

Công nghệ sinh học thực vật

I. Mở đầu

Nuôi cấy mô thực vật là một trong những lĩnh vực ứng dụng đạt nhiều thành công nổi bật của công nghệ sinh học thực vật. Bằng các kỹ thuật nuôi cấy trong điều kiện vô trùng các bộ phận tách rời của cơ thể thực vật, người ta đã nhân giống *in vitro* thành công nhiều loài cây trồng có giá trị mà trước đây các phương thức nhân giống truyền thống gặp nhiều khó khăn. Bên cạnh đó, một số kỹ thuật khác cũng đã được ứng dụng có kết quả như: nuôi cấy đơn bội (1n) để tạo dòng thuần chủng phục tráng giống cây trồng, dung hợp protoplast giúp mở rộng nguồn gen tạo ra nhiều loài thực vật mang tính trạng mới hữu ích, chọn dòng biến dị soma và biến dị giao tử có khả năng chống chịu các điều kiện bất lợi của ngoại cảnh như nóng-lạnh, phèn-mặn, khô hạn, sâu-bệnh..., và cuối cùng sản xuất các cây trồng sạch bệnh virus từ những cá thể nhiễm bệnh virus.

Một trong những hướng phát triển gần đây nhất của công nghệ sinh học thực vật là biến nạp và biểu hiện các gen ngoại lai trong tế bào thực vật. Việc biến đổi di truyền ở thực vật bậc cao bằng cách đưa DNA ngoại lai vào trong các tế bào của chúng là một quá trình phức tạp. Tuy nhiên, nhờ sử dụng enzyme hạn chế để cắt phân tử DNA sợi đôi thành những đoạn nhỏ riêng rẽ phát triển kỹ thuật lai phân tử và các gen chỉ thị, thiết kế các vector biểu hiện cao và xây dựng các kỹ thuật chuyển gen hiện đại... đã cho phép chọn lọc các tế bào thực vật biến nạp có khả năng hợp nhất DNA ngoại lai. Những nghiên cứu gần đây cho thấy thông tin di truyền mới được biến nạp vào các thực vật bậc cao không chỉ biểu hiện ở mức độ tế bào và sau đó mức độ cơ thể hoàn chỉnh mà còn có thể truyền lại cho các thế hệ sau của chúng. Thành tựu nổi bật của công nghệ gen ở thực vật bậc cao là tái sinh được cây chuyển gen đầu tiên vào đầu thập niên 1980, đến nay đã thành công ở nhiều loài khác nhau. Lúc đầu người ta sử dụng các gen chỉ thị để biến nạp, nhưng nay đã thay thế bằng các gen quan trọng có giá trị kinh tế nhằm mục đích cải thiện phẩm chất cây trồng.

Bên cạnh công nghệ hóa học và dược học đang phát triển một cách nhanh chóng và hiện đại, thực vật bậc cao vẫn 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 điều kiện tự nhiên không thuận lợi, chi phí lao động ngày càng tăng, các khó khăn về kỹ thuật và kinh tế trong trồng trọt... Phương pháp nuôi cấy tế bào dịch huyền phù thực vật trong bioreactor có khả năng góp phần giải quyết những khó khăn nói trên và những thành công của công nghệ này trong những năm gần đây đã được nhiều công trình tổng kết. Hiện nay, nhiều hợp chất tự nhiên dùng làm dược phẩm hoặc phụ gia thực phẩm đã được sản xuất thành công bằng phương thức nuôi cấy tế bào trên quy mô công nghiệp cho hiệu suất rất cao. Đặc biệt, việc sản xuất các protein ngoại lai để điều trị bệnh trong hệ thống tế bào thực vật đang được chú ý do chúng an toàn cho người hơn các protein có nguồn gốc từ tế bào động vật, bởi vì các chất nhiễm bẩn và virus thực vật không phải là tác nhân gây bệnh ở người.

II. Nuôi cấy mô và nhân giống *in vitro*

1. Thuật ngữ học (terminology)

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

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

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

Nhân giống *in vitro* và nuôi cấy mô bắt đầu bằng các mảnh cắt nhỏ của thực vật, sạch vi sinh vật, và được nuôi cấy vô trùng. Thuật ngữ đầu tiên

dùng trong quá trình nhân giống là explant (mẫu vật) tương đương với các phương thức nhân giống khác là cutting (cành giâm), layer (cành chiết), scion (cành ghép) hoặc seed (hạt).

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

1.1. Nuôi cấy đỉnh phân sinh (meristem-tip culture)

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

Thành công điển hình trong phương thức này là nhân giống các cây một lá mầm như hoa lan, dứa, huệ và chuối (protocorm hoặc cụm chồi)... hoặc cây hai lá mầm như khoai tây, cà chua và cúc (kéo dài chồi)...

1.2. Sinh sản chồi nách (axillary shoot proliferation)

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

Phương thức này thường được áp dụng cho các đối tượng hai lá mầm như cúc, cà chua, thuốc lá...

1.3. Tạo chồi bất định (adventitious shoot induction)

Loại nuôi cấy cho phép hình thành các chồi bất định hoặc trực tiếp trên mẫu vật hoặc gián tiếp từ mô callus, mà mô callus này hình thành trên bề mặt vết cắt của mẫu vật. Hệ thống nuôi cấy này có những yêu cầu tương tự với nuôi cấy mô phân sinh đỉnh, nó chỉ khác về nguồn mẫu vật và nguồn

gốc bất định của các chồi mới. Một số loại mẫu vật được dùng như là đoạn thân (thuốc lá, cam, chanh, cà chua, bắp cải), mảnh lá (thuốc lá, cà chua, bắp cải, cà phê, ca cao), cuống lá (thủy tiên), các bộ phận của hoa (súp lơ, lúa mì, thuốc lá), nhánh củ (họ hành, họ lay ơn, họ thủy tiên), đoạn mầm (măng tây)...

1.4. Phát sinh cơ quan (organogenesis)

Thuật ngữ này dùng để mô tả quá trình tái sinh các chồi hoặc/và rễ bất định từ các khối tế bào callus. Quá trình này xảy ra sau thời điểm mà mẫu vật được đặt vào môi trường nuôi cấy và bắt đầu cảm ứng tạo callus. Đối với mục đích nhân giống *in vitro*, nếu tái sinh được cây hoàn chỉnh trực tiếp từ mẫu vật nuôi cấy ban đầu thì không những nhanh chóng thu được cây mà các cây cũng khá đồng nhất về mặt di truyền. Tuy nhiên, trong nhiều trường hợp mô nuôi cấy không tái sinh cây ngay mà phát triển thành khối callus. Tế bào callus khi cấy chuyển nhiều lần sẽ không ổn định về mặt di truyền. Để tránh tình trạng đó nhất thiết phải sử dụng loại callus vừa phát sinh, tức là callus sơ cấp để tái sinh cây thì hy vọng sẽ thu được cây tái sinh đồng nhất.

1.5. Phát sinh phôi vô tính (somatic embryogenesis)

Thuật ngữ này dùng cho sự phát triển của các phôi hoàn chỉnh từ các tế bào sinh dưỡng được sản xuất từ các nguồn mẫu vật khác nhau sinh trưởng trong nuôi cấy *in vitro*. Thuật ngữ tương đương đối với sự phát triển phôi ở thực vật sinh trưởng trong điều kiện tự nhiên là phát sinh phôi hữu tính (zygotic embryogenesis) và phát sinh phôi vô tính (apomitic embryogenesis). Phôi vô tính có cấu trúc tương tự phôi hữu tính của thực vật sinh trưởng trong điều kiện tự nhiên. Điểm khác nhau cơ bản giữa phôi hữu tính và phôi vô tính là phôi hữu tính luôn luôn đi kèm với nội nhũ là cơ quan dự trữ năng lượng và chất dinh dưỡng phục vụ cho quá trình nảy mầm, còn ở phôi vô tính hoàn toàn không có nội nhũ. Phương thức tạo phôi vô tính được ứng dụng rất hiệu quả trong sản xuất hạt nhân tạo (synthetic seed).

2. Nhân giống *in vitro* và các hệ thống nuôi cấy mô

Phương pháp nhân giống *in vitro* thực chất là một tiến bộ vượt bậc của các phương pháp nhân giống vô tính cổ điển như giâm cành, giâm chồi, chiết, ghép, tách dòng... Ở đây giá trị thực tiễn của các tiến bộ khoa học kỹ

thuật là đã biến những phương thức cổ điển đó thành những phương thức hoàn toàn mới về chất cho phép giải quyết những khó khăn mà phương pháp cổ điển không thể vượt qua. Ví dụ: kỹ thuật giâm cành chỉ có thể ứng dụng thành công ở một số cây trồng nhất định, vì rằng với kích thước 5-20 cm khả năng tạo rễ phụ của vùng mô tượng tầng gần vết cắt hoặc khả năng đánh thức chồi phụ vẫn bị các vùng tế bào lân cận và toàn bộ phần còn lại của đoạn giâm khống chế. Nếu tiến hành nuôi cấy mẫu mô với kích thước 5-10 mm, tức là làm giảm thể tích khối mô xuống 10^3 lần thì rõ ràng mối tương tác giữa các tế bào và các loại mô sẽ đơn giản đi rất nhiều, hiệu quả tác động của các biện pháp nuôi cấy sẽ phải cao hơn. Sau đây là một số phương thức nhân giống *in vitro*:

2.1. Tái sinh cây mới từ các cấu trúc sinh dưỡng

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

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

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

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

- Cây phát triển từ chồi đỉnh (chồi ngọn).

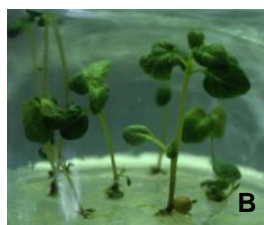
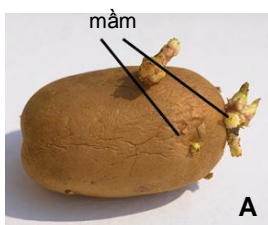
- Cây phát triển từ chồi nách phá ngủ.

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

- Phát triển cây trực tiếp

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

Mầm (đỉnh sinh trưởng) → Chồi nách → Cây (Hình 4.1)

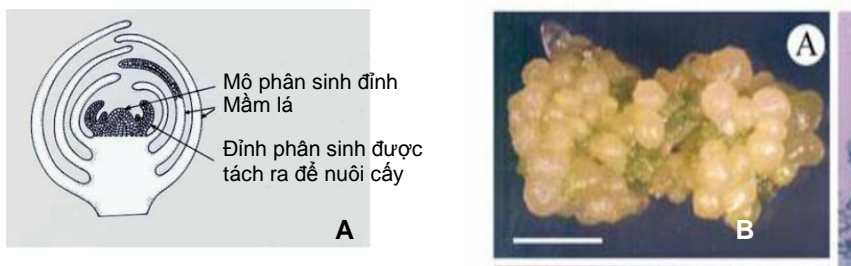


Hình 4.1. Sự phát triển cây trực tiếp. A: mầm khoai tây. B: sự kéo dài mầm khoai tây trong nuôi cấy và phát sinh chồi nách, các đoạn thân mang chồi nách sẽ được tách ra và cấy chuyển trên cùng môi trường để nhân nhanh.

- Phát triển cây thông qua giai đoạn protocorm

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

Đỉnh sinh trưởng → Protocorm → Cây (Hình 4.2)



Hình 4.2. Phát triển cây qua giai đoạn protocorm. A: đỉnh sinh trưởng. B: Protocorm hình thành từ nuôi cấy đỉnh sinh trưởng.

Các đối tượng hoa lan đã mang lại hiệu quả kinh tế đặc biệt cao. Sau những kết quả đầu tiên ở chi *Cymbidium* của Morel (1966), đến nay người ta đã thu được kết quả rất tốt ở khoảng 30 chi khác nhau của họ này. Sở dĩ nhân giống vô tính hoa lan đạt được thành công lớn và được ứng dụng rộng rãi như vậy là vì hoa lan có phương thức sinh sản qua protocorm. Nhờ có phương thức nhân giống nhanh và rẻ tiền mà hoa lan vốn đắt trở nên có giá phải chăng và được nhiều người ưa chuộng. Những thành công ở họ lan không những chỉ là bằng chứng mà còn mở đường cho việc ứng dụng kỹ thuật này đối với các loài cây khác.

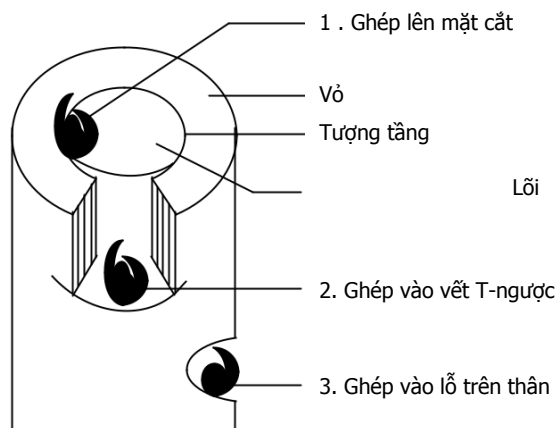
Lĩnh vực ứng dụng mới đây nhất cũng đã bắt đầu có kết quả là các cây ăn quả và cây lâm nghiệp, trong đó có các cây quý như cà phê, táo, lê, thông, bồ đề... Tổng số có trên 30 chi khác nhau đã được nuôi cấy thành công. Do các cây trồng rừng và các cây ăn quả là những cây trồng lâu năm nên mọi chi phí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

- Ghép đỉnh chồi (shoot apex grafting) hay vi ghép

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

được cây hoàn toàn sạch bệnh và mang đặc điểm di truyền của cây mẹ cho mắt ghép.

