

**BIÊN SOẠN: TS. NGUYỄN VĂN ÂY (CHỦ BIÊN)  
PGS. TS. LÊ VĂN BÉ - TS. TRẦN THANH MẾN**

# **NUÔI CẤY MÔ THỰC VẬT NGUYÊN LÝ VÀ THỰC HÀNH**



**NHÀ XUẤT BẢN ĐẠI HỌC CẦN THƠ  
2019**



## LỜI NÓI ĐẦU

Hiện nay tại đồng bằng sông Cửu Long người nông dân đã và đang sử dụng rất nhiều cây con cây mô như cây hoa kiếng (nhóm cúc, Lan), cây ăn trái (chuối, khóm), cây có vị thuốc (Đinh lăng, sâm), cây trồng rừng (Keo lai) dưới nhiều hình thức khác nhau như trồng trực tiếp hoặc sử dụng cây cấy mô để nhân giống. Nhằm đáp ứng nhu cầu cây cấy mô cho thực tế sản xuất, các sở trực thuộc tỉnh cũng như các công ty đã thành lập phòng nuôi cấy mô và đưa vào hoạt động mạnh mẽ ở các tỉnh như Lâm Đồng, Đồng Nai, Bình Dương, thành phố Hồ Chí Minh, Cần Thơ, Đồng Tháp.

Đối tượng có thể sử dụng tài liệu này là những sinh viên khối ngành nông nghiệp bậc đại học và sau đại học để họ nắm rõ nguyên lý và thực hành nuôi cấy mô. Hơn nữa, các kỹ thuật viên, nhà quản lý trong ngành sản xuất cây nuôi cấy mô có thể tham khảo vì tài liệu này đưa ra những nguyên lý và hướng dẫn những phần cụ thể và của công tác nuôi cấy mô.

Nguyên lý và thực hành sẽ được đề cập trong tài liệu này. Nguyên lý của nuôi cấy mô là dựa vào tính toàn năng của tế bào thực vật. Những tế bào chứa thông tin di truyền và có khả năng phân chia và tái sinh thành những cơ quan mới hoặc cơ thể mới khi đặt tế bào đó vào trong môi trường vô trùng.

Tài liệu này nhấn mạnh đến phần thực hành với các kỹ thuật thực hành cụ thể của một số cây mà nhóm tác giả đã thực hiện. Các nghiên cứu đó đã được tổng kết trong các luận văn, bài báo. Hơn nữa, trong vài các nghiên cứu đó đã được chuyển giao đến các trung tâm công nghệ của các tỉnh ở trong vùng. Hiện tại, các quy trình kỹ thuật đó đã và đang áp dụng mang lại nhiều lợi ích cho người nông dân sử dụng cây cấy mô trong thực tế sản xuất.

Tài liệu được biên soạn lần đầu và dựa trên sự hiểu biết có giới hạn của nhóm tác giả nên có thể không tránh khỏi một số thiếu sót. Nhóm tác giả cũng sẽ tự hiệu chỉnh, cập nhật và bổ sung để quyển sách này ngày càng được hoàn thiện hơn cả về nội dung và hình thức trong các tái bản lần sau. Với tinh thần cầu thị, nhóm tác giả rất mong nhận được sự góp ý của người học cũng như người đọc để bài giảng ngày càng hoàn chỉnh hơn.

Xin chân thành cảm ơn!

