

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

GIÁO TRÌNH MÔ ĐUN
VI NHÂN GIỐNG CÂY TRỒNG

NGÀNH/NGHỀ: CÔNG NGHỆ SINH HỌC

TRÌNH ĐỘ: CAO ĐẲNG

(Ban hành kèm theo Quyết định số: 761/QĐ-TCĐLTTP-ĐT ngày 17 tháng 08 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

Công nghệ sinh học là một công nghệ mới mang nhiều hứa hẹn. Việc tăng cường sử dụng và trao đổi các sản phẩm công nghệ sinh học trong nông nghiệp đang thúc đẩy sự phồn vinh ở cả các nước phát triển và các nước đang phát triển.

Vi nhân giống cây trồng là một trong những công nghệ cao nhằm tạo ra các sản phẩm đồng đều có tính ưu việt và quy mô lớn cung cấp cho thị trường.

Giáo trình đã tích hợp những kiến thức, kỹ năng cần có của nghề, cập nhật những tiến bộ của khoa học kỹ thuật và kinh nghiệm thực tế về nghề vi nhân giống nhằm trang bị cho người học một số kiến thức và kỹ năng cơ bản để thực hiện các bước công việc nhân giống cây trồng bằng phương pháp nuôi cấy mô.

Giáo trình mô đun gồm 5 bài:

Bài 1. Giới thiệu vi nhân giống trang bị cho người học những khái niệm, cơ sở khoa học, những hạn chế của vi nhân giống và đặc điểm của một số loài cây lâm nghiệp, cây hoa và cây dược liệu quan trọng.

Bài 2. Chuẩn bị thiết bị, dụng cụ và nguyên liệu trang bị cho người học những kiến thức, kỹ năng lựa chọn thiết bị, dụng cụ, nguyên liệu và các điều kiện vi nhân giống.

Bài 3. Chuẩn bị hóa chất và pha chế môi trường dinh dưỡng trang bị cho người học những kiến thức và kỹ năng xác định, pha chế, bảo quản hóa chất và môi trường dùng trong nghề vi nhân giống.

Bài 4. Thực hiện các giai đoạn trong quy trình nhân giống trang bị cho người học những kiến thức và kỹ năng cơ bản về nuôi cấy khởi đầu, nhân nhanh, tạo cây hoàn chỉnh và huấn luyện cây mầm.

Bài 5. Cấy cây và chăm sóc cây giống ở vườn ươm trang bị cho người học những kiến thức và kỹ năng cơ bản về chuẩn bị vườn ươm, cấy cây và chăm sóc cây mô ở vườn ươm.

Giáo trình là cơ sở cho các giảng viên soạn bài giảng để giảng dạy, là tài liệu nghiên cứu và học tập của người học. Các thông tin trong Giáo trình có giá trị hướng dẫn giảng viên thiết kế và tổ chức giảng dạy mô đun một cách hợp lý. Giảng viên có thể vận dụng cho phù hợp với điều kiện và bối cảnh thực tế trong quá trình dạy học.

Trong quá trình biên soạn Giáo trình mô đun chắc chắn không tránh khỏi những thiếu sót. Chúng tôi rất mong nhận được những ý kiến đóng góp quý báu của các nhà khoa học, các nhà quản lý và các bạn đọc để hiệu chỉnh và hoàn thiện giáo trình.

Đà Nẵng, ngày 07 tháng 07 năm 2017

Tham gia biên soạn

1. Nguyễn Hữu Nhân
2. Nguyễn Thị Duy Khoa

MỤC LỤC

LỜI GIỚI THIỆU.....	1
MỤC LỤC.....	2
BÀI 1. GIỚI THIỆU VI NHÂN GIỐNG	5
1. Một số thuật ngữ dùng trong vi nhân giống	5
1.1. Nuôi cấy đỉnh phân sinh (<i>meristem-tip culture</i>)	5
1.2. Sinh sản chồi nách (<i>axillary shoot proliferation</i>)	5
1.3. Tạo chồi bất định (<i>adventitious shoot induction</i>)	5
1.4. Phát sinh cơ quan (<i>organogenesis</i>)	5
1.5. Phát sinh phôi vô tính (<i>somatic embryogenesis</i>)	5
2. Tính toàn thể của tế bào	6
2.1. Khái niệm vi nhân giống	6
2.2. Cơ sở khoa học của vi nhân giống (Tính toàn thể của tế bào)	6
2.3. Những lợi thế và hạn chế của vi nhân giống	6
3. Sự phân hóa và phản phân hóa của tế bào	8
4. Các phương thức vi nhân giống	9
4.1. Tái sinh cây mới từ các cấu trúc sinh dưỡng	10
4.2. Nhân giống thông qua giai đoạn <i>callus</i>	13
5. Đặc điểm của một số loài cây lâm nghiệp và dược liệu quan trọng	14
5.1. Cây Keo lá tràm (<i>Acacia auriculiformis</i>)	14
5.2. Cây Keo tai tượng (<i>Acacia mangium</i>).	14
5.3. Cây keo lai.....	14
5.4 Cây Bạch đàn trắng (<i>Eucalyptus camldulensis</i>)	15
5.5. Cây Bạch đàn <i>Urophylla</i> (<i>Eucalyptus erophylla</i>).....	15
5.6. Cây Tếch (<i>Tectona grandis</i>)	16
5.7. Cây Lát hoa (<i>Chukrasia tabularis</i>).	16
5.8. Cây Sao đen (<i>Hopea odorata Roxb</i>)	16
BÀI 2. CHUẨN BỊ THIẾT BỊ, DỤNG CỤ VÀ NGUYÊN LIỆU.....	18
1. Chuẩn bị thiết bị, dụng cụ vi nhân giống	18
1.1. Máy lọc, cất nước	18
1.2. Thiết bị, dụng cụ hấp sấy, khử trùng	18
1.3. Thiết bị, dụng cụ chuẩn bị môi trường	19
1.4. Nhóm các máy khuấy, lắc	23
1.5. Thiết bị, dụng cụ cấy vô trùng.....	23
1.6. Thiết bị, dụng cụ nuôi mẫu cấy.....	25
1.7. Dụng cụ thủy tinh trong phòng thí nghiệm	25

1.8. Cách rửa dụng cụ thủy tinh	26
2. Chuẩn bị vật liệu vi nhân giống.....	27
2.1. Đối tượng của vi nhân giống	28
2.2. Lựa chọn cây giống gốc để lấy mẫu nuôi cấy	28
2.3. Lựa chọn mẫu mô (bộ phận cây) đưa vào nuôi cấy	28
3. Tổ chức, sắp xếp dây chuyền vi nhân giống.....	30
3.1. Phòng pha chế và xử lý môi trường	30
3.2. Phòng cấy.....	30
3.3. Phòng nuôi.....	31
3.4. Khu vực huấn luyện cây con	31
BÀI 3. CHUẨN BỊ HÓA CHẤT VÀ PHA CHẾ MÔI TRƯỜNG DINH DƯỠNG	34
1. Phân loại hóa chất dùng trong vi nhân giống	34
1.1. Nhóm hóa chất khử trùng.....	35
1.2. Nhóm các nguyên tố tạo môi trường dinh dưỡng	35
1.3. Các chất bổ sung khác	35
1.4. Nhóm hóa chất làm đông cứng môi trường	35
2. Vai trò, đặc tính lý, hóa, sinh học của các hóa chất dùng trong vi nhân giống	35
2.1. Nguyên tố đa lượng	35
2.2. Nguyên tố vi lượng	36
2.3. Các vitamin	36
2.4. Nguồn carbon	36
2.5. Các chất điều hòa sinh trưởng	36
2.6. Các chất bổ sung khác	37
2.7. Chất làm đông cứng môi trường	38
2.8. Danh mục các chất cho nuôi cấy cần dùng trong vi nhân giống	38
3. Pha chế hóa chất và bảo quản dung dịch mẹ	39
3.1. Cách pha chế và bảo quản khoáng Đa lượng và Vi lượng	40
3.2. Cách pha chế và bảo quản vitamin (MS5)	41
3.3. Cách pha chế và bảo quản chất điều hòa sinh trưởng	41
3.4. Những vấn đề cần lưu ý khi sử dụng dung dịch mẹ	42
3.5. Những vấn đề cần lưu ý khi bảo quản hóa chất	43
4. Pha chế bảo quản môi trường dinh dưỡng	43
4.1. một số môi trường nền nuôi cấy phổ biến	43
4.2. Công thức và cách pha chế môi trường nuôi cấy.....	43
4.3. Khử trùng môi trường nuôi cấy	46
BÀI 4. THỰC HIỆN CÁC GIAI ĐOẠN TRONG QUY TRÌNH NHÂN GIỐNG	49
1. Lấy mẫu để vi nhân giống	49

1.1. Chuẩn bị mẫu cấy	49
1.2. Xử lý mẫu	50
2. Nuôi cấy khởi đầu	50
2.1. Kiến thức cần thiết để thực hiện công việc	50
2.2. Quy trình nuôi cấy khởi đầu	53
2.3. Trình tự các bước.....	53
3. Nhân nhanh chồi.....	55
3.1. Kiến thức cần thiết để thực hiện công việc	55
3.2. Quy trình nhân nhanh	56
3.3. Trình tự các bước.....	56
4. Nuôi cấy tạo rễ (tạo cây hoàn chỉnh).....	58
4.1. Kiến thức cần thiết để thực hiện công việc	58
4.2. Quy trình tạo cây hoàn chỉnh	59
4.3. Trình tự các bước.....	59
5. Huấn luyện cây con.....	60
BÀI 5. CÂY CÂY VÀ CHĂM SÓC CÂY GIỐNG Ở VƯỜN ƯƠM	62
1. Chuẩn bị vườn ươm.....	62
1.1. Chuẩn bị các thiết bị, dụng cụ phục vụ vườn ươm	62
1.2. Chuẩn bị hỗn hợp bầu dinh dưỡng cho cây.....	63
2. Cây cây con ở vườn ươm	65
2.1. Chuẩn bị vật liệu, dụng cụ	65
2.2. Khử trùng bầu dinh dưỡng	65
2.3. Lấy cây ra khỏi bình	65
2.4. Thao tác cấy cây mô vào bầu	66
3. Chăm sóc cây mô ở vườn ươm	67
3.1. Đặc điểm sinh trưởng và phát triển của cây mô ở giai đoạn vườn ươm	67
3.2. Các biện pháp kỹ thuật chăm sóc cây mô ở vườn ươm	67
3.3. Tiêu chuẩn cây mô xuất vườn.....	68
HƯỚNG DẪN GIẢNG DẠY MÔ ĐUN.....	70
I. Vị trí, tính chất của mô đun.....	70
II. Mục tiêu của mô đun.....	70
III. Nội dung chính của mô đun	71
IV. Hướng dẫn thực hiện bài tập thực hành	71
V. Yêu cầu về đánh giá kết quả học tập.....	73
VI. Tài liệu tham khảo	81

BÀI 1. GIỚI THIỆU VI NHÂN GIỐNG

Mã bài: VNG-01

Mục tiêu

Sau khi học xong bài học này học viên có khả năng:

- Trình bày được khái niệm và cơ sở khoa học của kỹ thuật vi nhân giống;
- Nêu được đặc điểm của các phương thức vi nhân giống;
- So sánh được những ưu điểm và hạn chế của vi nhân giống với các phương pháp nhân giống khác.

A. Nội dung

1. Một số thuật ngữ dùng trong vi nhân giống

1.1. Nuôi cấy đỉnh phân sinh (*meristem-tip culture*)

Phương thức nhân giống bằng cách dùng các phần rất nhỏ của đỉnh chồi (shoot-tip) bao gồm mô phân sinh đỉnh riêng rẽ (single apical meristem) và mầm lá non (young leaf primordia) để kéo dài chồi (shoot elongation) ngay sau đó. Kiểu nuôi cấy này được dùng lần đầu tiên để làm sạch virus (virus-free) ở thực vật. Nếu dùng đỉnh phân sinh không thể sống sót và tạo rễ một cách độc lập, thì có thể thay thế bằng phương thức vi ghép (micrografting).

1.2. Sinh sản chồi nách (*axillary shoot proliferation*)

Kiểu nuôi cấy này sử dụng chồi của các điểm sinh trưởng bên và ngọn nơi mà sự kéo dài của chồi ngọn (elongation of terminal shoot) bị kìm hãm và sự sinh sản chồi nách được đẩy mạnh. Sự điều khiển này cho phép nhân nhanh được các chồi *in vitro* (microshoots), là các chồi có thể tách ra và tạo rễ *in vitro* để hình thành cây trong ống nghiệm (microplants), hoặc nó có thể được cắt ra riêng biệt tạo thành các cành giâm *in vitro* (microcuttings) để tạo rễ bên ngoài *in vitro*.

1.3. Tạo chồi bất định (*adventitious shoot induction*)

Loại nuôi cấy này cho phép hình thành các chồi bất định 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.

1.4. Phát sinh cơ quan (*organogenesis*)

Thuật ngữ này dùng để mô tả quá trình phát triển các chồi hoặc/và rễ bất định từ các khối tế bào callus. Quá trình này xảy ra sau thời điểm mà mẫu vật được đặt vào môi trường nuôi cấy và sự bắt đầu cảm ứng tạo callus.

1.5. Phát sinh phôi vô tính (*somatic embryogenesis*)

Thuật ngữ này dùng cho sự phát triển của các phôi hoàn chỉnh từ các tế bào sinh dưỡng được sản xuất từ các nguồn mẫu vật khác nhau sinh trưởng trong nuôi cấy *in vitro*. Thuật ngữ tương đương đối với sự phát triển phôi ở thực vật sinh trưởng trong điều kiện tự nhiên là phát sinh phôi hữu tính (zygotiic embryogenesis) và phát sinh phôi vô tính (apomitiic embryogenesis).

2. Tính toàn thể của tế bào

2.1. Khái niệm vi nhân giống

- Nuôi cấy mô (*tissue culture*) là thuật ngữ dùng để chỉ quá trình nuôi cấy vô trùng *in vitro* các bộ phận tách rời khác nhau của thực vật. Kỹ thuật nuôi cấy mô dùng cho cả hai mục đích nhân giống và cải thiện di truyền (ví dụ: giống cây trồng), sản xuất sinh khối các sản phẩm hóa sinh, bệnh học thực vật, duy trì và bảo quản các nguồn gen quý... Các hoạt động này được bao hàm trong thuật ngữ công nghệ sinh học (biotechnology).

- Vi nhân giống (*micro propagation*) hay còn gọi là nhân giống *in vitro* (*in vitro propagation*) được sử dụng đặc biệt cho việc ứng dụng các kỹ thuật nuôi cấy mô để nhân giống thực vật, bắt đầu bằng nhiều bộ phận khác nhau của thực vật có kích thước nhỏ, sinh trưởng ở điều kiện vô trùng trong các ống nghiệm hoặc trong các loại bình nuôi cấy khác.

Nhân giống *in vitro* và nuôi cấy mô bắt đầu bằng các mảnh cắt nhỏ của thực vật, sạch vi sinh vật, và được nuôi cấy vô trùng. Thuật ngữ đầu tiên dùng trong quá trình nhân giống là explant (mẫu vật) tương đương với các phương thức nhân giống khác là cutting (cành giâm), layer (cành chiết), scion (cành ghép) hoặc seed (hạt).

2.2. Cơ sở khoa học của vi nhân giống (Tính toàn thể của tế bào)

Tế bào là đơn vị cơ sở (đơn vị sinh lý) để cấu tạo nên cơ thể thực vật. Khi cơ thể chỉ là tế bào hợp tử thì mọi hoạt động sống đều được thực hiện trong tế bào duy nhất ấy. Nhưng khi cơ thể trưởng thành (cơ thể do nhiều tế bào hay đa bào) thì mọi hoạt động sống của các tế bào tạo nên hoạt động sống thống nhất của cả cơ thể thực vật.

Về mặt di truyền phân tử có thể nói toàn bộ quá trình phát triển cá thể của cây từ hợp tử cho đến khi cây chết ở tuổi tối đa đã được mã hoá trong cấu trúc của phân tử ADN đặc trưng của loài.

Đời sống của cây là quá trình thực hiện dần dần chương trình di truyền đó. Dưới sự thay đổi và tác động của điều kiện nội tại cũng như điều kiện ngoại cảnh mà các chương trình di truyền đó dần dần được biểu hiện thông qua phát sinh hình thái của cây.

Tính toàn năng của tế bào tức là nó có thể tồn tại độc lập nếu nuôi trong môi trường dinh dưỡng nhân tạo thì có thể tái sinh phát triển thành cơ thể hoàn chỉnh. Như vậy bất cứ tế bào nào của cây cũng có thể tái sinh trở thành cây hoàn chỉnh (trực tiếp hay cũng có thể tái sinh thông qua hình thành mô sẹo). Đây chính là cơ sở của nhân giống cây trồng bằng kỹ thuật nuôi cấy mô tế bào (kỹ thuật *in vitro*) hay kỹ thuật nhân bản ở thực vật.

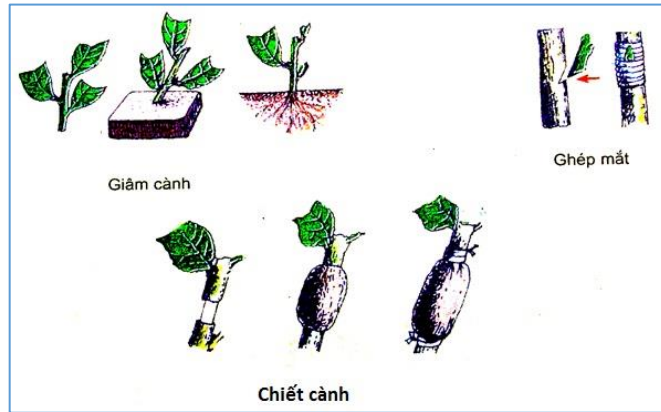
2.3. Những lợi thế và hạn chế của vi nhân giống

2.3.1. Các phương pháp nhân giống ở thực vật

2.3.1.1. Nhân giống bằng các phương pháp truyền thống

a. Nhân giống bằng hạt: dựa vào khả năng sinh sản hữu tính của cây.

b. Nhân giống bằng phương pháp sinh dưỡng như giâm, chiết, ghép là dựa vào khả năng sinh sản vô tính của thực vật.

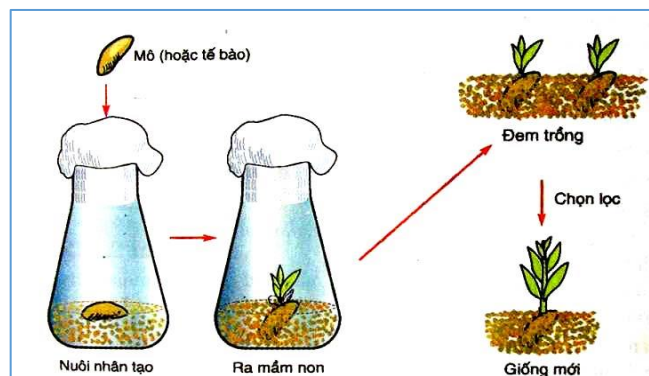


Hình 1.1. Các phương pháp nhân giống truyền thống

Nhân giống bằng phương pháp truyền thống tuy đơn giản có tính khả thi dễ thực hiện và dễ áp dụng nhưng hệ số nhân giống không cao. Cây giống luôn có sự tích lũy nguồn bệnh qua các lần nhân nên gây thoái hoá giống. Chu kỳ sống ngắn.

2.3.1.2. Nhân giống bằng phương pháp hiện đại

Đây là nuôi cấy tế bào tách rời hoặc mô không có nguồn vi sinh vật (sạch bệnh) trong môi trường dinh dưỡng nhân tạo vô trùng sẽ tái sinh thành cây mới hoàn chỉnh.



Hình 1.2. Tổng quan về nhân giống in vitro

2.3.2. Ưu điểm của vi nhân giống

- Đưa ra sản phẩm nhanh hơn: Từ một cây ưu việt bất kỳ đều có thể tạo ra một quần thể có độ đồng đều cao với số lượng không hạn chế, phục vụ sản xuất thương mại, dù cây đó là dị hợp về mặt di truyền.

- Nhân nhanh với hệ số nhân giống cao từ 1 cây trong vòng 1-2 năm có thể tạo thành hàng triệu cây.

- Sản phẩm cây giống đồng nhất, tạo ra quần thể có độ đồng đều cao dù xuất phát từ cây mẹ có kiểu gen dị hợp hay đồng hợp.

- Tiết kiệm không gian: Mật độ cây tạo ra trên một đơn vị diện tích lớn hơn rất nhiều so với sản xuất trên đồng ruộng và trong nhà kính theo phương pháp truyền thống.

- Nâng cao chất lượng cây giống: Cây giống sạch bệnh tạo ra bằng cấy mô thường tăng năng suất 15 - 30% so với giống gốc.

- Khả năng tiếp thị sản phẩm tốt hơn và nhanh hơn: Các dạng sản phẩm khác nhau có thể tạo ra từ vi nhân giống có thể được bán ở dạng cây, củ bi hay là thân củ.

- Lợi thế về vận chuyển: Các cây con kích thước nhỏ có thể vận chuyển đi xa dễ dàng và thuận lợi, đồng thời cây con tạo ra trong điều kiện vô trùng được xác nhận là sạch bệnh. Do vậy, bảo đảm an toàn, đáp ứng các qui định về vệ sinh thực vật quốc tế.

- Sản xuất quanh năm: Quá trình sản xuất có thể tiến hành vào bất kỳ thời gian nào, không phụ thuộc mùa vụ.

2.3.3. Hạn chế của vi nhân giống

- Hạn chế về chủng loại sản phẩm: Trong điều kiện kỹ thuật hiện nay, không phải tất cả cây trồng đều được nhân giống thương phẩm bằng vi nhân giống. Nhiều cây trồng có giá trị kinh tế hoặc quý hiếm vẫn chưa thể nhân nhanh để đáp ứng nhu cầu thương mại hoặc bảo quản nguồn gen. Nhiều vấn đề lý thuyết liên quan đến nuôi cấy và tái sinh tế bào thực vật *in vitro* vẫn chưa được giải đáp.

- Chi phí sản xuất cao: Vi nhân giống đòi hỏi lao động có trình độ cao. Do đó, giá thành sản phẩm còn khá cao so với các phương pháp truyền thống như chiết, ghép và nhân giống bằng hạt.

- Hiện tượng sản phẩm bị biến đổi kiểu hình:

+ Cây con nuôi cấy mô có thể sai khác với cây mẹ ban đầu do hiện tượng biến dị tế bào soma. Kết quả là cây con không giữ được các đặc tính quý của cây mẹ.

+ Tỷ lệ biến dị thường thấp ở giai đoạn đầu nhân giống, nhưng sau đó có chiều hướng tăng lên khi nuôi cấy kéo dài và tăng hàm lượng các chất kích thích sinh trưởng.

+ Hiện tượng biến dị này cần được lưu ý khắc phục nhằm đảm bảo sản xuất hàng triệu cây giống đồng nhất về mặt di truyền.

3. Sự phân hóa và phản phân hóa của tế bào

Cơ thể thực vật trưởng thành là một chỉnh thể thống nhất bao gồm nhiều cơ quan chức năng khác nhau, được hình thành từ nhiều loại tế bào khác nhau. Tuy nhiên, tất cả các loại tế bào đó đều bắt nguồn từ một tế bào đầu tiên (tế bào hợp tử). Ở giai đoạn đầu, tế bào hợp tử tiếp tục phân chia thành nhiều tế bào phôi sinh chưa mang chức năng riêng biệt (chuyên hóa). Sau đó từ các tế bào phôi sinh này chúng tiếp tục được biến đổi thành các tế bào chuyên hóa đặc biệt cho các mô, cơ quan có chức năng khác nhau.

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

Quá trình phân hóa có thể biểu thị như sau:

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

Tuy nhiên, khi tế bào đã phân hóa thành các tế bào có chức năng chuyên, chúng không hoàn toàn mất khả năng biến đổi mình. Trong trường hợp cần thiết, ở điều kiện thích hợp, chúng lại có thể trở về dạng tế bào phôi sinh và phân chia mạnh mẽ. Quá trình đó gọi là phản phân hóa tế bào, ngược lại với sự phân hóa tế bào.

Ví dụ: khi nuôi cấy mô thuốc lá, các tế bào đã phân hóa của lá gặp điều kiện thích hợp của môi trường sẽ phản phân hóa và phân chia liên tục tạo nên các mô sẹo (callus). Các tế bào mô sẹo không còn là tế bào có chức năng như tế bào lá nữa. Nếu

chuyển các callus này sang môi trường khác, tùy theo thành phần môi trường mà callus lại phân hóa theo hướng hình thành chồi, rễ và có thể hình thành nên cây hoàn chỉnh.

Về bản chất thì 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 tính trạng mới, còn một số gen khác lại bị đình chỉ hoạt động. Điều này xảy ra theo một chương trình đã được mã hóa trong cấu trúc của phân tử DNA của mỗi tế bào khiến quá trình sinh trưởng phát triển của cơ thể thực vật được hài hòa.

Mặt khác, khi tế bào nằm trong một khối mô của cơ thể thường bị ức chế bởi các tế bào xung quanh. Khi tách riêng từng tế bào hoặc giảm kích thước của khối mô sẽ tạo điều kiện thuận lợi cho sự hoạt hóa các gen của tế bào.

Hầu hết các tế bào thực vật đã biệt hóa có thể phát triển thành callus hoặc huyền phù tế bào không biệt hóa dưới sự cảm ứng của một chế độ hormone nhất định, dẫn đến sự bất tử của tế bào thực vật. Các tế bào thực vật có khả năng phát triển đến một cấu trúc có biệt hóa bằng cách thay đổi chương trình phát sinh hình thái của nó. Tế bào mầm (tế bào có khả năng tự sinh sản và biệt hóa thành những loại mô khác nhau) có thể tồn tại trong trạng thái không biệt hóa và tùy theo sự phân chia có thể biệt hóa thành một hay nhiều loại tế bào phụ thuộc vào những tế bào cơ bản, từ đó các cơ quan bên sẽ được hình thành.

Tế bào mầm được tìm thấy với lượng nhỏ trong mô phân sinh đỉnh chồi và mô phân sinh đỉnh rễ, tại đó những tế bào mầm này vẫn tồn tại trong trạng thái không biệt hóa trước khi trải qua quá trình biệt hóa tạo nên nhiều loại mô khác nhau. Những tế bào khối u hoặc những tế bào mô sẹo phát triển một con đường khóa sự biệt hóa bình thường và có khả năng tăng sinh không giới hạn, mặc dù việc trở về trạng thái biệt hóa bình thường có thể được thực hiện bằng cách điều khiển các điều kiện của môi trường nuôi cấy.

