MỘT SỐ GIẢI PHÁP CÔNG NGHỆ ỨNG DỤNG TRONG SẢN XUẤT CÂY GIỐNG HOA LAN SẠCH BỆNH VIRUS PHỤC XUẤT KHẨU

Nguyễn Ngọc Quỳnh
Viện KHKT Nông nghiệp miền Nam E-mail: quynh.nn@iasvn.org Tel: 0908866125

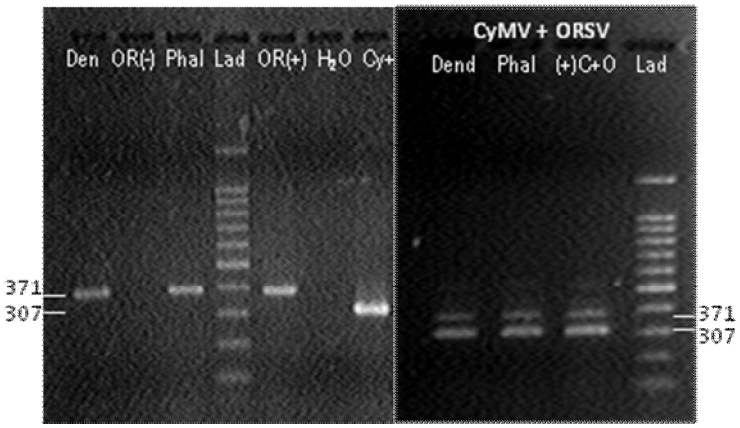
1- Hoa nhiệt đới trên thị trường thế giới và những thách thức

Sản phẩm hoa nhiệt đới trên thị trường thế giới chủ yếu là hoa lan (56%), hoa môn (28,7%), mỏ két (5,1%); Chuối pháo (2%) Nghệ bông (1,6%) và dứa cảnh (0,2%). Các loại khác sản xuất từ Châu Phi (6,5%). Năm 2008, tổng thị trường hoa Châu Âu khoảng 13 tỷ EUR. Trong đó thị phần hoa cắt cành nhiệt đới chiếm từ 2-5%. Nhu cầu về hoa nhiệt trên thị trường thế giới trong những năm gần đây nhìn chung có xu hướng tăng và ổn định. Hoa nhiệt đới không chỉ sản xuất ở các nước nhiệt đới mà còn sản xuất trong nhà kính ở các nước ôn đới như: Hà Lan, Đức, Italy, Pháp. Tuy nhiên từ năm 2006 đến nay, các nước EU gia tăng nhập khẩu hoa nhiệt đới từ các nước nhiệt đới phát triển bởi lợi nhuận cao hơn so với sản xuất trong nước.Chính vì vậy mười năm trở lại đây, nhu cầu hoa lan trên thị trường thế giới ngày càng tăng cao. Năm 2000 tổng giá trị hoa lan trên thị trường thế giới mới chỉ khoảng 0,5 tỉ USD, chỉ 3 năm sau (năm 2003) giá trị sản phẩm này tăng lên 1 tỉ USD, đặc biệt là sản phẩm hoa lan chậu. Năm 2003 tổng sản lượng tiêu thụ hoa lan chậu trên thị trường thế giới là 120 triệu chậu, năm 2006 tăng lên 155 triệu chậu và năm 2009 là 250 triệu chậu. Dự tính tới năm 2014 sản lượng tiêu thụ hoa chậu trên thế giới sẽ là 305 triệu chậu (ICOGO Bulleting, 2009). Nhiều nước coi hoa lan là sản phẩm chiến lược, mang lại nguồn lợi kinh tế cao cho quốc gia. Thái Lan là nước xuất khẩu hoa lan lớn thứ hai sau Hà lan, với sản phẩm chủ lực là hoa lan *Dendrobium* cắt cành, kim ngạch xuất khẩu hàng năm gần 100 triệu USD (OAE, 2010) và coi hoa lan là ”Quốc hoa” của đất nước. Đài Loan coi lan hồ điệp là ”siêu sản phẩm”, bởi chỉ với diện tích sản xuất 179 ha lan hồ điệp trong tổng số 564,6 ha hoa lan, năm 2010 Đài Loan thu được 82,554 triệu USD trong tổng số 116,564 triệu USD hoa lan xuất khẩu. Điều này đã đưa giá trị hoa lan hồ điệp lên tới 461,2 ngàn USD/ha. Cho tới nay chưa cây trồng nông nghiệp nào có thể bắt kịp (Dennis Kao, 2012). Tuy nhiên để sản phẩm có giá trị cao như hoa lan ra được thị trường thế giới, các nhà sản xuất hoa cần phải vượt qua được các rào cản lớn đó là: i) sản phẩm sạch bệnh. Bệnh vi rút đang là vấn đề nhức nhối đối với các nước sản xuất và xuất khẩu hoa lan, 2 trong số 30 loài vi rút được xem là nguy hiểm và phổ biến nhất gây hại hoa lan trên thế giới hiện nay là CyMV (*Cymbidium mosaic virus*) gây bệnh khảm vàng và ORSV (*Odontoglossum ringspot virus*) gây bệnh đốm vòng trên lá. Cả hai bệnh này giảm sức sống và chất lượng sản phẩm hoa lan và nằm trong danh mục cấm đối với các nước nhập khẩu hoa tuân thủ công ước Washington; ii) đối với hoa lan, để đảm bảo sản phẩm thuần nhất về màu sắc và và kích thước, hầu hết các nhà sản xuất sử dụng cây giống nuôi cấy mô để sản xuất. Tuy nhiên để tạo ra một số lượng lớn cây giống nuôi cấy mô trong một thời gian ngắn theo phương pháp nuôi cây mô truyền thống là vấn đề rất khó khăn. Như vậy thách thức lớn đối với các nhà sản xuất hoa lan xuất khẩu là làm sao phải tạo ra được nguồn cây giống sạch bệnh (virus-free) với một khối lượng đủ lớn trong một thời gian nhất định để đáp ứng kịp thời tiến độ sản xuất hoa sản phẩm.

