

QUY TRÌNH PHỤC TRÁNG, NHÂN NHANH VÀ LƯU GIỮ CÂY KHOAI LANG BẰNG NUÔI CÂY INVITRO

Phương pháp nuôi cấy invitro từ đỉnh sinh trưởng được sử dụng trong phục tráng tạo giống cây sạch bệnh, nhân nhanh các giống khoai có triển vọng và sử dụng trong công tác bảo tồn nguồn gen, đó là bảo tồn in-vitro.

1. Chọn mẫu

- Chọn những cây có thân khoẻ mạnh, không sâu bệnh, có nhiều chồi bên.
- Có thể dùng phương pháp nhân giống trên cát vô trùng để tạo nguyên liệu sạch cho nuôi cấy, khi đó việc khử trùng sẽ đơn giản hơn.
- Nên chọn ngày thời tiết khô ráo để lấy mẫu, tránh ngày mưa, nồm, độ ẩm không khí cao.

2. Khử trùng mẫu

- Sau khi rửa mẫu dưới vòi nước chảy, cho mẫu vào trong bình sạch đầy đĩa petri lên cho đến khi khử trùng bề mặt.
- Khử trùng bề mặt, thao tác được thực hiện trong bốc cấy vô trùng:
 - + Đưa mẫu ra đĩa sau đó xử lý với cồn 70 % trong vòng 1 phút
 - + Khử trùng trong canxihypoclorid 2,5 % trong 10 phút, hoặc HgCl₂ trong 5 phút.
 - + Rửa lại 3 lần bằng nước cất vô trùng.
- Trước khi tách đỉnh sinh trưởng mẫu được đưa vào dung dịch acid ascorbic 100 ppm nhằm giảm sự tạo thành hợp chất phenol của mẫu khi nuôi cấy.

3. Tách đỉnh sinh trưởng

- Đỉnh sinh trưởng được tách trong điều kiện vô trùng
- Mẫu sau khi khử trùng được đặt dưới kính hiển vi soi nổi (Sterio Microscop)
 - Sử dụng kim hoặc dao nhỏ tách loại bỏ những phần xung quanh đỉnh sinh trưởng, chỉ để lại 2-3 lá mầm non sát đỉnh sinh trưởng.
 - Kích thước đỉnh tối ưu là 0,6mm
 - Đỉnh sinh trưởng sau khi tách sẽ được đưa vào môi trường nuôi cấy

4. Đưa mẫu vào môi trường nuôi cấy

- Môi trường nuôi cấy dựa trên môi trường cơ bản MS và B₅ có bổ sung thêm một số chất điều hoà sinh trưởng
- Đỉnh sinh trưởng sau khi tách dưới kính hiển vi được đưa vào môi trường nuôi cấy MS-1

+ Công thức môi trường:

- + Môi trường cơ bản MS
- + Calcium panthotenate 2mmg/l
- + Gibberellic acid (GA₃) 20 mmg/l
- + Ascorbic acid (Vitamin C) 100 mmg/l
- + Thiamin (VTM B1) 20 mmg/l

| | |
|------------------|-----------|
| + L-Arginine | 100 mmg/l |
| + Nước dừa | 100 ml/l |
| + Than hoạt tính | 1 g/l |
| + Sucrose | 50 g/l |
| + Agar | 7 g/l |
| + pH | 5,8 |

- Điều kiện phòng nuôi: Nhiệt độ: 25-28°C, thời gian chiếu sáng: 12-14h/ngày, cường độ ánh sáng 2000-2500 lux.

- Sau khoảng 2-3 tuần nuôi cấy, mầm khoai bắt đầu phát triển, lúc này có thể chuyển sang giai đoạn nhân nhanh

5. Nhân nhanh invitro

- Công thức môi trường:

| | |
|---------------------------------------|-----------|
| + Môi trường cơ bản MS | |
| + Calcium panthotenate | 2mmg/l |
| + Gibberellic acid (GA ₃) | 10 mmg/l |
| + Ascorbic acid (Vitamin C) | 100 mmg/l |
| + Thiamin (VTM B1) | 20 mmg/l |
| + L-Arginine | 100 mmg/l |
| + Nước dừa | 100 ml/l |
| + Than hoạt tính | 1 g/l |
| + Sucrose | 50 g/l |
| + Agar | 7 g/l |
| + pH | 5,8 |

- Sau 6-8 tuần tùy theo mục đích sử dụng mà cây con có thể được chuyển sang nhân tiếp hoặc chuyển sang môi trường nghèo dinh dưỡng để duy trì giống hoặc chuyển sang giai đoạn tái sinh rễ, tạo cây con hoàn chỉnh.

6. Tái sinh rễ, tạo cây con hoàn chỉnh

- Để tái sinh thành cây hoàn chỉnh, các chồi invitro sẽ được cắt ra thành các đoạn nhỏ, mỗi đoạn chứa 1-2 mắt (chồi nách). Sau đó, đưa chúng vào môi trường tái sinh rễ.

+ Công thức môi trường:

| | |
|---------------------------------------|-----------|
| + MS | |
| + Calcium panthotenate | 2mmg/l |
| + Gibberellic acid (GA ₃) | 15 mmg/l |
| + Ascorbic acid (Vitamin C) | 100 mmg/l |
| + Thiamin (VTM B1) | 20 mmg/l |
| + L-Arginine | 100 mmg/l |
| + Nước dừa | 100 ml/l |
| + Than hoạt tính | 1 g/l |
| + Sucrose | 50 g/l |

- + Agar 7 g/l
- + pH 5,8

- Sau 6-8 tuần khi cây con phát triển nhiều rễ, tạo cây hoàn chỉnh có thể được đưa ra nhà kính hoặc vườn ươm để huấn luyện trong 7-10 ngày sau đó chuyển cây con ra bầu đất.

7. Lưu giữ In vitro

- Để lưu giữ in vitro, cây con sẽ được chuyển sang môi trường cơ bản MS nghèo dinh dưỡng,

+ Công thức môi trường:

- + MS
- + Calcium panthotenate 2mmg/l
- + Gibberellic acid (GA₃) 5 mmg/l
- + Ascorbic acid (Vitamin C) 100 mmg/l
- + L-Arginine 100 mmg/l
- + Sucrose 20 g/l
- + Agar 7 g/l

- Điều kiện phòng nuôi: Nhiệt độ: 15-18°C, thời gian chiếu sáng: 8/ngày, cường độ ánh sáng 1200-1500 lux.

- Có thể bổ sung một số chất ức chế sinh trưởng như ABA, CCC (chlorocoline chloride) để kéo dài thời gian cây chuyển từ 6-12 tháng .

8. Giai đoạn 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 đóng bầu nên xử lý nền đất giâm để trừ dế, giun, sâu xám...

Sử dụng túi bầu kích thước 8 x 10cm, xếp bầu thành từng luống rộng 1,0-1,2 m.

Dùng panh lấy cây con in vitro trong ống nghiệm, rửa sạch thạch bám vào rễ, không được làm thương tổn đến bộ rễ

Cấy cây con in vitro vào bầu, sau khi cấy phun nước đủ ẩm cho luống cây.

Khi trồng 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 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 giai đoạn ruộng giống siêu nguyên chủng