

P

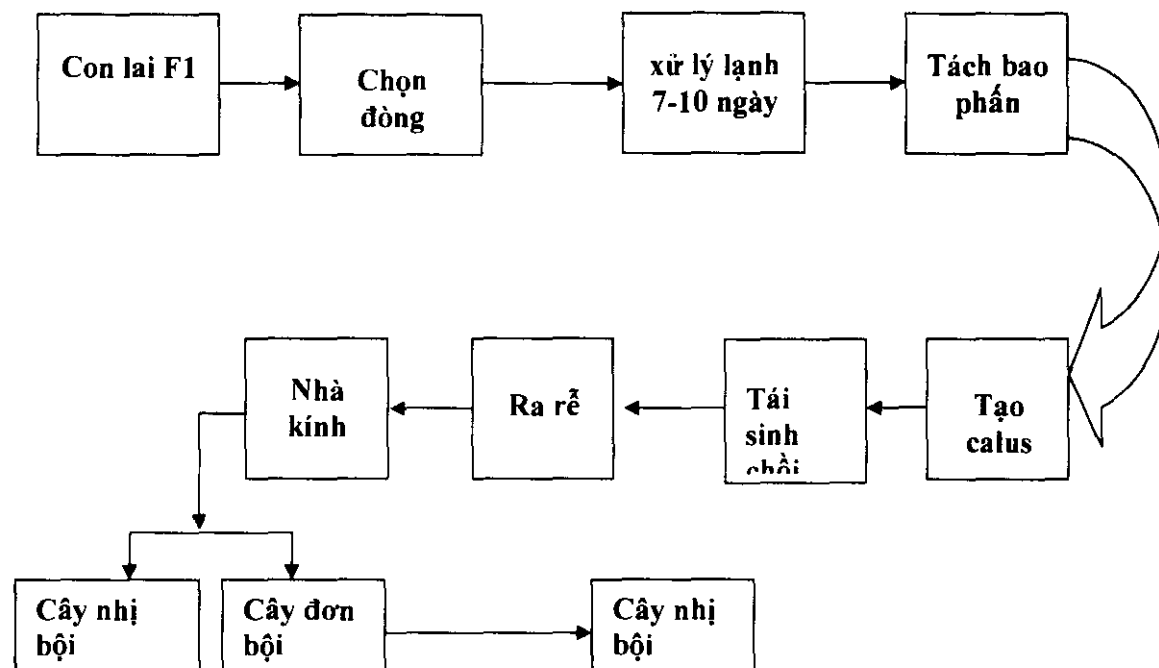
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM THÁI NGUYÊN
BỘ MÔN CNSH VÀ CBBQ

QUI TRÌNH NUÔI CÂY BAO PHẢN LÚA

Thái Nguyên ngày 15 tháng 12 năm 2008

QUY TRÌNH NUÔI CÂY BAO PHẤN LÚA

I. SƠ ĐỒ TÓM TẮT QUY TRÌNH NUÔI CÂY



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

1. Chọn vật liệu	- Vật liệu là con lai F1, F2 - Chọn những đồng to khoẻ mạnh ở giai đoạn túi phấn có chiều dài bằng $\frac{1}{2}$ bao phấn (thông thường trước khi trở bông từ 6-10 ngày). Mẫu được thu vào buổi sáng. Đồng được bóc thành từng bó, khoảng 10-15 đồng/bó.	
2. Xử lý mẫu sơ bộ (khử trùng mẫu và xử lý nhiệt độ lạnh trước khi nuôi cấy)	- Đồng lúa thu về, được rửa sạch dưới vòi nước. Bóc bỏ các lá phía dưới, chỉ để một lá sát lá đồng và lá đồng. Dùng kéo cắt bớt lá và gốc đồng, chỉ để lại khoảng 1-1.5cm tính từ tại lá và cổ đồng. - Dùng nước cất tráng sạch đồng, sau đó dùng cồn 70 phun xịt đều lên bề mặt đồng rồi bọc lại bằng giấy mềm để giữ mẫu. Cho các bó mẫu vào trong túi nilon hoặc bọc kín bằng giấy bạc. Các bó mẫu phải ghi tên, ngày xử lý. Mẫu được giữ ở 8-10 ⁰ c - Thời gian xử lý 7-10 ngày	- Kết quả : + Số bó mẫu đảm bảo 100% không bị nhiễm nấm. + Thời gian tối ưu nhất xử lý lạnh 7-10 ngày
	- các chất cần dùng + Tween 20 : 1-2 giọt/lít	- Kết quả : + Xử lý mẫu

