

**UBND TỈNH LÂM ĐỒNG
TRƯỜNG CAO ĐẲNG ĐÀ LẠT**

**GIÁO TRÌNH
MÔN HỌC/MÔ ĐUN: SẢN XUẤT GIỐNG
BẢNG KỸ THUẬT NUÔI CÂY MÔ TẾ BÀO THỰC VẬT**

**NGÀNH/NGHỀ: BẢO VỆ THỰC VẬT
TRÌNH ĐỘ: TRUNG CẤP**

*Ban hành kèm theo Quyết định số: /QĐ-... ngàytháng.... năm.....
..... của*

Lâm Đồng, 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

Giáo trình Sản xuất giống bằng kỹ thuật nuôi cấy mô tế bào thực vật được biên soạn cho trình độ cao đẳng và trung cấp nghề BVTV hiện đang được đào tạo tại Khoa Nông nghiệp và sinh học ứng dụng Trường Cao đẳng Nghề Đà Lạt

Giáo trình được biên soạn căn cứ trên chương trình khung mô đun sản xuất giống bằng kỹ thuật nuôi cấy mô tế bào thực vật trong nghề BVTV

Nguồn tài liệu tham khảo dựa trên nhiều tác giả và các biên soạn giáo trình của đồng nghiệp tại Khoa

Lâm Đồng ngày.....tháng.....năm.....

Tham gia biên soạn

Chủ biên

Nguyễn Thị Huế

Nguyễn Sanh Mân

MỤC LỤC

BÀI 1: MỞ ĐẦU.....	12
1. Tế bào thực vật.....	12
1.1. Khái niệm.....	12
1.2. Cấu tạo chung.....	14
1.2.1. Thành tế bào.....	14
1.2.2. Các bào quan:.....	15
2. Nuôi cấy mô tế bào thực vật.....	18
2.1. Khái niệm.....	18
2.2. Vai trò của nuôi cấy mô tế bào thực vật	18
3. Lịch sử phát triển.....	19
3.1. Giai đoạn khởi xướng	19
3.2. Giai đoạn nghiên cứu sinh lý	19
3.3. Giai đoạn nghiên cứu phát sinh hình thái	20
3.4. Giai đoạn nghiên cứu di truyền và ứng dụng.....	20
4. Các cơ quan của thực vật được sử dụng trong nuôi cấy mô tế bào	22
4.1. Nuôi cấy phôi.	22
4.2. Nuôi cấy mô và cơ quan tách rời	23
4.3. Nuôi cấy mô phân sinh.....	23
4.4. Nuôi cấy bao phấn.....	23
4.5. Nuôi cấy tế bào đơn	24
4.6. Nuôi cấy protoplast	24
BÀI 2: ĐIỀU KIỆN CỦA KỸ THUẬT NUÔI CẤY MÔ TẾ BÀO	27
1. Điều kiện vật lý – hóa học.....	27
1.1. Nhu cầu về ánh sáng	27
1.1.1. Cường độ ánh sáng:	27

1.1.2. Thời gian chiếu sáng:.....	27
1.1.3. Chất lượng ánh sáng:	27
1.1.4. Ảnh hưởng của nhiệt độ.....	28
1.2. Phòng thí nghiệm nuôi cấy mô tế bào.....	28
1.2.1. Phòng rửa dụng cụ.	28
1.2.2. Phòng chuẩn bị môi trường.....	28
1.2.3. Phòng cấy vô trùng.	29
1.2.4. Phòng nuôi mẫu cấy.....	29
1.3. Các thiết bị, dụng cụ cơ bản cần thiết cho phòng thí nghiệm nuôi cấy mô tế bào	30
1.3.1. Máy móc.	30
1.3.2. Dụng cụ khác.	30
2. Các thao tác cơ bản trong phòng thí nghiệm.....	32
2.1. Cân.	32
2.2. Đóng chất lỏng.....	32
2.3. Xác định độ pH.	33
2.4. Rửa dụng cụ thủy tinh và bình nuôi cấy	33
2.5. Khử trùng.....	34
2.5.1. Khử trùng phòng cấy và tủ cấy.....	34
2.5.2. Khử trùng bình cấy và dụng cụ khác.....	34
2.5.3. Khử trùng môi trường nuôi cấy.....	35
2.5.4. Khử trùng mẫu cấy thực vật.....	36
BÀI 3: MÔI TRƯỜNG NUÔI CẤY VÀ PHƯƠNG PHÁP PHA CHẾ MÔI TRƯỜNG NUÔI CẤY.....	40
1. Thành phần môi trường nuôi cấy.....	40
1.1. Các muối khoáng đa lượng.....	41
1.1.1. Nguồn Nitơ:	41
1.1.2. Nguồn phospho:	41
1.2.3. Nguồn Kali.....	41

1.2.4. Nguồn Can xi	41
1.2.5. Nguồn Magiê	42
1.2.6. Nguồn Sắt.....	42
1.2. Các muối khoáng vi lượng.....	42
1.3. Các vitamine.....	42
1.4. Đường làm nguồn carbon.....	43
1.5. Các chất điều hoà sinh trưởng thực vật.....	44
1.6. Các chất hữu cơ khác:	44
1.6.1. Nước dừa:.....	44
1.6.2. Nước chiết nấm men:	44
1.6.3. Than hoạt tính:	44
1.6.4. Yếu tố làm đặc môi trường nuôi cấy.	44
2. Một số môi trường nuôi cấy cơ bản và cách chọn lựa môi trường nuôi cấy.	45
2.1. Một số môi trường nuôi cấy cơ bản.	45
2.2. Cách chọn lựa môi trường nuôi cấy.....	47
3. Phương pháp pha chế môi trường.	47
3.1. Thành phần và phương pháp bảo quản các dung dịch mẹ.....	47
3.1.1.Mục đích và yêu cầu của việc pha chế dung dịch mẹ.....	48
3.1.2.Thành phần và phương pháp bảo quản các dung dịch mẹ.....	48
3.1.2.1. Các khoáng đa lượng.	48
3.1.2.1. Các khoáng vi lượng.....	49
3.1.2.4. Các chất điều hoà sinh trưởng.	50
3. 2. Phương pháp pha chế dung dịch làm việc	51
BÀI 4. CÁC GIAI ĐOẠN CHÍNH CỦA KỸ THUẬT	55
NHÂN GIỐNG INVITRO.....	55
1. Chuẩn bị vật liệu nuôi cấy ban đầu (cây mẹ).....	55
2. Khử trùng mẫu cấy.....	55
3. Tăng sinh khối mô nuôi cấy.....	57
3.1. Tạo phôi soma.....	57

3.2. Tăng cường phát triển chồi bên.	57
3.3. Sự phát triển chồi bất định.	57
3. Sự ra rễ <i>in vitro</i> và các điều kiện ra rễ.	57
3.1. Sự ra rễ <i>In Vitro</i>	57
3.2. Những điều kiện của sự ra rễ <i>in vitro</i> :	58
3.2.1. Chất điều hòa sinh trưởng.....	58
3.2.2. Các khoáng đa lượng và vi lượng.	58
3.2.3. Đường.	58
4. Giai đoạn sau <i>in vitro</i> (<i>ex vitro</i>)	59
BÀI 5. CÁC PHƯƠNG PHÁP NUÔI CÂY MÔ TẾ BÀO THỰC VẬT.....	63
1. Phương pháp nhân giống bằng nuôi cấy đỉnh sinh trưởng	63
1.1. Đỉnh sinh trưởng	63
1.2. Nuôi cấy đỉnh sinh trưởng.....	65
1.2.1. Các giai đoạn nuôi cấy.....	65
1.2.2. Môi trường nuôi cấy.	66
1.2.3. Các vấn đề về kỹ thuật.....	66
1.3. Tạo cây sạch bệnh bằng phương pháp nuôi cấy đỉnh sinh trưởng.....	67
1.3.1. Xử lý nhiệt:	67
1.3.2. Kiểm tra virus.	67
1.3.3. Quy trình nuôi cấy đỉnh sinh trưởng để làm sạch bệnh virus.	67
2. Phương pháp nhân giống bằng cách tạo mô sẹo (<i>callus</i>).	69
2.1. Giới thiệu.....	69
2.2. Khái niệm về quá trình tái sinh.....	70
2.2.1. Giai đoạn I: Giai đoạn phân biệt hóa:	70
2.2.1. Giai đoạn II: Giai đoạn tái biệt hóa:	70
2.3. Giai đoạn cảm ứng tạo <i>Callus</i>	71
2.4. Biến động di truyền trong nuôi cấy <i>callus</i>	71
2.5. Một số ví dụ nhân giống thông qua phương pháp nuôi cấy <i>callus</i>	72
2.5.1. Phương pháp nuôi cấy tạo <i>callus</i> từ củ cây Cà rốt.....	72

2.5.2. Phương pháp nuôi cấy callus từ Mía.	72
3. Phương pháp nhân giống bằng nuôi cấy lát mỏng.	73
4. Phương pháp nhân giống bằng nuôi cấy đốt đơn thân.....	74
5. Phương pháp nhân giống bằng nuôi cấy chồi bên	76
6. Thực hành: Kỹ thuật cơ bản và pha chế môi trường nuôi cấy	77
6.1. Kỹ thuật vô trùng	77
6.2. Pha chế môi trường.	79
6.2.1. Pha chế Thành phần môi trường dinh dưỡng	79
6.2.2. Pha chế Thành phần muối khoáng cơ bản của môi trường MS.....	79
6.2.3. Pha chế Thành phần vitamin của Morel (Morel's Vitamin).....	80
6.2.4. Cách pha các dung dịch mẹ (stock)	80
7. Nuôi cấy phôi cam chanh.....	84
7.1. Chuẩn bị	84
7. 1.1 Dụng cụ:.....	84
7.1.2. Thiết bị	85
7.1.3. Hoá chất	85
7.2.1.Chuẩn bị môi trường (thành phần cho 1 l môi trường).....	85
7.2.2. Chuẩn bị nguyên vật liệu thực vật:	86
7.2.3. Các bước thực hiện	86
8. Nuôi cấy mô hoa hồng	86
8.1. Chuẩn bị	86
8.2.1 Dụng cụ.....	86
8.2.2. Hóa chất và môi trường	87
8.2. Các bước thực hiện	87
8.3. Báo cáo thực hành.....	87
9. Bài tập: Khảo sát tạp nhiễm	88
9.1. Ghi nhận các kết quả thí nghiệm.....	88
9.2. Phương pháp xử lý và hạn chế tạp nhiễm.....	88
9. 3. Báo cáo thực hành.....	88

GIÁO TRÌNH MÔ ĐUN

Tên mô đun: Sản xuất giống bằng kỹ thuật nuôi cấy mô tế bào thực vật

Mã số của môn học: MĐ 28

Vị trí, tính chất, ý nghĩa và vai trò của môn học/mô đun:

- Vị trí: Môn học nuôi cấy mô tế bào thực vật là môn học kỹ thuật cơ sở được bố trí học sau các môn học chuyên ngành và học cùng môn học kỹ thuật tự chọn khác như: Công nghệ sản xuất rau bằng thủy canh, công nghệ sau thu hoạch ...
- Tính chất: Là môn học kỹ thuật tự chọn đối với sinh viên học nghề bảo vệ thực vật, kỹ năng của mô đun này có thể đáp ứng được một phần nhu cầu tìm việc của sinh viên sau khi ra trường.
- Vai trò môn học: Học xong mô đun này, sinh viên có thể xin làm việc tại các cơ sở sản xuất nuôi cấy mô.

Mục tiêu của môn học/mô đun:

1. Về kiến thức:

- Trình bày được cấu tạo, chức năng, sự sinh sản và phản phân hoá của tế bào.
- Phân tích được cơ sở khoa học của nuôi cấy mô tế bào thực vật.
- Trình bày được các bước thực hiện công nghệ nuôi cấy mô tế bào thực vật chung.
- Xác định được thành phần của môi trường nuôi cấy.
- So sánh ưu nhược điểm của phương pháp nhân giống truyền thống và nhân giống bằng in vitro.
- Trình bày được một số kỹ thuật hiện đại của công nghệ nuôi cấy mô tế bào thực vật.
- Hiểu được vai trò của các yếu tố trong môi trường nuôi cấy mô tế bào thực vật.

2. Về kỹ năng

- Vận hành được các thiết bị máy móc, trang thiết bị phòng thí nghiệm.
- Pha chế được môi trường nuôi cấy mô tế bào thực vật cơ bản.
- Thực hiện được quy trình: Lựa chọn mẫu, vào mẫu, nhân giống và ra cây ngoài vườn ươm.
- Thực hiện được thành thạo thao tác chuẩn bị hoá chất, môi trường, nhân nhanh cây in vitro.

- Tham khảo tài liệu liên quan tới môn học bằng tiếng anh.

3. Về năng lực tự chủ và trách nhiệm:

- Thực hiện được các kỹ năng làm việc theo nhóm, ra được quyết định khi làm việc với nhóm, tham mưu với người quản lý và tự chịu trách nhiệm về các quyết định của mình.
- Có khả năng tự nghiên cứu, tham khảo tài liệu có liên quan đến mô đun.
- Có khả năng tìm hiểu tài liệu để làm bài thuyết trình theo yêu cầu của giáo viên.
- Có khả năng vận dụng các kiến thức liên quan vào các môn học tiếp theo.
- Có ý thức, động cơ học tập chủ động, đúng đắn, tự rèn luyện tác phong làm việc công nghiệp, khoa học và tuân thủ các quy định hiện hành.

Nội dung của mô đun:

BÀI 1: MỞ ĐẦU

MÃ BÀI : MD 23 - 01

Giới thiệu:

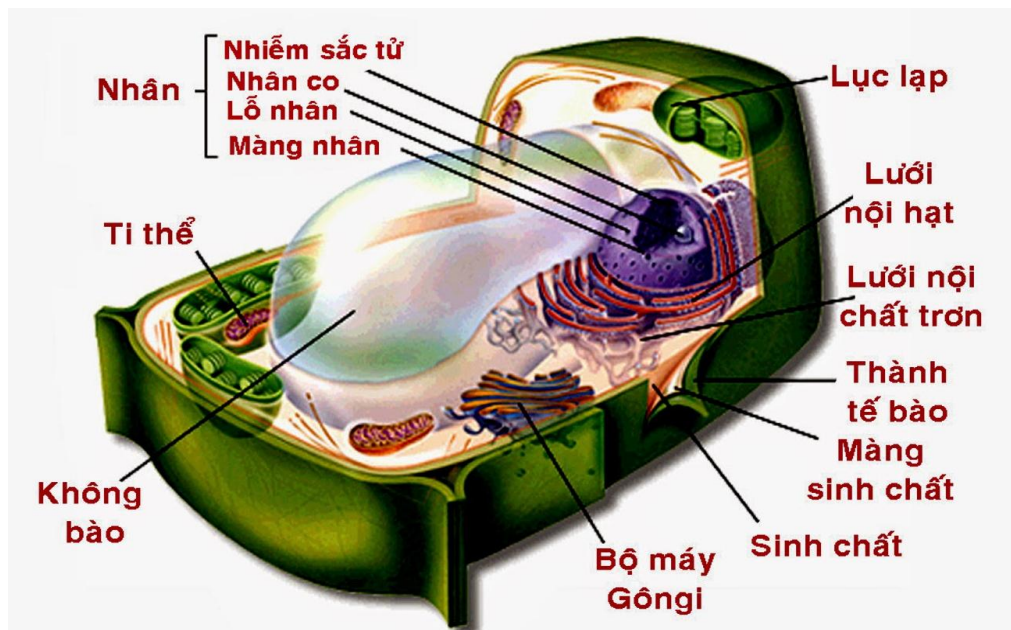
Bài mở đầu có nhiệm vụ giới thiệu về định nghĩa tế bào và nhiệm vụ của môn đụn, lịch sử phát triển...

Mục tiêu

- Trình bày được khái niệm về tế bào thực vật, cấu tạo chung của tế bào thực vật.
- Trình bày được khái niệm về nuôi cấy mô tế bào thực vật.
- Xác định được các cơ quan được sử dụng trong nuôi cấy mô tế bào thực vật.
- Trình bày được lịch sử ra đời và phát triển của công nghệ nuôi cấy mô tế bào thực vật.
- Rèn luyện ý thức học tập, nghiên cứu, tham khảo tài liệu liên quan tới môn học.

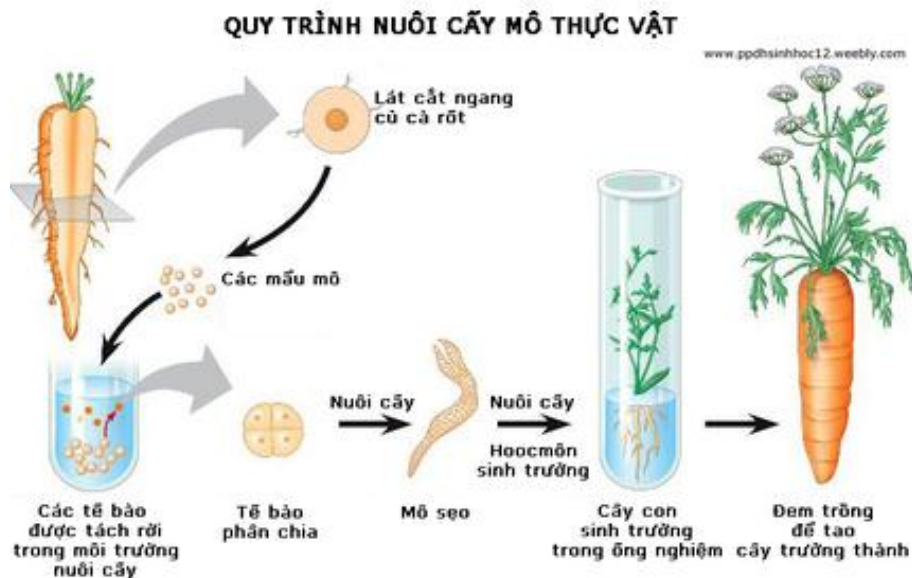
Nội dung

1. Tế bào thực vật



Hình 1.1. Cấu trúc tế bào thực vật

1.1. Khái niệm



Hình 1.2. Sơ đồ Nuôi cấy mô tế bào thực vật

Cơ thể sống cấu tạo từ một tế bào đơn độc hoặc một phức hợp các tế bào. Tế bào rất đa dạng, khác nhau về hình thái, kích thước, cấu trúc và chức năng. Tế bào động vật và tế bào thực vật là những biến đổi của cùng một kiểu cơ sở của đơn vị cấu trúc. Trên cơ sở đó học thuyết tế bào đã được hình thành do Mathias Schleiden và Theodor Schawn vào nửa đầu thế kỉ XIX. Thuật ngữ tế bào lần đầu tiên được Robert Hooke đặt ra vào năm 1665 dựa trên những quan sát các khoang nhỏ có vách bao quanh của nút bần và về sau ông còn quan sát thấy trên mô của nhiều cây khác. Nội chất của tế bào về sau mới được phát hiện và được gọi là chất nguyên sinh, còn thuật ngữ “thể nguyên sinh” là do Hanstein đề xướng năm 1880 để chỉ chất nguyên sinh có trong 1 tế bào đơn độc. Nhân được Robert Brown phát hiện năm 1831.

Mỗi tế bào là một hệ thống mở, tự duy trì và tự sản xuất: tế bào có thể thu nhận chất dinh dưỡng, chuyển hóa các chất này thành năng lượng, tiến hành các chức năng chuyên biệt và sản sinh thế hệ tế bào mới nếu cần thiết. Mỗi tế bào chứa một bản mật mã riêng hướng dẫn các hoạt động trên.

Mọi tế bào đều có một số khả năng sau:

- Sinh sản thông qua phân bào
- Trao đổi chất tế bào bao gồm thu nhận các vật liệu thô, chế biến thành các thành phần cần thiết cho tế bào, sản xuất các phân tử sinh năng lượng và các sản phẩm phụ. Để thực hiện được các chức năng của mình, tế bào cần phải hấp thu và

sử dụng được nguồn năng lượng hóa học dự trữ trong các phân tử hữu cơ. Năng lượng này được giải phóng trong các con đường trao đổi chất

- Tổng hợp các protein, đây là những phân tử đảm nhiệm những chức năng cơ bản của tế bào, ví dụ như enzyme. Một tế bào động vật thông thường chứa khoảng 10,000 loại protein khác nhau.

- Đáp ứng với các kích thích, hoặc thay đổi của môi trường bên trong và bên ngoài như những thay đổi về nhiệt độ, pH hoặc nguồn dinh dưỡng.

- Di chuyển các túi tiết.

1.2. Cấu tạo chung

Các tế bào thực vật ở các cơ thể khác nhau, hoặc ở các mô, các cơ quan khác nhau của cùng một cơ thể sẽ không giống nhau về hình dạng, kích thước và cấu trúc nhưng về bản chất cơ bản các tế bào đều có một số đặc điểm chung.

Tế bào thực vật chia làm 2 phần chính: Thành tế bào và phần nguyên sinh chất, đây là phần quyết định những đặc tính sống chủ yếu của tế bào thực vật

Mọi tế bào đều có màng tế bào, dùng để bao bọc tế bào, cách biệt thành phần nội bào với môi trường xung quanh, điều khiển nghiêm ngặt sự vận chuyển vào và ra của các chất, duy trì điện thế màng và nồng độ các chất bên trong và bên ngoài màng. Bên trong màng là một khối tế bào chất đặc (dạng vật chất chiếm toàn bộ thể tích tế bào). Mọi tế bào đều có các phân tử DNA, vật liệu di truyền quan trọng và các phân tử RNA tham gia trực tiếp quá trình tổng hợp nên các loại protein khác nhau, trong đó có các enzyme. Bên trong tế bào, vào mỗi thời điểm nhất định tế bào tổng hợp nhiều loại phân tử sinh học khác nhau.

1.2.1. Thành tế bào

Thành tế bào là cấu trúc thiết yếu đối với nhiều quá trình sinh lí và phát triển của thực vật. Là lớp vỏ bao bọc, thành tế bào có vai trò như bộ khung xương qui định hình dạng tế bào. Thành tế bào có mối quan hệ mật thiết đến thể tích và áp suất của tế bào do đó rất cần thiết cho quá trình trao đổi nước bình thường ở thực vật. Thành tế bào thực vật tham gia xác định độ dài cơ học của cấu trúc thực vật, cho phép chúng sinh trưởng đến một độ cao khá lớn.

