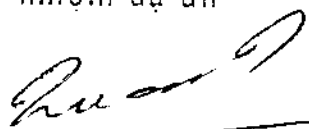


SỞ KHOA HỌC CÔNG NGHỆ VÀ MÔI TRƯỜNG TỈNH TRÀ VINH

BÁO CÁO TỔNG KẾT DỰ ÁN

ỨNG DỤNG CÔNG NGHỆ NUÔI CẤY MÔ TẾ BÀO
THỰC VẬT VÀO VIỆC CHỌN LỌC VÀ NHÂN GIỐNG
CÂY TRỒNG Ở TỈNH TRÀ VINH

Chủ nhiệm dự án



Trà Vinh, Ngày 25 tháng 5 năm 2002

Số quan chủ trì




Nguyễn Văn Truyền

I. MỞ ĐẦU :

1- Tổng quan về nhân giống vô tính bằng nuôi cấy mô tế bào thực vật:

Nuôi cấy mô tế bào thực vật là phạm trù sử dụng chung cho tất cả các loại nuôi cấy nguyên liệu thực vật, hoàn toàn sạch các vi sinh vật trên môi trường dinh dưỡng nhân tạo trong điều kiện vô trùng.

Trong kỹ thuật nuôi cấy mô tế bào thực vật thì nhân giống in vitro là một trong kỹ thuật chính. Bằng kỹ thuật này, trên môi trường nhân tạo, từ các mô hoặc cơ quan thực vật ban đầu có thể tái sinh thành cây hoàn chỉnh và chỉ trong thời gian ngắn có thể tạo ra lượng cây trồng lớn có cấu trúc di truyền và các đặc điểm sinh học giống hệt nhau.

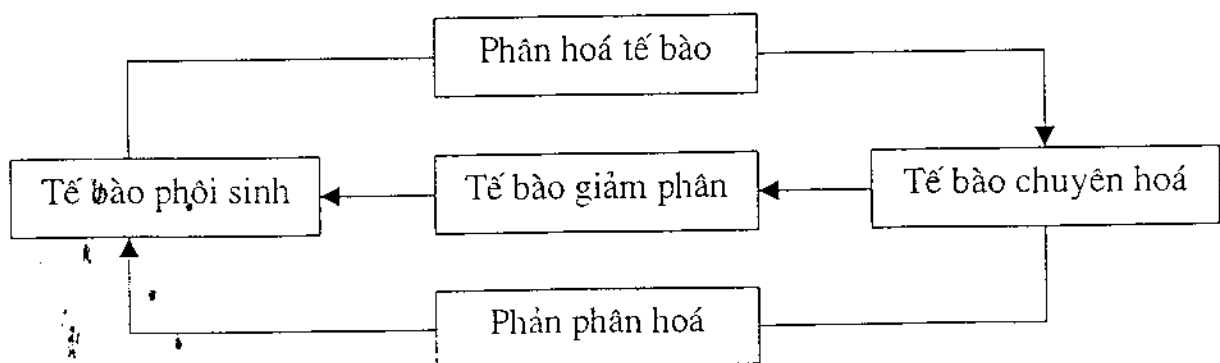
1.1- Cơ sở lý luận của phương pháp nhân giống vô tính in vitro:

Cơ sở lý luận của phương pháp nhân giống nuôi cấy in vitro là tính toàn năng (totipotency) của mọi tế bào. Mỗi tế bào thực vật đều có khả năng tái sinh thành cây hoàn chỉnh nếu được cung cấp các điều kiện cần thiết.

Cho đến nay, con người đã hoàn toàn chứng minh được luận điểm nêu trên do Haberlaudt (1982) nêu ra.

Hàng trăm loại cây trồng đã được nhân trên quy mô thương mại bằng cách nuôi dưỡng những bộ phận thích hợp trong môi trường dinh dưỡng vô trùng và tái sinh chúng thành cây (Murashige, 1980).

Quá trình phát sinh hình thái của nuôi cấy in vitro thực chất là kết quả của sự phân hoá và phản phân hoá của tế bào. Sự phân hoá tế bào là sự chuyển các tế bào phôi thành các tế bào mô chuyên hoá, đã nhận các chức năng khác nhau. Tuy nhiên, các tế bào chuyên hoá cũng không mất đi khả năng phân chia. Trong điều kiện thích hợp chúng lại có thể trở về dạng phôi sinh và lại phân chia mạnh mẽ. Quá trình này được gọi là sự phản phân hoá ngược lại với sự phân hoá. Các quá trình trên được biểu diễn theo sơ đồ sau:



Trong nuôi cấy in vitro, tính toàn năng của tế bào được thể hiện qua quá trình phản phân hoá, phân hoá tế bào và tái sinh cây hoàn chỉnh từ mô nuôi cấy. Quá trình này chủ yếu được điều khiển bởi hàm lượng tỷ lệ của các chất điều khiển sinh trưởng thực vật nhóm Auxin, Xytokinin:

+ Auxin có tác dụng trong môi trường nuôi cấy là kích thích hình thành rễ bất định của mô nuôi cấy. Đồng thời kích thích sự giãn nở của tế bào, làm tế bào phình to ra dẫn đến tăng kích thước của các cơ quan đưa vào nuôi cấy.

+ Xytokinin được ứng dụng chủ yếu trong nuôi cấy mô, tế bào thực vật. Các chất Xytokinin tổng hợp như Benzyladenin (BA), Kenitin cũng như Xytokinin tự nhiên trong nước dừa đã được ứng dụng rộng rãi trong nuôi cấy mô. Việc có mặt của chúng trong môi trường quyết định sự phân chia và hoá chồi trong mô nuôi cấy, trong quá trình nhân nhanh in vitro thì các mô nuôi cấy tái sinh rất nhiều chồi. Muốn vậy, phải nuôi cấy trong môi trường có một tỷ lệ Xytokinin nhất định.

+ Các đường tái sinh cây hoàn chỉnh trong nuôi cấy in vitro:

Cây con có thể tái sinh từ những tổ chức chứa sẵn mô phân sinh (phôi, điểm sinh trưởng, ngọn chồi, chồi nách) hoặc từ những mô có khả năng hình thành điểm sinh trưởng phụ, như vậy có hai phương pháp tái sinh cây con.

