

QUY TRÌNH NHÂN NHANH GIỐNG MÍA BẰNG *IN VITRO*

Phương pháp nhân giống *in vitro* là một phương pháp nhân giống hiện đại so với cách nhân giống cổ truyền là trồng bằng hom. Nhân giống *in vitro* hay vi nhân giống trong ống nghiệm là một trong bốn lĩnh vực ứng dụng của công nghệ nuôi cấy mô tế bào thực vật. Phương pháp nhân nhanh *in vitro* có thể tạo ra một lượng cây giống lớn chỉ trong một thời gian ngắn với các ưu điểm vượt trội như cây con có độ đồng đều cao, cây sinh trưởng phát triển khỏe, sạch bệnh, đẻ nhánh nhiều nên rất thích hợp cho việc nhân giống cho các vụ tiếp theo.

A. Quy trình nhân nhanh trong phòng thí nghiệm

I. Chuẩn bị môi trường nuôi cấy

1. Môi trường hóa học

Môi trường hóa học là nguồn cung cấp các chất cần thiết cho sự tăng trưởng phát sinh mô trong suốt quá trình sinh hóa của cây. Cơ sở của việc xây dựng các môi trường nuôi cấy là việc xem xét các thành phần cần thiết cho sự tăng trưởng và phát triển của cây. Đối với mía chủ yếu sử dụng môi trường *Murashige* và *Skoog* (1962) (MS) có bổ sung các Vitamin và hooc môn sinh trưởng.

THÀNH PHẦN MUỐI KHOÁNG CƠ BẢN CỦA MÔI TRƯỜNG MS^(*) (*Murashige và Skoog, 1962*) (Thành phần cho 01 lít môi trường nuôi cấy)

Thành phần	Hàm lượng (mg/l)	Cách pha	Ghi chú
MS I	KNO ₃	1900	38 g
	NH ₄ NO ₃	1650	33 g
	MgSO ₄ .7H ₂ O	370	7,4 g
	KH ₂ PO ₄	170	3,4 g
MS II	CaCl ₂	330	6,6 g
MS III	H ₃ BO ₃	6.2	620 mg
	MnSO ₄ .H ₂ O	22.3	2230 mg
	ZnSO ₄	8.6	860 mg
	Na ₂ MoO ₄	0.25	25 mg
	CuSO ₄ .7H ₂ O	0.025	2,5 mg
	CoCl ₂	0.025	2,5 mg
MS IV	Na ₂ EDTA	37.3	3730 mg
	FeSO ₄ .7H ₂ O	27.8	2780 mg
MS V (Vitamin)	Glycin	2	200 mg
	Myo-inositol	100	10 g
	Nicotimic acid	0.5	50 mg

Thành phần		Hàm lượng (mg/l)	Cách pha	Ghi chú
	Thiamin.HCl	0.1	10 mg	
	Pyridoxin. HCl	0.5	50 mg	
Các chất kích thích sinh trưởng (Hooc môn)	BA	2		Pha riêng từng chất
	Kinetin	0,1		
	2,4D:	2		
	NAA	2		
Các chất khác	Thạch (Agar)	7g/L		Khi nấu môi trường mới cho vào
	Đường	30 g/L		
	Nước Dừa	100 ml/L		
	Than hoạt tính	0,1 g/L		

* Chú ý. trong khi pha mỗi Stock thì pha trong nước cất, hòa tan chất này xong thì mới cho chất tiếp theo vào

- + Môi trường được hấp ở áp suất 1,1 At tương đương 121⁰C
- + PH môi trường là 5,6

2. Môi trường trong phòng nuôi cấy

- Ánh sáng

Thời gian chiếu sáng thích hợp là từ 12-18h/ngày. Cường độ ánh sáng thích hợp cho mô nuôi cấy là 1500-2500 lux.

- Nhiệt độ:

Nhiệt độ phòng nuôi cấy mô tế bào thích hợp ở 24-26⁰C

- Ẩm độ:

Dưới 50% (độ ẩm tương đối)

II. Chuẩn bị mẫu

Chọn cây làm vật liệu vào mẫu phải kỹ lưỡng, đúng giống, cây mẹ phải là cây có thể sinh trưởng, phát triển khỏe, thường lấy mẫu là cây non, có từ 2-4 đốt (đã tách rụng bẹ lá, lộ 2 đến 4 lóng). Lấy mẫu vào lúc trời nắng, khô ráo, sau khi lấy mẫu cần vào mẫu ngay, tránh để qua đêm. Nếu phải để qua đêm thì cần phải rửa sạch mẫu, bọc nilon kín và bảo quản trong ngăn mát tủ lạnh (khoảng 8⁰C)

Mẫu thu về rửa sạch, lau lại bằng cồn 70⁰, sau đó lau khô và đưa vào phòng cấy.

