

ỨNG DỤNG KỸ THUẬT NUÔI CÂY *IN VITRO* TRONG NHÂN GIỐNG CÂY GỪNG GIÓ (*Zingiber zerumbet*)

Trần Việt Hà¹, Nguyễn Văn Việt², Đoàn Thị Thu Hương³, Nguyễn Thị Huyền⁴,
Đinh Văn Hùng⁵, Sounthone Douangmala⁶

^{1,2,3,4,5}Trường Đại học Lâm nghiệp

⁶Trường Cao đẳng Nông - Lâm Bolikhāmxay, Viêng Chăn, Lào

TÓM TẮT

Ứng dụng kỹ thuật nuôi cây *in vitro* trong nhân giống loài Gừng gió (*Zingiber zerumbet*) đã được nghiên cứu thành công. Kết quả nghiên cứu cho thấy, sát khuẩn bề mặt chồi bằng cồn 70% trong 1 phút, khử trùng bằng dung dịch HgCl₂ 0,1% trong 9 phút và nuôi mẫu trên môi dinh dưỡng MS bổ sung 0,2 mg/l BAP và 30 g/l sucrose, cho tỷ lệ mẫu sạch 76,98%, tái sinh chồi 75,64%, chồi vươn cao, thân và lá xanh đậm. Cảm ứng tạo đa chồi trên môi trường khoáng MS bổ sung 1,2 mg/l BAP; 0,5 mg/l Kinetin; 0,2 mg/l NAA và 30 g/l sucrose, cho tỷ lệ mẫu tạo cụm chồi 100% với hệ số nhân đạt 4,08 lần/chu kỳ, sau 5 tuần nuôi cấy. Chồi ra rễ 100%, số rễ trung bình 5,7 rễ/cây và chiều dài rễ trung bình 5,05 cm khi nuôi trên môi trường khoáng MS bổ sung 0,2 mg/l NAA và 30 g/l sucrose sau 5 tuần nuôi cấy. Cây con hoàn chỉnh được huấn luyện và chuyển ra trồng trên giá thể 50% đất, 25% trấu hun và 25% bột xơ dừa, cho tỷ lệ sống đạt 95,78%. Quy trình vi nhân giống này có thể áp dụng để sản xuất hàng loạt cây giống Gừng gió chất lượng tốt, đáp ứng nhu cầu nguồn giống cho thị trường.

Từ khóa: Cây Gừng gió, cụm chồi, nhân nhanh, nuôi cấy mô, vi nhân giống, *Zingiber zerumbet*.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Gừng gió (*Zingiber zerumbet*) là cây thuốc dân tộc nổi tiếng từ lâu đời không chỉ ở Việt Nam mà còn ở rất nhiều nước Đông Nam Á như Indonexia, Thái Lan, Miến Điện. Thân rễ chứa nhiều tinh dầu, các cấu trúc đồng phân và đồng vị khác nhau của các hợp chất hóa học như polyphenol, terpenes và zerumbone (sesquiterpene) là hợp chất hoạt tính sinh học chính của loài này. Tách chiết được zerumbone từ tinh dầu Gừng gió, đó là một sesquiterpen keton đơn vòng, có tác dụng kháng khuẩn trên thực nghiệm đối với *Micrococcus pyogenes var aureus* và *Mycobacterium tuberculosis* (Hoàng Trung Sơn, 2016).

Thân và rễ của Gừng gió được sử dụng để điều trị viêm loét đại tràng, để chữa chứng khó tiêu, trĩ và khó chịu ở dạ dày. Chiết xuất ethyl acetate từ Gừng gió cũng chứa flavonoid glycoside, một dẫn xuất của kaempferol có hoạt tính chống oxy hóa cao và nhiều bằng chứng về tác dụng bảo vệ thần kinh (D. N. Dai và cộng sự, 2013; Thái Nguyễn Hùng Thu và cộng sự, 2010).

Mặc dù là một loại dược liệu quý, mọc hoang dại nhưng việc tìm kiếm loài này ngoài tự nhiên không hề dễ dàng. Bởi vậy, đã có một số nghiên cứu bước đầu đối với cây Gừng gió

về nuôi cấy mô để nhân nhanh tạo nguồn cung cấp cây giống sinh trưởng nhanh, sạch bệnh ở trong và ngoài nước như: Trần Thị Đính và cộng sự (2014); Trần Thị Thu Hà và cộng sự (2016); Hoàng Trung Sơn (2016); Babu K. N. và cộng sự (2013); Dekkers A. J. và cộng sự (1991); Hoque M. I. và cộng sự (1999).

