

NGHIÊN CỨU LÀM SẠCH VIRUS CHO CÂY TỎI TA (*ALLIUM SATIVUM* L.) BẰNG NUÔI CÂY MERISTEM

Virus Cleaning of Galic, in *Allium Sativum* L., by Meristem Culture

Nguyễn Thị Thanh Phương, Nguyễn Thị Lý Anh

Viện Sinh học Nông nghiệp, Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội

Địa chỉ email tác giả liên hệ: ngttphuong1901@gmail.com

Ngày gửi bài: 05.10.2011

Ngày chấp nhận: 12.03.2012

TÓM TẮT

Quy trình nuôi cấy đỉnh sinh trưởng (meristem) nhằm làm sạch virus cho giống tỏi ta (*Allium sativum* L.) đã được nghiên cứu và thiết lập. Các mẫu tỏi bệnh thu thập theo triệu chứng bệnh từ đồng ruộng được kiểm tra xác định nhiễm virus thông qua các phương pháp: (1) lây nhiễm nhân tạo trên cây chỉ thị rau muối (*Chenopodium album* L.); (2) sử dụng RT-PCR để xác định RNA của virus trong cây. Mẫu tỏi củ được xử lý với ethanol 70% trong 1 phút, NaDCC (sodium dichloroisocyanurate) nồng độ 5g/l trong 5 phút trước khi tách meristem. Môi trường nuôi cấy tái sinh meristem tốt nhất là MS + 30g saccarose + 1mg BA/l. Kết quả nghiên cứu cũng chỉ ra rằng để làm sạch virus cho giống tỏi nghiên cứu cần tách meristem ở kích thước nhỏ hơn 0,3mm, hoặc trong trường hợp tách meristem ở kích thước nhỏ hơn 1mm thì mẫu cấy cần được nuôi cấy trên môi trường có bổ sung ribavirin ở nồng độ 20mg/l. Chồi tỏi sạch virus tái sinh được nhân lên trong môi trường MS + 30g saccarose + 0,5mg α NAA/l + 2,0mg BA/l, cho hệ số nhân chồi cao nhất (4,08 lần), chồi sinh trưởng tốt nhất (chiều cao chồi đạt 7,55cm). Chồi cũng có thể được tái sinh từ callus trên môi trường MS + 15g saccarose/l + 10g glucose/l + 5g manitol/l + 2,0mg BA/l cho số chồi tái sinh trên mẫu là 11,67 chồi/mẫu. Môi trường tạo rễ *in vitro* cho cây tỏi là MS + 30g saccarose + 0,5g than hoạt tính/l + 0,5mg α NAA/l, cho tỷ lệ cây ra rễ đạt 100%, số rễ trung bình đạt 5,19 rễ/cây và cây sinh trưởng phát triển tốt.

Từ khóa: *Allium sativum* L., meristem, tái sinh, nhân nhanh, RT-PCR, làm sạch virus, ribavirin.

SUMMARY

A suitable protocol for meristem-tip culture for garlic (*Allium sativum* L.) to eliminate viruses was studied and established. The presence of viruses were identified by: (i) mechanical inoculation of inoculum isolated from infected garlic plants on indicator *Chenopodium album* L. and (ii) RT-PCR using potyvirus degenerate primers. After pretreatment with ethanol (70%) for 1 minute, shoots from infected plants were further treated with sodium dichloroisocyanurate (5g/l) for 5 minutes to eliminate microorganisms. Under a microscope, leaves of infected plants were removed one-by-one and meristems were excised and grown on MS+30g saccarose + 1mg BA/l to produce shoots. It is indicated that to get completely virus-free plants, meristems should be excised with size below 0.3 mm in length. If the excised meristem explants are of 1mm in size the culture medium should be added with ribavirin (20mg/l). The virus-free shoots that were multiplied on MS + 30g saccarose + 0,5mg α NAA/l + 2,0mg BA/l media yield not only the highest regeneration rate (4.08 times) but also the best growth (7.55cm). Adventitious shoots can also be regenerated via calluses on MS + 15g saccarose/l + 10g glucose/l + 5g manitol/l + 2,0mg BA/l media. The best medium for root generation was MS + 30g saccarose + 0,5g activated charcoal/l + 0,5mg α NAA/l, on which, 100 % shoots produced adventitious roots (5.19 roots per shoot on average) and the resulting plants grew normally.

Keywords: *Allium sativum* L., meristem, regeneration, micropropagation, virus-infected, RT-PCR.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây tỏi (còn gọi là tỏi ta, đại toán, hom کیا...) có tên khoa học là *Allium sativum* L. thuộc họ hành tỏi Alliaceae, vừa là cây thuốc vừa là cây rau gia vị quan trọng, được trồng rộng rãi ở nhiều quốc gia trên thế giới, đem lại nguồn thu nhập đáng kể cho người dân.

Việt Nam có các điều kiện thuận lợi cho việc trồng tỏi và đã hình thành nhiều vùng chuyên canh có tiếng như Tiên Sơn (Bắc Ninh), Mê Linh (Vĩnh Phúc), Hà Nội, Hưng Yên, Hải Phòng, Quảng Ngãi, Phú Yên, Khánh Hòa, Ninh Thuận và Đà Lạt... (Tạ Thu Cúc và cộng sự, 2000).

Trên cây họ hành tỏi bị nhiễm rất nhiều loại virus khác nhau và nhóm virus gây hại phổ biến nhất là các potyvirus (họ Potyviridae). Có ít nhất 3 potyvirus gây hại trên họ hành tỏi đã được xác định trên thế giới gồm Onion yellow dwarf virus (OYDV), Leek yellow stripe virus (LYSV) và Shallote yellow stunt virus (SYSV) (Van de Vlugt và cs., 1999). Năng suất của tỏi có thể giảm 15 - 50% khi bị nhiễm LYSV (Gisele Irvine and Samantha Sterling, 2002) và 39 - 60% khi bị nhiễm OYDV (Lot và cs., 1998).

