

ỨNG DỤNG KỸ THUẬT NUÔI CẤY *IN VITRO* TRONG NHÂN GIỐNG LAN HOÀNG THẢO VÔI (*Dendrobium cretaceum* Lindley)

Nguyễn Văn Việt¹

TÓM TẮT

Vì nhân giống lan Hoàng thảo vôi (*Dendrobium cretaceum*) đã được nghiên cứu thành công. Kết quả nghiên cứu cho thấy, sát khuẩn bề mặt quả lan bằng ethanol 70% trong 2 phút, khử trùng bằng dung dịch HgCl₂ 0,1% trong 10 phút và nuôi cấy trên môi trường MS, cho tỷ lệ mẫu sạch là 94,7%, tỷ lệ mẫu phát sinh thể chồi là 90% với thời gian phát sinh chồi 20 ngày. Cảm ứng tạo đa chồi trên môi trường bổ sung 0,5 mg/l BAP, 0,3 mg/l NAA, 0,3 mg/l Kinetin, 100 ml/l dịch chiết khoai tây, 100 ml/l nước dừa, 30 g/l sucrose, 5 g/l agar cho hệ số nhân chồi cao nhất 12,3 sau 5 tuần nuôi cấy. Chồi ra rễ đạt 93,3%, số rễ trung bình đạt 4,1 rễ/cây và chiều dài rễ trung bình 3,6 cm khi nuôi trên môi trường MS bổ sung 0,2 mg/l IBA, 0,3 mg/l NAA, 100 ml/l dịch chiết khoai tây, 20 g/l sucrose sau 5 tuần nuôi cấy.

Từ khóa: *Dendrobium cretaceum*, Hoàng thảo vôi, cụm chồi, nuôi cấy mô, *in vitro*

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Lan Hoàng thảo vôi (*Dendrobium cretaceum*) phân bố ở nhiều quốc gia như Ấn Độ, Nepal, Myanmar, Thái Lan, Lào ở độ cao 1000 - 1800 mét so với mặt nước biển. Tại Việt Nam, lan Hoàng thảo vôi phân bố tự nhiên tại các tỉnh Nam Bộ là loài lan có hoa mọc thành chùm, rất đẹp và lâu tàn rất được ưa chuộng trên thị trường. Hiện nay, ngoài tự nhiên loài lan này rất hiếm do bị thu mua và khai thác tận diệt, khiến giá thành rất cao và trở thành loài hoa có giá trị thương mại lớn. Việc bảo tồn và nhân giống Hoàng thảo vôi là hết sức cần thiết.

Kỹ thuật nhân giống *in vitro* là phương pháp hiệu quả hiện nay với các ưu điểm như tạo được cây con trẻ hoá và sạch bệnh nên tiềm năng sinh trưởng, phát triển và năng suất cao, tạo số lượng cây lớn và chất lượng đảm bảo, đáp ứng nhu cầu sản xuất trên quy mô rộng (Vũ Ngọc Lan và *ctv.*, 2013).

Trên thế giới cũng như ở Việt Nam có nhiều nghiên cứu về nhân giống *in vitro* cây *Dendrobium* đã được thực hiện (Jaime A *et al.*, 2015; Lita Soetopo *et al.*, 2012; Sana Asghar *et al.*, 2011; Nguyễn Văn Kết và *ctv.*, 2010; Vũ Kim Dung và *ctv.*, 2016) nhưng các nghiên cứu về nhân giống lan trên còn rất hạn chế. Bài báo công bố kết quả nhân giống *in vitro* lan Hoàng thảo vôi đạt hiệu quả cao, góp phần vào công tác bảo tồn nguồn gen loài lan có giá trị thẩm mỹ cao này.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Vật liệu nuôi cấy là quả lan Hoàng thảo vôi (*Dendrobium cretaceum*) thu thập tại Đồng Nai, được lưu giữ tại vườn ươm Viện Công nghệ sinh

học Lâm nghiệp - Trường Đại học Lâm nghiệp Việt Nam.

