

# HẢI DƯƠNG: Ứng dụng công nghệ nuôi cấy mô tế bào thực vật trong nhân giống tỏi chất lượng cao

Nguyễn Thị Quỳnh Mai

Trung tâm Ứng dụng khoa học công nghệ và khảo nghiệm giống tỉnh Hải Dương

Mới đây, tỉnh Hải Dương đã đạt được những kết quả nghiên cứu ban đầu khả quan về việc tạo ra và nhân giống cây tỏi sạch bệnh, hứa hẹn tiềm năng lớn trong cung cấp nguồn giống tỏi chất lượng cao cho địa phương. Đây là kết quả chuyển giao công nghệ giữa các nhà khoa học của Viện Sinh học nông nghiệp - Học viện Nông nghiệp Việt Nam với Trung tâm Ứng dụng khoa học công nghệ và khảo nghiệm giống tỉnh Hải Dương, nhằm giải quyết vấn đề thực tiễn trong nhân giống nuôi cấy mô tế bào thực vật (*in vitro*) làm sạch virus bằng phương pháp phân sinh đỉnh (meristem).

## Đặt vấn đề

Cây tỏi (*Allium sativum* L.) thuộc họ hành tỏi *Alliaceae*, có nguồn gốc từ châu Á và tây nam châu Âu, đặc biệt là vùng Địa Trung Hải (Thompson & Kelly, 1957). Tỏi không chỉ là đồ gia vị làm thức ăn thêm phần hấp dẫn và ngon miệng mà còn là vị thuốc chữa bệnh kỳ diệu của thiên nhiên. Nó được xem là một loại thực phẩm chức năng có giá trị hàng đầu trong việc chống oxy hóa, bảo vệ màng tế bào, giảm cholesterol, giảm huyết áp để phòng chống các bệnh tim mạch.

Hiện nay, tỏi được trồng rộng rãi ở nhiều nước trên thế giới, trong đó có Việt Nam. Với điều kiện tự nhiên thuận lợi, nhiều vùng chuyên canh tỏi ở các tỉnh, thành phố như Bắc Ninh, Vĩnh Phúc, Hà Nội, Hưng Yên, Hải Phòng, Quảng Ngãi, Phú Yên, Khánh Hòa, Ninh Thuận, Lâm Đồng, Hải Dương đã mang lại nguồn thu nhập đáng kể cho người dân.

Trong số 3 huyện trồng tỏi chính của tỉnh Hải Dương (Kinh Môn, Kim Thành và Nam Sách),



Hành tỏi Kinh Môn đã trở thành đặc sản nông nghiệp, giúp người dân địa phương làm giàu.

Kinh Môn có vùng chuyên canh hành, tỏi lớn nhất và được coi là vừa hành, tỏi lớn nhất miền Bắc nước ta. Trong những năm qua, đã có nhiều doanh nghiệp trong và ngoài nước đến thu mua và đánh giá cao về chất lượng sản phẩm hành, tỏi được sản xuất tại đây. Huyện cũng đã thành lập nhiều cơ sở sản xuất, chế biến tỏi với nhiều sản phẩm được xuất khẩu sang Đài Loan, Nhật Bản...

Trong sản xuất tỏi ở nước ta hiện nay, giữ giống và nhân giống thường là bằng các nhánh tỏi (tép tỏi, căn tỏi). Củ tỏi thu từ vụ trước sẽ được bảo quản để làm giống cho vụ sau. Do thời gian bảo quản dài trong điều kiện tán xạ thông thường nên củ giống rất dễ bị hỏng vì biến động của nhiệt độ, độ ẩm và sâu bệnh, gây hao hụt về số lượng và giảm chất lượng giống. Hơn thế, do nhân giống vô tính từ vụ này sang vụ

khác, tỷ lệ giống nhiễm bệnh, đặc biệt là bệnh do virus ngày càng gia tăng. Đây là một trong những nguyên nhân chính dẫn đến việc giảm năng suất và chất lượng củ tỏi thương phẩm, gây khó khăn trong quá trình trồng trọt và làm giảm thu nhập của người sản xuất. Chính vì vậy, việc cung cấp nguồn giống tỏi sạch bệnh, chất lượng cao là nhu cầu cấp bách của các địa phương trồng tỏi trong cả nước.

