

**Tiểu luận**

**NUÔI CÂY MÔ – TẾ BÀO  
THỰC VẬT**



## I. Nguyên tắc kĩ thuật nuôi cấy mô, tế bào thực vật

Nuôi cấy mô, tế bào thực vật (*plant tissue culture*) là kĩ thuật đưa một mô, bộ phận hoặc tế bào của thực vật vào trong một hệ thống vô trùng có thể kiểm soát về: thành phần chất khoáng, điều hoà sinh trưởng, các chất hữu cơ cung cấp cho cây, ánh sáng, nhiệt độ, độ ẩm để mô, bộ phận đó sinh trưởng, phát triển theo mục đích của người nuôi cấy. Kĩ thuật này dựa trên hai nguyên tắc sau:

### a) tính toàn năng của tế bào:

Mỗi tế bào đều mang đầy đủ lượng thông tin di truyền của cơ thể và có khả năng phát triển thành một cơ thể hoàn chỉnh khi gặp điều kiện thuận lợi.

Năm 1922 con người đã nuôi được đỉnh sinh trưởng tách từ đầu rễ một cây hòa thảo trong 12 ngày. Như vậy, lần đầu tiên tính toàn năng của tế bào được chứng minh bằng thực nghiệm. Sau 43 năm (năm 1965n), đã nuôi từng tế bào riêng biệt của cây thuốc lá và tạo được cây thuốc lá hoàn chỉnh trong ống nghiệm. Kết quả này chứng minh đầy đủ tính toàn năng của tế bào

### b) Khả năng biệt hóa và phản biệt hóa của tế bào

Biệt hóa là sự biến đổi của tế bào từ trạng thái tế bào phôi cho đến khi thể hiện một chức năng nào đó. Các tế bào dùng trong nuôi cấy đều đã biệt hóa về cấu trúc và chức năng từ tế bào phôi. Trong những điều kiện thích hợp, có thể làm cho những tế bào này quay trở lại trạng thái của tế bào đầu tiên đã sinh ra chúng - tế bào phôi và quá trình đó gọi là quá trình phản biệt hóa. Trong cùng một cơ thể, mỗi loại tế bào đều có khả năng biệt hóa, phản biệt hóa và vì thế triển vọng nuôi cấy thành công cũng khác nhau. Những tế bào càng chuyên hóa về một chức năng nào đó (đã biệt hóa sâu) thì càng khó xảy ra quá trình phản biệt hóa, như các tế bào mạch dẫn của hệ thống mạch dẫn ở thực vật, tế bào thần kinh động vật. Người ta đã tổng kết rằng; những tế bào càng gần với trạng thái của tế bào phôi bao nhiêu thì khả năng nuôi cấy thành công càng cao bấy nhiêu. Đối với các loài thực vật thì các tế bào phôi non, các tế bào mô phân sinh, các tế bào của cơ quan sinh sản (hạt phấn, noãn) rất dễ xảy ra quá trình phản biệt hóa. Vì vậy nói một cách hình tượng như Galson (1986) và Murashige (1974) thì khả năng hình thành cơ quan hay cơ thể của các tế bào thực vật là giảm dần theo chiều hướng từ ngọn xuống gốc. Các tế bào động vật nói chung

khó nuôi cấy hơn do chúng đã được biệt hóa quá sâu sắc và vì thế quá trình ngược lại (phản biệt hóa) rất khó thực hiện.

# Tiến hành thí nghiệm:

## a. Cách thực hiện:

Chọn khoảng 10 quả cây thí nghiệm, rửa bằng xà phòng; rửa dưới vòi nước máy nhiều lần. Ngâm mẫu trong dung dịch canxi hypochloride 10% trong 10 phút. Đổ bỏ dung dịch canxi hypochloride 10% trong tủ cấy (đã tắt UV ). Rửa mẫu bằng nước cất vô trùng. Tiến hành cắt quả và cấy vào ống nghiệm mầm ngủ. Bịt kín miệng ống nghiệm, ghi nhãn, đặt nuôi trong điều kiện 27<sup>0</sup> C, thời gian chiếu sáng 16 giờ/ngày, độ ẩm 80%

## b. Một số lưu ý khi làm bài thí nghiệm:

- đọc kỹ nội qui phòng thí nghiệm.
- cẩn thận với các hóa chất độc hại.
- Phải khử trùng môi trường nuôi cấy, dụng cụ thủy tinh và dụng cụ cấy.
- Phải khử trùng phòng nuôi cấy, tủ cấy.
- Khử trùng mô thực vật cần chú ý không làm tổn thương mầm ngủ.

- Khi ngâm mẫu trong canxi hypochloride 10%, nếu mẫu non thì cần ngâm mẫu trong thời gian ngắn hơn.
- Chọn và chuẩn bị môi trường nuôi cấy thích hợp.
- Rửa tay bằng xà phòng và lau kỹ đến khuỷu tay bằng cồn 70°.
- Tiến hành thao tác cẩn thận, không làm chết tế bào.

c) Kết quả thu được

Sau 2 tuần nuôi cấy trong điều kiện 27° C, thời gian chiếu sáng 16 giờ/ngày, độ ẩm 80% thì kết quả như sau:

Có 1 ống thấy có dấu hiệu sự sống, 4 ống còn lại mẫu bị chết trong đó có 3 ống bị nhiễm mốc trắng

Nguyên nhân mẫu bị chết:

Về thao tác thí nghiệm, chọn mẫu quá non nhưng khử trùng mẫu trong dung dịch canxi hypochloride 10% quá lâu. Que cấy quá nóng làm mẫu bị chết. Môi trường nuôi cấy không đảm bảo. các mẫu bị nhiễm mốc do Thao tác cấy chưa chính xác và điều kiện vô trùng chưa đảm bảo tốt. Về dụng cụ thủy tinh và dụng cụ cấy cũng chưa được vô trùng tuyệt đối.

# Trả lời câu hỏi

Có bao nhiêu phương pháp khử trùng dụng cụ và môi trường để nuôi cấy tế bào?  
Kể tên và nêu nguyên tắc cơ bản của các phương pháp đó?

