

NHÂN GIỐNG CÂY TAM THẤT GỪNG (*Stablianthus thorelli* Gagnep) BẰNG PHƯƠNG PHÁP IN VITRO

Lã Văn Hiền¹, Dương Hữu Khoa¹, Bùi Đình Lãm¹, Ngô Xuân Bình^{1,2}

¹Trường Đại học Nông Lâm - ĐH Thái Nguyên

²Bộ Khoa học và Công nghệ

TÓM TẮT

Nghiên cứu khả năng tái sinh cây tam thất gừng (*Stablianthus thorelli* Gagnep) được tiến hành trên môi trường MS (Murashige Skoog) có bổ sung một số chất kích thích sinh trưởng như: BAP, kinetin, TDZ, và NAA. Kết quả cho thấy: thân củ chứa chồi ngủ được khử trùng bằng HgCl_2 0,1% trong 10 phút có kết quả tốt nhất, cho tỷ lệ mẫu sống không nhiễm 71,11%. Mẫu được tái sinh trên môi trường MS có bổ sung BAP 5,0 mg/l thu được 108 chồi tái sinh sau 14 ngày. Khả năng nhân nhanh chồi trên môi trường có bổ sung BAP, NAA, kinetin và TDZ đã xác định được: (i) môi trường bổ sung BAP 5,0 mg/l + NAA 0,5 mg/l có 194 chồi tái sinh, hệ số nhân chồi 4,31 chồi; (ii) hệ số nhân chồi tăng lên đáng kể khi môi trường nuôi cấy được bổ sung kinetin 0,3 mg/l hoặc TDZ 0,5mg/l kết hợp với BAP 5,0mg/l + NAA 0,5mg/l, hệ số nhân chồi lần lượt đạt 4,71 và 5,11 chồi. Phần lớn chồi thu được sau quá trình nhân nhanh đều có hình thái tốt (chồi xanh, mập). Cây con được trồng trên giá thể thích hợp đất : trấu hun (3:1).

Từ khóa: *in vitro*, nhân nhanh, tái sinh, tam thất gừng, kích thích sinh trưởng.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Tam thất (*Panax Pseudoginseng* (Busk). F.H.Chen) còn gọi là nhân sâm tam thất, bao gồm thổ tam thất (*Gymura segetum* Lour. Merr), tam thất gừng (*Stablianthus thorelli* Gagnep), tam thất vũ điệp (*Panax bipinnatifidus* Seem) (Đỗ Tất Lợi, 2004). Tam thất là một cây dược liệu quý có tác dụng bồi bổ sức khỏe và chữa bệnh như chảy máu cam, cầm máu, giúp tăng cường sức đề kháng...(Đỗ Tất Lợi, 2004). Theo Nguyễn Minh Đức và đồng tác giả (1999) cho rằng trong 200 g củ tươi cho thấy thành phần hoạt chất của tam thất chứa 75 mg saponin A và 341 mg saponin B, một chất điển hình có tác dụng hạn chế sự phát triển của khối u được phát hiện ở sâm Ngọc Linh (Nhut D.T *et al.*, 2011; Đỗ Tất Lợi, 2004; Zhang Y.H và Zhong J.J, 1997). Việt Nam có nguồn dược liệu tự nhiên phong phú và đa dạng cả về chủng loại lẫn công dụng làm thuốc, khoảng 3948 loại thực vật bậc cao, bậc thấp và Nấm lớn được dùng làm thuốc trong đó nhóm thực vật bậc cao có 3870 loài (Đỗ Tất Lợi, 1996). Tuy nhiên nguồn tài nguyên này đang

ngày một cạn kiệt, nhiều loài đang đứng trước nguy cơ tuyệt chủng do khai thác quá mức, trong đó có cây tam thất (Sách đỏ Việt Nam, 2007). Việc phát triển cây tam thất còn gặp nhiều khó khăn do yêu cầu về sinh thái, thổ nhưỡng; hiện tại thì việc sản xuất tam thất chủ yếu là tự phát, chưa có kế hoạch tổng thể và quy hoạch vùng sản xuất rõ ràng. Phương pháp nuôi trồng tam thất nói chung và tam thất gừng hiện nay chủ yếu là giâm hom chồi củ, số lượng cây giống được tạo ra bằng phương pháp này còn hạn chế, khả năng nhân lên còn thấp (Đặng Ngọc Hùng *et al.*, 2013). Để nâng cao hiệu quả, những năm gần đây một số nhà khoa học đã và đang ứng dụng kỹ thuật nuôi cấy mô tế bào trong nhân giống và bảo tồn cây dược liệu (Nhut D.T. *et al.*, 2011, 2012; Nguyễn Thị Liễu *et al.*, 2011). Nội dung bài báo xin trình bày kết quả “Nhân giống cây tam thất gừng (*Stablianthus thorelli* Gagnep) bằng phương pháp *in vitro*”.

