

BỘ NÔNG NGHIỆP VÀ PHÁT TRIỂN NÔNG THÔN

GIÁO TRÌNH MÔ ĐUN

**THỰC HIỆN CÁC GIAI ĐOẠN
VI NHÂN GIỐNG**

MÃ SỐ: MĐ04

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: MĐ 04

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: Mô đun thực hiện các giai đoạn vi nhân giống là mô đun thứ 4 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 cơ bản để tiến hành các bước Lấy mẫu, nuôi cấy khởi đầu, nhân nhanh chồi, tạo cây hoàn chỉnh và huấn luyện cây vi nhân giống. Mô đun có thể dạy độc lập hoặc dạy cùng với mô đun 03 và mô đun 05 trong chương trình dạy nghề thường xuyên.

Giáo trình mô đun gồm 5 bài: Bài 1: Lấy mẫu để vi nhân giống; Bài 2: Nuôi cấy khởi đầu; Bài 3: Nhân nhanh chồi; Bài 4: Nuôi cấy tạo cây hoàn chỉnh; Bài 5: Huấn luyện cây 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 Vượng
2. TS. Nghiêm Xuân Hội
3. ThS. Vũ Thị Tâm
4. ThS. Nguyễn Thị Thanh Nguyên

MỤC LỤC

ĐỀ MỤC	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 THỰC HIỆN CÁC GIAI ĐOẠN VI NHÂN GIỐNG</u>	5
<u>Bài 1: LẤY MẪU ĐỀ VI NHÂN GIỐNG</u>	5
<u>A. Nội dung</u>	5
<u>1. Khái niệm lấy mẫu</u>	5
<u>2. Trình tự lấy mẫu</u>	5
<u>3. Tiêu chuẩn của mẫu</u>	5
<u>4. Thời gian, thời vụ lấy mẫu</u>	6
<u>B. Câu hỏi và bài tập thực hành</u>	7
<u>1. Câu hỏi:</u>	7
<u>2. Bài tập thực hành:</u>	7
<u>C. Ghi nhớ:</u>	8
<u>Bài 2: NUÔI CÂY KHỞI ĐẦU</u>	8
<u>A. Nội dung</u>	9
<u>1. Khái niệm nuôi cây khởi đầu</u>	9
<u>2. Mục đích yêu cầu</u>	9
<u>3. Trình tự các bước trong nuôi cây khởi đầu</u>	9
<u>4. Nuôi dưỡng sau cấy mẫu</u>	20
<u>B. Câu hỏi và bài tập thực hành:</u>	22
<u>1. Câu hỏi</u>	22
<u>2. Bài tập thực hành:</u>	22
<u>C. Ghi nhớ:</u>	29
<u>Bài 3: CÂY NHÂN CHỒI</u>	31
<u>A. Nội dung</u>	31
<u>1. Khái niệm cây nhân chồi</u>	31
<u>2. Mục đích</u>	31
<u>3. Các nguyên tắc trong cấy nhân chồi</u>	31
<u>4. Trình tự các bước nhân nhanh chồi</u>	34
<u>5. Chăm sóc và nuôi dưỡng:</u>	35
<u>B. Câu hỏi và bài tập thực hành:</u>	37
<u>1. Câu hỏi:</u>	37
<u>2. Bài tập thực hành:</u>	37
<u>C. Ghi nhớ:</u>	38
<u>Bài 4: NUÔI CÂY TẠO CÂY HOÀN CHỈNH</u>	40
<u>A. Nội dung</u>	40
<u>1. Khái niệm nuôi cấy tạo cây hoàn chỉnh</u>	40
<u>2. Mục đích, yêu cầu</u>	41
<u>3. Trình tự các bước cấy tạo cây hoàn chỉnh</u>	41

4. Chăm sóc, nuôi dưỡng cây vi nhân giống.....	42
<u>B. Câu hỏi và bài tập thực hành:</u>	43
1. Câu hỏi:	43
2. Bài tập thực hành:	43
<u>C. Ghi nhớ:</u>	45
<u>Bài 5: HUẤN LUYỆN CÂY VI NHÂN GIỐNG</u>	46
<u>A. Nội dung</u>	46
1. Khái niệm huấn luyện cây vi nhân giống	46
2. Mục đích, yêu cầu.....	46
3. Các giai đoạn huấn luyện cây vi nhân giống	47
4. Tiêu chuẩn cây vi nhân giống đem cấy	48
<u>B. Câu hỏi và bài tập thực hành</u>	49
1. Câu hỏi	49
2. Bài tập thực hành	49
<u>C. Ghi nhớ:</u>	49
<u>HƯỚNG DẪN GIẢNG DẠY MÔ ĐUN/MÔN HỌC</u>	50
<u>I. Vị trí, tính chất của mô đun :</u>	50
<u>II. Mục tiêu: Học xong mô đun này, học viên có khả năng:</u>	50
<u>III. Nội dung chính của mô đun:</u>	50
<u>IV. Hướng dẫn thực hiện bài tập, bài thực hành</u>	51
1. Các nguồn lực cần thiết:.....	51
2. Cách tổ chức thực hiện:.....	52
3. Thời gian: 96 giờ	52
4. Tiêu chuẩn sản phẩm	52
<u>V. Yêu cầu về đánh giá kết quả học tập</u>	52
5.1. Bài 1: Lấy mẫu để vi nhân giống	52
5.2. Bài 2: Nuôi cấy khởi đầu	52
5.2. Bài 3: Nhân nhanh chồi	53
5.2. Bài 4: Nuôi cấy tạo cây hoàn chỉnh	54
5.2. Bài 5: Huấn luyện cây vi nhân giống	55
<u>VI. Tài liệu tham khảo</u>	56

CÁC THUẬT NGỮ CHUYÊN MÔN, CHỮ VIẾT TẮT

MĐ: Mô đun

LT: lý thuyết

TH: thực hành

KT: kiểm tra

MÔ ĐƠN THỰC HIỆN CÁC GIAI ĐOẠN VI NHÂN GIỐNG

Mã số mô đun: MĐ 04

Giới thiệu mô đun:

Mô đun Thực hiện các giai đoạn vi nhân giống nhằm trang bị cho học viên kiến thức và kỹ năng thực hiện các bước lấy mẫu, nuôi cấy khởi đầu, nhân nhanh chồi, tạo cây hoàn chỉnh và huấn luyện cây vi nhân giống. Là mô đun chuyên môn trọng tâm trong chương trình dạy nghề Vi nhân giống cây lâm nghiệp được thực hiện trên lớp và trong phòng thí nghiệm tại cơ sở đào tạo, được giảng dạy sau mô đun 03 và trước mô đun 05, mô đun này có thể giảng dạy độc lập theo yêu cầu của người học.

Bài 1

LẤY MẪU ĐỂ VI NHÂN GIỐNG

Mục tiêu:

- Nêu được mục đích, yêu cầu và trình tự các bước lấy mẫu.
- Thành thạo các kỹ năng: Chọn, bảo quản mẫu, rửa mẫu.
- Tiết kiệm vật tư, nguyên liệu và đảm bảo an toàn lao động.

A. Nội dung

1. Khái niệm lấy mẫu

Lấy mẫu là công việc lấy các cơ quan của thực vật có đủ tiêu chuẩn, phẩm chất tốt, không sâu bệnh đã được tuyển chọn từ những cây mẹ đầu dòng để tiến hành vi nhân giống.

2. Trình tự lấy mẫu

- Chọn cây mẹ (cây giống gốc) để lấy nguồn vật liệu nuôi cấy
- Lựa chọn các bộ phận, cơ quan trên cây mẹ để vi nhân giống
- Định lượng tiêu chuẩn của các bộ phận để lấy mẫu.
- Cắt bộ phận để lấy mẫu

3. Tiêu chuẩn của mẫu

Lấy các cơ quan để tiến hành vi nhân giống trên cây mẹ với kích thước sau:



Hình 1: Chọn và cắt mẫu trên cây mẹ

Nguồn gốc mẫu cây	Kích thước	Mẫu được tách
Chồi ngọn (shoot tips)	0.5 – 1 mm	Chóp ngọn chứa một phần thân
Chồi bên (axillary buds)	0.5 – 1 cm	Chồi bên có chứa một phần thân, lá và chồi nách
Lá (leaf partioles)	0.2 – 0.3 cm	Mẫu lá cắt nhỏ được cấy chìm phần nửa vào môi trường nuôi cấy
Cây mầm (seedlings)	2 – 3 mm	Chồi non

4. Thời gian, thời vụ lấy mẫu

- Thời gian lấy mẫu cần căn cứ vào đặc điểm sinh học, sinh thái học của loài cây

- Lấy mẫu nuôi cấy khi chồi ngủ là tốt nhất vì ở thời kỳ này lượng auxin tập trung nhiều nhất ở các đỉnh sinh trưởng.

- Thời tiết và thời vụ: nên chọn thời điểm trời âm mát, không có mưa và những ngày không có gió hại để lấy mẫu cây.

- Mỗi loài cây đều có thời vụ nhất định cho quá trình ra hoa, kết quả, đâm chồi, nảy lộc.

- Có thể áp dụng mùa lấy mẫu theo các vùng khí hậu sau đây làm cơ sở để lấy mẫu:

+ Miền Bắc: Mùa xuân (từ tháng 2 đến tháng 4)

+ Miền Trung (tránh thời điểm có gió Lào)

+ Miền Nam: Mùa thu (từ tháng 6 đến tháng 10).

Ví dụ: Bạch đàn thường lấy mẫu cây vào vụ xuân (tháng 3- tháng 4)

Keo thường lấy mẫu cây vào (tháng 8 - tháng 10).

B. Câu hỏi và bài tập thực hành

1. Câu hỏi:

- Thế nào là lấy mẫu?
- Trình tự các bước lấy mẫu để vi nhân giống ?
- Trình bày tiêu chuẩn lấy mẫu từ các bộ phận của thực vật

2. Bài tập thực hành:

Lấy mẫu Keo và Bạch đàn để vi nhân giống

- *Cách thức:* chia lớp thành các nhóm nhỏ (5 – 6 học viên/nhóm)
- *Thời gian hoàn thành:* 4 giờ/1 nhóm
- *Hình thức:* thực hành tại chỗ
- *Phương pháp đánh giá:* kỹ năng vận dụng lý thuyết vào thực hành của mỗi học viên trong nhóm và thái độ thực hành của học viên.
- *Kết quả cần đạt được:*

Bước 1. Chuẩn bị dụng cụ để lấy mẫu:

- Kéo cắt cành
- Xô đựng nước sạch và cành sau khi cắt

Bước 2. Chọn cây mẹ để lấy mẫu vi nhân giống

- Cây có chứng chỉ công nhận giống tốt

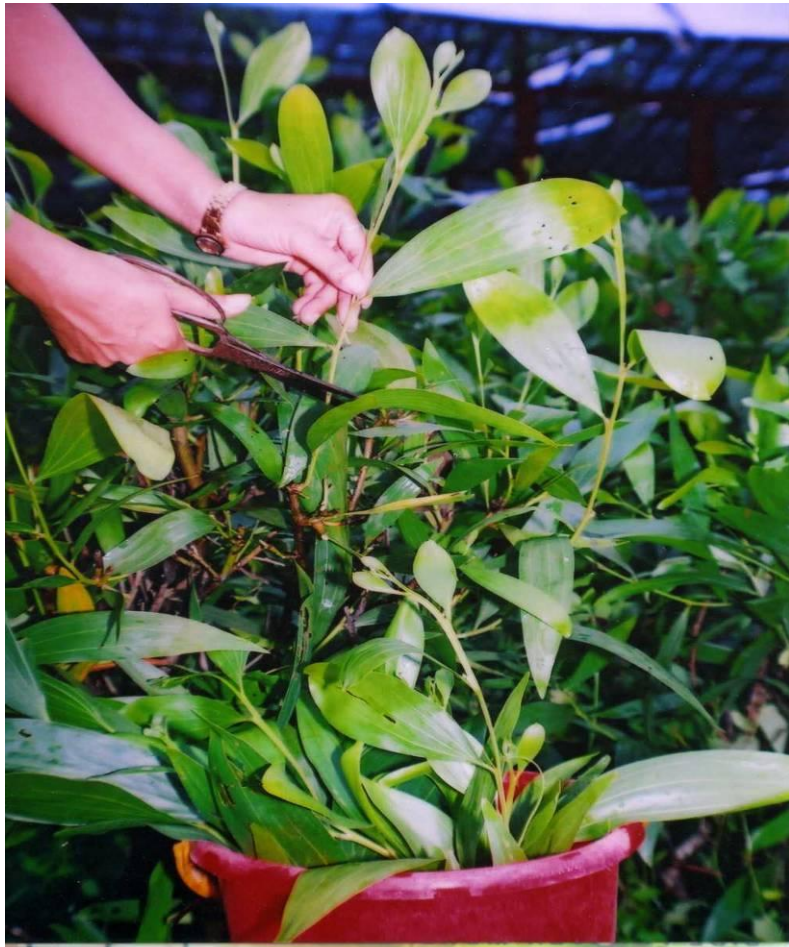
- Cây đang trong thời kỳ sinh trưởng, phát triển tốt, sạch sâu bệnh

Bước 3. Chọn cơ quan, bộ phận để lấy mẫu:

- Chồi ngọn
- Chồi bên
- Chồi bất định

Bước 4: Cắt mẫu

- Cắt mẫu bằng kéo
- Nhúng gốc cành cắt được vào xô đựng nước sạch



Hình 2: Cắt mẫu và nhúng gốc cành cắt vào nước sạch

C. Ghi nhớ:

- Chọn mẫu
- Cắt mẫu

Bài 2

NUÔI CÂY KHỞI ĐẦU

Mục tiêu:

- Trình bày được khái niệm, mục đích, yêu cầu và trình tự các bước trong nuôi cây khởi đầu.
- Thành thạo các kỹ năng: Chọn, cắt mẫu, khử trùng mẫu, cấy mẫu, chăm sóc và cấy chuyển mẫu đúng yêu cầu kỹ thuật, đạt tỷ lệ mẫu nảy chồi từ 5 - 10%.
- Tiết kiệm vật tư, nguyên liệu và đảm bảo an toàn lao động.