Có nhiều cách ghép khác nhau, chẳng hạn: (1) Ghép lên mặt cắt: đặt mắt ghép trực tiếp lên bề mặt lát cắt, trên vùng tượng tầng. (2) Ghép chữ T-ngược: dùng đầu nhọn của lưỡi dao cắt lỗ ghép hình chữ T-ngược, chân chữ T là mặt cắt để dễ bóc lộ vùng tượng tầng. (3) Ghép hàm ếch: khoét trên thân mầm cách mặt cắt 5 mm một vết lõm hình hàm ếch, chiều sâu vết lõm bằng chiều dày lớp vỏ. Đặt mắt ghép vào đáy hàm ếch (Hình 4.3).



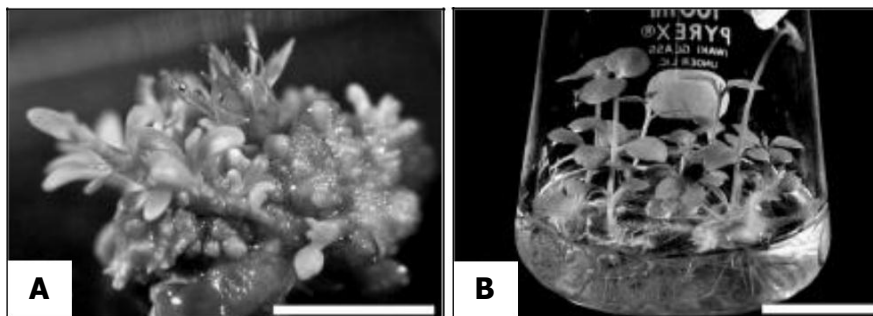
Hình 4.3. Vị trí mắt ghép trong ba kiểu vi ghép khác nhau

2.1.2. Nuôi cấy chồi bất định (adventitious shoot culture)

Hệ thống nuôi cấy này có những yêu cầu tương tự với nuôi cấy mô phân sinh đỉnh, nó chỉ khác về nguồn mẫu vật và nguồn gốc bất định của các chồi mới. Đỉnh chồi bất định mới có thể phát triển hoặc trực tiếp trên mẫu vật hoặc gián tiếp từ mô callus, mà mô callus này hình thành trên bề mặt vết cắt của mẫu vật (Hình 4.4). Một số loại mẫu vật được dùng như sau:

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

- Đoạn mầm: măng tây...



Hình 4.4. Tái sinh chồi bất định và nhân giống *in vitro* cây *Hylotelephium sieboldii*. A: Chồi bất định. B: Cây *in vitro* hoàn chỉnh.

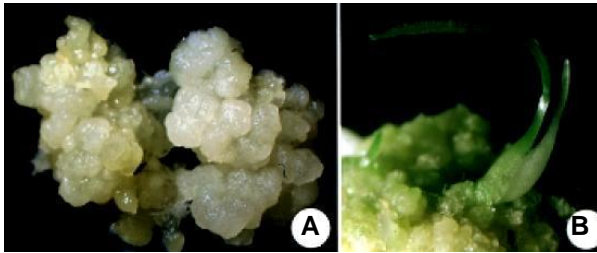
Sự phát sinh chồi bất định trực tiếp bắt đầu bằng các tế bào nhu mô (parenchyma cells) nằm ở trong biểu bì hoặc ngay phía dưới bề mặt của thân; một số tế bào này trở thành mô phân sinh và các túi nhỏ gọi là thể phân sinh (meristemoids) phát triển. Các thể phân sinh này rõ ràng có nguồn gốc từ các tế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

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

2.2. Nhân giống thông qua giai đoạn callus

Trong khuôn khổ của mục đích nhân giống *in vitro* nếu tái sinh được cây hoàn chỉnh trực tiếp từ mẫu vật nuôi cấy ban đầu thì không những nhanh chóng thu được cây mà các cây cũng khá đồng nhất về mặt di truyền.

Tuy nhiên, trong nhiều trường hợp mô nuôi cấy không tái sinh cây ngay mà phát triển thành khối callus (Hình 4.5).



Hình 4.5. Callus (A) và tái sinh chồi từ callus (B) của chi *Lilium*

Tế bào callus khi cấy chuyển nhiều lần sẽ không ổn định về mặt di truyền. Để tránh tình trạng đó nhất thiết phải sử dụng loại callus vừa phát sinh, tức là callus sơ cấp để tái sinh cây thì hy vọng sẽ thu được cây tái sinh đồng nhất. Thông qua giai đoạn callus còn có thể thu được những cá thể sạch virus như trường hợp của Kehr và Sehafter (1976) thu được ở tỏi.

2.3. Nhân giống thông qua phát sinh phôi vô tính-công nghệ hạt nhân tạo

2.3.1. Phôi vô tính

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

Phôi vô tính là các cá thể nhân giống (propagules) có cực tính bất nguồn từ các tế bào soma (Hình 4.6 và 4.7). Chúng rất giống phôi hữu tính (zygotic embryo) ở hình thái, quá trình phát triển và sinh lý, nhưng do không phải là sản phẩm của sự thụ tinh giữa giao tử đực và giao tử cái, và vì vậy không có quá trình tái tổ hợp di truyền (genetic recombination), các

phôi vô tính có nội dung di truyền giống hệt với các tế bào soma đã sinh ra chúng.

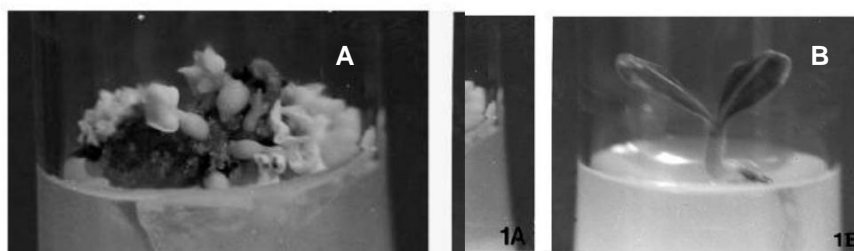
Ở trường hợp phôi hữu tính, sự kết hợp giao tử đực và cái cho ra hợp tử (zygote). Hợp tử phân chia nhiều lần tạo nên phôi hữu tính có cấu trúc hai cực: rễ và ngọn. Khi hợp tử phát triển, miền sinh trưởng rễ và miền sinh trưởng ngọn cùng phát triển và cuối cùng tạo thành cây hoàn chỉnh, qua các giai đoạn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

- Trường hợp cây hai lá mầm:

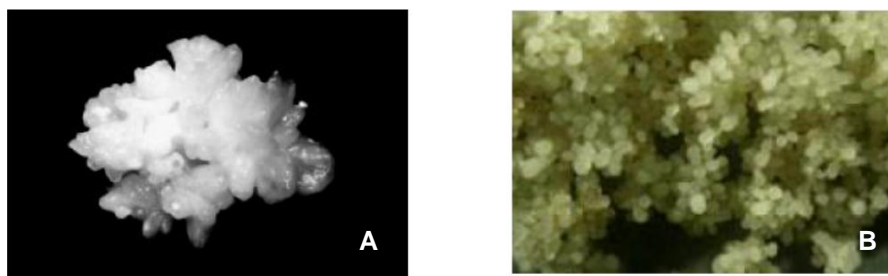
Dạng cầu → dạng thủy lồi → dạng có lá mầm

- Trường hợp cây một lá mầm:

Dạng cầu → dạng scutellar → dạng diệp tiêu



Hình 4.6. Các phôi vô tính (A) và cây mầm phát sinh từ phôi vô tính (B)



Hình 4.7. Phôi vô tính của chuối (A) và nuôi cấy phát triển phôi vô tính (B)

Bảng 4.1. Một số cây trồng có giá trị kinh tế được nhân giống bằng phương thức phát sinh phôi vô tính *in vitro*

Stt	Tên khoa học	Tác giả
1	<i>Citrus</i>	Stevenson (1966), Rangan <i>et al.</i> (1968), Jumin <i>et al.</i> (1996)
2	<i>Theobroma cacao</i>	Litz (1986), Alemanno <i>et al.</i> (1996)
3	<i>Coffea arabica</i>	Sondahl and Sharp (1977), Boxtel <i>et al.</i> (1996)
4	<i>Coffea canephora</i>	Berthouly <i>et al.</i> (1996), Boxtel <i>et al.</i> (1996)
5	<i>Hevea brasiliensis</i>	Carron and Enjalsic (1985)
6	<i>C. cogiensis</i> × <i>C. canephora</i>	Boxtel <i>et al.</i> (1996)
7	<i>Eugenia</i>	Litz (1984)
8	<i>Camellia sinensis</i>	Ponsamuel <i>et al.</i> (1996)
9	<i>Medicago suffruticosa</i>	Li <i>et al.</i> (1996)
10	<i>Saccharum officinarum</i>	Aftab <i>et al.</i> (1996)
11	<i>Docynia indica</i>	Litz (1985)
12	<i>Malus domestica</i>	Eichholtz (1979)
13	<i>Picea sitchensis</i>	Moorhouse <i>et al.</i> (1996)
14	<i>Mangifera indica</i>	Litz (1982), Pliego-Alfaro <i>et al.</i> (1996)

Ở rất nhiều cây, người ta nhận thấy các tế bào đang phân chia vô tổ chức đã tạo nên callus khi nuôi cấy. Có thể thay đổi hướng phát triển của chúng để tạo ra các phôi vô tính với các bước phát sinh hình thái rất giống với trường hợp phôi hữu tính. Điểm khác nhau cơ bản giữa phôi hữu tính và phôi vô tính là phôi hữu tính luôn luôn đi kèm với nội nhũ là cơ quan dự trữ năng lượng và chất dinh dưỡng phục vụ cho quá trình nảy mầm, còn ở phôi

vô tính hoàn toàn không có nội nhũ. Sự khác nhau này không chỉ đáng chú ý về mặt khoa học mà còn là một yếu tố rất quan trọng trong công nghệ phi vô tính.

Khả năng tạo phi vô tính trong nuôi cấy mô thực vật, ngoài các điều kiện vật lý, hóa học thuận lợi cho sự tạo phi, còn phụ thuộc rất lớn vào loài, vào các giống (cultivars), dòng (strains) trong cùng một loài. Khả năng này được chứng minh là do một hoặc một vài gen phụ trách. Vì vậy, bằng biện pháp lai tạo có thể chuyển khả năng tạo phi vô tính cao từ cây này qua cây khác.

2.3.2. Công nghệ hạt nhân tạo

Hạt nhân tạo (artificial seed hoặc synthetic seed) là phi vô tính bọc trong một lớp vỏ polymer như agar, agarose, alginate... Trong cấu trúc lưới của các lớp vỏ đó, nước, chất dinh dưỡng và chất sinh trưởng được cung cấp thay cho nội nhũ, giúp cho phi vô tính có thể nảy mầm trở thành cây hoàn chỉnh (Hình 4.8).



Hình 4.8. Hạt nhân tạo của giống táo M.26

Trong [redacted] các hạt nhân tạo thông qua phi vô tính từ nuôi cấy dịch lỏng, thì nội phản ứng sinh học (bioreactor) là thiết bị không thể thay thế được.

Do phi 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. Hạt nhân tạo gồm có ba phần:

- Phi vô tính

- Vỏ bọc polymer (alginate)
- Màng ngoài (calcium alginate)

Có nhiều loại polymer tự nhiên đã được thử nghiệm dùng cho công nghệ phi 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 hình thành các viên alginate.

2.3.3. Nhân giống trong các nồi phản ứng sinh học

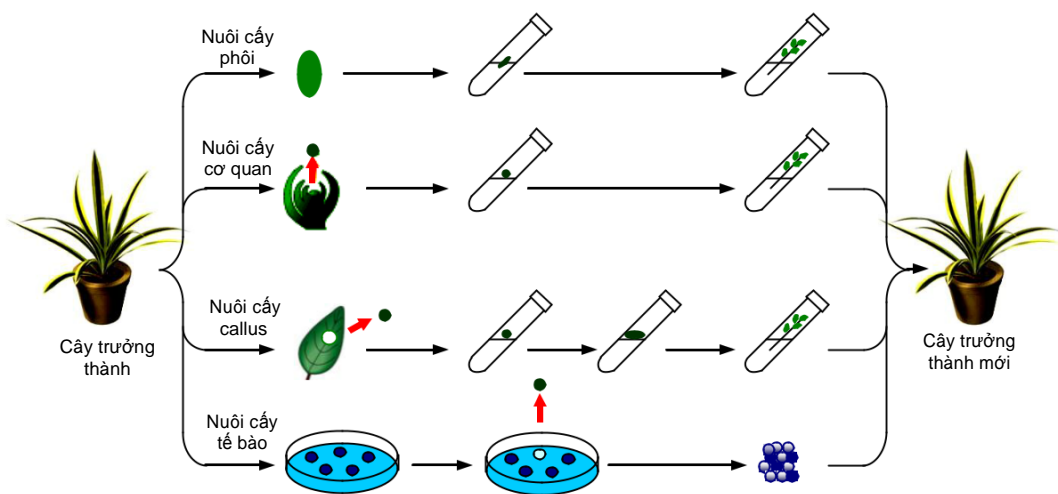
Trước đây, các nồi phản ứng sinh học hay còn gọi là bình lên men (fermenter) chủ yếu được dùng cho công nghệ vi sinh. Trên cơ sở các thiết bị đó, với một số cải tiến, nhiều tác giả đã nhân giống thành công nhiều loại phi vô tính và các thể chồi, cụm chồi hoặc củ nhỏ.