VẬT LIỆU, PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu nghiên cứu

Giống tam thất gừng thu thập tại Lục Yên - Yên Bái, Sapa - Lào Cai và Kim Bôi - Hòa Bình (hình 1-a) được trồng lưu trữ trong nhà lưới để phục vụ thí nghiệm.

* Email: hiencnsh87@gmail.com

Hóa chất thí nghiệm chủ yếu gồm MS (Murashige Skoog) đa lượng, vi lượng (Merk) và BAP, NAA, Kinetin, GA₃ (Duchefa).

Phương pháp nghiên cứu

Khử trùng mẫu cây

Vật liệu thân củ mang chồi ngủ được lựa chọn làm mẫu nuôi cấy. Mẫu củ được loại bỏ vỏ ngoài sau đó rửa sạch bằng nước xà phòng loãng. Mẫu củ tiếp tục được khử trùng bằng cồn 70% trong 1 phút, tráng sạch bằng nước cất vô trùng 2-3 lần. Để đánh giá hiệu quả khử trùng bằng HgCl₂ 0,1%, mẫu nuôi cấy sau đó được xử lý trong HgCl₂ 0,1% với thời gian khác nhau theo thí nghiệm 1:

Thí nghiệm 1: Ảnh hưởng của thời gian khử trùng bằng HgCl₂ 0,1% đến vô trùng mẫu cấy: Thí nghiệm 1 được bố trí 5 công thức thí nghiệm lần lượt là 4, 6, 8, 10 và 12 phút. Thí nghiệm lặp lại 3 lần, 45 mẫu/công thức. Nuôi cấy ở 25°C, ánh sáng 2000 lux, ẩm độ 60-70%. Sau 14 ngày thống kê tỷ lệ mẫu sống không nhiễm, tỷ lệ mẫu nhiễm, tỷ lệ mẫu chết.

Tái sinh và nhân nhanh chồi

Sau 14 ngày, lựa chọn mẫu không nhiễm chuyển sang môi trường MS có bổ sung chất kích thích sinh trưởng để tái sinh và nhân nhanh chồi. Để đánh giá ảnh hưởng của chất điều tiết sinh trưởng đến tái sinh và nhân nhanh chồi, thí nghiệm được tiến hành theo các công thức sau:

Thí nghiệm 2: Ảnh hưởng của BAP đến tái sinh chồi: Thí nghiệm tiến hành đánh giá BAP ở các nồng độ khác nhau lần lượt 0,0 mg/l; 0,5 mg/l; 1,0 mg/l; 2,0 mg/l; 5,0 mg/l.

Thí nghiệm 3: Ảnh hưởng của BAP và NAA đến nhân nhanh chồi: Thí nghiệm gồm 5 công thức, BAP có nồng độ tốt ở thí nghiệm 2 được lựa chọn để kết hợp với NAA nồng độ 0,0 mg/l; 0,1 mg/l; 0,3 mg/l; 0,5 mg/l; 1,0 mg/l.

Thí nghiệm 4: Ảnh hưởng của BAP, NAA và kinetin đến nhân nhanh chồi: Nồng độ BAP và NAA thích hợp ở thí nghiệm 3 được kết

hợp với kinetin với các nồng độ 0,0 mg/l; 0,1 mg/l; 0,3 mg/l; 0,5 mg/l.

Thí nghiệm 5: Ảnh hưởng của BAP, NAA và TDZ đến nhân nhanh chồi: Thí nghiệm gồm 5 công thức, BAP và NAA có nồng độ tốt nhất ở thí nghiệm 3 được kết hợp với TDZ nồng độ 0,1 mg/l; 0,3 mg/l; 0,5 mg/l; 1,0 mg/l.

