

BỘ NÔNG NGHIỆP VÀ PHÁT TRIỂN NÔNG THÔN
TRƯỜNG CAO ĐẲNG LƯƠNG THỰC – THỰC PHẨM

GIÁO TRÌNH
MÔN HỌC: CÔNG NGHỆ SINH HỌC TRONG BẢO VỆ THỰC VẬT
NGHỀ : BẢO VỆ THỰC VẬT
TRÌNH ĐỘ: CAO ĐẲNG

(Ban hành kèm theo Quyết định số: 761/QĐ-TCDLTTP-ĐT ngày 17 tháng 8 năm 2017 của Hiệu trưởng Trường Cao đẳng Lương thực Thực phẩm)



Đà Nẵng, 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.

LỜI GIỚI THIỆU

Với mục đích đáp ứng nhu cầu về tài liệu học tập cho sinh viên nhằm nâng cao chất lượng đào tạo, chúng tôi đã biên soạn giáo trình “Công nghệ sinh học trong bảo vệ thực vật”.

Giáo trình này cung cấp cho sinh viên các kiến thức về khái niệm, đặc điểm, phân loại công nghệ sinh học, các nguyên lý cơ bản, các phương pháp nghiên cứu DNA, các kỹ thuật DNA tái tổ hợp; quá trình lên men và các sản phẩm của chúng; ý nghĩa của nuôi cấy mô tế bào thực vật và chuyển gen vào tế bào thực vật; ứng dụng CNSH trong quản lý sâu hại cây trồng, bệnh hại cây trồng, CNSH trong sản xuất phân bón vi sinh.

Đây là một trong các giáo trình chuyên môn dành cho sinh viên ngành Bảo vệ thực vật bậc cao đẳng.

Giáo trình bao gồm các nội dung sau:

- Chương 1. Khái quát về công nghệ sinh học
- Chương 2. Công nghệ DNA tái tổ hợp
- Chương 3. Công nghệ sinh học vi sinh vật
- Chương 4. Công nghệ sinh học thực vật
- Chương 5. Công nghệ sinh học trong bảo vệ thực vật
- Chương 6. Marker phân tử DNA và ứng dụng trong chọn giống cây trồng

Giáo trình này chắc chắn còn nhiều thiếu sót, rất mong nhận được nhiều ý kiến bổ sung của các bạn đọc để cho giáo trình có thể giúp cho việc học tập và tham khảo của sinh viên.

Xin chân thành cảm ơn!

Tham gia biên soạn

1. Chủ biên: Nguyễn Thị Duy Khoa
- 2: Nguyễn Hữu Nhân

MỤC LỤC	TRANG
Lời giới thiệu	8
CHƯƠNG 1. KHÁI QUÁT VỀ CÔNG NGHỆ SINH HỌC	8
1. Khái quát về công nghệ sinh học	8
<i>1.1. Định nghĩa</i>	8
<i>1.2. Phân loại</i>	8
2. Sơ lược lịch sử hình thành công nghệ sinh học	8
3. Một số khía cạnh về khoa học và kinh tế của công nghệ sinh học hiện đại	9
<i>3.1. Về khoa học</i>	9
<i>3.2. Về kinh tế</i>	9
3. Các lĩnh vực ứng dụng của công nghệ sinh học	10
<i>3.1. Công nghệ sinh học trong nông nghiệp</i>	10
<i>3.2. Công nghệ sinh học trong y dược</i>	11
<i>3.3. Công nghệ sinh học công nghiệp và chế biến thực phẩm</i>	12
3.4. Công nghệ sinh học môi trường	12
3.5. Các vấn đề pháp lý của công nghệ sinh học hiện đại	12
3.5.1. An toàn sinh học	13
<i>3.5.1.1. Sự chuyển gen bằng hạt phấn</i>	13
<i>3.5.1.2. Sự bền vững của DNA trong đất</i>	13
<i>3.5.1.3. Chuyển gen ngang từ thực vật vào vi sinh vật đất</i>	15
<i>3.5.1.4. Chuyển gen từ thực vật vào virus</i>	15
3.5.2. An toàn thực phẩm	15
<i>3.5.2.1. Các chất gây dị ứng</i>	16
<i>3.5.2.2. Đánh giá độ an toàn của các thực phẩm</i>	16
3.5.3. Đạo đức sinh học	16
3.5.4. Quyền tác giả và sở hữu trí tuệ	17
<i>3.5.4.1. Quyền tác giả</i>	17
<i>3.5.4.2. Sở hữu trí tuệ</i>	18
CHƯƠNG 2. CÔNG NGHỆ DNA TÁI TỔ HỢP	18
1. Tách chiết DNA	19
<i>1.1. Tách chiết DNA của vi sinh vật</i>	19
<i>1.2. Tách chiết DNA từ mô, tế bào động vật và thực vật</i>	19
2. Vector tách dòng	20
<i>2.1. Khái niệm</i>	20
<i>2.2. Đặc điểm của vector tách dòng</i>	20
3. Các loại vector tách dòng	21
<i>3.1. Plasmid</i>	21
<i>3.2. Phage</i>	21
<i>3.3. Các vector tách dòng khác</i>	21
4. Các enzyme tham gia quá trình tạo vector tái tổ hợp	22
<i>4.1. Enzyme giới hạn (Restriction enzyme – RE)</i>	22
<i>4.2. Enzyme nối – Enzyme ligase</i>	22
<i>4.3. Enzyme polymerase</i>	23

4.4. Enzyme phiên mã ngược	24
4.5. Các enzyme sửa đổi DNA	27
5. Kỹ thuật PCR, RAPD, RFLP	27
5.1. Kỹ thuật PCR (Polymerase Chain Reaction)	27
5.2. Kỹ thuật RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA) - Đa hình các đoạn DNA nhân bản ngẫu nhiên	28
5.3. Kỹ thuật RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) – Đa hình chiều dài của các đoạn giới hạn	29
5.4. Lai Southern và lai Northern	29
6. Biến nạp vector tái tổ hợp vào vi khuẩn/tế bào vật chủ	29
6.1. Điện biến nạp	29
6.2. Hóa biến nạp	29
7. Chọn dòng mang DNA tái tổ hợp	30
7.1. Lai khuẩn lạc và vết tan	30
7.2. Khử hoạt tính bằng chèn đoạn	32
7.3. Tạo dòng định hướng	32
8. Biểu hiện của gen được tạo dòng	33
8.1. Vector biểu hiện	36
8.2. Xác định mức độ biểu hiện của gen được tạo dòng	37
CHƯƠNG 3 - CÔNG NGHỆ SINH HỌC VI SINH VẬT	42
1. Quá trình lên men	42
1.1. Các phương thức lên men	42
1.2. Chuẩn bị giống	43
1.3. Điều khiển phản ứng sinh học	43
1.4. Thu sản phẩm và tinh chế	44
2. Sản xuất sinh khối vi sinh vật	44
2.1. Giống vi sinh vật cho các quá trình lên men	44
2.2. Sản xuất men bánh mỳ	44
2.3. Phân vi sinh (Microbiol fertilizer)	44
2.4. Chế phẩm diệt côn trùng (Insecticides)	44
2.5. Chế phẩm trợ sinh (Probiotic)	45
3. Sản xuất vaccine	45
3.1. Vaccine cổ điển	45
3.2. Vaccine công nghệ gen	45
4. Protein đơn bào (Single Cell Protein – SCP)	45
4.1. SCP nấm men, vi khuẩn	46
4.2. SCP vi tảo, vi khuẩn lam	46
5. Các sản phẩm trao đổi chất	46
5.1. Lên men rượu	46
5.1.1. Rượu trắng	46
5.1.2. Rượu vang	47
5.2. Sản xuất các acid hữu cơ	49
5.3. Sản xuất acid amin, vitamin	50

5.4. Sản xuất kháng sinh (Antibiotic)	51
5.4.1. Penicillin	51
5.4.3. Tetracycline	53
5.5. Sản xuất enzyme	53
5.5.1 Các loại enzyme vi sinh vật	53
5.5.1.1.. Amylase nấm mốc	55
5.5.1.2. Amylase vi khuẩn	55
5.5.1.3. Protease	55
5.5.1.4. Pectinase	55
5.5.1.5. Cytolase	55
5.5.1.6. Invertase	56
5.5.1.7. Enzyme oxy hóa glucosooxydase-catalase	56
5.5.2. Sinh tổng hợp enzyme cảm ứng	56
5.5.3. Những phương pháp nuôi cấy vi sinh vật để sản xuất enzyme	57
5.5.3.1. Phương pháp nuôi cấy bề mặt	58
5.5.3.2. Phương pháp nuôi cấy chìm	59
5.5.4. Tách và tinh sạch chế phẩm enzyme	61
5.5.4.1. Chế phẩm enzyme từ môi trường nuôi cấy bề mặt	62
5.5.4.2. Chế phẩm enzyme từ dịch nuôi cấy chìm	62
CHƯƠNG 4 – CÔNG NGHỆ SINH HỌC THỰC VẬT	63
1. Nuôi cấy mô, tế bào thực vật	63
1.1. Định nghĩa	63
1.2. Cơ sở của kỹ thuật nuôi cấy mô, tế bào thực vật	63
1.2.1. Tính toàn năng của tế bào	63
1.2.2. Sự phân phân hóa và phân hóa của tế bào	64
1.3. Ứng dụng của nuôi cấy mô tế bào thực vật	64
1.4. Nhân giống in vitro và các hệ thống nuôi cấy mô	64
1.4.1. Tái sinh cây mới từ các cấu trúc sinh dưỡng	64
1.4.1.1. Nuôi cấy mô phân sinh đỉnh hay đỉnh phân sinh	64
1.4.1.2. Nuôi cấy chồi bất định (adventitious shoot culture)	67
1.4.2. Nhân giống thông qua giai đoạn callus	67
1.4.3. Nhân giống thông qua phát sinh phôi vô tính-công nghệ hạt nhân tạo	68
1.4.3.1. Phôi vô tính	68
1.4.3.2. Công nghệ hạt nhân tạo	70
1.4.3.3. Nhân giống trong các nồi phản ứng sinh học	71
1.5. Các giai đoạn trong quy trình nhân giống vô tính in vitro	71
1.5.1. Giai đoạn I-cây gậy	72
1.5.2. Giai đoạn II-nhanh	72
1.5.3. Giai đoạn III-chuẩn bị và đưa ra ngoài đất	73
1.6. Nhân giống in vitro và việc sử dụng giống ưu thế lai	74
1.7. Nhân giống in vitro và các đặc điểm không di truyền	74
1.7.1. Hiện tượng các đặc điểm epigenetic được lưu lại	74
1.7.2. Hiện tượng các đặc điểm epigenetic không lưu lại	75

2. Kỹ thuật chuyển gen vào thực vật	76
2.2. Các phương pháp chuyển gen vào thực vật	76
2.2.1. Biến nạp gián tiếp qua <i>Agrobacterium</i>	76
2.2.2. Chuyển gen nhờ virus	76
2.2.3. Chuyển gen trực tiếp	76
2.2.3.1. Chuyển gen nhờ kỹ thuật siêu âm (<i>Mild sonication</i>)	76
2.2.3.2. Chuyển gen nhờ kỹ thuật xung điện	76
2.2.3.3. Chuyển gen bằng súng bắn gen	77
2.3. Ứng dụng của kỹ thuật chuyển gen vào thực vật	77
2.3.1. Cải thiện giống cây trồng	77
2.3.2. Biến đổi chất lượng thực phẩm ở cây trồng	77
2.3.3. Thực vật sản xuất các loại hóa chất đặc biệt	78
2.3.4. Vaccine thực phẩm (<i>edible vaccine</i>)	78
3. Những bàn cãi về sinh vật chuyển gen (GMO)	80
3.1. Sinh vật biến đổi gen (<i>GMO</i>)	80
3.2. Những tranh luận về <i>GMO</i>	80
CHƯƠNG 5. CÔNG NGHỆ SINH HỌC TRONG BẢO VỆ THỰC VẬT	83
1. Ứng dụng công nghệ sinh học trong quản lý sâu hại cây trồng	83
1.1. Chế phẩm vi sinh vật	83
1.2. Cây trồng chuyển gen	85
1.2.1. Chuyển nạp gen Bt	85
1.2.2. Chuyển nạp gen “ <i>GNA</i> ”	86
1.3.1. Cây lúa	87
1.3.2. Cây lúa mì	89
1.3.3. Cây lúa mạch	89
1.3.4. Cây đậu tương	89
1.3.5. Cây đậu tây	90
1.3.6. Cây bông	90
1.3.7. Cố định đạm	90
2. Ứng dụng công nghệ sinh học trong quản lý bệnh hại cây trồng	91
2.1. Chế phẩm vi sinh	91
2.2. Cây trồng chuyển gen	93
2.2.1. Chuyển nạp gen “ <i>Chitinase</i> ”	94
2.2.2. Chuyển nạp gen “ <i>Xa-21</i> ”	94
2.2.3. Chuyển nạp gen “ <i>coat protein</i> ”	94
2.3. Chọn dòng biến dị soma	94
3. Ứng dụng công nghệ sinh học trong sản xuất phân vi sinh	95
3.1. Sử dụng vi khuẩn <i>Azotobacter</i> làm phân bón hữu cơ vi sinh	95
3.1.1. Vi sinh vật cố định nitơ phân tử	9596
3.1.1.1. Vi khuẩn cố định N_2 sống tự do:	97
3.1.1.2. Vi khuẩn cố định N_2 sống cộng sinh	97
3.1.2. Sản xuất phân vi sinh vật cố định nitơ	98
3.1.2.1. Quy trình sản xuất	98

3.1.2.3. <i>Lên men</i>	99
3.1.3. Phân lân vi sinh (Phân lân sinh học)	100
3.1.3.1. <i>Nhóm vi sinh vật phân giải lân hữu cơ</i>	100
3.1.3.2. <i>Nhóm vi sinh vật phân giải lân vô cơ</i>	100
3.1.4. Sản xuất các chế phẩm làm phân lân vi sinh	101
3.1.4.1. <i>Phân lập và tuyển chọn chủng vi sinh vật phân giải lân</i>	102
3.1.4.2. <i>Quá trình lên men theo phương pháp nuôi cấy chìm</i>	103
3.2. Sử dụng một số chủng vi sinh vật phân hủy xác bã thực vật làm phân bón hữu cơ	104
3.2.1. Nguyên lý sử dụng vi sinh vật trong xử lý xác bã thực vật	104
3.2.2. Thành phần của rác thải hữu cơ	104
3.3.3. Các vi sinh vật phân giải các chất hữu cơ	104
CHƯƠNG 6. MARKER PHÂN TỬ DNA VÀ ỨNG DỤNG TRONG CHỌN GIỐNG CÂY TRỒNG	105
1. Các loại DNA marker	105
2. RFLP (Restriction fragment length polymorphism)	105
3. Marker là sản phẩm của PCR	106
3.1. RADP marker	107
3.2. SSCP (single strand conformation marker)	108
3.3. STS marker	108
3.4. Microsatellite marker	109
3.5. AFLP marker	109
4. Tạo dòng DNA	110
5. Chọn tạo giống cây trồng nhờ marker phân tử DNA	111

GIÁO TRÌNH MÔN HỌC
CÔNG NGHỆ SINH HỌC TRONG BẢO VỆ THỰC VẬT
Mã môn học: MH09

CHƯƠNG 1. KHÁI QUÁT VỀ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Giới thiệu:

Nội dung chương này cung cấp cho sinh viên về khái niệm và phân loại công nghệ sinh học; tính khoa học và kinh tế của công nghệ sinh học hiện đại; tầm quan trọng của ứng dụng công nghệ sinh học phục vụ sản xuất và bảo vệ môi trường.

Mục tiêu:

- Nêu được khái niệm, lịch sử phát triển và các lĩnh vực cơ bản của công nghệ sinh học;
- Trình bày được sự phân loại công nghệ sinh học;
- Xác định được tính khoa học và kinh tế của công nghệ sinh học hiện đại;
- Ý thức được tầm quan trọng của ứng dụng công nghệ sinh học phục vụ sản xuất và bảo vệ môi trường;

A. Nội dung:

1. Khái quát về công nghệ sinh học

1.1. Định nghĩa

Có nhiều định nghĩa và cách diễn đạt khác nhau về công nghệ sinh học tùy theo từng tác giả, nhưng tất cả đều thống nhất về khái niệm cơ bản sau đây:

Công nghệ sinh học là quá trình sản xuất các sản phẩm trên quy mô công nghiệp, trong đó nhân tố tham gia trực tiếp và quyết định là các tế bào sống (vi sinh vật, thực vật, động vật). Mỗi tế bào sống của cơ thể sinh vật hoạt động trong lĩnh vực sản xuất này được xem như một lò phản ứng nhỏ.

Đầu những năm 1980, đã bắt đầu hình thành công nghệ sinh học hiện đại là lĩnh vực công nghiệp sử dụng hoạt động sinh học của các tế bào đã được biến đổi di truyền. Công nghệ sinh học hiện đại ra đời cùng với sự xuất hiện kỹ thuật gen. Cơ sở sinh học được áp dụng ở đây bao gồm sinh học phân tử, sinh học tế bào, hóa sinh học, di truyền học, vi sinh vật học, miễn dịch học, cùng các nguyên lý kỹ thuật máy tính...

1.2. Phân loại

* Dựa vào sự khác nhau của kỹ thuật có thể phân CNSH:

- Công nghệ sinh học truyền thống (traditional biotechnology)
 - + Thực phẩm lên men truyền thống (food of traditional fermentations)
 - + Công nghệ lên men vi sinh vật (microbial fermentation technology)
 - + Sản xuất phân bón và thuốc trừ sâu vi sinh vật (production of microbial fertilizer and pesticide)
 - + Sản xuất sinh khối giàu protein (protein-rich biomass production)
 - + Nhân giống vô tính bằng nuôi cấy mô và tế bào thực vật (plant micropropagation)

- + Thụ tinh nhân tạo (*in vitro* fertilization)
- Công nghệ sinh học hiện đại (modern biotechnology)
 - + Nghiên cứu genome (genomics)
 - + Thực vật và động vật chuyển gen (transgenic animal and plant)
 - + Động vật nhân bản (animal cloning)
 - + Chip DNA (DNA chip)
 - + Liệu pháp tế bào và gen (gene and cell therapy)
 - + Protein biệt dược (therapeutic protein)
 - + Tin sinh học (bioinformatics)
 - + Công nghệ sinh học nano (nanobiotechnology)

* Công nghệ sinh học cũng có thể được phân loại theo các kiểu khác nhau. Xét về góc độ các tác nhân sinh học tham gia vào quá trình công nghệ sinh học, có thể chia thành các nhóm sau:

- Công nghệ sinh học thực vật (plant biotechnology)
- Công nghệ sinh học động vật (animal biotechnology)
- Công nghệ sinh học vi sinh vật (microbial biotechnology)
- Công nghệ sinh học enzyme hay công nghệ enzyme (enzyme biotechnology)

Gần đây, đối với các nhân tố sinh học dưới tế bào còn hình thành khái niệm công nghệ protein (protein engineering) và công nghệ gen (gene engineering). Công nghệ protein và công nghệ gen xuyên suốt và trở thành công nghệ chìa khóa nằm trong công nghệ sinh học thực vật, công nghệ sinh học động vật và công nghệ sinh học vi sinh vật. Nhờ kỹ thuật đọc trình tự gen và kỹ thuật DNA tái tổ hợp, công nghệ gen đã đạt được những thành tựu hết sức to lớn mang tính quyết định, mở ra những giai đoạn phát triển mới. Đó là nghiên cứu về toàn bộ genome của nhiều sinh vật, đáng chú ý là việc giải mã genome của con người và của cây lúa.

* Dựa vào đối tượng phục vụ của công nghệ sinh học, có thể chia ra các lĩnh vực công nghệ sinh học khác nhau như:

- Công nghệ sinh học nông nghiệp (biotechnology in agriculture)
- Công nghệ sinh học chế biến thực phẩm (biotechnology in food processing)
- Công nghệ sinh học y dược (biotechnology in medicine-pharmaceutics)
- Công nghệ sinh học môi trường (environmental biotechnology)
- Công nghệ sinh học vật liệu (material biotechnology)
- Công nghệ sinh học hóa học (biotechnology in chemical production)
- Công nghệ sinh học năng lượng (biotechnology in energy production)...

2. Sơ lược lịch sử hình thành công nghệ sinh học

Công nghệ sinh học phát triển cho đến ngày nay, đã qua ba giai đoạn chính:

- Công nghệ vi sinh.
- Công nghệ tế bào (nuôi cấy mô và tế bào động-thực vật...).
- Công nghệ sinh học hiện đại, tức công nghệ gen.

Có tác giả gắn quá trình phát triển nêu trên với ba cuộc cách mạng vi sinh vật học.

- Cách mạng sinh học lần thứ nhất (đầu thế kỷ 20): sử dụng quá trình lên men để sản xuất các sản phẩm như acetone, glycerine, citric acid, riboflavin...

- Cách mạng sinh học lần thứ hai (sau thế chiến thứ 2): sản xuất kháng sinh, các sản phẩm lên men công nghiệp như glutamic acid, các polysaccharide; trong đó có các thành tựu về đột biến, tạo các chủng vi sinh vật cho năng suất và hiệu quả cao, phát triển các quá trình lên men liên tục và phát hiện phương pháp mới về bất động enzyme để sử dụng nhiều lần...

- Cách mạng sinh học lần thứ ba (bắt đầu từ giữa thập niên 1970): với các phát hiện quan trọng về enzyme cắt hạn chế, enzyme gắn, sử dụng plasmid làm vector tạo dòng, đặt nền móng cho một nền công nghệ sinh học hoàn toàn mới đó là công nghệ DNA tái tổ hợp.

Cũng có thể chia lịch sử hình thành và phát triển công nghệ sinh học theo các giai đoạn sau:

- *Giai đoạn thứ nhất*: Đã hình thành từ rất lâu trong việc sử dụng các phương pháp lên men vi sinh vật để chế biến và bảo quản thực phẩm, ví dụ sản xuất pho mát, dấm ăn, làm bánh mì, nước chấm, sản xuất rượu bia... Trong đó, nghề nấu bia có vai trò rất đáng kể. Ngay từ cuối thế kỷ 19, Pasteur đã cho thấy vi sinh vật đóng vai trò quyết định trong quá trình lên men. Kết quả nghiên cứu của Pasteur là cơ sở cho sự phát triển của ngành công nghiệp lên men sản xuất dung môi hữu cơ như aceton, ethanol, butanol, isopropanol... vào cuối thế kỷ 19, đầu thế kỷ 20.

- *Giai đoạn thứ hai*: Nổi bật nhất của quá trình phát triển công nghệ sinh học trong giai đoạn này là sự hình thành nền công nghiệp sản xuất thuốc kháng sinh penicillin, khởi đầu gắn liền với tên tuổi của Fleming, Florey và Chain (1940). Trong thời kỳ này đã xuất hiện một số cải tiến về mặt kỹ thuật và thiết bị lên men vô trùng cho phép tăng đáng kể hiệu suất lên men. Các thí nghiệm xử lý chất thải bằng bùn hoạt tính và công nghệ lên men yếm khí tạo biogas chứa chủ yếu khí methane, CO₂ và tạo nguồn phân bón hữu cơ có giá trị cũng đã được tiến hành và hoàn thiện.

- *Giai đoạn thứ ba*: Bắt đầu từ những năm 50 của thế kỷ 20, song song với việc hoàn thiện các quy trình công nghệ sinh học truyền thống đã có từ trước, một số hướng nghiên cứu và phát triển công nghệ sinh học đã hình thành và phát triển mạnh mẽ nhờ một loạt những phát minh quan trọng trong ngành sinh học nói chung và sinh học phân tử nói riêng. Đó là việc lần đầu tiên xác định được cấu trúc của protein (insulin), xây dựng mô hình cấu trúc xoắn kép của phân tử DNA (1953). Tiếp theo là việc tổng hợp thành công protein (1963-1965), đặc biệt là việc tổng hợp thành công gen và buộc nó biểu hiện trong tế bào vi sinh vật (1980). Chính những phát minh này tạo tiền đề cho sự phát triển nhanh chóng các nghiên cứu cơ bản và ứng dụng thực tế sau đó trong lĩnh vực công nghệ sinh học hiện đại.

- *Giai đoạn thứ tư*: Bắt đầu từ năm 1973, khi những thí nghiệm khởi đầu dẫn đến sự ra đời của kỹ thuật DNA tái tổ hợp được thực hiện và sự xuất hiện insulin-sản phẩm đầu tiên của nó vào năm 1982, cùng với thí nghiệm chuyển gen vào cây trồng cũng thành công vào năm này. Đến nay, công nghệ sinh học hiện đại đã có những bước tiến không lồ trong các lĩnh vực nông nghiệp (cải thiện giống cây trồng...), y dược (liệu pháp gen, liệu pháp protein, chẩn đoán bệnh...), công nghiệp thực phẩm (cải thiện các chủng vi sinh vật...)

3. Một số khía cạnh về khoa học và kinh tế của công nghệ sinh học hiện đại

Các phương tiện thông tin đại chúng đã đăng tải không ít các ý kiến phản đối ứng dụng một số thành tựu công nghệ sinh học trong sản xuất, thậm chí đối với những thành tựu được giới khoa học đánh giá là sáng chói. Thật vậy, công nghệ sinh học cũng như khoa học hạt nhân, bên cạnh các ứng dụng to lớn cho lợi ích và phát triển của loài người, có thể còn mang lại nhiều hiểm họa không thể lường trước được hậu quả. Gần đây, khi các nhà khoa học xác nhận kỹ thuật nhân bản cừu Dolly hoàn toàn có thể áp dụng cho việc nhân bản con người, ở khắp các nước đã dấy lên một làn sóng phản đối việc nhân bản người, có nơi cấm hoàn toàn hướng nghiên cứu này. Sau đây chúng ta sẽ tìm hiểu các hiểm họa tiềm tàng của công nghệ sinh học.

3.1. Về khoa học

Sự dè dặt trong sử dụng các sản phẩm chuyển gen làm thực phẩm cho người và gia súc do nhiều lý do khác nhau, nhưng tựu trung có thể chia thành hai nhóm sau:

- Bộ máy di truyền của sinh vật mang tính hoàn thiện rất cao vì đã tiến hóa qua hàng trăm triệu năm, những gen mới được gắn thêm vào cho cây trồng và vật nuôi để tăng năng suất hoặc chất lượng nông sản, biết đâu có thể phá vỡ tính hoàn thiện, tính cân bằng của sự sống ở các sinh vật này. Và vì thế, con người không thể yên tâm với việc hàng ngày nuốt vào cơ thể một số lượng lớn các sản phẩm thiếu tính hoàn thiện, cân bằng hay nói cách khác là có thể có dị tật.

- Cho đến nay trong việc tạo ra các GMO, các gen kháng kháng sinh như kanamycin, ampicillin hoặc hygromycin thường được sử dụng kèm theo để làm gen chỉ thị chọn lọc. Chúng tồn tại trong sản phẩm của các GMO và có thể có ảnh hưởng trực tiếp hoặc gián tiếp thông qua dây chuyền thức ăn của sinh quyển đến con người. Mặc dù khả năng này là vô cùng thấp, thậm chí khi một gen kháng sinh được phát tán sang một sinh vật khác thì tác động của việc này cũng không đáng kể do các gen chỉ thị chọn lọc được sử dụng trong sinh vật chuyển gen có ứng dụng rất hạn chế trong thú y và y học. Tuy nhiên, để làm dịu những lo lắng của xã hội, các nhà nghiên cứu được yêu cầu tránh sử dụng các gen kháng kháng sinh trong sinh vật chuyển gen. Việc sử dụng gen chỉ thị thay thế khác đang được đánh giá và phát triển. Hiện nay, người ta đang tìm cách thay thế các gen chỉ thị chọn lọc cũ bằng các gen có vẻ ít hại hơn như gen mã hóa protein phát huỳnh quang màu xanh lục (green fluorescence protein-GFP). Gen GFP được coi là một gen chỉ thị tốt, vì nó làm cho các GMO phát sáng xanh rực rỡ khi đặt dưới tia tử ngoại. Nhưng dù sao sự nghi ngại vẫn còn, vì gen GFP có nguồn gốc từ một loài cá ở Bắc Băng Dương, chứ không từ một động vật có nguồn gốc gần với người.

3.2. Về kinh tế

*Những công ty đa quốc gia về công nghệ sinh học

Tổ chức quốc tế nông nghiệp tiến bộ RAFI (Rural Advancement Foundation International) là một tổ chức phi chính phủ ở Canada hoạt động nhằm hạn chế ảnh hưởng của các công ty đa quốc gia về giống. Theo RAFI, các công ty đa quốc gia về công nghệ sinh học sẽ hoạt động rất mạnh trong thế kỷ 21, hiện nay những công ty này đang phát triển nhanh chóng nhờ thôn tóm các công ty nhỏ hơn và trước hết nhờ lợi nhuận khổng lồ thu được trong độ quyền bán các sản phẩm GMO.

Chẳng hạn cách đây hơn 15 năm, công ty Monsanto chỉ chuyên về các sản phẩm hóa dầu, thuốc trừ sâu và trừ cỏ. Tuy nhiên, thời gian gần đây Monsanto đã đầu tư rất lớn và triển khai công nghệ gen thực vật để tạo ra các giống GMO và đang trở thành công ty giống lớn nhất thế giới. RAFI gọi Monsanto là một “Microsoft công nghệ sinh học” vì từ năm 1996 đến nay Monsanto đã mua lại nhiều công ty trước đây vốn là người khổng lồ trên thị trường hạt giống.

* Sự lệ thuộc vào các công ty đa quốc gia về công nghệ sinh học

RAFI tiên đoán người nông dân ở hầu hết các nước trên thế giới, kể cả các nước công nghiệp phát triển, dần dần sẽ bị lệ thuộc vào một nhóm nhỏ các công ty công nghệ sinh học đa quốc gia. Với quy chế ngặt nghèo về quyền tác giả IPR (Intellectual Property Right) hiện hành trong quan hệ kinh tế thế giới, người nông dân sẽ bị tước bỏ hoàn toàn quyền tự do trồng cây gì trên mảnh đất của mình và bán cho ai sản phẩm của mình. Lý do để các công ty như Monsanto có được nhiều quyền hạn như vậy chính là sự tiến bộ của công nghệ sinh học.

Chẳng hạn, gen terminator được cơ quan đăng ký bản quyền của Mỹ chính thức cấp bằng phát minh cho công ty Delta Pine (3/1998). Khi chuyển gen vào bất cứ một giống cây nào, hạt bán ra sẽ chỉ nảy mầm trong một thế hệ duy nhất. Nếu người nông dân lấy hạt để trồng vụ sau, gen này sẽ tạo ra một hợp chất giết chết mầm, vì thế hạt hoàn toàn không nảy mầm được. Với gen terminator trong tay, các công ty đa quốc gia sẽ bắt nông dân các nước hàng năm phải mua hạt giống của họ. Mặt khác, các công ty giống đang thôn tính dần các công ty chế biến lương thực, thực phẩm là đầu ra của nông sản. Vừa độc quyền hạt giống GMO lại vừa nắm các công ty chế biến nông sản, các công ty đa quốc gia công nghệ sinh học sẽ không chừa một lối thoát nào cho nông dân các nước đang phát triển.

3. Các lĩnh vực ứng dụng của công nghệ sinh học

3.1. Công nghệ sinh học trong nông nghiệp

Lĩnh vực nông nghiệp tuy không phải là mục tiêu phát triển hàng đầu của công nghệ sinh học ở nhiều nước công nghiệp trên thế giới, nhưng trên thực tế những hoạt động nghiên cứu và phát triển, sản xuất và thương mại hóa ở lĩnh vực này cũng được nhiều tập đoàn lớn quan tâm. Có thể nêu ba lĩnh vực chính là:

- Giống cây trồng và vật nuôi nhân vô tính và chuyển gen mang những đặc điểm nông-sinh quý giá mà các phương pháp truyền thống không tạo ra được, đồng thời lại được bảo vệ thông qua bản quyền tác giả.

- Các chế phẩm sinh học dùng trong bảo vệ cây trồng vật nuôi, như: vaccine, thuốc trừ sâu bệnh và phân bón vi sinh.

- Công nghệ bảo quản và chế biến nông-hải sản bằng các chế phẩm vi sinh và enzyme. Giá trị nông sản được nâng lên nhiều lần và quy trình công nghệ đi kèm trang thiết bị là một dạng hàng hóa trong kinh doanh chuyển giao công nghệ.

Ngoài ra có thể liệt kê thêm một số lĩnh vực khác:

- Công nghệ sinh học chế biến thực phẩm: Các enzyme (amylase, rennin, β -galactosidase, invertase, gluco-isomerase, pectinase), các chất phụ gia thực phẩm (các chất tạo ngọt, hương vị, tạo màu, bột nở và làm ổn định, các vitamin, các amino acid, các chất chống oxy hóa, các chất bảo quản, các chất hoạt hóa bề mặt...).

- Các loại thức ăn bổ sung cho chăn nuôi (kháng sinh mới...).
- Các loại thuốc trừ sâu, diệt cỏ với tính đặc hiệu tăng lên (các sản phẩm *Bt*, các baculovirus, tuyến trùng ký sinh...).
- Các hormone sinh trưởng thực vật (các cytokinin...).
- Các hóa chất chẩn đoán bệnh cho động-thực vật

3.2. Công nghệ sinh học trong y dược

Có lẽ thành tựu công nghệ sinh học được thể hiện rõ nét nhất là ở lĩnh vực y học. Hiện nay, hầu hết các sản phẩm quan trọng sau đây đều được sản xuất trên cơ sở công nghệ sinh học, bao gồm các ứng dụng sau:

- Các loại kháng sinh và các chất diệt khuẩn, các loại vitamin và chất bổ dưỡng, các loại amino acid và hỗn hợp của chúng trong dịch truyền, các loại vaccine và các loại hormone chữa bệnh.
- Các bộ kit chuẩn dùng trong chẩn đoán bệnh và chẩn đoán hóa sinh trong y dược.
- Cây trồng và vật nuôi được cấy chuyển những gen sản sinh ra các loại protein trị liệu đang là mục tiêu đầu tư của khá nhiều công ty y dược hàng đầu trên thế giới hiện nay.

Cụ thể là nghiên cứu và sản xuất các dược phẩm, các kháng thể đơn dòng, interferon, các hormone (hormone sinh trưởng, insulin, erythropoietin, thrombopoietin...), các enzyme (urokinase, heparinase, alcohol dehydrogenase), các protein khác (các kháng nguyên đặc hiệu, albumin, antithrombin, fibronectin...), các kháng sinh, thuốc và vitamin mới, các dược phẩm có bản chất protein, các loại vaccine viêm gan B, C, HIV, cúm, sốt rét, viêm não, tả và các tác nhân gây bệnh tiêu chảy, các kit chẩn đoán như: chẩn đoán sự có mặt HIV, virus viêm gan B và C trong máu, một số chẩn đoán thai..., liệu pháp gen: điều trị các gen gây bệnh di truyền.

Hiện nay, các công ty công nghệ sinh học y dược hàng đầu thế giới đang tập trung vào nghiên cứu tạo ra sản phẩm chống lại các căn bệnh như HIV/AIDS, các loại bệnh ung thư, tiểu đường, các bệnh tim mạch, các bệnh truyền nhiễm...

3.3. Công nghệ sinh học công nghiệp và chế biến thực phẩm

Công nghệ sinh học công nghiệp bao gồm các lĩnh vực sản xuất các loại enzyme như amylase, cellulase và protease dùng trong công nghiệp dệt, công nghiệp xà phòng và mỹ phẩm, công nghiệp bánh kẹo, rượu bia và nước giải khát...

Sau đây là các loại sản phẩm của công nghệ sinh học công nghiệp:

- Công nghiệp hóa chất: Các hóa chất thông dụng (ví dụ: acrylamide) đều có thể sản xuất bằng công nghệ sinh học. Công nghiệp hóa học sẽ có hiệu quả hơn nếu dùng các chất xúc tác sinh học (enzyme), tái sinh và xử lý các dung môi bằng con đường sinh học.
- Quá trình chế biến tinh bột: Dùng các enzyme do công nghệ sinh học tạo ra để dịch hóa và đường hóa tinh bột thành glucose và chuyển hóa thành fructose.
- Công nghiệp làm sạch: Các chất giặt tẩy hiện đại được bổ sung protease và các enzyme khác làm sạch các vết bẩn protein, tinh bột và chất béo.
- Công nghiệp bột gỗ và giấy: Nhu cầu của thị trường và bảo vệ môi trường ngày càng lớn đối với giấy ít chứa các hợp chất chlorine gây ô nhiễm. Quá trình sản xuất bột giấy hiện nay gây ô nhiễm rất nặng. Công nghệ sinh học đưa ra giải pháp sinh học để sản xuất bột giấy không

gây ô nhiễm bằng cách sử dụng các loại nấm phân hủy lignin-cellulose để tạo bột. Các enzyme cũng được dùng nâng cao chất lượng sợi và chất lượng giấy.

- Công nghiệp khai khoáng và phát hiện khoáng sản. Có hai công nghệ: lọc sinh học/oxy hóa sinh học các kim loại, xử lý ô nhiễm kim loại và tái sinh. Công nghệ lọc kim loại dùng các vi sinh vật có thể thu được các kim loại quý như đồng, kẽm và cobalt. Công nghệ xử lý sinh học ô nhiễm có thể áp dụng đối với các kim loại nặng.

3.4. Công nghệ sinh học môi trường

Tuy là lĩnh vực khá mới nhưng sự phát triển và ứng dụng của công nghệ sinh học môi trường rất đáng kể. Mọi quá trình xử lý chất thải nếu không khép kín bằng xử lý sinh học thì khó có thể thành công trọn vẹn.

Các hoạt động chính của công nghệ sinh học môi trường đang được chú trọng là:

- Công nghệ phân hủy sinh học: Dùng các cơ thể sống phân hủy các chất thải độc tạo nên các chất không độc như nước, khí CO₂ và các vật liệu khác. Bao gồm, công nghệ kích thích sinh học: bổ sung chất dinh dưỡng để kích thích sự sinh trưởng của các vi sinh vật phân hủy chất thải có sẵn trong môi trường, công nghệ bổ sung vi sinh vật vào môi trường để phân hủy chất ô nhiễm, công nghệ xử lý ô nhiễm kim loại và các chất ô nhiễm khác bằng thực vật và nấm.

- Dự phòng môi trường: Phát triển các thiết bị dò và theo dõi ô nhiễm môi trường, đặc biệt trong việc dò nước và khí thải công nghiệp trước khi giải phóng ra môi trường.

Bảng 1.1. Một số hướng phát triển của công nghệ sinh học hiện đại

Lĩnh vực	Ứng dụng
Nông nghiệp	Tạo chủng vi sinh vật mới, xây dựng các phương pháp chọn giống cây trồng và vật nuôi mới.
Y tế	Dùng enzyme tạo các bộ cảm biến sinh học trong các thiết bị phân tích y tế. Sử dụng tế bào vi sinh vật, tế bào động-thực vật trong sản xuất thuốc (ví dụ: steroid) và tổng hợp các loại kháng sinh mới. Sử dụng enzyme trong chữa trị bệnh.
Công nghiệp thực phẩm	Xây dựng và hoàn thiện các phương pháp chế biến và bảo quản thực phẩm mới, sản xuất chất bổ sung vào thực phẩm (vitamin, amino acid...), sử dụng protein đơn bào và enzyme trong công nghệ chế biến thực phẩm.
Giám sát môi trường	Hoàn thiện các phương pháp dự đoán và giám sát tình trạng môi trường. Hoàn thiện các phương pháp xử lý chất thải (đặc biệt là chất thải công nghiệp).
Sản xuất hóa chất	Sản xuất các acid hữu cơ (citric acid, itaconic acid, acetic acid...), sản xuất enzyme làm chất tẩy rửa.
Năng lượng	Gia tăng phạm vi sử dụng biogas, xây dựng các dự án lớn sản xuất ethanol dùng làm nhiên liệu.

3.5. Các vấn đề pháp lý của công nghệ sinh học hiện đại

Công nghệ DNA tái tổ hợp đã giúp các nhà khoa học thay đổi cơ chế tiến hóa của tự nhiên, sáng tạo ra sản phẩm của gen, tạo ra các dạng sinh vật mới. Ngày càng có nhiều bằng chứng hiển nhiên về lợi ích của công nghệ DNA tái tổ hợp. Tuy nhiên, cũng phải cân nhắc đến những nguy cơ tiềm tàng của nó, và thực tế cũng đã nảy sinh một số vấn đề pháp lý quan trọng buộc chúng ta phải xem xét lại một cách thận trọng.

Chẳng hạn, chúng ta có thể tham khảo hệ thống quản lý đối với các sản phẩm cây trồng của công nghệ sinh học hiện đại ở Mỹ, nơi mà lĩnh vực công nghệ sinh học được đầu tư và phát triển tốt nhất trên thế giới.

Hệ thống quản lý của Mỹ là một bộ phận quan trọng nhằm đảm bảo an toàn lương thực. Phối hợp với Bộ Nông nghiệp Mỹ (USDA) và Cục Bảo vệ Môi trường (EPA), Cục quản lý Thực phẩm và Dược phẩm (FDA) đóng vai trò quản lý các loại lương thực có nguồn gốc thực vật được tạo ra nhờ công nghệ sinh học. Theo Đạo luật Lương thực, Dược phẩm và Mỹ phẩm (FD&C), FDA có thẩm quyền bảo đảm độ an toàn của tất cả các lương thực trong nước và nhập khẩu cho người và động vật trên thị trường Mỹ. Ngoại trừ thịt gia súc-gia cầm và một số sản phẩm trứng, những hạng mục này thuộc phạm vi điều tiết của USDA. Tuy nhiên, độ an toàn của dư lượng thuốc thú y trong thịt gia súc, gia cầm và thủy sản là do FDA quản lý. Thuốc trừ sâu lại chủ yếu do EPA điều tiết. Cơ quan Kiểm tra Sức khỏe Thực vật và Động vật của USDA (APHIS) có chức năng giám sát an toàn nông nghiệp và an toàn môi trường trong trồng trọt và thử nghiệm tại hiện trường các giống cây trồng được tạo ra nhờ công nghệ sinh học.

Các loại lương thực và thành phần lương thực được tạo ra nhờ công nghệ sinh học phải đáp ứng những tiêu chuẩn an toàn tương tự như các tiêu chuẩn mà Đạo luật FD&C áp dụng đối với các cây trồng được tạo ra theo phương pháp lai giống thông thường. Điều này có nghĩa là các sản phẩm công nghệ sinh học cũng phải an toàn giống như các sản phẩm truyền thống trên thị trường. FDA có quyền loại trừ một loại lương thực khỏi thị trường hoặc trừng phạt những người buôn bán loại lương thực đó nếu nó gây ra rủi ro đối với sức khỏe cộng đồng. Cần lưu ý rằng Đạo luật FD&C quy định những người áp dụng công nghệ sinh học phải chịu trách nhiệm pháp lý nhằm đảm bảo rằng những lương thực mà họ bán cho người tiêu dùng phải an toàn và đáp ứng tất cả các yêu cầu về pháp lý.

3.5.1. An toàn sinh học

3.5.1.1. Sự chuyển gen bằng hạt phấn

Cho tới nay không có hạt phấn của loại cây trồng biến đổi gen nào được hạn chế khả năng phát tán. Các phương thức quản lý như cách ly không gian và thời gian có thể hạn chế sự lưu chuyển gen (gene flow) giữa cây trồng, hạn chế hạt sót lại trong đất và cây sót lại sau khi thu hoạch. Việc sử dụng vùng cách ly, rào cản cây trồng và các rào cản thực vật khác giữa nguồn tạo và nơi nhận hạt phấn cũng có thể giảm mức độ phát tán hạt phấn. Thời gian hạt phấn ở trong không khí cũng khá dài, do đó có thể phát tán đến khoảng cách khá xa. Tuy nhiên, điều kiện thời tiết và môi trường thay đổi có thể gây ra sự phát tán ở những khoảng cách xa hơn nữa. Các

biện pháp cách ly sinh học đang được phát triển nhằm xác định liệu sự sinh sản ở cây trồng có thể kiểm soát được hay không để tránh sự giao lưu gen qua hạt hoặc hạt phấn.

Đặc biệt ở các giống hoặc dòng có cây bất dục đực, sẽ xảy ra hiện tượng lai xa với giống biến đổi gen hữu thụ ở một tần số cao hơn và khoảng cách xa hơn so với giống truyền thống. Sự tích lũy gen (gene stacking) đã được quan sát ở cây trồng và người ta dự đoán là cây trồng mang gen đa kháng sẽ trở nên phổ biến sau khi cây trồng chuyển gen được phép đưa vào thị trường, và vì vậy cây mọc hoang biến đổi gen sẽ phải cần các biện pháp diệt cỏ khác.