Hóa chất dùng để khử trùng mẫu là dung dịch HgCl₂ 0,1%; NaClO 6%.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp nghiên cứu chung

Bố trí thí nghiệm theo phương pháp sinh học thực nghiệm, lặp lại 3 lần, mỗi lần lặp có dung lượng mẫu lớn (n ≥ 30), số liệu thu thập sau 5 tuần.

Điều kiện nuôi cấy: Chiếu sáng bằng đèn neon cường độ 2000 lux, 14 giờ/ngày; nhiệt độ phòng nuôi 24 ± 2°C. Môi trường nuôi cấy được chuẩn độ pH = 5,8; khử trùng môi trường ở 118°C, áp suất 1atm trong 17 phút.

2.2.2. Bố trí thí nghiệm

- Thí nghiệm 1: Ảnh hưởng của kỹ thuật khử trùng đến tạo mẫu sạch và tạo thể chồi

Quả lan được làm sạch, sau đó sát khuẩn bằng ethanol 70% trong 2 phút. Khử trùng mẫu bằng dung dịch HgCl₂ 0,1% (5 - 15 phút) và NaClO 6% (10 - 25 phút). Tách vỏ quả, trái hạt lên môi trường nuôi cấy khởi động là môi trường cơ bản MS bổ sung thêm 30 g/l sucrose, 7g/l agar.

- Thí nghiệm 2: Ảnh hưởng của môi trường dinh dưỡng đến nhân nhanh chồi

Dùng các môi trường khoáng: Knops, MS, WPM bổ sung 0,2 mg/l BAP, 30 g/l sucrose, 7 g/l agar, 100 ml/l dịch chiết khoai tây, 100 ml/l nước dừa.

- Thí nghiệm 3: Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến nhân nhanh chồi

Dùng môi trường khoáng MS bổ sung 0,3 - 0,6 mg/l BAP, 0,2 - 0,3 mg/l NAA và 0,1 - 0,6 mg/l

¹ Viện Công nghệ sinh học Lâm nghiệp, Trường Đại học Lâm nghiệp Việt Nam

Kinetin, 30 g/l sucrose, 7 g/l agar, 100 ml/l dịch chiết khoai tây, 100 ml/l nước dừa.

- Thí nghiệm 4: Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng ra rễ

Dùng môi trường khoáng MS bổ sung 0,1 - 0,4 mg/l IBA, 0,2 - 0,4 mg/l NAA, 20 g/l sucrose, 7 g/l agar, 100 ml/l dịch chiết khoai tây, 100 ml/l nước dừa.

2.2.3. Phương pháp xử lý số liệu

Xử lý số liệu theo phương pháp thống kê sinh học ứng dụng các phần mềm đã lập trình trên máy tính điện tử như Excel.

2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện tại phòng thí nghiệm Công nghệ tế bào thực vật - Viện Công nghệ sinh học Lâm nghiệp, Trường Đại học Lâm nghiệp Việt Nam, từ tháng 10 năm 2016 đến tháng 6 năm 2017.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Tạo mẫu sạch và tái sinh thể chồi *in vitro*

Trong quy trình kỹ thuật nhân giống cây trồng bằng phương pháp nuôi cấy *in vitro*, tỷ lệ mẫu sạch có khả năng tái sinh chồi có ý nghĩa rất quan trọng đối với các bước tiếp theo. Việc xác định công thức khử trùng tối ưu để nâng cao hiệu quả tạo mẫu sạch *in vitro* và khả năng nảy mầm của mẫu sạch. Môi trường nuôi cấy là môi trường khoáng cơ bản MS bổ sung 30 g/l sucrose, 7g/l agar để bảo mẫu. Kết quả thu được sau 4 tuần theo dõi được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Ảnh hưởng của hóa chất và thời gian khử trùng đến tạo mẫu sạch và nảy mầm

