

TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM THÁI NGUYÊN

NGÔ XUÂN BÌNH (Chủ biên)

NUÔI CÂY MÔ TẾ BÀO THỰC VẬT

Cơ sở lý luận và ứng dụng

(Tài liệu chuyên khảo dành cho sinh viên đại học và sau đại học)



NHÀ XUẤT BẢN KHOA HỌC VÀ KỸ THUẬT

TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM THÁI NGUYÊN
NGÔ XUÂN BÌNH
(Chủ biên)

NUÔI CÂY
MÔ TẾ BÀO THỰC VẬT

Cơ sở lý luận và ứng dụng

Tài liệu chuyên khảo
dành cho sinh viên đại học và sau đại học

NHÀ XUẤT BẢN KHOA HỌC VÀ KỸ THUẬT

MỞ ĐẦU

Công nghệ sinh học ngày nay có bước phát triển mãnh mẽ, nhanh chóng. Trong đó, lĩnh vực công nghệ sinh học thực vật như các kỹ thuật di truyền, nuôi cấy mô tế bào thực vật luôn được ưu tiên trong nghiên cứu nhằm tạo ra sản phẩm giống cây trồng có năng suất và chất lượng cao. Khác với cuộc cách mạng xanh những năm 70 của thế kỷ trước, cách mạng về công nghệ sinh học tác động đến nhiều lĩnh vực khác nhau của cuộc sống như: nông nghiệp, y học và sức khỏe con người, môi trường, dinh dưỡng và thực phẩm, bảo tồn đa dạng sinh học... Trong lĩnh vực nuôi cấy mô tế bào thực vật - một kỹ thuật nền tảng phục vụ cho quá trình chuyển gen, tạo sinh khối trong sản xuất thực phẩm - y - dược, nhân giống cây trồng... đã có nhiều thành công, hàng loạt các kỹ thuật mới, qui trình được hoàn thiện. Ngày 4. 3. 2005, Ban Bí Thư Trung Ương ra chỉ thị số 50 – CT/TW về đẩy mạnh phát triển và ứng dụng công nghệ sinh học phục vụ sự nghiệp công nghiệp hoá, hiện đại hoá đất nước. Chính phủ đã xác định vai trò quan trọng công nghệ sinh học trong sự phát triển của nền kinh tế quốc dân và đã đưa ra nhiều biện pháp, chính sách thúc đẩy việc nghiên cứu và ứng dụng trong Công nghệ sinh học.

Xuất phát từ nhu cầu đào tạo, nghiên cứu khoa học và ứng dụng chuyển giao công nghệ trong lĩnh vực nuôi cấy mô tế bào thực vật, tác giả biên soạn tài liệu chuyên khảo “Nuôi cấy mô tế bào thực vật - Cơ sở lý luận và ứng dụng”.

Tài liệu gồm hai phần:

Phần 1: Bao gồm 8 chương trình bày các cơ sở lý luận của nuôi cấy mô tế bào thực vật.

Phần 2: Gồm 2 chương, trình bày một số kết quả nghiên cứu của tác giả và cả nhóm nghiên cứu từ giai đoạn 2001 đến 2009. Trong đó chủ yếu là các kết quả nghiên cứu xây dựng các qui trình nuôi cấy mô tế bào thực vật ở một số loại cây trồng chủ yếu, được thực hiện tại Bộ môn Công nghệ sinh học và Công nghệ thực phẩm, Trường Đại học Nông Lâm Thái Nguyên. Trong phần 2, có sự tham gia của thành viên nhóm nghiên cứu như sau:

- Chương 9: Ngô Xuân Bình, Trần Ngọc Ngoạn
Chương 10 - mục: 10.1, 10.2, 10.3, 10.4: Ngô Xuân Bình, Nguyễn Thị Tình
Chương 10 - mục 10.5, 10.11, 10.12: Ngô Xuân Bình, Nguyễn Tiến Dũng
Chương 10 - mục 10.6, 10.7, 10.10: Ngô Xuân Bình, Bùi Trí Thức.
Chương 10 - mục 10.8, 10.9, 10.13: Ngô Xuân Bình, Nguyễn Văn Hồng
Chương 10 - mục 10.14, 10.15, 10.16, 10.17: Ngô Xuân Bình, Đặng Ngọc Hùng

Tài liệu biên soạn chắc chắn không tránh khỏi thiếu sót, rất mong được sự đóng góp ý kiến của bạn đọc, đồng nghiệp, những người quan tâm để bổ sung ngày càng hoàn thiện.

Tác giả

MỤC LỤC

Phần I

CƠ SỞ LÝ LUẬN CỦA PHƯƠNG PHÁP NUÔI CÂY MÔ TẾ BÀO THỰC VẬT

Chương 1	Tổng quan về nuôi cấy mô tế bào thực vật	11
1.1.	Cơ sở của phương pháp nuôi cấy mô tế bào thực vật	11
1.2.	Lịch sử phát triển của nuôi cấy mô tế bào thực vật.	15
1.3.	Các cơ quan của thực vật được trồng nuôi cấy mô tế bào	17
1.4.	Một số phương pháp nuôi cấy mô tế bào thực vật	18
1.5.	Ứng dụng kỹ thuật nuôi cấy mô tế bào trong nông nghiệp	20
Chương 2	Điều kiện và môi trường nuôi cấy mô tế bào thực vật	26
2.1.	Yêu cầu cơ bản của phòng thí nghiệm nuôi cấy mô tế bào thực vật	26
2.2.	Những điều kiện cơ bản trong nuôi cấy mô tế bào thực vật	30
Chương 3	Ứng dụng nuôi cấy mô tế bào trong tạo giống cây sạch bệnh virus	49
3.1.	Tầm quan trọng của việc tạo cây sạch bệnh	49
3.2.	Cơ sở khoa học tạo cây sạch virus	51
3.3.	Phương pháp tạo cây sạch virus	54
3.4.	Một số kết quả đạt được trong công tác tạo cây sạch bệnh	59

Chương 4 Nhân giống cây trồng qua nuôi cấy phát sinh phôi soma và công nghệ phôi vô tính	64
4.1. Nhân giống cây trồng qua nuôi cấy phát sinh phôi Soma	64
4.2. Công nghệ phôi vô tính	71
Chương 5 Cây đơn bội và ứng dụng phương pháp nuôi cấy mô trong tạo cây đơn bội	81
5.1. Vấn đề đơn bội ở thực vật	81
5.2. Phương pháp tạo thể đơn bội <i>in vivo</i>	83
5.3. Phương pháp tạo đơn bội <i>in vitro</i>	85
5.4. Ứng dụng cây đơn bội	98
5.5. Ứng dụng kỹ thuật đơn bội trong tạo dòng thuần ở ngô, lúa	108
5.6. Nguồn gốc của các hiện dị tế bào soma	118
5.7. Quy trình tạo cây đơn bội	123
Chương 6 Nuôi cấy tế bào đơn và chọn dòng tế bào	130
6.1. Nuôi cấy tế bào đơn	130
6.2. Nguyên liệu, điều kiện và phương pháp nuôi cấy	132
6.3. Chọn dòng tế bào	142
Chương 7 Nuôi cấy tế bào trần và ứng dụng	156
7.1. Tế bào trần (protoplast)	156
7.2. Phương pháp tách protoplast	157
7.3. Nuôi cấy protoplast	165
7.4. Protoplast và vấn đề chọn dòng tế bào	169
7.5. Dung hợp protoplast	170
7.6. Chuyển gen vào tế bào trần	180
7.7. Các bước nuôi cấy Protoplast	182

Chương 8 Công nghệ sinh học trong việc bảo quản và phát triển nguồn gen quý hiếm	184
8.1. Khái niệm chung về bảo quản nguồn gen thực vật	184
8.2. Bảo quản nguồn gen <i>in vitro</i>	187
8.3. Các tiêu chí để tính số lượng nguồn gen cần lưu giữ tại Ngân hàng gen cây trồng Quốc Gia	190
8.4. Những kết quả và khó khăn còn tồn tại	193
8.5. Hiện trạng công tác bảo quản nguồn gen ở Việt Nam	193
8.6. Phương pháp thu thập quỹ gen cây trồng	197

Phần 2

MỘT SỐ KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ ỨNG DỤNG TRONG NUÔI CÂY MÔ TẾ BÀO THỰC VẬT

Chương 9 Kết quả nghiên cứu ứng dụng trong nuôi cấy bao phấn và tế bào phôi hạt chín ở cây lúa	203
9.1. Báo cáo kết quả nghiên cứu: Hoàn thiện quy trình nuôi cấy bao phấn và mô tế bào phôi hạt chín ở cây lúa nước (<i>Oryza Sativa L.</i>)	203
9.2. Quy trình nuôi cấy phôi lúa	238
9.3. Quy trình nuôi cấy bao phấn lúa	242
Chương 10 Quy trình nhân giống một số cây trồng chủ yếu	253
10.1. Quy trình nhân nhanh giống hoa lily từ đỉnh sinh trưởng bằng phương pháp <i>in vitro</i>	253
10.2. Quy trình tạo phôi vô tính từ vảy củ và lát mỏng vảy củ hoa lily	255
10.3. Quy trình nhân nhanh giống hoa cúc từ đỉnh sinh trưởng	257
10.4. Quy trình tạo phôi vô tính, chồi từ phát hoa và lá Lan Hồ Điệp	259

- 10.5. Quy trình nhân giống lan Đuôi Chồn, Đại Châu từ phôi 262
- 10.6. Quy trình nhân giống vô tính cây hoa Đồng Tiền
bằng phương pháp nuôi cấy mô tế bào 265
- 10.7. Quy trình nuôi cấy Hồng Môn 268
- 10.8. Quy trình nhân nhanh giống chuối 270
- 10.9. Quy trình nuôi cấy phôi cam quýt 272
- 10.10. Quy trình nuôi cấy phôi ngô 273
- 10.11. Quy trình nuôi cấy phôi Soma Đậu Tương 276
- 10.12. Quy trình nuôi nổi lá mầm cây đậu tương 279
- 10.13. Quy trình nuôi cấy đỉnh sinh cây lô hội 281
- 10.14. Quy trình nhân giống cây Ba kích
bằng phương pháp nuôi cấy mô tế bào 284
- 10.15. Quy trình nuôi cấy cây Song Mật 286
- 10.16. Quy trình nuôi cấy Keo lai 289
- 10.17. Quy trình nuôi cấy cây Bạch Đàn lai 292

PHẦN I

**CƠ SỞ LÝ LUẬN CỦA
PHƯƠNG PHÁP NUÔI CÂY
MÔ TẾ BÀO THỰC VẬT**

Chương 1

TỔNG QUAN VỀ NUÔI CÂY MÔ TẾ BÀO THỰC VẬT

1.1. CƠ SỞ CỦA PHƯƠNG PHÁP NUÔI CÂY MÔ TẾ BÀO THỰC VẬT

1.1.1. Định nghĩa

Nuôi cấy mô, tế bào thực vật là phạm trù khái niệm chung cho tất cả các loại nuôi cấy nguyên liệu thực vật hoàn toàn sạch các vi sinh vật, trên môi trường dinh dưỡng nhân tạo, trong điều kiện vô trùng.

Bao gồm:

- + Nuôi cấy cây non và cây trưởng thành.
- + Nuôi cấy cơ quan: rễ, thân, lá, hoa, quả, bao phấn, nõn chưa thụ tinh
- + Nuôi cấy phôi: phôi non và phôi trưởng thành.
- + Nuôi cấy mô sẹo (callus).
- + Nuôi cấy tế bào đơn (huyền phù tế bào).
- + Nuôi cấy Protoplast: nuôi cấy phần bên trong của tế bào thực vật sau khi tách vỏ, còn gọi là nuôi cấy tế bào trần.

Nuôi cấy mô, tế bào thực vật còn gọi là nuôi cấy thực vật *invitro* (trong ống nghiệm) để phân biệt với các quá trình nuôi cấy cây trong điều kiện tự nhiên ngoài ống nghiệm

Bảng 1.1. Khả năng sử dụng nuôi cấy mô, tế bào thực vật vào công tác giống cây trồng

Bộ phận nuôi	Mục đích
Đỉnh chồi (Đỉnh sinh trưởng)	- Tạo và nhân nhanh dòng đồng nhất về di truyền. - Làm sạch virus. - Nghiên cứu sinh lý phát triển.
Hoa cái (Bầu quả, noãn)	- Thu phấn trong ống nghiệm phục vụ lai xa. - Tạo đơn bội. - Tạo đa phôi.
Hoa đực (Bao phấn, hạt phấn)	- Tạo mô sẹo và cây đơn bội. - Tạo đột biến ở mức đơn bội. - Tạo dòng đồng hợp tử.
Phôi	- Nuôi cấy cứu phôi khi lai xa. - Nhân các dòng lai xa. - Phá ngủ nghỉ của hạt.
Mô sẹo	- Tạo phôi vô tính. - Nuôi cấy tế bào đơn và tách tế bào trần. - Tạo cây có biến dị soma.
Tế bào	- Tạo đột biến ở mức đa tế bào. - Tạo tế bào trần để lai vô tính - Biến nạp gen - Nuôi cấy tế bào đơn

1.1.2. Cơ sở kỹ thuật nuôi cấy mô, tế bào thực vật.

1.1.2.1. Tính toàn năng của tế bào

Haberlandt (1902) là người đầu tiên đưa ra quan điểm rằng mỗi 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. Theo quan điểm của sinh học hiện đại thì mỗi tế bào riêng rẽ đã phân hóa đều mang toàn bộ lượng thông tin di truyền cần thiết và đủ của cả cơ thể sinh vật đó. Khi gặp điều kiện thích hợp, mỗi tế bào đều có thể phát triển thành một cá thể hoàn chỉnh. Đó là tính toàn năng của tế bào.

Tính toàn năng của tế bào mà Haberlandt nêu ra chính là cơ sở lý luận của phương pháp nuôi cấy mô và tế bào thực vật. Cho đến nay con người đã hoàn toàn chứng minh được khả năng tái sinh một cơ thể thực vật hoàn chỉnh từ một tế bào riêng rẽ.

1.1.2.2. Sự phân phân hóa và phân hóa của tế bào.

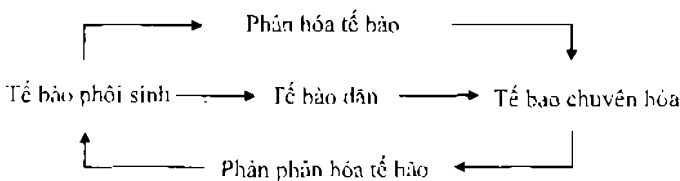
Cơ thể thực vật trưởng thành là một chính thể thống nhất bao gồm nhiều cơ quan chức năng khác nhau, được hình thành từ nhiều loại tế bào khác nhau. Tuy nhiên tất cả các loại tế bào đó đều bắt nguồn từ một tế bào đầu tiên (tế bào hợp tử). Ở giai đoạn đầu, tế bào hợp tử tiếp tục phân chia hình thành nhiều tế bào phôi sinh chưa mang chức năng riêng biệt (chuyên hóa). Sau đó từ các tế bào phôi sinh này chúng tiếp tục được biến đổi thành các tế bào chuyên hóa đặc hiệu cho các mô, cơ quan có chức năng khác nhau.

Sự phân hóa tế bào là sự chuyển các tế bào phôi sinh thành các tế bào mô chuyên hóa, đảm nhận các chức năng khác nhau. Ví dụ: Môậu làm nhiệm vụ quang hợp, mô bì làm nhiệm vụ bảo vệ, nhu mô dự trữ làm nhiệm vụ dự trữ, mô dẫn làm chức năng dẫn nước và dẫn dinh dưỡng.

Quá trình phân hóa tế bào có thể biểu thị:

Tế bào phôi sinh → Tế bào dẫn → Tế bào phân hóa có chức năng riêng biệt

Tuy nhiên, khi tế bào đã phân hóa thành các tế bào có chức năng chuyên, chúng không hoàn toàn mất khả năng biến đổi của mình. Trong trường hợp cần thiết, ở điều kiện thích hợp, chúng lại có thể trở về dạng tế bào phôi sinh và phân chia mạnh mẽ. Quá trình đó gọi là phân phân hóa tế bào, ngược lại với sự phân hóa tế bào.




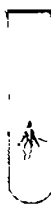
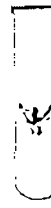
Hình 1.1. Quá trình phân hóa và phân phân hóa tế bào

Thí dụ: Khi nuôi cấy mô thuốc lá, các tế bào đã phân hóa của lá gặp điều kiện thích hợp của môi trường sẽ phân phân hóa và liên tục phân chia, liên tục tạo thành các mô sẹo (callus). Các tế bào của mô sẹo không còn là tế bào có chức năng như tế bào lá nữa. Nếu chuyển các mô sẹo này sang môi trường khác, tùy theo thành phần môi trường mà tế bào mô sẹo lại có thể phân hóa theo hướng hình thành chồi, rễ và có thể hình thành nên cây hoàn chỉnh.

Về bản chất thì sự phân hóa và phản phân hóa là một quá trình hoạt hóa, ức chế các gen. Tại một thời điểm nào đó trong quá trình phát triển cá thể, có một số gen được hoạt hóa (mà vốn trước nay bị ức chế) để cho ra tính trạng mới, còn một số gen khác lại bị đình chỉ hoạt động. Điều này xảy ra theo một chương trình đã được mã hóa trong cấu trúc phân tử DNA của mỗi tế bào khiến quá trình sinh trưởng phát triển của cơ thể thực vật luôn được hài hòa.

Mặt khác, khi tế bào nằm trong một khối mô của cơ thể thường bị ức chế bởi các tế bào xung quanh. Khi tách riêng từng tế bào hoặc giảm kích thước của khối mô sẽ tạo điều kiện thuận lợi cho sự hoạt hóa các gen của tế bào.

Quá trình phát sinh hình thái trong nuôi cấy mô, tế bào thực vật thực chất là kết quả của quá trình phân hóa và phản phân hóa tế bào. Kỹ thuật nuôi cấy mô, tế bào xét cho đến cùng là kỹ thuật điều khiển sự phát sinh hình thái của tế bào thực vật (khi nuôi cấy tách rời trong điều kiện nhân tạo và vô trùng) một cách định hướng dựa vào sự phân hóa và phản phân hóa của tế bào trên cơ sở tính toán năng của tế bào thực vật. Để điều khiển sự phát sinh hình thái của mô nuôi cấy người ta bổ sung vào môi trường nuôi cấy hai nhóm chất điều tiết sinh trưởng thực vật là auxin và cytokinin. Tỷ lệ hàm lượng hai nhóm chất này trong môi trường khác nhau sẽ tạo ra sự phát sinh hình thái khác nhau theo quy luật được biểu thị ở sơ đồ bên. Theo sơ đồ, khi trong môi trường nuôi cấy có tỷ lệ nồng độ auxin (đại diện là IAA)/cytokinin (đại diện là kinetin) thấp thì sự phát sinh hình thái của mô nuôi cấy theo hướng tạo chồi, khi tỷ lệ này cao mô nuôi cấy sẽ phát sinh hình thái theo hướng tạo rễ, còn ở môi trường tỷ lệ auxin/cytokinin cân đối sẽ phát sinh theo hướng tạo mô sẹo (callus). (Bảng 1.2)

IAA	2×10^{-5}	2×10^{-5}	2×10^{-7}
Kinetin	10^{-6}	10^{-7}	5×10^{-6}
Sự phát sinh hình thái của mẫu cấy			
	Callus	Rễ	Chồi

Hình 1.2. Một số đường hướng phát sinh hình thái của mô nuôi cấy

1.2. LỊCH SỬ PHÁT TRIỂN CỦA NUÔI CẤY MÔ TẾ BÀO THỰC VẬT

Năm 1838 - 1839 học thuyết hiện đại về tế bào học được công bố do hai nhà khoa học M.J. Schleiden (nhà nghiên cứu thực vật) và T. Schwann (nhà nghiên cứu động vật) đề xuất. Học thuyết này khẳng định: "mọi cơ thể sinh vật phức tạp đều gồm nhiều đơn vị nhỏ là các tế bào hợp thành. Các tế bào đã phân hóa đều mang các thông tin có trong tế bào đầu tiên và là những đơn vị độc lập, từ đó có thể xây dựng lại toàn bộ cơ thể"

Năm 1902 nhà khoa học Haberlandt lần đầu tiên đưa các giả thuyết của Schleiden và Schwann vào thực nghiệm. Haberlandt cho rằng: có thể tạo cá thể hoàn chỉnh từ việc nuôi cấy tế bào. Tuy nhiên, Haberlandt đã không thành công trong việc nuôi cấy tế bào thực vật. Những hạn chế về phương tiện kỹ thuật, kiến thức khoa học thời bấy giờ đã không đưa ông đến thành công như mong đợi.

Năm 1922, Kotte nhà khoa học Mỹ lặp lại thí nghiệm của Haberlandt với đỉnh sinh trưởng tách từ đầu rễ loài cây họ hoả thảo. Trong môi trường lỏng có chứa dinh dưỡng khoáng và đường glucose, đầu rễ sinh trưởng rất mạnh tạo thành một hệ rễ bao gồm cả rễ phụ. Tuy vậy, sinh trưởng của mẫu tồn tại một thời gian, sau đó chậm dần và ngừng lại, mặc dù tác giả đã chuyển qua môi trường mới.

Năm 1934, giai đoạn thứ hai trong lịch sử nuôi cấy mô thực vật. White - nhà khoa học Mỹ, nuôi cấy thành công trên cây cà chua với môi trường lỏng chứa dinh dưỡng khoáng, đường và dịch chiết nấm men. Sau đó, White chứng minh có thể thay thế nước chiết nấm men bằng hỗn hợp ba loại vitamin nhóm B: Thiamine (B1), pyridoxine (B6) và nicotinic acid. Từ đây, việc nuôi đã được tiến hành ở nhiều cây trồng khác nhau. Đồng thời, Gautheret tiến hành các nghiên cứu và thành công nuôi cấy mô phân sinh (tượng tầng) một số cây thân gỗ. Went & Thimann phát hiện chất điều hoà sinh trưởng (hormon) đầu tiên - acid- B - indolacetic (IAA). Gautheret xác nhận tác dụng của chất kích thích sinh trưởng trên mô sẹo của IAA và nhóm 3 vitamin do White khởi xướng. Cùng với Nobercourt (1939), Gautheret thành công trong việc duy trì sinh trưởng của mô sẹo cà rốt trên môi trường rắn có chứa thạch agar.

Năm 1941, nhà khoa học Overbeck chứng minh tác dụng kích thích sinh trưởng của nước dừa trong nuôi cấy phôi từ mẫu cây họ cà.

Năm 1948, Steward xác nhận tác dụng của nước dừa trên mô sẹo cà rốt. Sau đó nhiều chất kích thích sinh trưởng nhân tạo thuộc nhóm auxin đã được nghiên cứu và tổng hợp thành công. Hợp chất NAA và chất 2,4 - (Dichloro pheloxxy acetic acid) được bắt đầu sử dụng ở nồng độ cao để trừ cỏ trong sản xuất nông nghiệp.

Nhiều báo cáo cho thấy cùng với nước dừa, 2,4D, và NAA giúp cho quá trình hình thành mô sẹo, tăng khả năng phân chia tế bào trong quá trình tạo cây hoàn chỉnh trong nuôi cấy invitro.

Năm 1955, nhà khoa học Hoch Skoog phát hiện thấy vai trò của một hợp chất có tác dụng kích thích phân bào, và đặt tên là Kinetin.

Sau này, các nhà khoa học nghiên cứu kỹ hơn vai trò của Kinetin và xếp vào nhóm cytokinin.

Việc phát hiện và xác định được vai trò của IAA, NAA, 2,4D, kinetin cùng xác định được vai trò của các vitamin, nước dừa được coi bước tiến quan trọng trong giai đoạn thứ hai của lịch sử nuôi cấy mô thực vật, đây là những tiền đề kỹ thuật cho xác lập môi trường nuôi cấy cho nhiều loài thực vật.

Năm 1957, Skoog và Miller công bố các kết quả nghiên cứu về ảnh hưởng của tỷ lệ kinetin/auxin đối với sự hình thành mô sẹo cây thuốc lá. Khi giảm thấp tỷ lệ kinetin/auxin, mô sẹo có xu hướng tạo rễ, ngược lại nếu tỷ lệ kinetin/auxin tăng lên, mô sẽ phát sinh chồi. Hiện tượng này xác nhận có kết quả giống nhau trên nhiều loại cây trồng. Kết quả nghiên cứu góp phần quan trọng trong việc sử dụng chất điều hòa sinh trưởng trong nuôi cấy invitro.

Năm 1958, Kerint và Sterward tạo được phôi và cây hoàn chỉnh từ tế bào tượng tầng cây cà rốt.

Năm 1960 Morel ddx thành công trong nhân giống invitro loài lan *Cymbidium* từ mẫu nuôi cấy là đỉnh sinh trưởng. Nuôi cấy, các đỉnh sinh trưởng hình thành dạng cụm chồi gọi là các protocorm. Khi tách các protocorm tiếp tục nuôi cấy trên môi trường phù hợp, mẫu sẽ hình thành các protocorm mới. Điều chỉnh môi trường phù hợp, mẫu nuôi cấy có thể phát triển thành cây hoàn chỉnh.

Năm 1960, nhà khoa học Cooking lần đầu tiên dùng enzyme phân hủy thành tế bào và tạo ra số lượng lớn tế bào trần trên nhiều loại cây trồng khác nhau.

Năm 1966, Guha và cộng sự thành công trong nuôi cấy tạo cây đơn bội ở cà độc dược từ bao phấn.

Năm 1967- 1968 lần lượt Nichko Nakato và cộng sự tạo được cây đơn bội từ bao phấn thuốc lá.

Năm 1971 Takebe tái sinh thành công cây thuốc lá từ tế bào trần.

Năm 1972 Carlson và cộng sự lần đầu tiên thực hiện lai tế bào soma hai loài khác nhau, tạo được cây từ dung hợp tế bào trần của 2 loài thuốc lá *Nicotiana glauca* và *N langsdorfi*.

Năm 1977 ML chers dung hợp thành công hai loại tế bào soma của cây cà chua và cây khoai tây đánh dấu một bước ngoặt trong lịch sử chọn tạo giống cây trồng.

Từ năm 1980 đến 1992 nhiều thành công mới trong lĩnh vực công nghệ gen thực vật

Hiện nay, nuôi cấy mô tế bào thực vật đang ở giai đoạn thứ 4, nuôi cấy mô được ứng dụng khá phổ biến trong nhân giống cây trồng, chọn tạo giống, tạo đột biến, tạo sinh khối, sản xuất các hợp chất thứ cấp có hoạt tính sinh học.... các ứng dụng về nuôi cấy mô tế bào thực vật nói riêng và công nghệ tế bào thực vật nói chung đang trở thành công cụ có hiệu quả trong việc tạo ra sản phẩm đặc thù phục vụ con người.

1.3. CÁC CƠ QUAN CỦA THỰC VẬT ĐƯỢC TRỒNG TRONG NUÔI CẤY MÔ TẾ BÀO

Bảng 1.2: Các cơ quan bộ phận được sử dụng nuôi cấy

Nguồn gốc mẫu cây	Kích thước	Mẫu được tách
Đỉnh sinh trưởng	0,5 - 1mm	Tế bào đỉnh sinh trưởng
Chồi đỉnh	0,5 - 1cm	Chồi đỉnh có chứa một phần thân
Chồi bên	0,5 - 1cm	Chồi bên có chứa một phần thân, lá và chồi nách
Cuống lá	0,2- 0,3cm	Cuống lá được cắt nhỏ, cấy chìm vào môi trường một nửa
Phiến lá	0,2 - 1cm	Phiến lá non được đặt trên môi trường, mặt dưới được đặt trên mặt thạch

Rễ	0,5 - 1cm	Mẫu rễ được đặt trên mặt thạch
Dang hành	1 - 2cm	Mẫu được đặt trên mặt hay được cấy chìm phân nửa vào môi trường
Cây mầm	2 - 3mm	Chồi non
Hạt phấn	0,1 - 0,5mm	Hạt phấn trong túi phấn

1.4. MỘT SỐ PHƯƠNG PHÁP NUÔI CẤY MÔ TẾ BÀO THỰC VẬT

1.4.1. Nuôi cấy đỉnh sinh trưởng

Phương pháp thuận lợi có thể đạt được mục tiêu trong nuôi cấy mô tế bào thực vật là nuôi cấy đỉnh sinh trưởng (bao gồm mô phân sinh đỉnh và mô phân sinh bên). Sau khi vô trùng, mẫu được nuôi cấy trên môi trường thích hợp. Từ một đỉnh sinh trưởng sau một thời gian nuôi cấy nhất định phát triển thành một chồi hay nhiều chồi. Sau đó chồi tiếp tục vươn dài hình thành thân, lá, ra rễ để trở thành một cây hoàn chỉnh. Đây là một chu trình ngắn nhất và tiện lợi hơn các phương thức nhân giống thông thường khác.

1.4.2. Nuôi cấy mô sẹo

Trong điều kiện môi trường nuôi cấy có chứa nhiều auxin, mô sẹo được hình thành. Mô sẹo là một khối tế bào phát triển không có định hướng, thường có màu trắng. Trong môi trường phù hợp, mô sẹo có khả năng tái sinh thành cây hoàn chỉnh. Nuôi cấy mô sẹo được thực hiện đối với những loài thực vật không có khả năng nhân giống đỉnh sinh trưởng, hoặc với các loại mẫu nuôi cấy không thể trực tiếp hình thành chồi. Cây tái sinh từ mô sẹo có đặc tính giống như cây mẹ và từ một cụm tế bào mô sẹo có thể tái sinh cùng một lúc cho nhiều chồi hơn là nuôi cấy đỉnh sinh trưởng, tuy nhiên mức độ biến dị tế bào soma rất cao trong quá trình nuôi cấy để tạo mô sẹo.

1.4.3. Nuôi cấy tế bào đơn

Khối mô sẹo được nuôi cấy trong môi trường lỏng và được đặt trên máy lắc có tốc độ điều chỉnh thích hợp. Khối mô sẹo dưới tác dụng của cơ

học và các hoá chất hỗ trợ tách ra nhiều tế bào riêng rẽ gọi là tế bào đơn. Tế bào đơn được lọc và nuôi cấy trong môi trường đặc biệt và tăng sinh khối. Hệ thống nuôi cấy tế bào đơn giống như hệ thống nuôi cấy vi sinh. Với các cơ chất phù hợp được bổ sung môi trường, tế bào có khả năng sản xuất các chất có hoạt tính sinh học (alkloid, steoid...). Sau một thời gian nuôi cấy kéo dài trong môi trường lỏng tế bào đơn được tách ra và trải trên môi trường thạch, tế bào đơn được phát triển thành từng cụm tế bào mô sẹo khi môi trường có auxin hoặc có thể tái sinh thành cây hoàn chỉnh trên môi trường có tỷ lệ cytokinin/ auxin thích hợp. Sử dụng các tế bào đơn để xử lý đột biến bằng tia phóng xạ, hóa chất, có ý nghĩa lớn trong chọn tạo giống cây trồng.

1.4.4. Nuôi cấy tế bào trần

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

1.4.5. Nuôi cấy hạt phấn

Nuôi cấy bao phấn là kỹ thuật nuôi cấy *in vitro*. Bao phấn chứa các bào tử hoặc hạt phấn chưa chín nuôi trong môi trường dinh dưỡng xác định nhằm mục đích tạo cây đơn bội. Sau đó dùng colchicin lưỡng bội hoá tạo thành cây lưỡng bội. Nuôi cấy bao phấn được ứng dụng rộng rãi và có hiệu quả trong việc tạo ra các dòng, giống thuần ở các cây tự thụ phấn vì đã rút ngắn được thời gian tạo ra một giống mới. Nuôi cấy bao phấn tạo giống mới được ứng dụng thành công ở một số loài cây như: lúa mì, lúa nước, thuốc lá, ngô....

1.5. ỨNG DỤNG KỸ THUẬT NUÔI CẤY MÔ TẾ BÀO TRONG NÔNG NGHIỆP

1.5.1. Nhân nhanh giống cây trồng bằng nuôi cấy mô

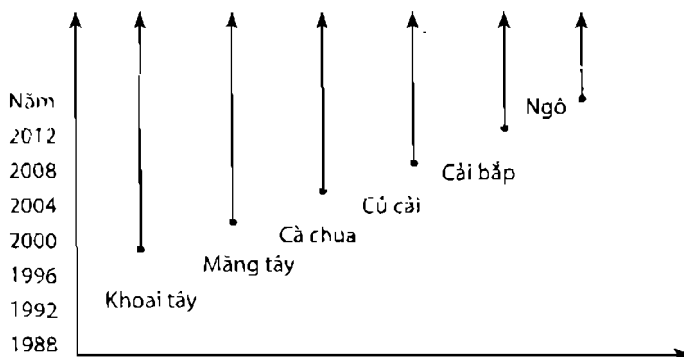
Đây là một lĩnh vực mà nuôi cấy mô và tế bào thực vật đã mang lại hiệu quả kinh tế to lớn thực sự. Một trong những ưu việt của phương pháp nhân *in vitro* là việc sử dụng các mô nuôi cấy ở kích thước nhỏ. Ở kích thước nhỏ, sự tương tác giữa các tế bào trong mô sẽ đơn giản hơn, tác động của các phương pháp sẽ hiệu quả hơn, mô nuôi cấy dễ phân hóa và sau đó dễ tái sinh hơn.

Kỹ thuật nhân nhanh *in vitro* có những ưu việt mà các phương pháp khác không có được đó là: Có thể nhân giống cây trồng ở quy mô công nghiệp (kể cả trên đối tượng khó nhân bằng phương pháp thông thường), phương pháp có hệ số nhân rất cao và cho ra các cá thể hoàn toàn đồng nhất về mặt di truyền, đồng đều về kích thước.

Kỹ thuật nhân nhanh được ứng dụng vào những mục đích sau:

- + Duy trì và nhân nhanh các kiểu gen quý làm vật liệu cho công tác tách giống.
- + Nhân nhanh các loài hoa, cây cảnh khó trồng bằng hạt.
- + Duy trì nhân nhanh các dòng bố mẹ và các dòng lai để tạo hạt giống cây rau, cây hoa và cây trồng khác.
- + Nhân nhanh kết hợp với làm sạch virus.
- .. Bảo quản tập đoàn gen.

Thời gian xuất hiện cây *in vitro* trong sản xuất



Hình 1.3. Biểu đồ dự đoán về sử dụng cây giống nhân *in vitro*

- Hơn 50% cây được trồng sử dụng cây nuôi cấy mô

Số liệu được phân tích và dự báo kỹ thuật
của trường ĐHTH Tel-Aviv, 1985

(Nguồn: G. Weizel 1988)

Với phương pháp này nhiều giống cây hoa (hoa lan, cẩm chướng, đồng tiền, lily, cúc, ...), cây lương thực phẩm (khoai tây, súp lơ, măng tây, cò dầu, mía, cà phê, cà điều, ...), cây ăn quả (chuối, dứa, dâu tây, ...), cây lâm nghiệp (bạch đàn, keo lai, thông, tùng, dứa sồi, ...) đã được phổ biến rất nhanh vào trong sản xuất.

1.5.2. Tạo giống sạch bệnh virus qua nuôi cấy mô phân sinh đỉnh (meristem)

Virus có thể lây truyền qua các thể hệ. Có khoảng 600 các loại virus ở thực vật đã được biết đến và trong số đó ít nhất 80 loại có thể truyền qua hạt giống. Các virus, khuẩn và nấm gần như luôn được lây truyền qua sinh sản vô tính. Tất nhiên, việc thanh lọc một dòng là có thể thực hiện được bằng việc chọn lọc nhờ vào những triệu chứng hay các test. Tuy nhiên, nếu như một dòng xuất hiện một vài cây bị nhiễm thì vấn đề là cần tránh sự lây lan. Đặc biệt, virus có thể dẫn đến sự mất mát về năng suất, giảm phẩm chất và vì thế việc sử dụng vật liệu khởi đầu sạch virus khi nhân giống vô tính là hết sức quan trọng.

Khi tiến hành nuôi cấy mô, mẫu thực vật phải được khử trùng, các vi sinh vật gây bệnh như nấm và vi khuẩn về cơ bản đã bị tiêu diệt. Tuy nhiên, virus hoặc micoplasma vẫn có thể tồn tại ở các tế bào sống. Bệnh virus hại thực vật là một loại bệnh nguy hiểm, dễ lan truyền qua nhân vô tính (do tồn tại trong các bộ phận sống), qua môi giới truyền bệnh (các loại côn trùng như rệp, bọ phấn, nhện, ...) qua tiếp xúc cơ giới. Khác với các bệnh gây ra do nấm và khuẩn, virus là một loại bệnh không chữa được trong khi lại gây tổn thất rất lớn về năng suất, phẩm chất và lan truyền qua các thể hệ khi nhân giống vô tính gây ra hiện tượng thoái hóa giống. Đa số các cây nhân giống vô tính như: khoai tây, khoai lang, các loại hoa trồng từ củ hoặc cành giâm đều bị thoái hóa giống do nhiễm virus. Chính vì thế, việc tạo ra các cây giống sạch virus là biện pháp bắt buộc phải tiến hành cho tất cả các cây nhân giống vô tính và cũng là một biện pháp phục tráng giống cho các giống đã bị thoái hóa do virus.

Công nghệ nuôi cấy mô tế bào thực vật là một công cụ hữu hiệu và gần như là duy nhất để tạo ra nguồn cây sạch virus. Có hai cách chính để tạo cây sạch virus: (1) Dùng các phương pháp chuẩn đoán bệnh virus để thanh lọc các mẫu nhiễm bệnh trước khi đưa vào nuôi cấy, sử dụng biện pháp nhân nhanh *invitro* để nhân nhanh mẫu sạch; (2) Làm sạch virus ở mẫu đã bị nhiễm, sau khi đã tạo mẫu sạch thì tiếp tục sử dụng biện pháp nhân nhanh *invitro* để nhân mẫu sạch.

1.5.3. Chọn giống nhờ công nghệ tế bào

- *Kỹ thuật tạo cây đơn bội invitro và ứng dụng trong công tác giống cây trồng.*

Các cây trồng thường có mức bội thể khác nhau, phổ biến là cơ thể lưỡng bội ($2n$) và tứ bội ($4n$). Như vậy mỗi đặc điểm di truyền ở chúng đều bị hai hay nhiều gen chi phối. Nếu đó là những dị hợp tử thì biểu hiện kiểu hình của gen đó hoàn toàn phụ thuộc vào tính trạng lặn hay trội của chúng quyết định. Còn ở thể đơn bội kiểu hình của cây phản ánh trung thực kiểu gen. Vì vậy thể đơn bội là nguyên liệu lý tưởng cho công tác giống cây trồng. Từ lâu các nhà chọn giống đã biết sử dụng dạng đơn bội và thông qua sự đa bội hóa cơ thể đơn bội để thu được các dạng đồng hợp tử tuyệt đối. Đây là những vật liệu di truyền quý giá cho công tác chọn giống vì toàn bộ các gen đều ở tình trạng đồng hợp tử nên đặc tính lặn cũng được biểu hiện.

Trong cơ thể thực vật có thể giao tử (hạt phấn, noãn) là những tế bào đơn bội. Nếu như chúng phát triển thành cây, cây đó là cây đơn bội (n). Năm 1924 Blakeslee và cộng sự đã chứng minh rằng có thể thu được các dòng nhị bội thuận, đồng hợp bằng các nhị bội hóa các thể đơn bội. Guka và Maheshqvari (1964) là hai nhà khoa học Ấn Độ lần đầu tiên đã tạo thành công cây đơn bội qua nuôi cấy bao phấn cà độc dược. Nhờ những đóng góp đáng kể của Nitsch (1973 - 1976) và Noieel (1973), phương pháp này đã trở thành một phương pháp rất hiệu quả để tạo hàng loạt cây đơn bội. Đây cũng là cơ sở để nghiên cứu di truyền các tính trạng và cũng là nguyên liệu quý cho công tác tạo giống. Hiện nay hơn 170 loại cây đã có thể tạo được từ con đường lưỡng bội hóa cây đơn bội.

Kỹ thuật tạo cây đơn bội *invitro* thông qua việc kích thích tiêu bào tử phát triển thành cây khi nuôi bao phấn, hạt phấn và gần đây, người ta còn

nuôi cấy kích thích các tế bào trứng (noãn chưa thụ tinh) phát triển thành cây đơn bội, đặc biệt trên đối tượng ngô, cho phép nhanh chóng tạo ra hàng loạt cây đơn bội là một giải pháp rất hữu hiệu đối với lĩnh vực ứng dụng đơn bội vào công tác giống cây trồng. Vì rằng, thông thường bằng con đường tự phối, muốn đạt được dòng đồng hợp tử tuyệt đối phải mất từ 5 - 7 thế hệ, trong khi bằng con đường đơn bội và đa bội hóa sau đó, chỉ cần một thế hệ là đủ.

- Kỹ thuật nuôi cấy tế bào trần và ứng dụng trong công tác giống cây trồng

Như trên đã trình bày, các tế bào thực vật có tính toàn năng, có thể nuôi cấy, điều khiển sự phát sinh hình thái của chúng cho tới thành một cây hoàn chỉnh. Có thể nói, nội dung bên trong vỏ tế bào trong đó vật chất chính là các thông tin di truyền chứa trong nhân của tế bào đã quyết định mọi đường hướng của quá trình thực hiện tính toàn năng của tế bào. Vì thế, hoàn toàn có thể nuôi cấy tạo cây hoàn chỉnh từ khối nguyên sinh chất chứa nhân của tế bào. Từ đây đưa đến khái niệm nuôi cấy tế bào thực vật. Nuôi cấy tế bào trần thành công sẽ cho phép mở ra khả năng biến nạp các gen thuận lợi và tế bào thực vật mà trước kia thường bị vỏ tế bào ngăn cản cũng như tạo ra khả năng dung hợp tế bào - gắn hai tế bào trần lại thành một tế bào với hai bộ thông tin di truyền của hai tế bào tạo nên một thể lai vô tính.

Con người đã biết đến tế bào trần từ lâu qua hiện tượng cơ nguyên sinh và rất nhiều nhà khoa học cũng rất muốn tách lớp vỏ tế bào để tiến hành các thực nghiệm trên đối tượng tế bào trần (Kuster 1910). Cho đến năm 1960, Cocking đã tìm được phương pháp tách tế bào trần bằng các enzym phân giải lớp vỏ bên ngoài tế bào và thu được tế bào trần. Tình trạng "tế bào trần" (không vỏ) chỉ có tính chất thời gian, vì sau đấy tế bào tự mình hình thành lại lớp vỏ khá nhanh. Kỹ thuật tách tế bào trần do Cocking khởi xướng, sau đó đã được cải tiến và sử dụng thành công trên nhiều đối tượng cây trồng khác. Sự ra đời của tế bào trần đã mở ra cho con người hàng loạt triển vọng mới trong lĩnh vực giống cây trồng.

Cho đến nay sự hoàn thiện các phương pháp nuôi cấy tế bào trần từ khâu tách đến nuôi cấy, tái sinh cây hoàn chỉnh đã thành công ở hàng loạt đối tượng cây trồng quan trọng: cà chua (Zapata 1977), cải dầu (Kartha 1974), khoai tây (Shepand, Tohen 1977), lúa (Fujimura 1985), lúa mỳ

(Lorz 1990). Đây là những nền tảng quan trọng cho các biện pháp lai soma và chuyển nạp gen nhằm cải tạo các giống cây trồng này.

Kỹ thuật nuôi cấy tế bào trần là một kỹ thuật phức tạp, hiện đại của công nghệ nuôi cấy mô tế bào thực vật. Ngày nay, kỹ thuật này đã được triển khai thành công trên nhiều đối tượng cây trồng khác nhau, đặc biệt là trên các cây họ cà và trên họ hòa thảo.

- **Biến dị dòng soma trong nuôi cấy mô.**

Biến dị dòng soma (somaclone variation) là khái niệm dùng để chỉ tất cả các biến dị thể hiện ở các tế bào, mô nuôi cấy và cây có nguồn gốc từ nuôi cấy mô (Larkin và Scowcroft, 1981). Biến dị dòng soma còn được gọi là biến dị dòng vô tính.

Trong nhân giống vô tính *in vitro*, tính di truyền không ổn định của các cây tái sinh sau nuôi cấy được xem là một trong những hạn chế lớn nhất vì quá trình nhân giống yêu cầu tính đồng nhất và ổn định di truyền. Tuy nhiên, trong chọn tạo giống cây trồng, các biến dị dòng vô tính cung cấp một tiềm năng lớn để làm phong phú thêm các kiểu gen mới vào quỹ gen cũng như giúp ích trong các nghiên cứu di truyền tế bào. Trên thực tế tỷ lệ các biến dị di truyền có thể là rất lớn và chính vì thế việc hiểu và xác định được cơ chế nguyên nhân gây ra các biến dị này là hết sức quan trọng. Qua đó chúng ta có thể điều khiển các biến dị này một cách hiệu quả theo hướng có lợi.

1.5.4. Khắc phục hiện tượng bất hợp trong lai xa

Hiện tượng bất hợp trong lai xa thường thể hiện ở hai khâu:

Bất hợp của giao tử trước khi thụ tinh: Nếu một hạt phấn lạ rơi trên núm nhụy, lập tức nhụy sẽ tiết ra một chất ức chế sự phát triển của ống phấn hoặc làm biến dạng ống phấn ngăn cản sự thụ tinh.

Bất hợp của giao tử sau khi thụ tinh: Trong một số trường hợp, quá trình thụ tinh vẫn xảy ra bình thường khi hạt phấn rơi trên nhụy. Tuy nhiên hạt của quả lại không phát triển được. Nguyên nhân là do giữa nội nhũ và phôi đã hình thành một cơ chế ức chế sự phát triển của phôi.

Đây là hiện tượng rất cần được khắc phục trong lai xa (khác loài, khác chi). Để khắc phục có thể tiến hành thụ phấn *in vitro* hoặc nuôi cấy phôi *in vitro*.

1.5.5. Sản xuất các chất thứ cấp qua nuôi cấy tế bào

Hợp chất trao đổi thứ cấp của thực vật là những hợp chất có chức năng quan trọng trong đời sống thực vật và được sản xuất trong khi sinh tổng hợp những hợp chất trao đổi cơ sở như hydrat carbon, lipid, axit amin...

Các chất trao đổi thứ cấp hay còn gọi là các chất thứ cấp có thể xếp trong ba nhóm chính: alkaloid, tinh dầu và glycoside.

Đa số các hợp chất trao đổi thứ cấp được sản xuất từ các nguyên liệu thực vật thu hái trong thiên nhiên hay một số loài cây trồng.

Nuôi cấy tế bào và mô thực vật cho phép sản xuất các hợp chất trao đổi thứ cấp được thực hiện trong điều kiện invitro. Sản xuất hợp chất thứ cấp theo phương pháp này có một số lợi thế:

- + Có thể sản xuất các hợp chất thứ cấp theo yêu cầu với số lượng thấp hoặc với số lượng rất lớn mà những phương pháp công nghiệp và thương mại không thể sản xuất được.
- + Có thể sản xuất nhiều hợp chất khác ngoài những hợp chất yêu cầu chính. Điều đáng lưu ý là điều kiện nuôi cấy biến đổi, các tế bào, mô nuôi cấy có thể biến đổi thể năng sinh tổng hợp nhiều hợp chất bao gồm cả khả năng cảm ứng những hợp chất mới hoặc những hợp chất chưa biết.
- + Có thể biến đổi những hợp chất trao đổi thứ cấp và những dẫn xuất của chúng trong quá trình sinh trưởng của tế bào thực vật. Điều đó dẫn tới sự chuyển đổi trong hoạt tính sinh học của các hợp chất.

Chương 2

ĐIỀU KIỆN VÀ MÔI TRƯỜNG NUÔI CÂY MÔ TẾ BÀO THỰC VẬT

2.1. YÊU CẦU CƠ BẢN CỦA PHÒNG THÍ NGHIỆM NUÔI CÂY MÔ TẾ BÀO THỰC VẬT

2.1.1. Phòng thí nghiệm nuôi cấy mô

Những yêu cầu cơ bản đối với phòng thí nghiệm nuôi cấy mô tương tự như phòng thí nghiệm nghiên cứu vi sinh vật. Những yêu cầu này gồm các điều kiện thuận lợi cho việc chuẩn bị khử trùng và bảo vệ môi trường dinh dưỡng, khử trùng các dụng cụ nuôi cấy, vô trùng trong khi thao tác nuôi cấy và liên hành nuôi cấy trong điều kiện được kiểm tra chặt chẽ.

Số phòng thí nghiệm tối thiểu phụ thuộc vào những điều kiện và nhiệm vụ cụ thể, nhưng ít nhất phải có những phòng sau:

1. Phòng chuẩn bị và giữ môi trường dinh dưỡng
2. Phòng thao tác nuôi cấy
3. Phòng nuôi cấy
4. Phòng phân tích
5. Phòng làm việc

Phòng chuẩn bị và giữ môi trường dinh dưỡng:

Phòng này dùng để làm các công việc sau: Chuẩn bị, khử trùng các môi trường nuôi cấy, bảo vệ một số môi trường dự trữ.

Thiết bị: Tủ sấy, thiết bị khử trùng, tủ lạnh, máy cất nước, pipet, ống đong, cân phân tích, cân kỹ thuật, bể rửa chai lọ.

Các chai lọ, ống nghiệm, pipet, ống đong cần được rửa sạch, tráng nước cất và sấy trước khi dùng.

Phòng thao tác nuôi cấy:

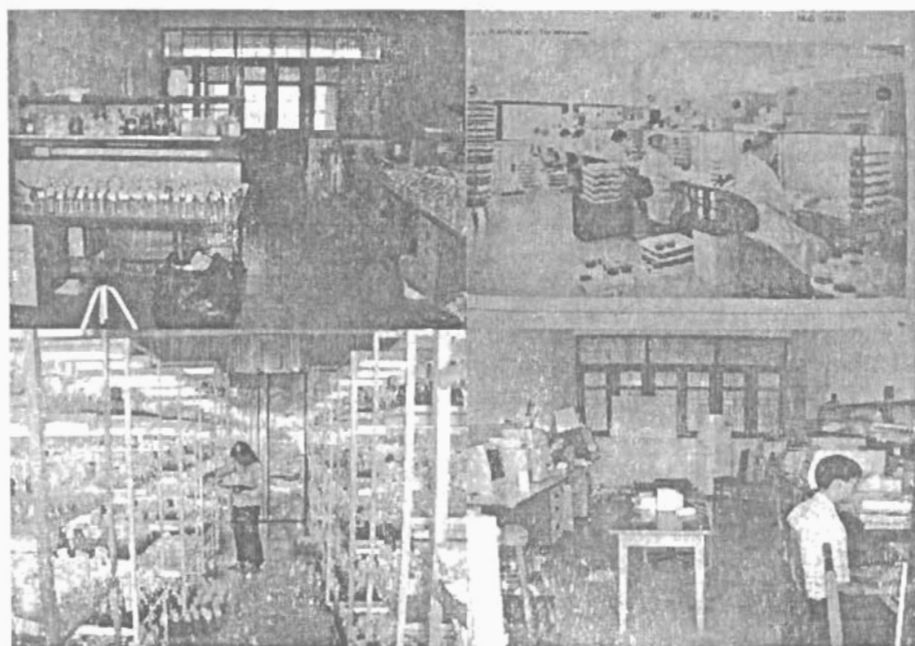
Đây là phòng để tiến hành các thao tác nuôi cấy, phòng này cần đảm bảo hạn chế đến mức tối thiểu sự gây bụi, phòng phải kín gió. Tường lát gạch men là tốt nhất, phòng có hệ thống đèn tím khử trùng trước khi vào làm việc.

Thiết bị: các tủ cấy vô trùng, giá bàn để môi trường, máy li tâm và kính hiển vi (trong trường hợp để tiến hành các thí nghiệm nuôi cấy tế bào và protoplast) và các dụng cụ như dao, kéo, đèn cồn.

Phòng nuôi cấy:

Phòng này dùng để nuôi mô hoặc cây trong ống nghiệm. Có phòng nuôi sáng và phòng nuôi tối.

- Phòng nuôi sáng: Tường có thể sơn màu trắng để đỡ bắt bụi và làm cho phòng sáng hơn.



Hình 2.1 Phòng thí nghiệm nuôi cấy mô tế bào

Thiết bị phòng cần có giá có tầng để bình hoặc ống nghiệm nuôi cấy. Các giá được lắp đèn ống (ánh sáng trắng) để chiếu sáng. Trong phòng cần có máy kiểm tra chính xác, nhiệt độ, ánh sáng, độ ẩm, máy điều hòa nhiệt độ.

- Phòng nuôi tối: Để nuôi mô sẹo và các xử lý một số loại mẫu đặc biệt. Phòng tối cần tất cả các thiết bị như phòng nuôi sáng chỉ có một điều khác là không cần lắp đèn chiếu sáng cho cây. Các cửa sổ cần che bằng vải đen hoặc bịt kín.

Phòng phân tích:

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

Thiết bị: Tủ hút, cân các loại, tủ ẩm, máy cắt tiêu bản, máy đo pH, ly tâm lạnh, máy điện di, máy soi DNA, tủ lạnh sâu, máy sắc ký, quang phổ, lò vi sóng, pipet tự động các loại, phòng rửa và các tủ đựng hóa chất.

Phòng làm việc:

Đối với các phòng này tùy thuộc theo từng điều kiện cụ thể có thể bố trí các thiết bị hợp lý (bàn làm việc, tủ đựng tài liệu, máy vi tính...)

2.1.2. Trang thiết bị, dụng cụ:

Phòng nuôi cấy mô cần trang bị một số các dụng cụ thủy tinh sau: ống đong, pipet, bình tam giác, cốc thí nghiệm, bình đun sôi trong, ống nghiệm, phễu, lọ thủy tinh....

Dụng cụ nuôi cấy:

Dụng cụ dùng trong nuôi cấy bao gồm: dao, kéo, panh, que cấy, tất cả đều làm bằng thép không gỉ, độ dài tùy thuộc vào độ dài của bình và ống nghiệm nuôi cấy. Các dụng cụ có thể khử trùng bằng nồi khử hoặc đốt kỹ trước khi sử dụng.

2.1.3. Hoá chất sử dụng trong nuôi cấy mô tế bào thực vật

- Khoáng đa lượng

Nitrat canxi

$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

Nitrat kali

KNO_3

Nitrat natri	NaNO_3
Nitrat amon	NH_4NO_3
Sunphat amon	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
Phot phat natri monobasic	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$
Phot phat kali monobasic	KH_2PO_4
Clrua kali	KCl
Clorua canxi	$\text{CaCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
Sunphat magie	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
Ethylendiamintetra acetatdinatri	(EDTA)
Sunphat sắt 2	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
Sunphat sắt 3	$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$

- Khoáng vi lượng

Sunphat mangan	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
Acid boric	H_3BO_3
Kẽm Sunphat	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
Magie Sunphat	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
Molydat amon	$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
Molydat natri	NaMoO_4
Clorua coban	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
Iodua kali	KI

- Vitamin

Myo- inositol
Acid nicotinic
Pyroidyxin HCl
Thiamine HCl
Panthothenate canxi
Riboflavine
Biotin
Acid folic

- Các chất điều hòa sinh trưởng

Acid 2,4 dichloro phenol acetic (2,4D)

IAA, NAA, Kinetin, BAP, TDZ, GA₃, ...

- Các chất hữu cơ khác

Dịch chiết nấm men.

Dịch thủy phân casein (casein hydrolysate).

Nước dừa.

Khoai tây, cà rốt.

Agar, đường...

2.2. NHỮNG ĐIỀU KIỆN CƠ BẢN TRONG NUÔI CẤY MÔ TẾ BÀO THỰC VẬT

Có ba điều kiện đảm bảo thành công trong nuôi cấy mô tế bào là:

- Bảo đảm điều kiện vô trùng.
- Chọn và sử lý mô cấy thích hợp.
- Chọn, chuẩn bị môi trường hợp lý và nuôi cấy đúng phương pháp.

2.2.1. Bảo đảm điều kiện vô trùng

2.2.1.1. Ý nghĩa của vô trùng trong nuôi cấy mô thực vật

Môi trường của nuôi cấy mô thực vật có chứa đường, các loại muối khoáng và vitamin. Đây là môi trường thích hợp cho quá trình sinh trưởng và phát triển của nhiều loại nấm, khuẩn.

Tốc độ phân bào của nấm, vi khuẩn lớn hơn so với rất nhiều so với tế bào thực vật vì vậy nếu trong môi trường chỉ nhiễm một vài vi khuẩn thì chỉ sau vài ngày đến một tuần toàn bộ bề mặt của môi trường sẽ bị nhiễm nấm và vi khuẩn, mô nuôi cấy sẽ không thể tiếp tục phát triển và chết dần.

Các nguyên nhân gây nhiễm nấm khuẩn:

- + Các dụng cụ nuôi cấy và môi trường không được vô trùng.
- + Mẫu nuôi cấy không được vô trùng.
- + Nhiễm khuẩn trong quá trình thao tác.

2.2.1.2. Vô trùng dụng cụ nuôi cấy

- Dụng cụ thủy tinh: Nuôi cấy mô thực vật đòi hỏi các dụng cụ thủy tinh thông dụng như:

- + Ống nghiệm các loại
- + Bình tam giác
- + Các lọ thủy tinh miệng rộng
- + Đĩa Petri.

Ngoài ra cần một số lọ đựng hóa chất, cốc chịu nhiệt để pha môi trường, ống đong, pipet, lọ đựng nước cất...

Cần rửa sạch các dụng cụ thủy tinh trước khi sử dụng. Các dụng cụ thủy tinh lần đầu nuôi cấy được xử lý bằng dung dịch sulfo – cromate sau đó rửa sạch bằng nước cất và sấy khô ở nhiệt độ 160° C trong một giờ. Sau mỗi lần sử dụng dụng cụ được rửa sạch bằng xà phòng, tráng bằng nước máy nhiều lần sau đó tráng bằng nước cất, sấy khô vô trùng bằng máy sấy ở nhiệt độ thích hợp cho từng loại dụng cụ thương thì nhiệt độ khoảng 70 – 100° C, cuối cùng là để nguội và cất giữ ở điều kiện vô trùng.

Các loại nút đậy bao gồm:

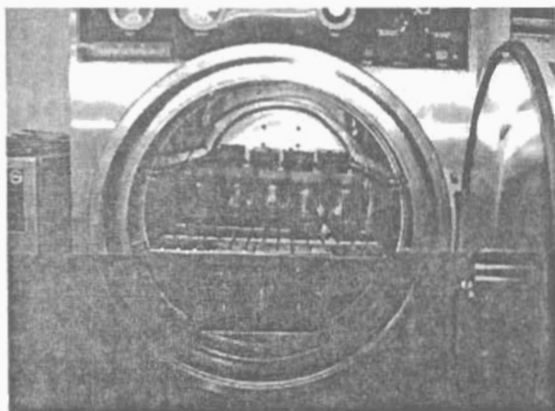
- Nút đậy bằng bông không thấm nước: Đây là loại nút đậy phổ biến nhất tại nước ta hiện nay vì giá thành rẻ, khi nút đậy tương đối chặt đảm bảo bụi không qua được và nước từ môi trường không bốc hơi trong quá trình nuôi cấy. Tuy nhiên loại nút bằng bông này có một số nhược điểm là khả năng tái sử dụng kém, khử trùng khó và khi khử trùng ở nhiệt độ cao dễ bị thấm nước hoặc dính vào môi trường nuôi cấy, là nơi mà vi khuẩn dễ phát sinh và không thích hợp cho nuôi cấy mô trên diện rộng.

- Giấy bạc: Là loại giấy làm nắp phổ biến nhất hiện nay, ưu điểm của nó là không bắt bụi, tránh được hiện tượng nhiễm trùng do nút bông gây ra đối với những nuôi cấy ở môi trường lỏng và dễ dàng khử trùng trong quá trình nuôi cấy. Tuy nhiên loại giấy bạc này chỉ sử dụng được với những loại ống loại nghiệm nhỏ và trung bình, giá thành của nó cũng tương đối cao.

- Hiện nay người ta cũng đang sử dụng một số lượng lớn loại nút đậy bằng nhựa trong suốt, chịu được nhiệt độ cao, có thể khử trùng dễ dàng nó rất thích hợp cho việc nuôi cấy mô trên các loại chai nuôi cấy, đĩa petri loại lớn.

2.2.1.3. Vô trùng môi trường nuôi cấy

Môi trường pha chế phải cất giữ trong điều kiện vô trùng và được hấp vô trùng trước khi sử dụng. Thời gian hấp vô trùng từ 120 – 125°C trong nồi hấp vô trùng (hình 2.5).



Hình 2.2. Nồi hấp vô trùng

Các chất dung để pha chế môi trường như (dung dịch muối khoáng, vitamin và các chất kích thích sinh trưởng) cần được bảo quản và cất giữ trong tủ lạnh. Tùy theo số lượng nuôi cấy mà pha một số lượng dung dịch mẹ vừa phải.

Trường hợp môi trường nuôi cấy có các chế phẩm dễ bị phân hủy ở nhiệt độ cao (120°C), cần phải lọc vô trùng trước bằng phễu thủy tinh xốp số 5 sau đó pha trực tiếp vào môi trường đã vô trùng.

Nồi hấp vô trùng: ở nhiệt độ 120 – 125°C, toàn bộ vi sinh vật có trong môi trường đều bị tiêu diệt kể cả sinh vật ở dạng bào tử. Áp suất tương ứng ở 120°C là 1 kg/cm³ vì vậy các nồi hấp có độ an toàn rất cao.

Trong môi trường nuôi cấy phải dùng nước cất và nước khử ion, tốt nhất là dùng nước cất hai lần từ các máy cất nước bằng thủy tinh.

2.2.1.4. Vô trùng nơi thao tác cấy và tủ cấy

Nguồn ngoại nhiễm thường xuyên nhất là bụi rơi vào dụng cụ thủy tinh chứa môi trường trong khi mở nắp hoặc nút bông khi thao tác cấy. Người ta thường áp dụng các biện pháp vô trùng như sau:

- **Phòng nuôi cấy:** Thường là các buồng có diện tích nhỏ từ 10 – 15m², có hai lớp cửa để tránh không khí chuyển bụi từ bên ngoài vào. Nơi đặt buồng cấy cần có sàn lát gạch trắng men, tường phải sơn để dễ dàng khử trùng.

Trước khi đưa vào sử dụng buồng cấy cần phải được xử lý bằng hơi formandehit 40% (cho formandehit vào các đĩa Petri để chúng bốc hơi tự do) với thời gian khoảng 24 giờ. Trong khi xử lý, cần đóng kín cửa phòng cấy, sau đó khử hơi formandehit thừa bằng dung dịch ammoniac 25% trong 24 giờ.

Để đảm bảo mức độ vô trùng cao, phòng cấy cần lắp đặt thêm đèn tử ngoại 40W. Chỉ sử dụng đèn để khử trùng khi phòng nuôi cấy không có người. Cần giảm sự chuyển động của không khí trong phòng cấy đến mức tối thiểu vì vậy tất cả các dụng cụ nuôi cấy phải chuẩn bị phải để tránh phải mang đi mang lại và ra vào buồng cấy nhiều lần.

- **Tủ cấy:** Là loại tủ chuyên dụng, có các loại đèn tử ngoại, quạt thổi không khí sạch và các loại đèn chiếu sáng khác. Có các loại tủ giành cho một hoặc hai người làm việc. Việc vệ sinh và khử trùng tủ cấy yêu cầu giống với phòng nuôi cấy.

Các dụng cụ mang vào buồng cấy phải vô trùng (dao, kéo, kẹp, giấy bọc, bông, ống nghiệm, bình đựng nước cất...) hoặc phải dùng riêng (quần, áo, mũ vải, khẩu trang...). Trên bàn lúc nào cũng phải có một đèn cồn 90° để vô trùng các loại dụng cụ nuôi cấy.

2.2.2. Chọn và xử lý vật liệu cấy

Cách chọn vật liệu cấy

Về nguyên tắc, trừ những mô đã hoá gỗ còn tất cả các mô khác trong cơ thể thực vật đều có thể dùng làm vật liệu cấy. Tuy vậy các mô đang phát triển mạnh (mô phân sinh ngọn, tượng tầng, đầu rễ, phôi đang phát triển, thịt quả non, lá non, cuống hoa, đế hoa, mô phân sinh đốt...) Khi đặt vào môi trường có chứa lượng chất sinh trưởng thích hợp có khả năng nuôi cấy để tạo mô sẹo hoặc tạo thành cây hoàn chỉnh.

Xử lý vật liệu cấy

Phương pháp xử lý vật liệu nuôi cấy phổ biến nhất hiện nay là dùng các chất hóa học có hoạt tính diệt nấm và vi khuẩn. Hiệu lực diệt nấm và

vi khuẩn của các chất này phụ thuộc vào thời gian xử lý, nồng độ và khả năng thẩm truyền qua của chúng vào vật liệu nuôi cấy. Để tăng tính linh động và khả năng xâm nhập của chất diệt vi khuẩn và nấm. Trước khi xử lý dung dịch diệt khuẩn, vật liệu nuôi cấy thường được rửa bằng rượu etilic 70% trong thời gian vài phút. Đồng thời người ta thêm các chất làm giảm sức căng bề mặt như Tween 20, Tween 80 vào dung dịch diệt khuẩn và nấm.

- Cách sử dụng một số vật liệu diệt khuẩn:
 - + Canxi hypoclonit $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ nồng độ 9-10% trong thời gian xử lý 5-30 phút.
 - + Natri hypoclonit NaOCl nồng độ 2% thời gian xử lý 5-30 phút.
 - + Clorua thủy ngân HgCl_2 nồng độ 0,1-1,0% thời gian xử lý 5-15 phút

Vật liệu cấy phải để hoàn toàn ngập trong dung dịch diệt khuẩn trong thời gian xử lý. Đối với các bộ phận bám nhiều bụi đất, trước khi xử lý nên rửa kỹ bằng nước xà phòng pha loãng rồi rửa lại bằng nước máy. Sau khi xử lý nên rửa lại bằng nước cất vô trùng tối thiểu là năm lần. Những phần trên vật liệu cấy bị nhiễm các tác nhân hóa học làm hại thì phải cắt bỏ trước khi đặt vật liệu cấy lên môi trường. Để tránh ảnh hưởng trực tiếp của các tác nhân vô trùng lên vật liệu cấy, nên chú ý để lại một lớp bọc ngoài khi ngâm vật liệu vào dung dịch diệt khuẩn. Lớp cuối cùng này sẽ được cắt bỏ hoặc bóc đi khi đặt vật liệu cấy lên môi trường.

2.2.3. Chuẩn bị môi trường nuôi cấy

Thành phần môi trường nuôi cấy mô thực vật thay đổi tùy theo loài, bộ phận và mục đích nuôi cấy vì vậy thành phần của môi trường là khác nhau. Thành phần môi trường còn thay đổi theo các giai đoạn phát triển, phân hóa khác nhau của mẫu cấy và mục đích nuôi cấy như: duy trì mô ở trạng thái mô sẹo, tạo rễ, tạo mầm hoặc tái sinh cây hoàn chỉnh.

Thành phần cơ bản của môi trường nuôi cấy gồm:

- Đường làm nguồn cung cấp cacbon
- Khoáng đa lượng
- Khoáng vi lượng

- Các vitamin
- Chất điều hòa sinh trưởng

Ngoài ra, tùy thuộc vào mục đích cấy có thể thêm một vài chất hữu cơ có thành phần hóa học xác định (axit amin..) hoặc không xác định (nước dừa, dịch chiết nấm men), hoặc chất độn như thạch..

2.2.3.1 Đường

Trong môi trường nuôi cấy nhân tạo, đường cung cấp nguồn cacbon để mô tế bào thực vật tổng hợp nên chất hữu cơ, giúp tế bào phân chia, tăng sinh khối khi tế bào chưa có khả năng quang hợp hoặc chưa đảm nhận hoàn toàn chức năng quang hợp. Hai dạng đường hay sử dụng nhất là sucrose và glucose, nhưng hiện nay sucrose được sử dụng phổ biến hơn. Tùy theo mục đích nuôi cấy, nồng độ sucrose biến đổi từ 1 – 6%, thông dụng nhất là từ 2-3%.

2.2.3.2. Các khoáng đa lượng

Nguyên tố khoáng đa lượng gồm N, P, K, S, Mg và Ca, sử dụng với nồng độ 30 mg/l môi trường nhằm cung cấp chất khoáng để cấu tạo tế bào, mô thực vật.

- Nguồn Nitơ (N): Mô tế bào thực vật trong nuôi cấy có thể sử dụng các dạng nitơ khoáng như amôn và nitrat, đồng thời có thể sử dụng các dạng hữu cơ như axit amin. Tỷ lệ giữa Nitơ dạng amôn và nitrat thích hợp tùy loại cây và trạng thái phát triển mô.

Nitrat được cung cấp dưới dạng muối canxi nitrat $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, Kali nitrat KNO_3 , natri nitrat NaNO_3 hoặc amôn nitrat NH_4NO_3 . Amon cung cấp dưới dạng muối amon sulphat $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ hoặc NH_4NO_3 . Trong một số ít trường hợp có thể cung cấp dưới dạng urê. Tổng nồng độ của NO_3^- và NH_4^+ trong môi trường thay đổi từ 3 đến 6 μM , thông thường khoản 20 μM .

- Nguồn Phốtpho (P): Hai dạng phốtpho thường dùng nhất là $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ và KH_2PO_4 với nồng độ môi trường từ 0,15 – 4 μM .

- Nguồn Kali (K): Cung cấp cho môi trường nuôi cấy ở dạng kali nitrat KNO_3 , kali clorua KCl , kali photphat (KH_2PO_4). Nồng độ K^+ trong môi trường từ 2 đến 25 μM .

- Nguồn Canxi (Ca): Canxi được cung cấp dưới dạng muối canxi nitrat $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. Canxi clorua $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Nồng độ Ca^{2+} trong môi trường từ 1 đến 3,5 μM .

- Nguồn Magiê (Mg): Magiê được cung cấp dưới dạng magiê sulphat $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ với nồng độ môi trường từ 0,5 đến 3 μM .

- Nguồn sắt (Fe): Các môi trường cổ điển thường dùng sắt dưới dạng clorua sắt $\text{FeCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, sunphat sắt $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{Fe}(\text{SO}_4)_3$. Hiện nay hầu hết các phòng thí nghiệm đều dùng sắt ở dạng chelat kết hợp với Na-etylen diamin-tetra-acetat (Na_2EDTA).

2.2.3.3. Các khoáng vi lượng

Các nguyên tố khoáng vi lượng được sử dụng ở nồng độ thấp hơn 30mg/lít môi trường, các nguyên tố thường sử dụng là: Fe, B, Mn, I, Mo, Zn, Cu, Ni, Co. Các nguyên tố này đóng vai trò quan trọng trong hoạt động của các enzyme.

Bảng 2.1: Các vi lượng thông dụng được sử dụng trong nuôi cấy mô tế bào thực vật

Tên vi lượng	Dạng sử dụng	Nồng độ μM
Mangan (Mn)	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	15-100
Bo (B)	H_3BO_3	6-100
Kẽm (Zn)	$\text{Zn}(\text{SO}_4) \cdot \text{H}_2\text{O}$	15-30
Đồng (Cu)	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,04-0,08
Molypden (Mo)	$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,007-1,0 0,1-0,4
Coban (Co)	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	2,5-20
Iốt (I)	KI	

1 μM = 1 micromol/l lít

2.2.3.4. Các vitamin

Các loại mô và tế bào thực vật nuôi cấy có khả năng tổng hợp được hầu hết các vitamin nhưng không đủ về số lượng, do đó phải bổ xung thêm vitamin vào môi trường nuôi cấy, đặc biệt là vitamin nhóm B như: B1, B2,

B3, B5, B6... Các vitamin đặc biệt quan trọng như Myo – inositol... đóng vai trò trong sinh tổng hợp thành tế bào và thường được sử dụng với hàm lượng lớn từ 50 – 100 mg/l (bảng 2.3).