Ở Việt Nam nói chung và tỉnh Hải Dương nói riêng, cây tỏi thường bị nhiễm virus, do đó ảnh hưởng rất nhiều đến năng suất (có thể bị giảm 15-50% do *potyvirus* LYSV, 39-60% do *potyvirus* OYDV và *potyvirus* SYSV - theo nghiên cứu của Vande Vlugt và cs, 1999). Hai loại virus LYSV và OYDV có thể nhiễm tới 20-30% số cây giống và 10-20% số cây giống có thể ẩn chứa triệu chứng, có ruộng nhiễm nặng tới 80%. Đặc biệt, đến nay vẫn chưa có thuốc bảo vệ thực vật đặc trị các bệnh do virus mà mới chỉ diệt được côn trùng trung gian lan truyền bệnh.

Để khắc phục tình trạng nhiễm virus trong quá trình sản xuất tỏi, biện pháp tốt nhất là áp dụng công nghệ nuôi cấy mô tế bào từ đỉnh sinh trưởng để nhân giống cây tỏi. Đây là công nghệ tiên tiến đã được nhiều nhà khoa học trên thế giới nghiên cứu, ứng dụng, như: Rabinowitch & Brewster (1990), Ayuso & Pena-Iglesias (1981), Bhojwani (1980). Ở Việt Nam, các tác giả Nguyễn Thị Thanh Phương, Nguyễn Thị Lý Anh (2012) cũng đã áp dụng phương pháp nuôi cấy meristem để làm sạch virus cho cây tỏi. Mới đây, tỉnh Hải Dương đã có một số kết

quả nghiên cứu ban đầu về việc tạo ra và nhân giống cây tỏi sạch bệnh, hứa hẹn những tiềm năng trong việc giải quyết vấn đề cung cấp nguồn giống tỏi sạch bệnh.

### **Một số kết quả nghiên cứu về ươm tạo và nhân giống *in vitro* cây tỏi sạch virus ở Hải Dương**

Các chuyên gia của Viện Sinh học nông nghiệp - Học viện Nông nghiệp Việt Nam đã trực tiếp chuyển giao công nghệ và đào tạo cho cán bộ của Trung tâm Ứng dụng khoa học công nghệ và khảo nghiệm giống tỉnh Hải Dương kỹ thuật nhân giống nuôi cấy mô tế bào thực vật (*in vitro*) làm sạch virus bằng phương pháp phân sinh đỉnh (meristem). Các thí nghiệm thực hiện trên củ (tép) tỏi giống thu thập tại huyện Kinh Môn, được bố trí ngẫu nhiên, nhắc lại 3 lần, tiến hành tại Phòng thí nghiệm công nghệ sinh học - Trung tâm Ứng dụng khoa học công nghệ và khảo nghiệm giống và Viện Sinh học nông nghiệp - Học viện Nông nghiệp Việt Nam.

### **Các nghiên cứu tiền đề áp dụng làm sạch virus cho cây tỏi**

Để tìm hiểu về khả năng tái sinh chồi của meristem mà sạch virus, chúng tôi tiến hành cắt các meristem với các kích thước khác nhau nhằm tìm ra kích thước meristem thích hợp nhất để có tỷ lệ mẫu sống cao và mô nuôi cấy sinh trưởng tốt nhất mà sạch bệnh virus. Meristem được cắt với 2 loại kích thước <0,5 mm và 0,5-1,0 mm rồi cấy vào môi trường tái sinh chồi. Số mẫu tách mô phân sinh đỉnh lấy ngẫu nhiên được gửi đi kiểm tra tại Trung tâm Nghiên cứu bảo vệ sức khỏe cây trồng và vật nuôi (Trâu Quỳ, Gia Lâm, Hà Nội) cho kết quả đạt 100% sạch virus. Những mẫu đã kiểm tra

sạch virus sẽ được đánh dấu làm mẫu đầu dòng để dùng cho các thí nghiệm tiếp theo tạo nguồn giống sạch bệnh.

### **Nghiên cứu nhân nhanh cây tỏi sạch virus**

Chồi tỏi tái sinh từ tách meristem sau khi được đánh số phân dòng và kiểm tra sạch virus bằng phương pháp RT-PCR đã tìm ra được 3 dòng sạch bệnh cho vào nuôi cấy trong môi trường MS 2-3 chu kỳ (mỗi chu kỳ 3 tuần) cho cây sinh trưởng và phát triển tốt. Sau đó, cây *in vitro* 4 tuần tuổi được sử dụng làm vật liệu nghiên cứu cho các thí nghiệm nhân nhanh. Trong các thí nghiệm này, sử dụng các chất điều hòa sinh trưởng thực vật có nồng độ khác nhau để kích thích tạo nhiều chồi nhằm đáp ứng các yêu cầu tạo ra hệ số nhân cao, chồi sinh trưởng, phát triển tốt nhất. Nhân nhanh chồi là công đoạn có ý nghĩa hết sức quan trọng đối với việc tạo ra số lượng lớn cây con *in vitro*. Các chất điều tiết sinh trưởng thực vật như BA, NAA và Kinetin thường được bổ sung kết hợp để giúp tăng hệ số nhân chồi (S.D. Huidrom, et al., 2013).