Loại hóa chất	Thời gian (phút)	Tỷ lệ mẫu sạch (%)	Tỷ lệ mẫu nảy mầm (%)	Thời gian nảy mầm (ngày)
HgCl ₂ 0,1%	5	83,3	80,0	20
	10	94,7	90,0	20
	15	100	66,7	30
NaClO 6%	15	76,7	66,7	20
	20	91,5	86,7	20
	25	100	30,0	25

Từ kết quả thu được (bảng 1), cho biết dùng dung dịch HgCl₂ 0,1% với thời gian khử trùng 5 - 15 phút và dung dịch NaClO 6% với thời gian 15 - 25 phút, tỷ lệ mẫu sạch tương đối cao, đạt giá trị từ 76 - 100%. Trong đó, ảnh hưởng của từng loại hóa chất đến kết quả khử trùng là rõ rệt khi bố trí thời gian khử trùng khác nhau. Khi tăng thời gian khử trùng thì tỷ lệ

mẫu sạch đều tăng, nhưng tỷ lệ mẫu nảy mầm có xu hướng giảm (đạt 30 - 90%), chứng tỏ hóa chất khử trùng có thể làm sạch mẫu nhưng đều là chất rất độc, nếu khử trùng lâu hóa chất sẽ ngấm vào mô thực vật sẽ làm hỏng hoặc gây độc, do đó hạt không thể nảy mầm (Lita Soetopo *et al.*, 2012). Với kết quả ở bảng trên, có thể chọn dung dịch HgCl₂ 0,1%, để khử trùng mẫu với thời gian 10 phút, hoặc NaClO 6% khử trùng mẫu trong 20 phút là phù hợp.

3.2. Ảnh hưởng của môi trường dinh dưỡng đến khả năng nhân nhanh chồi

Môi trường khoáng cơ bản cung cấp dinh dưỡng cho cây và có thể quyết định tới khả năng nhân nhanh chồi. Tuy vậy, mỗi loài cây sẽ thích hợp với mỗi loại môi trường khoáng nhất định. Trong thí nghiệm này, sử dụng 3 loại môi trường nuôi cấy với các môi trường khoáng cơ bản khác nhau (MS, WPM, Knops) bổ sung 0,2 mg/l BAP, 30 g/l sucrose, 7 g/l agar, 100 ml/l dịch chiết khoai tây, 100 ml/l nước dừa. Kết quả được trình bày qua bảng 2.

Bảng 2. Ảnh hưởng của môi trường dinh dưỡng đến khả năng nhân nhanh chồi

CTTN	Môi trường dinh dưỡng	Tỷ lệ (%)	Số chồi TB/mẫu	Chất lượng chồi
D ₁	MS	87,6	5,6	Chồi mập, xanh lá
D ₂	Knops	71,3	4,1	Chồi mập, ít, xanh đậm
D ₃	WPM	80,9	4,0	Chồi mập, xanh đậm

Kết quả ở bảng 2 cho thấy, môi trường khoáng cơ bản MS có khả năng tái sinh chồi cao (87,6%), thích hợp cho tái sinh chồi, chất lượng chồi tốt, phát triển nhanh và chồi mập, màu xanh đậm, số chồi nhiều (5,6 chồi/mẫu). Kết quả phân tích phương sai 1 nhân tố cho thấy, $F_{\text{tính}} = 90,97 > F_{\text{crit}} = 5,14$, chứng tỏ có sự khác biệt rõ rệt giữa tỷ lệ tái sinh chồi ở các môi trường cơ bản khác nhau.

3.3. Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng nhân nhanh chồi

Việc bổ sung Kinetin, BAP và NAA kết hợp làm cho hệ số nhân của chồi tăng lên rõ rệt. Các chất này thường được sử dụng để kích thích sự phân hóa, sinh trưởng và phát triển chồi của mẫu cấy *in vitro*. Tác dụng chủ yếu của chúng là kích thích sự phân chia mạnh mẽ của tế bào, đặc biệt ảnh hưởng rất lớn đến sự hình thành và phân hóa chồi (Nguyễn Văn Kết và *ctv.*, 2010).

