

## KẾT QUẢ ÁP DỤNG KỸ THUẬT NUÔI CÂY MERISTEM KẾT HỢP VI GHÉP ĐỂ SẢN XUẤT CÂY GIỐNG CAM BÙ SẠCH BỆNH

Phạm Thị Thanh Thìn<sup>1</sup>, Đặng Thu Hòa<sup>1</sup>,  
Trần Ngọc Hùng<sup>1</sup>, Đỗ Đình Ca<sup>1</sup>

### TÓM TẮT

Đề sản xuất cây Cam Bù sạch bệnh (một giống cây có múi đặc sản của huyện Hương Sơn, Hà Tĩnh) phục vụ cho việc phục tráng và bảo tồn lâu dài nguồn gen quý hiếm địa phương, nghiên cứu sản xuất cây sạch bệnh bằng nuôi cấy mô phân sinh (meristem) kết hợp với vi ghép bao gồm: (i) xác định kích thước meristem nuôi cấy và môi trường nuôi cấy phù hợp; (ii) xác định tuổi cây gốc ghép cho vi ghép và môi trường thích hợp cho cây vi ghép phát triển; (iii) tiêu chuẩn cây ra ngôi từ ống nghiệm, giá thể trồng cây ra ngôi và chế độ dinh dưỡng thích hợp đã được thực hiện từ năm 2010 đến năm 2011 tại Bộ môn Công nghệ sinh học, Viện Nghiên cứu Rau quả. Kết quả nghiên cứu cho thấy đề sản xuất được cây sạch bệnh theo phương pháp trên, kích thước meristem thích hợp cho tỷ lệ sống cao và đảm bảo sạch bệnh là 0,15 mm; môi trường nuôi cấy thích hợp là MT + 1,0 ppm BAP + 0,3 ppm GA<sub>3</sub> + 10% nước dừa + 30 g/l sacaroza + 5 g/l aga. Tuổi cây gốc ghép cho vi ghép thích hợp nhất là 15 ngày tuổi có chiều cao 10 - 12 cm, đường kính thân 1,5 - 2,0 mm; môi trường thích hợp cho cây vi ghép phát triển là MT + 1,0 ppm αNAA + 1,0 ppm IBA + 3% sacaroza. Cây ghép trong ống nghiệm có 8 lá thật ra ngôi ngoài vườn ươm cho tỷ lệ sống cao nhất và môi trường tốt nhất cho cây ra ngôi từ ống nghiệm sinh trưởng phát triển là: Hữu cơ GT 05 + trấu hun + than bùn (1/3:1/3:1/3) + phân vi sinh Sông Gianh kết hợp phun Komix 5 ngày/lần.

*Từ khóa:* Cam Bù, cây sạch bệnh, mô phân sinh, vi ghép.

### 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong công tác phục tráng lại giống và tạo được cây giống sạch bệnh người ta có thể sử dụng phương pháp nuôi cấy phôi tâm (nucellus). Vì phôi tâm được hình thành từ những tế bào soma nên cây hoàn toàn giống cây mẹ về di truyền và các bệnh, đặc biệt là các bệnh virút không truyền qua hạt, do vậy những cây hình thành từ phôi tâm là những cây sạch bệnh và giữ nguyên được đặc tính di truyền của cây mẹ (Navarro L. và J. Juarez, 1977). Tuy nhiên, phương pháp này tốn thời gian và phải cần trợ giúp của sinh học phân tử để sàng lọc cây phôi tâm. Phương pháp thường sử dụng hiện nay là ghép đỉnh sinh trưởng (shoottip-grafting). Phương pháp này hầu như đã được hoàn thiện ở nhiều nước trồng cây có múi, nhất là các nước mà cây có múi bị bệnh vàng lá greening và tristeza phá hoại (Weathers và Calavan, 1959; Roistacher và Kitto, 1977). Theo quy trình ghép đỉnh sinh trưởng thì vật liệu ghép (đỉnh sinh trưởng hay còn gọi là mô phân sinh - meristem) càng lớn thì tỷ lệ ghép sống càng cao, nhưng tỷ lệ sạch bệnh lại càng giảm. Nhằm tạo nguồn vật liệu ghép hoàn toàn sạch bệnh, nhưng lại có kích thước lớn thuận lợi cho thao tác ghép và đạt tỷ lệ sống cao từ nuôi cấy mô phân sinh trong ống nghiệm, Viện Nghiên cứu Rau Quả đã tiến hành nghiên cứu kỹ thuật tạo cây Cam Bù sạch bệnh greening, tristeza từ cây đầu dòng bằng nuôi cấy mô phân sinh trong ống nghiệm. Ngoài mục đích

trên, việc tạo vật liệu ghép sạch bệnh từ nuôi cấy mô phân sinh sẽ làm cho quá trình tạo cây sạch bệnh chủ động được khâu ươm gieo hạt gốc ghép, tránh lãng phí hạt gốc ghép, nhất là hạt cam ba lá phải nhập nội.