- Tái sinh trực tiếp từ lát cắt hoặc điểm sinh trưởng

- Tái sinh gián tiếp sau khi phản phân hoá thành mô sẹo(Reinert,1977)

Có rất nhiều phương pháp nhân giống vô tính (Donal propagation) đã được sử dụng trong nuôi cấy các loại cây ăn quả, hoa,... Về phương diện giá trị kinh tế, phẩm chất thì kỹ thuật tái sinh trực tiếp cây con từ các điểm sinh trưởng có sẵn là kỹ thuật được quan tâm nhất. Nhiều tác giả khẳng định rằng, đây là con đường an toàn nhất để thu được cây con đồng nhất về mặt di truyền và duy trì được các tính trạng của cây mẹ (Hu and Wang, 1983). Người ta chứng minh được rằng, chỉ có tế bào lưỡng bội mới giữ vai trò quan trọng trong quá trình phân hoá, tái sinh và chỉ có tế bào của mô phân sinh là chứa và duy trì được số nhiễm sắc thể đặc trưng của loại sau mỗi lần phân chia (D'Amato,1975). Cây con thu được từ kết quả của sự phân chia (phân hoá) của tế bào phân sinh. Do đó bảo tồn được đặc tính của cây mẹ.

Mặt khác, khi cần thiết phải tạo ra số lượng cây giống lớn trong một thời gian ngắn, kỹ thuật phôi hoá tế bào soma(somatic embryo gacnesis) là hướng đi có

xu thế cho kết quả cao. Từ 1gr mô sẹo có thể tạo ra được một khối lượng khổng lồ phôi soma (Sluis and Walkel, 1985) và chế ra các hạt giống nhân tạo (Redenbogh et al, 1986).

Ngoài ra, hai hướng khác có thể thu được cây con với hệ số lớn là nuôi cấy bao phấn, hạt phấn (androgenesis) và nuôi cấy tế bào trần (protoplast).

Điểm chung của kỹ thuật này là tế bào thường trải qua một giai đoạn phát triển mô sẹo. Chính ở giai đoạn này dù ở môi trường đặc hoặc môi trường lỏng dễ xuất hiện những tế bào đột biến, mang số nhiễm sắc thể không giống tế bào ban đầu, nhất là khi số lần cấy chuyển tăng lên (D'Amato, 1971). Đây là nguyên nhân dẫn đến tình trạng cây tái sinh từ mô nuôi cấy rất khác nhau và khác cây mẹ về mặt di truyền. Vì vậy cần chú ý lựa chọn hướng để nhân giống với một đối tượng cụ thể nào ta cần.

1.2- Nguyên tắc, kỹ thuật chung về nhân giống vô tính in vitro :

Theo quan điểm hiện nay, quy trình nhân giống vô tính in vitro được chia thành 5 giai đoạn nối tiếp nhau như sau:

• Giai đoạn 1 (giai đoạn chuẩn bị):

Là giai đoạn khử trùng mẫu đem nuôi cấy, tạo ra nguồn mẫu sạch ban đầu đưa vào nuôi cấy in vitro. Việc xử lý mẫu vật trong điều kiện tiệt trùng sẽ làm mẫu vật trở nên hoàn toàn vô trùng. Hoá chất dùng để khử trùng là HgCl_2 0,1%, NaOCl , Ca(OCl)_2 .v.v..

Với những cây nhiệt đới và cận nhiệt đới, nhiệt độ bằng 25°C và ẩm độ 75% là điều kiện giữ mẫu thích hợp, cho hiệu quả cao trong nuôi cấy, tỷ lệ nhiễm bệnh thấp (Debergh và Zimmerman, 1991)

• Giai đoạn 2 (tái sinh mẫu nuôi cấy);

Mục đích của giai đoạn này là tái sinh mẫu nuôi cấy. Mẫu nuôi cấy thường được sử dụng trong các thí nghiệm là chồi đỉnh (shoottip) hoặc chồi nách (axillary shoot) của cây mẹ. Ngoài ra, tùy từng đối tượng nuôi cấy, người ta còn có thể sử dụng các mẫu nuôi cấy như mẫu lá, đài hoa, cánh hoa, mẫu rễ ,v.v...

Đối với việc chọn mẫu là chồi đỉnh và chồi nách cần chú ý chỉ tiêu về tuổi sinh lý mẫu. Theo Anoleron- 1980 thì mẫu ở thời kỳ sinh trưởng mạnh của cây trong mùa sinh trưởng cho kết quả khả quan trong tái sinh chồi. Các mô lấy từ cây

con có khả năng tái sinh chồi cao hơn các mô từ cây trưởng thành (Bhatt,1979). Để tái sinh mẫu người ta sử dụng các tỷ lệ Auxin/Xytokinin khác nhau đưa vào môi trường nuôi cấy nhằm điều khiển sự tái sinh một cách định hướng các mô nuôi cấy.

- **Giai đoạn 3 (nhân nhanh chồi);**

Toàn bộ quá trình vi nhân giống, xét cho cùng chỉ nhằm một mục đích là tạo ra hệ số nhân chồi cao nhất. Chính vì vậy, giai đoạn này được coi là giai đoạn chính trong cả quá trình.

Ở giai đoạn này, môi trường dinh dưỡng nhân tạo để nuôi cấy thường được đưa thêm vào các chất điều hoà sinh trưởng (auxin, xytokinin, giberillin,...) các chất bổ sung khác như nước dừa, nước chiết nấm men, dịch thuỷ phân casein,... kết hợp với các yếu tố nhiệt độ, ánh sáng nhằm đạt được hệ số nhân cao nhất mà vẫn đảm bảo sức sống và bản chất di truyền của cây. Tuy nhiên, tùy từng đối tượng nuôi cấy, người ta có thể kích thích sự hình thành các cụm chồi, nhân cụm chồi hay kích thích sự phát triển của các chồi nách vì giảm cạnh hoặc thông qua việc tạo cây từ phôi vô tính.