3.3.1. Ảnh hưởng của nồng độ BAP và NAA đến khả năng nhân nhanh chồi

Một số công trình nghiên cứu đã công bố về nhân giống chi lan *Dendrobium* của các tác giả, cho thấy chất điều hòa sinh trưởng BAP, NAA ảnh hưởng rõ rệt đến tỷ lệ mẫu tái sinh chồi (Sana và *ctv.*, 2011). Trong thí nghiệm này đã sử dụng môi trường khoáng cơ bản là MS bổ sung 0,3 - 0,6 mg/l BAP và 0,2 - 0,3 mg/l NAA, 30 g/l sucrose, 7 g/l agar, 100 ml/l dịch chiết khoai tây, 100 ml/l nước dừa. Kết quả được trình bày tại bảng 3.

Kết quả cho thấy ở tất cả các công thức thí nghiệm có tỷ lệ mẫu tạo cụm chồi đều đạt trên 50%, trong đó công thức thí nghiệm NC₂ (bổ sung 0,4 mg/l BAP, 0,2 mg/l NAA) cho kết quả tốt với tỷ lệ mẫu tạo cụm chồi đạt 76,7%, số chồi TB/mẫu đạt 8,9, chất lượng chồi tốt, mập, đồng đều, màu xanh đậm (Bảng 3). Tương tự ở công thức NC₆ (bổ sung 0,5 mg/l BAP, 0,3 mg/l NAA) cho tỷ lệ mẫu tạo chồi cao (90%), số chồi TB/mẫu đạt 9,6. Kết quả phân tích phương sai một nhân tố cho thấy $F_{\text{tính}} = 85,14 > F_{\text{crit}} = 2,66$, như vậy hàm lượng chất điều hòa sinh trưởng có ảnh hưởng rõ rệt tới khả năng nhân nhanh chồi.

Bảng 3. Ảnh hưởng của nồng độ BAP và NAA đến khả năng nhân nhanh chồi

CTTN	Nồng độ ĐHST (mg/l)		Tỷ lệ tạo cụm chồi (%)	Số chồi TB/mẫu	Chất lượng chồi
	BAP	NAA			
ĐC	0	0	50,1	5,6	+
NC ₁	0,3	0,2	66,7	8,1	+++
NC ₂	0,4		76,7	8,9	+++
NC ₃	0,5		83,3	7,9	++
NC ₄	0,3	0,3	70,0	6,4	+++
NC ₅	0,4		80,0	8,4	+++
NC ₆	0,5		90,0	9,6	+++
NC ₇	0,6		83,3	7,8	+++

Ghi chú: Bảng 3, 4: +: Chồi mảnh, yếu, lá xanh; ++: Chồi thấp, gầy, yếu, lá xanh; +++: Chồi cao, mập, lá xanh đậm

3.3.2. Ảnh hưởng của nồng độ BAP, NAA và Kinetin đến nhân nhanh chồi

Xác định ảnh hưởng của tổ hợp BAP, NAA và Kinetin đến khả năng tạo chồi, thí nghiệm được bố trí với môi trường khoáng cơ bản MS bổ sung 0,5 mg/l BAP, 0,3 mg/l NAA, 0,2 - 1 mg/l Kinetin, 30 g/l sucrose, 7 g/l agar, 100 ml/l dịch chiết khoai tây, 100 ml/l nước dừa. Kết quả thu được sau 4 tuần được trình bày ở bảng 4.