- Khử trùng khô
- Khử trùng ướt
- Màng lọc

Dụng cụ thủy tinh, dụng cụ cấy kim loại

Dụng cụ thủy tinh dùng cho nuôi cấy mô và tế bào thực vật phải là loại thủy tinh trong suốt để ánh sáng qua được ở mức tối đa và trung tính để tránh kiềm từ thủy tinh gây ảnh hưởng đến sự phát triển của mô nuôi cấy.

Cần rửa sạch dụng cụ thủy tinh trước khi đưa vào sử dụng. Thông thường, chỉ cần xử lý dụng cụ thủy tinh bằng sulfochromate một lần đầu khi đưa vào sử dụng, về sau chỉ cần rửa sạch bằng xà phòng, tráng sạch bằng nước máy nhiều lần và cuối cùng tráng bằng nước cất. Sau khi để ráo nước, dụng cụ

thủy tinh (trừ các loại dùng để đo thể tích) cần được vô trùng khô bằng cách sấy ở 60-70°C/2 giờ. Sau khi nguội được lấy ra cất vào chỗ ít bụi.

Dụng cụ cấy bằng kim loại được khử trùng bằng nhiệt khô trong tủ sấy từ 130-170°C, 2-4 giờ. Trong khi cấy, các dụng cụ cấy được đốt nóng bởi đèn cồn

### Môi trường

Nói chung, môi trường được pha chế và dự trữ trong điều kiện không vô trùng và đem hấp vô trùng khi đã phân phối vào các dụng cụ thủy tinh đã đậy nút hoặc nắp. Thời gian hấp từ 15-20 phút ở áp suất khoảng 1 atm (121°C). Sau khi vô trùng cần phải làm khô nắp ống nghiệm hoặc nút bông.

Các dung dịch mẹ (stock solutions) dùng để pha chế môi trường (dung dịch muối khoáng, vitamine, chất kích thích sinh trưởng...) cần được bảo quản trong tủ lạnh. Dung dịch mẹ của hỗn hợp vitamin nên chia thành nhiều lọ nhỏ và bảo quản trong ngăn đá của tủ lạnh. Không nên pha một lượng quá lớn dung dịch mẹ các chất sinh trưởng, thường chỉ nên dùng các lọ có dung tích từ 100 đến 200 mL

Đôi khi ta cần cho vào môi trường nuôi cấy các chế phẩm mẫn cảm với nhiệt, có thể bị phân hủy khi ta hấp ở 121°C. Trường hợp này cần tiến hành lọc vô trùng riêng các chế phẩm đó và sau đó đưa vào môi trường được khử trùng

### Lọc vô trùng

Phương pháp đơn giản nhất là dùng các màng lọc Millipore (Hình 1) do hãng Millipore sản xuất hoặc dùng các phễu lọc thủy tinh xấp xỉ 5.





Hình 1. Một số loại màng lọc vô trùng của hãng Millipore (disposable).

Các lưu ý khi khử trùng mô thực vật?

- Trong thời gian xử lý, mô cấy phải ngập hoàn toàn trong dung dịch diệt khuẩn. Nếu mô non thì thời gian xử lý ngắn hơn.
- Đối với các bộ phận thực vật có nhiều bụi đất, trước khi xử lý nên rửa kỹ bằng xà phòng dưới dòng nước chảy. Khi xử lý xong, mô cấy được rửa nhiều lần bằng nước cất vô trùng (3-5 lần).
- Những phần trên mô cấy bị tác nhân vô trùng làm cho trắng ra cần phải cắt bỏ trước khi đặt mô cấy lên môi trường.
- Để tránh ảnh hưởng trực tiếp của các tác nhân vô trùng lên mô cấy, nên chú ý để lại một lớp bọc ngoài khi ngâm mô vào dung dịch diệt khuẩn. Lớp cuối cùng này sẽ được cắt bỏ hoặc bóc đi trước khi đặt mô cấy lên môi trường.
- Chú ý không ngâm mô trong cồn 900.

Môi MS đảm bảo điều kiện gì để nuôi cấy tế bào thực vật?

Năm 1962 Murashige và Skoog đã xây dựng môi trường dinh dưỡng cơ bản gọi là môi trường MS thích hợp cho hầu hết các thí nghiệm nuôi cấy tế bào thực vật có thành phần như sau

Thành phần	Nồng độ (mg/L)	Thành phần	Nồng độ (mg/L)
<i>1. Các nguyên tố đa lượng</i>		FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27,8
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370	Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O	37,2
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	<i>3. Nguồn carbon</i>	
KNO <sub>3</sub>	1900	Sucrose	30000
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650		
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	440		
<i>2. Các nguyên tố vi lượng</i>		<i>4. Các phụ gia hữu cơ</i>	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2	- Các vitamin	
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	22,3	Thiamine.HCl	0,5
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8,6	Pyridoxine.HCl	0,5
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,25	Nicotinic acid	0,5
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,025	myo-inositol	100
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,025	- Các chất khác	
KI	0,83	Glucose	2

Môi trường mẹ là gì? Môi trường nuôi cấy thường được pha với nồng độ đậm đặc hơn so với lượng cần dùng trong 1 lít để và nó có thể cất trữ được trong một thời gian tương đối lâu, chỉ pha loãng khi nào dùng đến. Việc chuẩn bị các dung dịch stock có thể tiết kiệm được rất nhiều thời gian của bạn

Ví dụ: Stock đa lượng: 20 lần/50 lần

Stock vi lượng: 100 lần/1000 lần

Stock Fe EDTA: 100 lần/1000 lần

Stock vitamin: 1000 lần

Stock BA: 1000ppm

Tại sao phải đưa pH môi trường bằng 5.8?

Agar là một sản phẩm tự nhiên được ly trích từ các loại tảo đỏ Rhodophycean, như *Gelidium*, *Gracillaria* và *Pterocladia*. Agar là phức hợp của các polysaccharide được tạo từ đường và galactose. Agar gồm 2 phân đoạn: agarose và agaropectin. Agarose là một polymer trung tính, tạo nên tính đông của agar. Agaropectin là một polymer tích điện âm, làm cho agar có tính nhầy. Phân đoạn agarose trong agar chiếm 50 – 90% (Adrian & Assoumani, 1983). Khi agar được trộn chung với nước thì tạo ra dạng gel, tan ra ở nhiệt độ 60 – 100°C và đặc lại khi nhiệt độ xuống dưới 45°C. Từ đây, chúng ta có thể lý giải: pH càng thấp thì nồng độ H<sup>+</sup> càng cao, agar chuyển sang trạng thái nhầy (không đông), pH càng cao thì nồng độ H<sup>+</sup> càng bị trung hòa nhiều khiến agar cứng (hay còn gọi là trạng thái gel).

