

BỘ NÔNG NGHIỆP VÀ PHÁT TRIỂN NÔNG THÔN
TRƯỜNG CAO ĐẲNG NÔNG NGHIỆP VÀ PTNT BẮC BỘ

.....****.....

GIÁO TRÌNH

CÔNG NGHỆ TẾ BÀO THỰC VẬT

HÀ NỘI 2012

Chương 1. KHÁI QUÁT VỀ CÔNG NGHỆ TẾ BÀO THỰC VẬT

1.1. Giới thiệu chung

Công nghệ tế bào thực vật là một trong những công nghệ quan trọng của công nghệ sinh học, nó là nền tảng để nghiên cứu và áp dụng các công nghệ khác trong lĩnh vực công nghệ sinh học nông nghiệp. Hiện nay, từ những thành tựu của công nghệ sinh học trong nuôi cấy mô tế bào, nuôi cấy hạt phấn và có thể ứng dụng rất nhiều vào lĩnh vực trồng trọt, như:

- Nhân nhanh vô tính các giống cây quý: từ một mẫu nuôi cấy người ta có thể tạo ra hàng triệu cây con như nhau nếu đủ thời gian cấy chuyên. Tuy nhiên, hệ số cấy chuyên phụ thuộc tùy giống, càng cấy chuyên nhiều lần càng tạo nhiều biến dị. Ví dụ, các nhà khoa học đã kết luận từ một chồi dưa đưa vào nuôi cấy trong ống nghiệm có thể nhân ra hàng triệu cây dưa giống; từ một chồi chuối đưa vào nuôi cấy có thể nhân ra 2.000 cây chuối giống, nếu qua số này sẽ có tỷ lệ biến dị cao.
- Cải lương giống cây trồng bằng nuôi cấy đỉnh sinh trưởng (meristem): để phục tráng những giống cây quý đã nhiễm virus người ta có thể nuôi cấy đỉnh sinh trưởng để nhân nhanh. Qua một số lần nuôi cấy theo kiểu này sẽ tạo ra được những cây hoàn toàn sạch bệnh từ cây đã nhiễm virus.
- Tạo dòng đơn bội từ nuôi cấy bao phấn và nuôi cấy tế bào hạt phấn: Người ta đã ứng dụng kĩ thuật nuôi cấy bao phấn và hạt phấn để tạo những cây đơn bội từ bao phấn hoặc hạt phấn, sau đó lưỡng bội hoá và tạo thành dòng đồng hợp tử. Kĩ thuật này đã thành công nhiều ở những cây họ cà.
- Khắc phục lai xa bằng cách thụ phấn trong ống nghiệm nhờ kĩ thuật nuôi cấy phôi: Nhờ nuôi cấy trong ống nghiệm đã khắc phục tính bất hợp giao tử trước và sau khi thụ tinh đối với lai giữa các cây khác nhau khá xa về mặt di truyền.
- Lai vô tính còn gọi là dung nạp tế bào trần (Protoplast): Nhờ kĩ thuật nuôi cấy mô tế bào thực vật mà người ta đã tạo thành cây lai từ 2 giống khác nhau khá xa về mặt di truyền bằng cách dùng các enzym để hoà tan màng tế bào rồi cho các tế bào trần (không còn màng) vào nuôi cấy chung trong môi trường nhân tạo và chúng phát triển thành khối mô sẹo (callus), từ đó chuyển khối callus này sang các môi trường phân hoá chức năng tế bào và để nuôi cấy thành cây lai.

Sơ lược lịch sử phát triển

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

xương học thuyết cơ bản của sinh học gọi là Học thuyết tế bào:

+ Mọi cơ thể sống được cấu tạo bởi một hoặc nhiều tế bào.

+ Tế bào là đơn vị cấu trúc và chức năng cơ bản của cơ thể sống, là hình thức nhỏ nhất của sự sống.

+ Tế bào chỉ được tạo ra từ tế bào tồn tại trước đó.

Năm 1875, Oscar Hertwig chứng minh bằng quan sát trên kính hiển vi rằng sự thụ thai là do sự hợp nhất của nhân tinh trùng và nhân trứng. Sau đó, Hermann P., Schneider F.A và Butschli O. đã mô tả chính xác quá trình phân chia tế bào. Năm 1883, Wilhelm Roux lần đầu tiên lý giải về phân bào giảm nhiễm ở cơ quan sinh dục. Từ một tế bào thực vật nuôi cấy in vitro có thể tái sinh thành một cơ thể sống hoàn chỉnh. Khả năng này của tế bào thực vật được gọi là tính toàn năng. Năm 1902, Haberlandt lần đầu tiên thí nghiệm nuôi cấy mô cây một lá mầm nhưng không thành công. Năm 1934, Kogl lần đầu tiên xác định được vai trò của IAA, 1 hoocmon thực vật đầu tiên thuộc nhóm auxin có khả năng kích thích sự tăng trưởng và phân chia tế bào. Năm 1939, ba nhà khoa học Gautheret, Nobecourt và White đã đồng thời nuôi cấy mô sẹo thành công trong thời gian dài từ mô thượng tầng (cambium) ở cà rốt và thuốc lá, mô sẹo có khả năng sinh trưởng liên tục. Năm 1941, Overbeek và cs đã sử dụng nước dừa trong nuôi cấy phôi non ở cây cà rốt *Datura*. Năm 1955, Miller và cs đã phát minh cấu trúc và sinh tổng hợp của kinetin - một cytokinin đóng vai trò quan trọng trong phân bào và phân hoá chồi ở mô nuôi cấy. Đến năm 1957, Skoog và Miller đã khám phá vai trò của tỷ lệ nồng độ các chất auxin: cytokinin trong môi trường đối với sự phát sinh cơ quan (rễ hoặc chồi). Khi tỷ lệ auxin/ cytokinin (ví dụ: nồng độ IAA/ nồng độ kinetin) nhỏ hơn 1 và càng nhỏ, mô có xu hướng tạo chồi. Ngược lại khi nồng độ IAA/ nồng độ kinetin lớn hơn 1 và càng lớn, mô có xu hướng tạo rễ. Tỷ lệ nồng độ auxin và cytokinin thích hợp sẽ kích thích phân hoá cả chồi và rễ, tạo cây hoàn chỉnh.

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

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

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

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

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

1.2. Học thuyết tế bào

Năm 1662, Robert Hooke đã thiết kế kính hiển vi đơn giản đầu tiên và quan sát được cấu trúc của miếng bấc bần bao gồm nhiều hạt nhỏ, ông gọi các hạt nhỏ đó là tế bào (cells). Năm 1675, Anton Van Leeuwenhoek xác nhận cơ thể động vật cũng bao gồm các tế bào. Ông quan sát dưới kính hiển vi thấy máu động vật có chứa các hồng cầu và ông gọi đó là các tế bào máu. Nhưng mãi đến năm 1838, Matthias Jacob

Schleiden (nhà thực vật học) và 1839, Theodor Schwann (nhà động vật học) mới chính thức xây dựng học thuyết tế bào. Schleiden và Schwann khẳng định rằng: Mỗi cơ thể động thực vật đều bao gồm những thể tồn tại hoàn toàn độc lập, riêng rẽ và tách biệt, đó chính là tế bào. Có thể nói Schleiden và Schwann là hai ông tổ của học thuyết tế bào. Tuy nhiên, cả hai ông không phải là các tác giả đầu tiên phát biểu một nguyên tắc nào đó, mà chỉ là diễn đạt nguyên tắc ấy rõ ràng và hiển nhiên tới mức nó được phổ biến rộng rãi và cuối cùng đã được đa số các nhà sinh học thời ấy thừa nhận.

1.2.1. Tính toàn năng của tế bào (cell totipotency).

Haberlandt (1902) là người đầu tiên đề xướng ra phương pháp nuôi cấy tế bào thực vật để chứng minh cho tính toàn năng của tế bào. Theo ông mỗi một tế bào bất kỳ của một cơ thể sinh vật đa bào đều có khả năng tiềm tàng để phát triển thành một cá thể hoàn chỉnh. Như vậy mỗi tế bào riêng rẽ của một cơ thể đa bào đều chứa đầy đủ toàn bộ lượng thông tin di truyền cần thiết của cả sinh vật đó và nếu gặp điều kiện thích hợp thì mỗi tế bào có thể phát triển thành một cơ thể sinh vật hoàn chỉnh. Hơn 50 năm sau, các nhà thực nghiệm về nuôi cấy mô và tế bào thực vật mới đạt được thành tựu chứng minh cho khả năng tồn tại và phát triển độc lập của tế bào. Tính toàn thể của tế bào thực vật đã được từng bước chứng minh. Nổi bật là các công trình: Miller và Skoog (1953) tạo được rễ từ mảnh mô cắt từ thân cây thuốc lá, Reinert và Steward (1958) đã tạo được phôi và cây cà rốt hoàn chỉnh từ tế bào đơn nuôi cấy trong dung dịch, Cocking (1960) tách được tế bào trần và Takebe (1971) tái sinh được cây hoàn chỉnh từ nuôi cấy tế bào trần của lá cây thuốc lá. Kỹ thuật tạo dòng (cloning) các tế bào đơn được phân lập trong điều kiện in vitro đã chứng minh một thực tế rằng các tế bào soma, dưới các điều kiện thích hợp, có thể phân hóa để phát triển thành một cơ thể thực vật hoàn chỉnh. Sự phát triển của một cơ thể trưởng thành từ tế bào đơn (hợp tử) là kết quả của sự hợp nhất sự phân chia và phân hóa tế bào. Để biểu hiện tính toàn thể, các tế bào phân hóa đầu tiên trải qua giai đoạn phản phân hóa (dedifferentiation) và sau đó là giai đoạn tái phân hóa (redifferentiation). Hiện tượng tế bào trưởng thành trở lại trạng thái phân sinh và tạo ra mô callus không phân hóa (undifferentiation) được gọi là phản phân hóa, trong khi khả năng để các tế bào phản phân hóa tạo thành cây hoàn chỉnh (whole plant) hoặc các cơ quan thực vật được gọi là tái phân hóa. Ở động vật, sự phân hóa là không thể đảo ngược trở lại. Như vậy, sự phân hóa tế bào là kết quả cơ bản của sự phát triển ở những cơ thể bậc cao, nó thường được gọi là cytodifferentiation.

1.2.3. Thể bội và gen

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

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

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

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

1.2.4. Thể bào tử và thể giao tử

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

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

1.2.5. Sinh sản hữu tính và sinh sản vô tính

Sinh sản vô tính là hiện tượng 1 cơ thể tạo ra các cơ thể mới từ một phần cơ quan sinh dưỡng của mình, không hề có sự tham gia của các yếu tố quy định giới tính, cơ thể con sinh ra hoàn toàn giống hệt cơ thể mẹ. Sinh sản vô tính có rất nhiều hình thức. Ở sinh vật đơn bào có phân đôi tế bào. Một số cơ thể đa bào bậc thấp thì một tế bào sinh dưỡng phân chia tạo ra một nhánh mới và sau đó tách ra khỏi cơ thể chính như ở thủy tức chẳng hạn, cũng có thể một mẫu của cơ thể mẹ đứt ra rồi nó mọc ra một cơ

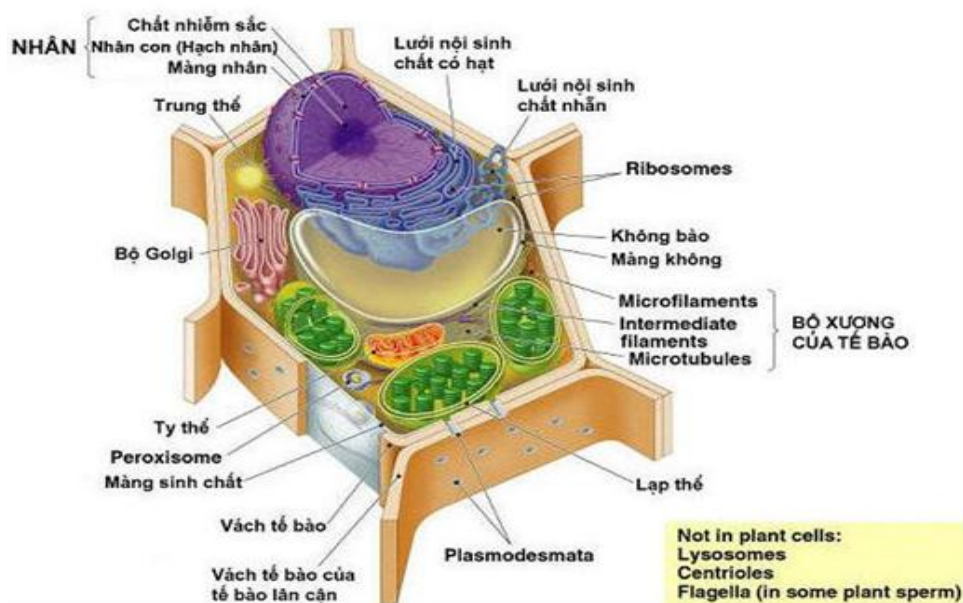
thể khác kiểu như tảo lam. Một số khác thì có hẳn một loại tế bào sinh sản riêng nhưng mà vẫn hoàn toàn không có tính chất giới tính gì cả mà chỉ là từ cơ thể mẹ tạo ra mà thôi. Đó chính là hiện tượng sinh sản vô tính bằng bào tử. Bào tử ở các cơ thể đơn bào có thể là khi môi trường bất lợi thì chúng tự rút nước ra khỏi tế bào, trở thành dạng tiềm sinh đợi thời cơ để sống lại. Ở sinh vật đa bào thì túi đựng các tế bào gọi là bào tử vô tính. Đến mùa sinh sản chúng sẽ phát tán các tế bào đó ra môi trường xung quanh. Khi gặp điều kiện thuận lợi thì mỗi bào tử tạo ra một cơ thể mới. Ở thực vật thì khác, nó tồn tại cả hai kiểu sinh sản vô tính và hữu tính. Sinh sản vô tính ở đây cũng là từ một phần của cơ thể mẹ tách ra và tạo ra một cơ thể mới.

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

1.3 Cấu trúc tế bào thực vật

Hình ảnh tế bào thực vật được minh họa ở hình 1.1. Một tế bào đơn thực vật thường có đường kính khoảng từ 20-40 μm và dài 100-200 μm . Cấu trúc chính của tế bào thực vật tương tự các tế bào đặc trưng của eukaryote. Tuy nhiên, tế bào thực vật có một số đặc điểm riêng biệt như thành tế bào dày, không bào lớn và có lục lạp. Tế bào thực vật được bọc chung quanh bởi thành tế bào. Lớp ngoài của thành tế bào chứa pectin để giúp nó liên kết với các tế bào bên cạnh. Lớp trong của thành tế bào là màng tế bào. Màng tế bào hoàn toàn khác với thành tế bào về hình dạng, thành phần và chức năng. Trong khi thành tế bào cứng rắn, có cấu trúc tương đối dày thì màng tế bào chất lại mỏng (khoảng 75 \AA) và mềm dẻo. Màng tế bào bao gồm protein và lipid trong khi thành tế bào là carbohydrate tự nhiên. Thành tế bào có chức năng nâng đỡ cho cây trong khi màng tế bào điều hòa sự vận chuyển các chất đi vào và ra khỏi tế bào. Không bào (vacuole) có vai trò tiếp nhận các chất thải của sự trao đổi chất hoặc các chất thứ cấp của thực vật. Ở các tế bào non không bào thường nhỏ và nhiều. Khi tế bào lớn dần và già hơn thì không bào cũng mở rộng lên và kết thành một khối. Ở các tế bào thực vật trưởng thành, không bào có thể chiếm tới 90% thể tích tế bào. Không bào được bọc chung quanh bởi màng huyết tương (plasma). Thành phần chính của các không bào lớn là nước chứa các chất hòa tan như các ion vô cơ, các amino acid, các acid hữu cơ, các sắc tố hòa tan trong nước (anthocyanin) và các chất không hòa tan ở dạng tinh thể và hình kim. Ngoài ra, không bào cũng chứa các protein như

các hydrolyse, catalase và photphatase. Phân bào tan muốn đề cập đến lipid ở chung quanh tất cả các cấu trúc nổi giữa nhân và màng tế bào. Lục lạp (chloroplast) là vị trí của quang hợp trong tế bào thực vật, nó chứa chlorophyll là sắc tố lục phản ứng với ánh sáng để sản xuất các carbohydrate. Nhân (nuclear) là trung tâm điều khiển của tế bào chứa DNA để phiên mã và dịch mã thành protein. Các protein tổng hợp được sắp xếp và đóng gói trong các túi của bộ máy Golgi. Nội sinh chất (endoplasmic reticulum) là mạng lưới của các ống nhỏ nối liền các phần khác nhau của tế bào. Ribosome được tập trung trên bề mặt của mạng lưới nội sinh chất và tham gia vào hoạt động sinh tổng hợp protein. Ty thể (mitochondrion) chứa vật liệu di truyền và nhiều enzyme quan trọng trong sự trao đổi chất của tế bào.



Hình 1.1. Cấu trúc tế bào thực vật

1.4. Môi trường nuôi cấy

Mặc dù nhu cầu dinh dưỡng của các loại mô nuôi cấy là rất khác nhau nhưng môi trường nuôi cấy mô thực vật đặc trưng chứa các thành phần sau:

- **Các nguyên tố đa lượng.** Bao gồm các loại muối của nitrogen, potassium, calcium, phosphorus, magnesium và sulfur. Đây là sáu nguyên tố chính cần thiết cho sinh trưởng của thực vật bậc cao.
- **Các nguyên tố vi lượng.** Bao gồm các loại muối của sắt, kẽm, mangan, boron, copper, molybdenum và cobalt ở dạng vết.

- **Các phụ gia hữu cơ.** Một lượng nhỏ các loại vitamin (myo-inositol, thiamine, nicotinic acid, pyridoxine, riboflavin...), các amino acid (thường cho phép bỏ qua nhưng trong một số trường hợp đặc biệt thì có thể dùng), và các phụ gia hữu cơ không xác định khác (malt, dịch chiết nấm men, dịch thủy phân casein, nước dừa...).

- **Các chất kích thích sinh trưởng thực vật.** Thành phần phụ gia quan trọng nhất quyết định kết quả nuôi cấy là các chất điều hòa sinh trưởng. Các auxin (IAA và các dạng tương tự được tổng hợp nhân tạo như 2,4-D , NAA , IBA , ...), và các cytokinin (zeatin, 2i-P và các dạng tương tự được tổng hợp nhân tạo như kinetin, BA ...) là những nhóm chất kích thích sinh trưởng và phát sinh hình thái chủ yếu trong nuôi cấy mô và cơ quan của thực vật.

- **Nguồn carbon.** Thường sử dụng sucrose làm nguồn carbon thay cho nguồn carbon được thực vật cố định từ khí quyển bằng quang hợp. Trong đa số các thí nghiệm nuôi cấy, tế bào thực vật đã mất khả năng quang hợp. Glucose cũng thường được đưa vào môi trường và cho hiệu quả tương đương sucrose, trong khi fructose cho hiệu quả kém hơn.

- **Các tác nhân làm rắn (tạo gel) môi trường.** Thường sử dụng là agar, một loại polysaccharide thu được từ một số loài tảo thuộc ngành tảo đỏ (Rhodophyta). Một số hợp chất khác cũng được thử nghiệm thành công như alginate, phytigel, methacel và gel-rite. Murasghige và Skoog (1962) đã xây dựng môi trường dinh dưỡng cơ bản (gọi là môi trường MS) thích hợp cho hầu hết các thí nghiệm nuôi cấy tế bào thực vật. Thành phần môi trường nuôi cấy được trình bày ở bảng 1.1.

Thành phần	Nồng độ (mg/L)	Thành phần	Nồng độ (mg/L)
<i>1. Các nguyên tố đa lượng</i>		FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8
MgSO ₄ .7H ₂ O	370	Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37,3
KH ₂ PO ₄	170	<i>3. Nguồn carbon</i>	
KNO ₃	1900	Sucrose	30000
NH ₄ NO ₃	1650		
CaCl ₂ .2H ₂ O	440		
<i>2. Các nguyên tố vi lượng</i>		<i>4. Các phụ gia hữu cơ</i>	
H ₃ BO ₃	6,2	- Các vitamin	0,5
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3	Thiamine.HCl	
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6	Pyridoxine.HCl	0,5
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25	Nicotinic acid	0,5
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	myo-inositol	100
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	- Các chất khác	
KI	0,83	Glycine	2

Bảng 1.1. Thành phần môi trường Murashige và Skoog (1962)

CÂU HỎI ÔN TẬP

1. Tóm tắt sơ lược lịch sử phát triển của công nghệ sinh học nói chung và công nghệ tế bào thực vật nói riêng
2. Trình bày tính toàn năng của tế bào (cell totipotency).
3. So sánh hình thức sinh sản hữu tính và sinh sản vô tính ở thực vật
4. Mô tả cấu trúc tế bào thực vật
5. Phân tích vai trò của các yếu tố cấu thành môi trường nuôi cấy mô, tế bào thực vật

Chương 2. THU NHẬN VÀ NUÔI CẤY PHÔI IN VITRO

2.1. Phôi soma

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

2.1.1. Sự phát sinh phôi soma

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

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

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

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

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

Sự hình thành phôi thông qua 2 con đường PEDC và IEDC. Con đường PEDC

là con đường phát sinh phôi không qua quá trình tạo mô sẹo và IDEC là con đường thông qua quá trình tạo mô sẹo.

Có 2 bước dẫn đến sự hệ thống phôi:

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

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

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

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

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

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

Một hệ thống thích hợp đã được thiết lập cho mục đích nghiên cứu trên qua việc dùng tế bào dung dịch huyền phù cà rốt. Những cụm tế bào phôi được chọn lọc sau khi lọc qua lưới để loại bỏ những cụm tế bào to và được ly tâm trong dung dịch Ficoll và được cấy chuyển sang môi trường không có auxin và có zeatin (10-7M). Phát sinh phôi

đồng nhất xảy ra từ những cụm tế bào có tần suất khoảng 90% phát sinh phôi. Hệ thống này cho thấy thích hợp để nghiên cứu tiến trình phát sinh phôi từ những cụm tế bào có khả năng phát sinh phôi, được gọi là những cụm tế bào giai đoạn 1. Tuy nhiên từ những cụm tế bào này có thể biệt hoá tạo phôi trong môi trường có auxin và không có chất nào khác, phát sinh phôi có thể ghi nhận được thông qua xác định những cụm tế bào có khả năng phát sinh phôi ở giai đoạn 1. Như vậy tiến trình hình thành những cụm tế bào giai đoạn 1 từ những tế bào đơn rất quan trọng để phân tích tiến trình phát sinh phôi. Một hệ thống được yêu cầu là có tần suất phát sinh phôi cao từ những tế bào đơn.

Những tế bào đơn có kích thước nhỏ, tròn và tế bào chất đậm đặc được gọi là những tế bào giai đoạn 0, thu nhận được qua lọc, rây. Những tế bào giai đoạn 0 được nuôi cấy trên môi trường có 2,4 D (5.10-8M) trong 6 ngày và được chuyển sang môi trường không có auxin, tế bào phôi hình thành với tần suất cao. Xử lý tế bào trước với auxin cho thấy là cần thiết và zeatin (10-6M), Manitol (10-3 M) và O2 cao (40%) có tác dụng thúc đẩy phát sinh phôi. Hệ thống này là một hệ thống có hiệu quả cho phép nghiên cứu tiến trình phát sinh phôi soma từ những tế bào đơn. Những tế bào giai

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

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

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

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

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

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

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

2.2.2. Tính bất hợp giao tử sau khi thụ tinh

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

2.3. Thụ phấn in vitro

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

Thụ phấn và thụ tinh ở điều kiện in vitro tạo ra cơ hội sản xuất các phôi lai giữa

các loài thực vật không thể lai bằng các phương pháp gây giống cây trồng truyền thống.

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

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

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

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

Một thời gian dài phương pháp thụ phấn in vitro chỉ thành công ở một số đối

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

2.3.1. Phương pháp thụ phấn in vitro

2.3.1.1. Nguyên liệu



Hình 2.1. Cấu tạo của hoa, bầu quả và phôi

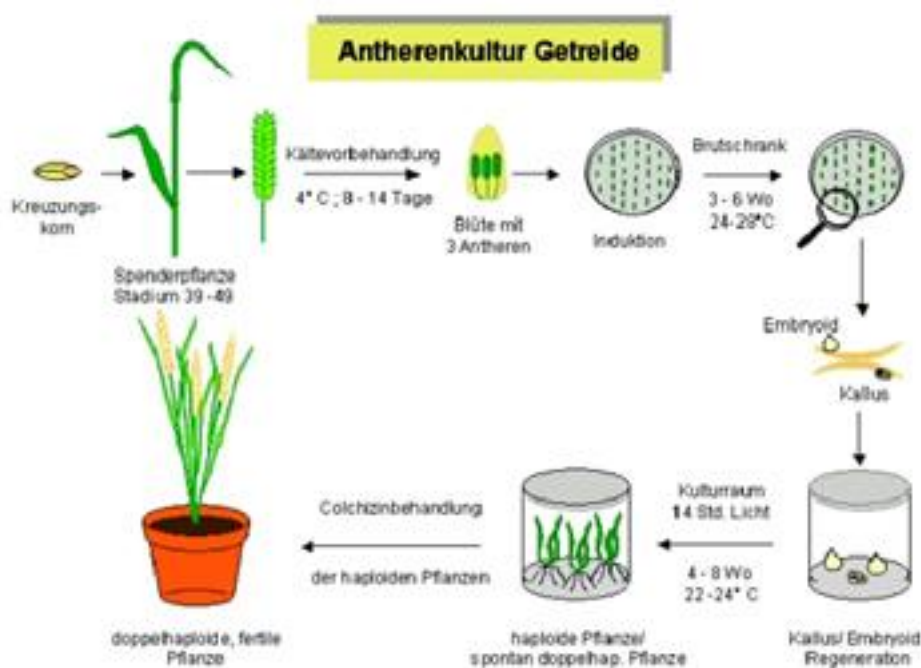
Các bầu quả (ovaries) có nhiều noãn (ovules) là nguyên liệu thực nghiệm tốt nhất. Ở các loài thuộc họ Solanaceae (*Nicotiana tabacum*, *N. alata*, *N. rustica*, *Petunia hybrida*), họ Papaveraceae (*Papaver somniferum*, *Eschscholtzia californica*, *Argemone mexicana*) và họ Caryophyllaceae (*Melandrium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

Một số vấn đề quan trọng không thể bỏ qua trong thụ phấn trong ống nghiệm là: tuổi bao phấn, cách giải phẫu bao phấn, sự nảy mầm của ống phấn trong noãn, khả

năng sống sót của noãn và sự thụ tinh bên trong túi phôi. Sự xâm nhập hoàn toàn của ống phấn vào lỗ noãn có thể quan sát được bằng kính hiển vi.

2.3.1.2. Khử trùng nguyên liệu

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



Hình 2.2. Quy trình nuôi cấy bao phấn cây lúa

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

2.3.1.3. Nuôi cấy noãn và bầu quả

- Noãn. Sinh trưởng của ống phấn gắn trên noãn trần (bare ovules) thường bị ức chế bởi sự có mặt của nước trên bề mặt của noãn. Màng nước này phải được làm khô

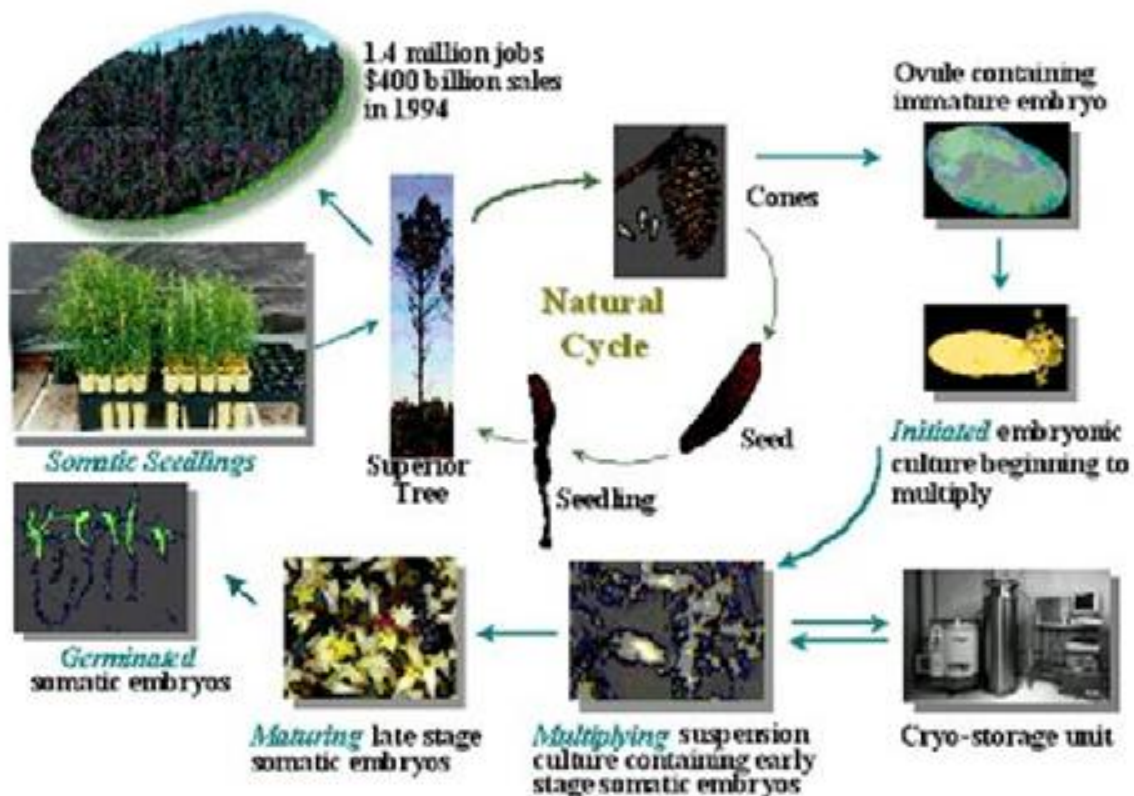
bằng giấy lọc và sau đó, noãn khô ráo được phủ bằng hạt phấn. Các hạt phát triển từ các noãn có phôi hình cầu hoặc phôi già có thể dễ dàng phân biệt, một số kết quả đã đạt được ở Gynandrophát sinhis gynandra, *Impatiens balsamina*, *Nicotiana tabacum* và *Allium cepa*. Tuy nhiên, các noãn sau khi thụ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

- Bầu quả. Kỹ thuật nuôi cấy bầu quả được phát triển bởi Nitsch (1951), ông đã nuôi thành công bầu quả tách từ các hoa thụ phấn in vitro để phát triển thành quả chín (*Cucumis* và *Lycopersicum*). Các quả này mang hạt có thể nảy mầm được nhưng chúng có kích thước nhỏ hơn các quả phát triển ở điều kiện tự nhiên. Các tác giả khác cũng đã nuôi cấy thành công các noãn tách rời từ một số loài (*Linaria macroccana*, *Tropaeolum majus*, *Iberis amara*, *Hyoscyamus niger*) trên môi trường chứa muối khoáng và sucrose.

Bổ sung vitamin B vào môi trường giúp quả đạt kích thước bình thường và các hạt có thể nảy mầm được. Các môi trường nuôi cấy ngày càng giàu dinh dưỡng hơn do bổ sung IAA hoặc nước dừa, thậm chí cho quả có kích thước lớn hơn các quả hình thành trong điều kiện in vivo (*Anethum graveolens*).

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

Reforestation & Somatic Embryogenesis



Hình 2.3 Qui trình nhân nhanh giống cây rừng bằng nuôi cấy phôi từ hạt

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

2.3.2.1. Trạng thái sinh lý của mẫu vật

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

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

2.3.2.2. Môi trường nuôi cấy

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

Trong nuôi cấy in vitro các noãn đã được thụ phấn ở hầu hết các loài thì môi trường Nitsch có cải biến được sử dụng rộng rãi. Tuy nhiên, môi trường Steward và Hsu (S-H) thích hợp hơn cho nuôi cấy các thể lai cùng loài hoặc khác loài sau khi thụ tinh các noãn non. Môi trường nuôi cấy chứa IAA 10 µg/L hoặc kinetin 0,1 µg/L làm tăng số lượng hạt được tạo thành từ noãn. Nồng độ cao hơn của kinetin thường gây ức chế.

Nguồn nitrogen (hỗn hợp các amino acid hoàn chỉnh) không ảnh hưởng đến tần số thụ tinh của các bầu quả của ngô được thụ phấn in vitro, nhưng cần thiết cho sự sinh trưởng và phát triển tối thích của hạt.

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

2.3.2.3. Điều kiện nuôi cấy

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

Bảng 2.1. Môi trường Nitsch-sử dụng phổ biến trong nuôi cấy các noãn thụ phấn in vitro

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

2.3.2.4. Kiểu gen

Phản ứng của bầu quả in vitro trong mối liên quan với sự hình thành hạt tùy thuộc vào từng loài. Hạt phấn của các loài họ cải khó nảy mầm trong nuôi cấy và người ta phải cải tiến kỹ thuật nuôi cấy cho phù hợp bằng cách nhúng noãn của Brassica oleracea trong dung dịch CaCl₂ 1%, sau đó gieo chúng trên một lớp gelatin 10% mỏng (10 μm) rồi thụ phấn với hạt phấn. Lớp gelatin mỏng được bảo quản trong đĩa petri có phủ giấy lọc gắn vào nắp hộp. Sau 24 giờ nuôi, noãn được thụ tinh và chuyển lên môi trường Nitsch có agar cho tới khi tạo hạt.

2.3.3. Ứng dụng của thụ phấn in vitro

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

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

Nuôi cấy thành công các noãn được thụ phấn in vitro đã tăng khả năng sản xuất

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

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

2.4.1. Các kiểu nuôi cấy phôi

2.4.1.1. Nuôi cấy phôi non

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

2.4.1.2. Nuôi cấy phôi trưởng thành

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

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

2.4.2. Kỹ thuật nuôi cấy

2.4.2.1. Khử trùng bề mặt

Phôi của thực vật có hạt thường phát triển bên trong noãn được bao bọc bởi bầu quả. Vốn ở chúng đã tồn tại sẵn một môi trường vô trùng do đó khử trùng bề mặt phôi là không cần thiết trừ khi vỏ hạt bị tổn thương hoặc xuất hiện sự nhiễm hệ thống. Vì thế các hạt trưởng thành, noãn nguyên vẹn, hoặc quả được khử trùng bề mặt và các phôi vô trùng tách khỏi các mô chung quanh. Khử trùng bề mặt được tiến hành bằng cách ngâm nguyên liệu vào trong dung dịch khử trùng thương mại có hypochlorite (Clorox 5-10%, sodium hoặc calcium hypochlorite 0,45%) trong 5-10 phút hoặc EtOH (70-75%) trong 5 phút.

Nồng độ thấp của các chất hoạt dịch (surfactant) như Tween 20, Tween 80, Teepol, hoặc Mannoxol được bổ sung vào dung dịch khử trùng làm tăng tính thấm của mô.

Đối với hạt ngô, và các phôi tách rời: ngâm trong EtOH 70% cộng với 5-10 phút khử trùng bằng sodium hypochlorite 2,6%.

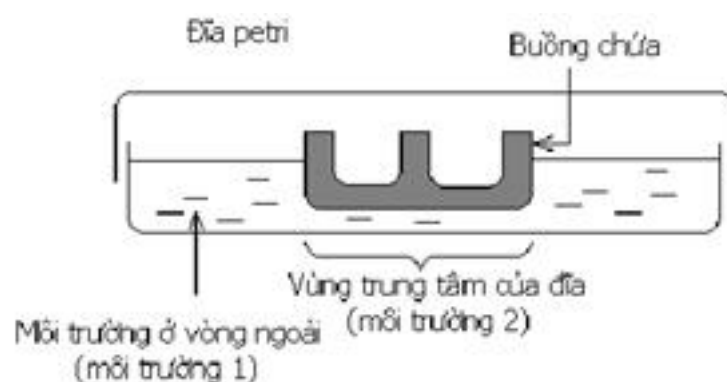
2.4.2.2. Phân lập phôi

Phân lập phôi phải thực hiện ở điều kiện vô trùng dưới laminar (laminar air flow hood). Phôi trưởng thành phân lập tương đối dễ bằng cách giải phẫu hạt. Ngâm hạt có vỏ cứng (Iris, Cyclamen) trong nước từ một vài giờ đến một vài ngày trước khi khử trùng để giải phẫu nó được dễ dàng hơn. Phân lập các phôi nhỏ hơn hoặc phôi non đòi hỏi giải phẫu phải đặc biệt cẩn thận nếu chúng được bọc trong nội nhũ dạng lỏng. Trong trường hợp như thế cần mở rãnh ở đầu lỗ noãn của noãn non và gây áp lực gây ở đầu đối diện để thu được phôi thông qua rãnh nứt.

2.4.2.3. Môi trường dinh dưỡng

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

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



Hình 2.4. Phương pháp nuôi cấy phôi non cho đến khi nảy mầm mà không cần chuyển chúng khỏi vị trí nuôi cấy đầu tiên trong đĩa petri.

a. Muối khoáng

Các chất dinh dưỡng của môi trường MS, B5 và White có cải biến nhất định được

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

b. Nguồn carbon

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

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

c. Nguồn nitrogen

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

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

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

d. Dịch chiết thực vật tự nhiên

Nếu môi trường được bổ sung thêm nước dừa không khử trùng bằng autoclave, các phôi này sẽ tăng chiều dài nhưng không có dấu hiệu nảy mầm sớm. Nhiều tác giả

gợi ý rằng sự có mặt của “nhân tố phôi” (embryo factor) trong nội nhũ dạng lỏng của nước dừa có thể thay thế cho sự thiếu hụt đường, amino acid, các hormone sinh trưởng và các chất khác trong môi trường nuôi cấy. Nước dừa có hiệu quả kích thích sinh trưởng của phôi non tách rời của mía đường, lúa mạch, cà chua, cà rốt và các loài dương xỉ.

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

Dịch chiết của *Datura* và *Sechium* cũng có hiệu quả như nước dừa, nhưng dịch chiết từ hạt *Lupinus* lại có hiệu quả gấp đôi.

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

e. Các chất điều khiển sinh trưởng

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

f. pH môi trường

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

g. Điều kiện nuôi cấy

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

Trước đây, nhiều tác giả cho rằng ánh sáng không ảnh hưởng nhiều đến sinh

trưởng của phôi in vitro, nhưng những nghiên cứu gần đây khi nuôi cấy phôi chưa trưởng thành của lúa mạch, lanh, loài lai *Aegilops* × *Hordeum*, và các cá thể lai khác loài của *Allium* lại tiến hành trong tối trước khi chuyển chúng sang điều kiện sáng để nảy mầm.

Các phôi sơ cấp dạng hình tim của các loài *Ilex* mẫn cảm với ánh sáng. Các phôi thứ cấp rất khó sinh trưởng đã hoạt động khi chúng được tách rời và nuôi ở điều kiện chiếu sáng 4.000 lux hoặc hơn trong 4 giờ chiếu sáng trong suốt 4 ngày nuôi đầu tiên. Nhiều tác giả cho rằng nuôi trong tối ở giai đoạn ban đầu (bốn ngày) là rất cần thiết theo đó chúng có thể sinh trưởng tới giai đoạn trưởng thành thậm chí dưới điều kiện chiếu sáng liên tục.

2.4.3. Một số khó khăn trong nuôi cấy phôi

2.4.3.1. Môi trường dinh dưỡng

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

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

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

2.4.3.2. Phát sinh callus

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

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

2.5. Nuôi cấy tế bào phôi tâm (nucellar)

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

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

2.5.1. Sự phát triển của phôi nucellar

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

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

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

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

1. Bao kín nụ hoa vào ngày hoa nở để tránh sự pha tạp di truyền của mẫu cấy.
2. Khử đực và thụ phấn với phấn của cam ba lá (*P. trifoliata*). Lý do của việc thụ phấn có kiểm soát này là tạo ra sự đánh dấu khác biệt để nhận biết sau này. Vì tất cả cây con từ hợp tử (phôi hữu tính) sẽ mang lá ba thùy giống cây mẹ, khác với những cây có nguồn gốc nucellar.
3. Thu hạt từ quả non ở những thời điểm khác nhau (tuần) để xác định giai đoạn thích hợp nhất cho nuôi cấy. Việc lựa chọn thời gian thu mẫu thay đổi tùy theo từng giống.
4. Sau khi xác định thời điểm tối ưu nhất, hái những quả đang phát triển, rửa sạch, khử trùng bề mặt bằng hypoclorit canxi trong 10-15 phút, rửa lại bằng nước cất vô trùng ba lần.
5. Cắt đôi quả trong điều kiện vô trùng. Tách hạt non, bỏ vỏ lụa, lấy phần còn lại của hạt đem nuôi cấy hoặc cắt hạt non theo chiều dọc và quan sát dưới kính hiển vi soi nổi. Loại bỏ phôi hợp tử và nội nhũ. Gấp nucellus và đặt vào môi trường nuôi cấy.

6. Môi trường nuôi cấy tế bào nucellar là môi trường cơ bản MS bổ sung thêm auxin, cytokinin và các phụ gia khác như casein hydrolysate hay dịch chiết malt nếu cần, tùy thuộc vào loài được nuôi cấy (Bảng 16).
7. Mẫu cây được giữ trong điều kiện nhiệt độ 25 C, độ ẩm 50-60% và chế độ ánh sáng 16h sáng/ 8h tối trong ánh sáng khuếch tán (1000 - 1500 lux).
8. Khi mô sẹo hình thành, cây chuyển sang môi trường (Murashige và Tucker, 1969). Thời gian giữa các lần cấy chuyển là 3- 4 tuần/ lần.
9. Các chồi hình thành sẽ được cấy chuyển sang môi trường chứa axit gibberellic (1- 5 mg/l).
10. Để kích thích sự hình thành rễ, có thể nuôi chồi trong môi trường lỏng thông qua cầu giấy lọc.
11. Cây chuyển cây con có rễ phát triển tốt ra bầu (chậu) với hỗn hợp đất vô trùng và che túi nhựa để giữ ẩm.
12. Tùy thuộc vào sự phát triển của cây, cấy chuyển cây con ra nhà kính và đảm bảo độ ẩm cao trong 4 - 7 ngày và dần dần bỏ túi nhựa giữ ẩm ra.

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

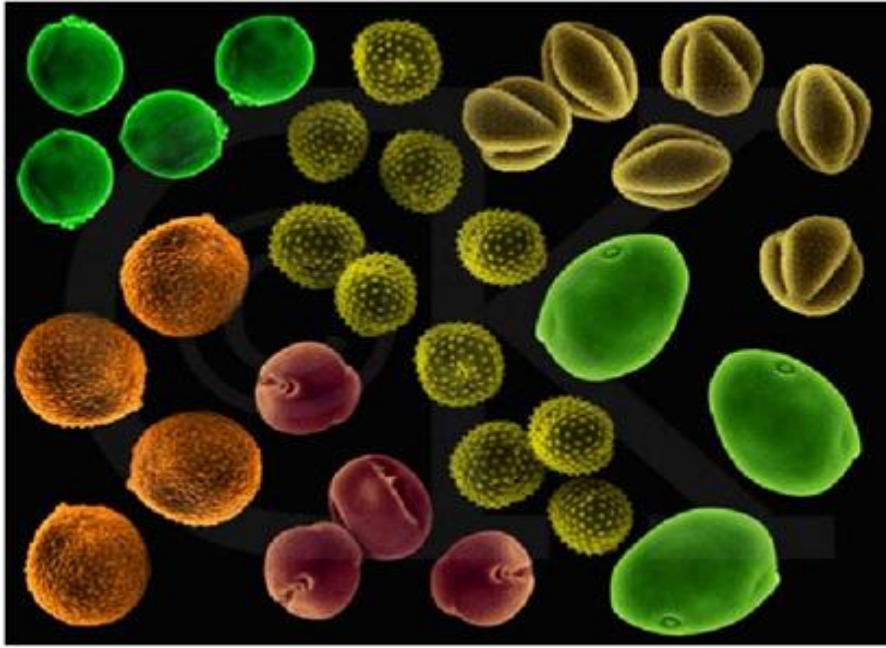
2.6.1. Hiện tượng đa phôi và ứng dụng trong chọn tạo giống sạch bệnh

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

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

2.6.2. Phôi vô tính

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



Hình 2.5 Hình dạng hạt nhân của một số loại cây trồng.

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

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

- Hệ số nhân giống cao. Các mô và tế bào sinh dưỡng nuôi cấy in vitro có thể tạo ra phôi vô tính một cách trực tiếp hoặc thông qua giai đoạn trung gian là mô sẹo. Tế bào mô sẹo có thể phân chia theo cấp số nhân và khi phân hoá thành phôi vô tính sẽ tạo ra số lượng phôi vô tính khổng lồ trong thời gian ngắn. Ví dụ, ở cà phê người ta có thể tạo được 600.000 phôi vô tính từ 1 gram sinh khối ban đầu trong vài tháng với tỷ lệ tái sinh cây từ phôi vô tính đạt 47% (Ducos cs, 1993).

- Phôi vô tính chứa một lượng chất dinh dưỡng tương tự với nội nhũ của phôi hữu tính, có mầm chóp rễ và chồi đỉnh, do vậy có thể nảy mầm trực tiếp thành cây (Ammirato, 1983).

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

Các yếu tố di truyền, đặc tính của mô nuôi cấy, thành phần môi trường và các yếu tố hoá lý khác nhau có tác động mạnh mẽ lên quá trình phân hoá tế bào thành phôi vô

tính. Thidiazuron là một chất có hoạt tính cực mạnh đối với tạo phôi vô tính ở một số cây trồng, đặc biệt là cây lâm nghiệp và cây ăn quả (Huetteman và Preece, 1993), cây chè (Sandal cs., 2001). Kỹ thuật tạo phôi vô tính đã được áp dụng thành công trong nhân nhanh hàng loạt cây trồng, ví dụ: nhân giống xoan ấn Độ (*Azadirach thaindica* A. Jus.) (Murthy and Saxena, 1998), thông (Garin cs., 1998), đu đủ (Jordan and Velozo, 1996; Castillo cs, 1998), loa kèn (Tribulato cs. 1997)...

2.6.3. Phôi hữu tính

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

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

Nhiều thí nghiệm cho thấy phôi vô tính trong hạt tuy không hình thành do thụ tinh nhưng sự thụ phấn vẫn có ý nghĩa kích thích hình thành phôi vô tính. Trong một số trường hợp, ở các giống bất tự hoà hợp, có thụ phấn nhưng do ống phấn không mọc được nên thụ tinh không xảy ra. Kết quả là vài hạt lép được tạo thành. Các hạt lép này có thể được tạo ra từ lớp tế bào nucellar do sự kích thích của ống phấn và do không có thụ tinh nên nội nhũ hạt không phát triển dẫn đến lép (Nagai và Tanikawa, 1928). Trong nuôi cấy *in vitro*, các phôi vô tính của hạt lép có thể dễ dàng tái sinh thành cây. Frost và Soost (1968) đã tổng hợp nghiên cứu về hiện tượng đa phôi trên 53 giống cây có múi khác nhau và cho biết đa phôi là hiện tượng phổ biến ở đa số giống và loài cây có múi, riêng ở 11 giống thuộc nhóm bưởi pumelo không thấy hiện tượng đa phôi. Tính đa phôi được xem như một đặc điểm phân biệt bưởi pummelo với nhóm bưởi grapefruit. Trong nhóm quýt *C. reticulata*, rất nhiều giống bao gồm Ponkan, Satsuma... có nhiều phôi và tỷ lệ phôi vô tính cao. Giống quýt King (nguồn gốc châu á - một dạng cam Sành) có tỷ lệ hạt đa phôi và tỷ lệ cây từ phôi vô tính thấp, giống Kunenbo tương tự giống King (có nguồn gốc từ Nhật Bản) lại có tỷ lệ đa phôi cao (Tanaka, 1954) hay giống Kinnow và Kara (giống King là bố hoặc mẹ của hai giống này) lại có rất nhiều phôi trong hạt và tỷ lệ cây mọc từ phôi hữu tính rất thấp, thậm chí không có phôi hữu tính. Giống Wilking và Kinuôi cây (giống King là bố hoặc mẹ của

2 giống này) lại là giống đơn phôi và không có phôi vô tính. Giống Temple và Clementine (là 2 giống lai không rõ bố mẹ) cũng là giống đơn phôi và chỉ có phôi hữu tính. Rất nhiều giống quýt là đơn phôi (monoembryonic). Trong nhóm cam *C. sinensis*, số phôi trong hạt thường trung bình hoặc cao. Số phôi vô tính thường khá cao ở đa số các giống, không có giống đơn phôi ở nhóm này. Các giống bưởi quý ở nước ta chủ yếu thuộc nhóm pummelo đơn phôi.

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

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

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

- Giống cây mẹ ban đầu về mặt di truyền và các đặc tính nông học khác. Phôi vô tính bảo tồn mọi đặc tính ưu thế lai của cây mẹ nếu mẹ có ưu thế lai cao.
- Không mang theo các bệnh virus chủ yếu mà cây mẹ nhiễm phải. Do vậy, cây từ phôi vô tính gần như sạch bệnh hoàn toàn. Cho đến nay, rất ít loại bệnh virus lây truyền qua hạt, ở cây có múi chỉ thấy có hai loại bệnh virus, đó là blind pocket và chảy gôm (concave gum) có khả năng truyền qua hạt (Tucker, 1993). Trong thực tiễn sản xuất, tạo cây từ phôi vô tính vẫn là một phương pháp truyền thống có giá trị trong tạo giống sạch bệnh ở cây có múi.

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

1. Có sự giống hệt nhau giữa cây con và cây mẹ ngay cả trong các trường hợp sau:
 - + Cây mẹ là cây lai dị hợp tử
 - + Cây mẹ được thụ phấn chéo với một giống cho phần khác
 - + Cây mẹ là giống tam bội, lệch bội...
2. Khi so sánh các cây con từ một dòng lai F1 (lai với bố mẹ khác nhau), không thấy có sự phân ly tính trạng hoặc biến đổi di truyền rất ít trong quần thể cây F2:
 - + Không thấy có đặc tính trội ở cây con khi lai cây mẹ mang gen lặn với cây bố mang gen trội (gen chi thị). Ví dụ, trong trường hợp bố là cam ba lá mang gen trội là lá có

ba chẻ lai với các cây mẹ khác nhau, con sinh ra không có tính trạng lá ba chẻ sẽ là cây từ phôi vô tính.

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

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

2.6.7. Nghiên cứu hạt nhân tạo

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

Hạt nhân tạo (artificial seed) là một khái niệm khá rộng. Hạt nhân tạo chủ yếu được tạo ra từ phôi vô tính với cấu trúc tương tự như phôi hữu tính. Tuy nhiên, hạt nhân tạo có thể là chồi mầm, chồi đỉnh, đốt lá, củ siêu nhỏ, protocorm (ở phong lan) được bọc bằng màng nhân tạo với khả năng lưu giữ, bảo quản và nảy mầm thành cây hoàn chỉnh trong điều kiện thích hợp (Ara cs., 2000; Brischia cs., 2002; Kosky cs., 2002). Màng nhân tạo được làm bằng các chất chiết tự nhiên từ rong biển (agar, caragreenan, alginate), cây trồng, chất gôm (chất dính) của hạt hoặc sinh khối vi sinh như dextran, gellan gum.

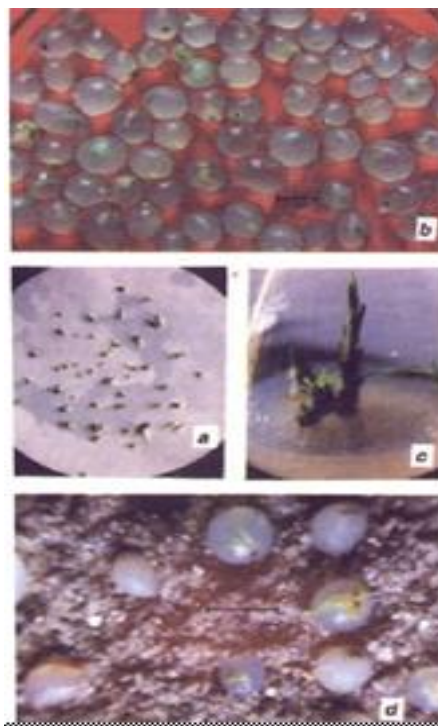
Dịch lỏng của các chất trên được làm cứng hoá khi trộn hoặc nhỏ giọt vào dung môi điện ly thích hợp của sulphat đồng, chlorit canxi hoặc amonium chlorit. Bổ sung một số chất khoáng, chất kích thích sinh trưởng, các chất diệt nấm khuẩn... vào mô sống bên trong màng có thể mang lại kết quả tốt (Wendy Shu, 2001). Thêm polyethylene glycol (PEG), một số chất điều hoà sinh trưởng GA3, zeatin vào môi trường nuôi cấy đã làm tăng đáng kể phân hoá phôi, số lượng và chất lượng phôi hạt nhân tạo ở một số cây trồng (Jones and Van Staden, 2001; Fiegert cs., 2000).

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

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

- Làm khô, bọc bằng màng nhân tạo
- Bảo quản hạt nhân tạo
- Làm cho hạt nhân tạo nảy mầm.

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



Hình 3. Hạt nhân tạo cây cà phê

Trong việc sản xuất các hạt nhân tạo thông qua phôi vô tính từ nuôi cấy dịch lỏng, thì nồi phản ứng sinh học (bioreactor) là thiết bị không thể thay thế được. Do phôi vô tính cũng có thể nảy mầm và phát triển thành cây hoàn chỉnh, nên kỹ thuật hạt nhân tạo đã được nghiên cứu và ứng dụng thành công ở nhiều nước.

Có nhiều loại polymer tự nhiên đã được thử nghiệm dùng cho công nghệ phôi vô tính, trong đó alginate được coi là tốt nhất. Alginate là một polymer sinh học, được chiết từ

rong biển mà chủ yếu là các loài thuộc chi Sargassum. Aliginat do các phân tử manuronic acid gắn với nhau tạo thành, giống như các phân tử glucose tạo nên cellulose. Đặc điểm quan trọng nhất của aliginat là chúng ở dạng hòa tan trong nước khi kết hợp với các ion hóa trị một (monovalent) như: Na^+ , K^+ , NH_4^+ ,... và lập tức chuyển sang dạng không tan trong nước khi kết hợp với các ion hóa trị hai (divalent) hoặc đa hóa trị (polyvalent) như: Ca^{2+} , Mg^{2+} , Al^{3+} ,... Nếu nhỏ một giọt dung dịch sodium aliginat vào dung dịch CaCl_2 thì sodium aliginat ở phần diện tích ngoài của giọt sẽ chuyển hóa ngay thành calcium aliginat và tạo nên một màng không thấm nước. Các viên aliginat được hình thành.

