

NGHIÊN CỨU XÂY DỰNG QUY TRÌNH NHÂN GIỐNG ĐỊA LAN BẰNG KỸ THUẬT NUÔI CẤY MÔ

1. Đặt vấn đề

Hoa lan (địa lan và phong lan) có giá trị kinh tế và thẩm mỹ cao, nhu cầu tiêu thụ lớn, sản xuất hoa lan mang lại lợi nhuận cao vì vậy chúng ta cần thiết phải chọn lọc và du nhập các giống hoa mới đồng thời xây dựng được các phương pháp nhân giống hữu hiệu nhằm đáp ứng nhu cầu tiêu thụ đa dạng.

Để có được cây giống với số lượng lớn, chất lượng cây giống đảm bảo Biện pháp nhân giống truyền thống cho hệ số nhân thấp, thời gian đòi hỏi kéo dài, dễ bị thoái hoá... Chính vì vậy phương pháp nhân giống in vitro với hệ số nhân cao, cây giống đồng đều, chất lượng cao được lựa chọn.

Quy trình nhân giống và sản xuất địa lan đã được một số cơ quan và doanh nghiệp trong nước nghiên cứu và đã triển khai ngoài sản xuất. Tuy nhiên, các công trình nghiên cứu này đều tập trung tại một số địa phương phía Nam như: Đà Lạt, TP HCM,... Bên cạnh đó, việc nghiên cứu để tìm ra quy trình nhân giống in vitro cho các loài lan quý nhằm tạo nguồn cây giống chất lượng cao cho sản xuất còn chưa được giải quyết. Chính vì vậy, trong khuôn khổ của đề tài khoa học công nghệ cấp Nhà nước KC04.08, đề tài nhánh chúng tôi được giao nhiệm vụ:

“Nghiên cứu xây dựng quy trình nhân giống địa lan bằng kỹ thuật nuôi cấy mô”

2. Mục đích và yêu cầu của đề tài

2.1. Mục đích của đề tài

Nghiên cứu xây dựng được quy trình nhân nhanh in vitro và công đoạn sau in vitro cho một số giống địa lan với công suất 1 vạn cây/năm.

2.2. Yêu cầu của đề tài:

2.2.1. Thu thập mẫu và lưu giữ nguồn gen

2.2.2. Giai đoạn nhân in vitro

Nghiên cứu chế độ khử trùng mẫu cấy, tạo nguồn vật liệu khởi đầu, quá trình nhân nhanh và tạo cây hoàn chỉnh.

2.2.3. Giai đoạn sau in vitro

2.2.3.1. Giai đoạn vườn ươm cấp I

Nghiên cứu ảnh hưởng khối lượng cây trước khi ra vườn ươm giá thể,, dinh dưỡng cho cây, thời vụ ra cây...

2.2.3.2. Giai đoạn vườn ươm cấp II

Nghiên cứu ảnh hưởng giá thể, dinh dưỡng đến sự sinh trưởng phát triển của cây

3. Vật liệu, nội dung và phương pháp nghiên cứu

3.1. Vật liệu

- Giống địa lan Trung quốc đỏ (Miss Kim) là vật liệu chính sử dụng trong toàn bộ thí nghiệm.
- Các giống: Xanh Chiểu; Hồng Bệt (Đà Lạt); Trung Quốc Xanh; Trung Quốc Vàng; C. Miss korre; C. Da fan và một số giống bản địa Phường hoàng thơm và Mạc nâu lá lớn là nguồn vật liệu dùng trong các thí nghiệm sản xuất thử. Các giống này có giá trị thương mại, đang có nhu cầu lớn trên thị trường.

3.2. Nội dung nghiên cứu

3.2.1. Điều tra, thu thập và lưu giữ nguồn gen

3.2.2. Nghiên cứu tạo nguồn vật liệu khởi đầu cho nhân nhanh in vitro

- Nghiên cứu ảnh hưởng của thời gian và phương pháp khử trùng mẫu.
- Nghiên cứu ảnh hưởng chất điều tiết sinh trưởng tới quá trình phát sinh hình thái của mẫu cấy.

3.2.3. Nghiên cứu nhân nhanh nguồn mẫu

- Nghiên cứu ảnh hưởng của chất điều tiết sinh trưởng đến khả năng nhân nhanh.
- Nghiên cứu ảnh hưởng của phương thức nuôi cấy (đặc, lỏng, lỏng + lắ) đến khả năng nhân nhanh.
- Ứng dụng phương pháp nuôi cấy lát mỏng tế bào trong nhân nhanh.

3.2.4. Nghiên cứu tạo cây hoàn chỉnh

- Nghiên cứu ảnh hưởng của α NAA đến tạo cây hoàn chỉnh.

- Nghiên cứu ảnh hưởng của than hoạt tính đến tạo cây hoàn chỉnh.

3.2.5. Các nghiên cứu giai đoạn sau nuôi cấy mô

- Nghiên cứu xác định tiêu chuẩn cây nuôi cấy mô khi đưa ra vườn ươm.
- Nghiên cứu ảnh hưởng của thời vụ và giá thể ra cây.
- Nghiên cứu chế độ dinh dưỡng đến sinh trưởng, phát triển của cây con (giai đoạn vườn ươm).

3.3. Phương pháp nghiên cứu

- Các thí nghiệm được tiến hành tại phòng thí nghiệm nuôi cấy mô và vườn thực nghiệm của phòng CNSH - Viện sinh học Nông nghiệp - Trường Đại học Nông nghiệp I - Hà nội và Sapa- Lào Cai.
- Phương pháp khử trùng: Mẫu cấy (chồi đỉnh, mắt ngủ trên các chồi non) được tách ra từ các cây mẹ khoẻ mạnh, sạch bệnh được rửa sạch và khử trùng đơn (1 lần) hay kép (2 lần) bằng HgCl_2 0,1% ở các nồng độ và thời gian xử lý khác nhau.
- Phương pháp nuôi cấy: các thí nghiệm nuôi cấy in vitro được thực hiện trong điều kiện nhân tạo cho phép chủ động các chế độ ánh sáng, nhiệt độ, ẩm độ.
 - + Cường độ ánh sáng: 2400 - 3000 lux
 - + Nhiệt độ phòng nuôi : 20 - 25°C.
 - + Quang chu kỳ: 16 giờ sáng/ 8 giờ tối
- Bố trí thí nghiệm:
 - + Các thí nghiệm được bố trí ngẫu nhiên, 3 lần lặp lại, mỗi công thức theo dõi 15 - 50 cá thể.
 - + Thí nghiệm được quan sát, theo dõi thường xuyên 10 - 15 ngày/lần đo đếm các chỉ tiêu sinh trưởng và phát triển của công thức thí nghiệm.
 - + Số liệu được xử lý thống kê sinh học theo chương trình IRRISTAT.

4. Kết quả và thảo luận

4.1. Điều tra thu thập, xác định đối tượng thí nghiệm

Trong quá trình thực hiện, chúng tôi đã tiến hành điều tra tại một số tỉnh có trồng và phát triển địa lan như Hà Nội; Bắc Ninh và Hưng Yên, kết quả ở bảng 1.

Bảng 1: Một số giống địa lan trồng phổ biến tại các nơi điều tra

STT	Tên Việt Nam	Tên Khoa học
1	Thanh Ngọc	Cymbidium. spp
2	Hồng Hoàng	C. Grandyflorum Griff
3	Mạc Biên	C. Ensifolium (L) Sw
4	Mạc Đen	C. Sinense
5	Bạch Ngọc	C. Eburneum Lindl
6	Trần Mộng	Cymbidium. spp
7	Đông Lan	Cymbidium. spp
8	Hoàng Vũ	Cymbidium. spp
9	Hoàng Điểm	Cymbidium. spp
10	Thanh Trường	C. Schoederi
11	Tổ Tâm	Cymbidium. spp
12	Quý Phi	Cymbidium. spp
13	Ngọc Anh, Ngọc Trâm	Cymbidium. spp
14	Đào Hồng Cơ	Cymbidium. spp
15	Hoàng Cẩm Tố	Cymbidium. spp

Sau khi điều tra, chúng tôi đã xác định được một số giống quý có khả năng thương mại cao và đã tiến hành thu thập và lưu giữ nguồn mẫu tại vườn thực nghiệm của Trường (bảng 2).

Bảng 2: Các giống đã thu thập tại vườn

Stt	Tên Việt Nam	Đặc điểm hình thái, màu sắc, hương vị của hoa					
		Chiều dài hoa (cm)	Số hoa/cành	Thời gian từ nở - tàn (ngày)	Màu sắc	Hương thơm	Thời gian ra hoa
1	Bạch Ngọc	25	5	35	Trắng	Thơm	9 - 10
2	Hoàng Điểm	45 - 46	11	30	Vàng hòng điểm	Thơm	1 - 2
3	Thanh Trường	45 - 46	11	30	Xanh hòng vàng	Thơm	1 - 2
4	Đào Hồng Cơ	35	12	45	Hồng	Thơm	11 - 12
5	Hoàng Cẩm Tố	120	25	45	Xanh vàng	Thơm	12 - 13

Bảng 3: Các giống đã được nuôi cấy và lưu giữ in vitro

STT	Tên thương mại	Tên Khoa học
1	Mạc nâu lá lớn	C. spp
2	Phượng hoàng thơm	C. spp
3	Xanh Chiểu	C. spp
4	Hồng Bệt	C. spp
7	Miss kim	C. spp
8	Organdi Moon Light	C. spp
9	Lancelost Misono	C. spp
10	Miss korre	C. spp
11	Da fan	C. spp

4.2. Giai đoạn tạo nguồn vật liệu khởi đầu

Đây là giai đoạn hết sức quan trọng cho quá trình nhân giống in vitro vì chỉ khi có được nguồn mẫu sạch thì mới có thể tiến hành tiếp các giai đoạn sau.

Để tạo nguồn vật liệu khởi đầu cho quá trình nuôi cấy in vitro, chúng tôi đã lấy các chồi bên có chiều cao từ 3 - 5cm làm nguồn mẫu để tiến hành thí nghiệm.

