

**ỦY BAN NHÂN DÂN TỈNH ĐỒNG THÁP
TRƯỜNG CAO ĐẲNG CỘNG ĐỒNG ĐỒNG THÁP**



GIÁO TRÌNH

**MÔN HỌC: NUÔI CÂY MÔ THỰC VẬT
NGÀNH, NGHỀ: KHOA HỌC CÂY TRỒNG
TRÌNH ĐỘ: CAO ĐẲNG**

*(Ban hành kèm theo Quyết định Số: /QĐ-CD-ĐT ngày... tháng... năm
2017 của Hiệu trưởng Trường Cao đẳng Cộng đồng Đồng Tháp)*

Đồng Tháp, năm 2017

TUYÊN BỐ BẢN QUYỀN

Tài liệu này thuộc loại sách giáo trình nên các nguồn thông tin có thể được phép dùng nguyên bản hoặc trích dùng cho các mục đích về đào tạo và tham khảo.

Mọi mục đích khác mang tính lệch lạc hoặc sử dụng với mục đích kinh doanh thiếu lành mạnh sẽ bị nghiêm cấm.

TaiLieu.vn

LỜI GIỚI THIỆU

Giáo trình Nuôi cấy mô thực vật được biên soạn trên cơ sở kế hoạch đào tạo ngành Khoa học cây trồng của Trường Cao đẳng Cộng đồng Đồng Tháp. Giáo trình này cung cấp cho sinh viên những kiến thức cơ bản nhất về kỹ thuật nuôi cấy mô ở thực vật.

Trong khi biên soạn, tác giả đã cố gắng cập nhật những kiến thức mới có liên quan đến nội dung chương trình đào tạo và phù hợp với mục tiêu đào tạo. Nội dung lý thuyết và thực hành được biên soạn gắn liền nguyên lý cơ sở với nhu cầu thực tế trong sản xuất đồng thời có tính thực tiễn cao.

Nội dung giáo trình được biên soạn với thời gian đào tạo hai tín chỉ gồm: năm bài

Bài 1: Giới thiệu về nuôi cấy mô thực vật

Bài 2: Các nguyên tắc của nuôi cấy mô và tế bào thực vật

Bài 3: Các ứng dụng của kỹ thuật nuôi cấy mô thực vật

Bài 4: Sự thuần dưỡng

Bài 5: Các sự cố và cách xử lý

Chân thành cảm ơn! Tất cả thành viên trong hội đồng thẩm định phản biện, đã đóng góp và điều chỉnh nội dung giáo trình được hoàn chỉnh.

Mặc dù đã cố gắng biên soạn để đáp ứng được mục tiêu đào tạo nhưng không tránh được những khiếm khuyết. Rất mong nhận được đóng góp ý kiến của các thầy, cô giáo, bạn đọc để giáo trình hoàn thiện hơn.

Xin chân thành cảm ơn.

Đồng Tháp, ngày.....tháng ... năm 2017

Chủ biên

Phan Thị Thanh Tuyền

MỤC LỤC

	Trang
LỜI GIỚI THIỆU	ii
CHƯƠNG 1: GIỚI THIỆU VỀ NUÔI CÂY MÔ THỰC VẬT	1
1. Khái niệm	1
2. Lịch sử phát triển nuôi cấy mô trên thế giới	2
3. Hiện trạng nuôi cấy mô ở Việt Nam	8
CHƯƠNG 2: CÁC NGUYÊN TẮC CỦA NUÔI CÂY MÔ VÀ TẾ BÀO THỰC VẬT	10
1. Nuôi cấy mô và tế bào thực vật.....	11
1.1. Định nghĩa	11
1.2. Các kiểu nuôi cấy	11
2. Thực vật và mẫu cấy	12
2.1. Thực vật.....	12
2.2. Mẫu cấy	12
3. Sự vô trùng	13
3.1. Vô trùng bề mặt mẫu cấy	13
3.2. Vô trùng môi trường và dụng cụ nuôi cấy	15
3.3. Tủ cấy vô trùng	16
4. Môi trường nuôi cấy.....	17
4.1. Nước	17
4.2. Các nguyên tố khoáng	17
4.3. Nguồn cacbohydrate	20
4.4. Vitamin.....	21
4.5. Chất tạo gel.....	22
4.6. Chất điều hòa sinh trưởng	22
4.7. Chelate	26
4.8. Tác nhân thẩm thấu	26
4.9. Than hoạt tính.....	26
4.10. pH	27