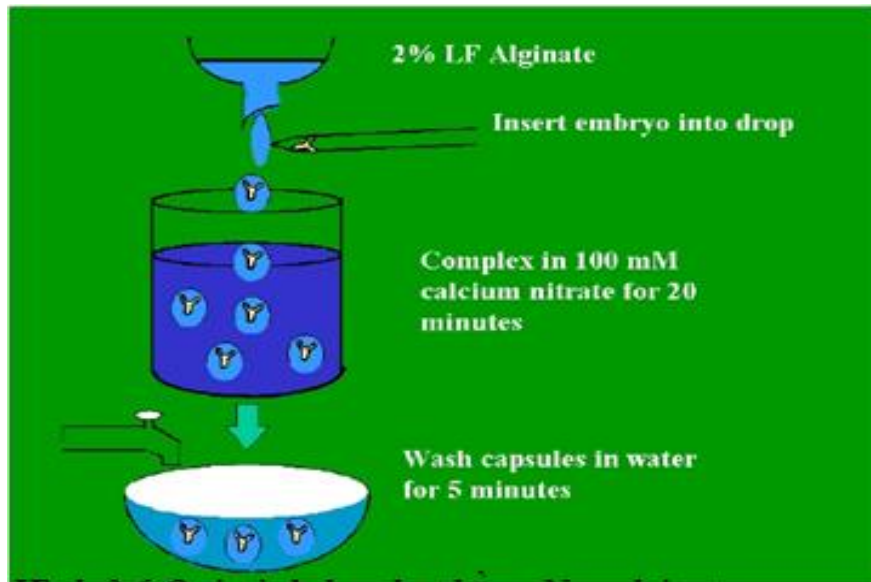
*Nghiên cứu áo bao hạt nhân tạo

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

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

* Bao hạt và làm khô hạt nhân tạo

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

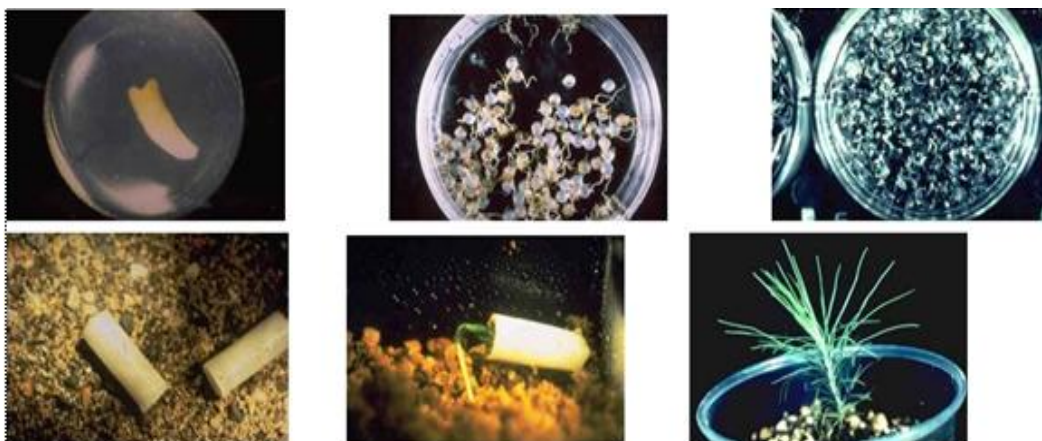


Hình.2.6 Quy trình bao hạt bằng Na- alginate

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

* Tồn trữ và nảy mầm hạt nhân tạo

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



Hình 2.7 Nhân giống cây thông bằng hạt giống nhân tạo

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

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

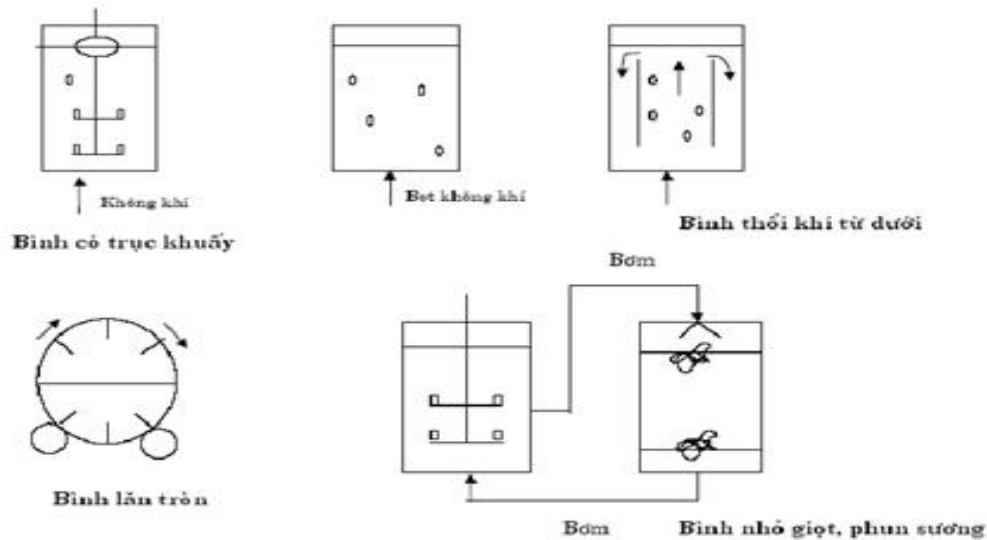
- Phôi được nuôi cấy kéo dài trong dung dịch lỏng, tế bào mất khả năng tái sinh.
- Vật liệu dung để tạo vỏ bao có khả năng trao đổi khí và cung cấp dinh dưỡng.

* Hệ thống cấy chuyển hạt nhân tạo

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

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

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



Hình 2.8 Một số dạng Bioreactor

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

CÂU HỎI ÔN TẬP

1. Trình bày quá trình phát sinh phôi soma
2. Nêu các giải pháp thiết lập hệ thống phát sinh phôi đồng nhất và hiệu suất cao
3. Phân tích tính bất hợp của giao tử trước và sau khi thụ tinh
4. Trình bày phương pháp thụ phân in vitro
5. Phân tích tác động của các nhân tố ảnh hưởng sự hình thành hạt sau khi thụ phân in vitro
6. Trình bày kỹ thuật nhân giống cây trồng qua nuôi cấy phát sinh phôi
7. Phân tích các khó khăn trong nuôi cấy phôi
8. Tóm tắt kỹ thuật nuôi cấy tế bào phôi tâm
9. Trình bày các phương pháp chính ứng dụng trong chọn tạo giống cây có múi sạch bệnh từ phôi vô tính

Chương 3. NHÂN GIỐNG VÔ TÍNH IN VITRO

3. 1. Sinh sản vô tính và hữu tính

3.1.1 Nhân giống theo cấu trúc tự nhiên của thực vật

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

3.1.2. Nhân giống theo phương thức nông học

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

3.2. Mục đích của nhân giống invitro

3.2.1. Ưu điểm của vi nhân giống

- Đưa ra sản phẩm nhanh hơn: Từ một cây ưu việt bất kỳ đều có thể tạo ra một quần thể có độ đồng đều cao với số lượng không hạn chế, phục vụ sản xuất thương mại, dù cây đó là dị hợp về mặt di truyền.
- Nhân nhanh với hệ số nhân giống cao: Trong hầu hết các trường hợp, công nghệ vi nhân giống đáp ứng tốc độ nhân nhanh cao, từ 1 cây trong vòng 1-2 năm có thể tạo thành hàng triệu cây.
- Sản phẩm cây giống đồng nhất: Vi nhân giống về cơ bản là công nghệ nhân dòng. Nó tạo ra quần thể có độ đồng đều cao dù xuất phát từ cây mẹ có kiểu gen dị hợp hay đồng hợp.
- Tiết kiệm không gian: Vì hệ thống sản xuất hoàn toàn trong phòng thí nghiệm, không phụ thuộc vào thời tiết và các vật liệu khởi đầu có kích thước nhỏ. Mật độ cây tạo ra trên một đơn vị diện tích lớn hơn rất nhiều so với sản xuất trên đồng ruộng và trong nhà kính theo phương pháp truyền thống.

- Nâng cao chất lượng cây giống: Nuôi cấy mô là một phương pháp hữu hiệu để loại trừ virus, nấm khuẩn khỏi các cây giống đã nhiễm bệnh. Cây giống sạch bệnh tạo ra bằng cấy mô thường tăng năng suất 15 - 30% so với giống gốc.
- Khả năng tiếp thị sản phẩm tốt hơn và nhanh hơn: Các dạng sản phẩm khác nhau có thể tạo ra từ hệ thống vi nhân giống như cây con in vitro (trong ống nghiệm) hoặc trong bầu đất. Các cây giống có thể được bán ở dạng cây, củ bi hay là thân củ.
- Lợi thế về vận chuyển: Các cây con kích thước nhỏ có thể vận chuyển đi xa dễ dàng và thuận lợi, đồng thời cây con tạo ra trong điều kiện vô trùng được xác nhận là sạch bệnh. Do vậy, bảo đảm an toàn, đáp ứng các qui định về vệ sinh thực vật quốc tế.
- Sản xuất quanh năm: Quá trình sản xuất có thể tiến hành vào bất kỳ thời gian nào, không phụ thuộc mùa vụ.

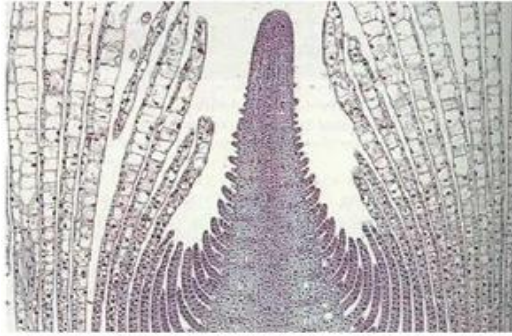
3.2.2. Hạn chế của vi nhân giống

- Hạn chế về chủng loại sản phẩm: Trong điều kiện kỹ thuật hiện nay, không phải tất cả cây trồng đều được nhân giống thương phẩm bằng vi nhân giống. Nhiều cây trồng có giá trị kinh tế hoặc quý hiếm vẫn chưa thể nhân nhanh để đáp ứng nhu cầu thương mại hoặc bảo quản nguồn gen. Nhiều vấn đề lý thuyết liên quan đến nuôi cấy và tái sinh tế bào thực vật in vitro vẫn chưa được giải đáp.
- Chi phí sản xuất cao: Vi nhân giống đòi hỏi nhiều lao động kỹ thuật thành thạo. Do đó, giá thành sản phẩm còn khá cao so với các phương pháp truyền thống như chiết, ghép và nhân giống bằng hạt.
- Hiện tượng sản phẩm bị biến đổi kiểu hình: Cây con nuôi cấy mô có thể sai khác với cây mẹ ban đầu do hiện tượng biến dị tế bào soma. Kết quả là cây con không giữ được các đặc tính quý của cây mẹ. Tỷ lệ biến dị thường thấp ở giai đoạn đầu nhân giống, nhưng sau đó có chiều hướng tăng lên khi nuôi cấy kéo dài và tăng hàm lượng các chất kích thích sinh trưởng. Hiện tượng biến dị này cần được lưu ý khắc phục nhằm đảm bảo sản xuất hàng triệu cây giống đồng nhất về mặt di truyền.

3.3. Các phương pháp nhân giống invitro

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

3.3.1.1. Đỉnh sinh trưởng



Hình 3.1. Đỉnh sinh trưởng

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

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

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

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

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

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

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

3.3.1.2. Nuôi cấy đỉnh sinh trưởng

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

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

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

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

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

Kích thước mẫu nuôi cấy càng lớn, tỷ lệ tái sinh và sống sót của mẫu càng cao, tuy nhiên mẫu càng nhỏ thì khả năng sạch bệnh virus lại cao hơn. Do vậy, kích thước mẫu nuôi cấy cần phải xác định bằng thực nghiệm đối với mỗi loài. Mẫu nuôi cấy nhỏ nhất chỉ có chóp sinh trưởng và 2 - 3 mầm lá sẽ là lý tưởng để tạo giống sạch bệnh do mô phân sinh đỉnh nằm ở chóp đỉnh chồi, là trung tâm hoạt động sinh trưởng, phân hoá và phát triển của thực vật. Ngay dưới mô phân sinh này là các mầm lá. Đôi khi kích thước mẫu lớn hơn vẫn đảm bảo sạch bệnh virus (Vine và Jones, 1969) song một số trường hợp khác lại đòi hỏi mẫu nhỏ hơn (Hunter và cs, 1984).

Phương thức này sử dụng các bộ phận nhỏ nhất của đỉnh chồi hay đỉnh sinh trưởng làm mẫu vật nuôi cấy. Nó bao gồm mô phân sinh đỉnh và các mầm lá non. Khái niệm mô phân sinh đỉnh (ngọn) chỉ đúng khi mẫu vật được tách từ đỉnh sinh trưởng có kích

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

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

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

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

- Phát triển cây trực tiếp

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

Đỉnh sinh trưởng → Chồi nách → Cây

- Phát triển cây thông qua giai đoạn protocorm

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

Đỉnh sinh trưởng → Protocorm → Cây

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

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

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

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

Kỹ thuật vi ghép chồi bao gồm các bước sau:

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

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

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

Hiện nay phương pháp vi ghép chồi đỉnh đang được sử dụng rộng rãi để tạo các dòng Citrus sạch bệnh phục vụ cho nhân giống thương mại.

*.Vi ghép kết hợp với xử lý nhiệt hoặc hoá chất

Murashige và cộng sự (1972) dùng vi ghép đỉnh sinh trưởng để tạo vật liệu sạch bệnh ở Citrus, cây con tái sinh đã sạch các tác nhân gây bệnh micoplasma và exocortis.

Năm 1975, Navarro và cộng sự đã hoàn thiện quy trình vi ghép chồi đỉnh cây có múi in vitro. Bằng kỹ thuật này, khoảng 90 loại cây có múi khác nhau được làm sạch bệnh (Navarro và cs, 1988). Kỹ thuật vi ghép đã loại trừ được hàng loạt bệnh khởi nguồn gen cây có múi, ví dụ:

- Virus gây bệnh tristeza, psorosis
- Stubborn spiroplasma
- Exocortis viroid
- Tác nhân gây bệnh chảy gôm, cristicortis, impietratura

Quy trình vi ghép:

- Gốc ghép được chuẩn bị từ hạt nuôi cấy in vitro trên môi trường cơ bản MS có 1% agar. Troyer citrance thường được dùng làm gốc ghép, còn gốc ghép Etrog citron được dùng để ghép tất cả các loại chanh.
- Cây giống đã nhiễm bệnh dùng làm mắt ghép được chuẩn bị như sau: bỏ lá, giữ cây ở nhiệt độ 32⁰ C từ 12-15 ngày. Sau đó, tách đỉnh sinh trưởng kích thước 0,1- 0,2 mm từ chồi mới hình thành và vi ghép theo kiểu chữ T lộn ngược trên gốc ghép.
- Nuôi cây sau vi ghép trên môi trường MS có 100 mg/l myo-inositol, đường 4%, thiamin HCl 0,2 mg/l, pyridoxine HCl 1mg/l, nicotinic 1mg/l, đặc biệt sử dụng nồng độ đường sucrose, các vitamin B cao với hàm lượng BA, IAA và GA3 khác nhau để kích thích bật chồi từ đỉnh sinh trưởng vi ghép. Tỷ lệ vi ghép thành công là 60-70% và cây chuyển ra đất đã sống 90%. Chương trình vi ghép tạo giống sạch bệnh ở cây có múi đã được triển khai ở hầu hết các nước.

Về nguyên tắc, vi ghép là nuôi cấy đỉnh sinh trưởng, nhưng thông qua dinh dưỡng tự nhiên của gốc ghép. Đỉnh sinh trưởng dùng làm mắt ghép có kích thước khoảng từ 0,2-0,5 mm, được tách từ búp non đang sinh trưởng mạnh của cây mẹ trưởng thành, gốc ghép là mầm giá mới nảy mầm từ hạt của giống hoang dại, toàn bộ cây ghép được nuôi dưỡng trong điều kiện ống nghiệm vô trùng. Phương thức này thường dùng để tạo ra các giống cây ăn quả sạch bệnh virus nhằm cung cấp mắt ghép và cành chiết đầu dòng làm nguyên liệu nhân giống cho sản xuất đại trà. Phương thức này cho phép thu được cây hoàn toàn sạch bệnh và mang đặc điểm di truyền của cây mẹ cho mắt ghép.

3.3.2. Tái sinh cây hoàn chỉnh từ các bộ phận khác của cây

3.3.2.1. Nuôi cấy chồi bất định

Đỉnh chồi bất định mới có thể phát triển hoặc trực tiếp trên mẫu vật hoặc gián tiếp từ mô callus, mà mô callus này hình thành trên bề mặt vết cắt của mẫu vật. Một số loại mẫu vật được dùng như sau:

- Đoạn thân: thuốc lá, cam, chanh, cà chua, bắp cải...

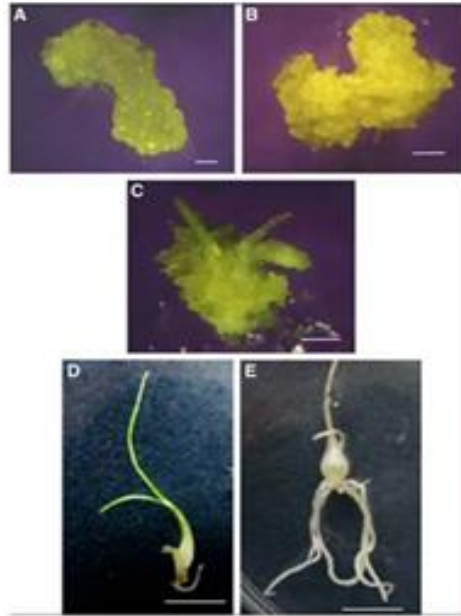
- Mảnh lá: thuốc lá, cà chua, bắp cải, cà phê, ca cao...
- Cuống lá: thủy tiên...
- Các bộ phận của hoa: súp lơ, lúa mỳ, thuốc lá...
- Nhánh củ: họ hành, họ lay ơn, họ thủy tiên...
- Đoạn mầm: măng tây.

Sự phát sinh chồi bất định trực tiếp bắt đầu bằng các tế bào nhu mô nằm ở trong biểu bì hoặc ngay phía dưới bề mặt của thân; một số tế bào này trở thành mô phân sinh và các túi nhỏ gọi là thể phân sinh phát triển. Các thể phân sinh này rõ ràng có nguồn gốc từ các tế bào đơn. Tuy nhiên, chiều hướng phản ứng của thực vật cũng tùy thuộc vào nồng độ phytohormone. Nghiên cứu sự tạo chồi ở mô nuôi cấy của cây linh sam Douglas cho thấy cytokinin (BAP $5\mu\text{M}$) cần thiết cho sự phát sinh chồi bất định, nhưng có ba kiểu phản ứng khác nhau có kết quả tùy thuộc vào nồng độ của auxin được cung cấp. Nồng độ auxin thấp ($\text{NAA} < 5\mu\text{M}$) chỉ có chồi phát triển. Khi nồng độ auxin cao hơn ($\text{NAA} > 5\mu\text{M}$) lá mầm tạo ra cả callus và nhiều chồi. Khi cung cấp chỉ riêng auxin ($\text{NAA} = 5\mu\text{M}$) thì chỉ có callus được tạo thành.

Sự phát triển các chồi bất định gián tiếp đầu tiên qua giai đoạn hình thành callus cơ sở từ các chồi được tách trong nuôi cấy. Các chồi sau đó phát triển từ ngoại vi mô callus và không có quan hệ ban đầu với các mô có mạch dẫn của mẫu vật.

3.3.2.2. Nhân giống thông qua giai đoạn callus

Trong nhân giống in vitro nếu tái sinh được cây hoàn chỉnh trực tiếp từ mẫu vật nuôi cấy ban đầu thì không những nhanh chóng thu được cây mà các cây cũng khá đồng nhất về mặt di truyền. Tuy nhiên, nhiều trường hợp mô nuôi cấy không tái sinh cây ngay mà phát triển thành khối callus. Tế bào callus khi cấy chuyển nhiều lần sẽ không ổn định về mặt di truyền. Để tránh tình trạng đó nhất thiết phải sử dụng loại callus vừa phát sinh, tức là callus sơ cấp để tái sinh cây thì hy vọng sẽ thu được cây tái sinh đồng nhất. Thông qua giai đoạn callus còn có thể thu được những cá thể sạch virus như trường hợp của Kehr và Sehafter (1976) thu được ở tỏi.



Hình 3.2. Nhân giống thông qua giai đoạn tạo mô sẹo

- A. Mô sẹo cây tỏi sau 2 tuần nuôi cấy B. Mô sẹo sau 4 tuần nuôi cấy
 C. Tạo chồi từ mô sẹo D. Cây tái sinh từ mô sẹo
 E. Củ tỏi thu được từ cây con nuôi cấy mô thông qua tạo mô sẹo

3.3.3. Nhân giống thông qua phát sinh phôi vô tính

3.3.3.1. Phôi vô tính

Năm 1958, Street và Reinert là hai tác giả đầu tiên mô tả sự hình thành phôi vô tính từ các tế bào đơn của cà rốt (*Daucus carota*). Đến năm 1977, Murashige cho rằng phôi vô tính có thể trở thành một biện pháp nhân giống in vitro. Ở một số loài, sự phát sinh phôi vô tính hình thành trực tiếp từ những phôi bất định nằm trong phôi tâm. Đến nay, công nghệ phôi vô tính được coi là công nghệ rất có triển vọng cho nông nghiệp trong thế kỷ 21.

Phôi vô tính là các cá thể nhân giống có cực tính bắt nguồn từ các tế bào soma. Chúng rất giống phôi hữu tính ở hình thái, quá trình phát triển và sinh lý, nhưng do không phải là sản phẩm của sự thụ tinh giữa giao tử đực và giao tử cái, và vì vậy không có quá trình tái tổ hợp di truyền các phôi vô tính có nội dung di truyền giống hệt với các tế bào soma đã sinh ra chúng.

Ở trường hợp phôi hữu tính, sự kết hợp giao tử đực và cái cho ra hợp tử (zygote). Hợp tử phân chia nhiều lần tạo nên phôi hữu tính có cấu trúc hai cực: rễ và ngọn. Khi hợp tử phát triển, miền sinh trưởng rễ và miền sinh trưởng ngọn cùng phát triển và cuối cùng tạo thành cây hoàn chỉnh, qua các giai đoạn phôi học như sau:

- Trường hợp cây hai lá mầm:

Dạng cầu → dạng thủy lôi → dạng có lá mầm

- Trường hợp cây một lá mầm:

Dạng cầu → dạng scutellar → dạng diệp tiêu

Ở rất nhiều cây, người ta nhận thấy các tế bào đang phân chia vô tổ chức đã tạo nên callus khi nuôi cấy. Có thể thay đổi hướng phát triển của chúng để tạo ra các phôi vô tính với các bước phát sinh hình thái rất giống với trường hợp phôi hữu tính. Điểm khác nhau cơ bản giữa phôi hữu tính và phôi vô tính là phôi hữu tính luôn luôn đi kèm với nội nhũ là cơ quan dự trữ năng lượng và chất dinh dưỡng phục vụ cho quá trình nảy mầm, còn ở phôi vô tính hoàn toàn không có nội nhũ. Khả năng tạo phôi vô tính trong nuôi cấy mô thực vật, ngoài các điều kiện vật lý, hóa học thuận lợi cho sự tạo phôi, còn phụ thuộc rất lớn vào loài, vào các giống, dòng trong cùng một loài.

3.3.4. Nhân giống trong các nồi phản ứng sinh học

Trước đây, các nồi phản ứng sinh học hay còn gọi là nồi lên men (fermentor) chủ yếu được dùng cho công nghệ vi sinh. Trên cơ sở các thiết bị đó, với một số cải tiến, nhiều tác giả đã nhân giống thành công nhiều loại phôi vô tính và các thể chồi, cụm chồi hoặc củ nhỏ.

Phôi vô tính cà phê được sản xuất thành công ở Brasil trên các nồi phản ứng sinh học dung tích từ 2-4 lít. Mỗi mẻ có thể thu được 4-5 triệu phôi vô tính cà phê. Ở Indonesia, cụm chồi dừa được đưa vào sản xuất thành công với nồi lên men 10 lít. Dịch lỏng nuôi cấy (môi trường mới) được bơm vào nồi và hút ra (môi trường cũ) theo chu kỳ ngắn, nhờ vậy mô và tế bào thực vật có đủ oxy và chất dinh dưỡng để phát triển mạnh.

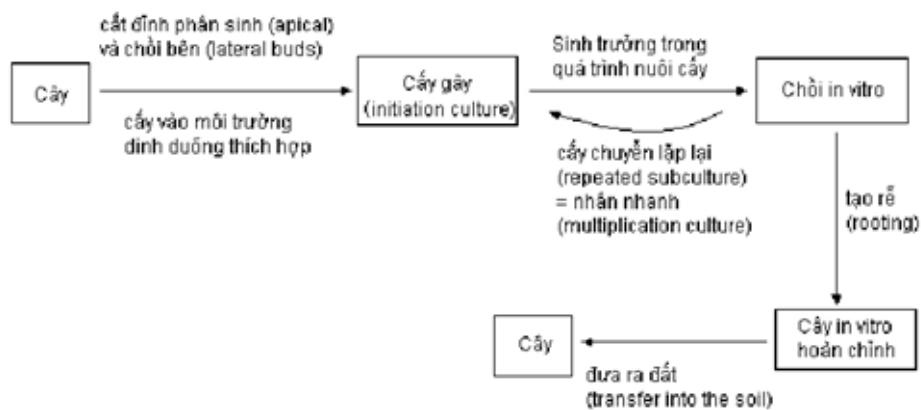
Phương thức nuôi cấy này được gọi là nuôi cấy thể ổn định hóa tính (chemostat culture).

3.3.5. Hệ thống hình thành chồi

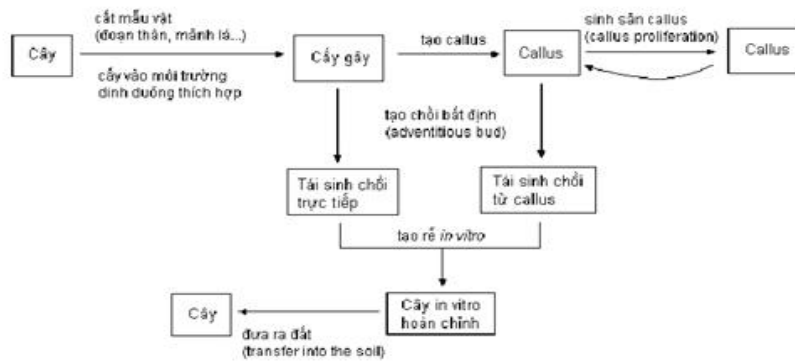
Sự hình thành chồi có tương quan với hàm lượng etylen và CO₂. Chồi phát sinh nhiều nhất khi trong bình nuôi cấy tích lũy 5-8 m C₂H₄ và 10% CO₂ trong 15 ngày nuôi cấy. Khi 2 chất này được phóng thích ra khỏi bình nuôi cấy thì quá trình biệt hóa bị ức chế. Sau 15 ngày các chất này thoát ra ngoài thì cũng không ảnh hưởng đến quá trình biệt hóa. Trong 10 ngày đầu tiên C₂H₄ và CO₂ ảnh hưởng đến quá trình biệt hóa phù hợp với giai đoạn tăng trưởng và phân chia tế bào dẫn đến sự hình thành vòm đỉnh sinh trưởng.

Như vậy tác động kích thích của C₂H₄ trong sự phát sinh hình thái có sự tác động bổ sung của quá trình phân bào.

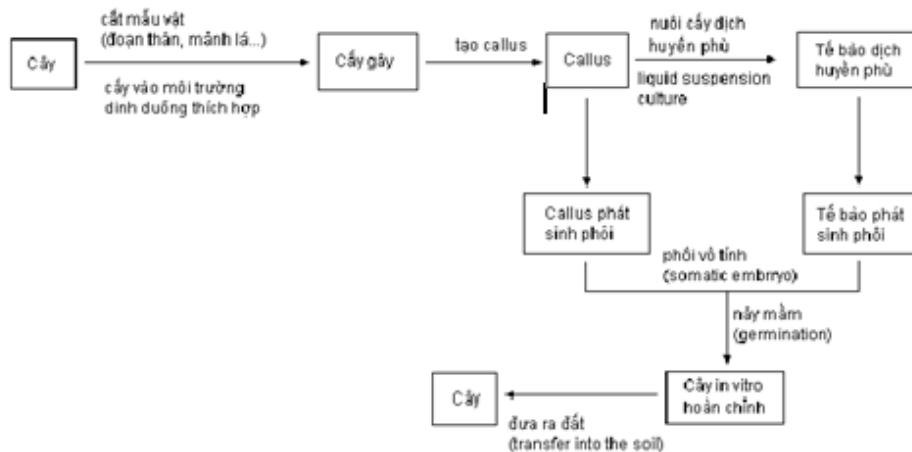
Sự tác động tương hỗ của C₂H₄ và CO₂ cho thấy qui luật tác động của CO₂:
 Trong 10 ngày đầu CO₂ kích thích quá trình sinh tổng hợp C₂H₄
 Sau 10 ngày có tác động tương phản với C₂H₄
 Sau cùng CO₂ tham gia vào quá trình trao đổi chất. tỉ lệ tác động C₂H₄/CO₂ chỉ có hiệu quả khi có mặt O₂ và CO₂ duy trì quá trình trao đổi oxihóa ở mô SF và SNF
 (SF: shoot forming: chồi mầm được nuôi cấy trên môi trường không có BA, phát sinh chồi sau 3 ngày thì tiến hành phân chia tế bào và không phân chia trong khi trong môi trường có BA thì sự hình thành chồi không xảy ra: NSF: non shoot forming)
 Tóm lại, có 3 phương thức tạo cây con trong nhân giống in vitro:
 - Mẫu mô trực tiếp tạo chồi và cây hoàn chỉnh (Sơ đồ 3.1).
 - Mẫu mô phát sinh callus và callus tạo chồi (Sơ đồ 3.2).
 - Mẫu mô phát sinh callus, callus phát triển phôi (hoặc nuôi cấy dịch huyền phù tế bào phát sinh phôi) và từ phôi thu được cây hoàn chỉnh (Sơ đồ 3.3).



Sơ đồ 3.1. Mẫu mô trực tiếp tạo chồi và cây hoàn chỉnh (thông qua phương thức tăng khả năng phát sinh chồi nách)



Sơ đồ 3.2. Mẫu mô phát sinh callus, callus tạo chồi và phát triển cây hoàn chỉnh (thông qua phương thức phát sinh chồi bất định)



Sơ đồ 3.3. Mẫu mô phát sinh callus, callus phát sinh phôi soma (hoặc nuôi cấy dịch huyền phù tế bào phát sinh phôi soma) và từ phôi thu được cây hoàn chỉnh

3.4. Các giai đoạn trong quy trình nhân giống vô tính in vitro

3.4.1. Quá trình sản xuất cây cấy mô

Quá trình vi nhân giống thông thường gồm năm giai đoạn chính, mỗi một giai đoạn có những yêu cầu riêng.

Giai đoạn 1: Chuẩn bị cây làm vật liệu gốc

- Chọn cây mẹ để lấy mẫu, thường là cây ưu việt, khỏe, có giá trị kinh tế cao.
- Chọn cơ quan để lấy mẫu thường là chồi non, đoạn thân có chồi ngủ, hoa non, lá non v.v...
- Mô chọn để nuôi cấy thường là các mô có khả năng tái sinh cao, sạch bệnh, giữ được các đặc tính sinh học quý của cây mẹ và ổn định. Tùy điều kiện, giai đoạn này có thể kéo dài 3 - 6 tháng.

Giai đoạn 2: Thiết lập hệ thống nuôi cấy vô trùng

- Khử trùng bề mặt mẫu vật và chuẩn bị môi trường nuôi cấy.
- Cấy mẫu vô trùng vào môi trường nhân tạo trong ống nghiệm hoặc bình nuôi.

Giai đoạn nuôi cấy này gọi là cấy mẫu in vitro.

- Các mẫu nuôi cấy nếu không bị nhiễm khuẩn, nấm hoặc virus sẽ được lưu giữ trong phòng với điều kiện nhiệt độ, ánh sáng phù hợp. Sau một thời gian nhất định, từ mẫu nuôi cấy bắt đầu xuất hiện các cụm tế bào hoặc cơ quan (chồi, cụm chồi, rễ) hoặc phôi vô tính có đặc tính gần như phôi hữu tính. Giai đoạn 2 thường yêu cầu 2 - 12 tháng hoặc ít nhất 4 lần cấy chuyển.

Đưa mẫu vật từ bên ngoài vào nuôi cấy vô trùng phải đảm bảo những yêu cầu sau:

- Tỷ lệ nhiễm thấp.
- Tỷ lệ sống cao.
- Tốc độ sinh trưởng nhanh.

Kết quả bước cấy gây này phụ thuộc rất nhiều vào cách lấy mẫu. Quan trọng nhất vẫn là đỉnh sinh trưởng, chồi nách, sau đó là đoạn hoa tự, hoa, đoạn thân, mảnh lá, rễ...

Chọn đúng phương pháp khử trùng sẽ đưa lại tỷ lệ sống cao và môi trường dinh dưỡng thích hợp sẽ đạt được tốc độ sinh trưởng nhanh.

Giai đoạn 3: Nhân nhanh chồi

- Thành phần và điều kiện môi trường phải được tối ưu hóa nhằm đạt mục đích nhân nhanh.
- Quy trình cấy chuyển để nhân nhanh chồi khoảng 1- 2 tháng tùy loại cây. Hệ số nhân nhanh là 2 - 8 lần/ 1 lần cấy chuyển. Nhìn chung giai đoạn 3 thường yêu cầu 10- 36 tháng và cũng không nên kéo dài quá lâu. Ví dụ từ đỉnh sinh trưởng của 1 cây chuối chọn lọc ban đầu, người ta chỉ nên nhân khoảng 2000 - 3000 chồi sau 7 - 8 lần cấy chuyển để tránh biến dị soma. Đối với các cây khác như mía, hoa cúc, phong lan sau 1

năm có thể nhân được trên 1 triệu chồi từ 1 cây mẹ ban đầu.

Những khả năng tạo cây đó là:

- Phát triển chồi nách.
- Tạo phôi vô tính.
- Tạo đỉnh sinh trưởng mới.

Trong giai đoạn này cần nghiên cứu các tác nhân kích thích phân hóa cơ quan, đặc biệt là chồi như:

- Bổ sung tổ hợp phytohormone mới (tăng cytokinin giảm auxin). Tăng tỷ lệ auxin/cytokinin sẽ kích thích mô nuôi cấy tạo rễ và ngược lại sẽ kích thích phát sinh chồi.
- Tăng cường thời gian chiếu sáng 16 giờ/ngày, tối thiểu 1.000 lux. Trong thực tế nghiên cứu, người ta nhận thấy khó tách biệt ảnh hưởng của chu kỳ chiếu sáng khỏi ảnh hưởng của cường độ chiếu sáng. Ánh sáng tím là thành phần quan trọng kích thích phân hóa mạnh. Ánh sáng đỏ có ảnh hưởng giống cytokinin (cytokinin-like effect), nó tạo nên sự tích lũy cytokinin trong mô của một số loài, chính lượng cytokinin này đã góp phần kích thích quá trình phát sinh cơ quan và tạo chồi từ những mô nuôi cấy in vitro.
- Bảo đảm chế độ nhiệt độ trong khoảng 20-30°C. Trường hợp những loài có nguồn gốc nhiệt đới, nhiệt độ nuôi cấy thích hợp vào khoảng từ 32-35°C. Ngược lại, đối với những loài hoa ở vùng ôn đới nhiệt độ thích hợp cho quá trình tạo cụm chồi phải < 30°C.

Mục tiêu quan trọng nhất của giai đoạn này là xác định được phương thức nhân nhanh nhất bằng môi trường dinh dưỡng và điều kiện khí hậu tối thích.

Giai đoạn 4: Tạo rễ

- Các chồi hình thành trong quá trình nuôi cấy có thể phát sinh rễ tự nhiên, nhưng thông thường các chồi này cần phải cấy chuyển sang một môi trường khác để kích thích tạo rễ. ở một số loài khác, các chồi sẽ tạo rễ khi được chuyển trực tiếp ra đất.

Giai đoạn 4 thông thường cần 2 - 8 tuần.

Giai đoạn 5: Chuyển cây ra đất trồng

- Đây là giai đoạn đầu tiên, trong đó cây được chuyển từ điều kiện vô trùng của phòng thí nghiệm ra ngoài tự nhiên. Đối với một số loài có thể chuyển chồi chưa có rễ ra đất, nhưng đa số chỉ sau khi chồi đã ra rễ và tạo cây hoàn chỉnh mới được chuyển ra vườn ươm. Quá trình thích nghi với điều kiện bên ngoài của cây cần sự chăm sóc đặc biệt. Vì cây chuyển từ môi trường bảo hòa hơi nước sang vườn ươm với những điều kiện khó khăn hơn, nên vườn ươm cần phải đáp ứng các yêu cầu:

+ Cây được che phủ bằng nilon, tưới phun sương đảm bảo cung cấp độ ẩm và làm mát

+ Giá thể trồng cây có thể là đất mùn hoặc các hỗn hợp nhân tạo không chứa đất, mùn cưa và bọt biển. Giai đoạn 5 thường đòi hỏi 4 - 16 tuần

Thời gian tối thiểu cho sự thích nghi là 2-3 tuần, trong thời gian này cây phải được chăm sóc và bảo vệ trước những yếu tố bất lợi sau:

- Mất nước nhanh làm cho cây bị héo khô.
- Nhiễm vi khuẩn và nấm gây nên hiện tượng thối nhũn.
- Cháy lá do nắng

3.4.2. Các bước vi nhân giống

Nhân giống vô tính các cây trồng thường trải qua các bước sau:

- Nuôi cấy đỉnh sinh trưởng
- Tạo thể nhân giống invitro
- Nhân giống invitro
- Tái sinh thành cây hoàn chỉnh invitro
- Chuyển cây ra vườn ươm để thuần hóa
- Nhân giống invitro
- Tạo cây con bầu đất.
- Đưa các cây ra đồng ruộng
- Chọn lọc cây đầu dòng.

3.4.2.1. Nuôi cấy đỉnh sinh trưởng

Mẫu được nuôi cấy thường còn ở giai đoạn non, quá trình phân chia và phân hóa mạnh. Đỉnh sinh trưởng và chồi bên được sử dụng ở hầu hết các loại cây trồng. Ngoài ra, chồi đỉnh và chồi non của hạt mới nảy mầm cũng được sử dụng. Đỉnh sinh trưởng nhỏ được tách bằng kính lúp. Môi trường được sử dụng rộng rãi trong nhân giống hiện nay là môi trường MS. Đối với mẫu dễ bị hóa nâu môi trường thường được bổ sung than hoạt tính hay ngâm mẫu với hỗn hợp ascorbic acid và citric acid (25-150 mg/l)

3.4.2.2. Tạo thể nhân giống in vitro

Mẫu nuôi cấy được cấy trên môi trường chọn lọc đặc biệt nhằm mục đích tạo thể nhân giống in vitro. Có hai thể nhân giống in vitro: thể chồi (multiple shoot) và thể cắt (cutting) đọt ngoài ra còn có thể giò (protocorm). Tạo thể nhân giống in vitro dựa vào đặc điểm nhân giống ngoài tự nhiên của cây trồng. Tuy nhiên có những cây trồng không có khả năng nhân giống người ta thường nhân giống bằng cách tạo cụm chồi bằng mô sẹo.

Để tạo thể nhân giống trong môi trường thường bổ sung Cytokinin, Auxin, GA3 và các chất hữu cơ khác.

3.4.2.3 . Nhân giống in vitro

Là giai đoạn quan trọng trong việc nhân giống cây trồng bằng phương pháp nuôi cấy

mô tế bào thực vật nhằm mục đích tăng sinh khối thể nhân giống. vật liệu nuôi cấy là những thể chồi, đôi khi nồng độ chất sinh trưởng giảm thấp cho phù hợp với quá trình nuôi cấy kéo dài. Điều kiện nuôi cấy thích hợp giúp cho quá trình tăng sinh được nhanh chóng. Cây nhân giống in vitro có trạng thái sinh lý trẻ và được duy trì trong thời gian vô hạn.

3.4.2.4. Tái sinh cây hoàn chỉnh in vitro

Đây là giai đoạn tạo cây con hoàn chỉnh có đầy đủ thân lá và rễ chuẩn bị chuyển ra vườn ươm. Cây con phải khỏe mạnh nhằm nâng cao sức sống khi ra ngoài môi trường bên ngoài. Các chất có tác dụng tạo chồi được loại bỏ thay vào đó là các chất kích thích quá trình tạo rễ. điều kiện nuôi cấy tương tự với quá trình nuôi cấy ngoài tự nhiên, một bước thuần hóa trước khi được tách ra khỏi điều kiện in vitro. Thường dung các chất thuộc nhóm auxin kích thích ra rễ.

3.4.2.5. Chuyển cây in vitro ra vườn ươm.

Đây là giai đoạn khó khăn nhất trong quá trình nhân giống vô tính. Cây in vitro được nuôi cấy trong điều kiện ổn định về dinh dưỡng ánh sáng nhiệt độ. Khi chuyển ra đất với điều kiện tự nhiên hoàn toàn khác hẳn cây con dễ bị mất nước, mau bị héo. Để tránh tình trạng này, vườn ươm nuôi cấy mô phải mát, cường độ chiếu sáng thấp, nhiệt độ không khí mát, độ ẩm cao... Cây con thường được cấy trong luống ươm có cơ chất dễ thoát nước, tơi xốp giữ được ẩm. Trong những ngày đầu cần được phủ nilon để giảm quá trình thoát hơi nước. Rễ được tạo ra trong quá trình nuôi cấy mô sẽ dần lui đi và rễ mới xuất hiện. Cây con thường được xử lý với chất kích thích ra rễ bằng cách ngâm hay phun lên lá để rút ngắn thời gian ra rễ.

3.4.2.6. Nhân giống in vitro

Cây con sau khi được chuyển ra luống ươm hay cấy vào bầu đất sau 7-10 ngày thì bắt đầu ra rễ. sau đó được phun dinh dưỡng với hỗn hợp N,P,K (1g/l cho mỗi loại). Tuy nhiên do quá trình nhân giống in vitro có nhiều tồn kém thì cây con được sử dụng như là cây mẹ và được tiếp tục nhân giống trên luống ươm. Điều kiện nhân giống trên luống ươm phải tiếp tục đảm bảo cây mẹ ở trạng thái bằng cách điều kiện khống chế bằng cách giảm dinh dưỡng, duy trì độ ẩm cao, nhiệt độ không khí thấp.... Hệ số nhân giống trên luống ươm phải tiếp tục đảm bảo cây mẹ ở trạng thái bằng cách điều kiện khống chế bằng cách giảm dinh dưỡng, duy trì độ ẩm cao, nhiệt độ không khí thấp.... Hệ số nhân giống trên luống ươm càng cao giúp cho việc giảm giá thành càng có ý nghĩa.

3.4.2.7. Cây con bầu đất

Cây con từ ống nghiệm hay được nhân giống trên luống ươm được cấy trên luống đất 15-20 ngày cho cây ra rễ và phát triển khỏe, sau đó được cấy vào bầu đất (cây chuối).

Bầu đất có cơ chất xốp đầy đủ chất dinh dưỡng tỉ lệ đất/ phân là 1/1, ngoài ra hàng tuần được phun dinh dưỡng khoáng 1-2 lần/tuần thường dùng phân khoáng có tỉ lệ N-P-K: 20-20-20. Thời gian cây con ở giai đoạn bầu đất phụ thuộc đặc điểm cây trồng khoảng 20 ngày (khoai tây) đến 2,5 tháng (cây chuối). Cây bầu đất được đặt ở nơi có nhiều ánh sáng, độ ẩm cao, nhiệt độ không khí mát để cây phát triển nhanh và khỏe.

3.4.2.8. Trồng cây ra ruộng.

Cây con sau khi đạt được kích thước về chiều cao, số lá đường kính thân thích hợp sẽ được chuyển ra trồng ở đồng ruộng. Duy trì độ ẩm cao trong giai đoạn này giúp cây thích nghi dần với điều kiện tự nhiên, các nhân tố nông học khác được tác động giống như cây trồng tập quán.

3.4.2.9. Chọn lọc cây đầu dòng

Là vấn đề quan trọng đối với cây ăn trái nhằm tạo ra một quần thể đồng đều có năng suất cao và ổn định. Những cây được chọn đầu dòng được đưa vào nhân giống trở lại bằng nuôi cấy mô.

Hiện tại công nghiệp nhân giống được ứng dụng nhiều trong kinh tế để giải quyết nhu cầu về giống cho sản xuất, giống cho cây lâm nghiệp, trồng rừng, rau, ngũ cốc, cây ăn trái, hoa và cây dược liệu.

3.5. Các vấn đề liên quan đến nhân giống invitro

3.5.1. Ảnh hưởng của môi trường và các chất kích thích sinh trưởng đến nhân giống in vitro.

3.5.1.1. Mẫu nuôi cấy

Có thể chia làm hai nhóm: lựa chọn mẫu cây và xử lý mẫu cây chọn mẫu:

Các nhân tố khi chọn mẫu bao gồm kiểu gen, cơ quan được chọn, tuổi sinh lý, mùa vụ, giai đoạn sinh trưởng, độ khỏe của mẫu và nguồn mẫu.

+ Kiểu gen: ảnh hưởng sâu sắc đến quá trình nuôi cấy, số lượng chồi tạo được, sự khác nhau về tăng sinh chồi, sự khác nhau về khả năng phát sinh phôi. Người ta cũng ghi nhận kiểu di truyền ảnh hưởng đến số lượng và đường kính của mô sẹo qua nuôi cấy hạt phấn cà chua, ghi nhận sự khác nhau giữa các genome qua nuôi cấy đỉnh sinh trưởng mô lõi.

+ Chọn cơ quan:

Hầu hết các loại cơ quan và mô đều có khả năng sử dụng nuôi cấy in vitro. Cho rằng mẫu nuôi cấy khác nhau ở các loài khác nhau có thể dùng chồi đỉnh để nuôi cấy, chồi mầm thích hợp làm mẫu nuôi cấy ở các cây nảy mầm từ hạt. Dùng mô cây tỏi để nuôi cấy tạo thể bulb. Nuôi cấy thân mầm cây để tạo protoplast có khả năng phát sinh phôi. Nuôi cấy lát cắt mỏng ở mô lá cây thuốc lá có thể tái sinh các cơ quan khác nhau như

hoa chồi và rễ phụ thuộc vào lớp mỏng tế bào ở bộ phận nào của cây được nuôi cấy và các hormone. Có thể thu nhận những cây con có kiểu hoa và màu hoa khác với cây mẹ khi nuôi cấy những phần của mẫu hoa.

+ Tuổi và sinh lý:

Tuổi thực của mẫu nuôi cấy và tuổi theo mùa trong năm của mẫu nuôi cấy có ảnh hưởng quan trọng đến sự biệt hóa tế bào và tuổi sinh lý. Thành phần cơ quan có cấu tạo thấp không thể nuôi cấy in vitro do không thể sử dụng thành phần khoáng trong môi trường. Rễ phát sinh trên lá non lunaria và không phát sinh trên lá già. Khả năng tái sinh cao ở lá cây trưởng thành so với lá cây còn non. Ngược lại mẫu non cắt cành của Hedera helix dễ ra mầm hơn so với mẫu trưởng thành và nuôi cấy lá non phát sinh cơ quan tốt hơn so với nuôi cấy lá trưởng thành.

+ Mẫu in vitro:

Mẫu in vitro có khả năng tái sinh cao hơn mẫu lấy từ cây mẹ trên đồng ruộng hay trong vườn ươm. Nuôi cấy mẫu in vitro cho thấy nâng cao khả năng nhân giống cắt đốt.

Nuôi cấy túi phấn đạt tỉ lệ thành công cao khi nuôi cấy túi phấn cây trên đồng ruộng.

+ Sức sống của mẫu:

Mẫu cây mẹ có ảnh hưởng rất quan trọng đến nuôi cấy in vitro. Nuôi cấy đỉnh sinh trưởng để loại virus sản xuất ra cây sạch bệnh. Những cây bị nhiễm virus cũng có thể tạo ra cây sạch bệnh nhờ nuôi cấy đỉnh sinh trưởng.

+ Duy trì mẫu:

Xử lý và vận dụng quản lý mẫu nuôi cấy cho phép nhà vi nhân giống luôn có nguồn nguyên liệu để sử dụng trong nhân giống. Nguyên liệu của nuôi cấy cần phải sạch bệnh. Có nhiều nhân tố kiểm tra và cải thiện những điều kiện sinh lý và vật lý mẫu cây mẹ như dinh dưỡng, nhiệt độ, cường độ ánh sáng mà mẫu cây mẹ sinh trưởng và những xử lý vật lý và hóa học trực tiếp trên mẫu cây mẹ.

+ Dinh dưỡng:

Sử dụng vật liệu nuôi cấy khỏe và dinh dưỡng cây mẹ cho thấy rất quan trọng để có mẫu nuôi cấy khỏe. Đoạn cắt cành cây cà chua mẹ được chăm bón đậm cao khó ra rễ hơn cây mẹ được chăm sóc đậm thấp. Khả năng tăng sinh chồi kém ở những lá cây mẹ được chăm bón đậm cao. Mức bón đậm thấp cho thấy khả năng tăng sinh chồi mất đi, và mức độ đậm trong lá có liên quan đến khả năng phát sinh chồi từ lá in vitro.

+ Nhiệt độ:

Có sự ảnh hưởng trong nuôi cấy mô khi thể bulb mẹ được bảo quản ở các nhiệt độ khác nhau và thời gian bảo quản khác nhau.

+ Ánh sáng:

Khả năng nuôi cấy túi phân cao khi cây mẹ sinh trưởng với cường độ ánh sáng cao. Khả năng tạo protoplast cao ở cây lúa mạch khi cây mẹ sinh trưởng ở cường độ ánh sáng thấp. Khi cây mẹ sinh trưởng ở cường độ ánh sáng thấp cho thấy cành cắt in vitro dễ dàng ra rễ hơn ở những cây mẹ sinh trưởng với cường độ ánh sáng cao hơn. Cường độ ánh sáng trung gian cho thấy số lượng chồi phát sinh nhiều hơn và khả năng tạo rễ tốt.

Khả năng tăng sinh chồi in vitro tốt khi nuôi cấy chồi cây mẹ trong bóng râm so với chồi ngoài trời. Tạo rễ cành cắt in vitro được thúc đẩy khi nuôi cấy mẫu cây mẹ 2 tuần với ánh sáng cao hơn ánh sáng đỏ sau đó nuôi cấy 2 tuần với ánh sáng đỏ. Sự tăng sinh chồi qua nuôi cấy mẫu lá sau khi cây mẹ được xử lý dưới ánh sáng đỏ. Ánh sáng đỏ kích thích tăng khả năng tổng hợp Cytokinin và làm giảm tổng hợp Auxin.

+ Hóa học và vật lý:

Có sự tăng sinh chồi khi nuôi cấy mẫu lá cà chua in vitro bằng cách phun chất ức chế sinh trưởng lên cây mẹ. Khi phun Daminozide (B9) sẽ tăng khả năng phát sinh mô sẹo. Tiền xử lý mẫu nuôi cấy in vitro có những ảnh hưởng đến khả năng tăng sinh cơ quan in vitro. Khi ngâm mẫu lá hay các bộ phận khác trong dung dịch Cytokinin như BA trước khi nuôi cấy, trong khi xử lý chồi tách rời với ABA hay NAA cho thấy có ý nghĩa tạo phôi trong nuôi cấy protoplast. Sử dụng các dung dịch xử lý là phương pháp mới có hiệu quả trong nuôi cấy thân gỗ. xử lý đoạn chồi tách rời cây thân gỗ bằng cách ngâm vào dung dịch tương tự như xử lý duy trì chất lượng và thời gian bảo quản cành.

3.5.1.2. Ảnh hưởng của môi trường.

Môi trường MS (Murashige và Skoog, 1962) được sử dụng phổ biến nhất trong nuôi cấy đỉnh sinh trưởng. Nhưng các loài khác nhau có thể đòi hỏi môi trường nuôi cấy khác nhau. Samartin (1989) đã sử dụng 6 công thức muối đa lượng khác nhau đối với cây trà *Camelia japonica* và thấy rằng môi trường MS cho tốc độ sinh trưởng nhanh nhất khi thu mẫu từ cây non. Môi trường MS đã chứng tỏ không thích hợp cho mẫu lấy từ cây già, trong khi môi trường muối loãng hơn (Heller, 1953) lại cho kết quả khá.

Tính độc của môi trường MS cũng được quan sát ở một số loài (Sommer, 1982; Vieitez, 1983) do môi trường này chứa hàm lượng muối đa lượng cao, có thể gây độc cho tế bào in vitro, nhất là protoplast. Phương pháp đơn giản nhất là giảm nồng độ muối khoáng xuống 1/3 hoặc 1/2 (Grosser, 1994). Môi trường cơ bản MS có hàm lượng NH_4NO_3 , KNO_3 giảm một nửa, bổ sung thêm glutamine 1,550 mg/l, KCl 750 mg/l rất tốt cho nuôi cấy mô sẹo phôi hoá và giảm tích lũy tinh bột ở một số giống Citrus (Grosser và Gmitter, 1990).

Trong số các muối đa lượng, muối nitơ có ý nghĩa quyết định đến sự tái sinh chồi. Welander (1985) cho biết khi nồng độ NH_4NO_3 và KNO_3 trong MS giảm đi 1/2, đỉnh sinh trưởng của dâu tây phát triển khá hơn, rễ tái sinh mạnh hơn. Giảm muối khoáng trong một số trường hợp có tác dụng tốt đối với sự ra rễ ở một số loài (Murashige, 1977; Hasegawa, 1980; Drew, 1987) như trường hợp chồi hoa hồng ra rễ tốt hơn khi nồng độ nitơ tổng số giảm (Hyndman cs., 1982).

Nguồn carbon cũng rất quan trọng đối với nuôi cấy đỉnh sinh trưởng. Nồng độ đường 1- 3 % được sử dụng phổ biến. Nồng độ đường sucrose cao hơn 3 % tỏ ra độc ở một số trường hợp (Rubblue và Kartha, 1985). Chong và Pua (1985) đã sử dụng sucrose, glucose, fructose and sorbitol nồng độ từ 1-7 % trong nuôi cấy đỉnh sinh trưởng giống táo Ottawa 3 và thấy rằng nồng độ sucrose 3% là tối ưu cho sinh trưởng, 100% chồi tạo rễ và chất lượng cây con khỏe mạnh.

Trạng thái vật lý của môi trường cũng có ý nghĩa quan trọng trong nuôi cấy đỉnh sinh trưởng. Đa số các trường hợp người ta sử dụng môi trường agar nhưng khi nuôi cấy đỉnh sinh trưởng một số loài, môi trường lỏng tỏ ra tốt hơn (Mellor và Stace Smith, 1969).

Nồng độ các chất kích thích sinh trưởng thấp trong môi trường có thể làm giảm các biến dị tế bào soma (Grosser và Gmitter, 1990). Tế bào mô sẹo phân hoá ở cây có múi có thể nuôi cấy và bảo quản lâu dài trong môi trường không có chất kích thích sinh trưởng.

+ Nhiệt độ:

Nhiệt độ thích hợp nuôi cấy mô 20-27°C. Nhiệt độ ảnh hưởng sâu sắc đến sinh trưởng và phát triển cây in vitro qua những tiến trình sinh lý như hô hấp hay hình thành tế bào và cơ quan.