Kéo dài chồi và tạo cây hoàn chỉnh

Sau 4 - 6 tuần nhân nhanh, cụm chồi được tách và chuyển sang môi trường kéo dài MS có bổ sung GA₃ ở các nồng độ 1,0 mg/l. Khi chồi cao khoảng 3 - 4 cm chuyển sang môi trường tạo cây hoàn chỉnh.

Các công thức thí nghiệm được lặp lại 3 lần, 50 mẫu/công thức, trên môi trường MS + inositol 100 mg/l + agar 5,7 g/l + đường 30 g/l. pH = 5,6. Chỉ tiêu theo dõi thí nghiệm: Số mẫu nảy chồi, hệ số nhân chồi, hình thái chồi, chiều dài rễ.

Điều kiện nuôi cấy: 25°C, độ ẩm 60 - 70%, ánh sáng 2000 lux, chu kỳ chiếu sáng 12 giờ/ngày.

Ra cây ở giai đoạn vườn ươm

Cây con hoàn chỉnh có chiều cao 3 - 5 cm được đưa ra khỏi bình nuôi cấy, rửa sạch agar và trồng trên các giá thể khác nhau. Để xác định được ảnh hưởng của giá thể đến sinh trưởng của cây con giai đoạn ra cây được tiến hành theo thí nghiệm 6:

Thí nghiệm 6: Ảnh hưởng của giá thể đến sinh trưởng của cây con giai đoạn vườn ươm: Gồm 3 công thức: CT1: Đất, CT2: Đất:cát theo tỷ lệ 2:1; CT3: Đất:trấu hun theo tỷ lệ 3:1. Thí nghiệm bố trí với 3 công thức, 3 lần nhắc lại (15 cây/công thức). Chỉ tiêu theo dõi gồm có tỷ lệ sống, chiều cao cây, đánh giá sinh trưởng của cây con.

Phương pháp xử lý số liệu

Kết quả thí nghiệm được xử lý thống kê bằng phần mềm Excell 2003 và IRRISTAT 5.0.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Ảnh hưởng của thời gian khử trùng HgCl_2 0,1% đến khả năng vô trùng mẫu cấyBảng 1. Ảnh hưởng thời gian khử trùng HgCl_2 0,1% đến vô trùng mẫu cấy (sau 14 ngày)

Thời gian (phút)	Tỷ lệ mẫu sống (%)		Tỷ lệ mẫu chết (%)
	Không nhiễm (%)	Bị nhiễm (%)	
4	42,22	57,78	0,00
6	48,89	51,11	0,00
8	53,33	46,67	0,00
10	71,11	28,89	0,00
12	78,89	14,44	6,67
CV (%)	3,9	5,2	
LSD ₀₅	4,06	3,97	

Bảng 2. Ảnh hưởng của phương pháp cắt mẫu đến khả năng tái sinh chồi (sau 20 ngày)

Phương pháp	Thời gian nảy chồi (ngày)	Số chồi phát sinh (chồi)	Hệ số tái sinh (chồi)	Hình thái chồi
Để nguyên mẫu củ	7 - 10	68	1,51	Xanh, nhỏ
Cắt 1/2 mẫu củ	5 - 7	66	1,52	Xanh, mập
Cắt 1/4 mẫu củ	8 - 12	48	1,07	Xanh, nhỏ
CV(%)			5,4	
LSD ₀₅			0,14	

Kết quả bảng 1 cho thấy việc sử dụng HgCl_2 0,1% cho kết quả vô trùng mẫu tương đối tốt, sau 14 ngày, thu được tỷ lệ mẫu sống không nhiễm dao động từ 42,22% - 78,89%. Trong đó, khử trùng HgCl_2 0,1% trong 12 phút có hiệu quả tốt nhất đạt 78,89% (hình 1-b). Thời gian khử trùng 4 đến 10 phút có tỷ lệ mẫu sống không nhiễm lần lượt 42,22; 48,89; 53,33 và 71,11%. Sự khác biệt giữa các công thức được thể hiện qua tỷ lệ mẫu nhiễm và mẫu chết, trong đó tỷ lệ mẫu nhiễm có xu hướng giảm dần từ 57,78% (4 phút) xuống 14,44% (12 phút). Tuy nhiên, tỷ lệ mẫu chết có xu hướng tăng lên khi kéo dài thời gian khử trùng 12 phút (6,67%). Hiện tượng này không xuất hiện ở các công thức có thời gian khử trùng dưới 12 phút. Điều này cho thấy thời gian nếu xử lý mẫu kéo dài bằng HgCl_2 0,1% sẽ ảnh hưởng đến sức sống của mẫu. Ở Việt Nam chưa có nhiều công bố sử dụng HgCl_2 trên cây tam thất, kết quả nghiên cứu đạt được phù hợp với kết quả nghiên cứu của Rahman M.M. và đồng tác giả (2004) tăng thời gian khử trùng trên củ nghệ vàng bằng HgCl_2 0,1% trong thời gian 5 phút đến 14 phút có kết quả mẫu sạch thu được là 50% đến 90%. Từ kết quả thu được cho thấy thời gian thích hợp vô trùng mẫu tam thất gừng bằng HgCl_2 0,1% là 10 phút.

