

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

Phạm Thị Thanh Thìn¹, Đặng Thu Hòa¹,
Trần Ngọc Hùng¹, Đỗ Đình Ca¹

TÓM TẮT

Để 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 gien 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 để 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 GA₃ + 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 VĂN 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 đinh 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 đinh sinh trưởng thì vật liệu ghép (đinh 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 ướm 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 té có tuổi 3- 4 tháng chín 2-3 mầm ngủ được khử trùng bằng dung dịch H₂O₂ 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 bắt 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, GA₃ 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 GA₃; CT4: bổ sung 1,0 ppm BAP + 0,3 ppm GA₃ + 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 đinh 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 α-NAA và IBA theo các công thức: CT1: Đối chứng (môi trường MT); CT2: ĐC + α-NAA 0,5% + IBA 0,5%; CT3: ĐC + α-NAA 0,5% + IBA 1,0%; CT4: ĐC + α-NAA 0,5% + IBA 1,5%; CT5: ĐC + α-NAA 1,0% + IBA 0,5%; CT6: ĐC + α-NAA 1,0% + IBA 1,0%; CT7: ĐC + α-NAA 1,0% + IBA 1,5%; CT8: ĐC + α-NAA 1,5% + IBA 0,5%; CT9: ĐC + α-NAA 1,5% + IBA 1,0%; CT10: ĐC + α-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.

Bảng 1. Ảnh hưởng của kích thước đinh sinh trưởng đến khả năng tái sinh cây

(sau 4 tuần nuôi cấy)

Công thức	Tổng số mẫu cấy	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

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 (P₂O₅): 0,8%, kali (K₂O): 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 (Häng 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.

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 đinh sinh trưởng có kích thước quá nhỏ bị khó khăn, tỷ lệ mẫu sống chỉ đạt 6,7% và chi 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 cây.

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	++
$LSD_{0,05}$					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 cây mô phân sinh thích hợp nhất là CT3: MT + 30 g/l sacaroza + 5 g/l aga + 1,0 ppm BAP + 0,3 ppm GA₃ + 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 cây là khá thích hợp, song một khó khăn trong nuôi cây 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, đinh sinh trưởng đã được tách lần thứ 2 để vi ghép trên gốc ghép gieo trong

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

Để đánh giá môi trường nuôi cây mô phân sinh thích hợp trên cơ sở sử dụng môi trường nuôi cây cơ bản là: MT + 30 g/l sacaroza + 5 g/l aga đã được lần lượt bổ sung BAP, GA₃ và nước dừa. Qua các nghiên cứu với các nồng độ của BAP và GA₃, đã tìm ra được nồng độ thích hợp nhất cho mô phân sinh phát triển là 1,0 ppm BAP và 0,3 ppm GA₃. 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.

Trong nghiên cứu, 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 sống và tỷ lệ bột mầm (bảng 3). Công thức 2 ghép trên cây 15 ngày tuổi có tỷ lệ cây bột mầm cao nhất (50%). Tỷ lệ bột mầm thấp nhất (30%) ở CT1 – 10 ngày tuổi, ở CT2 (20 ngày tuổi) tỷ lệ sống đạt 66,67%, nhưng tỷ lệ cây bột 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 vét cắt của gốc ghép tạo được callus (thả sần), nhưng mầm ghép lại chỉ xanh mà không phát triển nên tỷ lệ cây bột mầm thấp (46,67%). Kết quả nghiên cứu của đề tài cũng chỉ ra, với tỷ lệ cây ghép sống và tỷ lệ bột mầm cao nhất chỉ đạt 50%.

Bảng 3. Ảnh hưởng của tuổi cây gốc ghép tới kết quả vi ghép

Công thức	Số cây ghép	Số cây sống	Tỷ lệ cây sống (%)	Số cây bặt mầm	Tỷ lệ cây bặt mầm (%)
CT1 (10 ngày)	30	9	30,00	9	30,00
CT2 (15 ngày)	30	15	50,00	15	50,00
CT3 (20 ngày)	30	20	66,67	14	46,67

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

Bản thân gốc ghép là cây gieo hạt rất dễ ra rễ. Tuy nhiên, khi tiến hành ghép đã cắt bỏ một phần rễ, bên cạnh đó cây còn phải nuôi thêm phần mầm ghép mới, do vậy cần phải bổ sung thêm 1 hàm

lượng chất điều tiết sinh trưởng để đẩy nhanh quá trình ra rễ, giúp cây nhanh chóng lấy dinh dưỡng để nuôi mầm ghép. Thí nghiệm đã được tiến hành bằng việc bổ sung đồng thời α-NAA và IBA vào môi trường MT để tạo cây hoàn chỉnh.