*Cần Thơ, ngày 05 tháng 07 năm 2019*

**Nhóm Tác giả**



# MỤC LỤC

<b>Chương 1. THIẾT KẾ PHÒNG NUÔI CÂY MÔ VÀ TẾ BÀO THỰC VẬT</b>	<b>1</b>
1.1 NGUYÊN TẮC THIẾT KẾ PHÒNG THÍ NGHIỆM NUÔI CÂY MÔ	1
1.2 CÁC PHÒNG CHỨC NĂNG	1
1.2.1 Phòng chuẩn bị	1
1.2.2 Phòng chuẩn bị môi trường	1
1.2.3 Phòng trữ môi trường đã chuẩn bị	1
1.2.4 Phòng cấy	1
1.2.5 Phòng nuôi cây	3
1.2.6 Phòng rửa dụng cụ và cây	4
1.3 CƠ SỞ HẠ TẦNG	5
1.3.1 Hệ thống điện	5
1.3.2 Hệ thống chiếu sáng	5
1.3.3 Hệ thống phân hủy	5
1.4 CÁC TRANG THIẾT BỊ VÀ HÓA CHẤT CẦN THIẾT	5
1.4.1 Phòng cấy	5
1.4.2 Phòng chuẩn bị môi trường nuôi cấy	6
1.4.3 Phòng để hóa chất	7
1.4 MỘT SỐ VẤN ĐỀ CẦN QUAN TÂM KHI XÂY DỰNG VÀ VẬN HÀNH PHÒNG NUÔI CÂY MÔ	8
<b>Chương 2. KỸ THUẬT NUÔI CÂY MÔ: MÔI TRƯỜNG NUÔI CÂY     VÀ PHƯƠNG PHÁP CHUẨN BỊ</b>	<b>9</b>
2.1 TỔNG QUAN VỀ KỸ THUẬT NUÔI CÂY MÔ	9
2.1.1 Học thuyết tế bào	9
2.1.2 Định nghĩa nuôi cấy mô và tế bào thực vật	9
2.1.3 Các giai đoạn của nuôi cấy mô và tế bào thực vật	9
2.1.4 Ưu và khuyết điểm nuôi cấy mô và tế bào thực vật	12
2.2 THÀNH PHẦN MÔI TRƯỜNG NUÔI CÂY	12
2.2.1 Nước	15
2.2.2 Các nguyên tố khoáng	15
2.2.3 Các chất điều hòa sinh trưởng	16
2.2.4 Các vitamin	17
2.2.5 Nguồn carbohydrate	17
2.2.6 Chất tạo gel	17
2.2.7 Chelate	18

2.2.8 Than hoạt tính (activated charcoal)	18
2.2.9 pH	18
2.2.10 Amino acid	18
2.2.11 Các thành phần bổ sung không xác định	19
<b>2.3 PHƯƠNG PHÁP CHUẨN BỊ MÔI TRƯỜNG NUÔI CÂY</b>	<b>19</b>
2.3.1 Chuẩn bị hóa chất	20
2.3.2 Chuẩn bị dung dịch gốc (stock solution)	21
2.3.3 Nấu môi trường	22
2.3.4 Đo pH	22
2.3.5 Khử trùng môi trường	23
<b>2.4 ĐIỀU KIỆN NUÔI CÂY</b>	<b>23</b>
2.4.1 Nhiệt độ	23
2.4.2 Ánh sáng	23
2.4.3 Ẩm độ (humidity)	25
2.4.4 Một số thao tác kỹ thuật cần lưu ý	25
<b>Chương 3. MẪU CÂY VÀ KỸ THUẬT VÔ TRÙNG MẪU CÂY</b>	<b>28</b>
<b>3.1 MẪU CÂY</b>	<b>28</b>
<b>3.2 KHỬ TRÙNG BỀ MẶT MẪU CÂY</b>	<b>30</b>
<b>3.3 VÔ TRÙNG MẪU HẠT</b>	<b>32</b>
3.3.1 Cách thứ nhất	32
3.3.2 Cách thứ 2	33
<b>3.4 VÔ TRÙNG CÁC BỘ PHẬN KHÁC CỦA MẪU THỰC VẬT</b>	<b>33</b>
3.4.1 Vô trùng đoạn thân, chồi non và lá	33
3.4.2 Vô trùng mẫu củ và rễ	34
3.4.3 Tránh hư (hoại) mẫu	34
<b>3.5 CÁC HÓA CHẤT KHỬ TRÙNG</b>	<b>35</b>
3.5.1 Cồn	35
3.5.2 Ion kim loại nặng	35
3.5.3 Dung dịch hypochloride	35
3.5.4 Chất diệt nấm và chất kháng sinh (antibiotic)	36
3.5.5 Các chất khử trùng khác	36
<b>3.6 THỜI GIAN KHỬ TRÙNG</b>	<b>36</b>
<b>3.7 MỘT SỐ VÍ DỤ VỀ CÁCH KHỬ TRÙNG BỀ MẶT</b>	<b>37</b>
3.7.1 Khử trùng bề mặt đoạn cành của cây <i>Pseudotsuga</i> và <i>Pinus</i> trồng ngoài đồng	37
3.7.2 Khử trùng bề mặt mẫu cây thủy xương bồ ( <i>Acorus calamus</i> L.) từ đoạn thân rễ	37