4.11. Acid hữu cơ	27
4.12. Thành phần bổ sung không xác định	27
5. Các kiểu bình chứa và nắp đậy sử dụng trong nuôi cấy mô và tế bào.....	27
6. Điều kiện nuôi cấy.....	28
6.1. Nhiệt độ	28
6.2. Ánh sáng.....	29
6.3. Ẩm độ	29
7. Chuẩn bị môi trường nuôi cấy.....	29
7.1. Chuẩn bị hóa chất.....	29
7.2. Chuẩn bị dung dịch gốc.....	30
7.3. Nấu môi trường	30
7.4. Đo pH	30
8. Thực hành: Chuẩn bị môi trường nuôi cấy	30
CHƯƠNG 3: CÁC ỨNG DỤNG CỦA KỸ THUẬT NUÔI CẤY MÔ THỰC VẬT	35
1. Nhân giống hữu tính.....	36
2. Nhân giống vô tính – vi nhân giống.....	37
2.1. Lợi ích của vi nhân giống.....	37
2.2. Bất lợi của vi nhân giống	37
2.3. Một số kỹ thuật giúp gia tăng sự sinh trưởng và giảm giá thành trong vi nhân giống	38
3. Nhân giống từ phôi vô tính	38
4. Thực hành: Tái sinh mẫu cấy	39
CHƯƠNG 4: SỰ THUẦN DƯỠNG	42
1. CẤU TRÚC HÌNH THÁI VÀ GIẢI PHẪU CỦA CÂY CON CÂY MÔ	42
1.1. Cấu trúc hình thái và giải phẫu của lá cây con trong ống nghiệm.....	42
1.2. Khí khổng	43
1.3. Lá.....	43
1.4. Thân.....	43

1.5. Rễ.....	43
1.6. Khả năng giữ nước	43
2. Quang hợp	43
3. Kỹ thuật thuần dưỡng.....	44
3.1. Trong bình nuôi cấy	44
3.2. Trong môi trường tự nhiên hoặc nhà lưới.....	44
3.3. Cơ sở hạ tầng cho sự thuần dưỡng.....	44
3.4. Tự động hóa	46
4. Tóm tắt các thông số và sử dụng hóa chất trong quá trình thuần dưỡng	47
5. Thực hành: Thuần dưỡng cây cấy mô.....	47
CHƯƠNG 5 CÁC SỰ CỐ VÀ CÁCH XỬ LÝ	51
1. Nhiễm vi sinh vật	52
1.1. Nhiễm do virus.....	52
1.2. Nhiễm do vi khuẩn	53
1.3. Nhiễm do nấm.....	54
1.4. Mycoplasma	54
1.5. Nhện nhỏ và bọ trĩ	54
2. Sinh lý sinh thái.....	54
2.1. Sự vận chuyển nước	54
2.2. Thành phần khí trong bình nuôi cấy Error! Bookmark not defined.	54
3. Sự hóa nâu	55
3.1. Triệu chứng	55
3.2. Nguyên nhân	55
3.3. Các biện pháp chữa trị.....	55
4. Sự biến dị tế bào soma	55
5. Sự thừa nước	56
5.1. Triệu chứng	56
5.2. Nguyên nhân	56
5.3. Các biện pháp chữa trị.....	56
6. Sự chết chồi	57

7. Cấu trúc bất thường.....	57
8. Các dạng thể khảm.....	57
9. Thực hành: Khảo sát và xử lý một số trường hợp tạp nhiễm trong nuôi cấy mô	57
TÀI LIỆU THAM KHẢO	59

TaiLieu.vn

GIÁO TRÌNH MÔN HỌC

Tên môn học: NUÔI CÂY MÔ THỰC VẬT

Mã môn học: CNN483

Vị trí, tính chất, ý nghĩa và vai trò của môn học:

- Vị trí: Là môn học tự chọn được bố trí trong khung các môn học chuyên ngành.
- Tính chất: Đây là một trong những môn học kỹ năng quan trọng giúp cho sinh viên có kiến thức cơ bản về nuôi cấy mô ở thực vật. Yêu cầu sinh viên cần phải đảm bảo đủ số giờ lý thuyết và thực hành
- Ý nghĩa và vai trò: Giáo trình này cung cấp cho sinh viên những kiến thức, kỹ năng cơ bản nhất nuôi cấy mô thực vật.

Mục tiêu của môn học:

- Về kiến thức:
 - + Trình bày được về nuôi cấy mô và hiện trạng nuôi cấy mô trên thế giới và ở Việt Nam
 - + Trình bày được các nguyên tắc trong nuôi cấy mô và tế bào thực vật, những ứng dụng của kỹ thuật nuôi cấy mô, các kiến thức liên quan đến sự thuần dưỡng cây nuôi cấy mô, những kiến thức thường gặp trong các sự cố và cách xử lý.
- Về kỹ năng:
 - + Phân tích được hiện trạng và ưu nhược điểm của kỹ thuật nuôi cấy mô
 - + Thành thạo các thao tác trong chuẩn bị môi trường nuôi cấy mô, kỹ thuật tái sinh mẫu cấy, kỹ thuật thuần dưỡng cây nuôi cấy mô.
- Về năng lực tự chủ và trách nhiệm: Học tập tích cực, chủ động trong quá trình học và có ý thức vận dụng kiến thức vào thực tiễn.

