

**TRƯỜNG CAO ĐẲNG LƯƠNG THỰC THỰC PHẨM
KHOA CÔNG NGHỆ SINH HỌC
BỘ MÔN CÔNG NGHỆ TẾ BÀO**

BÀI THỰC HÀNH
CÔNG NGHỆ TẾ BÀO THỰC VẬT

NGÀNH: CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Trình độ: Cao đẳng

Tổng số giờ thực hành: 30 tiết/1 nhóm

Năm 2015

Bài 1. CHUẨN BỊ DỤNG CỤ, HÓA CHẤT NUÔI CÂY

Mục tiêu: Sau khi học xong bài này, sinh viên có khả năng:

- Trình bày đầy đủ các dụng cụ, thiết bị và hóa chất cần thiết cho thí nghiệm nuôi cấy mô tế bào thực vật.
- Thực hiện các thao tác vận hành dụng cụ, thiết bị dùng trong thí nghiệm nuôi cấy mô tế bào thực vật.
- Tuân thủ nội quy của phòng thí nghiệm và có ý thức bảo vệ thiết bị.

Thời gian thực hành: 5 tiết

Nhóm thực hành: 15-20 học sinh/sinh viên

Địa điểm thực hành: Phòng thí nghiệm

Nội dung bài thực hành:

1. Sơ lược về lý thuyết

- Đối với các dụng cụ dùng trong các bài thực hành phải rửa sạch bằng xà phòng; chùi sạch bằng cồn; khử trùng bằng quá trình hấp, sấy để đảm bảo độ chính xác cho các thí nghiệm trong bài thực hành.
- Các thiết bị được kiểm tra trong tình trạng bình thường để phục vụ cho các thí nghiệm tốt và đảm bảo an toàn cho người làm sử dụng. Và sinh viên sẽ được hướng dẫn cách vận hành và tự thực hiện thao tác vận hành dưới sự giám sát của giáo viên hướng dẫn thực hành.

2. Hóa chất, nguyên liệu

- Cồn tuyệt đối: 20 Lít
- Xà phòng: 0.5 Kg

3. Dụng cụ và thiết bị

- Bình thủy tinh; micropipet và các hộp chứa các loại đầu côn
- Máy cất nước 1 lần (8 L/giờ)
- Máy cất nước 2 lần (4 L/giờ)
- Máy sản xuất nước khử ion
- Máy cấp nước siêu sạch
- Nồi khử trùng
- Máy đo pH
- Máy khuấy từ
- Cân phân tích 10^{-4} g
- Cân kỹ thuật 10^{-2} g
- Bếp điện (bếp từ)
- Microwave (lò vi sóng)
- Tủ cấy vô trùng (Laminar, Clean Bench)

- Máy lắc nằm ngang (100-200 vòng/phút)
- Hệ thống Bioreactor (mô hình của trường CD LT-TP)

4. Các bước tiến hành

4.1. Chuẩn bị dụng cụ, thiết bị cho thí nghiệm

- Bình thủy tinh trước khi được dùng để đựng hóa chất phải được rửa sạch và sấy khô.
- Khử trùng Tube eppendoff và các loại đầu côn bằng cách hấp vô trùng và sấy.

4.2. Sử dụng dụng cụ, thiết bị dùng trong thí nghiệm

- Kiểm tra đầy đủ các dụng cụ, thiết bị dùng trong các thí nghiệm.
- Thực hiện các thao tác vận hành thiết bị (quy trình vận hành đã được dán trên thiết bị)
- Hướng dẫn và giải thích từng thao tác dùng dụng cụ và thao tác vận hành thiết bị
- Cho từng sinh viên tiến hành các thao tác trên dụng cụ và thiết bị

4.3. Cách sử dụng một số thiết bị chính trong nuôi cấy mô

4.3.1. Tủ sấy

- Xếp các dụng cụ cần khử trùng hoặc sấy khô vào các giá đỡ trong tủ sấy
- Đóng cửa tủ, bật công tắc để tủ hoạt động.
- Xoay núm để điều chỉnh kim chỉ trên đồng hồ nhiệt độ và kim chỉ trên đồng hồ thời gian tới các chỉ số mong muốn tương ứng với từng mục đích: Khi làm khô hoặc sấy mẫu vật, dụng cụ đặt chế độ 60 - 120⁰C. Khử trùng dụng cụ đặt chế độ 120 - 300⁰C trong vòng 20-50 phút.
- Nhiệt độ và thời gian mong muốn được duy trì nhờ bộ phận điều khiển tự động.
- Tắt tủ sấy, để nhiệt độ trong tủ hạ xuống 40 - 60⁰C mới mở tủ lấy dụng cụ. Tránh mở tủ lấy dụng cụ khi nhiệt độ trong tủ còn đang cao sẽ làm dụng cụ thủy tinh dễ bị nứt vỡ.