Các nghiên cứu cho thấy phần lớn sự thụ phấn chéo xảy ra ở khoảng cách ngắn và khả năng thụ phấn thành công giảm theo hàm mũ so với khoảng cách từ nguồn phát ra hạt phấn. Nhưng trên phạm vi nông trại vẫn có sự lưu chuyển gen, mặc dù mức độ xảy ra rất thấp ở một khoảng cách khá xa, vì vậy sự tách biệt hoàn toàn về mặt di truyền là rất khó duy trì.

Trong khi hạt phấn đóng vai trò quan trọng trong sự phát tán theo không gian thì hạt giống đóng vai trò quan trọng trong sự phát tán theo thời gian. Do đó, khi cách ly cây trồng chuyển gen với cây trồng không chuyển gen phải tính đến chuyện trước đó cây trồng chuyển gen có được trồng trên cùng mảnh đất đó không và tập quán canh tác có gây ra sự di chuyển các hạt giữa các mảnh ruộng hay không.

Ngoài ra, sự lưu chuyển gen giữa cây biến đổi gen và họ hàng của nó còn tùy thuộc vào loại tính trạng gen chuyển quy định, đặc điểm sinh học của cây (thụ phấn chéo hoặc tự thụ phấn) và bối cảnh nông nghiệp (hệ thống cây trồng, tổ chức không gian giữa các thửa ruộng).

3.5.1.2. Sự bền vững của DNA trong đất

DNA của cây chuyển gen có thể được phóng thích vào môi trường từ các nguyên liệu thực vật đã già hoặc mục nát. Vấn đề này đã được khảo sát ở một số cây chuyển gen như thuốc lá (aacC1), hoa dã yên (NOS-nptII) và củ cải đường (bar/TR1, TR2/nptII, 35S/BNYVV-cp). Sự bền vững của cấu trúc DNA trong đất được phát hiện bằng cách tách chiết DNA trực tiếp từ đất, sau đó khuếch đại cấu trúc này bằng kỹ thuật PCR. Chọn lọc primer thích hợp cho phép phát hiện rõ ràng cấu trúc chuyển gen bên cạnh các gen xuất hiện tự nhiên. Với phương pháp này sự hiện diện của cấu trúc DNA có thể được phát hiện nhưng không có thông tin nào về sự hiện diện của nó trong nguyên liệu thực vật mục nát, có thể do DNA tự do đã được hấp thụ vào bề mặt đất. DNA của cây củ cải đường chuyển gen được phát hiện trong mẫu đất ở vị trí đã không sử dụng 6, 12 và 18 tháng sau khi cây củ cải đường bị cày lấp trong đất. Người ta cũng đã tìm thấy DNA cây thuốc lá chuyển gen ở trong đất sau hơn 1 năm thu hoạch. Trong khi đó DNA của hoa dã yên chuyển gen chỉ có thể phát hiện vào thời điểm 2 tháng sau khi cây được cày lấp trong đất.

Mặc dù chỉ có một vài khảo sát về sự bền vững của DNA cây chuyển gen ở trong đất, nhưng sự bền vững của cấu trúc trong một thời gian dài có thể được chứng minh rõ ràng.

3.5.1.3. Chuyển gen ngang từ thực vật vào vi sinh vật đất

Chuyển gen ngang (horizontal gene transfer) là hiện tượng chuyển các gen hoặc nguyên liệu di truyền trực tiếp từ một cá thể riêng biệt vào một cá thể khác bằng các quá trình tương tự sự gây nhiễm. Phân biệt với một quá trình bình thường là chuyển gen dọc (vertical gene transfer)-từ bố mẹ vào con cái-xuất hiện trong quá trình sinh sản. Chuyển gen ngang trong phần này đề cập đến DNA ngoại lai của cây chuyển gen hiện diện ở trong đất, vi khuẩn phát triển khả năng để nhận gen này và cuối cùng, các trình tự này được hợp nhất trong genome của vi khuẩn.

Nguy cơ của công nghệ di truyền đó là làm tăng tiềm năng của sự chuyển gen ngang qua các loài không họ hàng. Các cơ chế tế bào cho phép các gen ngoại lai xen đoạn vào genome của một loài nào đó. Các gen kháng thuốc diệt cỏ hoặc kháng kháng sinh của vi khuẩn thường được sử dụng như là các chỉ thị chọn lọc đối với cây chuyển gen. Vì thế, chuyển ngang từ thực vật vào vi sinh vật của các gen kháng như thế thường được xem như là một hiệu ứng tiềm tàng không mong muốn giữa cây chuyển gen và các vi sinh vật đất.

Tuy nhiên, cho đến nay chưa có bằng chứng rõ ràng về việc chuyển gen từ thực vật vào các vi sinh vật. Hiện nay, các nghiên cứu an toàn sinh học (biosafety) về chuyển gen ngang từ cây chuyển gen vào vi sinh vật (vi khuẩn và nấm) có hai hướng chính là tìm hiểu cơ chế chuyển gen từ thực vật vào vi sinh vật và đánh giá các hậu quả sinh thái của nó.

Cơ chế chủ yếu của việc chuyển gen từ thực vật vào vi sinh vật là quá trình biến nạp tự nhiên đòi hỏi sự hấp thụ DNA tự do. Vi khuẩn đất có thể biến nạp tự nhiên và hợp nhất DNA ngoại lai trong genome của mình. Để chuyển gen từ thực vật vào vi sinh vật ở điều kiện đồng ruộng, không phải chỉ có cơ chế cho phép hấp thụ và sao chép trong một vật chủ mới mà sự chọn lọc vật chủ để biểu hiện một tính trạng mới là quan trọng nhất. Phát hiện chuyển gen ngang có thể thực hiện bằng cách phân tích vi khuẩn đất sau giai đoạn nuôi cấy đầu tiên.

3.5.1.4. Chuyển gen từ thực vật vào virus

Kết quả đầu tiên về cây chuyển gen biểu hiện protein vỏ của virus khảm thuốc lá (TMV) đã ngăn chặn sự phát triển của bệnh xuất hiện trong năm 1986. Phương thức này sau đó đã được sử dụng để tạo ra tính kháng cho các loại virus khác nhau, tuy nhiên các nhà di truyền học đã đặt câu hỏi về sự an toàn của cây trồng chuyển gen ngay từ những ngày đầu tiên. Nguy cơ rõ rệt nhất là tiềm năng tạo ra các virus gây nhiễm mới bằng sự tái tổ hợp, ví dụ: gen chuyển của virus (viral transgene) liên kết hoặc trao đổi các phần với nucleic acid của các virus khác. Do vỏ protein không ngăn được virus xâm nhập vào tế bào thực vật, gen chuyển (transgene) sẽ được tiếp xúc với các nucleic acid của nhiều virus được mang tới thực vật bởi các vector côn trùng (insect vector).

Một số nghiên cứu đã chứng minh rằng các virus thực vật có thể tấn công một loạt các gen virus khác nhau từ cây chuyển gen. Chẳng hạn:

- Virus gây bệnh khảm hoại tử ở cây cỏ ba lá màu đỏ (red clover necrotic mosaic virus-RCNMV) dạng khiếm khuyết đã thiếu gen cho phép nó chuyển từ tế bào này đến tế bào khác

(vì thế không gây nhiễm được) đã tái tổ hợp với một bản sao của gen đó trong cây thuốc lá chuyển gen *Nicotiana benthamiana*, và đã sinh sản các virus gây nhiễm.

- Cây cải *Brassica napus* chuyển gen VI, một nhân tố hoạt động dịch mã, của virus khảm súp- lơ (cauliflower mosaic virus-CaMV), đã tái tổ hợp với phần bổ sung của virus thiếu mất gen đó, và tạo ra virus gây nhiễm trong 100% cây chuyển gen.

- Sự tái tổ hợp giữa CaMV dạng hoang dại và dạng chuyển gen VI được chứng minh trong *N. bigelovii*. Ít nhất một trong số các virus tái tổ hợp có độc tính hơn dạng hoang dại.

- Cây *N. benthamiana* biểu hiện một đoạn gen protein vỏ của virus CCMV (cowpea chlorotic mottle virus) đã tái tổ hợp với virus khiếm khuyết thiếu gen đó.

Nhiều khảo sát cho thấy trong các thí nghiệm có CaMV tần số tái tổ hợp cao hơn nhiều so với các virus khác. Trong khi CCMV tái tổ hợp được phục hồi từ 3% cây chuyển gen *N. benthamiana*, thì CaMV tái tổ hợp được phục hồi từ 36% cây chuyển gen *N. bigelovii*. Người ta nghi ngờ rằng sự đứt gãy DNA sợi đôi có thể xảy ra trong trường hợp tái tổ hợp ở CaMV do thực tế là DNA chuyển gen bao gồm cả promoter CaMV 35S.

3.5.2. An toàn thực phẩm

Các giống cây trồng chuyển gen ngày càng được phát triển nhờ vào các công cụ của công nghệ sinh học hiện đại. Cũng chính vì vậy mà nhiều người băn khoăn rằng liệu các thực phẩm này có an toàn bằng các loại thực phẩm có được nhờ sử dụng các phương pháp nông nghiệp truyền thống hay không. Vậy sự khác biệt giữa lai giống thông thường và công nghệ sinh học thực vật là gì. Thực ra cả hai đều có cùng một mục tiêu là tạo ra các giống cây trồng có chất lượng cao với những đặc tính đã được cải thiện giúp chúng phát triển tốt hơn và ngon hơn. Sự khác biệt là ở chỗ mục đích này đạt được bằng cách nào.

Lai giống truyền thống đòi hỏi sự trao đổi hàng ngàn gen giữa hai cây để có được tính trạng mong muốn. Trong khi đó, nhờ công nghệ sinh học hiện đại, chúng ta có thể lựa chọn một đặc tính mong muốn và chuyển riêng nó vào hạt giống. Sự khác biệt giữa hai kỹ thuật này là rất lớn. Phương pháp công nghệ sinh học hợp lý hơn, có hiệu quả cao và đem lại kết quả rất tốt.

Các kỹ thuật sử dụng trong công nghệ sinh học hiện đại cung cấp cho những nhà lai tạo giống những công cụ chính xác cho phép họ chuyển những đặc tính mong muốn vào cây trồng. Hơn thế nữa, họ có thể làm điều này mà không bị chuyển thêm các tính trạng không mong muốn vào cây như vẫn thường xảy ra, nếu sử dụng lai giống truyền thống.

Thực phẩm có nguồn gốc từ cây trồng chuyển gen phải trải qua nhiều thử nghiệm hơn bất kỳ loại thực phẩm nào trong lịch sử. Trước khi được đưa ra thị trường, chúng phải được đánh giá sao cho phù hợp với các quy định do một vài tổ chức khoa học quốc tế đưa ra như Tổ chức Y tế Thế giới, Tổ chức Nông Lương, Tổ chức Hợp tác và Phát triển Kinh tế... Những quy định này như sau:

- Các sản phẩm chuyển gen cần được đánh giá giống như các loại thực phẩm khác. Các nguy cơ gây ra do thực phẩm có nguồn gốc từ công nghệ sinh học cũng có bản chất giống như các loại thực phẩm thông thường.

- Các sản phẩm này sẽ được xem xét dựa trên độ an toàn, khả năng gây dị ứng, độc tính và dinh dưỡng của chúng hơn là dựa vào phương pháp và kỹ thuật sản xuất.

- Bất kỳ một chất mới nào được đưa thêm vào thực phẩm thông qua công nghệ sinh học đều phải được cho phép trước khi đưa ra thị trường, cũng giống việc các loại chất phụ gia mới như chất bảo quản hay màu thực phẩm cần phải được cho phép trước khi thương mại hóa.

Một số nhận định trong vấn đề an toàn thực phẩm hiện nay như sau:

- Mức độ an toàn của thực phẩm chuyển gen ít nhất cũng tương đương với các thực phẩm khác bởi vì quá trình đánh giá an toàn đối với thực phẩm chuyển gen kỹ lưỡng hơn nhiều so với việc đánh giá các thực phẩm khác. Quá trình đánh giá an toàn thực phẩm đảm bảo rằng thực phẩm chuyển gen mang lại tất cả các lợi ích như thực phẩm thông thường và không có thêm một tác hại nào.

- Chưa có bằng chứng nào cho thấy thực phẩm chuyển gen hiện đang có trên thị trường gây ra bất cứ lo ngại nào về sức khỏe con người hay có bất kỳ khía cạnh nào kém an toàn hơn so với cây trồng tạo được nhờ lai giống truyền thống.

- Một điểm đặc trưng của kỹ thuật chuyển gen là nó đưa vào một hay nhiều gen đã được xác định rõ. Điều này giúp cho việc thử nghiệm độc tính của các cây trồng chuyển gen dễ thực hiện hơn so với các cây trồng bình thường.

3.5.2.1. Các chất gây dị ứng

Một trong những mối quan tâm lớn nhất về thực phẩm chuyển gen là chất gây dị ứng (một protein gây ra dị ứng) có thể được chuyển vào thực phẩm. Đến nay các nhà khoa học đã biết rất nhiều về các thực phẩm gây ra dị ứng ở trẻ nhỏ và người trưởng thành. Khoảng 90% sự dị ứng thức ăn là có liên quan tới tám thực phẩm và nhóm thực phẩm-động vật có vỏ (tôm, cua, sò, hến), trứng, cá, sữa, lạc, đậu tương, quả hạch và lúa mì. Những loại thực phẩm này và rất nhiều chất gây dị ứng khác đã được xác định rất rõ và do vậy khó tin rằng chúng có thể được đưa vào thực phẩm chuyển gen.

Tuy vậy, việc kiểm tra tính dị ứng vẫn là một khâu quan trọng trong việc kiểm tra an toàn trước khi một giống cây trồng được đưa ra làm thực phẩm. Hàng loạt các thử nghiệm và câu hỏi phải được xem xét kỹ để quyết định liệu thực phẩm này có làm tăng sự dị ứng hay không.

Các chất gây dị ứng có những đặc tính chung như không bị phân hủy trong quá trình tiêu hóa, có xu hướng không bị phân hủy trong quá trình chế biến thực phẩm, và thường có rất nhiều trong thực phẩm. Cho đến nay, không có loại protein nào được chuyển vào thực phẩm chuyển gen đã được thương mại hóa lại mang những đặc tính nói trên. Chúng không có tiền sử và khả năng gây dị ứng hay độc tính, cũng không giống với các chất gây dị ứng hay các độc tố đã biết và nói chung chức năng của chúng đã được biết rõ. Những protein này có một hàm lượng rất thấp trong thực phẩm chuyển gen, nhưng nhanh chóng bị phân hủy trong dạ dày và đã được kiểm tra độ an toàn trong các nghiên cứu về thực phẩm cho động vật.

Các gen mã hóa thông tin di truyền có mặt trong tất cả các loại thực phẩm và việc ăn chúng không gây ra bất kỳ ảnh hưởng xấu nào. Không có tác hại di truyền nào xảy ra khi tiêu

hóa DNA cả. Trên thực tế, chúng ta luôn nhận DNA mỗi khi ăn do nó có mặt ở tất cả thực vật và động vật.

3.5.2.2. *Đánh giá độ an toàn của các thực phẩm*

Bất kỳ một sản phẩm chuyển gen nào trước khi được đưa ra thị trường phải được thử nghiệm toàn diện, được các nhà khoa học và các giám định viên đánh giá độc lập xem có an toàn về dinh dưỡng, độc tính và khả năng gây dị ứng hay không. Các khía cạnh khoa học thực phẩm này dựa trên những quy định của các tổ chức có thẩm quyền của mỗi nước, bao gồm: một hướng dẫn sử dụng sản phẩm, thông tin chi tiết về mục đích sử dụng sản phẩm, các thông tin về phân tử, hóa sinh, độc tính, dinh dưỡng và khả năng gây dị ứng. Các câu hỏi điển hình có thể được đặt ra là: (1) Các thực phẩm chuyển gen có được tạo ra từ thực phẩm truyền thống đã được công nhận an toàn hay không. (2) Nồng độ các độc tố hay chất gây dị ứng trong thực phẩm có thay đổi hay không. (3) Hàm lượng các chất dinh dưỡng chính có thay đổi hay không. (4) Các chất mới trong thực phẩm chuyển gen có đảm bảo tính an toàn hay không. (5) Khả năng tiêu hóa thức ăn có bị thay đổi hay không. (6) Các thực phẩm có được tạo ra nhờ các quy trình đã được chấp nhận hay không.

Ngay khi các câu hỏi này và các câu hỏi khác về thực phẩm chuyển gen đã được trả lời, vẫn còn nhiều việc phải làm trong quá trình phê chuẩn trước khi thực phẩm chuyển gen được thương mại hóa. Thực tế, thực phẩm chuyển gen là loại sản phẩm được nghiên cứu nhiều nhất trong các loại đã được sản xuất.

3.5.3. Đạo đức sinh học

Đạo đức sinh học (bioethics) là một phạm trù phức tạp mà cách nhìn nhận tùy thuộc vào đặc điểm dân tộc và văn hóa khác nhau. Cho nên, những vấn đề được coi là hợp với đạo đức ở nơi này có thể là trái đạo đức ở nơi khác. Thuật ngữ này có lẽ bắt nguồn ở Mỹ vào những năm 1970, khi các kỹ thuật thao tác gen (gene manipulation), còn gọi là kỹ thuật di truyền hay công nghệ DNA tái tổ hợp, được áp dụng.

Phạm trù đạo đức sinh học bao hàm cách đánh giá lợi ích và rủi ro liên quan tới sự can thiệp của con người, đặc biệt là công nghệ mới, xem xét làm cân đối sự theo đuổi quyền tự do cá nhân với trách nhiệm pháp lý. Đạo đức sinh học đòi hỏi phải đánh giá công nghệ thật kỹ, trong đó có đánh giá ảnh hưởng đến xã hội và cá nhân.

Cùng với thời gian, vấn đề này ngày càng trở nên sâu sắc. Trước những xáo trộn do sự phát triển của di truyền học, người ta tự hỏi mình đang tiến tới loại xã hội nào và sự cân bằng mới nào trên hành tinh sẽ được thiết lập.

Đạo đức sinh học không giới hạn suy nghĩ về mối quan hệ giữa khoa học và xã hội. Nó gắn liền quan hệ giữa con người với tự nhiên trong tính đa dạng sinh học của nó, kể cả bản chất của chính con người. Mặt khác, đạo đức sinh học là một cách suy nghĩ về tương lai và giá trị

của chúng ta. Nó giúp cho giới chuyên môn đối thoại với những người ra quyết định và người dân, cùng quan tâm đến sự tồn tại của xã hội loài người.

Ngày 25/7/1978, bé gái được thụ tinh trong ống nghiệm (Louise Brown) đã ra đời ở Anh. Từ đó đến nay, kỹ thuật này đã tạo ra không biết bao nhiêu em bé như vậy trên thế giới, kể cả ở Việt Nam. Mục đích đầu tiên của công việc này là hoàn toàn lành mạnh. Trong trường hợp của Louise Brown, người mẹ bị vô sinh do khuyết tật ở vòi trứng nên để giúp bà có con, người ta đã lấy tế bào trứng của bà thụ tinh trong ống nghiệm với chính tinh trùng của chồng bà, rồi cấy hợp tử vào ngay tử cung của bà. Về mặt sinh học và pháp lý, em bé là con của họ và điều này cũng không đặt ra vấn đề gì về đạo đức hay vi phạm một điều luật nào.

Nhưng một vấn đề tế nhị và phức tạp khác lại được đặt ra nếu một phụ nữ không thể hoặc không muốn mang thai, đề nghị một phụ nữ khác nhận trứng được thụ tinh của mình và mang hộ cái thai đó, vậy đứa con sẽ là của ai. Cho đến nay, ở những nước có dịch vụ mang thai hộ đã phát sinh nhiều vụ kiện, vì người được thuê nhiều khi phá hợp đồng, không muốn trả lại đứa con cho người thuê nữa.

Một biểu hiện của chủ nghĩa ưu sinh dưới dạng mới, đó là người ta hy vọng có được những đứa con thiên tài bằng cách xin hoặc mua tinh trùng của các nhà bác học được giải thưởng Nobel, cho thụ tinh với trứng của những phụ nữ trẻ đẹp và thông minh rồi cấy phôi vào những phụ nữ này. Nhưng cách làm này không chắc chắn tuyệt đối do quy luật phân ly di truyền và đứa con sinh ra vẫn có thể thuộc loại tầm thường. Sau thành công nhân bản cừu Dolly, người ta hy vọng khắc phục được vấn đề trên bằng cách “nhân bản các thiên tài” nhờ chính tế bào của họ. Như ta đã biết, nhân bản người là một vấn đề rất khó và hiện nay hầu như bị cấm trên thế giới. Và lại đồng nhất di truyền không có nghĩa là đồng nhất bản sắc cá nhân. Xét về mặt luân lý và đạo đức việc làm trên không thể chấp nhận được, còn về mặt khoa học cũng khó hiện thực: thiên tài chỉ biểu hiện ở một độ tuổi nào đó và nếu định cho ra thiên tài theo cách này cũng khó vì hình dạng và thể chất của người mẹ đã khác trước. Lại càng khó thực hiện nếu thông qua một phụ nữ xa lạ không phải là mẹ mình, vì hệ gen của tế bào chất trong trứng lạ cũng có ảnh hưởng và sẽ không phát huy được như của chính mẹ mình.

Hiện nay, sự phát triển nhanh chóng của công nghệ sinh học đã đặt cho các ủy ban đạo đức và luật pháp trên thế giới những vấn đề sau đây:

- Có nên cho phép thay đổi chương trình di truyền của người hay không; và nếu cho phép thì ở mức độ nào, cho dù việc làm này được biện minh là để chữa các bệnh di truyền.

- Có nên chấp nhận việc chẩn đoán trước khi sinh để lựa chọn giới tính của đứa trẻ hay không.

- Có nên bắt buộc thực hiện các chương trình phát hiện di truyền phục vụ lợi ích sức khỏe của người dân hay để mỗi cá nhân nhận xét cơ hội dựa vào các thử nghiệm mà kết quả có thể trái ngược, ảnh hưởng tới họ và người thân của họ (ví dụ việc sinh ra một đứa con có thể có rủi ro khuyết tật hay không).

- Có nên cấm liệu pháp gen (gene therapy) nhằm vào các tế bào sinh dục hay không. Theo Suleiman, giáo sư nghiên cứu các vấn đề quốc tế và giám đốc của Ủy ban nghiên cứu châu Âu (Đại học Princeton, Mỹ) thì “Nhà nước cần xác định mức độ can thiệp vào nghiên cứu khoa

học qua tranh luận công khai nhằm hợp pháp hóa hành động cũng như để người dân kiểm soát các hành động này. Tóm lại, nhà nước cần hợp tác với cộng đồng khoa học để đảm bảo tự do nghiên cứu và ứng dụng hợp đạo đức các kết quả từ đó”.

3.5.4. Quyền tác giả và sở hữu trí tuệ

3.5.4.1. Quyền tác giả

Mặc dù đã có rất nhiều cuộc tranh luận ở các diễn đàn quốc tế về quyền tác giả của các nước có nguồn gen quý hiếm được phương Tây sử dụng trong công nghệ tạo giống nhưng đến nay vẫn chưa đem lại một kết quả thật sự nào. 169 nước đã đăng ký vào công ước Quốc tế về Đa dạng sinh học (Convention on Biological Diversity) và công ước này có hiệu lực từ 12/1993, trong đó quy định cùng chia sẻ quyền lợi giữa các nước có nguồn gen với các công ty phương Tây sử dụng nguồn gen đó. Tuy nhiên, từ đó đến nay các nước có nguồn gen quý hiếm vẫn tiếp tục bị mất dần tài sản quốc gia của mình mà quyền lợi được chia sẻ thì không đáng kể.

Chẳng hạn, năm 1994 hãng ArgEvo phân lập được gen PAT (phosphinothricin acetyltransferase) từ dòng vi khuẩn *Streptomyces viridochromogens* có trong mẫu đất lấy từ Camerun. Gen PAT cho phép tạo ra các giống cây trồng kháng thuốc diệt cỏ nhóm glufosinate, đóng góp quan trọng vào doanh số 2,3 tỷ USD của AgrEvo năm 1995. Tuy nhiên, hãng này đã từ chối không trả cho Camerun một khoản tiền nào về quyền tác giả.

Ngày 16/1/1996, Bản quyền sở hữu số 5.484.889 của Mỹ được cấp cho Giáo sư Sylvia Lee-Huang (Đại học New York) để bảo vệ quyền tác giả của ông về một loại protein chiết từ một giống mướp đắng (*Momordica charantia*) có nguồn gốc từ miền Nam Trung Quốc. Giống mướp đắng này là thành phần chính của một bài thuốc dân gian cổ truyền của Trung Quốc để chống nhiễm trùng. Lee-Huang đã cho rằng nhờ công nghệ DNA tái tổ hợp, từ nay ông không cần phải mua hạt mướp đắng từ Trung Quốc nữa, vì các protein tái tổ hợp sản xuất trong phòng thí nghiệm của ông hoàn toàn giống như protein chiết từ quả mướp đắng trước đây.

Các trường hợp trên cho thấy các công ty lớn ở các nước phát triển nhờ vào tiềm năng khoa học và nguồn vốn dồi dào của mình đã thương lượng về bản quyền tác giả với tư thế của kẻ mạnh. Sự thua thiệt của các nước yếu về công nghệ sinh học sẽ còn kéo dài.

3.5.4.2. Sở hữu trí tuệ

Một trong những nét đặc trưng của công nghệ sinh học hiện đại là sự gia tăng tính sở hữu của nó. Hiện nay, ngành công nghệ sinh học được bảo vệ bởi các bằng sáng chế và các quyền về sở hữu trí tuệ (IPR).

Như chúng ta biết, sở hữu trí tuệ đại diện cho các sản phẩm của trí tuệ. Chúng là các ý tưởng được chuyển thành dạng hữu hình. Ví dụ của sở hữu trí tuệ bao gồm: các sáng chế, phần mềm máy tính, ấn phẩm, băng đĩa ca nhạc, giống cây trồng-vật nuôi... Để tạo ra những sản phẩm như vậy thường đòi hỏi một khoảng thời gian dài và một nguồn vốn đầu tư lớn. Do vậy, các nhà sáng chế thường tìm cách thu hồi các nguồn đầu tư bằng cách sử dụng IPR. IPR cho phép các sáng chế giới hạn quyền sử dụng sở hữu trí tuệ, không một cá nhân hoặc tổ chức nào được phép sử dụng để sản xuất, nuôi trồng, bán hay đề nghị để sáng chế mà không được cho

phép. Có một số hình thức để bảo vệ các tác giả bao gồm: quyền tác giả, sáng chế, bí mật kinh doanh, nhãn hiệu hàng hóa, quyền bảo hộ giống cây trồng-vật nuôi...

Các bằng sáng chế, quyền bảo hộ giống cây trồng-vật nuôi và các nhãn hiệu hàng hóa được ban hành bởi chính phủ của từng quốc gia và sự bảo hộ chỉ có hiệu lực trong các nước mà sở hữu trí tuệ (IP) được ban hành. Do vậy, để nhận được sự bảo hộ ở nhiều nước, các quyền này phải được áp dụng và thông qua ở mỗi nước. Còn quyền tác giả và bí mật kinh doanh không đặc trưng theo quốc gia. Hiện nay, nhiều công nghệ mũi nhọn được sử dụng để tạo ra các sản phẩm công nghệ sinh học nông nghiệp dường như không được bảo hộ ở các nước đang phát triển. Chẳng hạn, các bằng sáng chế đối với promoter CaMV 35S chỉ được cấp và có hiệu lực ở Hoa Kỳ và Châu Âu (và ở Nhật Bản chỉ có một đơn xin đăng ký cấp bằng). Do đó, hiện nay chưa có IP nghiêm cấm các nước đang phát triển sử dụng công cụ này trong nghiên cứu.

Hơn nữa, các tổ chức và cá nhân có thể sử dụng các công nghệ trong tạo giống cây trồng bao gồm triển khai, sản xuất và tiêu thụ ở các nước mà công nghệ sản xuất này chưa có IP bảo hộ. Tuy nhiên, các vấn đề liên quan đến IP sẽ phát sinh ở các nước có những công nghệ được bảo hộ bởi IPR. Thời gian phát triển sản phẩm cũng cần được cân nhắc kỹ lưỡng vì các bằng sáng chế có thể được cấp ở trong nước cùng thời điểm phát triển sản phẩm. Do vậy, các nhà khoa học ở các nước đang phát triển cần phải biết về các vấn đề liên quan đến IP và có phương án giải quyết thích hợp.

Cây trồng được canh tác để sử dụng bền vững ở các nước đang phát triển và các công nghệ được áp dụng để tạo ra các cây trồng này đang nhận được rất ít sự quan tâm thương mại của khu vực kinh tế tư nhân. Trên thực tế, các công nghệ này đã và đang được chuyển giao nhằm tăng năng suất mùa vụ. Tuy nhiên, các nhà khoa học ở các nước đang phát triển cần thận trọng vì chuyển giao công nghệ liên quan đến nhiều vấn đề, không chỉ là ký kết các hợp đồng chuyển giao nguyên liệu và cấp giấy phép sử dụng cho một sản phẩm. Cả bên chuyển giao và bên tiếp nhận công nghệ phải thận trọng với các IPR liên quan đến công nghệ và điều này là cần thiết cho các đối tác để tạo sự tin tưởng lẫn nhau giữa các bên tham gia.

Các nước đang phát triển luôn thiếu năng lực và nguồn lực quản lý IP để tiến hành các phân tích và đánh giá về sự cho phép sử dụng công nghệ nhằm phát triển sản phẩm nhập khẩu, sử dụng hoặc xuất khẩu sản phẩm. Do vậy, để giúp chuyển giao các công nghệ ứng dụng trong nông nghiệp cho các nước đang phát triển, việc xây dựng khả năng quản lý IPR là rất quan trọng cho cả bên chuyển giao và bên tiếp nhận công nghệ. Cây trồng được canh tác để sử dụng bền vững ở các nước đang phát triển và các công nghệ được ứng dụng để tạo ra các cây trồng này rõ ràng nhận được ít sự quan tâm thương mại của khu vực kinh tế tư nhân. Trên thực tế các công nghệ này đã và đang được chuyển giao nhằm tăng năng suất mùa vụ.

Trong lĩnh vực công nghệ sinh học nông nghiệp, sáng chế có thể bao gồm: các phương pháp chuyển gen ở thực vật, các vector, các gen... Các sáng chế giữ vai trò quyết định nhất trong bảo hộ công nghệ sinh học nông nghiệp và được đánh giá là công cụ mạnh nhất trong hệ

thông IP. Các sáng chế tạm thời, thường được bảo hộ trong khoảng 20 năm và tùy thuộc vào mỗi quốc gia.

Nói chung, các cơ quan nghiên cứu khoa học của chính phủ cần xây dựng năng lực quản lý sở hữu trí tuệ mà họ nhận được hay tạo ra. Kiến thức về IPR sẽ giúp các nhà khoa học của các nước đang phát triển xác định được các thông tin về một công nghệ nhất định đã thuộc quyền sở hữu công cộng và họ có quyền sử dụng. Hơn nữa, IP do các khu vực kinh tế nhà nước tạo ra có thể được xem xét là tài sản được trao đổi với các công ty tư nhân hoặc được sử dụng làm hàng hóa trong các đàm phán chuyển giao công nghệ. Sự hợp tác giữa các khu vực kinh tế nhà nước và tư nhân trong phát triển công nghệ nhờ chia sẻ bí quyết sản xuất và IP sẽ thúc đẩy sự chuyển giao công nghệ cũng như đem lại lợi ích cho cả hai bên.

B. CÂU HỎI VÀ BÀI TẬP THỰC HÀNH:

Câu 1. Anh/chị hãy trình bày khái niệm và sự phân loại Công nghệ sinh học?

Câu 2. Anh chị hãy trình bày tính khoa học và kinh tế của công nghệ sinh học hiện đại?

Câu 3. Anh chị hãy trình bày được tầm quan trọng của ứng dụng công nghệ sinh học phục vụ sản xuất và bảo vệ môi trường?

C. GHI NHỚ:

- Khái niệm, lịch sử phát triển và các lĩnh vực cơ bản của công nghệ sinh học;
- Sự phân loại công nghệ sinh học;
- Tính khoa học và kinh tế của công nghệ sinh học hiện đại;
- Tầm quan trọng của ứng dụng công nghệ sinh học phục vụ sản xuất và bảo vệ môi trường;

CHƯƠNG 2. CÔNG NGHỆ DNA TÁI TỔ HỢP

Giới thiệu:

DNA tái tổ hợp (Recombinant DNA) là DNA được tạo ra từ hai hay nhiều nguồn vật liệu di truyền khác nhau được ghép nối từ các đoạn DNA của các cá thể khác nhau trong loài hoặc của các loài khác nhau.

Thực chất của công nghệ DNA tái tổ hợp là tập hợp nhiều kỹ thuật trên một gen hoặc bộ gen, cải biến cấu trúc của gen, tạo ra các gen mới trong bộ gen.

Công nghệ DNA tái tổ hợp bao gồm 4 bước cơ bản:

- Tách chiết DNA
- Tạo vectơ tái tổ hợp
- Biến nạp vectơ tái tổ hợp vào tế bào chủ và nhân dòng
- Sàng lọc, theo dõi hoạt động và biểu hiện của gen

Mục tiêu:

- Trình bày được các thành phần tham gia và các bước của quy trình tạo DNA tái tổ hợp;
- Thiết lập được trình tạo DNA tái tổ hợp cho từng đối tượng sinh học;

A. NỘI DUNG:

1. Tách chiết DNA

1.1. Tách chiết DNA của vi sinh vật

- Nuôi vi sinh vật thu sinh khối
- Phá vỡ màng tế bào
- Loại bỏ protein trong tế bào
- Kết tủa DNA

1.2. Tách chiết DNA từ mô, tế bào động vật và thực vật

Tương tự như tách chiết DNA của vi sinh vật, nhưng không phải nuôi cấy để thu sinh khối tế bào.

Tùy từng loại mẫu phẩm sinh học (lông, tóc, thịt, trứng, máu, nước bọt...), tùy vào mục đích nghiên cứu và điều kiện phòng thí nghiệm có thể sử dụng các kỹ thuật tách chiết với các loại hoá chất, dung môi khác nhau

2. Vectơ tách dòng

2.1. Khái niệm

Vectơ tách dòng còn gọi là vectơ chuyển gen.

Là các phân tử DNA có kích thước nhỏ, cho phép gắn các gen cần thiết, có khả năng tự tái bản không phụ thuộc vào sự phân chia của tế bào, tồn tại độc lập trong tế bào

2.2. Đặc điểm của vectơ tách dòng

- Kích thước vectơ càng nhỏ càng tốt để có thể gắn DNA có kích thước tối đa, dễ xâm nhập vào tế bào vi khuẩn và được sao chép nhanh.

- Có các đặc điểm cho phép dễ dàng phát hiện, nhận biết chúng trong tế bào vật chủ, thường là các gen kháng chất kháng sinh hoặc gen sinh tổng hợp chất màu, dễ phát hiện trên môi trường thạch.

- Có vị trí nhận biết duy nhất của một số lượng tối đa các enzyme giới hạn.

Khi cài gắn một gen hay một trình tự DNA vào vectơ tách dòng tạo thành vectơ tái tổ hợp và chuyển vectơ tái tổ hợp vào tế bào chủ. Trong tế bào chủ các vectơ tái tổ hợp được nhân lên thành một lượng lớn các bản sao của gen (DNA) ban đầu.

3. Các loại vectơ tách dòng

Gồm nhiều loại như plasmid, phage, cosmid, phagemid, nhiễm sắc thể nhân tạo ở nấm men...Tuỳ thuộc vào kích thước của gen cần tách dòng và đặc điểm của loại tế bào chủ để chọn loại vectơ tách dòng thích hợp.

3.1. Plasmid

Là những phân tử DNA có kích thước nhỏ (2-5kb), dạng vòng, nằm trong tế bào chất của tế bào vi khuẩn, nấm men...Có khả năng tái bản độc lập, không phụ thuộc vào sự tái bản của bộ gen tế bào.

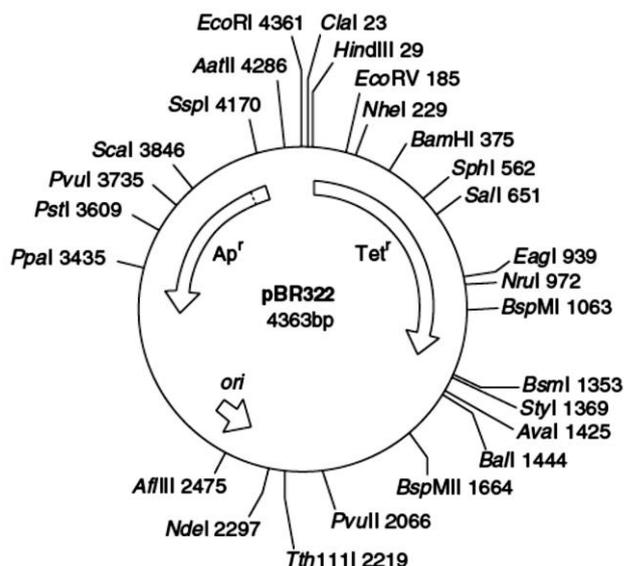
Các vectơ tách dòng thường sử dụng các plasmid của vi khuẩn và các bacteriophage.

Plasmid được phát hiện đầu tiên ở *E.coli* kí hiệu là ColE1. Từ các plasmid tự nhiên đã phân lập, cải biến thành nhiều thế hệ plasmid nhân tạo khác nhau, mang nhiều đặc tính quý, có lợi cho kỹ thuật tách dòng gen.

Plasmid thế hệ thứ nhất là các plasmid tự nhiên, như pSC101(Stanley và Cohen,1973), ColE1....Hiện nay người ta không sử dụng loại plasmid này nữa.

Plasmid thế hệ thứ 2 là các plasmid có cấu tạo phức tạp hơn, được cấu tạo từ nhiều đoạn nhỏ của các plasmid tự nhiên, để vừa có được các gen kháng thuốc, vừa có các điểm nhận biết cho các enzyme giới hạn. Điển hình cho plasmid thế hệ thứ 2 là pBR322 (p - viết tắt của plasmid; B - Bolivar, R – Rodriguez là tên của 2 tác giả; 322 chỉ số thứ tự).

pBR322 có kích thước 4363bp, mang 2 gen kháng chất kháng sinh Ap^R-kháng ampiciline, Tc^R-kháng tetracycline và hơn 20 vị trí nhận biết của các enzyme giới hạn, trong số đó có 11 vị trí nằm trong các gen kháng chất kháng sinh. Khi một gen lạ (hoặc một trình tự DNA) được gắn tại vị trí các gen đó, làm mất khả năng kháng chất kháng sinh tương ứng.



Hình 2.1 plasmid pBR322

Plasmid thế hệ thứ 3 là các plasmid mạnh, có kích thước rất nhỏ và được gắn thêm polylinker. Polylinker là một đoạn polynucleotid tổng hợp mang một chuỗi các vị trí nhận biết duy nhất của nhiều loại enzyme giới hạn.

3.2. Phage

Các phage sử dụng làm vectơ tách dòng hiện nay phần lớn bắt nguồn từ phage λ . Phage λ có DNA mạch kép kích thước 48.502bp, nằm trong phần đầu. λ

Sử dụng phage làm vectơ tách dòng có lợi hơn các loại plasmid khác vì phage có hệ thống giúp xâm nhập vào vi khuẩn nhanh, tái bản rất mạnh, và có khả năng mang đoạn DNA lạ dài hơn nhiều so với sử dụng plasmid.

Các phage EMBL3, EMBL4, λ GEM11, λ GEM12, phage M13...thường được sử dụng làm vectơ tách dòng.

3.3. Các vectơ tách dòng khác

Cosmid là vectơ được cấu tạo từ plasmid có gắn thêm đoạn cos của phage λ từ dạng thẳng nối đầu lại thành vòng tròn. Cosmid có thể chứa gen lạ có kích thước 40 – 50kb.

Phage M13 là phage có DNA mạch đơn, có kích thước 6,4kb. Được sử dụng để xác định trình tự nucleotid của gen bằng phương pháp Sanger, sản xuất các mẫu dò DNA và gây đột biến điểm định hướng.

Phagemid là vectơ được cấu tạo từ plasmid có gắn thêm một đoạn DNA của phage M13.

Plasmid Ti được sử dụng rộng rãi trong chuyên gen thực vật, bắt nguồn từ vi khuẩn trong đất, gây bệnh tạo khối u ở thực vật.

Nhiễm sắc thể nhân tạo ở nấm men, người ta tìm thấy ở nấm men *Saccharomyces cerevisiae* một loại plasmid dạng vòng, là plasmid duy nhất được tìm thấy ở Eukaryotae. Từ plasmid này người ta đã tạo ra một loại plasmid nhân tạo gọi tắt là YAC (Yeast Artificial Chromosome), có khả năng chứa đoạn DNA lạ dài đến 2000kb.

4. Các enzyme tham gia quá trình tạo vectơ tái tổ hợp

4.1. Enzyme giới hạn (Restriction enzyme – RE)

Năm 1962, V.Anber đã chứng minh trong tế bào vi khuẩn tồn tại loại enzyme đặc biệt có khả năng phân biệt DNA của vi khuẩn với DNA lạ (DNA của phage) từ ngoài vào. Enzyme này làm hạn chế hoạt động của DNA lạ trong tế bào vi khuẩn bằng cách cắt phân tử DNA một cách đặc hiệu nên còn được gọi là enzyme cắt hạn chế. Các enzyme này còn được gọi là nuclease, chia làm hai loại:

Exonuclease: phân cắt từ hai đầu mút của của DNA

Endonuclease: phân cắt ở giữa DNA

Năm 1970, Hamilton Smith đã tách được endonuclease đầu tiên từ vi khuẩn *Haemophilus influenzae*, đặt tên là Hin II. Từ sự kiện này người ta cho rằng công nghệ sinh bắt đầu từ năm 1970.

Các RE nhận biết DNA mạch kép ở những trình tự điểm nhận và cắt DNA ở ngay điểm này hoặc điểm kế cận. Các điểm này thường có trình tự 4 – 6 cặp nucleotid đối xứng đảo ngược nhau, gọi là palindrom. Mỗi RE có trình tự nhận biết đặc trưng.

Mỗi RE có vị trí cắt rất đặc hiệu nhưng lại không đặc hiệu về loài, nghĩa là chúng có khả năng cắt DNA từ nhiều nguồn khác nhau. RE thường cắt theo hai kiểu sau:

- Cắt tạo ra đầu bằng (Blunt ends): là các RE cắt cả hai mạch DNA cùng một vị trí. Các đoạn cắt kiểu này không có khả năng tự kết hợp lại với nhau mà phải sử dụng enzyme nối – DNA ligase hoặc các adaptor chuyên dụng cho mỗi loại enzyme.

- Cắt tạo ra đầu so le (Cohesive ends): là các RE cắt hai mạch của DNA ở hai vị trí lệch nhau kết quả tạo nên các đoạn DNA có các đầu so le có trình tự nucleotid hoàn toàn bổ sung cho nhau nên có thể tự nối lại với nhau, nhờ đặc tính này mà RE cắt tạo đầu so le được sử dụng nhiều trong công nghệ DNA tái tổ hợp.

Bảng 2. 1 - Một số loại enzyme giới hạn

Enzyme	Vi khuẩn có enzyme	Vùng nhận biết
<i>Eco RI</i>	<i>Escherichia coli</i>	G A-A-T-T-C C-T-T-A-A G
<i>Eco RV</i>	<i>Escherichia coli</i>	G-A-T A-T-C C-T-A T- A-G
<i>Tag I</i>	<i>Thermus aquaticus</i>	T C-G-A A-G-C T
<i>Hba I</i>	<i>Haemophilus baemoliticus</i>	G C-G-C C-G-C G
<i>Pst I</i>	<i>Providencia stuarti</i>	C-T-G-C-A G G A-C-G-T-C
<i>Bam HI</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	G G-A-T-C-C C-C-T-A-G G
<i>Hae III</i>	<i>Haemophilus aegyptius</i>	G-G C-C C-C G-G
<i>HhaI</i>	<i>Haemophilus haemolyticus</i>	G-G-C C C C-G-G

4.2. Enzyme nối – Enzyme ligase

Là enzyme xúc tác hình thành các liên kết phosphodiester nối các nucleotid với nhau. DNA ligase xúc tác nối hai đoạn DNA, RNA ligase nối hai đoạn RNA.