A. Nội dung

1. Khái niệm nuôi cây khởi đầu

Là quá trình khử trùng và đưa mẫu cây vào môi trường nuôi cấy invitro. Mẫu cây là một phần của mô hoặc cơ quan của cây được tách ra để đưa vào nuôi cấy invitro.

2. Mục đích yêu cầu

2.1. Mục đích:

Tạo được hệ thống phôi, chồi và cụm chồi vô trùng từ một mẫu ban đầu làm vật liệu cho các giai đoạn sau.

2.2. Yêu cầu:

Môi nuôi cấy phải là môi có khả năng tái sinh cao trong môi trường nuôi cấy nhân tạo, sạch bệnh và mang các đặc tính sinh học tốt của cây mẹ.

Tỷ lệ mẫu nhiễm nấm khuẩn thấp, tỷ lệ mẫu sống cao, mô cấy sinh trưởng tốt.

3. Trình tự các bước trong nuôi cây khởi đầu

3.1. Trình tự thực hiện

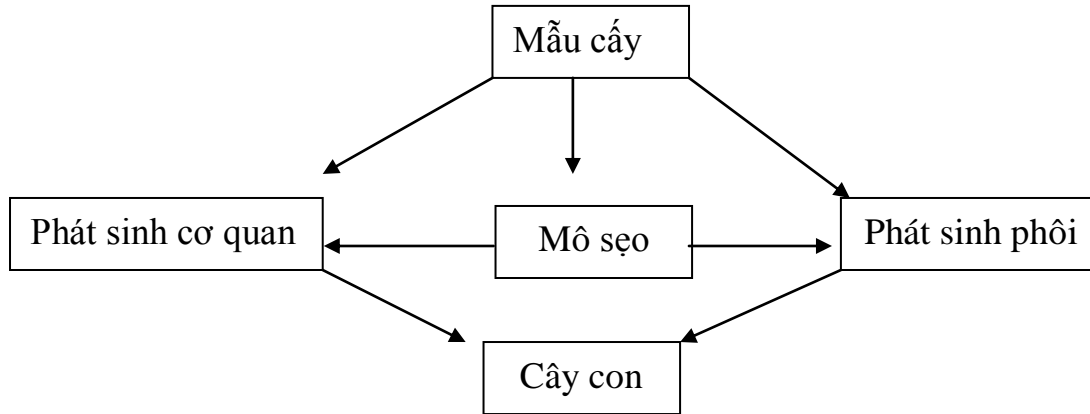
- Khử trùng bề mặt mẫu cây
- Cấy mẫu vào môi trường dinh dưỡng nhân tạo
- Nuôi trong phòng nuôi có điều kiện nhiệt độ và ánh sáng phù hợp.

3.2. Các bước tiến hành

3.2.1. Chuẩn bị:

a. Vật liệu nuôi cấy:

Tế bào thực vật có tính toàn năng nên nuôi cấy bất kỳ tế bào nào (mẫu cấy) cũng có thể tái sinh trở thành cây hoàn chỉnh (có thể thông qua hình thành phôi vô tính hoặc có thể tái sinh thông qua hình thành mô sẹo).



Mẫu nuôi cấy chỉ có ý nghĩa khi lấy trên cây mẹ ưu việt mang các tính trạng đặc tính tốt là đối tượng cần nhân giống.

Ví dụ: bạch đàn nên sử dụng cây mẹ là các dòng PN2, PN14, U6, GU1 và GU8 ... có tốc độ sinh trưởng nhanh và thị trường tiêu thụ cây giống lớn.

Mẫu nuôi cấy có thể là hầu hết các bộ phận của cây như đỉnh sinh trưởng chồi ngọn, chồi bên, lá, vẩy hành, cây mầm, hạt phấn ... song tế bào của bộ phận đó càng gần trạng thái phôi sinh càng tốt (mô phân sinh) thì thành công công hơn. Vì mô phân sinh có thể tích cố định chứa tế bào đỉnh sinh trưởng non trẻ có khả năng sinh trưởng mạnh, nhất là quá trình phân chia và tổng hợp các chất, được bao bọc bởi lớp cutin nên hạn chế sự mất nước trong quá trình nuôi cấy.

Tế bào đỉnh sinh trưởng mang đầy đủ một lượng thông tin di truyền và sạch bệnh. Vì thế cần tiến hành trẻ hoá cây mẹ (bắt cây mẹ mọc ra các chồi non ở những đoạn thân có tuổi phát dục nhỏ và sinh trưởng mạnh) trước khi lấy mẫu cấy.

Cơ sở của phương pháp trẻ hoá là trên thân cây thường có nhiều chồi bất định, nằm ở những vị trí không xác định. Chúng chỉ xuất hiện khi thân chính bị mất đi. Vì thế khi cắt bỏ thân chính các chồi bất định mới có cơ hội mọc ra và mọc ở những vị trí thân có tuổi phát dục nhỏ đây là nguồn vật liệu cung cấp mẫu cấy non trẻ.

Với bạch đàn, keo chồi thân và chồi gốc là vật liệu tốt nhất cho nuôi cấy

Có thể trẻ hoá cây mẹ bằng một số phương pháp sau:

- Phương pháp cắt chặt thân chính để tạo chồi:
 - + Với loài dễ mọc chồi bất định như bạch đàn, phi lao thì độ cao cắt thân là 10 -15cm so với mặt đất.

- + Với cây khó đâm chồi bất định như keo tai tượng, keo lá chàm thì chiều cao gốc chặt 0,70-1,20 m so với mặt đất. Sau khi chặt bỏ thân chính khoảng 15 đến 20 ngày thì các chồi bất định sẽ mọc ra.
- + Theo phương pháp này tuy có nhiều chồi được mọc ra nhưng lại phải chặt bỏ cây và mỗi loài cây khả năng đâm chồi bất định ở các độ cao là khác nhau.
- Phương pháp khoan vỏ:
 - + Đối với bạch đàn cắt khoan vỏ ở độ cao cách mặt đất 10 - 15cm. Đoạn vỏ cắt khoan bỏ đi bằng khoảng 2/3 chu vi thân.
 - + Để chồi bất định phát triển thuận lợi trước khi khoan vỏ cần dọn sạch cỏ dại xung quanh gốc cây và tiến hành bón phân tưới nước. sau khi cắt khoan vỏ các chồi mọc ra từ vị trí khoan được sử dụng làm mẫu nuôi cấy.
- Phương pháp ghép mắt, ghép đoạn cành ... hoặc giâm để kích chồi non hình thành làm vật liệu nuôi cấy.

Thời gian lấy mẫu: trong ngày thường tiến hành vào lúc trời mát để hạn chế mất nước của mẫu nên lấy vào buổi sáng sớm. Không lấy mẫu vào thời điểm nắng và có dịch bệnh xảy ra.

Nên cắt mẫu vào cuối giai đoạn ngủ nghỉ của cây, vì ở giai đoạn này hàm lượng auxin tích lũy khá cao để chuẩn bị cho nảy chồi.

Đối với bạch đàn nếu lấy mẫu vào cuối tháng 11 thì khả năng nảy tái sinh kém. Tốt nhất là lấy mẫu vào tháng 3 tháng 4.

Bảo quản mẫu: sau khi cắt rời khỏi cây mẹ rồi nhúng gốc cành cắt vào xô đựng nước sạch.

b. Chuẩn bị môi trường nuôi cấy khởi đầu:

Môi trường nuôi cấy là yếu tố cần thiết và quyết định cho sự tồn tại và tái sinh của mẫu cấy. Vì mô nuôi cấy là một bộ phận sống độc lập bị tách rời khỏi cây đang sống cho nên cần phải được cung cấp đầy đủ các chất để tiếp tục phát triển.

Mỗi loài cây phù hợp với một loại môi trường khác nhau, vì mỗi môi trường có thành phần và tỷ lệ các muối khoáng, các chất điều hoà sinh trưởng khác nhau, do đó trong nuôi cấy mô cần thăm dò để tìm ra môi trường thích hợp.

Môi trường nuôi cấy thường chứa muối khoáng, hydratecarbon, vitamin, và các chất điều hoà sinh trưởng. Tùy theo hàm lượng và tỷ lệ các chất trên hình thành nên các môi trường nuôi cấy khác nhau.

- + Các chất khoáng:

Gồm các nguyên tố đa lượng và vi lượng với nồng độ khác nhau trong môi trường nuôi cấy ổn định. Có loài cây thích hợp với môi trường có thành phần và tỷ lệ chất khoáng cao (môi trường giàu chất dinh dưỡng) và ngược lại có loài cây thích hợp với thành phần tỷ lệ các chất khoáng thấp (môi trường nghèo dinh dưỡng).

+ Hydratcacbon (đường)

Trong nuôi cấy mô tế bào, mô nuôi cấy dinh dưỡng theo phương thức dị dưỡng. Mô tế bào sử dụng nguồn Hydratcacbon này để tổng hợp nên các chất hữu cơ giúp tế bào phân chia tăng sinh khối của mô và tái sinh thành cây hoàn chỉnh. Nhu cầu về đường của các loài cây và giai đoạn nuôi cấy rất khác nhau biến động từ 1- 9% thông dụng nhất là 2% đến 4%.

Trong quá trình nuôi cấy, mô tế bào sử dụng đường, nên nồng độ đường trong môi trường sẽ giảm dần (khoảng 20 - 25 ngày) do vậy làm áp suất thẩm thấu của tế bào và mô sẽ giảm khi đó mẫu cấy không phát triển được. Vì vậy cần phải cấy chuyển sang môi trường mới.

+ Các chất điều hoà sinh trưởng:

Mỗi chất điều hoà sinh trưởng có tác dụng riêng và đặc trưng đến quá trình sinh lý ở thực vật.

Ví dụ: auxin có tác dụng kích thích ra rễ, cytokinin có tác dụng kích thích phân chia tế bào kích thích sự ra chồi cho nên trong môi trường nuôi cấy mô cytokinin là thành phần bắt buộc và thường sử dụng BAP (6-Benyl Amino Purin). Do vậy để cho mô tái sinh tốt cần chọn và cho vào môi trường chất điều hoà sinh trưởng với liều lượng và tỷ lệ thích hợp.

Ví dụ: trong nuôi cấy mô chuỗi sự hình thành phôi vô tính không cần qua giai đoạn hình thành mô sẹo, cho nên ở giai đoạn nhân chồi chỉ cần cho vào môi trường BA nồng độ 10^{-6} đến 10^{-5} .

Đối với trường hợp sự hình thành phôi vô tính cần qua giai đoạn hình thành mô sẹo thì giai đoạn nuôi cấy khởi đầu cần cho vào môi trường 2,4D (nồng độ 2-5mg/lít môi trường).

Chú ý: sử dụng chất điều hoà sinh trưởng trong nuôi cấy mô phải đảm bảo đúng nồng độ, vì chất điều tiết sinh trưởng tác động lên mô nuôi cấy ở nồng độ rất thấp (có thể ở 10^{-9} M đã gây ảnh hưởng) nên khi lấy dung dịch mẹ để pha chế môi trường làm việc, cần sử dụng micropipet riêng cho mỗi chất. Sau khi dùng xong cần phải rửa thật sạch các dụng cụ đã dùng, đã đựng loại hoá chất này.

+ Vitamin:

Các vitamin được dùng trong nuôi cấy mô là vitamin thiamin hay vitamin B₁ rất cần bổ sung vào môi trường nuôi cấy mô tế bào. Khi khử trùng môi trường ở nhiệt độ cao vitamin B₁ bị phân giải thành Pyrimidin và Thiazol.

Có thể bổ sung thêm ascorbic nồng độ 1-1,5mg/lit có tác dụng chống oxy hoá, ngăn chặn quá trình tiết các hợp chất phenol ra môi trường, ...

Chú ý: dung dịch vitamin cần được bảo quản ở nhiệt độ thấp để tránh bị nhiễm tạp nấm khuẩn làm hỏng mất hoạt tính do.

+ Các chất hữu cơ khác

Đó là hỗn hợp các chất tự nhiên không xác định. Nếu môi trường nuôi cấy càng đầy đủ các chất gần với tự nhiên thì mô nuôi cấy sẽ phát triển tốt.

Các hỗn hợp chất tự nhiên sử dụng trong nuôi cấy vi nhân giống 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, myo-inositol, các hợp chất điều hoà sinh trưởng (auxin, xytokinin), một số chất khoáng. Lượng dùng trong nuôi cấy mô 15 - 20% thể tích.

Cách chiết: bỏ quả dừa già lấy nước đem lọc lấy dịch trong 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, axit nucleic, axit amin, vitamin, auxin, khoáng ... Bổ sung vào môi trường nuôi cấy đều cho hiệu quả tốt.

- Dịch thủy phân casein: Chủ yếu là nguồn để cung cấp thêm axit amin cho môi trường nuôi cấy.

- Độ pH của môi trường nuôi cấy là yếu tố duy trì sự sống sự trao đổi chất của mô với môi trường dinh dưỡng. Vì pH của môi trường dinh dưỡng ảnh hưởng tới quá trình hấp thu các chất từ môi trường dinh dưỡng của mô nuôi cấy.

Khi pha chế xong môi trường nuôi cấy cần kiểm tra độ pH bằng giấy quì tím hay bằng pH met. Nếu pH quá xa với pH thích hợp với mô nuôi cấy thì cần phải chỉnh cho phù hợp. Hoá chất để chỉnh là NaOH 0,1N (để giảm pH) hoặc HCl 0,1N (để nâng pH)

- Than hoạt tính (than củi): Than hoạt tính có tác dụng:

+ Hấp phụ các chất kháng sinh phitonxit và các chất độc tố do mô nuôi cấy tiết ra môi trường.

+ Tạo môi trường thích hợp (bóng tối) để thúc đẩy sự hình thành rễ của cây, lượng sử dụng 1- 10g cho 1 lit môi trường.