Chú ý: Nếu trong tủ sấy có dụng cụ bằng nhựa, plastic thì không đặt nhiệt độ quá 60⁰C. Không nên để tủ sấy hoạt động qua đêm. Không để mẫu vật dễ cháy sát mặt dưới tủ. Không cho mẫu vật còn sống hoặc chưa ráo nước vào tủ.

4.3.2. Box cấy vô trùng (Laminair)

Thiết bị có cấu trúc dạng hộp, có khả năng làm vô trùng không khí trong box cấy nhờ đèn chiếu tia cực tím và hệ thống bơm, lọc khí bên ngoài thành không khí vô trùng thổi vào box đồng thời với bộ phận hút khí bên trong box cấy luôn được đảm bảo sự cân bằng áp suất trong và ngoài box. Vì vậy, không khí bên trong box cấy luôn luôn được vô trùng hay ít nhất cũng hạn chế tối đa sự tồn tại của vi sinh vật. Màng lọc của box cấy ngăn cản tất cả vi sinh vật có kích thước lớn hơn 0,2-0,3 μ M.

- Vệ sinh box cấy và kiểm tra tất cả dụng cụ cần thiết để dùng trong box cấy
- Bật đèn UV trong 15-25 phút

- Tắt đèn UV trong box cấy, bật công tắc quạt gió, đèn chiếu sáng.
- Khi làm việc trong box cấy phải mặc áo blu ngắn tay chỉ dùng trong phòng cấy, đeo khẩu trang, sát trùng tay bằng cồn 70⁰.
- Khi tiến hành xong các thao tác cấy, phải chuyển hết các hóa chất, vật liệu, dụng cụ ra khỏi box. Lau sạch mặt bàn trong box cấy với cồn 70⁰. Tắt hệ thống quạt và đèn.

4.3.3. Hệ thống cân

4.3.3.1. *Cân kỹ thuật*: dùng để cân chính xác hóa chất, mẫu vật nhất định có trọng lượng lớn hơn 1000 mG

- Trước khi cân và kiểm tra cân đã về trạng thái cân bằng chưa (giọt nước nằm giữa vòng tròn nằm ở bên hoặc phía sau cân)
- Bấm nút ON
- Đợi vài giây cho cân thật ổn định. Thông số trên cân sẽ là: 0.00g
- Đặt giấy cân (dụng cụ cân) lên bàn cân
- Đợi vài giây. Chữ số lên là trọng lượng của giấy cân
- Bấm nút ZERO để cân tự trừ trọng lượng của giấy cân. Màn hình sẽ xuất hiện: 0,00g
- Dùng thìa cân hóa chất cho vào giấy cân đến trọng lượng cần cân
- Lấy giấy cân có hóa chất ra khỏi cân.
- Bấm nút OFF để tắt cân
- Vệ sinh cân: Lấy giấy mềm hoặc khăn lau mặt bàn cân.

Chú ý: Khi đang cân không được bật quạt

4.3.3.2. *Cân phân tích*: Dùng cân để hóa chất, mẫu vật có trọng lượng lớn hơn 1mG. Cách sử dụng tương tự cân kỹ thuật.

4.4. Chuẩn bị đầy đủ các hóa chất dùng trong các thí nghiệm tiếp theo

Cồn 95⁰, KH₂PO₄, Bông không thấm, Nước cất, NH₄NO₃, MgSO₄.7H₂O, MnSO₄.4H₂O, CuSO₄.5H₂O, CoCl₂.6H₂O, ZnSO₄.7H₂O, Na₂MoO₄.2H₂O, KI, FeSO₄.7H₂O, Myo-Inositol, HCl, NaOH, Thiamine. HCl, Pyridoxin.HCl, Na₂-EDTA, H₃BO₃, CaCl₂.H₂O, Nicotinic acid, Glycin, NAA, BA, Ribozole, Kinetin, Đường saccharose

5. Kết quả

- Chuẩn bị đầy đủ các hóa chất, dụng cụ, thiết bị dùng trong thí nghiệm
- Sử dụng được dụng cụ và vận hành được thiết bị dùng trong thí nghiệm

Bài 2. CHUẨN BỊ MÔI TRƯỜNG NUÔI CÂY

Mục tiêu: Sau khi học xong bài này, sinh viên có khả năng:

- Trình bày được quy trình tiến hành pha hóa chất, pha môi trường nuôi cấy mô tế bào thực vật.
- Thực hiện được các thao tác pha hóa chất cần dùng trong thí nghiệm nuôi cấy mô tế bào thực vật theo đúng trình tự và yêu cầu kỹ thuật
- Tuân thủ nội quy của phòng thí nghiệm và có ý thức bảo vệ thiết bị.