2. Một số giải pháp của viện KHKT nông nghiệp miền Nam

2.1. Qui trình RT-PCR kiểm soát bệnh CyMV và ORSV trên cây hoa lan

Phần lớn các giống hoa lan đang trồng tại các nhà vườn ở nước ta đều bị nhiễm bệnh khảm vàng (CyMV) và nột số nhiễm bệnh đốm vòng (ORSV) trên lá. Từ năm 2007, viện Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp miền Nam đã thiết lập, hoàn thiện qui trình xét nghiệm RT-PCR để phát hiện sớm hai bệnh vi rút CyMV và ORSV trên các mẫu hoa lan hồ điệp *(phalaenopsis)* và *Dendrobium* thu thập tại một số tỉnh phía Nam, nhằm kiểm soát vi rút trên vật liệu nhân giống và cây giống sản phẩm phục vụ sản xuất cây lan giống sạch bệnh. Qui trình chạy thử trên 8 cặp mồi với các mẫu ly trích từ lá lan các cây lan mẫu, đã xác định được 2 cặp mồi đặc hiệu phát hiện vi rút CyMV và vi rút ORSV. Tiếp tục hiệu chỉnh và tối ưu các phản ứng PCR và hoàn thiện qui trình xét nghiệm. Kết quả đện di (hình 1), các mẫu lan hồ điệp (Phal) và Dendro (Den) bị nhiễm virus CyMV tương ứng vạch băng ở vị trí 307bp, và nhiễm vi rúut ORSV tương ứng với vạch băng 371bp. Các vị trí này đều trùng khớp với với các độ dài đoạn gene khuyếch đại của CyMV (307bp) và ORSV (371bp) theo tính toán. Điều này đúng với cả hai trường hợp chạy single PCR và Multiplex PCR.



Hình 1. Kết quả điện di sản phẩm PCR của các phản ứng Single PCR (trái) và Multiplex PCR (phải) với 2 cặp mồi Ph.CM.f/r và Ph.OR.f/r

Qui trình xét nghiệm vi rút bằng RT-PCR tóm tắt như sau:

RNA → cDNA → PCR → Đọc kết quả

(Ly trích mẫu lá) *(Enzym phiên mã ngược)* *(phản ứng PCR)* *(điện di sản phẩm)*

Qui trình xét nghiệm vi rút CyMV và ORSV trên cây hoa lan bằng RT-PCR của viện KHKT Nông nghiệp miền Nam thiết lập, đã áp dụng xét nghiệm kiểm tra vi rút CyMV và ORSV trên các cây lan hồ điệp mẹ và các chồi in vitro trước khi nhân giống và kiểm tra các cây giống trước khi chuyển ra vườn sản xuất. Kết quả đã tạo được 3000 cây lan hồ điệp giống *Phalaenopsis* Yukidian và hơn 2000 cây lan *Dendrobium* sonia sạch bệnh vi rút CyMV và ORSV cung cấp cho vườn sản xuất đạt kết quả. Ngoài ra qui trình này cũng đã áp dụng xét nghiệm bệnh virus CyMV và ORSV trên 100 mẫu địa lan (*Cymbidium)* cho phân viện Sinh Học Nhiệt Đới (2008-2009), phục vụ sản xuất địa lan sạch bệnh.

