

BỘ NÔNG NGHIỆP VÀ PHÁT TRIỂN NÔNG THÔN

**GIÁO TRÌNH MÔ ĐUN**

**CHUẨN BỊ HOÁ CHẤT VÀ MÔI  
TRƯỜNG VI NHÂN GIỐNG**

**MÃ SỐ: 03**

**NGHỀ: VI NHÂN GIỐNG CÂY LÂM NGHIỆP**

**Trình độ: Sơ cấp nghề**



## **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

## **MÃ TÀI LIỆU:**

## LỜI GIỚI THIỆU

*Vi nhân giống cây lâm nghiệp là nghề sản xuất giống cây lâm nghiệp chất lượng cao đáp ứng nhu cầu trồng rừng kinh doanh ở Việt Nam, trong chương trình đào tạo nghề ngắn hạn cho lao động nông thôn từ nay đến năm 2020, nhằm trang bị cho học viên một số kiến thức và kỹ năng cơ bản để thực hiện các bước công việc nhân giống cây lâm nghiệp bằng vi nhân giống.*

*Giáo trình Vi nhân giống cây lâm nghiệp được xây dựng và phát triển theo các bước: phân tích nghề, phân tích công việc và xây dựng chương trình, giáo trình dạy nghề theo mô đun.*

*Giáo trình mô đun: Chuẩn bị hóa chất và môi trường vi nhân giống là mô đun thứ 3 trong 6 mô đun của chương trình dạy nghề: Vi nhân giống cây lâm nghiệp nhằm trang bị cho học viên những kiến thức và kỹ năng xác định, pha chế, bảo quản hóa chất và môi trường dùng trong nghề Vi nhân giống cây lâm nghiệp.*

*Giáo trình mô đun gồm 3 bài: Bài 1: Xác định các loại hóa chất dùng trong vi nhân giống; Bài 2: Pha chế và bảo quản dung dịch mẹ; Bài 3: Pha chế và bảo quản môi trường vi nhân giống*

*Để hoàn thành giáo trình chúng tôi nhận được sự giúp đỡ của các nhà khoa học ở các viện nghiên cứu, các cán bộ kỹ thuật ở các cơ sở sản xuất, các giảng viên ở các trường đại học, cao đẳng, dạy nghề và khoa Lâm nghiệp Trường Đại học Nông - Lâm Bắc Giang. Nhân dịp này cho phép chúng tôi gửi lời cảm ơn đến lãnh đạo Bộ Nông nghiệp & PTNT, các viện nghiên cứu, các trường, các nhà khoa học, các cán bộ kỹ thuật, các thầy cô giáo đã tham gia chương trình và đóng góp nhiều ý kiến quý báu, tạo điều kiện thuận lợi để chúng tôi hoàn thành giáo trình này.*

*Trong quá trình biên soạn giáo trình mô đun chắc chắn không tránh khỏi những thiếu sót. Chúng tôi rất mong nhận được những ý kiến đóng góp của quý báu của các nhà khoa học, các nhà quản lý và các bạn đọc để hiệu chỉnh và hoàn thiện giáo trình phục vụ sự nghiệp đào tạo nghề ngắn hạn cho lao động nông thôn ở nước ta.*

Tham gia biên soạn

1. Chủ biên : TS. Nguyễn Văn Vương
2. TS. Nghiêm Xuân Hội
3. ThS. Vũ Thị Tâm
4. ThS. Nguyễn Thị Thanh Nguyên

## MỤC LỤC

TIÊU ĐỀ	TRANG
<u>LỜI GIỚI THIỆU</u> .....	1
<u>MỤC LỤC</u> .....	2
<u>CÁC THUẬT NGỮ CHUYÊN MÔN, CHỮ VIẾT TẮT</u> .....	4
<u>MÔ ĐUN CHUẨN BỊ HOÁ CHẤT VÀ MÔI TRƯỜNG VI NHÂN GIỐNG</u> ..	5
<u>Giới thiệu mô đun:</u> .....	5
<u>BÀI 1: XÁC ĐỊNH CÁC LOẠI HÓA CHẤT DÙNG TRONG VI NHÂN GIỐNG</u> .....	5
<u>Mục tiêu:</u> .....	5
<u>A. Nội dung:</u> .....	5
<u>1. Vai trò, ý nghĩa thực tiễn, họ, họ sinh học của các họ, chất dùng trong vi nhân giống</u> .....	5
<u>1.1. Các nguyên tố đa lượng</u> .....	5
<u>1.2. Các nguyên tố vi lượng (Fe, B, Cl, Co, Cu, Mn, Mo, Zn...)</u> .....	10
<u>1.3. Các vitamin</u> .....	15
<u>1.4. Các chất điều hoà sinh trưởng</u> .....	17
<u>1.5 Những chất thường dùng khác:</u> .....	23
<u>2. Phân loại hóa chất trong vi nhân giống</u> .....	23
<u>2.1. Nhóm hóa chất khử trùng</u> .....	23
<u>2.2. Nhóm hóa chất dùng để pha môi trường vi nhân giống</u> .....	25
<u>3. Danh mục các hóa chất dùng trong vi nhân giống</u> .....	28
<u>B. Câu hỏi và bài tập thực hành</u> .....	30
<u>1. Câu hỏi</u> .....	30
<u>2. Bài tập thực hành:</u> .....	30
<u>Xác định các loại hóa chất dùng trong vi nhân giống</u> .....	30
<u>1. Nhận biết các loại hóa chất dùng trong vi nhân giống theo nhãn ghi trên bao bì</u> .....	30
<u>2. Nhận biết các loại hóa chất dùng trong vi nhân giống theo dạng thương phẩm (Dạng kết tinh, dạng lỏng, màu sắc...)</u> .....	30
<u>C. Ghi nhớ</u> .....	32
<u>BÀI 2: PHA CHẾ HÓA CHẤT VÀ BẢO QUẢN DUNG DỊCH ME</u> .....	33
<u>I. Mục tiêu của bài:</u> .....	33
<u>A. Nội dung</u> .....	33
<u>1. Cách pha hóa chất và bảo quản hóa chất</u> .....	33
<u>1.1. Cách pha hoá chất</u> .....	33
<u>1.2. Cách pha và bảo quản từng loại hóa chất cụ thể</u> .....	34
<u>2. Cách pha chế dung dịch me và cách bảo quản dung dịch me</u> .....	36
<u>2.1. Cách pha dung dịch me</u> .....	36
<u>2.2. Cách pha chế và bảo quản chất điều hoà sinh trưởng</u> .....	37

2.3. Cách pha chế và bảo quản các chất vi lượng, đa lượng của dung dịch me .....	38
2.4. Cách pha chế và bảo quản Vitamin.....	39
B. Câu hỏi và bài tập thực hành .....	40
1. Câu hỏi.....	40
2. Bài tập thực hành .....	40
C. Ghi nhớ .....	46
<b>BÀI 3: PHA CHẾ VÀ BẢO QUẢN MÔI TRƯỜNG VI NHÂN GIỐNG...</b>	<b>47</b>
I. Mục tiêu: .....	47
A. Nội dung của bài: .....	47
1. Danh mục hóa chất dùng pha chế một số môi trường phổ biến:.....	47
2. Công thức và cách pha chế môi trường vi nhân giống .....	48
2.1. Công thức và cách pha chế môi trường nuôi cấy khởi đầu .....	53
2.2. Công thức và cách pha chế môi trường nhân nhanh chồi .....	54
2.3. Công thức và cách pha chế môi trường tạo cây hoàn chỉnh .....	55
3. Khử trùng môi trường vi nhân giống: .....	56
4. Các phương pháp bảo quản môi trường vi nhân giống .....	56
B. Câu hỏi và bài tập thực hành .....	56
1. Câu hỏi: .....	56
2. Bài tập thực hành: .....	57
Bài 1: Pha chế môi trường nuôi cấy khởi đầu.....	57
C. Ghi nhớ .....	59
Bài 2: Pha chế môi trường nhân nhanh chồi.....	59
C. Ghi nhớ .....	61
Bài 3: Pha chế môi trường tạo cây hoàn chỉnh .....	61
C. Ghi nhớ .....	63
<b>HƯỚNG DẪN GIẢNG DẠY MÔ ĐUN</b> .....	<b>64</b>
I. Vị trí, tính chất của mô đun .....	64
II. Mục tiêu .....	64
III. Nội dung chính của mô đun .....	64
IV. Hướng dẫn thực hiện bài tập thực hành.....	65
Bài 1: Xác định các loại hóa chất dùng trong vi nhân giống.....	65
Bài 2: Pha chế hóa chất và bảo quản dung dịch me .....	65
Bài 3: Pha chế và bảo quản môi trường vi nhân giống .....	66
V. Yêu cầu về đánh giá kết quả học tập .....	66
5.1. Bài 1 .....	66
5.2. Bài 2 .....	66
5.3. Bài 3 .....	67
VI. Tài liệu tham khảo .....	68

## **CÁC THUẬT NGỮ CHUYÊN MÔN, CHỮ VIẾT TẮT**

MĐ: Mô đun

LT: lý thuyết

TH: thực hành

KT: kiểm tra

**MÔ ĐUN CHUẨN BỊ HOÁ CHẤT  
VÀ MÔI TRƯỜNG VI NHÂN GIỐNG  
Mã số mô đun: MĐ 03**

**Giới thiệu mô đun:**

Mô đun nhằm trang bị cho người học những kiến thức, kỹ năng lựa chọn các loại hóa chất dùng trong vi nhân giống, cách pha chế các dung dịch gốc (hay còn gọi là dung dịch mẹ). Cách pha chế môi trường nuôi cấy khởi đầu, môi trường nhân nhanh chồi, môi trường ra rễ. Nội dung của mô đun được bố trí tích hợp giữa dạy lý thuyết trên lớp, thực hành trong phòng thí nghiệm. Thời lượng của mô đun 92 giờ; lý thuyết 16; thực hành 68; kiểm tra 8 giờ.

**Bài 1:**

**XÁC ĐỊNH CÁC LOẠI HÓA CHẤT DÙNG TRONG VI NHÂN GIỐNG**

**Mục tiêu:**

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

- Trình bày được vai trò, đặc tính lý, hóa học và sinh học của từng loại hóa chất dùng trong vi nhân giống
- Nhận biết được các hóa chất và phân hóa chất theo nhóm sử dụng.
- Xác định được các loại hóa chất cần dùng trong vi nhân giống

**A. Nội dung:**

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

Thực vật có nhu cầu sử dụng các nguyên tố đa lượng lớn hơn rất nhiều so với các nguyên tố vi lượng. Nguyên tố đa lượng có nồng độ cao nhất trong các môi trường nuôi cấy mô và tế bào thực vật. Nhìn chung cả phần anion và cation của các nguyên tố đa lượng đều quan trọng đối với tế bào thực vật. Ví dụ như  $\text{KNO}_3$ , cả  $\text{K}^+$  và  $\text{NO}_3^-$  là cần thiết.

**1.1. Các nguyên tố đa lượng**

**Nitơ (N):**

Thành phần chính của hầu hết các môi trường là nitơ vô cơ dưới dạng nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ) hoặc amonium ( $\text{NH}_4^+$ ). Các muối được dùng phổ biến là kali nitrat ( $\text{KNO}_3$ ), nitrat amon ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) và canxi nitrat ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ). Những hợp chất này cung cấp nitơ vô cơ cho thực vật để tổng hợp các phân tử chất hữu cơ phức tạp.

Mô, tế bào thực vật trong nuôi cấy có thể sử dụng nitrogen khoáng như aminonium và nitrate, đồng thời cũng sử dụng các dạng nitrogen hữu cơ như amino acid. Tỷ lệ amonium và nitrate thay đổi tùy theo loài và trạng thái phát triển của mô.

Nitrate được cung cấp dưới dạng muối  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{NaNO}_3$  hoặc  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . Amonium được cung cấp dưới dạng  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  hoặc  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . Trong một số ít trường hợp có thể cung cấp dưới dạng urea. Tổng nồng độ của  $\text{NO}_3^-$  và  $\text{NH}_4^+$  trong môi trường nuôi cấy thay đổi tùy theo đối tượng nuôi cấy và mục đích nghiên cứu.

Amonium chủ yếu được dự trữ ở rễ như nguồn nitơ hữu cơ. Nitrat có thể được vận chuyển theo mạch xylem đến các bộ phận của cây, tại đó nó sẽ tham gia vào quá trình đồng hoá nitơ. Nitrat có thể được dự trữ ở không bào và thực hiện chức năng quan trọng trong việc điều chỉnh sự thẩm thấu và cân bằng ion của cây trồng.

### **Phốt pho: (P)**

Phốt pho là nguyên tố quan trọng trong đời sống thực vật, tham gia vào việc vận chuyển năng lượng, sinh tổng hợp protein, acid nucleic và tham gia cấu trúc của màng.

Trong môi trường nuôi cấy, Phốt pho được cung cấp dưới dạng mono hay dihydrogenphosphate potassium hay sodium. Ion photphate hóa trị 1 và 2 có thể chuyển đổi lẫn nhau tùy theo pH. Ion  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  chiếm ưu thế ở pH nhỏ hơn 7, đây là đặc tính của hầu hết môi trường nuôi cấy mô tế bào thực vật cũng là ion dễ được thực vật hấp thụ nhất. Phốt pho thường được cung cấp dưới dạng photphate hòa tan hạn chế.

Nồng độ photphate hòa tan cao trong môi trường sẽ làm giảm sự tăng trưởng của mô, có thể do calcium và một số nguyên tố vi lượng bị kết tủa trong môi trường hoặc bị giảm hấp thụ vào trong mô. Nồng độ ion photphate cho vào môi trường cao nhất là 18,9 mM, trung bình là 1,7 mM, hầu hết các môi trường chứa photphate khoảng 1.3 mM.

Phốt pho ở dạng  $\text{HPO}_4^{2-}$  được hấp thụ nhờ hệ thống rễ của thực vật và ngược lại với nitrat, sunfat, nó không bị khử. Nó có thể có mặt trong thực vật dưới dạng P vô cơ hoặc dạng hợp chất este (R-O-P). Năng lượng thu được khi giải phóng một nguyên tử P khỏi các liên kết (cao năng lượng) là rất quan trọng đối với quá trình trao đổi chất của tế bào.



## **Kali (K):**

$K^+$  là một cation chủ yếu trong cây, giúp cho cây cân bằng các anion vô cơ và hữu cơ. Ion  $K^+$  được chuyển qua màng tế bào dễ dàng và có vai trò chính là điều hòa pH và áp suất thẩm thấu của môi trường nội bào. Sự thiếu hụt  $K^+$  trong môi trường nuôi cấy mô thực vật sẽ dẫn đến tình trạng thiếu nước.  $K^+$  được cung cấp dưới dạng muối  $KNO_3$ ,  $KCl$ ,  $6H_2O$ ,  $KH_2PO_4$

Trong thực vật,  $K^+$  là một cation có tính linh động cao, ở cả mức độ tế bào cũng như trong quá trình vận chuyển qua các khoảng cách dài trong mạch xylem hoặc mạch libe. Trong tất cả các nguyên tố, kali là nguyên tố có mặt với nồng độ cao nhất, ở tế bào chất từ 100 – 200 mM, ở lục lạp từ 20 – 200 mM.

Muối kali có vai trò quan trọng trong việc điều chỉnh tính thấm của tế bào. Đối với sự giãn tế bào cũng như các quá trình khác được điều chỉnh nhờ sức trương của tế bào,  $K^+$  có vai trò như một ion trung hoà các ion vô cơ và hữu cơ hoà tan trong dung dịch, đồng thời duy trì pH trong khoảng 7 – 8 là pH thích hợp cho hoạt động của hầu hết các enzym.

Bên cạnh vai trò trong hoạt động của nhiều enzym,  $K^+$  còn điều chỉnh sự cân bằng ion và pH của lục lạp trong quang hợp.  $K^+$  là ion trung hoà quan trọng nhất cho sự đưa dòng  $H^+$  qua màng thylakoid. Ion này cũng có mặt trong sự tạo thành gradien pH màng tế bào cần thiết cho quá trình tổng hợp ATP. Sự tăng nồng độ  $K^+$  dẫn đến sự tăng cường quá trình quang hợp, hô hấp và hoạt động của enzym ribuloza biphosphat cacboxylaza.

Sự giãn của tế bào: Sự tăng kích thước của không bào trung tâm trong tế bào là một quá trình quan trọng trong sự giãn tế bào. Để hình thành không bào, đầu tiên là sự tăng kích thước đủ lớn của thành tế bào, tiếp theo khả năng thẩm thấu của không bào tăng lên. Điều này có thể đạt được nhờ sự tích tụ  $K^+$  gây ra sự tăng mạnh về thể tích của không bào do tính thấm. GA3 và  $K^+$  dường như có tác dụng hỗ trợ nhau trong vai trò làm tăng chiều cao cây.

Sự cân bằng ion:  $K^+$  có vai trò quan trọng cho việc duy trì cân bằng ion. Nó trung hoà các anion kém linh động trong tế bào chất và rất nhiều các anion linh động trong mạch xylem, libe và không bào.

Trong quá trình trao đổi nitrat,  $K^+$  có chức năng chủ yếu là vận chuyển ion  $NO_3^-$  qua những khoảng cách dài trong mạch xylem hoặc dự trữ trong không bào. Sau quá trình khử nitrat trong lá cây, lượng  $K^+$  còn lại được sử dụng để tổng hợp các axit hữu cơ trung hoà ion  $K^+$ . Các muối kali của các axit hữu cơ như kali malat được vận chuyển tới rễ, sau đó  $K^+$  có thể nhận ion nitrat ở tế bào rễ và vận chuyển chúng qua mạch xylem.

## **Canxi (Ca):**

Calcium cũng là một cation chủ yếu giúp cân bằng các anion trong cây nhưng cách thức không giống như  $K^+$  và  $Mg^{2+}$  vì  $Ca^{2+}$  không phải là ion linh động. Calcium có thể liên kết các phân tử sinh học lại với nhau do đó nó góp phần vào trong cấu trúc và hoạt động sinh lí của màng tế bào và ở phiên giữa của thành tế bào. Sự hoạt động của nhiều enzym khác của thực vật cũng phụ thuộc vào  $Ca^{2+}$  vì calcium là đồng yếu tố với những enzym phân giải ATP.

Trong nuôi cấy tế bào,  $Ca^{2+}$  có vai trò trong sự phát sinh hình thái đồng thời với sự cảm ứng của các chất điều hòa sinh trưởng đặc biệt là auxin và cytokinin.

$Ca^{2+}$  là thành phần quan trọng của thành tế bào và màng tế bào. Số lượng lớn  $Ca^{2+}$  gắn trên thành tế bào đóng vai trò chủ yếu trong củng cố độ vững chắc cho thành tế bào và điều hoà cấu trúc màng tế bào.

Ion  $Ca^{2+}$  tự do có mặt trong tế bào ở nồng độ rất thấp, khoảng  $1\mu M$  có tác dụng ngăn chặn sự kết tủa P vô cơ. Do hàm lượng ion  $Ca^{2+}$  trong tế bào thấp nên không có sự cạnh tranh với ion  $Mg^{2+}$  về vị trí gắn cation và tránh làm bất hoạt enzym. Ion  $Ca^{2+}$  chỉ có thể di chuyển qua màng tế bào theo một chiều ( $Ca^{2+}$  chỉ ra ngoài tế bào được nhưng không vào được), do đó đảm bảo được nồng độ ion  $Ca^{2+}$  nội bào thấp.

Đặc biệt trong các tế bào lá, có một lượng lớn canxi liên kết với các không bào. Canxi cần thiết cho sự thiết lập cân bằng ion nhờ trung hoà các anion hữu cơ và vô cơ. Hầu như canxi ở dạng liên kết tạo muối oxalat. Mặc dù hợp chất này khó tan nhưng nó có vai trò duy trì nồng độ ion  $Ca^{2+}$  thấp trong lục lạp và tế bào chất. Muối canxi oxalat còn có chức năng điều chỉnh sự thẩm thấu của tế bào.

Canxi có vai trò quan trọng trong quá trình nhân lên của tế bào và rễ. Ngoài ra sự phát triển của ống phấn cũng phụ thuộc vào canxi, đây là quá trình được định hướng nhờ canxi ngoại bào. IAA tham gia vào quá trình vận chuyển canxi. Chất ức chế auxin như TIBA cũng ức chế sự phân phối  $Ca^{2+}$  trong thực vật làm xuất hiện sự thiếu hụt canxi.