- Nước: Nước để hoà tan các chất trong môi trường nuôi cấy và tạo điều kiện cho các chất từ môi trường thấm vào mô nuôi cấy, đồng thời nước là môi

trường để cho mô sinh trưởng. Do đó phải là nước sạch không có chất hữu cơ và chất khoáng, tốt nhất là dùng nước cất được chưng cất ở máy thủy tinh.

- Thạch Agar: Thạch agar là polysaccarit được chiết rút từ tảo rất cần thiết cho nuôi cấy vi nhân giống cố định.

Thạch có đặc điểm ở nhiệt độ khoảng 80°C ngậm nước thành trạng thái sol thuận tiện cho việc phân phối vào các bình nuôi cấy và ở 40°C chuyển sang trạng thái rắn gel đông lại.

Môi trường nuôi cấy cần có độ xốp thoáng, người ta sử dụng thạch làm chất tạo nền (giá thể) với hàm lượng từ 6 - 12 g/lit môi trường làm việc tùy thuộc vào độ tinh khiết của thạch agar.

Hiện nay có rất nhiều môi trường nuôi cấy mô khác nhau. Căn cứ vào hàm lượng và tỷ lệ các nguyên tố dinh dưỡng có thể chia thành 3 nhóm chủ yếu như sau:

Môi trường nghèo dinh dưỡng: Điển hình là môi trường White và Knop.

Thành phần của môi trường White như sau:

Dung dịch	Hoá chất	Nồng độ(g/l)	Số ml dung dịch mẹ/ 1lit dung dịch nuôi cấy
A	Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	3,0	100
	Na ₂ SO ₄	2,0	
	KNO ₃	0,80	
	KCl	0,65	
	NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	0,19	
B	MgBO ₄ .7H ₂ O	75,0	10
C	MnSO ₄ H ₂ O	0,50	10
	ZnSO ₄ 7H ₂ O	0,30	
	KI	0,075	
	CuSO ₄ 5H ₂ O	0,001	
D	FeSO ₄ .7H ₂ O	0,25	10
E	Vitmin B ₁	0,01	10

Vitamin B ₆	0,01
------------------------	------

Môi trường trung bình:

Điển hình là môi trường B₅ (Gamborg) được sử dụng trong môi trường nhân giống vô tính và đặc biệt là nuôi cấy tế bào trần. Môi trường B₅ có thành phần như sau:

Hoá chất	g/ lít	Hoá chất	g/ lít
(NH ₄) ₂ SO ₄	134	KI	0.75
KNO ₃	2500	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25
CaCl ₂ .2 H ₂ O	150	CuSO ₄ .5 H ₂ O	0,025
MgBO ₄ .7H ₂ O	250	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	150	FeEDTA	40
MgSO ₄ .7H ₂ O	250	Thiamin HCl	10
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	150	Axit nicotinic	1
MnSO ₄ .4H ₂ O	10	Pyridoxin HCl	1
ZnSO ₄ .7 H ₂ O	2	Myo-inositol	100
H ₃ BO ₃	3		

Môi trường giàu chất dinh dưỡng (MS = Murashige - Skoog) là môi trường được sử dụng rộng rãi nhất trong nuôi cấy mô và tế bào thực vật và thích hợp cho nuôi cấy mô cây một lá mầm và cây hai lá mầm.

Bảng thành phần môi trường MS

Dung dịch	Hoá chất	Nồng độ (g/l)	Số ml dung dịch mẹ cho 1lít dung dịch nuôi cấy
A	EDTA	0,80	28
	FeSO ₄ .7H ₂ O	0,38	

B	NH ₄ NO ₃	82,50	20
	KNO ₃	95,00	
C	H ₃ PO ₃	1,24	5
	KH ₂ PO ₄	34,00	
	KI	0,166	
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,050	
	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,005	
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	74,00	
D	MnSO ₄ ·4H ₂ O	4,46	5
	ZnSO ₄ ·7 H ₂ O	1,72	
	CuSO ₄ ·5 H ₂ O	0,005	
	CaCl ₂ ·2 H ₂ O	88,00	
F	Thiamin	0,02	5
	Axit nicotinic	0,10	
	Pyridoxin	0,10	
	Glyxin	0,40	
G	Chất điều hoà sinh trưởng	Tuỳ mục đích nuôi cấy	

c. Khử trùng:

Môi trường nuôi cấy mẫu để tái sinh thành cây cũng là môi trường dinh dưỡng thích hợp cho nhiều loại vi sinh vật (khuẩn và nấm) phát triển. Vi sinh vật thường có tốc độ phát triển nhanh hơn mô nuôi cấy.

Chu kỳ nuôi cấy mẫu dài có thể từ 1 đến 5 tháng trong khi đó chu kỳ phát triển của vi sinh vật có thể chỉ vài ngày.

Nếu trong môi trường nuôi cấy mẫu mà bị nhiễm nấm và khuẩn thì những vi sinh vật này phát triển nhanh và mạnh có trường hợp nấm phát triển bao trùm lên mô và tiết ra độc tố đầu độc làm mẫu chết trước khi kịp tái sinh thành cây, do đó vô trùng trong nuôi cấy mô là rất cần thiết.

Nói cách khác, trong nuôi cấy mô khâu vô trùng đòi hỏi nghiêm khắc và là một trong những điều kiện đảm bảo cho sự thành công của nuôi cấy mô tế bào.

Nguồn lây nhiễm (nấm và vi khuẩn) rơi vào môi trường nuôi cấy tồn tại cùng với mô nuôi cấy có từ các nguồn sau:

- Từ dụng cụ chai, bình, nút đậy, panh, dao... dùng cho nuôi cấy mô.
- Từ bề mặt của mô cấy: vi sinh vật (nấm và khuẩn) có khả năng bám chặt vào bề mặt của mô để lấy chất dinh dưỡng nhất là những mô thực vật tiếp xúc trực tiếp với đất thì hàm lượng vi sinh vật càng cao.
- Trong môi trường không khí, các thiết bị dụng cụ của phòng cấy mô (bề mặt của dụng cụ thiết bị rất dễ bị nhiễm bụi bẩn và vi sinh vật)
- Từ bản thân người làm thao tác cấy.

Có thể nói nấm và khuẩn là đối tượng gây hại cho nuôi cấy mô tế bào có mặt ở khắp mọi nơi. Cho nên việc vô trùng (thanh trùng) tiêu diệt nguồn nấm và khuẩn là tiền đề thành công trong nuôi cấy mô tế bào.

+ Khử trùng bề mặt mẫu cấy:

Mô cấy là hầu hết các bộ phận khác nhau của thực vật như đỉnh sinh trưởng ngọn, phôi non, lá non, rễ, thân củ vảy củ ...

Nhìn chung các bộ phận này của cây ít nhiều đều có vi sinh vật (nấm khuẩn) bám trên bề mặt, nhất là các bộ phận tiếp xúc với đất thì càng có lượng khuẩn và nấm cao, cần phải vô trùng mô trước khi đưa vào nuôi cấy.

Biện pháp thông dụng nhất là dùng hoá chất có hoạt tính diệt nấm và khuẩn nhưng không làm chết mẫu nuôi cấy.

Bảng hóa chất, nồng độ và thời gian vô trùng mô cấy:

Tên hoá chất	Nồng độ sử dụng (%)	Thời gian xử lý (phút)	Hiệu quả
Canxihypoclorit	9-10	5- 30	Rất tốt
Natrihypoclorit	2,0	5 -30	Rất tốt
Hypoperoxit	10 -12	5- 15	Tốt
Clorua thuỷ ngân	0,1- 1,0	2- 10	Trung bình
Nước Brom	1-2	2-10	Rất tốt
Chất kháng sinh	4-50 mg/lít	30- 60	Khá tốt

Clo xâm nhập vào tế bào vi sinh vật phân huỷ protein, enzym của vi sinh vật làm tế bào vi sinh vật không trao đổi chất được.

Hợp chất chứa Clo được sử dụng để khử trùng bề mặt mô cây là Canxihypoclorit nồng độ 9 -10% và Natrihypoclorit nồng độ sử dụng 2%.

Thuỷ ngân, chất kháng sinh ít được sử dụng vì tác dụng khử trùng không triệt để và còn ảnh hưởng xấu đến sự sống cũng như tái sinh của mô cây.

+ Khử trùng môi trường nuôi cấy: sau khi pha chế môi trường và chia vào các bình nuôi cấy xong phải đem vô trùng trong nồi áp suất ở nhiệt độ 121°C trong thời gian là 20 – 35 phút.

Trong điều kiện nhiệt độ cao 121⁰C và áp suất 1,1kg/cm² thì sau 15- 20 phút vi khuẩn và bào tử nấm bị diệt hoàn toàn.

3.2.2. Các bước tiến hành khử trùng mẫu cây

+ Cắt mẫu: Trên vườn sản xuất chọn cây có chất lượng tốt đang ở giai đoạn sinh trưởng phát triển mạnh, mang các đặc điểm đặc trưng của giống để làm cây gốc nguồn cung cấp mẫu nuôi cấy.

Chọn lựa cây gốc phải kết hợp với quan sát hình thái, nên lấy mẫu để kiểm tra nguồn bệnh hại nếu có virus hoặc vi khuẩn thì phải loại bỏ không lấy mẫu nuôi cấy ở những cây này

Mẫu lấy phải là chồi đỉnh, mầm ngủ, lá non ... của cây nhưng phải có khả năng tái sinh mạnh mang các đặc tính sinh học của cây mẹ và càng gần trạng thái phôi thai thì dễ tái sinh hơn.

+ Xử lý mẫu:

Mẫu lấy từ cây mẹ trước tiên cần phải xử lý sơ bộ như loại bỏ lá, các phần rườm rà không cần thiết và rửa sạch bụi bám dưới vòi nước chảy.

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

- Rửa mẫu dưới vòi nước chảy khoảng 3-5 phút để làm giảm nguồn vi sinh vật bám dính.

+ Khử trùng bề mặt mẫu thực hiện trong phòng vô trùng:

Qui trình khử trùng bề mặt thường áp dụng:

- Nhúng ngập mẫu trong cồn 70% trong khoảng 30 giây.

- Ngâm mẫu vào dung dịch khử khuẩn đậm nắp kín trong khoảng 15 phút và thỉnh thoảng lắc nhẹ.

- Rửa lại nhiều lần bằng nước vô trùng (nước vô trùng là nước được thanh trùng ở nhiệt độ cao trong nồi cao áp)

Bảo quản mẫu đã khử trùng trong điều kiện vô trùng để trong box cấy.

- Lấy mô ra rửa lại bằng nước vô trùng nhiều lần.

Hiệu quả vô trùng của hoá chất phụ thuộc vào thời gian xử lý, nồng độ và khả năng xâm nhập của hoá chất vào bề mặt của mô.

Để tăng tính linh động và khả năng xâm nhập của hoá chất khử trùng vào mô cần xử lý mô cây trong rượu etylíc 70° ở 30 giây sau đó xử lý trong dung dịch hoá chất diệt khuẩn.

Để tăng hiệu quả diệt khuẩn cần cho thêm chất làm giảm sức căng bề mặt như Tween 80, Teepol vào dung dịch diệt nấm khuẩn. Những chất này có tác dụng làm tăng tính chất thấm ướt, nhũ hoá và hoà tan thật sự các chất không phân cực (phần sáp...trên bề mặt của mô) tạo điều kiện cho quá trình thẩm thấu các chất diệt khuẩn vào các mao mạch và các điểm bất thường trên bề mặt mô làm tăng được hiệu quả diệt khuẩn.

d. Cấy mẫu vào môi trường dinh dưỡng (cấy mẫu invitro)

Thực hiện trong box cấy vô trùng, dùng dao mổ sắc cắt bỏ các phần bị tổn thương do hoá chất khử trùng và cắt tách lấy mẫu cấy.

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

Bảng kích thước mẫu nuôi cấy

Nguồn gốc mẫu cấy	Kích thước (cm)	Đối tượng mẫu tách
Chồi ngọn	0,5-1,0	Chồi ngọn + một phần thân
Chồi bên	0,5-1,0	Một phần thân + lá + chồi nách
Lá non	2,0- 3,0	Mẫu lá cắt nhỏ
Cây mầm	2,0-3,0	Chồi non

Sau khi tách được mẫu cấy dùng panh vô trùng gấp mẫu cấy đặt vào môi trường nuôi dưỡng trong ống nghiệm. Số lượng mẫu cấy trong một bình tùy thuộc vào kích thước của mô cấy.



Hình 3: Cây khởi đầu

4. Nuôi dưỡng sau cấy mẫu

Các bình đã có mẫu cấy cần đưa bình sang phòng nuôi trong điều kiện ánh sáng và nhiệt độ nhân tạo.

4.1. Yêu cầu điều kiện trong phòng nuôi

4.1.1. Về ánh sáng

Ánh sáng đèn huỳnh quang là phù hợp, những trường hợp hình thành phôi vô tính qua mô sẹo thì cần đưa mẫu nuôi cấy khởi đầu vào trong bóng tối.

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

Ví dụ với Bạch đàn ở giai đoạn nuôi mẫu sau cấy cần cường độ chiếu sáng là 600 lux giai đoạn nuôi chồi cần 2.500 lux và giai đoạn thúc ra rễ cần 1.000 lux.