- **Giai đoạn 4 (hình thành rễ);**

Sau 3 giai đoạn nuôi cấy trên, khi đạt đến một kích thước nhất định, các chồi sẽ được chuyển từ môi trường giai đoạn 3 vào môi trường ra rễ. Thường sau 2-3 tuần, từ những chồi riêng lẻ này sẽ xuất hiện rễ (Bhojwani,1980; Bhojwani et al,1982;). Ở giai đoạn này, người ta thường bổ sung vào môi trường các auxin vì auxin là nhóm hormon thực vật quan trọng có chức năng tạo rễ phụ (Pierik,1987). Trong nhóm này thì các chất: IAA, IBA, NAA, 2,4D được sử dụng và nghiên cứu nhiều nhất để tạo rễ cho chồi in vitro. Môi trường có bổ sung NAA, IBA, IAA với hàm lượng từ 0,1-1 mg/l rất thích hợp cho việc tạo rễ hầu hết các loại cây trồng. Tuy vậy, ở một số loại như chuối hoặc cây ngái sự hình thành rễ tốt hơn cả đạt được trong môi trường không có chất điều hoà sinh trưởng (Bhojwani và Razdan, 1983).

- **Giai đoạn 5 (đưa cây in vitro ra đất):**

Giai đoạn đưa cây hoàn chỉnh (có đủ rễ, thân, lá) từ ống nghiệm ra đất là bước cuối cùng của quy trình vi nhân giống.

Cây lấy ra từ ống nghiệm phải rửa sạch agar bám trên bề mặt rễ để tránh sự xâm nhập của côn trùng và nấm mốc.

Theo Bhofwani và Razdan (1983), quy trình này sẽ thành công hơn nếu trước khi đưa cây con ra đất, ta ươm cây trên cát có độ ẩm 90% từ 10-15 ngày. Trong khoảng thời gian này, rễ mới được sinh ra và bắt đầu hình thành lá mới. Sau đó chuyển cây ra đất với chế độ chăm sóc bình thường.

1.3- Ứng dụng của nuôi cây in vitro trong công tác chọn giống cây trồng:

Nuôi cây mô, tế bào thực vật có thể phục vụ nhiều lĩnh vực khác nhau. Trong công tác giống cây trồng, nuôi cây in vitro được ứng dụng để:

- + Làm phong phú vật liệu di truyền cho công tác chọn giống
- + Nhân nhanh và duy trì các giống, cá thể có ý nghĩa khoa học, có giá trị kinh tế cao.
- + Làm sạch virus phục tráng giống bị thoái hoá vì bệnh.

Trong đó ứng dụng nhân nhanh vô tính cây trồng là lĩnh vực được quan tâm hơn cả. Kỹ thuật nhân giống in vitro là một biện pháp nhân giống hữu hiệu nhất trong các phương pháp nhân giống vô tính, kỹ thuật này cho phép tạo ra một quần thể cây con đồng đều, giữ nguyên đặc tính của cây mẹ, có hệ số nhân cao, sớm phát huy được hiệu quả kinh tế, không tốn diện tích cho nhân giống, dễ chăm sóc, dễ dàng khắc phục những điều kiện bất lợi. Phương pháp này đặc biệt tỏ ra ưu việt với các loại cây khó nhân giống bằng con đường hữu tính, các giống quý hiếm có số lượng giống ban đầu hạn chế mà lại cần nhân nhanh.

Theo Murashige (1974) có 300 loại cây có thể nhân giống qua phương pháp nuôi cấy mô tế bào. Phương pháp này còn có lợi ở chỗ: tạo ra một quần thể cây con đồng nhất với số lượng lớn, khoẻ mạnh sạch bệnh, dùng phương pháp này để phục tráng một quần thể có nguy cơ bị diệt vong, có thể trao đổi các nguồn gen quý với quốc tế và bảo quản nguồn gen dưới dạng cây invitro (Murashige T, Marell R, Noreranch . 1974).

Khả năng ứng dụng dễ thấy nhất của phương pháp nuôi cấy mô thực vật là phục tráng giống cây trồng. theo Morel (1960) meristem của một số loại địa lan (Cymbidium) cổ rất ít hoặc không có virus, đồng thời ông cũng thành công trong kỹ thuật tạo protocorm khi nuôi cấy meristem. Các protocorm được cắt và nuôi cấy tạo protocorm mới, ở điều kiện nuôi cấy nhất định nó sẽ hình thành các cây địa lan con, đây là các cây sạch virus hoàn toàn. Kỹ thuật đặc biệt có giá trị quan trọng đối với khoai tây, cây ăn quả và nhiều loại cây trồng nhân giống vô tính khác. Đối với cây khoai tây, bệnh hiểm nghèo nhất là bệnh virus, một trong những nguyên

nhân chính gây nên hiện tượng thoái hoá giống. Năm 1955, Morell và Martin đã dùng kỹ thuật nuôi cấy meristem tạo được giống khoai tây sạch virus, mang lại ý nghĩa rất lớn cho ngành sản xuất khoai tây trên thế giới.

Việc ứng dụng nuôi cấy mô thực vật trong nhân giống được Nozeran nâng lên một mức khi ông nhận thấy sự trẻ hoá của các chồi nách cây nho và cây khoai tây, được đem nuôi cấy và cấy chuyển nhiều lần trong ống nghiệm. Việc ứng dụng nuôi cấy mô trong nhân giống trên quy mô lớn đã được thực hiện ở quy mô thương mại với hàng loạt cây trồng có ý nghĩa kinh tế cao như chuối, cà phê, cọ dầu, mía, hoa lan,... và đã có những đóng góp to lớn cho nền nông nghiệp thế giới.

Trong lĩnh vực sản xuất hoa, cây cảnh, kỹ thuật nuôi cấy in vitro và các công nghệ sinh học khác như : (cấy chuyển gen, biến dị soma,...) đã ngày càng đóng góp vào thị trường hoa của thế giới các loại hoa và cây cảnh với số lượng thương mại hoá. Năm 1985 kim ngạch thị trường này ước tính 20-25 tỷ USD. Ở Hà Lan kỹ thuật vi nhân giống trở thành nền tảng cho công nghệ hoa và cây cảnh. Năm 1987, Thái Lan đã có 20 công ty tư nhân dùng kỹ thuật nuôi cấy in vitro trên quy mô thương mại để sản xuất hoa cắt. Colombia là nước sản xuất hoa cắm chướng lớn nhất thế giới nhờ ứng dụng công nghệ nuôi cấy in vitro. Ở Maroc, nhân giống in vitro đóng góp tích cực cho sự phát triển nghề trồng hoa (Albert Sasson, 1992).

