

BÀI 1: MỞ ĐẦU

^ ! ^

1. CÁC THIẾT BỊ CƠ BẢN CỦA MỘT PHÒNG THÍ NGHIỆM NUÔI CÂY MÔ VÀ TẾ BÀO THỰC VẬT

a. Phòng rửa và cất nước

- Máy cất nước 1 lần
- Máy cất nước 2 lần

b. Phòng hấp – sấy

- Autoclave
- Tủ sấy 60 – 200°C

c. Phòng chuẩn bị môi trường

- Cân phân tích (chính xác đến 0,0001 g)
- Cân kỹ thuật (chính xác đến 0,01 g)
- pH kế
- Máy khuấy từ
- Tủ lạnh
- Lò vi sóng (microwave)

d. Phòng thao tác nuôi cấy

- Tủ cấy vô trùng (laminar)
- Quạt thông gió
- Đèn tử ngoại treo tường

e. Phòng nuôi cấy

- Các giàn kệ có gắn đèn huỳnh quang
- Máy điều hòa nhiệt độ
- Máy lắc nằm ngang
- Tủ ẩm

f. Phòng thí nghiệm:

(phòng này dùng để tiến hành các phân tích sinh hóa, phân tử và di truyền)

- Kính hiển vi 2 mắt (độ phóng đại 1000 lần)
- Kính lúp 2 mắt (độ phóng đại 75 lần)
- Microtome
- Máy ảnh kỹ thuật số
- Hệ thống đèn chiếu
- Quang phổ kế ...

2. CÁC NHÂN TỐ ĐẢM BẢO THÀNH CÔNG TRONG NUÔI CẤY MÔ TẾ BÀO THỰC VẬT

Có 3 nhân tố chính:

- Bảo đảm điều kiện vô trùng
- Chọn đúng môi trường và chuẩn bị môi trường đúng cách
- Chọn mô cấy và xử lý mô cấy thích hợp trước và sau khi cấy.

2.1. Ý nghĩa của vô trùng trong nuôi cấy mô và tế bào thực vật

Môi trường để nuôi cấy mô và tế bào thực vật có chứa đường, vitamin, muối khoáng... rất thích hợp cho các loại nấm và vi khuẩn phát triển. Do tốc độ phân bào của nấm và vi khuẩn lớn hơn rất nhiều so với tế bào thực vật, nếu trong môi trường nuôi cấy chỉ nhiễm một vài bào tử nấm hoặc vi khuẩn thì chỉ

sau vài ngày đến một tuần, toàn bộ bề mặt môi trường và mô nuôi cấy sẽ phủ đầy một hoặc nhiều loại nấm và vi khuẩn. Thí nghiệm phải bỏ đi vì trong điều kiện này mô nuôi cấy sẽ không phát triển và chết dần.

2.2 Nguồn tạp nhiễm

Có 3 nguồn tạp nhiễm chính:

- Dụng cụ thủy tinh, môi trường nuôi cấy và nút đậy không được vô trùng tuyệt đối
- Trên bề mặt hoặc bên trong mô cấy tồn tại các sợi nấm, bào tử nấm hoặc vi khuẩn
- Trong quá trình thao tác làm rơi nấm hoặc vi khuẩn theo bụi lên bề mặt môi trường

2.3 Kỹ thuật vô trùng

2.3.1 Vô trùng dụng cụ thủy tinh, nút đậy và môi trường

a. Dụng cụ thủy tinh

Thông thường các dụng cụ thủy tinh dùng trong các thí nghiệm thường được xử lý bằng dung dịch sulfocromate một lần đầu trước khi đưa vào sử dụng; về sau chỉ cần rửa sạch bằng xà phòng, tráng sạch bằng nước cất và để thật ráo trước khi sử dụng.

Trong trường hợp các dụng cụ thủy tinh dùng trong các thí nghiệm nuôi cấy mô và tế bào thực vật đòi hỏi vô trùng, có thể khử trùng trong tủ sấy ở nhiệt độ cao trong nhiều phút hoặc nhiều giờ. Các dụng cụ này luôn được gói trong giấy nhôm hoặc hộp kim loại để tránh bị nhiễm trở lại sau khi đã khử trùng.

Bảng 1.1: Thời gian khử trùng dụng cụ thủy tinh bằng nhiệt và nhiệt độ khử trùng

Nhiệt độ (°C)	Thời gian khử trùng(phút)
160	45
170	18

180

7,5

190

1,5

b. Nút đáy

Thường dùng nhất là các nút đáy làm bằng bông gòn không thấm nước. Nút phải tương đối chặt để đảm bảo bụi không đi qua được, đồng thời nước từ môi trường không bị bốc hơi quá dễ dàng trong quá trình nuôi cấy. Bông không thấm nước là loại nút đơn giản nhất nhưng có các nhược điểm sau:

- Nếu khi hấp nút bông bị ướt hoặc dính môi trường thì về sau sẽ rất dễ bị nhiễm nấm, nhất là với những thí nghiệm tiến hành trong một thời gian dài
- Thao tác làm nút bông chậm, không thuận tiện khi nuôi cấy trên qui mô lớn
- Chỉ dùng được vài lần là phải bỏ

Hiện nay người ta sử dụng nhiều loại nắp đáy khác thay thế nút bông. Các hãng sản xuất dụng cụ nuôi cấy mô cung cấp loại nắp ống nghiệm và bình tam giác bằng nhựa chịu nhiệt có thể hấp vô trùng ở nhiệt độ 121°C mà không bị biến dạng. Một số phòng thí nghiệm dùng nắp ống nghiệm bằng

inox hoặc cao su rất thuận tiện cho việc vô trùng khô hoặc ướt. Cũng có thể sử dụng giấy nhôm để làm nắp đáy...

c. Môi trường

Môi trường nuôi cấy thường được hấp khử trùng trong nồi hấp (autoclave), khử trùng bằng áp suất hơi nước bão hòa. Thời gian hấp từ 15-30 phút ở áp suất hơi nước bão hòa là 103,4 kPa (1atm) tương đương với nhiệt độ 121°C. Ở nhiệt độ 121°C, hầu hết các sinh vật có trong môi trường đều bị tiêu diệt, kể cả ở dạng bào tử. Sau khi vô trùng cần phải làm khô nắp ống nghiệm hoặc nút bông để tránh bị nhiễm trở lại.

Bảng 2: Thời gian khử trùng dung dịch và các môi trường lỏng bằng nồi hấp (autoclave) ở 121°C tại 103,4 kPa

Thể tích môi trường (mL)	Thời gian hấp khử trùng(phút)
<50	15
75	20
250-500	25
1000	30

Việc hấp khử trùng bằng nồi hấp thì không thích hợp với nhiều hoá chất nhạy cảm với nhiệt độ như: các acid amin, các vitamin, các hormon tăng trưởng, và các chất kháng sinh. Các chất như vậy thường phải được khử trùng bằng cách lọc vô trùng. Màng lọc được làm bằng màng polyethylen hoặc sợi cellulose. Các lỗ trên màng siêu lọc này được thiết kế hiệu quả cho việc giữ lại các vi sinh vật gây nhiễm.

d. Lọc vô trùng

Phương pháp đơn giản nhất là dùng các màng lọc Millipore hoặc dùng các phễu lọc thủy tinh xếp số 5. Một số loại màng lọc vô trùng của hãng Millipore. Đây là loại màng lọc đã được khử trùng bằng chiếu xạ và chỉ dùng 1 lần

Phương pháp sử dụng màng lọc Millipore: hãng Millipore cung cấp màng lọc và giá đỡ bằng nhựa chịu nhiệt. Dưới đây mô tả màng lọc loại Millipore Swinex có đường kính 25mm. Bộ lọc gồm có giá đỡ bằng loại nhựa chịu nhiệt gồm nắp và đế, vòng cao su và màng lọc. Đặt màng lọc (có kích thước lỗ $0,25\mu\text{m}$) trên đế, đặt vòng cao su lên và vặn chặt nắp vào đế. Gói toàn bộ bộ lọc vào trong một tờ giấy nhôm và khử trùng trong autoclave ở 121°C trong 15-20 phút. Đồng thời cũng hấp vô trùng một bình huỷ tinh để hứng dịch lọc. Dùng ống tiêm hút dịch lọc và bơm qua bộ lọc.