Vai trò của Ca đối với thành tế bào: Pectin là thành phần quan trọng của màng liên kết giữa các tế bào với nhau và được phân huỷ nhờ enzym polygalacturonase. Tuy nhiên, Ca ức chế mạnh hoạt động của polygalacturonaza. Hoạt động mạnh của enzym này được ghi nhận khi thiếu Ca. Nếu nồng độ Ca có đủ thì hầu hết các pectin sẽ tồn tại dưới dạng muối canxipectat. Nhờ vậy, thành tế bào có khả năng chống chịu tốt đối với hoạt động phá huỷ của enzym polygalacturonaza. Sự có mặt của ion  $Ca^{2+}$  cũng có vai trò quan trọng trong việc ngăn chặn sự xâm nhiễm nấm.

Ion  $\text{Ca}^{2+}$  có tác động lớn đến sự ổn định của màng tế bào. Sự thiếu ion  $\text{Ca}^{2+}$  sẽ làm tăng khả năng thoát ra ngoài màng tế bào của các hợp chất phân tử lượng nhỏ. Màng tế bào có thể sẽ bị phân huỷ hoàn toàn khi thiếu hụt nghiêm trọng ion  $\text{Ca}^{2+}$ . Ion  $\text{Ca}^{2+}$  có khả năng làm ổn định màng tế bào thông qua sự tương tác với các nhóm phosphat, cacboxyl của hợp chất phospholipid và protein có mặt trong màng tế bào.

Can xi chỉ tác động lên một vài enzym như: amilaza và ATPaza. Ca chủ yếu kích thích các enzym màng tế bào, mà hoạt động của những enzyme này được qui định nhờ cấu trúc màng. Tuy nhiên, ion  $\text{Ca}^{2+}$  cũng có tác dụng kìm hãm một số enzym của tế bào chất. Calmodulin trong tế bào có khả năng hoạt hoá các enzym như phospholipaza bằng cách tạo thành phức của  $\text{Ca}^{2+}$  calmodulin với enzym. Ngoài ra, người ta còn cho rằng calmodulin có vai trò trong việc vận chuyển ion  $\text{Ca}^{2+}$  tới không bào.

### **Magiê (Mg):**

Magiêsiem là nguyên tố cần thiết cho sự sinh tổng hợp diệp lục tố và đồng thời nó cũng tham gia vào cấu trúc của một số enzym vận chuyển photphate. Ion  $\text{Mg}^{2+}$  là một ion linh động, có thể khuếch tán vào trong tế bào như  $\text{K}^{+}$  vì vậy có vai trò như một cation có thể trung hòa các cation và các acid hữu cơ. Môi trường nuôi cấy mô thực vật thường chứa Mg với nồng độ không thay đổi nhiều trung bình là 6,8mM.  $\text{MgSO}_4$  là nguồn bổ sung ion  $\text{Mg}^{2+}$  duy nhất cho mô cấy.  $\text{Mg}^{2+}$  là một ion rất linh động có khả năng hình thành phức với các nhóm chức năng khác nhau.

Vai trò  $\text{Mg}^{2+}$  của đối với quang hợp:  $\text{Mg}^{2+}$  là nguyên tử trung tâm trong phân tử chlorophyl của hệ quang hợp I và II. Trong phân tử chlorophyl, các photon được hấp thụ tạo ra dòng điện tử, từ đó tạo ra ATP và NADPH đóng vai trò quan trọng đối với cố định  $\text{CO}_2$ . Nếu  $\text{Mg}^{2+}$  có mặt với nồng độ tối ưu thì khoảng 10 - 20% ion  $\text{Mg}^{2+}$  trong lá được cố định ở lục lạp. Nồng độ cao các ion  $\text{Mg}^{2+}$  và  $\text{K}^{+}$  cần thiết để duy trì pH khoảng 6,5 - 7,5 trong lục lạp và tế bào chất, trái với ở không bào pH chỉ vào khoảng 5 - 6. Trong một chừng mực nào đó, pH xác định cấu trúc của protein và enzym nên nó ảnh hưởng đến quá trình sinh tổng hợp protein và chức năng của lục lạp.

Vai trò  $\text{Mg}^{2+}$  đối với hoạt tính của các enzym:  $\text{Mg}^{2+}$  là ion cần thiết cho cấu trúc bậc ba của nhiều phức enzym-cơ chất vì nó tạo ra dạng cấu trúc không gian phù hợp giữa enzym và cơ chất.  $\text{Mg}^{2+}$  tham gia vào quá trình tổng hợp protein với nhiều cấp độ khác nhau.  $\text{Mg}^{2+}$  tạo thành cầu nối giữa các dưới đơn vị của ribosome. Khi thiếu  $\text{Mg}^{2+}$ , các dưới đơn vị sẽ bị tách ra và quá trình tổng hợp protein bị ngừng lại. Sự hoạt động của các enzym như: RNA polymeraza tham gia vào quá trình sinh tổng hợp RNA đòi hỏi phải có mặt  $\text{Mg}^{2+}$ , do đó

thiếu  $Mg^{2+}$  sẽ kìm hãm sinh tổng hợp RNA. ở lá cây, 25% protein tổng số nằm trong lục lạp, nếu thiếu  $Mg^{2+}$  thì ngay lập tức cấu trúc và chức năng của lục lạp bị ảnh hưởng.

Ngoài ra  $Mg^{2+}$  còn có vai trò quan trọng trong hoạt động của enzym ribulose biphosphat cacboxylaza. Đây là một enzym phụ thuộc nhiều vào pH và  $Mg^{2+}$ . Liên kết của  $Mg^{2+}$  với enzym làm tăng ái lực với cơ chất  $CO_2$  và  $V_{max}$ .

Vai trò  $Mg^{2+}$  đối với chuyển hoá năng lượng: Mg là một chất không thể thiếu trong quá trình chuyển hoá năng lượng của thực vật do vai trò quan trọng của nó đối với sinh tổng hợp ATP ( $ADP + P \text{ vô cơ} = ATP$ ), đặc biệt là ở lục lạp. Trong quá trình này,  $Mg^{2+}$  tạo thành cầu nối giữa enzym và ADP. Ngoài ra,  $Mg^{2+}$  còn có khả năng tạo phức với ATP. Enzym ATPaza vận chuyển các nhóm phosphoryl cao năng, cung cấp cho protein hoặc đường. Mặc dù  $Mg^{2+}$  có nhiều chức năng như vậy nhưng hầu như nó lại tồn tại ở dạng dự trữ trong không bào. Tại đây, nó đóng vai trò như một ion trung hoà với các anion hữu cơ và vô cơ trong việc cân bằng ion.

### **Lưu huỳnh (S):**

Lưu huỳnh như  $SO_4^{2-}$  tham gia vào một vài thành phần của axit amin quan trọng liên quan đến sự biến đổi ôxi hóa khử, lưu huỳnh được cây trồng đồng hóa từ Sunfat( $SO_4$ ). Lưu huỳnh được lấy từ hợp chất  $NaSO_4 \cdot 7H_2O$

#### *1.2 Các nguyên tố vi lượng (Fe, B, Cl, Co, Cu, Mn, Mo, Zn...)*

Các nguyên tố vi lượng là những chất có lượng sử dụng rất nhỏ, nhưng không thể thiếu cho sinh trưởng của mô và tế bào thực vật. Đó là các ion: iron (Fe), manganese (Mn), zinc (Zn), boron (B), copper (Cu), và molybdenum (Mo).

Fe được cung cấp dưới dạng chelate Fe, và Zn được dùng bình thường trong các môi trường nuôi cấy. Các dạng muối tatrata và citrate Fe khó hòa tan và thường hay kết tủa trong môi trường. Vấn đề này có thể khắc phục bằng cách dùng diaminetetraacetic acid (EDTA) - chelate Fe thay cho citrate Fe, đặc biệt đối với quá trình nhào tạo phôi. Tuy nhiên, các dạng chelate EDTA không hoàn toàn ổn định trong môi trường nuôi cấy dạng lỏng.

Một số môi trường nuôi cấy được làm giàu bằng cobalt (Co), iodine (I) và sodium (Na), nhưng các yêu cầu nghiêm ngặt về các nguyên tố này cho sinh trưởng của tế bào đã không được thiết lập.

Việc chia thành các nguyên tố vi lượng và đa lượng chủ yếu dựa trên nhu cầu của thực vật đối với các chất này. Nhu cầu của thực vật đối với các nguyên tố đa lượng là lớn hơn, với nồng độ > 30ppm. Các nguyên tố vi lượng được sử dụng trong môi trường ở nồng độ < 30ppm.

Nhu cầu của cây đối với nguyên tố vi lượng là rất thấp, do vậy những nguyên tố này cũng có mặt trong môi trường ở các nồng độ tương ứng. Hầu hết các nguyên tố vi lượng sử dụng ở lượng mol. Một số nguyên tố vi lượng có nhu cầu nhỏ hơn có thể thay thế dễ dàng bằng sự lẫn tạp ngẫu nhiên của chúng trong các thành phần của môi trường như agar, các chất bổ sung như nước dừa, dịch chiết nấm men (yeast extract), các muối và nước.

Tầm quan trọng của một số nguyên tố vi lượng trong thành phần môi trường còn chưa được hiểu một cách rõ ràng. Co, Al, Ni... có thể có lợi đối với thực vật nhưng cũng có thể là không cần thiết.

Trong thực tế, hầu hết các nguyên tố vi lượng chỉ được dùng với nồng độ thấp. Nếu hàm lượng lớn, vượt quá giới hạn cho phép thì cây sẽ bị chết hoặc lão hóa nhanh. Nhu cầu với các loài cây gần như nhau. Các nguyên tố vi lượng có tác dụng xúc tác men, tham gia phân hóa tế bào, duy trì các chức năng hoàn chỉnh của tế bào.

### **Sắt (Fe):**

Trong cây, sắt chủ yếu được gắn với các phức chất. Hàm lượng  $Fe^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$  tự do rất thấp ( $10^{-10}$  mM). Hầu hết thực vật chỉ hấp thu  $Fe^{2+}$ . Do đó,  $Fe^{3+}$  cần được khử thành  $Fe^{2+}$  ở bề mặt rễ trước khi nó được chuyển vào trong tế bào chất (chỉ một số loại cỏ là hấp thu sắt chủ yếu dưới dạng  $Fe^{3+}$ ).

Trong khi vận chuyển đi xa, qua mạch xylem của cây, sắt chủ yếu được di chuyển dưới dạng hợp chất sắt - cacbonhydrate (ở dạng  $Fe^{3+}$  - citrate hay dạng phức hợp sắt - peptide). Chức năng chính của sắt trong thực vật là tạo các liên kết sắt. Các chức năng cơ bản như một hệ thống oxi hoá khử thuận nghịch được biểu diễn trong phản ứng dưới đây:  $Fe(II) \rightleftharpoons Fe(III) + e^-$

Trong lá non, thiếu sắt sẽ dẫn đến sự giảm nhanh nồng độ chlorophyll do quá trình tổng hợp protein bị ngưng lại. Số lượng ribosom cũng giảm mạnh.

Thiếu sắt, rễ cây có những thay đổi hình thái, sự dài rễ giảm nhưng diện tích và số lượng lông rễ tăng.

Nếu sử dụng sắt dưới dạng  $Fe_2(SO_4)_3$  và  $FeCl_3$  ... thì những chất này không ổn định, đặc biệt là trong nồi hấp cao áp. Để ổn định hàm lượng Fe trong môi trường thì Fe thường được sử dụng dưới dạng chelát không phân li. Fe-ETDA được pha từ  $Na_2ETDA$  và  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$

### **Bo (B):**

Vai trò của nguyên tố Bo trong sinh hóa học và sinh lý học thực vật chưa được biết nhiều. Bo cần thiết cho sự hoạt động của đỉnh sinh trưởng bởi vì nó có mặt trong sự sinh tổng hợp các base nitơ đặc biệt là uracil, cũng như cần thiết cho sự sinh tổng hợp lignin và acid phenolic.

Thiếu Bo sẽ làm giảm sự sinh tổng hợp cytokinin. Sự phân chia tế bào bị kìm hãm do có sự giảm sinh tổng hợp ARN trong nhân.

Bo được hấp thu bởi rễ và được chuyển tới các bộ phận của cây nhờ các xylem ở các màng tế bào, Bo có mặt chủ yếu ở dạng liên kết este. Không có bất cứ một enzym đã biết nào có chứa hoặc được hoạt hoá bởi Bo.

Có những chỉ dẫn cho biết Bo có mặt ở trên hoặc bên trong các màng, có thể ảnh hưởng tới hoạt động của các enzym liên kết màng. Các chức năng chủ yếu của Bo là ở ngoại bào, được phát sinh trong quá trình hoá gỗ của thành tế bào và sự phân hoá xylem.

Thành tế bào: Những liên kết este đường - Bo là một phần cấu trúc của các hemicellulose trong thành tế bào. Hầu hết Bo trong thực vật tồn tại ở dạng este trong thành tế bào của cây. Yêu cầu về Bo đối với cây hai lá mầm cao hơn so với cây một lá mầm. Có thể giả định rằng Bo, cũng giống như Can xi, có chức năng điều hoà quá trình tổng hợp thành tế bào cũng như ổn định các thành phần của thành và màng tế bào.

Sự thiếu hụt Bo ngay lập tức ức chế quá trình phát triển chiều dài của các rễ sơ cấp và thứ cấp. Hơn thế, Bo góp phần điều hoà quá trình trao đổi phenol và tổng hợp lignin.

Tóm lại: Bo là nguyên tố cần thiết cho sự hoạt động bình thường của mô phân sinh ngọn, xúc tác một số quá trình hút một số chất khác. Bo được lấy từ  $H_3BO_3$

### **Đồng (Cu):**

Đồng hiện diện trong hệ thống enzym cytochrome oxidase của chuỗi vận chuyển điện tử hô hấp. Trong thực vật, đồng tồn tại dưới dạng ion hóa trị 1 và 2. Nồng độ đồng cao sẽ gây độc cho mô. Hầu hết các môi trường nuôi cấy có  $Cu^{2+}$  với hàm lượng 0,025mg/l. Các ion  $Cu^{2+}$  được bổ sung vào dưới dạng sulfate đồng, đôi khi người ta cũng có thể bổ sung đồng dưới dạng  $CuCl_2$  hoặc  $CuNO_3$ .

Đồng là một cation hoá trị 2 và được hấp thu vào cây dưới dạng  $Cu^{2+}$  hay dưới dạng phức chất của nó. Nếu nồng độ  $Cu^{2+}$  và phức đồng tương đương nhau, cây dường như ưa ion đồng tự do hơn.

Trong xylem và phloem, đồng hầu như tồn tại dưới dạng phức, và chủ yếu là dạng một phức amino axit- đồng. Trong tế bào, đồng chủ yếu là thành phần của phức hệ enzym và rất quan trọng trong các phản ứng oxi hoá khử  $[(Cu^{2+})/(Cu^+)]$  được thực hiện nhờ những enzym này. Thiếu đồng lập tức dẫn đến sự giảm hoạt độ của các enzym chứa đồng.

Vai trò của đồng đối với quang hợp: Khoảng 50% đồng trong lục lạp được gắn với plastocyanin, ở giữa chuỗi truyền điện tử, giữa quang hệ I và quang hệ II, có chứa 1 nguyên tử đồng trên 1 phân tử. Trong trường hợp thiếu

đồng, nồng độ các plastocyanin sẽ bị giảm. Cũng giống như plastocyanin, các plastoquinone đóng vai trò quan trọng trong truyền điện tử giữa quang hệ I và quang hệ II. Khi đồng bị thiếu, màng lục lạp sẽ thiếu 2 protein điều hoà chuyển động của các plastoquinone. Để tổng hợp các plastoquinone cần phải có enzym laccase, đây là một enzym chứa đồng và hoạt động của nó sẽ bị giảm ngay khi thiếu đồng. Do đó, hiện tượng thiếu đồng nhanh chóng kéo theo hiện tượng giảm quang hợp. Thiếu đồng sẽ xảy ra những thay đổi trong cấu trúc lục lạp, điều này thể hiện rõ chức năng bảo vệ của đồng.

### **Mangan (Mn):**

Manganese là một trong những nguyên tố vi lượng quan trọng nhất, gần như luôn có mặt trong môi trường nuôi cấy. Nồng độ của Mn trong môi trường tương đương với Fe và B. Mn có tác động hóa học tương tự như  $Mg^{+}$  nên có thể thay thế cho  $Mg^{+}$  trong một số hệ thống enzym.

Mangan tồn tại trong thực vật ở dạng ion  $Mn^{2+}$  không liên kết, hoá trị hai và ở dạng này nó được chuyển từ rễ qua mạch xylem đến các phần khác của cây.

Nguyên tố này liên kết chặt với một số loại protein chứa kim loại (metalloprotein), hoặc như một thành phần cấu trúc của enzym hoặc như một phần trong hệ oxi hoá khử [Mn(II)/Mn(III)]. Cũng giống như đồng, nếu thiếu mangan, sẽ xảy ra các thay đổi trong cấu trúc của lục lạp, thể hiện rõ nhất ở hệ thống bảo vệ của mangan.

### **Coban (Co):**

Cobalt có mặt trong khoảng một nửa số lượng môi trường nuôi cấy mô tế bào thực vật, nồng độ sử dụng là 0,025 mg/l, đôi khi người ta có thể sử dụng nồng độ Cobalt cao gấp 10 lần. Cobalt là thành phần kim loại trong vitamin B12 có liên quan đến sự sinh tổng hợp acid nucleic nhưng chưa có bằng chứng nào về tác động của nó lên sự tăng trưởng và phát sinh hình thái của mô trên môi trường nuôi cấy.

Một trong những mục đích của việc bổ sung cobalt vào môi trường nuôi cấy có lẽ là chống lại sự gây độc của các chelat kim loại và có thể ngăn cản các phản ứng oxi hóa gây ra bởi đồng và sắt.

Coban đóng vai trò quan trọng trong quá trình cố định nitơ ở rễ cây họ đậu. Coban là thành phần cần thiết của enzym cobalamin. Co (III) là thành phần kim loại định vị giữa 4 nguyên tử nitơ trong cấu trúc porphyrin. Ba hệ thống enzym của vi khuẩn *Rhizobium* được biết tới có chứa Co.

Người ta thấy rằng có mối liên hệ giữa nồng độ Co với sự cố định nitrogen và sự phát triển rễ củ. Co có vai trò trong quá trình tổng hợp methyonine ở vi khuẩn, tổng hợp ribonucleotide và enzym methymalonyl-coenzyme A mutaza, một enzym cần thiết cho sự tổng hợp leghemoglobin.

Không ai biết chắc rằng liệu Co có giữ vai trò gì ở thực vật bậc cao hay không. Chỉ có một enzym phụ thuộc cobalamin đã được biết tới là leucine-2,3-aminomutase ở khoai tây. Đối với thực vật bậc thấp, Co là yếu tố cần thiết và có mặt trong một số cấu trúc dưới tế bào và thylakoid ở lục lạp.

### **Molybden (Mo):**

Thực vật hấp thu Mo dưới dạng  $\text{MoO}_4^{2-}$ . Molybdate thường được bổ sung vào môi trường nuôi cấy với nồng độ đến 1 mg/l. Molybden chủ yếu tồn tại ở dạng  $\text{MoO}_4^{2-}$  dung dịch giống như nước. Trong môi trường axit yếu, ion molybden tùy thuộc vào độ axit có thể nhận 1 hoặc 2 proton theo phương trình sau:



Molipden tham gia vào sự trao đổi  $\text{N}_2$  và nước của cây. Molipden được lấy từ hợp chất  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . Mỗi phân tử nitơ gắn với hai nguyên tử molybden mà chính chúng lại là một phần của phân tử protein sắt-molybden. Sau quá trình hoạt hoá phức hệ enzym nitrogenase sử dụng ATP, phức hệ sắt-molybden thay đổi cấu trúc của nó.

### **Kẽm (Zn):**

Thiếu kẽm thì sự sinh tổng hợp protein, acid nucleic và diệp lục tố sẽ bị giảm đi. Thực vật có đọt thân ngắn, lá nhỏ, đồng thời tế bào trần cũng kém phát triển.

Trong thực vật có mối quan hệ gần gũi giữa Zn và nồng độ auxin nội sinh. Người ta cho rằng, kẽm là một thành phần trong enzym có liên quan đến sự tổng hợp tiền chất của IAA là tryptophan. Nồng độ của kẽm bổ sung vào trong môi trường nuôi cấy thay đổi từ 0,1-70 mg/l, như vậy sự dư kẽm trong môi trường nuôi cấy ít gây độc cho mô.

Kẽm được hệ rễ hấp thu dưới dạng  $\text{Zn}^{2+}$ . Trong mạch xylem nó được chuyển vận dưới dạng ion  $\text{Zn}^{2+}$  hoặc muối kẽm của một axit hữu cơ. Nguyên tố này là một hợp phần kim loại của một số enzym. Nó có thể là một cofactor cấu trúc cũng như cofactor điều hoà của phức hệ enzym.

Kẽm đóng vai trò quan trọng trong tổng hợp tryptophan, một tiền chất của IAA. Ví dụ, thiếu kẽm trong ngô có thể thay thế bằng cách bổ sung tryptophan.

