

R

TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM THÁI NGUYÊN
BỘ MÔN CNSH VÀ CBBQ

QUI TRÌNH NUÔI MÔ TẾ BÀO PHÔI HẠT
LÚA CHÍN

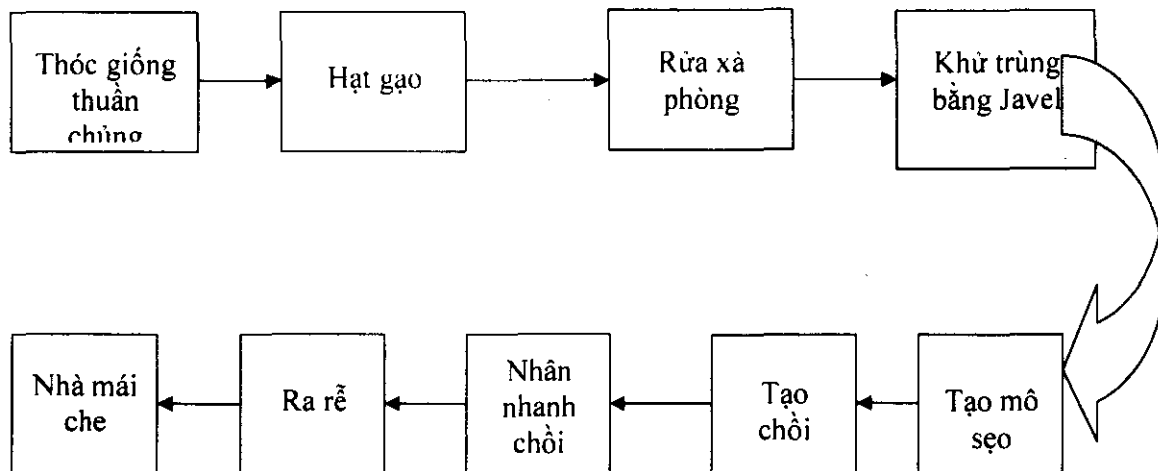
Thái Nguyên ngày 15 tháng 12 năm 2008

7435-1

I
1/2703

QUY TRÌNH NUÔI CÂY

I. SƠ ĐỒ TÓM TẮT QUI TRÌNH NUÔI CÂY



II. CÁC BƯỚC NUÔI CÂY, ĐIỀU KIỆN VÀ MÔI TRƯỜNG NUÔI CÂY

2.1. chọn vật liệu	- Vật liệu là giống lúa thuần chủng - Chọn những hạt lúa đã chín có độ sạch cao, bóc vỏ trấu.	
2.2. Xử lý mẫu sơ bộ (ngoài box cấy)	- Cho hạt đã bóc bỏ lớp vỏ bọc vào vải màn sau đó cho sang bình có chứa dung dịch xà phòng loãng 5% ngâm hạt từ 1-2 phút. Sau đó tráng sạch nước xà phòng bằng nước máy. Sau cùng mẫu được tráng bằng nước cất hai lần. Đưa mẫu vào box cấy.	- Kết quả : + Rửa xà phòng 3 lần số mẫu không bị nhiễm nấm có tỷ lệ cao nhất.
2.3. Xử lý mẫu trong box cấy	Mẫu sau khi rửa sạch bằng dung dịch xà phòng loãng được đưa sang dung dịch ethyl alcohol 70% ngâm trong 1-2 phút sau đó dùng nước cất hai lần đã khử trùng tráng lại 3-4 lần. - khử trùng bằng clorox + khử trùng lần 1 Cho mẫu đã được khử trùng sơ bộ bằng ethyl alcohol 70% sang bình chứa clorox nồng độ từ 2-5% và 1-2 giọt tween 20 trong vòng 5-7 phút sau đó tráng sạch bằng nước cất hấp vô trùng (tráng lại nước cất hấp vô trùng từ 3-4 lần).	- Kết quả : + Mẫu xử lý với clorox (nước giaven) cho kết quả tốt nhất.