Bảng 4. Ảnh hưởng của nồng độ BAP, Kinetin và NAA đến nhân nhanh chồi

CT TN	Nồng độ ĐHST (mg/l)			Tỷ lệ tạo cụm chồi (%)	Số chồi TB/mẫu	Chất lượng chồi
	BAP	NAA	Kinetin			
N ₁	0,5	0,3	0,1	63,3	9,8	+
N ₂			0,2	76,7	10,1	+++
N ₃			0,3	96,7	12,3	+++
N ₄			0,4	80,0	10,4	++
N ₅			0,5	73,3	9,6	+++

Kết quả cho thấy khi bổ sung đồng thời BAP, NAA và Kinetin vào môi trường nuôi cấy, ở các công thức thí nghiệm cho tỷ lệ tạo cụm chồi đều cao. Với giá trị tỷ lệ tạo cụm chồi đạt 63,3% đến 96,7%, số chồi trung bình của một mẫu đạt từ 9,6 đến 12,3. Đặc biệt là công thức N₃ đạt giá trị cao nhất, tỷ lệ tạo cụm chồi, số chồi trung bình của mỗi mẫu lần lượt là 96,7% và 12,3 (Bảng 4). Kết quả phân tích phương sai một nhân tố cho thấy: $F_{\text{tính}} = 94,15 > F_{\text{crit}} = 3,11$, chứng tỏ tổ hợp chất điều hòa sinh trưởng có ảnh hưởng rõ rệt tới nhân nhanh chồi.

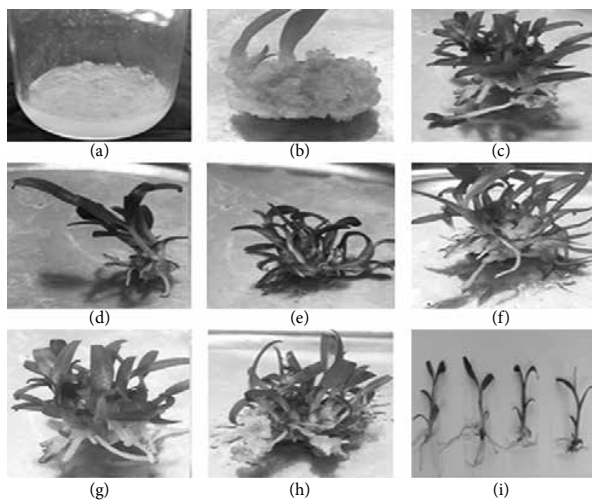
3.4. Ảnh hưởng của nồng độ chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng ra rễ

Ra rễ tạo cây hoàn chỉnh *in vitro* là khâu quan trọng trước khi cho cây ra ngoài huấn luyện. Thí nghiệm được tiến hành với việc cấy chuyển chồi lan đủ tiêu chuẩn (chồi đạt 3 - 4 cm, mập, lá xanh) vào môi trường khoáng cơ bản MS bổ sung 0,1 - 0,4 mg/l IBA, 0,2 - 0,4 mg/l NAA, 20 g/l sucrose, 7 g/l agar, 100 ml/l dịch chiết khoai tây, 100 ml/l nước dừa. Kết quả thí nghiệm được thu thập và trình bày ở bảng 5.

Kết quả ở bảng 5 cho thấy, ở các công thức thí nghiệm chỉ bổ sung một chất ĐHST (IBA hoặc NAA) cho tỷ lệ ra rễ thấp. Môi trường bổ sung 0,2 - 0,4 mg/l IBA, tỷ lệ ra rễ đạt 63,3 đến 80,3% và chỉ số ra rễ đạt 8,0 đến 9,8. Với các công thức môi trường bổ sung 0,2 - 0,4 mg/l NAA, tỷ lệ ra rễ và chỉ số ra rễ cao nhất lần lượt là 80,3% và 12,2. Các công thức môi trường bổ sung phối hợp hai chất 0,1 - 0,3 mg/l IBA và 0,2 - 0,4 mg/l NAA, cho kết quả cao hơn so với bổ sung một trong hai chất trên, cụ thể là ở công thức R₈, môi trường khoáng cơ bản MS bổ sung 0,2 mg/l IBA và 0,3 mg/l NAA cho kết quả cao nhất về tỷ lệ chồi ra rễ và chỉ số ra rễ lần lượt là 93,3% và 14,7. Kết quả phân tích phương sai một nhân tố cho thấy $F_{\text{tính}} = 75,52 > F_{\text{crit}} = 2,39$, như vậy nồng độ chất ĐHST khác nhau ảnh hưởng rõ rệt tới khả năng ra rễ của Hoàng thảo vôi.