Bài báo trình bày kết quả nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật nuôi cấy *in vitro* trong nhân giống loài Gừng gió đạt hiệu quả cao góp phần vào công tác bảo tồn, phát triển và nhân nhanh cây giống phục vụ thương mại hóa giống cây được liệu có giá trị kinh tế cao.

II. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu: Cây Gừng gió được thu thập từ Công ty Cây xanh Mai Linh, tại xã Hòa Thạch, Quốc Oai, Hà Nội.

Vật liệu nuôi cấy: Phần củ Gừng gió được dùng làm vật liệu nghiên cứu khởi đầu cùng với các môi trường nuôi cấy được liệt kê ở bảng 1.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Tạo mẫu sạch *in vitro*: Củ Gừng gió rửa sạch bằng nước máy, ngâm mẫu trong dung dịch xà phòng loãng khoảng 5 - 10 phút. Sát khuẩn bề mặt bằng cồn 70% trong 1 phút. Khử trùng mẫu bằng HgCl₂ 0,1% với các thời gian

khác nhau (5 - 13 phút). Sau mỗi lần dùng hóa chất để khử trùng đều phải tráng rửa mẫu bằng nước cất vô trùng.

Bảng 1. Thành phần các loại môi trường nuôi cấy Gừng gió *in vitro*

Giai đoạn nuôi cấy	Kí hiệu môi trường	Thành phần môi trường nuôi cấy
Nuôi cấy khởi động	MTKĐ	MS bổ sung 0,2 mg/l BAP; 30 g/l sucrose; 6,5 g/l agar.
Nhân nhanh chồi	GT1-5	MS bổ sung 0,5 - 1,5 mg/l BAP; 0,5 mg/l Kinetin; 0,2 mg/l NAA; 30 g/l sucrose; 6,5 g/l agar.
Kích thích ra rễ tạo cây hoàn chỉnh	GR1-4	MS bổ sung 0,1 - 0,4 mg/l NAA; 30 g/l sucrose; 6,5 g/l agar.

Nuôi cấy khởi động: Sau khi khử trùng được mẫu sạch, tiến hành cắt mẫu, cấy mẫu vào môi trường nuôi cấy khởi động (MTKĐ). Sau khoảng 5 - 6 tuần chồi bắt đầu tái sinh, chồi đạt 2 - 2,5 cm được sử dụng làm vật liệu cho nghiên cứu nhân nhanh chồi.

Nhân nhanh chồi: Chồi cây Gừng gió *in vitro* được cắt thành các đoạn có kích thước > 2 cm, loại bỏ bớt lá và cấy lên môi trường nhân nhanh chồi (GT1-5) có hàm lượng chất điều hòa sinh trưởng (ĐHST) khác nhau, mẫu được nuôi dưới ánh sáng gián đoạn, sau 6 tuần nuôi cấy, mẫu tạo cụm chồi, thống kê số chồi trên cụm chồi, chồi hữu hiệu và tính hệ số nhân chồi sau 5 - 6 tuần.

Tạo cây hoàn chỉnh: Chọn cụm chồi phát triển đồng đều, dùng kéo hoặc dao sắc tách các chồi hữu hiệu và cấy lên môi trường kích thích ra rễ tạo cây hoàn chỉnh (R1-4). Các bình chồi được nuôi dưới ánh sáng gián đoạn neon; sau 5 - 6 tuần nuôi cấy, chồi ra rễ, thống kê số rễ của cây và đo chiều dài rễ.

Các thí nghiệm được bố trí trong các bình thủy tinh tam giác (3 mẫu/bình 250 ml), mỗi công thức thí nghiệm cấy 30 mẫu, lặp lại 3 lần.

Bảng 2. Ảnh hưởng của thời gian khử trùng đến khả năng tạo mẫu sạch

CTTN	HgCl ₂ 0,1%		Tỷ lệ mẫu sạch (%)	Tỷ lệ mẫu tái sinh (%)
	Lần 1 (phút)	Lần 2 (phút)		
CT1	4	1	33,05	20,79
CT2	5	2	38,43	25,78
CT3	6	3	76,98	75,64
CT4	7	4	84,44	48,08
CT5	8	5	90,71	32,57

$$F_{tính} = 116,96 > F_{0,05} = 3,48$$

Số liệu được xử lý bằng phần mềm Excel.