Nội dung của môn học:

Số TT	Tên các chương trong môn học	Thời gian (giờ)			
		Tổng số	Lý thuyết	Thực hành, thí nghiệm, thảo luận, bài tập	Kiểm tra (định kỳ)/Ôn thi, Thi kết thúc môn học
1	CHƯƠNG 1: Giới thiệu về nuôi cấy mô thực vật 1. Khái niệm 2. Lịch sử phát triển của nuôi cấy mô trên thế giới 3. Hiện trạng nuôi cấy mô ở Việt Nam	3	3		
2	CHƯƠNG 2: Các nguyên tắc của nuôi cấy mô và tế bào thực vật 1. Nuôi cấy mô và tế bào 2. Thực vật và mẫu cấy 3. Sự vô trùng 4. Môi trường nuôi cấy 5. Các kiểu bình chứa và nắp đậy sử dụng trong nuôi cấy mô và tế bào 6. Điều kiện nuôi cấy 7. Chuẩn bị môi trường nuôi cấy 8. Thực hành	9	4	4	1LT
3	CHƯƠNG 3: Các ứng dụng của kỹ thuật nuôi cấy mô thực vật 1. Nhân giống hữu tính 2. Nhân giống vô tính – vi nhân giống	12	4	8	

	3. Nhân giống từ phôi vô tính 4. Thực hành				
	Kiểm tra (2)	1			1TH
4	CHƯƠNG 4: Sự thuần dưỡng 1. Cấu trúc hình thái và giải phẫu của cây con cấy mô 2. Quang hợp 3. Kỹ thuật thuần dưỡng 4. Tóm tắt các thông số và sử dụng hoá chất trong quá trình thuần dưỡng 5. Thực hành	8	4	4	
5	CHƯƠNG 5: Các sự cố và cách xử lý 1. Nhiễm vi sinh vật 2. Sinh lý sinh thái 3. Sự hóa nâu 4. Sự biến dị tế bào soma 5. Sự thừa nước 6. Sự chết chồi 7. Cấu trúc bất thường 8. Các dạng thể khảm 9. Thực hành	7	4	3	
	Ôn thi (3)				
	Thi/kiểm tra kết thúc môn học (4)				
	Cộng	40	19	19	2

BÀI 1

GIỚI THIỆU VỀ NUÔI CÂY MÔ THỰC VẬT

MD 40-01

Giới thiệu:

Từ rất lâu, con người đã biết nhân giống cây trồng bằng rất nhiều biện pháp. Từ cách gieo hạt đến cách mà người ta lấy trực tiếp một nhánh cây để trồng, gọi là giâm cành, chiết cành... Hay chắp nối những thân cây này với thân cây kia bằng cách ghép cành. Những ưu điểm vượt trội của nó rất được ứng dụng rộng rãi. Cùng một lúc chúng ta có thể nhân giống cây lên hàng loạt mà không mất nhiều thời gian để gieo hạt, chờ cho cây con lớn.

Bên cạnh đó người ta lại có một công nghệ hiện đại hơn, gọi là công nghệ nuôi cấy mô tế bào. Cùng với sự phát triển của khoa học kỹ thuật, nền công nghệ này đã và đang ứng dụng rộng rãi trong cây trồng... Cùng một lúc nó cũng tạo ra hàng vạn cây trồng mới, nhanh chóng mà không nhất thiết phải là từ các hạt của cây mà có thể lấy bất kỳ mô bào nào, trừ những mô tế bào đã hoá gỗ. Tuy nhiên nền công nghệ này đòi hỏi khá tốn kém, sự kiên nhẫn và khéo léo .

Mục tiêu:

Kiến thức: Trình bày được về nuôi cấy mô và hiện trạng nuôi cấy mô trên thế giới và ở Việt Nam

Kỹ năng: Phân tích được hiện trạng và ưu nhược điểm của kỹ thuật nuôi cấy mô.

Năng lực tự chủ và trách nhiệm: Học tập tích cực, chủ động trong quá trình học và có ý thức vận dụng kiến thức vào thực tiễn.

1. Khái niệm

Nuôi cấy mô tế bào thực vật là tổng hợp những kỹ thuật được sử dụng để duy trì và nuôi cấy các tế bào, mô hoặc cơ quan thực vật trong điều kiện vô trùng trên môi trường nuôi cấy giàu dinh dưỡng với những thành phần đã xác định.