Các vitamin sau đây thường được dùng trong môi trường nuôi cấy (chủ yếu là bốn loại đầu).

Bảng 2.2: Các dạng vitamin thường dùng

Tên vitamin	Nồng độ dung dịch (mg/l)
Myo – inositol	100
Axit Nicotinic (vitamin B3)	0,5 – 1,0
Pyridoxine HCl (vitamin B6)	0,05 – 0,5
Thiamine HCl (vitamin B1)	10 -50
Panthotenat canxi	1 – 5
Riboflavine (vitamin B2)	1 – 5
Biotin	0,1 – 1
Axit folic	0,1 - 1

Các vitamin được pha ở dạng dung dịch mẹ có nồng độ cao từ 500 đến 1000 lần dung dịch làm việc. Dung dịch vitamin dễ hỏng do nấm, khuẩn nhiễm tạp và bị phân hủy ở nhiệt độ cao, vì vậy cần bảo quản trong điều kiện lạnh dưới 0°C hoặc chỉ pha chế trước khi sử dụng.

2.2.3.5. Các chất điều hòa sinh trưởng

Trong môi trường nuôi cấy mô và tế bào thực vật, thành phần phụ gia quan trọng nhất quyết định kết quả nuôi cấy mô là các chất điều hòa sinh trưởng. Chúng là yếu tố quan trọng nhất trong điều khiển sự phát sinh hình thái và tái sinh cây hoàn chỉnh.

Các chất điều hòa sinh trưởng thường được sử dụng là:

Auxin: Auxin được gọi là hormon sinh trưởng do Went và Thimann (1937) phát hiện. Auxin có một số tác dụng sinh lý sau:

Auxin có tác dụng tốt đến các quá trình sinh trưởng của tế bào, hoạt động của tầng phát sinh, sự hình thành rễ, hiện tượng ưu thế ngọn, tính hướng của thực vật, sự sinh trưởng của quả và tạo ra quả không hạt.

Auxin kích thích sự sinh trưởng gián của tế bào, đặc biệt theo chiều ngang làm tế bào phình ra. Hiệu quả đặc trưng của auxin là tác động

lên sự giãn của thành tế bào: AIA gây ra sự giảm pH trong thành tế bào, hoạt hóa enzym phân hủy các polisacarit liên kết giữa các sợi xenluloz làm cho chúng lỏng lẻo và tạo điều kiện cho thành tế bào giãn ra dưới tác dụng của áp suất thẩm thấu của không bào trung tâm. Ngoài ra auxin cũng kích thích lên thành tế bào đặc biệt là các xenluloz, pectin, hemixenluloz.

Bên cạnh đó auxin còn ảnh hưởng đến sự phân chia tế bào. Tuy nhiên các ảnh hưởng của auxin lên sự giãn và phân chia tế bào trong mỗi tác động hỗ trợ với các phytohormon khác (giberelin, xytokinin).

Auxin gây ra tính hướng động của cây (hướng sáng và hướng đất)

Bằng việc sử dụng nguyên tử đánh dấu, người ta nhận thấy AIA phóng xạ được phân bố nhiều hơn ở phần khuất ánh sáng cũng như phần dưới của bộ phận nằm ngang và gây nên sự sinh trưởng không đều ở hai phía của cơ quan.

Có hai nguyên nhân: Nguyên nhân thứ nhất là khi kích thích thì sự vận chuyển phân cực của auxin bị ức chế; nguyên nhân thứ hai là có sự tồn tại của một điện thế trong các cơ quan và có thể đo được điện thế bằng dụng cụ đặc biệt.

Auxin trong cây thường bị ion hóa (AIA^-) và do đó phân bố về điện cực dương nhiều hơn.

Auxin gây ra hiện tượng ưu thế ngọn: Hiện tượng ưu thế ngọn là một hiện tượng phổ biến trong cây. Khi chồi ngọn hoặc rễ chính sinh trưởng sẽ ức chế sinh trưởng của chồi bên và rễ. Đây là một sự ức chế tương quan vì khi loại trừ ưu thế ngọn bằng cắt chồi ngọn và rễ chính thì chồi bên, rễ bên được giải phóng khỏi ức chế và lập tức sinh trưởng. Hiện tượng này được giải thích rằng AIA được hình thành trong đỉnh ngọn với hàm lượng cao hơn và được vận chuyển xuống dưới. Trên con đường đi xuống dưới nó đã ức chế sinh trưởng của chồi bên. Nếu cắt đỉnh ngọn thì làm giảm lượng auxin nội sinh sẽ kích thích chồi bên sinh trưởng. Nếu cắt đỉnh ngọn thì làm giảm lượng auxin nội sinh và sẽ kích thích chồi bên sinh trưởng. Nếu auxin làm tăng ưu thế ngọn thì ngược lại xytokinin lại làm yếu ưu thế ngọn, kích thích các chồi bên sinh trưởng. Mức độ ưu thế ngọn phụ thuộc vào tỷ lệ auxin/xytokinin. Càng gần chồi ngọn thì tỷ lệ càng lớn và hiện tượng ưu thế ngọn càng mạnh mẽ.

Auxin kích thích sự hình thành rễ: Trong sự hình thành rễ đặc biệt là rễ phụ, hiệu quả của auxin là rất đặc trưng. Sự hình thành rễ phụ (cành giâm, cành chiết) có thể chia làm ba giai đoạn: giai đoạn đầu là phân phân hóa tế bào trước tầng phát sinh; tiếp theo là xuất hiện mầm rễ và cuối cùng mầm rễ sinh trưởng thành rễ phụ chọc thủng vỏ và ra ngoài. Để khởi xướng sự phân phân hóa tế bào thì cần hàm lượng auxin khá cao. Các giai đoạn sinh trưởng của rễ cần rất ít auxin và có khi còn gây ức chế. Nguồn auxin này có thể là nội sinh, có thể là ngoại sinh. Vai trò của auxin cho sự phân hóa rễ thể hiện rất rõ trong nuôi cấy mô. Trong kỹ thuật nhân giống vô tính thì việc sử dụng auxin để kích thích sự ra rễ là cực kỳ quan trọng và bắt buộc.

Auxin kích thích sự hình thành, sự sinh trưởng của quả và tạo quả không hạt: tế bào trứng sau khi thụ tinh đã tạo nên hợp tử và sau phát triển thành phôi. Phôi hạt là nguồn tổng hợp auxin nội sinh quan trọng, khuếch tán vào bầu và kích thích sự lớn lên của bầu thành quả. Vì vậy, quả chỉ được hình thành khi có sự thụ tinh. Nếu không có quá trình thụ tinh thì không hình thành phôi và hoa sẽ bị rụng. Việc xử lý auxin ngoại sinh cho hoa sẽ thay thế được nguồn auxin nội sinh vốn được hình thành trong phôi và do đó không cần quá trình thụ phấn, thụ tinh nhưng bầu vẫn lớn thành quả được nhờ auxin ngoại sinh. Trong trường hợp này quả không qua thụ tinh và do đó không có hạt.

Auxin kìm hãm sự rụng lá, hoa, quả vì nó ức chế sự hình thành tầng rời ở cuống lá, hoa quả vốn được cảm ứng bởi các chất ức chế sinh trưởng. Vì vậy phun auxin ngoại sinh có thể làm giảm sự rụng lá, tăng sự đậu quả và phòng rụng nụ, quả non, làm tăng năng suất.

Auxin ảnh hưởng lên sự vận động của chất nguyên sinh, tăng tốc độ lưu động của chất nguyên sinh, ảnh hưởng lên các quá trình trao đổi chất: kích thích sự tổng hợp các polime và ức chế phân hủy chúng, ảnh hưởng đến các hoạt động sinh lý như quang hợp, hô hấp, sự vận chuyển vật chất trong cây.

Có 4 loại Auxin được sử dụng trong nuôi cấy mô là:

1. Indolylacetic acid (IAA)
2. Naphthyl acetic acid (NAA)
3. 2,4 - Dichlorphenoxy acetic acid (2,4 - D)
4. Indol butyric acid (IBA)

Riêng IAA là Auxin tự nhiên, NAA, IBA và 2,4 - D là các Auxin nhân tạo (hình 2.4, 1 a - d). Các Auxin nhân tạo thường có hoạt tính mạnh hơn, do cấu trúc phân tử khá bền vững nên Auxin nhân tạo ít bị oxy hoá bởi các enzyme. Kinh nghiệm sử dụng Auxin trong nuôi cấy mô cho hiệu quả cao khi sử dụng nồng độ cao tại thời điểm ban đầu, sau đó thấp hơn để tránh tình trạng mô bị "say" và nhiễm độc. Nồng độ của các hợp chất Auxin trong môi trường nuôi cấy thường từ 10^{-5} M - 10^{-6} M.

Cytokinin

Hiệu quả sinh lý đặc trưng nhất của cytokinin đối với thực vật là kích thích sự phân chia tế bào mạnh mẽ. Vì vậy mà người ta xem chúng như là các chất hoạt hóa phân chia tế bào. Có được hiệu quả này là do cytokinin hoạt hóa mạnh mẽ sự tổng hợp axit nucleic và protein. Cytokinin có mặt trong các ARN vận chuyển.

Cytokinin ảnh hưởng rõ rệt và rất đặc trưng lên sự phân hóa cơ quan của thực vật, đặc biệt là sự phân hóa chồi. Từ lâu người ta đã chứng minh rằng sự cân bằng tỷ lệ giữa auxin (phân hóa rễ) và cytokinin (phân hóa chồi) có ý nghĩa quyết định trong quá trình phát sinh hình thái của cây nuôi cấy mô in vitro cũng như trên cây nguyên vẹn. Nếu tỷ lệ auxin cao hơn cytokinin thì kích thích sự ra rễ, còn tỷ lệ cytokinin cao hơn auxin sẽ kích thích sự xuất hiện và phát triển của chồi. Để tăng hệ số nhân giống, người ta tăng nồng độ cytokinin trong môi trường nuôi cấy ở giai đoạn tạo chồi in vitro.

Cytokinin có khả năng kìm hãm sự già hóa của cơ quan và của cây nguyên vẹn. Chẳng hạn khi một lá bị ngắt khỏi cây thì chúng biểu hiện đặc trưng bằng sự giảm hàm lượng Chlorophin và sê hóa vàng, làm giảm hàm lượng của protein và axit nucleic. Nếu như lá tách rời được xử lý cytokinin thì duy trì được hàm lượng protein và Chlorophin trong thời gian lâu hơn và duy trì được màu xanh lâu hơn. Hiệu quả kìm hãm sự già hóa, kéo dài tuổi thọ của cơ quan có thể chứng minh là của cành giâm ra rễ, thì rễ tổng hợp cytokinin nội sinh và kéo dài thời gian sống của lá lâu hơn.

Trên cây nguyên vẹn thì khi hệ thống rễ phát triển mạnh sẽ là lúc cây trẻ và sinh trưởng mạnh. Nếu hệ thống rễ bị thương tổn thì cơ quan trên mặt đất chóng già.

Cytokinin trong một số trường hợp ảnh hưởng lên sự nảy mầm của hạt và củ. Vì vậy nếu xử lý cytokinin cũng có thể phá bỏ trạng thái ngủ nghỉ của hạt, củ, chồi...

Ngoài ra trong mối tương tác với auxin, cytokinin có ảnh hưởng tới ưu thế ngọn của cây. Cytokinin làm yếu hiện tượng ưu thế ngọn, làm phân cành nhiều. Chính vì vậy mà từ rễ (cơ quan tổng hợp cytokinin) lên chồi ngọn (cơ quan tổng hợp auxin) thì hiện tượng ưu thế ngọn càng tăng dần tương ứng với sự tăng hàm lượng auxin và giảm hàm lượng cytokinin.

Cytokinin có ảnh hưởng đến quá trình trao đổi chất như quá trình sinh tổng hợp axit nucleic, protein, chlorophin và do đó ảnh hưởng đến các hoạt động sinh lý của cây.

Việc sử dụng hàm lượng auxin và tỷ lệ auxin/ cytokinin trong môi trường nuôi cấy quyết định sự phân hoá của tế bào theo hướng tạo mô sẹo, tạo rễ tạo chồi hay tạo phôi soma.

Có 3 loại cytokinin chính thường được dùng trong nuôi cấy mô là:

- Kinetin là sản phẩm được phát hiện đầu tiên, có cấu trúc phân tử: 6-(2-furfuryl) - aminopurin. Kinetin được hình thành từ chế phẩm AND ở điều kiện nhiệt độ cao. Trong cơ thể sống có thể không có kinetin tồn tại. Sản phẩm này kích thích sự phát sinh chồi mô nuôi cấy.

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

Tác dụng của zeatin tương tự như kinetin, trong thực tiễn nuôi cấy mô, zeatin chỉ dùng trong những trường hợp đặc biệt vì quá đắt, thông thường sử dụng kinetin và các sản phẩm khác.

- 6-Bezylaminopurin (BAP): Tác dụng của BAP tương tự như hai hợp chất trên nhưng hoạt tính của BAP cao hơn nhiều so với kinetin và bền vững hơn zeatin dưới tác động của nhiệt độ cao.

Giberellin

Giberellin được phát hiện vào những năm 1930. Lịch sử phát hiện nhóm hormon này bắt đầu từ 1985 khi người Nhật nói về bệnh lúa von. 1926 phát hiện được bệnh lúa non là do loài nấm *Gibberella fujikuroi* gây ra. Đến những năm 30 thì phân lập và tinh chế được hoạt chất, gọi là

Giberellin. Sau chiến tranh thế giới thứ hai, năm 1950 người Anh và người Mỹ mới biết đến công trình này của người Nhật.

Tới nay đã phát hiện được trên 60 loại thuộc nhóm Giberellic acid loại thông dụng nhất trong nuôi cấy mô là GA_1 .

Vai trò Giberellin trong đời sống thực vật:

Hiệu quả sinh lý rõ rệt nhất của GA là kích thích mạnh mẽ sự sinh trưởng kéo dài của thân, sự vươn dài lóng cây họ lúa. Hiệu quả có được là do ảnh hưởng kích thích đặc trưng của GA lên pha giãn của tế bào theo chiều dọc. Vì vậy khi xử lý GA cho cây đã làm tăng nhanh sự sinh trưởng dinh dưỡng và tăng sinh khối của chúng.

GA ảnh hưởng rất rõ rệt lên sự sinh trưởng của các đột biến lùn. Nhiều nghiên cứu về trao đổi chất di truyền của GA đã khẳng định rằng đột biến lùn của một số thực vật như ngô, đậu Hà Lan là đột biến gen đơn giản, dẫn đến sự thiếu hụt những gen nào đây chịu trách nhiệm tổng hợp enzym của phản ứng nào đây trên con đường tổng hợp GA mà cây không thể hình thành được GA, dù là một lượng nhỏ. Với những đột biến này thì việc bổ sung GA ngoại sinh sẽ làm cho cây sinh trưởng bình thường. Vì phản ứng của các đột biến lùn rất nhạy với GA nên người ta sử dụng các đột biến này để thử xác định hàm lượng GA bằng phương pháp biotest

GA kích thích sự nảy mầm của hạt và củ, do đó nó có tác dụng đặc trưng trong việc phá bỏ trạng thái ngủ nghỉ của chúng. Trong trường hợp này GA kích thích sự tổng hợp enzym amilaza và các enzym thủy phân khác như proteaza, photphataza và làm tăng hoạt tính của các enzym này; chính vì vậy mà xúc tiến quá trình phân hủy tinh bột thành đường cũng như các polime thành monome khác tạo điều kiện về nguyên liệu và năng lượng cho quá trình nảy mầm. Trên cơ sở đó, nếu xử lý GA ngoại sinh thì có thể phá bỏ trạng thái ngủ nghỉ của hạt, củ, căn hành, kể cả trạng thái nghỉ sâu

Trong nhiều trường hợp GA kích thích sự ra hoa rõ rệt. Ảnh hưởng đặc trưng của GA lên sự ra hoa là kích thích sự sinh trưởng kéo dài và nhanh chóng của cụm hoa. Vì vậy trong học thuyết hoocmon ra hoa của Trailachyan thì GA được xem như là một thành viên của tổ hợp florigen. Xử lý GA cho cây ngày dài thì chúng có thể ra hoa trong điều kiện ngày ngắn và làm tăng hiệu quả của xuân hóa, có thể cây hai năm thành cây một năm.

Trong sự phát triển và phân hóa của cơ quan sinh sản thì GA ảnh hưởng đến sự phân hóa giới tính; ức chế phát triển hoa cái và kích thích sự phát triển hoa đực.

Trong sự sinh trưởng của quả và tạo quả không hạt thì GA có vai trò gần giống với auxin nó làm tăng kích thước quả và tạo nên quả không hạt trong một số trường hợp. Hiệu quả này càng rõ rệt khi phối hợp tác dụng với auxin.

Vì GA ảnh hưởng rõ rệt lên quá trình trao đổi chất, các hoạt động sinh lý, đến quá trình sinh trưởng và phát triển của cây nên GA là một trong những chất điều tiết sinh trưởng được ứng dụng có hiệu quả trong sản xuất nông nghiệp.

Trong nuôi cấy mô và tế bào thực vật, tác động của Gibberellic acid chưa thật rõ ràng. Nhiều tác giả đã sử dụng và coi đó là thành phần không thể thiếu của một số loại môi trường chuyên dụng.

Abscisic acid (ABA)

Axit abscixic là một chất ức chế sinh trưởng rất mạnh nhưng nó không gây hiệu quả độc khi ở nồng độ cao.

Kiểm tra sự rụng: vai trò của AAB trong việc điều chỉnh sự rụng đã được phát hiện lần đầu tiên cùng với sự phát hiện ra AAB và coi nó như là một chất điều chỉnh tự nhiên sự rụng của các cơ quan trong cơ thể. AAB đã kích thích sự xuất hiện và nhanh chóng hình thành tầng rời ở cuống. Tuy nhiên chức năng điều chỉnh sự rụng còn gắn liền với các hormone khác như etilen.

Điều chỉnh sự ngủ nghỉ: trong cơ quan đang ngủ nghỉ hàm lượng AAB tăng gấp 10 lần thời kỳ dinh dưỡng. Sự ngủ nghỉ kéo dài cho đến khi nào hàm lượng AAB trong chúng giảm đến mức độ tối thiểu. Khi xử lý lạnh để phá bỏ sự ngủ nghỉ thì hàm lượng AAB giảm 37% ở quả và 70% ở hạt, đồng thời hàm lượng GA tăng lên tương ứng. Do vậy từ trạng thái ngủ nghỉ chuyển sang trạng thái này mầm có sự biến đổi tỷ lệ AAB/GA trong chúng

Điều chỉnh sự đóng mở khí khổng: Trong những năm gần đây người ta đã phát hiện ra rằng AAB có vai trò quan trọng trong sự đóng mở khí khổng. Khi xử lý AAB ngoại sinh cho lá làm cho khí khổng đóng lại

nhanh chóng và do đó mà giảm thoát hơi nước qua khí khổng. Chức năng điều chỉnh sự đóng mở khí khổng của AAB chắc có liên quan đến sự vận động nhanh chóng của ion K^+ . AAB gây cho tế bào bảo vệ “lở thủng” K^+ và bị mất K^+ , mất sức trương và khí khổng đóng lại.

AAB được xem như là một hoocmon của “stress” vì nó được hình thành mạnh để phản ứng với các stress hoặc điều kiện bất thuận của môi trường và làm cho cây biến đổi để thích ứng với điều kiện môi trường. Một số ví dụ điển hình là sự tổng hợp AAB nhanh chóng để phản ứng với stress nước: Khi cây bị thiếu nước thì hàm lượng AAB tăng nhanh trong lá, làm khí khổng nhanh chóng đóng lại và làm giảm ngay sự thoát hơi nước. Vì vậy mà AAB có vai trò điều chỉnh trong sự trao đổi nước của cây, hạn chế sự mất nước và làm cây thích nghi với điều kiện khô hạn

Những điều kiện bất thuận khác của môi trường như mặn, lạnh, úng, sau bệnh, gây ra sự tăng hàm lượng AAB trong lá và có thể đây là một phản ứng tự vệ, thích nghi của cây.

Ngoài ra, AAB được xem như một hoocmon của sự hóa già, mức độ hóa già của cơ quan và của cây gắn liền với sự tăng hàm lượng AAB trong chúng. Khi hình thành cơ quan sinh sản và khi dự trữ cũng là giai đoạn tổng hợp và tích lũy nhiều AAB nhất và tốc độ già hóa cũng nhanh nhất.

Trong nuôi cấy mô, tế bào Abscisic acid có tác dụng tăng cường khả năng chống chịu của tế bào thực vật đối với điều kiện ngoại cảnh bất lợi vì vậy ABA được đưa vào môi trường tái sinh cây và mang lại hiệu quả nhất định.

Chú ý:

- Một số chất sinh trưởng không tan trong nước, do đó khi pha dung dịch mẹ chất sinh trưởng cần chú ý:

- + Đối với 2,4-D, NAA, IAA, IBA và GA_3 : cân một lượng chất sinh trưởng đủ pha trong 50 mL dung dịch mẹ vào một ly khô, thêm 2-3 ml cồn 90% rồi lắc đến khi tan hết, sau đó mới thêm nước cất đến 50 ml.
- + Đối với BAP (hay BA): trước hết thêm 2-3 giọt nước cất và vài giọt HCl 1 N, lắc cho tan sau đó thêm nước cất đến thể tích cần pha.

+ Đối với KIN: thêm 2-3 giọt NaOH 1 N trước khi pha đến thể tích cần thiết.

- Bảo quản dung dịch mẹ chất sinh trưởng trong lọ kín (riêng IAA bảo quản trong lọ màu nâu), cất giữ tủ lạnh. 2,4-D, NAA tương đối bền có thể bảo quản như vậy trong một năm. BAP, IBA, KIN, và GA₃ bảo quản được từ 2 đến 3 tháng, IAA cần pha lại hàng tháng để đảm bảo hoạt tính.

- Các chất sinh trưởng có thể tác động lên mô nuôi cấy ở nồng độ rất thấp (10⁻⁸). Cần dùng pipette riêng cho từng loại chất sinh trưởng một. Và chú ý rửa cẩn thận các ly, cốc, chai lọc đã dùng để đựng và pha các chất sinh trưởng ở nồng độ cao. Ngoại trừ IAA và GA₃, các chất sinh trưởng còn lại được coi là bền vững trong quá trình hấp vô trùng.

- IAA sau khi pha dung dịch stock, được lọc qua màng lọc millipore sau đó chứa trong các tube eppendorf được bọc giấy nhôm bên ngoài, bảo quản lạnh sâu. Môi trường sau khi hấp khử trùng để nhiệt độ giảm xuống còn khoảng 50-60°C khi đó mới cho IAA đã lọc vào (các thao tác thực hiện trong tủ cấy vô trùng).

2.2.3.6. Một số loại môi trường cơ bản

Thành phần cơ bản của một số loại môi trường nuôi cấy mô và tế bào thực vật được trình bày trong bảng 2.3.

- *Môi trường Murashige - Skoog (MS)* : Là một trong những loại môi trường được sử dụng rộng rãi nhất trong nuôi cấy mô và tế bào thực vật. Môi trường MS thích hợp cho cả thực vật 2 lá mầm và 1 lá mầm. Đến nay có rất nhiều công thức cải tiến môi trường MS trên cơ sở công thức gốc do Murashige và Skoog công bố năm 1962 (bảng 2.4, cột MS).

- *Môi trường Gamborg (B5)*: Là loại môi trường được thử nghiệm đầu tiên cho cây đậu tương, nhưng cũng được dùng nhiều trong nhân giống vô tính đặc biệt là tách và nuôi tế bào trần (bảng 2.4, cột B5).

Bảng 2.3. Một số môi trường phổ biến nuôi cấy mô tế bào thực vật

Thành phần	MS	WP	W	B5	SH	NN	AC
ĐA LƯỢNG (mg/l)							
NH ₄ NO ₃	1650	400				720	400

(NH ₄) ₂ SO ₄				134			
NH ₄ H ₂ PO ₄					300		
KNO ₃	1900		80	2500	2500	950	
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O		556	300				556
K ₂ SO ₄		990					900
CaCl ₂ .2H ₂ O	440	96		150	200	166	96
MgSO ₄ .7H ₂ O	370	370	750	250	400	185	370
KH ₂ PO ₄	170	170				68	170
NaH ₂ PO ₄			19	150			
KCl			65				
VI LƯỢNG (mg/l)							
MnSO ₄ .4H ₂ O	23,3		5	10	10	25	
MnSO ₄ .H ₂ O		22,3					22,3
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6	8,6	3	2	1	10	8,6
H ₃ BO ₃	6,2	6,2	1,5	3	5	10	6,2
KI	0,83		0,75	0,75	1		0,83
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25	0,25	0,001	0,25	0,1	0,25	0,25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	0,025	0,01	0,025	0,2	0,025	0,025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	0,025		0,025	0,1		0,025
Na ₂ EDTA	37,3		200		20	37,3	
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8				15	27,8	
Sodium Ferric EDTA		30	2,5				30
VITAMIN VÀ AXIT AMIN (mg/l)							
Thiamine HCl	0,1		0,5	10	5	0,5	0,1
Nicotinic axit	0,5		0,1	1	5	5	0,5
Pyridoxine HCl	0,5		0,1	1	0,5	0,5	0,5
Glycine	2		3				
Lysine							100
Folic axit						0,5	
Biotin						0,05	
Myo-inositol	100	100		100	1000	100	100

2.2.3.7. Các chất hữu cơ khác

Môi trường có thể bổ xung thêm các chất hữu cơ nhằm kích thích sự sinh trưởng và phát triển của mô và tế bào.

- Nước dừa: Lượng nước dừa dùng trong môi trường cấy thường khá lớn, từ 5 - 20% thể tích môi trường.

- Nước chiết nấm men: Là chế phẩm thường dùng đến nuôi cấy vi sinh vật, mô tế bào động vật, lượng thường dùng là 1g cho 1 lít môi trường.

- Dịch thủy phân Casein hydrolysate (CH): là thành phần của các loại sữa dùng nồng độ 0,10 %.

- Dịch triết của khoai tây: Trong dịch này có chứa một số ít đường axit amin, và các vi lượng cần thiết, được sử dụng trong môi trường nuôi cấy bao phần lúa có tác dụng tạo mô sẹo.

- Chất độn (thạch): Là một loại polysaccharid thu được từ một số loài tảo (trong đó có rau câu). Được dùng làm chất độn giúp cho môi trường đông đặc lại. Ở nhiệt độ 80°C thạch ngậm nước sang dạng thái sol và 40°C trở về trạng thái gel. Lượng sử dụng của thạch là 6 - 12 g/lít nước.

Độ pH của môi trường dinh dưỡng ảnh hưởng trực tiếp tới quá trình thu nhận các chất dinh dưỡng từ môi trường vào tế bào. Vì vậy đối với mỗi loại môi trường nhất định và từng trường hợp cụ thể, cần phải điều chỉnh pH cho phù hợp từ 5,5 - 6,8, bằng NaOH hoặc HCl IN.

2.2.3.8. Chuẩn bị các dung dịch mẹ và dung dịch làm việc

Nếu tổ chức tốt vấn đề chuẩn bị môi trường, sẽ giảm một số thời gian đáng kể cho việc nuôi cấy. Dưới đây xin nêu chi tiết phương pháp chuẩn bị môi trường thông dụng là MS (Murasige - Skoog, 1962).

Để thuận tiện cho việc pha các môi trường nuôi cấy, người ta không cân hoá chất mỗi lần pha môi trường mà chuẩn bị trước. Các hoá chất được pha thành nhóm có nồng độ đậm đặc từ 20 - 50 lần được gọi là dung dịch mẹ (A, B, C, D, E, F, G, H,) sau đó chỉ cần pha loãng khi sử dụng. Các dung dịch đậm đặc được bảo quản dài ngày trong tủ lạnh.

Muốn pha 1 lít môi trường làm việc, (nuôi cấy mô tế bào thực vật) cần thực hiện các bước sau:

- Cho khoảng 800ml nước cất vào một cái bình có dung tích 1 lít.

- Dùng pipette cho số lượng dung dịch mẹ A, B, C, D, E, F theo lượng đậm đặc đã pha sẵn luôn luôn khuấy đều.

- Thêm 100 mg - inositol

- Đo pH và dùng HCl 0,1 N, hoặc NaOH 0,1 N chỉnh pH đến 5,6 - 5,8.

- Thêm 20g sucrose, khuấy cho tan

- Thêm 6 - 8 g thạch

- Đun sôi cho tan hết thạch, vừa đun vừa khuấy đều. Sau đó lên thể tích đủ 1 lít và chia hỗn hợp dung dịch này vào các ống nghiệm hoặc bình tam giác. Cần chia xong trước khi dung dịch nguội dưới 50°C.

Bảng 2.4. Chuẩn bị Môi trường MS

Nhóm dung dịch mẹ	Hoá chất	Nồng độ (mg/l)	Nồng độ đậm đặc 20 lần (mg/20 lít môi trường)
A	EDTA	37,26	746,0
	Fe ₂ (SO ₄) ₃	27,8	556,0
B	NH ₄ NO ₃	1650,00	33.000,0
	KNO ₃	1900,0	38.000,0
C	H ₃ BO ₃	6,2	124,0
	KH ₂ PO ₄	170,0	3.400,0
	KI	0,83	16,6
	Na ₂ Mo ₄ .2H ₂ O	0,25	5,0
	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	0,5
D	MgSO ₄ .7H ₂ O	370,0	7.000,0
	MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3	446,0
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6	172,0
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	0,5
E	CaCl ₂ .H ₂ O	440,0	8.800,0
F	Thiamine HCl	0,1	2,0
	Axit nicotinic	0,5	10,0
	Pyridoxine HCl	0,5	10,0
	Glycine	2,0	40,0

Chương 3

ỨNG DỤNG NUÔI CÂY MÔ TẾ BÀO TRONG TẠO GIỐNG CÂY SẠCH BỆNH VIRUS

3.1. TẦM QUAN TRỌNG CỦA VIỆC TẠO CÂY SẠCH BỆNH

Tạo giống chống chịu các bệnh *virus* là một hướng nghiên cứu khá quan trọng. 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.

Do vậy, phương pháp có hiệu quả nhất hiện nay vẫn là tạo ra các vật liệu nhân giống sạch bệnh *virus* qua nuôi cấy 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, tói, cây ăn quả có múi, chuối, nho, mơ, mận, cây hoa như cúc, câm 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. Đường 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.

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.

3.2. CƠ SỞ KHOA HỌC TẠO CÂY 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 thể hệ này sang thể hệ khác. Vì vậy, biện pháp làm sạch bệnh virus luôn phải kết hợp với biện pháp duy trì tính sạch bệnh. Cả hai biện pháp nằm trong phạm vi phục tráng giống, người ta gọi là biện pháp giữ sạch bệnh. Bên cạnh hai nhiệm vụ là duy trì đặc tính giống và tính đồng đều của giống nhiệm vụ chủ yếu của công tác phục tráng giống là cung cấp được tập đoàn cây bố mẹ và hạt giống sạch virus. Kinh nghiệm thực tế cho hay những biện pháp phục tráng giống có hiệu quả là những biện pháp được thực hiện một cách triệt để và có trách nhiệm. Làm sạch virus được coi là mục tiêu của công tác phục tráng giống.

Bên cạnh xử lý nhiệt và xác định tính sạch bệnh, các phương pháp để thu được cây sạch *virus* bao gồm chủ yếu vẫn là nuôi cấy đỉnh phân sinh. Đương nhiên là kỹ thuật nuôi cấy đỉnh phân sinh ở đây được thực hiện theo một mục đích khác nên phức tạp và tốn kém hơn trong nhân giống vô tính. Vì thế, người ta phân biệt rõ giữa nuôi cấy đỉnh phân sinh trong công tác phục tráng giống nói chung và làm sạch *virus* nói riêng. Mục đích của công tác bảo vệ thực vật (trong nuôi cấy đỉnh phân sinh và nuôi cấy mô) phân biệt rõ với công tác duy trì giống. Trong công tác bảo vệ thực vật thì yêu cầu lớn nhất là làm sạch *virus*, nhưng trong thực tế điều đó hầu như không thể đạt được. Vì vậy phải kết hợp nhiều biện pháp để đảm bảo kết quả. Xử lý nhiệt, nuôi cấy đỉnh phân sinh và xác định (thử) *virus* phải được thực hiện theo một chu trình kín. Các nhà duy trì giống đòi hỏi phải có những cơ thể thực sự sạch *virus*, để rồi thông qua phương pháp nhân *in vitro* có thể nhân thành số lượng cây bất kỳ mà không bị tái nhiễm. Các nhà nuôi cấy mô thực vật rất quan tâm đến phương pháp nhân giống *in vitro*, mà lý do chính là việc làm sạch *virus* đối với cây trồng. Vì hiệu quả kinh tế, người ta chỉ giới hạn việc nhân giống *in vitro* ở những cây trồng mà đối với chúng các phương pháp cổ điển để nhân nhanh những giống

mới hoặc làm sạch *virus* không thực hiện được. Phương pháp nhân giống *in vitro* loại trừ được nguy cơ tái nhiễm và vì thế tỏ ra ưu việt hơn các phương pháp cổ điển. Tuy vậy theo kinh nghiệm thực tiễn, các cây trồng được nhân giống *in vitro* vẫn còn mang ít nhiều tác nhân gây bệnh.

Đa số các cây trồng thương mại (commercial crop plants), đặc biệt là các cây nhân giống vô tính đều chứa các *virus* nội hấp (systemic *virus*), các *virus* này ảnh hưởng xấu đến năng suất. Vì vậy, việc sản xuất ra các nguyên liệu thực vật sạch *virus* hoặc gần sạch *virus* là rất cần thiết trước khi chúng được nhân giống để đưa ra thị trường. Ở nhiều loài, phương thức cho hiệu quả cao là xử lý nhiệt các cơ quan khác nhau hoặc lúc cây đang sinh trưởng mạnh. Tuy nhiên, đối với một số *virus* phương thức này hoàn toàn không thích hợp vì thế phải sử dụng một số phương thức khác. Phương thức cho hiệu quả cao nhất là nuôi cấy đỉnh phân sinh, thường có thể kết hợp với xử lý hóa học hoặc xử lý nhiệt. Các phương pháp này cho phép có thể thu được các cá thể không những sạch *virus* mà còn sạch cả nấm và các nhân tố gây bệnh khác.

Từ năm 1952, 1953 Morel và Martin đã thành công trong việc loại trừ một số *virus* ở khoai tây và thược dược (*Dahlia variabilis*) bằng cách nuôi cấy đỉnh phân sinh, điều đáng tiếc là các chồi này đã không tạo rễ và người ta phải ghép lên các cây mầm khoẻ mạnh. Tuy nhiên, sau đó trên cơ sở các kết quả của Morel và Martin người ta đã đưa ra nhiều phương pháp sản xuất các cây trồng sạch *virus* có khả năng tạo rễ ở nhiều loài thực vật khác nhau và các dòng cây đó hiện nay đã được sử dụng rộng rãi trên thị trường.

Nuôi cấy đỉnh phân sinh là nuôi cấy các mẫu nhỏ của chồi đỉnh lên môi trường dinh dưỡng thích hợp để chúng sinh trưởng và tạo cây hoàn chỉnh. Phần mô thường được dùng là vòm phân sinh (meristem dome) cộng thêm cặp lá đầu tiên. Tùy thuộc vào từng loài khác nhau mà đỉnh phân sinh có thể có chiều dài từ 0,1-0,5 mm, một số tác giả yêu cầu chỉ nuôi cấy vòm phân sinh, tuy nhiên một số tác giả lại thu được cây sạch *virus* từ đỉnh sinh trưởng có chiều dài 0,5 mm. Chồi đỉnh hoặc đỉnh sinh trưởng sau khi cắt thường phải khử trùng bề mặt, nhưng giai đoạn này có thể không cần thiết. Các kỹ thuật nuôi cấy đỉnh sinh trưởng rất khác nhau tùy thuộc từng loài.

Môi trường agar thường không thích hợp cho cây sinh trưởng khi nuôi cấy, chỉ có các “cầu giấy lọc” (filter paper bridge) với phần chân

được nhúng trong môi trường lỏng chứa trong ống nghiệm nuôi cấy là thích hợp hơn cả. Chỉ trên các cầu giấy lọc như thế rễ mới phát triển tốt. và cây có thể sẵn sàng để đưa ra đất. Rất nhiều loại môi trường đã được dùng trong nuôi cấy đỉnh phân sinh nhưng không có một môi trường chung thích hợp cho mọi loài. Môi trường chứa các nguyên tố đa lượng và vi lượng của Knop và Berthlot (không có beryllium và titanium), glucose 40 g/L, thiamine 10-5g/L và myoinositol 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.

3.3. PHƯƠNG PHÁP TẠO CÂY SẠCH VIRUS

3.3.1. Chuẩn đoán bệnh virus

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

3.3.1.1. Xét nghiệm virus 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.

3.3.1.2. Xét nghiệm virus bằng 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.

3.3.1.3. Xét nghiệm virus bằng kính hiển vi điện tử

Kính hiển vi điện tử với sự hoàn chỉnh về kỹ thuật và sau khi ứng dụng phương pháp nhúng có thể đưa vào xét nghiệm hàng loạt với số lượng mẫu vừa phải. Khi chứng minh *virus* hình đĩa và hình sợi ở hoa phong lan và hoa huệ kính hiển vi điện tử đã mang lại những kết quả đáng tin cậy đối với xét nghiệm hàng loạt. Khó khăn chủ yếu hiện nay là chi phí cho thiết bị và số lượng mẫu được xét nghiệm bị hạn chế, đồng thời loại *virus* được chứng minh cũng chỉ là loại hình đĩa và hình sợi. Nếu *virus* tồn tại dạng cầu thì rất khó phát hiện vì nó khá giống các cơ quan từ của tế bào thực vật bình thường.

3.3.1.4. Xét nghiệm virus 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...

3.3.2. 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 Thùy Tiên thì chịu được nhiệt độ 34°C trong thời gian từ 4-6 tuần.

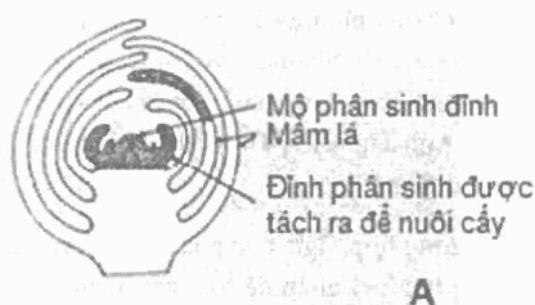
Trong một số trường hợp, người ta phải phối hợp xử lý nhiệt với nuôi cấy đỉnh sinh trưởng hoặc vi ghép để loại trừ bệnh *virus* (Walkey, 1980; Kartha, 1986; Brown và cs. 1988). Ưu thế của kỹ thuật này là sau khi cây đã qua xử lý nhiệt, mẫu nuôi cấy (hoặc vi ghép) thường có kích thước lớn hơn. Green và 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.

3.3.3. Nuôi cấy mô phân sinh đỉnh



Hình 3.1. Mô phân sinh đỉnh

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 tinh 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.

(c) Đảm bảo kết quả đưa cây ra đất

Các đỉnh sinh trưởng sau khi phân lập cần được nuôi ở các buồng nuôi cấy hoàn toàn không chế về mặt khí hậu: nhiệt độ 22°C và 16 giờ chiếu sáng ở 1.000-3.000 lux .

Khi đưa cây tái sinh từ đỉnh phân sinh ra ngoài đất cần phải phủ nilon để chúng thích nghi dần với độ ẩm không khí thấp. Tốt nhất là nên trồng ở các buồng nuôi cấy 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.

3.4. MỘT SỐ KẾT QUẢ ĐẠT ĐƯỢC TRONG CÔNG TÁC TẠO CÂY SẠCH BỆNH

3.4.1. Tạo giống cây sạch virus

3.4.1.1. Cây khoai tây sạch virus

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 từ 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*.

3.4.1.2. Cây rau sạch virus

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

Ngoài ra, ở những cây trồng dùng để sản xuất hạt của chúng có thể nhân giống vô tính qua nhiều năm, ví dụ như súp-lơ người ta cũng cần phải có vật liệu sạch bệnh *virus* ban đầu. Thông qua nuôi cấy mô người ta tạo được một vài trăm cây và bằng biện pháp thụ *virus* đã thu được 3.220 cây sạch bệnh.

3.4.1.3. Cây ăn quả sạch virus

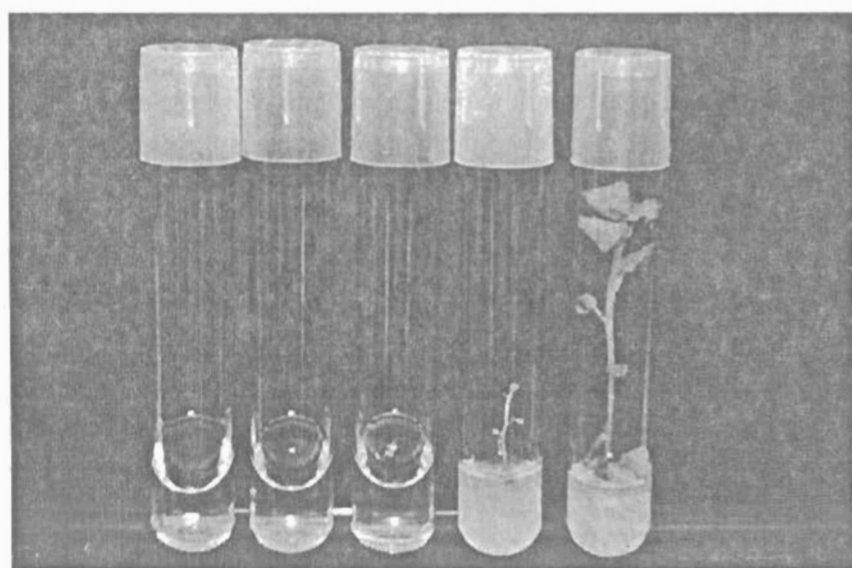
Cây ăn quả thường bị *virus* phá hoại một cách mạnh nhất. Các thể *virus* gây bệnh không những lan truyền khi nhân giống vô tính mà cả khi nhân giống bằng hạt. Ngoài ra cây ăn quả thường là cây lâu năm, luôn luôn chịu tác động của các tác nhân truyền bệnh vì thế chúng rất dễ bị nhiễm bệnh. Việc chứng 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 thụ 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.

3.4.1.4. Cây hoa sạch virus



Hình 3.2. Cây được tạo ra bằng phương pháp nuôi cấy đỉnh sinh trưởng

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 thùy 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 loại vật liệu để làm sạch *virus*. Ở Anh, cũng tổ chức một cơ quan tương tự như vậy. Ở Đông Đức (cũ) có xí nghiệp ươm cây con ở thành phố Dresden cũng nhận các loại 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.

3.4.2. 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.

Chương 4

NHÂN GIỐNG CÂY TRỒNG QUA NUÔI CẤY PHÁT SINH PHÔI SOMA VÀ CÔNG NGHỆ PHÔI VÔ TÍNH

4.1. NHÂN GIỐNG CÂY TRỒNG QUA NUÔI CẤY PHÁT SINH 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.

4.1.1. Sự phát sinh phôi soma

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

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

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

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

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

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

Có 2 bước dẫn đến sự hệ thống phôi:

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

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

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

Bước 1 cần có mặt auxin và bước 2 phải giảm thấp hay không có mặt của auxin.

Có hai yếu tố quan trọng trong phát sinh phôi: Auxin và nitrogen.

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

4.1.2. Tạo phôi đồng nhất, nâng cao hiệu suất tạo phôi

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 hoá hình thành phôi với tần suất cao, thể hiện được tính toàn thể.

4.1.3. Những yếu tố ảnh hưởng đến quá trình nuôi cấy phôi soma

4.1.3.1 Những yếu tố sinh lý ảnh hưởng đến quá trình phát sinh phôi soma

Môi trường White (1963), Murashige- Skoog (1962) và GamborgsB5 (1968) được dùng làm môi trường cơ bản để nuôi cấy phôi, đôi khi được bổ sung cho phù hợp với các loại cây trồng khác nhau.

Có hai yếu tố quan trọng trong sự phát sinh phôi đó là auxin và nitrogen

- Auxin

Auxin là nhân tố quan trọng nhất điều hoà sự phát sinh và phát triển phôi và có những ảnh hưởng khác nhau trong những pha khác nhau của quá trình phát sinh phôi. Môi trường nuôi cấy cần bổ sung 2,4D hay những auxin khác cần thiết cho việc hình thành những cụm tế bào có khả năng phát sinh phôi soma từ những tế bào đơn. Điều này cho thấy auxin là nhân tố cần thiết để tạo những tế bào có hiệu quả trong phát sinh phôi thể hiện tính toàn năng của tế bào thực vật. Tuy nhiên, auxin chất ức chế quá trình phát sinh phôi nếu nồng độ quá cao. chất hormon được sử dụng để loại trừ quá trình phát triển mầm và kích thích sự phát triển phôi, ABA thường được sử dụng ức chế sự hình thành mầm trên nhiều loại cây trồng, GA₃ có tác dụng ngược lại ABA kích thích sự nảy mầm trên cây đậu, ở cây Cucumis, nồng độ đường cao có tác dụng kích thích ngược lại với tác dụng của kinetin.

Chất hormon (Cytokinin, Auxin, Gibberlin) có tác động trên phôi non phụ thuộc vào từng loại cây trồng. Auxin ở nồng độ thấp kích thích sự phát triển phôi. Cytokinin có tác dụng yếu hơn. Cytokinin kết hợp với auxin kích thích quá trình biệt hoá phôi. Sự kết hợp IAA, KIN, AD kích thích sự sinh trưởng và biệt hoá phôi hình cầu. GA₃ nồng độ 0.01ppm kích thích sự phát triển phôi hình tim. ABA ở nồng độ thấp cũng có tác dụng kích thích sự sinh. Gibberlin và abscisic acid ức chế phát sinh phôi từ những cụm tế bào.

Nếu nồng độ auxin quá cao thì những tế bào đơn không thể biệt hoá trực tiếp tạo phôi khi chuyển mẫu sang môi trường nuôi cấy không có auxin, có hai giai đoạn trong quá trình phát sinh phôi soma:

- + Giai đoạn cần auxin
- + Giai đoạn bị ức chế bởi auxin.

- Nguồn nitrogen

NH₄NO₃ và KNO₃ là nguồn nitơ dùng trong nuôi cấy tạo phôi, mỗi loại cây trồng thích hợp với những dạng vô cơ khác nhau trong nuôi cấy tạo phôi vô nhân tạo.

Khi sử dụng ammonium trong môi trường nuôi cấy, thường bổ sung thêm các loại acid hữu cơ đặc biệt là các loại anion của malate hay citrale,

thí dụ trong môi trường cấy phôi của cây lúa mì ammonium malate kết hợp với glutamine và nồng độ muối kali cao, với nồng độ sucrose thấp, có ánh sáng thì hiệu quả sẽ cao.

Nitơ dạng amino acid và các amide cũng được sử dụng. Glutamine kích thích sự phát triển phôi nhất là các phôi chưa trưởng thành. Casein hydrolysate là một phức hợp các amino acid cũng có tác dụng kích thích sự phát triển phôi. Một hỗn hợp 20 amino acid được đưa vào môi trường nuôi cấy, cho thấy có tác dụng kích thích như Casein hydrolysate, nhưng từng amino acid thì không có tác dụng kích thích như CH. Nồng độ CH cao ức chế sự nảy mầm. Với nồng độ CH thích hợp, CH ức chế sự phát triển giai đoạn tiền nảy mầm và kích thích sự tạo phôi. Ngoài những chất điều hoà sinh trưởng, sự tương tác giữa các tế bào là một nhân tố quan trọng khác trong phát sinh phôi soma.

- Nguồn cac bon

Đường sucrose được sử dụng như nguồn cacbon cung cấp năng lượng chủ yếu trong nuôi cấy phôi nhân tạo cho nhiều loại cây trồng, đôi khi có những loại cây trồng, sử dụng đường glucose tỏ ra thích hợp hơn. Cacbon còn tác động như chất tạo ra áp suất thẩm thấu. Mỗi loại cây trồng và từng giai đoạn phát triển phôi khác nhau, nhu cầu về đường sucrose và áp suất thẩm thấu khác nhau, ví dụ cây Datura ở giai đoạn trước dạng hình trái tim cần 8-12% đường sucrose, sau khi có hình tim 4%, giai đoạn sớm của hình thùy lõi 1%, giai đoạn thùy lõi 0,1%. Khi phôi trưởng thành thì không cần đường Mannitol cũng được sử dụng như chất gây áp suất thẩm thấu, nhưng thường chỉ thích hợp cho mô hơn là tế bào do gây độc cho phôi.

- Các chất hữu cơ khác và dịch chiết

Nước dừa được dùng thông dụng trong nuôi cấy mô. CW cung cấp bổ sung cho môi trường các loại đường, amino acid, chất điều hoà sinh trưởng và các chất trao đổi khác. CW thường dùng ở nồng độ 15%. Từ việc sử dụng CW, nhiều mô thực vật được nghiền tách dịch chiết và bổ sung vào môi trường nuôi cấy có tác dụng kích thích sự phát triển phôi như nội nhũ ngô, chà là, chuối, mầm đậu, mầm lúa mì, nước chiết cà chua... nhưng thông thường các dịch chiết, chỉ có tác dụng trên các loài cây trồng không cùng nguồn gốc.

- Agar

Hầu hết các hệ thống nuôi cấy phôi đều thực hiện trên môi trường có thạch. Hàm lượng 0,5 - 1,5%. Cao hơn nồng độ trên ức chế sự hình thành phôi. Do sự trao đổi nước kém.

- Than hoạt tính

Phải có những thực nghiệm xác định nồng độ than hoạt tính thích hợp cho quá trình nuôi cấy. Than hoạt tính thêm vào môi trường kích thích sự phát triển phôi của cây ngô và cây đu đủ. Ngoài ra nó có tác dụng hút những chất độc do cây thải ra ngoài môi trường và lượng hormon thừa trong môi trường. Ở một số loại cây trồng yêu cầu ra rễ trong tối thì than hoạt tính có tác dụng tạo tối cho rễ phát triển.

- pH

Có rất ít các báo cáo về ảnh hưởng của pH trong nuôi cấy phôi. pH thích hợp cho nhiều loại cây trồng là 5 - 6. Tuy nhiên phụ thuộc vào từng loại cây trồng mà pH thay đổi cho phù hợp. pH thường được chỉnh trước khi khử trùng môi trường. Do đó khi chỉnh pH môi trường trước khi khử trùng bao giờ cũng cao hơn pH nuôi cấy là 0,5 đơn vị. Vì vậy nếu pH mà cao hơn môi trường nuôi cấy thì khi chuẩn pH ta phải dùng axit để giảm xuống nếu mà thấp thì dùng NaOH giảm xuống.

4.1.3.2. Các yếu tố ảnh hưởng tới khả năng tái sinh cây từ phôi soma

- Auxin

Auxin ảnh hưởng đến sự phát sinh phôi, nuôi cấy kéo dài trong môi trường có auxin sẽ làm tổn hại đến quá trình tái sinh mô phân sinh đỉnh của phôi dinh dưỡng. Nuôi cấy kéo dài trong môi trường có auxin nhằm mục đích cố định quá trình phát sinh phôi (bao gồm các pha phát sinh, phát triển và duy trì trạng thái phôi). Tuy nhiên, nuôi cấy liên tục trên môi trường auxin, nó sẽ gây tổn hại đến những tế bào có khả năng phát sinh phôi vừa hình thành và kết thúc sự phát sinh phôi và phát triển phôi. Nên sau một thời gian nuôi cấy có auxin, phôi được cấy chuyển sang môi trường không có hay nồng độ auxin thấp, sẽ phục hồi khả năng phát sinh phôi của tế bào phôi. Năm 1988 Parrott làm thí nghiệm cho thấy sau khi nuôi cấy trên môi trường có auxin thì khả năng tái sinh mô phân sinh thấp rõ rệt từ phôi soma, do đó duy trì nuôi cấy có auxin trong một thời gian ngắn sau đó phải tách

hay giảm nồng độ ở mức thấp nhất của auxin ra khỏi hệ thống nuôi cấy. Than hoạt tính có khả năng hấp thu trực tiếp auxin có sẵn trong môi trường.

- Làm khô

Sau giai đoạn hình thành phôi, phôi cần phải làm khô trước khi chuyển qua giai đoạn tái sinh phân hoá mầm và phát triển thành cây hoàn chỉnh. Trong thời gian này, hàm lượng đường cao trong môi trường nuôi cấy phôi là cần thiết cho sự phát sinh phôi và hình thành phôi. Áp suất làm khô tế bào là có lẽ được sử dụng mang lại nhiều thành công. Phụ thuộc vào từng loại cây trồng, mà có thể làm khô tế bào rễ dầm tái sinh thành cây. Tuy nhiên có những cây sau khi làm khô cần một sự tác động của chất kích thích sinh trưởng mới có khả năng tái sinh thành cây hoàn chỉnh ví dụ cây nho, có sự phát sinh phôi mạnh và tái sinh cây rễ rỗng khi cần phải có BA, GA₃, ABA. Sự phát sinh phôi từ phôi hợp tử cần có ABA. Tác dụng của ABA điều khiển sự tích tụ mô chứa Protein và Protein nhằm bảo vệ phôi trong quá trình làm khô ví dụ cây cà rốt.

4.1.4. Ưu điểm của tái sinh phôi soma bằng nuôi cấy mô tế bào thực vật

- Tái tạo những thể lai không tương hợp

Trong lai tạo giống đó là chuyển một gen quý của một loài thực vật hoang dại vào một loài cây trồng, có thể cùng loài hay cùng đặc điểm di truyền. Thì khả năng không tương hợp có thể xảy ra và kết quả là hình thành những hạt giống non không thuần thực về mặt di truyền hay sinh lý.

Wardlaw(1965) đã đúc kết hiện tượng hình thành những hạt giống non về mặt sinh lý. Ông đã dẫn chứng về kết quả nghiên cứu của Cooper & Brink (1940). Khi lai giống *Nicotiana*, họ ghi nhận rằng những tế bào mạch dẫn của cây mẹ có thể liên hệ với cấu trúc vỏ hạt mà nó có chức năng dinh dưỡng nhân và phôi nội nhũ của cây *N. ruatica*. Trong khi mạch dẫn của cây lai *N. ruatica* và *N.* có liên hệ với vỏ hạt nhưng không có liên hệ với nội nhũ. Kết quả cho thấy có sự phát triển quá mức của tế bào nhân và sự ít phát triển của tế bào nhân nội nhũ. Điều này được ghi nhận ở hạt giống lai không phát triển. Còn Wardlaw 1965 cho rằng trong sự yếu kém của hạt lai thì dấu hiệu phát triển không bình thường đầu tiên được ghi nhận ở nội nhũ. Sự kém phát triển của nội nhũ dẫn đến sự phát triển yếu

kém của tế bào phôi và đôi khi phôi sản sinh ra độc tố làm chết phôi. Kết quả được ghi nhận ở hạt lai cây *Linum aperciosum*- album lai với cây *L. aurantum* (Emsweller & Uehring, 1962). Nội nhũ và phôi hình thành trong hạt nhưng hạt không nảy mầm.

Việc nuôi cấy phôi hạt non về mặt sinh lý là rào cản đầu tiên. Laibach (1925) là người đầu tiên đề nghị kỹ thuật nuôi cấy phôi nhằm mục đích tái tạo lại những thể lai không tương hợp. Khi lai cây *Linum perenne* với *L. austriacum*, ông thấy rằng các hạt lai cần cỗi (yếu kém), rất mảnh, không có khả năng nảy mầm. Bằng phương pháp tách phôi ra khỏi hạt và nuôi cấy trên cầu giấy lọc trong môi trường có đường. Laibach đã thành công cho phôi nảy mầm. Từ thực nghiệm của Laibach mà nhiều hạt lai của các loại cây trồng không có khả năng nảy mầm đã được tái tạo. Nuôi cấy đã trở nên là kỹ thuật cơ bản trong lai giống.

Giai đoạn phát triển phôi trong thời điểm nuôi cấy rất quan trọng. Phôi càng thuần thực thì khả năng nuôi cấy phôi càng khó khăn và đòi hỏi điều kiện dinh dưỡng của môi trường nuôi cấy. Số lượng tế bào phôi có thể ngày một giảm dần theo thời gian nuôi cấy, do đó trong kỹ thuật nuôi cấy phôi phải duy trì tốc độ hình thành và phát triển phôi nhanh theo thời gian nuôi cấy, điều này quyết định sự thành công khi tái tạo hạt lai.

- Thông qua giai đoạn ngủ nghỉ rút ngắn chu kỳ lai chọn tạo giống.

Với cây *Tilia americana*, hạt giống đủ độ chín và mất một thời gian để hạt ngủ nghỉ thì mới nảy mầm ví dụ hạt ...cây crabapple, phải mất 3- 4 năm hạt mới nảy mầm nhưng nuôi cấy thì bất kỳ ở thời điểm nào phôi cũng có thể nảy mầm từ đó rút ngắn chu kỳ lai giống.

- Tăng khả năng nảy mầm của hạt.

Hạt giống cây *Prunus* spp, thu được ở trái lúc chín cũng rất khó nảy mầm do khi trái chín nhưng vẫn không đủ độ chín sinh lý và không nảy mầm.

4.2. CÔNG NGHỆ PHÔI VÔ TÍNH

4.2.1. Khái niệm về phôi vô tính

Trong tự nhiên, các loài thực vật bậc cao tự duy trì nòi giống thông qua sinh sản hữu tính. Sau khi thụ tinh, hợp tử phát triển thành phôi và

phôi đó được gọi là phôi hữu tính. Phôi hữu tính có tính chất phân cực rõ ràng tạo thành hai miền sinh trưởng: miền sinh trưởng rễ và miền sinh trưởng ngọn. Quá trình này mầm của hạt, cả hai miền sinh trưởng cùng đồng thời phát triển để tạo thành cây con. Nguồn dinh dưỡng ban đầu cung cấp cho hạt này mầm được huy động từ nội nhũ. Trong nhiều loại cây trồng, một loại phôi khác được hình thành từ tế bào soma hoàn toàn không qua thụ tinh, phôi đó được gọi là phôi vô tính hay phôi dinh dưỡng, phôi soma. Phôi vô tính cùng tồn tại với phôi hữu tính trong hạt của nhiều loài thực vật, chúng hoàn toàn giống với phôi hữu tính về hình thái, quá trình phát triển và sinh lý nhưng khác nhau về nguồn gốc di truyền. Như vậy có thể hiểu: phôi vô tính là một dạng phôi (thể tồn tại nội giống) được hình thành từ tế bào soma, không thông qua thụ tinh và có bản chất di truyền hoàn toàn giống với tế bào soma phát sinh ra nó. Ở các loài cây trồng mang hạt đa phôi (trong đó thường có một phôi hữu tính và một hoặc nhiều phôi vô tính), phôi vô tính thường phát triển rất mạnh và lấn át phôi hữu tính. Cơ quan nội nhũ nguồn dinh dưỡng chủ yếu cho phôi này mầm phát triển khá mạnh. Ở phôi vô tính, điều này lý giải vì sao ở cây mang hạt đa phôi, cây con mọc từ phôi vô tính chiếm tỷ lệ rất cao.

Năm 1968 hai nhà khoa học có tên là Street và Reinert phát hiện thấy rằng: trong quá trình nuôi cấy mô thực vật, một số mẫu nuôi cấy mô tế bào phân chia tế bào vô tổ chức tạo nên mô sẹo, nếu nuôi cấy mô sẹo trong môi trường dinh dưỡng thích hợp sẽ tạo ra các phôi vô tính. Hai nhà khoa học trên lần đầu tiên thành công tạo ra phôi vô tính từ tế bào đơn cây cà rốt.

Phôi vô tính tạo ra bằng nuôi cấy mô tế bào xét về mặt hình thái hoàn toàn giống với phôi hữu tính và phôi vô tính trong tự nhiên, điểm khác biệt duy nhất là chúng không có nội nhũ, cho nên nếu gieo cấy trong điều kiện bình thường phôi sẽ không hoặc rất khó khăn để phát triển thành cây hoàn chỉnh.

Việc nuôi cấy phôi vô tính đóng vai trò rất quan trọng, có thể tạo ra quần thể cây con đồng nhất về hình thái và mặt di truyền, hệ số nhân giống cao, có khả năng công nghiệp hoá để sản xuất một số lượng lớn.

4.2.2. Quy trình tạo phôi vô tính

Bước 1: Chọn mẫu và nuôi cấy mẫu trên môi trường tạo phôi

Mẫu chọn nuôi cấy phải xử lý vô trùng, có nhiều mẫu khác nhau được sử dụng để nuôi cấy tạo phôi tùy từng loại cây trồng. Về mặt lý thuyết, hầu hết các bộ phận cây (ngoại trừ phần gỗ và tế bào đã chết) đều có thể được sử dụng nuôi cấy tương tự như nhân giống *in vitro*. Tuy nhiên muốn xác định được loại mẫu nuôi cấy thích hợp nhất cần phải qua thực nghiệm. Ví dụ kết quả thực nghiệm cho thấy, đối với cây đu đủ, mẫu nuôi cấy tốt nhất là phần thân non của mầm hạt. Đối với cây cà phê, mẫu nuôi cấy tốt nhất là lá bánh tẻ...

- Sau khi vô trùng mẫu, mẫu được cắt thành các phần nhỏ, nuôi cấy trên môi trường tạo phôi (môi trường tạo phôi chủ yếu dựa vào MS với một chút ít thay đổi về thành phần và nồng độ tùy thuộc vào từng loại mẫu).

- Nuôi cấy mẫu trong các bình tam giác nhỏ, nhiệt độ nuôi cấy từ 27-30 độ. Điều kiện ánh sáng thích hợp với từng loại mẫu. Ví dụ mẫu cây là thân non của hạt đu đủ, có thể nuôi trong điều kiện bóng tối, mẫu cây là lá cà phê thì cần cường độ chiếu sáng là 300 lux với thời gian chiếu sáng từ 8-10 h/ngày. Thời gian xuất hiện phôi vào khoảng từ 4-8 tuần tùy từng loại cây trồng và tùy từng mẫu.

Bước 2: Nhân nhanh

Kết thúc bước 1 có thể đưa phôi nuôi cấy trong môi trường tạo chồi, rồi để tạo cây hoàn chỉnh. Trường hợp muốn nhân nhanh tạo một số lượng lớn các phôi đồng nhất, cần thiết phải đưa phôi sang bước 2 để nhân nhanh.

Các cụm phôi mọc từ mẫu nuôi cấy có thể dễ dàng phát hiện qua màu sắc và hình thái, phôi thường có màu trắng đục, hình cầu, hình trái tim hoặc ở dạng hạt. Đưa cụm phôi sang môi trường nhân nhanh giống như môi trường ở bước 1 nhưng môi trường ở trạng thái lỏng. Giai đoạn này nhất thiết phải giữ phôi ở trạng thái chuyển động bằng máy lắc. Phôi được chuyển động trên máy lắc vận tốc từ 60 -80 vòng trên phút. Thời gian ở bước 2 có thể từ vài ngày đến một tuần hoặc nhiều hơn tùy thuộc vào nhu cầu về số lượng phôi cần có. Ở trạng thái chuyển động, phôi sau khi hình thành được tách rời khỏi khối tế bào mẹ đi vào dung dịch giống như bào tử nấm phát tán trong nước. Do đó phôi nhận được dinh dưỡng nhiều hơn, sinh sản nhanh hơn và đồng đều hơn. Trong quá trình phôi phân chia tạo thành phôi mới, có thể chọn lọc các phôi có kích thước phù hợp (không

quá lớn hoặc quá nhỏ) bằng cách lọc dung dịch nuôi cấy chứa phôi qua lưới lọc có kích thước phù hợp. Như thế sẽ giúp tạo được quần thể cây con đồng đều sau này.

Bước 3: Tái sinh phôi thành cây hoàn chỉnh.

Chuyển phôi sang môi trường tái tạo chồi và ra rễ để phát triển thành cây hoàn chỉnh. Thành phần cơ bản của môi trường tạo chồi và tạo rễ giống như môi trường MS nhưng phải thay đổi tỷ lệ, nồng độ chất kích thích sinh trưởng phù hợp với từng loại cây trồng.

Cũng có thể tạo phôi vô tính từ tế bào trần dạng huyền phù, các bước tiến hành tương tự nhưng nuôi cấy trên môi trường lỏng.

4.2.3. Ứng dụng của phôi nhân tạo

- Sản xuất hạt nhân tạo
- Nhân giống vô tính ở mức độ công nghiệp.
- Ứng dụng trong bảo quản nguồn gen *in vitro*.
- Ứng dụng trong chuyển gen ở thực vật...

4 2.3.1 Nghiên cứu sản xuất hạt nhân tạo

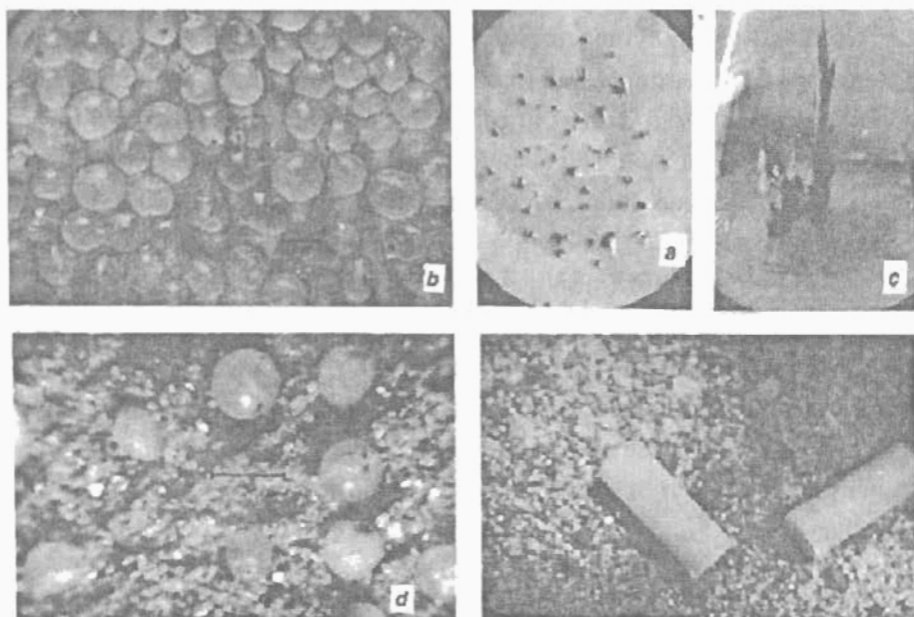
Murashige là người đầu tiên đề xuất khái niệm hạt nhân tạo tại Hội thảo quốc tế lần thứ IV về Nuôi cấy mô và tế bào năm 1978.

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 gồm (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 amonitium 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)



Hình 4.1. Hạt nhân tạo cây cà phê

- 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).

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

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

Có nhiều loại polymer tự nhiên đã được thử nghiệm dùng cho công nghệ phôi vô tính, trong đó alginate được coi là tốt nhất. Alginate là một polymer sinh học, được chiết từ rong biển mà chủ yếu là các loài thuộc chi *Sargassum*. Alginate do các phân tử manuronic acid gắn với nhau tạo thành, giống như các phân tử glucose tạo nên cellulose. Đặc điểm quan trọng nhất của alginate là chúng ở dạng hòa tan trong nước khi kết hợp với các ion hóa trị một (monovalent) như: Na^+ , K^+ , NH_4^+ ... và lập tức chuyển sang dạng không tan trong nước khi kết hợp với các ion hóa trị hai (divalent) hoặc đa hóa trị (polyvalent) như: Ca^{2+} , Mg^{2+} , Al^{3+} , ... Nếu nhỏ một giọt dung dịch sodium alginate vào dung dịch CaCl_2 thì sodium alginate ở phần diện tích ngoài của giọt sẽ chuyển hóa ngay thành calcium alginate và tạo nên một màng không thấm nước. Các viên alginate được hình thành.

* Nghiên cứu áo bao hạt nhân tạo

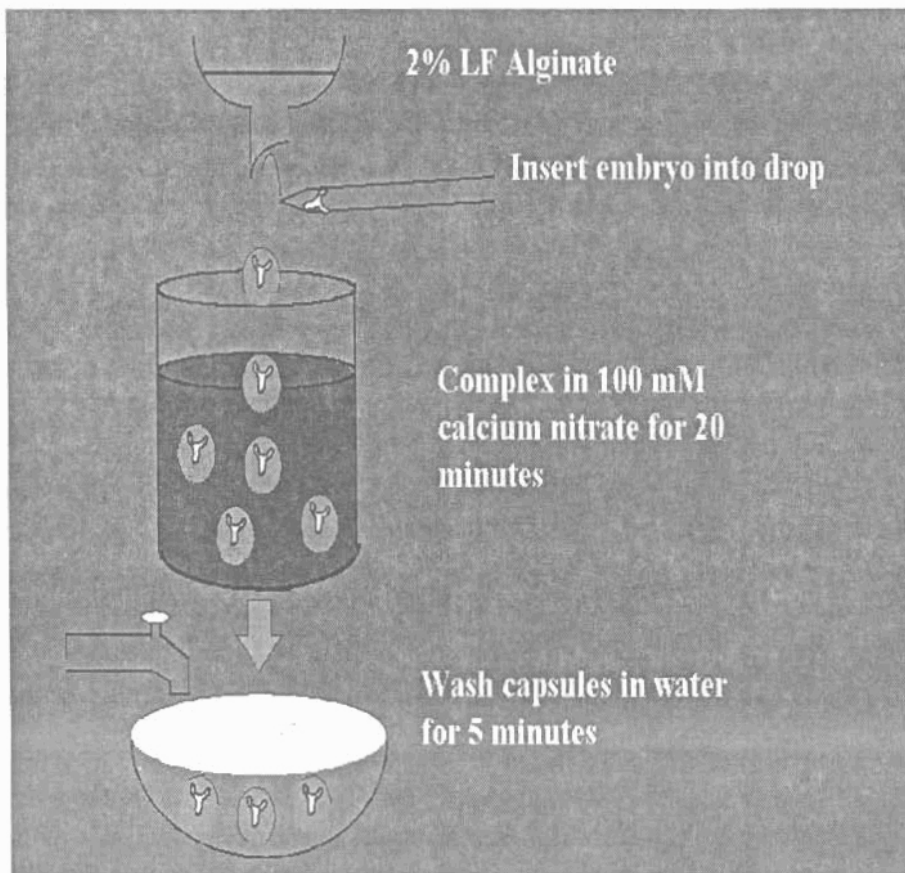
Những nghiên cứu hạt giống nhân tạo bắt đầu 1985, Drew (1979) tạo hạt có chứa phôi bằng nhiều giọt và tái sinh thành cây khi đưa vào môi trường không có carbohydrate, Kitto (1981) bao phôi hay từng cụm tế bào. Redenbang (1986) thành công khi dùng các giá thể hòa tan trong nước như Ca-alginate hay Na-alginate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

Dùng hệ thống SEM hay tia X nghiên cứu cấu tạo của hạt tự nhiên cho thấy có 3 lớp: lớp nhu mô giậu, lớp chịu áp lực và lớp nhu mô mềm. Ba

lớp này được cấu tạo bởi K, Ca, S và P... Nhiều chất liệu đã được nghiên cứu để có thể tạo ra lớp vỏ hạt tương tự như trong tự nhiên.

