

ỨNG DỤNG HỆ THỐNG NUÔI CÂY NGẬP CHÌM TẠM THỜI (PLANTIMA®) TRONG VI NHÂN GIỐNG MÍA Ở VIỆT NAM

Cao Anh Dương, Trần Đông Hạ, Đỗ Đức Hạnh

SUMMARY

Application of a temporary immersion system (Plantima®) for micropropagation of sugarcane in Vietnam

In micropropagation, the numbering and quality of the seedlings are highly affected by the shoot multiplication. These experiments we used a temporary immersion system (Plantima®) for shoot multiplication of sugarcane (variety Suphanburi7). The multiplication rate on Suphanburi7 was doubled in comparison with the conventional micro propagation protocol (solid medium). The Basic medium Mutative and Stooage (MS) supplemented with 0.6 mg/l BA, 150 ml/l krypton and 30 g/l sucrose showed the best result for multiplication of the sugarcane shoot. After 20 days culturing we collected the highest number of shoots at the good quality.

Keywords: Sugarcane, *Saccharum* spp., micropropagation, medium, tissue culture, multiplication, temporary immersion system (TIS), Plantima®

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trên thế giới, mía là một trong những cây trồng có giá trị kinh tế cao đang được chú trọng đầu tư phát triển. Điều kiện khí hậu của nước ta rất thích hợp cho việc trồng mía. Tuy nhiên, với phương pháp nhân giống bằng hom phổ biến hiện nay sẽ không thể sản xuất và cung cấp đủ số lượng lớn giống, với chất lượng đảm bảo trong thời gian ngắn cho nhu cầu cấp thiết của sản xuất.

Cùng với sự phát triển của công nghệ sinh học, công nghệ vi nhân giống đã được ứng dụng thành công trên nhiều cây trồng, trong đó có cây mía. Công nghệ vi nhân giống mía phổ biến hiện nay là nhân giống cây mô trên môi trường thạch. Phương pháp này đã giải quyết được một phần nhu cầu về việc nhân nhanh các giống mía mới. Tuy nhiên, phương pháp này có nhược điểm là chi phí giá thành cây giống cao do thời gian nuôi cây dài, sử dụng nhiều nhân công, độ đồng đều cây giống thấp, khó áp dụng sản xuất theo qui mô công nghiệp lớn.

Hiện nay, ở nhiều nước có ngành công nghệ sinh học phát triển như Braxin, Úc, Cuba,... người ta đã ứng dụng thành công hệ

thống và công nghệ nuôi cấy ngập chìm tạm thời (*Temporary Immersion System* - TIS) trong vi nhân giống mía trên quy mô công nghiệp. Ở nước ta, công nghệ này mới chỉ được ứng dụng ở một số viện, trường, trung tâm nghiên cứu trong vi nhân giống một số loại như dược liệu, hoa, cây cảnh quý,...

Để từng bước áp dụng công nghệ mới này trong nhân nhanh và sản xuất cây giống mía nuôi cấy mô ở nước ta, đẩy nhanh tiến độ sản xuất cây giống cây mô theo quy mô công nghiệp, góp phần khắc phục sự thiếu hụt cây giống cây mô chất lượng cao trong sản xuất hiện nay, chúng tôi đã tiến hành một số thí nghiệm về vi nhân chồi mía giống *Suphanburi7* bằng hệ thống nuôi cấy ngập chìm tạm thời Plantima®, có so sánh với phương pháp nhân chồi truyền thống trên môi trường thạch và thu được một số kết quả bước đầu.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Vật liệu nghiên cứu

1.1. Mẫu cây và giống thí nghiệm

- Mẫu cây thí nghiệm là chồi mía giống *Suphanburi7* khoảng 8 tuần tuổi, được Tổ

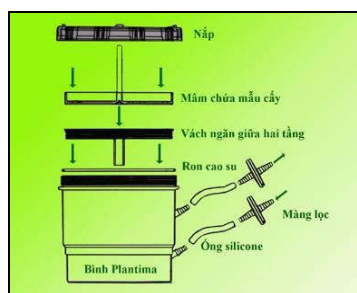
Nuôi Cây Mô và Phân Tích, Phòng Sản xuất Dịch vụ, Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Mía Đường nuôi cấy bằng đỉnh sinh trưởng

- Giống thí nghiệm: Là giống mía *Suphanburi7*, có nguồn gốc Thái Lan, nhập

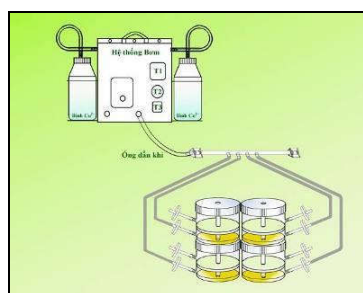
nội vào Việt Nam năm 2005, đã được công nhận cho sản xuất thử tháng 2/2011.