4.2.1. Nghiên cứu ảnh hưởng của thời gian và phương pháp khử trùng đến mẫu đưa vào nuôi cấy.

Bảng 4: Ảnh hưởng của thời gian và phương pháp khử trùng tới tỷ lệ nhiễm và tỷ lệ sống của mẫu

Chỉ tiêu theo dõi Công thức	Tỷ lệ nhiễm (%)	Tỷ lệ chết (%)	Tỷ lệ sống (%)
Khử trùng đơn: 3 phút	100	-	-
Khử trùng đơn: 5 phút	100	-	-
Khử trùng đơn: 7 phút	80	10	10
Khử trùng kép: 5 + 1	50	10	40
Khử trùng kép: 5 + 2	40	20	40
Khử trùng kép: 7 + 1	30	10	60
Khử trùng kép: 7 + 2	20	30	50

Từ kết quả bảng 4 cho thấy việc khử trùng mẫu trước khi đưa vào nuôi cấy nếu chỉ thực hiện 1 lần thì tỷ lệ nhiễm sẽ rất cao (80 - 100%). Với phương pháp khử trùng kép (khử trùng lần 1 rồi bóc lá bao khử trùng tiếp lần 2) thì tỷ lệ nhiễm mẫu chỉ còn (20% - 50%) và trong 4 công thức khử trùng kép ở thời gian khác nhau thì công thức 7 phút + 1 hoặc 2 phút tỏ ra có hiệu quả nhất vì

tuy tỷ lệ nhiễm là 20% - 30% nhưng tỷ lệ chết lại rất thấp (10 - 30 %) và kết quả sau khi khử trùng đạt được 50 - 60% số mẫu sạch sống sót (trong khi tất cả các công thức khác chỉ tiêu này đạt 0 - 40%).

4.2.2. Nghiên cứu ảnh hưởng của chất điều tiết sinh trưởng đến quá trình phát sinh hình thái mẫu

Qua thử nghiệm rất nhiều các chất điều tiết sinh trưởng ở trạng thái riêng rẽ cũng như tổ hợp của chúng với nhau, chúng tôi nhận thấy rằng chỉ trên môi trường có bổ xung riêng rẽ BA hoặc Kinetin (K) hoặc tổ hợp BA với Kinetin thì mẫu nuôi cấy mới có khả năng phát sinh hình thái theo 2 dạng: chồi hay tiền chồi protocorm. Kết quả thí nghiệm được thể hiện ở bảng 5 và bảng 6.

Bảng 5: Ảnh hưởng của BA đến quá trình phát sinh hình thái
(sau 10 tuần cấy)

Chỉ tiêu theo dõi Công thức	Hệ số nhân	Tỷ lệ tạo chồi (%)	Tỷ lệ tạo protocorm (%)
I (Đ/C):MS + 100ml ND + 10g đường + 1,5ppmBA + 6,5g agar	1,21	100,00	0,00
I + 0,5mg <u>B</u> enzin <u>A</u> denin	1,67	34,80	65,20
I + 1,0mg BA	2,40	31,24	68,76
I + 1,5mg BA	3,78	25,00	75,00
I + 2,0mg BA	3,64	22,25	77,75
I + 3,0mg BA	3,01	18,79	81,21
I + 5,0mg BA	2,98	9,80	90,20

Bảng 6: Ảnh hưởng của Kinetin đến quá trình phát sinh hình thái mẫu*(sau 10 tuần nuôi cấy)*

Chỉ tiêu theo dõi Công thức	Hệ số nhân	Tỷ lệ tạo chồi (%)	Tỷ lệ tạo protocorm (%)
I (Đ/C): MS + 100ml ND + 10g đường + 1,5ppm BA + 6,5g agar	1,21	100,00	0,00
I+ 0,5mg K _{inetin}	1,54	45,50	54,50
I+1,0mg K	1,70	42,10	57,90
I+1,5mg K	2,56	35,14	64,86
I+2mg K	2,98	33,20	66,80
I+3mg K	3,23	28,74	71,26
I+5mg K	3,01	25,00	75,00

Kết quả bảng 5 và 6 cho thấy việc bổ xung chất điều tiết sinh trưởng vào môi trường nuôi cấy có khả năng kích thích sự phát sinh hình thái của mẫu. Sự phát sinh hình thái của mẫu nuôi cấy theo hai hướng: tạo chồi và tạo thể protocorm, đặc biệt sự phát sinh hình thái theo hướng hình thành protocorm là nguồn nguyên liệu cho các quá trình nuôi cấy tiếp theo. Kết quả của thí nghiệm trên cho phép chúng tôi xác định được môi trường thích hợp nhất cho sự phát sinh hình thái của mẫu ban đầu là:

MS + 100ml ND + 10g đường + 1,5ppm BA + 6,5g agar

4.3. Giai đoạn nhân nhanh

Mục tiêu ở giai đoạn này là nghiên cứu nhằm tìm phương thức tốt nhất để có được nhiều thể protocorm nhất, trong thời gian ngắn nhất.

4.3.1. Nghiên cứu ảnh của chất điều tiết sinh trưởng đến khả năng nhân nhanh protocorm.

Qua rất nhiều thử nghiệm bổ sung các chất điều tiết sinh trưởng auxin và xytokinin vào môi trường nuôi cấy, chúng tôi nhận thấy để tăng hệ số nhân chỉ có BA và Kinetin có hiệu quả nhất. Tác động của chúng đến hệ số nhân được thể ở bảng 7 và 8.

Bảng 7: Ảnh hưởng của BA đến khả năng nhân nhanh (sau 4 tuần nuôi cấy).

Chỉ tiêu theo dõi Công thức	Hệ số nhân	Tỷ lệ chồi (%)	Tỷ lệ Protocorm (%)	Chất lượng mẫu
I (Đ/C)	1,38	4,33	95,67	+++
I+ 0,5ppm <u>B</u> enzin <u>A</u> denin	1,57	7,72	92,28	+++
I + 1ppm BA	1,71	18,68	81,32	+++
I + 1,5ppm BA	2,17	27,74	72,26	+++
I + 2ppm BA	1,91	13,70	86,30	++
I + 3ppm BA	1,78	11,28	88,72	++
LSD (5%)	0,09			

Bảng 8: Ảnh hưởng của Kinetin đến khả năng nhân nhanh (sau 4 tuần nuôi cấy)

Chỉ tiêu theo dõi Công thức	Hệ số nhân	Tỷ lệ chồi (%)	Tỷ lệ Protocorm (%)	Chất lượng mẫu
I (Đ/C)	1,42	3,33	96,67	+++
I + 0,5ppm <u>K</u> inetin	1,85	16,57	83,43	+++
I + 1ppm K	2,43	30,26	69,74	+++
I + 1,5ppm K	2,20	20,91	79,09	++
I + 2ppm K	1,95	12,10	87,90	++
I + 3ppm K	1,58	7,89	92,11	++
<i>LSD(5%)</i>	<i>0,13</i>			

Kết quả bảng 7 và 8 cho thấy việc bổ xung BA vào môi trường nuôi cấy đã làm tăng hệ số nhân so với đối chứng, hệ số nhân tăng (từ 1,38 – 2,17 lần) và tỷ lệ thuận với nồng độ của BA bổ xung vào môi trường từ nồng độ 0 – 1,5ppm nhưng khi tăng nồng độ (2ppm) thì hệ số nhân lại giảm. Cùng với sự tăng về hệ số nhân thì tỷ lệ mẫu hình thành chồi cũng như chất lượng chồi giảm.

Tiếp tục nghiên cứu ảnh hưởng của việc bổ xung kinetin đến hệ số nhân chồi và chất lượng chồi tạo ra. Các kết quả nhận được cũng có quy luật tương tự như khi bổ xung vào môi trường BA. Tuy nhiên, kinetin tỏ ra có hiệu quả cao hơn so với BA. Với nồng độ kinetin là 1ppm cho hệ số nhân đạt cao nhất (2,43) và tỷ lệ chồi và thể protocorm hình thành rất cân đối và có chất lượng cao nhất.

4.3.2. Nghiên cứu ảnh hưởng của nền môi trường và phương thức nuôi cấy đến nhân nhanh protocorm

Bảng 9: Ảnh hưởng của nền môi trường và phương thức nuôi cấy đến quá trình nhân nhanh (sau 8 tuần)

Môi trường	Công thức thí nghiệm	Tỷ lệ tạo protocorm (%)	Tỷ lệ tạo chồi (%)	Hệ số nhân (lần)
MS	CT1: MS +1% đường + 1ppmK + 0,65% agar	93,71	6,29	2,82
	CT2: MS +1% đường + 1ppmK (lỏng, lắc)	97,32	2,68	3,08
	CT3: MS +1% đường + 1ppmK (lỏng, không lắc)	95,76	4,34	2,37
Vaccin and Went	CT1: VW 1% đường + 1ppmK + 0,65% agar	95,42	4,58	3,44
	CT2: VW +1% đường + 1ppmK (lỏng, lắc)	91,32	9,68	3,67
	CT3: VW +1% đường + 1ppmK (lỏng, không lắc)	89,16	10,94	2,47
Hyponex	CT1: Hyponex 1% đường + 1ppmK + 0,65% agar	83,52	16,48	3,98
	CT2: Hyponex +1% đường + 1ppmK (lỏng, lắc)	86,23	13,77	5,42
	CT3: Hyponex +1% đường + 1ppmK (lỏng, không lắc)	86,00	14,00	3,60
	LSD 0,05			0,09

Qua kết quả nghiên cứu cho thấy: nền môi trường khác nhau ảnh hưởng rõ rệt đến nhân nhanh. Nhìn chung hệ số nhân đạt cao nhất trên môi trường hyponex (từ 3,6 – 5,42 lần) và thấp nhất là trên môi trường MS (từ 2,37 – 3,08 lần).

Trong cùng một nền môi trường thì phương thức nuôi cấy lỏng, lắc cho hệ số nhân cao hơn hẳn các phương thức nuôi cấy khác. Phương thức nuôi cấy lỏng, không lắc cho hiệu quả thấp nhất.

Như vậy nền môi trường thích hợp nhất cho nhân nhanh thể protocorm là hyponex và phương thức nuôi cấy thích hợp nhất là lỏng, lắc. Tuy nhiên, hyponex là loại môi trường phải nhập ngoại với giá cao vì vậy nên sử dụng môi trường có thể chủ động tại chỗ là Vacxin and Went hay môi trường MS kết hợp với phương thức nuôi cấy lỏng lắc.

4.3.3. Nghiên cứu ứng dụng phương pháp nuôi cấy lát mỏng tế bào trong quá trình nhân nhanh.

Phương pháp nuôi cấy lát mỏng tế bào là phương pháp rất hữu hiệu để nhân nhanh nguồn mẫu và đã được ứng dụng thành công trên một nhiều đối tượng như cây lúa miến (*Sorghum*); cây nhân sâm (*Panax ginseng*); cây cải bắp (*Brassica*), cây phong lan, dâu tây... Với mục đích để tăng nhanh số lượng protocorm, chúng tôi đã tiến hành các nghiên cứu nuôi cấy lát mỏng cắt từ thể protocorm ban đầu với độ dày từ 0,1mm – 1mm. Đồng thời, chúng tôi nghiên cứu ảnh hưởng của các chất điều tiết sinh trưởng; nước dừa và phương thức nuôi cấy đến khả năng nhân nhanh protocorm và chồi của lớp mỏng nuôi cấy. Kết quả thí nghiệm được thể hiện ở bảng 10; 11; 12 và 13.