*** Bao hạt và làm khô hạt nhân tạo**

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



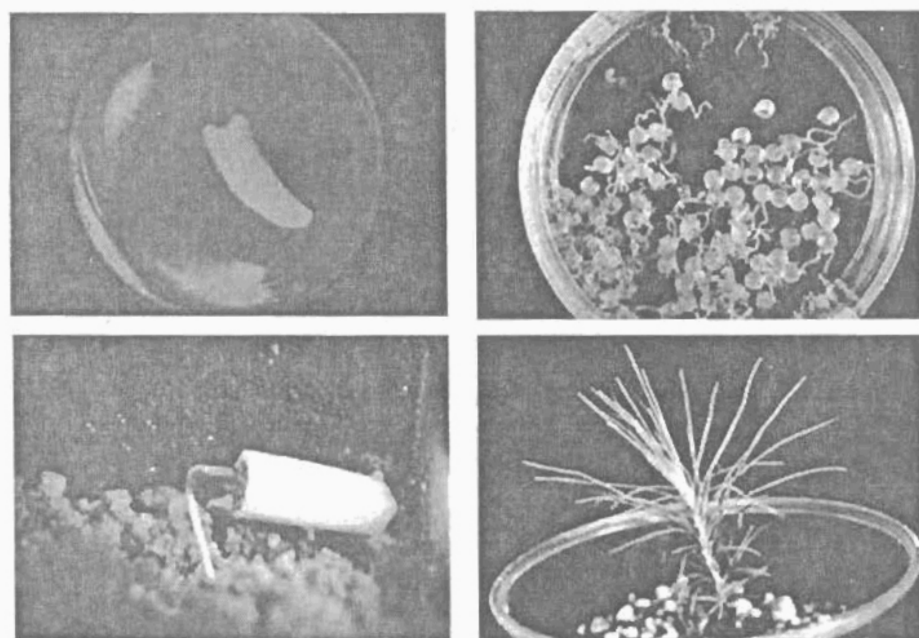
Hình4.2. Qui trình bao hạt bằng Na- alginate

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 4.3. Nhân giống cây thông bằng hạt giống nhân tạo

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

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

- Phôi được nuôi cấy kéo dài trong dung dịch lỏng, tế bào mất khả năng tái sinh.

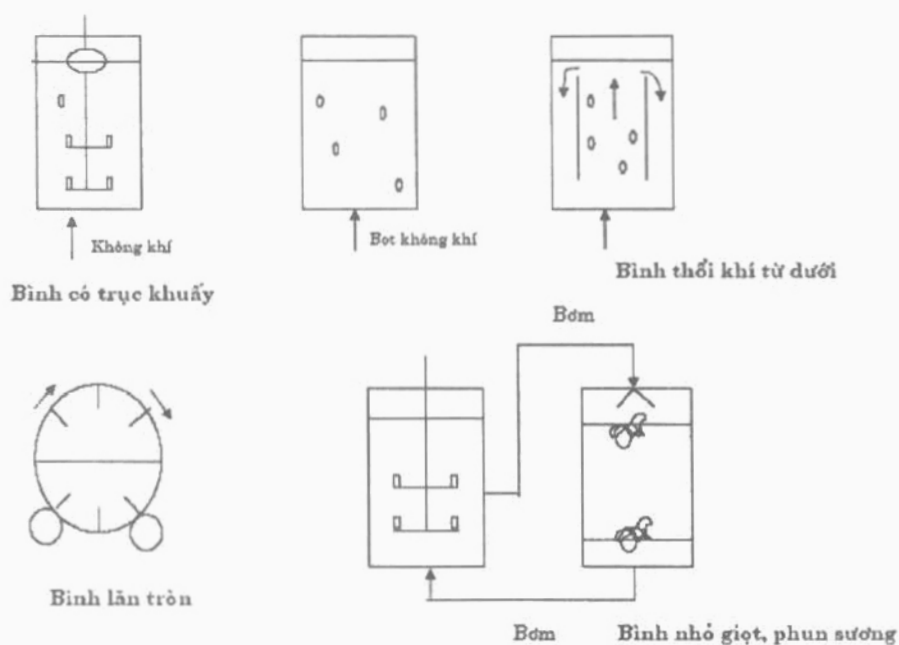
- Vật liệu dung để tạo vỏ bao có khả năng trao đổi khí và cung cấp dinh dưỡng.

* Hệ thống cấy chuyển hạt nhân tạo

Ngày nay hầu hết các hệ thống tái sinh phôi đều yêu cầu những bước trung gian trước khi tái sinh thành cây hoàn chỉnh và cấy chuyển ra ruộng. Speigel (1984) phát triển một hệ thống nuôi cấy tái sinh Citrus đòi hỏi phải 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 xoma phát triển thành cây đạt yêu cầu nuôi cấy trên vườn ươm.

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

Công nghệ bioreactor đã được ứng dụng trong sản xuất tế bào quy mô lớn để chiết rút được chất chống ung thư. Các bioreactor quy mô trên 20.000 lít đã được sử dụng trong sản xuất công nghiệp ở một số nước (Robert and Shuler, 1997). Hai nhà khoa học Nhật Bản Takayama và Misawa là những người đầu tiên công bố việc sử dụng bioreactor vào nhân giống thực vật. Kỹ thuật nhân giống này sau đó đã được áp dụng cho hàng loạt cây trồng như khoai tây, Liliun (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 cò 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 4.4. Một số dạng Bioreactor

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

Chương 5

CÂY ĐƠN BỘI VÀ ỨNG DỤNG PHƯƠNG PHÁP NUÔI CÂY MÔ TRONG TẠO CÂY ĐƠN BỘI

5.1. VẤN ĐỀ ĐƠN BỘI Ở THỰC VẬT

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

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

Năm 1964, lần đầu tiên trên thế giới, hai nhà khoa học Ấn Độ Guha và Maheshwari thành công trong việc tạo cây đơn bội từ nuôi cấy bao phấn *in vitro* cây cà *Datura innoxia*. Ngay sau đó, cây đơn bội đã được tạo ra bằng nuôi cấy bao phấn ở hàng loạt cây trồng khác nhau. Các nhà khoa học đã tìm ra những yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến thành công của quá trình nuôi cấy như ảnh hưởng của kiểu gen, giai đoạn phát triển của hạt phấn và các điều kiện môi trường nuôi cấy. Ngoài nuôi cấy bao

phần, các nhà khoa học còn có những thành công rất lớn trong nuôi cấy noãn chưa thụ tinh, nuôi cấy hạt phấn tách rời. Kỹ thuật tạo cây đơn bội *in vitro* thông qua kích thích tiểu bào tử hoặc đại bào tử trong nuôi cấy hạt phấn và noãn cho phép tạo ra nhanh chóng hàng loạt cây đơn bội, phục vụ đắc lực cho mục đích nghiên cứu di truyền và tạo giống cây trồng.

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

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

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

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

- Bao phấn, hạt phấn tách rời, cụm hoa (phương pháp này hay được áp dụng cho những loài có hoa nhỏ).

- Cừu phối sau lai xa. Khi lai xa giữa hai loài lúa mạch *Hordeum vulgare* và *H. bulbosum*, quá trình thụ phấn phối đơn bội xảy ra do nhiễm sắc thể của *H. bulbosum* bị loại trừ, nhưng nội nhũ của phối đơn bội lại không phát triển. Sử dụng phương pháp nuôi cấy phối đã cứu được những phối 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 trình 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 *et al.*, 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.

5.2. PHƯƠNG PHÁP TẠO THỂ ĐƠN BỘI *IN VIVO*

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

5.2.1. Sinh sản đơn tính cái (gynogenesis)

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

5.2.2. Sinh sản đơn tính đực (androgenesis)

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

5.2.3. Sự đào thải hệ gen bằng lai xa

Hiện tượng này xảy ra khi lai khác chi và khác loài do sự đào thải chọn lọc của một trong những hệ gen của bố mẹ trong quá trình phát triển sau khi thụ tinh. Ví dụ, 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*.

5.2.4. Sự giao phối không hoàn toàn (semigamy)

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

5.2.5. Xử lý hóa chất

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

5.2.6. Shock nhiệt

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

5.2.7. Ảnh hưởng của chiếu xạ

Tia X hoặc ánh sáng UV gián tiếp can thiệp làm đứt gãy nhiễm sắc thể và đảo thái chúng, tạo ra các thể đơn bội. Nhìn chung, các phương pháp *in vivo* có hiệu suất sản xuất cây đơn bội thấp. Các phương pháp *in vitro* cho hiệu quả cao hơn nhờ kỹ thuật nuôi cấy hạt phấn (pollen culture) hoặc nuôi cấy bao phấn (anther culture) ở khoảng 250 loài và loài lai. Các loài đặc trưng của họ Solanaceae cho kết quả tốt hơn cả, mặc dù ở các họ Cruciferae, Poaceae, Ranunculaceae và một số họ khác cũng có khả năng cảm ứng tạo cây đơn bội bằng sinh sản đơn tính bao phấn hoặc từ nuôi cấy hạt phấn phân lập.

5.3. PHƯƠNG PHÁP TẠO ĐƠN BỘI IN VITRO

5.3.1. Kỹ thuật nuôi cấy

Nuôi cấy hạt phấn: Nuôi cấy hạt phấn thành công đầu tiên vào năm 1950 đối với hạt phấn cây khế từ, ở đáy ống phấn và tế bào sinh sản tạo thành mô sẹo.

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

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

Có 3 phương thức nuôi cấy hạt phấn sau đây:

1. Nuôi cấy hạt phấn trưởng thành trên môi trường nửa cứng. Callus và cây con được phát sinh trực tiếp từ túi phấn
2. Nuôi cấy túi phấn trong môi trường nước, hạt phấn giải phóng ra ngoài, phôi, cây con tái sinh từ hạt phấn
3. Nuôi cấy hạt phấn non.

Kết quả thu được qua nuôi cấy túi phấn có thể là: mô sẹo, phôi, cây con. Nhiều khi trên cùng một thí nghiệm nuôi cấy một loại hạt phấn có thể thu được cả ba loại.

- Kết quả phụ thuộc vào giai đoạn phát triển của hạt phấn và trạng thái sinh lý của cây cho phấn. Nhìn chung tỷ lệ hạt phấn, túi phấn cho kết quả rất thấp, khoảng 1-2% số hạt phấn, túi phấn được cấy. Dĩ nhiên là tỷ lệ này phụ thuộc vào bản chất kiểu gene và các chất điều hòa sinh trưởng được bổ sung vào môi trường, nhất là nhóm cytokinin, BA, kinetin, hoặc nguồn carbon cung cấp, glucoza, maltoza...

Những môi trường chính sử dụng cho nuôi cấy túi phấn và hạt phấn được tập hợp trong hai nhóm

Nhóm 1 bao gồm muối khoáng, vitamin và đường. Thành phần môi trường này dùng chung cho cả hai giai đoạn: tạo mô sẹo và tái sinh cây con.

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

5.3.2. Phương thức tái sinh cây đơn bội

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

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*.

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*.

Sinh sản đơn tính hỗn hợp

Giai đoạn phát triển callus xảy ra rất ngắn và khó nhận biết

Ví dụ: Cà độc dược (*Datura*), Cà chua (*Lycopersicum*)

5.3.3. Các bước phát triển phôi của hạt phấn

Bình thường sau khi được giải phóng từ từ 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 này 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 tiêu bào tử vẫn là tiện lợi nhất.

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

Kết quả nuôi cấy bao phấn phụ thuộc cả vào kiểu gen lẫn điều kiện môi trường khi nuôi cấy.

a) Loài cây trồng và kiểu gen

Kiểu gen của cây cho bao phấn nuôi cấy có ảnh hưởng rất lớn đến kết quả nuôi cấy không chỉ trong phạm vi một chi mà còn khác nhau giữa các giống trong cùng một loài. Nuôi cấy bao phấn rất thành công trên cây thuốc lá, rồi từ đó kỹ thuật này được mở cho các loài cây khác, tuy vậy thu được các kết quả rất khác nhau. Nuôi cấy bao phấn các giống

lúa thuộc loài phụ Japonica (thậm chí cả trường hợp không cần xử lý lạnh trước) đều cho tỷ lệ thành cây cao hơn nuôi cấy các giống thuộc Indica. Ngay trong cùng một loài thì tỷ lệ hình thành mô sẹo và tái sinh cũng khác nhau. Trong quá trình nghiên cứu chúng tôi thấy rằng tỷ lệ hình thành mô sẹo ở con lai KimA/R278 là 3,75% trong khi đó tỷ lệ hình thành mô sẹo ở con lai Kim A/ R17 chỉ đạt 1,23%.

Theo Chen và Lin (1981) cho rằng tỷ lệ bao phần tạo callus, khả năng callus tái sinh thành cây, tỷ lệ cây xanh/cây bạch tạng và số lượng nhiễm sắc thể của cây tái sinh đều có liên quan đến kiểu gen của cây cho bao phần cấy. Điều này chứng tỏ khả năng nuôi cấy bao phần lúa cũng do gen điều khiển, Đối với những giống phản ứng tốt có thể chứa nhiều gen tác động nên quá trình này. Do vậy để tăng hiệu quả nuôi cấy người ta tiến hành lai tạo giữa những giống phản ứng tốt với những giống năng suất cao, chất lượng tốt. Đồng thời phải thay đổi điều kiện và môi trường nuôi cấy theo từng loại cây trồng, thậm chí cho từng giống cây trồng trong một loài.

h) Giai đoạn phát triển bao phần

Giai đoạn phát triển của hạt phần tại thời điểm tách rời ra và nuôi cấy cũng có ảnh hưởng rất quan trọng đến kết quả nuôi cấy. Rất nhiều loại cây trồng, tỷ lệ cho cây con cao nhất thường thu được khi nuôi cấy bao phần ở giai đoạn trước và sau phân chia bào tử lần đầu (hạt phần 1- 2 nhân, khi hạt phần hình thành không bào lớn, một nhân nằm ở một phía của bào tử), bao phần càng già thì tỷ lệ hình thành cây càng thấp và tỷ lệ cây bạch tạng lại tăng. Một số yếu tố khác hỗ trợ có thể gây lên sự thay đổi về giai đoạn phản ứng tối ưu, ví dụ đối với lúa giai đoạn phản ứng tốt tối ưu là trước và giữa giai đoạn hạt phần một nhân trong điều kiện nồng độ đường trong môi trường nuôi cấy tăng từ 6- 9% (Chen, 1978). Nếu không xử lý lạnh trước khi đưa bao phần vào môi trường nuôi cấy thì giai đoạn phản ứng tốt nhất là trước và giữa hạt phần một nhân, còn bào tử ở giai đoạn phân bào giảm nhiễm 1 và giai đoạn 2 nhân thì hoàn toàn không có phản ứng gì. Khi xử lý mầm hoa lạnh đột ngột ở nhiệt độ 7°C trong 7 – 10 ngày thì hạt phần ở giai đoạn hai nhân lại cho kết quả tốt hơn.



Hình 5.1. Lúa tái sinh từ bao phẩn trong dung dịch thuần dưỡng

Để xác định từng giai đoạn phát triển của hạt phẩn hiện có nhiều phương pháp khác nhau như nhuộm màu rồi soi kính hiển vi nhưng phương pháp đơn giản nhất là dựa vào khoảng cách giữa lưỡi lá đồng và lưỡi lá cạnh đồng. Khoảng cách giữa hai lá này từ 5 - 7 cm là cho kết quả nuôi cấy tốt nhất.

Ngoài ra người ta còn dựa vào màu sắc và kích thước hoa lúa và độ dài hạt phẩn so với vỏ trấu. Bằng kinh nghiệm tôi thấy rằng nên kết hợp cả hai biện pháp trên sẽ cho kết quả chính xác hơn.

c) Điều kiện sinh lý cây cho bao phẩn

Chen và Lin (1976), Chen và Tsay (1984) cho rằng bao phẩn nào được lấy ở những bông trổ sớm thì cho kết quả nuôi cấy tốt hơn bao

phần lấy ở bông trở muộn. Tỷ lệ tạo callus ở bao phần lấy ở nhánh cấp 3 thấp hơn nhánh cấp 1, nhánh cấp 2 và nhánh mẹ.

Bảng 5.1. Vị trí bông và khả năng tạo callus

Nguồn cho bao phần	Giống Tainung 67		Giống Tainan 5	
	Số bao phần nuôi cấy	Tỷ lệ bao phần tạo callus (%)	Số bao phần nuôi cấy	Tỷ lệ bao phần tạo callus (%)
Nhánh chính	856	42,8a	958	23.1a
Nhánh cấp 1	885	44,6a	749	22,4a
Nhánh cấp 2	892	40,6a	864	23,4è
Nhánh cấp 3	776	32,0b	889	16,0b

Môi trường tạo callus là MS có bổ sung 4mg/l NAA và 2mg/l Kinetin

Lý do bao phần từ nhánh cấp 3 cho hiệu quả nuôi cấy kém hơn có thể vì những nhánh này thiếu dinh dưỡng, tuy nhiên không có sự sai khác rõ rệt giữa những hoa ở các vị trí khác nhau trên cùng một bông. Ảnh hưởng của quang chu kỳ, cường độ chiếu sáng, nhiệt độ lúc trồng cây cho bao phần đã được nghiên cứu và cho kết quả thấy rằng có sự khác nhau rõ ràng giữa nuôi cấy bao phần lấy từ các cây trồng ở các tháng khác nhau trong năm. Theo Yeh và Tsay (1987) thì tỷ lệ phần trăm tạo callus của bao phần lấy từ cây trở từ tháng 4 đến tháng 12 biến động từ 27 đến 42%. Nếu bao phần lấy vào tháng 2 lúc nhiệt độ xuống 15 °C sẽ không có khả năng tạo callus. Biên độ và nhiệt độ đêm/ngày khi trồng cây cho hạt phần thấp 15°C/ 20°C có ảnh hưởng nghiêm trọng hơn là ở nhiệt độ cao 30°C- 35 °C, đặc biệt là ở giai đoạn sinh trưởng sinh thực, phân bào giảm nhiễm. Vì nhiệt độ thấp đã ức chế việc hình thành bào tử gây nên sự phân chia bất bình thường của lớp tế bào thành bao phần. Nhìn chung cây nào sinh trưởng khỏe, trong điều kiện môi trường tối ưu, có cường độ ánh sáng mạnh bao phần đó thường cho tỷ lệ thành cây cao. Theo Cowen và cộng sự (1992) cho rằng ở ngô có 2 cặp gen lặn chính tương tác với nhau và 2 gen phụ khác có tác dụng điều khiển phản ứng cho kết quả nuôi cấy hạt phần. Phân tích RFLP cho thấy hai gen chính này nằm trên nhiễm sắc thể số 3 và số 9. Từ kết quả nghiên cứu trên người ta đã nghĩ tới việc chuyển

các gen này vào các giống tốt để tăng hiệu quả của nuôi cấy bao phấn. Tuy nhiên, hướng tương lai không nên chọn những kiểu gen chuyên phản ứng chặt với nuôi cấy bao phấn.

d) Xử lý cây trước khi cho bao phấn

Vai trò xử lý mầm hoa ở nhiệt độ thấp đầu tiên được Nitsch và Noreel (1973) tiến hành đối với cây *Datura innoxia*. sau đó được nhiều tác giả khác khẳng định lại tác dụng của nó đến sự hình thành callus và cây con đã được nghiên cứu bởi một số tác giả về một số phương pháp xử lý.

Bảng 5.2. Ảnh hưởng của các điều kiện xử lý lạnh đến cấy bao phấn

Bộ phận xử lý	Nhiệt độ (°C)	Thời gian (ngày)	Tài liệu tham khảo
Bông	10	2	Wang và cộng sự (1974)
Bông	10 - 13	10 - 14	Genovesi và Magill (1979)
Bông	7	3	Chelef và Stolarz (1981)
Bao phấn đã được nuôi cấy	2 - 4	2	Cornejo - Martin và Primo- millo (1981)
Bao phấn đã được nuôi cấy	8	4	Hu et al (1978)
Bông	8	8	Zapata et al (1982)
Bông có lá cờ	10	10 - 15	Chen et al (1982)
Bông có lá cờ	8 - 10	7	Tsay và Chen (1984)
Bông có lá cờ	7 - 8	7	Lin và Tsay (1984)
	10	7 - 28	Tsay et al (1988)

Tất cả các phương pháp xử lý trên đều cho kết quả tốt, tuy nhiên tốt hơn cả là theo phương pháp của Genovest và Magill (1979) đã xử lý bông còn nằm trong bẹ lá ở nhiệt độ 10 hoặc 13°C trong 10 - 14 ngày. Tsay và Chen 1984. Lin và Tsay (1984) phát hiện ra rằng những hạt phấn được xử lý lạnh đột ngột 8- 10 °C trong 7 ngày tạo ra nhiều callus hơn 2 lần là không xử lý, tuy nhiên kết quả không khác biệt mấy khi xử lý lạnh bao phấn đã cấy trên môi trường. Thời gian xử lý lạnh dài 8 - 15 ngày tỏ ra

tốt hơn 2 – 4 ngày. Tuy nhiên nếu kéo dài quá trên 15 ngày lại ức chế quá trình hình thành callus (Chen và cộng sự 1982), ngược lại xử lý nhiệt độ quá thấp 4°C lại là nhiệt độ qua lạnh gây tổn thương tới cấu trúc tế bào, cấu trúc mô theo Lin và Tsay (1984). Tsay và cộng sự (1988) thì callus hình thành từ bao phần được xử lý lạnh sẽ tạo ra nhiều cây đơn bội và ít cây lưỡng bội hơn từ bao phần không xử lý lạnh. Điều kiện lạnh đã kích thích việc tạo callus sớm và khả năng tái sinh thành cây cao. Các giống khác nhau đòi hỏi điều kiện xử lý có khác nhau, trạng thái sinh lý và giai đoạn phát triển của hạt phấn cũng có ảnh hưởng đến kết quả của xử lý. Ngoài ra một số biện pháp xử lý khác như xử lý nhiệt độ cao, hoặc đặt bông lúa trong nước ở nhiệt độ trong phòng thấy cũng có ảnh hưởng.

Cơ chế xử lý lạnh

Theo nitsch(1974) thì nhiệt độ lạnh đã định hướng lại sợi tơ vô sắc trong phân bào nguyên nhiễm lần đầu. Kết quả tạo ra 2 bào tử hay 2 tế bào có nhân cân bằng, những bào tử này có khả năng tái sinh thành phôi cao hơn là những tế bào có nhân phát sinh và phát triển. Tuy nhiên nhiều tác giả khác (sunderland, 1980) lại phản đối giả thiết này trong trường hợp đối với lúa, vì cho rằng trước khi xử lý thì hầu hết các bào tử đã qua giai đoạn phân bào nguyên nhiễm lạnh. Ông giải thích có thể xử lý lạnh đã làm chậm quá trình hóa nâu của bào tử. Gần đây nhất người ta cho rằng xử lý lạnh không những làm ngừng hoạt động một số gen hoặc ức chế chức năng của sản phẩm gen (enzym chịu trách nhiệm phát triển giao tử). Những bào tử được xử lý ít phân hóa và chuyển thành hướng phát triển bào tử thể có 2 nhân cân bằng.

e) Thành phần môi trường

Môi trường nuôi cấy đóng vai trò rất quan trọng làm tăng hiệu quả nuôi cấy. Thành phần tối ưu của môi trường tùy theo cây trồng thậm chí tùy theo ca kiêu gen. Một số cây yêu cầu môi trường nuôi cấy rất đơn giản chỉ cần chứa đường và một số muối khoáng cần thiết là đủ, một số cây khác lại yêu cầu thêm cả auxin và cytokinin vào môi trường trên mới cho kết quả.

Nhiều nghiên cứu cho rằng nếu nồng độ ion NH_4^+ trong môi trường cao sẽ ức chế việc hình thành callus khi nuôi cấy bào tử đại mạch. Chu và cộng sự (1975) lại đề xuất khi nuôi cấy bao phần lúa nên dùng môi trường

N6 chứa nồng độ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ thấp và KNO_3 cao. Thường môi trường có hàm lượng nitrat cao và amoniac giảm như môi trường B5 và LS, sẽ cho kết quả thành công hơn.

Người ta thấy rằng những bông lúa được xử lí ở nhiệt độ 8°C trong một tuần sau đó tách lấy bao phấn, rồi nuôi cấy trong môi trường chứa thành phần muối vô cơ của N6 còn chất hữu cơ của MS có bổ sung NAA và kinetin sẽ thu được tỷ lệ hình thành callus tăng gấp 4 lần so với nuôi cấy trong môi trường MS. Yeh và Tsay (1988) phát hiện rằng muối vô cơ của môi trường N6 có tác dụng làm chậm quá trình chuyển màu nâu và tăng cường sự sinh trưởng của callus bao phấn so với nuôi cấy trên môi trường MS.

Nồng độ đường cao đã kích thích việc tạo thành cây trong nuôi cấy bao phấn của nhiều loài cây trồng đặc biệt đối với cây họ Gramineae. Đối với lúa, nồng độ đường tối ưu theo các tác giả khác nhau có khác nhau. Theo Chen (1978) thì tỷ lệ phối hợp giữa 6% đường trong môi trường tạo callus và 3% trong môi trường tái sinh cây sẽ cho tỷ lệ tạo callus và cây xanh cao. Tuy nhiên một số báo cáo khác lại cho rằng 6% đường là hơi cao lên giảm xuống còn 4 - 5%. Lí do tại sao phải cần nồng độ đường cao vẫn chưa rõ, xong điều chắc chắn là đường đã làm tăng áp suất thẩm thấu trong môi trường và kích thích quá trình phân hóa hạt phấn ở những giai đoạn phát triển của bào tử nuôi cấy.

Chất kích thích sinh trưởng có ảnh hưởng lớn đến kết quả nuôi cấy. Auxin, Cytokinin và abscisic rất cần thiết cho việc tạo callus. Kỹ thuật chuyển tiếp 2 lần cho thấy kết quả cấy lần một trong môi trường có ABA và 2 lần có kinetin sẽ cho tỷ lệ và tái tạo thành cây cao (Inue và Maeda 1981). 2,4 D và NAA có tác dụng tạo callus nhưng những callus này lại khó tạo thành cây so với môi trường chỉ cho thêm NAA, nồng độ NAA tối ưu để tạo callus khoảng 2mg/l , ở nồng độ này làm quá trình tạo callus và tái tạo thành cây tăng nếu như tăng nồng độ kinetin, tuy nhiên nồng độ kinetin không nên cao quá 2mg/l vì sẽ làm tăng tỷ lệ cây bạch tạng. Tỷ lệ phối hợp tối ưu là 2mg/l NAA và 1mg/l Kinetin.

Với các chất hữu cơ khác cũng có tác dụng tốt đối với nuôi cấy bao phấn hàng thực nghiệm tôi thấy rằng nếu bổ sung thêm vào môi trường nuôi cấy bao phấn một lượng khoai tây thì tỷ lệ callus tăng nên nhiều lần so với không bổ sung khoai tây.

Agar và than hoạt tính

Thời gian đầu các nhà khoa học cho rằng nuôi cấy bao phấn trên môi trường lỏng tốt hơn môi trường đặc nguyên nhân do môi trường lỏng thì khả năng tiếp xúc của bao phấn với chất dinh dưỡng trong môi trường tốt hơn và những chất ức chế do bao phấn tiết ra khi nuôi cấy dễ dàng bị rửa sạch hơn. Nhưng sau đó Horner và Pratt (1979) đã phát hiện ra rằng mật độ bao phấn đặt trên môi trường là nhân tố quan trọng ảnh hưởng tới kết quả nuôi cấy. Việc phát triển kém của bao phấn trên môi trường đặc là do sự có mặt của các chất ức chế sinh trưởng trong bản thân agar và nếu lọc agar bằng than hoạt tính trước khi sử dụng hoặc thêm than hoạt tính trực tiếp vào môi trường nuôi cấy theo agar sẽ kích thích bao phấn phát triển (Nakamura và Itagaki 1973), than hoạt tính không chỉ hấp thu chất ức chế do bao phấn thải ra, những chất có sẵn trong agar mà còn hấp phụ cả những hormone thực vật và cả những chất khác trong môi trường. Vì vậy mà một số loài cây trồng cần chất kích thích sinh trưởng thì khi nuôi cấy chúng ta không nên cho than hoạt tính vào môi trường nuôi cấy.

f) Điều kiện nuôi cấy

Theo Maheshwari và cộng sự (1980) thì ánh sáng và nhiệt độ đóng vai trò quan trọng đến sự phát triển của bào tử. Đối với lúa có thể từ tối hoàn toàn đến chiếu sáng liên tục trong suốt quá trình nuôi cấy. Một thí nghiệm so sánh giữa điều kiện tối hoàn toàn và chu kỳ 16 giờ sáng (2000 lux)/8 giờ tối cho thấy điều kiện tối có ảnh hưởng tốt đến việc hình thành callus. Mặc dầu ánh sáng không cần thiết cho việc hình thành callus nhưng quá trình tái sinh cây phải cần ánh sáng và người ta gợi ý nên đề cường độ ánh sáng ở giai đoạn tái sinh cây cao hơn ở callus. Ánh sáng xanh (475nm) và đỏ 630nm có ảnh hưởng rất tốt đối với nuôi cấy bao phấn ngô.

Nhiệt độ nuôi cấy bao phấn lúa thường từ 25 đến 30°C, trong ngưỡng này phản ứng của bao phấn tăng khi nhiệt độ tăng tuy nhiên kèm theo cả tỷ lệ cây bạch tạng cũng tăng. Wang và cộng sự kết luận rằng việc hình thành cây xanh hay cây bạch tạng chủ yếu do nhiệt độ bắt đầu phát triển bào tử chứ không phải ở pha phân hóa callus. Đối với lúa mì thì tỷ lệ tạo cây xanh được tăng lên nếu chuyển phôi nuôi cấy hạt phấn từ nhiệt độ 27°C xuống 5°C. Vì vậy mà Chen và cộng sự (1982, 1993) đã đề xuất đối với lúa nên nuôi cấy ở nhiệt độ thấp hơn một chút từ 20 đến 25° sẽ thuận lợi hơn cho quá trình tái sinh cây.

g) Thành bao phấn

Có rất nhiều bài báo nêu vai trò của thành bao phấn ảnh hưởng đến kết quả kích thích việc tạo cây đơn bội trong nuôi cấy bao phấn. Ở cây thuốc lá, những bao phấn đang chuyển màu nâu ở thời kỳ cuối của giai đoạn nuôi cấy có tiềm năng để hình thành phôi hơn là những bao phấn chuyển thành màu nâu sớm. Tỷ lệ phần trăm của những bao phấn chuyển nâu trong hai tuần đầu nuôi cấy rất thấp. Trong khi đó tỷ lệ này cao đối với những bao phấn sống dài hơn (Tsay 1982). Hiệu quả của quá trình hóa nâu cũng cũng xảy ra đối với nuôi cấy bao phấn lúa. Tsay cho biết, nồng độ chất khử trùng cao và thời gian khử trùng dài đã làm tăng quá trình hóa nâu và làm giảm quá trình hình thành callus. Chiều hướng này cũng xảy ra đối với nuôi cấy bao phấn của tổ hợp lai Japonica và Indica. Nguyên nhân của sự giảm khả năng hình thành callus là do quá trình nâu hóa bao phấn sớm, có thể đã tạo ra hợp chất quinon, một chất độc đối với bào tử. Rất nhiều bài báo khác đều cho rằng kết quả này là do hoạt động của một số nhân tố nằm trong thành bao phấn. Pilletier và Hami (1972) cho rằng mô thành bao phấn có chứa những điều kiện cần thiết để hạt phấn phát sinh thành phôi trong những ngày đầu nuôi cấy khi mà chúng chưa thể tự phân hóa được. Vậy chức năng của thành bao phấn trong nuôi cấy là gì?

Pelletier và Hami (1972) cho rằng, có một nhân tố kích thích nào đó được sinh ra từ thành bao phấn đã kích thích hạt phấn phát sinh phôi. Theo Dunwell (1976) thì sự cân bằng về hormone trong thành bao phấn đóng vai trò quan trọng cho quá trình phát triển của phôi thuốc lá. Mii (1976) lại chỉ ra rằng thành bao phấn đã bị nâu có ảnh hưởng xấu đến hạt phấn, làm cho nó không qua được giai đoạn khủng khoảng để chuyển sang giai đoạn phân hóa phôi. Tsay và cộng sự (1986) lại chứng minh rằng mô biểu bì (epidermis) và nội bì (endothecium) của bao phấn nuôi cấy có thể tích lũy và vận chuyển lipid và polyacchyrines cho bào tử ở những giai đoạn nhất định trong thời kỳ nuôi cấy. Tsay và cộng sự (1981) phát hiện ra rằng lớp tế bào tầng nuôi (tapetum) phát triển tốt là yếu tố quan trọng để tạo phôi đơn bội thuốc lá. Sunderland và Roberts (1977) lại cho rằng khi lớp tế bào tapetum phân rã có thể cung cấp dinh dưỡng cho bào tử phát triển thành phôi. Kohlenbach và cộng sự (1978) đã chứng minh rằng trong nuôi cấy bao phấn thuốc lá, vật chất của tapetum đã có tác dụng tốt cho sự phát triển của bào tử phân lập. Người ta cho rằng lớp tapetum đã cung cấp dinh dưỡng cho bào tử phát triển trong cây. Moss và Heslop - Harrison

phát hiện ra rằng tế bào tapetum có ích bởi vì việc tổng hợp ADN xảy ra nhanh ở tế bào đa bội hơn là tế bào nhị bội do vậy chúng có thể sử dụng như là nơi dự trữ ADN khi mà nhu cầu đột xuất tăng lên. Điều này có thể do thành bao phấn đã cung cấp ADN và một số vật chất khác cho tế bào sinh sản để nhận nhanh những tế bào cần thiết. Bởi vậy biện pháp để duy trì bao phấn lúa nuôi cấy còn tươi lâu đến tận khi bào tử có thể tái sinh là khâu quan trọng để nuôi cấy bao phấn thành công.

Trong nuôi cấy bao phấn một số quá trình nào đã làm giảm tối thiểu sự oxy hóa phenol có thể sẽ làm tăng một cách đáng kể khả năng tạo callus. Do vậy người ta đề xuất bằng cách lên dim bao phấn vào môi trường lỏng có bổ sung chất chống oxy hóa vào tuần đầu thứ hai của nuôi cấy. Trong buồng nuôi cấy không nên để nhiệt độ quá cao vì sẽ làm tăng quá trình oxy hóa phenol. Duy trì nuôi cấy trong điều kiện tối có lợi vì chiếu sáng đã kích thích để tạo phenol.

h) Quá trình phân hóa callus

Khả năng hạt phấn phân hóa thành cây phụ thuộc rất nhiều vào chất lượng callus trước khi nó được cấy chuyển sang môi trường tái sinh cây. Bởi vậy những yếu tố ảnh hưởng đến việc hình thành callus có ảnh hưởng quan trọng đến quá trình tái sinh cây. Chen và cộng sự (1986) cho rằng callus nào được tạo thành sớm sau 30-50 ngày đặt cấy bao phấn thì có khả năng tạo thành cây xanh cao, vì những callus hạt phấn thường mất khả năng phát sinh hình thái rất nhanh trong quá trình nuôi cấy, Do vậy Oono (1975) và Chen (1977) đề xuất cần chuyển callus sớm sang môi trường tái sinh. Thời gian cấy chuyển tốt nhất là sau khi callus được hình thành 15 ngày.

5.3.5. Những tồn tại trong nuôi cấy bao phấn tạo cây đơn bội

- *Khả năng ứng dụng chưa cao:*

Mặc dù việc nuôi cấy bao phấn (hạt phấn) để tạo thành cây đơn bội đã áp dụng thành công trong lĩnh vực chọn tạo giống của một số loại cây trồng. Nhưng nuôi cấy bao phấn hiện nay vẫn chưa đáp ứng được yêu cầu to lớn của công tác giống cây trồng, vì kỹ thuật này mới thành công ở khoảng trên 30 loài của trên 20 chi. Điều nổi bật là thành công này mới chủ yếu ở các chi và loại thuộc họ cà (Solanaceae), họ cải (Brassicaceae) và hoà thảo (Gramineae).

Thời gian qua người ta đã tiến hành các thí nghiệm với quy mô lớn trên đối tượng cây trồng ngũ cốc thuộc họ hoà thảo, nhưng kết quả mới hạn chế ở lúa mì (Piquard, 1978) và lúa nước (Niiseki và Oono, 1971).

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

Đối với thuốc lá, môi trường dinh dưỡng để nuôi bao phấn rất đơn giản gồm muối khoáng và đường saccharose, không cần các chất hữu cơ khác và hooc mon sinh trưởng (Vasil và Nisch, 1975). Nhưng để nuôi cấy bao phấn lúa nước và lúa mì thành công, các tác giả Trung Quốc phải dùng thêm dịch chiết khoai tây còn có nhiều thành phần chưa được biết tới. Mặc dù vậy bao phấn các loại ngũ cốc được nuôi cấy cũng chỉ tạo mô sẹo, để có cây hoàn chỉnh phải tiến hành tạo chồi từ mô sẹo đó.

- 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 mô sẹo thì tỷ lệ cây bị bạch tạng chiếm khá cao (20 - 30% hoặc cao hơn nữa).

Tỷ lệ cây bạch tạng phụ thuộc vào:

a) Tuổi mô sẹo: Cây chuyển từ môi trường tạo mô sẹo sang môi trường tái sinh cây đơn bội. Càng cây chuyển muộn tỷ lệ bạch tạng càng cao.

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

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

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

5.3.6. Tính toán hiệu quả nuôi cấy đơn bội

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

a) Tỷ lệ bao phân tạo callus và phôi:

$$CR = \frac{NAC + NAE}{NA} \times 100$$

CR Tỷ lệ tạo mô sẹo tính theo %

NAC: Số bao phân (hạt phấn) có callus

NAE: Số bao phân (hạt phấn) có phôi

NA: Tổng số bao phân (hạt phấn) được cấy

b) Tỷ lệ bao phân có phôi (CE tính theo %):

$$CE = \frac{NAC + NAE}{NA} \times 100$$

NAC: Số callus

NAE: Số phôi

c) Năng suất tạo callus hay tạo phôi (PE):

$$PE = \frac{NAC + NAE}{NA}$$

Quan sát của nhiều tác giả cho thấy, dùng những cây mẹ có nguồn gốc từ nuôi cấy bao phân *in vitro*, để thu bao phân cho nuôi cấy tiếp theo thì năng suất tạo callus và tạo phôi tăng lên đáng kể.

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

5.4. ỨNG DỤNG CÂY ĐƠN BỘI

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

5.4.1. Nghiên cứu về phôi học thực nghiệm:

Chủ yếu trên các đối tượng mà phôi phát triển trực tiếp từ tiêu bào tử trong nuôi cấy bao phấn thông qua quá trình sinh phôi đơn tính (androgenesis).

5.4.2. Nghiên cứu tế bào học:

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

$$\begin{array}{rcccl}
 \text{Nicotiana tabaccum} & = & \text{N. sylvestris} & \times & \text{N. tomentosus} \\
 (2n = 28) & & (2n = 24) & \times & (2n = 24) \\
 & & (n = 12S) & (n = 12T) & \\
 & & \downarrow & & \\
 & & \text{Hợp bào} & & \\
 & & (2n = 12S + 12T) & & \\
 & & \downarrow & & \\
 & & \text{Lưỡng bội hoá} & & \\
 & & (4x = 24S + 24T) & & \\
 & & (= Bộ NST của cây thuốc lá trồng) & &
 \end{array}$$

Ví dụ: Nghiên cứu bộ nhiễm sắc thể cây thuốc lá (*Nicotiana tabaccum*) nhị bội người ta thấy có 48 NST, lúc phân chia giảm nhiễm chúng sắp thành 2 dãy, gọi là dãy S và dãy T. Mỗi dãy gồm 24 NST. Nuôi 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.

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

5.4.3. Nghiên cứu đột biến và di truyền

Trong bộ gene đơn bội không có quan hệ tính trội, lặn mà chỉ còn quan hệ bổ sung giữa các gene, vì vậy việc nghiên cứu chức năng và mối tương tác gene được đơn giản hoá đáng kể.

5.4.4. Cải thiện giống cây trồng

5.4.4.1. Tạo dòng thuần

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

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

- Cây tự thụ :

F1 : Aa

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

- Nuôi cấy đơn bội :

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

FDH : 1/2 AA và 1/2 aa

Nếu số locus là 10 thì tự phối cần 410 cá thể mới có một cá thể đồng hợp (DH) ở F2. Trong khi đó đơn bội chỉ cần 210 cây đã có một cá thể đồng hợp.

Nếu số locus là n thì đơn bội cho phép đồng hợp tử xuất hiện theo tần số $(1/2)^n$ và phương pháp cổ điển sẽ là $(1/4)^n$. Đưa thêm các hệ số:

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

P2: tần số nhị bội hóa thành công

$$E = \frac{P1 \times P2 \times (1/2)}{(1/4)}$$

Tỷ số này biểu thị kết quả so sánh giữa phương pháp đơn bội và phương pháp cô điển.

Nếu $E \geq 1$ phương pháp đơn bội hiệu lực hơn. Để được như vậy thì:

$$P1 \times P2 \geq (1/2)^n$$

n càng lớn thì $P1 \times P2$ càng nhỏ và như vậy hiệu lực của phương pháp càng lớn. Nhưng vì giữa các gen có sự liên kết với nhau cho nên phải tính:

$$P1 \times P2 \geq (1/2)^{(n+n')}$$

n' : biểu thị sự liên kết.

- Có thể thông qua tính toán để chọn phương pháp thích hợp. ví dụ: có 20 gen độc lập hoặc liên kết theo phương thức trội, siêu trội, bằng tính toán cho thấy phương pháp đơn bội có ưu thế khi:

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

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

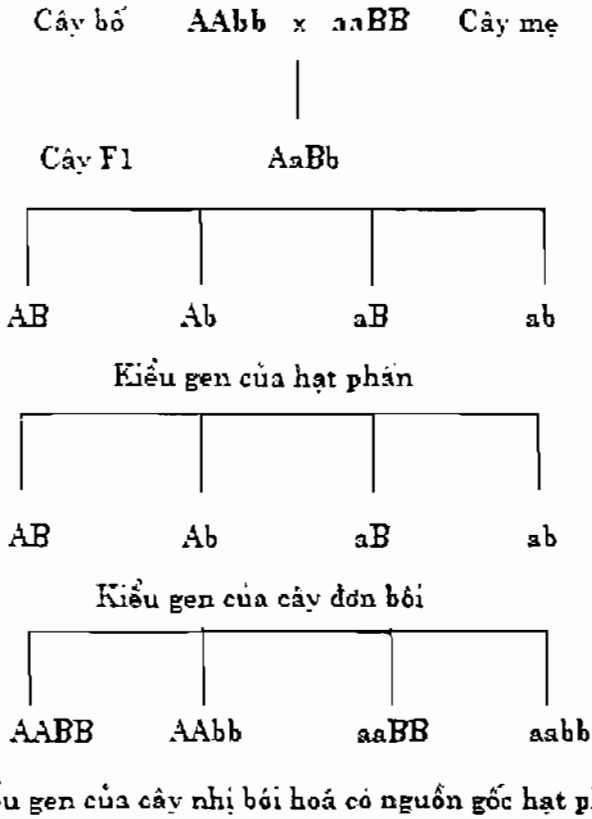
Ở những trường hợp tính di truyền không ổn định thì phương pháp đơn bội có hiệu quả hơn.

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

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

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

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 .



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 từ mong muốn ở các giống tự thụ phấn.

Bảng 5. 3 Các kiểu gen của cây F2

Kiểu gen GT đực / Kiểu gen GT cái	AB	Ab	aB	Ab
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 tử một gen đến n gen (các gen này không nằm trên cùng một nhóm liên kết) thì ở cây F₂ sẽ phân ly tính trạng theo bảng

Bảng 5.4. Sự phân ly tính trạng của cây F₂

n	2n	3n	4n
1	2	3	4
2	4	9	16
3	8	27	64
4	16	81	256
...
12	4.096	531.441	15.777.216
...

- n: Số gen có chứa các alen khác nhau ở hai nhiễm sắc thể đồng dạng.
 2ⁿ: Số giao tử khác nhau về hệ gen (genome); hoặc số kiểu gen đồng hợp nhân được ở F₂; hoặc số kiểu gen đồng hợp có thể nhận được bằng phương pháp tạo cây từ hạt phân ở F₂.
 3ⁿ: Số kiểu gen khác nhau nhận ở F₂.
 4ⁿ: 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: $X = 1/15.777.216$ (X là số dòng đồng hợp tử cần chọn) so với trường hợp cây từ hạt phân có thể thu được 4.096 dòng thuần khác nhau: thì xác suất là $X = 1/4.096$.

Ngoài ra, người chọn giống có thể dễ dàng phân biệt các kiểu gen khác nhau vì ở trạng thái đồng hợp, các đặc tính kiểu hình được biểu hiện rõ rệt. Như vậy, bằng phương pháp tạo cây từ hạt phân có thể rút ngắn thời gian và đơn giản hóa quá trình chọn giống.

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

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

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

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

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

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

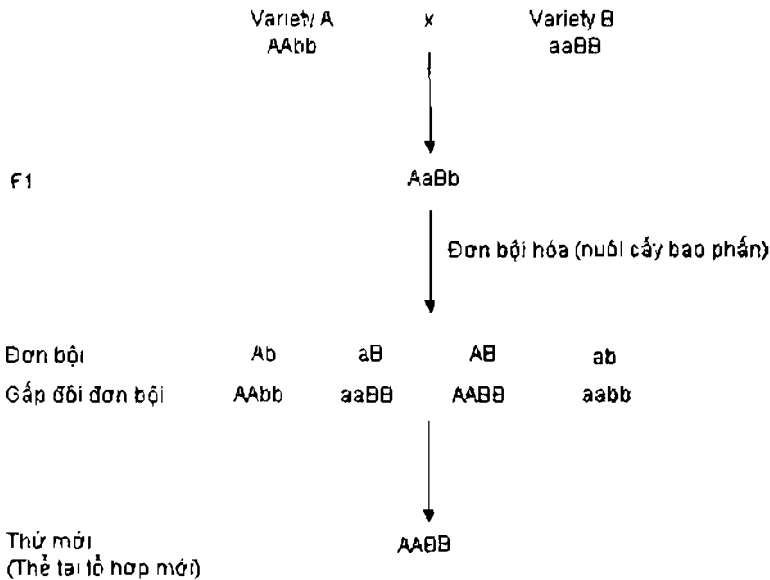
Phương pháp này dựa trên hiện tượng tự đa bội hóa của tế bào trong quá trình nuôi cấy *in vitro*. Lần đầu tiên Nitsch và cộng sự (1969) ứng dụng để nhận được cây thuốc lá nhị bội từ mô sẹo đơn bội. Sau đó nhiều nhà khoa học khác cũng ứng dụng phương pháp của Nitsch để nhận các dòng nhị bội đồng hợp tử (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 đã nhận được nhiều dòng đồng hợp từ các dòng lai (Đỗ Năng Vịnh và cs, 1979).

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

Kết quả nghiên cứu gần đây cho thấy một số giống lúa mặc dù đã được thuần hóa lâu năm và sinh sản bằng tự phối vẫn có thể tồn tại ở mức dị hợp tử nhất định. Đã nhận được các dòng lúa khác nhau từ hạt phấn của cùng một giống: giống cườm và giống 63 - 83. Nuôi cấy bao phấn giống cườm chúng tôi đã Bao phấn nuôi cấy *in vitro* Mô sẹo 1n, 2n, 3n, 4n, 5n. ... Cây 1n: Xử lý colchicine Cây 2n Cây đa bội khác nhận được một số dòng cườm khác nhau về chiều cao cây và thời gian sinh trưởng, có dòng cườm hạt có râu rất dài. Nuôi cấy bao phấn giống 63 - 83 chúng tôi đã nhận được dòng 63 - 83 lùn, ra hoa kết hạt bình thường, chiều cao cây chỉ bằng một nửa so với chính giống 63 - 83. Như vậy, bằng phương pháp tạo cây từ hạt phấn các dòng lai hoặc từ các giống thuần, người ta có thể nhận được các dòng đồng hợp tử khác nhau (do phân ly hoặc do đột biến). Các dòng này có thể làm nguyên liệu cho nghiên cứu di truyền chọn giống. Nhiều tác giả nước ngoài cũng thông báo nhận được kết quả tương tự. Các kỹ thuật giống cây trồng đơn bội thường bao gồm chỉ một chu kỳ tái tổ hợp giảm nhiễm. Tuy nhiên, nhiều phẩm chất nông học như năng suất được điều khiển bởi đa gen. Một chu kỳ tái tổ hợp thường không đủ cho sự cải thiện các tính trạng chất lượng như thế vì lẽ 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 thể 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 thể hệ.

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



Hình 5.2. Ứng dụng của hệ thống gấp đôi đơn bội F1 trong việc giải phóng các thể tái tổ hợp mới

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

Nuôi cấy và tái sinh cây từ các dạng đơn bội khác nhau (hạt phấn, tế bào đơn, tế bào trần, mô sẹo đơn bội) kết hợp với kỹ thuật đột biến và chọn dòng có thể cung cấp nguyên liệu quý cho nghiên cứu trao đổi chất và di truyền chọn giống. Vì tế bào đơn bội chỉ chứa một đơn vị gen nên kỹ thuật đột biến có thể làm thay đổi hoặc mất chức năng gen không có sự hỗ trợ của các alen khác. Các đột biến lặn do vậy cũng được biểu hiện ngay từ đầu. Bên cạnh đó cây nhị bội tái sinh từ các tế bào đơn bội sẽ hoàn toàn đồng hợp và không bị khảm như trong trường hợp xử lý đột biến các dạng nhị bội và đa bội. Bằng kỹ thuật gây đột biến các dạng đơn bội, có thể chọn ra các dòng tế bào và cây chống chịu độc tố do nấm và vi khuẩn gây bệnh tiết ra, các dòng tế bào và cây có đột biến sinh hóa hoặc các dòng tế bào có khả năng sản xuất một lượng lớn sản phẩm thứ cấp quan trọng như alkaloid, chất thơm, các loại nhựa và enzym sử dụng trong công nghiệp, y học. Người ta đã chọn ra các dòng tế bào chống chịu được các chất kháng sinh, độc tố nấm và vi khuẩn gây bệnh. Binding H., Binding K., và Straub J. (1970) đã nhận được mô sẹo chống chịu streptomycine

khi nuôi cấy *Petunia hybrida* đơn bội. Carlson (1973) cũng đã tạo được dòng tế bào chống chịu chất tương tự methionine (methionine analogue) là methionine sulphocimine, có cấu trúc gần với độc tố của vi khuẩn gây bệnh *Pseudomonas tabaci*. Cây từ dòng tế bào chống chịu này đã có khả năng chống bệnh tốt hơn cây bình thường. Maliga và cộng sự (1973) cũng công bố tạo được cây chống chịu streptomycine từ mô sẹo đơn bội thuốc lá.

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

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

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

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

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

5.4.4.6. 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

5.4.4.7. Thiết lập các dòng tế bào đơn bội và nhị bội của cây hạt phần

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

5.5. ỨNG DỤNG KỸ THUẬT ĐƠN BỘI TRONG TẠO DÒNG THUẦN Ở NGÔ, LÚA

5.5. 1. Cây lúa

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

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

- Cố định ưu thế lai thông qua việc rút ngắn thời gian tạo giống thuần chủng bằng phương pháp nuôi cấy bao phấn con lai F1
- Tạo dòng thuần có những đặc tính thích nghi với thụ phấn chéo và mang gen kết hợp rộng

Tại Viện Di truyền Nông nghiệp, phương pháp nuôi cấy bao phấn kết hợp với chọn dòng biến dị đã tạo ra 50 dòng bắt dục đực cảm ứng nhiệt độ (TGMS) mới, trong đó 5 dòng đã được xác định là có tính bắt dục ổn định, có ưu thế lai cao khi lai tạo và đang được sử dụng trong chọn giống lúa lai hai dòng.

Bằng phương pháp nuôi cấy bao phấn đã tạo ra 12 dòng giống thuần có ưu thế lai gần tương đương con lai F1. Các dòng giống có triển vọng gồm: DT26, DT29, DT32, J1, AC22, AC23, AC24, AC25... đang được khảo nghiệm. Nhờ nuôi cấy bao phấn lúa có thể rút ngắn thời gian chọn giống mới xuống từ 4 - 6 thế hệ. Kỹ thuật đơn bội *in vitro* cũng đang được triển khai mạnh trong chọn giống ở Viện lúa Đồng bằng Sông Cửu Long, Viện Công nghệ sinh học, vv...

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

- Cố định ưu thế lai và các gen hữu ích

Thông qua kỹ thuật nuôi cấy bao phấn, người ta có thể cố định ưu thế lai và các gen hữu ích từ con lai F1 có ưu thế lai cao, làm tăng năng suất lúa (M.S. Swaminathan, 1995; Chen cs., 1978; Narayanan cs., 1996;

Siddiq *cs.*, 1994; Rangasamy, 1994, 1996; Zhu De Yao, 1998). Nuôi cấy bao phấn lúa lai Indica/Indica đã thu được các dòng có năng suất cao hơn bố mẹ và bằng 93,2% so với con lai F1 (Batachandran *cs.*, 1994).

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

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

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

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

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

- Tối ưu hoá môi trường nuôi cấy bao phấn chọn tạo giống lúa hạt dài chất lượng cao:

Tại trường tổng hợp Louisiana (Mỹ), người ta đã xây dựng “Chiến lược chọn giống lúa hạt dài ưu việt cho miền Nam nước Mỹ” bằng nuôi

cây 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 chi thị phân tử (CTPT) để tạo dòng thuần và chọn dòng, giống mang gen kháng sâu bệnh:

Phương pháp chọn giống nhờ các chi 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 chi thị phân tử khắc phục được hạn chế của các phương pháp truyền thống, tiết kiệm công sức và rút ngắn đáng kể thời gian tạo giống mới. Nó đặc biệt có hiệu quả khi ta phải quy tụ nhiều gen (kể cả các gen lặn) vào một giống mà các phương pháp chọn dòng theo kiểu hình truyền thống gặp rất nhiều khó khăn, thậm chí đôi khi không thể thực hiện được.

Bệnh bạc lá gây ra bởi *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) là một trong các bệnh nguy hại nhất ở lúa. Người ta đã xác định được ít nhất 18 gen kháng bệnh bạc lá lúa (Konoshita, 1991). Gen kháng bạc lá Xa 21 là một gen trội, có nguồn gốc từ giống lúa dại *O. longistaminata* được chuyển vào các giống lúa Japonica (Song *cs.*, 1995) và các giống Indica (Tu *cs.*, 1998). Huang và cộng sự đã quy tụ bốn gen kháng bạc lá Xa4, Xa5, Xa13

và Xa21 vào giống lúa NH 56. Kết quả giống này đã tỏ ra kháng bệnh bạc lá tốt hơn so với giống IRBB21 chỉ mang một gen Xa21. Gen kháng bệnh đạo ôn ở lúa và số chủng nấm gây bệnh đạo ôn hết sức đa dạng. Konoshita (1991), Mackill và Bonman (1992) cho biết có 30 locus gen kháng đạo ôn ở lúa, trong đó 20 locus kháng bệnh chính và 12 locus chính không liên quan với nhau. Nhiều giống kháng bệnh đạo ôn đã được xác định và tạo ra như giống tẻ tếp của nước ta mang bốn gen kháng bệnh đạo ôn, giống 5173 chứa gen Pi- 2(t) kháng bệnh đạo ôn; giống IR20 có gen Pi-20, giống IR64 có gen Pi-20 và gen Pi-ta. Các giống này đã góp phần ngăn chặn bệnh đạo ôn ở nhiều nơi. Để phát triển các giống lúa chịu hạn, việc nghiên cứu các đặc điểm của rễ lúa: mật độ, độ sâu (Fukai và Cooper, 1995), khả năng điều tiết áp suất thẩm thấu là rất quan trọng. Việc lập bản đồ phân tử lúa liên quan đến các đặc điểm có lợi cho tính chịu hạn của rễ đã được tiến hành ở một số phòng thí nghiệm (Yadav *cs.*, 1997; Champoux *cs.*, 1995). Từ những công trình này, bước đầu đã xác định một số chi 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 chi 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 phần con lai F1, tạo ra dòng thuần với các đặc tính khác nhau
- Sử dụng kỹ thuật chi thị phân tử để chọn các dòng thuần mang gen kháng bệnh
- Khảo nghiệm các dòng thuần chọn lọc trong những điều kiện sản xuất khác nhau để chọn giống tốt, kháng bệnh.

5.5.2. Cây ngô

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

- Khả năng tái sinh cây từ bao phần và noãn nuôi cấy *in vitro* nói chung còn thấp và phụ thuộc rất nhiều vào kiểu gen (genotype). Một số giống có phản ứng trong nuôi cấy rất cao, nhưng hầu hết các giống đều có

phản ứng thấp hoặc không phản ứng. Hiệu quả tái sinh cũng đạt thấp, chỉ 3-5% phôi có thể tái sinh thành cây.

- Tần suất các cây đơn bội kép thu được từ nuôi cấy bao phần 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 phần, nhưng còn rất ít nghiên cứu theo hướng này.

Mặc dù vậy, kỹ thuật nuôi cấy bao phần 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).

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

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

5.5.2.2. Phát triển của hạt phấn trong nuôi cấy bao phần *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 phần *in vitro*, chỉ một tỷ lệ nhỏ các hạt phấn trải qua quá trình phát triển thể giao từ *in vivo* bình thường. Trong

những giờ đầu tiên của nuôi cấy bao phần các hạt phần bắt đầu trương lên, sau đó một phần lớn hạt phần bắt đầu chết. Trong tuần đầu tiên, tỷ lệ hạt phần sống sót giảm đi từ 80 - 90% xuống 10% thấp hơn (Pescitelli và cs, 1990). Trong số các hạt phần sống sót, một số hạt bắt đầu trải qua sự phân chia nguyên phân. Sau nhiều lần nguyên phân liên tiếp, các hạt phần phát triển thành các cấu trúc đa bào mà vẫn nằm trong vỏ hạt phần những cấu trúc này được gọi là “những hạt phần phát sinh phôi thuần túy” (Pace và cs 1992). Sau giai đoạn này các cấu trúc tế bào đa nhân tăng trưởng về kích thước và tách khỏi vỏ hạt phần. Các cấu trúc phát sinh phôi được tách ra hoàn toàn và được bao bọc bởi lớp tế bào ngoại vi. Cuối cùng là các cấu trúc tương tự phôi (embryo like structure ES) đa bào hình thành.

Nuôi cấy bao phần phải chọn đúng giai đoạn phát triển thích hợp của hạt phần để có thể thu nhận tỷ lệ tái sinh và số lượng cá thể tự nhi bội hoá (đồng đơn bội kép) cao. Giai đoạn nuôi cấy hiệu quả nhất là giai đoạn tế bào hạt phần từ tế bào đơn nhân sớm đến đầu giai đoạn hai nhân. Các hoa đực được tách khỏi cây cho bao phần (donor plants) khi phần lớn các hạt phần đang phát triển từ giữa đến cuối giai đoạn đơn nhân (mid- to late uninucleate stage). Thông thường các bao phần 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 phấn nuôi cấy. Các cấu trúc phôi này sau đó có khả năng phân chia tế bào và biệt hoá cơ quan hình thành cây hoàn chỉnh trong những điều kiện thích hợp.

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

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

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

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

Vào năm 1998, trên cơ sở các giống ngô CM2, CM8, Viện Di truyền Nông nghiệp đã hoàn thiện quy trình nuôi cấy bao phấn với tần số tái sinh cao (30-80%). Với quy trình này, thời gian tạo dòng thuần rút ngắn từ 5 - 8 thế hệ ngoài đồng ruộng xuống còn 8 tháng trong phòng thí nghiệm. Viện đã tiếp tục nghiên cứu áp dụng quy trình này để sản xuất các dòng thuần cho sản xuất. Các nghiên cứu tập đoàn ngô Việt Nam đã chỉ ra rằng: các giống ngô Việt Nam nhìn chung có phản ứng thấp trong nuôi cấy bao phấn, do đó cần phải cải tiến quy trình và nâng cao phản ứng của các giống ngô Việt Nam (Lê Huy Hàm, Đỗ Năng Vịnh và cs, 1995, 1996, 1997). Các nghiên cứu tiếp theo tiến hành tại Viện Di truyền Nông nghiệp cho thấy có thể nâng cao hiệu quả nuôi cấy bao phấn bằng các phương pháp sau:

- **Nâng cao hiệu quả của nuôi cấy bao phấn bằng cải tiến quy trình nuôi cấy:** như xử lý nhiệt bao phấn trước và sau khi cấy, xử lý mannitol, cải tiến quy trình tái sinh cây từ phôi trong nuôi cấy bao phấn...), cải tiến thành phần môi trường muối khoáng, các bổ sung hữu cơ...). Một trong các công trình này đã được trao giải của Hội các nhà sinh học Châu Á Thái Bình Dương trong hội thảo tại Hồng Kông tháng 7/1996, sau đó được

đánh giá xuất sắc tại Hội nghị Nông nghiệp toàn quốc ở Thành phố Hồ Chí Minh tháng 9/2000. Đặc biệt, các nghiên cứu gần đây nhất tiến hành tại Viện Di truyền Nông nghiệp đã phát hiện tác dụng của từ trường có thể tăng hiệu quả nuôi cấy bao phấn ngô lên 3 lần. Đây cũng là một trong những nghiên cứu đầu tiên trên thế giới trong lĩnh vực ứng dụng từ trường vào công nghệ tế bào thực vật (Lê Huy Hàm, Đỗ Năng Vịnh và CS, 2001: “Nghiên cứu hoạt tính sinh học của nước nhiễm từ, dung dịch hoạt chất sinh học trong môi trường nhiễm từ và ứng dụng trong sản xuất phục vụ ngành nông nghiệp” - đề tài phối hợp Viện Vật lý ứng dụng & Thiết bị khoa học và Viện Di truyền Nông nghiệp tháng 1/2001). Các nghiên cứu này đã khẳng định tiềm năng cải tiến và nâng cao hiệu quả của quy trình nuôi cấy bao phấn, ứng dụng có hiệu quả cho chọn giống ở Việt Nam .

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

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

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

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

+ Các dòng kích tạo đơn bội cái: Stock 6 Rig-col.sant; Stock 6 Ri-n_j 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 chuyên các gen kích tạo đơn bội vào các giống ngô có nguồn gốc nội địa.

5.5.2.4. Nuôi cấy noãn chưa thụ tinh:

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

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

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

triển của túi phôi, xử lý nhiệt trước và sau nuôi cấy, môi trường và điều kiện nuôi cấy... (Sita, 1997).

Quy trình nuôi cấy noãn ngô đã thành công ở nước ta và đạt được trình độ quốc tế. Các nghiên cứu tiến hành tại Viện Di truyền Nông nghiệp cho thấy có thể dùng phương pháp nuôi cấy noãn chưa thụ tinh để tạo dòng thuần ở ngô. Hai phương pháp nuôi cấy noãn đã được áp dụng:

1. Nuôi cấy noãn chưa thụ tinh tách rời: cho hệ số tái sinh trực tiếp thấp. Đại đa số noãn hình thành mô sẹo, tỷ lệ tái sinh cây và tỷ lệ sống sót khi đưa ra ngoài thấp.

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

5.6. NGUỒN GỐC CỦA CÁC BIẾN DỊ TẾ BÀO SOMA

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

Trong quá trình phát triển cá thể, phân hoá và già hoá của mô và tế bào một số các thay đổi di truyền đã xảy ra và được tích lũy trong các tế bào soma (D'amato, 1985). Nhờ kỹ thuật nuôi cấy mô, cây được tái sinh từ tế bào soma sẽ là các đột biến. Các nhà khoa học đưa ra khái niệm automutagenesis - tự đột biến (đột biến xảy ra không do các tác nhân từ bên ngoài gây nên hay là đột biến tự nó - automutagenesis). De Vries (1901) - người khởi xướng Học thuyết về đột biến cho rằng cây bị đột biến do được tái sinh từ hạt già (có nhiều đột biến đã tiềm ẩn từ trước trong hạt

già). Ba mươi năm sau, Nawacin chứng minh đột biến ở hạt già là do các chất tham gia quá trình trao đổi chất và các sản phẩm cặn bã có trong hạt gây nên. Các chất này có thể là: hợp chất chứa lưu huỳnh, amin, amino axit, amids, aldehyde, alkloide, phenol, quinone, axit nucleic và các sản phẩm khác. Nguyên nhân gây đột biến có thể do cấu trúc bình thường của hạt và tế bào bị phá vỡ - các enzym tiếp xúc với các chất và tạo ra sản phẩm đột biến.

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

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

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

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

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

Orton (1984) cho biết trong thời gian nuôi cấy trên môi trường dinh dưỡng, hệ gen của các tế bào thực vật đã trải qua quá trình cải tổ nhanh chóng và đã phát hiện những thay đổi số lượng, cấu trúc nhiễm sắc thể, đột biến gen. Tần số đột biến gen nhiều khi rất cao (10^{-2} - 10^{-1}) tính theo locus trên cây. Thay đổi di truyền phổ biến nhất xảy ra trong tế bào nuôi cấy là đa bội thể. Sau khi mô được nuôi cấy, nhân tế bào có thể trải qua quá trình nội phân (endoreduplication) làm số lượng nhiễm sắc thể trong

tế bào tăng lên gấp đôi hoặc hơn nữa nhưng không xảy ra phân chia tế bào. Kết quả số lượng nhiễm sắc thể của tế bào tăng lên. Quá trình nội phân của nhiễm sắc thể trước khi phân bào đã cho phép người ta nhận được cây lưỡng bội đồng hợp (dihaploid) từ hạt phấn đơn bội trong nuôi cấy bao phấn. Phổ rộng các biến đổi nhiễm sắc thể đã được quan sát thấy ở nhiều loài cây trồng khác nhau (Murashige và Nakano, 1967; Sacristan và Melchers, 1960; Sunderland 1973; Nishi và Mitsuoka, 1969). Nghiên cứu tế bào học cho thấy 10% số loài phân hoá cơ quan không kèm theo hiện tượng nội phân nhiễm sắc thể, 90% số loài phân hoá cơ quan có kèm theo nội phân nhiễm sắc thể.

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

5.6.3. Biến dị di truyền trong nuôi cấy mô lúa

Đột biến tế bào soma đã được phát hiện bởi nhiều công trình nuôi cấy tế bào lúa. Nhà khoa học Nhật bản Oono (1978) đã tái sinh cây qua mô sẹo có nguồn gốc từ hạt của cây nhị bội đồng hợp gồm 75 hạt và đã chứng minh đầy sức thuyết phục về sự tồn tại của đột biến tế bào soma và di truyền đột biến đó. Oono đã phân tích 800 dòng cây nhận được từ tế bào soma và 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 chlorophyl thấy ở 8,4% số dòng. Phân tích cây tái sinh từ mô sẹo cho biết đa số các biến đổi di truyền xảy ra trong quá trình nuôi cấy. Phân tích di truyền cho biết đột biến đã xảy ra ở năm tính trạng và biểu hiện với tần số 0,03 - 0,7% trên một phân chia tế bào. Oono (1975) cho biết các cây nhận được từ mô sẹo của bao phấn nuôi cấy cũng có các biến dị khác nhau. Sau đó Oono (1982) đã tách các đột biến đồng hợp chiều cao cây, đột biến các tính trạng số lượng và chất lượng, đột biến lặn và đột biến trội xảy ra ở các dòng nhận được qua nuôi cấy mô lúa. Một nhà khoa học Nhật Bản khác là Fukui (1983) đã nhận được 12 cây tái sinh qua mô sẹo có nguồn gốc từ 1 hạt lúa, trong đó đã tách được

các đột biến khác nhau như đột biến chín sớm, đột biến bạch tạng, đột biến thấp cây và bất dục. Dabarh (1983) cũng nhận được các dạng đột biến lúa có ý nghĩa thực tiễn từ một mô sẹo ban đầu. Tần số đột biến tỷ lệ thuận với tuổi mô sẹo.

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

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

Quan sát cây con nhận được từ mô sẹo phôi non và thể hệ con cái cho thấy phổ biến dị di truyền rất rộng. Green C. E. cs (1977) lần đầu tiên mô tả các cây nhận được từ mô sẹo phôi hoá (embryogenic callus) ở ngô với nhiều biến dị đặc điểm hình thái (thân, lá) và độ hữu thụ. Phân tích tế bào cho thấy có một cây khảm đa bội với nhiễm sắc thể số 5 trong tế bào được nhân lên nhiều lần và một cây có đoạn tứ bội. Tiếp theo các công trình nghiên cứu đầu tiên này, một loạt các công bố khác đã khẳng định tần số biến dị cao xảy ra với các tính trạng hình thái và nông học quan trọng như

cao cây, độ dài bắp, số hàng trên bắp, độ chín sớm (Nesticky M. cs 1984; Glaser V.P. 1984; Glaser V.P. 1984). Một số dòng ngô mới có nhiều ưu việt so với giống ban đầu đã nhận được từ cây tái sinh. Một vài giống lai tạo ra với sự tham gia của các dòng mới này có năng suất cao hơn nhiều so với giống lai đối chứng (Earle E.D. và Gracen V. E, 1985; Gracen V.E. và Earle E. D.1985). Các nhà di truyền và chọn giống đặc biệt quan tâm tới các biến dị xảy ra trong nội bào quan (tế bào chất). Các polypeptid tham gia vào quá trình hô hấp, quang hợp, tổng hợp ATP được mã hoá bởi các gen ty thể và lục lạp. Các tính trạng khác như bất dục đực tế bào chất, khả năng chống chịu các chất kháng sinh và độc tố cũng do ADN nội bào quan, trong đó có ADN ty thể quy định (Cornu A. cs, 1981; Kool A. T. cs, 1986). Cornu (1981) cho biết khi nuôi cấy phôi non của các dòng ngô bất dục đực kiểu T đã nhận được cây hữu thụ và kháng độc tố nấm *Drechslera maydis* gây bệnh. Phân tích cho hay đã có những thay đổi cấu trúc ở ADN ty thể dẫn đến khôi phục khả năng hữu thụ 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). Tình 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 S2 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.

5.6.5. Biến dị ở các cây nhân vô tính:

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

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

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

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

- Tạo ra các giống cây trồng mang những đặc tính biến dị quý, ví dụ, các nhà khoa học ở Đài Loan đã chọn tạo được giống chuối thấp cây, chống chịu bệnh thối 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.

5.7. QUI TRÌNH TẠO CÂY ĐƠN BỘI

5.7.1. Qui trình tạo cây đơn bội thuốc lá từ hạt phấn phân lập

5.7.1.1. 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 5-10°C sau khi cất để 48 giờ ở 2-5°C.

b) Tạo cây nhị bội

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

5.7.1.2. Nuôi bao phấn

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

5.7.1.3. Tách và nuôi hạt phấn

Ép bao phấn bằng đũa thủy tinh, lọc hạt phấn bằng lưới có mắt ($\Phi = 48 \mu\text{m}$) và đưa vào ống ly tâm vô trùng có bông ở đáy. Ly tâm 850 vòng/phút và rửa hai lần bằng môi trường mới. Nuôi hạt phấn với nồng độ 104 hạt phấn/ml, mỗi đĩa petri đường kính 5 cm nuôi 2.5 ml dung dịch, dán giấy parafilm và để ở nơi có ánh sáng nhạt. Sau 30 ngày sẽ xuất hiện phôi non.

5.7.2. Nuôi cấy hạt phấn lúa

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.