Enzyme nối được sử dụng phổ biến nhất là DNA ligase T4, enzyme này được tách chiết từ các tế bào *E.coli* bị nhiễm thực khuẩn thể (phage T4). DNA ligase T4 có thể gắn các đoạn DNA có đầu so le cũng như đầu bằng.

Có thể sử dụng adaptor thay cho enzyme nối để liên kết các trình tự DNA đầu bằng với nhau. Adaptor xúc tác nối các đoạn DNA do RE cắt đầu bằng tạo thành các đầu so le, mỗi RE cắt đầu bằng có các loại adaptor đặc trưng riêng.

4.3. Enzyme polymerase

Là nhóm các enzyme xúc tác quá trình tái bản DNA, tổng hợp RNA trong quá trình phiên mã:

-DNA polymerase I (pol I): xúc tác sự tổng hợp một mạch đơn DNA mới, xúc tác cho sự gắn các nucleotid vào khoảng trống trên mạch polynucleotid của sợi DNA. Ngoài ra, enzyme này còn có chức năng như một exonuclease có khả năng phân giải các liên kết giữa các nucleotid ở đầu mạch theo cả chiều 5' đến 3' và 3' đến 5'.

-*Taq* polymerase: được tách chiết từ vi khuẩn *Thermus aquaticus*, là polymerase chịu nhiệt được sử dụng trong nhân bản DNA bằng kỹ thuật PCR.

-RNA polymerase: các enzyme này xúc tác sự phiên mã tổng hợp RNA từ mạch khuôn của phân tử DNA theo chiều từ 5' đến 3'.

4.4. Enzyme phiên mã ngược

Là enzyme có khả năng tổng hợp nên DNA mạch đơn từ khuôn mRNA hoặc từ một đoạn polyribonucleotid tổng hợp hóa học, gọi là c-DNA (complementary DNA).

Các c-DNA mạch đơn có thể biến thành mạch kép nhờ DNA polymerase và được gọi là c-DNA kép (c-DNA duplex). Đoạn c-DNA kép được gắn vào plasmid và biến nạp vào vi khuẩn để tạo dòng c-DNA.

Nhờ enzyme phiên mã ngược này người ta có thể tổng hợp bất cứ gen riêng biệt nào chỉ cần có mặt mRNA của gen đó.

4.5. Các enzyme sửa đổi DNA

-Alkaline phosphatase: loại bỏ nhóm phosphat từ đầu 5' của phân tử DNA.

-Polynucleotide kinase: bổ sung nhóm phosphat vào các đầu 5' của phân tử DNA. Được dùng khi bổ sung các nhóm phosphat có hoạt tính phóng xạ vào các đầu 5' của phân tử DNA.

-Terminal deoxynucleotidyl transferase: bổ sung một hay nhiều nucleotid vào đầu 3' của phân tử DNA. Enzyme này được dùng để bổ sung các đuôi homopolymer vào các phân tử DNA khi tạo các phân tử DNA tái tổ hợp.

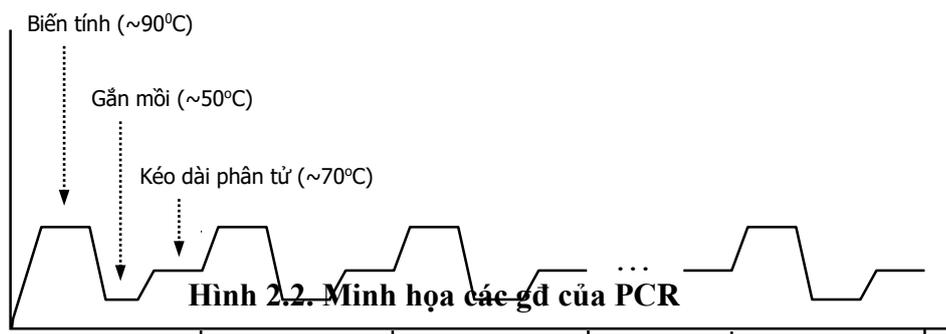
5. Kỹ thuật PCR, RAPD, RFLP

5.1. Kỹ thuật PCR (Polymerase Chain Reaction)

Bản chất của kỹ thuật PCR (phản ứng chuỗi trùng hợp, phản ứng chuỗi polymerase) là kỹ thuật tổng hợp nhân tạo các đoạn DNA với tốc độ nhanh và độ chính xác cao được thực hiện trong máy chu trình nhiệt (máy PCR).

Kỹ thuật PCR được Karl Mullis và cộng sự phát minh vào năm 1985. Kỹ thuật này được hoàn thiện và phát triển thông qua sự phân lập và sản xuất thành công enzyme tổng hợp DNA chịu nhiệt từ vi khuẩn *Thermus aquaticus* và sự thiết kế thành công các máy chu trình nhiệt cho phép thay đổi nhanh chóng và chính xác nhiệt độ cho từng giai đoạn phản ứng.

Nguyên tắc của kỹ thuật PCR là một chuỗi phản ứng gồm nhiều chu kỳ nối tiếp nhau tuân thủ những nguyên tắc cơ bản của quá trình tổng hợp DNA trong cơ thể, mỗi chu kỳ gồm 3 bước:



-Bước 1: giai đoạn biến tính (denaturation), trong một dung dịch cần thiết cho sự sao chép, phân tử DNA được biến tính ở nhiệt độ cao, thường là 94-95°C trong vòng 30-60 giây.

-Bước 2: giai đoạn gắn mồi (annealing), nhiệt độ được hạ thấp cho phép các cặp mồi bắt cặp với khuôn; trong thực nghiệm nhiệt độ này dao động trong khoảng 40-70°C tùy thuộc vào từng cặp mồi, thời gian từ 30-60 giây.

-Bước 3: giai đoạn tổng hợp (extension), nhiệt độ trong khoảng 65-75°C tạo điều kiện thuận lợi cho các nucleotid tự do gắn tiếp theo sau mồi theo nguyên tắc bổ sung tạo thành chuỗi DNA cần khuếch đại. Thời gian tùy thuộc độ dài của trình tự DNA, khoảng 30 giây đến vài phút.

Một chu kỳ gồm 3 bước trên lặp đi lặp lại nhiều lần và mỗi lần lại làm tăng gấp đôi số lượng mẫu của lần trước, đây là sự khuếch đại tăng theo cấp số nhân. Một phản ứng PCR thường 25-30 chu kỳ là đủ, theo tính toán sau 30 chu kỳ sự khuếch đại sẽ là 10^6 so với số lượng mẫu ban đầu.

Ứng dụng của kỹ thuật PCR:

- Giúp tách nhanh và chính xác từng gen hoặc từng đoạn DNA riêng biệt.
- Là kỹ thuật nền cho nhiều phương pháp nghiên cứu sinh học phân tử quan trọng: xác định trình tự gen, xác định tính đa hình DNA, làm cơ sở cho việc phân tích các chỉ thị phân tử phục vụ công tác giống (cây trồng, vật nuôi, vi sinh vật...), phát hiện các kiểu đột biến.
- Giúp chẩn đoán nhanh, nhạy chính xác các bệnh di truyền và nhiễm trùng (virus, vi khuẩn, nấm, ung thư...)
- Giúp xác định giới tính của động vật, người ở giai đoạn phôi thai sớm qua việc phát hiện các đoạn gen đặc trưng của nhiễm sắc thể giới tính.
- Khôi phục các gen của nhiều sinh vật đã tồn tại các đây hàng triệu năm.

- Giúp xác định chính xác nguồn gốc hài cốt liệt sĩ vô danh, thủ phạm hình sự khi có các dấu vết nhỏ như giọt máu, nước bọt, sợi tóc...

5.2. Kỹ thuật RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA) - Đa hình các đoạn DNA nhân bản ngẫu nhiên

Do William và cộng sự phát minh vào năm 1990, bản chất của kỹ thuật RAPD là quá trình nhân bản các đoạn DNA bằng kỹ thuật PCR có sử dụng các cặp mồi được thiết kế ngẫu nhiên. Các cặp mồi này sẽ bắt cặp ngẫu nhiên vào DNA khuôn ở vị trí bất kỳ nào có trình tự bổ sung với nó.

Các sinh vật có bộ gen giống nhau hoàn toàn kết quả sẽ nhận được các đoạn DNA có kích thước và vị trí trên điện di đồ giống nhau. Ngược lại, khi bộ gen của các mẫu kiểm tra khác nhau sẽ cho kết quả khác nhau trên điện di đồ. Từ đó giúp phát hiện sự đa dạng sinh học, nguồn gốc di truyền các sinh vật mà không cần biết thứ tự các nucleotid.

Kỹ thuật RAPD được thực hiện theo các bước cơ bản sau đây:

- Tách chiết DNA tổng số, nhân DNA bằng máy PCR
- Điện di trên gel agarose hoặc gel polyacrylamid
- Xác định tính đa dạng di truyền bằng các phần mềm thông dụng.

5.3. Kỹ thuật RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) – Đa hình chiều dài của các đoạn giới hạn

Là kỹ thuật tạo nên các đoạn cắt khác biệt nhau nhờ enzyme giới hạn, được phát hiện bằng điện di đồ. Các đoạn cắt được gọi là dấu vân tay “finger print” đặc trưng cho từng phân tử DNA.

Khi xử lý các mẫu DNA cùng một cặp enzyme giới hạn, các bộ gen có cấu trúc khác nhau tạo nên số lượng, kích thước đoạn cắt khác nhau. Những bộ gen hoàn toàn giống nhau sẽ tạo nên các đoạn cắt giống nhau.

Kỹ thuật RFLP được thực hiện như sau:

- Tách chiết và tinh sạch DNA;
- Cắt các mẫu DNA cần phân tích cùng một cặp RE;
- Điện di và thực hiện lai Southern;
- Xác định đa dạng di truyền các đoạn cắt giới hạn, lập bản đồ di truyền các đoạn giới hạn.

5.4. Lai Southern và lai Northern

*Lai Southern do Edward Southern phát minh năm 1975, cho phép nghiên cứu DNA của bộ gen, kiểm tra kết quả chuyển gen hoặc kiểm tra sự có mặt của một gen (một trình tự DNA) nào đó trong bộ gen của tế bào.

Các bước tiến hành lai Southern:

- DNA được xử lý bằng RE để thu nhận các đoạn DNA có chiều dài khác nhau, tạo nên các dải tách biệt trên gel agarose;
- Chuyển các đoạn gen này sang màng lai nitrocellulose, làm biến tính DNA, mở xoắn DNA, cố định các sợi DNA trên màng lai;
- Dùng mẫu dò đã được đánh dấu để lai với phân tử DNA trên màng lai.

Chỉ có mẫu dò nào có thứ tự các gốc base bổ sung với mẫu nghiên cứu sẽ bắt cặp với nhau theo nguyên tắc bổ sung tạo thành chuỗi xoắn kép.

*Lai Northern là phương pháp lai RNA của tế bào với mẫu dò DNA tạo nên các phân tử lai RNA – DNA. Nguyên tắc và các bước tiến hành giống như lai Southern.

6. Biến nạp vector tái tổ hợp vào vi khuẩn/tế bào vật chủ

Sau khi tạo được vector tái tổ hợp mang gen ngoại lai, việc tiếp theo là biến nạp nó vào tế bào vật chủ. Trong trường hợp này tế bào vật chủ thường được sử dụng là vi khuẩn *E. coli* để khuếch đại một lượng lớn DNA của plasmid tái tổ hợp dùng cho các phân tích về sau.

Hai phương pháp được dùng để biến nạp vector tái tổ hợp vào *E. coli* là điện biến nạp (electroporation transformation) và hóa biến nạp (chemical transformation).

6.1. Điện biến nạp

Đây là kỹ thuật hiệu quả nhất để biến nạp vi khuẩn. Hai thông số quan trọng của phương thức này là loại tế bào vi khuẩn và tần số xung điện cần thiết. Thể tích của dung dịch tế bào thường được dùng là 30 μL (tương ứng với nồng độ 10^{10} tế bào *E. coli*/mL) có bổ sung 5 ng plasmid trong một cuvette có khoảng trống điện cực (electrode gap) 0,1 cm. Hiệu suất biến nạp của phương thức này lớn hơn 1×10^9 thể biến nạp/ μg plasmid siêu xoắn và khoảng 1×10^8 thể biến nạp/ μg plasmid được dùng trong phản ứng gắn. Tần số biến nạp khoảng 0,02 cho cả hai loại plasmid. Tần số biến nạp thấp đã ngăn cản được sự đồng biến nạp (co-transformation) vào vi khuẩn của hai hoặc nhiều phân tử plasmid.

Phương pháp điện biến nạp có một số ưu điểm sau:

- Hiệu suất biến nạp cao.
- Có thể dùng một thể tích dịch tế bào nhỏ. Thể tích dịch tế bào khoảng 20 μL có thể cho hiệu suất khoảng 10^9 thể biến nạp.
- Phương pháp chuẩn bị tế bào biến nạp rất đơn giản, không sử dụng các kỹ thuật phức tạp và tốn thời gian. Hơn nữa, các tế bào dùng để biến nạp có thể được chuẩn bị trước và bảo quản vô hạn định mà không mất tính khả biến.
- Tần số điện biến nạp với DNA siêu xoắn và DNA mạch vòng là giống nhau. Do đó, không cần thiết phải dùng vector được tinh sạch cao trong các phản ứng gắn.
- Hiệu suất biến nạp phân tử cho DNA mạch vòng rất cao đối với các plasmid có kích thước lên đến 50 kb.

Nhược điểm của phương pháp này là đòi hỏi thiết bị biến nạp đắt tiền.

6.2. Hóa biến nạp

Đây là phương thức kinh điển để biến nạp plasmid vào tế bào *E. coli*. Các tế bào được ủ trong dung dịch CaCl_2 để trở thành tế bào khả biến giúp cho chúng dễ tiếp nhận plasmid. Plasmid được đưa vào bằng cách shock nhiệt nhanh (40-50 giây), các tế bào biến nạp sau đó được chọn lọc bằng phương pháp chọn lọc dương tính trên đĩa agar chứa môi trường LB với kháng sinh thích hợp. Mỗi khuẩn lạc trên đĩa kháng sinh đại diện cho một thể biến nạp đơn. Các tế bào chứa plasmid mang DNA ngoại lai có thể xác định bằng mắt trên đĩa môi trường có bổ sung thêm cơ chất nhiễm sắc thể cho β -galactosidase (X-gal) vì chúng là các khuẩn lạc không màu do sự khử hoạt tính của enzyme bằng cách chèn đoạn DNA ngoại lai.

Phương pháp chuẩn bị và bảo quản tế bào khả biến trong hóa biến nạp cũng rất đơn giản. Hiệu suất biến nạp của phương pháp này trong khoảng 10^4 - 10^6 thể biến nạp/ μg plasmid, tùy thuộc vào kích thước của đoạn DNA chèn (DNA ngoại lai) và chủng vi khuẩn được sử dụng. Hiệu suất này thích hợp cho các phương thức tạo dòng truyền thống. Đối với các phương thức cần hiệu suất biến nạp cao hơn (ví dụ: xây dựng thư viện cDNA, xây dựng thư viện phân tích trình tự DNA...) thì tốt hơn hết là dùng phương pháp điện biến nạp. Tuy nhiên, nếu không có sẵn thiết bị biến nạp bằng điện thì vẫn có thể thu được hiệu suất biến nạp cao bằng cách dùng các chủng vi khuẩn thích hợp hơn cho mục đích này và có thể thu được hiệu suất 10^9 thể biến nạp/ μg plasmid.

7. Chọn dòng mang DNA tái tổ hợp

Trong thí nghiệm tạo vector tái tổ hợp, hỗn hợp vector và một lượng lớn phân tử DNA cắt cùng một enzyme hạn chế được gắn lại với nhau bằng enzyme DNA ligase. Kết quả, hỗn hợp này có plasmid tái tổ hợp lẫn các plasmid không có gen ngoại lai chèn vào và chúng được trộn lẫn với các tế bào vi khuẩn để thực hiện biến nạp. Sau đó, người ta chuyển tất cả lên môi trường dinh dưỡng chọn lọc để chúng phát triển thành các dòng tức các khuẩn lạc vi khuẩn. Do cách tiến hành thí nghiệm trong một hỗn hợp không đồng nhất như vậy nên các dòng vi khuẩn mọc lên có ba loại như sau:

- Tế bào vi khuẩn không nhận plasmid.
- Tế bào vi khuẩn nhận plasmid không có gen ngoại lai chèn vào.
- Tế bào vi khuẩn nhận đúng plasmid tái tổ hợp.

Vì vậy, việc xác định đúng các dòng vi khuẩn chứa plasmid tái tổ hợp phải mất nhiều công sức. Có ba phương thức chính để xác định các dòng DNA tái tổ hợp là lai khuẩn lạc và vết tan, khử hoạt tính bằng chèn đoạn, và tạo dòng định hướng.

7.1. Lai khuẩn lạc và vết tan

DNA được tạo dòng trong plasmid sản xuất ra các khuẩn lạc khi các nuôi cấy biến nạp được dàn mỏng trên đĩa agar chứa môi trường sinh trưởng và nuôi cấy dưới những điều kiện thích hợp. Các bacteriophage sinh tan tế bào bị chúng xâm nhiễm và sản xuất ra các plaque (vết tan) có dạng hình tròn chu vi khoảng 2-3 mm có màu sáng trên thảm vi khuẩn (bacterial lawn) của lớp agar đỉnh [trong trường hợp này người ta chuẩn bị đĩa agar có hai lớp: lớp agar đỉnh (top agar) có nồng độ agar thấp để bacteriophage dễ sinh tan tế bào vi khuẩn, và lớp agar đáy (bottom agar) có nồng độ agar cao hơn.

Các vector, như mô tả ở trên, thường chứa gen chỉ thị cho phép chọn lọc những tế bào vật chủ mang vector (thể biến nạp). Các chỉ thị này thường là gen kháng kháng sinh và các tế bào biến nạp sinh trưởng trên môi trường chứa kháng sinh tương ứng.

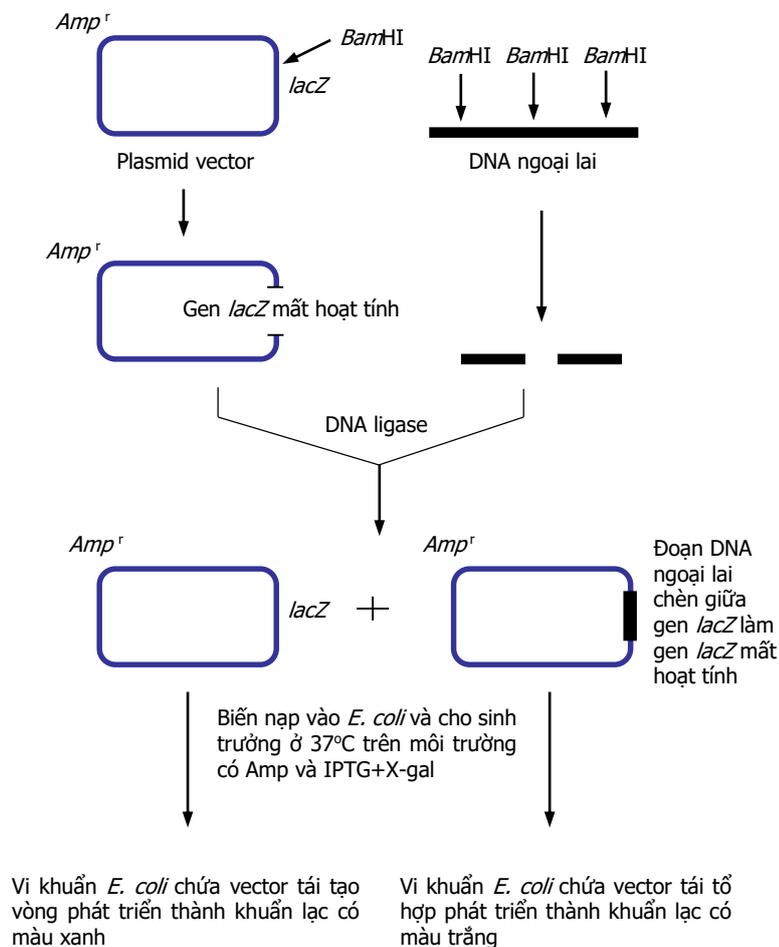
Ngoài ra, các vector còn chứa các gen chỉ thị bổ sung để phân biệt các tế bào biến nạp chứa đoạn chèn của DNA ngoại lai với các tế bào chứa các vector tự tái tạo lại vòng. Ví dụ: gen *lacZ* mã hóa enzyme β -galactosidase.

Một dòng chứa các chuỗi DNA quan tâm đặc biệt có thể được xác định bởi lai khuẩn lạc hoặc vết tan. Một lượng nhỏ khuẩn lạc biến nạp hoặc vết tan được chuyển lên màng nitrocellulose hoặc nylon bằng cách phủ (overlay) màng này lên trên đĩa agar. DNA được biến

tính và cố định trên màng bằng cách đun nóng (baking) hoặc chiếu tia tử ngoại (UV-crosslinking), và sau đó được lai trong đệm chứa probe đánh dấu đồng vị phóng xạ có trình tự bổ trợ một phần hoặc toàn bộ của chuỗi được xác định. Ví dụ: có thể một oligonucleotide tổng hợp nhân tạo, có nguồn gốc từ DNA hệ gen từng phần, cDNA hoặc trình tự protein hoặc sản phẩm PCR. Một đôi khi probe có thể được thiết kế dựa trên trình tự bắt nguồn từ gen tương đồng của các loài khác và thường được lai với cường lực thấp. Các probe thừa được rửa khỏi màng để ủ với phim X-quang. Theo hướng của phim (sau khi rửa) so sánh với đĩa agar gốc, chúng ta có thể đối chiếu các khuẩn lạc/vết tan thực tế với các khuẩn lạc/vết tan lai dương tính (positive clones) tương ứng trên phim X-quang.

7.2. Khử hoạt tính bằng chèn đoạn

Phương pháp này dùng cho các plasmid mang hai hoặc nhiều marker (ví dụ: *Amp^r*, *lacZ*). DNA ngoại lai và DNA của plasmid được cắt bởi cùng một loại enzyme hạn chế và tinh sạch, sau đó gắn hai DNA với nhau, hỗn hợp gắn được biến nạp vào *E. coli* miễn cảm *Amp* để chọn lọc thể biến nạp nhờ tính kháng *Amp* của plasmid và hoạt tính β -galactosidase của gen *lacZ*. Các khuẩn lạc chứa các plasmid tái tổ hợp sinh trưởng trên môi trường có mặt *Amp* và isopropyl-thiogalactoside (IPTG) cùng với cơ chất nhuộm sắc thể X-gal sẽ có màu trắng do đoạn DNA ngoại lai chèn vào giữa gen *lacZ* làm gen này mất hoạt tính. Trong khi đó, các khuẩn lạc chứa plasmid tái tạo lại vòng sẽ có màu xanh do gen *lacZ* không bị mất hoạt tính (Hình 2.11).

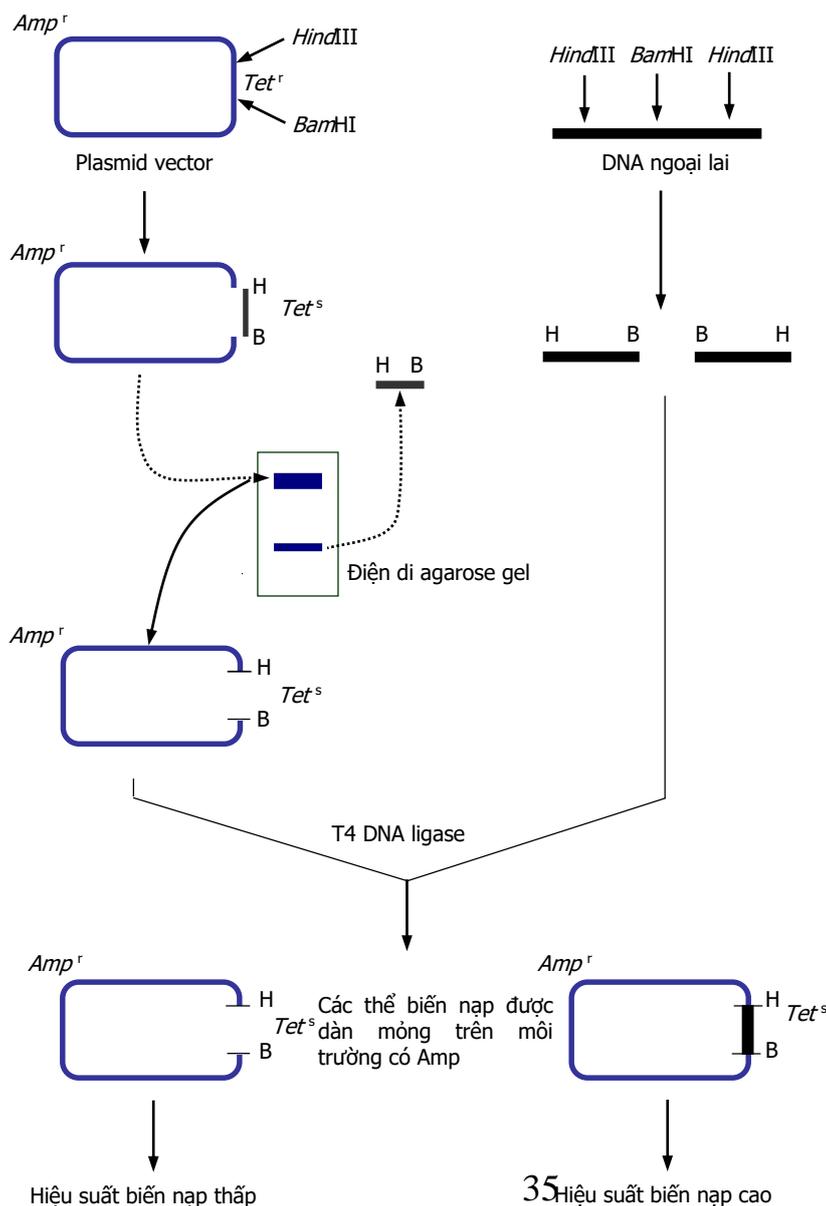


Hình 2.3. Khử hoạt tính bằng chèn đoạn. *Amp^r*: gen kháng ampicillin, *lacZ*: gen *lacZ* mã hóa enzyme β -galactosidase.

7.3. Tạo dòng định hướng

Hầu hết các plasmid vector mang hai hoặc nhiều vị trí nhận biết enzyme hạn chế, ví dụ: vector pBR 322 chứa các vị trí nhận biết đơn *Hind*III và *Bam*HI sau khi cắt bằng hai enzyme hạn chế tương ứng, đoạn DNA lớn hơn của vector có thể được tinh sạch bằng điện di agarose gel và gắn với một đoạn DNA ngoại lai mang các đầu dính (cohesive ends) tương đồng với nó cũng được cắt bởi *Bam*HI và *Hind*III. Kết quả, thể tái tổ hợp dạng vòng mang tính kháng Amp sau đó được dùng để biến nạp vào *E. coli*. Do thiếu sự hỗ trợ giữa các đầu lồi (protruding ends) *Hind*III và *Bam*HI nên đoạn vector lớn hơn không thể tái tạo lại vòng một cách hiệu quả được vì thế nó biến nạp vào *E. coli* với hiệu suất rất thấp (Hình 2.12). Dĩ nhiên, các tổ hợp khác của enzyme cũng có thể được sử dụng tùy thuộc vào các vị trí nhận biết (RS-recognition sites) trong vector và của đoạn DNA ngoại lai.

Về mặt lý thuyết, kỹ thuật tái tổ hợp DNA cho phép đưa bất kỳ một đoạn gen nào từ sinh vật này vào sinh vật khác. Vấn đề quan trọng tiếp theo là làm sao để các gen lạ đó có sự biểu hiện.



Hình 2.4. Tạo dòng định hướng. *Tet^r*: gen kháng tetracycline *Tet^s*: gen kháng tetracycline bị khuyết đoạn và mất hoạt tính.

8. Biểu hiện của gen được tạo dòng

Muốn gen tạo dòng có biểu hiện tổng hợp protein cần cấu tạo vector có đủ các yếu tố phiên mã và dịch mã. Các vector này được gọi là vector biểu hiện. Nếu gen không nằm giữa promoter và terminator, nó sẽ không được phiên mã. Các gen được tổng hợp hóa học hay từ cDNA không có promoter nên phải gắn chúng cạnh promoter thì mới có thể biểu hiện phiên mã. Để sự dịch mã được thực hiện, mRNA cần phải mang ở đầu 5' trình tự RBS (ribosome binding sites-vùng liên kết ribosome). Đoạn gen ngoại lai thiếu điểm bám của ribosome (RBS), do đó muốn được dịch mã thì nó phải gắn vào vị trí nằm sau promoter và RBS.

Ở một số gen của sinh vật eukaryote, sự dịch mã đòi hỏi quá trình splicing tức là cắt bỏ các đoạn intron khỏi tiền thân mRNA thông tin (premature mRNA) và nối các exon lại với nhau để tạo thành mRNA hoàn chỉnh (mature mRNA).

Mục đích việc tạo dòng các gen của động vật có vú, nhất là của người, là nhằm tạo ra các sản phẩm đúng như trong cơ thể với số lượng lớn và có giá trị thương mại. Sự biểu hiện của các gen eukaryote trong tế bào vi khuẩn nhiều khi gặp trở ngại, do đó cần phải thiết kế các vector biểu hiện thích hợp cho phép gen ngoại lai biểu hiện ở mức độ cao.

8.1. Vector biểu hiện

Các vector biểu hiện là vector có thể mang các gen ngoại lai mong muốn cho phép thực hiện sự phiên mã của các bản sao được tạo dòng và sự dịch mã các mRNA của chúng trong *E. coli*. Những vector như thế được dùng để biểu hiện các gen của eukaryote trong *E. coli* (nếu sản phẩm protein của các gen này không cần quá trình hậu dịch mã) hoặc tăng hiệu suất các sản phẩm của gen prokaryote. Để biểu hiện tất cả các gen ngoại lai trong *E. coli* phải bắt đầu bằng việc gắn đoạn gen ngoại lai vào trong vector biểu hiện (thường là plasmid). Vector này phải có đủ các cấu trúc cần thiết sau:

- Các trình tự mã hóa gen chỉ thị chọn lọc (selectable marker) để đảm bảo duy trì vector trong tế bào.

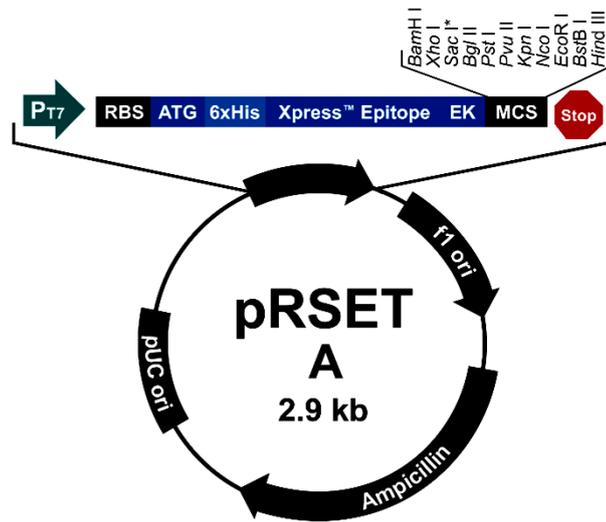
- Một promoter kiểm soát phiên mã (ví dụ: *lac*, *trp* hoặc *tac*) cho phép sản xuất một lượng lớn mRNA từ các gen được tạo dòng.

- Các trình tự kiểm soát dịch mã như vùng liên kết ribosome được bố trí thích hợp và codon khởi đầu ATG.

- Một polylinker để đưa gen ngoại lai vào trong một hướng chính xác với promoter.

Chỉ khi được cấu trúc đầy đủ như thế, các vector biểu hiện mang gen ngoại lai mới được biến nạp vào chủng *E. coli* thích hợp.

Tuy nhiên, cần lưu ý là số lượng các bản sao của vector phải hợp lý đối với một tế bào vật chủ và nó có sự ổn định lâu dài, đồng thời cần tránh sự thủy phân sản phẩm protein (proteolysis) do các enzyme của tế bào. Hình 2.13 mô tả một loại vector biểu hiện ở prokaryote.



Hình 2.5. Vector biểu hiện pRSET A ở prokaryote (*E. coli*) được thiết kế dựa trên hệ thống biểu hiện promoter T7. Sự biểu hiện của các gen đích tạo dòng trong vector được cảm ứng bằng cách sản xuất T7 RNA polymerase trong tế bào vật chủ *E. coli* chủng BL21(DE). P_{T7}-promoter mạnh của bacteriophage T7 cho phép biểu hiện gen ở mức độ cao, RBS-vùng liên kết ribosome, ATG-mã khởi đầu, N-terminal polyhistidine (6×His) tag-cho phép tinh sạch nhanh protein bằng nickel resin và phát hiện bằng kháng thể Anti-HisG, N-terminal Xpress™ epitope-cho phép phát hiện protein bằng kháng thể Anti-Xpress™, EK-enterokinase cắt điểm để loại bỏ đầu dung hợp, MCS-vùng tạo dòng, Stop-gen kết thúc phiên mã terminator, f1 ori của phage dạng sợi (filamentous phage)-sản xuất DNA sợi đơn để cho phép phân tích trình tự và phát sinh đột biến dễ dàng, Ampicillin-gen chọn lọc kháng kháng sinh. Nhóm pRSET bao gồm 3 vector A, B và C. Mỗi loại vector có trình tự mã hóa N-terminal tag ở trong một khung đọc khác nhau liên quan với vùng MCS để đơn giản hóa sự tạo dòng trong khung của gen quan tâm.

8.2. Xác định mức độ biểu hiện của gen được tạo dòng

Nói chung có ba cách thường được dùng để đánh giá mức độ biểu hiện protein ngoại lai của gen được tạo dòng:

- Điện di polyacrylamide gel để xác định protein có kích thước thích hợp được sản xuất ở mức độ cao trong các tế bào mang vector biểu hiện. Thông thường, protein quan tâm có thể quan sát bằng cách nhuộm gel với Coomassie Brilliant Blue hoặc bằng thuốc nhuộm bạc. Nếu không có băng protein mới được thấy khi dùng các thuốc nhuộm này, thì đánh dấu sự trao đổi chất với 100 μCi của [³⁵S]Met hoặc [³⁵S]Cys trên 1 mL dịch nuôi cấy trong 5 phút. Kỹ thuật SDS-PAGE¹ và phóng xạ tự ghi có thể cho phép phát hiện protein quan tâm.

- Phân tích Western blot bằng cách dùng các kháng thể đặc hiệu liên kết với protein quan tâm đã được thấm tích lên màng nitrocellulose sau khi thực hiện kỹ thuật SDS-PAGE.

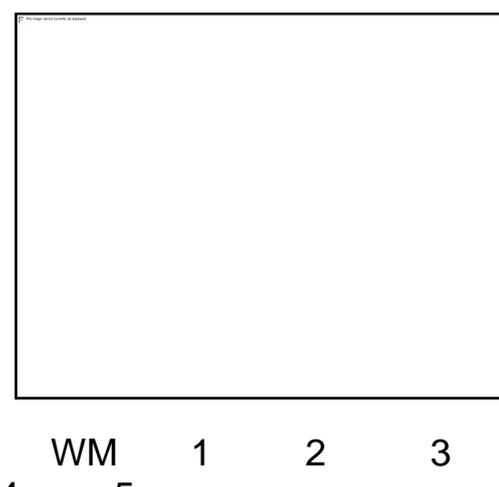
- Nếu mức độ biểu hiện thấp thì nên đặt gen *lacZ* cùng hướng với gen được biểu hiện. Như vậy, nếu sự phiên mã hoặc dịch mã hạn chế biểu hiện thì những thay đổi trong hệ thống biểu hiện có thể được kiểm soát bằng những thay đổi trong hoạt tính của β -galactosidase.

¹ SDS-PAGE: Điện di SDS-polyacrylamide gel (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis).

▪ Phân tích Western blot

- Kỹ thuật SDS-PAGE

Điện di trên polyacrylamide gel với sự có mặt của SDS cho phép phân ly các phân tử protein có khối lượng khác nhau. SDS có điện tích âm rất lớn và có khả năng liên kết với mạch peptide. Như vậy, số lượng SDS tương tác với protein tỷ lệ với kích thước phân tử protein và điện tích của SDS bám vào có thể làm bất cứ phân tử protein nào cũng chuyển động trong điện trường từ cực âm sang cực dương. Do đó, bằng phương pháp điện di, có thể phân tách riêng biệt các protein có khối lượng phân tử khác nhau (Hình 2.14). Ngoài ra, có thể điện di các protein tùy theo điểm đẳng điện (isoelectric point-IEP) của chúng. Phương pháp này được gọi là điện di tập trung đẳng điện (isoelectric focusing-IEF). Trong dung dịch đệm có pH biến thiên liên tục (gradient pH), các protein sẽ phân ly đến vị trí tương thích với điểm đẳng điện của chúng. Hai phương pháp điện di theo khối lượng phân tử và điểm đẳng điện có thể kết hợp với nhau tạo nên kỹ thuật điện di 2 chiều (2-D electrophoresis). Điện di protein trên polyacrylamide gel cho phép phân đoạn, xác định khối lượng phân tử và phân lập protein. Ngoài ra, khối lượng phân tử của protein còn được xác định chính xác bằng phương pháp sắc ký khối phổ.



Hình 2.6. Hình ảnh điện di SDS-PAGE. WM: chuẩn khối lượng phân tử của protein. Các làn từ 1-5: mẫu protein được điện di.

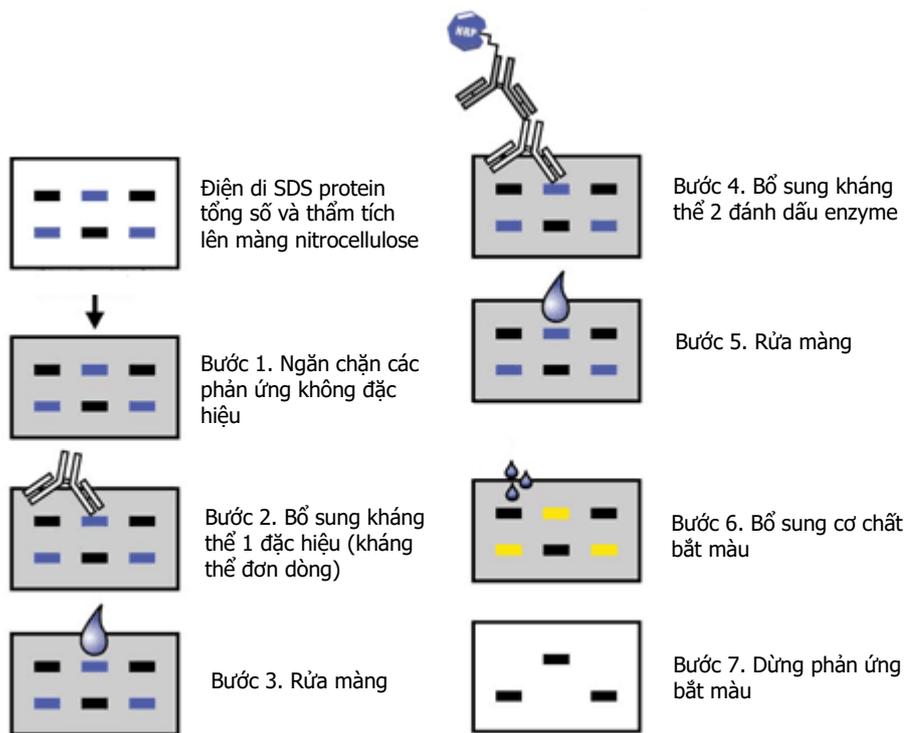
- Phản ứng liên kết kháng nguyên-kháng thể

Phản ứng liên kết kháng nguyên-kháng thể có tính đặc hiệu rất cao. Vì vậy, có thể áp dụng phản ứng này để phát hiện sự có mặt và tinh sạch protein. Kháng thể (antibody) được sản xuất khi đưa kháng nguyên vào tổ và được tinh sạch từ máu tổ sau khi gây nhiễm. Những kháng thể tạo ra bằng cách này là những kháng thể đa dòng (polyclonal antibodies-do các tế bào lympho khác nhau tiết ra), do đó chúng có khả năng nhận biết một số kháng nguyên. Ngược lại, kháng thể đơn dòng (monoclonal antibodies) chỉ tương tác với một kháng nguyên nhất định.

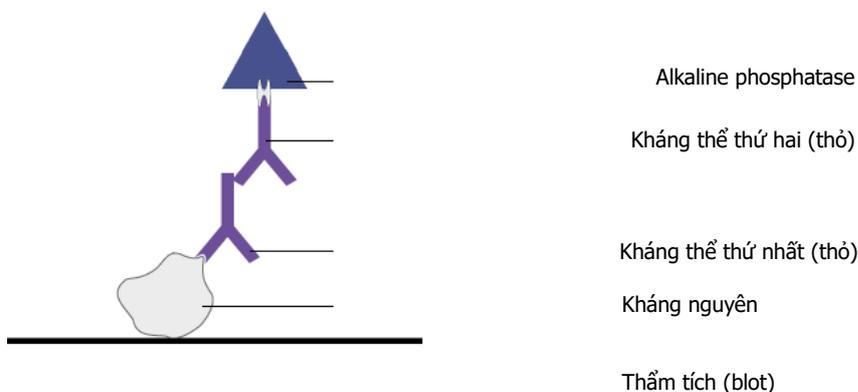
Kháng thể được đánh dấu bằng enzyme (hoặc bằng chất phát huỳnh quang) để phát hiện protein đặc hiệu (thường được thấm tích lên màng nitrocellulose sau khi chạy điện di SDS, và cố định ở đó) thông qua kỹ thuật Western blot (hoặc immunoblot) (Hình 2.7). Nguyên lý của phản ứng liên kết kháng nguyên-kháng thể được trình bày ở hình 2.8. Sau khi protein trên màng

nitrocellulose gắn với kháng thể thứ nhất đặc hiệu và tiếp đến là kháng thể thứ hai có đánh dấu enzyme (ví dụ: alkaline phosphatase, horse-radish peroxidase...) thì phức hợp này sẽ được liên kết với cơ chất để tạo màu. Sự hiện diện của protein ngoại lai (sản phẩm dịch mã của gen ngoại lai được chuyển vào tế bào vật chủ) sẽ được phát hiện nhờ sự xuất hiện màu của phản ứng liên kết.

Sự phân bố của protein đặc hiệu trong tế bào và tổ chức mô cũng có thể phát hiện bằng kỹ thuật lai *in situ* (*in situ* hybridization) với nguyên tắc tương tự Western blot. Ngoài ra, kháng thể cũng được sử dụng để tinh sạch protein đặc hiệu bằng kết tủa miễn dịch hoặc sắc ký ái lực (affinity chromatography). Kháng thể đánh dấu còn được dùng để định lượng kháng nguyên trong kỹ thuật xét nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzyme (enzyme-linked immunosorbent assay) gọi tắt là ELISA.



Hình 2.7 Sơ đồ kỹ thuật Western blot



Hình 2.8. Sơ đồ phản ứng liên kết kháng nguyên với kháng thể thứ nhất đặc hiệu và kháng thể thứ hai có đánh dấu enzyme trong Western blot

B. CÂU HỎI ÔN TẬP VÀ BÀI TẬP THỰC HÀNH:

Câu 1. Anh/chị hãy trình bày các thành phần tham gia và các bước của quy trình tạo DNA tái tổ hợp?

Câu 2. Anh/chị hãy trình bày nguyên tắc và các bước tách chiết DNA?

Câu 3. Anh/chị hãy trình bày các loại vector tạo dòng?

Câu 4. Anh/chị hãy trình bày các loại enzyme tham gia tạo DNA tái tổ hợp?

Câu 5. Anh/chị hãy trình bày các kỹ thuật sử dụng trong quy trình tạo DNA tái tổ hợp?

C. GHI NHỚ:

- Các thành phần tham gia và các bước của quy trình tạo DNA tái tổ hợp;
- Các loại vector tạo dòng;
- Các loại enzyme tham gia tạo DNA tái tổ hợp;
- Các kỹ thuật sử dụng trong quy trình tạo DNA tái tổ hợp.