Thời gian thực hành: 5 tiết

Nhóm thực hành: 15-20 học sinh/sinh viên

Địa điểm thực hành: Phòng thí nghiệm

Nội dung bài thực hành:

1. Sơ lược lý thuyết

Thành công chính trong các thí nghiệm nuôi cấy mô và tế bào thực vật là tìm ra thành phần vật chất của môi trường dinh dưỡng cần thiết để tế bào có thể sinh trưởng và phát triển được. Thành phần của môi trường dinh dưỡng thay đổi tùy theo loài và bộ phận nuôi cấy, tùy theo sự phát triển và phân hóa của mô cấy, tùy theo việc muốn duy trì mô ở trạng thái callus, muốn tạo rễ, tạo mầm hay muốn tái sinh cây hoàn chỉnh.

Người ta đã đưa ra rất nhiều loại môi trường khác nhau cho các thí nghiệm nuôi cấy mô. Đa số chúng có tính đặc hiệu cao, có nghĩa là chúng được nghiên cứu ra để nuôi cấy những mô đặc biệt nào đó. Một số môi trường khác có ứng dụng rộng hơn và đảm bảo sinh trưởng tốt cho nhiều loài cây, tuy nhiên không có những chỉ dẫn chung nào cho rằng môi trường nào trong chúng bảo đảm sinh trưởng tốt hơn. Để bắt đầu, cần phải thử trong những môi trường thông dụng nào đó, chẳng hạn môi trường Murashige -Skoog (1962) nếu không thành công thì sau đó thử trên các môi trường khác.

Tuy vậy, tất cả những môi trường nuôi cấy bao giờ cũng gồm năm thành phần chính:

- Đường cung cấp nguồn carbon.
- Các muối khoáng đa lượng.
- Các muối khoáng vi lượng.
- Các vitamin.
- Các chất điều khiển sinh trưởng.

Hiện nay, môi trường Murashige-Skoog được coi như là một môi trường thích hợp với nhiều loại cây do giàu và cân bằng về chất dinh dưỡng. Vì vậy,

những người mới tập sự nuôi cấy mô thường bắt đầu với môi trường này trước khi tìm ra được môi trường riêng của mình.

2. Chuẩn bị các dung dịch làm việc

Để thuận tiện cho việc pha các môi trường nuôi cấy (môi trường làm việc), người ta không cân hóa chất cho mỗi lần pha môi trường mà chuẩn bị trước dưới dạng đậm đặc (stock), sau đó chỉ cần pha loãng khi sử dụng. Các dung dịch đậm đặc được bảo quản dài ngày trong tủ lạnh thường hoặc tủ lạnh sâu. Nếu chuẩn bị môi trường tốt thì sẽ giảm một số thời gian đáng kể cho công tác nuôi cấy.

2.1. Chuẩn bị môi trường Murashige-Skoog (MS, 1962).

Chia làm 5 phần:

Bảng 2.1. Thành phần môi trường MS

Dung dịch stock	Nồng độ (mg/L)	Nồng độ trong dung dịch mẹ (g/200 mL)	Dung tích dùng cho 1 L môi trường
MS ₁ : KNO ₃ KH ₂ PO ₄ NH ₄ NO ₃ MgSO ₄ .7H ₂ O	1900 170 1650 370	(× 10) { 19 1,7 16,5 3,7	20 mL
MS ₂ : CaCl ₂ .2H ₂ O	440	(×20) 8,8	10 mL
MS ₃ : H ₃ BO ₃ MnSO ₄ .4H ₂ O CoCl ₂ .6H ₂ O CuSO ₄ .5H ₂ O ZnSO ₄ .4H ₂ O Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O KI	6,2 22,3 0,025 0,025 8,6 0,25 0,83	(× 20) { 0,124 0,446 0,5 mg 0,5 mg 0,172 5 mg 16,6 mg	10 mL
MS ₄ : FeSO ₄ .7H ₂ O Na ₂ -EDTA	27,8 37,3	(× 20) { 0,556 0,746	10 mL
MS ₅ : myo-inositol Thiamine.HCl Pyridoxine.HCl Nicotinic acid Glycine	100 0,1 0,5 0,5 2	(×20) { 2 2 mg 10 mg 10 mg 40 mg	10 mL