1.2. Hệ thống nuôi cấy

Hệ thống Plantima[®] được sản xuất và cung cấp bởi Công ty A-tech Bioscientific tại Đài Loan.



Các thành phần của 1 hộp bioreactor



Hệ thống điều khiển chu kỳ ngập

Hình 1. Hệ thống Plantima[®] - Bioreactor

1.3. Môi trường nuôi cấy

Các thí nghiệm sử dụng môi trường MS (Murashige và Skooge, 1962) bổ sung thêm một số thành phần sau: Chất điều hòa sinh trưởng: BA (*6-Benzyl-aminopurine*), trypton (nước dừa), đường, và agar nếu sử dụng môi trường thạch.

1.4. Điều kiện thí nghiệm

Nhiệt độ phòng nuôi mô và cây in vitro là $25 \pm 2^\circ\text{C}$, sử dụng đèn huỳnh quang, ánh sáng trắng, cường độ sáng từ 1.800 - 2.000 lux. Thời gian chiếu sáng 10 giờ/ngày, ẩm độ không khí phòng thí nghiệm duy trì từ 30 - 40%.

1.5. Địa điểm và thời gian nghiên cứu

- Địa điểm: Các thí nghiệm được tiến hành tại Phòng Nuôi cấy mô của Tổ Nuôi

Cây Mô và Phân Tích, Phòng Sản Xuất Dịch Vụ, Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Mía Đường.

- Thời gian: Từ tháng 11/2010 - 5/2011.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Bố trí thí nghiệm

2.1.1. Nghiên cứu ảnh hưởng của BA đến khả năng nhân chồi giống mía *Suphanburi 7* trong hệ thống Plantima[®]

Các thí nghiệm bố trí theo kiểu khối đầy đủ ngẫu nhiên, gồm 5 nghiệm thức môi trường, mỗi nghiệm thức 3 lần lặp lại, mỗi lần lặp lại tương ứng với 1 hộp bioractor. Thành phần của các nghiệm thức môi trường như sau:

Bảng 1. Ký hiệu và thành phần các môi trường nuôi cấy

Kí hiệu môi trường	Thành phần môi trường (được tính để pha cho 1 lít môi trường)
S1	MS + 0,0 (mg/lít) BA + 30(g/ lít) sucrose, 150 ml/ lít nước dừa
S2	MS + 0,1 (mg/ lít) BA + 30(g/ lít) sucrose, 150 ml/ lít nước dừa
S3	MS + 0,3 (mg/l) BA + 30(g/l) sucrose, 150 ml/ lít nước dừa
S4	MS + 0,6 (mg/l) BA + 30(g/l) sucrose, 150 ml/ lít nước dừa
S5	MS + 0,9 (mg/l) BA + 30(g/l) sucrose, 150 ml/ lít nước dừa

Thể tích môi trường lỏng trong mỗi hộp bioreactor là 250ml, pH 5,8, thời gian bơm 3 phút, ngập chìm 3 phút và thời gian nghỉ 3 giờ.

Hấp khử trùng ở nhiệt độ 121°C, hấp 20 phút đối với môi trường nuôi và 30 phút đối với dụng cụ. Sử dụng van lọc khuẩn 0,45 μ m.

Đỉnh sinh trưởng mía được nuôi cấy trong môi trường MS có bổ sung đầy đủ chất điều hòa sinh trưởng, trypton, đường và agar, với liều lượng được nghiên cứu tại Trung tâm Nghiên Cứu và Phát triển Mía Đường, sau 8 tuần sẽ hình thành cụm chồi. Cụm chồi được làm sạch và cắt ngắn bớt lá để cấy vào hộp bioreactor.

Số lượng mẫu trong mỗi hộp là: 6 cụm chồi và 6 chồi/cụm.

Thời gian theo dõi là 20 ngày.

2.1.2. So sánh hiệu quả nhân chồi bằng hệ thống Plantima® và phương pháp truyền thống trên môi trường thạch

Dựa trên kết quả của thí nghiệm trên ta lấy nghiệm thức có số chồi đạt được chất lượng lẫn số lượng để đem so sánh với phương pháp nhân truyền thống trên môi trường thạch với công thức môi trường đã được nghiên cứu và áp dụng ở Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Mía Đường là: MS + 1,5 mg/lít BA + 150 ml /lít nước dừa + 30 g/lít sucrose + 7 g/ lít Agar, pH 5,8.