Nuôi cấy mô tế bào thực vật dựa trên thực tế là rất nhiều các tế bào thực vật có khả năng tái sinh thành cây hoàn chỉnh (còn gọi là totipotency – khả năng biệt hóa của tế bào đơn lẻ thành những tế bào chuyên biệt với số lượng không giới hạn). Các tế bào đơn lẻ, các tế bào thực vật không có thành tế bào (protoplast), các mảnh lá, rễ hoặc thân, thường có thể được sử dụng để tạo ra các tế bào mới trên môi trường nuôi cấy bổ sung các chất dinh dưỡng và hormone thực vật.

*** Ưu điểm của công nghệ nuôi cấy mô tế bào thực vật**

- Sản xuất chính xác số lượng cây giống chất lượng cao hoặc chọn lọc những tính trạng mong muốn khác.
- Số lượng lớn cây giống đồng đều về kích thước và cùng mang những đặc tính vượt trội (khả năng sinh trưởng, phát triển tốt, khả năng chống sâu bệnh cao, rút ngắn thời gian trưởng thành của cây, năng suất cao...).
- Tái sinh cây hoàn chỉnh từ các tế bào thực vật đã được biến đổi gen.
- Tạo ra cây trong điều kiện vô trùng, để có thể vận chuyển mà hạn chế tối đa khả năng phát tán bệnh, sâu bệnh hoặc các nhân tố gây bệnh.
- Làm sạch các cây bị nhiễm virus nhất định hoặc các nhân tố lây nhiễm khác và nhân nhanh các cây này như là nguồn nguyên liệu sạch phục vụ nông nghiệp (chúng tôi)

*** Hạn chế của công nghệ nuôi cấy mô tế bào thực vật**

Rủi ro của công nghệ này nằm ở khâu tạo nguồn mẫu ban đầu. Để chọn được nguồn mẫu ban đầu tốt thì hầu như chỉ dựa vào kinh nghiệm là chủ yếu. Trong quá trình nuôi cấy nếu xảy ra hiện tượng đột biến gen thì phải tiến hành nuôi cấy từ đầu nên cũng mất khá nhiều thời gian. Ngoài ra, khi đưa cây từ ống nghiệm ra chăm sóc tại vườn ươm thì cần phải chăm sóc rất kỹ để cây thích nghi được với điều kiện môi trường bên ngoài.

Ngoài ra, chi phí đầu tư vào công nghệ nuôi cấy mô tế bào thực vật khá tốn kém nên trên thị trường cây giống cấy mô hiện tại chỉ xuất hiện những Trung tâm nghiên cứu trực thuộc cũng như nhà đầu tư chuyên môn cao và có tâm huyết lớn vào nông nghiệp Việt.

2. Lịch sử phát triển của nuôi cấy mô trên thế giới

Những mốc lịch sử của sự phát triển công nghệ tế bào thực vật

Năm	Sự kiện
1665	Robert Hooke quan sát được tế bào sống dưới kính hiển vi và đưa ra khái niệm tế bào
1838	Matthias Schleiden và Theodore Schwann đề xướng học thuyết tế bào. Schleiden M. J., Arch. Anat., Physiol. U. wiss. Med. (J. Muller), 1838: 137-176; Schwann T., W. Engelman, No. 176 (1910).

- 1902 Haberlandt lần đầu tiên thí nghiệm nuôi cấy mô cây một lá mầm nhưng không thành công. Haberlandt G., Sitzungsber Akad. Wiss. Wien, Math.-Naturwiss. Kl., 111: 69-92.
- 1904 Hannig tiến hành các thí nghiệm nuôi cấy phôi đầu tiên ở các loài họ cải Crucifers. Hannig B., Bot. Zeitung, 62: 45-80.
- 1922 Cho hạt phong lan nảy mầm in vitro. Knudson L., Bot. Gaz., 73: 1-25.
- 1924 Hình thành callus từ rễ cà rốt trong môi trường có acid lactic. Blumenthal F. and Meyer P. Z. Krebsforsch. 21: 250-252.
- 1925 Làm hạt phong lan nảy mầm in vitro. Knudson L., Bot. Gaz., 29: 345-379
- 1929 Laibach sử dụng nuôi cấy phôi để khắc phục hiện tượng bất hoà hợp khi lai ở *Linum* spp. Laibach F., J Hered., 20: 201-208.
- 1934 White đã thành công khi nuôi cấy mô rễ cà chua trong thời gian dài. White P. R., Plant Physiol., 9: 585-600.
- 1934 Kogl lần đầu tiên xác định được vai trò của IAA, 1 hoocmon thực vật đầu tiên có khả năng kích thích sự tăng trưởng và phân chia tế bào. Kogl F. et al., Z. Physiol. Chem., 228: 90-103.
- 1936 Nuôi cấy phôi các loài cây hạt trần khác nhau. LaRue C. R., Bull. Torrey Bot. Club, 63: 365-382
- 1939 Gautheret, Nobecourt và White lần đầu tiên nuôi cấy mô sẹo thành công trong thời gian dài từ mô thượng tầng (cambium) ở cà rốt và thuốc lá. Gautheret R. J., C. R. Acad. Sci. (Paris), 208: 118-120; Nobecourt P., C. R. Soc. Biol. (Paris), 130: 1270-1271; White P. R., Am. J. Bot., 26: 59-64.
- 1941 Overbeek và cs đã sử dụng nước dừa trong nuôi cấy phôi non ở cà rốt. Overbeek J. van et al., Science, 94: 350-351.
- 1942 Gautheret lần đầu tiên theo dõi sự hình thành chất trao đổi thứ cấp trong nuôi cấy mô sẹo thực vật. Gautheret R. J. Bull. Soc. Chim. Biol. 41: 13.
- 1944 Skoog lần đầu tiên nghiên cứu sự hình thành chồi phụ từ nuôi cấy mô thuốc lá in vitro. Skoog F., Am. J. Bot., 31: 19-24.