Bảng 10: Ảnh hưởng của kích thước lát mỏng đến khả năng nhân nhanh protocorm (sau 8 tuần)

Môi trường	Kích thước lát cắt (mm)	Tỷ lệ sống (%)	Hệ số nhân số (protocorm/lát cắt)
MS +1% đường + 1ppmK + 0,65% agar	0,1	16,60	2,00
	0,3	63,65	3,00
	0,5	75,41	2,83
	0,7	87,45	2,50
	1,0	92,18	2,30

Qua bảng trên chúng tôi nhận thấy: kích thước của lát cắt có ảnh hưởng rõ rệt đến tỷ lệ sống và sự hình thành protocorm. Nếu độ dày của lát cắt tăng thì tỷ lệ sống tăng nhưng tỷ lệ tạo protocorm lại giảm và ngược lại. Ở kích thước từ 0,3 - 0,5mm kết quả đạt được là cao nhất với tỷ lệ sống là 63,65 – 75,41% và số protocorm/lát cắt là 3,00 – 2,83

4.3.4. Nghiên cứu ảnh hưởng của nước dừa đến khả năng tạo protocorm của lớp mỏng nuôi cấy.

Sau khi cắt protocorm thành các lát mỏng với độ dày từ 0,3 - 0,5 mm và cấy trên nền môi trường MS + 1% đường + 0,65% agar có bổ sung nước dừa với nồng độ khác nhau, chúng tôi đã thu được kết quả ở bảng 11.

Bảng 11: Ảnh hưởng của nước dừa đến khả năng tạo protocorm (sau 8 tuần theo dõi)

CTTD CT	Tỷ lệ sống (%)	Số protocorm TB/ mẫu cấy	protocorm TB/ lát cắt
ĐC: MS +1% +0,65% agar	58,91	6,80	1,98
CT1: ĐC + 5% nước dừa	70,63	9,62	2,27
CT2: ĐC + 10% ND	79,57	12,65	2,65
CT3: ĐC + 15% ND	77,82	13,40	2,87
CT5: ĐC + 20% ND	60,00	9,14	2,54
LSD (0,5%)			0,80

Kết quả bảng 11 cho thấy nước dừa đã có ảnh hưởng khá rõ tới số protocorm trung bình trên lát cắt. Trên tất cả các công thức có bổ sung thêm nước dừa đều có số protocorm/lát cắt lớn hơn so với công thức đối chứng. Đồng thời CT3 (ĐC + 15% ND) cho kết quả là cao nhất.

Như vậy, ta có thể bổ sung nước dừa ở nồng độ 15% vào môi trường tạo protocorm làm nguyên liệu cho nhân nhanh.

4.3.5. Nghiên cứu ảnh hưởng của chất điều tiết sinh trưởng đến khả năng tạo protocorm của lớp mỏng nuôi cấy.

Khi đã xác định được độ dày lát cắt, chúng tôi cũng đã tiến hành bổ sung hàng loạt các chất điều tiết sinh trưởng khác nhau ở trạng thái riêng rẽ cũng như dạng tổ hợp vào môi trường nuôi cấy nhằm tìm ra tổ hợp và nồng độ thích hợp nhất vừa đảm bảo kích thích lát mỏng hình thành nhiều thể protocorm vừa đảm bảo được chất lượng của nguồn mẫu. Nhưng kết quả khả quan nhất đạt được khi sử dụng riêng rẽ các xytokinin, điều này được trình bày ở bảng 12 và 13.

Bảng 12: Ảnh hưởng của kinetin đến khả năng nhân nhanh protocorm của lớp mỏng nuôi cấy (sau 8 tuần nuôi cấy)

Chỉ tiêu theo dõi Công thức	Tỷ lệ mẫu hình thành thể protocorm(%)	Tỷ lệ mẫu tạo chồi (%)	Hệ số nhân (số protocorm TB/lát mỏng)
I (Đ/C): MS + 15% ND + 10g saccarosa + 6,5g agar	60,50	39,50	2,60
I + 0,3mg K _{inetin}	67,27	32,73	4,07
I + 0,5mg K	78,26	21,74	4,60
I + 1mg K	80,98	19,02	6,23
I + 1,5mg K	86,19	13,81	4,25
I + 2mg K	83,35	16,65	4,09
I + 3mg K	85,25	14,75	3,81
LSD (5%)			0,07

Bảng 13: Ảnh hưởng của BA đến khả năng nhân nhanh protocorm của lớp mỏng nuôi cấy (sau 8 tuần nuôi cấy)

Chỉ tiêu theo dõi Công thức	Tỷ lệ mẫu hình thành thể protocorm(%)	Tỷ lệ mẫu tạo chồi (%)	Hệ số nhân (Số protocorm TB/lát mỏng)
I (Đ/C): MS + 15% ND + 10g saccarosa + 6,5g agar	57,44	42,54	2,85
I + 0,3mg BA	70,86	29,14	4,50
I + 0,5mg BA	81,42	18,58	5,70
I + 1mg BA	76,67	23,33	4,00
I + 1,5mg BA	85,00	25,00	3,50
I + 2mg BA	86,19	13,81	3,40
I + 3mg BA	70,00	30,00	2,80
LSD (5%)			0,18

Từ các kết quả bảng 12 và 13 cho thấy việc bổ xung chất điều tiết sinh trưởng vào môi trường nuôi cấy đều có khả năng kích thích sự phát sinh hình thái của lát mỏng rất rõ rệt, tỷ lệ mẫu tạo protocorm cao hơn đối chứng từ 7 – 20% (đối với kinetin) và từ 13 – 23% (đối với BA). Ở nồng độ BA bằng 0,5ppm hay kinetin bằng 1ppm có thể thu được 27 hay 30 thể protocorm từ một protocorm mẫu ban đầu sau 8 tuần nuôi cấy. Trong khi đó cũng từ một protocorm như trên nếu dùng phương pháp tách thông thường rồi đưa vào môi trường nhân nhanh thì sau 8 tuần chỉ thu được từ 10 - 12 thể protocorm (thấp hơn 3 lần). Vì vậy sau khi tạo được nguồn vật liệu khởi đầu từ chồi đỉnh hay các mắt ngủ trên chồi bên để tăng nhanh nguồn mẫu cho quá trình nhân tiếp theo thì việc sử dụng nuôi cấy lát mỏng tế bào là phương pháp tối ưu nhất. Môi trường thích hợp để nuôi cấy protocorm là: **MS + 15% ND + 10g saccarosa + 0,5ppm BA (hoặc 1ppm kinetin) + 6,5 g agar.**

4.3.6. Nghiên cứu khả năng tái sinh chồi từ protocorm

Sau khi đã tạo và nhân nhanh được protocorm thì công đoạn tiếp theo sẽ là tái sinh chồi từ protocorm.

Bảng 14. Ảnh hưởng của nước dừa đến sự tái sinh tạo chồi từ protocorm và sự sinh trưởng của chồi sau tái sinh (theo dõi sau 8 tuần).

Stt	Chỉ tiêu theo dõi Công thức	Chiều cao cây (cm)	Số lá/cây (lá/cây)
1.	MS + 2% sacaro + 6,8g agar (Đ/C).	7,61	3,87
2.	MS + 2% sacaro + 6,8g agar + 5% nước dừa.	7,72	3,93
3.	MS + 2% sacaro + 6,8g agar + 10% nước dừa.	7,8	3,95
4.	MS + 2% sacaro + 6,8g agar + 15% nước dừa.	8,15	4,13
5.	MS + 2% sacaro + 6,8g agar + 20% nước dừa.	8,23	4,07
6.	MS + 2% sacaro + 6,8g agar + 30% nước dừa.	7,78	4,0
CV (%)		0,24	0,33
LSD (5%)		0,21	0,29

Kết quả bảng trên cho thấy: bổ sung nước dừa đã có ảnh hưởng tích cực tới sự tái sinh chồi từ protocorm đồng thời kích thích sự sinh trưởng và phát triển của cây địa lan sau khi tái sinh. Tuy nhiên, bổ sung nước dừa ở nồng độ 15% cho kết quả tốt nhất và được thể hiện rõ qua hai chỉ tiêu chiều cao cây và số lá/cây. Trên môi trường này cho chiều cao cây đạt 8,15 cm/cây, số lá đạt 4,13 lá/cây.

4.4. Giai đoạn tạo cây hoàn chỉnh

Các chồi riêng rẽ có kích thước 5,5 – 6,5cm, mập khỏe được đưa vào nuôi cấy trên các môi trường có bổ sung thêm α NAA và than hoạt tính ở các nồng độ khác nhau với mục đích xác định môi trường thích hợp cho việc tạo cây hoàn chỉnh trong ống nghiệm. Kết quả nghiên cứu được trình bày ở bảng 15 và 16.

Bảng 15: Ảnh hưởng của α NAA đến sự hình thành rễ ở cây địa lan

Chỉ tiêu theo dõi Công thức	Tỷ lệ ra rễ (%)			Số rễ/cây	Chiều dài rễ (cm)	Chiều cao cây (cm)
	Sau 15 ngày	Sau 20 ngày	Sau 30 ngày			
I (Đ/C)	0	46,67	100	2,47	1,47	7,09
I + 0,1ppm α NAA	20	53,33	100	3,00	1,32	7,10
I + 0,3ppm α NAA	53,33	100,00	-	4,20	1,09	7,32
I + 0,5ppm α NAA	93,33	100,00	-	4,72	0,92	7,06
I + 1ppm α NAA	46,67	73,33	100	3,60	0,53	6,93
<i>LSD(5%)</i>				0,26	0,16	

Bảng 16: Ảnh hưởng của than hoạt tính đến sự hình thành rễ ở cây địa lan

Chỉ tiêu theo dõi Công thức	Tỷ lệ ra rễ (%)			Số rễ/cây	Chiều dài rễ (cm)	Chiều cao cây (cm)
	Sau 15 ngày	Sau 20 ngày	Sau 30 ngày			
I (Đ/C): MS +10g saccharoza + 6,5g agar	0	53,33	100	2,47	1,45	7,06
I + 0,5g <u>T</u> han <u>H</u> oạt <u>T</u> ính	81,67	100	-	3,43	2,36	7,35
I + 1g THT	100	-	-	3,67	2,59	7,31
I + 1,5g THT	66,67	100	-	3,33	2,14	7,26
I + 2g THT	40,00	100	-	2,80	1,62	7,10
<i>LSD(5%)</i>				0,23	0,16	