### **Clo (Cl):**

Ion  $\text{Cl}^-$  cần thiết cho sự tăng trưởng của thực vật nhưng nó ít có mặt trong các phản ứng sinh học và có vai trò với một lượng rất nhỏ. Thông thường trong môi trường nuôi cấy mô, nồng độ  $\text{Cl}^-$  cần thiết là 3 mg/l trung bình là 6 mg/l. Một số loài thực vật mẫn cảm với  $\text{Cl}^-$  như: cà chua, khoai tây, hành tỏi, bầu bí, dưa lê, thuốc lá, cam, quýt.



Chloro có ở thực vật dao động trong 1 kg trọng lượng khô (2.000 đến 20.000 mg/kg trọng lượng khô). Chloro được hấp thu dưới dạng  $Cl^-$  và rất cơ động trong cây. Chức năng chính của ion này là điều hoà thẩm thấu và bổ sung các chất mang. Trong lục lạp có chứa hàm lượng chloro lớn. Người ta cho rằng Chloro đóng vai trò hết sức quan trọng trong quang hợp.

Năng lực thẩm thấu: Ion  $Cl^-$  điều hoà sự đóng, mở khí khổng. Tình trạng thiếu Chloro làm khí khổng mở mãi, có thể gây tình trạng mất nước nghiêm trọng. Chloro rất quan trọng trong điều hoà năng lực thẩm thấu của các không bào và với các quá trình liên quan đến sức trương.

Sự trao đổi nitơ: Chloro hoạt hoá enzym tổng hợp asparagin, một enzym quan trọng trong quá trình trao đổi nitơ. Enzym này chuyển hoá glutamin thành asparagin và axit glutamic. Trong điều kiện có  $Cl^-$ , tốc độ của phản ứng tăng lên gấp 7 lần. Bởi thế, Chloro đã thực hiện một chức năng quan trọng trong quá trình trao đổi nitơ ở các loài thực vật sử dụng asparagin như chất mang.

### 1.3 Các vitamin

Tất cả các tế bào được nuôi cấy đều có khả năng tổng hợp tất cả các loại vitamin cơ bản nhưng thường là với số lượng dưới mức yêu cầu. Để mô có sức sinh trưởng tốt phải bổ sung thêm vào môi trường một hay nhiều loại vitamin. Các vitamin là rất cần thiết cho các phản ứng sinh hoá. Có tác dụng tham gia vào thành phần các men, là sản phẩm trung gian của sự trao đổi chất, có tác dụng thúc đẩy sự sinh trưởng và phân hoá mô, đẩy nhanh tốc độ sinh trưởng của cây trong bình nuôi cấy.

Thông thường thực vật tổng hợp các vitamin cần thiết cho sự tăng trưởng và phát triển của chúng. Thực vật cần vitamin để xúc tác các quá trình biến dưỡng khác nhau. Khi tế bào và mô được nuôi cấy in vitro thì một vài vitamin trở thành yếu tố giới hạn sự phát triển của chúng.

Các vitamin được sử dụng nhiều nhất trong nuôi cấy mô là: thiamine (B1), acid nicotinic (PP), pyridoxine (B6) và myo-inositol. Thiamin là một vitamin căn bản cần thiết cho sự tăng trưởng của tất cả các tế bào.

Thiamin thường được sử dụng với nồng độ biến thiên từ 0,1-10 mg/l. Acid nicotinic và pyridoxine thường được bổ sung vào môi trường nuôi cấy nhưng cũng không cần thiết cho sự tăng trưởng của tế bào nhiều loài thực vật. Acid nicotinic thường được sử dụng với nồng độ 0,1-5 mg/l, pyridoxine được sử dụng với nồng độ 0,1-10 mg/l.

Myo-inositol thường được pha chung với dung dịch mẹ của vitamin. Mặc dù đây là một carbohydrate chứ không phải là vitamin, nó kích thích cho sự tăng trưởng của tế bào đa số loài thực vật. Người ta cho rằng myo-inositol được phân tách ra thành acid ascorbic và peptine và được đồng hóa thành phosphoinositide và phosphatidylinositol có vai trò quan trọng trong sự phân

chia tế bào. Myo-inositol thường được sử dụng trong môi trường nuôi cấy mô và tế bào thực vật ở nồng độ 50-5.000 mg/l.

Các vitamin khác như biotin, acid folic, acid ascorbic, panthothenic acid, vitamin E (tocopherol), riboflavin và p-aminobenzoic acid cũng được sử dụng trong một số môi trường nuôi cấy. Nhu cầu vitamin trong môi trường nuôi cấy nói chung không quan trọng và chúng cũng không cản trở sự tăng trưởng của tế bào. Nói chung các vitamin này được thêm vào môi trường chỉ khi nồng độ thiamin thấp hơn nhu cầu cần thiết hoặc để cho huyền phù tế bào có thể tăng trưởng khi mật độ tế bào khởi đầu thấp.

Các vitamin sau đây được sử dụng phổ biến: inositol, thiamine HCl (B1), pyridoxine HCl (B6), nicotinic axit, trong đó vitamin B1 là không thể thiếu và được sử dụng trong hầu hết những môi trường nuôi cấy mô và tế bào thực vật. Linsmaier và Skoog đã khẳng định vitamin B1 là cần thiết cho sự sinh trưởng của cây sau khi nghiên cứu kỹ lưỡng về sự có mặt của nó trong môi trường MS. Các tác giả khác cũng khẳng định vai trò rất quan trọng của B1 trong nuôi cấy mô.

Inositol thường được nói đến như là một vitamin kích thích một cách tích cực đối với sự sinh trưởng và phát triển của thực vật, mặc dù nó không phải là vitamin cần thiết trong mọi trường hợp. Các vitamin khác, đặc biệt là nicotinic axit (vitamin B<sub>3</sub>), canxi pantothenate (vitamin B<sub>5</sub>) và biotin cũng được sử dụng để nâng cao sức sinh trưởng của mô nuôi cấy. Ảnh hưởng của các vitamin lên sự phát triển của tế bào nuôi cấy in vitro ở các loài khác nhau là khác nhau hoặc thậm trí còn có hại (gây độc).

#### **a. Vitamin B1 (Thiamine.HCl, Aneurin)**

Là một chất bổ sung rất cần cho môi trường nuôi cấy . Khi khử trùng bằng cách hấp ở nhiệt độ cao vitamin B 1 bị nhiệt phân thành pyrimidin và thiazol là hai cấu tử của vitamin B 1, nhưng tế bào nuôi cấy có khả năng tổng hợp lại chúng thành phân tử vitamin B 1. Vì vậy không nhất thiết phải khử trùng bằng phương thức khác như lọc c chẳng hạn.

#### **b. Vitamin B2 (Riboflavin, Lactoflavin)**

Có màu vàng không bền dễ bị phân hủy khi đun sôi hay để ra ngoài ánh sáng. Nó là nhóm ngoại của coenzim vận chuyển hydro và điện tử trong các phản ứng ôxi hóa khử sinh học. Nếu cơ thể bị thiếu vitamin này không hình thành FAD, FMN nên các phản ứng ôxi hóa khử trong tế bào bị phá vỡ. Đối với nuôi cấy sáng chỉ dùng nồng độ 0,01 ppm, nhưng đối với nuôi cấy trong tối có thể tăng lên 10 - 50 ppm.

#### **c. Vitamin B6 (Pyridoxine, Adermin)**

Là tiền chất của pyridoxal - phosphate-cofactor của các nhóm enzyme như carboxylase và transaminase . Khi khử trùng ở nhiệt độ cao phản ứng xảy ra như sau: Pyridoxin + Phosphat → Pyridoxalphosphate

Vitamin B6 là coenzin của các enzym xúc tác cho các phản ứng chuyển hóa axit amin. Đó là then chốt trong quá trình trao đổi protein của cơ thể sinh vật

#### **d. Myo-Inositol (Bios I)**

Có vai trò trong sinh tổng hợp thành tế bào, cụ thể là sinh tổng hợp acid polygalacturonic và pectine. Inosit là chất bền vững khi khử trùng. Thường được sử dụng ở nồng độ cao 100 ppm. Khi phân tích thành phần của nước dừa người ta thu được inosit trong một phân đoạn trung tính.

#### **e. Nicotinic acid và pyridoxine**

Thường được bổ sung vào môi trường nuôi cấy nhưng có thể thay thế bằng các vitamin khác cho sự sinh trưởng của tế bào ở nhiều loài. Các vitamin khác như folic acid, ascorbic acid, vitamin E (tocopherol), và p-aminobenzoic acid cũng được sử dụng trong nuôi cấy mô và tế bào, đặc biệt khi tế bào sinh trưởng ở mật độ quần thể rất thấp. Nói chung, các vitamin này được bổ sung trong khoảng 0,1-10,0 ppm.

### **1.4 Các chất điều hoà sinh trưởng**

Bên cạnh các chất cung cấp dinh dưỡng cho mô nuôi cấy, việc bổ sung một hoặc nhiều chất điều hoà sinh trưởng như auxin, cytokinin và giberellin là rất cần thiết để kích thích sự sinh trưởng, phát triển và phân hoá cơ quan, cung cấp sức sống tốt cho mô và các tổ chức. Tuy vậy, yêu cầu đối với những chất này thay đổi tùy theo loài thực vật, loại mô, hàm lượng chất điều hoà sinh trưởng nội sinh của chúng. Các chất điều hoà sinh trưởng thực vật được chia thành các nhóm chính sau đây:

#### **a. Nhóm các auxin**

Các auxin có thể là auxin tự nhiên hoặc tổng hợp, thường được dùng trong nuôi cấy mô và tế bào để kích thích sự phân bào và sinh trưởng của mô sẹo, đặc biệt là 2,4-D, tạo phôi vô tính, tạo rễ, ...

Môi trường nuôi cấy được bổ sung các auxin khác nhau như: 1H-indole-3-acetic acid (IAA), 1-naphthaleneacetic acid (NAA), 1H-indole-3-butyric acid (IBA), 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) và naphthoxyacetic acid (NOA). IAA là auxin tự nhiên có trong mô thực vật; còn lại NAA, IBA, 2,4-D là các auxin nhân tạo, thường thì các auxin nhân tạo có hoạt tính mạnh hơn vì do đặc điểm phân tử của chúng nên các enzyme oxy hóa auxin (auxin-oxydase) không có tác dụng.

Auxin là nhóm chất điều hoà sinh trưởng thực vật được sử dụng thường xuyên trong nuôi cấy mô tế bào thực vật. Auxin kết hợp chặt chẽ với các thành phần khác của môi trường dinh dưỡng để kích thích sự tăng trưởng của mô sẹo, huyền phù tế bào và điều hoà sự phát sinh hình thái, đặc biệt là khi nó được phối hợp sử dụng với các cytokinin. Sự áp dụng loại Auxin và nồng độ auxin trong môi trường nuôi cấy phụ thuộc vào:

- Kiểu tăng trưởng hoặc phát triển cần nghiên cứu
- Hàm lượng auxin nội sinh của mẫu cây
- Khả năng tổng hợp auxin tự nhiên của mẫu cây
- Sự tác động qua lại giữa auxin ngoại sinh và auxin nội sinh

Đặc tính của auxin: Auxin có vai trò kích thích sự tăng trưởng và kéo dài tế bào. Auxin có khả năng khởi đầu sự phân chia tế bào ...

Đặc điểm chung của các auxin là tính chất phân chia tế bào. Các hormone thuộc nhóm này có các hoạt tính như: tăng trưởng chiều dài thân, lóng (gióng), tính hướng sáng, hướng đất, tính ưu thế ngọn, tạo rễ và phân hóa mạch dẫn. Nói chung các auxin được hòa tan hoặc trong ethanol hoặc trong NaOH loãng (Razdan 1994)

Các auxin liên quan tới độ dài của thân, đọt, chồi chính, rễ... Đối với nuôi cấy mô, auxin đã được sử dụng cho việc phân chia tế bào và phân hóa rễ. Những auxin dùng rộng rãi trong nuôi cấy mô là IBA (3-indolebutiric acid), IAA (3-indole acetic acid), NAA (Naphthaleneacetic acid), 2,4-D (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid) và 2,4,5-T (Trichlorophenoxyacetic acid). Trong số các auxin, IBA và NAA chủ yếu sử dụng cho môi trường ra rễ và phối hợp với cytokinin sử dụng cho môi trường ra chồi. 2,4-D và 2,4,5-T rất có hiệu quả đối với môi trường tạo và phát triển callus. Auxin thường hòa tan trong ethanol hoặc NaOH pha loãng.

Những auxin có hiệu lực riêng biệt trong nuôi cấy tế bào thực vật là 4-chlorophenoxyacetic acid (4-CPA) hoặc p-chlorophenoxyacetic acid (PCPA), 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid (2,4,5-T), 2-methyl-4-chlorophenoxyacetic acid (MCPA), 4-amino-3,5,6-trichloropicolinic acid (picloram), và 3,6-dichloro-2-methoxybenzoic acid (dicamba).

*Vai trò của các chất thuộc nhóm auxin:*

- Kích thích phân chia và kéo dài tế bào. Chồi đỉnh cung cấp auxin gây ra ức chế sinh trưởng của chồi bên. Ưu thế chồi đỉnh làm ức chế sinh trưởng của chồi nách. Nếu ngắt bỏ chồi đỉnh sẽ dẫn đến sự phát chồi nách. Nếu thay thế vai trò của chồi đỉnh (đã bị ngắt bỏ) bằng một lớp chất keo có chứa IAA thì chồi nách vẫn bị ức chế sinh trưởng. Cơ chế ức chế của chồi đỉnh liên quan đến một chất điều hòa sinh trưởng khác là ethylene. Auxin (IAA) kích thích chồi bên sản sinh ra ethylen làm ức chế sinh trưởng của chồi đỉnh. IAA đóng vai trò kích thích sự phân hoá của các mô dẫn (xylem and phloem).

- Auxin kích thích sự mọc rễ ở cành giâm và kích thích sự phát sinh chồi phụ trong nuôi cấy mô.

- Auxin có các ảnh hưởng khác nhau đối với sự rụng lá, quả, sự đậu quả, sự phát triển và chín của quả, sự ra hoa trong mối quan hệ với điều kiện môi trường.

- Tạo và nhân nhanh mô sẹo (callus)
- Kích thích tạo chồi bất định (ở nồng độ thấp)
- Tạo phôi soma (2,4-D)

## b. Nhóm các cytokinin

Các cytokinin là dẫn xuất của adenine, đây là những hormone liên quan chủ yếu đến sự phân chia tế bào, sự thay đổi ưu thế ngọn và phân hóa chồi trong nuôi cấy mô. Các cytokinin được sử dụng thường xuyên nhất là 6-benzylaminopurine (BAP) hoặc 6-benzyladenin (BA), 6- $\gamma$ - $\gamma$ -dimethylaminopurine (2-iP), N-(2-furfurylamino)-1-H-purine-6-amine (kinetin), và 6-(4-hydroxy-3-methyl-trans-2-butanyl-amino) purine (zeatin). Zeatin và 2-iP là các cytokinin tự nhiên, còn BA và kinetin là các cytokinin nhân tạo. Nói chung chúng được hòa tan trong NaOH hoặc HCl loãng.

Một số hợp chất được phát hiện trong thời gian gần đây có hoạt tính giống cytokinin là N,N'-diphenylurea (DPU), thidiaziron, N-2-chloro-4-puridyl-N-phenyl urea (CPPU) và một số dẫn xuất khác của diphenyl urea. Hiệu quả đặc biệt của các hợp chất gốc urea lên sự sinh trưởng của mô thực vật cần phải được nghiên cứu thêm.

Tỷ lệ auxin /cytokinin rất quan trọng đối với sự phát sinh hình thái (morphogenesis) trong các hệ thống nuôi cấy. Đối với sự phát sinh phôi (embryogenesis), để tạo callus và rễ cần có tỷ lệ auxin /cytokinin cao, trong khi ở trường hợp ngược lại sẽ dẫn đến sự sinh sản chồi và chồi nách. Vấn đề quan trọng không kém là nồng độ của hai nhóm chất điều khiển sinh trưởng này. Chẳng hạn 2,4-D cùng với BA ở nồng độ 5,0 ppm (mg/l) kích thích sự tạo thành callus ở *Agrostis* nhưng nếu dùng ở nồng độ 0,1 ppm chúng sẽ kích thích tạo chồi mặc dù trong cả 2 trường hợp tỷ lệ auxin /cytokinin là bằng 1. Cơ chế hoạt động của cytokinin là chưa được biết rõ ràng mặc dù có một số kết quả về sự có mặt của các hợp chất mang hoạt tính cytokinin trong RNA vận chuyển (transfer RNA). Các cytokinin cũng có hoạt tính tổng hợp RNA, tăng hoạt tính enzyme và protein trong các mô nhất định.

Kinetin được phân lập từ chế phẩm DNA cũ hoặc nucleic acid mới sau khi khử trùng ở nhiệt độ cao hay đun sôi. Trong cơ thể sống không có kinetin tồn tại, sản phẩm này kích thích sự phát sinh chồi của cây thuốc lá nuôi cấy, nhưng nếu phối hợp xử lý cùng auxin ở tỷ lệ nồng độ thích hợp thì sẽ kích thích quá trình phân chia tế bào (do đó có tên là kinetin) ở các mô không phân hóa.

Trong tự nhiên cũng tồn tại một hormone phân bào khác, Letham là người đầu tiên đã phân lập, tinh chế và cho kết tinh thành công hormone phân bào tự nhiên đó từ nội nhũ đang ở dạng sữa của hạt ngô. Hợp chất cytokinin tự nhiên đó được gọi là zeatin (zea: ngô).

Tương tự các cytokinin khác, zeatin cũng là một dẫn xuất của adenin. Trong thực tiễn nuôi cấy mô người ta chỉ dùng zeatin trong những trường hợp

đặc biệt vì giá thành rất đắt , thường thay thế zeatin bằng kinetin hoặc một sản phẩm tổng hợp nhân tạo khác , đó là:

6-Benzylaminopurine (BAP): Hoạt lực của BAP cao hơn nhiều so với kinetin và bản thân BAP bền vững hơn zeatin dưới tác động của nhiệt độ cao . BAP có khả năng làm tăng hình thành các sản phẩm thứ cấp và tăng kích thước của tế bào ở các lá mầm , kích thích sự nảy mầm của hạt và quá trình trao đổi chất.

Cytokinin liên quan tới sự phân chia tế bào, phân hóa chồi v.v... Trong môi trường nuôi cấy mô, cytokinin cần cho sự phân chia tế bào và phân hóa chồi từ mô sẹo hoặc từ các cơ quan, gây tạo phôi vô tính, tăng cường phát sinh chồi phụ.

*Chức năng chủ yếu của các cytokinin:*

- Kích thích phân chia tế bào
- Tạo và nhân callus
- Kích thích phát sinh chồi trong nuôi cấy mô
- Kích thích phát sinh chồi nách và kìm hãm ảnh hưởng ưu thế của chồi đỉnh
- Làm tăng diện tích phiến lá do kích thích sự lớn lên của tế bào
- Có thể làm tăng sự mở của khí khổng ở một số loài
- Tạo chồi bất định (ở nồng độ cao)
- Ức chế sự hình thành rễ
- Ức chế sự kéo dài chồi
- Ức chế quá trình già (hoá vàng và rụng) ở lá, kích thích tạo diệp lục

### **c. Gibberellin**

Gibberellin được phát hiện vào những năm 1930. Lịch sử phát hiện nhóm hormone này bắt đầu từ 1895 khi người Nhật nói về bệnh lúa von . Năm 1926, xác định được bệnh đó là do loài nấm *Gibberella fujikuroi* gây ra. Đến những năm 30, mới phân lập và tinh chế được hoạt chất , được gọi là gibberellin.

Mãi sau chiến tranh thế giới thứ II năm 1950, người Anh và người Mỹ mới biết đến công trình này của người Nhật . Tới nay , người ta đã phát hiện được trên 60 loại thuộc nhóm gibberellic acid . Loại gibberellic acid thông dụng nhất trong nuôi cấy mô thực vật là GA<sub>3</sub>.

Trong đời sống thực vật gibberellin đóng vai trò quan trọng đối với nhiều quá trình sinh lý như : sinh lý ngủ nghỉ của hạt và chồi , sinh lý phát triển của hoa, làm tăng sinh trưởng chiều dài của thực vật .

Nhưng trong nuôi cấy mô và tế bào thực vật tác dụng của gibberellic acid chưa thật rõ ràng. Nhiều tác giả có sử dụng và coi đó là thành phần không thể thiếu của một loại môi trường chuyên dụng nào đó .