Bảng 5. Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng tới khả năng ra rễ

CT TN	ĐHST (mg/l)		Tỷ lệ chồi ra rễ (%)	Số rễ TB/cây	Chiều dài TB/rễ	Chỉ số ra rễ
	IBA	NAA				
ĐC	-	-	23,3	2,7	2,0	5,4
R1	0,2	0	63,3	3,2	2,5	8,0
R2	0,3		70,0	3,3	2,6	8,6
R3	0,4		80,0	3,5	2,8	9,8
R4	0,2		73,3	3,1	2,4	7,4
R5	0	0,3	80,3	3,7	3,3	12,2
R6		0,4	78,5	3,7	3,0	11,1
R7	0,1	0,2	89,7	3,8	3,4	12,9
R8	0,2	0,3	93,3	4,1	3,6	14,7
R9	0,3	0,4	91,3	4,0	3,3	13,2



Hình 1. Hình ảnh cây lan Hoàng thảo với qua các giai đoạn nuôi cấy

a) Tạo mẫu sạch; b) Thể chồi lan Hoàng thảo vô; c) Cụm chồi ở môi trường MS; d) Cụm chồi ở môi trường Knops; e) Cụm chồi ở môi trường WPM; f) Cụm chồi ở CTMT NC₁; g) Cụm chồi ở CTMT NC₂; h) Cụm chồi ở CTMT N₃; i) Cây lan hoàn chỉnh

Using *in vitro* culture technique for propagation of *Dendrobium cretaceum* Lindley

Nguyen Van Viet

Abstract

Micropropagation of *Dendrobium cretaceum* Lindley by *in vitro* cultural technique has been successfully studied. The results showed that bud sterilization by soaking in ethanol 70% for 2 minutes, HgCl₂ 0.1% solution for 10 minutes, then culturing in MS medium could provide survival ratio of 94.7% and protocorm ratio of 90% after 20 days. Forming multi-buds induction in Knops with 6-benzylaminopurine (BAP) 0.5 mg/l, α-naphthaleneacetic acid (NAA) 0.3 mg/l, Kinetin 0.3 mg/l, coconut water 100 ml/l, potatoes extract 100 ml/l, sucrose 30g/l, agar 7 g/l gave the highest multiplication coefficient (12.3) of formed buds after 5 weeks. The rooted shoots reached 93.3%, the average number of roots was 4.1 per individual and the average length of roots was 3.6 cm when cultured in MS medium supplemented with IBA 0.2 mg/l, NAA 0.3 mg/l, and potatoes extract 100 ml/l, sucrose 20g/l after 5 weeks.

Key words: *Dendrobium cretaceum*, *in vitro*, knops, propagation, protocorm

Ngày nhận bài: 8/6/2017

Người phản biện: TS. Trần Danh Sửu

IV. KẾT LUẬN

- Khử trùng mẫu bằng dung dịch HgCl₂ 0,1% trong 10 phút đạt tỷ lệ sạch 94,7%, tạo thể chồi là 90%.

- Môi trường để nhân nhanh chồi và cụm chồi là môi trường khoáng cơ bản MS có bổ sung 0,5 mg/l BAP, 0,3 mg/l NAA và 0,3 mg/l Kinetin, 30 g/l sucrose, 7 g/l agar, 100 ml/l dịch chiết khoai tây, 100 ml/l nước dừa, pH = 5,8. Tỷ lệ tạo cụm chồi và số chồi TB/mẫu lần lượt là 96,7% và 12,3.

