

NGUYỄN VĂN MÃ
LA VIỆT HỒNG, ONG XUÂN PHONG

PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU
SINH LÝ HỌC THỰC VẬT
Methods in plant physiology

NHÀ XUẤT BẢN ĐẠI HỌC QUỐC GIA HÀ NỘI

Mục lục

Chương 1 NGUYÊN TẮC AN TOÀN TRONG PHÒNG THÍ NGHIỆM

- 1.1. Các quy định an toàn chung 9
- 1.2. Các thiết bị an toàn cần có trong phòng thí nghiệm..... 10
- 1.3. Nguyên tắc an toàn với hóa chất và các chất dễ cháy 10
- 1.4. Quy định an toàn khi làm việc với chất gây đột biến
và các chất độc hại 11
- 1.5. Một số lưu ý khi làm việc với nitơ lỏng và nước đá khô 12
- 1.6. Quy định an toàn khi làm việc với chất phóng xạ 12
- 1.7. Một số cách xử lý thông thường trong khi làm thí nghiệm 16

Chương 2 DỤNG CỤ, THIẾT BỊ TRONG PHÒNG THÍ NGHIỆM

- 2.1. Dụng cụ thường dùng 18
- 2.2. Các thiết bị đo lường trong nghiên cứu sinh lý học thực vật.. 20
- 2.3. Các thiết bị khác..... 45

Chương 3 CHUẨN BỊ DUNG DỊCH TRONG THÍ NGHIỆM SINH LÝ HỌC THỰC VẬT

- 3.1. Nồng độ dung dịch và các cách biểu diễn nồng độ 49
- 3.2. Chuẩn bị dung dịch trong nghiên cứu 55

Chương 4

THIẾT KẾ THÍ NGHIỆM

4.1. Phương pháp trồng cây trong dung dịch dinh dưỡng	61
4.2. Phương pháp trồng cây trong chậu	74
4.3. Phương pháp trồng cây ngoài đồng ruộng	76
4.4. Phương pháp lấy mẫu	81

Chương 5

CÁC PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU CHẾ ĐỘ NƯỚC VÀ KHẢ NĂNG CHỊU HẠN CỦA THỰC VẬT

5.1. Xác định áp suất thẩm thấu của mô thực vật	83
5.2. Xác định cường độ thoát hơi nước ở lá	87
5.3. Xác định khả năng giữ nước, khả năng hút nước và độ hút nước của mô lá	89
5.4. Xác định hệ số héo	92
5.5. Xác định nước tự do và nước liên kết trong cây	94
5.6. Xác định hàm lượng prolin trong mô thực vật	97
5.7. Xác định hàm lượng protein trong mô thực vật	100
5.8. Xác định hàm lượng nước tương đối trong mô thực vật	106
5.9. Định lượng glycine betaine	109

Chương 6

CÁC PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU VỀ QUANG HỢP VÀ SẮC TỐ QUANG HỢP

6.1. Định lượng diệp lục và carotenoid bằng phương pháp quang phổ	111
6.2. Xác định hàm lượng diệp lục tổng số bằng máy SPAD-502 .	115
6.3. Khả năng huỳnh quang diệp lục	116
6.4. Cường độ quang hợp	117
6.5. Sự tích lũy chất khô trong quang hợp	123
6.6. Xác định năng suất quang hợp thuần túy NAR (Net assimilation rate) - Hiệu suất quang hợp thuần túy.	124

Chương 7

CÁC NGHIÊN CỨU VỀ VAI TRÒ CHẤT KHOÁNG ĐỐI VỚI THỰC VẬT

- 7.1. Nguyên tắc chung 127
- 7.2. Nghiên cứu vai trò của nguyên tố vi lượng
trong kỹ thuật thủy canh và giá thể sạch..... 127
- 7.3. Nghiên cứu vai trò của nguyên tố vi lượng, đa lượng
đối với cây trồng trên đồng ruộng..... 129

Chương 8

CÁC NGHIÊN CỨU VỀ VAI TRÒ PHYTOHORMON

- 8.1. Nguyên tắc chung 131
- 8.2. Ảnh hưởng của auxin tới sự sinh trưởng của rễ và thân mầm. 132
- 8.3. Ảnh hưởng của gibberelin tới sinh trưởng
và phát triển của cây 133
- 8.4. Ảnh hưởng của xitokinin tới sự già hóa
của cơ quan thực vật 134

CHƯƠNG 9

CÁC NGHIÊN CỨU VỀ KHẢ NĂNG CHỐNG CHỊU ĐIỀU KIỆN NÓNG, LẠNH VÀ MẶN Ở THỰC VẬT

- 9.1. Xác định khả năng chịu nóng của thực vật..... 136
- 9.2. Xác định khả năng chịu rét của thực vật..... 140
- 9.3. Xác định khả năng chịu mặn của thực vật..... 144

Chương 10

CÁC NGHIÊN CỨU VỀ VAI TRÒ ENZYM TRONG MÔ THỰC VẬT

- 10.1. Xác định hoạt độ enzym protease 149
- 10.2. Xác định hoạt độ enzym lipase (triglyceride lipase) 153
- 10.3. Xác định hoạt độ enzym α -amylase và β -amylase 157

10.4. Xác định hoạt độ catalase	161
10.5. Xác định hoạt độ peroxidase.....	165

Chương 11

CÁC NGHIÊN CỨU VỀ CHẤT LƯỢNG SẢN PHẨM

11.1. Xác định hàm lượng nitơ tổng số.....	169
11.2. Xác định hàm lipit tổng số	171
11.3. Xác định hàm lượng đường khử bằng phương pháp vi phân tích.....	171
11.4. Xác định hàm lượng tinh bột	173
11.5. Xác định hàm lượng nitrat trong rau bằng phương pháp quang phổ	175

Chương 12

PHÂN TÍCH THỐNG KÊ DỮ LIỆU THỰC NGHIỆM BẰNG CHƯƠNG TRÌNH EXCEL

12.1. Giới thiệu chung về phương pháp khảo sát mẫu và phần mềm Excel	179
12.2. So sánh hai giá trị trung bình.....	184
12.3. So sánh nhiều giá trị trung bình.....	194

Tài liệu tham khảo.....	217
--------------------------------	------------

PHỤ LỤC.....	220
---------------------	------------

Lời nói đầu

Sinh lý học thực vật là cơ sở khoa học của sự trồng trọt hợp lý, hiệu quả. Những năm gần đây, sự phát triển mạnh mẽ của trồng trọt và chăn nuôi đã đem lại những thay đổi lớn trong nền kinh tế của nhiều quốc gia. Đồng hành với những thay đổi này là các nghiên cứu trong lĩnh vực sinh học, trong đó có sự đóng góp tích cực, hiệu quả của Sinh lý học thực vật. Từ những nghiên cứu cơ bản ban đầu, sinh lý học thực vật đã dần đi sâu vào các nghiên cứu theo hướng ứng dụng với sự trợ giúp của các thiết bị máy móc đo lường hiện đại gắn với các nghiên cứu *in vitro* và *in vivo* ở các mức độ khác nhau: từ mức độ phân tử đến mức độ cơ quan, cơ thể hay quần thể.

Sự phát triển của khoa học cơ bản và ứng dụng theo hướng này đòi hỏi phải có những phương pháp nghiên cứu phù hợp, đáp ứng yêu cầu thực tiễn của phát triển kinh tế, xã hội, đồng thời nó được tạo điều kiện thuận lợi bởi sự phát triển ngày càng cao của khoa học kỹ thuật, cho phép sử dụng các thiết bị hiện đại trong nghiên cứu các quá trình sinh lý bên trong cơ thể thực vật ở các mức độ cấu trúc khác nhau.

Những nghiên cứu cơ bản và ứng dụng thuộc lĩnh vực Sinh lý học thực vật gần đây được tăng cường khá mạnh mẽ tại các trường Đại học, các Viện nghiên cứu, nhằm hoàn thiện các đề tài nghiên cứu, các quy trình công nghệ phục vụ cho thực tiễn trồng trọt, song song với việc đào tạo sinh viên, học viên cao học, nghiên cứu sinh và các chuyên gia nghiên cứu.

Trước nhu cầu ngày càng cao về đào tạo và nghiên cứu khoa học trong lĩnh vực Sinh lý học thực vật, chúng tôi tập hợp và biên soạn tài

liệu “*Phương pháp nghiên cứu Sinh lý học thực vật*” nhằm góp phần đáp ứng nhu cầu đào tạo và nghiên cứu ở mức độ ngày càng cao của các cơ sở đào tạo và nghiên cứu khoa học. Tài liệu này hy vọng sẽ là cuốn cẩm nang bổ ích giúp cho sinh viên, học viên cao học và nghiên cứu sinh trong chặng đường học tập, nghiên cứu để đạt được các mục tiêu mong muốn.

Tài liệu được biên soạn có thể còn những vấn đề chưa đáp ứng được đầy đủ yêu cầu của người sử dụng, chúng tôi mong muốn nhận được các ý kiến góp ý để kịp thời bổ sung hoàn thiện hơn cho những lần tái bản sau phục vụ tốt hơn yêu cầu của người đọc.

Xin trân trọng cảm ơn!

Nhóm tác giả

NGUYÊN TẮC AN TOÀN TRONG PHÒNG THÍ NGHIỆM

1.1. Các quy định an toàn chung

** Phòng thí nghiệm:*

Người học phải tuân thủ tuyệt đối nội quy, quy định an toàn trong khu vực phòng thí nghiệm (PTN).

Để vật dụng, trang thiết bị, hóa chất, đồ dùng đúng nơi quy định.

Đọc kỹ hướng dẫn sử dụng các thiết bị, hóa chất trước khi làm việc. Kiểm tra thiết bị, dụng cụ và hóa chất trước khi tiến hành thí nghiệm.

Không ăn uống, hút thuốc trong phòng thí nghiệm.

Tuân thủ nghiêm túc việc sử dụng hoá chất, dụng cụ và thiết bị.... Nếu có trường hợp xảy ra tai nạn, sự cố phải báo ngay cho người phụ trách để có biện pháp xử lý kịp thời.

Không di rời các chai hóa chất, thiết bị từ chỗ này sang chỗ khác mà không được phép.

** Cá nhân:*

Sử dụng quần áo, dụng cụ bảo hộ cần thiết khi làm thí nghiệm.

Đeo kính bảo hộ khi làm việc với các chất ăn mòn, các chất gây kích ứng mắt hoặc khi làm việc với các chất dễ cháy nổ.

Khi sử dụng những hóa chất có mùi sốc, khó chịu (ete, este, amoniac, axit hypoclohydrit đậm đặc ...) phải sử dụng tủ hút.

Đọc kỹ hướng dẫn an toàn khi làm việc với các chất gây đột biến, các tác nhân gây ung thư, các chất phóng xạ, các loại axit.

Cần cất giữ các hóa chất và dung môi ở nơi kín gió trong phòng thí nghiệm.

Không đổ vật liệu sinh học có hoạt tính vào đường thoát nước. Khử trùng các dụng cụ thí nghiệm và rác thải trước khi đưa ra bên ngoài. Rác thải hóa chất cần được xử lý dưới sự giám sát của cán bộ phụ trách phòng thí nghiệm.

Vệ sinh sạch sẽ các thiết bị, khu vực thí nghiệm sau khi sử dụng.

Rửa tay bằng xà phòng khi rời khỏi phòng thí nghiệm.

1.2. Các thiết bị an toàn cần có trong phòng thí nghiệm

Hệ thống an toàn cần phải có bao gồm các thiết bị chống cháy, thiết bị khẩn cấp dùng trong trường hợp có sự cố về điện, vòi xịt nước khẩn cấp, hộp sơ cứu để gần phòng thí nghiệm (bông, băng, gạc...), dung dịch rửa mắt (NaCl 0,9%), bảng dữ liệu an toàn hóa chất, thùng đựng rác, bình chứa dung môi hữu cơ và các đồ chứa phế thải khác, bình đựng rác thủy tinh và các loại vật liệu sắc nhọn.

Khu vực/phòng sơ cứu ban đầu cần phải được trang bị và sẵn sàng sử dụng khi cần thiết.

1.3. Nguyên tắc an toàn với hóa chất và các chất dễ cháy

Chất dễ cháy là các chất khí, chất lỏng và chất rắn sẽ bắt cháy và tiếp tục cháy trong không khí nếu tiếp xúc với một nguồn lửa.

Ví dụ: Chất khí như: khí metan, propan, butan (thành phần khí thiên nhiên và dầu mỏ) rất dễ cháy. Chất lỏng như rượu, hexan (hexan là thành phần của xăng). Chất rắn như natri (natri cực kỳ dễ cháy, chỉ cần tiếp xúc với nước chúng sẽ cháy mãnh liệt).

Do vậy:

- Đối với chất rắn bảo quản nơi lạnh, tránh để gần nguồn nhiệt hoặc lửa, để phòng cháy nổ do tiếp xúc với nước, nên bảo quản từng lượng nhỏ natri, kali trong dầu.

- Đối với chất lỏng đậm đặc, chống rơi vãi, bảo quản nơi thông gió và không có điện, ma sát.

- Đối với chất khí không được va chạm hoặc đun nóng bình chứa, phải có hệ thống thông gió tốt khi sử dụng trong phòng.

1.4. Quy định an toàn khi làm việc với chất gây đột biến và các chất độc hại

Các chất gây đột biến và các chất độc hại là các hóa chất đặc biệt nguy hiểm, cần có sự cho phép và hướng dẫn của người phụ trách phòng thí nghiệm mới được làm việc với các hóa chất này. Ngoài ra, người làm thí nghiệm khi tiếp xúc với các chất này cần phải tuân thủ các quy định an toàn chung sau đây:

Phòng thí nghiệm phải có bảng dữ liệu an toàn hóa chất đối với các chất nguy hiểm.

Phải sử dụng găng tay dùng một lần khi làm việc với các hóa chất có nguy cơ cao. Nếu để các hóa chất này dính vào găng tay, cần tháo bỏ ngay găng tay. Có thể đi 2 hoặc 3 lớp găng tay tùy thuộc vào mức độ nguy hiểm của hóa chất và hệ số an toàn của loại găng tay sử dụng.

Trong quá trình làm việc với các hóa chất thuộc nhóm này, phải đảm bảo hóa chất không bị rơi rớt hoặc tạo khí dung tại nơi làm thí nghiệm.

Nên tiến hành thí nghiệm với các hóa chất này trong tủ hút. Vệ sinh sạch mặt bàn thí nghiệm và giá pipet nếu có dính hóa chất trước khi đưa ra khỏi tủ hút.

Găng tay dính hóa chất và các loại rác khác phải để trong tủ hút và bỏ vào thùng rác thích hợp.

Nếu hóa chất dính vào quần áo, cần cởi bỏ ngay quần áo khỏi người. Nếu hóa chất dính vào da, phải rửa ngay bằng nước sạch. Không được sử dụng các dung môi hữu cơ như etanol hoặc axeton vì các chất này có thể làm hóa chất thấm vào da dễ dàng hơn.

1.5. Một số lưu ý khi làm việc với nitơ lỏng và nước đá khô

Người làm việc với nitơ lỏng và nước đá khô có thể đối mặt với nguy cơ bị bỏng do quá lạnh và nghẹt thở do thiếu oxy (nhiệt độ của N₂ lỏng là -196°C và CO₂ là -78°C). Nồng độ CO₂ 10 - 20% có thể gây chết ngay lập tức. Do vậy, người làm thí nghiệm khi tiếp xúc với N₂ lỏng và nước đá khô cần chú ý:

Khi rót nitơ lỏng, phải đeo găng và khẩu trang.

Sự bay hơi lan rộng của nitơ lỏng làm chiếm chỗ của oxy, làm giảm nồng độ oxy có thể gây chóng mặt. Cần làm việc với nitơ lỏng tại những nơi thông gió tốt.

Không vận chuyển nitơ lỏng trong thang máy và xe đóng kín để tránh nguy cơ ngạt thở (một lít nitơ lỏng ở 20°C và 1atm chiếm thể tích khoảng 3/4m³).

Nitơ lỏng có vai trò như cái bẫy lạnh và ngưng tụ oxy không khí trong bình chứa cũng như bình được rót sang. Áp lực khí oxy lúc này có thể gây nổ dữ dội khi có mặt các hóa chất có khả năng oxy hóa như một số hợp chất hữu cơ.

Không được bơm không khí qua bình được làm lạnh với nitơ lỏng.

Đậy kín miệng bình chứa nitơ để ngăn sự khuếch tán không khí xuống bình.

1.6. Quy định an toàn khi làm việc với chất phóng xạ

Người làm việc với chất phóng xạ phải thực hiện các thao tác tại phòng thí nghiệm thích hợp, khi có sự cho phép đặc biệt của cơ quan có chức năng (Cục An toàn Lao động - Bộ Lao động Thương binh và Xã hội, Cục Kiểm soát và An toàn bức xạ hạt nhân - Bộ Khoa học và Công nghệ).

Cần tuân thủ quy định về an toàn với chất phóng xạ và chỉ làm việc với chất phóng xạ dưới sự hướng dẫn của cán bộ chuyên môn.

Khi làm việc với chất phóng xạ, phải thực hiện quy trình an toàn để hạn chế gây nhiễm xạ ra môi trường cũng như tránh nhiễm xạ vào cơ thể (nhiễm xạ trong).

Người thực hiện phải thành thạo các quy trình vệ sinh khi làm đổ hóa chất (chất rắn, lỏng, dính vào quần áo...) và định lượng đồng vị phóng xạ đang thao tác. Việc này cần thực hiện trước khi bắt đầu làm việc với chất phóng xạ.

Phụ nữ cho con bú không được làm việc với chất phóng xạ.

Không vào khu vực lân cận với vùng có chất phóng xạ hoặc vùng nhiễm xạ nếu không có nhiệm vụ.

Giữ phòng thí nghiệm gọn gàng, sạch sẽ, không để những đồ vật không cần thiết trong phòng thí nghiệm.

Cần có thiết bị phát hiện nhiễm xạ trong phòng thí nghiệm.

Cần có dụng cụ, thiết bị khử nhiễm xạ gần nơi thao tác với chất phóng xạ.

Không được mang vào hoặc sử dụng trong phòng thí nghiệm có chất phóng xạ: thức ăn, đồ uống, thuốc lá, ví, túi xách, ba lô, son môi hoặc mỹ phẩm nữ trang (đặc biệt là nhẫn), khăn tay (giấy lau cần có sẵn trong phòng thí nghiệm), hộp đựng thực phẩm, cốc, chén hay đĩa, sách vở, giấy viết hoặc các đồ dùng khác không cần thiết cho việc làm thí nghiệm.

Tất cả các dụng dịch chứa chất phóng xạ cần được đánh dấu với tên đồng vị, hoạt tính, ngày và tên người sử dụng.

Tùy thuộc công việc, cần chuẩn bị các dụng cụ bảo vệ cá nhân hoặc sơ cứu khác nhau. Khi cần thiết, phải có thông tin chi tiết về loại thiết bị bảo vệ.

Phải để hóa chất phóng xạ ở những nơi tránh được hỏa hoạn và nước.

Tất cả các chỗ để hóa chất phóng xạ, kể cả trong thời gian ngắn cần được dán nhãn cảnh báo có biểu tượng bức xạ ion hóa và chữ “phóng xạ - radioactivity”. Việc xác định đồng vị cũng như tên của người sử dụng và ngày cũng cần được ghi rõ ràng.

Áo blouse làm thí nghiệm cần được để trong phòng, phải phủ kín người và đóng khuy. Bàn thí nghiệm phải được phủ khăn nhựa và đánh dấu bằng băng dính ký hiệu phóng xạ, tên chất phóng xạ và tên người thao tác.

Nếu bị đứt tay, không được làm việc với chất phóng xạ, ngay cả khi đã băng kín vết đứt.

Dùng găng tay khi thao tác với các chất phóng xạ, luôn kiểm tra găng tay.

Phải thao tác với chất phóng xạ trong tủ hút.

Cần đeo mặt nạ khi cần thiết.

Mọi thao tác với chất phóng xạ phải được thực hiện trong một khay riêng và lót giấy hấp phụ. Vật liệu thải chứa chất phóng xạ khi vận chuyển ra khỏi phòng thí nghiệm cần để trong thùng kín và chỉ khi chắc chắn cần thiết (chẳng hạn, vận chuyển từ nơi làm thí nghiệm đến nơi định lượng đồng vị).

Cất ngay các dung dịch stock chất phóng xạ vào tủ chứa sau khi làm xong.

Khi ra khỏi phòng thí nghiệm, phải để lại áo blouse, kiểm tra cơ thể xem có nhiễm xạ không bằng thiết bị kiểm tra. Rửa tay sạch, chú ý tới móng tay.

Đồ thủy tinh được sử dụng có tiếp xúc với chất phóng xạ phải được để ở khay nhựa có đánh dấu và cách biệt với các đồ thủy tinh khác.

Mẫu nhiễm xạ cần được cất giữ và đánh dấu nhãn phóng xạ.

Các đồ vật nhiễm xạ, như bề mặt bàn làm thí nghiệm, giấy, cốc thí nghiệm dùng một lần, găng tay dùng một lần, ống đựng

mẫu phải được để trong thùng rác thích hợp. Rác có phóng xạ phải được đưa đi theo hướng dẫn của người phụ trách.

Xác định dạng bức xạ mà đồng vị đã sử dụng. Tia α chứa nhân heli, có độ thâm nhập thấp (vài mm) và không nguy hiểm khi ở bên ngoài, nhưng nếu được đưa vào cơ thể, chúng trở nên rất nguy hiểm vì nhân heli là yếu tố ion hóa. Tia β chứa các điện tử, chúng có độ thâm nhập khoảng 100 mm. Tia γ tương tự các tia X và vì thế có độ thâm nhập khá rộng. Cần tự bảo vệ bằng cách đặt tấm nhựa dày 5 mm, vuông góc giữa người và nguồn bức xạ.

Cần vệ sinh tủ hút và hộp găng. Kiểm tra sự nhiễm xạ ở khu vực làm việc.

Rác phóng xạ cần được vứt bỏ nhanh hoặc giữ đến khi phân rã đủ. Cần dán nhãn tên đồng vị, hoạt tính, lượng (thể tích), ngày hòa tan và ngày bỏ đi.



Chất độc sức khỏe



Chất dễ cháy



Chất ăn mòn



Chất độc môi trường



Nơi nguy hiểm về điện



Không phải vòi nước uống



Nơi giữ hóa chất độc



Nơi có bình chữa cháy



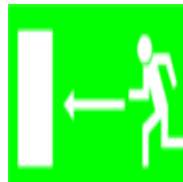
Nơi có tác nhân nguy hiểm sinh học



Nơi cấm lửa



Nơi có chất phóng xạ



Lối thoát hiểm

1.7. Một số cách xử lý thông thường trong khi làm thí nghiệm

Khi axit đậm đặc (axit sunfuric, axit nitric ...) rơi lên da phải rửa ngay chỗ bị bỏng bằng tia nước mạnh trong vòng 3 đến 5 phút, có thể trung hoà lượng còn dính lại trên da bằng dung dịch Na_2CO_3 2%, sau đó dùng băng thấm dung dịch tanin trong rượu hoặc dung dịch thuốc tím (KMnO_4) 3% bôi nhẹ lên vết bỏng. Nếu bị bỏng bởi kiềm đặc thì tiến hành cứu chữa bước đầu như trên có thể trung hoà lượng còn lại bằng dung dịch axit axetic 2%.

- Nếu nuốt phải: súc miệng và cổ họng, nếu không nôn mửa, cho uống thật nhiều nước hoặc sữa. Đối với người bị bất tỉnh không cho bất kỳ thức uống nào vào miệng. Không gây nôn trừ một số trường hợp được hướng dẫn riêng. Gọi ngay bác sĩ hay đưa đến cơ sở y tế gần nhất.

- Nếu hít phải: cần di chuyển người bị nạn đến nơi thoáng mát, nói lỏng quần áo. Nếu ngừng thở, hô hấp nhân tạo, nếu thở khó đưa đến các cơ sở y tế gần nhất.

- Khi bị axit hoặc kiềm bắn vào mắt, phải rửa mắt bằng nhiều nước ít nhất khoảng 15 phút cho tới khi sạch hoá chất, thỉnh thoảng nâng lên và hạ mi mắt xuống, sau đó phải đến ngay bệnh viện.

Khi bị bỏng bởi các vật nóng (thủy tinh, kim loại ...) thì đầu tiên phải bôi dung dịch tanin trong rượu hoặc dung dịch thuốc tím rồi bôi mỡ chống bỏng.

Khi bị bỏng bằng photpho thì phải bôi dung dịch đồng sunfat 2% vào.

Khi bị ngộ độc clo, brom, hiđro sunfua, cacbon oxit cần đưa ngay người bị nạn ra chỗ không khí trong lành.

Nếu bị ngộ độc bởi các chất asen, thủy ngân cũng như các muối xianua cần phải nhanh chóng đưa người bị nạn đến cơ sở y tế.

Khi bị đứt tay do dao hay mảnh thủy tinh cần lau sạch máu, bôi thuốc sát trùng (cồn hay dung dịch thuốc tím loãng), sau đó cầm máu bằng dung dịch FeCl_3 rồi băng lại.

Khi quần áo đang mặc trên người bị cháy một diện tích lớn thì tuyệt đối không được chạy ra chỗ gió, phải nằm xuống đất, lăn. Trường hợp cháy trên diện tích bé thì dùng khăn lau, dùng nước hoặc bất kỳ một phương tiện nào thích hợp để dập tắt chỗ cháy, tuyệt đối không dùng bình chữa cháy (thường là chứa CO₂) để phun vào người đang bị cháy quần áo, mà phải dùng nước dội hay trùm kín bằng chăn.

DỤNG CỤ, THIẾT BỊ TRONG PHÒNG THÍ NGHIỆM

2.1. Dụng cụ thường dùng

2.1.1. Dụng cụ thủy tinh không chia độ

Ống nghiệm: được sử dụng để làm những thí nghiệm với lượng nhỏ hóa chất. Khi làm thí nghiệm lượng hóa chất chỉ lấy 1/4 dung tích của ống nghiệm.

Trong phòng thí nghiệm thường dùng giá bằng gỗ để đặt các ống nghiệm.

Cốc: làm bằng thủy tinh chịu nhiệt và thường có hai dạng là cốc có mỏ (Becher) và không có mỏ. Khi đun nóng phải đun cốc thủy tinh qua lưới amiăng hoặc trên bếp cách thủy.

Bình tam giác: được sử dụng rộng rãi trong các thí nghiệm phân tích để chuẩn độ, người ta đun bình nón trên bếp cách thủy.

Phễu lọc: dùng để lọc và rót chất lỏng. Khi làm việc cần đặt phễu trên chiếc vòng cặp vào giá đỡ. Chú ý không để thân phễu dính sát vào cổ bình vì sẽ khó rót do áp suất trong bình tăng lên. Do đó cần tạo ra một khe hở giữa phễu và cổ bình.

Bình cầu: có hai loại bình cầu là đáy bằng và đáy tròn, cổ bình có thể ngắn hoặc dài, rộng hoặc hẹp. Các bình đáy bằng được dùng để pha dung dịch, đun nóng các chất lỏng hoặc còn dùng để làm bình rửa.

Ống nhỏ giọt: dùng cho những thí nghiệm cần thêm vào hỗn hợp phản ứng từng lượng nhỏ hoặc từng giọt chất lỏng. Có nhiều loại ống nhỏ giọt như ống nhỏ giọt có rãnh thủy tinh, ống nhỏ giọt có nút gắn với một pipet và quả bóp cao su.

2.1.2. Dụng cụ thủy tinh có chia độ

Ống đong: là dụng cụ thủy tinh có thành dày và có những vạch chia ở thành ngoài để chỉ thể tích. Chúng có dung tích rất khác nhau từ 5ml đến 100ml và lớn hơn.

Pipet: dùng để lấy một thể tích chất lỏng nhất định

Buret: được dùng để chuẩn độ, để đo những thể tích chính xác... Buret là một ống thủy tinh đầu dưới nhỏ hơn và có khóa.

Bình định mức: để pha những dung dịch có nồng độ xác định hoặc để đong một thể tích chất lỏng thật chính xác. Thường dùng bình định mức có thể tích 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000ml.

2.1.3. Các dụng cụ thủy tinh có công dụng đặc biệt

Ống sinh hàn: dùng để ngưng tụ các chất lỏng dễ bay hơi trong các quá trình phản ứng (loại sinh hàn tự hồi lưu), chưng cất (lấy chất lỏng dễ bay hơi hơn).