Qui trình cũng đã áp dụng xét nghiệm virus CyMV và ORSV trên hàng trăm mẫu cây như lan in vitro, loài *Dendrobium, phalaenopsis, cymbidium,* cà phê và cây hoa dạ thảo của trường Đại học Quốc tế TPHCM (2010) phục vụ công tác nhân giống sạch bệnh.

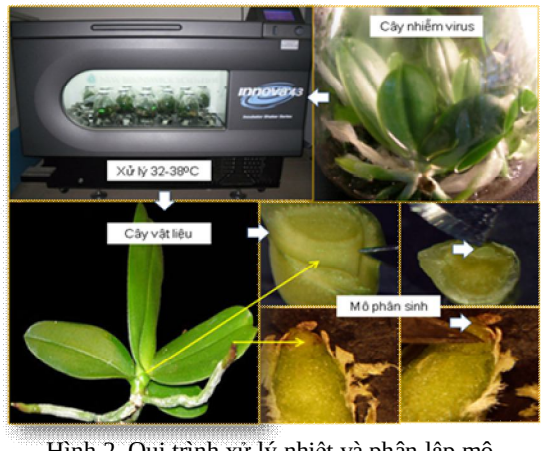
2.2. Qui trình tạo cây sạch bệnh từ nguồn cây mẹ bị nhiễm bệnh

Đối với nhân giống vô tính, muốn tạo được cây giống sạch vi rút thì trước tiên phải có cây mẹ sạch bệnh. Tuy nhiên trong thực tế, hầu hết các vườn lan sản xuất ở nước ta đều sử dụng cây giống từ nhiều nguồn, không kiểm soát bệnh, không có lưới bảo vệ côn trùng. Vì vậy xác xuất để tìm được cây lan sạch vi rút hoàn toàn trong quần thể các nhiễm bệnh là rất thấp. Như vậy muốn tạo cây sạch bệnh vi rút từ cây bị nhiễm bệnh, hay nói khác đi là loại vi rút ra khỏi cây mẹ, thì cách duy nhất là tái tạo cây từ mô phân sinh của cây bị nhiễm bệnh. Tuy nhiên tùy thuộc vào đặc tính di truyền từng giống, loài cây cũng như đặc tính hoạt động của từng loại vi rút mà có những phương pháp thanh lọc khác nhau.

Qui trình tạo cây lan sạch bệnh từ cây bị nhiễm bệnh tóm tắt như sau:

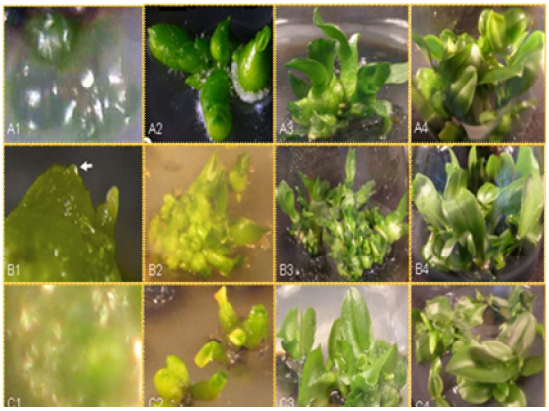
Cây mẹ nhiễm virus *(cây mẫu thu thập tại vườn sản xuất)* → Chồi *in vitro* *(tạo từ mắt ngủ phát hoa)* → Cây *in vitro* *(tạo từ chồi in vitro)* → Cây sạch bệnh *(tạo từ mô phân sinh sau khi xử lý nóng)*

Hình 2, cây in vitro tạo từ chồi in vitro của mắt ngủ các phát hoa của cây mẹ nhiễm bệnh vi rút, chuyển vào tủ plant grow chamber, xử lý ở các nhiệt độ từ 32~38^{0}C, (cao hơn nhiệt độ bình thường của cây từ 7-13^{0}C), xử lý liên tục trong thời gian từ 4 đến 16 giờ, sau đó đưa vào phòng cấy chuyển để phân lập mô phân sinh. Tiếp tục nuôi cấy các mảnh mô phân sinh có chiều dài 1mm trong các môi trường tái sinh chồi và tạo cây in vitro hoàn chỉnh.