Tóm lại, nuôi cấy invitro đã được đưa vào chương trình chọn giống và nhân giống hiện đại. Bằng phương pháp này, con người đã xây dựng nên các hệ thống sản xuất giống gốc cho nhiều cây nhân giống vô tính hoàn toàn sạch virus như: khoai tây, nho, chuối dứa, mía, hoa lan, huệ và một số loại khác,...

2- Ứng dụng công nghệ nuôi cấy mô tế bào thực vật ở Việt Nam .

Ở Việt nam, từ những năm 1975. nhiều phòng nuôi cấy mô trồng cả nước đã được thành lập và thu được nhiều thành quả đáng kể. Tại viện sinh học nhiệt đới - Viện Khoa học Việt Nam đã hoàn thiện qui trình nhân giống in vitro một số cây trồng có khả năng chống chịu như: Lúa, thuốc lá, khoai lang, dứa,...

Nguyễn Thị Quỳnh và Nguyễn Văn Uyển (1987) đã nghiên cứu thành công kỹ thuật nhân giống cây cà phê bằng 2 phương pháp: phương pháp giâm cành trên môi trường MS (Murashige- Skoog, 1982) có bổ sung 5ppm BA và 0,01 ppm IBA và phương pháp tạo phôi vô tính (Somatic embryos) trên môi trường MS + 10 ppm + 40 ppm Adenin + 0.1 ppm IBA.

Từ những năm 1980-1982 vấn đề khắc phục hiện tượng thoái hoá giống khoai tây đã được nghiên cứu (Nguyễn Quang Thạch) và đề nghị một mô hình sản xuất khoai tây sạch bệnh cho vùng đồng bằng Bắc bộ (Nguyễn Quang Thạch, Hoàng Minh tấn và cộng sự, 1990).

Năm 1993, Mai Xuân Lương và cộng sự đã thăm dò qui trình nhân giống hoa loa kèn trắng (hoa huệ tây-*Lilium longiflorum*) trên các môi trường đa lượng với các mức dinh dưỡng khác nhau như MS: White, B5, KnutsonC, thậm chí cả môi trường Knop, nhưng tốt nhất là môi trường MS.

Trường Đại Học Nông nghiệp I đã tiến hành nghiên cứu nhiều đối tượng khác nhau và nuôi cấy mô thành công trên cây thuốc lá, cẩm chướng, lan chuỗi, mía,... Ở các tỉnh phía Nam đã xây dựng được ngân hàng giống cà phê với 10 dòng khác nhau, hoàn thiện quy trình nhân giống cây cao su. Ngoài ra các phòng nuôi cấy mô khác đã nghiên cứu thành công và hoàn thiện quy trình nhân giống cây hoa, cây ăn quả, cây thuốc, cây rừng và các loại cây quý hiếm khác có giá trị kinh tế cao.

3- Nhu cầu và sự cần thiết áp dụng công nghệ nuôi cấy mô tế bào thực vật tại Trà Vinh .

Trà Vinh là một tỉnh thuộc khu vực Đồng Bằng Sông Cửu Long, chuyên sản xuất nông nghiệp, có thế mạnh về sản xuất đa dạng, đồng thời là hệ sinh thái đặc thù của vùng đồng bằng ven biển với nhiều giống thực vật có giá trị như: quách, dừa đặc ruột, chà là, chanh, cam, chuối, mía, dứa, các loại khoai củ, các loại hoa và cây rừng... Với nguồn gen phong phú cần phải được lưu trữ, bảo vệ; đồng thời có nhu cầu rất lớn về giống cây trồng phục vụ cho sản xuất và tiêu dùng. Tuy nhiên do chưa được đầu tư thiết bị và công nghệ nên từ trước đến nay phương pháp nhân giống ở đây chủ yếu là nhân giống bằng các phương pháp cổ truyền nên hệ số nhân không cao, chất lượng cây giống không đảm bảo, thêm vào đó là phải phụ thuộc vào điều kiện thời tiết, khí hậu,... Vì vậy, việc áp dụng công nghệ nuôi cấy mô tế bào thực vật vào việc nhân giống, lưu giữ bảo tồn nguồn gen của các loại cây quý hiếm trong tỉnh là một đòi hỏi cấp thiết.

Để giải quyết vấn đề trên UBND tỉnh Trà Vinh đã giao nhiệm vụ cho Sở Khoa Học Công Nghệ và Môi Trường xây dựng và chủ trì Dự án "**Ứng dụng Công nghệ nuôi cấy mô tế bào thực vật vào việc chọn lọc và nhân giống cây trồng ở tỉnh Trà Vinh**".

II. TÓM TẮT NỘI DUNG CHÍNH CỦA DỰ ÁN .

1- Tên dự án :

Ứng dụng công nghệ nuôi cấy mô tế bào thực vật vào việc chọn lọc và nhân giống cây trồng ở tỉnh Trà Vinh .

2- Mục tiêu của dự án :

Đầu tư xây dựng một cơ sở nuôi cấy mô tế bào thực vật, trên cơ sở đó tiếp thu công nghệ để ứng dụng vào việc lưu giữ, bảo tồn và phát triển các nguồn gen quý hiếm tại địa phương ; tổ chức sản xuất thử nghiệm một số giống cây trồng có giá trị phục vụ yêu cầu công nghiệp hóa, hiện đại hóa nông thôn tỉnh .

Dự án sẽ tập trung vào một số giống cây trồng sau :

- Cây ăn quả : Chanh (cam, chuối...)
- Cây công nghiệp : mía (dứa)
- Một số cây hoa cảnh quý : Lan (Huệ)

3- Nội dung của dự án :

- 1- Thiết kế, xây dựng phòng nuôi cấy mô thực vật đạt tiêu chuẩn kỹ thuật.
- 2- Đầu tư mua sắm, lắp đặt các trang thiết bị một cách đồng bộ, bao gồm:
 - Hệ thống điện, nước và các thiết bị phụ trợ .
 - Thiết bị, dụng cụ cần thiết cho một phòng nuôi cấy mô .
 - Hóa chất , nguyên liệu đủ cho nhu cầu nuôi cấy .
- 3- Đào tạo, tập huấn cán bộ đủ trình độ và tay nghề thực hành theo mục tiêu đã đề ra .
- 4- Tiến hành nuôi cấy nhằm nhân nhanh một số cây trồng có nhu cầu và giá trị kinh tế tại địa phương

III. KẾT QUẢ THỰC HIỆN DỰ ÁN

1. Kết quả khoa học công nghệ đạt được.

Đã thiết kế, xây dựng được một phòng nuôi cấy mô tế bào với đầy đủ các trang thiết bị đạt tiêu chuẩn kỹ thuật, đảm bảo cho việc tiếp nhận công nghệ và sản xuất thử nghiệm các loại giống cây trồng ngay tại phòng thí nghiệm.

a. Hệ thống phòng thí nghiệm:

+ Phòng rửa, chuẩn bị dụng cụ: Diện tích 20 m^2 , sạch sẽ thông thoáng, đầy đủ điện nước.