III. Cách đưa mẫu cây vào ống nghiệm:

- Có 2 cách vào mẫu:

1. Vào mẫu từ đỉnh sinh trưởng, không qua mô sẹo

- Khử trùng mẫu trước khi cấy vào ống nghiệm: dùng cồn 70⁰ lau toàn bộ mẫu. Bóc bẹ quá già đi và lau sạch phần, cắt điểm hai bên và phần dài của bẹ Mía. Rửa tay bằng nước cất sau đó dùng cồn lau lại mẫu một lần nữa rồi đưa vào thực hiện trong buồng (tủ cấy vô trùng).

- Dùng tay bóc từng lớp bẹ một, khi bóc không được chạm tay vào đoạn mẫu để vào mẫu, bóc hết lớp vỏ bẹ bao bọc ngoài mắt mía.

- Dùng dao cắt lấy mắt Mía có đỉnh phần thịt Mía, kích thước 1cm x 1cm, hoặc đỉnh sinh trưởng dài khoảng 1 cm cấy vào bình đựng môi trường MS có bổ sung thêm chất điều tiết sinh trưởng. Nuôi bình trong phòng nuôi với nhiệt độ 26⁰c – 28⁰c, và ánh sáng đèn neon, cường độ ánh sáng 2000 – 2500 lux. Sau 2 – 3 tuần chồi đỉnh và mắt mía mọc thì chuyển sang giai đoạn nhân chồi.

Môi trường nuôi cấy: MS + + thạch 7 g/l + 2 mg/l BAP + 0,1 mg/l kinetin + 30 g đường + 0,1 g than hoạt tính + nước dừa 100 ml/l

2. Vào mẫu qua giai đoạn mô sẹo:

- Khử trùng mẫu trước khi cấy vào ống nghiệm: dùng cồn 70⁰ lau toàn bộ mẫu. Bóc bẹ quá già đi và lau sạch phần. Rửa lại bằng nước cất sau đó dùng cồn lau lại mẫu một lần nữa rồi đưa vào trong phòng để cấy.

- Dùng tay bóc từng lớp bẹ một, khi bóc không được chạm tay vào đoạn mẫu để vào mẫu, bóc hết lớp vỏ bẹ già màu xanh và để lộ ra phần bẹ non màu trắng đường kính 0,5 -1 cm

- Cắt từng đoạn bẹ non, kích thước dài 0,6-1 cm, sau đó chẻ đôi và cấy vào môi trường tạo mô sẹo

- Môi trường tạo mô sẹo: MS + + thạch 7 g/l + 2 mg/l 2,4 D + 30 g đường + nước dừa 100 ml/l

- Bảo quản trong hộp kín, tối, không có ánh sáng, nhiệt độ 26⁰c – 28⁰c

- Sau 3 – 4 tuần mô sẹo được hình thành thì chuyển sang giai đoạn tái sinh chồi.

III. Giai đoạn tái sinh chồi và nhân nhanh

1. Tái sinh mô sẹo (áp dụng cho trường hợp vào mẫu qua mô sẹo)

- Sau khi vào mẫu 3 – 4 tuần, mô sẹo được hình thành thì chuyển sang giai đoạn tái sinh chồi. Lấy mô sẹo ra khỏi bình, cắt bỏ phần bẹ không tạo được mô sẹo, lấy các mô sẹo khô, màu trắng xanh không bị thâm ướt và cấy chuyển vào môi trường tái sinh cây.

Môi trường tái sinh cây: MS + + thạch 7 g/l + 2 mg/l BAP + 0,1 mg/l kinetin + 30 g đường + 0,1 g than hoạt tính + nước dừa 100 ml/l

Sau khoảng 3-4 tuần, từ các mô sẹo hình thành các cụm chồi, ta cấy chuyển sang môi trường nhân nhanh cụm chồi, môi trường này giống môi trường tái sinh cây

2. Giai đoạn nhân nhanh chồi

Chồi được phát triển từ mắt, đỉnh sinh trưởng của mía sau 3-4 tuần khi cho vào mẫu vào đã ra lá non, ta chuyển sang môi trường nhân nhanh. Khi cấy chuyển ta bóc phần bẹ lá già, cạo bỏ phần biểu bì hình thành xung quanh gốc chồi và cấy vào môi trường nhân nhanh.