Phễu chiết: dùng để tách rời các chất không tan vào nhau ở dạng lỏng hoặc lấy chất lỏng khỏi chất rắn có kích thước lớn.

Phễu lọc chân không: dùng để lọc nhanh các hệ lỏng - rắn. Thường bộ phễu lọc chân không đi kèm với một hệ thống bơm chân không.

Phễu lọc thường: có tác dụng tách rời hệ rắn - lỏng.

2.1.4. Một số dụng cụ khác

Chày cối sứ: dùng để nghiền các mẫu.

Chén sứ: dùng để đựng các mẫu đem nung, sấy ở nhiệt độ cao (đến 1200°C)

Kẹp: có thể làm bằng kim loại hoặc gỗ, dùng để kẹp ống nghiệm, kẹp chén nung...

Bình tia: có thể làm bằng nhựa hoặc thủy tinh, tác dụng để rửa các kết tủa bám trên dụng cụ thí nghiệm.

Đèn cồn: dùng để đun nóng trong các thí nghiệm cần nhiệt độ cao.

Micro pipet: có hai loại là đơn kênh và đa kênh dùng để lấy chính xác một lượng rất nhỏ chất lỏng.

2.2. Các thiết bị đo lường trong nghiên cứu sinh lý học thực vật

2.2.1. Cân điện

Cân là một dụng cụ quan trọng trong phòng thí nghiệm phân tích dùng để xác định khối lượng chất này hay chất khác. Thường dùng hai loại cân điện: cân kỹ thuật (sai số 10^{-2} g), cân phân tích (sai số 10^{-4} g).



Hình 2.1. Cân phân tích



Hình 2.2. Cân kỹ thuật

Những quy tắc khi sử dụng cân điện:

- Kiểm tra trạng thái cân bằng của cân và đĩa cân.
- Chú ý giới hạn tối đa của cân.
- Khi cân hóa chất, chất lỏng, chất hút ẩm phải để trong cốc, chén thủy tinh để cân.
- Không được bật quạt khi cân, cân phải được đặt trên vị trí vững chắc để kết quả chính xác.
- Khi cân xong phải lau chùi sạch và khô, cân phải được bảo vệ trong điều kiện độ ẩm thấp để tránh hỏng mạch điện tử.

2.2.2. Máy đo diện tích lá



Hình 2.3. Máy đo diện tích lá AM200-001 (ADC - Anh, 2003)

Một số đặc điểm của máy:

Máy đo dựa trên nguyên tắc quét hồng ngoại cho độ chính xác cao, độ phân giải màn hình 50% điểm/inch. Máy nhỏ gọn cho phép phân tích trên thực địa một cách dễ dàng.

Các thông số được hiển thị trên màn hình: chiều dài, chiều rộng, diện tích lá, diện tích trung bình. Có cổng giao diện RS232 cho phép kết nối với máy tính và chuyển dữ liệu sang máy tính dễ dàng.

Thao tác đo:

Máy có 4 nút mềm điều khiển thuận tiện, chức năng của các nút tương ứng với các hiển thị ở 4 góc của màn hình LCD.

Bước 1: Ấn nút mở nguồn để mở máy (giữ trong vòng 2 giây), tiếp tục ấn nút này một lần nữa sau đó màn hình LCD xuất hiện các hiển thị tương ứng các nút, lúc này ta có thể bắt đầu quét lá.

Bước 2: Chọn lá để đo (là cần được lau khô không để bùn đất bám vào), sau đó đặt lá dưới lớp bóng kính trên máy.

Bước 3: Đặt chuột lên trên mặt để quét sao cho khớp với thanh trượt và chóm từ mép của lá. Bắt đầu quét ta ấn nút **Start** trên chuột rồi di chuột trượt dọc theo thanh trượt đến hết phần của lá, khi đó ta lại ấn nút **Start** kết thúc quét, lúc này kết quả được hiển thị trên màn hình.

Chú ý:

Khi đo xong phải vệ sinh máy sạch sẽ đặc biệt là lớp bóng kính. Không được làm xước hay làm bẩn lớp bóng kính vì ảnh hưởng tới độ chính xác kết quả đo.

Ứng dụng trong sinh lý học thực vật:

Thông qua việc đo diện tích lá có thể đánh giá mức độ sinh trưởng bộ lá, hoạt động quang hợp, tiềm năng năng suất, ảnh hưởng của môi trường sống tới bộ lá nói riêng và cây trồng nói chung.

2.2.3. Máy đo huỳnh quang diệp lục

Một số đặc điểm của máy:

Máy gồm thân máy và đầu đo với kích thước gọn nhẹ cho phép thao tác với các mẫu ngoài thực địa thuận tiện. Máy được cung cấp ánh sáng bằng đèn Halogel 35W, ánh sáng điều biến. Máy sử dụng đầu dò PIN photodiode với kính lọc 700nm.

Máy đo các thông số:

+ F_0 xác định huỳnh quang diệp lục khi Q_A bị oxi hoá hoàn toàn.

- + F_m xác định lượng huỳnh quang cực đại.
- + $F_{v/m}$ hiệu suất quang hợp của PSII (hệ thống ánh sáng II).



Hình 2.4. Máy đo huỳnh quang diệp lục OSI 30 (ADC - Anh, 2003)

Thao tác đo:

Bước 1: Chọn mẫu đo, lau sạch và khô mẫu (không được để tổn thương mẫu). Sau đó dùng kẹp phân tích kẹp mẫu (phải đóng “cửa chớp” của kẹp lại). Thời gian kẹp tùy thuộc từng loại mẫu dao động từ 5 -15 phút.

Bước 2: Khi mẫu kẹp được mở bằng cách bật nút mở nguồn ở bên trái thân máy, ấn **Mode** màn hình sẽ xuất hiện các thông số mà máy đo được.

Bước 3: Mẫu đo đủ thời gian ủ tối, ta đưa đầu đo vào kẹp rồi rút “cửa chớp” của kẹp ra. Đo mẫu bằng cách ấn nút **Mode** trên thân máy hoặc ấn nút trên đầu đo, kết quả đo được hiển thị trên màn hình.

Tương tự như vậy ta đo các mẫu tiếp theo, khi đo xong tắt máy bằng công tắc ở bên trái thân máy.

Chú ý:

+ Thời gian ủ tối phải đủ để các trung tâm phản ứng trở về trạng thái mở hoàn toàn. Đối với mỗi loại cây trồng trước khi xác định huỳnh quang diệp lục của lá cần tiến hành xác định thời gian để trung tâm phản ứng mở hoàn toàn (Bằng cách kẹp kiểm tra ở các thời gian khác nhau để xác định thời gian kẹp tối thích hợp nhất).

+ Khi đo xong tháo pin và lau chùi vệ sinh máy sạch sẽ.

Ứng dụng trong sinh lý học thực vật:

Thiết bị đo huỳnh quang diệp lục là thiết bị chuyên dụng hiện nay cho nghiên cứu sinh lý học thực vật.

+ Thông qua việc xác định huỳnh quang diệp lục, cho phép xác định được tình trạng hiện tại của sắc tố cây trồng qua đó điều chỉnh chế độ chăm sóc hợp lý.

+ Nghiên cứu phát hiện sự ảnh hưởng của các yếu tố môi trường lên bộ máy quang hợp của cây.

+ Đánh giá mức độ ảnh hưởng của các chất gây ô nhiễm môi trường như: NO, O₃, SO₂ và sự thay đổi của khí hậu đến bộ máy quang hợp của thực vật.

+ Nghiên cứu khả năng chống chịu và khả năng thích nghi của thực vật với các điều kiện của môi trường.

2.2.4. Máy quang phổ tử ngoại khả kiến

Một số đặc điểm của máy:

Máy 2 chùm tia được cung cấp bởi hai loại đèn Deuterium và Halogen (50W), khoảng bước sóng có thể đo được 190nm - 1100nm.

Hệ thống được điều khiển bằng hệ điều hành Windows NT 4.0.

- Máy cùng một lúc có thể vừa đo vừa xử lý số liệu và một số chức năng khác.

- Chế độ trắc quang: bước sóng đơn, nhiều bước sóng (một bộ có 1, 2 hoặc 3 bước sóng), số lượng phổ (peak, lớn nhất, nhỏ nhất, vùng... cho khoảng phổ đặc trưng). Hiệu chỉnh trọng lượng, hiệu chỉnh hệ số pha loãng, sử dụng hiệu chỉnh các hệ số khác.

Máy cho phép đo bước sóng đơn hoặc đôi, in kết quả phổ đo.



**Hình 2.5. Máy quang phổ tử ngoại khả kiến UV2450
(SHIMADZU - NHẬT BẢN, 2003)**

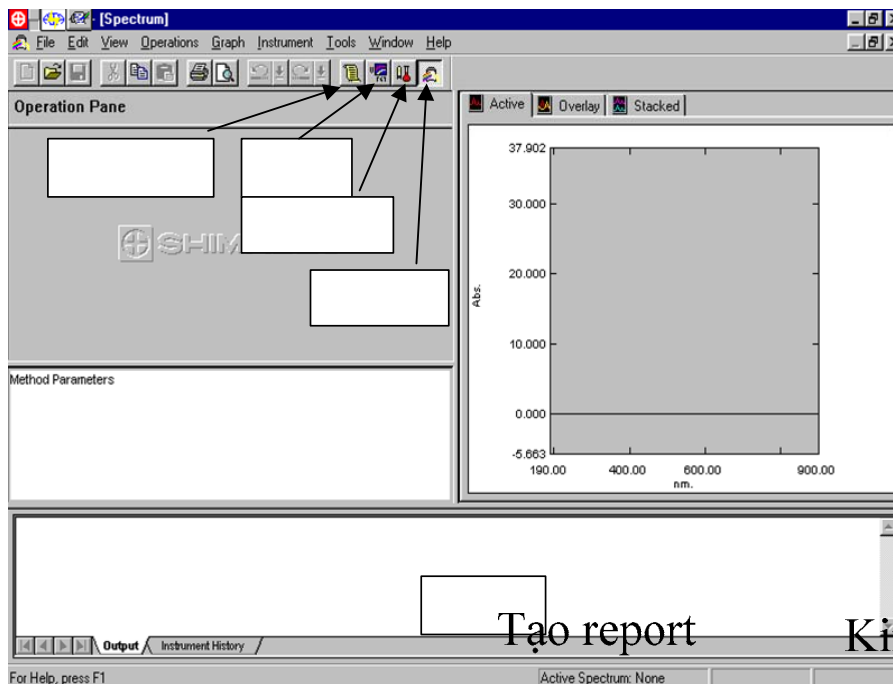
Thao tác đo:

Bước 1: Vào chương trình

1. Đảm bảo máy UV đã được bật điện.
2. Khởi động máy tính, nhấp đúp vào biểu tượng **UVProbe** trên màn hình để vào chương trình.

Bước 2: Chọn chế độ đo

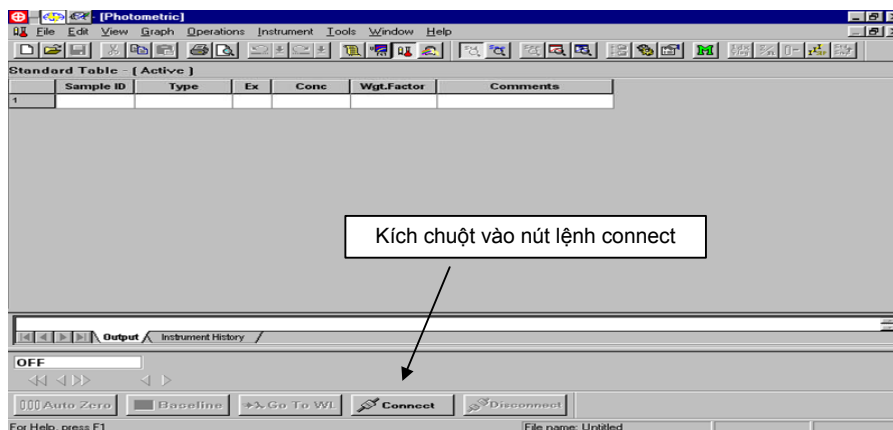
Kích chuột vào các biểu tượng tương ứng trên thanh công cụ.



Có 3 chế độ đo: Spectrum, Photometric, Kinetics

Photometric

Bước 3: Kết nối với máy UV



Bước 4: Đặt thông số cho phép đo và tiến hành đo

Đặt thông số cho phép đo (ở bất kỳ chế độ nào): Kích chuột vào nút lệnh chữ **M** hoặc chọn menu **Edit/Method** chương trình sẽ

mở ra một cửa sổ cho ta đặt thông số. Mỗi chế độ có cửa sổ **method** khác nhau.

- Cài đặt bước sóng, dải bước sóng, số lần lặp lại, thời gian hiện kết quả ở các chế độ đo khác nhau. **Transmittance** (truyền qua) - thường chọn khi mẫu dạng bản mỏng; **Absorbance** (hấp thụ) - thông dụng với hầu hết các mẫu; **Energy** (năng lượng) - thường chọn chế độ này để kiểm tra năng lượng đèn; **Reflectance** (phản xạ) - nếu chọn chế độ này cần lắp thêm bộ phụ kiện đo phản xạ.

Tiến hành phép đo:



- Đảm bảo trong buồng mẫu không đặt gì
- Kích chuột vào nút **Go To WL** để chọn bước sóng mà mẫu phân tích hấp thụ cực đại.
- Kích chuột vào nút **Auto Zero** hiệu chỉnh máy
- Kích chuột vào nút **Baseline** và chờ máy quét để chuẩn lại đường nền.
- Đặt cuvet đựng mẫu trắng (Blank) vào khay phía trong có chùm tia so sánh đi qua, đặt cuvet đựng mẫu cần đo (Sample) vào khay phía ngoài. Sau đó kích chuột vào nút **Start** để máy bắt đầu quét.
- Kết quả đo được hiển thị trên màn hình, ta có thể xử lý kết quả, lấy đồ thị mẫu...

Chú ý:

- Đây là thiết bị quang phổ nên cần: tránh cho máy không bị bụi (dùng vải che bụi khi không sử dụng), không đặt máy nơi bị rung hay có độ ẩm cao, điện áp cấp cho máy phải ổn định (nên sử dụng ổn áp).

- Bật và để máy ổn định ít nhất 15 phút trước khi bước vào phép phân tích.

- Thoát khỏi phần mềm UV Probe trước khi tắt máy UV

- Sau khi tắt máy, chờ tối thiểu 10 phút mới bật trở lại.

Ứng dụng trong sinh lý học thực vật:

- Dùng để định lượng các chất có phản ứng màu với bước sóng hấp thụ đặc trưng.

- Xác định hoạt độ một số enzym.

2.2.5. Hệ thống cất đạm



Hình 2.6. Hệ thống cất đạm (Bộ nung DK6, Máy chưng cất UDK-140)
(Velp - Italy, 2005)

Một số đặc điểm của hệ thống:

Hệ thống cất đạm gồm bộ công phá mẫu và máy chưng cất.

* Bộ công phá mẫu

Bộ công phá mẫu hoạt động dựa trên nguyên tắc nung mẫu bằng nhiệt có bổ sung một số chất phụ gia xúc tác quá trình nhanh hơn.

Bộ công phá mẫu Model DK6 điều khiển nhiệt độ điện tử với khoảng điều khiển 100 - 450°C, không truyền nhiệt ra môi trường xung quanh. Thời gian gia nhiệt nhanh 30 - 40 phút, có hệ thống bảo vệ khi nhiệt độ quá cao.

Hệ thống đi kèm bộ công phá mẫu là tủ hút được làm bằng inox phủ sơn tránh ăn mòn hoá chất, có khả năng chứa dung dịch để trung hoà và thu hồi ngưng tụ.

* Máy chưng cất

Máy tự động pha cất bao gồm: pha loãng mẫu, thêm sút, cất, hút xả dung dịch trong ống.

Máy có báo hiệu khi thuốc thử sẵn sàng, bom hoá chất đạt độ chính xác cao, có hệ thống an toàn bảo vệ người sử dụng. Có thể cất theo tốc độ nhanh hay chậm.

Chức năng của máy chưng cất UDK-140:

- Được dùng để phân đoạn các chất rắn hoặc lỏng không hoà tan trong nước theo định luật Dalton về áp suất từng phần trong một hỗn hợp khí. Nó cũng được dùng để xác định lượng nitơ và protein trong thực phẩm theo phương pháp rất phổ biến là phương pháp Kjeldahl.

- Thời gian chưng cất tùy thuộc vào từng loại mẫu, có thể là vài phút đối với xác định protein nhưng có thể tới vài chục phút đối với axit bay hơi trong thực phẩm.

Thao tác đo:

* Hướng dẫn sử dụng bộ nung DK6

+ Phím **SET**: nhấn liên tiếp phím này màn hình sẽ hiện nhiệt độ, thời gian duy trì ở nhiệt độ đó của 4 dải nhiệt (RAMP)

+ Phím **→**: để di chuyển con trỏ. Khi con trỏ đang nhấp nháy ở bên dưới chữ số nào ta có thể dùng phím **↑** để thay đổi giá trị của nó.

+ Phím **↑**: nhấn phím này để thay đổi giá trị nhiệt độ, thời gian, trạng thái kích hoạt A của RAMP là 0 (không kích hoạt) hay 1 (kích hoạt).

+ Phím **↵**: nhấn phím này để xác nhận sau khi đặt lại nhiệt độ, thời gian.

+ Phím **START**: nhấn phím này đèn chỉ thị sẽ sáng và máy bắt đầu nâng nhiệt theo chế độ ta đã đặt. Máy sẽ phát tiếng bíp để báo hiệu khi kết thúc quá trình nâng nhiệt.

Chú ý:

Khi máy đang nâng nhiệt không nên thay đổi lại thông số, không nên tắt đột ngột.

Đặt nhiệt độ ở RAMP sau lớn hơn RAMP trước, nếu không máy sẽ báo lỗi.

Máy sẽ chạy theo chương trình nhiệt độ của lần trước nếu ta ấn **START** và không thay đổi gì.

Nếu cần hủy bỏ chu trình đang chạy, nhấn đồng thời 2 phím **↑** và **↵** (*chỉ dùng lệnh này khi thật cần thiết*).

* Hướng dẫn sử dụng máy chung cất UDK-140

+ Phím **SET**: để chọn chương trình chạy, bấm phím này con số chỉ chương trình sẽ nhấp nháy, sau đó ta bấm các phím **↑↓** để chọn chương trình cần chạy. Có tất cả 20 chương trình.

+ Phím \updownarrow : bấm phím này liên tiếp để xem các thông số đã đặt của chương trình (nhiệt độ chung, thời gian chung, lượng hoá chất sẽ cộng thêm vào bình chung...). Sau khi cuộn qua hết các thông số của chương trình sẽ có tiếng bíp phát ra và trở về menu chính. Ta có thể kết hợp với các phím mũi tên lên xuống để thay đổi các thông số của chương trình hiện tại.

+ Phím \updownarrow : để tăng/giảm giá trị thông số. Nếu bấm đồng thời 2 phím này máy sẽ dừng quá trình chung một cách tức thời và chờ ta tiến hành một chu trình chung mới.

+ Phím **START**: bấm phím này máy sẽ tiến hành chu trình chung.

+ Phím **STOP**: bấm phím này để dừng chu trình chung. Nếu phím này được bấm trong khi máy đang hút dung dịch hỗ trợ chu trình chung sẽ dừng và quay về trạng thái "Ready" ban đầu. Nếu phím này được bấm trong khi máy đang tiến hành các công đoạn khác của chương trình thì công đoạn đó sẽ tạm dừng và chỉ tiếp tục khi ta bấm phím **START**.

+ Các đèn chỉ thị: đèn Ready sáng báo hiệu máy đã sẵn sàng, một trong các đèn H_2O , $NaOH$, H_3BO_3 sáng báo hiệu dung dịch tương ứng không đủ, cần đổ thêm.

Chú ý:

- + Yêu cầu về điện nguồn: điện áp 230V, dòng tối thiểu 16A.
- + Dòng nước làm mát: khoảng 10 lít/phút.
- + Hoá chất hỗ trợ: $NaOH$ 32-35%, H_3BO_3 4%.

Quy trình chung thông thường:

- Đặt ống chung dài, chưa đựng mẫu vào vị trí bên trái.
- Đặt ống thu sản phẩm vào vị trí bên phải.
- Bật công tắc điện trên mặt máy.
- Mở nước làm mát.

- Khi đèn chỉ thị Ready, thay ống chung không mẫu bằng ống chung có mẫu.

- Bấm phím **Set** rồi kết hợp với các phím $\uparrow\downarrow$ để chọn chương trình chung và đặt lại thông số nếu cần thiết.

- Bấm phím **START** để tiến hành chung tự động. Sau khi chung xong máy sẽ phát tiếng bíp để báo hiệu. Nhấc bình đựng sản phẩm thu ra và thay bằng bình mới.

- Tiến hành chung tương tự với các mẫu khác.

- Tắt máy: ngắt nước làm mát, tắt điện.

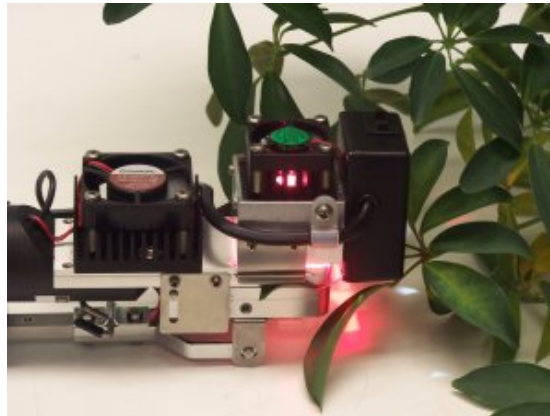
- Mẫu sau khi chung xong mang đi chuẩn độ.

Sơ đồ phân tích nito hữu cơ điển hình:

1. Nghiền và trộn đều mẫu
2. Cân mẫu
3. Chuyển mẫu vào ống nung
4. Cộng thêm axit hay muối vào ống nung
5. Cộng thêm chất xúc tác nếu cần
6. Đặt các ống nung lên bộ nung DK6
7. Tiến hành khoáng hoá mẫu (nung để vô cơ hoá mẫu)
8. Hạ nhiệt ống nung (về khoảng 50 - 60°C)
9. Đặt ống nung này lên bộ chung UDK-140
10. Tiến hành chung mẫu
11. Chuẩn độ sản phẩm thu được
12. Tính toán kết quả.

Ứng dụng trong sinh lý học thực vật: Xác định hàm lượng nito tổng số trong mẫu thực vật, trong đất.

2.2.6. Máy đo cường độ quang hợp



Hình 2.7. Máy đo cường độ quang hợp PP SYSTEM TPS-2 (Mỹ, 2011)

Một số đặc điểm của máy:

Máy gồm hai bộ phận chính là thân máy và buồng đo. Máy sử dụng pin 12V có thể sạc lại, dùng liên tục được 8h. Máy có trọng lượng 5kg, có túi đeo thuận tiện cho việc đo mẫu ngoài thực địa.

Máy lưu trữ được nhiều kết quả đo và có cổng R232 kết nối với máy tính để lấy dữ liệu.

Thao tác đo:

Kết nối đầu dò thu tín hiệu vào chân PLC, kết nối đầu khí vào của đầu dò (ký hiệu là A trên đầu dò) vào cổng PCL A trên máy

đo. Kết nối đầu khí ra của đầu dò (ký hiệu là R trên đầu dò) vào cổng PCL R trên máy đo.

Bật đầu máy đo lên màn hình, vào khởi động, sau đó hiện ra màn hình chính các lựa chọn tương ứng các phím chọn từ 1 - 6:

1REC 2CAL 3DMP
4CLR 5CLK 6DIAG

Trong đó:

+ REC: dùng để thiết lập phép đo và tiến hành phép đo.

+ CAL: dùng để chuẩn dòng khí trong máy (chỉ thực hiện theo hướng dẫn trực tiếp của nhà sản xuất).

+ DMP: dùng để xem các thông số và kết quả đã lưu vào bộ nhớ máy.

+ CLR: dùng để xóa toàn bộ dữ liệu trong bộ nhớ máy.

+ CLK: dùng để cài đặt thời gian.

+ DIAG: dùng để kiểm tra máy (chỉ thực hiện theo hướng dẫn trực tiếp của nhà sản xuất).

* Lựa chọn REC: thiết lập phép đo và tiến hành phép đo

- Từ màn hình chính ta nhấn 1 để chọn chế độ REC sẽ hiện ra: Menu 1 có các thông số:

SET PCL 1: BROAD
 2: UNIVERSAL

Nhấn nút	
1	Chọn 1 nếu sử dụng đầu dò PLC4 (B) (ở đây ta chọn 1 vì dùng đầu dò PLC4)
2	Chọn 2 nếu sử dụng đầu dò PLC (U) hoặc PLC2 (U)

- Sau khi chọn xong đầu đo máy sẽ hiện ra Menu 2:

1REC:M 2INT:0
FLOW:300

Nhấn nút	
1	Nhấn nút 1 để chuyển từ chế độ tự động (A) và bằng tay (M) ghi số liệu.
2	Nhấn nút 2 để thiết lập khoảng thời gian ghi số liệu ở chế độ tự động. Nếu chế độ tự động ghi (A) được chọn, nhấn nút 2 (INT) để thiết lập khoảng ghi (từ 1-250 phút). Nếu chế độ ghi bằng tay (M) được chọn, 2INT được thiết lập là 0 phút.

Dòng khí 300ccmin⁻¹ được thiết lập mặc định không thể thay đổi giá trị.

- Nhấn nút Y để chuyển sang Menu 3, chọn nguồn sáng và thiết lập diện tích lá:

1: LIGHT = SUN (hoặc nguồn sáng mặt trời/đèn LED)

2: LEAF AREA = 2.5

Nhấn nút	
1	Chuyển giữa nguồn sáng mặt trời hoặc đèn LED.
2	Thiết lập diện tích lá (cm ²), diện tích lá phụ thuộc vào cuvet trên đầu dò + PLC4 (B) Broad Leaf Cuvette: 2.5cm ² + PLC2 (U) Universal Leaf Cuvette: 4.5cm ² + PCL (U) Universal Leaf Cuvette: 10.35cm ²

- Nhấn nút Y để chuyển sang Menu 4, chọn ô nhớ:

1P:01 R:01

FREE RECORDS 820

Nhấn nút	
1	Thiết lập ô nhớ để xác định địa chỉ nhớ. Để thay đổi ta nhấn nút 1 và nhập các số từ 1 - 99 R tương ứng với các ngăn nhớ còn trống của ô nhớ. Nó sẽ thiết lập về 1 khi ô nhớ bị thay đổi và tăng lên giá trị lớn nhất là 89. Nó sẽ tuần hoàn lại 1 sau khi ngăn nhớ 89 được lưu.

FREE RECORDS là số ngăn nhớ có thể nhớ trước khi bộ nhớ đầy. Số ngăn nhớ lớn nhất có thể nhớ là 820.

- Nhấn nút Y để chuyển sang chế độ đo.

Máy sẽ tự động **Warmup**, hệ thống không đạt tới nhiệt độ vận hành (55°C) thì màn hình sẽ hiện thị:

WARM UP DELAY

47.7C dT=10

Sau khi Warmup xong máy sẽ chuyển sang chế độ đo, màn hình sẽ hiển thị số liệu:

Cnnnn +/-nnn Qnnnn

Hnn.n +/-nn.n Tnn.n

Dòng trên	
C	Nồng độ dòng CO ₂ so sánh (ppm). Range: 0000-9999
+/-nnn	Sự sai khác nồng độ CO ₂ (ppm). Đây là sự khác nhau nồng độ CO ₂ giữa khí vào cuvet (dòng so sánh) và dòng khí rời cuvet (dòng phân tích)
Q	PAR ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Dải: 0000-2500. Nếu đèn LED được chọn, Q là giá trị cường độ đèn LED
Dòng dưới	
H	Nồng độ hơi nước so sánh (mb). Dải: 00.0 - 75.0
+/-nnn	Sự sai khác nồng độ H ₂ O (mb). Đây là sự sai khác nồng độ hơi nước của khí vào cuvet và dòng khí ra khỏi cuvet.
T	Nhiệt độ cuvet (°C)

Để xem các dự liệu tính toán từ các thông số đo ta nhấn nút 4/X:

Enn.nn Gnnnn Tnn

A+/-nn.n Clnnnn

Dòng trên	
E	Tốc độ thoát hơi nước (Transpiration) ($\text{mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)
G	Độ mở của khí khổng (Stomatal conductance) ($\text{mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)
T	Nhiệt độ lá
Dòng dưới	
A	Cường độ quang hợp (Assimilation 'net photosynthetic' rate) ($\mu\text{mol CO}_2/\text{m}^2\text{s}$)
CI	Nồng độ CO_2 trong gian bào (Intercellular CO_2 concentration) ($\mu\text{mol mol}^{-1}$)

Trong quá trình đo ta có thể sử dụng các phím sau:

Nút nhấn	
R	Lưu dữ liệu đo
1	Chuyển sang loại ghi (bằng tay hoặc tự động). Để trở lại chế độ đo nhấn nút Y
2	Thay đổi loại ánh sáng sử dụng. Để trở lại chế độ đo nhấn nút Y
3	Thay đổi ô nhớ. Để trở lại chế độ đo nhấn nút Y
4/X	Chuyển giữa chế độ tính toán và chế độ đo
Y	Thiết lập điều khiển CO_2 , H_2O và LED
N	Trở lại Menu chính. Sau khi đo xong nên quay lại menu chính sau đó mới tắt máy.