Thể tích trong mỗi bình thạch là 60 ml, được hấp ở nhiệt độ 121°C trong 20 phút.

Chồi mía nuôi cấy từ đỉnh sinh trưởng khoảng 8 tuần tuổi được làm sạch, cắt ngắn bớt lá đem cấy vào bình thạch, khoảng 6 cụm/bình và 6 chồi/cụm.

Thời gian theo dõi là 20 ngày.

2.2. Các chỉ tiêu theo dõi

- Số chồi hình thành sau 20 ngày.
- Đặc tính của chồi sau 20 ngày.

2.3. Phân tích thống kê

Các kết quả thí nghiệm xử lý thống kê theo phương pháp phân tính phương sai theo Anova. So sánh kết quả theo phương pháp Duncan.

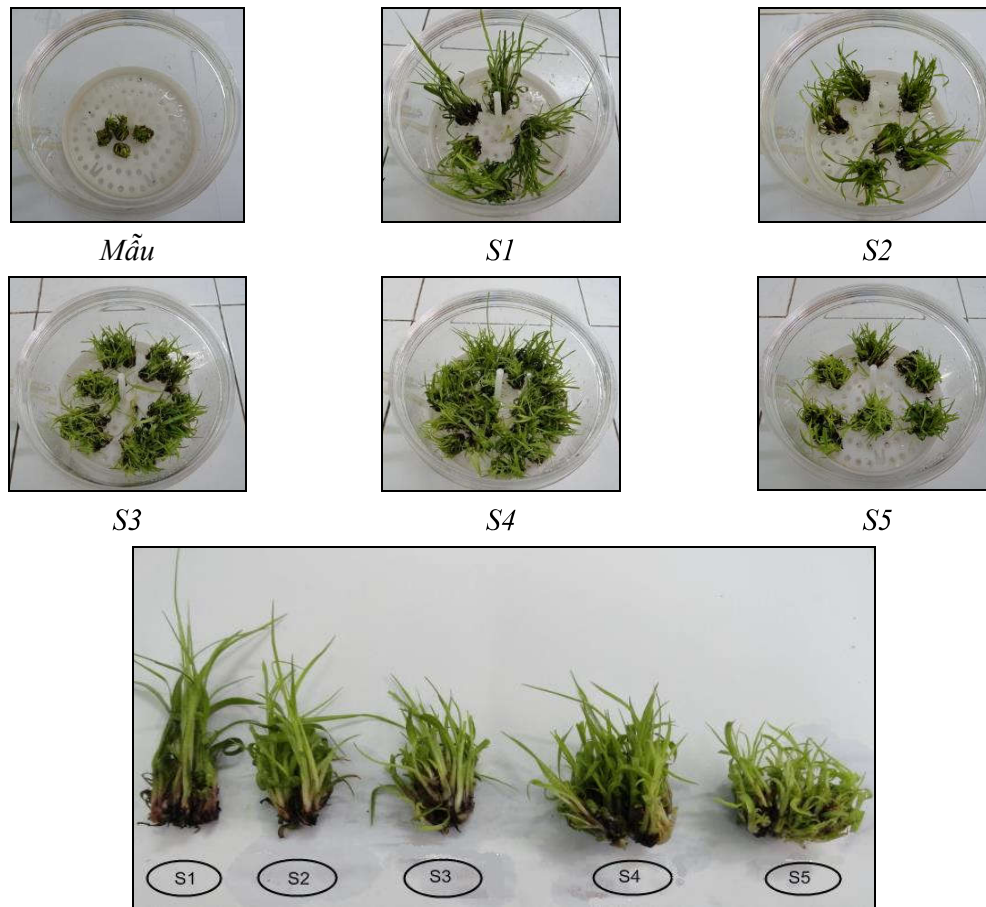
III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Nghiên cứu ảnh hưởng của BA đến khả năng nhân chồi giống mía Suphanburi7 trong hệ thống Plantima®

Chồi là giai đoạn quan trọng trong vi nhân giống, chồi có ảnh hưởng trực tiếp đến chất lượng cũng như năng suất của cây giống. Số lượng chồi nhiều hay ít phụ thuộc vào môi trường nuôi cấy. Thí nghiệm được thực hiện với 5 công thức môi trường trên các chồi mía giống *Suphanburi7* khoảng 8 tuần tuổi. Sau 20 ngày nuôi cấy kết quả thu được ở Bảng 2.

