

Chương 4:

CÔNG NGHỆ SINH HỌC THỰC VẬT PLANT BIOTECHNOLOGY

- I. Khái quát về CNSH thực vật (General plant biotechnology)
- II. Nuôi cấy mô & cơ quan thực vật (Plant tissue and organ culture)
- III. Các kỹ thuật chuyển gen ở thực vật (plant Gene transfer technologies)
- IV. Các ứng dụng của nuôi cấy mô tế bào thực vật (Applications of plant tissue culture)



I. Khái quát về CNSH thực vật

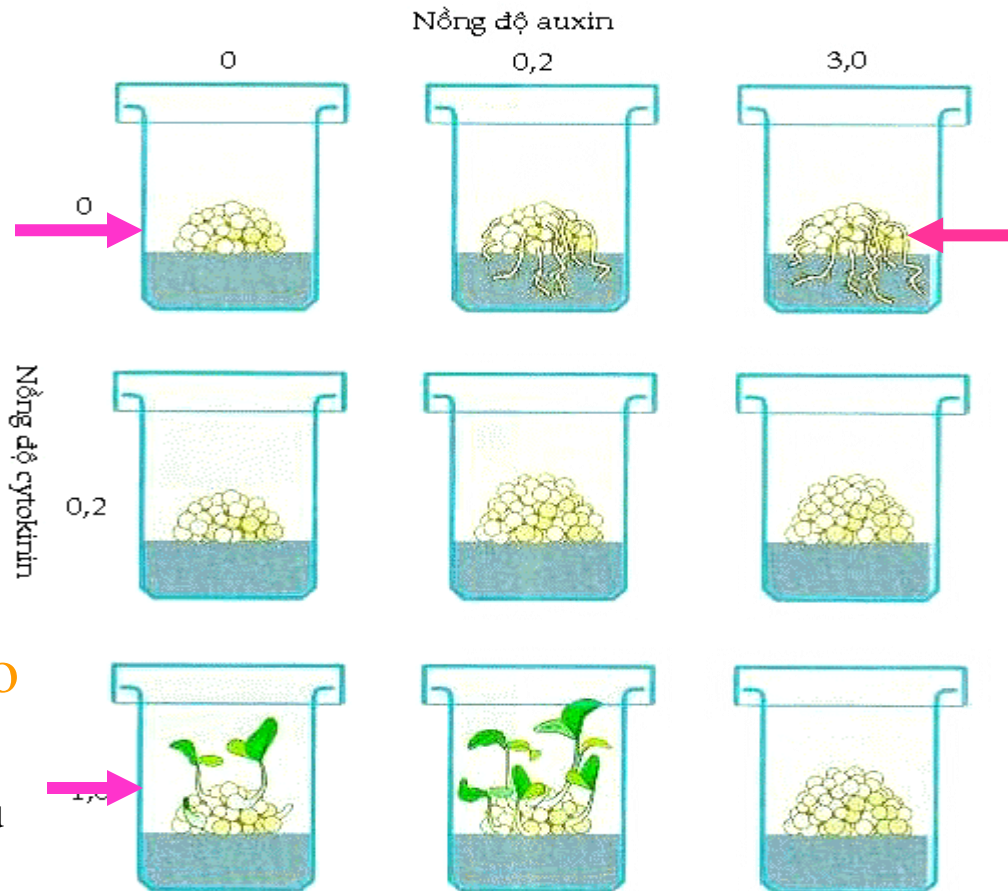
Lịch sử phát triển

- **1902 – 1930:** Thử nghiệm ban đầu
- **1934 – 1955:**
 - Nuôi thành công tế bào cà rốt (Gautheret, 1937)
 - Phát hiện vai trò của vitamin, IAA, NAA, 2.4D và kinetin ... là tiền đề xác định thành phần hóa học của MT trong nuôi cấy mô TBTV.
- **1957 – 1992:**
 - Tách và nuôi tế bào đơn
 - Vai trò auxin/cytokinin
 - Tạo protoplast và tái sinh cây
 - Tạo cây đơn bội từ nuôi cấy túi phấn

Lịch sử phát triển (Development history)

1957: Skoog & Miller nghiên cứu tỷ lệ giữa **Ki/Au** trong sự hình thành cơ quan của mô sẹo thuốc lá (Research on Ki / Au ratio in the organ formation of tobacco scar tissue.)

Mô sẹo
(callus)



Tỷ lệ Ki/Au giảm thì mô sẹo tạo rễ (the reduction of the Ki / Au ratio leads to the rooting of callus)

Tỷ lệ Ki/Au tăng thì mô sẹo tạo chồi

The ratio of Ki / Au increases and the callus produces shoots

Hình 15. Các chương trình phát triển của mô sẹo

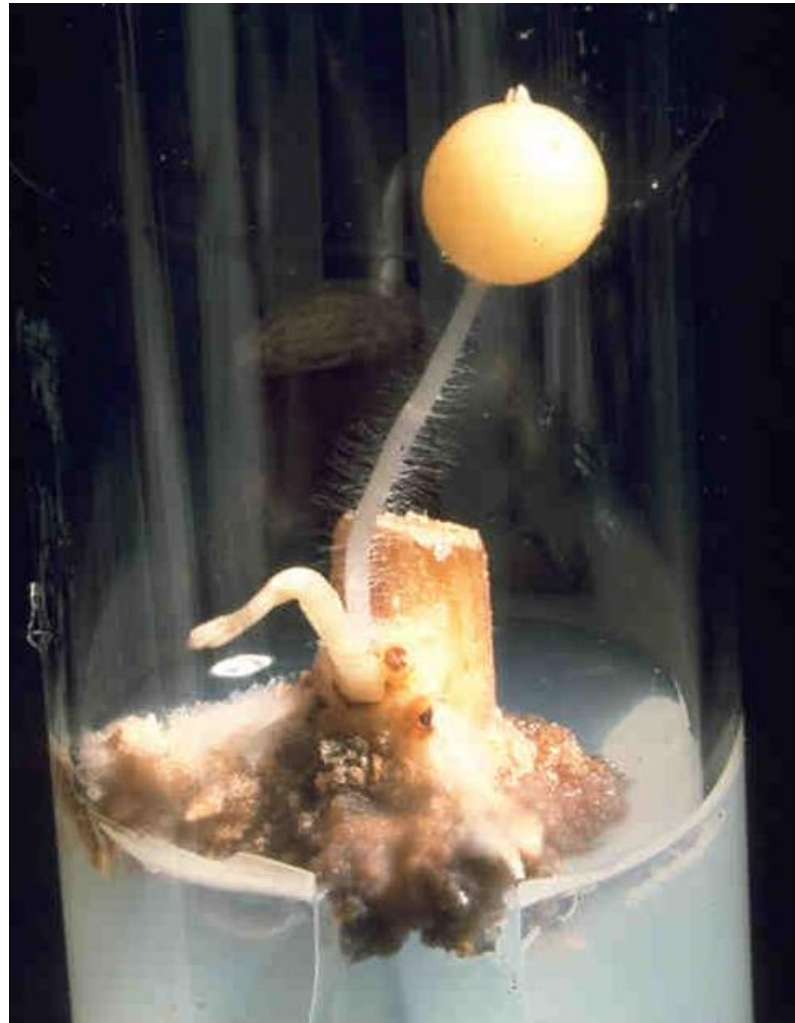
I. Khái quát về CNSH thực vật

Lịch sử phát triển

- **1902 – 1930:** Thử nghiệm ban đầu
- **1934 – 1955:**
 - Nuôi thành công tế bào cà rốt (Gautheret, 1937)
 - Phát hiện vai trò của vitamin, IAA, NAA, 2.4D và kinetin ... là tiền đề xác định thành phần hóa học của MT trong nuôi cấy mô TBTV.
- **1957 – 1992:**
 - Tách và nuôi tế bào đơn
 - Vai trò auxin/cytokinin
 - Tạo protoplast và tái sinh cây
 - Tạo cây đơn bội từ nuôi cấy túi phấn
- **Sản xuất quy mô lớn và trên diện rộng**



Điều khiển ra hoa trong *in vitro*
in vitro flowering control



Nuôi cấy phát sinh củ
Tuber induction culture



Sản xuất rễ tơ sâm Ngọc linh trong Bioreactor
Producing root of Ngọc Linh ginseng in
Bioreactor



Cây cà khoai ???



Tomtato???