◆◆◆◆ Độ pH môi trường được đo dựa vào nồng độ in H<sup>+</sup> trong môi trường. Độ pH biến thiên từ 0 – 14 và có điểm trung tính là 7. Độ pH môi trường cấy được điều chỉnh hầu hết ở  $5,7 \pm 1$  trước khi hấp khử trùng. Độ pH ảnh hưởng đến khả năng hòa tan của các ion trong môi trường khoáng, khả năng đông tụ agar và sự tăng trưởng của tế bào. Murashige & Skoog đã chứng minh bằng thực nghiệm rằng độ pH 5,7 – 5,8 thích hợp để duy trì sự hòa tan các chất khoáng trong môi trường MS, pH dưới 5,5 làm cho agar khó chuyển sang trạng thái gel, còn pH lớn hơn 6,0 agar có thể rất cứng.

◆◆◆◆ Nếu trong thành phần môi trường có GA3 thì phải điều chỉnh giá trị pH trong phạm vi nói trên. Vì ở pH kiềm hoặc quá axit, GA3 sẽ chuyển sang dạng không có hoạt tính (Van Braft & Pierk, 1971).

◆◆◆ Trong quá trình nuôi cấy, pH của môi trường có thể giảm xuống, do một số mẫu thực vật sản sinh ra các axit hữu cơ. Mặt khác, nhiệt độ cao sẽ làm tăng tính axit của môi trường nuôi cấy. Mann et al., 1982 nhận thấy rằng, nếu trước khi hấp tiệt trùng mà chỉnh pH bằng 5,7 thì sau khi hấp tiệt trùng, pH sẽ giảm xuống còn 5. Nếu muốn pH môi trường ở khoảng 5,7 – 5,9 trước khi cấy thì trước khi hấp khử

trùng cần phải chỉnh pH để khoảng 7.

❖❖❖❖ Đối với các nghiên cứu về nuôi cấy lỏng không có agar, chẳng hạn như nuôi cấy huyền phù tế bào, nuôi cấy thủy canh và vi thủy canh (hydroponics & microponic) trong môi trường không có agar nhưng tại sao chúng ta vẫn phải điều chỉnh pH môi trường? Như đã nói ở trên, Murashige & Skoog đã chứng minh bằng thực nghiệm rằng độ pH 5,7 – 5,8 thích hợp để duy trì sự hòa tan các chất khoáng trong môi trường MS. Nếu như môi trường MS được sử dụng ở dạng lỏng thì có thể chỉnh pH ở 5. Huyền phù tế bào đậu nành có thể tăng trưởng tốt nhất trong môi trường B5 lỏng ở pH 4,5 – 5,5. Nếu như chỉnh độ pH môi trường trên 5 thì trọng lượng khô của tế bào sẽ giảm xuống đáng kể. Hơn nữa, môi trường nuôi cấy huyền phù tế bào có pH thấp phần nào giảm bớt được tình trạng nhiễm vi sinh vật lạ (Veliky & Martin, 1970). Các môi trường nuôi cấy thủy canh phổ biến cũng sử dụng môi trường MS hoặc

Tại sao phải bổ sung đường 30g/l; agar có vai trò gì?

Đường là chất cung cấp nguồn cacbon cho cây trong thời gian cây được nuôi cấy trong bình kín giúp tế bào phân chia, tăng sinh khối mô.

Có hai loại đường chủ yếu dùng trong nuôi cấy mô là saccaroz và glucoz. Tuy nhiên saccaroz được dùng phổ biến do dễ tìm, giá thành rẻ. Nồng độ đường trong môi trường cũng thay đổi tùy thuộc loại cây, mục đích nuôi cấy, tuy nhiên hiện nay sử dụng thông dụng nhất là nồng độ từ 20 – 30 g/l.

Agar làm cho môi trường đặc đóng vai trò là giá thể để tế bào thực vật bám dính và tái sinh.

Người ta có thể lấy chóp rễ để nhân giống vô tính thực vật được không ? giải thích?

Tất cả các tế bào thực vật đều có tính toàn năng, biệt hóa và phản biệt hóa, tế bào chóp rễ cũng không ngoại lệ, vì thế ta có thể nhân giống vô tính thực vật từ chóp rễ

Tóm tắt các điều kiện cần và đủ để tái sinh thực vật trong ống nghiệm?

- Thực vật cần tái sinh phải có tế bào còn sống.
- Xác định loại mô dùng nuôi cấy và tìm hiểu phản ứng của mô trong nuôi cấy ở các nồng độ chất sinh trưởng khác nhau.
- Môi trường nuôi cấy phù hợp: Thành công chính trong các thí nghiệm nuôi cấy mô và tế bào thực vật là tìm ra thành phần vật chất của môi trường dinh dưỡng cần thiết để tế bào có thể sinh trưởng và phát triển được. Thành phần của môi trường dinh dưỡng thay đổi tùy theo loài và bộ phận nuôi cấy, tùy theo sự phát triển và phân hóa của mô cấy, tùy theo việc muốn duy trì mô ở trạng thái callus, muốn tạo rễ, tạo mầm hay muốn tái sinh cây hoàn chỉnh. Người ta đã đưa ra rất nhiều loại môi trường khác nhau cho các thí nghiệm nuôi cấy mô. Đa số chúng có tính đặc hiệu cao, có nghĩa là chúng được nghiên cứu ra để nuôi cấy những mô đặc biệt nào đó. Một số môi trường khác có ứng dụng rộng hơn và đảm bảo sinh trưởng tốt cho nhiều loài cây, tuy nhiên không có những chỉ dẫn chung nào cho rằng môi trường nào trong chúng bảo đảm sinh trưởng tốt hơn. Để bắt đầu, cần phải thử trong những môi trường thông dụng nào đó, chẳng hạn môi trường Murashige-Skoog (1962) nếu không thành công thì sau đó thử trên các môi trường khác. Tuy vậy, tất cả những môi trường nuôi cấy bao giờ cũng gồm năm thành phần chính:
  - Đường cung cấp nguồn carbon.
  - Các muối khoáng đa lượng.
  - Các muối khoáng vi lượng.
  - Các vitamin.
  - Các chất điều khiển sinh trưởng.

ngoài ra, tùy từng tác giả có thể bổ sung thêm một số chất hữu cơ có thành phần hóa học xác định (các amino acid, EDTA...) hoặc không xác định (nước dừa, dịch chiết nấm men, dịch chiết cà chua ...).