4.1.2. Nhiệt độ

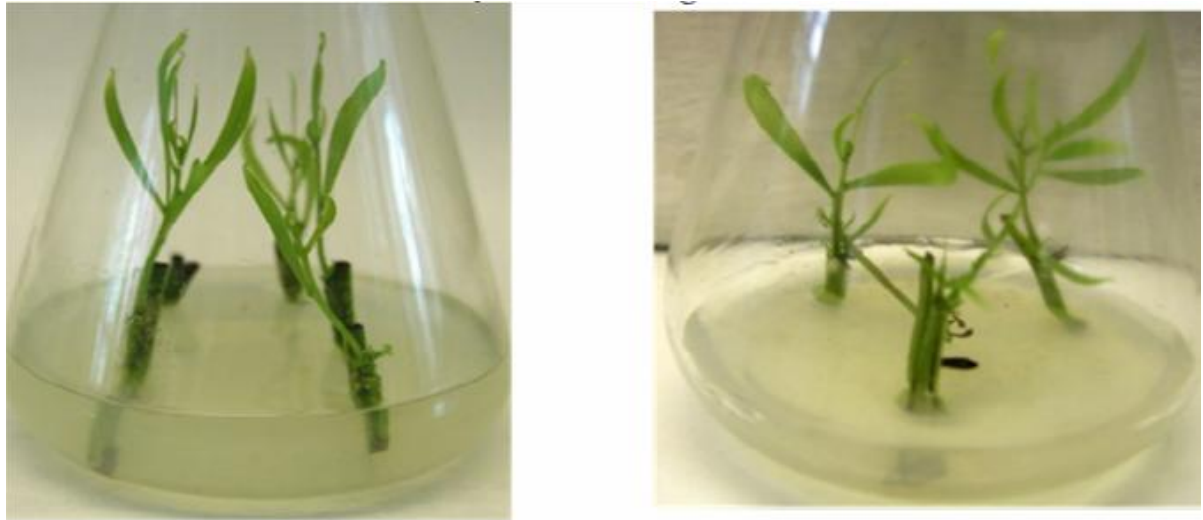
Tùy theo đặc điểm sinh lý, sinh thái của loài cây và giai đoạn nuôi cấy mà điều chỉnh nhiệt độ cho phù hợp.

Ví dụ: giai đoạn nhân chồi nhiệt độ thích hợp 25- 28⁰C và giai đoạn thúc rễ nhiệt độ thích hợp 25- 30⁰C.

Ví dụ: với bạch nhiệt độ phòng nuôi 26 - 28⁰C, giai đoạn nuôi chồi nhiệt độ phòng nuôi 26-28⁰C và giai đoạn thúc ra rễ nhiệt độ phòng nuôi 25-30⁰C.

4.2. Thời gian nuôi

Các mẫu cây khởi đầu nếu không bị nhiễm nấm khuẩn sẽ được lưu lại trong phòng nuôi ở điều kiện nhiệt độ và ánh sáng phù hợp với thời gian từ 2- 4 tháng và ít nhất có 4 lần cấy chuyền (Sau cấy mẫu được 20 - 30 ngày thì tiến hành cấy chuyền sang môi trường nhân chồi).



Hình 4: Keo lá trà nuôi cấy khởi đầu

Trong thời gian nuôi, mẫu cây sử dụng các chất trong bình nuôi và tiết ra các độc tố làm cho môi trường bị thay đổi, không phù hợp với sự tái sinh của mẫu. Nhất là ở cây thân gỗ do có chứa nhiều chất hữu cơ như tanin, phenol ... làm cho mẫu cây có hiện tượng hoá nâu hoặc hoá đen và các chất này khuếch tán ra môi trường nuôi cấy sẽ làm hỏng môi trường và làm chết mẫu cây.

Biện pháp khắc phục:

Bổ sung than hoạt tính với nồng độ 0,1- 0,3% vào môi trường nuôi cấy để than hấp thu hết các chất do mô tiết ra. Nhưng than hoạt tính cũng có thể hấp thu các chất điều tiết sinh trưởng nên ảnh hưởng đến tái sinh của mẫu cây

Bổ sung PVP (Poly Vinyl Pyrolidone) chất này có khả năng ngăn chặn quá trình oxy hóa các hợp chất phenol và tanin không gây ra hiện tượng đen mẫu và đen môi trường. Hoặc xử lý mẫu bằng dung dịch axit ascorbic hoặc axit xitric vài giờ trước khi cấy mẫu thì có tác dụng giảm quá trình tiết phenol ra môi trường.

Sử dụng mẫu cây là mô non và gây vết thương nhỏ nhất khi xử lý mẫu và cắt tách mẫu cây. Khi cắt mẫu dao phải thật sắc để hạn chế dập làm tổn thương mẫu quá lớn.

B. Câu hỏi và bài tập thực hành:

1. Câu hỏi

- Trình bày khái niệm, mục đích, yêu cầu trong nuôi cấy khởi đầu.
- Trình bày trình tự các bước trong nuôi cấy khởi đầu.
- Có mấy loại môi trường nuôi cấy? Người ta thường sử dụng môi trường nuôi cấy nào trong vi nhân giống cây lâm nghiệp?
- Trình bày cách chọn, cắt mẫu, khử trùng mẫu
- Trình bày cách cấy mẫu, nuôi mẫu sau cấy

2. Bài tập thực hành:

Bài tập 1:

Khử trùng mẫu cây

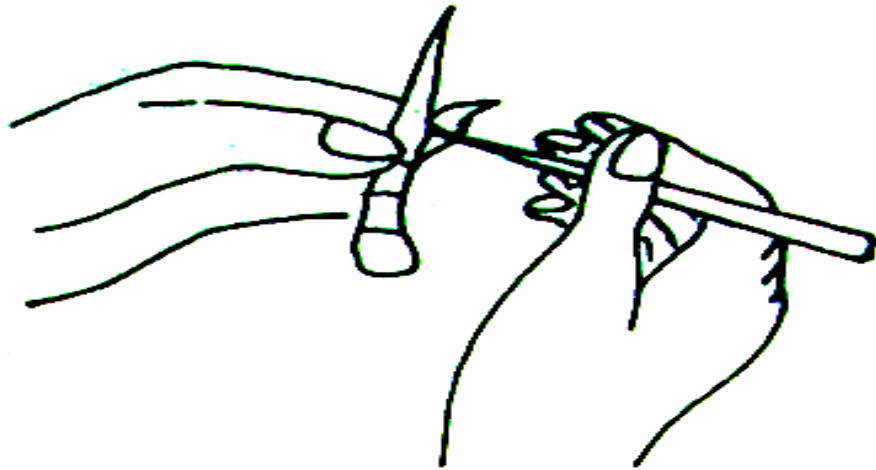
- *Cách thức:* chia lớp thành các nhóm nhỏ (5 – 6 học viên/nhóm)
- *Thời gian hoàn thành:* 4 giờ/1 nhóm
- *Hình thức:* thực hành tại chỗ
- *Phương pháp đánh giá:* kỹ năng vận dụng lý thuyết vào thực hành của mỗi học viên trong nhóm và thái độ thực hành của học viên.
- *Kết quả cần đạt được:*

1. Pha hoá chất khử trùng

- Bước 1: chọn hoá chất khử trùng (Chọn Hypocloritcanxi (Clorua vôi) nồng độ 9% -10% để khử trùng).
- Bước 2: Cân 90- 100gam hoà tan trong nước 500 ml cất rồi thêm nước cất cho đủ 1000ml.

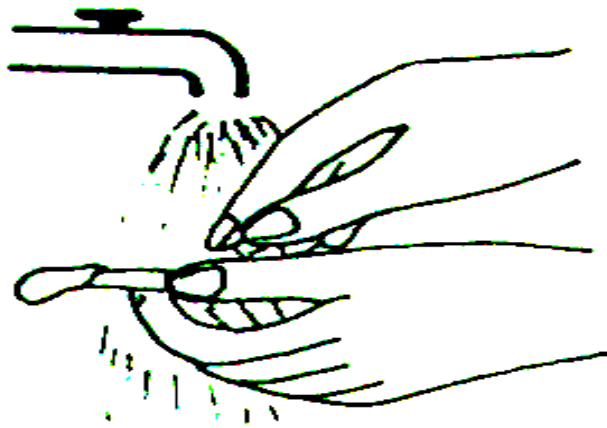
2. Lấy vật liệu nuôi cấy và xử sơ bộ

- Bước 1: Dùng dao sắc cắt lấy chồi thân hoặc chồi ngọn và cắt bỏ toàn bộ phần lá. Tách lấy một đoạn chồi ngọn dài 10- 12 cm.
- Bước 2: Xử lý sơ bộ mẫu cây loại bỏ các phần không cần thiết



Hình 5: Loại bỏ những phần không cần thiết loại bỏ lá.

- Rửa dưới vòi nước nước chảy.
- Rửa sạch bụi đất bám trên đoạn thân bằng xà phòng.
- Rửa lại bằng nước cất vô trùng nhiều lần và để mẫu trong bình đã qua khử trùng.



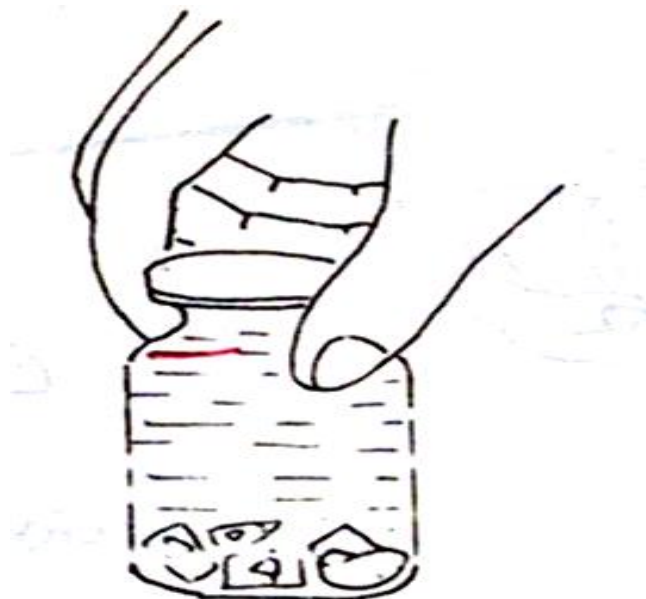
Hình 6: Rửa mẫu dưới vòi nước chảy.

3. Khử trùng

Tiến hành trong trong tủ cấy phòng vô trùng:

- Bước 1: Giót 300 ml cồn 70° vào bình vô trùng rồi dùng panh vô trùng gấp chôi đưa vào ngân ngập chôi dứa trong cồn (ngâm trong 2 phút đối với chôi ngọn và ngâm trong 5 phút đối với chôi thân) thường xuyên lắc nhẹ.

- Bước 2: Giót 300ml dung dịch Hypocloritcanxi (Clorua vôi) 9% vào bình hình trụ vô trùng. Dùng panh vô trùng gấp đoạn chồi từ bình còn cho vào bình đựng dung dịch hóa chất khử trùng ngâm trong thời gian là 15 phút.



Hình 7: Ngâm ngập mẫu trong dung dịch khử trùng

- Bước 3: Dùng panh vô trùng gấp đoạn chồi từ bình hoá chất khử trùng sang bình nước cất (nước vô trùng).
- Bước 4: Rửa chồi, thân chồi ngọn bằng nước vô trùng để loại bỏ hoá chất khử trùng ra khỏi mô.

Trình tự loại bỏ hoá chất khử trùng ra khỏi mô nuôi cấy như sau:

- + Giót 300ml nước vô trùng vào các bình hình trụ có thể tích 0,5 lít.
- + Dùng panh vô trùng gấp chồi cho vào bình chứa nước vô trùng rồi đậy nắp bình lại, lắc nhẹ trong 5 phút.
- + Dùng panh gấp chồi chuyển sang bình đựng nước vô trùng thứ 2 lặp lại 3 - 5 lần như trên.
- + Dùng panh vô trùng gấp lấy mẫu đã khử trùng chuyển vào bình vô trùng đậy nắp kín để trong tủ cấy.



Hình 8: Bảo quản mẫu đã được khử trùng

Bài tập 2:

Cấy mẫu khởi đầu

- *Cách thức:* chia lớp thành các nhóm nhỏ (5 – 6 học viên/nhóm)
- *Thời gian hoàn thành:* 4 giờ/1 nhóm
- *Hình thức:* thực hành tại chỗ
- *Phương pháp đánh giá:* kỹ năng vận dụng lý thuyết vào thực hành của mỗi học viên trong nhóm và thái độ thực hành của học viên.
- *Kết quả cần đạt được:*

1. Vệ sinh cá nhân (người cấy mẫu)

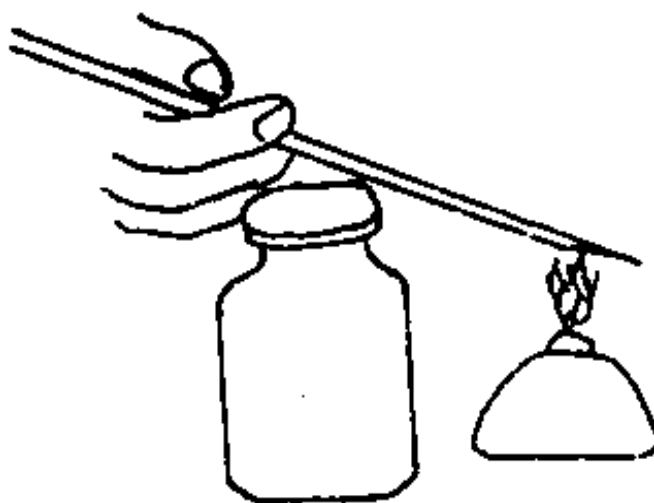
- Bước 1: Rửa chân tay bằng xà phòng (ở phòng chuẩn bị)
- Bước 2: Sát trùng tay bằng cồn 75⁰ và mặc áo choàng mang khẩu trang vô trùng (trong phòng vô trùng)

2. Chuẩn bị điều kiện cấy mẫu

- Bước 1: Giót cồn 90⁰ vào đèn cồn.
- Bước 2: Giót cồn 75⁰ để sát trùng dụng cụ như panh cấy dao mổ... vào bình tam giác
- Bước 3: Đưa các dụng cụ cần sử dụng khử trùng lên mặt tủ.
- Bước 4: Cho box cấy hoạt động trước khi cấy khoảng 15 phút
- Bước 5: Bật đèn cực tím để khử trùng phòng và box cấy trong 20- 30 phút. Tắt đèn cực tím trước khi có người làm việc trong phòng cấy.