3.7.3	Khử trùng bề mặt mẫu cây cỏ Vietiver ( <i>Vetiveria zizanioides</i> )	38
3.7.4	Khử trùng bề mặt đoạn cành của hoa đỗ quyên ( <i>Rhododendron simsii</i> )	38
3.7.5	Khử trùng bề mặt đoạn cành của hoa hồng Nhung ( <i>Rosa chinensis</i> cv. Nhung)	39
3.7.6	Khử trùng đoạn cành Tre Rồng ( <i>Dendrocalamus giganteus</i> Wallich ex Munro)	40
3.8	<b>KHỬ TRÙNG MÔI TRƯỜNG VÀ DỤNG CỤ NUÔI CÂY</b>	40
3.8.1	Khử trùng nhiệt ướt	40
3.8.2	Khử trùng nhiệt khô	41
3.8.3	Tiệt trùng bằng màng lọc	42
3.8.4	Tủ cấy vô trùng	42
3.8.5	Tiệt trùng keo lọ nuôi cấy mô, dụng cụ làm việc và môi trường làm việc	43
3.9	<b>MỘT SỐ LƯU Ý KHI CÂY MẪU</b>	44
3.10	<b>THỰC HÀNH</b>	44
3.10.1	Hạt hướng dương ( <i>Helianthus annuus</i> L.) và carrot ( <i>Daucus carota</i> L.)	44
3.10.2	Hạt bông vải ( <i>Gossypium hirsutum</i> L.)	45
3.10.3	Hạt cây linh sam ( <i>Antidesma</i> sp.)	45
	<b>Chương 4. KÍCH THÍCH TẠO CALLUS</b>	<b>46</b>
4.1	<b>CALLUS VÀ QUÁ TRÌNH HÌNH THÀNH CALLUS</b>	46
4.2	<b>KỸ THUẬT TẠO CALLUS</b>	46
4.2.1	Nguyên tắc tạo callus	46
4.2.2	Cấy chuyển callus (callus subculture)	47
4.3	<b>ĐỊNH HƯỚNG NGHIÊN CỨU TRÊN CÁC MẪU CÂY</b>	48
4.4	<b>KỸ THUẬT NUÔI CÂY TẾ BÀO CALLUS CỦA MỘT SỐ LOÀI THỰC VẬT</b>	48
4.4.1	Kỹ thuật tạo callus trên cây mã đề ( <i>Plantago major</i> L.)	48
4.4.2	Kỹ thuật tạo callus trên cà rốt ( <i>Daucus carota</i> L.)	49
4.4.3	Kỹ thuật tạo callus trên cây tre Rồng ( <i>Dendrocalamus giganteus</i> Wallich ex Munro)	50
4.5	<b>CHỌN LỌC GIỐNG KHÁNG <i>IN VITRO</i></b>	52
4.5.1	Phương pháp chọn lọc	53
4.6	<b>BIẾN DỊ TẾ BÀO TRONG NUÔI CÂY CALLUS</b>	55
4.6.1	Nguyên nhân gây biến dị soma	55
4.6.2	Cơ chế gây biến dị soma	56
4.7	<b>THỰC HÀNH</b>	57
4.7.1	Thực hành 1: Kích thích tạo callus	57