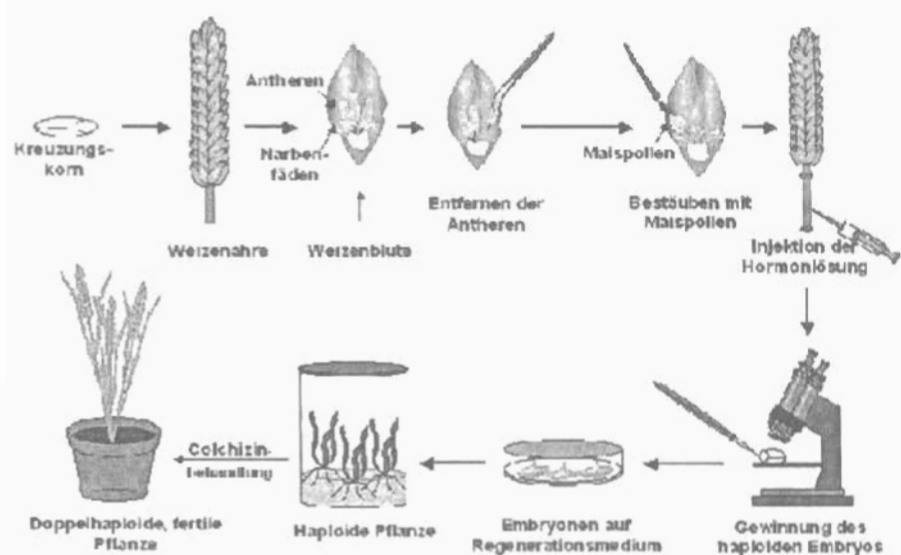
b) Xử lý vật liệu:

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.

c) Quy trình

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

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



Hình 5.3 Nuôi cấy bao phấn lúa

Xử lý lạnh túi phấn 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 phấn.

- Sự hình thành mô sẹo và tái sinh

- + Sau khi xử lý lạnh đoạn thân có chứa túi phấn, 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 phần 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 $\mu\text{mol/m}^2/\text{s}$ ở 27°C có quang chu kỳ 16 giờ sáng và 8 giờ tối.
 - + Cụm cây tái sinh được tách rời từng cây riêng biệt khi cây cao 1 cm và được cắt 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.

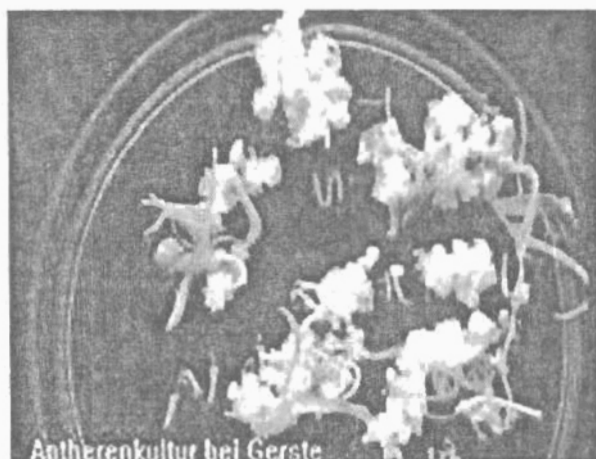
d) Quan sát và đo đếm

- 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 phần 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 tử phần nuôi cấy phát sinh mô sẹo và phân tích ANOVA để đánh giá sự khác nhau giữa các giống và các loài phụ:

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



Hình 5.4. 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.

5.7.3. Nuôi cấy bao phấn cây thuốc lá

5.7.3.1. Nguyên liệu thực vật

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

5.7.3.2. Môi trường nuôi cấy

Bảng 5.5. 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)	+	+	+	+
Saccarose (%)	2	2	2	2
Agar (%)	0,8	0,8	0,8	0,8
IAA (mg/L)	0,1			0,1
2,4-D (mg/L)		0,1 – 0,5		
KIN (mg/L)	0,1	0,1	0,1 – 1	
BAP (mg/L)			0,1 – 1	

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

5.7.3.3. Nuôi cấy bao phấn

Nụ thuốc lá hái ở giai đoạn cánh hoa sắp ló ra khỏi lá đài (nụ dài khoảng 10-15 mm) được khử trùng theo thứ tự: 2 phút trong cồn 70%, 5 phút trong dung dịch HgCl_2 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. 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 phơi ở giai đoạn tế bào đơn nhân, do đó thường người ta phải làm tiêu bản hiển vi để quan sát sự phát triển của hạt phấn, chọn giai đoạn thích hợp rồi mới tiến hành nuôi cấy.

5.7.3.4. Nhị bội hóa thông qua giai đoạn callus

Thân của cây thuốc lá đơn bội nuôi cấy trong ống nghiệm được cắt thành từng đoạn dài 5 mm và cấy lên môi trường tạo callus (Bảng 4.1,

cột 3). Sau 7-10 ngày, từ đoạn thân cây thuốc lá 1n sẽ hình thành một khối callus nhỏ được gọi là callus sơ cấp. Tế bào callus sơ cấp thường dễ tái sinh thành chồi khi gặp điều kiện thuận lợi. Các cây tái sinh từ tế bào callus nuôi cấy trên môi trường ở bảng 4.1, cột 4 có độ biến động về số lượng nhiễm sắc thể rất lớn.

- Phương pháp kiểm tra nhiễm sắc thể

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

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

Chương 6

NUÔI CÂY TẾ BÀO ĐƠN VÀ CHỌN DÒNG TẾ BÀO

6.1. NUÔI CÂY 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.

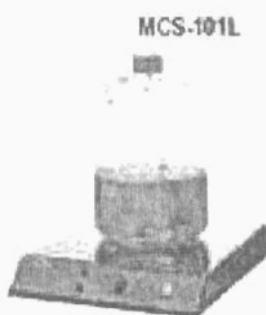
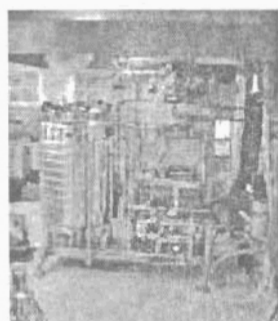
Cần có một lượng mô sẹo ban đầu thích hợp là 2-3 g/cm³. Khi mô sẹo được cấy vào dịch lỏng ta có ngay giai đoạn Lag-phase. Đây là giai đoạn đầu tiên cho đến khi có tín hiệu phân chia đầu tiên, sau đó là giai đoạn Exponential-phase và Linear-phase; là giai đoạn tế bào phân chia, tế bào tăng số lượng và 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.



Hình 6. 1 Thiết bị nuôi cấy tế bào đơn

6.2. NGUYÊN LIỆU, ĐIỀU KIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP NUÔI CẤY

6.2.1. 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 bộ thể khác nhau ở thứ indica mà không tái sinh được ở thứ japonica.

Mẫu vật được sử dụng từ nhiều nguồn mô khác nhau như lá, rễ, lóng (internodes), bầu quả (ovaries) và hoa tự (inflorescences). Nguồn mẫu vật được xem là rất quan trọng trong việc xuất hiện biến dị dòng soma. Nghiên cứu ở cây phong lữ (geranium) cho thấy các biến dị soma có thể thu được từ cành giâm cuống lá (petiole cuttings) hoặc rễ *in vivo*, nhưng không thể từ cành giâm của thân (stem cuttings). Cây dứa (*Ananas cosmosus*) phát triển từ callus của hom giâm (slip), chồi đỉnh và chồi nách (crown and axillary bud) cho thấy chỉ có sự biến đổi ở đặc điểm của gai (spine), trong khi các cây phát triển từ callus của quả tụ (syncarp) cho thấy có sự biến dị ở màu lá, gai, lớp sáp (wax) và tán lá (foliage) (Wakasa 1979). Van Harten

và cs (1981) quan sát thấy có sự thay đổi hình thái ở 12,3% cây khoai tây tái sinh từ mảnh lá (leaf discs), ngược lại có tới 50,3% các cây biến dị có nguồn gốc từ callus của cuống bông (rachis) và cuống lá. Các tác nhân chọn lọc khác nhau được sử dụng dựa vào các nguồn mẫu vật khác nhau trong nuôi cấy, tạo ra một dãy biến dị dòng soma giữa các cây tái sinh.

6.2.2. 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 mM/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.

6.2.3. Các phương pháp nuôi cấy

6.2.3.1. Nuôi cấy dịch thể tĩnh

Nuôi cấy dịch thể tĩnh được phát triển lần đầu tiên bởi Heller và Gautheret với mục đích nghiên cứu về dinh dưỡng khoáng. Trong phương pháp này, một cầu giấy lọc được gấp lại nhiều lần và được đặt một đầu vào môi trường dinh dưỡng khoáng theo phương thẳng đứng, đầu kia trong uôn cong một góc 90° tạo thành nơi chứa mẫu nuôi cấy. Phần dưới của cầu giấy lọc hoạt động như một cái “bắc đèn” vận chuyển nước và phát triển. Hiện nay nuôi cấy dịch thể tĩnh chỉ được dùng trong một số trường hợp do khó triển khai trên quy mô lớn.

6.2.3.2. Nuôi cấy dịch thể động

a) Nuôi cấy chìm liên tục

Trong nuôi cấy chìm liên tục, các tế bào luôn luôn được tiếp xúc với môi trường dinh dưỡng, do chúng được ngâm hẳn vào dung dịch môi

trường. Quá trình thông khí được thực hiện nhờ một máy lắc chạy ở tốc độ 100 - 150 vòng/phút, hoặc có thể dùng các phương pháp và thiết bị thông khí khác. Ngoài sự thoáng khí, quá trình rung, lắc còn có tác dụng ngăn chặn và làm giảm sự kết dính của các tế bào với nhau.

Theo Thomas và Davey (1975), khi nuôi cấy huyền phù tế bào trong các bình có dung tích 25ml, tốc độ phù hợp nhất của máy lắc từ 100 - 120 vòng/phút. Thể tích của môi trường lỏng cũng phải phù hợp với kích thước của bình nuôi cấy để đảm bảo thông khí tốt, thường dịch lỏng chiếm 20% thể tích của bình.

Các nuôi cấy quy mô nhỏ và trong những thời gian ngắn, có thể sử dụng máy khuấy từ ở tốc độ 250 vòng/phút và thời gian cho quá trình nuôi cấy thường từ 10 - 15 ngày. Sau đó các mẫu nuôi cấy phải được cấy chuyển sang môi trường mới để đảm bảo sự sinh trưởng và phát triển của các tế bào. Sự thông khí của bình nuôi cấy phải được duy trì tốt qua nút đậy của bình nhưng đồng thời cũng cần đảm bảo yêu cầu vô trùng. Các nghiên cứu về nhu cầu dinh dưỡng, trao đổi chất và sự sinh trưởng thường được tiến hành trên môi trường lỏng vì có một số trở ngại khi sử dụng môi trường chứa agar. Khi agar kém chất lượng sẽ có ảnh hưởng xấu đến sinh trưởng của mô sẹo. Ngoài ra, chỉ có một phần của mô sẹo tiếp xúc với agar để hấp thụ chất dinh dưỡng, bởi vậy sự mất cân bằng trong phản ứng sinh trưởng là không tránh khỏi, do có gradient các chất dinh dưỡng xảy ra giữa các phần của khối mô sẹo.

b) Nuôi cấy chìm tuần hoàn

Trong nuôi cấy chìm tuần hoàn, các tế bào được nhúng vào môi trường dịch thể xen kẽ với những khoảng thời gian được đưa ra khỏi môi trường. Quá trình này được thực hiện nhờ sự chuyển động "bập bênh" của các bình nuôi cấy với sự trợ giúp của các thiết bị khác.

Khi chuyển động, khối tế bào ở đầu này của bình được đưa vào môi trường còn ở đầu kia lại được tiếp xúc với không khí. Steward và cộng sự (1952) cũng đã thiết kế những bình nuôi cấy đặc biệt theo phương pháp nuôi cấy chìm tuần hoàn. Các bình nuôi cấy chuyển động quay theo chiều kim đồng hồ ở tốc độ 1 vòng/phút. Hệ thống nuôi cấy này đã được cải tiến và mô tả kỹ hơn trong những thí nghiệm của các tác giả khác..

6.2.4. Xác định tốc độ sinh trưởng

Sự sinh trưởng trong nuôi cấy huyền phù có thể được đo bằng cách xác định số lượng tế bào, thể tích tế bào, khối lượng tươi và khối lượng khô, xác định hàm lượng ADN và sức sống của tế bào.

6.2.4.1. Số lượng tế bào

Huyền phù tế bào nuôi cấy thường chứa các tế bào đơn và các cụm tế bào với những kích cỡ khác nhau. Trước khi tiến hành đếm tế bào, những cụm tế bào được tách thành những tế bào riêng rẽ qua xử lý với axit chromic (dung dịch chromium trioxide -5-10% (W/v), đun nóng $\approx 70^{\circ}\text{C}$ trong 5 - 10 phút đủ để gây ra sự phân tách nhưng chưa làm phân hủy tế bào (Burcher and street, 1960), sau đó làm nguội và lắc mạnh trong vài phút. Một số trường hợp người ta dùng enzym pectinaza 1% (W/v) để phá vỡ với cụm tế bào ở các giá trị pH thấp. Các huyền phù được pha loãng đến nồng độ phù hợp, nhuộm và đếm trực tiếp trên buồng đếm tế bào. Với mỗi dung dịch huyền phù cần đếm 20 vòng ngẫu nhiên và lấy giá trị trung bình, kết quả được thể hiện bằng giá trị số lượng tế bào/ml dung dịch nuôi cấy.

6.2.4.2. Thể tích tế bào

Để xác định thể tích tế bào, một thể tích đã biết của huyền phù nuôi cấy được lấy ngẫu nhiên và đem ly tâm ở tốc độ 2000g trong thời gian 5 phút. Thu lấy tế bào và đem xác định thể tích, có thể được tính theo số ml tế bào/thể tích môi trường nuôi cấy hoặc tính theo tỷ lệ %.

6.2.4.3. Xác định khối lượng tươi và khối lượng khô tế bào

Khối lượng tươi được xác định bằng cách thu thập các tế bào trong một thể tích xác định của huyền phù tế bào, sau đó rửa chúng bằng nước cất vô trùng và đem làm khô trong chân khô, cuối cùng cân để xác định khối lượng.

Để xác định khối lượng khô, cần lấy thể tích huyền phù tế bào nuôi cấy đem ly tâm. Loại bỏ phần nổi, rửa phần tế bào trên giấy lọc Whatman rồi đem sấy khô trong thời 12 giờ ở 80°C cho đến khi có khối lượng không đổi và đem xác định.

6.2.4.4. Xác định thành phần protein

Thu thập tế bào và chuyển lên lọc qua giấy Whatman, tiếp theo rửa các tế bào trong etanol 70% đang sôi. Làm khô với axeton rồi chuyển vào dung dịch NaOH 1M. sau đó đun nóng đến 85°C trong 1,5 giờ. Lọc và xác định protein thủy phân trong dịch theo phương pháp của Lowry và cộng sự (1951).

6.2.4.5. Xác định chỉ số nguyên phân

Chỉ số nguyên phân được coi là hữu ích trong đánh giá sự sinh trưởng của tế bào, cụm tế bào nuôi cấy dịch lỏng, hoặc để kiểm tra mức độ đồng đều về tuổi của các tế bào. Trước tiên huyền phù tế bào được cố định trong hỗn hợp dung môi etanol: axit axetic (tỷ lệ thể tích 3:1) sau đó chuyển sang lam kính. Nhỏ 1 giọt axeto - orcein lên mẫu trên lam kính rồi đem hơi trên ngọn lửa đèn cồn, tiếp theo để mẫu nguội trong khoảng 5 phút. Đặt mẫu bằng lamel, làm khô mẫu bằng giấy thấm và đem quan sát dưới kính hiển vi quang học ở vật kính dầu. Xác định các kỳ đầu, kỳ giữa và kỳ cuối có trong khoảng 1000 tế bào, từ đó tính được tỷ lệ % các tế bào có nhân đang xảy ra phân bào. Tổng số % của những tỷ lệ đó được gọi là chỉ số phân bào.

6.2.5. Đặc điểm của nuôi cấy huyền phù tế bào

Nuôi cấy huyền phù tế bào thường được khởi đầu bằng cách chuyển một mảnh mô sẹo vào môi trường lỏng và được chuyển động trong suốt thời gian nuôi cấy. Có thể sử dụng những loại mô đã biệt hóa cho nuôi cấy huyền phù tế bào, nhưng chỉ dùng được một số loại như lá mầm, trụ dưới lá mầm. Trong quá trình nuôi cấy, các tế bào sẽ dần dần tách ra khỏi mẫu do những chuyển động xoáy của môi trường, nhưng không có dịch huyền phù nào chỉ chứa các tế bào đơn. Sau một thời gian ngắn nuôi cấy, trong dịch huyền phù là một hỗn hợp của các tế bào đơn, các cụm tế bào với kích thước khác nhau, các mảnh còn lại của mẫu cấy và các tế bào chết. Tuy nhiên cũng có những dịch huyền phù hoàn hảo, chứa tỷ lệ cao các tế bào đơn và tỷ lệ nhỏ các cụm tế bào. Mức độ tách rời các tế bào trong nuôi cấy phụ thuộc vào đặc tính của các khối tế bào xấp, được hình thành từ phân bào và có thể được điều chỉnh bởi thay đổi thành phần môi trường. Khi tăng tỷ lệ auxin/cytokinin thì trong một số trường hợp sẽ sản sinh nhiều khối tế bào xấp. Theo King và Street (1977), không có một quy

trình chuẩn nào cho nuôi cấy huyền phù tế bào, vì vậy chọn lựa điều kiện và môi trường nuôi cấy thích hợp là những nghiên cứu đầu tiên trong nuôi cấy huyền phù tế bào.

Nuôi cấy huyền phù tế bào khởi đầu cần một lượng mô sẹo khá lớn, xấp xỉ 2 - 3g/100ml dung dịch môi trường (Helgeson, 1979). Trong nuôi cấy huyền phù tế bào cà rốt, mỗi bình nuôi cấy với 25ml môi trường cần từ 0,5 - 0,75g mô sẹo. Khi mô sẹo được đưa vào môi trường, đó là thời điểm bắt đầu của pha loãng, pha này kéo dài cho đến khi có dấu hiệu phân chia tế bào đầu tiên. Tiếp theo là pha hàm số mũ có số lượng phân bào tăng dần và tăng mạnh quần thể tế bào thuộc pha tuyến tính. Sau đó tỷ lệ phân bào giảm dần và cuối cùng các tế bào đi vào pha ổn định, chúng không phân chia, số lượng tế bào ở mức bão hòa. Để duy trì quá trình nuôi cấy, các tế bào cần được cấy truyền vào giai đoạn sớm của pha ổn định.

Do sức sống của các tế bào trong pha ổn định là không giống nhau khi dùng những vật liệu khác nhau cho nuôi cấy huyền phù, cho nên thường cấy chuyển vào giai đoạn đầu của pha ổn định và thời điểm cụ thể là dựa vào kinh nghiệm, nhưng nói chung cấy chuyển nên bắt đầu khi mật độ tế bào là cực đại. Đối với nhiều thí nghiệm nuôi cấy huyền phù, mật độ tế bào cực đại đạt được trong khoảng 18 - 25 ngày, tuy nhiên những huyền phù sinh trưởng mạnh thì thời gian này có thể ngắn hơn từ 6 - 9 ngày. Ở lần cấy chuyển đầu tiên, dịch nuôi cấy cần được lọc nhằm loại bỏ các cụm tế bào lớn, các mảnh từ mẫu cấy ban đầu, sau đó dùng pipet để lấy dịch cấy truyền. Lượng tế bào đem cấy chuyển phải đủ lớn để đảm bảo mật độ tế bào, vì khi thấp quá, các tế bào sẽ không sinh trưởng được. Trong nuôi cấy các tế bào cây sung dâu, mật độ tế bào thích hợp là từ $9 - 15 \cdot 10^3$ tế bào/ml.

Theo King (1980), những tế bào trải qua quá trình nuôi cấy, sinh trưởng và trao đổi chất trong dịch huyền phù gọi là dòng tế bào. Một số đặc điểm của dòng tế bào như sau:

- Khả năng tách tế bào cao.
- Phát sinh hình thái đồng nhất
- Nhân rõ ràng và tế bào chất đậm đặc.
- Nhiều hạt tinh bột.
- Tương đối ít các yếu tố mạch
- Có khả năng nhân đôi trong 24 - 72 giờ.

- Mất tính toàn năng
- Quen với chất sinh trưởng
- Tăng mức đa bội thể

Nuôi cấy huyền phù tế bào có thể được phân biệt thành các kiểu: Nuôi cấy kín và nuôi cấy mở. Trong hệ thống nuôi cấy kín, tất cả các tế bào được giữ lại, làm cho mật độ tế bào tăng lên cho đến khi đạt tới pha ổn định. Ở hệ thống nuôi cấy kín, cần có một dòng liên tục môi trường mới và thu hồi môi trường đã sử dụng. Hệ thống nuôi cấy mở tương tự như hệ thống nuôi cấy kín trong thay mới môi trường dinh dưỡng, nhưng khác ở chỗ các tế bào sẽ được lấy ra khỏi hệ thống. Có 2 kiểu chính trong hệ thống nuôi cấy mở: Chemostass và turbidostass. Trong Chemostass dòng môi trường mới liên tục được đưa vào hệ thống và được thiết lập sẵn ở tốc độ nào đó, dòng môi trường sẽ quy định tốc độ sinh trưởng của nuôi cấy.

Đối với turbostass, mật độ tế bào được xác lập trước ở một số mức độ, còn môi trường mới được bổ sung tuần hoàn để duy trì mật độ đó. Mật độ tế bào được quyết định nhờ thiết bị điều khiển photocell.

Hiện nay có nhiều hệ thống nuôi cấy huyền phù tế bào hiện đại, cho phép nghiên cứu chi tiết về sinh trưởng của tế bào, sinh lý dinh dưỡng, sản xuất các chất trao đổi thứ cấp... nhiều hệ thống đã được ứng dụng để sản xuất trên quy mô thương mại.

6.2.6. 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 chùng.

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 tó 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 cây 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 tiên khởi.

Sự phân bào nguyên nhiễm bất thường trong suốt quá trình phát sinh và duy trì phát sinh dẫn đến sự hình thành những tế bào đa bội, lệch bội và tái sắp xếp lại nhiễm sắc thể. Dùng tốc độ sinh trưởng trong điều kiện nuôi cấy thích hợp dẫn đến việc chọn lọc nhanh chóng những tế bào không đi vào giai đoạn biệt hóa; mô sẹo không đồng nhất tiên 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 lý 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 *in vitro* có thể được phân chia theo các kiểu sau đây:

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

Thí nghiệm nuôi cấy huyền phù Tế Bào

Nguyên liệu và thiết bị:

- Mẫu cây Cò nón
- Máy lắc
- Giấy nhôm và parafin (parafilm)
- Dao, kéo, panh... dùng cho nuôi cấy.
- Môi trường SH.

SH - 0 bao gồm muối khoáng SH và các hợp chất hữu cơ (bảng phần phụ lục). 30mg/l saccarozơ, điều chỉnh pH đến 5,4 trước khi khử trùng. Môi trường này dùng cho phôi này mầm.

SH - 30: Giống SH - 0 nhưng có thêm 6,6mg/l dicamba.

SH - 30C: Là môi trường SH - 30 được bổ sung thêm 3,0g/l casein thủy phân.

- Bình tam giác 125ml:

Các bình A (4 bình): Mỗi bình chứa 10ml môi trường lỏng SH - 30

Các bình B (12 bình): Mỗi bình chứa 20ml môi trường lỏng SH - 30

Các bình C (4 bình): Mỗi bình chứa 20ml môi trường lỏng SH - 30C.

- Đĩa petri vô trùng và đĩa petri chứa môi trường đặc SH - 0, SH - 30.

Tiến hành:

1. Lấy khoảng 2,0g mô sẹo phôi hóa sinh trưởng nhanh và cho vào bình tam giác A đã chứa 10ml môi trường SH - 30 (tổng số có 4 bình).
2. Bịt kín các bình bằng giấy nhôm vô trùng và quấn kỹ với giấy parafin. Tiếp theo đặt các bình lên máy lắc, điều chỉnh tốc độ máy ở 75 vòng/phút và để vào trong tối.
3. Sau khoảng 2 tuần nuôi cấy, thêm vào mỗi bình tam giác A 20ml môi trường SH - 30 và lắc ở tốc độ 100 vòng/phút trong 2 tuần kế tiếp.
4. Duy trì sự sinh trưởng qua cấy truyền bằng cách đổ một nửa bình nuôi cấy A vào bình tam giác B sau 2 tuần nuôi cấy (tổng số có 8 bình B).
5. Quan sát sự sinh trưởng của các tế bào trong nuôi cấy, những tế bào phôi hóa có tế bào chất nhỏ và đậm đặc.

6. Đẻ cảm ứng phát sinh phôi. chuyển một nửa số bình nuôi cấy sang các bình tam giác C (4 bình), nửa còn lại đưa sang các bình tam giác B mới (4 bình). Duy trì các nuôi cấy như trước và quan sát hai lần một tuần.
7. Sau 4 tuần sinh trưởng trong các môi trường SH - 30 và SH - 30C, loại bỏ dung dịch môi trường và đưa các tế bào, khối tế bào sang đĩa petri vô trùng.
8. Chuyển các cụm tế bào nhỏ vào các đĩa petri chứa môi trường SH - 30, với mật độ 5 khối tế bào/đĩa và đưa ra nuôi có ánh sáng. Quan sát sự sinh trưởng của mẫu hàng tuần trong thời gian khoảng 4 tuần nuôi cấy sẽ thấy các khối mô sẹo được hình thành ở tất cả các đĩa petri. Nhưng chỉ có các mô sẹo có nguồn gốc từ nuôi cấy trên môi trường SH - 30C mới có khả năng tạo ra phôi và nảy mầm thành cây con khi đưa sang môi trường SH - 0.

Như vậy cả 2 môi trường SH - 30 và SH -30C đều hỗ trợ sự tăng sinh của tế bào phôi hóa nhưng chỉ có môi trường chứa casein thủy phân mới thúc đẩy sự phát triển của tế bào thành phôi vô tính.

6.3. 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 hòa 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 (protoclones-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 (gameclonal 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.

6.3.1. Nguyên tắc chọn dòng tế bào

6.3.1.1. Chọn trực tiếp

Thông qua ru thể 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.

6.3.1.2. Chọn gián tiếp

Trong trường hợp này đặc điểm của dòng được chọn là kết quả biểu hiện khuyết tật của tế bào. Thí dụ điển hình là chọn dòng thiếu enzyme nitrate reductase (NR). Trên môi trường chứa ClO_3^- những tế bào có NR sử dụng ClO_3^- như NO_3^- và khử thành ClO_2^- , ClO_2^- tác dụng như một độc tố cho nên chỉ có những tế bào không có NR mới sống sót trên môi trường chọn lọc.

6.3.1.3. 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.

6.3.2. Cách chọn dòng tế bào

6.3.2.1. 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.

a) 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 inu thể 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*).

b) 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.

c) 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).

d) 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.

e) 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.

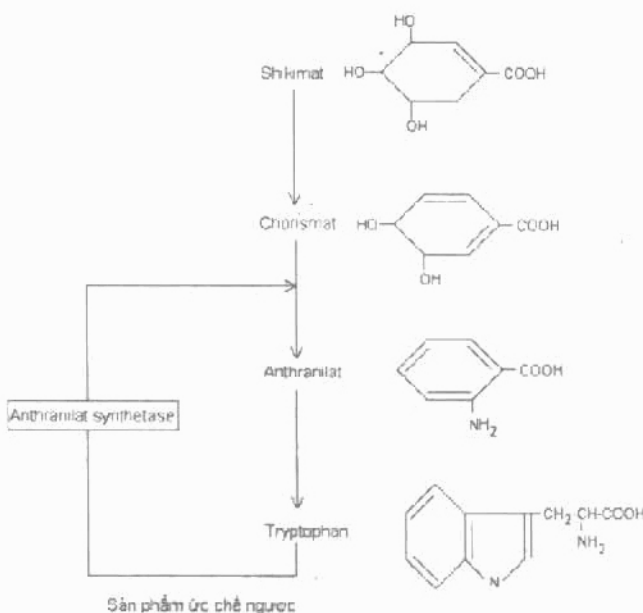
6.3.2.2. Có nhân tố chọn lọc (with selection pressure)

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 dân trải tế bào đơn/protoplast.

a) Kháng amino acid và các đồng đẳng của amino acid

Một số amino acid trong đó có valine và threonine ức chế sinh trưởng tế bào khi đưa chúng vào môi trường dùng đường nuôi cấy, vì chúng ức chế tế bào sử dụng NO_3^- hoặc ngăn cản amino acid cùng nguồn gốc. Ngoài ra, nếu bổ sung các chất đồng đẳng của amino acid vào môi trường nuôi cấy chúng có thể được sử dụng như amino acid vào việc tổng hợp ra các phân tử protein, kết quả các phân tử này bị mất hoạt tính. Hiện tượng ức chế này có thể khắc phục bằng cách cung cấp cho tế bào thêm các amino acid khác hoặc các hợp chất dẫn xuất bình thường khác của chúng.

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



Hình 6.2.
Cơ chế ức chế ngược đối với tryptophan

Trong thực tế hiện tượng kiểm tra lòng lèo 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 thái 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 do là điều cho đến nay vẫn chưa được kết luận.

Vấn đề tái sinh cây từ dòng tế bào kháng 5-methyltryptophan là vấn đề sinh lý khá lý thú. Kháng 5-methyltryptophan sẽ sản xuất dư thừa tryptophan mà tryptophan lại là tiền chất của IAA nên tế bào sẽ sản xuất dư thừa IAA và như vậy tế bào sẽ sinh trưởng tự dưỡng auxin nghĩa là không cần auxin ngoại sinh đưa vào môi trường. Lượng IAA tăng cũng làm cho tế bào mất khả năng tạo phôi và tạo chồi. Chỉ có 10^{-6} tế bào có thể tạo cây, và có thể do một đột biến thứ hai xảy ra trong trao đổi chất Tryp hay IAA. Cho tới nay đã có một số kết quả như sau:

- 2 trường hợp cây tái sinh từ mô sẹo-*Nicotiana tabacum* kháng methionine sulfoximine và valine.
- 1 trường hợp chọn từ nuôi phôi-*Hordeum vulgare* và *Zea mays* kháng lysine + threonine. *Nicotiana tabacum* kháng 5-methyl tryptophan.

- 1 trường hợp chọn cả cây-*Triticum* kháng 5-methyl tryptophan.

Những dòng này có khả năng di truyền tính trạng này cho thế hệ sau qua sinh sản hữu tính.

Bảng 6.1. Các dòng tế bào kháng các amino acid và các đồng đẳng của nó chọn lọc được trong nuôi cấy in vitro

Tác nhân chọn lọc	Loài	Tác nhân đột biến	Tái sinh cây
S-(aminoethyl)-Lcysteine	<i>Arabidopsis thaliana</i>	EMS	Có
	<i>Daucus carota</i>	Không	Không
	<i>Hordeum vulgare</i>	Azide	Có
	<i>Nicotiana tabacum</i>	EMS	Không
	<i>Nicotiana tabacum</i>	UV/EMS	Không
	<i>Nicotiana sylvestris</i>	Không	Không
Aminopterin	<i>Oryza sativa</i>	EMS	Không
	<i>Datura innoxia (1n)</i>	Không	Có
Azaguanine	<i>Acer pseudoplatanus</i>	NTG	Không
	<i>Glycine max</i>	EMS	Không
	<i>Haplopappus gracilis</i>	EMS	Không
	<i>Medicago sativa</i>	EMS	Không
Azauracil	<i>Haplopappus gracilis</i>	EMS	Không
	<i>Zea mays</i>	EMS	Không
Azetidine-2-carboxylic acid	<i>Daucus carota</i>	Không	Không
Bromodeoxy-ridine	<i>Glycine max</i>	NG	Không
	<i>Medicago sativa</i>	EMS	Không
	<i>Nicotiana tabacum</i>	Không	Có
Ethionine	<i>Daucus carota</i>	EMS	Không
	<i>Daucus carota</i>	Không	Không
	<i>Medicago sativa</i>	EMS	Không
p-Fluorophenyl alanine	<i>Acer pseudoplatanus</i>	Không	Không
	<i>Daucus carota</i>	Không	Không
	<i>Datura innoxia</i>	Không	Có
	<i>Nicotiana tabacum</i>	UV/EMS	Không
	<i>Nicotiana tabacum</i>	Không	Không
	<i>Nicotiana tabacum</i>	Không	Có
6-Fluorotryptophan	<i>Petunia hybrida</i>	NG	Không
5-Fluorouracil	<i>Daucus carota</i>	Không	Có

Glycine ydroxamate	<i>Nicotiana tabacum</i>	Không	Có
Δ -Hydroxyproline	<i>Nicotiana tabacum</i> <i>Nicotiana tabacum</i>	EMS UV/EMS	Không Không
Hydroxyproline	<i>Daucus carota</i> <i>Hordeum vulgare</i>	EMS Azide	Không Có
Hydroxyurea	<i>Nicotiana tabacum</i>	Không	Có
Lysine plus threonine	<i>Zea mays</i> <i>Zea mays</i>	Azide Không	Có Có
Methionine sulfoximin	<i>Nicotiana tabacum</i>	Không	Có
Methyltryptophan	<i>Catharanthus roseus</i> <i>Daucus carota</i> <i>Nicotiana tabacum</i> <i>Nicotiana tabacum</i> <i>Nicotiana tabacum</i> <i>Nicotiana sylvestris</i>	Không Không UV/EMS Không Không Không	Không Không Không Không Có Không
Seleno-amino acids	<i>Nicotiana tabacum</i>	Không	Không
Thienylalanine	<i>Nicotiana sylvestris</i>	Không	Không
Threonine	<i>Nicotiana tabacum</i>	Không	Có
Valine	<i>Nicotiana tabacum</i> (1n) <i>Nicotiana tabacum</i> (1n)	UV NG hoặc chiếu xạ	Có Không

Chú thích: NG: *N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine*.

b) 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 đục đục có khả năng kháng bệnh ri sắt do nấm *Helminthosporium maydis* gây ra bằng kỹ thuật chọn dòng tế bào nuôi cấy bằng phương thức sau:



Hình 6.3. 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 từ, chọn lọc tính chịu bệnh tức là chọn gen thích hợp trong quần thể đó. Tính kháng thường do mtDNA quyết định, và tính bất dục đực trong trường hợp này cũng do mtDNA quyết định.

Ở thuốc lá, người ta chọn lọc được đột biến kháng methionine sulfoximine, độc tố do *Pseudomonas tabacci* tiết ra (*P. tabaci* gây bệnh cháy rụi ở thuốc lá).

c) 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 đất 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), *Corydalis* (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 hoặc thông qua công nghệ chuyển gen.

Bảng 6.2. Các dòng tế bào đột biến mang tính trạng hữu ích trong nông nghiệp thu được từ nuôi cấy in vitro.

Tác nhân chọn lọc	Loài	Tác nhân đột biến	Tái sinh cây
1. Chịu lạnh	<i>Daucus carota</i> <i>Nicotiana sylvestris</i>	EMS Không	Có(e) Có
2. Kháng các chất diệt cỏ Asulam Bentazone 2,4-D 2,4-D; 2,4,5-T; 2,4-DB Isopropyl-N- phenylcarbamate Paraquat Phenmedifarm Picloram	<i>Apium graveolens</i> <i>Nicotiana tabacum</i> (1n) <i>Lotus corniculatus</i> <i>Trifolium repens</i> <i>Nicotiana tabacum</i> <i>Nicotiana tabacum</i> <i>Nicotiana tabacum</i> (1n) <i>Nicotiana tabacum</i>	Không Tia γ Không Không EMS Tia X Tia γ Không	Không Có(c) Có Không Có(c, d) Có(c) Có(c) Có(c)
3. Kháng các pathotoxins Fusarium oxysporum Helminthosporium maydis Phytophthora infestans	<i>Solanum tuberosum</i> <i>Zea mays</i> T-cms <i>Solanum tuberosum</i>	Không Không Không	Có Có(c) Có(c)
4. Chống chịu muối	<i>Capsicum annum</i> <i>Datura innoxia</i> <i>Kickxia ramosissima</i> <i>Medicago sativa</i> <i>Oryza sativa</i> <i>Nicotiana sylvestris</i> <i>Nicotiana sylvestris</i> <i>Nicotiana tabacum</i> <i>Nicotiana tabacum</i>	Không Không Không Không Không Không Không EMS Không	Không Có Có Không Không Không Không Có Có(c)

Chú thích

- (c) Cây kháng.
- (d) Cây bất thụ.
- (e) Không biểu hiện trong cây.

d) Chống chịu các stress của môi trường

Stress của môi trường do nồng độ muối cao ở trong đất là nhân tố chính kìm hãm phát triển nông nghiệp. Từ kết quả đầu tiên là tái sinh cây thuốc lá *in vitro* chống chịu NaCl (Nabors 1980), đến nay người ta đã phát triển một số lượng lớn các dòng tế bào và cây trồng có thể chống chịu nồng độ muối cao (Nguyễn Hoàng Lộc 1992). Dix (1977) đã phát triển các dòng chống chịu lạnh bằng cách nuôi cấy tế bào của *Nicotiana sylvestris* ở điều kiện nhiệt độ thấp. Tuy nhiên, phenotype của các cây tái sinh từ những dòng này không được chuyển sang thế 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).

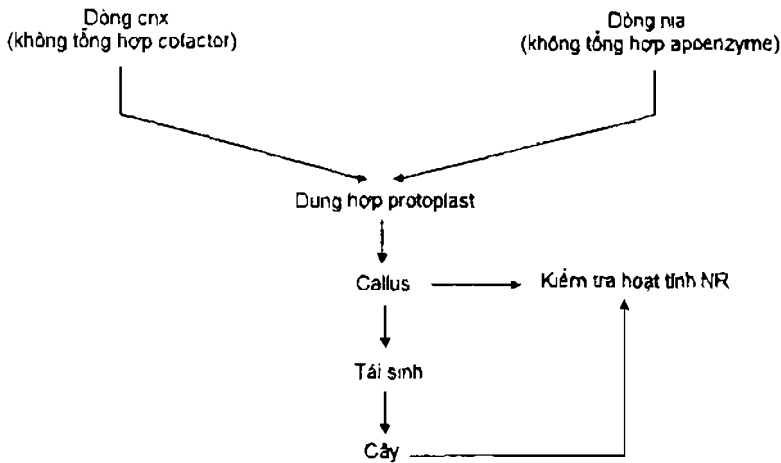
e) Các dòng khuyết dưỡng

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 *Hyoscyanus muticus*; và (c) isoleucine, leucine, và uracil ở *Nicotiana plumbaginifolia*. Các dòng *Datura* được phân lập trong nuôi cấy dịch huyền phù tế bào. Thông qua dung hợp bổ sung (fusion-complementation), các dòng khuyết dưỡng của *N. plumbaginifolia* và *H. muticus* được xác định là ở trạng thái lặn.

Chlorate (ClO_3^-)-một dạng tương tự nitrate-được biến đổi nhờ enzyme nitrate reductase trở thành chlorite (ClO_2^-), một loại độc tố của tế bào. Vì vậy, ở môi trường được bổ sung chlorate các tế bào dạng hoang dại có hoạt tính của enzyme nitrate reductase sẽ bị chết, trong khi các tế bào không có enzyme này sẽ sống sót. Các thể hồi biến (revertants) của dạng hoang dại

có thể được kiểm tra bằng khả năng sử dụng NO_3^- trong môi trường nuôi cấy của các tế bào này. Các dòng thiếu nitrate reductase được phân lập từ các tế bào nuôi cấy của *N. tabacum*, *N. plumbaginifolia*, *H. muticus*, *D. innoxia*, *Rosa damascena* và *Petunia*.

Người ta có thể sử dụng các loại dòng tế bào và các đặc tính của chúng như những đặc điểm chỉ thị trong nghiên cứu điều khiển di truyền và kỹ thuật gen. Hai loại dòng tế bào như thế đã được xác định: một loại là đột biến (nia) không tổng hợp apoenzyme, trong khi loại kia (cnx) không tổng hợp cofactor. Các phenotype này được sử dụng như là các marker bổ sung trong việc chọn lọc các thể lai soma.



Hình 6.4. Dòng cnx và nia về gen NR trong thuốc lá.

Bảng 6.3. Các đột biến khuyết dưỡng chọn lọc được trong nuôi cấy *in vitro*.

Nhu cầu dinh dưỡng/ kiểu hình	Loài	Tác nhân đột biến	Tái sinh cây
Adenine	<i>Datura innoxia</i> (1n)	EMS	Không
p-aminobenzoic acid	<i>Nicotiana tabacum</i> (1n)	EMS	Có
Arginine	<i>Nicotiana tabacum</i> (1n)	EMS	Có
Biotin	<i>Nicotiana tabacum</i> (1n)	EMS	Có
Histidine	<i>Hyoscyamus muticus</i> (1n)	NTG	Có
Hypoxanthine	<i>Nicotiana tabacum</i> (1n)	EMS	Có

f) 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.

g) 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.

Chương 7

NUÔI CÂY TẾ BÀO TRẦN VÀ ỨNG DỤNG

7.1. TẾ BÀO TRẦN (PROTOPLAST)

Các tế bào thực vật có thể phân chia và phát triển thành cây hoàn chỉnh trong những điều kiện nhất định. Ngoài ra mỗi tế bào thực vật đều có thành tế bào bao quanh. Thành tế bào giữ vai trò quan trọng liên quan đến cấu trúc và chức năng của thực vật. Nhưng chúng lại là trở ngại chính đối với việc chuyển ADN vào tế bào cũng như quá trình tạo thể lai xoma. Thành tế bào có thể bị tách tạm thời ra khỏi tế bào thực vật mà không làm mất sức sống của tế bào. Những tế bào thực vật có thành bị loại bỏ được gọi là tế bào trần (protoplast).

Kiercker (1892) lần đầu tiên tách tế bào trần thực vật khi làm thí nghiệm với vảy củ hành bằng cách cắt nhỏ chúng trong dung dịch co nguyên sinh, kết quả giải phóng ra các tế bào trần khi cắt xuyên qua thành tế bào. Số lượng tế bào trần thu được từ thí nghiệm trên rất thấp và bị hạn chế với những tế bào đã không bảo hóa mạnh

Việc thu nhận các tế bào trần đã dễ dàng hơn vào những năm đầu của thập kỷ 60 của thế kỷ XX khi nhiều enzym có thể dùng cho phân giải thành tế bào được tách chiết và tinh sạch thành công. Cocking (1960) đã phát hiện ra có thể thu nhận các tế bào trần từ mô thực vật khi ngâm chúng trong dung dịch enzym xellulaza chiết từ nấm *Myrothecium verrucaria*. Vào năm 1968, các enzym dùng trong phá thành tế bào như Macerozym và xellulaza đã được sản xuất, làm cho quá trình tách các tế bào trần trở nên thuận lợi hơn.

Năm 1970, hai tác giả là Nagata và Takebe tách được tế bào trần từ thuốc lá (*Nicotiana tabacum*) và phát triển quy trình tái tạo thành tế bào, phân chia tế bào và thậm chí đã tái sinh cây. Carlson và cs (1972) lần đầu

tiên đã thông báo về việc dung hợp và tạo con lai soma khác loài. Kể từ đó đã có nhiều loài thực vật được ứng dụng thành công kỹ thuật dung hợp và nuôi cấy tế bào trần, trong đó có các loại cây trồng.

7.2. 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 các mô dự trữ như chồi hành và vảy hành (bulbs and scales) của các loài thân hành, rễ củ cải (radish root), vỏ quả giữa của dưa chuột (mesocarp of cucumber), và rễ củ cải đường (beet root).

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

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

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

- Các enzyme (pectinase, cellulase, hemicellulase) từ 0,1-2%
- Sorbitol (0,15 M) 27,3 g
- Mannitol (0,15 M) 27,3 g

- Glucose (0,1 M) 18 g
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (6 mM) 441 mg
- KH_2PO_4 (0,7 mM) 95 mg
- Đệm MESI (3 mM) 650 mg
- Điều chỉnh pH 5,6 và khử trùng dung dịch enzyme bằng màng lọc Millipore.

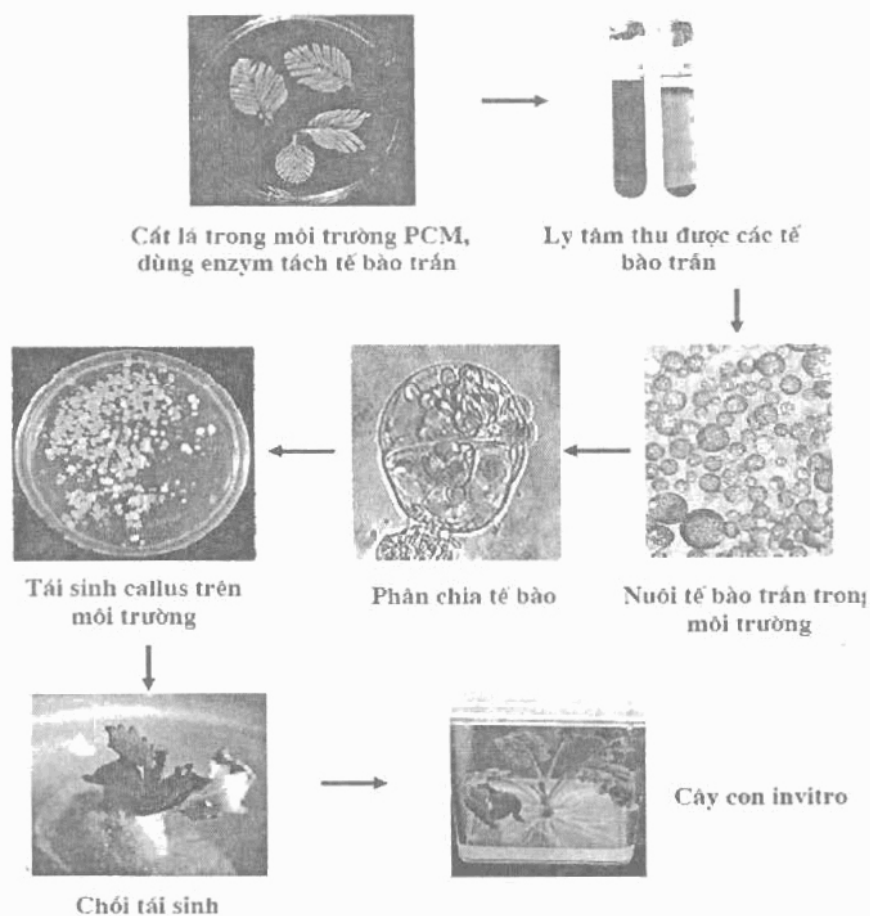
Tùy theo từng đối tượng và từng loại mô có thể thay đổi nồng độ của các enzyme trên cho thích hợp. Vì protoplast thực chất là tế bào trần không có thành cho nên có thể tách được từ nhiều nguồn khác nhau như: các bộ phận của cây (lá, rễ, hạt phấn), callus, tế bào đơn...

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/1ml 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.

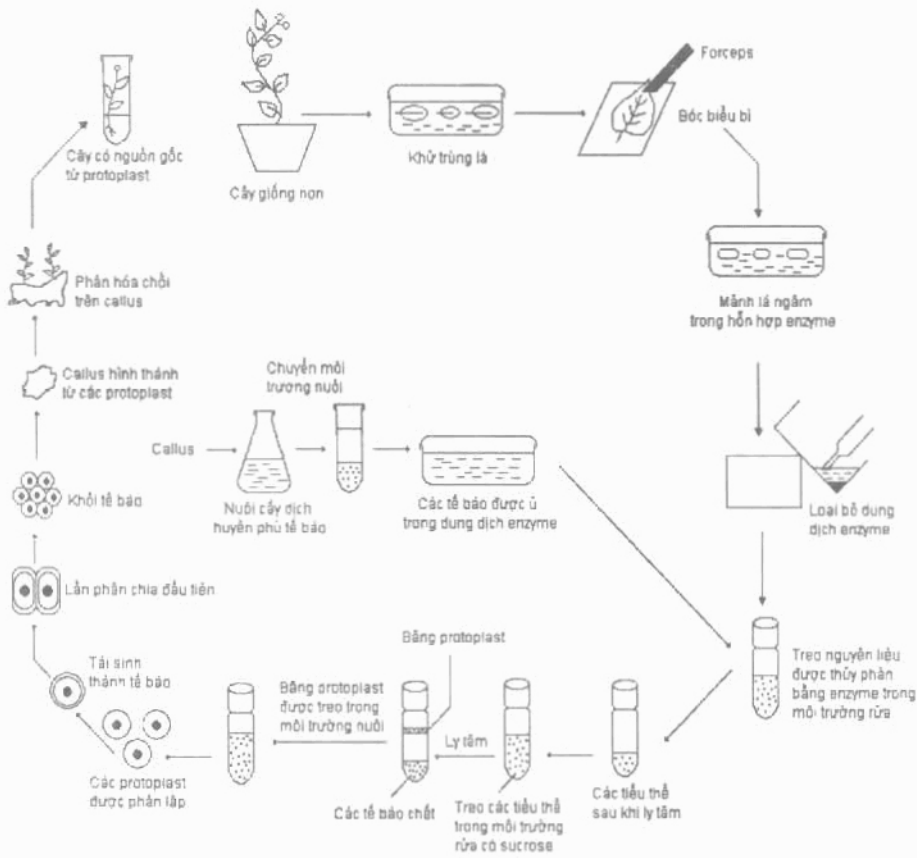


Hình 7.1 Các bước nuôi cấy tế bào trần cây hồng.

a) Lá cây

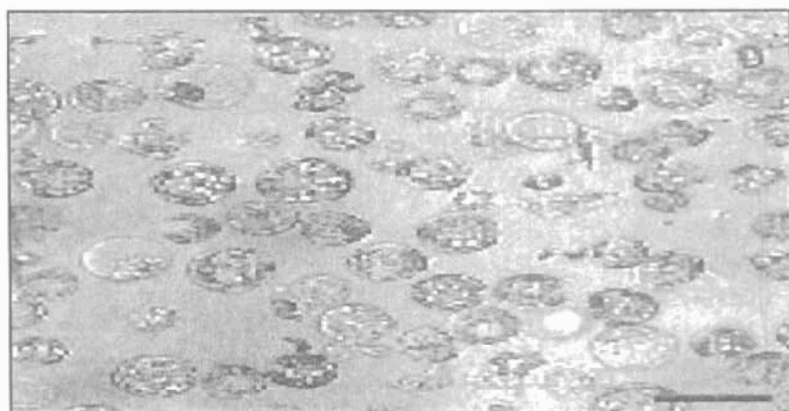
Lá là nguồn nguyên liệu thông dụng và truyền thống cho kỹ thuật protoplast thực vật, do nó cho phép phân lập được một số lớn các tế bào tương đối đồng nhất (relatively uniform cells). Protoplast phân lập từ lá qua năm bước:

- 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

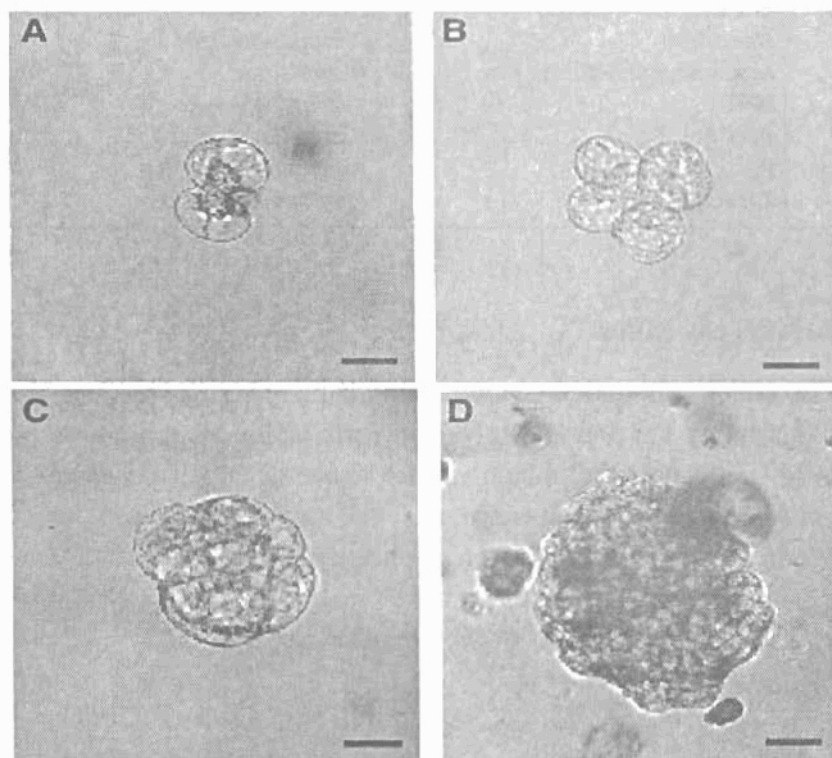


Hình 7.2. Các bước phân lập Protoplast từ lá cây

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 enzym
5. Tinh sạch tế bào trần
6. Nuôi cấy tế bào trần trong môi trường thích hợp



Hình 7.3. Phân lập protoplasts của *Echinacea purpurea* (bar = 50 mm).



Hình 7.4. Sự phân chia tiếp theo của protoplasts.

Echinacea purpurea (A) Phân chia protoplast- sau 6 giây (bar = 25 mm).

(B,C) Sự phân chia thứ hai và thứ 3 của protoplast (bar = 25 mm).

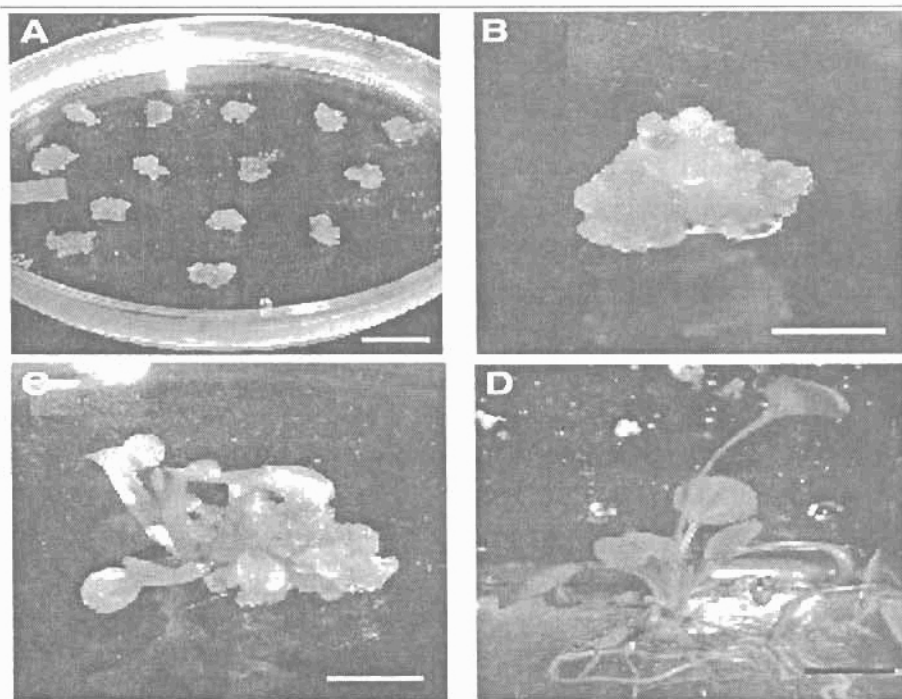
(D) Cụm Protoplast-nhận được sau 6 ngày nuôi cấy (bar = 100 mm).

Bảng 7.1. Các enzyme thương phẩm thích hợp cho phân lập protoplast

STT	Enzyme	Nguồn thu nhận
1	<i>Các enzyme cellulase Cellulase</i> Onozuka R-10 Cellulase Onozuka RS Cellulase YC Cellulase CEL Cellulysin Meicelase P-1 Driselase	<i>Trichodema 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 Rhozyme HP 150	<i>Helix pomatia</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Rhizopus sp.</i> <i>Aspergillus niger</i>
3	<i>Các enzyme Pectinase</i> Macerase Macerozyme R-10 PATE Pectinol Pectolyase Y-23 Zymolyase	<i>Rhizopus arrhizus</i> <i>R. arrhizus</i> <i>Bacillus polymyxa</i> <i>Aspergillus sp.</i> <i>Aspergillus japonicus</i> <i>Arthrobacter luteus</i>

b) Nuôi cấy callus

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



Hình 7.5. 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).

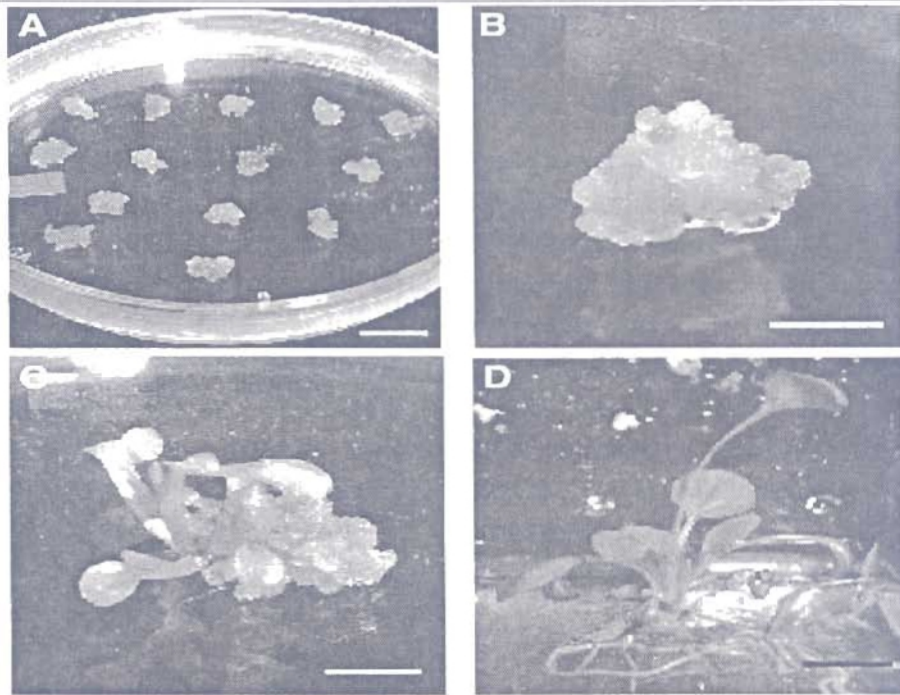
(C) Tái sinh chồi từ mô sẹo (bar = 1 cm).

(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



Hình 7.5. 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.



Hình 7.6. Phôi có nguồn gốc từ protoplast trong giai đoạn biệt hóa

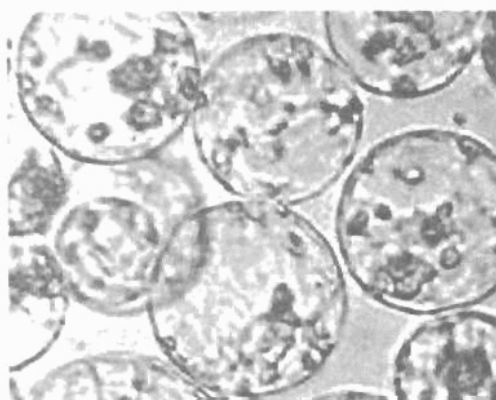
7.3. NUÔI CẤY PROTOPLAST

7.3.1. Môi trường nuôi cấy

a) Thành phần dinh dưỡng

Nói chung, môi trường nuôi cấy protoplast tương tự với môi trường nuôi cấy dịch huyền phù tế bào và callus. Tuy nhiên, nồng độ của Fe, Zn và amonium dùng trong môi trường nuôi cấy mô thực vật có thể là quá cao đối với nuôi cấy protoplast. Hầu hết muối của môi trường B5 và MS có cải biến một ít là thích hợp. Tăng nồng độ Ca^{2+} trong môi trường nuôi cấy protoplast từ 2-4 lần so với bình thường có lợi cho việc duy trì tính toàn vẹn của màng tế bào. Nồng độ sucrose thích hợp thường từ 3-5%, nhưng ở một số loài (ví dụ: thuốc lá) sucrose được sử dụng ở nồng độ thấp hơn (1,5%). Môi trường nuôi cấy protoplast sử dụng nitơ hữu cơ dạng CII và nitơ vô cơ NH_4NO_3 (20 mM/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.



Hình 7.7. Các protoplast được nuôi cấy trong môi trường dinh dưỡng

b) Áp lực thẩm thấu của môi trường

Trong quá trình phân lập và nuôi cấy, các protoplast cần được duy trì cân bằng áp lực thẩm thấu giữa môi trường và nội bào cho tới khi tái sinh được vách tế bào vững chắc. Trong cả hai trường hợp chênh lệch áp lực thẩm thấu giữa môi trường và nội bào theo hướng môi trường nhược trương hoặc ưu trương sẽ dẫn đến tình trạng protoplast bị vỡ hoặc teo lại. Các chất điều chỉnh áp lực thẩm thấu (thông thường là để tăng áp lực thẩm thấu) trong môi trường nuôi cấy protoplast và trong hỗn hợp enzyme là sorbitol, mannitol, glucose, hoặc sucrose. Các protoplast sẽ sinh trưởng ổn định hơn trong dung dịch được tăng nhẹ áp lực thẩm thấu. Đối với các protoplast thịt lá của ờ 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 mM/l và $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 40 mM/l) cải thiện tốt khả năng sống sót của protoplast. Thông thường các dung dịch enzyme được bổ sung các muối nhất định ($CaCl_2$ 5-100 mM/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 dán 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 dán 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) 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 dán 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 7.2. Môi trường KM 8p dùng cho nuôi cấy protoplast ở mật độ thấp (khử trùng bằng phương pháp lọc)

Thành phần	Nồng độ (mg/L)	Thành phần	Nồng độ (mg/L)
Muối khoáng		Các acid hữu cơ	
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	Các vitamin	
Sequestrene 330 Fe	28	Inositol	100
KI	0,75	Nicotinamide	1
H ₃ BO ₃	3	Pyridoxine-HCl	1
MnSO ₄ .H ₂ O	10	Thiamine-HCl	10
ZnSO ₄ .7H ₂ O	2	D-Calcium	0,5
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25	pantothenate	0,2
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	Folic acid	0,01
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	p-Aminobenzoic acid	
Đường		Biotin	0,005
Glucose	68400	Choline chloride	0,5
Sucrose	125	Riboflavin	0,1
Fructose	125	Ascorbic acid	1
Ribose	125		

Xylose	125	Vitamin A	0,005
Mannose	12	Vitamin D3	0,005
Rhamnose	125	Vitamin B12	0,01
Cellobiose	125		
Sorbitol	125		
Mannitol	125		
<i>Các phytohormone</i>		Đậu tương x lúa mạch	Đậu tương x đậu Hà Lan hoặc <i>N. glauca</i>
2,4-D			
Zeatin		1	0,2
NAA		0,1	0,5
Vitamin-free		-	1
casamino acid		125	-
Nước dừa		10 ml/L	-

- Kỹ thuật tầng nuôi dưỡng

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

- Đồng nuôi cấy các protoplast

Các protoplast của 2 loài khác nhau cũng được đồng nuôi cấy để kích thích sự sinh trưởng của chúng hoặc của tế bào lai. Phương pháp đồng nuôi cấy được sử dụng trong những thí nghiệm mà các callus hình thành từ 2 loại protoplast có thể phân biệt hình thái được. Ví dụ: Các tế bào lai phân lập một cách cơ học (mechanically isolated hybrid cells) được đồng nuôi cấy với các protoplast phân lập từ chủng bạch tạng (albino strain) sẽ phát triển thành các khuẩn lạc màu xanh là loại khuẩn lạc dễ phân biệt với các khuẩn lạc không có màu xanh của chủng bạch tạng.

- Nuôi cấy vi giọt

Kỹ thuật nuôi cấy vi giọt (microdrop culture) đã thành công ở trường hợp nuôi cấy các tế bào lai của *Nicotiana glauca* (+) *Glycine max* và

Arabidopsis thaliana (+) *Brassica campestris*. Kỹ thuật này cần đĩa nuôi cấy Cuprak được thiết kế đặc biệt gồm có một ngăn bên ngoài nhỏ và một ngăn bên trong lớn hơn. Các protoplast riêng rẽ hoặc các thể dị nhân trong giọt môi trường dinh dưỡng (khoảng 0.25-25 μ l) được chuyển bằng pipette Druond vào mỗi ngăn bên trong của đĩa Cuprak. Ngăn bên ngoài chứa đầy nước vô trùng để duy trì độ ẩm bên trong đĩa. Sau khi đậy nắp, đĩa được quấn giấy parafilm, giữ ở điều kiện ánh sáng và nhiệt độ tối thích. Tỷ lệ tế bào/dung tích môi trường nuôi cấy thích hợp tương đương mật độ $2-4 \times 10^3$ /ml. Nếu tăng kích thước giọt (~ 25 μ l), tức là giảm mật độ dàn trải sẽ cho hiệu quả nuôi cấy kém hơn.

7.3.2. Tái sinh cây từ protoplast

7.3.2.1. 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.

7.3.2.2. 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.

7.4. PROTOPLAST VÀ VẤN ĐỀ CHỌN DÒNG TẾ BÀO

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

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

7.5. DUNG HỢP PROTOPLAST

7.5.1. Cơ sở tế bào học của dung hợp

Dung hợp tế bào trần bao gồm ba pha:

- 1- Pha kết dính: Màng sinh chất của hai hay nhiều tế bào trần tiên sát nhau.
- 2- Dung hợp màng tại những vùng nhỏ liên kết chặt dẫn đến hình thành tế bào chất liên tục hoặc cầu giữa các tế bào trần.
- 3- Giãn nở của các cầu nguyên sinh chất và hình thành thể đồng nhân hoặc dị nhân hình cầu.

Sau khi dung hợp màng, tế bào chất của 2 loại tế bào trần sẽ kết hợp với nhau trong khoảng vài giờ. Trong thể dị nhân, hai nhân có thể phân bào đồng thời trên sợi tho chung nhưng các nhiễm sắc thể không đi cùng với nhau, kết quả tạo ra mô khảm (Kao và cộng sự, 1974; Gosch và Reinert, 1978). Thể dị nhân cũng có khả năng duy trì ở một vài thế hệ tế bào sau đó xảy ra dung hợp nhân ở gian kỳ hoặc ở lần nguyên phân đồng bộ đầu tiên. Chỉ có những tế bào lai được tạo ra qua dung hợp nhân trong nguyên phân mới có khả năng tiếp tục phát triển.

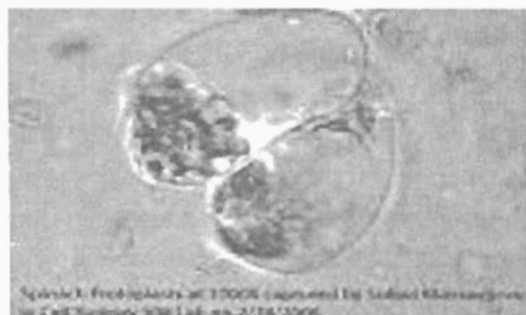
Những nghiên cứu tế bào học chi tiết của các dòng tế bào lai soma và những phân tích kiểu nhân thực vật lai soma đã cho thấy, trong các tế bào lai, sự hợp nhất hoàn toàn genôm từ 2 nguồn thường không xảy. Sự đảo thái dần dần nhiễm sắc thể của một trong các dạng cha mẹ đã được

biết đến ở tế bào lai soma động vật. Đặc điểm này đã quan sát thấy ở thực vật, chẳng hạn các phân bào không bình thường trong các dòng tế bào lai giữa loài đỗ tương với loài thuốc lá được ghi nhận xảy ra ngay ở lần phân chia nhân đầu tiên. Những dòng tế bào này cũng biểu hiện sự đảo thái chọn lọc nhiễm sắc thể của thuốc lá. Sau 1 tháng, các nhiễm sắc thể lớn của thuốc lá đã hiếm gặp và sau 7 tháng có thể chỉ một số nhiễm sắc thể của thuốc lá còn tồn tại. Đồng thời các dòng tế bào lai có các đặc điểm giống với các dòng đỗ tương về sự phân bố của các isoenzym: alcohol dehydrogenaza và aspartat aminotransferaza. Trong các tế bào lai khác loài được hình thành tổ hợp *Arabidopsis thaliana* x *Brassica campestris*, sự phân bào không bình thường là khá phổ biến, nhưng sau 4 - 5 tháng, các tế bào lai vẫn giữ được toàn bộ các nhiễm sắc thể của cha mẹ. Sau 7 tháng, một số nhiễm sắc thể của *Brassica campestris* đã bị loại bỏ, đặc biệt các tế bào của cây tái sinh từ tế bào lai đã thể hiện sự vắng mặt hoàn toàn nhiễm sắc thể của *Brassica*. Sự loại bỏ ưu tiên nhiễm sắc thể của 1 trong các dạng cha mẹ đã được thông báo xảy ra ở các mô lai soma giữa *Pasthinocissus* x *Petunia* (Power và cộng sự, 1975), loại tế bào trần đem lai có nguồn gốc từ tế bào thịt lá. Trong những trường hợp như vậy, nhiễm sắc thể của tế bào trần thịt lá sẽ bị loại bỏ ưu tiên.

7.5.2. Các phương pháp dung hợp

7.5.2.1. 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* x *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 7.8. Dung hợp tế bào trần bằng xử lý PEG

7.5.2.2. 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 10⁻³, và KH_2PO_4 0,7⁻³) 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 lỵ tâm và các protoplast được treo trở lại trong môi trường nuôi cấy.

Nồng độ và trọng lượng phân tử của PEG quyết định sự thành công của thí nghiệm dung hợp. PEG có trọng lượng phân tử thấp (~ 100) không thể tạo ra một sự dính chặt chắc chắn, trong khi PEG trọng lượng phân tử 6000 cho hiệu quả dung hợp cao hơn. Xử lý PEG cùng với pH/Ca^{2+} có hiệu quả tăng tần số dung hợp và khả năng sống của các protoplast.