I. Khái quát về CNSH thực vật (An overview of plant biotechnology)

Những ưu thế của nuôi cấy mô và tế bào

Vi nhân giống - Micropropagation

- Thực hiện trong PTN, không chịu ảnh hưởng của thời tiết, mùa vụ
- Hệ số nhân giống cao, giữ nguyên đặc tính cây mẹ



Những ưu thế của nuôi cấy mô và tế bào (The advantages of tissue and cell culture)



Nhân giống in vitro (micropropagation)



Tạo rễ (rooting)

Những ưu thế của nuôi cấy mô và tế bào (The advantages of tissue and cell culture)



Vườn ươm (nursery)



Cây chuẩn bị cấy vào bầu
(Plants prepare to transplant
into pots)



Bầu đất (potting soil)

Những ưu thế của nuôi cấy mô và tế bào (The advantages of tissue and cell culture)

Chọn giống *in vitro* dựa trên các công nghệ tế bào

(Selection of *in vitro* varieties based on cell technologies)

- Rút ngắn thời gian;
- Chọn các đặc tính quý;
- Thu được cây lưỡng bội $2n$ thuần chủng nhờ đa bội hóa dòng đơn bội;
- Tận dụng gen lặn thường không biểu hiện.

Những ưu thế của nuôi cấy mô và tế bào (The advantages of tissue and cell culture)

Khai thác các hợp chất (Extraction of compounds)

- Sản xuất chủ động và liên tục, không phụ thuộc vào điều kiện tự nhiên và mùa vụ;
- Khai thác các chất quý, cấu trúc phức tạp, không tổng hợp được bằng phương pháp hóa học;
- Chọn dòng tế bào sản sinh các chất với năng suất cao vượt trội so với cây tự nhiên và thời gian ngắn hơn;
- Thu nhận chất quý từ cây tăng trưởng chậm, sinh sản khó khăn;
- Giảm giá thành.

Vai trò CNSH TV trong tương lai

Tăng sản lượng lương thực gấp đôi (Increase food production twice)

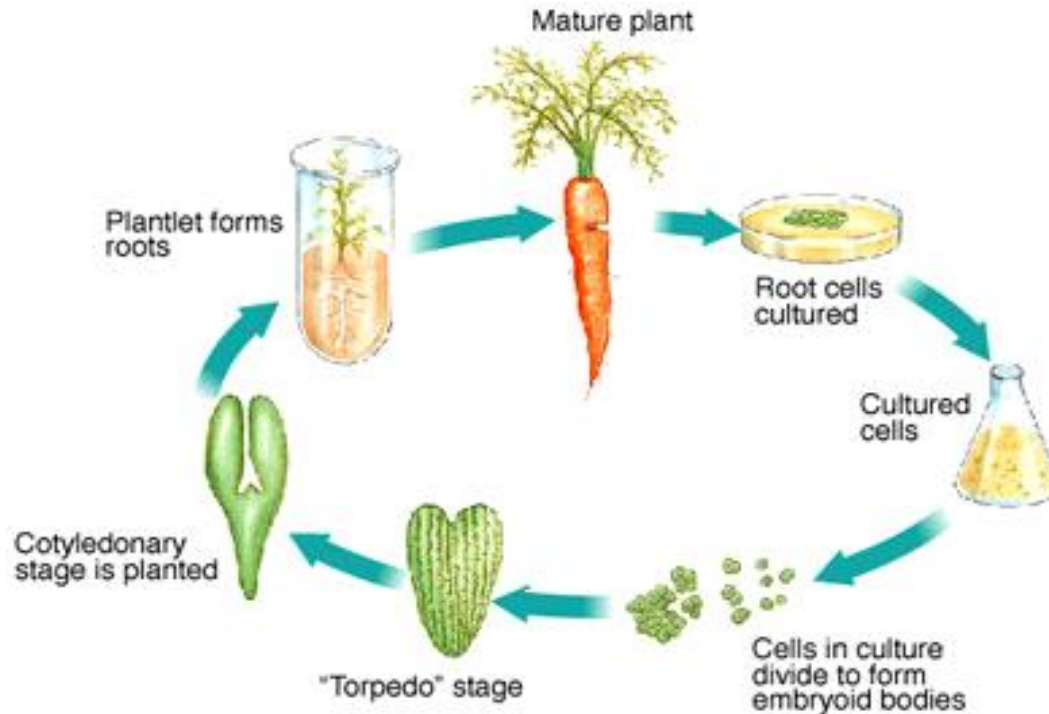
- Chọn giống: chống chịu thời tiết khắc nghiệt, phẩm chất tốt, năng suất cao, có khả năng sản xuất hóa chất, protein;
- Biện pháp chống sâu bệnh, cỏ dại;
- Giảm thuốc trừ sâu, diệt cỏ, phân bón;
- Phát triển nền nông nghiệp sạch và xanh hơn.

Phát triển bền vững (Sustainable Development)

- Tăng sinh khối để sản xuất năng lượng thay thế nguồn dầu mỏ;
- Phát triển hoá học xanh để một mặt cung cấp sinh khối cho sản xuất hóa chất, mặt khác phải biến thực vật thành nhà máy hóa chất.

II. Nuôi cấy mô và cơ quan thực vật (Plant organ and tissue culture)

Tế bào thực vật có *tính toàn thể*.



Để nuôi cấy mô thực vật (NCMTV) có hiệu quả cần thành thạo các **kỹ thuật vô trùng**, biết cách pha chế **môi trường thích hợp** và kèm theo là các dụng cụ trang thiết bị tương ứng.

II. Nuôi cấy mô và cơ quan thực vật (Plant organ and tissue culture)

Môi trường nuôi cấy (culture media)

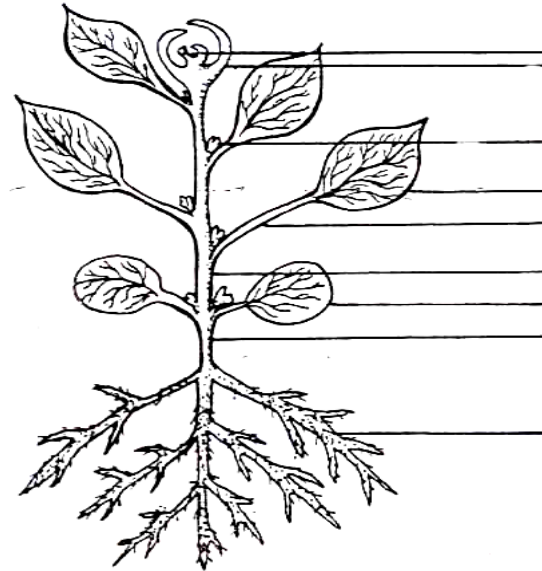
- Nguyên tố đa lượng: N , P, K, S, Ca, Mg
- Nguyên tố vi lượng: Fe, Mn, Zn, Br, Cu, Co, Mo
- Vitamine: B1, nicotinic acid, biotin,...
- Nguồn carbone: sucrose hoặc glucose
- Chất điều hòa tăng trưởng : auxine và cytokinine, GA, ABA
- Các chất phụ trợ khác

II. Nuôi cấy mô và cơ quan thực vật (Plant organ and tissue culture)

Mẫu dùng trong nuôi cấy (Sample used in culture)



shoot tip, leaf, lateral bud, stem
or root tissue (Fig. 1).