4.7.2	Thực hành 2: Định hướng phát triển của mẫu cấy tạo callus	59
4.7.3	Thực hành 3: Nuôi cấy tế bào giai đoạn khả nạp	61
4.7.4	Thực hành 4: Chọn lọc tính kháng mặn in vitro	62
4.7.5	Thực hành 5: Đường cong tăng trưởng của tế bào callus thực vật	63
4.7.6	Thực hành 6: Các biến dị kiểu hình trong nuôi cấy callus thực vật	65
<b>Chương 5. SỰ PHÁT SINH HÌNH THÁI VÀ TÁI SINH CÂY TỪ CALLUS</b>		<b>67</b>
5.1	SỰ TẠO PHÔI VÔ TÍNH	67
5.1.1	Sự tạo phôi vô tính (somatic embryogenesis)	67
5.1.2	Các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình hình thành phôi vô tính	68
5.2	SỰ PHÁT SINH HÌNH THÁI (Morphogenesis)	71
5.3	TÁI SINH CÂY	72
5.3.1	Tái sinh chồi tre rồng ( <i>Dendrocalamus giganteus</i> Wallich ex Munro)	73
5.3.2	Tái sinh chồi quýt Đường ( <i>Citrus reticulata</i> Blanco)	73
5.3.3	Cây Đại Hồng Môn ( <i>Anthurium andreanum</i> L.)	74
5.4	THỰC HÀNH	75
5.4.1	Thực hành 1: Khảo sát sự tạo rễ củ trên khoai tây	75
5.4.2	Thực hành 2: Khảo sát sự tạo phôi vô tính	76
5.4.3	Thực hành 3: Tái sinh cây con từ mẫu callus in vitro của lúa	78
5.4.4	Thực hành 4: Khảo sát tính miễn trạng của mẫu cấy	78
5.4.5	Thực hành 5: Khảo sát sự phát sinh hình thái từ mẫu cây tử diệp	80
<b>Chương 6. TẠO CÂY ĐƠN BỘI TỪ NUÔI CÂY HẠT PHẦN</b>		<b>81</b>
6.1	KỸ THUẬT CÂY TÚI PHẦN VÀ HẠT PHẦN (anther and pollen culture)	81
6.1.1	Điều kiện sinh trưởng của cây mẹ	81
6.1.2	Tiền xử lý mầm hoa hay túi phần	84
6.1.3	Phương pháp tách ra từng phần nhỏ	84
6.1.4	Môi trường cấy	86
6.1.5	Điều kiện nuôi cấy	87
6.1.6	Thuận lợi và bất lợi của nuôi cấy hạt phần	87
6.2	NUÔI CÂY HẠT PHẦN CÂY LÚA	88
6.2.1	Các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình nuôi cấy bao phấn lúa	88
6.3	NUÔI CÂY HẠT PHẦN CÂY CÀ CHUA ( <i>Lycopersicon esculentum</i> Miller)	91
6.4	NUÔI CÂY BAO PHẦN CÂY BẮP (NGÔ)	93
6.5	THỰC HÀNH	94
6.5.1	Thực hành 1: Nuôi cấy bao phấn cà dươc	94
6.5.2	Thực hành 2: Nuôi cấy bao phấn cây từ linh lan	96
6.5.3	Thực hành 3: Nuôi cấy bao phấn cây thuốc lá	97



<b>Chương 7. KỸ THUẬT CỨU PHÔI</b>	<b>99</b>
7.1 NUÔI CÂY PHÔI CÂY BẮP	99
7.2 NUÔI CÂY PHÔI TRÊN MỘT SỐ LOẠI HOA QUẢ	102
7.2.1 Cứu phôi lai giữa 2 loài đậu nành ( <i>Glycine max</i> X <i>Glycine mekongensis</i> )	102
7.2.2 Cứu phôi trên cây khoai mì ( <i>Manihot esculenta</i> Crantz)	105
7.3 THỰC HÀNH	106
7.3.1 Thực hành 1: Kỹ thuật nuôi cấy phôi bắp	106
7.3.2 Thực hành 2: Kỹ thuật nuôi cấy phôi của cây lê và táo	107
<b>Chương 8. NUÔI CÂY ĐỈNH SINH TRƯỞNG TẠO CÂY SẠCH BỆNH</b>	<b>109</b>
8.1 PHÂN LẬP ĐỈNH SINH TRƯỞNG	109
8.2 TẠO CÂY SẠCH BỆNH	110
8.2.1 Tái sinh cây thông qua nuôi cấy đỉnh sinh trưởng	110
8.2.2 Vi ghép	113
8.3 SẢN XUẤT GIỐNG QUY MÔ LỚN TRÊN MỘT SỐ CÂY RAU HOA QUẢ	116
8.3.1 Nhân giống lan <i>Cymbidium</i> sạch virus	116
8.3.2 Nhân nhanh giống khóm 'Queen' sạch bệnh héo khô đầu lá	118
8.4 THỰC HÀNH	120
8.4.1 Thực hành 1: Phân lập mô phân sinh của chồi đỉnh	120
8.4.2 Thực hành 2: Tạo cây sạch bệnh do vi khuẩn và virus	121
8.4.3 Thực hành 3: Nhân giống tỏi bằng phương pháp phân lập mầm chồi từ củ	122
<b>Chương 9. NHÂN GIỐNG <i>IN VITRO</i> CÂY HOA KIỂNG QUY MÔ THƯỜNG MẠI</b>	<b>123</b>
9.1 NHÂN GIỐNG CÁC CÂY THÂN THẢO	123
9.1.1 Nhân giống cây hoa vạn thọ ( <i>Tagetes patula</i> L.)	123
9.1.2 Nhân giống cây hàm hương ( <i>Nashia inaguensis</i> Millsp.)	125
9.1.3 Nhân giống cây tre Ròng ( <i>Dendrocalamus giganteus</i> Wallich ex Munro) bằng kỹ thuật nuôi cấy mô	127
9.1.4 Nhân giống cây khóm kiểng ( <i>Ananas ananassoides</i> var. <i>nanua</i> L.B.Sm)	129
9.1.5 Nhân giống cây oải hương ( <i>Lavandula angustifolia</i> )	131
9.1.6 Nhân giống cỏ vetiver ( <i>Vetiveria zizanioides</i> ) bằng phương pháp nuôi cấy mô	133
9.2 NHÂN GIỐNG CÁC CÂY THÂN GỖ	135
9.2.1 Nhân giống cây bằng lăng nhiều hoa ( <i>Lagerstroemia floribunda</i> Jack)	135
9.2.2 Nhân giống cây hoa hồng Nhung ( <i>Rosa chinensis</i> cv. Nhung)	137