Sự đa dạng về chức năng của thành tế bào bắt nguồn từ sự đa dạng và phức tạp trong cấu trúc của chúng. Nhìn chung các thành tế bào được chia thành hai nhóm chính: thành sơ cấp và thành thứ cấp. Thành sơ cấp hình thành bởi các tế bào đang tăng trưởng và thường được coi là tương đối chưa biệt hóa. Thành thứ cấp

được hình thành sau khi tế bào đã ngừng tăng trưởng, có mức độ chuyên hóa cao cả về thành phần và cấu trúc. Trong thành tế bào sơ cấp các vi sợi xeluloza được gắn chặt trong một mạng lưới hydrat hóa cao. Mạng lưới này bao gồm số các nhóm polisaccarit thường là hemixenluloza và pectin cùng 1 lượng nhỏ protein cấu trúc.

Bộ khung tế bào là một thành phần quan trọng, phức tạp và linh động của tế bào. Nó cấu thành và duy trì hình dáng tế bào; là các điểm bám cho các bào quan; hỗ trợ quá trình thực bào (tế bào thu nhận các chất bên ngoài); và cử động các phần tế bào trong quá trình sinh trưởng và vận động. các protein tham gia cấu thành bộ khung tế bào gồm nhiều loại và có chức năng đa dạng như định hướng, neo bám, phát sinh các tấm màng.

2.1.2. Các bào quan:

Không bào

Không bào là một khoang lớn nằm trong trung tâm chất nguyên sinh của tế bào. Những tế bào thực vật trưởng thành thường có một không bào lớn chứa đầy nước và chiếm từ 80-90% thể tích tế bào. Không bào được bọc trong một lớp màng gọi là màng không bào (tonoplast). Trong không bào chứa nước, các muối vô cơ, đường, các enzym và nhiều chất trao đổi thứ cấp.

Màng sinh chất

Ranh giới giữa thành tế bào với chất nguyên sinh cũng như giữa chất nguyên sinh với không bào được hình thành bởi các màng. Màng sinh chất ngăn cách chất nguyên sinh với môi trường xung quanh nhưng cũng cho phép chất nguyên sinh có thể hấp thụ hay đào thải các chất khác ra khỏi tế bào.

Màng tế bào - Tấm áo ngoài

Vỏ bọc bên ngoài của một tế bào eukaryote gọi là màng sinh chất (plasma membrane). Màng này cũng có ở các tế bào prokaryote nhưng được gọi là màng tế bào (cell membrane). Màng có chức năng bao bọc và phân tách tế bào với môi trường xung quanh. Màng được cấu thành bởi một lớp lipid kép và các protein. Các phân tử protein hoạt động như các kênh vận chuyển và bơm được nhúng vào lớp lipid một cách linh động (có thể di chuyển tương đối). Vỏ bọc bên ngoài của một tế bào eukaryote gọi là màng sinh chất (plasma membrane).

Mạng lưới nội chất

Màng nội chất là một hệ thống màng phức tạp, thể hiện trên bản cắt ngang là hệ thống các túi dẹp hoặc các ống nhỏ gồm hai lớp màng và ở giữa là một khoảng hẹp

Tế bào chất

Bên trong các tế bào là một không gian chứa đầy dịch thể gọi là tế bào chất (cytoplasm). Nó bao hàm cả hỗn hợp các ion, chất dịch bên trong tế bào và cả các bào quan. Các bào quan bên trong tế bào chất đều có hệ thống màng sinh học để phân tách với khối dung dịch này. Chất nguyên sinh (cytosol) là để chỉ riêng phân dịch thể, chứ không có các bào quan. Đối với các sinh vật prokaryote, tế bào chất là một thành phần tương đối tự do. Tuy nhiên, tế bào chất trong tế bào eukaryote thường chứa rất nhiều bào quan và bộ khung tế bào. Chất nguyên sinh thường chứa các chất dinh dưỡng hòa tan, phân cắt các sản phẩm phế liệu, và dịch chuyển vật chất trong tế bào tạo nên hiện tượng dòng chất nguyên sinh. Nhân tế bào thường nằm bên trong tế bào chất và có hình dạng thay đổi khi tế bào di chuyển. Tế bào chất cũng chứa nhiều loại muối khác nhau, đây là dạng chất dẫn điện tuyệt vời để tạo môi trường thích hợp cho các hoạt động của tế bào.

Môi trường tế bào chất và các bào quan trong nó là yếu tố sống còn của một tế bào.

Nhân tế bào - trung tâm tế bào: Nhân tế bào là bào quan tối quan trọng trong tế bào eukaryote. Nó chứa các nhiễm sắc thể của tế bào, là nơi diễn ra quá trình nhân đôi

DNA và tổng hợp RNA. Nhân tế bào có dạng hình cầu và được bao bọc bởi một lớp màng kép gọi là màng nhân. Màng nhân dùng để bao ngoài và bảo vệ DNA của tế bào trước những phân tử có thể gây tổn thương đến cấu trúc hoặc ảnh hưởng đến hoạt động của DNA. Trong quá trình hoạt động, phân tử DNA được phiên mã để tổng hợp các phân tử RNA chuyên biệt, gọi là RNA thông tin (mRNA). Các mRNA được vận chuyển ra ngoài nhân, để trực tiếp tham gia quá trình tổng hợp các protein đặc thù. Ở các loài prokaryote, các hoạt động của DNA tiến hành ngay tại tế bào chất (chính xác hơn là tại vùng nhân).

Ribosome - bộ máy sản xuất protein: Ribosome có cả trong tế bào eukaryote và prokaryote. Ribosome được cấu tạo từ các phân tử protein và RNA ribosome (rRNA). Đây là nơi thực hiện quá trình sinh tổng hợp protein từ các phân tử mRNA. Quá trình này còn được gọi là dịch mã vì thông tin di truyền mã hóa trong trình tự phân tử DNA truyền qua trình tự RNA để quyết định trình tự amino

acid của phân tử protein. Quá trình này cực kỳ quan trọng đối với tất cả mọi tế bào, do đó một tế bào thường chứa rất nhiều phân tử ribosome—thường hàng trăm thậm chí hàng nghìn phân tử.

Ty thể và lục lạp - các trung tâm năng lượng: Ty thể là bào quan trong tế bào eukaryote có hình dạng, kích thước và số lượng đa dạng và có khả năng tự nhân đôi. Ty thể có genome riêng, độc lập với genome trong nhân tế bào. Ty thể có vai trò cung cấp năng lượng cho mọi quá trình trao đổi chất của tế bào. Lục lạp cũng tương tự như ty thể nhưng kích thước lớn hơn, chúng tham gia chuyển hóa năng lượng mặt trời thành các chất hữu cơ (trong quá trình quang hợp). Lục lạp chỉ có ở các tế bào thực vật.

Mạng lưới nội chất và bộ máy Golgi - nhà phân phối và xử lý các đại phân tử: Mạng lưới nội chất (ER) là hệ thống mạng vận chuyển các phân tử nhất định đến các địa chỉ cần thiết để cải biến hoặc thực hiện chức năng, trong khi các phân tử khác thì trôi nổi tự do trong tế bào chất. ER được chia làm 2 loại: ER hạt (rám) và ER trơn (nhẵn). ER hạt là do các ribosome bám lên bề mặt ngoài của nó, trong khi ER trơn thì không có ribosome. Quá trình dịch mã trên các ribosome của ER hạt thường để tổng hợp các protein tiết (*protein xuất khẩu*). Các protein tiết thường được vận chuyển đến phức hệ Golgi để thực hiện một số cải biến, đóng gói và vận chuyển đến các vị trí khác nhau trong tế bào. ER trơn là nơi tổng hợp lipid, giải độc và bề chứa calcium.

Lysosome và peroxisome - hệ tiêu hóa của tế bào: Lysosome và peroxisome thường được ví như *hệ thống xử lý rác thải* của tế bào. Hai bào quan này đều dạng cầu, màng đơn và chứa nhiều enzyme tiêu hóa. Ví dụ, lysosome có thể chứa vài chục enzyme phân huỷ protein, nucleic acid và polysacharide mà không gây hại cho các quá trình khác của tế bào khi được bao bọc bởi lớp màng tế bào.

Vật liệu di truyền - Yếu tố duy trì thông tin giữa các thế hệ: Vật liệu di truyền là các phân tử nucleic acid (DNA và RNA). Hầu hết các sinh vật sử dụng DNA để lưu trữ dài hạn thông tin di truyền trong khi chỉ một vài virus dùng RNA cho mục đích này. Thông tin di truyền của sinh vật chính là mã di truyền quy định tất cả protein cần thiết cho mọi tế bào của cơ thể. Tuy nhiên, một nghiên cứu mới đây cho thấy có thể một số RNA cũng được sử dụng như là một bản lưu đối với một số gene để phòng sai hỏng.

Các sinh vật prokaryote, vật liệu di truyền là một phân tử DNA dạng vòng đơn giản. Phân tử này nằm ở một vùng tế bào chất chuyên biệt gọi là vùng nhân. Tuy nhiên, đối với các sinh vật eukaryote, phân tử DNA được bao bọc bởi các phân tử protein tạo thành cấu trúc nhiễm sắc thể, được lưu giữ trong nhân tế bào (với màng nhân bao bên ngoài). Mỗi tế bào thường chứa nhiều nhiễm sắc thể (số lượng nhiễm sắc thể trong mỗi tế bào là đặc trưng cho loài). Ngoài ra, các bào quan như ty thể và lục lạp đều có vật liệu di truyền riêng của mình (xem thêm thuyết nội cộng sinh).

Ví dụ, một tế bào người gồm hai genome riêng biệt là genome nhân và genome ty thể. Genome nhân (là thể lưỡng bội) bao gồm 46 phân tử DNA mạch thẳng tạo thành các nhiễm sắc thể riêng biệt. Genome ty thể là phân tử DNA mạch vòng, khá nhỏ và chỉ mã hóa cho một vài protein quan trọng.

2. Nuôi cấy mô tế bào thực vật

2.1. Khái niệm

Nuôi cấy mô tế bào thực vật là kỹ thuật cho phép nuôi cấy dễ dàng những tế bào thực vật hay mô phân sinh sạch bệnh trong môi trường nhân tạo thích hợp để tạo ra những khối tế bào hay những cây hoàn chỉnh trong ống nghiệm.

2.2. Vai trò của nuôi cấy mô tế bào thực vật

Nuôi cấy mô tế bào thực vật được sử dụng rộng rãi trong nghiên cứu thực vật, lâm nghiệp, và đồng ruộng. Các vai trò bao gồm:

Thương mại hóa sản xuất các loài thực vật sử dụng như là cây cảnh, trang trí phong cảnh và các lĩnh vực liên quan đến hoa, là thứ mà sử dụng nuôi cấy mô phân sinh và chồi để tạo ra số lượng lớn các cá thể giống hệt nhau.

Bảo tồn các giống cây hiếm hoặc đang bị đe dọa.

Các nhà nhân giống có thể ưu tiên sử dụng nuôi cấy mô để sàng lọc các tế bào hơn là sàng lọc cây trồng để tìm các tính trạng tốt, ví dụ kháng/chống chịu thuốc diệt cỏ.

Sinh trưởng quy mô lớn các tế bào thực vật trong môi trường lỏng trong các bioreactors để tạo ra các hợp chất có giá trị, giống như sinh tổng hợp các hợp chất thứ cấp có nguồn gốc thực vật và protein tái tổ hợp, được sử dụng như là dược phẩm sinh học.

Lai xa các loài thực vật bằng cách bởi dung hợp protoplast và tái sinh các phép lai mới.

Nghiên cứu nhanh cơ sở phân tử của các cơ chế sinh lý, sinh hóa và sinh sản ở thực vật, ví dụ như chọn lọc in vitro các cây chống chịu với các điều kiện bất lợi và các nghiên cứu quá trình ra hoa in vitro.

Lai - thụ phấn các loài xa nhau và sau đó nuôi cấy tế bào hợp tử được tạo thành (thường dễ bị chết nếu diễn ra trong tự nhiên) (cứu phôi).

Các thể đột biến nhân đôi nhiễm sắc thể và sự hình thành của các thể đa bội, ví dụ nhân đôi đơn bội, tứ bội và các dạng khác của thể đa bội có được tạo ra bằng cách áp dụng các chất chống phân bào (antimitotic) như là colchicine hoặc oryzalin.

Các mô tế bào nuôi cấy sau khi biến nạp có thể sử dụng để thử nghiệm ngăn hạn các cấu trúc di truyền (genetic constructs) hoặc tái sinh tạo các cây chuyển gen.

Các kỹ thuật nhất định như là nuôi cấy đỉnh phân sinh có thể được sử dụng để tạo nguồn nguyên liệu thực vật sạch từ nguồn bị lây nhiễm virus như là khoai tây và rất nhiều các loài có quả mềm.

Có thể tạo ra các loài lai vô trùng giống hệt nhau.

3. Lịch sử phát triển

3.1. Giai đoạn khởi xướng

Năm 1665, Robert Hooke quan sát thấy tế bào sống dưới kính hiển vi và đưa ra khái niệm "tế bào - Cell". Anton Van Leuwen Hoek (1632-1723) thiết kế kính hiển vi khuyếch đại được 270 lần, lần đầu tiên quan sát thấy vi khuẩn, tế bào tinh trùng trong tinh dịch người và động vật. Năm 1838, Matthias Schleiden và Theodore Schwann đề xướng học thuyết cơ bản của sinh học gọi là Học thuyết tế bào:

Mọi cơ thể sống được cấu tạo bởi một hoặc nhiều tế bào.

Tế bào là đơn vị cấu trúc và chức năng cơ bản của cơ thể sống, là hình thức nhỏ nhất của sự sống.

Tế bào chỉ được tạo ra từ tế bào tồn tại trước đó.

3.2. Giai đoạn nghiên cứu sinh lý

Năm 1875, Oscar Hertwig chứng minh bằng quan sát trên kính hiển vi rằng sự thụ thai là do sự hợp nhất của nhân tinh trùng và nhân trứng. Sau đó, Hermann P., Schneider F.A và Butschli O. đã mô tả chính xác quá trình phân chia tế bào. Năm 1883, Wilhelm Roux lần đầu tiên lý giải về phân bào giảm nhiễm ở cơ quan

sinh dục. Từ một tế bào thực vật nuôi cấy in vitro có thể tái sinh thành một cơ thể sống hoàn chỉnh. Khả năng này của tế bào thực vật được gọi là tính toàn năng.

Năm 1902, Haberlandt lần đầu tiên thí nghiệm nuôi cấy mô cây một lá mầm nhưng không thành công.

3.3. Giai đoạn nghiên cứu phát sinh hình thái

Năm 1934, Kogl lần đầu tiên xác định được vai trò của IAA, 1 hoocmon thực vật đầu tiên thuộc nhóm auxin có khả năng kích thích sự tăng trưởng và phân chia tế bào. Năm 1939, ba nhà khoa học Gautheret, Nobecourt và White đã đồng thời nuôi cấy mô sẹo thành công trong thời gian dài từ mô thượng tầng (cambium) ở cà rốt và thuốc lá, mô sẹo có khả năng sinh trưởng liên tục.

Năm 1941, Overbeek và cs đã sử dụng nước dừa trong nuôi cấy phôi non ở cây cà rốt *Datura*.

Năm 1955, Miller và cs đã phát minh cấu trúc và sinh tổng hợp của kinetin - một cytokinin đóng vai trò quan trọng trong phân bào và phân hoá chồi ở mô nuôi cấy.

Đến năm 1957, Skoog và Miller đã khám phá vai trò của tỷ lệ nồng độ các chất auxin: cytokinin trong môi trường đối với sự phát sinh cơ quan (rễ hoặc chồi). Khi tỷ lệ auxin/ cytokinin (ví dụ: nồng độ IAA/ nồng độ kinetin) nhỏ hơn 1 và càng nhỏ, mô có xu hướng tạo chồi. Ngược lại khi nồng độ IAA/ nồng độ kinetin lớn hơn 1 và càng lớn, mô có xu hướng tạo rễ. Tỷ lệ nồng độ auxin và cytokinin thích hợp sẽ kích thích phân hoá cả chồi và rễ, tạo cây hoàn chỉnh.

Năm 1949, Limmasets và Cornuet đã phát hiện rằng virus phân bố không đồng nhất trên cây và thường không thấy có virus ở vùng đỉnh sinh trưởng.

3.4. Giai đoạn nghiên cứu di truyền và ứng dụng

Năm 1952, Morel và Martin đã tạo ra cây sạch bệnh virus của 6 giống khoai tây từ nuôi cấy đỉnh sinh trưởng. Ngày nay, kỹ thuật này với một số cải tiến đã trở thành phương pháp loại trừ bệnh virus được dùng rộng rãi đối với nhiều loài cây trồng khác nhau. Năm 1952, Morel và Martin lần đầu tiên thực hiện vi ghép in vitro thành công. Kỹ thuật vi ghép sau đó đã được ứng dụng rộng rãi trong tạo nguồn giống sạch bệnh virus và tương tự virus ở nhiều cây trồng nhân giống bằng phương pháp vô tính khác nhau, đặc biệt là tạo giống cây ăn quả sạch bệnh.

Năm 1960, Morel đã thực hiện bước ngoặt cách mạng trong sử dụng kỹ thuật nuôi cấy đỉnh sinh trưởng trong nhân nhanh các loại địa lan *Cymbidium*, mở đầu công nghiệp vi nhân giống thực vật.

Năm 1960, Cocking lần đầu tiên sử dụng enzym phân giải thành tế bào và đã tạo ra số lượng lớn tế bào trần. Kỹ thuật này sau đó đã được hoàn thiện để tách nuôi tế bào trần ở nhiều cây trồng khác nhau.

Năm 1971, Takebe và cs đã tái sinh được cây từ tế bào trần mô thịt lá (mesophyll cell) ở thuốc lá. Năm 1972, Carlson và cs lần đầu tiên thực hiện lai tế bào soma giữa các loài, tạo được cây từ dung hợp tế bào trần của 2 loài thuốc lá *Nicotiana glauca* và *N. langsdorfii*. Năm 1978, Melchers và cs tạo được cây lai soma "Cà chua Thuốc lá" bằng lai xa tế bào trần của 2 cây này. Đến nay, việc tái sinh cây hoàn

chỉnh từ tế bào trần hoặc từ lai tế bào trần đã thành công ở nhiều loài thực vật.

Năm 1964, Guha và Maheshwari lần đầu tiên thành công trong tạo được cây đơn bội từ nuôi cấy bao phấn của cây cà *Datura*. Kỹ thuật này sau đó đã được nhiều tác giả phát triển và ứng dụng rộng rãi trong tạo dòng đơn bội (1x), dòng thuần nhị bội kép (2x), cố định ưu thế lai (nuôi cấy bao phấn hoặc hạt phấn của dòng lai F1 để tạo giống thuần mang tính trạng ưu thế lai).

Năm 1959, Tulecke và Nickell đã thử nghiệm sản xuất sinh khối mô thực vật quy mô lớn (134 lít) bằng nuôi cấy chìm. Năm 1977, Noguchi và cs đã nuôi cấy tế bào thuốc lá trong bioreactor dung tích lớn 20,000 lít. Năm 1978, Tabata và cs đã nuôi tế bào cây thuốc ở quy mô công nghiệp phục vụ sản xuất shikonin. Họ đã chọn lọc được dòng tế bào cho sản lượng các sản phẩm thứ cấp (shikonin) cao hơn. Năm 1985, Flores và Filner lần đầu tiên sản xuất chất trao đổi thứ cấp từ nhân nuôi rễ tơ ở *Hyoscyamus muticus*. Những rễ này sản xuất nhiều hoạt chất hyoscyamine hơn cây tự nhiên. Hiện nay, công nghệ nuôi cấy tế bào và mô (ví dụ, mô rễ của nhân sâm) trong các bioreactor dung tích lớn đã được thương mại hoá ở mức công nghiệp để sản xuất sinh dược.

Năm 1981, trên cơ sở quan sát các biến dị xảy ra rất phổ biến trong nuôi cấy mô và tế bào với phổ biến dị và tần số biến dị cao, Larkin và Scowcroft đã đưa ra thuật ngữ "biến dị dòng soma" (Somaclonal Variation) để chỉ các thay đổi di truyền tính trạng xảy ra do nuôi cấy mô và tế bào in vitro. Từ các dòng tế bào hoặc cây biến dị di truyền ổn định có thể nhân nhanh, tạo ra các dòng và giống đột biến

có năng suất, hàm lượng hoạt chất hữu ích cao, kháng một số các điều kiện bất lợi như bệnh, mặn, hạn,...

Đến nay các nhà khoa học đã khẳng định rằng mức độ thành công của chuyển gen vào cây trồng phụ thuộc rất nhiều vào hệ thống nuôi cấy và tái sinh tế bào thành cây in vitro sau chuyển gen. Năm 1974, Zaenen và CS đã phát hiện plasmid Ti đóng vai trò là yếu tố gây u (crown gall) ở cây trồng. Năm 1977, Chilton và cs đã chuyển thành công T- DNA vào cây chuyển gen. An và cs (1985) đã phát triển hệ thống hai vector cho chuyển gen thực vật. Năm 1987, Klein và cs đã sử dụng súng bắn gen (particle gun) mang vi đạn trong chuyển gen và tái sinh được cây biểu hiện gen chuyển. Năm 1994, thương mại hoá giống cà chua chuyển thực vật. Năm 1979, Marton và cs đã xây dựng quy trình chuyển gen vào tế bào trần bằng đồng nuôi cấy tế bào trần và *Agrobacterium*. Năm 1982, Krens đã chuyển thành công DNA vào tế bào trần. Năm 1985, Fraley và cs thiết kế vector plasmid Ti đã loại bỏ các gen độc gây hại để sử dụng cho việc thiết kế vector chuyển gen vào thực vật.

