

Nhân giống vô tính giống gừng trâu (*Zingiber officinale* (Willd.) Roscoe) bằng nuôi cấy cắt lát tế bào *in vitro*

Nguyễn Phương Quy^{1,2,*}, Phạm Thị Kim Hạnh², Lê Quỳnh Mai¹, Lê Khả Tường²

¹Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQGHN,
334 Nguyễn Trãi, Thanh Xuân, Hà Nội, Việt Nam

²Phòng Ngân hàng Gen *in vitro*, Trung tâm Tài nguyên thực vật, An Khánh, Hà Nội, Việt Nam

Nhận ngày 16 tháng 8 năm 2017

Chỉnh sửa ngày 20 tháng 9 năm 2017; Chấp nhận đăng ngày 10 tháng 10 năm 2017

Tóm tắt: Gừng là cây trồng truyền thống ở Việt Nam cũng như ở nhiều nước châu Á với mục đích chủ yếu là làm gia vị và dược liệu. Nghiên cứu này chú trọng xác định điều kiện ở một số bước chính giúp nhân nhanh *in vitro* giống gừng trâu qua phương pháp nuôi cấy lát cắt tế bào. Bước đầu kết quả đã đạt được như sau: Ở giai đoạn khử trùng, mẫu được khử trùng bằng NaClO (20%) trong 15 phút là công thức khử trùng phù hợp nhất với tỉ lệ mẫu sống lên 63,3%. Chuyển sang giai đoạn nuôi cấy lát cắt môi trường (MT) MS có bổ sung 3mg/l BAP có tỉ lệ tạo chồi, tiền chồi tốt nhất để tiếp tục làm vật liệu cho giai đoạn nhân nhanh. Trong giai đoạn nhân nhanh môi trường có bổ sung vitamin B1 có ảnh hưởng tốt hơn đến cây cụ thể MT bổ sung có bổ sung 1,0 mg/l BAP; 0,1 mg/l Ki và 3mg/l B1 là phù hợp nhất. Các chồi sau đó được chuyển sang môi trường bổ sung 3 mg/l B1 và 0,3 mg/l NAA sẽ cho hệ rễ phát sinh tốt nhất sau 1 tháng.

Từ khoá: Nhân nhanh, gừng, *Zingiber officinale*, Gừng trâu, cắt lát tế bào.

1. Đặt vấn đề

Đối với kỹ thuật nhân giống *in vitro* thông thường có nhiều ưu điểm nhưng đã có những hạn chế khi ứng dụng ở mức độ công nghiệp, đó là giá thành cao ở cây thành phẩm. Để cải thiện điều này phải thay đổi phương thức nhân giống. Một trong các phương pháp làm thay đổi phương thức nhân giống đạt hiệu quả nhân giống cao đó là phương pháp nuôi cấy lát mỏng tế bào. Phương pháp này được ứng dụng thành công ở rất nhiều loài ngay ở Việt Nam [1]. Đối với cây gừng, đã có những nghiên cứu bước

đầu về nuôi cấy mô để nhân nhanh tạo nguồn cung cấp cây giống sạch bệnh cả trong [2, 3] và ngoài nước [4-6]. Các nghiên cứu về nuôi cấy lát cắt mô lá [3], tạo phôi vô tính từ nuôi cấy lát cắt thân hay cuống lá sau đó tái sinh thành cây con *in vitro* [4] đã được thực hiện và với phương pháp nuôi cấy này đã tạo ra được số lượng cây con lớn hơn nhiều lần so với phương pháp nuôi cấy chồi thông thường. Tuy nhiên, ở Việt Nam chưa có nghiên cứu về cắt lát mô sinh dưỡng cây gừng, đặc biệt với giống gừng Trâu. Với mục đích sản xuất ra hàng loạt cây con chất lượng, đồng đều sạch bệnh trong thời gian ngắn chúng tôi đã “Nhân giống vô tính giống gừng Trâu (*Zingiber officinale* (Willd.) Roscoe) qua nuôi cấy lát tế bào *in vitro*” để tìm ra quy trình nhân nhanh đạt hiệu quả kinh tế cao.