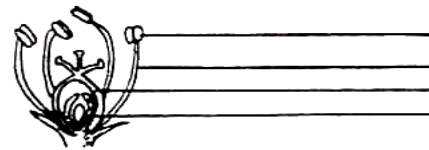
Đỉnh sinh trưởng
Chồi ngọn

Chồi nách

Lá
Cuống lá

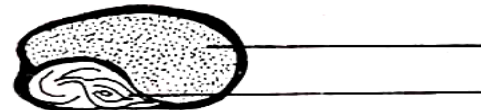
Thân
Lá mầm
Trục hạ điệp

Rễ



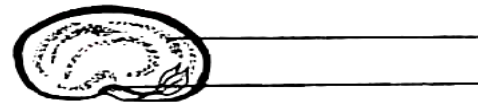
Bao phấn
Chỉ nhị

Bầu noãn, tiểu noãn



Phôi nhũ

Phôi



Lá mầm

Phôi

II. Nuôi cấy mô và cơ quan thực vật (Plant organ and tissue culture)

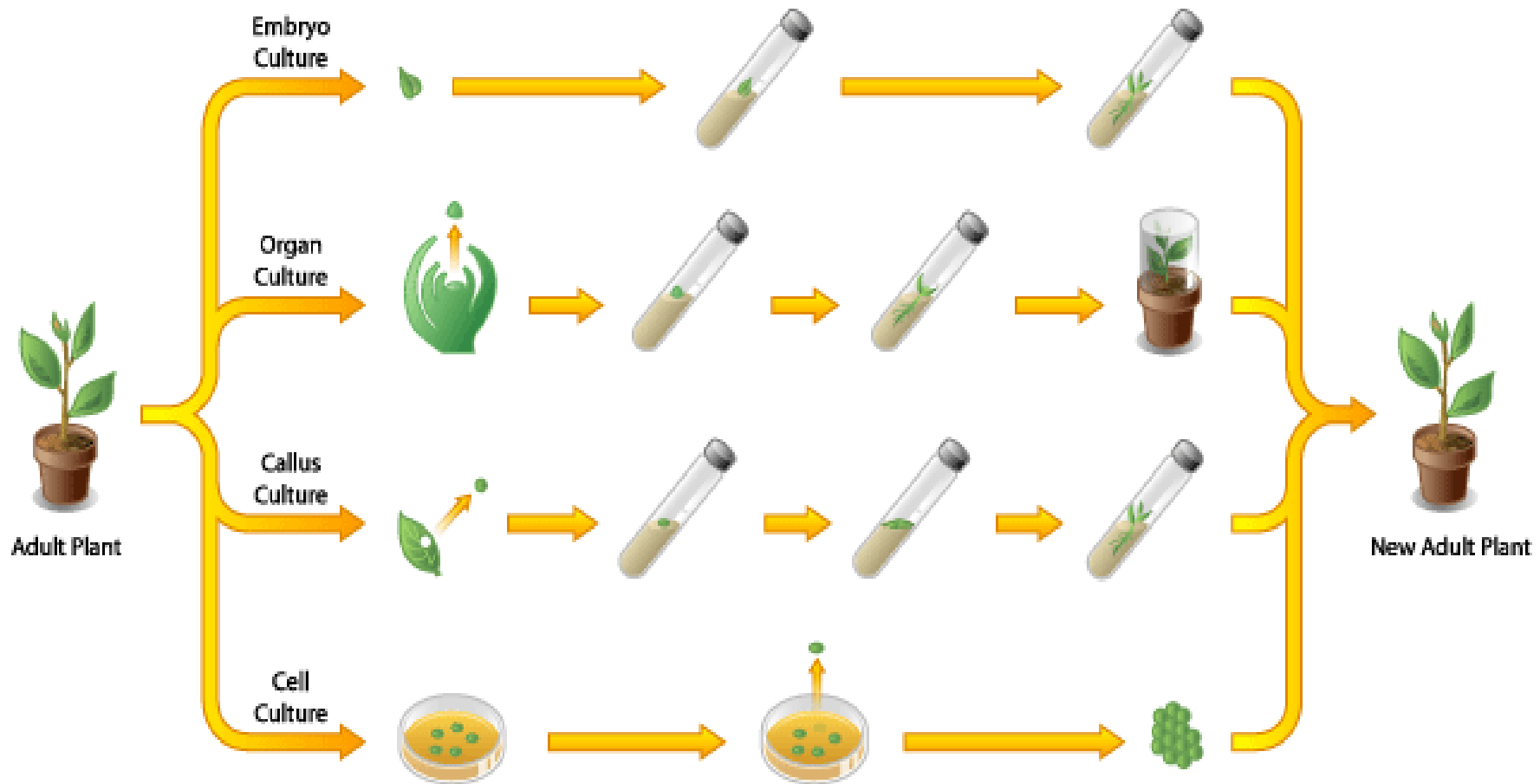
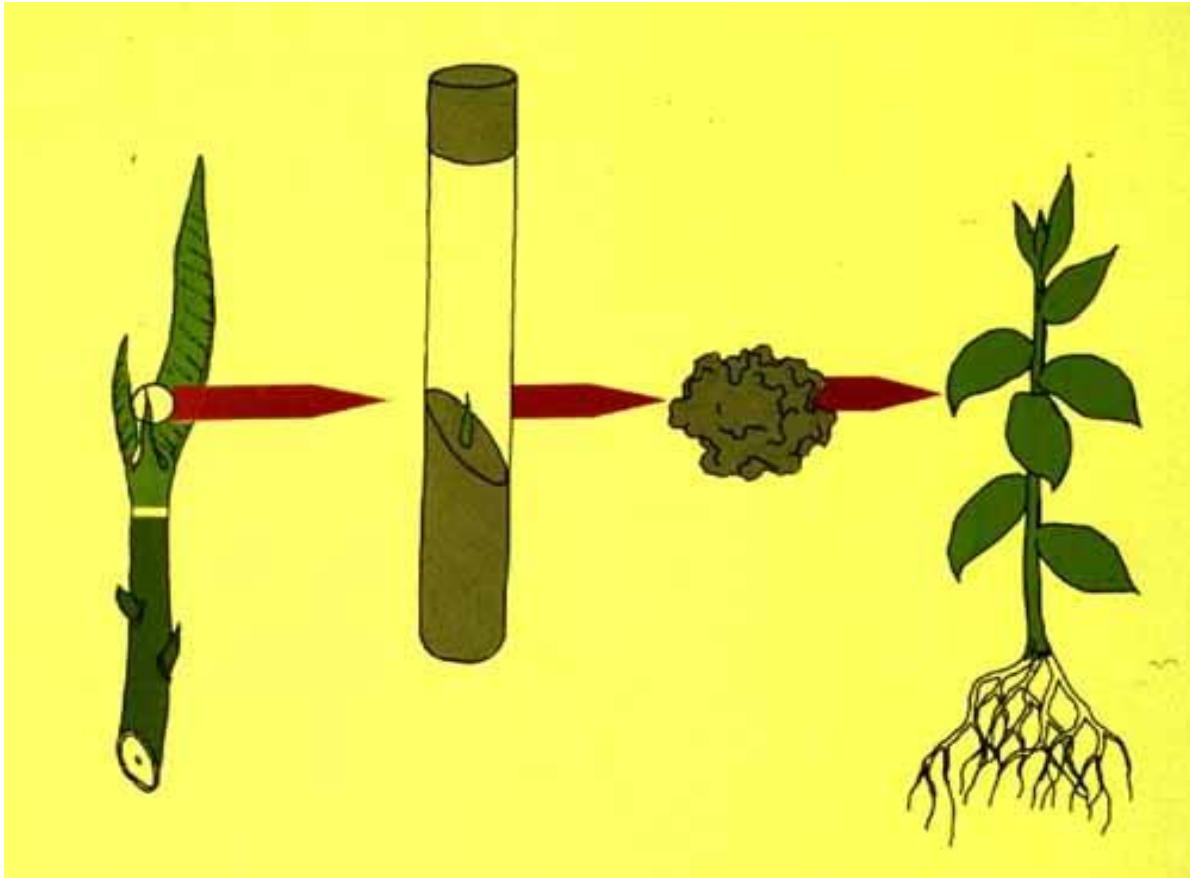


Figure : Different methods of cell culture.

www.scq.ubc.ca/your-guide-to-plant-cell-culture/

II. Nuôi cấy mô và cơ quan thực vật (Plant organ and tissue culture)

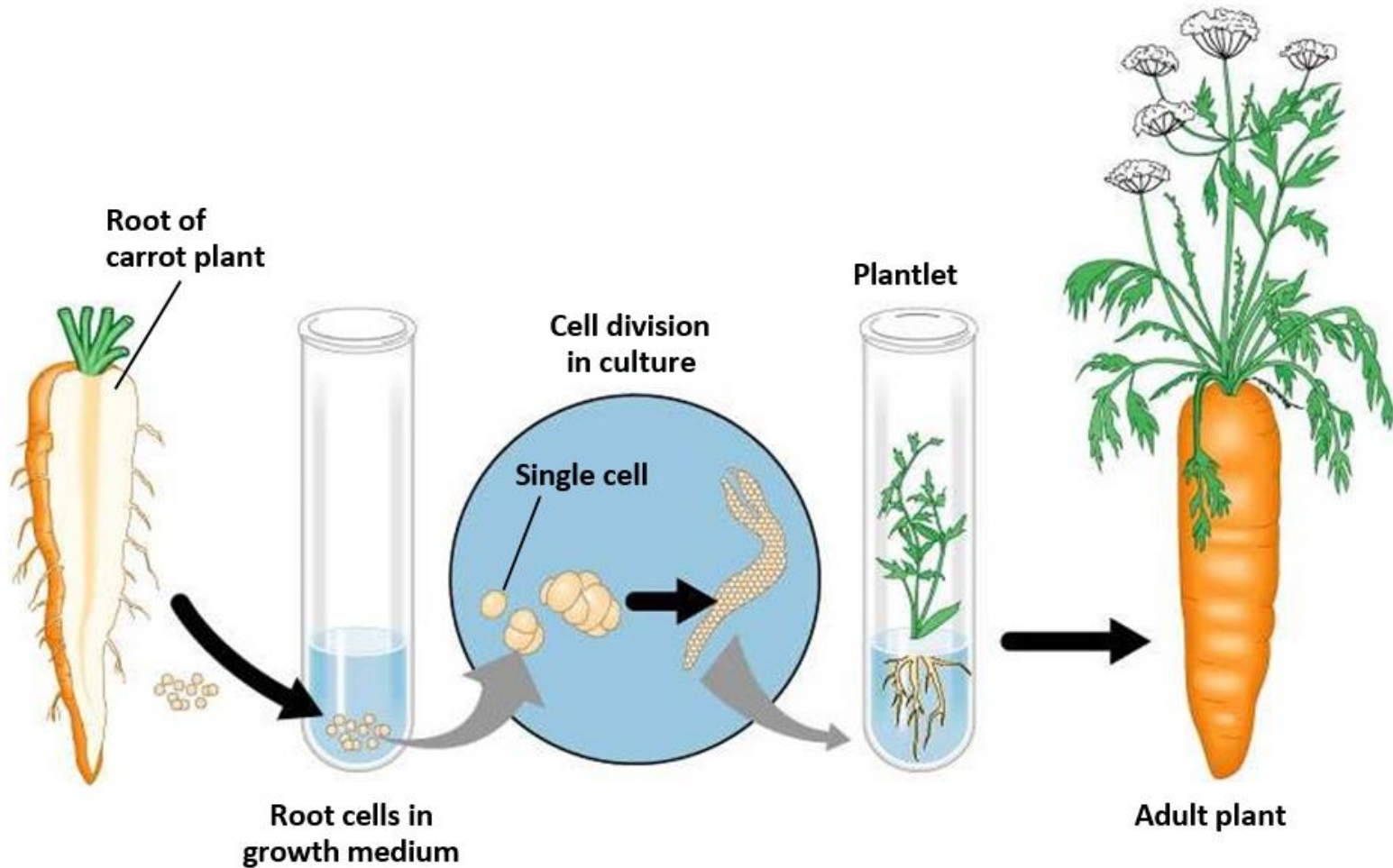
Nuôi cấy mô phân sinh (meristem culture)