2.3.2 Khử trùng mô thực vật

Mô cây có thể là hầu hết các bộ phận khác nhau của thực vật như hạt giống, phôi, noãn, đế hoa, lá, đầu rễ, thân củ...tùy theo sự tiếp xúc với môi trường bên ngoài, các bộ phận này chứa nhiều hay ít vi khuẩn và nấm. Đồng lúa non khi còn trong bẹ, mô thịt bên trong quả... thường ít bị nhiễm vi sinh vật; ngược lại, lá, thân đặc biệt ở các bộ phận nằm sâu trong đất như rễ, củ... có lượng nấm, khuẩn tạp rất cao. Hầu như không thể vô trùng mô cây được nếu nấm, khuẩn nằm sâu ở các tế bào bên trong mô chứ không hạn chế ở bề mặt. Lá khoai lang có thể vô trùng dễ dàng trong mùa khô nhưng không thể làm được trong mùa mưa. Phương pháp vô trùng mô cây thông dụng nhất hiện nay là dùng các chất hoá học có hoạt tính diệt nấm khuẩn. Hiệu lực diệt nấm khuẩn của các chất này phụ thuộc vào thời gian xử lý, nồng độ và khả năng xâm nhập của chúng vào các kẽ ngách lồi lõm trên bề mặt mô cây, khả năng đẩy hết các bọt khí bám trên bề mặt mô cây. Để tăng tính linh động và khả năng xâm nhập của chất diệt khuẩn, thông thường người ta xử lý mô cây trong vòng 30s trong rượu ethylic 70% sau đó mới xử lý dung dịch diệt khuẩn. Đồng thời người ta thêm các chất giảm sức căng bề mặt như Tween 80, Fotoflo, Teepol vào dung dịch diệt nấm khuẩn. Để có khái niệm về nồng độ và thời gian sử dụng các chất diệt nấm khuẩn để xử lý mô cây, xin dẫn tài liệu nghiên cứu của Street (1974) ở bảng sau:

Tác nhân vô trùng	Nồng độ %	Thời gian xử lý (phút)	Hiệu quả
Calci hypochlorit	9 – 10	5 – 30	Rất tốt
Natri hypochlorit	2	5 – 30	Rất tốt
Hydro peroxid	10 – 12	5 – 15	Tốt
Nước Brom	1-2	2 – 10	Rất tốt
HgCl ₂	0.1 – 1	2 – 10	Trung bình
Chất kháng sinh	4 – 50 mg/l	30 – 60	Khá tốt

Trong thời gian xử lý, mô cây phải ngập hoàn toàn trong dung dịch diệt khuẩn. Đối với các bộ phận có nhiều bụi cát, trước khi xử lý nên rửa cẩn thận bằng nước xà phòng bột và rửa sạch lại bằng nước máy. Khi xử lý xong, mô cây được rửa nhiều lần bằng nước cất vô trùng (tối thiểu là 3 lần). Những phần trên mô cây bị tác nhân vô trùng làm cho trắng ra cần phải được cắt bỏ trước khi đặt mô cây lên môi trường. Để tránh ảnh hưởng của tác nhân vô trùng lên mô cây, nên chú ý để lại một lớp bọc ngoài khi ngâm mô vào dung dịch diệt khuẩn. Lớp ngoài cùng này sẽ được lột bỏ đi trước khi đặt mô cây lên môi trường. Vô trùng mô cây là một thao tác khó, ít khi thành công ngay từ lần đầu tiên. Tuy vậy, nếu kiên trì tìm được nồng độ và thời gian vô trùng thích hợp thì sau vài lần thử chắc chắn sẽ đạt kết quả. Có thể dùng kháng sinh để kiểm soát hoặc loại bỏ sự nhiễm nấm trên mô cây. Hầu hết các kháng sinh nhạy cảm với nhiệt do đó không thể hấp vô trùng. Chúng hoà tan được trong nước hoặc dung môi thích hợp khác, lọc vô trùng và thêm vào môi trường vô trùng khi môi trường này đã được làm nguội còn 45-50°C. Không phải tất cả các kháng sinh đều thích hợp cho sử dụng trong nuôi cấy mô thực vật. Các kháng sinh như Streptomycin, Kanamycin và Neomycin thường độc cho mô thực vật và không hoạt động tốt trong một phạm vi pH nhất định. Tetracyclin cũng là độc tố thực vật, có khuynh hướng ức chế sự tăng trưởng của mô thực vật sau khi bị xử lý trong một thời gian dài. Chloramphenicol có phổ hoạt động rộng nhưng độc cho thực vật (và người) ở nồng độ thấp. Các kháng sinh thường được dùng trong nuôi cấy mô thực vật gồm Rifampicin (thường được dùng kết hợp với các kháng sinh khác), các polymycin và vancomycin.

Các loại kháng sinh**Aminoglycoside**

- Streptomycin
- Kanamycin
- Neomycin

Quinolone

- Nalidixic acid
- Ofloxacin
- Norfloxacin

 β -Lactam

- Penicillin
- Ampicillin
- Carbenicillin

Tetracyclin**Trimethoprim và sulphonamide****Chloramphenicol****Macrolide và lincosamide**

- Erythromycin
- Lincomycin

Glycopeptide

- Vancomycin

Polymixin

- Polymixin B
- PolymixinE

Rifampicin**Khả năng hoạt động**

Ức chế sự sinh tổng hợp protein bằng cách tác động lên các ribosome 30S hoặc 50S

Gây trở ngại cho quá trình sao chép DNA bằng cách ức chế enzym DNA gyrase

Ức chế sự tổng hợp vách tế bào vi khuẩn

Ức chế sinh tổng hợp protein bằng cách tác động lên ribosome 30S

Ức chế sự sinh tổng hợp tetrahydrofolate

Ức chế sự sinh tổng hợp protein bằng cách tác động lên Rbx 50S

Ức chế sự sinh tổng hợp protein bằng cách tác động lên Rbx 50S

Tác động lên sự sinh tổng hợp vách tế bào vi khuẩn.

Gắn lên màng tế bào làm thay đổi dòng ion dẫn đến sự phá vỡ tế bào

Tác động lên RNA bằng cách gắn vào RNA polymerase

2.3.3 Kỹ thuật cấy vô trùng

Để tránh bị nhiễm trong suốt thao tác cấy mô thực vật, các nhà khoa học làm việc trong tủ cấy vô trùng (laminar). Đó là các tủ cấy có thiết bị thổi không khí đã lọc vô trùng vào chỗ thao tác cấy. Tủ cấy vô trùng loại trừ một cách hiệu quả nguồn tạp nhiễm từ bên ngoài và tạo điều kiện thoải mái chongười cấy, nên hiện nay được sử dụng rất phổ biến trong các phòng thí nghiệm. Không khí từ bên ngoài được quạt hút vào qua một màng lọc thô. 99% bụi trong không khí được giữ lại ở màng lọc thô. Sau đó không khí được thổi qua màng lọc tinh và phân phối đều ra khắp bề mặt của tủ cấy, không tạo những xoáy không khí đưa bụi vào chỗ cấy. Màng lọc tinh ngăn cản các phần tử lớn hơn 0.3micron với hiệu quả 99,99% và do các hãng chuyên sản xuất màng lọc cung cấp. Tuổi thọ của màng lọc thô tùy theo số lượng bụi nơi làm việc, thường từ 6 tháng đến 1 năm và của màng lọc tinh từ 2 đến 3 năm. Khi thấy hiệu quả vô trùng của tủ cấy laminar kém đi thì cần phải thay màng lọc mới. Để kéo dài tuổi thọ của bộ màng lọc trong tủ cấy laminar- thường rất đắt tiền - nên bố trí tủ cấy trong các phòng riêng, càng ít bụi càng tốt.

2.3.4 Khử trùng nơi thao tác cấy và dụng cụ cấy

Nguồn nhiễm tạp quan trọng và thường xuyên nhất là bụi rơi vào dụng cụ thủy tinh chứa môi trường trong khi mở nắp hoặc nút bông để thao tác cấy. Người ta áp dụng nhiều biện pháp khác nhau để chống lại nguồn nhiễm tạp này. Phòng cấy thường là buồng có diện tích hẹp, rộng từ 10-15m², có hai lớp cửa để tránh không khí chuyển động từ bên ngoài trực tiếp đưa bụi vào. Sàn và tường lát gạch men để có thể lau chùi thường xuyên. Trước khi đưa vào sử dụng, phòng cấy cần được xử lý hơi formol bằng cách rót formaldehyde (formalin) 4% ra một số nắp đĩa petri để rải rác vài nơi trong phòng cho bốc hơi tự do. Đóng kín cửa phòng cấy trong 24h, sau đó bỏ formaldehyde đi và khử hơi formaldehyde còn thừa bằng dung dịch NH³ 25% cũng trong 24h. Bề mặt nơi chuẩn bị cấy, bề mặt bên trong và ngoài tủ cấy phải được khử trùng trước khi cấy bằng cách lau sạch các bề mặt này bằng cồn 90%. Tia UV cũng có thể được sử dụng để khử trùng bề mặt phòng cấy và tủ cấy nhưng nó ít hiệu quả hơn và nguy hiểm hơn là sử dụng cồn. Tia UV chỉ tiêu diệt được các mầm vi sinh nằm trực tiếp ngay trên các bề mặt mà tia này chiếu vào; nhưng nó không thể thâm qua các lớp bụi để tiêu diệt các vi sinh vật nằm bên dưới các lớp bụi này. Tia UV còn gây hại cho mắt và gây ung thư da. Các dụng cụ mang vào phòng cấy đều vô trùng trước: từ áo choàng, mũ vải, khẩu trang của người cấy đến dao, kéo, kẹp (forceps), giấy lọc, bình đựng nước cất... Trên bàn cấy thường xuyên có một đèn cồn để sử dụng trong khi cấy và một cốc đựng cồn 90% để nhúng các dụng cụ làm việc. Trước khi cấy, người cấy cần rửa tay bằng xà phòng và lau kỹ đến khuỷu tay bằng cồn 90%. Để đảm bảo mức độ vô trùng cao trong phòng cấy ần có một đèn tử ngoại 40W treo trần. Chỉ cho đèn này làm việc khi không có người trong phòng cấy. Nên bật đèn tử ngoại 30 phút trước khi cấy. Cần giảm sự chuyển động của không khí trong phòng cấy đến mức tối thiểu, vì vậy tất cả các dụng cụ phục vụ cho việc cấy đều phải chuẩn bị đầy đủ để trong thời gian cấy tránh đi lại ra vào phòng cấy quá nhiều. Các dụng cụ bằng kim loại như kẹp