Hình 2. Qui trình xử lý nhiệt và phân lập mô phân sinh tạo cây lan hồ điệp sạch bệnh

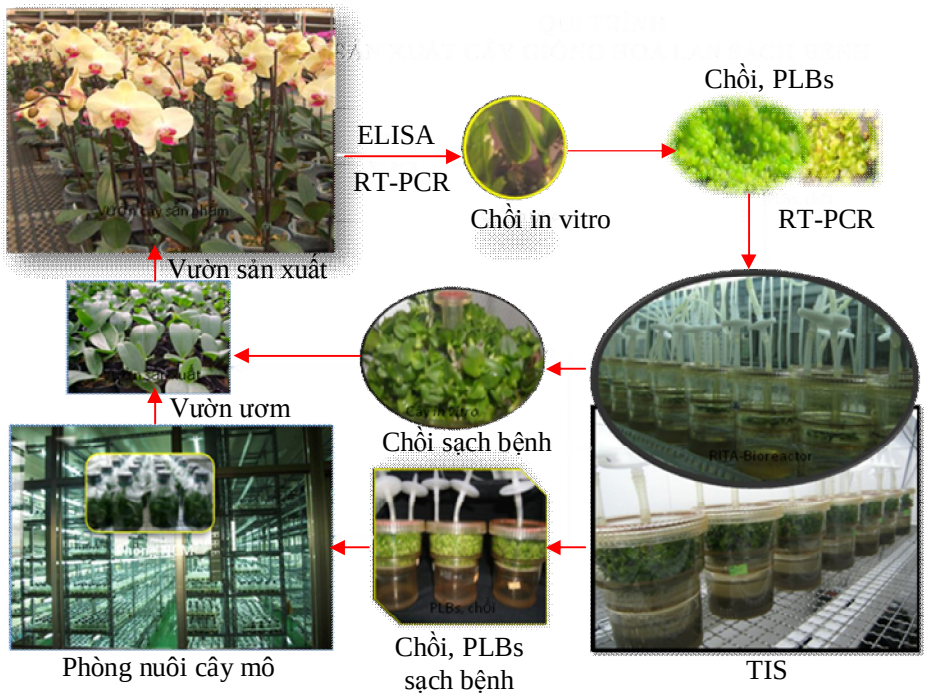
Hình 3. Kết quả nuôi cấy mô phân sinh lấy ở các vị trí khác nhau của cây lan hồ điệp trong thời gian nuôi va cấy chuyển 3-4 tuần/lần trong thời gian từ 12 đến 36 tuần nuôi cấy. Tiếp tục cấy các chồi thu được qua trường tạo cây in vi tro (môi trường thạch chứa 3,5 g/l Hyponex 7:6:19) để tạo cây sạch bệnh, hoặc chuyển sang môi trường lỏng để nhân chồi.



Hình 3. Sự hình thành chồi, PLBs lan hồ điệp từ các mô phân sinh khác nhau
A1~ A4: mô PS đỉnh chồi sau cấy 12, 16, 24, 36 tuần
B1~ B4: mô PS đỉnh lá sau cấy 12, 16, 24, 36 tuần
C1~ C4: mô PS đỉnh rễ sau cấy 12, 16, 24, 36 tuần

Chồi được tạo từ mô phân sinh được kiểm tra vi rút bằng phương pháp PCR chọn ra chồi siêu sạch tiếp tục nhân chồi và tạo cây giống sạch bệnh. Sản phẩm sạch bệnh này được nhân hanh bằng hệ thống nuôi cấy ngập tạm thời TIS (temporary immersion system)

2.3. Nhân chồi và PLB bằng hệ thống TIS (temporary immersion system)



Hình 4. Qui trình sản xuất cây lan hồ điệp sạch bệnh bằng hệ thống bioreactor TIS của viện Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp miền Nam

Viện Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp miền Nam đã hoàn thiện qui trình nhân và sản xuất cây giống hoa lan sạch bệnh bằng hệ thống bioreactor dạng nuôi cấy ngập không ổn định cho hiệu quả cao. Cụ thể đối với lan hồ điệp giống *Phalaenopsis* Yukidian TIS cho hệ nhân chồi cao gấp 3 lần (môi trường không TDZ) và cao gấp 4-5 lần (môi trường có TDZ). Đối với giống lan so với môi trường nuôi cấy mô truyền thống *Dendrobium* Sonia, TIS cho hệ số nhân chồi cao 4,5 lần (môi trường không TDZ) và cao gấp 6-7 lần (môi trường có TDZ) so với môi trường nuôi cấy mô truyền thống. Chất lượng cây giống đồng đều, sức sống cao tương đương như nuôi cấy trên môi trường truyền thống (hình 5)