Sau khi cấy, mô cấy cần được đặt trong điều kiện nhiệt độ và ánh sáng ổn định. Tùy vào các mục đích nghiên cứu mà có các chế độ chiếu sáng khác nhau, chẳng hạn quá trình tạo callus có thể cần bóng tối hoặc chiếu sáng nhưng quá trình tái sinh và nhân giống vô tính nhất thiết cần ánh sáng. Nhiệt độ phòng nuôi nên giữ ổn định từ  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$  bằng máy điều hòa nhiệt độ. Cường độ chiếu sáng khoảng từ 2000-3000 lux.

# Bài 2

## NHÂN TẠO

# HẠT

Nguyên tắc bài thí nghiệm

Hạt nhân tạo là dạng hạt mô phỏng hạt tự nhiên, có một phôi sinh dưỡng được bọc trong một lớp hydrogel có chứa chất dinh dưỡng. Sau đó phôi này nảy mầm thành cây con hoàn chỉnh. Do phôi vô tính có thể nảy mầm và thành cây hoàn chỉnh, kỹ thuật hạt nhân tạo đã được nghiên cứu và ứng dụng thành công ở nhiều nước.

Hạt nhân tạo gồm có 3 phần

- Phôi vô tính.- Vỏ bọc polime (alginat).- Màng ngoài (alginat canxi).

Có nhiều loại polyme tự nhiên đã được thử nghiệm dùng cho công nghệ nuôi vô tính, trong đó alginat được coi là tốt nhất. Alginat là một polime sinh học được chiết từ rong biển, chủ yếu từ rong mơ (*Sargassum sp.*). Alginat do các phân tử axit manuronic gắn với nhau, giống như các phân tử glucose tạo nên cellulose. Đặc điểm quan trọng nhất của alginat là chúng ở dạng hòa tan trong nước khi kết hợp với các ion 1 hóa trị ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ ...) và lập tức chuyển sang không tan trong nước khi kết hợp với các ion 2 hóa trị hoặc đa hóa trị ( $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$ ,  $\text{Al}^{+++}$ ...).

Nếu nhỏ 1 giọt dung dịch alginat Na vào một dung dịch Clorua Canxi thì alginat Na ở phần diện tích ngoài của giọt sẽ chuyển hóa ngay thành alginat Canxi và tạo nên một màng không thấm nước. Các viên alginat được hình thành.

## **I.1. II. Tiến hành thí nghiệm:**

Cách tiến hành:

Chồi nách cây dâu bụt được tách ra rải trên mặt Natri alginate, dùng một ống kim tiêm 6cc (bỏ mũi kim) hút các chồi vào cùng với dịch Natri alginate, sau đó đẩy nhẹ dịch Natri alginate nhỏ ra từng giọt vào dung dịch  $\text{CaCl}_2$  0,1M. Các giọt Natri alginate rơi ra sẽ mang cả chồi, khi gặp dung dịch  $\text{CaCl}_2$  các giọt Natri alginate sẽ ngay lập tức được bao bọc bởi lớp vỏ Canxi alginate. Để hạt trong dịch Chloride canxi 30 giây, lựa các hạt có chồi đem rửa trong nước cất và trữ trong nước cất vô trùng

Một số lưu ý khi làm thí nghiệm

Khi tách chồi nách cần cẩn thận tránh làm tổn thương chồi.

Pha Natri alginate 1% cần đun sôi trong lò viba khoảng 5 lần, mỗi lần 30 giây, cho đến khi tan.



Khi hút chồi cùng với dịch natri alghinate phải khéo léo.

Chọn những hạt tròn đều và có chồi ở giữa.

Kết quả và nhận xét

Kết quả hình ảnh chụp lại của hạt nhân tạo như sau:



Hình 2: hạt nhân tạo

Nhận xét:

Hạt nhân tạo gồm có 3 phần:

- phôi vô tính
- vỏ bọc polime(alghinate)
- màng ngoài (alghinate canxi)

Khi chưa trồng thì nó được trữ trong nước cất vô trùng .

Để gieo trồng hạt nhân tạo: ngâm trong  $\text{KNO}_3$  200mM trong 1 giờ, rửa dưới vòi nước trong 40 phút. Hạt được trồng vào khay, nảy mầm sau 6 giờ.

Trả lời câu hỏi

So sánh hạt nhân tạo và hạt tự nhiên? Ưu và khuyết điểm của hạt nhân tạo và hạt tự nhiên?

Giống nhau

Hạt nhân tạo và hạt tự nhiên đều có 2 phần là lớp vỏ bảo vệ và phôi

Khác nhau:

Hạt nhân tạo; lớp vỏ được tạo thành từ polime nhân tạo, phôi có thể là phôi hữu tính hoặc vô tính. không có phôi nhũ

Hạt tự nhiên :

vỏ

phôi

Chất dinh dưỡng dự trữ của hạt chứa trong lá mầm hoặc trong phôi nhũ.  
?

Ưu và khuyết điểm của hạt nhân tạo:

Rẻ tiền.

Thao tác nhanh chóng, dễ thực hiện.

Có thể tạo thành với số lượng lớn.

Tỉ lệ sống sót bằng nuôi cấy invitro cao

Khuyết điểm :

Thời gian bảo quản không cao như hạt tự nhiên: 6 tháng

Cần môi trường nhân tạo để nảy mầm

Hạt tự nhiên:

Ưu điểm:

có thể nảy mầm ngoài tự nhiên

thời gian bảo quản rất lâu nếu bảo quản tốt

Khuyết điểm :

Số lượng hạt phụ thuộc vào tự nhiên. Có những cây tạo hạt rất ít vd: phong lan.

Khả năng nảy mầm của hạt 1 số cây rất thấp:

Phân biệt phôi vô tính và phôi hữu tính?