Ảnh hưởng của phương pháp cắt mẫu đến khả năng tái sinh chồi

Bảng 2 và hình 1 cho thấy phương pháp cắt mẫu có ảnh hưởng rõ rệt đến thời gian nảy chồi và số chồi phát sinh của tam thất gừng, số chồi phát sinh từ 48 đến 68 chồi tương ứng với hệ số tái sinh dao động từ 1,07 đến 1,52 chồi.

Nhìn chung phương pháp để nguyên củ thu được số chồi phát sinh (68 chồi) và hệ số tái sinh chồi (1,51 chồi) cao hơn so với các công thức còn lại. Số chồi phát sinh và hệ số tái sinh chồi có xu hướng giảm dần theo kích thước của mẫu củ (bảng 2). Tuy nhiên, thời gian nảy chồi ở các phương pháp cắt mẫu có sự khác biệt, trong đó phương pháp cắt 1/2 mẫu củ có thời gian nảy chồi ngắn (5 - 7 ngày) so với hai công thức còn lại.

Nghiên cứu của Seran T.H. và Sathyagowri S. (2011) trên đối tượng cây gừng cho thấy kích thước của mẫu nuôi cấy có ảnh hưởng nhiều đến khả năng sống sót và thời gian tái sinh. Cụ thể, mẫu nuôi cấy có kích thước 0,5; 1,0 và 2,0 cm có thời gian tái sinh lần lượt là 10,33; 9,20; 7,67 ngày và số mẫu sống sót 34; 82 và 100% tương ứng với mẫu có kích thước như trên. Kết quả nghiên cứu cho thấy mẫu cắt 1/2 có thời gian nảy chồi ngắn (5-7) ngày,

hình thái chồi xanh - mập. Điều này cho thấy việc cắt mẫu có ảnh hưởng đến thời gian nảy chồi và chất lượng chồi, nếu bỏ qua yếu tố vật liệu mẫu củ chứa sẵn mắt ngủ (có hệ số tái sinh và số chồi phát sinh cao) thì phương pháp cắt 1/2 mẫu củ thích hợp cho tái sinh chồi và tạo được nhiều nguồn vật liệu ban đầu cho nuôi cấy.

Ảnh hưởng của nồng độ BAP đến tái sinh chồi

Kết quả bảng 3 cho thấy hệ số tái sinh chồi dao động từ 1,04 đến 3,73 chồi/mẫu, khi nuôi cấy trên môi trường bổ sung BAP ở các nồng độ từ 0,0 - 5,0 mg/l. Bổ sung BAP cho hiệu quả tái sinh chồi cao hơn so với đối chứng (từ 1,11 đến 3,73 chồi so với 1,04 chồi), hệ số nhân chồi cao nhất (3,73 chồi) khi bổ sung BAP 5,0 mg/l (hình 1-c).

Kết quả so sánh giữa các công thức cho thấy sự khác biệt ở các nồng độ BAP khác nhau, môi trường có nồng độ BAP tăng 0,5 - 5,0 mg/l đều thu được hệ số tái sinh chồi và chất lượng chồi tốt hơn. Một số báo cáo trước đây trên cây họ gừng (cây nghệ vàng, cây riềng) chỉ ra rằng việc sử dụng BAP 5,0 mg/l đem lại kết quả tốt cho tái sinh chồi (Behera K.K. và Shahoo S, 2010; Nayak S. *et al.*, 2011). Kết quả nghiên cứu thu được cho thấy bổ sung

BAP 5,0 mg/l vào môi trường nuôi cấy cho hiệu quả tái sinh chồi cao ở cây tam thất gừng.