* Tác giả liên hệ. ĐT.: 84-79937126.

Email: phuongquy41@gmail.com

<https://doi.org/10.25073/2588-1140/vnunst.4577>

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

- Vật liệu tạo chồi ban đầu là chồi phát sinh từ củ loài gừng trâu (*Zingiber officinale* (Willd.) Roscoe) giống G10.

- Vật liệu nuôi cấy cắt lát là các chồi *in vitro* của giống gừng này (đạt kích thước 2-3cm cao).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

- Chọn chồi *ex vitro* kích thước khoảng 3-5 cm, tách bỏ 1 phần lá bao bên ngoài. Rửa sạch bằng xà phòng, tráng bằng cồn 70%, tráng nước cất sau đó khử trùng bằng 20% NaClO trong 5-15 phút, tráng nước cất 3 lần.

- Chọn chồi *in vitro* kích thước 2 -3 cm, bỏ phần mô già, lấy phần mô non từ gốc lên ngọn cắt thành từng lát 0,7-1,0mm và cấy vào môi trường (MT).

- Môi trường cấy mẫu: Môi trường cơ bản là MT: MS (Murashige & Skoog, 1962) + nước dừa 100ml/l + agar 5g/l + 30g/l đường sucrose, có bổ sung các chất kích thích sinh trưởng tùy theo từng thí nghiệm.

- Điều kiện nuôi cấy: MT được khử trùng 19 phút với nhiệt độ 120°C, pH môi trường 5,8. Bình nuôi: Đĩa petri. Mẫu nuôi cấy lát mỏng được nuôi cấy tối 7-15 ngày ở nhiệt độ 25±2°C, sau đó đưa ra ngoài ánh sáng cường độ 2500 lux, chu kỳ sáng 12 h/ngày).

Mẫu được quan sát trên máy ảnh soi nổi và máy ảnh kỹ thuật số.

Các bước nghiên cứu được thể hiện bằng các thí nghiệm sau:

* *Thí nghiệm 1:* Nghiên cứu ảnh hưởng của chất khử trùng đến sinh trưởng của mẫu *in vitro*.

Mẫu được khử trùng bằng NaClO 20% trong 5, 10, 15, 20 phút và cấy vào môi trường: MS + 1 mg/l BAP + 5 g/l agar + 30g/l đường sucrose + 1mg/l PVP + 100mg/l nước dừa.

* *Thí nghiệm 2:* Nghiên cứu ảnh hưởng của môi trường đến khả năng phát sinh hình thái của mẫu lát cắt.

Các mẫu lát cắt cấy trên các công thức môi trường (MS + 100mg/l nước dừa + 5 g/l agar + 30g/l đường sucrose) bổ sung các chất điều

hòa sinh trưởng (ĐHST) BAP (0-5 mg/l); 2,4D (0,5 - 5mg/l). Thí nghiệm nuôi cấy trong tối 15 ngày sau đó đưa ra chiếu sáng bình thường. Thời gian nuôi cấy 1,5 tháng.

* *Thí nghiệm 3:* Ảnh hưởng của vitamin B1 đến khả năng nhân và sức sống của chồi.

Các chồi mới tạo thành cấy chuyển sang môi trường nhân chồi (MS + 100mg/l nước dừa + 5 g/l agar + 30g/l đường sucrose + 0,1mg/l Ki + 1,0 mg/l BAP) bổ sung vitamin B1 (0-4mg/l).

* *Thí nghiệm 4:* Ảnh hưởng của NAA đến sinh trưởng và phát triển cây *in vitro*. Chồi sau khi nhân đạt kích thước 4-6cm cấy chuyển sang môi trường tạo cây hoàn chỉnh, môi trường (MS + 100ml/l nước dừa + 3mg/l B1) bổ sung (0; 0,2; 0,3; 0,4mg/l NAA)

Các chỉ tiêu đánh giá:

- Số lá cây (lá): đếm tổng số lá/ cây sau lần theo dõi

- Chiều cao cây (cm): đo từ gốc đến ngọn lá.