	+ khử trùng lần 2 Cho mẫu đã khử trùng lần 1 bằng clorox sang bình có chứa clorox nồng độ từ 2- 5%, bổ sung 1-2 tween 20 lắc đều khoảng 15-20 phút sau đó dùng nước cất hấp tráng lại từ 5-7 lần. - Khử trùng bằng thủy ngân + Khử trùng lần 1 Cho mẫu đã được khử trùng sơ bộ bằng ethyl alcohol 70% sang bình có chứa dung dịch $HgCl_2$ nồng độ 1%, bổ sung 1-2 giọt tween 20 lắc đều trong vòng 5 phút. sau đó tráng sạch mẫu bằng nước cất hấp vô trùng (tráng lại nước cất hấp từ 3-4 lần) + khử trùng lần 2 Cho mẫu đã khử trùng lần 1 vào bình có chứa dung dịch $HgCl_2$ nồng độ từ 1-1,5% lắc đều trong vòng 10-15 phút sau đó dùng nước cất hấp tráng sạch (tráng từ 5-7 lần).	
2.4. Nuôi cấy tạo mô sẹo	Mẫu sau khi đã khử trùng cho vào đĩa petri có đặt giấy thấm đã được khử trùng, dùng pank cấy mẫu vào môi trường đã chuẩn bị sẵn. Mỗi bình cấy từ 15- 20 mẫu sau đó đậy nắp. Sau khi cấy xong cho mẫu vào trong phòng để mẫu trong điều kiện bóng tối, nhiệt độ $25-27^{\circ}C$, ẩm độ khoảng 75-80%. Thường xuyên kiểm tra kiểm tra các bình nuôi cấy loại bỏ ra ngoài các bình xuất hiện nhiễm nấm, vi khuẩn. Mẫu cấy sau 2 tuần bắt đầu xuất hiện mô sẹo ở phôi lúa, khi đường kính mô sẹo từ 1- 2mm thì chuyển sang môi trường tạo chồi. Thời gian tạo mô sẹo từ 4-6 tuần. Lưu ý: - Mô sẹo phải có màu trắng, cứng, có kích thước từ 1-2mm. Mô sẹo tốt nhất là có tuổi 7-10 ngày. Không nên để tuổi mô sẹo quá dài sẽ ảnh hưởng đến khả năng tái sinh sau này	Môi trường tạo mô sẹo tốt nhất MS + 1,5-2mg/12,4D + 30-40g/l đường + 100mg/l Inostol + 6,5g/l agar pH: 5,6- 5,8.
2.5. Nuôi cấy tạo chồi	Tách mô sẹo từ hạt lúa chuyển sang môi trường tạo chồi. Mỗi bình cấy từ 8-10 mô sẹo.	Môi trường tạo chồi tốt nhất :

	Sau đó cho vào phòng nuôi cây trong điều kiện nhiệt độ 25-27⁰c, ẩm độ 75-80%, chiếu sáng 10-12h/ngày. Mô sẹo sau 2 tuần nuôi cấy bắt đầu xuất hiện các đám màu xanh trên bề mặt. Khi xuất hiện chồi xanh cao khoảng 0,5cm thì tiến hành cấy chuyển sang môi trường nhân nhanh chồi. - Thời gian tạo chồi từ mô sẹo mất 3-4 tuần. - Chồi phải khỏe mạnh, có màu xanh, thông thường sau khoảng 10 ngày từ khi các đám xanh xuất hiện. - chú ý: Trong môi trường tạo chồi một số mô sẹo phát triển thành chồi, một số mô sẹo chỉ phát triển thành rễ, một số bị chết.	MS + 1-1,5mg/l Kinetine + 100mg/l Inostol + 30g/l đường + 6,5g/l agar pH: 5,6-5,8
2.6. Nuôi cấy nhân nhanh	Dùng pank gấp chồi đủ tiêu chuẩn sang môi trường nhân nhanh. Mỗi bình cấy từ 5-7 chồi. Nuôi trong phòng với cường độ chiếu sáng từ 2000- 3000 lux, thời gian chiếu sáng từ 10 - 12h/ngày, nhiệt độ phòng 25-27⁰C, ẩm độ từ 75- 80%. Sau cấy khoảng 1 tuần các cụm chồi được hình thành và phát triển thành chồi mới. Chồi mới hình thành có từ 1 lá được tách ra và cấy chuyển sang môi trường tạo rễ. Các chồi chưa đủ kích thước được tiếp tục nuôi trên môi trường nhân nhanh Thời gian nhân nhanh chồi từ 2-4 tuần.	Môi trường tốt nhất : MS + 1,5-2mg/l BAP + 30g/l đường + 100mg/l Inostol + 6,5g/l agar pH: 5,6- 5,8.
2.7. Nuôi cấy tạo rễ	Dùng pank cấy tách các chồi non có từ 1 lá, khỏe mạnh từ cụm chồi cấy vào môi trường ra rễ. Mỗi ống nghiệm cấy khoảng 1 cây. Cây được nuôi trong phòng với cường độ chiếu sáng từ 2000- 3000 lux, thời gian chiếu sáng từ 10 - 12h/ngày, nhiệt độ phòng 25-27⁰C, ẩm độ từ 75- 80%. Khi thấy cây mọc xanh dài khoảng 15-20cm, có từ 2-3 lá, bộ rễ khỏe thì chuyển sang môi trường thuần dưỡng. Thời gian trong môi trường ra rễ từ 7-10 ngày	Môi trường ra rễ tốt nhất LS +100mg/l inostol + 0,5-1 mg/l IAA +30g/l đường + 6,5g/l agar. pH: 5,8
2.8. Thuần dưỡng cây trước khi trồng ra	- Môi trường : Yoshida, MS, LS không có chất kích thích sinh trưởng	- Kết quả : Môi trường thuần dưỡng thích hợp