cây, dao mổ, que cấy vòng, kim mũi nhọn có thể được khử trùng bằng cách đốt dưới ngọn lửa đèn cồn. Những dụng cụ này trước hết phải được nhúng vào cồn tuyệt đối rồi mới đốt. Nhớ để ráo đi các giọt cồn thừa rồi mới đưa vào ngọn lửa đèn cồn. Khi mở nắp chai hoặc nắp ống nghiệm môi trường nuôi cấy, thì dùng ngón tay kế út và ngón tay út cầm lấy nắp gòn, và không chạm tay vào bề mặt bên trong của nắp gòn cũng như không thả nắp gòn xuống bất cứ bề mặt nào cho đến khi gắn nó trở lại chai môi trường.

BÀI 2: KỸ THUẬT PHA CHẾ MÔI TRƯỜNG ^ ! ^

1. VẤN ĐỀ LỰA CHỌN MÔI TRƯỜNG

Khi khởi sự nuôi cấy mô và tế bào đối với một số đối tượng nhất định, vấn đề đặt ra là chọn môi trường nào và trên cơ sở nào để phối hợp tỷ lệ các chất dinh dưỡng. Cách thường làm là qua các tài liệu đã xuất bản, các công trình đã nghiên cứu về đối tượng đó hoặc cùng họ tương đương xem các tác giả đã sử dụng môi trường loại nào. Bước đầu có thể giữ nguyên môi trường của tác giả đó hoặc trên cơ sở đó mà cải tiến cho phù hợp qua các thí nghiệm thăm dò.

Trong hàng trăm môi trường do rất nhiều tác giả đề nghị cho nhiều loại cây khác nhau, nhiều mục đích nuôi cấy khác nhau. Về cơ bản có thể chia ra làm 3 loại:

- Môi trường nghèo chất dinh dưỡng: điển hình là môi trường White, Knop và Knudson C ...
- Môi trường có hàm lượng chất dinh dưỡng trung bình: điển hình là môi trường B5 của Gamborg ...
- Môi trường giàu dinh dưỡng: điển hình là môi trường MS (Murashige-Skoog)...

Vì vậy khi bắt đầu nghiên cứu nuôi cấy mô một số đối tượng mới, chưa có tài liệu trước thì nên thăm dò so sánh 3 loại môi trường trên xem đối tượng nghiên cứu phù hợp với loại môi trường nào nhất. Sau đó cần thử tìm tỉ lệ $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ thích hợp. Các tác giả phương Tây làm việc với cây trồng cạn thường không đưa NH_4^+ vào môi trường. Nhưng đối với những cây dinh dưỡng NH_4^+ mạnh như cây lúa, việc thêm vào môi trường nuôi cấy một tỉ lệ NH_4^+ thích hợp chắc chắn sẽ có lợi. Việc sử dụng mang tính kinh nghiệm chủ nghĩa đối với một số môi trường đã cản trở khá nhiều sự tiến bộ của công tác ở một số phòng thí nghiệm nuôi cấy mô thực vật. Thuốc lá và carot là 2 loại cây kinh điển của

nuôi cấy mô thực vật. Môi trường nuôi cấy 2 loại cây này đã được xây dựng khá hoàn chỉnh. Tuy vậy, không thể dùng nguyên các môi trường đó để nghiên cứu các cây hoà thảo hoặc các cây họ đậu mà không có sự cải tiến, sửa đổi. Điều này giải thích sự tiến bộ chậm chạp của nuôi cấy mô một số cây hoà thảo so với cây 2 lá mầm.

Hiện nay, môi trường MS được coi như là môi trường thích hợp với nhiều loại cây do giàu và cân bằng về mặt dinh dưỡng. Vì vậy, những người tập sự làm nuôi cấy mô thường bắt đầu với môi trường này trước khi tìm được môi trường của riêng mình.

2. CHUẨN BỊ MÔI TRƯỜNG

Để thuận tiện cho việc pha các môi trường nuôi cấy người ta không cân hoá chất mỗi lần pha mà thường chuẩn bị trước dưới dạng các dung dịch đậm đặc (còn gọi là các stock), sau đó chỉ cần pha loãng khi sử dụng. Các stock này thường được bảo quản dài ngày trong tủ lạnh thường hoặc tủ lạnh sâu.

2.1 Thành phần môi trường dinh dưỡng

Nước cất

Chất hữu cơ - Đường- Acid amin- Vitamin (B_1 , B_6 , H, PP...)- Các chất điều hòa sinh trưởng thực vật (Auxin, Cytokinin, Gibberellin...)

Chất vô cơ

Đa lượng N P K Ca Mg S

Vi lượng Fe Zn B Co N Mn Cu Al Mo I

Các hợp chất không biết rõ thành phần

Nước dừa, nước khoai tây, nước chuối, casein, hydrolysate, trypton, pepton...

THÀNH PHẦN MUỐI KHOÁNG CƠ BẢN CỦA MÔI TRƯỜNG MS

(Murashige và Skoog, 1962)

SKOOG I

NH_4NO_3
 1650 mg/L
 KNO_3
 1900 mg/L
 KH_2PO_4
 170 mg/L
 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
 370 mg/L
 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
 440 mg/L
 Na_2EDTA
 37,3 mg/L

SKOOG II

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
 27,8 mg/L
 MnSO_4
 $\cdot 4\text{H}_2\text{O}$
 22,3 mg/L
 H_3BO_3
 6,2 mg/L
 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
 8,6 mg/L

SKOOG III

KI
 0,83 mg/L
 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
 0,25 mg/L
 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
 0,025 mg/L
 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
 0,025 mg/L

THÀNH PHẦN VITAMIN CỦA MOREL**Morel's Vitamin**

Piridoxine (B6)	Biotin (H)	Meso-inositol	Nicotinic acid (P.P)	Thiamine -HCl (B1)	Pantothate Calci
1 mg/L	0,01 mg/L	100 mg/L	1 mg/L	1 mg/L	1 mg/L

2.2 Cách pha các dung dịch mẹ (stock)*** Stock đa lượng MS : SKOOG I (x10)**

(Pha thành 1L với nồng độ sử dụng khi pha 1L môi trường MS là 100mL/L)

NH_4NO_3	KH_2PO_4	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
16500 mg	1700 mg	4400 mg
KNO_3	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	
19000 mg	3700 mg	

Cân và dùng nước cất hoà tan lần lượt từng chất trong bécher cho tan hoàn toàn. Dùng ống đong 1L điều chỉnh cho đủ 1 lít.

*** Stock sắt MS: SKOOG II (x100)**

(Pha thành 200mL với nồng độ sử dụng khi pha 1L môi trường MS là 2mL/L)

Na₂EDTA

FeSO₄.7H₂O

3730 mg

2780 mg

Cân và hoà tan từng chất bằng 100mL nước cất trong mỗi bécher riêng.

Đặt 2 bécher dung dịch lên bếp và gia nhiệt cho dung dịch ấm lên vừa có hơi

nóng bốc lên là được. Khuấy đều và đổ dung dịch Na₂EDTA vào ống đong

200 mL, rồi cho từ từ dung dịch FeSO₄ vào, vừa cho vừa khuấy đều. Để nguội rồi cho vào bình tối bảo quản trong tủ lạnh.