Ảnh hưởng của sự kết hợp nồng độ BAP, NAA, Kinetin và TDZ đến khả năng nhân nhanh

Bảng 4 cho thấy việc bổ sung BAP 5,0 mg/l và NAA từ 0,0 - 2,0 mg/l ảnh hưởng đến khả năng nhân nhanh chồi tam thất gừng. Hệ số nhân chồi có sự sai khác qua các công thức thí nghiệm, khi tăng nồng độ NAA từ 0,0 - 0,5 mg/l số chồi phát sinh và hệ số nhân chồi có xu hướng tăng lên, cụ thể ở công thức đối chứng NAA nồng độ 0,0 mg/l cho số chồi phát sinh là 168 chồi, hệ số nhân 3,73 chồi. Nồng độ NAA 0,5 mg/l đạt 194 chồi, hệ số nhân cao nhất 4,31 chồi (hình 1-d). Tuy nhiên, khi tăng nồng độ NAA từ 1,0 - 2,0 mg/l số chồi phát sinh và hệ số nhân chồi giảm dần lần lượt đạt 141; 129 và 124 chồi tương ứng với hệ số nhân là 3,13; 2,87 và 2,76 chồi. Ngoài ra khi tăng nồng độ NAA trong môi trường nuôi cấy cũng ảnh hưởng đến hình thái chồi tái sinh, Kết quả cho thấy chồi xanh, mập trên môi trường bổ sung NAA thấp hơn 1,0 mg/l, ở môi trường có nồng độ NAA lớn hơn (1,5 mg/l và 2,0 mg/l) chồi có hình thái xanh nhỏ.

Bảng 3. Ảnh hưởng của nồng độ BAP đến khả năng tái sinh chồi (sau 14 ngày)

BAP (mg/l)	Số chồi phát sinh (chồi)	Hệ số tái sinh chồi (chồi)	Hình thái chồi
0,0	47	1,04	Xanh, nhỏ
0,5	50	1,11	Xanh, nhỏ
1,0	54	1,20	Xanh, nhỏ
2,0	61	1,36	Xanh, mập
5,0	108	3,73	Xanh, mập
CV (%)		5,1	
LSD ₀₅		0,11	

Bảng 4. Ảnh hưởng của nồng độ BAP và NAA đến khả năng nhân nhanh (sau 30 ngày)

BA (mg/l)	NAA (mg/l)	Số chồi phát sinh (chồi)	Hệ số nhân chồi (chồi)	Hình thái chồi
5,0	0,0	168	3,73	Xanh, mập
5,0	0,5	194	4,31	Xanh, mập
5,0	1,0	141	3,13	Xanh, mập
5,0	1,5	129	2,87	Xanh, nhỏ
5,0	2,0	124	2,76	Xanh, nhỏ
CV (%)			6,7	
LSD ₀₅			0,41	

Greetha S.P. và đồng tác giả (1997) đã tiến hành nghiên cứu ảnh hưởng của BAP và NAA đến khả năng tái sinh trên một số cây thuộc họ gừng và chỉ ra rằng việc sử dụng BAP kết hợp với NAA cho hiệu quả tốt hơn so với khi sử dụng đơn thuần các chất kích thích sinh trưởng. Ở một nghiên cứu tương tự Nayak S. và đồng tác giả (2011) cho rằng kết hợp BAP ở nồng độ 3,0 mg/l và NAA 0,5 mg/l trên môi trường MS có hiệu quả tốt trong cảm ứng và nhân chồi ở cây riềng. Kết luận này cũng được khẳng định trong nghiên cứu sau đó của Shahinozzaman M. và đồng tác giả (2013). Tương tự Zuraida A.R (2013) thu được kết quả 9,5 chồi/mẫu khi nuôi cấy cây nghệ đen (*Curcuma caesia*). Theo Seran T.H. và Sathyagowri S. (2011), tác giả đã sử dụng BAP 5,0 mg/l kết hợp với NAA 0,5 mg/l cho giai đoạn nhân nhanh chồi ở cây gừng, kết quả thu được 5,33 chồi/mẫu. Kết quả nghiên cứu cho thấy BAP 5,0 mg/l kết hợp NAA 0,5 mg/l được sử dụng cho nghiên cứu nhân nhanh chồi ở cây tam thất gừng.