Trong số hơn 20 chất thuộc nhóm gibberellin, GA3 là chất được sử dụng nhiều hơn cả trong thực tiễn. GA3 kích thích kéo dài chồi và nảy mầm của phôi vô tính. So với auxin và cytokinin, gibberellin hiếm khi được dùng. GA3 có tính hoà tan trong nước.

*Gibberellin có các chức năng cơ bản sau:*

- Kích thích kéo dài chồi do tăng cường phân bào và kéo dài tế bào, ví dụ kéo dài thân và đòng lúa sau khi phun GA3, kéo dài đốt thân. Các cây lùn thường bị thiếu gibberellin.
- Phá ngủ hạt giống hoặc củ giống, ví dụ phá ngủ khoai tây sau thu hoạch.
- Kiểm soát sự ra hoa của các cây 2 năm tuổi. Năm đầu thân mầm nằm in, sau mùa đông mầm hoa kéo dài đốt rất nhanh và phân hoá hoa
- Ức chế sự hình thành rễ bất định
- Kích thích sinh tổng hợp của  $\alpha$ -amylase ở hạt cây ngũ cốc nảy mầm, giúp tiêu hoá các chất dự trữ trong nội nhũ để nuôi mầm cây
- Các chất ức chế tổng hợp kích thích quá trình tạo củ (thân củ, thân hành và củ)
- Kích thích sự nảy mầm của phân hoa và sinh trưởng của ống phần
- Có thể gây tạo quả không hạt hoặc làm tăng kích thước quả nhỏ không hạt
- Có thể làm chậm sự hoá già ở lá và quả cây có múi

#### **e. Abscisic axít (ABA)**

ABA thuộc nhóm các chất ức chế sinh trưởng tự nhiên gây ra sự ngủ nghỉ của chồi , làm chậm sự nảy mầm của hạt và sự ra hoa , đóng khí khổng . ABA còn có tác dụng tăng cường khả năng chống chịu của tế bào thực vật đối với điều kiện ngoại cảnh bất lợi , vì vậy ABA được đưa vào môi trường nuôi cấy và mang lại hiệu quả nhất định .

Trong nuôi cấy mô và tế bào, ABA có tác dụng tạo phôi vô tính, kích thích sự chín của phôi, kích thích sự phát sinh chồi ở nhiều loài thực vật. Các tác dụng cơ bản của ABA là:

- Tham gia vào sự rụng lá, hoa, quả ở hầu hết các cây trồng và gây ra sự nứt quả, ABA thường được sản sinh khi có các yếu tố ức chế cây trồng như mất nước và nhiệt độ thấp đóng băng.
- Tham gia vào sự ngủ nghỉ, kéo dài thời gian ngủ nghỉ và làm chậm sự nảy mầm của hạt.

- Ức chế sự kéo dài thân và được sử dụng để kiểm soát sự kéo dài thân cành.
- Gây ra sự đóng khí khổng.

#### f. Ethylene

Các chức năng cơ bản của ethylene:

- Gây già hoá lá, kích thích sự rụng lá và quả
- Làm chín quả
- Sinh tổng hợp ethylene được tăng cường khi quả đang chín, cây đang bị úng, lão hoá, tổn thương cơ giới và bị nhiễm bệnh
- Điều khiển sự chín của một số loại quả
- Ethylene kìm hãm sự ra hoa của đa số cây. Tuy vậy, sự ra hoa của xoài, dứa, một số cây cảnh lại được kích thích bởi ethylene.

**Bảng 1. Phân loại các chất điều hoà sinh trưởng thực vật**

<b>Chất điều hoà sinh trưởng tự nhiên (phytohormon)</b>	<b>Chất điều hoà sinh trưởng nhân tạo</b>
<b>Chất kích thích sinh trưởng (stimulator)</b>	
Auxin (AIA, IAN, APA) Gibberellin (A <sub>1</sub> , A <sub>2</sub> , A <sub>3</sub> , ... A <sub>54</sub> ) Cytokinin (zeatin, zeatin ribozit, diphenyl ure...)	Auxin tổng hợp (auxinoit) AIB; ANA; 2,4D; 2,4,5T; Cytokinin tổng hợp (kinetinm, BA, PBA)
<b>Chất ức chế sinh trưởng (inhibitor)</b>	
AAB, các chất phenol, axit jasmonic...	Retardant (MH, CCC, ATIB ...)
C – Ethylene	ACEP
<b>Danh pháp quốc tế</b>	
AIA: axit β - indol axetic IAN: axit β - indolyl axetonitril APA: axit phenyl axetic α - ANA: axit α - naphtil axetic 2,4D: axit 2,4 - diclo phenoixaxetic	BA: benzyl adenin PBA: tetrahydro piranyl benzyl adenin MH: malein hidrazit CCC: clo colin clorit ATIB: axit 2,3,5 - triiot benzoic ACEP: axit 2 - clo etyl Phốt phoric



### **1.5 Những chất thường dùng khác:**

\* *Đường*: Nguồn Carbon thường dùng là đường saccarosa và glucoza. Đường là nguồn carbon và năng lượng giúp mô tế bào thực vật tổng hợp nên các chất hữu cơ, giúp tế bào phân chia, tăng sinh khối của mô. Còn có chức năng làm ổn định áp lực thẩm thấu của tế bào, duy trì đều đặn lực thẩm thấu. Nồng độ thường dùng là từ 1 - 5%.

\* *Agar*: Là chất làm đông cứng môi trường (giả thể cho nuôi cấy). Ở 80°C agar ngậm nước chuyển sang trạng thái sol, ở 40°C trở về trạng thái gel. Agar có tác dụng cố định các vật cấy. Sở dĩ sử dụng agar vì nó trong suốt, dễ quan sát, khả năng thẩm thấu mạnh nhưng agar thường có tạp chất, phạm vi hấp phụ của mẫu vật nuôi với môi trường hẹp.

\* *Than hoạt tính*: Có tác dụng chủ yếu về mặt vật lý:

- Chống lại sự ô nhiễm của fitoxit (dịch tiết mô nuôi cấy) đến môi trường trong bình nuôi, chống lão hoá.
- Thúc đẩy sự hình thành rễ: Trong trường hợp ánh sáng nhiều thì than hoạt tính sẽ điều tiết ánh sáng cho thích hợp với sự hình thành rễ. Thường dùng từ 1 - 10 gam/1lít môi trường.

\* *Các chất kháng sinh* có tác dụng chống ô nhiễm, đặc biệt cho giai đoạn nhân nhanh, nhưng đây chỉ là giải pháp cứu vãn trong một số trường hợp.

\* *Nước dừa*: Nước dừa chứa muối khoáng, glucid 3%, lipid 1%, protid 0.15 - 0.29%, sinh tố B1, B6, Biotinic. Trong nuôi cấy mô người ta thường dùng nước dừa lấy ở trái xanh. Nước dừa chịu được nhiệt độ của nồi hấp, thường được sử dụng với nồng độ 10 - 20%.

\* *Dịch chiết nấm men*: Các chất này bị mất đi 40% hoạt tính ở nhiệt độ của nồi hấp, thường sử dụng ở nồng độ 0.1 - 1%.

## **2. Phân loại hóa chất trong vi nhân giống**

Hóa chất dùng trong vi nhân giống được phân ra làm 2 nhóm lớn là:

- + Nhóm hóa chất khử trùng
- + Nhóm hóa chất để pha môi trường vi nhân giống

### **2.1. Nhóm hóa chất khử trùng**

\* **Cồn**:

Cồn được dùng trong vi nhân giống là loại cồn 75% vừa có khả năng khuếch tán và thấm sâu vừa có tác dụng sát trùng nhưng đồng thời cũng dễ tổn thương tế bào mẫu cấy nên không kéo dài thời gian ở giai đoạn này.

Cũng có thể dùng cách xử lý khác với những mẫu đặc biệt như: quả, nụ hoa, chùm hoa có búp, vẩy, mô bao bọc, chồi nách hoặc chồi đỉnh được bọc kỹ bằng vẩy, sáp ... Trường hợp này sau khi xử lý bằng cồn 75% có thể vớt ra và

bóc tách dần trong khi còn bay hơi trước tủ cấy. Cũng có lúc phải dùng cồn 90% và đốt trên đèn cồn khi gặp mẫu quá khó.

**\* Các chất khử trùng khác**

Ca(ClO) <sub>2</sub>	AgNO <sub>3</sub>	Chất kháng sinh
NaClO	HgCl <sub>2</sub>	Nước Brôm
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>		

**Bảng 2. Bảng thử các loại hóa chất khử trùng**

Tên	Nồng độ %	Thời gian khử trùng	Độ khó	Hiệu quả
Ca(ClO) <sub>2</sub>	9-10	5-30	Dễ	Rất tốt
NaClO	2	5-30	Dễ	Rất tốt
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	10-12	5-15	Dễ nhất	Tốt
Nước Brôm	1-2	2-10	Dễ	Rất tốt
AgNO <sub>3</sub>	1	5-30	Hơi khó	Tốt
HgCl <sub>2</sub>	0.1-1.0	2-15	Hơi khó	Rất tốt
Chất kháng sinh	4-500ppm	30-60	Vừa	Rất tốt

*Cần lưu ý khi sử dụng các loại hoá chất khử trùng:*

- Ca(ClO)<sub>2</sub> và NaClO có tác dụng sát trùng do nguyên tử Cl tách ra khỏi phân tử trở thành dạng tự do, do đó khi sử dụng nên dùng bình nắp xoáy để lưu giữ Cl.
- Thuốc tẩy trắng - lơ hồng rất được trọng dụng với mẫu xì, dầu, nhựa, lông bám.... Nó có tác dụng khuếch tán, luồn sâu, kéo đẩy các vật dính bám theo kiểu hoá keo.
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sát trùng do sự tạo thành oxy nguyên tử. Cũng như 2 chất trên, cả 3 chất này dễ loại trừ tàn dư sau xử lý. Thường chỉ cần tráng rửa nước cất vô trùng 4-6 lần là đủ.
- HgCl<sub>2</sub> có hiệu lực sát trùng rất mạnh nhưng tàn dư cũng khó tẩy rửa. Do đó sau xử lý phải tráng rửa nước cất vô trùng ít nhất 6-8 lần.

Một số năm gần đây nhiều người thích dùng Tween. Các loại thường dùng là: Tween20, Tween40, Tween60, nhưng tốt nhất là Tween80 và

TweenX. Đây là loại thuốc hoạt hoá bề mặt tiếp xúc, do đó rất dễ luân lách, loại trừ bọt khí. Tuy nhiên tác hại của nó là làm tăng tổn thương mẫu cấy, do đó phải thực hiện nghiêm ngặt thời gian và nồng độ sử dụng.

## **2.2. Nhóm hóa chất dùng để pha chế môi trường dùng cho nuôi cấy mô**

Nhóm hóa chất dùng để pha chế môi trường dùng cho nuôi cấy mô gồm có các thành phần sau:

- Các loại muối khoáng (Các nguyên tố đa lượng và các nguyên tố vi lượng)
- Các Vitamin
- Các chất điều hòa sinh trưởng
- Các chất hữu cơ khác
- Chất nền (chất đông cứng môi trường)
- Nguồn các bon
- Than hoạt tính (than củi)

### **a. Các loại muối khoáng**

Muối khoáng là thành phần không thể thiếu trong các môi trường nuôi cấy mô và tế bào thực vật:

- Muối khoáng là các vật liệu (nguồn N, S, P....) cho sự tổng hợp các chất hữu cơ. Nitơ, lưu huỳnh, phốt-pho là các thành phần không thể thiếu của các phân tử protein, các axit nucleic và nhiều chất hữu cơ khác. Canxi và axit boric được tìm thấy chủ yếu ở thành tế bào, đặc biệt là canxi có nhiệm vụ quan trọng giúp ổn định màng sinh học.

- Các ion của các muối hoà tan đóng vai trò quan trọng ổn định áp suất thẩm thấu của môi trường và tế bào, duy trì thế điện hoá của thực vật.

Ví dụ: K và C rất quan trọng trong điều hoà tính thẩm lọc của tế bào, duy trì điện thế và tham gia hoạt hoá nhiều enzym.

Trong môi trường, các muối khoáng được chia thành các nguyên tố vi lượng và đa lượng:

- Các chất dinh dưỡng đa lượng : bao gồm sáu nguyên tố : nitrogen (N), phosphorus (P), potassium (K), calcium (Ca), magnesium (Mg) và sulphur (S) tồn tại dưới dạng muối khoáng , là thành phần của các môi trường dinh dưỡng khác nhau. Tất cả các nguyên tố này là rất cần thiết cho sinh trưởng của mô và tế bào thực vật.

- Các nguyên tố vi lượng : là các nguyên tố vô cơ cần một lượng nhỏ nhưng không thể thiếu cho sinh trưởng của mô và tế bào thực vật . Đó là các ion: iron (Fe), manganese (Mn), zinc (Zn), boron (B), copper (Cu), và

molybdenum (Mo). Fe được cung cấp dưới dạng chelate Fe, và Zn được dùng bình thường trong các môi trường nuôi cấy.

Các dạng muối tetratrate và citrate Fe khó hòa tan và thường hay kết tủa trong môi trường. Vấn đề này có thể khắc phục bằng cách dùng diaminetetraacetic acid (EDTA)-chelate Fe thay cho citrate Fe, đặc biệt đối với quá trình tạo phôi. Tuy nhiên, các dạng chelate EDTA không hoàn toàn ổn định trong môi trường nuôi cấy dạng lỏng.

Tầm quan trọng của một số nguyên tố vi lượng trong thành phần môi trường còn chưa được hiểu một cách rõ ràng. Co, Al, Ni... có thể có lợi đối với thực vật nhưng cũng có thể là không cần thiết. Trong thực tế, hầu hết các nguyên tố vi lượng chỉ có phần khoáng của muối (cation) là quan trọng, còn vai trò các anion có thể là không cần thiết.

### **b. Các chất Vitamin**

Các vitamin được sử dụng nhiều nhất trong nuôi cấy mô là: thiamine (B1), acid nicotinic (PP), pyridoxine (B6) và myo-inositol.

Thiamin là một vitamin cần thiết cho sự tăng trưởng của tất cả các tế bào, được sử dụng với nồng độ từ 0,1-10 mg/l

Acid nicotinic và pyridoxine thường được bổ sung vào môi trường nuôi cấy nhưng cũng không cần thiết cho sự tăng trưởng của tế bào nhiều loài thực vật. Acid nicotinic thường được sử dụng với nồng độ 0,1-5 mg/l, pyridoxine được sử dụng với nồng độ 0,1-10 mg/l.

Myo-inositol thường được pha chung với dung dịch mẹ của vitamin. Mặc dù đây là một carbohydrate chứ không phải là vitamin, nó cũng được chứng minh kích thích cho sự tăng trưởng của tế bào đa số loài thực vật. Myo-inositol thường được sử dụng trong môi trường nuôi cấy mô và tế bào thực vật ở nồng độ 50-5000 mg/l.

Các vitamin khác như biotin, acid folic, acid ascorbic, panthothenic acid, vitamin E (tocopherol), riboflavin và p-aminobenzoic acid cũng được sử dụng trong một số môi trường nuôi cấy. Nhu cầu vitamin trong môi trường nuôi cấy nói chung không quan trọng và chúng cũng không cản trở sự tăng trưởng của tế bào. Nói chung các vitamin này được thêm vào môi trường chỉ khi nồng độ thiamin thấp hơn nhu cầu cần thiết hoặc để cho huyền phù tế bào có thể tăng trưởng khi mật độ tế bào khởi đầu thấp.

### **c. Các chất bổ sung vào môi trường cấy mô**

Amino acid và các nguồn cung cấp nitrogen khác. Các nguồn nitrogen hữu cơ thường sử dụng trong môi trường nuôi cấy tế bào thực vật là hỗn hợp amino acid như casein hydrolysate, L-glutamine, L-asparagine và adenine. Casein hydrolysate nói chung được sử dụng với nồng độ 0,05-0,1%.

#### **d. Các chất điều hòa sinh trưởng**

##### ***Nhóm auxin***

- Indole-3-acetic acid (IAA)
- Indole-3-butyric acid (IBA)
- Naphtin Axetic Axit (NAA)
- 2,4-dichlorophenoxy- acetic acid (2.4D)
- p-chlorophenoxy- acetic acid (CPA)

##### ***Chức năng trong hệ thống nuôi cấy mô là***

- Phân chia tế bào
- Tạo và nhân callus
- Tạo rễ bất định (ở nồng độ cao)
- Tạo chồi bất định (ở nồng độ thấp)
- Tạo phôi soma (2,4-D)
- Ức chế chồi nách

##### ***Nhóm cytokinin*** (hocmon hoạt hoá phân chia tế bào phân chia tế bào và ức chế sự già hoá)

- Kinetin
- 6-Bezyl amino- purine (BAP)
- Zeatin (Z)
- Zeatinriboside (ZR)
- Isopentenyladenosine (iPA)

##### ***Chức năng trong hệ thống nuôi cấy mô là***

- Phân chia tế bào
- Tạo và nhân callus
- Kích thích bật chồi nách.
- Tạo chồi bất định (ở nồng độ cao)
- Ức chế sự hình thành rễ
- Ức chế sự kéo dài chồi.
- Ức chế quá trình già (hoá vàng) ở lá.

##### ***Nhóm gibberellin***

- Gibberellic acid (GA3)
- Gibberllin 1 (GA1)

- Gibberellin 4 (GA4)

*Chức năng trong hệ thống nuôi cấy mô*

- Kéo dài chồi
- Phá ngủ ở hạt giống.
- Ức chế sự hình thành rễ bất định.
- Các chất ức chế tổng hợp kích thích quá trình tạo củ (thân củ, thân hành và củ).

***Nhóm các chất điều hòa sinh trưởng khác***

- Ethylene: Gây già hoá lá, làm chín quả
- Abscisic acid: Sự chín của thể phôi, kích thích sự hình thành thân hành và thân củ, thúc đẩy sự phát triển của tình trạng ngủ
- Nhóm Polyamine, Abscisic acid: Kích thích sự tự hình thành rễ, kích thích sự hình thành chồi, đẩy mạnh sự phát sinh thể phôi

**3. Danh mục các hóa chất dùng trong vi nhân giống**

**a. Nhóm đa lượng**

- $KNO_3$  (Kali Nitrat)
- $NH_4NO_3$  (Amon Nitrat)
- $K(H_2PO_4)$  Photphat kali monno basic
- $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  Magie Sunphat.  $7H_2O$
- $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  Canxi clorua.  $2H_2O$
- $Ca(NO_3)_2 \cdot 2H_2O$  Canxi Nitrat.  $2H_2O$

**b. Nhóm vi lượng**

- $H_3BO_3$ .
- $MnSO_4 \cdot 7H_2O$
- $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ .
- $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ .
- $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ .
- $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ .
- Fe - EDTA (Muối sắt)

**c. Nhóm Vitamin**

- VB1: Thiamine

- VB5: Nicotinic acid
- VB6: Pyridoxine
- VB2: Riboflavine
- VC: acid L.ascorbic
- Myo- Inositol

**d. Nhóm chất điều hòa sinh trưởng**

- Naphtyl axetic axit ( $\alpha$ -NAA)
- Indol axetic axit (IAA)
- Indol butyric axit (IBA)
- 2,4 dicloro phenoxy axetic axit (2,4D)
- 6 - benzyl adenin purin (6BAP)
- A - adenine (A-Ad)
- Kinetin (KT)
- Zeatin (chất chiết từ ngô non - 1 chất tự nhiên - ngọc mễ tổ).
- BA được dùng phổ biến nhất vì có hoạt tính cao và giá không đắt

**d. Các chất chỉ thị, chất khử trùng**

- NaOH (ba giờ)
- HCl
- $\text{Ca}(\text{ClO})_2$
- NaClO
- $\text{H}_2\text{O}_2$
- Nước Brôm
- $\text{AgNO}_3$
- $\text{HgCl}_2$
- Nước khử trùng

**e. Một số các chất khác:** Đó là hỗn hợp các chất tự nhiên không xác định.

Nếu nuôi cấy mô tế bào trên môi trường đơn giản chỉ có muối khoáng và đường thì sự sinh trưởng và tái sinh của mô không bình thường. Nếu môi trường nuôi cấy càng phức tạp phong phú đầy đủ các chất là tạo điều kiện cho mô nuôi cấy phát triển tốt. Các hỗn hợp chất tự nhiên sử dụng trong nuôi cấy mô như sau:

\* Nước dừa:

Trong nước dừa (cả quả non và quả dừa già) đều chứa các chất như các axit amin tự do (nồng độ 190,5- 685ppm), protein, axit hữu cơ, đường, ARN, ADN, myo-inositol, các hợp chất điều hoà sinh trưởng (auxin, xytokilin), một số chất khoáng. Lượng dùng trong nuôi cây mô 15 –20% thể tích.