Điều kiện nuôi cấy: Cường độ chiếu sáng 3000 lux; thời gian chiếu sáng 14 h/ngày; nhiệt độ phòng nuôi: 25 ± 2⁰C.

Các loại môi trường nuôi cấy trong nghiên cứu dựa trên môi trường dinh dưỡng cơ bản MS (Murashige và cộng sự, 1962).

Tất cả các môi trường nuôi cấy được chuẩn độ pH = 5,8; khử trùng ở 121⁰C, áp suất 1 atm trong 20 phút.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

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

Tạo mẫu sạch là bước đầu tiên thực hiện đối với bất kỳ đối tượng nào trong quy trình nuôi cấy *in vitro*, đây là nguồn vật liệu khởi đầu cung cấp cho các giai đoạn tiếp theo có vai trò vô cùng quan trọng mang tính quyết định đến sự thành công của cả quá trình. Với mỗi đối tượng khác nhau có phương pháp khử trùng và thời gian khử trùng khác nhau. Đối tượng cây Gừng gió, bố trí thí nghiệm khử trùng bằng dung dịch HgCl₂ 0,1% ở các thời gian khác nhau. Kết quả thí nghiệm được trình bày trong bảng 2.

Kết quả thí nghiệm (bảng 2) cho thấy, thời gian sử dụng dung dịch $HgCl_2$ 0,1% có ảnh hưởng rõ rệt đến khả năng tạo mẫu sạch và khả năng tạo chồi của mẫu. Trong 5 công thức thí nghiệm, khi thời gian khử trùng tăng lên thì tỷ lệ mẫu sạch cũng tăng lên rõ rệt. Đặc biệt ở CT₅, tỷ lệ tạo mẫu sạch đạt giá trị cao nhất (90,71%). Còn ở công thức CT₁, thời gian khử trùng ngắn thì tỷ lệ tạo mẫu sạch cũng thấp nhất (33,05%). Như vậy, với phương pháp khử trùng trên thì thời gian khử trùng càng dài thì tỷ lệ mẫu sạch càng cao. Tuy nhiên, thời gian khử trùng càng dài thì khả năng tái sinh chồi có xu hướng giảm. Ở CT₁ và CT₂, vì thời gian khử trùng quá ngắn chưa đủ để tiêu diệt các vi sinh vật trên bề mặt mẫu nên bị nhiễm khuẩn nhiều, tỷ lệ nảy chồi chỉ đạt 20,79% và 25,78%. Ở CT₄ và CT₅, tuy khả năng tạo mẫu sạch là cao nhưng tỷ lệ mẫu sống và tái sinh chồi chỉ đạt lần lượt là 48,08% và 32,57%. Như vậy, do thời gian khử trùng quá dài nên hóa chất ngấm vào mô nhiều làm mẫu bị tổn thương nên khả năng sống và tái sinh kém

(Nguyễn Văn Việt và cộng sự, 2016). Kết quả ở CT₂ đạt giá trị cao nhất, tỷ lệ mẫu sạch và mẫu tái sinh chồi lần lượt là 76,98% và 75,64%, kết quả này tương tự như nghiên cứu của Nguyễn Phương Quý và cộng sự (2017). Kết quả phân tích phương sai cho thấy kết quả khử trùng thu được khác nhau ở các công thức thí nghiệm ($F_{tinh} > F_{0,05}$), chứng tỏ thời gian khử trùng khác nhau có ảnh hưởng rõ rệt đến tỷ lệ mẫu sạch và khả năng tái sinh chồi.

3.2. Nhân nhanh chồi Gừng gió

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

Môi trường dinh dưỡng là nhân tố quan trọng quyết định tới khả năng tái sinh và nhân nhanh chồi. Với mỗi loài cây khác nhau, môi trường dinh dưỡng dùng để nuôi cấy cũng cần phù hợp. Do vậy, để phát huy tối đa khả năng tái sinh chồi trong nhân nhanh, thí nghiệm tiến hành nuôi cấy chồi dựa trên 4 loại môi trường dinh dưỡng khác nhau. Kết quả nghiên cứu được trình bày ở bảng 3.