Từ kết quả bảng 15 và 16 cho thấy cây địa lan in vitro có thể ra rễ ngay trên môi trường không cần bổ xung chất điều tiết sinh trưởng. Tuy nhiên quá

trình ra rễ kéo dài hơn rất nhiều (30 ngày sau cấy) so với việc ta bổ sung α NAA ở nồng độ 0,3ppm hay 1g than hoạt tính thì sau 20 ngày nuôi cấy 100% số cây đã ra rễ. Bên cạnh đó, việc bổ sung NAA và than hoạt tính đã làm tăng chất lượng của bộ rễ. Môi trường ra rễ cho cây địa lan in vitro là: **MS +10g saccaroza + 0,3ppm α NAA (hoặc 1g than hoạt tính) + 6,5g agar.**

4.5. Các nghiên cứu ở giai đoạn sau nuôi cấy mô

4.5.1. Nghiên cứu ảnh hưởng khối lượng cây in vitro khi trồng đến sinh trưởng phát triển ở giai đoạn vườn ươm cấp I (bồn mạ)

Bảng 17: Ảnh hưởng khối lượng cây in vitro đến sinh trưởng phát triển ở giai đoạn bồn mạ (sau 3 tháng trồng)

CTTD	Sau 4 tuần trồng			Sau 8 tuần trồng			Sau 12 tuần trồng		
	Tỷ lệ chết (%)	Tăng chiều cao cây (cm)	Tăng số lá (lá/cây)	Tỷ lệ chết (%)	Tăng chiều cao cây (cm)	Tăng số lá (lá/cây)	Tỷ lệ chết (%)	Tăng chiều cao cây (cm)	Tăng số lá (lá/cây)
Khối lượng									
0,2 - 0,5g	10,00	0,39	0,15	33,13	0,91	0,20	-	1,58	0,40
0,5 - 1,0g	6,70	0,55	0,15	16,70	1,14	0,30	-	1,73	0,60
>1g	3,30	0,72	0,20	10,70	1,50	0,45	-	2,30	0,80

Số liệu ở bảng cho thấy khối lượng cây in vitro trước khi ra vườn ươm là chỉ tiêu rất quan trọng ảnh hưởng đến tỷ lệ sống cũng như sinh trưởng phát triển của cây sau này. Những cây có khối lượng thấp (<1gam) sẽ có tỷ lệ chết rất cao (16,70 – 33,13%), đồng thời những cây còn sống sót lại có tốc độ tăng trưởng về chiều cao, số lá rất chậm, khối lượng cây in vitro càng cao thì sức sinh trưởng của cây ngoài vườn ươm càng khỏe. Vì vậy để đảm bảo cho cây

sinh trưởng phát triển tốt ngoài vườn ươm thì cây in vitro phải đạt được khối lượng $\geq 1,0$ gam.

4.5.2. Nghiên cứu ảnh hưởng của giá thể đến sinh trưởng phát triển của cây

Bảng 18 : Ảnh hưởng của giá thể đến sinh trưởng phát triển của cây bôn mạ

Chỉ tiêu theo dõi	Sau trồng 4 tuần			Sau trồng 8 tuần		
	Tỷ lệ chết (%)	Tăng chiều cao cây (cm)	Tăng số lá (lá/cây)	Tỷ lệ chết (%)	Tăng chiều cao cây (cm)	Tăng số lá (lá/cây)
Giá thể						
Đất	18,00	0,28	0,07	22,00	0,72	0,13
Cát đen	5,30	0,59	0,27	13,30	1,04	0,53
Cát vàng	7,30	0,45	0,33	7,30	1,07	0,67
Dón:Cát:Than (8:1:1)	38,00	0,43	0,07	43,30	0,80	0,20
Dón:Xodừa (1:1)	16,00	0,76	0,27	18,30	1,57	0,40
Dón	10,60	0,78	0,32	10,30	1,84	0,89
Rễ dương xỉ	9,30	0,70	0,07	12,00	1,54	0,20
Trấu hun	11,30	0,67	0,20	11,30	1,30	0,60
Vỏ cây khô	20,70	0,46	0,13	24,00	1,43	0,40
Vỏ dừa	10,00	0,49	0,20	13,30	1,41	0,53
Xơ dừa chỉ	12,70	0,37	0,07	15,00	0,65	0,27
Xỉ than	8,0	0,53	0,27	10,00	1,29	0,80

Kết quả bảng 18 chứng tỏ: ở giai đoạn vườn ươm cây địa lan in vitro tỏ ra khá thích hợp với rất nhiều loại giá thể khác nhau như cát vàng, cát đen, rế dương xỉ, xỉ than,... Tuy nhiên, trong các nền giá thể thử nghiệm thì dớn biển tỏ ra thích hợp nhất đối với cây địa lan in vitro. Trên nền giá thể này cho tỷ lệ sống đạt 90% và nhất là ở giai đoạn sau khi ra cây 1 tháng thì sinh trưởng phát triển của cây con đều vượt trội hơn hẳn so với các nền giá thể khác.

4.5.3. Nghiên cứu ảnh của thời vụ, địa điểm ra cây đến tỷ lệ sống của cây địa lan khi đưa ra vườn ươm cấp I

Bảng 19: Ảnh hưởng của thời vụ đến tỷ lệ chết (%) của cây địa lan khi đưa ra vườn ươm cấp I (sau trồng 2 tháng)

Thời vụ Địa điểm	Vụ đông xuân	Vụ xuân	Vụ hè	Vụ thu
Hà nội	12,50	13,70	87,50	30,00
Sapa	18,80	10,00	21,30	15,40

Kết quả bảng 19 cho thấy yếu tố nhiệt độ có ảnh hưởng quyết định đến sự sống của cây địa lan ngoài vườn ươm. Cây địa lan in vitro có thể chịu được nhiệt độ tương đối thấp (10 – 15 °C). Nhiệt độ >30 °C hoàn toàn không thích hợp cho việc ra cây. Vì vậy trong điều kiện thời tiết vụ hè và đầu vụ thu muốn ra cây địa lan in vitro thì chúng ta phải chọn vùng khí hậu mát để ra cây.

4.5.4. Nghiên cứu ảnh hưởng của chế độ dinh dưỡng khác nhau đến sự sinh trưởng phát triển của cây địa lan giai đoạn vườn ươm cấp I

Bảng 20: Ảnh hưởng của chế độ dinh dưỡng khác nhau đến sự sinh trưởng phát triển của địa lan giai đoạn vườn ươm cấp I

Chỉ tiêu theo dõi Công thức	Sau trồng 1 tháng		Sau trồng 2 tháng	
	Độ tăng chiều cao cây(cm)	Độ tăng số lá (cm)	Độ tăng chiều cao cây(cm)	Độ tăng số lá (cm)
Đ/C	0,45	0,3	0,93	0,60
Growmore (2g/l)	1,57	0,8	2,47	1,80
A:1/250	1,96	0,5	3,08	1,20
A:1/500	1,35	0,8	3,09	1,80
A:1/1000	1,70	0,5	2,59	1,30
B:1/250	1,25	0,8	2,42	1,70
B:1/500	1,04	0,7	2,18	1,60
B:1/1000	0,83	0,9	2,01	1,90
A + B : 1/250	1,89	0,9	3,73	1,80
A + B : 1/500	1,84	0,8	3,30	1,90
A + B : 1/1000	1,32	0,9	2,40	1,90

Kết quả bảng 20 cho thấy nhất thiết phải cung cấp dinh dưỡng cho cây con sau trồng 1 – 1,5 tháng (tùy thuộc vào thời vụ ra cây). Loại phân bón Úc ở dạng dung dịch (A,B) tỷ lệ 1:1 với nồng độ 1/250 có hiệu quả cao hơn so với loại phân bón vẫn được sử dụng cho các loài lan (Growmore).

4.5.5. Nghiên cứu ảnh hưởng của các nền giá thể khác nhau đến sinh trưởng phát triển của cây địa lan giai đoạn vườn ươm cấp II

Cây in vitro sau khi trồng trong bồn mạ được 3 tháng bộ rễ cũng như thân lá đã phát triển vì vậy nhất thiết phải dần cách mật độ và thay đổi giá thể trồng thì mới đáp ứng được nhu cầu dinh dưỡng của cây. Đây là giai đoạn vườn ươm cấp II.

Ở giai đoạn này chúng tôi tiến hành thay đổi hoàn toàn nền giá thể trồng so với giai đoạn vườn ươm cấp I. Chúng tôi sử dụng nền giá thể có bổ xung thêm phân hữu cơ.

Bảng 21: Ảnh hưởng của các nền giá thể khác nhau đến sinh trưởng phát triển của cây địa lan ở vườn ươm cấp II tại Hà Nội (sau 8 tuần theo dõi).

Chỉ tiêu theo dõi	Độ tăng chiều cao cây (cm)	Độ tăng số lá (lá)	Độ tăng Đ/K thân (cm)	Độ tăng số rễ (rễ)	Độ tăng chiều dài rễ (cm)
Công thức					
Bùn ao phơi khô	1,35	1,02	0,12	1,27	1,23
Bùn ao + phân dê	2,22	1,47	0,20	1,67	2,20
Đất mùn	1,60	0,70	0,15	2,00	1,75
Mùn + phân dê	2,39	0,68	0,19	1,67	1,53
Mùn + phân dê + dương xỉ	3,32	1,75	0,21	2,33	2,43
Dương xỉ	4,45	1,78	0,37	2,67	2,73
Dương xỉ + phân dê	3,45	1,22	0,20	2,67	2,10
Dương xỉ + phân dê + xơ dừa	1,41	1,62	0,12	2,33	1,80
Xơ dừa + phân dê	1,59	0,75	0,15	2,33	2,33

Qua bảng 21 cho thấy: ở các loại giá thể khác nhau thì ảnh hưởng khác nhau đến sinh trưởng phát triển của cây. Cụ thể ở công thức 6 (đây là loại giá thể lấy từ rễ cây dương xỉ có độ xốp cao) sự sinh trưởng phát triển của cây là tốt nhất. Trong khi đó ở công thức 1 (đất bùn chặt nhỏ) và công thức 3 (mùn gỗ mục nghiền nhỏ) lại cho kết quả kém nhất. Lý do là vào thời điểm này cây vừa trong bồn mạ đưa ra cây còn nhỏ, bộ rễ còn yếu chính vì vậy giá thể này không thuận lợi cho cây phát triển. Còn đối với một số giá thể có bổ xung

thêm phân hữu cơ (phân dê) như CT 2, 5, 7, 8, 9 hay việc bón phân qua lá định kỳ (một tuần một lần) cũng không có hiệu quả rõ ràng. Điều này có thể do ở giai đoạn đầu, bộ rễ của địa lan cấy mô còn yếu, cây chưa cần lượng phân cao. Như vậy, giai đoạn đầu ở vườn ươm cấp II chưa cần thiết phải bổ xung phân hữu cơ vào nền giá thể trồng mà chỉ cần chọn giá thể đảm bảo độ tơi xốp đồng thời phải thoáng khí.