Cùng trong năm, Horsch và CS đã chuyển gen vào mảnh lá bằng *Agrobacterium tumefaciens* và tái sinh gen 'FlavrSavr' Các bước phát triển trong lịch sử công nghệ tế bào thực vật

4. Các cơ quan của thực vật được sử dụng trong nuôi cấy mô tế bào

4.1. Nuôi cấy phôi.

Sự ghi nhận đầu tiên về nuôi cấy phôi là công trình của Charles Bonnet ở thế kỷ XVIII. Ông tách phôi *Phascolus* và *Fagopyrum* trong trong đất và nhận được cây nhưng là cây lùn. Từ đầu thế kỷ XX các công trình nuôi cấy phôi dần được hoàn thiện hơn. Từ các công trình nghiên cứu trước đó, Knudson (1922) đã nuôi cấy thành công phôi cây lan trong môi trường chứa đường và khám phá ra một điều là nếu thiếu đường thì phôi không thể phát triển thành protocorm.

Raghavan (1976, 1980) đã công bố rằng phôi phát triển qua hai giai đoạn dị dưỡng và tự dưỡng. Ở giai đoạn dị dưỡng (tiền phôi) cần có các chất điều hoà sinh trưởng để phát triển. Trong giai đoạn tự dưỡng sự phát triển của phôi không cần chất điều hoà sinh trưởng.

Đối với nuôi cấy phôi, như đã biết đường đóng vai trò rất quan trọng. Trong nhiều trường hợp thì đường sucrose cho kết quả tốt hơn các đường khác. Ngoài ra một số chất tự nhiên như nước dừa, nước chiết malt, casein thuỷ phân, là những chất rất cần trong nuôi cấy phôi. Các chất kích thích sinh trưởng như GA₃, auxin,

cytokinine dùng nhiều trong nuôi cấy phôi. Auxin thường dùng ở nồng độ thấp. Kinetin có vai trò đặc biệt cho sự phát triển của phôi.

Các yếu tố ngoại cảnh như nhiệt độ, ánh sáng cũng ảnh hưởng đến sự phát triển của phôi nuôi cấy in vitro. Thường phôi nuôi cấy cần nhiệt độ và ánh sáng thấp hơn phôi phát triển tự nhiên.

4.2. Nuôi cấy mô và cơ quan tách rời

Wetmore (1946) nuôi cấy đỉnh chồi cây nho dại, cùng với một số tác giả khác, ông đã chứng minh các bộ phận của cây đều có thể nuôi cấy khi gặp điều kiện thuận lợi. Lon và Ball (1946) với thí nghiệm nuôi cấy đỉnh chồi cây măng tây đã cho thấy khi nuôi các bộ phận của cây như lá, thân, hoa thì khả năng tạo mô sẹo nhiều hơn.

Nhu cầu dinh dưỡng khi nuôi cấy các bộ phận khác nhau của cây là khác nhau nhưng có thể thấy một số yêu cầu chung như nguồn cacbon dưới dạng đường và các muối của các nguyên tố đa lượng (nito, phospho, kali, calci) và vi lượng (Mg, Fe, Mn, Co, Zn,...). Ngoài ra cần một chất đặc biệt như vitamin (B1, B6, B3, ...) và các chất điều hoà sinh trưởng. Muốn duy trì sinh trưởng và phát triển của cơ quan nuôi cấy cần thường xuyên cấy chuyển qua môi trường mới.

Đối với nuôi cấy mô, ngoài những thành phần dinh dưỡng như đối với nuôi cấy cơ quan tách rời, cần bổ sung thêm các chất hữu cơ chứa ít nito dưới dạng acide amine, đường và inositol. Trong trường hợp nuôi cấy mô, các chất điều hoà sinh trưởng có vai trò quan trọng hơn vì các mô tách rời không có khả năng tổng hợp các chất này.

4.3. Nuôi cấy mô phân sinh

Mô phân sinh thường là các mô đỉnh chồi và cành có kích thước 0,1mm÷1cm. Các mô phân sinh dùng để nuôi cấy thường tách từ các mầm non, các chồi mới hình thành hoặc các cành non.

Đối với nuôi cấy mô phân sinh sự cân bằng giữa các chất điều hoà sinh trưởng rất quan trọng. Muốn kích thích tạo chồi cần bổ sung cytokinine hoặc tổ hợp cytokinine với auxin. Muốn tạo rễ thì bổ sung các auxin như NAA, IAA,...

Nuôi cấy mô phân sinh được sử dụng để loại virus tạo cây sạch virus và nhân giống in vitro. Nuôi cấy mô phân sinh còn được sử dụng để nghiên cứu quá trình hình thành cơ quan, tạo cây đa bội qua xử lý colchicin.

4.4. Nuôi cấy bao phấn

Kỹ thuật nuôi cấy bào phần đã phát triển và hoàn thiện nhờ công trình nghiên cứu của Bourgin và Nitsch (1967) trên cây thuốc lá, Niizeki và Oono (1968) trên lúa. Từ cuối những năm 1970 đã nhận được cây đơn bội từ nuôi cấy bào phần trên 30 loại cây. Kết quả nghiên cứu của nhiều tác giả cho thấy hạt phấn nuôi cấy có thể phát triển thành cây đơn bội hoàn chỉnh trong điều kiện nuôi cấy in vitro bằng con đường tạo phôi trực tiếp hoặc gián tiếp thông qua tạo mô sẹo và tạo cơ quan.

4.5. Nuôi cấy tế bào đơn

Ngoài khả năng nuôi cấy các cơ quan và mô thực vật, tế bào thực vật có thể được tách và nuôi riêng rẽ trong môi trường phù hợp. Những công trình về nuôi cấy tế bào đơn được tiến hành từ những năm 50 của thế kỷ XX.

Tế bào đơn có thể nhận được bằng con đường nghiền mô, hoặc xử lý enzym. Mỗi loại cây, mỗi loại tế bào khác nhau đòi hỏi những kỹ thuật nuôi cấy khác nhau.

Nuôi cấy tế bào đơn được sử dụng để nghiên cứu cấu trúc tế bào, nghiên cứu ảnh hưởng của các điều kiện khác nhau lên các quá trình sinh trưởng, phát triển và phân hoá của tế bào. Nuôi cấy tế bào đơn còn được sử dụng trong chọn dòng tế bào.

4.6. Nuôi cấy protoplast

Nuôi cấy protoplasts được phát triển nhờ công trình của Cocking (1960). Ông là người đầu tiên dùng enzym để thuỷ phân thành tế bào và tách được protoplast từ tế bào rễ cà chua. Trong điều kiện nuôi cấy phù hợp protoplast có thể tái sinh thành tế bào mới, phân chia và tái sinh thành cây hoàn chỉnh.

Do không có thành tế bào nên protoplast trở nên một đối tượng lý tưởng trong nghiên cứu biến đổi di truyền ở thực vật. Bằng phương pháp dung hợp hai protoplast có thể tạo ra các cây lai soma. Ngoài ra còn có thể sử dụng kỹ thuật dung hợp protoplast để chuyển các bào quan và chuyển gene.

NỘI DUNG GHI NHỚ BÀI 1

Mọi tế bào đều có một số khả năng sau:

- Sinh sản thông qua phân bào
- Trao đổi chất tế bào bao gồm thu nhận các vật liệu thô, chế biến thành các thành phần cần thiết cho tế bào, sản xuất các phân tử sinh năng lượng và các sản phẩm phụ. Để thực hiện được các chức năng của mình, tế bào cần phải hấp thu và sử dụng được nguồn năng lượng hóa học dự trữ trong các phân tử hữu cơ. Năng lượng này được giải phóng trong các con đường trao đổi chất
- Tổng hợp các protein, đây là những phân tử đảm nhiệm những chức năng cơ bản của tế bào, ví dụ như enzyme. Một tế bào động vật thông thường chứa khoảng 10,000 loại protein khác nhau.
- Đáp ứng với các kích thích, hoặc thay đổi của môi trường bên trong và bên ngoài như những thay đổi về nhiệt độ, pH hoặc nguồn dinh dưỡng.
- Di chuyển các túi tiết.

Nuôi cấy mô tế bào thực vật là kỹ thuật cho phép nuôi cấy dễ dàng những tế bào thực vật hay mô phân sinh sạch bệnh trong môi trường nhân tạo thích hợp để tạo ra những khối tế bào hay những cây hoàn chỉnh trong ống nghiệm.

CÂU HỎI ÔN TẬP

1. Trình bày các cơ quan của thực vật được sử dụng trong nuôi cấy mô tế bào ?
2. Trình bày các khái niệm về nuôi cấy mô tế bào thực vật ?
3. Trình bày tính chất và khái quát cấu tạo của tế bào thực vật ?

BÀI 2: ĐIỀU KIỆN CỦA KỸ THUẬT NUÔI CÂY MÔ TẾ BÀO

MÃ BÀI : MĐ 23 - 02

Giới thiệu: Bài học có nhiệm vụ giới thiệu về các điều kiện về kỹ thuật cần và đủ để thực hiện quy trình nuôi cấy mô tế bào.

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

- Trình bày được các điều kiện lý hoá có ảnh hưởng như thế nào đến quá trình nuôi cấy mô tế bào thực vật.
- Vận dụng được các điều kiện cần của phòng thí nghiệm và phương pháp thiết lập, xây dựng phòng thí nghiệm nuôi cấy mô tế bào thực vật.
- Xác định được các loại thiết bị – dụng cụ cơ bản cần thiết để trang bị cho phòng thí nghiệm nuôi cấy mô tế bào thực vật.
- Thực hiện được các thao tác cơ bản trong phòng thí nghiệm nuôi cấy mô tế bào thực vật.

Nội dung

1. Điều kiện vật lý – hóa học

1.1. Nhu cầu về ánh sáng

1.1.1. Cường độ ánh sáng:

- Trong lúc nuôi cấy do việc sử dụng cường độ ánh sáng quá mạnh, chẳng hạn: 50w/m^2 tương đương khoảng 10.000lux ($1\text{w/m}^2 = 200\text{lux}$) thì có thể dẫn đến thất bại trong nuôi cấy.

- Bình thường trong các phòng nuôi cấy, cường độ ánh sáng thay đổi từ 5 - 25w/m^2 (1000-5000lux) nhưng người ta sử dụng thường xuyên nhất từ 10 đến 15w/m^2 .

1.1.2. Thời gian chiếu sáng:

Thông thường thời gian chiếu bổ sung cho quá trình sinh trưởng và phát triển mô nuôi cấy là từ 16 – 18 giờ/24 giờ

1.1.3. Chất lượng ánh sáng:

Một số công trình nghiên cứu đã kết luận rằng:

- Ánh sáng xanh, ánh sáng tím sẽ kích thích tạo chồi còn ánh sáng đỏ sẽ kích thích tạo rễ.

- Như vậy, người ta sẽ có lợi nếu trộn hai loại đèn huỳnh quang: một loại có nhiều tia xanh hơn, còn loại kia có nhiều tia đỏ.

1.1.4. Ảnh hưởng của nhiệt độ.

- Nhiệt độ của phòng nuôi cấy thường được điều chỉnh ổn định từ 22 – 25°C.

- Nhu cầu nhiệt độ của một loài lại khác nhau: các loại cây sống ở khí hậu ôn đới thì thích hợp nhiệt độ thấp hơn cây sống ở nhiệt đới. Chính vì vậy mà người ta sẽ điều chỉnh nhiệt độ của các phòng nuôi cấy các loại cây ôn đới là thấp $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$ và phòng nuôi cấy các loại cây sống ở điều kiện nhiệt đới là từ $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

- Cần chú ý khi điều chỉnh nhiệt độ phòng luôn luôn thấp hơn 2-4°C theo nhu cầu mục đích đặt ra bởi vì nhiệt độ trong bình nuôi cấy luôn luôn cao hơn nhiệt độ ở phòng là từ 2 - 4°C.

1.2. Phòng thí nghiệm nuôi cấy mô tế bào

Một phòng thí nghiệm nuôi cấy mô tế bào thường bao gồm các phòng cơ bản sau:

- Phòng rửa dụng cụ
- Phòng chuẩn bị môi trường, hấp triệt trùng và chứa dụng cụ.
- Phòng cấy vô trùng.
- Phòng nuôi mẫu cây có điều kiện nhiệt độ, ánh sáng có thể điều chỉnh phù hợp với mẫu cấy.
- Phòng quan sát và thu nhận số liệu.

1.2.1. Phòng rửa dụng cụ.

Phòng rửa dụng cụ phải có bồn rửa lớn, có đường thoát riêng cho acid, có kệ để các thiết bị như: dụng cụ khử ion nước, máy cất nước, tủ đựng dụng cụ thủy tinh.

1.2.2. Phòng chuẩn bị môi trường.

- Phòng chuẩn bị môi trường phải có chỗ để hoá chất, bình thủy tinh và các dụng cụ cần thiết để pha môi trường và các thiết bị như:

- + Máy rót môi trường (dụng cụ khác).
- + Máy khuấy từ.
- + Máy đo Ph.
- + Cân kỹ thuật.
- + cân phân tích.
- + Tủ sấy và nồi hấp triệt trùng.

+ Tủ lạnh đựng hoá chất, dụng cụ nấu môi trường và các dụng cụ thuỷ tinh khác.

- Cần phải có các bảng hướng dẫn cụ thể cho từng thiết bị và đặc tính của từng hoá chất sử dụng trong khi pha chế môi trường.

1.2.3. Phòng cấy vô trùng.

- Phòng cấy vô trùng nên thiết kế là một phòng nhỏ và kín. Sàn và tường cần được lát gạch men hoặc sơn nước để dễ vệ sinh và khử trùng thường xuyên.

- Cửa phòng cấy nên là cửa kính để tạo ánh sáng tốt, dễ dàng vệ sinh và tiện liên lạc với bên ngoài trong những lúc cần thiết.

- Trên trần phòng cấy vô trùng phải có gắn đèn cực tím (đèn UV) để khử trùng phòng. Nên thiết kế cửa phòng cấy vô trùng là cửa kéo.

1.2.4. Phòng nuôi mẫu cấy.



Hình 2.1. Phòng nuôi mẫu cấy.

- Tất cả các mẫu cấy đều được nuôi trong điều kiện nhiệt độ, ánh sáng, độ ẩm, thời gian chiếu sáng, thông không khí hợp lý. Phòng nuôi mẫu cấy phải có gắn quạt thông gió. Nền – tường phải lát gạch men để tiện cho công tác vệ sinh phòng.

- Phòng nuôi mẫu cấy phải có các giàn nuôi bằng sắt hay nhôm và trên giàn nuôi cần phải gắn hệ thống ánh sáng đèn huỳnh quang và có thể điều chỉnh được cường độ và thời gian chiếu sáng.

Bên cạnh phòng thí nghiệm phải có hệ thống nhà kính, vườn ươm để trồng cây nguyên liệu nuôi cấy và cây tái sinh trong ống nghiệm.

1.3. Các thiết bị, dụng cụ cơ bản cần thiết cho phòng thí nghiệm nuôi cấy mô tế bào

Kỹ thuật nuôi cấy mô tế bào đòi hỏi phải có những thiết bị cơ bản trong phòng thí nghiệm. Các dụng cụ và thiết bị sau đây cần thiết cho phòng thí nghiệm nuôi cấy mô:

1.3.1. Máy móc.

- Tủ cấy vô trùng.
- Tủ sấy.
- Kính hiển vi soi nổi.
- Cân phân tích.
- Cân kỹ thuật.
- Máy đo pH.
- Bếp điện.
- Máy khuấy từ gia nhiệt.
- Máy ly tâm (nếu có).
- Nồi hấp triệt trùng (autoclave)
- Máy cất nước hai hoặc một lần.
- Tủ lạnh.
- Nồi nấu môi trường.

1.3.2. Dụng cụ khác.

- Bình tam giác có thể tích từ 50 đến 250ml hoặc các bình nuôi cấy mô bằng plastic có thể hấp triệt trùng
- Đĩa petri
- Panh cấy, kéo Inox, dao cấy inox.
- Cốc thuỷ tinh, ống đong, pipet, bình định mức và ống nghiệm.
- Đèn cồn

Tất cả các dụng cụ được sử dụng để nuôi cấy mô phải hoàn toàn không tiết ra bất kỳ chất nào gây ảnh hưởng đến sự phát triển của mẫu cấy trong quá trình nuôi cấy.



Hình 2.2. Tủ cấy vô trùng



Hình 2.3. Máy khuấy từ gia nhiệt



Hình 2.3. Cân phân tích



Hình 2.4. Nồi hấp triệt trùng 1



Hình 2.4. Nồi hấp triệt trùng 2

2. Các thao tác cơ bản trong phòng thí nghiệm

2.1. Cân.

- Việc chuẩn bị môi trường đòi hỏi phải thao tác cân phải chính xác.
- Các lưu ý khi sử dụng cân để có kết quả chính xác:
 - + Cân phải đặt ở vị trí ổn định, không bị rung, không khí không bị dao động và cân bằng.
 - + Cân và đĩa cân phải được giữ gìn sạch sẽ.
 - + Không được cân quá trọng lượng cho phép và không đặt hoá chất trực tiếp lên đĩa cân.

2.2. Đóng chất lỏng.

- Trong quá trình chuẩn bị môi trường nuôi cấy cần thiết phải có một số dụng cụ thủy tinh (hoặc nhựa) có chia vạch như ống hút có chia độ (pipet), cốc thủy tinh có chia vạch (cốc đong), ống đong, ... để pha môi trường.
- Đong các dung dịch bằng ống hút có chia độ hoặc ống đong chỉ chính xác khi đáy của không khí ngang với vạch đánh dấu của dụng cụ đong.

2.3. Xác định độ pH.



Hình 2.5. Máy đo pH cầm tay

- Độ pH môi trường được đo dựa vào nồng độ ion H^+ trong môi trường. Độ pH môi trường nuôi cấy hầu hết được chỉnh ở $5,7 \pm 0,1$ trước khi khử trùng.
- Xác định chính xác độ pH trong môi trường nuôi cấy là rất cần thiết bởi vì độ pH có ảnh hưởng đến khả năng hoà tan của các ion trong môi trường khoáng, khả năng động tụ agar và sự tăng trưởng của tế bào.
- Độ pH của môi trường nuôi cấy thường được điều chỉnh bằng NaOH hay KOH hoặc bằng HCl sau khi đã pha xong môi trường và chuẩn bị đưa vào hấp triệt trùng.
- Có nhiều phương pháp xác định và điều chỉnh độ pH môi trường nuôi cấy. Chẳng hạn sử dụng các loại máy đo pH (bằng tay hay để bàn) hoặc sử dụng giấy quỳ tím hoặc chất chỉ thị

2.4. Rửa dụng cụ thủy tinh và bình nuôi cấy

- Các dụng cụ nuôi cấy bằng thủy tinh phải được rửa kỹ bằng xà phòng bột và sau đó phơi khô dưới điều kiện ánh sáng mặt trời.

- Một số trường hợp dụng cụ nuôi cấy quá bẩn thì phải được ngâm trong acid chloric hoặc sulfuric và sau đó rửa lại bằng xà phòng bột và nước máy.

* **Lưu ý**: Các bình môi trường bị nhiễm trong quá trình nuôi cấy cần phải được hấp triệt trùng trước khi rửa và tất cả các dụng cụ trước khi đưa vào sử dụng phải được sấy khô trong tủ sấy.

2.5. Khử trùng.

2.5.1. *Khử trùng phòng cấy và tủ cấy.*

- Đối với phòng cấy có diện tích lớn thì khử trùng tiện nhất là bằng đèn cực tím và thời gian khử trùng tùy theo kích thước của phòng.

- Đối với phòng nhỏ hơn và tủ cấy cũng được khử trùng bằng tia cực tím hoặc dung dịch diệt nấm, diệt khuẩn.

- Tủ cấy có hệ thống thổi gió vô trùng có thể được khử trùng dễ dàng bằng cách mở quạt gió và lau tất cả các bề mặt bằng cồn 95% trong vòng 15 phút trước khi bắt đầu làm việc trong tủ.

- Phòng nuôi cấy cũng phải được khử trùng trước hết bằng xà phòng bột, sau đó lau lại bằng dung dịch hypochlorite calcium 2% hoặc nước Javen hoặc bằng cồn 95%.

- Công tác vệ sinh khử trùng phòng cấy phải được thực hiện định kỳ hàng tuần.

2.5.2. *Khử trùng bình cấy và dụng cụ khác.*

- Dụng cụ thủy tinh dùng trong nuôi cấy mô thực vật cần phải chịu được nhiệt độ 160 - 180°C khi vô trùng khô(sấy) và 121°C khi vô trùng ướt(hấp).

- Nút đây: thường dùng nhất là bông gòn không thấm nước. Nút phải tương đối chặt để không cho bụi đi qua đồng thời nước từ môi trường không bị bốc hơi quá dễ dàng trong quá trình nuôi cấy.

- Dụng cụ kim loại, giấy nhôm,..cần được khử trùng bằng không khí nóng (130° - 180°) trong vòng 2 – 4 giờ trong tủ sấy. Tất cả các vật dụng này phải được gói kín trước khi khử trùng nhưng không được gói bằng giấy vì giấy sẽ phân rã ở nhiệt độ 170°C

2.5.3. Khử trùng môi trường nuôi cấy.

- Để khử trùng môi trường nuôi cấy thường sử dụng hai phương pháp: hấp triệt trùng và lọc bằng màng lọc vô trùng.

- Môi trường nuôi cấy, nước cất và các hoá chất ổn định khác có thể chứa trong bình thuỷ tinh và đậy bằng nút bông gòn không thấm nước, giấy nhôm hoặc nắp nhựa để hấp triệt trùng. Tuy nhiên, môi trường có các chất không bền với nhiệt thì cần sử dụng phin lọc milipore (lọc vô trùng). Thông dụng nhất là môi trường nuôi cấy được hấp triệt trùng ở 121°C , 1atm.

- Môi trường có thể tích nhỏ (100ml hoặc ít hơn) thì thời gian khử trùng là từ 15 – 20 phút nhưng với lượng môi trường lớn hơn thì phải khử trùng trong 30 – 40 phút. Áp suất không nên lên cao quá 1,3atm vì áp suất cao sẽ làm phân huỷ carbohydrate và các hợp chất nhạy cảm (không bền) với nhiệt độ ở trong môi trường. Thể tích môi trường và thời gian khử trùng có mối tương quan được trình bày bảng 1.