- phôi vô tính (somatic embryogenesis) Thuật ngữ này dùng cho sự phát triển của các phôi hoàn chỉnh từ các tế bào sinh dưỡng được sản xuất từ các nguồn mẫu vật khác nhau sinh trưởng trong nuôi cấy in vitro. Thuật ngữ tương đương đối với sự phát triển phôi ở thực vật sinh trưởng trong điều kiện tự nhiên là phát sinh phôi hữu tính (zygotic embryogenesis) và phát sinh phôi vô tính (apomitic embryogenesis). Phôi vô tính có cấu trúc tương tự phôi hữu tính của thực vật sinh trưởng trong điều kiện tự nhiên. Điểm khác nhau cơ bản giữa phôi hữu tính và phôi vô tính là phôi hữu tính luôn luôn đi kèm với nội nhũ là cơ quan dự trữ năng lượng và chất dinh dưỡng phục vụ cho quá trình nảy mầm, còn ở phôi vô tính hoàn toàn không có nội nhũ.-

Phôi vô tính là phôi được tạo từ các tế bào thể hệ( tế bào cơ thể,  $2n$ ), theo con đường sinh phôi thể hệ.

+ Đơn tử diệp→ tế bào cơ thể→phôi hình cầu→phôi hình núi lửa→phôi hình kim tự tháp.

+ Song tử diệp→tế bào cơ thể→phôi hình cầu→ phôi hình tim→phôi hình cá đuôi/thủy lôi.

Phôi hữu tính theo con đường sinh phôi hữu tính.

+ Đơn tử diệp→hợp tử →phôi hình cầu→phôi hình núi lửa→phôi hình kim tự tháp.

+ Song tử diệp→hợp tử→phôi hình cầu→phôi hình tim→phôi hình cá đuôi/thủy lôi.

Vai trò của dung dịch canxi chlorua?

Alginate là ở dạng hòa tan trong nước khi kết hợp với các ion 1 hóa trị ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ ...) và lập tức chuyển sang không tan trong nước khi kết hợp với các ion 2 hóa trị hoặc đa hóa trị ( $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$ ,  $\text{Al}^{+++}$ ...).

Nếu nhỏ 1 giọt dung dịch alginate Na vào một dung dịch Clorua Canxi thì alginate Na ở phần diện tích ngoài của giọt sẽ chuyển hóa ngay thành alginate Canxi và tạo nên một màng không thấm nước. Các viên alginate được hình thành.

Vì vậy, vai trò của  $\text{CaCl}_2$  là:

Bao bọc chồi bởi lớp vỏ Canxi alghinate ,có độ cứng gel vừa phải thuận lợi cho sự hô hấp của phôi.

Bảo vệ phôi khỏi những tổn thương bên ngoài.

### Bài 3

Giải phẫu rễ than lá

**I. Nguyên tắc bài thí nghiệm**

Tiến hành nhuộm các mẫu rễ thân lá đã được cắt mỏng ta sau đó quan sát dưới kính hiển vi có thể Quan sát hình thái và biết được các thành phần cấu tạo giải phẫu của rễ, thân, lá cây.

**II. Một số lưu ý khi làm thí nghiệm****III. Kết quả và nhận xét****IV. Trả lời câu hỏi****1. Ý nghĩa bài thí nghiệm giải phẫu rễ, thân, lá?**

Qua bài thí nghiệm ta có thể quan sát, mô tả hình dạng cấu tạo của các cơ quan, các mô và các loại tế bào đảm nhiệm những chức năng khác nhau trong đời sống của cây. Giúp ta có thể phân biệt được cây 1 lá mầm hay 2 lá mầm, c3 và c4... Không chỉ thế, việc tìm ra mối quan hệ giữa các tính chất về hình thái giải phẫu với điều kiện sống của nó cũng là một hướng nghiên cứu mới, thực vật sống trong môi trường luôn luôn chịu ảnh hưởng của các tác nhân sinh thái (nhiệt độ, ánh sáng, địa

hình...) nếu không thích nghi được với các điều kiện này cây sẽ chết, còn thích nghi được sẽ tồn tại và phát triển, chính hướng nghiên cứu này làm cơ sở cho ngành phỏng sinh học (Bionic)...

## **2. Tại sao phải ngâm mẫu trong javen và acid acetic?**

Nước Javel 15' để loại nội dung tế bào.

Rửa nước cho sạch Javel

Acid acetic 5' để loại nước Javel còn lại

Rửa nước cho sạch nước Javel còn lại

## **3. Tại sao phải sử dụng thuốc nhuộm 2 màu?**

Muốn phân biệt được các loại mô trong mẫu ta dùng 2 loại phẩm nhuộm:

- Phẩm nhuộm carmin sẽ nhuộm màu hồng lợt hay tím lợt nếu vách tế bào cấu

tạo từ cellulose và pectin.

- Phẩm nhuộm xanh iod sẽ nhuộm màu xanh lục nếu vách tế bào thấm lignin hay bần (suberin).

## **4. Tại sao phải cắt mẫu vật thành từng lát thật mỏng?**

muốn quan sát dễ dàng cấu tạo ta phải cắt các cơ quan thực vật (rễ, thân, lá thành các lát mỏng

## **5. Tại sao phải quan sát trong một giọt glycerin?**

Glycerin có độ khúc xạ gần với thủy tinh nên nó hạn chế sự sai lệch và tán sắc ánh sáng khi ánh sáng đi qua các môi chất có độ khúc xạ khác nhau

Glycerin không độc hại, có tác dụng bảo quản và làm trắng lên vì vậy dùng làm dung dịch bảo quản vật mẫu rất thích hợp. Vật mẫu bảo quản trong dung dịch glycerin theo thời gian sẽ trở nên trong hơn, vì vậy vật mẫu cần phải nhuộm trước đó. Một ưu điểm khác nữa của glycerin là hòa tan trong nước, điều khiến chúng ta không cần phải chiết nước ra trước khi bảo quản.

Nếu nhỏ quá nhiều thì gây lãng phí và làm loang mẫu

## **6. Hãy phân biệt lá 1 lá mầm và lá 2 lá mầm qua hình thái giải phẫu?**

2 lá Cấu tạo lá cây Hai lá mầm.

Đa số các cây Hai lá mầm đều có cuống và phiến lá phân biệt nhau rõ rệt. Do đó, ở cấu tạo giải phẫu cũng phân biệt 2 phần này.