Bảng 4. Ảnh hưởng của α-NAA và IBA đến chất lượng cây vi ghép (sau 4 tuần)

Công thức	Nồng độ α-NAA (ppm)	Nồng độ IBA (ppm)	Chiều dài rễ (cm)	ĐK rễ (mm)	Chiều cao chồi (cm)	ĐK chồi (mm)
1(DC)	0	0	5,15	1,93	0,81	1,55
2		0,5	5,17	1,66	0,87	1,56
3		0,5	5,33	1,70	1,11	1,55
4		1,0	5,31	1,63	1,39	1,61
5		1,0	6,25	1,65	1,15	1,76
6		1,0	6,13	1,83	1,43	1,91
7		1,0	6,45	1,67	1,45	1,37
8		0,5	6,55	1,36	1,23	1,43
9		1,5	6,31	1,53	1,15	1,36
10		1,5	6,66	1,41	1,13	1,31
LSD _{0.05} α-NAA			0,24	0,048	0,046	0,058
LSD _{0.05} IBA			0,24	0,048	0,046	0,058
LSD _{0.05} α-NAA * IBA			0,41	0,083	0,079	0,10
CV(%)			4,0	3,0	3,8	3,7

Khi bổ sung α-NAA và IBA rễ phát triển nhanh hơn so với đối chứng và việc bổ sung cả α-NAA và IBA ở nồng độ khác nhau thì khả năng phát triển của mầm ghép là khác nhau (bảng 4). Trong tất cả các công thức thí nghiệm, công thức bổ sung 1,0 ppm α-NAA và 1,0 ppm IBA (CT6) cả rễ và mầm ghép đều phát triển tốt hơn. Chiều dài rễ đạt 6,13 cm, đường kính rễ 1,83 mm, chiều cao chồi là 1,43 cm và đường kính chồi 1,91 mm. Điều này chứng tỏ môi trường MT + 1,0 ppm α-NAA + 1,0 ppm IBA + 3% sacaroza là môi trường thích hợp cho cây vi ghép phát triển.

3.3. Kết quả nghiên cứu tiêu chuẩn cây ra ngôi từ ống nghiệm, giá thể trồng cây ra ngôi và chế độ dinh dưỡng thích hợp

3.3.1 Ảnh hưởng của tiêu chuẩn cây ra ngôi đến tỷ lệ sống ngoài vườn ươm:

Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của tiêu chuẩn cây ra ngôi đến tỷ lệ sống được trình bày tại bảng 5 cho thấy: Sau khi ra ngôi cây bị chết dần và chỉ ổn định sau 20 ngày. Cây có số lá càng nhiều thì tỷ lệ sống càng cao. Sau 20 ngày ra ngôi cây có 8 lá có tỷ lệ sống cao nhất 58,7%, trong khi cây có 6 lá cho tỷ lệ sống đạt 50,6% và cây 4 lá chỉ đạt 28,4% sự sai khác thể hiện ở độ tin cậy 95%.

Bảng 5. Ảnh hưởng của tiêu chuẩn cây ra ngôi đến tỷ lệ sống ngoài vườn ươm

Công thức	Tỷ lệ sống sau ra ngôi (%)			
	Sau 5 ngày	Sau 10 ngày	Sau 15 ngày	Sau 20 ngày
CT1: Cây có 4 lá	51,6	31,6	28,4	28,4
CT2: Cây có 6 lá	77,8	57,5	50,6	50,6
CT3: Cây có 8 lá	82,5	62,8	58,7	58,7
$LSD_{0,05}$	6,78	4,94	4,48	4,48
$CV(%)$	4,8	4,9	4,9	4,9

3.3.2 Ảnh hưởng của giá thể ra ngôi và chế độ dinh dưỡng thích hợp đến tỷ lệ sống và sinh trưởng, phát triển của cây:

Thí nghiệm được tiến hành với 5 loại giá thể và kết hợp bồi sung dinh dưỡng Komic định kỳ 5 ngày, 10 ngày và 15 ngày/lần.