3. Xử lý mẫu trước khi cấy	+ cồn 70⁰ + Clorox : 2-5% + Nước cất hấp vô trùng - Thời gian xử lý + 15 phút + 20 phút - Mẫu cấy sau xử lý lạnh 7-10 ngày, lấy ra bóc lấy bông lúa, loại bỏ những gié lúa non, già, dị dạng. Cắt gié bông thành các đoạn ngắn sau đó bọc bằng vải màn vô trùng rồi đưa vào các bình tam giác 100ml, ghi tên mẫu. Cho clorox 5% đã chuẩn bị sẵn để khử trùng. Bỏ sung thêm 1-2 giọt tween 20 và lắc đều để tăng hiệu quả khử trùng. Thời gian khử trùng 15- 20 phút. Sau 15-20 phút loại bỏ hóa chất khử trùng và tráng sạch mẫu bằng nước cất 2 lần hấp vô trùng (tráng 4-5 lần). - Chú ý : Các thao tác xử lý mẫu được thực hiện trong box cấy vô trùng.	với Clorox 5% thời gian xử lý 20 phút có hiệu quả cao nhất (đạt trên 85% số mẫu không nhiễm)
4. Cấy bao phần 4.1 Môi trường tạo mô sẹo	- Môi trường nuôi cấy : MS (Murashige and Skoog), N6 có bổ sung chất kích thích sinh trưởng là 2,4D - Nhiệt độ phòng cấy : 25⁰C - Ẩm độ : 75-80% - Tạo mô sẹo trong điều kiện bóng tối. - Mẫu sau khi khử trùng xong, chuyển sang đĩa petri có chứa giấy thấm vô trùng và đậy kín lại. Dùng pank cấy gắp từng gié mẫu, lấy kéo cắt bỏ phần trên vỏ trấu rồi gỡ bao phần vào đĩa petri chứa môi trường nuôi cấy. Mỗi đĩa petri cấy khoảng 60 – 100 bao phần, ghi tên mẫu nuôi cấy, ngày cấy. - Sau 1 tuần nuôi cấy bao phần hóa nâu. Sau 4-7 tuần các bao phần bắt đầu hình thành mô sẹo. - Chú ý : Thời gian hình thành mô sẹo có thể kéo dài tới 90 ngày tùy thuộc vào dòng nuôi cấy - Các thao tác phải cẩn thận để tránh gây nhiễm nấm, khuẩn cho mẫu cấy. - Thường xuyên kiểm tra mẫu cấy, loại bỏ những mẫu bị nhiễm nấm, khuẩn ra ngoài	- Kết quả + Thời gian hình thành mô sẹo từ 30-50 ngày (với dòng phản ứng nhanh), 80-90 ngày với dòng phản ứng chậm + Môi trường thích hợp tạo mô sẹo là N6 + 1,5mg 2,4D/lit + 60g đường/lit + 6,5g agar/lit
4.2 Môi trường tái sinh chồi	- Môi trường tái sinh chồi : MS có bổ sung chất kích thích sinh trưởng NAA, BAP - Nhiệt độ phòng cấy : 25⁰C - Ẩm độ : 70-80% - Ánh sáng : chiếu sáng liên tục 12h/ngày - Khi mô sẹo có kích thước 1-2mm, có màu trắng, có 7-10	- Kết quả : Môi trường thích hợp cho tái sinh chồi : MS + 0,1mg/lit NAA + 1,5mg/lit BAP