* Điều khiển CO_2 , H_2O và đèn LED

Từ màn hình ở trạng thái đo ta nhấn phím Y và một menu điều khiển sẽ hiển thị:

CONTROL SETTINGS

1 CO_2 2 H_2O 3LED

- Điều khiển CO_2

Nhấn nút 1 để chọn điều khiển CO_2 , màn hình hiển thị:

CO₂ STEP n (MAX = 6)

N = CHANGE Y = OK

Điều khiển CO₂ có thể được cài đặt qua 6 bước, ta có thể chọn từ 1 đến 6. Bảng dưới đây chỉ giá trị CO₂ qua từng bước:

Bước	Nồng độ CO ₂ (% của môi trường)
6	100
5	75
4	60
3	45
2	25
1	0

Nhấn phím N để chuyển sang các bước. Nếu bước 6 được chọn dòng khí vào sẽ không bị hấp thụ CO₂ và nồng độ CO₂ khí vào bằng nồng độ CO₂ môi trường. Nếu bước 5 được chọn, dòng khí vào sẽ bị hấp thụ một phần và bằng xấp xỉ 75% nồng độ CO₂ môi trường.

Nhấn phím Y để trở về chế độ đo.

- Điều khiển H₂O

Nhấn phím 2 để chọn điều khiển H₂O và màn hình hiển thị menu:

H₂O STEP n (MAX = 4)

N = CHANGE Y = OK

Điều khiển H₂O có thể được thiết lập qua 4 bước. Bảng dưới sẽ mô tả từng bước:

Bước	Nồng độ H ₂ O (% của môi trường)
4	100
3	80
2	60
1	35

Nhấn phím N để thay đổi các bước. Nếu bước 4 được chọn sẽ không có H₂O được hấp thụ và nồng độ hơi nước khí vào bằng nồng độ hơi nước của môi trường. Nếu bước 2 được chọn, nồng độ hơi nước của khí vào bằng xấp xỉ 60% nồng độ H₂O của môi trường.

- Điều khiển nguồn sáng (sử dụng cho nguồn sáng LED)

Nhấn phím 3 để chọn điều khiển cường độ sáng.

LED LEVEL n = xxxx

PRESS 0-9 OR Y

n	Số cường độ (0-9) giá trị này được cài đặt trên modul đèn LED
xxxx	Cường độ ánh sáng (PAR) ($\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)

* DMP (Dump/Transfer) xem kết quả lưu

Từ màn hình chính ta chọn phím 3 (3DMP) để xem kết quả hoặc truyền kết quả đã lưu, màn hình hiển thị Menu:

1: SCREEN DISPLAY

2: DATA DUMP

- SCREEN DUMP: chọn phím 1 để xem dữ liệu trên màn hình máy, màn hình hiển thị Menu:

PLOT 01 REC 01

23-07 12:19

Màn hình hiển thị số ô nhớ, số thứ tự dữ liệu lưu, ngày tháng thời gian đo

Để xem kết quả đo tương ứng với số ô nhớ và số thứ tự lưu ta nhấn phím 7. Để xem kết quả tính toán tương ứng ta lại nhấn phím 7. Nhấn phím Y để xem các kết quả đo tiếp theo đã lưu vào trong máy.

Chú ý:

Kiểm tra các cột hấp phụ xem đã chuyển màu chưa, đối với cột hấp phụ CO₂ thì chuyển từ màu xanh sang màu cam, đối với cột hấp thụ H₂O thì chuyển từ màu cam sang màu xanh.

Trong khi đo ta nên để máy ổn định các thông số vào rồi mới lưu lại kết quả đo.

Ứng dụng trong sinh lý học thực vật: Dùng để xác định/ đo:

- Cường độ quang hợp
- Độ mở của khí khổng
- Nhiệt độ lá
- Tốc độ thoát hơi nước
- Nồng độ CO₂ trong gian bào

2.2.7. Máy đo hàm lượng diệp lục



**Hình 2.8. Máy đo hàm lượng diệp lục SPAD-502
(Minolta - Nhật Bản, 2009)**

Một số đặc điểm của máy:

Máy dựa trên nguyên tắc đo quang tại hai bước sóng, do đó xác định được hàm lượng diệp lục tổng số (diệp lục a và diệp lục b).

Các phím chức năng: AVERAGE: khi ấn vào máy kêu bíp, màn hình cho kết quả giá trị trung bình hàm lượng diệp lục của

các lần đo, phím DATA RECALL: gọi lại số liệu của phép đo, ứng với số $n = 1, 2, 3...$ trên màn hình, phím DATA DELETE: xóa một số liệu của phép đo, phím ALL DATA CLEAR: xóa toàn bộ số liệu của phép đo.

Vỏ thiết bị được thiết kế chống thấm nước, máy gọn nhẹ cho phép ta tiến hành ngoài thực địa dễ dàng, độ chính xác cao.

Kích thước: mẫu đo có đường kính 1cm.

Thao tác đo:

Bước 1: Xoay nút Power mở nguồn lên phía ON để mở máy

Lưu ý: Sau khi mở nguồn mẫu chưa được đặt vào kẹp mà dùng ngón cái và ngón trỏ tay phải đưa kẹp vào trạng thái đóng - hoạt động, giữ khoảng 3-5 giây cho đến khi nghe tiếng kêu bíp là máy đã khởi động xong.

Máy khởi động xong, trên màn hình xuất hiện hai dòng: $n = 0$ (thể hiện số thứ tự của phép đo), và hàng dưới là - - - (3 gạch ngang - thể hiện kết quả đo, đơn vị máy là SPAD)

Bước 2: Chọn mẫu đo rồi lau sạch và khô lá.

Bước 3: Dùng tay trái đưa mẫu vào kẹp sao cho phần mẫu cần đo vượt qua đèn trên kẹp, tay phải đóng kẹp, đợi khoảng 3-5 giây nghe tiếng kêu bíp là được. Kết quả được hiển thị trên màn hình. Cứ như vậy ta kẹp và đo các mẫu tiếp theo.

Chú ý:

- Khi đo xong ta xoay nút Power về OFF để tắt máy. Nếu không dùng máy trong thời gian dài thì phải tháo pin ra và vệ sinh máy.

Ứng dụng trong sinh lý học thực vật:

Thông qua thông số đo được cho phép đánh giá tình trạng cây trồng, ảnh hưởng của môi trường... để có chế độ tưới tiêu, dinh dưỡng và chăm sóc hợp lý.

Đây là phương pháp đo trực tiếp trên cây mà không phải ngắt lá do vậy rất thuận tiện và không ảnh hưởng tới cây trồng.

2.2.8. Buồng khí hậu nhân tạo

Một số đặc điểm:

Hệ thống có vỏ và bên trong được làm bằng thép không gỉ. Hệ thống tuần hoàn khí đảm bảo cho nhiệt độ đồng đều tối đa. Thể tích thực 800 lít, chiều cao 91cm.

Buồng có hệ thống gia nhiệt qua điện trở có bộ tản nhiệt bằng thép không gỉ, bộ điều khiển nhiệt độ cho nhiệt độ tới 80°C, bộ điều khiển độ ẩm từ 10% đến 98%. Hệ thống ánh sáng từ trên xuống, tạo độ ẩm bằng bộ nguồn siêu âm nên không sinh nhiệt trong buồng.



Hình 2.9. Buồng khí hậu nhân tạo E800 (AXYOS - Australia, 2004)

Điều khiển nhiệt độ: cung cấp bởi hệ thống phụ gia nhiệt và làm lạnh.

Điều khiển hệ thống: cung cấp bởi hệ thống phụ tạo ẩm và loại ẩm.

Nguồn sáng: điều khiển bởi một hệ thống công tắc, được tích hợp với các điều khiển khác.

Thao tác sử dụng:

OFF: Buồng không có điện áp cấp cho tới bất kỳ hệ thống phụ trợ nào (ngoại trừ lịch và đồng hồ thời gian được cấp bởi pin trên board mạch, được nạp bởi nguồn điện chính), màn hình tắt.

IDLE: Bộ điều khiển và các hệ thống phụ trợ của buồng được cấp nguồn nhưng không thực hiện bất kỳ công việc nào.

MANUAL: Nhiệt độ buồng sẽ đạt và duy trì giá trị nhiệt độ đặt, độ ẩm và trạng thái nguồn sáng mong muốn cho đến khi nhập giá trị mới thông qua bảng điều khiển phía trước.

TIMER: Buồng sẽ đạt và duy trì giá trị nhiệt độ, độ ẩm và trạng thái nguồn sáng như mong muốn trong khi giảm dần thời gian đã đặt. Khi hết thời gian thì các bộ điều khiển phụ trợ nhiệt độ, độ ẩm và nguồn sáng sẽ tắt.

PROGRAM: Buồng hoạt động theo nhiệt độ, độ ẩm và tình trạng nguồn sáng đã lựa chọn trong các bước với một chương trình nhiều bước.

** Các phím chức năng và màn hình hiển thị:*

- Người sử dụng dễ dàng sử dụng theo sơ đồ Menu bằng cách dùng các phím.

- Có 5 phím chức năng cho phép ta truy cập tất cả các chức năng. Phím chính giữa điều khiển nguồn, xác nhận dữ liệu vào và cấp độ Menu.

- Để bật hoặc tắt nguồn bấm và giữ phím ↵ khoảng 2 giây.

- Phải để ý tới các chỉ thị trên màn hình, và các phím chỉ được chấp nhận khi bấm và giữ khoảng 0,25 giây.

- Cách thay đổi các thông số:

+ Để mở khoá các phím, ta bấm và giữ đồng thời 2 phím **UP** và **DOWN**, khi đó sẽ có một thông báo trên màn hình, và ta thực hiện theo thông báo đó.

+ Phải mở khoá trước khi muốn thay đổi một thông số nào đó. Lúc đó con trỏ sẽ nhấp nháy tại các giá trị cho phép ta thay đổi thông số. Ta có thể dịch chuyển con trỏ sang các vị trí thích hợp bằng cách sử dụng phím **NEXT** hoặc **BACK**.

+ Khi người dùng muốn truy xuất vào phần Menu tiếp theo thì cần: Bấm phím **↵** và sau đó bấm **NEXT**, khi đó màn hình sẽ hiển thị chế độ cho phép ta nhập thông số. Hoặc ta có thể bấm phím **NEXT** vài lần cho đến khi con trỏ nhấp nháy xuất hiện trên màn hình, và lúc đó ta có thể nhập thông số.

- Cài đặt thông số:

+ Trước hết bật công tắc nguồn bằng cách bấm giữ phím **↵** trong 2 giây. Khi đó màn hình chỉ thị sẽ xuất hiện Menu chính.

+ Sau đó bấm **NEXT** để vào chế độ **OPERATION MANUAL**.

+ Rồi bấm đồng thời 2 phím **UP** và **DOWN** lúc đó con trỏ sẽ nhấp nháy cho phép ta lựa chọn các Mode khác nhau như:

+ **IDLE** : chế độ nghỉ

+ **MANUAL** : bằng tay

+ **TIMER** : thời gian

+ **PROGRAM** : chương trình

Khi màn hình hiển thị **OPERATION TIMER**, bấm phím **↵** để vào chế độ mình cần lựa chọn. Sau đó bấm **NEXT** màn hình sẽ chỉ thị **TEMPERATURE ### °C**.

Bấm **NEXT** tiếp theo để thay đổi giá trị độ ẩm HUMIDITY ##.# %R/H.

Bấm **NEXT** tiếp để chọn bật hoặc tắt đèn LIGHTING ON/OFF.

Bấm **NEXT** tiếp theo để thay đổi về ngày tháng DATE DD/MM/YYYY.

Lúc đó con trỏ sẽ nhấp nháy để ta nhập lại thời gian, sau khi nhập xong các thông số thì bấm phím ↵ để xác nhận.

Ta cần nhập chính xác thời gian để có thể chạy được chế độ thời gian TIMER hoặc chương trình PROGRAM.

Chú ý:

Các chế độ OPERATION MANUAL, OPERATION TIMER và OPERATION PROGRAM cũng tương tự như các bước trên.

Riêng chế độ PROGRAM ta có thể đặt được 4 chương trình, và tối đa 12 bước chương trình.

Theo các bước chương trình thì nhiệt độ có thể tăng dần từ thấp đến cao.

Ứng dụng trong sinh lý học thực vật: Buồng khí hậu nhân tạo cho phép nghiên cứu các đặc tính của cây trồng trong điều kiện vi khí hậu khác nhau. Có thể nghiên cứu khả năng nảy mầm của hạt giống; ảnh hưởng của nhiệt độ, của muối, của các chế độ dinh dưỡng vi lượng, của các chất có hoạt tính sinh học tới quá trình nảy mầm và sinh trưởng mầm, sinh trưởng cây con.

2.3. Các thiết bị khác

2.3.1. Tủ ẩm và tủ sấy

Một số đặc điểm:

Tủ sấy có tác dụng sấy mẫu thí nghiệm, dụng cụ thí nghiệm. Khoảng nhiệt độ của tủ sấy là 20°C - 300°C.

Tủ ấm có tác dụng giữ mẫu thí nghiệm ở một nhiệt độ nhất định trong khoảng thời gian xác định. Tủ ấm có vai trò quan trọng trong các thí nghiệm sinh học, cụ thể là các thí nghiệm về enzym. Khoảng nhiệt dao động của tủ ấm từ 20°C - 70°C.



Hình 2.10. Tủ sấy memmert



Hình 2.11. Tủ ấm memmert

Thao tác sử dụng:

Tủ ấm và tủ sấy có chung cách sử dụng được điều khiển bằng hai nút, thanh gạt có tác dụng điều chỉnh độ thoáng gió của tủ. Tủ có 3 chế độ sử dụng đó là chế độ theo chương trình thời gian, chạy theo thời gian hoặc chạy liên tục. Muốn cài đặt theo chương trình thời gian thì ta giữ phím **Set** và ấn nút mở nguồn rồi xoay nút nguồn để chọn một trong ba chế độ trên sau đó nhả phím **Set** ra và xoay núm vặn đến các thông số ta muốn cài đặt, việc cài đặt các thông số này ta cũng giữ phím **Set** và vặn núm xoay để chọn các thông số đó.

Chú ý:

Đối với tủ sấy khi ta sấy các mẫu tươi, mẫu có độ ẩm lớn ta phải mở hết độ thoáng khí của tủ để tránh hơi nước tụ trong tủ. Sau khi sấy mẫu xong thì ta phải để một thời gian cho tủ hạ về nhiệt độ môi trường thì ta mới bỏ mẫu sấy ra.

2.3.2. Máy ly tâm

Máy ly tâm là một loại máy được sử dụng nhiều trong các thí nghiệm sinh học. Có hai loại máy ly tâm: máy ly tâm thường và

máy ly tâm lạnh (cấu tạo tương tự máy ly tâm thường, được gắn thêm hệ thống làm lạnh).

Thao tác sử dụng:

Đầu tiên ta cắm nguồn điện vào sau đó bật công tắc nguồn bên phía trái của máy. Sau đó ấn nút **Open** màu đỏ để mở nắp máy lên đặt các mẫu cần ly tâm vào các vị trí đối xứng nhau (chú ý số lượng các mẫu ly tâm phải đặt đối xứng, ống chứa mẫu ly tâm phải là ống chịu lực, tốt nhất là dùng ống của hãng đi kèm theo máy). Sau đó đậy nắp lại và cài đặt các thông số: Ấn nút **Select** để chọn chương trình đo (có 0-9 chương trình) muốn chọn chương trình nào ta dùng nút xoay chuyển tới đó. Sau đó ấn **Select** chọn sang các chế độ tiếp theo như số vòng quay, thời gian quay, nhiệt độ, muốn thay đổi các thông số đó ta dùng nút xoay điều chỉnh. Khi cài đặt các thông số xong ta ấn nút **Start** để bắt đầu ly tâm, máy sẽ hiện thị số vòng quay và thời gian đếm ngược.



Hình 2.12. Máy ly tâm lạnh

Chú ý:

- Nếu máy ly tâm ở chế độ lạnh thì sau khi ly tâm ta phải mở cửa máy để cho hơi nước không bị ngưng tụ trong máy.

- Không được cho mẫu quá đầy vào ống ly tâm, tốt nhất là cho lượng dung dịch nhỏ hơn hoặc bằng 2/3 ống.

2.3.3. Tủ lạnh

Tủ lạnh có chức năng bảo quản mẫu thí nghiệm. Tủ lạnh có hai loại tủ lạnh đó là tủ lạnh sâu và tủ lạnh thường. Tủ lạnh sâu có nhiều loại mức nhiệt khác nhau như -20°C , -30°C , -80°C ... Tùy từng yêu cầu bảo quản của các loại mẫu thí nghiệm mà ta sử dụng tủ lạnh thường và tủ lạnh sâu có độ giới hạn nhiệt độ thấp phù hợp.

CHUẨN BỊ DUNG DỊCH TRONG THÍ NGHIỆM SINH LÝ HỌC THỰC VẬT

3.1. Nồng độ dung dịch và các cách biểu diễn nồng độ

Nồng độ dung dịch là một đại lượng đặc trưng cho dung dịch, thể hiện mối tương quan về lượng giữa chất tan và dung môi. Có nhiều cách thể hiện nồng độ dung dịch, trong nghiên cứu sinh lý thực vật thường sử dụng các kiểu nồng độ sau:

3.1.1. Nồng độ phần trăm (percent concentration, percent solution)

Nồng độ phần trăm khối lượng - khối lượng (w/w): số gam chất tan có trong 100g dung dịch:

$$C(\%w/w) = \frac{m_{ct}(g)}{m_{dd}(g)} \cdot 100\%$$

m_{ct} : khối lượng chất tan; m_{dd} : khối lượng dung dịch, trường hợp đơn giản nhất là $m_{dd} = m_{ct} + m_{dung\ môi}$. Đối với các axit đặc thường được biểu diễn nồng độ phần trăm theo khối lượng, ví dụ: H_2SO_4 98%, HCl 37%, H_3PO_4 65%...

Nồng độ phần trăm khối lượng - thể tích (w/v): số gam chất tan có trong 100ml, thường ghi là C%(w/v):

$$C(\%w/v) = \frac{m_{ct}(g)}{V_{dd}(ml)} \cdot 100\%$$

Nồng độ phân trăm thể tích - thể tích (v/v): số ml chất tan có trong 100ml dung dịch.

$$C(\%v/v) = \frac{V_{ct}}{V_{dd}} \times 100\%$$

Nồng độ ppm (parts per million): thường được dùng để biểu diễn nồng độ tương đối thấp của một chất nào đó, nồng độ 1ppm của một chất tan (thường là tan trong nước) là nồng độ $1/10^6$ của dung dịch. Nồng độ ppm được tính từ khối lượng chất tan (mg) với khối lượng dung dịch (mg).

$\text{ppm} = 10^6 \cdot \frac{m_{ct}}{m_{dd} + m_{ct}}$, thông thường khối lượng chất tan m_{ct} nhỏ hơn rất nhiều so với khối lượng dung dịch m_{dd} , do đó khi tính ppm người ta bỏ qua m_{ct} ở mẫu số, $\text{ppm} = 10^6 \cdot \frac{m_{ct}(\text{mg})}{m_{dd}(\text{mg})}$, ppm cũng được tính bằng khối lượng chất tan (mg) chia cho khối lượng dung dịch (kg). Khi dung dịch tan trong nước (nước là dung môi), 1(l) nước \approx 1(kg), khi đó $\text{ppm} = \frac{m_{ct}(\text{mg})}{V_{dd}(\text{l})}$.

Ngoài đơn vị ppm, người ta còn dùng ppb (parts per billion - một phần tỉ), ppt (parts per trillion - một phần tỉ tỉ), cách biểu diễn này ít dùng trong nghiên cứu sinh lý thực vật.

3.1.2. Nồng độ mol/lít (molarity - nồng độ phân tử gam, kí hiệu C_M, M)

Là số mol chất tan có trong 1 lít dung dịch. Đây là kiểu biểu diễn nồng độ dung dịch được dùng phổ biến trong các nghiên cứu sinh lý học thực vật với cách chuẩn bị đơn giản, tuy nhiên có một chú ý là nồng độ này phụ thuộc vào nhiệt độ:

$$C_M = \frac{n_{ct}(\text{mol})}{V_{dd}(\text{l})}$$

- Để chuẩn bị dung dịch theo nồng độ mol/l, thường sử dụng công thức tính nồng độ mol/l:

$$C_M = \frac{m_{ct}/M}{V_{dd}} = \frac{m_{ct}}{M \cdot V_{dd}} \rightarrow m_{ct} = C_M \cdot M \cdot V_{dd}$$

- Các bước để pha dung dịch theo nồng độ mol/l, giả sử pha 1 lít dung dịch NaOH 1M?

Hướng dẫn: có $C_M = 1$ (mol/l), $V_{dd} = 1$ (l), xác định $M_{NaOH} = 40$ (g), thay vào công thức trên ta có:

$$m_{ct} = C_M \cdot M \cdot V_{dd} = 1 \cdot 40 \cdot 1 = 40 \text{ (g)}$$

Các bước pha:

- + Cân chính xác $m_{ct} = 40$ (g) vừa tính được.
- + Cho vào bình định mức 1000ml, dâng nước đến ngần.
- + Cách pha các nồng độ 2M, 3M, 0,01M được thực hiện tương tự.

3.1.3. Nồng độ đương lượng (normality, kí hiệu C_N , N)

- Là số mol đương lượng chất tan (Đ) có trong 1 lít dung dịch hay số đương lượng gam chất tan có trong 1 lít dung dịch:

$$C_N = \frac{m_{ct}}{\text{Đ} \cdot V_{dd}}$$

- Để chuẩn bị dung dịch theo nồng độ đương lượng cũng giống như pha dung dịch theo nồng độ mol/l, và thường sử dụng công thức:

$$C_N = \frac{m_{ct}}{\text{Đ} \cdot V_{dd}} = \frac{m_{ct}}{\frac{M}{z} \cdot V_{dd}} = z \cdot \frac{m_{ct}}{M \cdot V_{dd}} \rightarrow m_{ct} = \frac{C_N \cdot M \cdot V_{dd}}{z}$$

Trong đó: Đ là đương lượng chất tan $\text{Đ} = M/z$, trong đó M: khối lượng phân tử của chất tan, z: hệ số đương lượng, z phụ thuộc vào bản chất của chất tan và phản ứng mà chất tan đó tham gia.

- Các bước để pha dung dịch theo nồng độ đương lượng, giả sử cần pha 1(l) dung dịch CuSO₄ 1N?

Hướng dẫn: có C_N = 1, M = 160 (g), V_{dd} = 1 (l), xác định z của CuSO₄; đối với muối thì z bằng tổng số hóa trị cation hoặc anion → z = 2. Thay vào công thức tính m_{et}:

$$m_{\text{CuSO}_4} = \frac{C_N \cdot M \cdot V_{\text{dd}}}{z} = \frac{1 \cdot 160 \cdot 1}{2} = 80 \text{ (g)}$$

Các bước pha:

+ Xác định hệ số đương lượng z của CuSO₄;

+ Cân chính xác m_{CuSO₄} = 80 (g);

+ Cho vào bình định mức 1000ml, dâng nước đến ngần.

- Đương lượng và hệ số đương lượng của một số chất thường dùng trong thí nghiệm sinh lý thực vật:

+ Đương lượng của một muối: bằng khối lượng phân tử của chất tan chia cho tổng số hóa trị (HT) gốc cation hoặc anion.

Tên muối	Công thức	∑ HT cation/anion	z	Đ
Natri clorua	NaCl	1	1	58,5/1 = 58,5
Natri cacbonat	Na ₂ CO ₃	2	2	106/2 = 53
Magie clorua	MgCl ₂	2	2	95/2 = 47,5
Canxi cacbonat	CaCO ₃	2	2	100/2 = 50
Bạc nitrat	AgNO ₃	1	1	170/1 = 170
Đồng sunphat	CuSO ₄	2	2	159, 5/2 = 79,75

+ Đương lượng của một axit hay một bazơ: bằng khối lượng phân tử chất đó chia cho số ion H⁺ hay OH⁻ tham gia phản ứng.

Đương lượng và hệ số đương lượng của một số axit				
Tên axit	Công thức	$\sum H^+$	z	Đ
Axit clorua hidric	HCl	1	1	36,5/1 = 36,5
Axit nitric	HNO ₃	1	1	63/1 = 63
Axit sunphuric	H ₂ SO ₄	2	2	98/2 = 49
Axit axetic	CH ₃ COOH	1	1	60/1 = 60
Axit photphoric	H ₃ PO ₄	3	3	98/3 = 32,66
Axit oxalic	H ₂ C ₂ O ₄	2	2	90/2 = 45
Đương lượng và hệ số đương lượng của một số bazơ				
Tên bazơ	Công thức	$\sum OH^-$	z	Đ
Natri hydroxit	NaOH	1	1	40/1 = 40
Kali hydroxit	KOH	1	1	56/1 = 56
Amoni hydroxit	NH ₄ OH	1	1	35/1 = 35
Magie hydroxit	MgOH	2	2	58/2 = 29
Canxi hydroxit	Ca(OH) ₂	2	2	74/2 = 37

+ Đương lượng của một chất oxi hóa, chất khử: đương lượng gam của một chất muối có tính chất oxi hóa hay tính khử bằng khối lượng phân tử của nó chia cho số electron nhận hoặc cho bởi chất đó trong phản ứng hóa học.

Đương lượng và hệ số đương lượng của một số chất oxi hóa				
Tên chất	Công thức	$\sum n_e$ nhận	z	Đ
Kali pemaganat	KMnO ₄	5 (trong môi trường axit)	5	158/5 = 31,6
Kali pemaganat	KMnO ₄	3 (trong môi trường trung tính)	3	158/3 = 52,6
Kali bicromat	K ₂ Cr ₂ O ₇	6	6	294/6 = 49

Đương lượng và hệ số đương lượng của một số chất khử				
Tên chất	Công thức	$\sum n_e$ cho	z	Đ
Muối Mohr's	$\text{FeSO}_4(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1	1	$392/1 = 392$
Hypo	$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	1	1	$158/1 = 158$
Axit oxalic	$\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2	2	$126/2 = 63$
Sắt sunphat	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1	1	$278/1 = 278$

3.1.4. Mối quan hệ giữa các loại nồng độ

Việc chuyển đổi cách biểu diễn nồng độ dung dịch sẽ thuận lợi hơn nếu kiểu nồng độ “giống nhau”, chẳng hạn như nồng độ mol/l và nồng độ đương lượng đều là số mol chất tan hoặc số mol đương lượng chất tan trong 1(l) dung dịch, do đó ta chỉ cần tìm biểu thức liên hệ giữa số mol chất tan và số mol đương lượng chất tan đó là việc chuyển đổi kết thúc. Tuy nhiên, việc chuyển đổi trở nên khó khăn hơn khi cách biểu diễn khác nhau, ví dụ dung dịch phần trăm theo khối lượng - khối lượng và dung dịch phần trăm khối lượng - thể tích, công việc phải làm đó là tìm ra mối liên hệ giữa thể tích và khối lượng dung dịch, mối liên hệ đó được thể hiện qua phương trình sau nhờ tỉ trọng của dung dịch:

$$V_{dd}(\text{ml}) = \frac{m_{dd}(\text{g})}{d(\text{g/ml})}$$

(chú ý đơn vị của V và d, nếu V (l), d(g/ml) thì biểu thức có dạng $V_{dd}(\text{l}) = \frac{m_{dd}(\text{g})}{1000 \cdot d(\text{g/ml})}$).