Phi vô tính cà phê được sản xuất thành công ở Brasil trên các nồi phản ứng sinh học dung tích từ 2-4 lít. Nồi vận hành theo các nguyên tắc của một bình lên men (có thể không dùng cánh khuấy mà chỉ dùng bọt khí để thực hiện việc sục khí và truyền nhiệt). Mỗi mẻ có thể thu được 4-5 triệu phi vô tính cà phê. Ở Indonesia, cụm chồi dừa được đưa vào sản xuất thành công với bình lên men 10 lít. Điểm đáng chú ý trong công nghệ này là thay vì bơm khí vào nồi phản ứng, dịch lỏng nuôi cấy (môi trường mới) được bơm vào nồi và hút ra (môi trường cũ) theo chu kỳ ngắn, nhờ vậy mô và tế bào thực vật có đủ oxy và chất dinh dưỡng để phát triển mạnh. Phương thức nuôi cấy này được gọi là nuôi cấy thể ổn định hóa tính (chemostat culture).

Củ siêu bi (microtuber) được thị trường quốc tế công nhận là dạng khoai tây giống của thế kỷ 21. Củ khoai tây siêu bi có kích thước bằng hoặc nhỏ hơn hạt ngô, hoàn toàn sạch bệnh virus được công ty Microtuber Inc. (Mỹ) sản xuất trong các nồi phản ứng là các đoạn thân khoai tây nhân giống

bằng nuôi cấy mô theo phương pháp kinh điển. Trong nồi phản ứng, các đoạn thân được kích thích ra rễ và tạo củ nhỏ. Hiện nay, Microtuber Inc. có thị trường ở Bắc Mỹ và Hà Lan. Nồi phản ứng ở hãng Microtuber Inc. là các ống nhựa kín chịu nhiệt, đường kính 15 cm, dài 50 cm, quá trình tạo củ hoàn toàn không cần chiếu sáng.

Hình 4.9 mô tả các phương thức phổ biến để phát triển cây hoàn chỉnh trong nhân giống *in vitro*.



Hình 4.9. Các phương thức tạo cây hoàn chỉnh *in vitro*

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

Quy trình nhân giống vô tính *in vitro* được thực hiện theo ba (hoặc bốn) giai đoạn tùy theo cách phân chia của từng tác giả:

- Cây gậy
- Nhân nhanh
- Chuẩn bị và đưa ra ngoài đất

3.1. Giai đoạn I-cây gậy

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

- Tỷ lệ nhiễm thấp

- Tỷ lệ sống cao
- Tốc độ sinh trưởng nhanh

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

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

Một số dạng môi trường dinh dưỡng phổ biến:

- Muối khoáng: Theo White (1943), Heller (1953), Murashige và Skoog (1962) (Bảng 4.2).

- Chất hữu cơ:

+ Đường saccharose 1-6 %.

+ Vitamin: B1, B6, *myo*-inositol, nicotinic acid.

+ Amino acid: Arg, Asp, Asp-NH₂, Glu, Glu-NH₂, Tyr.

+ Phytohormone:

- Nhóm auxin: IAA, IBA, NAA, 2,4-D...
- Nhóm cytokinin: BAP, kinetin, 2-iP, zeatin...
- Nhóm gibberellin: GA₃.

Tùy theo từng loài, từng bộ phận nuôi cấy và từng mục đích nuôi cấy mà bổ sung các hàm lượng và thành phần phytohormone khác nhau.

3.2. Giai đoạn II-nhân nhanh

Ở giai đoạn này người ta mới kích thích tạo cơ quan phụ hoặc các cấu trúc khác mà từ đó cây hoàn chỉnh có thể phát sinh. Những khả năng tạo cây đó là:

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

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

Bảng 4.2. Thành phần môi trường Murashige và Skoog (1962)

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

- Bổ sung tổ hợp phytohormone mới (tăng cytokinin giảm auxin). Tăng tỷ lệ auxin/cytokinin sẽ kích thích mô nuôi cấy tạo rễ và ngược lại sẽ kích thích phát sinh chồi.

- Tăng cường thời gian chiếu sáng 16 giờ/ngày, tối thiểu 1.000 lux. Trong thực tế nghiên cứu, người ta nhận thấy khó tách biệt ảnh hưởng của chu kỳ chiếu sáng khỏi ảnh hưởng của cường độ chiếu sáng. Ánh sáng tím là thành phần quan trọng kích thích phân hóa mạnh. Ánh sáng đỏ có ảnh hưởng giống cytokinin (cytokinin-like effect), nó tạo nên sự tích lũy cytokinin trong mô của một số loài, chính lượng cytokinin này đã góp phần

kích thích quá trình phát sinh cơ quan và tạo chồi từ những mô nuôi cấy *in vitro*.

- Bảo đảm chế độ nhiệt độ trong khoảng 20-30°C. Trường hợp những loài có nguồn gốc nhiệt đới, nhiệt độ nuôi cấy thích hợp vào khoảng từ 32-35°C. Ngược lại, đối với những loài hoa ở vùng ôn đới nhiệt độ thích hợp cho quá trình tạo cụm chồi phải <30°C.

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

3.3. Giai đoạn III-chuẩn bị và đưa ra ngoài đất

Đây là giai đoạn quan trọng bao gồm việc tạo rễ, huấn luyện thích nghi với thay đổi nhiệt độ, độ ẩm, sự mất nước, sâu bệnh và chuyển từ trạng thái dị dưỡng sang tự dưỡng hoàn toàn. Giai đoạn này thường bị bỏ qua một cách thiếu căn cứ.

Các nghiên cứu về cấu trúc của lá khoai tây nuôi cấy *in vitro* và so sánh với lá cây khoai tây trồng bên ngoài cho thấy chúng rất khác nhau. Điều đó chứng tỏ phải tiến hành thích nghi dần dần cây nhân giống *in vitro* với điều kiện tự nhiên. Quá trình thích nghi ở đây phải được hiểu là quá trình thay đổi những đặc điểm sinh lý và giải phẫu của bản thân cây non đó. Thời gian tối thiểu cho sự thích nghi là 2-3 tuần, trong thời gian này cây phải được chăm sóc và bảo vệ trước những yếu tố bất lợi sau:

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

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

Trong chăn nuôi, việc sử dụng giống vật nuôi mang ưu thế lai ở thế hệ F₁ đã trở thành biện pháp tăng năng suất quan trọng bậc nhất.

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

Sử dụng ưu thế lai không những làm tăng năng suất từ 20-40%, mà giống lai còn có đặc điểm là rất đồng đều so với giống bố mẹ. Tính đồng đều của giống là tiền đề quan trọng cho sản xuất theo phương thức công nghiệp. Ở súp-lơ chẳng hạn, phương thức sản xuất công nghiệp đòi hỏi phải thu hoạch toàn bộ diện tích bằng cơ giới vào một thời điểm. Điều này chỉ được thực hiện khi sử dụng giống ưu thế lai F_1 . Nếu dùng giống thuần chủng theo phương thức tự phối thì không đảm bảo, vì ở các giống rau họ cải (Brassicaceae) thường xuất hiện hiện tượng bất tự thụ. Vì vậy, phương pháp nhân giống và bảo quản giống trong ống nghiệm đối với một số giống rau và giống hoa có một ý nghĩa kinh tế cao.

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

5. Nhân giống *in vitro* và các đặc điểm không di truyền

Bên cạnh những đặc điểm di truyền ở thực vật người ta còn phát hiện được hàng loạt đặc điểm (hình thái và sinh lý) không di truyền, đó là các đặc điểm epigenetic. Quá trình nhân giống *in vitro* có ảnh hưởng tới các đặc điểm không di truyền này.

5.1. Hiện tượng các đặc điểm epigenetic được lưu lại

Nghiên cứu nhân giống vô tính về cây *Phyllanthus amarys* (cây chó đẻ) cho thấy:

Phyllanthus là một loại cây cỏ có thân thẳng đứng và cành ngang giống lá kép nhưng lại ở nách lá và có hoa cho nên vẫn tạm coi như cành ngang. Lá ở thân đứng xếp theo kiểu xoắn ốc, nhưng ở cành ngang là tương đối so le.

Ở nách lá có cành ngang, chồi nách phát triển mạnh thành cành thẳng đứng như thân. Nếu cắt cành ngang để ươm thì sẽ thu được cành ngang dài hàng mét. Cành ngang phát triển vô hạn theo một chương trình “ngang” định trước. Nếu ươm cành thẳng thì sẽ thu được cây thẳng đứng. Như vậy, mô phân sinh của cành khác mô phân sinh của thân và khi nhân giống vô tính các bộ phận khác nhau sẽ thu được các dạng cây khác nhau. Ở đây mô

phân sinh đỉnh điều khiển mô phân sinh cành phát triển theo hướng ngang. Nếu cắt bỏ mô phân sinh đỉnh sớm thì cành ngang sẽ phát triển thành cành đứng.

Tế bào sinh trưởng đỉnh (organisor) điều khiển sự hoạt động của các tế bào khác (tương tự như ở động vật). Hiện tượng điều khiển hướng phát triển này có một ý nghĩa thực tiễn rất lớn.

Các cây cà phê và ca cao cùng có đặc điểm xếp cành tương tự như vậy, do đó khi tiến hành nhân giống vô tính các loài cây này phải chú ý đến hiện tượng điều khiển hướng phát triển như ở *Phyllanthus*.

5.2. Hiện tượng các đặc điểm epigenetic không lưu lại

Nhân giống vô tính *in vitro* giống dưa Cayen không gai thông qua phân chia protocorm người ta thu được một tỷ lệ đáng kể các cá thể có gai.

Bình thường trong kỹ thuật trồng dưa người ta sử dụng hom dưa có kích thước khá lớn 15-30 cm. Đặc điểm không gai đã được chương trình hóa trong các đợt có kích thước lớn như vậy và vườn dưa trồng như vậy đều không có gai. Vì sao khi tách đỉnh sinh trưởng và nuôi cấy thành protocorm và cây dưa non thì gai lại xuất hiện.

Có thể ở giai đoạn sinh lý sớm của protocorm và quá trình nuôi cấy đỉnh sinh trưởng phân lập, mô phân sinh của những cây dưa non tương lai đã được giải phóng một phần khỏi ảnh hưởng của tổ chức điều khiển và vì thế chúng phát triển tự do theo đặc điểm có gai của thể hệ xa xưa. Hiện tượng tương tự chúng ta cũng bắt gặp ở trường hợp cây cam không gai. Khi gieo hạt hoặc nuôi cấy phôi vô tính từ mô phôi tâm sẽ thu được những cá thể có gai.

Hiện nay, vấn đề này đang được quan tâm vì một số đặc tính chống chịu như chịu mặn, chịu bệnh, chịu lạnh vẫn thường là những đặc tính epigenetic và liệu thông qua nhân giống *in vitro* các đặc tính đó có còn được giữ lại hay không.

III. Các kỹ thuật chuyển gen ở thực vật

Chuyển gen là kỹ thuật sử dụng DNA tinh khiết để đưa vào cơ thể hay tế bào khác và theo dõi biểu hiện của thông tin di truyền mới này. Để chuyển gen vào tế bào vật chủ một cách hiệu quả, các cấu trúc di truyền cần

được thiết kế thích hợp cho sự hợp nhất và biểu hiện của các gen ngoại lai. Cấu trúc di truyền phải mang một gen chỉ thị chọn lọc (selectable marker gene: gen mã hóa một protein khử độc của hóa chất bổ sung trong môi trường nuôi cấy, cho phép sinh trưởng ưu tiên của các tế bào có DNA ngoại lai được hợp nhất) hoặc sàng lọc (screenable marker gene: gen mã hóa một protein cho kết quả trong sản phẩm sống sót nhờ đó có thể xác định tế bào biến nạp thể hiện gen) để nhận biết hiệu quả chuyển gen.

Một cấu trúc di truyền cơ bản bao gồm: trình tự khởi động (promoter), gen mã hóa (reporter gene) và trình tự kết thúc (terminator). Các gen mã hóa có thể được đưa vào mô thực vật nhờ vào các plasmid vector. Hai promoter chủ yếu thường được sử dụng cho biến nạp gen ở thực vật là: promoter CaMV 35S (cauliflower mosaic virus) thích hợp cho sự biểu hiện của DNA ngoại lai ở cây hai lá mầm và promoter ubiquitin của ngô thích hợp cho sự biểu hiện mạnh của DNA ngoại lai ở cây một lá mầm.

Các mẫu vật (các bộ phận của cây hoặc mô) thích hợp nhất cho chuyển gen là những mẫu vật đòi hỏi thời gian nuôi cấy trước và sau khi chuyển gen ngắn nhất. Nhiều nghiên cứu cho thấy thời gian kéo dài của mô nuôi cấy thường tạo ra các đột biến di truyền làm mất khả năng tái sinh của các cây được chuyển gen. Các mẫu vật được sử dụng trong chuyển gen thường là: protoplast, phôi non hoặc callus có nguồn gốc từ hạt (lúa mì), các mô nuôi cấy phát sinh chồi, trụ phôi (có nguồn gốc từ các hạt non hoặc hạt già), và mô phân sinh ở cây hai lá mầm (legumes, bông...). Trong một số trường hợp, (embryogenic culture) cũng có thể thực hiện được, chẳng hạn ở các loài tùng bách, các loài cây ăn quả và một số loài khác.