- Môi trường ra rễ tạo cây hoàn chỉnh là môi trường khoáng cơ bản MS bổ sung 0,2 mg/l IBA và 0,3 mg/l NAA, 100 mg/l dịch chiết khoai tây, 20 g/l sucrose, 5 g/l agar. Tỷ lệ chồi ra rễ 93,3%, số rễ trung bình là 4,1, chiều dài rễ trung bình là 3,6 cm, chỉ số rễ 14,7.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Vũ Kim Dung, Nguyễn Văn Việt, Bùi Văn Thắng, 2016. Nhân giống lan Hoàng thảo ý thảo ba màu (*Dendrobium gratiosissimum* Reichenb.f) bằng kỹ thuật nuôi cấy *in vitro*. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Lâm nghiệp* 6: 156-161.
- Nguyễn Văn Kết, Nguyễn Văn Vinh, 2010. Nghiên cứu khả năng nhân giống loài Lan Hoàng Thảo Sáp (*Dendrobium crepidatum* Lindl. & Paxt.) *in vitro*. *Tạp chí khoa học và công nghệ*, 48(5): 89-95.
- Vũ Ngọc Lan, Nguyễn Thị Lý Anh, 2013. Nhân giống *in vitro* loài lan bản địa *Dendrobium nobile* Lindl. *Tạp chí Khoa học và phát triển*, 11 (7): 917-925.
- Jaime A, Teixeira da Silva, Jean Carlos Cardoso, Judit Dobranszki, Songjun Zheng, 2015. *Dendrobium* micropropagation a review. *Plant Cell Rep*, 34: 671-704.
- Lita Soetopo and Sri Lestari Purnamaningsih, 2012. *In vitro* propagation of *Dendrobium* and *Phalaenopsis* through tissue culture for conservation. *Agrivita*, 34(2): 115-126.
- Sana Asghar, Touqeer Ahmad, Ishfaq Ahmad Hafiz, Mehwish, 2011. *In vitro* propagation of orchid (*Dendrobium nobile*) var. Emma white. *African Journal of Biotechnology*, 10(16): 3097-3103.

Ngày phản biện: 13/6/2017

Ngày duyệt đăng: 25/6/2017

ỨNG DỤNG KỸ THUẬT PCR CHẨN ĐOÁN *PIPER YELLOW MOTTLE VIRUS* GÂY HẠI TRÊN HỒ TIÊU (*Piper nigrum* L.) Ở VIỆT NAM

Nguyễn Xuân Dũng¹, Dương Hoa Xô¹

¹ Trung tâm Công nghệ Sinh học Thành phố Hồ Chí Minh

TÓM TẮT

Piper yellow mottle virus (PYMoV) là một trong 2 loại virus gây hại chính trên hồ tiêu đã được phát hiện ở nhiều nước trên thế giới. Tuy nhiên, vấn đề chẩn đoán virus PYMoV trên hồ tiêu vẫn chưa được quan tâm nhiều tại Việt Nam. Để hỗ trợ cho việc chẩn đoán chính xác tác nhân gây bệnh virus trên hồ tiêu, trong đó có PYMoV, và sản xuất giống tiêu sạch virus ở Việt Nam, quy trình PCR đã được phát triển để chẩn đoán virus này. Theo đó, kỹ thuật PCR được áp dụng để khuếch đại đoạn gen có kích thước khoảng 450 bp hay 400 bp từ bộ gen virus với mỗi PYMoI hay PYMoIII tương ứng. Quy trình chẩn đoán được sử dụng cho việc xác định sự hiện diện của virus ở các vườn trồng hồ tiêu tại các khu vực Tây Ninh, Đồng Nai và Đắk Lắk. Kết quả cho thấy đã phát triển thành công quy trình chẩn đoán PYMoV. Phản ứng PCR có thể phát hiện virus ở mức 100 bản sao/ μ L. Trình tự đoạn gen khuếch đại có độ tương đồng từ 85% - 87% so với trình tự đã được công bố trên Ngân hàng gen. Sự hiện diện của virus được ghi nhận ở tất cả các khu vực khảo sát với tỷ lệ nhiễm trung bình 41,12% (88 trong tổng số 214 mẫu). Tỷ lệ nhiễm virus cao nhất được ghi nhận tại Tây Ninh (57,69%) và thấp nhất tại Đồng Nai (24,51%). Kết quả này cho thấy PYMoV hiện đang gây nhiễm khá phổ biến trên hồ tiêu ở Việt Nam.