- 1946 Sự tạo cây đầu tiên từ đỉnh chồi ở *Lupinus* và *Tropaeolum*. Ball E., Am. J. Bot., 33: 301-318.
- 1948 Hình thành chồi phụ và rễ ở thuốc lá. Skoog F. and Tsui C., Am. J. Bot., 355: 782-787
- 1950 Lần đầu tiên nuôi cấy thành công cây một lá mầm bằng nước dừa. Morel G. C. R. Acad. Sci., 230: 2318-2320
- 1951 Nitsch lần đầu tiên nghiên cứu nuôi cấy noãn tách rời in vitro. Nitsch J. P., Am. J. Bot., 38: 566-577.
- 1951 Skoog nghiên cứu sử dụng các hoá chất điều hoà sinh trưởng và phát sinh cơ quan. Skoog F., Annee Biol., 26: 545-562
- 1952 Morel và Martin lần đầu tiên tạo được cây *Dahlia* sạch *virus* bằng nuôi cấy đỉnh sinh trưởng. Morel G. and Martin C., C. R. Hebd. Seances Acad. Sci. (Paris), 235: 1324-1325
- 1952 Morel và Martin lần đầu tiên thực hiện vi ghép in vitro thành công. Morel G. and Martin C., C. R. Acad. Sci. (Paris), 235: 1324-1325.
- 1953 Tulecke lần đầu tiên thành công trong nuôi cấy bao phấn và tạo mô sẹo đơn bội từ hạt phấn *Ginkgo biloba*. Tulecke W. R., Science, 117: 599-600.
- 1954 Muir và cs lần đầu tiên tạo được mô sẹo từ mô nuôi dưỡng (nurse culture). Muir W. H. et al., Science, 119: 877-878.
- 1955 Miller và cs đã phát minh cấu trúc và con đường sinh tổng hợp kinetin. Miller C. et al., J. Am. Chem. Soc., 77: 1392 & 2662-2663.
- 1957 Skoog và Miller đã khám phá vai trò tỷ lệ nồng độ các chất auxin : cytokinin trong môi trường đối với sự phát sinh cơ quan (rễ hoặc chồi). Skoog F. and Miller C. O., In vitro Symp. Soc. Exp. Biol., No. 11: 118-131.
- 1957 Vasil nghiên cứu nuôi cấy bao phấn tách rời ở *Allium cepa*. Vasil I. K., Phytomorph., 7: 138-149
- 1958 Maheshwari thực hiện nuôi cấy noãn tách rời in vitro ở cây anh túc *Papaver somniferum*. Maheshwari N., Science, 127: 342