Gần đây, dựa trên các phân tích phân tử, cả 3 potyvirus này đều đã được phát hiện ở Việt Nam (Ha và cs., 2008a). Trước đây, dựa trên triệu chứng, Vũ Triệu Mân và cộng sự (2001) đã cho rằng ở Việt Nam, 2 virus hại hành tỏi là OYDV và LYSV. Hai virus này có thể nhiễm tới 20 - 30% cây giống và 10 - 20% số cây giống có thể ẩn triệu chứng, có ruộng nhiễm nặng tới 80%.

Sự nhiễm do virus đã làm giảm đáng kể năng suất cũng như chất lượng củ tỏi, do vậy bên cạnh những biện pháp truyền thống như chọn lựa hạt giống và cây con khoẻ thì việc xây dựng quy trình sản xuất

củ giống tỏi sạch bệnh bắt nguồn từ nuôi cấy meristem là yêu cầu cấp bách đặt ra trong thực tiễn sản xuất.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Củ tỏi giống và củ tỏi bị nhiễm virus thu thập ngoài đồng ruộng ở xã Cổ Bi và Đặng Xá - Gia Lâm - Hà Nội.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Sử dụng các kỹ thuật nuôi cấy mô thông dụng, quá trình nuôi cấy *in vitro* được diễn ra ở nhiệt độ 25 - 28°C, cường độ ánh sáng từ 2000 - 2500lux, thời gian chiếu sáng 16 giờ sáng/8 giờ tối.

Các thí nghiệm nghiên cứu được tiến hành trên nền môi trường cơ bản Murashige and Skoog (1962) (MS).

Virus nhiễm trên tỏi được xác định bằng lây nhiễm nhân tạo theo phương pháp tiếp xúc cơ học trên cây chỉ thị rau muối. Mô lá bệnh được nghiền với đệm phosphate 0,01M; pH 7 (theo tỷ lệ 1 g lá/ 2 ml đệm). Dịch nghiền được bổ sung bột carborandum 600 mesh và được lây nhiễm trên lá cây rau muối (giai đoạn 4 - 5 lá thật). Triệu chứng cục bộ trên lá (các vết đốm chết hoại) hình thành thành vòng 1 tuần chứng tỏ cây tỏi bị nhiễm virus. Ngoài ra, phản ứng RT-PCR dùng cặp mồi chung CIFor/CIRev đặc hiệu cho tất cả các potyvirus (Ha và cs., 2008b) cũng được sử dụng để phát hiện virus trên các mẫu tỏi thí nghiệm. Qui trình chiết RNA và phản ứng RT-PCR được thực hiện theo Ha và cs. (2008b).

Thí nghiệm được bố trí ngẫu nhiên, nhắc lại 3 lần, mỗi lần nhắc lại 5 - 10 mẫu/công thức. Thí nghiệm được theo dõi định kỳ 7 - 15 ngày/lần (tùy theo yêu cầu của thí nghiệm).

Bảng 1. Ảnh hưởng của HgCl₂ 0,1% và NaDCC đến khả năng sống và sạch của mẫu cấy meristem (sau 6 tuần)

Hóa chất khử trùng	Thời gian xử lý (phút)	Số mẫu thí nghiệm/ công thức	Tỷ lệ mẫu sạch (%)	Tỷ lệ mẫu sạch sống (%)	Tỷ lệ tạo chồi (%)
HgCl ₂ 0,1%	3	15	32,20	37,00	30,40
	5	15	75,34	44,67	36,82
	7	15	80,40	36,70	31,89
	10	15	84,65	16,70	8,00
	15	15	92,82	4,95	0,00
NaDCC 5g/l	3	15	28,00	34,12	30,00
	5	15	74,88	66,51	58,85
	10	15	76,00	54,50	40,75
	15	15	79,16	42,53	27,57
	20	15	92,98	23,42	9,67

Môi trường nền: MS₀ = MS + 30g saccarose + 6g agarose/l, pH 5,8

Số liệu thực nghiệm được xử lý bằng phương pháp thống kê sinh học sử dụng chương trình Excel và chương trình IRRISTAT 4.0.

Thí nghiệm được tiến hành tại phòng thí nghiệm Công nghệ tế bào thực vật và vườn thực nghiệm của Viện sinh học Nông nghiệp - Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Các nghiên cứu tiền đề áp dụng làm sạch virus cho cây tỏi ta

3.1.1. Chế độ khử trùng tạo vật liệu khởi đầu

Phản ứng của mẫu cấy đỉnh sinh trưởng với hai hoá chất khử trùng là HgCl₂ 0,1% và NaDCC sau 6 tuần nuôi cấy khá giống nhau: Khi xử lý mẫu với HgCl₂ 0,1%, và NaDCC (5g/l), thời gian càng lâu thì tỷ lệ mẫu sạch càng cao, nhưng ngược lại tỷ lệ mẫu sạch sống lại giảm dần. Tỷ lệ tạo chồi của mẫu

meristem cũng giảm mạnh khi tăng thời gian xử lý (Bảng 1).

Xử lý với NaDCC 5g/l tỏ ra có ưu thế hơn hẳn so với HgCl₂ 0,1% do ít độc hại, hiệu quả khử trùng đạt được lại cao hơn HgCl₂ 0,1%: Sử dụng NaDCC 5g/l cho hiệu quả khử trùng tốt nhất trong thời gian xử lý 5 phút, đạt tỷ lệ mẫu sạch là 74,88%, tỷ lệ mẫu sống là 66,51%, và mẫu tái sinh chồi là 58,85%. Trong khi đó sử dụng HgCl₂ 0,1% thì công thức cho hiệu quả khử trùng tốt nhất trong thời gian xử lý 5 phút, đạt tỷ lệ mẫu sạch là 75,34%, tỷ lệ mẫu sống là 44,67%, và mẫu tái sinh chồi là 36,82%. Như vậy NaDCC 5g/l được lựa chọn để sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

3.1.2. Xác định môi trường nuôi cấy tái sinh chồi từ meristem

Trong nuôi cấy mô tế bào thực vật, sử dụng riêng rẽ hoặc kết hợp hai nhóm chất điều tiết sinh trưởng auxin và cytokinin

nhằm mục đích điều khiển sự phát sinh hình thái được áp dụng rất phổ biến.