Cách chiết: bổ quả dừa già lấy nước đem lọc lấy dịch trong quả dừa để sử dụng ngay. Trường hợp cần phải bảo quản thì phải đựng trong các túi vải nhựa bảo quản lạnh sâu thì cũng có thể bảo quản được vài tháng.

**\* Dịch chiết nấm men**

Trong dịch nấm men chứa các chất cần thiết cho sự sinh trưởng của rễ như đường, axitnucleic, axit amin, vitamin, auxin, khoáng...Bổ sung vào môi trường nuôi cấy đều cho hiệu quả tốt

**\* Dịch thuỷ phân casein:**

Chủ yếu được sử dụng làm nguồn để cung cấp thêm axit amin cho môi trường nuôi cấy.

## **B. Câu hỏi và bài tập thực hành**

### **1. Câu hỏi**

- Trình bày vai trò của các nguyên tố đa lượng
- Trình bày vai trò của các nguyên tố vi lượng
- Trình bày vai trò của chất điều hòa sinh trưởng thuộc nhóm auxin
- Trình bày vai trò của chất điều hòa sinh trưởng thuộc nhóm Cytokinin

### **2. Bài tập thực hành:**

#### **Bài tập:**

#### **Xác định các loại hóa chất dùng trong vi nhân giống**

### **1. Nhận biết các loại hóa chất dùng trong vi nhân giống theo nhãn ghi trên bao bì:**

Bước 1: Đọc tên hóa chất trên nhãn bao bì theo công thức

Bước 2: Đọc tên hóa chất trên nhãn bao bì:

- Theo danh pháp quốc tế.
- Theo cách đọc thông dụng nhất.

### **2. Nhận biết các loại hóa chất dùng trong vi nhân giống theo dạng thương phẩm (Dạng kết tinh, dạng lỏng, màu sắc...)**

Bước 1: Các hóa chất ở dạng tinh thể: (tên hóa chất, công thức...)



- $\text{KNO}_3$  (Kali Nitrat) thể rắn, màu trắng
- $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (Amon Nitrat): Được dùng dưới dạng muối vô cơ, thể rắn, màu trắng
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Photphat kali monno basic): được dùng dưới dạng thể rắn, màu trắng
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Magie Sunphat.  $7\text{H}_2\text{O}$ ): Được dùng dưới dạng muối vô cơ, thể rắn, màu trắng và đựng trong hộp nhựa
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (Canxi clorua.  $2\text{H}_2\text{O}$ ): Được dùng dưới dạng muối vô cơ ngậm nước, thể rắn, màu trắng
- $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (Canxi Nitrat.  $2\text{H}_2\text{O}$ ): Được dùng dưới dạng muối vô cơ, thể rắn, màu trắng
- $\text{H}_3\text{BO}_3$ . Được dùng dưới dạng axit vô cơ, thể rắn, màu trắng
- $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ : Được dùng dưới dạng muối vô cơ ngậm nước, thể rắn, màu trắng
- $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ : Được dùng dưới dạng muối vô cơ ngậm nước, thể rắn, màu trắng
- $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ : Được dùng dưới dạng muối vô cơ ngậm nước, thể rắn, màu trắng
- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ : Được dùng dưới dạng muối vô cơ ngậm nước, thể rắn, màu xanh lam
- $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ .
- Fe - EDTA (Muối sắt 3). Được dùng dưới dạng muối vô cơ ngậm nước, thể rắn, màu xanh xẫm

\* Các vitamin được sử dụng bao gồm:

- B6 (Pyridoxin)  $\text{C}_8\text{H}_{10}\text{NO}_3 \cdot \text{HCl}$ .
- B5 (Nicotinic acid)  $\text{C}_9\text{H}_{16}\text{NO}_3 \cdot \text{Ca}$ .
- B1 (Thiamine)  $\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{C}_2\text{N}_2\text{OS}$ . Tinh thể màu trắng, vị đắng, tan nhanh trong nước
- C (Axit l. ascorbic)  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ . Ở dạng tinh thể không màu, không mùi, có vị chua, không bền với môi trường axit và ôxy
- B2 (Riboflavine)  $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_6$  Có màu vàng không bền dễ bị phân hủy khi đun sôi hay để ngoài ánh sáng

\* Các chất điều hòa sinh trưởng

- 1H- indole-3-acetic acid (IAA)
- Naphthaleneacetic acid (NAA): Thường tồn tại dưới dạng bột có màu trắng xẫm, bông nhẹ

- 1H-indole-3-butyric acid (IBA),
- 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)
- 6-benzylaminopurine (BAP) hoặc 6-benzyladenin (BA),
- 6- $\gamma$ - $\gamma$ -dimethyl-aminopurine (2-iP)
- N-(2-furfurylamino)-1-H-purine-6-amine (kinetin)
- 6-(4-hydroxy-3-methyl-trans-2-butanylamino)purine (zeatin).
- Zeatin và 2-iP là các cytokinin tự nhiên , ịn BA và kinetin là các cytokinin nhân tạo.

Bước 2: Các hóa chất ở dạng khác: (tên hóa chất, công thức...)

- Cồn (Ethanol) Thường được dùng dưới dạng lỏng có mùi thơm, dễ cháy
- Focmol: Thường tồn tại dưới dạng lỏng, không màu, có mùi
- Các chất khử trùng khác:  $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ ,  $\text{NaClO}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , Nước Brôm,  $\text{AgNO}_3$ ,  $\text{HgCl}_2$ , Chất kháng sinh, nước khử trùng.

### C. Ghi nhớ

- Tên các nhóm hóa chất dùng trong vi nhân giống
- Cách sử dụng và bảo quản hóa chất dùng trong vi nhân giống.

## Bài 2:

# PHA CHẾ HÓA CHẤT VÀ BẢO QUẢN DUNG DỊCH MẸ

## I. Mục tiêu của bài:

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

- Trình bày được cách pha chế và bảo quản dung dịch mẹ.
- Pha chế và bảo quản được dung dịch mẹ theo đúng quy trình

## A. Nội dung

### 1. Cách pha hóa chất và bảo quản hóa chất

Môi trường dinh dưỡng dùng cho nuôi cấy mô tế bào có thành phần phức tạp, bao gồm nhiều chất. Để tiết kiệm thời gian và hoá chất người ta thường chuẩn bị các dung dịch mẹ có nồng độ cao (10 → 100 lần).

Ngày nay nhiều hãng hoá chất đã pha sẵn dưới dạng dung dịch mẹ, khi mua về chỉ cần pha loãng theo tỷ lệ để dùng. Đối với các muối đa lượng thường pha dung dịch mẹ có nồng độ gấp 10 lần, giữ ở nhiệt độ bình thường và có thể sử dụng trong vòng 1 → 2 tháng. Các vi lượng, vitamin và các chất điều hòa sinh trưởng dung dịch mẹ có thể pha ở nồng độ gấp 100 lần và bảo quản ở 5 → 10°C.

#### 1.1. Cách pha hoá chất

##### 1.1.1. Cách pha các hoá chất tan trong nước

Dùng nước sạch để pha hoá chất, đầu tiên dùng với một lượng nước nhỏ, khuấy hoá chất cho đến khi tan hoàn toàn rồi mới thêm nước dần cho đến khi đạt yêu cầu thì thôi

##### 1.1.2. Cách pha các hoá chất tan trong cồn hoặc dung môi

Dùng một ít cồn hoặc dung môi vừa đủ để pha hoá chất, chú ý khuấy đều cho đến khi hoá chất tan hoàn toàn. Sau đó đổ từ từ hoá chất vào nước cất nóng vừa đổ vừa khuấy đều.

##### 1.1.3. Cách pha hoá chất với nồng độ cho trước

###### 1.1.3.1 Pha hoá chất tính theo nồng độ thương phẩm.

Chỉ áp dụng với các chế phẩm đã được nhà sản xuất pha chế theo công thức bản quyền, người dùng chỉ cần pha theo chỉ dẫn

###### 1.1.3.2 Pha hoá chất tính theo nồng độ chất hoạt động

Đa số các loại hoá chất được tổng hợp chỉ đạt hàm lượng chất tinh khiết nhất định còn lại là chất phụ gia hoặc dung môi. Khi sử dụng hoá chất để điều khiển sinh trưởng của thực vật người ta thường tính theo nồng độ hoá chất tinh

khiết (chất hoạt động), do đó chúng ta phải tính nồng độ quy đổi thông qua hàm lượng chất tinh khiết có trong hoá chất.

**Bài toán:** Người ta cần dung dịch axit Boric 0,01% để phun nhằm tăng tỷ lệ đậu quả của xoài. Có 20 gam axit Boric (dạng tinh khiết) thì có thể pha được bao nhiêu lít dung dịch phun có nồng độ trên ?

**Giải:** Theo bài ra cứ: 1 gam axit Boric thì pha được 10 lít dung dịch phun

Vậy: 20 gam axit Boric thì pha được X lít dung dịch phun

$$X = \frac{20 \times 10}{1} = 200 \text{ lít dung dịch phun}$$

**Bài toán:** Có 1 gói hoá chất  $\alpha$ NAA thô chứa 40% đựng trong túi thiếc 5g/túi. Muốn pha dung dịch  $\alpha$ NAA có nồng độ 0,1% (tính theo % chất hoạt động) thì túi  $\alpha$ NAA 40% có thể pha được bao nhiêu lít dung dịch ?

**Giải:**

- Theo bài ra cứ 1 lít dung dịch  $\alpha$ NAA 0,1% thì có 1g  $\alpha$ NAA tinh khiết.
- Mà  $\alpha$ NAA thô dùng để pha chỉ có 40% tinh khiết tức là 1g  $\alpha$ NAA thô chỉ có 0,4g  $\alpha$ NAA tinh khiết.

Theo bài ra cứ: 1g  $\alpha$ NAA thô thì có  $\longrightarrow$  0,4g  $\alpha$ NAA tinh khiết

Cần 1g  $\alpha$ NAA tinh khiết thì phải có  $\longrightarrow$  X gam  $\alpha$ NAA thô

$$X = \frac{1 \times 1}{0,4} = 2,5 \text{ g } \alpha\text{NAA thô}$$

$\longrightarrow$  Do đó để có 1g  $\alpha$ NAA tinh khiết phải cần 2,5g  $\alpha$ NAA thô.

$\longrightarrow$  Vậy 1 túi  $\alpha$ NAA thô chứa 5g có 2g  $\alpha$ NAA tinh khiết, do vậy chúng ta sẽ pha được 2 lít dung dịch  $\alpha$ NAA 0,1% tinh khiết.

## 1.2. Cách pha và bảo quản từng loại hóa chất cụ thể.

### 1.2.1. Cách pha và bảo quản các chất đa lượng:

Chuẩn bị nước cất đủ, đĩa thủy tinh, ống đong định mức, ca hoặc cốc ... Cân hóa chất cho vào ca rồi đổ 10-15% lượng nước cất vào khuấy cho tan hết. *Chú ý:* Không dùng chung đĩa khuấy, để tránh hiện tượng kết tủa. Sau đó thêm nước vào cho đến khi đủ lượng cần pha, dùng bình thủy tinh có nút nhám (nút mài), ghi nhãn, để ở nhiệt độ bình thường trong phòng hoặc bảo quản trong tủ lạnh.

Ví dụ: pha  $\text{KNO}_3$  nồng độ 0,2% (2g/l). Ta cân 2g  $\text{KNO}_3$  cho vào ca đong, sau đó cho khoảng 100ml nước cất vào khuấy đều cho tan hết sau đó

thêm dần nước cho đến khi đủ 1lit thì đổ vào bình thủy tinh hình trụ có nút đậy. Bảo quản ở nhiệt độ thường hoặc trong tủ lạnh.

### 1.2.2. Cách pha các nguyên tố vi lượng:

Cách pha các chất vi lượng tương tự như pha các chất đa lượng. Nhưng các chất vi lượng được sử dụng với nồng độ nhỏ, vì vậy khi cân hóa chất cần sử dụng cân phân tích để cân.

*Cần chú ý khi pha muối sắt:* Sau khi cân 2 hợp chất EDTA.Na<sub>2</sub> và FeSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O với khối lượng EDTA.Na<sub>2</sub> là 37,3 mg FeSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O 27,8 mg. Cho riêng ra từng cốc, hòa tan bằng nước cất. Đổ từ từ dung dịch EDTA.Na<sub>2</sub> vào dung dịch FeSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O. Đun dung dịch trên bếp điện, vừa đun và vừa khuấy đều cho đến khi sôi, nhắc ra để nguội và cho thêm nước cất để có thể tích là 1 lít. Đựng trong chai nâu và bảo quản trong tủ lạnh.

### 1.2.3. Cách pha các chất vitamin

Chuẩn bị nước cất đủ, đĩa thủy tinh, ống đong định mức, ca hoặc cốc ... Cân Vi ta min cho vào ca rồi đổ 10 - 15% lượng nước cất vào khuấy cho tan hết. Chú ý là không dùng chung đĩa khuấy, để tránh hiện tượng kết tủa. Sau đó thêm nước vào cho đến khi đủ lượng cần pha, dùng bình thủy tinh có nút nhám (nút mài), ghi nhãn, để ở nhiệt độ bình thường trong phòng hoặc bảo quản trong tủ lạnh.

### 1.2.4. Cách pha các chất điều hòa sinh trưởng

Trong nuôi cấy mô các chất điều hòa sinh trưởng thường được sử dụng ở nồng độ thấp, thường có nồng độ mg/l (ppm). Hơn nữa có một số chất không hoặc ít tan trong nước nên cần pha trong dung môi:

Đối với 2,4D, NAA, IAA, IBA, GA... Pha nồng độ dung dịch mg/l. Cân các chất điều hòa sinh trưởng trên cho vào bình định mức thủy tinh có nút đậy, hoặc ca đong thủy tinh, nhỏ từ từ vào đó 3 - 5 ml dung môi thích hợp (cồn 95<sup>0</sup> hoặc NaOH. 1N hay HCl. 1N) lắc cho tan rồi thêm nước cất nóng cho đến vạch định mức cần lấy.

Ví dụ: Pha NAA (0,5mg/l). Cân vừa đủ 0,5 mg NAA, cho vào ca đong thủy tinh hoặc lọ thủy tinh, hoà tan NAA bằng 3 - 5ml cồn 95<sup>0</sup>. Hòa tan dung dịch này, nhỏ giọt dung dịch vừa pha vào nước cất nóng (80°C) khuấy đều, đổ thêm nước cất cho đủ thể tích cần lấy.

### 1.2.5. Cách pha chế các chất khử trùng, chất chỉ thị

#### \* Cồn:

Cồn được sử dụng trong nuôi cấy mô tế bào bao gồm có cồn 75<sup>0</sup> và cồn 95<sup>0</sup>. Vì vậy khi muốn pha cồn từ 95<sup>0</sup> thành cồn 75<sup>0</sup> ta làm như sau:

Cồn 95<sup>0</sup> có nghĩa là trong 1000ml dung dịch có chứa 950 ml cồn

Cồn 75<sup>0</sup> có nghĩa là trong 1000ml dung dịch có chứa 750 ml cồn

Vậy muốn pha 1lít cồn Cồn 95<sup>0</sup> xuống cồn 75<sup>0</sup> ta làm như sau:

$$\begin{array}{l} \text{Theo bài ra cứ } 1000\text{ml cồn } 95^0 \text{ thì có} \qquad 950 \text{ ml cồn } 95^0 \\ \qquad \qquad \qquad X \text{ ml cồn } 95^0 \quad \longleftarrow \quad \text{cần } 750 \text{ ml cồn } 75^0 \\ \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad 750 \times 1000 \\ X = \frac{\qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad}{950} = 790\text{ml cồn } 95^0 \end{array}$$

Nghĩa là muốn pha cồn 95<sup>0</sup> xuống cồn 75<sup>0</sup> ta chỉ cần lấy 790 ml cồn 95<sup>0</sup> rồi thêm 210 ml nước cất là ta có được 1000 ml (1 lít) cồn 75<sup>0</sup>

## 2. Cách pha chế dung dịch mẹ và cách bảo quản dung dịch mẹ

### 2.1. Cách pha dung dịch mẹ

Với các loại hoá chất có nồng độ sử dụng nhỏ (phần triệu, viết tắt là ppm), để thuận tiện cho sử dụng người ta pha qua một nồng độ trung gian (một phần nghìn) gọi là dung dịch mẹ. Khi sử dụng cần ở nồng độ bao nhiêu ppm người ta chỉ cần lấy bấy nhiêu ml dung dịch mẹ thêm nước vào cho đến khi đủ 1 lít là được. Trường hợp dung dịch mẹ sử dụng không hết có thể bảo quản trong chai bọc giấy đen, để ở nơi thoáng mát. Dung dịch mẹ có thể lưu giữ được trong thời gian từ 1 - 3 tháng tùy từng loại hoá chất.

Ví dụ 1: Pha 1gam  $\alpha$ NAA 99% tinh khiết với 990ml nước ta được dung dịch mẹ 0,1%.

$$C = \frac{1 \text{ gam} \times 99/100}{990 \text{ ml nước}} = 0,1\%$$

Cách pha như sau: Pha 1g  $\alpha$ NAA 99% tinh khiết với 50 ml cồn 90% (vì hoá chất này không tan trong nước) khuấy đều cho đến khi hoá chất tan hết, sau đó đóng 940 ml nước cất nóng rồi đổ từ từ dung dịch  $\alpha$ NAA tan trong cồn vào cốc nước vừa đổ vừa khuấy đều chúng ta sẽ được dung dịch mẹ có nồng độ 0,1%  $\alpha$ NAA. Khi sử dụng dung dịch  $\alpha$ NAA 20 ppm chúng ta chỉ cần lấy 20 ml dung dịch mẹ pha vào 980 ml nước là được dung dịch phun theo ý muốn.

Ví dụ 2: Pha 1gam  $\alpha$ NAA 40% tinh khiết với 400ml nước ta được dung dịch mẹ 0,1%.

$$C = \frac{0,4\text{gam}}{400 \text{ ml nước}} = 0,1\%$$

Cách pha như sau: Pha 1g  $\alpha$ NAA 40% tinh khiết với 20 ml cồn 90% (vì hoá chất này không tan trong nước) khuấy đều cho đến khi hoá chất tan hết,

sau đó đong 380 ml nước cất nóng, rồi đổ từ từ dung dịch  $\alpha$ NAA tan trong cồn vào cốc nước nóng, vừa đổ vừa khuấy đều chúng ta sẽ được dung dịch mẹ có nồng độ 0,1%  $\alpha$ NAA.

## 2.2. Cách pha chế và bảo quản chất điều hoà sinh trưởng

Trong nuôi cấy mô các chất điều hoà sinh trưởng thường được sử dụng ở nồng độ thấp, để tiện lợi cho việc sử dụng cần pha dung dịch mẹ có nồng độ cao gấp 100  $\rightarrow$  1000 lần dung dịch làm việc (mg/ml). Hơn nữa có một số chất không hoặc ít tan trong nước nên cần pha như sau:

### \* Đối với 2,4D, NAA, IAA, IBA, GA...

+ Pha nồng độ dung dịch mẹ: 0,1% (mg/ml)

+ Dung môi để pha 3-5ml cồn 95<sup>0</sup>

+ Cách pha: Cân 100 mg các chất điều hoà sinh trưởng (2,4D, NAA, IAA, IBA, GA...) cho vào bình định mức có thể tích 100ml khô và sạch, nhỏ từ từ dung môi cồn 95<sup>0</sup> (khoảng 3-5 ml) vào hóa chất vừa cân, vừa nhỏ vừa khuấy cho tan hết. Sau đó thêm vào nước cất nóng 80<sup>0</sup> cho đủ thể tích là 100ml.

*Chú ý:* Khi pha các chất điều hoà sinh trưởng chúng ta chỉ lấy ra một lượng nhỏ vừa đủ, không được đổ lại. Dung môi pha đạt tiêu chuẩn tức là dung dịch có màu trong suốt không có vẩn lẫn tẩn.

+ Cách bảo quản:

Các loại dung dịch mẹ này cần được bảo quản trong lọ nút mài màu nâu. Thời gian bảo quản từ 2-3 tháng với 2,4D và NAA tương đối bền nên có thể bảo quản thời gian lâu hơn (khoảng một năm). Riêng IAA phải bảo quản trong tủ lạnh mới đảm bảo giữ được hoạt tính.

+ Cách sử dụng: Phải đảm bảo đúng nồng độ.

Ví dụ: khi sử dụng IBA với nồng độ 30mg/l (30 ppm) để cho cây mô ra rễ, thì ta chỉ cần lấy 30 ml dung dịch mẹ (IBA 0,1%) pha vào 1 lít môi trường là được.

*Chú ý:* Khi lấy dung dịch mẹ để pha chế môi trường làm việc cần sử dụng micropipet và riêng cho mỗi chất. Sau khi dùng xong cần phải rửa thật sạch các dụng cụ đã dùng, đã đựng loại hoá chất này.