Bảng 22: Ảnh hưởng của một số loại giá thể khác nhau đến sinh trưởng phát triển của cây địa lan giai đoạn vườn ươm cấp II tại Sapa (sau 8 tuần theo dõi)

Chỉ tiêu theo dõi Công thức	Độ tăng chiều cao cây (cm)	Độ tăng số lá (lá)	Độ tăng Đ/K thân (cm)	Độ tăng số rễ (rễ)	Độ tăng chiều dài rễ (cm)
Dương xỉ	1,75	2,10	0,26	2,45	1,89
Mùn địa phương	2,05	2,61	0,32	2,16	2,12
1/2 dương xỉ + 1/2 mùn địa phương	2,25	2,20	0,28	1,98	2,15
3/4 mùn địa phương + 1/4 phân dê	2,50	2,10	0,28	2,12	1,78
1/2 mùn địa phương + 1/4 dương xỉ + 1/4 phân dê	4,78	2,20	0,39	3,55	3,42
1/4 phân dê + 3/4 dương xỉ	2,99	2,10	0,16	2,10	2,13
1/4 mùn địa phương + 1/2 dương xỉ + 1/4 phân dê	2,19	1,95	0,23	2,21	1,87

Kết quả bảng 22 cho thấy rằng: với điều kiện thuận lợi của vùng núi Sapa vào mùa hè thì cây địa lan sinh trưởng phát triển tương đối ổn định. Tuy nhiên, giữa các giá thể khác nhau cũng ảnh hưởng khác nhau đến sinh trưởng phát triển của cây địa lan. Cụ thể là công thức 1/2 mùn địa phương + 1/4 rễ dương xỉ + 1/4 phân dê thì sự sinh trưởng phát triển của cây đạt giá trị cao nhất.

4.5.6. Nghiên cứu ảnh hưởng của dinh dưỡng khác nhau đến sinh trưởng phát triển của cây địa lan giai đoạn vườn ươm cấp II

Bảng 23: Ảnh hưởng của một số loại dinh dưỡng khác nhau đến sinh trưởng phát triển của cây địa lan tại Hà Nội (sau 8 tuần theo dõi).

Chỉ tiêu theo dõi Công thức	Độ tăng chiều cao cây (cm)	Độ tăng số lá (lá)	Độ tăng ϕ thân (cm)	Độ tăng số rễ (rễ)	Độ tăng chiều dài rễ (cm)
Phân Yogen (2g/lít)	1,93	1,14	0,27	2,33	1,80
phân 20:20:20 +vi lượng + vitamin	2,93	1,10	0,09	2,67	2,03
phân: 20:20:20 + dịch chiết	2,66	1,05	0,04	2,00	1,53
phân 30:10:10 +vi lượng + vitamin	4,51	1,22	0,23	2,00	2,17
phân 30:10:10 + dịch chiết	1,89	1,09	0,14	2,33	1,50
phân hữu cơ	0,66	1,05	0,23	1,67	1,27
phân hữu cơ + dịch chiết	1,22	0,96	0,22	2,67	1,73
luân phiên phân 20:20:20 + vi lượng + vitamin và phân hữu cơ	0,40	0,96	0,10	1,00	1,00
luân phiên 30:10:10 +vi lượng + vitamin và phân hữu cơ	1,96	1,01	0,15	2,00	1,70

Bảng 24: Ảnh hưởng của một số loại dinh dưỡng khác nhau đến sinh trưởng phát triển của cây địa lan tại Sapa (sau 8 tuần theo dõi)

Chỉ tiêu theo dõi Công thức	Độ tăng chiều cao cây (cm)	Độ tăng số lá (lá)	Độ tăng Đ/K thân (cm)	Độ tăng số rễ (rễ)	Độ tăng chiều dài rễ (cm)
Phân Yogen (2g/lít)	2,10	1,90	0,08	3,33	2,13
Phân 20:20:20 +vi lượng + vitamin	1,89	2,00	0,19	2,33	1,89
Phân: 20:20:20 + dịch chiết	2,75	1,30	0,14	2,87	1,82
Phân 30:10:10 +vi lượng + vitamin	4,89	2,40	0,28	3,56	<u>2,17</u>
Phân 30:10:10 + dịch chiết	2,14	1,73	0,19	2,33	2,11
Phân hữu cơ	1,65	1,90	0,10	2,67	1,50
Phân hữu cơ + dịch chiết	1,82	1,85	0,20	2,10	1,78
Luân phiên phân 20:20:20 + vi lượng + vitamin và phân hữu cơ	1,40	1,61	0,22	2,33	1,33
Luân phiên 30:10:10 +vi lượng + vitamin và phân hữu cơ	2,10	2,11	0,23	2,50	1,98

Qua bảng 23 và 24 cho ta thấy nhìn chung giữa các công thức chưa có sự sai khác nhau nhiều. Tuy nhiên, công thức phân 30:10:10 +vi lượng + vitamin (của môi trường MS) cho kết quả tốt hơn cả. Điều này được thể hiện ở hầu hết các chỉ tiêu như: chiều cao cây, số lá, đường kính thân. Công thức phân hữu cơ lại cho kết quả kém nhất. Như vậy, ở giai đoạn đầu cây bắt đầu bước vào thời kỳ sinh trưởng phát triển nhanh thì việc cung cấp phân bón với yếu tố đạm cao là rất cần thiết.

Đồng thời qua đây cũng cho ta thấy được giữa 2 vùng Sapa và Hà Nội mặc dù khác nhau về khí hậu nhưng cũng không ảnh hưởng nhiều về nhu cầu dinh dưỡng của cây. Điều này càng khẳng định rõ nguồn dinh dưỡng giàu N là rất cần thiết cho cây địa lan vào giai đoạn này. Mặc dù thời gian theo dõi chưa nhiều nhưng bước đầu cho thấy cây địa lan sinh trưởng và phát triển tốt hơn khi

được trồng tại Sapa. Các kết quả nghiên cứu trên đã được vận dụng, thử nghiệm trên các giống địa lan thương mại khác và đều cho kết quả tương tự. Quy trình ra cây đã được vận hành thử nghiệm ở quy mô sản xuất thử nghiệm tại Hà Nội và Sa Pa.

5. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

5.1. Kết luận

1. Chồi bên có kích thước 3 - 5 cm là cơ quan thích hợp nhất đưa vào nuôi cấy tạo vật liệu khởi đầu cho quá trình nhân giống vô tính. Môi trường nuôi cấy tạo vật liệu khởi đầu thích hợp là: **MS + 100ml ND + 10g đường Saccaroza + 1,5mg BA + 6,5g agar/lít**
2. Phương pháp nuôi cấy lớp mỏng tế bào có hiệu quả rất cao đối với việc nhân nhanh, kích thước lát mỏng tối ưu cho nuôi cấy có tỷ lệ sống và phát sinh hình thái cao là 0,3 - 0,5mm. Bằng phương pháp này có tác dụng thúc đẩy mạnh mẽ sự phát sinh thể protocorm thể thu được 27 hay 30 thể protocorm từ một một protocorm ban đầu sau 8 tuần nuôi cấy. Môi trường xác định được để nuôi cấy lớp mỏng là :**MS + 15%ND + 1mg Kinetin (hoặc 0,5mg BA) + 10g Saccaroza + 6,5g agar/lít.**
3. Môi trường tái sinh cây địa lan từ protocorm là: **MS + 2% đường sacaro + 15% nước dừa.**
4. Môi trường thích hợp để tạo cây hoàn chỉnh là: **MS +10g saccaroza + 0,3mg α NAA (hoặc 1g than hoạt tính) + 6,5g agar/lít.** Trên môi trường này sau 20 ngày nuôi cấy 100% số cây ra rễ, số rễ trên cây đạt 4,72 và 3,67.
5. Đối với giai đoạn vườn ươm cấp I:
 - Khối lượng cây in vitro càng cao thì sức sinh trưởng của cây ngoài vườn ươm càng khỏe. Vì vậy để đảm bảo cho cây sinh trưởng phát triển tốt ngoài vườn ươm thì cây in vitro phải đạt được khối lượng $\geq 1,0$ gam.

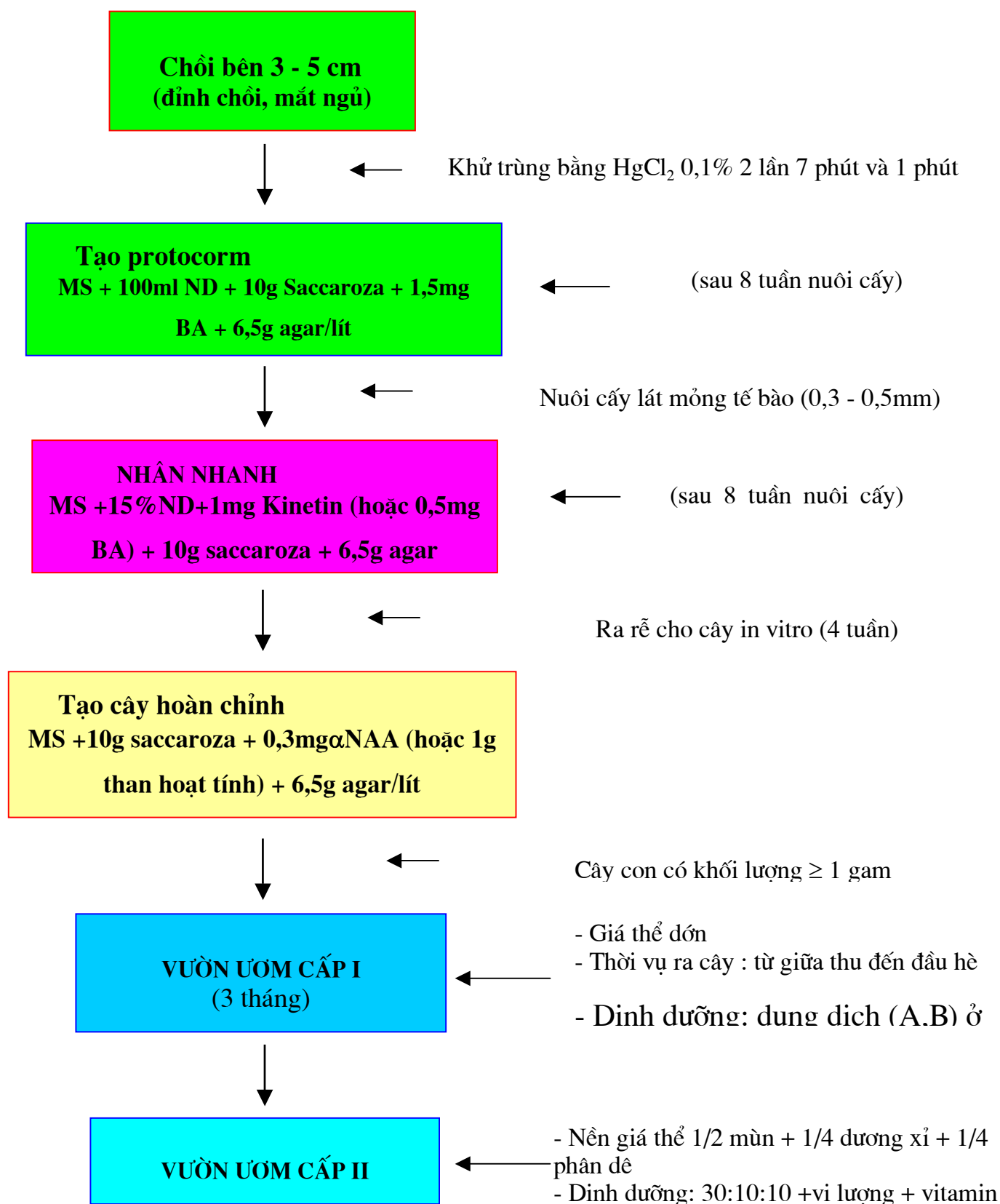
- Thời vụ ra cây in vitro tốt nhất là vụ đông xuân và vụ xuân ở điều kiện Hà Nội. Trong điều kiện Sapa – Lào Cai tốt nhất là vụ xuân và thu.
- Giá thể trồng cây ở giai đoạn này là dớn. Trên nền giá thể này cây có tỷ lệ sống đạt 90% và sinh trưởng phát triển của cây con đều vượt trội hơn hẳn so với các nền giá thể khác.
- Dinh dưỡng thích hợp cho cây ở giai đoạn này là phân bón ở dạng dung dịch (A,B) ở nồng độ 1/250 (với A:B tỷ lệ 1:1). Trên nền dinh dưỡng này cho hiệu quả cao hơn so với một số loại phân bón thông dụng vẫn được dùng cho hoa lan (ví dụ như Growmore).