### **Nghiên cứu tạo củ tỏi *in vitro* sạch bệnh virus**

Chọn những chồi tỏi khỏe mạnh và thân to, có chiều cao 5-7 cm, sau 2 chu kỳ nuôi cấy (mỗi chu kỳ 3 tuần) để sử dụng cho thí nghiệm nghiên cứu tạo củ tỏi *in vitro*. Củ *in vitro* là dạng củ bi siêu nhỏ có thể lưu trữ trong khoảng thời gian lâu hơn, việc xử lý và vận chuyển dễ dàng hơn so với cây con, do vậy là một vật liệu nhân giống lý tưởng. Chúng có thể được gieo trực tiếp vào đất và có thể được sản xuất với số lượng lớn trong bất cứ mùa

nào. Với đặc điểm hình thái học và sinh hóa tương tự như củ được sản xuất ngoài đồng ruộng, số lượng và kích thước của củ bị được sản xuất ra phụ thuộc vào nhiều yếu tố, như: nồng độ tối ưu của đường, chất kích thích sinh trưởng, các chất kìm hãm sinh trưởng trong môi trường nuôi cấy.

Theo nghiên cứu của Dantu và Bhojwani (1995), nồng độ đường cao trong môi trường giúp tăng khả năng tích lũy tinh bột trong củ, ở nồng độ thấp thì khả năng tích lũy tinh bột thấp, dẫn đến khả năng tạo củ hạn chế, trọng lượng củ thấp. Do đường là nguồn cacbon có ảnh hưởng nhiều nhất trong quá trình tăng trưởng củ *in vitro* nên chúng tôi đã tiến hành thí nghiệm với các nồng độ đường khác nhau. Kết quả cho thấy, công thức MS + 120 g/l đường sucrose tạo củ tối *in vitro* tốt nhất cho giống tỏi trắng Hải Dương với tỷ lệ mẫu tạo củ đạt 100% và khối lượng củ tươi 0,89 g sau 4 tuần nuôi cấy.

**Nghiên cứu giai đoạn ươm trồng củ tỏi *in vitro***

Công đoạn ra cây sau *in vitro* có tầm quan trọng quyết định thành công của quy trình nhân giống bằng công nghệ nuôi cấy mô tế bào và đánh giá khả năng ứng dụng của sản phẩm nuôi cấy mô vào thực tiễn sản xuất. Để xây dựng được quy trình kỹ thuật sau *in vitro* cho củ tỏi *in vitro*, có rất nhiều vấn đề cần được giải quyết như: nhiệt độ, thời tiết, đất đai giá thể, sâu bệnh, chế độ dinh dưỡng và đặc biệt với giống tỏi còn phụ thuộc vào thời vụ trồng. Bên cạnh đó, kích cỡ củ *in vitro* cũng có ảnh hưởng rất lớn đến sức đề kháng và sự sinh trưởng, phát triển của củ. Vì vậy, ở công

đoạn này, yếu tố quan trọng nhất là xác định được kích thước củ *in vitro* cũng như thời điểm trồng củ *in vitro* thích hợp.