+ Phòng pha chế môi trường: Diện tích 20 m^2 , đầy đủ điện nước

+ Phòng cấy vô trùng: Diện tích 20 m^2 đảm bảo vô trùng và nhiệt độ 25°C , đủ ánh sáng.

+ Phòng nuôi cấy và lưu trữ: Diện tích 40 m^2 , đảm bảo thời gian chiếu sáng 12 giờ/ngày, ánh sáng 1500lux và nhiệt độ 25°C .

b. Vườn ươm:

+ Nhà ươm cấp I: Diện tích 200 m^2 , đảm bảo độ che sáng 70%, chắn gió, thông thoáng, giữ ẩm, tránh công trùng.

+ Nhà ươm cấp II: Diện tích 200 m^2 , dạng nhà lưới đơn giản.

c. Thiết bị, nguyên vật liệu và các phụ trợ.

+ Mua sắm, lắp đặt trang thiết bị đồng bộ đảm bảo các tiêu chuẩn kỹ thuật, bao gồm:

+ Hệ thống điện nước và các thiết bị phụ trợ.

+ Thiết bị dụng cụ cần thiết cho phòng nuôi cấy mô.

+ Hoá chất, nguyên liệu đủ cho nhu cầu nuôi cấy.

d. Đào tạo và tiếp nhận công nghệ.

+ Cử cán bộ đến Trường Đại học Tổng hợp TP. Hồ Chí Minh tiếp nhận công nghệ và được các chuyên gia đến tư vấn triển khai dự án tại tỉnh.

+ Đã đào tạo được 04 cán bộ tiếp nhận toàn bộ công nghệ về công nghệ nuôi cấy mô tế bào thực vật và 02 công nhân phòng thí nghiệm.

+ Ngoài ra còn phối hợp với một số cơ quan khoa học công nghệ trong cả nước để triển khai dự án.

2. Quy trình công nghệ nuôi cấy mô tế bào thực vật.

Sau khi được tiếp nhận công nghệ các cán bộ của trung tâm ứng dụng KHKT đã tiến hành nhân thử nghiệm trên 7 loại giống cây trồng, ngay tại phòng

thí nghiệm của tỉnh và đã đưa ra quy trình công nghệ nhân 7 loại cây như sau: Lan, Huệ, Dưa, Mía, Chuối, cam, Chanh.

a. Quy trình nhân giống chanh;

Cây chanh (*Citrus limonia Osbesk*) các sản phẩm của cây rất cần thiết và gần gũi với đời sống hàng ngày: làm nước giải khát, rượu, gia vị trong bữa ăn, thuốc chữa bệnh,... nhờ trồng chanh nhất là chanh trái vụ nhiều gia đình nông dân cho thu nhập cao. Tuy nhiên, để mở rộng diện tích trồng chanh ra phổ biến hơn thì việc cung cấp giống đầu dòng sạch bệnh và ổn định về di truyền là vấn đề được đặt ra. Song người dân chỉ nhân giống bằng các phương pháp cổ truyền như : giâm cành, chiết cành, gieo hạt. Với những phương pháp này thì lại gặp rất nhiều khó khăn như: gieo hạt thì có số lượng lớn nhưng không giữ được đặc tính của cây mẹ, chiết cành thì không có số lượng nhiều và ảnh hưởng đến cây mẹ,... Vì vậy, để giải quyết vấn đề về cây giống thì việc áp dụng nuôi cấy mô tế bào thực vật để nhân giống cây chanh là một việc làm thiết thực.

- Vật liệu khởi đầu:

Đối tượng đưa vào lấy mẫu nuôi cấy là các cành bánh tẻ.

- Xử lý mẫu:

Mẫu đưa vào, cắt lá, rửa sạch bằng nước xà phòng. sau đó, được khử trùng bằng $HgCl_2$ 0,1% trong thời gian 10 phút rồi rửa sạch bằng nước cất (3-5) lần, đưa mẫu vào phòng cấy, các thao tác tiếp theo được thực hiện trong điều kiện vô trùng (Box Laminer).

- Nuôi cấy:

Mẫu đã được khử trùng xong, dùng dụng cụ vô trùng cắt bỏ phần mô tiếp xúc với hoá chất khử trùng, cắt đoạn cành mang chồi nách thành những đoạn có chiều dài 0,6 - 1 cm. sau đó cấy vào ống nghiệm có môi trường tái sinh chồi và đặt vào phòng nuôi ở điều kiện chiếu sáng 12 giờ/ngày, 1500lux, nhiệt độ $25^{\circ}C$. Sau 4 tuần theo dõi thì chồi được tái sinh và nhú lên, ta lại tách chồi và nhân trên môi trường $MS + 0,1ppmBAP$, khi có chồi ta tiến hành tạo cây hoàn chỉnh. Mang chồi cấy chuyển sang môi trường ra rễ $MS + 0,5 ppm\alpha NAA$ sau 4 tuần cây ra rễ, chuyển cây ra vườn ươm và tưới chăm sóc 5 tuần ta có cây con giống.

b. Quy trình nhân giống cây cam.

Cây cam (*Citrus sinensis* (L)). Quả cam ngoài việc dùng để ăn tươi còn được dùng để đóng hộp, làm nước hoa quả,... Vỏ cam, hoa lá còn được dùng để chiết xuất tinh dầu, dùng để chữa bệnh,... quy trình nhân giống cây cam cũng tương tự như cây chanh.

- Vật liệu khởi đầu:

Đối tượng đưa vào lấy mẫu nuôi cấy là các cành bánh tẻ.