Quá trình phát sinh hình thái trong nuôi cấy mô, tế bào thực vật thực chất là kết quả của quá trình phân hóa và phản phân hóa tế bào. Kỹ thuật nuôi cấy mô, tế bào cho đến cùng là kỹ thuật điều khiển sự phát sinh hình thái của tế bào thực vật một cách định hướng dựa vào sự phân hóa và sự phản phân hóa của tế bào trên cơ sở tính toàn năng của tế bào thực vật. Để điều khiển sự phát sinh hình thái của mô nuôi cấy, người ta thường bổ sung vào môi trường nuôi cấy hai nhóm chất điều hòa sinh trưởng là auxin và cytokinin. Tỷ lệ hai nhóm này sẽ tạo ra sự phát sinh hình thái khác nhau. Khi môi trường nuôi cấy có tỷ lệ nồng độ auxin thấp thì sự phát sinh hình thái của mô nuôi cấy theo hướng tạo chồi, khi tỷ lệ này cao mô nuôi cấy sẽ phát sinh hình thái theo hướng tạo rễ, còn ở tỷ lệ cân đối sẽ phát sinh theo hướng tạo mô sẹo.

4. Các phương thức vi nhân giống

Phương pháp nhân giống *in vitro* thực chất là một bước 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 thượng 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 khổng 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 môi 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*:

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

Sự tái sinh cơ quan không xảy ra ngay khi vừa cô lập mẫu cây mà phải trải qua một quá trình phức tạp vì:

- Có những mối tương quan cần phải phá vỡ để lập lại những mối tương quan khác có thể đưa đến việc tái sinh cơ quan:

- Gồm có các quá trình sau:

- + Sự phân phân hóa của những tế bào đã phân hóa, có thể dẫn đến sự trẻ hóa của tế bào.

- + Sự phân chia tế bào, đôi khi tạo thành mô sẹo; khi tế bào phân chia thì bắt đầu xảy ra sự hình thành cơ quan.

- + Sự hình thành cơ quan

- + Sự phát triển cơ quan.

- Có một số hạn chế về mặt số lượng lẫn chất lượng do nhiều yếu tố:

- + Các yếu tố nội sinh trong mẫu cấy

- + Điều kiện tăng trưởng của cây mẹ trong nhà kính hoặc ngoài thiên nhiên

- + Vị trí của mẫu cấy trên cây

- + Thời gian nuôi mẫu trong năm

- + Hàm lượng chất điều hòa sinh trưởng thực vật nội sinh

- + Kích thước của mẫu cấy, phương pháp nuôi cấy, thành phần dinh dưỡng trong môi trường nuôi cấy, các chất điều hòa sinh trưởng, các yếu tố vật lý trong quá trình nuôi cấy như nhiệt độ, ánh sáng,...

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 (shoot-tip) hay đỉnh sinh trưởng (apex) làm mẫu vật nuôi cấy. Nó bao gồm mô phân sinh đỉnh (apical meristem) và các mầm lá non (young leaf primordia). 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, thông 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

- 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

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 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. Vì rằng, 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.

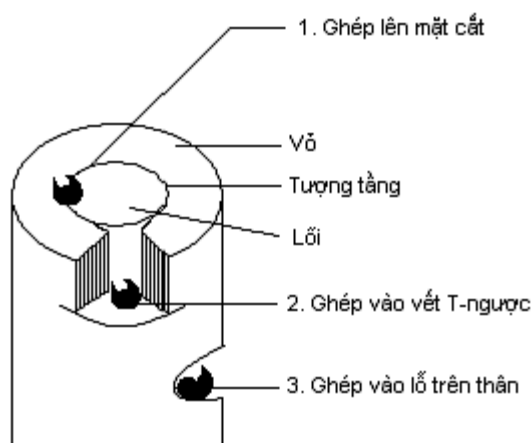


Hình 1.3. Protocom hoa lan

- 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 bóc 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 3.2).



Hình 1.4. Vị trí mắt ghép trong ba kiểu vi ghép khác nhau

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. 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 mỳ, thuốc lá...
- Nhánh củ: họ hành, họ lay ơn, họ thủy tiên...
- Đoạn mầm: măng tây.

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 $5 \mu\text{M}$) 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 ($\text{NAA} < 5 \mu\text{M}$) chỉ có chồi phát triển. Khi nồng độ auxin cao hơn ($\text{NAA} > 5 \mu\text{M}$) lá mầm tạo ra cả callus và nhiều chồi. Khi cung cấp chỉ riêng auxin ($\text{NAA} = 5 \mu\text{M}$) 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.

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. 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 Sehafter (1976) thu được ở tỏi.

Sự phát sinh cơ quan từ callus tương tự như sự phát sinh cơ quan trực tiếp từ mẫu cây. Tế bào của mẫu cây sẽ phân phân hóa dưới tác động của các chất điều hòa sinh trưởng thực vật để phân chia hỗn loạn tạo thành callus. Khi thay đổi thành phần và nồng độ các chất điều hòa sinh trưởng thì tế bào callus được cảm ứng để phân hóa tạo cơ quan.

Vị trí của vùng mô phân sinh trong callus có liên quan đến tổ chức của cơ quan vừa mới hình thành trong callus, sau đó chồi và rễ phát sinh từ bên trong callus và phát triển ra ngoài. Ở một vài loài thực vật (*Convolvulus*), hai loại cơ quan khác nhau hình thành từ những phần khác nhau của callus, rễ thường hình thành từ những tế bào ở trên callus, còn chồi thì xuất phát từ những tế bào tiếp xúc với môi trường nuôi cấy.

Tóm lại, có 3 phương thức tạo cây con trong nhân giống *in vitro*:

- Mẫu mô trực tiếp tạo chồi và cây hoàn chỉnh.

- Mẫu mô phát sinh callus và callus tạo chồi.
- Mẫu mô phát sinh callus, callus phát triển phôi (hoặc nuôi cấy dịch huyền phù tế bào phát sinh phôi) và từ phôi thu được cây hoàn chỉnh.

5. Đặc điểm của một số loài cây lâm nghiệp và dược liệu quan trọng

5.1. Cây Keo lá tràm (*Acacia auriculiformis*)

- Đặc điểm nhận biết
 - + Cây gỗ nhỏ, thân tròn thẳng, cành thường phân cành đôi.
 - + Lá biến thái: Cây dưới 1 năm có lá kép LC2 lần, cây trưởng thành có lá đơn, mọc cách, không có lá kèm. Các gân nhỏ song song với gân lớn.
- Đặc tính sinh học và sinh thái học: Cây mọc nhanh, ưa sáng, chịu được đất nghèo dinh dưỡng, mùa ra hoa quả gần quanh năm. Khả năng tái sinh hạt và chồi tốt.
- Phân bố: Mọc ở Úc, Indônêsiá,.. Việt Nam thấy ở: Vĩnh phúc, Phú thọ,..
- Giá trị: Dùng làm củi, than hầm, làm nguyên liệu giấy, cây trồng rừng phòng hộ.
- Khả năng kinh doanh bảo tồn: Có thể gây trồng thuần loài và hỗn giao trên đất trồng, diệt cỏ tranh.

5.2. Cây Keo tai tượng (*Acacia mangium*).

- Đặc điểm nhận biết
 - + Cây gỗ nhỏ, tán hình trứng hoặc tháp, trên cành nhỏ dưới 1 năm có lá kép LC2 lần, cuống thường bẹt.
 - + Lá đơn mọc cách, không có lá kèm, có 4 gân dọc song song nổi rõ.
 - + Quả đậu xoắn, rễ cây nhiều nốt sần cố định đạm.
- Đặc tính sinh học và sinh thái học: Cây mọc nhanh, mọc tốt nơi đất sâu, nhiều ánh sáng, nơi đất xấu mọc chậm và phân cành thấp.
- Phân bố: Phân bố rộng khắp trong cả nước
- Giá trị: Cây cải tạo đất, cây cho nguyên liệu giấy.
- Khả năng kinh doanh bảo tồn: Đã được gây trồng thuần loài và hỗn giao với Bạch đàn.

5.3. Cây keo lai

Keo lai là sự kết hợp giữa hai loài: keo lá tràm (*Acacia Auriculiormis*) và Keo tai tượng (*Acacia Mangium*) và được tuyển chọn từ những cây đầu dòng có năng suất cao. Cây có nguồn gốc ở Australia, được trồng phổ biến ở Đông Nam Á, ở Việt Nam cây được trồng rộng rãi trên toàn quốc trong những năm gần đây. Cây mọc tốt ở hầu hết các dạng đất, thích nghi nhất là ở các tỉnh từ Quảng Bình trở vào.

Cho đến nay, Keo lai đã được khẳng định là loài cây có khả năng chịu đựng được khô hạn, tăng trưởng nhanh và ưu việt hơn Keo lá tràm kể cả trên đất cát nghèo dinh dưỡng. Cây Keo lai có sức sinh trưởng nhanh hơn cây bố mẹ. Nhằm hạn chế tình trạng phân ly của giống lai, Keo lai thường được tạo cây con bằng phương pháp vô tính.

- Đặc điểm nhận biết: Cây có thể cao đến 25-30 m, đường kính lên đến 60 – 80 cm. Cây ưa sáng, mọc nhanh, có khả năng cải tạo đất, chống xói mòn, chống cháy rừng. Gỗ thẳng, màu vàng trắng có vân, có giác lõi phân biệt, gỗ có tác dụng nhiều mặt: kích thước nhỏ làm nguyên liệu giấy, kích thước lớn sử dụng trong xây dựng, đóng đồ mộc mỹ nghệ, hàng hóa xuất khẩu.
- Đặc tính sinh học và sinh thái học: Cây mọc nhanh, mọc tốt nơi đất sâu, nhiều ánh sáng, nơi đất xấu mọc chậm và phân cành thấp.
- Phân bố: Phân bố rộng khắp trong cả nước
- Giá trị: Cây cải tạo đất, cây cho nguyên liệu giấy.
- Khả năng kinh doanh bảo tồn: Đã được gây trồng thuần loài và hỗn giao với Bạch đàn.

5.4 Cây Bạch đàn trắng (*Eucalyptus camldulensis*)

- Đặc điểm nhận biết.
 - + Cây gỗ lớn, thân thẳng, tán thưa phân cành cao, cành non màu tím hồng, mảnh và hơi rủ.
 - + Lá đơn, mọc cách, mép nguyên, không có lá kèm.
 - + Hoa tự hình tán ở nách lá.
 - + Quả nang khi chín mở ô.
- Đặc tính sinh học và sinh thái học: Cây mọc nhanh, cây ưa sáng, sống trong điều kiện từ âm đến nóng, cây dễ tính có biên độ sinh thái rộng.
- Phân bố: Khắp lục địa châu úc, Việt Nam thấy trồng ở khắp các tỉnh.
- Giá trị: Gỗ cứng, nặng, không bị mối mọt có thể dùng làm trong công trình xây dựng, gột gỗ làm nguyên liệu giấy, hoa nuôi ong mật, có thể trồng cải tạo đất.
- Khả năng kinh doanh bảo tồn: Là cây nhập nội cần gây trồng thử nghiệm nơi có cùng hoàn cảnh.

5.5. Cây Bạch đàn *Urophylla* (*Eucalyptus erophylla*)

- Đặc điểm nhận biết.
 - + Cây gỗ lớn, thân thẳng, tán hình tháp, phân cành thấp, cành và lá non có màu đỏ tía.
 - + Lá đơn, mọc cách, hơi lõm ở mặt trên.
 - + Hoa tự tán, cuống bẹt.
 - + Quả nang khi chín mép quả nứt 4 - 5 ô vết chín trong quả.
- Đặc tính sinh vật học và sinh thái học: Cây mọc khá nhanh ở Vĩnh phúc, mùa quả chín tháng 4 -5. Ưa sáng, có thể sống trên đất khô hạn.
- Phân bố: Phân bố ở vùng Đông bắc miền Bắc: Vĩnh phúc, Tuyên quang,..
- Giá trị: Kinh doanh gỗ nhỏ, gỗ cho nguyên liệu giấy do cây mọc nhanh.
- Khả năng kinh doanh và bảo tồn: Có thể gây trồng rừng thuần loài hoặc trồng hỗn giao với keo.

5.6. Cây Téch (*Tectona grandis*)

- Đặc điểm nhận biết:

+ Cây gỗ lớn, thân lớn có múi, gốc có bạnh vè, vết vỏ đẽo dày có nhiều xơ, cành non vuông cạnh, phủ lông hình sao màu nâu vàng nhạt.

+ Lá đơn, mọc đối, mặt trên nhẵn, mặt dưới phủ lông hình sao màu nâu vàng nhạt, vỏ lá màu đỏ tươi. Không có lá kèm.

+ Hoa tự hình viên chùy khá lớn, hoa có lá bắc nhỏ hình lưỡi mác.

+ Quả hạch hình cầu, phủ lông hình sao, đài phát triển bao kín quả, hạt

- Đặc tính sinh học và sinh thái học: Cây mọc khá nhanh (điều kiện phù hợp), rụng lá vào mùa khô. Mùa ra hoa tháng 6-8, quả chín tháng 11- 2 năm sau. Cây ưa sáng, ưa khí hậu mưa nhiều (có 2 mùa rõ rệt). Thích hợp với đất sâu, ẩm thoáng và thoát nước. Khả năng tái sinh chồi và hạt tốt.

- Phân bố: Có nhiều ở Ấn Độ, Thái Lan, Việt Nam gây trồng ở các tỉnh miền Nam như: Đồng Nai, Sông Bé,..

- Giá trị: Giác màu vàng nhạt, lõi vàng sẫm, kết cấu mịn, vân thớ đẹp có mùi thơm, gỗ cứng, nặng, không bị mối mọt, có thể đóng tàu thuyền, xây dựng, ván sàn,..

- Khả năng kinh doanh bảo tồn: Cây có giá trị sử dụng cao, có thể trồng bằng hạt hoặc thân cụt, nên nghiên cứu gây trồng rộng ở phía Nam.

5.7. Cây Lát hoa (*Chukrasia tabularis*).

- Đặc điểm nhận biết.

+ Cây gỗ lớn, thân thẳng, vỏ màu xám tro nhiều đốm dài vòng quanh thân, cành non phủ lông hung vàng, sọc lá trên cành rõ, cành xếp tầng.

+ Lá kép LC1 chẵn, mọc cách, lá chét mọc gần đối hoặc cách, không kèm.

+ Hoa tự xim viên chùy ở đầu cành, hoa đều lưỡng tính, mẫu 5, đài và bầu có phủ lông.

+ Quả nang, hạt dẹt hình quạt.

- Đặc tính sinh học và sinh thái học: Cây mọc tương đối nhanh. Mùa ra hoa tháng 6-7, mùa quả chín tháng 10-2 năm sau, thường rụng lá vào cuối đông đầu xuân. Cây ưa sáng, lúc nhỏ chịu bóng, ưa đất tơi xốp ẩm nhiều mưa. Có khả năng tái sinh hạt tốt dưới tàn che cao.

- Phân bố: Phân bố từ Hà Tĩnh trở ra Bắc.

- Giá trị: Gỗ có ánh vân đẹp có thể đóng đồ dân dụng, xuất khẩu,..

- Khả năng kinh doanh bảo tồn: Cây gỗ quý, mọc khá nhanh, dễ gây trồng phát triển trên diện rộng.

5.8. Cây Sao đen (*Hopea odorata Roxb*)

- Đặc điểm nhận biết.

+ Cây gỗ lớn thường xanh, thân hình trụ thẳng, Vỏ ngoài màu nâu đen, nứt dọc sâu hành mảnh sù xim thịt vỏ màu nâu đậm, nhiều sợi, có nhiều dầu màu vàng, thơm.

+ Lá hình trái xoan thuôn hay trái xoan ngọn giáo, mặt trên nhẵn mặt dưới có lông hình sao và có tuyến ở nách các gân cấp 2.

+ Hoa tự hình chùy mang nhiều bông ở nách lá hay đầu cành, mỗi bông có 4-6 hoa, cánh trắng nhỏ, cong, màu vàng nhạt có mùi thơm dịu.

+ Quả nhỏ hình trứng, mang 2 cánh phát triển.

- Đặc tính sinh học và sinh thái học: Cây mọc trong các rừng ẩm thường xanh, rừng ven sông suối ở độ cao dưới 800m, thường mọc rải rác hay thành đám nhỏ. Thường mọc cùng với Dầu rái, vên vên, cây khi nhỏ ưa bóng sau chuyển dần sang ưa sáng. Cây ra lá non vào tháng 10-12 hàng năm, lượng quả nhiều nhưng thường 2 năm mới ra quả một lần, cây trồng ở Hà Nội chu kỳ ra quả kéo dài tới 7-8 năm. Mùa hoa tháng 2, ra quả tháng 3 và kết thúc tháng 5.

- Phân bố địa lý: Cây mọc từ Quảng Nam, Đà Nẵng trở vào Nam, tập trung nhiều ở Tây Nam Nguyên và Đông Nam Bộ.

- Giá trị: Dùng làm sườn nhà, đồ mộc, xe cộ, đồ tiện, đón tàu thuyền. Lấy nhựa dính trong công nghiệp nhẹ.

- Khả năng kinh doanh và bảo tồn: Cây Sao đen có thể gây trồng bằng hạt, là loài cây kinh doanh lấy gỗ.

B. Câu hỏi

- Thế nào là vi nhân giống.
- Trình bày cơ sở khoa học của vi nhân giống.
- Trình bày hạn chế của vi nhân giống.

C. Ghi nhớ

- Khái niệm vi nhân giống
- Cơ sở khoa học của vi nhân giống (tính toàn năng của tế bào)
- Ưu điểm và hạn chế của vi nhân giống
- Các loài cây lâm nghiệp và dược liệu quan trọng

BÀI 2. CHUẨN BỊ THIẾT BỊ, DỤNG CỤ VÀ NGUYÊN LIỆU

Mã bài: VNG-02

Mục tiêu

Sau khi học xong bài học này học viên có khả năng

- Trình bày được phương pháp chuẩn bị thiết bị, dụng cụ và nguyên vật liệu phục vụ vi nhân giống;
- Xác định được danh mục các thiết bị, dụng cụ, vật liệu dung trong vi nhân giống;
- Tổ chức, sắp xếp được các thiết bị, dụng cụ vi nhân giống hợp lý, khoa học;
- Có tác phong công nghiệp, tiết kiệm vật tư và tuân thủ các quy định trong phòng thí nghiệm.

A. Nội dung

1. Chuẩn bị thiết bị, dụng cụ vi nhân giống

1.1. Máy lọc, cất nước



Hình 2.1. Máy cất nước

Đây là một hệ thống bao gồm các cột lọc để làm sạch nguồn nước trước khi vào máy cất nước. Sau khi qua hệ thống cột lọc, nước được đun sôi để bay hơi và ngưng tụ. thông thường quá trình này được thực hiện 2 lần (máy cất nước 2 lần) và nước sau khi ngưng tụ sẽ được đi qua hệ thống cột loại bỏ ion hòa tan trong nước (cột anion và cột cation). Vì vậy nước sử dụng sẽ là nước cất 2 lần, khử ion.

Một điểm lưu ý là do chất lượng nước đầu vào của hệ thống máy thành phố chưa đảm bảo vì vậy cần phải thay cột lọc thường xuyên để tránh hỏng, tắc máy.

1.2. Thiết bị, dụng cụ hấp sấy, khử trùng

1.2.1. Tủ sấy chân không (60 – 600°C)

Đây là loại tủ sấy có dung tích lớn. Bao gồm một tủ sấy được gắn với bơm hút chân không.

Tủ sấy dùng để làm khô mẫu, dụng cụ trong điều kiện nhiệt độ cao và áp suất thấp. Trong điều kiện áp suất thấp, nước có thể bay hơi ở nhiệt độ không quá cao chính

vì vậy người ta có thể sử dụng để làm khô các mẫu sinh học mà vẫn giữ được hoạt tính của nó



Hình 2.2. Các loại tủ sấy chân không

1.2.2. Nồi hấp khử trùng



Hình 2.3. Nồi hấp khử trùng

Ngoài các hình thức khử trùng như khử bằng tia cực tím (UV), Pasteur, màng lọc vô khuẩn... 2 hình thức khử trùng được sử dụng phổ biến đó là:

- *Khử trùng khô*: Đây là hình thức sử dụng nhiệt độ cao để khử trùng. Để khử trùng người ta bọc các vật cần khử trùng bằng giấy nhôm sau đó đưa vào tủ sấy ở 200-3000C từ 2 đến 3 giờ. Loại khử trùng này chỉ sử dụng đối với các dụng cụ thủy tinh, kim loại. Nhược điểm ở chỗ thời gian khử trùng kéo dài, tiêu tốn điện năng, không diệt được một số bào tử và không áp dụng đối với những đồ bằng nhựa, giấy...

- *Khử trùng ướt*: Là thiết bị được sử dụng để khử trùng môi trường nuôi cấy, các vi khuẩn, nấm, mầm bệnh và các dụng cụ cần vô trùng khi sử dụng.

Thiết bị hoạt động dựa trên cơ sở khử trùng bằng hơi nước ở nhiệt độ và áp suất cao. Thông thường ở 120-1300C trong 30 phút ở áp suất 1atm. Loại khử trùng này nhanh, tiết kiệm điện và có thể tiêu diệt được hầu hết các bào tử, chính vì vậy nó được sử dụng nhiều nhất.

1.3. Thiết bị, dụng cụ chuẩn bị môi trường

1.3.1. Máy đo pH (pH meter)



Hình 2.4. Các loại máy đo pH (pH meter)

Thiết bị được sử dụng để xác định giá trị pH của một dung dịch. Để đo pH của dung dịch người ta có thể dùng các loại điện cực khác nhau: điện cực hydro, điện cực thủy tinh... trong đó điện cực thủy tinh đang được sử dụng phổ biến. Hiện nay người ta tích hợp nhiều chức năng vào cùng một điện cực chẳng hạn đồng thời có thể đo được pH, nhiệt độ và nồng độ một số ion nhất định.

Một điểm lưu ý khi sử dụng máy đo pH là phải điều chỉnh đúng bằng dung dịch chuẩn của nhà cung cấp và sau khi sử dụng xong phải rửa sạch bằng nước cất và ngâm ngập điện cực trong dung dịch bảo quản tương ứng của nhà cung cấp, thông thường là dung dịch KCl 3M.

1.3.2. Cân phân tích



Hình 2.5. Các loại cân phân tích

Là thiết bị sử dụng để cân được một khối lượng chính xác mẫu vật hoặc hóa chất. Tùy thuộc vào khối lượng của mẫu hoặc hóa chất và mức độ sai số cho phép mà người ta chia thành 2 nhóm: Cân phân tích thường và cân phân tích đặc biệt.

Cân phân tích thường sử dụng để cân với lượng tương đối lớn (có thể đến 2000g) và độ chính xác không cao, sai số khoảng 10-2g, trong khi đó cân phân tích đặc biệt thường chỉ cân với lượng nhỏ (<200g) và cho độ chính xác từ 10^{-3} đến 10^{-6} g. Tuy nhiên trên thực tế khối lượng nhỏ nhất có thể cân được và chính xác thường chỉ dừng lại ở mức 10^{-3} . Chính vì thế để pha được những dung dịch có nồng độ thấp người ta sẽ pha một dung dịch gốc (dung dịch mẹ) có nồng độ cao sau đó pha loãng theo ý muốn.

1.3.3. Các loại tủ lạnh



Hình 2.6. Các loại tủ lạnh

Đây là nhóm thiết bị không thể thiếu trong mọi phòng thí nghiệm. Tùy thuộc vào yêu cầu sử dụng mà người ta sử dụng các loại máy làm lạnh khác nhau.

- *Tủ mát*: Nhiệt độ từ 1-8°C: Bảo quản các mẫu hạt giống mà vẫn giữ nguyên hoạt tính sức nảy mầm... Bảo quản mẫu DNA, Protein trong thời gian ngắn, bảo quản các mẫu vi khuẩn.

- *Tủ lạnh thường*: Nhiệt độ từ -10 đến -30 °C: Bảo vi khuẩn trong thời gian dài, bảo quản các protein enzyme Bảo quản các hóa chất chạy PCR, các hóa chất khác

- *Tủ lạnh sâu*: Nhiệt độ từ -85 đến -30 °C: Bảo quản các chủng giống vi khuẩn lâu dài, bảo quản các enzyme protein và các hóa chất đặc biệt

1.3.4. Nồi nấu môi trường



Hình 2.7. Nồi nấu môi trường

Là dụng cụ đựng để đun nóng môi trường nuôi cấy. Tùy vào lượng môi trường ta sử dụng để nuôi cấy mà chọn loại nồi nấu môi trường phù hợp.