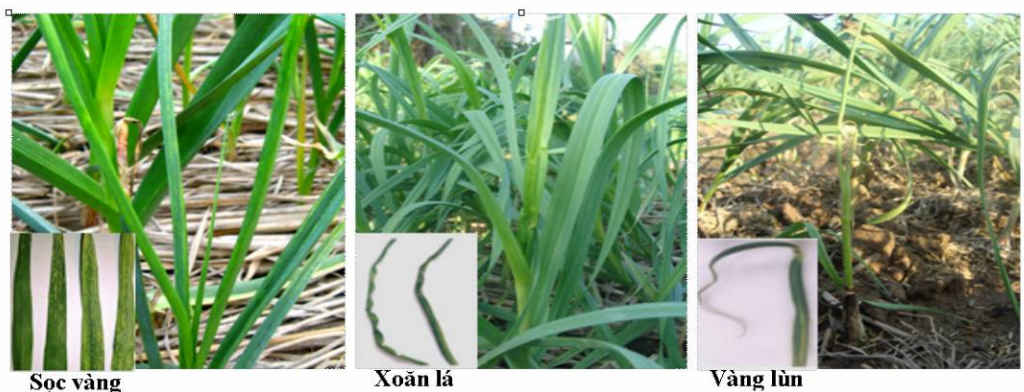
Kết quả nghiên cứu ở bảng 2 cho thấy, khi tách meristem ở kích thước từ 0,5 - 0,7mm và

đặt vào môi trường nuôi cấy có bổ sung các chất điều tiết sinh trưởng, tỷ lệ mẫu sạch sống của các thí nghiệm khá cao, đạt từ 60,75 - 72,93%.

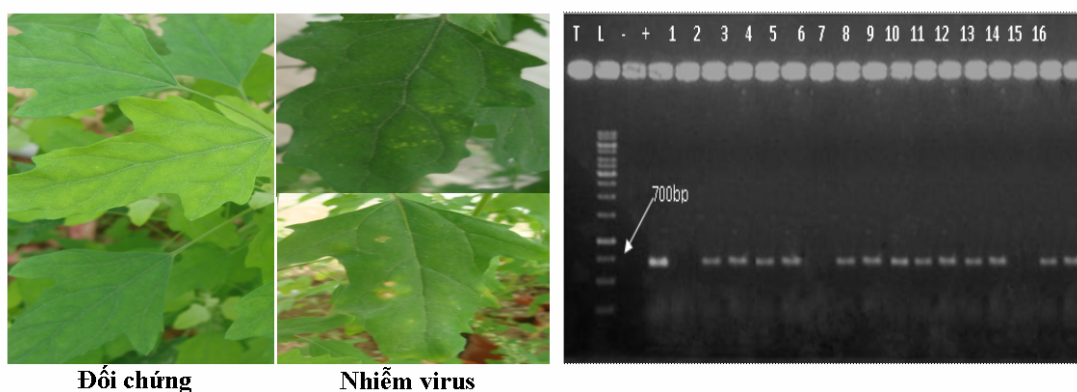
Bảng 2. Ảnh hưởng của các chất điều tiết sinh trưởng đến khả năng tái sinh đỉnh sinh trưởng (sau 6 tuần nuôi cấy)

Thí nghiệm	Công thức	Số mẫu thí nghiệm/ công thức	Nồng độ mg/l				Tỷ lệ mẫu sạch sống (%)	Đường hướng phát sinh			Số chồi/ mẫu (chồi)
			BA	Ki	2,4D	α NAA		Tỷ lệ tạo callus (%)	Tỷ lệ tạo rễ (%)	Tỷ lệ tạo chồi (%)	
Ảnh hưởng của BA	CT1	15	0	-	-	-	68,71	0	0	56,36	0,82
	CT2	15	0,5	-	-	-	60,75	32,72	0	56,46	1,33
	CT3	15	1,0	-	-	-	68,23	44,33	0	64,18	1,88
	CT4	15	1,5	-	-	-	66,14	56,45	0	58,86	1,41
	CT5	15	2,0	-	-	-	70,00	70,00	0	56,71	1,00
	CT6	15	2,5	-	-	-	70,07	70,07	0	48,06	0,86
	CT7	15	3,0	-	-	-	64,53	64,53	0	40,34	0,56
Ảnh hưởng của Ki	CT8	15	-	0	-	-	68,71	0	0	56,36	0,82
	CT9	15	-	0,5	-	-	68,00	12,58	0	57,05	1,00
	CT10	15	-	1,0	-	-	64,84	24,10	0	60,61	1,15
	CT11	15	-	1,5	-	-	68,41	40,32	0	62,82	1,27
	CT12	15	-	2,0	-	-	72,20	52,00	0	58,00	1,17
	CT13	15	-	2,5	-	-	64,26	64,26	0	56,77	1,00
	CT14	15	-	3,0	-	-	72,93	66,74	0	44,84	0,78
Ảnh hưởng của 2,4D	CT15	15	-	-	0	-	68,71	0	0	56,36	0,82
	CT16	15	-	-	0,25	-	67,22	67,22	0	16,30	0,36
	CT17	15	-	-	0,5	-	64,15	64,15	0	12,45	0,25
	CT18	15	-	-	1,0	-	62,71	62,71	0	4,22	0,15
	CT19	15	-	-	2,0	-	68,36	68,36	0	0	0
Ảnh hưởng của tổ hợp BA và 2,4D	CT20	15	0	-	0	-	68,71	0	0	56,36	0,82
	CT21	15	15	-	0	-	68,00	45,62	0	67,37	1,85
	CT22	15	1,0	-	0,25	-	72,75	72,75	0	66,50	1,55
	CT23	15	1,0	-	0,5	-	69,23	69,23	0	44,82	1,31
	CT24	15	1,0	-	1,0	-	70,14	70,14	0	28,10	0,78
Ảnh hưởng của tổ hợp BA và α NAA	CT25	15	0	-	-	0	68,71	0	0	56,36	0,82
	CT26	15	1,0	-	-	0	68,00	45,62	0	67,37	1,85
	CT27	15	1,0	-	-	0,1	70,62	70,62	36,80	53,70	1,11
	CT28	15	1,0	-	-	0,25	61,60	61,60	43,20	52,70	1,09
	CT29	15	1,0	-	-	0,5	69,22	69,22	24,18	51,90	1,00