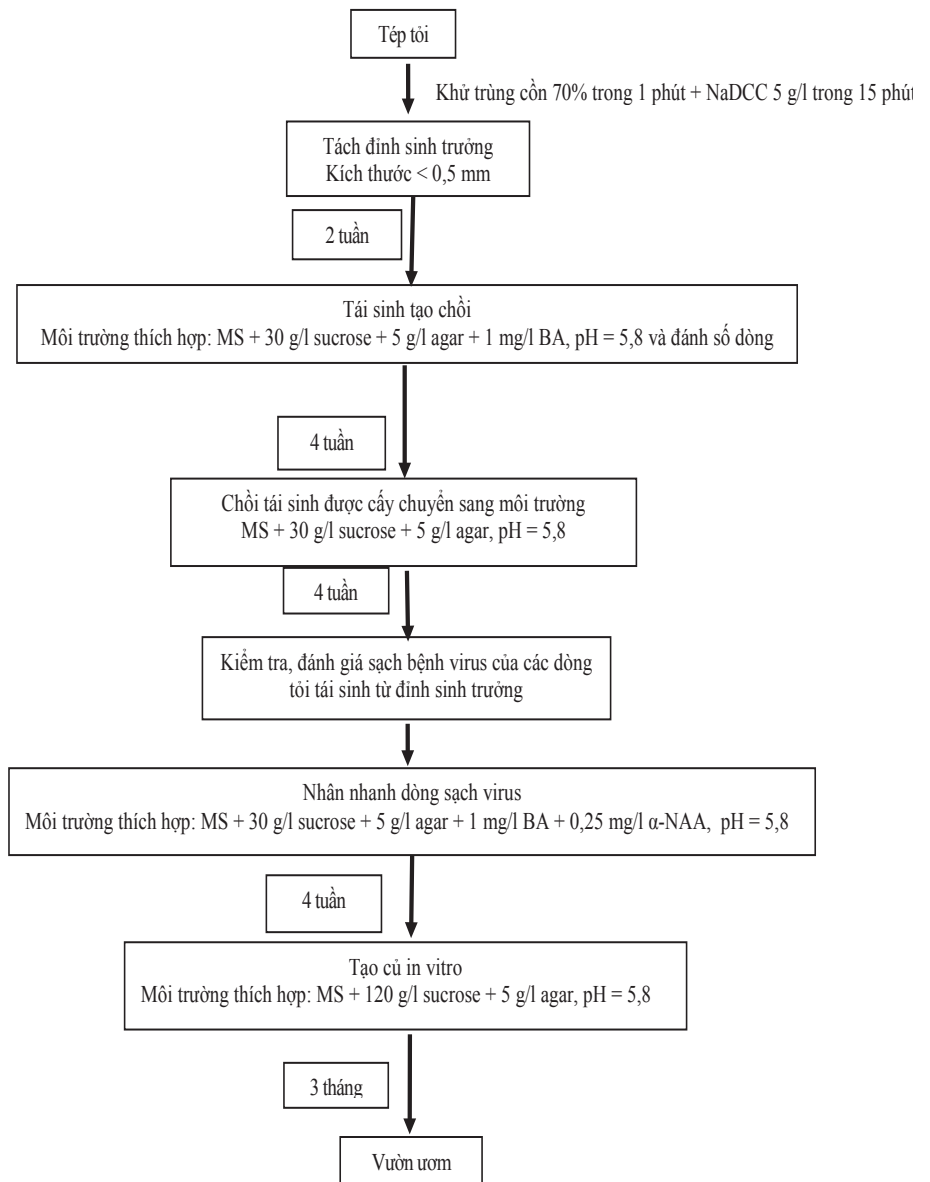
**Đề xuất sơ đồ quy trình nhân giống *in vitro* cây tỏi Hải Dương sạch virus**

Từ nghiên cứu thực tiễn, chúng tôi đề xuất sơ đồ quy trình nhân giống *in vitro* cây tỏi Hải Dương sạch virus như sau:

**Kết luận và một số khuyến nghị**

Căn cứ vào kết quả nghiên cứu thực tiễn, chúng tôi đưa ra một số kết luận sau:

1. Đã tạo được cây tỏi Kinh Môn - Hải Dương sạch virus khi nuôi cấy meristem có kích thước <0,5 mm trên môi trường: MS + 30 g/l sucrose + 1 mg/l BA. Tỷ lệ cây sạch Potyvirus đạt 100% đối với các mẫu kiểm tra ngẫu nhiên bằng kỹ thuật RT-PCR.



2. Môi trường thích hợp để nhân nhanh chồi *in vitro* tối là: MS + 1,0 mg/l BA + 0,25 mg/l  $\alpha$ -NAA; đối với môi trường này, hệ số nhân đạt được là 3,24 và chồi sinh trưởng tốt nhất, đạt chiều cao 10,84 cm sau 4 tuần nuôi cấy.

3. Môi trường thích hợp nhất cho việc tạo củ tối *in vitro* là: MS + 120 g/l sucrose.

4. Kích thước và khối lượng củ *in vitro* càng lớn, sự sinh trưởng tại vườn ươm của cây mọc từ củ càng cao. Kích thước củ *in vitro* đủ tiêu chuẩn để đưa ra trồng tại vườn ươm là: đường kính 0,9-1,5 cm và khối lượng trung bình 0,89-1,42 g; thích hợp nhất khi đưa ra ngoài vườn ươm là củ *in vitro* có đường kính 1,5 cm và khối lượng trung bình 1,42 g.

