

# NGHIÊN CỨU XÁC ĐỊNH MÔI TRƯỜNG LƯU GIỮ INVITRO NGUỒN GEN GỪNG TẠI NGÂN HÀNG GEN CÂY TRỒNG QUỐC GIA

Lê Khả Tường, Nguyễn Thị Hà Phương

Trung tâm tài nguyên thực vật-An Khánh, Hoài Đức, Hà Nội

## TÓM TẮT

Lưu giữ nguồn gen gừng phục vụ công tác chọn tạo giống là nhiệm vụ quan trọng trong chương trình phát triển cây dược liệu ở nhiều nước trên thế giới. Theo đó nguồn gen gừng đang được bảo tồn dưới nhiều phương pháp khác nhau. Ở nước ta, bảo tồn gừng trong điều kiện đồng ruộng đang bị hạn chế bởi các loài sâu bệnh làm xói mòn nguồn gen. Lưu giữ nguồn gen gừng trong điều kiện In vitro đã khắc phục được những hạn chế do bảo tồn đồng ruộng gây ra. Môi trường thích hợp để lưu giữ invitro phải đạt được tiêu chí là bảo tồn nguyên trạng số lượng, chất lượng nguồn gen, đạt tốc độ sinh trưởng chậm nhất, giảm thiểu tối đa các chu kỳ nuôi cấy. Để thực hiện nội dung này, Trung tâm Tài nguyên Thực vật đã tiến hành nghiên cứu xác định môi trường thích hợp trong lưu giữ Invitro nguồn gen gừng tại ngân hàng gen cây trồng quốc gia giai đoạn 2013-2015. Kết quả cho thấy bổ sung sucrose nồng độ 60 g/l và 30g/l sucrose, 6g/l agar, 100mg/l myo-inositol trong môi trường MS với pH= 5,6- 5,8 ở nhiệt độ 25°C đã làm cây gừng đạt tốc độ sinh trưởng chậm nhất về cao cây và số lá đồng thời đảm bảo chất lượng cây cao nhất trong lưu giữ tại ngân hàng gen cây trồng quốc gia.

**Từ khóa:** Bảo tồn, gừng, môi trường, sinh trưởng chậm.

## I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Gừng (*Zingiber officinales Roscoe.*) là cây dược liệu truyền thống ở vùng nhiệt đới với thành phần sinh hoá chủ yếu gồm Protein 5,08%, Dầu 3,72%, Insoluble fibre 23,5%, Soluble fibre 25,5%, carbohydrate 38,35%, Vitamin C 9,33%, chất tro 3,85% (Balachandran at al, 1990). Do đó gừng và các sản phẩm của nó đang được tiêu thụ với số lượng hàng triệu tấn/năm trên thế giới. Để đáp ứng nhu cầu này, gừng đã và đang được sản xuất tại nhiều quốc gia như Ấn Độ, Trung Quốc, Jamaica, Đài Loan và nhiều nước khác ở Thái Bình Dương. Áp dụng giống gừng mới có năng suất cao, chất lượng tốt là giải pháp căn bản để nâng cao sản lượng và hiệu quả sản xuất gừng (Trần Thị Đính, Lê Khả Tường, 2014). Vì vậy việc lưu giữ ngân hàng gen gừng nhằm đáp ứng nhu cầu cải tiến giống mới là nhiệm vụ quan trọng đặc biệt để phát triển cây gừng ở các quốc gia. Tuy nhiên ở Việt Nam, nguồn gen gừng lưu giữ tại ngân hàng gen đồng ruộng hiện đang nhiễm nặng nhiều đối tượng sâu bệnh hại, có nguy cơ làm xói mòn nguồn gen. Việc lưu giữ nguồn gen gừng bằng phương pháp invitro đã thành công ở nhiều nước trên thế giới do khắc phục được tình trạng nhiễm sâu bệnh trong quá trình lưu giữ đồng ruộng. Đây là một ưu thế của phương pháp bảo tồn mới cần được nghiên cứu áp

dụng đối với ngân hàng gen cây trồng nước ta. Để thực hiện chủ trương này, Trung tâm tài nguyên thực vật (PRC) đã tiến hành nghiên cứu kỹ thuật lưu giữ In vitro nguồn gen gừng trong giai đoạn 2013-2015. Trong đó nội dung nghiên cứu xác định môi trường thích hợp trong lưu giữ in vitro nguồn gen gừng tại ngân hàng gen cây trồng quốc gia là một hợp phần rất quan trọng. Dưới đây là kết quả của hợp phần nghiên cứu này.