- 1958 Maheshwari đã tái sinh thành công phôi soma từ phôi tâm (nucella) trong nuôi cấy noãn Citrus. Maheshwari P. and Rangaswamy N. S., Ind. J. Hort., 15: 275- 281.
- 1959 Tulecke và Nickell thử nghiệm sản xuất sinh khối thực vật quy mô lớn (134 L) bằng nuôi cấy chìm. Tulecke W. and Nickell L. G., Science, 130: 863-864
- 1959 Reinert và Steward lần đầu tiên tạo được phôi vô tính từ nuôi cấy mô cà rốt.
- 1960 Kanta lần đầu tiên thực hiện thụ tinh trong ống nghiệm ở Papaver rhoeas. Kanta K., Nature, 188: 683-684.
- 1960 Cocking lần đầu tiên đã sử dụng enzym phân giải thành tế bào để tạo ra số lượng lớn tế bào trần. Cocking E. C., Nature, 187: 927-929
- 1960 Morel lần đầu tiên thành công trong nuôi cấy mô đỉnh sinh trưởng để nhân nhanh phong lan. Morel G., Am. Orchid Soc. Bull., 29: 495-497.
- 1962 Murashige và Skoog phát minh môi trường nuôi cấy mô tế bào thực vật- môi trường MS. Murashige T. and Skoog F., Physiol. Plant., 15: 473-497.
- 1964 Guha và Maheshwari lần đầu tiên thành công trong tạo được cây đơn bội từ nuôi cấy bao phấn của cây cà rốt. Guha S. and Maheshwari S. C., Nature, 204: 497 and Nature, 212: 97-98 (1966).
- 1967 Bourgin và Nitsch tạo cây đơn bội từ hạt phấn thuốc lá. Bourgin J. P. and Nitsch J. P., Ann. Physiol. Veg., 9: 377-382 & 10: 69-81.
- 1969 Phân lập tế bào trần từ nuôi cấy tế bào dịch lỏng (huyền phù) của Hapopappus gracilis. Ericksson T. and Jonassen K., Planta, 89: 85-89
- 1970 Chon lọc đột biến sinh hoá ở thuốc lá. Carlson P. S., Science, 168: 487-489.
- 1971 Takebe và cs đã tái sinh được cây từ tế bào trần mô thịt lá ở thuốc lá. Takebe I. et al., Naturewiss., 58: 318-320.

- 1972 Carlson và cs tạo được cây từ lai xa tế bào trần đầu tiên nhờ dung hợp tế bào trần của 2 loài thuốc lá *Nicotiana glauca* và *N. langsdorfii*. Carlson P. S. et al., P. N. A. S. (USA), 69: 2292-2294
- 1973 Phát hiện cytokinin có khả năng phá ngủ ở *Gerberas*. Pierik R. L. M. et al., Sci. Hort., 1: 117-119.
- 1974 Zaenen và cs phát hiện plasmid Ti đóng vai trò là yếu tố gây u (crown gall) ở cây trồng. Zaenen I. et al., J. Molec. Biol., 86: 109-127; Larebeke N. van et al., Nature, 252: 169-170.
- 1974 Melchers và Lalib tạo được cây đa bội từ dung hợp tế bào trần đơn bội. Melchers G. and Lalib G., Mol. Gen. Genet. 135: 277-294
- 1975 Gengenbach và Green chọn lọc dòng tế bào kháng bệnh nấm *Helminthosporium maydis* trong nuôi cấy mô sẹo ngô. Gengenbach B. G. and Green C. E., Crop Sci., 15: 645-649.
- 1977 Chilton và cs chuyển thành công T-DNA vào thực vật. Chilton M. D. et al., Cell, 11: 263-271.
- 1977 Noguchi và cs nuôi cấy tế bào thuốc lá trong bioreactor 20,000 L. Noguchi M. et al., Plant Tissue Culture & its Biotechnological Application, Springer Verlag, Berlin,: 85-94.
- 1977 Noguchi và cs nuôi cấy tế bào thuốc lá trong bioreactor 20,000 L. Noguchi M. et al., Plant Tissue Culture & its Biotechnological Application, Springer Verlag, Berlin,: 85-94.
- 1978 Melchers và cs tạo được cây lai soma cà chua- thuốc lá bằng dung hợp tế bào trần. Melchers G. et al., Carlsburg Res. Comm., 43: 203-218.
- 1978 Tabata và cs nuôi tế bào thực vật ở quy mô công nghiệp phục vụ sản xuất shikonin (chọn lọc dòng tế bào cho sản lượng các sản phẩm thứ cấp cao hơn). Tabata M. et al., Frontiers of Plant Tissue Culture 1978, Univ. Calgary Press, Calgary,: 213-222.
- 1979 Marton và cs xây dựng quy trình chuyển gen vào tế bào trần bằng đồng nuôi cấy tế bào và *Agrobacterium*. Marton L. et al., Nature, 277: 129-131