Proliferate under the sterile conditions of *in vitro* culture

II. Nuôi cấy mô và cơ quan thực vật (Plant organ and tissue culture)

Nuôi cấy mô rễ (root culture)



II. Nuôi cấy mô và cơ quan thực vật (Plant organ and tissue culture)

Nuôi cấy bao phấn hạt phấn (anther and pollen culture)

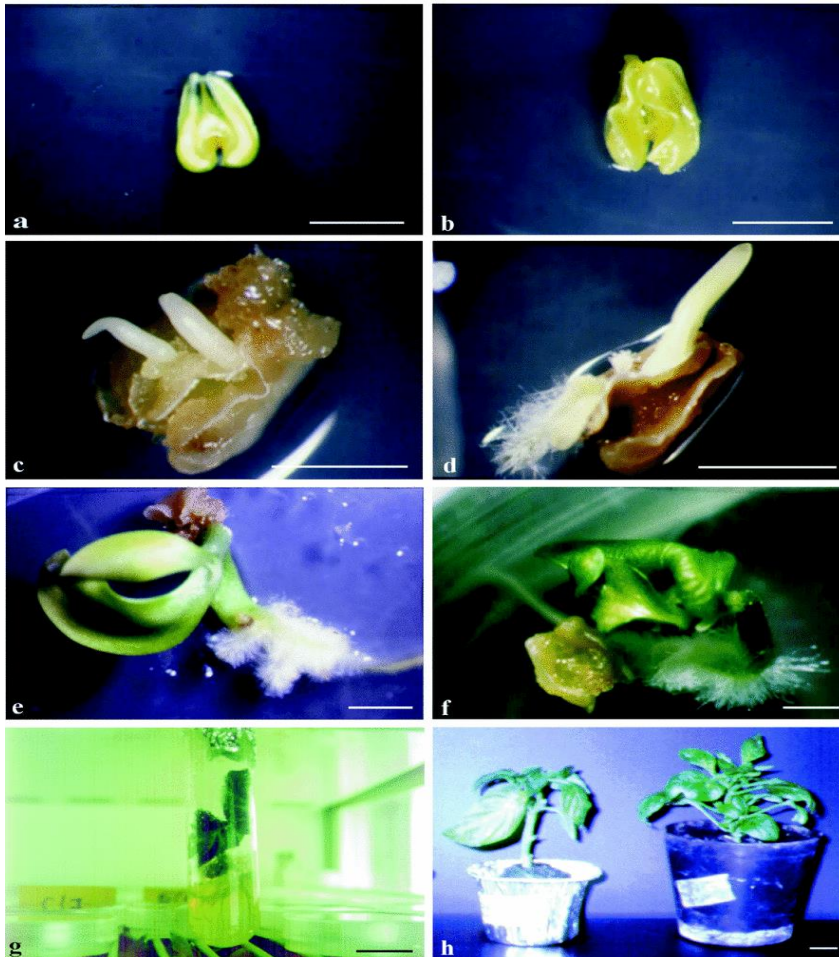


Figure Anther culture and haploid plants regeneration

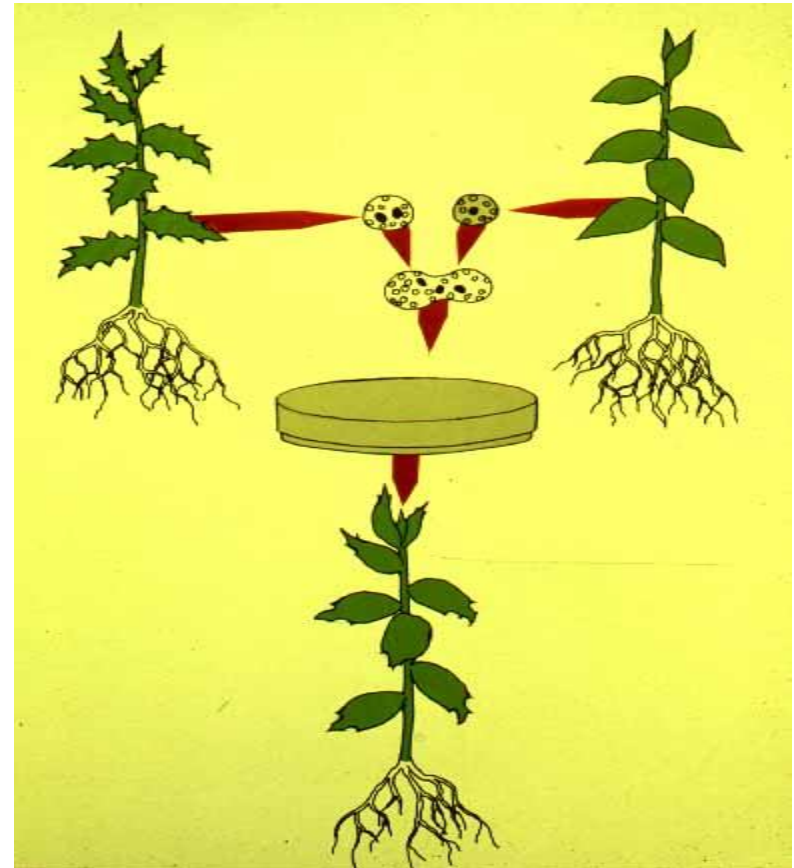
(a) Anther at the onset of the culture. (b) Anther after 6 days in culture. (c, d) Embryos emerging from the anthers after 30 days in culture, (e) and with leaves (f, g) subcultured in growing medium. (h) 80-day-old regenerated haploid plant from anther culture (left-hand side) and a diploid control of the same age (right-hand side).

II. Nuôi cấy mô và cơ quan thực vật (Plant organ and tissue culture)

Nuôi cấy protoplast (protoplast culture)