Ảnh hưởng của sự kết hợp giữa BAP, NAA và Kinetin đến nhân nhanh chồi

Bảng 5 thể hiện kết quả ảnh hưởng của nồng độ BAP, kinetin và NAA đến khả năng nhân

nhân chồi. Hệ số nhân chồi dao động từ 2,67 đến 4,71 chồi. Môi trường bổ sung BAP 5,0 mg/l và NAA 0,5 mg/l kết hợp kinetin 0,3 mg/l cho hệ số nhân cao nhất là 4,71 chồi (hình 1-e). Nồng độ kinetin 0,5 - 1,5 mg/l hệ số nhân chồi tương ứng giảm dần từ 3,98 chồi xuống còn 2,67 chồi. Cùng với đó, chất lượng chồi tăng lên khi tăng nồng độ kinetin từ 0,5 - 1,5 mg/l (chồi xanh và mập). Kết quả cho thấy bổ sung kinetin ở nồng độ 1,0 mg/l kết hợp BAP 5,0 mg/l và NAA 0,5 mg/l thích hợp cho nhân nhanh chồi cây tam thất gừng.

Quá trình kết hợp cytokinin (BAP, kinetin) và auxin (NAA) trong nuôi cấy cây riềng đã được Nayak S. và đồng tác giả (2011) nghiên cứu. Kết quả cho thấy quá trình nhân nhanh chồi tốt nhất khi kết hợp kinetin 3,0 mg/l + BAP 3,0 mg/l + NAA 1,0 mg/l, số chồi thu được đạt 15 chồi/mẫu sau 8 tuần nuôi cấy (Nayak S. *et al.*, 2011). Kết quả thu được ở bảng 5 cũng cho thấy việc sử dụng kết hợp kinetin, BAP trong nuôi cấy có tác dụng tích cực trong quá trình nhân lên và sự phát triển của chồi.

Ảnh hưởng của sự kết hợp giữa BAP, NAA và TDZ đến nhân nhanh chồi

Bảng 5. Ảnh hưởng của sự kết hợp giữa BA, NAA và Kinetin đến nhân nhanh chồi (sau 30 ngày)

BAP (mg/l)	NAA (mg/l)	Kinetin (mg/l)	Số chồi phát sinh (chồi)	Hệ số nhân chồi (chồi)	Hình thái chồi
5,0	0,5	0,0	179	3,98	Xanh, nhỏ
5,0	0,5	0,3	212	4,71	Xanh, mập
5,0	0,5	0,5	135	3,00	Xanh, mập
5,0	0,5	1,0	139	3,09	Xanh, mập
5,0	0,5	1,5	120	2,67	Xanh, mập
CV(%)				5,2	
LSD ₀₅				0,33	

Bảng 6. Ảnh hưởng của sự kết hợp giữa BAP, NAA và TDZ đến nhân nhanh chồi (sau 30 ngày)