- Chuyển từ C(w/v) sang C(w/w):

$$C(\%w/w) = \frac{C(\%w/v)}{d(\text{g/ml})}$$

- Mối quan hệ giữa C_M và C(%w/w):

$$C_M = \frac{10 \cdot C(\%w/w) \cdot d}{M}$$

(d là tỉ trọng dung dịch có đơn vị g/ml, M là khối lượng mol phân tử của chất tan)

- Mối quan hệ giữa C_M và C_N : $C_N = C_M \cdot z$ (z: hệ số đương lượng)

- Mối quan hệ giữa ppm và các nồng độ khác:

+ ppm sang nồng độ phần trăm: $\text{ppm} = C(\%w/w) \cdot 10000$;

+ ppb sang ppm: $\text{ppm} = \text{ppb}/1000$;

+ Chuyển mg/l sang ppm:

$$\text{ppm} = \text{mg/kg} = 1000 \cdot \frac{m \text{ (g/l)}}{d \text{ (kg/m}^3\text{)}};$$

+ Chuyển mol/l sang ppm:

$$\text{ppm} = \text{mg/kg} = 10^6 \cdot \frac{C_M \text{ (mol/l)} \cdot M \text{ (g/mol)}}{d \text{ (kg/m}^3\text{)}}$$

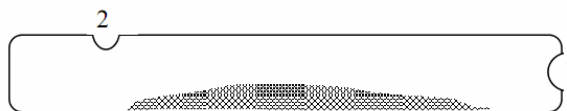
Khi chất tan trong dung môi là nước, ta có thể tính như sau:

$$\text{ppm} = 10^6 \cdot \frac{C_M \text{ (mol/l)} \cdot M \text{ (g/mol)}}{998,2 \text{ (kg/m}^3\text{)}} = 1000 \cdot C_M \cdot M$$

3.2. Chuẩn bị dung dịch trong nghiên cứu

3.2.1. Chuẩn bị dung dịch chuẩn

- Pha từ ống fixanal: Ống fixanal là ống thủy tinh trong chứa lượng chính xác của hóa chất cần pha, trên ống ghi rõ dung tích cần pha để thu được nồng độ xác định. Ví dụ: Ống fixanal đựng tinh thể $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ trên đó có ghi "N/10" có nghĩa khi pha vào bình định mức loại 1000ml sẽ thu được dung dịch axit oxalic có nồng độ 0,1N hay 0,05M.



Hình 3.1. Ống fixanal đựng các dung dịch chuẩn

Cách dùng: Các điểm 1, 2 trên hình 3.1 là các điểm cần phải chọc thủng bằng đũa thủy tinh hoặc đinh chữ thập để chuyển hóa chất vào bình định mức theo cách vị trí điểm 1 cho vào bình định mức, vị trí điểm 2 dùng bình tia đựng nước cất phun vào để đưa hết hóa chất trong ống xuống bình định mức.

- Một số dung dịch tiêu chuẩn: trong phòng thí nghiệm, một số dung dịch tiêu chuẩn thường dùng để chuẩn độ như H₂SO₄ 0,1N; KMnO₄ 0,1N. Từ các dung dịch có nồng độ 0,1N pha ra các dung dịch 0,05N; 0,02N; 0,01N. Để pha những dung dịch này, trước hết cần pha gần đúng nồng độ 0,1N (thường pha cao hơn một ít), rồi sau đó mới xác định lại nồng độ và điều chỉnh chúng bằng cách pha loãng.

Bảng 3.1: Pha dung dịch tiêu chuẩn thường dùng (nồng độ gần đúng)

Dung dịch tiêu chuẩn	Lượng hóa chất để pha thành 1 lít dung dịch
H ₂ SO ₄ 0,1N	2,8ml H ₂ SO ₄ đặc (d=1,84)
NaOH 0,1N	4,0g
KMnO ₄ 0,1N	3,16g

Phần lớn các hóa chất đã nêu trên không thể căn cứ khối lượng đã pha để tính ra nồng độ chính xác vì chúng chứa tỷ lệ nước ngậm không ổn định hoặc trong thành phần của chúng có lẫn thành phần khác như NaOH có chứa Na₂CO₃, KMnO₄ lẫn MnO₂. Người ta thường dùng những hóa chất có thành phần ổn định, có lượng nước trong tinh thể ổn định hoặc dễ dàng sấy khô, không bị hút ẩm hay bị oxi hóa trong quá trình pha chế, những chất này được gọi là *hóa chất gốc* dùng để kiểm tra các *dung dịch tiêu chuẩn* đã pha trên. Nồng độ hóa chất gốc được tính từ khối lượng đã lấy pha, sau đó tính nồng độ đương lượng và áp dụng công thức:

$$N_1 \cdot V_1 = N_2 \cdot V_2$$

Trong đó: V_1 là sốml dung dịch thứ nhất có nồng độ đương lượng N_1

V_2 là sốml dung dịch thứ hai có nồng độ đương lượng N_2 .

Cách kiểm tra:

+ Pha 100ml hóa chất gốc có nồng độ chính xác 0,1N.

+ Lấy 3 bình nón cỡ 250ml, cho vào mỗi bình chính xác 20ml dung dịch 0,1N của hóa chất gốc và chất chỉ thị.

+ Lấy dung dịch tiêu chuẩn đã pha cho vào buret. Chuẩn độ cho đến điểm tương đương (đổi màu chất chỉ thị).

- Các chất gốc dùng để kiểm tra nồng độ các dung dịch tiêu chuẩn:

Dung dịch tiêu chuẩn	Chất gốc	Số gam để pha 100ml chất gốc 0,1N	Bình nón có 20ml dung dịch chất gốc và chất chỉ thị	Màu chuẩn độ
H_2SO_4	Natri tetraborat $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$	1,910	2 giọt chỉ thị metyl da cam	Vàng sang đỏ nhạt
	TRIS Tris [hidroximetyl] aminetan $C_4H_{11}NO_3$	1,214	Như trên	Như trên
$NaOH$ 0,4N	Axit oxalic $H_2C_2O_4 \cdot 2H_2O$	0,630	3 giọt chỉ thị phenolphtalein	Xuất hiện màu hồng nhạt
$KMnO_4$ 0,1N	Axit oxalic	0,630	15ml H_2SO_4 đun nóng nhẹ ($80^\circ C$)	Xuất hiện màu hồng nhạt
Na_2SO_3 0,1N	Kali bicromat $K_2Cr_2O_7$ (sấy ở $120^\circ C$)	0,490	15ml KI 10%, 3ml HCl đặc ($d=1,19$), 150ml nước cất, chuẩn độ đến màu vàng nhạt thì thêm 2ml tinh bột 0,5%	Mất màu xanh

3.2.2. Pha dung dịch loãng từ dung dịch đặc

- Nồng độ được biểu thị bằng nồng độ M, N:

$$C_1V_1 = C_2V_2 = C_2(V_1 + V_n)$$

C_1, C_2 là nồng độ của dung dịch đặc và dung dịch loãng của chất cần pha

V_1, V_2 là thể tích của dung dịch đặc và dung dịch loãng

V_n là thể tích nước cần phải thêm vào V_1 ml dung dịch nồng độ C_1 để được V_2 ml dung dịch nồng độ C_2 .

Ví dụ: Cần lấy bao nhiêu ml dung dịch HCl 12M để được 250ml dung dịch HCl 0,1M?

Hướng dẫn: $C_1V_1 = C_2V_2$, thay số vào ta có: $12.V_1 = 0,1.250$
 $\rightarrow V_1 = 0,1.250/12 = 2,085$ ml.

- Nồng độ được biểu thị theo % khối lượng:

$$C_1 \cdot d_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot d_2 \cdot V_2 \rightarrow V_1 = \frac{C_2 \cdot d_2}{C_1 \cdot d_1} V_2$$

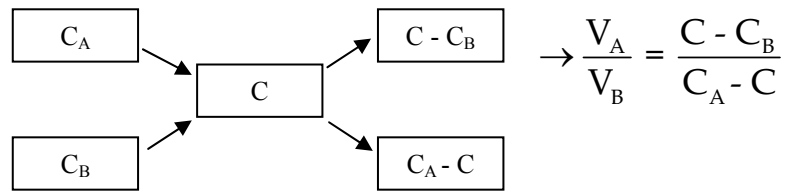
$C_1, C_2; d_1, d_2; V_1, V_2$: nồng độ, tỉ trọng, thể tích dung dịch đặc và dung dịch loãng cần pha.

Ví dụ: Cần bao nhiêu ml dung dịch H_2SO_4 98% ($d = 1,84$) để pha 1 lít dung dịch H_2SO_4 5% ($d = 1,00$) ?

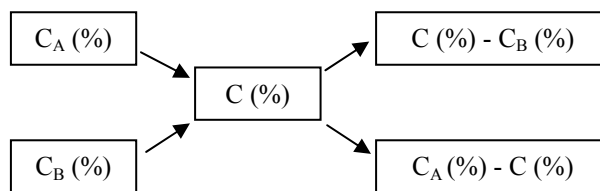
$$V_1 = \frac{C_2 \cdot d_2}{C_1 \cdot d_1} V_2 = \frac{5 \cdot 1,00}{98 \cdot 1,84} \cdot 1000 = 27,73$$
ml

- Sử dụng sơ đồ đường chéo trong pha loãng dung dịch:

+ Tính theo nồng độ M: gọi C_A, V_A là nồng độ ban đầu của dung dịch, C_B, V_B là nồng độ và thể tích của dung dịch sau có cùng chất tan, dung dịch cần pha có nồng độ và thể tích cần pha là C, V (giả sử $C_A > C > C_B$):



+ Tính theo nồng độ phần trăm: khi pha m_A gam dung dịch A có nồng độ C_A (%) với m_B gam dung dịch B có nồng độ C_B (%) thành dung dịch mới có nồng độ C (%) (giả sử $C_A > C > C_B$):



$$\rightarrow \frac{m_A}{m_B} = \frac{C (\%) - C_B (\%)}{C_A (\%) - C (\%)}$$

Khi hai dung dịch A và B có tỉ khối bằng nhau và bằng với tỉ khối của dung dịch cần pha (do tỉ khối thay đổi không đáng kể), $d_A = d_B = d$, khi đó thay $m = d.V$ vào hệ thức trên ta có:

$$\frac{m_A}{m_B} = \frac{d.V_A}{d.V_B} = \frac{C (\%) - C_B (\%)}{C_A (\%) - C (\%)}$$

hay
$$\frac{V_A}{V_B} = \frac{C (\%) - C_B (\%)}{C_A (\%) - C (\%)}$$

Trường hợp tỉ khối của hai dung dịch A, B khác nhau và khác với tỉ khối của dung dịch cần pha, ta thực hiện tương tự sơ đồ đường chéo cho trường hợp đó, rút ra hệ thức giữa thể tích và tỉ khối.

3.2.3. Chuẩn bị hỗn hợp làm lạnh

Trong 100g đá, nếu thêm muối sau đây sẽ hạ nhiệt độ thấp dưới 0°C

STT	Tên muối	Khối lượng cần (gam)	Nhiệt độ đạt được (-°C)
1	CaCl ₂ .6H ₂ O	41,0	-90
2	Na ₂ S ₂ O ₃ .5H ₂ O	67,5	-11
3	KCl	30,0	-11
4	NH ₄ Cl	25,0	-16
5	NH ₄ NO ₃	45,0	-17
6	NaNO ₃	59	-19
7	(NH ₄) ₂ SO ₄	62	-19
8	NaCl	33	-21
9	CaCl ₂ khan	82	-22
		125	-40
		143	-56

3.2.4. Pha hóa chất để rửa dụng cụ trong phòng thí nghiệm

STT	Thành phần dung dịch rửa	Loại chất bẩn
1	Dung dịch NaOH hoặc KOH 10%	Máu, protein
2	Dung dịch NaOH cồn nóng (120g NaOH hòa tan trong 120ml nước cất và dẫn đến 1000ml bằng cồn)	Mỡ
3	Axeton	Mỡ
4	Cồn-HCl (3ml HCl đặc + 100ml cồn)	Thuốc nhuộm
5	Dung dịch triosunfat (khoảng 3%)	Dầu iot, brom
6	Dung dịch axit oxalic (khoảng 2%)	MnO ₂ (có ở pin)
7	Dung dịch natri xitrat trong NaOH 10%	Tất cả
8	Dung dịch Na ₃ PO ₄ nóng 5%, 10%, 20%	Tất cả
9	Hỗn hợp crom (50g K ₂ Cr ₂ O ₇ hòa tan trong 100ml nước nóng, cho vào cốc sứ trộn với 1 lít H ₂ SO ₄ đặc) <u>Chú ý:</u> chuẩn bị hỗn hợp crom phải có kính bảo vệ và găng tay cao su.	Tất cả

THIẾT KẾ THÍ NGHIỆM

4.1. Phương pháp trồng cây trong dung dịch dinh dưỡng

4.1.1. Mục đích thí nghiệm

Trồng cây trong dung dịch dinh dưỡng là phương pháp tốt giúp cho việc nghiên cứu nhu cầu dinh dưỡng từng nguyên tố hay tập hợp các nguyên tố khoáng của cây, đồng thời phương pháp này còn giúp cho việc nghiên cứu ảnh hưởng của các điều kiện ngoại cảnh (ánh sáng, nhiệt độ,...) đến sự sinh trưởng, phát triển cây trồng, cùng với năng suất, phẩm chất và khả năng chống chịu của cây trồng.

Từ mục đích rộng lớn trong nghiên cứu đòi hỏi có sự kiểm soát chặt chẽ các điều kiện ảnh hưởng, nên kỹ thuật của phương pháp trồng cây trong dung dịch ngày càng được hoàn thiện để đáp ứng được nhu cầu thí nghiệm, thực nghiệm và thậm chí triển khai ra sản xuất. Các dung dịch dinh dưỡng ngày càng được nghiên cứu hoàn thiện và cho từng cây trồng cụ thể, phương pháp sử dụng dung dịch không ngừng cải tiến. Từ việc nhúng rễ vào dung dịch đến phun, dòng chảy, giá thể. Từ việc sử dụng chủ yếu nắp bình nay đã được sử dụng chất dẻo nhân tạo kèm theo các thiết bị kiểm tra tự động.

4.1.2. Dung dịch dinh dưỡng

Dung dịch dinh dưỡng là hỗn hợp các muối khoáng hòa tan trong nước. Chất khoáng bao gồm nguyên tố đa lượng và vi lượng.

Việc lựa chọn thành phần các chất khoáng phụ thuộc vào từng loài cây và mục đích thí nghiệm.

Khái niệm *dung dịch dinh dưỡng đầy đủ và không đầy đủ*, đó là các dung dịch chính đầy đủ các nguyên tố khoáng chính yếu và dung dịch pha thiếu 1 loại nguyên tố khoáng nào đó nhằm mục đích nghiên cứu vai trò, ảnh hưởng của chúng đến sinh trưởng.

Việc chuẩn bị dung dịch cần chú ý hòa tan muối khoáng theo thứ tự nhất định rồi đưa vào bình lớn hơn khuấy đều rồi dùng nước cất cho đến mức để đạt nồng độ quy định.

Một số dung dịch dinh dưỡng đầy đủ giới thiệu sau đây có thể sử dụng cho các cây trồng phù hợp. Mỗi dung dịch có dùng số lượng muối tính theo gam trong 1 lít nước.

- *Dung dịch Knop (g/lít)*

Ca(NO ₃) ₂	0,572
KNO ₃	0,143
KCl	0,071
KH ₂ PO ₄	0,143
MgSO ₄	0,143
FeCl ₃ .6H ₂ O (dd 5%)	1 giọt
Nồng độ 1,072 ‰	pH = 5,73

Dùng cho: lúa mì, đậu, cà chua, khoai tây, thuốc lá,...

- *Dung dịch Prianisnikov (g/lít)*

NH ₄ NO ₃	0,24
KCl	0,16
CaHPO ₄ .2H ₂ O	0,172
CaSO ₄ .2H ₂ O	0,344
MgSO ₄	0,060
FeCl ₃ .6H ₂ O	0,025
Nồng độ 0,747 ‰	pH = 6,35 - 6,50

Dùng cho: lúa nước, lúa mì, ngô,...

- Dung dịch Wrangell (mg/lít)

NH ₄ NO ₃	8,5
K ₂ SO ₄	8,5
NaHPO ₄	0,1; 0,6; 3,6
CaSO ₄ .2H ₂ O	70,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	20,0
CaCl ₂ .6H ₂ O	30,0
NaCl	20,0
Nồng độ 0,148%	pH = 5,8 - 6,8

Dùng cho: ngô.

- Dung dịch Richter (g/lít)

Ca(NO ₃) ₂	0,50
KNO ₃	0,20
KH ₂ PO ₄	0,20
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,25
10ml dung dịch dinh dưỡng này (0,5g FeCl ₃ + 1,56 chelaton III + 100ml H ₂ O cho vào 10 lít dung dịch dinh dưỡng).	
Nồng độ 1,051%.	pH = 4,8 - 5,2.

Dùng cho: lúa mì, đậu, ngô, đay, lúa nước, thuốc lá, khoai tây,...

- Dung dịch Hampe và Truffaut (g/lít)

KNO ₃	0,568
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	0,710
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0,142
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,284
Fe ₂ (SO ₄) ₃ .9H ₂ O	0,116
Nồng độ 1,424 ‰	pH = 6,4

Dùng cho: cà chua.

- Dung dịch Van Der Elst (g/lít)

KNO ₃	1,40
(NH) ₂ SO ₄	0,46
Ca(H ₂ PO ₄)	0,70
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,70
FeCl ₃ .6H ₂ O (dd 5%)	2 - 3 giọt
Nồng độ 2,401 ‰	pH = 4,8

Dùng cho: lúa nước.

- Dung dịch Detmer (g/lít)

Ca(NO ₃) ₂	1,0
KCl	0,25
KH ₂ PO ₄	0,25
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,25
FeCl ₃ .6H ₂ O (dd 5%)	1 giọt
Nồng độ 1,622 ‰	pH = 4,76 - 5,40

Dùng cho: ngô, đậu. (g/lít)

KNO ₃	1,0
Ca(PO ₄) ₂	0,50
CaSO ₄ .2H ₂ O	0,11
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,50
NaCl	0,50
FeCl ₃ .6H ₂ O (dd 5%)	1 giọt
FePO ₄ .4H ₂ O	0,11
Nồng độ 1,827 ‰	pH = 5,35 - 6,35

Dùng cho: đậu nành.

- Dung dịch Tritikov (g/lít)

Ca(SO ₄) ₂	0,464
KNO ₃	1,00
CaSO ₄ .2H ₂ O	0,50
MgSO ₄	0,50
Fe ₂ (SO ₄) ₃	0,31
Nồng độ 2,205	pH = 5,55

Dùng cho: ngô, lúa mỳ, đậu, lanh....

- Dung dịch Crone (g/lít)

KNO ₃	1,00
CaSO ₄ .2H ₂ O	0,50
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,50
Ca(PO ₄) ₂	0,25
Fe ₃ (PO ₄) ₂	0,25
Nồng độ 1,539‰	pH = 6,20 - 6,37

Dùng cho: ngô, lúa mỳ, đậu, thuốc lá, lúa nước....

- Dung dịch Alten (g/lít)

Ca(NO ₃) ₂	0,492
K ₂ SO ₄	0,523
Ca(H ₂ PO ₄) ₂	0,117
CaSO ₄ . 2H ₂ O	0,861
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,123
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,139
Fe ₂ (SO ₄) ₃	0,120
Nồng độ 1,339 ‰	

Dùng cho: ngô.

- Dung dịch Gile A Carrero (g/lít)

KNO ₃	0,5355
NaNO ₃	0,0715
H ₂ SO ₄	0,01225
KHPO ₄	0,357
CaCl ₂ .6H ₂ O	0,10
MgCl ₂	0,10
Na ₂ SO ₄	1,1575
Nồng độ ‰ 3,283	

Dùng cho: lúa nước.

- Dung dịch Chesnokov (g/lít)

NH ₄ NO ₃	0,2
KNO ₃	0,5
Ca(HPO ₄) ₂	0,55
MgSO ₄	0,3
ZnSO ₄	0,002
CuSO ₄	0,002
H ₃ BO ₃	0,029
MgSO ₄	0,019
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,022

- Dung dịch Hoagland (g/lít)

Ca(NO ₃) ₂	0,821
KNO ₃	0,506
KH ₂ PO ₄	0,136
MgSO ₄	0,120
Nồng độ: 1,583	pH = 4,57

Dùng cho: ngô.

- Dung dịch Merkenschlager (g/lít)

KNO ₃	1,00
Ca ₃ (PO ₄) ₂	0,25
CaSO ₄ .2H ₂ O	0,50
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,50
Fe ₃ (PO ₄) ₂	0,50
Nồng độ: 1,64 ‰	pH = 6,73

Dùng cho: ngô, lúa nước, lúa mạch, đậu, thuốc lá, khoai tây, cải đường...

- Dung dịch Helrigel (dùng cho trồng cây trên cát, liều lượng g/kg cát)

Ca(NO ₃) ₂	0,492
KH ₂ PO ₄	0,136
KCl	0,076
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,060
FeCl ₃	0,025

- Dung dịch Prianisnikov (dùng cho trồng cây trên cát, liều lượng g/kg cát)

NH ₄ NO ₃	0,024
CaHPO ₄ .2H ₂ O	0,172
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,600
KCl	0,150
CaSO ₄ .2H ₂ O	0,344
FeCl ₃	0,025

- Dung dịch Prianisnikov (g/lít dung dịch)

NH ₄ NO ₃	0,24
CaHPO ₄	0,172
MgSO ₄	0,06
KCl	0,16
Fe ₂ Cl ₆	0,025

- Dung dịch Belousov

Ca(NO ₃) ₂	1.11
KH ₂ PO ₄	0.36
K ₂ HPO ₄	0.43
MgSO ₄	0.054
NaCl	0.10
Fe ₂ Cl ₆	0.01

- Dung dịch Xinxadze

Ca(NO ₃) ₂	0,21
KNO ₃	0,80
CaSO ₄	0,28
Ca ₃ (PO ₄) ₂	0,70
MgSO ₄	0,50
Fe ₂ (SO ₄) ₃	0,25

Chú ý:

* Nếu muốn pha dung dịch không đầy đủ để nghiên cứu vai trò của một nguyên tố khoáng nào đó thì ta thay thế muối khoáng cho phù hợp.

Ví dụ: Dung dịch Knop thiếu nitơ ta thay Ca(NO₃)₂ bằng CaSO₄; thiếu kali thì thay KH₂PO₄ bằng NaH₂PO₄ và KCl bằng NaCl; thiếu photpho thì thay KH₂PO₄ bằng KCl.

* Các dung dịch đã nêu có thể được sử dụng cho các loại cây. Tuy nhiên muốn cây trồng sinh trưởng tốt, thường bổ sung các nguyên tố vi lượng.

Ví dụ:

+ Dung dịch Scharrer và Schropp (tính g/lượng nước đã nêu)

H ₃ BO ₃	1,1430
KF	0,3060
KI	0,1308
MnCl ₂ .4H ₂ O	2,1620
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,8800
Al ₂ (SO ₄) ₃ .18H ₂ O	2,4710
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,1965
H ₂ O	1 lít

Lấy 10ml dung dịch này cho vào 1 lít dung dịch các nguyên tố đa lượng.

+ Công thức Shropp (g/lít)

ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,01
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,01
Na ₂ SiO ₃	0,01
Al ₂ (SO ₄) ₃ .18H ₂ O	0,01
Na ₂ B ₄ O ₇	0,005
NaF	0,002
KI	0,002

Số lượng này bổ sung vào 1 lít dung dịch các nguyên tố đa lượng.

+ Công thức Van Schreven (g/lít)

H ₃ BO ₃	0,0008
MnSO ₄ .4H ₂ O	0,0015
Al ₂ (SO ₄) ₃ .16H ₂ O	0,0005
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,0005
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,000125
KI	0,00025
KF	0,00025

Số lượng này cho vào 1 lít dung dịch các nguyên tố đa lượng.

4.1.3. Chậu trồng cây

Chậu trồng cây phải có thể tích nhất định đảm bảo yêu cầu trồng loại cây định trước, đồng thời đảm bảo độ dinh dưỡng và làm giá đỡ cho cây trồng.

Nguyên liệu làm chậu phải tro về hóa học, thường là thủy tinh, chất dẻo nhân tạo, sứ, cũng có một số người sử dụng chậu kim loại có sơn lớp ở trong.

Khi làm thí nghiệm về ảnh hưởng của nguyên tố vi lượng có thể dùng chậu thủy tinh đặc biệt, còn lại thì có thể sử dụng thủy tinh thường hay sứ nhưng có lớp sơn tro hóa học hay lớp Parafin. Chậu bằng chất dẻo nhân tạo thuận lợi nhưng chú ý rửa sạch vì thành chậu thường dễ hấp thụ một số nguyên tố khoáng.

Hình dạng chậu bình thường hình trụ, vuông, chữ nhật,... có độ lớn thích hợp từng loại cây trồng và thời gian cần thay đổi dung dịch. Thường dùng loại 0,5 - 1 lít cho cây trồng ngắn ngày có thể thay đổi dung dịch nhiều lần hơn loại 5 - 10 lít.

Thường thì sơn chậu bằng hai lớp sơn: lớp trong màu tối để ngăn ánh sáng tới rễ và lớp ngoài sáng để phản xạ ánh sáng tránh cho chậu tăng nhiệt ngoài sáng.

Nắp chậu thường làm bằng nhựa PVC có cấu trúc phù hợp để giữ hạt, giữ cây, số lỗ tùy mục đích thí nghiệm. Để giữ cây có thể cấu trúc nắp bình dày và bổ sung một số bi nhựa/thủy tinh nhỏ để giữ cây. Những cây thân leo, thân cao có thể tạo thêm giá đỡ.

4.1.4. Trồng cây trong dung dịch dinh dưỡng

4.1.4.1. Dung dịch dinh dưỡng cố định

Phương pháp này thường sử dụng cho thí nghiệm ngắn ngày với loại cây nhỏ, không đòi hỏi kết quả quá chính xác. Chọn chậu với thể tích phù hợp loại cây, số lượng cây và thời gian cần thí nghiệm.

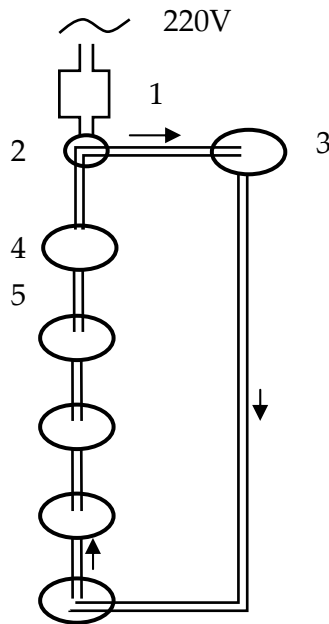
Chọn dung dịch dinh dưỡng, kiểm tra độ pH cho phù hợp.

Phương pháp này cũng có thể kết hợp thay đổi dung dịch sau 1 thời gian nhất định.

4.1.4.2. Dung dịch dinh dưỡng thay đổi

Phân biệt 2 loại: Thay đổi theo chu kỳ và thay đổi liên tục.

Để có thiết bị thay đổi dung dịch theo chu kỳ cần xác định rõ thời gian cần thay đổi (phụ thuộc vào cây, số lượng dung dịch ở bình/chậu trồng cây) sau đó thiết kế thiết bị này theo kiểu sơ đồ Borner.



Hình 4.1. Sơ đồ Borner

- | | |
|--------------------------|--------------------------------|
| 1. Bơm khí | 2. Điều chỉnh tốc độ dung dịch |
| 3. Chứa dung dịch | 4. Chậu trồng cây |
| 5. Ống nối giữa các chậu | |

Ngày nay nhiều nơi ứng dụng phương pháp trồng cây trong dung dịch dinh dưỡng thay đổi liên tục. Nhiều trạm, trại đã thiết kế bể dung dịch dinh dưỡng cao cho dòng chảy liên tục qua hệ thống máng hở có cây trồng và đã thu được kết quả khá tốt. Trong phòng thí nghiệm cũng có thể thiết kế tương tự bằng cách bố trí bình đựng dung dịch dinh dưỡng đặt cao hơn và để chảy xuống tốc độ chậm qua các chậu trồng cây nối ra ngoài hoặc qua hàng loạt các nắp hộp trồng cây và nhúng rễ vào máng nước chảy qua.