2.2. Chuẩn bị môi trường Nitsch (Nt, 1956).

Chia làm 5 phần:

Bảng 2.6. Thành phần môi trường Nitsch

Dung dịch stock	Nồng độ (mg/L)	Nồng độ trong dung dịch mẹ (g/200 mL)	Dung tích dùng cho 1 L môi trường
Nt ₁ : KNO ₃ KH ₂ PO ₄ NH ₄ NO ₃ MgSO ₄ .7H ₂ O	950 68 720 185	(× 10) $\left\{ \begin{array}{l} 9,5 \\ 0,68 \\ 7,2 \\ 1,85 \end{array} \right.$	20 mL
Nt ₂ : CaCl ₂ .2H ₂ O	166	(×20) 1,66	10 mL
Nt ₃ : H ₃ BO ₃ MnSO ₄ .4H ₂ O CuSO ₄ .5H ₂ O ZnSO ₄ .4H ₂ O Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	10 25 0,0025 10 0,25	(× 20) $\left\{ \begin{array}{l} 0,2 \\ 0,5 \\ 0,05 \text{ mg} \\ 0,2 \\ 0,5 \text{ mg} \end{array} \right.$	10 mL
Nt ₄ : FeSO ₄ .7H ₂ O Na ₂ -EDTA	27,8 37,3	(× 20) $\left\{ \begin{array}{l} 0,556 \\ 0,746 \end{array} \right.$	10 mL
Nt ₅ : myo-inositol Thiamine.HCl Pyridoxine.HCl Nicotinic acid Glycine Biotin Acid folic	100 0,5 0,5 5 0,05 2 0,5	(× 20) $\left\{ \begin{array}{l} 2 \\ 10 \text{ mg} \\ 10 \text{ mg} \\ 100 \text{ mg} \\ 40 \text{ mg} \\ 1 \text{ mg} \\ 10 \text{ mg} \end{array} \right.$	10 mL

2.3. Chuẩn bị môi trường nuôi cấy protoplast (theo Trigiano & Gray, 2000)

- Môi trường phân lập (Protoplast Isolation medium –PI)

Bảng 2.2. Thành phần môi trường phân lập PI

Stt	Thành phần	Nồng độ (mg/L)
1	CaCl ₂ .H ₂ O	1480
2	KH ₂ PO ₄	27,2
3	KNO ₃	101
4	MgSO ₄ .7H ₂ O	246
5	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
6	KI	0,16
pH môi trường		5,8

- Môi trường nuôi cấy (Protoplast Culture medium –PC)

Bảng 2.3. Thành phần môi trường PC

Dung dịch stock	Nồng độ (mg/L)	Nồng độ trong dung dịch mẹ (g/200 mL)	Dung tích dùng cho 1 L môi trường
PC ₁ : Ca(H ₂ PO ₄) ₂ .2H ₂ O CaCl ₂ .2H ₂ O	100 450	(× 20) { 2 9	10 mL
PC ₂ : KNO ₃ NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O (NH ₄) ₂ SO ₄ MgSO ₄ .7H ₂ O	2500 170 134 250	(× 20) { 50 3,4 1,68 5	10 mL
PC ₃ : H ₃ BO ₃ MnSO ₄ .4H ₂ O CoCl ₂ .6H ₂ O CuSO ₄ .5H ₂ O ZnSO ₄ .7H ₂ O Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O KI	3 13,2 0,025 0,025 2 0,25 0,75	(× 20) { 60 mg 132 mg 0,5 mg 0,5 mg 40 mg 5 mg 15 mg	10 mL
PC ₄ : myo-inositol Nicotinic acid	100 1	(× 20) { 2 20 mg	10 mL

Lấy mỗi loại stock PC (PC₁, PC₂, PC₃ và PC₄) 10 mL. Bổ sung thêm:

+ Sequestrene 330 28 mg/L

+ Sucrose 10 g/L

+ Glucose 18 g/L

+ Mannitol 100 g/L

3. Nguyên liệu, hóa chất

Cồn 95⁰, KH₂PO₄, Bông khô thấm, Nước cất, NH₄NO₃, MgSO₄.7H₂O, MnSO₄.4H₂O, CuSO₄.5H₂O, CoCl₂.6H₂O, ZnSO₄.7H₂O, Na₂MoO₄.2H₂O, KI, FeSO₄.7H₂O, Myo-Inositol, HCl, NaOH, Thiamine. HCl, Pyridoxin.HCl, Na₂-EDTA, H₃BO₃, CaCl₂.H₂O, Nicotinic acid, Glycin, NAA, BA, Ribozole, Kinetin, Đường saccharose

4. Dụng cụ, thiết bị

- Bình thủy tinh, bì nilong, dây thun

- Micropipet và các hộp chứa các loại đầu côn
- Nồi khử trùng
- Máy đo pH
- Máy khuấy từ
- Cân phân tích 10^{-4} g
- Cân kỹ thuật 10^{-2} g
- Bếp điện (bếp từ)

5. Cách tiến hành

5.1. Pha môi trường stock MS (MS1, MS2, MS3, MS4, MS5)

- Chuẩn bị 5 chai thủy tinh sạch (500-1000mL)
- Lần lượt cân từng hóa chất có trong các dung dịch MS1, MS2, MS3, MS4, MS5 (bảng 2.5)
- Mỗi dung dịch MS đựng từng chai riêng.

5.2. Pha và nấu môi trường dinh dưỡng (1 Lit)

- Lấy dung dịch 5 loại MS như ở bảng 2.5
- Lấy dung dịch chất kích thích sinh trưởng (theo công thức môi trường dinh dưỡng nuôi cấy)
- Cân đường sacharose 20-30g và hòa tan trong các dung dịch trên
- Cân 7-8g agar (nếu môi trường nuôi cấy ở dạng rắn)
- Đo pH dung dịch môi trường (pH:5,8)
- Định mức dung dịch môi trường đến 1L
- Đổ dung dịch môi trường vào chai thủy tinh
- Đậy chai thủy tinh bằng nilong và dây thun
- Hấp các chai môi trường

6. Kết quả

- Môi trường dinh dưỡng nuôi cấy
- Môi trường dinh dưỡng đạt yêu cầu
- + độ rắn vừa phải, trong suốt
- Môi trường dinh dưỡng không đạt yêu cầu
- + môi trường cứng hoặc lỏng, có màu

Bài 3. NUÔI CÂY ĐỈNH SINH TRƯỞNG

Mục tiêu: Sau khi học xong bài này, sinh viên có khả năng:

- Nêu được nguyên tắc chung của việc vào mẫu đỉnh sinh trưởng, nuôi cấy đỉnh sinh trưởng.
- Trình bày được quy trình tiến hành khử trùng mẫu và cấy mẫu đỉnh sinh trưởng
- Thực hiện các thao tác tiến hành khử trùng mẫu và cấy mẫu đỉnh sinh trưởng;
- Tuân thủ nội quy của phòng thí nghiệm và có ý thức bảo vệ thiết bị.

Thời gian thực hành: 5 tiết

Nhóm thực hành: 15-20 học sinh/sinh viên

Địa điểm thực hành: Phòng thí nghiệm

Nội dung bài thực hành:

1. Sơ lược lý thuyết

Một phương thức dễ dàng nhất để đạt được mục tiêu trong nuôi cấy mô và tế bào thực vật là nuôi cấy đỉnh sinh trưởng (bao gồm nuôi cấy chồi đỉnh và chồi bên). Môi trường thích hợp thay đổi tùy theo từng loại cây trồng được đưa vào nuôi cấy nhưng cơ bản là môi trường chứa đầy đủ chất dinh dưỡng khoáng vô cơ và hữu cơ, được bổ sung chất kích thích sinh trưởng thích hợp. Từ một đỉnh sinh trưởng sau một thời gian nuôi cấy nhất định sẽ phát triển thành một chồi hay nhiều chồi. Sau đó chồi tiếp tục phát triển vươn thân, ra lá và rễ trở thành một cây hoàn chỉnh. Cây con được chuyển ra đất có điều kiện sinh trưởng phát triển bình thường. Đây là một chu trình ngắn nhất và tiện lợi hơn các phương thức nhân giống thông thường, được thực hiện bằng kỹ thuật nhân giống vô tính *in vitro* thông qua nuôi cấy đỉnh sinh trưởng.