- Số rễ trung bình/cây (rễ): đếm số rễ trung bình/cây.

- Màu sắc phiến lá quan sát bằng mắt thường.

- Tỷ lệ mẫu PSHT (%)

- Tỷ lệ tạo mô sẹo, chồi (%)

- Tỷ lệ mẫu mọng nước (%)

Phương pháp xử lý số liệu: Các thí nghiệm thực hiện cùng một thời điểm, được lặp lại 3 lần. Số lượng mẫu trong 1 thí nghiệm là 30 mẫu. Số liệu sau khi thu thập được xử lý theo chương trình thống kê Irristat. Tính toán số liệu kiểu ngẫu nhiên 1 nhân tố.

3. Kết quả nghiên cứu

3.1. Thiết lập hệ nuôi cấy vô trùng

Trong đề tài để tạo mẫu sạch chúng tôi tiến hành khử trùng với NaOCl (20%) trong 5, 10, 15, 20 phút. Mẫu sau khi được khử trùng được cấy vào môi trường: MS + 1 mg/l BAP + 5 g/l agar + 30g/l đường sucrose + 1mg/l PVP + 100mg/l nước dừa. Kết quả của thí nghiệm được thể hiện ở Bảng 1.

Bảng 1. Ảnh hưởng của nồng độ chất khử trùng đến sinh trưởng của mẫu chồi

Hóa chất	Nồng độ (%)	Thời gian (phút)	Số mẫu ban đầu	Mẫu (sau 10 ngày)		Mẫu nội nhiễm sau 45 ngày	Mẫu sống (%)
				Mẫu chết (%)	Mẫu nhiễm (%)		
NaClO	20	5	30	0,0	46,7	23,3	30,0
	20	10	30	3,3	30,0	06,7	60,0
	20	15	30	26,7	10,0	00,0	63,3
	20	20	30	79,0	00,0	00,0	21,0
LSD0,05							1,40876
CV(%)							1,6

Khi khử trùng trong 5-10 phút mẫu chết tỉ lệ rất thấp nhưng tỉ lệ mẫu nhiễm cao lại cao. Khử trùng tăng lên 15 phút thì tỉ lệ sống cao đạt 63,3%, số mẫu chết tăng lên 26.7%, mẫu nhiễm 10% và mẫu không tiếp tục nhiễm. Nếu tiếp tục tăng thời gian khử trùng thì số mẫu sống giảm mạnh chỉ còn 21%.

Từ kết quả phân tích, ta có thể nhận thấy khử trùng bằng NaClO 20% trong 15 phút là công thức khử trùng phù hợp nhất. Mẫu sau khi khử trùng rửa sạch 3 lần bằng nước cất và cấy vào môi trường (MT): MS + 0,5mg/l BAP + 30g/l Đường + 5g Agar + 1mg/IPVP. Sau 15

ngày xuất hiện chồi. Các chồi này lớn lên sau 45 ngày được chồi kích thước 2-3cm là vật liệu để nuôi cấy cắt lát.

3.2. Nghiên cứu môi trường nuôi cấy tạo chồi từ lát cắt mô non

Chọn chồi *in vitro* kích thước 2-3 cm, bỏ phần mô già, lấy phần mô non từ gốc lên ngọn cắt thành từng lát 0,7-1,0mm và cấy vào môi trường chứa các chất điều hòa sinh trưởng để tạo nguồn vật liệu nhân (hình 1a). Kết quả ở Bảng 2.