6. Đối với giai đoạn vườn ươm cấp II

- Trong điều kiện của Hà Nội thì giá thể dương xỉ là thích hợp nhất, còn tại Sapa giá thể thích hợp nhất cho cây địa lan lại là tổ hợp 1/2 mùn địa phương + 1/4 dương xỉ + 1/4 phân dê.
- Dinh dưỡng tốt nhất cho cây sinh trưởng phát triển ở giai đoạn này là phân bón 30:10:10 + vi lượng + vitamin (MS).

Từ các kết luận trên, chúng tôi đưa ra quy trình nhân giống địa lan bằng nuôi cấy mô như sau:

Quy trình nhân giống địa lan bằng nuôi cấy mô



Chúng tôi đã ứng dụng thành công quy trình trên trong sản xuất thử nghiệm các giống Xanh Chiểu; Hồng Bệt (Đà Lạt); Trung Quốc Xanh; Trung Quốc Vàng; C. Miss korre; C. Da fan và một số giống bản địa Phụng hoàng thơm và Mạc nâu lá lớn với số lượng sản phẩm là 1 vại cây.

5.2. Đề nghị:

Trong thời gian thực hiện đề tài, ngoài các đối tượng nghiên cứu chúng tôi cũng tiến hành thí nghiệm trên nhiều giống khác và cũng đạt được kết quả khả quan. Tuy nhiên, vẫn còn nhiều vấn đề cần phải nghiên cứu hoàn thiện quy trình đến kết quả cuối cùng (sản phẩm cây thương mại – có hoa). Kính đề nghị Ban chủ nhiệm chương trình cho phép đề tài được tiếp tục triển khai trong 2 năm tới.

MỤC LỤC

1. Đặt vấn đề	1
2. Mục đích và yêu cầu của đề tài	1
2.1. Mục đích của đề tài	1
2.2. Yêu cầu của đề tài:	1
2.2.1. Thu thập mẫu và lưu giữ nguồn gen	1
2.2.2. Giai đoạn nhân in vitro	1
2.2.3. Giai đoạn sau in vitro.....	2
2.2.3.1. Giai đoạn vườn ươm cấp I.....	2
2.2.3.2. Giai đoạn vườn ươm cấp II	2
3. Vật liệu, nội dung và phương pháp nghiên cứu	2
3.1. Vật liệu	2
3.2. Nội dung nghiên cứu	2
3.2.1. Điều tra, thu thập và lưu giữ nguồn gen	2
3.2.2. Nghiên cứu tạo nguồn vật liệu khởi đầu cho nhân nhanh in vitro.....	2
3.2.3. Nghiên cứu nhân nhanh nguồn mẫu	2
3.2.4. Nghiên cứu tạo cây hoàn chỉnh	2
3.2.5. Các nghiên cứu giai đoạn sau nuôi cấy mô	3
3.3. Phương pháp nghiên cứu.....	3
4. Kết quả và thảo luận	4
4.1. Điều tra thu thập, xác định đối tượng thí nghiệm.....	4
4.2. Giai đoạn tạo nguồn vật liệu khởi đầu.....	6
4.2.1. Nghiên cứu ảnh hưởng của thời gian và phương pháp khử trùng đến mẫu đưa vào nuôi cấy.	6
4.2.2. Nghiên cứu ảnh hưởng của chất điều tiết sinh trưởng đến quá trình phát sinh hình thái mẫu	7
4.3. Giai đoạn nhân nhanh.....	9
4.3.1. Nghiên cứu ảnh của chất điều tiết sinh trưởng đến khả năng nhân nhanh protocorm.	9

4.3.2. Nghiên cứu ảnh hưởng của nền môi trường và phương thức nuôi cấy đến nhân nhanh protocorm.....	11
4.3.3. Nghiên cứu ứng dụng phương pháp nuôi cấy lát mỏng tế bào trong quá trình nhân nhanh.....	12
4.3.4. Nghiên cứu ảnh hưởng của nước dừa đến khả năng tạo protocorm của lớp mỏng nuôi cấy.....	13
4.3.5. Nghiên cứu ảnh hưởng của chất điều tiết sinh trưởng đến khả năng tạo protocorm của lớp mỏng nuôi cấy.....	14
4.3.6. Nghiên cứu khả năng tái sinh chồi từ protocorm	16
4.4. Giai đoạn tạo cây hoàn chỉnh	16
4.5. Các nghiên cứu ở giai đoạn sau nuôi cấy mô	18
4.5.1. Nghiên cứu ảnh hưởng khối lượng cây in vitro khi trồng đến sinh trưởng phát triển ở giai đoạn vườn ươm cấp I (bồn mạ)	18
4.5.2. Nghiên cứu ảnh hưởng của giá thể đến sinh trưởng phát triển của cây.....	19
4.5.3. Nghiên cứu ảnh của thời vụ, địa điểm ra cây đến tỷ lệ sống của cây địa lan khi đưa ra vườn ươm cấp I	20
4.5.4. Nghiên cứu ảnh hưởng của chế độ dinh dưỡng khác nhau đến sự sinh trưởng phát triển của cây địa lan giai đoạn vườn ươm cấp I	20
4.5.5. Nghiên cứu ảnh hưởng của các nền giá thể khác nhau đến sinh trưởng phát triển của cây địa lan giai đoạn vườn ươm cấp II.....	21
4.5.6. Nghiên cứu ảnh hưởng của dinh dưỡng khác nhau đến sinh trưởng phát triển của cây địa lan giai đoạn vườn ươm cấp II.....	24
5. Kết luận và đề nghị.....	26
5.1. Kết luận	26
Quy trình nhân giống địa lan bằng nuôi cấy mô	28
5.2. Đề nghị:	29

SẢN PHẨM III

QUI TRÌNH NHÂN NHANH *IN VITRO* MỘT SỐ GIỐNG ĐỊA LAN QUY MÔ BÁN SẢN XUẤT

**Thuộc đề tài: Nghiên cứu sử dụng công nghệ tế
bào và kỹ thuật chỉ thị phân tử phục vụ
chọn tạo giống cây trồng**

Mã số: KC.04.08

Hà Nội, 11/2004

Quy trình nhân nhanh *in vitro* một số giống địa lan quy mô bán sản xuất

Quy trình nhân nhanh một số giống địa lan bằng kỹ thuật nuôi cấy mô bao gồm các giai đoạn: điều tra thu thập nguồn mẫu giống; khử trùng; xác định cơ quan nuôi cấy, kích thước, tìm nồng độ chất điều tiết sinh trưởng thích hợp cho sự phát sinh hình thái của cơ quan này; nhân nhanh bằng kỹ thuật cắt lớp mỏng; tạo cây hoàn chỉnh; xác định tiêu chuẩn của cây invitro; thời vụ ra cây, giá thể ra cây, xác định chế độ dinh dưỡng thích hợp.

Các giai đoạn này được thực hiện như sau:

TRONG PHÒNG THÍ NGHIỆM

Chuẩn bị môi trường nuôi cấy: Môi trường sử dụng trong quy trình nhân một số giống địa lan được mô tả dựa trên môi trường khoáng cơ bản theo Murashige và Skoog (1962) gồm các thành phần ghi dưới đây:

Lượng pha 1 lít dd mẹ

Lượng lấy cho 1 lít môi trường

1. Đa lượng

NH_4NO_3	33,0g	Lấy 50ml/1lít
KNO_3	38,0g	
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	7,4g	
KH_2PO_4	3,4g	
* $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	8,8g	($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ pha riêng)

2. Vi lượng

H_3PO_3	620,0mg	Lấy 10ml/1lít
$\text{MnSO}_4.4\text{H}_2\text{O}$	2230,0mg	
$\text{ZnSO}_4.4\text{H}_2\text{O}$	860,0mg	
KI	83,0mg	
$\text{MoO}_4 \text{Na}_2.2\text{H}_2\text{O}$	25,0mg	
$\text{CoCl}_2.6\text{H}_2\text{O}$	2,5mg	
$\text{CuSO}_4.5\text{H}_2\text{O}$	2,5mg	

3. Sắt

$\text{FeSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$	5,56mg	Lấy 5ml/1lít
Na_2EDTA	7,46mg	

4. Vitamin

Glycine	400,0mg	Lấy 5ml/1lít
Axit Nicotinic (B_5)	100,0mg	
Pyridoxin(B_6)	100,0mg	
Thiamin HCl (B_1)	20,0mg	

***Inositol** 100,0mg/ 1lít

pH = 5,8 - 6,0

Các thành phần hoá chất dùng trong pha chế môi trường nuôi cấy được pha thành 5 dung dịch mẹ như sau:

Dung dịch ĐL: Muối khoáng chính(trừ CaCl_2), được cân lượng như ở bảng trên đây, hoà tan từng chất, pha hỗn hợp và lên thể tích 1lít. Khi dùng pha 1lít môi trường thì dùng 50ml lượng dung dịch này

+ **Dung dịch CaCl_2 :** Cân lượng 8,8g hoà tan bằng nước cất rồi lên thể tích 1lít. Dùng 50 ml dung dịch này khi pha 1lít môi trường.