CHƯƠNG 3 - CÔNG NGHỆ SINH HỌC VI SINH VẬT

Giới thiệu:

Thuật ngữ lên men (fermentation) trong công nghệ vi sinh có nguồn gốc từ động từ Latin *fervere* nghĩa là đun sôi, mô tả sự hoạt động của nấm men trên dịch chiết của trái cây hoặc các hạt ngũ cốc được tạo mạch nha (malt) trong sản xuất đồ uống có ethanol. Tuy nhiên, sự lên men được các nhà vi sinh vật học và hóa sinh học giải thích theo các cách khác. Theo các nhà vi sinh vật học thuật ngữ lên men có nghĩa là quá trình sản xuất một sản phẩm bằng nuôi cấy sinh khối vi sinh vật. Tuy nhiên, các nhà hóa sinh học lại cho rằng đó là quá trình sản sinh ra năng lượng trong đó các hợp chất hữu cơ hoạt động với vai trò vừa là chất cho lẫn chất nhận điện tử, đó là quá trình yếm khí mà ở đó năng lượng được sản xuất không cần sự tham gia của oxygen hoặc các chất nhận điện tử vô cơ khác.

Trong chương này thuật ngữ lên men được sử dụng theo nghĩa rộng của nó, ở góc độ vi sinh.

Mục tiêu:

- Trình bày được các bước của quá trình lên men;
- Trình bày được các sản phẩm của quá trình lên men;
- Xây dựng được mối quan hệ giữa các yếu tố trong quá trình lên men.

A. NỘI DUNG:

1. Quá trình lên men

Lên men là quá trình chuyển hoá kỵ khí hoặc hiếu khí các hydratcacbon dưới tác dụng của vi sinh vật.

Trước khi sự lên men bắt đầu, môi trường phải được pha chế và khử trùng, hệ lên men đã vô trùng, và nuôi cấy khởi đầu phải có một số lượng vi sinh vật vừa đủ ở trong một trạng thái sinh lý phù hợp để cấy chuyển vào hệ lên men sản xuất. Kết thúc quá trình lên men các sản phẩm phải được tinh sạch và xử lý thêm.

1.1. Các phương thức lên men

- Lên men gián đoạn hay từng mẻ: là dạng lên men được ứng dụng đầu tiên trong công nghiệp lên men. Môi trường được cung cấp một lần, cấy giống và thực hiện lên men đến khi thu sản phẩm. Ví dụ sản xuất acid glutamic.

- Lên men liên tục: trong quá trình lên men, nguồn dinh dưỡng ban đầu được bổ sung liên tục và dịch lên men (tế bào vi sinh vật và sản phẩm tạo ra) được lấy bớt ra liên tục, tạo được sự cân bằng hợp lý.

Phương thức bổ sung dinh dưỡng này làm cho các điều kiện trong quá trình lên men luôn ở trạng thái ổn định, do đó sản phẩm tạo ra tốt hơn. Một ưu thế khác của kiểu lên men này là không phải nhân giống lại sau mỗi mẻ và thời gian lên men có thể kéo dài hơn. Ví dụ lên men rượu theo kiểu gián đoạn 5 -7 ngày, theo kiểu liên tục có thể kéo dài cả tháng.

Tuy nhiên, lên men liên tục không thể áp dụng cho tất cả các quy trình sản xuất, ví dụ sản xuất các chất có hoạt tính sinh học như enzyme, acid amin...

1.2. Chuẩn bị giống

Giống thuần chủng và lượng giống ban đầu chiếm khoảng 1-10% tổng khối lượng của môi trường nuôi. Nếu lượng giống ban đầu quá ít thời gian lên men kéo dài và dễ bị nhiễm.

Trong giai đoạn đầu của quá trình lên men phải tạo điều kiện cho sự sinh sản của vi sinh vật đạt số lượng nhất định. Quá trình nhân giống bắt đầu với quy mô nhỏ tăng dần lên quy mô lớn hơn, đảm bảo tăng nhanh số lượng và chất lượng các giống vi sinh vật cần thiết. Thời gian nhân giống nhanh hay chậm phụ thuộc vào chủng vi sinh vật sử dụng.

Trong quá trình lên men với quy mô công nghiệp cần đảm bảo: Sự ổn định của chủng giống sản xuất, các chủng này thường trải qua một quá trình chọn lọc nhiều lần có sử dụng các tác nhân gây đột biến. Các chủng siêu sản xuất mà con người mong muốn thì các tế bào của chúng hoạt động sống không bình thường. Do vậy trong quần thể vi sinh vật có số lượng lớn thường xuất hiện các dạng hội biến có năng suất kém hơn và làm giảm sản lượng.

Sự phù hợp của các chỉ số vật lý, hóa học khi mở rộng quy mô, những điều kiện tối ưu cho quy mô 100 lít có thể không còn thích hợp cho các quy mô lớn hơn. Phải theo dõi các thông số nuôi cấy như: lượng oxy hòa tan, pH, nhiệt độ và sự khuấy trộn trong quá trình nuôi cấy.

1.3. Điều khiển phản ứng sinh học

Mục đích cuối cùng là các tế bào phải có hoạt tính được lựa chọn như mong muốn. Thông thường quá trình nuôi trải qua 2 giai đoạn đòi hỏi những điều kiện khác nhau. Ở giai đoạn đầu cần các điều kiện cho tế bào sinh sản nhanh, nhiều để tạo sinh khối lớn. Ở giai đoạn sau các tế bào được khống chế để thực hiện tối đa các phản ứng mong muốn. Ví dụ trong sản xuất acid glutamid, penicillin được thêm vào giai đoạn sau để tế bào vi khuẩn tiết ra nhiều sản phẩm hơn.

1.4. Thu sản phẩm và tinh chế

Thu sản phẩm là công đoạn tốn kém, chiếm 50% chi phí giá thành sản phẩm. các kỹ thuật hóa học, công nghệ thực phẩm được sử dụng chủ yếu ở giai đoạn này. Khó khăn lớn nhất là công đoạn tách nước trong tế bào ra khỏi sản phẩm, tiếp theo là từ dịch lên men thu đúng sản phẩm mong muốn.

Tất cả các hoạt động trong một quá trình lên men liên quan chặt chẽ với nhau, các bước đầu đa dạng biến hóa và khó kiểm soát, vì tế bào vi sinh vật rất nhạy với những thay đổi của ngoại cảnh dù rất nhỏ. Sự thay đổi của thời tiết có thể ảnh hưởng đến sản xuất công nghệ sinh học. Các kỹ thuật mới nhằm tự động điều khiển các thông số kỹ thuật góp phần đáng kể trong ổn định sản xuất.

2. Sản xuất sinh khối vi sinh vật

Công nghệ thu sinh khối vi sinh vật là các quá trình nuôi cấy các chủng thuần khiết hoặc hỗn hợp vài chủng để thu được khối lượng tế bào sau khi sinh trưởng với các mục đích:

- Sinh khối giàu protein dùng làm thực phẩm cho người và thức ăn cho gia súc là những tế bào vi sinh vật (kể cả sinh khối tảo) đã sấy khô và chết, giàu protein, các vitamin nhóm B và chất khoáng. Nguồn sinh khối này được gọi là protein đơn bào.

- Sinh khối nấm men là những tế bào sống để dùng trong công nghiệp bánh mì-men bánh mì, sinh khối vi khuẩn lactic sống có hoạt tính enzyme tiêu hóa để sản xuất các thuốc hỗ trợ tiêu hóa như biolactovin...

- Sinh khối cố định đạm làm phân bón vi sinh, các loại phân bón vi sinh với vi khuẩn sống tự do trong đất và sống cộng sinh với cây họ đậu.

- Sinh khối vi khuẩn sinh độc tố đối với các loại sâu thân mềm phá hoại rau màu, để sản xuất thuốc trừ sâu vi sinh.

- Sinh khối vi sinh vật có hệ enzyme phân giải các chất hữu cơ kể cả thuốc trừ sâu và hydrocarbon để sản xuất các chế phẩm vi sinh xử lý nước thải và ô nhiễm trong bảo vệ môi trường.

2.1. Giống vi sinh vật cho các quá trình lên men

Tất cả các quá trình lên men công nghiệp đều cần giống vi sinh vật ban đầu, yêu cầu chất lượng giống vi sinh ở giai đoạn này phải đảm bảo đủ số lượng và hoạt tính không thay đổi để thực hiện các phản ứng sinh hóa trong quá trình lên men.

2.2. Sản xuất men bánh mỳ

Men bánh mỳ là sinh khối tế bào nấm men *Saccharomyces cerevisiae* được nuôi trong môi trường giàu đường (mật ri đường) có bổ sung phospho và amonium, urea,...

Tế bào nấm men có 3 vai trò trong quá trình sản xuất bánh mỳ: làm nở bột mỳ do quá trình lên men rượu sinh ra CO₂ làm cho bánh xốp và góp phần tạo hương cho bánh mỳ.

Men bánh mỳ được bán dưới dạng sấy khô hay tươi, được ép thành bánh.

2.3. Phân vi sinh (*Microbiol fertilizer*)

Có nhiều loại phân vi sinh khác nhau:

Phân vi khuẩn *Rhizobium*: đây là vi khuẩn cố định đạm cộng sinh với

2.4. Chế phẩm diệt côn trùng (*Insecticides*)

Các loại vi khuẩn được sử dụng làm chế phẩm diệt côn trùng là *Bacillus thuringiensis* (BT), *B. sphaericus* và *B. popilliae*

Vi khuẩn BT tạo bào tử chứa protein tinh thể nội độc tố (δ – endotoxin) diệt côn trùng. Khi côn trùng ăn tế bào BT vào, δ – endotoxin sẽ tạo thành độc tố có hoạt tính gắn lên màng tế bào, phá hỏng tính thấm ion và gây chết.

Ngoài ra, còn có nhiều nhóm virus gây bệnh cho côn trùng. *Baculovirus* là tác nhân sinh diệt côn trùng đầy hứa hẹn vì chúng không có mối liên hệ sinh học với bất kỳ loài động vật có xương sống và thực vật nào, có số lượng vật chủ hạn chế (vài loại côn trùng) không gây hại đến các loài côn trùng khác.

Cùng với sự phát triển của công nghệ gen đã tạo ra các vi khuẩn diệt côn trùng thế hệ mới, chỉ diệt côn trùng có hại mà hoàn toàn không ảnh hưởng đến con người.

2.5. Chế phẩm trợ sinh (Probiotic)

Là các chế phẩm chứa các vi sinh vật sống (vô hại hoặc có lợi) có tác dụng làm cải thiện cân bằng vi sinh vật trên cơ thể vật chủ.

Tác dụng của chế phẩm trợ sinh: trung hòa độc tố; cạnh tranh với mầm bệnh; thay đổi chuyển hóa của vi sinh vật; kích thích tính miễn dịch của chủ thể.

Bacillus subtilis là một chế phẩm trợ sinh, được sử dụng qua đường uống để đề phòng và chữa các rối loạn tiêu hóa sau khi dùng thuốc kháng sinh, có tác dụng phục hồi hệ vi sinh vật tự nhiên trong hệ tiêu hóa của người sử dụng kháng sinh kéo dài tránh được hiện tượng tiêu chảy.

3. Sản xuất vaccine

3.1. Vaccine cổ điển

Vaccine sống là các vi khuẩn, virus gây bệnh được xử lý bằng nhiệt, bằng muối nồng độ cao hoặc formol để tế bào yếu đi, khi tiêm vào cơ thể sẽ kích thích sinh kháng thể.

Vaccine chết là những tế bào nguyên vẹn của vi khuẩn gây bệnh bị làm chết hoặc là các protein độc tố bị bất hoạt.

Một số sản phẩm vaccine cổ điển:

- Vaccine vi khuẩn chết: ho gà, sốt thương hàn
- Độc tố vi khuẩn bất hoạt: bạch hầu, uốn ván
- Vaccine virus sống: quai bị, sởi, rubella, sốt vàng da
- Vaccine virus bất hoạt: cúm

3.2. Vaccine công nghệ gen

Ứng dụng công nghệ gen sản xuất vaccine gọi là vaccine tái tổ hợp, chỉ chứa một phần nhỏ tác nhân gây bệnh, có thể dùng các vi sinh vật an toàn như nấm men, E.coli để sản xuất.

Sản phẩm: vaccine siêu vi gan B.

4. Protein đơn bào (Single Cell Protein – SCP)

Sinh khối vi khuẩn, nấm men, nấm sợi, vi tảo có chứa nhiều protein nên gọi là protein đơn bào.

Sinh khối của tế bào vi sinh vật có hàm lượng protein cao, năng suất cao và có thể tạo SCP từ các nguồn nguyên liệu rẻ tiền, phụ phế liệu công, nông, lâm nghiệp.

4.1. SCP nấm men, vi khuẩn

Việc sử dụng vi sinh vật làm nguồn thực phẩm đã được Đức thực hiện với sinh khối nấm men *Torula* trong thế chiến thứ nhất và trong thế chiến thứ 2 đạt 15000 tấn.

Năm 1967, tập đoàn BP (British Petroleum) đã bắt đầu sản xuất SCP bằng lên men công nghiệp nấm men từ parafin dầu mỏ, n-alkane. Có tên thương mại là Toprina từ dầu mỏ - "bittet từ dầu mỏ". Tương tự ở Ý, Nhật sản xuất SCP từ n-paraffin với công suất 100000 – 200000 tấn/năm.

Năm 1980, Liên Xô sản xuất SCP nấm men từ nguồn nguyên liệu là gỗ thủy phân đạt 1 triệu tấn/1 năm.

Ngoài ra, vi khuẩn *Methylophilus methylotrophus* có thể sử dụng methanol, một phụ phẩm dồi dào của công nghiệp dầu mỏ, để tạo SCP.

Tuy nhiên, các SCP này chủ yếu được sử dụng làm nguồn thức ăn cho gia súc, chỉ có sản phẩm SCP từ nấm sợi *Fusarium graminearum* được sản xuất theo công nghệ của công ty McDougall (Anh) được sử dụng làm thực phẩm cho người.

4.2. SCP vi tảo, vi khuẩn lam

Vi tảo là những loài tảo có kích thước nhỏ, thích hợp với việc sử dụng các phương pháp nuôi cấy như vi sinh vật

Từ những năm 1940, người ta đã biết được một số vi tảo có khả năng tạo ra một lượng sinh khối lớn trong khoảng thời gian ngắn, với hàm lượng protein cao như *Chlorella* sp. 60% protein khối lượng khô, *Scenedesmus* 50 -55% protein khối lượng khô. Tuy nhiên *Chlorella* không được sử dụng trong chăn nuôi do lớp vỏ tế bào dày khó tiêu hóa.

Hiện nay, người ta sử dụng vi khuẩn lam *Spirulina* thuộc Cyanobacteria có hàm lượng protein cao và chứa nhiều acid amin không thay thế làm nguồn thực phẩm và dược phẩm cho con người.

5. Các sản phẩm trao đổi chất

5.1. Lên men rượu

Là quá trình lên men chuyển hóa đường thành rượu được thực hiện nhờ các loài nấm men *Saccharomyces*.

Rượu đã được con người sản xuất và sử dụng rất lâu, vào khoảng 6.000 năm trước công nguyên. Do nhu cầu và lợi ích của sản phẩm này nên đến nay việc nghiên cứu và mở rộng sản xuất chúng ngày càng được quan tâm. Có rất nhiều loại rượu và mỗi loại đều có thành phần và quy trình sản xuất khác nhau, có thể tạm chia thành ba loại chủ yếu sau: Rượu trắng (ethanol), rượu vang (wine) và rượu mùi (liquor).

Nguyên liệu làm rượu có thể chia thành 3 nhóm:

-Các cơ chất giàu đường như rỉ đường, nước mía, củ cải đường, nước trái cây chín... Quá trình lên men xảy ra trực tiếp trên nguyên liệu này mà không cần xử lý.

-Tinh bột từ các loại ngũ cốc như lúa mì, gạo, ngô...và các loại củ như khoai tây, sắn. Được sử dụng phổ biến, thực hiện quá trình thủy phân các nguyên liệu này thành đường trước khi lên men rượu.

-Phức hợp lignocellulose từ gỗ, phế thải nông, lâm nghiệp, giấy in báo...đây là nguồn nguyên liệu dồi dào nhưng ít được sử dụng do quá trình chuyển hóa cellulose thành glucose khó khăn và tốn kém.

5.1.1. Rượu trắng

Rượu trắng được sản xuất bằng hai phương pháp chính: phương pháp lên men vi sinh vật và phương pháp hóa học. Tuy nhiên, phương pháp lên men vi sinh vật là phương pháp chủ yếu. Đây là quá trình lên men rượu của nấm men và một số vi sinh vật khác, trong đó nấm men là đối tượng chính được sử dụng để sản xuất rượu ở quy mô công nghiệp (Hình 3.4). Lên men rượu là một quá trình phức tạp chuyển đường thành rượu, có sự tham gia của nấm men trong điều kiện yếm khí. Phương trình tổng quát của lên men rượu như sau:



Quy trình sản xuất rượu trắng bằng phương pháp lên men rượu bởi nấm men được thực hiện qua các bước sau: Chế biến nguyên liệu thành dịch đường, lên men biến đường thành rượu, chưng cất và tinh chế ethanol. Trong đó, lên men biến đường thành rượu là giai đoạn quan trọng nhất trong sản xuất rượu, quyết định chất lượng sản phẩm tạo thành. Sau khi dịch đường hóa đã được xử lý, người ta bổ sung thêm một số thành phần để cung cấp thêm vitamin và amino acid như muối ammonium, muối phosphate, dịch thủy phân nấm men. Môi trường có thành phần như trên có thể sử dụng để lên men. Giống được sử dụng chủ yếu trong lên men rượu là các chủng nấm men *Saccharomyces cerevisiae* có tốc độ phát triển mạnh và hoạt lực lên men cao, lên men được nhiều loại đường khác nhau và có tốc độ lên men nhanh, có khả năng chịu được độ ethanol cao từ 10-12%.



Hình 3.1. Nhà máy sản xuất ethanol quy mô nhỏ

Môi trường lên men sau khi được khử trùng cần có độ đường đạt 90-120 g/L và pH trong khoảng 4,5-4,8. Thời gian lên men từ 65-72 giờ, trong đó 10 giờ đầu có sục khí để nấm men sinh sôi nảy nở, sau đó cho lên men tĩnh (yếm khí). Quá trình lên men rượu qua các bước sau: đường và các chất dinh dưỡng của môi trường lên men được hấp thụ vào trong tế bào nấm men qua màng tế bào và tham gia vào quá trình trao đổi chất, rượu ethanol và CO₂ tạo thành liên tục thoát ra khỏi tế bào, rượu ethanol tan tốt trong nước do vậy nó khuếch tán rất nhanh vào môi trường chung quanh. Kết thúc lên men rượu, sau khi đã loại bỏ tế bào nấm men, muốn được rượu tinh khiết cần chưng cất dịch lên men để loại bỏ tạp chất. Kỹ thuật chưng cất rượu ảnh hưởng rất lớn đến chất lượng rượu thu được.

5.1.2. Rượu vang

Danh từ rượu vang được dùng để chỉ loại rượu lên men từ dịch ép trái cây (nho, dâu, thom, táo, lê...) với một số chủng nấm men. Rượu vang thu được không qua chưng cất, có hương vị thơm ngon của trái cây tự nhiên, có độ cồn nhẹ (10-15%) là loại nước giải khát thơm ngon giàu chất bổ dưỡng.

Quy trình sản xuất rượu vang đơn giản hơn lên men ethanol và qua các bước sau: chế biến nguyên liệu và lên men tạo rượu vang (Hình 3.2).



Hình 3.2. Một dây chuyền sản xuất rượu vang

Khi chế biến nguyên liệu thành dịch quả cần bổ sung SO_2 để ngăn cản các phản ứng oxy hóa và tiêu diệt các vi khuẩn tạp nhiễm, bổ sung thêm đường để tăng quá trình chuyển hóa thành rượu của vi sinh vật, điều chỉnh độ chua vì độ chua có thể ảnh hưởng đến chất lượng nước quả cũng như làm thay đổi pH của dịch nước quả sẽ ảnh hưởng bất lợi đến hoạt động của vi sinh vật và các enzyme. Quá trình lên men tạo rượu vang được tiến hành hoặc bằng cách dùng nấm men dính trên vỏ quả (rơi vào dịch quả một cách tự nhiên) hoặc cho lên men dịch quả nhờ các chủng nấm men như *Sac. ellipsoideus*, *Sac. cerevisiae*, *Sac. oviformis*...

Lên men rượu vang bao gồm ba giai đoạn: (1) Giai đoạn hình thành rượu, bắt đầu từ lúc cấy men giống vào cho lên men đến khi dịch lên men hết sủi bọt mạnh. Trong thời gian này nấm men hoạt động mạnh nhất. (2) Giai đoạn phát triển, gạn dịch lên men thu “rượu non” tiếp tục cho rượu non lên men phụ để phân hủy lượng đường còn trong dịch lên men. Quá trình gạn lọc và lên men phụ có thể lặp lại nhiều lần để có dung dịch trong suốt. Ở giai đoạn này có quá trình lên men malolactic chuyển hóa malic acid thành lactic acid, làm cho rượu được chuyển từ vị chua gắt sang vị chua nhẹ dễ chịu. (3) Giai đoạn vang chín, rượu non đã ổn định thành phần nhưng rượu vẫn còn “sống”, do đó cần hạ thổ rượu ở nơi mát một thời gian lâu để rượu được “chín” và có chất lượng hoàn hảo.

Các sản phẩm của quá trình lên men rượu:

* Bia là đồ uống có độ rượu thấp, sủi bọt mạnh được tạo ra từ lên men rượu trên dịch matl (lúa đại mạch nảy mầm) với hoa houblon.

*Rượu cần là loại rượu không chưng cất và có lịch sử lâu đời, nguyên liệu ban đầu là bột từ gạo tẻ (gạo), gạo nếp (nếp), ngô (bắp), sắn (củ mì, khoai mì)...

*Rượu Sake là loại rượu truyền thống của Nhật Bản, là loại rượu không chưng cất duy nhất có độ cao 20-22%.

*Rượu vang nho là loại rượu không chưng cất được lên men từ nguyên liệu nước nho (nho đỏ - vang đỏ, nho trắng – vang trắng).

Champagne là vang nho mà ở giai đoạn cuối có bổ sung đường để tạo khí CO₂ áp lực mạnh.

*Rượu Cognac là một loại rượu vang chưng cất, được cất trữ trong thùng gỗ sồi tạo nên hương vị đặc trưng.

*Rượu trắng và Volka đều là rượu chưng cất nguyên chất có độ cồn cao 40⁰. Một số sản phẩm rượu trắng nổi tiếng của nước ta: rượu Làng Vân (Bắc Ninh), Gò Đen (Long An), Bàu Đá (Bình Định).

5.2. Sản xuất các acid hữu cơ

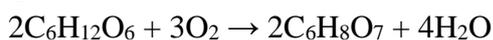
* Acid citric (Acid limonic – C₆H₈O₇)

Có nhiều trong tự nhiên (chanh, cam, bưởi, lá bông, thuốc lá...) được dùng trong sản xuất bánh kẹo, đồ uống, trong công nghiệp in, trong y dược, sản xuất sơn, chất dẻo...

Các phương pháp sản xuất acid citric: tổng hợp hóa học, chiết từ quả, lên men vi sinh vật. Hiện nay chủ yếu sản xuất bằng phương pháp lên men nhờ chủng nấm mốc *Aspergillus niger*.

Citric acid hay limonic acid (C₆H₈O₇) có nhiều trong thiên nhiên, đặc biệt trong các loài cây ăn quả có múi (họ cam chanh-Rutaceae) được dùng chủ yếu trong chế biến thực phẩm và dược phẩm. Citric acid cũng có thể được sản xuất ở quy mô công nghiệp bằng phương pháp lên men, nấm mốc sẽ chuyển hóa đường thành citric acid.

Cơ chế sinh tổng hợp citric acid ở vi sinh vật có thể biểu diễn bằng phương trình tổng quát như sau:



Các nấm mốc sinh citric acid hiếu khí, nhiệt độ thích hợp cho phát triển và lên men là 30-32°C. Nguồn carbon tốt nhất đối với *Asper. niger* là saccharose, còn đối với *Citromyces* là maltose. Nồng độ đường trong môi trường 10-20% là thích hợp hơn cả. Các nguồn nitrogen vô cơ dùng trong lên men citric acid tốt nhất là nitrate còn nitrogen hữu cơ là nước chiết đậu nành. Trong môi trường lên men cần chú ý các nguyên tố khoáng P, Mg, K, Fe và Zn.

Có hai phương pháp được dùng để sản xuất citric acid là lên men bề mặt (trên môi trường lỏng hoặc rắn) và lên men chìm.

- **Phương pháp lên men bề mặt trên môi trường lỏng.** Phương pháp này được dùng rộng rãi trong công nghiệp sản xuất citric acid. Lớp váng nấm phát triển trên các khay lên men chứa môi trường dinh dưỡng là dịch đường sẽ chuyển hóa đường thành citric acid.

- **Phương pháp lên men chìm.** Quá trình lên men giống như sản xuất kháng sinh, được thực hiện trong các bình lên men chứa môi trường dinh dưỡng và giống nấm mốc. Sau khi kết thúc lên men dùng H₂SO₄ để chuyển calcium citrate thành citric acid.

* Acid lactic

Acid lactic được sản xuất bằng phương pháp hóa học, lên men nhờ vi sinh vật trong đó 2/3 khối lượng acid lactic được sản xuất bằng sự lên men.

Acid lactic là một chất có độ hút ẩm cao, là chất lỏng sánh đặc. Được ứng dụng vào các ngành khác nhau và phụ thuộc vào độ tinh sạch có nhiều tiêu chuẩn khác nhau: acid lactic kỹ thuật, thực phẩm, dược phẩm và acid lactic plastic.

Ngoài ra, các vi khuẩn lactic đóng vai trò quan trọng trong nhiều loại thực phẩm như chế biến các sản phẩm của sữa, nem chua, dưa rau quả,...

5.3. Sản xuất acid amin, vitamin

Acid amin, vitamin được sử dụng rộng rãi trong công nghiệp thực phẩm, dược phẩm như các chất tăng cường hương vị, chất chống oxy hóa, chất dinh dưỡng bổ sung, chất phụ gia thức ăn chăn nuôi, các thành phần dịch truyền cho xử lý hậu phẫu trong y dược, các vật liệu khởi động quá trình sản xuất polymer và mỹ phẩm.

Một số acid amin, vitamin được tổng hợp bằng quá trình lên men:

- Acid glutamid là acid amin chiếm tỷ lệ lớn trong số các acid amin tạo protein trong cơ thể. Năm 1908, K. Ikeda đã chứng minh rằng trong tảo bẹ (*Lamarina japonica*) có acid glutamid đã góp phần tạo mùi vị đặc trưng, ngon cho các món ăn ở Nhật. Năm 1909, acid glutamid được sản xuất bằng cách thủy phân các nguồn protein chứa nhiều acid glutamid như đậu nành, gluten của lúa mì, nhưng hiệu suất thấp. Từ 1957 - 1962, Kinoshita đã phát hiện và trình bày cơ chế lên men acid glutamid từ chủng vi khuẩn *Corynebacterium glutamicum*. Từ đó đến nay hàng loạt nhà máy lên men acid glutamid đã và đang xây dựng tại hơn 20 nước trên thế giới.

-Vitamin B2 (Riboflavin) là sản phẩm thương mại được tổng hợp bằng phương pháp lên men và phương pháp hóa học. Do 2 chủng nấm mốc *Eremothecium ashbyii* và *Ashbya gossypii* với sản lượng 20g/l. Sử dụng phương pháp tái tổ hợp trên 2 chủng *Candida* hoặc *Bacillus subtilis* cho sản lượng 20-30g/l.

-Vitamin B12 (Cyanocobalamin) được sản xuất trong công nghiệp do hai chủng vi sinh vật *Propionibacterium shermanii* và *Pseudomonas denitrificans*.

Ngoài ra còn có các sản phẩm khác như vitamin H (biotin hay vitamin B7), vitamin C (acid ascorbic)...

5.4. Sản xuất kháng sinh (Antibiotic)

Từ năm 1928, Alexander Fleming khám phá ra kháng sinh penicilline từ chủng nấm mốc *Penicillium notatum*, *Penicillium chrysogenum* đã có hơn 6000 chất kháng sinh với tính đặc hiệu khác nhau và các kiểu tác động đa dạng đã được phân lập từ các chủng vi sinh vật.

Các chất kháng sinh được sử dụng trong y học giúp điều trị và chữa bệnh cho con người, gia súc, gia cầm. Trên thế giới có hơn 100000 tấn kháng sinh được sản xuất mỗi năm với doanh thu 5 tỉ USD.

Bảng 3.1. Một số chất kháng sinh

STT	TÊN KHÁNG SINH	VI SINH VẬT SẢN XUẤT
1	Penicilline	<i>Penicillium notatum</i> <i>Penicillium chrysogenum</i>

2	Penicillamine	<i>Penicillium chrysogenum</i>
3	Neomycine	<i>Streptomyces fradiae</i>
4	Cephalosporine	<i>Cephalosporium acremonium</i>
5	Cyclosporine	<i>Tolypocladium inflatum gams</i>
6	Streptomycine	<i>Streptomyces griseus</i>
7	Erythromycine	<i>Streptomyces erythreus</i>

5.4.1. Penicillin

Penicillin là kháng sinh được tìm ra đầu tiên và được sản xuất sớm nhất dùng để chữa một số bệnh nhiễm khuẩn vào những năm đầu của Thế chiến thứ 2.

Những vi sinh vật sinh penicillin thuộc các giống nấm mốc *Penicillium* và *Aspergillus*. Nhưng các chủng của *Penicillium notatum* và *Pen. chrysogenum* có hoạt lực cao và được dùng trong công nghiệp kháng sinh. Tuy nhiên, những chủng *Penicillium* có hoạt lực cao lại thường kém ổn định. Do đó, một vấn đề khó khăn được đặt ra là tạo được khả năng sinh kháng sinh cao nhất, giữ được ổn định trong quá trình nghiên cứu và sản xuất. Nhiệm vụ này có một ý nghĩa rất lớn trong công nghiệp. Ngày nay, nhờ kỹ thuật di truyền học người ta đã tạo được những giống ổn định, ít nhất sau sáu thế hệ vẫn không giảm hoạt tính kháng sinh.

Quá trình lên men penicillin thuộc vào loại lên men hai pha: pha sinh trưởng và pha sinh penicillin. Nguồn carbon trong lên men penicillin bằng nấm *Pen. chrysogenum* có thể là glucose, saccharose, lactose, tinh bột, dextrin, các acid hữu cơ (lactic, acetic, formic), các amino acid... Tuy nhiên, đường lactose cho hiệu suất penicillin cao nhất và thường được dùng trong công nghiệp. Nhưng do nấm sử dụng đường lactose chậm, vì vậy trong thực tế lactose được dùng phối hợp cùng với đường khác (glucose, saccharose...) trong môi trường dinh dưỡng.

Trong pha lên men thứ nhất giống phát triển mạnh, sử dụng glucose và lactic acid của cao ngô. Sau đó, lactose mới được sử dụng (chủ yếu trong pha thứ hai tạo thành penicillin). Khi trong môi trường cạn lactose và không bổ sung các chất dinh dưỡng, hệ sợi nấm sẽ bắt đầu tự phân, nếu tiếp tục lên men nồng độ penicillin sẽ giảm. Trong thực tế sản xuất cần phải kết thúc lên men trước thời điểm này.

▪ Phương pháp sản xuất penicillin

Sản xuất penicillin cũng như các chế phẩm sinh học khác, dựa trên cơ sở nuôi cấy vi sinh trên môi trường rắn hoặc lỏng. Trong quá trình nuôi cấy, giống vi sinh vật phát triển sẽ tích tụ các sản phẩm trao đổi chất trong môi trường hoặc trong sinh khối. Quy trình công nghiệp sản xuất penicillin dựa trên nấm mốc *Pen. chrysogenum* có khả năng sinh penicillin cao, theo hai phương pháp:

- *Lên men bề mặt*. Phương pháp này được áp dụng trong thời gian đầu của công nghiệp kháng sinh. Môi trường nuôi cấy bề mặt có thể là các cơ chất rắn hoặc lỏng. (1) Cơ chất rắn có thể là cám hoặc các loại hạt, cám được làm ướt rồi trải lên khay một lớp dày khoảng 2 cm, giống nấm mốc được trộn vào môi trường có độ ẩm 50-60% đã vô trùng để nguội tới 30°C. Thời gian lên men 6-7 ngày ở 24-28°C trong các buồng được điều chỉnh nhiệt độ, độ ẩm và

thông gió. Nói chung, phương pháp này giống như lên men các enzyme bằng nấm mốc. (2) Môi trường lỏng dùng nguồn carbon là lactose, cao ngô và một số nguyên tố khoáng. Giống được cấy vào môi trường rồi lên men ở 24°C khoảng 6-7 ngày đạt hiệu suất khoảng 193 unit/mL penicillin. Ngày nay, phương pháp lên men chìm đã thay thế phương pháp lên men bề mặt.

- *Lên men chìm*. Thành phần môi trường gồm có cao ngô, glucose, lactose và các muối khoáng. Giống dùng trong công nghiệp thường ở dạng bào tử. Bào tử được nuôi trên các bình nhân giống có cánh khuấy và sục khí 36-50 m³/giờ để hệ sợi nấm phát triển, sau đó chuyển vào các bình lên men. Quá trình lên men penicillin bằng nấm mốc *Pen. chrysogenum* ở 26±1°C trong khoảng 120-125 giờ. Trong quá trình lên men ở pha thứ nhất nấm phát triển hệ sợi mạnh, sinh khối tăng nhanh, các nguồn carbon dễ đồng hóa (glucose, saccharose) cùng các nguồn nitrogen được tiêu hao nhanh, cường độ hô hấp tăng dần đến cực đại, pH tăng và penicillin được tạo thành ít. Sang pha thứ hai hệ sợi nấm phát triển chậm, lactose được tiêu hao dần, pH tăng đến khoảng 7-7,5 và penicillin được tạo thành chủ yếu trong pha này. Nếu nguồn carbon trong môi trường cạn và sinh khối nấm mốc bắt đầu tự phân thì pH có thể tăng tới 8 hoặc hơn, lượng penicillin được tạo thành trong môi trường sẽ giảm. Vì vậy, quá trình lên men cần được kết thúc trước thời điểm hệ sợi nấm mốc bắt đầu tự phân. Nấm mốc sinh penicillin rất hiếu khí, cho nên quá trình nuôi cấy (nhân giống và lên men) cần phải sục khí và khuấy môi trường để đảm bảo độ hòa tan oxygen cân bằng với nhu cầu sinh lý của chúng. Nếu không đủ oxygen hiệu suất penicillin có thể giảm tới hai lần.

5.4.2. Streptomycin

Streptomycin là một kháng sinh dùng phổ biến trong y học, thú y và bảo vệ thực vật. Schatz và cs (1944) đã phát hiện ra streptomycin từ dịch nuôi cấy một chủng xạ khuẩn *Streptomyces griseus* (còn gọi là *Actinomyces streptomycin*).

Giống xạ khuẩn sinh streptomycin khi nuôi cấy chìm phát triển thành hai pha:

- **Pha thứ nhất (pha sinh trưởng mạnh)**. Các bào tử nảy chồi và mọc thành sợi sau 6-8 giờ, mỗi bào tử mọc một chồi, khuẩn ty thường thẳng và phân nhánh rất yếu, tế bào chất ưa kiềm.

- **Pha thứ hai (khuẩn ty không phát triển)**. Cuối ngày thứ ba sợi xạ khuẩn bị chia nhỏ và bắt đầu tự phân.

Những giống sinh streptomycin rất không ổn định. Do đó, trong tương lai cần có sự can thiệp của kỹ thuật di truyền để tạo ra những giống có hoạt lực cao và ổn định để đưa vào sản xuất. Giữ bào tử ở dạng đông khô trong khoảng năm năm có thể còn 96-99% hoạt lực, trong cát thạch anh tới ba năm, trên môi trường thạch nước đậu ở 5°C tới một năm. Các nguồn carbon mà giống *Streptomyces* có thể đồng hóa được và sinh kháng sinh là glucose, tinh bột, dextrin, maltose, fructose, galactose, manose. Trong thực tế, glucose và tinh bột được dùng làm nguồn nguyên liệu trong sản xuất streptomycin.

▪ Phương pháp sản xuất streptomycin

Lên men streptomycin được thực hiện theo phương pháp nuôi cấy chìm. Quá trình lên men này cũng giống như lên men các loại kháng sinh khác, bao gồm các giai đoạn: Nhân giống và lên men chính.

- *Nhân giống*. Giống xạ khuẩn được bảo quản ở dạng bào tử. Cấy bào tử vào môi trường nhân giống trong bình tam giác lắc 180-220 vòng/phút ở 26-28°C/30-70 giờ, sau đó cho tiếp vào các bình nhân giống (có sục khí và khuấy), nuôi tiếp cho phát triển sinh khối 20-40 giờ. Nhiệm vụ chính trong giai đoạn nhân giống là tạo ra một khối lượng lớn khuẩn ty xạ khuẩn ưa kiềm có khả năng phát triển mạnh trong giai đoạn lên men chính và tạo thành một lượng lớn kháng sinh.

- *Lên men*. Lên men streptomycin là quá trình lên men hai pha điển hình. Nhiệt độ lên men khoảng 26-28°C, thời gian lên men 96 giờ. Trong thời gian lên men cần phải thông khí và khuấy trộn môi trường. Lượng không khí thổi qua môi trường trung bình là 1 thể tích khí/1 thể tích môi trường. Khuấy trộn môi trường liên tục trong suốt cả quá trình lên men (kể cả khi nhân giống) nếu ngừng khuấy chỉ trong một thời gian ngắn sẽ làm giảm hiệu suất streptomycin. Độ pH trong những giờ đầu có giảm chút ít sau đó tăng dần.

5.4.3. Tetracycline

Tetracycline là một dãy các chất kháng sinh có cùng một nhân chung tetracycline (ví dụ: tetracycline, chlortetracycline, oxytetracycline, dimethyltetracycline...) và một số nhóm chung có trong phân tử (ví dụ nhóm dimethylamino $-N(CH_3)_2$, nhóm amide $CONH_2$...). Tetracycline được dùng rộng rãi trong y học và thú y. Tetracycline có thể được sản xuất bằng lên men xạ khuẩn *Streptomyces aureofaciens*. Tetracycline được tìm thấy vào năm 1953 bằng cách khử halogen trong phân tử chlortetracycline. Lúc đầu phương pháp này được dùng trong công nghiệp nhưng giá thành sản phẩm rất đắt, sau đó người ta tìm thấy chất kháng sinh này có trong dịch nuôi cấy xạ khuẩn sinh chlortetracycline là *Strep. aureofaciens*.

Giống xạ khuẩn có khả năng tổng hợp tetracycline và chlortetracycline là *Strep. aureofaciens*, còn giống sinh oxytetracycline là *Strep. rimosus*. Nguồn carbon dùng trong nuôi cấy *Strep. aureofaciens* là glucose (tích tụ nhiều tetracycline), còn *Strep. rimosus* cho nhiều oxytetracycline trên môi trường maltose.

Trong quá trình lên men, ở pha thứ nhất các chất dinh dưỡng tiêu hao nhanh. Trong khoảng 24-48 giờ nuôi cấy khối khuẩn ty đã được 70-80% mức tối đa và 60-80% các chất dinh dưỡng đã được sử dụng. Bước sang pha lên men thứ hai các giống xạ khuẩn này đều phát triển chậm lại, tốc độ sử dụng các chất dinh dưỡng giảm đi rất nhiều, phát triển khuẩn ty chậm lại dần, đạt tới mức độ cực đại và ổn định rồi bước vào giai đoạn tự phân. Kháng sinh tích tụ tối đa ở 110-120 giờ.

▪ Phương pháp sản xuất tetracycline

Lên men tetracycline (tetracycline, chlortetracycline, oxytetracycline, dimethyltetracycline...) theo phương pháp nuôi cấy chìm. Quá trình lên men ở đây giống như lên men các chế phẩm khác, bao gồm các giai đoạn: nhân giống và lên men.

- Xạ khuẩn *Strep. aureofaciens* dùng trong lên men tetracycline và chlortetracycline hoặc các halogentetracycline khác. Cấy bào tử vào môi trường nhân giống trong bình tam giác pH 6,8-7,0 lắc 220-250 vòng/phút khoảng 24-40 giờ. Sau đó, được tiếp tục nhân giống trong nồi

nhỏ rồi chuyển vào môi trường lên men. Lên men tetracycline và chlortetracycline là lên men hai pha điển hình.

- Giống *Strep. rimosus* được nhân giống ở bình tam giác lắc 220-250 vòng/phút ở 27-28°C/48-72 giờ, sau đó nhân tiếp tục trong nồi có sục khí và khuấy rồi chuyển sang môi trường lên men có điều kiện tương tự nhưng kéo dài từ 5-7 ngày.

5.5. Sản xuất enzyme

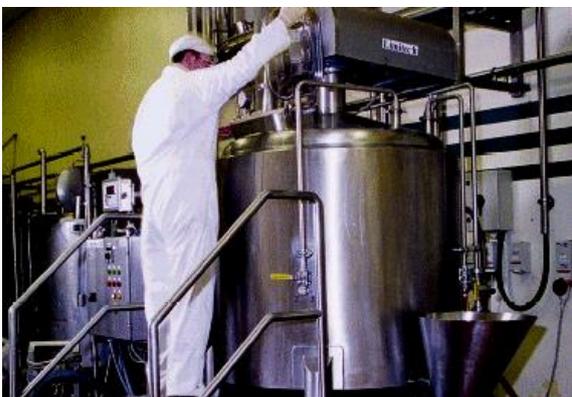
Ứng dụng thương mại chính của các enzyme vi sinh vật là trong công nghiệp thực phẩm và sản xuất bia mặc dù enzyme đã được thừa nhận trong các ứng dụng phân tích và chẩn đoán bệnh, cũng như trong sản xuất bột giặt. Hầu hết các loại enzyme được tổng hợp trong pha log của nuôi cấy mẻ và có thể, vì thế, được xem như các chất trao đổi sơ cấp. Tuy nhiên, trong một số trường hợp amylase (*Bacillus stearothermophilus*) được sản xuất bởi nuôi cấy idiophase vì thế có thể xem là tương đương với các chất trao đổi thứ cấp. Các enzyme có thể được sản xuất từ động-thực vật cũng như các nguồn vi sinh vật, nhưng sản xuất bằng lên men vi sinh vật là phương pháp kinh tế và thích hợp nhất. Hơn nữa, hiện nay nhờ công nghệ DNA tái tổ hợp người ta có thể chuyển gen vào các tế bào vi sinh vật để sản xuất các enzyme của động-thực vật (Hình 3.3).

Các tiến bộ của công nghệ DNA tái tổ hợp đã mở rộng phạm vi các sản phẩm lên men tiềm tàng của vi sinh vật. Có khả năng đưa các gen từ các cơ thể bậc cao vào các tế bào vi sinh vật như là các tế bào nhận để tổng hợp các protein (bao gồm enzyme) ngoại lai. Các tế bào vật chủ dùng trong những trường hợp này là *E. coli*, *Sac. cerevisiae* và một số loại nấm men khác.

5.5.1 Các loại enzyme vi sinh vật

Trong quá trình sinh trưởng, các enzyme được hình thành trong tế bào và một số được tiết ra môi trường xung quanh. Trong sản xuất chủ yếu là sản phẩm của enzyme ngoại bào, còn nếu muốn tách enzyme nội bào thì phải phá vỡ tế bào. Các vi sinh vật được dùng trong sản xuất enzyme gồm có vi khuẩn, nấm mốc, nấm men và xạ khuẩn.

Các chế phẩm enzyme được sản xuất từ vi sinh vật đã được ứng dụng trong nhiều ngành công nghiệp khác nhau, chủ yếu là các enzyme thủy phân: amylase, protease, pectinase, cellulase...



Hình 3.3. Sản xuất enzyme ở quy mô công nghiệp

5.5.1.1. Amylase nấm mốc

Nhiều chủng nấm mốc có khả năng sản xuất enzyme amylase. Amylase nấm mốc có các loại sau:

- α -amylase có tác dụng thủy phân tinh bột thành maltose, glucose và các dextrin có phân tử lượng khác nhau.

- Glucoamylase có tác dụng thủy phân tinh bột, glycogen và polysaccharide. Enzyme này được dùng trong sản xuất rượu, chuyển những dextrin có phân tử lượng cao không lên men thành những hợp chất lên men được và do đó nâng cao được hiệu suất nấu rượu từ các nguyên liệu là tinh bột.

- α -glucosidase thủy phân maltose thành glucose.

- Dextrinase thủy phân isomaltose, panose và dextrin thành những loại đường có thể lên men được.