Bảng 2.1. Thời gian tối thiểu để hấp khử trùng môi trường nuôi cấy mô ở 121°C

Thể tích môi trường(ml)	Thời gian khử trùng tối thiểu (phút)
20 – 25	24
50	26
100	28.5
250	31.5
500	35
1.000	40
2.000	48
3.000	55
4.000	63

2.5.4. Khử trùng mẫu cấy thực vật

Về mặt nguyên tắc, các tế bào còn sống đã phân hoá đều có khả năng phản phân hoá để trở lại trạng thái trẻ hoá và tái lập khả năng phân chia. Các mô thực vật thường được sử dụng để nuôi cấy là:

- Đỉnh sinh trưởng thân hoặc rễ.
- Chồi bên.
- Tượng tầng.
- Vảy củ như ở cây Tulip, lys, lyly....
- Chồi ngọn.
- Nhu mô lá hoặc nhu mô vỏ thân.
- Chồi nảy từ củ (khoai tây, khoai lang,...)

- Khử trùng mẫu cấy là việc làm khó vì mẫu sống không thể khử trùng bằng nhiệt độ cao. Do đó, mẫu cấy hoặc mô cấy hoặc cơ quan thực vật phải được khử trùng bằng các dung dịch khử trùng.

- Các dung dịch khử trùng thường là hypochlorite calcium, chlorua thủy ngân,... Tỷ lệ vô trùng thành công phụ thuộc vào thời gian khử trùng và nồng độ các chất khử trùng. Thời gian và nồng độ khử trùng của một số chất khử trùng được thể hiện qua bảng 2.2

Bảng 2.2. Các chất khử trùng- thời gian thường sử dụng để khử trùng mẫu cấy.

Chất khử trùng	Nồng độ khử trùng	Thời gian khử trùng (phút)
Hypochlorite calcium	9 – 10%	5 – 30
Hypochlorite sodium	0.5 – 5.0%	5 – 30
Oxy già	3.0 – 12%	5 – 30
Chlorua thủy ngân	0.1 – 1.0%	2 – 30
Nước bromine	1.0 – 2.0%	2 – 30
Nitrate bạc	0.5 – 1.0%	5 – 30
Kháng sinh	4.0 – 50mg/l	30 – 60

Việc xử lý thành công nguồn gây nhiễm phần lớn là phụ thuộc vào kỹ thuật xử lý trong nuôi cấy vô trùng. Các nguồn gây nhiễm là bụi, tóc, tay, quần áo vì vậy trong khi cấy phải chú ý rửa tay, lau bằng cồn 70⁰ tới khuỷu tay, tay áo phải được xắn lên cao, kẹp gọn tóc,... không nói chuyện hoặc nhảy mũi trong khi đang cấy. Không đưa vào tủ cấy các bình cấy đã bị nhiễm vì bào tử dễ phát tán trong tủ cấy.

NỘI DUNG GHI NHỚ BÀI 2

1. Một phòng thí nghiệm nuôi cấy mô tế bào thường bao gồm các phòng cơ bản sau:

- Phòng rửa dụng cụ
- Phòng chuẩn bị môi trường, hấp triệt trùng và chứa dụng cụ.
- Phòng cấy vô trùng.
- Phòng nuôi mẫu cây có điều kiện nhiệt độ, ánh sáng có thể điều chỉnh phù hợp với mẫu cây.
- Phòng quan sát và thu nhận số liệu.

2. Phòng cấy vô trùng:

- Phòng cấy vô trùng nên thiết kế là một phòng nhỏ và kín. Sàn và tường cần được lát gạch men hoặc sơn nước để dễ vệ sinh và khử trùng thường xuyên.
- Cửa phòng cấy nên là cửa kính để tạo ánh sáng tốt, dễ dàng vệ sinh và tiện liên lạc với bên ngoài trong những lúc cần thiết.
- Trên trần phòng cấy vô trùng phải có gắn đèn cực tím (đèn UV) để khử trùng phòng. Nên thiết kế cửa phòng cấy vô trùng là cửa kéo

3. Phòng nuôi mẫu cây :

- Tất cả các mẫu cây đều được nuôi trong điều kiện nhiệt độ, ánh sáng, độ ẩm, thời gian chiếu sáng, thông không khí hợp lý. Phòng nuôi mẫu cây phải có gắn quạt thông gió. Nền – tường phải lát gạch men để tiện cho công tác vệ sinh phòng.
- Phòng nuôi mẫu cây phải có các giàn nuôi bằng sắt hay nhôm và trên giàn nuôi cần phải gắn hệ thống ánh sáng đèn huỳnh quang và có thể điều chỉnh được cường độ và thời gian chiếu sáng.

Bên cạnh phòng thí nghiệm phải có hệ thống nhà kính, vườn ươm để trồng cây nguyên liệu nuôi cấy và cây tái sinh trong ống nghiệm.

CÂU HỎI ÔN TẬP

1. Trình bày các điều kiện vật lý – hóa học trong nuôi cấy mô thực vật
2. Trình bày các thao tác cơ bản trong phòng thí nghiệm nuôi cấy mô thực vật
3. Bài tập: Sử dụng các máy móc thiết bị trong phòng thí nghiệm nuôi cấy mô thực vật

BÀI 3: MÔI TRƯỜNG NUÔI CÂY VÀ PHƯƠNG PHÁP PHA CHẾ MÔI TRƯỜNG NUÔI CÂY

MÃ BÀI : MD 23 - 03

Giới thiệu: Thành phần có trong môi trường nuôi cấy mô tế bào đóng vai trò lớn quyết định sự thành công trong quá trình nuôi cấy mô. Bài học trình bày về thành phần môi trường nuôi cấy mô tế bào và phương pháp pha chế môi trường nuôi cấy

Mục tiêu

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

- Trình bày được môi trường nuôi mô tế bào thực vật bao gồm những thành phần nào.
- Xác định được một số môi trường nuôi cấy cơ bản và có thể liên hệ - vận dụng các cách chọn lựa môi trường nuôi cấy trên từng đối tượng cây trồng thích hợp.
- Phân tích được trình tự các bước trong phương pháp pha chế môi trường nuôi cấy.

Nội dung

1. Thành phần môi trường nuôi cấy.

Thành phần môi trường nuôi cấy tế bào và mô thực vật thay đổi tùy theo loài, bộ phận nuôi cấy, mục đích nuôi cấy và nhiều yếu tố khác. Tuy vậy, tất cả các môi trường nuôi cấy bao giờ cũng gồm 5 thành phần chính sau:

- Các muối khoáng đa lượng.
- Các muối khoáng vi lượng.
- Các vitamine.
- Đường làm nguồn carbon.
- Các chất điều hoà sinh trưởng thực vật.

Ngoài ra, người ta còn thường thêm vào môi trường nuôi cấy một số chất hữu cơ thành phần hoá học xác định (amino acid, EDTA,...) hoặc không xác định (nước dừa, nước chiết nấm men, khoai tây,...)

1.1. Các muối khoáng đa lượng.

Nhu cầu muối khoáng của mô, tế bào tách rời không khác nhiều so với cây trồng trong điều kiện tự nhiên. Các nguyên tố đa lượng cần phải cung cấp nitơ(nitrogen), phospho(phosphorus), kali(potassium), magiê(mangiesium), sắt.

1.1.1. Nguồn Nitơ:

- Mô tế bào thực vật trong nuôi cấy có thể sử dụng các dạng nitơ khoáng như amôn và nitrat, đồng thời cũng có thể sử dụng các dạng nitơ hữu cơ như amino acid. Tỷ lệ amôn và nitrat thay đổi tùy theo loại cây và trạng thái phát triển của mô.

+ Nitrat được cung cấp dưới dạng muối canxi nitrat ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), Kali nitrat (NaNO_3) hoặc amôn nitrat (NH_4NO_3).

+ Amôn được cung cấp dưới dạng muối amôn sulphate $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ hoặc amôn nitrate (NH_4NO_3).

- Tổng nồng độ của NO_3^- và NH_4^+ trong môi trường nuôi cấy thay đổi tùy thuộc đối tượng nghiên cứu và mục đích nghiên cứu.

1.1.2. Nguồn phospho:

- Nồng độ của phospho hoà tan cao trong môi trường nuôi cấy sẽ làm giảm sự tăng trưởng của mô, có thể là do canxi và một số nguyên tố vi lượng bị kết tủa trong môi trường hoặc bị giảm hấp thu vào mô.

- Hai dạng phosphor thường dùng nhất là $\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ và KH_2PO_4 . Nồng độ phosphor trong môi trường thường biến thiên từ 0,15 đến 4,0mM, thường dùng khoảng 1,0mM.

1.2.3. Nguồn Kali.

K^+ là một cation chủ yếu trong cây, giúp cho cây cân bằng các anion vô cơ và hữu cơ. Sự thiếu hụt K^+ trong môi trường nuôi cấy mô thực vật sẽ dẫn đến tình trạng thừa nước (Pasqualetto và cộng sự, 1988) và làm giảm tốc độ hấp thu phosphate (Chin và Miller, 1982)

Các dạng muối thường dùng để cung cấp kali là kali nitrat (KNO_3), kali chlorua (KCl), Kali phosphate (KH_2PO_4).

1.2.4. Nguồn Can xi

- Canxi có vai trò trong việc phát sinh hình thái của mô cấy.

- Canxi được cung cấp dưới dạng muối canxi nitrat ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), canxi chlorua ($\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) hoặc $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

1.2.5. Nguồn Magiê

Magiê được cung cấp dưới dạng magiê sulphate $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ với nồng độ trong môi trường khoảng 0,5 đến 3,0 mM.

1.2.6. Nguồn Sắt.

Những môi trường cổ điển thường dùng sắt dưới dạng chlorua FeCl_2 , $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, sulphate sắt $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{Fe}_2(\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6)$.

- Hiện nay, sắt dạng Chelat kết hợp với Na_2 – Ethylen Diamine Tetra Acetate (Na_2 -EDTA) được sử dụng thông dụng nhất. Ở dạng này sắt không bị kết tủa và giải phóng từ từ ra môi trường theo nhu cầu của mô thực vật.

1.2. Các muối khoáng vi lượng.

Rất ít các nguyên tố vi lượng đã được chứng minh là không thể thiếu được đối với sự phát triển của mô và tế bào.

Sau này là một số khoáng vi lượng thông dụng và ngưỡng cung cấp:

Bảng 3.1. Các khoáng vi lượng thông dụng:

Tên khoáng vi lượng	Dạng sử dụng	Nồng độ micromol
Mangan (Mn)	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	15 -100
Bo (B)	H_3BO_3	06 - 100
Kẽm (Zn)	$\text{Zn SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	30 - 150
Đồng (Cu)	$\text{Cu SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.04 – 0.08
Molypden (Mo)	$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.007 – 1.0
Coban (Co)	CoCl_2	0.1 – 0.4
Iốt (I)	KI	2.5 – 20.0

1.3. Các vitamine

- Thực vật cần vitamine để xúc tác các quá trình biến dưỡng khác nhau.

- Các vitamine thường được sử dụng nhiều nhất trong nuôi cấy mô tế bào thực vật là vitamine nhóm B mà quan trọng nhất là vitamine B1 (Thiamine HCl). B1 là một vitamine căn bản cần thiết cho sự tăng trưởng của tất cả các tế bào.

- Các vitamine được sử dụng thông dụng trong môi trường nuôi cấy tế bào thực vật được giới thiệu trong Bảng 3.2.

Bảng 3.2. Các vitamine sử dụng thông dụng trong môi trường nuôi cấy mô.

Tên vitamine	Nồng độ sử dụng (mg/l)
Myo – inozitol	100
Glycine	0,5 – 5.0
Acid nicotinic (Niacin, vitamine PP)	0,5 – 1.0
Pyridoxine HCl (vitamine B ₆)	0.05 – 0.5
Thiamine HCl (vitamine B ₁)	10 – 50
Panthotenat canxi	1.0 – 5.0
Riboflavine (vitamine B ₂)	1.0 – 5.0
Biotine	0.1 – 1.0
Acid folic	0.1 – 1.0

1.4. Đường làm nguồn carbon.

Mô hoặc tế bào khi nuôi cấy trong ống nghiệm thì quá trình quang hợp phần nào bị hạn chế chính vì vậy mà trong môi trường nuôi cấy cần phải bổ sung nguồn carbon nhằm giúp mô, tế bào thực vật tổng hợp nên các hợp chất hữu cơ giúp tế bào phân chia, tăng sinh khối.

Bảng 3.3. Các chất điều hoà sinh trưởng thực vật thường dùng trong nuôi cấy mô.

Tên chất điều hoà sinh trưởng	Tên viết tắt	Nồng độ micromol
- Indole – 3 – acetic acid	IAA	5.0 – 20.0
- Naphthaleneacetic acid	NAA	0.1 – 5.0
- 2,4 – Dichlorophenoxyacetic acid	2,4 – D	0.2 – 5.0
- Indole – 3 - butyric acid	IBA	1.0 – 5.0
- Gibberellic acid	GA ₃	0.1 – 2.0
- 6 – Furfurylamino purine	Kinetine	0.1 – 2.0
- 6 – Benzyl – aminopurine	BA	0.1 – 2.0
- Trans – 6 – (4 hydroxyl – 3 – methylbut – 2 – enyl) amino purine	Zeatine	1.0 – 5.0
- Thidiazuron	TDZ	0.1 - 2.0

Hai dạng đường thường gặp nhất trong nuôi cấy *in vitro* là glucose và sucrose, nhưng hiện nay sucrose được sử dụng phổ biến hơn.

Tuỳ theo mục đích nuôi cấy, nồng độ sucrose biến đổi trong môi trường nuôi cấy từ 2% - 6% và thông dụng nhất là 3%.

1.5. Các chất điều hoà sinh trưởng thực vật

Chất điều hoà sinh trưởng thực vật có một vai trò rất quan trọng trong quá trình nuôi cấy tế bào thực vật. Chúng giúp cho việc nuôi cấy theo mục đích tăng trưởng hay ức chế tế bào với các liều lượng sử dụng rất nhỏ từ 0.01 mg/l đến 10mg/l. Các chất điều hoà sinh trưởng thực vật được sử dụng thông dụng nhất trong nuôi cấy mô tế bào được giới thiệu ở Bảng 3.3.

1.6. Các chất hữu cơ khác:

1.6.1. Nước dừa:

Trong nước dừa có một lượng lớn Myo – inozitol và còn có một số amino acid vì vậy nó có tác dụng kích thích mô tế bào sinh trưởng - phát triển rất tốt.

Lượng nước dừa dùng trong môi trường nuôi cấy thường khá lớn, từ 15 đến 20% thể tích môi trường. Nên sử dụng nước dừa tươi là tốt nhất.

1.6.2. Nước chiết nấm men:

Là các chế phẩm thường được dùng nhiều trong nuôi cấy vi sinh vật, mô tế bào động vật. Thành phần hoá không rõ, trừ một số amino acid. Lượng thường dùng là 1g/1l môi trường.

1.6.3. Than hoạt tính:

Bổ sung than hoạt tính vào môi trường nuôi cấy sẽ có tác dụng khử độc đặc biệt là các chất phenol. Lượng than hoạt tính sử dụng trong môi trường nuôi cấy từ 0.5 đến 3%.

1.6.4. Yếu tố làm đặc môi trường nuôi cấy.

Agar là chất thường được sử dụng thông dụng nhất để tạo môi trường đặc hay môi trường bán lỏng để nuôi cấy mô thực vật.

Agar không phản ứng với các chất trong môi trường nuôi cấy. Nồng độ agar thường sử dụng trong môi trường nuôi cấy thường dao động từ 0.5 đến 10% tuỳ theo mục đích nuôi cấy.

2. Một số môi trường nuôi cấy cơ bản và cách chọn lựa môi trường nuôi cấy.

2.1. Một số môi trường nuôi cấy cơ bản.

Tên hoá chất	TÊN MÔI TRƯỜNG						
	Murashi ge et Skoog	Gambor g	Gauther et	Helle r	Kno p	Monnie r	Whil e
Khoáng đa lượng	Miligam/lít						
NH_4NO_3	1650	-	-	-	-	825	-
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	-	134	-	-	-	-	-
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440	150	-	75	-	880	-
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	-	-	500	-	1000	-	300
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370	250	125	250	250	370	720
KCl	-	-	-	750	-	350	65
KNO_3	1900	2500	125	-	250	1900	80
KH_2PO_4	170	-	125	-	250	170	-
NaNO_3	-	-	-	600	-	-	-
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	-	150	-	125	-	-	16.5
Na_2SO_4	-	-	-	-	-	-	200
Khoáng vi lượng	Miligam/lít						
AlCl_3	-	-	-	0.03	-	-	-
BeSO_4	-	-	0.1	-	-	-	-
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025	0.025	0.05	-	-	0.05	-
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025	0.025	0.05	0.03	0.02	0.05	-

					5		
FeCl ₃ .6H ₂ O	-	-	-	1.0	-	-	-
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.85	27.85	-	-	-	14.9	-
Na ₂ – EDTA	37.25	37.25	-	-	-	11.1	-
Fe ₂ (SO ₄) ₃	-	-	5.0	-	-	-	2.5
MnSO ₄ .4H ₂ O	22.3	10.0	3.0	0.1	3.0	33.6	7.0
NiCl ₂ .6H ₂ O	-	-	-	0.03	-	-	-
NiSO ₄	-	-	0.05	-	-	-	-
KI	0.83	0.75	0.5	0.01	0.5	1.66	0.75
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25	0.25	-	-	0.02 5	0.5	-
Ti(SO ₄) ₃	-	-	0.2	-	-	-	-
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6	2.0	0.18	-	0.5	21	3.0
H ₃ BO ₃	6.2	3.0	0.05	1.0	0.5	12.4	1.5
Fe – citrate	-	-	-	1.0	10.0	-	-
Vitamine	Miligam/lít						
Thiamine HCl	0.1	10		1.0			0.5
Nicotinic acid	0.5	1.0					0.1
Piridoxine HCl	0.5	1.0					0.1
Glycine	2.0	-					3.0
Folic acid	-	-					-
Myo – Inositol	100	-					-
Đường	30	20					20

2.2. Cách chọn lựa môi trường nuôi cấy.

Khi bắt đầu công tác nuôi cấy mô tế bào thực vật đối với một số đối tượng nhất định thì vấn đề khó khăn đặt ra là chọn môi trường nào thích hợp và trên cơ sở nào để phối hợp các tỷ lệ chất dinh dưỡng. Có hai cách :

2.2.1. Cách 1:

Có thể tham khảo tài liệu, sách báo, các công trình khoa học,...để từ đó làm cơ sở để thí nghiệm thăm dò.

2.2.2. Cách 2:

Bám sát vào sự phân loại môi trường nuôi cấy dựa vào thành phần dinh dưỡng:

- + Môi trường nghèo dinh dưỡng: White, Knop.
- + Môi trường có hàm lượng chất dinh dưỡng trung bình: B5 (Gamborg)
- + Môi trường giàu dinh dưỡng: MS (Murashige - Skoog)

Vì vậy, khi bắt đầu nuôi cấy mô một số đối tượng cây trồng mới mà chưa có tài liệu trước thì nên thăm dò so sánh ba loại môi trường trên để xem đối tượng nghiên cứu thích hợp với loại môi trường nào nhất.

Sau khi tìm thấy môi trường thích hợp chúng ta có thể từng bước cải tiến để tự tìm cho mình môi trường thích hợp nhất cho mục đích, đối tượng và nội dung nghiên cứu.

Ví dụ, chúng ta có thể tìm tỷ lệ $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ cho từng đối tượng. Với các cây trồng trên cạn người ta thường không dùng NH_4^+ nhưng đối với một số cây khác có khả năng hấp thu mạnh NH_4^+ như cây Lựu thì sử dụng ion này trong môi trường nuôi cấy chắc chắn sẽ đem lại kết quả tốt.

Hiện nay, môi trường MS được coi như là một môi trường thích hợp cho nhiều loại cây trồng do giàu và cân bằng về chất dinh dưỡng. Vì vậy, những người tập sự nuôi cấy mô thường bắt đầu bằng môi trường này trước khi tìm ra môi trường thích hợp cho đối tượng nuôi cấy của mình.

3. Phương pháp pha chế môi trường.

Chọn lựa được thành phần dinh dưỡng và các chất điều hoà sinh trưởng thực vật cho một đối tượng nuôi cấy là rất quan trọng nhưng để có kết quả chính xác thì cần phải có một phương pháp pha môi trường chính xác và hợp lý.

3.1. Thành phần và phương pháp bảo quản các dung dịch mẹ.

- Việc pha chế môi trường nuôi cấy đòi hỏi phải có dụng cụ thuỷ tinh sạch, nước có chất lượng cao, hoá chất tinh khiết, cân đong cẩn thận tất cả các thành phần của môi trường.

- Môi trường nuôi cấy phải gồm có khoáng đa lượng, vi lượng, nguồn carbon, vitamine, agar, chất ĐHST và một số chất phụ gia khác.

3.1.1. Mục đích và yêu cầu của việc pha chế dung dịch mẹ.

- Việc sử dụng dung dịch mẹ giúp làm giảm sự lặp lại các thao tác trong lúc pha môi trường. Mặt khác giúp cho quá trình cân đong dễ dàng và chính xác hơn.

- Các dung dịch mẹ cần phải ghi nhãn cụ thể, ngày pha, ngày hết hạn sử dụng và tên người pha.

3.1.2. Thành phần và phương pháp bảo quản các dung dịch mẹ.

3.1.2.1. Các khoáng đa lượng.

- Thành phần: (Đối với môi trường MS)

STT	Tên hoá chất	Nồng độ chuẩn (mg/l)	Nồng độ (ml/l) pha đậm đặc 20 lần trong 1000ml nước	Số ml sử dụng cho 1 lít môi trường làm việc
I	STOCK I hay MS1			
1	NH ₄ NO ₃	1650	33.000	50 ml
2	KNO ₃	1900	38.000	50 ml
3	MgSO ₄ .7H ₂ O	370	7.400	50 ml
4	KH ₂ PO ₄	170	3.400	50 ml
II	STOCK II hay MS2			
1	CaCl ₂ .2H ₂ O	440	8.400	50 ml

- Phương pháp bảo quản:

+ Dung dịch mẹ của khoáng đa lượng nên pha với nồng độ gấp 20 lần dung dịch chuẩn. Nên pha riêng dung dịch mẹ của muối canxi để tránh kết tủa.