### 2. VẬT LIỆU, NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

#### 2.1. Vật liệu và thời gian, địa điểm nghiên cứu

##### 2.1.1 Vật liệu

- Vật liệu nuôi cấy được tách từ các cành Cam Bù của các cây ưu tú được trồng tại Viện Nghiên cứu Rau Quả. Sử dụng gốc ghép cho vi ghép là cam ba lá gieo trong ống nghiệm 15 ngày tuổi.

##### 2.1.2 Thời gian, địa điểm nghiên cứu

- Các nghiên cứu được tiến hành tại phòng thí nghiệm - Bộ môn Công nghệ sinh học, Viện nghiên cứu Rau quả.

- Thời gian thực hiện: năm 2010 và 2011

#### 2.2. Nội dung và phương pháp nghiên cứu

##### 2.2.1. Nghiên cứu xác định kích thước meristem nuôi cấy và môi trường nuôi cấy phù hợp

##### Xác định tiêu chuẩn cành ghép

Các đoạn cành bánh tẻ có tuổi 3- 4 tháng chứa 2-3 mầm ngủ được khử trùng bằng dung dịch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nồng độ 15% trong thời gian 7 phút, sau đó các cành được nuôi cấy trên môi trường MT + 30 g/l sacaroza + 5 g/l aga + 1,0 ppm BAP để bật mầm mới. Mô phân sinh nuôi cấy được tách từ những chồi mới bật của đoạn cành.



*Xác định kích thước mô phân sinh nuôi cấy thích hợp*

Thí nghiệm được bố trí với 3 công thức kích thước của mô phân sinh nuôi cấy: CT1: 0,1 mm; CT2: 0,15 mm; CT3: 0,2 mm. Môi trường nuôi cấy là: MT + 30 g/l sacaroza + 5 g/l aga + 1,0 ppm BAP.

*Xác định môi trường nuôi cấy mô phân sinh thích hợp*

Thí nghiệm được bố trí với môi trường cơ bản MT + 30 g/l sacaroza + 5g/l aga, được bổ sung lần lượt các chất BAP, GA<sub>3</sub> và nước dừa gồm 4 công thức: CT1: (đối chứng); CT2: bổ sung 1,0 ppm BAP; CT3: bổ sung 1,0 ppm BAP + 0,3 ppm GA<sub>3</sub>; CT4: bổ sung 1,0 ppm BAP + 0,3 ppm GA<sub>3</sub> + 10% nước dừa.

*2.2.2. Nghiên cứu xác định tuổi cây gốc ghép cho vi ghép và môi trường thích hợp cho cây vi ghép phát triển*

*Xác định tuổi cây gốc ghép thích hợp*

Cây gốc ghép được sử dụng để ghép dinh sinh trưởng từ nuôi cấy mô phân sinh là cam ba lá với 3 công thức: CT1: 10 ngày tuổi; CT2: 15 ngày tuổi và CT3: 20 ngày tuổi.

*Xác định môi trường thích hợp cho cây vi ghép phát triển*

Môi trường nuôi cấy là MT được bổ sung đồng thời  $\alpha$ - NAA và IBA theo các công thức: CT1: Đối chứng (môi trường MT); CT2: ĐC +  $\alpha$ - NAA 0,5% + IBA 0,5%; CT3: ĐC +  $\alpha$ - NAA 0,5% + IBA 1,0%; CT4: ĐC +  $\alpha$ - NAA 0,5% + IBA 1,5%; CT5: ĐC +  $\alpha$ - NAA 1,0% + IBA 0,5%; CT6: ĐC +  $\alpha$ - NAA 1,0% + IBA 1,0%; CT7: ĐC +  $\alpha$ - NAA 1,0% + IBA 1,5%; CT8: ĐC +  $\alpha$ - NAA 1,5% + IBA 0,5%; CT9: ĐC +  $\alpha$ - NAA 1,5% + IBA 1,0%; CT10: ĐC +  $\alpha$ - NAA 1,5% + IBA 1,5%.