5.5.1.2. Amylase vi khuẩn

Một số vi khuẩn có khả năng sinh ra nhiều enzyme α -amylase. Amylase vi khuẩn chỉ có khả năng phân hủy tinh bột mạnh và tạo thành những α -dextrin phân tử lượng cao bắt màu với iodine. Enzyme α -amylase vi khuẩn được dùng trong sản xuất đường mật ngô và chocolate, trong sản xuất bia, chế biến dextrin với dịch đường để sản xuất thức ăn cho người già và trẻ em, trong sản xuất nước quả và trong y học.

Dextrinase nấm mốc và amylase vi khuẩn còn được sử dụng rộng rãi trong công nghiệp dệt và giấy.

5.5.1.3. Protease

Protease là nhóm enzyme thủy phân các liên kết peptide trong phân tử protein hoặc các polypeptide.

- Protease thủy phân protein thành các peptide có phân tử lượng nhỏ (peptone và polypeptide). Tiếp theo đó là sự phân hủy các peptide trên thành các amino acid tự do dưới tác dụng của peptidase.

- Protease được dùng để nâng cao giá trị dinh dưỡng của thịt cá, thủy phân protein của sữa để chế biến những món ăn kiêng đặc biệt, được dùng trong thuộc da, sản xuất bột giặt, phim ảnh, tơ sợi, len dạ và trong y học. Protease vi sinh vật có thể sử dụng cùng với amylase trong chế biến thức ăn gia súc.

5.5.1.4. Pectinase

Là nhóm enzyme thủy phân pectin tạo thành galacturonic acid, glucose, galactose, arabinose, methanol... Pectinase có nhiều loại, nhưng có hai loại được nghiên cứu nhiều hơn cả là pectinesterase và polygalacturonase.

- Pectinesterase có tác dụng thủy phân các liên kết ester trong phân tử pectin, tách nhóm metocyl tạo thành methanol và polygalacturonic acid.

- Polygalacturonase thủy phân pectinic acid và các polygalacturonic khác, tách các gốc D-galacturonic acid tự do.

5.5.1.5. Cytolase

Vi sinh vật (đặc biệt là nấm mốc) sản sinh ra hệ enzyme có hoạt tính cao có thể phân hủy hemicellulose, pentozan, lignin... Các enzyme này được gọi chung là cytolase (bao gồm cellulase, hemicellulase, pentosinase).

Cellulase tác dụng phân hủy cellulose thành cellobiose, rồi sau đó tiếp tục thủy phân tới glucose. Việc phân lập các chủng vi sinh vật sản xuất cellulase có hoạt tính cao và tách enzyme này ra dưới dạng tinh khiết vẫn còn gặp nhiều khó khăn. Vì vậy, hiện nay chưa sản xuất được enzyme này ở quy mô công nghiệp, song việc sử dụng nó trong các ngành kinh tế và công nghiệp có nhiều tiềm năng. Ví dụ cytolase có thể dùng trong công nghiệp bia để phân hủy các vỏ hạt không phải vỏ mạch, trong sản xuất nước quả, trong chế biến bánh mì, trong các quá trình gia công thực phẩm để nâng cao giá trị dinh dưỡng, cũng như trong sản xuất thức ăn gia súc.

5.5.1.6. *Invertase*

Invertase của nấm mốc và nấm men đều thủy phân saccharose, nhưng cơ chế tác dụng của chúng hoàn toàn khác nhau. Invertase của nấm mốc là glucosidase, tác dụng lên đầu glucose của saccharose. Còn invertase của nấm men là fructosidase, tác dụng lên đầu fructose của saccharose.

Invertase là enzyme nội bào và chỉ thoát ra môi trường khi tế bào bị phân hủy. Enzyme này được dùng rộng rãi trong sản xuất bánh kẹo, rượu mùi, kem, mật ong nhân tạo. Nó làm tăng vị ngọt khi thủy phân đường saccharose thành fructose và glucose, làm tăng độ hòa tan của saccharose trong sản phẩm.

5.5.1.7. *Enzyme oxy hóa glucosooxydase-catalase*

Glucosooxydase là enzyme oxy hóa khử, chỉ tác dụng lên β -D-glucose khi có mặt oxygen, nó oxy hóa glucose thành gluconic acid và H_2O_2 . Dưới tác dụng của catalase (một enzyme hay đi cùng với glucosooxydase) H_2O_2 sẽ bị khử thành H_2O và O_2 .

Glucosooxydase-catalase có thể loại bỏ oxygen không khí khỏi môi trường. Vì vậy, chúng được dùng để bảo vệ những nguyên liệu, vật liệu khác nhau để tránh oxy hóa bởi không khí. Sử dụng những enzyme này cho phép kéo dài thời gian bảo quản thực phẩm (các dịch cô đặc, chất béo, bia, rượu vang, nước uống, sữa...). Đồng thời chúng cũng được sử dụng rộng rãi trong y học từ năm 1950 để chữa bệnh.

5.5.2. Sinh tổng hợp enzyme cảm ứng

Những enzyme được tạo thành trong tế bào vi sinh vật không phải chỉ phụ thuộc vào hoạt tính riêng của từng loại vi sinh vật, mà còn phụ thuộc vào thành phần môi trường nuôi cấy và điều kiện nuôi cấy.

Khi nuôi cấy nấm mốc *Asper. oryzae* trên môi trường cám mì theo phương pháp bề mặt có hàng chục enzyme tự do được hình thành, trong đó có amylase, protease, mantase, pectinase, investase, ribonuclease... Nếu nuôi nấm mốc này trên môi trường Kzapek với tinh bột và nitrate thì chỉ có α -amylase được tạo thành, còn các enzyme khác chỉ có ở dạng vết. Nhưng nếu thay sodium nitrate bằng casein ở dạng sữa đã tách chất béo thì protease được tạo thành cùng với α -amylase.

Tương tự như vậy khi nuôi cấy bề mặt nấm mốc *Asper. awamori* trên cám sẽ thu được một số lượng lớn glucoamylase, α -amylase, protease, pectinase, cellulase; nhưng khi nuôi chìm trên môi trường chứa tinh bột và nitrate thì chỉ thu được phức hợp amylase.

Hiện tượng này có thể giải thích bằng lý thuyết sinh tổng hợp cảm ứng enzyme, nó chỉ xảy ra trong khi nuôi cấy vi sinh vật mà không thấy ở động-thực vật. Những enzyme thủy phân của vi sinh vật đều thuộc hệ enzyme cảm ứng. Khi trong môi trường nuôi cấy có một chất khó đồng hóa, vi sinh vật phải tiết vào môi trường một hoặc những enzyme tương ứng để phân hủy nó thành những chất có thể đồng hóa được.

Một định nghĩa tổng quát có thể nêu lên như sau: Một quá trình sinh tổng hợp được gọi là cảm ứng, nếu như nó chỉ xảy ra ở mức độ đáng kể khi trong môi trường có cơ chất đặc hiệu của enzyme này hoặc các chất trao đổi có cấu trúc tương tự cơ chất. Các enzyme thuộc loại này gọi là enzyme cảm ứng. Các cơ chất kích thích quá trình tổng hợp này được gọi là chất cảm ứng.

Muốn tổng hợp được enzyme cảm ứng cần phải có bốn điều kiện:

- Có gen tương ứng trong thể nhiễm sắc của tế bào.
- Có đầy đủ các nguyên liệu để xây dựng các phân tử enzyme đó (các amino acid và các hợp chất coenzyme nếu enzyme đó gồm hai cấu tử).
- Năng lượng cần thiết dùng cho việc tổng hợp enzyme.
- Chất cảm ứng, nếu không có chất cảm ứng thì dù có đủ ba điều kiện trên cũng không thể tổng hợp được enzyme.

Như vậy, có thể coi việc có chất cảm ứng là điều kiện rất cần thiết để thu được những enzyme mong muốn. Trong công nghiệp sản xuất enzyme cần phải lựa chọn những chất cảm ứng thích hợp và xác định nồng độ tối ưu của nó trong môi trường để có hiệu suất sinh tổng hợp cao nhất.

5.5.3. Những phương pháp nuôi cấy vi sinh vật để sản xuất enzyme

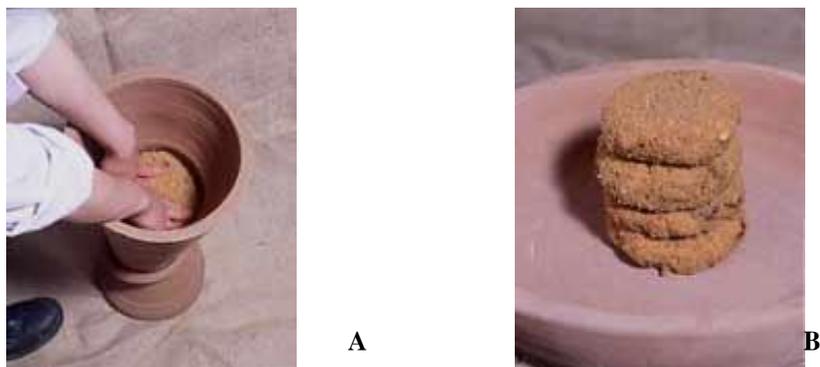
Công nghệ sản xuất enzyme hiện nay trên thế giới ứng dụng hai phương pháp: nuôi cấy bề mặt và nuôi cấy chìm.

Trong nuôi cấy bề mặt, vi sinh vật mọc trên bề mặt môi trường rắn (Hình 3.7) hoặc lỏng. Các môi trường rắn trước khi nuôi cấy vi sinh vật cần được làm ẩm. Vi sinh vật phát triển sẽ lấy những chất dinh dưỡng trong môi trường và sử dụng oxygen phân tử của không khí để hô hấp. Để đảm bảo cho vi sinh vật mọc đều trên bề mặt môi trường và sử dụng được nhiều chất dinh dưỡng sinh ra enzyme, những lớp môi trường rắn cần phải mỏng (chỉ dày khoảng 2-5 cm). Điều này dẫn đến một nhược điểm cơ bản của phương pháp này cần phải có mặt bằng sản xuất lớn và chi phí lao động chân tay nhiều.

Trong nuôi cấy chìm, vi sinh vật hiếu khí chỉ sử dụng được oxygen hòa tan trong môi trường, vì vậy trong quá trình nuôi cấy phải sục khí và khuấy liên tục. Phương pháp nuôi cấy chìm hiện đại hơn, dễ cơ khí hóa và tự động hóa, việc tổ chức quy mô lớn tương đối dễ dàng và đơn giản. Với phương pháp này có thể dùng các chủng vi sinh vật đột biến có khả năng sinh tổng hợp enzyme cao và lựa chọn các thành phần môi trường thích hợp, các điều kiện nuôi cấy tối ưu.

Phương pháp nuôi cấy bề mặt trên môi trường rắn cũng có một số ưu điểm so với phương pháp nuôi cấy chìm, đó là: nồng độ enzyme tạo thành ở môi trường rắn cao hơn nhiều lần,

không cần các thiết bị phức tạp, chủ yếu nuôi trên khay và buồng nuôi giữ ở nhiệt độ và độ ẩm thích hợp, quá trình sản xuất tiêu tốn ít năng lượng. Trong phương pháp nuôi cấy bề mặt vi sinh vật được nuôi cấy trong điều kiện không vô trùng tuyệt đối. Nếu có vi sinh vật tạp nhiễm thì chỉ cần loại bỏ phần đó. Còn trong nuôi cấy chìm cần phải giữ vô trùng tuyệt đối trong tất cả quá trình, nếu bị nhiễm thì hư hỏng toàn bộ và có thể phải bỏ đi hoàn toàn. Khi nuôi cấy chìm không những chỉ cần vô trùng ở quá trình nhân giống, lên men, mà còn phải đảm bảo vô trùng đối với không khí thổi vào môi trường.



Hình 3.4. Lên men trên môi trường rắn. A: lên men kỵ khí trong nồi bằng đất nung, B: lên men hiếu khí.

5.5.3.1. Phương pháp nuôi cấy bề mặt

Nuôi cấy nấm mốc và một số vi khuẩn theo phương pháp bề mặt để sản xuất enzyme thường dùng môi trường rắn, một số trường hợp có thể dùng môi trường lỏng.

Môi trường rắn thường là các nguyên liệu tự nhiên như cám, đôi khi dùng gạo tấm, ngô, bã bia, bã củ cải đường, khoai tây, lõi ngô... hoặc hỗn hợp những nguyên liệu này. Môi trường lỏng thường là rỉ đường, dịch thủy phân từ thóc mầm, nước bã rượu... có pha thêm muối khoáng.

Để đảm bảo đủ các chất dinh dưỡng trong môi trường người ta có thể bổ sung các nguồn N, P, K hoặc các chất sinh trưởng (nước khoai tây, cao ngô...). Độ ẩm 58-60% tương đối thích hợp với nhiều chủng nấm mốc nuôi cấy bề mặt trên khay hở. Tuy nhiên, độ ẩm 60% vi khuẩn dễ phát triển, dễ gây tạp nhiễm, khó thông khí. Trường hợp độ ẩm từ 45-50%, khi nuôi cấy môi trường sẽ khô nhanh, sinh bào tử yếu và làm giảm hoạt tính của enzyme tạo thành. Trong thời gian nuôi cấy, nên giữ độ ẩm của môi trường ở 50-60%, muốn vậy độ ẩm không khí phòng nuôi cấy phải khoảng 90-100%.

Tuy rằng, nuôi cấy bề mặt không cần điều kiện vô trùng tuyệt đối nhưng môi trường (đặc biệt trong quá trình nhân giống) cũng cần được vô trùng để cho giống phát triển bình thường nhất là giai đoạn đầu. Trong sản xuất cần phải vô trùng môi trường rắn ở 1-1,5 atm bằng hơi nóng trong 45-60 phút. Nếu môi trường trước khi vô trùng được trộn với chlohydric acid hoặc sulfuric acid đến pH thích hợp, hay thêm một ít formalin hoặc một số chất sát trùng khác thì chỉ cần vô trùng dưới ở 0,2-0,3 atm. Thêm acid và giữ môi trường ở pH nhất định sẽ giúp cho một vài enzyme tạo thành được nhiều hơn.

Môi trường được dàn mỏng ra các khay đã vô trùng dày khoảng 2- 2,5 cm, để nguội tới 30°C thì tiến hành cấy giống. Giống được nhân cũng theo phương pháp bề mặt hoặc bằng bào tử thu được theo phương pháp tách bào tử khỏi môi trường nhân giống và chứa vào các bình nút kín hoặc trong các túi polyethylene. Trong nuôi cấy nhân giống thường để mốc phát triển đến già sinh ra nhiều bào tử. Tỷ lệ nhân giống khoảng 0,2-2%. Mỗi gram bào tử mốc có thể cấy vào 10 kg môi trường. Các khay có môi trường đã cấy mốc được đặt vào phòng nuôi có sẵn các giá. Phòng nuôi có thể điều chỉnh được nhiệt độ, độ ẩm và được thông gió. Nhiệt độ thích hợp với đa số mốc là 30-32°C, nếu nhiệt độ xuống dưới 24°C nấm phát triển chậm, sinh bào tử yếu, thời gian nuôi cấy dài dẫn đến giảm khả năng sinh tổng hợp enzyme. Thời gian nuôi cấy nấm mốc khoảng 36-60 giờ.

Quá trình nuôi cấy nấm mốc trên bề mặt môi trường bao gồm ba thời kỳ:

- **Khoảng 10-14 giờ đầu.** Bào tử bắt đầu nảy mầm, thời kỳ này chưa hình thành enzyme không đòi hỏi phải thông khí nhiều, chỉ cần làm thoáng khoảng 2-3 thể tích không khí/thể tích phòng/giờ. Giống rất nhạy cảm với nhiệt độ ở những giờ này, nhiệt độ buồng nuôi cần giữ 29-31°C .

- **Thời kỳ giữa khoảng 14-18 giờ.** Mốc phát triển nhanh, hô hấp mạnh. Sợi nấm có thể quan sát thấy bằng mắt thường, lúc đầu lớp lông có màu trắng xám và ngày càng rõ, làm môi trường kết bánh lại. Có thể phải lật môi trường, bề nhỏ ra để sợi nấm mọc tốt hơn. Các chất dinh dưỡng trong môi trường tiêu hao nhanh để phục vụ cho quá trình trao đổi chất trong tế bào và giống hô hấp mạnh tỏa ra môi trường chung quanh 80-90 kcal/giờ, làm nhiệt độ môi trường có thể tăng lên đến 37-40°C hoặc hơn. Thời kỳ này cần phải thông khí mạnh, tới 60 thể tích không khí/thể tích phòng/giờ để cung cấp O₂ cho mốc và đuổi CO₂ ra khỏi môi trường, đồng thời làm giảm nhiệt độ buồng nuôi. Nhiệt độ buồng nuôi ở giai đoạn này cần giữ ở 28-29°C và độ ẩm trong phòng khoảng 100%.

- **Thời kỳ cuối khoảng 18-20 giờ.** Các quá trình trao đổi chất vẫn tiếp tục nhưng yếu dần, nhiệt độ môi trường giảm xuống và việc tạo thành enzyme của tế bào vẫn tiếp tục. Nhiệt lượng tỏa ra khoảng 15-30 kcal/kg/giờ. Thông khí không quá 20-25 thể tích không khí/thể tích phòng/giờ, giữ nhiệt độ buồng nuôi ở 30°C.

Tùy thuộc vào đặc tính sinh lý của từng loại mốc, thời gian nuôi cấy có thể kết thúc tại điểm mà lượng enzyme tạo thành tối đa.

5.5.3.2. Phương pháp nuôi cấy chìm

Nuôi cấy vi sinh vật sinh enzyme theo phương pháp chìm được thực hiện trong các bình lên men có cánh khuấy và sục khí liên tục (Hình 3.8 và 3.9). Quá trình tương tự như trong sản xuất amino acid, kháng sinh...



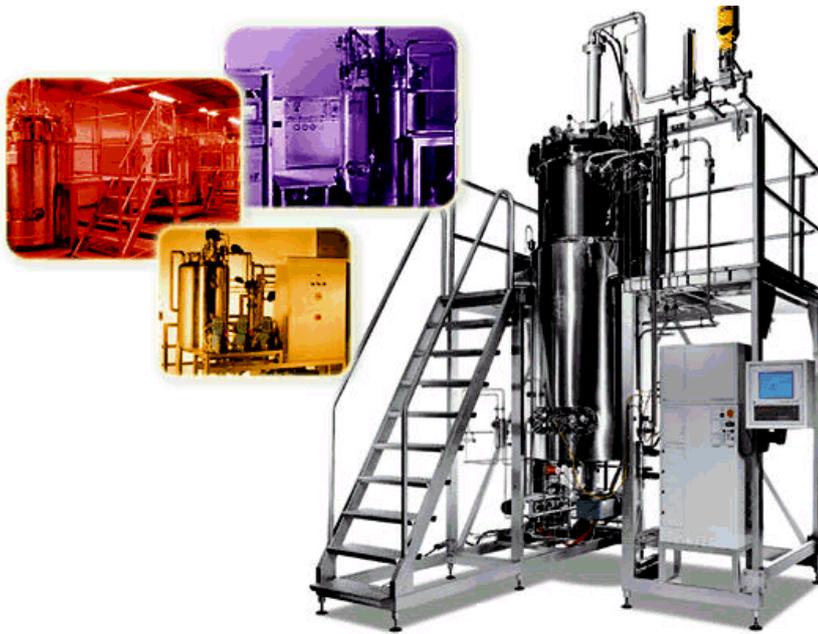
Hình 3.5. Lên men bằng phương pháp nuôi cấy chìm trong môi trường lỏng ở quy mô phòng thí nghiệm (5 L)

Không thể có môi trường nuôi cấy chung cho tất cả các chủng vi sinh vật, vì vậy cần phải chọn thành phần môi trường, tỷ lệ các chất dinh dưỡng sao cho thích hợp với từng chủng, đặc biệt phải chú ý tới chất cảm ứng cần thiết để cho vi sinh vật sản sinh ra enzyme ở mức tối đa. Trong nhiều môi trường nuôi cấy chìm, nguồn carbon thường là tinh bột hoặc các loại bột khác nhau. Có thể thêm một lượng rất hạn chế các carbohydrate dễ tiêu như glucose hoặc saccharose. Trong sản xuất người ta còn sơ bộ dịch hoá tinh bột bằng amylase trước khi hấp vô trùng môi trường. Đối với các mốc sinh amylase thì đường maltose lại là chất cảm ứng tốt hơn tinh bột. Các nguồn nitrogen hữu cơ thường dùng là cao ngô, nước chiết từ mầm mạ... Khi cho thêm các chất này phải thận trọng, vì hỗn hợp các amino acid sẽ có tác dụng nâng cao sinh tổng hợp amylase ở *Aspergillus*, nhưng lại có ảnh hưởng xấu đối với các enzyme khác.

Thành phần khoáng trong môi trường cũng rất có ý nghĩa. Trong môi trường nuôi cấy một số chủng *Asper. oryzae* ngoài tinh bột và nitrate còn cần thêm $MnSO_4$. Nếu thiếu $MnSO_4$ mốc vẫn phát triển bình thường, nhưng amylase không được tạo thành (trong phân tử amylase có chứa những amino acid mang S và Mn). Môi trường được vô trùng trong thiết bị riêng hoặc trong bình lên men ở 121-125°C/45-60 phút. Môi trường trước khi vô trùng cần được dịch hóa sơ bộ để tránh tình trạng tinh bột hồ hóa làm môi trường đặc sệt hoặc có độ dính cao.

Sau khi làm nguội môi trường đến nhiệt độ thích hợp sẽ tiến hành tiếp giống. Giống được cấy từ ống nghiệm qua các bình tam giác, đặt trên máy lắc, rồi nuôi ở bình nhân giống có thể tích bằng 5-10% thể tích bình lên men từ 24-36 giờ. Như vậy, nuôi cấy chìm cần tiếp giống ở hệ sợi không dùng giống bào tử như cấy các xạ khuẩn sinh chất kháng sinh. Cấy giống mốc bào tử theo phương pháp chìm sẽ kéo dài thời gian nảy mầm và cũng kéo dài toàn bộ quá trình nuôi cấy. Môi trường nhân giống có thể dùng các hợp chất nitrogen dễ tiêu đối với vi sinh vật mà trong quá trình nuôi cấy vẫn nâng cao được hoạt tính sinh tổng hợp. Tỷ lệ tiếp giống nằm trong khoảng 2-5%, nhưng ở một số chủng tỷ lệ này thấp hơn nhiều (0,5-0,6%).

Sinh tổng hợp enzyme theo phương pháp nuôi cấy chìm thường khoảng từ 2-4 ngày. Đa số các enzyme thủy phân do nấm mốc, xạ khuẩn tạo thành được tiết ra môi trường xung quanh, phần còn lại trong hệ sợi sau ba ngày nuôi cấy khoảng 10-15%. Độ pH môi trường có một ý nghĩa rất lớn, độ pH thích hợp cho sinh tổng hợp α -amylase là 7-8, glucoamylase là 4,5-5. Khi dùng các muối ammonium làm nguồn nitrogen, quá trình phát triển vi sinh vật sẽ acid hóa môi trường còn khi dùng nitrate làm nguồn nitrogen môi trường sẽ bị kiềm hóa.



Hình 3.6. Lên men bằng phương pháp nuôi cấy chìm trong môi trường lỏng ở quy mô pilot (200 L)

Sự sục khí không những ảnh hưởng đến sinh trưởng của vi sinh vật mà còn ảnh hưởng đến sự tạo thành enzyme. Tốc độ sử dụng oxygen cao nhất của nấm mốc sau khoảng 24 giờ nuôi cấy rồi giảm dần. Tăng nồng độ tất cả các chất dinh dưỡng và oxygen hòa tan trong môi trường có thể nâng cao được khả năng sinh tổng hợp α -amylase.

5.5.4. Tách và tinh sạch chế phẩm enzyme

5.5.4.1. Chế phẩm enzyme từ môi trường nuôi cấy bề mặt

Để chiết rút enzyme từ môi trường rắn người ta dùng nước, các dung dịch muối trung tính, các dung môi hữu cơ (ethanol, acetone). Nhiều nghiên cứu cho thấy dùng nước có kết quả tốt và dễ áp dụng trong sản xuất. Có thể chiết được lượng enzyme trên 90-95% và trong nước chiết không chứa các tạp chất không tan. Nước thường dùng để khuếch tán hòa tan ở nhiệt độ 25-28°C. Để tránh tạp nhiễm nên thêm vào nước một ít formalin hoặc chất sát trùng khác. Dịch chiết thu được có màu nâu sẫm, khá trong, chứa 10-15% chất khô hòa tan và được làm lạnh kịp thời xuống 10-12°C.

Dịch chiết được cô đặc chân không tới 50-55% chất khô hòa tan. Dịch đậm đặc này có thể bảo quản lâu dài mà không mất hoạt tính và rất dễ hòa tan. Dịch chiết có thể không cần phải cô đặc mà đưa ngay vào máy sấy phun và sẽ thu được sản phẩm ở dạng bột.

Phương pháp tách chiết và làm sạch enzyme được sử dụng rộng rãi nhất hiện nay là phương pháp kết tủa enzyme bằng dung môi hữu cơ (ethanol, isopropanol và acetone). Các dung môi hữu cơ này làm giảm hằng số điện môi của môi trường. Như ta đã biết, lực hút tĩnh điện tỷ lệ nghịch với hằng số điện môi. Vì vậy, các enzyme-protein cũng như các chất có phân tử lượng thấp trong hệ dung dịch nước-dung môi hữu cơ sẽ kết tủa và lắng xuống. Độ hòa tan của enzyme vào dung dịch ethanol-nước phụ thuộc vào nồng độ ethanol, nhiệt độ, pH, lực hút ion của dung dịch và tính chất protein của enzyme. Thông thường, người ta thêm 3-4 thể tích

ethanol vào một thể tích nước chiết enzyme. Để tránh mất hoạt tính của enzyme tất cả phải được làm lạnh xuống 3-5°C. Khi trộn phải khuấy mạnh, khi các enzyme kết tủa và lắng xuống dưới cần tách ly tâm ngay. Enzyme được rửa 2-3 lần bằng ethanol cao độ, rồi đưa vào bình hút ẩm hoặc máy đông khô chân không, sản phẩm thu được sẽ có dạng bột. Dùng isopropanol kết tủa enzyme chỉ cần 1,5-2 thể tích dung môi/1 thể tích dịch chiết. Các enzyme tách ra sẽ ở dạng sữa đặc quánh rất khó sấy. Dùng acetone với tỷ lệ như khi dùng isopropanol, nhưng kỹ thuật phòng tránh cháy nổ trong sản xuất là rất khó khăn.

Phương pháp thứ hai để tách enzyme là dùng muối trung tính để kết tủa. Chế phẩm enzyme thu được có hoạt lực cao hơn so với việc tách bằng dung môi. Muối trung tính thường dùng là $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ với tỷ lệ 50-66% (có khi cao hơn) so với dịch chiết enzyme. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ pha thành dung dịch bão hòa rồi cho vào dịch lên men. Dịch lên men có thể sơ bộ cô đặc trong thiết bị chân không và như vậy sẽ cần dùng một lượng $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ít hơn. Chế phẩm enzyme thu được có lẫn $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, vì vậy muốn sử dụng rộng rãi cần phải loại muối bằng cách thẩm tích qua màng bán thấm.

5.5.4.2. Chế phẩm enzyme từ dịch nuôi cấy chìm

Dịch nuôi cấy chìm sau khi lọc sinh khối vi sinh vật và các tạp chất rắn không tan còn khoảng 1-3% chất khô hòa tan, trong đó có các enzyme. Về nguyên tắc tách enzyme từ dịch lọc nuôi cấy chìm cũng tương tự như tách từ dịch chiết trong môi trường rắn nuôi cấy bề mặt. Dịch lọc cần phải cô để giảm thể tích từ 4-10 lần trong điều kiện chân không ở 25-30°C, rồi tiến hành tách enzyme.

Ngoài phương pháp cô chân không, có thể tiến hành theo phương pháp hấp phụ qua nhựa trao đổi ion hoặc các chất có hoạt tính bề mặt, sau đó lại tiến hành phản hấp phụ. Tiến hành nhiều lần và dịch thu được chứa α -amylase của nấm mốc và vi khuẩn có thể được hấp phụ lại bằng tinh bột khoai tây hoặc ngô đã được xử lý sơ bộ bằng nhiệt. Trước khi cho hấp phụ cần cho thêm 20% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ để nâng cao khả năng hấp phụ của tinh bột. Trừ amylase được hấp phụ còn các enzyme khác sẽ ở lại trong dịch. Tinh bột có amylase được sấy khô (không cần phản hấp phụ) và đem sử dụng trong kỹ thuật sản xuất các sản phẩm chứa tinh bột.

Hiện nay, còn một số phương pháp tương đối phức tạp khác để kết tinh và tách enzyme như lọc gel (gel filtration), điện di (electrophoresis), siêu ly tâm (ultracentrifuge)...

B. CÂU HỎI VÀ BÀI TẬP THỰC HÀNH:

- Câu 1: Anh/chị hãy trình bày các bước của quá trình lên men?
Câu 2. Anh/chị hãy trình bày việc sản xuất sinh khối vi sinh vật trong quá trình lên men?
Câu 3. Anh/chị hãy trình bày protein đơn bào trong của quá trình lên men?
Câu 4. Anh/chị hãy trình bày các sản phẩm trao đổi chất của quá trình lên men?
Câu 5. Anh/chị hãy trình bày các enzyme được tạo ra của quá trình lên men?

C. GHI NHỚ:

- Các bước của quá trình lên men;
- Các sản phẩm của quá trình lên men;
- Các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình lên men.

CHƯƠNG 4 – CÔNG NGHỆ SINH HỌC THỰC VẬT

Giới thiệu:

Công nghệ sinh học thực vật là quá trình sản xuất các sản phẩm trên quy mô công nghiệp, trong đó nhân tố tham gia trực tiếp và quyết định là các tế bào sống (thực vật). Mỗi tế bào sống của cơ thể sinh vật hoạt động trong lĩnh vực sản xuất này được xem như một lò phản ứng nhỏ. Nội dung của chương này cung cấp cho sinh viên về 2 ứng dụng của công nghệ sinh học thực vật: nuôi cấy mô tế bào thực vật và kỹ thuật chuyển gen vào tế bào thực vật.

Mục tiêu:

- Trình bày được các kiến thức cơ bản về nuôi cấy mô và kỹ thuật chuyển gen ở tế bào thực vật;
- Trình bày được các ứng dụng của kỹ thuật nuôi cấy mô và kỹ thuật chuyển gen tế bào thực vật trong tạo giống và bảo vệ cây trồng
- Mô phỏng được quy trình nuôi cấy mô, chuyển gen ở đối tượng thực vật cụ thể.

A. NỘI DUNG:

1. Nuôi cấy mô, tế bào thực vật

1.1. Định nghĩa

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

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

Bao gồm:

- Nuôi cấy cây non và cây trưởng thành
- Nuôi cấy cơ quan: rễ, thân, lá, hoa, quả, bao phấn, noãn chưa thụ tinh
- Nuôi cấy phôi: phôi non, phôi trưởng thành
- Nuôi cấy mô sẹo (callus)
- Nuôi cấy tế bào đơn (huyền phù tế bào)
- Nuôi cấy tế bào trần (protoplast): nuôi cấy phần bên tế bào thực vật sau khi đã tách vỏ

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

1.2.1. Tính toàn năng của tế bào

Mỗi tế bào của bất kỳ cơ thể sinh vật đa bào nào đều có khả năng tiềm tàng để phát triển thành một cá thể hoàn chỉnh được Harberlandt phát biểu vào năm 1902.

Theo quan niệm của sinh học hiện đại thì mỗi tế bào riêng rẽ đã phân hóa đều mang toàn bộ lượng thông tin di truyền cần thiết và đủ của cả cơ thể đó. Khi gặp điều kiện thích hợp, mỗi tế bào đều có thể phát triển thành một cá thể hoàn chỉnh.

Đó là tính toàn năng của tế bào, là cơ sở lý luận của phương pháp nuôi cấy mô, tế bào thực vật.

1.2.2. Sự phân hóa và phân hóa của tế bào

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

Quá trình phân hóa có thể biểu thị:

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

Sự phân hóa tế bào là trong trường hợp cần thiết, ở điều kiện thích hợp các tế bào chuyên hóa có thể biến đổi trở về dạng tế bào phôi sinh và phân chia mạnh mẽ. Do các tế bào đã phân hóa thành các tế bào có chức năng chuyên biệt, chúng hoàn toàn không mất khả năng biến đổi của mình.

Bản chất của sự phân hóa và phản phân hóa là một quá trình hoạt hóa, ức chế các gen. Tại một thời điểm nào đó trong quá trình phát triển cá thể, có một số gen được hoạt hóa (mà vốn trước đây bị ức chế) để cho ta tính trạng mới, còn một số gen khác lại bị đình chỉ hoạt động.

1.3. Ứng dụng của nuôi cấy mô tế bào thực vật

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

1.4. 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*:

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

1.4.1.1. 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).

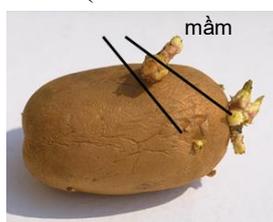
- Cây phát triển từ chồi nách phá ngủ.

- 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)



A



B

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.

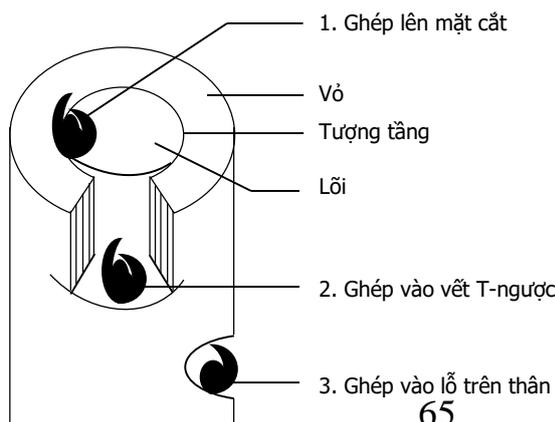
Các đối tượng hoa lan đã mang lại hiệu quả kinh tế đặc biệt cao. Sau những kết quả đầu tiên ở chi *Cymbidium* của Morel (1966), đến nay người ta đã thu được kết quả rất tốt ở khoảng 30 chi khác nhau của họ này. Sở dĩ nhân giống vô tính hoa lan đạt được thành công lớn và được ứng dụng rộng rãi như vậy 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 bộc 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).

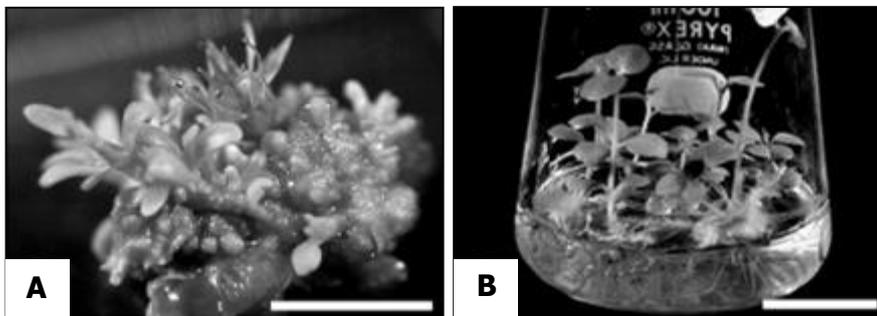


Hình 4.3. Vị trí mắt ghép trong ba kiểu vi ghép khác nhau

1.4.1.2. 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 *Hylothelephium sieboldii*. A: Chồi bất định. B: Cây *in vitro* hoàn chỉnh.

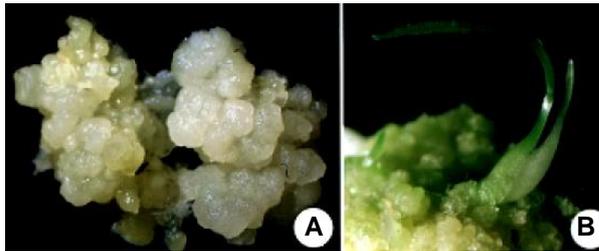
Sự phát sinh chồi bất định trực tiếp bắt đầu bằng các tế bào nhu mô (parenchyma cells) nằm ở trong biểu bì hoặc ngay phía dưới bề mặt của thân; một số tế bào này trở thành mô phân sinh và các túi nhỏ gọi là thể phân sinh (meristemoids) phát triển. Các thể phân sinh này rõ ràng có nguồn gốc từ các tế 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.

1.4.2. 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 Schaffer (1976) thu được ở tỏi.

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

1.4.3.1. 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 bắt 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:

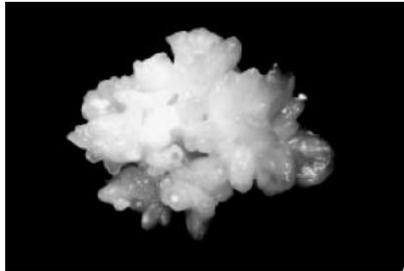
Dạng cầu → dạng thủy lôi → dạng có lá mầm

- 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 phôi vô tính.

Khả năng tạo phôi vô tính trong nuôi cấy mô thực vật, ngoài các điều kiện vật lý, hóa học thuận lợi cho sự tạo phôi, còn phụ thuộc rất lớn vào loài, vào các giống (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 phôi vô tính cao từ cây này qua cây khác.

1.4.3.2. Công nghệ hạt nhân tạo

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

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

- Phôi vô tính
- Vỏ bọc polymer (alginate)
- Màng ngoài (calcium alginate)

Có nhiều loại polymer tự nhiên đã được thử nghiệm dùng cho công nghệ phôi vô tính, trong đó alginate được coi là tốt nhất. Alginate là một polymer sinh học, được chiết từ rong biển mà chủ yếu là các loài thuộc chi *Sargassum*. Alginate do các phân tử manuronic acid gắn với nhau tạo thành, giống như các phân tử glucose tạo nên cellulose. Đặc điểm quan trọng nhất của alginate là chúng ở dạng hòa tan trong nước khi kết hợp với các ion hóa trị một (monovalent) như: Na^+ , K^+ , NH_4^+ ... và lập tức chuyển sang dạng không tan trong nước khi kết hợp với các

ion hóa trị hai (divalent) hoặc đa hóa trị (polyvalent) như: Ca^{2+} , Mg^{2+} , Al^{3+} ,... Nếu nhỏ một giọt dung dịch sodium alginate vào dung dịch CaCl_2 thì sodium alginate ở phần diện tích ngoài của giọt sẽ chuyển hóa ngay thành calcium alginate và tạo nên một màng không thấm nước hình thành các viên alginate.

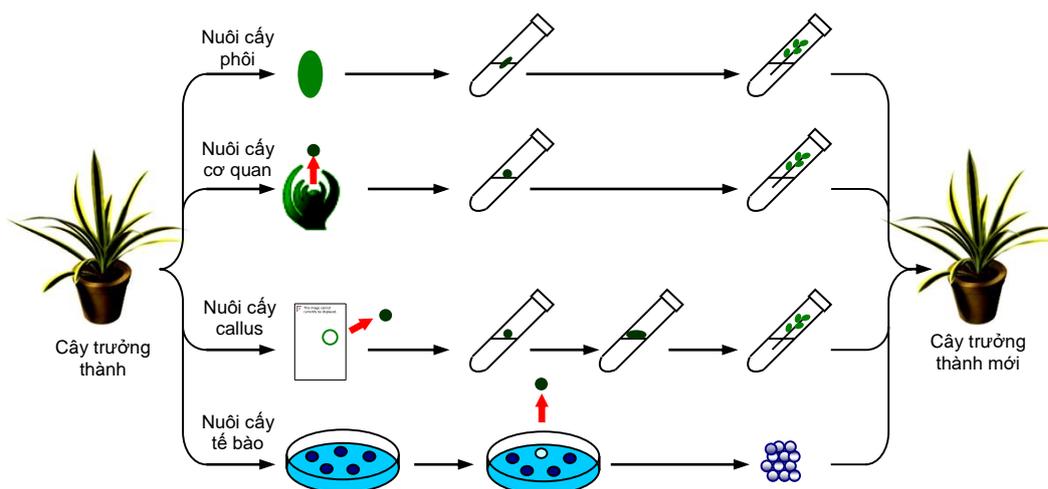
1.4.3.3. Nhân giống trong các nồi phản ứng sinh học

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 phôi vô tính và các thể chồi, cụm chồi hoặc củ nhỏ.

Phôi vô tính cà phê được sản xuất thành công ở Brasil trên các nồi phản ứng sinh học dung tích từ 2-4 lít. 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 phôi 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*

1.5. 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 gây

- Nhân nhanh
- Chuẩn bị và đưa ra ngoài đất

1.5.1. 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 gậy 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.

1.5.2. 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)
------------	----------------	------------	----------------

1. Các nguyên tố đa lượng		FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8
MgSO ₄ .7H ₂ O	370	Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37,3
KH ₂ PO ₄	170		
KNO ₃	1900	3. Nguồn carbon	
NH ₄ NO ₃	1650	Sucrose	30000
CaCl ₂ .2H ₂ O	440		
2. Các nguyên tố vi lượng		4. Phụ gia hữu cơ	
H ₃ BO ₃	6,2	- Các vitamin	
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	- Các chất khác	
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.

1.5.3. 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.

1.6. 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 F₁. Nếu dùng giống thuần chủng theo phương thức tự phối thì không đảm bảo, vì ở các giống rau họ cải (Brassicaceae) thường xuất hiện hiện tượng bất tự thụ. Vì vậy, phương pháp nhân giống và bảo quản giống trong ống nghiệm đối với một số giống rau và giống hoa có một ý nghĩa kinh tế cao.

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

1.7. 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.

1.7.1. 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 (organisator) 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 cũng 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*.

1.7.2. 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 thế 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.

2. Kỹ thuật chuyển gen vào thực vật

2.2. Các phương pháp chuyển gen vào thực vật

Agrobacterium là vi khuẩn đất, xâm nhập vào cây trồng qua các vết xước, vết thương trên cây. Gồm các loài: *A.tumefaciens* gây bệnh u thân; *A.rhizogenes* gây bệnh tóc rễ; *A.rubi* gây u ở các loài dâu đất, mâm xôi. *A.tumefaciens* được sử dụng nhiều nhất cho việc chuyển gen.

2.2.1. Biến nạp gián tiếp qua *Agrobacterium*

Khi cây bị nhiễm *A.tumefaciens*, khối u sẽ được hình thành ngay chỗ lây nhiễm. Khối u không ngừng tăng trưởng kể cả khi đã tiêu diệt vi khuẩn do vi khuẩn đã vào cây tác nhân gây khối u dưới dạng vật chất di truyền.

Vi khuẩn *A.tumefaciens* chứa một plasmid kích thước khoảng 200kb, gọi là Ti – plasmid (Tumor inducing plasmid), là tác nhân gây bệnh khối u cho cây. Trên Ti – plasmid có đoạn T-DNA (Tumor DNA) được giới hạn bằng hai bờ phải (right border) và bờ trái (left border), trình tự nucleotid của bờ phải và bờ trái tương tự nhau. T-DNA là đoạn có kích thước 25kb chứa các gen tổng hợp auxin, cytokinin là các gen gây khối u. Ngoài T-DNA, trên plasmid còn có vùng *vir* gồm nhiều gen khác nhau chịu trách nhiệm hoạt động lây nhiễm, chuyển nạp.

Quá trình chuyển nạp gen của vi khuẩn như sau: Khi cây bị thương tiết ra các chất độc vết thương có bản chất phenol sẽ thu hút vi khuẩn tập trung vào vết thương đồng thời hoạt hóa các gen ở vùng *vir* của plasmid hoạt động. Các gen ở vùng *vir* sẽ tạo ra các enzyme tương ứng, các enzyme này có hai chức năng chính: -cắt đứt bờ phải và bờ trái để giải phóng đoạn T-DNA; -bao bọc và vận chuyển T-DNA vào tế bào thực vật và tiếp cận với bộ gen của tế bào chủ một cách an toàn.

Vi khuẩn *A.tumefaciens* có đầy đủ các gen thực hiện các chức năng cần thiết trong quá trình chuyển gen. Dựa vào cơ chế chuyển gen của vi khuẩn *A.tumefaciens* để chuyển các gen mong muốn trên cơ sở thiết kế lại hệ thống Ti – plasmid.

2.2.2. Chuyển gen nhờ virus

Ngoài vi khuẩn người ta còn dùng virus làm vectơ chuyển gen cho cây trồng do virus rất dễ xâm nhập và lây lan trong cơ thể thực vật. Trong cấu tạo của virus có mặt axit nucleic làm cơ sở cho việc gắn các gen cần chuyển vào.