Trong nuôi cấy mô Nhiệt độ thích hợp nhất từ 32-35°C. Tuy nhiên ở 24 0C Cytokinin kích thích hình thành chồi bị ức chế. Sự hình thành các cơ quan in vitro phụ thuộc vào nhiệt độ.

Xử lý cây mẹ trước khi đưa vào nuôi cấy in vitro là một phương pháp xử lý cơ bản để sản xuất cây sạch bệnh. Xử lý nhiệt trước khi nuôi cấy in vitro cho thấy đỉnh sinh trưởng đã được khử virus.

+ Ánh sáng

Cường độ ánh sáng: cường độ ánh sáng là một nhân tố quan trọng trong quang hợp, ảnh hưởng đến khả năng nuôi cấy in vitro cây có lá xanh. Tuy nhiên ảnh hưởng đầu tiên đến sự quang hợp là ảnh hưởng đến sinh lý. Ảnh hưởng quan trọng đến chồi, nhưng lại tối cần thiết cho sự tạo rễ. cường độ ánh sáng cao hay thấp quá cũng đều ảnh hưởng đến sự tăng sinh chồi.

+ Quang kì và chất lượng ánh sáng

Thời gian chiếu sáng ảnh hưởng sâu sắc đến những đáp ứng sinh lý ở cây trồng. Ở những cây ngày ngắn, ra hoa ngày ngắn, điều này cũng xảy ra tương tự đối với cây dài ngày (đêm ngắn), thời gian chiếu sáng 12-15 giờ thích hợp cho loại cây thân gỗ.

Chất lượng ánh sáng ảnh hưởng trực tiếp đến cây in vitro vì ánh sáng cao hơn ánh sáng đỏ hay ánh sáng đỏ có ảnh hưởng đến những biến đổi sinh lý trên cây như ra hoa, chế độ dinh dưỡng và những hiện tượng khác như tăng sinh chồi in vitro bằng cách xử lý cây mẹ với ánh sáng đỏ. ánh sáng đỏ và cao hơn ánh sáng đỏ ảnh hưởng đến khả năng ra rễ của cành cắt in vitro. Có loài xử lý 2 tuần với ánh sáng đỏ cho thấy hiệu quả cao hơn ánh sáng trắng. ánh sáng xanh có khả năng kích thích và ức chế. Ngoài ra có ảnh hưởng của bước sóng đến phản ứng cây in vitro và có mối tương tác giữa bước sóng ánh sáng và môi trường dinh dưỡng.

+ Các chất khí:

Thành phần chất khí trong bình nuôi cấy có ảnh hưởng đến sinh trưởng của cây in vitro. O₂, CO₂ và etylen là những chất được khảo sát nhiều. CO₂ có thể bị giới hạn trong bình nuôi cấy và sử dụng nắp bình có lỗ thông khí, sử dụng bình có bổ sung CO₂ và làm giàu CO₂ trong phòng dưỡng cây có thể cho vi nhân giống giá thành hạ.

Giàu CO₂ và cường độ ánh sáng cao giúp cho quá trình quang hợp xảy ra nhanh hơn và nâng cao tốc độ vi nhân giống. Không sử dụng đường sucrose làm giảm sự hoại mầu trong nuôi cấy do vi sinh vật gây ra.

O₂ có giới hạn trong nuôi cấy mô. Etylen xem như là chất làm giảm sinh trưởng trong nuôi cấy mô. Auxin hưởng đến sự phóng thích etylen. Nâng cao hàm lượng etylen làm giảm sinh trưởng mô sẹo.

+ Hormon

Người ta nhấn mạnh tầm quan trọng của việc sử dụng auxin và Cytokinin trong hệ thống vi nhân giống. sự phối hợp của 2,4 D và NAA có ảnh hưởng đến sự hình thành mô sẹo cũng như tái sinh cây. GA₃ được sử dụng trong môi trường nuôi cấy để kích thích vươn thân, đặc biệt trong trường hợp có hàm lượng Cytokinin cao dẫn đến hình thành các cụm chồi có cấu trúc đặc.

3.5.2. Tính bất định về mặt di truyền

Mặc dù kỹ thuật nhân giống vô tính được sử dụng nhằm mục đích tạo ra quần thể cây trồng đồng nhất với số lượng lớn nhưng phương pháp cũng tạo ra những quần thể biến dị tế bào soma qua nuôi cấy mô sẹo và nuôi cấy tế bào đơn. Những biến dị này được nghiên cứu vận dụng vào cải thiện giống cây trồng nhưng rất ít những biến dị có lợi được báo cáo.

Tần số biến dị hoàn toàn khác nhau và không lặp lại. nuôi cấy mô sẹo và tế bào đơn có

sự biến dị nhiều hơn nuôi cấy chồi đỉnh.

Cây trồng biến dị tế bào soma qua nuôi cấy thường là biến dị về chất lượng, số lượng và năng suất, và biến dị này không di truyền. Nguyên nhân gây ra biến dị chưa được làm sáng tỏ chủ yếu là do những biến đổi trong vật chất di truyền như đứt gãy, chuyển đoạn ADN hoạt đảo đoạn. Những nguyên nhân gây biến dị tế bào soma là:

+ kiểu di truyền

+ thể bội : cây đa bội thể tần số biến dị cao hơn cây nhị bội

+ số lần cấy truyền: số lần cấy truyền càng cao thì tần số biến dị càng lớn

+ loại mô

3.5.3. Mẫu đưa vào nuôi cấy

- Sự hoại mẫu:

Có hai tác nhân làm hư mẫu nuôi cấy in vitro:

+ Bị virus hay thể giống như virus xâm nhiễm, không hoại mẫu nhưng có ảnh hưởng về sau. Có sự xâm nhiễm của nhiều vi sinh vật như: Agrobacterium, bacillus, erwinia và pseudomonas vào nhu mô sẽ dẫn truyền sự hoại mẫu khi tế bào bắt đầu phân chia. Để làm giảm tác nhân gây nhiễm sử dụng mẫu nuôi cấy là nhu mô phân sinh đỉnh.

+ Bị vi sinh vật hoại hoại, có thể khử trùng mẫu trước khi cấy vào môi trường. Những loại khi đưa vào nuôi cấy thường bị vi sinh vật hoại mẫu nên đưa vào trồng trong môi trường mát và khô vài tuần trước khi lấy mẫu nuôi cấy sẽ giảm sự hoại mẫu.

Sử dụng thuốc kháng sinh

Nhằm hạn chế sự hoại mẫu của vi sinh vật như amphotericin B, nystelin, kanamicin, vancomycin và penicillin khử được vi khuẩn Gram (-) Gram(+) nấm mốc... sử dụng từng đơn chất hay phối hợp. Nồng độ khử trùng 5-100 g/l phụ thuộc vào vật liệu nuôi cấy và loại kháng sinh sử dụng. Mô thực vật rất nhạy cảm với tác động của kháng sinh và có những phản ứng khác nhau lên kiểu di truyền do đó nên cẩn thận khi sử dụng.

3.5.4. Việc sản xuất các chất gây độc từ mẫu cấy

Hiện tượng hóa mẫu hóa nâu hay bị đen là chết mẫu hay làm giảm sự tăng trưởng. Nguyên nhân của hiện tượng này là do mẫu nuôi cấy có chứa nhiều tannin hay hydroxyphenol có nhiều trong mô già hơn mô se

Một số phương pháp làm giảm sự hóa nâu mẫu:

- tách các phần tử phenol ra khỏi môi trường

- bổ sung các chất khử redox (oxidation-reduction) phenol vào môi trường

- ngăn chặn sự hoạt động của enzym phenolase

- giảm lượng phenol có sẵn trong mẫu bằng môi trường lỏng giống môi trường rắn

- mẫu chuẩn bị có vết cắt nhỏ, để ngoài vài giờ trước khi cấy, hay nơi cấy trong môi

trường không có ánh sáng.

Than hoạt tính được đưa vào môi trường để hấp thụ chất kìm hãm phenol, ngăn chặn quá trình hóa nâu hay đen, đặc biệt có hiệu quả trên các loại phong lan, nồng độ thường 0,1-0,3%. Tuy nhiên than hoạt tính sẽ làm chậm quá trình phát triển của mô do hấp thụ chất kích thích sinh trưởng và các chất khác. Polyvinylpyrrolidone (pvp), một chất thuộc loại polyamide, hấp thụ phenol qua vòng hydrogen, ngăn chặn sự hóa nâu, hiệu quả phụ thuộc vào các loài cây trồng khác nhau.

Giảm sự hóa nâu bằng cách cho các chất khử quá trình oxi hóa vào môi trường ngăn chặn sự oxi hóa phenol. Chất khử thường dùng: vitamin C, axit citric, L-cystein hydroclorit, gluta thione, và mecaptoethanol. Phương pháp quan trọng là phối hợp vitamin C và axit citric. Phương pháp đề nghị:

- + sử dụng mẫu cây nhỏ từ mô sẹo
- + gây vết thương trên mẫu nhỏ nhất khi khử trùng
- + ngâm mẫu vào dung dịch vitamin C và axit citric vài giờ trước khi cấy
- + Nuôi cấy mẫu trong môi trường lỏng, O₂ thấp không có đèn 1-2 tuần chuyển mẫu từ môi trường có nồng độ chất kích thích sinh trưởng thấp sang môi trường có nồng độ cao.

3.5.5 Hiện tượng thủy tinh thể

Nhân giống vô tính in vitro chỉ có hiệu quả khi cây con được nhân giống chuyển ra đồng ruộng có tỉ lệ sống cao. Có hiện tượng trong nuôi cấy mô là xuất hiện cây in vitro thủy tinh thể. Khi chuyển ra khỏi bình nuôi cấy, cây con dễ dàng bị mất nước và tỉ lệ sống thấp. Đây là một dạng bệnh sinh lý. Dạng này thường thấy khi nuôi cấy trên môi trường lỏng hay môi trường thạch có hàm lượng thạch thấp, đặc biệt khi sự trao đổi khí thấp, quá trình thoát hơi nước tập trung trong cây.

- Đặc điểm cây thủy tinh thể

Nhận thấy là có sự khác nhau về hình thành lớp sáp ở cây nuôi cấy mô và cây ngoài tự nhiên. Lớp sáp chứa trong cây ngoài vườn ươm cao hơn hẳn cây in vitro. Tế bào có chứa nhiều phân tử có cực dễ dàng nhận phân tử nước gắn trên nó, gia tăng độ mất nước và tốc độ hô hấp của tế bào trong nhân vô tính và đưa đến sự chết của mô trong nuôi cấy.

- Ngăn chặn quá trình thủy tinh thể

- + giảm sự hút nước bằng cách tăng nồng độ đường
- + giảm sự tăng hấp thụ nước bằng cách tăng nồng độ đường trong nuôi cấy và dùng các chất có áp suất thẩm thấu cao, nhưng phương pháp này làm thay đổi sự tổng hợp cấu trúc không gian của diệp lục và ức chế hình thành chồi.
- + giảm gây vết thương trên mẫu qua chất khử trùng và tiếp xúc với môi trường cấy ít

nhất. ABA ngăn chặn được sự hóa thủy tinh thể ở một số loài cây trồng.

+ giảm nồng độ đạm trong môi trường nuôi cấy

+ chuyển cây in vitro thuần hóa ngoài vườn ươm không ảnh hưởng đến cây bị thủy tinh thể.

+ giảm etylen trong bình nuôi cấy bằng cách thông khí tốt + tăng nồng độ ánh sáng và giảm nhiệt độ phòng cấy.

3.5.6. Khống chế điều kiện môi trường

Chứng minh được rằng nuôi cấy có diệp lục hay cây con in vitro có khả năng quang hợp tự dưỡng. Để nâng cao tối đa khả năng quang hợp in vitro, cải thiện điều kiện vật lí của môi trường nuôi cấy như nhiệt độ, cường độ và thời gian chiếu sáng, sự trao đổi khí...

Nhân giống in vitro trong điều kiện quang tự dưỡng có ưu thế hơn các phương pháp thông thường:

+ sinh trưởng và phát triển cây in vitro có thể được thúc đẩy bằng cách tăng cường độ ánh sáng của phòng nuôi cấy từ 30-35 $\mu\text{mol/m}^2/\text{s}$ đến ít nhất 100 và tăng nồng độ CO_2 lên gấp 2-3 lần. Quá trình ra rễ được gia tăng. Có thể dùng một lượng nhỏ chất kích thích sinh trưởng hay chất dinh dưỡng trong môi trường nuôi cấy. Bình nuôi cấy có thể được đậy kín nối tiếp với hệ thống cung cấp khí, điều này dẫn đến sự giảm độ ẩm tương đối và khí etylen trong môi trường, ảnh hưởng đến khả năng hình thành khí khổng bình thường và sập bảo vệ. Dẫn đến sự thuần hóa cây con in vitro được thuận lợi, tăng tỉ lệ cây sống, tiết kiệm chi phí sản xuất cây con.

+ sử dụng môi trường nuôi cấy in vitro không đường làm giảm đáng kể cây chết do những nguyên nhân sinh học

+ ngăn chặn hay tránh được các quá trình phát sinh hình thái hay các hiện tượng sinh lý không thuận lợi và sản xuất ra những cây in vitro đồng nhất.

+ bình nuôi cấy in vitro có thể sử dụng những bình có thể tích lớn, dễ dàng trong kiểm soát môi trường nuôi cấy, thực hiện tự động hóa.

3.5.7. Những trở ngại khi thương mại hóa

Có nhiều loài cây phải dùng phương pháp thông thường, có loại cây dùng nuôi cấy mô tốt nhưng có loài không có hiệu quả về kinh tế

+ Giảm chi phí sản xuất: chi phí lao động chiếm 60-80 % nên hạn chế kỹ thuật nuôi cấy mô trong nhân giống cây trồng. Đặc biệt đối với các cây có hệ số nhân giống thấp.

+ Ở những phòng thí nghiệm thương mại thí nghiệm cây truyền trong 1 thời gian dài là một vấn đề. Có những cây mất 1-2 năm mới trưởng thành

+ Khi nhân giống in vitro có 1 số cây thay đổi kiểu di truyền

3.5.8. Nhân giống in vitro và việc sử dụng giống ưu thế lai

Ở ngành trồng trọt, giống ưu thế lai mới chỉ được ứng dụng ở một số đối tượng như: ngô, cà chua, lúa, cải đầu, bắp cải, hành tây, măng tây, đặc biệt là các giống hoa...

Sử dụng ưu thế lai không những làm tăng năng suất từ 20-40%, mà giống lai còn có đặc điểm là rất đồng đều so với giống bố mẹ. Tính đồng đều của giống là tiền đề quan trọng cho sản xuất theo phương thức công nghiệp. Ở súp- lơ chẳng hạn, phương thức sản xuất công nghiệp đòi hỏi phải thu hoạch toàn bộ diện tích bằng cơ giới vào một thời điểm. Điều này chỉ được thực hiện khi sử dụng giống ưu thế lai F1. Nếu dùng giống thuần chủng theo phương thức tự phối thì không đảm bảo, vì ở các giống rau họ cải (Brassicaceae) thường xuất hiện hiện tượng bất tự thụ. Vì vậy, phương pháp nhân giống và bảo quản giống trong ống nghiệm đối với một số giống rau và giống hoa có một ý nghĩa kinh tế cao.

Vấn đề đặt ra hiện nay là phải nghiên cứu các quy trình nhân giống in vitro tối ưu cho từng loài cây trồng và cải tiến quy trình đó để giảm tới mức đối đa các tổn kém về nhân công lao động trong các công đoạn nuôi cấy và đưa cây con ra ngoài đất.

3.6. Quy trình nhân giống một số cây trồng phổ biến

3.6.1. Cây khoai tây *Solanum tuberosum* L

* Phục tráng giống khoai tây bằng phương pháp nuôi cấy đỉnh sinh trưởng

Phương pháp tiến hành:

3.6.1.1. Xử lý nhiệt:

Trồng khoai tây trong chậu đất trong điều kiện nhiệt độ, ánh sáng bình thường. Khi chồi nảy ra từ củ cao khoảng 15 cm thì cắt phần ngọn dài 6-8 cm, bỏ bớt 2 lá dưới cùng và cắm vào một ly thủy tinh đựng đất mùn vô trùng. Dùng một ly thủy tinh khác đặt trên ly đất để tránh cho chồi và đất bị mất nước trong vòng 10 ngày để chồi ra rễ (điều kiện nhiệt độ, ánh sáng không thay đổi). Sau 3-4 tuần chuyển cây sang điều kiện chiếu sáng 3000-4000 lux, thời gian chiếu sáng 12 giờ/ngày, nhiệt độ 36oC ban ngày và 33oC ban đêm. Sau 2 tuần cắt bỏ chồi ngọn để các chồi bên phát triển. Sau 6 tuần xử lý nhiệt, chồi bên được thu để tách đỉnh sinh trưởng.

3.6.1.2. Tách đỉnh sinh trưởng:

Chồi được cắt bỏ bớt lá và đặt trên giấy thấm ẩm trong hộp petri kín để tránh bị mất nước. Nếu trong giai đoạn tạo chồi, cây được nuôi cẩn thận thì việc khử trùng chồi cũng không cần thiết lắm. Nếu cần thì cũng có thể khử trùng mẫu trong dung dịch khử trùng có nồng độ thấp, trong khoảng thời gian ngắn. Mẫu được rửa sạch dung dịch khử trùng nhiều lần bằng nước cất vô trùng. Thao tác tách đỉnh sinh trưởng được thực

hiện trong tủ cấy vô trùng, dưới kính lúp có độ phóng đại x25. Dùng kim nhọn hay đầu dao mỏng gạt bỏ các lá bao bên ngoài đến khi còn đỉnh sinh trưởng và 2 phác thể lá. Cắt đỉnh sinh trưởng với độ dài khoảng 0,6 mm và cấy lên mặt môi trường MS đặc có bổ sung IAA 0,5 mg/l, GA3 0,1 mg/l và inositol 100 mg/l. Đỉnh sinh trưởng được nuôi ở 23°C, thời gian chiếu sáng 16 giờ/ngày. Sau vài tuần, khi cây cao khoảng 3 cm có thể cấy sang môi trường mới. Khi cây có nhiều lá thì có thể nhân lên bằng cách cắt đốt, mỗi đốt mang một lá. Mỗi đốt được cấy vào trong 1 ống nghiệm 12 x 100 mm có chứa 3,5 ml môi trường. Nếu khoai tây khó ra rễ thì bổ sung than hoạt tính vào trong môi trường. Cây khoai tây tạo thành sẽ được chẩn đoán bệnh trên các cây chỉ thị như *Gomphrena globosa* (virus X), *Chenopodium amaranticolor* (virus S và X), *Solanum demissum* (virus Y). Khi chắc chắn không còn virus trong khoai tây thì những cây khoai tây sạch bệnh được đưa vào nhân giống đại trà.

3.6.1.3. Nhân giống trên khay cát

Cây khoai tây trên ống nghiệm được cắt thành từng đốt, mỗi đốt mang một lá, và cắm vào khay cát ẩm. Khoảng cách cắm 3 x 3 cm. Che nắng, giữ ẩm cho đốt giâm trong 7 ngày đầu. Khi đốt giâm ra rễ, tưới bằng dung dịch NPK loãng 1 lần/ngày. Phun thuốc trừ sâu bệnh thường xuyên. Sau 1 tháng, cắt ngọn cây và giâm vào luống đất. Phần còn lại vẫn được chăm sóc như cũ. Sau khi cắt ngọn 5-7 ngày, chồi bên sẽ bật lên và tiếp tục tăng trưởng. Các chồi bên này cũng sẽ được cắt và trồng trên đất. Khay cát này sẽ được giữ khoảng 12 tháng để thu chồi.

3.6.1.4. Nhân trên luống đất

Chồi ngọn trên khay cát được cấy vào luống đất. Đất và phân đã hoại được trộn theo tỷ lệ 3 phần đất: 1 phần phân. Hỗn hợp đất và phân được khử trùng sơ bộ để khử bớt các mầm gây bệnh. Luống đất được trải rộng 80cm, dài 5-10m. chiều cao luống 6-8 m. Khoảng cách cắm chồi 5x5 cm. Sau 20 ngày bắt đầu cắt ngọn để cấy vào bầu đất. Chồi bên này cũng được thu và cấy vào bầu đất. Có thể cắt liên tục trong 6-7 tháng đến khi mạ hóa già.

3.6.1.5. Cây trong bầu đất

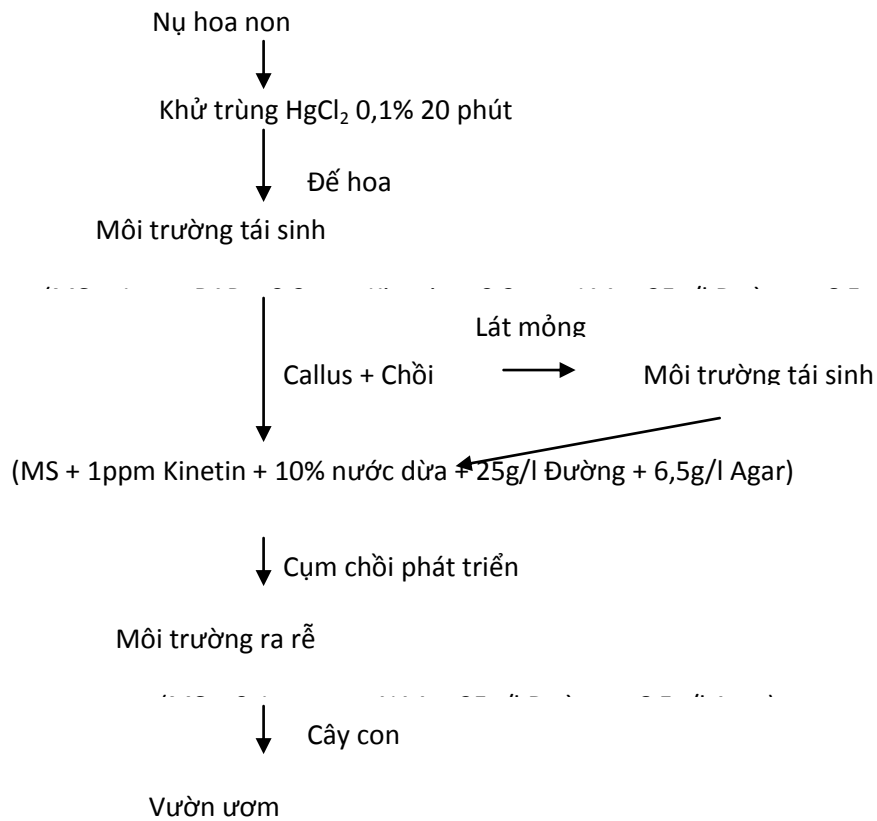
Bầu đất được làm bằng lá chuối. kích thước 5x 12 cm. bên trong có chứa đất. Chồi ngọn và chồi bên thu từ luống mạ sẽ được cắm vào bầu đất. Che nắng và giữ ẩm trong 4-5 ngày đầu. Khi chồi ra rễ và tăng trưởng thì bỏ lưới che và tưới bằng dung dịch NPK loãng mỗi ngày. Sau 15-20 ngày (kể từ khi cấy chồi vào bầu) thì cây khoai tây đã phát triển mạnh, thân mập, có bộ rễ hoàn chỉnh, sẵn sàng được đưa ra trồng ngoài ruộng.

3.6.1.6. Trồng cây ngoài ruộng để tạo củ giống:

Cây khoai tây bầu đất được trồng ngoài ruộng với mật độ rất cao (100.000 cây/ha) để

hạn chế sự tăng trưởng của củ. Với mật độ trồng này có thể thu được nhiều củ nhỏ trọng lượng 15-50 g/củ. Khi củ nảy mầm sẽ được đem trồng với mật độ 30.000-40.000 cây/ha. Sau khi thu hoạch, củ khoai tây lớn sẽ được bán cho người tiêu thụ, củ nhỏ và trung bình được bán để làm giống.

3.6.2. Vi nhân giống hoa đồng tiền



3.7.Nhân giống cây thân gỗ

3.7.1.Vì nhân giống cây thân gỗ còn non

Cây còn non là cây trồng từ hạt được một năm tuổi. Nhân giống thông qua hai con đường nuôi cấy cơ quan và nuôi cấy phôi. Thông dụng là nuôi cấy cơ quan. nuôi cấy cơ quan và nuôi cấy phôi khác nhau ở chỗ phát sinh chồi ngọn hay chồi bên đầu tiên và sau đó phát triển rễ, cây hoàn chỉnh được tái tạo.

Trong nuôi cấy phôi thì phôi phát sinh đầu tiên sau đó hình thành lá mầm và rễ, là giai đoạn nảy mầm thành cây hoàn chỉnh.

3.7.1.1. Nuôi cấy cơ quan

Các bước nhân giống và môi trường:

- Hình thành chồi từ mẫu cây đưa vào nuôi cấy
- Vươn thân và nhân giống
- Tạo rễ
- Thuần hoá cây con in vitro

Chọn môi trường nuôi cấy cho từng bước phụ thuộc vào từng loại cây, từ nồng độ thấp đến cao. Thường người ta bổ sung môi trường cơ bản được chọn lựa trước phù hợp cho từng loại cây và từng bước nhân giống.

+ Tạo chồi:

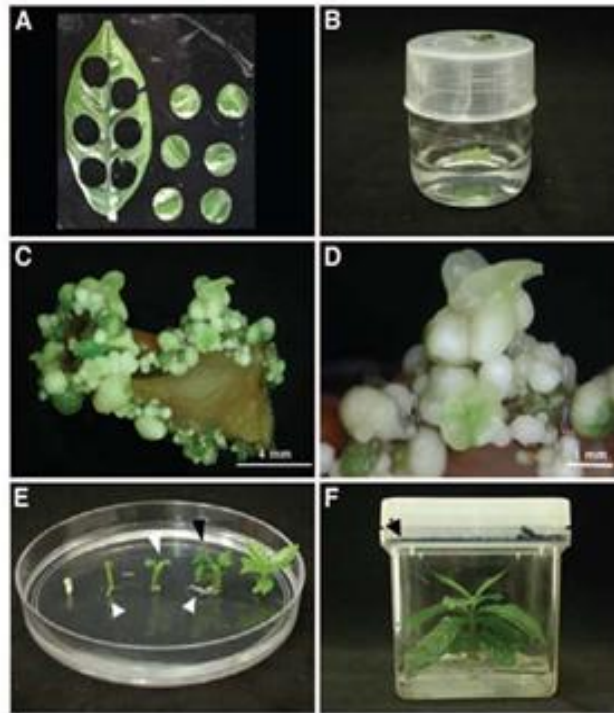
Mẫu đang phát triển cho khả năng tạo chồi cao

Mẫu non và chứa nhiều dinh dưỡng có nhu mô phân sinh có khả năng tạo chồi cao. chồi mầm cây từ hạt còn non có khả năng tạo chồi nhiều hơn cây già. Phôi hợp tử trưởng thành, lá mầm, phần trên lá mầm và chồi bên của lá, các bộ phận này chứa nhiều mô phân sinh, tạo được chồi ngọn hay chồi bên.

Chồi thường được tạo trên môi trường có Cytokinin với nồng độ 0,5-5 phương pháp, trên 5 phương pháp chồi ngọn và chồi bên xuất hiện chậm lại sau 4-6 tháng.

+ Vươn thân và nhân giống

Môi trường cho vươn thân giống môi trường nhân giống nhưng không có cytokinin. Sử dụng than hoạt tính (0,5-1%) rất cần thiết cho sự vươn thân. Đường Sacarosa 3% thích hợp cho sự vươn thân và nhân giống, 2% cho tạo rễ. Môi trường lỏng hay môi trường lỏng trên lớp agar thích hợp cho vươn thân.



Hình 3.6. Vi nhân giống cây caphe

Nhân giống được thực hiện bằng hai phương pháp:

1. Phương pháp cắt đốt có thể có hay không có cytokinin
2. Phương pháp nhân theo cụm chồi, có sử dụng cytokinin kích thích chồi phát sinh và phát triển. phương pháp này thường dùng đối với cây thân gỗ.

+ Tạo rễ và thuần hoá

Sự tạo rễ chịu ảnh hưởng của Auxin, cách xử lí Auxin, chất lượng chồi, tuổi sinh lý, giống cây và nhiệt độ. Để tạo rễ cây thường được cấy vào môi trường có Auxin như IBA, NAA hay cả hai loại với nồng độ 0,1-5 mg/l cho IBA và 0,1-5 mg/l cho NAA. Nồng độ và thời gian xử lí phụ thuộc vào giống. Tạo rễ và thuần hoá thường đi đôi với nhau. Trong thời gian thuần hoá cây non cần được duy trì ở tình trạng tự dưỡng, giảm độ ẩm từ 90% đến xuống 30-50%, lá dày lên và rễ phát triển.

3.7.1.2. Nuôi cấy phôi

+ Các bước nhân giống và môi trường

Tạo cây từ phôi trải qua 5 bước

1. Tạo phôi
2. Nhân phôi

3. Phát triển và trưởng thành phôi

4. Nảy mầm của phôi

5. Thuần hoá cây con in vitro

Môi trường nuôi cấy giống như môi trường nuôi cấy cơ quan. Thêm ABA vào trong môi trường cho sự phát triển phôi trưởng thành là cần thiết

+ Phát sinh phôi và nhân phôi:

Phôi hợp tử chưa trưởng thành, 3-5 tuần được dùng làm nguyên liệu tạo phôi. BA (0,5-5 phương pháp) và 2,4D (1-10 phương pháp) được dùng để tạo phôi. Auxin rất cần thiết cho sự phát sinh và phát triển phôi trưởng thành đồng nhất. Nhân phôi bằng môi trường lỏng được sử dụng phổ biến hiện nay.

+ Sự phát triển và trưởng thành của phôi

Để phôi phát triển và trưởng thành cần có ABA (10-20 phương pháp). ABA kích thích sự hình thành nơi dự trữ lipít, protein, và carbohydrat trong sự phát triển phôi là cần thiết cho phôi nảy mầm. môi trường có áp suất thẩm thấu cao, sự trao đổi tốt O₂ và CO₂ cải thiện chất lượng và số lượng phôi được tạo ra. Dùng đường Saccaroza 12% tạo áp suất thẩm thấu lớn, tăng sự trưởng thành và làm khô phôi. Đối với cây thân gỗ, sự hình thành phôi trên môi trường không có Auxin.

+ Sự nảy mầm của phôi.

Sự nảy mầm của phôi thường được thực hiện trên môi trường agar, nhưng khả năng tái sinh cây từ phôi cây thân gỗ là thấp. Tái sinh phôi trên cầu giấy đặt trên môi trường lỏng có ẩm độ cao cải thiện được khả năng tái sinh.

Đưa cây ra đồng ruộng

Thể nhân giống được tái sinh từ chồi hay in vitro phải được đưa ra thử nghiệm trên đồng ruộng so sánh với cây từ hạt và giâm cành. Nhưng sinh trưởng và phát triển của thể nhân giống đôi khi khác về sinh lý và di truyền xuất hiện trong quá trình nhân giống. Nên rất cẩn thận khi nuôi cấy thể nhân giống trên đồng ruộng trước khi nhân hàng loạt.

+ Nhân thể nhân giống qua phát sinh cơ quan

- Nhân giống cây thân gỗ sinh trưởng như cây từ hạt

- Thể nhân giống từ những chồi non có trạng thái chín cây tốt và có khuynh hướng tạo những chồi ngọn sát nhau, có chiều cao giống nhau, đường kính cây hơi nhỏ hơn.

- Cây từ giâm cành thường tốt hơn thể nhân giống.

+ Nhân thể nhân giống qua phát sinh phôi:

Sự hình thành thể nhân giống qua phát sinh phôi vẫn chưa được thử nghiệm hoàn chỉnh.

3.7.2. Vi nhân giống cây thân gỗ trưởng thành

Nhân giống vô tính cây trưởng thành khó hơn cây còn non

Có hai loại mẫu được dùng:

1. Mô non ở gần gốc
2. Chồi trưởng thành ở đỉnh cây

3.7.2.1. Nuôi cấy cơ quan:

+ Xử lý cây mẹ

Cây mẹ có tuổi trưởng thành lớn tuổi được đem đi giâm cành, chiết cành trước khi đưa vào nuôi cấy in vitro nhằm để tạo mô non hoá.

+ Có 4 bước nhân giống

1. Tạo chồi
2. Vươn thân và nhân giống
3. Tạo rễ
4. Thuần hoá cây in vitro

Môi trường nhân giống như nuôi cấy cây còn non. Trên môi trường bổ sung than hoạt tính giúp vươn thân

+ Tạo chồi:

Chọn mẫu đang tăng trưởng, có nhu mô đỉnh hay chồi bên được kích thích tạo chồi, trên mẫu cây có sẵn 1-2 mm. Chọn những chồi non vươn ra ánh sáng thì khả năng tạo chồi cao.

+ Vươn thân và nhân giống

Môi trường chồi vươn thân không có chất kích thích sinh trưởng và bổ sung than hoạt tính (0,5-2%), khi vươn thân có rễ thì đem nhân giống. Đối với nhiều cây thân gỗ, khi chồi xuất hiện, thường được tách ra và cấy trên môi trường có nồng độ chất sinh trưởng thấp như BA (0,202 ppm) BA+IBA, BA+IBA+GA3. Tuy nhiên mẫu được nuôi cấy trên môi trường có cytokinin+ than hoạt tính hay không có cytokinin thì cây được trẻ hoá.

+ Tạo rễ và thuần hoá

Đối với mẫu già, Auxin cần thiết cho tạo rễ thường dùng IBA hay IBA+ NAA để tạo rễ. Nhân tố quyết định đến sự ra rễ: Dùng chồi có chất lượng, cơ chất xốp, phun sương giữ ẩm và giảm nhiệt độ ban ngày, tách mô sẹo ở gốc và môi trường nuôi cấy tạo rễ có 6% đường Sacarosa.

+ Thử nghiệm trên đồng ruộng và trẻ hoá:

Khả năng làm trẻ lại có thể được thực hiện khi xử lý cây mẹ bằng các kỹ thuật nông học, chọn mẫu nuôi cấy, nuôi cấy in vitro và môi trường hay những xử lý mang tính chất vật lý khác

Phụ thuộc vào mục tiêu sử dụng thể nhân giống:

1. Trẻ lại hay trẻ lại ở mức độ nào đó, cây có tc hình thái trẻ hơn cho thấy cần thiết trồng trên các khu rừng.

2. Các thể nhân giống chín hơn cần thiết để ra hoa kết hạt.

+ Chỉ thị hoá sinh:

Để tránh nhiều tháng chờ đợi và đôi khi hàng nhiều năm để quan sát những ảnh hưởng của các xl khác nhau trên hình thái, sinh lý, tập tính tái sinh của những thể nhân giống từ cây trưởng thành, những phương pháp chỉ thị hoá sinh được sử dụng để nghiên cứu. Nghiên cứu tỉ lệ K/Ca trong mô chịu ảnh hưởng của cytokinin và mức độ trẻ của chồi trong nuôi cấy.

Sử dụng phương pháp sinh học phân tử để nghiên cứu những ảnh hưởng của trường thành đến những đặc tính hình thái và quang hợp ở cây trưởng thành giúp ta phát hiện những chỉ thị trẻ lại.

CÂU HỎI ÔN TẬP

1. Nêu một số phương pháp nhân giống thực vật truyền thống
2. Phân tích những hạn chế của phương pháp vi nhân giống
3. Tóm tắt các phương pháp nhân giống invitro
4. Trình bày các giai đoạn trong quy trình nhân giống vô tính in vitro
5. Phân tích các vấn đề liên quan đến nhân giống invitro
6. Tóm tắt qui trình vi nhân giống cây khoai tây và cây đồng tiền
7. So sánh sự giống và khác nhau trong qui trình vi nhân giống cây nông nghiệp thông thường và cây thân gỗ

Chương 4. NUÔI CÂY GIAO TỬ, TẠO CÂY ĐƠN BỘI IN VITRO

4.1. Vấn đề đơn bội của thực vật

Hầu hết các loài cây trồng của chúng ta đều có mức bội thể lớn hơn 1, phổ biến là nhị bội (2n) và tứ bội (4n). Như vậy, mỗi đặc điểm di truyền ở những cá thể này đều bị hai hay nhiều allel của một gen chi phối. Nếu đó là những cá thể dị hợp tử, tức là các gen trong mỗi hệ gen nhị bội hay tứ bội khác nhau thì biểu hiện tính trạng (phenotype) của gen đó hoàn toàn tùy thuộc vào tính trạng lặn hay trội của chúng quyết định. Vì vậy, mức bội thể lý tưởng để tiến hành nghiên cứu di truyền các tính trạng phải là mức đơn bội (1n) hoặc các mức đa bội khác nhưng chúng phải đồng nhất tuyệt đối.

Giá trị của cây đơn bội trong các nghiên cứu di truyền và chọn giống đã được phát hiện từ lâu. Kể từ khi Blakeslee (1921) mô tả cây đơn bội tự nhiên đầu tiên ở *Datura stramonium*, cây đơn bội tự nhiên đã được tìm thấy ở rất nhiều loài cây khác nhau. Tuy vậy, các cây đơn bội tự nhiên xuất hiện một cách ngẫu nhiên với tần suất rất thấp không thể đáp ứng yêu cầu của nghiên cứu và chọn giống.

Năm 1964, lần đầu tiên trên thế giới, hai nhà khoa học Ấn Độ Guha và Maheshwari thành công trong việc tạo cây đơn bội từ nuôi cấy bao phấn in vitro cây cà *Datura innoxia*. Ngay sau đó, cây đơn bội đã được tạo ra bằng nuôi cấy bao phấn ở hàng loạt cây trồng khác nhau. Các nhà khoa học đã tìm ra những yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến thành công của quá trình nuôi cấy như ảnh hưởng của kiểu gen, giai đoạn phát triển của hạt phấn và các điều kiện môi trường nuôi cấy. Ngoài nuôi cấy bao phấn, các nhà khoa học còn có những thành công rất lớn trong nuôi cấy noãn chưa thụ tinh, nuôi cấy hạt phấn tách rời. Kỹ thuật tạo cây đơn bội in vitro thông qua kích thích tiêu bào tử hoặc đại bào tử trong nuôi cấy hạt phấn và noãn cho phép tạo ra nhanh chóng hàng loạt cây đơn bội, phục vụ đắc lực cho mục đích nghiên cứu di truyền và tạo giống cây trồng.

Hai phương pháp cơ bản của kỹ thuật đơn bội hiện nay là:

- Nuôi cấy bao phấn hay tiêu bào tử tách rời hay còn gọi là như phương pháp trình sinh đực trong ống nghiệm (in vitro androgenesis).

- Nuôi cấy tế bào trứng chưa thụ tinh hay còn gọi là phương pháp trình sinh cái trong ống nghiệm (in vitro gynogenesis).

Vật liệu ban đầu cho quá trình nuôi cấy in vitro tạo cây đơn bội thường là:

- Bao phấn, hạt phấn tách rời, cụm hoa (phương pháp này hay được áp dụng

cho những loài có hoa nhỏ).

- Cứu phôi sau lai xa. Khi lai xa giữa hai loài lúa mạch *Hordeum vulgare* và *H. bulbosum*, quá trình thụ phấn phôi đơn bội xảy ra do nhiễm sắc thể của *H. bulbosum* bị loại trừ, nhưng nội nhũ của phôi đơn bội lại không phát triển. Sử dụng phương pháp nuôi cấy phôi đã cứu được những phôi này và tạo ra hàng loạt cây đơn bội (Jensen, 1977).

- Thụ tinh giả. Đây là quá trình thụ phấn nhưng không xảy ra sự thụ tinh. Mặc dù vậy, tế bào trứng vẫn được kích thích phát triển thành cây đơn bội. Hess và Wagner (1974) đã tiến hành thụ phấn in vitro giữa *Mimulus luteus* với *Torenia fournieri* và kết quả là đã tạo được cây đơn bội.

- Noãn chưa thụ tinh.

Trong số các vật liệu trên, bao phấn, hạt phấn tách rời và noãn chưa thụ tinh là những nguồn nguyên liệu quan trọng, được sử dụng phổ biến hơn để tạo cây đơn bội.

Kể từ thành công đầu tiên của Guha và Meheshinari (1996, 1967), các cây đơn bội của hơn 247 loài thuộc 88 chi và 34 họ thực hạt kín đã được tạo ra từ nuôi cấy bao phấn và hạt phấn (Bajaj, 1990). Cây đơn bội từ nuôi cấy noãn hình thành theo kiểu trinh sinh cái.

Tại Trung Quốc, công nghệ đơn bội đã được triển khai có hệ thống trên quy mô lớn và có định hướng chiến lược rõ ràng trong tạo giống mới. Hơn một nghìn cơ sở nuôi cấy bao phấn đã hoạt động trên toàn quốc từ những năm 1970, kết quả đã tạo được trên 100 giống lúa mới trong một thời gian ngắn. Trong đó, giống lúa nước và lúa mì mới tạo ra từ kỹ thuật đơn bội đã mở rộng sản xuất trên diện tích vài triệu ha. Tại Triều Tiên, kỹ thuật nuôi cấy bao phấn đã tạo ra 42 giống lúa mới (Sasson, 1993; Jain cs., 1997). Ưu thế của các phương pháp nuôi cấy này là tất cả các cây tạo thành đều có nguồn gốc từ tiểu bào tử hoặc đại bào tử, vì vậy cây con nhận được sẽ là cây đơn bội hoặc cây nhị bội đồng hợp tử tuyệt đối với các cặp nhiễm sắc thể tương đồng hoàn toàn giống nhau (trừ trường hợp đột biến). Cây nhị bội thu được là do quá trình nhị bội hoá tự nhiên của hạt phấn đơn bội trong nuôi cấy hoặc xử lý đa bội hoá bằng thực nghiệm.

Từ lâu, các nhà di truyền và chọn giống cây trồng đã sử dụng trạng thái đơn bội của cây trồng để tiến hành nghiên cứu và thông qua đa bội hóa thể đơn bội đó để thu được các dạng đồng hợp tử tuyệt đối. Tuy nhiên, các phương pháp kinh điển để thu nhận cây đơn bội cho hiệu quả rất thấp. Kỹ thuật tạo cây đơn bội in vitro thông qua kích thích tiểu bào tử phát triển thành cây trong nuôi cấy bao phấn và hạt phấn cho phép nhanh chóng tạo ra hàng loạt cây đơn bội đã là một biện pháp hữu hiệu đối với lĩnh vực ứng dụng đơn bội vào nghiên cứu di truyền và tạo giống cây trồng. Với các thể

đơn bội của thực vật bậc cao người ta có thể sử dụng vào các mục đích:

- Nghiên cứu di truyền về mối tương tác của các gen.
- Tạo đột biến ở mức độ đơn bội.
- Tạo dạng đồng hợp tử tuyệt đối.

4.2. Phương pháp tạo thể đơn bội in vivo

Kể từ khi Bergner phát hiện ra cây đơn bội ở *Datura stramonium* vào năm 1921, các nhà tạo giống thực vật đã tập trung nghiên cứu và thu được nhiều cây đơn bội hoặc trong điều kiện in vitro hoặc trong điều kiện in vivo. Trong tự nhiên, các dạng đơn bội tăng lên do kết quả của sự trinh sản và các cây này hiếm khi mang các đặc điểm của cây bố. Các kỹ thuật in vivo được ứng dụng để sản xuất cây đơn bội như sau:

4.2.1. Sinh sản đơn tính cái (gynogenesis)

Sản xuất các thể đơn bội riêng rẽ bằng cách phát triển các tế bào noãn bất thụ (unfertilised egg-cell) trong trường hợp sự thụ phấn xảy ra chậm. Gynogenesis được tìm thấy khi lai khác loài giữa *Solanum tuberosum* ($2n = 4x$) x *S. phureja* ($2n = 2x$) kết quả tạo ra dạng song đơn bội (dihaploid) là khoai tây ($2n = 2x$).

4.2.2. Sinh sản đơn tính đực (androgenesis)

Sản xuất các thể đơn bội riêng rẽ bởi sự phát triển của tế bào noãn mang nhân của bố. Trong trường hợp này, sự đào thải hoặc bất hoạt của nhân noãn (egg-nucleus) xuất hiện trước khi thụ tinh.

4.2.3. Sự đào thải hệ gen bằng lai xa

Hiện tượng này xảy ra khi lai khác chi và khác loài do sự đào thải chọn lọc của một trong những hệ gen của bố mẹ trong quá trình phát triển sau khi thụ tinh. Vì thế, phôi được tạo thành chỉ với một hệ gen và cây phát triển từ phôi như thể có thể là cây đơn bội. Chẳng hạn: lai khác loài giữa *Hordeum vulgare* và *H. bulbosum* cho ra cây đơn bội *H. vulgare*.

4.2.4. Sự giao phối không hoàn toàn (semigamy)

Quá trình lai mà ở đó nhân của tế bào noãn và nhân sinh sản (generative nucleus) của hạt phấn nảy mầm phân chia độc lập, cho kết quả tạo ra thể khảm đơn bội (haploid chimera).

4.2.5. Xử lý hóa chất

Một số hóa chất, như chloramphenicol và parafluorophenylalanine có thể cảm ứng đào thải một bộ nhiễm sắc thể ở các tế bào hoặc mô soma, làm tăng các thể đơn bội. Xử lý bằng toluene blue, maleic hydrazide, nitrous oxide và colchicine cũng có thể cho các kết quả tương tự.

4.2.6. Shock nhiệt

Xử lý nhiệt độ cao hoặc nhiệt độ thấp có thể có tác dụng trong việc ngăn cản sinh sản hữu tính (syngamy) và cảm ứng thể đơn bội.

4.2.7. Ảnh hưởng của chiếu xạ

Tia X hoặc ánh sáng UV gián tiếp cảm ứng làm đứt gãy nhiễm sắc thể và đào thải chúng, tạo ra các thể đơn bội.

Nhìn chung, các phương pháp in vivo có hiệu suất sản xuất cây đơn bội thấp. Các phương pháp in vitro cho hiệu quả cao hơn nhờ kỹ thuật nuôi cấy hạt phấn (pollen culture) hoặc nuôi cấy bao phấn (anther culture) ở khoảng 250 loài và loài lai. Các loài đặc trưng của họ Solanaceae cho kết quả tốt hơn cả, mặc dù ở các họ Cruciferae, Poaceae, Ranunculaceae và một số họ khác cũng có khả năng cảm ứng tạo cây đơn bội bằng sinh sản đơn tính bao phấn hoặc từ nuôi cấy hạt phấn phân lập.

4.3. Phương pháp tạo đơn bội in vitro

Đơn bội xuất hiện trong nuôi cấy in vitro vào giữa những năm 60. Guha và Maheshawari (1964-1966) đã phát hiện được những cấu trúc giống phôi trong nuôi cấy bao phấn của cà độc dược (*Datura*) và chứng minh được rằng cây đơn bội này xuất hiện từ hạt phấn đơn bội. Năm 1967, Bourgin và Nitsch đã nuôi thành công cây thuốc lá *Nicotiana* đơn bội từ bao phấn tới lúc ra hoa. Cho đến nay, người ta đã thành công trong nuôi cấy bao phấn của nhiều loài như: lúa, lúa mì, ngô, cải, tiêu...

4.3.1. Các phương pháp phát sinh cây đơn bội invitro

Hiện tượng phát sinh cây đơn bội từ các tế bào giao tử đực của thực vật được gọi là sinh sản đơn tính đực (androgenesis). Người ta phân biệt 3 phương thức sinh sản đơn tính đực:

4.3.1.1. Sinh sản đơn tính trực tiếp từ tiểu bào tử

Tiểu bào tử trong bao phấn → Phôi → Cây đơn bội ($n = 1$)

Cấu trúc dạng phôi (embryoid) phát triển trực tiếp từ hạt phấn. Quá trình này thường xảy ra trong bao phấn, điển hình là: *Datura*, *Nicotiana*, *Atropa*.

4.3.1.2. Sinh sản vô tính qua callus

Tiểu bào tử trong bao phấn → Callus → Chồi → Cây đơn bội ($n = 1$)

Cây hoàn chỉnh phát triển từ khối callus, khối mô này thường phát triển ra ngoài bao phấn, ví dụ: *Oryza*, *Brassica*, *Lolium*, *Hordeum*.

4.3.1.3. Sinh sản đơn tính hỗn hợp

Giai đoạn phát triển callus xảy ra rất ngắn và khó nhận biết, ví dụ: *Datura*, *Lycopersicum* (chưa chắc chắn).

4.3.2. Các bước phát triển phôi của hạt phấn

Bình thường sau khi được giải phóng từ tử tử hạt phấn chứa một nhân, giai đoạn này được gọi là giai đoạn hạt phấn đơn nhân. Sau đó nhân chia đôi tạo thành một nhân dinh dưỡng và một nhân sinh sản. Nhân sinh sản lại chia đôi tạo thành hai tinh tử (giai đoạn nảy mầm tạo thành ống phấn) làm nhiệm vụ thụ tinh kép cho noãn và nội nhũ của túi phôi.

Sunderland (1970) cho rằng trong nuôi cấy in vitro, bước phát triển đầu tiên của hạt phấn vẫn xảy ra như bình thường cho tới giai đoạn hai nhân. Quá trình tạo phôi thường bắt đầu từ nhân sinh sản, nhân dinh dưỡng hay cả hai nhân, song chủ yếu là nhân dinh dưỡng, trong khi nhân sinh sản chỉ phân chia một vài lần rồi ngừng hẳn. Có trường hợp ngoại lệ cây đơn bội phát triển từ nhân sinh sản nhưng thường rất yếu. Cũng có ý kiến ngược lại, chẳng hạn Raghavan (1977) cho rằng phần lớn phôi *Hyoscyamus niger* mà ông thu được bằng nuôi cấy bao phấn có nguồn gốc nhân sinh sản.

Về nguyên tắc, thì kỹ thuật nuôi cấy in vitro cho phép tạo được đơn bội bằng nhiều phương thức khác nhau, nhưng phương thức bắt đầu từ tiểu bào tử vẫn là tiện lợi nhất.

4.3.3. Các nhân tố ảnh hưởng đến nuôi cấy bao phấn

4.3.3.1. Kiểu gen của cây cho bao phấn

Kiểu gen của cây mẹ có vai trò rất quan trọng trong việc xác định tần số sản xuất cây hạt phấn. ở lúa mì, tần số cảm ứng của callus hạt phấn và sự tạo thành cây xanh tiếp sau đó được điều khiển bởi nhiều gen. Mỗi kiểu gen khác nhau tương ứng với phản ứng sinh sản đơn tính khác nhau trong nuôi cấy bao phấn. Vì thế, đây là vấn đề cần lưu ý để chọn lọc chỉ các kiểu gen có phản ứng cao, còn hơn là tập trung chú ý đến việc cải thiện các điều kiện cho hệ thống nuôi cấy (một vấn đề phức tạp) trong nuôi cấy bao phấn.

4.3.3.2. Nhân tố thành bao phấn

Hạt phấn của một giống thuốc lá sẽ phát triển thành phôi ngay cả khi chuyển vào bao phấn của một giống khác. Chính kết quả này đã đưa ra khái niệm "nhân tố thành" (wall factor) và nó giúp đỡ cho nhiều nhà nghiên cứu sử dụng "hiệu ứng bảo mẫu" (nursing effect) của bao phấn hoàn chỉnh để phát triển sinh sản đơn tính ở các hạt phấn phân lập của nhiều loài. Dịch chiết của bao phấn cũng có tác dụng kích thích sản xuất phôi hạt phấn (pollen-embryo production).

Các nghiên cứu về mô học (histology) đã xác định vai trò của nhân tố thành bao phấn trong việc phát triển phôi hạt phấn. Một số kết quả nghiên cứu cho thấy glutamine riêng rẽ hoặc phối hợp với serine và myo-inositol có thể thay thế nhân tố thành bao phấn trong các thí nghiệm nuôi cấy hạt phấn phân lập.

4.3.3.3. Môi trường nuôi cấy

Thành phần môi trường nuôi cấy thay đổi tùy thuộc vào kiểu gen và tuổi của bao phấn cũng như các điều kiện mà ở đó cây cho bao phấn sinh trưởng. Sinh sản đơn tính tiêu bào tử ở *Nicotiana tabacum* và *Datura innoxia* có thể được cảm ứng trên môi trường agar đơn giản chỉ chứa sucrose. Hạt phấn tiếp tục phát triển trên môi trường như thế cho đến giai đoạn hình cầu (globular stage). Quá trình sinh trưởng về sau của phôi hạt phấn đòi hỏi bổ sung các muối khoáng vào môi trường. Tuy nhiên, hầu hết các loài thuộc họ Solanaceae chỉ phát triển sinh sản đơn tính trên môi trường nuôi cấy hoàn chỉnh (complete nutrient medium) bao gồm các loại muối khoáng, vitamin và sucrose của Nitsch hoặc MS. Muối Fe ($40 \mu\text{mol/L}$ Fe-EDTA hoặc Fe-EDDHA) dường như quyết định chủ yếu cho sự phát triển phôi của hạt phấn 3 hoặc 4 tuần tuổi trong quá trình nuôi cấy.

Ở các loài không thuộc họ Solanaceae, thành phần môi trường bao gồm: các chất điều khiển sinh trưởng và các hỗn hợp dinh dưỡng phức tạp (như dịch chiết nấm men, dịch thủy phân casein, nước dừa). Môi trường N6 sau đó cũng được sử dụng cho nuôi cấy bao phấn của các loại ngũ cốc khác như lúa, lúa mạch đen. Trong khi nhiều loài cần có auxin và/hoặc cytokinin để cảm ứng sinh sản đơn tính thì đa số các loài thuộc họ Solanaceae chỉ cần môi trường cơ bản. Sucrose là một thành phần không thể thay thế của môi trường, thông thường người ta sử dụng ở nồng độ 2-4% nhưng các loài như *Brassica* cần nồng độ cao hơn (10%). Thay thế sucrose bằng cách bổ sung glutathione, ascorbic acid và glucose cũng có tác dụng tương tự, kích thích sinh sản đơn tính ở lúa mạch đen. Bổ sung than hoạt tính hoặc 2-chloroethyl-phosphate vào môi trường nuôi cấy cũng có tác dụng kích thích sinh sản đơn tính ở một số hệ thống nuôi cấy.

4.3.3.4. Ảnh hưởng của nhiệt độ và ánh sáng

Gây shock nhiệt sẽ tăng tần số sinh sản đơn tính tiêu bào tử. Các nụ được xử lý lạnh ở 3°C hoặc $5^{\circ}\text{C}/72$ giờ kích thích hạt phấn phát triển thành phôi (xấp xỉ 58%) ở một số loài thuộc họ Solanaceae (*Datura*, *Nicotiana*), ngược lại bao phấn được duy trì ở 22°C trong cùng thời gian chỉ cho khả năng phát triển phôi khoảng 21%. Nói chung, gây shock nhiệt từ $2-5^{\circ}\text{C}/72$ có tác dụng kích thích sự phát triển không bình thường của giao tử đực và tích lũy hạt phấn đơn nhân (ức chế sự phát triển tiếp ở các giai đoạn sau).