1.3.5. Các dụng cụ hút dung dịch

Ngoài các thiết bị hút và đo dung dịch thông thường như: ống đong, cốc đong, các loại pipet, ống hút thủy tinh có vạch mức, phòng thí nghiệm vi nhân giống sử dụng các dụng cụ hút dung dịch đặc biệt với độ chính xác từ 10-4 ml đến 1ml. Các dụng cụ này được gọi là pipet. Có nhiều loại pipet, tùy thuộc vào ngưỡng thể tích mà người ta chia thành các loại sau: Pipet 1000 - 5000 μ l, Pipet 100 - 1000 μ l, Pipet 10 - 100 μ l, Pipet 2 - 20 μ l, Pipet 0,5 - 10 μ l, Pipet 0,1 - 2,5 μ l



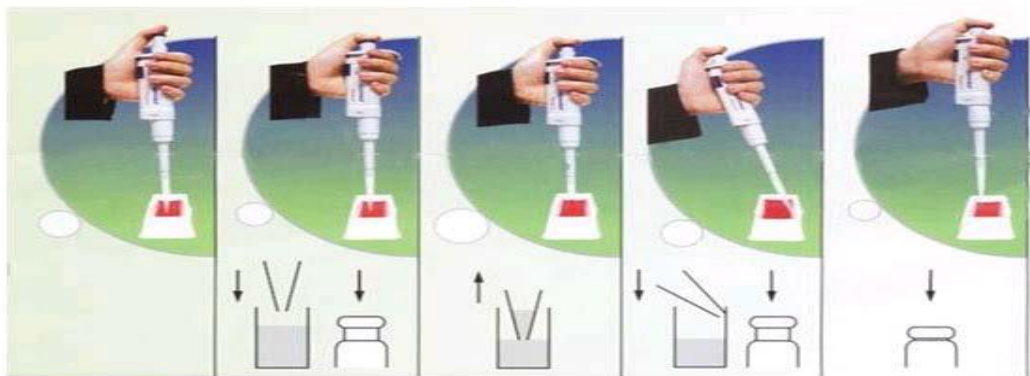
Hình 2.8. Pipet hút dung dịch

*Lưu ý khi sử dụng pipet:

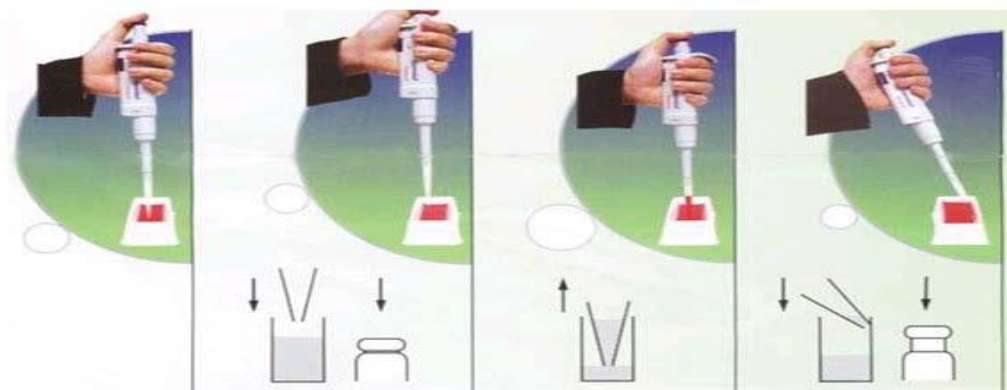
- Pipet là dụng cụ hút chính xác và rất đắt. Bất kỳ pipet nào cũng có giới hạn hút chính xác vì vậy chỉ sử dụng pipet để hút một thể tích chất lỏng tương ứng với thể tích ghi trên nhãn. Không được điều chỉnh thể tích vượt quá ngưỡng cho phép.

- Trong bất kỳ trường hợp nào cũng không được ngửa phần đầu hút của pipet lên trên để tránh các chất lỏng chảy ngược vào trong piston của pipet.

Phương pháp lấy mẫu có thể đa dạng tùy theo các loại dung dịch khác nhau, trên thực tế có hai cách lấy mẫu được minh họa dưới đây



Hình 2.9. Cách lấy mẫu theo chiều xuôi



Hình 2.10. Cách lấy mẫu theo chiều ngược lại

1.4. Nhóm các máy khuấy, lắc



Hình 2.11. Máy khuấy Máy lắc

Đây là nhóm máy tạo ra một dai động lắc với tần số được điều chỉnh tùy ý của người sử dụng. Nhóm này được dùng để chọn các chất, tránh hiện tượng vón cục của tế bào trong nuôi cấy ...

- *Máy lắc*: Có giá gắn với các hệ thống lắc với hệ thống điều chỉnh tốc độ. Ngoài ra, một số máy lắc còn được đặt trong một hệ thống giữ ổn định nhiệt độ, loại này thường được dùng trong nuôi cấy tế bào thực vật protoplast ... Máy lắc còn dùng trong trường hợp vi nhân giống động trong môi trường lỏng...

- *Máy khuấy từ*: Máy sẽ tạo ra lực từ xoay tròn, nhờ đó khi cho một thanh nam châm vào trong dung dịch, dung dịch sẽ được trộn đều. Một số hệ thống máy khuấy từ còn được trang bị hệ thống gia nhiệt nhờ đó quá trình hòa tan các chất sẽ nhanh hơn.

1.5. Thiết bị, dụng cụ cấy vô trùng

1.5.1. Buồng cấy vô trùng

Cho phép người sử dụng thực hiện các thao tác như phân lập vi khuẩn, nấm, bào tử, nuôi cấy mô tế bào ... trong điều kiện vô trùng. Buồng cấy vô trùng được trang bị các màng để hút, lọc không khí với kích thước lỗ khác nhau để lọc vi khuẩn, virus.



Hình 2.12. Buồng cấy vô trùng

Ngoài ra buồng cấy vô trùng còn được trang bị đèn chiếu tử ngoại UV, đèn chiếu sáng và phụ kiện cho việc sử dụng gas để khử trùng. Tùy thuộc vào mức độ vô trùng

mà người ta chia thành các buồng cấy đặc biệt sử dụng cho những thao tác liên quan đến các virus gây bệnh nguy hiểm.

1.5.2. Quạt thông gió, thiết bị lọc không khí



Hình 2.13. Quạt thông gió Điều hòa

Điều hòa, lưu thông, lọc không khí trong phòng thí nghiệm.

1.5.3. Đèn tử ngoại treo trần hoặc treo tường



Hình 2.14. Đèn tử ngoại treo tường

Đèn tử ngoại (UV) có tác dụng khử trùng trong phòng thí nghiệm. Trước khi tiến hành làm việc trong phòng cấy cần khử trùng bằng đèn tử ngoại ít nhất là 15 phút.

1.5.4. Bộ dụng cụ cấy



Hình 2.15. Bộ dụng cụ cấy

Bao gồm: panh, kéo, đĩa cây, que cấy...

Ngoài ra, để tiện lợi cần có các loại thiết bị khác như: giá, bàn để môi trường, xe đẩy để di chuyển môi trường, bình môi trường từ phòng pha môi trường tới phòng nuôi cấy.

1.6. Thiết bị, dụng cụ nuôi mẫu cấy



Hình 2.16. Hệ thống giàn giá có đèn huỳnh quang để nuôi cấy

- Thiết bị, dụng cụ nuôi sáng
- Thiết bị, dụng cụ nuôi tối
- Các giàn đèn huỳnh quang nhiều ngăn
- Máy điều hòa nhiệt độ
- Các thiết bị và dụng cụ nuôi cấy tế bào đơn
- Tủ ẩm.

1.7. Dụng cụ thủy tinh trong phòng thí nghiệm

1.7.1. Khái niệm

Thủy tinh là một chất rắn vô định hình đồng nhất, có gốc silicat, thường được pha trộn thêm các tạp chất để có tính chất theo ý muốn. Các loại dụng cụ thủy tinh trong phòng thí nghiệm thường bằng thủy tinh borosilicat, thạch anh nấu chảy hoặc oxyd silic nấu chảy khác do tính bền vững hoá học cao hơn và hệ số giãn nở của loại thủy tinh này thấp.

1.7.2. Yêu cầu đối với dụng cụ thủy tinh dùng trong phòng thí nghiệm

Chịu hóa chất: là thủy tinh trung tính, chịu được hầu hết các hóa chất, dung dịch ăn mòn mạnh ở nhiệt độ cao (ngoại trừ HF là dung dịch acid có độ ăn mòn cao nhất thậm chí tại nồng độ thấp).

Tính chịu nhiệt: chịu được nhiệt độ cao, shock nhiệt.

Ngoài ra dụng cụ thủy tinh dùng cho phòng thí nghiệm cần phải sạch về mặt hoá học (không dính các chất hữu cơ hoặc vô cơ) và sạch về mặt vi sinh vật học (không chứa bất kỳ tế bào vi sinh vật hay bào tử của chúng). Do vậy, trước khi sử dụng thì cần được rửa sạch và khử trùng.

1.8. Cách rửa dụng cụ thủy tinh

Nhìn chung tất cả các dụng cụ thủy tinh trong phòng thí nghiệm đều phải rửa rất cẩn thận, phải thật sạch, thật khô trước khi sử dụng.

1.8.1. Xử lý dụng cụ trước khi rửa

Dụng cụ thủy tinh mới mua, chưa sử dụng, cần ngâm nước hoặc dung dịch H₂SO₄ loãng trong khoảng 24 giờ. Rửa lại bằng xà phòng và nước nhiều lần cho tới pH trung tính.

Các dụng cụ đã sử dụng để nuôi cấy vi sinh vật, nhất là các vi sinh vật gây bệnh, trước khi rửa nhất thiết phải được khử trùng bằng hơi nước áp lực cao trong nồi hấp vô trùng (autoclave) để giết chết các tế bào, bào tử của vi sinh vật, đảm bảo an toàn cho người rửa, không reo rắc mầm bệnh vào môi trường.

1.8.2. Rửa dụng cụ thủy tinh

Sau khi tiệt trùng dụng cụ bản, tháo bỏ nút bông, môi trường, thạch, cặn bản chứa trong dụng cụ.

Tráng dụng cụ bằng nước để loại hết cặn bản.

Dùng miếng nhám thấm xà phòng hoặc bông thấm cồn để lau sạch các ký hiệu ghi bằng bút dạ trên thủy tinh.

Chọn chổi rửa thích hợp với từng loại ống hoặc bình, một đầu nên buộc miếng mút nhỏ để phần sắt không chọc thủng đáy ống nghiệm hoặc đáy bình. Dùng chổi rửa thấm xà phòng cọ kỹ phía trong, dùng khăn mềm thấm xà phòng cọ phía ngoài, đối với các đĩa petri chỉ cần dùng khăn mềm thấm xà phòng cọ kỹ. Xả sạch bằng nước nhiều lần, tráng lại bằng nước cất để pH đạt đến trung tính.

Đối với pipet cần ngâm trong dung dịch sunfocromat 1 ngày, chuyển sang bình rửa pipet tự động qua đêm hoặc rửa trực tiếp dưới vòi nước để dòng nước chảy bên trong pipet, rửa sạch bằng xà phòng sau đó rửa nước nhiều lần, tráng lại bằng nước cất.

Nếu dụng cụ bản nhiều hoặc dính dầu mỡ, ngâm các dụng cụ đó vào dung dịch sunfocromic trong nhiều giờ sau đó rửa lại.

Dụng cụ sau khi rửa phải đảm bảo pH đạt đến trung tính, úp ngược dụng cụ cho ráo nước, làm khô ở nhiệt độ phòng hoặc đem sấy ở nhiệt độ 600C - 800C trong vài giờ. Sau đó cất giữ đồ thủy tinh khô hoặc bao gói chúng để đem đi khử trùng.

1.8.3. Khử trùng dụng cụ thủy tinh

1.8.3.1. Chuẩn bị đồ thủy tinh để khử trùng

Pipet: nhồi một miếng bông nhỏ vừa phải vào đầu ống hút, cho vào ống bằng kim loại không gỉ có bông ở phía đặt đầu nhọn hoặc dùng giấy bao gói từng cái pipet hoặc bao gói theo từng bó có cùng kích cỡ, buộc hai đầu, đánh dấu đầu hút, sau khi khử trùng chỉ được mở phần này để lấy pipet ra dùng, tay không được chạm vào phần đầu nhọn của pipet.

Đĩa petri: xếp thành chồng khoảng 5 bộ đĩa, bao gói bằng giấy hoặc xếp vào ống trụ làm bằng thép không gỉ hoặc nhôm.

Ống nghiệm, bình tam giác, bình cầu nếu không có nút thì nhất thiết phải được đậy nút bông. Dùng bông mỡ (bông không thấm nước) để làm nút. Nút bông có chức

năng như một dụng cụ lọc khí vô trùng do vậy cần có độ dày vừa phải để không khí có thể đi qua nhưng vi sinh vật bị giữ lại, hơn nữa nút bông cũng cần phải làm đúng kiểu cách để thuận tiện khi thao tác thí nghiệm.

1.8.3.2. Khử trùng dụng cụ thủy tinh

Khử trùng bằng hơi nóng khô: xếp dụng cụ đã bao gói kín vào tủ sấy, không để ống có nút bông vào giá ở ngăn dưới để phòng bông cháy. Không xếp quá chặt để không khí lưu thông làm nóng đều dụng cụ cần khử trùng. Khử trùng ở nhiệt độ từ 160-1700C trong thời gian 1 giờ. Khi nhiệt độ trong tủ khử trùng xuống đến nhiệt độ phòng mới được lấy dụng cụ ra.

Khử trùng bằng nồi hấp ướt (Autoclave) dùng hơi nước áp lực cao (121oC, 1 at, trong 30 phút) để khử trùng dụng cụ. Sau khi khử trùng xong nên sấy khô trước khi sử dụng.

1.8.3.3. Bảo quản dụng cụ thủy tinh

Dụng cụ thủy tinh sau khi khử trùng nếu không sử dụng ngay nên cho vào túi polyetylen buộc chặt, bảo quản trong tủ kín sạch sẽ, khô ráo.

Các loại dụng cụ như que gạt, que cấy thủy tinh sau khi khử trùng chỉ nên sử dụng trong vòng 1 ngày, hộp petri trong vòng 3 ngày, ống nghiệm, bình tam giác, bình cầu khoảng 7- 10 ngày nếu bảo quản tốt. Nếu để quá lâu dụng cụ cần được khử trùng lại trước khi dùng.

** Lưu ý khi loại bỏ dụng cụ thủy tinh:*

Thủy tinh không có tính chất mềm dẻo ngăn chặn tác động của xung lực hoặc sự rạn nứt và gãy dưới tác dụng của lực. Thủy tinh khi vỡ, gãy tạo ra những góc cạnh sắc rất nguy hiểm, có thể làm tổn thương người làm công tác dọn dẹp trong phòng thí nghiệm. Tất cả các dụng cụ thủy tinh khi đã loại bỏ cần phải được khử trùng và phải bỏ vào thùng rác chuyên dụng có cảnh báo chứa vật sắc nhọn.

1.9. Vệ sinh các thiết bị, dụng cụ dùng trong vi nhân giống

Bộ dụng cụ cấy giống, các thiết bị thủy tinh (ống nghiệm, bình tam giác) cần phải được vô trùng bằng cách đưa đi sấy ở nhiệt độ 160 – 1700C trong thời gian 2 giờ trong tủ sấy.

Các phòng cấy, phòng nuôi mẫu cấy phải dùng các chất tẩy rửa như xà phòng, nước rửa chén, cồn... để vệ sinh và dùng nước sạch để lau sạch. Định kỳ khử trùng bằng foocmol, bột lưu huỳnh, cloramin B, ...

Đối với các thiết bị không thể dùng nước để vệ sinh: máy đo pH, âm kế, tủ cấy, tủ lạnh, cân... thì cần phải dùng khăn khô (có thấm cồn nếu cần) để lau sạch.

2. Chuẩn bị vật liệu vi nhân giống

Vi nhân giống là một kỹ thuật hiện đại, có những ưu việt mà các phương pháp nhân giống truyền thống không có được.

Vậy thì câu hỏi đặt ra ở đây là: Chúng ta phải nhân giống cây gì, giống gì và bộ phận nào? Để vi nhân giống phát huy tối đa những lợi thế mà nó mang lại.

Và liệu rằng có phải bất cứ loại vật liệu nào ta cũng có thể chọn để nhân lên và đều mang lại lợi ích kinh tế hay không? Vì trong sản xuất thì bài toán kinh tế luôn phải đặt lên hàng đầu.

Phần này giúp chúng ta trả lời cho những vấn đề nêu ra trên đây.

2.1. Đối tượng của vi nhân giống

Cây trồng có đặc tính nông học quý như: màu sắc đẹp, có hương thơm, lâu tàn, ..., được thị trường ưa chuộng dẫn đến nhu cầu ngày càng tăng.

Cây trồng phù hợp với điều kiện sinh thái của từng vùng, có khả năng đưa ra sản xuất đại trà.

Cây trồng khó sinh sản bằng hạt hoặc cây con trồng từ hạt dễ phân ly, làm cho hàm lượng hạt, chất lượng hoa không ổn định, cây có thể được nhân vô tính truyền thống nhưng hệ số nhân giống thấp (hoa rum).

Các cây trồng đã bị thoái hoá: Sau một thời gian dài nhân giống vô tính truyền thống, các giống hoa bị thoái hoá nghiêm trọng do nhiễm một số loại nấm và vi sinh vật gây hại đặc biệt là bệnh do virus. Thường áp dụng với những loài hoa trồng bằng ngắt ngọn hay tách nhánh như: hoa cúc, cẩm chướng, đồng tiền...

Cây cần nhân nhanh dòng bố mẹ để sản xuất hạt lai

Cần chủ động nguồn giống chất lượng cao để sản xuất quanh năm.

Cây trồng có nguy cơ tuyệt chủng, nguồn mẫu còn lại là rất ít

2.2. Lựa chọn cây giống gốc để lấy mẫu nuôi cấy

Trước khi tiến hành nhân giống *in vitro* cần chọn lọc cẩn thận các cây giống gốc làm nguồn mẫu cho nuôi cấy. Các cây này cần phải sạch bệnh, đặc biệt là bệnh virus và đang ở giai đoạn sinh trưởng mạnh. (Việc trồng các cây mẹ trong điều kiện môi trường thích hợp với chế độ chăm sóc và phòng trừ sâu bệnh hiệu quả trước khi lấy mẫu cấy sẽ làm giảm tỷ lệ mẫu nhiễm, tăng khả năng sống và sinh trưởng của mẫu cấy *in vitro*).



Hình 2.17. Nơi thu thập nguồn mẫu

2.3. Lựa chọn mẫu mô (bộ phận cây) đưa vào nuôi cấy

Khi lấy mẫu cần chọn đúng loại mô, giai đoạn phát triển của cây. Nói chung thì mẫu dùng trong vi nhân giống có thể là bất cứ mô, cơ quan nào của cây như: chồi ngọn,

chồi bên, phiến lá, cuống lá,..., các cấu trúc phôi như lá mầm, các cơ quan tự dưỡng như củ,...Nhưng để chọn cơ quan nuôi cấy tốt nhất phải căn cứ vào:

2.3.1. Mục đích của vi nhân giống

+ Nhân giống kết hợp với làm sạch virus: mẫu thường là đỉnh sinh trưởng.

+ Nhân giống để thu được hệ số nhân giống cao: mẫu thường là mảnh cắt ngang lá, lát mỏng tế bào thân, đoạn rễ, ...

2.3.2. Tuổi của mẫu cấy

Mẫu càng non trẻ thì phản ứng với điều kiện nuôi cấy càng nhanh, dễ tái sinh. Nuôi cấy đỉnh sinh trưởng của cây non dễ dàng hơn cây trưởng thành, tỷ lệ ra rễ trong trường hợp này đạt 83%, trong khi với cây trưởng thành chỉ đạt 63%.

Mặt khác, mẫu đưa vào nuôi cấy đảm bảo độ chín sinh lý thì khả năng phát sinh chồi cao. Mẫu quá non dễ bị chết sau khi khử trùng còn nếu quá già thì khả năng tái sinh lại kém.

Nhưng độ chín sinh lý mẫu nuôi cấy cần phải xác định qua thực nghiệm vì đối với mỗi loại cây trồng thì giai đoạn lấy mẫu tốt nhất thường là khác nhau. Thí dụ người ta tiến hành nuôi cấy trên cùng môi trường các mẫu cây thông đỏ lần lượt có tuổi sinh lý là 12, 13 và 18 tháng và nhận thấy rằng mẫu 18 tháng tuổi là tốt nhất về khả năng tái sinh cũng như chất lượng chồi; cây cảm chương thì giai đoạn lấy mẫu tốt nhất là 3 tháng sau trồng, đồng tiền mẫu tốt nhất là hoa chưa nở....

2.3.3. Kích thước và vị trí lấy mẫu

Nhìn chung, kích thước mẫu nuôi cấy càng lớn tỷ lệ tái sinh và sống sót của mẫu càng cao và kích thước càng nhỏ thì càng khó nuôi. Vì trong quá trình khử trùng mẫu có thể các hoá chất khử trùng như $HgCl_2$, Javen, còn thấm sâu vào tế bào, phá vỡ cấu trúc và một phần chức năng của tế bào. Tuy nhiên mẫu nhỏ thì khả năng sạch bệnh virus lại cao hơn.

2.3.4. Thời điểm lấy mẫu

Nên lấy mẫu vào thời điểm cây sinh trưởng và phát triển mạnh nhất (thường là vào mùa xuân). Tránh lấy mẫu vào những ngày mưa, ngày có độ ẩm không khí cao mà nên lấy vào ngày nắng, khô ráo.



Hình 2.18. Củ lily Ngõng hoa lan

3. Tổ chức, sắp xếp dây chuyền vi nhân giống

3.1. Phòng pha chế và xử lý môi trường



Hình 2.19. Phòng pha chế môi trường

Mục đích: rửa, sấy dụng cụ, xử lý, pha chế và thanh trùng môi trường để nhân giống.

Yêu cầu: Phòng phải được xây dựng kiên cố, sạch sẽ, có diện tích tương đối rộng, thông thoáng, tiện cho việc đi lại, thao tác trong khi làm việc. Có hệ thống điện nước đầy đủ an toàn, có đường thoát nước tốt.

Cấu tạo: gồm 3 khu vực

- Khu vực chuyên rửa dụng cụ, nguyên liệu
- Khu vực chuyên pha chế, phối trộn nguyên liệu
- Khu vực bố trí các thiết bị dùng cho sấy dụng cụ và thanh trùng môi trường nhân giống, khu vực này yêu cầu hệ thống điện đầy đủ và an toàn.

3.2. Phòng cấy



Hình 2.20. Phòng cấy giống

Mục đích:

- Phòng đệm: dùng để chứa môi trường sau khi đã khử trùng
- Phòng cấy: dùng cho nhân giống và cấy chuyển. Thường thiết kế phòng cấy ở bên trong phòng đệm

Yêu cầu:

- Phòng đệm: phải kiên cố, sạch sẽ, kín nhưng thông thoáng và đảm bảo vô trùng trong quá trình lưu giữ môi trường, phòng các ít cửa ra vào, cửa sổ càng tốt, đầy đủ ánh sáng.

- Phòng cấy: Thường thiết kế trong phòng đệm, phòng có cửa lùa lệch với vị trí của cửa phòng đệm để khỏi gió lùa vào phòng cấy. Xung quanh có thể lắp đặt hệ thống kính hoặc áp gạch men để tiện lợi cho công tác vệ sinh khử trùng. Trong phòng cần lắp đặt hệ thống quạt thông gió, máy điều hòa nhiệt độ đảm bảo môi trường cây khô thoáng, vô trùng. Phòng cấy cần lắp hệ thống đèn tử ngoại đảm bảo vô trùng cho phòng. Phòng cấy thường được bố trí liền kề phòng pha chế môi trường.

3.3. Phòng nuôi



Hình 2.21. Phòng nuôi

Mục đích: dùng cho việc nuôi cây.

Yêu cầu: Được thiết kế nối tiếp với phòng cấy. Phòng phải kiên cố, sạch sẽ, trong phòng cần lắp đặt hệ thống quạt thông gió, máy điều hòa nhiệt độ, đảm bảo nhiệt độ luôn ổn định. Trong phòng bố trí các giàn giá để các bình nuôi cấy.

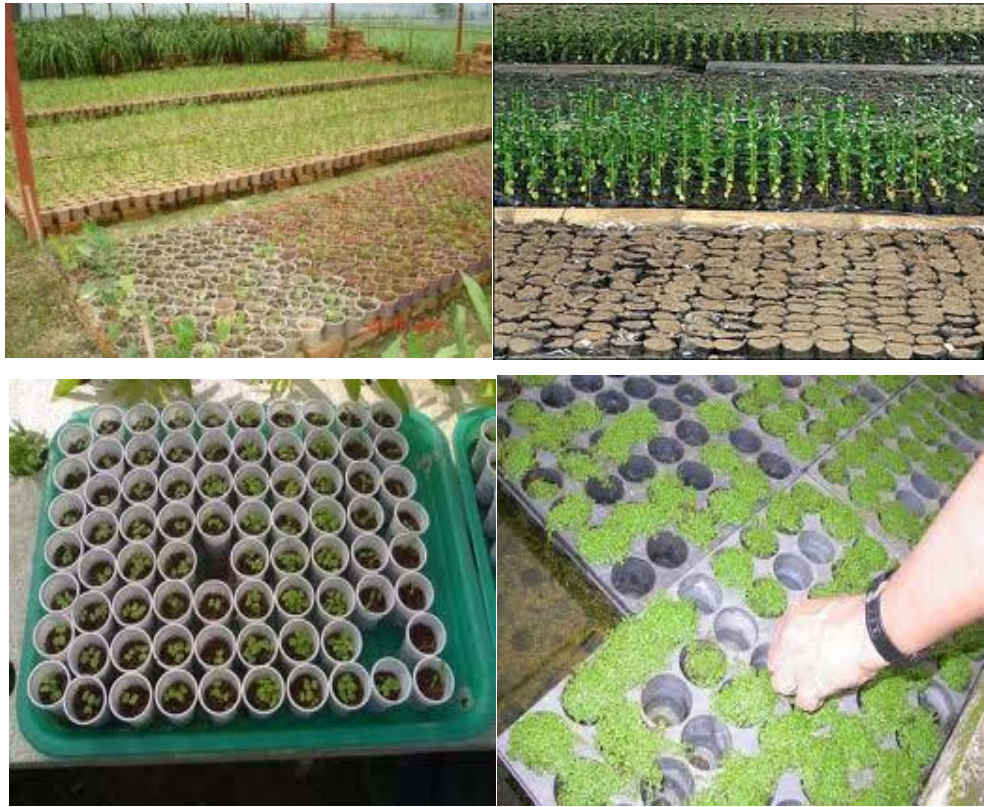
3.4. Khu vực huấn luyện cây con

Huấn luyện cây: Các cây con hoàn chỉnh trong môi trường tạo rễ, được đưa ra môi trường bên ngoài phòng nuôi cấy với nhiệt độ 30-35°C, cường độ ánh sáng 2000-3000lux, trong thời gian 14 ngày

Ươm cây: Sau huấn luyện, cây khoẻ mạnh, không nhiễm khuẩn, đen rễ, cụt ngọn, cong queo, thì được đưa ra ươm. Tức đổ thạch ra, cây cắt rễ mầm còn 1cm rồi trồng vào bầu. Bầu ươm cây là hỗn hợp gồm đất và cám dừa (*mùn dừa*) theo tỷ lệ là 3/2 đã được xử lý bằng Viben C nồng độ 0,3%. Trong điều kiện nhiệt độ 30-35°C, ánh sáng che phủ 50%, ẩm độ 80-85%. Sau 14 ngày thì cây bén rễ. Sau đó 4 ngày thì tháo dỡ màn che phủ và chăm bón theo đúng quy trình kỹ thuật. Đến khi cây cao 25-30cm thì đem trồng.

3.5. Khu vực vườn ươm

Vườn ươm là một bộ phận không thể thiếu được của vi nhân giống cây trồng. Cây sau khi được huấn luyện sẽ được đưa ra ngoài vườn ươm để thích nghi dần với điều kiện môi trường bên ngoài; sau đó cây giống đủ tiêu chuẩn mới được xuất vườn.