Môi trường nền: MS₀ = MS + 30g saccarose + 6g agarose/l, pH 5,8



Hình 1. Mẫu tỏi biểu hiện bệnh virus ngoài đồng ruộng



Đối chứng

Nhiễm virus

Hình 3. Kết quả kiểm tra RT-PCR

Hình 2. Biểu hiện bệnh virus trên cây chỉ thị rau muối

Ghi chú: T: Đối chứng trắng +: Đối chứng dương
 -: Đối chứng âm L: ladder
 1 -> 16: Các mẫu bệnh

Bổ sung BA vào môi trường nuôi cấy đã kích thích mẫu tạo callus mạnh. Nồng độ BA càng cao tỷ lệ tái sinh tạo callus càng lớn (từ 0% ở công thức đối chứng tăng lên 100% mẫu sống tạo callus ở CT5, CT6, CT7). Bên cạnh đó, ở tất cả các công thức mẫu cấy không hề có sự tái sinh tạo rễ. Bổ sung BA từ nồng độ 0,5 -2,0mg/l đã kích thích khả năng tái sinh tạo chồi của mẫu cấy nhưng khi nồng độ BA tăng cao hơn 2,0mg/l lại làm giảm tỷ lệ mẫu tạo chồi và giảm số lượng chồi tái sinh trên mẫu. Sau 6 tuần nuôi cấy, bổ sung BA 1,0mg/l cho tỷ lệ mẫu tái sinh chồi cao nhất (64,18%), số chồi trung bình là 1,88 chồi/mẫu.

Tương tự như BA, tỷ lệ mẫu tạo callus cũng tăng dần khi tăng nồng độ kinetin (Ki). Công thức đối chứng không tạo callus nhưng khi bổ sung Ki thì tỷ lệ mẫu tạo callus tăng lên trong đó ở CT13 và CT14 (nồng độ Ki từ 2,5 - 3,0mg/l) cho 100% số mẫu sống đều tái sinh tạo callus. Nồng độ Ki từ 0,5 -2,0mg/l đã kích thích khả năng tái sinh tạo chồi của mẫu cấy nhưng khi nồng độ Ki tăng lên cao hơn 2,0mg/l đã làm giảm tỷ lệ mẫu tái sinh chồi. Sau 6 tuần nuôi cấy, công thức 11 có nồng độ 1,5mgKi/l cho tỷ lệ mẫu tái sinh chồi cao nhất 62,82%, số chồi trung bình là 1,27 chồi/mẫu.

Bảng 3. Ảnh hưởng của kích thước đến khả năng tái sinh và làm sạch virus (sau 6 tuần)

Công thức	Kích thước tách (mm)	Số mẫu thí nghiệm/ công thức	Tỷ lệ sống (%)	Tỷ lệ callus (%)	Tỷ lệ chồi (%)	Số mẫu kiểm tra virus (mẫu)	Số mẫu bị bệnh		Tỷ lệ mẫu bị bệnh virus (%)
							Kết quả lây nhiễm nhân tạo (mẫu)	Kết quả RT - PCR (mẫu)	
CT1	0,1	15	28,00	16,21	20,00	9	0	0	0
CT2	0,3	15	36,73	20,22	26,34	9	0	0	0
CT3	0,5	15	62,56	36,64	58,32	9	2	2	22,22
CT4	0,7	15	69,90	44,70	65,26	9	6	6	66,67
CT5	1,0	15	76,58	48,26	67,00	9	8	8	98,80
CT6	1,5	15	88,00	48,35	72,00	9	9	9	100

Môi trường nền: MS₀ = MS + 30g saccarose + 6g agarose/l, pH 5,8

100% số mẫu sống đều tái sinh tạo callus khi được nuôi cấy trên môi trường có bổ sung 2,4D. Tuy nhiên, tỷ lệ tái sinh tạo chồi rất thấp (cao nhất là 16,30%), hệ số nhân chồi là 0,36 chồi/mẫu ở CT16.

Kết hợp giữa BA (1mg/l) với 2,4-D hoặc α NAA đã làm tăng khả năng tái sinh tạo callus của đỉnh sinh trưởng. Tuy nhiên, tỷ lệ đỉnh sinh trưởng tái sinh tạo chồi ở công thức này đều giảm so với ở công thức chỉ bổ sung 1mg BA/l. Bên cạnh đó, 2,4D và α NAA lại làm giảm khả năng sinh trưởng của chồi tái sinh.

Như vậy, môi trường tái sinh tạo chồi từ meristem tốt nhất là 1mg BA/l, cho tỷ lệ mẫu tái sinh tạo chồi là 64,18%, số chồi tái sinh đạt 1,88 chồi/mẫu.

3.2. Nghiên cứu làm sạch virus cho cây tỏi

3.2.1. Thu thập mẫu bệnh và xác định mẫu bị nhiễm virus từ các cây tỏi thu thập ngoài đồng ruộng.

Dựa vào triệu chứng bệnh điển hình do 3 potyvirus là OYDV, LYSV và SYSV trên cây họ hành tỏi (Bos, 1976, 1978; Bar và cs., 1994; Wahab và cs., 2009), mẫu cây tỏi ta có biểu hiện bệnh virus ngoài đồng ruộng sau

trồng 90 ngày ở vụ xuân tại Cổ Bi và Đặng Xá - Gia Lâm - Hà Nội (Hình 2) đã được thu thập. Các mẫu cây này được kiểm tra xác định bị nhiễm virus bằng phương pháp lây nhiễm nhân tạo trên cây chỉ thị rau muống và RT - PCR với cặp mồi chung CIFor/CIRev đặc hiệu cho các potyvirus.

Kết quả thu được khi kiểm tra 30 mẫu tỏi thu thập ngoài đồng ruộng theo triệu chứng nhiễm virus có 25 mẫu tỏi bị nhiễm virus. Các mẫu tỏi được xác định bị nhiễm virus sẽ được sử dụng làm vật liệu cho nghiên cứu làm sạch virus.