	ngày tuổi thì tiến hành cấy chuyển sang môi trường tái sinh cây. Sau khi chuyển sang môi trường tái sinh 20-30 ngày trên khối mô sẹo xuất hiện các đám màu xanh và hình thành cụm chồi. Chồi được hình thành có màu xanh, khỏe mạnh, cao khoảng 10-12cm, có từ 2 lá được cấy chuyển sang môi trường tạo rễ. Những chồi còn non, yếu chưa đủ kích thước được tiếp tục nuôi cấy trên môi trường nhân nhanh. - Chú ý : Mô sẹo cần phải được cấy chuyển kịp thời. Nếu để tuổi mô sẹo quá lớn (hơn 10 ngày tuổi) thì tỷ lệ tái sinh thành cây xanh rất kém	+ 6,5g agar + 60g đường; pH 5,6-5,8
4.3 Môi trường ra rễ	- Môi trường ra rễ : LS (Linsmaier and Skoog) có bổ sung chất kích thích sinh trưởng NAA - Nhiệt độ phòng cấy : 25⁰C - Ẩm độ : 75-80% - Ánh sáng : chiếu sáng liên tục 12h/ngày Chồi có kích thước khoảng 10cm, có từ 2 lá trở lên được chuyển sang môi trường tạo rễ. Mẫu được cấy trong ống nghiệm, mỗi ống cấy 1 cây. Khi đạt 15-20cm có khoảng 2 lá thật được chuyển sang môi trường thuần dưỡng. Thời gian trong môi trường ra rễ từ 7-10 ngày	- Kết quả : Môi trường thích hợp cho tái sinh chồi : LS + 0,5-1mg/lit NAA + 6,5g agar + 60g đường ; PH 5,6-5,8
4.4 Môi trường thuần dưỡng	- Môi trường : Yoshida, MS, LS không có chất kích thích sinh trưởng - Nhiệt độ phòng cấy : 25⁰C - Ẩm độ : 75-80% - Ánh sáng : chiếu sáng liên tục 12h/ngày Sau khi cây có đủ bộ rễ, có 2-3 lá thật được đưa ra khỏi ống nghiệm, rửa sạch hết agar ở phần rễ cả rồi chuyển sang môi trường thuần dưỡng. Thời gian cây trong môi trường thuần dưỡng khoảng 20 ngày.	- Kết quả : Môi trường thuần dưỡng thích hợp nhất cho cây sinh trưởng : Yoshida không có chất kích thích sinh trưởng ; pH 5,0
4.5 Trồng cây trong nhà kính	- Khi cây sinh trưởng bình thường trong môi trường thuần dưỡng (sau khoảng 20 ngày). Đưa cây ra luyện cho thích nghi dần với điều kiện bên ngoài. Thông thường thời gian luyện cây từ 7-10 ngày. - Khi cây thích nghi với điều kiện bên ngoài, có từ 3 lá trở lên tiến hành chuyển cây sang chậu đất và trồng trong nhà kính: cường độ ánh sáng 2000-2200lux. Các cây được đeo thẻ và tiến hành chăm sóc theo dõi.	- Kết quả: + Sau khoảng 7 ngày cây bắt đầu đẻ nhánh + Sau 45-60 ngày cây làm đòng và trổ + Sau khoảng 90-115 ngày cây bắt đầu chín sinh lý
5. Xử lý cây đơn bội	- Cây đơn bội được nhị bội hoá bằng colchicine + Nồng độ 0.1% + Thời gian xử lý 5h-7h	Nhận xét: Cần tiến hành các thí nghiệm