## **II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP**

### **2.1. Vật liệu nghiên cứu**

Vật liệu nghiên cứu gồm những cây gừng in vitro chất lượng tốt, sạch bệnh, không có lá úa vàng, có nguồn gốc từ phòng nuôi cấy mô thuộc PRC.

### **2.2. Phương pháp nghiên cứu**

Sử dụng nguồn vật liệu cây in vitro có chiều cao từ 9 – 10 cm, dùng pank lấy mẫu ra khỏi ống nghiệm, loại bỏ hoại tử, lá già úa, sau đó cắt mẫu thành những đoạn thân chứa chồi bên, cấy mẫu vào môi trường nuôi cấy MS bổ sung 30g/l sucrose, 6g/l agar, 100mg/l myo-inositol, pH= 5,6- 5,8 và một số chất điều tiết sinh trưởng. Xác định môi trường thích hợp thông qua các thí nghiệm nghiên cứu ảnh hưởng của nhiệt độ và chất điều tiết đến khả năng lưu giữ nguồn gen gừng ở nhiệt độ 25<sup>0</sup>C và 20<sup>0</sup>C với 16h chiếu sáng/ngày trong 8 tuần như sau:

**Thí nghiệm 1:** Nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ D- manitol đến khả năng phát triển của cây in vitro ở 2 nền nhiệt độ 20<sup>0</sup>C và 25<sup>0</sup>C với 5 công thức, được bố trí theo khối hoàn toàn ngẫu nhiên gồm 4 lần nhắc lại, 15 mẫu/ công thức: CT0: 0 g/l, CT1: 10 g/l, CT2: 30 g/l, CT3: 60 g/l, CT4: 90 g/l

**Thí nghiệm 2:** Nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ axit abscisic đến khả năng phát triển của cây in vitro ở 2 nền nhiệt độ 20<sup>0</sup>C và 25<sup>0</sup>C với 5 công thức, được bố trí theo khối hoàn toàn ngẫu nhiên gồm 4 lần nhắc lại, 15 mẫu/ công thức: CT0: 0 mg/l, CT1: 0,5 mg/l, CT2: 1,0 mg/l, CT3: 2,0 mg/l, CT4: 3,0 mg/l

**Thí nghiệm 3:** Nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ sucrose đến khả năng phát triển của cây in vitro ở 2 nền nhiệt độ 20<sup>0</sup>C và 25<sup>0</sup>C với 5 công thức được bố trí theo khối hoàn toàn ngẫu nhiên gồm 4 lần nhắc lại, 15 mẫu/ công thức: CT0: 0 mg/l, CT1: 20 g/l, CT2: 30 g/l, CT3: 60 g/l, CT4: 90 g/l.

Xác định môi trường thích hợp trong lưu giữ in vitro: Xác định được công thức đồng thời đạt các tiêu chí: cao cây và số lá thấp nhất, chất lượng cao nhất sau 8 tuần nuôi cấy. Xác định chiều cao cây, số lá và chất lượng cây: theo phương pháp của PRC