### \* Đối với dung dịch 6 BA

Pha nồng độ dung dịch mẹ (mg/ml)

- Dung môi để pha 3-5 ml HCl. 1N

+ Cách pha: Cân bằng hộp thuỷ tinh có nắp một lượng vừa đủ 100 mg 6BA cho vào bình định mức có thể tích 100ml khô và sạch, nhỏ từ từ dung môi HCl 1N (3 - 5 ml) vào lượng hóa chất vừa cân. Đun nước cất với lượng nước cất vừa đủ dùng, cho lên trên bếp điện đun đến 80<sup>0</sup>C sau đó nhắc ra và nhỏ

từng giọt 6BA vào (vừa nhỏ vừa khuấy đều), sau đó cho hỗn hợp vào bình thủy tinh màu nâu có thể tích là 100ml.

+ Cách bảo quản: với dung dịch 6 BA cần được bảo quản trong lọ nút mài màu nâu. Thời gian bảo quản từ 2-3 tháng ở nhiệt độ 5 -10 °C.

Chú ý: Khi sử dụng phải đảm bảo đúng nồng độ. khi lấy dung dịch mẹ để pha chế môi trường làm việc cần sử dụng micropipet và riêng cho mỗi chất. Sau khi dùng xong cần phải rửa thật sạch các dụng cụ đã dùng, đã đựng loại hoá chất này.

#### \* Đối với Kinetin

+ Pha nồng độ dung dịch mẹ (mg/ml)

+ Dung môi để pha 5 - 10 ml HCl. 1N

+ Cách pha: Cân bằng hộp thủy tinh có nắp một lượng vừa đủ 40mg kinetin cho vào bình định mức có thể tích 100ml khô và sạch, hòa tan lượng kinetin vừa cân bằng dung môi HCl 1N (5 - 10 ml), vừa nhỏ vừa khuấy cho tan hết. Sau đó thêm vào nước cho đủ thể tích là 40ml.

+ Cách bảo quản: với dung dịch kinetin cần được bảo quản trong lọ nút mài màu nâu. Thời gian bảo quản từ 2-3 tháng ở nhiệt độ 5 - 10 °C.

### 2.3. Cách pha chế và bảo quản các chất vi lượng, đa lượng của dung dịch mẹ

Các muối khoáng (chất đa lượng, vi lượng) có thể được chuẩn bị thành dạng dung dịch mẹ có nồng độ gấp từ 10→100 lần nồng độ dùng trong môi trường. Các nguyên tố muối khoáng thường được chia thành 2 nhóm dung dịch mẹ là nguyên tố đa lượng, nguyên tố vi lượng, tuy nhiên trừ khi chúng được pha loãng tối đa nếu không sẽ sảy ra hiện tượng kết tủa. Để pha được dung dịch mẹ có nồng độ đậm đặc hơn, phương pháp thường sử dụng là thường chia theo nhóm các ion. Pha dung dịch chất khoáng đậm đặc thành 5 nhóm (dung dịch mẹ ký hiệu là A, B, C, D, E)

+ Pha nồng độ dung dịch mẹ: 0,1% (gam/lít)

+ Dung môi để pha là nước cất

+ Cách pha:

#### \* Pha dung dịch mẹ A: (EDTA.Na<sub>2</sub> và Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>)

Sau khi cân 2 hợp chất EDTA.Na<sub>2</sub> có khối lượng 0,8 gam/lít và FeSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O có khối lượng là 0,38gam/l. Cho riêng ra từng cốc, hòa tan bằng nước cất.

Đổ từ từ dung dịch EDTA.Na<sub>2</sub> vào dung dịch FeSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O.

Đun dung dịch trên bếp điện, vừa đun và vừa khuấy đều cho đến khi sôi, nhắc ra để nguội và cho thêm nước cất để có thể tích là 1 lít, dán nhãn ghi ký hiệu hóa chất A(x 200) Dung dịch hỗn hợp này đựng trong bình nút mài có màu nâu bảo quản lạnh.



**\* Pha dung dịch mẹ B: ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{KNO}_3$ )**

Sử dụng 2 cốc 1 lít, mỗi cốc có đựng 100ml nước cất.

Cân và hòa tan từng chất trong nhóm B( $\text{NH}_4\text{NO}_3$  có khối lượng 82,5gam,  $\text{KNO}_3$  có khối lượng 95gam) cho vào từng cốc khuấy đều cho tan, sau đó đổ dung dịch vào cốc 1( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) vào cốc 2( $\text{KNO}_3$ ).

Đổ hỗn hợp trên vào các bình trụ có để sẵn định mức 1 lít, cho thêm nước cất vào cho đủ 1 lít, sau đó đậy nút dán nhãn ghi ký hiệu hóa chất B(x 50) rồi bảo quản trong tủ lạnh.

**\*Pha dung dịch mẹ C: ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{KI}$ ,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4.2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CoCl}_2.6\text{H}_2\text{O}$ )**

Sử dụng 5 cốc 1 lít, mỗi cốc có đựng 400ml nước cất

Cân từng hóa chất để pha (Cốc 1:  $\text{H}_3\text{BO}_3$  có khối lượng 1,24 gam; Cốc 2:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  có khối lượng là 34 gam; Cốc 3:  $\text{KI}$  có khối lượng là 0,166gam; Cốc 4:  $\text{Na}_2\text{MoO}_4.2\text{H}_2\text{O}$  có khối lượng là 0,05gam, Cốc 5:  $\text{CoCl}_2.6\text{H}_2\text{O}$  có khối lượng là 0,005 gam, hòa tan từng loại hóa chất riêng.

Sau đó đổ dung dịch vào theo thứ tự từ cốc 1, đến cốc 2 cho đến cốc cuối cùng. Rót vào bình trụ có vạch định mức 1 lít cho thêm nước để đủ 1 lít.

Ghi nhãn là dung dịch C(x 200) bảo quản trong tủ

**\*Pha dung dịch mẹ D: ( $\text{MgSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MnSO}_4.4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{ZnSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CuSO}_4.5\text{H}_2\text{O}$ )**

Sử dụng 4 cốc 1 lít, mỗi cốc có đựng 100ml nước cất.

Cân từng loại hóa chất trong nhóm (cốc 1:  $\text{MgSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$  là 74gam; Cốc 2:  $\text{MnSO}_4.4\text{H}_2\text{O}$  4,46 gam; Cốc 3:  $\text{ZnSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$  1,72 gam; Cốc 4:  $\text{CuSO}_4.5\text{H}_2\text{O}$  0,005g) cho các hóa chất vào từng cốc khuấy đều đến khi tan hết.

Sau đó đổ dung dịch theo thứ tự từ cốc 1 đến cốc 4 vào bình trụ có nắp và định mức 1lit, sau đó cho thêm nước cất để có thể tích cho đủ 1 lít.

Ghi nhãn là dung dịch D(x 50) bảo quản trong tủ lạnh

**\* Pha dung dịch mẹ E:  $\text{CaCl}_2.2\text{H}_2\text{O}$**

Sử dụng một bình trụ có định mức 1 lít có chứa 800ml nước cất.

Cân 88 g  $\text{CaCl}_2.2\text{H}_2\text{O}$  cho vào bình khuấy đều sau đó cho thêm nước vào đủ lít.

Ghi nhãn là dung dịch E(x 50) bảo quản trong tủ lạnh

**2.4. Cách pha chế và bảo quản Vitamin**

**\*Thiamin, Acid Nicotinic, Pyridoxin, Glyxin**

- Pha nồng độ dung dịch mẹ: 0,1% (gam/lít)

- Dung môi để pha là nước cất

- *Cách pha:*

Sử dụng 4 cốc 1 lít, mỗi cốc có đựng 100ml nước cất.

Cân từng loại vitamin Thiamin (B1) có khối lượng 0,02 gam, Acid Nicotinic (PP) có khối lượng 0,1gam, Pyridoxin (B6) có khối lượng 0,1 gam, Glyxin có khối lượng 0,4 gam, pha và hòa tan từng loại hóa chất.

Sau đó đổ dung dịch theo thứ tự từ cốc 1 đến cốc 4 vào bình trụ có nắp và định mức 1lít, sau đó cho thêm nước cất để có đủ thể tích là 1 lít.

Ghi nhãn là dung dịch F(x 50) bảo quản trong tủ lạnh

- *Cách bảo quản:*

Các Vitamin có một số chất bị phân hủy dưới ánh sáng và nhiệt độ, vì vậy tốt nhất nên để trong chai nâu và bảo quản trong tủ lạnh

*Chú ý: các chất dung dịch mẹ pha đạt tiêu chuẩn là phải tan hết, dung dịch pha có màu trong suốt.*

## **B. Câu hỏi và bài tập thực hành**

### **1. Câu hỏi**

- Tại sao khi hòa tan các chất điều hòa sinh trưởng lại phải dùng các chất dung môi?
- Tại sao khi cân các chất điều hòa sinh trưởng tuyệt đối không được đổ các chất thừa lại?

### **2. Bài tập thực hành**

#### **Bài tập 1:**

#### **Chuẩn bị các thành phần dinh dưỡng của môi trường**

#### **Bước 1: Chuẩn bị dụng cụ và thiết bị**

- Cốc chứa (cốc đong) có vạch chia
- Bình trụ có chia độ
- Đũa thủy tinh
- Cồn
- Pipettes

#### **Bước 2: Chuẩn bị hóa chất**

- Các chất đã lượng

- Các chất vi lượng
- Các chất vitamin
- Các chất điều hòa chất điều hoà sinh trưởng

### **Bước 3: Chuẩn bị các thành phần dinh dưỡng của môi trường**

#### **\*Nước cất 1 lần (hoặc 2 lần)**

Cần đặc biệt chú ý đến thành phần này vì nước chiếm đến 95% thành phần môi trường dinh dưỡng. Nên sử dụng nước cất 1 đến 2 lần, không dùng nước máy trong nuôi cấy mô. Trong trường hợp nước cất không có sẵn thì nên sử dụng nước khử ion.

#### **\* Thạch (Agar)**

Là chất làm đông cứng môi trường (giá thể cho nuôi cấy). Nồng độ thạch dùng trong nuôi cấy mô rất giao động, phụ thuộc vào độ tinh khiết của hóa chất và mục đích nuôi cấy (thường từ 4-12g/1 lít môi trường nuôi cấy).

#### **\* Dinh dưỡng khoáng (đa lượng, vi lượng)**

**Các chất dinh dưỡng đa lượng** : bao gồm sáu nguyên tố : nitrogen (N), phosphorus (P), potassium (K), calcium (Ca), magnesium (Mg) và sulphua (S) tồn tại dưới dạng muối khoáng , là thành phần của các môi trường dinh dưỡng khác nhau.

Môi trường nuôi cấy phải chứa ít nhất 25 mmol/L nitrate và potassium , nguồn N cung cấp trong môi trường dưới cả 2 dạng nitrate và amonium (2-20 mmol/L).

Các nguyên tố chính khác , như: Ca, P, S và Mg , nồng độ thường dùng trong khoảng 1-3 mmol/L.

#### **Các nguyên tố vi lượng (Fe, B, Cl, Co, Cu, Mn, Mo, Zn...)**

Đó là các ion : iron (Fe), manganese (Mn), zinc (Zn), boron (B), copper (Cu), và molybdenum (Mo).

Fe được cung cấp dưới dạng chelate Fe , và Zn được dùng bình thường trong các môi trường nuôi cấy .

Diaminetetraacetic acid (EDTA)-chelate Fe thay cho citrate Fe , đặc biệt đối với quá trình tạo phôi . Tuy nhiên, các dạng chelate EDTA không hoàn toàn ổn định trong môi trường nuôi cấy dạng lỏng .

#### **\* Các vitamin**

Các vitamin được sử dụng nhiều nhất trong nuôi cấy mô là: thiamine (B1), acid nicotinic (PP), pyridoxine (B6) và myo-inositol. Thiamin là một vitamin căn bản cần thiết cho sự tăng trưởng của tất cả các tế bào. Thiamin thường được sử dụng với nồng độ từ 0,1-10 mg/l.

Acid nicotinic sử dụng với nồng độ 0,1-5 mg/l, pyridoxine được sử dụng với nồng độ 0,1-10 mg/l. Myo-inositol thường được pha chung với dung dịch mẹ của vitamin.

### \* Các chất điều hoà sinh trưởng

#### Nhóm các auxin

Môi trường nuôi cấy được bổ sung các auxin khác nhau như : 1H-indole-3-acetic acid (IAA), 1-naphtaleneacetic acid (NAA), 1H-indole-3-butyric acid (IBA), 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) và naphthoxyacetic acid (NOA). IAA là auxin tự nhiên có trong mô thực vật ; còn lại NAA , IBA, 2,4-D và NOA là các auxin nhân tạo .

#### Nhóm các cytokinin

Các cy tokinin được sử dụng thường xuyên nhất là 6-benzylaminopurine (BAP) hoặc 6-benzyladenin (BA), 6- $\gamma$ - $\gamma$ -dimethylaminopurine (2-iP), N-(2-furfurylamino)-1-H-purine-6-amine (kinetin), và 6-(4-hydroxy-3-methyl-trans-2-butanylamino) purine (zeatin).

Zeatin và 2-iP là các cytokinin tự nhiên , còn BA và kinetin là các cytokinin nhân tạo

### \* Các hợp chất tự nhiên

Nước dừa

Dịch chết nấm men

### \* Nguồn Các bon

Đường saccaroza và glucoza nồng độ từ 1 - 5%.

### \*pH

pH dùng trong môi trường nuôi cấy thích hợp cho đa số loại cây giao động từ 5,5- 5,6

### C. Ghi nhớ

- Chuẩn bị các dụng cụ và thiết bị
- Chuẩn bị hóa chất
- Chuẩn bị các thành phần dinh dưỡng của môi trường

## Bài tập 2:

### Pha dung dịch mẹ

\* **Bước 1:** Sắp xếp các vật liệu và thiết bị và dụng cụ

- Các dụng cụ vô trùng
- Bình định mức Erlemery (100, 250, 500, 1000ml)
- Cốc đong các loại: 50, 100, 250, 500, 1000ml
- Ống đong 50, 100, 250, 500 và 1000ml
- Pipét các loại
- Nút mài hoặc nút ca su để đậy các bình dung dịch mẹ sau khi đã pha xong
- Nước cất
- Bút đánh dấu không thấm nước

\* **Bước 2:** Cách pha chế các dung dịch mẹ (Bảng liệt kê các dung dịch mẹ cho môi trường MS pha ở nồng độ gấp 50 - 100 lần)

#### *Pha các chất điều hoà sinh trưởng.*

*Pha dung dịch 6- PBA: ( đại diện cho nhóm cytokinin)*

- \* Thao tác 1: Chuẩn bị và kiểm tra hoạt động của cân
- \* Thao tác 2: Đặt hộp thuỷ tinh có nắp đậy lên trên mặt cân, lấy đúng lượng hóa chất cần dùng.
- \* Thao tác 3: Dùng dung môi hoà tan 6-PBA bằng HCl 1N (5 - 10 ml).
- \* Thao tác 4: Đun nước cất trên bếp điện đến  $80^{\circ}\text{C}$  sau đó nhắc ra và nhỏ từng giọt 6-BA vào (vừa nhỏ vừa khuấy đều), lên thể tích đủ với lượng cần pha.
- \* Thao tác 5: Đựng dung dịch trong chai nâu bảo quản ở nhiệt độ  $5 - 10^{\circ}\text{C}$ .

*Pha dung dịch NAA:*

- \* Thao tác 1: Chuẩn bị và kiểm tra hoạt động của cân
- \* Thao tác 2: Đặt hộp thuỷ tinh có nắp đậy lên trên mặt cân, lấy đúng lượng hóa chất cần dùng.
- \* Thao tác 3: hoà tan NAA bằng 5 - 10ml cồn  $95^{\circ}$
- \* Thao tác 4: Đun nước cất trên bếp điện đến  $80^{\circ}\text{C}$  sau đó nhắc ra và nhỏ từng giọt &NAA vào (vừa nhỏ vừa khuấy đều), lên thể tích đủ với lượng cần pha.
- \* Thao tác 5: Đựng dung dịch trong chai nâu bảo quản ở nhiệt độ  $5 - 10^{\circ}\text{C}$

*Pha dung dịch IBA:*

- \* Thao tác 1: Chuẩn bị và kiểm tra hoạt động của cân
- \* Thao tác 2: Đặt hộp thủy tinh có nắp đậy lên trên mặt cân, lấy đúng lượng hóa chất cần dùng.
- \* Thao tác 3: Hoà tan IBA bằng 5 - 10ml cồn 95<sup>0</sup>
- \* Thao tác 4: Đun nước cất trên bếp điện đến 80<sup>0</sup>C sau đó nhắc ra và nhỏ từng giọt IBA vào (vừa nhỏ vừa khuấy đều), lên thể tích đủ với lượng cần pha.
- \* Thao tác 5: Đựng dung dịch trong chai nút mài, bảo quản ở nhiệt độ 5 - 10 <sup>0</sup>C Bảo quản trong tủ lạnh.

### ***Pha nguyên tố đa lượng và nguyên tố vi lượng***

#### **Pha dung dịch A: (FeSO<sub>4</sub> - EDTA) (Muối sắt) (gam/l)**

- \* Thao tác 1: Chuẩn bị
- \* Thao tác 2: Cân 0,8g EDTA.Na<sub>2</sub> và 0,38g FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O
- \* Thao tác 3: Hoà tan hóa chất bằng nước cất. Đổ từ từ dung dịch EDTA vào dung dịch FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O.
- \* Thao tác 4: Đun dung dịch này trên bếp điện, vừa đun vừa khuấy đều cho đến khi sôi, nhắc ra để nguội và lên thể tích đủ 1 lít, ghi nhãn dung dịch A(x 200) rồi bảo quản (trong chai nâu) để trong tủ lạnh.

#### **Pha dung dịch B: (NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, KNO<sub>3</sub>)**

- \* Thao tác 1: Chuẩn bị
- \* Thao tác 2: Sử dụng 2 cốc 1 lít có đựng 100ml nước cất. Cân 82,5g NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> và 95g KNO<sub>3</sub>
- \* Thao tác 3: Cho hóa chất vào từng cốc khuấy đều cho tan sau đó đổ dung dịch vào theo thứ tự cốc 1 đến cốc 2 rồi rót vào bình trụ định mức 1 lít cho thêm nước vào cho đủ 1 lít, sau đó đậy nút dán nhãn ghi ký hiệu hóa chất B(x 50) rồi bảo quản trong tủ lạnh.

#### **Pha dung dịch C: (H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; KI; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O; CoCL<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O)**

- \* Thao tác 1: Chuẩn bị
- \* Thao tác 2: Sử dụng 5 cốc 1 lít mỗi cốc đựng 100ml nước cất, Cân 1,24g H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>; 34g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,166g KI; 0,05g Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O; 0,005g CoCL<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O cho vào từng cốc khuấy tan đều.
- \* Thao tác 3: Sau đó đổ dung dịch vào theo thứ tự từ cốc 1, đến cốc 5. Rót vào bình trụ có vạch định mức 1 lít cho thêm nước để đủ 1 lít. Ghi nhãn là dung dịch C(x 200) bảo quản trong tủ lạnh.

#### **Pha dung dịch D: (MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, MnSO<sub>4</sub>.4H<sub>2</sub>O, ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O)**

- \* Thao tác 1: Chuẩn bị

\* Thao tác 2: Sử dụng 4 cốc 1 lít có đựng 100ml nước cất. Cân 74g  $MgSO_4.7H_2O$ ; 4,4g  $MnSO_4.4H_2O$ ; 1,72g  $ZnSO_4.7H_2O$ ; 0,005g  $CuSO_4.5H_2O$  cho vào từng cốc khuấy đều.

\* Thao tác 3: Sau đó đổ dung dịch theo thứ tự từ cốc 1 đến cốc 4 vào bình trụ có nắp và định mức 1lít, sau đó thêm nước cho đủ 1 lít. Ghi nhãn là dung dịch D(x 50) bảo quản trong tủ lạnh

#### **Pha dung dịch E: $CaCl_2.2H_2O$**

\* Thao tác 1: Chuẩn bị

\* Thao tác 2: Sử dụng một bình trụ có định mức 1 lít có chứa 800ml nước cất. Cân 88 g  $CaCl_2.2H_2O$  cho vào bình khuấy đều sau đó cho thêm nước đến khi đủ 1 lít. Ghi nhãn là dung dịch E(x 50) bảo quản trong tủ lạnh.

#### **Pha chế và bảo quản Vitamin**

##### **Pha dung dịch F: Thiamin, Acid Nicotinic, Pyridoxin, Glyxin**

\* Thao tác 1: Chuẩn bị

\* Thao tác 2: Sử dụng 4 cốc 1 lít có đựng 100ml nước cất. Cân 0,02g Thiamin; 0,1g Acid Nicotinic; 0,1g Pyridoxin; 0,4g Glyxin cho vào từng cốc khuấy đều.