Các phương pháp chuyển gen có thể bị hoặc không bị giới hạn bởi các genotype khác nhau của thực vật. Tùy thuộc vào mục đích ứng dụng, có thể thiết kế các phương thức chuyển nạp thích hợp cho từng genotype. Trong những nghiên cứu cơ bản, người ta thường tập trung tìm hiểu về cấu trúc và chức năng của các gen chuyển nạp, khảo sát các promoter và các cơ chế phân tử ở thực vật để có thể chuyển gen thành công vào các loài khác nhau. Các thí nghiệm chuyển gen đầu tiên đã sử dụng *Agrobacterium tumefaciens* để đưa vào cây thuốc lá các gen kháng kháng sinh. *Agrobacterium* là vật truyền hữu hiệu để đưa các DNA ngoại lai vào trong các loài thuộc họ cà

(Solanaceae), nhưng ở một số cây trồng khác quan trọng hơn việc sử dụng nó còn gặp nhiều hạn chế. Trở ngại lớn nhất là tính đặc trưng vật chủ của *Agrobacterium*, mặc dù những tiến bộ gần đây đã cho phép ứng dụng thành công trên một số giống cây trồng. Sự phát triển của các phương pháp tái sinh cây hoàn chỉnh từ callus và protoplast đã mở ra một hướng mới cho công nghệ di truyền thực vật thông qua các phương pháp chuyển gen trực tiếp. Nhờ sự phát triển của phương pháp bắn gen-dựa trên cơ sở tăng gia tốc của các hạt kim loại nặng mang nguyên liệu di truyền vào trong mô thực vật-việc chuyển gen ở các loài cây trồng đã gặp nhiều thuận lợi hơn. Các phương pháp chuyển nạp khác cũng có hiệu quả đối với từng trường hợp đặc biệt, nhưng khả năng ứng dụng rộng rãi của chúng bị hạn chế. Chẳng hạn, phương pháp chuyển gen vào tế bào bằng xung điện (electroporation), phương pháp xử lý hóa học bằng PEG (polyethylene glycol), phương pháp vi tiêm (microinjection) đưa DNA ngoại lai trực tiếp vào tế bào, phương pháp dùng silicon carbide lác với tế bào có tác dụng như các mũi kim nhỏ giúp DNA bên ngoài xâm nhập vào bên trong tế bào, phương pháp siêu âm, phương pháp chuyển gen qua ống phấn...

Mặc dù hiện nay việc chuyển gen đã được tiến hành ở nhiều loài nhưng vẫn còn gặp nhiều khó khăn. Hai nhân tố then chốt thúc đẩy sự phát triển của công nghệ gen ở thực vật bậc cao là: các phương pháp tái sinh cây hoàn chỉnh từ những tế bào chuyển nạp và các phương pháp đưa DNA ngoại lai vào các loài thực vật khác nhau. Muốn chuyển một gen thành công cần phải chứng minh hiệu quả của phương pháp chuyển nạp, nhưng đôi khi các loài được nghiên cứu hoặc không thể tái sinh được cây từ các mô không phân hóa, hoặc có thể tái sinh nhưng sau đó khó phát triển thành cây hoàn chỉnh. Do đó, hai nhân tố nói trên thường được nghiên cứu phát triển song song. Có nhiều phương pháp chuyển gen khác nhau ở thực vật, nhưng ở đây chỉ trình bày một vài phương pháp chủ yếu:

1. Chuyển gen gián tiếp thông qua *Agrobacterium*

1.1. Vi khuẩn *Agrobacterium*

Agrobacterium tumefaciens và *Agrobacterium rhizogenes* là hai loài vi khuẩn gây bệnh cho thực vật được sử dụng như các vector tự nhiên để mang các gen ngoại lai vào mô và tế bào thực vật. *A. tumefaciens* có chứa

một plasmid lớn kích thước khoảng 200 kb gọi là Ti-plasmid (tumor inducing plasmid) chính là tác nhân gây bệnh cho cây. Khi cây bị nhiễm *A. tumefaciens* qua các vết thương, biểu hiện bệnh rõ nhất là các khối u được hình thành ở ngay chỗ lây nhiễm. Sự hình thành khối u sau đó có thể tiếp tục mà không cần thiết phải có sự hiện diện của vi khuẩn. Khả năng này có được do *A. tumefaciens* đã chuyển một đoạn DNA của Ti-plasmid (T-DNA) xâm nhập vào hệ gen của cây bị bệnh.

1.2. Ti-plasmid

Trong thế giới động-thực vật đều tồn tại các thể plasmid, đó là các vòng DNA tự sinh sản độc lập. Ở vi khuẩn và động-thực vật, plasmid liên quan tới yếu tố giới tính của tế bào, đến khả năng chống chịu các loại kháng sinh... Đặc điểm quan trọng của plasmid là chúng có thể liên kết vào nhiễm sắc thể nhưng cũng có thể tồn tại bên ngoài nhiễm sắc thể một cách độc lập.

Các plasmid của *Agrobacterium* được sử dụng vào công nghệ gen thực vật ở hai dạng vector *cis* và *trans*. Đây là hai dạng vector rất thuận lợi để tái tổ hợp gen ngoại lai và chuyển vào tế bào thực vật. Dạng *cis* chỉ sử dụng Ti-plasmid và tế bào vật chủ là *Agrobacterium tumefaciens* mà không có sự tham gia của các plasmid và vi khuẩn khác. Vùng T-DNA của Ti-plasmid được thiết kế lại để gắn những gen ngoại lai mong muốn, các phần còn lại của Ti-plasmid vẫn được giữ nguyên. *Agrobacterium tumefaciens* được dùng làm tế bào vật chủ để nhân lên nhiều bản sao của Ti-plasmid và chuyển gen. Dạng *trans* hay *binary* là dạng sử dụng hai hay nhiều loại plasmid và vi khuẩn cùng lúc, ví dụ: vi khuẩn *E. coli* và *Agrobacterium*, plasmid trong trường hợp này thích ứng với cả *E. coli* và *Agrobacterium*. Trước tiên, plasmid của *E. coli* chứa đoạn T-DNA được giới hạn bởi bờ phải (right border-RB) và bờ trái (left border-LB) mang gen ngoại lai được thiết kế và nhân lên trong vi khuẩn *E. coli*. Tiếp đến plasmid mang gen ngoại lai được chuyển nạp vào vi khuẩn *Agrobacterium* nhờ một helper plasmid thực hiện sự tiếp hợp thông qua quá trình giao phối bộ ba (triparental mating). Vi khuẩn *Agrobacterium* đã mang sẵn một loại plasmid khác chứa vùng *vir* (virulence region) có chức năng quan trọng trong quá trình chuyển gen ngoại lai. Sự tồn tại song song hai plasmid này đã tương tác lẫn nhau trong việc chuyển gen vào tế bào thực vật. Như vậy, gen ngoại lai và vùng DNA

giúp quá trình chuyển gen (vùng *vir*) không nằm trên cùng một plasmid nên hệ chuyển gen này được gọi là hệ *trans*.

1.3. Vùng T-DNA

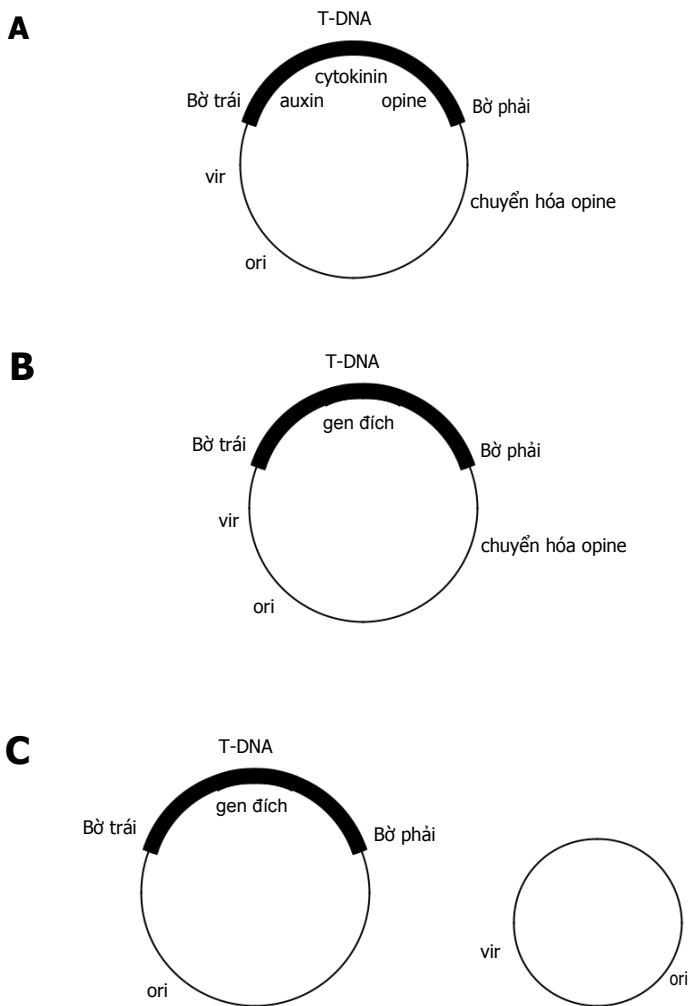
Vùng TDNA được nghiên cứu rất kỹ. Đó là một đoạn DNA có kích thước 25kb trong đó chứa gen mã hóa cho sinh tổng hợp auxin, cytokinin, opine là các gen gây khối u (oncogenes). Trong Ti plasmid vị trí của T-DNA được giới hạn bằng RB và LB. Ngoài T-DNA trên Ti plasmid còn có các vùng DNA mã hóa cho việc tái sinh plasmid (replication), cho khả năng lây nhiễm và tiếp hợp (vùng *vir*), cho việc tiêu hóa opine (opine catabolism) (Hình 4.10).

Trong các vùng DNA của Ti plasmid ngoài T-DNA được nghiên cứu nhiều hơn cả là vùng DNA phụ trách khả năng lây nhiễm còn gọi là vùng *vir*. Sản phẩm hoạt động của các gen nằm trong vùng *vir* dưới tác động kích thích của các hợp chất phenol tiết ra từ vết thương là một loạt các protein đặc hiệu như *virE2*, *virB*, *virD*, *virD2*, *virC1*...

vết thương ở các cây chủ thích hợp (hầu hết là cây hai lá mầm), kích thích sản sinh ra các đoạn T-DNA, bao bọc che chở các đoạn DNA này và giúp chúng tiếp cận với hệ gen của cây chủ một cách an toàn.

Khi cây nhiễm *A. tumefaciens*, do T-DNA nạp vào trong hệ gen của cây chủ bắt đầu hoạt động và sản sinh ra auxin, cytokinin và opine, toàn bộ sinh trưởng của cây bị rối loạn, các tế bào phân chia vô tổ chức và tạo ra các khối u. Opine được vi khuẩn sử dụng như một loại “thức ăn” nhờ gen chuyển hóa opine trên Ti plasmid. Cơ chế lây nhiễm của *A. rhizogenes* đối với cây hai lá mầm cũng tương tự nhưng trong vùng T-DNA của *A. rhizogenes* chỉ có gen sản sinh ra auxin, vì thế sự thay đổi hình thái chính của thực vật là chúng tạo ra rất nhiều rễ tơ (hairy roots) khi bị nhiễm bệnh.

Trên thực tế bệnh cây, *Agrobacterium* chỉ gây hại ở cây hai lá mầm, vì T-DNA vào hệ gen các cây hai lá mầm. Gần đây, nhiều tác giả đã chứng minh khi nhiễm vi khuẩn, các cây một lá mầm cũng có thể sản xuất opine và có thể khai thác khả năng biến nạp gen của *Agrobacterium* vào cây một lá mầm.



Hình 4.10. Bản đồ của các dạng Ti-plasmid. A: dạng tự nhiên ban đầu, B: dạng *cis*, C: dạng *trans*.

1.4. Chuyển DNA ngoại lai vào tế bào và mô thực vật nhờ *Agrobacterium tumefaciens*

Cơ chế gây bệnh của các *Agrobacterium* là sau khi xâm nhiễm vào tế bào, - nguyên của tế bào thực vật, dẫn đến sự rối loạn các chất sinh trưởng nội sinh, tạo ra khối u (trường hợp A.

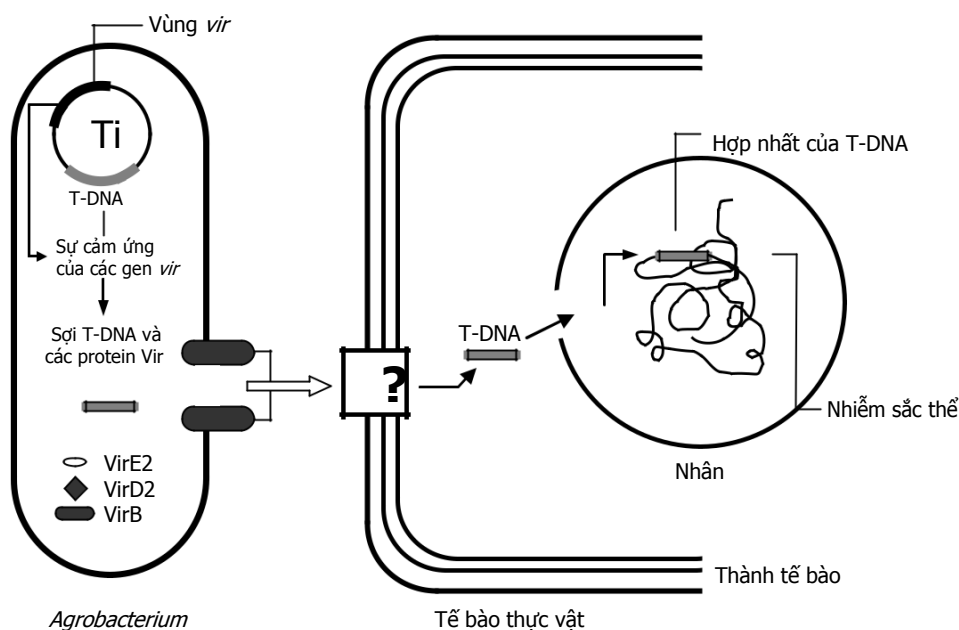
tumefaciens) hoặc rễ tơ (trường hợp *A. rhizogenes*). Khả năng chuyển gen này đã được khai thác để chuyển gen ngoại lai vào bộ máy di truyền của tế bào thực vật theo ý muốn.