đồng ruộng	Sau giai đoạn tạo rễ, cây mô được lấy ra, rửa sạch agar ở phần rễ và chuyển vào môi trường thuần dưỡng. Trong điều kiện nhiệt độ phòng cây : 25 ⁰ C-27 ⁰ C, ẩm độ : 75-80%, chiếu sáng liên tục 12h/ngày - Thời gian cây thuần dưỡng khoảng 20 ngày	nhất cho cây sinh trưởng : Yoshida không có chất kích thích sinh trưởng ; pH 5,0
2.9. Trồng cây trong nhà kính	- Sau khoảng 20 ngày, các cây sinh trưởng bình thường trong môi trường thuần dưỡng được đưa ra ngoài luyện cây thích nghi dần với điều kiện bên ngoài. - Thời gian luyện cây khoảng 10-15 ngày - Khi cây con có từ 3 lá trở lên tiến hành chuyển cây sang chậu đất và trồng trong nhà kính: cường độ ánh sáng 2000-2200lux	- Kết quả: + Sau khoảng 7 ngày cây bắt đầu đẻ nhánh + Sau 45-60 ngày cây làm đồng và trổ + Sau khoảng 90-115 ngày cây bắt đầu chín sinh lý

III. THÀNH PHẦN MÔI TRƯỜNG VÀ CÁCH PHA CHẾ

3.1 Môi trường tạo mô sẹo

Dung dịch mẹ	Hóa chất	Nồng độ (mg/l)	Dung dịch mẹ (nồng độ đậm đặc 20 lần (mg/l)
MS I	NH ₄ NO ₃	1650,0	33000,0
	KNO ₃	1900,0	38000,0
MS II	MgSO ₄ . 7H ₂ O	370,0	7400,0
	MnSO ₄ . 4H ₂ O	22,3	446,0
	ZnSO ₄ . 7H ₂ O	10,6	212,0
	CuSO ₄ . 5H ₂ O	0,025	0,5
MS III	CaCl ₂ . 2H ₂ O	440,0	8800,0
	KI	0,83	16,6
	CocL2. 6H ₂ O	0,025	0,5
MS IV	KH ₂ PO ₄	170,0	3400,0
	H ₃ BO ₃	6,2	124,0
	Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	0,25	5,0
MS V	FeSO ₄ . 7H ₂ O	27,85	557,0
	Na ₂ Edta. 2H ₂ O	37,25	745,0
Vitamins	Nicotinic acid	0,5	10,0
	Pyridocine HCl	0,5	10,0
	Thiamine HCl	0,1	2,0
	Glycine	2,0	40,0
Hormone	2,4 D	1,5	30,0
Inositol		100,0	2000,0
Sucrose		30000	600000,0
Agar		6500	130000,0
pH		5,6 - 5,8	

3.2. Môi trường tạo chồi

Môi trường tạo chồi

Dung dịch mẹ	Hóa chất	Nồng độ (mg/l)	Dung dịch mẹ (nồng độ đậm đặc 20 lần (mg/l))
MS I	NH ₄ NO ₃	1650,0	33000,0
	KNO ₃	1900,0	38000,0
MS II	MgSO ₄ . 7H ₂ O	370,0	7400,0
	MnSO ₄ . 4H ₂ O	22,3	446,0
	ZnSO ₄ . 7H ₂ O	10,6	212,0
	CuSO ₄ . 5H ₂ O	0,025	0,5
MS III	CaCl ₂ . 2H ₂ O	440,0	8800,0
	KI	0,83	16,6
	CocL ₂ . 6H ₂ O	0,025	0,5
MS IV	KH ₂ PO ₄	170,0	3400,0
	H ₃ BO ₃	6,2	124,0
	Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	0,25	5,0
MS V	FeSO ₄ . 7H ₂ O	27,85	557,0
	Na ₂ Edta. 2H ₂ O	37,25	745,0
Vitamins	Nicotinic acid	0,5	10,0
	Pyridocine HCl	0,5	10,0
	Thiamine HCl	0,1	2,0
	Glycine	2,0	40,0
Hormone	Kinetine	1,0	20,0
Inositol		100,0	2000,0
Sucrose		30000	600000,0
Agar		6500	130000,0
pH		5,6 - 5,8	