Cụm hoa hình chùy (panicles) được tách rời của lúa khi xử lý ở $13^{\circ}\text{C}/10-14$ ngày cho tần số hạt phấn tạo callus cao nhất. Cảm ứng sinh sản đơn tính sẽ có hiệu quả cao nếu bao phấn của các loại ngũ cốc khác (lúa, ngô, pennisetum) được bảo quản ở nhiệt độ thấp trước khi nuôi cấy. Một số kết quả nghiên cứu cho thấy tiền xử lý bao phấn ở nhiệt độ 35°C đã kích thích sinh sản đơn tính ở một số loài *Brassica* và *Capsicum*.

Tần số phát sinh cây đơn bội và sinh trưởng của cây nói chung sẽ tốt hơn nếu chúng được nuôi trong điều kiện chiếu sáng, mặc dù cây hạt phấn của một số kiểu gen sinh trưởng trong cả hai điều kiện có chiếu sáng và trong tối. Tuy nhiên, các hạt phấn phân lập dường như miễn cảm với ánh sáng hơn so với bao phấn. Ánh sáng trắng cường độ thấp (low intensity white light) hoặc ánh sáng huỳnh quang đỏ (red fluorescent light) kích thích phát triển nhanh hơn của phôi trong nuôi cấy hạt phấn thuốc lá phân lập so với với ánh sáng trắng cường độ cao.

4.3.3.5. Trạng thái sinh lý của cây cho bao phấn

Bao phấn tách từ cây sinh trưởng trong điều kiện ngày ngắn (8 giờ/ngày) và ở vùng có cường độ ánh sáng cao cho phản ứng tương đối tốt hơn so với cây dài ngày (16 giờ/ngày) có cùng cường độ chiếu sáng. Sự phát sinh phôi hạt phấn có thể được cải thiện nhiều hơn nếu nhiệt độ dưới điều kiện ngày ngắn duy trì ở 18°C. Sự thay đổi mùa vụ thích hợp và tuổi cây cho bao phấn ảnh hưởng lớn đến phản ứng của các hạt phấn. Xử lý cây bằng cách bơm thuốc trừ sâu hoặc các chất độc khác cần phải được tránh. Cây thiếu nitrogen có thể ảnh hưởng xấu đến bao phấn hơn so với cây được cung cấp đủ nitrogen. Vì thế, có thể khuyến cáo rằng chỉ có những nguyên liệu sinh trưởng ở các điều kiện môi trường được điều chỉnh tốt chẳng hạn như nhà kính (greenhouse) mới có thể dùng cho việc sinh sản đơn tính tiểu bào tử.

4.3.4. Những tồn tại trong nghiên cứu đơn bội

Việc kích thích hạt phấn phát triển thành cây đơn bội là một đóng góp rất lớn cho công tác cải thiện giống cây trồng. Nuôi cấy bao phấn hiện nay vẫn chưa đáp ứng được yêu cầu to lớn của công tác giống cây trồng, vì rằng kỹ thuật này mới thành công ở khoảng trên 30 loài của trên 20 chi, chủ yếu ở các chi và loài thuộc họ cà (Solanaceae).

Thời gian qua, người ta đã tiến hành các thí nghiệm với qui mô lớn trên các đối tượng cây trồng ngũ cốc thuộc họ hòa thảo (Poaceae), nhưng kết quả mới hạn chế ở lúa mì và lúa nước.

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

Đối với thuốc lá, môi trường dinh dưỡng để nuôi bao phấn rất đơn giản gồm muối khoáng và sucrose, không cần các chất hữu cơ khác cũng như hormone sinh trưởng.

Thế nhưng để nuôi cấy bao phấn lúa nước và lúa mì thành công các tác giả Trung Quốc phải dùng dịch chiết khoai tây mà thành phần chưa được biết tới. Mặc dù vậy, bao phấn các loài ngũ cốc được nuôi cấy cũng chỉ tạo callus, để có cây hoàn chỉnh phải tiến hành tạo chồi từ callus đó. Và thông thường thì tỷ lệ bạch tạng rất cao,

chẳng hạn: Mix và cs (1977) nhận được 3.400 cây bạch tạng trong số 4.000 cây yên mạch tái sinh từ callus bao phấn.

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

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

Thường là người ta phải nuôi cả bao phấn 4-16 ngày trên một môi trường dinh dưỡng rồi sau đó mới tách riêng hạt phấn để nuôi tiếp tục trên môi trường cũ đó. Hiệu quả của phương pháp này rất cao, đã đạt tới 1.000 phôi/ đĩa petri. Thông qua quá trình nuôi trước đó, môi trường dinh dưỡng được bổ sung thêm những chất cần thiết do bao phấn tiết ra. Glutamine là một thành phần quan trọng, nhưng còn nhiều chất khác vẫn chưa được biết tới.

4.3.5. Hiện tượng bạch tạng trong nuôi cấy đơn bội

Ở các đối tượng cây hai lá mầm như *Datura*, *Atropa*, *Nicotiana*, *Brassica*... khi nuôi cấy bao phấn cây đơn bội thường phát triển trực tiếp từ tiểu bào tử và ít khi xuất hiện cây bạch tạng. Nhưng ở những đối tượng cây một lá mầm như lúa nước (*Oryza*), lúa mì (*Triticum*)... cây hoàn chỉnh phát sinh thông qua giai đoạn callus thì tần số cây bị bạch tạng chiếm khá cao (20-30 % hoặc cao hơn nữa). Tần số cây bạch tạng phụ thuộc vào các yếu tố sau:

- Tuổi callus cây chuyển từ môi trường tạo mô sẹo sang môi trường tái sinh cây.

Càng cấy chuyển muộn tần số bạch tạng càng cao.

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

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

Cũng có giả thuyết giải thích hiện tượng bạch tạng là kết quả của hiệu ứng mẹ:

Hiệu ứng mẹ biểu hiện rõ ở một số đặc điểm di truyền tế bào chất. Khi thụ phấn chỉ có nhân của tế bào sinh sản đực được chuyển sang tế bào noãn. Vì vậy, các tính trạng di truyền tế bào chất chỉ di truyền theo đường mẹ. Hạt phấn là tế bào chứa rất ít nguyên sinh chất, tức là số lượng ty thể và tiền lạp lạp cũng rất ít. Khi nuôi những tế bào này thành những cá thể thực vật hoàn chỉnh có thể xảy ra hiện tượng mất cân đối trong tương tác di truyền giữa nhân và cơ quan tử, dẫn đến sai lệch trong quá trình phát sinh

cơ quan tử, đặc biệt là lục lạp.

4.4. Ứng dụng của thể đơn bội

4.4.1. Nghiên cứu về phôi học thực nghiệm

Chủ yếu trên các đối tượng mà phôi phát triển trực tiếp từ tiểu bào tử trong nuôi cấy bao phấn thông qua quá trình phát sinh phôi đơn tính, còn gọi là sinh sản đơn tính đực (androgensis).

4.4.2. Nghiên cứu về tế bào học

Cây đơn bội có thể sinh trưởng và phát triển tới giai đoạn ra hoa, nhưng bất dục. Khi nghiên cứu quá trình phân bào giảm nhiễm đầu tiên của tế bào mẹ hạt phấn cây đơn bội có thể phát hiện được mối quan hệ tương tác giữa các nhiễm sắc thể, bởi vì bộ nhiễm sắc thể đơn bội không thể giảm nhiễm bình thường được, ví dụ:

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

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

4.4.3. Nghiên cứu đột biến và di truyền

Trong hệ gen (genome) của thể đơn bội không có quan hệ tính trội mà chỉ có quan hệ bổ sung giữa các gen, do đó các thể đơn bội là những nguyên liệu lý tưởng trong chọn dòng đột biến cũng như trong những nghiên cứu về mối tương tác của các gen.

4.4.4. Cải thiện giống cây trồng

4.4.4.1. Tạo dòng thuần

Thông thường bằng phương thức tự phối nếu muốn thu được dòng đồng hợp tử của hệ gen $2x$ thì phải qua 10 thế hệ và bộ gen $4x$ thì phải qua 30 thế hệ. Bằng nuôi cấy đơn bội và đa bội chỉ cần một thế hệ.

Khi so sánh hiệu quả chọn giống bằng các phương pháp khác nhau người ta thấy rằng phương pháp đơn bội có ưu thế khi:

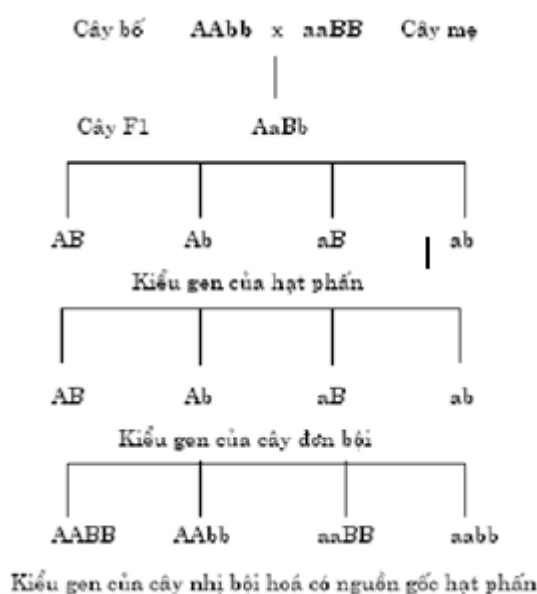
- Gen có tương tác di truyền.
- Bộ nhiễm sắc thể rất dị hợp.

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

Ở những trường hợp tính di truyền không ổn định thì phương pháp đơn bội có hiệu quả hơn.

4.4.4.2. Tạo cây từ hạt phấn của các dòng lai F1

Kỹ thuật nuôi cấy bao phấn và hạt phấn trên môi trường tổng hợp đã được sử dụng rộng rãi vào nhiều mục đích khác nhau. Kết quả công bố gần đây trên thế giới cũng như trong nước cho thấy: phương pháp tạo cây từ hạt phấn của các dòng lai F1 không chỉ rút ngắn thời gian tạo giống mà còn đơn giản hóa quá trình chọn giống.



Ví dụ: Một giống mang gen A chống chịu một bệnh nấm lai với một giống mang gen B cũng chống chịu bệnh do một loại nấm khác gây ra .

Theo sơ đồ, bằng phương pháp tạo cây từ hạt phấn sẽ nhận được bốn kiểu gen (genotype) đồng hợp khác nhau, trong đó xác suất xuất hiện kiểu gen chống được cả hai loại bệnh nấm (AABB) là 1/4. Nếu so với phương pháp chọn lọc thông thường thì xác suất xuất hiện kiểu gen AABB là 1/16.

Mặt khác, nhà chọn giống sẽ không thể phân biệt được cây đồng hợp AABB với các cây dị hợp như AABb, AaBb vì chúng đều giống nhau về kiểu hình (phenotype). Do đó bắt buộc nhà chọn giống phải tiếp tục chọn lọc ở các thế hệ tiếp theo. Kinh nghiệm cho thấy bằng phương pháp chọn lọc thông thường cho đến đời thứ năm, người ta vẫn chưa chọn được các dòng đồng hợp tử mong muốn ở các giống tự thụ phấn.

Bảng 4.1 Các kiểu gen của cây F2

Kiểu gen giao tử cái	AB	Ab	aB	ab
Kiểu gen giao tử đực				

AB	AABB	AABb	AaBB	AaBb
Ab	AABb	AAbb	AaBb	Aabb
aB	AaBB	AaBb	aaBB	aaBb
ab	AaBb	Aabb	aaBb	aabb

Trường hợp tổng quát, nếu kiểu gen của cây F1 là dị hợp từ một gen đến n gen (các gen này không nằm trên cùng một nhóm liên kết) thì ở cây F2 sẽ phân ly tính trạng theo bảng

Bảng 4.2. Sự phân ly tính trạng của các cây F2 dị hợp

N	2^n	3^n	4^n
1	2	3	4
2	4	9	16
3	8	27	64
4	16	81	256
.....
12	4096	531441	16777216
.....

n : số gen có chứa các alen khác nhau ở hai nhiễm sắc thể đồng dạng

2^n : số giao tử khác nhau về hệ gen (genome); hoặc số kiểu gen đồng hợp nhận được ở F2; hoặc số kiểu gen đồng hợp có thể nhận được bằng phương pháp tạo cây từ hạt phấn ở F2.

3^n : Số kiểu gen khác nhau nhận được ở F2

4^n : Tổng số kiểu gen nhận được ở F2 theo lý thuyết

Ví dụ ở lúa có 12 cặp nhiễm sắc thể $2n = 24$. Nếu tất cả các nhiễm sắc thể đồng dạng đều không giống nhau từng đôi một thì ở F2 người ta sẽ thu được 531.441 kiểu gen khác nhau, trong đó có 4.096 kiểu gen đồng hợp. Vì vậy, trong phương pháp truyền thống, nhà chọn giống phải rất tinh tế và phải qua nhiều thế hệ mới có thể chọn lọc được một vài dạng đồng hợp mang những đặc điểm mong muốn. Xác suất chọn lọc trong trường hợp này ở F2 sẽ là: $X = 1/16.777.216$ (X là số dòng đồng hợp tử cần chọn) so với trường hợp cây từ hạt phấn có thể thu được 4.096 dòng thuần khác nhau: thì xác suất là $X = 1/4.096$.

Ngoài ra, người chọn giống có thể dễ dàng phân biệt các kiểu gen khác nhau vì ở trạng thái đồng hợp, các đặc tính kiểu hình được biểu hiện rõ rệt. Như vậy, bằng

phương pháp tạo cây từ hạt phần có thể rút ngắn thời gian và đơn giản hóa quá trình chọn giống.

Cho tới nay người ta đã biết hai trường hợp phát triển khác nhau của cây từ hạt phần nuôi cấy in vitro:

1. Cây xuất hiện thẳng từ hạt phần không qua giai đoạn mô sẹo

Ví dụ: ở các loại cây cà *Datura innoxia*, thuốc lá *Nicotinna tabacum*, cải dầu *Brassica napus* ...

2. Cây xuất hiện từ hạt phần qua giai đoạn mô sẹo

Ví dụ: ở các loài bắp cải *Brassica oleracea*, lúa *Oryza sativa*, lúa mạch *Hordeum vulgare*, ngô *Zea mays*, lúa mì *Triticum satium*...

Cây thuốc lá là ví dụ điển hình cho trường hợp thứ nhất: các cây đồng hợp tử phát triển từ dòng lai F1 theo sơ đồ sau:

Xử lý colchicine → Bao phần hoặc hạt phần → Cây đơn bội → Cây nhị bội

Mô sẹo

Ở thuốc lá, người ta có thể tạo cây nhị bội bằng hai phương pháp xử lý cây đơn bội bằng colchicine (Tanaka M., Nakata, 1969) hoặc:

1. Tạo mô sẹo từ các bộ phận khác nhau của cây đơn bội

2. Tạo cây từ mô sẹo trên môi trường thích hợp

Phương pháp này dựa trên hiện tượng tự đa bội hóa của tế bào trong quá trình nuôi cấy in vitro. Lần đầu tiên Nitsch và cộng sự (1969) ứng dụng để nhận được cây thuốc lá nhị bội từ mô sẹo đơn bội. Sau đó nhiều nhà khoa học khác cũng ứng dụng phương pháp của Nitsch để nhận các dòng nhị bội đồng hợp tử (Kasperbauer và Collins, 1972; Iman và Ternovski, 1975). Nisch và Mitsuoka (1969), Niizeki và Oono (1971), Woo và Chen (1982) đã quan sát thấy mô sẹo và cây lúa tái sinh từ hạt phần in vitro tồn tại ở các mức bội thể rất khác nhau. Kết quả nghiên cứu trên cây lúa qua nhiều lần quan sát cho thấy mức bội thể ở mô sẹo mới xuất hiện dưới 5 ngày như sau: đơn bội 78,38%; nhị bội 11,74%, số còn lại là mô sẹo ở các mức đa bội khác từ 3n đến 5n. Cây lúa xuất hiện từ mô sẹo cũng có mức đa bội thể khác nhau, trong số 168 cây nhận được từ hạt phần có 62% là cây nhị bội, 35% cây đơn bội, số còn lại là tam bội. Một số tác giả khác cũng đã nhận được hơn 50% cây nhị bội tự nhiên từ hạt phần khi nuôi cấy bao phần in vitro. Các cây nhị bội này là đồng hợp, các thể hệ sau đó rất đồng đều, giống nhau và giống cây mẹ ở mọi đặc điểm quan sát.

Kết hợp với Viện Cây lương thực và Cây thực phẩm (Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn), Viện Di truyền Nông nghiệp đã tiến hành nghiên cứu tạo cây lúa từ hạt phần của các dòng lai F1 vụ mùa năm 1977, hạt của các cây này đã được thu hoạch và

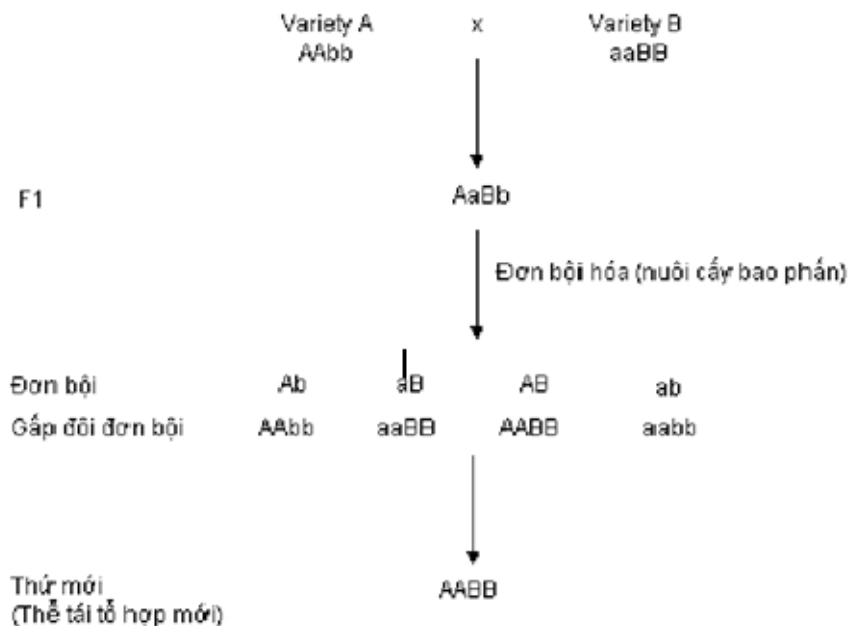
gieo vào vụ mùa năm sau cũng cho ra các cây rất đồng đều. Như vậy, chỉ sau một năm chúng tôi đã nhận được nhiều dòng đồng hợp tử từ các dòng lai (Đỗ Năng Vịnh và CS, 1979).

4.4.4.3. Nghiên cứu tạo cây từ hạt phấn của các giống thuần

Kết quả nghiên cứu gần đây cho thấy một số giống lúa mặc dù đã được thuần hóa lâu năm và sinh sản bằng tự phối vẫn có thể tồn tại ở mức dị hợp tử nhất định. Đã nhận được các dòng lúa khác nhau từ hạt phấn của cùng một giống: giống cườm và giống 63 - 83. Nuôi cấy bao phấn giống cườm chúng tôi đã Bao phấn nuôi cấy in vitro Mô sẹo 1n, 2n, 3n, 4n, 5n, ... Cây 1n: Xử lý colchicine Cây 2n Cây đa bội khác nhận được một số dòng cườm khác nhau về chiều cao cây và thời gian sinh trưởng, có dòng cườm hạt có râu rất dài. Nuôi cấy bao phấn giống 63 - 83 chúng tôi đã nhận được dòng 63 - 83 lùn, ra hoa kết hạt bình thường, chiều cao cây chỉ bằng một nửa so với chính giống 63 - 83. Như vậy, bằng phương pháp tạo cây từ hạt phấn các dòng lai hoặc từ các giống thuần, người ta có thể nhận được các dòng đồng hợp tử khác nhau (do phân ly hoặc do đột biến). Các dòng này có thể làm nguyên liệu cho nghiên cứu di truyền chọn giống. Nhiều tác giả nước ngoài cũng thông báo nhận được kết quả tương tự.

Các kỹ thuật giống cây trồng đơn bội thường bao gồm chỉ một chu kỳ tái tổ hợp giảm nhiễm. Tuy nhiên, nhiều phẩm chất nông học như năng suất được điều khiển bởi đa gen. Một chu kỳ tái tổ hợp thường không đủ cho sự cải thiện các tính trạng chất lượng như thế vì lẽ mối liên kết giữa các đa gen sẽ không giải phóng tất cả biến dị tiềm tàng trong khi lai. Để vượt qua sự bất lợi này, ở Trung Quốc người ta đã phát triển phương pháp nuôi cấy bao phấn tổ hợp bằng cách lai hữu tính giữa các kiểu gen khác nhau của các cây có nguồn gốc bao phấn. Bao phấn của thế lai thế hệ F1 sẽ là nguyên liệu tạo giống lý tưởng để phát triển số lượng các cây đồng hợp tử có nguồn gốc từ hạt phấn (thể đơn bội kép-double haploid) trong đó các đặc điểm bổ sung của bố mẹ được tổ hợp trong một thế hệ.

Các thể đơn bội kép cũng rất hữu ích trong nghiên cứu di truyền của các tính trạng thuộc về phẩm chất. Trong các lĩnh vực tạo giống cây trồng, các cá thể song đơn bội có nguồn gốc từ nuôi cấy hạt phấn biểu hiện khả năng biến động di truyền (genetic variability) trong một phạm vi tương đối rộng. Bằng phương thức cảm ứng đơn bội theo cách gấp đôi nhiễm sắc thể, người ta có khả năng thu được các cây đực riêng biệt ở các loài khác gốc (dioecious species)



Sơ đồ 4.1. Ứng dụng của hệ thống gấp đôi đơn bội F1 trong việc giải phóng các thể tái tổ hợp mới.

4.4.4.4. Nghiên cứu đột biến, gây đột biến ở các dạng đơn bội và chọn lọc

Nuôi cấy và tái sinh cây từ các dạng đơn bội khác nhau (hạt phấn, tế bào đơn, tế bào trần, mô sẹo đơn bội) kết hợp với kỹ thuật đột biến và chọn dòng có thể cung cấp nguyên liệu quý cho nghiên cứu trao đổi chất và di truyền chọn giống. Vì tế bào đơn bội chỉ chứa một đơn vị gen nên kỹ thuật đột biến có thể làm thay đổi hoặc mất chức năng gen không có sự hỗ trợ của các alen khác. Các đột biến lặn do vậy cũng được biểu hiện ngay từ đầu. Bên cạnh đó cây nhị bội tái sinh từ các tế bào đơn bội sẽ hoàn toàn đồng hợp và không bị khảm như trong trường hợp xử lý đột biến các dạng nhị bội và đa bội. Bằng kỹ thuật gây đột biến các dạng đơn bội, có thể chọn ra các dòng tế bào và cây chống chịu độc tố do nấm và vi khuẩn gây bệnh tiết ra, các dòng tế bào và cây có đột biến sinh hóa hoặc các dòng tế bào có khả năng sản xuất một lượng lớn sản phẩm thứ cấp quan trọng như alkaloid, chất thơm, các loại nhựa và enzym sử dụng trong công nghiệp, y học.

Người ta đã chọn ra các dòng tế bào chống chịu được các chất kháng sinh, độc tố nấm và vi khuẩn gây bệnh. Binding H., Bingding K., và Straub J. (1970) đã nhận được mô sẹo chống chịu streptomycine khi nuôi cấy *Petunia hybrida* đơn bội. Carlson (1973) cũng đã tạo được dòng tế bào chống chịu chất tương tự methionine (methionine analogue) là methionine sulphocimine, có cấu trúc gần với độc tố của vi khuẩn gây bệnh *Pseudomonas tabaci*. Cây từ dòng tế bào chống chịu này đã có khả năng chống

bệnh tốt hơn cây bình thường. Maliga và cộng sự (1973) cũng công bố tạo được cây chống chịu streptomycine từ mô sẹo đơn bội thuốc lá.

Người ta cũng đã tạo được các dòng đột biến sinh hóa. Tulecke (1960) lần đầu tiên tách được các dòng đột biến hạt phân dị dưỡng arginine bằng nuôi cấy hạt phân cây Ginkgo trên môi trường có chứa arginine. Wildholm (1972) đã tách ra các dòng tế bào cà rốt và thuốc lá chống chịu một vài đồng đẳng của axit amin. Các dòng thuốc lá chọn được có khả năng tổng hợp L - tryptophane gấp 18 lần tế bào bình thường.

Như chúng ta đã biết hạt của đa số các cây lương thực thường thiếu một hay vài axit amin như tryptophane, lysine, threonine, methionine là các axit amin rất quan trọng đối với người và động vật (Nelson, 1969). Vì vậy, việc chọn ra các dòng đột biến sinh hóa giàu axit amin ở các cây lương thực là rất quan trọng và có thể thực hiện được bằng phương pháp gây đột biến và chọn dòng tế bào (S. C. Woo và C. C. Chen, 1982). Kỹ thuật này đã được ứng dụng rộng rãi trong nuôi cấy tế bào cây dược liệu.

Phương pháp nuôi cấy mô và tế bào đơn bội kết hợp với kỹ thuật gây đột biến và chọn dòng hứa hẹn nhiều ứng dụng quan trọng trong nghiên cứu di truyền chọn giống. Song phương pháp này còn vấp phải một số khó khăn như tỷ lệ tái sinh cây từ hạt phân nói chung thấp và nhiều dòng tế bào chọn lọc được với những đặc tính quý nhưng chưa tái sinh thành cây. Một khi những khó khăn đó được giải quyết thì giá trị thực tiễn của phương pháp này sẽ rất khả quan.

Chọn lọc các đột biến kháng bệnh là một hướng nghiên cứu quan trọng trong cải thiện giống cây trồng. Cây đơn bội cung cấp một hệ thống tương đối dễ dàng cho việc tạo ra các đột biến. Vì thế, chúng được ứng dụng để chọn lọc nhanh các đột biến mang tính kháng bệnh. Người ta đã nuôi cấy bao phấn để chọn đột biến kháng bệnh đen cuống hoa (black shank) ở thuốc lá và kháng bệnh nấm vảy (*Fusarium graminearum*) ở lúa mì.

4.4.4.5. Phát triển các dòng vô tính ở các loài cây thân gỗ lâu năm

Một số tác giả Trung Quốc đã thu được cây cao su có nguồn gốc hạt phân cao hơn 6 m là những cây sau đó có thể nhân bằng phương thức nhân giống vô tính. Ví dụ tương tự là cây bạch dương, cây mâm đơn bội được dùng để chọn lọc các kiểu gen mong muốn, và được gấp đôi tự nhiên thành cây nhị bội sau 7-8 năm. Các cây đơn bội nguồn gốc hạt phân cũng đã thu được ở một loài cây thân gỗ lâu năm như *Aesculus hippocastatum*, *Citrus microcarpa*, *Vitis vinifera*, *Malus prunifolia*, *M. pumila*, *Litchi chinensis*, *Euphoria longan*, *Ponocirus trifoliata*, *Lycium halimifolium*, *L. barbarium*, *L. chinensis* và *Camellia sinensis*.

4.4.4.6. Chuyển các gen ngoại lai mong muốn

Thông qua quá trình lai và nuôi cấy bao phấn, phương thức tạo giống cây trồng hạt

phần tiêu chuẩn có thể được phát triển ở lúa để chuyển các gen cho năng suất cao và kháng bệnh khô héo

4.4.4.7. Thiết lập các dòng tế bào đơn bội và nhị bội của cây hạt phấn

Kỹ thuật nuôi cấy bao phấn được sử dụng để tạo dòng tế bào soma đơn bội và nhị bội của cây hạt phấn ở lúa mì và ngô. Tương tự, dòng thuốc lá đơn bội kháng methionine sulfoxomide (MSO) đã được chọn lọc, dòng này đồng nhất kiểu hình và có hiệu lực đối với độc tố được sản xuất do tác nhân gây bệnh *Pseudomonas tabaci*.

4.5. Ứng dụng kỹ thuật đơn bội trong tạo giống mới và dòng thuần ở ngô, lúa

4.5. 1. Cây lúa

Nhờ kỹ thuật nuôi cấy bao phấn lúa có thể rút ngắn thời gian chọn giống mới xuống từ 4 đến 6 thế hệ và tạo ra hàng loạt các dòng thuần mới. Trung Quốc là một trong những nước đầu tiên triển khai công nghệ đơn bội trong tạo giống lúa với quy mô lớn. Vào những năm 1976, những giống lúa đầu tiên từ chọn giống đơn bội kép đã được sản xuất thương phẩm (Yin *cs.*, 1976). Hàng trăm giống lúa mới được tạo ra và trồng trên diện tích hàng triệu hecta (Jia S.R., 1992). Tại Triều Tiên, kỹ thuật nuôi cấy bao phấn đã tạo ra 24 giống lúa lùn mới (Jain *cs.*, 1997; Sasson, 1993).

Thành tựu nuôi cấy mô hứa hẹn nhiều triển vọng đối với chọn tạo giống lúa là tái sinh cây lúa từ nuôi cấy hạt phấn tách rời ở cả hai dạng lúa nước Japonica và Indica do Raina và Irfan công bố gần đây (Raina và Irfan, 1998). Trên 500 phôi đã được tái sinh từ khoảng 80.000 hạt phấn nuôi cấy trong đĩa petri đường kính 3,5 cm. Rất nhiều cây đã được tái sinh từ hạt phấn. Đây là một tiến bộ kỹ thuật đặc biệt quan trọng ở cây ngũ cốc, có thể mở ra triển vọng mới trong chọn tạo giống lúa bằng kỹ thuật đơn bội và kỹ thuật gen. Theo lý thuyết, từ một cặp lúa lai F1 có thể tạo ra 4.096 kiểu gen đồng hợp khác nhau tái sinh từ hạt phấn *in vitro* (Đỗ Năng Vịnh và Phan Phái, 1996). Kỹ thuật nuôi cấy hạt phấn tách rời hứa hẹn có thể tạo ra vô số các nguồn gen đa dạng cho chọn giống. ở nước ta, công nghệ đơn bội được áp dụng với hai mục tiêu chính sau:

- Cố định ưu thế lai thông qua việc rút ngắn thời gian tạo giống thuần chủng bằng phương pháp nuôi cấy bao phấn con lai F1
- Tạo dòng thuần có những đặc tính thích nghi với thụ phấn chéo và mang gen kết hợp rộng Tại Viện Di truyền Nông nghiệp, phương pháp nuôi cấy bao phấn kết hợp với chọn dòng biến dị đã tạo ra 50 dòng bất dục đực cảm ứng nhiệt độ (TGMS) mới, trong đó 5 dòng đã được xác định là có tính bất dục ổn định, có ưu thế lai cao khi lai tạo và đang được sử dụng trong chọn giống lúa lai hai dòng.

Bằng phương pháp nuôi cấy bao phấn đã tạo ra 12 dòng giống thuần có ưu thế lai gần tương đương con lai F1. Các dòng giống có triển vọng gồm: DT26, DT29, DT32, J1,

AC22, AC23, AC24, AC25... đang được khảo nghiệm. Nhờ nuôi cấy bao phấn lúa có thể rút ngắn thời gian chọn giống mới xuống từ 4 - 6 thế hệ. Kỹ thuật đơn bội in vitro cũng đang được triển khai mạnh trong chọn giống ở Viện lúa Đồng bằng Sông Cửu Long, Viện Công nghệ sinh học, vv...

Hiện nay, công nghệ nuôi cấy bao phấn và hạt phấn tách rời được dùng phổ biến cho các mục đích sau:

- Cố định ưu thế lai và các gen hữu ích

Thông qua kỹ thuật nuôi cấy bao phấn, người ta có thể cố định ưu thế lai và các gen hữu ích từ con lai F1 có ưu thế lai cao, làm tăng năng suất lúa (M.S. Swaminathan, 1995; Chen cs., 1978; Narayanan cs., 1996; Siddiq cs., 1994; Rangasamy, 1994, 1996; Zhu De Yao, 1998). Nuôi cấy bao phấn lúa lai Indica/Indica đã thu được các dòng có năng suất cao hơn bố mẹ và bằng 93,2% so với con lai F1 (Batachandran cs., 1994).

- Tạo các dòng bất dục đực mới và các dòng mang gen kết hợp rộng cho tạo giống lúa lai

Duy trì tính trạng bất dục đực và khả năng kết hợp của dòng thuần là yếu tố tiên quyết trong tạo giống lúa lai. Hiện nay, sản xuất lúa lai ở nước ta vẫn phải phụ thuộc rất lớn vào nhập khẩu giống lai từ Trung Quốc. Để tạo ra các dòng bất dục đực mới, các dòng B tiềm năng và rút ngắn quá trình tạo giống, người ta đã kết hợp lai, lai xa với nuôi cấy bao phấn (Dalmacio cs., 1995; Quing and Han, 1990). Kết quả nhiều công trình cho thấy kỹ thuật nuôi cấy bao phấn của con lai Japonica/Indica, Javanica/Indica là con đường nhanh và có hiệu quả để phát triển các dòng phục hồi mang gen kết hợp rộng trong tạo giống lúa lai (Yan J. Q cs., 1996; Virmani, 1996).

Để chọn tạo các dòng bất dục đực nhân với các nền di truyền khác nhau, nuôi cấy bao phấn con lai F1 mang gen bất dục đực nhân sẽ cho phép tạo ra các dòng thuần bất dục đực nhân mới chỉ sau một lần nuôi cấy bao phấn (Nin Jin cs., 1997; Q.R. Chu cs., 1998a, 1998b).

- Lai xa kết hợp với nuôi cấy mô tế bào trong chọn tạo các dòng kháng sâu bệnh và các điều kiện bất thuận của môi trường:

Người ta đã tạo được các con lai khác loài để chuyển gen kháng từ lúa dại vào lúa trồng. Tuy nhiên, khó khăn gặp phải khi lai là tính không tương hợp. Phương pháp cứu phôi và nuôi cấy bao phấn đã có hiệu quả trong việc tạo ra cây từ các cặp lai khác loài. Bằng phương pháp này người ta đã tạo được giống lúa có gen kháng chuyển từ lúa dại *O. officianlis* và *O. austrasiensis*, kháng với ba biotype của rầy nâu (Jena and Khush, 1997; Multani, 1994). Tương tự, các gen kháng bệnh đạo ôn, bạc lá đã được chuyển từ *O. minuta* để cải thiện nguồn gen kháng bệnh đạo ôn, bạc lá đã được chuyển từ *O. minuta* để cải thiện nguồn gen của lúa (Brar and Khush, 1977;

Batachandran cs., 1994).

- Tối ưu hoá môi trường nuôi cấy bao phần chọn tạo giống lúa hạt dài chất lượng cao: Tại trường tổng hợp Louisiana (Mỹ), người ta đã xây dựng "Chiến lược chọn giống lúa hạt dài ưu việt cho miền Nam nước Mỹ" bằng nuôi cấy bao phần lúa. Các giống lúa hạt dài có khả năng tái sinh yếu, tỷ lệ 0,5%. Bằng tối ưu hoá môi trường nuôi cấy, hàng năm họ đã tạo được trên 8.000 dòng thuần đơn bội kép từ nuôi cấy bao phần của các cặp lai F1 hạt dài. Mục tiêu là chọn ra các giống lúa hạt dài có giá trị thương mại cao. Nhiều dòng tỏ ra có chất lượng hạt cao, chống chịu bệnh đạo ôn tốt hơn và tăng năng suất so với đối chứng, có dòng tăng 25% năng suất (Chu và CS, 1998; 2000).

- Kỹ thuật nuôi cấy hạt phần tách rời ở lúa

Hiện nay nuôi cấy hạt phần tách rời đang thu hút sự chú ý của các nhà nghiên cứu do hiệu quả cao. Quy trình có thể là tái sinh cây trực tiếp từ hạt phần (Mahdal cs, 1996; Zhuo cs, 1996) hay tái sinh cây thông qua giai đoạn mô sẹo (Wang cs, 1995). Raina và Irffran (1998) cho biết từ một đĩa petri đường kính 3,5 cm đã tạo được 500 phôi từ các hạt phần lúa nuôi cấy hạt phần tách rời. Kỹ thuật nuôi cấy hạt phần tách rời kết hợp với phương pháp tạo phôi vô tính trong các bioreactor chắc chắn sẽ mở ra triển vọng lớn cho kỹ thuật chọn giống trên quy mô lớn.

- Nuôi cấy bao phần kết hợp với các chỉ thị phân tử (CTPT) để tạo dòng thuần và chọn dòng, giống mang gen kháng sâu bệnh:.

Phương pháp chọn giống nhờ các chỉ thị phân tử (marker-assisted selection-MAS) là một phương pháp chọn giống mới đang áp dụng khá rộng rãi ở nhiều cây trồng. Phương pháp này cho phép xác định nhanh, chính xác sự có mặt của các gen mong muốn, do vậy có thể hỗ trợ cho chọn giống. Chọn giống nhờ chỉ thị phân tử khắc phục được hạn chế của các phương pháp truyền thống, tiết kiệm công sức và rút ngắn đáng kể thời gian tạo giống mới. Nó đặc biệt có hiệu quả khi ta phải quy tụ nhiều gen (kể cả các gen lặn) vào một giống mà các phương pháp chọn dòng theo kiểu hình truyền thống gặp rất nhiều khó khăn, thậm chí đôi khi không thể thực hiện được.

Bệnh bạc lá gây ra bởi *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) là một trong các bệnh nguy hại nhất ở lúa. Người ta đã xác định được ít nhất 18 gen kháng bệnh bạc lá lúa (Konoshita, 1991). Gen kháng bạc lá Xa 21 là một gen trội, có nguồn gốc từ giống lúa đại O. *longistaminata* được chuyển vào các giống lúa Japonica (Song cs., 1995) và các giống Indica (Tu cs., 1998). Huang và cộng sự đã quy tụ bốn gen kháng bạc lá Xa4, Xa5, Xa13 và Xa21 vào giống lúa NH 56. Kết quả giống này đã tỏ ra kháng bệnh bạc lá tốt hơn so với giống IRBB21 chỉ mang một gen Xa21. Gen kháng bệnh đạo ôn ở lúa và số chủng nấm gây bệnh đạo ôn hết sức đa dạng. Konoshita (1991), Mackill và Bonman (1992) cho biết có 30 locus gen kháng đạo ôn ở lúa, trong đó 20 locus kháng

bệnh chính và 12 locus chính không liên quan với nhau. Nhiều giống kháng bệnh đạo ôn đã được xác định và tạo ra như giống tế tếp của nước ta mang bốn gen kháng bệnh đạo ôn, giống 5173 chứa gen Pi- 2(t) kháng bệnh đạo ôn; giống IR20 có gen Pi-20, giống IR64 có gen Pi-20 và gen Pi-ta. Các giống này đã góp phần ngăn chặn bệnh đạo ôn ở nhiều nơi. Để phát triển các giống lúa chịu hạn, việc nghiên cứu các đặc điểm của rễ lúa: mật độ, độ sâu (Fukai và Cooper, 1995), khả năng điều tiết áp suất thẩm thấu là rất quan trọng. Việc lập bản đồ phân tử lúa liên quan đến các đặc điểm có lợi cho tính chịu hạn của rễ đã được tiến hành ở một số phòng thí nghiệm (Yadav cs., 1997; Champoux cs., 1995). Từ những công trình này, bước đầu đã xác định một số chỉ thị phân tử liên quan đến đặc điểm rễ có lợi cho tính chịu hạn, đặc biệt là độ dày, độ ăn sâu, tỷ lệ rễ ăn sâu/thân... Các chỉ thị này có thể dùng trong chọn giống với sự trợ giúp của marker phân tử.

Các bước chọn giống có thể tiến hành theo trình tự sau:

- Lai giống có các đặc tính nông học và chất lượng ưu việt với giống mang gen kháng để tạo ra dòng lai F1
- Nuôi cấy bao phấn con lai F1, tạo ra dòng thuần với các đặc tính khác nhau
- Sử dụng kỹ thuật chỉ thị phân tử để chọn các dòng thuần mang gen kháng bệnh
- Khảo nghiệm các dòng thuần chọn lọc trong những điều kiện sản xuất khác nhau để chọn giống tốt, kháng bệnh.

4.5.2. Cây ngô

Ở ngô, việc ứng dụng kỹ thuật đơn bội trong thực tiễn chọn tạo giống còn đang gặp nhiều khó khăn và hạn chế:

- Khả năng tái sinh cây từ bao phấn và noãn nuôi cấy in vitro nói chung còn thấp và phụ thuộc rất nhiều vào kiểu gen (genotype). Một số giống có phản ứng trong nuôi cấy rất cao, nhưng hầu hết các giống đều có phản ứng thấp hoặc không phản ứng. Hiệu quả tái sinh cũng đạt thấp, chỉ 3-5% phôi có thể tái sinh thành cây.
- Tàn suất các cây đơn bội kép thu được từ nuôi cấy bao phấn rất thấp (chỉ 20% số cây thu được là đơn bội kép). Khả năng làm nhị bội hoá các cây đơn bội để thu nhận các dòng nhị bội đồng hợp còn rất thấp.
- Phương pháp nuôi cấy noãn chưa thụ tinh có thể là một phương pháp thay thế khắc phục được một số hạn chế trong nuôi cấy bao phấn, nhưng còn rất ít nghiên cứu theo hướng này.

Mặc dù vậy, kỹ thuật nuôi cấy bao phấn ngô để thu nhận các dòng đơn bội kép đã được ứng dụng thành công ở một số nước. ở Trung Quốc, hơn 100 dòng thuần đã thu được từ 30 tổ hợp khác nhau (Wu và cs., 1983), một số giống được áp dụng trong tạo

giống lai và đã được sử dụng trong sản xuất như AC 4115, Elite DK 524... (Genovesi, 1987).

Kỹ thuật nuôi cấy bao phấn ngô:

4.5.2.1. Các giai đoạn phát triển khác nhau của hạt phấn ngô

Ở mức độ *in vivo*, tiếp theo sau quá trình phân chia giảm nhiễm của tế bào, các hạt phấn đơn bội đơn nhân được giải phóng ra khỏi tứ tử rồi trải qua hai lần phân bào nguyên phân để thu được một hạt phấn ba nhân (Pescitelli và Petolino. 1988). Giai đoạn đơn nhân sớm có đặc điểm kích thước nhân tương đối lớn chiếm 1/3 đến 1/2 thể tích tế bào. Đến giữa giai đoạn đơn nhân các hạt phấn có kích thước lớn hơn, nhân nhỏ hơn với sự hình thành của không bào trung tâm lớn, nhân bị đẩy về phía đối diện với lỗ hạt phấn (pollen pore). Đến cuối giai đoạn đơn nhân tế bào hạt phấn có thể tích tăng lên và trải qua lần phân bào nguyên phân lần thứ nhất. Đến đầu giai đoạn hai nhân, các nhân giống nhau về kích thước nhưng ngay sau đó bắt đầu biệt hoá, nhân sinh dưỡng có kích thước lớn hơn. Tới cuối giai đoạn hai nhân, nhân này di trú đến phía đối diện và nằm gần lỗ hạt phấn, nhân sinh sản di trú về phía lỗ hạt phấn rồi trải qua sự phân bào nguyên phân lần thứ hai để thu được một hạt phấn ba nhân.

4.5.2.2. Phát triển của hạt phấn trong nuôi cấy bao phấn *in vitro*

Trong kỹ thuật nuôi cấy *in vitro*, các cây đơn bội có thể hình thành trực tiếp thông qua phát sinh phôi hoặc gián tiếp qua hình thành mô sẹo.

Trong quá trình nuôi cấy bao phấn *in vitro*, chỉ một tỷ lệ nhỏ các hạt phấn trải qua quá trình phát triển thể giao tử *in vivo* bình thường. Trong những giờ đầu tiên của nuôi cấy bao phấn các hạt phấn bắt đầu trương lên, sau đó một phần lớn hạt phấn bắt đầu chết. Trong tuần đầu tiên, tỷ lệ hạt phấn sống sót giảm đi từ 80 - 90% xuống 10% thấp hơn (Pescitelli và cs, 1990). Trong số các hạt phấn sống sót, một số hạt bắt đầu trải qua sự phân chia nguyên phân. Sau nhiều lần nguyên phân liên tiếp, các hạt phấn phát triển thành các cấu trúc đa bào mà vẫn nằm trong vỏ hạt phấn những cấu trúc này được gọi là "những hạt phấn phát sinh phôi thuần túy" (Pace và cs 1992). Sau giai đoạn này các cấu trúc tế bào đa nhân tăng trưởng về kích thước và tách khỏi vỏ hạt phấn. Các cấu trúc phát sinh phôi được tách ra hoàn toàn và được bao bọc bởi lớp tế bào ngoại vi. Cuối cùng là các cấu trúc tương tự phôi (embryo like structure ES) đa bào hình thành. Nuôi cấy bao phấn phải chọn đúng giai đoạn phát triển thích hợp của hạt phấn để có thể thu nhận tỷ lệ tái sinh và số lượng cá thể tự nhị bội hoá (dòng đơn bội kép) cao. Giai đoạn nuôi cấy hiệu quả nhất là giai đoạn tế bào hạt phấn từ tế bào đơn nhân sớm đến đầu giai đoạn hai nhân. Các hoa đực được tách khỏi cây cho bao phấn (donor plants) khi phần lớn các hạt phấn đang phát triển từ giữa đến cuối giai đoạn đơn nhân (mid- to late uninucleate stage). Thông thường các bao phấn được xử lý nhiệt độ lạnh

trước khi nuôi cấy. Sau giai đoạn xử lý lạnh các bao phần chứa các hạt phần ở giai đoạn giữa hoặc cuối giai đoạn đơn nhân đến đầu giai đoạn hai nhân được tách khỏi hoa và cấy lên môi trường tạo cấu trúc phôi (induction medium - ký hiệu IM). Các bao phần chứa các hạt phần ở những giai đoạn này được xem là thích hợp nhất cho quá trình sinh sản đơn tính đực in vitro. Sau khoảng 4 - 6 tuần những cấu trúc phôi đầu tiên xuất hiện và xuất hiện nhiều. Các cấu trúc phôi này khi đạt kích thước khoảng 2 - 3 mm được chuyển thẳng sang môi trường tái sinh để phát triển thành cây hoàn chỉnh (tái sinh trực tiếp). Một cách khác, các cấu trúc phôi có thể dùng để tạo mô sẹo có khả năng tái sinh cây hoàn chỉnh (tái sinh gián tiếp qua giai đoạn mô sẹo). Để tạo nên các cấu trúc mô sẹo có khả năng tái sinh cây, các cấu trúc phôi có thể được chuyển sang môi trường chứa 2,4D và một lượng BAP thích hợp. Sau khi chuyển sang môi trường tái sinh các mô sẹo phát triển thành cây hoàn chỉnh. Tái sinh gián tiếp dễ dàng tạo ra sự phát triển của nhiều cây non từ cùng một mô sẹo có nguồn gốc từ một hạt phần. Một quy trình nuôi cấy bao phần hay hạt phần tách rời về cơ bản có thể chia làm ba giai đoạn:

1. Giai đoạn tạo cấu trúc phôi từ các hạt phần nuôi cấy. Các cấu trúc phôi này sau đó có khả năng phân chia tế bào và biệt hoá cơ quan hình thành cây hoàn chỉnh trong những điều kiện thích hợp.

2. Giai đoạn biệt hoá cơ quan và tái sinh cây đơn bội từ các cấu trúc phôi (giai đoạn tái sinh).

3. Giai đoạn lưỡng bội hoá bộ nhiễm sắc thể của các cây đơn bội tạo thành cây đơn bội kép (doubled haploids) đồng hợp tử cùng nguồn gen.

Các phương pháp nhằm giảm tỷ lệ chết của hạt phần thường góp phần nâng cao tần số tạo cấu trúc phôi. Thông thường một hạt phần đơn lẻ sẽ hình thành một cấu trúc phôi nhưng cũng có trường hợp một hạt phần hình thành nhiều cấu trúc phôi.

Việc nghiên cứu và ứng dụng kỹ thuật nuôi cấy bao phần ở ngô cũng đã thu hút được mối quan tâm của các nhà khoa học trong nước (Lê Huy Hàm và cs, 1995, 1998, 1999). Trên cơ sở đó, việc nghiên cứu tối ưu hoá các điều kiện nuôi cấy là cần thiết đối với chương trình nghiên cứu chọn và cải tạo giống, nghiên cứu di truyền và kỹ thuật gen đối với cây ngô ở Việt Nam trong thời gian tới, phục vụ đặc lực cho việc tạo giống ngô mới, đặc biệt là ngô lai.

Vào năm 1998, trên cơ sở các giống ngô CM2, CM8, Viện Di truyền Nông nghiệp đã hoàn thiện quy trình nuôi cấy bao phần với tần số tái sinh cao (30-80%). Với quy trình này, thời gian tạo dòng thuần rút ngắn từ 5 - 8 thế hệ ngoài đồng ruộng xuống còn 8 tháng trong phòng thí nghiệm. Viện đã tiếp tục nghiên cứu áp dụng quy trình này để sản xuất các dòng thuần cho sản xuất. Các nghiên cứu tập đoàn ngô Việt Nam đã chỉ

ra rằng: các giống ngô Việt Nam nhìn chung có phản ứng thấp trong nuôi cấy bao phần, do đó cần phải cải tiến quy trình và nâng cao phản ứng của các giống ngô Việt Nam (Lê Huy Hàm, Đỗ Năng Vịnh và cs, 1995, 1996, 1997). Các nghiên cứu tiếp theo tiến hành tại Viện Di truyền Nông nghiệp cho thấy có thể nâng cao hiệu quả nuôi cấy bao phần bằng các phương pháp sau:

- Nâng cao hiệu quả của nuôi cấy bao phần bằng cải tiến quy trình nuôi cấy:

như xử lý nhiệt bao phần trước và sau khi cấy, xử lý mannitol, cải tiến quy trình tái sinh cây từ phôi trong nuôi cấy bao phần...), cải tiến thành phần môi trường muối khoáng, các bổ sung hữu cơ...). Một trong các công trình này đã được trao giải của Hội các nhà sinh học Châu á Thái Bình Dương trong hội thảo tại Hồng Kông tháng 7/1996, sau đó được đánh giá xuất sắc tại Hội nghị Nông nghiệp toàn quốc ở Thành phố Hồ Chí Minh tháng 9/2000. Đặc biệt, các nghiên cứu gần đây nhất tiến hành tại Viện Di truyền Nông nghiệp đã phát hiện tác dụng của từ trường có thể tăng hiệu quả nuôi cấy bao phần ngô lên 3 lần. Đây cũng là một trong những nghiên cứu đầu tiên trên thế giới trong lĩnh vực ứng dụng từ trường vào công nghệ tế bào thực vật (Lê Huy Hàm, Đỗ Năng Vịnh và CS, 2001: "Nghiên cứu hoạt tính sinh học của nước nhiễm từ, dung dịch hoạt chất sinh học trong môi trường nhiễm từ và ứng dụng trong sản xuất phục vụ ngành nông nghiệp" - đề tài phối hợp Viện Vật lý ứng dụng & Thiết bị khoa học và Viện Di truyền Nông nghiệp tháng 1/2001). Các nghiên cứu này đã khẳng định tiềm năng cải tiến và nâng cao hiệu quả của quy trình nuôi cấy bao phần ngô, ứng dụng có hiệu quả cho chọn giống ở Việt Nam .

- Nâng cao hiệu quả của nuôi cấy bao phần bằng phương pháp di truyền: Các nghiên cứu tiến hành tại Viện Di truyền Nông nghiệp trên một số giống ngô cho thấy lai hữu tính giữa các giống ngô có phản ứng thấp với giống ngô có phản ứng cao trong nuôi cấy bao phần có thể tạo ra giống ngô và các cặp lai F1 có phản ứng cao, nâng hiệu quả nuôi cấy bao phần lên hàng chục lần (Lê Huy Hàm, Đỗ Năng Vịnh và cs 1999, 2000; Hoàng Thụy Dương, 1999). Viện đã sử dụng sơ đồ lai để tạo ra một loạt các dòng ngô Việt Nam có phản ứng cao trong nuôi cấy bao phần.

4.5.2.3. Tạo dòng thuần bằng sử dụng dòng kích tạo đơn bội:

Bên cạnh việc nghiên cứu tạo dòng thuần bằng nuôi cấy bao phần, Viện Di truyền Nông nghiệp đã sưu tập và nghiên cứu các dòng kích tạo đơn bội sau:

+ Các dòng kích tạo đơn bội đực: Line Ig1 Ri- nj/ig 1 Ri-nj; Line Ig Maitainer ; Line 1873-7 fertile Ig/ig X (N) ig/ig; Line 182 F1 Ig/ig X (N) ig/ig (ACR-nj/ACR-nj); Line Kindiger Ig Maitainer: ig1 ig1 B-3Ld IgI - Ri-nj.

+ Các dòng kích tạo đơn bội cái: Stock 6 Rig-col.sant; Stock 6 Ri-nj B1P11/same; Coe Stock 6 ACR-g Colored scutelum; (Coe Stock 6 C/C-I wx AR) X same.

Các nghiên cứu tiến hành trong năm 1999 - 2000 cho thấy các dòng kích tạo đơn bội trong những điều kiện thích hợp có thể tạo ra 3-5% hạt đơn bội. Hiện nay, Viện Di truyền Nông nghiệp đang kết hợp với nhà khoa học Mỹ - Bryan Kindiger - tác giả của một số dòng kích tạo đơn bội để chuyển các gen kích tạo đơn bội vào các giống ngô có nguồn gốc nội địa.

4.5.2.4. Nuôi cấy noãn chưa thụ tinh:

Vào đầu năm 1932, White đã tiến hành nuôi cấy noãn của cây *Antirrhinum*. Tiếp đó, một số nghiên cứu nuôi cấy noãn chưa thụ tinh ở một vài cây trồng khác như *Cooperia pedunculata* cũng được tiến hành nhưng không thu được kết quả (Maheshwari, 1958; Maheshwari và Lal, 1969). Đến năm 1964, Tulecke mới thu được mô sẹo đơn bội từ nuôi cấy noãn của cây *Ginkgo biloba*. Song đến thời điểm này, nghiên cứu thành công tạo cây đơn bội từ bao phấn ở cây cà *Datura innoxia* (Guha và Maheshwari, 1964) đã hướng sự chú ý của nhiều nhà khoa học vào tạo cây đơn bội bằng trình sinh đực trong suốt hơn một thập kỷ. Cho mãi đến đầu những năm 70, nghiên cứu tạo cây đơn bội thông qua nuôi cấy noãn chưa thụ tinh vẫn còn bỏ ngõ. Tuy nhiên, ở một số loài cây trồng, việc tạo cây đơn bội bằng trình sinh đực không đạt kết quả như: hành, lúa mì, củ cải đường, hoa hướng dương... (Keller, 1990). Điều này một lần nữa làm hồi sinh sự quan tâm vào tạo cây đơn bội trình sinh cái. Uchimiya và cs (1971) đã nuôi cấy noãn chưa thụ tinh ở ngô và cây *Solanum melongena*. Họ đã thu được mô sẹo trên môi trường bổ sung IAA và kinetin, mặc dù nguồn gốc của những mô sẹo này chưa được xác định song kết quả kiểm tra tế bào học đã khẳng định là đơn bội. Đồng thời họ cũng quan sát được sự phân chia tế bào đơn bội của các mô sẹo này. Đến cuối những năm 70, đã có hơn 100 báo cáo về phôi tạo ra từ nuôi cấy túi phôi. Những kết quả nghiên cứu bước đầu về kỹ thuật nuôi cấy noãn chưa thụ tinh để tạo cây đơn bội đã được Yang và Zhou (1982) tổng kết: "Nuôi cấy noãn có thể là một trong những phương pháp hiệu quả để tạo cây đơn bội".