Để gắn T-DNA vào tế bào thực vật, đầu tiên vi khuẩn *A. tumefaciens* phải tiếp xúc với thành tế bào thực vật bị tổn thương. Quá trình này được thực hiện nhờ các gen *chvA* và *chvB*. Gen *chvB* mã hóa một protein liên quan đến hình thành β -1,2 glucan mạch vòng, trong khi đó gen *chvA* xác định một protein vận chuyển, định vị ở màng trong của tế bào vi khuẩn. Protein vận chuyển giúp vận chuyển β -1,2 glucan vào khoảng giữa thành tế bào và màng sinh chất. β -1,2 glucan giữ vai trò quan trọng để vi khuẩn *Agrobacterium* tiếp xúc với thành tế bào thực vật. Nếu không có sự tiếp xúc này, sẽ không có sự dẫn truyền T-DNA.

Các sản phẩm protein của vùng *vir* có tác dụng cho việc dẫn truyền T-DNA từ vi khuẩn vào tế bào thực vật. Các loại protein đó rất cần thiết cho quá trình cắt T-DNA khỏi Ti-plasmid, cảm ứng thay đổi màng tế bào thực vật mà chúng tiếp xúc, tham gia di chuyển phần T-DNA qua màng vi khuẩn tới tế bào chất của tế bào thực vật, vận chuyển tới nhân rồi cuối cùng xâm nhập vào genome của cây chủ.

Thực chất chỉ riêng T-DNA của Ti-plasmid được chuyển vào genome tế bào thực vật, mà không còn phần nào khác. Quá trình dẫn truyền chỉ do sản phẩm của các gen *vir* (vùng *vir*) và gen *chv* quyết định mà không liên quan đến các gen khác trên T-DNA. Tuy nhiên, chuỗi DNA 25 bp (RB và LB của T-DNA) có vai trò là vị trí cảm ứng cho các sản phẩm của tổ hợp các gen vùng *vir*, đặc biệt là protein từ gen *virE* mang chúng dẫn truyền vào tế bào thực vật. Chúng hoạt động như các tín hiệu nhận biết và khởi động quá trình dẫn truyền. Trước hết gen *virA* trong tổ hợp gen vùng *vir* được phosphoryl hóa nhờ tác động của các hợp chất phenol như acetosyringone giải phóng ra từ các tế bào thực vật tổn thương. Sản phẩm của quá trình này lại tiếp tục phosphoryl hóa gen *virG*. Sản phẩm của gen *virG* liên tiếp làm hoạt hóa toàn bộ các gen *vir* còn lại, mà hai gen cuối cùng được hoạt hóa là gen *virB* và *virE*. Trước đó, khi gen *virD* được hoạt hóa, sản phẩm của nó cảm ứng nhận biết RB và LB của T-DNA và làm đứt phần T-DNA ra khỏi DNA của Ti-plasmid thành các sợi đơn. Đồng thời quá trình phosphoryl hóa này cũng làm thay đổi thẩm xuất màng tế bào thực vật, màng tế bào bị mềm ra và bị thủng. Các sợi đơn T-DNA được gắn vào protein do gen *virE* tổng

hợp và dịch chuyển về phía màng tế bào vi khuẩn. Ngay sau đó, sợi T-DNA được trượt từ vi khuẩn vào tế bào thực vật. Cầu nối chính là sự tiếp hợp (conjugation) giữa hai tế bào do cảm ứng sản phẩm gen *virB* mà thành. Khi T-DNA đã được chuyển giao vào tế bào thực vật, chúng nhanh chóng hợp nhất (integration) trong genome tế bào thực vật được ổn định và di truyền như các gen bình thường khác (Hình 4.11).



Hình 4.11. Phương thức chuyển T-DNA vào genome của thực vật

2. Các gen chỉ thị chọn lọc và gen chỉ thị sàng lọc

Các gen chỉ thị chọn lọc chung nhất mã hóa các protein khử độc các nhân tố ức chế trao đổi chất như các kháng sinh hoặc chất diệt cỏ (herbicide). Các gen chỉ thị sàng lọc thường được sử dụng là các gen β -glucuronidase (*gus^A*), luciferase và gần đây hơn là gen mã hóa protein phát huỳnh quang màu xanh lục (green fluorescent) của sứa.

Bằng các phương pháp sinh học phân tử có thể tạo ra các cấu trúc DNA plasmid, trong đó ngoài các promoter, các gen của vi khuẩn *Agrobacterium* giúp cho DNA plasmid gắn được vào bộ gen thực vật, gen ngoại lai cần chuyển vào...còn có các gen giúp phân lập ra tế bào hoặc mô

Các gen được lắp ghép vào DNA của plasmid với mục đích này thí nghiệm. được gọi là gen chỉ thị chọn lọc hay gen chỉ thị sàng lọc.

Gen chỉ thị chọn lọc thường dùng nhất là các gen mã hóa cho một số enzyme chỉ có trong vi khuẩn ở điều kiện tự nhiên mà không có trong giới thực vật. Sau khi chuyển gen, nếu thấy enzyme vi khuẩn hoạt động thì có thể suy ra là toàn bộ DNA plasmid đã được gắn vào bộ gen của thực vật và gen ngoại lai mà ta cần chuyển đã trở thành một bộ phận của bộ máy di truyền thực vật.

Các gen chỉ thị thường dùng nhất là các gen: *gus A*, *npt II*, *lux*, *cat*, *nos* và *bar* (Bảng 4.3).

- **Gen *npt II*.** Gen mã hóa cho neomycin phosphotransferase, đây là một enzyme vi sinh vật có khối lượng phân tử khoảng 25 kD, xúc tác cho phản ứng phosphoryl hóa một số kháng sinh gốc aminoglycoside như neomycin, kanamycin và G148. Trong phản ứng này, nhóm γ phosphate của ATP được gắn vào phân tử chất kháng sinh làm nó trở nên bất hoạt do ngăn trở sự liên kết của kháng sinh với ribosome.

- **Gen *bar*.** Gen *bar* là tên gọi của gen mã hóa cho enzyme phosphinothricin acetyltransferase (PAT), có tác dụng làm mất độc tính của phosphinothricin (PPT), là hoạt chất chính của thuốc trừ cỏ như Bialaphos và Basta. Gen *bar* được tạo dòng đầu tiên từ một dòng vi khuẩn *Streptomyces hygroscopicus*. Phương pháp đơn giản nhất để kiểm tra sự có mặt của gen *bar* là phương pháp trực tiếp. Mô, được đặt trên môi trường có các nồng độ phosphinothricin khác nhau (hoặc các thuốc trừ cỏ tương ứng) và so sánh sinh trưởng của mô, tế bào hoặc cây đối chứng đặt trên cùng môi trường.

- **Gen *gus A*.** Gen mã hóa cho sinh tổng hợp enzyme β -glucuronidase. β -glucuronidase là một hydrolase xúc tác cho sự phân giải các β -glucuronide, sản phẩm phân giải có màu xanh chàm đặc trưng, dễ nhận biết. β -glucuronide thường dùng nhất trong phản ứng để nhận biết sự tồn tại của ^{gen *gus*} A là X-Gluc (5-bromo 4-chloro 3-indolyl β -D-glucuronide). Dung dịch X-Gluc không màu dưới tác động của enzyme β -glucuronidase sẽ chuyển sang màu xanh chàm.

- **Gen *lacZ*.** Gen mã hóa cho enzyme β -galactosidase có khối lượng phân tử 116 kD. Gen *lacZ* ở *E. coli* được dùng rất phổ biến trong công nghệ gen và đã có sẵn các hệ thống phương pháp kiểm tra rất nhạy với thuốc thử

X.Gal. Sự tồn tại hoạt động của $lacZ$ trong tế bào thực vật đã được khẳng định. Vì vậy trước khi kiểm tra sự có mặt của gen $lacZ$ ngoại lai, cần phải bất hoạt gen $lacZ$ nội sinh bằng glutaraldehyde.

Bảng 4.3. Hệ thống các gen chỉ thị chọn lọc và các gen chỉ thị sàng lọc

A. Một số gen chỉ thị chọn lọc		
Ký hiệu gen	Enzyme tương ứng	Chất dùng để chọn lọc
<i>npt II</i>	Neomycin phosphotransferase	Kanamycin
<i>hyg</i>	Hygromycin phosphotransferase	Hygromycin
<i>gent</i>	Gentamycin acetyl transferase	Gentamycin
<i>aat</i>	Streptomycin phosphotransferase	Streptomycin
<i>bleo</i>	Enzyme kháng bleomycin	Bleomycin
<i>bar</i>	Phosphinothricin acetyltransferase	Phosphinothricin
<i>bxn</i>	Bromoxynil nitrilase	Bromoxynil
B. Một số gen chỉ thị sàng lọc		
Ký hiệu gen	Enzyme tương ứng	Chất dùng để phát hiện
<i>gus A</i>	β -glucuronidase	X-Gluc
<i>lacZ</i>	β -galactosidase	X-Gal
<i>luc</i>	Luciferase đom đóm	Lumis Phos
<i>lux</i>	Luciferase vi khuẩn	Lumi Phos
<i>cat</i>	Chloramphenicol acetyltransferase	Chloramphenicol đánh dấu
<i>nos</i>	Nopaline synthase	Nopaline

- **Gen *cat*.** Được phân lập và tạo dòng từ dòng vi khuẩn Tn9, là gen gây khả năng kháng chloramphenicol ở vi khuẩn nói chung. Gen *cat* đã

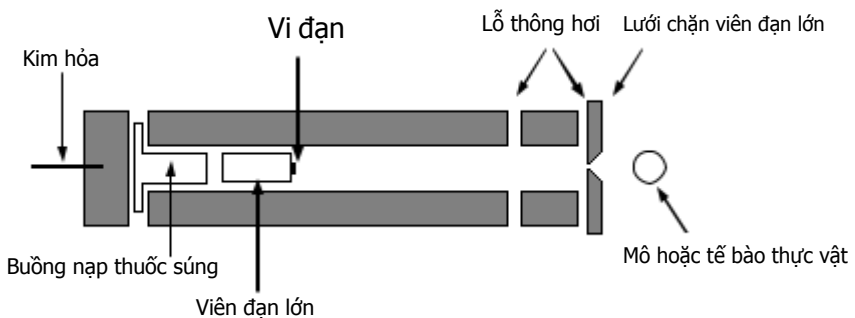
được dùng rộng rãi trong công nghệ gen động vật và thực vật vì nó mã hóa cho enzyme chloramphenicol acetyltransferase (CAT). Enzyme này xúc tác phản ứng acetyl hóa hai vị trí trên phân tử chloramphenicol và làm nó bất hoạt.

3. Chuyển gen bằng vi đạn

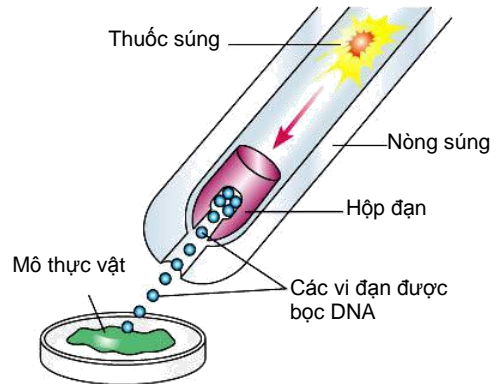
Đây là phương pháp hiện đang được sử dụng phổ biến tại các phòng thí nghiệm công nghệ sinh học thực vật ở trong nước và trên thế giới. Phương pháp này được đề xuất lần đầu tiên vào năm 1987, nguyên lý của nó là sử dụng các viên đạn có kích thước hiển vi, có tỷ trọng cao để đạt gia tốc cao xuyên qua vỏ và màng tế bào, đưa lớp DNA bọc ngoài tiếp cận với bộ máy di truyền của tế bào.

Hạt tungsten hoặc vàng có đường kính $1-15\mu\text{ m}$ được dùng làm vi đạn (microprojectile). Vi đạn được trộn với DNA theo một tỷ lệ thích hợp cùng với các chất phụ gia và sau khi kết tủa DNA bao quanh vi đạn, hỗn hợp được làm khô trên một đĩa kim loại mỏng kích thước $0,05-0,08\text{ cm}$. Đĩa kim loại được gắn vào đầu một viên đạn lớn (macroprojectile) vừa khít với nòng của súng bắn gen (gene gun) (Hình 4.12)

(bombardement) (Hình 4.13). Thường đạn lớn làm bằng nhựa hoặc bông nén hay các vật liệu nhẹ. Khi bắn, áp suất hơi đẩy viên đạn lớn đi với tốc độ cao. Ra khỏi đầu nòng, một lưới thép mịn cản viên đạn lớn lại, nhưng các vi đạn vẫn tiếp tục quỹ đạo với gia tốc lớn đến đích và xuyên vào tế bào. Một tỷ lệ nhất định DNA ngoại lai hội nhập với DNA tế bào và biểu hiện, thực hiện quá trình biến nạp gen.