3.2.2. Ảnh hưởng của kích thước đỉnh sinh trưởng đến khả năng tái sinh và làm sạch virus

Kích thước của đỉnh sinh trưởng có ảnh hưởng rất lớn đến tỷ lệ sống, sự phát sinh hình thái cũng như sự sinh trưởng của chồi tái sinh (Bảng 3). Kích thước đỉnh sinh trưởng càng lớn (trong khoảng 0,1-1,5mm) thì khả năng sống, tỷ lệ tạo callus, tạo chồi, sinh trưởng của chồi tái sinh càng cao. Ở kích thước 0,1mm, tỷ lệ sống của meristem là 28%, tạo callus là 16,21%, tạo chồi là 20% nhưng khi tăng kích thước lên 1,5mm thì tỷ lệ sống của meristem là 88%, tạo callus là 48,35%, tạo chồi là 72%.

Bảng 4. Ảnh hưởng của việc kết hợp tách meristem và xử lý hóa chất ribavirin đến khả năng tái sinh và sạch virus của meristem (sau 6 tuần)

Công thức	Nồng độ Ribavirin (mg/l)	Số mẫu thí nghiệm/ công thức	Tỷ lệ mẫu sống (%)	Tỷ lệ mẫu tạo chồi (%)	Kết quả kiểm tra bằng RT-PCR	
					Số mẫu kiểm tra (mẫu)	Tỷ lệ nhiễm virus (%)
CT1	0	15	72,06	65,10	3	100
CT2	10	15	63,84	56,84	3	66,67
CT3	15	15	56,62	42,62	3	33,33
CT4	20	15	44,35	31,43	3	0
CT5	25	15	20,52	16,87	3	0
CT6	30	15	16,28	12,56	-	-

Môi trường nền: MS₀ = MS + 30g saccarose + 6g agarose/l, pH 5,8

Kết quả, kiểm tra độ sạch virus của cây tái sinh bằng phương pháp lây nhiễm nhân tạo và phân tích RT - PCR cho thấy: độ sạch virus của chồi tái sinh phụ thuộc vào kích thước của đỉnh sinh trưởng. Đỉnh sinh trưởng khi được tách ở kích thước từ 0,1 - 0,3mm cho tỷ lệ mẫu sạch virus là 100%, khi tăng kích thước tách lên 0,5mm thì tỷ lệ chồi tái sinh vẫn còn virus là 22,22% và tỷ lệ mẫu bệnh là 100% khi kích thước tách là 1,5mm.

3.2.3. Ảnh hưởng của ribavirin đến khả năng tái sinh và làm sạch virus của meristem

Ribavirin là một chất tương tự nucleoside tổng hợp. Do nhóm carboxamide của ribavirin giống với adenosine hoặc guanosine, do đó ribavirin có thể bắt cặp với uracil hoặc cytosine trong quá trình nhân bản của virus gây nên đột biến RNA trong quá trình sao chép RNA (Theo Wikipedia, 2010). Do vậy, ribavirin đã được sử dụng rộng rãi nhằm làm sạch virus.

Để phân biệt tác dụng làm sạch virus của ribavirin với tác dụng làm sạch virus khi meristem được tách ở kích thước nhỏ hơn 0,5mm, ở thí nghiệm này chúng tôi sử dụng meristem có kích thước từ 0,7 - 1,0mm.

Nồng độ ribavirin càng cao thì tỷ lệ sống của mẫu càng giảm. Ở công thức đối chứng không bổ sung ribavirin cho tỷ lệ sống là 72,06%, bổ sung ribavirin đã làm giảm tỷ lệ sống xuống 16,28% CT6 (30mg ribavirin). Tỷ lệ mẫu tạo chồi cũng giảm dần khi nồng độ ribavirin tăng (từ 65,10% công thức đối chứng giảm xuống 12,56% ở CT6). Bên cạnh đó, sinh trưởng của chồi tái sinh cũng giảm mạnh khi tăng của nồng độ ribavirin (Bảng 4).

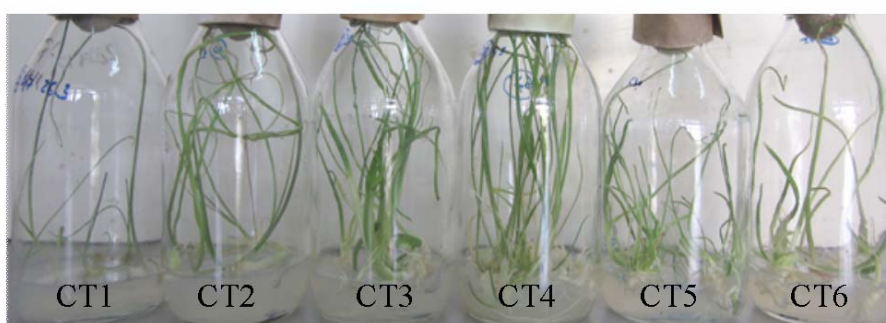
Kết quả kiểm tra bằng phương pháp RT - PCR cho thấy: trong 15 mẫu chồi tái sinh được kiểm tra có 6 mẫu xuất hiện sản phẩm PCR (khoảng 700bp) trùng với sản phẩm của mẫu đối chứng mang virus (đối chứng dương). Trong đó, công thức đối chứng không bổ sung ribavirin trong môi trường nuôi cấy cho tỷ lệ cây vẫn còn virus là 100%. Nồng độ ribavirin 20 - 25mg/l đã có tác dụng làm sạch virus hoàn toàn (tỷ lệ cây sạch virus đạt 100% ở CT4 và CT5).

Các kết quả nghiên cứu trên cho thấy: để làm sạch virus cho cây tỏi cần: (1) Tách meristem ở kích thước $\leq 0,3$ mm hoặc (2) Bổ sung ribavirin vào môi trường nuôi cấy tái sinh meristem ở nồng độ 20mg/l khi kích thước tách $\leq 1,0$ mm.