9.3 NHÂN GIỐNG MỘT SỐ CÂY DÙNG LÀM DƯỢC LIỆU	139
9.3.1 Nhân giống cây thủy xương bồ ( <i>Acorus calamus</i> L.)	139
9.3.2 Quy trình nhân giống cây gác ( <i>Momordica cochinchinensis</i> (Lour.) Spreng.)	141
9.3.3 Nhân giống cây mã đề ( <i>Plantago</i> sp.)	141
9.3.4 Nhân giống cây Ngũ gia bì chân chim ( <i>Schefflera heptaphylla</i> )	143
9.3.5 Nhân giống cây Kim ngân hoa ( <i>Lonicera japonica</i> Thunb.)	145
9.4 NHÂN GIỐNG MỘT SỐ CÂY ĂN QUẢ	147
9.4.1 Quy trình nhân giống cây chuối xiêm ( <i>Musa</i> sp.) bằng phương pháp cây mô	147
9.4.2 Quy trình nhân giống cây chuối già ( <i>Musa</i> sp.) bằng phương pháp cây mô	151
9.5 THỰC HÀNH	155
9.5.1 Thực hành 1: Nhân giống nhóm dương xỉ Boston	155
9.5.2 Thực hành 2: nhân giống nhóm ráng (dương xỉ Staghorn Ferns)	157
9.5.3 Thực hành 3: Nhân giống các cây nhóm ficus	158
9.5.4 Thực hành 4: Nhân giống các cây họ sống đời (kalanchoe)	159
9.5.5 Thực hành 5: Nhân giống cây hoa hồng từ đoạn thân mang mầm ngủ	161
9.5.6 Thực hành 6: Nuôi cấy mô lá cây tử linh lan	162
<b>Chương 10. PHÂN LẬP VÀ DUNG HỢP TẾ BÀO TRẦN</b>	<b>164</b>
10.1 PHÂN LẬP TẾ BÀO TRẦN	164
10.1.1 Lý do nuôi cấy tế bào trần	164
10.1.2 Các phương pháp tách tế bào trần	165
10.1.3 Môi trường và cách nuôi cấy tế bào trần	166
10.1.4 Biến đổi tế bào trần thành cây	167
10.2 DUNG HỢP TẾ BÀO TRẦN	169
10.2.1 Xử lý bằng $\text{NaNO}_3$	169
10.2.2 Xử lý bằng polyethylen glycol (PEG)	169
10.2.3 Dung hợp bằng điện	169
10.3 THỰC HÀNH	170
10.3.1 Thực hành 1: Phân lập tế bào trần của cây tử linh lan và cây bông vải	170
10.3.2 Thực hành 2: Dung hợp tế bào trần	173
<b>Chương 11. MỘT SỐ VẤN ĐỀ MẮC PHẢI TRONG NUÔI CÂY MÔ VÀ KỸ THUẬT XỬ LÝ</b>	<b>174</b>
11.1 NHIỄM VI SINH VẬT	174
11.1.1 Nhiễm do virus	174