Từ những kết quả nghiên cứu nêu trên, chúng tôi khuyến nghị:

- Ứng dụng các kết quả nêu trên để nuôi cấy đỉnh sinh trưởng của cây tỏi Hải Dương và nhân nhanh cây sạch virus nhằm tạo ra nguồn cây chất lượng cao phục vụ cho sản xuất giống.

- Ứng dụng những kết quả nghiên cứu nhân nhanh, tạo củ *in vitro*, trồng củ *in vitro* ngoài vườn ươm của giống tỏi Hải Dương để nghiên cứu mở rộng thêm ở các giống tỏi khác.

- Cần tiến hành các nghiên cứu đánh giá khả năng sinh trưởng, phát triển và năng suất của tỏi sạch virus ở các thế hệ tiếp theo để có thể thiết lập hệ thống sản xuất tỏi giống bắt nguồn từ cây nuôi cấy mô sạch bệnh.

- Cần nghiên cứu thời vụ trồng tỏi ở các thế hệ tiếp theo để giảm thời gian sản xuất giống

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

### Tiếng Việt

1. Nguyễn Thị Lý Anh (2005), “Sự tạo củ lily *in vitro* và sự sinh trưởng của cây lily trồng từ củ *in vitro*”, *Tạp chí Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp*, (5), tr.349-353.

2. Tạ Thu Cúc, Hồ Hữu An và Nghiêm Thị Bích Hà (2000), *Giáo trình cây rau*, NXB Nông nghiệp.

3. Trịnh Văn Hải (2007), *Nghiên cứu nuôi cấy meristem cây tỏi*, Khóa luận tốt nghiệp, Trường Đại học Bách khoa Hà Nội.

4. Vũ Triệu Mân và Lê Lương Tê (2001), *Giáo trình Bệnh cây nông nghiệp*, NXB Nông nghiệp.

5. Nguyễn Quang Thạch, Nguyễn Thị Lý Anh và Nguyễn Thị Phương Thảo (2005), *Giáo trình Công nghệ sinh học nông nghiệp*, NXB Nông nghiệp.

6. Nguyễn Quang Thạch, Nguyễn Thị Lý Anh, Nguyễn Xuân Trường (2004), *Ứng dụng công nghệ cao sản xuất khoai tây giống sạch bệnh*, Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn.

7. Nguyễn Thị Thanh Phương và Nguyễn Thị Lý Anh (2012), “Nghiên cứu làm sạch virus cho cây tỏi ta (*Allium sativum* L.) bằng nuôi cấy meristem”, *Tạp chí Khoa học và Phát triển*, 10(2), tr.244-255.

8. Bùi Huy Hiền (2014), “Kỹ thuật thâm canh bón phân cho tỏi đạt năng suất cao”, *Báo Dân Việt*, ngày 15/10/2014.

9. Nguyễn Thị Thu Hằng và cs (2015), “Ảnh hưởng của điều kiện ánh sáng và thành phần dinh dưỡng (đường, benzyl adenine, chlorocholine chloride) đến khả năng tạo củ bi khoai tây (*Solanum tuberosum* L.) trong nuôi cấy *in vitro*”, *Tạp chí Khoa học, Đại học Quốc gia Hà Nội: Khoa học tự nhiên và Công nghệ*, 31(3), tr.9-15.

### Tiếng Anh

1. B. Alizadeh, S.D. Royandazagh, K.M. Khawar, and S. Ozcan (2013), “Micropropagation of garlic chives (*Allium tuberosum* ROTTLEEX Sprang) using mesocotyl axis”, *The Journal of Plant Sciences*, 23(2), pp.543-549.

2. N.S. Arifin, O. Ykio, and O. Hiroshi (2000), “Genetic diversity in Indonesian shallot (*Allium cepa* var. *ascalonicum*) and *Allium x wakegi* reveal by RAPD marker and origin of *A. x wakegi* reveal by RFLP analyses of amplified chloroplast genes”, *Euphytica*, 111(1), pp.23-31.

3. E. Barg, D.E. Lesemann, and H.J. Vetten (1994), “Identification, partial characterization, and distribution of viruses infecting *Allium* crops in south and southeast Asia”, *Acta Hort.*, (358), pp.251-258.

4. L.N. Bos Huijberts, H. Huttinga, and D.Z. Maat (1978), “Leek yellow stripe virus and its relationships to onion yellow dwarf virus; characterization, ecology and possible control”, *Neth. J. Plant. Pathol.*, (84), pp.185-204.

5. S.D. Huidrom and I. Sanglakpam (2013), “High frequency plant regeneration system of *Aerides odorata* Lour, through foliar and shoot tip culture”, *Not. Bot. Horti Agrob.*, 41(1), pp.169-176.