*** Stock vi lượng MS: SKOOG III (x100)**

Trước tiên cần chuẩn bị các stock con:

Dung dịch KI: (83mg/mL)

Cân 8300 mg KI hoà tan với nước cất cho đủ 100mL

Dung dịch Na₂MoO₄.2H₂O: (25mg/mL)

Cân 2500mg Na₂MoO₄.2H₂O hoà tan với nước cất cho đủ 100mL

Dung dịch CuSO₄.5H₂O (2,5mg/mL)

Cân 250mg CuSO₄.5H₂O hoà tan với nước cất cho đủ 100mL

Dung dịch CoCl₂.6H₂O (2,5 mg/mL)

Cân 250 mg CoCl₂.5H₂O hoà tan với nước cất cho đủ 100 mL

SKOOG III (x100): pha thành 500mL với nồng độ sử dụng khi pha 1L môi trường MS là 5mL/L

MnSO₄.4H₂O

KI

2230 mg

83 mg/1 mL

H₃BO₃

Na₂MoO₄.2H₂O

620 mg

25 mg/1 mL

ZnSO₄.7H₂O

CuSO₄.5H₂O

860 mg

2,5 mg/1 mL

CoCl₂.6H₂O

2,5 mg/1 mL

Cân 3 chất đầu tiên và hoà tan với nước cất trong từng bécher riêng. Cho từng dung dịch theo thứ tự vào ống đong 500mL. Sau đó hút 1mL dung dịch trong stock con của 4 chất tiếp theo cho vào ống đong, vừa cho vừa khuấy đều và thêm nước cất cho đủ 500mL

*** Thành phần vitamin**

Pha các stock con

Dung dịch pyridoxine (B₆) (10mg/mL)

Cân 1000mg B₆ hòa tan với nước cất cho đủ 100mL

Dung dịch Biotin (H) (1mg/mL)

Cân 100mg biotin hòa tan với nước cất cho đủ 100 mL

Dung dịch Nicotinic Acid (P.P) (10mg/mL)

Cân 1000 mg nicotinic acid hòa tan với nước cất cho đủ 100mL

Dung dịch Thiamin-HCl (B₁) (10mg/mL)

Cân 1000 mg B₁ hoà tan với nước cất cho đủ 100 mL

Dung dịch Pantotheate-Ca (10mg/mL)

Cân 1000 mg Pantotheate-Ca hòa tan với nước cất cho đủ 100mL

Vitamin Morel (x 100)

Meso-inosito 110 g/10g

Thiamin –

Pyridoxine (B₆)100g/10mL

Nicotinic acid(P.P)

HCl(B₁)100mg/10mL

Biotin (H)1 mg/1 mL

100mg/10mL

Pantotate Calci100 mg/10 mL

Cân meso-inositol rồi hòa tan với nước cất. Đong từng chất theo thứ tự cho vào ống đong có chứa nước cất , vừa cho vừa khuấy đều và thêm nước cho đủ 200mL

*** Thành phần các chất điều hòa sinh trưởng thực vật (tính theo mg)**

Dung dịch BAP (1mg/mL)

Cân 100 mg Benzylaminopurine (BAP) hoà tan trong 5mL NaOH 1N.Cho thêm nước cất cho đủ 100 mL. Mỗi mL dung dịch có chứa 1mg BAP

Dung dịch IAA (1mg/mL) Cân 100mg Indolacetic acid (IAA) hòa tan trong 5 mL NaOH 1N. Cho thêm nước cất cho đủ 100mL. Mỗi mL dung dịch có chứa 1mg IAA.

Dung dịch IBA (1mg/mL) Cân 100mg Indolebutyric acid (IBA) hòa tan trong 5mL NaOH 1N. Cho thêm nước cất cho đủ 100mL. Mỗi mL dung dịch có chứa 1mg IBA

Dung dịch Kinetin (1mg/mL) Cân 100mg Kinetin (KIN) hòa tan trong 5 mL NaOH 1N. Cho thêm

nước cất cho đủ 100mL. Mỗi mL dung dịch có chứa 1mg KIN. Dung dịch NAA (1mg/mL)

Cân 100mg Naphthaleneacetic acid (NAA) hòa tan trong 5mL NaOH 1N. Cho thêm nước cất cho đủ 100mL. Mỗi mL dung dịch có chứa 1mg NAA.

Dung dịch 2,4-D (1mg/mL)Cân 100mg 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) hòa tan trong 50mL ethanol 50%. Cho thêm nước cất cho đủ 100mL. Mỗi mL dung dịch có chứa 1mg 2,4-D.

*** Các dung dịch chất điều hòa sinh trưởng thực vật (tính bằng mol/l)**

BAP có trọng lượng phân tử (MW) là 225.26

- Hoà tan 225.26gr BAP trong 1l nước cất tức ta có 1l dung dịch BAP1M hay 1mol/l
- Cân 225.26 mg BAP hoà tan trong 1l nước cất tức ta có 1l dung dịch BAP 1mM hay 1mmol/l
- Cân 225.26×10^{-3} mg BAP hoà tan trong 1l nước cất tức ta có 1l dung dịch BAP 1 μ M hay

1 μ mol/l Dung dịch BAP (MW 225.26) (10mM)

Cân 225.26 mg BAP hoà tan trong 5 mL NaOH 1N. cho thêm nước cất cho đủ 100 mL , tức ta có 100 mL dung dịch BAP 10mM

Ví dụ: Cho 1mL dung dịch BAP 10mM vào môi trường MS để pha được 1L môi trường. Như vậy ta có 1L môi trường MS có chứa 10 μ M BAP. Muốn pha 1L môi trường MS có chứa 1 μ M BAP, ta sử dụng 0.1mL dung dịch BAP 10 mM.

Tương tự như vậy pha cho các loại kích thích tố còn lại, biết:

- | | |
|-----------------------|---------------------|
| - IAA (MW 175.19) | - NAA (MW 186.21) |
| - IBA (MW 203.24) | - 2,4-D (MW 221.04) |
| - Kinetin (MW 215.22) | |

3. THỰC HÀNH

- Tiến hành pha Skoog I, II và III của môi trường MS
- Pha stock vitamin Morel, glycin và inositol
- Pha các stock chất điều hoà sinh trưởng như đã hướng dẫn phần trên

BÀI 3:

GIEO HẠT *IN-VITRO*

^ ! ^

I.CHỌN MÔ CÂY VÀ XỬ LÝ MÔ CÂY

1.1 Chọn lựa mô cây

Không có những hướng dẫn cụ thể trong việc chọn mô cây. Về nguyên tắc, trừ những mô cây đã hóa gỗ, các mô khác trong cơ thể thực vật đều có thể dùng làm mô cây. Tuy vậy có thể nhận xét chung là các mô đang phát triển, thịt quả non, lá non, cuống hoa, đế hoa, mô phân sinh... khi đặt vào môi trường có chứa một lượng chất sinh trưởng thích hợp đều có khả năng phân chia và phân hóa. Để bắt đầu nghiên cứu nhân giống vô tính một cây nhất định, trước tiên người ta chú ý đến các chồi nách và mô phân sinh ngọn. Cần biết rằng tuy mang một lượng thông tin di truyền như nhau, các mô khác nhau trên cùng một cây có thể sinh trưởng và phát triển với khả năng tái sinh chồi, rễ hay cây hoàn chỉnh rất khác nhau. Vì vậy, khi khởi sự chọn giống, nhân giống một cây cụ thể bằng phương pháp nuôi cấy mô và tế bào thực vật, trước hết cần thí nghiệm tìm hiểu phản ứng của các bộ phận khác nhau của cây trong nuôi cấy ở các nồng độ chất sinh trưởng khác nhau. Sau khi cấy, mô cây cần được đặt trong điều kiện nhiệt độ và ánh sáng ổn định. Tùy vào các mục đích nghiên cứu mà có các chế độ chiếu sáng khác nhau, chẳng hạn quá trình tạo mô sẹo có thể cần bóng tối hay ánh sáng, nhưng quá trình tái sinh và nhân giống vô tính nhất thiết phải có ánh sáng. Nhiệt độ phòng nuôi nên giữ ổn định $25 \pm 2^\circ\text{C}$ bằng máy điều hòa nhiệt độ. Cường độ chiếu sáng khoảng từ 2000 – 3000 lux.

1.2 Xử lý vô trùng mẫu cây

Mẫu đưa vào nuôi cấy invitro có nhiều nguồn gốc khác nhau. Có thể là những mẫu cây đã vô trùng như cây con invitro cho nảy mầm trong điều kiện vô trùng; cũng có thể đó là các mẫu cây chưa vô trùng, lấy trực tiếp từ bên ngoài tự nhiên như chồi non, lá, thân, củ, rễ... Thuận lợi nhất là sử dụng các mẫu cây đã vô trùng bởi lẽ các phương pháp vô trùng mẫu cây trực tiếp thường ít nhiều gây hại cho mẫu cây do chất khử trùng gây ra.

Có nhiều phương thức vô trùng mẫu cây:

a. Vô trùng hạt:

- Rửa hạt bằng xà phòng, lắc đều 2-3 phút. Với các loại hạt nhỏ, thường đựng hạt trong túi vải mùng.
- Rửa sạch xà phòng bằng nước máy dưới vòi nước chảy mạnh
- Vô trùng sơ bộ bằng cồn 70%, lắc đều 1-2 phút
- Rửa sạch cồn bằng nước vô trùng
- Cho hạt vào dung dịch khử trùng NaOCl 1-15%. Thêm vài giọt bắm

dính Tween20. Khử trùng trong 15-20 phút tùy mẫu.

- Rửa sạch chất khử trùng nhiều lần bằng nước vô trùng (khoảng 5 lần) cho đến khi hết mùi javel.

- Hạt vô trùng đã có thể nuôi cấy trên môi trường tạo mẫu vô trùng.

b. Các phương thức khác vô trùng hạt

- Khử trùng lần thứ nhất với NaOCl 5,25%

- Khử trùng lần thứ hai với HgCl_2 0,1 – 1%, thêm vài giọt HCl 0,5% trong 10 phút.