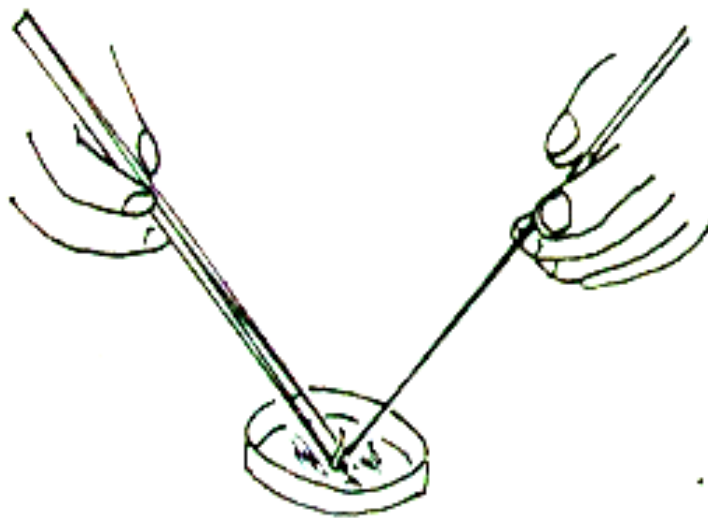
3. Cấy mẫu:

- Bước 1: Vệ sinh xung quanh các bình cấy bằng cách lấy bông thấm cồn 75⁰ lau xung quanh bình đựng môi trường nuôi cấy hoặc bình có mẫu rồi đặt vào xe đẩy.
- Bước 2: Khử trùng dụng cụ dao mổ và panh:
 - + Nhúng dao, panh...vào cồn 90⁰
 - + Đốt lần lượt dụng cụ đó trên ngọn lửa đèn cồn (đây là thao tác khử trùng) cho đến khi cháy đỏ và cháy hết cồn.



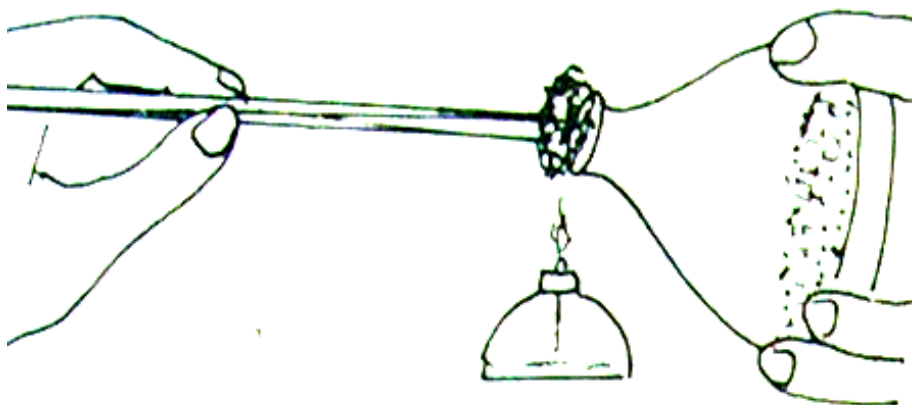
Hình 9: Khử trùng dụng cụ bằng ngọn lửa đèn cồn

- + Khử trùng dụng cụ cấy
- + Đặt các dụng đã khử trùng vào khay nhôm vô trùng vào trong box cấy. Khay để dụng cụ nằm ở phía thuận cho việc lấy trong khi làm việc.
- Bước 3: Cấy mẫu
 - + Cắt tách hay mổ xẻ để lấy mẫu cấy: Sát trùng tay bằng cồn rồi lấy từ 3 đến 4 tờ giấy vở học sinh hoặc giấy khổ A4 đã vô trùng lên mặt bàn cấy thẳng góc với ngọn đèn cồn đang cháy.
 - + Mở nắp bình để mẫu vô trùng và hơi miệng bình nhanh trên ngọn lửa rồi dùng panh gấp các mẫu cấy đặt lên giấy vô trùng.
 - + Tách lấy mô cấy: một tay cầm panh để cố định mẫu, tay kia cầm dao mổ để cắt tách lấy mô cấy.



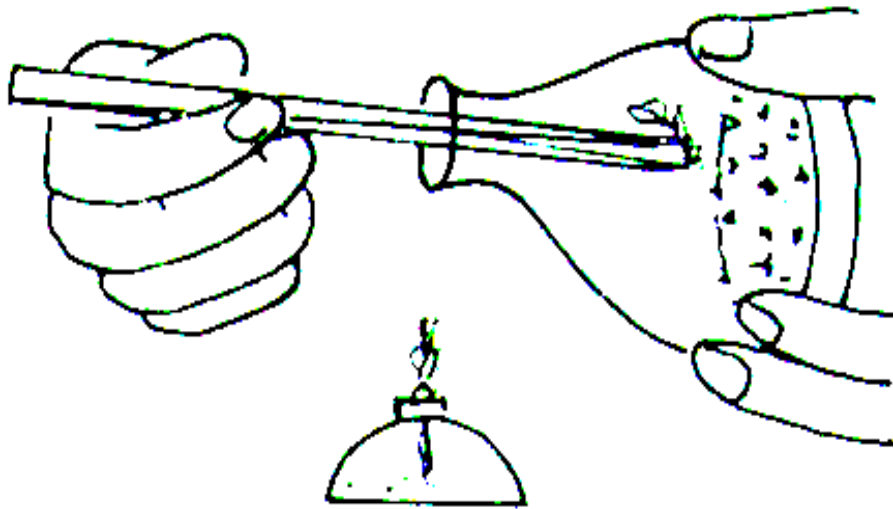
Hình 10: Cắt tách mô cây

- + Dụng cụ sau mỗi lần sử dụng cần phải khử trùng lại.
- + Cây mô:
 - * Tay trái cầm đáy bình đựng môi trường nuôi cây mô để nghiêng một góc 80 độ so với đèn cồn.
 - * Tay phải mở nút miệng bình hơi trên ngọn lửa.



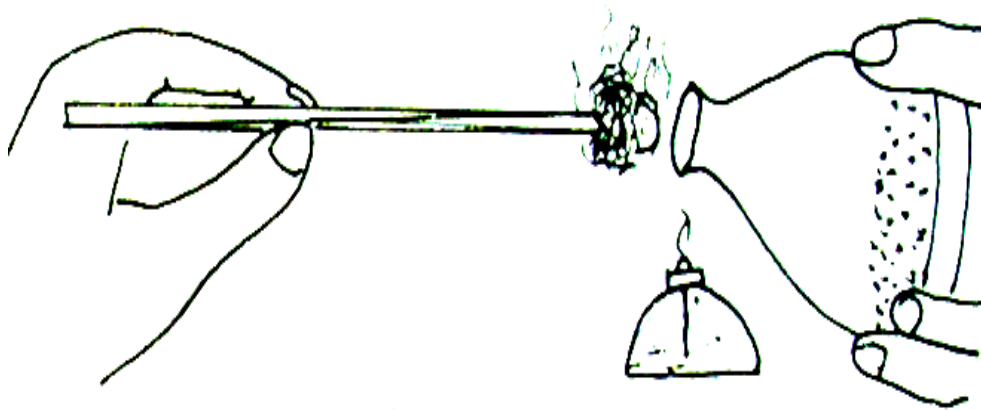
Hình 11: Khử trùng miệng bình bằng ngọn lửa đèn cồn

- * Tay phải cầm panh vô trùng gấp lấy mô thật nhẹ nhàng cẩn thận đưa mẫu cắm vào môi trường dinh dưỡng ở trong bình.



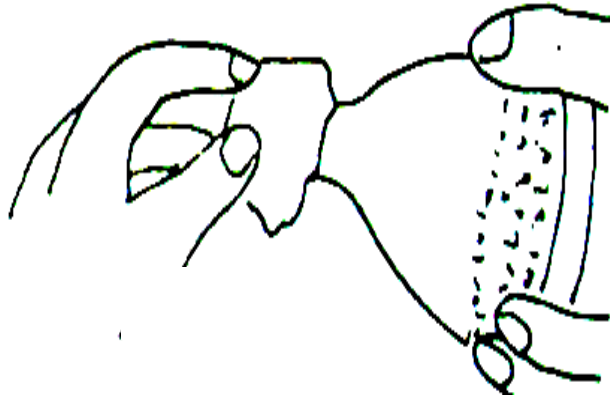
Hình 12: Cây mẫu vào bình

- * Khử trùng miệng bình và nút dây trên ngọn lửa đèn cồn (thao tác nhanh đối với nút bông) rồi đậy kín lại.



Hình 13: Khử trùng miệng bình cấy trước khi đậy nút bằng ngọn lửa đèn cồn

* Đậy miệng bình cây:



Hình 14: Đậy miệng bình cây bằng nút bông



Hình 15: Sản phẩm sau khi cấy mẫu

Chú ý: để hạn chế khuẩn và nấm nhiễm vào bình cây luôn để miệng bình nghiêng một góc 80° so với ngọn lửa đèn cồn.

C. Ghi nhớ:

- Khử trùng mẫu cấy:
 - + Pha hoá chất khử trùng
 - + Lấy vật liệu nuôi cấy và xử sơ bộ

- + Khử trùng mẫu cấy
- Cấy mẫu khởi đầu:
 - + Vệ sinh: Rửa chân tay bằng xà phòng, sát trùng tay bằng cồn 75%, mặc áo choàng
 - + Chuẩn bị điều kiện cấy mẫu: Khử trùng dụng cụ bằng cồn, cho tủ cấy hoạt động trước khi cấy 20-30 phút, Bật đèn cực tím khử trùng phòng cấy, tắt đèn cực tím trước khi vào phòng cấy để cấy mẫu.
 - + Cấy mẫu: Vệ sinh các bình cấy, khử trùng dụng cụ, cấy mẫu.

Bài 3

CÂY NHÂN CHỒI

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

- Trình bày được khái niệm, mục đích, yêu cầu, nguyên tắc và trình tự các bước trong giai đoạn cây nhân chồi.
- Thành thạo các kỹ năng: Chọn bình chồi đủ tiêu chuẩn, khử trùng, cắt chồi, cấy chồi và chăm sóc cây vi nhân giống đúng yêu cầu kỹ thuật, đảm bảo tỷ lệ bình chồi nhiễm nấm, khuẩn < 10%.
- Tiết kiệm vật tư, nguyên liệu, cây giống và đảm bảo an toàn lao động.

A. Nội dung

1. Khái niệm cây nhân chồi

Là giai đoạn duy trì và nhân nhanh chồi làm tăng số lượng chồi để cung cấp cho giai đoạn sau. Trong giai đoạn này cần kích thích mẫu cây phát triển phát sinh nhiều phôi vô tính hoặc cụm chồi sau này phát triển thành cây giống.

2. Mục đích

Cây chuyển mẫu nuôi cấy sang môi trường dinh dưỡng mới để tạo được nhiều chồi.

Trong môi trường nuôi cấy vẫn xảy ra hiện tượng thoát hơi nước làm cho môi trường cây bị khô dần đi và nồng độ chất khoáng không còn phù hợp với mô nuôi cấy nữa. Ví dụ nồng độ đường có thể bị giảm thấp sau cấy 20-25 ngày.

Trong môi trường nuôi cấy có thể hình thành các chất độc do mẫu cấy tiết ra các chất độc này sẽ ức chế sự tăng trưởng và phân chia tế bào của mẫu cấy.

Do sự tăng trưởng của mô nuôi cấy trong môi trường dinh dưỡng lâu ngày sẽ bị thiếu chất dinh dưỡng và không gian cần thiết cho sự sinh trưởng.

3. Các nguyên tắc trong cấy nhân chồi

3.1. Phải đảm bảo điều kiện vô trùng

* Với người làm việc:

Trước khi vào làm việc, người cấy mẫu cần phải vệ sinh chân tay, sát trùng từ khuỷu tay trở xuống bằng cồn 70⁰, mặc áo choàng và mang khẩu trang tiệt trùng, không được nói chuyện hoặc đi lại nhiều trong khi làm việc trong phòng cấy.

* Với các dụng cụ dùng trong nuôi cấy:

Panh, kéo, dao: dùng nhiệt độ cao để khử trùng. Sau khi rửa sạch dụng cụ đều phải sấy vô trùng ở nhiệt độ 160-180°C ở trong tủ sấy (vô trùng khô) hoặc ở hấp trong nồi áp suất ở nhiệt độ 120°C trong thời gian 1 giờ (vô trùng bằng hơi nước nóng hay vô trùng ướt) rồi đem sấy khô lấy ra bảo quản cẩn thận.

* Với dụng cụ và không gian trong phòng cấy:

Dụng cụ đưa vào phòng cấy đều phải vô trùng ướt ở nhiệt độ cao trước.

Khử trùng phòng nuôi cấy: Vệ sinh lau rửa sạch bụi trên sàn và tường của phòng. Dùng Focmalin ở dạng hơi để khử trùng môi trường, vô trùng các phòng ... focmalin ở dạng lỏng để khử trùng sát khuẩn bề mặt dụng cụ, thiết bị của nuôi cấy mô.

Thời gian tiêu diệt vi sinh vật và hiệu lực diệt khuẩn của dung dịch focmalin phụ thuộc vào nồng độ khi sử dụng, mật độ, loại vi sinh vật.

Ví dụ: Trong dung dịch focmalin 5% bào tử vi khuẩn chết sau 30 phút, ở 2% chết sau 1 giờ phút và ở nồng độ 1% chết sau 2 giờ.

Trong thực tế người ta hay dùng dung dịch focmalin 2% được pha từ focmalin thương phẩm có hoạt tính focmon là 30 – 36%.

Để tăng hiệu lực diệt khuẩn khi dùng ở dạng hơi nên kết hợp với KMnO_4 , dung dịch này có thể pha như sau:

Cân 5 gam KMnO_4 hoà với 10 ml nước rồi cho thêm 10 ml formalin (dùng cho 1m^3). Có thể cho thêm một ít axit H_2SO_4 để tránh focmôn kết tủa. Cho hỗn hợp này vào phòng đóng kín lại hoặc để trong thùng kín hơi Focmadehyt sinh ra sẽ có tác dụng diệt khuẩn. Yêu cầu khi khử trùng cần đóng kín phòng trong vòng 24 giờ. Sau đó phải khử hơi Focmadehyt bằng dung dịch NH_4OH .