Bảng 3. Ảnh hưởng của môi trường dinh dưỡng đến khả năng nhân nhanh chồi

CTTN	Môi trường	Tỷ lệ tái sinh (%)	Chiều cao TB (cm)	Đặc điểm chồi
MT ₁	MS	61,29	1,51	Chồi mập, lá xanh, sinh trưởng tốt
MT ₂	½MS	47,76	0,76	Chồi mập, lá xanh, sinh trưởng trung bình
MT ₃	B ₅	35,82	0,55	Chồi mập, lá xanh, sinh trưởng trung bình
MT ₄	Knops	24,88	0,47	Chồi mảnh, lá hơi vàng, sinh trưởng kém

$$F_{tinh} = 38,96 > F_{0,05} = 4,06$$

Qua kết quả ở bảng 3 cho thấy, tỷ lệ tái sinh chồi trung bình trên một mẫu ở các công thức môi trường khác nhau. Với môi trường MS, các mẫu cho tỷ lệ tái sinh cao nhất (61,29%) so với 3 môi trường còn lại, cụ thể là ½MS, B₅ và Knops đạt tỷ lệ tái sinh chồi lần lượt là 47,76%, 35,82% và 24,88%.

Chiều cao trung bình của chồi cũng tương đối khác nhau, với 4 môi trường nuôi cấy trên thì môi trường MS cũng cho giá trị cao nhất (1,51 cm), ngược lại là môi trường Knops cho giá trị thấp nhất (0,47 cm). Điều này cho thấy, môi trường Knops nghèo chất dinh dưỡng nên

khả năng sinh trưởng và phát triển chồi cũng kém. Kết quả phân tích phương sai cho thấy môi trường nuôi cấy khác nhau đã ảnh hưởng đến hiệu quả nhân nhanh ($F_{tinh} > F_{0,05}$), sự khác biệt giữa các công thức thí nghiệm là có ý nghĩa.

3.2.2. Nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ các chất ĐHST thực vật đến nhân nhanh chồi

Việc bổ sung Kinetin, BAP và NAA kích thích sự phân chia mạnh mẽ của tế bào, đặc biệt ảnh hưởng rõ rệt lên sự hình thành và phân hóa chồi (Nguyễn Văn Kết và cộng sự, 2010), dẫn đến hệ số nhân của chồi tăng lên rõ rệt. Thí

thí nghiệm này được thiết kế với 5 công thức có bổ sung chất điều hòa sinh trưởng thực vật và 01 công thức đối chứng không bổ sung các chất trên. Môi trường sử dụng là môi trường

khoáng cơ bản MS bổ sung (0,5 - 1,5 mg/l) BAP; 0,5 mg/l Kinetin; 0,2 mg/l NAA. Kết quả thu được sau 5 tuần nuôi cấy được trình bày ở bảng 4.

Bảng 4. Ảnh hưởng của nồng độ các chất ĐHST đến khả năng nhân nhanh chồi

CTTN	Chất ĐHST (ml/l)			Hệ số nhân chồi (lần)	Chiều cao TB/chồi (cm)	Đặc điểm chồi
	BAP	Kinetin	NAA			
ĐC	0	0	0	1,22	1,98	Chồi sinh trưởng kém, lá nhỏ màu hơi vàng
GT ₁	0,5	0	0	2,59	2,26	Chồi sinh trưởng kém, lá nhỏ màu hơi vàng
GT ₂	0	0,5	0	2,37	2,54	Chồi sinh trưởng kém, lá nhỏ màu hơi vàng
GT ₃	0,8	0,5	0,2	3,20	3,17	Chồi sinh trưởng trung bình, lá to, xanh nhạt
GT ₄	1,2	0,5	0,2	4,08	3,21	Chồi sinh trưởng tốt, lá to, xanh đậm
GT ₅	1,5	0,5	0,2	3,47	3,09	Chồi sinh trưởng trung bình, lá to, xanh nhạt