Bảng 2. Số chồi mía giống *Suphanburi7* sau 20 ngày nuôi cấy

Ký hiệu môi trường	Số chồi hình thành	Đặc tính của chồi
S1	38,00 ^e	Chồi cao, to, khô, xanh đậm
S2	62,67 ^d	Chồi to, khỏe, xanh nhiều
S3	111,00 ^c	Chồi to, khỏe, xanh nhiều
S4	182,67 ^a	Chồi to khỏe, xanh, đồng đều
S5	123,00 ^b	Chồi nhỏ, xanh nhạt, không đều
CV (%)	1,54	
LSD _{0,05}	3,007	



Hình 2. Số chồi hình thành sau 20 ngày nuôi cấy

Đối với môi trường S1 không có bổ sung chất điều hòa sinh trưởng thì chồi không sinh sản mà chỉ phát triển về chiều cao, lá to có màu xanh đậm. Môi trường S5 có nồng độ BA cao, số lượng chồi sinh sản nhiều nhưng chồi nhỏ, thậm chí có nhiều chồi rất nhỏ và không được đồng đều (Bảng 2 và Hình 2).

Như vậy, nếu xét về chất lượng và số lượng thì S4 phát sinh chồi nhiều, chất lượng chồi to và khỏe.

2. So sánh hiệu quả nhân chồi bằng hệ thống Plantima® và phương pháp truyền thống trên môi trường thạch

Sau 8 tuần nuôi cấy, ở thí nghiệm 1 môi trường cho hiệu quả chồi cao nhất là S4, đem so sánh với phương pháp nhân chồi trên môi trường thạch, chúng tôi thu được kết quả ở Bảng 3 và Hình 3.

Bảng 3. So sánh hệ số nhân chồi bằng hệ thống Plantima® và môi trường thạch

Hệ thống	Hệ số nhân chồi	Đạt điểm của chồi
Môi trường thạch	2,7	Chồi vừa, đẹp, xanh nhiều
Bioreactor-Plantima®	5,0	Chồi khỏe, to, đẹp, xanh vừa



Bioreactor-Plantima®



Môi trường thạch

Hình 3. So sánh hệ số nhân chồi bằng hệ thống Plantima® và môi trường thạch

Kết quả từ Bảng 3 và Hình 3 đã cho chúng ta thấy rằng sự sinh trưởng và hệ số nhân nhanh chồi của mía được nuôi cấy trong hệ thống ngập tạm thời luôn cao hơn so với những chồi mía được nuôi cấy trong hệ thống thông thường trên môi trường rắn. Có thể nói hệ thống nuôi cấy ngập tạm thời đã kết hợp thành công những ưu điểm của hệ thống nuôi cấy rắn thoáng khí và hệ thống nuôi cấy lỏng giúp cây tránh được những hiện tượng bất lợi do sự thiếu thông thoáng của môi trường lỏng ngập liên tục hay trong hệ thống kín trên môi trường rắn, giúp gia tăng sự hấp thu chất dinh dưỡng.

Ngoài ra, chu kỳ và tần số ngập là những chỉ số chủ yếu ảnh hưởng đến sự phát triển của mẫu cây cũng như toàn bộ quy trình nhân giống. Khi những chỉ số này được tối ưu hóa, sản lượng sẽ được gia tăng, quá trình kiểm soát sự phát sinh hình thái tốt hơn và còn có khả năng hạn chế tối đa hiện tượng thủy tinh thể. Đây là ưu điểm lớn nhất của hệ thống này so với phương pháp nuôi cấy mô truyền thống trên môi trường thạch. Cho nên chúng ta sẽ tiến hành nghiên cứu để áp dụng hệ thống nuôi cấy ngập chìm tạm thời trên nhiều giống mía khác nhau nhằm đáp ứng nhu cầu cấp thiết cho sản xuất hiện nay.

IV. KẾT LUẬN

Việc áp dụng hệ thống nuôi cấy bằng hệ thống ngập chìm tạm thời Plantima® trên chồi mía *Suphanburi7* đã mang lại hiệu quả cao hơn hẳn so với phương pháp nuôi cấy mô truyền thống trên môi trường thạch. Môi trường thích hợp để nhân chồi mía *Suphanburi7* trong hệ thống Plantima® là

S4: MS + 0,6 (mg/l) BA + 30 (g/l) sucrose, 150ml/ lít nước dừa. Môi trường này tạo nhiều chồi và chất lượng chồi tốt.