4.1.5. Trồng cây trong môi trường cát, sỏi, sơ dừa, hạt polyme có tưới dung dịch dinh dưỡng

Ngày nay, con người rất thường xuyên sử dụng môi trường cứng (hạt polyme, sơ dừa, cát, sỏi,...) để trồng nhiều loại cây trồng và thu được kết quả khá tốt.

Hạt nhựa polyme được sử dụng trồng cây trong điều kiện phòng thí nghiệm để nghiên cứu vai trò của nguyên tố khoáng và các loại dung dịch dinh dưỡng mới. Đây là môi trường sạch và có thể rửa đi rửa lại sạch sẽ nhiều lần và do đó có thể tiến hành các thí nghiệm khá chính xác.

Sơ dừa, cát, sỏi là những giá thể tốt để trồng cây. Bên cạnh việc tưới dung dịch dinh dưỡng có thể sử dụng phân bón. Môi trường này có thể sử dụng cho thí nghiệm trong chậu, trong nhà lưới để nghiên cứu chế độ nước, chế độ phân bón, quang hợp, hô hấp và ảnh hưởng của môi trường (nhiệt độ, ánh sáng, ô nhiễm không khí,...) đồng thời có thể nghiên cứu về năng suất và ngưỡng năng suất của một giống cây cụ thể.

4.1.6. Chọn cây trồng trong dung dịch

Cần chọn loại cây theo mục đích thí nghiệm. Nhìn chung, chọn hạt tốt, đều, mẩy, cho nảy mầm trong khay với nước cất. Khi rễ ra dài 3 - 4cm, chọn các mầm tốt, đều nhau đưa vào nắp chậu trồng cây có dung dịch dinh dưỡng. Số lượng cây trên một chậu xác định căn cứ vào loài cây, độ lớn của cây, tán lá, thể tích dung dịch dinh dưỡng, phương pháp trồng cây trong dung dịch cố định hay thay đổi, điều kiện ánh sáng, nhiệt độ, không khí,....

Trường hợp trồng cây trong giá thể polyme, sơ dừa, cát, sỏi thì ươm hạt nảy mầm nên dài hơn 3 - 4cm rồi trồng vào môi trường đã nêu. Cũng có thể gieo hạt thẳng vào sơ dừa, cát và đảm bảo độ ẩm đủ để chúng nảy mầm.

Khi chọn số lượng hạt cần trồng nên tính toán cẩn thận theo mục tiêu thí nghiệm: số lượng cây sẽ sử dụng trong quá trình thí nghiệm, số lần nhắc lại cần thiết, số cây còn lại để ra hoa kết trái, số cây cần dự trữ,... và đặc biệt là tỷ lệ nảy mầm của loại hạt thí nghiệm.

Khi trồng trong chậu chú ý dùng bông hóa học bọc nhẹ quanh cổ rễ và chèn vào các lỗ trên nắp chậu trồng cây cho chắc. Sau một

khoảng thời gian (10 - 15 ngày) nên lựa chọn những cây đều nhau để tiếp tục chăm sóc, loại bớt cây sinh trưởng kém và để lại số lượng cây cần thiết (bình thường là từ 1 - 3 cây/chậu).

Việc thông khí cho chậu trồng cây cần tiến hành hàng ngày, sử dụng ống bóp cao su hoặc hệ thống bơm khí tự động.

4.1.7. Chăm sóc cây trồng trong dung dịch dinh dưỡng

Trong quá trình trồng cây cần chú ý chăm sóc theo những nội dung sau:

- Đảm bảo nước dung dịch ổn định hàng ngày.
- Thay dung dịch dinh dưỡng theo kế hoạch.
- Thổi khí cho bình trồng cây bằng quả bóp cao su (thời gian 1 - 2 phút cho cây nhỏ và 3 - 5 phút cho cây lớn). Thổi khí cũng còn có tác dụng trộn dung dịch thay cho việc trộn khuấy dung dịch hàng tuần.
- Đảm bảo cây sạch bằng cách hàng tuần phun cây bằng ống phun nước nhỏ cầm tay.
- Chú ý bệnh úa vàng (chlorose)

Nếu thấy lá non bạc trắng cần đưa cây ra bình khác có chứa sắt (2ml FeCl_3 1% + 1 lít nước) để 2 - 3 ngày là khỏi bệnh. Nếu bệnh quá nặng, kéo dài thì sử dụng định kỳ sắt nồng độ cao hơn (0,1 - 0,2g Fe_2Cl_6 hay Fe_2SO_4 trên 1 lít nước) cho cây vào dung dịch trên 3 - 6 giờ là tối đa vì nếu để lâu hơn sẽ ảnh hưởng xấu đến rễ.

Có thể phun cây bằng dung dịch loãng, tốt nhất là xitrat sắt (0,01g/1 lít) vào buổi chiều.

Cần đảm bảo đồng thời độ pH trong giai đoạn này. Nếu dùng sắt selat, cây dễ hấp thụ loại này nhất, thường sử dụng Trilon B (muối Natri êtylen diamintetra axetic). Pha loại này bằng cách cho vào nước 25g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, thêm vào 30g Trilon B và KOH = 5% tới

pH = 5,5 và đưa dung dịch tới 1lít. Để dung dịch thoáng trong 1 ngày đêm, sau đó cho vào dung dịch dinh dưỡng: 1ml selat/1lít.

- Độ pH dung dịch thích hợp cho từng loại cây. Trong quá trình trồng cây, độ pH cũng luôn thay đổi. Do đó cần theo dõi chỉ số này và có thể điều chỉnh bằng H_2SO_4 0,2% và NaOH 0,2%. Độ pH thích hợp cho cây lúa là 4,5 - 5,5; ngô: 4,5 - 6,0; đậu: 4,8 - 5,0; cà chua: 5,0; bắp cải: 5,5 - 6,5; thuốc lá: 5,2 - 6,5; cà phê: 4,0; dứa: 3,0 - 4,0.

4.2. Phương pháp trồng cây trong chậu

Trồng cây trong chậu chứa đất nhằm mục đích tìm hiểu vai trò của phân bón, ảnh hưởng điều kiện môi trường (nhiệt độ, ánh sáng, độ ẩm, ô nhiễm,...) và nghiên cứu về năng suất cây trồng.

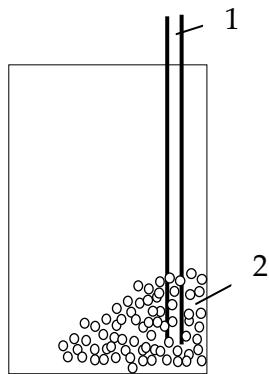
4.2.1. Chọn chậu trồng cây

Sử dụng chậu sành, sứ, thủy tinh, kim loại tráng men,... đáy có lỗ thủng nhỏ để thoát nước thừa, kích thước chậu tùy theo loại cây trồng, thường từ 20 - 50cm đường kính; chiều cao 25 - 40cm đủ chứa lượng đất cần thiết. Bên ngoài chậu nên sơn trắng để giảm nóng vào mùa hè, thiết kế giá đỡ cây có độ cao phù hợp.

4.2.2. Đất trồng cây

Chọn loại đất tơi xốp có độ ẩm đạt chuẩn (nếu thiếu cần bổ sung nước) đồng đều từ một địa điểm lấy đất.

Cho xuống đáy một ít sỏi, rồi để một đầu ống thủy tinh tưới nước. Nên có lớp cát mịn để chặn đất, cho lớp sỏi, cho đất đầy chậu cách miệng chậu 5 - 10cm, trên mặt cho thêm lớp cát mỏng. Khi dồn đất vào chậu chú ý đảm bảo độ tơi xốp.



1. Ống thủy tinh

2. Lớp sỏi

Phân trộn đều với đất, phân hữu cơ thì tùy loại cây mà chọn số lượng. Phân vô cơ thường trộn rất ít, rồi sau này có thể tưới bổ sung.

Số lượng phân vô cơ có thể bón vào đất tùy loại cây như sau:

(g/kg đất)

Loại cây	N	P ₂ O ₅	K ₂ O
Lúa, ngô	0,15	0,10	0,15
Đậu	0,10 - 0,15	0,10 - 0,15	0,1 - 0,15
Cà chua	0,10 - 0,15	0,15 - 0,20	0,15 - 0,20
Thuốc lá	0,20 - 0,25	0,15 - 0,20	0,16 - 0,20
Bắp cải	0,15 - 0,20	0,20 - 0,25	0,20 - 0,25

4.2.3. Trồng cây trong chậu

Chọn hạt đều, khỏe để gieo. Cũng có thể lấy hạt cho nhú mầm trước rồi gieo vào chậu.

Nên lấy bìa carton bằng miệng chậu, đục lỗ nhỏ theo các vị trí gieo hạt. Đặt bìa carton bao miệng chậu, lấy đũa thủy tinh hay đũa tre đục lỗ để gieo hạt với độ sâu cần thiết. Thường thì gieo hạt ở độ sâu 1 - 2cm tùy loại cây. Sau đó gieo hạt và phủ đất lên miệng các lỗ nhỏ.

Số hạt gieo thường nhiều hơn số lượng cần thiết để sau này bỏ bớt cây kém sinh trưởng và để sử dụng trong quá trình nghiên cứu.

Gieo xong hạt, đem các chậu để vào nhà lưới, nhà kính để chăm sóc.

4.2.4. Chăm sóc cây trong chậu

Cây trồng trong chậu cần được đảm bảo chế độ nước đầy đủ thường xuyên. Độ ẩm cần đạt của đất trong chậu từ 60 - 80% ẩm dung tuyệt đối (trước khi trồng cây nên xác định độ ẩm đất và ẩm dung tuyệt đối).

Đảm bảo độ thoáng khí trong đất bằng cách làm đất tơi xốp ở mức vừa phải, kết cấu đất hợp lý, trên bề mặt chậu rải một lượt cát mịn để tránh thoát nước nhiều.

Đảm bảo chế độ ánh sáng, nhiệt độ hợp lý.

Thường xuyên kiểm tra sự sinh trưởng, trạng thái cây, sâu bệnh...

Thí nghiệm gây hạn có thiết kế riêng một khu vực, có thiết kế tránh mưa và sương đêm nhưng vẫn đảm bảo đủ ánh sáng và không khí. Thí nghiệm này được theo dõi nghiêm ngặt hàng ngày.

4.3. Phương pháp trồng cây ngoài đồng ruộng

Thí nghiệm trồng cây ngoài đồng ruộng tiếp xúc gần nhất với điều kiện tự nhiên có thể tạo điều kiện để nghiên cứu về chất lượng đất trồng, vấn đề thời vụ gieo trồng, vai trò của chất khoáng, vai trò của các điều kiện khí hậu thời tiết, đồng thời tìm hiểu được mối quan hệ giữa các quá trình sinh lý của cây với điều kiện môi trường.

4.3.1. Chọn khu đất thí nghiệm

Nếu chọn được khu đất thí nghiệm đạt yêu cầu, thí nghiệm sẽ thành công. Khu đất phải thoáng, bằng phẳng. Chất đất đồng đều. Tùy mục đích mà có thể chọn đất thịt, đất cát pha, đất bạc màu,... và cần nắm lai lịch đất rõ ràng (chất đất, độ phì, độ ngập nước,

mức bón phân, năng suất,...). Khu đất thí nghiệm cần dễ dàng bố trí hệ thống tưới tiêu và có vành đai bảo vệ.

4.3.2. Bố trí ô thí nghiệm

Hình dạng các ô thí nghiệm nên có hình chữ nhật và xếp theo hướng bắc - nam để có được độ chiếu sáng thuận lợi nhất.

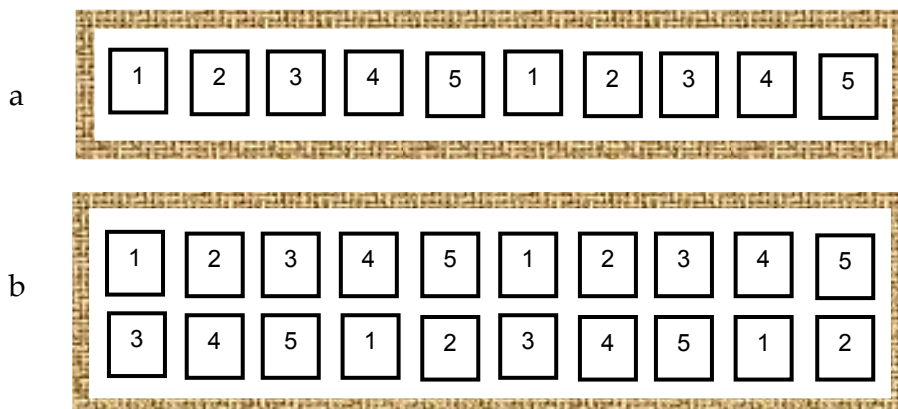
Độ lớn của ô thí nghiệm nhỏ nhất 1m^2 và càng lớn thì độ chính xác thí nghiệm càng cao.

Giữa các ô thí nghiệm nên để một khoảng trống rộng khoảng $0,5\text{m}$ để đi lại và giúp thoáng khí.

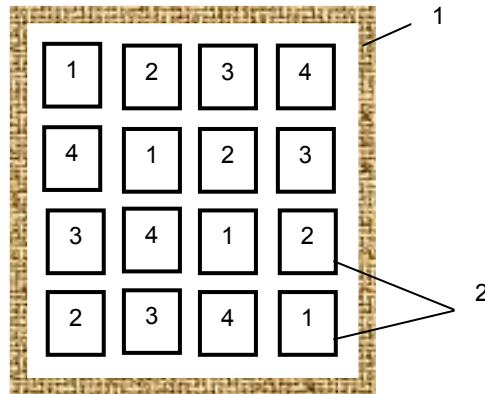
Số lần nhắc lại là vấn đề quan trọng trong thí nghiệm đồng ruộng. Số lần nhắc lại thí nghiệm tối thiểu 4 lần. Đối với thí nghiệm chia ô nhỏ nên với số lần nhắc lại lớn hơn.

Việc bố trí các ô thí nghiệm phụ thuộc vào hình dạng đất ở khu vực thí nghiệm và số mẫu thí nghiệm cùng với số lần nhắc lại của chúng.

Chẳng hạn, nếu khu vực thí nghiệm hình vuông hay chữ nhật tương đối phẳng và đồng đều về chất đất, có thể bố trí 4 mẫu thí nghiệm theo 4 lần nhắc lại như hình 4.3. Trường hợp khu đất thí nghiệm hình dài hẹp nên bố trí theo hình 4.2.a, hình dài rộng hơn bố trí như hình 4.2.b.



Hình 4.2. Bố trí thí nghiệm khu đất hình dài



Hình 4.3. Bố trí thí nghiệm khu đất hình vuông
1 - Lớp bảo vệ, 2 - Ô thí nghiệm

4.3.3. Làm đất và bón phân

Cần làm đất tương đối nhỏ, mịn, đảm bảo kết cấu cần thiết để thoát khí, giữ được nước và giúp cho vi sinh vật dễ dàng phân hủy mùn và phân hữu cơ. Chú ý nhặt rễ cỏ sạch và tạo mặt phẳng cần thiết cho khu vực thí nghiệm.

Nên sử dụng mùn và phân hữu cơ mục để tăng độ xốp của đất. Phân vô cơ cần thiết nhất là nito, photpho và kali. Phân nito thường dùng: NaNO_3 , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4NO_3 , $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$, CaCN_2 với liều lượng trung bình 40 - 60kgN/ha hay 4,5 - 6,0gN/1m² đất. Phân photphat thường sử dụng $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ (chứa 14 - 15% P_2O_5), sử dụng 60kg/ha hay 6g P_2O_5 /1m² đất. Phân kali thường sử dụng KCl, K_2SO_4 hoặc các chất khoáng tự nhiên: xivinit KCl.NaCl (chứa 10 - 24% K_2O), carnalit KCl.MgCl₂ (chứa 16 - 17% K_2O). Trung bình trên 1ha sử dụng 60kg K_2O hay 6g/1m². Các chất vô cơ khi sử dụng nên lưu ý vì các chất này hấp thụ nước khá mạnh (như NH_4NO_3 , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ không nên để hở 2 - 3 ngày mà phải để trong bình hút ẩm) và khả năng có thể xảy ra phản ứng hóa học không cần thiết.

Phân hữu cơ cần thiết như phân chuồng, bùn. Trung bình sử dụng 40 tấn phân chuồng/ha (4kg/m²) 40 - 60 tấn bùn/ha. Phân

chuồng được coi là phân tổng hợp vì là nguồn gồm N, P, K rất cần cho nền đất bạc màu, nếu sử dụng phân chuồng cho đất bạc màu sẽ cải thiện nhiều về tính chất vật lý, độ ngậm nước, hệ vi sinh vật và lượng CO₂ cần thiết gần cây.

Hiện nay có nhiều loại phân bón được sản xuất: phân vi sinh, phân mùn, phân hỗn hợp,... có thể sử dụng theo hướng dẫn để thực hiện các thí nghiệm đồng ruộng.

Bón phân hữu cơ thường bón sâu 10 - 20cm tùy loại đất (đất cát nông hơn, đất thịt sâu hơn). Bón phân khoáng có thể ở 2 dạng: dạng khô bón theo dãy giữa hai hàng cây rồi lấp đất hoặc ở dạng pha nước rồi tưới vào gốc (trường hợp này chú ý nồng độ thấp và thời kỳ sử dụng).

4.3.4. Chọn hạt giống và gieo hạt

Chọn hạt theo 3 tiêu chí: tỷ lệ nảy mầm, sức nảy mầm, khối lượng 1000 hạt.

Để xác định tỷ lệ nảy mầm: chọn 100 hạt trung bình cho vào đĩa petri hay khay chuyên dụng lót giấy thấm và đặt hạt bằng bông hay giấy thấm 2 lượt. Để ở nhiệt độ 26°C trong phòng hay trong tủ ẩm, microclima. Theo dõi hàng ngày trong khoảng 3 - 5 ngày để biết tỷ lệ nảy mầm, độ nảy mầm tập trung ở những ngày đầu (sức nảy mầm). Khối lượng 1000 hạt: có thể cân 100 hạt từng mẫu giống (3 - 4 lần nhắc lại) rồi đánh giá kết quả.

Sau khi xác định được mẫu giống có tỷ lệ nảy mầm và sức nảy mầm lớn sẽ chọn để gieo.

Trước khi gieo nên tính số lượng hạt cần thiết cho mỗi ô thí nghiệm và toàn bộ khu vực thí nghiệm. Chọn hạt lành lặn, đều, khỏe để gieo.

Độ sâu gieo hạt phụ thuộc loại hạt to nhỏ khác nhau. Hạt nhỏ nên gieo sâu 0,5 - 1cm (hạt rau, hạt cải, hạt cà rốt,...), hạt to hơn (ngũ cốc) gieo sâu 2 - 4cm. Có thể gieo hàng thẳng hay chéo hoặc rải tự do.

Để gieo đều khoảng cách nên gieo theo hàng. Số lượng hạt nên gieo nhiều hơn số cần thiết để sau này tỉa bớt trong quá trình thí nghiệm.

Khoảng cách giữa các cây có thể tham khảo bảng sau:

Cải bắp	50 × 50 (cm)
Cải canh	35 × 20 (cm)
Cà rốt	25 × 15 (cm)
Củ cải	20 × 10 (cm)
Xà lách	25 × 15 (cm)
Lúa	20 × 25 (cm)
Đậu	35 × 20 (cm)

Rãnh gieo hạt nên tưới nước trước khi gieo để hạt dễ nảy mầm. Các loại hạt đậu, lạc có thể ủ cho nảy mầm trước khi gieo.

4.3.5. Chăm sóc cây trồng

Ngay sau khi gieo hạt cần theo dõi sự can thiệp của chuột, chim. Nhất là khi nhú mầm khỏi mặt đất là lúc nhạy cảm nhất. Nên có phương án chống chuột, chống chim truyền thống, không nên dùng thuốc hóa học.

Khi cây có lá thật chú ý chăm sóc đầy đủ chế độ nước, nhổ cỏ, bón bổ sung phân (nếu cần) và thực hiện các phép đo theo kế hoạch nghiên cứu.

Phòng trừ sâu bệnh là một nội dung cần được chú ý khi thí nghiệm trồng cây ngoài đồng ruộng. Công việc này tiến hành theo chuyên đề riêng với phương châm bảo vệ cây trồng tổng thể khu vực gieo trồng, sử dụng thuốc bảo vệ thực vật đảm bảo hợp lý. Bên cạnh sâu bệnh thông thường, các thí nghiệm cần chú ý bảo vệ khỏi chuột, chim,... nhất khi ra hoa kết quả và khi quả chín.

4.4. Phương pháp lấy mẫu

4.4.1. Mẫu trung bình

Trong nghiên cứu sinh lý học thực vật thường phải làm rõ nội hàm của quá trình trao đổi chất, trạng thái, sản phẩm tạo thành,... của từng cơ quan, bộ phận, tế bào và so sánh chúng trong phạm vi các cây riêng biệt, các giống khác nhau. Trong khi đó việc gieo trồng thường cùng một lúc nhưng việc sinh trưởng của từng cá thể lại không đồng nhất, bên cạnh đó sự sinh trưởng của từng bộ phận của cây lại càng không đồng thời. Vì thế việc lấy mẫu để nghiên cứu là một vấn đề hết sức quan trọng và thường được quan tâm sâu sắc.

Mẫu trung bình là khái niệm thường được dùng đến, ám chỉ một lượng mẫu đại diện có giá trị trung bình để đem ra nghiên cứu. Thường trong nghiên cứu gặp phải trường hợp có một số ít cây sinh trưởng khác lạ với đa số, những cây này nên loại khỏi việc lấy mẫu vì chúng không phải là đại diện cho ô thí nghiệm.

4.4.2. Chọn mẫu trung bình và số lượng mẫu

Việc chọn mẫu trung bình cho từng bộ phận của cây có khác nhau. Việc này liên quan đến mục đích thí nghiệm và từng loại cây thí nghiệm.

Chọn mẫu lá thí nghiệm thường phải để ý tới tầng lá vì chúng sinh trưởng cùng thời kỳ sẽ có những đặc điểm để so sánh với nhau. Nếu mục đích thí nghiệm cho phép lấy tất cả các tầng lá thì không cần chú ý vấn đề trên. Lấy mẫu thí nghiệm bằng cách chia từng ô thí nghiệm ra 4 phần nhỏ (theo đường chéo) sao cho mỗi phần có ít nhất 5 cây đủ điều kiện đại diện cho cả ô thí nghiệm. Sau đó tiến hành lấy mẫu lá về phòng thí nghiệm hay tiến hành đo các chỉ tiêu trực tiếp tại ruộng. Lượng mẫu lá tùy mục đích thí nghiệm.

Chọn mẫu quả cần chú ý đến độ chín của quả sao cho khi đem phân tích, so sánh chúng phải có cùng mức độ chín. Lấy mẫu

trung bình ở những cây có kích thước nhỏ trồng theo ô như ở phần trên. Nếu cây lớn thì có thể chọn 10 cây ở các vị trí khác nhau trong ruộng để lấy mẫu. Lượng quả tùy mục đích thí nghiệm.

Chọn mẫu hạt cũng lưu ý mức độ chín của hạt, hạt lấy từ thân hay cành,... để nghiên cứu. Mẫu trung bình lấy theo mục tiêu thí nghiệm, thu hạt từ các ô thí nghiệm như trên, sau đó trộn đều và rải ra giấy và chia theo hình chéo để lấy một phần đem phân tích. Lượng hạt lấy theo yêu cầu của thí nghiệm.

CÁC PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU CHẾ ĐỘ NƯỚC VÀ KHẢ NĂNG CHỊU HẠN CỦA THỰC VẬT

5.1. Xác định áp suất thẩm thấu của mô thực vật

5.1.1. Nguyên tắc thí nghiệm

Trong dịch bào ở không bào chứa các chất vô cơ, hữu cơ tạo lực thẩm thấu nhất định. Có thể xác định được áp suất thẩm thấu này bằng cách tìm nồng độ đẳng trương môi trường (nồng độ pha đã biết có giá trị tương đương với nồng độ của dịch bào) sau đó tính áp suất thẩm thấu dịch bào theo công thức Van Hoff $P = CRTi$, trong đó P - áp suất thẩm thấu (tính bằng atm) C - nồng độ dung dịch đẳng trương (M), R - hằng số khí (0,0821), T - nhiệt độ K, i - hệ số điều chỉnh sự phân ly ($i = 1 + \alpha (n - 1)$), α - hằng số điện ly, n - số ion phân ly). Đối với đường sacarosa $i = 1$. Đối với NaCl hệ số i như sau:

NaCl (M)	1	0,8	0,7	0,6	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1	0,01
i	1,62	1,64	1,66	1,68	1,70	1,73	1,75	1,78	1,83	1,93

Trị số α của NaCl và CaCl₂ như sau:

NaCl		CaCl ₂	
Nồng độ (M)	α	Nồng độ (M)	α
0,02	0,92	0,01	0,88
0,05	0,88	0,03	0,82
0,10	0,83	0,05	0,77
0,20	0,78	0,10	0,74
0,30	0,75	0,15	0,71
0,40	0,73	0,20	0,68
0,50	0,70	0,25	0,65
1,00	0,62	0,50	0,59

Tùy mẫu thí nghiệm là dịch tế bào có màu hay không có màu mà lựa chọn phương pháp đo thích hợp.

5.1.2. Xác định áp suất thẩm thấu tế bào bằng phương pháp gây co nguyên sinh (theo Nguyễn Duy Minh và CS)

Trong trường hợp này tìm nồng độ đẳng trương bằng cách chuẩn bị dãy nồng độ dung dịch đường sacaroza hay NaCl từ 0,1 - 0,7M gây co nguyên sinh các lát cắt thực vật rồi tìm nồng độ đẳng trương là nồng độ nằm giữa mẫu hơi co và không co nguyên sinh. Khi cần nghiên cứu chính xác hơn nữa thì tiến hành 2 bước thí nghiệm: bước 1 - tìm nồng độ đẳng trương ở các dung dịch cách nhau 0,1M; bước 2 - tìm nồng độ đẳng trương ở các dung dịch cách nhau 0,02M đoạn giữa 2 nồng độ trước đây nhằm xác định nồng độ đẳng trương.

Ví dụ bước 1 tìm được nồng độ đẳng trương giữa khoảng 0,3M và 0,4M thì bước 2 sẽ tìm nồng độ đẳng trương trong các dung dịch 0,30 - 0,32 - 0,34 - 0,36 - 0,38 - 0,40M.

* Thiết bị, vật liệu: kính hiển vi, đĩa đồng hồ, mẫu thí nghiệm có màu như: củ hành có màu, thái lát tía, dao lam, kẹp.

Hóa chất: dung dịch đường hay NaCl 0,1 - 0,2 - 0,3 - 0,4 - 0,5 - 0,6 - 0,7M, nước cất

Pha dung dịch bằng cách pha dung dịch 1M sau đó pha loãng dần để có nồng độ cần thiết.

* Cách tiến hành:

+ Cho các dung dịch vào đĩa đồng hồ theo thứ tự từ nồng độ cao đến thấp, chú ý rửa và lau pipet sau mỗi lần nếu dùng chung.

+ Dùng dao lam cắt lát mẫu thực vật có màu bỏ vào đĩa 2 - 3 lát thứ tự cách nhau 5 - 10 phút rồi ngâm 20 - 30 phút.

+ Xem dưới kính hiển vi các mẫu lát cắt trong 1 giọt dung dịch tương ứng dung dịch ngâm chúng. Phát hiện dung dịch đẳng trương theo nguyên lý nêu trên.

+ Tính áp suất thẩm thấu theo công thức Van Hoff.

5.1.3. Xác định áp suất thẩm thấu tế bào theo sự thay đổi nồng độ dung dịch (theo Sardacov)

Trong trường hợp này tìm nồng độ đẳng trương bằng cách tìm dung dịch chứa mẫu không thay đổi nồng độ so với dung dịch đường/muối ban đầu.

* Thiết bị, vật liệu: 2 dãy ống nghiệm, khoan nút chai 1cm.

Vật liệu: mô thực vật (không cần có màu).

Hóa chất: xanh metylen, đường sacaroza 0,10 - 0,15 - 0,20 - 0,25 - 0,30 - 0,35 - 0,40 - 0,45 - 0,50M, hoặc dung dịch CaCl₂, NaCl nồng độ thấp bằng nửa.

* Cách tiến hành:

+ Cho dung dịch đường/muối vào các ống nghiệm theo từng dãy nồng độ từ cao xuống thấp tạo các cặp ống nghiệm có cùng nồng độ dung dịch ở 2 dãy.