$$F_{tính} = 14,67 > F_{0,05} = 4,06$$

Từ kết quả bảng 4 cho thấy, nồng độ các chất điều hòa sinh trưởng thực vật khác nhau đã tạo sự khác biệt đối với nhân nhanh chồi Gừng gió. Trong 5 công thức thí nghiệm ở giai đoạn nhân nhanh chồi thì hệ số nhân chồi dao động khoảng 2,89 - 4,08 lần. Ở công thức GT₁, GT₂ khi chỉ sử dụng 1 trong 3 loại chất ĐHST thì cho chất lượng chồi khá thấp, hệ số nhân chồi và chiều cao trung bình đạt lần lượt 2,37 - 2,59 lần và 2,26 - 2,54 cm, cây con phát triển kém, lá nhỏ hơi vàng. Ở công thức GT₃, GT₄ và GT₅ khi kết hợp sử dụng cả BAP và Kinetin và NAA, sự tác động bổ sung đã cho kết quả cao hơn, số lượng chồi và chiều cao chồi cũng

tăng lên rõ rệt. Công thức GT₄ cho hệ số nhân chồi cao nhất 4,08, các chồi tạo thành đều có đặc điểm mập, xanh, khỏe, nhiều lá và đồng đều.

Kết quả trên cũng tương đồng với các nghiên cứu của Nguyễn Văn Vinh và cộng sự (2011). Vì vậy, sử dụng công thức môi trường MS bổ sung 0,5 mg/l Kinetin; 0,2 mg/l NAA; 1,2 mg/l BAP thích hợp cho nhân nhanh chồi cây Gừng gió. Kết quả phân tích phương sai cho thấy ảnh hưởng của tổ hợp chất ĐHST đến khả năng nhân nhanh chồi có sự khác nhau ($F_{tính} > F_{0,05}$), chứng tỏ các công thức thí nghiệm khác nhau cho kết quả sai khác có ý nghĩa.

3.3. Kích thích chồi ra rễ tạo cây hoàn chỉnh

Bảng 5. Ảnh hưởng của NAA đến khả năng ra rễ

CTTN	NAA (mg/l)	Chiều dài rễ TB (cm)	Số rễ TB/cây	Đặc điểm của rễ
ĐC	0,0	2,13	2,20	Rễ nhỏ, ngắn
GR ₁	0,1	3,17	3,08	Rễ dài, nhỏ
GR ₂	0,2	5,05	5,70	Rễ mập, to, dài
GR ₃	0,3	2,70	3,47	Rễ dài, nhỏ
GR ₄	0,4	2,14	2,92	Rễ dài, mỏng

$$F_{tính} = 66,69 > F_{0,05} = 3,47$$

Trong nuôi cấy mô - tế bào, ra rễ là giai đoạn cuối cùng để tạo cây con hoàn chỉnh kết thúc giai đoạn nuôi cấy trong phòng thí

thí nghiệm. Trong giai đoạn này, loại và nồng độ chất điều hòa sinh trưởng được bổ sung vào môi trường tạo cây hoàn chỉnh chủ yếu thuộc

nhóm Auxin. Ở thí nghiệm này, đã tiến hành cấy chuyển các chồi hữu hiệu (chiều cao chồi > 2,5 cm) vào môi trường khoáng cơ bản MS, bổ sung NAA (0,1 - 0,4 mg/l). Kết quả thí nghiệm sau 5 tuần theo dõi được trình bày ở bảng 5.

Kết quả ở bảng 5 cho thấy, khi bổ sung NAA cây con có dấu hiệu phát triển tốt hơn, chiều dài rễ và số lượng rễ cũng tăng. Ở môi trường không có NAA (ĐC) thì chỉ số chiều dài và số rễ trung bình khá thấp đạt 2,13 và 2,2. Từ GR₁ đến GR₄ có bổ sung NAA (0,1 - 0,4 mg/l) nên chất lượng và số lượng rễ tăng lên đáng kể. Ở GR₁, chiều dài và số lượng đạt 3,17 và 3,08. Ở công thức GR₃ có các chỉ số về chiều dài và số rễ trung bình lần lượt là 2,7 cm và 3,47 rễ. Công thức GR₄ chỉ số chiều dài và số rễ trung bình thấp (2,14 cm và 2,92 rễ), điều đó cho thấy hàm lượng NAA cao sẽ không thuận lợi cho việc tạo rễ. Ở công thức GR₂, chỉ số chiều dài rễ và số rễ TB cho kết quả cao

nhất đạt lần lượt là 5,05 và 5,7, cây con sinh trưởng và phát triển tốt. Như vậy, có thể sử dụng môi trường khoáng cơ bản MS bổ sung 0,2 mg/l NAA cho việc nuôi cấy kích thích ra rễ tạo cây hoàn chỉnh. Phân tích phương sai cũng cho thấy kết quả tạo rễ khác nhau ($F_{tính} > F_{0,05}$), chứng tỏ sự khác biệt giữa các công thức thí nghiệm là có ý nghĩa.