Tuy nhiên kỹ thuật nuôi cấy noãn chưa thụ tinh còn gặp nhiều khó khăn và phức tạp do việc tách tế bào trứng đối với thực vật hạt kín là rất khó và rất dễ gây thương tổn đến mô thực vật (Keller, 1996).

Bằng nuôi cấy noãn chưa thụ tinh, tỷ lệ tạo cây đơn bội ở một số cây trồng như hành, củ cải đường biến động từ 5-20%, lúa 1,5-12% và ở dâu tằm tỷ lệ tạo cây đơn bội cũng đạt 3-6%. Nhằm làm tăng thêm hiệu quả tạo cây đơn bội trình sinh cái, cần tập trung nghiên cứu các yếu tố ảnh hưởng đến khả năng tái sinh tế bào nuôi cấy in vitro như: kiểu gen, giai đoạn phát triển của túi phôi, xử lý nhiệt trước và sau nuôi cấy, môi trường và điều kiện nuôi cấy... (Sita, 1997).

Quy trình nuôi cấy noãn ngô đã thành công ở nước ta và đạt được trình độ quốc tế.

Các nghiên cứu tiến hành tại Viện Di truyền Nông nghiệp cho thấy có thể dùng phương pháp nuôi cấy noãn chưa thụ tinh để tạo dòng thuần ở ngô. Hai phương pháp nuôi cấy noãn đã được áp dụng:

1. Nuôi cấy noãn chưa thụ tinh tách rời: cho hệ số tái sinh trực tiếp thấp. Đại đa số noãn hình thành mô sẹo, tỷ lệ tái sinh cây và tỷ lệ sống sót khi đưa ra ngoài thấp.
2. Nuôi cấy cùng lúc nhiều noãn trên một phần của lõi bắp ngô: Các nghiên cứu tiến hành với mô nuôi là một phần của lõi bắp ngô và noãn chưa thụ tinh đã khẳng định ưu thế vượt trội so với nuôi cấy noãn tách rời. Quy trình nuôi cấy đơn giản, noãn phát triển trực tiếp thành hạt, số hạt đơn bội *in vitro* đạt 4 - 5%, tỷ lệ hạt tự nhị bội hoá đạt 45%, tỷ lệ nảy mầm cao, cây con trong ống nghiệm phát triển khoẻ, dễ chuyển ra bầu đất với tỷ lệ biến dị thấp. Các nghiên cứu tại Viện Di truyền Nông nghiệp đã khẳng định khả năng nâng cao hiệu quả tạo dòng thuần ở ngô thông qua mô nuôi cấy noãn chưa thụ tinh và tiềm năng ứng dụng cho chọn giống là rất hiện thực. Trong các hội thảo quốc tế về chọn tạo giống ngô gần đây tại Băng Cốc (11/1999), Bắc Kinh (10/2000), Hamburg (3/2001), các công trình này đã được đánh giá là một trong những nghiên cứu cơ bản nhất về ứng dụng phương pháp nuôi cấy noãn chưa thụ tinh cho chọn tạo giống ngô.

4.6. Nguồn gốc của các biến dị tế bào soma

4.6.1. Những thay đổi di truyền xảy ra trước khi nuôi cấy mô *in vitro*:

Trong quá trình phát triển cá thể, phân hoá và già hoá của mô và tế bào một số các thay đổi di truyền đã xảy ra và được tích lũy trong các tế bào soma (D'amato, 1985). Nhờ kỹ thuật nuôi cấy mô, cây được tái sinh từ tế bào soma sẽ là các đột biến. Các nhà khoa học đưa ra khái niệm automutagenesis - tự đột biến (đột biến xảy ra không do các tác nhân từ bên ngoài gây nên hay là đột biến tự nó - automutagenesis). De Vries (1901) - người khởi xướng Học thuyết về đột biến cho rằng cây bị đột biến do được tái sinh từ hạt già (có nhiều đột biến đã tiềm ẩn từ trước trong hạt già). Ba mươi năm sau, Nawacin chứng minh đột biến ở hạt già là do các chất tham gia quá trình trao đổi chất và các sản phẩm cặn bã có trong hạt gây nên. Các chất này có thể là: hợp chất chứa lưu huỳnh, amin, amino axit, amids, aldehyde, alkloide, phenol, quinone, axit nucleic và các sản phẩm khác. Nguyên nhân gây đột biến có thể do cấu trúc bình thường của hạt và tế bào bị phá vỡ - các enzym tiếp xúc với các chất và tạo ra sản phẩm đột biến.

Tuỳ theo phương thức nuôi cấy tế bào soma, người ta phân biệt các loại biến dị dưới đây:

- Biến dị dòng tế bào mô sẹo (callusoclonal variation): khi cây biến dị tái sinh từ mô

sẹo (callus)

- Biến dị dòng tế bào trần (protoclonal variation) - khi cây biến dị tái sinh từ tế bào trần.

Ngoài ra Evans và cộng sự (1984) còn đưa ra khái niệm "biến dị giao tử" (gametoclonal Variation) khi cây được tái sinh từ các tế bào sinh dục (gamete). Những biến dị di truyền xảy ra và được phát hiện trong quá trình nuôi cấy in vitro gọi chung là đột biến tế bào dòng.

4.6.2. Những thay đổi di truyền xảy ra trong quá trình in vitro:

Một nguồn biến dị tế bào soma quan trọng là thay đổi trong bộ máy di truyền xảy ra khi nuôi cấy tạo mô sẹo và phân hoá cơ quan in vitro. Chroqui và Bercetch (1985) cho biết auxin gây ra đa bội hoá bên trong tế bào nuôi cấy (endopolyploidization). Oono (1982) nuôi cấy mô sẹo từ hạt lúa và tái sinh cây từ mô sẹo cho biết BAP có nồng độ 30 mg/l tạo ra tần số đột biến lớn gấp 50 lần so với BAP ở nồng độ 2 mg/l. Mức độ đột biến tế bào soma lớn đến mức tần số đột biến do các chất đột biến gây ra cũng không cao hơn (Larkin and Scowcroft, 1981).

Orton (1984) cho biết trong thời gian nuôi cấy trên môi trường dinh dưỡng, hệ gen của các tế bào thực vật đã trải qua quá trình cải tổ nhanh chóng và đã phát hiện những thay đổi số lượng, cấu trúc nhiễm sắc thể, đột biến gen. Tần số đột biến gen nhiều khi rất cao (10^{-2} - 10^{-1}) tính theo locus trên cây. Thay đổi di truyền phổ biến nhất xảy ra trong tế bào nuôi cấy là đa bội thể. Sau khi mô được nuôi cấy, nhân tế bào có thể trải qua quá trình nội phân (endoreduplication) làm số lượng nhiễm sắc thể trong tế bào tăng lên gấp đôi hoặc hơn nữa nhưng không xảy ra phân chia tế bào. Kết quả số lượng nhiễm sắc thể của tế bào tăng lên. Quá trình nội phân của nhiễm sắc thể trước khi phân bào đã cho phép người ta nhận được cây lưỡng bội đồng hợp (dihaploid) từ hạt phấn đơn bội trong nuôi cấy bao phấn. Phổ rộng các biến đổi nhiễm sắc thể đã được quan sát thấy ở nhiều loài cây trồng khác nhau (Murashige và Nakano, 1967; Sacristan và Melchers, 1960; Sunderland 1973; Nishi và Mitsuoka, 1969). Nghiên cứu tế bào học cho thấy 10% số loài phân hoá cơ quan không kèm theo hiện tượng nội phân nhiễm sắc thể, 90% số loài phân hoá cơ quan có kèm theo nội phân nhiễm sắc thể.

Đột biến tế bào soma xảy ra ở các gen trong tế bào chất đã được chứng minh bằng phương pháp tách ADN ty thể và lục lạp nhờ enzyme cắt (Kemble R.T cs, 1984). Đột biến tế bào soma đã ứng dụng vào chọn giống hiệu quả ở nhiều cây trồng như mía, khoai tây, cà chua, thuốc lá, lúa và lúa mì. ở Petunia đã nhận được giống mới gọi là Velevetrose, giống mía Q47 (Larkin and Scowcroft, 1981).

4.6.3. Biến dị di truyền trong nuôi cấy mô lúa

Đột biến tế bào soma đã được phát hiện bởi nhiều công trình nuôi cấy tế bào

lúa. Nhà khoa học Nhật bản Oono (1978) đã tái sinh cây qua mô sẹo có nguồn gốc từ hạt của cây nhị bội đồng hợp gồm 75 hạt và đã chứng minh đầy sức thuyết phục về sự tồn tại của đột biến tế bào soma và di truyền đột biến đó. Oono đã phân tích 800 dòng cây nhận được từ tế bào soma và thể hệ con cái tự thụ. Kết quả cho biết chỉ có 28,1 % số cây là giống với cây mẹ về các đặc điểm phân tích. Phổ biến dị di truyền rộng đã quan sát thấy ở các đặc điểm như độ hữu thụ của hạt, chiều cao cây, thời gian trổ bông. Đột biến sắc tố chlorophyll thấy ở 8,4% số dòng. Phân tích cây tái sinh từ mô sẹo cho biết đa số các biến đổi di truyền xảy ra trong quá trình nuôi cấy. Phân tích di truyền cho biết đột biến đã xảy ra ở năm tính trạng và biểu hiện với tần số 0,03 - 0,7% trên một phân chia tế bào. Oono (1975) cho biết các cây nhận được từ mô sẹo của bao phấn nuôi cấy cũng có các biến dị khác nhau. Sau đó Oono (1982) đã tách các đột biến đồng hợp chiều cao cây, đột biến các tính trạng số lượng và chất lượng, đột biến lặn và đột biến trội xảy ra ở các dòng nhận được qua nuôi cấy mô lúa. Một nhà khoa học Nhật Bản khác là Fukui (1983) đã nhận được 12 cây tái sinh qua mô sẹo có nguồn gốc từ 1 hạt lúa, trong đó đã tách được các đột biến khác nhau như đột biến chín sớm, đột biến bạch tạng, đột biến thấp cây và bất dục.

Dabarh (1983) cũng nhận được các dạng đột biến lúa có ý nghĩa thực tiễn từ một mô sẹo ban đầu. Tần số đột biến tỷ lệ thuận với tuổi mô sẹo.

Các công trình nghiên cứu trên chứng tỏ tần số biến dị cao và phổ biến dị rộng trong nuôi cấy mô ở lúa có ý nghĩa quan trọng đối với chọn giống. Phân tích biến dị trong quá trình nuôi cấy giao tử đơn bội thường phức tạp hơn do khó phân biệt biến dị di truyền với phân ly tính trạng xảy ra trong giảm phân. Những biến dị số lượng nhiễm sắc thể ở mô sẹo và cây lúa nhận được trong nuôi cấy bao phấn là rất phổ biến và được ghi nhận bởi rất nhiều tác giả (Nishi và Mitsuoka, 1969; Oono, 1975; Đỗ Năng Vịnh cs, 1979; Đỗ Năng Vịnh cs, 1987; Qiren chu cs, 1985...). Trong các công trình trên, tần số cây có mức độ bội thể khác nhau (1x, 2x, 3x, 4x, 5x, x = 12 nhiễm sắc thể) và lệch bội rất cao. Raina S.K (1983) đã nhận được 347 cây từ bao phấn của bốn con lai F1, trong đó 7 cây nhận được từ mô sẹo có biểu hiện biến dị di truyền. Tác giả đã chứng tỏ biến dị tế bào dòng giao tử (gametoclone) xảy ra trong nuôi cấy bao phấn. Schlaeffer (1982) nhận được các đột biến thấp cây (thấp hơn 15- 30% so với giống ban đầu calrose 76) qua nuôi cấy bao phấn. Phân tích đa hình độ dài đoạn phân cắt ADN ở các cây lúa tái sinh từ nuôi cấy mô cho thấy 23% số cây tạo được từ nuôi cấy in vitro dài hạn đã thể hiện các biến đổi trong cấu trúc ADN, so với tỷ lệ 6,3 % cây tái sinh từ nuôi cấy ngắn hạn. Như vậy, thời gian nuôi cấy tế bào kéo dài ở trạng thái chưa phân hoá (mô sẹo) là một yếu tố quan trọng làm phát sinh các đột biến gen và sau đó là đột biến ở cây tái sinh (Moller E. cs, 1990).

4.6.4. Biến dị tế bào soma trong quá trình nuôi cấy phôi ở ngô và khả năng ứng dụng thực tiễn:

Quan sát cây con nhận được từ mô sẹo phôi non và thể hệ con cái cho thấy phổ biến dị di truyền rất rộng. Green C. E. cs (1977) lần đầu tiên mô tả các cây nhận được từ mô sẹo phôi hoá (embryogenic callus) ở ngô với nhiều biến dị đặc điểm hình thái (thân, lá) và độ hữu thụ. Phân tích tế bào cho thấy có một cây khảm đa bội với nhiễm sắc thể số 5 trong tế bào được nhân lên nhiều lần và một cây có đoạn tứ bội. Tiếp theo các công trình nghiên cứu đầu tiên này, một loạt các công bố khác đã khẳng định tần số biến dị cao xảy ra với các tính trạng hình thái và nông học quan trọng như cao cây, độ dài bắp, số hàng trên bắp, độ chín sớm (Nesticky M. cs 1984; Glaser V.P,1984; Glaser V.P,1984). Một số dòng ngô mới có nhiều ưu việt so với giống ban đầu đã nhận được từ cây tái sinh. Một vài giống lai tạo ra với sự tham gia của các dòng mới này có năng suất cao hơn nhiều so với giống lai đối chứng (Earle E.D. và Gracen V. E, 1985; Gracen V.E. và Earle E. D,1985). Các nhà di truyền và chọn giống đặc biệt quan tâm tới các biến dị xảy ra trong nội bào quan (tế bào chất). Các polypeptid tham gia vào quá trình hô hấp, quang hợp, tổng hợp ATP được mã hoá bởi các gen ty thể và lục lạp. Các tính trạng khác như bất dục đực tế bào chất, khả năng chống chịu các chất kháng sinh và độc tố cũng do ADN nội bào quan, trong đó có ADN ty thể quy định (Cornu A. cs, 1981; Kool A. T. cs ,1986). Cornu (1981) cho biết khi nuôi cấy phôi non của các dòng ngô bất dục đực kiểu T đã nhận được cây hữu thụ và kháng độc tố nấm *Drechslera maydis* gây bệnh. Phân tích cho hay đã có những thay đổi cấu trúc ở ADN ty thể dẫn đến khôi phục khả năng hữu dục ở dòng bất dục. Quá trình khôi phục khả năng hữu thụ và khả năng chống chịu không phụ thuộc vào sự có hay không có độc tố gây bệnh của nấm *Drechslera maydis* trong môi trường chọn lọc (Brettell cs 1979; Brettell cs 1980). Những biến dị tế bào soma đã xảy ra trong nuôi cấy mô, mặc dù không có sự can thiệp của tác nhân gây đột biến và môi trường chọn lọc (Brettall và Ingram, 1979). Tính trạng bất dục đực tế bào chất và cảm ứng với độc tố T có thể xảy ra do một thay đổi di truyền độc nhất trong tế bào chất và thay đổi này có thể được phục hồi lại với tần số cao. Vậy có thể tạo ra các dòng bất dục đực kiểu T chống chịu độc tố gây bệnh T bằng nuôi cấy mô hay không? Kết quả lai tạo cho thấy sự khôi phục khả năng hữu thụ của các dòng bất thụ đực tế bào chất in vitro là do những thay đổi trong tế bào chất (Gracen V. E. và Earle E. D., 1985). Sự phục hồi liên quan đến sự mất ADN tương tự như plasmid S1 và S1 ở ty thể (Escorte cs,1985). Sự biến mất của các plasmid tự do S1 và S2 trong ty thể có thể do chúng lại gắn vào ADN ty thể. Quá trình hồi phục quan sát thấy trong nuôi cấy phôi non ở ngô đã mở ra mô hình mới cho việc nghiên cứu cơ chế phân tử của hiện tượng bất dục đực tế bào chất. Một thay

đổi lý thú khác là sự chuyển ngược lại từ hữu thụ thành bất thụ tế bào chất. Gracen và Earle (1985) thông báo đã nhận được một dạng bất dục đực kiểu C mới hoặc một loại bất dục đực tế bào chất hoàn toàn mới nhờ nuôi cấy mô phôi non. Phát hiện này mở ra triển vọng sử dụng nuôi cấy phôi non để tạo ra các dạng bất dục đực tế bào chất cho sản xuất hạt lai.

4.6.5. Biến dị ở các cây nhân vô tính:

Những thay đổi di truyền ở gen nhân, lục lạp, ty thể xảy ra trên cây tạo ra các cây khảm di truyền. Bằng phương pháp nhân vô tính có thể tạo các dòng vô tính đột biến từ các bộ phận khác nhau trên các cây đột biến khác nhau.

Bảng 4.3. Sự khác nhau về biến dị di truyền ở các cây sinh sản vô tính và hữu tính

Cây sinh sản vô tính	Cây sinh sản hữu tính
Bảo tồn đa dạng về số lượng nhiễm sắc thể - các mức lệch bội và tam bội khác nhau. Ví dụ, các giống mía có số lượng NST rất khác nhau, dao động từ 40, 48, 55,64, 72,77, 78, 80, 96... đến 130NST	Bảo tồn và di truyền số nhiễm sắc thể là chắc (quá trình meiosis không bị phá vỡ)
Có thể tách được các dạng đột biến từ mô và tế bào sinh dưỡng - tế bào soma (Thân, củ, rễ, chồi, mắt ghép...), ví dụ các giống đa bội hoá hoặc các giống bất dục đực không hạt thu nhận được từ các đột biến tự nhiên ở mắt ghép cam chanh.	Chỉ các đột biến xảy ra trong giao tử mới di truyền được
Trong điều kiện in vitro, có thể tách ra các tế bào đơn riêng biệt, cụm tế bào, mô và cơ quan có đột biến →? tái sinh chúng thành cây đột biến hoàn chỉnh - Nhân tiếp bằng phương pháp vô tính →? Tạo dòng vô tính đột biến	Trong điều kiện in vitro, có thể tách ra các tế bào đơn riêng biệt, cụm tế bào, mô và cơ quan có đột biến →? Tái sinh chúng thành cây đột biến hoàn chỉnh - Nhân tiếp bằng phương pháp vô tính →? Tạo dòng vô tính đột biến.

4.6.6. Các hướng ứng dụng của hiện tượng biến dị tế bào soma

Như đã phân tích ở trên, việc gây tạo và chọn lọc các đột biến tế bào soma xảy ra trong nuôi cấy in vitro có nhiều ứng dụng đa dạng:

- Tạo ra dòng tế bào nuôi cấy có khả năng sản xuất các chất hoạt tính sinh học với năng suất cao (xem công nghệ bioreactor)

- Tạo ra các giống cây trồng mang những đặc tính biến dị quý, ví dụ, các nhà khoa học ở Đài Loan đã chọn tạo được giống chuối thấp cây, chống chịu bệnh thối rữa do nấm Fusarium gây ra. ở nước ta, Viện Công nghệ sinh học đã tạo được giống lúa mới DR2 có khả năng chịu hạn, chịu lạnh bằng phương pháp chọn lọc các biến dị tế bào soma in vitro từ một giống lúa không có khả năng chống chịu. Giống này đã được công nhận là giống quốc gia.

4.7. Quy trình tạo cây đơn bội

4.7.1. Quy trình tạo cây đơn bội thuốc lá từ hạt phấn phân lập

4.7.1.1. Cảm ứng

a. Tạo cây đơn bội

Nụ hoa được xử lý bằng ly tâm 2.000 vòng/phút trong thời gian 30 phút ở nhiệt độ 5-10oC sau khi cắt để 48 giờ ở 2-5oC.

b. Tạo cây nhị bội

Nụ hoa được ngâm trong dung dịch colchicine 0,04% và dimethyl sulfoxide (chất dẫn nạp) 2% trong thời gian 24 giờ ở 2-5oC và hút chân không. Sau đó rửa sạch dung dịch colchicine và xử lý lạnh tiếp 24 giờ.

4.7.1.2. Nuôi bao phấn

Bao phấn được tách từ nụ, nuôi 3 ngày trong môi trường khoáng Halperin chứa đường sucrose 2% và Fe-EDTA (5mL/L: Na₂EDTA 754mg + FeSO₄.7H₂O 557 mg pha trong 100 mL nước sôi), pH 5,8. Nuôi 50 bao phấn trong 5 mL môi trường lỏng.

4.7.1.3. Tách và nuôi hạt phấn

Ép bao phấn bằng đĩa thủy tinh, lọc hạt phấn bằng lưới có mắt ($\square = 48 \mu\text{m}$) và đưa vào ống ly tâm vô trùng có bông ở đáy. Ly tâm 850 vòng/phút và rửa hai lần bằng môi trường mới. Nuôi hạt phấn với nồng độ 104 hạt phấn/mL, mỗi đĩa petri đường kính 5 cm nuôi 2,5 mL dung dịch, dán giấy parafilm và để ở nơi có ánh sáng nhạt. Sau 30 ngày sẽ xuất hiện phôi non.

4.7.2. Nuôi cấy hạt phấn lúa

4.7.2.1. Phương pháp

a. Thiết kế thí nghiệm:

Trong thí nghiệm có thể dùng các dòng lúa có kiểu di truyền khác nhau, nuôi cấy túi phấn của các loài lúa khác nhau, khảo sát tần suất tạo mô sẹo và tái sinh. Nuôi cấy trên đĩa petri là chủ yếu và mỗi đĩa petri là mỗi lần lặp lại, có ít nhất 4 lần lặp lại.

b. Xử lý vật liệu:

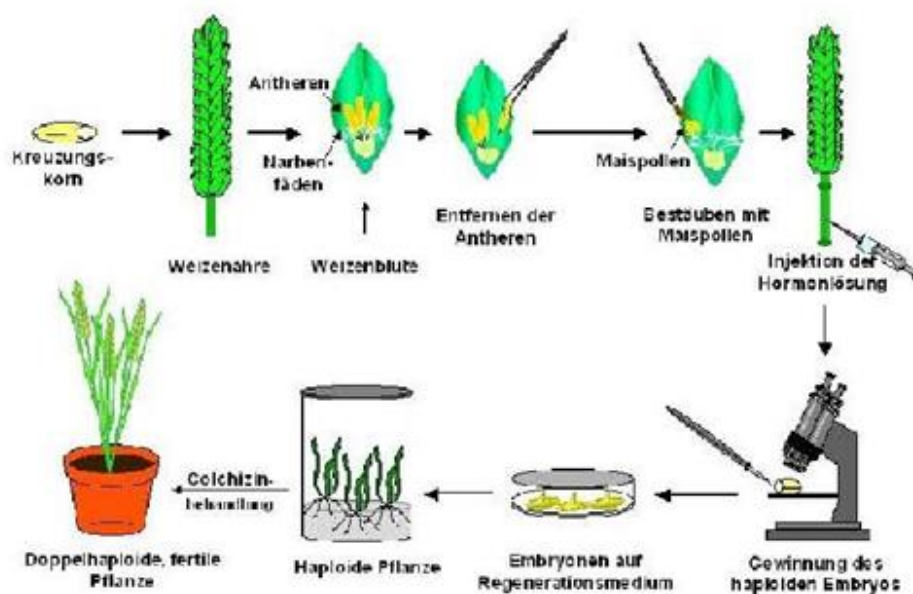
Các giống lúa được trồng trên vườn ươm. Thu hạt của các giống trên. Các dòng lúa này được trồng trong chậu và được đặt trong vườn ươm. Túi phấn được thu nhận vào

ngày thứ 60 hoặc 90 sau trồng. Các dòng lúa được gieo trồng cách khoảng nhau 1 tuần và tiến hành trong 5 lần để tránh các giống có thời gian chín khác nhau. Mỗi dòng cần 1-2 tếp có mang tược hoa thụ phấn ở giai đoạn chín.

c. Quy trình

- Thu thập và xử lý vật liệu (túi phần)

- Giai đoạn chín của cây lúa ở ngay thời điểm thích hợp cho nuôi cấy túi phần là giai đoạn phân tử có nhân phân chia đồng nhất trước khi hạt phấn đi vào quá trình phân chia giảm nhiễm. Mẫu được lấy là đoạn thân giữa lá cò và lá đòng (2-5 cm). Đoạn thân được đặt trong bao nylon và dán kín lại và giữ trong lạnh trong suốt thời gian thu thập mẫu và vận chuyển.



Hình 4.1 Nuôi cấy bao phần lúa

Xử lý lạnh túi phần trước khi đưa vào nuôi cấy để tăng hiệu suất tạo mô sẹo. Trước khi xử lý, bẹ lá được tách rời khỏi thân tránh gây thương tổn hay dập đoạn thân.

- Đoạn thân được giữ trong túi nylon và dán kín lại cùng ghi chú cẩn thận. Túi nylon được đặt trong bao giấy nhôm và đặt trong tối để tiến hành xử lý lạnh với ánh sáng giảm hẳn. Đoạn thân xử lý ở 5°C trong 5-7 ngày trước khi nuôi cấy túi phần.

- Sự hình thành mô sẹo và tái sinh

- Sau khi xử lý lạnh đoạn thân có chứa túi phần, đoạn thân được khử trùng với Natrihypoclorit 2,5 % trong 20 phút.

- Đoạn thân được lấy ra sau khi khử trùng và được rửa lại bằng nước cất vô trùng.

- Chùm hoa lúa được tách ra khỏi thân và được đặt trên đĩa petri.
- Dùng kéo được vô trùng cắt phần chân hoa lúa.
- Dùng que inox vô trùng có đầu móc vô trùng để tách túi phấn bên trong hoa lúa ra.
- Túi phấn được cấy trên môi trường N6 tạo mô sẹo. Cấy khoảng 120 túi phấn trên 1 đĩa petri (100 x 15 mm). Mỗi giống cấy ít nhất 3 đĩa petri. Đĩa được ghi chú cẩn thận về ngày cấy, giống, môi trường và người cấy.
- Đĩa petri được dán kín bằng parafilon. Dán 2-3 lớp parafilon để tránh mất mát môi trường.
- Đĩa được đặt trong phòng dưỡng cây ở 27°C.
- Trong 2 tuần đầu tiên thì cứ cách 5 ngày ghi nhận số liệu về sự phát sinh mô sẹo. Khi mô sẹo phát triển đến đường kính 2 mm thì tách mô sẹo và cấy trên môi trường tái sinh MS. Túi phấn còn lại chưa hình thành mô sẹo hay mô sẹo chưa phát triển đến mức tối thiểu ($D = 2 \text{ mm}$) còn lại trong đĩa petri được dán kín lại. Tiếp tục theo dõi trong 3 tháng.
- Cấy 5-10 mẫu mô sẹo trên 1 đĩa petri (100 x 15 mm) có chứa môi trường tái sinh MS. Đĩa petri được dán kín và đặt trong phòng dưỡng cây có cường độ chiếu sáng 50-60 mol/m²/s ở 27°C có quang chu kỳ 16 giờ sáng và 8 giờ tối.
- Cụm cây tái sinh được tách rời từng cây riêng biệt khi cây cao 1 cm và được cấy trên môi trường tái sinh MS.
- Cây tái sinh được cấy chuyển sang chậu trong vườn ươm cây khi cây cao 5 cm, cây được đánh dấu.
- Duy trì cây tái sinh trong chậu có lớp nước mỏng phủ 1 mặt cho đến khi cây chín.
- Khi cây lúa chín, thu hạt đặt trong bao giấy và được đặt trong 1 bao kín và làm khô ở 40°C với độ ẩm còn lại 12%. Thời gian làm khô 1-3 ngày. Hạt khô có thể tồn trữ nhiều năm ở -20°C. Nếu làm khô ở 50°C và kéo dài 5 ngày thì sẽ làm mất khả năng nảy mầm của hạt.

d. Quan sát và đo đếm

- Sự hình thành mô sẹo

Sau 2 tuần nuôi cấy, theo dõi sự hình thành mô sẹo cách khoảng 5 ngày ghi ngày phát sinh mô sẹo và số lượng mô sẹo được cấy chuyển sang môi trường tái sinh trên mỗi giống trong vòng 90 ngày nuôi cấy. Xác định tổng số túi phấn được nuôi cấy hình thành mô sẹo trên mỗi giống ở thời điểm 30, 60 và 90 ngày nuôi cấy. Xác định sự hình thành mô sẹo bằng tỉ lệ túi phấn nuôi cấy phát sinh mô sẹo và phân tích ANOVA để đánh giá:

1. Tổng số lượng mô sẹo hình thành của các loài
 2. Sự hình thành mô sẹo ở giai đoạn 30, 60 và 90 ngày sau cấy
- Phân tích sự khác nhau giữa các giống và các loài phụ,



Hình 4.2 Mô sẹo từ bao phấn lúa

- Tái sinh

Kiểm tra việc nuôi cấy mô sẹo hàng tuần. Ghi nhận ngày cấy và số lượng mô sẹo tái sinh thành cây trong 8 tuần, ghi nhận cây có lá xanh hay cây bạch tạng Ghi nhận tổng số lượng mô sẹo của mỗi giống hình thành cây xanh hay cây bạch tạng ở các thời điểm 2, 4, 6 và 8 tuần sau khi cấy chuyển sang môi trường tái sinh. Ghi nhận tỉ lệ tái sinh cây từ mô sẹo, thống kê số lượng mô sẹo tái sinh được trong 1 đĩa. Thống kê số cây xanh tái sinh và cây bạch tạng và tổng lượng cây tái sinh được ở thời điểm 2, 4, 6 và 8 tuần sau cấy. Dùng ANOVA phân tích kết quả. Phân tích sự khác nhau và giống nhau giữa các giống và các loài phụ.

4.7.3. Nuôi cấy bao phấn cây thuốc lá

4.7.3.1. Nguyên liệu thực vật

Sử dụng bao phấn của cây thuốc lá (*Nicotiana tabacum*) để nuôi cấy đơn bội.

4.7.3.2. Môi trường nuôi cấy

Bảng 4.4. Thành phần các môi trường nuôi cấy bao phấn thuốc lá

Thành phần môi trường	Tạo cây 1n	Tạo Callus 1n	Tạo chồi 1n	Tạo rễ 1n
Nitsch đầy đủ (Nt1,+Nt2,Nt3, Nt4 và Nt5)		+	+	+
Saccharose (%)	2	2	2	2
Agar (%)	0.8	0.8	0.8	0.8
IAA (mg/L)	0.1	-	-	0.1

2,4-D (mg/L)	-	0.1 – 0.5	-	-
KIN (mg/L)	0.1	0.1	0.1 - 1	-
BAP (mg/L)	-	-	0.1 - 1	-

Chú ý

Môi trường được chuẩn bị trong ống nghiệm (làm thạch nghiêng).

4.7.3.3. Nuôi cấy bao phấn

Nụ thuốc lá hái ở giai đoạn cánh hoa sắp ló ra khỏi lá đài (nụ dài khoảng 10-15 mm) được khử trùng theo thứ tự: 2 phút trong cồn 70%, 5 phút trong dung dịch HgCl₂ 0,05% và rửa bằng nước cất vô trùng từ 4-5 lần. Trong điều kiện vô trùng, dùng forceps và dao mổ tách nụ lấy các bao phấn cấy vào ống nghiệm chứa môi trường dinh dưỡng đã chuẩn bị sẵn (Bảng 4.1, cột 2). Mỗi ống nghiệm cấy 5-10 bao phấn và đặt ở nhiệt độ 25- 27°C, chiếu sáng từ 10-12 giờ/ngày với cường độ chiếu sáng 2000-3000 lux.

Sau 6-8 tuần nuôi, vỏ bao phấn sẽ nứt ra và xuất hiện các cây thuốc lá đơn bội, cấy chuyển những cây thuốc lá này sang những bình tam giác loại 250 mL chứa 50 mL của cùng một loại môi trường để cây đơn bội phát triển.

Chú ý: Các thí nghiệm nuôi cấy đơn bội chỉ thành công với điều kiện hạt phấn phải ở giai đoạn tứ tử hoặc đơn nhân, do đó thường người ta phải làm tiêu bản hiển vi để quan sát sự phát triển của hạt phấn, chọn giai đoạn thích hợp rồi mới tiến hành nuôi cấy.

4.7.3.4. Nhị bội hóa thông qua giai đoạn callus

Thân của cây thuốc lá đơn bội nuôi cấy trong ống nghiệm được cắt thành từng đoạn dài 5 mm và cấy lên môi trường tạo callus (Bảng 4.1, cột 3). Sau 7-10 ngày, từ đoạn thân cây thuốc lá 1n sẽ hình thành một khối callus nhỏ được gọi là callus sơ cấp. Tế bào callus sơ cấp thường dễ tái sinh thành chồi khi gặp điều kiện thuận lợi. Các cây tái sinh từ tế bào callus nuôi cấy trên môi trường ở bảng 4.1, cột 4 có độ biến động về số lượng nhiễm sắc thể rất lớn.

- Phương pháp kiểm tra nhiễm sắc thể

Mảnh lá non (1-2 mm) hoặc đầu rễ (2 mm) được tách ra từ cây thuốc lá đơn bội nuôi cấy trong ống nghiệm, cố định bằng hỗn hợp cồn: acetic (3:1) trong 24 giờ. Mẫu được bảo quản ở cồn 70%, nhuộm nhiễm sắc thể bằng acetocarmin. Đếm số lượng nhiễm sắc thể dưới kính hiển vi.

Kết quả phân tích số lượng nhiễm sắc thể của các cây tái sinh từ quần thể tế bào callus đơn bội là không đồng nhất, cho thấy: cây 1n chiếm tỷ lệ khoảng 21,9 %, cây 2n khoảng 61,5 % và khoảng 11,5 % là những cây có mức bội thể cao hơn nhị bội.

CÂU HỎI ÔN TẬP

1. Nêu vấn đề đơn bội của thực vật
2. Tóm tắt các phương pháp tạo thể đơn bội in vivo
3. Phân tích các nhân tố ảnh hưởng đến nuôi cấy bao phấn
4. Chỉ ra những tồn tại trong nghiên cứu đơn bội
5. Trình bày hiện tượng bạch tạng trong nuôi cấy đơn bội
6. Vì sao nói thể đơn bội có vai trò rất lớn trong công tác tạo giống mới?
7. Nêu các ứng dụng của kỹ thuật đơn bội trong tạo giống mới và dòng thuần ở ngô, lúa
8. Vì sao trong quá trình nuôi cấy in vitro luôn xuất hiện các biến dị tế bào soma?
9. So sánh sự khác nhau về biến dị di truyền ở các cây sinh sản vô tính và hữu tính
10. Tóm tắt qui trình tạo cây đơn bội

Chương 5. NUÔI CÂY TẾ BÀO TRẦN

5.1. Giới thiệu chung về nuôi cấy tế bào trần

Việc giới thiệu về quy trình sử dụng enzyme để cô lập tế bào trần thực vật (Cooking 1960) đã đưa ra một bộ mặt mới đầy hứa hẹn cho tế bào thực vật và nuôi cấy mô và mở ra một lĩnh vực mới trong sinh học tế bào thực vật. Điều làm cho tế bào trần có tác động mạnh như một hệ thống thí nghiệm đó là hệ enzyme phân hủy vách tế bào làm lộ ra bề mặt màng tế bào như là một rào cản giữa môi trường bên ngoài và thành phần bên trong tế bào. Sự tiếp cận đến màng sinh chất có ý nghĩa là thí nghiệm có thể được thiết lập để nghiên cứu và thao tác trên các thuộc tính của màng tế bào điều mà không thể thực hiện được khi bị bao phủ bởi vách tế bào. Tế bào trần được sử dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực thí nghiệm từ nghiên cứu những tính chất vật lý của màng sinh chất (Ruesink 1973) đến những nghiên cứu nhập bào và hấp thu các phân tử (Willison et al. 1971), các bào quan (Potrykus 1975) và vi sinh vật (Davey và Power 1975). Hơn thế nữa, do tính sẵn sàng có thể sử dụng tế bào trần cho các phương pháp phá vỡ tế bào để nhanh chóng thu nhận các bào quan và các đại phân tử mà không gặp phải sự biến dạng hư hỏng như các phương pháp ly trích thông thường (Howland et al. 1975). Rất dễ nhanh chóng nhận thấy rằng các tính chất của màng sinh chất dưới một số điều kiện thuận lợi nào đó có thể chịu sự dung hợp và có khả năng hình thành tế bào lai, cuối cùng dẫn đến sự tạo ra tế bào lai sinh dưỡng liên quan đến sự cải thiện năng suất thu hoạch mùa vụ (Nickell và Torey 1969). Do mỗi một tế bào cách ly với tế bào khác trong quần thể tế bào trần và là một hệ thống đơn bào nên có thể thao tác tương tự như quần thể vi sinh vật. Tính chất này được khai thác thành công trong thí nghiệm cho nhiễm đồng loạt bởi virus (Takebe 1975), nuôi cấy nhân giống vô tính tế bào và phân lập các tế bào đột biến.

Giai đoạn chính trong sự phục hồi trở lại của tế bào trần trong môi trường nuôi cấy tế bào nguyên vẹn là quá trình tổng hợp và phát sinh trở lại vách tế bào. Tế bào trần phân lập từ mô quả cà chua được khảo sát chi tiết đầu tiên quá trình cung cấp enzym để phục hồi trở lại vách tế bào (Pojnar et al. 1967). Mặc dù báo cáo đầu tiên về enzyme phân lập của tế bào trần được công bố vào năm 1960 (Cooking 1960) nhưng mãi đến 10 năm sau sự phân chia tế bào đầu tiên từ tế bào trần mới được báo cáo (Nagata và Takebe 1970) thí nghiệm khảo sát trên tế bào thịt lá thuốc lá tái tạo nhanh chóng vách tế bào mới và khoảng 60-80% số tế bào có vách mới đã phân cắt tế bào trong môi

trường nuôi cấy. Mô sẹo được hình thành thúc đẩy sự tạo thành cành non rồi sau đó là cây thuốc lá nguyên vẹn (Takebe et al. 1971). Cùng thời gian ấy Kao et al. (1970) quan sát sự tái tạo và phân chia ở tế bào trần cây đậu nành trong môi trường nuôi cấy. Cuối năm 1970 đã chứng minh rõ nuôi cấy tế bào trần để tạo tập đoàn tế bào và cuối cùng là cây hoàn chỉnh đã trở nên là quy trình trong nhiều phòng thí nghiệm, và có nhiều loài đã được nhân bội ổn định. Tuy nhiên, còn có một số vấn đề cần khắc phục được nêu ra do Evans và Cocking (1978) đó là môi trường nuôi cấy, yếu tố vật lý môi trường, và yếu tố di truyền.

Một trong những lý do protoplast không rời nhau ra là bề mặt tế bào có tích điện và chúng có khuynh hướng kết dính với nhau. Nghiên cứu bằng điện di có thể xác định bề mặt tế bào có tích điện (Grout and Coutts 1974) và có thể trong một số điều kiện thông thường nào đó điện tích này là âm. Một trong những điều kiện tất yếu của yếu tố làm tan rã các tế bào là làm giảm thiểu điện tích này xuống làm cho tế bào tập hợp lại và màng tế bào sát lại gần nhau hơn. Một trong những hợp chất đầu tiên được ghi nhận gây ra sự tan rã là nitrate sodium (Power et al. 1970). Tế bào bóc trần để vào dung dịch muối này sẽ nhanh chóng đưa đến sự kết tập lại, và thông qua việc khảo sát sự chuyển động của tế bào trần trong buồng điện di cho thấy rõ nitrate sodium giảm thiểu điện âm của tế bào trần (Grout và Coutts 1974). Polyethylene glycol (PEG) được chấp nhận rộng rãi như một tác nhân gây ra sự tan rã (Kao và Michayluk 1974, Wallin et al. 1974); xử lý tế bào trần với PEG gây ra một sự kết tập nhanh chóng với tế bào trần thực sự tan rã xảy ra trong thời gian hydrat hoá trở lại kết hợp với sự gỡ bỏ của PEG. Sự sử dụng nitrate sodium để thúc đẩy sự hoà nhập dẫn đến sự tạo thành tế bào lai thực vật về mặt di truyền, ví dụ khối u lai giữa *Nicotiana glauca* và *Nicotiana langsdorfii* do Carlson và cộng sự (Carlson et al. 1972). Những tiến bộ nổi bật về yêu cầu phát triển những quy trình chọn lọc các tế bào lai sinh dưỡng độc lập của các thuộc tính bất kỳ đã biết của lai hữu tính. Do vậy những nỗ lực hướng trực tiếp đến việc sử dụng các đột biến, và sử dụng những chọn lọc trên căn bản sự khác biệt xảy ra giữa tăng trưởng thực vật tự nhiên và đáp ứng với môi trường dinh dưỡng và thuốc. Ở Nottingham *Petunia* được chọn cho những đánh giá này bởi vì đáp ứng của chúng đối với mô nuôi cấy và sự di truyền màu sắc cánh hoa được ổn định. Thực vật lai sinh dưỡng của *Petunia hybrida* và *P. parodii* đã được tạo ra thành công vào năm 1976 (Power et al. 1976). Như đã được thảo luận bởi Cocking (1989), những thành công khi sử dụng các đối tượng của họ cà Solanaceae không tiến hành song song với thành công trong nuôi cấy tế bào trần ngũ cốc. Điều đáng nói là hơn hai mươi năm sau không một ai đạt được sinh sản ổn định tế bào trần lá ngũ cốc. Thành công chỉ đạt

được trong mười năm gần đây trong việc tái tạo cây nguyên vẹn từ tế bào trần lúa, cô lập không phải từ lá nhưng từ dịch treo nuôi cấy tế bào (Abdullah et al. 1986). Thành công ban đầu khi lấy tế bào trần của cây thuốc lá và cây *Petunia* để tái tạo vách tế bào rồi trải qua sự phân chia để tạo thành mô sẹo, sau đó phân hóa thành cơ quan để tạo thành rễ và chồi non, làm lộ ra con đường nghiên cứu sai về các loại cây ngũ cốc.

Năm 1980 đã nhìn thấy được phương pháp tinh vi mở rộng trong tái tạo lại cây nguyên vẹn từ gia tăng vững chắc số các loài cây và trong sản xuất tế bào lai sinh dưỡng và cybrids, bao gồm ví dụ như các cá thể khác loài không có khả năng giao phối, *Petunia parodii* và *Petunia parviflora* (Powder et al. 1980). Quy trình được phát triển để tái tạo lại cây nguyên vẹn từ tế bào trần cô lập, không chỉ cho cây lúa, nhưng còn ở cà chua, đậu nành, hạt lanh, cải bắp, rau diếp và các cây lai sinh dưỡng giữa các loài khác nhau, có bộ máy di truyền khác nhau của *Lycopersicon*, *Nicotiana*, *Solanum*, *Glycine*, *Citrus*, *Brassica*, *Medicago* và *Trifolium* spp (Bajaj 1989a). Thêm vào đó các quy trình được phát triển xa hơn cho các kỹ thuật vi tiêm, dung hợp bằng điện, flow cytometry, hấp thu và tích hợp DNA, cô lập nhân và nhuộm sắc thể từ tế bào trần (Bajaj 1989b).

Việc khám phá ra tế bào trần có thể bị nhiễm bởi virus khảm thuốc lá (Cocking and Pojnar 1969) kích thích sự quan tâm về vấn đề hấp thu vào hệ thống tế bào trần, mà đỉnh điểm là sự biểu hiện của plasmid Ti trong vi khuẩn *Agrobacterium* gây khối u, được đưa vào tế bào trần để biến đổi tế bào trần, cung cấp bằng chứng đầu tiên về vai trò độc lập của plasmid Ti ở khía cạnh này (Davey et al. 1980). Điều này mở đường cho việc sử dụng plasmid chuyển nạp trực tiếp cho tế bào trần dẫn đến việc tạo ra được các loại rau và ngũ cốc chuyển gen và các vụ thu hoạch cây trồng bằng chuyển nạp trực tiếp DNA cho tế bào trần, bao gồm các loại lúa chuyển gen có khả năng sinh sản theo phương cách chuyển nạp bằng điện xung vào tế bào trần lúa plasmids chimaeric (Zang et al. 1988).

Những nghiên cứu trên cây lúa chuyển gen minh họa vai trò của tế bào trần trong việc biến đổi tế bào ngũ cốc và làm cho vấn đề phân tử và tế bào tiếp cận nhau hơn. Khảo sát trên một vài chi tiết minh họa các nghiên cứu này đã phát triển như thế nào trong thập niên 1980. Sự tương tác giữa virus với tế bào trần cô lập minh chứng poly-L-ornithine kích thích sự lây nhiễm, trong khi các nghiên cứu tiếp theo xác nhận rằng PEG cũng gia tăng sự thu hút virus và acid nhân của virus vào trong tế bào trần (Davey và Kumar 1983). Rồi sau đó những năm cuối thập niên 1970 đầu thập niên

1980 đây là thời gian phối hợp giữa các kỹ thuật xác định plasmid Ti có thể chuyên nạp hay không vào tế bào trần thực vật. Như đã đề cập trước đây các nghiên cứu bao gồm sự tương tác của cấu trúc siêu xoắn của plasmid Ti từ dòng octopine của *A. tumefaciens* với dịch treo tế bào trần *Petunia hybrida* với sự có mặt của PLO, kết quả tạo ra một tập đoàn tế bào trần có biểu hiện tính chất có vị đắng của đỉnh tăng trưởng trong môi trường có hormone tự do và sự tổng hợp octopine, cả hai đều mã hoá bởi gen Ti T-DNA (Davey et al. 1980). Deshayes et al (1985) đóng gói pGV23 NEO, đây là một plasmid mang gen aminoglycoside phosphotransferase type II (APH II; neomycin phosphotransferase, NTP II) từ Tn5 có khả năng kháng kanamycin trong tế bào thực vật, vào trong thể tích chất béo (liposome) và dung hợp với plasmid có chứa túi của tế bào trần thuốc lá sử dụng PEG. Tập đoàn tế bào kháng kanamycin được cô lập ở $4.0 \cdot 10^5$. Mẫu cắt hạn chế DNA được chèn vào trong quá trình chuyển gen vào tế bào thực vật được chỉ định theo cách tích hợp kế nhau trong trình tự của plasmid, bao hàm sự tái tổ hợp đồng dạng giữa các trình tự trong khi chuyên nạp.

Tiến bộ chính trong chuyên nạp trực tiếp DNA vào tế bào trần đạt được khi nó được chứng minh rằng trình tự T-DNA là không cần thiết cho sự chuyên nạp ổn định và biểu hiện của DNA lạ trong tế bào thực vật. Một gen lai có thể chọn lọc bao gồm vùng giải mã của gen Tn5 NP II dưới sự kiểm soát của gen promoter CaMV VI được đưa và tế bào trần thuốc lá như là một phần của *E. coli* (pABCD1) bằng cách xử lý hỗn hợp tế bào trần - plasmid bằng PEG 6000. Tập đoàn đã chuyên nạp sẽ được chọn lọc trong môi trường có chứa 7 mg/ml kanamycin. Gen lạ sẽ được truyền qua cho thế hệ cây con bằng phép lai Mendel.

Trong khi tế bào trần thuốc lá được sử dụng rộng rãi như một hệ thống tiêu biểu cho các nghiên cứu DNA, các hệ thống tế bào trần khác, bao gồm lúa, cũng được quan tâm rộng rãi. Chuyên nạp gen hữu thụ cho *Brassica napus* được chuyển gen bởi pABD1 vào trong tế bào trần thịt lá bằng phương pháp xung điện (Guerche et al. 1987). Tính kháng kanamycin được truyền qua thế hệ cây con qua con đường hữu tính bởi lai một tính Mendel. Chuyển gen trực tiếp cũng chứng minh khả năng tạo hạt rau *Vigna aconitifolia* kháng kanamycin mô sẹo tái tạo từ tế bào trần sốc nhiệt xử lý bởi PEG và pLGV NEO 2103 (Kuhler et al. 1987). Các nghiên cứu chuyển gen trực tiếp vào tế bào trần thực vật cũng cung cấp một hệ thống để quan sát sự biểu hiện gen trong khoảng thời gian vài giờ xử lý chuyên nạp. Các nghiên cứu biểu hiện gen tạm thời (ngắn ngủi) như vậy có ích trong việc đánh giá cấu trúc và gen khởi động khi gen reporter sẵn sàng có thể thử nghiệm ví dụ như CAT và β -glucuronidase.

Rất hữu ích khi so sánh một vài tính chất chuyển nạp của tế bào trần thực vật và tế bào động vật. Thật vậy sự thúc đẩy để lượng định tính khả chuyển DNA trực tiếp vào tế bào thực vật, đặc biệt là tế bào thực vật đã được loại bỏ vách tế bào bằng enzym như trong trường hợp tế bào trần thực vật, từ các báo cáo nuôi cấy mô tế bào động vật cho thấy có khả năng chọn và biểu hiện một nhóm gen và hệ gen DNA. Bây giờ cơ hội xuất hiện các thể hệ đột biến do đưa các đột biến gen vào tế bào trần thực vật tương tác với DNA; đó là các bằng chứng chứng tỏ rằng các mẫu DNA lớn có thể đưa vào và biểu hiện ở tế bào động vật (Allshire et al. 1987).

Tế bào trần có thể cô lập bằng enzyme từ một số nhóm tế bào ví dụ như từ tế bào biểu bì lá của thuốc lá rồi có thể tái tạo lại thành cây nguyên vẹn (Davey et al. 1974). Lông hút của rễ là sản phẩm tự nhiên của tế bào biểu bì rễ, và nó đã được chứng minh xử lý bằng enzyme có thể làm tiêu hủy đỉnh sinh trưởng của lông hút và phóng thích tế bào trần (Cooking 1985). Tế bào trần cô lập từ rễ cây con, thân lá mầm, và lá mầm của *Lotus corniculatus* (sen) sẵn sàng phân chia trong môi trường nuôi cấy để tạo ra mô sẹo và từ đó có thể sinh ra tế bào trần (Ahuja et al. 1983) điều đáng quan tâm là xác định tế bào trần từ lông hút rễ còn giữ tính chất nguyên thủy hay không. Xử lý rễ của cây con *Lotus corniculatus* với cellulase và pectinase phóng thích các tế bào trần của đầu rễ lông hút khi ủ trong môi trường có enzym khoảng 1 phút. 10% của tế bào trần phân chia để tạo ra một tập đoàn tế bào mà sau đó tạo được chồi non. Cây tái tạo có kiểu hình và tế bào bình thường. Các nghiên cứu trong tương lai sẽ có thể làm cho một hệ thống như vậy được sử dụng để xác định nguồn gốc của tế bào trần có ảnh hưởng hay không đến con đường phát triển sau đó. Trong các tế bào trần cô lập từ dịch nuôi cấy để tái tạo cây nguyên vẹn cho thấy xảy ra qua sự phát sinh phôi dinh dưỡng (Abdullah et al. 1986). Có thể chẳng thay đổi con đường phát triển này bằng kỹ thuật điện cao thế trong quá trình phân bào của dẫn suất tế bào trần thực vật như đã quan sát bởi Rech et al. (1987). Gần đây, Chand et al. (1988) quan sát thấy sự bóc trần tế bào cây dược liệu thân gỗ *Solanum dulcamara* ở điện áp 250 đến 1250 vol/cm² trong ba xung điện kế tiếp nhau mỗi xung kéo dài 10 - 50 ms đã kích thích sự tăng trưởng của mô dẫn suất từ tế bào trần và cho thấy có gia tăng khả năng biệt hóa (Chand et al. 1988). Sẽ rất quan trọng để mở rộng các nghiên cứu này trên hệ thống tế bào trần. Sẽ có ích khi tế bào trần *Physcomitrella* tái tạo chỉ sản sinh một khối u khi đáp ứng với ánh sáng đơn cực, và tế bào phân cực này phân chia sau 24 giờ từ tế bào trần cô lập, từ hai tế bào con có hai mặt phát triển khác nhau (Jenkin và Cove 1983). Biến đổi con đường phát triển có thể cung cấp đầu mối giải mã về sự phát triển tế bào thực vật, tế

bào của nó và điều khiển phân tử.

Có lẽ vấn đề quan tâm chính là sự tương tác mới lạ giữa các đại phân tử, viruses và vi sinh vật và màng tế bào của tế bào trần. Điện xung để hình thành các lỗ trên màng tế bào có thể được dùng để khảo sát theo hướng này. Hơn nữa, điều chủ yếu không phải là tất cả vách tế bào phải được bỏ đi; một lợi ích của nghiên cứu trên nhiều mảng. Như đã khám phá ở hoa sen Lotus rất dễ bỏ đi vách tế bào một cách nhanh chóng ở đầu lông hút của rễ bằng xử lý rễ cây con với một hỗn hợp cellulase và pectinase. Gần đây chúng ta đã quan sát cấu trúc nốt sần tạo ra ở rễ lúa, rễ cây con của cây cải cho dầu khi xử lý rễ với hỗn hợp enzyme cellulase và pectinase và cho nhiễm Rhizobium hay Bradyrhizobium (Al-Mallah et al. 1989 và 1990). Các nghiên cứu này bao gồm sự phân hủy một phần vách tế bào làm lộ ra một phần màng sinh chất của tế bào biểu mô có ý nghĩa quan trọng cho việc nghiên cứu sự cộng sinh của Rhizobium đối với các cây trồng không phải họ đậu (Cooking và Davey 1991).

5.2. Phương pháp tách protoplast

Có 3 phương thức phân lập protoplast, đó là:

- Cơ học (không dùng các enzyme).
- Sử dụng enzyme tuần tự (qua hai bước).
- Sử dụng hỗn hợp enzyme (xử lý đồng thời).

Phương pháp cơ học tiến hành dựa trên cơ sở phá các mối liên kết của mô bằng các dao sắt nhọn (sharp-edged knife) và giải phóng các protoplast riêng rẽ. Phương pháp này cho hiệu suất thấp. Nói chung, các protoplast thường được phân lập từ các tế bào không bào hóa cao của mô dự trữ như chồi hành và vảy hành (bulbs and scales) của các loài thân hành, rễ củ cải (radish root), vỏ quả giữa của dưa chuột (mesocarp of cucumber), và rễ củ cải đường (beet root).

Phương pháp dùng enzyme có hiệu quả cao hơn rất nhiều so với phương pháp cơ học, phương pháp enzyme cho phép tách được hàng gram protoplast. Các enzyme được sử dụng là cellulase hoàn toàn không độc hại đối với tế bào.. Do vách tế bào có thành phần gồm pectin, cellulose, hemicellulose cho nên phải sử dụng hỗn hợp enzyme:

- Pectinase phân hủy pectin.
- Cellulase phân hủy cellulose.
- Hemicellulase phân hủy hemicellulose.