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

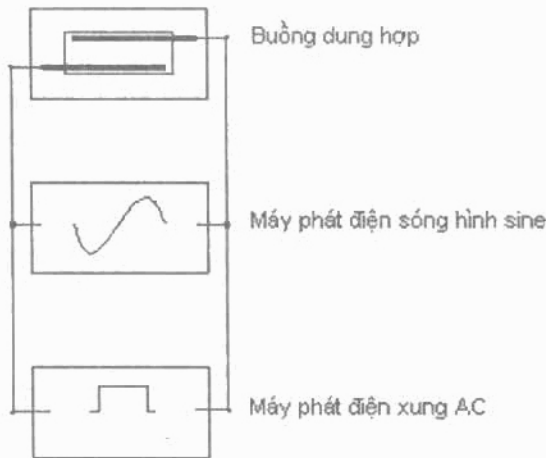
7.5.2.3. Dung hợp bằng điện

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, Ziermann 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

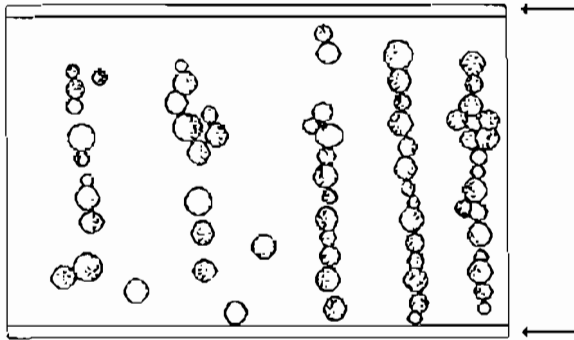
thích các protoplast sắp thành từng chuỗi tế bào giữa các điện cực. Sau khi các tế bào xếp hàng hoàn chỉnh, quá trình dung hợp được thực hiện theo từng đợt ngắn của xung DC điện áp cao. Xung DC điện áp cao tạo ra sự phá vỡ thuận nghịch của màng nguyên sinh chất ở vị trí tiếp xúc của các tế bào, tạo ra 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 7.9. 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 7.10. 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)

7.5.2.4. Chọn lọc các thể lai soma

- Phương pháp miễn cảm được phẩm

Có thể ứng dụng sự miễn 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 được 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

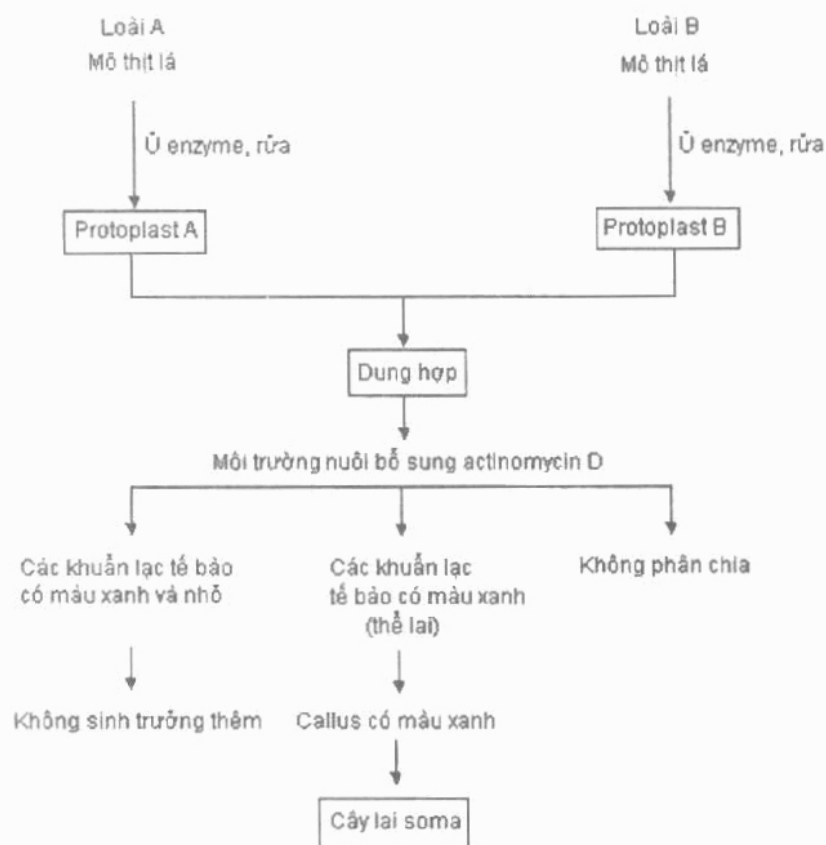
Chọn lọc các thể lai soma nhờ sự bổ sung di truyền của các đột biến khuyết dưỡng Mặc dù phương pháp này ứng dụng cho các thực vật bậc cao có gặp một số khó khăn, nhưng người ta cũng đã thành công trong việc chọn lọc một số lượng lớn các thể lai soma bằng cách dùng các protoplast khuyết tật enzyme nitrate-reductase (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 bổ mẹ không sinh trưởng khi có mặt nitrate trong khi các sản phẩm dung hợp đã tái sinh cây.



Hình 7.11.. 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

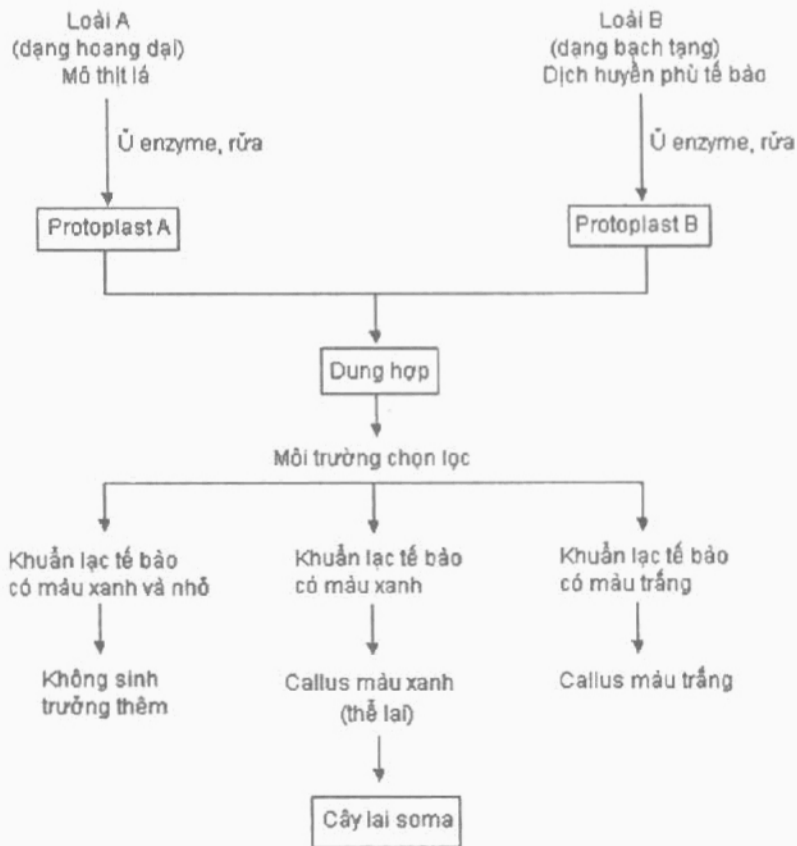
Dùng phương thức chọn lọc bằng mắt để phân lập các tế bào lai phát triển trên môi trường nuôi cấy có thành phần gây mẫn cảm đối với các protoplast bổ mẹ. Thí nghiệm điển hình là dùng protoplast dạng hoang dại (mô thịt lá) của *Petunia parodii* dung hợp với protoplast bạch tạng phân lập từ nuôi cấy dịch 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 bổ 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.



Hình 7.12. 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

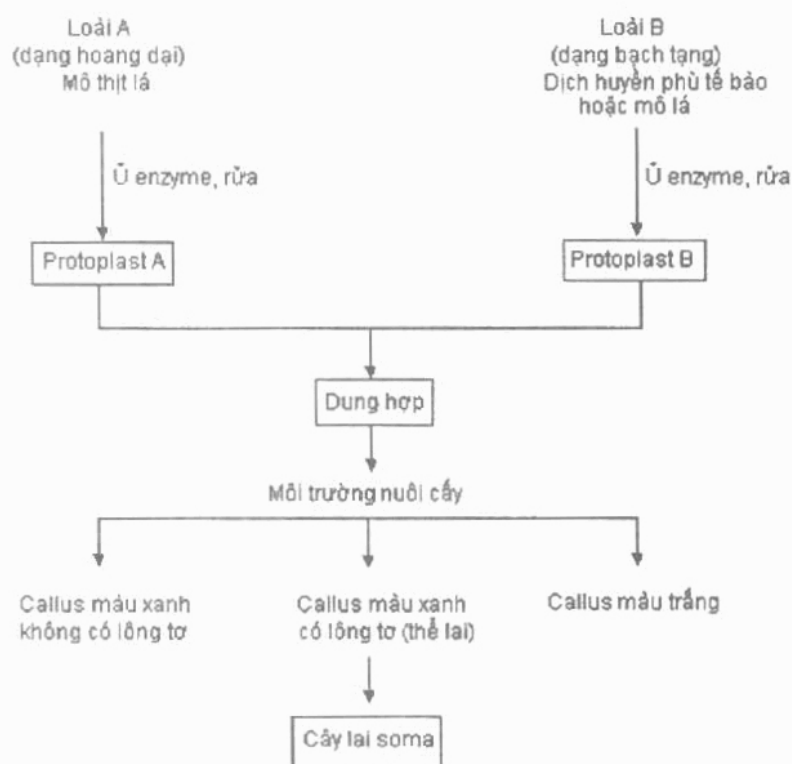
- Chọn lọc bổ sung di truyền

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 bổ 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 bổ 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.



Hình 7.13. 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



Hình 7.14. Phương thức dùng cho lai soma khác chi của *Atropa belladonna*

- Sử dụng các đột biến bạch tạng có các gen không allele cho chọn lọc bổ sung di truyền

Melchers và Labib (1974) đã tiến hành thí nghiệm bằng cách sử dụng protoplast của hai giống thuốc lá *Nicotiana tabacum*: Giống s (sublethal) không tổng hợp được diệp lục bình thường nên rất mẫn cảm với ánh sáng cường độ cao. Giống v (virescent) cũng không tạo được lục lạp bình thường lá non trắng hoàn toàn và mẫn cảm với ánh sáng cường độ cao.

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

Melchers đã tiến hành tách protoplast của cây đơn bội thu được từ nuôi cấy bao phấn của cây s và cây v rồi cho dung hợp. Sản phẩm dung

hợp được chọn lọc trên môi trường chiếu 10.000 lux cho kết quả chỉ những hợp bào sống và phát triển thành khối callus xanh, trong khi các loại tế bào bố mẹ đều chết. Cây tái sinh từ khối callus xanh có lá xanh bình thường và chịu được ánh sáng cường độ cao.

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

7.5.2.5. 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 tủng 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 sang 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 phần cho. Tuy nhiên, giới hạn đào thải tùy thuộc vào hệ gen cho và các điều kiện nuôi cấy xác định.

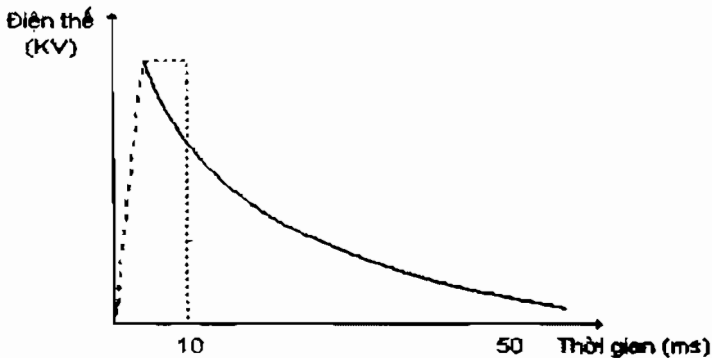
Maliga và cs (1982) chứng minh rằng tính kháng streptomycin được mã hóa bởi chloroplast có thể được chuyển thông qua tế bào chất. Tương tự, Tan (1987) thu được các tế bào lai bằng cách dung hợp tế bào chất của *Petunia hybrida* và protoplast của *Lycopersicum peruvianum*.]

7.6. CHUYỂN GEN VÀO TẾ BÀO TRẦN

7.6.1. Chuyển nạp DNA ngoại lai vào protoplast bằng xung điện

Thiết bị điện xung (electroporator) là thiết bị có khả năng tạo ra các xung điện trong thời gian rất ngắn (5-6 phần nghìn giây) và ở điện thế (pulse strength) chính xác (500 V/cm) với thời gian tắt dần (decay time) 20 ms. Protoplast được đặt giữa hai tấm kim loại cách nhau từ 1-4 trong một cuvette bằng nhựa. Ở điện thế cao, xung điện tạo các lỗ tạm thời (cỡ 30 nm) trên màng protoplast và DNA bên ngoài có thể xâm nhập vào chất nguyên sinh.

Xung điện được tạo ra khi giải phóng dòng điện chứa trong một điện dung (capacitor) từ điện cực này qua điện cực khác. Các vật nằm trong không gian giữa hai điện cực chịu tác động tắt dần của xung điện. Xung điện được xác định bởi hai giá trị là sự chênh lệch điện thế và thời gian tắt dần. Ở các thiết bị điện xung hiện đại, thời gian tắt dần được thu lại rất ngắn và trên biểu đồ xung điện được biểu diễn gần như một cột vuông. Nói chung, các thiết bị điện xung hoàn chỉnh được nhiều hãng cung cấp để thực hiện chuyển gen vào vi sinh vật, protoplast thực vật hoặc tế bào động vật.

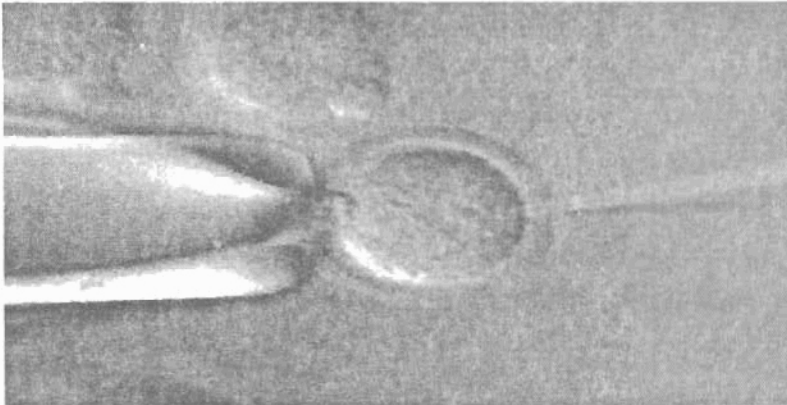


Hình 7.15. Thời gian tắt dần của xung điện trên các thiết bị chuẩn (---) và thiết bị đơn giản (—)

7.6.2. Chuyển nạp DNA ngoại lai vào protoplast bằng kỹ thuật vi tiêm

Vi tiêm (microinjection) là kỹ thuật sử dụng phổ biến trong công nghệ tế bào động vật (animal cell biotechnology). Trên hiện vi trường, DNA

plasmid có thể được tiêm vào protoplast và thực hiện biến nạp gen thành công ở khá nhiều đối tượng thực vật. Tuy nhiên, Kỹ thuật này hiện nay ít được các phòng thí nghiệm sử dụng, vì thao tác vi tiêm dưới kính hiển vi đòi hỏi thiết bị vi thao tác (micromanipulator) cực nhạy, thiết bị kéo và mài kim tiêm ở các ống thủy tinh (puller) rất đắt tiền. Ngoài ra, nó còn đòi hỏi kỹ năng thao tác và sự kiên nhẫn cao của kỹ thuật viên.



Hình 7.16. Vi tiêm DNA vào protoplast

7.6.3. Chuyển nạp DNA ngoại lai vào protoplast bằng PLO và PEG

Năm 1977, Lurquin và Kado chứng minh việc biến nạp DNA plasmid vào protoplast của cây đậu đũa (cowpea) được kích thích bởi chất poly-L-ornithine (PLO). Davey và cs (1980) đã dùng phương thức này để biến nạp DNA của Ti plasmid vào protoplast của *Petunia*.

PEG (polyethylene glycol) cùng với sự có mặt của Ca^{2+} là tác nhân dung hợp được sử dụng phổ biến nhất trong lai soma. Krens và cs (1982) là những người đầu tiên chứng minh có thể dùng PEG để chuyển trực tiếp DNA vào trong protoplast thực vật. Kỹ thuật này đòi hỏi phải nuôi protoplast với DNA trần (naked DNA) có mặt PEG và $CaCl_2$. Sau khi hòa tan dần dần hỗn hợp, các protoplast được phân lập, rửa và cuối cùng dàn trải trên môi trường chọn lọc. Tần số chuyển nạp trung bình ở protoplast thuốc lá khoảng từ 10^{-2} và 10^{-5} . Kỹ thuật này đã được cải biến để ứng dụng cho protoplast của các loài ngũ cốc và các loài hai lá mầm khác, như sau: (a) bổ sung PEG sau DNA và (b) xử lý shock nhiệt protoplast ở $46^\circ C$ rồi làm lạnh trên băng. Một số ví dụ gần đây của PEG/ $CaCl_2$ kích thích biến nạp DNA vào protoplast và biểu hiện các gen khám ở ba loài

một lá mầm (Uchimiya và cs 1986, Paszkowski và Saul 1986), và biểu hiện trong một thời gian ngắn gen khảm *nos-cat* ở protoplast tế bào thịt lá của thuốc lá, lúa mì và ngô (Paszty và Lurquin 1989).

7.7. CÁC BƯỚC NUÔI CẤY PROTOPLAST

7.7.1. Nguyên liệu thực vật

Lá của cây thuốc lá *in vitro* được chọn dùng làm nguyên liệu tách protoplast. Sử dụng các lá được tách trong ngày.

7.7.2. Chuẩn bị môi trường

Dung dịch enzyme tách protoplast:

- + Onozuka cellulase R10 0,5 %
- + Onozuka macerozyme R10 0,1 %
- + Mannitol 13,0 %
- + pH môi trường ~ 5,8

Dung dịch này được khử trùng bằng màng lọc Millipore loại có đường kính lỗ lọc 0,2-0,25 μm .

7.7.3. Tiến hành

* Ngày thứ nhất

- Các mẫu lá thuốc lá *in vitro* được loại bỏ hết gân lá và đặt lên đĩa petri vô trùng. Dùng dao cắt băm nhỏ các mảnh lá.

- Cho các mảnh lá đã băm nhỏ vào cốc đong vô trùng loại 50 ml bổ sung 10 ml dung dịch enzyme tách protoplast. Bọc cốc đong bằng giấy parafilm, ghi nhãn và đặt trong tối qua đêm trên máy lắc ở tốc độ thấp (khoảng 40 vòng/phút).

* Ngày thứ hai

- Dùng micropipette chuyển dịch protoplast lên lưới lọc vô trùng ($\Phi = 65\mu\text{m}$) đặt trong cốc loại 50 ml.

- Bổ sung thêm 3 ml dung dịch rửa (PI + 10% mannitol) vào cốc chứa các mảnh lá vụn, lắc mạnh, và lọc tiếp trên lưới lọc rồi chuyển vào hỗn hợp protoplast-enzyme của bước trên.

- Bổ sung thêm 2 ml dung dịch rửa để rửa protoplast hết khỏi lưới lọc
1. Chuyển hỗn hợp protoplast-enzyme (tổng cộng 15 ml) vào tube ly tâm loại 15 ml và ly tâm 50×g trong 10 phút.

- Loại bỏ phần dịch nổi phía trên, tái huyền phù thể bằng 10ml dung dịch tách (PI + 20% sucrose), thêm 1ml dung dịch rửa lên trên bề mặt dung dịch tách và protoplast sao cho không làm hòa lẫn hai dung dịch, tốt nhất là tạo thành hai pha (nhỏ từ từ dung dịch rửa bên thành tube tránh bắn tung toé lên dịch rửa bên dưới), ly tâm 50×g trong 10 phút. Các protoplast sống sót sẽ nằm ở trên bề mặt dung dịch .

- Dùng micropipette hút lớp protoplast màu xanh lục nổi trên tube ly tâm và chuyển nó sang một tube ly tâm sạch, thêm 10 ml dung dịch rửa và ly tâm lại. Protoplast sẽ lắng xuống đáy tube và có dạng viên.

- Rửa protoplast thêm một lần nữa trong 10 ml dung dịch rửa. Loại bỏ phần nổi trên mặt và tái huyền phù protoplast trong khoảng chừng 1 ml môi trường nuôi cấy protoplast (PC).

- Đặt một giọt protoplast trên buồng đếm hồng cầu và ước lượng mật độ protoplast (số lượng tế bào/số ô đếm ×10.000). Nuôi cấy protoplast bằng cách pha loãng 50.000 tế bào/ml môi trường nuôi cấy protoplast và chuyển sang một đĩa petri vô trùng.

- Bọc lại, ghi nhãn và nuôi cấy qua đêm trong tối ở 28°C.

* Ngày thứ ba

- Chuyển sang nuôi cấy ở ánh sáng yếu (10-20 $\mu\text{mol}/\text{sec}/\text{m}^2$ hoặc bọc một lớp vải thưa dưới đèn huỳnh quang ánh sáng trắng, với chu kỳ chiếu sáng 16 giờ, nuôi trong 2 ngày.

* Ngày thứ năm

- Chuyển sang nuôi cấy ở cường độ ánh sáng cao hơn (50-75 $\mu\text{mol}/\text{sec}/\text{m}^2$) trong 2 ngày bằng cách bỏ lớp vải thưa ra.

* Ngày thứ bảy

- Ghi lại kết quả của bài học nuôi cấy protoplast, số tế bào phân chia từ tổng số tế bào nuôi cấy ban đầu, trong một mẫu có 100-200 protoplast nuôi cấy. Có dấu hiệu của sự nhiễm bẩn không.

Chương 8

CÔNG NGHỆ SINH HỌC TRONG VIỆC BẢO QUẢN VÀ PHÁT TRIỂN NGUỒN GEN QUÝ HIẾM

8.1. KHÁI NIỆM CHUNG VỀ BẢO QUẢN NGUỒN GEN THỰC VẬT

Mục đích cơ bản của việc bảo quản nguồn tài nguyên gen thực vật là duy trì sự phong phú, đa dạng di truyền trong loài, giữa các loài và cả hệ sinh thái nói chung. Trên cơ sở đó làm cơ sở cho việc khai thác, sử dụng chúng có hiệu quả nhất cả trong thời gian hiện tại và trong tương lai (Khanna và cs, 1991). Công việc bảo quản nguồn gen thực vật là một công việc không thể thiếu trong công tác giống cây trồng.

- Tùy thuộc vào loại cây trồng khác nhau và bản năng sinh tồn nói giống của từng loài mà người ta chọn phương thức bảo quản nguồn gen phù hợp. Dựa vào đặc tính sinh sản, các loài cây trồng nói riêng và các loài thực vật nói chung được chia làm 3 nhóm phương pháp chính sau:

+ Cây sinh sản hữu tính, hạt của chúng có thể chịu đựng được điều kiện bảo quản ở nhiệt độ thấp, độ ẩm thấp. Các loài cây này gồm có: hạt lúa nước, ngô, đậu tương, lúa mì, đại mạch, ôi, các hạt rau....

+ Cây sinh sản hữu tính, hạt của chúng không thể chịu được điều kiện bảo quản ở nhiệt độ và ẩm độ thấp. Khi bảo quản trong điều kiện nhiệt độ và ẩm độ thấp, hạt dễ bị hỏng, mất khả năng nảy mầm. Các loài cây trồng này gồm có cao su, dừa, xoài, mít, lê, măng cụt, sầu riêng, chôm chôm....

+ Các cây trồng được nhân giống vô tính lâu dài, chúng mất khả năng sinh sản hữu tính. Các loài này gồm có: khoai sọ, dưa, dong riềng.... là loài mất hoàn toàn khả năng sinh sản hữu tính. Một số loài nhân vô tính nhưng vẫn còn một phần khả năng sinh sản hữu tính như: khoai lang, sắn, mía, chuối, tỏi, hành....

- Tùy theo đặc tính sinh học của loài, tùy theo mức độ tồn tại mà có các phương thức bảo quản nguồn gen khác nhau. Tuy nhiên, có thể chia làm hai phương thức bảo quản chính như sau:

+ Bảo quản tại chỗ - Bảo quản *in situ* là hình thức bảo quản nguồn gen tại chỗ, tại vùng chúng thường được trồng, được tồn tại trong điều kiện sinh thái tự nhiên của chúng. Phương thức bảo quản này thực hiện đối với cây sinh sản vô tính, cây hoang dại, một số loài cây có múi đặc sản như cam, bưởi, quýt.....

+ Bảo quản *ex situ* là hình thức bảo quản mẫu trong điều kiện nhân tạo tối ưu, Nói cách khác đây là hình thức thu gom các loài cây trồng từ nơi xuất xứ được bảo quản cất giữ, hoặc trồng tại các vườn mẫu. Bảo quản *ex situ* có các hình thức như:

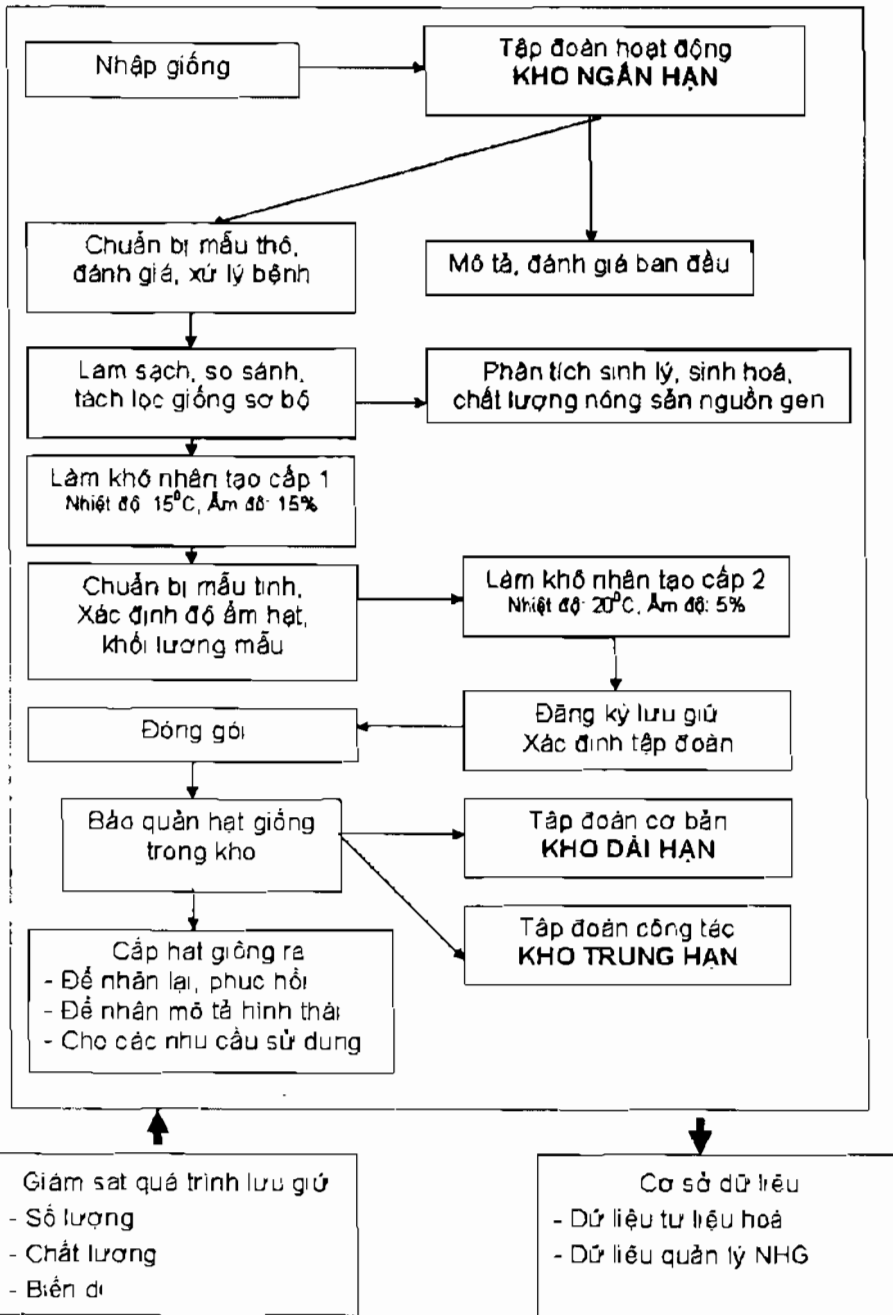
- (+) Bảo quản tại vườn ươm (*field genebank*)
- (+) Bảo quản hạt trong kho lạnh (*seed genebank*)
- (+) Bảo quản *in vitro* (*in vitro genebank*)
- (+) Bảo quản ADN

Việc lựa chọn hình thức bảo quản đối với cây trồng là phụ thuộc vào bản chất, phụ thuộc vào điều kiện kinh tế, sự phát triển khoa học và công nghệ của từng Quốc gia. Nhiều nước sử dụng cả 4 hình thức bảo quản nói trên để duy trì, bảo quản vốn gen của cây trồng. Tuy nhiên, tùy từng loài mà tỷ lệ phân trăm hình thức bảo quản khác nhau.

Ví dụ đối với lúa, bảo quản hạt chiếm 80%, bảo quản *in situ* chiếm 10%, bảo quản *in vitro* là 7%, còn bảo quản hạt phấn 3%.

Bảo quản khoai lang: bảo quản trên đồng ruộng là 50%, bảo quản hạt 10%, bảo quản *in situ* là 8%, bảo quản *in vitro* là 25% và bảo quản hạt phấn là 7%.

Trên thế giới hiện nay có những kho bảo quản hạt giống rất lớn, gồm hầu hết các hạt giống cơ bản trên thế giới. Nhìn chung phương thức bảo quản *in vitro* có vai trò rất lớn vì chủ yếu cần một khoảng không gian nhỏ hẹp, có thể lưu giữ một số lượng lớn cá thể để chủ động trong công tác trồng trọt.



Hình 8.1. Sơ đồ bảo quản hạt trong kho lạnh



Hình 8.2. Bảo quản hạt trong kho lạnh

8.2. BẢO QUẢN NGUỒN GEN IN VITRO

Bảo quản nguồn gen *in vitro* sử dụng hai phương pháp chính là bảo quản sinh trưởng tối thiểu và phương pháp bảo quản nguồn sinh trưởng tạm thời

a) Phương pháp bảo quản sinh trưởng tối thiểu

Phương pháp này áp dụng cho việc bảo quản ngắn hạn các cây nhân giống vô tính *in vitro* (chuối, dứa, khoai tây, khoai lang, ...). Đặc điểm cơ bản của phương pháp này là kéo dài thời gian giữa 2 lần cấy chuyển nhờ ức chế sinh trưởng của mẫu nuôi cấy nhằm giữ mức tối thiểu chi phí trong quá trình bảo quản.

Mẫu đưa vào bảo quản thường là dạng phôi, chồi, mầm, hoặc cây con sạch bệnh. Mẫu cần được đặt trong điều kiện nhiệt độ, ánh sáng và chế độ dinh dưỡng nhất định để tốc độ sinh trưởng của chúng giảm đi 15 - 20 lần so với tốc độ sinh trưởng trong điều kiện bình thường.

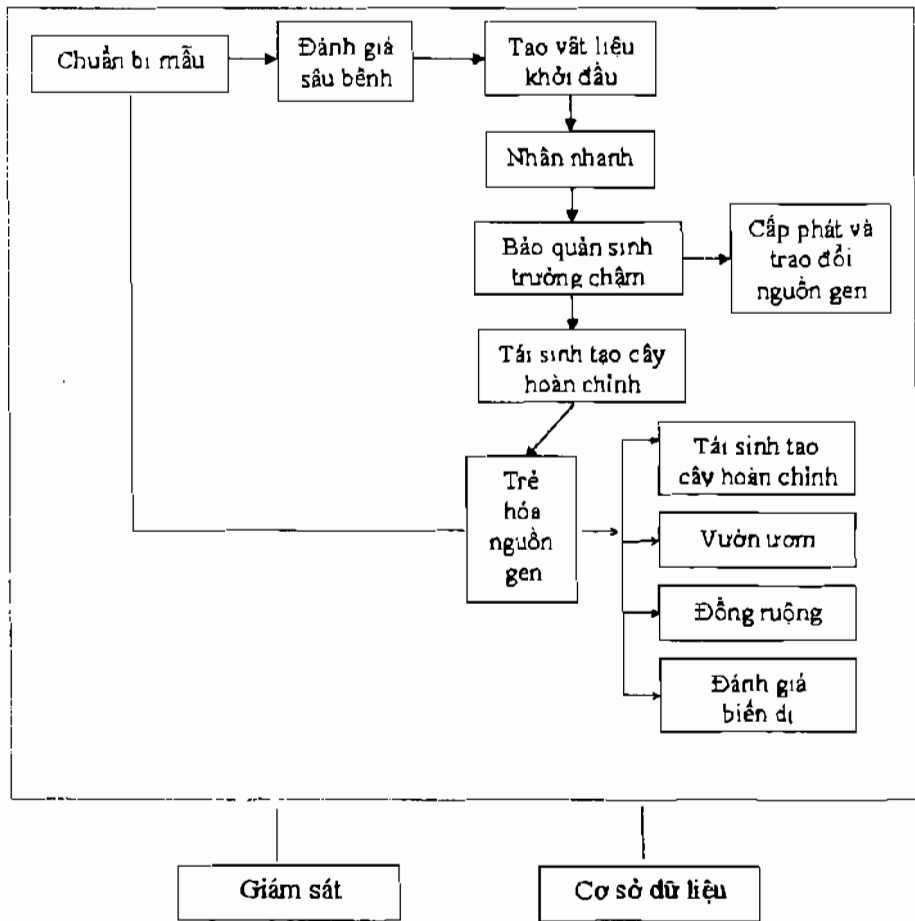
Các nhân tố thường dùng để ức chế sinh trưởng là:

- Nhiệt độ phòng nuôi cấy thấp: Đây là nhân tố phổ biến để ức chế sinh trưởng. Tùy từng loại khác nhau mà chúng ta hạ nhiệt độ cho thích hợp.

Đối với các loài chịu lạnh, nhiệt độ bảo quản từ 0°C đến 5°C. Ví dụ, giữ chồi cây táo, cây thông ở nhiệt độ 2°C trong 52 tuần, khoai tây giữ ở nhiệt độ 6 - 12°C thời gian 25 - 52 tuần... Những cây nhiệt đới cần bảo

quản ở nhiệt độ cao hơn, ví dụ như cây chuối giữ ở nhiệt độ 15°C, trong thời gian 18 tháng. khoai lang giữ ở 18°C, thời gian 12 đến 18 tháng.

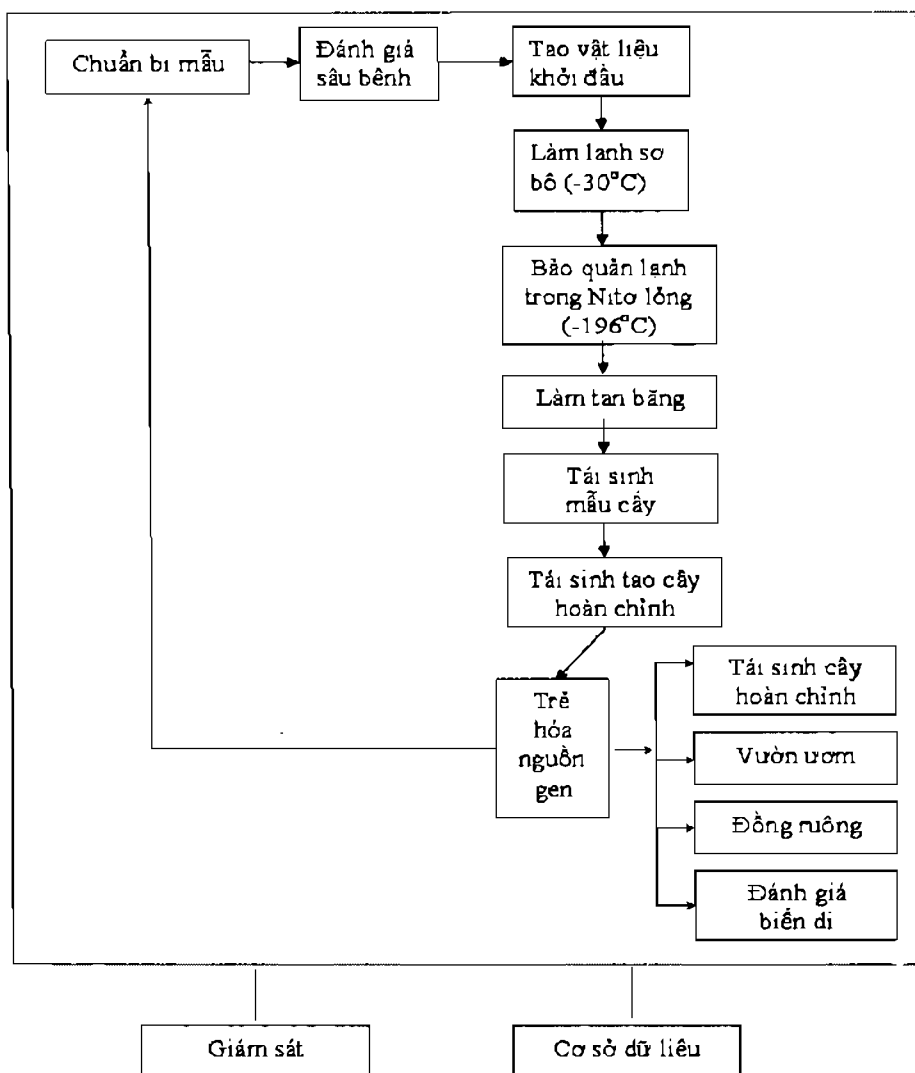
- Bổ sung vào môi trường nuôi cấy các chất ức chế sinh trưởng như axit abscisic, clo, cholin clorit, làm tăng áp suất thẩm thấu bằng cách bổ sung vào môi trường nuôi cấy các chất như sucrose, manitol..., làm giảm việc cung cấp oxy cho mẫu cấy bằng cách dùng dầu phủ và có thể làm nghèo môi trường dinh dưỡng đến mức tối thiểu. Tất cả các biện pháp này làm giảm đáng kể khả năng sinh trưởng của mẫu nuôi cấy bao quản. Ví dụ, khi nuôi cấy sắn ở nhiệt độ 20°C có bổ sung vào môi trường 4% sucrose, có thể kéo dài thời gian nuôi cấy tới 15 tháng.



Hình 8.3. Sơ đồ phương pháp bảo quản sinh trưởng tối thiểu

b) Phương pháp bảo quản ngừng sinh trưởng tạm thời

Đây là phương pháp bảo quản mẫu giống trong nitơ lỏng, thường áp dụng cho nhiều loại cây trồng. Trong thời gian bảo quản tế bào, mô hoàn toàn ngừng sinh trưởng. Mẫu bảo quản gồm phôi, mô sẹo và tế bào. Thời gian bảo quản có thể kéo dài 20 - 30 năm, hoặc lâu hơn. Trước khi đưa vào bảo quản, mẫu phải được xử lý tránh hình thành các tinh thể nước trong tế bào làm chết mẫu. Quy trình bảo quản gồm các bước sau:



Hình 8.3. Sơ đồ phương pháp bảo quản ngừng sinh trưởng tạm thời

- Tách mẫu nuôi cấy *in vitro* đang ở pha sinh trưởng mạnh để đưa vào bảo quản.

- Xử lý chống đông bằng dung dịch DMSO, nồng độ 1M; kết hợp với glycerol, nồng độ 1M và đường sucrose, nồng độ 2M.

- Hạ nhiệt độ xuống - 30°C đến - 40°C để giữ ổn định các chất trong tế bào.

- Bảo quản ở nhiệt độ - 196°C trong thời gian dài, có thể tới 30 năm. Khi hết thời gian bảo quản, hoặc khi cần đưa mẫu ra thì phải phá băng và phục hồi sinh trưởng theo thứ tự:

+ Phá băng ở nhiệt độ 37 - 40°C.

+ Phục hồi sinh trưởng và nuôi cấy tạo ra cây hoàn chỉnh.

8.3. CÁC TIÊU CHÍ ĐỂ TÍNH SỐ LƯỢNG NGUỒN GEN CẦN LƯU GIỮ TẠI NGÂN HÀNG GEN CÂY TRỒNG QUỐC GIA

Số lượng nguồn gen cần lưu giữ được tính toán dựa trên bốn tiêu chí chính (theo Tiêu chuẩn ngân hàng gen do FAO và IPGRI ban hành năm 1994):

- *Sự giàu có về tài nguyên thực vật của nước ta.* Việt Nam là quốc gia có diện tích và dân số vào loại trung bình trên thế giới (330.991,5 km², trên 80 triệu dân. Đất nước có 54 dân tộc), lãnh thổ trải dài từ 8^o30' đến 23^o30' vĩ bắc. Hai phần ba diện tích là đồi núi, trên 3000 km bờ biển, có hai đồng bằng châu thổ lớn. Khí hậu nhiệt đới gió mùa, xen lẫn một số đặc điểm khí hậu cận nhiệt đới. Do những điều kiện trên nên tài nguyên thực vật của nước ta bao gồm cả những loài cây ôn đới, cận nhiệt đới và nhiệt đới. Việt Nam cũng là một trong những nước sớm có nền văn minh nông nghiệp, số lượng các loài, giống cây trồng rất phong phú. Vì vậy nước ta được thế giới đánh giá là một trong 15 quốc gia giàu có nhất về tài nguyên thực vật, nằm trong một cửa tâm trung tâm khởi nguyên và nằm trong một cửa mười hai trung tâm đa dạng di truyền quỹ gen cây trồng trên toàn Thế giới.

Số liệu điều tra gần đây cho thấy nước ta có trên 14.000 loài thực vật bậc cao, trong đó có 150 loài cho tinh bột, 130 loài cây ăn quả, 100 loài cây lấy dầu, 90 loài cây lấy sợi, 1.000 loài cây lấy gỗ và trên 2000 loài cây làm thuốc và hàng trăm loài cây gia vị và cây hương liệu.

Hiện nay, cả nước đang khai thác, sử dụng 700 loài cây trồng, những nhóm chủ yếu là:

- Cây trồng lấy tinh bột làm lương thực:	39 loài
- Cây trồng làm lương thực không phải là tinh bột:	95 loài
- Cây trồng ăn quả:	104 loài
- Cây trồng làm rau:	55 loài
- Cây trồng lấy dầu:	44 loài
- Cây trồng lấy sợi:	16 loài
- Cây trồng để sản xuất đồ uống:	12 loài
- Cây trồng làm gia vị:	39 loài
- Cây trồng làm hương liệu:	19 loài
- Cây trồng để che phủ đất trồng đời trọc:	29 loài

Đặc biệt trong số trên 2000 loài cây thuốc thuộc 263 chi, khoảng 700 loài đã được ghi trong sách thuốc. 150 - 180 vị thuốc lấy từ các cây thuốc được sử dụng trong các bài thuốc truyền thống. Khoảng 120 loài cây thuốc được người dân địa phương sử dụng đặc biệt là người dân vùng núi và khu vực nông thôn.

Trong khi đó, hiện nay do hạn chế về cơ sở vật chất phục vụ bảo quản (kho lạnh, đồng ruộng ...) cũng như mức độ đầu tư cho thu thập, số lượng nguồn gen đang lưu giữ tại Ngân hàng gen cây trồng quốc gia và các cơ quan mạng lưới của Hệ thống bảo quản tài nguyên di truyền thực vật mới chỉ là khoảng 24.500 của gần 400 loài cây trồng. Các loài cây thuốc chưa thu thập hết và chưa được lưu giữ trong Ngân hàng gen cây trồng Quốc gia. Nhiều loài cây chưa được triển khai bảo quản được do thiếu kinh phí và thiết bị công nghệ.

Những năm gần đây, do tốc độ phát triển kinh tế xã hội nói chung và chuyển đổi cơ cấu cây trồng nói riêng trong nông nghiệp, quỹ gen cây trồng trong sản xuất và trong tự nhiên đang bị suy giảm, mất mát rất nhanh. Nhà nước cần cấp bách đầu tư thu thập đưa vào lưu giữ ngân hàng gen để ngăn chặn quá trình mất mát nói trên. Hệ thống kho lạnh bảo quản ex-situ cần được hiện đại hóa để đủ sức lưu giữ số lượng lớn nguồn gen sau khi thu thập.

- Nguồn gen được nhập nội thông qua hợp tác và trao đổi quốc tế trong thời kỳ hội nhập, nhất là sau khi Việt Nam gia nhập WTO. Thời gian vừa qua, mỗi năm riêng Trung tâm Tài nguyên thực vật nhập nội 300 – 500 nguồn gen từ các cơ quan nghiên cứu nông nghiệp quốc tế và một số quốc gia để phục vụ nghiên cứu khoa học và sản xuất. Rất nhiều nguồn gen do các cơ quan khác nhập nội, nhưng sau khi đánh giá khẳng định có những đặc tính quý đã không được đưa vào lưu giữ tại Ngân hàng gen cây trồng quốc gia do chưa có biện pháp tổ chức thống nhất. Thời gian tới, do nhu cầu nhập nội nguồn gen tăng trong môi trường hội nhập quốc tế thuận lợi, cần lưu giữ tất cả các nguồn gen nhập nội sau khi được đánh giá phát hiện những đặc tính quý phục vụ cho nhu cầu khai thác sử dụng của nước ta.

- Nguồn gen sinh ra do cải tạo nguồn gen gốc. Một trong những nhiệm vụ quan trọng của việc bảo quản nguồn gen cây trồng là làm giàu quỹ gen (Genetic enhancement). Những năm vừa qua do nhân lực và cơ sở vật chất còn hạn chế, Trung tâm Tài nguyên thực vật phải ưu tiên cho những nhiệm vụ cấp bách khác mà chưa có điều kiện triển khai nhiệm vụ làm giàu quỹ gen. Những năm tới, khi xúc tiến làm giàu quỹ gen, rất nhiều nguồn gen mới sinh ra. Công tác chọn tạo giống mới và xu hướng khai thác sử dụng nguồn gen ở trình độ công nghệ cao cũng sẽ sản sinh ra rất nhiều nguồn gen mới từ nguồn gen gốc. Các nguồn gen mới sinh ra cần được lưu giữ ngân hàng gen để phục vụ cho việc tiếp tục khai thác sử dụng lâu dài.

- Trách nhiệm quốc tế của Việt Nam trong việc lưu giữ nguồn gen một số tập đoàn quỹ gen cơ bản mang tính khu vực và quốc tế. Hầu hết những Ngân hàng gen quốc gia của các nước đủ tiêu chuẩn quốc tế đều có trách nhiệm lưu giữ kép tập đoàn nguồn gen quốc tế. Nước lưu giữ vừa được hưởng lợi từ những tập đoàn đó vừa đảm bảo nguồn gen không bị mất đi khi nước sở hữu chưa có đủ năng lực lưu giữ hay thảm họa (thiên tai, chiến tranh, thay đổi chính trị ...). Ví dụ hầu hết các tập đoàn quỹ gen cây trồng của Liên Xô cũ được giữ kép tại Ngân hàng gen quốc gia của Cộng hòa liên bang Đức, Pháp, Nhật Bản, Đài Loan, Hàn Quốc... đều giữ nhiều tập đoàn quỹ gen lúa, rau và cây ăn quả của các nước châu Á, châu Phi ...

Do vậy chúng ta cần phải xây dựng Ngân hàng gen thực vật quốc gia có năng lực bảo quản từ 100.000 đến 120.000 nguồn gen của các loài cây trồng và nhiều loài thực vật quan trọng bao gồm cả cây thuốc và cây lâm nghiệp.

8.4. NHỮNG KẾT QUẢ VÀ KHÓ KHĂN CÒN TỒN TẠI

a) Những kết quả

Hàng chục năm qua, nguồn tài nguyên cây trồng trên thế giới được quan tâm gìn giữ và bảo quản. Nhiều loài cây trồng đã được đưa vào bảo quản *in vitro* như: cây dứa, cây cà phê, cây cao su, khoai lang, khoai tây, sắn, cây chuối, cây đu đủ, cây dứa, cây nho, các cây có mùi (cam, chanh ...) các cây họ gừng riềng (gừng, nghệ, riềng ...), mía, mít và một số loài cây trồng khác.

b) Những khó khăn còn tồn tại

Việc bảo quản nguồn gen thực vật được nhiều nước quan tâm. Đã có nhiều trung tâm chuyên bảo quản nguồn gen như Trung tâm nghiên cứu khoai tây (CIP) ở Peru; Trung tâm bảo quản sắn, củ mài (IITA) ở Nigeria; Trung tâm nghiên cứu nhiệt đới (CIAT), ở Columbia; Mạng lưới cải tạo giống chuối Thế giới (INIBAP) ở Bỉ; Phòng bảo quản giống khoai lang ở Việt Nam ... Tuy nhiên, việc bảo quản còn gặp những hạn chế, khó khăn như:

- Chưa có những nghiên cứu đánh giá đầy đủ mối tương quan giữa các yếu tố môi trường (môi trường dinh dưỡng, chất ức chế sinh trưởng, nhiệt độ, ánh sáng ...) trong quá trình bảo quản.

- Chưa có điều kiện thử nghiệm thời gian bảo quản an toàn đối với từng loại cây trồng, khả năng kiểm tra sự ổn định về phẩm chất của giống và về tính di truyền trong quá trình bảo quản còn hạn chế.

- Điều kiện xây dựng các trung tâm, kho bảo quản cần nhiều kinh phí nên khó thực hiện, đặc biệt ở những nước có nguồn tài nguyên phong phú nhưng kinh tế chậm phát triển.

8.5. HIỆN TRẠNG CÔNG TÁC BẢO QUẢN NGUỒN GEN Ở VIỆT NAM

8.5.1. Bảo quản và phát triển bảo quản *in-situ* tài nguyên di truyền thực vật

- Điều tra và kiểm kê tài nguyên di truyền thực vật: đã có 50 đề tài/hoạt động điều tra của 25 cơ quan khác nhau trên một số vùng. Các kết

quả điều tra đã chỉ ra sự phong phú và đa dạng không chỉ về loài mà còn cả về đa dạng di truyền của tài nguyên di truyền thực vật của nước ta. Số liệu cho thấy Việt Nam được biết đến như là một trung tâm phát sinh nhiều loài cây trồng như lúa gạo, khoai môn sọ, chuối, mít, xoài, dứa, chè, hành ta và các giống cây ăn quả có múi.

- *Hỗ trợ việc quản lý và phát triển tài nguyên di truyền thực vật trên đồng ruộng*: 23 hoạt động được 16 cơ quan triển khai với sự tham gia của khoảng 15.000 lượt cán bộ địa phương và nông dân với các mục tiêu chính:

- + Tăng cường cơ sở khoa học về bảo quản trên đồng ruộng đa dạng sinh học nông nghiệp
- + Tăng cường vai trò của vườn gia đình trong việc bảo quản in-situ tài nguyên di truyền thực vật
- + Bảo quản trên đồng ruộng tài nguyên di truyền thực vật cây lúa ở cộng đồng
- + Thúc đẩy công tác quản lý tài nguyên di truyền thực vật trên đồng ruộng với sự tham gia của cộng đồng.

- *Hỗ trợ nông dân phục hồi các hệ thống sản xuất nông nghiệp sau thảm họa*: Dự án hỗ trợ nông dân phục hồi hệ thống sản xuất nông nghiệp trong vùng ngập lụt khu vực duyên hải trung bộ; Dự án phục hồi rừng đầu nguồn khu vực thủy điện Hoà Bình; một số hoạt động nâng cao nhận thức cộng đồng về tầm quan trọng của đa dạng tài nguyên di truyền thực vật trong vùng có nguy cơ xói mòn đa dạng sinh học cao.

- *Tăng cường bảo quản in-situ các loài hoang dại có quan hệ di truyền gần gũi với cây trồng và các loài hoang dại dùng làm lương thực và thực phẩm*: Có 8 chương trình, đề tài, hoạt động.

8.5.2. Bảo quản và phát triển bảo quản ex-situ tài nguyên di truyền thực vật

- *Duy trì bền vững các tập đoàn ex-situ hiện có*: 56 chương trình, đề tài, hoạt động với sự tham gia của 29 đơn vị. Tổng số khoảng 40.000 nguồn gen thuộc khoảng 200 loài đã được thu thập và bảo quản ở các Ngân hàng gen hạt, Ngân hàng gen đồng ruộng và Ngân hàng gen invitro.

- *Phục hồi nguồn gen bị đe dọa trong các tập đoàn*: 41 tập đoàn ex-situ bị đe dọa đã được phục hồi tại 19 cơ quan

- *Hỗ trợ việc thu thập tài nguyên di truyền thực vật theo kế hoạch và có mục tiêu*: 28 chương trình, dự án và hoạt động tập trung vào các các cây như lúa, chuối, sắn, khoai lang, từ vạc, khoai môn sọ, các loại rau, đậu đỗ, cây ăn quả có múi và nhiều cây khác.

- *Mở rộng các hoạt động ex-situ*: Các quy định phân công trách nhiệm cho nhiều cơ quan/tổ chức, các chính sách khuyến khích sự tham gia của công đồng và các cấp chính quyền địa phương được ban hành. Thúc đẩy phương pháp “Bảo quản thông qua sử dụng” bước đầu hình thành “Ngân hàng gen cộng đồng”.

8.5.3. Sử dụng tài nguyên di truyền thực vật

- *Mở rộng mô tả, đánh giá và tăng số lượng các tập đoàn hạt nhân phục vụ mục tiêu sử dụng*: Có 41 chương trình, đề tài, hoạt động mô tả và đánh giá nguồn gen của 23 loài cây chủ yếu là các đặc điểm hình thái.

- *Tăng cường các hoạt động mở rộng nền (cơ sở) di truyền*: 12 dự án, hoạt động theo hướng nhập nội, phục tráng, sử dụng nguồn gen địa phương trong lai tạo giống.

- *Phát triển nông nghiệp bền vững thông qua đa dạng hoá cây trồng và sản phẩm*: 27 dự án, đề tài, hoạt động tập trung vào việc thu thập, phục hồi và mở rộng sản xuất các giống cây trồng địa phương như các giống lúa, đậu, ngô, xoài, rau, quýt bưởi, nhãn vải, khoai môn sọ. Giảm tình trạng độc canh cây lúa hoặc một số cây lương thực khác.

- *Thúc đẩy phát triển và thương mại hóa các cây trồng và các loài còn ít được quan tâm khai thác sử dụng*: 13 chương trình, đề tài, hoạt động ở mức nghiên cứu và đề xuất

- *Hỗ trợ sản xuất giống và cung cấp cây trồng*: 30 chương trình, đề tài, hoạt động sử dụng khoảng 1000 nguồn gen/năm từ các tập đoàn ex-situ để nghiên cứu chọn tạo. Hỗ trợ nông dân tham gia chọn tạo giống. Các hoạt động khuyến nông cung cấp giống trợ giá.

- *Phát triển thị trường mới cho các giống địa phương và sản phẩm không đồng nhất*: Các đề tài, hoạt động đang ký thương hiệu, hội chợ giống ...

8.5.4. Xây dựng tổ chức và năng lực

- *Xây dựng các chương trình quốc gia mạnh*: Hệ thống bảo quản tài nguyên di truyền thực vật quốc gia với Trung tâm Tài nguyên di truyền thực vật là cơ quan điều phối được thành lập, Đề tài bảo quản quỹ gen cây trồng được nâng cấp thành nhiệm vụ thường xuyên. Chương trình giống cây trồng vật nuôi đã giành một nội dung cho việc xây dựng cơ sở vật chất và thu thập, khai thác sử dụng nguồn gen địa phương.

- *Thúc đẩy mạng lưới tài nguyên di truyền thực vật*: Năm 1995 Chính phủ phê chuẩn kế hoạch hành động quốc gia 10 năm lần đầu tiên về đa dạng sinh vật, trong đó tài nguyên di truyền thực vật là một trong các đối tượng ưu tiên. Năm 2005 kế hoạch hành động quốc gia về đa dạng sinh học được xây dựng trong đó tài nguyên di truyền thực vật được đặt vào vị trí ưu tiên hàng đầu. Chính phủ đã tái tổ chức lại hệ thống các cơ quan nghiên cứu nông nghiệp, thành lập Viện Khoa học nông nghiệp Việt Nam gồm 9 Viện và 1 Trung tâm, Trung tâm Tài nguyên di truyền thực vật được nâng cấp thành Trung tâm Tài nguyên thực vật thuộc VAAS. Chức năng và nhiệm vụ của Trung tâm được điều chỉnh nhằm điều phối có hiệu quả hơn Hệ thống bảo quản tài nguyên di truyền thực vật quốc gia.

- *Thiết lập hệ thống thông tin quốc gia về tài nguyên di truyền thực vật*: Web site Tài nguyên di truyền thực vật Việt nam được xây dựng năm 2003 (<http://www.pgrvietnam.org.vn>), NIMS Việt nam tham gia NIMS toàn cầu (<http://www.pgrfa.org/gpa/vnm>).

- *Phát triển hệ thống giám sát và cảnh báo sớm mất mát tài nguyên di truyền thực vật*: Những mảnh ghép đầu tiên của hệ thống đã được hình thành: NISM Việt Nam, Web site tài nguyên di truyền thực vật Việt Nam, Phần mềm quản lý Ngân hàng gen giao diện tiếng Việt, các nghiên cứu ứng dụng GIS phục vụ bảo quản và sử dụng tài nguyên di truyền thực vật.

- *Giáo dục và tập huấn về tài nguyên di truyền thực vật*: Số lượng các nhà khoa học, kỹ thuật viên của nhiều cơ quan được đào tạo về các lĩnh vực liên quan đã tăng lên nhiều thông qua nhiều hình thức đào tạo. Môn học bảo quản và sử dụng tài nguyên di truyền thực vật đang được thiết kế cho một số trường Đại học và Cao đẳng.

- *Nâng cao nhận thức cộng đồng*: Được thực hiện ở mức hạn chế thông qua các dự án tăng cường bảo quản trên đồng ruộng và thu thập

bảo quản nguồn gen cây trồng. Các Hội thảo, khoá tập huấn được tổ chức trong khuôn khổ của dự án GCP/RAS/186/JPN được đưa trên phương tiện truyền thông (Chương trình Khoa giáo của VTV2) cũng góp phần nâng cao nhận thức cộng đồng về bảo quản và sử dụng bền vững tài nguyên di truyền thực vật.

8.6. PHƯƠNG PHÁP THU THẬP QUỸ GEN CÂY TRỒNG

Phương pháp này bao gồm những hướng dẫn chung để thực hiện nhiệm vụ thu thập quỹ gen cây trồng trong điều kiện cụ thể hiện nay của nước ta tại Ngân hàng gen cây trồng Quốc gia và các cơ quan nghiên cứu nông sinh học khác có nhu cầu tiến hành nghiệp vụ này.

8.6.1. Xác định mục tiêu và thứ tự ưu tiên thu thập.

Trong điều kiện cụ thể của Việt Nam, mục tiêu và thứ tự ưu tiên của công tác thu thập cần dựa vào ba điều kiện sau đây:

- 1) *Khả năng bảo quản giống sau thu thập.* Chỉ tiến hành thu thập khi có mục tiêu sử dụng giống và có khả năng bảo quản, không để mất giống sau khi thu thập.
- 2) *Thu thập tại những nơi và đối với những loài, giống có nguy cơ mất mát nguồn gen cao.* Những nơi nào, loài nào có nguy cơ mất mát nguồn gen cao hơn thì thu thập trước.
- 3) *Khả năng tài chính và nhân sự.* Dựa trên khả năng tài chính và nhân sự để tổ chức các hoạt động thu thập cụ thể.

8.6.2. Tổ chức công tác thu thập.

Các bước trong việc thiết lập chương trình thu thập quỹ gen:

- 1) Khảo sát tình hình nguồn gen cây trồng trong giai đoạn trước và hiện nay
- 2) Sắp xếp thứ tự ưu tiên
- 3) Lập kế hoạch thu thập và tìm kiếm kinh phí
- 4) Thành lập và tập huấn đội thu thập
- 5) Công thức hoá chiến lược lấy mẫu

- 6) Triển khai hoạt động thu thập
- 7) Xử lý mẫu đã thu thập
- 8) Tuân theo nguyên tắc kiểm dịch thực vật
- 9) Tư liệu hoá

*** Một số lưu ý trong quá trình triển khai thu thập**

1) *Xác định địa bàn thu thập.* Đối với các đoàn thu thập quỹ gen chính quy, đề nâng cao hiệu quả kinh tế và chuyên môn của công tác thu thập, cần lập kế hoạch thu hết giống của loài trên từng địa danh cụ thể và thu thập nhiều loài cây trồng trong một chuyến công tác. Lấy huyện làm đơn vị thu thập. Chia huyện ra nhiều vùng sinh thái nhỏ, mỗi vùng có sự đa dạng về giống cần thu tương đối thuần nhất và thu hết số giống của mỗi vùng.

2) *Xác định thời gian thu thập.* Thời gian thu thập thích hợp ở nước ta là mùa khô, từ tháng 10 khi bắt đầu thu hoạch, đến tháng 5 trước khi gieo trồng cây vụ mùa. Đối với một số loài cây cụ thể và tùy thuộc vào điều kiện giao thông, có thể tiến hành thu thập trong mùa mưa.

3) *Trang bị thu thập.* Các đoàn thu thập chính quy phải có đủ các dụng cụ vật tư cơ bản phục vụ cho công tác thu thập (bản đồ, máy đo độ cao, máy ảnh, máy GPS đo kinh độ, vĩ độ...), đặc biệt lưu ý đến chuẩn bị trang bị cho cá nhân, thuốc bệnh

4) *Tiến hành hoạt động thu thập.*

- Phải ghi phiếu thu thập đầy đủ và chính xác.

- Đoàn thu thập phải họp sau mỗi ngày làm việc để hoàn chỉnh phiếu thu thập và làm các xử lý cần thiết đối với các mẫu giống mới thu; phải họp tổng kết ngay sau khi chuyến công tác kết thúc để giải quyết các vấn đề chuyên môn nảy sinh trong quá trình thu thập.

5) *Nhập mẫu giống vào kho bảo quản ngay sau khi đã thu thập.*

PHẦN II

**MỘT SỐ KẾT QUẢ
NGHIÊN CỨU
VÀ ỨNG DỤNG
TRONG NUÔI CẤY MÔ
TẾ BÀO THỰC VẬT**

Chương 9

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU ỨNG DỤNG TRONG NUÔI CẤY BAO PHẤN VÀ TẾ BÀO PHÔI HẠT CHÍN Ở CÂY LÚA

9.1. BÁO CÁO KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU: HOÀN THIÊN QUY TRÌNH NUÔI CẤY BAO PHẤN VÀ MÔ TẾ BÀO PHÔI HẠT CHÍNH Ở CÂY LÚA NƯỚC (*ORYZA SATIVA L.*)

9.1.1. Đặt vấn đề

Cây lúa ở Việt Nam có một vai trò rất quan trọng trong sản xuất nông nghiệp và phát triển kinh tế nông hộ. Hơn 10 năm trở lại đây, nhờ kinh nghiệm sản xuất lúa lâu đời, việc áp dụng các tiến bộ kỹ thuật và chính sách phát triển phù hợp, Việt Nam đã trở thành nước xuất khẩu lúa gạo đứng thứ 2 trên thế giới sau Thái Lan. Cuộc khủng hoảng kinh tế thế giới làm cho lạm phát, giá lương thực tăng cao đã cho thấy vai trò quan trọng của an ninh lương thực nói chung và của lúa gạo nói riêng. Nhiều quốc gia trở lại tập trung đầu tư phát triển nông nghiệp tăng sản lượng cây trồng, cây lương thực nhằm đảm bảo an ninh lương thực và sản xuất một phần nhiên liệu thay cho nhiên liệu hóa thạch vốn đang ngày càng cạn kiệt.

Một trong các biện pháp nhằm cải thiện năng suất, sản lượng lúa gạo đó là việc đầu tư nghiên cứu chọn tạo các giống lúa mới có năng suất và chất lượng cao, vừa phù hợp với tiêu thụ trong nước và đạt tiêu chuẩn xuất khẩu. Ở Việt Nam, ngoài việc áp dụng các biện pháp kỹ thuật truyền thống, các nhà khoa học đã ứng dụng tương đối thành công các kỹ thuật công nghệ hiện đại trong chọn tạo giống lúa.

Trong đó, việc nghiên cứu tạo giống lúa và dòng thuần từ nuôi cấy bao phấn và nuôi cấy mô tế bào lúa (phục vụ chuyên gen) đang là kỹ thuật có độ thành công đối cao. Lúa là cây tự thụ, các giống lúa thuần

mang kiểu gen đồng hợp tử, nếu để chọn giống lúa theo phương pháp lai tạo thông thường cần phải chọn tạo qua 6-8 thế hệ (khoảng 4-5 năm), nhưng nếu sử dụng con lai (đời F1 hoặc F2) làm vật liệu nuôi cấy bao phấn, quá trình chọn tạo giống được rút ngắn rất nhiều - chỉ cần qua 1-2 thế hệ (khoảng 1-2 năm). Một số viện nghiên cứu của Việt Nam như “Viện Cây lương thực thực phẩm” đã chọn tạo thành công nhiều giống lúa từ nuôi cấy bao phấn. Đồng thời, trong nghiên cứu chuyển gen tạo giống mới trên cây lúa, quá trình tạo cây lúa hoàn chỉnh từ mô tế bào đóng vai trò rất quan trọng. Để chuẩn bị cho việc tạo các giống lúa, việc nghiên cứu hoàn thiện qui trình nuôi cấy mô tế bào lúa và nuôi cấy bao phấn là một yêu cầu cấp thiết.

Xuất phát từ các mục đích nêu trên, việc “ **Nghiên cứu xây dựng qui trình nuôi cấy bao phấn và mô tế bào phôi hạt lúa chính ở cây lúa nước (*Oryza sativa*.L)**” là rất cần thiết. Kết quả nghiên cứu làm tiền đề quan trọng cho việc chọn tạo giống lúa từ nuôi cấy bao phấn. Đồng thời làm cơ sở bước đầu cho việc tạo giống lúa bằng chuyển gen trên mẫu mô tế bào từ nuôi cấy mô tế bào cây lúa.

Mục đích của đề tài:

- Hoàn thiện qui trình tạo cây lúa hoàn chỉnh từ nuôi cấy bao phấn và mô tế bào phôi hạt lúa chín. Làm cơ sở cho việc tạo vật liệu khởi đầu chọn tạo giống lúa mới (từ nuôi cấy bao phấn) và tạo vật liệu cho các nghiên cứu tạo giống lúa từ kỹ thuật chuyển gen, biến dị tế bào soma (từ nuôi cấy phôi hạt lúa chín).

Yêu cầu của đề tài:

- Hoàn thiện qui trình nuôi cấy bao phấn lúa.
- Hoàn thiện qui trình nuôi cấy mô tế bào phôi hạt lúa chín.
- Tạo ra một số dòng lúa từ nuôi cấy bao phấn làm vật liệu cho việc chọn tạo giống lúa mới.

9.1.2. Vật liệu, nội dung và phương pháp nghiên cứu

9.1.2.1. Địa điểm nghiên cứu

Thí nghiệm được thực hiện tại phòng thí nghiệm “Công nghệ tế bào thực vật”, Bộ Môn CNSH Nông Nghiệp, Khoa Nông Học, Trường Đại học

Nông Lâm Thái Nguyên. Phần chăm sóc và gieo cấy vật liệu thí nghiệm được tiến hành tại Trung Tâm Thực hành Thực nghiệm, Trường Đại học Nông Lâm Thái Nguyên.

9.1.2.2 Vật liệu nghiên cứu

Vật liệu sử dụng nuôi cấy mô tế bào phôi hạt lúa chín:

Sử dụng vật liệu là giống lúa thuần Khang Dân, là giống có khả năng sinh trưởng khỏe, năng suất chất lượng và khả năng chống chịu tốt, đang được trồng khá phổ biến ở các tỉnh khu vực miền núi phía Bắc. Với yêu cầu nuôi cấy tạo cây hoàn chỉnh từ mô tế bào phôi hạt lúa chín, nhằm phục vụ cho việc chuyển gen và tạo giống lúa mới thông qua phương pháp biến dị tế bào soma, vật liệu mô tế bào cần thiết phải có kiểu gen đồng hợp tử đảm bảo sự thay đổi di truyền được tạo ra từ các yếu tố thí nghiệm. Vì vậy, việc chọn giống lúa thuần, có khả năng sinh trưởng, cho năng suất phẩm chất và khả năng chống chịu tốt làm vật liệu nuôi cấy là yếu tố rất quan trọng.

Vật liệu sử dụng cho nuôi cấy bao phấn:

Sử dụng các giống lúa lai có triển vọng và tổ hợp lai F1, F2, các tổ hợp trên có nguồn gốc bố mẹ là các giống khác nhau cho năng suất phẩm chất và chống chịu tốt trong điều kiện miền núi phía Bắc. Với mục tiêu nuôi cấy bao phấn lúa để chọn tạo dòng thuần làm vật liệu cho chọn tạo giống mới. Bao phấn phải được lấy từ các mẫu có kiểu gen dị hợp tử. Các giống lúa lai, dòng hoặc các tổ hợp lai F1, F2 còn phân li ở đời sau đáp ứng được các yêu cầu trên. Bao phấn được thu nhận từ 20 dòng và tổ hợp lai F1, F2, các tổ hợp lai được lai tạo trước đó tại trường Đại học Nông Lâm Thái Nguyên, gồm các dòng và tổ hợp lai như sau:

NA/TN13, KD/R217, KimA/R278, KD/Tam Nông, VL20, NA/T10, I88A/SL02, RA, TG/CL02, KimA/TN13, KI/T10, NA/R171, KD/CL02, KimA/R171, KD/R17, NA/CL02, KimA/R17, DA/R17, KD/T10, NA/N01.

Sau khi thử nghiệm trên môi trường nuôi cấy tạo mô sẹo, những dòng/tổ hợp lai phản ứng tốt nhất với môi trường, khả năng ra mô sẹo cao sẽ được sử dụng làm vật liệu cho các thí nghiệm tiếp theo để hoàn thiện qui trình nuôi cấy bao phấn.

9.1.2.3 Nội dung và phương pháp nghiên cứu

Các giai đoạn của quá trình nuôi cấy, được duy trì ở các điều kiện như sau:

Số giờ chiếu sáng trong ngày: 8 - 10 h/ngày

Nhiệt độ phòng nuôi cấy: 18 - 25°C

Cường độ ánh sáng: 2000 - 3000 lux

Ẩm độ: 80 - 90%

(Đối với giai đoạn tạo mô sẹo từ bao phấn, quá trình nuôi cấy được tiến hành trong điều kiện không có ánh sáng).

Trên cơ sở một số kết quả của nhóm nghiên cứu đã tiến hành trước đó, nhóm nghiên cứu xác định được một số yếu tố quan trọng liên quan đến quá trình nuôi cấy mô tế bào từ phôi hạt chín và bao phấn ở cây lúa. Trong đó các thí nghiệm xác định thành phần, nồng độ của một số chất quan trọng trong môi trường nuôi cấy được thử nghiệm nhằm xác định được các điều kiện nuôi cấy tốt nhất cho việc hoàn thiện qui trình nuôi cấy.

THÍ NGHIỆM NGHIÊN CỨU ẢNH HƯỞNG CỦA MỘT SỐ YẾU TỐ LIÊN QUAN ĐẾN QUÁ TRÌNH NUÔI CẤY NHẪM HOÀN THIỆN QUI TRÌNH NUÔI CẤY MÔ TẾ BÀO PHÔI HẠT LÚA CHÍN

** Nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ và thời gian khử trùng đến tỷ lệ sống của mẫu cấy (mẫu là các phôi hạt lúa chín đã được bóc vỏ).*

Được tiến hành trên hai loại hóa chất là: Clorox (nước javen) và clorua thủy ngân.

Thí nghiệm 1: Nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ chất khử trùng Clorox đến tỷ lệ sống của mẫu cấy: Gồm 3 công thức, mỗi công thức thí nghiệm tiến hành với 100 mẫu hạt, để hạn chế yếu tố lây nhiễm, phôi hạt lúa được nuôi cấy trong các ống thủy tinh nhỏ hình trụ (kích thước rộng 2cm, cao 12 cm). Tiến hành bóc vỏ hạt lúa chín, rửa qua bằng nước xả phòng, ngâm trong cồn 70° với thời gian 1 phút, xử lý với Clorox ở các nồng độ khác nhau với thời gian 20 phút. Sau đó tráng lại bằng nước cất vô trùng 5 lần.

CT1: Xử lý mẫu bằng Clorox nồng độ 5%

CT 2: Xử lý mẫu bằng Clorox nồng độ 10%

CT 3 : Xử lý mẫu bằng Clorox nồng độ 15%

Chỉ tiêu theo dõi: Sau 5 ngày cấy mẫu vào môi trường tiến hành theo dõi tỷ lệ mẫu sống, nhiễm và tỷ lệ chết.