+ Dung dịch mẹ khoáng đa lượng bảo quản tốt nhất trong điều kiện lạnh, từ 2 - 4⁰C.

3.1.2.1. Các khoáng vi lượng.

Thành phần: (Đối với môi trường MS)

Phương pháp bảo quản: Dung dịch mẹ các khoáng vi lượng nên pha với nồng độ gấp 200 lần dung dịch chuẩn và được cất trữ trong tủ lạnh là tốt nhất. Các khoáng vi lượng được chia thành bốn nhóm để pha dung dịch mẹ.

STT	Tên hoá chất	Nồng độ chuẩn (mg/l)	Nồng độ (ml/l) pha đậm đặc 200 lần trong 1000ml nước	Số ml sử dụng cho 1 lít môi trường làm việc
I	STOCK III hay MS 3			
1	MnSO ₄ .4H ₂ O	22.3	4460	5 ml
2	ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6	1720	5 ml
3	H ₃ BO ₃	6.2	1240	5 ml
II	STOCK IV hay MS 4			
1	KI	0.83	166	5 ml
2	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25	50	5 ml
III	STOCK V hay MS 5			
1	FeSO ₄ .7H ₂ O	27.85	5570	5 ml
2	Na ₂ – EDTA	37.25	7450	5 ml
IV	STOCK VI hay MS 6 (Pha đậm đặc 1000 lần trong 1000ml nước)			
1	CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025	25	1 ml
2	CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025	25	1 ml

3.1.2.3. Các Vitamine

Phương pháp bảo quản: Vitamine được pha với nồng độ gấp 200 hoặc 1000 lần so với dung dịch chuẩn và cất trữ trong điều kiện lạnh sâu hơn so với các dung dịch mẹ khác. Bởi vì dung dịch mẹ của các vitamine dễ bị nhiễm nấm, tạp khuẩn vì vậy nhất thiết phải lưu giữ ở nhiệt độ dưới 0⁰C.

Thành phần: (Đối với môi trường MS)

STT	Tên hoá chất	Nồng độ chuẩn (mg/l)	Nồng độ (ml/l) pha đậm đặc 20 lần trong 1000ml nước	Số ml sử dụng cho 1 lít môi trường làm việc
I	STOCK VII hay MS 7			
1	Myo – Inositol	100	20.000	5 ml
II	STOCK VII hay MS 8			
1	Glycine	2.0	400	5ml
2	Thiamine HCl	0.1	20	5ml
3	Nicotinic acid	0.5	100	5ml
4	Piridoxine HCl	0.5	100	5ml

3.1.2.4. Các chất điều hoà sinh trưởng.

Thông thường người ta pha các dung dịch mẹ chất điều hoà sinh trưởng có nồng độ cao gấp 1000 lần dung dịch làm việc. Do một số chất điều hoà sinh trưởng có thể tan trong nước và một số khác lại không tan trong nước mà tan trong dung môi.

Chẳng hạn các dung dịch mẹ nhóm auxin thường được chuẩn bị bằng cách cân 100mg auxin (NAA, IAA, IBA, 2,4 - D) cho vào cốc đong, sau đó thêm vài giọt NaOH hoặc KOH 1N cho đến khi các tinh thể tan hoàn toàn. Tiếp theo nhanh chóng thêm vào cốc đong 90ml nước cất hai lần, sau đó tiếp tục dùng nước cất để chỉnh dung dịch về đúng vạch 100ml. Ngoài ra, người ta có thể sử dụng cồn 98^o để làm dung môi hoà tan cho nhóm auxin nêu trên.

Tương tự như vậy các chất ĐHST khác như GA₃ và cytokynine cũng pha tương tự nhưng đối với các chất ĐHST nhóm auxin nhưng sử dụng HCL 1N thay thế cho NaOH 1N và cần thêm vài giọt nước cất vào cốc đong trước khi cho các chất ĐHST vào.

Bảo quản các dung dịch mẹ chất ĐHST trong lọ kín (riêng IAA bảo quản trong lọ màu nâu) và lưu giữ trong tủ lạnh. Trong số các chất ĐHST thì IAA và

GA₃ là không bền vững trong quá trình hấp vô trùng bởi không bền vững trong điều kiện nhiệt độ cao.

Chú ý: Các chất ĐHST có thể tác động lên mô nuôi cấy ở nồng độ rất thấp vì vậy cần dùng pipet riêng cho từng loại chất ĐHST

3. 2. Phương pháp pha chế dung dịch làm việc

3.2.1. Bước 1:

Sử dụng các dung dịch mẹ đậm đặc (stock) và dụng cụ pha chế để pha chế môi trường làm việc. Sử dụng các dung dịch làm việc để đưa mô nuôi cấy vào môi trường. Trước hết lấy ống đong 1 lít cho vào :

- + 800 ml nước cất và sau đó lần lượt hút:
- + 50 ml của Stock I hay dung dịch mẹ MS1
- + 50 ml của Stock II hay dung dịch mẹ MS 2
- + 5 ml của Stock III hay dung dịch mẹ MS 3
- + 5 ml của Stock IV hay dung dịch mẹ MS 4
- + 5 ml của Stock V hay dung dịch mẹ MS 5
- + 1 ml của Stock VI hay dung dịch mẹ MS 6
- + 5 ml của Stock VII hay dung dịch mẹ MS 7
- + 5 ml của Stock VIII hay dung dịch mẹ MS 8

Tổng thể tích sau khi cho các dung dịch mẹ và nước vào ống đong là: 926 ml và sau đó bổ sung nước vào cho đủ 1000ml (1lít).

3.2.2. Bước 2: Chuẩn độ giá trị pH của môi trường. pH thích hợp cho nuôi cấy in vitro là 5,6 – 5,8. Nếu:

- pH chưa sử dụng dung dịch NaOH 1N (0,1N) để điều chỉnh.
- pH kiềm sử dụng dung dịch HCl 1N (0,1N) để điều chỉnh.

Lưu ý: Nếu chuẩn độ giá trị pH không chính xác thì môi trường sẽ không đồng. Ngoài ra, môi trường không đồng có thể do:

- Ống nghiệm và bình nuôi cấy sử dụng không sạch
- Agar không đạt chất lượng.
- Thời gian khử trùng không chính xác.

3.2.3. Bước 3

Cân 30g đường và 6 – 8g agar trộn lại, đun sôi cho đến lúc agar tan ra. Tiếp theo chia dung dịch đun sôi đó sang bình tam giác, ống nghiệm hay túi nilon. Thể tích môi trường chiết ra các bình nuôi cấy là tùy thuộc vào nhu cầu và mục đích nuôi cấy

3.2.4. Bước 4.

Cuối cùng là cho các bình nuôi cấy đã có môi trường vào nồi hấp triệt trùng (autoclave) để khử trùng, với nhiệt độ 121°C , 1atm trong thời gian từ 30 – 40 phút.

NỘI DUNG GHI NHỚ BÀI 3

Thành phần môi trường nuôi cấy tế bào và mô thực vật thay đổi tùy theo loài, bộ phận nuôi cấy, mục đích nuôi cấy và nhiều yếu tố khác. Tuy vậy, tất cả các môi trường nuôi cấy bao giờ cũng gồm 5 thành phần chính sau:

- Các muối khoáng đa lượng.
- Các muối khoáng vi lượng.
- Các vitamine.
- Đường làm nguồn carbon.
- Các chất điều hoà sinh trưởng thực vật.

- Ngoài ra, người ta còn thường thêm vào môi trường nuôi cấy một số chất hữu cơ thành phần hoá học xác định (amino acid, EDTA,...) hoặc không xác định (nước dừa, nước chiết nấm men, khoai tây,...)

Khi bắt đầu công tác nuôi cấy mô tế bào thực vật đối với một số đối tượng nhất định thì vấn đề khó khăn đặt ra là chọn môi trường nào thích hợp và trên cơ sở nào để phối hợp các tỷ lệ chất dinh dưỡng

Việc pha chế môi trường nuôi cấy đòi hỏi phải có dụng cụ thủy tinh sạch, nước có chất lượng cao, hoá chất tinh khiết, cân đong cẩn thận tất cả các thành phần của môi trường. Môi trường nuôi cấy phải gồm có khoáng đa lượng, vi lượng, nguồn carbon, vitamine, agar, chất ĐHST và một số chất phụ gia khác.

Bảo quản các dung dịch mẹ chất ĐHST trong lọ kín (riêng IAA bảo quản trong lọ màu nâu) và lưu giữ trong tủ lạnh. Trong số các chất ĐHST thì IAA và GA₃ là không bền vững trong quá trình hấp vô trùng bởi không bền vững trong điều kiện nhiệt độ cao

Thông thường người ta pha các dung dịch mẹ chất điều hoà sinh trưởng có nồng độ cao gấp 1000 lần dung dịch làm việc. Do một số chất điều hoà sinh trưởng có thể tan trong nước và một số khác lại không tan trong nước mà tan trong dung môi.

CÂU HỎI ÔN TẬP

1. Trình bày các thành phần môi trường nuôi cấy mô tế bào ?
2. Trình bày phương pháp pha chế môi trường.
3. Bài tập TH: Pha chế một số môi trường nuôi cấy cơ bản và cách chọn lựa môi trường nuôi cấy.

BÀI 4. CÁC GIAI ĐOẠN CHÍNH CỦA KỸ THUẬT NHÂN GIỐNG INVITRO. MÃ BÀI : MĐ 23 - 04

Giới thiệu: Bài học giới thiệu, đi sâu về các giai đoạn chính trong quy trình nhân giống bằng kỹ thuật nuôi cấy mô tế bào thực vật

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

- Hiểu và nắm vững các giai đoạn chính trong quy trình nhân giống bằng kỹ thuật nuôi cấy mô tế bào thực vật.
- Biết và nhận định được trong giai đoạn chuẩn bị vật liệu nuôi cấy ban đầu thì đòi hỏi những yêu cầu nào để có nguồn mẫu ban đầu thích hợp.
- Hiểu và vận dụng được các thao tác cơ bản trong giai đoạn xử lý vô trùng mẫu. Các yêu cầu cơ bản trong xử lý mẫu cây là gì?
- Hiểu và giải thích được vì sao trong quy trình nhân giống in vitro cần phải trải qua giai đoạn tăng sinh khối mô nuôi cấy.
- Hiểu và giải thích được sự ra rễ trong ống nghiệm để tạo cây hoàn chỉnh và sự ra rễ này chịu ảnh hưởng của những điều kiện nào.
- Hiểu và giải thích được mối liên quan giữa cây ở điều kiện in vitro và cây ở điều kiện ex vitro. Các điều kiện cần thiết khi đưa cây từ trong ống nghiệm ra vườn ươm là gì.

Nội dung

1. Chuẩn bị vật liệu nuôi cấy ban đầu (cây mẹ)

Khi chọn cây mẹ phải chú ý xác định đúng cây cần nhân giống và các yêu cầu khác:

- Cây mẹ phải sạch bệnh virus
- Cây mẹ phải được trồng trong nhà kính cách ly.
- Cây mẹ phải có sức sinh trưởng và phát triển tốt.

2. Khử trùng mẫu cây.

Hầu hết các mô hay cơ quan thực vật đều có thể sử dụng để nuôi cấy nhưng mức độ thành công phụ thuộc vào các yếu tố sau:

- + Hệ thống môi trường sử dụng.

- + Loài thực vật được nuôi cấy.
- + Kỹ thuật khử trùng.

Quá trình khử trùng mẫu cấy thành công là phải thỏa mãn các yêu cầu sau:

- + Tỷ lệ nhiễm thấp.
- + Tỷ lệ sống cao.
- + Tốc độ sinh trưởng mạnh.

Kết quả giai đoạn này phụ thuộc rất nhiều vào cách lấy mẫu: đỉnh sinh trưởng, chồi nách, hoa, đoạn thân, mảnh lá, rễ,... và chọn đúng phương pháp khử trùng sẽ đưa lại tỷ lệ sống cao và môi trường thích hợp sẽ đạt được tốc độ sinh trưởng nhanh.

Tiến trình khử trùng mẫu cấy:

Bước 1: Thu mẫu cấy từ cây mẹ và rửa dưới vòi nước chảy từ 30 phút đến 2 giờ

Bước 2: Rửa mẫu bằng xà phòng bột sẽ làm giảm đáng kể nguồn gây nhiễm và một số trường hợp thì phải lắc mẫu cấy trong dung dịch thuốc trừ nấm loăng.

Bước 3: Rửa mẫu lại bằng nước cất.

Bước 4: Khử trùng nhanh bề mặt mẫu cấy bằng dung dịch cồn 70⁰ trong vòng 30 giây.

Bước 5: Sau đó rửa mẫu cấy lại bằng nước cất vô trùng từ 2 – 3 lần.

Bước 6: Khử trùng mẫu cấy bằng các dung dịch khử trùng bề mặt như cồn, hypochlorite calcium, oxyl già, nitrate bạc, dung dịch bromine, chlorua thủy ngân ...với thời gian và nồng độ tối thích. Bên cạnh đó cần bổ sung thêm Tween 20 vào dung dịch khử trùng thì sẽ làm tăng hiệu quả khử trùng vì Tween 20 làm giảm sức căng bề mặt giữa nước và mô thực vật chính vì vậy bề mặt mẫu cấy tiếp xúc với chất khử trùng tốt hơn.

Bước 7: Rửa lại mẫu cấy bằng nước cất vô trùng từ 3 – 4 lần để rửa sạch các chất khử trùng còn bám trên bề mặt mẫu cấy.

Bước 8: Làm khô mẫu bằng giấy thấm và tách mẫu để nuôi cấy trên môi trường thích hợp.

* Lưu ý: Khi tách mẫu cấy để nuôi cấy thì những phần mẫu cấy bị tổn thương bởi chất khử trùng thì phải được cắt bỏ.

- Nếu như mẫu cây bị nhiễm thì sẽ dễ dàng nhận ra sau 3 đến 7 ngày kể từ khi bắt đầu nuôi cấy.

3. Tăng sinh khối mô nuôi cấy.

Ở giai đoạn này kích thích tạo cơ quan phụ hoặc cấu trúc khác mà từ đó cây hoàn chỉnh có thể phát sinh. Những khả năng tạo cây đó là:

3.1. Tạo phôi soma.

Việc tạo ra các tế bào có khả năng phát sinh phôi giúp cho việc nhân dòng thực vật một cách nhanh chóng. Trong quá trình này, một tế bào đơn có thể được cảm ứng trở thành một phôi và từ đó phát triển thành một cây nguyên vẹn.

3.2. Tăng cường phát triển chồi bên.

Chồi bên và chồi ngọn có thể được cảm ứng phát triển *in vitro* bằng cách làm tăng sự phát triển của những chồi đang hiện hữu. Một mẫu cây có mang một chồi đơn sẽ phát triển thành một chồi hay thành một cụm chồi tùy thuộc vào loài thực vật và môi trường nuôi cấy. Đây là phương pháp được áp dụng rộng rãi đối với nhiều loài thực vật.

3.3. Sự phát triển chồi bất định.

Chồi bất định và những mô có liên quan là những cấu trúc có nguồn gốc từ những vùng không phải là trục lá hoặc chồi ngọn. Chồi bất định, rễ, vi củ và các cấu trúc đặc biệt khác có thể có nguồn gốc từ thân, lá, củ, rễ.

Chồi hoặc rễ bất định có thể có nguồn gốc từ mô sẹo và mô sẹo được coi như là thể trung gian giữa mẫu cây và cây con. Số lượng cụm chồi/ mô sẹo được tăng lên qua những lần phân cắt khi cây chuyển. Cây con có thể được chuyển sang giai đoạn 4 để tạo rễ.

Lưu ý: Trong giai đoạn tăng sinh khối mô nuôi cấy, cần chú ý một số yêu cầu sau:

- + Bổ sung các chất ĐHST vào môi trường nuôi cấy theo chức năng và cần chú ý tỷ lệ auxin/cytokinin.

- + Tăng thời gian và cường độ chiếu sáng theo nhu cầu sinh lý của từng loại cây.

- + Bảo đảm nhiệt độ phòng thích hợp từ 20 – 28⁰C.

3. Sự ra rễ *in vitro* và các điều kiện ra rễ.

3.1. Sự ra rễ In Vitro.

Ở giai đoạn ra rễ *in vitro* chồi được cấy chuyển thành từ cụm, nhưng trước khi chuyển chồi sang môi trường ra rễ thì chồi phải được tách ra thành những đơn vị riêng rẽ. Tuy nhiên có một số trường hợp thì chuyển cả cụm chồi sang môi trường ra rễ thì lại tốt hơn.

Ví dụ: cây dâu tây, Layon,...

Đây là giai đoạn mà các chồi hay cụm chồi được chuyển sang môi trường cảm ứng ra rễ để trở thành cây con hoàn chỉnh. Giai đoạn này có thể kéo dài từ 2 – 6 tuần và chất ĐHST cũng như nồng độ sử dụng để kích thích ra rễ là phụ thuộc vào từng loài thực vật nhưng nhóm chất ĐHST thường được sử dụng là nhóm auxin (trừ chất 2,4-D).

Có một số đối tượng cây trồng thì có thể trực tiếp tạo rễ ngay trong điều kiện *in vitro* và một số khác thì ngược lại. Sau khi nhân chồi thì chuyển ra môi trường giá thể ẩm để kích thích tạo rễ. Phương pháp này có rất nhiều ưu điểm về mặt chất lượng rễ cũng như về mặt hiệu quả kinh tế.

3.2. Những điều kiện của sự ra rễ *in vitro*:

3.2.1. *Chất điều hòa sinh trưởng*

+ Môi trường cảm ứng ra rễ phải có hàm lượng chất cytokynine thấp nhất hoặc hoàn toàn không có vì cytokinine sẽ ức chế sự hình thành rễ.

+ Đại đa số rễ của các loài khi hình thành bắt buộc đòi hỏi trong môi trường nuôi cấy phải có sự hiện diện một trong những chất ĐHST thuộc nhóm auxin.

3.2.2. *Các khoáng đa lượng và vi lượng.*

+ Môi trường cảm ứng ra rễ thông thường thì nghèo về khoáng đa lượng, vi lượng (có thể giảm xuống $\frac{1}{2}$ hoặc $\frac{1}{4}$).

+ Các chất hữu cơ cũng rất cần thiết trong giai đoạn ra rễ *in vitro*.

3.2.3. *Đường.*

Một số loài thực vật ra rễ mạnh trong điều kiện môi trường nuôi cấy có hàm lượng đường cao hơn so với giai đoạn nhân chồi. Nhiều nhà khoa học cho rằng đường glucose thích hợp hơn cho việc ra rễ *in vitro* so với đường fructose và sucrose.

- Ánh sáng cũng cần thiết cho sự ra rễ ở một số loài thực vật và nhiệt độ kích thích ra rễ tốt nhất trong khoảng 25 đến 28°C.

4. Giai đoạn sau *in vitro* (*ex vitro*)

Trước khi đưa cây đã ra rễ *in vitro* ra điều kiện *ex vitro* cần phải trải qua giai đoạn huấn luyện thích nghi với điều kiện thay đổi nhiệt độ, độ ẩm, sự mất nước, sâu bệnh và chuyển cây từ trạng thái dị dưỡng sang tự dưỡng hoàn toàn.

Những lưu ý trong thời gian huấn luyện thích nghi hay gặp những bất lợi sau:

- + Mất nước nhanh làm cây bị héo.
- + Nhiễm vi khuẩn và nấm gây nên hiện tượng bị thối nhũn.
- + Cháy lá do nắng.

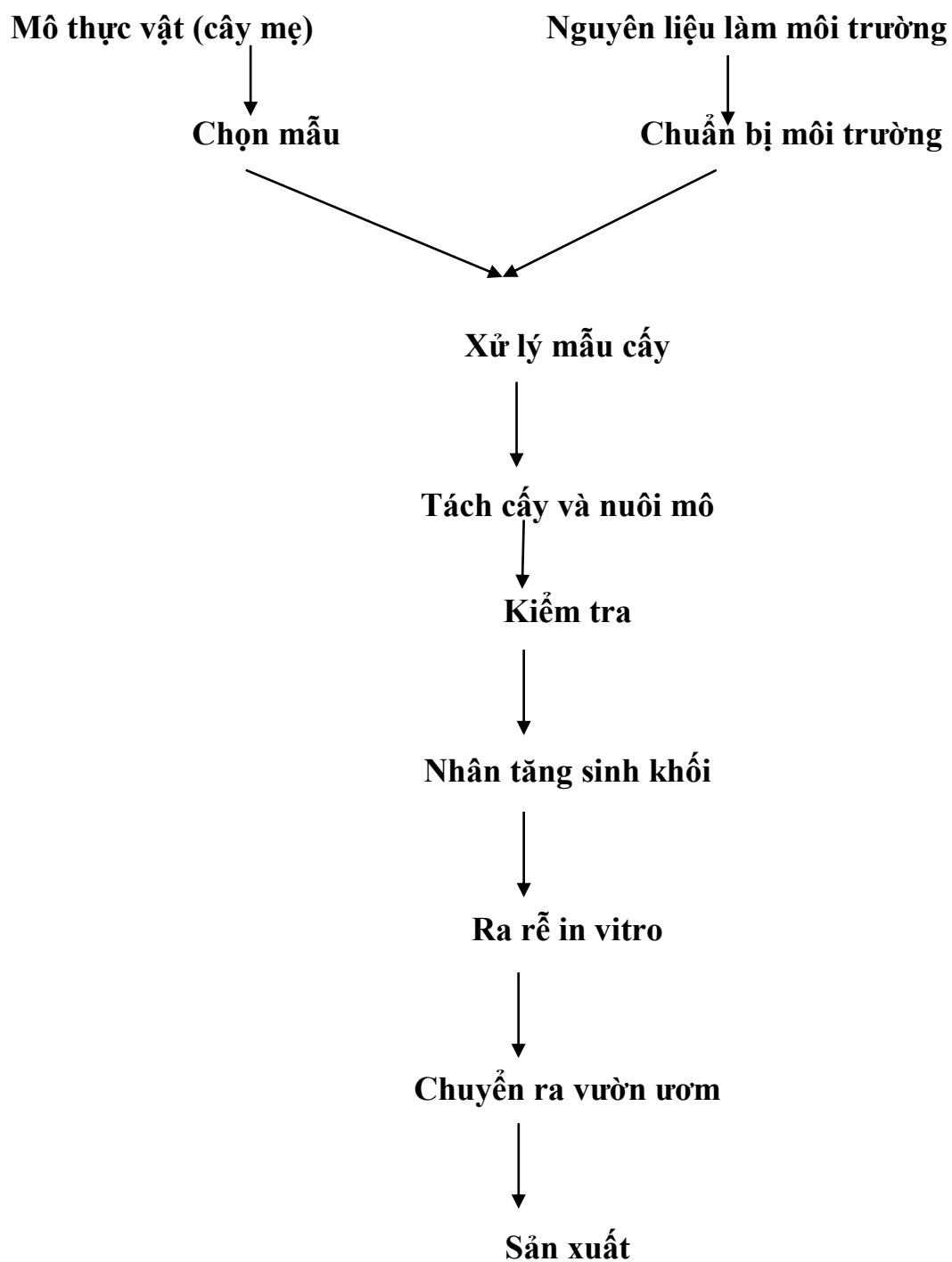
Sau khi huấn luyện, chồi hoặc cây đã có rễ được giâm vào trong một hỗn hợp giá thể ẩm nhằm giúp cho sự bén rễ hoặc ra rễ.