Hình 4.12. Sơ đồ súng bắn gen



Hình 4.13. Thao tác chuyển gen bằng phương thức đội bom

4. Các ứng dụng của công nghệ chuyển gen

4.1. Một số kết quả bước đầu

Ứng dụng của các kỹ thuật chuyển gen trong công nghệ sinh học thực vật có một tiềm năng rất lớn, vượt qua các tiến bộ kỹ thuật quan trọng trong cuộc cách mạng sản xuất nông nghiệp trước đây. Nó chỉ mất bốn năm cho sự phát triển thương mại các cây trồng chuyển gen ở Bắc Mỹ và đạt tới 52% đối với đậu tương, 30% với ngô, và 9% cho cả hai loại bông và canola (năm 1999) cùng với việc tăng sản lượng trên nhiều loại cây trồng chuyển gen khác như: lúa, lúa mì, lúa mạch, lúa miến, mía, củ cải đường, cà chua, khoai tây, hướng dương, đậu phụng, đu đủ, các loài cây gỗ và các loài cây hoa như cẩm chướng... Trong số 27,8 triệu hecta cây trồng chuyển gen được canh tác trong năm 1998, thì 74% được trồng ở Mỹ, 15% Argentina, 10% ở Canada và 1% ở Úc. Các tính trạng chuyển gen được tập trung chủ yếu là chống chịu chất diệt cỏ (71%), kháng côn trùng (28%) và 1% cho các tính trạng khác.

Các cây chuyển gen đang được thương mại hóa hiện nay là thế hệ đầu tiên của các cây trồng chuyển gen, và ba thế hệ cây trồng chuyển gen có thể được dự đoán trước là :

- **Thế hệ thứ nhất.** Các tính trạng sản xuất (ví dụ chống chịu chất diệt cỏ, kháng bệnh/côn trùng).

- **Thế hệ thứ hai.** Các gen xếp thành chồng cho nhiều tính trạng (ví dụ tổ hợp của các gen kháng bệnh cộng với các tính trạng chất lượng).

- **Thế hệ thứ ba.** Các tính trạng khác nhau được đáp ứng cho việc sử dụng đặc biệt cuối cùng (ví dụ thực phẩm, sợi, nhiên liệu, dầu nhờn, nhựa, dược phẩm và các nguyên liệu thô cho các quá trình công nghiệp).

Việc sản xuất các cây trồng chuyển gen thế hệ thứ hai đang tiến triển. Tuy nhiên, để hướng tới các lợi ích tiềm tàng của công nghệ sinh học thực vật chuyển gen, có nhiều nhân tố bổ sung cần xem xét bao gồm: sự kiểm soát công nghệ sinh học, sở hữu trí tuệ, an toàn thực phẩm, sự chấp nhận của cộng đồng, tính chất gây dị ứng, nhãn hiệu, sự chọn lựa, môi trường, sự phân biệt của các sản phẩm chuyển gen và mậu dịch quốc tế. Tầm quan trọng ở đây là việc ứng dụng và các lợi ích tiềm tàng của các kỹ thuật chuyển gen. Trong khi mọi kỹ thuật đang phát triển, thì mục đích cần đạt được là tối đa các lợi ích và giảm thiểu các rủi ro.

4.2. Triển vọng và hướng phát triển

Trong những năm qua, các phương pháp chuyển gen ở thực vật bậc cao đã có rất nhiều tiến bộ. Hiện nay, các phòng thí nghiệm công nghệ gen đang bắt tay vào việc cải thiện có ý nghĩa cho một số loài cây trồng nhờ các công cụ của sinh học tế bào và sinh học phân tử. Trong một vài trường hợp đặc biệt (đậu tương, lúa, ngô và bông) các phương pháp chuyển gen bị giới hạn bởi genotype. Một số các cây trồng quan trọng cần thiết cho nhu cầu sử dụng của người dân ở các nước đang phát triển hiện ít được chú ý.

Công nghệ di truyền thực vật là một bước ngoặt quyết định. Một số cây trồng quan trọng đã được chuyển gen; một vài vấn đề kỹ thuật vẫn đang còn tồn tại, nhưng chúng đang dần dần được giải quyết. Để có kết quả cần phải thay đổi dần sang một phạm vi khác, như là phát hiện và tạo dòng các gen mang các tính trạng đa gen (multigenic traits). Một điều không thể quên là vấn đề nhận thức của xã hội và dự báo nguy cơ tác động xấu đến môi trường do các sản phẩm có nguồn gốc từ công nghệ DNA tái tổ hợp mang lại. Hiện nay, công nghệ chuyển gen đang được quan tâm hơn thông qua các quỹ tài trợ của các cơ quan quốc tế như là chương trình Rockefeller Foundation (Mỹ), và vấn đề đang được thảo luận nhiều là cần thiết xác định phương thức tốt nhất để chuyển các lợi ích do công nghệ chuyển gen mang lại đến các nước đang phát triển.

Cây chuyển gen đầu tiên thu được vào đầu thập niên 1980. Điều này cho phép nhận xét rằng mới chỉ hơn hai thập niên, các công cụ của công nghệ DNA tái tổ hợp và sinh học tế bào đã giúp ích rất nhiều cho các nhà tạo giống thực vật. Việc lựa chọn phương thức sử dụng các cây trồng thu được từ công nghệ DNA tái tổ hợp có thể cung cấp thêm nguồn tài nguyên mới cho công nghiệp và người tiêu dùng, như vậy có thể mở rộng cơ sở kinh tế ở cả các nước công nghiệp lẫn các nước đang phát triển.

5. Công nghệ di truyền trong kháng chất diệt cỏ

Ước tính khoảng 10% tổng sản lượng lương thực hàng năm trên thế giới bị mất mát do cỏ dại, mặc dù đã tiêu tốn khoảng 10 tỷ USD và sử dụng trên 100 loại hóa chất khác nhau để diệt trừ. Hơn nữa, dùng thuốc diệt cỏ dại vẫn bị hạn chế vì nhiều loại thuốc không phân biệt được cỏ dại và cây trồng. Glyphosate (phosphonomethyl glycine) là một loại thuốc diệt được nhiều loại cỏ dại nhưng chúng cũng có thể làm chết cây trồng. Vì vậy, nếu tạo được các giống cây chuyển gen chống chịu được glyphosate thì nó sẽ được dùng phổ biến để diệt cỏ. Một trong những hướng nghiên cứu là chuyển gen sản xuất dư thừa 5-enolpyruvyl-shikimate-3-phosphatase (EPSP), một enzyme bị ức chế bởi thuốc diệt cỏ glyphosate. Nghĩa là nếu cây sản xuất được nhiều enzyme EPSP chúng có thể chống chịu được glyphosate.

Chất diệt cỏ là phương pháp được chọn lựa để kiểm soát cỏ dại trong hầu hết các hệ thống nông nghiệp quy mô lớn. Chúng đóng một vai trò quan trọng trong việc tăng sản lượng cây trồng bằng cách giảm thiểu sự cạnh tranh giữa cây trồng với cỏ dại về không gian, ánh sáng, nước và chất dinh dưỡng. Cỏ dại cũng có thể hoạt động như một nguồn cung cấp các tác nhân gây bệnh cho cây trồng.

Do các gen kháng chất diệt cỏ cũng là các gen chỉ thị chọn lọc hiệu quả trong trồng trọt, nên đây là tính trạng chuyển gen đầu tiên được sản xuất và thương mại hóa, và các thứ (variety) chống chịu chất diệt cỏ vẫn đang là các cây trồng chuyển gen sinh trưởng rộng rãi nhất.

Dựa trên cơ sở hoặc là sự biểu hiện của gen không miễn cảm chất diệt cỏ, sự thoái biến của chất diệt cỏ hoặc sự biểu hiện mạnh của sản phẩm gen đích của chất diệt cỏ, mà tính kháng được chuyển gen thích hợp trong một phạm vi rộng các chất diệt cỏ như 2,4-D, glyphosate, glufosinate,

protoporphyrinogen oxidase inhibitors, imidazalonones, chlorsulfuron/sulfonylureas, bromoxynil, triazines và isoxazoles.

Hiện nay, có những bằng chứng tốt cho thấy chẳng những không tăng sử dụng của các chất diệt cỏ, mà sự điều chỉnh các cây trồng chuyển gen kháng chất diệt cỏ được cung cấp cho nông dân đã cho kết quả giảm sử dụng glyphosate tới 33% trên các giống đậu tương Roundup Ready, và giảm sử dụng glufosinate khoảng 20% đối với giống canola Liberty Link.

6. Công nghệ di truyền trong kháng sâu-bệnh

6.1. Kháng côn trùng

Sử dụng hóa chất để phòng trừ sâu bọ côn trùng vừa đắt tiền vừa tác động xấu đến môi trường. Các cây trồng như bông, ngô và khoai tây chuyển gen đang được sinh trưởng thương mại biểu hiện độc tố của *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) để tạo ra tính kháng đối với các côn trùng nhóm nhai-nghiền (chewing insects). *B. thuringiensis* tổng hợp các protein δ -endotoxin tinh thể được mã hóa bởi các gen *Cry*. Khi côn trùng ăn vào bụng, các prototoxins bị đứt gãy trong dạ dày kiềm của côn trùng để tạo thành độc tố hoạt động. Các liên kết này tạo ra các receptor đặc trưng trong các tế bào biểu mô ruột làm thành các lỗ chân lông và cuối cùng là gây chết côn trùng. Một số ưu điểm của độc tố *Bt* như sau :

- Tính đặc hiệu, mỗi protein *Cry* chỉ hoạt động chống lại một hoặc một vài loài côn trùng.
- Sự đa dạng, nhiều protein *Cry* khác nhau đã được nhận biết.
- Các ảnh hưởng không bắt lợi hoặc bị giảm đã được xác nhận trên các côn trùng không phải đích hoặc các địch thủ tự nhiên của côn trùng.
- Độc tính với động vật có vú là rất thấp.
- Có thể thoái biến dễ dàng.

Kết quả nghiên cứu cho thấy điểm mấu chốt là gen chịu trách nhiệm tổng hợp protein tinh thể trừ sâu của vi khuẩn *B. thuringiensis* chủng *kurstaki*, chưa đặc biệt biểu hiện rõ ở cây trồng. Để nâng cao hiệu quả của độc tố, các nhà nghiên cứu đã cắt bớt gen chỉ để tổng hợp phần protein có hoạt tính chứa độc tố mà không cần các phần gen phụ khác. Gen *Cry* được cắt bớt đã biểu hiện tổng hợp protein gấp 500 lần so với gen tự nhiên. Hiện nay, hơn 40 gen khác nhau mang tính kháng côn trùng đã được hợp nhất

trong cây trồng chuyển gen với một vài giống đã được thương mại hóa ở các nước khác nhau như Mỹ và Úc.

Đưa ra lợi ích của các độc tố của *Bt* đối với sự kiểm soát côn trùng, các phương thức quản lý khác nhau phải được chấp nhận để làm chậm sự phát triển của tính kháng côn trùng đối với *Bt*. Những cái đó bao gồm :

- Bố trí các vùng bên cạnh trồng cây bông không chuyển gen *Bt* làm nơi trú ẩn để giảm áp lực chọn lọc hướng tới việc kháng côn trùng.
- Triển khai các gen kháng côn trùng khác nhau (ví dụ: protease inhibitors).
- Dùng các loại độc tố *Bt* cho các receptors đích khác nhau.
- Dùng các promoter khác nhau để điều chỉnh sự biểu hiện của các gen *Bt*.
- Dùng các promoter đặc trưng mô (tissue-specific promoter) như thế côn trùng có thể ăn mà không tổn hại đến kinh tế trên các bộ phận ít quan trọng của thực vật.

Có các hướng khác để phát triển tính kháng côn trùng cho cây chuyển gen dựa trên cơ sở: protease inhibitors, α -amylase, lectins, chitinases, cholesterol oxidase, các virus của côn trùng được tạo dòng, tryptophan decarboxylase, anti-chymotrypsin, anti-elastase, nhân tố ức chế trypsin tuyến tụy của bò và nhân tố ức chế lá lách.

6.2. Kháng các virus thực vật

Các virus gây ra những thiệt hại đáng kể trong hầu hết các cây trồng lương thực và cây cho sợi trên phạm vi thế giới. Nhiều phương thức được sử dụng để kiểm soát sự xâm nhiễm virus bao gồm các xử lý hóa học để giết các vector virus, chuyển vào cây trồng các gen kháng tự nhiên từ các loài liên quan, sử dụng chẩn đoán và chỉ dẫn để đảm bảo nhân giống các vật liệu khởi đầu sạch virus (ví dụ: hạt, củ...). Tuy nhiên, sự phát triển chính đã khai thác tính kháng xuất phát từ các tác nhân gây bệnh, ví dụ sử dụng các trình tự xuất phát từ virus được biểu hiện trong các cây chuyển gen để cung cấp tính kháng đối với các virus thực vật. Hướng này dựa trên cơ sở các nghiên cứu về sự gây nhiễm (inoculation) hay xâm nhiễm (infection) ở thực vật khởi đầu với các chủng virus nhẹ cung cấp sự bảo vệ chống lại sự gây nhiễm tiếp theo với cùng loại chủng virus hoặc các virus liên quan gần gũi. Tính kháng bắt nguồn từ tác nhân gây bệnh như vậy đòi hỏi sự chuyển nạp

gen thực vật với các trình tự xuất phát từ virus; tính kháng vật chủ xuất hiện cho kết quả từ hai cơ chế khác nhau: (1) sự bảo vệ được dàn xếp bởi sự biểu hiện của các protein virus tự nhiên hoặc biến đổi (ví dụ protein vỏ, replicase, và replicase khiếm khuyết), và (2) sự bảo vệ được dàn xếp ở mức độ phiên mã (“RNA-mediated resistance”), đòi hỏi sự phiên mã của RNA hoặc từ các chuỗi hoàn chỉnh hoặc từng phần xuất phát từ virus đích (bao gồm các gen cho protein vỏ, replicase, replicase khiếm khuyết, protease, protein vận động...).