- Rửa mẫu với H_2O_2 6% vô trùng trước khi rửa lại bằng nước vô trùng

- Có thể khử trùng sơ bộ hạt bằng acid sulfuric trong 2-10 phút

- Với hạt có vỏ cứng, có thể dùng phương pháp đốt để khử trùng sơ bộ.

c. Vô trùng chồi non, lá và thân cỏ:

- Vô trùng sơ bộ bằng cách ngâm mẫu vào cồn 70% trong 1-3 phút, thời gian xử lý này cũng còn tùy thuộc vào độ cứng hay mềm của mẫu

- Vô trùng mẫu với chất khử trùng NaOCl 1% hay với javel thương phẩm theo tỉ lệ 1:4 hay 1:5 trong thời gian 5-20 phút tùy theo mẫu

- Rửa lại bằng nước vô trùng cho sạch hoàn toàn chất khử trùng

d. Vô trùng củ, rễ

- Mẫu nuôi cấy phải được rửa dưới vòi nước chảy mạnh cho thật sạch đất cát bám trên mẫu, sau đó ngâm trong nước xà phòng loãng 10 phút

- Vô trùng sơ bộ bằng cồn 70% trong 1-5 phút

- Vô trùng với chất khử trùng có nồng độ và thời gian thay đổi tùy mẫu

- Rửa lại bằng nước vô trùng cho thật sạch chất khử trùng

e. Tránh hoại mẫu

Trong quá trình nuôi cấy thường xuất hiện nhiễm là do trong quá trình nuôi cấy đã để bào tử trong không khí rơi vào hay mẫu cấy chưa được vô trùng hoàn toàn. Sau một thời gian thì bào tử phát triển nhanh chóng và có thể sẽ làm chết mẫu hoặc cạnh tranh chất dinh dưỡng làm mẫu không phát triển. Hoại mẫu thường do nấm mốc (khuẩn lạc có dạng sợi) hoặc do khuẩn (khuẩn lạc có dạng vẩn nhầy). Nếu nấm hoặc khuẩn chỉ mọc trên bề mặt môi trường, đó thường là nhiễm do thao tác cấy chưa tốt; nếu có khắp trong môi trường là nhiễm do môi trường chưa được tiệt trùng hoàn toàn; còn nếu khuẩn và nấm xuất phát từ gốc mẫu lan ra thì đó là do mẫu chưa được khử trùng triệt để. Tùy theo quan sát và dựa vào kinh nghiệm của người cấy mà có nhận định chính xác về nguyên nhân gây hoại mẫu để tìm cách khắc phục tình trạng này. Trong trường hợp các bình nuôi cấy đã bị nhiễm, cần được hấp bỏ trước khi đem đi rửa sạch để tránh lây lan nguồn nhiễm trong khu vực cấy.

2.THỰC HÀNH

2.1 Mục đích

Giúp cho sinh viên làm quen với thao tác vô trùng mẫu cấy và kỹ thuật cấy vô trùng

2.2 Dụng cụ, thiết bị và hóa chất**2.2.1 Dụng cụ:**

- Bình tam giác (250mL)
- Giấy cấy vô trùng
- Béchér (cốc đốt thuỷ tinh) 500mL, 1000mL
- Forceps (kẹp), dao cấy, đèn cồn
- Đĩa petri vô trùng

2.2.2 Thiết bị:

- Autoclave
- Tủ sấy
- Tủ cấy (laminar)
- Tủ lạnh
- Cân kỹ thuật
- Máy cất nước 2 lần
- Máy khuấy từ
- pH kế

2.2.3 Hoá chất

- Dung dịch Skoog I, II và III của môi trường MS
- Stock vitamin Morel
- Stock glycine
- Đường saccharose
- Agar
- Nước cất vô trùng
- Cồn 90%, 70%
- Dung dịch hypochloride calcium 10%
- Xà phòng bột

2.3 Các bước tiến hành**2.3.1 Chuẩn bị môi trường**

(thành phần cho 1L môi trường)

- Skoog I (MS): 100mL
- Skoog II (MS): 2mL
- Skoog III (MS): 5mL
- Vitamin Morel: 2mL
- Glycine: 2mL
- Sucrose: 30g
- pH :5,8
- Agar: 7g

2.3.2 Nguyên liệu thực vật:

- Các hạt cam chanh còn nguyên vẹn, không bị hư hại

2.3.3. Các bước thực hiện

- Cho hạt vào bécher có chứa nước xà phòng loãng, rửa hạt cho sạch chất nhớt bám xung quanh hạt

- Rửa hạt cho sạch xà phòng bằng nước cất. Ngâm hạt 2 phút trong cồn 70%

- Rửa hạt sạch etanol bằng nước cất. Sau đó ngâm hạt 10 phút trong dung dịch hypochloride calcium 10%
- Trong tủ cấy vô trùng, rửa hạt cho sạch chất khử trùng bằng cách lắc hạt trong nước cất vô trùng (3 lần)
- Tiến hành tách áo hạt bằng kẹp và dao mổ vô trùng. Cho các hạt vừa tách bỏ vỏ áo vào đĩa petri vô trùng có chứa giấy thấm vô trùng và làm ẩm giấy thấm bằng một ít nước cất vô trùng.
- Gieo hạt: gieo 4-5 hạt vào các bình tam giác chứa môi trường nuôi cấy đã được hấp khử trùng.
- Đậy nắp bình cấy và ghi rõ họ tên, ngày cấy, số nhóm, tên giống và môi trường.

2.4 Yêu cầu

- Thực hiện pha môi trường gieo hạt
- Thực hiện các thao tác vô trùng trong nuôi cấy và kỹ thuật gieo hạt
- Thu được các cây con vô trùng trong ống nghiệm

BÀI 4: NUÔI CÂY ĐỈNH SINH TRƯỞNG

^ ! ^

1. GIỚI THIỆU

Trong nuôi cây *invitro*, một phương thức đơn giản và thường hay được sử dụng để tái sinh chồi *invitro* là nuôi cây đỉnh sinh trưởng. Hiểu một cách đúng nghĩa thì nuôi cây đỉnh sinh trưởng là sử dụng phần mô phân sinh ngọn với 3-4 tiền phát khởi lá, tức là các đỉnh sinh trưởng có kích thước từ 0,1 – 0,15mm tính từ chóp sinh trưởng. Kỹ thuật này khá phức tạp, phải thực hiện dưới kính lúp và khả năng sống sót của mẫu cây có kích thước nhỏ như thế thường không cao, do đó chỉ được tiến hành khi cần nuôi cây với mục đích tạo các cây con *invitro* sạch virus.

Trên thực tế người ta thường nuôi cả đỉnh chồi non với kích thước khoảng vài mm. Đó có thể là đỉnh chồi ngọn hoặc đỉnh chồi nách. Mỗi đỉnh sinh trưởng nuôi cây ở điều kiện thích hợp sẽ tạo ra một hay

nhều chồi và mỗi chồi sẽ phát triển thành cây hoàn chỉnh. Xét về nguồn gốc của các cây đó, có thể có ba khả năng:

- Cây phát triển từ chồi ngọn
- Cây phát triển từ chồi nách phá ngủ
- Cây phát triển từ chồi mới phát sinh, ví dụ: nuôi cây đoạn trụ hạ diệp của cây măng cầu (*Annona squamosa*) sẽ cho rất nhiều mầm (buds) trên mô cây và một số mầm sau đó sẽ phát triển thành chồi và sau đó sẽ thành cây *invitro* hoàn chỉnh. Tuy nhiên thông thường rất khó phân biệt chồi phá ngủ và chồi mới phát sinh. Các phương thức phát triển cây hoàn chỉnh từ đỉnh sinh trưởng nuôi cây 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

* 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

Theo Champagnat (1977) và Fast (1980), các chồi non đang tăng trưởng dài 10-15cm, của mới nhú lá thường được dùng làm vật liệu cho việc nuôi cây đỉnh sinh trưởng. Đất bản được dội sách

đuối vôi nước chảy và là được lột sách cho đến khi thấy rõ các chồi bên. Chồi non lúc này được nhúng vào cồn 70% và được khử trùng trong dung dịch khử trùng 10%(v/v). Các chồi bên được lấy ra và rửa trong nước cất vô trùng. Sau đó, chúng được khử lại thêm 10 phút nữa trong dung dịch khử trùng 3% có chứa Tween80 và được rửa lại trong nước cất vô trùng. Trong tủ cấy vô trùng, phần gốc của những

chồi nhỏ nhất được cắt bỏ và việc cấy được tiến hành. Trên các chồi lớn hơn, trước hết tách bỏ các lá và phần gốc bị chết do tác động của chất khử trùng, sau đó cấy vào môi trường. Phải mất một thời gian tương đối dài thì protocorm mới được thành lập. Các protocorm này được cắt ra và cấy chuyển vào môi trường mới. Ngày nay, người ta thường cấy các đỉnh chồi lớn hơn (mang 3-4 tiền phát khởi lá) vì dễ thành công hơn là cấy các đỉnh chồi chỉ có 2 tiền phát khởi lá. Nếu protocorm không được cắt khỏi mẫu cấy thì nó phát triển thành còi và ra rễ; nếu được tách ra khỏi mẫu cấy thì sẽ có sự thành lập các protocorm bất định mới từ các protocorm ban đầu.