Khi chọn đỉnh sinh trưởng để nhân giống cần lưu ý, nếu dùng đỉnh sinh trưởng nhỏ quá thì nuôi cấy khó thành công, nếu dùng đỉnh sinh trưởng lớn quá thì nuôi cấy dễ thành công nhưng cũng dễ bị nhiễm trùng. Kích thước của đỉnh sinh trưởng thay đổi tùy theo từng loài cây, tuy nhiên một đỉnh sinh trưởng có kích thước 5-10 mm là thích hợp hơn cả.

2. Nguyên liệu và hóa chất

- Cành cúc *in vivo*
- Nước cất khử trùng
- Cồn tuyệt đối
- Bông thấm nước

- $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ (HgCl_2 0,1%)

3. Dụng cụ và thiết bị

- Chai thủy tinh chứa môi trường nuôi cấy
- Lọ thủy tinh khử trùng mẫu vật nuôi cấy
- Forceps, kéo, dao mổ
- Đĩa petri vô trùng
- Cốc chịu nhiệt, ống đong, micropipette các loại
- Đèn cồn, ống đựng cồn
- Laminar

4. Cách tiến hành

- Rửa sạch đoạn thân có mầm lá và chồi đỉnh bằng xà phòng dưới dòng nước chảy, cắt bỏ những lá chung quanh chỉ để lại một vài lá, cho vào lọ thủy tinh vô trùng để chuẩn bị khử trùng mẫu vật.
- Trước khi cấy, laminar phải được bật đèn khử trùng 30 phút. Các dụng cụ cần thiết cho quá trình cấy (forceps, kéo, dao, bình khử trùng, cồn, giấy thấm...) được đặt trong laminar trước khi bật đèn.
- Khử trùng sơ bộ bằng cồn 90% từ 30 giây đến 1 phút, sau đó bằng HgCl_2 0,1% trong 5 phút, cuối cùng rửa sạch HgCl_2 bằng nước cất vô trùng từ 4-5 lần (*các thao tác này thực hiện trong laminar*).
- Lấy mẫu vật ra thấm khô trên giấy thấm vô trùng bóc bỏ những lá chung quanh, chỉ giữ lại đỉnh sinh trưởng (những phần mô thấm dung dịch khử trùng cũng cần phải cắt bỏ). Sau đó, cấy mẫu vào các bình tam giác chứa môi trường dinh dưỡng đã được chuẩn bị sẵn. Các bình môi trường đã cấy mẫu được đặt trong phòng nuôi với nhiệt độ $25 \pm 2^\circ\text{C}$, thời gian chiếu sáng 8-10 giờ/ngày với cường độ 2000-3000 lux.

Sau 3-4 tuần, đỉnh sinh trưởng (trong chồi bên, trong chồi đỉnh) sẽ phát triển thành cây nhờ quá trình kéo dài chồi (shoot elongation).

5. Kết quả

- Các bình môi trường dinh dưỡng chứa các đỉnh sinh trưởng
- Quan sát các chồi đỉnh và chồi bên
- + Các chồi không có dấu hiệu bị nhiễm, vẫn xanh: sẽ phát triển chồi
- + Các chồi có dấu hiệu bị nhiễm, màu thay đổi chuyển sang đen: chồi sẽ không phát triển

Bài 4. CÂY CHUYỀN NHANH NHÂN

Mục tiêu: Sau khi học xong bài này, sinh viên có khả năng:

- Nêu được nguyên tắc chung của việc cấy chuyền nhân nhanh.
- Trình bày được quy trình tiến hành cấy chuyền nhân nhanh.
- Thực hiện các thao tác tiến hành cấy chuyền nhân nhanh.
- Tuân thủ nội qui của phòng thí nghiệm và có ý thức bảo vệ thiết bị.

Thời gian thực hành: 5 tiết

Nhóm thực hành: 15-20 học sinh/sinh viên

Địa điểm thực hành: Phòng thí nghiệm

Nội dung bài thực hành:

1. Sơ lược về lý thuyết:

Sau khi nuôi cấy đỉnh sinh trưởng thành công, tạo chồi. Giai đoạn tiếp theo sẽ nhân nhanh chồi để tạo nguyên liệu tạo cây hoàn chỉnh.

Chồi được đưa lên môi trường dinh dưỡng thích hợp thì trong một thời gian ngắn sẽ tái sinh nhiều chồi từ chồi ban đầu.

