

GÂY ĐỘT BIẾN BẰNG PHƯƠNG PHÁP THỰC NGHIỆM Ở GIAI ĐOẠN HỢP TỬ VÀ TIỀN PHÔI

PHAN PHẢI

Đề nghiên cứu bản chất các chất di truyền nói riêng và hiện tượng di truyền biến dị nói chung, một nhiệm vụ vô cùng quan trọng và khó khăn đặt ra là thu nhận và điều khiển một cách định hướng quá trình đột biến. Một trong những bước quan trọng để giải quyết nhiệm vụ này là nghiên cứu những tính chất đặc trưng của các yếu tố gây đột biến đối với cơ thể sống. Để thực hiện có hiệu quả điều đó, cần xác định những yếu tố và tìm kiếm những phương pháp gây đột biến mạnh mẽ và ưu việt nhất. Cho đến nay, tuyệt đại đa số các công trình gây đột biến áp dụng phương pháp tác động các yếu tố gây đột biến vào hạt khô. Nếu có thể gây đột biến ở những giai đoạn sớm hơn nữa trong chu trình phát triển cá thể (giai đoạn hợp tử hay tiền phôi) sẽ có thể gây được những biến đổi sâu sắc hơn.

Sự thụ tinh, suy cho cùng, chính là sự kết hợp và lắp ghép rất phức tạp nhưng chưa thật bền vững hai tổ hợp gen, lắp ghép những phần khác nhau của các gen trong hai tổ hợp gen của hai giao tử đực và cái. Vì thế, tác động các yếu tố gây đột biến ngay vào lúc vừa mới thụ tinh xong, có thể gây được nhiều đột biến về gen hơn là đột biến nhiễm sắc thể.

Xuất phát từ cách đặt vấn đề như trên, chúng tôi tiến hành gây đột biến ở giai đoạn hợp tử và tiền phôi tức là những giai đoạn sớm nhất của sự phát triển cá thể.

Đối tượng nghiên cứu là loại cây thuốc *Nigella damascena* L. thuộc họ Ranunculaceae. Ở nhiều nước trên thế giới, hạt cây *Nigella* được sử dụng rộng rãi để sản xuất các vị thuốc trợ tim. Bộ nhiễm sắc thể song bội của

cây *Nigella* là 12. Hình dạng các cặp nhiễm sắc thể khác biệt nhau rõ rệt, cho phép dễ dàng nghiên cứu sự biến đổi khi nhiễm sắc thể chịu sự tác động của các yếu tố gây đột biến. Hiện nay, *Nigella* được nhiều phòng thí nghiệm nghiên cứu di truyền học trên thế giới sử dụng như là một đối tượng thuận lợi để tiến hành những nghiên cứu về di truyền và tế bào học.

Trong thí nghiệm của mình, chúng tôi sử dụng tia rơngen (R) với 4 liều lượng: 300, 600, 900 và 1200 r cùng với 4 chất hóa học: Etilenimin (EI), Nitrosometin urê (NU), Dietin sunfat (DS) và Trimetyl photphat (TP) với 30 công thức thí nghiệm gồm nhiều nồng độ và thời gian tác động khác nhau.

Như trên đã nói, khác với nhiều công trình gây đột biến, nhiệm vụ chính của chúng tôi không phải tác động các yếu tố gây đột biến vào hạt khô (1) mà là vào giai đoạn hợp tử, hoặc lúc hợp tử bắt đầu phân chia và chỉ có từ 2 đến 18 tế bào. Vì thế phải tiến hành gây đột biến ngay sau khi thụ tinh. Muốn thế, phải xác định cho được các giai đoạn và nhịp điệu phát triển của phôi, đồng thời phải xác định được những liều lượng, nồng độ và thời gian tác động các yếu tố gây đột biến thật thích hợp đối với sự phát triển của phôi. Đó là khâu quan trọng và khó khăn nhất.

(1) Việc tác động các yếu tố gây đột biến vào hạt khô trong công trình của chúng tôi được xem như là những công thức đối chứng. Trong những công thức tác động vào hạt khô chúng tôi dùng tia rơngen với liều lượng 9000 và 12000 r cùng với nồng độ 0,025 và 0,050% của hai chất hóa học EI và NU với thời gian tác động là 6, 12, 18, 24 giờ.