Hình 2.22. Khu vực huấn luyện cây con

3.5.1. Chọn địa điểm thành lập vườn ươm

Khi chọn địa điểm thành lập vườn ươm, cần chú ý một số yêu cầu sau đây:

- *Điều kiện khí hậu:* Vườn ươm phải đặt ở nơi có điều kiện khí hậu phù hợp với yêu cầu sinh thái của các chủng loại cây giống

- *Điều kiện đất đai:* Khu đất xây dựng vườn ươm phải bằng phẳng, có độ dốc nhỏ hơn 5° và tiêu thoát nước tốt.

- *Nguồn nước tưới:* có nguồn cung cấp đủ nước tưới tất cả các tháng trong năm, bảo đảm yêu cầu về chất lượng. Ngoài ra, vườn ươm phải đặt ở nơi có vị trí thuận lợi về giao thông, gần thị trường yêu cầu cây giống.

3.5.2. Các loại vườn ươm

Tuỳ theo nhiệm vụ và thời gian sử dụng mà có thể chia thành 2 loại vườn ươm:

- Vườn ươm cố định: là loại vườn ươm có thời gian sử dụng lâu dài, thực hiện cả 2 nhiệm vụ cơ bản của vườn ươm là chọn lọc, bồi dưỡng giống tốt

- Vườn ươm tạm thời: Vườn ươm này chỉ tồn tại trong một thời gian ngắn sau khi đã hoàn thành nhiệm vụ cung cấp giống cho sản xuất.

B. Bài tập

Bài tập 1: Đọc tên đúng các loại thiết bị dùng trong các phòng cấy và phòng nuôi mẫu cấy? Cho biết mục đích của các thiết bị trên?

Bài tập 2: Thực hành khử trùng phòng cấy, phòng nuôi mẫu cấy bằng formol và bột lưu huỳnh?

Bài tập 3: Thực hành vận hành nồi khử trùng: nồi áp suất hoặc nồi Autoclave?

Bài tập 4: Xác định vật liệu đạt tiêu chuẩn để tiến hành vi nhân giống cho hoa lan, hồng môn, hoa cúc, lily và đồng tiền?

Bài tập 5: Thực hành lựa chọn cây giống gốc đúng tiêu chuẩn?

Bài tập 6: Tổ chức, sắp xếp các phòng thiết bị, dụng cụ vi nhân giống hợp lý, khoa học.

Bài tập 7: Thực hành lựa chọn vị trí thích hợp và xây dựng vườn ươm?

C. Ghi nhớ: Cần chú ý một số nội dung trọng tâm

- Bộ phận thích hợp nhất để nuôi cấy của mỗi loại cây giống
- Tiêu chuẩn lựa chọn cây giống gốc và vật liệu nuôi cấy.
- Yêu cầu vô trùng đối với phòng cấy, phòng nuôi mẫu cấy, tủ cấy và bộ dụng cụ cấy
- Các thiết bị dụng cụ dùng cho vi nhân giống: mục đích và cách sử dụng.
- Dây chuyền vi nhân giống phù hợp
- Địa điểm thích hợp để xây dựng vườn ươm

BÀI 3. CHUẨN BỊ HÓA CHẤT VÀ PHA CHẾ MÔI TRƯỜNG DINH DƯỠNG

Mã bài: VNG-03

Mục tiêu

Sau khi học xong bài này học viên có kỹ năng

- Trình bày được phương pháp pha chế, bảo quản hóa chất và môi trường dinh dưỡng sử dụng trong vi nhân giống;
- Phân loại được các nhóm hóa chất cần sử dụng;
- Lựa chọn, thiết kế được công thức môi trường dinh dưỡng phù hợp với các mục đích nuôi cấy khác nhau;
- Pha chế, bảo quản được hóa chất và môi trường nuôi cấy đúng quy trình kỹ thuật.

A. Nội dung

1. Phân loại hóa chất dùng trong vi nhân giống

Trong quá trình vi nhân giống môi trường nuôi cấy được xem là vấn đề quyết định sự thành bại của quá trình nuôi cấy. Môi trường nuôi cấy cung cấp các chất dinh dưỡng cần thiết cho sự tăng trưởng và phân hoá trong suốt quá trình nuôi cấy. Môi trường vi nhân giống tuy rất đa dạng nhưng đều gồm một số thành phần cơ bản sau:

- Các muối khoáng đa lượng và vi lượng.
- Các vitamin
- Nguồn carbon: Một số loại đường
- Các chất điều hoà sinh trưởng
- Các chất bổ sung khác
- Chất làm thay đổi trạng thái môi trường: Các loại thạch



Hình 3.1. Một số loại hóa chất dùng trong vi nhân giống

Nhìn chung khó có thể phân loại một cách rõ ràng vì mỗi loại hóa chất được sử dụng cho nhiều mục đích khác nhau nhưng có thể phân loại một cách tương đối như sau:

1.1. Nhóm hóa chất khử trùng

Sự phát triển của nấm, vi khuẩn rất bất lợi cho quá trình vi nhân giống. Vì vậy, mẫu cấy cần được khử trùng trước khi vào mẫu để tiến hành vi nhân giống. Một số hóa chất khử trùng phổ biến:

1.1.1. Cồn

Cồn dùng để khử trùng mẫu cấy là loại cồn 70%. Cồn thương phẩm bán trên thị trường thường là cồn 96%, nên khi sử dụng cần pha cồn từ 96% thành 70%.

Ngoài ra, cồn còn được dùng nhiều để vệ sinh tay, dụng cụ cấy... trong khi tiến hành vi nhân giống.

1.1.2. Các hóa chất khử trùng khác

Các hóa chất khử trùng khác thường được sử dụng như: H_2O_2 , NaClO, $Ca(ClO)_2$, $HgCl_2$... Các hóa chất này thường được dùng để khử trùng các loại mẫu cấy ở giai đoạn vào mẫu (giai đoạn nuôi cấy khởi động).

1.2. Nhóm các nguyên tố tạo môi trường dinh dưỡng

Là nhóm các nguyên tố cung cấp đầy đủ các chất dinh dưỡng cần thiết cho cây trong quá trình vi nhân giống.

- Nguồn carbon: Các loại đường: Saccaroza, glucoza...
- Nhóm các nguyên tố đa lượng: Gồm 6 nguyên tố: Mg, Ca, P, S, N, K
- Nhóm các nguyên tố vi lượng: Gồm các nguyên tố: Fe, B, Cl, Cu, Mn, Mo, Zn...
- Các Vitamin
- Nhóm chất acid amin
- Nhóm các chất auxin
- Nhóm các chất cytokinin

1.3. Các chất bổ sung khác

Dung dịch hữu cơ có thành phần không xác định như nước dừa, dịch chiết nấm men... được bổ sung vào môi trường...

1.4. Nhóm hóa chất làm đông cứng môi trường

Đối với nuôi cấy tĩnh nếu sử dụng môi trường lỏng, mô có thể bị chìm và chết vì thiếu oxy. Để tránh tình trạng này môi trường nuôi cấy được làm đặc lại bằng thạch agar (một loại Polysacharid của tảo).

2. Vai trò, đặc tính lý, hóa, sinh học của các hóa chất dùng trong vi nhân giống

2.1. Nguyên tố đa lượng

Các nguyên tố đa lượng gồm 6 nguyên tố, Mg, Ca, P, N, S và K là cần thiết và thay đổi tùy vào đối tượng nuôi cấy. Nhìn chung nhu cầu của thực vật với các nguyên tố này ở nồng độ $> 0,5$ mM. Nguyên tố đa lượng có nồng độ cao nhất trong các môi trường nuôi cấy mô và tế bào thực vật.

Các nguyên tố đa lượng có chức năng cung cấp nguyên liệu để mô hoặc tế bào thực vật xây dựng thành phần cấu trúc và chức năng trong sinh tổng hợp protein (như

N và S), tổng hợp Nucleotit (như P, N, S), tổng hợp thành tế bào (Ca) hoặc giúp cho quá trình trao đổi chất giữa tế bào thực vật với môi trường được thuận lợi.



Hình 3.2. Một số hóa chất thuộc nhóm đa lượng

2.2. Nguyên tố vi lượng

Nhóm các nguyên tố vi lượng gồm: Fe, Mn, Zn, Cu, Mo, Co, B, I, Ni, Cl, Al bào chúng đóng vai trò quan trọng trong các hoạt động của enzym. Các nguyên tố này được sử dụng ở nồng độ thấp (nồng độ < 0,5 mM) để bảo đảm sự sinh trưởng và phát triển bình thường của cây.

2.3. Các vitamin

Tất cả các tế bào được nuôi cấy đều có khả năng tổng hợp tất cả các loại vitamin cơ bản nhưng thường là với số lượng dưới mức yêu cầu. Để mô có sức sinh trưởng tốt phải bổ sung vào môi trường một hay nhiều loại vitamin. Các vitamin là rất cần thiết cho các phản ứng sinh hoá.

Các vitamin sau đây được sử dụng phổ biến: inositol, thiamin HCl (B1), pyridoxine HCl (B6), nicotinic acid trong đó vitamin B1 là không thể thiếu và được sử dụng trong hầu hết các môi trường nuôi cấy mô và tế bào thực vật.

Inositol thường được nói đến như một vitamin kích thích một cách tích cực đối với sự sinh trưởng và phát triển của thực vật, mặc dù nó không phải là vitamin cần thiết trong mọi trường hợp. Các vitamin khác đặc biệt là nicotinic acid (B3), canxi pantothenate (B5) và biotin cũng được sử dụng để nâng cao sức sinh trưởng của mô nuôi cấy. Ảnh hưởng của vitamin lên sự phát triển của tế bào nuôi cấy *in vitro* ở các loài khác nhau là khác nhau thậm chí nó còn có thể gây hại.

2.4. Nguồn carbon

Trong nuôi cấy mô, các tế bào chưa có khả năng quang hợp để tổng hợp nên chất hữu cơ nên người ta phải đưa vào môi trường một lượng hợp chất carbon nhất định để cung cấp năng lượng cho tế bào và mô. Nguồn carbon ở đây là các loại đường khoảng 20 – 30mg/l có tác dụng giúp đỡ mô tế bào thực vật tổng hợp các chất hữu cơ, giúp tế bào tăng sinh khối, ngoài ra nó còn có vai trò là chất thẩm thấu chính của môi trường. Người ta thường sử dụng hai loại đường: Saccarose và glucoze.

2.5. Các chất điều hoà sinh trưởng

Các phytohormon là những chất có tác dụng điều hoà sinh trưởng và phát triển của thực vật. Chúng đóng vai trò quan trọng trong quá trình sinh trưởng và phát triển của thực vật như: Phân chia, biệt hoá tế bào.... Ngoài ra nó còn ảnh hưởng đến quá trình lão hoá mô và nhiều quá trình khác. Các phytohormon có thể chia thành 5 nhóm: Auxin,

Cytokinin, Gibberilin, Ethylen, Abscisic Acid. Chúng là yếu tố rất quan trọng trong môi trường quyết định sự thành công của kết quả nuôi cấy.

2.5.1. Nhóm các chất auxin

Nhóm này gồm có các chất chính là: IBA (3 –Indol butyric acid), IAA (Indo acetic acid), NAA (Naphthyl acetic acid).... trong nuôi cấy mô thực vật auxin thường được sử dụng để kích thích sự phân chia tế bào, biệt hoá rễ, hình thành mô sẹo, kìm hãm sự phát triển chồi và tạo ra các rễ phụ.

2.5.2. Cytokinin

Cytokinin được bổ sung vào môi trường chủ yếu để kích thích sự phân chia tế bào và quyết định sự phân hoá chồi bất định từ mô sẹo và cơ quan. Các hợp chất thường sử dụng là: Kinetin (6–Furfuryl aminopurine- $C_{10}H_9NO_5$), BAP (6- benzyl amino purine), Zip (Izopentenyl adenin), Zeatin. Trong các chất này thì kinitin và BAP được sử dụng phổ biến nhất vì chúng có hoạt tính cao mà giá thành rẻ.

Tuỳ vào từng hệ mô và mục đích nuôi cấy mà cytokinin được sử dụng ở các nồng độ khác nhau. ở nồng độ thấp (10^{-7} - $10^{-6}M$) chúng có tác dụng kích thích sự phân hoá tế bào, ở nồng độ 10^{-6} - $10^{-5}M$ chúng kích thích sự phân hoá chồi. Trong nuôi cấy mô để kích thích sự nhân nhanh người ta thường sử dụng cytokinin với nồng độ 10^{-6} - $10^{-4}M$.

2.5.3. Gibberellin

Nhóm này có khoảng 50 loại hormone khác nhau nhưng quan trọng nhất là GA_3 (Gibberellic acid 3). GA_3 có tác dụng kích thích nảy mầm của các loại hạt khác nhau, kéo dài các lóng đốt thân cành. Bên cạnh đó GA_3 còn có tác dụng phá ngủ các phôi, ức chế tạo rễ phụ, cũng như tạo chồi phụ. Ngoài ra nó còn ảnh hưởng đến sự ra hoa của một số thực vật và có tác dụng rút ngắn thời gian sinh trưởng sinh dưỡng của cây.

2.5.4. Abscisic Acid (ABA)

Là chất ức chế sinh trưởng trong tự nhiên nhưng vẫn được dùng trong nuôi cấy in vitro. ABA có ảnh hưởng âm tính đến mô nuôi cấy in vitro. Khi ABA tương tác với BAP cho hệ số nhân chồi cao hơn khi dùng BAP riêng rẽ.

2.5.5. Ethylen

Có biểu hiện tác động hai chiều nó kìm hãm sự hình thành chồi ở giai đoạn sớm nhưng lại kích thích phát triển chồi ở giai đoạn muộn. Trong một số trường hợp ethylen có tác dụng kích thích hình thành rễ nhưng trong một số trường hợp nó lại kìm hãm quá trình này.

2.6. Các chất bổ sung khác

Dung dịch hữu cơ có thành phần không xác định như nước dừa, dịch chiết nấm men... được bổ sung vào môi trường có tác dụng kích thích sinh trưởng mô sẹo và các cơ quan khác. Nước dừa được sử dụng vào nuôi cấy in vitro từ năm 1941 và được ứng dụng khá rộng rãi trong các môi trường nhân nhanh in vitro. Trong nước dừa thường chứa các acid amin, acid hữu cơ, đường, ARN và AND. Đặc biệt trong nước dừa còn có chứa những hợp chất quan trọng cho nuôi cấy mô đó là: Myoinositol, các hợp chất có hoạt tính auxin, các Glucid của Cytokinin.

2.7. Chất làm đông cứng môi trường

Đối với nuôi cấy tĩnh nếu sử dụng môi trường lỏng, mô có thể bị chìm và chết vì thiếu oxy. Để tránh tình trạng này môi trường nuôi cấy được làm đặc lại bằng thạch agar (một loại Polysacharid của tảo) và mô được nuôi cấy trên bề mặt của môi trường. Nồng độ agar trong môi trường dao động trong khoảng 6 - 10 g/ l tùy theo mục đích nuôi cấy.



Hình 3.3. Một số hóa chất vi lượng, chất điều tiết sinh trưởng

2.8.. Danh mục các chất cho nuôi cấy cần dùng trong vi nhân giống

Thành phần	MS(1)	VW(2)	B5(3)	WP(4)
Đa lượng				
KNO ₃	1900,00	525	2500	
NH ₄ NO ₃	1650,00			400
MgSO ₄ .7H ₂ O	370	200	250	370
KH ₂ PO ₄	170	250		170
CaCl ₂ .2H ₂ O	440		150	96
(NH ₄) ₂ SO ₄		500	134	
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O				556
K ₂ SO ₄				990
NaH ₂ PO ₄		250	150	
Vi lượng				
KI	0,83		0,75	
H ₃ BO ₃	6,2		0,75	6,2
MnSO ₄ .4H ₂ O	23,2	7,5	10	
MnSO ₄ .H ₂ O				22,3
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6		2	8,6
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025		0,025	0,025
CoCl ₂ . 6H ₂ O	0,025		0,025	0,025
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O;	0,25		0.25	0,25

FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8			
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37,3			
Sodiumferric EDTA		28		30
Vitamin và acid amin				
Myo – inositol	100		100	100
pyridoxine HCl	0.5		1	
Glycine	2	3		
Nicotin acid	0,5		1	
Thiamin HCl	0,1		10	
Sucrose(g/l)	30	20	20	20

Chú thích:

- 1- Môi trường Murashige & Skoog
 - 2- Vacin & Went
 - 3- Môi trường Gamborg B5 Medium.
 - 4- Môi trường McCown Woody Plant Medium
- Nguồn cacbon bổ sung: Thường dùng là đường Sucrose, glucozơ.
- Các chất hữu cơ khác: Myo – inositol, pyridoxine HCl; IAA; Glycine; Nicotin acid; thiamin HCl; Kinitin; Edamine.
- Chất làm đông cứng môi trường: agar

3. Pha chế hóa chất và bảo quản dung dịch mẹ

Pha và sử dụng dd mẹ là rất cần thiết, giúp làm giảm sự lặp lại các thao tác trong lúc pha môi trường, đồng thời việc cân trực tiếp các thành phần môi trường (khoáng vi lượng, các chất điều hòa sinh trưởng thực vật) có trọng lượng thấp (mg hoặc μ g) là không chính xác. Hơn nữa, dd dịch mẹ của một số hóa chất thường ổn định hơn và có thể trữ được trong thời gian lâu hơn là các dd pha loãng.

- DD mẹ của khoáng đa lượng nên pha với nồng độ gấp 10-50 lần dd chuẩn. DD mẹ của muối Canxi nên pha riêng để tránh kết tủa.
- DD mẹ của khoáng vi lượng nên pha nồng độ gấp 100-200 lần dd chuẩn.
- DD mẹ của vitamin và các chất điều hòa sinh trưởng nên pha với nồng độ 100-1000 lần so với dd chuẩn. Các chất điều hòa sinh trưởng khó tan trong nước, khi pha dung dịch mẹ phải chú ý đến dung môi hòa tan của mỗi chất, thường là: Cồn, NaOH, HCl.

Pha chế dung dịch mẹ theo môi trường *Murashige-Skoog* (MS, 1962): Chia môi trường MS ra làm 5 phần: MS1, MS2, MS3, MS4, MS5 (Bảng 3.1).

Bảng 3.1: Các chất và nồng độ sử dụng của môi trường MS

Hóa chất	Nồng độ (mg/l)	Nồng độ trong dung dịch mẹ (g/400 ml)	Dung tích dùng cho 1 lít môi trường (ml)	
MS1: KNO ₃	1900	38,0	20	
KH ₂ PO ₄	170	3,4		
NH ₄ NO ₃	1650	33,0		
MgSO ₄ .7H ₂ O	370	7,4		
MS2: CaCl ₂ .2H ₂ O	440	17,6	(x100)	10
MS3: H ₃ BO ₃	6,2	0,248	(x100)	10
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3	0,892		
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	1,000		
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	1,000		
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6	0,424		
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25	10,000		
KI	0,83	33,200		
MS4: FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8	1,012	(x100)	10
Na ₂ -EDTA	37,3	1,492		
MS5: Myo-Inositol	100	4,000	(x100)	10
Thiamine.HCl	0,1	0,004		
Pyridoxine.HCl	0,5	0,020		
Acid nicotinic	0,5	0,020		
Glycine	2	0,080		

3.1. Cách pha chế và bảo quản khoáng Đa lượng và Vi lượng

3.1.1. Chuẩn bị dụng cụ, hóa chất

* Dụng cụ: Cân phân tích, máy khuấy từ (hoặc đũa thủy tinh), dụng cụ đo lường, lọ đựng dung dịch sau khi pha, nước cất 2 lần, tủ lạnh bảo quản dung dịch sau khi pha...

* Hóa chất: Chuẩn bị các hóa chất cần thiết (xem danh mục hóa chất ở bảng 2.1-MS1, MS2, MS3 và MS4).

3.1.2. Các bước tiến hành

a. Pha MS1

Lấy 300 ml nước cất vào cốc thủy tinh có chia vạch dung tích 1l, đặt lên máy khuấy từ (hoặc khuấy bằng đũa thủy tinh), khởi động máy.

Cân chính xác 38,0g KNO₃ cho vào cốc, khuấy cho tan hết. Lần lượt cân chính xác 3,4g KH₂PO₄; 33,0g NH₄NO₃; 7,4g MgSO₄.7H₂O cho vào cốc (Chú ý: Sau khi tan

hết hóa chất trong cốc mới thêm chất khác vào). Sau đó thêm nước cất vào cho đủ 400ml.

Đổ dd MS1 đã pha xong vào lọ thủy tinh và dán nhãn cho dd.

b. Pha MS2

Cách pha như MS1, nhưng thay hóa chất bằng 17,6g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

c. Pha MS3

Cách pha như MS1, nhưng thay hóa chất bằng 0,248g H_3BO_3 ; 0,892g $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 1,000g $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 1,000g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 0,424g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 10,000g $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 33,200g KI.

d. Pha MS4

Cách pha như MS1, nhưng thay hóa chất bằng: 1,012g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1,492g $\text{Na}_2\text{-EDTA}$.

3.1.3. Phương pháp bảo quản

DD mẹ của khoáng đa lượng có thể trữ được trong vài tuần lễ ở trong tối, thoáng mát. Tốt nhất là trữ trong tủ lạnh ở nhiệt độ 2-4°C. dd mẹ nên được lọc qua để loại bỏ những phần không tan trước khi cất trữ.

DD mẹ của khoáng vi lượng nên được cất trữ trong tủ lạnh hoặc tủ đông cho đến khi sử dụng, với cách này có thể bảo quản trong 1 năm mà không thay đổi tính chất.

DD mẹ MS4 phải chứa trong chai màu và trữ trong tủ lạnh

3.2. Cách pha chế và bảo quản vitamin (MS5)

3.2.1. Chuẩn bị dụng cụ hóa chất

Giống như pha dd khoáng đa lượng và vi lượng. Danh mục hóa chất xem ở bảng 2.1-MS5.

3.2.2. Các bước tiến hành

Cách pha như khoáng đa lượng và vi lượng chỉ khác là cân chính xác: 4,000g Myo-Inositol; 0,004g Thiamine.HCl; 0,020g Pyridoxine.HCl; 0,020g Acid nicotinic; 0,080g Glycine.

3.2.3. Phương pháp bảo quản

DD MS5 dễ bị nhiễm do nấm, tạp khuẩn nên trữ trong tủ đông cho đến khi sử dụng. Nên chia sẵn dd mẹ MS5 ra nhiều lọ nhỏ, mỗi lọ đủ dùng cho vài lít môi trường và bảo quản trong ngăn đá.

DD MS5 có thể trữ được an toàn trong tủ lạnh từ 2-3 tháng và không nên sử dụng khi quá thời gian đó.

3.3. Cách pha chế và bảo quản chất điều hòa sinh trưởng

3.3.1. Chuẩn bị dụng cụ hóa chất

* Dụng cụ: Giống như pha dd khoáng đa lượng và vi lượng.

* Hóa chất: Danh mục hóa chất xem *Bảng 1.6.* chuẩn bị Cồn 95°, dd NaOH 1N, dd HCl 1N

3.3.2. Các bước tiến hành

Nồng độ chất điều hòa sinh trưởng trong dd mẹ thường là 1mg/1ml. Mỗi chất được pha riêng và chứa trong các lọ khác nhau. Bài này trình bày cách pha cho 50ml dd mẹ.

a. Pha dd mẹ nhóm auxin: 2,4D; IAA; IBA; NAA

2,4D: Cân chính xác 50mg 2,4D cho vào cốc có dung tích 100ml, thêm vào 15-20 ml cồn 95°, khuấy đều cho đến khi tan hết hóa chất trong cốc, thêm nước cất vào cho đủ 50ml. Cho dd đã pha xong vào lọ chứa, dán nhãn cho dd.

IBA: Cân chính xác 50mg IBA cho vào cốc có dung tích 100ml, thêm vào 15-20 ml cồn 95° hoặc vài ml NaOH 1N, khuấy đều cho đến khi tan hết hóa chất trong cốc, thêm nước cất vào cho đủ 50ml. Cho dd đã pha xong vào lọ chứa, dán nhãn cho dd.

IAA và NAA: Pha giống như IBA.

b. Pha dung dịch mẹ nhóm cytokinin: (BAP, KIN, GA₃): Cách pha giống như nhóm auxin, nhưng chú ý dung môi của BAP và KIN là dd NaOH 1N hoặc HCl 1N; dung môi của GA₃ là Cồn 95°.

* *Cần chú ý*, chất sinh trưởng có thể tác động lên mô nuôi cấy ở nồng độ rất thấp 10⁻⁹. Cần dùng riêng pipet cho từng loại chất sinh trưởng một và chú ý rửa cẩn thận các ly, cốc, chai lọ đã đựng và dùng pha các chất sinh trưởng ở nồng độ cao. Trừ IAA và GA₃, các chất sinh trưởng còn lại được coi là bền vững trong quá trình hấp vô trùng.

3.3.3. Phương pháp bảo quản

IAA và IBA: phải được chứa trong chai màu, trữ trong tủ lạnh ở nhiệt độ 0-4°C.

2,4D; NAA: có thể bảo quản ở nhiệt độ phòng hoặc trong tủ lạnh. Thời gian bảo quản có thể kéo dài vài tháng.

BAP; KIN; GA₃: trữ trong tủ lạnh ở nhiệt độ từ 2-8°C, bảo quản 2-3 tháng.

Tốt nhất dd mẹ chất điều hòa sinh trưởng nên pha một lượng đủ dùng và pha lại hàng tháng.

3.4. Những vấn đề cần lưu ý khi sử dụng dung dịch mẹ

Dung dịch mẹ bị nhiễm: thường do 3 nguyên nhân chính sau, khi dd mẹ bị tạp nhiễm cần phải hủy ngay.

- + Nhiễm sữa thường xuất hiện huyền phù của sữa trong dd mẹ.
- + Nhiễm nấm thường thấy sợi tơ hay các cụm hình cầu trôi nổi trong dd mẹ.
- + Nhiễm khuẩn thường bốc mùi hôi.

Bảo quản dd mẹ: tồn trữ các dd mẹ trong tủ lạnh có nhiệt độ bảo quản ổn định, tùy loại dd mẹ mà có nhiệt độ bảo quản khác nhau. Khi sử dụng dd mẹ, thao tác cần phải nhanh và đưa vào tủ lạnh ngay để tránh tạp nhiễm.

Sự kết tủa dd mẹ: đây là phản ứng của các chất có canxi, photphat và magie. Thường xuất hiện kết tủa do liều lượng pha dd mẹ quá đậm đặc và không theo tuần tự cho vào hỗn hợp giữa các chất.