Bảng 2. Ảnh hưởng của chất ĐHST đến khả năng phát sinh hình thái của mẫu lát cắt mô non (sau 1,5 tháng)

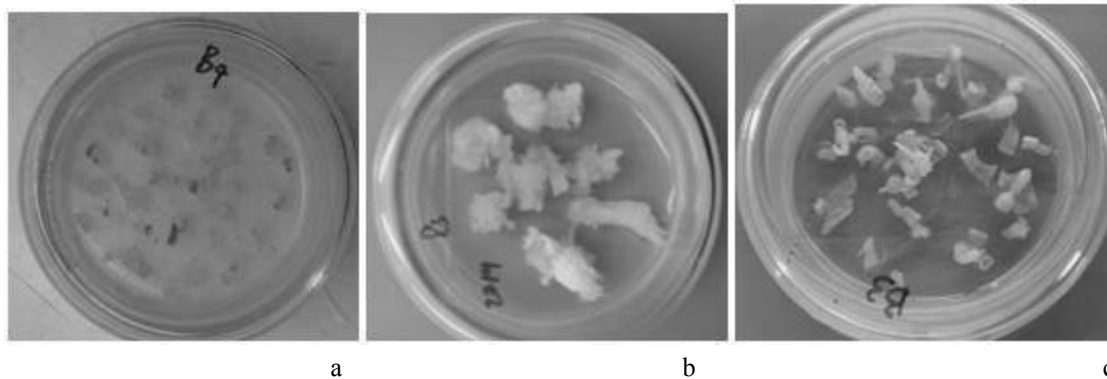
Chất ĐHST	Nồng độ (mg/l)	Tỉ lệ mẫu PSHT	Dạng hình thái phát sinh	Chất lượng mẫu mới
BAP	0	2	chồi	tốt
	1	44	chồi	tốt
	2	48	chồi	tốt
	3	56	chồi, tiền chồi	tốt, bình thường
	5	48	Mô sẹo, mô sẹo bất định, tiền chồi	Cứng, thành khối trắng
LSD0,05		0,828870		
CV(%)		1,1		
2,4D	0,5	29	chồi	Mềm éo lá
	1	48	Chồi, tiền chồi bất định	Mềm éo lá, phát sinh rễ
	2	54	Mô sẹo, tiền chồi	Mềm éo lá, phát sinh rễ
	3	82	Mô sẹo	Mềm, nhũn
	5	80	Mô sẹo	Mềm, nhũn, nát ướt mọng nước
LSD0,05		1,32299		
CV(%)		1,2		

Kết quả thí nghiệm cho thấy Môi trường bổ sung BAP mẫu đều phát sinh hình thái (PSHT), hình thái mới chủ yếu là chồi, 1 số mẫu khi bổ sung liều cao BAP phát sinh chồi bất định, tiền chồi nhưng dạng khối trắng. Tỉ lệ PSHT tăng dần và đạt cao nhất khi bổ sung vào môi trường

BAP đến 3mg/l, hình thái dạng chồi và tiền chồi, sinh trưởng tốt (hình 1 c). Nếu bổ sung BAP liều cao hơn thì chất lượng chồi kém hơn, mô sẹo dạng bất định, dạng khối cứng khó tái sinh thành cây.

Môi trường bổ sung 2,4D nồng độ 0,5-5mg/l đều PSHT. Hình thái tạo thành dạng chồi, tiền chồi, mô sẹo nhưng chất lượng kém hơn so với bổ sung BAP. Bổ sung 2,4D 3mg/l xuất hiện mô sẹo dạng mềm, có thể hòa vào

môi trường lỏng tách riêng từng tế bào hoặc cụm tế bào thuận lợi cho sự tạo phôi vô tính và tái sinh cây (hình 1 b). Nếu bổ sung đến 5mg/l 2,4D mô sẹo trở lên mọng nước, kém phát triển.



Hình 1. a, mẫu cắt lát đưa vào MT b, mẫu trong MT bổ sung 3mg/l 2,4D c, mẫu trong MT bổ sung 3mg/l BAP.