Bảng 5. Ảnh hưởng của các chất điều tiết sinh trưởng đến khả năng nhân nhanh chồi tỏi sạch virus (sau 6 tuần nuôi cấy)

Thí nghiệm	Công thức	Số mẫu thí nghiệm/ công thức	Nồng độ mg/l		Tỷ lệ mẫu sạch sống (%)	Tỷ lệ tạo callus (%)	Tỷ lệ tạo rễ (%)	C.cao chồi (cm)	Hệ số nhân (chồi)
			BA	α NAA					
Ảnh hưởng của BA	CT1	25	0	-	100	0	8,33	6,50	1,08
	CT2	25	0,5	-	100	100	4,15	6,09	1,52
	CT3	25	1,0	-	100	100	0	5,50	1,45
	CT4	25	2,0	-	100	100	0	4,56	1,26
	CT5	25	3,0	-	100	100	0	4,00	1,08
	CT6	25	4,0	-	100	100	0	3,86	1,00
	CV							0,8	
<i>LSD</i> 5%								0,75	
Ảnh hưởng của α NAA	CT7	25	-	0	100	0	8,33	6,50	1,08
	CT8	25	-	0,1	100	100	55,64	7,86	1,20
	CT9	25	-	0,2	100	100	88,27	7,84	1,48
	CT10	25	-	0,5	100	100	100	7,84	1,68
	CT11	25	-	1,0	100	100	100	7,80	1,44
	CV							0,3	3,7
<i>LSD</i> 5%								0,46	0,92
Ảnh hưởng của tổ hợp α NAA và BA	CT12	25	0	0	100	0	8,33	6,50	1,08
	CT13	25	0	0,5	100	100	100	7,38	1,70
	CT14	25	1,0	0,5	100	100	82,82	7,42	2,76
	CT15	25	2,0	0,5	100	100	28,34	7,55	4,08
	CT16	25	3,0	0,5	100	100	12,00	5,15	3,98
	CT17	25	4,0	0,5	100	100	0	3,50	3,77
	CV							1,9	
<i>LSD</i> 5%								0,21	

Môi trường nền: MS₀ = MS + 30g saccarose + 6g agarose/l, pH 5,8.



Hình 4. Ảnh hưởng của tổ hợp BA và NAA đến sự nhân nhanh chồi

3.3. Nghiên cứu nhân nhanh cây tỏi sạch virus

Sau khi tạo ra được những chồi tỏi sạch virus, việc tiến hành nhân nhanh là quan trọng nhằm tăng nhanh số lượng làm nguyên liệu cho sản xuất giống tỏi sạch bệnh, chất lượng cao.

3.3.1. Nhân nhanh cây tỏi sạch virus từ chồi đơn

Khi bổ sung BA vào môi trường nuôi cấy chồi đã kích thích mẫu cấy phát sinh callus mạnh (đạt 100% ở tất cả các công thức có bổ sung BA). Bổ sung BA trong khoảng nồng độ từ 0,5 - 2,0mg/l đã làm tăng hệ số nhân chồi với công thức đối chứng không bổ sung BA, công thức cho hệ số nhân chồi cao nhất là CT2 (0,5mg/l), đạt 1,52 chồi/mẫu. Khi nồng độ BA bổ sung cao hơn 2,0mg/l, hệ số nhân cũng như sự sinh trưởng của chồi giảm, đến tuần thứ 5 lá trở nên vàng, mất dần sắc tố xanh, callus có dạng hạt sùi to ở gốc.

α NAA là một chất điều tiết sinh trưởng thuộc nhóm auxin do vậy khi bổ sung vào môi trường nuôi cấy chồi tỏi đã kích thích sự hình thành rễ mạnh (đạt 100% ở tất cả các công thức có bổ sung α NAA). Mặc dù vậy, α NAA lại làm tăng hệ số nhân chồi cũng như chất lượng của chồi tái sinh. Ở tất cả các công thức có bổ sung α NAA chồi sinh trưởng tốt hơn đối chứng và được thể hiện qua các chỉ tiêu như chiều cao chồi, độ mập, cây khỏe và có lá màu xanh đậm. Mặc dù hệ số nhân chồi khi bổ sung α NAA đều đạt cao hơn so với công thức đối chứng. Như vậy, bổ sung riêng rẽ BA và α NAA mặc dù có làm tăng khả năng nhân chồi nhưng hệ số nhân

vẫn còn thấp. Do vậy, ảnh hưởng của tổ hợp BA và α NAA đến khả năng nhân nhanh chồi tiếp tục được nghiên cứu. Kết quả cho thấy: sự kết hợp giữa BA và α NAA đã làm tăng hệ số nhân khi so sánh với việc sử dụng riêng rẽ. Hệ số nhân đạt cao nhất ở tổ hợp 0,5mg α NAA/l và 2,0mg BA/l và đạt 4,08 chồi/mẫu. Sự sinh trưởng của chồi tái sinh cũng tăng khi nồng độ BA từ 0,5 - 2,0mg/l, đạt cao nhất là 7,55cm ở CT15, ở nồng độ BA cao từ 3,0 - 4,0mg/l, chiều cao chồi giảm mạnh xuống còn 3,50cm ở CT17 (Hình 4).

Như vậy, môi trường thích hợp nhất cho nhân nhanh chồi tỏi là $MS_0 + 0,5mg \alpha NAA/l + 2,0mg BA/l$, đạt hệ số nhân chồi 4,08 chồi/mẫu, chồi sinh trưởng tốt nhất đạt chiều cao 7,55cm.

3.3.2. Tái sinh tạo chồi từ callus

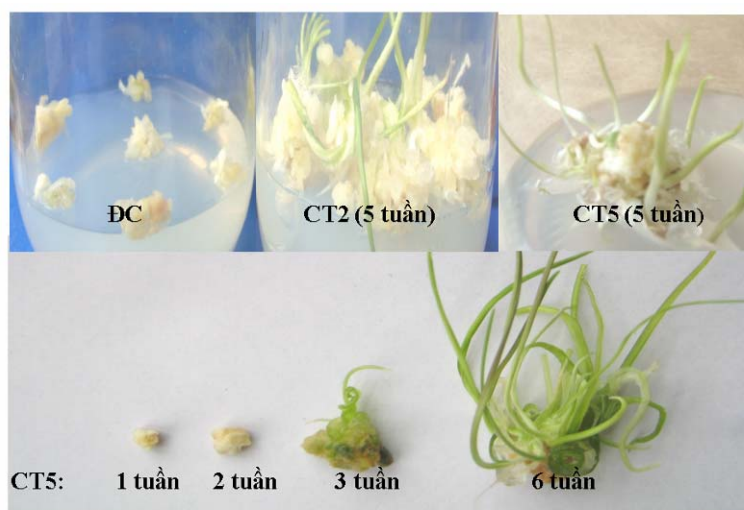
Quan sát các thí nghiệm nghiên cứu ảnh hưởng của một số chất điều tiết sinh trưởng đến khả năng tái sinh và nhân nhanh chồi tỏi sạch bệnh cho thấy: callus được tạo ra khá nhiều và hoàn toàn có khả năng tái sinh tạo chồi (callus có màu vàng hơi xanh, rắn chắc, dạng hạt). Do vậy, tái sinh chồi từ nguồn vật liệu này sẽ giúp tăng nhanh số lượng mẫu tỏi sạch virus.