2. Nguyên liệu và hóa chất

- Các bình cúc *in vitro*
- Cồn

3. Dụng cụ và thiết bị

- Chai thủy tinh chứa môi trường nuôi cấy
- Forceps, kéo, dao mổ
- Đĩa petri vô trùng
- Đèn cồn, ống đựng cồn
- Laminar

4. Cách tiến hành

- Trước khi cấy, laminar phải được bật đèn khử trùng 30 phút. Các dụng cụ cần thiết cho quá trình cấy (forceps, kéo, dao, bình khử trùng, cồn, giấy thấm...) được đặt trong laminar trước khi bật đèn.

- Lấy mẫu vật ra thấm khô trên giấy thấm vô trùng bóc bỏ những lá chung quanh, chỉ giữ lại đỉnh sinh trưởng (những phần mô thấm dung dịch khử trùng cũng cần phải cắt bỏ). Sau đó, cấy mẫu vào các bình tam giác chứa môi trường dinh dưỡng đã được chuẩn bị sẵn. Các bình môi trường đã cấy mẫu được đặt trong phòng nuôi với nhiệt độ $25 \pm 2^\circ\text{C}$, thời gian chiếu sáng 8-10 giờ/ngày với cường độ 2000-3000 lux.

Sau 3-4 tuần, chồi mới sẽ xuất hiện từ chồi ban đầu

5. Kết quả

- Quan sát thấy chồi vẫn xanh và phát sinh thêm chồi mới: quá trình nhân nhanh chồi thành công
- Quan sát thấy chồi vẫn xanh mà không phát sinh thêm chồi mới: quá trình nhân nhanh chồi không thành công
- Quan sát thấy chồi chuyển màu sang đen: quá trình nhân nhanh chồi không thành công (chồi chết)

Bài 5. TÁI SINH CÂY

Mục tiêu: Sau khi học xong bài này, sinh viên có khả năng:

- Nêu được nguyên tắc chung của việc tái sinh cây.
- Trình bày được quy trình tiến hành tái sinh cây;
- Thực hiện các thao tác tiến hành tái sinh cây;
- Tuân thủ nội qui của phòng thí nghiệm và có ý thức bảo vệ thiết bị.

Thời gian thực hành: 5 tiết

Nhóm thực hành: 15-20 học sinh/sinh viên

Địa điểm thực hành: Phòng thí nghiệm

Nội dung bài thực hành:

1. Sơ lược về lý thuyết

Trong các giai đoạn của quá trình nuôi cấy mô tạo cây con *in vitro*, giai đoạn tạo rễ (tái sinh cây) không thể thiếu được vì rễ là cơ quan hút chất dinh dưỡng và nước để cung cấp cho cây. Các chồi phải hình thành rễ để tạo cây hoàn chỉnh. Trên môi trường dinh dưỡng thích hợp các chồi sẽ tạo rễ.

2. Nguyên liệu và hóa chất

- Các chồi cúc *in vitro*
- Cồn
- Chai thủy tinh chứa môi trường nuôi cấy
- Forceps, kéo, dao mổ
- Đĩa petri vô trùng
- Đèn cồn, ống đựng cồn
- Laminar

4. Cách tiến hành

- Trước khi cấy chuyển mẫu ta phải khử trùng tủ cấy
- + Đưa các dụng cụ cần thiết vào tủ cấy sau khi đã vệ sinh tủ sạch bằng cồn
- + Bật đèn UV trong tủ từ 30-45 phút
- + Tắt đèn UV và bật đèn và quạt gió trong tủ cấy để làm việc (khi cửa tủ đóng hay đang chế độ khử trùng thì không được bật quạt)
- + Dùng bông thấm cồn chùi bên ngoài chai môi trường và chai đựng mẫu *in vitro* trước khi đưa vào tủ cấy
- + Khử trùng dụng cụ trên ngọn đèn cồn thật cẩn thận
- + Để dụng cụ vừa khử trùng xong không còn nóng mới được sử dụng
- + Mở nắp bình đựng mẫu nhẹ nhàng, dùng kẹp đưa mẫu ra khỏi miệng bình một cách nhẹ nhàng, đặt vào 1 khay
- + 1 tay dùng dao hay kéo để cắt chồi ra, tay kia sẽ dùng kẹp để giữ mẫu

- + Mở nắp bình môi trường nhân nhanh nhẹ nhàng, dùng kẹp đưa các chồi con hay đoạn thân vào bình môi trường tái sinh
- + Đậy nắp bình lại và ghi chú trên bình: tên giống mẫu, ngày cấy, tên người cấy
- + Đưa bình môi trường đã cấy mẫu qua phòng nuôi