+ **Dung dịch vi lượng:** chúng ta cân lượng hoá chất như ở bảng trên(pha mẹ cho 200 lit môi trường), pha tan từng chất với nước cất, rồi lên thể tích là 1 lít. Khi pha môi trường lấy 10ml dung dịch này.

+ **Dung dịch sắt:** cân riêng và hoà tan hai lượng muối trên bằng nước cất nóng vừa pha vừa đun nhẹ.

+ **Dung dịch vitamin:** Thành phần gồm các vật chất hữu cơ và vitamin. Cân lượng các chất như trong bảng dưới đây, pha trong nước cất thành 1 lít.

Ghi chú: 5 loại dung dịch trên đều phải bảo quản ở 4 °C.

Môi trường khoáng cơ bản được bổ xung thêm các chất kích thích sinh trưởng tùy theo mục đích sử dụng như BA để kích thích tái tạo protocorm, kinetin có tác dụng tái tạo chồi từ lát cắt mỏng, αNAA và than hoạt tính có tác dụng tạo rễ hình thành cây hoàn chỉnh. Về tính năng tác dụng của những chất kích thích sinh trưởng đó có thể nêu như sau:

BA(tên đầy đủ là benzyladenin) có hoạt tính auxin, nhưng không mạnh như kinetin. Sự có mặt của BA với nồng độ thích hợp trong môi trường nuôi

cây tạo nên sự cân bằng mới về các chất điều hoà sinh trưởng, khiến cho ưu thế chồi ngọn bị phá vỡ, chồi phát triển thành cụm chồi.

Kinetin là một hoạt chất có nguồn gốc tự nhiên thuộc nhóm Cytokinin, kích thích phân bào và tạo chồi với mô phân sinh. Trong mối tương tác cân bằng động với BA, Kinetin cho phép giữ cho khối mô nuôi cấy phát triển theo một dạng nhất định, chẳng hạn như dạng cụm chồi non hoàn toàn hay cụm chồi cho nhiều chồi già.

α NAA(tên đầy đủ là Naptinaxeticacid) có hoạt tính au xin. Sự có mặt của α NAA ở nồng độ thích hợp trong môi trường nuôi cấy tạo nên sự cân bằng mới về các chất điều hoà sinh trưởng, từ đó có quá trình tái tạo rễ.

Than hoạt tính tuy không phải là chất điều tiết sinh trưởng nhưng nó có tác dụng hấp phụ bớt các chất điều tiết sẵn có còn tồn dư ở giai đoạn nhân nhanh, làm cho mối cân bằng giữa auxin và cytokinin thuận lợi theo xu hướng thuận lợi cho việc hình thành rễ.

Pha 100 ml mỗi loại chất BA, kinetin, α NAA theo tỷ lệ 1:1 như sau:

Cân 100mg mỗi loại, cho vào lọ thuỷ tinh sạch, thêm NaOH 0,1N cho đến khi tan hết và rồi lên thể tích là 100ml. Khi sử dụng lấy các chất ĐTST phải sử dụng các dụng cụ sạch.

Tiến hành pha chế môi trường: mỗi mẻ là 20 lít

Phần 1: Cân 130g agar bột vào nồi đun môi trường (nồi thuỷ tinh hay kim loại) thêm khoảng 5 lít nước cất, đặt lên bếp đun cho thạch tan hoàn toàn.

Phần 2: Cân 200g đường saccaroza+ 2 lít nước+ 1 lít dung dịch ĐL+1 lít dung dịch CaCl_2 +0,2lít dung dịch vi lượng+ 0,1 lít dung dịch sắt + 0,1 lít dung dịch vitamin+ 2g myo inositol+ nước dừa...đo pH và chỉnh về 5,8 bằng các dung dịch NaOH 0,1N; HCl 0,1N

Trộn hai phần với nhau thêm nước cất cho đủ thể tích 20 lít. Dùng máy phân phối môi trường cho vào các bình tam giác là 50 hay 70ml, nút bình tam giác bằng bông không thấm nước, bọc ngoài nút bông là nút giấy và khử trùng 20 phút ở 120°C . Tiến hành đặt các bình tam giác này ở nơi khô mát, vô trùng trong khoảng 2 tuần.

Lấy mẫu vật: Chồi đỉnh, mắt ngủ trên các chồi non được tách ra từ các cây mẹ khoẻ mạnh. Tiến hành tách cắt các chồi bên có chiều cao từ 3 đến 5 cm.

Khử trùng: Dụng cụ được sử dụng trực tiếp khi khử trùng là các bình trụ có nắp. Các chồi bên được sơ rửa sạch bằng dung dịch nước xà phòng.

Lần 1: dùng HgCl_2 0,1% khử trùng trong 7 phút.

Lần 2: bóc loại bỏ hoàn toàn lá bao ngoài, khử trùng lại bằng HgCl_2 0,1% trong 2 phút.

Cấy mẫu vật và kích thích quá trình phát sinh hình thái: dùng dao mổ đã vô trùng tách bỏ hết phần vỏ lá bao, phần mô đã bị tổn thương do khử trùng, để lại những phần chồi bên tinh sạch có kích thước nhỏ khoảng 5x5mm. Dùng panh cấy lên môi trường (**MS+ 10% nước dừa+ 10g Saccroza + 6,5g agar+1,5mg BA**)/1lít; **pH: 5,8; lượng môi trường là 70ml/1 bình tam giác, được hấp khử trùng 20 phút ở 120°C ; Các bình mẫu được nuôi trong điều kiện: nhiệt độ 20 - 25°C , cường độ chiếu sáng: 3000 – 3500 lux, quang chu**

kỳ: 16 giờ sáng/ 8 giờ tối. Trong điều kiện như vậy mẫu cấy phát sinh hình thái tạo chồi và tiền chồi(thể protocorm).

Nhân nhanh: sản phẩm của giai đoạn khởi động mẫu là nguồn vật liệu(phương pháp cắt lớp mỏng) cho giai đoạn này. Trong giai đoạn nhân nhanh sẽ thu được hai dạng: tiền chồi, chồi.

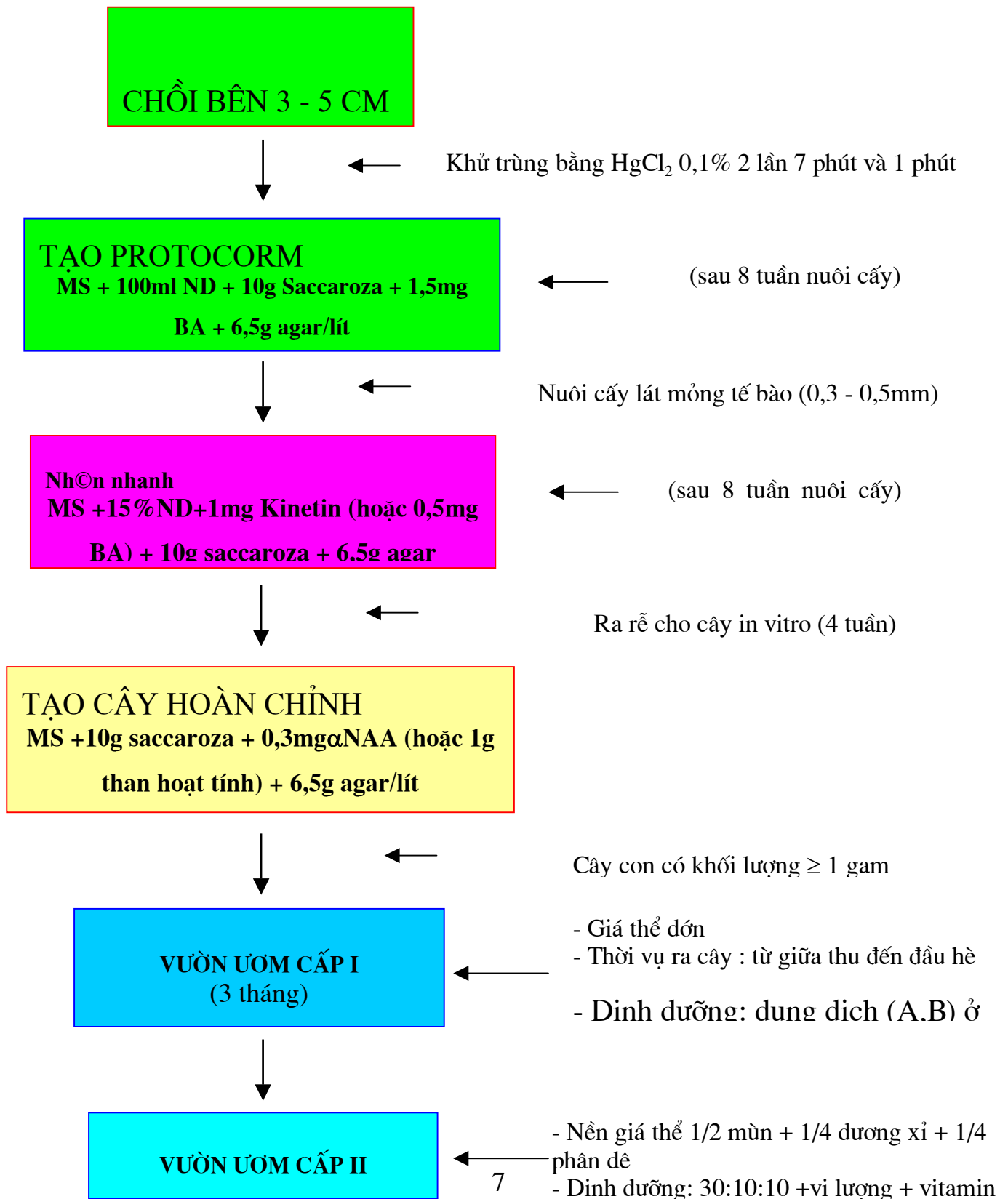
Thể tiền chồi(dạng protocorm tiếp tục cắt thành từng lát mỏng có kích thước từ 0,3 – 0,5 mm, được cấy trên môi trường **(MS+ 15% nước dừa+ 10g Saccroza + 6,5g agar +1,0mg Kinetin hoặc 0,5mg BA)/1lít ; pH: 5,8; lượng môi trường là 70ml/1 bình tam giác, được hấp khử trùng 20 phút ở 120°C; Các bình mẫu được nuôi trong điều kiện: nhiệt độ 20 - 25°C, cường độ chiếu sáng: 3000 – 3500 lux, quang chu kỳ: 16 giờ sáng/ 8 giờ tối.**

Tất cả các chồi có chiều cao khoảng 5,5 – 6,5 cm sẽ được chuyển sang giai đoạn sau, giai đoạn tạo cây hoàn chỉnh.