3.5. Những vấn đề cần lưu ý khi bảo quản hóa chất

Hóa chất sau khi pha xong phải được chứa trong lọ thủy tinh nút mài có nút đậy kín.

Phải có nhãn cho hóa chất đã pha: nội dung phải + Tên hóa chất
+ Nồng độ của hóa chất
+ Ngày pha

Hóa chất phải có nơi để riêng với các dụng cụ khác, nơi bảo quản hóa chất phải khô ráo thoáng mát. Phải đảm bảo được các yêu cầu về bảo quản đối với mỗi loại hóa chất khác nhau.

4. Pha chế bảo quản môi trường dinh dưỡng

4.1. một số môi trường nền nuôi cấy phổ biến

Khi khởi sự công tác nuôi cấy mô đối với một số đối tượng nhất định, vấn đề đặt ra là chọn môi trường nào cho thích hợp. Trong hàng trăm môi trường do rất nhiều tác giả đề nghị cho nhiều loại cây khác nhau, hiện nay, môi trường MS được cho là giàu, cân bằng về chất dinh dưỡng và thích hợp cho nhiều loại cây. Môi trường WP là môi trường thích hợp cho nuôi cấy cây thân gỗ.

4.2. Công thức và cách pha chế môi trường nuôi cấy

Mức độ thành công của kỹ thuật nuôi cấy mô và tế bào thực vật liên quan đến nhiều nhân tố. Một nhân tố quan trọng nhất là chọn lựa thành phần môi trường dinh dưỡng và các chất điều hòa sinh trưởng thực vật.

Sau đây là công thức và cách pha chế môi trường nuôi cấy.

4.2.1. Công thức và cách pha chế môi trường tạo mẫu

a. Công thức:

- Môi trường WP (hoặc MS)
- 20g đường Saccaroza
- 8g agar.
- pH 5,8

b. Cách pha 1L môi trường:

* Chuẩn bị dụng cụ hóa chất:

- Dụng cụ: Máy khuấy từ (hoặc đũa thủy tinh), dụng cụ đo lường, cốc thủy tinh dung tích 2lit, bếp gas (hoặc bếp điện), nồi nấu môi trường, nước cất hoặc nước khử ion, bông không thấm nước hoặc giấy nhôm, máy đo pH, nồi hấp vô trùng.

- Hóa chất: DD mẹ WP: WP1, WP2, WP3, WP4, WP5; đường saccaroza; agar, dd NaOH 0,1N, dd HCl 0,1N.

Bảng 3.2. Các chất và nồng độ sử dụng của môi trường WP

Hóa chất	Nồng độ mg/L	Dung dịch Stock g/200ml	Dùng cho một lít môi trường
<u>WP1</u>			
NH ₄ NO ₃	400	8	10 ml
MgSO ₄ .7H ₂ O	370	7,4	
KH ₂ SO ₄	170	3,4	
K ₂ SO ₄	990	19,8	
<u>WP2</u>			
CaCl ₂ .2H ₂ O	96	1,92	10 ml
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	556	11,12	
<u>WP3</u>			
H ₃ BO ₃	6,2	0,124	10 ml
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,25	5 mg	
MnSO ₄ .H ₂ O	22,3	0,446	
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25	5 mg	
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6	0,172	
<u>WP4</u>			
Na ₂ EDTA	37,3	0,746	10 ml
Fe ₂ SO ₄ .7H ₂ O	27,8	0,556	
<u>WP5</u>			
Myo-Inositol	100	2	10 ml
Glycine	2,0	40 mg	
Nicotinic acid	0,5	10 mg	
B6 (Pyridoxin acid)	0,5	10 mg	
B1 (Thiamin acid)	0,1	2 mg	

Cách tiến hành pha môi trường WP cũng tương tự như môi trường MS, nhưng một điều nên chú ý rằng môi trường WP này chủ yếu để sử dụng cho một số loại cây thân gỗ. Ví dụ như cây keo lai, cây gió, cây bạch đàn, ...

* Các bước tiến hành:

- Cho khoảng 500ml nước cất vào cốc thủy tinh thứ nhất có dung tích 2lit đặt lên máy khuấy từ.

- Dùng pipet lần lượt lấy chính xác và thêm vào 10 ml dung dịch mẹ WP1, 10 ml WP2, 10 ml WP3, 10 ml WP4 và 10 ml WP5, luôn luôn khuấy đều.

- Thêm 20 g saccharose vào dung dịch WP trên và khuấy tan.

- Đo pH của dung dịch bằng máy đo pH, dùng HCl 0,1N hoặc NaOH 0,1N để điều chỉnh pH đến 5,8.

- Lấy 8 g agar cho vào 1 cốc thủy tinh thứ hai (loại chịu nhiệt và trung tính), bổ sung 400 ml nước cất và đun sôi bằng bếp gas. Khuấy đều cho đến khi tan hết agar.

- Đổ dung dịch ở cốc thứ nhất vào cốc thứ hai, khuấy đều và định mức 1lit bằng nước cất.

- Phân phối môi trường đã chuẩn bị vào các bình tam giác hoặc ống nghiệm hoặc các loại bình nuôi cấy khác (khoảng 50ml/bình tam giác hoặc 10ml/ống nghiệm). Cần chia xong môi trường trước khi dung dịch nguội xuống dưới 50°C.

- Nút bông (hoặc bọc bằng giấy nhôm) ống nghiệm hoặc bình tam giác, bọc giấy lại và đem hấp khử trùng.

4.2.2. Công thức và cách pha chế môi trường nhân nhanh

* Công thức và cách pha chế môi trường tạo chồi

a. Công thức

- Môi trường WP (hoặc MS)
- Chất điều hòa sinh trưởng: auxin/cytokinin < 1
- 30g đường Saccaroza
- Nước dừa: 10%
- 8g agar.
- pH 5,8

b. Cách pha 1l môi trường:

+ Chuẩn bị dụng cụ hóa chất:

- Dụng cụ: Máy khuấy từ (hoặc đĩa thủy tinh), dụng cụ đo lường, cốc thủy tinh dung tích 2lit, bếp gas (hoặc bếp điện), nồi nấu môi trường, nước cất hoặc nước khử ion, bông không thấm nước hoặc giấy nhôm, máy đo pH, nồi hấp vô trùng.

- Hóa chất: DD mẹ WP: WP1, WP2, WP3, WP4, WP5; dd mẹ chất điều hòa sinh trưởng; đường saccaroza; agar, dd NaOH 0,1N, dd HCl 0,1N.

+ Các bước tiến hành:

- Cho khoảng 500ml nước cất vào cốc thủy tinh thứ nhất có dung tích 2lit đặt lên máy khuấy từ.

- Dùng pipet lần lượt lấy chính xác và thêm vào 10 ml dung dịch mẹ WP1, 10 ml WP2, 10 ml WP3, 10 ml WP4 và 10 ml WP5, luôn luôn khuấy đều.

- Dùng pipet lấy chính xác lượng chất điều hòa sinh trưởng cần dùng thêm vào dd trên.

- Dùng ống đong thêm vào dung dịch trên 100ml nước dừa, khuấy đều.

- Thêm 30g saccharose vào và khuấy tan.

- Đo pH của dung dịch bằng máy đo pH, dùng HCl 0,1N hoặc NaOH 0,1N để điều chỉnh pH đến 5,8.

- Lấy 8 g agar cho vào 1 cốc thủy tinh thứ hai (loại chịu nhiệt và trung tính), bổ sung 400 ml nước cất và đun sôi bằng bếp gas. Khuấy đều cho đến khi tan hết agar.

- Đổ dung dịch ở cốc thứ nhất vào cốc thứ hai, khuấy đều và định mức 1lit bằng nước cất.

- Phân phối môi trường đã chuẩn bị vào các bình tam giác hoặc ống nghiệm hoặc các loại bình nuôi cấy khác (khoảng 50ml/bình tam giác hoặc 10ml/ống nghiệm). Cần chia xong môi trường trước khi dung dịch nguội xuống dưới 50°C.

- Nút bông (hoặc bọc bằng giấy nhôm) ống nghiệm hoặc bình tam giác, bọc giấy lại và đem hấp khử trùng.

* Công thức và cách pha chế môi trường tạo cụm chồi

a. Công thức

- Môi trường WP (hoặc MS)

- Chất điều hòa sinh trưởng: auxin/cytokinin < 1, nhưng nồng độ auxin và cytokinin đều tăng.

- 30g đường Saccaroza

- Nước dừa: 10%

- 8g agar.

- pH 5,8

b. Cách pha 1l môi trường: giống như pha môi trường tạo chồi.

4.2.3. Công thức và cách pha chế môi trường tạo cây hoàn chỉnh

a. Công thức:

- Môi trường WP (hoặc MS)

- Chất điều hòa sinh trưởng: auxin/cytokinin >1

- 20g đường Saccaroza

- 8g Agar.

- pH 5,8

b. Cách pha 1l môi trường: Quá trình chuẩn bị và cách pha chế giống như môi trường nhân nhanh.

4.3. Khử trùng môi trường nuôi cấy

4.3.1. 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, muối khoáng, vitamin... rất giàu dinh dưỡng thích hợp cho các loại nấm và vi khuẩn phát triển. Do tốc độ phân bào của nấm và vi khuẩn nhanh 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 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.

Thông thường, một chu kỳ nuôi cấy mô và tế bào thực vật dài từ 1-5 tháng (tùy đối tượng và mục đích nuôi cấy), trong khi thí nghiệm vi sinh vật có thể kết thúc trong

một vài ngày. Do đó, mức độ vô trùng trong thí nghiệm nuôi cấy mô và tế bào thực vật đòi hỏi rất nghiêm khắc.

4.3.2. Phương pháp khử trùng môi trường nuôi cấy

Để khử trùng môi trường khoáng thường sử dụng hai phương pháp: Hấp vô trùng và lọc bằng màng lọc vô trùng. Với thể tích nhỏ (<100ml) thời gian khử trùng là 25-30 phút, với lượng môi trường lớn (>100ml) thì phải khử trùng trong 30-60 phút. Màu của môi trường có agar sau hấp thường là màu vàng. Môi trường lỏng thường có màu vàng nhạt. Tuy nhiên màu của môi trường còn phụ thuộc vào pH của môi trường.

Bảng 3.3. Thời gian tối thiểu để hấp khử trùng môi trường ở 121°C.

Thể tích môi trường (ml)	Thời gian khử trùng tối thiểu (phút)
20-25	24
50	26
100	28
250	31
500	35
1000	40
2000	48
3000	55
4000	65

* Đối với môi trường bền với nhiệt

Môi trường được hấp khử trùng bằng nồi hấp ở nhiệt độ 121°C, 1atm. Thời gian khử trùng tùy thuộc vào thể tích môi trường trong bình nuôi cấy. Nên chia khoảng 20-25ml môi trường vào các bình nuôi cấy và hấp khử trùng trong thời gian 30 phút, vì các thành phần môi trường dễ bị phân hủy khi hấp trong thời gian dài ở nhiệt độ cao và áp suất cao. Đồng thời khi hấp ở nhiệt độ cao thì agar không thể đông lại và tế bào thực vật nuôi cấy cũng không tăng trưởng được.

* Đối với môi trường có chất không bền với nhiệt

- Đầu tiên ta phải pha môi trường gồm các chất bền với nhiệt, đem hấp tiệt trùng, sau đó làm lạnh môi trường xuống còn 50-60°C.

- Các chất không bền với nhiệt được lọc bằng phin lọc milipore hoặc seitz (có kích thước lỗ không lớn hơn 0,2 μ m) trong điều kiện vô trùng.

- Hai dd đã khử trùng này phối hợp với nhau trong điều kiện vô trùng để tạo ra một môi trường hoàn chỉnh.

4.4. Các phương pháp bảo quản môi trường nuôi cấy

- Môi trường sau khi hấp xong phải được sấy khô nút bông và chuyển vào phòng cấy.

- Các loại môi trường khác nhau phải được để riêng và ghi chú cẩn thận.

- Môi trường nuôi cấy thường được bảo quản ở nhiệt độ phòng, được để nơi khô ráo, thoáng mát.



Hình 3.4. Pha chế môi trường nuôi cấy

B. Bài tập

Bài tập 1: Xác định các nhóm hóa chất dùng trong vi nhân giống? Cho biết vai trò của các nhóm hóa chất trên?

Bài tập 2: Thực hành xác định chủng loại và số lượng hóa chất cần dùng để pha chế một số môi trường vi nhân giống phổ biến?

Bài tập 3: Thực hành pha chế dung dịch mẹ cho MS?

Bài tập 4: Thực hành pha chế các loại chất điều tiết sinh trưởng?

Bài tập 5: Thực hành pha chế môi trường nuôi cấy khởi đầu ?

Bài tập 6: Thực hành pha chế môi trường nhân nhanh ?

Bài tập 7: Thực hành pha chế môi trường tạo cây hoàn chỉnh ?

Bài tập 8: Thực hành khử trùng môi trường nuôi cấy bằng nồi áp suất hoặc nồi Autoclave?

C. Ghi nhớ: Cần chú ý một số nội dung trọng tâm:

- Vai trò của các nhóm hóa chất
- Danh mục hóa chất cần dùng cho một số môi trường vi nhân giống phổ biến.
- Pha chế và bảo quản các loại dung dịch mẹ
- Pha chế và bảo quản một số chất điều tiết sinh trưởng phổ biến
- Quy trình pha chế các loại môi trường vi nhân giống
- Vận hành nồi áp suất để khử trùng môi trường vi nhân giống.

BÀI 4. THỰC HIỆN CÁC GIAI ĐOẠN TRONG QUY TRÌNH NHÂN GIỐNG

Mã bài: VNG-04

Mục tiêu

Sau khi học xong bài này học viên có khả năng:

- Trình bày được phương pháp lấy mẫu, nuôi cấy khởi đầu, nhân nhanh chồi, tạo cây hoàn chỉnh và huấn luyện cây *in vitro*;
- Xác định và thu thập được vật liệu nuôi cấy khởi đầu đối với mỗi đối tượng nhân giống khác nhau;
- Thực hiện được các thao tác vi nhân giống để nhân giống thành công một số cây trồng phổ biến;
- Chăm sóc, huấn luyện được cây giống đảm bảo chất lượng và tỷ lệ sống cao.

A. Nội dung

1. Lấy mẫu để vi nhân giống

1.1. Chuẩn bị mẫu cấy

Khi lấy mẫu cần chọn đúng loại mô, đúng giai đoạn phát triển của cây. Quan trọng nhất là đỉnh chồi ngọn, đỉnh chồi nách, sau đó là chồi hoa, đoạn thân, mảnh lá....

Ví dụ: Chồi ngọn, chồi nách sử dụng để nhân nhanh hoa cúc, cẩm chướng. Mảnh lá sử dụng để nhân nhanh hoa chuông.

* *Chọn cây cung cấp nguồn mẫu cấy*

Trong vườn sản xuất chọn cây có chất lượng tốt đang ở giai đoạn sinh trưởng phát triển mạnh, mang các đặc điểm đặc trưng của giống để làm cây gốc cung cấp nguồn mẫu nuôi cấy. Đặc biệt cây gốc không có nguồn sâu bệnh hại. Chọn lựa cây gốc phải kết hợp với quan sát hình thái cũng cần phải lấy mẫu để kiểm tra nguồn bệnh hại nếu có virus hoặc vi khuẩn thì phải loại bỏ không lấy mẫu nuôi cấy ở những cây này. Nguyên liệu sử dụng cho nuôi cấy mô tế bào thực vật có thể là bất cứ bộ phận nào của cây: các đoạn của rễ, thân, các phần của lá, các cấu trúc của phôi như cuống mầm, hạt phấn, noãn... thậm chí cả mẫu thân ngầm hay cơ quan dự trữ dưới mặt đất cũng được dùng cho nuôi cấy.

Mục đích nuôi cấy và đặc tính của từng loại cây sẽ quyết định lựa chọn loại mẫu nào là phù hợp. Cây mẹ phải mang một hoặc nhiều đặc tính ưu việt mà ta quan tâm như sinh trưởng tốt, cho sản lượng, chất lượng cao đối với hoa, quả, hạt hay cơ quan sinh dưỡng, ít bị nhiễm bệnh, có khả năng chống chịu với các điều kiện bất lợi của môi trường (chịu hạn, chịu lạnh...), các mẫu thường được lấy vào đầu mùa sinh trưởng, lúc sáng sớm khi toàn cây vẫn còn ở trạng thái căng trương.

Sự tái sinh của mẫu phụ thuộc vào thành phần môi trường nuôi cấy, đặc điểm di truyền của loài, trạng thái sinh lý của cây khi lấy mẫu và đôi khi chịu ảnh hưởng của các mùa trong năm (ở hoa loa kèn chỉ có những mẫu thu thập vào mùa xuân và mùa thu mới có khả năng tái sinh còn các mùa khác không thể đạt kết quả tương tự). Cây hai lá mầm có thể tái sinh dễ hơn cây một lá mầm. Tuổi sinh lý của mẫu cũng ảnh hưởng nhiều tới khả năng tái sinh của cây: mẫu lấy từ cây trẻ có khả năng tái sinh cao hơn mẫu lấy từ cây già, đặc biệt đối với cây thân gỗ. Để khắc phục hiện tượng này người ta có thể làm trẻ hoá mẫu bằng nhiều biện pháp như nuôi cấy meristem, ghép

meristem hay chồi đỉnh lên gốc cây giống, tách mẫu từ những vùng còn non, tỉa cành một vài lần để kích thích chồi ngủ. Mặc dù chồi và phôi bất định thường hình thành trong quá trình trẻ hoá, nhưng chúng thường không thích hợp vì thường tạo ra các đột biến không mong muốn. Sự trẻ hoá bằng phương pháp nuôi cấy đỉnh sinh trưởng mặc dù rất khó nhưng vẫn là biện pháp thích hợp nhất do duy trì được tính bền vững di truyền, loại trừ được nấm, vi khuẩn, đôi khi cả virus. Đặc biệt khả năng tái sinh của các loài khác nhau tăng lên trong thời gian ra hoa.

Mẫu lấy để cấy là chồi đỉnh, mầm ngủ, lá non... của cây nhưng phải có khả năng tái sinh mạnh và mang các đặc tính sinh học của cây mẹ.

1.2. Xử lý mẫu

Mẫu lấy từ cây mẹ đầu tiên cần phải xử lý sơ bộ như loại bỏ các phần không cần thiết và rửa sạch đất cát dưới vòi nước chảy.

Để giảm nguồn lây nhiễm bám vào cây gốc có thể chuyển cây gốc về nuôi trồng trong điều kiện có cách ly chăm sóc và phòng trừ sâu bệnh tốt như trồng trong nhà kính nhà lưới đảm bảo cách ly với môi trường bên ngoài.

2. Nuôi cấy khởi đầu

2.1. Kiến thức cần thiết để thực hiện công việc

Nuôi cấy khởi đầu là giai đoạn khử trùng đưa mẫu vào nuôi cấy *in vitro*.

Mục đích: Tạo vật liệu (mẫu cấy) khởi đầu sạch bệnh cho quá trình nhân nhanh và tạo cây hoàn chỉnh.

- Yêu cầu:
- Tỷ lệ nhiễm thấp
 - Tỷ lệ sống cao
 - Mô tồn tại sinh trưởng tốt

Giai đoạn này bao gồm các khâu công việc khử trùng mẫu, tách lấy mẫu nuôi cấy và cấy vào môi trường dinh dưỡng.

Nguyên liệu để nuôi cấy *in vitro* được lựa chọn từ những cá thể ưu tú của loài, khoẻ và sạch bệnh nhưng ít nhiều đều có nhiễm vi sinh vật và nấm, tùy thuộc vào sự tiếp xúc của chúng với môi trường xung quanh. Các bộ phận khác nhau thì tỷ lệ nhiễm vi sinh vật là khác nhau. Phương pháp thông dụng nhất hiện nay để loại bỏ hệ vi sinh vật khỏi vật liệu cấy là sử dụng các hoá chất có hoạt tính diệt khuẩn và nấm.

+ Tạo mẫu cấy vô trùng bằng khử trùng bề mặt mẫu cấy:

Mẫu lấy được cắt bóc bỏ lá rửa sạch bằng xà phòng rồi rửa dưới vòi nước chảy, rửa tráng lại nhiều lần bằng nước vô trùng rồi đưa vào phòng cấy vô trùng để tiến hành khử trùng bằng hoá chất.

Khả năng tiêu diệt nấm và khuẩn của hoá chất khử trùng tùy thuộc vào nồng độ, thời gian xử lý và mức độ xâm nhập của chúng vào các ngõ ngách trên bề mặt của mô cấy. Để làm tăng hiệu quả người ta thường nhúng mẫu vào ethanol 70 – 80% trong 30 giây, sau đó mới xử lý bằng dung dịch diệt khuẩn. Đối với những mẫu có bề mặt bao phủ bởi một lớp sáp, muốn đạt được kết quả tốt cần cho thêm vào dung dịch khử trùng một vài giọt tween 20, tween 80...vì các chất này làm tăng tính bám dính của hoá chất

khử trùng. Với các mẫu quá bẩn, việc rửa kỹ bằng nước xà phòng và để dưới vòi nước chảy từ 20 – 30 phút sẽ có tác dụng làm giảm đáng kể hệ vi khuẩn khỏi mẫu cấy.

Tác nhân khử trùng ngoài tác dụng diệt vi sinh vật còn ảnh hưởng đến mô cấy, vì vậy việc lựa chọn hoá chất phải căn cứ vào mức độ nhiễm khuẩn và độ mặn cảm của từng mẫu. Trong số các hoá chất thường được dùng để khử trùng thì canxihypoclorit và natrihypoclorit là hay được sử dụng hơn cả vì có độc tính thấp với mô được xử lý, không gây ức chế sinh trưởng và hiệu quả diệt khuẩn tốt. Nồng độ của canxihypoclorit và natrihypoclorit tương ứng thường là 5 – 15% và 0,5 – 2% trong thời gian từ 15 – 30 phút. Tuy nhiên những chất này không bền nên trong thực tế, HgCl₂ cũng hay được dùng để thay thế, thời gian khử trùng của HgCl₂ từ 7 – 10 phút.

+ Môi trường nuôi cấy khởi đầu

Thành công của phương pháp nuôi cấy *invitro* phụ thuộc rất nhiều vào điều kiện nuôi cấy. Nhu cầu dinh dưỡng cho sự sinh trưởng và phát triển tối ưu của các loài là không giống nhau, ngay cả giữa các bộ phận trong cùng một cơ thể cũng ít nhiều có sự khác nhau. Sự lựa chọn môi trường nuôi cấy, bao gồm cả chất lượng và số lượng hoá chất sử dụng đóng vai trò quyết định đối với bản thân sự phân hoá và chiều hướng phân hoá của tế bào.

Môi trường nuôi cấy ở giai đoạn này thường sử dụng môi trường MS có auxin và cytokinine với nồng độ và tỷ lệ thích hợp.

Nếu muốn mô nuôi cấy khởi đầu phát triển thành phôi vô tính hoặc cụm chồi không cần qua hình thành callus thì bổ sung cytokinine là BA vào môi trường làm việc. Ví dụ với phong lan BA = 1mg/l môi trường MS. Trường hợp để hình thành callus tiền đề hình thành phôi vô tính và cụm chồi thì auxin cần bổ sung là 2,4D vào môi trường nuôi cấy.

+ Cấy mẫu vào bình chứa môi trường dinh dưỡng đã chuẩn bị sẵn.

+ Nuôi dưỡng sau cấy: Đưa bình mẫu cấy sang phòng nuôi trong điều kiện nhân tạo có quang chu kỳ là 16- 18 giờ sáng/ ngày, cường độ 4.000lux và nhiệt độ 26- 28oC. Với điều kiện này thì sau 20- 30 ngày trên mô cấy hình thành các phôi vô tính hay chồi nhỏ chồng chất lên nhau tạo thành cụm chồi thì cần phải cấy chuyển sang môi trường dinh dưỡng mới (nhân chồi). Nếu để tạo callus cần để trong điều kiện không có ánh sáng.

Để mô nuôi cấy tái sinh thành chồi cần chú ý một số vấn đề sau:

+ Chọn môi trường dinh dưỡng phù hợp

Nuôi cấy mô là nuôi cấy một bộ phận sống độc lập tách rời khỏi cây đang sống cho nên mô cần được cung cấp đầy đủ các chất để tiếp tục phát triển. Mỗi loài cây phù hợp với một loại môi trường khác nhau. Mỗi môi trường có thành phần và tỷ lệ các muối khoáng khác nhau. Trong nuôi cấy mô cần thăm dò để tìm ra môi trường thích hợp. Trong thực tế thường sử dụng môi trường MS. Vì môi trường này giàu và cân bằng về dinh dưỡng. Hơn nữa nó thích hợp cho nuôi cấy mô của cây một lá mầm cũng như cây hai lá mầm.

+ Đảm bảo nồng độ đường trong môi trường nuôi cấy

Trong nuôi cấy mô tế bào, mô nuôi cấy dinh dưỡng theo phương thức dị dưỡng. Do đó cần phải đưa vào môi trường nuôi cấy nguồn carbon hữu cơ (đường) là bắt buộc.

Mô tế bào sử dụng nguồn carbon này để tổng hợp nên các chất hữu cơ giúp tế bào phân chia tăng sinh khối của mô và tái sinh thành cây hoàn chỉnh. Nồng độ sử dụng từ 1 - 6% thông dụng nhất là 2%. Trong quá trình nuôi cấy do mô tế bào sử dụng nên nồng độ đường này giảm dần (khoảng 20 - 25 ngày) do vậy áp suất thẩm thấu của tế bào giảm khi đó mô sẽ không phát triển được. Vì vậy cần phải cấy chuyển sang môi trường mới.

+ Các chất điều hoà sinh trưởng

Mỗi chất điều hoà sinh trưởng có tác dụng riêng và đặc trưng cho quá trình sinh lý ở thực vật. Ví dụ Auxin có tác dụng kích thích ra rễ, BA có tác dụng kích thích phân chia tế bào kích thích sự ra chồi, 2,4D dễ gây độc nhưng rất cần cho sự hình thành callus... Do vậy để cho mô tái sinh tốt cần chọn và cho vào môi trường các chất điều hoà sinh trưởng với hàm lượng và tỷ lệ thích hợp.