Bảng 6. Tỷ lệ sống và sinh trưởng của cây sau ra ngôi 1 tháng

Công thức	Bồi sung Komix 5 ngày/lần				Bồi sung Komix 10 ngày/lần				Bồi sung Komix 15 ngày/lần			
	Tỷ lệ sống (%)	Cao cây (cm)	Số lá/cây	ĐK thân (cm)	Tỷ lệ sống (%)	Cao cây (cm)	Số lá/cây	ĐK thân (cm)	Tỷ lệ sống (%)	Cao cây (cm)	Số lá/cây	ĐK thân (cm)
CT1	50,4	11,2	10	0,22	51,2	9,5	10	0,20	50,4	9,2	10	0,18
CT2	58,7	11,6	10	0,22	56,7	10,2	10	0,20	58,7	9,8	10	0,18
CT3	62,5	12,0	12	0,25	63,2	10,5	12	0,22	64,2	10,5	12	0,20
CT4	72,5	12,5	12	0,25	71,5	10,7	12	0,22	70,5	10,5	12	0,20
CT5	81,7	13,5	14	0,30	80,8	11,2	12	0,28	80,0	11,0	12	0,26
$LSD_{0,05}$	5,83	0,10	1,00	0,02	5,68	0,09	0,97	0,02	5,80	0,08	0,97	0,02
$CV(%)$	4,9	4,6	4,8	4,9	4,8	4,8	4,8	4,8	4,9	4,2	4,8	4,9

Kết quả nghiên cứu đã chỉ ra giá thể khác nhau có ảnh hưởng rõ đến tỷ lệ sống và sinh trưởng của cây (bảng 6). Một tháng sau trồng, các chỉ tiêu về tỷ lệ sống, chiều cao cây, đường kính thân và số lá trên cây ở CT5 đều cao hơn các công thức còn lại ở mức sai khác có ý nghĩa 0,05. Kết quả cũng chỉ ra, khi bồi sung dinh dưỡng Komix giảm, các chỉ tiêu về tỷ lệ sống, chiều cao cây, đường kính thân và số lá/cây cũng giảm dần, do vậy có thể kết

luận: Giá thể HC GT05 + trâu hun + than bùn (1/3:1/3:1/3) + PVS bồi sung dinh dưỡng Komix 5 ngày 1 lần là công thức tốt nhất cho ra ngôi cây vi ghép.

Các cây con ở vườn ươm 1 tháng, mầm ghép khỏe mạnh được tiến hành ghép lần 2 trên gốc chấp và được xét nghiệm bệnh Greening và Tristeza cùng với mẫu vi ghép của Viện Bảo vệ thực vật.

Bảng 7. Kết quả kiểm tra bệnh của cây vi ghép sau khi ghép lần 2

Mẫu kiểm tra	Kết quả		
	ELISA - CTV		PCR - Greening
	Mật độ quang (405nm)	Kết luận	
2 (1, 2, 3)*	0,103	-	-
3 (4, 5, 6)*	0,140	-	-
4 (7, 8, 9)*	0,163	-	-
5 (1, 2, 3)**	0,120	-	-
6 (4, 5, 6)**	0,097	-	-
Đối chứng âm	0,105	-	
Đối chứng dương	0,356	+	+