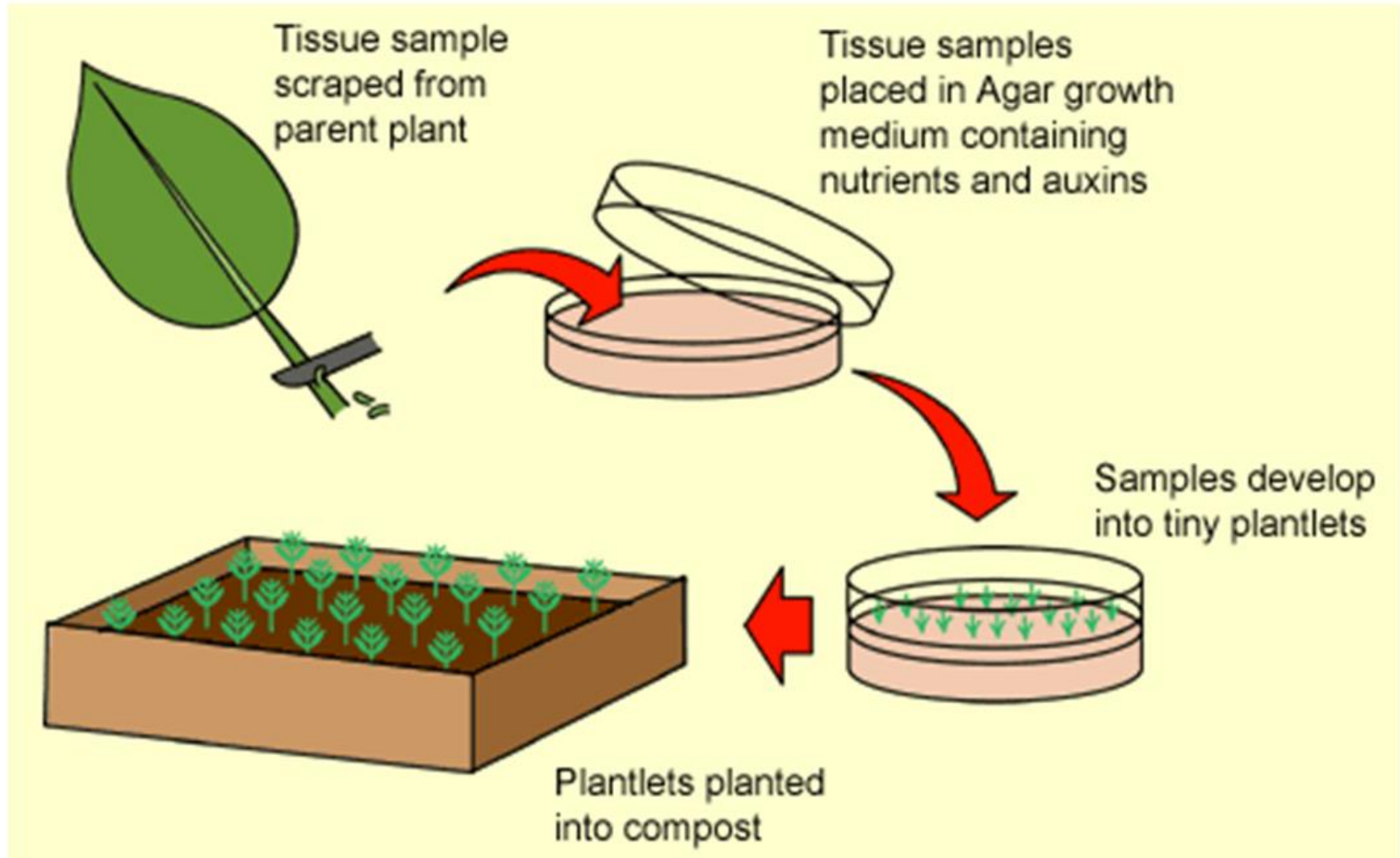
02 protoplast có khả năng dung hợp



Cells are stripped of their cell walls and brought into close contact, they tend to fuse with each other

II. Nuôi cấy mô và cơ quan thực vật (Plant organ and tissue culture)

Quá trình vi nhân giống (micropropagation process)



III. Sự phát triển công nghệ gen ở thực vật (Gene technology development in plants)

3.1. Các phương pháp chuyển gen ở thực vật (Methods of gene transfer in plants)

Nhờ phát hiện *Agrobacterium tumefaciens* gây khối u ở thực vật, việc chuyển gen ở thực vật có bước nhảy vọt.

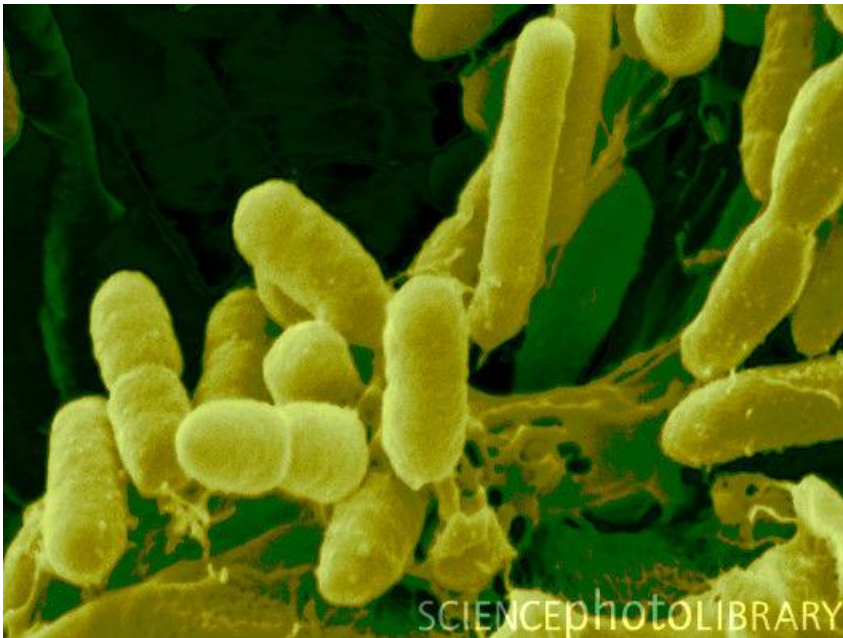
Do tế bào thực vật có vách cứng nên các nhà nghiên cứu đã tìm nhiều phương pháp khác nhau để đưa gen vào bên trong tế bào TV.

- Chuyển gen bằng phương pháp gián tiếp
- Chuyển gen bằng phương pháp trực tiếp

3.1. Các phương pháp chuyển gen ở thực vật

a/ Chuyển gen qua trung gian *Agrobacterium tumefaciens*

Được thực hiện nhờ vi khuẩn tạo khối u ở thực vật, chủ yếu qua Ti-plasmid. Đây là phương pháp thông dụng và dễ thực hiện ở thực vật

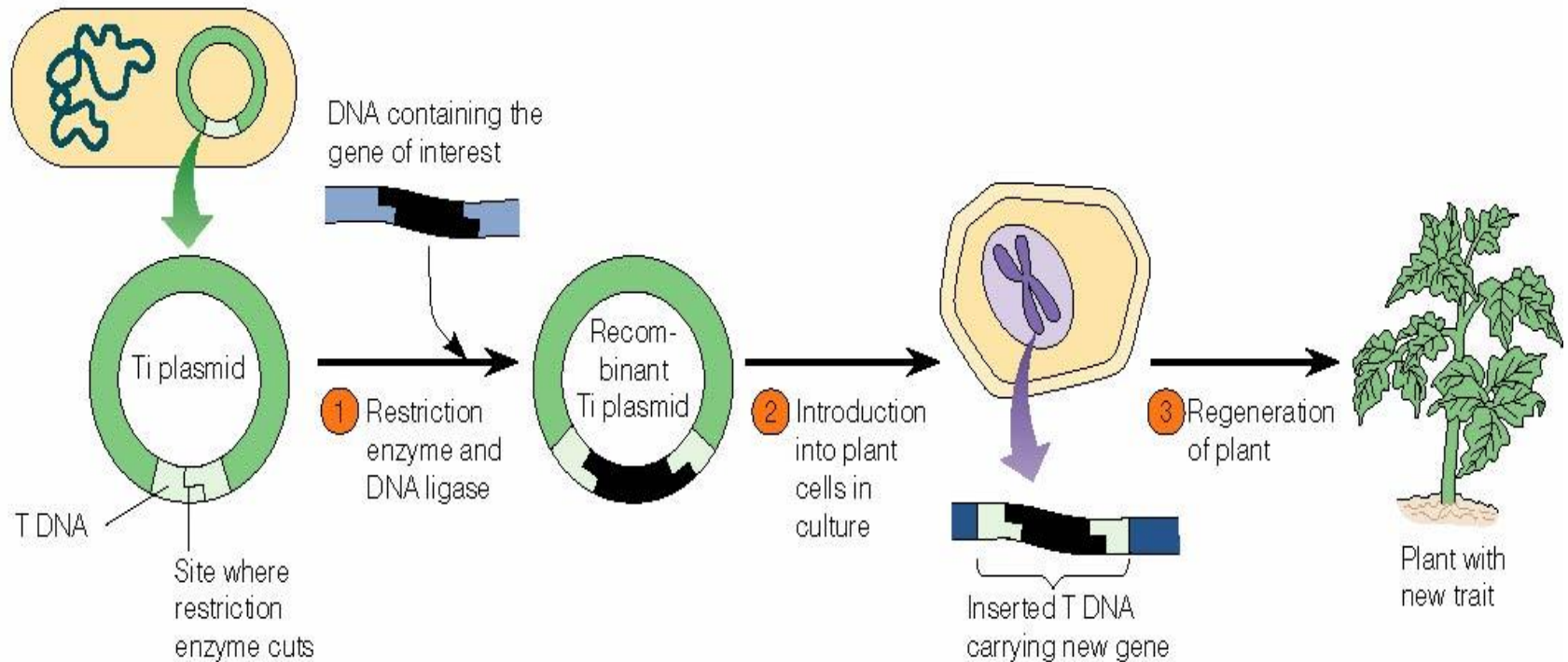


A. tumefaciens là loài VK G⁻, sống trong đất, gây bệnh cho TV được sử dụng như các vector tự nhiên để mang các gen ngoại lai vào mô và TB thực vật.