+ Dùng khoan nút chai khoan các lá và bỏ vào mỗi ống nghiệm ở dãy 2 đều 15 - 20 bản lá. Đậy nút ống nghiệm và thi thoảng lắc nhẹ ống nghiệm và để 1 - 1,5 giờ thì vớt lá ra.

+ Cho vào dãy 2 mỗi ống nghiệm 1 - 2 tinh thể xanh metylen (không cho nhiều xanh metylen vì sẽ làm ảnh hưởng nồng độ dung dịch).

+ Hút dung dịch màu ở mỗi ống nghiệm ở dãy 2 nhỏ vào ống nghiệm ban đầu cùng nồng độ ở dãy 1 nhẹ nhàng, nếu giọt màu đứng yên, không nổi lên và không chìm xuống thì chứng tỏ dung dịch ngấm lá không thay đổi nồng độ hay đó là dung dịch có nồng độ tương đương nồng độ dung dịch tế bào (nồng độ đẳng trương).

Muốn chính xác hơn có thể chia nhỏ tiếp khoảng nồng độ giữa 2 giá trị tương đương như thí nghiệm trước và tiếp tục tìm nồng độ đẳng trương chính xác hơn.

+ Tính áp suất thẩm thấu tế bào/mô theo Van Hoff.

5.1.4. Xác định áp suất thẩm thấu mô thực vật bằng phương pháp so sánh tỷ trọng dung dịch (theo Vũ Văn Vụ và CS)

Trường hợp này tìm nồng độ đẳng trương bằng cách so sánh tỷ trọng dịch chiết từ mẫu thực vật với dãy dung dịch đường hay muối đã biết bằng cách nhỏ dịch chiết vào dãy dung dịch đường/muối (theo cách đã làm ở thí nghiệm trước).

* Thiết bị, vật liệu: dụng cụ ép dịch thực vật, nôi cách thủy micropipet, ống đong, giấy lọc, ống nghiệm và giá ống nghiệm.

Vật liệu: mẫu lá, rễ,...

Hóa chất: dung dịch sacaroza/muối với các nồng độ như ở thí nghiệm trước.

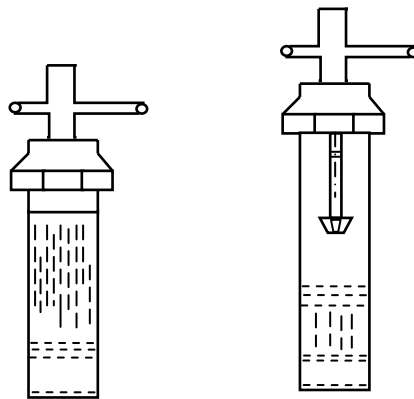
* Cách tiến hành:

+ Rút dịch bào: vì chất nguyên sinh sống có tính thấm chọn lọc nên trước khi rút dịch bào cần giết chết tế bào, có 2 cách giết tế bào bằng nhiệt độ cao hoặc nhiệt độ thấp.

Trường hợp sử dụng nhiệt độ thấp: tạo nhiệt độ thấp -30°C đến -20°C bằng nước đá trộn với muối ăn, lấy 2 - 5g mẫu lá cho vào ống nghiệm đậy kín đưa vào bình lạnh giữ trong 2 giờ lá sẽ chết và màu trong dễ phân biệt.

Trường hợp sử dụng nhiệt độ cao: cho mẫu lá vào ống nghiệm và đun cách thủy ở $90 - 100^{\circ}\text{C}$ trong 20 phút (sử dụng nhiệt độ cao thường hay làm thủy hóa keo tế bào, làm loãng dịch bào, nên sử dụng nhiệt độ thấp thì tốt hơn).

+ Đặt lá vào dụng cụ ép lấy dịch chú ý ép với lực đều nhau thu được dịch chính xác để so sánh. Cho dịch vào ống nghiệm tương ứng.



Hình 5.1. Dụng cụ ép dịch

+ Dùng pipet lấy dịch nhỏ vào các ống nghiệm chứa dung dịch đường/muối và tìm nồng độ dung dịch, ở đó khi đưa giọt dịch mẫu vật vào sẽ đứng yên (thí nghiệm cũng có thể làm 2 bước như đã nêu ở trên).

+ Tính áp suất thẩm thấu theo công thức Van Hoff.

5.2. Xác định cường độ thoát hơi nước ở lá

Sự thoát hơi nước ở lá là sự bay hơi nước từ bề mặt lá qua khí khổng vào không khí. Thoát hơi nước là quá trình sinh lý diễn ra khi lá ở trong trạng thái trao đổi chất bình thường. Cường độ

thoát hơi nước có thể đo được khi ta biết lượng nước bay hơi từ lá trong đơn vị thời gian và trên một đơn vị diện tích lá. Việc đo đạc này có thể tiến hành theo 2 phương pháp: Phương pháp Ivanốp và phương pháp sử dụng máy đo cường độ thoát hơi nước.

5.2.1. Phương pháp Ivanốp

Có thể xác định lượng nước bốc hơi khỏi lá trong thời gian ngắn khi lá còn đang trao đổi chất bình thường bằng cân điện.

* Thiết bị, vật liệu: cân điện hoặc cân kỹ thuật (chính xác đến 10^{-4} và 10^{-2}), dao, kéo, giấy đo diện tích, đồng hồ, lá cây thí nghiệm.

* Cách tiến hành:

- Cắt cuống lá thí nghiệm rồi đem cân lá lần 1. Để lá trong phòng cho tự bốc hơi nước, sau 30 - 40 phút cân lần 2. Số lần nhắc lại của thí nghiệm nên lớn cho chính xác. Tính hiệu số khối lượng lá cân được giữa 2 lần cân. $P = P_1 - P_2$.

- Đo diện tích lá: có 2 cách đo

+ Cách 1: bằng máy đo diện tích lá. Dùng máy này quét toàn bộ diện tích lá (xem phần sử dụng máy đo diện tích lá) rồi ghi vào thẻ nhớ trên máy kết quả đo được.

+ Cách 2: bằng cách cân giấy có diện tích bằng diện tích lá sau đó tính theo tỷ lệ khối lượng để ra diện tích lá $S = \frac{b}{a}$, trong đó S là diện tích lá (dm^2); b - khối lượng giấy vẽ theo hình lá; a - khối lượng 1dm^2 giấy cùng loại.

- Tính cường độ thoát hơi nước theo công thức:

$$I = \frac{p \cdot 60}{t \cdot s} \text{ (g/dm}^2\text{/h)}$$
 trong đó t là thời gian làm thí nghiệm (tính bằng phút).

5.2.2. Phương pháp sử dụng máy đo cường độ thoát hơi nước

Có thể đo cường độ thoát hơi nước bằng hệ thống đo cường độ quang hợp và thoát hơi nước PP SYSTEM TPS-2

Đo bằng máy thuận tiện hơn vì lúc này cây còn đang ở trạng thái sống và nguyên vẹn. Các nghiên cứu cần độ chính xác cao và thu kết quả nhanh nên dùng phương pháp này.

Bước 1: Bật công tắc mở máy

Bước 2: Cài đặt các thông số cần thiết như chế độ lưu, cường độ ánh sáng, chế độ ánh sáng mặt trời hoặc đèn led. Chờ máy khởi động khi nào nhiệt độ máy đạt 55°C sẽ không còn báo hiển thị sấy ẩm trên màn hình.

Bước 3: Chọn mẫu lá cần làm thí nghiệm (tốt nhất là các lá thứ 3 từ trên xuống, vì các lá này đang sinh trưởng phát triển tốt).

Bước 4: Thấm khô và lau sạch lá (chú ý không làm tổn thương lá) sau đó kẹp đầu đo vào lá.

Bước 5: Đọc và ghi lại kết quả hiển thị trên màn hình.

Cứ như vậy lặp lại đo các mẫu tiếp theo.

Kết quả được máy tính toán tự động và lưu trong bộ nhớ của máy. (Xem kỹ cách sử dụng máy)

5.3. Xác định khả năng giữ nước, khả năng hút nước và độ hút nước của mô lá (theo Kozushko N.N)

5.3.1. Nguyên tắc thí nghiệm

Trong điều kiện bình thường, lá tiến hành quá trình thoát hơi nước qua khí khổng hay cutin. Lượng nước thoát ra ngoài được bù lại bằng quá trình hút nước và đảm bảo sự cân bằng nước trong cây. Khi gặp điều kiện bất lợi tác động, ở lá xảy ra hiện tượng mất nước, lúc này cơ chế giữ nước trong tế bào hoạt động, thường ở thực vật khi mất nước trên 40% lượng nước tổng số thì cơ chế giữ nước của hệ keo hoạt động do đó dễ phân biệt về khả năng giữ nước của các loại cây khi để lá mất trên 40% lượng nước.

Có thể xác định được khả năng giữ nước, khả năng hút nước và độ hút nước của lá bằng cách để chúng héo trong điều kiện nhiệt độ phòng và theo dõi sự thay đổi khối lượng lá nói chung và hàm lượng nước trong lá nói riêng. Có thể phân tích các chỉ tiêu này đối với cây trong điều kiện gây hạn hoặc so sánh các giống có khả năng chịu hạn khác nhau.

5.3.2. Phương pháp xác định khả năng giữ nước của mô lá

* Thiết bị, vật liệu: cân điện có độ chính xác 10^{-3} - 10^{-4} , kéo, mẫu lá.

* Cách tiến hành:

- Cắt lá (buổi sáng) cùng tầng lá ở các mẫu thí nghiệm cho vào túi nilon đưa nhanh về phòng thí nghiệm rồi cân lá (số lượng tùy loại lá) nhanh bằng cân điện có độ chính xác 10^{-4} .

- Sau đó để lá héo tự nhiên trên bàn không có ánh nắng chiếu trực tiếp, ở nhiệt độ phòng, thời gian 3 - 4 giờ đối với loại lá mềm, mỏng và 4 - 5 giờ đối với lá cứng để cho chúng mất đến trên 40% nước (có thể xác định mức độ mất nước trên đối với từng loại cây trước đó). Có thể để lá héo trong tủ điều nhiệt càng tốt.

- Cân lá để xác định khối lượng sau héo và lượng nước đã mất.

- Sau đó sấy khô lá ở 105°C đến khối lượng không đổi (khoảng 3 - 4 giờ) để tính khối lượng khô.

- Cách tính kết quả: có thể tính khả năng giữ nước bằng lượng nước mất khi héo hoặc lượng nước còn lại sau héo:

$$a = \frac{B - b}{A} \cdot 100(\%)$$

Trong đó: a - lượng nước mất khi héo/lượng nước tổng số;
B - khối lượng tươi lá ban đầu; b - khối lượng tươi lá sau khi héo;
A - lượng nước tổng số ($A = B - V$ trong đó V - khối lượng khô).

hoặc: $a = \frac{b - V}{A} \cdot 100(\%)$. (Lượng nước còn lại/lượng nước tổng số)

+ Ở ngoài đồng ruộng nhiều khi khó so sánh khả năng giữ nước do hàm lượng nước rất khác nhau trong cây, vì thế trong nghiên cứu nên theo dõi chỉ tiêu này trong điều kiện gây hạn chủ động trong điều kiện nhà lưới, trồng trong chậu. Có thể theo dõi khả năng giữ nước trong điều kiện gây hạn ở một số thời điểm sinh trưởng (cây non, ra hoa, quả non, quả chắc,...) để phát hiện khả năng giữ nước của cây rất khác nhau trong suốt quá trình sống.

- Đánh giá kết quả và so sánh khả năng giữ nước của mẫu lá thí nghiệm với đối chứng hay giữa các giống cây cần đánh giá, so sánh khả năng chịu hạn.

5.3.3. Xác định khả năng hút nước phục hồi sức trương của lá

Sau khi để héo, lá có khả năng hút nước để phục hồi sức trương. Khả năng hút nước ở các loài, giống cây khác nhau và không giống nhau trong từng thời kỳ sinh trưởng.

Giống cây có khả năng hút nước phục hồi sức trương tốt sẽ có khả năng chịu đựng điều kiện hạn hán tốt hơn.

* Thiết bị, vật liệu: kéo, hộp để bảo hòa nước cho lá (dung tích khoảng 0,5 - 1 lít có nắp), cân điện hay cân phân tích,.. mẫu vật là lá.

* Cách tiến hành:

- Lấy lá (thường chọn 1 tầng lá nhất định là lá đã hoàn toàn sinh trưởng) đem về phòng thí nghiệm ngay rồi cho vào hộp để lá hút nước bão hòa trong 3 giờ. Sau đó cân lấy khối lượng tươi bão hòa nước (A_1).

- Tiếp tục để lá héo trong phòng thí nghiệm như thí nghiệm trên (nên cho thời gian lâu hơn). Sau đó cho lá vào hộp bảo hòa để 3 giờ rồi cân xác định khối lượng tươi bão hòa sau khi để héo (A_2).

- Tính khả năng hút nước theo lượng nước mà lá cây không hút được do chịu héo (a%).

$$a = \frac{A_1 - A_2}{A_1} \cdot 100\%$$

5.3.4. Xác định độ hụt nước “còn lại” của lá

Ban ngày do nắng nóng, gió, thiếu nước của đất,... mà cây thường thiếu hụt nước. Lượng nước thiếu hụt này thường được bù lại vào ban đêm do cây hút nước từ đất. Nếu cây không hút đủ nước để bù vào lượng nước thiếu hụt ban ngày thì ban sáng có thể xác định lượng nước còn thiếu hụt. Lượng nước này cho biết khả năng chịu đựng hạn hán của cây.

* Thiết bị, vật liệu: kéo, hộp bảo hòa, cân điện, mẫu lá.

* Cách tiến hành:

- Lấy mẫu lá vào sáng sớm, trước khi mặt trời lên để tránh thoát hơi nước mạnh. Đặt mẫu lá vào túi nilon rồi đưa về phòng thí nghiệm cân lá bằng cân điện.

- Sau đó cho lá vào hộp bảo hòa nước trong 3 giờ. Dem cân lá lại.

- Tính độ hụt nước còn lại theo chênh lệch khối lượng lá trước và sau khi làm bảo hòa.

$$v = \frac{V_2 - V_1}{V_2} \cdot 100\%$$

Trong đó: V_1 - khối lượng lá ban đầu; V_2 - khối lượng lá sau khi bảo hòa nước.

Thí nghiệm này có thể lấy lá toàn bộ cây hoặc chỉ ở 1 tầng lá.

5.4. Xác định hệ số héo (theo Novicov V.A)

* Nguyên tắc thí nghiệm:

Khi cây trồng không được tưới nước đầy đủ sẽ tới lúc cây thiếu nước và bị héo. Lượng nước trong đất còn lại khi cây không hút được tính theo tỷ lệ trên khối lượng đất khô tuyệt đối gọi là hệ số héo.

* Thiết bị, vật liệu: cân điện hoặc kỹ thuật, chén sứ, bình hình trụ, xẻng con, đất trồng cây.

* Cách tiến hành:

Trước khi xác định hệ số héo người ta tính ẩm độ, khối lượng khô tuyệt đối và ẩm dung toàn phần của đất.

- Ẩm độ đất: lấy đất, rây nhỏ, cho vào chén sứ đã biết trước khối lượng. Sấy khô ở nhiệt độ 105°C đến khối lượng không đổi.

Độ ẩm đất tính bằng lượng nước có trong đất tính theo % so với lượng đất chưa sấy.

- Khối lượng khô tuyệt đối của đất:

Tính bằng khối lượng đất ẩm - lượng nước chứa trong đất. Lượng nước chứa trong đất tính theo độ ẩm.

Ví dụ: lấy a gam đất ẩm, lượng nước chứa trong a gam khi độ ẩm đã tính được 40% bằng $\frac{a.40}{100}$ (g). Vậy khối lượng đất khô tuyệt đối là:

$$a - \frac{a.40}{100} \text{ (g)} = \frac{a.60}{100}$$

- Ẩm dung toàn phần

Lấy đất vào bình hình trụ bằng kẽm/inox độ cao 15 - 20cm, đường kính 5 - 6cm, đáy có lỗ rây đặt cách mép 1 - 2cm (có thể dùng ống thủy tinh đáy có bịt vải màn).

Trước khi cho đất vào bình kẽm, tiến hành đặt ở đáy bình 1 tờ giấy lọc hay vải ướt, và cân bình + giấy lọc/ vải ướt.

Đặt bình có đất vào trong cốc nước sao cho nước trong cốc vừa chạm vào lỗ rây có giấy lọc. Đậy kín cốc bằng chuông thủy tinh để tạo không gian bão hòa hơi nước.

Khi lớp đất trên cùng cũng ướt, lấy bình ra khỏi cốc và thấm nước thừa ở đáy bình. Đem cân bình có đất.

Tiếp tục để bình vào cốc nước như vậy 2 giờ rồi đem ra cân lại, nếu khối lượng không tăng thì đã đạt yêu cầu.

Tính toán: lấy a_1 gam đất ẩm, sau khi hút nước tăng lên đạt a_2 .
 Khối lượng đất ẩm tăng: $a_2 - a_1$ (g) hay $\frac{a_2 - a_1}{a_1} \cdot 100$ (% so với
 lượng đất ẩm ban đầu).

Ấm dung toàn phần = $\frac{a_2 - a_1}{a_1} \cdot 100 +$ độ ẩm đất ban đầu (tính
 theo % đất ẩm). Còn bình thường ẩm dung tính bằng % trên khối
 lượng đất khô tuyệt đối. Ví dụ: giả sử độ ẩm đất 40%.

Trong 100g đất ẩm chứa 40g nước và 60g đất khô.

$$\left\{ \begin{array}{l} 60g \text{ đất khô: } \frac{a_2 - a_1}{a_1} \cdot 100 (\%) + 40 (\%) \\ \text{Vậy } 100g \text{ đất khô: } X(g) \end{array} \right.$$

$$\rightarrow X = \frac{\left(\frac{a_2 - a_1}{a_1} \cdot 100 + 40 \right) \cdot 100}{60} \text{ (gam) (hay hiểu đơn giản là lấy}$$

ẩm dung toàn phần ở trên $\times 100/60$).

- Hệ số héo: Hiệu số: khối lượng đất ẩm - khối lượng đất khô
 tuyệt đối = lượng nước. Trong trường hợp cây đã bị héo thì đó là
 lượng nước còn lại cây không hút được. Lượng nước này tính trên
 100g đất khô tuyệt đối là hệ số héo. Kết quả này cũng gần bằng kết
 quả tính theo kinh nghiệm:

$$K \text{ (hệ số héo)} = \frac{\text{Ấm dung toàn phần} - 21}{2,9}$$

5.5. Xác định nước tự do và nước liên kết trong cây

5.5.1. Nguyên tắc thí nghiệm

Trong mô thực vật, nước tồn tại ở 2 dạng: tự do và liên kết.
 Khái niệm nước tự do là nước có thể làm dung môi và dễ dàng
 đóng băng ở 0°C. Nước liên kết thường trong môi liên kết keo với

các đại phân tử hữu cơ. Lượng nước tự do và liên kết tồn tại trong môi cân bằng động, phụ thuộc vào cường độ quá trình trao đổi chất và điều kiện ngoại cảnh.

Mẫu mô thực vật (thường sử dụng lá) khi đem ngâm trong dung dịch đường sacaroza nồng độ cao sẽ bị mất nước, dung dịch đường khi đó sẽ giảm nồng độ. Người ta có thể xác định được lượng nước của mô thực vật đã bị dung dịch đường lấy đi bằng khúc xạ kế hay các dụng cụ, các cách xác định khác. Mẫu đối chứng xác định hàm lượng nước tổng số. Hiệu số giữa hàm lượng nước tổng số và hàm lượng nước tự do là lượng nước liên kết còn lại trong mẫu thực vật.

Nghiên cứu này cũng để xem tình trạng trao đổi chất của tế bào, so sánh giữa các thời kỳ sinh trưởng, so sánh giữa các giống để đánh giá khả năng chống chịu hạn, nóng, lạnh, mặn...

5.5.2. Xác định nước tự do và liên kết bằng khúc xạ kế (theo Guxép N.A)

* Thiết bị, vật liệu: khúc xạ kế, cân điện hay cân kỹ thuật, ống nghiệm 3ml, đĩa thủy tinh, khoan lá, cốc nung, kẹp

Dung dịch đường sacaroza, nước cất.

* Cách tiến hành:

- Dùng pipet cho vào 2 ống nghiệm mỗi ống 1,5ml dung dịch đường sacaroza 30% (kiểm tra lại nồng độ bằng khúc xạ kế). Các ống nghiệm phải được sấy khô để nguội trước đó và có nắp cao su và xác định trước khối lượng. Sau khi cho dung dịch đường cân lại ống nghiệm.

- Lấy mẫu lá bằng khoan lá (tùy loại cây mà lấy từ 20 – 50 bản, ví dụ: ngô lấy 20 bản, lúa lấy 40 bản), sau đó đem cân trên cân điện, (tùy loại cây: từ 20 - 50 bản ví dụ: ngô: 20 bản, lúa: 40 bản...) và cho vào một ống nghiệm sao cho ngập trong dung dịch đường, hơi lắc nhẹ ống nghiệm. Để ngâm như vậy trong 2 giờ để dung dịch đường rút nước tự do từ lá. (Đối với các loại lá khác nhau có thể cần thời gian ngâm lá khác nhau và nồng độ đường khác nhau).

- Sau khi ngâm lá xong, lấy bản lá ra (dùng kẹp nhỏ có tráng Parafin để không dính dung dịch đường ra ngoài) và dùng khúc xạ kế để đo nồng độ dung dịch đường sau thí nghiệm.

- Ở mẫu đối chứng tương tự số lượng bản lá xác định hàm lượng nước tổng số bằng cách cho bản lá vào cốc nung và đưa vào tủ sấy ở nhiệt độ 105°C đến khối lượng không đổi. Hàm lượng nước tổng số tính bằng % khối lượng tươi.

- Tính toán: kí hiệu nồng độ dung dịch đường A_1 - trước thí nghiệm; A_2 - sau thí nghiệm; khối lượng dung dịch đường B_1 - trước thí nghiệm; B_2 - sau thí nghiệm.

+ Lượng đường có trong dung dịch lúc ban đầu và cuối thí nghiệm bằng nhau và bằng: $X = B_1 \cdot A_1\%$ (A_1 ở thí nghiệm này bằng 30%)

+ Khối lượng dung dịch sau thí nghiệm B_2 :

$$B_2 = \frac{X \cdot 100}{A_2} = \frac{A_1 B_1}{A_2} \cdot 100$$

+ Khối lượng dung dịch tăng thêm bằng $B_2 - B_1 = Y$ (lượng nước tự do).

+ Nồng độ nước tự do (%) / khối lượng tươi (K) của lá là:

$$\frac{Y \cdot 100}{K} = \frac{B_2 - B_1 \cdot 100}{K}$$

+ Nước liên kết = Hàm lượng nước tổng số (%) - Hàm lượng nước tự do (%).

5.5.3. Xác định nước tự do và liên kết yếu của mô lá

* Thiết bị, vật liệu: cân điện có độ chính xác 10^{-4} , khoan lá, đĩa thủy tinh, kẹp, cốc nung, giấy thấm.

Dung dịch đường, nước cất.

* Cách tiến hành:

- Dùng khoan lá lấy mẫu lá 20 - 50 bản, cân bằng cân điện.

- Cho dung dịch đường vào ống nghiệm (1,5ml) rồi cho mẫu lá ngâm trong dung dịch đường 30% trong 2 giờ, lắc nhẹ.

- Sau 2 giờ dùng kẹp lấy mẫu lá ra, thấm khô bản lá bằng giấy thấm rồi đem cân lá.

- Hiệu số 2 lần cân lá là lượng nước tự do đã bị hút ra do dung dịch đường 30%.

Thí nghiệm nên làm với số lần nhắc lại không ít hơn 4 lần, thí nghiệm này có thể dùng để đánh giá hiệu lực của các nồng độ đường khác nhau trong việc rút nước tự do và liên kết yếu của lá. Có thể xác định lượng nước liên kết chặt sau khi sấy mẫu ở 105°C đến khối lượng không đổi.

5.6. Xác định hàm lượng prolin trong mô thực vật (theo Bates và CS)

Prolin có vai trò điều hòa thẩm thấu, bảo vệ trao đổi chất chống lại điều kiện stress, điều hòa pH tế bào chất, lưu trữ cacbon và nitơ, chức năng chống oxy hóa.

* Nguyên tắc thí nghiệm:

Dựa trên phản ứng giữa prolin và dung dịch ninhydrin trong axit tạo hợp chất màu vàng, hấp thụ bước sóng đặc trưng 520nm. Công thức tính hàm lượng prolin xác định trên cơ sở tham khảo Reigosa Roger M.J.

* Thiết bị, vật liệu:

- Axit sulphosalicylic 3% (w/v).

- Axit photphoric 6M.

- Axit axetic.

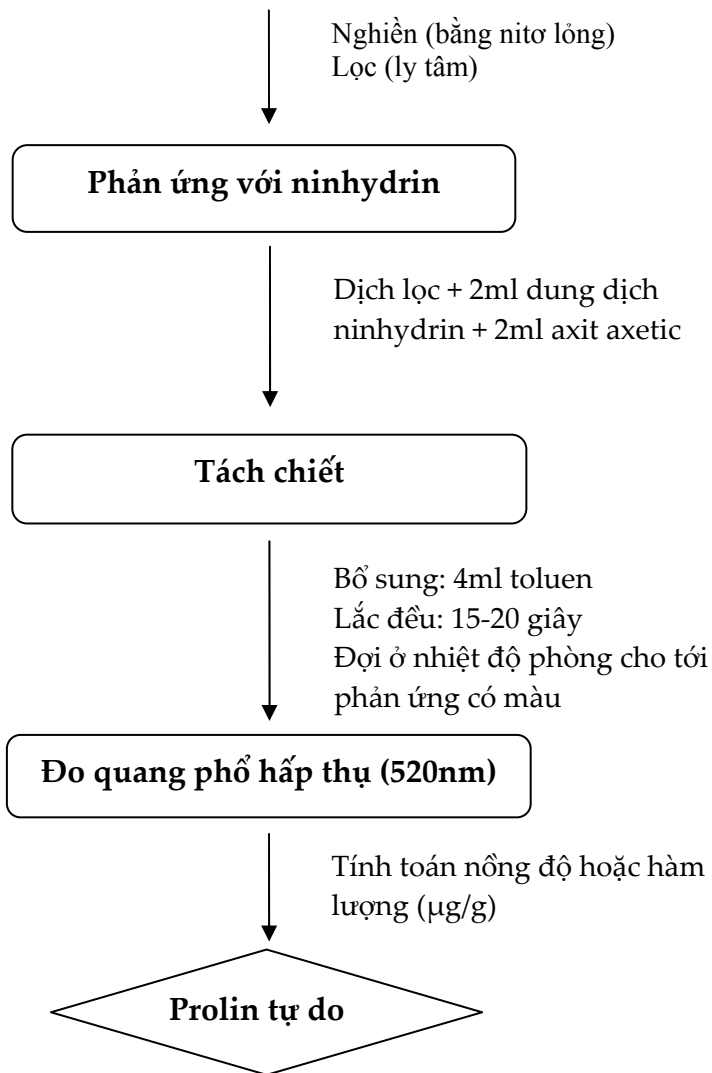
- Dung dịch ninhydrin trong axit (được chuẩn bị bằng cách ủ nóng 1,25g ninhydrin trong 30ml axit axetic, và thêm 20ml axit photphoric 6M). *Lưu ý: axit ninhydrin sẽ giữ ổn định chỉ trong 24 giờ, tại 4°C.*

- Toluen.

* Cách tiến hành:

Ở đây chúng tôi mô tả các phương pháp định lượng prolin tự do trong các mô lá, bao gồm bốn bước chính:

Mô lá tươi (0,25-0,50g) + 5ml axit
sulphosalicylic 3%



Hình 5.2. Các bước chính của quá trình định lượng prolin tự do bằng phương pháp so màu

- Cân 0,5g/mẫu nghiền kĩ, thêm 10ml dung dịch axit sulfosalicylic 3%, ly tâm 7000 vòng/phút trong thời gian 20 phút, lọc lấy dịch lọc.
- Lấy 2ml dịch chiết cho vào bình, thêm 2ml axit axetic và 2ml dung dịch ninhydrin, ủ trong nước nóng 100°C trong thời gian 1 giờ sau đó ủ nước đá 5 phút.
- Bổ sung vào bình phản ứng 4ml toluen, lắc đều. Lấy phần dịch màu hồng ở trên đem đo OD_{520nm} bằng máy đo quang phổ.
- Hàm lượng prolin được xác định dựa vào đường chuẩn prolin và tính toán theo công thức sau:

$$\text{Prolin } (\mu\text{g/g}) = \frac{X(\mu\text{g/ml}) \cdot V(\text{ml}) \cdot df}{w(\text{g})}$$

Trong đó:

X: giá trị OD₅₂₀ của mẫu; V: thể tích dịch chiết (= sốml toluen); df: hệ số pha loãng (trong trường hợp này là 5); w: khối lượng mẫu.