## **III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

### **3.1. Nghiên cứu ảnh hưởng của các nồng độ D-manitol đến sinh trưởng cây gừng**

Manitol là đồng phân của sorbitol, một trong các phân tử lưu trữ năng lượng và carbon có nhiều nhất trong tự nhiên, được sản xuất bởi rất nhiều các vi sinh vật, bao gồm cả vi khuẩn, nấm men, nấm, tảo, địa y và nhiều loài thực vật. Trong nuôi cấy *in vitro*, nguồn carbon giúp mô và tế bào thực vật tổng hợp các chất hữu cơ để tế bào phân chia, tăng sinh khối không phải từ quá trình quang hợp mà chính là nguồn carbon bổ sung vào môi trường dưới dạng đường (Collin và Edwards, 1988). Kết quả nghiên cứu tốc độ sinh trưởng của cây gừng trong môi trường có bổ sung D-manitol với 5 nồng độ tăng dần: 0, 10, 30, 60, 90 g/l ở nhiệt độ 20 và 25°C đã cho thấy chiều cao cây, số lá và chất lượng cây có xu hướng tỷ lệ nghịch với nồng độ D-manitol và tỷ lệ thuận với nhiệt độ. Theo đó trong môi trường có bổ sung 10 g/l (CT2) ở nhiệt độ 20°C được xem là môi trường thích hợp nhất để lưu giữ *in vitro* nguồn gen gừng do đồng thời đạt tốc độ sinh trưởng chậm về chiều cao cây, số lá tương ứng với 11,98 cm, 5,14 lá/cây nhưng vẫn đảm bảo chất lượng cây cao nhất (Bảng 1).

**Bảng 1. Ảnh hưởng của nồng độ D- manitol đến khả năng phát triển của cây *in vitro* ở nhiệt độ 20°C và 25°C**

CT	Nồng độ (g/l)	20°C			25°C		
		Cao cây (cm)	Số lá/cây	Chất lượng cây	Cao cây (cm)	Số lá/cây	Chất lượng cây
CT1	0	13,15	5,73	+++	15,77	6,21	+++
CT2	10	11,98	5,14	+++	13,40	5,47	+++
CT3	30	10,43	4,76	++	11,12	5,00	++
CT4	60	1,34	0,80	++	1,67	1,08	+
CT5	90	0,00	0,00	+	0,00	0,00	+
LSD <sub>0,05</sub>		0,34	0,14		0,28	0,20	
CV%		3,0	2,90		2,2	3,7	

**Ghi chú:** + Sinh trưởng kém; ++ Sinh trưởng trung bình; +++ Sinh trưởng tốt

### 3.2. Nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ axit abscisic đến sinh trưởng cây gừng

Abscisic acid có công thức hóa học  $C_{15}H_{20}O_4$  là một chất ức chế sinh trưởng tự nhiên đại diện cho nhóm các chất thuộc nhóm terpenoit. Abscisic acid ức chế sự tổng hợp acid nucleic trong tế bào, ức chế quá trình tổng hợp protein, từ đó ảnh hưởng đến quá trình sinh trưởng phát triển của cây, làm cây nhanh già và rút ngắn chu kỳ sống. Trong thực vật nó có vai trò đa dạng như đóng mở khí khổng, làm hạn chế sự bốc thoát

nước, ngăn ngừa rụng hoa, quả, kiểm soát sự tăng trưởng (*Võ Hà Giang và Ngô Xuân Bình, 2010*). Kết quả nghiên cứu tốc độ sinh trưởng của cây gừng trong môi trường có bổ sung axit abscisic với 5 nồng độ tăng dần: 0; 0,5; 1,0; 2,0 và 3,0 mg/l ở nhiệt độ 20 và 25°C đã cho thấy chiều cao cây, số lá và chất lượng cây có xu hướng tỷ lệ nghịch với nồng độ axit abscisic và tỷ lệ thuận với nhiệt độ. Theo đó trong môi trường có bổ sung 1,0 mg/l (CT3) ở nhiệt độ 20°C được xem là môi trường thích hợp nhất để lưu giữ invitro nguồn gen gừng do đồng thời đạt tốc độ sinh trưởng chậm về chiều cao cây, số lá tương ứng 12,35 cm, 4,19 lá/cây và đảm bảo chất lượng cây cao nhất (Bảng 2).