Các chất hóa học, với những nồng độ khác nhau, được tiêm vào noãn vừa mới thụ tinh. Sau những thời gian khác nhau (tùy thuộc vào công thức thí nghiệm) được rửa bằng nước lã, và sau đó là dung dịch Na_2SO_3 5%. Tiếp theo đó, noãn đã thụ tinh được định hình sau từng 2 giờ một trong suốt 80 giờ liền để theo dõi ảnh hưởng của các yếu tố gây đột biến đến sự phân chia của tế bào phôi, xác định chu kì phân chia của tế bào phôi và những sự phá hủy, biến đổi của nhiễm sắc thể do các yếu tố gây đột biến gây nên. Tiêu bản cố định nhằm xác định các giai đoạn phát triển của phôi được nhuộm bằng hematoxylin.

Chúng tôi tiến hành nghiên cứu ảnh hưởng của các yếu tố gây đột biến đến sự sinh trưởng, phát triển của cây ở 6 thể hệ: M_1 M_2 M_3 M_4 M_5 và M_6 ; nghiên cứu tác động của các yếu tố gây đột biến đến sự hình thành các giao tử đực và cái, sự thụ tinh và sự phát triển của hợp tử ở các thể hệ, đặc biệt là ở các thể đột biến đã thu được.

Trong phạm vi thông báo này, chúng tôi muốn trình bày một số nhận xét chính về quá trình gây đột biến ở giai đoạn hợp tử và tiền phôi, đồng thời công bố những thể đột biến ở cơ quan sinh sản thực vật sau khi tác động các yếu tố gây đột biến vào giai đoạn hợp tử và tiền phôi.

Trước hết cần nói rằng để thu nhận được số lượng noãn cần thiết cho việc gây đột biến, cây của M_0 được gieo trong nhà kính. Phải gây đột biến với một số lượng noãn lớn của M_0 để thu được số hạt cần thiết cho M_1 . Quá trình thụ tinh và sự tác động của các yếu tố gây đột biến vào noãn, phụ thuộc chặt chẽ vào yếu tố nhiệt độ. Ổn định được nhiệt độ lúc diễn ra quá trình thụ tinh và trong suốt thời gian gây đột biến cho tất cả các công thức thí nghiệm là việc rất quan trọng, bảo đảm được kết quả và chính xác của thí nghiệm.

Những số liệu về tế bào và phôi sinh học mà chúng tôi thu được cho biết rằng một chu kì phân chia tế bào phôi kéo dài từ 24 đến 26 giờ. Nồng độ và liều lượng các yếu tố gây đột biến quá cao gây ức chế nghiêm trọng sự phân chia của hợp tử. Số lượng tế bào với bộ nhiễm sắc thể bị biến đổi khác nhau tùy thuộc vào các yếu tố đột biến, vào nồng độ và thời gian tác động.

Tia rơngơn gây biến đổi và phá hủy nhiễm sắc thể nhiều hơn so với các yếu tố hóa học. Số lượng tế bào với bộ nhiễm sắc thể biến

đổi dưới tác động của tia rơngơn đạt đến cực đại nhanh hơn nhiều (sau khi tác động 56 giờ) so với các yếu tố hóa học (sau khi tác động 72 giờ). Ở những công thức thí nghiệm với nồng độ quá cao, mãi đến cuối thí nghiệm mitose vẫn chưa bắt đầu được.

Sau khi gây phóng xạ, ở các tế bào phôi xuất hiện các cầu nhiễm sắc thể và nhiễm sắc chất, đồng thời quan sát được sự thay đổi kế tiếp nhau của những cầu này. Lúc đầu xuất hiện các cầu nhiễm sắc chất, nhưng đến khi tần số biến đổi nhiễm sắc thể đạt đến cực đại (56 giờ sau khi gây đột biến), thì số lượng của chúng lại giảm xuống, còn ngược lại, thì số lượng cầu nhiễm sắc thể tăng lên. Dưới tác động của các yếu tố hóa học, trong tế bào phôi cũng xuất hiện hai loại cầu nói trên. Tác động các yếu tố gây đột biến vào hạt khô (đối chứng) chỉ thấy có cầu nhiễm sắc chất.