5. Kết quả

- Chồi vẫn xanh và tạo rễ : quá trình tái sinh thành công
- Chồi vẫn xanh không tạo rễ : quá trình tái sinh không thành công
- Chồi chuyển màu sang đen : quá trình tái sinh thành công (chồi đang có dấu hiệu chết)

Bài 6. ĐƯA CÂY RA VƯỜN

Mục tiêu: Sau khi học xong bài này, sinh viên có khả năng:

- Nêu được nguyên tắc chung của việc đưa cây ra vườn.
- Trình bày được quy trình tiến hành đưa cây ra vườn;
- Thực hiện các thao tác tiến hành đưa cây ra vườn;
- Tuân thủ nội qui của phòng thí nghiệm và có ý thức bảo vệ thiết bị.

Thời gian thực hành: 5 tiết

Nhóm thực hành: 15-20 học sinh/sinh viên

Địa điểm thực hành: Phòng thí nghiệm

Nội dung bài thực hành:

1. Sơ lược về lý thuyết

- Giai đoạn cuối cùng của nuôi cấy mô tạo cây con *in vitro* là đưa cây ra vườn. Cây *in vitro* phải sống được trên môi trường tự nhiên. Cây con *in vitro* được huấn luyện để thích nghi với điều kiện hoàn toàn tự nhiên (*in vivo*)
- Tùy vào điều kiện sống của từng loại cây mà chọn giá thể cho thích hợp vì đó chính là nơi để rễ cây *in vitro* bám vào và lấy chất dinh dưỡng. Ví dụ: đối với phong lan thì giá thể phải đảm bảo sự thoáng khí cho rễ phát triển rất quan trọng, nó biểu hiện khả năng áp dụng kỹ thuật nuôi cấy mô vào thực tiễn sản xuất. Vì vậy, kỹ thuật huấn luyện cây con *in vitro* là một bước không thể thiếu được trong kỹ thuật nuôi cấy mô.
- Tỷ lệ sống của cây khi đưa ra trồng ngoài vườn ươm là một chỉ tiêu

2. Nguyên liệu và hóa chất

- Cây phong lan *in vitro*
- Xơ dừa (bột dừa)

3. Dụng cụ, thiết bị

- Kẹp lấy mẫu, thùng xốp (khay xốp)
- Các bình mẫu (cây con *in vitro*) đã được huấn luyện
- Chậu, bình xịt

4. Cách tiến hành

- Chuyển các dụng cụ cần thiết, giá thể, bình đựng mẫu ra vườn ươm
- Mở nắp bình, dùng kẹp lấy các cây ra nhẹ nhàng, rửa sạch bằng nước

Chú ý: Khi rửa cây không để cho cây bị dập nát, gãy lá hay rễ. Cây con đã xếp vào khay phải được bao lại bằng một lớp giấy đã làm ẩm để tránh làm mất nước của cây.

- Đưa các cây con đã rửa sạch vào chậu thuốc tím ngâm 10-15 phút, sau đó vớt ra và phân ra các ở các kích thước khác nhau để dễ cho việc trồng cây vào giá thể

- Làm giá thể xơ dừa: Đưa xơ dừa vào thùng xốp, xịt nước vào (tạo độ ẩm >70%)

- Đưa các cây con đã phân loại vào thùng xốp (dùng cây nhỏ tạo lỗ trên giá thể xơ dừa và đặt cây con vào vị trí đó)

Chú ý: Một tay cầm que chọc tạo lỗ trên giá thể, một tay cầm cây cho vào lỗ cây và dùng que ấn nhẹ xơ dừa sao cho cây không được cong rẽ và gãy rẽ. Không cầm tay lên ngọn cây hoặc lá cây để làm gãy ngọn/lá, nên cầm phần thân cây sát gốc. Mọi thao tác phải nhẹ nhàng, tránh làm tổn thương cây con.

- Sau khi trồng cây con xong, tiến hành phun sương lên các cây con và đặt ở vị trí tránh nắng lớn, nhiệt độ ổn định

- Theo dõi tưới nước 1 ngày 2 lần (buổi sáng, buổi chiều mát)

5. Kết quả

- Các cây con không héo vẫn xanh và phát triển: quá trình chuyển cây con *in vitro* ra vườn thành công

- Các cây con không héo vẫn xanh và không phát triển: quá trình chuyển cây con *in vitro* ra vườn không thành công

- Các cây con héo dần và không phát triển: quá trình chuyển cây con *in vitro* ra vườn không thành công