Khi cấy đỉnh sinh trưởng của *Cymbidium* chỉ có vùng xung quanh tiền phát khởi lá u lên và cuối cùng tạo thành protocorm. Sự thành lập protocorm có thể được tạo ra mà không cần có đỉnh sinh trưởng ngọn. Khi cấy đỉnh sinh trưởng của *Cattleya*, các mô thường nhanh chóng hoá nâu. Vì lý do đó mà đỉnh sinh trưởng được cắt trong môi trường lỏng hoặc nước cất vô trùng và được vẩy trong môi trường lỏng, nhờ đó các chất nâu dễ khuếch tán vào trong môi trường và ít gây ảnh hưởng đến mô cấy (Fast, 1980). Ở *Cattleya*, người ta thường tách một chồi (3-5mm) với nhiều tiền phát khởi lá. Môi trường cấy *Cattleya* thường phức tạp hơn môi trường cấy *Cymbidium* (Fast, 1980 và Champanat, 1977) đôi khi có chứa auxin, cytokinin, nước dừa và peptone. Sự thành lập protocorm ở *Cattleya* mất nhiều thời gian và luôn được tạo ra ở phần gốc của lá già nhất; thực tế đỉnh sinh trưởng ngọn không đóng vai trò gì cả và mất đi. Việc cấy các tiền phát khởi lá *Cattleya* cũng có thể đáp ứng cho sự thành lập protocorm.

Môi trường nuôi cấy đỉnh sinh trưởng tương đối đơn giản và rất giống môi trường gieo hạt cho nhiều giống lan khác nhau. *Cymbidium* thường được nuôi cấy trên môi trường khoáng Knudson C hoặc Vacin & Went Đỉnh sinh trưởng thường được cấy trên môi trường đặc (ngoại trừ *Cattleya*) nhưng protocorm thường được nhân lên trong môi trường lỏng, và protocorm chỉ tăng trưởng thành chồi con khi được cấy trên môi trường đặc, thành phần môi trường thường khác nhau trong từng giai đoạn. Môi trường có pH trong khoảng từ 4,8 – 5,8. Nồng độ đường saccharose từ 1-3% (w/v) hoặc đôi khi là 1,5% glucose + 1,5% fructose. Một số loài lan đơn thân thì không cần đường trong giai đoạn nuôi cấy đỉnh sinh trưởng vì sự hiện diện của đường có thể làm đỉnh sinh trưởng và chết. Trong giai đoạn tạo protocorm, thường đường và nước dừa (10-15%) được thêm vào môi trường để kích thích sự thành lập protocorm. Chất điều hoà sinh trưởng thực vật nói chung không cần thiết, sự hiện diện của chúng trong môi trường có thể làm cơ hội cho đột biến lớn hơn. Nhiệt độ tối ưu cho nhân giống từ 22-28°C.

Ánh sáng đèn huỳnh quang thường được sử dụng với 12-16 giờ chiếu sáng/ngày. Có thể nuôi cấy ở cường độ chiếu sáng thấp nhưng cần gia tăng ánh sáng trong giai đoạn tạo chồi từ protocorm. Nói chung có thể thực hiện việc nhân giống lan từ đỉnh sinh trưởng theo 2 cách: hoặc trên môi trường đặc hoặc trên môi trường lỏng. Trong môi trường lỏng cần lắc vòng với vận tốc rất khác nhau tùy theo loài nhưng hầu hết các nhà nghiên cứu thường thực hiện với vận tốc thấp 2-5 vòng/phút. Sự nhân giống trong môi trường lỏng thường tốt hơn trên môi trường đặc bởi vì khi lắc sẽ cung cấp O_2 và chất dinh dưỡng cho mẫu cây hiệu quả hơn. Khi cây con cao khoảng 5-7cm với 3-4 lá có thể mang ra trồng trong vườn ươm.

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) người ta đã thu được kết quả rất tốt ở 22 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 cả 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.

2.THỰC HÀNH

2.1 Mục đích

- Khử trùng mẫu đỉnh chồi
- khảo sát sự tái sinh cây trực tiếp từ nuôi cấy đỉnh chồi
- Khảo sát sự thành lập protocorm từ nuôi cấy đỉnh chồi

2.2 Nuôi cấy phát triển thành cây trực tiếp

2.2.1 Nguyên vật liệu

Đoạn thân non cây cam hoặc chanh

2.2.2 Môi trường nuôi cấy

Môi trường MS bổ sung BA 2ppm và NAA 0,2ppm

2.2.3 Tiến hành:

- Các cành mẫu non lấy từ vườn ươm về được cắt bỏ hết lá, cắt thành đoạn 2-3cm, cho vào bécher
- Rửa sạch cành mẫu bằng nước xà phòng loãng, sau đó rửa sạch xà phòng bằng nước máy nhiều lần dưới vòi nước chảy mạnh.
- Đưa cành mẫu vào tủ cấy vô trùng, ngâm trong cồn 70% trong 2-3 phút
- Rửa sạch cồn bằng nước cất vô trùng 1 lần
- Xử lý mẫu bằng $Ca(OCl)_2$ 6% trong 10 phút sau đó thay bằng dung dịch $Ca(OCl)_2$ 5% trong 5 phút

- Rửa sạch mẫu bằng nước cất vô trùng 6-7 lần cho hết mùi javel
- Cành mẫu được cắt bỏ cuống lá và 2 đầu của phần thân đã bị chất khử trùng tẩy trắng. Chia cành mẫu thành các đốt 1cm
- Cắm các đốt vào môi trường nuôi cấy đã chuẩn bị, cho phần cuống lá hướng lên trên, chồi ngủ phải nằm trên mặt thoáng của môi trường.
- Nuôi mẫu trong điều kiện sáng 2000lux/16h/ngày ở 25°C.

2.3 Nuôi cấy phát triển cây thông qua giai đoạn protocorm

2.3.1 Nguyên vật liệu

Các đoạn chồi con *Dendrobium* cao 10cm

2.3.2 Môi trường nuôi cấy đỉnh sinh trưởng (cho 1L môi trường)

- | | | |
|------------------------------------|----------------------|-------------------------|
| - Khoáng đa lượng Knudson
100mL | - Vitamin Morel: 2mL | - Nước dừa: 150mL |
| - Khoáng vi lượng Heller
5mL | - Glycin :2mL | - Khoai tây: 60g |
| - Skoog II MS : 2mL | - Inositol : 5mL | - Than hoạt tính: 0,25g |
| | - Vitamin B1: 5mL | - pH: 5,5 |
| | - Đường: 30g | - Agar: 6g |

* Khoáng đa lượng của KnudsonC (Morel,G.M.,1965)

- | | |
|--|---------------------------------------|
| - NH_4NO_3 : 500mg/L | - KCl : 250 mg/L |
| - $\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$: 500mg/L | - KH_2PO_4 : 250 mg/L |
| - $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$: 241,3mg/L | - MgSO_4 : 122,15mg/L |

* Khoáng vi lượng của Heller (1953)

- | | |
|--|---|
| - $\text{AlCl}_3.6\text{H}_2\text{O}$: 0,054 mg/L | - $\text{MnSO}_4.\text{H}_2\text{O}$: 0,08 mg/L |
| - $\text{CuSO}_4.5\text{H}_2\text{O}$: 0,03 mg/L | - $\text{NiCl}_2.6\text{H}_2\text{O}$: 0,03 mg/L |
| - H_3BO_3 : 6,2 mg/L | - $\text{ZnSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$:1,0 mg/L |
| - KI : 0,01 mg/L | |

2.3.3 Các bước tiến hành:

- Rửa sạch chồi *Dendrobium* dưới vòi nước chảy. Dùng dao mổ lột hết các lá non bao xung quanh chồi cho đến khi để lộ ra các chồi bên và chồi ngọn
- Ngâm chồi trong nước xà phòng loãng và dùng gòn lau nhẹ lên thân chồi. Rửa cho sạch xà phòng dưới vòi nước chảy
- Lắc chồi trong cồn 70% trong 1 phút. Sau đó xử lý với dung dịch javel thương phẩm theo tỉ lệ 1:5 trong vòng 25-30 phút
- Trong tủ cấy, dùng kẹp vô trùng cho chồi vào các bécher có chứa nước cất vô trùng. lắc như thế 3-5 lần cho hết mùi javel.

- Đặt các chồi lên giấy vô trùng, dùng dao cắt riêng từng chồi bên và chồi ngọn ra khỏi chồi mẹ ban đầu. Nhổ cắt bỏ hết các mô chết đã bị chất khử trùng làm trắng ở phần gốc chồi. Cấy từng chồi vào ống nghiệm có chứa môi trường đã chuẩn bị.