- Cấu tạo của cuống lá: Cuống lá của nhiều cây thường phân biệt mặt trên và mặt dưới rất rõ: mặt trên phẳng hoặc hơi lõm, mặt dưới lồi. Cắt ngang cuống lá ta thấy nó gồm mấy phần sau:

+ Biểu bì: là những tế bào hình chữ nhật, xếp theo chiều dài của cuống. phía ngoài cũng có tầng cutin và có lỗ khí. Đôi khi biểu bì có lông che chở.

+ Mô dày: nằm sát dưới lớp biểu bì, làm nhiệm vụ nâng đỡ.

+ Mô mềm: các tế bào của mô này thường dài theo trục của cuống, chứa nhiều lục lạp. Ở các cây thủy sinh, trong lớp mô mềm đồng hoá này có nhiều khoang khuyết lớn chứa khí (cây sen, cây súng...). Ở một số cây khác thì tại phần này có ống tiết (ví dụ: cuống lá trầu không, rau mùi...) hay có tế bào đá (cuống lá súng, lá trang, ngọc lan...).

+ Các bó dẫn: nằm trong khối mô mềm. Các bó dẫn thường xếp thành hình cung mà mặt lõm quay về phía trên. Bó dẫn to ở dưới, các bó nhỏ ở trên: cuống lá có cấu tạo đối xứng hai bên qua một mặt phẳng. Chính vì vậy, dù cho cuống lá có mặt cắt tròn (như cuống lá gạo) cũng không thể lẫn với một khúc thân được (vì ở thân hoặc rễ có đối xứng toả tròn). Đôi khi các bó dẫn này có thể xếp thành một cung liên tục. Trong mỗi bó dẫn, phần gỗ bao giờ cũng ở trong (mặt lõm của cung) và libe ở ngoài (ứng với mặt lồi của cung).

Nói chung, số bó dẫn thường ít và không đổi. Đó là đặc điểm của các cây đã tiến hoá. Ở các họ như Cà, Hoa Mối, Cúc... cuống lá chỉ có một bó dẫn mà thôi, còn các họ nguyên thủy như Ngọc lan, Sen, Súng, Mao lương... thì số bó dẫn trong cuống lá nhiều hơn. Trong trường hợp chỉ có một bó dẫn thì bó đó có thể làm thành một cung gồm gỗ ở trong và libe ở ngoài (như ở cuống lá bưởi).

Đó là cấu tạo sơ cấp, mà đối với cuống lá thì chỉ có lối cấu tạo ấy, vì sự sinh trưởng của lá là có hạn.

- Cấu tạo của phiến lá: Phiến lá cây Hai lá mầm thường có gân hình lông chim, gồm một gân chính ở giữa, các gân con ở hai bên phân nhánh và xếp thành mạng lưới. Do đó, khi cắt ngang phiến lá, ta thấy phần giữa thường dày và lồi hẳn ở mặt dưới, còn hai bên là phiến lá chính thức, mỏng hơn. Cấu tạo ở hai phần này có khác nhau.

Mặt trên và mặt dưới lá đều được giới hạn bởi lớp tế bào biểu bì có cấu tạo điển hình: không có lục lạp, màng ngoài thường dày hơn và có cutin, đôi khi có sáp hoặc lông. Biểu bì trên thường không có hoặc có rất ít lỗ khí, còn ở mặt dưới có nhiều lỗ khí. Số lượng lỗ khí trên  $1\text{mm}^2$  thay đổi tùy loài và tùy môi trường sống, nhưng con số thường là hằng trăm. Các lỗ khí có thể nằm trên lớp tế bào biểu bì, hoặc ẩn sâu trong khoang kín (như ở lá trúc đào), gọi là phòng ẩn lỗ khí. Giữa hai lớp biểu bì trên và dưới là phần thịt lá. Đó là những tế bào mô mềm đồng hóa có màng mỏng, nội chất phân hoá, trong chứa nhiều lục lạp và hạt tinh bột. Thịt lá có thể phân biệt

thành hai phần: mô giậu và mô khuyết (mô xốp).

- Mô giậu: nằm tiếp biểu bì trên, gồm một đến vài lớp tế bào hình chữ nhật dài xếp tương đối sát nhau. Trong tế bào mô giậu chứa nhiều lục lạp hơn trong tế bào mô xốp, các hạt diệp lục thường xếp theo chiều dọc tế bào khiến chúng nhận được ánh sáng đều đặn. Cách sắp xếp này rất lợi cho sự quang hợp ở mô giậu.

- Mô xốp: nằm dưới mô giậu và tiếp với biểu bì dưới của lá. Nó gồm những tế bào tròn cạnh, không đều, xếp thưa nhau để hở nhiều khoảng trống chứa khí, các khoảng trống đó thông với phòng lỗ khí.

Tại chỗ tiếp giáp giữa mô giậu và mô xốp có những tế bào thuộc mô xốp, hình đa giác, chứa ít lục lạp hơn các tế bào khác và có tác dụng thấu góp các sản phẩm quang hợp rồi chuyển vào phần libe của gân lá. Đó là những tế bào thấu góp.

Ở một vài cây (như trúc đào, đa) ngay dưới lớp biểu bì là hạ bì, che chở cho lục lạp ở các tế bào bên trong khỏi bị ánh sáng quá chói. Ở các cây mọng nước, tế bào chứa nước phát triển nhiều hơn, chiếm phần lớn thịt lá, mô đồng hoá chỉ còn là một hoặc hai lớp mỏng ở hai mặt mà thôi, chúng gồm hoàn toàn những tế bào mô giậu. Trong trường hợp này lỗ khí thường phân bố ở cả biểu bì trên và dưới (lá chè), đó là yếu tố cơ học của lá.

- Các bó dẫn (gân lá): Các bó dẫn nằm trong phần mô đồng hoá, chỗ giáp giữa mô giậu và mô xốp, làm thành hệ gân lá. Trong số các bó dẫn lớn nhất nằm ở trong mặt phẳng đối xứng của lá và tạo thành đường gân chính. Các bó dẫn khác càng xa bó dẫn lớn ở giữa càng bé đi và xếp đối xứng hai bên với bó giữa. Xung quanh các bó dẫn có các tế bào thấu góp. Cấu tạo ở gân chính giống như cấu tạo của cuống lá. Trong các bó dẫn, phần gỗ nằm trên, libe nằm dưới. Cách sắp xếp này cũng dễ hiểu vì các bó dẫn của phiến lá chính là phần kéo dài và phân nhánh của các bó ở cuống lá. Điểm đáng chú ý là các bó dẫn ở lá (cả cuống và ở phiến) đều không có tầng phát sinh: đó là lỗi cấu tạo sơ cấp. Vì vậy, lá sinh trưởng có hạn, thường chỉ một năm (hoặc có khi một mùa) là rụng đi.