A. tumefaciens

a/ Chuyển gen qua trung gian *Agrobacterium tumefaciens*

Agrobacterium tumefaciens



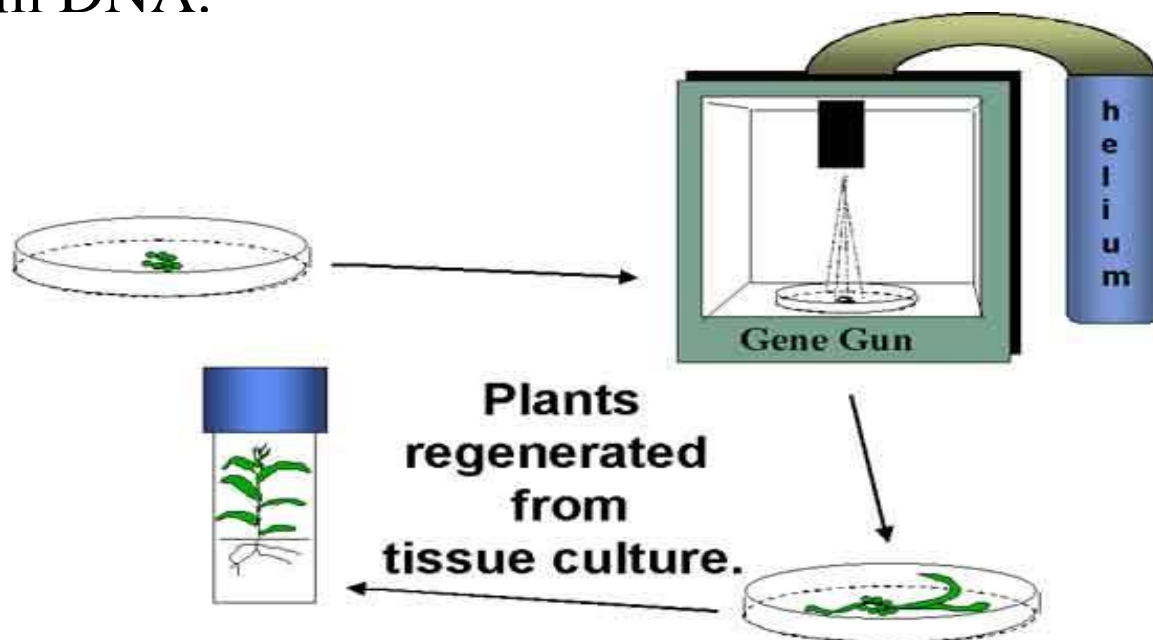
Copyright © 2005 Pearson Education, Inc. publishing as Benjamin Cummings

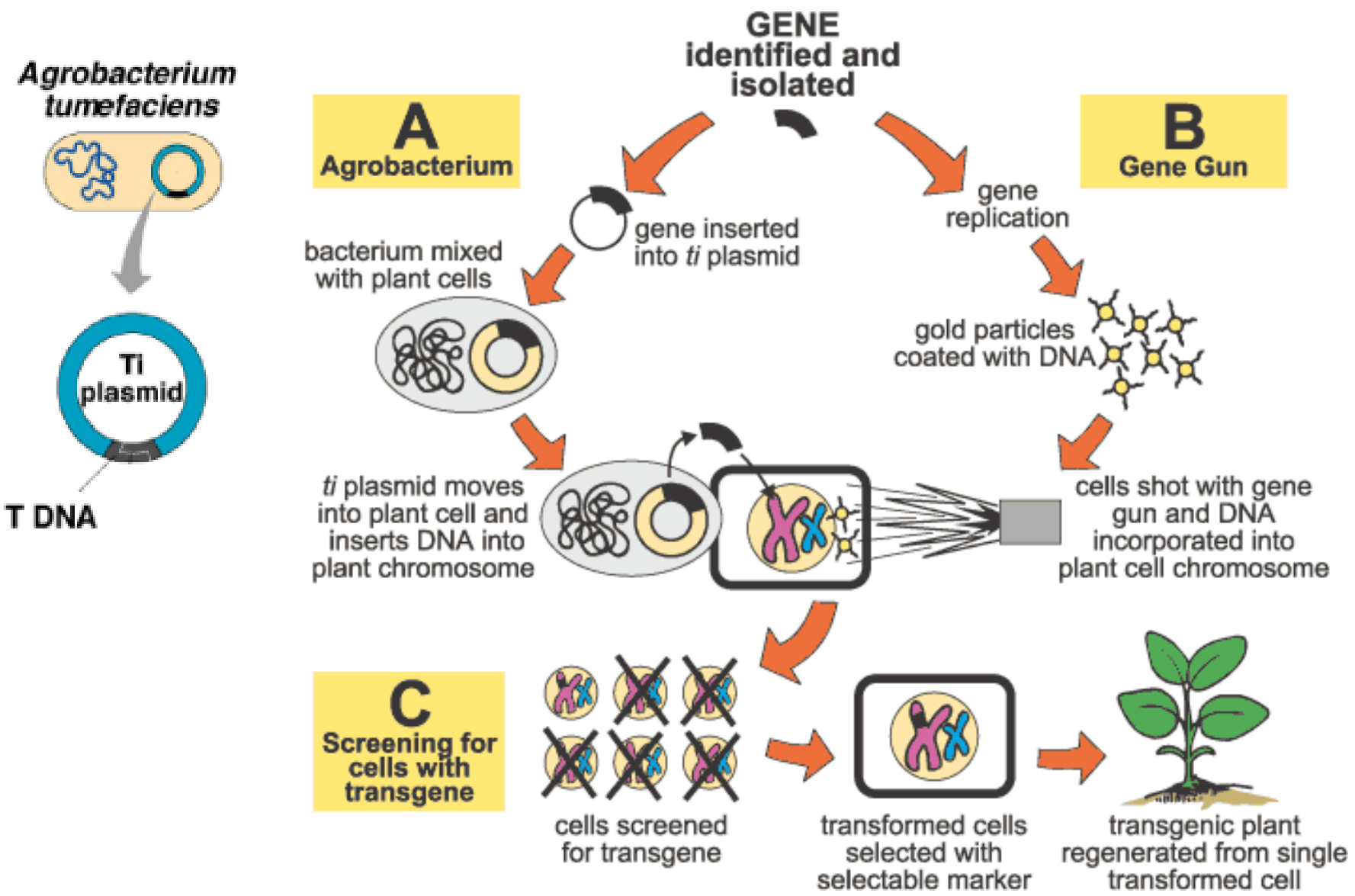
3.1. Các phương pháp chuyển gen ở thực vật

b) Chuyển gen trực tiếp

Có nhiều phương pháp như sử dụng lyposome, điện biến nạp, vi tiêm, bắn gen, dùng silicon carbide.

+ Bắn gen là sử dụng tốc độ cao của vi đạn đạo mang RNA hay DNA xuyên vào trong tế bào. Các vi đạn là những hạt tungsten hay vàng tẩm DNA.





The basic process of plant transformation with *Agrobacterium* and the gene gun.