- Xử lý mẫu:

Mẫu đưa vào, cắt lẻo lá, rửa sạch bằng nước xà phòng. sau đó, được khử trùng bằng HgCl_2 0,1% trong thời gian 10 phút rồi rửa sạch bằng nước cất (3-5) lần, đưa mẫu vào phòng cấy, các thao tác tiếp theo được thực hiện trong điều kiện vô trùng (Box Laminer).

- Nuôi cấy:

Mẫu đã được khử trùng xong, dùng dụng cụ vô trùng cắt bỏ phần mô tiếp xúc với hoá chất khử trùng, cắt đoạn cành (mang mắt ngủ) thành những đoạn có chiều dài 0,6 - 1 cm. sau đó cấy vào ống nghiệm có môi trường tái sinh chồi và đặt vào phòng nuôi ở điều kiện chiếu sáng 12 giờ/ngày, 1500lux, nhiệt độ 25°C . Sau 4 tuần theo dõi thì chồi được tái sinh và bật lên, ta lại tách chồi nhân trên môi trường $\text{MS} + 0,7\text{ppmBAP}$, khi có chồi ta tiến hành tạo cây hoàn chỉnh. Mang chồi cấy chuyển sang môi trường ra rễ $\text{MS} + 0,5\text{ppm} \alpha\text{NAA}$ sau 4 tuần cây ra rễ, chuyển cây ra vườn ươm và tưới chăm sóc 5 tuần ta có cây giống.

C. Quy trình nhân giống chuối.

Cây Chuối (*Musa.sp*) là cây ăn quả nhiệt đới có giá trị dinh dưỡng và giá trị kinh tế cao. Theo tài liệu của FAO, trong 100g chuối tiêu chín cho 72 kg calo, 79,2 %nước, 1,8% Protein, 6,2 lipit, 185 đường tổng số, 80mg vitamin, 8mg vitamin C. Ngoài ra còn có các chất khoáng như Ca, P, Fe, Na, K và các vitamin khác B₁, B₂. Quả không những dùng để ăn tươi mà còn là nguyên liệu chế biến bột chuối, mứt chuối, rượu chuối,... trồng chuối nhanh cho thu hoạch, ít vốn đầu tư, biết thâm canh cho hiệu quả kinh tế cao. Từ những lợi ích của cây chuối rất nhiều người muốn trồng chuối với diện tích rộng, song gặp nhiều vấn đề về giống.

- Vật liệu khởi đầu:

Đối tượng đưa vào lấy mẫu nuôi cấy là đỉnh chồi của củ chuối.

- Xử lý mẫu:

Mẫu đưa vào rửa sạch dưới vòi nước sạch 1 giờ, sau đó rửa qua nước cất vô trùng và đem vào ngâm trong cồn 70° 1 phút, tiếp đến ngâm trong dung dịch Sodium Hypochloride 3% trong thời gian 15 phút và rửa lại bằng nước cất vô trùng 3 lần, sau đó khử trùng trở lại với Sodium Hypochloride 1% trong thời gian 1 phút, rửa lại bằng nước cất vô trùng từ 3-5 lần, sau khi xử lý mẫu xong chuyển mẫu vào phòng nuôi cấy.

- Nuôi cấy:

Mẫu đã được khử trùng xong, dùng dụng cụ vô trùng cắt bỏ phần mô tiếp xúc với hoá chất khử trùng, cắt thành các mô với kích thước 5 mm² và cấy vào ống nghiệm có môi trường tái sinh chồi, các thao tác được thực hiện trong tủ cấy vô trùng, môi trường MS + 5ppmBAP + 1gr than hoạt tính và đặt vào phòng nuôi ở điều kiện chiếu sáng 12 giờ/ngày, 1500lux, nhiệt độ 25°C. Từ mô cấy, cụm chồi bắt đầu phát triển sau 2 tuần và tiếp tục theo dõi sau 6-8 tuần các chồi lớn trong cụm chồi được tiếp tục nhân bằng cách cắt dọc phần gốc thân để cấy vào môi trường, các chồi nhỏ được cấy sang môi trường khác. Sau đó các chồi lại được cấy ra môi trường tạo rễ MS. Bốn tuần sau cây được hình thành hoàn chỉnh và được chuyển ra vườn ươm. Ngoài vườn ươm cây được trồng trong bầu đất + 1 phần đất + 1 phần phân chuồng ủ hoai + 2 phần tro trấu. sau 8 tuần cây xuất vườn.

d. Quy trình nhân giống cây Dứa:

Cây Dứa (*Ananas comonius* L.) Dứa có đặc điểm chung là sinh trưởng nhanh dễ trồng, không kén đất, chịu hạn, ít sâu bệnh cho thu hoạch nhanh, sản lượng cao, quả để ăn tươi, làm đồ hộp xuất khẩu, nước giải khát,... bã của lá dùng làm giấy. Dứa có rất nhiều giống với những giống có từ trước thì cho năng suất thấp và giống càng ngày càng bị thoái hoá, còn những giống dứa mới cho năng suất cao thì lại hạn chế về số lượng. Vì vậy, việc nhân nhanh các giống dứa mới cho năng suất cao để đáp ứng đủ giống cho người trồng là vấn đề cần được giải quyết. Để giải quyết vấn đề này thì việc nhân giống dứa bằng phương pháp nuôi cấy mô tế bào là việc làm cần thiết.

- Vật liệu khởi đầu:

Nguyên liệu dùng để nuôi cấy là ngọn dứa

- Xử lý mẫu:

Ngọn dừa được lấy mẫu, được cắt bỏ sạch lá và rửa bằng nước xà phòng sạch, đem vào ngâm trong cồn 70^o trong thời gian 1 phút vớt ra đem ngâm vào dung dịch Kali hypochloride 10% trong thời gian 30 phút, sau đó rửa sạch mẫu nhiều lần bằng nước cất vô trùng.