Các cụm chồi hình thành từ mô sẹo cũng được cấy vào môi trường này.

Môi trường tái sinh cây: MS + + thạch 7 g/l + 2 mg/l BAP + 0,1 mg/l kinetin + 30 g đường + 0,1 g than hoạt tính + nước dừa 100 ml/l

Điều kiện phòng nuôi: nhiệt độ 26⁰C – 28⁰C, cường độ ánh sáng 2000 – 2500 lux.

Sau khoảng 2-3 đợt nhân, thì ta chuyển sang môi trường ra rễ. Chú ý giai đoạn này không nên nhân nhiều lần làm ảnh hưởng đến quá trình hình thành rễ và làm tăng tỷ lệ biến dị cho giống.

IV. Giai đoạn tái sinh rễ để tạo cây con hoàn chỉnh.

Các cụm chồi được tách thành các cụm chồi nhỏ từ 2-5 chồi/cụm và cấy chuyển sang môi trường ra rễ

Môi trường ra rễ: MS + NAA 2 mg/l + thạch 7 g/l + đường 30 g/l + than hoạt tính 0,2 g/l, 100 ml/l nước dừa

Sau 20 ngày cấy cây có chiều cao 10 cm, có 3-5 rễ, chiều dài rễ đạt 3 – 5cm và rễ có màu vàng nhạt thì kết thúc nuôi cây trong ống nghiệm.

Trước khi cấy chuyển ra vườn ươm, cần chuyển cây ra nhà lưới có mái che từ 7-10 ngày, không để ánh sáng trực xạ chiếu để huấn luyện cây

Sau 1 tháng tái sinh rễ để tạo cây con hoàn chỉnh, có thể chuyển cây ra giâm ngoài vườn ươm.

B. Quy trình chăm sóc cây mía nuôi cấy mô ngoài vườn ươm

Dùng đất bãi phù sa sông trộn với cát theo tỉ lệ 3 đất: 1 cát bổ sung phân chuồng mục (nếu không có thì thay bằng phân hữu cơ vi sinh), trấu hun

Trước khi trồng nên xử lý nền đất giâm để trừ dế, giun, sâu xám...

Đổ đất đã chuẩn bị trên thành luống rộng 1,2m, độ dày lớp đất mặt luống 15 – 20 cm, thoát nước tốt.

Nếu trồng trong bầu thì sử dụng túi bầu kích thước 8 x 10cm, xếp bầu thành từng luống rộng 1,0-1,2 m

Các cây Mía được tạo trong ống nghiệm dùng panh lấy ra rửa sạch bộ rễ, rửa sạch thạch bám vào rễ, không được làm thương tổn đến bộ rễ

Cấy cây mía vào luống đã chuẩn bị với mật độ 100 cây/ 1m², hoặc trồng trực tiếp vào bầu, sau khi cấy phun nước đủ ẩm cho luống cây.

Khi giâm xong, phun thuốc trừ nấm, vi khuẩn: Kasuran hoặc Kasai, sau 02 ngày phun nhắc lại

Chế độ chăm sóc sau khi cấy: Trong 10 ngày đầu thường xuyên phun ẩm cho cây 6-8 lần/ngày và che sáng cho luống cây bằng lưới che râm với độ che sáng 80%. Nếu về mùa mưa rào phải làm mái che mưa. Sau 15 ngày bỏ dần lưới che râm để tỉ lệ che sáng 50%, giảm dần số lần tưới nước trong một ngày và tăng lượng nước tưới trong một lần.

Sau một tháng bỏ lưới che râm và mái che mưa đi. Sau khi ra ngôi 15 ngày có thể dùng phân bón qua lá (Kumix, Grown...) liều lượng theo hướng dẫn trên bao bì hoặc tưới phân hỗn hợp NPK hoà tan 100g phân với 10 lít nước tưới cho 10m². Cứ 1 tuần phun hoặc tưới phân một lần và tăng dần lượng phân bón. Khi cây được 1,5 tháng ngừng tưới phân, giảm tưới nước.