Nghiên cứu quá trình melose, chúng tôi cũng thấy những qui luật như trên.

Sự sinh trưởng và phát triển của cây mọc từ hợp tử đã được gây đột biến, tùy thuộc vào loại yếu tố gây đột biến khác nhau vào nồng độ và thời gian tác động, tỉ lệ với số lượng tế bào phôi có bộ nhiễm sắc thể biến đổi.

Những số liệu về tần số đột biến cho biết cả ba phương pháp tính: số họ có đột biến (%), số cá thể đột biến (%) và số đột biến có trong 100 họ (%), các yếu tố hóa học gây đột biến với tần số đều cao hơn nhiều so với các yếu tố vật lí. Tính liên tục trong hoạt tính của các yếu tố gây đột biến thể hiện rõ rệt ở mọi trường hợp. Hoạt tính của các yếu tố gây đột biến có thể sắp xếp theo thứ tự sau:

$$EI > NU > TP > DS > R.$$

Phân tích tần số đột biến diệp lục cho thấy, đột biến diệp lục xuất hiện với tần số cao khi hợp tử và phôi chịu sự tác động của các yếu tố hóa học. EI gây đột biến diệp lục với tần số cao nhất, và tia rơngơn gây đột biến diệp lục với tần số thấp nhất. Hoạt tính của các yếu tố gây đột biến với tần số đột biến diệp lục có thể sắp xếp theo thứ tự sau:

$$EI > NU > TP > DS > R.$$

Những số liệu về tần số đột biến hình thái sinh lí cho biết, EI và NU gây đột biến với tần số cao nhất. Các yếu tố hóa học gây nhiều đột biến hình thái sinh lí hơn so với các yếu tố vật lí. Có thể sắp xếp các yếu tố gây đột biến hình thái sinh lí theo thứ tự như sau:

$$EI > NU > DS > TP > R.$$

Trong thí nghiệm của mình, chúng tôi cũng thấy rằng các yếu tố hóa học gây nhiều đột

biến khác nhau ở những cây trong cùng một họ.

Nếu lưu ý đến hiện quả tác động của các nồng độ và liều lượng, chúng ta thấy nồng độ và liều lượng quá thấp hoặc quá cao tỏ ra ít hiệu quả. Với phương pháp tác động vào giai đoạn hợp tử và phôi, nồng độ và liều lượng các yếu tố gây đột biến có hiệu quả cao nhất là EI — 0,003% (16 giờ), NU — 0,005% và 0,008% (16 giờ), TP — 0,01% (16 giờ) và công thức phóng xạ 900 rơngen.

Do tác động các yếu tố gây đột biến vào những giai đoạn rất sớm của sự phát triển cá thể mà có thể thu được tần số đột biến rất cao, và những đột biến này lại rất phong phú. Điều đó nói lên tính chất ưu việt của phương pháp này, mặc dù kĩ thuật gây đột biến khá phức tạp, đòi hỏi nhiều công sức.

Trong các công thức gây đột biến ở giai đoạn hợp tử và tiền phôi, chúng tôi thu được 124 kiểu đột biến khác nhau ở tất cả các pha phát triển của lá mầm, các lá thật, thân, hoa, quả và hạt. Trong số 124 kiểu đột biến này có 10 thể đột biến diệp lục và 9 kiểu đột biến ở cơ quan sinh sản.

Những biến đổi ở cơ quan sinh sản thường có ý nghĩa thực tiễn và lí luận quan trọng. Nhưng những biến đổi này lại rất khó di truyền lại cho những thế hệ về sau. Điều đó nói lên tính chất bền vững đặc biệt của gen và các phần khác nhau của gen ở các tế bào sinh dục. Chính vì vậy nên không phải dễ dàng tìm thấy được những kiểu biến đổi ở cơ quan sinh sản trong các công trình nghiên cứu đột biến. Mặt khác, không phải mọi biến đổi ở cơ quan sinh sản đều là đột biến. Chúng ta đã biết khả năng tái sinh và hồi phục lại trạng thái ban đầu một cách khá nhanh chóng của nhiễm sắc thể và gen. Vì vậy, có thể ở M_1 , M_2 chúng ta thu được một số biến đổi nào đó, nhưng đến thế hệ thứ 3 chúng ta lại không thấy nữa. Chỉ có thể tạm gọi là đột biến nếu những biến đổi bất kì xảy ra do tác động của các yếu tố gây đột biến đã di truyền đến thế hệ thứ 3.