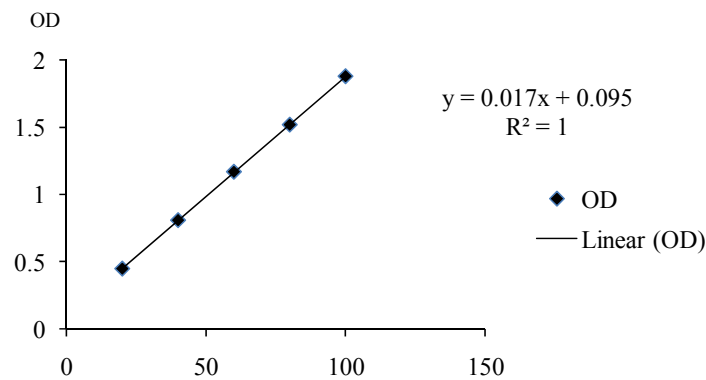
* Xây dựng đường chuẩn prolin:

Tiến hành pha prolin tinh khiết theo các nồng độ ghi trong bảng 5.1, tiến hành phản ứng theo quy trình đã trình bày, sau đó tiến hành đo độ hấp thụ quang ở bước sóng 520nm trên máy UV-Vis 2450 (Shimadzu, Nhật Bản). Nồng độ prolin và giá trị hấp thụ OD được trình bày trong bảng 5.1.

Bảng 5.1. Nồng độ prolin và giá trị OD

Nồng độ (μg/ml)	OD
20	0,45
40	0,81
60	1,17
80	1,52
100	1,88

Dựng đồ thị biểu diễn và lập đường chuẩn prolin bằng phần mềm *Excel*.



Hình 5.2: Biểu đồ biểu diễn đường chuẩn prolin

Trong đó: X - nồng độ prolin ($\mu\text{g/ml}$); Y - giá trị OD tương ứng với nồng độ X.

5.7. Xác định hàm lượng protein trong mô thực vật

Khi thực vật gặp phải điều kiện stress của yếu tố vô sinh hay hữu sinh thì phản ứng đầu tiên quan sát được là sự giảm trao đổi chất, giảm sinh trưởng. Trong “pha báo động này”, sinh tổng hợp protein, quang hợp, vận chuyển các chất chuyển hóa, sự hấp thu và vận chuyển các ion bị giảm xuống.

Hơn nữa, trong thực vật không có cơ chế chống chịu hoặc chỉ ở mức thấp, sự thiệt hại và sự già hóa sẽ diễn ra nhanh chóng. Cùng với sự mất đi của diệp lục, rubisco và các protein lục lạp khác bị thủy phân và đi vào cơ thể qua phloem, tiếp theo đó là sự thủy phân của protein ty thể và mô dẫn. Do đó, nồng độ protein thấp được hiểu như là một triệu chứng rõ rệt về thiệt hại do stress ở thực vật.

Tuy nhiên, ở hầu hết thực vật phản ứng với điều kiện bất lợi sẽ hoạt hóa các cơ chế để thích ứng với stress, chẳng hạn như quá trình trao đổi chất thích hợp, hoạt hóa các quá trình sửa chữa, trao

đổi chất dài hạn và thích nghi hình thái, chúng được gọi chung là “Hội chứng thích ứng chung”. Các cơ chế đó gồm sinh tổng hợp protein có chức năng đặc hiệu, sự điều chỉnh thẩm thấu (như tích lũy prolin) và chống quá trình oxy hóa (như tích lũy polyamin)...

Các cơ chế đó bao gồm các phản ứng chuyển hóa chẳng hạn như tái điều chỉnh quá trình trao đổi chất thích hợp và thay đổi sinh khối. Dù là phản ứng thích nghi nhưng tất cả đều kèm theo thay đổi mức độ hoạt động của nhiều enzym thuộc các con đường trao đổi chất khác nhau, tất cả đều thể hiện qua mức độ protein tổng số thực vật.

Có rất nhiều quy trình để định lượng hàm lượng protein từ dung dịch chiết. Một dung dịch protein đơn giản có thể cho kết quả khác nhau nếu được định lượng bằng phương pháp khác nhau, bởi vì các phương pháp đó dựa trên nguyên tắc khác nhau. Thực ra một phương pháp tuyệt đối là không tồn tại, mỗi phương pháp đều tồn tại những ưu và nhược điểm. Việc lựa chọn phương pháp thích hợp phụ thuộc vào protein có trong mẫu, độ tinh khiết của mẫu chiết... Các phương pháp được sử dụng rộng rãi hiện nay để định lượng protein như Biuret, Bradford, Kjendahl, Lowry, Smith và Warburg - Christian. Tuy nhiên, nhiều tác giả đề nghị phương pháp phân tích quang phổ của Bradford (1976) bởi vì nó có nhiều ưu điểm hơn so với các phương pháp khác.

5.7.1. Xác định hàm lượng protein (theo Bradford; Nguyễn Quang Vinh và CS)

* Thiết bị, vật liệu: Mẫu protein cần xác định, dung dịch protein chuẩn (albumin huyết thanh bò) 1mg/ml.

Bảng 5.2. Chuẩn bị thuốc thử Bradford

Hóa chất	Nồng độ cuối cùng
Coomassie® Brilliant Blue G-250	0,01 % (w/v)
Etanol 95%	4,7% (w/v)
Axit photphoric 85% (w/v)	8,5% (w/v)

Ví dụ cần pha 1 lít dung dịch thuốc thử: hòa tan 100mg CBB G250 trong 50ml etanol 95% và 100ml H₃PO₄ 85%, bổ sung nước đến 1000ml.

* Cách tiến hành:

Nguyên liệu thực vật tươi bảo quản trong tủ lạnh ở 2°C sử dụng từ 5-10 ngày hoặc giữ ở -20°C cho đến khi tách chiết.

Dung dịch chiết hay đệm chiết tùy thuộc vào từng tác giả, ở đây sử dụng đệm chiết theo Arulsekar và Parfitt (1986). Đệm Tris 0,05M (pH = 8) với các thành phần sau:

Bảng 5.3. Chuẩn bị đệm chiết

Hóa chất	Nồng độ
Tris base	0,05 M
Axit ascorbic (muối Na hoặc axit tự do)	0,1 % (w/v)
Cystein hydroclorit	0,1 % (w/v)
Polyethylene glycol (3500 - 4000)	1,0 % (w/v)
Axit xitric (monohydrat)	0,15% (w/v)
2-mercaptoetanol	0,008 % (v/v)

- Cân 100 - 300mg mẫu thực vật tươi được nghiền nhỏ bằng cối chày sứ trong nitơ lỏng + 1ml đệm Tris 0,05M để tách chiết protein, có thể thêm một lượng nhỏ chất chống oxy hóa polyvinyl polypyrrolidon (PVPP)

- Ly tâm lạnh 14.000 - 19.000 vòng/phút trong 20 phút ở 4°C.

- Mẫu sau khi ly tâm được đo ngay hoặc bảo quản ở -20°C.

- Cho vào ống nghiệm 200µl dung dịch mẫu protein, 2ml dung dịch thuốc thử bradford, lắc đều. Sau 2 phút đo OD_{595nm} (chú ý cần đo trước 1 giờ)

* Xây dựng đường chuẩn protein:

- Chuẩn bị dung dịch chuẩn albumin huyết thanh bò 1mg/ml.

- Chuẩn bị 6 ống nghiệm sạch khô, cho vào lần lượt các ống lượng dung dịch chuẩn tương đương là: 1; 2,5; 5; 10; 15; 20 μ l, thêm nước đến 200 μ l.

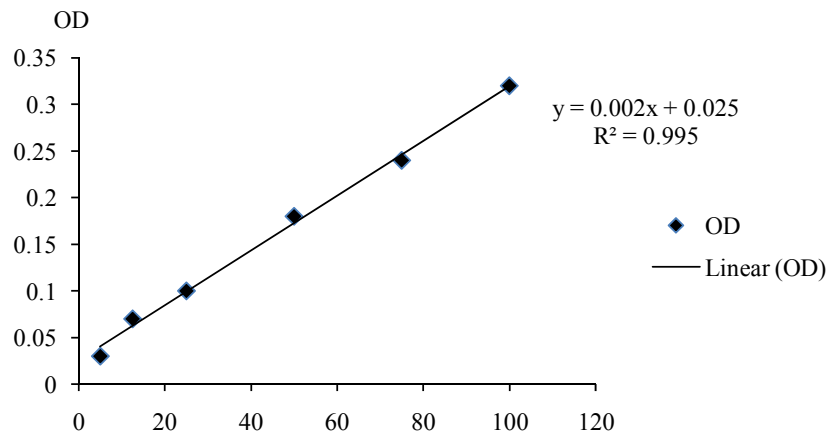
- Cho thêm 2ml thuốc thử Bradford, lắc đều và đo OD_{595nm}.

- Dựng đồ thị biểu diễn sự tương quan giữa OD và nồng độ protein. Từ OD của mẫu đối chiếu với đồ thị chuẩn để tính ra hàm lượng protein.

Bảng 5.4. Bảng nồng độ protein và giá trị OD

Nồng độ (μ g/ml)	OD
5	0,03
12,5	0,07
25	0,10
50	0,18
75	0,24
100	0,32

Dựng đồ thị biểu diễn và lập đường chuẩn protein bằng phần mềm Excel.



Hình 5.4. Biểu đồ biểu diễn đường chuẩn protein

Trong đó: X - nồng độ protein ($\mu\text{g/ml}$); Y - giá trị OD tương ứng với nồng độ X.

$$\text{protein}(\mu\text{g/g}) = \frac{X(\mu\text{g/ml}) \cdot V(\text{ml}) \cdot df}{w(\text{g})}$$

X - nồng độ protein ($\mu\text{g/ml}$); V - số ml dịch chiết protein (1ml); df - yếu tố pha loãng (df = 1/0,2 = 5); w - số gam mẫu.

Ngoài sử dụng đệm chiết trên, chúng tôi còn dùng đệm PBS (Phosphate buffered saline) để chiết protein:

Bảng 5.5. Thành phần đệm PBS

Thành phần	Khối lượng
NaCl	8,0g
KCl	0,2g
Na ₂ HPO ₄	1,44g
KH ₂ PO ₄	0,24g

Thêm nước cất đến mức 800ml; điều chỉnh pH = 7,4 bằng HCl; bổ sung nước cất tới 1000ml; khử trùng.

5.7.2. Xác định hàm lượng protein theo phương pháp Lowry (Folin - Ciocalteu)

Phương pháp này dựa trên phương pháp Biuret. Sự oxi hóa các axit amin tyrosin và tryptophan với thuốc thử Folin – Ciocalteu tạo thành phức chất màu xanh tím. Phương pháp này cũng rất nhạy để định lượng protein, tuy nhiên kết quả dễ bị nhiễu bởi nhiều loại hóa chất như Tris, EDTA, urea, một số loại đường.

- Lấy 1ml dung dịch cần phân tích cho vào ống nghiệm. Chuẩn bị ống blank bằng cách sử dụng 1ml nước cất.

- Bổ sung vào 5ml “dung dịch kiềm” (được chuẩn bị bằng cách trộn Na₂CO₃ 2%(w/v) trong NaOH 0,1 mol/lít, CuSO₄ 1%

(w/v) và NaK tartrat 2% (w/v) theo tỷ lệ 100:1:1). Đảo đều và để yên trong 10 phút.

- Bổ sung 0,5ml thuốc thử Folin – Ciocalteu (sản phẩm thương mại được pha loãng với nước cất với tỷ lệ 1:1). Sau đó để yên trong 30 phút.

- Đo OD_{600nm}.

- Dụng đường chuẩn protein từ BSA (xem phương pháp 5.7.1).

5.7.3. Xác định hàm lượng protein theo phương pháp Biuret

Phương pháp này dựa trên phản ứng đặc hiệu của ion Cu²⁺ trong dung dịch kiềm với hai liên kết peptit liên kế.

- Lấy 1ml dung dịch cần phân tích cho vào ống nghiệm.

- Bổ sung 1ml hóa chất Biuret (CuSO₄.5H₂O 1,5g, NaK tartrat 6,0g trong 300ml NaOH 30% (w/v)) vào các ống chứa mẫu và cả ống blank.

- Ủ 37°C trong 15 phút.

- Đo OD_{520nm}.

- Dụng đường chuẩn protein từ BSA (xem phương pháp 5.7.1, nồng độ thường từ 1 - 10mg/ml).

5.7.4. Xác định hàm lượng protein theo phương pháp đánh giá trực tiếp độ hấp thụ UV (theo Warburg – Christian)

- Đo độ hấp thụ dung dịch cần phân tích OD_{280nm}. Nếu giá trị OD lớn hơn 1 thì cần pha loãng mẫu.

- Đo nhắc lại mẫu đó ở OD_{260nm}.

- Tính hàm lượng protein theo phương trình:

$$[\text{Protein}] \text{ mg/ml} = 1,45 \cdot \text{OD}_{280\text{nm}} - 0,74 \cdot \text{OD}_{260\text{nm}}$$

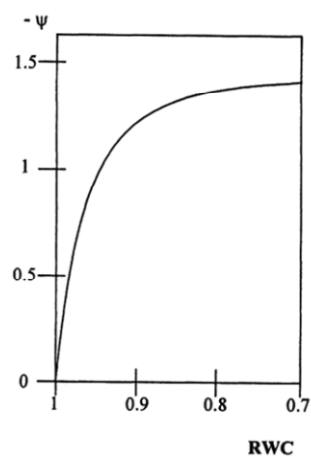
5.8. Xác định hàm lượng nước tương đối trong mô thực vật

Hàm lượng nước trong mô có thể được thể hiện bằng nhiều cách, bao gồm lượng nước trên một đơn vị khối lượng khô hoặc tươi và trên một đơn vị trọng lượng nước ở dạng hydrat hóa. Hàm lượng nước tương đối (RWC - Relative water content) đã được Slatyer đưa ra năm 1967, đây là một chỉ số hữu ích phản ánh trạng thái cân bằng nước trong mô thực vật bởi vì nó thể hiện lượng nước tuyệt đối mà trong đó thực vật cần để đạt độ bão hòa nhân tạo hoàn toàn. Như vậy có một mối quan hệ giữa RWC và thế năng nước (xem hình 5.5). Mối quan hệ này thay đổi đáng kể theo tính chất, độ tuổi của nguyên liệu thực vật.

RWC biểu thị phần trăm hàm lượng nước trong mô thực vật ở một thời điểm nhất định khi mô đó trương nước hoàn toàn:

$$RWC = \frac{\text{trọng lượng tươi} - \text{trọng lượng khô}}{\text{trọng lượng bão hòa} - \text{trọng lượng khô}} \cdot 100$$

Mô thực vật đạt được độ bão hòa hoàn toàn khi khối lượng không đổi. Lá non sẽ hấp thụ nước trong một thời gian dài (thường là vài ngày). Mô còn non sẽ hô hấp và tiêu thụ một phần khối lượng khô. Điều đó ảnh hưởng tới độ bão hòa nước của mô. Do vậy, để tránh vấn đề này cần giảm thời gian đạt độ bão hòa mô bằng cách giảm kích thước mẫu và bảo quản mẫu làm sao để tránh diễn ra các hoạt động sinh lý bằng cách ức chế sinh trưởng và hô hấp trong một thời gian xác định. Thường bảo quản mô thực vật trong thí nghiệm này ở 4°C.



Hình 5.5. Mối quan hệ giữa thế năng nước và hàm lượng nước tương đối

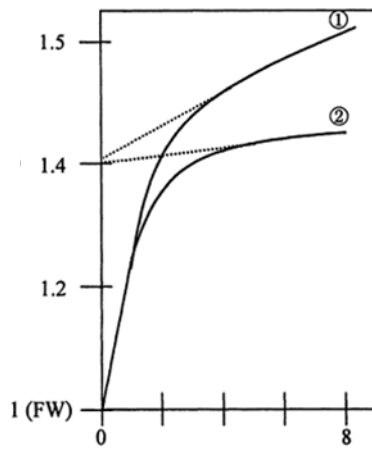
* Các khía cạnh sinh lý:

Nước chiếm hầu hết khối lượng của tế bào thực vật. Trong mỗi tế bào, tế bào chất chỉ chiếm 5 đến 10% khối lượng tế bào và phần còn lại là không bào lớn chứa đầy nước.

Sự thay đổi về thể tích chất nguyên sinh lá và sự thay đổi hoạt động quang hợp của lá có một mối tương quan chặt chẽ. Đôi khi sự suy giảm về hàm lượng nước trong mô có thể ảnh hưởng đến sinh trưởng nhiều hơn so với sự suy giảm thế năng nước hoặc thế áp suất. Thực vật trong môi trường tự nhiên có thể chịu ảnh hưởng của các điều kiện môi trường khác nhau tương tác với các đặc điểm di truyền của nó. Thể lưỡng bội *Dactylis glomerata* cho thấy RWC nhỏ hơn thể tứ bội (González-Vilar và cộng sự). Điều này có nghĩa là thực vật sẽ thay đổi về trao đổi chất như ngừng hoạt động quang hợp, tăng hô hấp, tích lũy prolin và axit abscisic.

Trong quá trình bão hòa của mô có hai giai đoạn (pha) sự hấp thụ nước. Đầu tiên diễn ra sự hấp thụ nước nhanh chóng để đáp ứng tình trạng thiếu nước của mô. Sau đó, nước được hấp thụ chậm hơn bởi sự sinh trưởng và các yếu tố sinh lý khác, khó xác định nơi nó diễn ra. Mô còn non rất nhạy cảm với giai đoạn thứ hai (hình 5.6).

RWC là một chỉ tiêu về thể tích tương đối của tế bào (relative cellular volume) cho thấy sự thay đổi về thể tích tế bào mà có thể ảnh hưởng đến tương tác giữa các đại phân tử và các bào quan. Theo quy định chung, RWC dao động trong khoảng 100 - 90% có liên quan đến sự đóng của khí khổng trên lá và giảm độ giãn của tế bào cũng như sinh trưởng. Hàm lượng khoảng 90 - 80% là tương quan với sự thay đổi trong thành phần của mô và một số biến đổi liên quan đến tốc độ của quá trình quang hợp và hô hấp. Nếu RWC dưới 80% có nghĩa thế năng nước khoảng -1,5 MPa hoặc ít hơn, và điều này sẽ tạo ra những thay đổi trong trao đổi chất với việc ngừng quá trình quang hợp, tăng hô hấp và tăng tích lũy prolin và axit abscisic.



Hình 5.6. Đường cong bão hòa của mảnh cắt từ mô non (1) và mô trưởng thành (2). FW: khối lượng tươi.

* Xác định hàm lượng nước tương đối (theo Sharper):

- Cắt các mảnh lá (kích thước 1cm², cân nhanh các mảnh lá đó để xác định khối lượng tươi của lá FW (Fresh weight).

- Chuyển các mảnh lá đã được cân vào ống eppendorf (hoặc thay bằng ống nghiệm) chứa nước de ion.

- Sau đó đặt trong tủ lạnh khoảng 4 giờ để mô hấp thụ nước.

- Lấy ra những lát cắt của mô từ nước de ion. Cân thận loại bỏ nước dư thừa trên bề mặt lá bằng giấy thấm. Cân trọng lượng của các mẫu để xác định khối lượng tươi tương nước của lá (TFW - Turgid fresh weight).

- Sau đó đặt các mẫu đó vào tủ sấy 70°C trong thời gian ít nhất là 48 giờ. Sau khi sấy, cân lại mô để có được trọng lượng khô của mô (DW - Dry weight).

- Hàm lượng nước tương đối được tính bằng công thức sau đây:

$$RWC(\%) = \frac{FW - DW}{TFW - DW} \cdot 100$$

5.9. Định lượng glycine betaine (theo Grieve và Grattan, 1983)

* Thiết bị và vật liệu:

- Dung dịch Kali tri-iod: lấy 15,7g Iot và 20g kali iot hòa tan trong 100ml nước cất và bảo quản ở tủ 4°C.

- Dung dịch H₂SO₄ 2N.

* Cách tiến hành:

- Lấy mẫu lá nghiền nhỏ thành dạng bột bằng cối chày sứ với nito lỏng. Cân 0,5g bột nghiền nhỏ hòa vào 20ml nước đê ion, đặt vào máy lắc trong 24 giờ ở 25°C.

- Lọc thu dịch, bảo quản trong tủ đá để phân tích.

- Pha loãng dịch lọc bằng H₂SO₄ 2N với tỷ lệ 1 : 1.

- Lấy 0,5ml dịch sau pha loãng cho vào ống eppendorf 2ml, đặt vào hộp đá trong 60 phút.

- Sau đó bổ sung 0,2ml dung dịch kali tri-iod, đặt hỗn hợp phản ứng này vào nhiệt độ 0 - 4°C trong 16 giờ.

- Sau đó ly tâm ở 10.000 vòng/phút trong 15 phút ở 0°C.

- Hút phần dịch nổi (chú ý thao tác nhẹ nhàng) cho vào ống nghiệm, bổ sung 9ml 1,2-diclometan (đã làm mát ở -10°C), đảo đều trong khoảng 1-2 phút (luôn giữ hỗn hợp phản ứng ở 4°C).

- Sau 2 - 2,5 giờ, bỏ lớp nước phía trên và xác định mật độ quang học của lớp chất hữu cơ phía dưới ở bước sóng 365nm.

- Hàm lượng của glycine betain được tính toán từ đường chuẩn.

$$Y = 0,865.X - 0,348 \quad (R^2 = 0,97)$$

Trong đó: Y - nồng độ glycine betain (µg/ml), X - OD_{365nm}.

$$\text{Glycine betaine (mg/g)} = \frac{Y(\mu\text{g/ml}) \cdot V(\text{ml}) \cdot df}{1000 \cdot w(\text{g})}$$

Trong đó:

X: giá trị OD_{365nm} của mẫu; V: thể tích dịch chiết (= số ml 1,2-diclorometan); df: hệ số pha loãng (trong trường hợp này là $80 = 40\text{ml}$ dịch chiết đã pha loãng bằng H_2SO_4 2N/0,5ml phân tích); w: khối lượng mẫu (= 0,5g); 1000: hệ số chuyển đổi đơn vị $\mu\text{g/g}$ sang mg/g mẫu).

Nồng độ glycine betaine được chuẩn bị ở $50 - 200\mu\text{g/ml}$ trong axit H_2SO_4 1N để dựng đường chuẩn.

CÁC PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU VỀ QUANG HỢP VÀ SẮC TỐ QUANG HỢP

6.1. Định lượng diệp lục và carotenoit bằng phương pháp quang phổ (theo Lichtenthaler H.K và Wellburn A.R, 1983)

Định lượng diệp lục a, b và carotenoit trong dịch chiết sắc tố của mô thực vật bằng phương pháp quang phổ UV - Vis rất phức tạp bởi tùy thuộc vào việc lựa chọn mẫu, hệ thống dung môi và máy quang phổ được sử dụng. Vì các sắc tố thực vật khác nhau nhưng hấp thụ ánh sáng ở các vùng quang phổ có thể trùng nhau.

* Thiết bị, vật liệu: etanol 96%, máy vortex, máy đo quang phổ với cuvet 1cm. Mẫu lá (lấy cùng tầng lá để so sánh)

* Cách tiến hành:

- Làm lạnh mẫu lá bằng nitơ lỏng, nghiền thành bột mịn
- Lấy khoảng 5mg bột mịn vào ống (với khối lượng DW (mg) đã biết).
- Bổ sung 100 μ l nước cất và đợi nguyên liệu thấm nước (khoảng 10 phút).
- Bổ sung 8,0ml etanol 96% và vortex.
- Quấn ống nghiệm bằng lá nhôm mỏng và ủ ở nhiệt độ phòng trong tủ hút qua đêm.
- Đến ngày hôm sau, vortex mẫu và chờ cho đến khi hạt phân tán đã rơi xuống đáy (hoặc dùng máy ly tâm).

- Đo sự hấp thụ của dịch chiết ở bước sóng 470nm, 648,6nm và 664,2nm. Giá trị OD nên trong khoảng 0,2 - 0,8.

* *Tính toán:*

Nồng độ của diệp lục a (C_a), diệp lục b (C_b) và carotenoid tổng số (C_{x+c}) có thể được tính toán thông qua các phương trình dưới đây tùy thuộc vào từng loại dung môi khác nhau, ở đây nồng độ được tính là $\mu\text{g/ml}$ dịch chiết:

- Dietyl ete (dung môi tinh khiết):

$$+ C_a (\mu\text{g/ml}) = 10,05.A_{660,6} - 0,97.A_{642,2}$$

$$+ C_b (\mu\text{g/ml}) = 16,36.A_{642,2} - 2,43.A_{660,6}$$

$$+ C_{(x+c)} (\mu\text{g/ml}) = (1000.A_{470} - 1,43.C_a - 35,87.C_b)/205$$

- Dietyl ete (nước tự do):

$$+ C_a (\mu\text{g/ml}) = 9,93.A_{660,6} - 0,75.A_{641,8}$$

$$+ C_b (\mu\text{g/ml}) = 16,23.A_{641,8} - 2,42.A_{660,6}$$

$$+ C_{(x+c)} (\mu\text{g/ml}) = (1000.A_{470} - 1,43.C_a - 33,12.C_b)/213$$

- Etanol với 5% (v/v) nước:

$$+ C_a (\mu\text{g/ml}) = 13,36.A_{664,1} - 5,19.A_{648,6}$$

$$+ C_b (\mu\text{g/ml}) = 27,43.A_{648,6} - 8,12.A_{664,1}$$

$$+ C_{(x+c)} (\mu\text{g/ml}) = (1000.A_{470} - 2,13.C_a - 97,64.C_b)/209$$

- Axeton (dung môi tinh khiết):

$$+ C_a (\mu\text{g/ml}) = 11,24.A_{661,6} - 2,04.A_{644,8}$$

$$+ C_b (\mu\text{g/ml}) = 20,13.A_{644,8} - 4,19.A_{661,6}$$

$$+ C_{(x+c)} (\mu\text{g/ml}) = (1000.A_{470} - 1,90.C_a - 63,14.C_b)/214$$

- Axeton với 20% (v/v) nước:

$$+ C_a (\mu\text{g/ml}) = 12,25.A_{663,2} - 2,79.A_{646,8}$$

$$+ C_b (\mu\text{g/ml}) = 21,50.A_{646,8} - 4,19.A_{663,2}$$

$$+ C_{(x+c)} (\mu\text{g/ml}) = (1000.A_{470} - 1,82.C_a - 85,02.C_b)/198$$

- Metanol (dung môi tinh khiết):

$$+ C_a (\mu\text{g/ml}) = 16,72.A_{665,2} - 9,16.A_{652,4}$$

$$+ C_b (\mu\text{g/ml}) = 34,09.A_{652,4} - 15,28.A_{665,2}$$

$$+ C_{(x+c)} (\mu\text{g/ml}) = (1000.A_{470} - 1,63.C_a - 104,96.C_b)/221$$

- Metanol với 10% (v/v) nước:

$$+ C_a (\mu\text{g/ml}) = 16,82.A_{665,2} - 9,28.A_{652,4}$$

$$+ C_b (\mu\text{g/ml}) = 36,92.A_{652,4} - 16,54.A_{665,2}$$

$$+ C_{(x+c)} (\mu\text{g/ml}) = (1000.A_{470} - 1,91.C_a - 95,15.C_b)/225$$

- Ví dụ: nếu tính ra hàm lượng diệp lục/g mẫu khô như sau:

$$+ C_a (\text{mg/g khối lượng khô}) = (13,36.A_{664,1} - 5,19.A_{648,6}).8,1/ \text{khối lượng khô}$$

$$+ C_b (\text{mg/g khối lượng khô}) = 27,43.A_{648,6} - 8,12.A_{664,1}).8,1/ \text{khối lượng khô}$$

$$+ C_{a+b} (\text{mg/g khối lượng khô}) = (5,24.A_{664,1} + 22,24.A_{648,6}).8,1/ \text{khối lượng khô}$$

$$+ C_{(x+c)} (\mu\text{g/g khối lượng khô}) = (4,785.A_{470} + 3,657.A_{664,1} - 12,76.A_{648,6}).8,1/ \text{khối lượng khô.}$$

* An toàn: đeo găng tay, lấy etanol trong tủ hút, sau khi đo xong, dịch chiết sắc tố được đổ vào bình chứa chất thải.