Từ khóa: Bệnh virus, *Piper yellow mottle virus*, *Piper nigrum*, PCR, chẩn đoán virus

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hồ tiêu (*Piper nigrum* L.) là một loại cây trồng có giá trị kinh tế hiện đang được trồng phổ biến ở Việt Nam. Bệnh do virus gây ra gây ảnh hưởng nghiêm trọng đến ngành sản xuất hồ tiêu do làm giảm năng suất thu hoạch. Các triệu chứng đặc trưng của bệnh bao gồm lá bị giảm kích thước, khảm và biến dạng; cây còi cọc, tạo ra giá hoa ngắn và ít hoa. Triệu chứng bệnh có thể khó phân biệt được bằng mắt thường ở một số thời điểm, giai đoạn sinh trưởng và dưới tác động của một số nhân tố khác (de Silva *et al.*, 2002).

Piper yellow mottle virus (PYMoV) là virus DNA mạch kép, gây nhiễm trên các loài thuộc giống tiêu (*Piper* spp) (Lockhart *et al.*, 1997) và đã được phát hiện trên cây hồ tiêu ở các nước như Brazil (Duarte *et al.*, 2001), Sri Lanka (de Silva *et al.*, 2002), Ấn độ (Bhat *et al.*, 2003; Hareesh và Bhat, 2008; Bhat *et al.*, 2009), Malaysia, Philippin, Thái Lan (Lockhart *et al.* 1997). Tuy nhiên, tại Việt Nam, các nghiên cứu phát hiện PYMoV trên hồ tiêu vẫn còn rất ít. Một số nghiên cứu về nhân giống hồ tiêu sạch virus đã công bố chỉ tiến hành kiểm tra sự hiện diện của các loại virus như TMV (*Tobacco mosaic virus*) (Nguyễn Thị Kim Linh *et al.*, 2006), ToMV (*Tomato mosaic virus*), PVX (*Potato virus X*), PVY (*Potato virus Y*) (Đoàn Thị Ái Thuyền *et al.*, 2005; Nguyễn Thị Kim Linh *et al.*, 2006) và CMV (*Cucumber mosaic virus*) (Đoàn Thị Ái Thuyền *et al.*, 2005). Vì vậy, việc nghiên cứu chẩn đoán và từ đó xác định sự hiện diện của PYMoV trên hồ tiêu trồng tại Việt Nam là vấn đề có ý nghĩa

quan trọng đối với việc chẩn đoán bệnh virus trên hồ tiêu ở trong nước.

Nghiên cứu này được thực hiện nhằm đề xuất quy trình chẩn đoán nhanh PYMoV trên hồ tiêu, góp phần then chốt trong công tác sản xuất giống hồ tiêu sạch virus ở Việt Nam.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Mẫu lá hồ tiêu có biểu hiện các triệu chứng như khảm và biến dạng được thu thập tại các vườn trồng hồ tiêu ở Việt Nam.

Mỗi PYMoI và PYMoIII dùng cho khuếch đại đoạn gen của virus.

Chủng vi khuẩn *E.coli* DH5 α sử dụng cho nhân dòng gen.

2.2. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Các thí nghiệm được thực hiện trong khoảng thời gian từ 01/2012 đến 12/2014 tại phòng Công nghệ Sinh học Thực vật, thuộc Trung tâm Công nghệ Sinh học Thành phố Hồ Chí Minh.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Tách chiết DNA

ADN tổng số được tách chiết từ mẫu lá hồ tiêu có biểu hiện triệu chứng nhiễm virus (100 mg) bằng kit tách chiết ADN EZ-10 Spin Column Plant DNA Minipreps (Biobasic, Canada). DNA sau khi tách

¹ Trung tâm Công nghệ Sinh học Thành phố Hồ Chí Minh