*: Mẫu vi ghép của nhóm tác giả

**: Mẫu vi ghép theo phương pháp của Viện Bảo vệ thực vật

Kết quả kiểm tra bệnh (bảng 7) cho thấy cả 15 cây của 2 phương pháp đều hoàn toàn sạch bệnh. Như vậy có thể thấy, so với phương pháp vi ghép cũ, phương pháp mới phải thêm 1 công đoạn song tỷ lệ cây sống sau vi ghép đạt rất cao, đạt gần 100%. Để có tỷ lệ cây ghép sống cao thì chất lượng cây gốc ghép có ảnh hưởng rất lớn. Cây gốc ghép non hoặc già đều không thích hợp. Nếu gieo hạt làm gốc ghép cùng 1 lúc đến khi ghép không kịp, gốc ghép bị già làm giảm tỷ lệ sống của cây ghép. Trong quá trình nuôi đinh sinh trưởng, chúng ta có thể bố trí được nhiều đợt gieo cây gốc ghép mà không lo cây gốc ghép bị già. Điều này khắc phục được khó khăn trong vấn đề chuẩn bị cây gốc ghép. Như vậy với phương pháp này chúng ta hoàn toàn chủ động cây gốc ghép.

4. KẾT LUẬN

Có thể sử dụng kỹ thuật nuôi cây mô phân sinh kết hợp với vi ghép để sản xuất cây Cam Bù sạch bệnh, nâng cao được tỷ lệ sống so với cách ghép thông thường do kích thước của đinh sinh trưởng tách từ nuôi cây mô phân sinh lớn hơn.

Để nuôi cây và vi ghép thành công, kích thước mô phân sinh thích hợp là 0,15 mm; môi trường nuôi cây thích hợp là MT + 1,0 ppm BAP + 0,3 ppm GA₃ + 10% nước dừa + 30 g/l sacaroza + 5 g/l agar. 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.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Jagoueix S. Bove J. M. and Garnier M. (1996). PCR detection of the two "Candidatus" liberobacter species associated with greening disease of citrus. Molecular and Cellular Probes 10: 43-50.
2. Navarro L. and J. Juarez, 1977. Elimination of citrus pathogen in propagative bud wood, II invitro propagation. Proc. Int. Soc.
3. Roistacher, C. N. and S. L. Kitto (1977). Elimination of additional citrus viruses by shoot tip grafting in vitro. Plant Dis.
4. Weathers, L. G. and E. C. Calavan (1959). Nucellar embryony as a means of freeing citrus clones of viruses In Wallace J. M. (ed). Citrus Virus Diseases, Univ Cal Div Agric Sci, Berkeley.

RESULTS IN APPLYING THE TECHNIQUE OF MERISTEM CULTURE AND MICRO – GRAFTING TO PRODUCE HEALTHY BU ORANGE TREES

Pham Thi Thanh Thin, Dang Thu Hoa,
Tran Ngoc Hung, Do Dinh Ca

Summary

Producing the healthy Bu trees is necessary for conservating and developing the precious genetic resources in Huong Son - Ha Tinh. The researches were conducted: (i) to identify the dimension and culture medium of meristem; (ii) identify the rootstock age and culture medium for micro grafting plants and (iii) researches on the standard of transplant, growth medium and fertilizer for healthy Bu orange trees by meristem culture and micro – grafting, from 2010 to 2011 at Department of Biotechnologies in Institute of Fruit and Vegetable. The results showed that the (i) the optimal dimension of meristems was 0.15 mm obtained the higher percentage of live and healthy. The optimal culture medium was MT + 1.0 ppm BAP + 0.3 ppm GA₃ + 10% coconut milk + 30 g/l saccharose + 5 g/l agar. (ii) the appropriate age of rootstocks for micro grafting was 15 days with 10 – 12 cm in height; 1.5 – 2.0 mm in diameter; the optimal medium for growth of micro – grafting trees was MT + 1.0 ppm αNAA + 1.0 ppm IBA + 3% saccharose. (iii) the micro grafting plants were transplanted at 8 leaves/plants obtained the highest percentage of live; The best culture medium for transplanting was organic GT 05 + burned husk + peat (1/3:1/3:1/3) + PVS; spraying fertilizer Komix with 5 days/time released the micro grafting plants with better growth (i.e. height plant, diameter, and number of leaves...) than those in other treatments.

Từ khóa: Bu orange, healthy plants, meristem, micro grafting.

Người phản biện: TS. Hà Việt Cường

Ngày nhận bài: 5/12/2014

Ngày thông qua phản biện: 7/1/2015

Ngày duyệt đăng: 14/1/2015