\* Thao tác 3: Sau đó đổ dung dịch theo thứ tự từ cốc 1 đến cốc 4 vào bình trụ có nắp và định mức 1lít, sau đó thêm nước đến khi đủ 1 lít. Ghi nhãn là dung dịch F(x 50) bảo quản trong tủ lạnh.

**Bảng 2.3. Thành phần môi trường MS để pha dung dịch mẹ**

<b>Dung dịch</b>	<b>Hoá chất</b>	<b>Nồng độ (g/l)</b>
A (x 200)	$EDTA.Na_2$	0,80
	$Fe(SO_4).7H_2O$	0,38
B (x 50)	$NH_4NO_3$	82,50
	$KNO_3$	95,00
C (x 200)	$H_3PO_3$	1,24
	$KH_2PO_4$	34,00
	KI	0,166
	$Na_2MO_4.2H_2O$	0,050
	$CoCl_2.6H_2O$	0,005

D (x 50)	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	74,00
	MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	4,46
	ZnSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O	1,72
	CuSO <sub>4</sub> .5 H <sub>2</sub> O	0,005
E (x 50)	CaCl <sub>2</sub> .2 H <sub>2</sub> O	88,00
F (x 50)	Thiamin	0,02
	Axit nicotinic	0,10
	Pyridoxin	0,10
	Glyxin	0,40
G	Chất điều hoà sinh trưởng	Tùy theo mục đích nuôi cấy

### C. Ghi nhớ

- Sắp xếp các vật liệu và thiết bị và dụng cụ
- Cách pha chế các dung dịch mẹ
  - + Các dung dịch mẹ dùng để pha chế môi trường (dung dịch muối khoáng, vitamin..) cần được bảo quản trong tủ lạnh.
  - + Dung dịch vitamin nên chia thành nhiều lọ nhỏ và bảo quản trong ngăn đá của tủ lạnh.
  - + Không nên pha một lượng quá lớn dung dịch mẹ các chất sinh trưởng, thường chỉ nên dùng các lọ có dung tích 100 → 200 ml.



### Bài 3:

## PHA CHẾ VÀ BẢO QUẢN MÔI TRƯỜNG VI NHÂN GIỐNG

### I. Mục tiêu:

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

- Liệt kê được danh mục hóa chất dùng pha chế một số môi trường phổ biến trong vi nhân giống (tên hóa chất, nồng độ và liều lượng).
- Trình bày được công thức, cách pha chế, khử trùng và bảo quản 3 loại môi trường vi nhân giống.
- Pha chế được 3 loại môi trường vi nhân giống.
- Khử trùng và bảo quản được các loại môi trường dùng trong vi nhân giống theo đúng quy trình.

### A. Nội dung của bài:

#### 1. Danh mục hóa chất dùng pha chế một số môi trường phổ biến:

**Bảng 4: Các hóa chất dùng pha chế một số môi trường nuôi cấy**

Đa lượng	
KNO <sub>3</sub>	1900 mg/l
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650 mg/l
CaCl <sub>2</sub> .2 H <sub>2</sub> O	440 mg/l
MgSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	370 mg/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170 mg/l
Vi lượng	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2 mg/l
Na <sub>2</sub> + EDTA	37,3 mg/l
Fe(SO <sub>4</sub> ).7H <sub>2</sub> O	27,8 mg/l
Na <sub>2</sub> Mo <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	0,25 mg/l

CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,025 mg/l
CuSO <sub>4</sub> .5 H <sub>2</sub> O	0,025 mg/l
MnSO <sub>4</sub> . 4 H <sub>2</sub> O	2,3 mg/l
ZnSO <sub>4</sub> . 4 H <sub>2</sub> O	8,6 mg/l
Vitamin	
Inositol	100 mg/l
VB1	0,5 mg/l
VB6	0,5 mg/l
VB3	1 mg/l
Nicotinic acid	0,5 mg/l
Các chất điều hòa sinh trưởng	
NAA +Naphthaleneacetic acid	0,1+ 3mg/l
Kinetin	0,04+ 1 mg/l
IBA (1H+indole+3+butyric acid)	1+ 30 mg/l
6 + BA	0,1+ 3 mg/l
IAA (1H+ indole+3+acetic acid )	1+ 30 mg/l

## 2. Công thức và cách pha chế môi trường vi nhân giống

Thành phần cơ bản của một số loại môi trường nuôi cấy mô và tế bào thực vật có rất nhiều môi trường (White; Knop; B5 (gamborg), N6 (môi trường Chu), MS (Murashige+Skoog). Nhưng môi trường (MS) là một trong những loại môi trường được sử dụng rộng rãi nhất trong nuôi cấy mô và tế bào thực vật.

Môi trường MS là môi trường giàu dinh dưỡng, thích hợp cho cả thực vật hai lá mầm và một lá mầm. Tới nay, có rất nhiều công thức cải tiến môi trường MS trên cơ sở công thức gốc do Murashige và Skoog công bố năm 1962.

Có 2 cách pha chế môi trường MS như sau:

**Cách 1:** Pha môi trường MS dùng để nuôi cấy từ các hóa chất.

**Bảng 5: Bảng thành phần môi trường MS dùng để nuôi cấy mô và tế bào thực vật**

<b>Ký hiệu bình</b>	<b>Muối khoáng</b>	<b>Nồng độ (mg/l)</b>
A	Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O	37.2
	Ferrous sulfate (FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O)	27.8
B	Potassium nitrate (KNO <sub>3</sub> )	1900
	Amonium nitrate (NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> )	1650
C	Potassium phosphate (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	170
	Potassium Iodine (KI)	0.83
	Sodium molybdate (Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O)	0.25
	Boric Acid (H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> )	6.2
	Colbalt chloride (CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O)	0.025
D	Magnesium sulfate (MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O)	370
	Zinc Sulfate (ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O)	8.6
	Manganese sulfate (MnSO <sub>4</sub> . 4H <sub>2</sub> O)	22.3
	Cupric Sulfate (CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O)	0.025
E	Calcium chloride (CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O)	440
	Myo+inositol	100
F	Pyridoxine HCl	0.5
	Nicotinic acid	0.5
	Thiamine HCl	0.1

	Glyxin	2
Các chất hữu cơ		
	Sucrose	20 – 30g/l
	Agar	4,5 – 7g/l
G	Chất điều hòa sinh trưởng	Tùy mục đích nuôi cấy

**\* Cách pha:**

- Chuẩn bị nước cất đủ, đĩa thủy tinh, ống đong định mức, ca hoặc cốc ... Cân hóa chất trong bảng cho vào ca rồi đổ 5% lượng nước cất cần dùng vào khuấy cho tan hết. Chú ý: không dùng chung đĩa khuấy, để tránh hiện tượng kết tủa.

Ví dụ: Cần pha 2 lít môi trường cho nuôi cấy khởi đầu ta lấy nồng độ các chất đa lượng x 2 ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  có khối lượng là 440mg x 2= 880mg) hòa tan trong 100 ml nước cất, khuấy đều cho tan hết. Cứ như vậy pha hết chất đa lượng, vi lượng, vitamin. Tất cả đổ vào một ca nhựa.

- Đong lượng nước cất bằng khoảng  $\frac{1}{4}$  số lượng môi trường cần pha. Đổ vào nồi nấu môi trường, đặt lên bếp đun sôi
- Cân đường và thạch với khối lượng cần dùng (20 - 30g đường; 4,5 - 7g thạch) cho thêm một ít nước cất khuấy cho thạch và đường tan hết. Đổ vào nồi nấu, khuấy đều cho đến khi sôi
- Đổ tất cả các hóa chất vừa pha vào nồi khuấy đều, thêm nước cất cho đủ số lượng môi trường cần chuẩn bị
- Điều chỉnh pH của môi trường bằng (HCl 0,1N hoặc NaOH 0,1N) cho đến khi môi trường có pH = 6
- Rót môi trường vào bình cấy
- Khử trùng môi trường trong nồi hấp vô trùng

**\* Ưu, nhược điểm của cách pha:**

- Ưu điểm: tiện cho việc sử dụng với lượng dùng môi trường ít.
- Nhược điểm: do nồng độ các chất sử dụng quá nhỏ có thể cân thừa hoặc thiếu dẫn đến sai nồng độ, ảnh hưởng đến kết quả nghiên cứu.

**Cách 2:** Pha môi trường mẹ (môi trường MS đậm đặc) từ các hóa chất.

**Bảng 6: Bảng thành phần môi trường MS đậm đặc**

Dung dịch	Hoá chất	Nồng độ (g/l)	Số ml dung dịch mẹ cho 1lít dung dịch nuôi cấy
A	Na <sub>2</sub> EDTA	0,80	28
	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,38	
B	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	82,50	20
	KNO <sub>3</sub>	95,00	
C	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1,24	5
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	34,00	
	KI	0,166	
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,050	
	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,005	
D	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	74,00	5
	MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	4,46	
	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1,72	
	CuSO <sub>4</sub> .5 H <sub>2</sub> O	0,005	
E	CaCl <sub>2</sub> .2 H <sub>2</sub> O	88,00	5
F	Thiamin	0,02	5
	Axit nicotinic	0,10	
	Pyridoxin	0,10	
	Glyxin	0,40	
G	Chất điều hòa sinh trưởng	Tùy theo mục đích nuôi cấy	

**\* Cách pha chế:**

\* Pha dung dịch A: ( $\text{FeSO}_4$  - EDTA) (Muối sắt).

Cân 0,8g  $\text{EDTA.Na}_2$  và 0,38g  $\text{FeSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$  hoà tan bằng nước cất. Đổ từ từ dung dịch EDTA vào dung dịch  $\text{FeSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$ . Đun dung dịch này trên bếp điện, vừa đun vừa khuấy đều cho đến khi sôi, nhắc ra để nguội và lên thể tích đủ 1 lít, ghi nhãn dung dịch A(x 200) rồi bảo quản (trong chai nâu) để trong tủ lạnh.

\* Pha dung dịch B: ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{KNO}_3$ )

Sử dụng 2 cốc 1 lít có đựng 100ml nước cất. Cân 82,5g  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  và 95g  $\text{KNO}_3$  cho vào từng cốc khuấy đều cho tan sau đó đổ dung dịch vào theo thứ tự cốc 1 đến cốc 2 rồi rót vào bình trụ định mức 1 lít cho thêm nước vào cho đủ 1 lít, sau đó đậy nút dán nhãn ghi ký hiệu hóa chất B(x 50) rồi bảo quản trong tủ lạnh.

\* Pha dung dịch C: ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; KI;  $\text{Na}_2\text{MoO}_4.2\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{CoCl}_2.6\text{H}_2\text{O}$ )

Sử dụng 5 cốc 1 lít mỗi cốc đựng 100ml nước cất, Cân 1,24g  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ; 34g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,166g KI; 0,05g  $\text{Na}_2\text{MoO}_4.2\text{H}_2\text{O}$ ; 0,005g  $\text{CoCl}_2.6\text{H}_2\text{O}$  cho vào từng cốc khuấy tan đều. Sau đó đổ dung dịch vào theo thứ tự từ cốc 1, đến cốc 5. Rót vào bình trụ có vạch định mức 1 lít cho thêm nước để đủ 1 lít. Ghi nhãn là dung dịch C(x 200) bảo quản trong tủ lạnh

\* Pha dung dịch D: ( $\text{MgSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MnSO}_4.4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{ZnSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CuSO}_4.5\text{H}_2\text{O}$ )

Sử dụng 4 cốc 1 lít có đựng 100ml nước cất. Cân 74g  $\text{MgSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$ ; 4,4g  $\text{MnSO}_4.4\text{H}_2\text{O}$ ; 1,72g  $\text{ZnSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,005g  $\text{CuSO}_4.5\text{H}_2\text{O}$  cho vào từng cốc khuấy đều. Sau đó đổ dung dịch theo thứ tự từ cốc 1 đến cốc 4 vào bình trụ có nắp và định mức 1lít, sau đó thêm nước cho đủ 1 lít. Ghi nhãn là dung dịch D(x 50) bảo quản trong tủ lạnh

\* Pha dung dịch E:  $\text{CaCl}_2.2\text{H}_2\text{O}$

Sử dụng một bình trụ có định mức 1 lít có chứa 800ml nước cất. Cân 88 g  $\text{CaCl}_2.2\text{H}_2\text{O}$  cho vào bình khuấy đều sau đó cho thêm nước đến khi đủ 1 lít. Ghi nhãn là dung dịch E(x 50) bảo quản trong tủ lạnh.

\* Pha dung dịch F: Thiamin, Acid Nicotinic, Pyridoxin, Glyxin

Sử dụng 4 cốc 1 lít có đựng 100ml nước cất. Cân 0,02g Thiamin; 0,1g Acid Nicotinic; 0,1g Pyridoxin; 0,4g Glyxin cho vào từng cốc khuấy đều. Sau đó đổ dung dịch theo thứ tự từ cốc 1 đến cốc 4 vào bình trụ có nắp và định mức 1lít, sau đó thêm nước đến khi đủ 1 lít. Ghi nhãn là dung dịch F(x 50) bảo quản trong tủ lạnh.

\* Pha dung dịch G: Tùy theo loại chất điều hòa sinh trưởng (xem cách pha ở mục: 2.2 bài 2: Pha dung dịch mẹ)

### 2.1. Công thức và cách pha chế môi trường nuôi cấy khởi đầu

**Cách 1:** Pha môi trường nuôi cấy khởi đầu từ hóa chất (bảng 5 và hướng dẫn pha ở dưới bảng) rồi thêm các chất điều hòa sinh trưởng sau ta sẽ có môi trường nuôi cấy khởi đầu.

6BA	0,1-3 mg/l
NAA	0,1-3 mg/l
Kinetin	0.4-1 mg/l

**Cách 2:** Pha môi trường nuôi cấy khởi đầu từ môi trường MS đậm đặc.

Tức là từ môi trường dung dịch mẹ đậm đặc đã pha sẵn, ta lấy số ml dung dịch mẹ theo chỉ dẫn trong (bảng 6 trang 50-51) rồi thêm các chất sau ta sẽ có một lít môi trường nuôi cấy.

Moy - inostol	100mg/l
Sucrose	20-30 g/l
Agar	4,5-7 g/l
6BA	0,1-3 mg/l
NAA	0,1-3 mg/l
Kinetin	0.4-1 mg/l

Cụ thể: Muốn pha 1 lít môi trường nuôi cấy khởi đầu cần thực hiện các động tác sau: Dùng pipet lấy 28 ml dung dịch A; 20 ml B; 5 ml C; 5 ml D; 5ml E; 5 ml F.

#### \* Cách pha chế

- Pha các chất điều hòa sinh trưởng (xem bài 2)
- Đong lượng nước cất bằng khoảng  $\frac{1}{4}$  số lượng môi trường cần pha. Đổ vào nồi nấu môi trường, đặt lên bếp đun sôi
- Cân đường và thạch với khối lượng cần dùng (20-30g đường; 4,5-7 gam thạch) cho thêm một ít nước cất khuấy cho thạch và đường tan hết. Đổ vào nồi nấu, khuấy đều cho đến khi sôi

- Đổ tất cả các hóa chất vừa lấy từ các dung dịch mẹ dựa trên số lượng chuẩn bị và rót vào nồi, khuấy đều, thêm nước cất cho đủ số lượng môi trường cần chuẩn bị
- Điều chỉnh pH của môi trường bằng (HCl 0,1N hoặc NaOH 0,1N) cho đến khi có pH = 6
- Rót môi trường vào bình cấy
- Khử trùng môi trường trong nồi hấp vô trùng

\* Ưu điểm của cách pha này là: tiết kiệm thời gian, nồng độ sử dụng đạt chuẩn tiện cho việc sử dụng với lượng dùng môi trường làm việc với quy mô lớn. Trong sản xuất cũng như nghiên cứu nên sử dụng cách pha này.

Chú ý: Ở bảng 5 nồng độ các chất đơn dùng để pha 1 lít môi trường làm việc. Còn nồng độ các chất ở bảng 6 được pha sẵn từ trước và có nồng độ pha đậm đặc gấp 10 - 100 lần so với ban đầu vì thế khi sử dụng lượng hóa chất ở bảng 2.6 thì chỉ việc lấy đúng số ml đúng như trên là được

## 2.2. Công thức và cách pha chế môi trường nhân nhanh chồi

Tương tự như pha chế môi trường nuôi cấy khởi đầu. Có thể pha chế môi trường nhân nhanh chồi từ các hóa chất có nồng độ ban đầu ban đầu cho trước. Hoặc từ dung dịch mẹ pha sẵn từ trước.

\* Công thức: Môi trường MS + chất điều hòa sinh trưởng (6BA, NAA, Kinetin)

**Cách 1:** Pha môi trường nhân nhanh chồi từ hóa chất trong bảng 5 và hướng dẫn pha ở dưới bảng rồi thêm các chất điều hòa sinh trưởng sau ta sẽ có môi trường nhân nhanh chồi.

6BA	0,1-3 mg/l
Kinetin	0.4-1 mg/l

**Cách 2:** Pha môi trường nhân nhanh chồi từ môi trường MS dung dịch mẹ + Sucrose 20-30 g/l + Agar 4,5-7 g/l + chất điều hòa sinh trưởng.

Tức là từ môi trường dung dịch mẹ đậm đặc đã pha sẵn, ta lấy số ml dung dịch mẹ theo chỉ dẫn trong (bảng 6) rồi thêm các chất sau ta sẽ có một lít môi trường nuôi cấy.

Moy - inostol	100mg/l
Sucrose	20-30 g/l



Agar	4,5-7 g/l
6BA	0,1-3 mg/l
Kinetin	0.4-1 mg/l

Cụ thể: Muốn pha 1 lít môi trường nhân nhanh chồi cần thực hiện các thao tác sau: Dùng pipet lấy 28 ml dung dịch A; 20 ml B; 5 ml C; 5 ml D; 5ml E; 5 ml F.

#### \* Cách pha chế

- Pha các chất điều hòa sinh trưởng (xem bài 2)
- Đo lượng nước cất bằng khoảng  $\frac{1}{4}$  số lượng môi trường cần pha. Đổ vào nồi nấu môi trường, đặt lên bếp đun sôi
- Cân đường và thạch với khối lượng cần dùng (20-30g đường; 4,5-7 gam thạch) cho thêm một ít nước cất khuấy cho thạch và đường tan hết. Đổ vào nồi nấu, khuấy đều cho đến khi sôi
- Đổ tất cả các hóa chất vừa lấy từ các dung dịch mẹ dựa trên số lượng chuẩn bị và rót vào nồi, khuấy đều, thêm nước cất cho đủ số lượng môi trường cần chuẩn bị
- Điều chỉnh pH của môi trường bằng (HCl 0,1N hoặc NaOH 0,1N) cho đến khi có pH = 6
- Rót môi trường vào bình cấy
- Khử trùng môi trường trong nồi hấp vô trùng

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

\* Công thức môi trường: Môi trường MS + chất điều hòa sinh trưởng

**Cách 1:** Pha môi trường tạo cây hoàn chỉnh từ hóa chất trong bảng 5 và hướng dẫn pha ở dưới bảng rồi thêm 1- 30mg IBA ta sẽ có môi trường tạo cây hoàn chỉnh.

**Cách 2:** Pha môi trường tạo cây hoàn chỉnh từ môi trường MS đậm đặc

Tức là từ môi trường dung dịch mẹ đậm đặc đã pha sẵn, ta lấy số ml dung dịch mẹ theo chỉ dẫn trong (bảng 6) rồi thêm các chất sau ta sẽ có một lít môi trường nuôi cấy.

Moy inostol	100mg/l
Sucrose	20-30 g/l
Agar	4,5-7 g/l
IBA hoặc IAA hoặc NAA	1-30 mg/l

Cụ thể: Muốn pha 1 lít môi trường tạo cây hoàn chỉnh cần thực hiện các thao tác sau: Dùng pipet lấy 28 ml dung dịch A; 20 ml B; 5 ml C; 5 ml D; 5ml E; 5 ml F, rồi thêm 4 chất trên ta sẽ có 1 lít môi trường nuôi cấy.