Trên nền môi trường MS_0 , khi bổ sung BA và Ki ở nồng độ 2,0mg/l đã kích thích callus tăng sinh khối callus mạnh. Môi trường MS_0 , khi bổ sung BA và Ki ở nồng độ 2,0mg/l cũng kích thích callus tái sinh tạo chồi, tỷ lệ callus tạo chồi tăng từ 0% ở công thức đối chứng lên 67,23% ở công thức có bổ sung 2,0mg BA/l, và 54,81% ở công thức bổ sung 2,0mg Ki/l (Bảng 6).

Bảng 6. Nhân nhanh cây tỏi sạch virus bằng tái sinh chồi từ callus (sau 6 tuần)

Công thức	Số mẫu thí nghiệm/ công thức	Tỷ lệ sống (%)	Đường hướng phát sinh			Chiều cao chồi (cm)	Số chồi (chồi/mẫu)
			Tạo rễ (%)	Tạo callus (%)	Tạo chồi (%)		
CT1 (ĐC1)	30	100	0	43,76	0	0	0
CT2	30	100	0	100	67,23	2,71	1,27
CT3	30	100	0	100	54,81	2,60	1,00
CT4 (ĐC2)	30	100	0	100	10,27	2,34	1,52
CT5	30	100	0	100	100	3,25	11,67
CT6	30	100	0	100	100	3,56	7,35

Môi trường nền: MS1 = MS + 15g saccarose + 10g glucose + 5g manitol/l



Hình 5. Nhân nhanh cây tỏi sạch virus bằng tái sinh chồi từ callus

Tuy nhiên, trên nền môi trường MS₁ có bổ sung thêm manitol và glucose tỏ ra có tác động kích thích mạnh đến khả năng phát sinh hình thái của mẫu cấy (Hình 5). Ngoài việc, kích thích mẫu cấy tái sinh tạo callus và kích thích tăng sinh khối callus, thì tỷ lệ callus tái sinh tạo chồi đạt 10,27% ở CT4 và tăng lên 100% ở các CT5 và CT6. Tái sinh chồi bất định từ callus cho hệ số nhân cao, rút ngắn được thời gian cũng như chi phí. Tuy nhiên, đột biến soma đã được biết đến là có khả năng phát sinh ở giai đoạn callus. Do vậy, mặc dù có nhiều ưu điểm, kỹ thuật này nên hạn chế sử dụng khi sản xuất cây tỏi giống cấy mô.

3.4. Nghiên cứu tạo cây hoàn chỉnh

Trong thí nghiệm về nhân nhanh chồi bằng chồi đơn, kết quả thí nghiệm cho thấy rằng sự hình thành rễ ở các mẫu cấy đã đạt 100% trên môi trường có bổ sung αNAA ở nồng độ 0,5 - 1,0mg/l nhưng rễ có dạng bản mỏng to, mọng nước, xê thùy và ngắn nên sẽ không đảm bảo khi đưa ra vườn ươm. Vì vậy, nghiên cứu cần tiến hành thử nghiệm với một số chất khác như IBA, than hoạt tính (THT) và tổ hợp của THT với αNAA hoặc IBA để nâng cao chất lượng rễ cho cây.

Bảng 7. Nghiên cứu tạo cây tỏi sạch virus hoàn chỉnh (sau 4 tuần)

Thí nghiệm	Công thức	Số mẫu thí nghiệm/ công thức	Nồng độ			TL sống (%)	TL ra rễ (%)	Sinh trưởng cây		
			THT (g/l)	IBA (mg/l)	α NAA (mg/l)			Số rễ/cây (rễ)	C. cao cây (cm)	Số lá/cây (lá)
Ảnh hưởng của IBA	CT1	25	-	0	-	100	6,70	2,10	4,70	3,45
	CT 2	25	-	0,25	-	100	43,30	3,67	5,23	3,82
	CT 3	25	-	0,50	-	100	56,72	4,53	5,65	3,87
	CT 4	25	-	1,00	-	100	50,10	4,47	5,10	3,55
	CV%							3,6	0,6	1,3
	LSD5%							0,25	0,61	0,89
Ảnh hưởng của THT	CT5	25	0	-	-	100	6,70	2,10	4,70	3,45
	CT6	25	0,5	-	-	100	50,00	4,67	4,23	3,38
	CT7	25	1,0	-	-	100	43,30	4,80	4,10	3,36
	CV%							2,7	0,7	1,0
	LSD5%							0,21	0,62	0,66
Ảnh hưởng của tổ hợp THT với IBA hoặc α NAA	CT8	25	0	0	0	100	6,74	2,22	5,12	3,58
	CT9	25	0,5	0	0	100	51,54	4,74	5,00	3,60
	CT10	25	0,5	0	0,25	100	96,38	5,02	5,31	3,60
	CT11	25	0,5	0	0,5	100	100	5,19	5,47	3,69
	CT12	25	0,5	0,25	0	100	93,20	5,07	5,32	3,61
	CT13	25	0,5	0,5	0	100	98,00	5,12	5,34	3,66
	CV%							1,4	1,0	1,2
LSD5%							0,12	0,94	0,75	

Môi trường nền: MS₀ = MS + 30g saccarose + 6g agarose/l, pH 5,8

Kết quả nghiên cứu ở bảng 7 cho thấy: bổ sung riêng rẽ IBA hoặc THT vào môi trường nuôi cấy có tác dụng làm tăng sự ra rễ của chồi đồng thời làm tăng chất lượng của cây tỏi cấy mô. Tuy nhiên, tỷ lệ tái sinh tạo rễ khi bổ sung riêng rẽ THT và IBA chưa cao và chỉ đạt dưới 60%.