* Khía cạnh sinh lý liên quan đến hàm lượng diệp lục (dl) và carotenoid:

Nồng độ của diệp lục a và diệp lục b trong nguyên liệu thực vật có thể được định lượng với các hệ thống tham chiếu khác nhau. Các hệ thống tham chiếu hiện tại bao gồm: mg dl_{a+b}/m² diện tích lá (hoặc μg/cm² diện tích lá), μg dl_{a+b}/g khối lượng khô, và mg dl_{a+b}/g khối lượng tươi (cách này ít phù hợp so với khối lượng khô).

Khi so sánh các kết quả với các nhóm còn lại hoặc các giá trị thu được từ quan sát trước đó, nên dùng chung cùng một hệ tham chiếu. Thay đổi trong hàm lượng dl cần được thể hiện bằng các giá trị trung bình của một tham chiếu không thay đổi, nếu không, có thể một biến thể của quan sát dữ liệu có được không phải do sự thay đổi nồng độ dl mà thay đổi trong hệ thống tham chiếu. Ví dụ, sự tăng hàm lượng dl trên khối lượng tươi (trong lá hoặc quả) có thể chỉ do sự giảm khối lượng tươi do mất nước. Trong nhiều trường hợp, số lá trên cây, số cặp lá mầm, số cây con (số chồi) hoặc số quả có thể là hệ thống tham chiếu tốt để theo dõi những thay đổi về mức độ sắc tố, vì những số này không thay đổi khi diện tích lá hay khối lượng lá khác nhau.

Dlb được tìm thấy chỉ ở hệ thống sắc tố ăng-ten, trong khi đó, dla có mặt trong trung tâm phản ứng của hệ thống PSI, PSII và trong sắc tố ăng-ten. Ngoài ra, hệ thống hấp thu ánh sáng LHC-I của hệ thống PSI có tỷ lệ dla/b xấp xỉ 3, mà tỷ lệ này ở LHC-II của PSII là khoảng 1,1 - 1,3. Mức độ của LHC-II của PSII biến động và cho thấy phản ứng thích nghi ánh sáng. Cây ưa bóng có số lượng LHC-II cao hơn so với cây ưa sáng, vì vậy tỷ lệ dla/b của chúng thấp hơn cây ưa sáng (Lichtenthaler et al., 1982, 1984). Sự suy giảm tỷ lệ dla/b có thể được hiểu như là sự mở rộng của hệ thống ăng-ten của PSII. Tỷ lệ dla/b trong lá ở các giai đoạn phát triển khác nhau là khác nhau, thay đổi tùy theo điều kiện sáng mạnh hoặc yếu. Tỷ lệ dla+b với carotenoid tổng số: $(a+b)/(x+c)$ là một chỉ số của màu xanh lá cây. Tỷ lệ $(a+b)/(x+c)$ thường nằm trong khoảng 4,2 - 5,0 trong lá cây ưa sáng và cây ngoài sáng, với cây ưa bóng, cây chịu bóng thì nằm trong khoảng 5,5 - 7,0. Giá trị thấp hơn của tỷ lệ này là một chỉ số (dấu hiệu) của sự già hóa và stress ảnh hưởng có hại tới cây và tới bộ máy quang hợp, nó là biểu hiện của sự phá hủy dl và carotenoid nhanh chóng. Lá trở nên vàng hơn và giá trị của tỷ lệ này khoảng 3,5 thậm chí xuống đến 2,5 - 3,0 khi già hóa. Hàm lượng dla+b của lá ưa sáng ở các cây khác nhau có giá trị trung bình khoảng 400-700mg/m² diện tích lá (40-70μg/cm²) và ở lá cây ưa bóng là 380-570mg/m² diện tích lá (38-57μg/cm²).

6.2. Xác định hàm lượng diệp lục tổng số bằng máy SPAD-502

* Nguyên tắc thí nghiệm:

Sử dụng máy đo hàm lượng diệp lục là phương pháp xác định nhanh hàm lượng diệp lục mà không gây tổn thương tới cây trồng. Máy dựa trên nguyên tắc đo mật độ quang tại hai bước sóng 940nm và 660nm do đó xác định được hàm lượng diệp lục tổng số (diệp lục a và diệp lục b).

* Thiết bị và vật liệu:

Sử dụng máy đo hàm lượng diệp lục tổng số SPAD-502, đơn vị đo mặc định của máy là SPAD, từ đơn vị này quy đổi sang mg/cm^2 .

Mẫu lá: chọn các mẫu lá cùng tầng để đo (tốt nhất lá thứ 3 từ trên trở xuống vì những lá này có khả năng quang hợp tốt nhất). Diện tích lá của các mẫu đo phải có chiều dài và chiều rộng lớn hơn hoặc bằng 1cm vì buồng lá để đo của máy có hình tròn với diện tích 1cm^2 .

* Cách tiến hành:

Bước 1: Xoay nút **Power** mở nguồn lên phía **ON** để mở máy

Sau khi mở nguồn chưa đặt mẫu vào kẹp mà dùng ngón cái và ngón trỏ tay phải đưa kẹp vào trạng thái đóng - hoạt động, giữ khoảng 3-5 giây cho đến khi nghe tiếng kêu bíp là máy đã khởi động xong.

Máy khởi động xong, trên màn hình xuất hiện hai dòng: $n=0$ (thể hiện số thứ tự của phép đo), và hàng dưới là - - - (3 gạch ngang - thể hiện kết quả đo).

Bước 2: Chọn mẫu đo rồi lau sạch và khô lá.

Bước 3: Dùng tay trái đưa mẫu vào kẹp sao cho phần mẫu cần đo vượt qua đèn trên kẹp, tay phải đóng kẹp, đợi khoảng 3-5 giây nghe tiếng kêu bíp là được. Kết quả được hiển thị trên màn hình. Cứ như vậy ta kẹp và đo các mẫu tiếp theo.

Bước 4: Khi đo xong ta xoay nút **Power** về **OFF** để tắt máy.

Chú ý: Thời gian đo hàm lượng diệp lục tổng số nên đo cùng thời điểm ở các ngày đo. Tùy thuộc vào mùa vụ ta chọn thời gian đo phù hợp. Ví dụ: Mùa hè, thời gian đo khoảng 7 - 8 giờ sáng lúc đó lá đã khô sương và ánh sáng thích hợp nhất để cây quang hợp; mùa đông chọn thời gian khoảng 8 - 9 giờ sáng.

* *Cách tính hàm lượng diệp lục:*

Trong phương pháp này, chúng tôi tính hàm lượng diệp lục (a, b, a+b) từ đơn vị SPAD sang mg/cm² quy đổi theo Richardson A.D:

- Hàm lượng d_{la}:

$$Y \text{ (mg/cm}^2\text{)} = 1,56 \cdot 10^{-6} + 3,33 \cdot 10^{-4}x + 9,03 \cdot 10^{-6}x^2 \text{ (r}^2 = 0,952\text{)}$$

- Hàm lượng d_{lb}:

$$Y \text{ (mg/cm}^2\text{)} = 5,46 \cdot 10^{-4} + 6,89 \cdot 10^{-5}x + 3,37 \cdot 10^{-6}x^2 \text{ (r}^2 = 0,964\text{)}$$

- Hàm lượng d_{la+b}:

$$Y = 5,52 \cdot 10^{-4} + 4,04 \cdot 10^{-4}x + 1,25 \cdot 10^{-5} \cdot x^2 \text{ (r}^2 = 0,960\text{)}.$$

Trong đó: Y – hàm lượng diệp lục (mg/cm²); x – giá trị SPAD.

6.3. Khả năng huỳnh quang diệp lục

* Nguyên tắc thí nghiệm:

Diệp lục là sắc tố có khả năng thu nhận năng lượng ánh sáng. Một phần năng lượng ánh sáng được diệp lục chuyển cho trung tâm phản ứng sử dụng cho việc tổng hợp chất hữu cơ, một phần lớn năng lượng còn lại được diệp lục bức xạ trở lại ở dạng huỳnh quang.

Cây sống trong điều kiện thuận lợi, diệp lục không bị tổn thương sẽ làm tốt nhiệm vụ thu nhận, vận chuyển năng lượng và phát huỳnh quang. Khi điều kiện môi trường bất lợi hay trao đổi

chất bị ảnh hưởng xấu, việc sử dụng năng lượng ánh sáng trong quang hợp kém và ít hiệu quả nên năng lượng dư thừa lớn, điều này thấy rõ ở giá trị huỳnh quang F_0 tăng và giá trị F_v giảm sút. Sự biến động của 2 giá trị này còn cho thấy mức độ tổn thương của diệp lục dưới tác động của stress môi trường.

* Thiết bị, vật liệu: máy đo huỳnh quang Chlorophyll fluorometer OS-30. Mẫu lá cây.

* Cách tiến hành:

- Chọn mẫu lá có kích thước phù hợp với buồng đo.

- Dùng kẹp của máy kẹp lá để tạo thời gian ủ tối 10 phút để các trung tâm phản ứng về trạng thái mở. Đo giá trị F_0 . Sau đó đo

giá trị F_m , rồi tính $F_v = \frac{F_m - F_0}{F_m}$.

Các kết quả đo được lưu lại và chuyển qua máy tính để xử lý.

* *Một số ứng dụng trong sinh học*: Nghiên cứu huỳnh quang thường được tiến hành khi cần đánh giá ảnh hưởng của stress môi trường, tác động của phân bón và các chất phytohormon, sâu bệnh hại...

So sánh với mẫu đối chứng có thể đánh giá được mức độ ảnh hưởng của điều kiện bên ngoài đến bộ máy quang hợp của cây.

6.4. Cường độ quang hợp

6.4.1. Xác định cường độ hấp thụ CO_2 trong quang hợp nhờ hệ thống PP SYSTEM TPS-2

* Nguyên tắc thí nghiệm:

Sử dụng thiết bị PP SYSTEM TPS-2 phân tích chỉ tiêu quang hợp (CO_2) của cây trồng dựa trên phương pháp phát hiện bằng detector hồng ngoại.

Máy sử dụng bộ vi xử lý điện tử điều khiển và thiết lập các thông số đo, hiển thị kết quả đo trên màn hình LCD.

* Thiết bị, vật liệu: máy đo cường độ quang hợp PP SYSTEM TPS-2, mẫu lá (chọn các lá cùng tầng, tốt nhất là tầng thứ 3 từ trên xuống)

* Cách tiến hành:

Bước 1: Kết nối đầu dò thu tín hiệu vào chân PLC, kết nối đầu khí vào cửa đầu dò (ký hiệu là A trên đầu dò) vào cổng PCL A trên máy đo. Kết nối đầu khí ra của đầu dò (ký hiệu là R trên đầu dò) vào cổng PCL R trên máy đo.

Bước 2: Ấn vào nút Power để mở máy, chờ máy khởi động (khi máy hiển thị nhiệt độ sưởi ấm 55°C thì khởi động xong)

Bước 3: Trong khi chờ máy khởi động thiết lập thông số của phép đo như chế độ lưu tự động hay lưu bằng tay, chế độ ánh sáng tự nhiên hay đèn led, mức độ chiếu sáng

Bước 4: Sau khi máy khởi động xong ta chọn mẫu lá để đo, chọn các mẫu lá cùng tầng, tốt nhất là lá thứ 3 từ trên xuống vì lá đó có khả năng quang hợp tốt nhất.

Bước 5: Sau khi chọn được lá cần đo phải lau sạch lá (chú ý không được làm tổn thương lá). Kẹp buồng lá vào lá cần đo theo đúng kỹ thuật.

Bước 6: Chờ thông số CO₂ hiển thị tương đối ổn định rồi ấn nút 4/X để xem dữ liệu tính toán của phép đo, ghi lại kết quả đo.

Tiếp tục ta kẹp buồng lá vào các lá khác để đo mẫu tiếp theo

* *Chú ý:*

- Khi không đo phải khoá buồng đo lại.

- Sau khi đo xong phải lau chùi vệ sinh máy và buồng đo sạch sẽ.

* *Một số ứng dụng trong sinh học*

Phân tích thông số quang hợp của cây qua các chỉ số máy đo được ta có thể xác định khả năng quang hợp của các loài thực vật,

các giống cây trồng khác nhau; đánh giá tác động của chế độ dinh dưỡng, của các biện pháp kỹ thuật; ảnh hưởng của các yếu tố stress môi trường tới quang hợp và năng suất.

6.4.2. Xác định cường độ quang hợp theo độ tăng khối lượng chất khô (theo Sachs)

* Nguyên tắc thí nghiệm: muốn biết cây quang hợp mạnh hay yếu thường dùng khái niệm về cường độ quang hợp. Cường độ quang hợp thường được tính theo số mg CO₂ hút vào ở 1dm² diện tích lá trong 1 giờ. Ngoài ra, cường độ quang hợp còn được tính theo độ tăng khối lượng lá trong đơn vị thời gian do chất hữu cơ tạo thành trong quang hợp, theo lượng cacbon hữu cơ tích lũy được trong một đơn vị thời gian, trên một đơn vị diện tích lá.

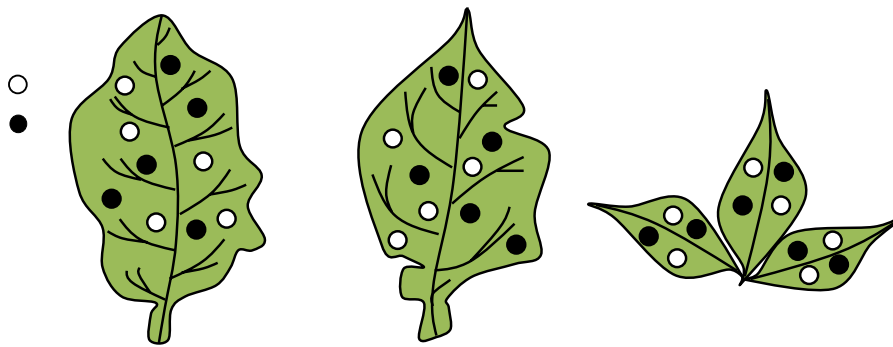
* Thiết bị và vật liệu:

- Cây có cấu tạo lá đối xứng qua gân lá.
- Tủ sấy, bình hút ẩm.
- Khoan lá cây có đường kính 1cm.
- Hộp sấy bằng kim loại, hoặc chén sứ.
- Cân phân tích hoặc cân điện.

* Cách tiến hành:

Chọn cây thí nghiệm có cấu tạo lá đối xứng qua gân lá. Dùng kéo cắt 1/2 lá về một phía (vào thời điểm 7 - 8 giờ sáng) rồi ngâm vào trong nước 30 phút, sau đó đặt lá lên bàn cao su, khoan lấy một số mảnh lá (cũng có thể không cần cắt rời lá ra, mà chỉ cần khoan các mảnh trên phiến lá, phần còn lại để lá tiếp tục quang hợp). Đếm số mảnh lá đó nhân với diện tích một mảnh được diện tích lá thí nghiệm. Cho các mảnh lá đó vào hộp kim loại hoặc chén sứ đặt vào tủ sấy, sấy ở nhiệt độ 100 -105⁰C sau thời gian 2 giờ lấy

ra, để nguội trong bình hút ẩm, rồi cân cả hộp và nguyên liệu, sau đó lại tiếp tục sấy trong 30 phút mang cân lại đến khi nào khối lượng không đổi - đó là khối lượng khô tuyệt đối. Khối lượng của lá khô sẽ bằng khối lượng cả hộp và lá trừ đi khối lượng vỏ hộp. Đặt cây mang 1/2 lá còn lại (hoặc mang lá đã khoan một số miếng mà không cắt đi) ra ngoài sáng 4 - 6 giờ, cắt nửa lá đó rồi tiến hành như nửa lá trước (hoặc vẫn để nguyên lá chỉ khoan lấy mảnh lá), để xác định khối lượng khô tuyệt đối.



- Mảnh lá khoan trước khi thí nghiệm
- Mảnh lá khoan sau khi thí nghiệm

Cường độ quang hợp ở đây sẽ bằng hiệu số khối lượng khô những mảnh lá sau khi quang hợp trừ đi khối lượng khô những mảnh lá khoan trước trên 1dm² trong 1 giờ. Theo công thức sau:

$$I = \frac{P_2 - P_1}{S \cdot t} \text{ (mg/dm}^2\text{/h)}$$

Trong đó: I - cường độ quang hợp; P₁ - khối lượng khô tuyệt đối của những miếng lá trước khi để cây ra ngoài sáng; P₂ - khối lượng khô tuyệt đối của những miếng lá của nửa lá còn lại sau khi để cây ra ngoài sáng 4 - 6 giờ; S - diện tích lá (dm²); T - thời gian thí nghiệm (giờ).

Cần chú ý: số miếng lá khoan trước và sau phải bằng nhau.

6.4.3. Xác định cường độ quang hợp theo phương pháp Ivanop - Kosovich

* Nguyên tắc thí nghiệm:

- Cường độ quang hợp được đo bằng lượng CO₂ hấp thu trong thời gian cây quang hợp trên một đơn vị diện tích lá (số mg CO₂ hấp thu/cm²/1 giờ).

Lượng CO₂ hấp thu được xác định trong bình kín có lá cây đặt ngoài sáng. Hiệu số giữa lượng CO₂ trước và sau khi thí nghiệm chính là lượng CO₂ mà cây sử dụng để quang hợp trong thời gian thí nghiệm. Để xác định lượng CO₂ trong bình, ta cho kết hợp với Ba(OH)₂. Từ lượng Ba(OH)₂ tác dụng với CO₂ ta sẽ tính được lượng CO₂ trong bình đối chứng và bình thí nghiệm.

- Tuy nhiên trong thời gian cây tiến hành quang hợp, cây cũng tiến hành quá trình hô hấp và thải CO₂ vào bình. Vì vậy để xác định chính xác lượng CO₂ sử dụng trong quang hợp, ta cần xác định lượng CO₂ thải ra trong hô hấp bằng cách có một bình cây che sáng để tiến hành hô hấp và xác định cường độ hô hấp.

- Tiếp theo cần xác định diện tích lá để áp dụng công thức tính cường độ quang hợp và cường độ hô hấp của cây.

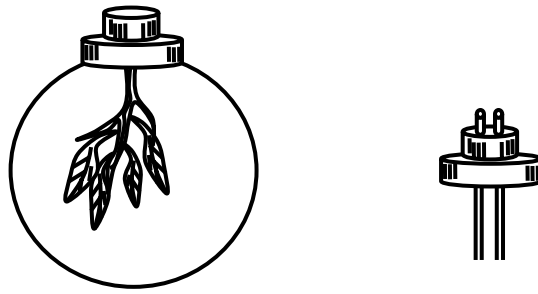
* Thiết bị và vật liệu:

- Cành cây tươi để xác định cường độ quang hợp.

- Bình tam giác 1000ml (hoặc bình tròn 1000ml), nút cao su có lỗ, dao, kéo, dây buộc, giấy đen, buret 2 vòi, buret 1 vòi, bình trụ 5l có nút kín đựng dung dịch Ba(OH)₂, HCl 0,02N, Ba(OH)₂ 0,02N, nước cất.

* Cách tiến hành:

Chuẩn bị 3 bình: Bình đối chứng (không có cây), bình quang hợp (có cây ở ngoài sáng), bình hô hấp (có cây đặt trong bình có bọc giấy đen bên ngoài và để ở ngoài sáng)



Hình 5.8. Bình đo cường độ quang hợp

- Mở nút bình trước khi thí nghiệm để không khí trong và ngoài bình như nhau, rồi đậy nút lại. Cho lá cây vào bình quang hợp và bình hô hấp rồi đậy nút lại như hình 5.8:

- o Bình quang hợp để ngoài sáng, bình hô hấp lấy giấy đen bao lại.
- o Bình đối chứng cũng đậy lại và đặt trong phòng thí nghiệm. Sau 30 phút nhẹ nhàng lấy lá cây ra khỏi bình và đậy nút lại.
- o Lấy vào mỗi bình 20ml $\text{Ba}(\text{OH})_2$ qua lỗ trên nút bình.
- o Lắc tròn nhẹ nhàng để tác dụng với CO_2 trong bình.
- o Sau đó dùng HCl 0,02N để chuẩn lại lượng $\text{Ba}(\text{OH})_2$ còn dư cho đến khi dung dịch chuyển từ màu hồng sang trắng.

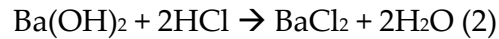
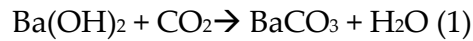
Chú ý:

- Vì $\text{Ba}(\text{OH})_2$ dễ thay đổi nồng độ khi tác dụng với CO_2 của không khí nên trước khi tính toán phải xác định lại nồng độ thực của $\text{Ba}(\text{OH})_2$. Muốn vậy, ta lấy 20ml $\text{Ba}(\text{OH})_2$ vào bình tam giác và chuẩn độ với HCl 0,02N. Sốml HCl sẽ là lượng cần thiết để trung hòa hết với 20ml $\text{Ba}(\text{OH})_2$ với nồng độ đúng của nó.

- Số liệu thu được về sự đồng hóa CO_2 chỉ là số liệu của quang hợp biểu kiến vì lượng CO_2 do hô hấp còn chưa được tính đến. Vì vậy, phải xác định cường độ hô hấp để tính cường độ quang hợp thực.

* Cách tính toán:

Thí nghiệm được tiến hành dựa trên hai phản ứng:



- Gọi lượng chuẩn độ HCl ở bình quang hợp là Aml, ở bình hô hấp là Bml, bình đối chứng là Cml.

- Lượng chuẩn độ lại 20ml Ba(OH)₂ là Xml. Vậy lượng CO₂ có trong bình đối chứng là (X-C).0,44

- Lượng CO₂ có trong bình quang hợp là (X-A).0,44. Lượng CO₂ mà cây sử dụng trong quang hợp là (X-C).0,44 - (X-A).0,44

$$I_{\text{qhbk}} = \frac{(X-C).0,44 - (X-A).0,44}{t} \times \frac{60}{s}$$

- Lượng CO₂ có trong bình hô hấp là (X-B).0,44. Lượng CO₂ thải ra trong hô hấp là (X-B).0,44 - (X-A).0,44

$$I_{\text{hh}} = \frac{(X-B).0,44 - (X-A).0,44}{t} \times \frac{60}{s}$$

- Vậy cường độ quang hợp thực là $I_{\text{qht}} = I_{\text{qhbk}} + I_{\text{hh}}$

6.5. Sự tích lũy chất khô trong quang hợp

* Nguyên tắc thí nghiệm:

Sự tích lũy chất khô trong quang hợp có vai trò quan trọng trong việc hình thành năng suất của cây trồng. Có thể xác định khả năng tích lũy chất khô của bất kỳ bộ phận nào của cây sau một thời gian ngắn (trong ngày) và thời gian dài hơn (một số ngày). Tuy nhiên, việc xác định sau thời gian ngắn gặp nhiều trở ngại hơn do mối tương quan giữa quá trình tổng hợp trong quang hợp với sự tiêu hao trong hô hấp và sự vận chuyển chất hữu cơ tới các cơ quan khác. Vì thế trong nghiên cứu nên xác định lượng chất

khô tích lũy được sau một thời gian. Hiệu suất quang hợp thuần túy là một chỉ tiêu khá thuận tiện để sử dụng.

* Thiết bị, vật liệu: cân điện có độ chính xác 10^{-4} , tủ sấy, kéo, máy đo diện tích lá, các bộ phận của cây theo mục đích thí nghiệm.

* Cách tiến hành:

Chọn các cây đại diện của công thức thí nghiệm. Mỗi đợt lấy khoảng 10 cây. Tách riêng các bộ phận cần đánh giá sự tích lũy chất khô (rễ, thân, lá, củ, quả...). Cân khối lượng tươi từng phần. Riêng lá cần đo diện tích. Sấy khô ở 105°C đến khối lượng không đổi. Diện tích lá có thể xác định bằng cách so sánh diện tích các hình lá có diện tích 1dm^2 vẽ trên giấy theo phương pháp khối lượng hoặc nhờ máy quét đo diện tích lá. Xác định sự tăng trưởng khối lượng chất khô nhờ quang hợp sau một thời gian thí nghiệm đối với các bộ phận của cây (rễ, thân, lá, quả...). Từ kết quả này có thể tính toán sự tăng trưởng khối lượng chất khô trung bình sau 1 ngày trên một đơn vị diện tích lá

$$\frac{1}{2}(S_1 - S_2)(t_1 - t_2)$$

Trong đó: S_1, S_2 - diện tích lá ở thời điểm t_1 ban đầu và t_2 (lần tiếp theo) hay trên một đơn vị khối lượng tươi/khô ban đầu.

6.6. Xác định năng suất quang hợp thuần túy NAR (Net assimilation rate) - Hiệu suất quang hợp thuần túy.

NAR: một giá trị phản ánh liên quan giữa năng suất cây trồng với kích thước của nó. Giá trị này là tỷ lệ giữa tăng khối lượng khô với kích thước lá (thường là diện tích lá).

* Thiết bị, vật liệu: tủ sấy, kéo, máy đo diện tích lá (hoặc giấy A_4 , thước kẻ, bút... nếu xác định diện tích lá bằng phương pháp gián tiếp qua khối lượng)

* Cách tiến hành:

- Trong một ruộng cây trồng, ta chọn lấy những cây đại diện rồi đánh dấu cẩn thận, mỗi đợt lấy một số cây nhất định.

- Đem tách riêng thân, lá, rễ. Lá được đo diện tích bằng máy đo diện tích lá hoặc đo gián tiếp bằng phương pháp khối lượng.

- Sau đó sấy khô các phần bằng tủ sấy tại 105°C cho đến khi khối lượng không đổi (khoảng 3 giờ đồng hồ). Cân lại khối lượng các phần.

- Ví dụ: Khối lượng khô trung bình toàn bộ cơ quan dinh dưỡng của 10 cây ngô trong lần xác định đầu tiên là $\bar{w}_1 = 200\text{mg}$, diện tích lá $\bar{L}_1 = 1,75\text{m}^2$. Sau 10 ngày, ta lại thu mẫu từ quần thể đó với số lượng cây giống lần thu thứ nhất, tiến hành thí nghiệm tương tự lần 1 ta được khối lượng trung bình $\bar{w}_2 = 300\text{mg}$, diện tích lá $\bar{L}_2 = 2,25\text{m}^2$

* Cách tính toán kết quả: Năng suất quang hợp thuần túy (tỷ lệ đồng hóa thực NAR) được tính theo một trong các công thức sau:

+ Theo Gregory:

$$\text{NAR} = \frac{1}{L} \cdot \frac{dW}{dt} \quad (1)$$

Trong thực nghiệm, mẫu thường được lấy trong khoảng 1 - 4 tuần để xác định cả W và L. Giá trị trung bình mẫu W và L được sử dụng để tính toán NAR theo công thức:

$$\text{NAR} = \frac{(\bar{W}_2 - \bar{W}_1)(\log_e^{L_2} - \log_e^{L_1})}{(t_2 - t_1)(\bar{W}_2 - \bar{W}_1)} \quad (2)$$

$$\text{NAR} = \frac{(300 - 200)(\text{Ln}2,25 - \text{Ln}1,75)}{10.(2,25 - 1,75)} = 5,026\text{g.m}^{-2}.\text{ngày}^{-1}$$

(nguồn:<http://www.nature.com/nature/journal/v200/n4908/abs/200814a0.html>)

+ Hoặc tính theo công thức được mô tả trong tài liệu của Nguyễn Duy Minh và cộng sự (Thực hành sinh lý thực vật, 1982, Nxb Giáo dục, tr.121):

$$\text{NAR} = \frac{(W_2 - W_1)}{1/2 \cdot (A_2 + A_1)(t_2 - t_1)}$$

Trong đó: A_1, A_2 : diện tích lá ở thời điểm ban đầu (t_1) và thời gian tiếp theo (t_2)

W_1 : khối lượng khô lúc ban đầu của toàn bộ cây

W_2 : khối lượng khô thời gian tiếp theo của toàn bộ cây.

Tính toán cho kết quả là $\text{NAR} = 5\text{g} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{ngày}^{-1}$.