11.1.2	Nhiễm vi khuẩn	175
11.1.3	Nấm	176
11.1.4	Mycoplasma	177
11.1.5	Nhện và bọ trĩ (mite và thrips)	177
11.2	SỰ HÓA NÂU (BROWNING)	178
11.2.1	Triệu chứng	178
11.2.2	Nguyên nhân	178
11.2.3	Các biện pháp chữa trị	179
11.3	SỰ BIẾN DỊ TẾ BÀO SO MA (SOMACLONAL VARIATION)	180
11.4	SỰ THỪA NƯỚC (HYPERHYDRICITY)	181
11.4.1	Triệu chứng (Symptoms)	181
11.4.2	Nguyên nhân	182
11.4.3	Chữa trị	182
11.5	SỰ CHẾT CHỒI (SHOOT NECROSIS)	182
11.6	CÁC CẤU TRÚC BẤT THƯỜNG VÀ THỂ KHẢM	183
	<b>TÀI LIỆU THAM KHẢO</b>	<b>185</b>

## THUẬT NGỮ VÀ TỪ VIẾT TẮT

- 2,4-D:	2,4-Dichlorophenoxy acetic acid
- 2iP:	6-Di-methyl-allyl-aminopurine.
- Adventitious roots or shoots:	chồi hoặc rễ bất định
- Adventitious shoot induction:	sự tạo chồi bất định (quá trình hình thành các chồi bất định trực tiếp trên mẫu vật hay gián tiếp từ tế bào callus)
- Adventitious shoot induction:	tạo chồi bất định
- Aseptic technique:	kỹ thuật vô trùng
- Autotrophy:	tự dưỡng (khả năng phát triển nhờ quang hợp mà không cần cung cấp nguồn dưỡng chất hữu cơ)
- Axillary shoot proliferation:	tạo (sinh sản) chồi nách hay chồi bên
- BA:	Benzyl adenine
- BAP:	Benzyl aminopurine
- Cell culture:	nuôi cấy tế bào
- Cryopreservation:	bảo quản lạnh sâu
- Differentiation:	sự biệt hóa, sự phân hóa (quá trình chuyên môn hóa các tế bào về chức năng và hình thái để tạo ra các loại mô, cơ quan và cơ thể hoàn chỉnh)
- DNA:	deoxyribonucleic acid
- EDDHA:	ethylene-diamine-di-o-hydroxyphenyl-acetic acid
- EDTA:	Ethylene-diamine-tetra-acetic acid
- Embryo culture:	nuôi cấy phôi
- Embryogenesis:	sự tạo phôi.
- Endogenous:	có nguồn gốc nội sinh
- Epigenetic variation:	ngoại biến
- Exogenous:	có nguồn gốc ngoại sinh
- Explant:	mẫu cấy
- Gametoclonal variation:	biến dị dòng giao tử
- HKĐL:	Héo khô đầu lá

- Hyperhydricity (vitrification): sự thừa nước, còn gọi là hiện tượng thủy tinh thể (sự mất cân đối về sinh lý của mẫu cây thực vật)
- IAA: Indole-3-acetic acid
- IBA: Indole-3-butyric acid
- *In vitro* propagation: nhân giống trong ống nghiệm
- *In vitro*: phương pháp nghiên cứu trong ống nghiệm
- *In vivo* (in life): phương pháp nghiên cứu trên sinh vật sống ở điều kiện sinh lý bình thường của của nó.
- Induction: sự cảm ứng, kích thích
- Juvenile: trạng thái non trẻ
- LED: light-emitting diode
- Meristem culture: nuôi cấy đỉnh sinh trưởng
- Micropropagation: vi nhân giống
- Micropropagators: các nhà vi nhân giống.
- Morphogenetic differentiation: sự biệt hóa về hình thái
- MS: Môi trường MS (Murashige và Skoog, 1962)
- MW: molecular weight, trọng lượng phân tử
- NAA:  $\alpha$ -Naphthalene acetic acid
- NST: nhiễm sắc thể
- Organ culture: nuôi cấy cơ quan (duy trì và phát triển toàn bộ hay một phần cơ quan của sinh vật trong điều kiện *in vitro*).
- Organogenesis: sự phát sinh cơ quan (hiện tượng các cơ quan riêng biệt như chồi, lá, rễ hình thành trong nuôi cấy)
- Pathogen free: sạch mầm bệnh
- PE: polyethylene
- Plant tissue culture: nuôi cấy mô thực vật
- PP: Polypropylene
- Primary culture: nuôi cấy khởi đầu, nuôi cấy sơ cấp
- Protoplast: tế bào trần (tế bào bị làm mất toàn bộ vách tế bào)
- Pseudodiploid: lưỡng bội giả