Ngoài ra, để protoplast không bị vỡ sau khi thành cellulose bị phân hủy người ta phải bổ sung những chất tăng áp lực thẩm thấu vào dung dịch enzyme để duy trì cân bằng thẩm thấu giữa nội bào và môi trường bên ngoài. Thành phần dịch enzyme (trên lít)

gồm có:

- Các enzyme (pectinase, cellulase, hemicellulase) từ 0,1-2%
- Sorbitol (0,15 M) 27,3 g - Mannitol (0,15 M) 27,3 g
- Glucose (0,1 M) 18 g
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (6 mM) 441 mg
- KH_2PO_4 (0,7 mM) 95 mg
- Đệm MES1 (3 mM) 650 mg
- Điều chỉnh pH 5,6 và khử trùng dung dịch enzyme bằng màng lọc Millipore.

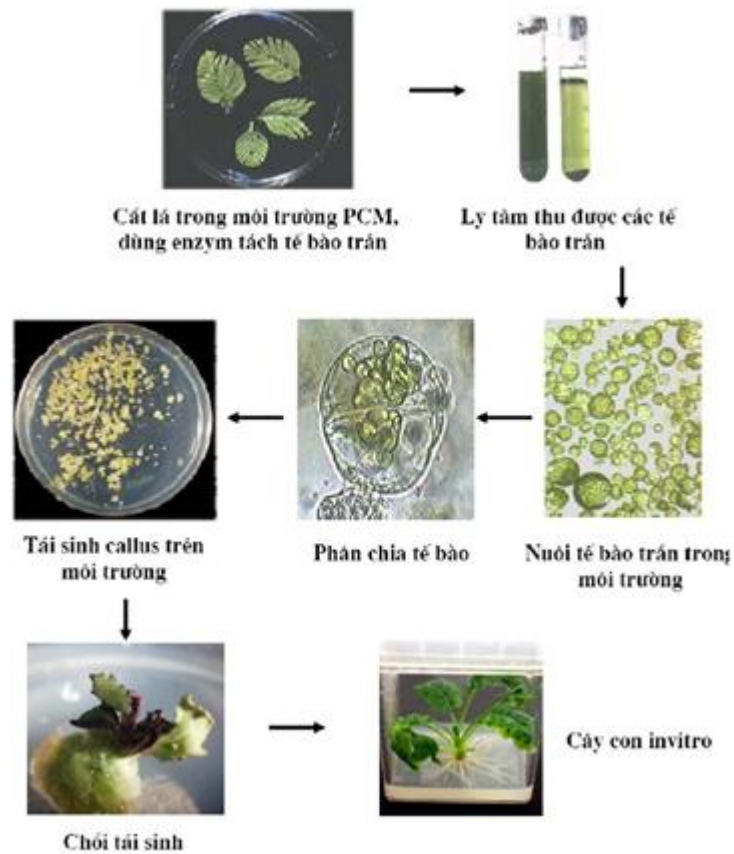
Tùy theo từng đối tượng và từng loại mô có thể thay đổi nồng độ của các enzyme trên cho thích hợp. Vì protoplast thực chất là tế bào trần không có thành cho nên có thể tách được từ nhiều nguồn khác nhau như: các bộ phận của cây (lá, rễ, hạt phấn), callus, tế bào đơn ...

Khác với tế bào vi sinh và tế bào động vật, tế bào thực vật có thành tế bào cứng được tạo ra bởi nhiều loại polime khác nhau. Thành tế bào có chức năng cơ học, tạo khung xương tế bào và hệ màng liên kết giữa các tế bào với nhau. Thành phần hoá học của tế bào rất phức tạp. Cellulose là thành phần chủ yếu của màng tế bào thực vật. Công thức hoá học tổng quát của cellulose là $(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5)_n$. Phân tử cellulose có hình sợi dài, thậm chí rất dài với sự liên kết của hàng nghìn các phân tử đường đơn với nhau. Ngoài cellulose còn có hemicellulose, pectin, lignin, một số chất béo và chất khoáng, pectin còn đóng vai trò quan trọng liên kết giữa các tế bào với nhau.

Tế bào trần (protoplast) là tế bào đã được tách khỏi màng tế bào (một lớp polyme bao bọc tế bào) và màng liên kết giữa các tế bào. Các enzym đóng vai trò chủ yếu trong phân huỷ màng tế bào và tạo ra tế bào trần là cellulase và pectinase. Tế bào sau khi bị mất lớp màng cứng sẽ có dạng hình cầu dưới áp suất thẩm thấu phù hợp của môi trường.

Tế bào trần có thể được tách ra từ các mô hoặc cơ quan khác nhau ở cây như lá, rễ, mô sẹo nuôi cấy in vitro .

Ưu thế của kỹ thuật tách và nuôi cấy tế bào trần là tế bào không có màng cứng, ở trạng thái đơn bào, mật độ tế bào thu được trên 1 đơn vị thể tích môi trường có thể rất cao (đạt 10^6 tế bào/ml môi trường). Tế bào trần ở một số cây trồng có khả năng tái sinh rất mạnh, ví dụ tế bào mô thịt lá ở thuốc lá, cải dầu, ... Bằng thao tác di truyền ở tế bào trần có thể dễ dàng tạo ra các tế bào biến đổi gen. Tế bào với kiểu gen biến đổi sẽ được bảo tồn khi tái sinh tế bào thành cây hoàn chỉnh.

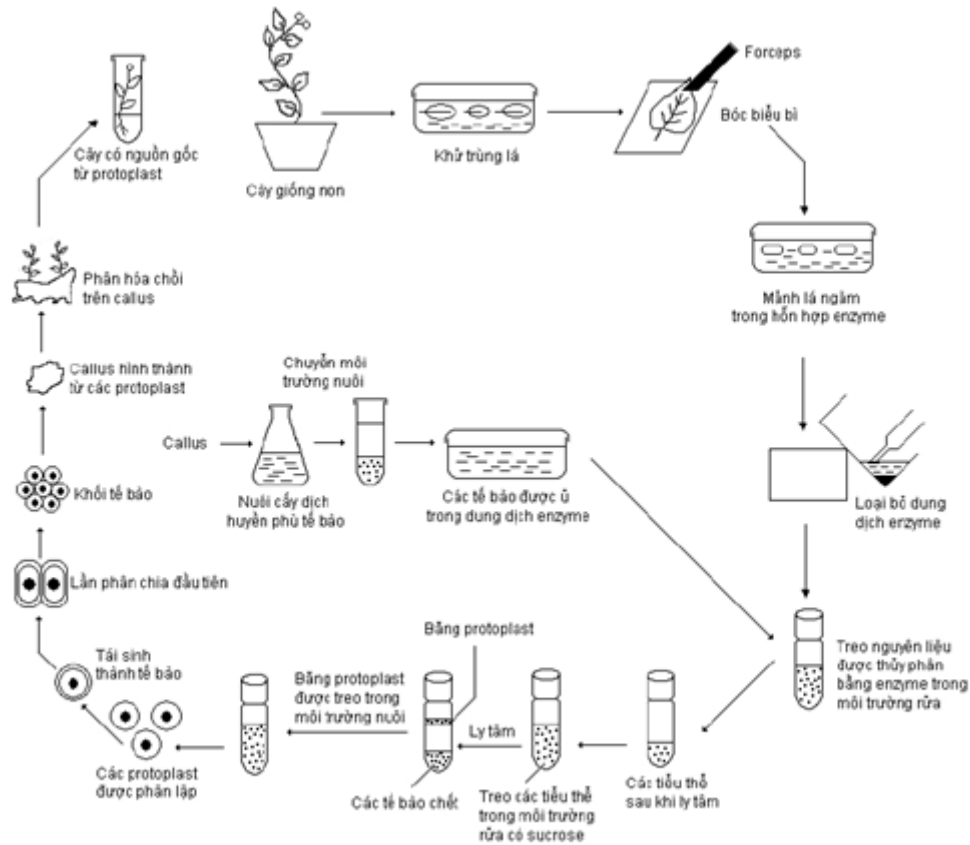


Hình 5.1 Các bước nuôi cấy tế bào trần cây hồng.

Lá cây

Lá là nguồn nguyên liệu thông dụng và truyền thống cho kỹ thuật protoplast thực vật, do nó cho phép phân lập được một số lớn các tế bào tương đối đồng nhất (relatively uniform cells). Protoplast phân lập từ lá qua năm bước:

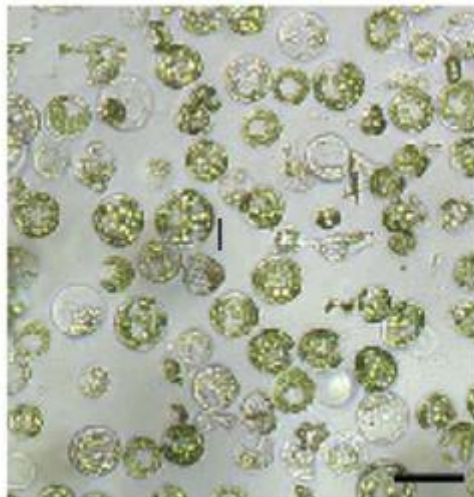
- Khử trùng lá.
- Loại bỏ lớp tế bào biểu bì (epidermal cell layer).
- Tiền xử lý enzyme.
- Ủ enzyme.
- Phân lập protoplast bằng phương pháp lọc và ly tâm



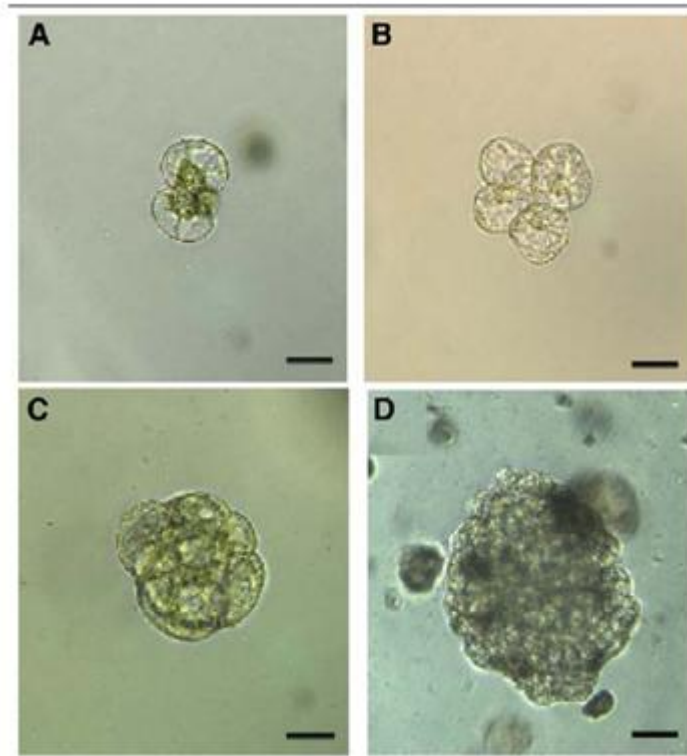
Hình 5.2. Các bước phân lập Protoplast từ lá cây

Phương pháp cơ bản để tách tế bào trần từ lá cây

1. Khử trùng mẫu lá
2. Ngâm mẫu trong dung dịch thẩm thấu để tế bào co nguyên sinh chất
3. Tách lớp mặt dưới lá
4. Ngâm mẫu trong hỗn hợp enzyme
5. Tinh sạch tế bào trần
6. Nuôi cấy tế bào trần trong môi trường thích hợp



Hình 5.3. Phân lập protoplasts của *Echinacea purpurea* (bar = 50 mm).



Hình 5.4. Sự phân chia tiếp theo của protoplasts. *Echinacea purpurea* (A) Phân chia protoplast- sau 6 giờ (bar = 25 mm). (B,C) Sự phân chia thứ hai và thứ 3 của protoplast (bar = 25 mm). (D) Cụm Protoplast-nhận được sau 6 ngày nuôi cấy (bar = 100 mm).

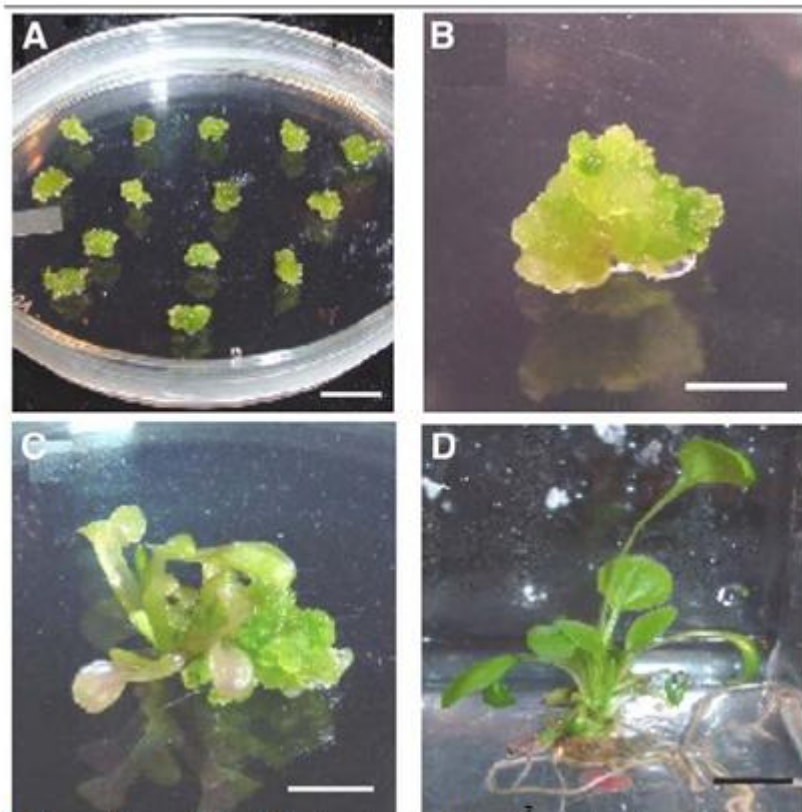
Bảng 5.1. Các enzyme thương phẩm thích hợp cho phân lập protoplast

STT	Enzyme	Nguồn thu nhận
1	<i>Các enzyme cellulase</i> Cellulase Onozuka R-10 Cellulase Onozuka RS Cellulase YC Cellulase CEL Cellulysin Meicelase P-1 Driselase	<i>Trichoderma viride</i> <i>T. viride</i> <i>T. viride</i> <i>T. viride</i> <i>T. viride</i> <i>T. viride</i> <i>T. viride</i> <i>Irpex lacteus</i>
2	<i>Các enzyme Hemicellulase</i> Helicase Hemicellulase Hemicellulase H-2125	<i>Helix pomatia</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Rhizopus sp.</i>

	Rhozyme HP 150	<i>Aspergillus niger</i>
3	<i>Các enzyme Pectinase</i> Macerase Macerozyme R-10 PATE Pectinol Pectolyase Y-23 Zymolyase	<i>Rhizopus arrhizus</i> <i>R. arrhizus</i> <i>Bacillus polymyxa</i> <i>Aspergillus sp.</i> <i>Aspergillus japonicus</i> <i>Arthrobacter luteus</i>

b. Nuôi cấy callus

Các callus non nuôi cấy in vitro cũng là nguyên liệu lý tưởng để thu được một lượng lớn protoplast. Nuôi cấy các callus già hơn thường cho các tế bào có kích thước lớn hơn và vách tế bào dày, điều này sẽ gây khó khăn cho sự thủy phân bằng enzyme. Vì thế, người ta thường sử dụng các callus non sau hai tuần cấy chuyển để phân lập protoplast.



Hình 5.5. Tạo mô sẹo, Tái sinh cây và sự phát triển của cây con từ protoplasts của *Echinacea purpurea*. (A) Tạo mô sẹo từ cụm protoplast thu nhận được (bar = 1 cm). (B) sự phát sinh cơ quan từ mô sẹo (bar = 1 cm). (C) Tái sinh chồi từ mô sẹo (bar = 1

cm). (D) cây con hoàn chỉnh (bar = 1 cm).

Các cây tái sinh từ quần thể tế bào đơn (single cells) có thể duy trì đầy đủ các đặc tính bảo toàn cao của giống hoặc dòng nhưng vẫn có thể thay đổi một số tính trạng như mong muốn. Ví dụ: Các cây mía đường có nguồn gốc từ các tế bào callus mang đầy đủ các đặc điểm của bố mẹ, nhưng một vài tính trạng đã được cải thiện như kháng bệnh, tăng sản lượng và hàm lượng đường cao hơn. Gần đây, người ta thường phân lập protoplast từ callus để tạo ra các tế bào đơn, dẫn đến kết quả là thu được các protoclonal khác nhau (protoplast propagated clones) ở các loài cây trồng quan trọng trong nông nghiệp.

c. Nuôi cấy dịch huyền phù tế bào

Nuôi cấy dịch huyền phù tế bào (cell suspension cultures) cũng cung cấp nguồn nguyên liệu rất tốt cho phân lập protoplast. Dịch huyền phù tế bào có mật độ cao được ly tâm, sau đó loại bỏ thể nổi (supernatants). Các tế bào được ủ trong hỗn hợp enzyme (cellulase + pectinase) và lắc từ 6 giờ tới qua đêm tùy thuộc vào nồng độ của các enzyme. Sử dụng nồng độ thấp của các enzyme mục đích ngăn cản sự kết dính trong dịch huyền phù tế bào để thu được hiệu suất phân lập protoplast cao hơn.

Các protoplast có nguồn gốc từ nuôi cấy dịch huyền phù tế bào có tiềm năng tái sinh cây hơn hẳn ở các loài mà trước đó đã không thành công khi thử tái sinh từ các protoplast có nguồn gốc tế bào thịt lá. Những thành công gần đây khi tái sinh cây in vitro hoàn chỉnh từ protoplast của các loài ngũ cốc (kê, lúa miến, lúa mạch giống Golden Promise) đã chứng minh nuôi cấy dịch huyền phù tế bào là nguồn nguyên liệu lý tưởng cung cấp các protoplast toàn vẹn.

d. Tái sinh cây từ tế bào trần

Các bước:

Từ 1 tế bào trần khi nuôi cấy trong môi trường tái sinh thì màng tế bào hình thành, sau đó tế bào phát triển thành cụm tế bào (mô sẹo). Từ mô sẹo sẽ hình thành phôi rồi tái sinh thành cây hoàn chỉnh.

5.3. Nuôi cấy protoplast

5.3.1. Môi trường nuôi cấy

a. Thành phần dinh dưỡng

Nói chung, môi trường nuôi cấy protoplast tương tự với môi trường nuôi cấy dịch huyền phù tế bào và callus. Tuy nhiên, nồng độ của Fe, Zn và amonium dùng trong môi trường nuôi cấy mô thực vật có thể là quá cao đối với nuôi cấy protoplast. Hầu hết muối của môi trường B5 và MS có cải biến một ít là thích hợp. Tăng nồng độ

Ca²⁺ trong môi trường nuôi cấy protoplast từ 2-4 lần so với bình thường có lợi cho việc duy trì tính toàn vẹn của màng tế bào. Nồng độ sucrose thích hợp thường từ 3-5%, nhưng ở một số loài (ví dụ: thuốc lá) sucrose được sử dụng ở nồng độ thấp hơn (1,5%). Môi trường nuôi cấy protoplast sử dụng nitơ hữu cơ dạng CH và nitơ vô cơ NH₄NO₃ (20 mmol/L).

Các vitamin dùng trong nuôi cấy protoplast cũng giống trong môi trường nuôi cấy mô tiêu chuẩn. Auxin và cytokinin sử dụng ở các tổ hợp nồng độ khác nhau để cảm ứng tạo vách tế bào và kích thích phân chia trong các protoplast phân lập. Protoplast của ngũ cốc đòi hỏi cung cấp 2,4-D riêng rẽ hoặc tốt hơn là phải phối hợp với cytokinin. Tuy nhiên 2,4-D cũng như các auxin khác (NAA, IAA) được sử dụng riêng rẽ thường làm mất tiềm năng phát sinh hình thái ở các callus có nguồn gốc protoplast. Các cytokinin thường được sử dụng là BAP, kinetin, 2-iP, hoặc zeatin. Mặc dù, tổ hợp hai loại phytohormone nói trên thay đổi tùy loài, nhưng nói chung trong nuôi cấy protoplast tỷ lệ auxin/kinetin cao thích hợp cho phân chia tế bào, trong khi các protoplast có nguồn gốc từ những tế bào phân hóa cao lại cần tỷ lệ kinetin/auxin cao để tái sinh cây.

b. Áp lực thẩm thấu của môi trường

Trong quá trình phân lập và nuôi cấy, các protoplast cần được duy trì cân bằng áp lực thẩm thấu giữa môi trường và nội bào cho tới khi tái sinh được vách tế bào vững chắc. Trong cả hai trường hợp chênh lệch áp lực thẩm thấu giữa môi trường và nội bào theo hướng môi trường nhược trương hoặc ưu trương sẽ dẫn đến tình trạng protoplast bị vỡ hoặc teo lại. Các chất điều chỉnh áp lực thẩm thấu (thông thường là để tăng áp lực thẩm thấu) trong môi trường nuôi cấy protoplast và trong hỗn hợp enzyme là sorbitol, mannitol, glucose, hoặc sucrose. Các protoplast sẽ sinh trưởng ổn định hơn trong trong dịch được tăng nhẹ áp lực thẩm thấu. Đối với các protoplast thịt lá của ở ngũ cốc và đậu thì mannitol hoặc sorbitol là các nhân tố ổn định áp lực thẩm thấu thích hợp hơn cả, trong khi sucrose lại thích hợp hơn glucose hoặc mannitol trong nuôi cấy protoplast của khoai tây, đậu hoa (sweet pea), tước mạch (brome grass) và sắn. Trong nuôi cấy dịch huyền phù thuốc lá, galactose và fructose đã được sử dụng để điều chỉnh áp lực thẩm thấu.

Các chất phân ly ion (KCl 335 mmol/L và MgSO₄.7H₂O 40 mmol/L) cải thiện tốt khả năng sống sót của protoplast. Thông thường các dung dịch enzyme được bổ sung các muối nhất định (CaCl₂ 5-100 mmol/L) song song với các nhân tố ổn định thẩm thấu không phân ly ion. Cocking và Peberdy (1974) đã phát triển dung dịch rửa protoplast (cell-protoplast washing, CPW) chứa muối và các nhân tố ổn định thẩm thấu thích hợp. Dung dịch CPW có thể được dùng trong suốt quá trình ủ enzyme và rửa

protoplast. Thời gian ủ enzyme tùy thuộc vào nồng độ của nó trong dung dịch và loại nguyên liệu được sử dụng.

c. Mật độ dàn trải protoplast

Mật độ protoplast tối ưu là từ $1 - 10^4$ đến $1 - 10^5$ /mL. Tuy nhiên, các thí nghiệm lai soma (somatic hybridization) và phát sinh đột biến (mutagenesis) cần tạo dòng tế bào riêng rẽ, do đó phải dàn trải protoplast ở mật độ thấp hơn (100-500 protoplast/mL). Nuôi cấy ở mật độ thấp giúp dễ dàng phân lập và xác định các khuẩn lạc lai khi có mặt của hệ thống chọn lọc. Kao và Michayluk (1975) đã xây dựng môi trường nuôi cấy protoplast (KM 8p) (Bảng 6.2) trong đó các protoplast được nuôi cấy riêng rẽ (ví dụ: *Vicia hajastana*) có khả năng phân chia cho tới khi tạo thành callus. Môi trường này còn kích thích phân chia nhanh hơn ở các protoplast thịt lá của cỏ linh lăng (alfalfa), đậu (pea), khoai tây, và sản phẩm dung hợp potato + tomato được nuôi cấy dàn trải ở mật độ thấp. Các protoplast nuôi cấy trên môi trường này được đặt trong tối vì môi trường KM 8p sẽ trở nên độc đối với tế bào dưới điều kiện ánh sáng mạnh.

Bảng 5.2. Môi trường KM8p dung cho nuôi cấy protoplast ở mật độ thấp (khử trùng bằng phương pháp lọc)

Thành phần	Nồng độ (mg/L)	Thành phần	Nồng độ (mg/L)
<i>Muối khoáng</i>		<i>Các acid hữu cơ</i>	
NH ₄ NO ₃	600	(chỉnh pH tới 5,5 bằng NH ₄ OH)	
KNO ₃	1900	Sodium pyruvate	5
CaCl ₂ .2H ₂ O	600	Citric acid	10
MgSO ₄ .7H ₂ O	300	Malic acid	10
KH ₂ PO ₄	170	Fumaric acid	10
KCl	300		
Sequestrene330Fe	28		
KI	0,75		
H ₃ BO ₃	3	<i>Các vitamin</i>	
MnSO ₄ .H ₂ O	10	Inositol	100
ZnSO ₄ .7H ₂ O	2	Nicotinamide	1
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25	Pyridoxine-HCl	1
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	Thiamine-HCl	10
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	D-Calciumpantothenate	0,5

		Folic acid	0,2
		p-Aminobenzoic acid	0,01
		Biotin	0,005
		Choline chloride	0,5
<i>Đường</i>		Riboflavin	0,1
Glucose	68400	Ascorbic acid	1
Sucrose	125	Vitamin A	0,005
Fructose	125	Vitamin D3	0,005
Ribose	125	Vitamin B12	0,01
Xylose	125		
Mannose	12		
Rhamnose	125		
Cellobiose	125		
Sorbitol	125		
Mannitol	125		
<i>Các phytohormone</i>		Đậu tương x Lúa mạch	Đậu tương x Đậu Hà Lan
2,4-D	1		0,2
Zeatin NAA	0,1		1
Vitamin-free	-		0,5
casamino acid	125		-
Nước dừa (lấy từ quả già xử lý 60oC/30 phút rồi lọc)	10ml/l		-

- Kỹ thuật tầng nuôi dưỡng

Một hướng khác trong nuôi cấy protoplast ở mật độ thấp là kỹ thuật tầng nuôi dưỡng (feeder layer technique). Raveh và cs (1973) đã chuẩn bị tầng tế bào nuôi dưỡng bằng cách chiếu xạ tia X (2×10^3 R) lên các protoplast dịch huyền phù tế bào của thuốc lá, khi đó sự phân chia của tế bào bị ức chế nhưng vẫn cho phép chúng duy trì các hoạt động trao đổi chất. Các protoplast bị chiếu xạ sẽ được rửa sạch ba lần và sau đó dàn trải chúng trên môi trường có agar mềm ở mật độ $2,4 \times 10^4$ /ml. Nuôi cấy trải các protoplast không qua chiếu xạ ở mật độ thấp (10-100 protoplast/ml) trên tầng nuôi dưỡng này.

- Đồng nuôi cấy các protoplast

Các protoplast của 2 loài khác nhau cũng được đồng nuôi cấy để kích thích sự sinh trưởng của chúng hoặc của tế bào lai. Phương pháp đồng nuôi cấy được sử dụng trong

những thí nghiệm mà các callus hình thành từ 2 loại protoplast có thể phân biệt hình thái được. Ví dụ: Các tế bào lai phân lập một cách cơ học (mechanically isolated hybrid cells) được đồng nuôi cấy với các protoplast phân lập từ chủng bạch tạng (albino strain) sẽ phát triển thành các khuẩn lạc màu xanh là loại khuẩn lạc dễ phân biệt với các khuẩn lạc không có màu xanh của chủng bạch tạng.

- Nuôi cấy vi giọt

Kỹ thuật nuôi cấy vi giọt (microdrop culture) đã thành công ở trường hợp nuôi cấy các tế bào lai của *Nicotiana glauca* (+) *Glycine max* và *Arabidopsis thaliana* (+) *Brassica campestris*. Kỹ thuật này cần đĩa nuôi cấy Cuprak được thiết kế đặc biệt gồm có một ngăn bên ngoài nhỏ và một ngăn bên trong lớn hơn. Các protoplast riêng rẽ hoặc các thể dị nhân trong giọt môi trường dinh dưỡng (khoảng 0,25-25 μ l) được chuyển bằng pipette Drummond vào mỗi ngăn bên trong của đĩa Cuprak. Ngăn bên ngoài chứa đầy nước vô trùng để duy trì độ ẩm bên trong đĩa. Sau khi đặt nắp, đĩa được quấn giấy parafilm, giữ ở điều kiện ánh sáng và nhiệt độ tối thích. Tỷ lệ tế bào/dung tích môi trường nuôi cấy thích hợp tương đương mật độ 2-4 \times 10³/ml. Nếu tăng kích thước giọt (~ 25 μ l), tức là giảm mật độ dàn trải sẽ cho hiệu quả nuôi cấy kém hơn.

5.3.2. Tái sinh cây từ protoplast

5.3.2.1. Tạo vách tế bào

Quá trình hình thành vách tế bào có thể hoàn chỉnh trong vòng hai đến một vài ngày mặc dù các protoplast trong nuôi cấy thường bắt đầu tái sinh vách tế bào ngay sau khi phân lập một vài giờ. Vách tế bào được tạo thành bao gồm các vi sợi (microfibrils) sắp xếp lỏng lẻo, quá trình này đòi hỏi cung cấp nguồn carbon (sucrose) trong môi trường dinh dưỡng. Các chất phân ly ion để ổn định thẩm thấu trong môi trường đã ngăn cản sự phát triển vách tế bào. Các protoplast phát triển vách kém thường phân chia tế bào cũng rất kém.

5.3.3.2. Phát triển callus và tạo cây hoàn chỉnh

Ngay sau khi tạo vách tế bào chung quanh protoplast, các tế bào được tái cấu trúc đã tăng kích thước và sau một tuần xuất hiện sự phân chia tế bào đầu tiên. Sau 2-3 tuần, các khuẩn lạc tế bào có kích thước lớn được tạo thành và có thể cấy chuyển chúng lên môi trường không có sự điều chỉnh áp lực thẩm thấu để phát triển callus. Các callus này được cảm ứng để phân hóa cơ quan, hoặc tái sinh cây hoàn chỉnh.

5.4. Protoplast và vấn đề chọn dòng tế bào

Cơ thể thực vật bậc cao thường có kích thước khá lớn cho nên các kỹ thuật xử lý và chọn dòng khó thực hiện với số lượng cơ thể theo tính toán xác suất thống kê, chính vì vậy kỹ thuật chọn dòng thường chỉ được ứng dụng ở đối tượng vi sinh vật và đạt được

nhiều kết quả rất khả quan.

Bằng biện pháp bỏ thành cellulose và đưa cơ thể thực vật về trạng thái từng tế bào riêng rẽ với kích thước không lớn hơn nhiều so với cơ thể vi sinh vật đã cho phép tiến hành kỹ thuật chọn dòng vi sinh vật đối với thực vật bậc cao. Một đĩa petri đường kính 5- 7 cm cho phép nuôi tới $5 \cdot 10^6$ protoplast thuốc lá trong khi muốn trồng $5 \cdot 10^6$ cây thuốc lá cần có 106 m² tức là 100 ha đất canh tác.

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

5.5. Dung hợp protoplast

5.5.1 Xử lý bằng $NaNO_3$

Năm 1970, Power và cs đã dùng $NaNO_3$ (0,25 M) kích thích dung hợp hai protoplast. Carlson và cs (1972) cũng dùng phương pháp này để sản xuất cây lai soma đầu tiên (*Nicotiana glauca*. *N. langsdorffii*). Tuy nhiên, phương pháp này cho hiệu suất thấp vì $NaNO_3$ không thích hợp với tế bào bị không bào hóa mạnh như protoplast từ nhu mô lá.



Hình 5.6 Dung hợp tế bào trần bằng xử lý PEG

5.5.2. Xử lý bằng PEG

Tác nhân kích thích dung hợp là PEG (polyethylen glycol). Khoảng 0,6 ml dung dịch PEG (hòa tan 1 g PEG mol. wt. 1500 trong 2 ml glucose 0,1 M, $CaCl_2$ 10 mM, và KH_2PO_4 0,7 mM) làm thành một giọt protoplast và chuyển lên đĩa petri. Sau khi đậy nắp, protoplast trong dung dịch PEG được nuôi ở nhiệt độ phòng trong 40 phút, pha loãng dung dịch PEG bằng cách bổ sung 0,5-1 ml môi trường nuôi cấy protoplast sau mỗi 10 phút. Rửa protoplast với dung dịch không có tác nhân dung hợp bằng cách ly tâm và các protoplast được treo trở lại trong môi trường nuôi cấy.

Nồng độ và trọng lượng phân tử của PEG quyết định sự thành công của thí nghiệm dung hợp. PEG có trọng lượng phân tử thấp (~ 100) không thể tạo ra một sự dính chặt chắc chắn, trong khi PEG trọng lượng phân tử 6000 cho hiệu quả dung hợp cao hơn. Xử lý PEG cùng với pH/Ca²⁺ có hiệu quả tăng tần số dung hợp và khả năng sống của các protoplast.

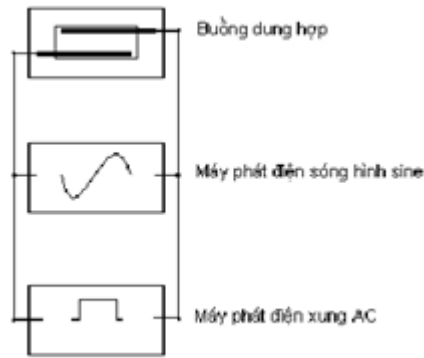
Sau khi xử lý bằng tác nhân dung hợp, các protoplast được nuôi cấy theo phương thức chuẩn. PEG có 2 tác dụng: hoặc cung cấp một cầu nối để Ca²⁺ có thể liên kết các bề mặt màng với nhau hoặc dẫn đến sự rối loạn tích điện bề mặt màng trong suốt quá trình rửa giải.

5.5.3. Dung hợp bằng điện

Phương pháp này đơn giản hơn, nhanh hơn và hiệu quả hơn dung hợp bằng hóa chất. Điều quan trọng hơn cả là dung hợp bằng điện (electrofusion) không gây độc đối với tế bào như thường thấy ở các protoplast hoặc các thể dị nhân được xử lý bằng PEG. Người ta đã dùng các xung điện (electric pulses) để đưa trực tiếp DNA ngoại lai vào trong tế bào thực vật, kỹ thuật này đã làm tăng sự quan tâm về việc ứng dụng dung hợp bằng điện vào lĩnh vực di truyền tế bào soma.

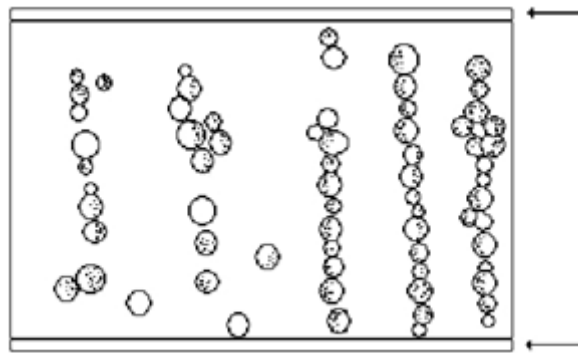
Senda và cs (1979) là những người đầu tiên nghiên cứu theo hướng dung hợp bằng điện ở *Rauwolfia*, quá trình dung hợp đã thực hiện thành công khi dùng xung điện 5-12 amp DC. Sau đó, Zimmermann và Scheurich (1981), cũng đã chứng minh rằng các protoplast có thể dung hợp bằng điện trường và đưa ra một protocol có thể sử dụng rộng rãi. Protocol này bao gồm 2 bước: Đầu tiên, các protoplast được đưa vào trong ngăn dung hợp nhỏ có 2 dây kim loại song song với nhau đóng vai trò là các điện cực. Tiếp đó, sử dụng điện áp thấp và trường điện từ AC dao động nhanh, kích thích các protoplast sắp thành từng chuỗi tế bào giữa các điện cực. Sau khi các tế bào xếp hàng hoàn chỉnh, quá trình dung hợp được thực hiện theo từng đợt ngắn của xung DC điện áp cao. Xung DC điện áp cao tạo ra sự phá vỡ thuận nghịch của màng nguyên sinh chất ở vị trí tiếp xúc của các tế bào, tạo ra sự dung hợp và tái tổ chức lại màng một cách hợp lý. Một quá trình hoàn chỉnh bắt đầu từ lúc đưa các protoplast vào bên trong ngăn và chuyển chúng lên môi trường nuôi cấy, có thể được hoàn chỉnh trong 5 phút hoặc ít hơn.

Các thể dị nhân hình thành nhờ dung hợp bằng điện đã phân chia trong môi trường nuôi cấy và có khả năng tái sinh chồi hoặc cây lai soma, bao gồm: *Nicotiana tabacum* (+) *N. tabacum*, *N. plumbaginifolia* (+) *N. tabacum*, *N. glauca* (+) *N. langsdorfii*, và *Solanum tuberosum* (+) *S. phureja*. Một số tổ hợp lai protoplast đã hình thành callus như: *Brassica napus* (+) *B. napus* và *Solanum brevidens* (+) *N. rustica*.



Hình 5.7. Sơ đồ dung hợp bằng điện

Buồng dung hợp có 2 điện cực song song được nối với máy dao động tần số cao (máy phát điện sóng hình sine hoặc trường AC) và máy phát điện xung DC.



Hình 5.8. Các protoplast thịt lá của cây thuốc lá xếp thành chuỗi ngọc trai dưới ảnh hưởng của trường AC (100 V/cm, 0,6 MHz)

5.5.4. Chọn lọc các thể lai soma

- Phương pháp mẫn cảm dược phẩm

Có thể ứng dụng sự mẫn cảm khác nhau của các protoplast phân lập từ các loài khác nhau. Ví dụ: *Petunia hybrida* và *P. Parodii* đối với actinomycin D. Trên môi trường MS, các protoplast tế bào thịt lá của của *P. hybrida* phát triển mạnh tạo thành khối callus lớn trong khi ở *P. parodii* các protoplast chỉ tạo thành các khuẩn lạc tế bào nhỏ. Bổ sung actinomycin D vào môi trường nuôi cấy có hiệu quả đối với khả năng tái sinh của protoplast *P. parodii*, nhưng ở *P. hybrida* các protoplast lại mất khả năng phân chia. Mặc dù môi trường nuôi có bổ sung dược phẩm, các thể dị nhân vẫn có thể sinh trưởng và sau cùng phân hóa thành các cây lai soma.

- Các đột biến khuyết dưỡng

Chọn lọc các thể lai soma nhờ sự bổ sung di truyền của các đột biến khuyết dưỡng

Mặc dù phương pháp này ứng dụng cho các thực vật bậc cao có gặp một số khó khăn, nhưng người ta cũng đã thành công trong việc chọn lọc một số lượng lớn các thể lai soma bằng cách dùng các protoplast khuyết tật enzyme nitrate-reductase (không sử dụng nitrate) và các dòng đột biến thuốc lá kháng chlorate. Các protoplast của hai đột biến khác nhau này đã được dung hợp và nuôi cấy trên môi trường chứa nitrate (nguồn nitrogen chính). Trong thí nghiệm đối chứng các protoplast bố mẹ không sinh trưởng khi có mặt nitrate trong khi các sản phẩm dung hợp đã tái sinh cây.



Sơ đồ 5.1. Sơ đồ chọn lọc các thể lai soma bằng cách ứng dụng sự mẫn cảm khác nhau của các protoplast thịt lá đối với actinomycin D

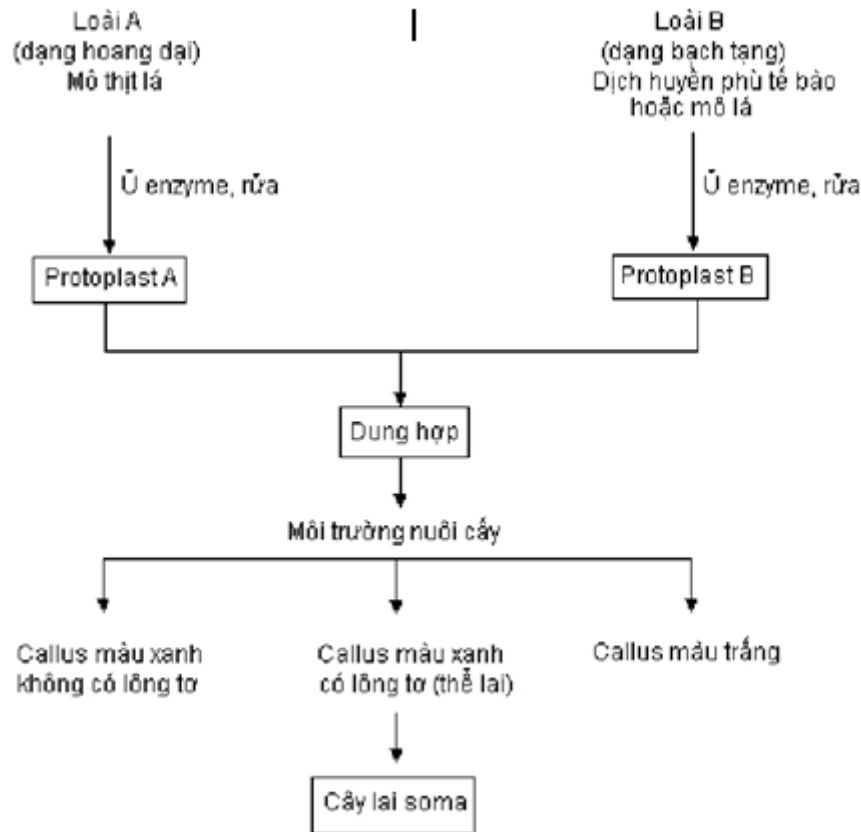
- Chọn lọc bổ sung di truyền

Dùng phương thức chọn lọc bằng mắt để phân lập các tế bào lai phát triển trên môi trường nuôi cấy có thành phần gây mẫn cảm đối với các protoplast bố mẹ. Thí nghiệm điển hình là dùng protoplast dạng hoang dại (mô thịt lá) của *Petunia parodii* dung hợp với protoplast bạch tạng phân lập từ nuôi cấy dịch huyền phù tế bào của *P. hybrida*, *P. inflata* và *P. parviflora* trong các thí nghiệm riêng rẽ. Ở trong tất cả các tổ hợp này protoplast màu xanh của *P. parodii* bị đào thải ở giai đoạn khuẩn lạc có kích thước

nhỏ, trong khi các protoplast của các loại bố mẹ khác phát triển thành các khuẩn lạc không màu. Ngược lại, các thể lai sinh sản thành các callus màu xanh và sau đó thành cây lai soma. Phương thức này cũng dùng để lai soma khác loài ở các chi *Daucus*, *Datura* và các chi khác.



Sơ đồ 5.2 Phương thức chọn lọc bổ sung di truyền chỉ có callus lai tái sinh cây
Tuy nhiên, trong các thí nghiệm lai soma khác chi, người ta đã dùng phương thức trong đó các protoplast bố mẹ và các thể lai dị nhân được phép phát triển callus trong nuôi cấy. Kết quả tạo ra ba loại callus khác nhau về hình thái, và có thể xác định được các mô lai, là các mô sau đó được phân lập ra để tái sinh thành cây lai soma



Sơ đồ 5.3. Phương thức dùng cho lai soma khác chi của *Atropa belladonna*

- Sử dụng các đột biến bạch tạng có các gen không allele cho chọn lọc bổ sung di truyền Melchers và Labib (1974) đã tiến hành thí nghiệm bằng cách sử dụng protoplast của hai giống thuốc lá *Nicotiana tabacum*: Giống s (sublethal) không tổng hợp được diệp lục bình thường nên rất mẫn cảm với ánh sáng cường độ cao. Giống v (virescent) cũng không tạo được lục lạp bình thường lá non trắng hoàn toàn và mẫn cảm với ánh sáng cường độ cao.

Hai giống này là hai dạng đột biến có thể bổ sung cho nhau được khi lai tạo, nghĩa là nuôi cấy ở ánh sáng 800 lux tới giai đoạn ra hoa, sau đó cho thụ phấn chéo sẽ thu được cây lai F1 có lá xanh bình thường và chịu ánh sáng cao (10.000 lux).

Melchers đã tiến hành tách protoplast của cây đơn bội thu được từ nuôi cấy bao phần của cây s và cây v rồi cho dung hợp. Sản phẩm dung hợp được chọn lọc trên môi trường chiếu 10.000 lux cho kết quả chỉ những hợp bào sống và phát triển thành khối callus xanh, trong khi các loại tế bào bố mẹ đều chết. Cây tái sinh từ khối callus xanh có lá xanh bình thường và chịu được ánh sáng cường độ cao.

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

5.5.5. Chọn lọc các tế bào lai

Bình thường, các tế bào lai được tạo thành trong quá trình dung hợp protoplast từ hai loài xa nhau về quan hệ họ hàng. Cây tái sinh từ tế bào lai như thế sẽ có plastome từ cả 2 loài bố mẹ nhưng hệ gen chức năng chỉ của một loài do có sự đào thải một bộ nhiễm sắc thể. Vì thế, cây có nguồn gốc từ những cây tái sinh đó sẽ là thể lai di truyền chỉ cho các tính trạng tế bào chất.

Để chuyển gen tế bào chất một cách hiệu quả, các tế bào của loài cho tế bào chất sẽ được chiếu xạ. Chiếu xạ bằng tia X hoặc γ từ 50-300 Gy có hiệu quả từng phần hoặc bất hoạt hoàn toàn các tế bào cho. Xử lý theo phương thức này ngăn chặn hoàn toàn sự phân chia của các tế bào không dung hợp và có vai trò như một nhân tố chọn lọc để sàng lọc các tế bào lai. Phương thức dung hợp dùng tia γ được ứng dụng thành công trong lai khác loài và, thỉnh thoảng, khác chi ở cả 2 mức độ nhân và cơ quan tử. Tác động qua lại giữa nhân và tế bào chất có thể xuất hiện ngay cả trong những sản phẩm dung hợp dùng tia γ khi chúng được xuất phát từ những protoplast thuộc những loài hữu tính không tương hợp nhau. Sự phân chia ở các sản phẩm dung hợp, và các tế bào tiếp theo sau, sẽ làm tăng khuôn lạc tế bào mà ở đó sự đào thải không định hướng nhiễm sắc thể đã xuất hiện từ phân cho. Tuy nhiên, giới hạn đào thải tùy thuộc vào hệ gen cho và các điều kiện nuôi cấy xác định.

Maliga và cs (1982) chứng minh rằng tính kháng streptomycin được mã hóa bởi chloroplast có thể được chuyển thông qua tế bào chất. Tương tự, Tan (1987) thu được các tế bào lai bằng cách dung hợp tế bào chất của *Petunia hybrida* và protoplast của *Lycopersicum peruvianum*.

5.6. Tồn tại của kỹ thuật protoplast

Kỹ thuật protoplast đã thu được thành công ở các loài thuộc họ cà (Solanaceae) và một số họ khác, nhưng thành công ở họ hòa thảo (Poaceae) là họ của các cây trồng ngũ cốc chính còn rất hạn chế. Potrykus (1980) đã thảo luận rất kỹ về vấn đề này. Theo Potrykus có những chỉ tiêu sau liên quan đến kết quả nuôi cấy và tái sinh từ protoplast tiềm lực in vitro.

1. Phân lập

- Cơ sở di truyền của tế bào (khả năng tiềm tàng của tế bào trong nuôi cấy in vitro).
- Tương tác tế bào trong cây.
- Cơ chế phân hóa trong quá trình phát triển cơ thể.
- Nguồn gốc cơ quan và cây hoàn chỉnh.
- Trạng thái sinh lý của tế bào.
- Tác động của quá trình phân lập.

- Tác động của trạng thái phân lập.

2. Điều kiện nuôi cấy

- Nhu cầu dinh dưỡng.

- Nhu cầu về phytohormone.

- Điều kiện vật lý của nuôi cấy.

- Các yếu tố ức chế có thể xuất hiện.

- Tác động của mật độ quần thể tế bào

3. Sự phân bào

- Sinh tổng hợp thành tế bào.

- Điều khiển sinh tổng hợp thành tế bào.

- Chức năng của thành tế bào đối với phân bào.

- Điều khiển sự phân bào.

- Điều khiển sự phân chia nhân.

- Điều khiển phân bào.

4. Sự phân hoá

- Điều khiển phân hóa tế bào.

- Tương tác tế bào trong nuôi cấy.

- Điều khiển và cơ chế tạo kiểu mô.

- Điều khiển quá trình tạo cơ quan, phôi.

CÂU HỎI ÔN TẬP

1. Giới thiệu chung về kỹ thuật nuôi cấy tế bào trần

2. Trình bày các phương pháp tách protoplast

3. Tóm tắt qui trình nuôi cấy protoplast

4. Nêu mối liên hệ của kỹ thuật Protoplast và vấn đề chọn dòng tế bào

5. So sánh các phương pháp dung hợp protoplast

6. Trình bày phương pháp chọn lọc các thể lai soma và các tế bào lai

7. Phân tích các tồn tại của kỹ thuật protoplast

Chương 6. NUÔI CÂY TẾ BÀO VÀ CHỌN DÒNG TẾ BÀO

6.1. Nuôi cấy tế bào đơn

Bản thân mỗi tế bào thực vật là một đơn vị độc lập, nó chứa đựng tất cả những thông tin di truyền đặc trưng của cơ thể từ đó nó sinh ra. Cho nên mỗi tế bào có thể xây dựng lại toàn bộ cơ thể mới nhờ tính toàn thể. Thực vật bậc cao là một nguồn cung cấp các hợp chất hóa học và dược liệu rất quan trọng. Tuy nhiên trong những năm gần đây sản lượng các thực vật đó rất khó đảm bảo ở mức ổn định do hậu quả của một số yếu tố như:

- Điều kiện tự nhiên không thuận lợi.
- Chi phí lao động ngày càng tăng.
- Khó khăn kỹ thuật và kinh tế trong trồng trọt.

Phương pháp nuôi cấy tế bào dịch huyền phù (dịch lỏng) của thực vật có khả năng góp phần giải quyết những khó khăn trên. Những tế bào trải qua quá trình nuôi cấy và sinh trưởng trong dịch huyền phù gọi là dòng tế bào. Dòng tế bào có những đặc điểm sau:

- Khả năng tách tế bào cao
- Phát sinh hình thái đồng nhất
- nhân to và tế bào chất đậm đặc
- Nhiều hạt tinh bột
- Có những dẫn liệu tạo cơ quan
- Có khả năng nhân đôi trong 24-72 giờ
- Mất tính toàn thể
- Tăng mức đa bội thể

Dịch huyền phù được tạo ra do sự nuôi cấy một mảnh mô sẹo không có khả năng biệt hóa, trong môi trường lỏng và được chuyển động trong suốt thời gian nuôi cấy. Có thể nuôi cấy một mảnh mô biệt hóa vào trong môi trường mặc dù thời gian nuôi cấy sẽ kéo dài nhưng những tế bào nuôi cấy sẽ ở trạng thái tự do. Tuy nhiên không có dịch huyền phù nào chỉ có những tế bào đơn. Các tế bào liên kết với kích thước khác nhau, các tế bào đang phân chia và những tế bào chết. Danh từ xốp (friability) dùng để chỉ những tế bào tách rời nhau sau khi phân chia.

Mức độ tách rời tế bào phụ thuộc khả năng tạo nhiều tế bào xốp và được điều khiển bởi môi trường. Tăng tỉ lệ Cytokinin/ Auxin sẽ sản xuất nhiều tế bào xốp.

Cần có một lượng mô sẹo ban đầu thích hợp là 2-3 g/cm³. Khi mô sẹo được cấy vào dịch lỏng ta có ngay giai đoạn Lag-phase. Đây là giai đoạn đầu tiên cho đến

khi có tín hiệu phân chia đầu tiên, sau đó là giai đoạn Exponential-phase và Linear-phase; là giai đoạn tế bào phân chia, tế bào tăng số lượng và tăng quần thể nhanh. Sau cùng là giai đoạn Stationary-phase là giai đoạn tế bào không phân chia, lượng tế bào sinh ra và chết đi bằng nhau. Sau cùng là giai đoạn suy vong.

Những tiến bộ của kỹ thuật này trong những năm gần đây đã được nhiều công trình tổng kết. Nuôi cấy tế bào thực vật trong điều kiện in vitro để sản xuất các chất tự nhiên có một số ưu điểm sau:

- Các tế bào thực vật có thể được nuôi cấy trong các điều kiện nhân tạo mà không phụ thuộc vào thời tiết và địa lý. Không cần phải vận chuyển và bảo quản một số lượng lớn các nguyên liệu thô.
- Có thể kiểm soát chất lượng và hiệu suất của sản phẩm bằng cách loại bỏ các trở ngại trong quá trình sản xuất thực vật, như là chất lượng của nguyên liệu thô và sự đồng nhất giữa các lô sản xuất.
- Một số sản phẩm trao đổi chất có thể được sản xuất từ nuôi cấy dịch huyền phù có chất lượng cao hơn trong cây hoàn chỉnh.
- Một số sản phẩm trao đổi chất có thể được sản xuất từ nuôi cấy dịch huyền phù có chất lượng cao hơn trong cây hoàn chỉnh.

Thách thức lớn nhất đối với công nghệ tế bào thực vật là sự ổn định cho phép nuôi cấy tế bào thực vật trên quy mô lớn và đạt hiệu suất tối đa cho sự tích lũy và sản xuất các hợp chất tự nhiên (hay còn gọi là các sản phẩm thứ cấp). Điều này có thể thực hiện bằng cách chọn lọc các kiểu gen thích hợp và các dòng tế bào có sản lượng cao, xây dựng các công thức môi trường dinh dưỡng hợp lý để nuôi cấy tế bào, thiết kế và vận hành các hệ thống nuôi cấy tế bào (bioreactor) hiệu quả. Chúng ta cũng có thể sử dụng kinh nghiệm và kiến thức có được từ nuôi cấy vi sinh vật để áp dụng cho nuôi cấy tế bào thực vật. Tuy nhiên, tế bào thực vật và vi sinh vật có một số đặc điểm khác nhau, vì thế cần phải cải biến và điều chỉnh các điều kiện nuôi cấy cũng như cấu hình của nồi phản ứng (bioreactor) để tìm được các yêu cầu đặc thù của nuôi cấy tế bào thực vật.

6.2 Chọn dòng tế bào

Kỹ thuật chọn dòng tế bào đã ra đời rất sớm trong nghiên cứu vi sinh vật. Nhưng ở thực vật bậc cao, kỹ thuật này mới được ứng dụng cách đây khoảng hơn 20 năm. Người ta có thể tiến hành xử lý và chọn lọc tế bào thực vật ở ba mức độ chính:

- Mô sẹo (callus).
- Tế bào đơn (single cell).
- Tế bào trần (protoplast).

Mục đích chọn lọc in vitro có thể khái quát ở những điểm sau :

- Chọn dòng tế bào chống chịu các điều kiện bất lợi của ngoại cảnh, ví dụ: chống chịu nóng, lạnh, phèn, mặn, khô hạn...
- Chọn dòng tế bào kháng các độc tố: độc tố do nấm bệnh tiết ra, các loại kháng sinh.
- Chọn dòng tế bào sản xuất dư thừa (over production) các loại sản phẩm chủ yếu là amino acid.
- Chọn các đặc điểm chỉ thị để nghiên cứu di truyền (genetic markers)...

Hiện tượng biến dị di truyền xuất hiện ở các tế bào không phân hóa (undifferentiation), các protoplast phân lập, các callus và các mô nuôi cấy in vitro. Nguyên nhân của biến dị chủ yếu là do những thay đổi về số lượng và cấu trúc của nhiễm sắc thể. Tính không đồng nhất của tế bào trong nuôi cấy tăng lên do các nhân tố sau:

(a) Nhiễm sắc thể ở trạng thái khảm hoặc có rối loạn di truyền ở các tế bào của mẫu vật cấy gây.