3.4. Huấn luyện và ra ngôi

Các cây Gừng gió *in vitro* được tạo ra trên môi trường cảm ứng ra rễ được huấn luyện trong nhà lưới 5 - 6 ngày để cây thích nghi dần với điều kiện tự nhiên trước khi ra ngôi. Sau thời gian huấn luyện, cây con được trồng vào bầu đã chuẩn bị giá thể. Đặt cây trong nhà lưới có mái che, nếu trời nắng cần che thêm bằng lưới đen để tránh ánh sáng mặt trời chiếu trực xạ, tưới nước 2 lần/ngày đảm bảo độ ẩm. Sau 3 tuần, bón phân NPK 2 g/m² luống bầu bằng cách hòa tan và tưới đều lên mặt bầu.

Bảng 6. Ảnh hưởng của thành phần giá thể đến tỷ lệ sống và chất lượng cây

CTTN	Giá thể	Tỷ lệ sống (%)	Chiều cao TB/cây (cm)	Chất lượng cây con
G-X ₁	Đất	72,22 ^a	9,24 ^a	Lá xanh nhạt, cây sinh trưởng bình thường
G-X ₂	Đất: bột xơ dừa: trấu hun (2:1:1)	95,78 ^d	13,35 ^c	Lá xanh đậm, cây sinh trưởng tốt
G-X ₃	Đất : bột xơ dừa (1:1)	91,56 ^c	13,56 ^d	Lá xanh đậm, cây sinh trưởng tốt
G-X ₅	Cát sạch	84,67 ^b	10,45 ^b	Lá xanh nhạt, cây sinh trưởng bình thường

Ghi chú: Những chữ cái khác nhau (a,b,c...) trong cột thể hiện sự sai khác có ý nghĩa với độ tin cậy $P < 0,05$ trong phép phân tích Duncan.

Kết quả thu được ở bảng 6 cho thấy, đa phần các công thức thí nghiệm đều cho kết quả tốt, tỷ lệ cây sống lớn hơn 70%. Tuy nhiên, ở các công thức phối trộn giá thể khác nhau có sự sai khác nhiều về tỷ lệ sống, ở công thức G-X₂ có thành phần giá thể gồm (đất, bột xơ dừa và trấu hun với tỷ lệ 2:1:1) cho tỷ lệ cây sống cao nhất (95,78%), chiều cao cây trung bình đạt 13,35 cm. Tương tự, công thức G-X₃ có thành phần giá thể gồm (đất và bột xơ dừa với tỷ lệ 1:1) cũng cho tỷ lệ cây sống cao (91,56%) với chiều cao cây trung bình đạt 13,56 cm. Cả hai công thức trên đều có cây sinh trưởng tốt,

hiều lá và xanh đậm. Từ kết quả nghiên cứu trên, có thể lựa chọn giá thể ruột bầu gồm đất, bột xơ dừa và trấu hun hoặc đất và bột xơ dừa cho việc trồng Gừng gió nuôi cấy *in vitro* tại vườn ươm.

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật nuôi cấy *in vitro* trong nhân giống cây Gừng gió đã đạt được kết quả khả quan:

Khử trùng bằng dung dịch HgCl₂ 0,1% trong thời gian 9 phút (lần 1: 6 phút và lần 2: 3 phút) cho khả năng tạo mẫu sạch đạt 76,98%, tái sinh chồi đạt 75,64%;