Đối với trường hợp giâm trực tiếp lên luống thì sau ra vườn ươm 20 ngày thì có thể cấy chuyển vào bầu.

Sau khi ra ngôi được 1,5-2 tháng, cây mía nuôi cấy mô có chiều cao 25cm – 40 cm đạt tiêu chuẩn trồng sẽ chuyển ra ruộng để trồng, gọi là gia đoạn ruộng giống siêu nguyên chủng

C. Quy trình trồng trọt hai giống mía nuôi cấy mô ngoài ruộng

I. Giống mía:

Tiêu chuẩn cây con nuôi cấy mô:

- Cây giống được ươm trong bầu, cao khoảng 30-40 cm, có từ 4-6 lá trở lên, sinh trưởng khỏe, sạch sâu bệnh, không dập nát, vỡ bầu

- Trước khi trồng có thể cắt 1/3 chiều dài lá để chống thoát hơi nước và thuận tiện cho vận chuyển, trồng và chăm sóc.

II. Thời vụ:

- Miền Bắc trồng tốt nhất từ tháng 2 đến tháng 5,
- Miền Nam từ tháng 3 đến tháng 6.

III. Chuẩn bị đất:

3.1. Chọn đất:

Mía là loại cây công nghiệp khoẻ, dễ tính, không kén đất, vậy có thể trồng mía trên nhiều loại đất khác nhau, từ 70% sét đến 70% cát. Đất thích hợp nhất cho mía là những loại đất xốp, tầng canh tác sâu, có độ phì cao, giữ ẩm tốt và dễ thoát nước. Nhưng cây mía thích hợp nhất trên đất phù sa cát có độ pH = 4 – 8.

3.2. Làm đất:

- Đất cày và bừa 2 - 3 lần, cày sâu 30 - 35 cm, bừa phẳng rộng, dọn sạch cỏ, rạch thành rãnh, rãnh sâu 30cm, rộng 30-40 cm, khoảng cách giữa các rãnh 1,0 - 1,2m.

- Đối với đất đòi thiết kế hàng mía theo đường đồng mức; nên làm đất trước khi trồng khoảng 1 tháng để cho đất có thời gian phơi ải diệt nguồn sâu bệnh.

- Xử lý đất để chống sâu xám, con sùng (sâu non bọ hung) bằng thuốc Padan hoặc Vibasu bột (Basudin) rắc đều lên bề mặt luống để xử lý đất.

IV. Mật độ, khoảng cách và cách trồng:

- *Mật độ*: Tùy theo điều kiện đất đai và giống mía để bố trí mật độ, đảm bảo mật độ 20.000 cây mía nuôi cấy mô/ha

- *Khoảng cách*: khoảng cách cây x cây 50 cm

- *Cách trồng*:

Trước khi trồng cần bóc bỏ túi bầu, bóc cẩn thận không làm vỡ bầu, trồng thành 2 hàng so le dọc theo rãnh, lấp đất kín bầu, cách mặt túi bầu 2-3 cm. Đất cần nén chặt vừa phải xung quanh bầu. Nếu có điều kiện nên tưới ẩm sau khi trồng và sử dụng nilon che phủ để giữ ẩm và hạn chế cỏ dại cho mía.

V. Chăm sóc:

5.1. Bón phân:

- *Lượng phân*:

+ Phân hữu cơ: 20-25 tấn/ha (phân chuồng hoai mục) Nếu là phân hữu cơ vi sinh thì tùy từng loại phân mà liều lượng bón theo khuyến cáo của nhà sản xuất.

+ Vôi bột: 500 - 1.000kg.

+ Urê: 500 - 700kg.

+ Super lân: 800 - 1.000 kg.

+ Clorua kali 500 - 600kg.

Lưu ý: Nếu dùng phân NPK thì giảm lượng phân đơn tương ứng.

- *Cách bón*:

+ Bón lót: Vôi được rải trên mặt ruộng trước khi cày bừa lần cuối; toàn bộ phân chuồng (hoặc phân hữu cơ vi sinh), phân lân, 1/3 lượng phân đạm, lượng phân kali bón theo rạch trước khi trồng.

+ Bón thúc lần 1: 1/3 lượng phân đạm sau thời kỳ mía có 4 - 5 lá.