3.1. Các phương pháp chuyển gen ở thực vật

b) Chuyển gen trực tiếp

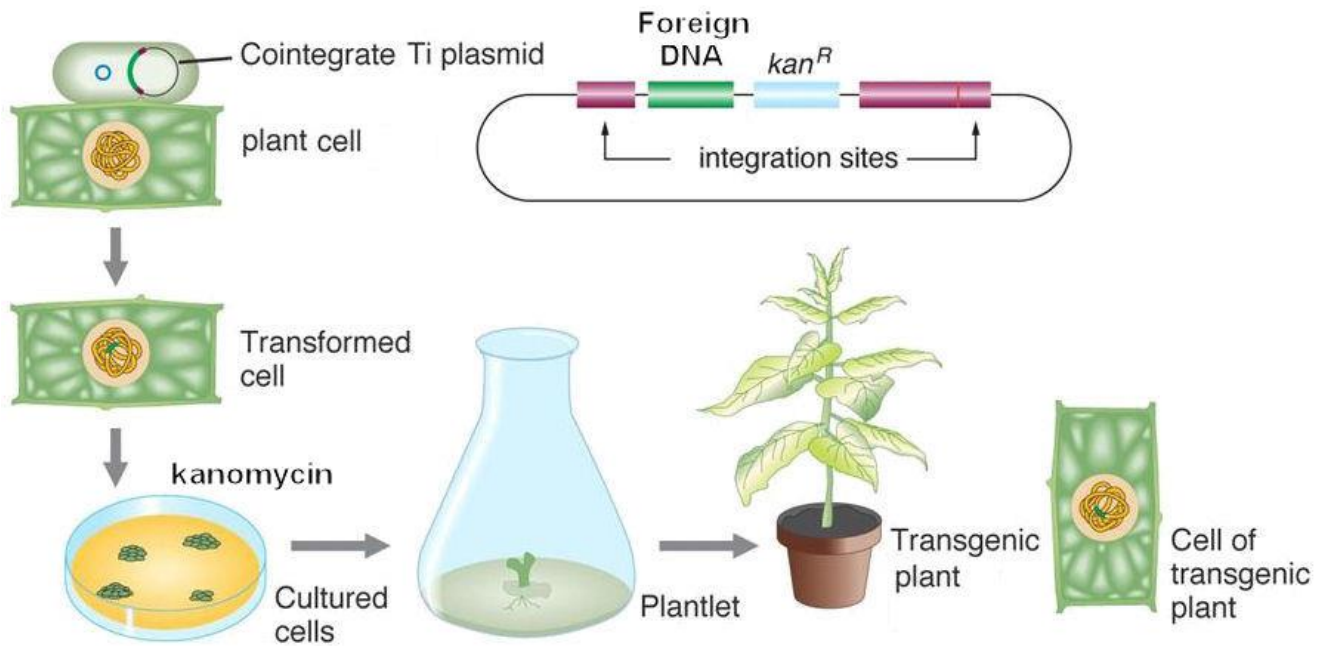
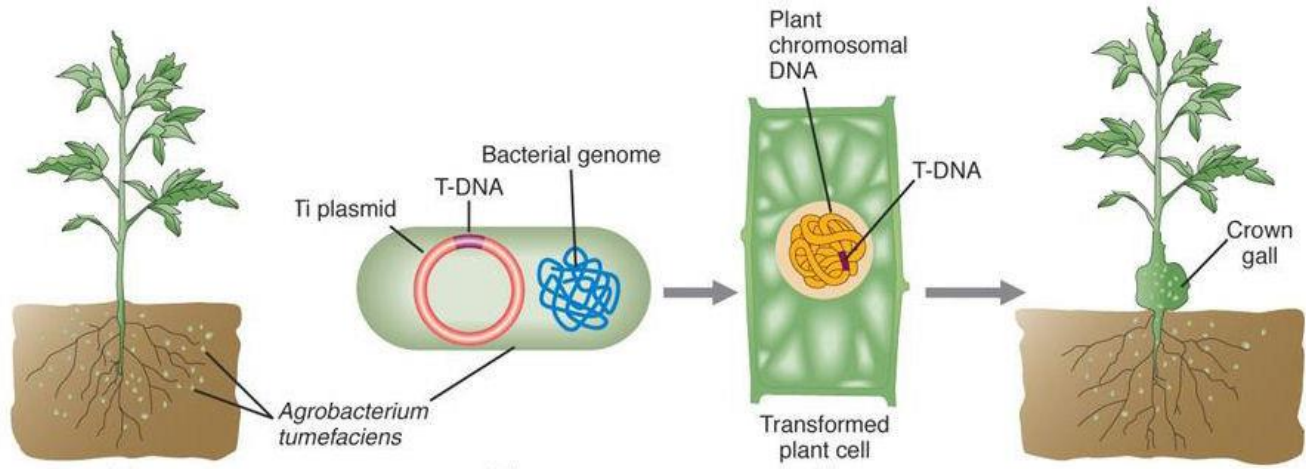
+ Vi tiêm có thể được thực hiện dễ dàng đối với tế bào trần cố định trên alginate. Hiệu quả có thể đạt 20% đối với tế bào cây thuốc lá.

+ Biến nạp qua trung gian các sợi silicon carbide: Trộn chung các plasmid DNA với tế bào trong sự hiện diện của các sợi silicon carbide và lắc. Khi lắc dung dịch, các sợi mảnh của silicon carbide tương tự như những cây kim làm thủng vách tế bào để plasmid DNA xâm nhập vào trong

3.1. Các phương pháp chuyển gen ở thực vật

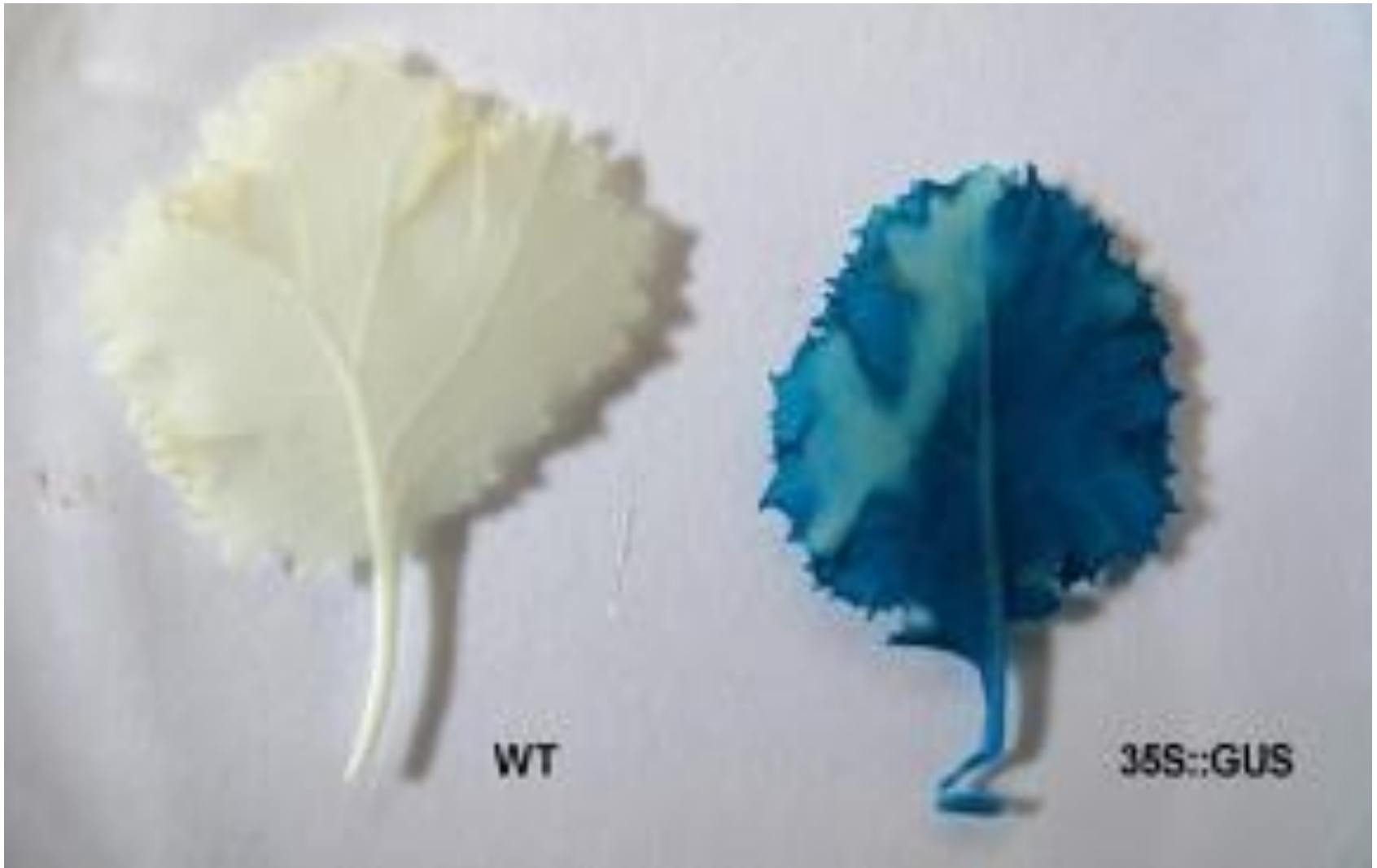
c/ Các gen đánh dấu

- Gen kháng kháng sinh
- Gen β -glucuronidase (*gusA*)
- Gen luciferase
- Gen mã hóa protein phát huỳnh quang màu xanh lục GFP (green fluorescent protein) của sứa.