- Nuôi cấy:

Mẫu đã được xử lý vô trùng chuyển vào phòng nuôi cấy. Dùng dao đã vô trùng tách bỏ các lớp vỏ bao bên ngoài mầm chồi, cắt chồi thành các mảnh có kích thước 1x2cm, cắt bỏ các phần bị tổn thương do khử trùng rồi cấy mẫu vào môi trường tạo chồi MS + 3ppm + 0,5ppm α NAA và chuyển vào phòng nuôi điều kiện chiếu sáng 12 giờ/ngày, 1500lux, nhiệt độ 25^oC. Sau 15 ngày chồi bắt đầu phát triển, sau 30 ngày cây cao 9-10 mm. Tiếp tục tách các chồi lớn tạo cây hoàn chỉnh trên môi trường ra rễ MS + 1,5 α NAA và sau 30 ngày cây cao 5-6cm. Chuyển cây ra vườn ươm trên cát sạch, tại vườn ươm sau 60 ngày cây cao 12-15 cm bón phân DAP 1g/l, KNO₃ 2g/l mỗi tuần tưới 1 lần sau 8 tuần xuất trồng được.

e. Nhân giống Mía:

Cây Mía (*Saccharum officinarum* L.) giống mía giữ vai trò quan trọng trong sản xuất mía trên thế giới. Trước đây khi chưa biết lai hữu tính để tạo giống, những giống mía thuộc loại nhiệt đới được sử dụng cho đến cuối thế kỷ 19 không đáp ứng được nhu cầu đa dạng sinh thái khác nhau. Nhưng với việc tạo giống lai hữu tính thì sự sinh trưởng phát triển của cây không mạnh, không đồng đều. Để đáp ứng số lượng cây giống lớn có năng suất chất lượng cao thì việc áp dụng phương pháp nuôi cấy mô là cần thiết.

- Vật liệu khởi đầu:

Đỉnh sinh trưởng và lá non có độ dài 60-80 cm

- Xử lý mẫu:

Ngọn mía được lấy mẫu đem rửa sạch dưới vòi nước chảy sau đó đưa vào khử trùng bằng cồn 70^o trong thời gian 1 phút vớt ra ngâm vào dung dịch Sodium hypochloride trong 20 phút và rửa lại bằng nước cất vô trùng 4-5 lần.

- Nuôi cấy:

Mẫu đã được xử lý mang vào phòng nuôi cấy dùng dao vô trùng bóc các lá bao xung quanh đỉnh chồi và cắt đỉnh chồi thành các miếng nhỏ 1-2 cm cấy lên môi trường MS + 1ppm BAP + 1ppm Kinetin + 0,5 ppm NAA và chuyển vào phòng nuôi ở điều kiện chiếu sáng 12 giờ/ngày, 1500lux, nhiệt độ 25°C. Sau 1 tuần mẫu có hiện tượng sống là tốt và sau 4 tuần mẫu phát triển thành cụm chồi, các chồi cao 5 cm được cấy chuyển sang môi trường tạo rễ và tạo cây hoàn chỉnh MS. sau 4 tuần cây phát triển hoàn chỉnh và chuyển cây ra vườn ươm để ươm (ngoài ra cây mía còn phát triển tốt trong môi trường lỏng MS). Ngoài vườn ươm mía được trồng trên đất: 2 phần cát núi + 2 phần tro trấu và sau khi mía được đưa ra trồng cần được chăm sóc ngày 3 lần, sau 4 tuần cây được xuất vườn.

f. Nhân giống hoa lan:

Cây hoa lan (Orchidaceae) được trồng thông dụng và xuất khẩu, lưu thông như một ngành thương mại và được phát triển ở nhiều nước, đã gây trồng, lai tạo được nhiều giống mới độc đáo,... Các quốc gia có công nghệ sản xuất hoa lan bằng phương pháp tiên tiến như: Australia, Anh, Pháp, Nhật, Thái Lan,... Để nhân giống vô tính hoa lan có 2 phương pháp chính.

+ Tách chồi

+ Nuôi cấy mô (nhân giống invitro)

Phương pháp tách chồi (nhân giống invitro). Phương pháp nhân giống invitro hệ số nhân thấp, rất khó có thể hình thành một vườn ươm có số lượng lớn cây cùng chủng loại, Chỉ có phương pháp nuôi cấy mô mới có khả năng giải quyết vấn đề này, ngoài ra còn sản xuất một số lượng cây giống lớn. Đây là phương pháp duy nhất nhân bản bố mẹ thành các cây con hoàn toàn đồng nhất. Ở Thái Lan trên 90% lan thương mại được nhân bằng phương pháp này. Phương pháp này đã được áp dụng rất thành công để nhân các giống mới và sớm đưa chúng vào sản xuất nông nghiệp, ở đây chúng tôi tiến hành nhân giống 2 loại lan là *Dendrobium* và *Phalenopsis*.

+Dendrobium:

- Vật liệu khởi đầu:

Nguyên liệu đưa vào nuôi cấy là đỉnh sinh trưởng, mẫu lấy vào buổi sáng khi đã khô sương, chọn chồi mới nhú.

- Xử lý mẫu:

Mẫu đưa vào được rửa sạch dưới vòi nước chảy rồi rửa lại bằng xà phòng, sau đó ngâm trong cồn 70° trong 1 phút, mang ra khử trùng bằng Kali hypochloride trong 10-15 phút. Sau đó rửa sạch bằng nước cất vô trùng từ 3-5 lần.

- Nuôi cấy:

Mẫu đã được xử lý mang vào phòng nuôi cấy dùng dao tách đỉnh sinh trưởng dưới kính lúp và cấy vào môi trường MS + 0,2ppm α NAA + 0,2ppmBAP và đưa vào phòng nuôi điều kiện chiếu sáng 12 giờ/ngày, 1500lux, nhiệt độ 25°C. Theo dõi sau một tuần mẫu bắt đầu sống tốt, sau 4 tuần thì phát triển thành cụm chồi. Ngoài ra ta bổ sung thêm 100g khoai tây vào 1 lít môi trường thì cây lan phát triển càng tốt, cây khoẻ và mập. Sau đó, những chồi to được cấy chuyển sang môi trường ra rễ MS và sau 3 tháng ta có cây hoàn chỉnh ra vườn ươm. Tại vườn ươm cây được trồng trên giá thể là xơ dừa và mỗi ngày tưới 4 lần, phun growmore 1 lần/tuần, cây phát triển tốt và sống 100%.