Thí nghiệm 2: Nghiên cứu ảnh hưởng của thời gian khử trùng bằng $HgCl_2$ đến tỷ lệ sống của mẫu nuôi cấy (mẫu là các phôi hạt lúa chín đã được bóc vỏ): Gồm 3 công thức, mỗi công thức thí nghiệm tiến hành với 100 mẫu phôi hạt chín, để hạn chế yếu tố lây nhiễm, phôi hạt lúa được nuôi cấy trong các ống thùy tinh nhỏ hình trụ (kích thước rộng 2cm, cao 12 cm).. Tiến hành bóc vỏ hạt gạo, rửa qua bằng nước xà phòng, ngâm trong cồn 70^o với thời gian 1 phút, xử lý chất khử trùng $HgCl_2$ 0,1% ở các khoảng thời gian khác nhau. Sau đó tráng lại bằng nước cất vô trùng 5 lần.

CT 1: Xử lý mẫu bằng $HgCl_2$ 0,1% trong 5 phút

CT 2: Xử lý mẫu bằng $HgCl_2$ 0,1% trong 10 phút

CT 3: Xử lý mẫu bằng $HgCl_2$ 0,1% trong 15 phút

Chỉ tiêu theo dõi: Sau 5 ngày cấy mẫu vào môi trường tiến hành theo dõi tỷ lệ mẫu sống và chết và tỷ lệ nhiễm của mẫu phôi hạt nuôi cấy.

*** Nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ 2,4 D đến khả năng ra mô sẹo của mẫu nuôi cấy.**

Thí nghiệm 3: Sau khi phôi hạt lúa nảy mầm trên môi trường nuôi cấy, thân mầm lúa được sử dụng làm mẫu nuôi cấy. Thí nghiệm gồm 6 công thức, mỗi công thức thí nghiệm gồm 3 nhắc lại, số mẫu thí nghiệm là 30 mẫu/1 lần nhắc lại.

CT1: Môi trường nền + 0 mg 2,4 D/l

CT2: Môi trường nền + 0,5 mg 2,4 D/l

CT3: Môi trường nền + 1.0 mg 2,4 D/l

CT4: Môi trường nền + 1,5 mg 2,4 D/l

CT5: Môi trường nền + 2,0 mg 2,4 D/l

CT6: Môi trường nền + 2,5 mg 2,4 D/l

(Môi trường nền: MS + 30 g đường/l + 6.5 g agar/l)

Chỉ tiêu theo dõi: Sau 5 ngày cấy mẫu vào môi trường tiến hành theo dõi tỷ lệ ra mô sẹo của phôi hạt.

*** Nghiên cứu ảnh hưởng của một số nồng độ NAA đến khả năng ra mô sẹo của phôi hạt lúa chín**

Thí nghiệm 4: Tương tự như thí nghiệm 3, sử dụng thân mầm hạt lúa làm mẫu nuôi cấy. Gồm 7 công thức, mỗi công thức thí nghiệm gồm 3 nhắc lại, số mẫu là 30/1 lần nhắc lại.

CT1: Môi trường nền + 0 mg NAA/l

CT2 : Môi trường nền + 0,5 mg NAA/l

CT3 : Môi trường nền + 1,0 mg NAA/l

CT4 : Môi trường nền + 1,5 mg NAA/l

CT5 : Môi trường nền + 2,0 mg NAA/l

CT6 : Môi trường nền + 2,5 mg NAA/l

CT7 : Môi trường nền + 3,0 mg NAA/l

(Môi trường nền: MS + 30 g đường/l + 6,5 g agar/l)

Chỉ tiêu theo dõi: Sau 5 ngày cấy mẫu vào môi trường tiến hành theo dõi tỷ lệ ra mô sẹo.

*** Nghiên cứu ảnh hưởng của một số nồng độ kinetin đến khả năng tạo chồi của mô sẹo tạo ra từ phôi mầm hạt lúa**

Thí nghiệm 5: Sau khi mô sẹo được hình thành vào khoảng 7 -10 ngày, mô sẹo trắng dạng tròn nhỏ. mọng là thời điểm chuyển mẫu sang nuôi cấy trên môi trường tạo chồi. Thí nghiệm gồm 6 công thức, mỗi công thức thí nghiệm gồm 3 nhắc lại, số mẫu thí nghiệm là 50 mô sẹo/1 lần nhắc lại.

CT1: Môi trường nền + 0 mg kinetin/l

CT2 : Môi trường nền + 0,5 mg kinetin/l

CT3 : Môi trường nền + 1,0 mg kinetin/l

CT4 : Môi trường nền + 1,5 mg kineti/l

CT5 : Môi trường nền + 2.0 mg kinetin/l

CT6 : Môi trường nền + 2,5 mg kinetin/l

(Môi trường nền: MS + 30g đường /l + 6,5g agar /l)

Chỉ tiêu theo dõi: Sau 5 ngày cấy mẫu vào môi trường tiến hành theo dõi tỷ lệ ra chồi.

*** Nghiên cứu ảnh hưởng của một số nồng độ BAP tới khả năng nhân nhanh (tạo cụm chồi) của chồi lúa tạo ra từ phôi hạt lúa chín**

Thí nghiệm 6: Khi chồi mọc ra từ mô sẹo của giai đoạn tạo chồi, đối với nuôi cấy tạo cây hoàn chỉnh từ phôi hạt chín, có thể tạo cụm chồi (nhân nhanh) từ chồi ban đầu. Giai đoạn này, tiến hành thử nghiệm ảnh hưởng của BAP đến khả năng tạo cụm chồi. Thí nghiệm gồm 6 công thức, mỗi công thức thí nghiệm tiến hành với 3 nhắc lại, số mẫu là 35 chồi/1 lần nhắc lại. Mẫu cây là chồi có kích thước đồng đều dài khoảng 1 cm, có 1- lá thật.

CT1: Môi trường nền + 0 mg BAP/l

CT2 : Môi trường nền + 0,5 mg BAP/l

CT3 : Môi trường nền + 1,0 mg BAP/l

CT4 : Môi trường nền + 1,5 mg BAP/l

CT5 : Môi trường nền + 2,0 mg/l BAP

CT6 : Môi trường nền + 2,5 mg BAP/l

Môi trường nền (MS + 30 g đường /l + 6,5g agar /l)

Chỉ tiêu theo dõi: Sau 20 ngày cấy mẫu vào môi trường tiến hành theo dõi số lượng chồi được hình thành.

*** Nghiên cứu ảnh hưởng của một số nồng độ IAA tới khả năng ra rễ chồi nuôi cấy**

Thí nghiệm 7: Sau khi chồi xanh đã sinh trưởng tốt có từ 2 lá thật, tiến hành chuyển chồi sang môi trường ra rễ để tạo cây hoàn chỉnh. Thí nghiệm gồm 6 công thức, mỗi công thức thí nghiệm làm với 3 nhắc lại, số chồi thí nghiệm là 30/1-lần nhắc lại. Mẫu cây là những chồi có kích thước đồng đều đủ tiêu chuẩn, có từ hai lá thật trở lên.

CT1: Môi trường nền + 0 mg IAA/l

CT2: Môi trường nền + 0,1 mg IAA/l

CT3: Môi trường nền + 0,3 mg IAA /l

CT4 : Môi trường nền + 0,5 mg IAA/l

CT5 : Môi trường nền + 0,7 mg IAA/l

CT6 : Môi trường nền + 1,0 mg IAA/l

(Môi trường nền: MS + 30 g đường /l + 6,5 g agar/l)

Chỉ tiêu theo dõi: Sau 2 tuần cấy mẫu vào môi trường tiến hành theo dõi mẫu khả năng ra rễ gồm: số lượng rễ, chiều dài rễ.

*** Nghiên cứu ảnh hưởng môi trường thuần dưỡng tới sự sinh trưởng của cây lúa tạo ra từ nuôi cấy phôi hạt chín**

Thí nghiệm 8: Gồm 4 công thức, mỗi công thức thí nghiệm làm với 3 nhắc lại, số mẫu là 10/ 1 lần nhắc lại. Mẫu cấy là những cây lúa có kích thước đồng đều có từ 3 lá thật trở lên, được đưa ra môi trường thuần dưỡng (giúp cây thích nghi với điều kiện đồng ruộng) trước khi đem trồng trên đồng ruộng. Thí nghiệm gồm 3 lần nhắc lại, số mẫu là 30 /1 lần nhắc lại.

CT1 : Môi trường đất

CT2 : Môi trường MS

CT3 : Nước cất

CT4 : Môi trường Yoshida

Chỉ tiêu theo dõi: Sau 15 ngày đưa cây vào môi trường tiến hành theo dõi một số chỉ tiêu sinh trưởng gồm: số rễ, chiều dài rễ, chiều cao cây, số lá, số nhánh.

THÍ NGHIỆM NGHIÊN CỨU ẢNH HƯỞNG CỦA MỘT SỐ YẾU TỐ LIÊN QUAN ĐẾN QUÁ TRÌNH NUÔI CẤY NHẪM HOÀN THIỆN QUI TRÌNH NUÔI CẤY BAO PHÂN LÚA

*** Nghiên cứu ảnh hưởng của thời gian xử lý nhiệt độ lạnh đến khả năng tạo mô sẹo của bao phấn lúa**

Thí nghiệm 9: gồm 6 công thức, mỗi công thức làm với 3 lần nhắc lại. Số mẫu thí nghiệm là 10 bình nuôi cấy/ 1 lần nhắc lại (bình nuôi cấy sử dụng loại bình tam giác loại 250 cc). Mỗi bình nuôi cấy 120 hạt phấn, như vậy tổng số bao phấn nuôi cấy cho một công thức thí nghiệm là: 30 bình x 120 bao phấn = 3600 bao phấn. Vật liệu cho thí nghiệm gồm 20 dòng đã nêu ở mục 2.2.

CT 1: Không xử lý lạnh.

CT 2: 24 giờ xử lý lạnh

CT 3: 72 giờ xử lý lạnh.

CT 4: 120 giờ xử lý lạnh.

CT 5: 168 giờ xử lý lạnh.

CT 6: 240 giờ xử lý lạnh

(nhiệt độ xử lý lạnh của các công thức là 8 độ C)

Bao phần lúa được thu hái theo đồng lúa trước trở khoảng 1 tuần, rửa sạch qua nước cất, phun cồn 70^o để khử trùng và xử lý ở nhiệt độ 8^oC theo thời gian của các công thức thí nghiệm. Trước khi xử lý lạnh, đồng lúa được khử trùng bằng clorox 15-20% trong thời gian 20 phút. Bao phần lúa được nuôi cấy trên các môi trường theo công thức tốt nhất ở thí nghiệm 10. Nuôi cấy trong điều kiện bóng tối, ở nhiệt độ 25^oC, ẩm độ 70-80%. Sau 7 ngày cấy mẫu vào môi trường tiến hành theo dõi tỷ lệ bao phần ra mô sẹo.

*** Nghiên cứu ảnh hưởng của môi trường MS và N6 đến khả năng tạo mô sẹo của bao phần lúa**

Thí nghiệm 10: nghiên cứu ảnh hưởng của hai môi trường MS và N6 đến khả năng hình thành mô sẹo của hạt phần thu hái từ 20 các tổ hợp lai như đã trình bày ở phần vật liệu nghiên cứu. Thí nghiệm gồm 2 công thức sau, mỗi công thức gồm 3 lần nhắc lại, số bình nuôi cấy (bình tam giác loại 100-250 cc) cho một lần nhắc lại là 10 bình, trong mỗi bình nuôi cấy khoảng 120 bao phần, như vậy tổng số bao phần nuôi cấy cho một công thức là: 30 bình x 120 bao phần/bình = 3600 bao phần.

Thí nghiệm gồm 2 công thức:

Công thức 1: MS + 1,5mg 2,4D/l + 60g đường + 100mg inositol/l + 6,5g agar/l.

Công thức 2: N6 + 1,5mg 2,4D/l + 60g đường + 100mg inositol/l + 6,5g agar/l.

Phương pháp xử lý mẫu và nuôi cấy: Bao phần lúa được thu hái theo đồng lúa trước trở khoảng 1 tuần, rửa sạch qua nước cất, phun cồn 70^o để khử trùng và xử lý ở nhiệt độ 8^oC trong 7 đến 10 ngày. Trước khi nuôi cấy đồng lúa được khử trùng bằng clorox 15-20% trong thời gian 15-20 phút. Bao phần lúa được nuôi cấy trên các môi trường theo công thức thí nghiệm như đã nêu trên. Nuôi cấy trong điều kiện bóng tối, ở nhiệt độ 25^oC, ẩm độ 70-80%, 7 ngày sau cấy tiến hành theo dõi tỷ lệ hình thành mô sẹo.

** Nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ 2,4D đến khả năng tạo mô sẹo của bao phấn lúa*

Thí nghiệm 11: gồm 6 công thức, mỗi công thức gồm 3 lần nhắc lại, số bình nuôi cấy cho một lần nhắc lại là 10 bình/1 lần nhắc lại (loại bình tam giác thể tích từ 100 -250 cc), mỗi bình nuôi cấy 120 bao phấn, tổng số bao phấn nuôi cấy cho một thí nghiệm là 30 bình x 120 bao phấn = 3600 bao phấn.

CT 1: Môi trường nền + 0 mg 2,4D/l

CT 2: Môi trường nền + 0,5mg 2,4D/l

CT 3: Môi trường nền + 1mg 2,4D/l

CT 4: Môi trường nền + 1,5mg 2,4D/l

CT 5: Môi trường nền + 2mg 2,4D/l

CT 6: Môi trường nền + 2,5mg 2,4D/l

(Môi trường nền: N6 + 6,5g agar + 30g đường + 100mg inositol/l).

Phương pháp xử lý mẫu và nuôi cấy: xử lý mẫu và nuôi cấy tương tự như thí nghiệm 10, sau 7 ngày cấy mẫu tiến hành theo dõi tỷ lệ bao phấn hình thành mô sẹo.

** Nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ BAP đến khả năng tái sinh chồi của mô sẹo tạo thành từ bao phấn lúa.*

Thí nghiệm 12: gồm 8 công thức với 3 lần nhắc lại, số mẫu thí nghiệm là 30. Để hạn chế yếu tố lây nhiễm, mô sẹo bao phấn lúa được nuôi cấy riêng rẽ 1 mô sẹo/ 1 ống nghiệm (ống thủy tinh hình trụ, có kích thước 2 cm x 15 cm). Các công thức thí nghiệm gồm:

CT 1: Môi trường nền + 0mg BAP/l

CT 2: Môi trường nền + 1mg BAP/l

CT 3: Môi trường nền + 1,5mg BAP/l

CT 4: Môi trường nền + 2mg BAP/l

CT 5: Môi trường nền + 2,5mg BAP/l

CT 6: Môi trường nền + 3mg BAP/l

CT 7: Môi trường nền + 3,5mg BAP/l

CT 8: Môi trường nền + 4mg BAP/l

(Môi trường nền: MS + 6,5g agar + 30g đường + 100mg inositol/l).

Mẫu nuôi cấy là các mô sẹo hình thành từ bao phấn lúa, sau khi mô sẹo hình thành, đạt tiêu chuẩn về kích thước và chất lượng, mô sẹo được chuyển sang môi trường tái sinh có bổ sung BAP với các nồng độ khác nhau. Nuôi cấy trong điều kiện nhiệt độ 25°C, ẩm độ 70-80%, ánh sáng chiếu liên tục 12 giờ/ngày.

Sau 7 ngày cấy chuyển mô sẹo vào môi trường tái sinh, tiến hành theo dõi thí nghiệm với các chỉ tiêu: tỷ lệ mẫu hình thành chồi xanh, tỷ lệ mẫu hình thành chồi bạch tạng, tỷ lệ mẫu nhiễm và mẫu chết.

*** Nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ NAA đến khả năng ra rễ của chồi lúa tạo ra từ mô sẹo bao phấn lúa.**

Chồi xanh được hình thành trong quá trình tái sinh, sau khi đạt tiêu chuẩn 2 lá trở lên, được chuyển sang môi trường ra rễ có bổ sung NAA với nồng độ khác nhau.

Thí nghiệm 13: gồm 4 công thức với 3 lần nhắc lại, số mẫu thí nghiệm là 15/1 lần nhắc lại. Để hạn chế yếu tố lây nhiễm, chồi lúa được nuôi cấy trong ống nghiệm riêng biệt (1 chồi/1 ống nghiệm), ống nghiệm sử dụng nuôi cấy là ống nghiệm hình trụ có kích thước 2 cm x 15-20 cm.

Công thức 1: Môi trường nền + 0 mg NAA/l

Công thức 2: Môi trường nền + 0,1mg NAA/l

Công thức 3: Môi trường nền + 0,2mg NAA/l

Công thức 4: Môi trường nền + 0,3mg NAA/l

(Môi trường nền: MS + 6,5 g agar + 30g đường+ 100mg inositol/l).

Sau 5 ngày chuyển cây vào môi trường ra rễ, tiến hành theo dõi thí nghiệm, chỉ tiêu theo dõi gồm chiều dài rễ, số rễ hình thành.

*** Nghiên cứu ảnh hưởng của môi trường thuần dưỡng đến khả năng sinh trưởng của cây lúa tạo ra từ nuôi cấy bao phấn.**

Thí nghiệm gồm 4 công thức với 3 lần nhắc lại, số mẫu là 10/1 lần nhắc lại.

Công thức 1: Môi trường nước cất.

Công thức 2: Môi trường MS.

Công thức 3: Môi trường Yoshida.

Công thức 4: Môi trường Đất.

Sau 5 ngày chuyển cây vào môi trường thuần dưỡng tiến hành theo dõi sự sinh trưởng của cây. Chỉ tiêu theo dõi: chiều cao cây, chiều dài rễ, số lá, số nhánh.

SƠ BỘ ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG SINH TRƯỞNG VÀ NĂNG SUẤT CỦA MỘT SỐ DÒNG LÚA TẠO RA TỪ PHƯƠNG PHÁP NUÔI CÂY BAO PHẦN

Trên cơ sở ứng dụng quy trình nuôi cấy bao phần lúa, nhóm nghiên cứu tiến hành tạo một số dòng lúa từ phương pháp nuôi cấy bao phần và sơ bộ đánh giá khả năng sinh trưởng, năng suất trên đồng ruộng.

Thí nghiệm được tiến hành ở 20 dòng lúa tạo ra từ nuôi cấy bao phần. Đó là các dòng: TN49, TN50, TN53, TN57, TN64, TN65, TN68, TN70, TN71, TN72, TN73, TN76, TN81, TN83, TN84, TN85, TN87, TN91, TN93, TN97.

Thí nghiệm tiến hành trong 3 vụ: vụ mùa 2007, xuân 2008 và mùa 2008. Sơ bộ đánh giá về một số đặc điểm sinh trưởng, tính chống chịu, năng suất và các yếu tố cấu thành năng suất.

9.1.3. Kết quả và thảo luận

9.1.3.1. Kết quả nghiên cứu hoàn thiện quy trình nuôi cấy mô tế bào phôi hạt chính ở cây lúa.

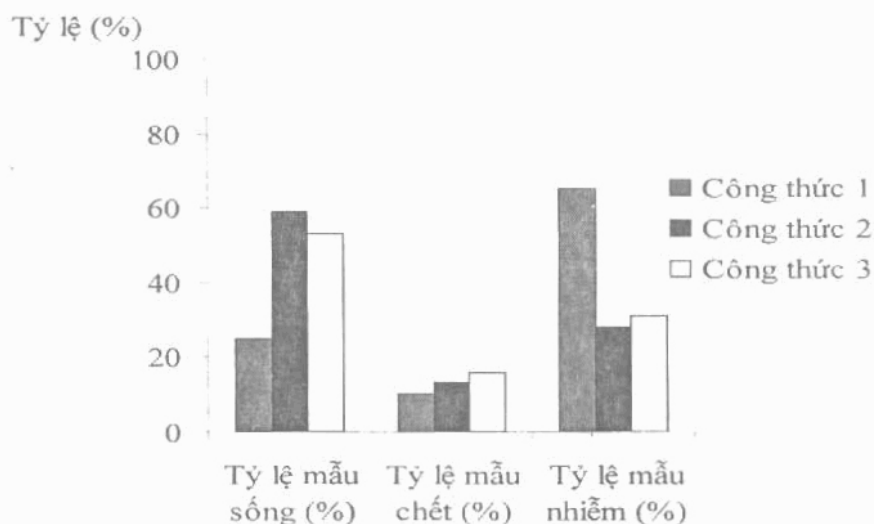
Nuôi cấy tạo cây lúa chính từ phôi hạt lúa chín, trải qua các bước nuôi cấy chủ yếu như: chọn mẫu và khử trùng – nuôi cấy phôi hạt lúa chín tạo mầm hạt – nuôi cấy tạo mô sẹo từ thân mầm hạt – nuôi cấy tạo chồi xanh từ mô sẹo – nhân nhanh tạo cụm chồi từ chồi xanh – nuôi cấy tạo rễ từ chồi xanh để tạo cây hoàn chỉnh – đưa cây trồng trên môi trường thuần dưỡng nhằm giúp cho cây quen dần với điều kiện đồng ruộng – trồng trực tiếp đánh giá đồng ruộng (phụ thuộc vào từng mục đích của thí nghiệm). Trên cơ sở các giai đoạn nuôi cấy, thí nghiệm được tiến hành trên từng giai đoạn với các yếu tố ảnh hưởng chủ yếu liên quan đến quá trình nuôi cấy nhằm đưa ra kết luận hoàn thiện quy trình tạo cây hoàn chỉnh từ mô tế bào phôi hạt lúa chín.

Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ và thời gian khử trùng đến tỷ lệ sống của mẫu nuôi cấy (phôi hạt lúa chín – sau 30 ngày nuôi cấy)

Bảng 9.1: Ảnh hưởng của nồng độ chất khử trùng clorox đến tỷ lệ sống của phôi hạt lúa chín (sau 30 ngày nuôi cấy)

Chỉ tiêu Công thức	Số hạt phôi (mẫu)	Tỷ lệ mẫu sống (%)	Tỷ lệ mẫu chết (%)	Tỷ lệ mẫu nhiễm (%)
CT1	100	25,00 ^a	10,00 ^a	65,00 ^b
CT2	100	59,00 ^c	13,00 ^b	28,00 ^a
CT3	100	53,00 ^b	16,00 ^c	31,00 ^a
Cv(%)		5,3	9,3	4,4

(a, b, c: các mức phân nhóm trong so sánh duncan)



Hình 9.1: Biểu đồ ảnh hưởng của nồng độ chất khử trùng Clorox đến tỷ lệ sống của mẫu nuôi cấy (phôi hạt lúa chín)

Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của chất khử trùng clorox được thể hiện ở bảng 9.1 và hình 9.1 cho thấy: sau 3 ngày cấy mẫu vào môi trường bắt đầu xuất hiện mẫu bị nhiễm và chết.

Công thức 2 thu được tỷ lệ mẫu sống cao nhất là 59,00% ở mức “c” trong so sánh Duncan. Công thức 1 thu được tỷ lệ mẫu sống thấp nhất là 25,00 % (CT1) ở mức “a” trong so sánh Duncan.

Khi xử lý Clorox nồng độ 15% (CT3) tỷ lệ sống là 53,00 % ở mức “b” trong so sánh Duncan.

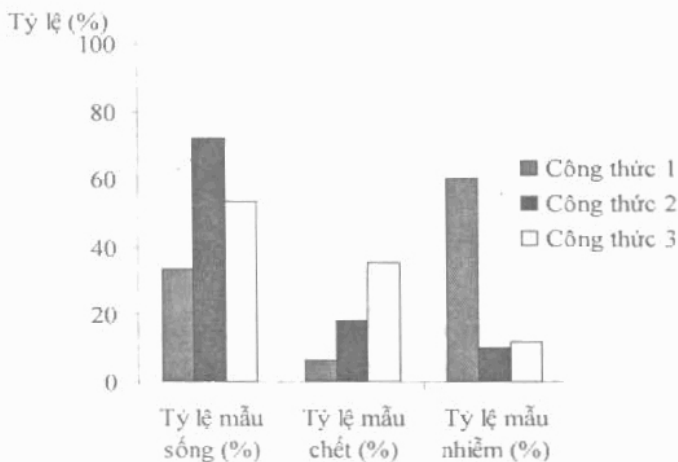
Vì vậy khi xử lý bằng Clorox nồng độ hợp lý để khử trùng mẫu là 10%.

Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của thời gian khử trùng bằng $HgCl_2$ 0,1% đến tỷ lệ sống của phôi hạt lúa chín (sau 30 ngày nuôi cấy)

Bảng 9.2: Ảnh hưởng của thời gian khử trùng bằng $HgCl_2$ 0,1% đến tỷ lệ sống của phôi hạt lúa chín (sau 30 ngày nuôi cấy)

Chỉ tiêu Công thức	Số hạt phôi (mẫu)	Tỷ lệ mẫu sống (%)	Tỷ lệ mẫu chết (%)	Tỷ lệ mẫu nhiễm (%)
CT1	100	33,00 ^a	6,00 ^a	61,00 ^b
CT2	100	72,00 ^c	18,00 ^b	10,00 ^a
CT3	100	54,00 ^b	35,00 ^c	11,00 ^a
Cv(%)		3,2	6,7	5,0

(a, b, c: các mức phân nhóm trong so sánh duncan)



Hình 9.2: Biểu đồ ảnh hưởng của thời gian khử trùng bằng $HgCl_2$ 0,1% đến tỷ lệ sống phôi hạt lúa chín

Kết quả thu được thể hiện ở bảng 9.2 và hình 9.2 cho thấy: công thức 2 thu được số mẫu sống cao nhất là 72,00 % ở mức “c” trong so sánh Duncan. Công thức 1 thu được số mẫu sống thấp là 33,00 % ở mức “a” trong so sánh Duncan. Số mẫu sống ở công thức 3 là 54,00 % ở mức “b” trong so sánh Duncan. Khi xử lý mẫu bằng HgCl₂ ngoài việc khử trùng, HgCl₂ có thể còn tác dụng phụ gây ngộ độc cho mẫu nuôi cấy. Vì vậy chọn thời gian hợp lý khi xử lý bằng HgCl₂ là rất quan trọng. Kết quả của thí nghiệm cho thấy: thời gian khử trùng mẫu cấy hợp lý bằng HgCl₂ 0,1% là 10 phút.

Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của một số nồng độ 2,4 D đến khả năng ra mô sẹo của phôi hạt lúa chín (sau 30 ngày nuôi cấy)

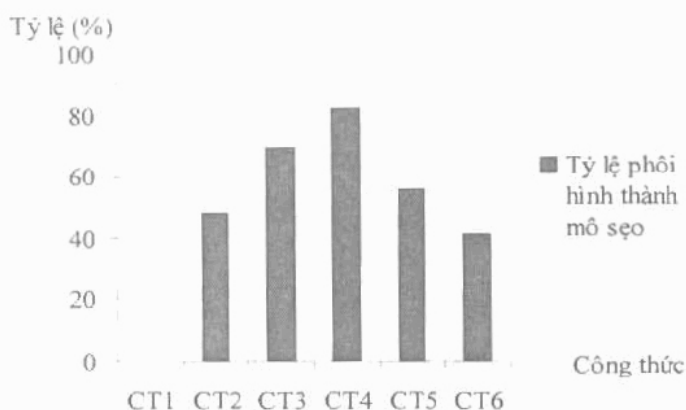
Bên cạnh các chất cung cấp dinh dưỡng cho mô nuôi cấy, việc bổ sung một hoặc nhiều chất điều hòa sinh trưởng như: auxin, gibberellin, cytokinin... rất cần thiết để kích thích sự sinh trưởng, phân hóa cơ quan hình thành các bộ phận của cây.

Thí nghiệm sử dụng 2,4 D, là auxin tổng hợp thường được dùng trong nuôi cấy mô tế bào để kích thích sự phân bào nhất là quá trình hình thành mô sẹo. Kết quả thu được thể hiện ở bảng 9.3 và hình 9.3.

Bảng 9.3: Ảnh hưởng của một số nồng độ 2,4 D đến khả năng ra mô sẹo của phôi hạt lúa chín sau 30 ngày

Công thức \ Chỉ tiêu	Số phôi ban đầu (mẫu)	Tỷ lệ mẫu hình thành mô sẹo sau 30 ngày (%)
CT1	90	0,00 ^a
CT2	90	47,78 ^c
CT3	90	64,44 ^e
CT4	90	82,22 ^f
CT5	90	55,56 ^d
CT6	90	41,11 ^b
Cv(%)		3,8

(a, b, c, d, e, f: là các mức phân nhóm trong so sánh Duncan)



Hình 9.3: Biểu đồ ảnh hưởng của một số nồng độ 2,4 D đến khả năng ra mô sẹo của phôi hạt lúa chín sau 30 ngày nuôi cấy

Kết quả thí nghiệm cho thấy: sau 15 ngày nuôi cấy, một số mẫu cấy trên môi trường bắt đầu hình thành mô sẹo và sau cấy 30 ngày các công thức có 2,4 D cho tỷ lệ mẫu hình thành mô sẹo tương đối cao. Trong đó: Công thức 4 có tỷ lệ mẫu hình thành mô sẹo cao nhất khi bổ sung 1,5mg 2,4D/l (CT4) là 82,22% ở mức “f” trong so sánh Duncan. Công thức 1 có tỷ lệ mẫu hình thành mô sẹo 0 % khi không bổ sung 2,4D (CT1) ở mức “a” trong so sánh Duncan. Tỷ lệ mẫu ra mô sẹo khi bổ sung 2,5mg 2,4D/l (CT6) là 41,11% ở mức “b” trong so sánh Duncan. Tỷ lệ mẫu ra mô sẹo khi bổ sung 0,5mg 2,4 D/l (CT2) là 47,78% ở mức “c” trong so sánh Duncan. Tỷ lệ mẫu ra mô sẹo khi bổ 2,0mg 2,4 D/l (CT5) là 55,56% mẫu ở mức “d” trong so sánh Duncan. Tỷ lệ mẫu ra mô sẹo khi bổ sung 1,0 mg 2,4 D/l (CT3) là 64,44% ở mức “e” trong so sánh Duncan.

Như vậy nồng độ 2,4 D là 1,5mg/l (CT4) cho tỷ lệ mẫu ra mô sẹo cao nhất.

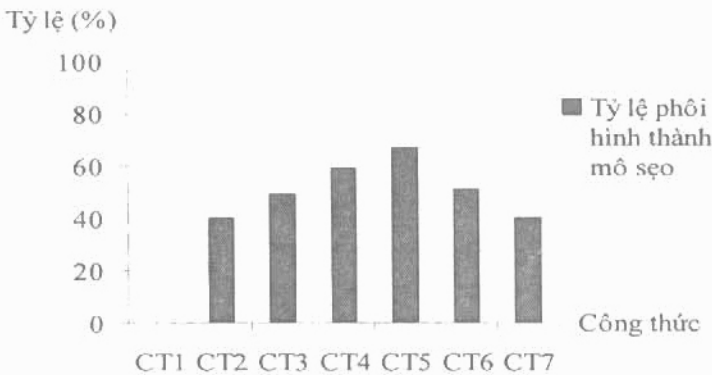
Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của một số nồng độ NAA đến khả năng ra mô sẹo của phôi hạt lúa chín sau 45 ngày nuôi cấy

NAA cũng là một auxin tổng hợp thường được dùng trong nuôi cấy mô và tế bào để kích thích sự phân bào và hình thành mô sẹo. Do đó cần thiết phải tiến hành nghiên cứu ảnh hưởng của một số nồng độ NAA đến khả năng hình thành mô sẹo của mô tế bào lúa. Kết quả thu được thể hiện ở bảng sau 9.4 và hình 9.4

Bảng 9.4: Ảnh hưởng của một số nồng độ NAA đến khả năng ra mô sẹo của phôi hạt lúa chín sau 45 ngày nuôi cấy

Chỉ tiêu Công thức	Số phôi ban đầu (mẫu)	Tỷ lệ mẫu hình thành mô sẹo sau 45 ngày(%)
CT1	90	0,00 ^a
CT2	90	40,00 ^b
CT3	90	48,89 ^c
CT4	90	58,89 ^d
CT5	90	66,67 ^e
CT6	90	51,11 ^c
CT7	90	40,00 ^b
Cv(%)		6,5

(a, b, c, d, e, f: là các mức phân nhóm trong so sánh duncan)



Hình 9.4: Biểu đồ ảnh hưởng của một số nồng độ NAA đến khả năng ra mô sẹo của phôi hạt lúa chín sau 45 ngày nuôi cấy

Môi trường bổ sung NAA, thời gian hình thành mô sẹo kéo dài hơn so với môi trường bổ sung 2,4 D. Môi trường bổ sung 2,4 D sau 30 ngày số mẫu ra mô sẹo gần như đạt mức tối đa, môi trường bổ sung NAA quá trình hình thành mô sẹo kéo dài hơn, có thể đến 45 ngày. Tuy nhiên trong nhiều trường hợp cần thiết phải kéo dài thời gian tạo mô sẹo của mẫu nuôi cấy, việc sử dụng NAA sẽ có ý nghĩa hơn. Công thức 5 có tỷ lệ mẫu ra mô sẹo

cao nhất khi bổ sung 2,0mg NAA/l (CT5) là 66,67 % ở mức “e” trong so sánh Duncan. Công thức 1 có tỷ lệ mẫu ra mô sẹo đạt 0 % khi không bổ sung NAA (CT1) ở mức “a” trong so sánh Duncan.

Tỷ lệ mẫu ra mô sẹo khi bổ sung 0,5 và 3,0mg NAA/l (CT2, CT7) đạt 40,00 % đều ở mức “b” trong so sánh Duncan. Tỷ lệ mẫu ra mô sẹo khi bổ sung 1,0 và 2,5mg 2.4 D/l (CT3, CT6) là 48,89% và 51,11% ở mức “c” trong so sánh Duncan. Tỷ lệ mẫu ra mô sẹo khi bổ sung 1,5 NAA/l (CT4) là 58.89% ở mức “d” trong so sánh Duncan.

Như vậy nồng độ NAA hợp lý cho sự hình thành mô sẹo là công thức 5 (2,0mg/l), cho tỷ lệ mẫu ra mô sẹo cao nhất.

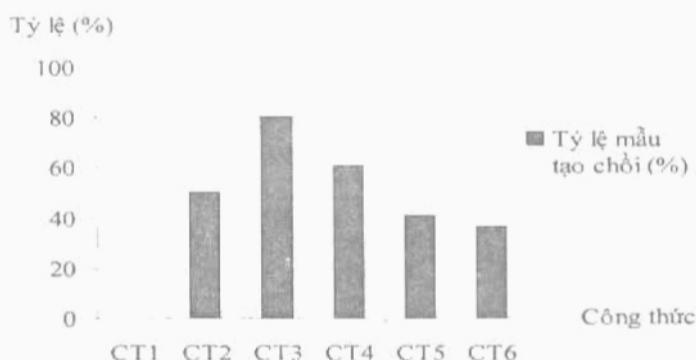
Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ kinetin đến khả năng tạo chồi từ mô sẹo phối hạt lúa chín (sau 20 ngày nuôi cấy)

Kinetin thuộc nhóm cytokinin, trong môi trường nuôi cấy mô, kinetin cần cho sự phân chia tế bào và phân hóa chồi từ mô sẹo. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ Kinetin đến sự hình thành chồi từ mô sẹo được thể hiện ở bảng 9.5 và hình 9.5.

Bảng 9.5: Ảnh hưởng của một số nồng độ kinetin đến khả năng tạo chồi từ mô sẹo phối hạt lúa chín (sau 20 ngày nuôi cấy)

Chỉ tiêu Công thức	Số mô sẹo (mẫu)	Tỷ lệ mẫu tạo chồi từ mô sẹo sau 4 tuần (%)
CT1	150	0,00
CT2	150	50,00 ^c
CT3	150	80,00 ^e
CT4	150	60,65 ^d
CT5	150	40,65 ^b
CT6	150	36,60 ^a
CV(%)		3,30

(a, b c d, e: là các mức phân nhóm trong so sánh duncan)



Hình 9.5: Biểu đồ ảnh hưởng của một số nồng độ kinetin đến khả năng tạo chồi từ mô sẹo phôi hạt lúa chín (sau 20 ngày nuôi cấy)

Sau 1 tuần nuôi cấy, mẫu trên môi trường có bổ sung kinetin bắt đầu hình thành chồi nhỏ màu xanh nhạt, sau 3 tuần nuôi cấy các công thức môi trường có nồng độ kinetin khác nhau cho tỷ lệ mẫu tạo chồi khác nhau ở mức có ý nghĩa. Trong đó tỷ lệ mẫu tạo chồi cao nhất khi bổ sung 1,0mg kinetin/l (CT3) là 80,00% ở mức “e” trong so sánh Duncan. Tỷ lệ mẫu hình thành chồi thấp nhất khi bổ sung 2,5mg kinetin/l (CT6) là 36,60% ở mức “a” trong so sánh Duncan. Tỷ lệ mẫu tạo chồi khi bổ sung 2,0mg kinetin/l (CT5) là 40,65 ở mức “b” trong so sánh Duncan. Tỷ lệ mẫu tạo chồi khi bổ sung 0,5mg kinetin /l (CT2) là 50,00% ở mức “c” trong so sánh Duncan. Tỷ lệ mẫu tạo chồi khi bổ sung 1,5mg kinetin /l (CT4) là 60,65% ở mức “d” trong so sánh Duncan. Công thức 1 khi không bổ sung kinetin, mô sẹo không hình thành chồi xanh.

Thí nghiệm cho thấy nồng độ Kinetin là 1,0mg/l (CT3) có tỷ lệ mẫu tạo chồi cao nhất là (80,00%).

Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ BAP tới khả năng tạo cụm chồi của chồi xanh tái sinh từ phôi hạt lúa chín (sau 20 ngày nuôi cấy)

Hệ số nhân chồi phụ thuộc vào khả năng phân bào của tế bào nuôi cấy. Trong điều kiện bình thường, tốc độ phân bào diễn ra chậm, khi có tác động của các chất kích thích sinh trưởng, quá trình phân chia tế bào diễn ra nhanh hơn. Bổ sung BAP (thuộc nhóm cytokinin) với nồng độ thích hợp sẽ kích thích hình thành cụm chồi tạo điều kiện nhân nhân chồi xanh với

hệ số nhân cao. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của một số nồng độ BAP đến quá trình nhân nhanh chồi lúa được trình bày ở bảng 9.6.

Bảng 9.6: Ảnh hưởng của một số nồng độ BAP tới khả năng nhân nhanh chồi của chồi xanh tái sinh từ phôi hạt lúa chín (sau 20 ngày nuôi cấy)

Công thức \ Chi tiêu	Số chồi ban đầu (chồi)	Hệ số nhân chồi sau 20 ngày (lần)
CT1	105	1,83 ^a
CT2	105	3,36 ^b
CT3	105	4,11 ^c
CT4	105	4,52 ^d
CT5	105	5,45 ^e
CT6	105	4,36 ^d
CV(%)		3,3

(a, b, c, d, e.: là các mức phân nhóm trong so sánh Duncan)

Sau khoảng 20 ngày nuôi cấy, các công thức thí nghiệm cho hệ số nhân chồi khác nhau có ý nghĩa. Trong đó số mẫu cho hệ số nhân chồi cao nhất khi bổ sung 2,0 mg BAP/l (CT5) là 5,45 lần ở mức “e” trong so sánh Duncan. Số mẫu cho hệ số nhân chồi thấp nhất khi không bổ sung BAP (CT1) là 1,83 lần, ở mức “a” trong so sánh Duncan. Số mẫu cho hệ số nhân chồi khi bổ sung 0,5 mg BAP/l (CT2) là 3,36 lần ở mức “b” trong so sánh Duncan. Số mẫu có hệ số nhân chồi khi bổ sung 2,0 mg BAP /l (CT3) là 4,11 lần - mức “c” trong so sánh Duncan. Số mẫu cho hệ số nhân chồi khi bổ sung 1,5 và 2,5 mg BAP /l (CT4,CT6) là 4,52 và 4,36 ở mức “d” trong so sánh Duncan.

Kết quả thí nghiệm cho thấy nồng độ BAP là 2,0mg/l (CT5) có hệ số nhân chồi cao nhất là (5,54 lần).

Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của một số nồng độ IAA tới khả năng ra rễ của chồi tái sinh từ mô sẹo phôi hạt lúa chín (sau 20 ngày nuôi cấy)

Sau khi nhân chồi được số lượng đủ lớn, chồi đạt từ 2 lá thật trở lên, giai đoạn cuối cùng là tạo cây hoàn chỉnh đưa ra trồng trên đồng ruộng.

Việc nghiên cứu quá trình ra rễ để tạo cây hoàn chỉnh được thí nghiệm với quá trình bổ sung liều lượng IAA (thuộc nhóm auxin) vào môi trường. IAA có khả năng trong việc kích thích quá trình phân hóa mô tế bào hình thành rễ của cây. Kết quả được trình bày ở bảng 9.7.

Bảng 9.7: Ảnh hưởng của IAA tới khả năng ra rễ của chồi tái sinh từ mô sẹo phôi hạt lúa hạt chín (sau 20 ngày nuôi cấy)

Chỉ tiêu Công thức	Số mẫu cây (mẫu)	Tỷ lệ mẫu ra rễ (%)	Số rễ/cây (rễ)	Chiều dài rễ/ cây (cm)
CT1	90	86,67 ^b	6,73 ^a	5,55 ^{cd}
CT2	90	84,44 ^b	7,47 ^{a^b}	4,04 ^b
CT3	90	88,89 ^{bc}	8,07 ^b	4,95 ^c
CT4	90	94,44 ^c	8,87 ^c	5,71 ^{cd}
CT5	90	74,44 ^a	14,20 ^d	3,57 ^b
CT6	90	70,00 ^a	15,80 ^e	2,47 ^a
CV(%)		3,8	4,3	8,2

(a,ab, b, bc, c, cd, e : là các mức phân nhóm trong so sánh duncan)

Sau 3 tuần nuôi cấy, quá trình ra rễ, và sinh trưởng của rễ có sự khác biệt có ý nghĩa ở các công thức thí nghiệm.

Tỷ lệ mẫu ra rễ cao nhất khi bổ sung 0,5mg IAA/l (CT4) là 94.44% được phân ở nhóm "c" trong so sánh Duncan. Tỷ lệ mẫu ra rễ thấp nhất khi bổ sung 0.7 và 1,0 mg IAA/l (CT5, CT6) là 74,44% và 70,00% ở mức "a" trong so sánh Duncan. Tỷ lệ mẫu ra rễ khi không bổ sung IAA (CT1) và bổ sung 0,1 mg BAP/l (CT2) là 86,67% và 84,44% ở nhóm "b" trong so sánh Duncan. Tỷ lệ mẫu ra rễ khi bổ sung 0.3 mg IAA /l (CT3) là 88,89% ở mức "bc" trong so sánh Duncan. Như vậy công thức có số rễ ra nhiều nhất là CT4 với liều lượng IAA là 0,5mg/l môi trường.

Sinh trưởng về chiều dài rễ đạt giá trị cao nhất khi không bổ sung BAP (CT1) và bổ sung 0,5 mg IAA /l (CT4) là 5,55 cm và 5,71cm ở nhóm "cd" trong so sánh Duncan. Sinh trưởng chiều dài rễ đạt giá trị thấp nhất khi bổ sung 1,0 mg IAA/l (CT6) là 2,47 cm ở mức "a" trong so sánh Duncan.

Số lượng rễ của cây có giá trị thấp nhất khi không bổ sung IAA/l (CT1) là 6.73 rễ ở mức "a" trong so sánh Duncan. Số rễ của cây tăng khi nồng độ IAA tăng từ 0,1-1.0 mg/l (CT2-CT6) là 7.47-15,8 rễ ở mức "ab và e" trong so sánh Duncan.

Thực tế thí nghiệm cũng cho thấy, ở công thức 4, khi mang cây ra trồng ngoài đồng ruộng cho tỷ lệ chết thấp nhất.

Vì vậy công thức thích hợp cho giai đoạn ra rễ để tạo cây hoàn chỉnh là công thức 4, bổ sung liều lượng IAA là 0,5 mg/l.

Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của một số môi trường thuần dưỡng đến sinh trưởng của cây lúa (sau 25 ngày nuôi dưỡng)

Việc xác định môi trường thuần dưỡng thích hợp cho sinh trưởng của cây lúa sau giai đoạn nuôi cấy là rất cần thiết. Giai đoạn thuần dưỡng thực tế là giai đoạn luyện cây trước khi trồng trên đồng ruộng. Thí nghiệm được thử nghiệm với nhiều loại môi trường khác nhau. Tuy nhiên ngoài yếu tố môi trường dinh dưỡng là các yếu tố thí nghiệm, các yếu tố khác như nhiệt độ, ánh sáng, ẩm độ được điều khiển phù hợp cho điều kiện thuần dưỡng (nhiệt độ : 25 độ C, ẩm độ 70-80%, ánh sáng 3000 lux).

Ảnh hưởng của môi trường thuần dưỡng đến tỷ lệ sống của cây lúa (sau 20 ngày nuôi dưỡng).

Kết quả được thể hiện ở bảng 9.8: Trong các loại môi trường thử nghiệm, tỷ lệ sống của 3 loại môi trường là nước cất, MS và Yoshida đạt giá trị tuyệt đối (100 %) và cùng trong nhóm có tỷ lệ cao nhất ở nhóm "a" trong so sánh Duncan. Công thức môi trường đất có tỷ lệ mầm sống thấp nhất (33,33 %) ở mức "b" trong so sánh Duncan.

Bảng 9.8: Ảnh hưởng của các môi trường thuần dưỡng đến tỷ lệ sống của cây lúa (sau 20 ngày nuôi dưỡng)

Môi trường	Số mẫu	Số mẫu sống		Số mẫu chết		Quan sát sinh trưởng của cây
		Số mẫu (cây)	Tỷ lệ (%)	Số mẫu (cây)	Tỷ lệ (%)	
Nước cất	90	90	100a	0	0	Lá vàng, rễ ít và dài

MS	90	90	100a	0	0	Lá xanh đậm, rễ ngắn
Yoshida	90	90	100a	0	0	Cây sinh trưởng bình thường
Đất	90	30	33,3b	60	66,7	Cây sinh trưởng tốt
Cv%			9,1			

(a, b là mức phân nhóm trong so sánh Duncan)

Sơ bộ quan sát sinh trưởng của cây lúa cho thấy, môi trường đất cây sinh trưởng tương đối tốt, môi trường Yoshida cây sinh trưởng bình thường giống cây mạ sinh trưởng ngoài đồng ruộng, môi trường MS cây sinh trưởng lá xanh đậm, dày hơn bình thường, rễ ngắn, môi trường nước cất cây sinh trưởng yếu kém. Để đánh giá cụ thể hơn về sinh trưởng của cây lúa, nhóm nghiên cứu tiếp tục tiến hành theo dõi một số chỉ tiêu sinh trưởng của cây trong giai đoạn thuần dưỡng.

Ảnh hưởng của môi trường thuần dưỡng đến một số chỉ tiêu sinh trưởng của cây lúa

Bảng 9.9: Ảnh hưởng của các môi trường thuần dưỡng đến sự sinh trưởng của cây lúa (sau 20 ngày thuần dưỡng)

Chỉ tiêu Môi trường	Chiều cao cây (cm)	Số nhánh (nhánh)	Số lá (lá)	Chiều dài rễ (cm)
Nước cất	11,67a	0,27a	4,27a	22,67c
MS	23,83c	0,80b	4,67a	8,50a
Yoshida	21,33b	1,73c	5,73b	10,10a
Đất	25,17d	3,27d	7,27c	20,5b
Cv(%)	3,9	13,2	3,4	5,6

(a, b, c, d: là các mức phân nhóm trong so sánh duncan)

Sau khi đưa vào môi trường thuần dưỡng 20 ngày, sinh trưởng của cây lúa có sự khác biệt giữa các công thức.

Chiều cao cây ở môi trường đất đạt giá trị cao nhất (25,17 cm) ở mức “d” trong so sánh Duncan. Chiều cao cây ở môi trường nước cất có giá trị thấp nhất (11,67 cm) ở mức “a” trong so sánh Duncan. Chiều cao cây ở môi trường Yoshida là 21,33 cm ở mức “b” trong so sánh Duncan. Chiều cao cây ở môi trường MS là 23,83 cm đạt ở mức “c” trong so sánh Duncan.

Số nhánh, số lá ở môi trường đất cao nhất là 3,27 nhánh và 7,27 lá ở mức “d”, “c” trong so sánh Duncan. Số nhánh, số lá ở môi trường nước cất thấp nhất là 0,27 nhánh và 4,27 lá ở mức “a” trong so sánh Duncan. Các công thức khác nằm ở giữa hai mức trên.

Chiều dài rễ ở môi trường nước cất đạt giá trị cao nhất là 22,67 cm ở mức “c” trong so sánh Duncan. Chiều dài rễ ở môi trường MS và Yoshida ngắn nhất là 8,50 và 10,10 cm đều ở mức “a” trong so sánh Duncan. Chiều dài rễ ở môi trường đất là 20,5 cm ở mức “b” trong so sánh Duncan.

Tổng hợp kết quả của hai bảng 3.8 và 3.9 kết hợp với theo dõi ở giai đoạn tiếp theo (giai đoạn trồng ngoài đồng ruộng) cho thấy : Môi trường nước, tỷ lệ sống cao nhưng cây sinh trưởng yếu kém lá vàng, sức sống của cây sau khi trồng ngoài đồng ruộng kém hơn nhiều so các công thức khác và đối chứng; Môi trường MS, tỷ lệ sống cao, cây sinh trưởng tương đối tốt, tuy nhiên sinh trưởng của rễ kém hơn so với môi trường Yoshida, cây mang trồng ngoài đồng ruộng sinh trưởng bình thường sinh trưởng tương đương so với sinh trưởng của cây ở môi trường Yoshida và đối chứng; môi trường Yoshida, tỷ lệ sống cao, cây sinh trưởng tốt, sức sống của cây giai đoạn trồng trên đồng ruộng tương đương với cây ở môi trường MS và đối chứng ; môi trường đất, mặc dù những cây còn sống ở giai đoạn thuần dưỡng có sức sinh trưởng tốt hơn so với cây lúa trồng ở các môi trường khác, nhưng tỷ lệ sống rất thấp, cây trồng ở giai đoạn đồng ruộng có sức sống tương đương so với đối chứng.

Từ kết quả trên có thể đi đến kết luận, môi trường thuần dưỡng phù hợp là môi trường Yoshida và MS, trong đó môi trường Yoshida có nhiều ưu điểm hơn.

Sơ bộ kết luận kết quả nghiên cứu tạo cây hoàn chỉnh từ nuôi cấy mô tế bào phôi hạt chín ở cây lúa

Nuôi cấy tạo cây hoàn chỉnh từ mô tế bào phôi hạt lúa chín ở cây lúa, có thể sử dụng hai loại hóa chất khử trùng mẫu là Clorox và $HgCl_2$, trong

đó Clorox sử dụng nồng độ 10 % với thời gian 20 phút, $HgCl_2$ sử dụng ở nồng độ 0,1% trong thời gian 10 phút.

Sử dụng 2,4D liều lượng 1,5 mg /l hoặc 2,0 mg NAA/l môi trường nuôi cấy cho tỷ lệ mẫu hình thành mô sẹo tốt nhất.

Sử dụng 1,0 mg kinetin/l môi trường nuôi cấy cho tỷ lệ mẫu tái sinh chồi cao nhất.

Sử dụng 2,0 mg BAP /l môi trường nuôi cấy cho hệ số nhân chồi đạt giá trị cao nhất.

Sử dụng 0,5 mg IAA/l môi trường nuôi cấy cho khả năng ra rễ tốt nhất.

Môi trường Yoshida là môi trường thích hợp cho giai đoạn thuần dưỡng cây lúa trước khi mang ra trồng ngoài đồng ruộng.

9.1.3.2. Kết quả nghiên cứu hoàn thiện quy trình nuôi cấy bao phần lúa

Nuôi cấy tạo cây lúa chình từ bao phần lúa, trải qua các bước nuôi cấy chủ yếu như: chọn mẫu và khử trùng, xử lý nhiệt độ lạnh trước khi nuôi cấy – nuôi cấy bao phần lúa tạo mô sẹo – nuôi cấy tạo mô sẹo nhằm tái sinh chồi xanh – nuôi cấy chồi xanh trên môi trường ra rễ để tạo cây hoàn chỉnh – đưa cây trồng trên môi trường thuần dưỡng nhằm giúp cho cây quen dần với điều kiện đồng ruộng – trồng trọt đánh giá đồng ruộng (phụ thuộc vào từng mục đích của thí nghiệm). Trên cơ sở các giai đoạn nuôi cấy, các thí nghiệm được tiến hành ở từng giai đoạn với các yếu tố ảnh hưởng chủ yếu liên quan đến quá trình nuôi cấy nhằm đưa ra kết luận hoàn thiện quy trình tạo cây hoàn chỉnh từ nuôi cấy bao phần lúa.

Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của môi trường MS và N6 đến khả năng tạo mô sẹo của bao phần lúa

Thí nghiệm sử dụng các tổ hợp lai và dòng với hai loại môi trường sử dụng cho nuôi cấy bao phần lúa có bổ sung thêm một số hóa chất (đã ghi ở thí nghiệm 10 phần phương pháp thí nghiệm) kết quả được trình bày ở bảng 9.10.

Bảng 9.10 Ảnh hưởng của môi trường MS và N6 đến khả năng tạo mô sẹo của bao phấn lúa (sau 50 ngày nuôi cấy)

TT	Đòng	MS			N6		
		Số bình nuôi cấy/ số bao phấn	Số mô sẹo tạo thành	Tỷ lệ (%)	Số bình nuôi cấy/ số bao phấn	Số mô sẹo tạo thành	Tỷ lệ (%)
	NA/TN13	30/3600	137,0	3,80 ^h	30/3600	187,0	5,19 ^k
	KD/R271	30/3600	148,0	4,11 ⁱ	30/3600	180,7	5,02 ^{ij}
	Kim A/R278	30/3600	225,0	6,25 ^l	30/3600	281,0	7,80 ⁿ
	KD/Tam Nông	30/3600	95,0	2,64 ^f	30/3600	81,0	2,25 ^{cd}
	VL20	30/3600	1,0	0,03 ^a	30/3600	32,0	0,89 ^b
	NA/T10	30/3600	69,0	1,92 ^d	30/3600	112,0	3,11 ^g
	I88A/SL02	30/3600	156,0	4,33 ^l	30/3600	198,0	5,50 ^k
	RA	30/3600	84,0	2,33 ^e	30/3600	89,0	2,47 ^{de}
	TG/CL02	30/3600	69,0	1,92 ^d	30/3600	74,0	2,06 ^c
	Kim A/TN13	30/3600	119,0	3,30 ^g	30/3600	173,0	4,8 ^{ij}
	KI/T10	30/3600	23,0	0,64 ^b	30/3600	19,3	0,54 ^{ab}
	NA/R171	30/3600	98,0	2,72 ^f	30/3600	106,0	2,94 ^{fg}
	KD/CL02	30/3600	102,0	2,83 ^f	30/3600	137,0	3,81 ^h
	KimA/R171	30/3600	1,0	0,03 ^a	30/3600	218,0	6,06 ^l
	KD/R17	30/3600	191,0	5,30 ^j	30/3600	93,0	2,58 ^{def}
	NA/CL02	30/3600	37,0	1,03 ^e	30/3600	102,0	2,83 ^{efg}
	KimA/R17	30/3600	214,0	5,94 ^k	30/3600	267,0	7,42 ^m
	DA/R17	30/3600	82,0	2,27 ^e	30/3600	132,7	3,68 ^h
	KD/T10	30/3600	2,7	0,07 ^a	30/3600	17,0	0,473 ^a
	NA/N01	30/3600	70,7	1,96 ^d	30/3600	98,3	2,73 ^{efg}
Cv (%)				6,7			6,0

(a, b, c, d, e, f, g, h, j, i, k, l, de, efg, def, là các mức phân nhóm trong so sánh duncan)

Số liệu bảng 9.10 cho thấy: các tổ hợp lai đều có khả năng ra mô sẹo. Trong cùng một vật liệu nuôi cấy, môi trường N6 cho tỷ lệ ra mô sẹo tốt hơn so với môi trường MS.

Ở môi trường MS, tỷ lệ ra mô sẹo của bao phần từ các tổ hợp lai khác nhau dao động từ 0,03% đến 6,52%. Theo so sánh Duncan, các tổ hợp lai ở nhóm a có tỷ lệ ra mô sẹo thấp nhất (gồm tổ hợp lai: NA/CL02; VL 20), các tổ hợp lai cho tỷ lệ mô sẹo cao nhất thuộc nhóm l trong so sánh Duncan (tổ hợp lai KimA/R278). Nhìn chung các hợp lai có bố hoặc mẹ là dòng Kim A hoặc KD cho tỷ lệ ra mô sẹo tương đối cao (KimA/R17: 5,94%; KD/R271: 4,11%; KD/R17: 5,30%...).

Môi trường N6, tỷ lệ mô sẹo dao động từ 0,47% (tổ hợp KD/T10) đến 7,80% (tổ hợp KimA/R278). Dòng/ tổ hợp lai có nguồn gốc bố mẹ là dòng Kim có khả năng ra mô sẹo cao nhất. Theo so sánh Duncan, tổ hợp lai ở nhóm "a" có tỷ lệ ra mô sẹo thấp nhất (gồm tổ hợp lai: KD/T10), tổ hợp lai cho tỷ lệ mô sẹo cao nhất thuộc nhóm "n" trong so sánh Duncan (tổ hợp lai KimA/R278: 7,80%). Nhìn chung các hợp lai có bố hoặc mẹ là dòng Kim cho tỷ lệ ra mô sẹo tương đối cao (Kim A/R17: 7,42%; Kim A/R171; 6,06%...). Điều này cho thấy, khả năng ra mô sẹo phụ thuộc rất nhiều vào phản ứng kiểu gen với môi trường nuôi cấy. Kinh nghiệm nghiên cứu từ Viện di truyền và Viên cây lương thực và cây thực phẩm (Bộ NN và PTNT) cũng nhận định, trong quá trình nuôi cấy bao phần lúa, cần phải thử nghiệm nhiều tổ hợp lai để xác định cây bố mẹ có phản ứng tốt với môi trường nuôi cấy để có thể tạo thành công mô sẹo nguồn vật liệu có vai trò quan trọng cho nuôi cấy bao phần thành công. Trong các dòng thí nghiệm, KimA/R278 là dòng cho tỷ lệ bao phần tạo mô sẹo cao nhất. Do đó trong các thí nghiệm tiếp theo, bao phần của dòng KimA/R278 được sử dụng làm vật liệu thí nghiệm.

Kết quả thử nghiệm khả năng ra mô sẹo của bao phần ở các môi trường khác nhau, có thể đi đến kết luận; Môi trường N6 có khả năng ra mô sẹo tốt hơn so với môi trường MS, dòng Kim A/R278 là dòng có tỷ lệ ra mô sẹo cao nhất được sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo để hoàn chỉnh qui trình nuôi cấy bao phần lúa.

Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của thời gian xử lý nhiệt độ lạnh đến khả năng tạo mô sẹo của bao phấn lúa (sau 50 ngày nuôi cấy).

Trên cơ sở của kết quả thí nghiệm ở bảng 9.10 (thử nghiệm khả năng ra mô sẹo của bao phấn lúa trên hai môi trường MS và N6. Dòng Kim A/R278 cho kết quả tốt nhất được sử dụng làm vật liệu cho các thí nghiệm tiếp theo để hoàn thiện qui trình nuôi cấy bao phấn lúa.

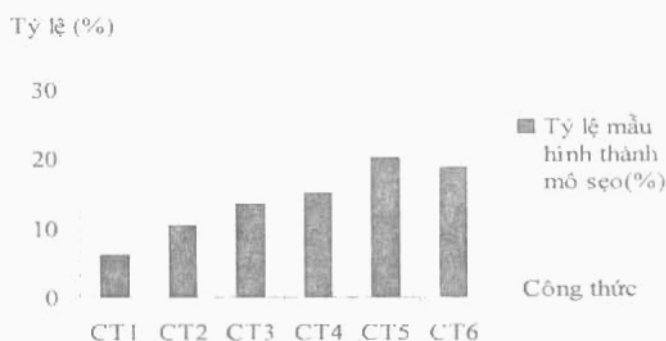
Kết quả nghiên cứu về ảnh hưởng của thời gian xử lý lạnh đến khả năng tạo mô sẹo của bao phấn lúa được thể hiện qua bảng 9.11 và hình 9.6.

Bảng 9.11. Ảnh hưởng của thời gian xử lý lạnh đến khả năng tạo mô sẹo của bao phấn lúa (sau 50 ngày nuôi cấy – thí nghiệm trên dòng Kim A/R278)

Công thức thí nghiệm	Số bình nuôi cấy/số bao phấn (120 bao phấn/bình)	Tỷ lệ mẫu hình thành mô sẹo (%)
CT1	30/3600	8,00 ^e
CT2	30/3600	10,33 ^d
CT3	30/3600	13,33 ^c
CT4	30/3600	15,00 ^b
CT5	30/3600	20,00 ^a
CT6	30/3600	18,67 ^a
CV (%)		5,74

(a, b, c, d, e: các mức phân nhóm trong so sánh Duncan).

Kết quả cho thấy: thời gian xử lý lạnh khác nhau ảnh hưởng đến khả năng tạo mô sẹo của bao phấn lúa. Giữa công thức 5 và công thức 6 không có sự khác, tỷ lệ bao phấn ra mô sẹo lần lượt là 20,00% và 18,67%, đạt cao nhất ở mức “a” trong so sánh Duncan.



Hình 9.6: Biểu đồ ảnh hưởng của thời gian xử lý lạnh đến khả năng tạo mô sẹo của bao phần lúa (sau 50 ngày nuôi cấy)

Công thức 4 cho tỷ lệ bao phần tạo mô sẹo là 15,00%, ở mức “b” trong so sánh Duncan. Công thức 3 cho tỷ lệ bao phần tạo mô sẹo là 13,33%, ở mức “c” trong so sánh Duncan. Công thức 2 cho tỷ lệ mẫu ra mô sẹo là 10,33%, ở mức “d” trong so sánh Duncan. Khi không xử lý lạnh (công thức 1) tỷ lệ mẫu cấy hình thành mô sẹo thấp nhất (8,00%), ở mức “e” trong so sánh Duncan.

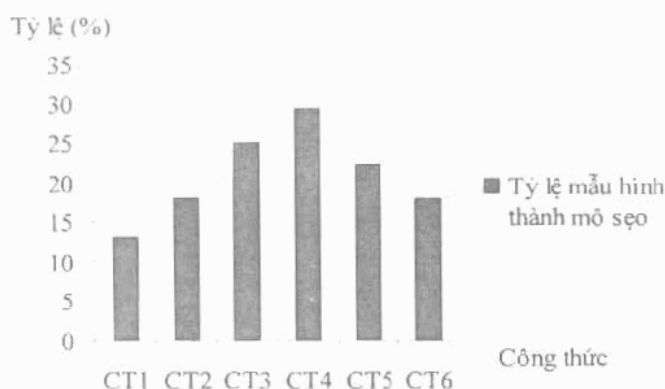
Kết quả cho thấy thời gian xử lý lạnh tốt nhất là công thức 5 và 6 (từ 168 đến 240 giờ).

Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ 2,4D đến khả năng tạo mô sẹo từ bao phần (sau 50 ngày nuôi cấy)

Bảng 9.12. Ảnh hưởng của nồng độ 2,4D đến khả năng tạo mô sẹo của bao phần lúa (sau 50 ngày nuôi cấy – thí nghiệm trên dòng Kim A/R278)

Công thức thí nghiệm	Số bình nuôi cấy/số bao phần (120 bao phần/bình)	Tỷ lệ mẫu hình thành mô sẹo (%)
CT1	30/3600	13,00e
CT2	30/3600	18,00d
CT3	30/3600	25,00b
CT4	30/3600	29,33a
CT5	30/3600	22,33c
CT6	30/3600	18,00d
CV (%)		5,03

(a, b, c, d,e: các mức phân nhóm trong so sánh Duncan)



Hình 9.7: Biểu đồ ảnh hưởng của nồng độ 2,4D đến khả năng hình thành mô sẹo của bao phấn lúa (sau 50 ngày nuôi cấy)

Kết quả cho thấy: bổ sung vào môi trường nuôi cấy 1,5 mg 2,4D /l (công thức 4) tỷ lệ mẫu tạo mô sẹo cao nhất (29,33%), ở mức “a” trong so sánh Duncan. Bổ sung 1,0 mg 2,4D/l (công thức 3) tỷ lệ mẫu tạo mô sẹo là 25,00%, ở mức “b” trong so sánh Duncan. Bổ sung 2,0 mg 2,4D /l (công thức 5) tỷ lệ mẫu tạo mô sẹo là 22,33%, ở mức “c” trong so sánh Duncan. Công thức 6 và công thức 2 cho tỷ lệ mẫu tạo mô sẹo là 18,00%, ở mức “d” trong so sánh Duncan. Không bổ sung 2,4D (công thức 1) tỷ lệ mẫu tạo mô sẹo thấp nhất (13,00%), ở mức “e” trong so sánh Duncan.

Qua kết quả thí nghiệm có thể kết luận, bổ sung 1,5 mg 2,4D cho một lít môi trường nuôi cấy cho kết quả bao phấn hình thành mô sẹo tốt nhất.

Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ BAP đến khả năng tái sinh chồi của mô sẹo hình thành từ bao phấn lúa (sau 20 ngày nuôi cấy)

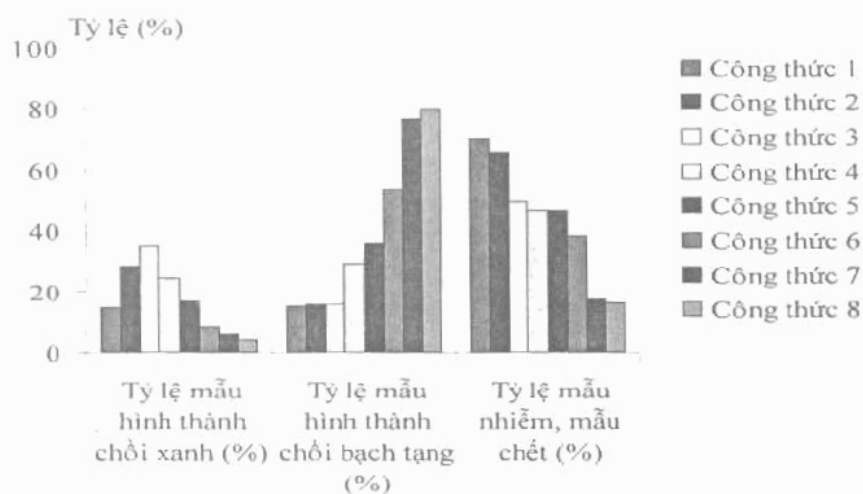
Để tạo cây hoàn chỉnh, sau khi mô sẹo được hình thành, được chuyển sang môi trường tái sinh tạo chồi xanh. Thành phần môi trường ít nhiều thay đổi, trong đó chất kích thích sinh trưởng đóng vai trò quan trọng đối với tái sinh chồi là BAP, được thử nghiệm với các nồng độ khác nhau. Kết quả nghiên cứu được thể hiện ở bảng 9.13 và hình 9.8.

Bảng 9.13. Ảnh hưởng của nồng độ BAP đến khả năng tái sinh chồi từ mô sẹo bao phần lúa (sau 20 ngày nuôi cấy – thí nghiệm trên dòng KimA/R278)

Công thức	Số bình nuôi cấy (120 bao phần/1 bình)	Chỉ tiêu theo dõi		
		Tỷ lệ mẫu hình thành chồi xanh (%)	Tỷ lệ mẫu hình thành chồi bạch tạng (%)	Tỷ lệ mẫu nhiễm, mẫu chết (%)
CT1	30	14,67 ^d	15,00 ^f	70,33
CT2	30	28,33 ^b	16,00 ^f	65,67
CT3	30	35,00 ^a	15,67 ^f	49,33
CT4	30	24,67 ^c	29,00 ^e	46,33
CT5	30	17,00 ^d	35,67 ^d	46,33
CT6	30	8,33 ^e	53,67 ^c	38,00
CT7	30	6,00 ^{ef}	76,67 ^b	17,33
CT8	30	4,00 ^f	79,67 ^a	16,33
CV (%)		8,03	4,00	-

(a, b, c, d, e, f các mức phân nhóm trong so sánh Duncan).

Tỷ lệ chồi xanh có sự khác biệt khi thay đổi nồng độ BAP, công thức 3 (bổ sung 1,5mg BAP /l) cho tỷ lệ mẫu tạo chồi xanh cao nhất (35%), ở mức "a" trong so sánh Duncan. Khi tăng hoặc giảm dần nồng độ BAP tỷ lệ mẫu tạo chồi xanh giảm dần, tỷ lệ chồi bạch tạng, mẫu nhiễm, mẫu chết có chiều hướng tăng. Công thức 2 (bổ sung 1mg BAP/l) cho tỷ lệ mẫu tạo chồi xanh là 28,33%, ở mức "b" trong so sánh Duncan. Công thức 4 (bổ sung 2mg BAP /l) cho tỷ lệ mẫu tạo chồi xanh là 26,67%, ở mức "c" trong so sánh Duncan. Công thức 1, 5 (không bổ sung và bổ sung 2,5mg BAP /l) cho tỷ lệ mẫu tạo chồi xanh lần lượt là 14,67%, và 17,00%, ở mức "d" trong so sánh Duncan. Công thức 6 (bổ sung 3mg BAP/l) cho tỷ lệ mẫu tạo chồi xanh là 8,33%, ở mức "e" trong so sánh Duncan. Trong khi đó, nếu tăng nồng độ BAP lên 3.5 mg/l (công thức 7), tỷ lệ mẫu tạo chồi xanh là (6,00%), đạt mức "ef" trong so sánh Duncan. Tỷ lệ mẫu tạo chồi xanh thấp nhất khi bổ sung 4.0 mg BAP/l (công thức 8) là 4,00%, ở mức "f" trong so sánh Duncan.



Hình 9.8: Biểu đồ ảnh hưởng của nồng độ BAP đến khả năng tái sinh chồi của mô sẹo hình thành từ bao phấn lúa.

Tỷ lệ mẫu tạo chồi bạch tạng: giữa công thức 1, công thức 2 và công thức 3 không có sự khác biệt, công thức 1 (15,00%), công thức 2 (16,00%), công thức 3 (15,67%) ở mức “f” trong so sánh Duncan. Tỷ lệ mô sẹo hình thành chồi bạch tạng tăng dần khi tăng nồng độ BAP, công thức 4 (bổ sung 2,0 mg BAP/l) cho tỷ lệ mẫu tạo chồi bạch tạng là 29,00%, ở mức “e” trong so sánh Duncan. Công thức 5 (bổ sung 2,5mg BAP/l) cho tỷ lệ mẫu tạo chồi bạch tạng là 35,67%, ở mức “d” trong so sánh Duncan. Công thức 6 (bổ sung 3mg BAP/l) cho tỷ lệ mẫu tạo chồi bạch tạng là 53,67%, ở mức “c” trong so sánh Duncan. Khi tăng nồng độ BAP lên 3,5 mg/l (công thức 7) tỷ lệ mẫu tạo chồi bạch tạng rất cao (76,67%), ở mức “b” trong so sánh Duncan. Tỷ lệ mẫu tạo chồi bạch tạng có giá trị cao nhất khi bổ sung 4,0 mg/l BAP (công thức 8) là 79,67%, ở mức “a” trong so sánh Duncan.

Khi không bổ sung BAP tỷ lệ mẫu nhiễm, mẫu chết cao nhất (70,33%), bổ sung 4,0 mg/l BAP thì tỷ lệ này rất thấp (16,33%).