Để làm vectơ chuyển gen virus cần có các tiêu chuẩn sau:

- Bộ gen của virus có cấu tạo DNA;
- Có khả năng di chuyển từ tế bào này sang tế bào khác qua các lỗ thành tế bào;
- Có khả năng tải được các đoạn DNA gắn vào;
- Có phổ ký chủ càng rộng càng tốt;
- Không gây hại hoặc gây hại không đáng kể.

Tuy nhiên việc chuyển gen nhờ virus ít được sử dụng do việc nhân giống các cây chuyển gen nhờ virus phải tiến hành bằng phương pháp vô tính. Điều này không thể thực hiện được với tất cả các loại cây.

2.2.3. Chuyển gen trực tiếp

2.2.3.1. Chuyển gen nhờ kỹ thuật siêu âm (*Mild sonication*)

Được dùng để chuyển gen vào các tế bào trần. Các bước tiến hành:

- Tạo tế bào trần;
- Trộn chung tế bào trần với các plasmid tái tổ hợp mang gen mong muốn;
- Cắm đầu siêu âm của máy siêu âm ngập trong huyền phù tế bào 3mm, tần suất 20kHz, thời gian trong vài giây đến vài phút;
- Nuôi tế bào trần trong các môi trường thích hợp để tách các tế bào trần đã nhận được DNA;
- Nuôi cấy tái sinh cây.

2.2.3.2. Chuyển gen nhờ kỹ thuật xung điện

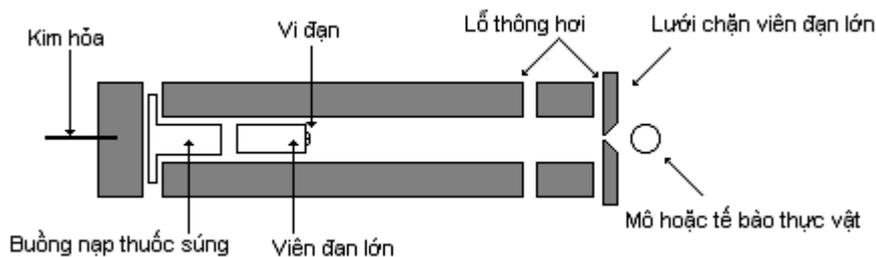
Sử dụng để chuyển gen vào tế bào trần, ở một điện thế cao trong thời gian ngắn có thể tạo nên các lỗ trên màng tế bào trần làm cho DNA bên ngoài có thể xâm nhập vào bộ gen của tế bào. Tiến hành:

- Chuẩn bị huyền phù tế bào trần với các plasmid tái tổ hợp mang gen mong muốn;
- Dùng thiết bị điện xung tạo điện thế cao 200-600V/cm trong thời gian 4-5 phần nghìn giây, được thực hiện trong các cuvet chuyên dụng hoặc các “buồng xung điện”;
- Nuôi tế bào trần trong môi trường thích hợp để tách các tế bào trần đã nhận được DNA;
- Nuôi cấy tái sinh và tiếp tục chọn lọc.

2.2.3.2. Chuyển gen bằng súng bắn gen

Nguyên tắc chung là sử dụng các viên đạn có kích thước nhỏ nhưng có tỷ trọng cao để đạt được gia tốc cao dưới tác dụng của một lực nén chúng có thể xuyên qua vỏ và màng tế bào đưa DNA từ ngoài vào tế bào và tiếp cận với bộ gen của tế bào.

Sử dụng hạt tungsten hoặc vàng có đường kính 1-1,5 μ m làm các hạt vi đạn. Đạn được bọc một lớp plasmid tái tổ hợp mang gen cần chuyển.



Hình 4.10 Súng bắn gen

2.3. Ứng dụng của kỹ thuật chuyển gen vào thực vật

2.3.1. Cải thiện giống cây trồng

Bước phát triển đầu tiên của các thực vật chuyển gen là tạo cây trồng thích nghi với các điều kiện khí hậu địa phương, kháng sâu bệnh, năng suất cao, mùi vị, màu sắc hấp dẫn, đáp ứng nhu cầu dinh dưỡng và vệ sinh, thuận lợi cho bảo quản lâu.

Nhiều thực vật được dùng làm cây cảnh nên việc thay đổi màu sắc của chúng rất được quan tâm. Nhiều gen tạo sắc tố cho hoa đã được tạo dòng và đang được nghiên cứu cho việc biểu hiện ở thực vật.

Bảng 4.3 - Một số loại cây chuyển gen phổ biến hiện nay

Sản phẩm	Đặc điểm
Cải dầu	Chống chịu chất diệt cỏ
Cải dầu	Hàm lượng oleic acid cao
Cải dầu	Hàm lượng laurat cao
Bắp	Chống chịu chất diệt cỏ
Bắp	Kháng côn trùng
Bông	Chống chịu chất diệt cỏ
Bông	Kháng côn trùng
Đu đủ	Kháng virus
Khoai tây	Kháng côn trùng
Khoai tây	Kháng virus
Đậu tương	Chống chịu chất diệt cỏ
Đậu tương	Hàm lượng oleic acid cao
Bí	Kháng virus
Cà chua	Chín chậm

2.3.2. Biến đổi chất lượng thực phẩm ở cây trồng

Đây là bước phát triển thứ hai của thực vật chuyển gen và đã thành công trong việc nâng cao chất lượng thực phẩm, tăng hàm lượng acid amin có giá trị (lysine, methionine, cysteine), tăng lượng vitamin, độ ngọt, chất bột...

Thực vật sản xuất vaccine đã thu được kết quả đầu tiên ở khoai tây, chuối, cà chua. Khi sử dụng các sản phẩm này con người sẽ khởi tiêm vào cơ thể loại vaccine nào đó, và một hướng phát triển mới hình thành là ăn trị bệnh, còn gọi là thực phẩm chức năng (dinh dưỡng dược).

Nhờ *Agrobacterium*, người ta đã chuyển gen quy định toàn bộ chuỗi sinh tổng hợp β -carotene (tiền chất vitamin A) vào lúa, giống lúa này có màu vàng nên được gọi là “lúa vàng”.

Tạo giống lúa cho hạt gạo giàu sắt dễ hấp thu do được chuyển các gen: gen mã hóa ferritin - protein trữ sắt hàm lượng cao từ đậu ve, gen mã hóa phytase và metallothionein - tăng khả năng hấp thu sắt từ nấm *Aspergillus fumigatus*.

Monellin là protein có trong một loại trái cây ở châu Phi, độ ngọt gấp 3000 lần so với đường ăn cùng khối lượng. Gen mã hóa monellin được biến đổi và chuyển gen thành công vào cà chua và rau xà lách.

2.3.3. Thực vật sản xuất các loại hóa chất đặc biệt

Đây là bước tiến thứ 3 của thực vật chuyển gen

- Dầu nhờn công nghiệp: thực vật bậc cao tạo ra hơn 200 loại acid béo và một số được dùng làm thực phẩm. Tuy nhiên một số loại dầu thực vật có giá trị công nghiệp cao hơn dầu ăn. Giống Cải dầu chuyển gen làm thay đổi thành phần acid béo để có nhiều ứng dụng rộng rãi hơn:

Bảng 4.2. - Ứng dụng của giống Cải dầu chuyển gen

Sản phẩm hạt	Ứng dụng thương mại
40% stearic acid	Bơ thực vật
40% lauric	Chất tẩy rửa
80% oleic	Thực phẩm, dầu bóng, mực in
40% myrystate	Chất tẩy rửa, xà phòng, mỹ phẩm
90% erucic	Polymer, mỹ phẩm, mực in được phẩm

2.3.4. 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.

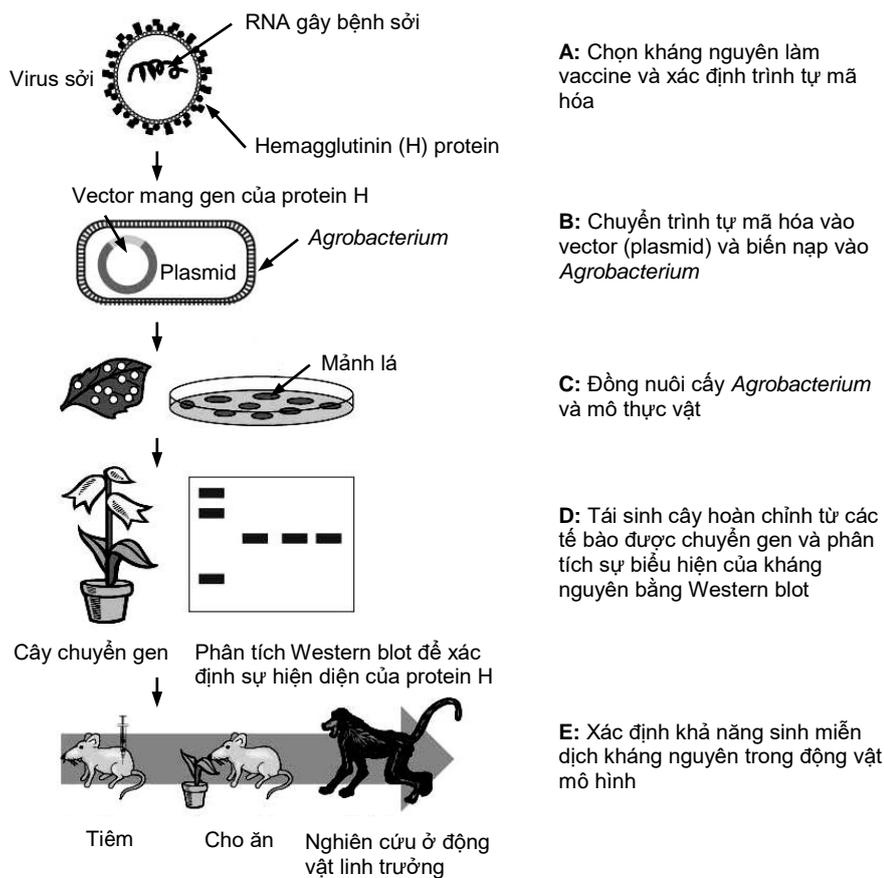
Vaccine thực phẩm là một mô hình lý tưởng cho các nước đang phát triển, vì nó giúp khắc phục được các khó khăn nói trên của vaccine được sản xuất theo phương pháp truyền thống hoặc DNA tái tổ hợp. Nguyên lý cơ bản của quá trình này là chuyển một loại gen đặc biệt vào tế bào thực vật. Loại gen này hoạt 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...



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.

3. Những bàn cãi về sinh vật chuyển gen (GMO)

3.1. Sinh vật biến đổi gen (GMO)

- **GMO: Genetically Modified Organism (Sinh vật biến đổi gen)**
- **GMF: Genetically Modified Food (Thực phẩm biến đổi gen)**
- **GMC: Genetically Modified Crop (Cây trồng biến đổi gen)**
- **LMO: Living Modified Organism (Sinh vật sống biến đổi gen)**
- GMO bao gồm động vật, thực vật, vi sinh vật, là sản phẩm của CNSH hiện đại được con người tạo ra nhờ sử dụng các kỹ thuật phân tử để đưa gen mới vào bộ gen của sinh vật nhận.
- LMO: Là các GMO sống
- GMO qua chế biến sẽ trở thành GMF (Thực phẩm biến đổi gen)
- Thực vật biến đổi gen: thực vật được đưa gen mới vào bộ máy di truyền nhờ CNSH hiện đại.

So với vi sinh vật thì thực vật biến đổi gen ít được quan tâm về rủi ro hơn vì thực vật dễ được điều khiển và đánh giá. Tuy nhiên, một vấn đề được quan tâm đặc biệt thực vật chuyển gen có thể trở thành cỏ dại mà rất khó điều khiển. Mức độ quan tâm phụ thuộc vào bản chất của thực vật, gen cải biến và môi trường thực vật cải biến được đưa vào.

3.2. Những tranh luận về GMO

Tranh cãi về thực phẩm biến đổi gen được chấp nhận về việc sử dụng và các hàng hóa khác có nguồn gốc từ tree grow variable thay vì tree grow thông thường và khác ứng dụng của công nghệ gen trong sản xuất lương thực. Các tranh chấp nhận liên quan đến người dùng, nông dân, công ty công nghệ sinh học, cơ quan quản lý chính phủ, tổ chức phi chính phủ và nhà khoa học. Các lĩnh vực tranh cãi chính liên quan đến thực phẩm có thể biến đổi gen (thực phẩm có thể biến đổi hoặc thực phẩm có thể biến đổi gen) là sản phẩm thực hiện nên được dán nhãn hoặc không, trò chơi của các trò chơi chính cơ quan quản lý, bao phủ máy tính của nghiên cứu quản lý và công bố khoa học, tác động của gen biến đổi cây đối với sức khỏe và môi trường, ảnh hưởng đến khả năng kháng thuốc trừ sâu, tác động của các loại cây trồng đối với dân và vai trò của cây trồng trong công việc cung cấp thức ăn cho dân số thế giới. Ngoài ra, các sản phẩm có nguồn gốc từ sinh vật GMO đóng một vai trò trong công việc sản xuất etanol nhiên liệu và dược phẩm.

Các mối quan tâm có thể bao gồm các gen biến đổi công việc và không thay đổi gen thành nguồn cung cấp sản phẩm, tác động của GMO đối với môi trường, quản lý quy tắc tính toán và cố gắng kiểm tra nguồn cung cấp thực phẩm trong công ty sản xuất và bán GMO. Các nhóm vận động như Trung tâm An toàn Thực phẩm, Hiệp hội Người dùng Hữu cơ, Liên minh các nhà khoa học có quan tâm and Greenpeace nói rằng các rủi ro chưa được xác định và quản lý đầy đủ, và họ đã đặt câu hỏi về tính năng của người quản lý cơ sở.

Đánh giá toàn bộ các sản phẩm có thể thay đổi gen của các cơ quan quản lý bắt đầu bằng việc đánh giá các sản phẩm đó có vẻ cơ bản tương đương với các sản phẩm Sản phẩm

không thể thay đổi gen đã được coi là phù hợp để sử dụng hay không. Không có báo cáo nào về tác động xấu của sản phẩm biến đổi gen đối với người dân từ sản phẩm biến đổi gen.

Có sự đồng thuận của khoa học mà sản phẩm thực hiện có nguồn gốc từ cây trồng biến đổi gen không gây rủi ro lớn hơn cho sức khỏe người thực hiện thông thường, nhưng mỗi Thực hiện biến gen cần được thử nghiệm trên từng trường hợp cụ thể trước khi đưa vào sử dụng. Tuy nhiên, các thành viên của công ty chúng tôi, tôi ít có khả năng hơn các nhà khoa học nhận thức thực phẩm biến gen là an toàn, mặc dù mối quan hệ đang giảm nhanh chóng ở EU. Tình trạng pháp lý và quản lý của thực phẩm biến đổi gen thay đổi theo từng quốc gia, với một số quốc gia cấm hoặc hạn chế họ và những quốc gia khác cho phép chúng tôi với các quy định khác nhau.

B. CÂU HỎI VÀ BÀI TẬP THỰC HÀNH:

Câu 1. Anh/chị hãy trình bày về cơ sở khoa học và kỹ thuật của nuôi cấy mô tế bào thực vật?

Câu 2. Anh chị hãy trình bày ứng dụng của nuôi cấy mô tế bào thực vật?

Câu 3. Anh chị hãy trình bày phương pháp chuyển gen trực tiếp ở tế bào thực vật?

Câu 4. Anh chị hãy trình bày phương pháp chuyển gen gián tiếp ở tế bào thực vật?

Câu 5. Anh chị hãy trình bày ứng dụng của kỹ thuật chuyển gen ở thực vật?

C. GHI NHỚ:

- Cơ sở khoa học và kỹ thuật của nuôi cấy mô tế bào thực vật;
- Các ứng dụng của nuôi cấy mô tế bào thực vật;
- Phương pháp chuyển gen trực tiếp ở tế bào thực vật;
- Phương pháp chuyển gen trực tiếp ở tế bào thực vật;
- Các ứng dụng của kỹ thuật chuyển gen ở thực vật.

CHƯƠNG 5. CÔNG NGHỆ SINH HỌC TRONG BẢO VỆ THỰC VẬT

Giới thiệu:

Một trong những ứng dụng của Công nghệ sinh học trong Nông Nghiệp đó là tạo ra các chế phẩm sinh học để bảo vệ thực vật. Ước tính nhu cầu cho sản phẩm BVTV trên thị trường toàn cầu (BVTV truyền thống cũng như chế phẩm sinh học) sẽ thay đổi, tuy nhiên mọi người đều nhất trí rằng sản phẩm sinh học sẽ tăng từ khoảng 2% vào năm 2003 lên khoảng 8% (ước tính vượt mốc 82 tỉ USD) năm 2020 trên thị trường quốc tế. Hiện tại, tỉ trọng tăng trưởng hàng năm của các sản phẩm chế phẩm BVTV sinh học trong giai đoạn này ước tính khoảng hơn 12% cao hơn 7% so kết quả tỉ trọng tổng quan.

Mục tiêu:

- Trình bày được các ứng dụng công nghệ sinh học trong quản lý sâu hại, bệnh hại cây trồng, sản xuất phân vi sinh ;
- Nhận diện tầm quan trọng của công nghệ sinh học trong bảo vệ thực vật;

A. NỘI DUNG:

1. Ứng dụng công nghệ sinh học trong quản lý sâu hại cây trồng

1.1. Chế phẩm vi sinh vật

Hiện nay, xu hướng phát triển nền nông nghiệp hữu cơ với việc *tăng cường sử dụng chế phẩm sinh học*, phân bón hữu cơ trong canh tác cây trồng đang là xu hướng chung của Việt Nam nói riêng và cả thế giới. Theo đó, các loại thuốc trừ sâu hóa học truyền thống, do gây ảnh hưởng nghiêm trọng đến môi trường và hệ sinh thái, đặc biệt là gây tác động xấu đến sức khỏe con người nên đang *dần dần bị thay thế bởi các loại thuốc trừ sâu sinh học*. Theo đó, một ngành áp dụng khoa học sự sống vào đời sống sản xuất như Công nghệ sinh học càng khẳng định hơn vị thế quan trọng của mình trong sự phát triển kinh tế - xã hội.

Thuốc trừ sâu sinh học là những chế phẩm sinh học có thành phần hữu hiệu là các vi sinh vật, hoặc các chất có nguồn gốc từ vi sinh vật, thực vật, động vật để phòng trừ côn trùng hại cây trồng.

Thuốc trừ sâu sinh học trên thị trường hiện nay được chia thành hai nhóm chính là **thuốc trừ sâu nguồn gốc vi sinh** và **thuốc trừ sâu nguồn gốc thảo mộc**.

- **Nhóm thuốc trừ sâu vi sinh** bao gồm các chế phẩm chứa trực tiếp vi sinh vật thường ở dạng tiềm sinh là các bào tử hoặc nang, có thể chịu đựng lâu dài trong các điều kiện sống không thuận lợi; hoặc các chế phẩm chứa hoạt chất nguồn gốc từ vi sinh vật, thường là kháng sinh.

- **Thuốc trừ sâu thảo mộc** sử dụng các hoạt chất có sẵn trong cây cỏ hoặc dầu thực vật để diệt trừ sâu hại.

Ưu nhược điểm của thuốc trừ sâu bệnh sinh học

- Ưu điểm:

+ Thuốc trừ sâu sinh học giúp phòng trừ sâu bệnh hiệu quả, đặc biệt có thể **hạn chế tình trạng kháng thuốc của sâu hại** và tạo ra nông sản sạch, an toàn.

+ Các chế phẩm sinh học hầu như **không gây hại cho người và các sinh vật có ích** nên vẫn đảm bảo sự cân bằng sinh học trong tự nhiên, đồng thời ít để lại dư lượng độc trên nông sản và thời gian cách ly ngắn, do đó **an toàn với sức khỏe con người và môi trường**.

+ Quy trình sản xuất thuốc trừ sâu sinh học khá đơn giản, chi phí thấp, các nguyên liệu có sẵn, dễ tìm.

- Nhược điểm:

+ Thuốc trừ sâu sinh học thường có hiệu quả chậm hơn và yêu cầu bảo quản khắt khe hơn so với thuốc trừ sâu hóa học.

+ Giá thành thường cao hơn thuốc trừ sâu hóa học.

Tuy nhiên, để hướng đến nền nông nghiệp bền vững lâu dài, cần bỏ qua các lợi ích trước mắt, các nhược điểm này có thể được chấp nhận dễ dàng.

*** Nhóm thuốc trừ sâu nguồn gốc thảo mộc**

Hiện nay trên thị trường, có nhiều loại thuốc trừ sâu nguồn gốc thảo mộc, có thành phần chứa các loại hoạt chất như **azadirachtin** (cây neem), **matrine** (khổ sâm), **rotenone** (cây thuốc cá) và **pyrethrin** (cúc trừ sâu).

Các sản phẩm chế biến từ **cây neem (cây xoan, sấu đầu)** hiện nay đã được đưa vào ứng dụng rộng rãi trong công tác bảo vệ thực vật, có thể dùng nguyên liệu từ cả thân, lá và đặc biệt là hạt neem. Hoạt chất chính sử dụng cho mục đích diệt côn trùng có trong cây neem là **azadirachtin** với cơ chế tác động lên côn trùng: làm cho trứng của côn trùng không nở được, ấu trùng khi tiếp xúc với neem sẽ chán ăn, ức chế quá trình phát triển và gây loạn giới tính, con trưởng thành tiếp xúc sẽ bị mất khả năng giao phối, ức chế khả năng đẻ trứng. Neem có khả năng phòng trừ sâu hại hiệu quả trên nhiều loại cây trồng khác nhau: lúa, rau màu, cây công nghiệp, cây ăn trái, hoa kiểng.



Hình 5.1. Thuốc trừ sâu bọ Bio Neem chứa dầu neem của ROSAVA Việt Nam

* Nhóm thuốc trừ sâu từ vi khuẩn

Phổ biến nhất hiện nay là **thuốc trừ sâu từ chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* (Bt)**; là thuốc có tác động đường ruột; không có tác động tiếp xúc, xông hơi và nội hấp. *Bt* sản sinh protein độc tố, được hoạt hóa dưới tác động của môi trường kiềm trong ruột côn trùng, chọc thủng ruột giữa gây ra sự tổn thương làm chúng ngừng ăn và chết sau đó.

Thuốc trừ sâu *Bt* được khuyến cáo sử dụng phòng trừ một số loại sâu non bộ cánh vảy như sâu tơ hại rau họ thập tự, các loại sâu non khác hại bông, đậu nành, cây ăn quả, cây công nghiệp như sâu xanh bướm trắng, sâu khoang, sâu đo, sâu đục quả, sâu cuốn lá,...

Thuốc trừ sâu sinh học từ vi khuẩn *Bt* được coi là một loại thuốc chủ lực trong phương pháp quản lý dịch hại tổng hợp (IPM) và thực hành nông nghiệp tốt (GAP) ở nước ta.



Một số sản phẩm trừ sâu chứa *Bacillus thuringiensis*

* Nhóm thuốc trừ sâu từ vi nấm

Hiện nay, có 2 loại vi nấm thông dụng là ***Beauveria bassiana* (nấm trắng)** và ***Metarhium anisopliae* (nấm xanh)** được sử dụng cho mục đích diệt trừ côn trùng gây hại cây trồng. Chúng xâm nhập trực tiếp vào biểu bì côn trùng, tiết enzyme phá vỡ chitin và protein ở biểu bì, vào khoang cơ thể, sản sinh ra các chất chuyển hóa, làm sâu chết nhanh chóng.

- **Nấm *Beauveria bassiana*** hay ký sinh trên cơ thể sâu non bộ cánh vảy, dùng phòng trừ sâu đục thân lúa, ngô; sâu xanh da láng cà chua; bọ xít, rầy nâu lúa; sâu róm thông; châu chấu, rầy lưng trắng, sâu đo đay, nhện vàng, nhện đỏ, ...

- **Nấm *Metarhium anisopliae*** có khả năng ký sinh trên nhiều loài côn trùng gây hại thuộc bộ cánh vảy, cánh cứng, cánh phấn, ..., trừ rầy, bọ xít trên lúa và cây ăn quả đạt hiệu quả rất cao.



Hình 5.3. Một số chế phẩm sinh học phòng trừ sâu từ vi nấm

* Nhóm thuốc trừ sâu chứa kháng sinh từ xạ khuẩn

Một số loại kháng sinh như *Avermectin*, *Abamectin*, *Emamectin*, *Methylamine Avermectin*, *Spinosad* và *Spinetoram* được sản xuất chủ yếu từ xạ khuẩn *Streptomyces avermitilis* và *Saccharopolyspora spinosa*, có khả năng diệt trừ côn trùng thông qua tiếp xúc và vị độc, có thể nội hấp.

Tại Việt Nam hiện nay, sản xuất phổ biến hơn là **nhóm thuốc *Abamectin* và *Emamectin* từ *Streptomyces avermitilis***, phòng trừ được nhiều loài sâu miệng nhai, miệng chích hút thuộc các bộ cánh vảy, hai cánh, cánh đều (như sâu vẽ bùa, đục thân, quả,...) và nhện.

1.2. Cây trồng chuyển gen

1.2.1. Chuyển nạp gen Bt

- Lần đầu tiên người ta phân lập được Bt trên ruột côn trùng bị bệnh do vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* vào năm 1901-1915. Vi khuẩn này có khả năng tiết ra độc chất, giết chết côn trùng phá hoại mùa màng. Các chế phẩm Bt đã được sản xuất, áp dụng trên đồng ruộng vào năm 1929. Năm 1954 người ta mới phân lập được protein dạng tinh thể của Bt. Từ đó chế phẩm Bt với nhiều tên thương mại đã được phát triển trong thập niên 1960, áp dụng cho nông nghiệp và lâm nghiệp. Năm 1981, gen Bt lần đầu tiên được phân lập và được phân tích chuỗi mã. Sau đó những cây được chuyển nạp gen Bt được chính phủ Mỹ chấp thuận trồng khảo nghiệm trên đồng ruộng. Năm 1993, hội đồng an toàn quốc gia Philippines cho phép trồng cây lúa có gen Bt trong Phytotron của Viện lúa quốc tế. Năm 1995 chính phủ Mỹ công bố phóng thích các giống cây chuyển nạp gen Bt, cho ra sản xuất thương mại là: bắp, khoai tây, sau đó là bông (1996).

- Bt toxin là những protein, được mã hóa bởi các gen, giống như phần lớn các gen trong tự nhiên. Mỗi gen mã hóa mỗi Bt toxin, cho nên khi chuyển nạp gen vào cây, cây có thể sản xuất ra toxin này. Gen Bt được phân lập từ tế bào Bt, được cải biến một ít trước khi sử dụng cho cây trồng. Gen được đưa vào bằng các phương pháp chuyển gen, cây nguyên vẹn được tái sinh từ tế bào đã chuyển nạp gen. Những công việc sau đó là đảm bảo toxin này được sản xuất với số lượng mong muốn, sản xuất tại vị trí cần thiết của cây. Các Bt toxin rất chuyên tính, ví dụ cryI chỉ gây độc với côn trùng thuộc Lepidoptera, không gây độc với côn trùng khác, hoặc động vật khác như chim, lớp có vú,...

- Cây chuyển nạp gen Bt có ưu điểm nhiều hơn chế phẩm sinh học Bt trước đây dùng để phun lên cây, bởi vì nó khắc phục được các nhược điểm như thuốc không ổn định, không xâm nhập sâu vào mô cây, không lưu dẫn để tiếp xúc với côn trùng trong tất cả các bộ phận của cây, mức chuyên tính quá hẹp. Trong khi đó cây chuyển gen có khả năng thể hiện protein tinh thể. Toxin này được sản xuất liên tục, chống lại sự phân giải, có mặt ở các mô cần thiết. Riêng vấn đề chuyên tính hẹp ta có thể khắc phục bằng cách làm sao cho các gen điều khiển những protein chuyên tính khác nhau thể hiện cùng một lúc.

- Trên cây lúa, sâu đục thân có thể gây thiệt hại từ 10-30% năng suất. Theo phương pháp chọn giống cổ truyền, chúng ta chưa phát hiện những donor cho gen kháng thể có thể truyền lại đời con cháu, và tính chất di truyền tính kháng sâu đục thân rất phức tạp, chưa được biết rõ ràng. Năm 1996, Johnson và cộng sự đã ứng dụng chuyển nạp gen *cryIIIA* vào giống lúa indica. Công trình của Nayar và cộng sự (1997) cho thấy trên cây lúa india được chuyển nạp gen *cryIA* (b,c) diệt được sâu đục thân màu vàng. Giống lúa japonica Taipei 309 được Wu và cộng sự nghiên cứu chuyển gen *cryIA* (b) cũng có kết quả diệt được sâu đục thân màu vàng.

1.2.2. Chuyển nạp gen “GNA”

- Đối với côn trùng thuộc Homoptera như rầy nâu (*Nilaparvata lugens*), hoặc các loài rầy khác truyền bệnh virus cho cây trồng, người ta ghi nhận lectin có từ nguồn gốc thực vật gây độc đối với chúng (Powell và cs, 1993) và nhóm lectin GNA (*Galantus nivalis agglutinin*) có độc tính mạnh nhất. GNA có độc tính đối với côn trùng nhưng không gây độc tính đối với các loài động vật có vú. Trong cây lúa, người ta thấy nó có thể diệt rầy nâu và rầy xanh đuôi đen. Đối với rầy nâu, nó là một côn trùng gây hại nhất trên cây lúa ở Việt Nam. Khi nó hút nhựa cây lúa không những gây cháy mà còn truyền bệnh siêu vi trùng lúa cỏ, bệnh lùn xoắn lá. Nó được kiểm soát bằng chiến lược giống kháng và biện pháp phun thuốc hóa học, nhưng khả năng phát sinh loại hình sinh học mới của rầy nâu đã làm cho chiến lược này có mức ổn định thấp, nếu chúng ta không khéo léo quản lý chúng bằng dịch hại tổng hợp.

- Lợi dụng tính chất hút nhựa của loại côn trùng này, người ta tổng hợp gen GNA nhân tạo để chuyển nạp vào trong cây trồng. Côn trùng này có mức độ rất thấp trong phản ứng phân giải protein ở ruột, bởi vì chúng sử dụng aa tự do trong nhựa như một nguồn cung cấp chất đạm cho cơ thể sống. Trên cơ sở hạn chế khả năng tiêu hóa protein bởi chất ức chế “protease” người ta nghĩ ra một chiến lược nghiên cứu tạo ra cây chuyển gen có tính chất ức chế như vậy. Xét nghiệm sinh học cho thấy, sản phẩm lectin thực vật rất có hiệu quả đối với hiện tượng làm giảm sức sống, sự phát triển, sự đẻ trứng của rầy nâu (Powell và cs, 1993), của rầy mềm (Rahbe và cs, 1993; Sauvion và cs, 1996)

- Đối với cây khoai tây chuyển gen GNA (Gatehouse và cs, 1990; Birch và cs, 1999) thu được kết quả như sau

+ Lectin GNA ảnh hưởng làm giảm tuổi thọ và khả năng sinh dục của rầy mềm, đặc biệt trên con cái

+ Lectin của cây khoai tây chuyển gen được tìm thấy gắn ở tế bào màng ruột của rầy mềm

+ Sự thể hiện của gen điều khiển lectin diệt rầy mềm trên cây khoai tây chuyển gen có thể có hiệu quả ngược đối với thiên địch của rầy mềm thông qua chu trình biến giải thức ăn của nó.

- Chúng ta không thể sử dụng thuốc trừ sâu để phun trên hạt lúa mì vì sự lưu tồn của nó sẽ có hại cho người tiêu dùng, đồng thời nó có hiệu quả thấp do thời tiết của những vùng trồng

lúa mì. Hầu hết các loại thuốc dùng để kiểm soát rầy mềm rất độc cho các loài thiên địch trên đồng ruộng. Rầy mềm có khả năng bộc phát thành dịch hại trên lúa mì, gây thiệt hại khá lớn cho sản xuất. Hiệu quả của GNA đối với rầy mềm *Sitobion avenae* trên hạt cây lúa mì do Stoger và cs năm 1999 thực hiện. Và GNA đã được thể hiện trên lá lúa mì.

1.3. Nói chung, hầu hết các loài thực vật đều có thể chuyển được gen. Bảng 7.1 và Hình 7.3 giới thiệu một số loài cây trồng có giá trị kinh tế đã được chuyển gen thành công. Thông thường, hiệu quả chuyển gen khác nhau tùy thuộc vào từng loại cây trồng, và dĩ nhiên quá trình chuyển gen vẫn còn bị hạn chế ở nhiều loài. Dưới đây chỉ trình bày các kết quả chuyển gen thành công ở một giống cây trồng quan trọng.

1.3.1. Cây lúa

Kết quả tái sinh của cây lúa chuyển gen bằng xung điện hoặc PEG thông qua nuôi cấy protoplast được thông báo lần đầu tiên cách đây khoảng hơn 10 năm. Các nghiên cứu sau đó cũng đã sử dụng hai kỹ thuật này để chuyển gen vào protoplast và phục hồi các cây biến nạp hữu thụ. Tuy nhiên, hạn chế của hai phương pháp này là phải xây dựng phương thức tái sinh cây từ tế bào đơn. Mặc dù các phương thức này đang dùng cho một số giống lúa thuộc loài phụ japonica (chẳng hạn Taipei 309) nhưng hầu hết các giống japonica ưu tú cũng như phần lớn các giống indica đều khó tái sinh cây từ protoplast.

Bảng 5.1. Một số cây trồng chính đã được chuyển gen

Stt	Loài	Phương pháp chuyển gen	Thử nghiệm trên đồng ruộng
1	Chuối	Bắn gen/ <i>Agrobacterium</i>	-
2	Lúa mạch	Bắn gen	Kháng vi rus
3	Đậu tây	Bắn gen	-
4	Canola	Bắn gen/ <i>Agrobacterium</i>	Chống chịu chất diệt cỏ, điều khiển sự thụ phấn
5	Sắn	Bắn gen/ <i>Agrobacterium</i>	-
6	Ngô	Bắn gen/ <i>Agrobacterium</i>	Kháng côn trùng, chống chịu chất diệt cỏ
7	Bông	Bắn gen/ <i>Agrobacterium</i>	Kháng côn trùng, chống chịu chất diệt cỏ
8	Đu đủ	Bắn gen/ <i>Agrobacterium</i>	Kháng virus
9	Đậu phộng	Bắn gen/ <i>Agrobacterium</i>	Kháng virus
10	Bạch dương	Bắn gen/ <i>Agrobacterium</i>	Chống chịu chất diệt cỏ
11	Khoai tây	<i>Agrobacterium</i>	Kháng côn trùng, kháng virus, chống chịu chất diệt cỏ
12	Lúa	Bắn gen/ <i>Agrobacterium</i>	Chống chịu chất diệt cỏ
13	Đậu tương	Bắn gen/ <i>Agrobacterium</i>	Chống chịu chất diệt cỏ
14	Bí	Bắn gen/ <i>Agrobacterium</i>	Kháng virus
15	Củ cải đường	<i>Agrobacterium</i>	Chống chịu chất diệt cỏ

16	Mía	Bản gen	-
17	Hướng dương	Bản gen	-
18	Cà chua	<i>Agrobacterium</i>	Quả chín muộn, kháng virus
19	Lúa mì	Bản gen	-



Hình 5.4. Một số cây trồng chuyển gen. A: ngô kháng côn trùng. B: lúa mạch kháng virus. C: cà chua cho quả chín muộn . D: khoai tây chống chịu chất diệt cỏ.

Phương pháp bản gen cho phép thực hiện việc chuyển nạp hiệu quả ở lúa trong các kiểu gen độc lập, và hiện nay hơn 40 giống đã được chuyển gen thành công. Mẫu vật sử dụng là phôi non và các callus có nguồn gốc từ hạt trưởng thành. Kháng hygromycin B là gen chỉ thị chọn lọc thường được dùng cho lúa. Tần số chuyển gen có thể cao tới 50% (tính theo số cây chuyển gen có nguồn gốc độc lập/số mẫu được bản gen).

Gần đây, kỹ thuật chuyển gen ở lúa thông qua *Agrobacterium* cũng đã có những cải tiến quan trọng có hiệu quả tương đương với kỹ thuật bản gen.

1.3.2. Cây lúa mì

Phương pháp bắn gen cũng được sử dụng để chuyển gen ở lúa mì. DNA ngoại lai được bắn vào trong các vảy nhỏ (scutellum) của phôi non của hai giống mùa xuân và một giống mùa đông. Các callus chống chịu được chọn lọc bằng phosphinothricin hoặc các nhân tố ức chế trao đổi chất tương tự như basta, bialaphos hoặc glufosinate ammonium. Chọn lọc bằng các hợp chất như thế không hiệu quả lắm và kết quả là một số lớn cây thất thoát. Phân tích di truyền và phân tử đã xác nhận sự hợp nhất ổn định của các gen biến nạp. Nói chung, công nghệ di truyền lúa mì vẫn còn tập trung ở một hoặc hai giống đặc trưng có khả năng tái sinh cây nhanh, thích hợp với phương pháp bắn gen.

1.3.3. Cây lúa mạch

Wan và Lemaux (1994), đã tái sinh một số lượng lớn các cây lúa mạch chuyển gen độc lập, tự thụ phấn. Các phôi hợp tử non, các callus mới hình thành và các phôi có nguồn gốc từ tiểu bào tử hạt phấn đã được sử dụng để bắn gen với plasmid mang gen *bar* và *gusA* đơn độc hoặc phối hợp với plasmid khác mang gen protein vỏ của virus gây bệnh lùn vàng ở lúa mạch. Kiểm tra khả năng nảy mầm của phôi non để phân lập các cây biểu hiện hoạt tính *bar* bằng môi trường chứa bialaphos, mặc dù đây chưa phải là một chất chỉ thị tốt cho sự có mặt hoặc không của gen.

1.3.4. Cây đậu tương

Những cố gắng đầu tiên ở cây đậu tương chuyển gen tập trung ở việc tái sinh cây từ protoplast và nuôi cấy dịch huyền phù phát sinh phôi. Mặc dù có những thành công ban đầu, tiến triển của công việc này vẫn còn chậm và việc phục hồi các cây chuyển gen vẫn đang còn gặp nhiều khó khăn. Sau đó, công nghệ chuyển gen ở đậu tương đã có triển vọng hơn nhờ sự phát triển và tối ưu hóa của kỹ thuật bắn gen. Thực tế, đậu tương đã được dùng như một cây mô hình để phát triển kỹ thuật cho nhiều loài cây trồng khó áp dụng công nghệ di truyền.

Kết quả đầu tiên ở đậu tương là tái sinh thành công cây chuyển gen nhờ *Agrobacterium*. Phương thức này dựa vào sự phát sinh chồi từ lá mầm của giống Peking chọn lọc cho tính miễn cảm với *Agrobacterium*. Các mẫu lá mầm được xâm nhiễm với *Agrobacterium* mang plasmid kháng kanamycin và có hoạt tính *gusA*, hoặc kháng kanamycin và chống chịu glyphosate. Có thể chuyển gen hiệu quả vào protoplast đậu tương bằng các phương thức thông dụng nhưng rất khó tái sinh được cây.

Để chuyển gen vào các giống đậu tương khác nhau người ta đã phối hợp hai yếu tố: genotype đơn giản và phương thức tái sinh cây độc lập (dựa trên cơ sở sự tăng sinh của cụm chồi từ vùng chung quanh mô phân sinh của trụ phôi) với sự tăng gia tốc của vi đạn (particle) có phóng điện để phân phối DNA ngoại lai. Hàng trăm cây đậu tương có nguồn gốc độc lập đã thu được và kết quả chuyển nạp đã cho nhiều phenotype khác nhau. Nói chung, ở các dòng đậu tương chuyển gen có nhiều bản sao của các gen chuyển nạp (số bản sao khoảng từ 1-50 nhưng thường thay đổi từ 2-10). Phân tích DNA (Southern blot) ở thế hệ sau của các bản sao gen phức cho thấy tất cả các bản sao cùng tách rời, như thế mỗi các thể chuyển gen chỉ hiện diện một kết quả chuyển nạp độc lập và có thể sự tái tổ hợp thông nhất đã không xuất hiện thường xuyên.

1.3.5. Cây đậu tây

Cho đến nay, việc nghiên cứu chuyển gen ở *Phaseolus* thành công rất ít. Hai hướng được ứng dụng trong công nghệ di truyền ở đậu tây là kỹ thuật xâm nhiễm bằng *Agrobacterium* và bắn gen. Tuy nhiên, chỉ có kỹ thuật sau mới có khả năng tái sinh các cây chuyển nạp. Cây đậu tây chuyển gen biểu hiện các gen *gusA*, *bar* và protein vỏ của virus khảm màu vàng đã được tái sinh. Các cây chuyển gen này qua 5 thế hệ tự thụ phấn vẫn không mất các gen được biến nạp hoặc khả năng biểu hiện. Kỹ thuật bắn gen cũng được sử dụng để chuyển gen *gusA* được điều khiển bằng promoter concanavalin A, hoạt tính *gus* đã biểu hiện trong lá mầm và vỏ hạt của các cây chuyển gen

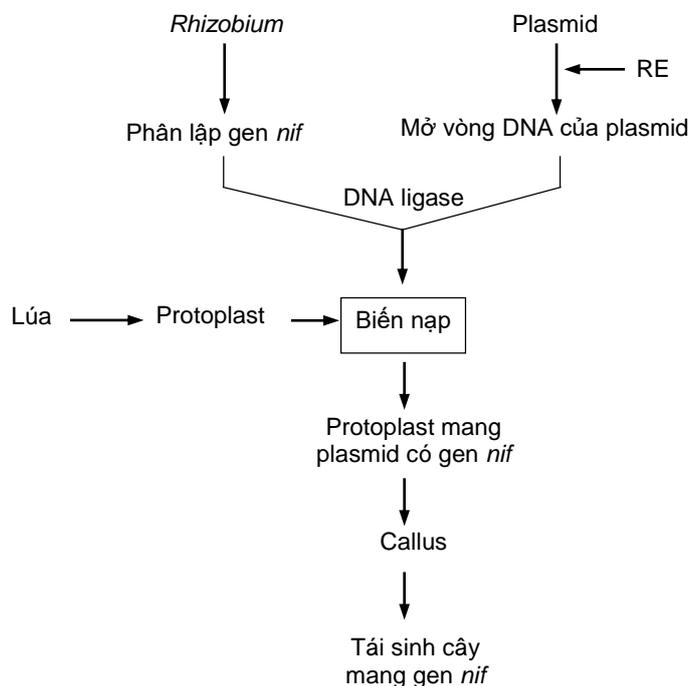
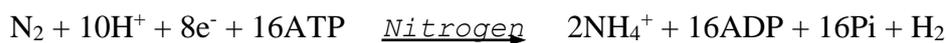
1.3.6. Cây bông

Phương thức chuyển gen gián tiếp thông qua *Agrobacterium tumefaciens* là kỹ thuật đầu tiên được sử dụng để đưa gen vào cây bông giống Coker 312 (Umbeck 1987). Cây bông chuyển gen cũng của giống trên đã được tái sinh sau khi bắn gen vào dịch huyền phù nuôi cấy phát sinh phôi (Finer và McMullen 1990). Hầu hết các giống bông có giá trị kinh tế khác không thể tái sinh cây từ giai đoạn callus. Một số ít các giống đó có thể tái sinh cây nhưng quá trình này thiên về biến dị dòng soma. Phương thức phân phối gen ngoại lai trực tiếp vào trong mô phân sinh của trụ phôi dựa trên công nghệ ACCELL cũng được phát triển và đã thu được cây chuyển gen.

1.3.7. Cố định đạm

Quá trình cố định đạm diễn ra ở rễ của các loài cây họ đậu nhờ một số loài vi khuẩn cộng sinh có khả năng hấp thụ nitrogen của không khí và tạo ra chất đạm cho cây. Vi khuẩn chính tham gia quá trình cố định đạm là *Rhizobium*. Sự có mặt của nó dẫn đến hình thành các nốt sần trên rễ cây nhiễm khuẩn. Các vi khuẩn sống trong nốt sần sẽ thực hiện quá trình cố định đạm. Phương trình tổng quát có dạng sau:

Để tăng mức độ cung cấp đạm tự nhiên cho cây trồng, người ta chọn giải pháp chuyển gen *nif* (nitrogen fixation-gen mã hóa enzyme nitrogenase) vào cơ thể thực vật và vi sinh vật sống tự do hoặc sống cộng sinh với thực vật (Hình 7.4). Vì trong tự nhiên, giữa các cơ thể vi sinh vật vẫn xảy ra sự trao đổi thông tin di truyền, như vậy về mặt kỹ thuật việc chuyển gen *nif* vào cơ thể vi sinh vật sẽ dễ dàng hơn. Vấn đề còn lại là làm thế nào để gen *nif* hoạt động sau khi được chuyển vào cơ thể vi sinh vật chủ. Tương tự, việc chuyển gen *nif* vào tế bào thực vật có thể được thực hiện thông qua viral vector hoặc vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*. Tuy nhiên, đây là một công việc khó khăn và có lẽ trong một tương lai gần vấn đề này vẫn chưa giải quyết được.