		ở các công thức với nồng độ và thời gian xử lý khác nhau đối với các giai đoạn sinh trưởng khác nhau của cây.
--	--	---

III. THÀNH PHẦN MÔI TRƯỜNG VÀ CÁCH PHA CHẾ

3.1 Môi trường tạo mô sẹo (sử dụng môi trường N6)

Dung dịch mẹ	Hóa chất	Nồng độ (mg/l)	Dung dịch mẹ (nồng độ đậm đặc 20 lần (mg/l)
N6 - A	KNO ₃	2830,0	56600,0
N6 - B	MgSO ₄	185,0	3700,0
	MnSO ₄ . 4H ₂ O	4,4	88,0
	ZnSO ₄ . 7H ₂ O	1,5	30,0
	(NH ₄) ₂ SO ₄	463,0	9260,0
N6 - C	KH ₂ PO ₄	400,0	8000,0
	KI	0,1	2,0
	H ₃ BO ₃	1,6	32,0
N6 - D	CaCl ₂ . 2H ₂ O	166,0	3320,0
N6 - E	FeSO ₄ . 7H ₂ O	27,8	556,0
	Na ₂ Edta	37,3	746,0
Vitamins	Nicotinic acid	0,5	10,0
	Glycine	2,0	40,0
	Thiamine HCl	1,0	20,0
	Pyridocine HCl	0,5	10,0
Hormone	2,4 - D	1,5	30,0
Sucrose		60000,0	1200000,0
Agar		6500,0	130000,0
pH		5,6 - 5,8	

Để thuận tiện cho việc pha chế chính xác các môi trường nuôi cấy và thuận lợi cho việc bảo quản, thông thường môi trường được pha chế ở dạng dung dịch mẹ có độ đậm đặc thông thường gấp 20 – 50 lần so với môi trường nuôi cấy. Khi pha môi trường nuôi cấy chỉ cần hút một lượng nhỏ các dung dịch mẹ cần thiết đem pha với nước cất. Các dung dịch đậm đặc có thể bảo quản tương đối dài trong trong tủ lạnh.

Khi pha một lít môi trường làm việc (môi trường nuôi cấy) cần thực hiện những thao tác sau:

- Cho khoảng 500ml nước cất vào một cái bình có dung tích 1 lít.

- Dùng pipet lấy lần lượt các dung dịch mẹ (A,B,C,D,E, vitamin và hormone), lượng dung dịch mẹ cần lấy tỷ lệ với lượng hóa chất cần lấy cho một lit môi trường.

- Thêm 60g sucrose. khuấy cho tan.

- Điều chỉnh pH: dùng NaOH 0,1N hoặc HCl 0,1N để tăng hoặc giảm pH đến giá trị 5,6- 5,8.

- Thêm 6,5 g agar (sợi hoặc bột).

- Vừa đun vừa khuấy đều cho agar tan hết. Sau đó chia hỗn hợp dung dịch này vào các đĩa petri hoặc bình tam giác và cần chia xong trước khi dung dịch nguội (dưới 50°C). Chú ý, có thể sử dụng lò vi sóng để nấu chảy agar sẽ rất nhanh và tiện lợi.

3.2 Môi trường tái sinh (sử dụng môi trường Murashige and Skoog: MS)

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	NAA	0,1	10,0
	BAP	1,5	30,0
Inositol		100,0	2000,0
Sucrose		30000	600000,0
Agar		6500	130000,0
pH		5,6 - 5,8	

Thông thường môi trường được pha chế ở dạng dung dịch mẹ có nồng độ đậm đặc gấp nhiều lần (20 - 50 lần). Khi pha môi trường nuôi cấy chỉ cần hút một lượng cần thiết các dung dịch mẹ đem pha với nước cất. Các dung dịch đậm đặc được bảo quản dài ngày trong tủ lạnh.