- + Hỗn hợp giá thể bao gồm than bùn, vỏ cây, khoáng chất, cát, đất, phân chuồng, tro trấu và có thể trộn thêm một lượng nhỏ phân bón.

- + Phần trăm của các thành phần tạo nên giá thể là tùy thuộc vào từng đối tượng cây trồng.

- + pH của giá thể thích hợp ở mức trung tính hoặc hơi acid.

Tất cả các quá trình trên có thể tóm lược qua sơ đồ sau:



Sơ đồ 4.1. Các giai đoạn của quá trình nhân giống in vitro

NỘI DUNG GHI NHỚ BÀI 4

Khi chọn cây mẹ phải chú ý xác định đúng cây cần nhân giống và các yêu cầu khác:

- Cây mẹ phải sạch bệnh virus
- Cây mẹ phải được trồng trong nhà kính cách ly.
- Cây mẹ phải có sức sinh trưởng và phát triển tốt.

Việc tạo ra các tế bào có khả năng phát sinh phôi giúp cho việc nhân dòng thực vật một cách nhanh chóng. Trong quá trình này, một tế bào đơn có thể được cảm ứng trở thành một phôi và từ đó phát triển thành một cây nguyên vẹn.

Chồi bên và chồi ngọn có thể được cảm ứng phát triển *in vitro* bằng cách làm tăng sự phát triển của những chồi đang hiện hữu. Một mẫu cấy có mang một chồi đơn sẽ phát triển thành một chồi hay thành một cụm chồi tùy thuộc vào loài thực vật và môi trường nuôi cấy. Đây là phương pháp được áp dụng rộng rãi đối với nhiều loài thực vật.

Trước khi đưa cây đã ra rễ *in vitro* ra điều kiện *ex vitro* cần phải trải qua giai đoạn huấn luyện thích nghi với điều kiện thay đổi nhiệt độ, độ ẩm, sự mất nước, sâu bệnh và chuyển cây từ trạng thái dị dưỡng sang tự dưỡng hoàn toàn.

Những lưu ý trong thời gian huấn luyện thích nghi hay gặp những bất lợi sau:

- Mất nước nhanh làm cây bị héo.
- Nhiễm vi khuẩn và nấm gây nên hiện tượng bị thối nhũn.
- Cháy lá do nắng.

Ở giai đoạn ra rễ *in vitro* chồi được cấy chuyển thành từ cụm, nhưng trước khi chuyển chồi sang môi trường ra rễ thì chồi phải được tách ra thành những đơn vị riêng rẽ. Tuy nhiên có một số trường hợp thì chuyển cả cụm chồi sang môi trường ra rễ thì lại tốt hơn.

CÂU HỎI ÔN TẬP

1. Trình bày các bước của quá trình khử trùng mẫu cấy.
2. Trình bày sự ra rễ *in vitro* và các điều kiện ra rễ của cây mô.
3. Trình bày giai đoạn sau *in vitro* (*ex vitro*) của cây mô.

BÀI 5. CÁC PHƯƠNG PHÁP NUÔI CÂY MÔ TẾ BÀO THỰC VẬT

MÃ BÀI : MD 23 - 05

Giới thiệu: Bài học giúp người học thực hiện các các phương pháp nuôi cấy mô tế bào thực vật

Mục tiêu:

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

- Hiểu và nắm vững các phương pháp cơ bản trong nuôi cấy mô tế bào thực vật là gì?

- Hiểu và xác định được đỉnh sinh trưởng là gì và phương pháp nuôi cấy đỉnh sinh trưởng có những ý nghĩa gì trong công tác giống cây trồng. Trình tự của phương pháp nuôi cấy đỉnh sinh trưởng diễn ra như thế nào.

- Hiểu và giải thích được các cơ chế để hình thành mô sẹo (callus) và phương pháp này có ý nghĩa như thế nào trong công tác chọn tạo giống cây trồng. Các điều kiện cơ bản của nuôi cấy tạo mô sẹo là gì?

- Nắm vững mục đích và phương pháp của kỹ thuật nuôi cấy, nhân giống từ lát mỏng. Ý nghĩa của phương pháp này trong công tác giống cây trồng.

- Hiểu và nắm vững trình tự của phương pháp nhân giống bằng con đường nuôi cấy đột đơn thân. Phương pháp này có những ưu khuyết điểm gì và thường được áp dụng trên những đối tượng cây trồng nào.

- Hiểu và phân tích được những ưu điểm của phương pháp nuôi cấy chồi bên so với các phương pháp khác. Nắm được trình tự của quá trình nuôi cấy chồi bên.

- Hiểu và xác định được túi phấn của cây và các bước quan trọng của quá trình nuôi cấy túi phấn. Ứng dụng thực tiễn của phương pháp này.

- Hiểu và giải thích được thế nào là tế bào trần (protoplast). Các bước tách tế bào trần và dung hợp giữa các tế bào trần. Ứng dụng thực tiễn của phương pháp này trong công tác giống cây trồng.

Nội dung

1. Phương pháp nhân giống bằng nuôi cấy đỉnh sinh trưởng

1.1. Đỉnh sinh trưởng

Mô phân sinh ngọn chứa những tế bào đỉnh sinh trưởng, được bao bọc bởi một lớp vỏ cutin để hạn chế tối đa sự mất nước.

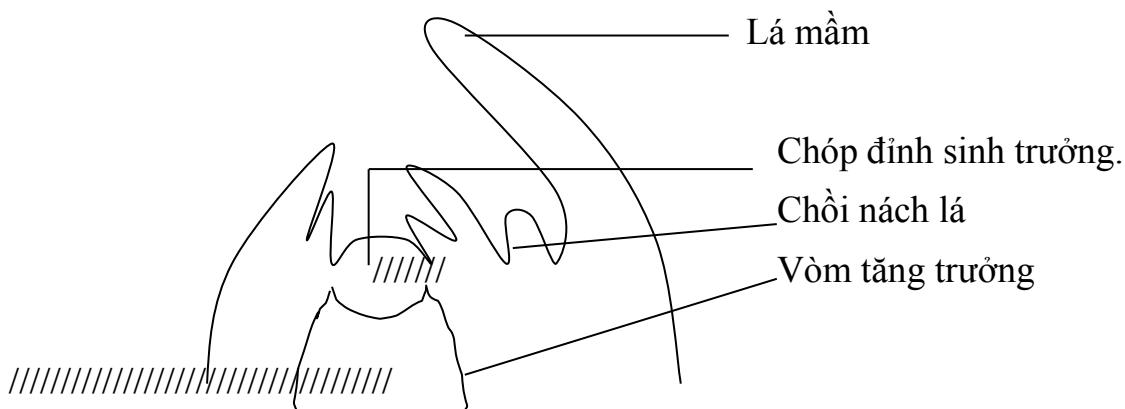
Ở thực vật, sự hình thành mới các cơ quan bắt đầu từ trong các mô phân sinh ngọn, các mô này được phân hóa ngay từ những giai đoạn phát triển đầu tiên của phôi và giữ lại trong suốt quá trình sống của cây. Điều này xảy ra là do trong mô phân sinh có sự phân hóa của các tế bào sơ khởi và tất cả các tế bào còn lại đều xuất phát từ các tế bào sơ khởi.

Quá trình sinh trưởng của đỉnh sinh trưởng được chia thành ba giai đoạn chính:

- *Giai đoạn thứ nhất*: thường được gọi là giai đoạn khởi sinh, trong các điểm sinh trưởng (trong các mô phân sinh ngọn) xảy ra sự hình thành mầm cơ quan và sự phân chia đầu tiên của nó (thành các mô riêng biệt).

- *Giai đoạn thứ hai*: là giai đoạn kéo dài do sự tăng trưởng nhanh chóng và dẫn đến các mầm cơ quan đạt đến kích thước tối đa và trở nên có hình dạng nhất định.

- *Giai đoạn thứ ba*: là giai đoạn kết thúc sự phân hóa tế bào, bắt đầu dẫn đến sự hóa gỗ các thành tế bào và kết quả là mô không còn khả năng sinh trưởng. Cụ thể như sau: trước hết các u lồi dần dần được tạo thành và được gọi là u lá. Thể tích của u lá tăng nhanh và kéo dài theo nó là một phần lớn của đỉnh sinh trưởng. Dần dần u lồi chuyển thành phác thể lá (thể nguyên thủy của lá). Phác thể lá phát triển nhanh theo chiều dài và sau khi lá được tách ra sẽ lặp lại sự phân chia tế bào như trên, kết quả là thể tích của đỉnh sinh trưởng được khôi phục lại nhanh chóng và sự hình thành lá mới lại bắt đầu.



Hình 5. 1. Đỉnh sinh trưởng.

Ở mỗi nách lá đều có chồi nách(chồi bên), chồi bên thực chất có cấu tạo không khác gì so với đỉnh sinh trưởng ở chồi ngọn.

Tại đỉnh sinh trưởng thì quá trình sinh tổng hợp ADN của virus thực vật không xảy ra do một cơ chế nào đó mà hiện nay vẫn chưa có kết quả công bố. Vì vậy, đỉnh sinh trưởng là mô duy nhất sạch virus. Do đó, đỉnh sinh trưởng được sử dụng để nuôi cấy tạo cây con sạch bệnh từ những cây mẹ nhiễm virus.

Do đỉnh sinh trưởng có kích thước nhỏ nên đỉnh sinh trưởng phải được tách lấy dưới kính hiển vi soi nổi.

1.2. Nuôi cấy đỉnh sinh trưởng

1.2.1. Các giai đoạn nuôi cấy.

Sự cấy đỉnh sinh trưởng là một kỹ thuật thâm canh trong ống nghiệm. Các giai đoạn khác nhau của sự nuôi cấy đỉnh sinh trưởng được hệ thống trong bốn giai đoạn chính sau:

- Tách và nuôi cấy đỉnh sinh trưởng.
- Cây lấy lại sự tăng trưởng và chức năng sinh trưởng bình thường của đỉnh sinh trưởng.
- Sự ra rễ in vitro của chồi non.
- Trồng cây vào chậu hay vườn ươm

1.2.1.1. Giai đoạn I: Trích lấy đỉnh sinh trưởng và nuôi cấy.

Thu thập mẫu có chứa đỉnh sinh trưởng từ các cây mẹ đã nhiễm virus.

Tiến hành khử trùng mẫu có chứa đỉnh sinh trưởng.

Tách Đỉnh sinh trưởng dưới kính hiển vi soi nổi và nuôi cấy trên môi trường thạch. Đây là một công đoạn khó bởi vì đỉnh sinh trưởng có kích thước rất bé nên chúng ta cần có các dụng cụ tách chuyên dụng.

Các mô có kích thước 1mm không được xem là đỉnh sinh trưởng mà xem như là chồi thân.

1.2.1.2. Giai đoạn II: Cây lấy lại sự tăng trưởng và chức năng của đỉnh sinh trưởng.

Trong giai đoạn này vấn đề đảm bảo vết sẹo vừa cắt ra để lấy đỉnh sinh trưởng và lấy lại sức tăng trưởng của mô phân sinh là rất quan trọng.

Ở giai đoạn này đỉnh sinh trưởng cần lấy lại chức năng phát triển bình thường của mình đó là cần có sự hiện diện của các lá nguyên thủy. Vì vậy, lựa chọn môi trường nuôi cấy thích hợp cho đỉnh sinh trưởng tái sinh sinh là rất quan trọng.

1.2.1.1. Giai đoạn 3: Ra rễ

Yếu tố tạo rễ cho cây hoặc chồi để tạo cây hoàn chỉnh và chuẩn bị đưa cây ra ngoài trồng là một yếu tố rất cần thiết và nó ảnh hưởng rất lớn đến sản phẩm nhân giống.

Một khi các điều kiện nuôi cấy không thuận lợi thì sự ra rễ của các chồi hay các cụm chồi tái sinh từ đỉnh sinh trưởng là khó khăn.

Môi trường nuôi cấy cho sự ra rễ cây tái sinh từ đỉnh sinh trưởng sẽ thuận lợi hơn khi trong môi trường nuôi cấy có bổ sung các chất ĐHST thuộc nhóm auxin.

1.2.1.1. Giai đoạn IV: Trồng cây con vào chậu hay vườn ươm.

Đây là một giai đoạn tương đối đơn giản đối với hầu hết các loại cây trồng. Cần trồng và chăm sóc đúng theo các quy trình biện pháp kỹ thuật thông dụng.

1.2.2. Môi trường nuôi cấy.

- Thành phần khoáng đa lượng, vi lượng đóng vai trò rất lớn mà đặc biệt là các chất điều hoà sinh trưởng có tính quyết định đến sự tái sinh cây của đỉnh sinh trưởng.

- Tùy theo loại đỉnh sinh trưởng mà chúng ta chọn các loại môi trường khác nhau và nồng độ của các chất điều hoà tăng trưởng cũng thay đổi theo loài, theo hiện trạng đỉnh sinh trưởng.

- Hiện nay, môi trường được sử dụng nhiều nhất để nuôi cấy đỉnh sinh trưởng là môi trường MS.

- Ngoài ra độ pH của môi trường nuôi cấy cũng là yếu tố có ảnh hưởng quyết định đến sự tái sinh của đỉnh sinh trưởng.

1.2.3. Các vấn đề về kỹ thuật.

Trong nuôi cấy đỉnh sinh trưởng để làm sạch bệnh virus thì thường gặp những khó khăn sau:

- Do đỉnh sinh trưởng có kích thước bé nên việc tách được đỉnh sinh trưởng nguyên vẹn và không bị tổn thương là rất khó.

- Môi trường nuôi cấy để tái sinh cây từ đỉnh sinh trưởng là phải thích hợp.

- Khả năng tái sinh cây sạch bệnh virus từ đỉnh sinh trưởng của cây nhiễm bệnh virus là thấp.

- Các điều kiện vật lý hoá phải thoả mãn để đỉnh sinh trưởng tái sinh cây cũng như cần có các dụng cụ – thiết bị chuyên dụng.

1.3. Tạo cây sạch bệnh bằng phương pháp nuôi cấy đỉnh sinh trưởng.

1.3.1. Xử lý nhiệt:

Là một phương pháp hiệu quả để khống chế hoạt động của một số loài virus mẫn cảm với nhiệt độ. Quá trình xử lý nhiệt ở nhiệt độ từ 34 – 36⁰C trong thời gian từ 4 – 6 tuần bằng hệ thống đèn hay một loại thiết chuyên dụng.

1.3.2. Kiểm tra virus.

Có ba phương pháp kiểm tra virus cơ bản:

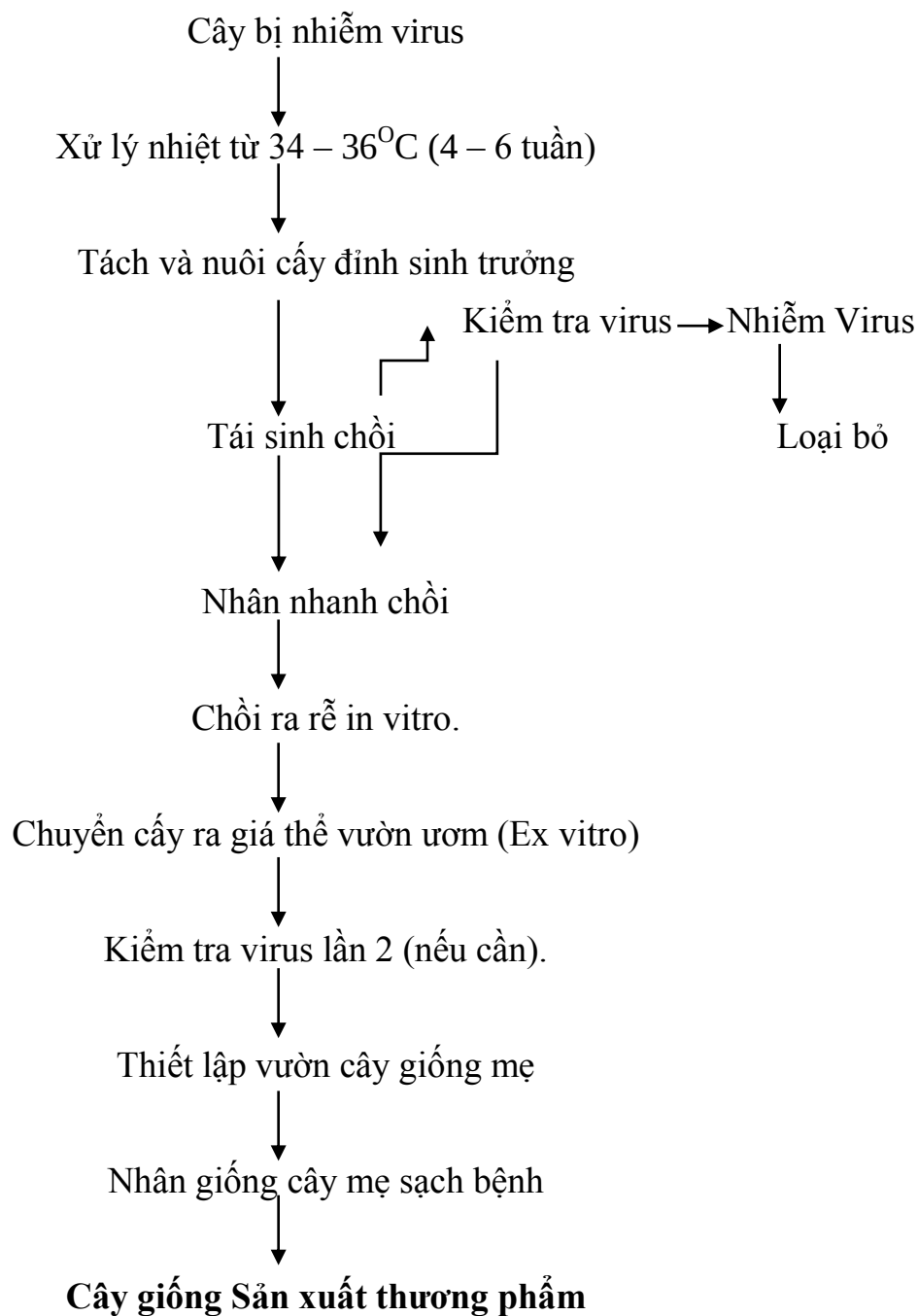
- *Phương pháp huyết thanh học hay Elisa*: Phương pháp này đòi hỏi về chuyên môn cao và chi phí cao nhưng độ chính xác là rất cao. Xác định được cụ thể từng loài virus gây hại.

- *Phương pháp bằng cây chỉ thị*: Cây cà độc dược, cây hoa nút áo và cây thuốc lá. Phương pháp này dễ thực hiện hơn nhưng chỉ xác định ở mức độ cây có bị nhiễm virus hay không chứ không xác định được cụ thể từng loài virus.

- *Phương pháp bằng cảm quan*: đây là phương xác định dựa vào biểu hiện bên ngoài của cây. Phương pháp này dễ thực hiện nhưng độ chính xác là không cao.

1.3.3. Quy trình nuôi cấy đỉnh sinh trưởng để làm sạch bệnh virus.

Quá trình nuôi cấy đỉnh sinh trưởng để làm sạch bệnh virus trên cây trồng được tóm lược qua sơ đồ 5.1.



Sơ đồ 5.1. Quy trình làm sạch bệnh virus bằng kỹ thuật nuôi cấy mô tế bào

Chú ý: Có ba phương pháp kiểm tra virus:

- + Bằng phương pháp Elisa (Huyết thanh học)
- + Bằng phương pháp cây chỉ thị (cây hoa nút áo, cây cà độc dược và cây thuốc lá).