- Nuôi trong phòng sáng
- Ghi rõ tên nhóm, ngày cấy, giống cây vào tất cả các ống nghiệm

2.4 Yêu cầu

- Thực hiện tốt thao tác cấy vô trùng và khử trùng mẫu

BÀI 5: NUÔI CÂY MÔ SẸO

^ ! ^

1. GIỚI THIỆU

Nuôi cây mô sẹo là khâu rất quan trọng trong nuôi cấy mô tế bào. Mô sẹo là nguyên liệu khởi đầu cho các nghiên cứu quan trọng khác như: phân hóa mô và tế bào, chọn dòng tế bào, nuôi cấy tế bào trần, nuôi cấy tế bào đơn, nuôi cấy phôi soma, sản xuất các chất thứ cấp có hoạt tính sinh học... Mô sẹo là một khối tế bào không có tổ chức, hình thành từ các mô và các cơ quan phân hóa dưới các điều kiện đặc biệt (có vết thương, xử lý các chất điều hòa sinh trưởng thực vật...). Các tế bào thuộc các mô hoặc cơ quan này phải chịu một sự phản phân hóa trước lần phân chia đầu tiên. Nhìn chung sự tạo mô sẹo *in vitro* (nhờ auxin tác động) do 3 quá trình:

- Sự phản phân hóa tế bào nhu mô (ít nhiều ở sâu bên trong cơ quan) bao gồm các tế bào nhu mô mộc và libe, nhu mô vỏ hay lõi.
- Sự phân chia của các tượng tầng: các tế bào tượng tầng của phần lớn STD dễ dàng phân chia dưới tác động của auxin thậm chí không cần auxin ngoại sinh như ở các loài cây cỏ hay dây leo.
- Sự xáo trộn của các mô phân sinh sơ khởi (chồi hay rễ) quá trình này được ưu tiên áp dụng ở ĐTD, vì các cây này tượng tầng thiếu và nhu mô khó phản phân hoá so với STD. Màu sắc của mô sẹo không giống nhau trên các môi trường nuôi cấy khác nhau hay trên các bộ phận khác nhau và chúng thường có màu vàng, trắng, nâu hay trắng xanh...

Nồng độ và loại kích thích tố sử dụng trong môi trường nuôi cấy là những yếu tố có ảnh hưởng đến sự hình thành và phát triển mô sẹo. Thường mô sẹo được hình thành trên môi trường giàu auxin; có thể dùng auxin riêng rẽ hay kết hợp với nhau hoặc có thể kết hợp với cytokinin tùy từng loại cây.

Hàm lượng hormon nội sinh và chiều di chuyển của các hormon này trong mẫu cây có ảnh hưởng đến sự phát sinh mô sẹo. Vì vậy nguồn mẫu cây, việc lấy mẫu cây, cách đặt mẫu cây trên môi trường nuôi cấy sẽ ảnh hưởng đến sự phát sinh mô sẹo dẫn đến những phản ứng khác nhau của mẫu cây.

Với một số cây thì vấn đề này không quan trọng nhưng cũng có một số cây chịu ảnh hưởng rất lớn.

2. THỰC HÀNH

2.1. Mục đích:

Khảo sát sự phát sinh mô sẹo từ các bộ phận khác nhau ở cây thuốc lá

2.2 Vật liệu

2.2.1 Môi trường nuôi cấy

MS (20g/l đường) có bổ sung $0.1\mu\text{M}$ 2,4-D và $1\mu\text{M}$ 2,4-D

2.2.2 Nguyên liệu thực vật

Cây con thuốc lá *in-vitro*

2.2.3 Hoá chất và dụng cụ

- Nước cất vô trùng
- Dao, kẹp, đĩa cấy, giấy cấy...

2.3. Các bước thực hiện

Cẩn thận gắp cây con *in-vitro* ra khỏi bình nuôi cấy. Tránh kẹp quá mạnh làm dập mẫu cấy (hình A)

- Dùng dao cấy cắt đoạn rễ, lóng thân và lá chuyển qua một đĩa cấy khác

để xử lý mẫu (hình B)

- Lá: cắt bỏ gân lá và rìa lá. Phần lá còn lại được cắt thành nhiều mảnh

nhỏ với kích thước $0,8 - 1\text{mm} \times 8 - 10\text{mm}$. Đặt các mảnh lá này nuôi trên các đĩa petri chứa môi trường MS + $1\mu\text{M}$ 2,4-D BC

- Lóng thân: chọn các đoạn lóng thân có đường kính $2 - 2,5\text{mm}$ được cắt lát mỏng $0,05 - 0,1\text{mm}$ bằng lưỡi dao thật sắc. Các lát cắt được đặt nằm trên các đĩa petri chứa môi trường MS + $1\mu\text{M}$ 2,4-D

Rễ: Rửa sạch agar bằng nước cất vô trùng, cắt nhỏ thành từng đoạn $1 - 1,5\text{mm}$ đặt lên các đĩa petri có chứa môi trường MS + $0.1\mu\text{M}$ 2,4-D

- Dùng nhựa nylon cuốn quanh mép đĩa petri để đảm bảo sự vô trùng trong thời gian nuôi cấy.
- Ghi rõ số nhóm, tên mẫu cấy, tên môi trường và ngày cấy.
- Đặt nuôi trong tối

4. Yêu cầu:

- Thao tác xử lý mẫu cấy tốt, lát cắt đứt khoát càng mỏng càng tốt; tránh dập mẫu
- Ghi nhận và so sánh thời gian phát sinh sẹo, hình dạng và màu sắc khối mô sẹo, vị trí phát sinh sẹo từ các mẫu cấy khác nhau.

BÀI 6:

KHẢO SÁT SỰ PHÁT SINH CHỒI TỪ CÁC BỘ PHẬN KHÁC NHAU CỦA CÂY THUỐC LÁ

^ ! ^

1. GIỚI THIỆU

Nhân giống cây trồng bằng phương pháp nuôi cấy mô tế bào *invitro* được gọi là vi nhân giống. Có nhiều phương pháp vi nhân giống khác nhau để tạo chồi từ đó tạo cây con *invitro* hoàn chỉnh. Tùy thuộc vào từng đối tượng khác nhau mà sử dụng phương pháp phù hợp và tất nhiên mỗi phương pháp sẽ có những ưu và nhược điểm riêng

** Vi nhân giống bằng phương pháp cắt đốt giâm cành*

- Hệ số nhân thấp
- Thường ứng dụng ở các đối tượng khó tạo cụm chồi (ví dụ như lan sò...)

** Vi nhân giống bằng cách tách chồi từ cụm chồi*

- Hệ số nhân cao
- Phức tạp hơn trong việc kích thích chồi phát triển cao thành cây con hoàn chỉnh

Cụm chồi có thể được hình thành từ nhiều con đường khác nhau:

- Tái sinh từ mô sẹo (khả năng đột biến cao hơn nên thường được sử dụng trong nuôi cấy chọn lọc giống mới)
- Phát sinh chồi bất định từ các cơ quan không sinh sản của cây như lông thân, lá, cuống lá, rễ, trục phát hoa, lá đài, cánh hoa... (mẫu cây trải qua giai đoạn phản phân hóa để tạo các tế bào sinh mô; tiếp đến là giai đoạn tạo cơ quan với giai đoạn trung gian tạo mô sẹo mà ta có thể quan sát thấy hoặc không rồi từ đó mới phát sinh chồi bất định)
- Phá trạng thái tiềm sinh của các chồi ngủ ở mẫu cây là 1 tổ chức như đốt thân, đỉnh sinh trưởng. Cần kiểm soát hormone tăng trưởng để chặn đứng sự phát triển của chồi để tạo nhiều chồi (cụm chồi) Về nguyên tắc có thể kích thích sự thành lập chồi bất định từ tất cả các cơ quan không sinh sản của thực vật. Tuy nhiên trên thực tế thường chỉ thành công trên đối tượng là lá và cuống lá ngoại trừ ở một số đối tượng kinh điển, dễ làm như thuốc lá, cà chua... Hàm lượng và loại kích thích tố bổ sung vào môi trường có ảnh hưởng quyết định đến sự thành lập chồi (thường sử dụng kích thích tố nhóm cytokinin với nồng độ cao kết hợp với nhóm auxin có nồng độ thấp). Khả năng tái tạo chồi còn phụ thuộc vào kích thích của mẫu cây. Mẫu cây quá nhỏ có thể không đáp ứng được với các điều kiện nuôi cấy và sẽ hoá nâu.

2. THỰC HÀNH

2.1. Mục đích

Chứng minh nguyên tắc vi nhân giống và khả năng tái tạo chồi bất định từ các bộ phận khác nhau của thực vật

2.2. Vật liệu

2.2.1 Môi trường

MS (20g/l đường) có bổ sung $10\mu\text{M}$ BA

2.2.2 Nguyên liệu thực vật

Cây con thuộc lá *invitro*

2.2.3 Hoá chất và dụng cụ

- Nước cất vô trùng
- Dao cắt, kẹp, đĩa cây và giấy cây vô trùng...

2. 3. Các bước tiến hành

Xử lý mẫu cây tương tự bài 5 và cấy vào các đĩa petri có chứa môi trường đã chuẩn bị (Rễ, Lóng thân, Phiến lá)

4.Yêu cầu

- Thực hiện tốt thao tác xử lý mẫu cây
- Lát cắt lóng thân cần mỏng đến kích thước yêu cầu
- Quan sát và ghi nhận kết quả về sự thành lập chồi , thời gian và số lượng chồi trên mỗi mẫu cây.