Hoá chất Focmadehyt này có nhược điểm là rất độc đối với niêm mạc mắt mũi của người nên khi khử trùng phải rất cẩn thận, phải mang trang bị mặt nạ hoặc đeo khẩu trang và phải khử mùi thật kỹ trước khi người vào làm việc. Trước khi vào phòng làm việc cần phải khử mùi formol bằng NH_3 25% trong 24 giờ.

Tất cả các dụng cụ đưa vào phòng cấy như quần áo choàng, khẩu trang, dụng cụ cho việc cấy mô phải đều phải vô trùng.

Trước khi cấy mô cần phải bật quạt trong tủ cấy và đèn cực tím của tủ cấy và của phòng trước 30 phút để khử trùng

Chú ý:

- Khi có người làm việc trong phòng cấy không bật đèn cực tím, giảm sự chuyển động của không khí từ ngoài vào phòng cấy đến mức tối thiểu và tránh đi lại nhiều.

- Định kỳ hàng ngày, hàng tuần, hàng tháng tổng vệ sinh phòng cấy như lau kính, lau tường bằng thuốc sát trùng như cồn 70⁰. Dùng nước Brôm hoặc phun cồn 70⁰ hoặc dùng phenol 0,5% hoặc xông hơi bằng formol 40%.

3.2. Phải duy trì được mẫu sạch

Thường xuyên kiểm tra loại các bình bị nhiễm nấm nhiễm khuẩn hoặc bị chết không có khả năng tái sinh và có biện pháp xử lý thích hợp để không cho nguồn này lây lan.

3.3. Chọn được môi trường và chuẩn bị môi trường đúng cách

Mục đích trong giai đoạn nhân nhanh này tạo ra nhiều chồi. Khả năng tạo chồi của mẫu cấy phụ thuộc vào mẫu nuôi cấy và đặc biệt là môi trường nuôi cấy. Vì mẫu nuôi cấy không thể tự tổng được đầy đủ các chất cần thiết cho sự sinh trưởng và phát triển của cây. Hơn nữa trong giai đoạn này cần phải tăng hệ số nhân, để có hệ số nhân cao cần nhiều yếu tố tác động đồng thời như môi trường, cách cắt mẫu và điều kiện nuôi dưỡng.

Trong giai đoạn nhân chồi thì môi trường nuôi cấy mà đặc biệt là chất điều tiết sinh trưởng là quan trọng nhất.

Để tăng hệ số nhân thường sử dụng môi trường nuôi giàu chất dinh dưỡng và chất điều tiết sinh trưởng là 6 Benzyl adenin purin (BAP hoặc BA) thuộc nhóm cytokinin. Hiệu quả của BA sinh lý đặc trưng nhất của BA là kích thích phân chia tế bào phát sinh chồi nên BA có tác dụng làm tăng hệ số nhân chồi.

Đường sacaroza trong môi trường do mô sử dụng nên hàm lượng giảm theo thời gian (sau cấy 20 - 25 ngày nồng độ đường trong môi trường giảm thấp) và theo sự tăng trưởng của mẫu cấy nên cũng cần hàm lượng cao (20 - 40g/lit).

Cần bổ sung các chất hấp phụ vào môi trường, các chất này có tác dụng hấp phụ một số chất do mẫu cấy tiết ra làm ức chế hoặc làm chết mẫu cấy. Để khắc phục hiện tượng trên sau cấy mẫu 15 - 20 ngày cần phải cấy chuyển sang môi trường thúc chồi mới.

Để đảm bảo chất lượng cây giống, thời gian giữa hai lần cấy chuyển là khoảng 20- 30 ngày và chỉ cấy nhân chồi 2- 8 lần không nên kéo dài lâu. Nếu để thời gian lâu dẫn đến tích đọng của hoocmon và một số chất không phù hợp làm cho chồi bị lão hoá.

Hiện nay môi trường nhân chồi rất phong phú vì thế cần chọn môi trường thích hợp (môi trường giàu chất dinh dưỡng khoáng đa lượng và vi lượng) như môi trường MS bổ sung BA nồng độ 1- 5ppm.

4. Trình tự các bước nhân nhanh chồi

4.1. Cây chuyển bình gốc:

Mục đích là tạo ra nhiều chồi, sau 20 - 30 ngày mẫu cây sẽ phát sinh ra phôi hoặc ra 1- 3 chồi hoặc cụm chồi vô tính để tăng hệ số nhân cần phải cấy chuyển sang môi trường nhân chồi.

Dùng panh gấp cụm chồi ra tách chồi, cắt bỏ phần bị già. Muốn có nhiều chồi cần phá đỉnh sinh trưởng, cắt chồi thành nhiều đoạn. Mỗi đoạn có từ 1- 2 lá.

Dùng panh gấp các đoạn thân cắm phần gốc vào môi trường nhân chồi mới giàu chất dinh dưỡng.



Hình 16: Mẫu Bạch đàn dùng để cấy chuyển

Việc cấy chuyển tiến hành lặp lại cho đến khi mật độ chồi trong bình đủ tiêu chuẩn bình giống gốc. Giai đoạn này kéo dài từ 2 - 4 tháng và ít nhất có 4 lần cấy chuyển, không nên kéo dài hơn vì dễ gây biến dị tế bào soma.

4.2. Cấy tạo cụm chồi và nhân nhanh chồi

Đây là giai đoạn nhân nhanh để tăng số lượng chồi mầm cung cấp cho giai đoạn sau. Chồi từ bình gốc lấy ra được cắt và tách để cấy sang môi trường nhân chồi mới sẽ tạo thành cụm chồi. Các cụm chồi này được nuôi dưỡng trong vòng 15 - 20 ngày lại được lấy ra tách thành các cụm chồi nhỏ hơn lại cấy vào môi trường nhân chồi mới.



Hình 17: Cấy chuyển mẫu

Trong giai đoạn này chất điều tiết sinh trưởng BA có ảnh hưởng lớn đến hệ số nhân chồi. Giai đoạn nhân nhanh này có thể kéo dài từ 10 đến 36 tháng không nên kéo dài quá lâu.

4.3. Điều chỉnh hệ số nhân chồi

Nhân chồi là giai đoạn quan trọng quyết định về số lượng cây trong quá trình nuôi cấy *in vitro*. Số lượng chồi (hệ số nhân chồi) càng nhiều thì khả năng nhân giống càng lớn. Hệ số nhân chồi cao cần rất nhiều yếu tố tác động đồng thời như môi trường, cách cắt tạo mẫu, điều kiện nuôi dưỡng ...

Trong đó sự bổ sung các chất điều hoà sinh trưởng vào môi trường nuôi cấy một cách thích hợp là yếu tố quan trọng nhất. Chất 6 benzyl adenine purin (BAP) thuộc nhóm cytokinin có tác dụng kích thích sự hình thành chồi của mô nuôi cấy và thích hợp với nhiều loại cây được sử dụng phổ biến để làm tăng hệ số nhân chồi.

5. Chăm sóc và nuôi dưỡng:

5.1. Thời gian nuôi

Chu kỳ cấy chuyển nhân chồi là 20 - 30 ngày.

5.2. Các yêu cầu về ngoại cảnh

Sự phát triển nhanh hay chậm của cụm chồi và chồi phụ thuộc nhiều vào ánh sáng và nhiệt độ trong phòng nuôi. Trong giai đoạn này cụm chồi trong

bình đã tiến hành quang hợp cho nên cần ánh sáng mạnh. Ví dụ: Bạch đàn cần cường độ chiếu sáng 1500 - 2500lux.

Nhiệt độ ảnh hưởng đến sự phân chia tế bào và các quá trình sinh lý sinh hoá chuyển hoá các chất trong cây. Nhiệt độ cao trong giới hạn sinh thái có thể làm cho chồi phát triển nhanh nhưng lại làm cho môi trường nuôi cấy mất nước nhanh không phù hợp cho mẫu nuôi cấy. Nhiệt độ thích hợp cho giai đoạn này khoảng 25 - 28⁰C.

Quang chu kỳ ảnh hưởng đến thời gian quang hợp, do đó ảnh hưởng đến hàm lượng sản phẩm quang hợp (gluxit). Thời gian chiếu sáng phù hợp cho giai đoạn này là 10 - 12 giờ/ ngày.



Hình 18: Nuôi mẫu bằng dàn đèn huỳnh quang

5.3. Phòng trừ nấm bệnh

Tuy các cụm chồi được sống trong môi trường hoàn toàn vô trùng nhưng vẫn phải đảm bảo môi trường trong phòng nuôi sạch sẽ để hạn chế nguồn nấm bệnh lây lan qua dụng cụ, bình cấy, do đó phải thường xuyên vệ sinh, khử trùng.

B. Câu hỏi và bài tập thực hành:

1. Câu hỏi:

- Trình bày khái niệm, mục đích, yêu cầu trong giai đoạn nhân nhanh chồi
- Trình bày nguyên tắc trong cấy nhân nhanh chồi.
- Trình bày trình tự các bước trong cấy nhân nhanh chồi.

2. Bài tập thực hành:

Bài tập 1:

Pha chế môi trường cấy nhân chồi (cấy chuyên)

- *Cách thức:* chia lớp thành các nhóm nhỏ (5 – 6 học viên/nhóm)
- *Thời gian hoàn thành:* 4 giờ/1 nhóm
- *Hình thức:* thực hành tại chỗ
- *Phương pháp đánh giá:* kỹ năng vận dụng lý thuyết vào thực hành của mỗi học viên trong nhóm và thái độ thực hành của học viên.
- *Kết quả cần đạt được:*
 - Bước 1: Chọn môi trường nuôi cấy.
 - Bước 2: Lập bảng thành phần hoá chất.
 - Bước 3: Cân thạch cho vào nồi nấu trên bếp, khuấy cho tan không được để cháy.
 - Bước 4: Cân đường.
 - Bước 5: Dùng pipet lấy đúng lượng dung dịch mẹ
 - Bước 6: Cho đường và hoá chất vào nồi thạch đang nóng
 - Bước 7: Kiểm tra và chỉnh độ pH của môi trường.
 - Bước 8: Phân phối nhanh dung dịch môi trường vào các bình và đậy nắp lại.
 - Bước 9: Cho vào nồi cao áp hấp trong thời gian 20 - 30 phút.
 - Bước 10: Xả hết hơi nước trong nồi cao áp và lấy các bình môi trường ra đưa vào phòng cấy.

Bài tập 2:

Cấy mẫu nhân chồi

- *Cách thức:* chia lớp thành các nhóm nhỏ (5 – 6 học viên/nhóm)
- *Thời gian hoàn thành:* 4 giờ/1 nhóm
- *Hình thức:* thực hành tại chỗ
- *Phương pháp đánh giá:* kỹ năng vận dụng lý thuyết vào thực hành của mỗi học viên trong nhóm và thái độ thực hành của học viên.
- *Kết quả cần đạt được:*

Bước 1: Chuẩn bị các khâu sau:

- Các dụng cụ và vật liệu đưa vào tủ cấy.
- Vệ sinh xung quanh bình mẫu: Lau cồn xung quanh bình có chồi cần nhân chuyên.
- Lấy chồi trong bình ra:
 - + Dùng panh gấp lấy hết các chồi trong bình ra đặt lên giấy hoặc đĩa vô trùng.
 - + Tách chồi:
 - * Tay trái cầm panh để cố định chồi.
 - * Tay phải cầm dao mổ cắt bỏ các phần không cần thiết như lá, đoạn thân khô, phần gốc bị già, tách các cụm chồi (với chồi to tách riêng rồi phá đỉnh sinh trưởng để tăng hệ số nhân), gạt bỏ thạch bám vào gốc chồi. Các chồi thu được để riêng sang tờ giấy vô trùng khác.
 - * Các dụng cụ sau khi sử dụng xong luôn phải khử trùng lại.

Bước 2: Cấy cụm chồi vào bình:

- Lau cồn sát trùng toàn bộ mặt ngoài của bình chứa môi trường mới.
- Tay trái cầm đáy bình đựng môi trường nuôi cấy mô mới. Miệng của bình vuông góc với ngọn lửa đèn cồn để hạn chế khuẩn và nấm nhiễm vào bình và cứ vài bình cấy thì lại phải lau lại mặt tủ cấy bằng cồn sát trùng.
- Cấy chồi vào môi trường mới: Tay phải mở nút miệng bình rồi hơ trên ngọn lửa rồi cầm panh gấp lấy mẫu thật nhẹ nhàng cẩn thận đưa mẫu cắm vào môi trường dinh dưỡng ở trong bình (mỗi bình cấy 5 - 6 cây).
 - + Hơ nắp bình trên ngọn lửa đèn cồn rồi đậy kín nắp lại.
 - + Thu dọn sau mỗi lần cấy mẫu các sản phẩm như bình cho mẫu, giấy lót đưa ra khỏi tủ cấy

Bước 3: Chuyển các bình có mẫu cây sang phòng nuôi có điều kiện chiếu sáng và nhiệt độ nhân tạo thích hợp.

C. Ghi nhớ:

- Các nguyên tắc trong cấy nhân chồi
- Trình tự các bước nhân nhanh chồi
 - + Pha chế môi trường
 - + Chuẩn bị dụng cụ và vật liệu phục vụ cấy
 - + Khử trùng
 - + Cấy nhân chồi
 - + Chuyển bình sau cấy sang phòng nuôi

Bài 4

NUÔI CÂY TẠO CÂY HOÀN CHỈNH

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

- Nêu được khái niệm, mục đích, yêu cầu và trình tự các bước trong giai đoạn nuôi cấy tạo cây hoàn chỉnh.
- Thành thạo các kỹ năng: Chọn bình chồi đủ tiêu chuẩn, khử trùng, cắt chồi, cấy chồi và chăm sóc cây vi nhân giống đúng yêu cầu kỹ thuật, đảm bảo tỷ lệ cây ra rễ đạt > 90%.
- Tiết kiệm vật tư, nguyên liệu, cây giống và đảm bảo an toàn lao động.

A. Nội dung

1. Khái niệm nuôi cấy tạo cây hoàn chỉnh

Là chuyển các chồi mầm hoặc các phôi vô tính vào môi trường thích hợp để chúng ra rễ tạo thành cây hoàn chỉnh.