Như trên đã nói, trong thí nghiệm gây đột biến ở giai đoạn hợp tử và tiền phôi, chúng tôi thu được 9 kiểu đột biến ở cơ quan sinh sản. Những kiểu đột biến này đã di truyền một cách bền vững đến thế hệ thứ 6. Những kiểu đột biến đó là:

Kiểu 1 — Bao hoa biến thành cánh hoa: các bộ phận của bao hoa dính lại và màu sắc biến đổi sang màu trắng của cánh hoa.

Kiểu 2 — Bao hoa biến thành nhị cái: các

bộ phận của bao hoa dính liền lại, phần gốc uốn cong và phình ra hình thành nên bầu nhụy, phần trên kéo dài ra tạo thành vòi nhụy. Trong bầu nhụy xuất hiện nhiều noãn và phát triển thành hạt.

Kiểu 3 — Cánh hoa biến thành lá.

Kiểu 4 — Toàn bộ nhị được biến thành tuyến mật. Số lượng tuyến mật tăng lên nhiều. Cây chỉ có cái mà không có đực.

Kiểu 5 — Nhị được biến thành tuyến mật và tuyến mật lại biến thành cánh hoa. Đây là kiểu đột biến kép khá phức tạp chỉ thu được trong công thức thí nghiệm với F_1 .

Kiểu 6 — Cánh hoa biến thành nhị cái. Bầu nhụy hình thành do phần gốc của cánh hoa uốn cong lại. Bầu nhụy không đóng kín để lộ rõ những noãn trần. thỉnh thoảng gặp những bầu nhụy đóng kín. Trong trường hợp này, hạt hình thành ít hơn và nhỏ hơn so với bầu nhụy hở.

Kiểu 7 — Nhị được biến thành nhị cái. Tất cả nhị được chịu sự biến đổi rất phức tạp và tạo thành nhị cái có đầy đủ các bộ phận. Bầu nhụy thường đóng kín không hoàn toàn. Phần lớn noãn sắp xếp ở hai bên mép của bầu nhụy. Kiểu đột biến này cho số lượng hạt cao nhất. Cây chỉ có cái không có đực.

Kiểu 8 — Nhị cái teo lại chỉ còn là một u lồi nhỏ, hoàn toàn thoái hóa. Cây chỉ có yếu tố sinh sản đực.

Hai kiểu đột biến 7 và 8 có ý nghĩa lí luận và thực tiễn quan trọng cho phép nói đến khả năng điều khiển tính đực và cái ở thực vật bằng phương pháp đột biến thực nghiệm.

Kiểu 9 — Tất cả các bộ phận của hoa đều biến thành lá. Những số liệu di truyền và tế bào học chúng tôi thu được ở các thế hệ từ thứ 3 đến thứ 6 cho phép khẳng định rằng, những kiểu đột biến nói trên hoàn toàn đã thuần khiết và đồng hợp tử, cho phép đề cập đến khái niệm « các dãy đột biến đồng hợp tử ».

Ở những công thức tác động các yếu tố gây đột biến vào hạt khô, chúng tôi chỉ thu được có 49 các loại biến dị ở cơ quan sinh dưỡng, và trong số đó chỉ có 32 di truyền lại được. Nếu tần số đột biến cao nhất trong thí nghiệm với hợp tử và tiền phôi chúng tôi thu được là 88,92% (tính tổng số cây có đột biến) và 100% họ đều có đột biến, thì tần số đột biến cao nhất ở công thức với hạt khô chỉ có 41,18% và số họ có đột biến 48,57%.

Nhưng điều quan trọng nhất không phải là số lượng đột biến thu được mà là chất lượng các kiểu đột biến. Trong những công thức gây

đột biến vào hạt khô, chúng tôi không thu được những kiểu đột biến ở cơ quan sinh sản, và rất ít gặp những đột biến có lợi như thân lùn, hạt to và dài, quả to, cây phân nhánh nhiều, hạt biến từ màu đen sang màu nâu hoặc màu vàng, cánh hoa chuyển từ màu trắng sang màu xanh hoặc màu hồng v.v... mà chúng tôi thường thấy ở các công thức gây đột biến vào giai đoạn hợp tử và tiền phôi.