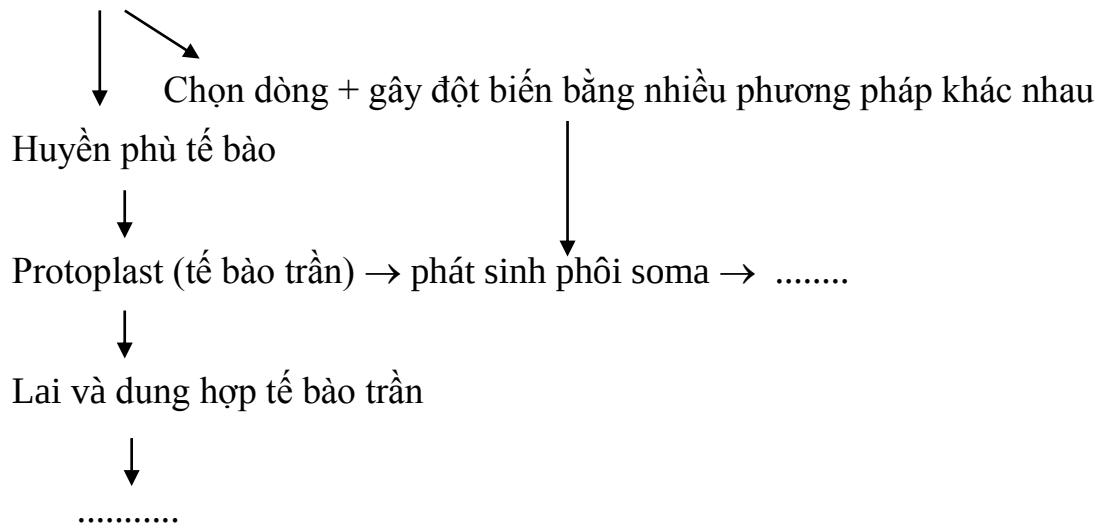
+ Bằng phương pháp cảm quan (triệu chứng bên ngoài).

2. Phương pháp nhân giống bằng cách tạo mô sẹo (callus).

2.1. Giới thiệu.

Chúng ta có thể hình dung việc ứng dụng của nuôi cấy callus theo sơ đồ sau :

Mẫu cây → callus → phát sinh cơ quan → Nhân nhanh → Ra rễ *in vitro* → *Ex vitro*



Sơ đồ 5.2. Phương pháp nhân giống bằng cách tạo callus



Hình 5. 2. Callus .

Năm 1950 một số nhà khoa học như White, Gautheret, Hilderbrandt, Reinert đã nghiên cứu thành công việc nuôi cấy callus, nuôi cấy huyền phù tế bào và nghiên cứu sinh lý sinh trưởng cũng như là sự biệt hóa tế bào trên nhiều đối tượng khác nhau.

Ngày nay thì phương pháp nuôi cấy callus trở nên rất thịnh hành trong các hướng nghiên cứu cơ bản về di truyền và chọn giống.

Ví dụ: Nghiên cứu quá trình phát sinh phôi, phát sinh cơ quan, phương pháp lai soma và nghiên cứu những quá trình hình thành vỏ tế bào cũng như nghiên cứu những ảnh hưởng của chất ĐHST và tỷ lệ của chất ĐHST lên quá trình biệt hóa tế bào.

2.2. Khái niệm về quá trình tái sinh

- Quá trình tái sinh: nguyên lý cơ bản của quá trình tái sinh do Kohlenback 1977 và Street đưa ra, có thể tóm tắt nguyên lý như sau: *Quá trình tái sinh là một quá trình biểu hiện tính toàn thể của tế bào, quá trình đó làm cho tế bào và mô có thể phát triển thành cơ quan hoàn chỉnh.* Quá trình này bao gồm hai giai đoạn

2.2.1. Giai đoạn I: Giai đoạn phản biệt hóa:

Đây là giai đoạn làm cho các tế bào và các mô đã chuyên hóa mất tính định hướng và mất tính chuyên môn hóa của nó để trở lại trạng thái ban đầu tương tự như những tế bào phôi.

Những tế bào đã biệt hóa thì thông thường có nhân nhỏ và không bào lớn. Đến giai đoạn phản biệt hóa thì những tế bào này trở thành không có không bào. Và trong tế bào chỉ có nhân và chất nguyên sinh và nhân lúc này thường lớn hơn so với khi biệt hóa.

Quá trình phản biệt hóa có thể do nhiều yếu tố tác động mà đặc biệt là hormon thực vật, gồm hormon nội sinh và hormon ngoại sinh. Thông thường thì để cho quá trình phản biệt hóa xảy ra ở hầu hết các đối tượng thì hormon bổ sung chủ yếu vào môi trường nuôi cấy và rõ ràng nhất là nhóm hormon auxin, đặc biệt là chất 2,4-D còn các hormon khác thuộc nhóm auxin chỉ đáp ứng đối với những loài thực vật nhạy cảm với auxin.

2.2.1. Giai đoạn II: Giai đoạn tái biệt hóa:

Là quá trình xuất phát từ những tế bào đã phản biệt hóa để tiếp tục phân hóa thành cơ thể hoàn chỉnh bao gồm: thân, rễ, lá...

Thông thường trong giai đoạn phản biệt hóa này thì người ta không sử dụng 2,4-D mà thường sử dụng các loại auxin khác phối hợp với cytokinine với một tỷ lệ nhất định hoặc có loài chỉ cần bổ sung nhóm cytokinine là đủ để thực hiện quá trình tái biệt hoá tế bào.

Kết quả của quá trình phản biệt hóa tế bào là từ chồi và rễ có thể hình thành phôi, sau đó từ phôi có thể hình thành cây con hoàn chỉnh.

2.3. Giai đoạn cảm ứng tạo Callus

Callus thường được tạo ra do sự xáo trộn quá trình phân chia của tế bào. Thường quá trình này trước tiên đều phải trải qua giai đoạn phản biệt hóa.

Ví dụ tế bào nhu mô vỏ, lõi, nhu mô thịt lá. Còn đối với các tế bào tượng tầng hay tế bào mô phân sinh thì không cần trải qua giai đoạn phản biệt hóa bởi vì bản thân nó là những tế bào chưa phân hóa do đó nó có thể trực tiếp bị phản ứng để phát sinh cây.

Các loại cây hai lá mầm thường dễ phân chia khi trong môi trường có sự hiện diện của auxin. Cũng có trường hợp callus được tạo ra mà không có sự hiện diện của auxin ngoại sinh.

Ví dụ như cây cỏ, dây leo,..

Đối với các cây một lá mầm thì sự tạo callus thường đòi hỏi phải có auxin

Những callus tạo ra trên mẫu cấy in vitro là kết quả của sự đáp ứng giữa hormon nội sinh và hormon ngoại sinh ngay trên các tế bào nằm ở các vết thương.

Hầu hết các mẫu cấy của cây có thể sử dụng được để tạo callus như thân, lá, rễ, các tổ chức dự trữ, các mô quả và các bộ phận của hoa (bầu, noãn, tràng, đài,..)

Các callus sau khi được tạo thành có thể cấy chuyển liên tục từ 3 -4 tuần một lần để nhân sinh khối của nó trong một thời gian nhất định theo định hướng nuôi cấy.

Hầu hết các nghiên cứu nuôi cấy callus đều sử dụng môi trường cơ bản là môi trường MS và bổ sung thêm một số chất kích thích sinh trưởng nhóm auxin, nhóm cytokinine

Trong trường hợp mới khởi đầu nuôi cấy callus trên một đối tượng nào đó thì chúng ta nên tổ chức thành nhiều nghiệm thức khác nhau giữa tỷ lệ auxin và cytokinine

2.4. Biến động di truyền trong nuôi cấy callus

Trong quá trình nuôi cấy callus thì thường người ta sử dụng 2,4-D vì vậy về nguyên tắc do mô sẹo (callus) có tốc độ phân chia tế bào rất nhanh mà đặc điểm di truyền của các cây con tái sinh không ổn định. Nhiều tác giả đã kết luận rằng có sự thay đổi về số lượng nhiễm sắc thể.

Thường các cây con có dạng dị bội và đa bội và những biến đổi di truyền này càng tăng lên khi số lần cấy chuyển callus càng nhiều. Vì vậy, những cây được tái sinh từ callus thường có số lượng nhiễm sắc thể khác với cây mẹ. Chính vì vậy phương pháp nuôi cấy callus được ứng dụng theo một hướng khác (chọn, tạo giống) chứ không phải sử dụng để nhân nhanh các giống cây trồng.

Đại đa số các trường hợp thì sử dụng phương pháp nuôi cấy mô sẹo để tạo các giống cây trồng đột biến hay chọn lọc các dòng đột biến thông qua các phương pháp nuôi cấy khác nhau mà từ callus người ta có thể bổ sung các hợp chất gây đột biến vào môi trường nuôi cấy hay sử dụng bức xạ gamma, sau đó tiến hành chọn lọc để xác định các giống cây trồng đột biến phục vụ cho công tác giống cây trồng.

2.5. Một số ví dụ nhân giống thông qua phương pháp nuôi cấy callus.

2.5.1. *Phương pháp nuôi cấy tạo callus từ củ cây Cà rốt.*

Quá trình nuôi cấy tạo mô sẹo từ củ cây cà rốt được tiến hành theo các bước chính sau:

Thu hoạch củ Cà rốt và chọn giống, chọn mẫu.

Khử trùng bề mặt bằng cách rửa dưới vòi nước máy và sử dụng các chất khử trùng như HgCl_2 1%, Javen 2%, NaClO 5%, Hypochlorite Calcium 3%,... trong vòng 15 phút.

Sau đó cắt ngang củ cà rốt bằng dao cắt. Củ Cà rốt có hai phần: phần lõi (chứa nhiều nước) và phần vỏ. Sử dụng một số dụng cụ khác để tách phần lõi ra khỏi phần vỏ và cho phần lõi lên đĩa petri. Tiếp theo chúng ta cắt phần lõi này thành những lát cắt mỏng khoảng 2 – 3mm.

Tiếp theo chúng ta dùng panh để cấy các mẫu trên lên môi trường MS thạch có bổ sung chất ĐHST, cụ thể là 0.1mg/l 2,4-D + 0.5mg/l Kinetine + 0,1mg/l IAA hay môi trường B5 (Garmborg) có bổ sung 1 mg/l 2,4-D (1ppm).

Sau một thời gian thì mẫu cấy xuất hiện sùi callus và từ các callus này tiến hành nhiều kỹ thuật nuôi cấy khác nhau để tái sinh cây hoàn chỉnh bằng cách thay đổi tỷ lệ giữa auxin/cytokinine trong môi trường nuôi cấy. Thời gian cấy chuyển nhiều lần hay ít là tùy thuộc vào định hướng nuôi cấy.

2.5.2. *Phương pháp nuôi cấy callus từ Mía.*

Đối với cây Mía thì người ta lấy nơm mía để làm vật liệu nuôi cấy. Do nơm mía có nhiều lá bao quanh nên thời gian khử trùng có thể kéo dài hơn so với khử

trùng mẫu cây cây Cà rốt. Ngoài ra, trong quá trình xử lý mẫu (nõn mía) cần bổ sung thêm vài giọt Tween 20%.

Sau đó rửa lại bằng nước cất vô trùng nhiều lần.

Tiếp theo tiến hành tách bớt các lá bên ngoài, sau đó cắt ngang tạo thành các khoang mẫu (dày khoảng 0.5 – 1cm) và cắt dọc khoang mẫu này thành 4 phần.

Cuối cùng là cấy các mẫu nhỏ này vào các bình tam giác có chứa môi trường nuôi cấy MS có bổ sung 2 mg/l 2,4-D.

Sau khoảng 4 -5 tuần thì mẫu cấy xuất hiện sùi callus có màu trắng. Tiếp theo là cấy chuyển nhiều lần để tăng sinh khối mẫu cấy đã tạo callus.

Cuối cùng chuyển mẫu cấy sang môi trường có tỷ lệ auxin/cytokinin hợp lý để tái tạo cây hoàn chỉnh để đưa ra vườn ươm

3. Phương pháp nhân giống bằng nuôi cấy lát mỏng.

Đối với nhiều loại cây trồng thì để nhân giống người ta sử dụng những lát mỏng được cắt từ những mô còn non như đoạn thân non, thịt quả non, củ,...

Nhiều thí nghiệm cho thấy trong phương pháp này cho kết quả rất tốt. Một trong những trường hợp như vậy là đối với vảy hành của cây Huệ tây (cây hoa lys *Lilium longiflorum*).

Phương pháp nuôi cấy cây hoa Lys bao gồm các bước sau:

+ Vật liệu nuôi cấy là những củ hoa Lys đã thành thực và được thu từ những cây khỏe mạnh không có các triệu chứng nhiễm virus.

+ Xử lý mẫu: sau khi rửa sạch củ hoa Lys bằng xà bột và tiếp tục tách các vảy củ ở lớp ngoài. Sau đó tiến hành khử trùng bằng Hypochlorite Calcium 5%, HgCl_2 0.1% hay một chất khử trùng bất kỳ thường dùng trong kỹ thuật nuôi cấy mô.

+ Tiếp theo tiến hành tách và cắt mẫu. Mỗi vảy cắt được cắt thành nhiều lát mỏng dày 1 – 3mm (cắt theo chiều ngang) và cấy vào môi trường với tư thế vảy nằm ngửa (mặt trong của vảy hướng lên trên).

*** Lưu ý:**

Cần chú ý tư thế của mẫu cấy khi nuôi cấy ảnh hưởng rất lớn đến khả năng tái sinh cây con của lát cắt.

Mỗi mẫu được cấy vào một ống nghiệm hoặc cấy từ 8 – 10mẫu/1bình tam giác.

Có thể dùng các môi trường có thành phần khoáng đa lượng với mức độ dinh dưỡng khác nhau như MS, White, B5, Knudson C, thậm chí cả môi trường Knop nhưng tốt nhất là môi trường MS.

Tất cả các môi trường nêu trên đều cần phải bổ sung vi lượng Heller, vitamine Morel, 100mg/l Inositol, 20g đường /l là thuận lợi nhất cho quá trình tái sinh và sinh trưởng của cây Lys.

Yêu cầu về nhiệt độ nuôi cấy là từ 18 – 20°C, cường độ chiếu sáng từ 2500 – 3000lux, thời gian chiếu sáng là 16giờ/24giờ.

15 ngày sau khi nuôi cấy thì mẫu cấy chuyển dần sang màu lục và trên mẫu cấy bắt đầu xuất hiện các khối u. Những khối u này lớn dần và sau khoảng 5 tuần thì từ chúng hình thành các củ dạng li ti và cuối cùng những củ này phát triển thành cây hoàn chỉnh.

Có nhiều trường hợp các tế bào của khối u phát triển thành cụm chồi thì có thể tiến hành tách và cấy chuyển nhiều lần những cụm chồi này để tạo ra một số lượng lớn cây con.

Muốn tăng nhanh khả năng nhân cụm chồi thì cần bổ sung vào môi trường nuôi cấy 2.0mg/l 2,4-D hoặc một trong các tổ hợp các chất ĐHST sau:

- + 1.0mg/l 2,4-D + 15% dịch chiết chuối xanh
- + 1.0mg/l 2,4-D + 0.5mg/l BA
- + 2.0mg/l IAA + 0.5mg/l BA.

Việc cấy chuyển cũng có thể thực hiện với các vảy hành lấy từ các cây con tái sinh trong ống nghiệm.

Sau khoảng 2 tháng chúng ta có thể thu được các cây con hoàn chỉnh để đem ra trồng ngoài vườn ươm.

Giá thể để trồng cây con là giàu mùn và được trồng trong điều kiện che nắng 50%, hàng ngày cần phải tưới dung dịch Knop 50%.

Ngoài ra cần áp dụng chế độ phòng trừ sâu bệnh thích hợp.

Sau 2 -3 thế hệ trồng ngoài đồng sẽ thu được các củ giống gốc dùng để sản xuất hoa thương phẩm.

4. Phương pháp nhân giống bằng nuôi cấy đốt đơn thân.

Phương pháp nuôi cấy này sử dụng mẫu cấy là các chồi ngọn hoặc chồi bên có mang một đoạn thân ngắn. Chồi này sẽ được kích thích để tăng trưởng, ra rễ và

tạo cây hoàn chỉnh sau một thời gian nuôi cấy nhất định. Đây là phương pháp tự nhiên nhất trong những phương pháp nhân giống vô tính in vitro.

Những chồi được thu từ chồi ngọn và các nách lá, sau đó cấy trên môi trường thích hợp và các điều kiện khác thì mẫu cấy sẽ tăng trưởng bình thường để trở thành một chồi mới. Chồi mới tăng trưởng sẽ mang nhiều lá và các chồi bên ở các nách lá lại tiếp tục được cắt và cấy chuyển đến khi đạt số lượng chồi non cần thiết thì chúng ta chuyển sang môi trường cảm ứng ra rễ để tạo cây hoàn chỉnh. Sau cùng là chuyển cây ra trồng ngoài vườn ươm.

Với phương pháp nuôi cấy này không cần sử dụng nhóm chất điều hoà sinh trưởng cytokinine. Tuy nhiên, khi áp dụng phương pháp nuôi cấy này có một số điểm cần lưu ý sau:

- + Phương pháp này không thể áp dụng với những cây có lá xếp theo dạng hoa hồng (đồng tiền, dâu tây,...)

- + Phương pháp không nên áp dụng đối với những cây có khả năng bị nhiễm cao mà nên sử dụng phương pháp nuôi cấy chồi bất định.

- + Để giảm khả năng bị nhiễm thì nên chọn những chồi non còn khép kín và nếu mẫu cấy đã nhiễm bên trong thì tốt nhất là sử dụng phương pháp nuôi cấy đỉnh sinh trưởng.

- + Tốc độ nhân giống phụ thuộc vào số lượng chồi có sẵn. Nếu số lượng chồi ít thì tốc độ nhân giống sẽ chậm và ngược lại.

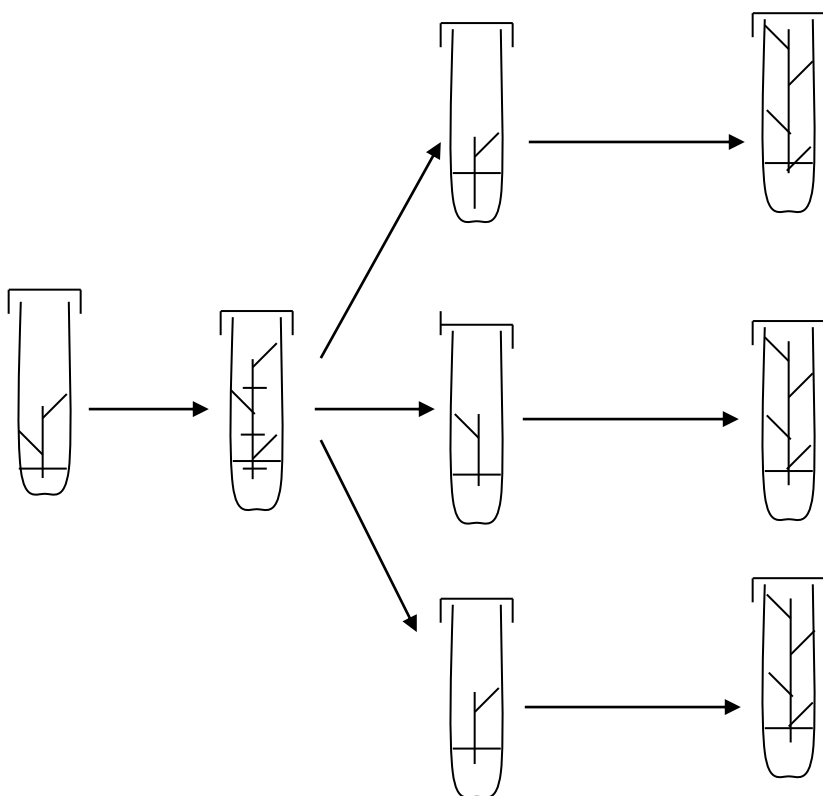
- + Các chồi được trẻ hoá, đặc biệt đối với cây thân gỗ.

- + Sự tạo rễ trên các chồi đã trưởng thành khó thực hiện vì vậy cần phải trẻ hoá chồi để có thể cảm ứng được sự ra rễ.

Phương pháp nuôi cấy bằng đốt thân đã được thực hiện thành công trên nhiều đối tượng cây trồng như cây khoai tây, lê, cà chua, dưa chuột, cà tím ...

Nói chung, phương pháp này rất có hiệu quả trong việc nhân giống những cây có tính ưu thế ngọn mạnh và không thể nhân giống bằng chồi bất định.

Để kéo dài các đoạn thân đốt người ta thường cho vào môi trường nuôi cấy một hàm nhất định của chất Gibberelin.



Sơ đồ 5.3. Phương pháp nhân giống bằng đốt thân.

5. Phương pháp nhân giống bằng nuôi cấy chồi bên

Về nguyên tắc, phương pháp này giống như phương pháp nuôi cấy đốt đơn thân. Điều khác nhau lớn nhất là trong phương pháp nuôi cấy đốt đơn thân có sự kéo dài chồi, thân và thường không cần đến nhóm chất ĐHST cytokinin để phát triển. Trong khi đó thì phương pháp nuôi cấy chồi bên thì chồi ngọn được cô lập và các chồi bên từ các nách lá phát triển dưới ảnh hưởng của nhóm chất cytokinin với nồng độ tương đối cao. Vai trò của cytokinin lúc này là hạn chế tính ưu thế ngọn để cho các chồi bên có thể phát triển.

Các chồi bên này được tiếp tục chuyển sang môi trường nuôi cấy mới có bổ sung cytokinin thì các chồi bên lại tiếp tục tạo ra các chồi bên mới. Sau đó, các chồi này được chuyển sang môi trường nuôi cấy cảm ứng ra rễ để tạo cây hoàn chỉnh và đưa ra ngoài trồng ở vườn ươm (ex vitro).

Thực tế, cả hai phương pháp này thường được áp dụng chung: đầu tiên chồi tăng trưởng bình thường sau đó bổ sung cytokinin vào môi trường nuôi cấy để cảm ứng sự hình thành các chồi bên.

Phương pháp này có ý nghĩa rất quan trọng trong thực tế vì:

- + Phương pháp này đơn giản hơn so với các phương pháp nhân giống khác.
- + Tốc độ nhân giống cao.
- + Sản phẩm ổn định về mặt di truyền.
- + Cây con tăng trưởng rất tốt.

6. Thực hành: Kỹ thuật cơ bản và pha chế môi trường nuôi cấy

6.1. Kỹ thuật vô trùng

- *Dụng cụ thủy tinh*

Bảng 5.1: Thời gian khử trùng dụng cụ thủy tinh bằng nhiệt và nhiệt độ khử trùng

Nhiệt độ (°C)	Thời gian khử trùng (phút)
160	45
170	18
180	7,5
190	1,5

- *Nút đậy*: Hấp khử trùng cùng với các dụng cụ thủy tinh 1210C, 1atm. Không khử trùng khô, gây cháy đối với nút bông và biến dạng với nút nhựa.