Chức năng chính của các bó dẫn ở lá là dẫn truyền, nhưng ngoài ra chúng còn nhiệm vụ nâng đỡ nữa. Do đó, xung quanh các bó dẫn lớn thường có một vòng mô cơ (gồm các tế bào mô dày hoặc mô cứng) để tăng phần cứng rắn cho gân và cả phiến lá.

Đa số cây Một lá mầm đều không có cuống, chỉ gồm bẹ và phiến lá. Cấu tạo của bẹ lá có những phần tương ứng với thân cây Một lá mầm. Trong trường hợp có cuống lá, cấu tạo tương tự cuống lá cây Hai lá mầm. Ở đây chủ yếu nói về cấu tạo phiến lá.

Khác với cây Hai lá mầm, lá của nhiều cây Một lá mầm thường xếp hơi thẳng đứng, hai mặt lá được chiếu sáng tương đối đồng đều, do đó ít sai khác nhau và có cấu tạo đồng nhất. Một điểm sai khác nổi bật nữa là do đa số cây Một lá mầm có hệ gân song song hoặc hình cong, nên các bó dẫn ở đây thường nhiều và xếp thành một hàng ngang trong phiến lá.

Khi quan sát lát cắt ngang cây Một lá mầm, ví dụ lá ngô, ta thấy có cấu tạo sau: hai mặt lá là hai lớp biểu bì, bên ngoài có tầng cutin. Ở một số cây khác, biểu bì có thể ngấm thêm chất sáp (lá chuối) hoặc chất silic (lá mía, lá cỏ tranh). Lỗ khí có mặt ở biểu bì trên và biểu bì dưới. Riêng biểu bì trên ở nhiều cây họ Lúa thỉnh thoảng có những tế bào đặc biệt, lớn hơn các tế bào bên cạnh, không bào chiếm gần hết khoảng tế bào. Đó là những tế bào vận động của biểu bì, chúng có thể xếp thành hình quạt.

Phần thịt lá có cấu tạo đồng nhất, nghĩa là không phân hoá thành mô giậu, mô xốp. Chúng gồm các tế bào mô mềm tròn cạnh hay có cạnh, chứa lục lạp, để hở các khoảng gian bào. Ở

## **7. Hãy phân biệt thân 1 lá mầm và thân 2 lá mầm qua hình thái giải phẫu?**

2 lá mầm Đối xứng tỏa tròn, các mô sắp xếp thường đều quanh trục. Có sự chuyển hóa rất cao của các mô.

+ Biểu bì: Ít có lỗ khí, không có lục lạp.

+ Vỏ sơ cấp: Chủ yếu có mô dày (thân non 2 lá mầm) ít gặp mô cứng, mô mềm thường có chứa diệp lục ở thân non.



+ Trụ: Ở đa số cây, các yếu tố dẫn làm thành bó. Các bó chằng chất hở đơn và kép.

+ Trong cùng là các tế bào mô mềm ruột.

1 lá mầm: - Khó phân biệt vỏ và trụ

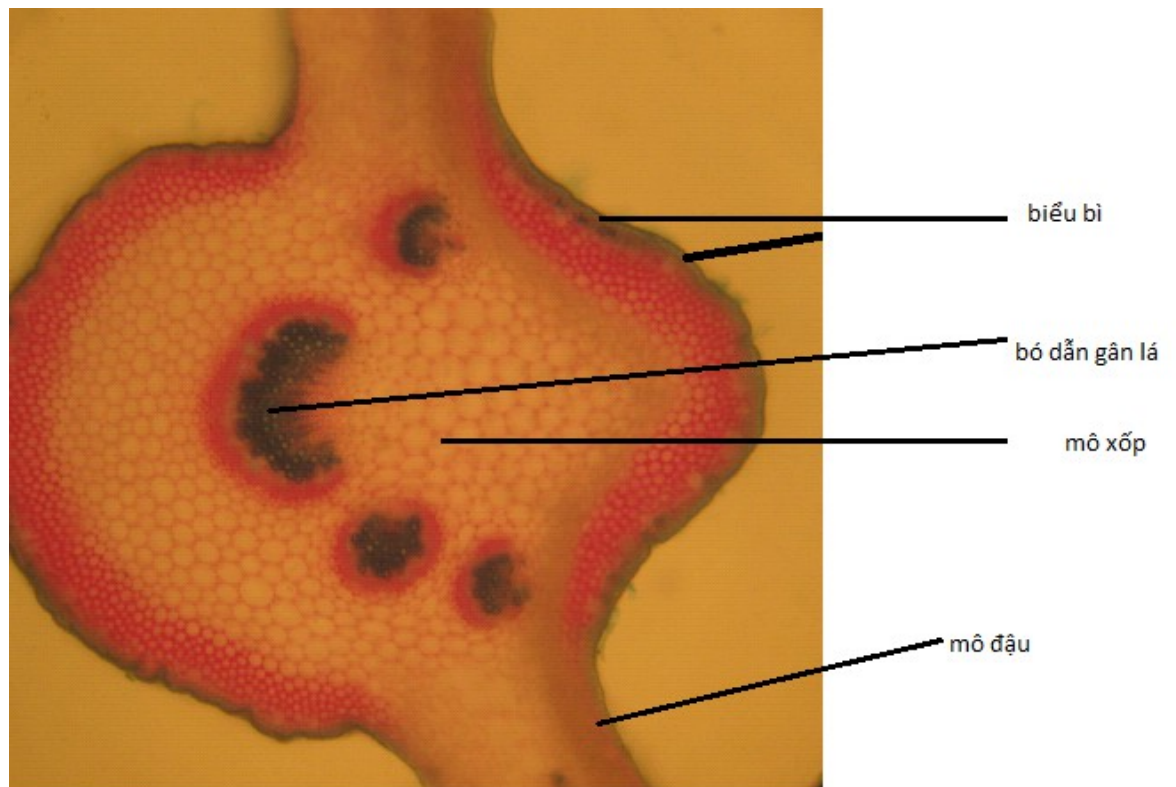
-mạch libe xếp thành bó, Bó mạch chằng chất kín sắp xếp lộn xộn, có mô cứng bao bọc ở chung quanh