Trên cơ sở kết quả ứng dụng hệ thống nuôi cấy bằng hệ thống ngập chìm tạm thời Plantima® cho giống mía *Suphanburi7* trên đây, chúng ta có đủ cơ sở để ứng dụng phương pháp này cho các giống mía khác trong thời gian tới.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Dương Công Kiên (2003). *Nuôi cấy mô thực vật*. NXB. Đại Học Quốc Gia. Tp. Hồ Chí Minh.
2. Dương Tấn Nhựt (2007). *Công nghệ sinh học thực vật - Tập 1*, NXB. Nông Nghiệp.
3. Lorenzo J.C., González B.L., Escalona M., Teisson C., Borroto C. (1998). *Sugarcane shoot formation in an improved temporary immersion system*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, pp. 197-200.
4. Mordocco A.M., Brumbley J.A., Lakshmanan P. (2009). *Development of a temporary immersion system (RITA®) for mass production of sugarcane (Saccharum spp. interspecific hybrids)*. In vitro cellular & developmental biology - Plant, vol. 5, pp. 450-457.
6. Murashige T., Skooge F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15(3), pp. 473-497.

Người phản biện:

PGS. TS. Nguyễn Văn Tuất

ẢNH HƯỞNG CỦA CHẾ PHẨM VI SINH VẬT KẾT HỢP CÂY CHE PHỦ ĐẤT TRONG CẢI TẠO ĐẤT BẠC MÀU TẠI PHÚ THỌ

Nguyễn Quang Tin, Lê Quốc Doanh,
Nguyễn Thị Biển, Nguyễn Thu Hà

SUMMARY

The effects of microbial products combined with cover crops in improving soils in Phu Tho

Vietnam have ¼ hills area in which soil eroded area accounts for 17% of the country's natural and 25% hilly land, including 1.5% of the area has lost nearly production capacity. To address the need to provide protection and nutrients for soil enrichment as well as management measures proper nutrition. Improving soils with additional methods applied microbial products combined with cover crops in the barren hills in Phu Tho initial results have been obtained: Plant cover Growth well, which uses Guinea grass cover crops and fertilizer micro-organisms added 20 kg/ha for good performance. Green biomass of cover crops collected 33.97 tons/ha/year, equivalent to 10.75 tons of dry matter and only after six months has grown 100% ground cover. Soil moisture if left uncultivated natural annual average is 9.82%, while the soil is added fertilizer combined cover crops reached 11.42% soil moisture and soil nutrient composition was first the improvement.

Keywords: soils, microorganisms, soil improvement, soil fertility, nutrient

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Đất bạc màu là một trong những loại đất có vấn đề ở nước ta, đất có nhiều yếu tố hạn chế như quá trình nghèo chất dinh dưỡng, dung tích hấp thu và tỷ lệ sét thấp; đất thường xuyên bị tác động bởi rửa trôi, xói mòn gây bạc màu. Cùng với nhược điểm về tính chất vật lý nên đã gây không ít khó khăn cho sản xuất nông nghiệp. Theo Lê Thái Bạt, trong tổng số 14,2 triệu ha đất chưa sử dụng thì đất đồi núi có tới 10,4 triệu ha chiếm 73 % tổng diện tích. Việc tìm ra các giải pháp nhằm cải tạo đất bạc màu nói chung và đất trồng đồi trọc nói riêng là rất cần thiết. Vì vậy nghiên cứu đánh giá “*Ảnh hưởng của chế phẩm vi sinh vật kết hợp cây che phủ đất trong cải tạo đất trồng đồi trọc tại Phú Thọ*” nhằm góp phần giải quyết những khó khăn, bất cập nêu trên là cần thiết.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Vật liệu nghiên cứu

- Giống cây che phủ: Cỏ Ghine (*Panicum maximum*), muồng hoa vàng

(*Crotalaria pallida*), đậu đen (*Vigna unguiculata*)

- Chế phẩm vi sinh vật: Chế phẩm vi sinh vật 1 bón cho cỏ Ghine và muồng hoa vàng, chế phẩm vi sinh vật 2 bón cho đậu đen

2. Phương pháp nghiên cứu

- *Bố trí thí nghiệm:* thí nghiệm được thực hiện tại xã Phú Hộ, thị xã Phú Thọ, tỉnh Phú Thọ; Bố trí theo khối ngẫu nhiên đầy đủ, nhắc lại 3 lần.

- Tổng diện tích thí nghiệm: 10 công thức \times 3 lần nhắc \times 125m²/ô = 3.750 m²

- Công thức thí nghiệm:

C (đối chứng): Đất bạc màu, bỏ hoá tự nhiên

T1: Trồng cỏ Ghine

T2: Trồng cỏ Ghine + 20 kg chế phẩm VSV1/ ha

T3: Trồng cỏ Ghine + 5 kg chế phẩm VSV1/ ha

T4: Trồng muồng hoa vàng

T5: Trồng muồng hoa vàng + 20 kg chế phẩm VSV1/ ha