gian giữa hai lần cấy truyền (kéo dài sự sinh trưởng) hay làm sinh trưởng chậm lại (sinh trưởng chậm) hay ngừng hẳn (lạnh sâu).

Bảo quản bằng phương pháp lạnh sâu hiện vẫn còn đang được nghiên cứu:

- Sự thay đổi ít nhất về hình thái và sinh lý.
- Kích thước chồi đỉnh, số lá, vị trí đỉnh sinh trưởng, tuổi sinh lý.
- Giai đoạn sinh trưởng thích hợp
- Giai đoạn thuần hoá, tiền sinh trưởng và chống đông.

Tóm tắt

Với những biến động xấu của điều kiện tự nhiên, môi trường sinh thái và đặc biệt là tác động của con người, việc mất đi các nguồn gen thực vật quý hiếm vẫn đang hàng ngày diễn ra. Chính vì vậy, công tác bảo tồn, lưu giữ các nguồn gen quý hiếm, có ý nghĩa cho chọn giống là hết sức cần thiết.

Việc lưu trữ có thể thực hiện bằng các phương pháp:

- Bảo quản bằng phương pháp sinh trưởng chậm.
- Bảo quản bằng phương pháp lạnh sâu.

Mỗi phương pháp đều có những ưu, nhược điểm riêng. Việc lựa chọn bảo quản bằng phương pháp nào phải tùy thuộc vào từng đối tượng thực vật, tùy trạng thái sinh lý và tùy thuộc vào từng kiểu mô khác nhau của thực vật.

Câu hỏi ôn tập

1. Ý nghĩa của việc bảo quản nguồn gen *in vitro*
 2. Bảo quản nguồn gen theo phương pháp truyền thống
 3. Phương pháp bảo quản sinh trưởng chậm
 4. Phương pháp bảo quản lạnh sâu
-