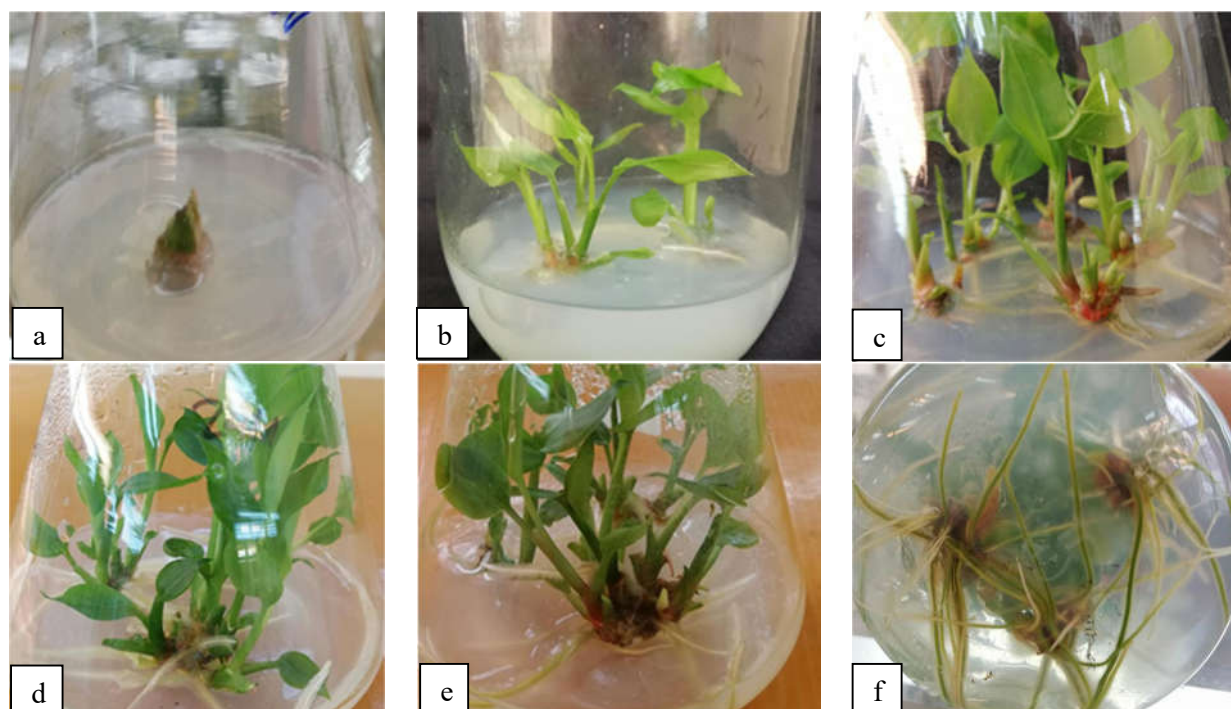
Môi trường dinh dưỡng phù hợp cho nuôi cấy là MS, cho kết quả tỷ lệ mẫu tái sinh chồi đạt 61,29%, chiều cao trung bình của chồi đạt 1,51 cm;

Nhân nhanh chồi phù hợp với môi trường khoáng cơ bản là: MS bổ sung 1,2 mg/l BAP; 0,5 mg/l Kinetin; 0,2 mg/l NAA, cho hệ số nhân chồi đạt 4,08 lần; chiều cao trung bình của chồi đạt 3,21cm, chồi sinh trưởng và phát

triển tốt;

Kích thích ra rễ tạo cây hoàn chỉnh phù hợp với môi trường khoáng cơ bản MS bổ sung 0,2 mg/l NAA, chiều dài trung bình của rễ đạt 5,05 cm; số rễ trung bình đạt 5,7 rễ/cây, rễ mập, dài, phân nhánh nhiều;

Huấn luyện 6 ngày, trồng cây vào bầu có tỷ lệ đất: bột xơ dừa: trấu hun với tỷ lệ 2:1:1, cho tỷ lệ cây sống đạt 95,78%; cây cao 13,35 cm.



Hình 1. Cây Gừng gió qua các giai đoạn trong quy trình nhân giống in vitro
(a) Mẫu sạch sau 3 tuần; b,c,d,e) Nhân chồi trên môi trường GT₁, GT₂, GT₃, GT₄;
f) Tạo rễ trên môi trường GR₂)

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. A.J. Dekkers, A.N. Rao, C.J. Goh (1991). *In vitro* storage of multiple shoot culture of Ginger at ambient temperatures of 24-29°C. *Sci. Hort.* Vol.47: 157-167
2. Babu K.N., Samsudeen K., Ratnambal M.J. (1992). *In vitro* plant regeneration from leaf-derived callus in ginger (*Zingiber officinale*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, vol. 29:71-74.
3. D. N. Dai, T. D. Thang, L.T. M Chau and I. A. Ogunwande (2013). Chemical constituents of the root essential oils of *Zingiber rubens* Roxb. and *Zingiber zerumbet* (L.) Smith. *American Journal of Plant Sciences*, 4(1): 7-10.
4. Hoàng Trung Sơn (2016). *Nghiên cứu cây Gừng núi đá (Zingiber purpureum) bằng phương pháp in vitro*. Khóa luận tốt nghiệp Đại học. Đại học Nông lâm Thái Nguyên.
5. Hoque M. I., Perveen S. and Sarker R. H. (1999).