- Regeneration: sự tái sinh (hiện tượng các tế bào hoặc mô nuôi cấy chịu tác động kích thích phân hóa thành mô, cơ quan hay cây hoàn chỉnh)
- Shoot apical meristem: đỉnh sinh trưởng chồi ngọn
- Shoot tip (apex) culture: nuôi cấy đỉnh chồi (ngọn)
- Somatic cell hybridization: lai tế bào sinh dưỡng (soma)
- Somatic embryogenesis: sự tạo phôi soma hay phát sinh phôi vô tính (chỉ sự phát triển của các phôi hoàn chỉnh từ các tế bào sinh dưỡng nuôi cấy *in vitro*)
- Subculture: cấy truyền
- Suspension culture: nuôi cấy huyền phù, dịch treo tế bào (phương pháp nuôi tế bào đơn hay cụm nhiều tế bào ở trạng thái lơ lửng trong môi trường lỏng)
- TDZ: Thidiazuron
- Totipotency: tính toàn năng
- UV: ultraviolet, tia cực tím
- Vegetative propagation: nhân giống vô tính
- Virus free: sạch virus
- Zygotic embryogenesis: sự phát sinh phôi hữu tính

# Chương 1

## THIẾT KẾ PHÒNG NUÔI CÂY MÔ VÀ TẾ BÀO THỰC VẬT

### 1.1 NGUYÊN TẮC THIẾT KẾ PHÒNG THÍ NGHIỆM NUÔI CÂY MÔ

Nguyên tắc thiết kế phòng nuôi cây mô phải độc lập, giảm bớt sự nhiễm bẩn và phải có sự liên kết với nhau giữa các phòng chức năng.

Một phòng cây mô để sản xuất hoặc nghiên cứu thì phải có ít nhất 5 phòng chức năng. Các phòng này có cửa độc lập và nối với nhau bằng hành lang và hành lang này cũng độc lập với bên ngoài để giảm bụi bẩn, ô nhiễm. Các phòng này phải lau dọn định kỳ 1 tuần/lần hoặc khử trùng khi cần thiết vào những ngày nghỉ.

### 1.2 CÁC PHÒNG CHỨC NĂNG

#### 1.2.1 Phòng chuẩn bị

Phòng này có diện tích khoảng 60-80 m<sup>2</sup>, chức năng của phòng này là để nhân viên rửa tay, thay trang phục, giày dép trước khi đi vào các phòng khác. Phòng này còn nơi chứa những dụng cụ keo lọ sử dụng liền. Các mẫu từ ngoài đồng đem vào cũng được vệ sinh tại phòng này (Hình 1.1).

#### 1.2.2 Phòng chuẩn bị môi trường

Đây là phòng quan trọng vì phòng này quyết định công suất hoạt động của phòng nuôi cây mô. Phòng này cũng là nơi tập trung nhiều trang thiết bị nhất như nồi hấp khử trùng, tủ sấy, các hóa chất, nước cất, v.v... Tùy vào số lượng sinh viên hoặc công suất vận hành mà phòng này có diện tích lớn khoảng hơn 100 - 240 m<sup>2</sup>. Trong phòng này nên có bảng để giảng dạy hoặc bảng phân công công tác trong tuần (Hình 1.1).

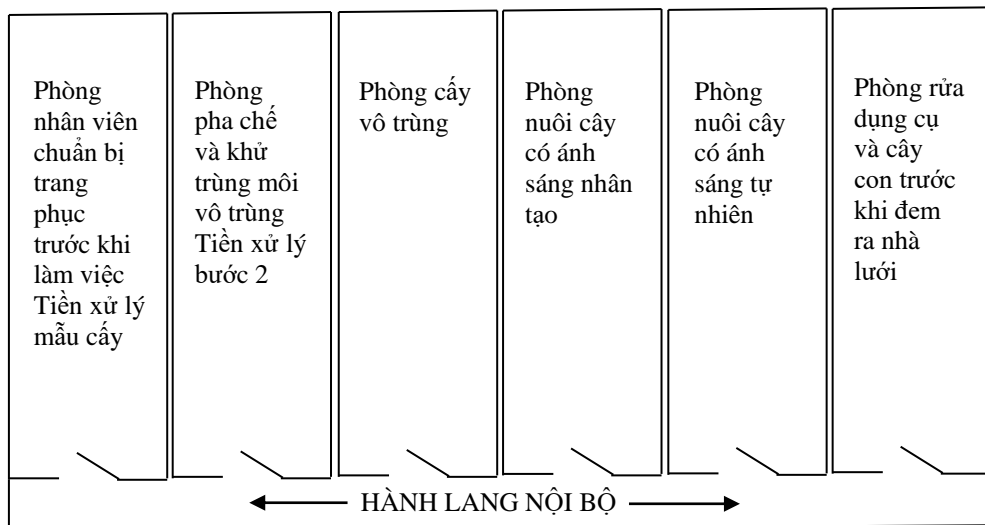
#### 1.2.3 Phòng trữ môi trường đã chuẩn bị