Những chồi có chiều cao từ 1,5 cm trở lên, thân thẳng, khoẻ mạnh không bị callus (có 3 - 4 cặp lá) là những chồi đủ tiêu chuẩn để chuyển sang môi trường thúc rễ, sau cấy hai tuần các chồi sẽ ra rễ. Môi trường nuôi dưỡng tạo cây hoàn chỉnh cần bổ sung các hợp chất auxin để kích thích phát sinh rễ.



Hình 19: Cây vi nhân giống nuôi cấy tạo rễ

Ví dụ môi trường nuôi cấy tạo rễ có thể sử dụng là MS và bổ sung (0,7g thạch + 3 đường saccaroza + 0,5mg NAA/1lit môi trường dinh dưỡng). Có thể bổ sung thêm than hoạt tính để hấp thu BA.

2. Mục đích, yêu cầu

Tạo thành cây hoàn chỉnh có đủ điều kiện để đưa chuyển ra ngoài hệ thống vô trùng và tăng hệ số nhân.

Đảm bảo các điều kiện để tạo thành cây hoàn chỉnh.

3. Trình tự các bước cấy tạo cây hoàn chỉnh

- Bước 1: Chuẩn bị dụng cụ: Khử trùng panh, dao mổ
- Bước 2: Chuẩn bị môi trường nuôi cấy: Pha môi trường với công thức MS + 0,7g thạch + 3 đường saccaroza + 0,5mg NAA/1lit môi trường dinh dưỡng.



Hình 20: Cấy tạo rễ cây vi nhân giống

- Bước 3: Tách chồi và chọn chồi đủ tiêu chuẩn, cấy vào môi trường ra rễ:
 - + Dùng panh gấp từng cụm chồi ra đĩa
 - + Tách chọn những chồi đủ tiêu chuẩn để cấy.
 - + Tay trái dùng panh kẹp hơi nghiêng dọc theo chồi (chìa ngọn ra phía ngoài)

- + Tay phải dùng kéo cắt ở vị trí tính từ trên ngọn xuống là 1,5cm (Nếu các cụm chồi có độ đồng đều lớn hơn thì có thể cắt > 1,5cm). Cắt bỏ bớt lá phía dưới gốc.
- + Cắm chồi theo phương thẳng đứng vào môi trường thúc rễ, chiều sâu khoảng 0,5cm.

4. Chăm sóc, nuôi dưỡng cây vi nhân giống

4.1. Thời gian nuôi dưỡng

Thời gian nuôi dưỡng trong giai đoạn tạo cây hoàn chỉnh là 20 - 25 ngày trong điều kiện nhiệt độ và ánh sáng nhân tạo để cây ra rễ hoàn chỉnh đạt yêu cầu trước khi đưa ra huấn luyện.

4.2. Các yêu cầu về môi trường vật lý trong phòng nuôi dưỡng

4.2.1. Ánh sáng

Trong phòng nuôi có cường độ ánh sáng 1.000 lux là thích hợp nhất.



Hình 21: Nuôi cây hoàn chỉnh bằng dàn đèn huỳnh quang

Ví dụ: Yêu cầu ánh sáng trong phòng nuôi cây Bạch đàn.

- Thời gian nuôi cấy mẫu: cường độ ánh sáng 600 lux

- Thời kỳ nuôi chồi: cường độ ánh sáng 2.500 lux
- Thời kỳ thúc rễ: cường độ ánh sáng 1.000 lux
- Thời kỳ huấn luyện cây con: từ 3.000 - 10.000 lux.

4.2.2. Nhiệt độ:

Nhiệt độ duy trì trong khoảng từ: 25 - 30⁰C là thích hợp cho chồi ra rễ sau hai tuần cấy mẫu.

Cây sống trong môi trường nhân chồi và thúc rễ 20 - 25 ngày.

Kết thúc giai đoạn này cây trong bình đạt tiêu chuẩn về chiều cao, số lá số rễ, do vậy cần đưa sang môi trường huấn luyện (môi trường bán nhân tạo).

Ví dụ: tiêu chuẩn cây bạch đàn vi nhân giống đưa ra huấn luyện:

- Thân có chiều cao cây khoảng 1,5cm có màu đỏ hoặc xanh và có đỉnh sinh trưởng ngọn.
- Lá xoè đều có màu đỏ tím hoặc xanh.
- Rễ có chiều dài trên 1cm và có từ 2- 3 rễ trở lên.

4.2.3. Độ ẩm

- Độ ẩm tương đối của không khí trong bình nuôi cấy 85-90% sẽ thuận lợi cho cây phát triển.
- Độ ẩm của phòng nuôi nhỏ hơn hoặc bằng 60 %.

4.3. Phòng trừ nấm, khuẩn

Thường xuyên vệ sinh khử trùng: Môi trường xung quanh, phòng nuôi, bình nuôi cấy, bản thân môi trường, mẫu cấy, dụng cụ dùng trong quá trình nuôi cấy và người nuôi cấy để đảm bảo các điều kiện tốt nhất đảm bảo cho cây vi nhân giống hoàn thiện.

B. Câu hỏi và bài tập thực hành:

1. Câu hỏi:

- Trình bày khái niệm, mục đích, yêu cầu giai đoạn nuôi cấy tạo cây hoàn chỉnh
- Nêu trình tự các bước trong giai đoạn nuôi cấy tạo cây hoàn chỉnh.
- Trình bày tiêu chuẩn cây bạch đàn chọn để cấy tạo cây hoàn chỉnh
- Trình bày tiêu chuẩn cây bạch đàn đem huấn luyện sau vi nhân giống

2. Bài tập thực hành:

Bài tập 1:

Pha chế môi trường ra rễ

- *Cách thức:* chia lớp thành các nhóm nhỏ (5 – 6 học viên/nhóm)
- *Thời gian hoàn thành:* 4 giờ/1 nhóm
- *Hình thức:* thực hành tại chỗ
- *Phương pháp đánh giá:* kỹ năng vận dụng lý thuyết vào thực hành của mỗi học viên trong nhóm và thái độ thực hành của học viên.
- *Kết quả cần đạt được:*

Bước 1: Lập bảng thành phần hoá chất cho 1 lít môi trường làm việc.

Bước 2: Nấu thạch (cân thạch cho vào nồi nấu trên bếp khuấy cho tan không được để cháy).

Bước 3: Cân đường.

Bước 4: Lấy dung dịch mẹ dùng pipet lấy đúng lượng

Bước 5: Cho đường hoá chất vào nồi thạch đang nóng

Bước 6: Kiểm tra và chỉnh độ pH của môi trường.

Bước 7: Phân phối nhanh dung dịch môi trường vào các bình và đậy nắp lại.

Bước 8: Cho các bình đựng môi trường đã đậy nắp vào nồi cao áp, hấp trong thời gian 20 - 30 phút.

Bước 9: Xả hết hơi nước trong nồi cao áp lấy các bình môi trường ra đưa vào phòng cấy.

Bài tập 2:

Thực hiện cấy mẫu

- *Cách thức:* chia lớp thành các nhóm nhỏ (5 – 6 học viên/nhóm)
- *Thời gian hoàn thành:* 4 giờ/1 nhóm
- *Hình thức:* thực hành tại chỗ
- *Phương pháp đánh giá:* kỹ năng vận dụng lý thuyết vào thực hành của mỗi học viên trong nhóm và thái độ thực hành của học viên.
- *Kết quả cần đạt được:*

Bước 1: Chuẩn bị

- Khử trùng phòng cấy và cho box cấy hoạt động trước 15 phút.
- Vệ sinh xung quanh bình cấy: lau cồn xung quanh bình có chổi cần nhân chuyên.

- Trải từ 3 đến 4 tờ giấy vở học viên hoặc giấy khổ A4 đã được vô trùng lên mặt bàn cấy trước ngọn đèn cồn.
- Mở nắp bình cấy, cầm panh gấp lấy hết các chồi trong bình ra đặt lên giấy.

Bước 2: Tách chồi:

- Dùng panh gấp từng cụm chồi ra đĩa
- Tách chọn những chồi đủ tiêu chuẩn.
- Cắt mẫu:
 - + Tay trái cầm panh gấp hơi nghiêng dọc theo thân chồi (chia ngọn ra phía ngoài)
 - + Tay phải cầm kéo cắt ở vị trí tính từ trên ngọn xuống là 1,5cm (nếu các cụm chồi có độ đồng đều lớn hơn thì có thể cắt > 1,5cm). Cắt bỏ bớt lá phía dưới gốc
 - + Để mẫu cắt được vào đĩa đã vô trùng
- Các dụng cụ sau khi sử dụng xong luôn phải khử trùng lại.

* Bước 3: Cấy cụm chồi vào bình:

- Vệ sinh xung quanh bằng lau cồn sát trùng toàn bộ mặt ngoài của bình chứa môi trường mới.
- Tay trái cầm đáy bình đựng môi trường nuôi cấy mới. Miệng của bình đặt vuông góc với ngọn lửa đèn cồn để hạn chế khuẩn và nấm nhiễm vào bình và cứ vài bình mẫu thì lại phải lau lại mặt tủ cấy bằng cồn sát trùng.
- Tay phải mở nút miệng bình rồi hơ trên ngọn lửa, cầm panh gấp lấy mẫu thật nhẹ nhàng cẩn thận đưa mẫu cắm vào môi trường dinh dưỡng ở trong bình (mỗi bình cấy 5 - 6 cây) chiều sâu khoảng 0,5cm.
- Hơ nắp bình trên ngọn lửa đèn cồn rồi đậy kín nắp lại.
- Thu dọn sau mỗi lần cấy xong bình mẫu giống và các sản phẩm như bình cho mẫu, giấy lót đưa ra khỏi tủ cấy

* Bước 4: Chuyển các bình có mẫu cấy sang phòng nuôi có điều kiện ánh sáng và nhiệt độ nhân tạo thích hợp.

C. Ghi nhớ:

- Pha chế môi trường ra rế
- Thực hiện khâu cấy:
 - + Bước 1: Chuẩn bị

- + Bước 2: Tách chồi
- + Bước 3: Cấy cụm chồi vào bình
- + Bước 4: Chuyển các bình có mẫu cấy sang phòng nuôi

Bài 5

HUẤN LUYỆN CÂY VI NHÂN GIỐNG

Mục tiêu:

- Nêu được mục đích, yêu cầu và trình tự các bước huấn luyện cây vi nhân giống.
- Thành thạo các kỹ năng chăm sóc và huấn luyện cây vi nhân giống đúng yêu cầu kỹ thuật, đạt tiêu chuẩn cây vi nhân giống cấy vào bầu.
- Có tinh thần trách nhiệm và tác phong công nghiệp.

A. Nội dung

1. Khái niệm huấn luyện cây vi nhân giống

Là đưa bình cây giống ra tiếp xúc làm quen với môi trường tự nhiên. Cây vi nhân giống được sống trong môi trường nhân tạo lý tưởng về nhiệt độ ánh sáng và môi trường dinh dưỡng nên rất non và vô trùng. Nếu chuyển ngay ra (ra ngôi) sống trong điều kiện tự nhiên thì rất dễ chết. Để có tỷ lệ sống cao trước khi ra ngôi cần phải đưa bình cây giống vào nhà huấn luyện (môi trường bán nhân tạo).

2. Mục đích, yêu cầu

2.1. Mục đích

Để cây vi nhân giống thích nghi dần với điều kiện của môi trường tự nhiên như tiếp xúc với ánh sáng và nhiệt độ trước khi ra ngôi.

2.2. Yêu cầu

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

Thời gian huấn luyện các bình cây khoảng một tuần. Khi thân chuyển sang màu của tự nhiên, lá xoè ra đầy đủ thì có thể tiến hành cấy chuyển vào bầu đất. Không nên kéo dài thời gian huấn luyện vì để lâu rễ sẽ bị đen, lá úa vàng. Khi đó tỷ lệ sống khi cấy vào bầu đất sẽ không cao.

Nhà huấn luyện được xây tường xung quanh (cao khoảng 80 cm), phía trên được bao bằng lưới. Mái lợp bằng tôn xen tấm lợp nhựa chịu nhiệt với tỷ lệ 1/1 để ánh sáng mặt trời chiếu sáng tới các giá để bình cây. Phía dưới mái có dàn phủ lưới che râm, thiết kế lưới che râm để có thể kéo ra hoặc thu lại dễ dàng khi cần thiết. Trong nhà huấn luyện có các giàn để xếp bình chứa cây vi nhân giống.

3. Các giai đoạn huấn luyện cây vi nhân giống

3.1. Giai đoạn trong phòng nuôi cây vi nhân giống

Cây con trong ống nghiệm được sản xuất dưới điều kiện lý tưởng về nhiệt độ, ánh sáng và môi trường dinh dưỡng, trong thời gian khoảng 20-25 ngày. Để cây con ra bầu đất với tỷ lệ sống cao cần phải huấn luyện cây cho cứng cáp trước khi cho ra khỏi ống nghiệm.

3.2. Giai đoạn huấn luyện ngoài phòng nuôi cây vi nhân giống

Cây vi nhân giống làm quen với nhiệt độ, ánh sáng và độ ẩm tự nhiên trong thời gian huấn luyện khoảng 6 - 8 ngày để cây con quen dần với điều kiện tự nhiên.

Khi thân cây chuyển sang màu của tự nhiên, lá xoè ra đầy đủ thì có thể tiến hành cấy chuyển vào bầu đất.

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



Hình 22: Nhà huấn luyện cây vi nhân giống



Hình 23: Sắp đặt bình cây vi nhân giống trong nhà huấn luyện

4. Tiêu chuẩn cây vi nhân giống đem cấy

Tiêu chuẩn cây vi nhân giống trước khi đem cấy có thể dựa trên các tiêu chí chung sau đây:

- Thời gian huấn luyện
- Màu sắc vỏ thân, kích thước thân
- Màu sắc lá, số lá
- Số rễ, chiều dài rễ
- Ngọn cây phải có đỉnh sinh trưởng

Tùy theo từng loài cây mà các tiêu chuẩn trên có thể khác nhau trước khi đem cấy. Ví dụ: Tiêu chuẩn cây Bạch đàn vi nhân giống đem cấy:

- Thân dài từ 1,5 - 3 cm, thân đỏ hoặc xanh
- Lá xòe đều, không úa vàng, không héo và có từ 1-2 lớp lá
- Rễ dài 1- 3 cm, có màu trắng và có từ 3-5 rễ hoàn chỉnh.
- Ngọn: Cây phải có đỉnh sinh trưởng.