So sánh tỉ lệ PSHT, sức sống và dạng hình thái của tạo thành cho thấy môi trường bổ sung BAP tỉ lệ PSHT cao tạo chồi tốt hơn so với bổ sung 2,4 D. Đặc biệt khi bổ sung 3mg/l BAP đạt tỉ lệ PSHT cao nhất với kết quả là các chồi và tiền chồi có sức sinh trưởng tốt chất lượng chồi ổn định. Như vậy có lẽ đây là môi trường phù hợp để nuôi cấy cắt lát mẫu, tạo chồi tiền chồi làm vật liệu để tiến hành nhân chồi

3.3. Nghiên cứu MT nhân chồi từ lát cắt mô non

Trong thí nghiệm nhân chồi, cây sinh trưởng có hiện tượng bị chết nhũn đầu lá sau 28-30 ngày nuôi cấy. Theo kết quả nghiên cứu của Chu Bá Phúc và cs., 2003 khi bị chết đầu lá trên 1 số loại cây trồng nếu bổ sung 1 lượng đủ vitamin (B1 trên cây tetch) đã giảm đáng kể tỉ lệ chết nhũn đầu lá [1]. Vì vậy thí nghiệm bổ sung B1 vào môi trường nuôi cấy. Kết quả thí nghiệm thể hiện ở Bảng 3.

Bảng 3. Ảnh hưởng của VTM B1 đến khả năng nhân và sức sống của chồi

Nồng độ	Nồng độ B1 (mg/l)	Số chồi ban đầu	Chiều cao chồi (cm)	Hệ số nhân sau 35 ngày	Đặc điểm chồi
	0	30	3,2	2,2	Chồi xanh, sinh trưởng bình thường, héo nhũn đầu lá
1,0mg/lBAP + 0,1mg/l Kinetin	1	30	3,3	2,3	Chồi xanh, sinh trưởng bình thường, biểu hiện mất màu xanh ở đầu lá
	2	30	3,8	2,5	Chồi xanh, sinh trưởng bình thường, biểu hiện mất màu xanh ở đầu lá
	3	30	3,9	2,8	Chồi xanh, sinh trưởng bình thường
	4	30	3,8	2,8	Chồi xanh, sinh trưởng bình thường
LSD (0,05)			0,0720293	0,123760	
CV (%)			1,1	2,6	

Kết quả trên cho thấy vitamin B1 có ảnh hưởng tốt đến sinh trưởng, giảm chết nhũn phần ngọn của cây, đồng thời cũng kích thích sinh

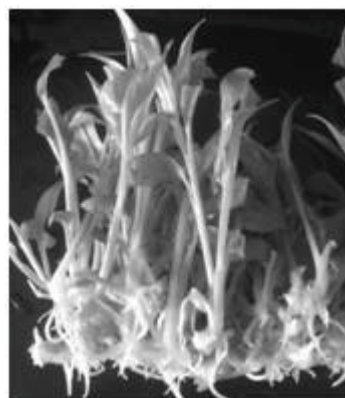
trưởng, tăng chiều cao cây, tăng hệ số nhân cây. Khi không sử dụng B1 hoặc với hàm lượng nhỏ (1-2 mg/l) hệ số nhân thấp hơn và có hiện tượng

đầu lá bị nhũn hoặc mất màu xanh. Khi bổ sung tới 3mg/l B1 vào môi trường ta thấy chồi xanh và cây phát triển bình thường hệ số nhân cũng có dấu hiệu tăng cụ thể là 2,8 lần. Nếu bổ sung

nồng độ cao hơn (4mg/l) cũng không ảnh hưởng nhiều đến cây nhưng cũng không thích thích sinh trưởng nên thí nghiệm chỉ bổ sung vào môi trường 3mg/l B1.



a



b

Hình 2. a, chồi bị nhũn đầu lá sau 30 ngày nuôi cấy. b, chồi sau khi nuôi cấy trên MT bổ sung B1.

Thí nghiệm nhân chồi các cụm chồi có xuất hiện 1 số rễ. Tuy nhiên các rễ này dài, mảnh, khi đưa ra ngoài vườn đều bị chết, thậm chí còn làm chết cây. Vì vậy thí nghiệm loại bỏ các rễ trong quá trình nhân.