- 1980 Alfermann và cs sử dụng các tế bào nuôi cấy trong chuyển hoá sinh học digitoxin thành digoxin. Alfermann A. W. et al., *Planta Medica*, 40: 218.
- 1981 Larkin và Scowcroft đưa ra thuật ngữ "biến dị soma" để chỉ các thay đổi di truyền tính trạng xảy ra do nuôi cấy mô và tế bào in vitro. Larkin P. J. and Scowcroft W. R., *Theor. Appl. Gen.*, 60: 197-214
- 1982 Krens đã chèn DNA vào tế bào trần. Krens F. A. et al., *Nature*, 296: 72-74.
- 1982 Zimmerman sử dụng kỹ thuật xung điện trong dung hợp tế bào trần. Zimmermann U., *Biochim. Biophys. Acta*, 694: 227-277.
- 1983 Công ty Mitsui Petrochemicals lần đầu tiên đã sản xuất chất trao đổi thứ cấp trên quy mô công nghiệp bằng nuôi cấy tế bào dịch lỏng *Lithospermum* spp. Mitsui Petrochemicals.
- 1983 Zambryski và cs thiết kế các vector chuyển gen thông qua *Agrobacterium*. Zambryski P. et al., *EMBO J.*, 2: 2143-2150.
- 1984 Chuyển gen vào tế bào trần thuốc lá *Nicotiana* bằng ADN plasmid và tái sinh cây chuyển gen. Paszkowski J. et al., *EMBO J.*, 3: 2717-2722.
- 1985 Fraley và cs thiết kế vector Ti plasmid đã loại bỏ các gen độc gây hại cho việc chuyển gen vào thực vật. Fraley R. T. et al., *Bio/Technol.*, 3: 629-635.
- 1985 Horsch và cs chuyển gen vào mảnh lá bằng *Agrobacterium tumefaciens* và tái sinh cây chuyển gen. Horsch R. B. et al., *Science*, 227: 1229-1231.
- 1985 An và cs đã phát triển hệ thống hai vector cho chuyển gen thực vật. An G. et al., *EMBO J.*, 4: 277-284.
- 1985 Chuyển gen vào tế bào trần cây một lá mầm và hai lá mầm bằng phương pháp điện thẩm. Fromm M. E., *P. N. A. S. (USA)*, 82: 5824-5828
- 1985 Flores và Filner lần đầu tiên sản xuất chất trao đổi thứ cấp từ nhân nuôi rễ tơ ở *Hyoscyamus muticus*. Những rễ này sản xuất nhiều hoạt chất hyoscyamine hơn cây tự nhiên. Flores H. E. and Filner P., *Primary &*

Secondary Metabolism of Plant Cell Cultures. Springer Verlag, (Eds. Neumann K. H., Barz W. and Reinhard E.): 174-186.

- 1986 Crossway và cs chuyển gen vào tế bào trần thuốc lá bằng vi tiêm AND trực tiếp. Crossway A. et al., Mol. Gen. Genet., 202: 179-185.
- 1987 Klein và cs đã sử dụng súng bắn gen (Particle gun) mang vi đạn trong chuyển gen và tái sinh cây biểu hiện gen chuyển. Klein T. M. et al., Nature, 327: 70-73.
- 1987 Bytebier và cs lần đầu tiên đã chuyển gen vào cây một lá mầm (Asparagus) bằng *Agrobacterium tumefaciens*. Bytebier B. et al., P. N. A. S. (USA), 84: 5345- 5349.
- 1988 Klein và cs tái sinh cây chuyển gen ổn định thông qua phương pháp bắn gen. Klein T. M. et al., P. N. A. S. (USA), 85: 4305-4309.
- 1991 Sản xuất cây mang gen đầu tiên ở thông *Larix decidua* bằng chuyển gen qua *Agrobacterium rhizogenes*. Huang Y. et al., In vitro Cell Dev. Biol., 27: 201- 207.
- 1992 Lúa kháng chất diệt cỏ nhờ chuyển gen vào tế bào trần thông qua PEG. Dutta S. K. et al., Plant Mol. Biol., 20: 619-629.
- 1993 Kranz và Lorz thực hiện thụ tinh in vitro tạo ra và nuôi cấy phôi hợp tử ở ngô. Các quá trình phát triển và phân hoá của phôi sau đó đã được quan sát dưới kính hiển vi và phân tích biểu hiện của gen nhằm xác định các gen tham gia trong từng giai đoạn phát triển của phôi. Kranz E. and Lorz H., The Plant Cell, 5: 739- 746.
- 1994 Thương mại hoá giống cà chua chuyển gen 'Flavr-Savr'
- 1998 Hamilton và cs đã phát triển vector mang NST nhân tạo của hai vi khuẩn (BBIC) cho chuyển gen thông qua *Agrobacterium* (khả năng chuyển 150 kb). Hamilton C. M. et al., P. N. A. S. (USA), 93: 9975-9979

3. Hiện trạng nuôi cấy mô ở Việt Nam

Ở Việt Nam, nuôi mô và tế bào thực hiện được nghiên cứu trên 30 năm. Nhưng áp dụng trong thực tế sản xuất trong các lĩnh vực vì nhân giống cây tế bào thực hiện hoa cảnh, cây nông nghiệp, cây lâm nghiệp và cây dược liệu trong khoảng 10-20 năm trở lại. Nhiều phòng thí nghiệm trọng điểm quốc gia, các trung

tâm công nghệ sinh học với các đại thiết bị trang cũng được xây dựng ở các thành phố lớn như Hà Nội, thành phố Hồ Chí Minh. Bên cạnh đó, có rất nhiều phòng thí nghiệm nuôi cấy và tế bào thực hiện cũng được xây dựng ở các trường đại học, thư viện về nghiên cứu, khoa học và công nghệ của các tỉnh, thành phố.