B. Câu hỏi và bài tập thực hành

1. Câu hỏi

1. Thế nào là huấn luyện cây vi nhân giống?
2. Trình bày mục đích, yêu cầu huấn luyện cây vi nhân giống
3. Trình bày các giai đoạn huấn luyện cây vi nhân giống
4. Trình bày tiêu chuẩn cây vi nhân giống đem cấy. Cho ví dụ?

2. Bài tập thực hành

Huấn luyện cây vi nhân giống

- *Cách thức*: chia lớp thành các nhóm nhỏ (5 – 6 học viên/nhóm)
- *Thời gian hoàn thành*: 4 giờ/1 nhóm
- *Hình thức*: thực hành tại chỗ
- *Phương pháp đánh giá*: kỹ năng vận dụng lý thuyết vào thực hành của mỗi học viên trong nhóm và thái độ thực hành của học viên.
- *Kết quả cần đạt được*:

Bước 1: Vệ sinh nhà huấn luyện và giàn nuôi cây

Bước 2: Lựa chọn các bình cây đủ tiêu chuẩn đem huấn luyện

Bước 3: Đưa bình cây lên giàn trong nhà huấn luyện

Bước 4: Đo cường độ ánh sáng

Bước 5: Điều chỉnh cường độ ánh sáng trong nhà huấn luyện theo yêu cầu của nuôi dưỡng

- Trải giàn che để giảm sáng khi cường độ ánh sáng quá mạnh
- Thu giàn che khi cường độ sáng yếu.

Bước 6: Đánh giá tiêu chuẩn cây vi nhân giống để đem cấy ngoài vườn ươm.

C. Ghi nhớ:

- Các giai đoạn huấn luyện cây vi nhân giống
 - + Giai đoạn trong phòng nuôi cây vi nhân giống
 - + Giai đoạn huấn luyện ngoài phòng nuôi cây vi nhân giống
- Tiêu chuẩn cây vi nhân giống đem cấy

HƯỚNG DẪN GIẢNG DẠY MÔ ĐUN/MÔN HỌC

I. Vị trí, tính chất của mô đun :

- Vị trí: Mô đun thực hiện các giai đoạn vi nhân giống là một mô đun chuyên môn trong chương trình dạy nghề trình độ sơ cấp của nghề Vi nhân giống cây lâm nghiệp; được giảng dạy sau mô đun 03 và trước mô đun 05, Mô đun này có thể giảng dạy độc lập theo yêu cầu của người học.

- Tính chất: Là mô đun chuyên môn trọng tâm trong chương trình dạy nghề Vi nhân giống cây lâm nghiệp được thực hiện trên lớp và trong phòng thí nghiệm tại cơ sở đào tạo.

II. Mục tiêu: Học xong mô đun này, học viên có khả năng:

- Trình bày được trình tự các bước: Lấy mẫu, nuôi cấy khởi đầu, nhân nhanh chồi, tạo cây hoàn chỉnh và huấn luyện cây vi nhân giống.
- Thành thạo các thao tác vi nhân giống để nhân giống thành công cho một số loại cây lâm nghiệp quan trọng đảm bảo tỷ lệ cây mẫu thành công 5 - 10%, tỷ lệ nhiễm nấm (khuẩn) trong nhân chồi dưới 10% và tỷ lệ ra rễ >90%.
- Chăm sóc, huấn luyện được cây vi nhân giống đảm bảo chất lượng và tỷ lệ sống cao.
- Có tác phong công nghiệp, tiết kiệm vật tư, mẫu cây và tuân thủ các quy định trong phòng vi nhân giống.

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 04-01	Lấy mẫu để vi nhân giống	Tích hợp giữa lý thuyết và thực hành	Lớp học và vườn ươm	8	2	6	
MĐ 04-02	Nuôi cấy khởi đầu	Tích hợp giữa lý thuyết và thực hành	Lớp học và phòng thí nghiệm	24	4	19	1

Mã bài	Tên bài	Loại bài dạy	Địa điểm	Thời gian			
				Tổng số	Lý thuyết	Thực hành	Kiểm tra*
MĐ 04-03	Nhân nhanh chồi	Tích hợp giữa lý thuyết và thực hành	Lớp học và phòng thí nghiệm	20	4	15	1
MĐ 04-04	Nuôi cây tạo cây hoàn chỉnh	Tích hợp giữa lý thuyết và thực hành	Lớp học và phòng thí nghiệm	20	4	15	1
MĐ 04-05	Huấn luyện cây vi nhân giống	Tích hợp giữa lý thuyết và thực hành	Lớp học và nhà lưới	20	2	17	1
	<i>Kiểm tra hết mô đun</i>			4			4
Cộng				96	16	68	8

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

IV. Hướng dẫn thực hiện bài tập, bài thực hành

1. Các nguồn lực cần thiết:

- Phòng học: Phòng học lý thuyết và phòng học thực hành (phòng cây và phòng nuôi và khu huấn luyện)
- Thiết bị:
 - + Máy vi tính, máy chiếu đa năng
 - + Máy cấy: 2 - 3 học viên/máy
- Dụng cụ: Panh, kéo, giá đỡ, đĩa cấy, đèn cồn, lọ đựng cồn, que cấy, khăn lau, bật lửa.
- Nguyên liệu: Cồn 75⁰, cồn 90⁰, dung dịch HgCl₂ 0,1%, nước cất, xà phòng
- Vật liệu: Mẫu cây, bình chồi đủ tiêu chuẩn cấy nhân chồi và cấy tạo rễ
- Môi trường hóa học: Nuôi cấy khởi đầu, nhân nhanh và tạo cây hoàn chỉnh
- Bảo hộ lao động: Quần, áo, mũ, khẩu trang và kính bảo hộ.
- Các bảng, biểu, qui trình hướng dẫn: Cây khởi đầu, nhân nhanh, tạo cây hoàn chỉnh và huấn luyện cây vi nhân giống.

2. Cách tổ chức thực hiện:

- Học lý thuyết trên lớp với 5 bài
- Thực hành và rèn kỹ năng trong phòng thí nghiệm theo nhóm: chia lớp thành 4 - 5 nhóm.

3. Thời gian: 96 giờ

4. Tiêu chuẩn sản phẩm

- Mẫu để vi nhân giống đạt tiêu chuẩn kỹ thuật
- Bình cây cấy khởi đầu có tỷ lệ nảy chồi 10%
- Bình cây cấy nhân chồi không bị nhiễm khuẩn
- Bình cây cấy tạo rễ không bị nhiễm khuẩn
- Bình cây sau huấn luyện đạt tiêu chuẩn cây đem cấy ngoài vườn ươm

V. Yêu cầu về đánh giá kết quả học tập

5.1. Bài 1: Lấy mẫu để vi nhân giống

Tiêu chí đánh giá	Cách thức đánh giá	Điểm
Lý thuyết: <ul style="list-style-type: none">- Thế nào là lấy mẫu? Trình tự các bước lấy mẫu để vi nhân giống- Trình bày tiêu chuẩn lấy mẫu từ các bộ phận của thực vật	Vấn đáp (Giáo viên cho học viên trả lời 1 trong 2 câu)	2 2 2
Thực hành: Bước 1. Chuẩn bị dụng cụ để lấy mẫu Bước 2. Chọn cây mẹ để lấy mẫu vi nhân giống Bước 3. Chọn cơ quan, bộ phận để lấy mẫu Bước 4: Cắt mẫu	Thao tác thực hiện các bước công việc	8 2 2 2 2

5.2. Bài 2: Nuôi cấy khởi đầu

Tiêu chí đánh giá	Cách thức đánh giá	Điểm
-------------------	--------------------	------

Tiêu chí đánh giá	Cách thức đánh giá	Điểm
<p>Lý thuyết:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Trình bày khái niệm, mục đích, yêu cầu trong nuôi cấy khởi đầu. - Trình bày trình tự các bước trong nuôi cấy khởi đầu. - Có mấy loại môi trường nuôi cấy? Người ta thường sử dụng môi trường nuôi cấy nào trong vi nhân giống cây lâm nghiệp? - Trình bày cách chọn, cắt mẫu, khử trùng mẫu - Trình bày cách cấy mẫu, nuôi mẫu sau cấy 	<p>Vấn đáp</p> <p>(Giáo viên cho học viên trả lời 1 trong 5 câu)</p>	<p>2</p> <p>2</p> <p>2</p> <p>2</p> <p>2</p>
<p>Thực hành:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Khử trùng mẫu cấy: <ul style="list-style-type: none"> + Pha hoá chất khử trùng + Lấy vật liệu nuôi cấy và xử sơ bộ + Khử trùng mẫu cấy - Cấy mẫu khởi đầu: <ul style="list-style-type: none"> + Vệ sinh: Rửa chân tay bằng xà phòng, sát trùng tay bằng cồn 75%, mặc áo choàng. + Chuẩn bị điều kiện cấy mẫu: Khử trùng dụng cụ bằng cồn, cho tủ cấy hoạt động trước khi cấy 20-30 phút, Bật đèn cực tím khử trùng phòng cấy, tắt đèn cực tím trước khi vào phòng cấy để cấy mẫu. + Cấy mẫu: Vệ sinh các bình cấy, khử trùng dụng cụ, cấy mẫu. 	<p>Thao tác thực hiện các bước công việc</p>	<p>8</p> <p>3</p> <p>5</p>

5.2. Bài 3: Nhân nhanh chồi

Tiêu chí đánh giá	Cách thức đánh giá	Điểm
--------------------------	---------------------------	-------------

Tiêu chí đánh giá	Cách thức đánh giá	Điểm
Lý thuyết: <ul style="list-style-type: none"> - Trình bày khái niệm, mục đích, yêu cầu trong giai đoạn nhân nhanh chồi - Trình bày nguyên tắc trong cấy nhân nhanh chồi. - Trình bày trình tự các bước trong cấy nhân nhanh chồi. 	Vấn đáp (Giáo viên cho học viên trả lời 1 trong 3 câu)	2 2 2
Thực hành: <ul style="list-style-type: none"> - Pha chế môi trường - Chuẩn bị dụng cụ và vật liệu phục vụ cấy - Khử trùng - Cấy nhân chồi - Chuyển bình sau cấy sang phòng nuôi 	Thao tác thực hiện các bước công việc	8 2 1 2 2 1

5.2. Bài 4: Nuôi cấy tạo cây hoàn chỉnh

Tiêu chí đánh giá	Cách thức đánh giá	Điểm
Lý thuyết: <ul style="list-style-type: none"> - Trình bày khái niệm, mục đích, yêu cầu giai đoạn nuôi cấy tạo cây hoàn chỉnh - Nêu trình tự các bước trong giai đoạn nuôi cấy tạo cây hoàn chỉnh. - Trình bày tiêu chuẩn cây bạch đàn chọn để cấy tạo cây hoàn chỉnh - Trình bày tiêu chuẩn cây bạch đàn đem huấn luyện sau vi nhân giống 	Vấn đáp (Giáo viên cho học viên trả lời 1 trong 4 câu)	2 2 2 2
Thực hành: <ul style="list-style-type: none"> - Pha chế môi trường ra rễ - Thực hiện khâu cấy: <ul style="list-style-type: none"> + Bước 1: Chuẩn bị 	Thao tác thực hiện các bước công việc	8 3 5

Tiêu chí đánh giá	Cách thức đánh giá	Điểm
<ul style="list-style-type: none"> + Bước 2: Tách chồi + Bước 3: Cấy cụm chồi vào bình + Bước 4: Chuyển các bình có mẫu cây sang phòng nuôi 		

5.2. Bài 5: Huấn luyện cây vi nhân giống

Tiêu chí đánh giá	Cách thức đánh giá	Điểm
<p>Lý thuyết:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Thế nào là huấn luyện cây vi nhân giống? - Trình bày mục đích, yêu cầu huấn luyện cây vi nhân giống - Trình bày các giai đoạn huấn luyện cây vi nhân giống - Trình bày tiêu chuẩn cây vi nhân giống đem cấy. Cho ví dụ? 	<p>Vấn đáp</p> <p>(Giáo viên cho học viên trả lời 1 trong 4 câu)</p>	<p>2</p> <p>2</p> <p>2</p> <p>2</p>
<p>Thực hành:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Bước 1: Vệ sinh nhà huấn luyện và giàn nuôi cây - Bước 2: Lựa chọn các bình cây đủ tiêu chuẩn đem huấn luyện - Bước 3: Đưa bình cây lên giàn trong nhà huấn luyện - Bước 4: Đo cường độ ánh sáng - Bước 5: Điều chỉnh cường độ ánh sáng trong nhà huấn luyện theo yêu cầu của nuôi dưỡng <ul style="list-style-type: none"> + Trải giàn che để giảm sáng khi cường độ ánh sáng quá mạnh + Thu giàn che khi cường độ sáng yếu. - Bước 6: Đánh giá tiêu chuẩn cây vi nhân giống để đem cấy ngoài vườn ươm. 	<p>Thao tác thực hiện các bước công việc</p>	<p>8</p> <p>1</p> <p>1</p> <p>1</p> <p>1</p> <p>2</p> <p>2</p>

VI. Tài liệu tham khảo

1. Giáo trình: Công nghệ nuôi cấy mô - tế bào thực vật - Trung tâm nghiên cứu cây nguyên liệu giấy - Phù Ninh - Phú Thọ.
2. Bài giảng: Công nghệ nuôi cấy mô - tế bào thực vật - Trung tâm nghiên cứu ứng dụng KH&SX Lâm nông nghiệp Quảng Ninh.

**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./.