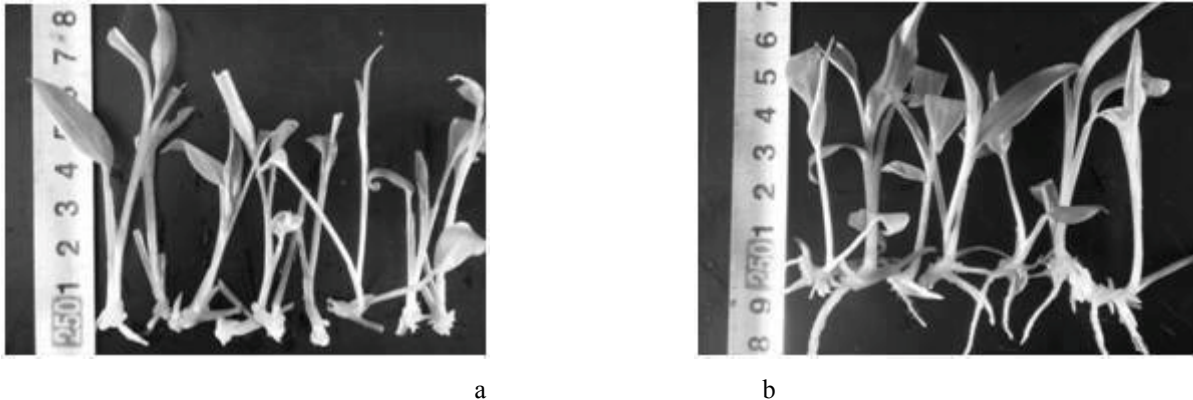
3.4. Nghiên cứu môi trường phát triển hoàn chỉnh cây con *in vitro*

Sau 2-4 lần nhân chồi đạt kích thước 4-6cm thì chuyển sang môi trường tạo cây hoàn chỉnh. Môi trường tạo cây hoàn chỉnh, với thí nghiệm MS + 100ml/l nước dừa + 3mg/l B1 + 0; 0,2; 0,3; 0,4mg/l NAA. Kết quả thí nghiệm thể hiện ở Bảng 4.

Kết quả cho thấy, khi ta không bổ sung thêm NAA tỉ lệ ra rễ chỉ đạt 88%, xuất hiện ít rễ và rễ ngắn (hình 3a). Khi có bổ sung thêm chất ĐHST NAA cây con có dấu hiệu phát triển tốt hơn khi chiều cao cây số lá trung bình, tỉ lệ ra rễ, số lượng và độ dài rễ đều tăng. Quan sát kết quả ta thấy có thể sử dụng môi trường bổ sung 0,3mg/l NAA để phát triển cây hoàn chỉnh, sau 1 tháng cây chiều cao đạt 5,5cm; 4,7 lá; 100% cây tạo hơn 3 rễ/cây; rễ dài vừa phải 0,8cm (hình 3b), khi ra ngoài các rễ này tiếp tục ra rễ mới, cây không bị chết, sinh trưởng và phát triển tốt.

Bảng 4. Ảnh hưởng của NAA đến sinh trưởng và phát triển cây *in vitro*

Chất ĐHST	Chiều cao TB/ cây (cm)	Số lá TB/cây	Tỷ lệ ra rễ (%)	Số rễ TB/cây	Độ dài rễ (cm)
0,0mg/l NAA	5,2	4,3	88	2,2	0,5
0,2mg/l NAA	5,3	4,6	92	3,0	0,7
0,3mg/l NAA	5,5	4,7	100	3,8	0,8
0,4mg/l NAA	5,4	4,7	100	3,4	0,8



Hình 3. a; mẫu trên MT đối chứng (0mg/l NAA) b; mẫu trên MT bổ sung 0,3 mg/l NAA4.

4. Kết luận

Khử trùng bằng NaClO 20% trong 15 phút là công thức khử trùng phù hợp nhất. Mẫu sau khi khử trùng có tỉ lệ sống lên đến 63,3 %.

Môi trường có bổ sung 3mg/l BAP có tỉ lệ tạo chồi, tiền chồi là phù hợp nhất để nuôi cấy cắt lát mẫu, tạo chồi mới thuận lợi cho sự phát triển cây hoàn chỉnh sau này.