Môi trường sau khi khử trùng thì được trữ lại sau 1 tuần mới được sử dụng. Phụ thuộc vào công suất vận hành của hệ thống cũng như phụ thuộc vào số lượng sinh viên đến thực tập mà phòng này có diện tích lớn hay nhỏ. Tuy nhiên, để thuận tiện thì phòng này có diện tích nhỏ hơn 100 m<sup>2</sup> (Hình 1.2).

#### 1.2.4 Phòng cấy

Đây là phòng quan trọng vì đòi hỏi phải vô trùng tốt nhất trong các phòng. Các mẫu cây từ ngoài đem vào sau khi vệ sinh thật sạch thì tiến hành khử trùng một lần nữa bằng hóa chất trong các tủ cấy vô trùng. Phòng này

không được thiết kế các vòi nước rửa vì làm tăng ẩm độ thì mầm bệnh dễ phát triển. Phải trang bị máy lạnh cho phòng này và duy trì nhiệt độ khoảng 24-25°C. Các hóa chất khử trùng chứa kim loại nặng như  $HgCl_2$ , sau khi sử dụng thì cho vào thùng nhựa chứa lại để đi xử lý.



**Hình 1.1** Sơ đồ bố trí các phòng chức năng của phòng nuôi cấy mô



**Hình 1.2** Phòng thử môi trường nuôi cấy sau khi đã khử trùng



Ngoài ra, phòng này có nhiều tủ cấy, nhiều người tham gia nên phải thiết kế rộng để cùng nhau thoát khỏi phòng một cách nhanh chóng và an toàn khi gặp sự cố (Hình 1.3).



**Hình 1.3** Hoạt động của phòng cấy tại công ty Rừng Hoa Đà Lạt

### **1.2.5 Phòng nuôi cây**

Diện tích của phòng này lớn nhất trong các phòng và cây cũng lưu lại trong phòng này dài nhất. Có hai loại phòng nuôi dưỡng cây là sử dụng ánh sáng nhân tạo và phòng sử dụng ánh sáng tự nhiên.

#### **Phòng có ánh sáng nhân tạo**

Phòng này là một trong những phòng tiêu thụ điện nhiều nhất vì có hàng loạt bóng đèn. Thật ra phòng này được thiết kế những kệ dài có trang bị đèn. Cường độ ánh sáng trong khoảng 2.000 lux. Tùy theo cây có thể bố trí ánh sáng xanh như bóng đèn LED hoặc huỳnh quang. Có những loại cây cần ánh sáng trong vùng vàng giúp cây cứng cáp. Thời gian chiếu sáng trong ngày khoảng 12-14 giờ/ngày. Nhiệt độ trong phòng này nên duy trì khoảng 24-25°C (Hình 1.4).



**Hình 1.4** Phòng nuôi cây có ánh sáng đèn nhân tạo dao động 2.000 lux, duy trì nhiệt độ 24-25°C

### **Phòng sử dụng ánh sáng tự nhiên**

Phòng này dành cho những phòng thí nghiệm nuôi cấy mô sản xuất tận dụng ánh sáng tự nhiên để giảm giá thành sản xuất. Một vai trò của phòng sử dụng ánh sáng tự nhiên để huấn luyện cây trước khi đem ra ngoài nhà lưới. Thông thường phòng này không cần máy lạnh được thiết kế liền kề trong hệ thống (Hình 1.1) hoặc tách rời như Hình 1.4.

#### **1.2.6 Phòng rửa dụng cụ và cây**

Phòng này khá rộng vì để vệ sinh các dụng cụ của phòng cấy mô và trữ tạm thời các dụng cụ sau khi làm vệ sinh. Ngoài ra, trong phòng này còn có máy thanh trùng để khử các dụng cụ, keo, chai lọ bị nhiễm trước khi rửa.



**Hình 1.5** Phòng nuôi cây sử dụng ánh sáng tự nhiên để huấn luyện cây trước khi đem cây ra nhà lưới