Ví dụ trong nuôi cấy mô chuỗi sự hình thành phôi vô tính không cần qua giai đoạn hình thành callus cho nên ở giai đoạn nhân chồi chỉ cần cho vào môi trường BA nồng độ 10⁻⁶ đến 10⁻⁵. Đối với trường hợp sự hình thành phôi vô tính cần qua giai đoạn hình thành callus cho nên ở giai đoạn nuôi cấy khởi đầu cần cho vào môi trường 2,4D (nồng độ 2-5mg/l môi trường). Để tạo cây hoàn chỉnh cần cho vào môi trường nuôi cấy nhóm chất auxin. Thông thường để cho mô sinh trưởng tốt cần cho vào môi trường cả auxin và cytokinin với nồng độ và tỷ lệ thích hợp.

+ Mẫu nuôi cấy

- Chọn nguyên liệu ban đầu gần trạng thái phôi sinh là tốt (mô phân sinh) và nhất là mô phân sinh đỉnh. Vì mô phân sinh non trẻ nuôi cấy dễ tái sinh, đảm bảo tính di truyền và không bị nhiễm virus hoặc tương tự virus.

- Kích thước mô nuôi cấy nhỏ đến mức tối thiểu cho phép (vì có thể nuôi cấy tế bào độc lập). Nếu mô có kích thước lớn thì rất dễ nhiễm khuẩn, nấm.

- Thời gian nuôi dưỡng: Thời gian nuôi dưỡng mẫu cấy có thể từ vài ngày đến vài tuần tùy theo loại cụ thể. Có mẫu cấy chỉ cần thời gian từ 5- 7 ngày như hoa cúc, 2 - 3 tuần như hoa lan, hoa chuông...

* Các yếu tố về môi trường trong phòng nuôi dưỡng

+ Chế độ ánh sáng

Trong nuôi cấy mô đa số sử dụng ánh sáng nhân tạo, ánh đèn huỳnh quang là phù hợp. Trong trường hợp muốn mô nuôi cấy hình thành callus cần đưa mô nuôi cấy khởi đầu vào trong bóng tối.

Về chu kỳ chiếu sáng 10 - 12 giờ/ngày. Tuy nhiên, mỗi loài cây yêu cầu chu kỳ chiếu sáng khác nhau do đó cần điều chỉnh cho phù hợp.

+ Nhiệt độ

Tùy theo đặc điểm sinh lý sinh thái của loài cây và mục đích của giai đoạn nuôi cấy mà điều chỉnh nhiệt độ cho phù hợp. Ví dụ giai đoạn nhân chồi nhiệt độ thích hợp 25 - 28oC và giai đoạn thúc rễ nhiệt độ thích hợp 25 - 30oC.

2.2. Quy trình nuôi cấy khởi đầu

Chuẩn bị mẫu cây và môi trường dinh dưỡng

↓
Khử trùng mẫu nuôi cấy

↓
Cấy mẫu vào môi trường nuôi cấy khởi đầu

2.3. Trình tự các bước

2.3.1. Chuẩn bị

+ Dụng cụ, vật tư

- Dao, kéo, panh vô trùng (đã được khử trùng trong nồi áp suất hoặc trong tủ sấy), tủ cấy vô trùng.

- Bình hình trụ có thể tích 250 ml vô trùng 3 bình, ống đong 100ml, đèn cồn, đĩa petri

- Bông thấm nước

- Áo blouse, khẩu trang, găng tay su

+ Hoá chất

- Cồn 96⁰: 1lit

- Cồn 75⁰: 1 lit

- Hoá chất khử trùng: 1 lit HgCl₂ 1%

- Nước vô trùng khoảng 5 lit.

- Môi trường nuôi cấy

+ Mẫu cây

- Mẫu hoa cúc, phong lan,...

+ Địa điểm

- Tại phòng rửa và phòng cấy vô trùng.

2.3.2. Các bước tiến hành

- Chuẩn bị điều kiện cấy mô

* Bước 1. Rót cồn 960 vào đèn cồn.

* Bước 2. Rót cồn 960 vào bình tam giác để cắm dụng cụ cho cấy mô như panh, dao mổ...

* Bước 3. Bật công tắc quạt của tủ cấy với tốc độ gió vừa phải làm cho ngọn lửa đèn cồn tạt nghiêng một góc 30^o là vừa và tiến hành vệ sinh tủ cấy như lau sạch mặt tủ cấy bằng cồn.

* Bước 4. Đưa các dụng cụ cần sử dụng khử trùng vào trong tủ.

* Bước 5. Cắm panh, dao mổ, kéo vào bình đựng cồn 960.

* Bước 6. Bật đèn cực tím để khử trùng phòng cấy trong 20 - 30 phút

- Lấy vật liệu nuôi cấy và xử lý sơ bộ

* Bước 1. Dùng dao sắc cắt lấy chồi thân hoặc chồi ngọn và cắt bỏ toàn bộ phần lá. Cắt mẫu thành từng đoạn dài 10 - 12 cm.

* Bước 2. Xử lý sơ bộ mẫu nuôi cấy

- Loại bỏ những phần không cần thiết, loại bỏ lá.

- Rửa dưới vòi nước nước máy chảy.

- Rửa sạch bụi đất bám trên đoạn thân bằng xà phòng.

- Rửa lại bằng nước cất vô trùng nhiều lần và để mẫu trong bình đã qua khử trùng.

- Khử trùng mẫu vật: Tiến hành trong tủ cấy vô trùng

* Bước 1. Vệ sinh chân tay bằng nước sạch (ở phòng chuẩn bị)

* Bước 2. Sát trùng tay bằng cồn và mặc áo choàng mang khẩu trang vô trùng (trong phòng vô trùng), đốt đèn cồn.

* Bước 3. Cho mẫu vào bình khử trùng, rửa lại mẫu bằng nước cất vô trùng.

* Bước 4. Khử trùng mẫu bằng cồn 75⁰ trong thời gian 30 giây đến 1 phút (tùy theo thể tích, tính toán pha cồn từ 96⁰ thành 75⁰ cho phù hợp), thường xuyên lắc nhẹ. Rửa lại bằng nước cất vô trùng

* Bước 5. Khử trùng mẫu cấy bằng HgCl₂ 0,1% trong thời gian 7 phút (tùy theo thể tích, tính toán pha HgCl₂ từ 1% thành 0,1% cho phù hợp), trong thời gian khử trùng lắc bình chứa mẫu liên tục.

* Bước 6: Rửa mẫu từ 4-5 lần bằng nước vô trùng để loại bỏ hoá chất khử trùng ra khỏi mô.

- Cấy mẫu khởi đầu

* Bước 1. Lấy bông thấm cồn 75^o lau xung quanh bình đựng môi trường nuôi cấy rồi đặt vào xe đẩy.

* Bước 2. Khử trùng dụng cụ cấy

+ Nhúng dao, panh, kéo vào cồn.

+ Đốt lần lượt dụng cụ đó trên ngọn lửa đèn cồn (đây là thao tác khử trùng) cho đến khi cháy đỏ và cháy hết cồn (lặp lại nhiều lần cho 1 dụng cụ).

+ Đặt các dụng cụ này vào khay nhôm hoặc đĩa petri vô trùng trong tủ cấy. Khay để dụng cụ này ở phía thuận tay cho việc lấy dụng cụ trong khi làm việc.

* Bước 3. Mở nắp bình khử trùng mẫu cấy và hơ miệng bình nhanh trên ngọn lửa đèn cồn, cầm panh gấp lấy mẫu đã vô trùng từ bình đựng đặt lên đĩa petri.

* Bước 4. Tách lấy mô cấy: tay trái cầm panh để cố định mẫu, tay phải cầm dao mổ hoặc kéo cắt tách lấy mô cấy.

Các dụng cụ chỉ sử dụng một lần và sau khi sử dụng xong phải cắm vào bình cồn sát trùng.

* Bước 5. Cấy mẫu vào bình môi trường

+ Tay trái cầm đáy bình đựng môi trường nuôi cấy mô để nghiêng một góc 45° so với đèn.

+ Tay phải mở nắp miệng bình và hơ miệng bình trên ngọn lửa. (Nếu nắp bình bằng nút bông thì dùng ngón út của tay phải cấp chặt nút bông còn nếu nắp bình bằng giấy nhôm thì để nắp sang một phía tiện tay lấy).

+ Tay phải cầm panh vô trùng gấp lấy mô thật nhẹ nhàng cẩn thận đưa mẫu cấy vào môi trường dinh dưỡng ở trong bình rồi hơ nhanh nắp đáy bình trên ngọn lửa đèn còn (thao tác nhanh đối với nút bông) rồi đáy kín lại. Chú ý để hạn chế khuẩn và nấm nhiễm vào bình cấy luôn để miệng bình nghiêng một góc 45° so với ngọn lửa đèn còn.

+ Sau khi cấy xong, thu dọn sạch sẽ và vệ sinh tủ cấy.

* Bước 6. Ghi tên mẫu cấy, ngày cấy lên miệng hoặc thân bình mẫu.

* Bước 7. Chuyển bình mẫu vào phòng nuôi.

3. Nhân nhanh chồi

3.1. Kiến thức cần thiết để thực hiện công việc

Nhân nhanh là giai đoạn kích thích mô nuôi cấy phát sinh hình thái và tăng nhanh về số lượng thông qua các con đường: hoạt hóa chồi nách, tạo chồi bất định và tạo phôi vô tính.

Mục đích: Cắt và cấy chồi vào môi trường dinh dưỡng nuôi cấy thích hợp để tạo ra số lượng chồi lớn nhất.

- Yêu cầu:
- Tỷ lệ nhiễm thấp
 - Số lượng cây chồi sống cao
 - Tiết kiệm vật tư nguyên liệu

Giai đoạn nhân nhanh là giai đoạn đánh giá tính ưu việt hay không ưu việt của phương pháp vì nhân giống vì nó liên quan đến hệ số nhân chồi.

Giai đoạn duy trì và nhân nhanh chồi hay là giai đoạn sản xuất cây giống. Đây là giai đoạn quan trọng quyết định số lượng cây giống nhân được. Cho nên giai đoạn này cần kích thích mẫu cấy phát triển phôi vô tính hay các cụm chồi để tăng nhanh số lượng chồi.

Môi trường nuôi cấy giai đoạn này thường giàu dinh dưỡng, tỷ lệ auxin/cytokininine < 1 .

Nuôi dưỡng sau cấy; nhiệt độ tối thích nuôi cấy là $25-27^{\circ}\text{C}$ và cường độ chiếu sáng $2000-4000$ lux với quang chu kỳ là tùy loại cây (9 –12 giờ).

Cần chú ý không nên kéo dài thời gian nuôi chồi quá 2- 3 tháng. Vì thời gian lâu dài môi trường nuôi dưỡng bị kém chất lượng. Ngoài ra để tăng hệ số nhân chồi có thể áp dụng phương pháp phá đỉnh sinh trưởng. Theo lý thuyết trung bình nếu cấy 5 cây/bình dinh dưỡng với hệ số nhân là 6 thì số cây thu được sau một năm là 2.000.000 cây và lượng cấy này đủ trồng cho 100ha.

Số lượng chồi càng nhiều thì khả năng nhân giống (hệ số nhân giống) càng lớn. Để có hệ số nhân chồi cao cần có nhiều yếu tố tác động đồng bộ như môi trường nuôi thích hợp (nhất thiết phải có BA), cách cắt mẫu, mô nuôi cấy và điều kiện nuôi.

Mục đích của cấy chuyền mẫu nuôi cấy sang môi trường dinh dưỡng mới là:

- Để tạo ra nhiều chồi.
- Trong môi trường nuôi cấy vẫn xảy ra thoát hơi nước làm cho môi trường cấy khô dần đi và nồng độ chất khoáng không còn phù hợp cho mô nuôi cấy nữa.
- Trong môi trường nuôi cấy có thể hình thành các chất độc sẽ ức chế sự tăng trưởng và phân chia của tế bào.
- Do sự tăng trưởng của mô nuôi cấy trong môi trường dinh dưỡng lâu ngày sẽ bị thiếu chất dinh dưỡng và không gian cần thiết cho sự sinh trưởng.

Để đảm bảo chất lượng cây giống thời gian giữa hai lần cấy chuyền là khoảng 20- 30 ngày và chỉ cấy nhân chồi 2- 8 lần không nên kéo dài lâu.

* Chăm sóc nuôi dưỡng chồi

- Thời gian nuôi cấy: 1 - 4 tuần tùy loại mẫu cây
- Yêu cầu ngoại cảnh: Thời gian chiếu sáng: 16h chiếu sáng/ngày, cường độ chiếu sáng 2000 - 4000lux. Tuy nhiên, mỗi loại cây có thể yêu cầu chế độ sáng khác nhau. Nhiệt độ 22 – 25°C. Độ ẩm 65 – 70%
- Phòng trừ nấm khuẩn: Vệ sinh phòng cấy và phòng nuôi thường xuyên. Điều chỉnh nhiệt độ phòng nuôi thích hợp, hạn chế nhiệt độ quá cao để phát sinh nấm khuẩn... Các thao tác trong buồng cấy nên thực hiện một lần dứt khoát, tránh đưa vào buồng cấy những vật dụng không cần thiết và chưa được vô trùng.

3.2. Quy trình nhân nhanh

Khử trùng buồng cấy, dụng cụ cấy



Lựa chọn chồi để nhân nhanh



Cắt, tách chồi



Cấy trong môi trường nhân nhanh

3.3. Trình tự các bước

3.3.1. Chuẩn bị

+ Dụng cụ, vật tư

- Dao, kéo, panh vô trùng (đã được khử trùng trong nồi áp suất hoặc trong tủ sấy), đèn cồn, đĩa cấy (đĩa petri, đĩa nhôm, giấy vô trùng...), tủ cấy vô trùng...
- Bông thấm nước
- Áo blouse, khẩu trang, găng tay su

+ Hoá chất

- Cồn 96⁰: 1lit
- Cồn 75⁰: 1 lit

- Môi trường nuôi cấy

+ Mẫu cấy

- Mô nuôi cấy từ vật liệu khởi đầu, có thể đoạn thân cành, tách chồi.

+ Địa điểm

- Tại phòng cấy vô trùng.

3.3.2. Các bước tiến hành

- Chuẩn bị điều kiện cấy mô

* Bước 1. Rót cồn 960 vào đèn cồn.

* Bước 2. Rót cồn 960 vào bình tam giác (hoặc ống nghiệm...) để cầm dụng cụ cho cấy mô như panh, dao mổ, kéo...

* Bước 3. Bật công tắc quạt của tủ cấy với tốc độ gió vừa phải làm cho ngọn lửa đèn cồn tạt nghiêng một góc 30° là vừa và tiến hành vệ sinh tủ cấy như lau sạch mặt tủ cấy bằng cồn.

* Bước 4. Cắm panh, dao mổ vào bình đựng cồn 960.

* Bước 5. Bật đèn cực tím để khử trùng phòng cấy trong 20 - 30 phút

- Vệ sinh cá nhân

* Bước 1. Vệ sinh chân tay bằng nước sạch (ở phòng chuẩn bị)

* Bước 2. Sát trùng tay bằng cồn và mặc áo choàng mang khẩu trang vô trùng (trong phòng vô trùng)

- Khử trùng dụng cụ, bình chồi

* Bước 1. Lấy bông thấm cồn 750 lau xung quanh bình đựng môi trường nuôi cấy hoặc bình có mẫu rồi đặt vào xe đẩy.

* Bước 2. Đốt đèn cồn, khử trùng dụng cụ dao mổ và panh:

+ Nhúng dao, panh, kéo vào cồn.

+ Đốt lần lượt dụng cụ đó trên ngọn lửa đèn cồn (đây là thao tác khử trùng) cho đến khi cháy đỏ và cháy hết cồn (lặp lại nhiều lần cho 1 dụng cụ).

+ Đặt các dụng cụ này vào khay nhôm hoặc đĩa petri vô trùng trong tủ cấy. Khay để dụng cụ này ở phía thuận tay cho việc lấy dụng cụ trong khi làm việc.

- Cấy chuyên mẫu

* Bước 1. Tách cụm chồi

+ Lau cồn xung quang bình có chồi cần nhân chuyên. Tay trái cầm đáy bình chồi cây, tay phải mở nắp bình hơ trên ngọn lửa đèn cồn (miệng bình luôn nghiêng một góc 45°), đặt nắp bình xuống vị trí thích hợp trong tủ cấy.

+ Tay phải cầm panh gấp lấy các chồi trong bình ra (với số lượng thích hợp) đặt lên đĩa cấy, sau đó đặt bình chứa cây vào vị trí an toàn trong tủ cấy (nếu còn cây).

+ Tay trái cầm panh để cố định chồi, tay phải cầm dao mổ (hoặc kéo) cắt bỏ các phần không cần thiết như cắt bỏ bớt lá, đoạn thân khô, phần gốc bị già, tách các cụm

chồi (với chồi to tách riêng rồi phá đỉnh sinh trưởng để tăng hệ số nhân), rồi gạt bỏ thạch bám vào gốc chồi. Các chồi thu nhận này để riêng sang đĩa cấy vô trùng khác.

Các dụng cụ sau khi sử dụng xong luôn phải cắm vào bình cồn (hoặc đốt lại trên ngọn lửa).

* Bước 2. Cấy cụm chồi vào bình:

+ Lau cồn sát trùng toàn bộ mặt ngoài của bình.

+ Tay trái cầm đáy bình đựng môi trường nuôi cấy mô mới. Miệng của bình nghiêng một góc 45° trên ngọn lửa đèn cồn. Để hạn chế khuẩn và nấm nhiễm vào bình và cứ vài bình cấy thì lại phải lau lại mặt tủ cấy bằng cồn sát trùng.

+ Tay phải mở nắp bình hơi trên ngọn lửa rồi đặt xuống vị trí thích hợp trong tủ cấy, tay phải cầm panh gấp lấy mẫu thật nhẹ nhàng cẩn thận đưa mẫu cắm vào môi trường dinh dưỡng ở trong bình (tùy theo thể tích bình nuôi mà cấy số lượng mẫu/bình cho phù hợp).

+ Hơ nắp bình trên ngọn lửa đèn cồn rồi đặt kín nắp lại.

+ Sau khi cấy xong, thu dọn sạch sẽ và vệ sinh tủ cấy.

* Bước 3. Ghi tên mẫu cấy, ngày cấy lên miệng hoặc thân bình mẫu

* Bước 4. Đưa các bình có mẫu cấy sang phòng nuôi có chế độ nhiệt và quang chu kỳ nhân tạo thích hợp. Nhiệt độ từ $26 - 28^{\circ}\text{C}$ và 16-18 giờ chiếu sáng trong ngày.

4. Nuôi cấy tạo rễ (tạo cây hoàn chỉnh)

4.1. Kiến thức cần thiết để thực hiện công việc

Nuôi cấy tạo cây hoàn chỉnh là để tạo rễ cho chồi, người ta chuyển từ môi trường nhân nhanh sang môi trường ra rễ có bổ sung auxin

Kết thúc giai đoạn nhân nhanh thu được các chồi và phần lớn là chồi không có rễ vì thể cần phân loại, chọn lấy những chồi đạt tiêu chuẩn có chiều cao >3 cm, khối lượng đạt $> 0,5$ g, phát triển bình thường đưa cấy sang môi trường tạo cây hoàn chỉnh (môi trường tạo rễ). Môi trường nuôi cấy tạo rễ sử dụng là MS và có bổ sung auxin. Giai đoạn này thường kéo dài từ 2 tuần đến 2 tháng (tùy theo loài cây) và kết thúc giai đoạn này cây con có 6 - 8 lá, cao 4 - 5cm, có rễ dài khoảng 1 - 3cm và nhiều lông hút thì cần chuyển các bình cây này ra nhà huấn luyện cây (môi trường bán nhân tạo) là nơi có ánh sáng tán xạ tự nhiên để cho cây trong bình được trực tiếp tiếp xúc quen dần điều kiện tự nhiên.

Một số chồi có thể phát sinh rễ ngay sau khi chuyển từ môi trường nhân nhanh giàu cytokinine sang môi trường không chứa chất điều hòa sinh trưởng.

Đối với các phôi vô tính thường chỉ cần gieo chúng trên môi trường không có chất điều hòa sinh trưởng hoặc môi trường có chứa nồng độ thấp của cytokinine để phôi phát triển thành cây hoàn chỉnh.

- Yêu cầu ngoại cảnh: Thời gian chiếu sáng: 16h chiếu sáng/ ngày, cường độ chiếu sáng 2000- 4000lux. Tuy nhiên mỗi loại cây có thể yêu cầu chế độ sáng khác nhau. Nhiệt độ $22 - 25^{\circ}\text{C}$. Độ ẩm 65 - 70%

- Phòng trừ nấm khuẩn: Vệ sinh phòng cấy và phòng nuôi thường xuyên. Điều chỉnh nhiệt độ phòng nuôi thích hợp, hạn chế nhiệt độ quá cao để phát sinh nấm

khuẩn... Các thao tác trong buồng cấy nên thực hiện một lần dứt khoát, tránh đưa vào buồng cấy những vật dụng không cần thiết và chưa được vô trùng.

4.2. Quy trình tạo cây hoàn chỉnh



4.3. Trình tự các bước

4.3.1. Chuẩn bị

+ Dụng cụ, vật tư

- Dao, kéo, panh vô trùng (đã được khử trùng trong nồi áp suất hoặc trong tủ sấy), đèn cồn, đĩa cấy (đĩa petri, đĩa nhôm, giấy vô trùng...), tủ cấy vô trùng...

- Bông thấm nước

- Áo blouse, khẩu trang, găng tay su

+ Hoá chất

- Cồn 96⁰: 1lit

- Cồn 75⁰: 1 lit

- Môi trường nuôi cấy

+ Mẫu cây

- Các chồi đủ tiêu chuẩn để tạo cây hoàn chỉnh.

+ Địa điểm

- Tại phòng cấy vô trùng.

4.3.2. Các bước tiến hành

- Chuẩn bị điều kiện cấy mô

* Bước 1. Rót cồn 960 vào đèn cồn.

* Bước 2. Rót cồn 960 vào bình tam giác (hoặc ống nghiệm...) để cắm dụng cụ cho cấy mô như panh, dao mổ, kéo...

* Bước 3. Bật công tắc quạt của tủ cấy với tốc độ gió vừa phải làm cho ngọn lửa đèn cồn tạt nghiêng một góc 30^o là vừa và tiến hành vệ sinh tủ cấy như lau sạch mặt tủ cấy bằng cồn.

* Bước 4. Cắm panh, dao mổ vào bình đựng cồn 960.

* Bước 5. Bật đèn cực tím để khử trùng phòng cấy trong 20 - 30 phút

- Vệ sinh cá nhân

* Bước 1. Vệ sinh chân tay bằng nước sạch (ở phòng chuẩn bị)

* Bước 2. Sát trùng tay bằng cồn và mặc áo choàng mang khẩu trang vô trùng (trong phòng vô trùng)

- Khử trùng dụng cụ, bình chôi

* Bước 1. Lấy bông thấm cồn 750 lau xung quanh bình đựng môi trường nuôi cấy hoặc bình có mẫu rồi đặt vào xe đẩy.

* Bước 2. Đốt đèn cồn, khử trùng dụng cụ dao mổ và panh:

+ Nhúng dao, panh, kéo vào cồn.

+ Đốt lần lượt dụng cụ đó trên ngọn lửa đèn cồn (đây là thao tác khử trùng) cho đến khi cháy đỏ và cháy hết cồn (lặp lại nhiều lần cho 1 dụng cụ).

+ Đặt các dụng này vào khay nhôm hoặc đĩa petri vô trùng trong tủ cấy. Khay để dụng cụ này ở phía thuận tay cho việc lấy dụng cụ trong khi làm việc.

- Cấy tạo cây hoàn chỉnh

Cụm chôi là một hỗn hợp gồm các chôi có kích thước khác nhau như mầm chôi, chôi và có thể có cả cây hoàn chỉnh.

* Bước 1: Tách lấy chôi đạt tiêu chuẩn như chiều cao >3 cm, khối lượng đạt khoảng >0,5g, phát triển bình thường.

* Bước 2: cấy sang môi trường tạo rễ. Các thao tác và trình tự như cấy chuyên. Còn các chôi và mầm chôi thì tiếp tục cấy vào môi trường nhân nhanh.

* Bước 3. Ghi tên mẫu cấy, ngày cấy lên miệng hoặc thân bình mẫu

* Bước 4. Đưa các bình có mẫu cấy sang phòng nuôi có chế độ nhiệt và quang chu kỳ nhân tạo thích hợp. Nhiệt độ từ 26 - 28°C và 16 - 18 giờ chiếu sáng trong ngày.

5. Huấn luyện cây con

Huấn luyện cây con là quá trình đưa các bình cấy từ phòng thí nghiệm ra môi trường bên ngoài để cây thích nghi dần với điều kiện ngoại cảnh giúp cây khỏe hơn, tăng khả năng chống chịu, là bước quan trọng trước khi đưa cây ra khỏi ống nghiệm để trồng vào giá thể ươm cây.

Cây con nhân ra trong nuôi cấy mô được sống trong môi trường nhân tạo lý tưởng về nhiệt độ ánh sáng và môi trường dinh dưỡng nên rất non và vô trùng. Để có tỷ lệ ra ngôi sống cao trước khi ra ngôi cần phải đưa cây vào nhà huấn luyện (còn gọi là môi trường bán nhân tạo) trong thời gian khoảng một tuần để cây con thích nghi dần với điều kiện tự nhiên như tiếp xúc với ánh sáng (có cường độ 5000- 10000 lux) và nhiệt độ tự của nhiên.

Mục đích của giai đoạn huấn luyện cây con: Đưa cây hoàn chỉnh *in vitro* thích nghi với điều kiện ngoại cảnh để khi ra vườn ươm tỷ lệ cây sống cao và cây sinh trưởng phát triển tốt.

Yêu cầu của giai đoạn huấn luyện cây con: Cây sống trong ống nghiệm đã đạt tiêu chuẩn hình thái nhất định (số lá, số rễ, chiều cao cây).

Nơi huấn luyện cây con là nơi thoáng mát, có đầy đủ các điều kiện về ánh sáng, nhiệt độ, độ ẩm...

Cây sau giai đoạn huấn luyện đã dần thích nghi với điều kiện ngoại cảnh để có sức sinh trưởng tốt ở ngoài vườn ươm.

* Để huấn luyện được cây mầm cần chuẩn bị các điều kiện sau

- Chọn địa điểm huấn luyện cây mầm, tiêu chuẩn cây mầm đem huấn luyện

+ Chọn địa điểm huấn luyện: Nơi huấn luyện cây con là nơi thoáng mát, có đầy đủ điều kiện về ánh sáng, nhiệt độ, độ ẩm... thường là những nơi hành lang của phòng thí nghiệm... Tùy từng loại cây mà chọn địa điểm khác nhau.