+ Bón thúc lần 2: 1/3 lượng đạm, 1/2 lượng kali còn lại khi mía kết thúc đẻ nhánh (9 - 12 lá).

5.2. Tưới nước.

- Cây mía nuôi cấy mô giai đoạn đầu rất cần có chế độ tưới nước đặc biệt. Có thể dùng nilon che phủ bề mặt luống để hạn chế thoát hơi nước và cỏ dại. Khi trồng xong phải tưới ngay và phải đảm bảo độ ẩm đất liên tục trong vòng 01 tháng sau khi trồng khi cây mía bén rễ và ra lá mới.

- Sau đó bảo đảm độ ẩm thường xuyên như cây mía trồng bằng hom

5.3. Làm cỏ, xới xáo và vun gốc:

- Sau trồng tiến hành kiểm tra thường xuyên, giai đoạn này mía hay bị sâu xám phá hoại gây làm chết cây, vì vậy khi mía khoảng 1-2 tuần cần tiến hành kiểm tra, dặm những

chỗ mát khoảng bằng cây mía dự phòng, khi dặm đảm bảo chế độ chăm sóc như ban đầu để mía dặm sinh trưởng bình thường như các cây khác.

- Sau trồng 30-40 ngày cần làm cỏ, xới và vun gốc cùng với 2 lần bón phân thúc kết hợp với xới xa gốc khi bón lần 1. Xới sâu, xới gần gốc khi bón thúc lần 2. Khi mía trên 12 lá xới xa gốc, dọn sạch cỏ dưới vòng. Nếu có điều kiện kết hợp tưới đủ ẩm cho mía để đạt năng suất cao.

VI. Phòng trừ sâu bệnh:

- Khi cây con mới trồng thường bị sâu xám phá hoại, chúng thường phá hoại vào sáng sớm gây khuyết cây vì vậy có thể bắt bằng cách dạy sớm (5h sáng) hoặc xử lý đất trước khi trồng

- Các đối tượng dịch hại chủ yếu là: Rệp bông trắng, bọ hung đục gốc, sâu đục thân, bệnh than đen, bệnh trắng lá.

- Biện pháp phòng trừ: Dùng giống kháng bệnh, áp dụng biện pháp quản lý dịch hại tổng hợp (IPM), khi sâu bệnh đến ngưỡng gây hại thì sử dụng thuốc hoá học theo nguyên tắc 4 đúng.

+ Sâu đục thân dùng thuốc Padan nồng độ 0,1% tưới vào mầm cây bị sâu hại.

+ Rệp hại lá: Nên bóc lá rệp kịp thời thu gom lại để tiêu huỷ. Dùng 1 trong các loại thuốc Bassa nồng độ 0,1% Sumicidin nồng độ 0,2%, Supracide nồng độ 0,15 - 0,2%, Desis nồng độ 0,2%... để phun lên lá.

+ Bọ hung cắn rễ và mối hại gốc: Dùng Padan bột rắc 2 bên rãnh mía rồi lấp đất. Lượng thuốc 10kg/ha. Dùng Terbufos với lượng 30kg/ha được rắc xuống rãnh mía trước khi trồng. Đối với mía gốc, sau khi mưa xới đất sâu 15cm và rắc Terbufos quanh gốc mía, rồi lấp lại.

+ Phá hết các tổ mối khi làm đất.

VII. Thu hoạch:

Mía nuôi cấy mô sinh trưởng phát triển khỏe, đặc biệt chúng đẻ rất nhiều nhánh, nhưng cây nhỏ hơn trồng hom nên vụ mía đầu chủ yếu thu hoạch sử dụng làm giống. Không nên thu hoạch mía quá già làm giảm chất lượng hom giống. Thường khi ruộng mía đạt 6-7 tháng tuổi có thu hoạch làm giống.

Mục đích của vườn giống nuôi cấy mô là nhân giống ban đầu (siêu nguyên chủng), để từ đó tạo ra giống nguyên chủng, tạo giống cấp I và giống thương phẩm. Khi cây 7 - 8 tháng tuổi, chặt lấy hom trồng tiếp và chăm sóc để lấy giống gốc

Nếu thu hoạch để chế biến: thu hoạch mía đủ độ chín (chữ đường > 10 CCS). Thu hoạch xong vận chuyển và đưa vào chế biến trong vòng 24 giờ để đảm bảo hàm lượng đường trong mía không bị hao hụt.