Khi pha một lít môi trường làm việc (môi trường nuôi cấy) cần thực hiện những thao tác sau:

- Cho khoảng 500ml nước cất vào một cái bình có dung tích 1 lít.
- Dùng pipet lấy lần lượt các dung dịch mẹ (I. II. III. IV. V, vitamin và hormone), lượng dung dịch mẹ cần tỷ lệ với lượng hóa chất cần lấy cho một lít môi trường.
- Thêm 100 mg Inistol.
- Thêm 30g sucrose, khuấy cho tan.
- Điều chỉnh pH: dùng NaOH 0,1N hoặc HCl 0,1N để tăng hoặc giảm pH đến giá trị 5,6- 5,8.
- Thêm 6,5g agar (sợi hoặc bột).
- Vừa đun vừa khuấy đều cho agar tan hết. Sau đó chia hỗn hợp dung dịch này vào các ống nghiệm hoặc bình tam giác. Cần chia xong trước khi dung dịch nguội (dưới 50°C). Chú ý, có thể sử dụng lò vi sóng để nấu chảy agar sẽ rất nhanh và tiện lợi.

3.3 Môi trường ra rễ (sử dụng môi trường Linsmaier and Skoog)

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
	CaCl ₂ . 2H ₂ O	440,0	8800,0
LS III	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
Inositol		100,0	2000,0
Sucrose		30000	600000,0
Agar		6500	130000,0
pH		5,6 - 5,8	

Thông thường môi trường được pha chế ở dạng dung dịch mẹ có nồng độ đậm đặc gấp nhiều lần (20 - 50 lần). Khi pha môi trường nuôi cấy chỉ cần hút một

lượng cần thiết các dung dịch mẹ đem pha với nước cất. Các dung dịch mẹ có thể được bảo quản dài ngày trong tủ lạnh.

Khi pha một lít môi trường làm việc (môi trường nuôi cấy) cần thực hiện những thao tác sau:

- Cho khoảng 500ml nước cất vào một cái bình có dung tích 1 lít.
- Dùng pipet lấy lần lượt các dung dịch mẹ (I,II,III,IV,V, vitamin và hormone), lượng dung dịch mẹ cần lấy tỷ lệ với lượng hóa chất cần lấy cho một lít môi trường.

- Thêm 100mg Inistol.
- Thêm 30g sucrose, khuấy cho tan.
- Điều chỉnh pH: dùng NaOH 0,1N hoặc HCl 0,1N để tăng hoặc giảm pH đến giá trị 5,6- 5,8.

- Thêm 6,5g agar (sợi hoặc bột).
- Vừa đun vừa khuấy đều cho agar tan hết. Sau đó chia hỗn hợp dung dịch này vào các ống nghiệm hoặc bình tam giác. Cần chia xong trước khi dung dịch nguội (dưới 50°C). Chú ý, có thể sử dụng lò vi sóng để nấu chảy agar sẽ rất nhanh và tiện lợi.

3.4 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	

Thông thường môi trường được pha chế ở dạng dung dịch mẹ có nồng độ đậm đặc gấp nhiều lần (20 - 50 lần). Khi pha môi trường nuôi cấy chỉ cần hút một lượng cần thiết các dung dịch mẹ đem pha với nước cất. Các dung dịch mẹ có thể được bảo quản dài ngày trong tủ lạnh

Khi pha một lít môi trường làm việc (môi trường nuôi cấy) cần thực hiện những thao tác sau:

- Cho khoảng 500ml nước cất vào một cái bình có dung tích 1 lít.

- Dùng pipet lấy lần lượt các dung dịch mẹ (A,B,C,D,E,F), lượng dung dịch mẹ cần lấy tỷ lệ với lượng hóa chất cần lấy cho một lít môi trường.

- Điều chỉnh pH: dùng NaOH 0,1N hoặc HCl 0,1N để tăng hoặc giảm pH đến giá trị 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 cấy (3 tầng, 0,6m X 2m)	10 dàn	
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	
----	--	-------	--