Ví dụ: Cây hoa cúc chọn những nơi có cường độ chiếu sáng cao hơn so với cây hoa lan. Cây đồng tiền chọn những nơi có cường độ chiếu sáng thấp.

+ Tiêu chuẩn cây con đem huấn luyện: Đạt tiêu chuẩn hình thái nhất định (số lá, số rễ, chiều cao cây)

Ví dụ: Cúc, cắm chướng trung bình từ 3 – 5 lá, 8-10 rễ, cao 4-6cm

Cây hoa lily trung bình có 5-7 lá, rễ 5-7, cao 6-8cm

Chú ý:

- Khi gặp điều kiện thời tiết không thuận lợi như mưa to gió lớn... không đưa cây ra huấn luyện.

- Thời tiết quá nắng nên chọn những nơi có cường độ chiếu sáng ít hơn để huấn luyện cây.

- Đưa cây mầm ra huấn luyện

Đặt các bình nuôi cây vào những nơi đã chọn làm nơi huấn luyện. Có thể đặt cách nhau để các cây chịu ảnh hưởng của điều kiện ngoại cảnh là như nhau tạo độ đồng đều cho cây vào giá thể.

B. Bài tập

Bài tập 1: Thực hành xác định mẫu nuôi cấy khởi đầu đạt tiêu chuẩn cho một số loại cây giống?

Bài tập 2: Thực hành chọn, cắt mẫu, khử trùng mẫu, cấy mẫu, chăm sóc và cấy chuyển mẫu đúng yêu cầu kỹ thuật?

Bài tập 3: Thực hành khử trùng buồng cấy, dụng cụ cấy?

Bài tập 4: Thực hành nhân nhanh cây giống?

Bài tập 5: Thực hành tạo cây hoàn chỉnh cho cây giống?

C. Ghi nhớ: Cần chú ý một số nội dung trọng tâm

- Kỹ thuật khử trùng buồng cấy, bộ dụng cụ cấy

- Các bước nhân nhanh cây giống

- Tiêu chuẩn mẫu nuôi cấy khởi đầu của một số loại cây giống

- Kỹ thuật nuôi cấy khởi đầu

- Các bước tạo cây hoàn chỉnh cho cây giống

BÀI 5. CÂY CÂY VÀ CHĂM SÓC CÂY GIỐNG Ở VƯỜN ƯƠM

Mã bài: VNG-05

Mục tiêu

Sau khi học xong bài này học viên có khả năng

- Trình bày được nguyên nhân và cách khắc phục những điều kiện bất lợi khi chuyển cây con ra vườn ươm;
- Trình bày được các tiêu chuẩn, yêu cầu cần đạt được khi chăm sóc cây con *in vitro* ngoài vườn ươm;
- Xác định và phối trộn được cơ chất thích hợp để ra ngôi cây con *in vitro*;
- Thực hiện được các thao tác cấy cây con vào bầu giá thể;
- Chăm sóc cây con đúng quy trình kỹ thuật.

A. Nội dung

1. Chuẩn bị vườn ươm

1.1. Chuẩn bị các thiết bị, dụng cụ phục vụ vườn ươm

1.1.1. Kiểm tra, vận hành thử hệ thống tưới nước

- Nguồn nước tưới: đủ hay thiếu, nếu thiếu thì sử dụng nguồn nước dự trữ ở đâu
- Máy bơm: kiểm tra xem máy bơm hoạt động thế nào, có đáp ứng được yêu cầu không
- Hệ thống đường ống: kiểm tra xem hệ thống đường ống dẫn nước có bị hỏng hóc không, nếu hỏng thì biện pháp khắc phục thế nào để có nước tưới
- Khóa nước: kiểm tra các khóa nước trong hệ thống đường ống dẫn nước có bị hỏng hóc không, nếu hỏng thì biện pháp khắc phục thế nào để có nước tưới
- Vòi phun: kiểm tra các vòi phun có bị hỏng hóc không, nếu hỏng thì biện pháp khắc phục thế nào.
- Vận hành thử hệ thống tưới nước theo các bước sau:
 - + Đóng cầu dao hoặc công tắc cho máy bơm chạy
 - + Kiểm tra hệ thống đường ống dẫn nước tưới
 - + Đóng, mở khóa chia nước đi các nhánh
 - + Mở vòi phun và điều chỉnh kích thước hạt nước tưới theo yêu cầu

1.1.2. Kiểm tra, vận hành thử giàn che

- Kiểm tra: lưới che sáng, hệ thống pully để dòn và trải lưới che
- Vận hành thử hệ thống điều chỉnh lưới che bằng cơ học:
 - + Trải lưới che
 - + Dòn lưới che



Hình 5.1. Hệ thống luống, giàn che, vòi phun trong nhà lưới.

1.1.3. Kiểm tra, vận hành thử máy phun thuốc, bón phân

- Với máy phun thuốc trừ sâu có động cơ
- + Kiểm tra nhiên liệu: xăng, dầu nhớt trong máy
- + Kiểm tra hệ thống điện (bugi đánh lửa tốt hay xấu)
- + Kiểm tra hệ thống bình đựng thuốc, khóa, vòi phun.
- + Khởi động và vận hành thử động cơ và phun thử bằng nước xem hạt nước phun có to hay không, tiến hành điều chỉnh bet phun để kích thước hạt phun đạt yêu cầu.

- Với máy phun thuốc trừ sâu thủ công
- + Kiểm tra hệ thống tạo áp lực của bình bơm gồm: Cần tạo áp; bình tạo áp lực; piston bơm ...

- + Kiểm tra hệ thống bình đựng thuốc, khóa, vòi phun thuốc to hay không, tiến hành điều chỉnh bet phun để kích thước hạt phun đạt yêu cầu.

- + Vận hành thử bình bơm và phun thử bằng nước xem hạt nước phun có to hay không, tiến hành điều chỉnh pet phun để kích thước hạt phun đạt yêu cầu.

1.1.4. Chuẩn bị các dụng cụ khác (cuốc, xẻng, xe kéo, ...)

- Kiểm tra các dụng cụ cần thiết: cuốc, xẻng, dầm xới đất, xe kéo... đảm bảo về số lượng và khả năng sử dụng của các dụng cụ.

- Kiểm tra các dụng cụ cần thiết khác nếu thấy cần thiết

1.2. Chuẩn bị hỗn hợp bầu dinh dưỡng cho cây

1.2.1. Chuẩn bị đất, phân bón tạo hỗn hợp ruột bầu

Với đất sử dụng tại chỗ để làm bầu dinh dưỡng cần ưu tiên nơi đất tốt để đóng bầu, nên chia vườn thành các khu gieo ươm, luống canh theo hình vuông hoặc hình chữ nhật để tạo luống cân đối, thuận tiện cho sản xuất và công việc vận chuyển phân bón, tưới nước, chăm sóc cây con, bảo vệ vườn...

Đối với đất chuyển từ nơi khác đến nên để ở nơi khô ráo, có mái che.

Đất dùng để đóng bầu phải có độ phì và thành phần cơ giới phù hợp với loài cây vì nhân giống. Trong sản xuất, thường khai thác tầng mặt của đất rừng hoặc dưới tán rừng, tầng B, loại bỏ hết rễ cây, sỏi đá, chuyển về tập trung nơi cao ráo có mái che.

- Vỏ bầu: Bằng P.E kích thước tùy theo tuổi cây ở vườn ươm có thể 7 x 11cm hoặc lớn hơn tùy thuộc vào loài cây và thời gian cây sống trong vườn ươm dài hay ngắn.

- Trộn hỗn hợp ruột bầu: Đất tầng B trộn lẫn với phân hữu cơ tươi nhỏ, tùy theo tính chất của đất, yêu cầu dinh dưỡng của loài cây mà xác định tỷ lệ hỗn hợp đất phân làm ruột bầu, có thể trộn thành phần của ruột bầu theo các tỷ lệ sau:

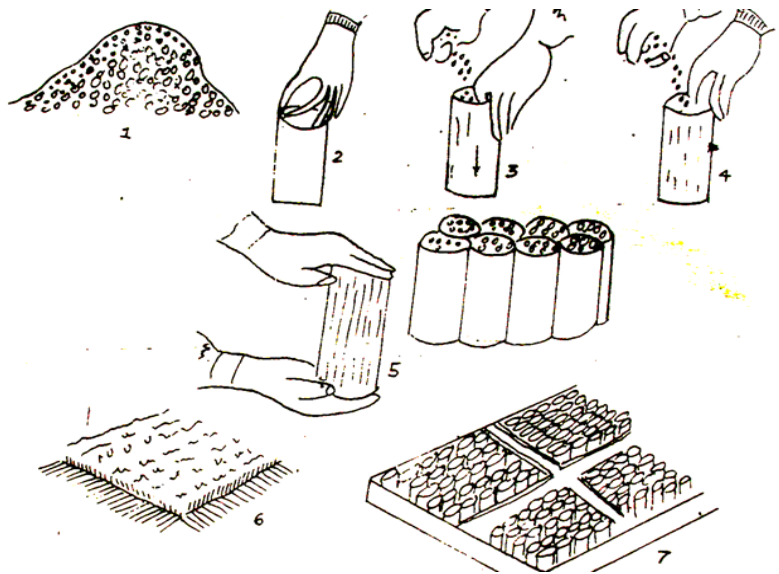
+ Đất tầng B 99% + Supe lân 1%.

+ Đất tầng B 89% + phân chuồng hoai 10% + Supe lân 1%.

+ Đất tầng B 79% + phân chuồng hoai môm 20% + lân supe 1% (hoặc lân vi sinh)

1.2.2. Đóng bầu và xếp luống

- Đóng và xếp bầu: Thường đóng và xếp bầu ngay trong nền đất bầu, có thể là luống cứng hoặc nền đất.



Hình 5.2 Trình tự thao tác đóng xếp bầu

- | | |
|------------------------------------|----------------------------------|
| 1. Trộn hỗn hợp ruột bầu | 2. Mở miệng vỏ bầu |
| 3. Đưa đất chèn lần 1 | 4. Đưa đất chèn lần 2 |
| 5. Bỏ xung đất hoàn chỉnh, xếp bầu | 6. Vun đất áp mở luống ở nền mềm |
| 7. Nẹp giữ bầu ở nền cứng | |

- Đóng bầu: đất được đóng vào bầu theo 3 bước:

+ Bước 1: mở miệng bầu, cho đất vào 1/2 bầu

+ Bước 2: dồn đất để căng hết đáy bầu

+ Bước 3: thêm đất đầy đến mặt bầu và nén đất sao cho đất trong bầu vừa đầy và căng túi, đất trong bầu không quá chặt, không quá lỏng.

- Xếp bầu thành luống có kích thước: rộng 1m x dài 10m theo các ô cứng định sẵn trong vườn. Nếu không có luống cứng thì tiến hành san nền để xếp bầu, nền phải phẳng, sạch cỏ dùng dây căng định hướng và kích thước luống để đặt bầu, dùng que nẹp quanh luống bầu để bầu không nghiêng ngã.

2. Cây con ở vườn ươm

2.1. Chuẩn bị vật liệu, dụng cụ

- Panh để lấy cây
- Bình cây con đủ tiêu chuẩn để ra ngôi
- Thuốc tím để khử trùng bầu dinh dưỡng
- Bầu dinh dưỡng đã xếp thành luống trong nhà lưới
- Que cấy cây mô
- Rổ đựng cây mô
- Chậu để rửa thạch

2.2. Khử trùng bầu dinh dưỡng

Trước khi cấy cây 12 giờ, bầu đất phải được xử lý bằng dung dịch thuốc tím 0,1% (hoà thuốc tím vào nước và dùng ô doa tưới đều lên bề mặt bầu cho thấm sâu 1,5 - 2 cm. Vào mùa nguy cơ nấm bệnh cao thì dùng thuốc tím có nồng độ cao hơn (0,2 - 0,3%).

2.3. Lấy cây ra khỏi bình

- Tiêu chuẩn cây con đem cấy vào bầu: Khi thân chuyển sang màu của tự nhiên, lá xòe ra đầy đủ, có 3-4 rễ thì có thể tiến hành cấy chuyển vào bầu đất.

- *Chú ý:* Không nên kéo dài thời gian huấn luyện vì để lâu rễ sẽ bị đen, lá úa vàng. Khi đó cấy vào bầu đất tỷ lệ sống sẽ không cao.



Hình 5.3. Cây con được lấy từ trong bình ra

Ví dụ: tiêu chuẩn cây bạch đàn con đem cấy: thân đỏ tím hoặc tím, rễ dài khoảng 2cm và không bị đen đầu, lá xòe đều, có khả năng quang hợp thì đảm bảo tỷ lệ sống cao khi cấy ra bầu.

- Thời vụ cấy: tùy từng loại cây, thời vụ cấy với nhiều loại cây là từ tháng 4 đến tháng 10. Mật độ ươm 400 cây/m².

- Yêu cầu: Lấy ra khỏi bình không được làm dập và nhẹ nhàng rửa sạch thạch bám rễ rồi cấy vào giá thể.

- Thao tác: phải nhẹ nhàng, cẩn thận tránh làm tổn thương cho cây.

+ Lấy cây con từ trong lọ ra bằng cách đổ cây trong bình ra lòng bàn tay

+ Nhặt từng cây một cho ra khỏi nền nuôi cấy

- + Rửa sạch thạch bằng nước sạch
- + Hồ rễ bằng đất đã được khử trùng



Hình 5.4. Rửa thạch bám gốc cây mô con



Hình 5.5. Cây mô con đã được rửa sạch thạch bám gốc

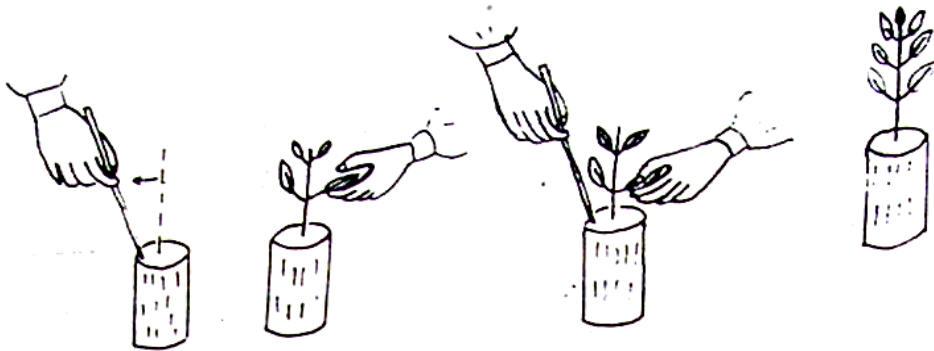
2.4. Thao tác cấy cây mô vào bầu

- Tạo dung dịch hồ rễ: Trộn đất tầng B với dung dịch thuốc tím $KMnO_4$ 0,1%, tỷ lệ đất : nước là 1:1 trước khi hồ rễ ít nhất 12 giờ.

- Trước khi hồ rễ tiến hành rửa dung dịch hồ rễ để loại bỏ thuốc tím bằng nước sạch từ 3- 4 lần và tạo cho đất ở dạng hồ loãng để hồ rễ cây.

- Cấy cây:

+ Yêu cầu: cây sao cho rễ cây thẳng và xòe ra tự nhiên, không bị cuộn lại với nhau hoặc bị gập lên trong mặt bầu.



Hình 5.6. Cấy cây mô vào bầu

+ Thao tác cấy cây vào bầu theo các bước sau:

- * Bước 1: Mở lỗ cây bằng que cây
- * Bước 2: Đặt cây cây
- * Bước 3: Lấp đất bằng que cây để cố định cây

- Tưới cho cây mô sau khi cấy: Thời gian quan trọng nhất là tuần đầu tiên sau cấy, cần phải theo dõi độ ẩm, ánh sáng và nhiệt độ. Nhiệt độ thích hợp từ 25 - 30°C, độ ẩm từ 85 - 90%, cần chú ý điều chỉnh ánh sáng cho cây quang hợp, những ngày trời

năng chú ý phải che râm để giảm bớt ánh sáng trực xạ, tốt nhất là che râm từ 7 - 10 ngày sau khi cấy, độ tàn che 50 - 60%.

3. Chăm sóc cây mô ở vườn ươm

3.1. Đặc điểm sinh trưởng và phát triển của cây mô ở giai đoạn vườn ươm

Cây vi nhân giống được sản xuất dưới điều kiện lý tưởng (nhân tạo) về nhiệt độ, ánh sáng và môi trường dinh dưỡng. Để cấy cây ra bầu đất với tỷ lệ sống cao cần phải huấn luyện cây cho cứng cáp trước khi cho ra khỏi ống nghiệm.

Cây được huấn luyện bằng cách đặt ống nghiệm (bình cây) trong điều kiện ánh sáng và nhiệt độ tự nhiên với cường độ ánh sáng từ 5.000-10.000 lux, nếu lớn hơn 10.000 lux cần phải che bớt lượng ánh sáng. Thời gian huấn luyện khoảng 6 - 8 ngày để cây con quen dần với điều kiện tự nhiên.

Cây được cấy vào bầu đất khi thân cây chuyển sang màu của tự nhiên, có rễ và lá xòe ra đầy đủ. Sau cấy, cây mô yêu cầu nhiệt độ khoảng 25 – 30°C ẩm độ 80 – 90% cần chú ý điều chỉnh ánh sáng. Những ngày có nắng to cần phải che râm, không để ánh sáng trực xạ trực tiếp chiếu vào cây trong thời gian 7 – 10 ngày với độ tàn che 50 - 60%.

Thời gian cây mô sống ở vườn ươm từ 2- 2,5 tháng, sau khi cấy vào bầu đất cây rất non, tỷ lệ C/N rất thấp do vậy cần tạo điều kiện tối ưu trong chăm sóc để cây quen dần với điều kiện sống bên ngoài môi trường. Việc điều chỉnh ánh sáng và lượng nước tưới trong quá trình chăm sóc là biện pháp cơ bản để huấn luyện cây cứng cáp có tỷ lệ C/N cao dần. Công việc đảo bầu, xén rễ, kết hợp với phân loại cây con để có chế độ chăm sóc nuôi dưỡng thích hợp là biện pháp kỹ thuật không thể thiếu được trong việc huấn luyện để cây con có đủ tiêu chuẩn khi xuất vườn đáp ứng nhu cầu trồng rừng của thực tiễn sản xuất.

3.2. Các biện pháp kỹ thuật chăm sóc cây mô ở vườn ươm

3.2.1. Điều chỉnh ánh sáng cho cây mô ở vườn ươm

Che phủ với tỷ lệ dày mỏng khác nhau để giảm cường độ ánh sáng từ 50 - 60% khi cây con còn non yếu hoặc sau khi cấy với thời gian 1 - 2 tuần, khi cây con bén rễ thì tháo dần dần che để tăng dần ánh sáng.

Trong thời kỳ đầu mới cấy, nếu có mưa to, gió lớn cần phải che đậy kịp thời cho cây con không để bùn đất do nước mưa bắn lên bám vào lá cản trở sự hô hấp và quang hợp, cây con bị siêu vẹo dập nát.

3.2.2. Tưới nước cho cây mô ở vườn ươm

Lượng nước tưới khi cây còn nhỏ, mỗi ngày tưới 2 lần (vào sáng sớm và chiều mát), mỗi lần chỉ tưới đủ một lượng nước đủ ướt mặt luống 2 lít/m². Khi cây đã lớn, nhu cầu nước nhiều hơn thì tăng lượng nước tưới đến 3 lít/m² và giảm số lần tưới nước còn 1 lần/ ngày, những ngày nắng, có gió cần tăng thêm lượng nước tưới cho cây. Có thể tưới thấm theo rãnh hoặc tưới phun mưa bằng nước sạch vào sáng sớm và chiều mát, không tưới khi trời đang nắng gắt.

3.2.3. Làm cỏ, phá váng

Thường xuyên kiểm tra và nhổ sạch cỏ dại mọc trong bầu cây, khi cây còn nhỏ cần phải tiến hành thường xuyên (1 tuần 1 lần); khi cây đã lớn, tùy điều kiện mà quyết định thời gian làm cỏ.

Xới đất, phá váng: dùng que nhọn xới đất trong mặt bầu, nhằm đảm bảo cho đất luôn tơi xốp, thông thoáng, tăng khả năng thấm nước, giảm sự bốc hơi bề mặt (sau mỗi trận mưa hoặc sau một số lần tưới nước cần kiểm tra và tiến hành xới váng).

3.2.4. Bón phân cho cây mô ở vườn ươm

Tùy điều kiện, người ta có thể dùng các loại phân khác nhau để bón thúc cho cây như phân chuồng hoai, phân đạm, phân lân, phân kali hoặc phân tổng hợp NPK, thời gian bón và phương pháp bón như sau:

- Bón thúc cho cây mô bằng cách tưới phân NPK (5:10:3) nồng độ 0,3%, khoảng cách giữa các lần tưới từ 5 - 7 ngày tưới 1 lần, lượng tưới 3 - 4 g/lít nước.
- Sau khi tưới phân phải dùng nước sạch để rửa không để phân bám vào lá làm cháy lá.
- Trong lần bón cuối cùng chỉ nên sử dụng phân lân và kali để làm cho cây cứng cáp.
- Trước khi xuất vườn từ 2- 4 tuần thì ngừng hẳn việc bón phân để hãm cây.
- Trong trường hợp phải lưu giữ cây ở vườn ươm lâu hơn thì rất hạn chế tưới phân và nước để hãm cây.

3.2.5. Phòng trừ sâu, bệnh hại cây mô

Thường xuyên tiến hành điều tra sâu bệnh hại cây mô trong vườn ươm bằng phương pháp 5 điểm đường chéo, mỗi điểm 1m² (ô dạng bản).

Bệnh hại cây mô trong vườn ươm chủ yếu là bệnh lở cổ rễ do nấm (*Fusarium* hoặc *Collectotricicum*) hoặc vi khuẩn (*Pseudomonas*); bệnh phấn trắng trong cây keo do nấm (*Oidium*) gây nên ..., tùy thuộc vào thời vụ ươm cây mô. Khi phát hiện bệnh hại cây mô trong vườn có thể phun phòng nấm, vi khuẩn gây bệnh bằng dung dịch bellate nồng độ 5g/10lít nước phun cho 100m² thời gian 1 tuần một lần, nếu phát hiện nấm bệnh cần phun nồng độ cao hơn và thời gian ngắn hơn, có thể 3- 5 ngày một lần tùy theo tình trạng bệnh.

3.2.6. Đảo bầu, xén rễ

Là biện pháp gây chấn thương hạn chế sinh trưởng thân lá, được tiến hành trước khi đem đi trồng từ 15 - 20 ngày, bằng cách cắt đứt những rễ ăn ra khỏi bầu, rễ ăn quá sâu, để chúng tái sinh rễ mới, khi đem trồng sẽ đạt tỷ lệ sống cao.

Tiến hành nhổ bầu lên khỏi luống sau đó xếp bầu lại trong luống, nếu rễ cây thò dài ra ngoài bầu thì dùng kéo sắc cắt rễ sát bên ngoài vỏ bầu và tiến hành xếp lại bầu như ban đầu. Chú ý: khi xếp lại bầu thì xếp các cây có chiều cao tương tự như nhau vào cùng một khu vực để thuận tiện cho việc chăm sóc sau đảo bầu và lấy cây khi xuất vườn. Sau đảo bầu tiến hành che sáng và tưới nước thường xuyên đủ lượng để cây con sau đảo không bị chết.

3.3. Tiêu chuẩn cây mô xuất vườn

Phân loại cây con: Sau khi cấy cây con vào bầu được 45 - 50 ngày tuổi cần tiến hành phân loại cây con để có chế độ chăm sóc phù hợp tạo ra các luống cây đồng đều đảm bảo đủ tiêu chuẩn xuất vườn.

Tiêu chuẩn xuất vườn: Các loại cây khác nhau hoặc cùng loại cây nhưng đem trồng với các mục đích khác nhau có tiêu chuẩn xuất vườn cũng khác nhau.

Ví dụ: bạch đàn để trồng rừng có thể áp dụng tiêu chuẩn sau:

- Tuổi xuất vườn từ 2 - 2,5 tháng
- Cây sinh trưởng khỏe, không cong queo, không bị sâu bệnh.
- Được đảo bầu, xén rễ và hạn chế sinh trưởng trước khi xuất vườn 2 tuần.



Hình 5.7. Chăm sóc cây mô trong vườn ươm.

B. Bài tập

Bài tập 1: Đọc tên đúng các loại thiết bị, dụng cụ dùng trong vườn ươm? Cho biết mục đích của các thiết bị, dụng cụ trên?

Bài tập 2: Thực hành chuẩn bị bầu dinh dưỡng cho cây?

Bài tập 3: Thực hành chuẩn bị cây con để cấy vào bầu?

Bài tập 4: Thực hành cấy cây mô ở vườn ươm?

Bài tập 5: Thực hành làm cỏ, phá váng và tưới nước cho cây mô ở vườn ươm?

Bài tập 6: Thực hành bón phân cho cây mô tại vườn ươm?

C. Ghi nhớ: Cần chú ý một số nội dung trọng tâm:

- Thiết bị, dụng cụ dùng trong vườn ươm cây
- Kỹ thuật chuẩn bị bầu dinh dưỡng cho cây.
- Chuẩn bị thiết bị, dụng cụ dùng trong quá trình cấy cây ở vườn ươm
- Kỹ thuật cấy cây mô ở vườn ươm
- Yêu cầu về các yếu tố ngoại cảnh của cây mô ở vườn ươm
- Kỹ thuật chăm sóc cây mô ở vườn ươm

HƯỚNG DẪN GIẢNG DẠY MÔ ĐUN

I. Vị trí, tính chất của mô đun

- *Vị trí:* Vi nhân giống cây trồng là mô đun chuyên môn trong chương trình đào tạo trình độ trung cấp nghề Sinh học ứng dụng, được giảng dạy độc lập và có thể giảng dạy song song với các mô đun chuyên môn khác trong chương trình.

- *Tính chất:* Vi nhân giống cây trồng là mô đun tích hợp lý thuyết và thực hành, trang bị cho người học những kiến thức cơ bản về phương pháp nuôi cấy mô thực vật, các bước thực hiện để nhân giống thành công một loại cây trồng, mô đun này cần tổ chức giảng dạy tại phòng học có đầy đủ trang thiết bị cần thiết cho việc dạy, học lý thuyết và thực hành.

II. Mục tiêu của mô đun

1. Kiến thức

- Trình bày được khái niệm, cơ sở khoa học và những hạn chế của kỹ thuật vi nhân giống cây trồng;

- Liệt kê được các thiết bị, dụng cụ, hóa chất cần thiết sử dụng trong vi nhân giống;

- Nêu được các nguyên tắc cơ bản trong pha chế, sử dụng và bảo quản môi trường dinh dưỡng;

- Trình bày được các bước trong quy trình vi nhân giống.