Trường hợp các phân tử làm nền tảng cho tính kháng xuất phát từ virus là đối tượng của nghiên cứu chuyên sâu. Cơ sở của tính kháng virus được sắp đặt bởi RNA (RNA-mediated) và sự im lặng của các gen hậu dịch mã có khả năng tương tự, phản ánh các hoạt động cơ bản trong các tế bào thực vật để phát hiện, bất hoạt và đào thải các DNA hoặc các RNA ngoại lai. Ví dụ: các gen nội sinh của thực vật được chèn vào virus như PVX có thể biểu hiện im lặng của gen nội sinh của thực vật.

Để tạo giống cây trồng chống chịu virus, hiện nay có các hướng:

- Bảo vệ chéo.
- Sử dụng RNA vệ tinh.
- Sử dụng enzyme replicase.

6.2.1. Bảo vệ chéo

Là biện pháp lợi dụng hiện tượng lớp vỏ protein của virus thứ nhất đã cản trở sự xâm nhập của virus thứ hai, nghĩa là cho cây nhiễm loại virus có độc lực vừa phải sẽ chống được sự xâm nhiễm của virus có độc lực cao hơn. Để tăng cường khả năng biểu hiện gen protein vỏ người ta gắn thêm vào đuôi phần promoter 35S từ virus khảm súp lơ (CaMV) và đưa vào genome cây trồng nhờ hệ thống Ti-plasmid của *Agrobacterium*. Thành công đầu tiên theo hướng này là kháng bệnh virus khảm thuốc lá (TMV) ở cây thuốc lá, nhờ sự biểu hiện gen *cp*. Thí nghiệm đồng ruộng đầu tiên về cây cà chua biểu hiện gen *cp* kháng bệnh TMV tiến hành năm 1987 tại Mỹ và cho kết quả kháng bệnh cao. Sau đó hàng loạt kết quả chứng tỏ gen *cp* có hiệu lực đối với tất cả các loại virus gây bệnh ở 20 loài cây khác nhau kể cả các loại cây trồng như cà chua (1987), dưa hấu (1987), lúa (1990), khoai tây (1989, 1990), củ cải đường... Qua hàng loạt thí nghiệm đồng ruộng, Bộ Nông

ngiệp Mỹ đã công nhận giống quốc gia cho giống bí xanh (Freedom II) kháng virus (1995). Các giống khoai tây, dưa chuột, cà chua chống bệnh virus đã và đang được tiếp tục công nhận.

6.2.2. Sử dụng RNA vệ tinh

Trong một số quần thể virus có các thực thể giống virus chứa các phân tử RNA nhỏ hơn gọi là RNA vệ tinh (sattelite RNA). RNA vệ tinh dường như không mã hóa cho bất cứ protein nào nhưng được nhân lên nhờ enzyme của RNA từ virus bình thường và hợp thành các tiểu phần giống virus có vỏ protein. Một số RNA vệ tinh có thể ức chế rất mạnh sự nhân bản của virus bình thường. cDNA từ RNA vệ tinh được tổng hợp với sự tham gia của promoter 35S CaMV rồi đưa vào cây thông qua hệ thống Ti-plasmid của *Agrobacterium*. Các cây được chuyển gen kiểu này thể hiện tính kháng virus thuốc lá và virus khảm dưa chuột khá tốt. Tuy nhiên, so với tính kháng theo phương pháp bảo vệ chéo, tính kháng này khó đạt hơn vì phải cần nồng độ virus rất cao. Bên cạnh đó, người ta vẫn lo ngại dễ xảy ra hiện tượng đột biến từ phân tử RNA vệ tinh thành một loại gây độc cho chính cây chủ.

6.2.3. Sử dụng enzyme replicase

Replicase là enzyme tham gia quá trình tổng hợp nucleic acid của virus, hoạt hóa cho sự nhân lên của DNA hoặc RNA theo cơ chế bổ sung. Cây trồng chống virus cũng có thể được tạo ra bằng chuyển các gen replicase với nhiều đoạn bị biến đổi hoặc bị cắt bớt, kết quả cho thấy kháng virus rất cao. Ví dụ, thuốc lá theo phương pháp chuyển gen đã biểu hiện gen replicase bị cắt bớt cho khả năng kháng virus khảm thuốc lá rất tốt (1990). Hiện nay, vẫn chưa thành công với enzyme replicase của virus khảm từ cỏ alfalfa đối với bệnh virus khảm thuốc lá. Protoplast đại mạch được chuyển gen replicase từ virus khảm brome cũng chưa kháng được bệnh này ở đại mạch. Tuy thế, từ khi tìm thấy hướng ứng dụng gen replicase, người ta vẫn đang hy vọng vào hướng này.

6.3. Kháng các bệnh nấm

Nấm bệnh gây hại cây trồng rất nặng, nhất là ở các nước nhiệt đới có độ ẩm cao. Cải tạo giống chống nấm hại dựa trên nguyên lý đưa gen mã hóa

một loại enzyme nào đó có tác dụng ức chế trực tiếp hoặc gián tiếp đến sự phát triển của nấm hại. Enzyme làm thoái hóa các thành phần chính của vỏ tế bào nấm chitin và β -1,3 glucan là loại đang được chú ý. Khi có gen chitinase chuyển vào, cây thuốc lá chuyển gen đã tăng cường hoạt tính chống nấm hại. Sự biểu hiện đồng thời của cả hai gen chitinase và glucanase trong thuốc lá làm cho cây có tính kháng nấm hại cao hơn cây có một gen độc lập. Cũng tương tự, cà chua cho tính kháng nấm *Fusarium* cao hơn hẳn, sau khi được chuyển giao cả hai gen nói trên.

Protein ức chế ribosome (ribosome inhibitive protein, RIP) cũng biểu hiện tính kháng nấm khả quan. Cây thuốc lá cho tính kháng nấm rất tốt, khi cây được chuyển giao đồng thời gen RIP và chitinase.

6.4. Kháng các bệnh vi khuẩn

Đối với vi khuẩn, hướng nghiên cứu tạo giống công nghệ sinh học mới bắt đầu. Về cơ bản có ba hướng :

- Dùng gen mã hóa enzyme làm thoái hóa thành tế bào vi khuẩn, ví dụ gen lysozyme từ các nguồn tế bào động vật hoặc gen lysozyme từ thực khuẩn thể T4 đưa vào cây thuốc lá và khoai tây. Các gen này biểu hiện rất cao hoạt tính lysozyme và các tế bào có khả năng phòng trừ vi khuẩn *Erwina carotovora* rất tốt.

- Gen mã hóa -thionin-cystein được chuyển giao sang cây thuốc lá cũng phòng ngừa được vi khuẩn *Pseudomonas syringae*.

- Cây gen sản xuất protein làm giảm độc tố của vi khuẩn, là hướng có nhiều hứa hẹn. Các gen này chủ yếu sản xuất các loại enzyme phân hủy độc tố của vi khuẩn, do vậy vô hiệu hóa tác hại của chúng.

IV. Sản xuất các dược liệu sinh học

1. Các hợp chất tự nhiên

Thực vật là nguồn cung cấp các hợp chất hóa học dùng làm dược liệu rất có giá trị. Những sản phẩm này, được biết như là các chất trao đổi thứ cấp (secondary metabolites), thường được sản xuất với một lượng rất nhỏ (dạng vết) trong thực vật và không có chức năng trao đổi chất rõ ràng. Chúng dường như là sản phẩm của các phản ứng hóa học của thực vật với

môi trường chung quanh, là sự thích nghi với stress của môi trường hoặc là sự bảo vệ hóa học chống lại vi sinh vật và động vật.

Để sản xuất các sản phẩm thứ cấp từ thực vật, các mô thực vật ngoại sinh từ cây hoàn chỉnh được nuôi cấy dịch huyền phù (suspension culture) trong điều kiện vô trùng (Hình 4.14). Cơ sở của kỹ thuật nuôi cấy mô thực vật dựa trên tính toàn thể hóa sinh (biochemical totipotency) duy nhất của tế bào thực vật. Nhiều 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. Có nhiều bằng chứng cho thấy có mối quan hệ ngược (feedback) giữa tốc độ sinh trưởng và sản xuất các chất thứ cấp. Khi tốc độ sinh trưởng cao, các quá trình sơ cấp của tế bào là phân chia tế bào và sản xuất sinh khối tế bào. Trong pha tĩnh, khi sự sinh trưởng giảm đến mức tối thiểu, sự sản xuất và tích lũy các chất thứ cấp sẽ tăng lên.



Hình 4.14. Nuôi cấy tế bào dịch huyền phù thực vật trong hệ lên men 100 L

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.

Các alkaloid có dạng tinh thể là các hợp chất chứa nitrogen, có thể được tách chiết bằng cách dùng dung dịch acid. Alkaloid có hoạt tính sinh lý trên tất cả động vật và được sử dụng trong công nghiệp dược. Họ alkaloid bao gồm: codein, nicotine, caffeine và morphine. Các tinh dầu chứa hỗn hợp terpenoid và được sử dụng như là chất mùi, chất thơm và dung môi. Glycoside bao gồm các phenolic, tanin và flavonoid, saponin và các cyanogenic glycoside, một số trong chúng được sử dụng làm chất nhuộm, các chất mùi thực phẩm và dược phẩm.

1.1. Các alkaloid

Người ta cũng có thể thu được các chất như caffeine từ nuôi cấy tế bào cây *Coffea arabica*, betalain trong callus củ cải đường, berberin từ tế bào cây *Coptis japonica* (loài cây này phải trồng từ 4-6 năm mới thu được hàm lượng đáng kể berberin trong rễ, so với hàm lượng này có thể thu được sau 4 tuần bằng phương pháp nuôi cấy tế bào)... Những chất này được sử dụng rộng rãi trong công nghiệp hương liệu và trong y học.

Chất reserpine có tác dụng chữa bệnh cao huyết áp và các bệnh rối loạn tuần hoàn cũng được sản xuất bằng phương pháp nuôi cấy tế bào cây *Rauwolfia serpentina*. Nuôi cấy tế bào của cây này trong 30 ngày ở hệ lên men quy mô lớn có thể sản xuất được 3.500 kg reserpine, tương đương với lượng hàng năm của cả thế giới thu được từ rễ cây đó.

Các nhà nghiên cứu thuộc tổ hợp dược phẩm Gibageigy (Based, Thụy Sĩ) đã sản xuất được loại alkaloid là scopolamine từ tế bào cây *Hyoscyanus aegypticus* nuôi cấy trong hệ lên men không có cánh khuấy. Bằng cách chọn lọc các dòng tế bào cao sản nhờ kỹ thuật đột biến tế bào trần, biến dị đơn dòng và kỹ thuật gen, người ta đã tăng được sản lượng scopolamine lên gấp hàng ngàn lần.

Nhiều nghiên cứu cho thấy nuôi cấy callus và tế bào của cây *Catharanthus roseus* có hàm lượng serpentin ngang với cây dược liệu bình thường. Một số nghiên cứu đã phân lập được các dòng tế bào *Cantharanthus* sản xuất serpentin và ajmalacine từ nuôi cấy *in vitro*. Bằng loại môi trường sản xuất đặc biệt người ta đã đưa được sản lượng alkaloid của hai dòng tế bào tốt nhất lên một mức cao hơn nữa, trong đó một dòng

tạo được 162 mg/L serpentin, còn dòng kia tạo được 72 mg/L serpentin cùng với 264 mg/L ajmalacine. Mới đây người ta đã hoàn thiện được công nghệ nuôi cấy tế bào của cây *Catharanthus roseus* để sản xuất vincristine và vinorelbine là hai chất kháng ung thư rất mạnh, hiện đang có nhu cầu rất cao vì chúng được sử dụng để chữa ung thư máu.

Sikuli và cs (1997) sau khi gây nhiễm cây *Datura stramonium* với *Agrobacterium rhizogenes* đã nhận thấy hàm lượng hyoscyamine ở rễ đạt cực đại sau 6 tuần nuôi cấy <100 mg/L.

1.2. Các steroid

Trong lĩnh vực steroid và chuyển hóa steroid, các dòng tế bào có năng suất cao đã được Kaul và cs đề cập đến từ năm 1969. Họ đã nuôi cấy thành công tế bào của cây *Dioscorea deltoidea* để sản xuất diosgenin, là nguyên liệu thô chủ yếu để sản xuất các steroid chống thụ thai và các hormone tuyến thượng thận.

Quá trình chuyển hóa các hợp chất glycoside tim (cardiac) bằng nuôi cấy tế bào của cây *Digitalis lanata* cũng đã được nghiên cứu. Người ta nhận thấy, mặc dù các tế bào *Digitalis* ngừng sản xuất glycoside tim nhưng chúng vẫn có khả năng hydroxyd hóa digitoxin ở nguyên tử ^{12}C để tạo ra digoxin. Digoxin là một hợp chất có ý nghĩa y học lớn hơn digitoxin. Quá trình hydroxyd hóa xảy ra trong nuôi cấy tế bào rất nhanh và rất hiệu quả khi đưa vào môi trường nuôi cấy chất -methyl-digitoxin. Sau 18 ngày, người ta đã thu được 4 g -methyl-digitoxin trong một bình nuôi dung tích 20 L.

1.3. Một số chất khác

Thí dụ điển hình nhất là công nghệ sản xuất shikonin, một loại sắc tố đỏ có khả năng diệt khuẩn, có trong rễ của cây *Lithospermum erythrorhizon*. Bình thường shikonin tích lũy không nhiều trong rễ. Tuy nhiên, các nhà khoa học Nhật đã tạo được dòng tế bào rễ cây *Lithospermum* có khả năng tích lũy đến 15% shikonin và đã hoàn chỉnh công nghệ nuôi cấy tế bào sản xuất shikonin. Công nghệ này cho phép trong một chu kỳ nuôi cấy thu hoạch tới 5 kg hoạt chất và giúp giảm rất nhiều giá thành của shikonin.