- *Môi trường*

Bảng 5.2: Thời gian khử trùng dung dịch và các môi trường lỏng bằng nồi hấp (autoclave) ở 121⁰C, 1atm

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

- *Khử trùng mô thực vật*

Bảng 5.3: Hoá chất khử trùng, nồng độ, thời gian xử lý và hiệu quả thực nghiệm.

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

Trong thời gian xử lý, mô cấy phải ngập hoàn toàn trong dung dịch diệt khuẩn.

Đối với các bộ phận có nhiều bụi cát, trước khi xử lý nên rửa cẩn thận bằng nước xà phòng bột và rửa sạch lại bằng nước máy. Khi xử lý xong, mô cấy được rửa nhiều lần bằng nước cất vô trùng (tối thiểu là 3 lần).

Khử trùng nơi thao tác cấy và dụng cụ cấy.

Sàn và tường lau chùi thường xuyên, trước khi đưa vào sử dụng, phòng cấy cần được xử lý hơi formol. Đóng kín cửa phòng cấy trong 24h, bỏ formaldehyde đi và khử hơi formaldehyde còn thừa bằng dung dịch NH₃ 25% cũng trong 24h.

Khử trùng trước tủ cấy bằng cách lau sạch bằng cồn 700. Bật đèn UV khử trùng phòng cấy 30 phút trước khi sử dụng.

Các dụng cụ mang vào phòng cấy đều vô trùng trước: từ áo choàng, mũ vải, khẩu trang của người cấy đến dao, kéo, kẹp (forceps), giấy lọc, bình đựng nước cất...

Trên bàn cấy thường xuyên có một đèn cồn để sử dụng trong khi cấy và một cốc đựng cồn 96⁰ để nhúng các dụng cụ làm việc. Trước khi cấy, người cấy cần rửa tay bằng xà phòng và lau kỹ đến khuỷ tay bằng cồn 96⁰.

Các dụng cụ bằng kim loại như kẹp cấy, dao mổ, que cấy vòng, kim mũi nhọn có thể được khử trùng bằng cách đốt dưới ngọn lửa đèn cồn. Những dụng cụ này trước hết phải được nhúng vào cồn tuyệt đối rồi mới đốt. Nhớ để ráo đi các giọt cồn thừa rồi mới đưa vào ngọn lửa đèn cồn.

Khi mở nắp chai hoặc nắp ống nghiệm môi trường nuôi cấy, thì dùng ngón tay kế út và ngón tay út cầm lấy nắp gòn, và không chạm tay vào bề mặt bên trong của nắp gòn cũng như không thả nắp gòn xuống bất cứ bề mặt nào cho đến khi gắn nó trở lại chai môi trường.

6.2. Pha chế môi trường.

6.2.1. Pha chế Thành phần môi trường dinh dưỡng

Bảng 5.4. Thành phần môi trường dinh dưỡng

Nước cất	Đường, Acid amin, Vitamin (B1, B6, H, PP...)
Các chất điều hòa sinh trưởng thực vật	Đa lượng N P K Ca Mg S
Chất hữu cơ	Auxin, Cytokinin, Gibberellin...
Chất vô cơ	Vit lượng Fe Zn B Co N Mn Cu Al Mo I
Các hợp chất không biết rõ thành phần	Nước dừa, nước khoai tây, nước chuối, casein, hydrolysate, trypton, pepton...

6.2.2. Pha chế Thành phần muối khoáng cơ bản của môi trường MS

Bảng 5.5. Thành phần muối khoáng cơ bản của môi trường MS

(Murashige và Skoog, 1962)

SKOOG I		SKOOG II		SKOOG III	
NH ₄ NO ₃	1650 mg/L	FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8 mg/L	KI	0,83 mg/L
KNO ₃	1900 mg/L	MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3 mg/L	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25 mg/L
KH ₂ PO ₄	170 mg/L	H ₃ BO ₃	6,2 mg/L	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025 mg/L
MgSO ₄ .7H ₂ O	370 mg/L	ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6 mg/L	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025 mg/L

		O			
CaCl ₂ .2H ₂ O	440 mg/L				
Na ₂ EDTA	37,3 mg/L				

6.2.3. Pha chế Thành phần vitamin của Morel (Morel's Vitamin)

Bảng 5.6. Thành phần vitamin của Morel (Morel's Vitamin)

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

6.2.4. Cách pha các dung dịch mẹ (stock)

- Stock đa lượng MS : SKOOG I (x10)

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

Thành phần	Khối lượng
NH ₄ NO ₃	16500 mg
KNO ₃	19000 mg
KH ₂ PO ₄	1700 mg
MgSO ₄ .7H ₂ O	3700 mg
CaCl ₂ .2H ₂ O	4400 mg

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

- **Stock sắt MS: SKOOG II (x100):** Pha thành 200ml với nồng độ sử dụng khi pha 1lít môi trường MS là 2ml/l)

Thành phần	Khối lượng
Na ₂ EDTA	3730 mg
FeSO ₄ .7H ₂ O	2780 mg

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

Đặt 2 bécher dung dịch lên bếp và gia nhiệt cho dung dịch ấm lên vừa có hơi nóng bốc lên là được.

Khuấy đều và đổ dung dịch Na₂EDTA vào ống đong 200 ml, rồi cho từ từ dung dịch FeSO₄ vào, vừa cho vừa khuấy đều. Để nguội rồi cho vào bình tối bảo quản trong tủ lạnh.

- **Stock vi lượng MS:**

SKOOG III (x100)

Trước tiên cần chuẩn bị các stock con:

Thành phần	Khối lượng	Thể tích dd
KI	8300mg	100ml
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	2500mg	100ml
CuSO ₄ .5H ₂ O	250mg	100ml
CoCl ₂ .6H ₂ O	250 mg	100ml

Cân 3 chất đầu tiên và hoà tan với nước cất trong từng becher riêng. Cho từng dung dịch theo thứ tự vào ống đong 500ml.

Sau đó hút 1ml dung dịch trong stock con của 4 chất tiếp theo cho vào ống đong, vừa cho vừa khuấy đều và thêm nước cất cho đủ 500ml.

- **SKOOG III (x100):** Pha thành 500ml với nồng độ sử dụng khi pha 1lít môi trường MS là 5ml/l

Thành phần	Khối lượng
MnSO ₄ .4H ₂ O	2230 mg
H ₃ BO ₃	620 mg
ZnSO ₄ .7H ₂ O	860 mg
KI	83 mg/1 ml
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	25 mg/1 ml
CuSO ₄ .5H ₂ O	2,5 mg/1 ml
CoCl ₂ .6H	2,5 mg/1 ml

Thành phần vitamin

- Pha các stock con

Dung dịch	Phương pháp
Piridoxine (B6) (10mg/ml)	Cân 1000mg B6 hòa tan với nước cất cho đủ 100ml
Biotin (H) (1mg/ml)	Cân 100mg biotin hòa tan với nước cất cho đủ 100 ml
Nicotinic Acid (P.P) (10mg/ml)	Cân 1000 mg nicotinic acid hòa tan với nước cất cho đủ 100ml
Thiamin-HCl (B1) (10mg/ml)	Cân 1000 mg B1 hoà tan với nước cất cho đủ 100 ml
Pantotate-Ca (10mg/ml)	Cân 1000 mg Pantotate-Ca hòa tan với nước cất cho đủ 100ml

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

Dung dịch các chất	Phương pháp thực hiện
Dung dịch BAP (1mg/ml)	Cân 100 mg Benzylaminopurine (BAP) hoà tan trong 5ml NaOH 1N.

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

	Cho thêm nước cất cho đủ 100 ml. Mỗi ml dung dịch có chứa 1mg BAP.
Dung dịch IAA (1mg/ml)	Cân 100mg Indolacetic acid (IAA) hòa tan trong 5ml NaOH 1N. Cho thêm nước cất cho đủ 100ml. Mỗi ml dung dịch có chứa 1mg IAA.
Dung dịch IBA (1mg/ml)	Cân 100mg Indolebutyric acid (IBA) hòa tan trong 5ml NaOH 1N. Cho thêm nước cất cho đủ 100ml. Mỗi ml dung dịch có chứa 1mg IBA
Dung dịch Kinetin (1mg/ml)	Cân 100mg Kinetin (KIN) hòa tan trong 5ml NaOH 1N. Cho thêm nước cất cho đủ 100ml. Mỗi ml dung dịch có chứa 1mg KIN.
Dung dịch NAA (1mg/ml)	Cân 100mg Naphthaleneacetic acid (NAA) hòa tan trong 5ml NaOH 1N. Cho thêm nước cất cho đủ 100ml. Mỗi ml dung dịch có chứa 1mg NAA.
Dung dịch 2,4-D (1mg/ml)	Cân 100mg 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) hòa tan trong 50ml ethanol 50%. Cho thêm nước cất cho đủ 100ml. Mỗi ml dung dịch có chứa 1mg 2,4-D.

- BAP có trọng lượng phân tử (MW) là 225.26

- Hoà tan 225.26gr BAP trong 1l nước cất tức ta có 1l dung dịch BAP1M hay 1mol/l

Cân 225.26 mg BAP hoà tan trong 1l nước cất tức ta có 1l dung dịch BAP 1mM hay 1mmol/l.

Cân 225.26×10^{-3} mg BAP hoà tan trong 1lít nước cất tức ta có 1l dung dịch BAP 1 μ M hay 1 μ mol/l Dung dịch BAP (MW 225.26) (10mM)

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

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

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

IAA (MW 175.19)

IBA (MW 203.24)

Kinetin (MW 215.22)

NAA (MW 186.21)

2,4-D (MW 221.04)

Thực hiện pha các môi trường nuôi cấy sau:

Môi trường nuôi cấy phôi cam chanh.

Môi trường nuôi cấy đỉnh sinh trưởng lan Dendrobium.

Môi trường khảo sát sự biệt hóa cơ quan từ lá Saintpaulia.

Môi trường tăng sinh (mô sẹo).

7. Nuôi cấy phôi cam chanh

7.1. Chuẩn bị

7. 1.1 Dụng cụ:

Bình tam giác

Becher

Ống nghiệm + môi trường

Kẹp inox

Đĩa petri vô trùng

Dao cắt, đèn cồn
Pipet thủy tinh
Bình định mức, ống đong
Quả bóp cao su
Giấy cấy vô trùng

7.1.2. *Thiết bị*

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

7.1.3. *Hoá chất*

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

7.2. Các bước tiến hành

7.2.1. *Chuẩn bị môi trường (thành phần cho 1 l môi trường)*

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

7.2.2. Chuẩn bị nguyên vật liệu thực vật:

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

7.2.3. Các bước thực hiện

Bước 1: Cho hạt vào bécher có chứa nước xà phòng loãng, rửa hạt cho sạch chất nhớt bám xung quanh hạt

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

Bước 3: Rửa hạt sạch etanol bằng nước cất. Sau đó ngâm hạt 10 phút trong dung dịch hypochloride calcium 10%

Bước 4: Trong tủ cấy vô trùng, rửa hạt cho sạch chất khử trùng bằng cách lắc hạt trong nước cất vô trùng (3 lần)

Bước 5: Tiến hành tách áo hạt bằng kẹp và dao mổ vô trùng. Cho các hạt vừa tách bỏ vỏ áo vào đĩa petri vô trùng có chứa giấy thấm vô trùng và làm ẩm giấy thấm bằng một ít nước cất vô trùng.

Bước 6: Gieo hạt: gieo 4-5 hạt vào các bình tam giác chứa môi trường nuôi cấy đã được hấp khử trùng.

Bước 7: Đậy nắp bình cấy và ghi rõ họ tên, ngày cấy, số nhóm, tên giống và môi trường

7.3. Báo cáo thực hành

Tóm tắt phương pháp thực hiện nuôi cấy mô hạt cam chanh.

Thu được các cây con vô trùng trong ống nghiệm

Quan sát và ghi nhận thời gian tăng trưởng của cây con hoàn chỉnh

8. Nuôi cấy mô hoa hồng

8.1. Chuẩn bị

8.2.1 Dụng cụ

Bình tam giác;

Becher

Ống nghiệm + môi trường

Kẹp inox

Đĩa petri vô trùng

Dao cắt, đèn cồn
Pipet thủy tinh
Bình định mức, ống đong
Quả bóp cao su
Giấy cấy vô trùng

8.2.2. Hóa chất và môi trường

Môi trường MS bổ sung 30g/l đường, 100mg/l myo-inositol, vitamin MS, 8g/l agar, và 1 μ M BA

Cồn 960 và 700
Nước cất vô trùng
Dung dịch chlorine 10%
Xà phòng bột
Than hoạt tính
Tween 20

8.2. Các bước thực hiện

Bước 1: Cách chọn và thu nhận mẫu: thu lấy chồi phát triển mạnh. Những chồi có thể lấy từ vườn, vườn ươm hoặc cây trong chậu.

Bước 2: Loại bỏ lá

Bước 3: Khử trùng mẫu: khử trùng 10-15 phút trong chlorine 10% (v/v) với vài giọt tween 20 (2 giọt/ 100ml dung dịch). Rửa sạch với nước cất vô trùng 3 lần.

Bước 4: Cắt thân thành các đoạn chứa 1 chồi ngọn hay 1-3 đốt thân.

Bước 5: Cấy mẫu vào 1/4 môi trường. Để vài ngày (16-24 giờ chiếu sáng)

Khi chồi mọc lên từ các mầm cao khoảng 1cm, tách lấy chúng và cấy lên môi trường mới. Loại bỏ phần ngọn của các chồi sẽ làm tăng sự tạo nhánh. Theo dõi sự thay đổi về chất lượng chồi (tính ổn định) khi số lần cấy chuyển tăng lên. (Có thể khảo sát thêm sự ảnh hưởng của nồng độ BA lên sự tái sinh chồi: 0, 1, 4 và 10 μ M). Những chồi cao khoảng 2cm được đem ra ngoài môi trường trồng.

8.3. Báo cáo thực hành

Thao tác thực hành thí nghiệm
Quan sát và ghi nhận kết quả

9. Bài tập: Khảo sát tạp nhiễm

9.1. Ghi nhận các kết quả thí nghiệm. Xác định nguyên nhân gây nhiễm mẫu. Các nguyên nhân có thể gây nhiễm đối với:

Mẫu cây; các chất khử trùng; nguồn mẫu cây; tạp nhiễm vi sinh từ bên trong mẫu cây; sự nhiễm từ người cấy; tủ cấy; môi trường; dụng cụ

9.2. Phương pháp xử lý và hạn chế tạp nhiễm

Đánh giá ảnh hưởng của sự tạp nhiễm lên mức độ thành công của công nghệ nuôi cấy mô tế bào.

Xem xét lại thao tác thực hiện kỹ thuật nuôi cấy mô.

9. 3. Báo cáo thực hành

Quan sát và ghi nhận tạp nhiễm mẫu.

Số lượng cây con đạt yêu cầu không nhiễm mỗi nhóm

NỘI DUNG GHI NHỚ BÀI 5

Mô phân sinh ngọn chứa những tế bào đỉnh sinh trưởng, được bao bọc bởi một lớp vỏ cutin để hạn chế tối đa sự mất nước

Ở thực vật, sự hình thành mới các cơ quan bắt đầu từ trong các mô phân sinh ngọn, các mô này được phân hóa ngay từ những giai đoạn phát triển đầu tiên của phôi và giữ lại trong suốt quá trình sống của cây. Điều này xảy ra là do trong mô phân sinh có sự phân hóa của các tế bào sơ khởi và tất cả các tế bào còn lại đều xuất phát từ các tế bào sơ khởi.

Tại đỉnh sinh trưởng thì quá trình sinh tổng hợp ADN của virus thực vật không xảy ra do một cơ chế nào đó mà hiện nay vẫn chưa có kết quả công bố. Vì vậy, đỉnh sinh trưởng là mô duy nhất sạch virus. Do đó, đỉnh sinh trưởng được sử dụng để nuôi cấy tạo cây con sạch bệnh từ những cây mẹ nhiễm virus. Do đỉnh sinh trưởng có kích thước nhỏ nên đỉnh sinh trưởng phải được tách lấy dưới kính hiển vi soi nổi.

Quá trình tái sinh: nguyên lý cơ bản của quá trình tái sinh do Kohlenback 1977 và Street đưa ra, có thể tóm tắt nguyên lý như sau: *Quá trình tái sinh là một quá trình biểu hiện tính toàn thể của tế bào, quá trình đó làm cho tế bào và mô có thể phát triển thành cơ quan hoàn chỉnh*

Những tế bào đã biệt hóa thì thông thường có nhân nhỏ và không bào lớn. Đến giai đoạn phản biệt hóa thì những tế bào này trở thành không có không bào. Và trong tế bào chỉ có nhân và chất nguyên sinh và nhân lúc này thường lớn hơn so với khi biệt hóa.

Phương pháp nuôi cấy này sử dụng mẫu cấy là các chồi ngọn hoặc chồi bên có mang một đoạn thân ngắn. Chồi này sẽ được kích thích để tăng trưởng, ra rễ và tạo cây hoàn chỉnh sau một thời gian nuôi cấy nhất định. Đây là phương pháp tự nhiên nhất trong những phương pháp nhân giống vô tính in vitro.

Những chồi được thu từ chồi ngọn và các nách lá, sau đó cấy trên môi trường thích hợp và các điều kiện khác thì mẫu cấy sẽ tăng trưởng bình thường để trở thành một chồi mới. Chồi mới tăng trưởng sẽ mang nhiều lá và các chồi bên ở các nách lá lại tiếp tục được cắt và cấy chuyển đến khi đạt số lượng chồi non cần thiết thì chúng ta chuyển sang môi trường cảm ứng ra rễ để tạo cây hoàn chỉnh. Sau cùng là chuyển cây ra trồng ngoài vườn ươm.

CÂU HỎI ÔN TẬP

1. Trình bày phương pháp nhân giống bằng nuôi cấy đỉnh sinh trưởng
2. Trình bày phương pháp nhân giống bằng cách tạo mô sẹo (callus).
3. Trình bày phương pháp nhân giống bằng nuôi cấy lát mỏng.
4. Trình bày phương pháp nhân giống bằng nuôi cấy đốt đơn thân.
5. Trình bày phương pháp nhân giống bằng nuôi cấy chồi bên

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Đái Duy Ban, 1998, *Công nghệ ADN trong điều trị gen và các bệnh hiếm nghèo*, Nhà xuất bản y học
2. Đái Duy Ban, 2004, *Công nghệ gen*, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật
3. Nguyễn Bá, 2006, *Hình thái học thực vật*, Nhà xuất bản Giáo dục.
4. Hồ Huỳnh Thùy Dương, 1996, *Sinh học phân tử*, Nhà xuất bản giáo dục
5. Nguyễn Đình Huyền, 1998, *Sinh học phân tử ADN*, Nhà xuất bản khoa học kỹ thuật
6. Lê Văn Hoàng, 2004, *Các quá trình và thiết bị Công nghệ sinh học trong Công nghiệp*, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật Hà Nội
7. Phạm Thành Hồ, 2000, *Di truyền học*, Nhà xuất bản giáo dục
8. Nguyễn Như Hiền.2002. *Di truyền và Công nghệ tế bào xoma*. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật
9. Võ Thị Hương Lan, 2002, *Sinh học phân tử*, Nhà xuất bản Đại học quốc gia Hà Nội
10. Nguyễn Thị Lang, 2002, *Phương pháp cơ bản trong nghiên cứu công nghệ sinh học*, Nhà xuất bản nông nghiệp
11. Lê Đình Lương, 1994, *Cơ sở di truyền học*, Nhà xuất bản giáo dục
12. Nguyễn Đức Lương, Lê Thị Thủy Tiên, 2002, *Công nghệ tế bào*, Nhà xuất bản ĐHQG TP HCM
13. Trần Văn Minh, 1999, *Công nghệ tế bào thực vật*, Đại học quốc gia thành phố Hồ Chí Minh- Trường ĐH Nông Lâm.
14. Phan Cử Nhân, 1998, *Sinh học đại cương*, Nhà xuất bản Đại học quốc gia Hà Nội
15. Nguyễn Đức Thành, 2000, *Nuôi cấy mô tế bào thực vật nghiên cứu và ứng dụng*, Nhà xuất bản nông nghiệp Hà Nội
16. Lê Ngọc Tú, Đỗ Ngọc Liên, Đặng Thị Thu, 2002, *Tế bào và các quá trình sinh học*, Nhà xuất bản khoa học kỹ thuật Hà Nội
17. Khuất Hữu Thanh, 2003, *Cơ sở di truyền phân tử và kỹ thuật gen*, Nhà xuất bản khoa học kỹ thuật

- 18.Đặng Thị Thu, Lê Ngọc Tú, Tổ kim Anh, Phạm Thu Thủy, Nguyễn Xuân Sâm, 2003, *Công nghệ Enzym*. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật
- 19.Quyền Đình Thi. 2005, *Những kỹ thuật cơ bản trong phân tích DNA*, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật
- 20.Trần Thị Xô, Nguyễn Thị Lan, 2004, *Cơ sở di truyền và công nghệ gen*, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật
- 21.Vũ Văn Vụ, Nguyễn Mộng Hùng, Lê Hồng Điệp,2005, *Công Nghệ Sinh Học*, Tập Hai Công Nghệ Sinh Học Tế Bào, Nhà xuất bản Giáo Dục,.
- 22.Vũ Văn Vụ, Vũ Thành Tâm, Hoàng Minh Tấn, 2001, *Sinh Lý Học Thực Vật*, Nhà xuất bản Giáo Dục
- 23.Đỗ Năng Vịnh. *Công nghệ sinh học cây trồng*,2002, Nhà xuất bản Nông Nghiệp
- 24.Nguyễn Văn Uyên,1995-1996, *Những phương pháp công nghệ sinh học thực vật. Tập 1 (1995), Tập 2 (1996)*, Nhà xuất bản Nông nghiệp, TP Hồ Chí Minh