Khi kết hợp THT với IBA hoặc α NAA tỷ lệ chồi tạo rễ đã tăng lên rất cao, đạt từ 93,20% đến 100% và quan sát cũng cho thấy chất lượng rễ hình thành cũng tốt hơn rất nhiều so với công thức đối chứng và công thức chỉ bổ sung 0,5g THT. Công thức cho tỷ lệ chồi ra rễ 100% và cho số rễ cao nhất 5,19 rễ/chồi là công thức 11. Khi xét về sự sinh trưởng của cây tỏi thì sự sinh trưởng

chiều cao, số lá ở các công thức tương đối đồng đều, trung bình từ chiều cao cây từ 5,00 - 5,47cm và số lá từ 3,58 - 3,69 lá/cây không có sự khác biệt so với đối chứng. Tuy nhiên, xét tổng thể ở các chỉ tiêu chiều cao, số lá, số rễ thì công thức 11 (MS + 30g saccarose + 0,5g THT/l + 0,5mg α NAA/l) là công thức thích hợp cho giai đoạn tạo cây tỏi hoàn chỉnh trong điều kiện *in vitro*.

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã tìm ra công thức khử trùng mẫu tỏi tốt nhất là: Ethanol 70% trong 1 phút + NaDCC 5g/l trong 5 phút, đạt tỷ lệ mẫu sạch là 68,88%, tỷ lệ mẫu sạch vi sinh vật có khả năng tái sinh chồi là 66,85%.

Môi trường tái sinh chồi từ meristem tốt nhất là MS + 30g saccarose + 1mg BA/l, cho tỷ lệ mẫu sống là 68,23%, tỷ lệ tái sinh tạo callus 44,33%, tạo chồi là 64,18%, chiều cao chồi đạt 4,33cm, hệ số nhân chồi đạt 1,88 chồi/mẫu.

Có thể làm sạch virus cho cây tỏi khi tách meristem ở kích thước $\leq 0,3\text{mm}$. Và khi bổ sung ribavirin vào môi trường nuôi cấy tái sinh meristem ở nồng độ 20mg/l có tác dụng làm sạch virus khi kích thước tách $\leq 1,0\text{mm}$.

Nghiên cứu cũng đã xác định được môi trường nhân nhanh chồi tỏi tốt nhất là môi trường MS + 30g saccarose + 0,5mg $\alpha\text{NAA/l}$ + 2,0mg BA/l, cho hệ số nhân chồi đạt 4,08 chồi/mẫu, chồi sinh trưởng tốt nhất đạt chiều cao 7,55cm.

Môi trường nhân nhanh callus là MS + 30g saccarose + 2,0mg BA/l. Môi trường tái sinh chồi từ callus tốt nhất là MS + 15g saccarose/l + 10g glucose/l + 5g manitol/l + 2,0mg BA/l cho số chồi tái sinh trên mẫu là 11,67 chồi/mẫu.

Môi trường tạo cây hoàn chỉnh tốt nhất cho cây tỏi là MS + 30g saccarose + 0,5g THT/l + 0,5mg $\alpha\text{NAA/l}$, cho tỷ lệ cây ra rễ đạt 100%, số rễ 5,19 rễ/cây và cây sinh trưởng phát triển tốt.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Tạ Thu Cúc, Hồ Hữu An, Nghiêm Thị Bích Hà (2000). Giáo trình cây rau, NXB Nông nghiệp, Hà Nội, Tr 262 - 233.
- A.S. Abdel Wahab, S. Elnagar and M.A.K. El-Sheikh (2009). Incidence of Aphid-borne onion yellow dwarf virus (OYDV) in Alliaceae Crops and Associated Weeds in Egypt 4 th Conference on Recent Technologies in Agriculture, pp 21-23.
- Barg, E., Lesemann, D.E and Vetten, H.J (1994). Identification, partial characterization, and distribution of viruses infecting *Allium* crops in south and southeast Asia. *Acta Hort.* 358:251- 258.
- Bos, L. (1976). Onion yellow dwarf virus. CMI (Commonw. Mycol. Inst.)/AAB (Assoc. Appl. Biol.) Descriptions of Plant Viruses. No. 158. Kew, Surrey, England.
- Bos, L., Huijberts, N., Huttinga, H., and Maat, D. Z. (1978). Leek yellow stripe virus and its relationships to onion yellow dwarf virus; characterization, ecology and possible control. *Neth. J. Plant Pathol* 84:185-204.
- Diekmann M, (1995). *Allium spp.* FAO/IPGRI Technical Guidelines for the Safe Movement of Germplasm, pp 19-31.
- Gisele Irvine and Samantha Sterling (2002). Increasing the export potential - opportunities for Australian garlic, pp 1-3.
- Ha, C.V., Coombs, S., Revill, P.A., Harding, R.M., Vu, M.T. and Dale, J.L. (2008a). Identification and sequence analysis of potyviruses infecting crops in Vietnam. *Archives of virology*. Vol.153, p:45-60.
- Ha, C.V., Coombs, S., Revill, P.A., Harding, R.M., Vu, M.T. and Dale, J.L. (2008b). Design and application of two novel degenerate primer pairs for the detection and complete genomic characterization of potyviruses. *Archives of virology*. Vol.153, p:25-36.
- Vũ Triệu Mân, Lê Lương Tề (2001). Giáo trình bệnh cây nông nghiệp, NXB Nông nghiệp, Hà Nội.
- Lot H., Chovelon V., Souche S. and Delecalle, B. (1998). Effects of onion yellow dwarf and leek yellow stripe viruses on symptomatology and yield loss of three French garlic cultivars. *Plant-Disease.*, pp 82-(12):1381-1385
- Schwartz H. F. and Mohan S.K. (1995). Compendium of onion and garlic diseases. APS. PRESS. The American Phytopathological Society. pp 52.
- Van der Vlugt, R.A.A., Steffens, P., Cuperus, C., Barg, E., Lesemann, D.E., Bos, L., and Vetten, H.J. (1999). Further evidence that shallot yellow stripe virus (SYSV) is a distinct potyvirus and reidentification of Welsh onion yellow stripe virus as a SYSV strain. *Phytopathology*. Vol.89, p: 148-155.