Đột biến là nhân tố quan trọng của quá trình tiến hóa, không những thúc đẩy nhanh chóng quá trình tiến hóa mà còn là phương pháp có giá trị lớn trong việc nghiên cứu chủng loại phát sinh. Chính vì vậy mà phương pháp đột biến thực nghiệm có ý nghĩa lý luận và thực tiễn vô cùng to lớn. Ngoài việc tạo ra được những thể đột biến có năng suất cao, chống được bệnh v.v... các thể đột biến còn được sử dụng để nghiên cứu cấu trúc của gen, các khu vực phân bố của gen, nghiên cứu các bước và cơ chế của quá trình thông tin di truyền trong chu trình phát triển cá thể, cũng như để nghiên cứu các bước của quá trình tiến hóa.

Trong thí nghiệm của chúng tôi, nhờ phương pháp gây đột biến ở giai đoạn hợp tử và tiền phôi, thấy rõ được các bước phát triển và tiến hóa của cơ quan sinh sản ở thực vật. Những đột biến thu được không những chứng minh được nguồn gốc của các cơ quan sinh sản ở thực vật, quan hệ giữa các bộ phận khác nhau của cơ quan sinh sản, mà còn mở ra khả năng bằng thực nghiệm, tạo những "đột biến nghịch" ở cơ quan sinh sản do việc đưa gen trở về trạng thái ban đầu.

Bằng phương pháp gây đột biến ở giai đoạn hợp tử và tiền phôi, có thể tạo ra được một số lượng lớn noãn bổ sung (do các bộ phận khác nhau của hoa biến thành nhị cái) hoàn toàn có khả năng phát triển thành hạt như những hạt của hoa cái chính thức. Những thể đột biến này có số lượng hạt nhiều gấp 5 đến 10, đôi khi gấp 15 lần số lượng hạt các cây

đối chứng. Đến thế hệ thứ 6 những thể đột biến này vẫn phát triển tốt, và 99,58% hạt hình thành bổ sung có khả năng nảy mầm bình thường. Với những thể đột biến này, phương pháp gây đột biến ở giai đoạn hợp tử và tiền phôi đã gây được sự chú ý đáng kể, đồng thời nói lên giá trị thực tiễn và triển vọng của phương pháp gây đột biến ở giai đoạn hợp tử và tiền phôi.

Một nhiệm vụ khó khăn đối với di truyền học là việc điều khiển sự phát triển các cơ quan sinh sản, tức là vấn đề tính đực và cái. Kết quả của chúng tôi thu được cho thấy, có thể sử dụng phương pháp gây đột biến ở giai đoạn hợp tử và tiền phôi như là một trong những phương pháp để điều khiển sự phát triển tính đực và cái ở thực vật.

Nhằm nghiên cứu bản chất và cơ chế của các thể đột biến thu được, từ thế hệ thứ 3, chúng tôi đã tiến hành lại các đột biến này với nhau và với các cây đối chứng. Chúng tôi đã thu được hơn 300 tổ hợp lai có từ 3 đến 5 đột biến trên một cây. Với những tổ hợp này, bằng phương pháp tế bào và phôi sinh học bước đầu chúng tôi đã nghiên cứu các thể đột biến, tiến hành xác định sự tác động tương hỗ của hệ gen, của những gen riêng biệt dưới ảnh hưởng của các yếu tố gây đột biến. Trên cơ sở này, chắc chắn sẽ có thể phần nào biết được cơ chế của quá trình đột biến nói trên.

Tiếp tục nghiên cứu di truyền học về phát triển những thể đột biến ở cơ quan sinh sản sẽ góp phần giải quyết nhiều vấn đề quan trọng cả về mặt lý luận cũng như thực tiễn mà hiện nay còn đang bàn cãi (vấn đề nguồn gốc của hoa, nguồn gốc và các bước hình thành những tính trạng đối với từng yếu tố riêng biệt của cơ quan sinh sản ở thực vật bị từ). Có thể sử dụng kết quả này như là một trong những hình mẫu để nghiên cứu khả năng tăng năng suất thu hoạch hạt ở những cây trồng có cả hoa đực lẫn hoa cái.