BÀI 7: KHẢO SÁT SỰ TÁI SINH CHỒI TỪ MÔ SẸO

^ ! ^

1.GIỚI THIỆU

Quá trình hình thành cơ quan trong mô xảy ra qua 2 giai đoạn:

- Giai đoạn thứ nhất là tái phân hóa. Trong giai đoạn này xảy ra quá trình chuyển các tế bào biệt hóa thành mô sẹo
- Giai đoạn thứ hai là hình thành các mầm mống cơ quan. Bằng phương pháp phóng xạ tế bào đã thấy rằng những tế bào của các mầm mống nhu mô mà ở đây được hình thành mầm mống cơ quan, tổng hợp DNA và protein xảy ra rất mạnh, hàm lượng đường cũng tăng. Trong quá trình phân hóa, ở các mô sẹo không có tổ chức được hình thành các cấu trúc hình thái dẫn đến việc tạo chồi, rễ, cành, hoa và cây hoàn chỉnh. Quá trình phân hóa này có thể thực hiện bằng cách thay đổi một số chất và các chất điều hòa sinh trưởng trong môi trường nuôi cấy Đối với mô sẹo, xu thế tạo

cơ quan giảm dần khi mô cấy chuyển nhiều lần vì khi cấy chuyển nhiều lần như thế thường hình thành các tế bào đa bội

và lệch bội, ngoài ra có thể mất các yếu tố di truyền.

Theo Vũ Văn Vụ (1999) mô sẹo khi hình thành thường có 2 loại:

- Loại xốp: chứa nhiều tế bào xốp với nhân nhỏ, tế bào chất lỏng và không bào to.
- Loại cứng: Các tế bào cứng, chắc thành khối, nhân to, tế bào chất đậm đặc và không bào nhỏ.

Dạng mô sẹo cũng có ảnh hưởng đến khả năng tái sinh cơ quan của khối mô. Khả năng tái sinh chồi sớm mất đi ở mô sẹo xốp nhưng vẫn duy trì ở mô sẹo cứng. Nguyên nhân có thể do các tế bào mô sẹo sẽ mất đi khả năng tổng hợp một số chất thiết yếu cho sự tái sinh của nó khi số lần cấy chuyển tăng lên (Gauthier, 1962). Vì vậy khi nuôi cấy mô sẹo nhằm mục đích tái sinh chồi, nhất thiết phải cố gắng tìm điều kiện môi trường thích hợp cho sự hình thành các khối mô sẹo cứng, chắc; các mô sẹo xốp cần được loại bỏ trong các lần cấy chuyển vì đôi khi dạng mô sẹo này phát triển rất nhanh và lấn át cả các mô sẹo cứng có khả năng tái sinh phôi.

2.THỰC HÀNH

2.1. Mục đích:

Chứng minh khả năng tái sinh chồi từ mô sẹo

2.2. Vật liệu:

2.2.1 Môi trường

MS (30g đường) + BA 1,5 μ M + NAA 0,5 μ M

2.2.2 Nguyên liệu thực vật

Mô sẹo từ lông thân, lá và rễ của bài 3 sau 4 tuần nuôi cấy

2.2.3 Hoá chất và dụng cụ

- Nước cất vô trùng
- Dao cấy, kẹp, đĩa cấy và giấy cấy vô trùng...

2. 3. Các bước thực hiện

- Dùng kẹp gấp mô sẹo từ bình mẫu cho vào đĩa petri
- Dùng dao cấy lấy sạch phần agar còn bám vào mẫu
- Nếu mô sẹo quá lớn thì cắt nhỏ thành từng mẫu khoảng 1/2 ngón tay
- Cấy vào môi trường tái sinh chồi đã chuẩn bị
- Ghi rõ tên nhóm, tên môi trường, tên giống, ngày cấy
- Đặt mẫu nuôi trong phòng sáng

4. Yêu cầu:

- Thực hiện tốt thao tác cấy chuyển

- Ghi nhận tỉ lệ mẫu tạo chồi, thời gian tái sinh chồi, số chồi trên mỗi mẫu, kích thước chồi, sự biến đổi của mẫu

- So sánh sự phát triển của các loại mô sẹo từ các bộ phận khác nhau. Rút ra nhận xét.

Rễ	Phiến lá	Chồi tái	Mô sẹo
Lóng thân		sinh	

BÀI 8: ĐƯA CÂY RA VƯỜN ƯƠM

^ ! ^

1. GIỚI THIỆU

Các kỹ thuật chiết cành, giâm cành và ghép là các phương pháp nhân giống vô tính thực vật hay còn gọi là nhân giống *in vivo*. Ngoài ra còn có kỹ thuật nhân giống *in vitro* hay nuôi cấy mô là một phương pháp nhân giống vô tính thực vật cho hệ số nhân cao hơn các kỹ thuật trên Cây con *in vitro* khi đã phát triển hoàn chỉnh có đầy đủ thân, lá và rễ sẽ được chuyển ra vườn ươm. Đây là giai đoạn khó khăn nhất trong kỹ thuật nhân giống vô tính bằng nuôi cấy mô. Cây *in vitro* được nuôi cấy trong điều kiện ổn định về dinh dưỡng, ánh sáng, nhiệt độ, ẩm độ... nên khi chuyển ra đất với các điều kiện tự nhiên hoàn toàn khác hẳn như dinh dưỡng thấp, ánh sáng có cường độ mạnh, nhiệt độ cao, ẩm độ thấp... cây con dễ bị stress, dễ mất nước và mau bị héo. Mặt khác trong môi trường tự nhiên có rất nhiều vi khuẩn và nấm gây bệnh làm thối và chết cây. Để khắc phục tình trạng này, người ta có các biện pháp như sau:

- Vườn ươm cây cấy mô phải mát, cường độ chiếu sáng thấp, nhiệt độ không khí thấp, ẩm độ thấp
- Cây con được trồng trên luống ươm cây có cơ chất dễ thoát nước, tơi xốp, giữ được độ ẩm. Cơ chất và cây con cần được xử lý với thuốc chống nấm hoặc thuốc tím để phòng ngừa nấm bệnh cho cây
- Trước khi đưa cây ra vườn ươm nên để các bình mẫu ngoài vườn ươm trong 1-2 tuần cho cây thích nghi dần với điều kiện tự nhiên - Trong những ngày đầu đưa cây ra vườn ươm, luống ươm cây cần được phủ nylon để giảm quá trình thoát hơi nước ở lá (thường 7-10 ngày sau khi ra cây). Mỗi ngày nên tưới nước 2 lần kèm theo phun sương thường xuyên khi trời nắng nhằm duy trì độ ẩm.
- Cây con sau khi trồng 7-10 ngày cần phải bón phân để cây phát triển đồng thời phun thuốc ngừa nấm bệnh.

2. THỰC HÀNH

2.1. Mục đích

Làm quen các kỹ thuật đưa cây ra vườn ươm

2.2. Vật liệu

2.2.1. Đối tượng cây giống:

- Cây con Lan Hoàng Thảo (*Dendrobium sp.*) *in-vitro*
- Cây con Thuộc lá *in-vitro*

2.2.1 Nguyên liệu và dụng cụ

- | | | |
|----------------|-------------------|-------------|
| - Xơ dừa | - Dây thun | - Thau nhựa |
| - Tro trấu | - Túi ươm 12x17cm | - Rổ nhựa |
| - Cát xây dựng | - Kẹp | - Bình phun |

2. 3. Các bước thực hiện

- Cho một ít nước vào các bình môi trường có cây giống, lắc mạnh để môi trường vỡ ra.
- Dùng kẹp gấp nhẹ nhàng cây giống ra khỏi bình tránh làm đứt, dập thân, lá hoặc rễ cây
- Rửa sạch agar bám ở rễ cây bằng 1 tấm nhon; cần thao tác nhẹ nhàng để không làm đứt và dập rễ ; nếu không khi đem trồng ở vườn ươm cây sẽ dễ bị nhiễm nấm bệnh và chết.
- Ngâm cây trong dung dịch thuốc tím 10/100 trong 1 phút sau đó rửa lại bằng nước sạch để ráo.
- Đối với Thuộc lá (giá thể trồng là hỗn hợp xơ dừa, tro trấu và cát xây dựng): Dùng 1 cây đũa xâm các lỗ ươm trên túi ươm với độ sâu khoảng 5cm. Đặt gọn rễ cây con vào lỗ ươm và dùng tay ép chặt đất lại để giữ cây đứng vững. Ươm 5 cây cho 1 túi ươm
- Đối với Lan hoàng thảo (giá thể trồng là xơ dừa): Gói gọn phần rễ trong miếng xơ dừa, dùng thun buộc nhẹ để định hình cây. Xếp vào rổ nhựa, tưới phun sương nhẹ trước khi đưa ra vườn ươm.

4. Yêu cầu:

- Thực hành thao tác đưa cây con ra vườn ươm, tránh làm dập và đứt rễ quá nhiều
- Quan sát tỷ lệ cây con sống sót sau khi ra vườn ươm.