Hình 5a. Sản phẩm chồi của lan hồ điệp và Dendro nhân bằng hệ thống TIS sau 14 tuần nuôi trong môi trường lỏng

Hình 5b : A. Cây giống lan Dendro; B cây giống lan hồ điệp nuôi từ nguồn chồi của hệ thống TIS

3. Nhận xét chung

Thanh lọc vi rút CyMV gây bệnh khảm vàng và ORSV gây bệnh đốm vòng trên lá cây hoa lan hồ điệp và dendrobium bị nhiễm bệnh bằng phương pháp nuôi cấy lớp mỏng mô phân sinh đỉnh, với chiều dài 1 mm, kết hợp sử dụng phương pháp RT-PCR trong kiểm soát vi rút trên cây vật liệu và cây lan sản phẩm, đã tạo được cây giống lan hồ điệp in vitro hoàn toàn sạch vi rút CyMV, (CyMV-free) làm nguyên liệu sản xuất cây lan giống sạch bệnh.

Sản xuất cây giống hoa lan hồ điệp và dendro bằng hệ thống TIS cho hệ số nhân chồi cao, rút ngắn được thời gian nuôi trong phòng nuôi cấy, cây giống đảm bảo chất lượng, đáp ứng được nhu cầu số lượng cây giống lớn trong một thời gian ngắn, khắc phục được sự thiếu hụt cây giống trong sản xuất.

Tỉnh Đồng Tháp nói riêng và ĐBSCL nói chung có truyền thống sản xuất hoa nhiệt đới lâu đời. Tuy nhiên với sản lượng và chất lượng hoa cảnh hiện nay chỉ đáp ứng được nhu cầu thị trường trong nước. Việc hướng tới xuất khẩu trong tương lai cần phải cải tiến lại một số cung đoạn sản suất.

Hiện nay một số địa phương có các phòng nuôi cấy mô sản xuất cây giống. Để nâng cao hiệu quả sản xuất cây giống, đáp ứng nhu cầu ngày càng cao cho người trồng hoa ở địa phương, các cơ sở sản xuất cây giống cần hợp tác với các viện nghiên cứu để trao đổi nguồn nguyên liệu (chồi, PLB) sạch bệnh nhân bằng hệ thống TIS để nâng cao sản lương và chất lương cây giống

5. Tài liệu tham khảo

Brown D.C.W. and Thorpe T.A., 1995. Crop improvement through tissue culture *World Journalof Microbiology* & *Biotechnology*. 11: 409-415

Dennis Kao, 2012. President of Taiwan Orchid Growers Association. The developments and trends of orchid in Taiwan[http://www.toga.org.tw/images/upload/File/ICOGO6.pdf]

ICOGO manual 2009. A Message from the President. [Sourse: Meeting 5 March 2009]. [Available form http://www.icogo.org/images/2009_ICOGO_Bulletin_3_1_.pdf]

Kassanis, 1957. The use of tissue culture to produce virus – free clones from infected potato varieties. *Ann. Appl. Biol.* 45:422-427.

Khentry Y., Paradornuwat A., Tantiwiwat S., Phansiri S.and Thaveechai N., 2006. Incidence of *Cymbidium mosaic virus* and *Odontoglossum ringspot virus* in *Dendrobium* spp. *in Thailand. CropProtection* 25: 926-932

Tanaka s., H. Nishii, S. Ito, M. Kameya-Iwaki, 1997. Detection of Cymbidium Mosaic Potexvirus and Odontoglossum Ringspot Tobamovirus from Thai Orchids by Rapid Immunofilter Paper Assay. Plant diseases 81:167-170.

Wong S.M., Chng C.G., Lee Y.H., Tan K. and Zettler F.W., 1994. Incidence of cymbidium mosaic and odontoglossum ringspot viruses and their significance in orchid cultivation in Singapore. Crop Protection 13: 235-239

Bùi Cách Tuyến, 2005. [http://www.sggp.org.vn/thongtincanuoc/nam2005/thang2/36781/]

Lâm Quang dự, 2007.
[http://www.rauhoaquavietnam.vn/default.aspx?tabID=10&ID=92&LangID=2&NewsID=2214