Các thí nghiệm được bố trí ngẫu nhiên hoàn toàn, mỗi công thức được bố trí 3 lần nhắc lại, mỗi lần nhắc lại 5 bình tam giác, mỗi bình cấy 5 mẫu.

Môi trường nuôi cấy được hấp khử trùng ở 121°C trong thời gian 18 phút.

Các mẫu thí nghiệm được nuôi cấy ở cường độ ánh sáng 2.000 lux, nhiệt độ 25°C, chu kỳ chiếu sáng (10-12 h)/24 h

*2.2.3. Nghiên cứu tiêu chuẩn cây ra ngôi từ ống nghiệm, giá thể trồng cây ra ngôi và chế độ dinh dưỡng thích hợp*

*Xác định tiêu chuẩn cây vi ghép thích hợp ra ngôi từ ống nghiệm:*

Thí nghiệm được bố trí với 3 công thức: CT1: Cây có 4 lá; CT2: Cây có 6 lá; CT3: Cây có 8 lá. Giá thể ra ngôi là: Giá thể HC + phân vi sinh.

*Xác định giá thể ra ngôi và dinh dưỡng thích hợp đến sinh trưởng, phát triển của cây:*

Thí nghiệm được bố trí với 5 công thức: CT1: Giá thể hữu cơ (HC) GT 05; CT2: Giá thể HC + phân vi sinh; CT3: Giá thể HC + trấu hun (1:1) + PVS; CT4: Giá thể HC + than bùn (1:1) + PVS; CT5: Giá thể HC + trấu hun + than bùn (1/3:1/3:1/3) + PVS.

Các công thức được bố trí ngẫu nhiên với 3 lần nhắc lại, mỗi lần nhắc bố trí 10 cây và được bổ sung dinh dưỡng Komix 5, 10 và 15 ngày một lần.

*\*) Thành phần dinh dưỡng của giá thể hữu cơ GT-05, gồm: Đạm (N): 1,2%, lân (P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>): 0,8%, kali (K<sub>2</sub>O): 0,7%, chất hữu cơ (OM): 44%.*

*\*\*) Dinh dưỡng bổ sung là phân bón lá Komix.*

Các cây ghép được kiểm tra bệnh Greening bằng PCR với cặp mồi A2/J5 (Jagoueix et al., 1996) và bệnh Tristeza bằng phương pháp ELISA (Hãng Agdia).

### 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

#### 3.1. Kết quả xác định kích thước mô phân sinh nuôi cấy và môi trường nuôi cấy phù hợp

##### 3.1.1. Kích thước mô phân sinh.

Kích thước của mô phân sinh ảnh hưởng tới sự sống và độ sạch virus. Kích thước lớn tỷ lệ sống cao nhưng đôi khi không sạch virút và ngược lại.

**Bảng 1. Ảnh hưởng của kích thước dinh sinh trưởng đến khả năng tái sinh cây (sau 4 tuần nuôi cấy)**

Công thức	Tổng số mẫu cây	Số mẫu sống	Tỷ lệ mẫu sống (%)	Số mẫu tái sinh	Tỷ lệ mẫu tái sinh (%)
CT1 (0,1 mm)	75	5	6,7	1	20
CT2 (0,15 mm)	75	20	26,7	8	40
CT3 (0,2 mm)	75	15	20	8	53,3



Kết quả nghiên cứu với các kích thước mô phân sinh khác nhau (0,1 – 0,2 mm) ảnh hưởng lớn đến tỷ lệ sống cũng như tỷ lệ mẫu tái sinh (bảng 1). Mô phân sinh kích thước 0,1 mm (CT1) mẫu không bị nhiễm nấm, khuẩn nhưng chết rất nhiều do có thể việc tách đỉnh sinh trưởng có kích thước quá nhỏ bị khó khăn, tỷ lệ mẫu sống chỉ đạt 6,7% và chỉ thu được 1 mẫu tái sinh, bằng 20% số mẫu sống. Ở công thức 2 kích thước 0,15 mm, tỷ lệ mẫu sống đạt 26,7% và tỷ lệ mẫu tái sinh đạt 40%. Ở công thức 3, tỷ lệ mẫu sống và tỷ lệ mẫu tái sinh khá cao, tương ứng là 20% và 53,3%. Tuy nhiên, ở công thức này kích thước mô phân sinh rất lớn dẫn đến cây tái sinh rất dễ bị nhiễm bệnh hơn. Tốt nhất là lựa chọn mô phân sinh có kích thước 0,15 mm cho nuôi cấy.