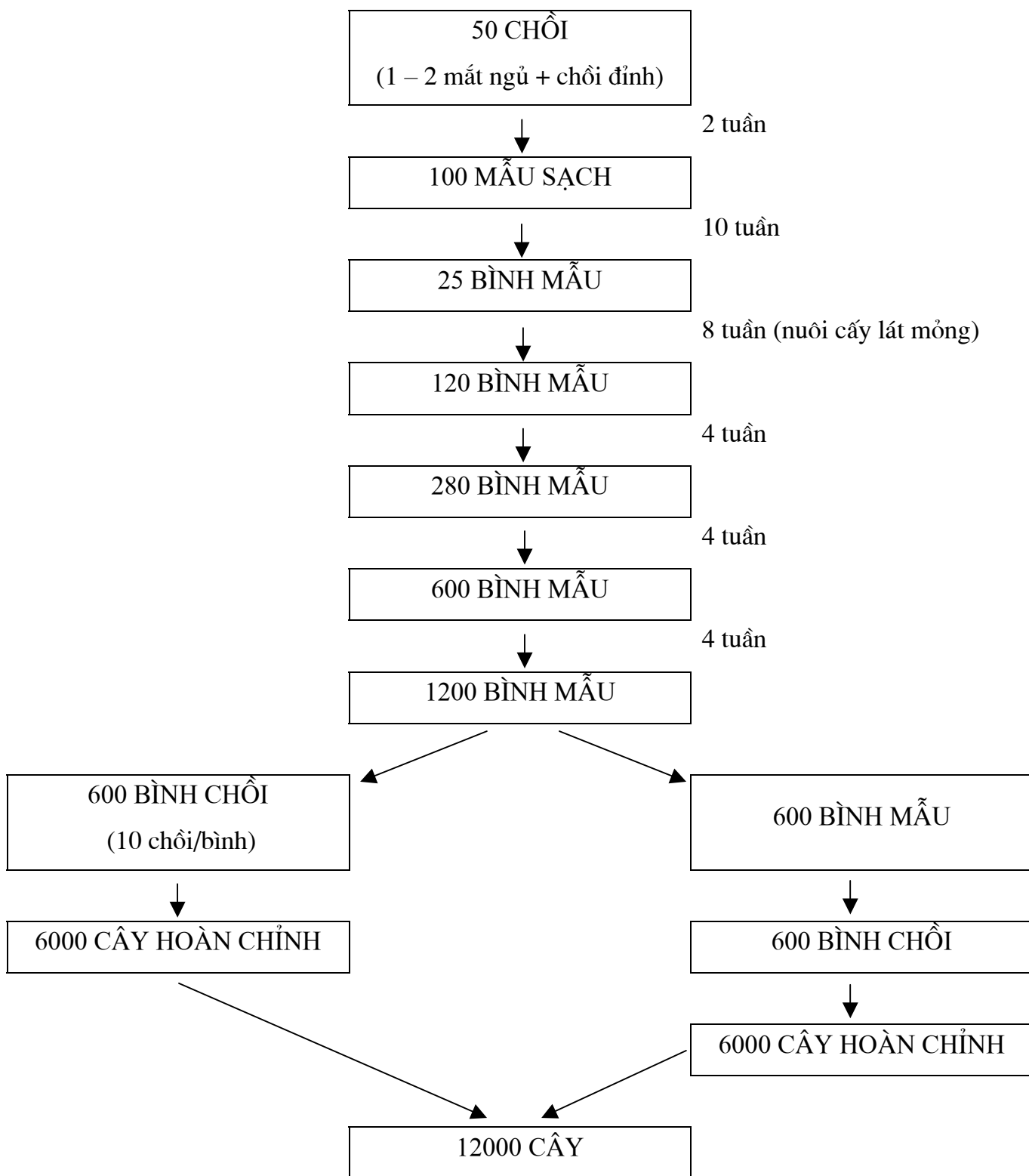
Hệ số nhân nhanh: sau 8 tuần nuôi cấy vòng nhân nhanh được lặp lại, cứ như vậy việc nhân nhanh được tiến hành quanh năm với hệ số nhân 6,23⁶

*Tạo cây hoàn chỉnh:*Các chồi có chiều cao 5,5 – 6,5 cm, mập khoẻ được chuyển vào môi trường kích thích ra rễ sau: **(MS+ 10g Saccroza + 6,5g agar+ 0,3mg α NAA hoặc 1g than hoạt tính)/1lít ; pH: 5,8; lượng môi trường là 50ml/1 bình tam giác, được hấp khử trùng 20 phút ở 120°C; Các bình mẫu được nuôi trong điều kiện: nhiệt độ 20 - 25°C, cường độ chiếu sáng: 3000 – 3500 lux, quang chu kỳ: 16 giờ sáng/ 8 giờ tối.**

QUY TRÌNH NHÂN GIỐNG ĐỊA LAN BẰNG NUÔI CẤY MÔ



QUY TRÌNH SẢN XUẤT 1 VẠN CÂY IN VITRO/ NĂM



QUY TRÌNH CÔNG NGHỆ SAU NUÔI CẤY MÔ

Giai đoạn ở vườn ươm cấp I:

* Chuẩn bị nhà trồng cây:

Vườn ươm cấp 1 cần có các yêu cầu sau:

- + Lưới đen che nắng: dùng loại lưới che 80 - 85 % ánh sáng.
- + Mái che mưa (có thể dùng ni lông hoặc mái nhựa...)
- + Giàn để cây (cao 40 – 50 cm).
- + Vườn được đặt ở vị trí thông thoáng .

* Chuẩn bị cây

Các cây sau giai đoạn tạo cây hoàn chỉnh có đủ tiêu chuẩn Cây in vitro có trọng lượng > 1 gam có 5 – 6 lá, 3 – 5 rễ được đưa khỏi phòng nuôi cấy để dưới ánh sáng tán xạ cho quen dần với điều kiện môi trường tự nhiên. Sau 2- 3 tuần dùng panh gấp cây khỏi bình nuôi cấy thả vào chậu nước sạch rửa hết agar bám trên rễ sau đó rửa lại thêm một đến 2 lần nữa rồi xếp cây vào rổ để ở chỗ mát cho ráo nước.

* Chuẩn bị giá thể:

Dón khô bỏ vào chậu nước sạch cho hút nước đến bão hoà. Sau đó vắt kiệt nước chuẩn bị để trồng.

Vườn ươm 1 trồng cây trong các rổ thưa có khả năng thoát nước tốt. Dưới đáy rổ lót lớp xốp vụn 2- 3 cm. Tiếp theo là lớp xơ dừa chỉ sao cho lớp này còn cách mặt rổ 3 – 4 cm lớp giá thể xơ dừa này vừa có tác dụng tiết kiệm dón vừa có tác dụng làm thông thoáng hơn.

* Cách trồng

Dùng dớn đã vắt khô quấn cây sao cho kín hết các rễ (khi quấn cần để hở phần cổ rễ) rồi xếp cây vào các rổ có xơ dừa đã chuẩn bị sẵn với mật độ 60 – 70 cây/rổ có diện tích 0,25 m². Phun mù trên bề mặt cho ướt lá dùng vòm che ni lông bao lấy rổ cây (vòm che cao hơn mặt rổ 20- 30 cm trên đó chọc các lỗ nhỏ). Một ngày mở ni lông phun mù như trên 3- 4 lần. Sau 5 đến 7 ngày thì có thể bỏ vòm che trên các rổ. Sau khi bỏ vòm che duy trì chế độ tưới ẩm 70 – 80 % (chế độ tưới trong vườn ươm 1 hoàn toàn là phun sương).

Tuỳ theo thời vụ ra cây khác nhau mà sau 4 – 5 tuần tiến hành cung cấp dinh dưỡng cho cây con sử dụng dinh dưỡng AB(theo tỷ lệ 1:1, nồng độ 1/250) 1 lần/tuần phun ướt đều trên lá. Sau 3 tháng các cây sẽ được chuyển sang vườn ươm cấp II.

Vườn ươm cấp II:

Khu vườn trồng cấp 2 cần chuẩn bị tương tự như vườn ươm cấp 1 chỉ có phần lưới che sáng giảm bớt nghĩa là giai đoạn này chỉ cần dùng lưới che ánh sáng loại 50 – 60% ánh sáng.

* Chuẩn bị giá thể, chậu trồng.

+ Phân dê ủ kỹ sau 2 – 3 tháng có thể dùng được

+ Rễ cây dương xỉ chặt nhỏ thành các đoạn 3 – 5 cm

+ Mùn

Ba loại trên được trộn theo tỷ lệ 1/2 mùn :1/4 rễ dương xỉ :1/4 phân dê trộn đều

+ Chậu trồng: sử dụng chậu nhựa đen mềm, chiều cao 20 – 30 cm đường kính 10 – 15 cm.

Giá thể trộn xong cho vào chậu khi cách mặt chậu 5 cm thì nhấc cây từ rổ đặt vào chậu trồng 3 cây/chậu. Trồng cây hở cổ rễ, sau khi trồng xong xếp cây lên giá rồi phun cho ướt cả cây và giá thể.

Duy trì độ ẩm (75 – 80%) đặc biệt là độ ẩm của không khí và sự thông thoáng là rất quan trọng. Sau khi trồng sang chậu được 2 – 3 tuần thì có thể tưới bổ xung thêm dinh dưỡng 2 tuần/ 1 lần bằng loại phân có tỷ lệ ni tơ cao (N:P:K=30:10:10).

*** Phòng trừ sâu bệnh**

Đối tượng sâu bệnh hại chính trên cây địa lan ở cả vườn ươm cấp 1 và vườn sản xuất là bệnh thối khuẩn thường xuất hiện nhiều khi nhiệt độ không khí cao, mưa kéo dài hay khi trời có sương ẩm độ không khí > 90%. Vì vậy thường sau khi có hiện tượng trên chúng ta tiến hành phun phòng cho cây bằng một trong các loại thuốc sau: Alli S, SOM5D với lượng thuốc 2 gam/lít phun sương cho ướt lá và giá thể.

SƠ ĐỒ QUY TRÌNH CÔNG NGHỆ SAU NUÔI CẤY MÔ