### \* Cách pha chế

- Pha các chất điều hòa sinh trưởng (xem bài 2)
- Đo lượng nước cất bằng khoảng  $\frac{1}{4}$  số lượng môi trường cần pha. Đổ vào nồi nấu môi trường, đặt lên bếp đun sôi
- Cân đường và thạch với khối lượng cần dùng (20 - 30 g đường; 4,5 - 7 gam thạch) cho thêm một ít nước cất khuấy cho thạch và đường tan hết. Đổ vào nồi nấu, khuấy đều cho đến khi sôi
- Đổ tất cả các hóa chất vừa lấy từ các dung dịch mẹ dựa trên số lượng chuẩn bị và rót vào nồi, khuấy đều, thêm nước cất cho đủ số lượng môi trường cần chuẩn bị
- Điều chỉnh pH của môi trường bằng (HCl 0,1N hoặc NaOH 0,1N) cho đến khi có pH = 6
- Rót môi trường vào bình cấy
- Khử trùng môi trường trong nồi hấp vô trùng

### 3. Khử trùng môi trường vi nhân giống:

- Sau khi pha chế được môi trường vi nhân giống, chia đều vào các bình thủy tinh hình trụ, bình tam giác
- Xếp các bình đựng môi trường vào sọt rồi cho vào nồi hấp, tiến hành hấp trong khoảng thời gian khoảng 25 - 30 phút, chú ý nhiệt độ trong nồi hấp phải đạt  $121^{\circ}\text{C}$ , 1atm

### 4. Các phương pháp bảo quản môi trường vi nhân giống

Bảo quản môi trường vi nhân giống rất đơn giản. Sau khi lấy từ nồi hấp ra cần chuyển nhanh vào phòng vô trùng, xếp ngay ngắn lên giá. Bảo quản ở nhiệt độ thường.

## B. Câu hỏi và bài tập thực hành

### 1. Câu hỏi:

- Phân biệt sự khác nhau giữa môi trường nhân nhanh chồi và môi trường ra rễ?
- Tại sao khi pha chế môi trường cần phải tuân thủ đúng thứ tự các bước đổ hóa chất?

## 2. Bài tập thực hành:

### Bài tập 1:

#### Pha chế môi trường nuôi cấy khởi đầu

**Bước 1:** Chuẩn bị các vật liệu và thiết bị

- Các dụng cụ vô trùng
- Bình định mức Erlemery (100, 250, 500, 1000ml)
- Cốc đong các loại: 50, 100, 250, 500, 1000ml
- Ống đong 50, 100, 250, 500 và 1000ml
- Pipét các loại
- Nước cất
- Xoong để nấu môi trường

**Bước 2:** Lấy các chất theo đúng số ml của dung dịch mẹ

Dung dịch	Hoá chất	Nồng độ (g/l)	Số ml dung dịch mẹ cho 1lit dung dịch nuôi cấy
A	Na <sub>2</sub> EDTA	0,80	28
	FeSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0,38	
B	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	82,50	20
	KNO <sub>3</sub>	95,00	
C	H <sub>3</sub> PO <sub>3</sub>	1,24	5
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	34,00	
	KI	0,166	
	Na <sub>2</sub> MO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	0,050	
	CoCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O	0,005	
D	MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	74,00	5
	MnSO <sub>4</sub> . 4H <sub>2</sub> O	4,46	
	ZnSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	1,72	

	CuSO <sub>4</sub> .5 H <sub>2</sub> O	0,005	
E	CaCl <sub>2</sub> .2 H <sub>2</sub> O	88,00	5
F	Thiamin	0,02	5
	Axit nicotinic	0,10	
	Pyridoxin	0,10	
	Glyxin	0,40	

Tiến hành lấy số ml dung dịch mẹ theo chỉ dẫn trong bảng, rồi thêm các chất sau ta sẽ có một lít môi trường nuôi cấy.

Moy - inostol	100mg/l
Sucrose	20-30 g/l
Agar	4,5-7 g/l
6BA	0,1-3 mg/l
NAA	0,1-3 mg/l
Kinetin	0.4-1 mg/l

### Bước 3: Cách pha

- Pha các chất điều hòa sinh trưởng (xem bài 2)
- Đo lượng nước cất bằng khoảng ¼ số lượng môi trường cần pha. Đổ vào nồi nấu môi trường, đặt lên bếp đun sôi.
- Cân đường và thạch với khối lượng cần dùng (20 - 30g đường; 4,5 - 6 gam Thạch) cho thêm một ít nước cất khuấy cho thạch và đường tan hết. Đổ vào nồi nấu, khuấy đều cho đến khi sôi.
- Đổ tất cả các hóa chất vừa lấy từ các dung dịch mẹ dựa trên số lượng chuẩn bị và rót vào nồi, Cân 100mg Myo - Inositol hòa tan vào trong hỗn hợp môi trường trên, khuấy đều, thêm nước cất cho đủ số lượng môi trường cần chuẩn bị.
- Điều chỉnh pH của môi trường bằng (HCl 0,1N hoặc NaOH 0,1N) cho đến khi pH = 6
- Rót môi trường vào bình cấy

- Khử trùng môi trường trong nồi hấp vô trùng

### C. Ghi nhớ

- Chuẩn bị các vật liệu và thiết bị
- Lấy các chất theo đúng số ml của dung dịch mẹ
- Pha chế theo đúng trình tự các loại hóa chất

### Bài tập 2:

#### Pha chế môi trường nhân nhanh chồi

**Bước 1:** Chuẩn bị các vật liệu và thiết bị, dụng cụ

- Các dụng cụ vô trùng
- Bình định mức Erlemery (100, 250, 500, 1000ml)
- Cốc đong các loại: 50, 100, 250, 500, 1000ml
- Ống đong 50, 100, 250, 500 và 1000ml
- Pipét các loại
- Bình thủy tinh tam giác
- Nước cất
- Xoong để nấu môi trường

**Bước 2:** Lấy các hóa chất theo đúng số ml của dung dịch mẹ

Dung dịch	Hoá chất	Nồng độ (g/l)	Số ml dung dịch mẹ cho 1lit dung dịch nuôi cấy
A	Na <sub>2</sub> EDTA	0,80	28
	Fe <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0,38	
B	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	82,50	20
	KNO <sub>3</sub>	95,00	
C	H <sub>3</sub> PO <sub>3</sub>	1,24	5
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	34,00	
	KI	0,166	

	Na <sub>2</sub> MO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	0,050	
	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,005	
D	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	74,00	5
	MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	4,46	
	ZnSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O	1,72	
	CuSO <sub>4</sub> .5 H <sub>2</sub> O	0,005	
E	CaCl <sub>2</sub> .2 H <sub>2</sub> O	88,00	5
F	Thiamin	0,02	5
	Axit nicotinic	0,10	
	Pyridoxin	0,10	
	Glyxin	0,40	

Ta tiến hành lấy số ml dung dịch mẹ theo chỉ dẫn trong bảng trên, rồi thêm các chất sau ta sẽ có một lít môi trường nuôi cấy.

Moy inostol	100mg/l
Sucrose	20→30 g/l
Agar	4,5→7 g/l
6+ BA	0,1→3 mg/l
Kinetin	0.4→1 mg/l

### Bước 3: Cách pha

- Pha các chất điều hòa sinh trưởng (xem bài 2)
- Đong lượng nước cất bằng khoảng ¼ số lượng môi trường cần pha. Đổ vào nồi nấu môi trường, đặt lên bếp đun sôi
- Cân đường và thạch với khối lượng cần dùng (20→ 30 g đường; 4,5→ 6 gam Thạch) cho thêm một ít nước cất khuấy cho thạch và đường tan hết. Đổ vào nồi nấu, khuấy đều cho đến khi sôi
- Đổ tất cả các hóa chất vừa lấy từ các dung dịch mẹ dựa trên số lượng chuẩn bị và rót vào nồi, Cân 100mg Myo Inositol hòa tan vào trong hỗn

hợp môi trường trên, khuấy đều, thêm nước cất cho đủ số lượng môi trường cần chuẩn bị.

- Điều chỉnh pH của môi trường bằng (HCl 0,1N hoặc NaOH 0,1N) cho đến khi pH = 6
- Rót môi trường vào bình cấy
- Khử trùng môi trường trong nồi hấp vô trùng

### C. Ghi nhớ

- Chuẩn bị các vật liệu và thiết bị
- Lấy các chất theo đúng số ml của dung dịch mẹ
- Pha chế theo đúng trình tự các loại hóa chất

### Bài tập 3:

#### Pha chế môi trường tạo cây hoàn chỉnh

Pha chế môi trường tạo cây hoàn chỉnh từ môi trường mẹ có sẵn (môi trường MS đậm đặc) + chất điều hòa sinh trưởng (IBA) + đường (20-30gam) + Thạch

**Bước 1:** Chuẩn bị các vật liệu và thiết bị, dụng cụ

- Các dụng cụ vô trùng
- Bình định mức Erlemery (100, 250, 500, 1000ml)
- Cốc đong các loại: 50, 100, 250, 500, 1000ml
- Ống đong 50, 100, 250, 500 và 1000ml
- Pipét các loại
- Bình thủy tinh (bình trụ có nắp nhựa chịu nhiệt)
- Nước cất

**Bước 2:** Lấy các hóa chất theo đúng số ml của dung dịch mẹ

Dung dịch	Hoá chất	Nồng độ (g/l)	Số ml dung dịch mẹ cho 1lit dung dịch nuôi cấy
A	Na <sub>2</sub> EDTA	0,80	28
	Fe <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0,38	
B	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	82,50	20

	KNO <sub>3</sub>	95,00	
C	H <sub>3</sub> PO <sub>3</sub>	1,24	5
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	34,00	
	KI	0,166	
	Na <sub>2</sub> MO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	0,050	
	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,005	
D	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	74,00	5
	MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	4,46	
	ZnSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O	1,72	
	CuSO <sub>4</sub> .5 H <sub>2</sub> O	0,005	
E	CaCl <sub>2</sub> .2 H <sub>2</sub> O	88,00	5
F	Thiamin	0,02	5
	Axit nicotinic	0,10	
	Pyridoxin	0,10	
	Glyxin	0,40	

Tiến hành lấy số ml dung dịch mẹ theo chỉ dẫn trong bảng trên rồi thêm các chất sau ta sẽ có một lít môi trường nuôi cấy.

Moy inostol	100mg/l
Sucrose	20-30 g/l
Agar	4,5-7 g/l
IBA	1-30 mg/l

### Bước 3: Cách pha

- Pha các chất điều hòa sinh trưởng (xem bài 2)



- Đong lượng nước cất bằng khoảng  $\frac{1}{4}$  số lượng môi trường cần pha. Đổ vào nồi nấu môi trường, đặt lên bếp đun sôi
- Cân đường và thạch với khối lượng cần dùng (20-30 g đường; 4,5-6 gam Thạch) cho thêm một ít nước cất khuấy cho thạch và đường tan hết. Đổ vào nồi nấu, khuấy đều cho đến khi sôi
- Đổ tất cả các hóa chất vừa lấy từ các dung dịch mẹ dựa trên số lượng chuẩn bị và rót vào nồi, Cân 100mg Myo Inositol hòa tan vào trong hỗn hợp môi trường trên, khuấy đều, thêm nước cất cho đủ số lượng môi trường cần chuẩn bị.
- Điều chỉnh pH của môi trường bằng (HCl 0,1N hoặc NaOH 0,1N) cho đến khi pH = 6.
- Rót môi trường vào bình cấy
- Khử trùng môi trường trong nồi hấp vô trùng (121°C, 1.0 atm, 20 phút)
- Sau khi khử trùng xong, chuyển các ống nghiệm vào phòng vô trùng...

### **C. Ghi nhớ**

- Chuẩn bị các vật liệu và thiết bị, dụng cụ
- Lấy các hóa chất theo đúng số ml của dung dịch mẹ
- Pha chế hóa chất theo đúng trình tự quy định

# HƯỚNG DẪN GIẢNG DẠY MÔ ĐUN

## I. Vị trí, tính chất của mô đun

- Vị trí: Mô đun chuẩn bị hóa chất và môi trường vi nhân giống là một mô đun chuyên môn nghề trong chương trình dạy nghề trình độ sơ cấp của nghề Vi nhân giống cây lâm nghiệp; được giảng dạy sau mô đun 02 và trước mô đun 04.

- Tính chất: Mô đun được thực hiện trên lớp trong phòng thí nghiệm nhằm trang bị cho học viên những kiến thức và kỹ năng xác định, pha chế, bảo quản hóa chất và môi trường dùng trong nghề Vi nhân giống cây lâm nghiệp.

## II. Mục tiêu

*Về kiến thức:*

- Trình bày được phương pháp pha chế, bảo quản hóa chất và môi trường vi nhân giống tế bào.

- Xác định được các loại hóa chất dùng trong vi nhân giống

- Nắm được cách pha chế, bảo quản được hóa chất và môi trường nuôi cấy theo đúng quy trình

*Về kỹ năng:*

- Pha chế, bảo quản được hóa chất và môi trường nuôi cấy theo đúng quy trình

*Về thái độ:*

- Tham gia đầy đủ các buổi học tập lý thuyết và thực hành

- Chấp hành nghiêm chỉnh quy định trong học tập của giáo viên

- Chấp hành nghiêm chỉnh quy định an toàn lao động

## III. Nội dung chính của mô đun

Mã bài	Tên bài	Loại bài dạy	Địa điểm	Thời gian			
				Tổng số	Lý thuyết	Thực hành	Kiểm tra*
MĐ 03-01	Xác định các loại hóa chất dùng trong vi nhân giống	Tích hợp	Lớp học/phòng thí nghiệm	12	5	7	

Mã bài	Tên bài	Loại bài dạy	Địa điểm	Thời gian			
				Tổng số	Lý thuyết	Thực hành	Kiểm tra*
MĐ03-02	Pha chế hóa chất và bảo quản dung dịch mẹ	Tích hợp	Lớphọc/phòng thí nghiệm	36	5	29	2
MĐ02-03	Pha chế và bảo quản môi trường vi nhân giốngvi nhân giống	Tích hợp	Lớphọc/phòng thí nghiệm	40	6	32	2
	<i>Kiểm tra hết mô đun</i>			4			4
	<b>Cộng</b>			<b>92</b>	<b>16</b>	<b>68</b>	<b>8</b>

\* Ghi chú: Thời gian kiểm tra được tính vào giờ thực hành.

#### **IV. Hướng dẫn thực hiện bài tập thực hành**

##### **Bài 1: Xác định các loại hóa chất dùng trong vi nhân giống**

###### **1. Nguồn lực cần thiết:**

- Vật liệu: Các loại hoá chất và môi trường cần thiết trong vi nhân giống
- Dụng cụ và trang thiết bị:
  - + Phòng pha chế và bảo quản hóa chất
  - + Cân phân tích (chính xác từ  $10^{-2}$  –  $10^{-4}$  gam), Thiết bị cất nước, tủ lạnh, nồi hấp cao áp, máy sấy, máy khuấy từ, bình tam giác, bình trụ, bếp điện (ga), xoong nấu môi trường, dụng cụ đo lường, chai lọ ...

###### **2. Cách tổ chức thực hiện**

Chia lớp làm 4 nhóm

###### **3. Thời gian: 8 giờ**

###### **4. Tiêu chuẩn sản phẩm:**

Nhận dạng, chuẩn bị được đầy đủ các dụng cụ, danh mục hóa chất dùng trong nuôi cấy mô tế bào

##### **Bài 2: Pha chế hóa chất và bảo quản dung dịch mẹ**

###### **1. Nguồn lực cần thiết:**

- Dụng cụ: Cốc chứa (cốc đong) có vạch chia, Bình trụ có chia mm, Đũa thủy tinh, Pipettes

- Vật liệu: Cồn, Các chất đa lượng, vi lượng, vitamin, chất điều hoà sinh trưởng, HCL, NaOH

## 2. Cách tổ chức thực hiện

Chia lớp làm 4 nhóm

3. Thời gian: 30 giờ

## 4. Tiêu chuẩn sản phẩm:

Pha chế được bộ hóa chất gốc chuẩn đúng nồng độ

### Bài 3: Pha chế và bảo quản môi trường vi nhân giống

#### 1. Nguồn lực cần thiết:

Dụng cụ: Cốc chứa (cốc đong) có vạch chia, Bình trụ có chia mm, Đũa thủy tinh, Pipettes

- Vật liệu: Cồn, Các chất đa lượng, vi lượng, vitamin, chất điều hoà sinh trưởng, HCL, NaOH và bộ dung dịch gốc

#### 2. Cách tổ chức thực hiện

Chia lớp làm 4 nhóm

3. Thời gian: 34 giờ

#### 4. Tiêu chuẩn sản phẩm:

Pha chế được bộ hóa chất dùng cho nuôi cấy khởi đầu, dùng cho nhân nhanh chồi, dùng cho tạo rễ hoàn chỉnh

### V. Yêu cầu về đánh giá kết quả học tập

#### 5.1. Bài 1

Tiêu chí đánh giá	Cách thức đánh giá	Điểm
<b><u>Lý thuyết:</u></b> - Trình bày được vai trò, đặc tính lý, hóa học và sinh học của từng loại hóa chất dùng trong vi nhân giống	Vấn đáp	2
<b><u>Kỹ năng:</u></b> - Nhận biết, liệt kê được các hóa chất và phân hóa chất theo nhóm sử dụng.	Kiểm tra thao tác thực hiện	8

### 5.2. Bài 2

Tiêu chí đánh giá	Cách thức đánh giá	Điểm
<b><u>Lý thuyết:</u></b> - Trình bày được cách pha chế và bảo quản dung dịch mẹ	Vấn đáp	3
<b><u>Kỹ năng:</u></b> - Các bước pha chế dung dịch mẹ Bước 1: Sắp xếp các vật liệu và thiết bị và dụng cụ Bước 2: Cách pha chế các dung dịch mẹ (Bảng liệt kê các dung dịch mẹ cho môi trường MS pha ở nồng độ gấp 50 - 100 lần) - Tiêu chuẩn về hình thái - Tiêu chuẩn về nồng độ	Kiểm tra thao tác thực hiện	7

### 5.3. Bài 3

Tiêu chí đánh giá	Cách thức đánh giá	Điểm
<b><u>Lý thuyết:</u></b> - Liệt kê được danh mục hóa chất dùng pha chế một số môi trường phổ biến trong vi nhân giống (tên hóa chất, nồng độ và liều lượng). - Trình bày được công thức, cách pha chế, khử trùng và bảo quản 3 loại môi trường vi nhân giống. - Pha chế được 3 loại môi trường vi nhân giống. - Khử trùng và bảo quản được các loại môi trường dùng trong vi nhân giống theo đúng quy trình.	Vấn đáp	4
<b><u>Kỹ năng:</u></b> - Cách pha chế môi trường nuôi cấy khởi đầu - Cách pha chế môi trường nhân nhanh chồi - Cách pha chế môi trường tạo cây hoàn	Kiểm tra thao tác thực hiện	6

chính		
-------	--	--

## **VI. Tài liệu tham khảo**

1. Trung tâm nghiên cứu cây nguyên liệu giấy - Tổng công ty giấy Việt Nam (2003), Giáo trình công nghệ nuôi cấy mô tế bào.
2. Viện di truyền nông nghiệp (1995), Giáo trình hướng dẫn thực tập công nghệ nuôi cấy mô tế bào.

**DANH SÁCH BAN CHỦ NHIỆM CHỈNH SỬA  
CHƯƠNG TRÌNH DẠY NGHỀ TRÌNH ĐỘ SƠ CẤP**

*(Kèm theo Quyết định số 2949 /BNN-TCCB ngày 03 tháng 11 năm 2010  
của Bộ trưởng Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn)*

**1. Chủ nhiệm:** Ông Nghiêm Xuân Hội - Hiệu trưởng Trường Cao đẳng Nông Lâm

**3. Thư ký:** Ông Nguyễn Văn Vượng - Trưởng khoa Trường Cao đẳng Nông Lâm

**4. Các ủy viên:**

- Ông Triệu Văn Khôi, Giảng viên Trường Cao đẳng Nông Lâm

- Ông Trần Minh Cảnh, Giảng viên Trường Cao đẳng Nông Lâm

- Ông Đặng Văn Tạng, Kỹ sư Trung tâm Cây lâm nghiệp, cây ăn quả Bắc Giang./.

**DANH SÁCH HỘI ĐỒNG NGHIỆM THU  
CHƯƠNG TRÌNH, GIÁO TRÌNH DẠY NGHỀ TRÌNH ĐỘ SƠ CẤP**

*(Theo Quyết định số 3495 /QĐ-BNN-TCCB ngày 29 tháng 12 năm 2010  
của Bộ trưởng Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn)*

**1. Chủ tịch:** Ông Trần Văn Dư - Phó hiệu trưởng Trường Cao đẳng Nông nghiệp và Phát triển nông thôn Bắc Bộ

**2. Thư ký:** Bà Đào Thị Hương Lan - Phó trưởng phòng Vụ Tổ chức cán bộ, Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn

**3. Các ủy viên:**

- Bà Kiều Thị Thuyên - Trưởng bộ môn Trường Cao đẳng Nông nghiệp và Phát triển nông thôn Bắc Bộ

- Ông Phạm Xuân Mạnh - Trưởng khoa Nông Lâm Trường Cao đẳng nghề Cơ điện - Xây dựng và Nông Lâm Trung Bộ

- Ông Nguyễn Việt Khoa - Phó trưởng phòng Trung tâm Khuyến nông Quốc gia./.