Giai đoạn tạo chồi, cần phải đạt được tỷ lệ mẫu ra chồi xanh cao nhất, kết quả cũng cho thấy không nên bổ sung quá nhiều BAP vào môi trường tái sinh, sẽ làm tăng tỷ lệ mẫu tạo chồi bạch tạng. Bổ sung BAP cho quá trình tái sinh chồi, công thức 3 (bổ sung 1,5mg/l BAP) đạt kết quả tốt nhất.

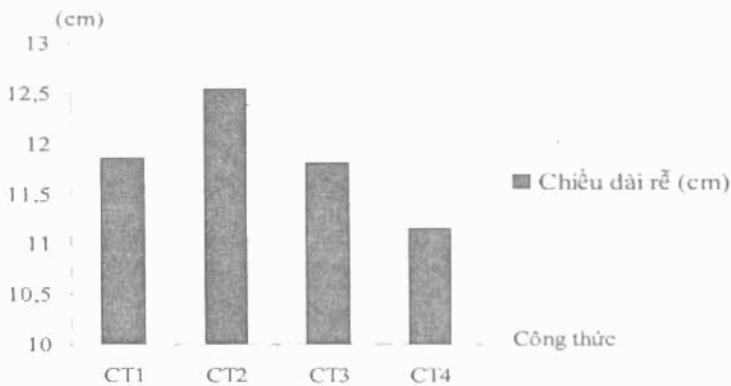
Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ NAA đến khả năng ra rễ của chồi xanh tái sinh từ mô sẹo bao phấn lúa (sau 20 ngày nuôi cấy)

Sau khi các chồi đã hình thành và đủ tiêu chuẩn từ 2 lá thật trở lên, chồi xanh được chuyển sang môi trường ra rễ để tạo cây hoàn chỉnh. Trong đó NAA (thuộc nhóm auxin) có vai trò quan trọng kích thích khả năng ra rễ. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của NAA đến khả năng ra rễ của chồi được thể hiện ở bảng 9.14 hình 9.9 (a) và (b).

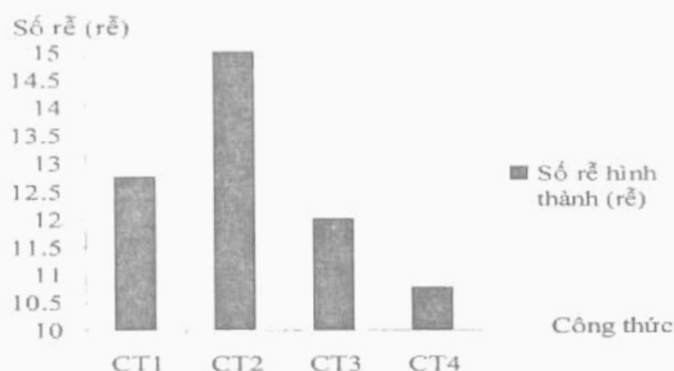
Bảng 9.14: Ảnh hưởng của nồng độ NAA đến khả năng ra rễ của chồi xanh (sau 20 ngày nuôi cấy – thí nghiệm trên dòng KimA/R278)

Công thức thí nghiệm	Số lượng chồi nuôi cấy	Chỉ tiêu theo dõi	
		Chiều dài rễ (cm)	Số rễ hình thành (rễ)
CT1	45	11,85 ^b	12,75 ^b
CT2	45	<u>12,53^a</u>	<u>15,00^a</u>
CT3	45	11,80 ^b	12,00 ^{bc}
CT4	45	<u>11,15^c</u>	<u>10,75^c</u>
CV (%)		3,28	7,05

(a, b, c: các mức phân nhóm trong so sánh Duncan).



Hình 9.9(a): Biểu đồ ảnh hưởng của NAA đến sinh trưởng chiều dài của rễ



Hình 9.9(b): Biểu đồ ảnh hưởng của NAA đến số lượng rễ

Kết quả theo dõi chiều dài rễ cho thấy: công thức 2 (bổ sung 0,1mg NAA /l) có chiều dài rễ cao nhất (12,53cm), ở mức “a” trong so sánh Duncan. Công thức 1 (không bổ sung NAA) có chiều dài rễ là 11,85cm và công thức 3 (bổ sung 0,2mg/l) có chiều dài rễ là 11,80cm, đều ở mức “b” trong so sánh Duncan. Chiều dài rễ thấp nhất khi bổ sung 0,3 mg NAA /l (công thức 4) là 11,15cm, ở mức “c” trong so sánh Duncan.

Theo số rễ lượng rễ hình thành: công thức 2 (bổ sung 0,1mg NAA /l) có số rễ cao nhất (15,00 rễ), ở mức “a” trong so sánh Duncan. Công thức 1 (không bổ sung NAA) có số rễ là 12,75 rễ, ở mức “b” trong so sánh Duncan. công thức 3 (bổ sung 0,2 mg NAA /l) có số rễ là 12,00 rễ, ở mức “bc” trong so sánh Duncan. Số rễ hình thành thấp nhất khi bổ sung 0,3 mg NAA/l (công thức 4) là 10,75 rễ, ở mức “c” trong so sánh Duncan.

Kết hợp hai chỉ tiêu trên cùng với theo dõi sự sinh trưởng của chồi lúa ở các giai đoạn tiếp theo, có thể kết luận môi trường ra rễ có bổ sung 0,1 mg NAA/l cho kết quả tốt nhất.

Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của môi trường thuần dưỡng đến khả năng sinh trưởng của cây lúa (sau 25 ngày nuôi cấy)

Anh hưởng của môi trường thuần dưỡng đến tỷ lệ sống của cây lúa

Kết quả cho thấy, môi trường Yoshida có tỷ lệ sống cao nhất (100%) ở mức “a” trong so sánh Duncan; môi trường MS có thể lệ cây sống cao thứ hai đạt mức “b” trong so sánh Duncan.

Bảng 9.15: Ảnh hưởng của các môi trường thuần dưỡng tỷ lệ sống của cây lúa (sau 20 ngày nuôi cấy – thí nghiệm trên dòng Kim A/R278)

Môi trường	Số mẫu	Số mẫu sống		Số mẫu chết		Quan sát sinh trưởng của cây
		Số mẫu (cây)	Tỷ lệ (%)	Số mẫu (cây)	Tỷ lệ (%)	
Nước cất	30	22	73,30 ^c	8	26,72	Lá vàng, rễ ít và dài
MS	30	26	86,71 ^b	4	13,31	Lá xanh đậm, ngắn
Yoshida	30	30	100,00 ^a	0	0,00	Cây sinh trưởng bình thường
Đất	30	4	13,33 ^c	26	86,70	Cây sinh trưởng tốt
CV%		9,12	11,30	8,71	7,87	

(a, b, c, e: các mức phân nhóm trong so sánh Duncan).

Môi trường nước cất có tỷ lệ cây sống là 73,30% ở mức “c” trong so sánh Duncan; môi trường đất có tỷ lệ sống thấp nhất (13,32 %) ở mức “e” trong so sánh Duncan.

Sơ bộ quan sát sinh trưởng của cây lúa: môi trường đất cây sinh trưởng tương đối tốt, môi trường Yoshida cây sinh trưởng bình thường giống cây mạ sinh trưởng ngoài đồng ruộng, môi trường MS cây sinh trưởng lá xanh đậm, lá dày hơn bình thường, rễ ngắn, môi trường nước cất cây sinh trưởng yếu kém. Nghiên cứu kỹ hơn về sinh trưởng của cây lúa một số chỉ tiêu sinh trưởng được tiếp tục đánh giá với các môi trường trên.

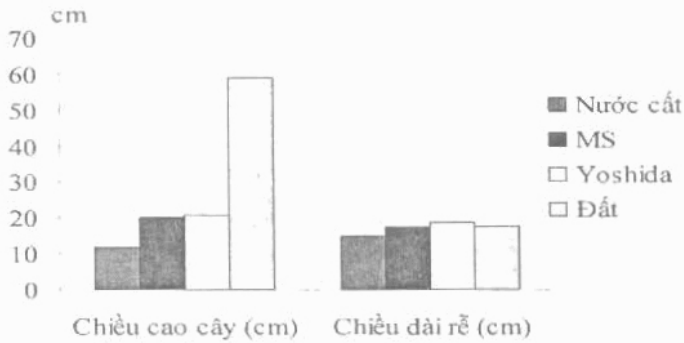
Ảnh hưởng của môi trường thuần dưỡng đến một số chỉ tiêu sinh trưởng của cây lúa:

Bảng 9.16. Ảnh hưởng của môi trường thuần dưỡng đến khả năng sinh trưởng của cây lúa (sau 25 ngày nuôi cấy – thí nghiệm trên dòng Kim A/R278)

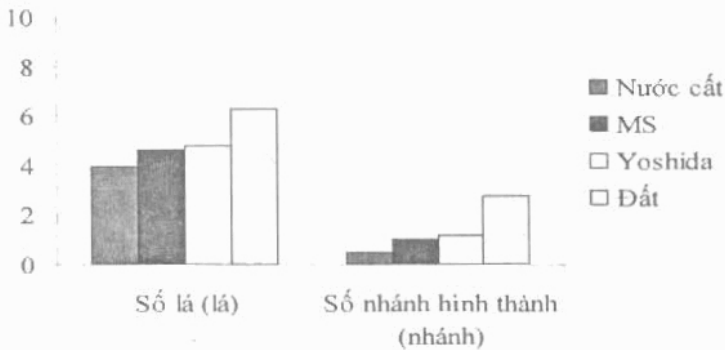
Môi trường	Chỉ tiêu theo dõi			
	Chiều cao cây (cm)	Chiều dài rễ (cm)	Số lá (lá)	Số nhánh hình thành (nhánh)
Nước cất	11,78 ^c	14,88 ^c	3,95 ^c	0,46 ^c
MS	20,05 ^b	17,40 ^b	4,65 ^b	1,03 ^b
Yoshida	20,65 ^b	18,80 ^a	4,78 ^b	1,15 ^b

Đất	39,05 ^a	17,83 ^{ab}	6,27 ^a	2,78 ^a
CV (%)	8,15	4,91	5,28	14,32

(a, b, c.... các mức trong phân nhóm trong so sánh Duncan).



Hình 9.10(a): Biểu đồ ảnh hưởng của môi trường thuần dưỡng đến chiều cao cây và sinh trưởng chiều dài của rễ



Hình 9.10(b): Biểu đồ ảnh hưởng của môi trường thuần dưỡng đến khả năng ra lá và nhánh của cây lúa

Sinh trưởng chiều cao cây: Chiều cao cây ở môi trường nước cất thấp nhất (11,78cm), ở mức “c” trong so sánh Duncan. Môi trường MS có chiều cao cây là 20,05cm, môi trường Yoshida có chiều cao cây là 20,65cm, đều ở mức “b” trong so sánh Duncan. Chiều cao cây ở môi trường đất cao nhất (39,05cm), ở mức “a” trong so sánh Duncan. Chiều cao cây ở môi trường đất lớn hơn so với các môi trường khác trong thí nghiệm.

Sinh trưởng chiều dài rễ: chiều dài rễ ở môi trường nước cất thấp nhất (14,88cm), ở mức “c” trong so sánh Duncan. Trong môi trường MS là 17,40 cm, ở mức “b” trong so sánh Duncan. Trong môi trường đất là 17,83 cm, ở mức “ab” trong so sánh Duncan. Chiều dài rễ ở môi trường Yoshida cao nhất (18,08cm), ở mức “a” trong so sánh Duncan, chiều dài rễ ở các môi trường khác nhau có sự chênh lệch không lớn.

Sinh trưởng của cây thông qua số lượng lá: Số lá hình thành trong môi trường nước cất là 3,95 lá, ở mức “c” trong so sánh Duncan. Số lá hình thành trong môi trường MS là 4,65 lá, trong môi trường Yoshida là 4,78 lá, cùng mức “b” trong so sánh Duncan. Số lá hình thành trong môi trường đất cao nhất (6,27 lá), ở mức “a” trong so sánh Duncan.

Sinh trưởng của cây thông qua số nhánh: Số nhánh hình thành trong môi trường nước cất có số nhánh thấp nhất (0,46 nhánh) ở mức “c” trong so sánh Duncan. Số nhánh hình thành trong môi trường MS là 1,03 nhánh và trong môi trường Yoshida là 1,15 nhánh, nằm ở mức trung bình giữa môi trường nước cất và đất và đều ở mức “b” trong so sánh Duncan. Trong môi trường đất, số nhánh hình thành cao nhất (2,78 nhánh), đạt mức “a” trong so sánh Duncan.

Tổng hợp kết quả của hai bảng 9.14 và 9.16 cho thấy: Môi trường nước, tỷ lệ sống thấp cây sinh trưởng yếu kém lá vàng; môi trường MS, tỷ lệ sống thấp hơn so với môi trường Yoshida, cây sinh trưởng tương đối tốt, tương đương với cây ở môi trường Yoshida; môi trường Yoshida, tỷ lệ sống cao nhất, cây sinh trưởng tốt; môi trường đất, mặc dù những cây còn sống ở giai đoạn thuần dưỡng có sức sinh trưởng tốt hơn so với cây lúa trồng ở các môi trường khác, nhưng tỷ lệ sống rất thấp.

Một yêu cầu quan trọng của giai đoạn thuần dưỡng là cây phải có tỷ lệ sống cao và sinh trưởng tốt, từ kết quả thí nghiệm trên có thể đi đến kết luận: Môi trường Yoshida là môi trường phù hợp cho giai đoạn thuần dưỡng cây lúa trước khi mang trồng ngoài đồng ruộng.

Kết luận từ kết quả nghiên cứu nuôi cấy bao phấn lúa

Trong hai loại môi trường MS và N6, môi trường N6 phù hợp hơn trong việc tạo mô sẹo từ bao phấn lúa.

Thời gian xử lý lạnh phù hợp cho đồng lúa trước khi nuôi cấy để tạo mô sẹo vào khoảng từ 168 giờ đến 240 giờ.

Chất kích thích sinh trưởng 2,4D có tác dụng tốt đến quá trình hình thành mô sẹo ở bao phấn lúa, lượng 2,4 D phù hợp nhất là 1,5 mg/l môi trường nuôi cấy.

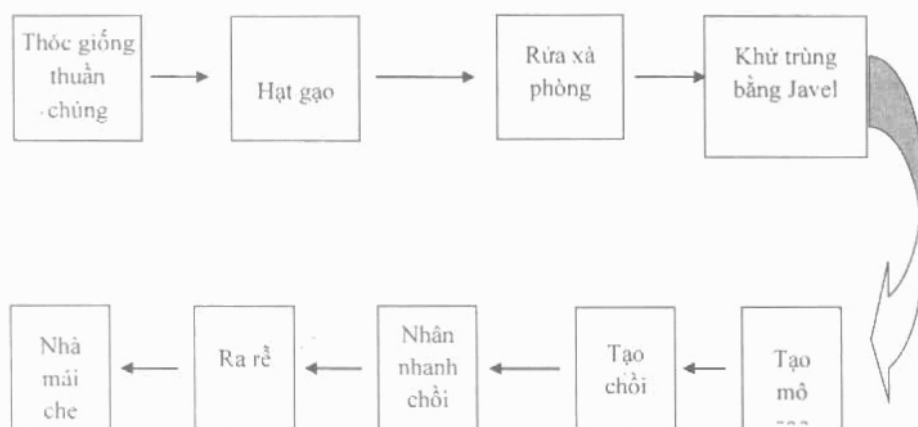
Liều lượng BAP phù hợp cho quá trình tạo chồi xanh của mô sẹo là 1,5 mg/l môi trường.

Bổ sung chất kích thích sinh trưởng NAA nâng cao quá trình hình thành và sinh trưởng của rễ từ chồi xanh: liều lượng phù hợp là 0,1 mg NAA /l môi trường.

Cây lúa nuôi cấy từ bao phấn trước khi mang trồng ngoài đồng ruộng nhất thiết phải qua giai đoạn thuần dưỡng luyện cây, môi trường thuần dưỡng phù hợp là môi trường Yoshida, trong điều kiện có điều tiết về nhiệt độ (25 độ C), ẩm độ (70-80%), và ánh sáng (2000-3000 Lux).

9.2. QUY TRÌNH NUÔI CẤY PHÔI LÚA

9.2.1. Sơ đồ quy trình nuôi cấy phôi lúa chín



9.2.2. Các bước nuôi cấy và điều kiện nuôi cấy

* Chọn vật liệu

Vật liệu là giống lúa thuần chủng. Hạt chắc, sạch không bị bệnh.

* Vô trùng mẫu

- Xử lý mẫu sơ bộ (ngoài box cấy)

Tiến hành bóc vỏ trấu của hạt, cho vào vải màn. Sau đó cho sang bình có chứa dung dịch xà phòng loãng 5% ngâm hạt từ 1-2 phút, tráng sạch nước xà phòng bằng nước máy. Sau cùng mẫu được tráng bằng nước cất hai lần và đưa vào box cấy.

Trong box cấy, mẫu được đưa sang dung dịch ethyl alcohol 70% ngâm trong 1-2 phút, sau đó tráng lại 3-4 lần bằng nước cất hai lần (đã hấp vô trùng).

- Khử trùng bằng clorox

+ Khử trùng lần 1

Cho mẫu đã được khử trùng sơ bộ bằng ethyl alcohol 70% sang bình chứa clorox nồng độ từ 2-5% và 1-2 giọt tween 20 trong 5-7 phút, sau đó tráng sạch 3-4 lần bằng nước cất hai lần (đã hấp vô trùng).

+ Khử trùng lần 2

Cho mẫu đã khử trùng lần 1 bằng clorox sang bình có chứa clorox nồng độ từ 2- 5%, bổ sung 1-2 tween 20 lắc đều khoảng 15-20 phút sau đó dùng nước cất hấp tráng lại từ 5-7 lần.

*** Nuôi cấy tạo mô sẹo**

Mẫu sau khi đã khử trùng cho vào đĩa petri có đặt giấy thấm đã được khử trùng. dùng pank cấy mẫu vào môi trường tạo mô sẹo. Mỗi bình cấy từ 15- 20 mẫu sau đó đậy nắp.

Môi trường tạo mô sẹo tốt nhất: MS + 1,5-2mg 2,4D/l + 30- 40g đường/l + 100mg Inostol/l + 6,5g agar/l, pH: 5,6- 5,8.

Sau khi cấy xong cho mẫu vào trong phòng để mẫu trong điều kiện bóng tối, nhiệt độ 25-27°C, ẩm độ khoảng 75-80%. Thường xuyên kiểm tra kiểm tra các bình nuôi cấy loại bỏ ra ngoài các bình xuất hiện nhiễm nấm, vi khuẩn.

Mẫu cấy sau 2 tuần bắt đầu xuất hiện mô sẹo ở phôi lúa, khi đường kính mô sẹo từ 1- 2mm thì chuyển sang môi trường tạo chồi.

Thời gian tạo mô sẹo từ 4-6 tuần.

Lưu ý:

Mô sẹo phải có màu trắng, cứng, có kích thước từ 1-2mm. Mô sẹo tốt nhất là có tuổi 7-10 ngày. Không nên để tuổi mô sẹo quá dài sẽ ảnh hưởng đến khả năng tái sinh sau này

*** Giai đoạn tái sinh chồi từ mô sẹo**

Tách mô sẹo từ hạt lúa chuyển sang môi trường tạo chồi. Mỗi bình cấy từ 8-10 mô sẹo.

Môi trường tạo chồi tốt nhất : MS + 1-1,5mg Kinetine/lít + 100mg Inostol/lít + 30g đường/lít + 6,5g agar/lít, pH: 5,6-5,8.

Sau đó cho vào phòng nuôi cây trong điều kiện nhiệt độ 25-27°C, ẩm độ 75-80%, chiếu sáng 10-12h/ngày. Mô sẹo sau 2 tuần nuôi cấy bắt đầu xuất hiện các đám màu xanh trên bề mặt và thông thường khoảng 10 ngày sau xuất hiện chồi.

Thời gian tạo chồi từ mô sẹo mất 3-4 tuần.

Chú ý:

Trong môi trường tạo chồi một số mô sẹo phát triển thành chồi, một số mô sẹo chỉ phát triển thành rễ, một số bị chết .

*** Giai đoạn nhân nhanh**

Khi xuất hiện chồi xanh, khỏe mạnh, cao khoảng 0,5cm thì tiến hành cấy chuyển sang môi trường nhân nhanh chồi. Mỗi bình cấy từ 5-7 chồi.

Môi trường nuôi cấy: MS + 1,5-2mg BAP/lít + 30g đường/lít + 100mg Inostol/lít + 6,5g agar/lit, pH= 5,6-5,8.

Nuôi trong phòng với cường độ chiếu sáng từ 2000- 3000 lux, thời gian chiếu sáng từ 10 - 12h/ngày, nhiệt độ phòng 25-27°C, ẩm độ từ 75-80%. Sau cấy khoảng 1 tuần các cụm chồi được hình thành và phát triển. Chồi mới hình thành có từ 1 lá được tách ra và cấy chuyển sang môi trường tạo rễ. Các chồi chưa đủ kích thước được tiếp tục nuôi trên môi trường nhân nhanh.

Thời gian nhân nhanh chồi từ 2-4 tuần.

*** Giai đoạn tạo cây hoàn chỉnh:**

Dùng pank cây tách các chồi non có từ 1 lá, khỏe mạnh từ cụm chồi cây vào môi trường ra rễ. Mỗi ống nghiệm cấy 1 chồi.

Môi trường ra rễ: LS +100 mg inositol/lít + 0,5-1 mg IAA/lít +30g đường/lít+ 6,5g agar/lít. pH: 5,8

Cây được nuôi trong phòng với cường độ chiếu sáng từ 2000- 3000 lux, thời gian chiếu sáng từ 10 - 12h/ngày, nhiệt độ phòng 25-27°C, ẩm độ từ 75- 80%. Khi thấy cây mọc xanh dài khoảng 15-20cm, có từ 2-3 lá, bộ rễ khỏe thì chuyển sang môi trường thuần dưỡng.

Thời gian trong môi trường ra rễ từ 7-10 ngày.

*** Giai đoạn thuần dưỡng**

Sau giai đoạn tạo rễ, cây mô được lấy ra, rửa sạch agar ở phần rễ và chuyển vào môi trường thuần dưỡng.

Môi trường thuần dưỡng :Yoshida, pH 5.0

Điều kiện nhiệt độ phòng cây : 25°C-27°C, ẩm độ : 75-80%, chiếu sáng liên tục 12h/ngày.

Thời gian thuần dưỡng cây: khoảng 20 ngày.

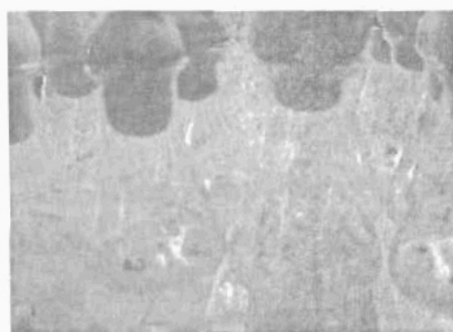
*** Giai đoạn trồng cây trong nhà kính**

Sau khoảng 20 ngày, các cây sinh trưởng bình thường trong môi trường thuần dưỡng, có từ 3 lá trở lên được đưa ra ngoài để luyện cây.

Trong giai đoạn này, cây được trồng trong chậu đất và nuôi trong nhà kính.

Thời gian luyện cây khoảng 10-15 ngày

Sau khoảng 7 ngày trong môi trường đất cây bắt đầu đẻ nhánh; Sau 45-60 ngày cây làm đòng và trổ; Sau khoảng 90-115 ngày cây bắt đầu chín sinh lý.



Hình 9.11. Mô sẹo
(Ảnh tác giả)



Hình 9.12. Cây lúa tạo từ phôi
(Ảnh tác giả)

9.3. QUI TRÌNH NUÔI CẤY BAO PHẦN LÚA

9.3.1. Sơ đồ quy trình nuôi cấy bao phần lúa



9.3.2. Các bước nuôi cấy và môi trường nuôi cấy

9.3.2.1. Các bước nuôi cấy

* Chọn vật liệu

Lựa chọn những cây không bị sâu bệnh của con lai F1 để lấy đồng. Chọn những đồng to, khỏe mạnh, ở giai đoạn túi phần có chiều dài bằng $\frac{1}{2}$ bao phần (thông thường trước khi trổ bông từ 6-10 ngày), khoảng cách

giữa hai tai lá đòng là 5-7 cm. Dùng dao cắt sát gốc đòng và đem về phòng khử trùng sơ bộ.

* Xử lý mẫu sơ bộ

Mẫu sau khi lấy từ ruộng về tiến hành rửa sạch dưới vòi nước máy, sau đó tráng sạch mẫu bằng nước cất. Dùng cồn 70^o xịt ướt mẫu, bọc mẫu bằng giấy bạc để giữ ẩm cho mẫu. Mẫu được bảo quản trong tủ lạnh ở nhiệt độ 8-10^oC trong thời gian 7- 10 ngày.

* Xử lý mẫu trước khi cấy

- Các chất cần dùng

- + Tween 20 : 1-2 giọt/lít
- + Cloxox : 15-20%
- + Nước cất hấp vô trùng

- Phương pháp xử lý:

Mẫu sau khi xử lý lạnh, cắt lấy những ré đủ tiêu chuẩn đưa vào box cấy khử trùng. Mẫu được để ngập trong dung dịch Cloxox 15- 20% có bổ sung 1-2 giọt tween 40 trong thời gian 20 phút, tráng sạch bằng nước cất vô trùng. Trong thời gian khử trùng dùng tay lắc nhẹ bình chứa mẫu khử trùng.

Xử lý mẫu với Cloxox 20% thời gian xử lý 20 phút có hiệu quả cao nhất (đạt trên 85% số mẫu không nhiễm).

* Nuôi cấy bao phấn

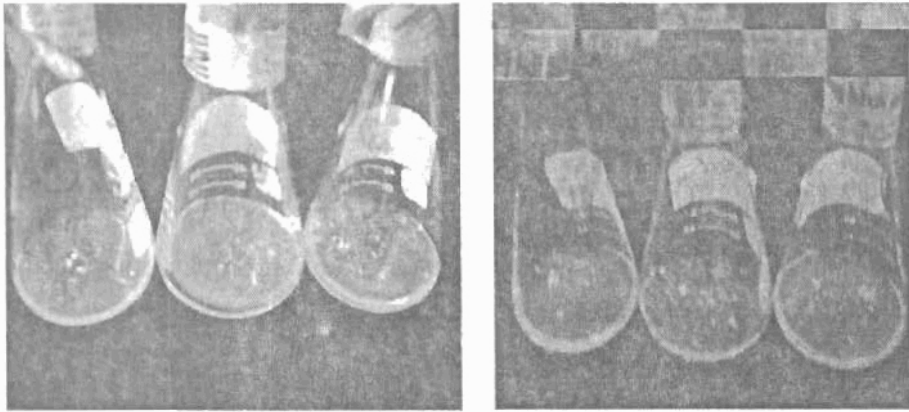
Giai đoạn vào mẫu

Bao phấn sau khi được khử trùng, dùng kéo cắt các đầu bao phấn sao cho không cắt vào bao phấn. Dùng pank cấy gỗ các bao phấn lên miệng bình cấy sao cho các bao phấn rơi hết xuống môi trường.

Môi trường tạo callus: N₆ + 2mg 2,4D/lít + 8g agar/lít + 50 g đường/lít + 100mg Inositol/lít, pH 5,8.

Sau khi cấy vào môi trường, các bao phấn được đưa vào trong phòng tối phát sinh mô sẹo. Nhiệt độ phòng cấy : 25^oC, ẩm độ 70%.

Thời gian hình thành callus từ 30-50 ngày (với dòng phản ứng nhanh), 60 ngày với dòng phản ứng chậm.



Hình 9.13. Callus tạo từ hạt phấn sau 30-35 ngày (Ảnh tác giả)

Giai đoạn tái sinh chồi

Mô sẹo sau khi hình thành được 2 tuần tuổi đường kính khoảng 1-2mm chuyển mô sẹo sang môi trường tái sinh chồi.

Môi trường nuôi cấy: MS + 1mg/lit NAA + 1mg/lit K + 6gram agar + 60 gram đường, pH 5,6-5,8.

Điều kiện phong nuôi cấy: Nhiệt độ: 25°C, Ẩm độ : 70%, Ánh sáng: thời gian chiếu sáng 12h/ngày, cường độ chiếu sáng 2000 lux.

Giai đoạn này rất cần cường độ chiếu sáng cao để mô sẹo tái sinh thành chồi. Nếu giai đoạn này cường độ ánh sáng không đáp ứng yêu cầu sẽ dẫn đến tỷ lệ cây bạch tạng và ra rễ của mô sẹo cao. Tốt nhất là giàn cây nên lắp đặt nhiều loại bóng đèn có bước sóng khác nhau.



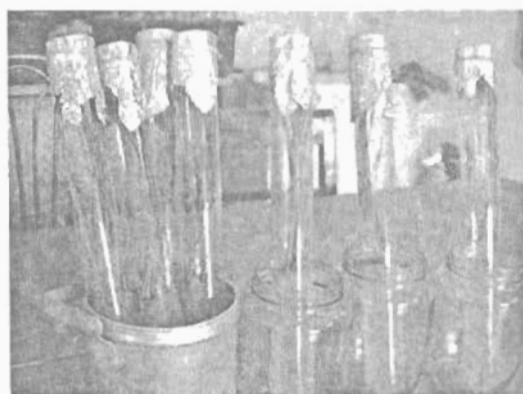
Hình 9.14.
Môi trường ra rễ
(Ảnh tác giả)

Sau khi các chồi hình thành từ mô sẹo có chiều dài 3 - 4 cm thì tách từng chồi ra khỏi cụm chồi cấy chuyển sang môi trường ra rễ.

Giai đoạn tạo cây hoàn chỉnh

Tách những chồi có chiều cao 3-4 cm, có từ 2 lá thật trở cây chuyển sang môi trường ra rễ. Môi trường ra rễ tốt nhất là: LS + 1mg/lit NAA + 6g agar/lít + 60 g đường/lít, pH 5,6-5,8.

Điều kiện nuôi cấy: Nhiệt độ 25°C, ẩm độ : 70%, thời gian chiếu sáng 12h/ngày, cường độ chiếu sáng 2000lux.



Hình 9.15. Cây hoàn chỉnh trước khi ra ngoài (Ảnh tác giả)

Giai đoạn thuần dưỡng.

Giai đoạn thuần dưỡng giúp cho cây lúa *in vitro* thích nghi và sinh trưởng phát triển tốt. Giai đoạn trong môi trường thuần dưỡng kéo dài tùy thuộc vào điều kiện thời tiết trong năm. Nếu vụ xuân hè thì kéo dài 3 tuần. Còn nếu vụ hè thu thì kéo dài 2 tuần.

Môi trường : có thể sử dụng một số loại môi trường Yoshida, pH 5.0.

Điều kiện thuần dưỡng: Nhiệt độ phòng cây: 25°C, Ẩm độ: 70-80%, Ánh sáng : thời gian chiếu sáng 12h/ngày, cường độ chiếu sáng 2000lux. Trong giai đoạn này ta cũng có thể mang cây ra môi trường nhà kính hay nhà lưới có mái che.



Hình 9.16. Lúa giai đoạn thuần dưỡng (Ảnh tác giả)

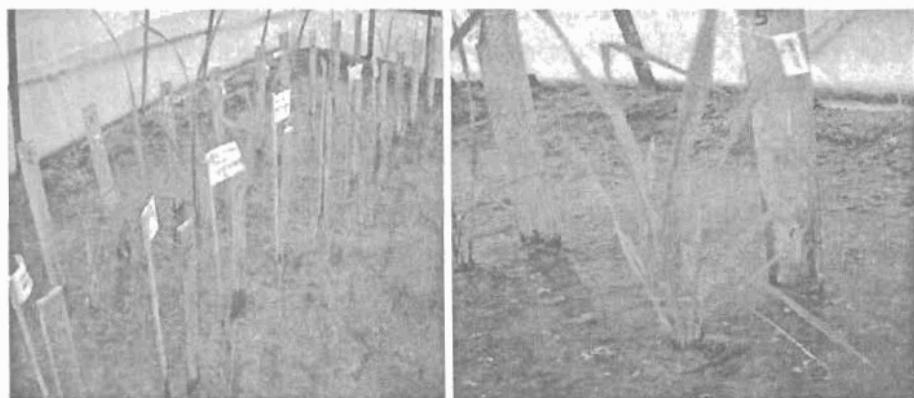
Giai đoạn trồng cây trong nhà kính

Khi cây con có từ 3 lá trở lên tiến hành chuyển cây sang chậu đất và trồng trong nhà kính: cường độ ánh sáng 2000-2200lux.

Sau khoảng 7 ngày cây bắt đầu đẻ nhánh, sau 45-60 ngày cây làm đòng và trổ, sau khoảng 90-115 ngày cây bắt đầu chín sinh lý

Giai đoạn xử lý cây đơn bội

Sau quan sát hình thái của cây, kiểm tra lại bằng soi nhiễm sắc thể nếu là cây đơn bội được nhị bội hoá bằng colchicines ở nồng độ 0,1% và thời gian xử lý 5h-7h.



Hình 9.17. Lúa trồng trong ô thí nghiệm (Ảnh tác giả)

9.3.2.2. Thành phần môi trường nuôi cấy và cách pha chế

* Môi trường tạo mô sẹo (sử dụng môi trường N6)

Dung dịch mẹ	Hóa chất	Nồng độ (mg/l)	Dung dịch mẹ (nồng độ đậm đặc 20 lần (mg/l))
N6 - A	KNO_3	2830,0	56600,0
N6 - B	$MgSO_4$	185,0	3700,0
	$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	4,4	88,0
	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	1,5	30,0
	$(NH_4)_2SO_4$	463,0	9260,0
N6 - C	KH_2PO_4	400,0	8000,0
	KI	0,1	2,0
	H_3BO_3	1,6	32,0
N6 - D	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	166,0	3320,0
N6 - E	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	27,8	556,0
	Na2Edta	37,3	746,0
Vitamins	Nicotinic acid	0,5	10,0
	Glycine	2,0	40,0
	Thiamine HCl	1,0	20,0
	Pyridocine HCl	0,5	10,0
Hormone	2,4 - D	2,0	40,0
Sucrose		30000,0	600000,0
Agar		7500,0	150000,0
pH		5,6 - 5,8	

Để thuận tiện cho việc pha chế chính xác các môi trường nuôi cấy và thuận lợi cho việc bảo quản, thông thường môi trường được pha chế ở dạng dung dịch mẹ có độ đậm đặc thông thường gấp 20 – 50 lần so với môi trường nuôi cấy. Khi pha môi trường nuôi cấy chỉ cần hút một lượng nhỏ các dung dịch mẹ cần thiết đem pha với nước cất. Các dung dịch đậm đặc có thể bảo quản tương đối dài trong tủ lạnh.

Khi pha một lít môi trường làm việc (môi trường nuôi cấy) cần thực hiện những thao tác sau:

- Cho khoảng 500ml nước cất vào một cái bình có dung tích 1 lit.
- Dùng pipet lấy lần lượt các dung dịch mẹ (A,B,C,D,E, vitamin và hormone), lượng dung dịch mẹ cần lấy tỷ lệ với lượng hóa chất cần lấy cho một lit môi trường.
- Thêm 30g sucrose, khuấy cho tan.
- Điều chỉnh pH: dùng NaOH 0,1N hoặc HCl 0,1N để tăng hoặc giảm pH đến giá trị 5,6- 5,8.
- Thêm 7,5 g agar (sợi hoặc bột).
- Vừa đun vừa khuấy đều cho agar tan hết. Sau đó chia hỗn hợp dung dịch này vào các đĩa petri hoặc bình tam giác và cần chia xong trước khi dung dịch nguội (dưới 50°C). Chú ý, có thể sử dụng lò vi sóng để nấu chảy agar sẽ rất nhanh và tiện lợi.

*** Môi trường tái sinh (sử dụng môi trường Murashige and Skoog: MS)**

Dung dịch mẹ	Hóa chất	Nồng độ (mg/l)	Dung dịch mẹ (nồng độ đậm đặc 20 lần (mg/l))
MS I	NH_4NO_3	1650,0	33000,0
	KNO_3	1900,0	38000,0
MS II	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370,0	7400,0
	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22,3	446,0
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10,6	212,0
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025	0,5
MS III	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440,0	8800,0
	KI	0,83	16,6
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025	0,5
MS IV	KH_2PO_4	170,0	3400,0
	H_3BO_3	6,2	124,0
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,25	5,0

MSV	FeSO ₄ ·7H ₂ O	27,85	557,0
	Na ₂ Edta. 2H ₂ O	37,25	745,0
Vitamins	Nicotinic acid	0,5	10,0
	Pyridocine HCl	0,5	10,0
	Thiamine HCl	0,1	2,0
	Glycine	2,0	40,0
Hormone	NAA	1,0	20,0
	Kinetin	1,0	20,0
Inositol		100,0	2000,0
Sucrose		30000	600000,0
Agar		7500	150000,0
pH		5,6 - 5,8	

Thông thường môi trường được pha chế ở dạng dung dịch mẹ có nồng độ đậm đặc gấp nhiều lần (20 - 50 lần). Khi pha môi trường nuôi cấy chỉ cần hút một lượng cần thiết các dung dịch mẹ đem pha với nước cất. Các dung dịch đậm đặc được bảo quản dài ngày trong tủ lạnh.

Khi pha một lít môi trường làm việc (môi trường nuôi cấy) cần thực hiện những thao tác sau:

- Cho khoảng 500ml nước cất vào một cái bình có dung tích 1 lít.
- Dùng pipet lấy lần lượt các dung dịch mẹ (I, II, III, IV, V, vitamin và hormone). lượng dung dịch mẹ cần tỷ lệ với lượng hóa chất cần lấy cho một lít môi trường.
- Thêm 100 mg Inistol.
- Thêm 30g sucrose, khuấy cho tan.
- Điều chỉnh pH: dùng NaOH 0,1N hoặc HCl 0,1N để tăng hoặc giảm pH đến giá trị 5,6- 5,8.
- Thêm 6 - 8 g agar (sợi hoặc bột).
- Vừa đun vừa khuấy đều cho agar tan hết. Sau đó chia hỗn hợp dung dịch này vào các ống nghiệm hoặc bình tam giác. Cần chia xong trước khi dung dịch nguội (dưới 50°C). Chú ý, có thể sử dụng lò vi sóng để nấu chảy agar sẽ rất nhanh và tiện lợi.

* Môi trường ra rễ (sử dụng môi trường Linsmaier and Skoog)

Dung dịch mẹ	Hóa chất	Nồng độ (mg/l)	Nồng độ đậm đặc 20 lần (mg/l)
LS I	NH_4NO_3	1650,0	33000,0
	KNO_3	1900,0	38000,0
LS II	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370,0	7400,0
	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22,3	446,0
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10,6	212,0
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025	0,5
LS III	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440,0	8800,0
	KI	0,83	16,6
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025	0,5
LS IV	KH_2PO_4	170,0	3400,0
	H_3BO_3	6,2	124,0
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,25	5,0
LS V	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27,85	557,0
	$\text{Na}_2\text{Edta} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	37,25	745,0
Vitamins	Thiamine HCl	2,0	40,0
Inositol		40,0	800,0
Sucrose		40000	800000,0
Agar		7500	150000,0
pH		5,6 - 5,8	

Thông thường môi trường được pha chế ở dạng dung dịch mẹ có nồng độ đậm đặc gấp nhiều lần (20 - 50 lần). Khi pha môi trường nuôi cấy chi cần hút một lượng cần thiết các dung dịch mẹ đem pha với nước cất. Các dung dịch mẹ có thể được bảo quản dài ngày trong tủ lạnh.

Khi pha một lít môi trường làm việc (môi trường nuôi cấy) cần thực hiện những thao tác sau:

- Cho khoảng 500ml nước cất vào một cái bình có dung tích 1 lít.
- Dùng pipet lấy lần lượt các dung dịch mẹ (I,II,III,IV,V, vitamin và hormone), lượng dung dịch mẹ cần lấy tỷ lệ với lượng hóa chất cần lấy cho một lít môi trường.

- Thêm 40mg Inistol.
- Thêm 40g sucrose. khuấy cho tan.
- Điều chỉnh pH: dùng NaOH 0,1N hoặc HCl 0,1N để tăng hoặc giảm pH đến giá trị 5.6- 5.8.
- Thêm 6 - 8 g agar (sợi hoặc bột).
- Vừa đun vừa khuấy đều cho agar tan hết. Sau đó chia hỗn hợp dung dịch này vào các ống nghiệm hoặc bình tam giác. Cần chia xong trước khi dung dịch nguội (dưới 50°C). Chú ý: có thể sử dụng lò vi sóng để nấu chảy agar sẽ rất nhanh và tiện lợi.

*** Môi trường thuần dưỡng (sử dụng môi trường Yoshida)**

Dung dịch mẹ	Hóa chất	Nồng độ (mg/l)	Nồng độ đậm đặc 50 lần (mg/l)
Y - A	NH_4NO_3	0,457	22,850000
Y - B	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,2015	10,075000
Y - C	K_2SO_4	0,357	17,850000
Y - D	CaCl_2	0,443	22,150000
Y - E	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,62	81,000000
Y - F	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,0075	0,375000
	$(\text{NH}_4)_6\text{MoO}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,00037	0,018500
	H_3BO_3	0,00467	0,233500
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,000175	0,008750
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,000155	0,00775
	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,0385	1,92500
	Citric acid	0,0595	2,97500
pH		5,0	

Môi trường được pha chế ở dạng dung dịch mẹ có nồng độ đậm đặc gấp nhiều lần (20 - 50 lần). Khi pha môi trường nuôi cấy chỉ cần hút một lượng cần thiết các dung dịch mẹ đem pha với nước cất. Các dung dịch mẹ có thể được bảo quản dài ngày trong tủ lạnh

Khi pha một lít môi trường làm việc (môi trường nuôi cấy) cần thực hiện những thao tác sau:

- Cho khoảng 500ml nước cất vào một cái bình có dung tích 1 lít.
- Dùng pipet lấy lần lượt các dung dịch mẹ (A,B,C,D,E,F). lượng dung dịch mẹ cần lấy tỷ lệ với lượng hóa chất cần lấy cho một lít môi trường.
- Điều chỉnh pH: dùng NaOH 0.1N hoặc HCl 0.1N để tăng hoặc giảm pH đến giá trị 5,0.

9.3.2.3. Dụng cụ cần thiết trong quá trình nuôi cấy

STT	Tên thiết bị/dụng cụ	Số lượng
1	Bàn thao tác phẩm chế môi trường (1,2m x 2m)	01- 02 cái
2	Máy khuấy từ gia nhiệt	01 máy
3	Cân phân tích và cân điện tử độ chính xác từ 10^{-2} đến 10^{-4}	02 cái
4	Máy đo PH	01 cái
5	Tủ lạnh 250 lít	01 cái
6	Máy cắt nước 2 lần	01 cái
7	Cạn (từ 5 lít trở lên) hoặc bình tam giác đựng nước (1- 2 lít)	10 cái
8	Bồn rửa dụng cụ	01 cái
9	Nồi hấp vô trùng (105 lít)	01 cái
10	Tủ cấy vô trùng (02 chỗ ngồi)	01 cái
11	Lò vi sóng	01 cái
12	Dàn nuôi cấy (3 tầng, 0,6m X 2m)	10 dàn
13	Bộ pipet (200 μ l, 1ml, 10ml, 20ml)	01 bộ
14	Đèn cồn	02 đèn
15	Bộ que cấy mẫu	02 bộ
16	Găng tay	05 bộ
17	Đĩa Petri (10cm)	100 đĩa
18	Bình tam giác 100 ml	100 bình
19	Bình tam giác 250 ml	100 bình
20	Cặp găng tay dùng cho nồi hấp vô trùng	02 bộ

Chương 10

QUI TRÌNH NHÂN GIỐNG MỘT SỐ CÂY TRỒNG CHỦ YẾU

10.1. QUI TRÌNH NHÂN NHANH GIỐNG HOA LILY TỪ ĐỈNH SINH TRƯỞNG BẰNG PHƯƠNG PHÁP IN VITRO

10.1.1. Giai đoạn chuẩn bị

a) Lựa chọn mẫu

Mẫu nuôi cấy là những củ lily đúng giống, đúng kích cỡ và sạch bệnh.

b) Khử trùng mẫu

Sử lý sơ bộ: Củ lily sau khi lấy về được tiến hành rửa dưới vòi nước sạch, tách các lớp vảy củ ở lớp ngoài, dùng xà phòng bột Đức Giang nồng độ loãng rửa sạch các vảy củ bao lấy đỉnh sinh trưởng sau đó tiến hành đem khử trùng sơ bộ bằng cồn 70% trong vòng 1- 2 phút. Tráng sạch cồn bằng nước cất rồi đưa vào box cấy.

Khử trùng mẫu nuôi cấy: Pha dung dịch calcium hypoclorit nồng độ 7%, 5%. Tiến hành đổ dung dịch calcium hypoclorit nồng độ 7% có bổ sung thêm 1-2 giọt Tween 40 ngập vào bình đựng mẫu, đồng thời dùng tay nhấc nhẹ trong 5 phút, giót dung dịch khử trùng ra ngoài cốc đong, dùng nước cất hấp tráng lại nhiều lần loại bỏ hết dung dịch calcium hypoclorit dính trên mẫu. Sau đó giót dung dịch calcium hypoclorit nồng độ 5% có bổ sung một vài giọt tween 40 ngập vào bình mẫu đã qua khử trùng lần một, đồng thời dùng tay lắc nhẹ trong suốt thời gian 7 phút. Kết thúc khử trùng lần 2, dùng nước cất vô trùng tráng lại 5 -7 lần. Mẫu đã được khử trùng được gấp đặt lên trên giấy thấm vô trùng để chuẩn bị cấy vào môi trường vào mẫu.

10.1.2. Giai đoạn tái sinh chồi

Mẫu sau khi đã được khử trùng dùng dao cắt, pank cây loại bỏ hết phần vảy củ bao bên ngoài tiến hành tách đến khi nào quan sát thấy mẫu chỉ còn 1 – 2 vảy củ bao bên ngoài thì đưa vào môi trường nuôi cấy:

Môi trường nuôi cấy đỉnh sinh trưởng: môi trường tái sinh đỉnh sinh trưởng của hoa lily và nhân được số lượng củ con khá cao: 4,3củ/đỉnh sinh trưởng trong thời gian rất ngắn (sau 3 tuần): MS + 2mg 2,4D + 1mgBA + 40g Đường + 7 gram Agar + 100mg Inostol, pH 5.8.

Sau cấy các đỉnh sinh trưởng vào trong các bình thí nghiệm thì đưa mẫu vào trong phòng chăm sóc cây sau cấy. Phòng chăm sóc cây sau cấy có nhiệt độ phòng khoảng 25°C, ẩm độ 70%. Đồng thời mẫu cấy là các đỉnh sinh trưởng trong những ngày đầu để trong bóng tối hoặc ánh sáng mờ. Sau 10 ngày quan sát thấy đỉnh sinh trưởng phát triển đưa ra ngoài sang cường độ chiếu sáng khoảng 2000 lux. 2 tuần thì thấy trên củ mọc ra từ đỉnh sinh trưởng xuất hiện các củ nhỏ.

10.1.3. Giai đoạn nhân nhanh

Sau 3 tuần nuôi cấy tiến hành tách những củ nhỏ chuyển sang môi trường nuôi cấy (nuôi cấy lác, nuôi tĩnh)

Môi trường nhân nhanh củ: MS + 2mg 2,4D + 3mgBA + 60g Đường + 7 g Agar + 100mg Inostol, pH 5.8.

Điều kiện phòng nuôi cấy: giai nhiệt độ phòng khoảng 25°C, ẩm độ 70%, thời gian chiếu sáng 8-10 h/ngày, cường độ chiếu sáng 2000lux.

Sau 2 tuần cấy chuyển mẫu một lần.

10.1.4. Giai đoạn tạo cây hoàn chỉnh

Sau khi đạt được một số lượng củ giống chúng ta cấy chuyển mẫu sang môi trường ra rễ và tăng kích thước, trọng lượng củ gần đạt với kích thước và trọng lượng củ ở ngoài tự nhiên.

Môi trường ra rễ và tăng kích thước, trọng lượng củ: LS + 2mg NAA/lít + 0,5mg BA/lít + 90g Đường/lít + 7 g Agar/lít + 100mg Inostol/lít, pH 5.8.

Sau 4 tuần nuôi cấy củ để đạt kích thước 1 – 1,3 cm và trọng lượng 1g. Sau đó tiến hành đưa ra khay cát để nuôi củ.

10.1.5. Giai đoạn ra ngôi củ lily *in vitro*

Kết thúc giai đoạn ra rễ và phình củ, củ lily *in vitro* được đưa ra giá thể hỗn hợp cát và châu hun với tỷ lệ: 1:1



Nhân nhanh củ lily



Củ giống hoa lily chuẩn bị đưa ra giá thể



Ảnh hưởng của nồng độ đường đến khả năng tăng kích thước và trọng lượng củ

**Hình 10.1. Ảnh nhân nhanh giống hoa lily từ đỉnh sinh trưởng
(Ảnh tác giả)**

10.2. QUI TRÌNH TẠO PHÔI VÔ TÍNH TỪ VẢY CỦ VÀ NÁT MỎNG VẢY CỦ HOA LILY

10.2.1. Giai đoạn chuẩn bị

+ Lấy mẫu và xử lý sơ bộ:

Củ được lấy sau khi đã thi hái hoa lựa chọn những củ không bị sâu bệnh, hoa có chất lượng tốt, loại bỏ những phần không cần thiết (rễ, thân..), tiến hành rửa dưới vòi nước sạch sau đó tách các lớp vảy củ ở lớp

ngoài và dùng xà phòng bột Đức Giang nồng độ loãng rửa sạch từng vảy củ. Tiếp theo đem khử trùng sơ bộ bằng cồn 70% trong vòng 1- 2 phút. Tráng sạch cồn bằng nước cất rồi đưa vào hộp cấy khử trùng bằng chất khử trùng hoạt lực cao.

+ Khử trùng mẫu nuôi cấy:

Tiến hành đổ dung dịch $HgCl_2$ nồng độ 0,15% có bổ sung 1-2 giọt Tween 40 ngập vào bình đựng mẫu và dùng tay nhắc nhẹ trong 5 phút. Sau đó đổ bỏ dung dịch khử trùng và dùng nước cất vô trùng tráng lại nhiều lần nhằm loại bỏ hết dung dịch $HgCl_2$ dính trên mẫu. Tiếp theo giót ngập dung dịch $HgCl_2$ 0,1% vào bình mẫu đã qua khử trùng lần một và để tăng hiệu quả khử trùng tiến hành bổ sung một vài giọt tween 40 đồng thời dùng tay lắc nhẹ trong 5 phút. Hết thời gian khử trùng, tiến hành giót hết dung dịch khử trùng ra khỏi bình mẫu và dùng nước cất vô trùng tráng lại 5-7 lần.

10.2.2. Giai đoạn tạo phôi vô tính từ vảy củ lily

Mẫu sau khi đã được khử trùng dùng dao cấy, pank cấy loại bỏ hết phần bị chất khử trùng làm trắng mẫu, cắt vảy củ thành từng mảnh nhỏ dày 0,5mm rồi đưa mẫu vào môi trường nuôi cấy.

Môi trường nuôi cấy vảy củ: MS + 2mg 2,4D + 3mgK + 600g Đường + 7 g Agar + 100mg Inostol, pH 5.8. Trong môi trường này, sau 2 tuần thu được 3,67củ/ mảnh vảy củ.

Điều kiện nuôi cấy: nhiệt độ phòng khoảng 25°C, ẩm độ 70%. Giai đoạn đầu để giảm quá trình oxy hóa phenol nên đưa mẫu vào trong bóng tối hoặc ánh sáng mờ. Sau 1 tuần quan sát thấy các mảnh vảy củ đã phát triển những củ con đưa mẫu ra cường độ chiếu sáng khoảng 2000 lux. Sau 2 tuần thì tiến hành tách các củ nhỏ nhỏ từ vảy củ.

10.2.3. Giai đoạn nhân nhanh củ hoa lily:

Sau 2 tuần nuôi cấy tiến hành tách những củ nhỏ chuyển sang môi trường nhân nhanh củ (nuôi cấy lác, nuôi tĩnh).

Môi trường nhân nhanh củ: MS + 2mg 2,4D + 3mgBA + 60g Đường + (7 g Agar) + 100mg Inostol, pH 5.8.

Điều kiện nuôi cấy: nhiệt độ phòng khoảng 25°C, ẩm độ 70%, thời

gian chiếu sáng 8-10 h/ngày, cường độ ánh sáng 2000lux. Để tăng hiệu quả nhân có thể nuôi cấy mẫu trong dung dịch lỏng có lắc.

Chu kỳ nhân nhanh: 2 tuần cấy chuyển mẫu một lần.

10.2.4. Giai đoạn ra rễ và kích thích kích cỡ củ

Môi trường ra rễ và tăng kích thước, trọng lượng củ: LS + 2mg NAA/lít + 0,5mg BA/lít + 90g Đường/lít + 7 g Agar/lít + 100mg Inostol/lít, pH=5.8.

Sau 4 tuần nuôi cấy củ đạt kích thước 1 – 1,3 cm và trọng lượng 1 g.

10.2.5. Giai đoạn ra ngôi cây in vitro

Kết thúc giai đoạn ra rễ và tăng cường kích thước củ, ta tiến hành rửa sạch củ và mang trồng trong giá thể cát+trấu hun ở vườn ươm. Tỷ lệ cát: trấu hun tốt nhất là 1:1



Mẫu củ lily

Mẫu nuôi cấy sau 2 tuần

Hình 10.2. Ảnh tạo phôi vô tính từ vẩy củ và lát cắt mỏng củ hoa lily
(Ảnh tác giả)

10.3. QUI TRÌNH NHÂN NHANH GIỐNG HOA CÚC TỪ ĐỈNH SINH TRƯỞNG

10.3.1. Giai đoạn chuẩn bị

a. Kỹ thuật lựa chọn mẫu cấy

Mẫu cấy là chồi nách và đỉnh sinh trưởng được thu hái về phòng thí nghiệm, tiến hành cắt bớt lá, rửa sạch dưới vòi nước bằng dung dịch xà

phòng loãng, lau sạch bằng cồn. Chồi nách và chồi đỉnh là bộ phận rất khó khử trùng khi rửa mẫu phải tiến hành rửa thật cẩn thận ở những kẽ lá.

b. Phương pháp khử trùng

Lấy những mẫu đã qua khử trùng sơ bộ bằng nước máy và xà phòng loãng đem vào khử trùng bằng hóa chất. Khử trùng đối với chồi nách và chồi đỉnh tốt nhất là dung dịch Calcium hypochlorit nồng độ 7% bổ sung 2-5 giọt tween 40 trong thời gian 12 phút.

Trong suốt quá trình khử trùng mẫu phải được ngập hoàn toàn trong dung dịch khử trùng và dùng tay lắc nhẹ bình khử trùng. Sau đó dùng nước cất hấp trắng nhiều lần loại bỏ hết các chất khử trùng ra khỏi mẫu.

10.3.2. Giai đoạn tái sinh chồi

Mẫu sau khi đã khử trùng xong, dung pank cấy gấp mẫu ra đĩa cấy vô trùng, loại bỏ những phần thừa và những phần mẫu bị bọt trắng do tác dụng của hóa chất khử trùng. Tiếp theo dùng pank, dao cấy tách lấy đỉnh sinh trưởng đưa vào trong môi trường nuôi cấy, đường kính đỉnh sinh trưởng khoảng 0,5mm (có thể sử dụng mẫu cấy là đỉnh chồi nách hoặc chồi ngọn chiều dài khoảng 1-2cm).

Lưu ý: khi tách đỉnh sinh trưởng để cấy phải để pank, dao cấy thật nguội tránh làm chết mẫu. Khi tách không được làm cho mẫu bị trầy xước. Sau khi tách xong mẫu nào thì đưa luôn vào môi trường nuôi cấy.

Môi trường: MS + 1mg 2,4D/lít + 2mg Kinetine/lít + 7 g Agar/lít + 30 g đường/lít, pH 5,8.

Mẫu được đặt trong cường độ ánh sáng 1200Lux, nhiệt độ phòng khoảng 25 °C, ẩm độ 70 %. Sau 2 tuần, các đỉnh sinh trưởng tái sinh thành chồi. Sau khoảng 3 tuần thì tiến hành tách mẫu đưa sang môi trường nhân nhanh.

10.3.3. Giai đoạn nhân nhanh cụm chồi

Chồi sau khi có chiều dài khoảng 3-4 cm thì tiến hành cắt ra từng đoạn dài 1cm (có chứa mắt ngủ) cấy chuyển mẫu sang môi trường nhân nhanh.

Môi trường nhân nhanh: MS + 2mg BAP/lít + 7 g Agar/lít + 30 g đường/lít, pH 5,8.

Giai đoạn này kéo dài khoảng 20 ngày trong phòng cây. Sau khi các chồi có chiều dài khoảng 5cm lại tiếp tục cắt thành từng đoạn đưa vào môi trường nhân nhanh đến khi nào đủ số lượng cây.

10.3.4. Giai đoạn tạo cây hoàn chỉnh

Chuyển các chồi cúc đủ chiều cao 2-3 cm sang môi trường ra rễ. Giai đoạn này kéo dài trong ống nghiệm khoảng 2 tuần

Môi trường ra rễ: LS + 0,2mg BAP/lít + 1mg NAA/lít + 7 g Agar/lít + 30 g đường/lít, pH=5.8

10.3.5. Giai đoạn ra ngôi cây cúc in vitro

Sau khi thấy các cây có đủ chất lượng tiến hành đưa ra ngoài làm quen với ánh sáng khoảng 1- 2 tuần. Tiếp theo dùng pank cấy gấp các cây ra khỏi bình nuôi cấy, rửa sạch agar và đường có ở trên cây để tránh cây bị nhiễm nấm khi trồng ra giá thể. Giá thể tốt nhất cho cây hoa cúc nuôi cấy mô là cát.



Hình 10.3 .Cây cúc nuôi cấy in vitro (Ảnh tác giả)

10. 4. QUI TRÌNH TẠO PHÔI VÔ TÍNH, CHỞI TỬ PHÁT HOA VÀ LÁ LAN HỒ ĐIỆP

10.4.1. Giai đoạn chuẩn bị

+ Lấy mẫu về sử lý sơ bộ:

Để có cây giống chất lượng cao phải lựa chọn thu mẫu ở những cây có chất lượng hoa tốt, màu sắc hợp với thị hiếu người chơi hoa. Mẫu phải

được thu từ những cây khỏe, không bị sâu bệnh hại đồng thời mẫu phải được lấy sau khi hoa trên cây đã bắt đầu tàn đối với mẫu thu từ phát hoa và cây đang sinh trưởng mạnh đối với mẫu thu từ lá.

Mẫu sau khi được thu hái về phòng thí nghiệm tiến hành rửa sạch dưới vòi nước bằng dung dịch xà phòng loãng. Đối với phát hoa là bộ phận rất khó khử trùng khi rửa mẫu phải tiến hành rửa cẩn thận, nhẹ nhàng cả ở những kẽ được bao bọc bởi lưới lá nhỏ ôm lấy các mắt mầm và cả các cuống hoa.

+ Khử trùng mẫu:

Chất khử trùng tốt nhất đối với phát hoa là dung dịch Calcium hypochlorit nồng độ 7% trong 15 phút và với mẫu lá là dung dịch H_2O_2 nồng độ 10% trong 10 phút. Để tăng hiệu quả khử trùng ta có thể bổ sung thêm 2-5 giọt tween 40 vào dung dịch khử trùng. Kết thúc khử trùng, dùng nước cất vô trùng tráng nhiều lần (5-7 lần) loại bỏ hết các chất khử trùng ra khỏi mẫu.

Lưu ý: trong suốt quá trình khử trùng mẫu phải được ngập hoàn toàn trong dung dịch khử trùng và để tăng hiệu quả khử trùng trong suốt quá trình khử trùng dùng tay lắc nhẹ.

10.4.2. Giai đoạn tái sinh

a. Tái sinh protocôm từ phát hoa lan hồ điệp

Loại bỏ những phần thừa và những phần mẫu bị bọt trắng do tác dụng của hóa chất khử trùng. Cắt mẫu có chiều dài khoảng 2-3 cm có chứa một mắt ngủ sau đó đưa vào môi trường tái sinh mắt ngủ

Môi trường: $\frac{1}{2}$ MS + 100ml ND/lít + 1g peptol/lít + 3mg 2,4D/lít + 1mg Kinetine/lít + 7 g Agar/lít + 30 g đường/lít, pH 6.0

Điều kiện nuôi cấy: mẫu được đặt trong điều kiện tối, nhiệt độ phòng khoảng 25 °C, ẩm độ 70 %. thông thường mẫu được đặt vào trong điều kiện tối khoảng 30 ngày khi quan sát thấy trên các mầm ngủ xuất hiện mầm màu xanh tiến hành mang ra ngoài ánh sáng có cường độ 1000 lux.

Giai đoạn này kéo dài khoảng 3 tuần thì tiến hành tách các protocôm đưa sang môi trường nhân nhanh.

b. Tái sinh protocom từ mảnh lá lan Hồ Điệp

Loại bỏ những phần thừa và những phần mẫu bị hoại do tác dụng của hóa chất khử trùng. Cắt mẫu có kích thước khoảng 0.5 - 1 cm và đưa vào môi trường vào mẫu.

Môi trường: MS + 150ml ND/lít + 2g peptol/lít + 5mg 2,4D/lít + 8mg Kinetine/lít + 7 g Agar/lít + 30 g đường/lít, pH 5.5

Điều kiện nuôi cấy: mẫu được đặt trong điều kiện tối, nhiệt độ phòng khoảng 25 °C, ẩm độ 70 %. Thông thường mẫu được đặt vào trong điều kiện tối khoảng 45 ngày đến khi quan sát thấy trên các mặt của mẫu cấy xuất hiện các hạt màu xanh tiến hành mang ra ngoài ánh sáng có cường độ 1000 lux. Giai đoạn này kéo dài khoảng 3 tuần thì tiến hành tách mẫu đưa sang môi trường nhân nhanh protocom.

10.4.3. Nhân nhanh protocom và tái sinh chồi

+ Nhân nhanh protocom:

Môi trường nhân nhanh là : ½ MS + 150ml ND + 50g (Khoai tây, cà rốt) + 1g peptol + 1.5-2.0mg BAP/lít + 7 g Agar + 30 g đường. 1g than hoạt tính. pH 5,8. Sau khoảng 2-3 tháng nuôi cấy, khi các cụm protocom xuất hiện thì cấy chuyển sang môi trường tạo chồi.

+ Tạo chồi từ protocom:

Tiến hành dùng dao, pank cấy cắt từng miếng nhỏ protocom chuyển sang môi trường tạo chồi.

Môi trường tạo chồi: MS + 100ml ND + 100g (Khoai tây, cà rốt) + 1g peptol + 0.5mg BAP + 7 g Agar + 30 g đường. 1g than hoạt tính. pH 5,8.

Giai đoạn này kéo dài khoảng 45 ngày trong phòng cấy

10.4.4. Giai đoạn tăng kích thước cây

Môi trường nuôi cấy: LS + 100ml ND/lít + 100g (Khoai tây, cà rốt)/lít + 1g peptol/lít + 0,3mg BAP/lít + 1mg NAA/lít + 7 g Agar/lít + 30 g đường/lít + 1g than hoạt tính/lít. pH 5,8.

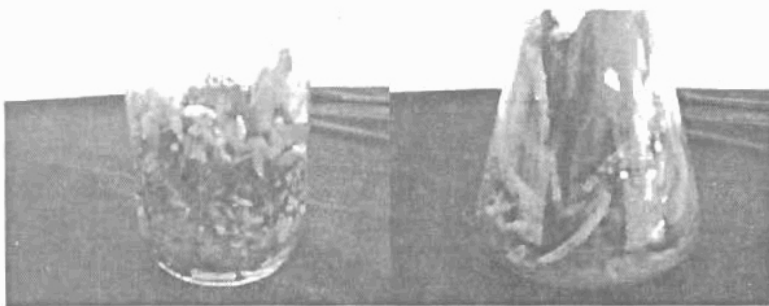
Giai đoạn này kéo dài khoảng 45 ngày

Lưu ý : Với Lan hồ điệp không nhất thiết cần giai đoạn tạo rễ.

10.4.5. Giai đoạn ra cây ngoài cây *in vitro*

Sau khi thấy các cây có đủ chất lượng tiến hành đưa ra ngoài làm quen với ánh sáng khoảng 1- 2 tuần. Sau đó dùng pank cấy gấp các cây ra khỏi bình nuôi cấy rửa sạch agar và đường có ở trên cây để tránh cây bị nhiễm nấm sau khi đem trồng ra giá thể.

Giá thể tốt nhất mà chúng tôi nghiên cứu cho lan Hồ điệp giai đoạn sau nuôi cấy mô là Rón trộn với xơ dừa đã được khử trùng bằng thuốc tím theo tỷ lệ Dón : xơ dừa là 2:1.



Hình 10.4. Lan Hồ điệp nuôi cấy mô - nhân nhân và tạo cây hoàn chỉnh (Ảnh tác giả)

10.5. QUI TRÌNH NHÂN GIỐNG LAN ĐUÔI CHỖN, ĐAI CHÂU TỪ PHÔI

10.5.1. Giai đoạn chuẩn bị:

Quả lan có tuổi từ 8 – 12 tháng sau thụ phấn được tiến hành thu hái mang về phòng thí nghiệm. Rửa sạch quả bằng dung dịch xà phòng loãng dưới vòi nước máy sau đó ngâm trong cồn 70% trong vòng 1- 2 phút, rửa sạch cồn bằng nước cất hấp sau đó tiến hành đưa mẫu vào trong box cấy.

Nhúng quả lan vào trong cồn 90% sau đó đem đốt nhanh trên ngọn lửa đèn cồn (trong 5 giây). Sau đó đưa quả lên đĩa cấy tiến hành tách lấy phôi đưa vào môi trường.

10.5.2. Giai đoạn tái sinh chồi

Tiến hành dùng dao, kéo, pank cấy tách lớp vỏ ngoài và gạt lấy phôi đưa vào môi trường nuôi cấy:

Môi trường nuôi cấy phôi: MS + 0.5mg Kinetin/lít + 0,5mg NAA/lít + 120ml ND/lít + 100mg Inostol/lít + 1g Peptol/lít + 7 g agar/lít. pH = 5.8.

Điều kiện phòng nuôi cấy: nhiệt độ phòng khoảng 25°C. ẩm độ khoảng 70%, thời gian chiếu sáng 8-10h/ngày. cường độ ánh sáng 2000lux.

Thời gian nuôi phôi khoảng 40 ngày thấy xuất màu xanh và sau khoảng 2 tháng tiến hành cấy chuyển chồi sang môi trường nhân nhanh.

10.5.3. Giai đoạn nhân nhanh

Cấy chuyển các chồi tái sinh từ phôi sang môi trường nhân nhanh. Mỗi bình cấy từ 5- 7 chồi.

Môi trường nhân nhanh: Knudson + 0,5mgK + 0,5mgNAA/lít + 120ml ND/lít + 100mg Inostol/lít + 1g Peptol/lít + 7 g agar/lít. pH=5,6-5,8.

Sau 3 tháng nuôi cấy thì cấy chuyển tiếp. Khi nào thấy đủ số lượng cây, lựa chọn những cây đạt tiêu chuẩn cấy chuyển sang môi trường tạo cây hoàn chỉnh.

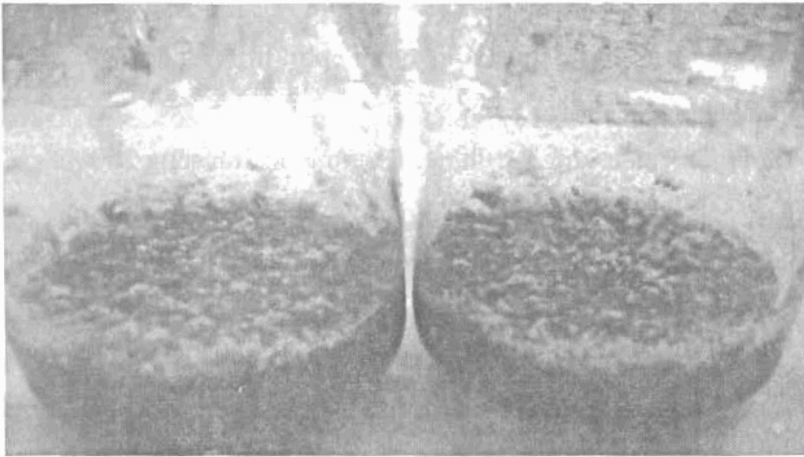
10.5.4. Giai đoạn ra rễ và tăng kích thước cây.

Môi trường nuôi cấy: LS + 100ml ND/lít + 1g peptol/lít + + 0,3mg BAP/lít + 1mg NAA/lít + 7 g Agar/lít + 30 g đường/lít + 1g than hoạt tính/lít. pH= 5,6-5,8.

Giai đoạn này kéo dài khoảng 60 ngày trong phòng cấy. khi các cây có đủ chất lượng tiến hành đưa ra ngoài làm quen với ánh sáng khoảng 1- 2 tuần.

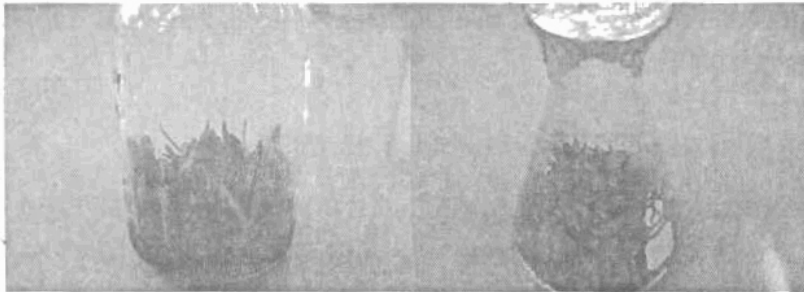
10.5.5. Giai đoạn ra ngôi cây *in vitro*

Dùng pank gắp cây ra khỏi bình nuôi cấy, rửa sạch agar và đường có ở trên cây để tránh cây bị nhiễm nấm sau khi đem trồng ra giá thể. Giá thể tốt nhất cho lan giai đoạn sau nuôi cấy mô là than củi (đã qua khử trùng bằng thuốc tím).



Hạt lan đại châu trong môi trường sau 40 ngày

Hình 10.5a. Lan nhân giống bằng nuôi cấy mô tế bào
(Ảnh tác giả)



Lan nuôi cấy mô nhân nhanh



Cây lan nuôi cấy mô trong
GD huấn luyện

Cây lan nuôi cấy mô trong giai

Hình 10.5b. Lan nhân giống bằng nuôi cấy mô tế bào
(Ảnh tác giả)

10.6. QUI TRÌNH NHÂN GIỐNG VÔ TÍNH CÂY HOA ĐỒNG TIỀN BẰNG PHƯƠNG PHÁP NUÔI CẤY MÔ TẾ BÀO

10.6.1. Giai đoạn chuẩn bị

+ Chọn vật liệu

Chọn cây mẹ cung cấp vật liệu: Cây hoa đồng tiền Đại Tuyết Cam khỏe mạnh, không bị sâu bệnh, sinh trưởng, phát triển bình thường được lựa chọn làm cây cung cấp vật liệu nuôi cấy.

Vật liệu nuôi cấy là những nụ hoa dài từ 5-10 cm.