Hình 5.5. Mô hình biến nạp gen *nif*

2. Ứng dụng công nghệ sinh học trong quản lý bệnh hại cây trồng

2.1. Chế phẩm vi sinh

Chế phẩm sinh học Trichoderma thành phần có chứa nấm Trichoderma, bacillus, vitamin và các loại vi chất, đây là sản phẩm được Viện Nghiên cứu Sinh học Ứng dụng (VBio) nghiên cứu và sản xuất. Nấm Trichoderma là loại nấm đối kháng có khả năng tấn công, ký sinh và ức chế nhiều loại nấm bệnh cây trồng. Ngoài ra, nó có tác dụng cao trong việc thúc đẩy quá trình phân huỷ chất hữu cơ, giúp đất tơi xốp và giữ được độ phì của đất.

Trichoderma có khả năng đối kháng được với nấm bệnh nhờ vào nhiều "hoạt động" khác nhau, chúng có thể sử dụng:

- **Cạnh tranh dinh dưỡng:** Trichoderma sử dụng cùng một nguồn tài nguyên (dinh dưỡng, không gian sống) với các sinh vật gây bệnh nhưng Trichoderma "xâm chiếm" môi trường trước khi tác nhân không mong muốn đến.

- **Kháng sinh:** chúng tạo ra chất có hoạt tính tương tự như "thuốc kháng sinh" có tác dụng kiềm hãm sự tăng trưởng của tác nhân gây bệnh.

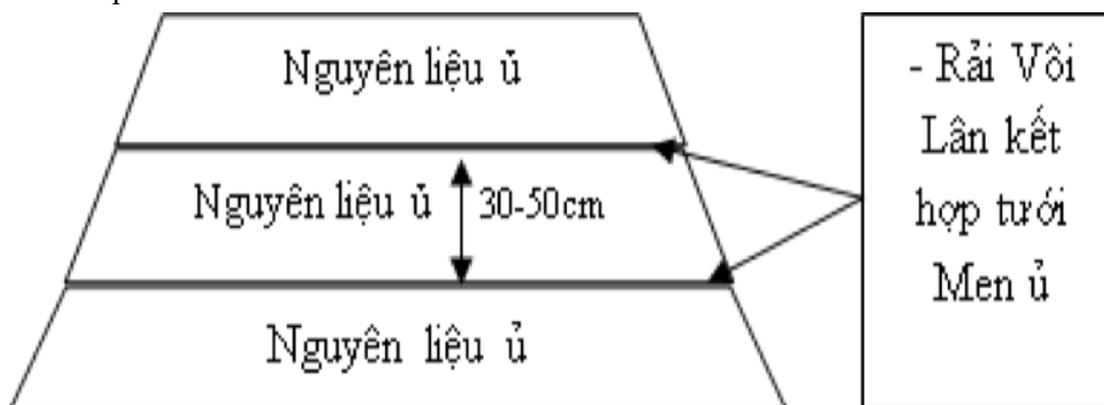
- **Ký sinh:** tức giết chết các loài gây bệnh bằng cách xâm nhập vào bên trong loài nấm gây hại và/hoặc tiết ra những chất (enzyme) để phân huỷ chúng

QUY TRÌNH Ủ XÁC BÃ THỰC VẬT VỚI CHẾ PHẨM TRICHODERMA, RÚT NGẮN THỜI GIAN Ủ, PHÂN HUỶ ĐỒNG Ủ NHANH, MANG LẠI HIỆU QUẢ CAO NHẤT.

* Quy trình ủ như sau :

- Quy trình ủ xác bã thực vật với chế phẩm Trichoderma, rút ngắn thời gian ủ, phân huỷ đồng

ủ nhanh, mang lại hiệu quả cao nhất
Sơ đồ ủ phân bón



Hình 5.6. Quy trình ủ xác bã thực vật với chế phẩm Trichoderma

Bước 1. Nguyên liệu và Phụ gia

- Chuẩn bị nguyên liệu 1 tấn nguyên liệu (3-4m³):Vỏ cà, bã mía, sắn,phân chuồng, bánh dầu...

- Chế phẩm ủ và phụ gia: KFT Trichoderma, Vôi, Đường, Ure, Lân

Bước 2:Trộn phụ gia và ủ nguyên liệu

- Pha chế phẩm ủ: KFT Trichoderma (1kg)+ đường (2kg) +Ure (1kg), hòa vào phuy nước, ngâm trong thời gian từ 6-10 tiếng trước khi cho vào đồng ủ.(Tùy vào ẩm độ của nguyên liệu ủ mà pha men ủ với lượng nước thích hợp). , hoặc dùng loại KFT Trichoderma (1kg) dạng rải để rải trực tiếp

- Ủ nguyên liệu:

+ Rãi từng lớp nguyên liệu dày 30-40 cm,

+Rãi 1 lớp vôi + lân

+ Sau đó tưới chế phẩm Trichoderma đã pha, hoặc dùng Trichoderma dạng rải trực tiếp lên đồng ủ, tiến hành tưới nước để đảm bảo độ ẩm đạt từ 45-60% (có thể thử độ ẩm bằng cách lấy tay nắm chặt nguyên liệu ủ nếu thấy rỉ nước ra kẽ tay là được)

- Tiếp tục rải nguyên liệu lớp thứ 2 dày 20-30 cm, rải lân vôi và chế phẩm như trên, đến khi chiều cao đồng ủ đạt 1,5-2m

+ Dùng bạt tú kín đồng ủ để giữ ẩm và nhiệt cho đồng ủ, không nên nén chặt đồng

Bước 3: Kiểm tra đồng ủ

- Sau khi ủ từ 5-7 ngày kiểm tra đồng ủ, nếu thấy đồng ủ khô thì bổ sung nước để duy trì độ ẩm, nếu độ ẩm cao quá tiến hành đảo trộn để thoáng khí và thoát hơi nhanh.

+ Nếu nhiệt độ cao khoảng 60-70^oc, là đảm bảo

+ Kiểm tra độ ẩm lấy tay nắm chặt nguyên liệu ủ nếu thấy rỉ nước ra kẽ tay là được, nếu khô quá tiến hành tưới nước thêm,

- Sau khoảng thời gian 20 ngày (tùy nguyên liệu) tiến hành đảo nguyên liệu: mục đích cung cấp không khí cho vi sinh hoạt động, và đảo nguyên liệu từ ngoài vào trong cho hoại mục đều

+ Khi đảo đồng có thể bổ sung thêm rỉ mật hoặc đường cát cùng với Chế phẩm

Trichoderma. Nên đảo trộn đồng ủ ít nhất 1 lần trong quá trình ủ

- Trước khi bón 7 ngày tiến hành đảo đồng ủ, và bổ sung thêm chế phẩm

Trichoderma để phòng nấm bệnh. sau đó tiến hành bón cho cây trồng.



Hình 5.7. Chế phẩm Trichoderma

– Lưu ý:

- + Nguyên liệu là phân heo hàm lượng đạm cao, nhưng lượng muối cũng chiếm tỷ lệ lớn, cần chú ý ủ hoai mục và bón với liều lượng cân đối cho cây
- + Ủ xong không nên để quá lâu mới đem bón, vì để lâu lượng phân sẽ mất dần chất dinh dưỡng
- + Nếu kiểm tra từ 20-30 ngày mà chưa có hiện tượng phân hủy, kiểm tra lại độ ẩm
- + Đống ủ không đảm bảo nhiệt độ, độ nóng: nguyên nhân có thể do đống ủ quá nhỏ, hoặc thiếu đạm, và vi sinh phân giải. Cần tạo đống ủ đủ lớn, cung cấp đủ đạm và men ủ.

2.2. Cây trồng chuyển gen

2.2.1. Chuyển nạp gen “Chitinase”

- Thực vật phản ứng với sự xâm nhập của Pathogen gây bệnh hại bằng cách tạo ra một protein mới trong cơ thể tự bảo vệ. Đó là nhóm protein được gọi là protein PR (pathogenesis-related protein). Nhóm protein PR của thuốc lá được ghi nhận là PR-1, PR-2 (β -1,3 glucunase), PR-3 (chitinase), PR-4, PR-5 (thaumatine-like protein) và PR-6 (chất ức chế protease). Chitinase được nghiên cứu khá sâu. Chitinase được tìm thấy trong nhiều loại thực vật khác, chúng thể hiện như chất điều hòa hormon và sự tăng trưởng. Chitinase có nhiệm vụ phân giải β -1-4 của N-acetyl-D-glucosamine polymer, nó có thể đóng vai trò bảo vệ cây chống lại sự tấn công của nấm gây bệnh.

- Người ta đã ghi nhận sự thể hiện chitinase trong cây thuốc lá chuyển nạp gen, với kết quả làm tăng khả năng sống sót của thuốc lá trên đất có nguồn bệnh, làm giảm sự phát triển của bệnh trên thuốc lá (Broglie và cs, 1991).

- Bệnh đốm vằn trên cây lúa do nấm *Rhizoctonia solani* gây ra là một bệnh chưa có giống kháng tuyệt đối. Người ta đã nghiên cứu ứng dụng việc chuyển nạp gen chitinase vào cây lúa để kiểm soát bệnh này (Lin và cs, 1995). Cây con lai từ những cây có chitinase đã được thanh lọc bệnh đốm vằn cho thấy mức độ kháng bệnh tương quan với mức độ thể hiện gen chitinase ở cây lúa.

- Các dòng dưa leo chuyển gen có tính chống chịu cao với bệnh do nấm *Botrytis cinera* gây ra được công bố là CR29, CR32, CR33 (Tabei và cs, 1998).

2.2.2. Chuyển nạp gen “*Xa-21*”

- Bệnh bạc lá do vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* là một trong những bệnh nguy hại đối với sản xuất lúa gạo. Một gen trội kiểm soát tính kháng bệnh bạc lá đã được tìm thấy trên loài lúa hoang ở châu phi *Oryza longistaminata*, được ký hiệu là *Xa-21*, có phổ kháng rất rộng đối với nhiều họ hàng của vi khuẩn gây bệnh bạc lá, do vậy nó thể hiện tính kháng ổn định hơn so với các gen khác đã được phân lập trước.

- Tu và cs năm 1998, đã sử dụng phương pháp chuyển gen *Xa-21* vào giống lúa indica IR72 và đã thành công.

2.2.3. Chuyển nạp gen “*coat protein*”

- Tính kháng virus của “*coat protein*” (CP) để được đề cập rất sớm, từ đó khái niệm này đã đưa vào chiến lược nghiên cứu cây chuyển gen có CP. Thành tựu của phương pháp này đã cho ra nhiều mức độ kết quả khác nhau. Báo cáo đầu tiên về gen CP áp dụng vào trường hợp cây thuốc lá và cà chua, kháng bệnh khảm thuốc là (Nelson và cs, 1988; Ngon và cs, 1993), người ta đã thực hiện thành công trên nhiều cây trồng khác.

- Sivamani và cs năm 1999 nghiên cứu chuyển gen CP vào cây lúa để kiểm soát tính kháng bệnh siêu vi khuẩn gây bệnh tungro dạng cầu (RTSV) – làm cho cây lúa bị vằn lụi và chết.

2.3. Chọn dòng biến dị soma

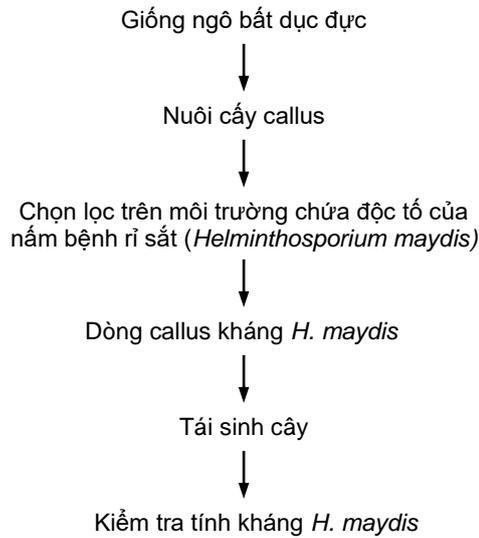
Người ta có thể tiến hành xử lý và chọn lọc tế bào thực vật ở ba mức độ chính: callus, tế bào đơn (single cell) và protoplast. Mục đích chọn lọc *in vitro* có thể khái quát ở những điểm sau:

- Chọn dòng tế bào chống chịu các điều kiện bất lợi của ngoại cảnh, ví dụ: chống chịu nóng-lạnh, phèn-mặn, khô hạn...

- Chọn dòng tế bào kháng các độc tố: độc tố do nấm bệnh tiết ra (Hình 7.2), các loại kháng sinh...

- Chọn dòng tế bào sản xuất dư thừa (overproduction) các loại sản phẩm chủ yếu là amino acid...

- Chọn dòng tế bào mang các đặc điểm chỉ thị để nghiên cứu di truyền (genetic markers)...



Hình 5.8. Sơ đồ chọn dòng kháng *Helminthosporium maydis* ở ngô

Hiện tượng biến dị di truyền xuất hiện ở các tế bào không phân hóa (undifferentiation), các protoplast phân lập, các callus và các mô nuôi cấy *in vitro*. Nuôi cấy mô và tế bào thực vật có khả năng tạo biến dị di truyền tương đối nhanh và không cần phải ứng dụng các kỹ thuật phức tạp khác. Biến dị di truyền trong nuôi cấy mô biểu hiện ở sự thay đổi tính trạng của các cây tái sinh và sau đó truyền sang thế hệ sau bằng phương thức nhân giống hữu tính (ví dụ rau diếp, thuốc lá) hoặc dinh dưỡng (ví dụ mía, khoai tây).

Các biến dị chọn lọc được trong nuôi cấy mô có nhiều cách gọi khác nhau như: dòng callus (calliclones-từ nuôi cấy callus) hoặc dòng protoplast (protoclones-từ nuôi cấy protoplast). Tuy nhiên, thuật ngữ biến dị dòng soma (somaclonal variation) được sử dụng phổ biến nhất, hoặc biến dị dòng giao tử (gametoclonal variation) để chỉ các dòng bị biến đổi di truyền phát triển từ các tế bào giao tử hoặc thể giao tử. Sự đa dạng của biến dị ở các dòng soma làm nổi bật một thực tế rằng biến dị dòng soma là một công cụ rất hữu hiệu cho việc cải thiện di truyền cây trồng.

3. Ứng dụng công nghệ sinh học trong sản xuất phân vi sinh

3.1. Sử dụng vi khuẩn *Azotobacter* làm phân bón hữu cơ vi sinh

3.1.1. Vi sinh vật cố định nitơ phân tử

Trong khí quyển của hành tinh chúng ta có đến 4 triệu tỷ tấn N_2 phân tử nhưng các sinh vật không sử dụng được nguồn nitơ này, chỉ có một số vi sinh vật mới có thể hấp thụ được. Qua hoạt động sống của vi sinh vật, N_2 phân tử sẽ chuyển thành dạng hợp chất hoặc nitơ vô cơ thành nitơ hữu cơ (các acid amin, protein), quá trình này được gọi là sự cố định nitơ phân tử.

Nhiều loài vi sinh vật có khả năng cố định nitơ phân tử. Chúng bao gồm 3 nhóm chính: nhóm vi khuẩn cố định nitơ cộng sinh, nhóm vi khuẩn cố định nitơ sống tự do và nhóm vi tảo cố định nitơ. Ngày nay người ta đã biết tới 40 loài tảo lam (vi khuẩn lam) có khả năng cố định nitơ, 1 ha lúa nước có tảo lam có thể cố định được 30 - 35 kg N trong một năm.

3.1.1.1. Vi khuẩn cố định N_2 sống tự do: thuộc họ *Azotobacteraceae*, *Bacillaceae*, *Enterobacteriaceae*.

- *Azotobacter*

Azotobacter là vi khuẩn sống tự do, hô hấp hiếu khí, không có bào tử. Tế bào hình trứng, thường sinh chất nhầy ngoại bào. Chúng sinh trưởng nhanh, catalase (+), thích hợp pH trung tính hoặc kiềm yếu. Khi nuôi cấy *Azotobacter* trong môi trường nhân tạo, chúng biểu hiện đặc tính đa hình: khi còn non chúng có dạng trực khuẩn hình que, có tiên mao, có khả năng năng di động. Khi già, *Azotobacter* có khả năng di động, tế bào chuyển thành dạng hình cầu, xung quanh được bao bọc bởi một lớp nhầy. Một số loại *Azotobacter* có khả năng hình thành nang xác vỡ, tế bào lại sinh trưởng, phát triển. Nang xác là một hình thức tồn tại của *Azotobacter*, nó không phải là bào tử. Một nang xác có thể bao bọc một số tế bào bên trong. Khuẩn lạc của *Azotobacter* lúc non còn có màu trắng đục. Khi già chuyển thành màu lục hoặc màu nâu.

Trong đất, nhất là đất lúa, thường có phổ biến những loài *Azotobacter* sau:

+ *Azotobacter beUerincbii*: không có khả năng di động, có khả năng hình thành nang xác. Khuẩn lạc lúc già có màu vàng hoặc màu nâu sáng, sắc tố không khuếch tán vào môi trường.

+ *Azotobacter chroococcum*: có khả năng di động lúc còn non, khi già có khả năng hình thành nang xác. Khuẩn lạc lúc già có sắc tố màu nâu hoặc màu đen, không khuếch tán vào môi trường.

+ *Azotobacter uinelandii*: có khả năng di động và hình thành nang xác. Khuẩn lạc màu huỳnh quang, sắc tố khuếch tán vào môi trường.

+ *Azotobacter agillis*: có khả năng di động, không tạo thành nang xác, khuẩn lạc màu vàng lục huỳnh quang, sắc tố khuếch tán vào môi trường.

Azotobacter có khả năng đồng hóa nhiều loại đường khác nhau, nhất là các sản phẩm phân giải của xenlulose. Bởi vậy, đất có bón phân xanh, rơm rạ, rác rưởi rất tốt cho sự phát triển của *Azotobacter*. Sự phát triển và khả năng cố định nitơ của *Azotobacter* phụ thuộc rất nhiều vào hàm lượng phospho dễ tiêu trong môi trường. Ngoài ra, canxi và các nguyên tố vi lượng như B, Mo, Fe, Mn cũng rất cần thiết đối với *Azotobacter*. Một vài nguyên tố phóng xạ có tác dụng kích thích sinh trưởng đối với *Azotobacter*.

Azotobacter thích hợp nhất với pH = 7,2 - 8,2, song chúng có thể phát triển được pH = 4,5 - 9,0. Chúng thích hợp với nhiệt độ 25 - 30°C.

Azotobacter đã được nghiên cứu để chế tạo phân vi sinh vật bón cho lúa, ở một số nơi chúng thể hiện hiệu quả tốt nhưng không phổ biến bằng phân vi khuẩn nốt sần nitragin. Chế phẩm chế tạo từ *Azotobacter* được gọi là azotobacterin.

- *Clostridium*

Clostridium được phát hiện từ năm 1893, là một loài vi khuẩn kỵ khí sống tự do trong đất. Khác với *Azotobacter*, nó có khả năng hình thành bào tử. Loài phổ biến nhất trong đất là *Clostridium pasteurianum* có hình con thoi do bào tử hình thành lớn hơn kích thước tế bào.

Clostridium có khả năng đồng hóa nhiều nguồn cacbon khác nhau như các loại đường, rượu, tinh bột,... Nó thuộc loại kỵ khí nên các sản phẩm trao đổi chất của nó thường là các loại axit hữu cơ, butanol, etanol, axeton,... Đó là các sản phẩm chưa được oxy hóa hoàn toàn. P, K là 2 nguyên tố rất cần thiết cho sự phát triển và cố định nitơ của *Clostridium*.

Ngoài ra, các nguyên tố vi lượng như Mo, Co, Cu, Mn cũng rất cần thiết đối với *Clostridium*. *Clostridium* có khả năng phát triển ở pH = 4,7 - 8,5. Bào tử của chúng có thể chịu được nhiệt độ cao, có thể sống được 1 giờ ở nhiệt độ 80°C. Một số loài còn có thể chịu được nhiệt độ 100°C trong 30 phút.

Ngoài những giống vi sinh vật cố định nitơ phân tử nói trên, còn vô số những giống khác đều có khả năng cố định nitơ phân tử, chúng có nhiều ý nghĩa trong sản xuất nông, lâm, ngư nghiệp.

3.1.1.2. Vi khuẩn cố định N₂ sống cộng sinh

- *Vi khuẩn nốt sần họ đậu*: được phân lập từ rễ cây họ đậu và có tên là *Rhizobium*. Khi cố định trong nốt sần cây họ đậu, các vi khuẩn *Rhizobium* hấp thụ nitơ không khí để cung cấp nitơ vô cơ cho cây và cây đậu cung cấp cho chúng nguồn glucid.

Trong quá trình nuôi cấy, vi khuẩn nốt sần thường có sự thay đổi hình thái. Lúc còn non, đa số các loài có hình que, có khả năng di động bằng đơn mao, chùm mao hoặc chu mao tùy từng loài. Sau đó trở thành dạng giả khuẩn thể (bacteroid) có hình que phân nhánh, mất khả năng di động. Ở dạng này, vi khuẩn nốt sần phình to có hình côn, hình chùy, hình chữ X, V,... và có khả năng cố định nitơ. Khi già, dạng hình que phân nhánh phân cắt tạo thành dạng hình cầu nhỏ.

Vi khuẩn nốt sần thuộc loại hiếu khí, ưa pH trung tính hoặc hơi kiềm, thích hợp với nhiệt độ 28 - 30°C, độ ẩm 60 - 80%. Chúng có khả năng đồng hóa các nguồn cacbon khác nhau như các loại đường đơn, đường kép, axit hữu cơ, glycerin,... Đối với nguồn nitơ, khi cộng sinh với cây đậu, vi khuẩn nốt sần có khả năng sử dụng nitơ không khí. Khi sống tiềm sinh trong đất hoặc được nuôi cấy trên môi trường, chúng mất khả năng cố định nitơ. Lúc đó, chúng đồng hóa các nguồn nitơ sẵn có, nhất là các nguồn amôn và nitrat, Chúng có thể đồng hóa tốt các loại axit amin, một số có thể đồng hóa pepton. Ngoài nguồn dinh dưỡng cacbon và nitơ, vi khuẩn nốt sần còn cần các loại chất khoáng, trong đó quan trọng nhất là phospho. Khi nuôi vi khuẩn nốt sần ở môi trường có sẵn đạm lâu ngày, chúng sẽ mất khả năng xâm nhiễm và hình thành nốt sần. Đó là điều cần chú ý trong việc giữ giống vi khuẩn nốt sần.

Sự hình thành nốt sần và quan hệ cộng sinh của vi khuẩn nốt sần với cây bộ Đậu:

Quan hệ cộng sinh giữa vi khuẩn nốt sần và cây bộ Đậu tạo thành một thể sinh lý hoàn chỉnh. Chỉ trong quan hệ cộng sinh này, chúng mới có khả năng sử dụng nitơ của không khí. Khi tách ra, cả cây đậu và vi khuẩn đều không thể sử dụng nitơ tự do, không phải tất cả các cây thuộc bộ Đậu đều có khả năng cộng sinh với vi khuẩn nốt sần mà chỉ khoảng 9% trong chúng.

Khả năng hình thành nốt sần ở cây đậu không những phụ thuộc vào vi khuẩn có trong đất mà còn phụ thuộc vào các điều kiện ngoại cảnh khác nhau. Ví dụ về độ ẩm, chúng thích ứng với độ ẩm từ 40 - 80%, trong đó độ ẩm tối thích là 60 - 70%. Tuy nhiên, cũng có những trường hợp ngoại lệ, ví dụ như cây điền thanh có thể hình thành nốt sần trong điều kiện ngập nước. Độ thoáng khí của đất cũng ảnh hưởng đến sự hình thành và chất lượng nốt sần. Thông thường, nốt sần chỉ hình thành ở phần rễ nông, phần rễ sâu rất ít nốt sần. Nguyên nhân là do tính hiếu khí của vi khuẩn nốt sần, thiếu oxy sẽ làm giảm cường độ trao đổi năng lượng và khả năng xâm nhập vào rễ cây. Đối với cây, thiếu oxy cũng làm giảm sự hình thành sắc tố leghemoglobin. Những nốt sần hữu hiệu có màu hồng chính là màu của sắc tố này.

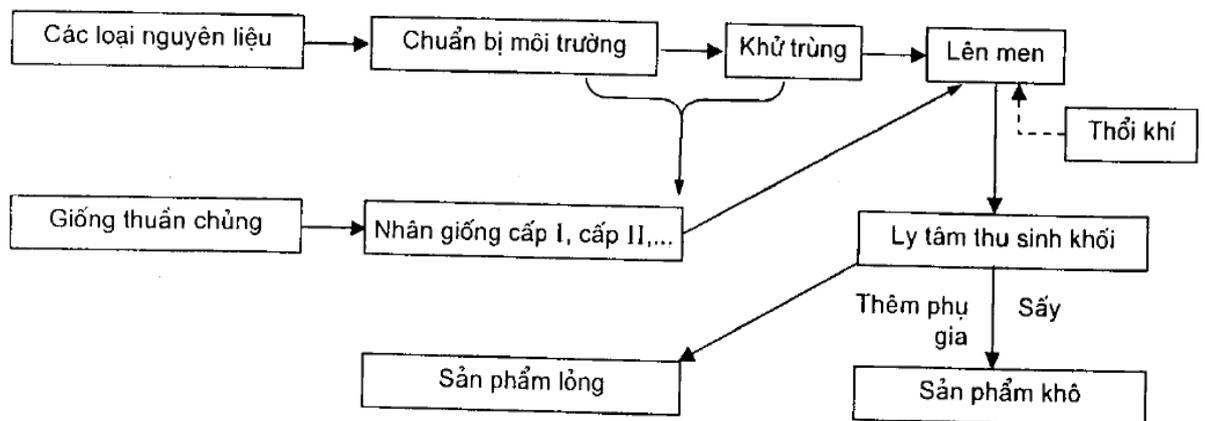
Nhiệt độ thích hợp nhất với hoạt động của vi khuẩn nốt sần là 24°C, dưới 10°C nốt sần vẫn có thể hình thành nhưng hiệu quả cố định nitơ giảm. Ở nhiệt độ 36°C, cây đậu phát triển

tốt nhưng cường độ cố định nitơ lại kém. pH môi trường cũng ảnh hưởng đến sự hình thành và chất lượng nốt sần. Có loại chỉ hình thành nốt sần ở pH = 6,8 - 7,4 có loại có khả năng hình thành nốt sần ở pH rộng hơn, từ 4,6 - 7. Tính đặc hiệu là một đặc điểm quan trọng trong quan hệ cộng sinh với một hoặc vài loài vi khuẩn nốt sần chỉ có khả năng cộng sinh với một hoặc vài loài đậu. Cũng có một số loại vi khuẩn có khả năng hình thành nốt sần ở cây đậu không đặc hiệu với nó nhưng số lượng nốt sần ít và có khả năng cố định nitơ kém. Tuy nhiên, đặc tính này giúp cho vi khuẩn nốt sần có thể tồn tại ở những nơi không có cây đậu đặc hiệu đối với nó. Tính đặc hiệu giữa vi khuẩn và cây đậu được quyết định bởi hệ gen của chúng. Bởi vậy, người ta có thể cải biến tính đặc hiệu bằng các tác nhân đột biến, hoặc có thể dùng kỹ thuật di truyền để cải biến hệ gen quy định tính đặc hiệu cộng sinh.

Vi khuẩn lam: *Anabaena asollae* cộng sinh trong bèo hoa dâu. Toàn bộ lượng nitơ trong protein của bèo là được cố định từ không khí nhờ các vi khuẩn lam sống cộng sinh này.

3.1.2. Sản xuất phân vi sinh vật cố định nitơ

3.1.2.1. Quy trình sản xuất



Hình 5.9. Phân vi sinh cố định nitơ

3.1.2.2. Giống sản xuất

Là giống thuần chủng được phân lập và tuyển chọn từ nguồn tự nhiên, giữ giống trong thạch nghiêng ở điều kiện lạnh trong phòng thí nghiệm. Trước khi sử dụng được cấy chuyển qua ống có môi trường thạch để hoạt hóa giống, sau đó nhân giống trước khi đưa vào lên men. Có thể nhân giống cấp I, cấp II, để đảm bảo tiếp chuyển giống có thể gấp 5 - 10 lần qua mỗi lần,

Yêu cầu nhân giống: dịch giống không tạp nhiễm, mật độ từ vài trăm triệu đến hàng tỷ tế bào/ml, thường kết thúc nhân giống ở mỗi cấp tại thời điểm sinh khối phát triển chậm dần khi sắp sửa vào pha cân bằng.

Môi trường nhân giống vi sinh vật cố định Nitơ tự do

Saccarozơ (có thể thay bằng mannit)	15	15 (manitol)	20 (manitol)
K_2HPO_4	0,2	0,5	0,2
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2	0,2	0,2
$CaCl_2$	0,02	$CaSO_4 - 0,1$	$K_2SO_4 - 0,1$
$FeCl_3$ (pha thành dung dịch 10%)	0,05	$NaCl - 0,2$	$NaCl - 0,2$
Muối molipden	Vết	$CaCO_3 - 5,0$	$CaCO_3 - 5$
Nước cho đủ	1 lít	Nước đủ 1 lít	Nước đủ 1 lít
pH	7,2	pH 8,3	pH 8,3

Tùy thuộc vào giống thuần chủng hiếu khí hoặc kỵ khí ta sẽ quyết định nuôi cấy chúng theo phương pháp lên men bề mặt hoặc lên men chìm. Nuôi cấy bề mặt đối với vi khuẩn trên môi trường rắn (hay bán rắn, xốp) đòi hỏi độ ẩm 70 - 80% là khó thông khí (hiếu khí kém) và vi khuẩn không có hệ sợi cơ chất như vi nấm nên rất khó phát triển. Nuôi cấy chìm cần nuôi ở thùng lên men sục khí trong điều kiện vô trùng, nhân giống cấp I có thể thực hiện trong bình tam giác và được đặt trên máy lắc.

3.1.2.3. Lên men

Lên men trong trường hợp này là nuôi cấy mở rộng vi khuẩn để thu sinh khối chế tạo chế phẩm vi sinh cố định nitơ. Môi trường lên men thường chú trọng nguồn cacbon và nitơ. Nguồn C là các loại đường hoặc manitol hay glyxerol. Nguồn N là nước chiết đậu, nấm men hay dịch thủy phân từ cây hoặc hạt đậu, thêm các nguồn muối khoáng cần thiết.

Nuôi cấy các giống thuần chủng cố định nitơ thường dùng phương pháp lên men chìm. Quá trình lên men cần kiểm soát nhiệt độ, pH, Oxi hòa tan. Đây là quá trình lên men một pha sinh trưởng. Kết thúc lên men khi sinh trưởng đạt ở đầu pha cân bằng, sau đó ly tâm để nhận sinh khối. Lên men công nghiệp ở các bể lên men tới hàng chục mét khối hoặc lớn hơn.

Sinh khối thu được đem trộn với chất mang (thạch cao, đất sét không nghiền nhỏ, đất phù sa khô, nhỏ, hoặc diatomit, than bùn khô,...) và các chất phụ gia, đem sấy khô với nhiệt độ không khí nóng không quá 45°C để đảm bảo các tế bào vi khuẩn sống (qua sấy có thể bị chết một tỷ lệ tế bào nào đó. Mục đích càng giảm tỷ lệ này càng tốt).

Chế phẩm có thể sử dụng ở dạng lỏng, nhưng phải đóng gói kỹ và giữ vệ sinh, hoặc có thêm chất bảo quản. Chế phẩm dạng lỏng thường không giữ được lâu và cần được giữ ở điều kiện lạnh.

Các chế phẩm vi khuẩn cố định nitơ có nhiều tên gọi khác nhau: Azotobacterin, Rhizobin, Rizogin, Flavobacterin, Nitragin, Niterobacterin, phổ biến hơn cả là Azotobacterin, Nitragim.

* Azotobacterin

Azotobacterin là chế phẩm phân bón làm từ vi khuẩn *Azotobacter* sống tự do trong đất và trong vùng rễ của các cây ngũ cốc (lúa, ngô, mạch, cao lương, kê,...), cây mía, hướng dương. Ở vùng rễ của các cây này có rất nhiều vi sinh vật. Chúng ta thấy có các loài thuộc gốc *Azotobacter* và *Azospirillum*. Chúng có khả năng cố định đạm (N.) của không khí nhờ hệ enzym của bản thân xúc tác quá trình chuyển nitơ từ khí quyển thành những hợp chất cho cây có thể tiêu hóa được, cũng như tạo ra các chất kích thích sinh trưởng thực vật và tăng cường cho cây hấp thu các chất dinh dưỡng khác.

Một số chủng thuộc loài *Azotobacter chroococcum* có hoạt tính cố định nitơ cao và được dùng sản xuất *Azotobacterin*. Đây là những chủng vi khuẩn không sinh bào tử, hiếu khí. Tế bào trong thời kỳ phân chia thường kéo dài ra hoặc có hình ovan. Kích thước tế bào là 2 - 5 µm. Khi già, xung quanh tế bào tạo thành màng nhầy. Hoạt lực cố định nitơ của chúng được tăng lên khi môi trường có mặt molipden (Mo). Do vậy, môi trường nuôi cấy vi khuẩn cần phải bổ sung kim loại này với tư cách là nguyên tố vi lượng cần thiết.

Nuôi ở nhiệt độ thích hợp là 25 - 27°C trên máy lắc và kết thúc khi sinh khối đạt được ở mức phát triển ổn định. Tách bỏ dịch nuôi cấy bằng ly tâm để thu sinh khối. Sinh khối thu được đem trộn với đất hoặc than bùn đã xử lý, thanh trùng. Cách xử lý đất và than bùn như sau: chọn đất nhiều mùn, có thể là đất phù sa. Than bùn cần phải qua phân hủy sơ bộ bằng axit

clohydric rồi trung hòa đưa về trung tính. Nghiền nhỏ những phần thô hoặc tạp chất lớn cần phải loại bỏ qua sàng. Sau đó đất hoặc than bùn được bổ sung 1 - 2% vôi bột hoặc CaCO_3 và 0,1% supephosphat, trộn đều, chia vào các chai hoặc bình nửa lít nút bằng nút bông. Đất hoặc than bùn ở trong bình cần được làm ẩm tới 40 - 60%, đem hấp thanh trùng. Sinh khối được chế thành dịch huyền phù rồi lấy pipet vô trùng hút chuyển vào đất hoặc than bùn đã vô trùng ở trong bình. Mỗi bình tam giác 500 ml, chỉ cần cho vài giọt giống, lắc đều và nuôi tiếp ở tủ ấm.

Giống vi khuẩn có thể nuôi trên môi trường thạch với thành phần dinh dưỡng như đã giới thiệu ở trên. Nhiệt độ nuôi là 20 - 27°C với thời gian là 3 - 5 ngày đến khi trên mặt thạch phủ đều một lớp khối nhầy.

Dùng nước vô trùng để rửa cạo thu sinh khối thành dịch huyền phù giống. Lấy huyền phù giống bằng pipet vô trùng nhỏ vào đất hoặc than bùn vô trùng trong các bình tam giác. Lắc đều và để ở tủ ấm với nhiệt độ thích hợp cho vi khuẩn tiếp tục phát triển. Sau khi nuôi cấy, mỗi gam chế phẩm không ít hơn 50 triệu tế bào. Thời gian bảo quản để sử dụng vào khoảng 2 - 3 tháng. Sử dụng chế phẩm cho vào đất canh tác hoặc xử lý hạt giống bằng cách ngâm hạt với dịch nước hòa với chế phẩm. Bón cho cây theo liều sử dụng là 3 - 6 kg cho 1 ha gieo trồng.

Azotobacterin thích hợp cho các loại cây ngũ cốc cho hạt, có thể tăng sản lượng được 9 - 18 %. Ngoài ra, còn thấy hiệu quả cho cây cà chua, củ cải đường, hoặc củ cải làm thức ăn chăn nuôi, khoai tây.

3.1.3. Phân lân vi sinh (Phân lân sinh học)

Phân lân vi sinh hay phân lân sinh học là chế phẩm các vi sinh vật có khả năng phân giải các hợp chất phospho khó tan thành dạng dễ tan và cây trồng có thể đồng hóa được

3.1.3. Vi sinh vật phân giải lân

3.1.3.1. Nhóm vi sinh vật phân giải lân hữu cơ

Các hợp chất phospho hữu cơ có trong cơ thể động vật, thực vật như phytin, phospholipit, axit nucleic. Trong không bào của tế bào còn thấy dạng vô cơ là orthophosphat làm nhiệm vụ đệm và chất dự trữ. Cây trồng không thể trực tiếp đồng hóa được hợp chất phospho hữu cơ. Các vi sinh vật có thể chuyển hóa các hợp chất hữu cơ này thành các dạng muối phosphat của H_3PO_4 .

Trong số các vi sinh vật phân giải P hữu cơ ta thấy có các loài thuộc giống *Bacillus* (*B. megatherium*, *B. subtilis*, *B. malaberensis*). *B. megatherium* có khả năng phân hủy hợp chất P hữu cơ và cô vơ. Ngoài ra, còn thấy các chủng vi khuẩn thuộc giống *Serratia*, *Proteus*, *Athrobacter*, các chủng nấm thuộc giống *Aspergillus*, *Penicillium*, *Zhizopus*, *Cunninghamella* và xạ khuẩn *Streptomyces*.

3.1.3.2. Nhóm vi sinh vật phân giải lân vô cơ

Hợp chất phospho vô cơ (thường gọi là lân vô cơ) thường ở các dạng khoáng như apatit, phosphat sắt, phosphat nhôm. Đây là các hợp chất khó tan và cây trồng không thể đồng hóa trực tiếp được. Để cây trồng sử dụng trực tiếp được, cần phải biến chúng thành dạng dễ tan trong nước.

Nhiều công trình nghiên cứu đã xác định nhiều chủng thuộc các giống vi sinh vật có khả năng phân giải lân vô cơ:

- Vi khuẩn: *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Aerobacter*, *Breuibacterium*, *Micrococcus*,...

- Nấm: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Zhizopus*, *Sclerotium*,...

- Xạ khuẩn: *Streptomyces*.

3.1.4. Sản xuất các chế phẩm làm phân lân vi sinh

3.1.4.1. Phân lập và tuyển chọn chủng vi sinh vật phân giải lân

Nguồn vi sinh vật thường là mẫu đất lấy ở nơi có nhiều chất hữu cơ hoặc vùng rễ cây trồng. Theo phương pháp dịch huyền phù, mẫu được pha loãng cấy vào môi trường thạch vô trùng trong các hộp Petri, sau 6 - 7 ngày, chọn các khuẩn lạc riêng biệt. Trong môi trường phân lập chủng vi sinh phân hủy lân hữu cơ, người ta thường dùng leucine hoặc axit nucleic làm chất cảm ứng. Trường hợp không có leucine và acid nucleic ta có thể dùng lòng đỏ trứng gà (sau khi luộc chín, lấy lòng đỏ nghiền nhỏ, dùng rượu và acetone kết tủa, cuối cùng dùng rượu hòa tan).

Môi trường phân lập vi sinh vật phân giải lân hữu cơ

Lơxitin	0,05	MgSO ₄	0,3
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,3	FeSO ₄	Vết
CaCO ₃	5,0	Glucosơ	10,0
NaCl	0,3	Thạch	15 - 18,0
MnSO ₄	Vết	Nước cho đủ	1 lít

Nuôi các hộp Petri có môi trường đã cấy dịch huyền phù mẫu đất ở 28 - 30°C trong 3 - 4 ngày thấy xuất hiện các khuẩn lạc màu trắng đục hình tròn, có mép nhẵn. Soi tế bào dưới kính hiển vi, nếu thấy tế bào hình que hai đầu hơi tròn, đứng riêng rẽ hoặc kết chuỗi. Đó có thể là vi khuẩn phân giải lân hữu cơ và đây cũng có thể thuộc giống *Bacillus megatherium*.

Môi trường phân lập vi sinh vật phân giải lân vô cơ (có thể dùng môi trường phía trên)

Saccarozơ	10,0	MnSO ₄	0,03
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5	Fe ₂ (SO ₄) ₃ .7H ₂ O	0,03
NaCl	0,3	Ca ₃ (PO ₄) ₂	10,0
KCl	0,3	Thạch	20,0
MgSO ₄	0,3	Nước cho đủ	1 lít

Môi trường sau khi thanh trùng phân vào các hộp Petri, cấy dịch huyền phù mẫu thử trang đều, nuôi ở 28 - 30°C. Sau 5 - 7 ngày xem khuẩn lạc và tế bào. Nếu xung quanh khuẩn lạc có vòng phân giải trong suốt thì đó là chúng ta cần tìm.

Để kiểm tra, nhỏ dung dịch amoni molipdat (NH₄)₆Mo₇O₂₄.2H₂O vào vòng phân giải, nếu có lân dễ tan sẽ kết hợp với amoni molipdat thành phosphomolipdat có kết tủa màu vàng.

3.14.2. Quá trình lên men theo phương pháp nuôi cấy chìm

Sinh khối thu được có thể thêm chất mang và sấy khô thành chế phẩm vi khuẩn phân giải lân. Chế phẩm phân giải lân hữu cơ làm phân lân vi sinh điển hình là phosphobacterin. Phosphobacterin là chế phẩm phân bón được chế từ vi khuẩn *Bacillus megatherium*. Vi khuẩn hình que nhỏ, kích thước tế bào là (1,8 - 2) x (2,5 - 6) μm. Chúng hiếu khí, tạo thành bào tử và có khả năng kháng hóa rất hữu hiệu các hợp chất phospho hữu cơ, như nucleotide, acid nucleotide, leucine, phytine,... và cung cấp cho cây những hợp chất phospho có thể tiêu hóa được.

Giống thuần chủng có hoạt tính cao phân hủy các hợp chất phospho hữu cơ được nhân giống trên môi trường rỉ đường có thêm cao ngô và muối khoáng trong bình lắc hoặc bình nuôi có sục khí. Lên men trong bình có khuấy và sục khí đến giai đoạn tế bào vi khuẩn sinh bào tử.

Thu sinh khối qua ly tâm, thêm phụ gia rồi sấy khô bằng sấy thăng hoa hoặc sấy phun. Chế phẩm thu được có độ ẩm là 2 - 3%. Mỗi gam chế phẩm cần có ít nhất 200 triệu tế bào sống.

Chế phẩm vi sinh phân giải lân có thể được sản xuất từ nấm mốc. Để có chế phẩm nấm mốc làm phân lân vi sinh, người ta có thể nuôi giống sản xuất theo phương pháp bề mặt trên môi trường xốp đến khi nấm sinh bào tử già thì đem sấy khô ở dưới 40°C, sau đó trộn với chất mang.

3.2. Sử dụng một số chủng vi sinh vật phân hủy xác bã thực vật làm phân bón hữu cơ

3.2.1. Nguyên lý sử dụng vi sinh vật trong xử lý xác bã thực vật

Xử lý rác thải bằng công nghệ vi sinh vật là nhờ hoạt động sống của vi sinh vật phân hủy rác thải thành các thành phần nhỏ hơn, hình thành sinh khối vi sinh vật cao hơn, các sản phẩm trao đổi chất của vi sinh vật và các loại khí như CO₂, CH₄,... Các quá trình chuyển hóa này có thể xảy ra ở điều kiện hiếu khí hay kỵ khí.

Việc lựa chọn các vi sinh vật xử lý rác thải cần dựa trên những nguyên tắc sau:

- Các chủng vi sinh vật phải có hoạt tính sinh học cao như khả năng sinh phức hệ enzyme cellulase cao và ổn định.
- Sinh trưởng và phát triển tốt trong điều kiện thực tế của đồng ủ.
- Có tác dụng cải tạo đất và có lợi cho thực vật khi sản xuất được phân ủ bón vào đất.
- Không độc cho người, cây trồng, động vật và vi sinh vật hữu ích trong đất.
- Nuôi cấy dễ dàng, sinh trưởng tốt trên môi trường tự nhiên, thuận lợi cho quá trình xử lý.

Phân loại rác thải:

- Phân loại dựa vào đặc tính tự nhiên như: các chất hữu cơ, vô cơ, chất có thể cháy hoặc không có khả năng cháy.