(b) Các đặc tính mới không theo quy luật do các điều kiện nuôi cấy gây ra. Trong nuôi cấy mô, các kiểu thay đổi như thế thường bị loại bỏ khi mục đích chính là tăng các quá trình nuôi cấy ổn định di truyền.

Những nghiên cứu gần đây cho thấy các thí nghiệm nuôi cấy mô hoặc tế bào thường trải qua những thay đổi di truyền (đa bội-polyploidy, lệch bội-aneuploidy, đứt gãy nhiễm sắc thể-chromosomal breakage, khuyết đoạn-deletion, chuyển đoạn-translocation, khuếch đại gen-gene amplifications, và đột biến-mutations), và những thay đổi này biểu hiện ở mức độ sinh hóa hoặc phân tử. Như vậy, nuôi cấy mô và tế bào thực vật có khả năng tạo biến dị di truyền tương đối nhanh và không cần phải ứng dụng các kỹ thuật phức tạp khác. Biến dị di truyền trong nuôi cấy mô biểu hiện ở sự thay đổi tính trạng của các cây tái sinh và sau đó truyền sang thế hệ sau bằng phương thức nhân giống hữu tính (ví dụ: rau diếp, thuốc lá) hoặc dinh dưỡng (ví dụ: mía, khoai tây).

Các biến dị chọn lọc được trong nuôi cấy mô có nhiều cách gọi khác nhau như: dòng callus (calliclones-từ nuôi cấy callus) hoặc dòng protoplast (protoplasts-từ nuôi cấy protoplast). Năm 1981, Larkin và Scowcroft dùng một thuật ngữ chung là biến dị dòng vô tính (somaclonal variation), mặc dù Evans và cs (1984) lại dùng thuật ngữ biến dị dòng giao tử (gametoclonal variation) cho các dòng bị biến đổi di truyền phát triển từ các tế bào giao tử hoặc thể giao tử. Sự đa dạng của biến dị ở các dòng vô tính làm nổi bật một thực tế rằng biến dị dòng vô tính có thể là một công cụ rất hữu hiệu cho việc cải thiện di truyền cây trồng.

6.2.1. Đặc tính của tế bào thực vật được nuôi cấy

Sự ổn định của các dòng tế bào được nuôi cấy là sự thể hiện tốc độ sinh trưởng và sinh tổng hợp các hợp chất thứ cấp có giá trị kinh tế, đặc biệt nhất là ứng dụng kỹ thuật nuôi cấy tế bào trên qui mô công nghiệp. Biến dị di truyền của tế bào nuôi cấy là cơ sở để thu nhận những thể biến dị soma có những đặc tính quý. Sự ổn định là yêu cầu cần thiết cho việc vi nhân giống các dòng tế bào và chọn lọc ổn định trong tạo giống. Một vấn đề khác được đề cập tới trong thông báo về nuôi cấy tế bào *Catharanthus* là tính không ổn định của các dòng tế bào đối với việc tạo sản phẩm thứ cấp. Một vài dòng mất khả năng tạo alkaloid ngay cả khi tiến hành bảo quản chúng. Vì thế, hiện tượng giảm năng suất không thể hoàn toàn loại trừ được. Khó khăn ngày càng trở nên lớn hơn khi đưa qui mô sản xuất lên dạng công nghiệp. Như vậy trước hết là phải tiến hành chọn lọc những dòng tế bào tỏ ra tương đối ổn định và tiến hành nghiên cứu cơ chế và nguyên nhân dẫn đến tính bất ổn định. Hiện nay, người ta cần tuân theo qui trình được ứng dụng trong ngành vi sinh vật học nhằm thu được những dòng tế bào có năng suất ổn định trong tất cả các giai đoạn nuôi cấy đồng thời để tránh mất hoàn toàn những dòng sản xuất này. Một số nghiên cứu cho thấy có những dòng tế bào chuyên tạo ra sắc tố có tính ổn định đặc biệt là những điều rất quan trọng trong vấn đề năng suất. Thế nhưng, xét về nghiên cứu di truyền cho đến nay thì chỉ mới có một công trình duy nhất phân tích số lượng nhiễm sắc thể của dòng tế bào tạo nhiều caroten và dòng không tạo caroten của cây *Daucus carota* và tác giả không tìm thấy sự sai khác giữa hai dòng này. Sự ổn định năng suất ở đây có thể do quá trình cấy chuyển, người ta chỉ cấy chuyển những khối callus có màu sắc đậm nhất, mặc dù việc làm đó hoàn toàn vô ý thức. Ngoài ra, người ta sẽ còn phát triển kỹ thuật bảo quản đông lạnh đạt tới trình độ cho phép tránh hoàn toàn sự xuất hiện những thay đổi do chính kỹ thuật đông lạnh gây ra. Phương pháp bảo quản bằng cách giảm phân chia tế bào trong nuôi cấy ở nhiệt độ 0°C là phương pháp có hiệu quả.

Việc tái thiết được năng suất của dòng tế bào *Catharanthus* nêu ở trên có thể được giải thích bằng hiện tượng tái biến song toàn bộ vấn đề mất đi và tái thiết năng suất sẽ được giải thích nếu những dòng tế bào được nghiên cứu là dòng epigenetic chứ không phải là những dòng genetic. Sự thật rằng tế bào thực vật nuôi cấy mang nhiều đặc điểm không di truyền đã được biết khá kỹ. Chỉ có một số ít trường hợp người ta chứng minh được rằng những thay đổi của dòng tế bào là do những đột biến cụ thể trong genome và plastome hoặc người ta chứng minh được có những sản phẩm gen thay đổi, ví dụ như enzyme thay đổi được tạo ra. Như vậy, việc sử dụng những dòng tế bào epigenetic hoặc không di truyền làm phức tạp hóa mục tiêu sản xuất các hợp

chất thứ cấp bằng nuôi cấy tế bào. Thật không may mắn vì rất khó chọn được dòng tế bào không mang những thay đổi không di truyền vì rằng muốn chứng minh điều đó phải tái sinh cây hoàn chỉnh từ những dòng tế bào này và sau đó tiến hành kiểm tra nuôi cấy mô từ hạt hoặc cây thu được từ những cây hoàn chỉnh đó.

Loại tế bào chính dung trong nuôi cấy là những tế bào mô sẹo là kết quả của những tế bào soma phân biệt hóa và những tế bào lai hữu tính. Tính đa dạng của những dòng tế bào là sự thuận lợi cho các nghiên cứu sinh học. Những mô sẹo đầu tiên, hình thành qua sự phân chia những tế bào ở mô thường không đồng nhất. Những tế bào mô nuôi cấy khác nhau là nguyên nhân tính không đồng nhất của tế bào mô sẹo tiền khởi.

Sự phân bào nguyên nhiễm bất thường trong suốt quá trình phát sinh và duy trì phát sinh dẫn đến sự hình thành những tế bào đa bội, lệch bội và tái sắp xếp lại nhiễm sắc thể. Dùng tốc độ sinh trưởng trong điều kiện nuôi cấy thích hợp dẫn đến việc chọn lọc nhanh chóng những tế bào không đi vào giai đoạn biệt hóa; mô sẹo không đồng nhất tiền khởi chuyển hóa thành tế bào mô sẹo chặt và sau đó chuyển hóa thành tế bào mô sẹo xốp, cả hai loại tế bào này không có cấu trúc mô học.

Thành phần dinh dưỡng của môi trường nuôi cấy và hormone xác định đặc tính sinh lí và phát sinh biểu sinh của những tế bào phụ thuộc vào những phần khác nhau của mô sẹo. Kiểu di truyền của một loại thực vật chịu ảnh hưởng bởi các quá trình biến đổi xác định cấu trúc và tốc độ sinh trưởng của mô sẹo.

Để có sự phân bào ở tế bào đơn, cần phải sử dụng môi trường giàu dinh dưỡng hay môi trường điều kiện bằng cách nuôi cấy chung với mô dinh dưỡng hay một lớp mô cung cấp dinh dưỡng.

Mật độ tế bào đơn cao và sự giảm thể tích môi trường thúc đẩy tế bào chuyển qua phân chia, đây là những điều kiện định trước để phát sinh phân bào ở những tế bào không có khả năng phân chia.

Nuôi cấy tế bào thực vật bậc cao có tính hai mặt trong di truyền:

1- Nó mang tính sở hữu thông tin di truyền cần thiết thể hiện ở mức độ tế bào.

Thông tin di truyền này được thực hiện trên chức năng của tế bào.

2- Tế bào nuôi cấy vẫn duy trì thông tin bổ sung xác định khả năng sản xuất các cơ chất.

Nguyên nhân gây chết trong quần thể tế bào invitro có thể được phân chia theo các kiểu sau đây:

- Có sự chết của tế bào ở tất cả các phase trong chu kì tế bào

- Sự chết xuất hiện ở một phase của giai đoạn giảm dần trong nuôi cấy do giới hạn dưỡng chất hay sự ức chế của các sản phẩm độc tố trong quá trình trao đổi chất.

- Sự chết thể hiện trước khi tế bào phân chia.

6.2.2. Nguyên liệu và điều kiện nuôi cấy

6.2.2.1. Kiểu gen và mẫu vật

Kiểu gen ảnh hưởng lên tần số tái sinh cây và tần số biến dị dòng soma. Sun và cs (1983) khi nghiên cứu khả năng tái sinh ở các thể đa bội của 18 thứ (variety) khác nhau của lúa thì chỉ tái sinh được nhiều dạng bội thể khác nhau ở thứ indica mà không tái sinh được ở thứ japonica.

Mẫu vật được sử dụng từ nhiều nguồn mô khác nhau như lá, rễ, lóng (internodes), bầu quả (ovaries) và hoa tự (inflorescences). Nguồn mẫu vật được xem là rất quan trọng trong việc xuất hiện biến dị dòng soma. Nghiên cứu ở cây phong lữ (geranium) cho thấy các biến dị soma có thể thu được từ cành giâm cuống lá (petiole cuttings) hoặc rễ in vivo, nhưng không thể từ cành giâm của thân (stem cuttings). Cây dứa (Ananas cosmosus) phát triển từ callus của hom giâm (slip), chồi đỉnh và chồi nách (crown and axillary bud) cho thấy chỉ có sự biến đổi ở đặc điểm của gai (spine), trong khi các cây phát triển từ callus của quả tự (syncarp) cho thấy có sự biến dị ở màu lá, gai, lớp sáp (wax) và tán lá (foliage) (Wakasa 1979). Van Harten và cs (1981) quan sát thấy có sự thay đổi hình thái ở 12,3% cây khoai tây tái sinh từ mảnh lá (leaf discs), ngược lại có tới 50,3% các cây biến dị có nguồn gốc từ callus của cuống bông (rachis) và cuống lá. Các tác nhân chọn lọc khác nhau được sử dụng dựa vào các nguồn mẫu vật khác nhau trong nuôi cấy, tạo ra một dãy biến dị dòng soma giữa các cây tái sinh.

6.2.2.2. Ảnh hưởng của phytohormone

Nồng độ cao của các nhân tố điều khiển sinh trưởng ảnh hưởng đến sự thay đổi của kiểu nhân trong các tế bào nuôi cấy. 2,4-D cảm ứng biến dị nhiễm sắc thể ở các cây tái sinh trong nuôi cấy mô của lúa mạch (Deambrogio and Dale 1980) và khoai tây (Shepard 1981) khi hiện diện ở nồng độ cao trong môi trường. Tương tự, các biến dị dòng soma của các loài *Nicotiana* cảnh (ornamental nicotiana) thu được từ mẫu lá trên môi trường có cung cấp BAP từ 5-10 mmol/L (Bravo and Evans 1985). Các phytohormone rất cần thiết cho cảm ứng phát sinh cơ quan và phân hóa chồi; tuy nhiên, nồng độ cao của các chất này không cho phép tái sinh thành cây hoàn chỉnh trong nuôi cấy mô và tỷ lệ phytohormone trong môi trường cần được điều chỉnh cẩn thận trong các hệ thống nuôi cấy nhân giống in vitro cho các biến dị dòng soma.

6.3 Biến dị dòng tế bào

6.3.1. Cơ sở phân tử của biến dị

Các biến dị cũng có thể xuất hiện như là kết quả của những thay đổi tinh vi hơn do các đột biến đơn gen xuất hiện trong nuôi cấy, và các đột biến này biểu hiện rõ

ràng không có những thay đổi thuộc nhân (karyological changes). Các đột biến lặn không phát hiện được trong những cây R0 (các cây tái sinh in vitro từ các tế bào hoặc mô bất kỳ), nhưng biểu hiện ở thế hệ R1 (thế hệ thu được sau khi tự thụ phấn (selfing) của cây R0).

Thế hệ F1 phân ly tính trạng quan tâm theo quy luật Mendel với tỷ lệ 3:1. Những phân tích sâu hơn đã xác định bản chất của biến dị. Biến dị dòng soma của các đột biến lặn đơn gen cũng đã được tìm thấy ở ngô, *Nicotiana sylvestris*, lúa và lúa mì. Trong một số trường hợp đặc biệt, các dòng chỉ thị di truyền (thiếu chlorophyll) đã giúp đánh giá các cây tái sinh từ nuôi cấy tế bào.

Những thay đổi trong hệ gen (genome) của tế bào chất cũng được quan sát ở các dòng soma. Ở cây ngô có hai tính trạng thuộc tế bào chất: (a) mẫn cảm với độc tố chết từ *Drechslera maydis* nội T-tác nhân gây bệnh rụi lá (leaf blight) ở giống ngô Southern, và (b) tế bào chất bất dục đực Texas (cms-T). Cả hai tính trạng này được điều khiển bởi mtDNA (DNA ty thể).

Một hướng khác của đột biến đơn gen trong biến dị dòng soma liên quan với các nhân tố gen nhảy (transposable elements). Chourey và Kemble (1982) đã phát hiện sự biến dị như là kết quả của sự xen đoạn của các DNA giống plasmid (plasmid-like DNA) trong hệ gen ty thể của nuôi cấy tế bào ngô cms-s. Những thay đổi cảm ứng bằng gen nhảy được thông báo chi tiết hơn ở các dòng thuốc lá, alfalfa và lúa mì. Biến dị dòng soma xuất hiện cũng có thể do những thay đổi phân tử gây ra do hiện tượng trao đổi chéo nguyên phân (mitotic crossing over-MCO) ở các cây tái sinh. Hiện tượng này bao gồm hai trường hợp biến dị đối xứng và bất đối xứng. Các đột biến đơn gen bởi MCO có thể hình thành một cơ chế thống nhất các biến dị di truyền mới. Những thay đổi nhỏ trong cấu trúc của các nhiễm sắc thể có thể dẫn đến những thay đổi về sự biểu hiện và chuyển giao di truyền (sang thế hệ sau) của các gen đặc trưng, như là khuyết đoạn (deletion) và nhân đoạn (duplication) của một bản sao (hoặc nhiều bản sao) của một gen, hoặc sự biến đổi gen trong các quá trình sửa chữa. Sự tái tổ hợp về sau, hoặc đứt gãy nhiễm sắc thể ở vùng ưu tiên hoặc các "điểm nóng" di truyền (hot spots) của các nhiễm sắc thể đặc biệt ảnh hưởng đến hệ gen dẫn đến thay đổi biểu hiện phenotype.

Các nghiên cứu gần đây đã chứng minh rằng những thay đổi trong DNA cơ quan tử, các profiles của protein và isoenzyme liên quan với sự xuất hiện của biến dị dòng soma ở thực vật (lúa mì, lúa, khoai tây, ngô, lúa mạch và lanh). DNA cơ quan tử được tinh sạch tương đối dễ và có chuỗi nucleotide phức tạp. Một số enzyme cắt hạn chế có thể dễ dàng phân biệt giữa các kiểu cytosine-methylation (thay đổi trong các biến dị dòng soma) bên ngoài và bên trong ở vị trí cắt hạn chế. Các dòng soma của lúa

mì có những biến đổi ở mặt bên của gliadin. Ở lúa mạch, các biến dị thường có nguồn gốc từ nuôi cấy callus; những biến dị có liên quan tới các đoạn spacer 1 của rDNA và các hordein cũng đã được tìm thấy.

6.3.2. Bản chất của biến dị dòng giao tử

Nguyên liệu di truyền trong các tế bào và mô soma được phân bố một cách bình thường như nhau thông qua quá trình nguyên phân (mitosis). Ngược lại ở các giao tử, chúng là sản phẩm của quá trình giảm phân (meiosis), nhận một nửa của sự bổ sung di truyền với các allele theo các quy luật phân ly độc lập theo Mendel. Để phân biệt các dòng soma có nguồn gốc soma và các dòng giao tử có nguồn gốc giao tử, người ta dùng 3 thông số khác nhau. Thứ nhất, cả hai loại gen đột biến lặn và trội cảm ứng bởi biến dị dòng giao tử sẽ biểu hiện trực tiếp ở các cây đơn bội tái sinh từ tiểu bào tử (microspores) của các bao phấn nhị bội (từ đó chúng sẽ có chỉ một bản sao của mỗi gen). Điều này cho phép phân tích trực tiếp các dòng giao tử (R0) để xác định các thể biến dị mới. Thứ hai, các thể tái tổ hợp phát triển trong các dòng giao tử sẽ là kết quả của tổ hợp chéo giảm phân (meiotic crossing over). Thứ ba, dòng giao tử có thể được dùng chỉ sau khi có được sự ổn định nhờ gấp đôi số lượng nhiễm sắc thể của nó. Giá trị của biến dị dòng giao tử trong cải thiện di truyền rõ ràng từ sự phát triển của các dòng đơn bội kép (double-haploid) bằng cách nuôi cấy bao phấn của các cây lai F1 của lúa mì và lúa. Nuôi cấy bao phấn đã được sử dụng để phát triển các cây tái tổ hợp của thể lai F1 của lúa mì giống Xian nog 5675 (một thứ có mày trắng, râu ở đầu hạt thóc, cụm hoa hình chùy và cuống hoa ngắn) và giống Jili (một thứ có mày màu đỏ, có râu, cụm hoa hình thoi và cuống hoa cao). Một số cây đơn bội kép đã được phát triển biểu hiện các đặc điểm hỗn hợp của cả hai bố mẹ.

Biến dị ở cây tái sinh từ mô của thể giao tử đã được thông báo ở một số trường hợp do khám phá ra "dị hợp tử dư" (residual heterozygosity, thường có ở vi khuẩn). Hướng nghiên cứu khám phá các dị hợp tử dư ở thực vật là nuôi cấy bao phấn từ các thể đơn bội kép và kiểm tra biến dị xuất hiện ở các chu trình tiếp theo của sinh sản đơn tính (androgenesis). Kiểm tra các cây có nguồn gốc từ chu trình thứ hai của nuôi cấy bao phấn đơn bội kép cây thuốc lá đã tìm ra được các biến dị về năng suất, chiều cao cây, ngày ra hoa, và hàm lượng alkaloid tổng số. Các biến dị tương tự đã được thông báo ở các cây từ thể đơn bội kép của *N. sylvestris* phát triển sau một số chu trình sinh sản đơn tính. Các biến dị dòng giao tử là kết quả của các nhân tố gây ra sự tái tổ hợp giảm phân và các đột biến trước khi nuôi cấy bao phấn.

6.3.3. Đột biến hay thay đổi hoạt tính gen

Đột biến phải là kết quả rõ ràng của sự thay đổi cấu trúc bậc một của DNA có di truyền dẫn đến những biến đổi về tính trạng, đột biến phải là thay đổi lâu dài và di

truyền cấu trúc bậc một của DNA dẫn đến những biến đổi tính trạng.

Thông thường trong nuôi cấy tế bào thực vật đột biến được chọn lọc thông qua thay đổi tính trạng của tế bào. Những thay đổi về tính trạng tế bào có thể là kết quả của thay đổi hoạt tính gen. Ví dụ: Dòng tế bào thuốc lá kháng cycloheximide của Maliga (1976) nếu cấy chuyển 1-2 lần sang môi trường không chứa cycloheximide thì khả năng kháng cycloheximide mất đi. Điều đó chứng tỏ tính kháng cycloheximide do một gen bình thường không thể hiện.

- Tương tự như vậy người ta cũng gặp ở dòng tế bào cà rốt chống chịu 2,4-D của Widholm (1977).

- Dòng tế bào cà rốt kháng colchicine là kết quả thay đổi tính chất màng tế bào.

Các dạng biến đổi như vậy do một cơ chế không di truyền (epigenetic mechanism) điều khiển. Thay đổi tính trạng do đột biến phải là những tính trạng chuyển qua thế hệ sau bằng sinh sản hữu tính được. Đột biến của DNA nhân sẽ phân ly theo định luật Mendel sau khi lai, còn đột biến ở DNA cơ quan tử như lục lạp và ty thể thì có thể di truyền theo đường mẹ. Cho tới lúc lai xong, tốt nhất chỉ nên gọi các dòng vừa phân lập được là các dòng tế bào (hoặc các dạng thay đổi tính trạng). Khi tái sinh cây từ một dòng tế bào cũng có thể xuất hiện những cây không di truyền tính trạng đã chọn. Điều đó có thể giải thích như sau: lúc chọn một số tế bào mẫn cảm được bảo vệ bởi các tế bào chống chịu xung quanh bằng cách cung cấp các sản phẩm trao đổi chất hoặc enzyme qua các khe tế bào, những tế bào mẫn cảm cũng có thể xuất hiện thông qua hiện tượng tách tế bào vô tính, hiện tượng tạo khảm hoặc những biến đổi di truyền (back mutation-thoái biến) và không di truyền (epigenetic).

Các dạng biến đổi chọn được trong nuôi cấy *in vitro* thường xuất hiện với tần số 10⁻⁵-10⁻⁸ khi không xử lý đột biến. Nếu xử lý sẽ tăng được tần số đó lên 10 lần.

Các tác nhân gây đột biến thường được sử dụng là:

- Ethylmethane sulphonate (EMS).
- N-methyl-N-nitro-N-nitroso guanidine (MNNG).
- N-ethyl-nitrosourea (ENU).
- Tia X hoặc tia UV.

Chưa có số liệu cụ thể về nồng độ, phổ và tần số đối với từng loại tác nhân bởi vì độ lớn của khối tế bào được xử lý, mật độ tế bào gieo trên đĩa petri và số nhiễm sắc thể cũng như karyotype của tế bào bị xử lý. Sử dụng protoplast thực vật bậc cao có thể là phương pháp tốt nhất để tiếp cận vấn đề này.

6.4. Nguyên tắc chọn dòng tế bào

6.4.1. Chọn trực tiếp

Thông qua ưu thế về sinh trưởng hay sự khác biệt thấy được về màu sắc có thể chọn được dòng tế bào từ quần thể tế bào. Một số dòng có khả năng kháng kháng sinh, kháng các chất đồng đẳng của amino acid hoặc chống chịu muối cũng có thể chọn trực tiếp từ quần thể tế bào. Hệ thống tế bào hay được sử dụng là các tế bào dịch huyền phù hoặc khối callus. Điều kiện chọn lọc ở đây là các độc tố với nồng độ khác nhau gây tác động trực tiếp lên sinh trưởng của tế bào. Những tế bào có khả năng phân chia trong môi trường chứa độc tố với nồng độ tăng dần từ lần cấy chuyển này đến lần cấy chuyển khác được sàng lọc dần (chọn lọc kiểu bậc thang). Hoặc có thể đưa cả quần thể tế bào vào điều kiện môi trường ức chế sinh trưởng hoàn toàn để chọn ra những tế bào sống sót, tuy nhiên ngưỡng tối đa của mức độ hoặc nồng độ tác nhân chọn lọc cần phải được thăm dò trước nếu không có thể ức chế sự phát triển của các tế bào đột biến trong quần thể tế bào nuôi cấy. Thông thường, người ta trộn tế bào vào môi trường thạch chứa được độc tố và chọn những tế bào sống sót phân chia thành khuẩn lạc mô sẹo, cũng có thể cấy trực tiếp lên môi trường chọn lọc chứa độc tố. Dòng chống chịu thường xuất hiện từ một phần của khối tế bào nuôi cấy.

6.4.2. Chọn gián tiếp

Trong trường hợp này đặc điểm của dòng được chọn là kết quả biểu hiện khuyết tật của tế bào. Thí dụ điển hình là chọn dòng thiếu enzyme nitrate reductase (NR). Trên môi trường chứa CIO-3 những tế bào có NR sử dụng CIO-3 như NO-3 và khử thành CIO-2, CIO-2 tác dụng như một độc tố cho nên chỉ có những tế bào không có NR mới sống sót trên môi trường chọn lọc.

6.4.3. Chọn tổng thể

Các tế bào dị dưỡng thực vật thường được chọn bằng phương thức xử lý đột biến và nuôi trên môi trường có chứa yếu tố dinh dưỡng cần thiết có khi lại chính là yếu tố gây đột biến, ví dụ: đột biến lặn chịu được S-2-aminoethyl cysteine xuất hiện sau khi xử lý đột biến phôi nuôi cấy.

6.5. Cách chọn dòng tế bào

6.5.1. Không có tác nhân chọn lọc

Các tế bào và callus không tổ chức (unorganised), sinh trưởng trong nuôi cấy in vitro ở các thời kỳ khác nhau trên môi trường không chứa tác nhân chọn lọc (độc tố hoặc các chất ức chế), được cảm ứng để phân hóa các cây hoàn chỉnh. Các cây tái sinh sẽ được trồng trên đồng ruộng để chọn lọc các biến dị. Bằng phương thức này người ta đã thu được các biến dị dòng soma của các loài cây trồng khác nhau.

6.5.1.1. Cây mía đường (*Saccharum officinarum*)

Cây biến dị phân lập từ nuôi cấy mô và tế bào được xác nhận đầu tiên ở mía.

Công việc bắt đầu ở đảo Fiji (Nhật), phân lập các dòng phụ (subclones) ở giống mía Pindar để kháng bệnh Fiji (do virus aphid-transmitted) và bệnh mốc sương (downey mildew) (do *Scelerospora sacchari*). Tính kháng được duy trì ở các dòng soma qua một vài thế hệ trồng trên đồng ruộng. Ở Australia, Larkin và Scowcroft (1981), đã khai thác khả năng tạo các biến dị của nuôi cấy mô để cải thiện một số giá trị nông học của giống mía Q101 kháng bệnh đốm mắt (do *Helminthosporium sacchari*). Tương tự, Liu (1981) đã xác định các dòng callus mía cho cây ưu thế hơn giống (thứ) địa phương tốt nhất (F- 160, Taiwan) về năng suất, hàm lượng đường và khả năng kháng bệnh than (do *Ustilago scitaminea*).

6.5.1.2. Cây khoai tây (*Solanum tuberosum*)

Shepard và cs (1980) đã tái sinh một số lớn cây từ protoplast tế bào thịt lá của giống "Russet Burbank" và thông báo các biến dị thu được trong quần thể protoclonal. Một số trong chúng kháng được bệnh thối sớm (early blight-do *Alternaria solani*) hoặc thối muộn (late blight-do *Phytophthora infestans*). Các protoclonal kháng virus Y và xoắn lá (leaf-roll) cũng đã xuất hiện trên đồng ruộng (Thomson và cs 1986).

Biến dị di truyền ở khoai tây phát triển từ cây tái sinh trong nuôi cấy mô có thể di truyền sang thế hệ sau thông qua sinh sản sinh dưỡng (Sree Ramulu 1986). Các biến dị phân lập trong các cây tái sinh từ callus giống Bintje, cho các dòng-sản xuất bằng phương thức sinh dưỡng-mang các tính trạng về năng suất, kháng bệnh thối muộn và nấm vảy (scab) trên đồng ruộng tốt hơn.

6.5.1.3. Cây cà chua (*Lycopersicon esculentum*)

Evans và cs (1987), đã phân lập các dòng soma của cà chua bằng các biến dị hình thái, là các đột biến lặn của tính bất dục đực kháng nấm *Fusarium oxysporium* ở mắt của cuống lá, khả năng lục hóa của lá, màu sắc của quả và hoa. Một số biến dị về hình thái nói trên là do những thay đổi về số lượng nhiễm sắc thể. Các nhà khoa học ở DNA Plant Technology Co. (USA) đã phát triển các biến dị dòng soma của cà chua cho quả có vị ngọt tăng, cấu tạo (texture) quả tốt hơn, màu và hàm lượng chất khô cao (20%). Một trong những biến dị như thế đã được đăng ký bản quyền là giống (thứ) thương mại vào năm 1986 (Marty 1988).

6.5.1.4. Cây phong lữ (*geranium*)

Skirvin và Janick (1976) đã phát triển một loài *geranium* (*Pelargonium*) từ các biến dị soma có mùi hương được cải thiện và đặt tên là "Velvet Rose". Điều này cho thấy giống cây trồng thương mại (commercial crop plants) đầu tiên bắt nguồn từ các biến dị dòng soma. Giống mới này có hoa đối xứng mang các nhị hữu thụ lớn, núm nhụy chẻ 5, trồng bằng hạt. Trong khi ở giống bố mẹ thì ngược lại, hoa bất đối xứng mang các bao phấn bé và bất thụ, núm nhụy chẻ 2, và không bao giờ trồng bằng hạt.

6.5.1.5. Các loài ngũ cốc và hòa thảo (*cereals and grasses*)

Các cây ngũ cốc và hòa thảo có nguồn gốc callus có thể là nguồn nguyên liệu cung cấp các biến dị dòng soma. Cây của các dòng này khác nhau về chiều cao, kích thước, dạng lá, chiều dài của râu (ở đầu hạt thóc), khả năng hữu thụ của cụm hoa, hoặc màu của hạt. Các biến dị chọn lọc có giá trị thương mại là dòng bất dục đực (male sterility), điều chỉnh protein gliadin, kháng bệnh sương giá ở lúa mì (Galiba và Sutka 1988), tăng năng suất ở lúa và chín sớm ở ngô (Evans 1989), kháng bệnh cháy rụi (fireblight) ở cây lê (*Pyrus communis*) (Viseur 1989). Trong số các loài hòa thảo, các loài thuộc chi *Lolium*, *Panicum* và *Pennisetum* cũng cho nhiều hứa hẹn về tiềm năng biến dị dòng soma.

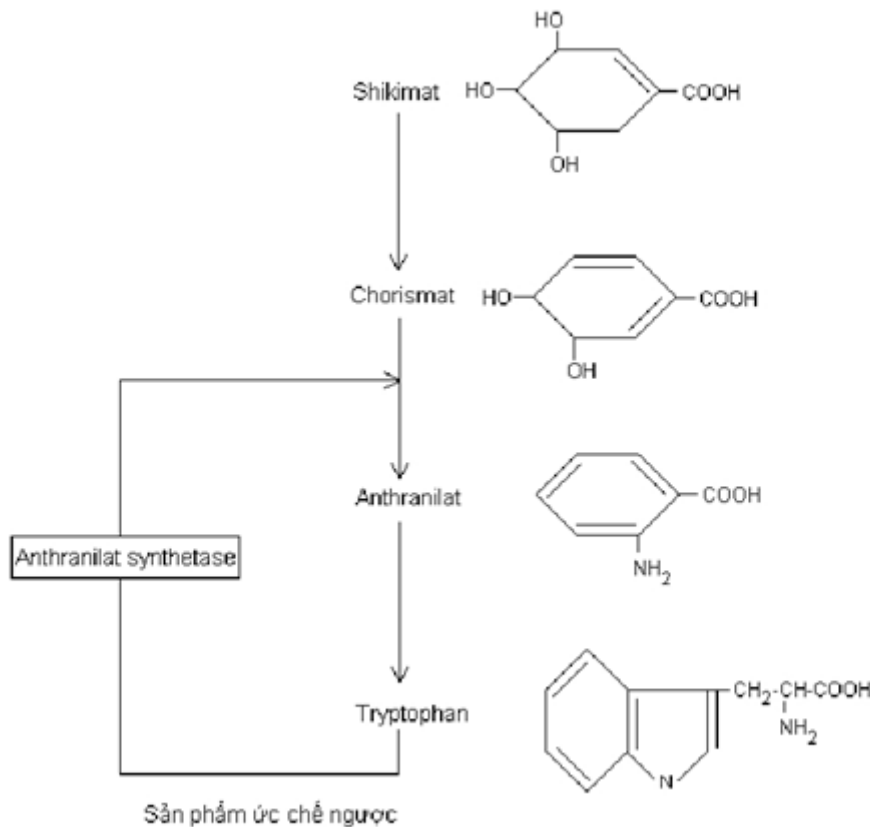
6.5.2. Có nhân tố chọn lọc (*with selection pressure*)

Theo phương pháp này, các dòng tế bào biến dị được sàng lọc từ nuôi cấy nhờ vào khả năng sống sót của chúng khi có mặt các độc tố/chất ức chế trong môi trường dinh dưỡng, hoặc dưới các điều kiện stress của môi trường. Các biến dị có thể thu được bằng cách chọn lọc trực tiếp, gián tiếp. Sự phân lập được tiến hành trong nuôi cấy dịch huyền phù hoặc bằng cách dàn trải tế bào đơn/protoplast.

6.5.2.1. Kháng amino acid và các đồng đẳng của amino acid

Một số amino acid trong đó có valine và threonine ức chế sinh trưởng tế bào khi đưa chúng vào môi trường dùng đường nuôi cấy, vì chúng ức chế tế bào sử dụng NO₃ hoặc ngăn cản amino acid cùng nguồn gốc. Ngoài ra, nếu bổ sung các chất đồng đẳng của amino acid vào môi trường nuôi cấy chúng có thể được sử dụng như amino acid vào việc tổng hợp ra các phân tử protein, kết quả các phân tử này bị mất hoạt tính. Hiện tượng ức chế này có thể khắc phục bằng cách cung cấp cho tế bào thêm các amino acid khác hoặc các hợp chất dẫn xuất bình thường khác của chúng.

Đối với tế bào, chúng có thể tự khắc phục bằng cách tăng cường tổng hợp các amino acid thích ứng. Và đây là nguyên nhân vì sao các dòng tế bào kháng được các chất đồng đẳng của amino acid lại sản xuất dư thừa amino acid. Cơ chế của hiện tượng sản xuất dư thừa là quá trình ức chế ngược (feed-back inhibition) kém mẫn cảm hơn. Trong dòng tế bào kháng 5-methyl-tryptophan cơ chế ức chế sản phẩm ngược này kém mẫn cảm vì vậy hoạt tính của anthranilat synthetase vẫn cao và lượng Trp được tạo ra cao gấp năm lần so với bình thường. Ở các dòng kháng p-fluorophenyl alanine cơ chế ức chế sản phẩm ngược hoạt động của enzyme chorismat mutase kém mẫn cảm với phenylalanine và tyrosine. Vì vậy lượng phenyl được tạo ra rất cao.



Sơ đồ 6.1. Cơ chế ức chế ngược đối với tryptophan

Trong thực tế hiện tượng kiểm tra lỏng lẻo các quá trình sinh tổng hợp amino acid vẫn tồn tại không cần sự có mặt các chất đồng đẳng của amino acid. Các amino acid tự do này (Phe, Tyr, Met, Lys) sẽ được tích lũy lại hoặc chuyển hóa tiếp (ví dụ: thành các hợp chất phenol). Hiện tượng thải amino acid tự do ra môi trường chỉ gặp đối với proline (Pro).

Ngoài ra, khả năng kháng các chất đồng đẳng của amino acid còn có thể do những cơ chế khác gây ra, ví dụ như:

- Tế bào hạn chế thu nhận các chất đồng đẳng của amino acid.

Hoạt động thu nhận các chất đó rất yếu.

- Tế bào có khả năng chọn các amino acid bình thường để tổng hợp protein trong khi các chất đồng đẳng của amino acid bị bỏ lại.

- Trường hợp kháng threonine thì tế bào có những thay đổi trong hệ thống enzyme sử dụng NO-3 .

Nghiên cứu về tính kháng các đồng đẳng của amino acid có ý nghĩa thực tiễn rất lớn. Người ta hy vọng sẽ tạo được các giống cây có giá trị dinh dưỡng cao. Chẳng hạn: Widholm (1977) đã chọn được một dòng tế bào cà rốt có thể sản xuất 27 lần tryptophan tự do nhiều hơn bình thường và tổng 25% lượng Tryp tổng số (tự do +

trong protein). Ở một dòng tế bào cà rốt khác cùng một lúc kháng được 4 chất đồng đẳng của amino acid, và hàm lượng các amino acid tương ứng là Lys, Phe, Met và Tryp tăng từ 6-34 lần. Tuy nhiên, biểu hiện sự sản xuất dư thừa này có còn giữ được sau khi tái sinh cây hay không đó là điều cho đến nay vẫn chưa được kết luận.

Vấn đề tái sinh cây từ dòng tế bào kháng 5-methyltryptophan là vấn đề sinh lý khá lý thú. Kháng 5-methyltryptophan sẽ sản xuất dư thừa tryptophan mà tryptophan lại là tiền chất của IAA nên tế bào sẽ sản xuất dư thừa IAA và như vậy tế bào sẽ sinh trưởng tự dưỡng auxin nghĩa là không cần auxin ngoại sinh đưa vào môi trường. Lượng IAA tăng cũng làm cho tế bào mất khả năng tạo phôi và tạo chồi. Chỉ có 10-6 tế bào có thể tạo cây, và có thể do một đột biến thứ hai xảy ra trong trao đổi chất Tryp hay IAA. Cho tới nay đã có một số kết quả như sau:

- 2 trường hợp cây tái sinh từ mô sẹo-Nicotiana tabacum kháng methionine sulfoximine và valine.
- 1 trường hợp chọn từ nuôi phôi-Hordeum vulgare và Zea mays kháng lysine + threonine, Nicotiana tabacum kháng 5-methyl tryptophan.
- 1 trường hợp chọn cả cây-Triticum kháng 5-methyl tryptophan.

Những dòng này có khả năng di truyền tính trạng này cho thế hệ sau qua sinh sản hữu tính.

6.5.2.2. Kháng bệnh

Các tế bào đơn hoặc protoplast phân lập được nuôi cấy dưới tác dụng của các tác nhân gây đột biến vật lý hoặc hóa học để cảm ứng cho tính kháng phytotoxin. Carlson (1973) tái sinh cây từ protoplast thuốc lá được xử lý ethylmethane sulphonate (EMS)- chọn lọc cho tính kháng methionine sulphoximide (MSO)-nhận thấy tính chống chịu tăng lên đối với Pseudomonas tabacci. Tính kháng được di truyền như một tính trạng đơn nửa trội (single semi-dominant trait).

Gegenbach và Green (1975-1977), chọn lọc tính kháng T-toxin của Helminthosporium (độc tố đặc trưng vật chủ) ở nuôi cấy in vitro ngô, đã thu được dòng ngô bắt dục dục có khả năng kháng bệnh rỉ sắt do nấm Helminthosporium maydis gây ra bằng kỹ thuật chọn dòng tế bào nuôi cấy bằng phương thức sau:



Sơ đồ 6.2. Chọn dòng kháng *Helminthosporium maydis* ở ngô

Kháng độc tố của nấm bệnh rỉ sắt và tính bất dục đực di truyền đường mẹ do đột biến trong một gen gây nên, hoặc do trong tế bào chất có cả một quần thể genome của các cơ quan tử, chọn lọc tính chịu bệnh tức là chọn gen thích hợp trong quần thể đó. Tính kháng thường do mtDNA quyết định, và tính bất dục đực trong trường hợp này cũng do mtDNA quyết định.

Ở thuốc lá, người ta chọn lọc được đột biến kháng methionine sulfoximine, độc tố do *Pseudomonas tabaci* tiết ra (*P. tabaci* gây bệnh cháy rụi ở thuốc lá).

6.5.2.3. Kháng chất diệt cỏ

Sinh trưởng của cỏ dại trong quần thể các cây trồng quan trọng trong nông nghiệp thường được điều chỉnh bằng các chất diệt cỏ. Vì các chất diệt cỏ (herbicide) có thời gian sống dư ngắn (short residual life), nên chúng được ứng dụng lặp lại nhiều lần trên cây trồng. Một số cây trồng đã trở nên nhạy cảm với chất diệt cỏ do việc sử dụng lặp lại của nó trên cây. Hơn nữa, phương pháp điều chỉnh cỏ dại như thế này là không kinh tế vì các chất diệt cỏ hầu hết là đắt tiền. Phương pháp nuôi cấy in vitro cho phép thu được các cây biểu hiện tính chống chịu đối với các chất diệt cỏ. Nuôi cấy protoplast trên môi trường có các chất diệt cỏ khác nhau đã cảm ứng đột biến tạo các dòng tế bào chống chịu sau đó có thể tái sinh thành cây. Các cây kháng các chất diệt cỏ tái sinh từ tế bào nuôi cấy bao gồm *Nicotiana tabacum* (kháng amitrole, bentazone, chlorosulphon, isopropyl N-carbamate, phenmedifarm, picloram và paraquat), *Corydallis* (kháng glyphosphate), và *Medicago sativa* (kháng glufosinate). Một số tính trạng chống chịu được di truyền như là các đơn allele (monogenic alleles) trội hoặc

lặn. Khả năng chống chịu chất diệt cỏ cũng có thể được biến nạp vào tế bào bằng cách lai soma (xem chương 4) hoặc thông qua công nghệ chuyển gen (xem chương 5).

6.5.2.4. *Chống chịu các stress của môi trường*

Stress của môi trường do nồng độ muối cao ở trong đất là nhân tố chính kìm hãm phát triển nông nghiệp. Từ kết quả đầu tiên là tái sinh cây thuốc lá in vitro chống chịu NaCl (Nabors 1980), đến nay người ta đã phát triển một số lượng lớn các dòng tế bào và cây trồng có thể chống chịu nồng độ muối cao (Nguyễn Hoàng Lộc 1992). Dix (1977) đã phát triển các dòng chống chịu lạnh bằng cách nuôi cấy tế bào của *Nicotiana glauca* ở điều kiện nhiệt độ thấp. Tuy nhiên, phenotype của các cây tái sinh từ những dòng này không được chuyển sang thể hệ sau bằng phương thức hữu tính. Lê Trần Bình (1992) cũng đã thu được các dòng lúa chịu nhiệt độ thấp thông qua nuôi cấy mô callus. Các kết quả tương tự theo hướng biến dị dòng soma mang tính trạng chống chịu stress nước được cảm ứng bằng PEG hoặc mannitol (mannitol or PEG-induced water stress) trong nuôi cấy mô callus thuốc lá, mía và lúa cũng đã được thông báo (Nguyễn Hoàng Lộc 1992, 2003; Razdan 1994; Trương Thị Bích Phượng 2004).

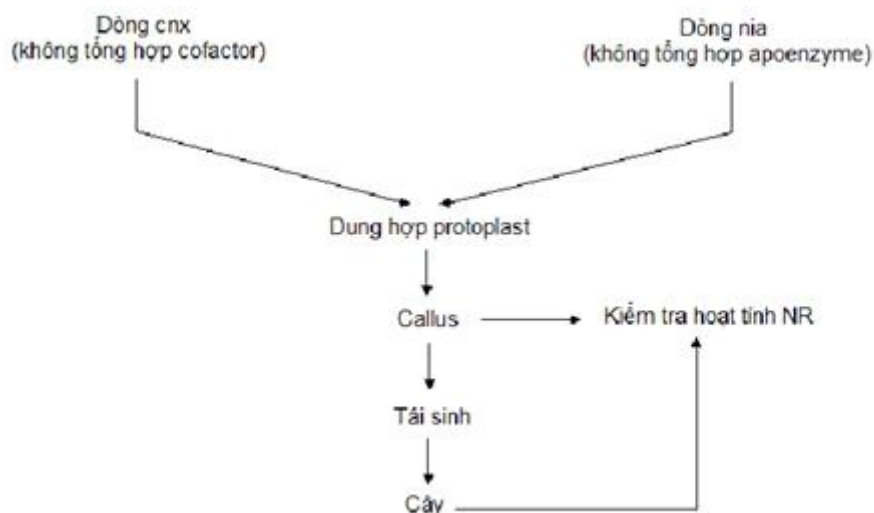
6.5.2.5. *Các dòng khuyết dưỡng*

Các dạng khuyết dưỡng được sử dụng cho biến nạp DNA, lai soma và nghiên cứu các quá trình trao đổi chất. Sử dụng nuôi cấy tế bào đơn bội và xử lý đột biến gen tiện lợi cho phát triển một số lớn các loại khuyết dưỡng. Các dòng tế bào khuyết dưỡng đầu tiên được Carlson (1970) thông báo là cây thuốc lá đơn-nhị bội (dihaploid) sinh trưởng chậm trên môi trường tối thiểu và đòi hỏi sự trao đổi chất đặc biệt để hồi phục lại sự sinh trưởng bình thường. Các dòng khuyết dưỡng phân lập được trong nuôi cấy in vitro các loài thực vật khác nhau bao gồm các yêu cầu: (a) pathotenate, adenin và isoleucine + valine ở *Datura innoxia*; (b) histidine, tryptophan và nicotinic acid ở *Hyoscyamus muticus*; và (c) isoleucine, leucine, và uracil ở *Nicotiana glauca*. Các dòng *Datura* được phân lập trong nuôi cấy dịch huyền phù tế bào. Thông qua dung hợp bổ sung (fusion-complementation), các dòng khuyết dưỡng của *N. glauca* và *H. muticus* được xác định là ở trạng thái lặn.

Chlorate (ClO_3^-)-một dạng tương tự nitrate-được biến đổi nhờ enzyme nitrate reductase trở thành chlorite (ClO_2^-), một loại độc tố của tế bào. Vì vậy, ở môi trường được bổ sung chlorate các tế bào dạng hoang dại có hoạt tính của enzyme nitrate reductase sẽ bị chết, trong khi các tế bào không có enzyme này sẽ sống sót. Các thể hồi biến (revertants) của dạng hoang dại có thể được kiểm tra bằng khả năng sử dụng NO_3^- trong môi trường nuôi cấy của các tế bào này. Các dòng thiếu nitrate reductase

được phân lập từ các tế bào nuôi cấy của *N. tabacum*, *N. plumbaginifolia*, *H. muticus*, *D. innoxia*, *Rosa damascena* và *Petunia*.

Người ta có thể sử dụng các loại dòng tế bào và các đặc tính của chúng như những đặc điểm chỉ thị trong nghiên cứu điều khiển di truyền và kỹ thuật gen. Hai loại dòng tế bào như thế đã được xác định: một loại là đột biến (*nia*) không tổng hợp apoenzyme, trong khi loại kia (*cnx*) không tổng hợp cofactor. Các phenotype này được sử dụng như là các marker bổ sung trong việc chọn lọc các thể lai soma.



Sơ đồ 6.3. Dòng *cnx* và *nia* về gen NR trong thuốc lá.

6.5.2.6. Kháng kháng sinh (antibiotic resistance)

Maliga (1973) chọn lọc thành công dòng tế bào thuốc lá kháng streptomycin di truyền đường mẹ. Streptomycin ức chế sinh tổng hợp protein ở lục lạp, ty thể nhưng không ảnh hưởng đến sinh tổng hợp protein trong ribosome tế bào chất. Dòng tế bào kháng streptomycin có màu xanh được chọn bằng cách tách những cụm tế bào xanh trên môi trường chứa streptomycin. Dòng tế bào có màu trắng được chọn thông qua khả năng sinh trưởng trên môi trường chứa streptomycin. Khả năng kháng này có thể do cả lục lạp và ty thể nhưng cũng có thể chỉ do một cơ quan tử quyết định. Ngoài ra, người ta còn phát hiện được tính kháng tổ hợp nghĩa là chọn lọc tính kháng một loại kháng sinh này nhưng cũng kháng được một số kháng sinh khác. Ví dụ: dòng *N. sylvertris* kháng kanamycin vẫn có thể kháng được streptomycin và neomycin.

6.5.2.7. Kháng các đồng đẳng base của DNA

Trong nuôi cấy mô tế bào động vật người ta dùng: 5-bromodeoxy uridin (BUdR) và 8-azaguanidin (AG) để chọn những dòng tế bào đột biến thiếu thymidinkinase (TK) và hypoxanthin guanidin phosphoribosyl transferase (HGPRT). Cơ chế chọn lọc đó như sau:

- Các tế bào có TK và HGPRT bình thường sẽ sử dụng BUdR và AG như các nucleotide cho sinh tổng hợp DNA. DNA mang BUdR và AG sẽ không bình thường và tế bào sẽ chết.
- Những tế bào thiếu TK và HGPRT không sử dụng BUdR và AG chúng sẽ sống được.

Các nhà nuôi cấy mô thực vật cũng sử dụng mô hình này đối với tế bào thực vật và bước đầu thu được một số kết quả. Ví dụ: chọn được dòng tế bào thuốc lá có hoạt tính HGPRT giảm 50%, song các dòng kháng BUdR vẫn có hoạt tính enzyme lại phụ thuộc TK khá lớn. Điều đó được giải thích như sau: trong tế bào thực vật có hai loại TK, như vậy phải chọn được hai tế bào đột biến đồng thời mới mất hoàn toàn hoạt tính TK. Mặt khác dòng tế bào đậu tương kháng BUdR của Okyana (1976) lại do tế bào có khả năng sản xuất dư thừa thymidin. Cũng thể có tế bào có cơ chế sửa chữa DNA tốt cho phép chúng sửa được những sai lệch do BUdR hay AG gây ra và như vậy chúng có khả năng kháng BUdR và AG.

6.6. Nuôi cấy tế bào trong sản xuất các hợp chất tự nhiên

6.6.1. Phương hướng chiến lược trong sản xuất các sản phẩm thứ cấp bằng nuôi cấy tế bào

Mặc dù trong nhiều trường hợp các hợp chất có giá trị chữa bệnh hoàn toàn thu được hoặc được sản xuất nhưng với hàm lượng rất nhỏ thì người ta vẫn có thể tổng kết chung được rằng: Mỗi tế bào đều có khả năng biểu hiện tính toàn thể hóa học cũng như hình thái học.

Một vài ví dụ chứng minh cho chiến lược chung mà chúng ta cần phải tuân theo để có thể có được các dòng tế bào có năng suất cao. Đầu tiên là cấy gây nuôi cấy tế bào của loài thực vật sản sinh ra hợp chất chúng ta cần có (nên chọn loài có năng suất cao) và sau đó tiến hành chọn tính ổn định của những dòng tế bào khác nhau từ những cơ thể khác nhau để tìm ra dòng có năng suất cao. Theo phương thức này những dòng tế bào có năng suất alkaloid cao được chọn từ nuôi cấy mô của *Catharanthus* hoặc những dòng tế bào với hoạt tính hydroxyd hóa cao được chọn từ nuôi cấy của cây *Digitalis*. Tuy nhiên, những dòng tế bào *Digitalis* này cho đến thời điểm hiện tại vẫn không sản sinh ra cardiac glycoside. Kỹ thuật chọn dòng này cũng đã được ứng dụng để chọn ra dòng tế bào sản xuất ra nhiều nicotin từ một dòng tế bào của *Nicotiana rustica* đã mất hoàn toàn khả năng tổng hợp alkaloid.

Phương pháp chọn dòng này đã được cải tiến bằng cách kết hợp với những phương pháp phân tích có độ nhạy và tính đặc thù cao hơn, ví dụ miễn dịch phóng xạ. Mặc dù đó không phải là tiền đề cần thiết trong mỗi trường hợp. Đương nhiên, con

đường tối ưu nhất vẫn là tìm ra được những phương pháp cho phép xác định những sản phẩm thứ cấp ở ngay trong tế bào sống, chẳng hạn thông qua các chất huỳnh quang UV hay chất có màu sắc nhận thấy được. Thế nhưng trong thực tế rất khó tìm ra chất màu có khả năng thâm nhập vào không bào là nơi các sản phẩm thứ cấp được tích trữ để vẫn tạo ra phản ứng màu mà không làm chết tế bào.

Sự phân lập các dòng tế bào chịu p-fluorphenylalanine, trong đó có một dòng có hoạt tính enzyme tăng lên và hàm lượng cao các hợp chất fenol tan trong etanol cho thấy một triển vọng khác trong việc chọn dòng tế bào. Đó là cách sử dụng các chất đặc biệt gây áp lực chọn lọc để phân lập những tế bào sản xuất dư thừa các sản phẩm thứ cấp thực vật điều đó có thể kiểm nghiệm với những nuôi cấy tế bào tạo alkaloid có nguồn gốc là các acid amin. Tuy nhiên, người ta cần thấy rằng việc sản xuất các amino acid đặc thù này không phải là yếu tố hạn chế duy nhất đối với quá trình sinh tổng hợp các sản phẩm thứ cấp trong tế bào mà ở đây còn có nhiều yếu tố khác cần đề cập tới.

Một bước tiếp theo là phải cải tiến qui trình nuôi cấy bằng cách thay đổi hợp lý môi trường, cũng như nhiều tài liệu đã thông báo người ta thay đổi hàm lượng hormone, đường, vitamin, nhiệt độ... Hàng loạt những biến đổi môi trường, điều kiện nuôi cấy hoặc thay đổi cả dòng tế bào cũng mới chỉ được kiểm nghiệm trong hệ thống kiểm định như phương pháp giọt nhỏ kết hợp với phương pháp miễn dịch phóng xạ. Nghiên cứu thay đổi môi trường nuôi cấy được cải tiến thêm một bước khi kỹ thuật nuôi chemostat (thể ổn định hóa tính) được ứng dụng.

6.6.2. Nuôi cấy tế bào năng suất cao

Nuôi cấy tế bào của nhiều cây dược liệu đã được tiến hành nhưng trong nhiều trường hợp người ta không tìm thấy hoặc thấy với lượng rất nhỏ (dạng vết) các hợp chất muốn có. Tuy nhiên, tới nay thực tế đã cho thấy có những thí nghiệm nuôi cấy tế bào thực vật có khả năng sản xuất các sản phẩm thứ cấp thực vật với hàm lượng lớn hơn cả hàm lượng của các chất đó ở chính những bộ phận thực vật có nhiệm vụ tích trữ các hợp chất đặc biệt này.

Nuôi cấy đầu tiên được phân lập có chứa hàm lượng cao các sản phẩm thứ cấp đó là các nuôi cấy sản xuất ra các hợp chất sắc tố như anthocyanin trong tế bào *Haplopappus*, betalain trong callus của củ cải đường hoặc anthraquinon trong tế bào của *Lithospermum erythrorhizon*, *Morinda citrifolia* và các loài *Galium*. Trong trường hợp của cây *Morinda* và *Galium*, người ta đã nâng được hàm lượng anthraquinon trong nuôi cấy tế bào lên 20 lần so với rễ là cơ quan tích trữ các hợp chất này của các cây nói trên. Kể cả khi người ta so sánh hàm lượng các chất trong tế bào và là tế bào chuyên sản sinh ra các chất đó thì hàm lượng ở tế bào nuôi cấy vẫn lớn hơn từ 2-4 lần.