**Bảng 2. Ảnh hưởng của nồng độ abscisic acid đến khả năng phát triển của cây *in vitro* ở nhiệt độ 20°C và 25°C**

CT	Nồng độ (mg/l)	20°C			25°C		
		Cao cây (cm)	Số lá/cây	Chất lượng cây	Cao cây (cm)	Số lá/cây	Chất lượng cây
CT1	0	13,40	5,46	+++	16,26	6,33	+++
CT2	0,5	12,65	4,64	+++	14,47	5,76	+++
CT3	1,0	12,35	4,14	+++	14,06	4,87	+++
CT4	2,0	11,16	3,79	++	13,21	4,37	++
CT5	3,0	10,52	3,11	++	12,16	3,97	++
LSD <sub>0,05</sub>		0,30	0,14		0,76	0,15	
CV%		1,60	2,20		3,50	2,00	

**Ghi chú:** + Sinh trưởng kém; ++ Sinh trưởng trung bình; +++ Sinh trưởng tốt

### 3.3. Nghiên cứu ảnh hưởng của các nồng độ sucrose đến sinh trưởng cây gừng

Đường sucrose (saccharoza) là nguồn cacbon chủ yếu và được sử dụng thường xuyên trong hầu hết các môi trường nuôi cấy mô, kể cả khi mẫu nuôi cấy là các chồi xanh có khả năng quang hợp (*Ngô Xuân Bình, 2010*). Khi khử trùng, đường sucrose bị thủy phân một phần, thuận lợi hơn cho cây hấp thụ. Trong một số trường hợp, ví dụ nuôi cấy mô cây một lá mầm, đường glucose tỏ ra tốt hơn so với sucrose. Mô và tế bào thực vật nuôi cấy *in vitro* sống chủ yếu theo phương thức dị dưỡng, mặc dù ở nhiều trường hợp chúng có thể sống bán dị dưỡng nhờ điều kiện ánh sáng nhân tạo và lục lạp có khả năng quang hợp. Vì vậy, việc đưa vào môi trường nuôi cấy nguồn

**Bảng 3. Ảnh hưởng của nồng độ sucrose đến khả năng phát triển của cây *in vitro* ở nhiệt độ 20°C và 25°C**

CT	Nồng độ (g/l)	20°C			25°C		
		Cao cây (cm)	Số lá/cây	Chất lượng cây	Cao cây (cm)	Số lá/cây	Chất lượng cây
CT1	0	0	0	0	0	0	0
CT2	20	8,94	5,54	++	10,02	0,22	++
CT3	30	10,51	5,20	+++	10,97	6,27	+++
CT4	60	6,61	4,44	++	7,47	5,22	+++
CT5	90	5,20	3,36	++	6,12	3,90	++
LSD <sub>0,05</sub>		0,42	0,30		0,29	0,16	
CV%		4,40			2,70		

**Ghi chú:** + Sinh trưởng kém; ++ Sinh trưởng trung bình; +++ Sinh trưởng tốt

carbon hữu cơ là điều bắt buộc. Nguồn carbon thông dụng nhất đã được kiểm chứng là sucrose, nồng độ thích hợp phổ biến là 2-3%. Kết quả nghiên cứu khả năng sinh trưởng của cây gừng trong môi trường có bổ sung đường sucrose với 5 nồng độ tăng dần: 0; 20; 30; 60 và 90 g/l ở nhiệt độ 20 và 25°C đã cho thấy tốc độ tăng trưởng chiều cao cây, số lá và chất lượng cây có xu hướng tỷ lệ thuận với nồng độ đường sucrose từ 0 đến 30 g/l tương ứng với 10,51 cm, 5,2 lá/cây ở nhiệt độ 20°C và 10,97 cm, 6,27 lá/cây ở nhiệt độ 25°C. Nồng độ đường sucrose tiếp tục tăng lên ở 60 và 90 g/l đã làm giảm tốc độ tăng trưởng cao cây và số lá ở cả 2 nền nhiệt độ 20 và 25 °C. Tuy nhiên chất lượng cây giống cao nhất chỉ được ghi nhận ở nhiệt độ 25°C. Do đó sử dụng môi trường có bổ sung đường sucrose với nồng độ 60 g/l ở nhiệt độ 25°C đã làm tốc độ sinh trưởng chậm nhất đồng thời vẫn đảm bảo chất lượng cây cao nhất (Bảng 3)