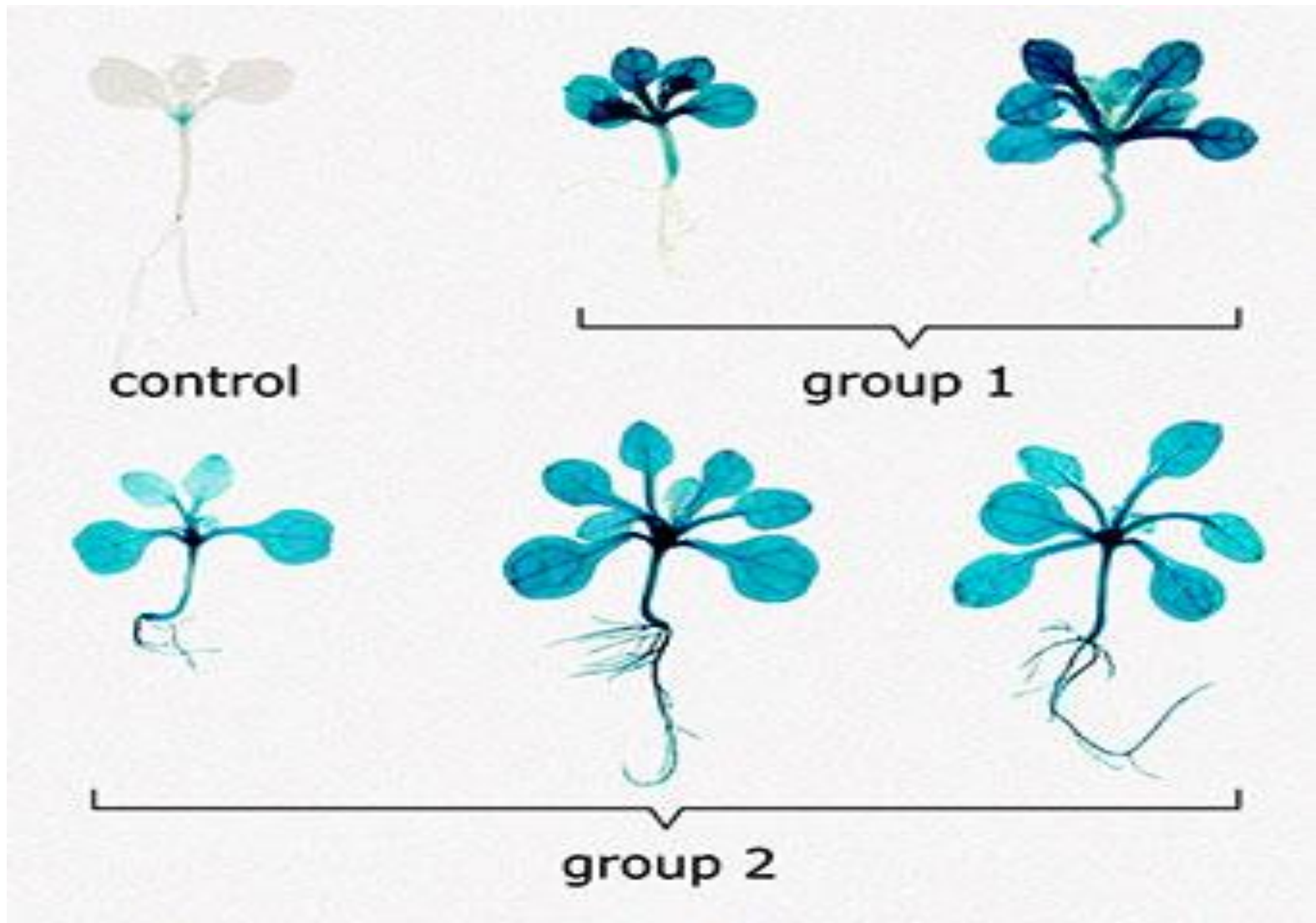


Phương pháp thử hoạt tính β -glucuronidase

- Ngâm mẫu lá trong thuốc thử Gus, để qua đêm ở 37⁰ C.
- Quan sát dưới KHV, các tế bào xuất hiện màu xanh chàm đặc trưng



Sử dụng gen chỉ thị GUS ở cây *Brassica* sau chuyển gen



Sử dụng gen chỉ thị GUS ở *Arabidopsis thaliana* sau chuyển gen

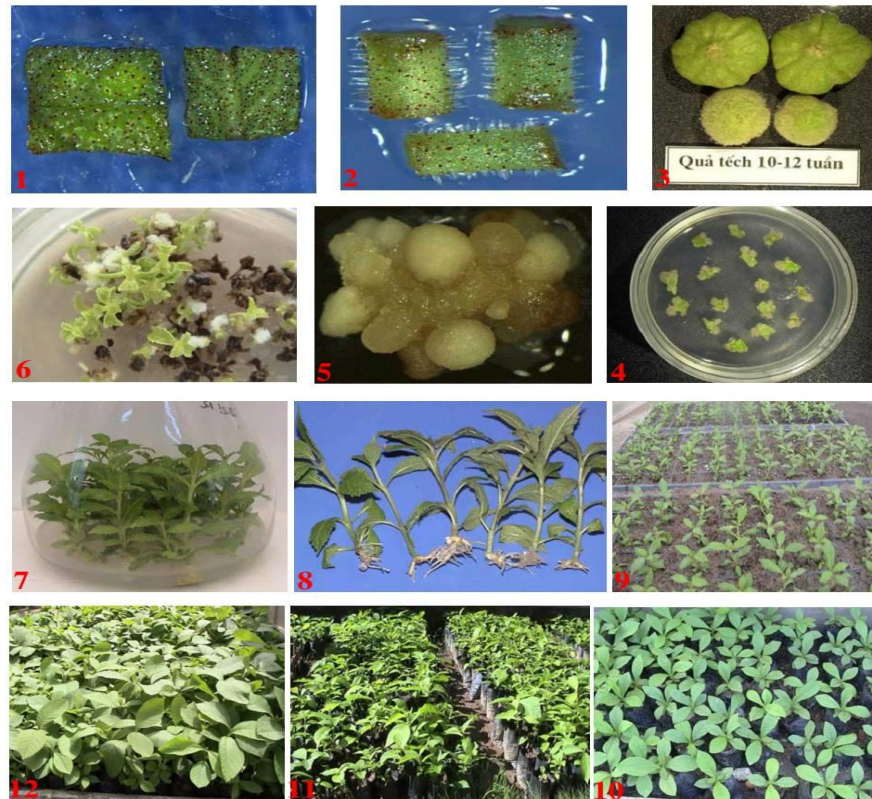
IV. Các ứng dụng của nuôi cấy mô tế bào thực vật

a/ Nhân giống vô tính quy mô lớn

- Hệ số nhân giống lớn;
- Sự đồng đều của cây giống ảnh hưởng đến năng suất và chất lượng sản phẩm;
- Rút ngắn thời kỳ sinh trưởng và sử dụng ưu thế lai.

IV. Các ứng dụng của nuôi cấy mô tế bào thực vật

a/ Nhân giống vô tính quy mô lớn



Quy trình vi nhân giống cây tẻch

1, 2, 3: Mẫu đưa vào nuôi cấy;

4, 5: Tạo callus phân hoá; 6: Cây con tái sinh từ phân vô tính;

7: Nhân nhanh chồi in vitro; 8: Nuôi cấy phát sinh rễ;

9, 10, 11, 12: Cây tẻch in vitro ngoài vườn ươm (1 tháng, 3 tháng, 5 tháng tuổi)

IV. Các ứng dụng của nuôi cấy mô tế bào thực vật

a/ Nhân giống vô tính quy mô lớn



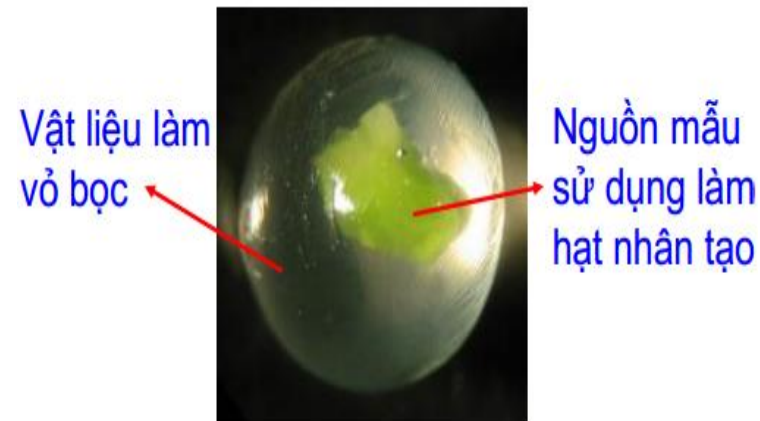
IV. Các ứng dụng của nuôi cấy mô tế bào thực vật

b/ Củ bi và hạt giống nhân tạo (artificial seeds)

- Dễ dàng bảo quản và vận chuyển
- Cung cấp giống số lượng lớn



Hàng trăm “hạt” giống khoai tây nằm gọn trong lòng bàn tay đủ để trồng trên diện tích cả trăm mét vuông. Và điều đặc biệt là, theo tác giả của công trình nghiên cứu, loại “hạt” này cho năng suất cao gấp đôi, gấp ba giống khoai tây bình thường.



IV. Các ứng dụng của nuôi cấy mô tế bào thực vật

c/ Sản xuất cây giống sạch mầm bệnh

Cây bị nhiễm vi khuẩn, nấm, tuyến trùng là chọn cành nhánh không nhiễm để vi nhân giống.

Cây bị nhiễm virus, thì dùng pp nuôi cấy mô:

- Qua nhiều dòng cây chuyên, chọn dòng không nhiễm
- Xử lý nhiệt độ: 30 – 37°C/ 10 – 14 ngày; 50 – 60°C/ 5 – 10 phút
- Xử lý hóa chất: malachite, thiouracil, ức chế sinh sản virus



Sơ đồ cắt dọc đỉnh sinh trưởng chồi lan

IV. Các ứng dụng của nuôi cấy mô tế bào thực vật

d/ Lập ngân hàng gen thực vật

Cách giữ giống có hiệu quả hơn cả đối với tế bào nuôi cấy mô và meristem là bảo tồn lạnh. Vấn đề quan trọng trong lưu trữ giống là không để xuất hiện biến dị, phải kiểm tra thường xuyên sức sống và tính ổn định của giống. Lập ngân hàng gen thực vật bằng tế bào nuôi cấy mô là một cách bảo vệ sự đa dạng sinh học của thực vật.

The End