3.1.2 Xác định môi trường nuôi cấy mô phân sinh thích hợp:

Để đánh giá môi trường nuôi cấy mô phân sinh thích hợp trên cơ sở sử dụng môi trường nuôi cấy cơ bản là: MT + 30 g/l sacaroza + 5 g/l aga đã được lần lượt bổ sung BAP, GA<sub>3</sub> và nước dừa. Qua các nghiên cứu với các nồng độ của BAP và GA<sub>3</sub>, đã tìm ra được nồng độ thích hợp nhất cho mô phân sinh phát triển là 1,0 ppm BAP và 0,3 ppm GA<sub>3</sub>. Để nâng cao hơn nữa khả năng sinh trưởng cũng như chất lượng của chồi, thí nghiệm bổ sung nước dừa cũng đã được tiến hành với các công thức nồng độ từ 0 đến 15% và thu được kết quả ở bảng 2.

Bảng 2. Ảnh hưởng của nước dừa đến khả năng tái sinh và chất lượng cây tái sinh từ mô phân sinh (sau 4 tuần)

CTTD CTTN	Nồng độ nước dừa (%)	Tổng số mẫu cây	Tỷ lệ mẫu sống (%)	Tỷ lệ mẫu tái sinh (%)	Chiều cao chồi (cm)	Chất lượng chồi
CT 1 (ĐC)	0	75	47	54	0,90	+++
CT 2	5	75	51	58	0,97	+++
CT 3	10	75	56	61	1,15	+++
CT 4	15	75	53	60	1,23	++
LSD <sub>0,05</sub>					0,098	
CV(%)					4,9	

Ghi chú: (++) : Chồi vươn cao, lá xanh, phát triển TB

(+++): Chồi xanh đậm, mập, khỏe, phát triển cân đối

Kết quả nghiên cứu xác định môi trường nuôi cấy mô phân sinh thích hợp nhất là CT3: MT + 30 g/l sacaroza + 5 g/l aga + 1,0 ppm BAP + 0,3 ppm GA<sub>3</sub> + 10% nước dừa (bảng 2). Tỷ lệ mẫu sống cũng như tỷ lệ cây tái sinh, chiều cao cây đều vượt trội so với công thức còn lại. Chất lượng chồi xanh, mập, phát triển cân đối.

3.2. Kết quả xác định tuổi cây gốc ghép cho vi ghép và môi trường thích hợp cho cây vi ghép phát triển

3.2.1 Kết quả vi ghép:

Mặc dù môi trường nuôi cấy là khá thích hợp, song một khó khăn trong nuôi cấy mô phân sinh là tốc độ sinh trưởng của mô phân sinh rất chậm. Sau 1 tháng chồi chỉ cao khoảng 1 cm, sau đó có hiện tượng dừng và chết dần. Để khắc phục hiện tượng này, và phát triển vật liệu mô phân sinh sạch bệnh thành cây, đỉnh sinh trưởng đã được tách lần thứ 2 để vi ghép trên gốc ghép gieo trong

ống nghiệm. Gốc ghép sử dụng để vi ghép là cam 3 lá (Trifoliata). Tiến hành với 3 độ tuổi của cây gốc ghép (10, 15 và 20 ngày tuổi). Kết quả cho thấy tuổi cây gốc ghép có ảnh hưởng lớn tới tỷ lệ cây ghép sống và tỷ lệ bật mầm (bảng 3). Công thức 2 ghép trên cây 15 ngày tuổi có tỷ lệ cây bật mầm cao nhất (50%). Tỷ lệ bật mầm thấp nhất (30%) ở CT1 – 10 ngày tuổi, ở CT2 (20 ngày tuổi) tỷ lệ sống đạt 66,67%, nhưng tỷ lệ cây bật mầm lại chỉ đạt 46,67%. Điều này có thể được giải thích, tỷ lệ cây sống cao ở CT2 thời gian đầu có thể do mầm tiếp xúc rất tốt nên tỷ lệ sống khá cao, song sau một thời gian do tuổi cây và mô phân sinh không tương thích, có nhiều cây vết cắt của gốc ghép tạo được callus (thể sần), nhưng mầm ghép lại chỉ xanh mà không phát triển nên tỷ lệ cây bật mầm thấp (46,67%). Kết quả nghiên cứu của đề tài cũng chỉ ra, với tỷ lệ cây ghép sống và tỷ lệ bật mầm cao nhất chỉ đạt 50%.