- Không có sự xuất hiện 2 tầng phát sinh

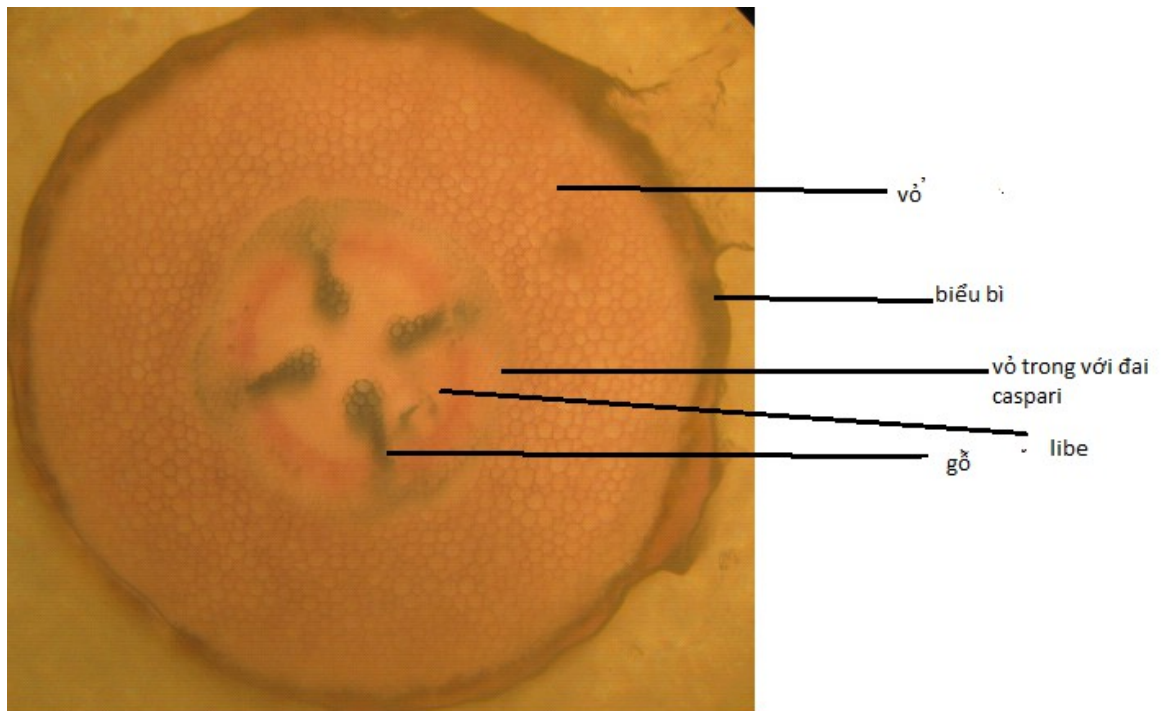
- Thường gặp mô cứng trong cấu tạo của thân, ngay cả khi còn non

Hình ảnh:

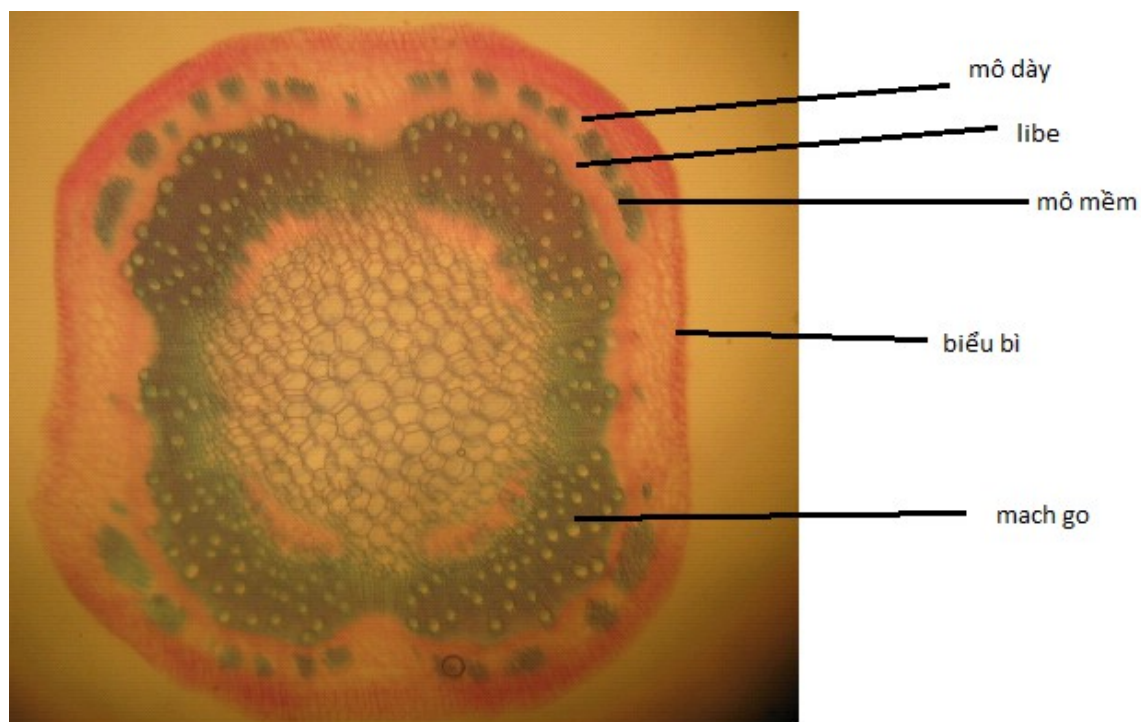
Lá



Rễ:



Than:



## MỤC LỤC

Tiến hành thí nghiệm:.....	5
Trả lời câu hỏi.....	7
Bài 2 HẠT NHÂN TẠO.....	15
: GIẢI PHẪU RỄ, THÂN, LÁ.....	21