Hiện nay, có nhiều vấn đề được quan tâm nghiên cứu trong nuôi cấy mô và tế bào thực vật như vi nhân giống, tạo nên ma, tạo tổng hợp (kernel), sản xuất bằng gen chuyển tải, sản xuất các chất biến dưỡng thứ cấp.

Ngoài ra, nhiều phòng thí nghiệm tư nhân cũng được xây dựng từ miền Bắc đến miền Nam để phục vụ sản xuất. Thành phố Đà Lạt được thiên nhiên ưu đãi nhiều về khí hậu nên có nhiều phòng thí nghiệm nuôi cấy của tư nhân phục vụ sản xuất.

CÂU HỎI ÔN TẬP

1. Kể tên những phương pháp nhân giống vô tính?
2. Ưu điểm và hạn chế của nuôi cấy mô tế bào thực vật?
3. Nuôi cấy mô là gì?
4. Tóm tắt các giai đoạn lịch sử phát triển của nuôi cấy mô tế bào thực vật?
5. Hiện trạng nuôi cấy mô tế bào thực vật ở Việt Nam?

BÀI 2

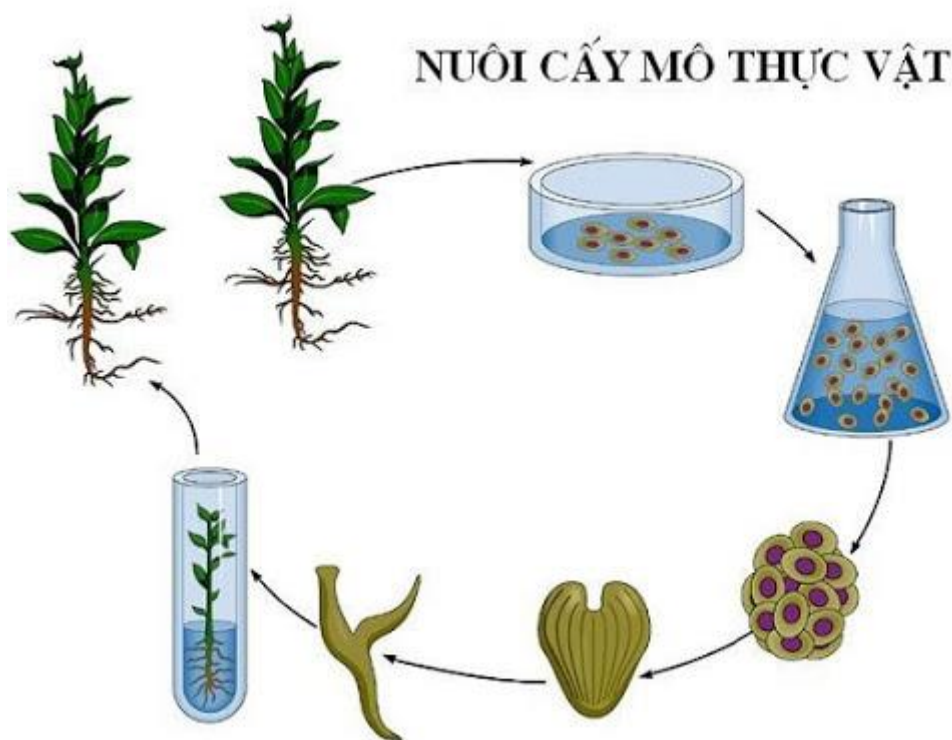
CÁC NGUYÊN TẮC CỦA NUÔI CÂY MÔ VÀ TẾ BÀO THỰC VẬT

MĐ 40-02

Giới thiệu:

Ngày nay, hầu hết các nhà nghiên cứu khoa học đều thống nhất rằng thành công của nuôi cấy mô chỉ đạt được khi nó trải qua 5 bước (Hình 2.1):

- Bước 0: Bước chuẩn bị
- Bước 1: Nuôi cấy khởi động
- Bước 2: Nhân nhanh mẫu
- Bước 3: Tạo cây hoàn chỉnh
- Bước 4: Thích ứng cây in vitro trong điều kiện tự nhiên



Hình 2.1 Năm bước trong nuôi cấy mô

Do đó để thành công 5 bước này cần phải tuân thủ các nguyên tắc trong nuôi cấy mô và tế bào thực vật

Mục tiêu:

Kiến thức: Trình bày được các nguyên tắc trong nuôi cấy mô và tế bào thực vật.

Kỹ năng: Thành thạo các thao tác trong chuẩn bị môi trường nuôi cấy mô