+*Phalenopsis*:

Nguyên liệu dùng để nuôi cấy là vòi hoa, ta tiến hành lấy mẫu và khử trùng tương tự như *Denrobium* nhưng mẫu của *Phalenopsis* được khử trùng trong Kali hypochloride 3% trong 5 phút. Sau đó cắt các đoạn mẫu 5mm và cấy vào môi trường Knudson's c + 1ppm α NAA + 10 PPmBAP + 10ppm Adenin, sau 4 tuần theo dõi mẫu bắt đầu mọc rễ và trong môi trường này nó phát triển cụm chồi 1 cách mãnh liệt nhưng lại thiếu diệp lục tố. Nếu trong môi trường Knudsnic + 0,2ppm BAP + 0,2ppmNAA + 10 ppm Adenin thì có khả quan hơn là sớm hình thành cây con và lá xanh hơn. Sau đó các chồi to được chuyển vào môi trường ra rễ Knudson's c + 0,5ppm α NAA, sau 3 tháng có cây con hoàn chỉnh và chuyển ra vườn ươm cũng trên giá thể xơ dừa và được chăm sóc như chế độ chăm sóc *Dernobium*.

g. Nhân giống hoa Huệ:

Giống huệ đưa vào nuôi cấy là giống huệ hương trắng

Nguyên liệu đưa vào nuôi cấy là lá vẩy (vẩy củ). Lấy củ của cây hoa rửa sạch, khử trùng bằng Hypochloride sodium 30% tỉ lệ 1:1 trong 20 phút. Sau đó đem rửa sạch bằng nước cất vô trùng 3-5 lần. Dùng dao vô trùng tách các lớp vẩy ngoài rồi cắt từng đoạn 5 mm cấy vào môi trường Knudsnic + 1ppm NAA + 10 ppm BAP + 10 ppm Adenin. Mẫu có hiện tượng sau 1 tuần và 4 tuần đã tạo thành cây hoàn chỉnh chuyển ra vườn ươm.

Tại vườn ươm: đất trồng được chuẩn bị theo tỷ lệ:

1 phần cát + 1 phần phân chuồng ủ hoai + 3 phần tro trấu và cho vào bầu trồng, che mát 70% cây phát triển tốt, tỷ lệ sống 70%.

3- Kết quả nhân giống :

a- Trong phòng thí nghiệm :

Đã nuôi cấy được 1000 lọ bao gồm :

- Chuối : 10 lọ
- Dứa : 20 lọ
- Mía : 30 lọ
- Huệ : 05 lọ

Còn lại là lan các loại

b- Ngoài vườn ươm :

- Chuối : 10 cây
- Dứa : 10 cây
- Mía : 10 cây
- Lan : - 200 giò các loại
- 500 cây con

IV- KẾT LUẬN - KIẾN NGHỊ.

1- Kết luận :

- Nuôi cấy mô tế bào thực vật là một công việc tương đối khó, đòi hỏi tính tỷ mỉ cao và phải có óc quan sát nhạy bén, đặc biệt là khâu vô trùng, đây là thao tác khó nhất, ít khi thành công ngay lần đầu. Mặc khác, trên lý thuyết người ta có thể tạo thành công các phôi nhân tạo từ các tế bào sinh dưỡng để cho ra một cây mới hoàn chỉnh như : mẫu rễ , mẫu lá , dài hoa , vôi hoa. Nhưng thực tế cho thấy đỉnh sinh trưởng là bộ phận có thể tạo ra thể chồi có khả năng phân chia mạnh nhất, nên tạo được hệ số nhân cao . Hơn nữa do đặc tính phân chia nhanh nên vi khuẩn không kịp xâm nhập, vì thế việc khử trùng mẫu cũng dễ dàng hơn .

Tuy nhiên, còn tùy thuộc từng loại cây mà đòi hỏi chất liệu khác nhau :

Mía : Sử dụng lá non còn đang bọc trong bẹ và dài hoa non .

Huệ : Lá vảy .

Dứa : Chồi nách nằm ở phần giữa ngọn dứa .

Chuối : Đỉnh của củ chuối .

Lan : Tùy theo từng giống .

- *Dendrobium* : Đỉnh sinh trưởng của chồi mới nhú .

- *Phalopsis* : Vòi hoa .

- *Cymbidium* : Đầu rễ .

- Cam, chanh : Vi giâm cành .

- Nuôi cấy mô tế bào thực vật có thể áp dụng hiệu quả vào chương trình chọn giống, nhân giống hiện đại, có thể tạo lập các cá thể ưu tú đã chọn lọc từ một quần thể mang tính đồng nhất cao, tạo ra các dòng vô tính sạch bệnh với tốc độ cực nhanh, và có khả năng tồn trữ tế bào thực vật sống trong một thời gian dài ở nhiệt độ thấp mà không mất tính toàn thể của tế bào .

Riêng đối với tỉnh Trà Vinh nuôi cấy mô tế bào thực vật có thể áp dụng trong lĩnh vực hoa kiểng như nhân giống phong lan, và cây công nghiệp như : cải thiện giống mía để tăng năng suất . Trà Vinh có những vùng chuyên canh mía tập trung ở huyện Trà Cú , do đó việc cải thiện giống mía để tăng năng suất là việc làm cần thiết, nếu nhân giống vô tính theo phương pháp cổ truyền thì hệ số nhân thấp, phải mất một thời gian dài mới thay thế toàn bộ giống cũ, sử dụng phương pháp nuôi cấy mô để nhân giống thì chỉ mất một thời gian ngắn .

Tóm lại :

Qua hơn 2 năm thực hiện dự án, lúc đầu gặp rất nhiều khó khăn, và cùng một lúc phải làm nhiều loại cây khác nhau nên kết quả chưa cao, nhưng dự án cấy mô cũng đạt được một số thành công nhất định, ngoài những sản phẩm thu được bước đầu còn tiếp thu những kiến thức cấy mô có thể vận dụng vào việc nhân giống vô tính ở một số loài cây, nếu chỉ dùng phương pháp giâm cành đơn thuần thì khó có thể thành công được .

2- Kiến nghị :

- UBND tỉnh tiếp tục đầu tư, duy trì hoạt động của Phòng thí nghiệm cấy mô thực vật để phục vụ yêu cầu nhân giống cây trồng của tỉnh trước mắt và lâu dài
- Bộ KHCN&MT hỗ trợ tỉnh đào tạo một số cán bộ khoa học chuyên sâu về cấy mô, giúp tỉnh tiếp thu và quản lý tốt công nghệ hiện đại này .