Rác thải có thể phân loại bằng nhiều cách khác nhau:

- Phân loại dựa vào nguồn gốc phát sinh như: rác thải sinh hoạt, văn phòng, thương mại, công nghiệp, đường phố, chất thải trong quá trình xây dựng hay đập phá nhà xưởng.

3.2.2. Thành phần của rác thải hữu cơ

Các chất hữu cơ trong rác thải là các phần của thực vật, động vật bị loại bỏ, chúng có chứa các thành phần như trong cơ thể sinh vật, trong đó quan trọng nhất là: hydratcacbon, protein, lipit.

Các Hydratcacbon: chiếm tỷ trọng lớn nhất trong sinh khối động vật, thực vật, vi sinh vật.

Chúng tương đối phức tạp và khó phân hủy. Trong rác thải thường gặp các loại như: cellulose, hemicellulose, lignin, tinh bột, pectin.

Protein là hợp chất hữu cơ cao phân tử chứa nitơ, thường chứa 15%-17,5% nitơ, là thành phần quan trọng trong cơ thể động vật, thực vật, vi sinh vật.

Lipit: lipit và các chất sáp có nhiều trong cơ thể sinh vật.

3.3.3. Các vi sinh vật phân giải các chất hữu cơ

** Các vi sinh vật phân giải cellulose*

Các nhóm vi khuẩn và xạ khuẩn: Trong thiên nhiên có nhiều nhóm vi sinh vật có khả năng phân hủy cellulose nhờ có hệ enzym cellulose ngoại bào nhưng chủ yếu là các chi thuộc nhóm vi khuẩn hiếu khí, vi khuẩn kỵ khí và các xạ khuẩn hiếu khí. Các vi sinh vật hiếu khí có khả năng phân giải cellulose thuộc về các chi: Arzotobacter, Achromobacter, Pseudomonas,

Cellulomonas, Vibrio, Cellvibrio, Bacillus, Cytophaga, Angiococcus, Polyangium, Sorangium,...(vi khuẩn hiếu khí); Micromonospora, Proactinomyces, Actinomyces, Streptomyces,...(xạ khuẩn). Nhưng trong thực tế, trong nghiên cứu người ta thấy chi Bacillus, Fravobacterium và Pseudomonas là các chi phân lập được có tần suất cao nhất. Một số vi khuẩn kỵ khí tham gia vào quá trình phân giải cellulose, điển hình là các vi khuẩn trong dạ cỏ của động vật nhai lại: Ruminococcus flavefeciens, R. albus, R. parvum, Bacteroides succinigenes, Butyrivibrio fibrisolvens, Clostridium cellobioparum, Cillobacterium cellulosolvens,...

Các nhóm vi nấm: Vi nấm là nhóm có khả năng phân giải mạnh vì nó tiết ra môi trường một lượng lớn enzym có đầy đủ các thành phần.

- Nấm mốc phát triển mạnh ở môi trường xốp có độ ẩm trên 70%, tối ưu 95% và nhiệt độ ẩm (24C), các loại thường gặp thuộc nấm bất toàn và Ascomysetes. Các loại nấm này chủ yếu thuộc các chi Aspergillus, Penicillium, Trichoderma, Fusarium,...trong đó đáng chú ý là Trichoderma (hầu hết các loài thuộc chi Tricoderma sống hoại sinh trong đất, rác và có khả năng phân huỷ cellulose).

- Nấm đốm là các loại nấm phát triển sâu trong tế bào gỗ tạo thành các đốm màu nâu. Hầu hết các loài thuộc nhóm nấm bất toàn và nấm Ascomysetes. Sống phụ thuộc vào độ ẩm của gỗ (khoảng 30%) và nhiệt độ 30-35C, quần thể nấm phát triển lúc đầu là màu xanh sau đó tạo thành màu nâu. Ví dụ các loài: Ceratocystis sp, Cladosporium sp, Aureobasidium sp,...

- Nấm mục: Nấm mục xốp có khoảng 300 loài thuộc các chi: *Chaetomium*, *Humocola* và *Phialophora* của nấm bất toàn và *Ascomysetes*, chủ yếu phát triển bên trong thành tế bào gỗ. Nấm mục nâu thuộc nhóm của nấm bất toàn và *Basidiomycetes*, chúng xâm nhập vào thành tế bào gỗ và phân huỷ chúng, nhiệt độ sinh trưởng tối ưu 22-31C, độ ẩm thấp khoảng 40-55%, các loài quan trọng như: *Phaeolus schweinitzi*, *Piptopous betulinus*, *Laetipous sulphureus*, *Sperassis srispa*,... Nấm mục trắng thuộc nhóm của nấm bất toàn và *Basidiomycetes*, nhiệt độ sinh trưởng tối ưu 22-31C, tối đa không quá 44C, độ ẩm tối ưu có loài thấp, cao và rất cao, các loài điển hình như: *Armillaria mellea*, *Fonus fomentatus*, *Meripilus giganteus*, *Fomes annosus*,... Vi khuẩn có khả năng phân huỷ cellulose, tuy nhiên cường độ không mạnh bằng vi nấm. Nguyên nhân là do số lượng enzym tiết ra môi trường của vi khuẩn thường ít hơn, thành phần các loại enzym không đầy đủ. Thường ở trong đồng ủ rác có ít loài vi khuẩn có khả năng tiết ra đầy đủ bốn loại enzym trong hệ enzym cellulose. Nhóm này tiết ra một loại enzym, nhóm khác tiết ra loại khác, chúng phối hợp với nhau để phân giải cơ chất trong mối quan hệ hỗ sinh.

* Các vi sinh vật phân giải protein

Trong môi trường rác ủ đồng, nitơ tồn tại ở các dạng khác nhau, từ nitơ phân giải ở dạng khí cho đến các hợp chất hữu cơ phức tạp có trong cơ thể động, thực vật và con người. Trong cơ thể sinh vật, nitơ tồn tại chủ yếu dưới dạng các hợp chất đạm như protein, axit amin. Khi cơ thể sinh vật chết đi, lượng nitơ hữu cơ này tồn tại trong đất (rác).

Nhóm vi khuẩn chính phân giải protein là vi khuẩn nitrat hoá, vi khuẩn nitrit hóa vi khuẩn cố định nitơ.

Nhóm vi khuẩn nitrit hoá bao gồm bốn chi khác nhau: *Nitrozomonas*, *Nitrozocystic*, *Nitrozolobus* và *Nitrosospira*, chúng đều thuộc loại tự dưỡng bắt buộc, không có khả năng sống trên môi trường thạch.

Nhóm vi khuẩn nitrat hoá tiến hành oxi hoá NO_2^- thành NO_3^- bao gồm ba chi khác nhau: *Nitrobacter*, *Nitrospira* và *Nitrococcus*.

Nhóm vi khuẩn cố định nitơ có trong môi trường rác ủ là các nhóm: *Azotobacter* – là một loại vi khuẩn hiếu khí, không sinh bào tử, có khả năng cố định nitơ phân tử, sống tự do trong đất (rác); *Clostridium* – là một loại vi khuẩn kỵ khí sống tự do trong rác, có khả năng hình thành bào tử, loài phổ biến nhất là *Clostridium pastenisiium* có hình que ngắn. *Clostridium* có khả năng đồng hoá nhiều nguồn cacbon khác nhau như các loại đường, rượu, tinh bột ...

*** Vi sinh vật phân giải tinh bột**

Trong rác bủ ủ có nhiều loại vi sinh vật có khả năng phân giải tinh bột. Một số vi sinh vật có khả năng tiết ra môi trường đầy đủ các loại enzym trong hệ enzym amilaza. Ví dụ như một số vi nấm bao gồm một số loại trong các chi *Aspergillus*, , *Rhizopus*. Trong nhóm vi khuẩn có một số loài thuộc chi *Bacillus*, *Cytophaza*, *Pseudomonas* ... Xạ khuẩn cũng có một số các chi *Aspergillus*, *Fusarium*, *Rhizopus*,... có khả năng phân huỷ tinh bột. Đa số các vi sinh vật không có khả năng tiết đầy đủ hệ enzym amilaza phân huỷ tinh bột. Chúng chỉ có thể tiết ra môi trường một hoặc một vài men trong hệ đó. Ví dụ như các loài *Apergillus candidus*, *Pasteurianum*, *Bacillus subtilis*, *B. Mesenterices*, *Clostridium*, *A. Oryzae* ... chỉ có khả năng tiết ra môi trường một loại enzym amilaza. Các loài *Aspergillus oryzae*, *Clostrinium acetobuliticum* chỉ tiết ra môi trường enzyme amiolaza. Một số loài khác chỉ có khả năng tiết ra môi trường enzym gluco amilaza. Các nhóm này cộng tác với nhau trong quá trình phân huỷ tinh bột thành đường. Trong chế biến rác thải hữu cơ người ta cũng sử dụng những chủng vi sinh vật có khả năng phân huỷ tinh bột để phân huỷ tinh bột có trong thành phần rác hữu cơ.

*** Vi sinh vật phân giải phosphat**

Trong rác thải, phospho tồn tại ở nhiều dạng hợp chất khác nhau. Phospho được tích lũy trong rác khi động thực vật chết đi, những hợp chất phospho hữu cơ này được vi sinh vật phân giải tạo thành các hợp chất phospho vô cơ.

Vi khuẩn phân giải phospho hữu cơ chủ yếu thuộc hai chi: *Bacillus* và *Pseudomonas*. Các loài có khả năng phân giải mạnh là *B. Megatherium*, *B. Mycoides*, *B. butyricus*, *B. mycoides* và *Pseudomonas sp*, *Pseudomonas radiobacter*, *P. gracilis*.

Ngày nay, người ta đã phát hiện ra một số xạ khuẩn và vi nấm cũng có khả năng phân giải phospho hữu cơ. Trong nhóm vi nấm thì *Aspergillus niger* có khả năng phân giải mạnh nhất. Ngoài ra một số xạ khuẩn cũng có khả năng phân giải lân vô cơ.

CHƯƠNG 6. MARKER PHÂN TỬ DNA VÀ ỨNG DỤNG TRONG CHỌN GIỐNG CÂY TRỒNG

Giới thiệu:

Một trong ứng dụng của Công nghệ sinh học trong Nông nghiệp là sử dụng DNA marker để chọn giống cây trồng. DNA marker là một đoạn DNA liên kết với 1 gen nhất định trong hệ gen của sinh vật. Nhờ nó chúng ta có thể chọn những giống cây trồng mang đặc điểm mong muốn. Trong chương này học sinh được biết đến các loại DNA marker: RFLP marker, RADP marker, SSCP marker và AFLP marker.

Mục tiêu:

- Trình bày được đặc điểm chung của DNA marker;
- Trình bày được các loại DNA marker: RFLP marker, RADP marker, SSCP marker và AFLP marker.

Phân tích được ưu điểm và nhược điểm của từng loại DNA marker.

A. NỘI DUNG:

1. Các loại DNA marker

- DNA marker là những marker phân tử được tạo ra nhờ kỹ thuật phân cắt DNA bằng những enzyme cắt giới hạn. Khi sáng tạo ra những đoạn DNA mới, người ta đã cố gắng tìm kiếm một sự liên kết giữa marker và gen định vị trên NST nào đó. Về căn bản, bất cứ chuỗi mã DNA nào được dùng để phân biệt giữa hai các thể, hai dòng hoặc giống nhau khác nhau, đều có thể được xem như là một DNA marker.

- Những lợi ích của DNA markers so với marker hình thái và isozyme marker là:

- + đo lường trực tiếp các vật liệu di truyền
- + có nhiều markers trong quần thể
- + đo lường không chi phối ảnh hưởng môi trường và ảnh hưởng có tính chất phát triển

- DNA markers có thể được chia thành 2 nhóm như sau:

- + PCR-based: ALP, AFLP, SSR, SSCP
- + DNA/DNA + DNA/DNA hybridization-based: RFLP, minisatellite

2. RFLP (Restriction fragment length polymorphism)

RFLP- Đa hình chiều dài của các đoạn DNA cắt hạn chế, chất thăm dò RFLP marker và tạo ra thể đa hình DNA

- Phân lập DNA

+ Chuẩn bị chất thăm dò của marker và bộ lọc DNA lai. Đây là giai đoạn có tính chất quyết định trong phân tích RFLP

+ Tách chiết DNA từ đối tượng chúng ta cần: Nguồn gốc của mô cũng ảnh hưởng đến số lượng và chất lượng của DNA. Mô của cây khỏe và trẻ cho kết quả phân lập DNA tốt.

+ DNA được phân lập có thể tồn trữ trong điều kiện -20°C . Nhưng chúng ta phải lưu ý rằng, một chút thay đổi nhỏ nào trong quá trình đông lạnh cũng có thể làm phân hủy DNA, tránh đông lạnh nhiều lần, hoặc làm tan băng nhiều lần.

+ Trong quá trình phân lập người ta sử dụng 2 dung môi hết sức quan trọng: EDTA, Tris
- Sự cắt DNA

+ Có một nhóm enzyme thủy phân DNA được ghi nhận chuyên tính đối với một chuỗi mã DNA nào đó. Nhóm enzyme cắt giới hạn có trình tự nhận biết là các palindrome (trình tự đối xứng đảo ngược)

+ Theo tính chất của cấu trúc palindrom tại vị trí mục tiêu để cắt, người ta có thể viết một nửa chuỗi mã di truyền DNA, nếu một nửa trước đó đã biết rồi kể từ vị trí cắt. Trong một đoạn mã ngẫu nhiên nào đó trên DNA vừa phân lập, tần suất của vị trí này là 4^n với n là số nucleotide trong đoạn palindrome.

+ DNA sẽ được đưa vào một bộ sưu tập DNA thống nhất sau khi hoàn tất việc phân cắt các chuỗi mã thành những đoạn phân tử riêng biệt

- Điện di gel: Độ lớn của các đoạn DNA sau khi được cắt bởi enzyme cắt hạn chế biến thiên trong khoảng 30-100kb. Để xác định các đoạn phân tử DNA thông qua kỹ thuật Southern blot, người ta điện di các DNA này trên gel agarose

+ Để có kết quả mong muốn trong khi nghiên cứu các đoạn DNA ta phải chú ý đến sự tương ứng giữa nồng độ agarose và kích thước đoạn phân tử DNA

+ Sau khi điện di trên gel, các đoạn DNA được phân ra tùy theo trọng lượng phân tử. Các đoạn DNA được phân tích thông qua kỹ thuật Southern blot.

- Tạo dòng nhân bản vô tính DNA (clones)

+ Có hàng triệu đoạn DNA sau khi được phân cắt và kiểm tra, nhưng chúng không thể được sử dụng như RFLP marker, nếu từng đoạn này chưa được thanh lọc và làm cho thuần khiết và chưa được khuếch đại nhằm có đủ số lượng các đoạn DNA đồng nhất, thuần chủng. Kỹ thuật tạo dòng các đoạn DNA nhờ plasmid, rồi khuếch đại plasmid trong một tế bào chủ của nó đã được áp dụng rất thành công.

- Đánh dấu thăm dò và lai DNA

+ DNA bị cắt được chuyển lên tấm lọc, muốn phát hiện ra chuỗi mã DNA đặc biệt người ta áp dụng kỹ thuật lai DNA-DNA. Kỹ thuật này được khai thác theo tính biến chất DNA (mở sợi đôi thành 2 sợi đơn) và tính hoàn nguyên (nối 2 sợi đơn thành sợi đôi).

+ Trước khi được chuyển lên tấm lọc bị biến chất, nên DNA trên tấm lại là dạng sợi đơn. Để xét nghiệm một DNA đặc biệt nào đó trên tấm lọc, chúng ta cần có một DNA mẫu dò (probe)

có đánh dấu đồng vị phóng xạ, nó giúp ghi nhận hoặc lai với DNA đặc biệt nào đó thông qua cầu nối base. Theo cách này chúng ta đã xác định được một chuỗi DNA cần nghiên cứu.

- RFLP marker: Đoạn DNA được xác định như phần mô tả trên được gọi là đoạn phân tử được cắt giới hạn. Chiều dài của nó được xác định bởi các vị trí cắt. Trong quá trình tiến hóa của cây lúa, sự thay đổi chuỗi mã di truyền DNA cũng có thể tạo ra sự thay đổi về chiều dài của đoạn DNA. Khi chúng ta so sánh hai giống lúa mà độ dài DNA của nó khác nhau, chúng ta có thể nói đó là đa hình chiều dài của đoạn DNA hay RFLP. Chất thăm dò được dùng để phát hiện ra thể đa hình được gọi là RFLP marker

- Phương pháp southern blot

+ Việc sử dụng southern blot để phân tích RFLP đã có hiệu quả nổi bật trong chẩn đoán bệnh di truyền ở người.

+ Các đoạn DNA trên màng lai sẽ gắn với mẫu dò (probe, RFLP marker) có đánh dấu đồng vị phóng xạ. Các băng có tính đa hình sẽ được quan sát để đánh giá.

- RFLP marker có khả năng sử dụng rất phong phú, nhưng quy trình thực hiện phức tạp, nguy hiểm đến sức khỏe người thực hiện, đắt tiền, yêu cầu DNA có số lượng và chất lượng cao. Do đó, người ta có xu hướng sử dụng các marker đơn giản hơn, an toàn hơn, trên cơ sở phản ứng PCR.

3. Marker là sản phẩm của PCR

Phát hiện DNA có tính đa hình nhờ PCR

Sản phẩm của PCR là những đoạn mã DNA. Khi DNA xuất phát từ 2 dòng lai với nhau được khuếch đại lên nhờ primer tại locus đặc biệt nào đó, thì trọng lượng phân tử của sản phẩm PCR này có thể rất khác nhau, vì có những thay đổi vật lý trên chuỗi mã DNA, nghĩa là sự mất đoạn hay thêm đoạn xảy ra ở vùng khuếch đại này. Thể đa hình được gọi là ALP (amplicon length polymorphism) phản ánh DNA có tính đa hình giữa các cá thể/các dòng lai/các giống. Thuận lợi của ALP so với RFLP trong việc phát hiện này là: nó rất nhanh, chỉ cần một ngày giúp ta tìm ra kết quả; không có chất đồng vị phóng xạ; rẻ tiền; cần rất ít DNA. Bất lợi của nó là phải biết trình tự của chuỗi mã DNA đầu tiên khi tổng hợp primer

3.1. RADP marker

- Một trong những giới hạn của ALP marker là mọi thông tin về chuỗi mã DNA đầu tiên phải được biết rõ trước khi chuẩn bị các primer tương ứng. Nhưng hiện nay, thông tin về các chuỗi mã này trên các vùng của genome của 1 loại cây trồng nào đó chưa được biết hết. Để phát hiện ra các thể đa hình DNA trên những vùng như vậy, người ta phải cải tiến kỹ thuật PCR. William và cs (1990) đã thực hiện việc cải tiến để phát hiện ra thể đa hình DNA bằng PCR tiêu chuẩn.

- Welsh và cs (1990), đã phát minh ra AP-PCR (arbitrary primer PCR- những mồi có trình tự ngắn ngẫu nhiên). Trong AP-PCR người ta sử dụng một primer đơn hay một cặp primer với một chuỗi mã điều hành có khoảng 20Nu tiếp nhận điều kiện nghiêm ngặt PCR thay vì 2 sử dụng primer đặc biệt như những primer tiêu chuẩn. Sau bước một, sự kiện mở dây đôi DNA của chu kỳ đầu tiên, nhiệt độ của phản ứng được phép giảm xuống khoảng 40°C, bấy giờ primer điều hành có thể tác động ở đầu dây đơn DNA, tại nhiều nơi trong genome, để bắt đầu tổng hợp DNA. Sau 2 vòng khuếch đại trong điều kiện không nghiêm ngặt lắm, người ta sử dụng PCR bình thường và người ta quan sát các sản phẩm PCR không chuyên biệt ở trên gel. Nếu AP-PCR được lập lại, thì sản phẩm PCR sẽ được sản xuất giống hệt nhau.

- Thay vì sử dụng primer có 20 Nu, William và cs đã sử dụng primer có 10 Nu. Vì nhiệt độ Tm thấp hơn rất nhiều so với 20 Nu, cho nên đã sử dụng mọi điều kiện giống nhau cho tất cả các chu kỳ. Thể đa hình DNA được xác định thông qua sản phẩm PCR trên gel, với đa hình độ dài của các đoạn DNA. William gọi đó RADP.

3.2. SSCP (single strand conformation marker)

- Không phải APL luôn luôn tìm được thấy nếu những amplicons có cùng một độ dài, thậm chí trong trường hợp chúng có biến dị di truyền giữa các amplicons. Người ta tìm thấy sự dịch chuyển của đoạn DNA dạng dây đơn, ngắn trong điều kiện chưa qua quá trình biến hóa DNA thành sợi đơn. Người ta giả định rằng, sự thay đổi chuỗi mã DNA là do sự thay đổi ngoại hình của dây đơn (single strand conformation). Sự thay đổi này làm cho DNA chuyển dịch trên gel, tạo thể đa hình.

- Trong phân tích SSCP, phản ứng chuẩn PCR đã hoàn thành. Sản phẩm của PCR này lại bị mở dây đơn lần nữa. Người ta ngâm các mẫu này trong nước đá. Bấy giờ hiện tượng ‘snap-back’ sẽ xảy ra trên cấu trúc thứ cấp. Để tránh hiện tượng đứt gãy cấu trúc thứ cấp, các mẫu này được xử lý trong điều kiện lạnh. Nếu P³² được dùng trong PCR, thì phim chụp X quang sẽ thể hiện rõ trên gel. Nếu không, người ta sẽ dùng bạc để nhuộm gel.

3.3. STS marker

- Sự chọn lọc nhờ marker (MAS) có thể làm tăng hiệu quả lai tạo giống cây trồng đối với những tính trạng rất khó phân lập kiểu hình. Mặc dù phương pháp này đã xây dựng được bản đồ gần như là khá đầy đủ với DNA marker, nhưng việc ứng dụng của những nhà chọn giống vẫn phải bị lệ thuộc vào chi phí rất đắt của công nghệ gen. Kỹ thuật DNA marker trên cơ sở vị trí được đánh dấu có tính chất mã di truyền :STS (sequence-tagged-sites), là một cách khác phục trở ngại nói trên.

- Olson và cs năm 1989 đề xuất khái niệm STS. Trong khi đánh giá hiệu quả PCR trên lĩnh vực nghiên cứu genome con người, họ ghi nhận những chuỗi mã DNA dạng copy đơn của một vị trí đã biết rồi trên bản đồ, có thể được xem như một marker, để lập bản đồ di truyền và

bản đồ vật lý các gen quan trọng trong các NST. Những marker được lưu trữ có tính chất điện từ được gọi là STS

STS-based PCR và kỹ thuật marker phân tử

- Một STS là một đoạn ngắn của chuỗi mã di truyền, được tìm thấy bởi PCR. Mỗi STS được ghi nhận trên bản đồ, tại một vị trí chuyên biệt nào đó như là một ranh giới trong genome. Kỹ thuật PCR có vẻ thích hợp hơn kỹ thuật DNA blotting trong chọn lọc giống nhờ marker (MAS). Nó yêu cầu DNA có số lượng và chất lượng thấp hơn DNA blotting. Do đó, quy trình tách chiết DNA có thể được cải tiến đơn giản hơn, mà vẫn tránh được hiện tượng mẫu lớn. Nó còn có tính tự động hóa rất cao, hay yêu cầu các hệ thống tìm kiếm có tính chất hóa sinh phức tạp. STS-based PCR có ưu điểm là một bộ phận đơn giản, có tính sinh sản trên gel; bộ phận này dễ nhận thấy và dễ diễn giải. Những marker như vậy cho phép thể dị hợp có thể được phân biệt với 2 thể đồng hợp.

- STS-based PCR có 2 nhược điểm: nó yêu cầu dữ liệu mã di truyền thích hợp đối với từng locus; nó không có tính chất đa hình như những marker khác như microsatellites

- Trình tự tạo ra STS gồm các bước sau:

+ Đọc sequence của RFLP qua phân tích với sự trợ giúp của computer

+ Thiết kế primer xuôi và primer ngược

+ Sáng tạo STS, xét nghiệm thông qua PCR

+ Thử nghiệm tìm ra enzyme thích hợp để có đa hình sau điện di, và sáng tạo ra marker có tính chất codominant.

PCR-based marker

- Biến thiên di truyền giữa hai giống lúa có thể được phân tích nhờ khác biệt về độ dài của DNA đặc biệt nào đó thông qua kỹ thuật PCR với cùng một cặp mồi. Vì sản phẩm PCR được gọi là amplicon, cho nên biến thiên như vậy được gọi là amplicon length polymorphism (ALP). Khi không có ALP nào được phát hiện bởi một cặp mồi giữa 2 giống, người ta áp dụng kỹ thuật PCR-based RFLP (PBR), với một enzyme cắt hạn chế nào đó, cho thêm vào để tiêu hóa amplicon này. Việc xác định enzyme này cần làm với hàng loạt xét nghiệm, cho đến khi nào tìm ra được đa hình xảy ra trên điện di

- Trước đó cặp primer được thiết kế sau khi chạy sequence RFLP marker cần thiết. Việc thiết kế này tùy thuộc vào kinh nghiệm và kỹ năng của người làm việc trong phòng thí nghiệm. Cả hai ALP và PBR đều được xem là PCR-based marker.

3.4. Microsatellite marker

- Những marker vi vệ tinh đã được ứng dụng khá thành công từ 1995 đến nay. Nó được dùng để phát hiện các bệnh ung thư thường gặp trên người. Nó cũng được dùng để phát hiện các gen có ích trong thực vật, sự liên hệ về huyết thống.

- Người ta thấy rằng cần phải cải tiến để có những marker cung cấp ở mức độ cao hơn tính đa dạng alen, dùng trong thẩm định gen. Những marker vi vệ tinh đã đáp ứng được phần nào yêu cầu này bởi vì nó cho kết quả rất nhanh, tin cậy hơn RADP, có thể nhuộm bằng bạc, không dùng chất đồng vị phóng xạ.

- Marker vi vệ tinh bao gồm một chuỗi mã gốc được lặp lại nhiều lần, và phân tán rộng khắp trong genome, trên nhiều loci, mỗi locus chứa alen thích ứng với mỗi dạng khác nhau về lần lặp lại của nó và nó rất nhạy cảm. Do đó, nó còn được gọi với thuật ngữ chuỗi mã đơn giản lặp lại nhiều lần SSR (simple sequence repeats). Marker vi vệ tinh chứa đựng các đoạn mã di truyền đơn, lặp lại nhiều lần là một công cụ rất có giá trị để phân tích di truyền, đánh dấu gen cần tìm.

3.5. AFLP marker

- AFLP (Amplified restriction fragment length polymorphism) nó được áp dụng cho kỹ thuật DNA fingerprinting (kỹ thuật in dấu tay) để tìm kiếm tính chất đa hình của DNA giữa các mẫu xét nghiệm khác nhau. Những sản phẩm “fingerprint” này có thể được xem như một công cụ nhằm xác định sự phân lập của một mẫu DNA đặc biệt nào đó. Những “fingerprint” cũng được dùng làm nguồn cung cấp các marker di truyền hình thành bản đồ liên kết gen,.

- Kỹ thuật AFLP là kỹ thuật DNA fingerprinting, kết hợp cả hai chiến lược này. Nó dựa trên cơ sở khuếch đại có chọn lọc một phần các đoạn DNA bị cắt, sử dụng trong PCR. Mẫu DNA được phân hủy với enzyme nội sinh và adapters của dây đôi được gắn vào đầu dây DNA để phát sinh ra dây đơn “template” (mang mã ngược với dây gốc), sau đó khuếch đại nhờ PCR. Chuỗi mã của những adapters và vị trí tương ứng của nó trên dây DNA hoạt động như một primer ở vùng gắn vào nhau, để liên tục khuếch đại các đoạn DNA. Những Nu có tính chọn lọc phát triển nhanh thành những đoạn phân cắt, được bổ sung thêm vào đầu 3' PCR primer. Do đó, chỉ có những phần của các đoạn DNA này mới ghi nhận được. Chỉ có những đoạn phân cắt mà Nu của nó định vị xung quanh vị trí cắt giới hạn che khuất các Nu có tính chọn lọc, mới có thể được khuếch đại sẽ đem phân tích thông qua điện di để có sản phẩm “fingerprint”

4. Tạo dòng DNA

- Bất kỳ một quy trình tạo dòng DNA nào cũng phải có 4 phần căn bản như sau: phương pháp tạo ra các đoạn DNA; phản ứng kết nối DNA và vector để tạo ra vector tái tổ hợp; phương tiện chuyển DNA tái tổ hợp này vào tế bào vật chủ, ở đó nó có thể tự tái bản; phương chọn lọc hoặc thanh lọc dòng vô tính nào đó của tế bào nhận, tế bào này tạo ra được phân tử tái tổ hợp này.

- Phân tử DNA được tạo dòng theo trình tự:

1. Phân lập DNA của một sinh vật nào đó

2. Cắt phân tử DNA thành những đoạn nhỏ bằng enzyme cắt giới hạn chẻ, rồi chèn các đoạn này vào một vector để tạo ra một phân tử DNA tái tổ hợp.

3. Chuyển nạp phân tử DNA tái tổ hợp vào tế bào chủ. Sự kiện tự tái bản phân tử DNA tái tổ hợp (tạo dòng phân tử) xảy ra trong tế bào chủ sẽ tạo ra nhiều bản sao giống y hệt nhau được gọi là dòng. Vì sinh vật chủ sản sinh ra dòng, nên những phân tử DNA tái tổ hợp đều có mặt trong tất cả thế hệ con lai, tạo ra một quần thể mang các chuỗi mã của dòng (clone).

- Lợi ích của tạo dòng phân tử đã được đánh giá như một sự kiện khoa học có tính đột phá, giúp các nhà khoa học phương tiện nghiên cứu gen đối với protein nào đó, nhằm xác định chuỗi mã DNA của nó, nhằm khẳng định cách thức nó thể hiện có tính chất điều tiết rất tinh vi. Bản sao của gen được nhân bản nhiều lần cung cấp đầy đủ cho yêu cầu phân tích.

- Thư viện DNA tái tổ hợp có thể được chia thành 2 nhóm: thư viện của DNA genome và thư viện cDNA. Nhà nghiên cứu muốn biết chính xác một gen nào đó hay một đoạn phân tử DNA nào đó, họ cần phải có một bộ sưu tập các đoạn phân tử DNA khác nhau, trong từng vector riêng biệt. Thư viện là một bộ sưu tập các clone có chứa ít nhất một bản sao của mỗi chuỗi mã DNA trong genome.

5. Chọn tạo giống cây trồng nhờ marker phân tử DNA

Kỹ thuật di truyền và công nghệ sinh học đã tạo ra một tiềm năng to lớn cho công tác tạo giống cây trồng. Việc áp dụng những kỹ thuật ở mức độ phân tử cho phép chúng ta có thể du nhập những gen mong muốn vào trong các giống cây trồng có cùng một loài, và chúng ta có thể du nhập những gen mới từ loài hoang dại gần gũi với loài cây trồng. Đối với những tính trạng đa gen, người ta đã gặp khó khăn trong phân tích, khi sử dụng phương pháp chọn giống cổ truyền. Nhưng điều này trở nên dễ dàng hơn, vì người ta có thể sử dụng những marker phân tử- công cụ đánh dấu rất hiệu quả. Người ta có thể hình thành nên mối quan hệ di truyền giữa những cây trồng mà trước đó nó không thể nào tương hợp nhau về giới tính. Kỹ thuật hỗ trợ cho việc chọn lọc giống thường được sử dụng là RADP, RFLP, STS, AFLP, microsatellite,...

- Vấn đề có tính chiến lược trong ứng dụng di truyền phân tử vào lĩnh vực chọn giống chính là “chọn giống nhờ marker phân tử”. Những marker phân tử có nhiều ưu điểm hơn các marker hình thái. Do đó nó rất có ích cho các nhà chọn tạo giống. Hiệu quả cải tiến giống cây trồng sẽ gia tăng gia tăng gấp nhiều lần so với chọn giống cổ điển, nhờ thực hiện việc chọn lọc không cần trực tiếp trên tính trạng mong muốn, mà thông qua vector phân tử liên kết với tính trạng đó. Điều này đòi hỏi marker phải liên kết chặt chẽ với tính trạng mong muốn. Hơn nữa, marker này phải không bị điều tiết bởi môi trường, không bị ảnh hưởng bởi điều kiện trong đó cây trồng đang sinh trưởng và phát triển.

- Trong các marker RFLP được sử dụng đầu tiên trong việc lập bản đồ gen con người. Sử dụng RFLP marker, bản đồ di truyền đã được người ta phát triển trên nhiều cây trồng, đặc biệt là trên cây lúa. Tính đa hình được phát hiện bởi nó sẽ rất đáng tin cậy vì nó bao gồm sự xác

nhận của enzyme phân cắt hạn chế và sự lai phân tử thăm dò chuyên tính nào đó. Nhưng tiến hành thực hiện nó tốn số lao động lớn và thời gian dài.

- Các phương pháp cải tiến gần đây đều dựa trên tiến bộ PCR, nhiều marker trên cơ sở PCR được cải tiến, đã được phát triển cho kết quả rất triển vọng.

+ Phương pháp AFLP tạo ra một số lượng lớn các băng trong điện di, làm cho việc phát hiện thể đa hình thuận lợi hơn rất nhiều. Số đoạn phân tử DNA được khuếch đại có thể được kiểm soát, bằng cách chọn lọc các baze khác nhau và thành phần Nu trong adapter. Phương pháp này ngày càng được áp dụng phổ biến để phát triển các marker đa hình nhờ tính chất tái sản xuất cao, tần suất cao về tính đa hình đồng nhất. Tuy nhiên, AFLP vẫn còn đắt tiền, vì phải nhuộm băng điện di bằng bạc, fluorescent, hoặc hoạt động của chất phóng xạ.

+ SSR hay microsatellite marker phản ánh thể đa hình trên cơ sở số đơn vị lặp lại của một vùng mục tiêu nào đó trên genome

+ SSCP marker là công cụ rất mạnh và nhanh, nhưng nó chỉ áp dụng cho việc tìm kiếm thể đa hình của những đoạn DNA tương đối ngắn.

B. CÂU HỎI VÀ BÀI TẬP THỰC HÀNH:

Câu 1. Anh/chị hãy trình bày đặc điểm chung của DNA marker?

Câu 2. Anh/chị hãy trình bày RFLP marker?

Câu 3. Anh/chị hãy trình bày AFLP marker?

Câu 4. Anh/chị hãy trình bày RADP marker?

Câu 5. Anh/chị hãy trình bày SSCP marker?

C. GHI NHỚ:

- Đặc điểm chung của DNA marker;

- Đặc điểm và ứng dụng của RFLP marker;

- Đặc điểm và ứng dụng của AFLP marker;

- Đặc điểm và ứng dụng của RADP marker;

- Đặc điểm và ứng dụng của SSCP marker.

HƯỚNG DẪN GIẢNG DẠY MÔN HỌC

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

- *Vị trí:* Công nghệ sinh học trong bảo vệ thực vật là môn học bắt buộc thuộc kiến thức cơ sở trong chương trình đào tạo nghề Bảo vệ thực vật trình độ cao đẳng.

- *Tính chất:* là môn học lý thuyết, cần tổ chức giảng dạy tại phòng học có đầy đủ trang thiết bị cần thiết cho việc dạy và học.

- *Ý nghĩa và vai trò của môn học:* Môn học Công nghệ sinh học trong bảo vệ thực vật cung cấp cho sinh viên các kiến thức về khái niệm, phân loại CNSH, tính khoa học, kinh tế của CNSH; quy trình tạo DNA tái tổ hợp; quá trình lên men và các sản phẩm của chúng; ý nghĩa của nuôi cấy mô tế bào thực vật và chuyển gen vào tế bào thực vật; ứng dụng CNSH trong quản lý sâu hại cây trồng, bệnh hại cây trồng, CNSH trong sản xuất phân bón vi sinh; rèn luyện cho sinh viên kỹ năng: trình bày trước đám đông, kỹ năng làm việc nhóm.

II. Mục tiêu của môn học

1. Kiến thức

- Liệt kê được tầm quan trọng của việc đảm bảo tính an toàn trong công tác đối với các đối tượng sinh học;

- Trình bày được các yêu cầu về an toàn sinh học, tiêu chuẩn, qui định trong xây dựng và sử dụng phòng thí nghiệm an toàn sinh học sinh học;

- Xác định được các nhu cầu đánh giá về an toàn sinh học của cây chuyển gen;

- Xác định được phương pháp đánh giá an toàn của thực phẩm biến đổi gen;

- Phân biệt được các phương pháp phân loại vi sinh vật theo nhóm rủi ro và cách đánh giá rủi ro các tác nhân vi sinh vật;

- Giải thích được các ứng dụng của nhân bản vô tính trong thực tế cuộc sống.-

2. Kỹ năng

- Phân loại được các lĩnh vực ứng dụng của công nghệ sinh học;

- Thu thập, tìm kiếm thông tin về những thành tựu mới của công nghệ sinh học trong các lĩnh vực bảo vệ thực vật;

- Có khả năng tự học, tự nghiên cứu thông qua việc nghe giảng, tự đọc các sách, giáo trình, các bài báo....

3. Năng lực tự chủ và trách nhiệm

- Ý thức được tầm quan trọng, vị trí của công nghệ sinh học trong đời sống;

- Sẵn sàng hợp tác và chia sẻ với các thành viên trong nhóm/tập thể lớp, khi học tập môn học;

- Có ý thức tự học, tự nghiên cứu, tinh thần hợp tác trong làm việc nhóm.

III. Nội dung chính của môn học

1. Nội dung tổng quát và phân bổ thời gian

Stt	Tên các chương	Thời gian (giờ chuẩn)			
		Tổng số	Lý thuyết	Thực hành, thảo luận, bài tập	Kiểm tra quá trình*
1	Khái quát về công nghệ sinh học	3	3	0	0

Stt	Tên các chương	Thời gian (giờ chuẩn)			
		Tổng số	Lý thuyết	Thực hành, thảo luận, bài tập	Kiểm tra quá trình*
2	Công nghệ DNA tái tổ hợp	7	7	0	0
3	Công nghệ sinh học vi sinh vật	8	7	0	1
4	Công nghệ sinh học thực vật	6	6	0	0
5	Công nghệ sinh học trong bảo vệ thực vật	5	4	0	1
6	Hướng dẫn ôn thi kết thúc môn học	1	1	0	0
	Cộng	30	28	0	2

VI. HƯỚNG DẪN THỰC HIỆN MÔN HỌC

1. Phạm vi áp dụng môn học

Môn học Công nghệ sinh học trong bảo vệ thực vật được áp dụng trong chương trình đào tạo trình độ cao đẳng ngành Bảo vệ thực vật

2. Hướng dẫn về phương pháp giảng dạy, học tập môn học

2.1. Đối với giáo viên

a. Phần lý thuyết

- Giáo viên có thể sử dụng phương pháp giảng dạy như phương pháp thuyết trình, phương pháp động não, phương pháp hoạt động nhóm, phương pháp suy nghĩ - từng cặp - chia sẻ, phương pháp đóng vai...

- Ngoài tài liệu, giáo viên nên sử dụng các học cụ trực quan như: Mô hình, bảng biểu, tranh ảnh, băng đĩa ... để hỗ trợ trong giảng dạy.

b. Phần thực hành

Giáo viên hướng dẫn thực hành theo phương pháp làm mẫu:

- Giáo viên hướng dẫn làm mẫu trước cho sinh viên quan sát. Sau đó, mời một hoặc một số sinh viên trong lớp thực hiện làm mẫu các thao tác trong bài thực hành... và mời các sinh viên khác nhận xét, trên cơ sở đó giáo viên tổng hợp, đưa ra các nhận xét từng tình huống thực hành. Sau đó, chia sinh viên của lớp thành các nhóm để thực hiện cho đến khi đạt yêu cầu đề ra trong khoảng thời gian cho phép;

- Giáo viên khuyến khích thái độ tự tin và mạnh dạn của sinh viên trong thực hành và giúp sinh viên tự kiểm tra việc thực hiện của chính bản thân họ;

- Giáo viên nhận xét kỹ năng thực hành của sinh viên, nêu ra những trở ngại, sai sót đã hoặc có thể gặp phải trong khi thực hiện công việc và cách khắc phục.

2.2. Đối với người học

- Mỗi bài đều được cấu trúc: mục tiêu, nội dung chính và cuối mỗi bài đều có các câu hỏi ôn tập, thảo luận, như vậy người học cần nắm bắt được mục tiêu và nội dung cơ bản của bài trước khi đi sâu vào các nội dung cụ thể;

- Sau mỗi bài, người học cần nghiên cứu trả lời các câu hỏi, trao đổi thảo luận và đọc thêm những tài liệu liên quan như: sách tham khảo, tạp chí chuyên ngành, các trang thông tin điện tử (website) để mở rộng thêm kiến thức;

- Hoàn thành các bài tập theo yêu cầu và hướng dẫn của giáo viên.

V. Yêu cầu về đánh giá kết quả học tập

1. Phương pháp đánh giá

Kiểm tra thường xuyên, kiểm tra định kỳ:

* *Kiểm tra thường xuyên, kiểm tra định kỳ:*

- Kiểm tra thường xuyên:

+ Điểm chuyên cần:

Vắng từ 1 đến dưới 10% tổng số giờ: trừ 1 điểm.

Vắng từ 10 đến dưới 20 % tổng số giờ: trừ 2 điểm.

Vắng từ 20 - 30% tổng số giờ: trừ 3 điểm

+ Điểm thái độ học tập (chuẩn bị bài, làm đầy đủ các bài tập, tham gia thảo luận): Tùy theo mức độ sẽ đánh giá số điểm thích hợp

+ Điểm bài kiểm tra: Hình thức: trắc nghiệm. Thời gian: 20 phút.

* *Kiểm tra định kỳ:*

- Điểm bài kiểm tra viết. Hình thức: Trắc nghiệm. Thời gian: 45 phút

- Điểm bài tiểu luận

* Điểm trung bình chung điểm kiểm tra

- Trung bình cộng của 03 điểm kiểm tra thường xuyên có hệ số 1 và 02 điểm kiểm tra định kỳ có hệ số 2.

* *Thi kết thúc môn học*

- Điều kiện được dự thi kết thúc môn học:

+ Điểm trung bình chung điểm kiểm tra đạt từ 5,0 điểm trở lên

+ Tham dự ít nhất 70% thời gian học lý thuyết .

- Hình thức thi: Thi trắc nghiệm.

- Thời gian làm bài thi: 60 phút

* *Điểm môn học*

- Là trung bình điểm kiểm tra có trọng số 0.4 và điểm thi kết thúc môn học có trọng số 0.6

- Điểm môn học đạt yêu cầu khi đạt từ 4.0 trở lên.

2. Nội dung đánh giá

- **Kiến thức:** Kiểm tra trắc nghiệm hoặc vấn đáp các kiến thức về về khái niệm, phân loại CNSH, tính khoa học, kinh tế của CNSH; quy trình tạo DNA tái tổ hợp; quá trình lên men và các sản phẩm của chúng; ý nghĩa của nuôi cấy mô tế bào thực vật và chuyển gen vào tế bào thực vật; ứng dụng CNSH trong quản lý sâu hại cây trồng, bệnh hại cây trồng, CNSH trong sản xuất phân bón vi sinh

- **Kỹ năng:** Đánh giá kỹ năng trình bày trước đám đông, kỹ năng làm việc nhóm.

- **Năng lực tự chủ và trách nhiệm:** Đánh giá thái độ học tập, khả năng làm việc nhóm.

VI. Tài liệu tham khảo

[1]. TS. Nguyễn Hoàng Lộc (2007), *Giáo trình Nhập môn Công nghệ sinh học*, Nhà xuất bản Đại học Huế.

[2]. Nguyễn Hoàng Lộc và cs (2010), *Công nghệ DNA tái tổ hợp*, Nxb Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh.

[3]. Lương Đức Phẩm (2009), *Công nghệ vi sinh*, Nxb Khoa Học Tự Nhiên và Công Nghệ.

[4]. Lương Đức Phẩm (2009), *Sản xuất và sử dụng chế phẩm sinh học trong Nông Nghiệp*, Nxb Giáo Dục Việt Nam.

- [5]. Nguyễn Xuân Thành (2008), *Giáo trình Công nghệ vi sinh trong sản xuất Nông nghiệp và xử lý môi trường*, Nxb Hà Nội.
- [6]. Tủ sách Khuyến nông người lao động (2010), *Phòng trừ sâu hại bằng công nghệ vi sinh*, NXb Lao Động.