Môi trường nhân chồi có bổ sung Vitamin B1 có ảnh hưởng tốt đến sinh trưởng của cây hơn. Môi trường nhân chồi có bổ sung 1,0mg/l BAP, 0,1mg/l Ki và 3mg/l B1 là phù hợp nhất.

Cuối cùng để hoàn thiện môi trường phát triển cây con sử dụng môi trường có bổ sung thêm 0,3mg/l NAA sẽ cho cây con có chất lượng tốt nhất khi ra ngoài các rế này tiếp tục ra rế mới, cây không bị chột, sinh trưởng và phát triển tốt.

Lời cảm ơn

Tác giả bài báo xin chân thành cảm ơn phòng Ngân hàng Gen in vitro, Trung tâm Tài nguyên thực vật, An Khánh, Hà Nội đã giúp đỡ trong công tác nghiên cứu thí nghiệm. Nghiên

cứu này được hỗ trợ kinh phí từ dự án của Trung tâm Tài nguyên thực vật.

Tài liệu tham khảo

- [1] Chu Bá Phúc, Phạm Thị Kim Hạnh, Phạm Thị Liên, Phạm Thị Trang, Nguyễn Thị Liên, Nguyễn Bảo Ngọc, Đỗ Năng Vịnh. "Nghiên cứu nhân nhanh một số cây thân gỗ thông qua hệ thống tái sinh mô sẹo phối hóa và nhân chồi *in vitro* (Tếch, Trâm, Thông, Hồng, Bạch đàn)". Báo cáo khoa học, Hội nghị sinh học toàn quốc (1993-2003). Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật (2003).
- [2] Trần Thị Đinh, Lê Khả Tường, Nhân giống gừng mới QT1 bằng phương pháp nuôi cấy mô. Tạp chí Nông nghiệp & Phát triển nông (2014).
- [3] Hoàng Trung Sơn, Nghiên cứu cây Gừng núi đá (*Zingiber purpureum* Roscoe) bằng phương pháp *in vitro*. Khóa luận tốt nghiệp Đại học. Đại học Nông lâm Thái nguyên (2016).
- [4] Babu K. N., Samsudeen, K. and Ratnambal, M. J, *In vitro* plant regeneration from leaf-derived callus in ginger, Plant Cell Tiss, (2013).
- [5] Dekkers A. J., Rao A. N. and Ghosh C. J.. *In vitro* storage, of multiple shoot culture of gingers at ambient temperatures of 24-290 C. Sci. Hort. (1991).
- [6] Hoque M. I., Perveen S. and Sarker R. H. (1999). *In vitro* propagation of Ginger (*Zingiber officinales* Rocs.) Plant tissue cult. 9: 45-51.

Clonal Propagation of *Zingiber officinale* (Willd.) Roscoe by *in vitro* Explant Cultures

Nguyen Phuong Quy^{1,2}, Pham Thi Kim Hanh², Le Quynh Mai¹, Le Kha Tuong²

¹Faculty of Biology, VNU University of Science, 334 Nguyen Trai, Thanh Xuan, Hanoi, Vietnam

²Invitro genebank, Plant resources center, An Khanh, Hanoi, Vietnam

Abstract: Ginger is a plant product in Vietnam as well as in many Asian countries with the main purpose of making spices and medicines. This study focuses on determining the conditions at major steps to accelerate the *in vitro* micropropagation of Gingerbread by explant culture. As the results, in the sterilize stage, sample was sterilized by NaClO (20%) in 15 minutes which is considered as the most suitable antiseptic formula with the rate of alive sample is 63.3%. Move to the explant culture stage in MS medium, 3mg/l BAP is added which is at the best rate of shoot growth and pre-shoot growth. It then will be the important material for micropropagation process. In the multiplication stage, vitamin B1 was used as concentration of 3.0 mg/l in combination with BAP (1.0 mg/l and Ki (0.1 mg/l) to promote shoot growth. Finally, the sample was cultured on developmental medium which added 3 mg/L B1 and 0.3 mg/L NAA. It would be the most efficient medium for the development of the root system after 1 month.

Keywords: Ginger, *Zingiber officinale*, Gingerbread, explant cultures.