#### IV. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

##### 4.1. Kết luận

Bổ sung D-manitol với nồng độ 10 g/l và 30g/l sucrose, 6g/l agar, 100mg/l myo-inositol trong môi trường MS, pH= 5,6- 5,8 ở nhiệt độ 20°C để lưu giữ invitro nguồn gen gừng đạt tốc độ sinh trưởng chậm về chiều cao cây, số lá tương ứng với 11,98 cm, 5,14 lá/cây và đảm bảo chất lượng cây cao nhất sau 8 tuần lưu giữ. Bổ sung axit abscicic với nồng độ 1,0 mg/l và 30g/l sucrose, 6g/l agar, 100mg/l myo-inositol trong môi

trường MS, pH= 5,6- 5,8 ở nhiệt độ 20°C để lưu giữ invitro nguồn gen gừng đạt tốc độ sinh trưởng chậm về chiều cao cây, số lá tương ứng với 12,35 cm, 4,19 lá/cây và đảm bảo chất lượng cây cao nhất sau 8 tuần lưu giữ. Bổ sung đường sucrose với nồng độ 60 g/l và 30g/l sucrose, 6g/l agar, 100mg/l myo-inositol trong môi trường MS, pH= 5,6-5,8 ở nhiệt độ 25°C đã làm tốc độ sinh trưởng chậm nhất về cao cây và số lá tương ứng với 7,47 cm và 5,22 lá/cây đồng thời đảm bảo chất lượng cây cao nhất sau 8 tuần lưu giữ.

#### **4.2.Đề nghị**

Áp dụng môi trường MS với pH= 5,6- 5,8, nhiệt độ 25°C và bổ sung sucrose nồng độ 60 g/l và 30g/l sucrose, 6g/l agar, 100mg/l myo-inositol để thực hiện công tác bảo tồn nguồn gen gừng tại Ngân hàng gen cây trồng quốc gia.

#### **TÀI LIỆU THAM KHẢO**

Ngô Xuân Bình, 2010. *Nuôi cấy mô tế bào thực vật, cơ sở lý luận và ứng dụng*, Nhà xuất bản Khoa học và kỹ thuật, Hà Nội.

Trần Thị Đình, Lê Khả Tường, 2014. Nhân giống gừng mới QT1 bằng phương pháp nuôi cấy mô. *Tạp chí nông nghiệp và PTNT*, tr. 40-45

Võ Hà Giang, Ngô Xuân Bình, 2010). Nghiên cứu nhân giống phong lan Đuôi Chồn (*Rhynchotylis rotunda* (L.) Blume) bằng phương pháp nuôi cấy mô tế bào, *Tạp chí Nông nghiệp và phát triển nông thôn số 5/ 2010*, tr. 25-30.

Balachandran, S.N., S.R. Bhat, and K.P.S. Chandel. 1990. *In vitro clonal multiplication of turmeric (Curcuma spp.) and ginger (Zingiber officinalesRosc.)*. Plant Cell Rep. 8: 521-524

Collin, H.A. and S. Edwards, 1998. *Plant Cell Culture*. Bios Scientific Eds., Guilford.

#### **Summary**

#### **Identify on appropriate environment in invitro storage for ginger genetic resources in national plant gene bank**

Storage of ginger germplasm to give the breeding program is an important mission for development of ginger in many countries around the world. But in our country, conserve of ginger genetic resources in field gene banks are severely limited by infected many kind of diseases and pests. That is reason causes erosion of genetic resources. Ginger germplasm storage in invitro gene bank has been successful in many countries around the world by overcoming disease status during the field storage. That is a new conservation method should be applied to crop gene banks in our country. To implement this policy, Plant Resource Center (PRC) has conducted technical studies on Invitro ginger genetic resources storage in period 2013-2015, of which the

determination of appropriate environment for invitro storage is a very important component. Experiments have identified that the best suitable invitro environment for storing of ginger by Addition of sucrose at a concentration of 60 g / l and 30 g / l sucrose, 6g / l agar, 100 mg / l myo-inositol in MS medium, pH = 5,6- 5.8 at 25<sup>0</sup>C. This environments reduced on growth rate while ensuring the best quality seedlings.

***Key words: Invitro environment , rate, slow growth, good quality seedlings***

*Địa chỉ liên hệ: Lê Khả Tường, Trung tâm tài nguyên thực vật, An Khánh, Hoài Đức, Hà Nội. ĐT: 0946079555; Email: lekhatuong59@yahoo.com.vn*