2. Kỹ năng

- Xác định, lựa chọn được môi trường dinh dưỡng và điều kiện thích hợp để vi nhân giống một số đối tượng thực vật;

- Lựa chọn và sử dụng được các dụng cụ và thiết bị sử dụng trong vi nhân giống;

- Pha chế và bảo quản được dung dịch mẹ và các loại dung dịch nuôi cấy khác nhau;

- Thực hiện được các công đoạn trong quy trình vi nhân giống: Lựa chọn cây lấy mẫu, lấy mẫu và khử trùng mẫu nuôi cấy, nuôi cấy khởi đầu, nhân nhanh, tạo cây hoàn chỉnh, cấy và chăm sóc cây ngoài vườn ươm.

3. Năng lực tự chủ và trách nhiệm

- Có tinh thần trách nhiệm trong sử dụng, bảo quản các thiết bị, dụng cụ và hóa chất thí nghiệm;

- Có ý thức tuân thủ nội quy phòng thí nghiệm;

- Tiết kiệm nguyên vật liệu, đảm bảo an toàn lao động và vệ sinh môi trường;

- Có ý thức tự học, tự nghiên cứu, tinh thần hợp tác trong làm việc nhóm.

III. Nội dung chính của mô đun

Mã bài	Tên bài	Loại bài dạy	Địa điểm	Thời lượng			
				Tổng số	Lý thuyết	Thực hành	Kiểm tra
VNG-01	Bài 1. Giới thiệu vi nhân giống	Lý thuyết	Lớp học	4	4		
VNG-02	Bài 2. Chuẩn bị thiết bị, dụng cụ và nguyên liệu	Tích hợp	Phòng thực hành	8	4	4	
VNG-03	Bài 3. Chuẩn bị hóa chất và pha chế môi trường dinh dưỡng	Tích hợp	Phòng thực hành	20	4	16	
VNG-04	Bài 4. Thực hiện các giai đoạn trong quy trình nhân giống	Tích hợp	Phòng thực hành	44	10	34	
VNG-05	Bài 5. Cây cây và chăm sóc cây giống ở vườn ươm	Tích hợp	Vườn ươm	8	2	6	
	<i>Hướng dẫn ôn tập</i>			4	4		
	<i>Kiểm tra hết mô đun</i>			4			4
	Cộng			92	28	60	4

IV. Hướng dẫn thực hiện bài tập thực hành**Bài 2. Chuẩn bị thiết bị, dụng cụ và nguyên liệu**

- *Nguồn lực cần thiết:*

- + Các loại dụng cụ, thiết bị, nguyên vật liệu dùng trong vi nhân giống
- + Vườn cây mẹ để lấy mẫu vi nhân giống
- + Cây giống gốc đủ tiêu chuẩn lấy mẫu
- + Các loại hóa chất dùng trong vi nhân giống
- + Bảo hộ lao động.

- *Cách chức tổ chức thực hiện:*

- + Chia lớp thành các nhóm nhỏ: tùy theo yêu cầu của bài tập.

- *Tiêu chuẩn sản phẩm:*

- + Xác định đúng tên các loại thiết bị, dụng cụ, nguyên vật liệu

- + Lựa chọn được các loại hóa chất dùng trong vi nhân giống
- + Lựa chọn được cây giống đủ tiêu chuẩn
- + Sắp xếp các loại dụng cụ, thiết bị hợp lý, khoa học

Bài 3. Chuẩn bị hóa chất và pha chế môi trường dinh dưỡng

- *Nguồn lực cần thiết:*

- + Các loại hóa chất dùng trong vi nhân giống
- + Các loại chất điều tiết sinh trưởng
- + Bảng môi trường vi nhân giống
- + Dụng cụ pha chế hóa chất, môi trường
- + Bảo hộ lao động.

- *Cách chức tổ chức thực hiện:*

- + Chia lớp thành các nhóm nhỏ: tùy theo yêu cầu của bài tập.

- *Tiêu chuẩn sản phẩm:*

- + Xác định được tên các loại hóa chất dùng cho vi nhân giống hoa
- + Pha chế dung dịch mẹ đúng yêu cầu kỹ thuật
- + Pha chế môi trường nuôi cấy phù hợp với từng giai đoạn sinh trưởng, phát triển

Bài 4. Thực hiện các giai đoạn trong quy trình nhân giống

- *Nguồn lực cần thiết:*

- + Các dụng cụ để khử trùng mẫu cấy
- + Dụng cụ cấy chuyển mẫu
- + Mẫu cây đủ tiêu chuẩn
- + Các loại giá thể, vườn ươm Bình chồi đạt tiêu chuẩn Bảo hộ lao động.

- *Cách chức tổ chức thực hiện:*

- + Chia lớp thành các nhóm nhỏ: Tùy theo yêu cầu của bài tập.

- *Tiêu chuẩn sản phẩm:*

- + Khử trùng mẫu đạt tiêu chuẩn đảm bảo an toàn lao động
- + Xác định chính xác bình chồi đạt tiêu chuẩn
- + Cắt, tách và cấy chuyển mẫu đạt yêu cầu
- + Lựa chọn được giá thể phù hợp với từng loại hoa
- + Cấy cây đúng yêu cầu kỹ thuật

Bài 5. Cấy cây và chăm sóc cây giống ở vườn ươm

- *Nguồn lực cần thiết:*

- + Vườn ươm
- + Các loại dụng cụ, thiết bị dùng trong vườn ươm

- + Giá thể trồng cây vi nhân giống
- + Đất đóng bầu, bầu
- + Dụng cụ dùng để phun xịt, pha chế hóa chất. Bảo hộ lao động.
- Cách chức tổ chức thực hiện:
- + Chia lớp thành các nhóm nhỏ: Tùy theo yêu cầu của bài tập.
- Tiêu chuẩn sản phẩm:
- + Đóng bầu đạt yêu cầu kỹ thuật
- + Lựa chọn được giá thể phù hợp
- + Chăm sóc cây ở vườn ươm đạt tiêu chuẩn chất lượng

V. Yêu cầu về đánh giá kết quả học tập

Bài 1. Giới thiệu vi nhân giống

Tiêu chí đánh giá	Cách thức đánh giá
<ul style="list-style-type: none"> - Thế nào là vi nhân giống? Cơ sở khoa học của vi nhân giống? - Những hạn chế của vi nhân giống? 	Tự luận

Bài 2. Chuẩn bị thiết bị, dụng cụ và nguyên liệu

* Bài tập 1

- *Cách thức:* mỗi học viên được nhận một thiết bị có trong phòng
- *Thời gian hoàn thành:* 5 phút/1 học viên
- *Hình thức trình bày:* vấn đáp
- *Phương pháp đánh giá:* đánh giá trên cơ sở lý thuyết
- *Kết quả sản phẩm cần đạt được:* gọi tên đúng thiết bị, nêu đúng mục đích sử dụng của thiết bị đó trong quá trình tiến hành công việc vi nhân giống

* Bài tập 2

- *Cách thức:* chia các nhóm nhỏ (3 – 5 học viên/nhóm), mỗi nhóm nhận nhiệm vụ khử trùng 1 phòng
- *Thời gian hoàn thành:* 2 giờ/1 nhóm
- *Hình thức trình bày:* thực hành tại chỗ
- *Phương pháp đánh giá:* kỹ năng vận dụng lý thuyết vào thực hành của mỗi học viên trong nhóm và thái độ thực hành của học viên.
- *Kết quả cần đạt được:*
 - + Chọn chính xác loại hóa chất khử trùng,
 - + Thực hiện thứ tự các bước khử trùng đúng theo quy trình,
 - + An toàn đối với con người và môi trường làm việc
 - + Phòng sau khi khử trùng đạt yêu cầu cho sử dụng.

*** Bài tập 3**

- *Cách thức:* mỗi học viên thực hiện vận hành
- *Thời gian hoàn thành:* 3 phút/1 học viên
- *Hình thức trình bày:* thực hành tại chỗ
- *Phương pháp đánh giá:* kỹ năng vận dụng lý thuyết vào thực hành và thái độ học viên trong quá trình thực hành.
- *Kết quả cần đạt được:*
 - + Giải thích được chú thích, ký hiệu trên máy
 - + Thực hiện vận hành các bước đúng theo quy trình
 - + Nội hoạt động bình thường
 - + An toàn đối với người sử dụng và thiết bị

Bài tập 4

- *Cách thức:* chia các nhóm nhỏ (5 – 7 học viên/nhóm), mỗi nhóm nhận nhiệm vụ xác định vật liệu đạt tiêu chuẩn cho 1 loại cây giống
- *Thời gian hoàn thành:* 1 giờ/1 nhóm
- *Hình thức trình bày:* vấn đáp + thực hành tại chỗ
- *Phương pháp đánh giá:* kỹ năng vận dụng lý thuyết vào thực hành của mỗi học viên trong nhóm và thái độ thực hành của học viên
- *Kết quả sản phẩm cần đạt được:* Xác định đúng vật liệu đạt tiêu chuẩn, nêu đúng lý do lựa chọn vật liệu

*** Bài tập 5**

- *Cách thức:* chia các nhóm nhỏ (5 – 7 học viên/nhóm), mỗi nhóm lựa chọn cây giống gốc cho 1 loại cây giống
- *Thời gian hoàn thành:* 1 giờ/1 nhóm
- *Hình thức trình bày:* thực hành tại chỗ
- *Phương pháp đánh giá:* kỹ năng vận dụng lý thuyết vào thực hành của mỗi học viên trong nhóm và thái độ thực hành của học viên.
- *Kết quả cần đạt được:*
 - + Chọn chính xác cây giống gốc đạt tiêu chuẩn

*** Bài tập 6**

- *Cách thức:* chia các nhóm nhỏ (5 – 7 học viên/nhóm), mỗi nhóm nhận nhiệm vụ tổ chức, sắp xếp các thiết bị dụng cụ của 1 phòng, 1 khu vực thuộc dây chuyền vi nhân giống.
- *Thời gian hoàn thành:* 2 giờ/1 nhóm
- *Hình thức trình bày:* thực hành tại chỗ
- *Phương pháp đánh giá:* kỹ năng vận dụng lý thuyết vào thực hành của mỗi học viên trong nhóm và thái độ thực hành của học viên.

- *Kết quả sản phẩm cần đạt được:* Xác định đúng chủng loại và vị trí sắp xếp các thiết bị, dụng cụ của các phòng, các khu vực trong dây chuyền vi nhân giống.

* Bài tập 7

- *Cách thức:* chia các nhóm nhỏ (5 – 7 học viên/nhóm), mỗi nhóm thực hiện một công đoạn trong quy trình xây dựng vườn ươm cho cây giống sau vi nhân giống.

- *Thời gian hoàn thành:* 2 giờ/1 nhóm

- *Hình thức trình bày:* thực hành tại chỗ

- *Phương pháp đánh giá:* kỹ năng vận dụng lý thuyết vào thực hành của mỗi học viên trong nhóm và thái độ thực hành của học viên.

- *Kết quả cần đạt được:*

+ Xây dựng được vườn ươm đạt tiêu chuẩn

Bài 3. Chuẩn bị hóa chất và pha chế môi trường dinh dưỡng

* Bài tập 1

- *Cách thức:* mỗi học viên được yêu cầu xác định đúng nhóm cho 1 hóa chất và vai trò của nhóm hóa chất đó

- *Thời gian hoàn thành:* 5 phút/1 học viên

- *Hình thức trình bày:* vấn đáp

- *Phương pháp đánh giá:* đánh giá trên cơ sở lý thuyết

- *Kết quả sản phẩm cần đạt được:* Xác định đúng tên nhóm và vai trò của nhóm hóa chất đó trong môi trường vi nhân giống hoa.

* Bài tập 2

- *Cách thức:* chia các nhóm nhỏ (7 – 10 học viên/nhóm), mỗi nhóm nhận nhiệm vụ xác định hóa chất cho một loại môi trường

- *Thời gian hoàn thành:* 1 giờ/1 nhóm

- *Hình thức trình bày:* thực hành tại chỗ

- *Phương pháp đánh giá:* kỹ năng vận dụng lý thuyết vào thực hành của mỗi học viên trong nhóm và thái độ thực hành của học viên.

- *Kết quả cần đạt được:*

+ Chọn chính xác loại hóa chất theo danh mục,

+ Thực hiện thứ tự các bước lựa chọn theo quy trình,

+ An toàn đối với con người và môi trường làm việc

* Bài tập 3

- *Cách thức:* chia các nhóm nhỏ (5 – 7 học viên/nhóm), mỗi nhóm nhận nhiệm vụ pha chế một loại dung dịch mẹ

- *Thời gian hoàn thành:* 2 giờ/1 nhóm

- *Hình thức trình bày:* thực hành tại chỗ

- *Phương pháp đánh giá:* kỹ năng vận dụng lý thuyết vào thực hành của mỗi học viên trong nhóm và thái độ thực hành của học viên.

- *Kết quả cần đạt được:*

- + Chọn chính xác loại hóa chất để pha chế
- + Cân chính xác khối lượng hóa chất cần dùng
- + Thực hiện thứ tự các bước pha chế đúng theo quy trình,
- + An toàn đối với con người và môi trường làm việc
- + Dung dịch mẹ sau pha chế đạt yêu cầu cho sử dụng.

* Bài tập 4

- *Cách thức:* chia các nhóm nhỏ (5 – 7 học viên/nhóm), mỗi nhóm nhận nhiệm vụ pha chế một loại chất điều tiết sinh trưởng

- *Thời gian hoàn thành:* 2 giờ/1 nhóm

- *Hình thức trình bày:* thực hành tại chỗ

- *Phương pháp đánh giá:* kỹ năng vận dụng lý thuyết vào thực hành của mỗi học viên trong nhóm và thái độ thực hành của học viên.

- *Kết quả cần đạt được:*

- + Chọn chính xác loại hóa chất để pha chế
- + Cân chính xác khối lượng hóa chất cần dùng
- + Thực hiện thứ tự các bước pha chế đúng theo quy trình,
- + An toàn đối với con người và môi trường làm việc
- + Dung dịch chất điều tiết sinh trưởng sau pha chế đạt yêu cầu cho sử dụng.

* Bài tập 5

- *Cách thức:* chia các nhóm nhỏ (3 – 5 học viên/nhóm), mỗi nhóm nhận nhiệm vụ pha chế 1 lít môi trường nuôi cấy khởi đầu

- *Thời gian hoàn thành:* 2 giờ/1 nhóm

- *Hình thức trình bày:* thực hành tại chỗ

- *Phương pháp đánh giá:* kỹ năng vận dụng lý thuyết vào thực hành của mỗi học viên trong nhóm và thái độ thực hành của học viên.

- *Kết quả cần đạt được:*

- + Lấy chính xác các loại dung dịch mẹ, chất điều tiết sinh trưởng cần sử dụng để pha chế
- + Thực hiện thứ tự các bước pha chế đúng theo quy trình
- + An toàn đối với con người và môi trường làm việc
- + Môi trường sau pha chế đạt yêu cầu cho sử dụng.

* Bài tập 6

- *Cách thức*: chia các nhóm nhỏ (3 – 5 học viên/nhóm), mỗi nhóm nhận nhiệm vụ pha chế 2 lít môi trường nhân nhanh
- *Thời gian hoàn thành*: 2 giờ/1 nhóm
- *Hình thức trình bày*: thực hành tại chỗ
- *Phương pháp đánh giá*: kỹ năng vận dụng lý thuyết vào thực hành của mỗi học viên trong nhóm và thái độ thực hành của học viên.
- *Kết quả cần đạt được*:
 - + Lấy chính xác các loại dung dịch mẹ, chất điều tiết sinh trưởng cần sử dụng để pha chế,
 - + Thực hiện thứ tự các bước pha chế đúng theo quy trình,
 - + An toàn đối với con người và môi trường làm việc
 - + Môi trường sau pha chế đạt yêu cầu cho sử dụng.

* Bài tập 7

- *Cách thức*: chia các nhóm nhỏ (3 – 5 học viên/nhóm), mỗi nhóm nhận nhiệm vụ pha chế 1 lít môi trường tạo cây hoàn chỉnh
- *Thời gian hoàn thành*: 2 giờ/1 nhóm
- *Hình thức trình bày*: thực hành tại chỗ
- *Phương pháp đánh giá*: kỹ năng vận dụng lý thuyết vào thực hành của mỗi học viên trong nhóm và thái độ thực hành của học viên.
- *Kết quả cần đạt được*:
 - + Lấy chính xác các loại dung dịch mẹ, chất điều tiết sinh trưởng cần sử dụng để pha chế
 - + Thực hiện thứ tự các bước pha chế đúng theo quy trình
 - + An toàn đối với con người và môi trường làm việc
 - + Môi trường sau pha chế đạt yêu cầu cho sử dụng.

* Bài tập 8

- *Cách thức*: chia các nhóm nhỏ (3 – 5 học viên/nhóm), mỗi nhóm nhận nhiệm vụ khử trùng 1 lít môi trường.
- *Thời gian hoàn thành*: 3 giờ/1 nhóm
- *Hình thức trình bày*: thực hành tại chỗ
- *Phương pháp đánh giá*: kỹ năng vận dụng lý thuyết vào thực hành của mỗi học viên trong nhóm và thái độ thực hành của học viên.
- *Kết quả cần đạt được*:
 - + Biết vận hành máy,
 - + Thực hiện thứ tự các bước pha chế đúng theo quy trình,

- + An toàn đối với con người và môi trường làm việc
- + Môi trường sau khi khử trùng đạt yêu cầu cho sử dụng.

Bài 4. Thực hiện các giai đoạn trong quy trình nhân giống

*** Bài tập 1**

- *Cách thức:* chia các nhóm nhỏ (7 – 10 học viên/nhóm), mỗi nhóm nhận nhiệm vụ xác định mẫu nuôi cấy khởi đầu đạt tiêu chuẩn cho một loại cây giống
- *Thời gian hoàn thành:* 1 giờ/1 nhóm
- *Hình thức trình bày:* vấn đáp + Thực hành tại chỗ
- *Phương pháp đánh giá:* đánh giá trên cơ sở lý thuyết + sản phẩm thực
- *Kết quả sản phẩm cần đạt được:* Xác định được mẫu nuôi cấy khởi đầu đạt tiêu chuẩn.

*** Bài tập 2**

- *Cách thức:* chia các nhóm nhỏ (7 – 10 học viên/nhóm), mỗi nhóm nhận nhiệm vụ chọn, cắt mẫu, khử trùng mẫu, cấy mẫu, chăm sóc và cấy chuyển mẫu cho một loại cây giống.
 - *Thời gian hoàn thành:* 3 giờ/1 nhóm
 - *Hình thức trình bày:* thực hành tại chỗ
 - *Phương pháp đánh giá:* kỹ năng vận dụng lý thuyết vào thực hành của mỗi học viên trong nhóm và thái độ thực hành của học viên.
 - *Kết quả cần đạt được:*
- + Thực hiện thứ tự các bước nuôi cấy khởi đầu theo quy trình, đảm bảo tỷ lệ mẫu nhiễm thấp.
- + An toàn đối với con người và môi trường làm việc.

*** Bài tập 3**

- *Cách thức:* mỗi học viên được yêu cầu khử trùng buồng cấy, bộ dụng cụ
 - *Thời gian hoàn thành:* 15 phút/1 học viên
 - *Hình thức trình bày:* thực hành tại chỗ
 - *Phương pháp đánh giá:* kỹ năng vận dụng lý thuyết vào thực hành của mỗi học viên trong nhóm và thái độ thực hành của học viên.
 - *Kết quả cần đạt được:*
- + Thực hiện thứ tự các bước khử trùng buồng cấy và bộ dụng cụ cấy đúng theo quy trình.
- + An toàn đối với con người và môi trường làm việc
- + Buồng cấy, bộ dụng cụ cấy sau khử trùng đạt yêu cầu cho sử dụng.

*** Bài tập 4**

- *Cách thức:* mỗi học viên được yêu cầu lựa chọn bình giống gốc và nhân nhanh một loại cây giống.
- *Thời gian hoàn thành:* 15 phút/1 học viên

- *Hình thức trình bày:* thực hành tại chỗ
- *Phương pháp đánh giá:* kỹ năng vận dụng lý thuyết vào thực hành của mỗi học viên trong nhóm và thái độ thực hành của học viên.
- *Kết quả cần đạt được:*
 - + Chọn chính xác bình chôi đủ tiêu chuẩn
 - + Thao tác cắt, tách chôi và cấy chuyển vào môi trường nhanh, chính xác
 - + Thực hiện thứ tự các bước nhanh nhẹn đúng theo quy trình.
 - + An toàn đối với con người và môi trường làm việc.

* Bài tập 5

- *Cách thức:* mỗi học viên được yêu cầu lựa chọn bình giống gốc và tạo cây hoàn chỉnh cho một loại cây giống
- *Thời gian hoàn thành:* 15 phút/1 học viên
- *Hình thức trình bày:* thực hành tại chỗ
- *Phương pháp đánh giá:* kỹ năng vận dụng lý thuyết vào thực hành của mỗi học viên trong nhóm và thái độ thực hành của học viên.
- *Kết quả cần đạt được:*
 - + Chọn chính xác bình chôi đủ tiêu chuẩn
 - + Thao tác cắt, tách chôi và cấy chuyển vào môi trường nhanh, chính xác
 - + Thực hiện thứ tự các bước nhanh nhẹn đúng theo quy trình
 - + An toàn đối với con người và môi trường làm việc

Bài 5. Cây cây và chăm sóc cây giống ở vườn ươm

* Bài tập 1

- *Cách thức:* mỗi học viên được nhận một thiết bị, dụng cụ có trong vườn ươm.
- *Thời gian hoàn thành:* 5 phút/1 học viên
- *Hình thức trình bày:* vấn đáp
- *Phương pháp đánh giá:* đánh giá trên cơ sở lý thuyết
- *Kết quả sản phẩm cần đạt được:* gọi tên đúng thiết bị, nêu đúng mục đích sử dụng của thiết bị đó trong quá trình tiến hành công việc chăm sóc cây tại vườn ươm.

* Bài tập 2

- *Cách thức:* chia các nhóm nhỏ (5 – 10 học viên/nhóm), mỗi nhóm nhận nhiệm vụ đóng và xếp luống 50 bầu dinh dưỡng
- *Thời gian hoàn thành:* 3 giờ/1 nhóm
- *Hình thức trình bày:* thực hành tại chỗ
- *Phương pháp đánh giá:* kỹ năng vận dụng lý thuyết vào thực hành của mỗi học viên trong nhóm và thái độ thực hành của học viên.
- *Kết quả cần đạt được:*

- + Chọn được đất làm ruột bầu phù hợp với yêu cầu của cây mô
- + Làm được bầu dinh dưỡng để cấy cây mô đúng kỹ thuật
- + Xếp được luống bầu đúng kỹ thuật

* Bài tập 3

- *Cách thức:* chia các nhóm nhỏ (5 – 10 học viên/nhóm), mỗi nhóm nhận nhiệm vụ chuẩn bị cây con để cấy vào bầu cho một loại cây giống
- *Thời gian hoàn thành:* 1 giờ/1 nhóm
- *Hình thức trình bày:* thực hành tại chỗ
- *Phương pháp đánh giá:* kỹ năng vận dụng lý thuyết vào thực hành của mỗi học viên trong nhóm và thái độ thực hành của học viên.
- *Kết quả cần đạt được:*

- + Chọn được bình cây đủ tiêu chuẩn để ra cây
- + Cây sau khi chuẩn bị đạt tiêu chuẩn để cấy vào bầu

* Bài tập 4

- *Cách thức:* mỗi học viên được nhận nhiệm vụ cấy vào bầu cho 10 cây con
- *Thời gian hoàn thành:* 10 phút/1 học viên
- *Hình thức trình bày:* Thực hành tại chỗ
- *Phương pháp đánh giá:* kỹ năng vận dụng lý thuyết vào thực hành của mỗi học viên trong nhóm và thái độ thực hành của học viên.
- *Kết quả sản phẩm cần đạt được:*

- + Thực hiện đúng và đầy đủ các thao tác cấy cây
- + Cây sau cấy đạt yêu cầu về tỷ lệ sống

* Bài tập 5

- *Cách thức:* chia các nhóm nhỏ (5 – 10 học viên/nhóm), mỗi nhóm nhận nhiệm vụ thực hiện các nội dung trong cho một loại cây mô ở vườn ươm
- *Thời gian hoàn thành:* 2 giờ/1 nhóm
- *Hình thức trình bày:* thực hành tại chỗ + lý thuyết
- *Phương pháp đánh giá:* kỹ năng vận dụng lý thuyết vào thực hành của mỗi học viên trong nhóm và thái độ thực hành của học viên.
- *Kết quả cần đạt được:*

- + Đánh giá được tình trạng của cây mô ngoài vườn ươm
- + Thực hiện các thao tác đúng quy trình kỹ thuật
- + Cây sau khi chăm sóc sinh trưởng và phát triển tốt

* Bài tập 6

- *Cách thức:* chia các nhóm nhỏ (5 – 10 học viên/nhóm), mỗi nhóm nhận nhiệm vụ thực hiện bón phân cho một loại cây mô ở vườn ươm

- Thời gian hoàn thành: 1 giờ/1 nhóm
- Hình thức trình bày: thực hành tại chỗ
- Phương pháp đánh giá: kỹ năng vận dụng lý thuyết vào thực hành của mỗi học viên trong nhóm và thái độ thực hành của học viên.
- Kết quả cần đạt được:
 - + Đánh giá được tình trạng của cây mô ngoài vườn ươm
 - + Thực hiện các thao tác bón phân đúng quy trình kỹ thuật
 - + Cây sau khi chăm sóc sinh trưởng và phát triển tốt

VI. Tài liệu tham khảo

- [1]. Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn, (2011), *Chương trình đào tạo trình độ sơ cấp, nghề: vi nhân giống cây hoa.*
- [2]. Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn, (2011), *Chương trình đào tạo trình độ sơ cấp, nghề: vi nhân giống cây lâm nghiệp.*
- [3]. Lê Văn Hoàng (2007), *Công nghệ nuôi cấy mô và tế bào thực vật*, NXB Khoa học và Kỹ thuật
- [4] Trần Văn Minh (2001), *Công nghệ sinh học thực vật*, Viện Sinh học nhiệt đới-Trung tâm Khoa học Tự nhiên và Công nghệ quốc gia.
- [5]. Robert N T, Dennis J G, (2000), *Plant tissue culture concepts and laboratory exercises*, CRC Press.