In vitro propagation of Ginger (*Zingiber officinales*). *Plant tissue cult.* 9: 45-51.

6. Murashige T. and Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol plant*, 15: 473-497.

7. Nguyễn Phương Quý, Phạm Thị Kim Hạnh, Lê Quỳnh Mai, Lê Khả Tường (2017). Nhân giống vô tính giống Gừng trâu (*Zingiber officinale*) bằng nuôi cấy cắt lát tế bào *in vitro*. *Tạp chí Khoa học ĐHQGHN: Khoa học Tự nhiên và Công nghệ*, Tập 33, Số 2S: 127-133.

8. Nguyễn Văn Kết, Nguyễn Văn Vinh (2010). Nghiên cứu khả năng nhân giống loài Lan Hoàng Thảo Sáp (*Dendrobium crepidatum*) *in vitro*. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*, 48 (5): 89-95.

9. Nguyễn Văn Việt, Nguyễn Thị Hương, Bùi Văn Thắng (2016). Nhân giống cây Khôi tía (*Ardisia sylvestris*) bằng kỹ thuật nuôi cấy *in vitro*. *Tạp chí Nông nghiệp & PTNT*, 12: 35-39.

10. Thái Nguyễn Hùng Thu, Nguyễn Thái An, Hoàng Lan Nhung, Hoàng Thị Tuyết Nhung (2010). Định lượng kaempferol trong một số dược liệu bằng sắc kí lỏng hiệu năng cao. *Tạp chí Dược học*, 410: 31-33.

11. Trần Thị Đình, Lê Khả Tường (2014). Nhân giống gừng mới QT1 bằng phương pháp nuôi cấy mô.

Tạp chí Nông nghiệp & PTNT, 9: 40-45.

12. Trần Thị Thu Hà, Phạm Thị Tháo, Phạm Văn Điền (2016). Ảnh hưởng của một số chất điều hòa sinh trưởng đến nhân giống *in vitro* cây Gừng gió (*Zingiber zerumbet*). *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*, tập 149 (04): 35-42.

APPLICATION OF *IN VITRO* CULTURE TECHNIQUES FOR PROPAGATION OF *ZINGIBER ZERUMBET*

**Tran Viet Ha¹, Nguyen Van Viet², Doan Thi Thu Huong³, Nguyen Thi Huyen⁴,
Dinh Van Hung⁵, Sounthone Douangmala⁶**

^{1,2,3,4,5}*Vietnam National University of Forestry*

⁶*Bolikhamxay College of Agriculture and Forestry, Vientiane, Laos*

SUMMARY

Application of *in vitro* culture techniques for propagation of *Zingiber zerumbet* has been established. The result showed that the optimal method for bud sterilization was soaked in 70% ethanol for 1 minutes, in HgCl₂ 0.1% for 9 minutes. The explants were then grown *in vitro* on Murashige and Skoog (MS) basal medium supplemented with Benzylaminopurine (BAP) 0.2 mg/l and sucrose 30 g/l, by which the regeneration rate achieved 75.64 percent after 6 weeks of culture. MS basal medium supplemented with BAP 1.2 mg/l, Kinetin 0.5 mg/l, α -naphthalene acetic acid (NAA) 0.2 mg/l and sucrose 30 g/l was the optimal medium for multi-shoot regeneration (4.08 shoots/plant), and the multi - shoot regeneration rate was 100% after 5 weeks of culture. Shoots were rooted on MS basal medium containing NAA 0.2 mg/l and sucrose 3% giving rise to approximately 5.7 roots per shoot and length of root (5.05 cm) after 5 weeks of culture. The survival rate archived 95.78% after transplanting to pots of 50% sand, 25% rice husk, and 25% coconut fiber. The plantlets were successfully acclimatized under greenhouse conditions with high humidity before transferring to the field. This procedure can be applied for mass production of *Zingiber zerumbet* to meet the commercial demand.

Keywords: Micropropagation, multi-shoot, tissue culture, *Zingiber zerumbet*.

Ngày nhận bài : 29/10/2018

Ngày phản biện : 27/11/2018

Ngày quyết định đăng : 05/12/2018