+ Vô trùng mẫu nuôi cấy

Phương pháp xử lý mẫu: để hoa đồng tiền non được đem rửa sạch bằng xà phòng dưới vòi nước 3 lần. Rửa sạch bằng nước máy và tráng 3 lần bằng nước cất. Dem ngâm trong nước cất 30 phút, loại bỏ cuống nụ, tráng lại 3 lần bằng nước cất vô trùng trong tủ cấy. Sử dụng HgCl_2 0,1% khử trùng với thời gian 10 phút.

Kết thúc khử trùng, cắt để hoa đồng tiền non thành những lát mỏng có kích thước 2mm x 2mm rồi cấy vào môi trường nuôi cấy khởi động: MS (Murashige & Skoog, 1962), bổ sung 30 gram saccarose/lít, 6,5 gram agar/lít, pH = 5,8.

Điều kiện nuôi cấy: Nhiệt độ phòng cây: $25^{\circ}(\pm 2)$; Ẩm độ : 60-70%; Ánh sáng : 2000-3000 lux, thời gian chiếu sáng 10-12 h/ngày

Sau 20 ngày nuôi cấy cho tỷ lệ mẫu sống: 58,75%

10.6.2. Tái sinh chồi

* *Tạo callus từ lát cắt hoa đồng tiền non*

Môi trường tạo callus: MS + 30 gram saccarose/lít + 6,5 gram agar/lít + 1,5 mg 2,4D/l, pH = 5,8.

Điều kiện nuôi cấy: nhiệt độ phòng cây: 25°C ; ẩm độ : 70-80%; cường độ ánh sáng 2000-3000 lux, chiếu sáng liên tục 10-12h/ngày

Sau 3 tuần nuôi cấy, tỷ lệ tạo callus đạt 90,42 %

* *Tái sinh chồi từ callus*

Môi trường nuôi cấy: MS + 30 gram saccarose/lít + 6,5 gram agar/lít + 1,0 mg BAP/l + 0,2 mg Kinetin/l + 0,1 mg NAA/l, pH = 5,8.

Điều kiện nuôi cấy: nhiệt độ phòng cấy: 25^o (±2); ẩm độ : 60-70%; ánh sáng : 2000-3000 lux, thời gian chiếu sáng : 10-12h/ngày

Sau 12 tuần, tỷ lệ bật chồi: 36,11 %.

10.6.3. Giai đoạn nhân nhanh cụm chồi

Sử dụng những chồi sinh trưởng bình thường có đầy đủ thân và lá (không bị dị dạng) làm vật liệu cấy chuyển sang môi trường nhân nhanh.

Môi trường nuôi cấy nhân nhanh: MS + 30 gram saccarose/lít + 6.5 gram agar/lít + 1,5 mg BAP/l + 15% nước, pH = 5,8.

Điều kiện nuôi cấy: nhiệt độ phòng cấy: 25^o (±2); ẩm độ: 60-70%; ánh sáng: 2000-3000 lux, thời gian chiếu sáng: 10-12h/ngày

Sau 6 tuần trong môi trường nhân nhanh thu được hệ số nhân chồi: 7,45 lần, chồi mập và xanh thẫm.

10.6.4. Giai đoạn tạo cây hoàn chỉnh

Kết thúc giai đoạn nhân nhanh, lựa chọn những chồi hoa đồng tiền mập, cuống thân màu trắng, lá xanh to và dày có từ 3-5 lá, dài 10-15cm để cấy chuyển sang môi trường ra rễ.

Môi trường nuôi cấy: MS + 30 gram saccarose/lít + 6,5 gram agar/lít + 0,15 mg NAA/l, pH = 5,8.

Điều kiện nuôi cấy: nhiệt độ phòng cấy: 25^o (±2); ẩm độ: 60-70%; ánh sáng: 2000-3000 lux, thời gian chiếu sáng: 10-12h/ngày.

Sau 15-10 ngày, tỷ lệ bật chồi: 100 %, số rễ/cây: 4,26 rễ, chiều dài rễ TB là 1.39 cm; chất lượng rễ tốt.

10.6 .5. Giai đoạn ra ngôi cây đồng tiền in vitro

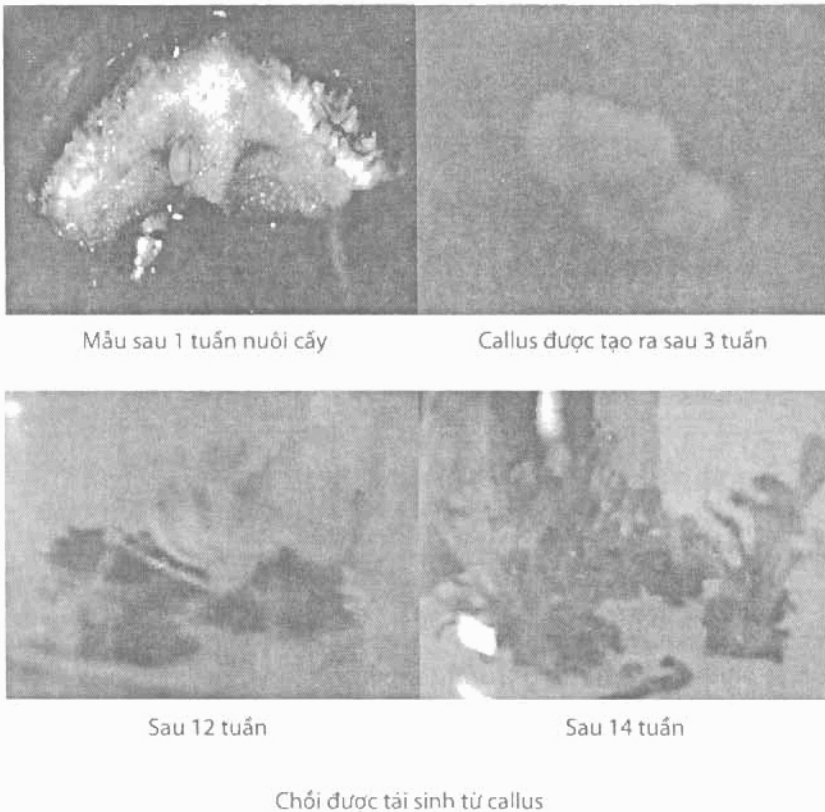
Tiêu chuẩn cây ra ngôi: Cây đầy đủ thân, lá(3-5 lá), rễ, sinh trưởng bình thường.

Phương pháp ra cây: Trước khi đưa cây con ra trồng vào giá thể đất, cần huấn luyện để cây quen dần với điều kiện môi trường bên ngoài. Thời gian này có thể kéo dài khoảng 10-15 ngày và tăng cường độ vào những ngày cuối để đạt tỷ lệ cây sống cao. Cây con trong bình cấy được rửa sạch những phần thạch hoặc đường bám vào, tiếp đó ngâm cây vào nước để tránh hiện tượng mất nước, rồi đem trồng vào giá thể.

Giá thể ra cây: hỗn hợp 1Cát+1đất+1trấu hun +1/4 vi sinh SG.

Điều kiện ra cây: cây trong điều kiện nhà lưới có mái che. Tưới phun sương 2 lần/ngày bằng nước sạch (ẩm độ giá thể 75 - 85%).

Sau 30 ngày cây sống trong giá thể, tỷ lệ cây sống và phát triển tốt thu được là 98,33%.



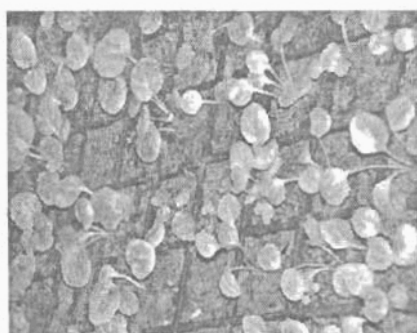
Hình 10.6a. Ảnh nhân giống hoa đồng tiền invitro (Ảnh tác giả)



Cụm chồi được nhân nhan sau 60 ngày



Nuôi cấy ra rễ sau 2 tuần



Cây trong giá thể sau 30

**Hình 10.6b. Ảnh nhân giống hoa đồng tiền invitro
(Ảnh tác giả)**

10.7. QUI TRÌNH NUÔI CẤY HỒNG MÔN

10.7.1. Giai đoạn chuẩn bị

+ Chọn vật liệu:

Chọn những cây mẹ sinh trưởng tốt đã cho hoa, sạch bệnh để thu chồi nách làm vật liệu nuôi cấy.

+ Vô trùng vật liệu nuôi cấy

Khử trùng sơ bộ: Khi lấy mẫu về, dùng nước máy rửa sạch những bụi bẩn bám trên bề mặt. Tiếp theo dùng nước xà phòng rửa sạch hoặc ngâm trong nước xà phòng 1-2 phút, tráng lại mẫu bằng nước máy.

Sau đó cắt mẫu cho vào bình tam giác sạch và tráng lại mẫu bằng nước cất 2-3 lần.

Khử trùng bằng hóa chất: công tác khử trùng này tiến hành trong box cấy. Dùng cồn 70° tráng qua mẫu trong thời gian 1 phút. Tiếp theo dùng dung dịch NaOCl 2% để khử trùng mẫu trong thời gian 20 -30 phút (tùy theo mẫu non hay già). Kết thúc khử trùng ta tráng lại bằng nước cất vô trùng 3-5 lần.

Bằng phương pháp này ta có thể thu được 70 % mẫu sống và không bị nhiễm nấm, khuẩn.

10.7.2. Giai đoạn tái sinh chồi

Kết thúc giai đoạn khử trùng ta cấy mẫu vào môi trường tái sinh. Môi trường tái sinh chồi sử dụng là: MS + 2 mg KI/lit + 30g đường/lit + 7g agar/lit, pH=5,6-5,8.

Điều kiện nuôi cấy: nhiệt độ 25°C, ẩm độ 70-80%. Trong 10 ngày đầu, bình mẫu được đặt ầu trong điều kiện tối để kích thích hình thành callus. Sau đó, chuyển bình đã hình thành callus ra ngoài điều kiện ánh sáng có cường độ 2000 lux, thời gian chiếu sáng 8-10h/ngày.

Với điều kiện trên, sau vào mẫu 20-30 ngày ta có thể thu được chồi tái sinh từ callus.

10.7.3. Giai đoạn nhân nhanh

Kết thúc giai đoạn tái sinh chồi, lựa chọn những chồi sinh trưởng bình thường có hơn 2 lá cấy chuyển sang môi trường nhân nhanh. Môi trường nhân nhanh sử dụng là: MS + 1,5 mg BAP/lit + 7g agar + 30 g đường; PII 5,6-5,8.

Điều kiện nuôi cấy: Điều kiện nuôi cây: nhiệt độ phòng cây: 25°; ẩm độ: 60-70%; ánh sáng: 2000 lux, thời gian chiếu sáng: 10-12h/ngày.

10.7.4. Giai đoạn tạo cây hoàn chỉnh

Lựa chọn những chồi mập, có trên 2 lá thật đem cấy chuyển sang môi trường ra rễ. Môi trường ra rễ sử dụng là: MS + 0,5 mg/lit IBA + 7 g agar + 30 g đường : PH 5,6-5,8.

Điều kiện nuôi cấy: Điều kiện nuôi cấy: nhiệt độ phòng cấy: 25^o; ẩm độ: 60-70%; ánh sáng: 2000 lux, thời gian chiếu sáng: 10-12h/ngày.

Sau 1 tuần nuôi cấy, tỷ lệ ra rễ đạt 80%. Rễ có chất lượng tốt.

10.7.5. Giai đoạn ra ngôi cây hồng môn *in vitro*

Luyên cây: Lựa chọn những bình cấy *in vitro* có từ 2-3 cặp lá thật, chiều cao 1-2 cm, có 2-3 rễ mập và trắng để đem ra luyện cây. Mang cả bình cấy từ phòng nuôi cấy vô trùng rang ngoài ánh sáng, để ở chế độ ánh sáng tán xạ. Giai đoạn này tiến hành trong 10 ngày.

Cây sau khi được luyện trong bình cấy, tiến hành rửa sạch agar và đường. Sau đó cấy vào giá thể đất : trấu hun (tỷ lệ 1 :1). Trong giai đoạn này thường xuyên tưới phun mù cho cây ngày 2-4 lần. Sau 7-10 ngày cây bắt đầu ra lá mới và khi cây có 3-4 lá mới thì mang trồng ra luống đất.

10.8. QUI TRÌNH NHÂN NHANH GIỐNG CHUỐI

10.8.1. Giai đoạn chuẩn bị

+ Chọn vật liệu:

Vật liệu nuôi cấy lấy từ cây con có độ tuổi từ 2-3 tuần tuổi, có chất lượng quả tốt, năng suất cao. Loại bỏ những bẹ lá ốm ở phần ngoài sau đó đưa về phòng xử lý mẫu.

Bộ phận đưa vào nuôi cấy là mô phân sinh đỉnh

+ Vô trùng mẫu cấy

Rửa mẫu sơ bộ bằng nước máy hoặc nước lã sạch, sau đó rửa lại mẫu bằng nước xà phòng loãng (hoặc ngâm mẫu trong nước xà phòng 1-2 phút)

Rửa sạch mẫu dưới vòi nước nước máy. Tiến hành loại bỏ những phần lá bao bên ngoài thuận tiện cho việc tách đỉnh sinh trưởng thì tách chỉ còn lại khoảng 3 – 4 lá bao ở đỉnh sinh trưởng. dùng cồn 70% lau lại rồi cho vào bình tam giác sạch đưa vào box cấy.

Dùng nước cất hấp vô trùng 1-2 lần tráng lại sau đó đưa vào box cấy. Sau đó, ngâm hoặc dùng cồn 70^o lau mẫu và tách lấy đỉnh sinh trưởng có

đường kính 5mm, dùng dao cắt hủy đỉnh chồi để ức chế ưu thế ngọn, kích thích chồi bên phát triển. Với kỹ thuật sử lý mẫu bằng cồn 70⁰ có thể thu được 90% số mẫu không bị nhiễm.

10.8.2. Giai đoạn tái sinh chồi

Sau khử trùng mẫu được cấy vào môi trường tái sinh chồi. Môi trường thích hợp cho tái sinh chồi : MS + 0,2mg BA /lít+ 0,5mg IAA+ 150 ml nước dừa/lít + 7g agar/lít + 30g đường/ lít; pH 5,6-5,8.

Điều kiện nuôi cấy: Điều kiện nuôi cấy: nhiệt độ phòng cấy: 25⁰; ẩm độ: 60-70%; ánh sáng: 2000 lux, thời gian chiếu sáng: 10-12h/ngày.

Sau 45 ngày chồi xuất hiện và vươn cao khoảng 3 cm.

10.8.3. Giai đoạn nhân nhanh chồi

Các chồi tái sinh trên mẫu được tách riêng rẽ từng chồi một, mỗi chồi lại được tách lá bao và hủy đỉnh sinh trưởng và cấy vào môi trường nhân nhanh.

Môi trường nhân nhanh: MS + 2mg BA/lít + 0,5mg IAA/lít + 150 ml nước dừa/lít + 7g agar/lít + 30g đường/ lít; pH 5,6-5,8.

Sau 30 ngày từ một chồi đơn phát triển thành một cụm chồi. Hệ số nhân có thể thu được là 5/lần cấy chuyển.

10.8.4. Giai đoạn tạo cây hoàn chỉnh

Trước khi chuyển ra môi trường đất, mỗi chồi con được tách ra riêng rẽ, cấy trên môi trường ra rễ. Môi trường ra rễ: MS + 0,2mg BA + 0,5mg IAA + 15% ND + 7g agar/lít + 30g đường/ lít + 1g than hoạt tính/lít. pH 5,6-5,8.

Sau 30 ngày cấy chồi con có thân lá phát triển mạnh mẽ có thể ra ngôi.

10.8.5. Giai đoạn ra ngôi cây chuối in vitro

Trong giai đoạn này cây chuối con trong bình tam giác được đặt trong điều kiện bình thường có nhiệt độ thấp, thoáng mát, có độ ẩm cao, ánh sáng khếch tán... nhằm mục đích thuần hoá dần dần cây chuối invitro.

Cây chuối con nuôi cấy mô được là sạch agar, đường, chuyển ra và cấy trên luống ươm, có chứa xơ dừa. Đây là giai đoạn trung gian giữa phòng thí nghiệm và đưa cây ra điều kiện tự nhiên. Cây con được giữ ẩm và phun thuốc kích thích ra rễ. Sau 15- 20 ngày, cây con ra rễ, phát triển thân rễ mạnh mẽ và đạt chiều cao 5 - 7 cm.

10.9. QUI TRÌNH NUÔI CẤY PHÔI CAM QUÝT

Làm sạch bệnh virus cho vườn cây ăn quả thuộc họ cam chanh đang là nhu cầu lớn đối với mọi nhu cầu trên thế giới. Trong khi chưa tạo được những giống kháng virus thì việc tạo ra những khu vườn cây mẹ sạch virus để cung cấp mắt ghép và cành chiết là vấn đề cấp thiết. Tạo phôi trong nuôi cấy phôi tâm, nuôi cấy đỉnh sinh trưởng đang được áp dụng rộng rãi và có hiệu quả cao trong việc làm sạch bệnh virus đối với nhiều loại cây trồng khác nhau.

Trong trường hợp cây ăn quả lâu năm, kỹ thuật ghép đang chiếm vị trí hàng đầu trong nhân giống vì kết hợp được khả năng chống chịu của gốc cây hoang dại (gốc ghép được trồng tái sinh từ phôi) với ưu điểm năng suất và phẩm chất của mắt ghép. Tuy nhiên, ghép theo kỹ thuật truyền thống, do thời gian trồng gốc ghép kéo dài và kích thước mắt ghép khá lớn, nên virus có thể lây truyền. Bên cạnh đó thì kỹ thuật nuôi cấy phôi mục đích cứu phôi trong trường hợp lai giữa các loài với nhau đã cứu được hàng loạt các hạt lai. Kỹ thuật vi ghép, nuôi cấy cứu phôi lai xa giữa hai loài cam quýt đã góp phần tạo nên những tập đoàn giống cây có mùi hoàn toàn sạch bệnh, tạo ra các con lai có chất lượng làm nguyên liệu cho sản xuất đại trà.

10.9.1. Giai đoạn chuẩn bị

Chọn những cây sinh trưởng phát triển khỏe mạnh. Thu hái những quả cam quýt được hình thành sau 3 tháng thụ phấn.

Tiến hành rửa quả dưới vòi nước máy bằng dung dịch xà phòng loãng sau đó lau qua cồn 70^o và đưa vào box cấy, tách lấy hạt non, bóc vỏ lụa của hạt rồi đưa vào môi trường nuôi cấy phôi. Hạt cam quýt được nằm trong lớp vỏ quả dày đây là môi trường hoàn toàn vô trùng lên không cần phải khử trùng.

10.9.2. Giai đoạn nuôi cấy phôi non

Môi trường nuôi cấy cam quýt: MT + 20 g đường + 7g agar. pH 5,8.

Điều kiện nuôi cấy: Nhiệt độ phòng 25°C, ẩm độ 70%, trong điều kiện tối.

Sau 3 tuần trong bình nuôi cấy, chồi được tái sinh từ phôi non thì chuyển sang môi trường có cường độ ánh sáng 2000 lux và thời gian chiếu sáng liên tục 8-10h/ngày.

10.9.3. Giai đoạn tạo cây hoàn chỉnh

Chồi sau khi đã tái sinh từ phôi non chuyển sang môi trường ra rễ tạo cây hoàn chỉnh. Môi trường ra rễ : MS + 30 g đường/lít + 7g agar/lít + 0,5 mg NAA/lít. pH 5,8.

Điều kiện nuôi cấy: nhiệt độ phòng 25°C, ẩm độ 70%, cường độ chiếu sáng 2000 lux, thời gian chiếu sáng liên tục từ 8-10 h/ngày.

Sau 4 tuần trong bình nuôi cấy, cây sinh trưởng tốt với đầy đủ thân, lá, rễ.

10.9.4. Giai đoạn ra ngôi cây con invitro

Cây trong ống nghiệm có bộ rễ phát triển mạnh mẽ và rất khoẻ, vì thế khi chuyển cây ra đất rễ sống. Trước khi đưa cây ra phải rửa thật sạch agar để bộ rễ không bị nhiễm nấm. Đất phân làm bầu nên khử trùng để tránh gây lây nhiễm bệnh. Những cây này sẽ là nguồn nguyên liệu đầu dòng nên trồng trong khu vực cách ly.

10.10. QUI TRÌNH NUÔI CẤY PHÔI NGÔ

10.10.1. Giai đoạn chuẩn bị

+ Chọn vật liệu:

Vật liệu là bắp ngô lai F1. Chọn những bắp to, hạt đều, phôi kích thước 0,8 - 1,5 mm, không bị sâu bệnh.

+ Khử trùng mẫu nuôi cấy:

Sau khi lấy bắp vè, tách bỏ 2-3 lớp lá bao bắp. Đưa bắp vào bóc cây, dùng cồn 70° lau sạch lá bao bắp. Dùng tay bóc lần lượt từng lớp lá bao bắp còn lại. Với phương pháp khử trùng như trên có thể thu được 100% mẫu sống và sạch nấm, bệnh.

10.10.2. Giai đoạn tái sinh chồi

+ Tách phôi và vào mẫu cấy

Dùng dao cấy tách từng hạt ngô, tách phôi ra khỏi hạt, đặt phôi mới tách ra lên môi trường nuôi cấy. Phôi tách phải nguyên vẹn, không bị dập nát, không bị nhiễm nấm khuẩn.

Môi trường vào mẫu: MS + 1,5 mg 2.4D/lit + 60g đường/lit + 7g agar/lit. pH=5,6-5,8.

Sau khi vào mẫu từ 7 - 12 ngày, mẫu bắt đầu hình thành callus.

Điều kiện nuôi cấy: nhiệt độ phòng cấy : 25°C, ẩm độ : 70-80%, tạo calus trong điều kiện bóng tối.

+ Tái sinh chồi từ callus

Môi trường thích hợp cho tái sinh chồi : MS + 1mg/lit NAA + 1mg/lit K + 7g agar + 60 g đường, pH 5.6-5,8.

Điều kiện nuôi cấy: nhiệt độ phòng cấy : 25°C, ẩm độ : 70-80%, ánh sáng : chiếu sáng liên tục 12h/ngày, cường độ ánh sáng 2000 lux.

10.10.3. Giai đoạn nhân nhanh chồi

Sau khi hình thành, callus được cấy chuyển sang môi trường tái sinh chồi. Môi trường tái sinh chồi là: MS + 1mg NAA/lit + 1,5mg BAP/lit + 7g agar + 60g đường, pH 5,6-5,8.

Điều kiện nuôi cấy: nhiệt độ phòng cấy : 25°C, ẩm độ : 70-80%, ánh sáng : chiếu sáng liên tục 12h/ngày, cường độ ánh sáng 2000 lux.

10.10.4. Giai đoạn tạo cây hoàn chỉnh

Môi trường thích hợp cho chồi ra rễ là: MS + 0,2 mgBAP/lit + 7 g agar + 60 g đường, pH 5,6-5,8.

Điều kiện nuôi cấy: nhiệt độ phòng cây : 25°C, ẩm độ: 70-80%, ánh sáng: chiếu sáng liên tục 12h/ngày, cường độ ánh sáng 2000 lux.

Sau 7 - 10 ngày rễ mới bắt đầu xuất hiện

10.10.5. Giai đoạn ra cây ngô in vitro

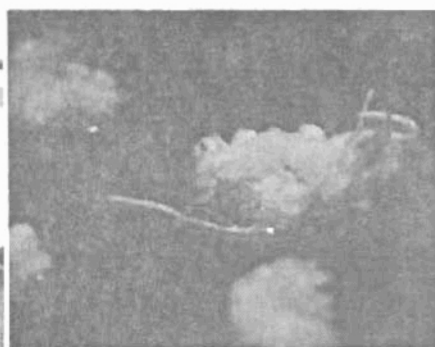
Trong thời gian cuối bình cây được đặt trong điều kiện bình thường có nhiệt độ thấp, thoáng mát, có độ ẩm cao, ánh sáng khếch tán... nhằm mục đích thuần hoá dần dần cây ngô invitro.

Khi cây con có từ 1 lá trở lên tiến hành chuyển cây ra bầu đất : trấu hun (1:1). Sau khi đã chuyển cây ra bầu, bầu cây được đặt trong nhà kính có cường độ chiếu sáng 2000 - 2500 lux. Sau khi trồng ra bầu đất khoảng 5 -7 ngày sau cây bắt đầu bén rễ và ra lá mới

Khi cây có 2 - 3 lá tiến hành chuyển cây trồng ra luống. Sau 60 - 70 ngày cây trổ cờ. Khi chuyển ra đất đạt 100% số cây sống và cho bắp



Bắp ngô lai F1 làm vật liệu



Mô sẹo hình thành từ phôi sau 20 ngày

Hình 10.7 a. Cây ngô được tạo từ nuôi cấy phôi



Cây ngô trong môi trường
ra rễ 15 ngày

Cây con trồng
trong nhà lưới

Bắp của cây ngô nuôi
cấy mô

**Hình 10.7 b. Cây ngô được tạo từ nuôi cấy phôi
(Ảnh tác giả)**

10.11. QUI TRÌNH NUÔI CẤY PHÔI SOMA ĐẬU TƯƠNG

10.11.1. Giai đoạn chuẩn bị

+ Chọn vật liệu:

Chọn những quả đậu tương có tuổi từ 15 - 20 ngày, lạnh lặn, không bị nấm bệnh. Bộ phận đưa vào nuôi cấy là mảnh lá mầm hạt non

+ Xử lý sơ bộ:

Rửa quả đậu tương dưới vòi nước nhằm loại bỏ toàn bộ phần đất, cát, bụi dính trên quả. Tiếp theo rửa lại quả đậu tương bằng nước xà phòng (hoặc ngâm trong nước xà phòng 1 - 2 phút) và rửa lại mẫu bằng nước máy, sau đó cho mẫu vào vào bình tam giác sạch, tráng lại mẫu bằng nước cất 2 - 3 lần

Trong xử lý sơ bộ phải loại bỏ được hết đất, cát và bụi bám trên quả nhưng không để quả đậu tương không bị đập, nát.

+ Khử trùng mẫu:

Tráng mẫu bằng nước cất hấp vô trùng 1 - 2 lần sau đó lắc mẫu trong dung dịch cồn 90° với thời gian 1 phút. Tiếp theo dùng dung dịch NaOCl 1% để xử lý mẫu, thời gian khử trùng khoảng 20 - 30 phút (tùy theo mẫu non hay già). Để tăng thêm hiệu quả khử trùng mẫu có thể cho thêm 1 - 2 giọt Tween 20 vào dung dịch khử trùng. Kết thúc khử trùng tráng lại bằng nước cất từ 3 - 5 lần đến khi hết bọt.

Với cách khử trùng trên ta có thể thu được 100% mẫu sống không bị nhiễm nấm, khuẩn.

10.11.2. Giai đoạn tái sinh chồi

Để tái sinh chồi đậu tương từ mảnh lá mầm đậu tương, trong nuôi cấy phôi soma đậu tương phải trải qua các giai đoạn sau:

+ Giai đoạn tạo mô sẹo:

Môi trường nuôi cấy: MS + B5 vitamins + 6g agar/lít + 30g đường/lít + 40 mg 2,4D / lít, pH=5,6 - 5,8.

Điều kiện nuôi cấy: Sau khi cấy chuyển sang môi trường tạo chồi, mẫu được đặt trong phòng nuôi cấy, nhiệt độ phòng nuôi cấy 25°C (± 2), độ ẩm 60 - 70%. Sau 6 - 8 tuần nuôi cấy 100% số mẫu hình thành mô sẹo.

+ Giai đoạn hình thành phôi soma

Môi trường thích hợp cho hình thành phôi soma: MS + B5 vitamins + 6g agar/lít + 30g đường/lít + 5mM asparagine + 20 mg 2,4D/ lít, pH = 5,6 - 5,8.

Sau khi chuyển sang môi trường tạo phôi soma, mẫu được đặt trong phòng nuôi cấy, nhiệt độ phòng nuôi cấy trung bình 25°C (± 2), ẩm độ 60-70%, thời gian chiếu sáng 16 h/ngày, cường độ chiếu sáng 2500 lux. Thời gian nuôi cấy trong môi trường tạo phôi soma từ 2 - 3 tuần.

+ Giai đoạn tái sinh chồi

Môi trường thích hợp cho tái sinh chồi : MS + B5 vitamins + 6g agar + 60g đường + 5 g than hoạt tính/ lít; pH = 5,6-5,8.

Sau khi cấy chuyển sang môi trường tạo chồi, mẫu được đặt trong phòng nuôi cấy, nhiệt độ phòng cây: 25°C (± 2), ẩm độ 60-70%, thời gian chiếu sáng 16 h/ngày, cường độ chiếu sáng 2500 lux. Thời gian nuôi cấy trong môi trường tái sinh chồi từ 3 - 4 tuần.

10.11.3. Giai đoạn tạo cây hoàn chỉnh

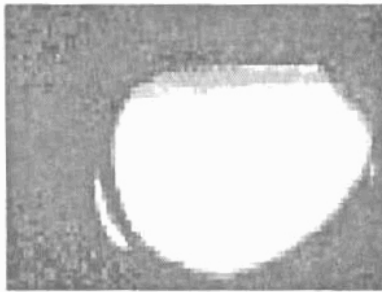
Môi trường thích hợp ra rễ: MS + B5 vitamins + 6g agar + 30g đường + 1,5 mg BAP + 0,1 mg NAA/ lít, pH 5.6 - 5.8.

Sau khi cấy chuyển sang môi trường ra rễ, bình nuôi cấy được đặt trong phòng nuôi cấy có nhiệt độ trung bình 25°C, ẩm độ 60 - 70%, thời gian chiếu sáng 16 h/ngày, cường độ chiếu sáng 2500 lux. Sau 7 - 10 ngày rễ mới bắt đầu xuất hiện

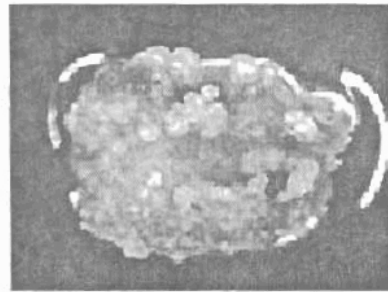
10.11.4. Giai đoạn ra cây *in vitro*

Giá thể trồng cây: Khi cây con có từ 1 lá trở lên tiến hành chuyển cây ra bầu có giá thể là cát vàng. Sau khi đã chuyển cây ra bầu, bầu cây được đặt trong nhà kính có cường độ chiếu sáng 2000 - 2500 lux, ẩm độ đất luôn đạt 80%

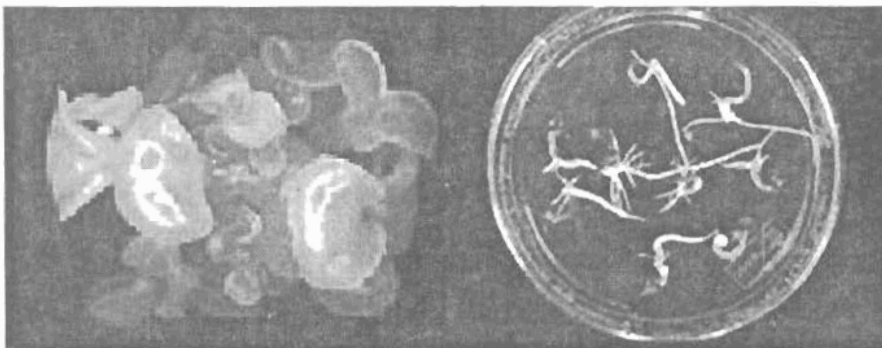
Sau 7 - 10 ngày cây bắt đầu ra lá mới



Vật liệu nuôi cấy



Cảm ứng tạo mô sẹo trên D40



Hình thành phôi soma trên D20

Tái sinh chồi trên M6AC

**Hình 10.8 . Nuôi cấy đậu tương từ tế bào soma
(Ảnh tác giả)**

10.12. QUI TRÌNH NUÔI NỐT LÁ MẪN CÂY ĐẬU TƯƠNG

10.12.1. Giai đoạn chuẩn bị

+ Chọn vật liệu:

Lá mầm hạt đậu tương

+ Xử lý sơ bộ:

Rửa qua đậu tương dưới vòi nước nhằm loại bỏ toàn bộ phần đất, cát, bụi dính trên quả. Tiếp theo rửa lại quả đậu tương bằng nước xà phòng (hoặc ngâm trong nước xà phòng 1 - 2 phút) và rửa lại mẫu bằng nước máy, sau đó cho mẫu vào vào bình tam giác sạch, tráng lại mẫu bằng nước cất 2 - 3 lần

Trong xử lý sơ bộ phải loại bỏ được hết đất, cát và bụi bẩn bám trên quả nhưng không để quả đậu tương không bị dập, nát.

+ Khử trùng mẫu:

Tráng mẫu bằng nước cất hấp vô trùng 1 - 2 lần sau đó lãc mẫu trong dung dịch cồn 90° với thời gian 1 phút. Tiếp theo dùng dung dịch NaOCl 15% để xử lý mẫu, thời gian khử trùng khoảng 13-15 phút. Để tăng thêm hiệu quả khử trùng mẫu có thể cho thêm 1 -2 giọt Tween 20 vào dung dịch khử trùng. Kết thúc khử trùng tráng lại bằng nước cất từ 3 - 5 lần đến khi hết bọt.

Với cách khử trùng trên ta có thể thu được 100% mẫu sống không bị nhiễm nấm, khuẩn.

10.12.2. Giai đoạn tái sinh chồi

+Nuôi cấy nảy mầm:

Môi trường nuôi cấy: MS + B5 vitamins + 6g agar/lít + 30g đường/lít, pH=5,6 - 5,8.

Điều kiện nuôi cấy: Sau khi cấy chuyển sang môi trường tạo chồi, mẫu được đặt trong phòng nuôi cấy, nhiệt độ phong nuôi cấy 25°C (\pm 2), độ ẩm 60 - 70%. Sau 3 - 5 tuần nuôi cấy 100% số mẫu nảy mầm.

+ Tái sinh chồi:

Hạt đậu tương sau khi nảy mầm trên môi trường MS 3-5 ngày được sử dụng làm vật liệu nuôi cấy tái sinh chồi. Dùng dao cắt bỏ trụ dưới và trụ trên lá mầm, chia làm hai phần có chứa ½ chồi đỉnh (mỗi phần là một mảnh lá mầm), cấy vào môi trường tái sinh.

Môi trường tái sinh chồi: MS + B5 vitamins + 1,5mg BAP/lít + 6g agar/lít + 30 g đường/lít, pH=5,6-5,8.

Điều kiện nuôi cấy: Sau khi cấy chuyển sang môi trường tạo chồi, mẫu được đặt trong phòng nuôi cấy, nhiệt độ phong nuôi cấy 25°C (\pm 2), độ ẩm 60 - 70%.

+ Kéo dài chồi:

Môi trường nuôi cấy: MS + B5 vitamins + 1,5mg BAP/l + 0,5 GA3/lít + 6g agar/lít + 30 g đường/lít, pH=5,6-5,8.

Điều kiện nuôi cấy: Sau khi cấy chuyển sang môi trường tạo chồi, mẫu được đặt trong phòng nuôi cấy, nhiệt độ phong nuôi cấy 25°C (\pm 2), độ ẩm 60 - 70%, thời gian chiếu sáng 10h/ngày. cường độ chiếu sáng 2000lux

10.12.3. Giai đoạn tạo cây hoàn chỉnh

Môi trường nuôi cấy ra rễ: MS + B5 vitamins + 0,1mg NAA/l + 6g agar/lít + 30 g đường/lít, pH=5,6-5,8.

Điều kiện nuôi cấy: Sau khi cấy chuyển sang môi trường tạo chồi, mẫu được đặt trong phòng nuôi cấy, nhiệt độ phong nuôi cấy 25°C (\pm 2), độ ẩm 60 - 70%, thời gian chiếu sáng 10h/ngày cường độ chiếu sáng 2000lux.

10.12.4. Giai đoạn ra ngôi cây đậu tương in vitro

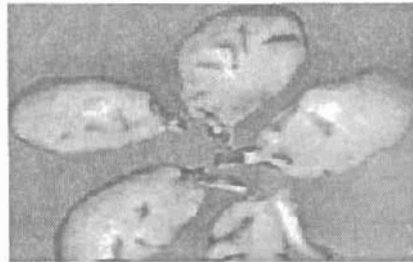
Trước khi đưa cây ra ngoài cần luyện cây thích nghi dần với điều kiện bên ngoài, thời gian từ 7-10 ngày.

Khi cây con cao khoảng 4 -5cm trở lên có lá, rễ đầy đủ tiến hành chuyển cây sang chậu đất và trồng trong nhà kính, nhà lưới.

Giá thể tốt nhất cho ra cây : cát hoặc cát + trấu hun (tỷ lệ 1 :1). Tỷ lệ cây sống sót trên 95%



Nuôi cấy nảy mầm hạt (3-5 ngày)



Tách lá mầm làm vật liệu nuôi cấy



Nuôi cấy tái sinh chồi từ nốt lá mầm (sau cấy 3-4 tuần)



Nuôi cấy kéo dài chồi trên môi trường (thời gian nuôi cấy 4 tuần)



Ra rễ tạo cây hoàn chỉnh



Ra cây

Hình 10.9 . Hình ảnh nuôi cấy nốt lá mầm cây đậu tương in vitro (Ảnh tác giả)

10.13. QUI TRÌNH NUÔI CẤY ĐỈNH SINH CÂY LÔ HỘI

Cây Lô hội (*Aloe vera* L.) hay còn được gọi là cây Nha Đam, là loại cây dược liệu được dùng trong cả Đông y và Tây y. Trong cây Lô hội có chất đông dính (gel) chứa các chất có hoạt tính sinh học, các a.a, vitamin, chất kháng sinh (Võ Thanh Thái, 1962; Afzal, Ali, Phami, 1991).

Những năm gần đây, chất gel chiết rút từ cây Lô hội được dùng nhiều trong các ngành công nghệ dược phẩm, hóa mỹ phẩm như: Kem thoa lên

da, thuốc viên hay thuốc mỡ để trị bệnh, sử dụng trực tiếp chất gel có trong lá tươi đắp mặt dưỡng da, làm nước uống... nên cây Lô hội ngày càng được nhiều người quan tâm (Đỗ Thanh Hội, 1977; Anshoo, Singh et al, 2005). Chính vì lẽ đó, tăng cường phát triển vùng nguyên liệu cây Lô hội là việc nên làm. Tuy nhiên, cây Lô hội rất khó nhân giống bằng hạt, người dân thường nhân giống bằng phương pháp tách chồi, phương pháp này đơn giản nhưng cho hệ số nhân giống không cao, cây dễ bị già hóa, sức sống thấp nên không thể sản xuất được số lượng lớn cây giống theo Qui mô công nghiệp (Mạnh Tùng, 2004). Với phương pháp nhân giống bằng kỹ thuật nuôi cấy mô tế bào trong một thời gian ngắn cung cấp đủ số lượng cây giống chất lượng tốt, đồng thời giống nhau về hình thái, di truyền.

10.13.1. Giai đoạn chuẩn bị

+ Lựa chọn mẫu

Vật liệu nuôi cấy là đỉnh sinh trưởng được tách từ những cây khỏe, sinh trưởng phát triển nhanh.

+ Khử trùng mẫu

Sau khi thu mẫu về tiến hành loại bỏ những phần không cần thiết sau đó rửa sạch mẫu bằng dung dịch xà phòng loãng. Sau đó khử trùng sơ bộ bằng cồn 70% trong thời gian 2 phút. Tráng lại bằng nước cất rồi đưa vào tủ cấy vô trùng.

Trong tủ cấy vô trùng, sử dụng $HgCl_2$ 0,1% khử trùng mẫu trong thời gian 7 phút. Rồi tráng sạch bằng nước cất (3 – 5 lần) trước khi cấy vào môi trường.

10.13.2. Giai đoạn tái sinh chồi

Chồi sau khi đã được khử trùng dung dao, pank cấy tách đỉnh sinh trưởng có đường kính 0,5mm sau đó đưa vào môi trường nuôi cấy tạo chồi.

Môi trường nuôi cấy đỉnh sinh trưởng cây lô hội:

MS + 1mg BAP/lít + 7 g Agar/lít + 30 g đường/lít. pH = 5,8.

Sau khi đưa mẫu vào môi trường nuôi cấy tái sinh chồi, đưa mẫu vào nuôi cấy trong phòng nuôi cấy: nhiệt độ phong nuôi cấy $25^{\circ}C (\pm 2)$, độ ẩm 60 - 70%, thời gian chiếu sáng 10h/ngày, cường độ chiếu sáng 2000lux

Thời gian để trong ánh sáng phòng kéo dài 3 tuần sau khi chồi phát triển có chiều dài 2 cm thì tiến hành chuyển sang môi trường nhân nhanh.

Lưu ý: Đối với đỉnh sinh trưởng cây lô hội khi tách phải chừa dao cắt, pank cây nguội.

10.13.3. Giai đoạn nhân nhanh

Mẫu sau khi tái sinh có chiều cao 1-2cm thì tiến hành chuyển sang môi trường nhân nhanh đỉnh sinh trưởng.

Môi trường nuôi cấy: MS + 3mg BAP/lít + 7 g Agar/lít + 30 g đường/lít, pH 5,8.

Giai đoạn này kéo dài 40 – 45 ngày tách các chồi đưa sang môi trường nhân chồi. Khi nào có đủ số lượng chồi đủ lớn thì tiến hành cấy chuyển sang môi trường ra rễ.

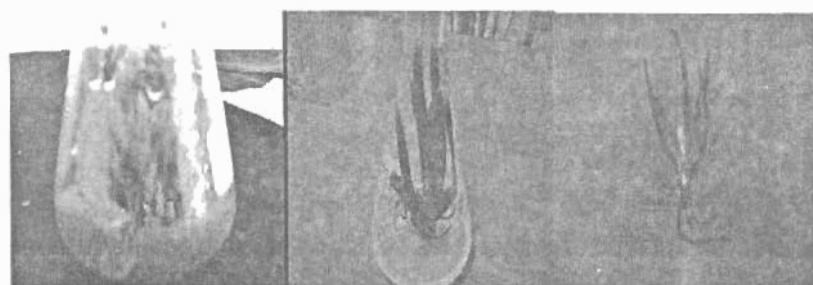
10.13.4. Giai đoạn tạo cây hoàn chỉnh

Tách các chồi có đủ số lượng sang môi trường ra rễ. mỗi bình nuôi cấy đặt 5 chồi . Môi trường ra rễ: MS + 1mg NAA/lít + 0,5mg BAP/lít + 7 g Agar/lít + 30 g đường/lít + 1g than hoạt tính/lít. pH=5,8.

Sau 20 ngày nuôi cấy rễ ra đầy đủ thì tiến hành chuyển ra luyện cây.

10.13.5. Giai đoạn tạo ra ngôi cây lô hội in vitro

Trước khi đưa cây ra ngoài cần luyện cây thích nghi dần với điều kiện bên ngoài, thời gian từ 7-10 ngày. Tiến hành đưa cây con ra ngoài giá thể cát + trấu hun. Tỷ lệ cát : trấu hun là 1 : 1.



Hình 10.10 . Ảnh nhân giống cây lô hội (Ảnh tác giả)

10.14. QUI TRÌNH NHÂN GIỐNG CÂY BA KÍCH BẰNG PHƯƠNG PHÁP NUÔI CẤY MÔ TẾ BÀO

10.14.1. Giai đoạn chuẩn bị

+ Chọn vật liệu:

Chọn những cây chồi, cây đầu dòng đã qua khảo nghiệm. Trẻ hoá cây giống cung cấp mẫu cho quá trình nuôi cấy bằng các biện pháp kỹ thuật tác động chặt sát gốc.

Vật liệu nuôi cấy là chồi nách lấy từ cây giống có độ tuổi từ 1-2 năm tuổi.

+ Vô trùng mẫu:

Rửa mẫu: Rửa mẫu sơ bộ bằng nước máy hoặc nước lã sạch, rửa hoặc ngâm (1-2 phút) mẫu bằng nước xà phòng. Rửa lại mẫu bằng nước máy. Sau đó cắt mẫu cho vào bình tam giác sạch và tráng lại mẫu bằng nước cất 2-3 lần. Mẫu sau rửa không để bị dập, sứt hay biến dạng. Mẫu được rửa sạch xà phòng (không còn bong bóng khi lắc tráng mẫu).

Khử trùng mẫu: Sau khi rửa mang mẫu vào box cấy và tráng lại 1-2 lần bằng nước cất vô trùng. Tiếp đó, tráng qua mẫu bằng dung dịch cồn 70^o trong 1 phút. Dùng dung dịch HgCl₂ 0,1% khử trùng trong 5-7 phút cho mẫu non và 8-10 phút cho mẫu già. Trong thời gian khử trùng tiến hành lắc mẫu và giữ cho mẫu chìm trong dung dịch chất khử trùng. Kết thúc khử trùng tráng sạch hóa chất khử trùng bằng nước cất vô trùng 5-7 lần.

Với kỹ thuật vô trùng vật liệu nuôi cấy trên ta có thể thu được khoảng 75% mẫu sống và sạch bệnh.

10.14.2. Giai đoạn tái sinh chồi

Môi trường nuôi cấy tạo chồi là: MS* (MS có bổ xung một số vitamin) + 0,3mg BAP/lit + 30g đường/lit + 6,0g agar/lit ; pH 5,8.

Điều kiện nuôi cấy: Nhiệt độ phòng cấy là 25°C (± 2), ẩm độ : 60-70%, thời gian chiếu sáng 10-12h/ngày, cường độ ánh sáng 2000 lux.

Sau 30-35 ngày thì hình thành chồi

10.14.3. Giai đoạn nhân nhanh chồi

Sau khi chồi hình thành ta cắt sát cuống chồi, bỏ đi phần đoạn cành cũ và cấy chuyển sang môi trường nhân nhanh.

Môi trường nhân nhanh chồi : MS + 0,5 mg BAP/lít + 0,1 mg IAA/lít + 6,0g agar/lít + 30g đường/ lít; pH 5,8.

Điều kiện nuôi cấy: Nhiệt độ phòng cây là 25°C (± 2), ẩm độ: 60-70%, thời gian chiếu sáng 10-12h/ngày, cường độ ánh sáng 2000 lux.

10.14.4. Giai đoạn tạo cây hoàn chỉnh

Kết thúc giai đoạn nhân nhanh, lựa chọn những chồi sinh trưởng, phát triển bình thường (không bị dị dạng) cấy chuyển ra môi trường ra rễ.

Môi trường ra rễ: 1/2 MS* + 0,25mg IBA/lít + 5g agar + 15 g đường/ lít; pH=5,8-6,0.

Điều kiện nuôi cấy: Nhiệt độ phòng cây là 25°C (± 2), ẩm độ : 60-70%, thời gian chiếu sáng 8-10h/ngày, cường độ ánh sáng 2000 lux.

10.14.5. Giai đoạn ra ngôi cây *in vitro*

Lựa chọn những chồi có từ 2-3 cặp lá thật, chiều cao từ 1-2 cm, có từ 2-3 rễ mập, trắng mang ra luyện cây. Đưa bình chồi ra ngoài ánh sáng, để ở chế độ ánh sáng tán xạ sử lý để luyện cây. Thời gian luyện cây khoảng 10 ngày.

Sau khi luyện cây, gắp cây ra khỏi bình nuôi cấy, rửa sạch agar và đường bám vào, khử trùng bằng thuốc tím 1% và trồng trong giá thể. Giá thể sử dụng có thể là cát hoặc bầu đất.

Tỷ lệ sống của cây sau ra ngôi đạt 85-90%.

Cây trồng ra đất sau 7 ngày thì thích nghi với điều kiện bên ngoài. Sau 3-4 tháng cây cao 30-40 cm và có thể mang trồng ngoài đồng ruộng.



Cây đầu dòng
cung cấp
chối vào mẫu

Tạo chồi
vào mẫu

Vào mẫu
sau 35 ngày
Nuôi cấy

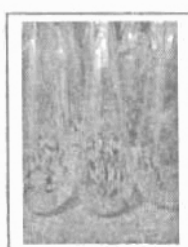
Nhân nhanh chồi s
au 45 ngày nuôi cấy



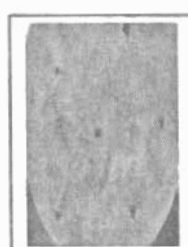
Dâm hom thân
Ba kích tím
sau 50 ngày



Chồi Ba kích
cấy ra rễ
sau 1 tháng



Nhân nhanh
chồi sau 45 ngày
nuôi cấy



Ra rễ chồi
Ba kích tím

**Hình 10.11. Ảnh nhân giống ba kích bằng nuôi cấy in vitro
(Ảnh tác giả)**

10.15. QUI TRÌNH NUÔI CẤY CÂY SONG MẬT

10.15.1. Giai đoạn chuẩn bị

+ Lựa chọn vật liệu .

Chọn những giống từ những cây chồi, cây đầu dòng đã qua khảo nghiệm

Vật liệu nuôi cấy lấy từ củ hoặc hạt của cây giống có độ tuổi từ 1-3 năm.

+ Sử lý vô trùng mẫu:

Rửa mẫu: Rửa mẫu sơ bộ bằng nước máy hoặc nước lã sạch và Rửa mẫu hoặc ngâm (1-2 phút) bằng nước xà phòng. Sau đó rửa lại mẫu bằng nước máy, cho vào bình tam giác sạch và tráng mẫu bằng nước cất 2-3 lần.

Mẫu sau rửa không để bị dập, sứt hay biến dạng. Mẫu được rửa sạch xà phòng (không còn bong bóng khí lấp trắng mẫu).

Khử trùng mẫu: Sau khi rửa mang mẫu vào box cấy và tráng lại 1- 2 lần bằng nước cất vô trùng. Tiếp đó, tráng qua mẫu bằng dung dịch cồn 70^o trong 1 phút. Dùng dung dịch HgCl₂ 0,1% khử trùng trong 10 phút cho mẫu non và 13 phút cho mẫu bánh tẻ. Trong thời gian khử trùng tiến hành lắc mẫu và giữ cho mẫu chìm trong dung dịch chất khử trùng. Kết thúc khử trùng tráng sạch hóa chất khử trùng bằng nước cất vô trùng 5-7 lần.

Với kỹ thuật vô trùng vật liệu nuôi cấy trên ta có thể thu được khoảng 75% mẫu sống và sạch bệnh.

10.15.2. Giai đoạn tái sinh chồi

Đề tái sinh chồi từ vật liệu nuôi cấy là củ song mật, phải trải qua 2 giai đoạn:

+ Tạo callus :

Mẫu sau khử trùng được mang cấy vào môi trường tạo callus. Môi trường tạo callus thích hợp cho củ Song mật là : MS + 0,5 mg BAP/l + 0,2 mg Kinetin/l+0,2mg 2,4-D/l+ 100mg Ino/l+100mg casein/l 30g đường/l+ 5,5g agar/l, pH 5,6-5,8

Điều kiện nuôi cấy tạo callus: Điều kiện nuôi cấy: Nhiệt độ phòng cấy là 25^oC (± 2), ẩm độ : 60-70%, thời gian chiếu sáng 10-12h/ngày, cường độ ánh sáng 2000 lux.

Sau 15-20 ngày callus được hình thành với chất lượng tốt.

+ Tạo chồi:

Sau khi callus được hình thành, cắt bỏ phần bị thâm đen (phần mẫu không tạo callus mà bị hoại), cấy vào môi trường tạo chồi:

Môi trường nuôi cấy tạo chồi: MS + 0,6mg BAP/l + 0,15 mg IAA/l+1mg VTMC /l + 30g đường/l + 100mg Ino/l+100mg Casein/l+6g agar/l, pH 5,6-5,8.

Điều kiện nuôi cấy tạo callus: Điều kiện nuôi cấy: Nhiệt độ phòng cấy là 25^oC (± 2), ẩm độ : 60-70%, thời gian chiếu sáng 10-12h/ngày, cường độ ánh sáng 2000 lux.

Sau 30-35 ngày nuôi cấy callus bắt đầu tạo chồi mới.

10.15.3. Giai đoạn nhân nhanh chồi

Sau khi chồi được hình thành, tiến hành lựa chọn những chồi sinh trưởng phát triển bình thường không bị dị dạng để cấy vào môi trường nhân nhanh. Môi trường nhân nhanh tốt nhất là: MS + 0,6 mg BAP/lit + 0,15 mg IAA/l + 0,3mg Kinetin/l + 6,0g agar + 30g đường/l + 50mg Ino/l + 50mg Casein/l, pH 5,6-5,8.

Điều kiện nuôi cấy tạo callus: Điều kiện nuôi cấy: Nhiệt độ phòng cấy là 25°C (± 2), ẩm độ : 60-70%, thời gian chiếu sáng 10-12h/ngày, cường độ ánh sáng 2000 lux.

Sau khoảng 30 ngày nhân nhanh ta lại cấy chuyển môi trường 1 lần

10.15.4. Giai đoạn tạo cây hoàn chỉnh

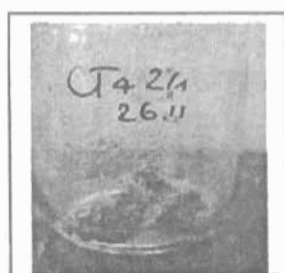
Trong giai đoạn này tiến hành kích thích chồi ra rễ. Môi trường nuôi cấy ra rễ thích hợp là: MS + 0,4 mg BAP/l + 0,15 mg IAA/l + 5,5g agar + 30g đường/l, pH 5,6-5,8.

Điều kiện nuôi cấy: Điều kiện nuôi cấy: Nhiệt độ phòng cấy là 25°C (± 2), ẩm độ : 60-70%, thời gian chiếu sáng 10-12h/ngày, cường độ ánh sáng 2000 lux. Sau 30 ngày nuôi cấy, 100% chồi ra rễ.

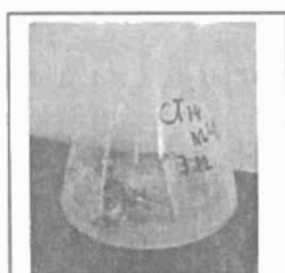
10.15.5. Giai đoạn ra ngôi.

Lựa chọn cây có từ 2 cặp lá thật, chiều cao 1-2 cm, có 2-3 rễ mập và trắng đưa ra ngoài ánh sáng, để dưới ánh sáng tán xạ để luyện cây. Thời gian xử lý luyện cây trong thời gian 10 ngày là tốt cho cây thích nghi trước khi cấy vào giá thể là cát hoặc bầu đất, tỷ lệ sống là 85-90%.

Sau giai đoạn luyện cây trong bình nuôi cấy, cây được rửa sạch và khử trùng bằng thuốc tím 1% trước 1 ngày cấy cây mạ vào bầu cát và đặt trong nhà kính. Sau đó 1 tuần cấy vào bầu đất. Sau 2 tháng cây cao 20-30 cm có thể đem đi trồng.



Song mật sau 25 ngày
nuôi cấy trong môi trường
tạo Callus



Song mật sau 25 ngày
nuôi cấy trong môi trường
tạo chồi

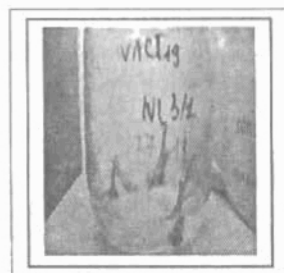


Song mật nuôi cấy
trong môi trường nhân
nhanh chồi sau 20 ngày

**Hình 10.12a. Ảnh nhân giống Song Mật
bằng phương pháp nuôi cấy mô Tế Bào (Ảnh tác giả)**



Song mật sau 30 ngày nuôi
cấy trong môi trường nhân
nhanh chồi sau 20 ngày



Song mật sau 30 ngày
nuôi cấy tiến ra rễ



Ra rễ chồi Song Mật
sau 10 ngày nuôi cấy

**Hình 10.12b. Ảnh nhân giống Song Mật bằng phương pháp
nuôi cấy mô Tế Bào (Ảnh tác giả)**

10.16. QUÌ TRÌNH NUÔI CẤY KEO LAI

10.16.1. Giai đoạn chuẩn bị

+ Lựa chọn vật liệu

Chọn những cây chồi, cây đầu dòng đã qua khảo nghiệm hay chọn những dòng nhập nội có triển vọng

Trẻ hoá cây giống cung cấp mẫu cho quá trình nuôi cấy bằng các biện pháp kỹ thuật tác động chặt sát gốc và khoanh vỏ với chiều cao 1,3m.

Vật liệu nuôi cấy lấy từ cây giống có độ tuổi từ 1-2 năm tuổi

Bộ phận đưa vào nuôi cấy là mô phân sinh đỉnh đối với Keo lai

+ Sử lý vô trùng mẫu:

Rửa mẫu: Rửa mẫu sơ bộ bằng nước máy hoặc nước lã sạch và Rửa mẫu hoặc ngâm (1-2 phút) bằng nước xà phòng. Sau đó rửa lại mẫu bằng nước máy, cho vào bình tam giác sạch và tráng mẫu bằng nước cất 2-3 lần. Mẫu sau rửa không để bị dập, sước hay biến dạng. Mẫu được rửa sạch xà phòng (không còn bong bóng khí lác tráng mẫu).

Khử trùng mẫu: Sau khi rửa mang mẫu vào box cấy và tráng lại 1- 2 lần bằng nước cất vô trùng. Tiếp đó, tráng qua mẫu bằng dung dịch cồn 70% trong 1- 2 phút. Dùng dung dịch $HgCl_2$ 0,1% khử trùng trong 5-7 phút cho mẫu non và 8-10 phút cho mẫu bánh tẻ. Trong thời gian khử trùng tiến hành lác mẫu và giữ cho mẫu chìm trong dung dịch chất khử trùng. Kết thúc khử trùng tráng sạch hóa chất khử trùng bằng nước cất vô trùng 5-7 lần.

Với kỹ thuật vô trùng vật liệu nuôi cấy trên ta có thể thu được khoảng 75% mẫu sống và sạch bệnh.

10.16.2. Giai đoạn tái sinh chồi

Sau khi callus được hình thành, cắt bỏ phần bị thâm đen (phần mẫu không tạo callus mà bị hoại), cấy vào môi trường tạo chồi:

Môi trường nuôi cấy tạo chồi: MS + 0.3mg BAP/lit + 30g đường/lit + 6g agar/lit ; pH 5,6-5,8

Điều kiện nuôi cấy tạo callus: Điều kiện nuôi cấy: Nhiệt độ phòng cây là 25°C (\pm 2), ẩm độ : 60-70%, thời gian chiếu sáng 10-12h/ngày, cường độ ánh sáng 2000 lux.

Sau 30-35 ngày chồi ngủ bắt đầu bật mầm.

10.16.3. Giai đoạn nhân nhanh chồi

Sau khi chồi được hình thành, tiến hành lựa chọn những chồi sinh trưởng phát triển bình thường không bị dị dạng để cấy vào môi trường nhân nhanh. Môi trường nhân nhanh tốt nhất là: MS + 0,5 mg BAP/lit + 0,1 mg/lit IAA + 6g agar + 30g đường/ lít; pH 5,6-5,8.

Điều kiện nuôi cấy tạo callus: Điều kiện nuôi cấy: Nhiệt độ phòng cây là 25°C (\pm 2), ẩm độ : 60-70%, thời gian chiếu sáng 10-12h/ngày, cường độ ánh sáng 2000 lux.

Sau khoảng 30 ngày nhân nhanh ta lại cấy chuyển môi trường 1 lần

10.16.4. Giai đoạn tạo cây hoàn chỉnh

Trong giai đoạn này tiến hành kích thích chồi ra rễ. Môi trường nuôi cấy ra rễ thích hợp là: 1/2 MS + 0,2mg/lit NAA + 5g agar + 15 g đường/lít; pH 5,6-5,8

Điều kiện nuôi cấy: Điều kiện nuôi cấy: Nhiệt độ phòng cấy là 25°C (± 2), ẩm độ : 60-70%, thời gian chiếu sáng 10-12h/ngày, cường độ ánh sáng 2000 lux. Sau 15 ngày nuôi cấy, 100% chồi ra rễ.

10.16.5. Giai đoạn ra ngôi.

Lựa chọn cây có từ 2 -3 cặp lá thật, chiều cao 2-3 cm, có 2-3 rễ mập và trắng đưa ra ngoài ánh sáng, để dưới ánh sáng tán xạ để luyện cây. Thời gian xử lý luyện cây trong thời gian 15 ngày là tốt cho cây thích nghi trước khi cấy vào giá thể là cát hoặc bầu đất, tỷ lệ sống là 85-90%.

Sau giai đoạn luyện cây trong bình nuôi cấy, cây được rửa sạch và khử trùng bằng thuốc tím 1% trước 1 ngày cấy cây mạ vào bầu cát và đặt trong nhà kính. Sau đó 1 tuần cấy vào bầu đất. Sau 1-2 tháng cây cao 30-40 cm có thể đem đi trồng.



Chồi sau 25 ngày
nuôi cấy



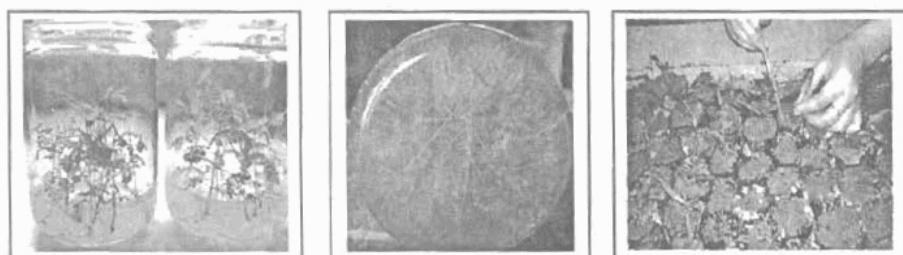
Chồi sau 17 ngày
nuôi cấy



Nhân nhanh chồi sau
25 ngày nuôi cấy



Cụm chồi sau
30 ngày nuôi cấy



Chồi ra rễ sau 15 ngày nuôi cấy

Cây keo con sau huấn luyện sau 15 ngày cấy vào bầu đất

Hình 10.13. Ảnh nhân giống cây keo lai (Ảnh tác giả)

10.17. QUI TRÌNH NUÔI CẤY CÂY BẠCH ĐÀN LAI

10.17.1. Giai đoạn chuẩn bị

+ Lựa chọn vật liệu

Chọn những cây chồi, cây đầu dòng đã qua khảo nghiệm hay chọn những dòng nhập nội có triển vọng

Trẻ hoá cây giống cung cấp mẫu cho quá trình nuôi cấy bằng các biện pháp kỹ thuật tác động chặt sát gốc và khoanh vỏ với chiều cao 1,3m.

Vật liệu nuôi cấy lấy từ cây giống có độ tuổi từ 1-2 năm tuổi

Bộ phận đưa vào nuôi cấy là chồi nách.

+ Sử lý vô trùng mẫu:

Rửa mẫu: Rửa mẫu sơ bộ bằng nước máy hoặc nước lã sạch và Rửa mẫu hoặc ngâm (1-2 phút) bằng nước xà phòng. Sau đó rửa lại mẫu bằng nước máy, cho vào bình tam giác sạch và tráng mẫu bằng nước cất 2-3 lần.

Khử trùng mẫu: Sau khi rửa mang mẫu vào box cấy và tráng lại 1-2 lần bằng nước cất vô trùng. Tiếp đó, tráng qua mẫu bằng dung dịch cồn 70^o trong 1 phút. Dùng dung dịch HgCl₂ 0,1% khử trùng trong 5-7 phút cho mẫu non và 8-10 phút cho mẫu bánh tẻ. Trong thời gian khử trùng tiến hành lắc mẫu và giữ cho mẫu chìm trong dung dịch chất khử trùng. Kết thúc khử trùng tráng sạch hóa chất khử trùng bằng nước cất vô trùng 3-5 lần.

Với kỹ thuật vô trùng vật liệu nuôi cấy trên ta có thể thu được khoảng 75% mẫu sống và sạch bệnh.

10.17.2. Giai đoạn tái sinh chồi

Sau khi callus được hình thành, cắt bỏ phần bị thâm đen (phần mẫu không tạo callus mà bị hoại), cấy vào môi trường tạo chồi:

Môi trường nuôi cấy tạo chồi: WPM + 0,25mg BAP/lít + 30g đường/lít + 5,5g agar/lít, pH 5,8-6,0

Điều kiện nuôi cấy tạo callus: Điều kiện nuôi cấy: Nhiệt độ phòng cây là 25°C (± 2), ẩm độ : 60-70%, thời gian chiếu sáng 10-12h/ngày, cường độ ánh sáng 2000 lux.

Sau 30-35 ngày chồi ngủ bắt đầu bật mầm.

Lưu ý: Bạch đàn rất thích hợp với môi trường bán lỏng

10.17.3. Giai đoạn nhân nhanh chồi

Sau khi chồi được hình thành, tiến hành lựa chọn những chồi sinh trưởng phát triển bình thường không bị dị dạng để cấy vào môi trường nhân nhanh. Môi trường nhân nhanh tốt nhất là: MS + 0,4 mg BAP/lít + 0,15 mg/lít NAA + 5.5g agar + 30g đường/lít; pH 5,8-6,0.

Điều kiện nuôi cấy tạo callus: Điều kiện nuôi cấy: Nhiệt độ phòng cây là 25°C (± 2), ẩm độ : 60-70%, thời gian chiếu sáng 10-12h/ngày, cường độ ánh sáng 2000 lux.

Sau khoảng 30 ngày nhân nhanh ta lại cấy chuyển môi trường 1 lần

10.17.4. Giai đoạn tạo cây hoàn chỉnh

Trong giai đoạn này tiến hành kích thích chồi ra rễ. Môi trường nuôi cấy ra rễ thích hợp là: 1/2 WPM + 0,2mg/lít IBA + 5g agar/lít + 15 g đường/lít; pH 5,8-6,0.

Điều kiện nuôi cấy: Điều kiện nuôi cấy: Nhiệt độ phòng cây là 25°C (± 2), ẩm độ : 60-70%, thời gian chiếu sáng 10-12h/ngày, cường độ ánh sáng 2000 lux. Sau 13 ngày nuôi cấy, 100% chồi ra rễ.

10.17.5. Giai đoạn ra ngôi.

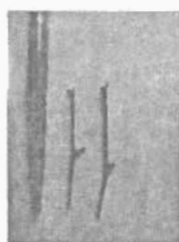
Lựa chọn cây có từ 2 -3 cặp lá thật, chiều cao 2-3 cm, có 2-3 rễ mập và trắng đưa ra ngoài ánh sáng, để dưới ánh sáng tán xạ để luyện cây. Thời

gian sử lý luyện cây khi thân chồi chuyển màu nâu-đỏ thì cấy vào giá thể là cát hoặc bầu đất, tỷ lệ sống là 85-90%.

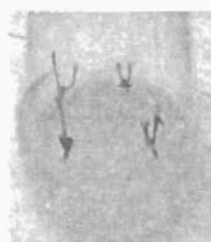
Sau giai đoạn luyện cây trong bình nuôi cấy, cây được rửa sạch và khử trùng bằng thuốc tím 1% trước 1 ngày cấy cây mạ vào bầu cát và đặt trong nhà kính. Sau đó 1 tuần cấy vào bầu đất. Sau 1-2 tháng cây cao 30-40 cm có thể đem đi trồng.



Cây đầu dòng
cung cấp
chồi vào mẫu



Chồi nách
có từ 1-2 đốt



Nhân chồi sau
25 ngày nuôi cấy



Nhân nhanh
chồi sau 13 ngày
nuôi cấy



Nhân nhanh
chồi sau 30 ngày
nuôi cấy



Ra rễ chồi sau
13 ngày nuôi cấy



Ra rễ chồi sau
13 ngày nuôi cấy



Cây con trồng
bầu đất
sau 30 ngày

Hình 10.14. Ảnh nhân giống cây Bạch Đàn bằng phương pháp nuôi cấy mô Tế Bào (Ảnh tác giả)

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Adrian Slater, Nigel W.Scott and Mark R.Fowler, *Plant Biotechnology the Genetic manipulation of plants*. Oxford University Press, 2001.
2. Đái Duy Ban, Lữ Thị Cẩm Vân, *Công nghệ gen và công nghệ sinh học ứng dụng trong nông nghiệp hiện đại*, Nxb. Nông nghiệp, 1994.
3. Lê Trần Bình, Hồ Hữu Nghị, Lê Thị Muội, *Công nghệ sinh học thực vật trong cải tiến giống cây trồng*, Nxb. Nông nghiệp, 1997.
4. Lê Trần Bình và cộng sự, *Bài giảng công nghệ tế bào thực vật*. Viện Khoa học Công nghệ sinh học Việt Nam, 2004.
5. Ngô Xuân Bình, *Giáo trình công nghệ sinh học*, Nxb. Nông nghiệp, 2002.
6. Nguyễn Trọng Lượng, Chu Hoàng Mậu, Nguyễn Thị Tâm, *Sinh học tế bào*. Nxb. Nông nghiệp Hà Nội, 2005.
7. Trần Văn Minh, *Công nghệ tế bào thực vật*, Viện Sinh học nhiệt đới - Trung tâm Khoa học Tự nhiên và Công nghệ Quốc gia, 1997.
8. National Library of Australia Cataloguing - in - Publication entry, *Plant tissue culture practice*
9. R.L.M. Pierik, *In vitro culture of higher plants*, Department of Horticulture Agricultural University Wageningen. The Netherlands, 1987.
10. S.S. Bhojwani and M.K. Razdan, *Plant tissue culture: Theory and practice*, Department of Botany. University of Delhi, India, 1983.
11. Lê Duy Thành, *Cơ sở Di truyền và chọn giống thực vật*, Nxb. Khoa học kỹ thuật.
12. Nguyễn Đức Thành, *Nuôi cấy mô tế bào thực vật - nghiên cứu và ứng dụng*, Nxb. Nông nghiệp. Hà Nội, 2000.
13. Phan Hữu Tôn, *Giáo trình Công nghệ sinh học trong chọn tạo giống cây trồng*, Nxb. Nông nghiệp, 2005.
14. Phạm Hữu Tôn, *Giáo trình công nghệ sinh học trong chọn tạo giống cây trồng*, Nxb. Nông nghiệp. Hà Nội, 2005.
15. Đỗ Năng Vịnh, *Công nghệ tế bào thực vật ứng dụng*, Nxb. Nông nghiệp. Hà Nội, 2005.
16. Vũ Văn Vụ, Nguyễn Mộng Hùng, Lê Hồng Điệp, *Công nghệ sinh học tế bào*, Nxb. Giáo Dục, 2006.
17. Vũ Văn Vụ - Nguyễn Mộng Hùng - Lê Hồng Điệp, *Giáo trình công nghệ sinh học*, Nxb. Nông Nghiệp, 2005.

TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM THÁI NGUYÊN

NGÔ XUÂN BÌNH

(Chủ biên)

NUÔI CÂY MÔ TẾ BÀO THỰC VẬT

Cơ sở lý luận và ứng dụng

NHÀ XUẤT BẢN KHOA HỌC VÀ KỸ THUẬT

70 Trần Hưng Đạo, Hà Nội

Người chịu trách nhiệm xuất bản:

TS Phạm Văn Diễm

Biên tập: Ngô Xuân Bình

Trình bày nội dung và bìa: Tuvanbooks

(Trung tâm Hợp tác xuất bản – Phát hành sách Từ Văn)

In 300 cuốn, khổ 16 x 24, tại Công ty Thương mại và In Prime
Số đăng ký kế hoạch: 209 – 2009/CXB/223 – 10/KHKT, ngày 18/03/2009
Quyết định xuất bản số 453/QĐXB – NXBKHKT, ngày 30/12/2009
In xong và nộp lưu chiểu Quý I năm 2010

NUÔI CÂY MÔ TẾ BÀO THỰC VẬT



kt) nuôi cây mô tế bào thực vật (khk



8935048901007

68,000