Hàm lượng tương đối cao của ubiquinone-10 được tìm thấy trong tế bào thuốc lá nuôi cấy *in vitro* và của L-dopa trong môi trường nuôi cấy tế bào *Mucuna pruriens*. Nuôi cấy tế bào của cây *Panax pseudoginseng* đã cho hàm lượng saponin khá cao. Nuôi cấy tế bào của cây *Glycyrrhiza glabra* đã thu được hàm lượng glycyrrhizin từ 3-4% khối lượng khô.

Hàm lượng chất thứ cấp cao nhất được tìm thấy trong nuôi cấy tế bào của cây *Coleus blumei* đó là chất rosmarinic acid chiếm 13-15% khối lượng khô trong chu kỳ nuôi 13 ngày, lớn gấp 5 lần so với hàm lượng trong cây trồng ở điều kiện tự nhiên. Trong những năm 1980, người ta cũng đã sản xuất rất có hiệu quả ginsenoside là hoạt chất chủ yếu của nhân sâm *Panax ginseng*. Các anthraquinone là một nhóm các sản phẩm tự nhiên quan trọng có ở vi khuẩn, nấm, địa y và thực vật bậc cao có các hoạt tính sinh học như: kháng khuẩn, kháng nấm, hạ huyết áp, giảm đau, chống sốt rét, chống oxy hóa, kháng bệnh bạch cầu và các chức năng đột biến. Ở thực vật bậc cao, chúng đã được tìm thấy ở rất nhiều họ thực vật khác nhau, chẳng hạn Rubiaceae, Rhamnaceae, Polygonaceae, Leguminosae... Nuôi cấy tế bào các loài của họ Rubiaceae đã cho phép thu được một lượng lớn anthraquinone thậm chí trong một số trường hợp đã vượt quá hàm lượng anthraquinone ở cây bố mẹ.

2. Các protein tái tổ hợp

Protein tái tổ hợp (protein ngoại lai) là protein tự nhiên được biến đổi bằng công nghệ DNA tái tổ hợp nhằm nâng cao hoặc thay đổi hoạt tính của chúng. Nuôi cấy tế bào thực vật đã được sử dụng để sản xuất các sản phẩm tự nhiên cách đây hơn 20 năm và gần đây hơn chúng được dùng để sản xuất các protein tái tổ hợp. Các tế bào thực vật rất thích hợp cho các nguyên liệu tái tổ hợp do chúng có thể sinh trưởng trên môi trường tương đối đơn giản không cần bổ sung protein. Nếu protein ngoại lai được sản xuất trong nuôi cấy tế bào và được tiết ra trong môi trường, nhiều hơn phần được tích lũy trong tế bào, thì việc thu hồi và tinh sạch sản phẩm có thể được tiến hành mà không có nhiều protein nhiễm bản. Các protein có nguồn gốc thực vật an toàn cho người hơn các protein có nguồn gốc từ tế bào động vật bởi vì các chất nhiễm bản và virus thực vật không phải là tác nhân gây bệnh ở người. Ngoài ra, nuôi cấy tế bào thực vật cũng là một công cụ thực nghiệm thuận lợi cho việc khảo sát sự sản xuất protein ngoại lai trong cây hoàn chỉnh.

Bảng 4.4. Sản xuất các protein tái tổ hợp bằng nuôi cấy tế bào thực vật

Protein	Loài thực vật
Hormone sinh trưởng ở người	<i>Nicotiana tabacum</i>
Albumin huyết thanh người	<i>N. tabacum, Solanum tuberosum</i>
Nhân tố sinh trưởng biểu mô ở người	<i>N. tabacum</i>
Nhân tố sinh trưởng ở cá hồi	<i>N. tabacum</i>
α -interferon người	<i>Oryza sativa</i>
Hirudin (chống đông máu)	<i>N. tabacum</i>
Erythropoetin	<i>N. tabacum</i>
α and β haemoglobin người	<i>N. tabacum</i>
Human muscarinic cholinergic receptors	<i>N. tabacum</i>
GM-CSF chuột	<i>N. tabacum</i>
Interleukin-2 và Interleukin-4	<i>N. tabacum</i>
Alkalinephosphatase nhau thai người	<i>N. tabacum</i>
α 1-antitrypsin người	<i>O. sativa</i>
Hormone sinh trưởng người	<i>N. tabacum</i>
GM-CSF người	<i>N. tabacum, O. sativa</i>

Thực vật chuyển gen hiện nay được xem là hệ thống sản xuất rất kinh tế cho việc sản xuất các protein ngoại lai như kháng thể, enzyme và hormone. Sản xuất thương mại một số protein của vi khuẩn và động vật đã được tiến hành bằng thực vật. Yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến hiệu quả kinh tế của sản xuất protein dựa trên cơ sở thực vật là hiệu suất của protein ngoại lai hoặc nồng độ của sản phẩm được tích lũy trong sinh khối. Theo đó, người ta đã chú ý cải thiện sự biểu hiện gen ngoại lai trong cây chuyển gen thông qua việc phát triển các promoter tốt hơn, chọn lọc các dòng chuyển gen ổn định, và ức chế gen im lặng (silence gene). Tuy nhiên, một yếu tố

quan trọng là sự đứt gãy protein ngoại lai đã làm giảm nồng độ của sản phẩm chức năng trong mô thực vật sau khi các phân tử được tổng hợp và lắp ráp. Sự đứt gãy protein ngoại lai đã làm bản sản phẩm với các đoạn protein mất hoạt tính, và người ta cũng gặp khó khăn khi loại bỏ các protein đứt gãy này trong các hoạt động thu hồi protein chức năng ở sản xuất quy mô lớn. Tìm hiểu chi tiết về vị trí và cơ chế của sự đứt gãy ở nội và ngoại bào là rất cần thiết để có thể phát triển phương pháp sao cho giảm thiểu được sự tổn thất protein sau dịch mã.

3. Vaccine thực phẩm (edible vaccine)

Cho đến thời gian gần đây người ta vẫn sử dụng vaccine sống nhược độc làm kháng nguyên kích thích tạo kháng thể cần thiết trong cơ thể người và vật nuôi. Vaccine kiểu này có một số hạn chế như: có khả năng quay trở lại dạng độc hoặc hoạt lực của nó giảm khá nhanh trong cơ thể người và vật nuôi. Hiện nay, nhờ công nghệ DNA tái tổ hợp người ta đã sản xuất được protein vỏ của một số loại virus như virus bệnh lở mồm long móng, bệnh dại và viêm gan B. Tuy nhiên, vaccine được sản xuất theo các phương pháp trên có giá thành cao, điều kiện bảo quản và vận chuyển nghiêm ngặt, cần có kỹ thuật viên để tiến hành tiêm chủng.

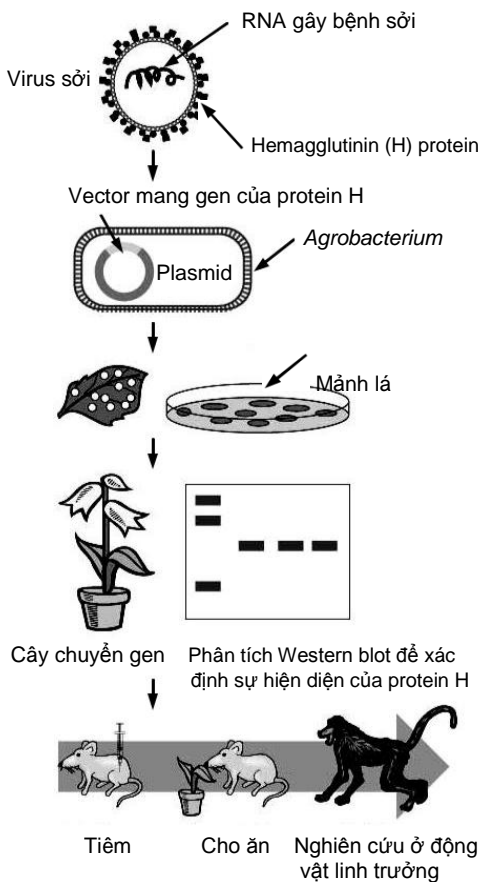
Vaccine thực phẩm là một mô hình lý tưởng cho các nước đang phát triển, vì nó giúp khắc phục được các khó khăn nói trên của vaccine được sản xuất theo phương pháp truyền thống hoặc DNA tái tổ hợp. Nguyên lý cơ bản của quá trình này là chuyển một loại gen đặc biệt vào tế bào thực vật. Loại gen này hoạt động trong cơ thể thực vật, sẽ biến thành nơi sinh ra protein kháng nguyên. Khi những kháng nguyên này đi vào cơ thể người thông qua ăn uống (dưới dạng tươi sống không nấu chín, nếu không sẽ làm mất hoạt tính kháng nguyên), hệ thống miễn dịch của người sẽ tự động sinh ra kháng thể để chống lại kháng nguyên. Như vậy là đã thay việc tiêm chủng vaccine bằng việc ăn những hoa quả hoặc rau xanh có kháng nguyên.

Vaccine thực phẩm có một số ưu điểm sau: giá thành rẻ, ổn định, dễ sản xuất trên quy mô lớn, dễ quản lý, không cần tinh sạch, bảo quản lâu, dễ vận chuyển...

Một số kết quả nghiên cứu bước đầu của vaccine thực phẩm:

- Sản xuất vaccine chống bệnh infectious bursan disease virus (IBDV) ở gà trong cỏ *Arabidopsis* chuyển gen.

- Chuyển gen *orf2* của virus gây bệnh viêm gan E vào cây cà chua, và cây *Pichia pastoris*.
- Sản xuất vaccine viêm gan B trong cây chuối chuyển gen, cây *Physalis ixocarpa*, đậu lupin vàng, rau diếp và cà chua.
- Chuyển gen *ltb* của *E. coli* (B subunit of *E. coli* heat-labile enterotoxin) gây bệnh đường ruột vào khoai tây.
- Chuyển gen *ctb* (cholera toxin B subunit) gây bệnh tả của vi khuẩn *Vibrio cholerae* và gen *ltb* vào cây thuốc lá...



A: Chọn kháng nguyên làm vaccine và xác định trình tự mã hóa

B: Chuyển trình tự mã hóa vào vector (plasmid) và biến nạp vào *Agrobacterium*

C: Đồng nuôi cấy *Agrobacterium* và mô thực vật

D: Tái sinh cây hoàn chỉnh từ các tế bào được chuyển gen và phân tích sự biểu hiện của kháng nguyên bằng Western blot

E: Xác định khả năng sinh miễn dịch kháng nguyên trong động vật mô hình

Hình 4.15. Mô hình phát triển vaccine thực phẩm

Một nghiên cứu đã được công bố gần đây trong lĩnh vực sản xuất vaccine từ thực vật, đó là gây miễn dịch trong cơ thể người bằng vaccine thực phẩm để điều trị bệnh viêm gan B. Loại cây trồng được sử dụng để chuyển gen viêm gan B lần này là khoai tây. Người ta hy vọng rằng khi ăn loại khoai tây này, chất kháng nguyên sẽ gây ra một phản ứng miễn dịch nhẹ trong cơ thể người. Từ đó, cơ thể người sẽ tạo ra chất miễn dịch cá thể đối với căn bệnh lây nhiễm viêm gan B. 42 nhân viên chăm sóc sức khỏe ở độ tuổi 25-58 đã tham gia vào cuộc nghiên cứu. Trong đó, 33 người được chỉ định ăn khoai tây chuyển gen mà không có tá dược, một chất làm tăng khả năng phản ứng miễn dịch. Chuẩn độ kháng nguyên kháng virus viêm gan B trong huyết thanh được đo trong một số lần nhất định mỗi ngày. Kết quả cho thấy đối với những người ăn khoai tây không chuyển gen các chuẩn độ không tăng, trong khi đó 19 trong số 33 người ăn khoai tây chuyển gen thì chuẩn độ tăng 57,6%, trong khi vaccine hiện có trên thị trường có tác dụng tới 90% đối tượng, kể cả khi có chứa chất tá dược.

Tài liệu tham khảo/đọc thêm

1. **Ammirato PV, Evans DA, Sharp WR and Bajaj YPS.** 1990. Handbook of Plant Cell Culture. Vol 5, *McGraw-Hill Publishing Company*. USA.
2. **Chrispeels MJ and Sadava DE.** 2003. Plants, Genes, and Crop Biotechnology. 2nd ed. *Jones and Bartlett Publishers*, Massachusetts, USA
3. **Cutler SJ and Cutler HG.** 2000. Biologically Active Natural Products: Pharmaceuticals. *CRC Press LLC*, USA.
4. **Jain SM, Gupta PK and Newton RJ.** 1994. Somatic Embryogenesis in Woody Plants. Vol 3. Forestry Sciences 44, *Kluwer Academic Publishers*, Netherland.
5. **Klevenz H.** 2002. Industrial Pharmaceutical Biotechnology. *Wiley-VCH Verlag GmbH*, Weinheim, Germany.
6. **Narayanaswamy S.** 1994. Plant Cell and Tissue Culture. *Tata McGraw-Hill Publishing Co. Ltd.* New Delhi, India.
7. **Ramawat KG and Merillon JM.** 1999. Biotechnology: Secondary Metabolites. *Science Publishers Inc.* USA.
8. **Ratledge C and Kristiansen B.** 2002. Basic Biotechnology. *Cambridge University Press*, UK.

9. Razan MK. 1994. An Introduction to Plant Tissue Culture. *Oxford and IBH Publishing Co. Pvt. Ltd.* New Delhi, India.

10. Roberts MF and Wink M. 1998. Alkaloids: Biochemistry, Ecology, and Medicinal Applications. *Plenum Press*, New York, USA.

11. Trigiano RN and Gray DJ. 2000. Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises. *CRC Press*, New York, USA.