3.3. Môi trường nhân nhanh

Dung dịch mẹ	Hóa chất	Nồng độ (mg/l)	Dung dịch mẹ (nồng độ đậm đặc 20 lần (mg/l))
MS I	NH ₄ NO ₃	1650,0	33000,0
	KNO ₃	1900,0	38000,0
MS II	MgSO ₄ . 7H ₂ O	370,0	7400,0
	MnSO ₄ . 4H ₂ O	22,3	446,0
	ZnSO ₄ . 7H ₂ O	10,6	212,0
	CuSO ₄ . 5H ₂ O	0,025	0,5
MS III	CaCl ₂ . 2H ₂ O	440,0	8800,0
	KI	0,83	16,6
	CocL ₂ . 6H ₂ O	0,025	0,5
MS IV	KH ₂ PO ₄	170,0	3400,0

	H ₃ BO ₃	6,2	124,0
	Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	0,25	5,0
MS V	FeSO ₄ . 7H ₂ O	27,85	557,0
	Na ₂ Edta. 2H ₂ O	37,25	745,0
Vitamins	Nicotinic acid	0,5	10,0
	Pyridocine HCl	0,5	10,0
	Thiamine HCl	0,1	2,0
	Glycine	2,0	40,0
Hormone	BAP	2,0	40,0
Inositol		100,0	2000,0
Sucrose		30000	600000,0
Agar		6500	130000,0
pH		5,6 - 5,8	

3.4. Môi trường ra rễ

Dung dịch mẹ	Hóa chất	Nồng độ (mg/l)	Nồng độ đậm đặc 20 lần (mg/l)
LS I	NH ₄ NO ₃	1650,0	33000,0
	KNO ₃	1900,0	38000,0
LS II	MgSO ₄ . 7H ₂ O	370,0	7400,0
	MnSO ₄ . 4H ₂ O	22,3	446,0
	ZnSO ₄ . 7H ₂ O	10,6	212,0
	CuSO ₄ . 5H ₂ O	0,025	0,5
LS III	CaCl ₂ . 2H ₂ O	440,0	8800,0
	KI	0,83	16,6
	CocL2. 6H ₂ O	0,025	0,5
LS IV	KH ₂ PO ₄	170,0	3400,0
	H ₃ BO ₃	6,2	124,0
	Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	0,25	5,0
LS V	FeSO ₄ . 7H ₂ O	27,85	557,0
	Na ₂ Edta. 2H ₂ O	37,25	745,0
Vitamins	Nicotinic acid	0,5	10,0
	Pyridocine HCl	0,5	10,0
	Thiamine HCl	0,1	2,0
	Glycine	2,0	40,0
IAA		0,5	10,0
Inositol		100,0	2000,0
Sucrose		30000	600000,0
Agar		6500	130000,0
pH		5,8	

3.5. Môi trường thuần dưỡng (sử dụng môi trường Yoshida)

Dung dịch mẹ	Hóa chất	Nồng độ (mg/l)	Nồng độ đậm đặc 50 lần (mg/l)
Y - A	NH_4NO_3	0,457	22,850000
Y - B	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,2015	10,075000
Y - C	K_2SO_4	0,357	17,850000
Y - D	CaCl_2	0,443	22,150000
Y - E	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,62	81,000000
Y - F	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,0075	0,375000
	$(\text{NH}_4)_6\text{MoO}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,00037	0,018500
	H_3BO_3	0,00467	0,233500
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,000175	0,008750
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,000155	0,00775
	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,0385	1,92500
	Citric acid	0,0595	2,97500
pH		5,0	

IV. DỤNG CỤ CẦN THIẾT TRONG QUÁ TRÌNH NUÔI CÂY

STT	Tên thiết bị/dụng cụ	Số lượng	Ghi chú
1	Bàn thao tác pha chế môi trường (1,2m x 2m)	01- 02 cái	Mặt bàn phủ nhựa để chống sự phá hủy của hóa chất
2	Máy khuấy từ gia nhiệt	01 máy	
3	Cân phân tích và cân điện tử độ chính xác từ 10^{-2} đến 10^{-4}	02 cái	
4	Máy đo PH	01 cái	
5	Tủ lạnh 250 lít	01 cái	
6	Máy cất nước 2 lần	01 cái	
7	Can (từ 5 lít trở lên) hoặc bình tam giác đựng nước (1- 2 lít)	10 cái	
8	Bồn rửa dụng cụ	01 cái	
9	Nồi hấp vô trùng (105 lít)	01 cái	
10	Tủ cấy vô trùng (02 chỗ ngồi)	01 cái	
11	Lò vi sóng	01 cái	
12	Dàn nuôi cây (3 tầng, 0,6m X	10 dàn	

	2m)		
13	Bộ pipet (200 μ l, 1ml, 10ml, 20ml)	01 bộ	
14	Đèn cồn	02 đèn	
15	Bộ que cấy mẫu	02 bộ	
16	Găng tay	05 bộ	
17	Đĩa Petri (10cm)	100 đĩa	
18	Bình tam giác 100 ml	100 bình	
19	Bình tam giác 250 ml	100 bình	
20	Cặp găng tay dùng cho nồi hấp vô trùng	02 bộ	