Hàm lượng tương đối cao của ubiquinon-10 được tìm thấy trong tế bào thuốc lá và L-dopa trong môi trường nuôi cấy tế bào *Mucuna pruriens*. Nhiều công trình cho thấy nuôi cấy callus và tế bào của cây *Catharanthus roseus* có hàm lượng serpentin ngang với cây được liệu bình thường. Người ta đã phân lập được các dòng tế bào *Catharanthus* sản xuất serpentin ajmalicin từ nuôi cấy in vitro. Bằng loại môi trường sản xuất đặc biệt họ đã đưa được sản lượng alkaloid của hai dòng tốt nhất lên một mức cao hơn nữa, trong đó một dòng tạo được 162 mg/L serpentin, còn dòng kia tạo được 72 mg/L serpentin cùng với 264 mg/L ajmalicin. Cũng rất đáng chú ý là nuôi cấy tế bào cây *Panax pseudoginseng* cho hàm lượng saponin khá cao và nuôi cấy tế bào của cây *Glycyrrhiza glabra* đạt được hàm lượng glycyrrhizin từ 3-4% trọng lượng khô. Hàm lượng chất thứ cấp cao nhất được xác định trong nuôi cấy tế bào của cây *Coleus blumei*, đó là 13-15% trọng lượng khô chất rosmarinic acid trong chu kỳ nuôi 13 ngày. Nồng độ rosmarinic acid trong tế bào nuôi cấy lớn hơn năm lần so với trong cây.

Trên lĩnh vực steroid và chuyển hóa steroid các dòng tế bào có năng suất cao đã được nghiên cứu. Một số công trình đã nuôi cấy thành công tế bào của cây *Dioscorea deltoidea* với sản lượng diogenin là nguyên liệu thô chính để sản xuất các steroid chống thụ thai và các hormone thượng thận. Quá trình chuyển hóa các steroid được khá nhiều phòng thí nghiệm nghiên cứu. Chẳng hạn, nghiên cứu quá trình sinh chuyển hóa các hợp chất glycoside cardiac bằng nuôi cấy tế bào của *Digitalis lanata* mặc dù tế bào *Digitalis lanata* ngừng sản xuất glycoside cardiac nhưng chúng vẫn có khả năng hydroxyd hóa digitoxin ở nguyên tử C12 để tạo ra digoxin. Digoxin là một hợp chất có ý nghĩa y học lớn hơn digitoxin. Quá trình hydroxyd hóa xảy ra trong nuôi cấy tế bào rất nhanh và rất hiệu quả khi đưa vào môi trường nuôi cấy chất α -methyl-digitoxin. Sau 12 ngày người ta thu được 4 g α -methyl-digoxin trong một bình nuôi dung tích 20 lít.

Ngoài ra, người ta còn có thể thu được các chất như caffein từ nuôi cấy tế bào cây *Coffea arabica*, berberin từ tế bào cây *Coptis japonica* (loài cây này phải trồng từ 4-6 năm mới thu được hàm lượng đáng kể berberin trong rễ, song hàm lượng này có thể thu được sau 4 tuần bằng phương pháp nuôi cấy tế bào)... Những chất này được sử dụng rộng rãi trong công nghệ hương liệu và trong y học. Chất reserpin là chất có tác dụng chữa bệnh cao huyết áp và các bệnh rối loạn tuần hoàn khác cũng được sản xuất bằng phương pháp nuôi cấy tế bào cây *Rauwolfia serpentina*. Nuôi cấy tế bào cây này trong 30 ngày có thể sản xuất được 3500 kg reserpin, tương đương với lượng hàng năm của cả thế giới thu được từ rễ cây đó. Chất naptathoquinones chiết từ rễ cây cỏ rế máu (puccoon) được dùng để chữa bỏng và bệnh ngoài da. Chất này cũng được sản

xuất bằng phương pháp nuôi cấy mô, sản lượng chất này được tạo ra từ mô nuôi cấy cao hơn tám lần so với cây tự nhiên. Các nhà nghiên cứu thuộc tổ hợp được phẩm Gibageigy (Based, Thụy Sĩ) đã sản xuất được loại alkaloid scopolanin từ tế bào cây *Hyoscyanus aegypticus* nuôi cấy trong hệ lên men không có cánh khuấy. Bằng cách chọn lọc các dòng tế bào cao sản nhờ kỹ thuật đột biến tế bào trần, biến dị đơn dòng và kỹ thuật gen, người ta đã làm tăng sản lượng scopolamin gấp ngàn lần.

Tóm lại, nuôi cấy mô và tế bào thực vật có khả năng sản xuất các hợp chất thứ cấp với năng suất cao và trong một vài trường hợp cao hơn hẳn so với những cây hoàn chỉnh có năng suất cao nhất.

6.6.3. Sản xuất bằng nuôi cấy tế bào ở những nước công nghiệp

Kỹ thuật tiên bộ về nuôi cấy tế bào đang được triển khai ngày càng rõ ràng ở các nước công nghiệp tiên tiến. Sản phẩm công nghiệp đầu tiên từ nuôi cấy tế bào là shikonin được tập đoàn công nghiệp hóa dầu Mitsui (Nhật) sản xuất. Shikonin cũng là một vị thuốc dân tộc Nhật Bản dùng làm thuốc chống viêm. Năm 1983, Mitsui thông báo về quá trình phát triển kỹ nghệ sản xuất công nghiệp chất shikonin bằng nuôi cấy tế bào trong thùng lên men loại nhỏ 750 lít. Thành công bước đầu là chọn được một dòng tế bào tích lũy shikonin gấp mười lần nhiều hơn so với nguồn nguyên liệu tự nhiên ở cây *Lithospermum erythrozhizon* (koshikon) và xây dựng phương pháp hai giai đoạn để sản xuất shikonin từ nuôi cấy tế bào.

Tuy nhiên, có năm vấn đề quan trọng hạn chế kỹ thuật nuôi cấy tế bào cho mục tiêu thương phẩm đối với một số chất có giá trị cao:

- Chọn được dòng thực sự có năng suất cao.
- Điều khiển được tế bào tạo ra chất quan tâm. Gen mã hóa các sản phẩm hóa học đó thường chỉ hoạt động ở những điều kiện rất đặc biệt.
- Nhiễm khuẩn và nhiễm nấm vì tế bào thực vật sinh trưởng chậm, xử lý kháng sinh cũng gây ra hậu quả cho sinh trưởng và tạo hoạt chất.
- Sản phẩm không tập trung vì tế bào thực vật không tổng hợp chuyên một sản phẩm thứ cấp mà thường là kèm một số chất khác nữa.
- Nuôi cấy tế bào thay đổi vì những biến động trong tương tác các gen khác nhau và dòng năng suất kém có thể lấn át toàn bộ nuôi cấy.

Mặc dù vậy, những đột phá trong kỹ thuật nuôi cấy tế bào (ví dụ nuôi cấy rễ tơ) cho thấy trong tương lai gần bất cứ hóa chất công nghiệp nào có nguồn gốc thực vật cho dù đó là dược liệu, thuốc nhuộm hay chất màu thực vật đều có thể sản xuất trong các nồi phản ứng sinh học.

6.6.4. Nuôi cấy rễ tơ (hair roots) và sinh tổng hợp

Những vấn đề tồn tại trong nuôi cấy tế bào công nghiệp có thể được giải quyết

thông qua kỹ thuật nuôi cấy rễ tơ, cơ sở khoa học của giải pháp này là việc nhiễm callus với giống vi khuẩn đất *Agrobacterium rhizogenes* khiến cho tế bào callus đồng nhất phân hóa thành rễ. Vi khuẩn này chuyển DNA của nó vào trong bộ gen của tế bào thực vật và khiến cho những gen tạo chất điều khiển sinh trưởng của rễ hoạt động. Hệ thống rễ đa bội bào là nơi lý tưởng để sản sinh ra hóa chất thực vật và chúng rất ổn định về di truyền, sinh trưởng nhanh (từ một đầu rễ nuôi cấy rễ lông có thể tăng trọng lượng từ 2500 – 5000 lần trong 3 tuần) mang lại cho nuôi cấy tế bào khá nhiều ưu điểm trong đó đáng kể là khả năng tránh nhiễm khuẩn.

Các công ty Nhật Bản đã sử dụng kỹ thuật này để mở rộng nuôi cấy rễ nhân sâm, loại nuôi cấy này tỏ ra dễ điều khiển hơn.

Công ty Escagenetics (California, Mỹ) cũng đã thông báo thành công trong việc sản xuất taxol bằng nuôi cấy rễ lông. Taxol là chất tách chiết từ vỏ và lá kim của cây thủy tùng (*Taxus brerifolia*) đang được dùng thử có kết quả trong điều trị nhiều loại ung thư. Việc cung cấp taxol gặp khó khăn vì bản thân cây thủy tùng khan hiếm và hàm lượng taxol trong chúng rất thấp. Escagenetics đã có thể sản xuất taxol với nồng độ cao hơn nồng độ tự nhiên thấy trong vỏ và lá cây thủy tùng.

Hiện nay, hãng Phyton Catalytic (New York, Mỹ) đã mua bản quyền sản xuất toxol hoặc chất đồng đẳng của taxol ở qui mô pilot. Giá bán taxol hiện nay được xác định là 200.000 - 300.000 USD/kg. Theo Escagenetics việc sản xuất vanillin bằng nuôi cấy tế bào công nghiệp đã là bộ phận tốt để họ đi tới nuôi cấy tế bào taxol. Thông qua mối quan tâm về sản xuất taxol hiểu biết về quá trình sinh tổng hợp được chất được mở rộng. Tới nay mới có 10 trong số các dược chất có nguồn gốc thực vật đang được sử dụng rộng rãi (khoảng 300.000 loài) được tổng hợp nhân tạo trong phòng thí nghiệm, số còn lại đều được chiết trực tiếp từ cây cỏ. Thế nhưng mới đây Văn phòng thương mại và bản quyền Mỹ đã cấp quyền tác giả cho ĐH Quốc gia Florida về qui trình công nghệ bán tổng hợp thuốc chống ung thư. Công nghệ này kết hợp một chất gọi là baccatin III và một chuỗi tổng hợp để thu được một chất có cấu trúc giống chất taxol tự nhiên. Baccatin III được tách chiết từ thủy tùng nước Anh, họ hàng với thủy tùng Địa Trung Hải. Công ty dược Bristol-Myers Squibb, nơi cung cấp taxol tự nhiên chính vừa ký hợp đồng bản quyền với ĐH Quốc gia Florida để đưa công nghệ sản xuất taxol vào sản xuất.

Srinivasan và cs. (1997) đã nuôi cấy dịch huyền phù tế bào của 2 loài thủy tùng là *Taxus chinensis* và *T. baccata* trong hệ thống nuôi cấy mô hình (model system) nhằm chứng minh khả năng tương tự trong tích lũy sinh khối (biomass) và sản xuất các chất trao đổi thứ cấp (taxane) thu từ nuôi cấy trong các đĩa polystyrene 6 ngăn (six-well polystyrene plates) và các bình thủy tinh (loại 25 ml và 125 ml, lắc 120

vòng/phút).

Merkli và cs. (1997) đã nuôi cấy rễ tơ của cây *Trigonella foenum-graecum* với sự gây nhiễm chủng A4 của *Agrobacterium rhizogenes*. Các rễ tơ này đã sản xuất diosgenin, một spirostanol quan trọng cho sự bán tổng hợp (semi-synthesis) của các hormone steroid. Hàm lượng diosgenin thu được cao nhất là 0,040% trọng lượng khô (trên môi trường nuôi cấy thích hợp nhất-McCown's woody plant medium có 1% sucrose) gần gấp 2 lần so với các rễ không biến nạp chủng A4 8 tháng tuổi (0,024%). Các tác giả này cũng đã nghiên cứu ảnh hưởng của cholesterol, pH môi trường và chitosan đến khả năng sản xuất diosgenin. Bổ sung 40 mg/l chitosan vào môi trường nuôi cấy sẽ nâng hàm lượng diosgenin lên gấp 3 lần so với đối chứng.

Sevón và cs. (1997) đã tái sinh cây từ protoplast của rễ cây *Hyoscyamus muticus* được gây nhiễm *Agrobacterium rhizogenes* và sau đó phân tích hóa học trên 34 cây riêng rẽ đã trưởng thành. Kết quả nghiên cứu cho thấy các cây này có sản xuất hyoscyamine, scopolamine, và nhiều loại calystegin, và điều đáng kể là đã tìm thấy các biến dị dòng soma trong các cây này. Tuy nhiên, sự có mặt của các gen rol (A, B và C) của *A. rhizogenes* gây bất lợi cho việc tích lũy các alkaloid trong các cây chuyển gen ngược lại với ưu điểm của nuôi cấy rễ tơ.

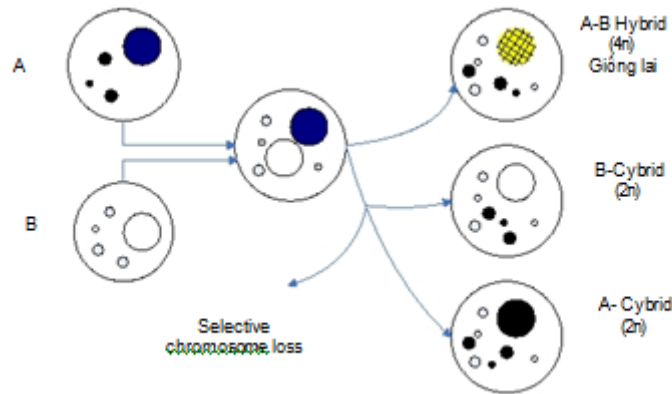
Sikuli và cs. (1997), đã nghiên cứu ảnh hưởng của tuổi mô nuôi cấy đến sự tích lũy sinh khối và sản lượng alkaloid của rễ tơ thu được sau khi gây nhiễm cây *Datura stramonium* với chủng *Agrobacterium* ATCC 15834. Hàm lượng hyoscimine ở rễ đạt cực đại sau 6 tuần nuôi cấy khoảng 100mg/l. Bên cạnh đó, các tác giả này còn nghiên cứu ảnh hưởng của sự cân bằng ion (NO_3^- , SO_4^{2-} , H_2PO_4^- , K^+ , Ca^{2+} và Mg^{2+}) đến sản lượng sinh khối và sự tích lũy hyoscyamine. Nồng độ NO_3^- và K^+ cao cho sinh khối cao nhất, còn sản lượng hyoscyamine cao nhất khi SO_4^{2-} và K^+ cao.

6.7. Ứng dụng của biến dị dòng soma và dòng giao tử trong công tác giống cây trồng

Các đột biến đơn gen trong hệ gen của nhân hoặc cơ quan tử có thể tạo ra một thứ in vitro (in vitro variety) thích hợp nhất có các đặc tính đặc trưng được cải thiện. Trong khuôn khổ tạo giống cây trồng, biến dị dòng soma có thể được sử dụng để khám phá ra các thể biến dị mới duy trì tất cả các đặc tính tốt và có bổ sung tính trạng hữu ích, như kháng các bệnh hoặc chất diệt cỏ. Các biến dị này sau đó có thể được thử nghiệm trên đồng ruộng để xác định chắc chắn sự ổn định di truyền của chúng. Lai thuận nghịch (reciprocal cross) giữa thế hệ F1 mang tính trạng mong muốn với đối chứng có nguồn gốc từ hạt sẽ ổn định xa hơn (further stabilise) các thể biến dị và giúp đỡ tạo hạt giữa các dòng hứa hẹn. Biến dị dòng giao tử, được cảm ứng hầu hết bởi sự

tái tổ hợp giảm phân trong chu trình hữu tính của thể lai F1, tạo ra sự phân ly vượt quá giới hạn để khám phá ra các tổ hợp gen duy nhất.

Các dòng tế bào khác nhau chọn lọc trong điều kiện in vitro có thể chứng minh năng lực ứng dụng cho nông nghiệp và công nghiệp. Các cây tái sinh biểu hiện các tính trạng kháng chất diệt cỏ, pathotoxin, muối hoặc phen. Hơn nữa, khả năng biến dị trong nuôi cấy tế bào đã thể hiện một vai trò hữu ích trong việc tổng hợp các chất thứ cấp liên quan đến phạm vi thương mại.



Hình 6.1 Biểu đồ khai thác hiệu quả tác động giữa nhân và tế bào chất

Các kỹ thuật ứng dụng cho việc cảm ứng biến dị dòng soma và dòng giao tử dễ dàng hơn công nghệ DNA tái tổ hợp. Đặc biệt, cải thiện cây trồng mang các tính trạng đa gen (polygenic traits) bằng các phương pháp tạo giống cây trồng truyền thống và không truyền thống đã được chứng minh là rất khó khăn. Biến dị dòng soma có thể là một kỹ thuật thích hợp cho công nghệ di truyền các cây trồng này.

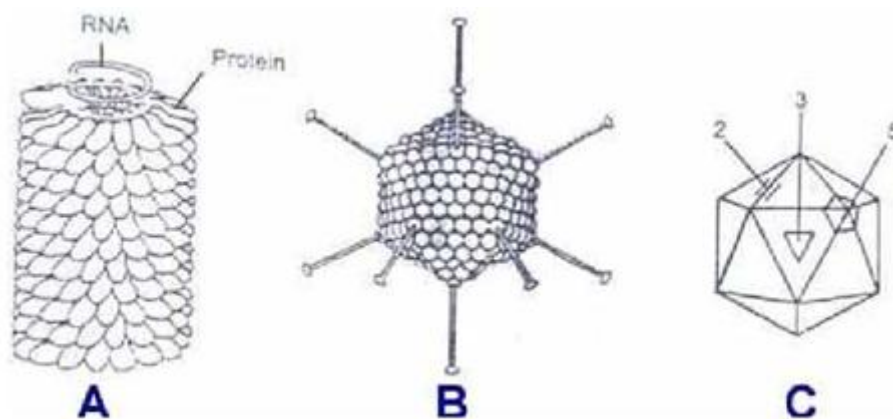
CÂU HỎI ÔN TẬP

1. Khái quát vấn đề nuôi cấy tế bào thực vật đơn
2. Trình bày đặc tính của tế bào thực vật được nuôi cấy
3. Nêu các yêu cầu về nguyên liệu và điều kiện nuôi cấy
4. Vì sao luôn xuất hiện các biến dị dòng tế bào?
5. Trình bày các nguyên tắc chọn dòng tế bào
6. Trình bày cách chọn dòng tế bào trong trường hợp không có tác nhân chọn lọc và có tác nhân chọn lọc
7. Trình bày phương pháp nuôi cấy tế bào trong sản xuất các hợp chất tự nhiên
8. Nêu các ứng dụng của biến dị dòng soma và dòng giao tử trong công tác giống cây trồng

Chương 7. NUÔI CÂY MÔ THỰC VẬT VÀ VẤN ĐỀ LÀM SẠCH VIRUS Ở THỰC VẬT

7.1. Tầm quan trọng

Tạo giống chống chịu các bệnh virus là một hướng nghiên cứu khả quan. Nhưng trong thực tế, chọn tạo giống gặp nhiều khó khăn do thiếu nguồn gen có khả năng chống chịu với các loại bệnh virus khác nhau. Bên cạnh đó, việc tạo giống cây lưu niên còn gặp trở ngại hơn do mất nhiều thời gian và công sức. Gần đây, kỹ thuật gen đã mở ra triển vọng tạo giống miễn dịch di truyền với một số loại virus bằng cách chuyển gen protein vỏ virus hoặc gen iARN vào cây trồng, làm cây có khả năng bất hoạt gen và mARN virus. Tuy nhiên, nhiều vấn đề kỹ thuật và lý luận vẫn còn khá nan giải.



Hình 7.1. Các dạng cấu tạo ngoài của virus

Do vậy, phương pháp có hiệu quả nhất hiện nay vẫn là tạo ra các vật liệu nhân giống sạch bệnh virus qua nuôi cây đỉnh chồi, đỉnh sinh trưởng hoặc kết hợp với xử lý hoá chất, nhiệt độ. Những phương pháp này đã giúp loại trừ các bệnh virus khác nhau khỏi vật liệu nhân giống và tạo giống sạch bệnh ở một loạt cây trồng, chủ yếu là khoai tây, khoai lang, sắn, tỏi, cây ăn quả có múi, chuối, nho, mơ, mận, cây hoa như cúc, cẩm chướng... Phương pháp này cho phép loại bỏ hầu hết các bệnh virus, viroid và các tác nhân gây bệnh tương tự virus (Vasil và Thorpe, 1994).

Chóp đỉnh sinh trưởng được coi là sạch bệnh virus. Mẫu mô nuôi cấy càng nhỏ và càng gần đỉnh sinh trưởng thì khả năng sạch bệnh càng lớn. Dường như có tương quan tỷ lệ thuận giữa kích thước mẫu với khả năng cây tái sinh sạch bệnh (Stone, 1982; Green và Lo, 1989). Nhưng trong một vài trường hợp, việc loại trừ virus rất khó khăn và không phụ thuộc vào kích thước mẫu do một số virus có khả năng sinh sản và

chuyển dịch nhanh chóng đến vùng sinh trưởng (Theiley và cs, 1984). Người ta đã quan sát thấy mật độ virus khá cao ở vùng chóp đỉnh sinh trưởng của một số loài dưới kính hiển vi điện tử (Toussaint và cs, 1984). Do vậy, việc kết hợp kỹ thuật nuôi cấy này với các yếu tố kìm hãm virus như hoá chất, nhiệt độ có thể tăng cường khả năng loại trừ bệnh virus và tạo giống sạch bệnh ở cây trồng.



Hình 7.2. Cà chua bị bệnh virus đốm vàng

Hầu hết các cây trồng nông-lâm nghiệp đều bị nhiễm các hệ thống gây bệnh như nấm, virus, vi khuẩn, mycoplasma và nematodes. Các tác nhân gây bệnh không phải luôn gây chết cây, nhưng nó thường xuyên làm giảm năng suất và chất lượng của cây trồng. Trong khi các tác nhân gây bệnh khác gần như luôn xâm nhiễm vào cơ thể thực vật qua nhân giống sinh dưỡng, thì các bệnh virus lại xuất hiện ở cả những cây trồng nhân giống bằng hạt cũng như nhân giống sinh dưỡng. Mặc dù các cây trồng bị nhiễm bệnh vi khuẩn và nấm có thể phản ứng với việc xử lý các hợp chất diệt khuẩn (bactericidal) và diệt nấm (fungicidal), nhưng người ta chưa thể sản xuất ra các hợp chất thương mại diệt virus để chữa bệnh cho các cây trồng nhiễm virus.

Để sản xuất cây sạch bệnh virus, thông thường người ta chọn ra một hoặc nhiều cây khỏe mạnh và sau đó nhân giống chúng bằng phương thức sinh dưỡng, tạo ra một quần thể cây khỏe mạnh. Nhưng tại nơi mà quần thể của một dòng hoàn toàn bị nhiễm bệnh virus thì chỉ có cách thu được cây sạch bệnh thông qua nuôi cấy mô. Các mô phân sinh đỉnh ở các cây bị nhiễm bệnh thường hoặc là sạch bệnh hoặc chứa nồng độ virus rất thấp. Tuy nhiên, nồng độ của virus trong cây tăng lên tương ứng với việc tăng khoảng cách tính từ các đỉnh phân sinh. Các lý do khác nhau để cho mô phân sinh không hoặc ít bị virus xâm nhiễm là: (a) các virus di chuyển dễ dàng trong cơ thể thực vật thông qua hệ thống mạch dẫn là cấu trúc mà ở đỉnh phân sinh không có, (b) hoạt tính trao đổi chất cao trong quá trình phân chia của các tế bào phân sinh ngăn cản sự chép virus, và (c) nồng độ auxin nội sinh cao ở trong các đỉnh chồi có thể ức chế sinh sản của virus.

Morel và Martin (1952) đã ứng dụng các kỹ thuật nuôi cấy mô để loại bỏ sự xâm nhiễm virus ở thực vật. Họ nuôi cấy các đỉnh phân sinh tách ra từ cây Dahlia bị nhiễm virus và thu được các cây sạch bệnh. Sau đó, các tiến bộ trong loại bỏ virus bằng kỹ thuật nuôi cấy mô đã được ứng dụng rộng rãi trong nông nghiệp. Nuôi cấy

đỉnh phân sinh cũng cho phép thu được các cây sạch những bệnh khác như bệnh viroid (dạng virus-tác nhân gây bệnh chỉ chứa một đoạn rất ngắn RNA), mycoplasma, vi khuẩn, và nấm.

7.2. Nguyên lý làm sạch virus

Danh từ làm sạch virus chỉ đúng về nội dung của công việc. Đó là việc phải giải phóng các thực vật bị nhiễm virus khỏi virus. Ở đây chỉ đề cập tới các cây trồng nhân giống vô tính vì phương thức nhân giống này là nguyên nhân truyền bệnh từ thế hệ này sang thế hệ khác. Vì vậy, biện pháp làm sạch bệnh virus luôn phải kết hợp với biện pháp duy trì tính sạch bệnh. Cả hai biện pháp nằm trong phạm vi phục tráng giống, người ta gọi là biện pháp giữ sạch bệnh. Bên cạnh hai nhiệm vụ là duy trì đặc tính giống và tính đồng đều của giống nhiệm vụ chủ yếu của công tác phục tráng giống là cung cấp được tập đoàn cây bố mẹ và hạt giống sạch virus. Kinh nghiệm thực tế cho hay những biện pháp phục tráng giống có hiệu quả là những biện pháp được thực hiện một cách triệt để và có trách nhiệm. Làm sạch virus được coi là mục tiêu của công tác phục tráng giống.

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

Đa số các cây trồng thương mại (commercial crop plants), đặc biệt là các cây

nhân giống vô tính đều chứa các virus nội hấp (systemic virus), các virus này ảnh hưởng xấu đến năng suất. Vì vậy, việc sản xuất ra các nguyên liệu thực vật sạch virus hoặc gần sạch virus là rất cần thiết trước khi chúng được nhân giống để đưa ra thị trường. Ở nhiều loài, phương thức cho hiệu quả cao là xử lý nhiệt các cơ quan khác nhau hoặc lúc cây đang sinh trưởng mạnh. Tuy nhiên, đối với một số virus phương thức này hoàn toàn không thích hợp vì thế phải sử dụng một số phương thức khác. Phương thức cho hiệu quả cao nhất là nuôi cấy đỉnh phân sinh, thường có thể kết hợp với xử lý hóa học hoặc xử lý nhiệt. Các phương pháp này cho phép có thể thu được các cá thể không những sạch virus mà còn sạch cả nấm và các nhân tố gây bệnh khác. Từ năm 1952, 1953 Morel và Martin đã thành công trong việc loại trừ một số virus ở khoai tây và thược dược (*Dahlia variabilis*) bằng cách nuôi cấy đỉnh phân sinh, điều đáng tiếc là các chồi này đã không tạo rễ và người ta phải ghép lên các cây mầm khỏe mạnh. Tuy nhiên, sau đó trên cơ sở các kết quả của Morel và Martin người ta đã đưa ra nhiều phương pháp sản xuất các cây trồng sạch virus có khả năng tạo rễ ở nhiều loài thực vật khác nhau và các dòng cây đó hiện nay đã được sử dụng rộng rãi trên thị trường.

Nuôi cấy đỉnh phân sinh là nuôi cấy các mẫu nhỏ của chồi đỉnh lên môi trường dinh dưỡng thích hợp để chúng sinh trưởng và tạo cây hoàn chỉnh. Phần mô thường được dùng là vòm phân sinh (meristem dome) cộng thêm cặp lá đầu tiên. Tùy thuộc vào từng loài khác nhau mà đỉnh phân sinh có thể có chiều dài từ 0,1-0,5 mm, một số tác giả yêu cầu chỉ nuôi cấy vòm phân sinh, tuy nhiên một số tác giả lại thu được cây sạch virus từ đỉnh sinh trưởng có chiều dài 0,5 mm. Chồi đỉnh hoặc đỉnh sinh trưởng sau khi cắt thường phải khử trùng bề mặt, nhưng giai đoạn này có thể không cần thiết. Các kỹ thuật nuôi cấy đỉnh sinh trưởng rất khác nhau tùy thuộc từng loài.

Môi trường agar thường không thích hợp cho cây sinh trưởng khi nuôi cấy, chỉ có các "cầu giấy lọc" (filter paper bridge) với phần chân được nhúng trong môi trường lỏng chứa trong ống nghiệm nuôi cấy là thích hợp hơn cả. Chỉ trên các cầu giấy lọc như thế rễ mới phát triển tốt, và cây có thể sẵn sàng để đưa ra đất. Rất nhiều loại môi trường đã được dùng trong nuôi cấy đỉnh phân sinh nhưng không có một môi trường chung thích hợp cho mọi loài. Môi trường chứa các nguyên tố đa lượng và vi lượng của Knop và Berthlot (không có beryllium và titanium), glucose 40 g/L, thiamine 10-5g/L và myo- inositol 10-3 g/L ở pH 5,5 có thể được dùng cho nhiều loài. NAA ở nồng độ 10-3 mg/L cần thiết cho sự hình thành các rễ ban đầu, nhưng sau đó phải cấy chuyển sang môi trường không có NAA.

Các số liệu về điều kiện chiếu sáng và nhiệt độ lý tưởng được công bố rất ít, mặc dù trước đây Hollings (1968) đã đưa ra nhiệt độ nuôi là 20°C dưới ánh sáng đèn

huỳnh quang với thời gian chiếu sáng 22 giờ/ngày. Thời gian để đỉnh phân sinh tạo chồi và rễ là từ vài tuần đến vài tháng tùy loài.

Hiện nay, ba biện pháp làm sạch virus tỏ ra có hiệu quả đối với cây lương thực và cây thực phẩm, đó là xử lý nhiệt, nuôi cấy đỉnh phân sinh và chọn lọc bằng các phương pháp thử virus. Mỗi một biện pháp đều thu được kết quả nhất định, nhưng chỉ khi sử dụng một cách tổng hợp cả ba biện pháp người ta mới thu được kết quả sạch virus thực sự. Mức độ hữu hiệu của quá trình làm sạch virus đối với thực tiễn phụ thuộc vào những yếu tố sau:

- Khả năng xử lý nhiệt.
- Khả năng nuôi cấy đỉnh phân sinh.
- Phương pháp thử virus có độ chính xác cao.
- Hệ số nhân giống vô tính cây khá cao.
- Trồng các vật liệu sạch bệnh ban đầu dưới điều kiện cách ly tốt, tránh được tái nhiễm.
- Mức độ (diện tích) trồng trọt cho phép cung cấp đủ cây giống mới trong mỗi năm.

Những điều kiện trên đây được thực hiện ở các mức độ rất khác nhau đối với các loài cây trồng khác nhau. Việc làm sạch virus không thể thay bằng việc phân tích virus của một loài cây trồng, phân tích virus cần được thực hiện trước đó và để rồi từ đó mà tìm ra biện pháp thích hợp để bảo đảm cây trồng sạch bệnh.

7.3. Phương pháp làm sạch virus

7.3.1. Các phương pháp chuẩn đoán bệnh virus

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

7.3.1.1. Xét nghiệm bằng cây chỉ thị

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

Trong trường hợp xét nghiệm hàng loạt công việc gây bệnh nhân tạo đối với số lượng cây chỉ thị là 10.000 đến 100.000 ở một thời gian nhiều tháng thì độ chính xác của phương pháp giảm đi vì không thể tiến hành các thí nghiệm lặp lại. Tuổi của cây trồng cũng như trạng thái sinh lý của chúng trong các mùa khác nhau của một năm ảnh hưởng rất nhiều đến tính chính xác của phương pháp xét nghiệm. Vì lý do đó, trong trường hợp phải xét nghiệm hàng loạt phương pháp dùng cây chỉ thị không đảm bảo bằng phương pháp miễn dịch. Nếu chỉ xét nghiệm một số lượng cây vừa phải ví dụ 1.000 cá thể thì phương pháp dùng cây chỉ thị không cần thay bằng phương pháp khác vì công việc có thể tiến hành trong một thời vụ thích hợp.

Triệu chứng bệnh lý có thể quan sát được sau 3-5 ngày song thông thường là sau hai tháng vì vậy cần một diện tích nhà kính khá rộng trong một thời gian tương đối dài chi phí cho xét nghiệm bằng phương pháp cây chỉ thị thường đắt gấp ba lần so với phương pháp huyết thanh.

7.3.1.2. Phương pháp huyết thanh

Tính đặc hiệu cao của phương pháp huyết thanh là một đặc điểm quan trọng. Ngoài ra, phương pháp này còn cho phép xác minh nhanh sự tồn tại của virus và phân loại chúng. Kết quả thu được chậm nhất là sau 48 giờ. Chi phí cho xét nghiệm thấp, để chứng minh virus không cần có nhà kính trồng cây. Phương pháp huyết thanh lại có độ chính xác cao, tuy nhiên người ta chưa sản xuất được kháng thể đối với tất cả các loài virus và kể cả khi có huyết thanh rồi cũng chưa có thể nói rằng kết quả xét nghiệm hoàn toàn bảo đảm. Vì rằng với phương pháp này người ta không thể xác minh được đặc tính gây bệnh của từng loài virus đối với thực vật chủ, có nhiều phương pháp huyết thanh khác nhau đã được ứng dụng trong xét nghiệm hàng loạt đối với cây hoa, trong đó có phương pháp kết tủa giọt, xét nghiệm khuếch tán agar gel hai chiều, xét nghiệm latex, xét nghiệm miễn dịch hướng tâm... Mỗi một phương pháp đều có ưu và nhược điểm đặc trưng thông số về độ chính xác thường thu được với dãy nồng độ dịch ép từ thực vật hoặc virus phân lập. Nhiều nghiên cứu cho thấy không thể coi độ nhạy cảm này thường thu được khi pha loãng dịch ép nhiều lần hoàn toàn cho phép tin tưởng vào kết quả xét nghiệm hàng loạt. Vì thế cần chọn phương pháp thích hợp cho xét nghiệm hàng loạt.

7.3.1.3. Xét nghiệm bằng kính hiển vi điện tử

Kính hiển vi điện tử với sự hoàn chỉnh về kỹ thuật và sau khi ứng dụng phương pháp nhúng có thể đưa vào xét nghiệm hàng loạt với số lượng mẫu vừa phải. Khi chứng minh virus hình đũa và hình sợi ở hoa phong lan và hoa huệ kính hiển vi điện tử đã mang lại những kết quả đáng tin cậy đối với xét nghiệm hàng loạt. Khó khăn chủ yếu hiện nay là chi phí cho thiết bị và số lượng mẫu được xét nghiệm bị hạn chế, đồng thời loại virus được chứng minh cũng chỉ là loại hình đũa và hình sợi. Nếu virus tồn tại dạng cầu thì rất khó phát hiện vì nó khá giống các cơ quan tử của tế bào thực vật bình thường.

7.3.1.4. Xét nghiệm bằng phương pháp PCR

Hiện nay, một phương pháp được sử dụng phổ biến của công nghệ sinh học có rất nhiều tiềm năng ứng dụng đó là khuếch đại gen bằng phản ứng trùng hợp polymerase (polymerase chain reaction) trên máy PCR. Bằng cách thiết kế các cặp mồi (primers) đặc hiệu của các gen gây bệnh ở virus, người ta có thể khuếch đại các gen này (nếu có) từ DNA hệ gen của thực vật đã được xử lý làm sạch virus. Nếu không xuất hiện sản phẩm PCR đặc trưng của gen virus sau khi phân tích điện di agarose gel thì ta có thể kết luận là cây đã được làm sạch bệnh hoặc ngược lại, cây được xử lý vẫn còn mang virus. Phương pháp này có độ nhạy rất cao, chính xác và ít tốn kém hơn các phương pháp nói trên. Hiện nay, người ta đã sản xuất một thiết bị phân tích PCR có độ nhạy rất cao gọi là Realtime- PCR (PCR thời gian thực hay còn gọi là PCR định lượng) cho phép phân tích với một nồng độ virus vô cùng thấp ở những sinh vật mới bị nhiễm bệnh. Kỹ thuật này đã khắc phục được thời gian chờ đợi virus sinh sản tới một nồng độ đủ cao để đảm bảo độ chính xác của phương pháp xét nghiệm.

Phương pháp phân tích PCR đã được ứng dụng rất rộng rãi để chẩn đoán bệnh ở người như sốt xuất huyết Dengue, viêm gan B, viêm gan C, Chlamydia... Và rõ ràng nó rất hữu ích trong việc ứng dụng để xét nghiệm các thực vật bị nhiễm bệnh virus, vi khuẩn hoặc vi nấm...

7.3.2. Xử lý nhiệt

Quá trình xử lý nhiệt được coi như là biện pháp làm sạch bệnh có cơ sở thực tiễn. Những cây mía mắc bệnh có thể cho năng suất cao sau khi ngâm ở nước nóng, các nghiên cứu về vấn đề này cho thấy dùng không khí nóng thuận lợi hơn đối với hầu hết cây trồng bởi vì chúng có thể chịu đựng tốt hơn và virus bị loại trừ dần dần. Những hiểu biết của chúng ta về quá trình làm sạch bệnh thông qua xử lý nhiệt còn chưa đầy đủ. Người ta nêu ra giả thiết chung là virus bị ức chế sinh sản ở nhiệt độ từ 34-40°C. Quá trình sinh trưởng của thực vật trong khi xử lý nhiệt cũng bị ức chế

nhưng ít hơn vì thế những bộ phận vừa được sinh trưởng thường sạch hoặc nghèo virus. Kết quả xử lý nhiệt còn cho thấy cơ thể thực vật có thể được bảo tồn ở trạng thái tối thích trong một thời gian dài ở nhiệt độ cao. Tốt nhất là nên xử lý với chu kỳ quang 16 giờ/ngày. Nhiệt độ phải được kiểm tra liên tục bằng máy ghi tự động để đảm bảo cung cấp lượng nhiệt năng cần thiết, độ ẩm tương đối phải đạt trung bình là 50%. Để đảm bảo sự phân bố nhiệt độ đồng đều trong phòng cần phải có quạt gió. Mỗi một loài cây hoa thường mẫn cảm rất khác nhau đối với nhiệt độ cao trong khi xử lý, ví dụ: hoa cúc có khả năng chịu đựng nhiệt rất lớn: 38°C trong thời gian nửa năm tiếp theo là hoa anh túc. Hoa thủy tiên thì chịu được nhiệt độ 34°C trong thời gian từ 4-6 tuần. Trong một số trường hợp, người ta phải phối hợp xử lý nhiệt với nuôi cấy đỉnh sinh trưởng hoặc vi ghép để loại trừ bệnh virus (Walkey, 1980; Kartha, 1986; Brown và cs, 1988). Ưu thế của kỹ thuật này là sau khi cây đã qua xử lý nhiệt, mẫu nuôi cấy (hoặc vi ghép) thường có kích thước lớn hơn. Green và Lo (1989) đã tạo giống khoai lang sạch bệnh virus (bệnh vàng lụi) bằng nuôi cấy đỉnh sinh trưởng kích thước nhỏ (0,3 mm) hoặc nuôi cấy đỉnh chồi kích thước lớn hơn (1,0 - 2,5 cm) sau khi xử lý cây mẹ ở 37°C trong một đến hai tháng (hình 9). Kết quả tương tự cũng nhận được ở cây sắn (Kartha và Gambong, 1975).

Cây mẹ hoặc một phần cây mẹ được xử lý ở nhiệt độ cao bằng cách tăng nhiệt một cách từ từ cho đến khi đạt nhiệt độ tới hạn. Nhiệt độ này có thể ức chế hoặc loại trừ virus khỏi vùng sinh trưởng mạnh nhưng không ảnh hưởng đến sinh trưởng của cây. Cây được lưu giữ ở nhiệt độ tới hạn trong khoảng thời gian xác định, sau đó tách và nuôi cấy chồi đỉnh hoặc sử dụng trong vi ghép.

Tỷ lệ sạch bệnh của mẫu phụ thuộc vào thời gian xử lý nhiệt độ tới hạn và phụ thuộc vào khả năng chịu nhiệt của giống (Converse và Tanne, 1984; Lozoya-Saldana và Merlin -Lara, 1984). Xử lý nhiệt có tác dụng tốt với đa số trường hợp, song đôi khi mô tế bào của cây nhiễm virus nhưng không bị loại trừ ở nhiệt độ cao do chủng virus vẫn có khả năng sinh sản ở nhiệt độ này (Dawson, 1976).

Kết hợp xử lý nhiệt độ thấp với nuôi cấy đỉnh sinh trưởng đã được sử dụng thành công để loại trừ virus khỏi khoai tây và hoa cúc (Paduch-Cichal và Kryczynski, 1987). Bên cạnh đó, người ta sử dụng kết hợp một số hoá chất ức chế virus như ribavirin, vidarabine có gốc adenine để tạo giống sạch bệnh (Cassells và Long, 1980; Stone, 1982). Các hoá chất chống virus thường độc cho mô cây nên ứng dụng của kỹ thuật này vẫn còn hạn chế.

7.3.3. Nuôi cấy đỉnh phân sinh

Người ta đã chứng minh được rằng nồng độ virus trong thực vật giảm dần ở bộ phận gần đỉnh sinh trưởng riêng đỉnh phân sinh thì hoàn toàn sạch virus. Thực tế này

đã được ứng dụng để làm sạch virus bằng cách tách đỉnh sinh trưởng ở điều kiện vô trùng rồi nuôi cấy chúng thành thực vật hoàn chỉnh. Việc phân lập đỉnh phân sinh có kích thước 0,01-0,1 mm rất khó khăn và việc tái sinh thành cây hoàn chỉnh cũng chỉ đạt được với tần số rất thấp (0,2-5%) vì vậy người ta thường phân lập cả chồi ngọn và gọi nó là đoạn đỉnh (shoot tips) có kích thước từ 0,1- 1 mm qua đó tính sạch bệnh của mẫu vật nuôi cấy bị giảm xuống nhưng tốc độ tái sinh cây được tăng lên và đó chính là phương pháp được ứng dụng trong thực tiễn.

Khái niệm sạch virus của thực vật không có nghĩa là cần phải có đỉnh phân sinh hoàn toàn sạch, các phần tử virus mà nó được hoàn thiện trong quá trình phân hóa của các tế bào chưa phân hóa. Vì vậy, trong thực tiễn phải giới hạn nồng độ virus và khối lượng mô phân hóa ở một mức nhất định nếu cần có thực vật sạch virus. Việc phối hợp xử lý nhiệt với nuôi cấy đỉnh phân sinh là phương pháp rất thuận lợi bởi vì thông qua xử lý nhiệt quá trình sinh sản của virus trong chồi ngọn bị ức chế mạnh và thông qua quá trình phân hóa đỉnh phân sinh tính sạch virus sẽ được đảm bảo với độ xác suất cao, ở đây không đề cập đến vấn đề chọn các môi trường thích hợp. Thông thường người ta xử dụng môi trường Murashige-Skoog hoặc White. Theo quan điểm lý thuyết và kinh nghiệm thực tiễn người ta thu được những kết quả khác nhau trong từng phòng thí nghiệm, nếu việc nuôi cấy đỉnh phân sinh được thực hiện trên quan điểm sản xuất lớn thì cần phải chú ý những mặt sau đây: (a) đảm bảo độ đồng nhất của giống trong tất cả các khâu nuôi cấy, (b) đảm bảo tốc độ sinh trưởng nhanh và đều đối với một số lượng đỉnh phân sinh lớn đồng thời (c) kết quả đưa cây ra đất cũng cần phải được bảo đảm. Các đỉnh sinh trưởng sau khi phân lập cần được nuôi ở các buồng nuôi cây hoàn toàn khống chế về mặt khí hậu: nhiệt độ 22oC và 16 giờ chiếu sáng ở 1.000-3.000 lux .

Khi đưa cây tái sinh từ đỉnh phân sinh ra ngoài đất cần phải phủ nilon để chúng thích nghi dần với độ ẩm không khí thấp. Tốt nhất là nên trồng ở các buồng nuôi cây cách ly có thông khí và hoàn toàn sạch rệp lá. Từ tháng 10 đến tháng 3 cần phải chiếu sáng thêm, nhưng trong mùa hè lại phải che bớt ánh sáng.

7.4. Kết quả trong thực tiễn sản xuất

7.4.1. Tạo các giống cây sạch bệnh

7.4.1.1. Cây khoai tây

Khoai tây là cây trồng ở châu Âu được nhân giống vô tính và bị virus phá hoại nhiều nhất. Trong thời gian qua việc làm sạch virus ở khoai tây mới được ứng dụng một cách chậm chạp trong quá trình duy trì giống. Người ta chú ý nhiều nhất tới việc tạo ra các cây giống sạch bệnh bằng qui trình thử virus và trồng ở các khu vực sạch

bệnh để tránh tái nhiễm thông qua các loài rệp lá. Qui trình được sử dụng chủ yếu là giết các cây thảo có thể truyền bệnh vào củ khoai tây. Qui trình này có thể nâng cao hiệu suất thông qua xử lý nhiệt và nuôi cấy đỉnh sinh trưởng. Quá trình xử lý nhiệt giữa 32 và 38°C trong thời gian 7 ngày đến 7 tuần và sau đó nuôi cấy đỉnh phân sinh có thể loại trừ được virus A, xoắn lá, X và Y trong khi virus M và S cũng được giảm đi một cách đáng kể.

Các ảnh hiển vi điện tử của đỉnh sinh trưởng khoai tây có độ lớn từ 80-100 µm cho thấy chúng vẫn còn chứa trong tiêu bản tới 12 thể virus X. Tuy vậy, sau quá trình phân loại từ các đỉnh phân sinh đó vẫn thu được một tỷ lệ phần trăm nhất định các cây sạch virus.

7.4.1.2. *Cây thức ăn gia súc*

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

7.4.1.3. *Cây hoa bia*

Các loại bệnh virus ở hoa bia thường làm giảm năng suất đáng kể. Tiến hành chọn lọc bằng mắt thường, xử lý nhiệt và nuôi cấy đỉnh sinh trưởng, cải tiến dần tình trạng sạch bệnh người ta đã giải phóng 66% cây khỏi virus hop-mosaic (HMV) và latent bằng nuôi cấy đỉnh phân sinh, sau đó làm sạch virus prunis necrotic ringspot (PNRV) bằng xử lý nhiệt trong thời gian 10 ngày.

7.4.1.4. *Cây rau*

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

Ngoài ra, ở những cây trồng dùng để sản xuất hạt của chúng có thể nhân giống vô tính qua nhiều năm, ví dụ như súp- lơ người ta cũng cần phải có vật liệu sạch bệnh

virus ban đầu. Thông qua nuôi cấy mô người ta tạo được một vài trăm cây và bằng biện pháp thử virus đã thu được 3.220 cây sạch bệnh.

7.4.1.5. Cây ăn quả

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

Vì việc xử lý nhiệt đối với các cây thân gỗ và việc nuôi cấy đỉnh phân sinh của chúng khó khăn hơn nhiều so với các loài cây thân thảo cho nên từ lâu người ta đã sử dụng phương pháp thử để tìm ra các vật liệu sạch bệnh ban đầu. Quá trình xử lý nhiệt đối với cây ăn quả đến nay thường được tiến hành chủ yếu ở những đoạn cành mà các mắt của chúng sẽ được sử dụng để ghép sau này. Theo tài liệu tổng hợp của Nyland và Coheen (1969) về vấn đề xử lý nhiệt ở các cây thân gỗ có thể loại trừ được bốn loài virus ở cây anh đào, một loài virus ở cây mận, bảy loài virus ở cây táo, hai virus ở cây nho đất (nho tây), sáu virus ở cây đào và hai virus ở phúc bồn tử. Thành công trong xử lý nhiệt ở cây ăn quả không bao giờ đạt được 100%. Ở mỗi đối tượng ít nhất còn lại một thậm chí một số loài còn tới bốn virus không bị mất hoạt tính khi xử lý nhiệt.

Nuôi cấy đỉnh phân sinh ở cây ăn quả tới nay mới chỉ được sử dụng ở những đối tượng sau: dâu chua, dâu chua quả đỏ, dâu chua quả đen và cây táo. Thực tiễn cho thấy đối với cây ăn quả (cây thân gỗ) việc nuôi cấy đỉnh phân sinh còn gặp khó khăn hơn bởi vì khả năng tái sinh của chúng yếu hơn so với cây thân thảo. Các thí nghiệm trong những năm sắp tới chắc chắn sẽ nêu ra những kết quả mới.

7.4.1.6. Cây hoa

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

Việc ứng dụng thực tiễn trong các xí nghiệp chuyên sản xuất hoa đã trở thành quen thuộc trong những năm gần đây. Ở Hà lan, có những cơ sở của tổ chức trồng hoa chuyên nhận các loài vật liệu để làm sạch virus. Ở Anh, cũng tổ chức một cơ quan tương tự như vậy. Ở Đông Đức (cũ) có xí nghiệp ươm cây con ở thành phố Dresden cũng nhân các loài hoa như cúc, hoa anh túc, hoa thủy tiên... để xử lý nhiệt và làm

sạch virus.

Các điều kiện để làm sạch virus đối với cây hoa thường được thực hiện dễ dàng, vì thế ở những loài cây trồng này việc làm sạch virus thường có kết quả nhất. Vì thế dưới đây một số biện pháp quan trọng như xử lý nhiệt, nuôi cấy đỉnh phân sinh và xét nghiệm virus được trình bày trên đối tượng cây hoa.

7.4.2. Kiểm định tính sạch bệnh virus

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

Vì vậy, theo kinh nghiệm thực tế cần tiến phải xét nghiệm theo phương thức sau:

Đưa vật liệu ban đầu vào xử lý nhiệt trong một thời gian dài để làm sạch những virus mẫn cảm nhiệt độ sau đó dùng phương pháp nuôi cấy đỉnh phân sinh sau từ 4-6 tháng kể từ ngày nuôi cấy mới bắt đầu xét nghiệm thời gian này đủ để cho virus bảo tồn trong cây đủ nồng độ cho phép chứng minh được. Những cơ thể được xác định là sạch bệnh là nguồn vật liệu ban đầu để cung cấp cây mẹ cho sản xuất. Khoảng 5-10% số cơ thể này được tách riêng ra thành tập đoàn nhân mạnh khỏe (health nucleus clone) để các nhà tạo giống cải tiến tính chất theo ý muốn và độ thuần chủng (đồng nhất) của giống. Người ta kiểm tra những cơ thể này bằng tất cả các phương pháp xét nghiệm virus hiện có. Với hoa nelken người ta đã kiểm tra bằng phương pháp huyết thanh các loài virus caruation wottle, caruation latent, caruation ringspot... và xét nghiệm bằng cây chỉ thị *Cheopodium quinoa* và *Vaccara pyramydata* nhằm loại trừ những virus ít sinh sản không có biểu hiện nhận biết được. Những cây xác minh được là khỏe được tiến hành ươm cành rồi sau đó đưa vào xử lý nhiệt, tiếp theo nuôi cấy đỉnh sinh trưởng và cuối cùng kiểm tra bằng xét nghiệm virus. Đó là toàn bộ qui trình làm sạch virus khép kín.

Ngoài phương pháp và quá trình xét nghiệm thì kết quả làm sạch virus phụ thuộc nhiều vào trạng thái của cây cần được xét nghiệm, nghĩa là nồng độ virus có trong các bộ phận khác nhau, tuổi khác nhau, mùa khác nhau. Muốn bảo đảm xét nghiệm hàng loạt chính xác thì cần phải có nhà nuôi cấy. Nhiệt độ ổn định, tương quan ánh sáng ổn định và cây xét nghiệm phải cùng độ tuổi nhất định với nồng độ virus thích hợp cho xét nghiệm, cho phép thu được kết quả xét nghiệm chính xác.

7.4.3. Duy trì tính sạch bệnh virus

Vấn đề có tầm quan trọng đáng kể và cũng là vấn đề quyết định cuối cùng đối với thực tiễn nông nghiệp liên quan tới thời gian duy trì được cây trồng sạch virus. Đối với thực tiễn sản xuất thì cây được coi là bị bệnh chỉ khi nào năng suất giảm xuống. Hiện nay, trong sản xuất nông nghiệp và trồng cây ăn quả vấn đề này còn chưa được giải quyết thỏa đáng. Việc sản xuất dòng Elite trong qui trình sản xuất khoai tây giống kéo dài nhiều năm, trong khi đó nguy cơ tái nhiễm thông qua yếu tố truyền bệnh luôn tồn tại và phụ thuộc vào điều kiện khí hậu. Trong ngành trồng hoa tình hình thuận lợi hơn nhiều. Hiện nay ở CHLB Đức với tập đoàn nhân (nucleus clone) của hoa cúc và nelken người ta duy trì được tính sạch bệnh trong một năm rưỡi, trong khi chỉ cần một năm là có thể thay được hoàn toàn tập đoàn giống. Vì vậy, vấn đề nêu ra ở trên có thể được trả lời tóm tắt như sau: khối lượng và chất lượng vật liệu có sẵn ban đầu xác định khả năng sản xuất một vụ không bị giảm năng suất do bệnh virus.

Giảm năng suất có thể xuất hiện nếu nguồn giống sạch virus bị nhiễm sớm. Đối với khoai tây thì nhiễm chủ yếu do các yếu tố truyền bệnh sống ở điều kiện tự nhiên đối với cây hoa thì tái nhiễm xảy ra khi đưa cây giống sạch bệnh vào các xí nghiệp sản xuất bị nhiễm sẵn. Có thể nói rằng trong ngành trồng hoa qui trình làm sạch virus được coi như mô hình phương pháp. Cũng qua đó có thể nhận thấy phương pháp làm sạch virus không phải là biện pháp chữa bệnh một lần mà là một quá trình phức tạp đối với cây trồng đã bị bệnh từ trước. Người ta có thể so sánh bệnh virus của thực vật nhân giống vô tính như bệnh xã hội của con người không thể chữa bằng thuốc men mà phải thay đổi cả thói quen sinh hoạt. Ở các xí nghiệp công nghiệp sản xuất cây trồng có thể gọi các tiến bộ khoa học kỹ thuật là một loại stress khi mà từ một cây cúc mẹ một năm cho 100 cây ươm, trước kia chỉ thu được 15 và một cây ươm chỉ cần 11 ngày để ra rễ trong khi trước đây cần 21 ngày. Để tạo điều kiện cho các xí nghiệp sản xuất công nghiệp cây giống thu được những thành tích to lớn hơn nữa thì việc đầu tư hàng năm cho công tác chống bệnh virus trở nên cần thiết. Trong trường hợp nhân giống vô tính in vitro thì việc làm sạch virus càng phải được coi là điều kiện trước tiên.

CÂU HỎI ÔN TẬP

1. Nêu tầm quan trọng của phương pháp làm sạch virus thông qua nuôi cấy mô
2. Trình bày nguyên lý làm sạch virus cho thực vật
3. So sánh các phương pháp chuẩn đoán bệnh virus ở thực vật
4. Trình bày kỹ thuật nuôi cấy đỉnh phân sinh
5. Khái quát các kết quả trong thực tiễn sản xuất của phương pháp tạo giống sạch virus nhờ nuôi cấy đỉnh sinh trưởng

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- 1) Nguyễn Quang Thạch, Nguyễn Thị Lý Anh, Nguyễn Thị Phương Thảo, (2003). *Giáo trình công nghệ sinh học nông nghiệp*. Nhà xuất bản Nông nghiệp
- 2) Lê Văn Hoàng. *Công nghệ nuôi cấy mô tế bào thực vật*, Nxb Đà Nẵng
- 3) Lê Trần Bình, Hồ Hữu Nhị, Lê Thị Muội (1997), *Công nghệ sinh học thực vật trong công tác cải tiến giống cây trồng*. Nhà xuất bản Nông nghiệp
- 4) Nguyễn Văn Uyên, (1996). *Những phương pháp công nghệ sinh học thực vật*. NXB Nông nghiệp Thành phố Hồ Chí Minh