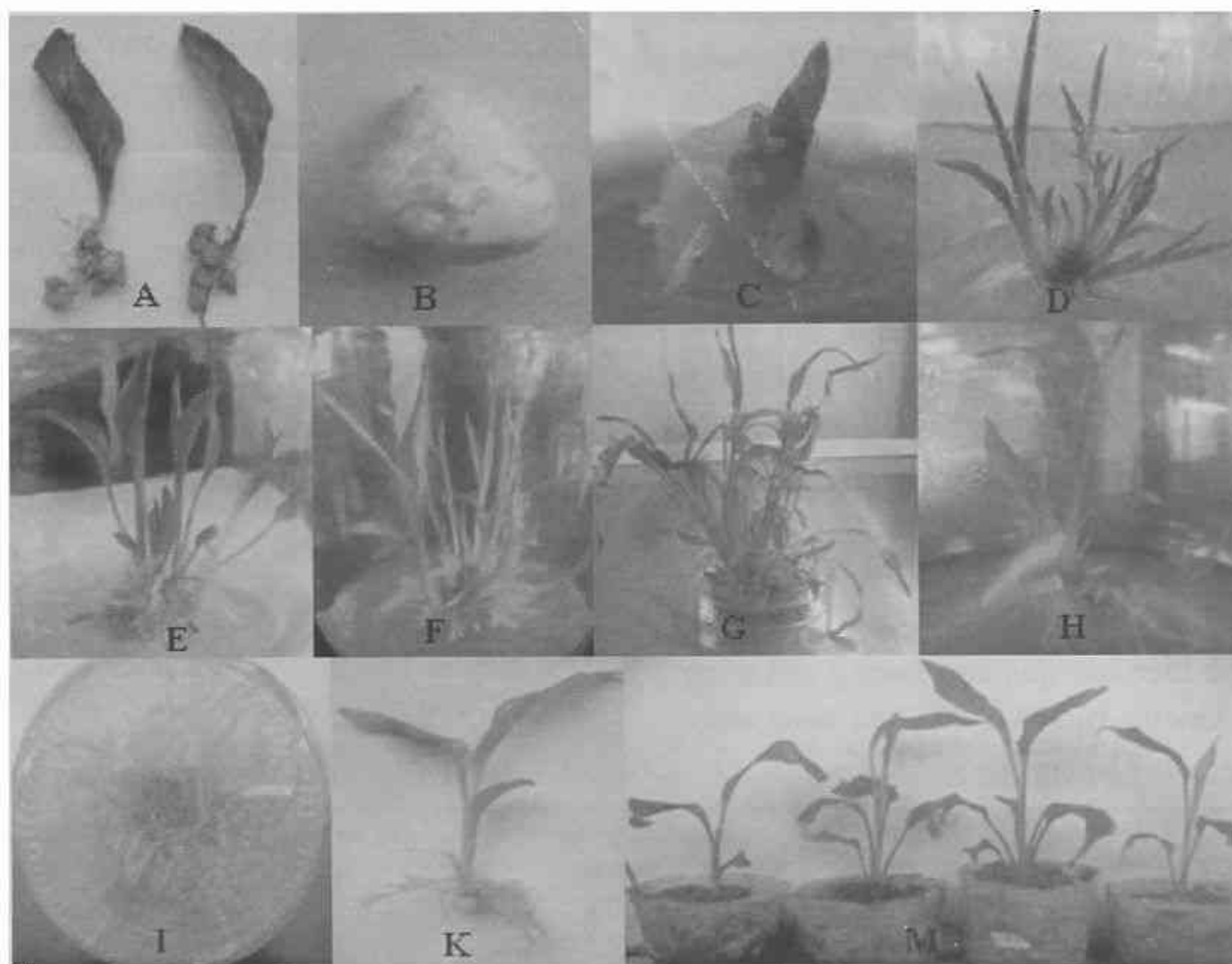
BAP (mg/l)	NAA (mg/l)	TDZ (mg/l)	Số chồi phát sinh (chồi)	Hệ số nhân chồi (chồi)	Hình thái chồi
5,0	0,5	0,0	151	3,36	Xanh, nhỏ
5,0	0,5	0,3	196	4,36	Xanh, mập
5,0	0,5	0,5	230	5,11	Xanh, mập
5,0	0,5	1,0	168	3,73	Xanh, nhỏ
5,0	0,5	1,5	158	3,51	Xanh, nhỏ
CV(%)				6,3	
LSD ₀₅				0,45	

Bảng 7. Ảnh hưởng của một số chất kích thích sinh trưởng (BAP, kinetin, NAA và TDZ) đến khả năng nhân nhanh chồi tam thất gừng

Công thức	Hệ số nhân (chồi)	Hình thái chồi
BAP 5,0 mg/l + NAA 0,5 mg/l	4,31	Xanh, mập
BAP 5,0 mg/l + NAA 0,5 mg/l + Kinetin 0,3 mg/l	4,71	Xanh, mập
BAP 5,0 mg/l + NAA 0,5 mg/l + TDZ 0,5 mg/l	5,11	Xanh, mập

Bảng 8. Ảnh hưởng của giá thể đến quá trình ra cây tam thất gừng (sau 15 ngày)

Giá thể	Số cây con	Số cây sống	Tỷ lệ cây sống (%)	Chiều cao cây (cm)	Số lá/cây
Đất	50	35	70	5 - 7	5 - 6
Đất : cát (2:1)	50	30	60	8 - 10	5 - 6
Đất : trấu hun (3:1)	50	50	100	13 - 15	5 - 7

**Hình 1. Kết quả nhân giống cây tam thất gừng**

A - Cây tam thất gừng 1 năm tuổi; **B** - Thân củ; **C** - Mẫu này chồi (sau 10 ngày); **D** - Nhân chồi (BAP 5,0 mg/l + NAA 0,5 mg/l); **E** - Nhân chồi (BAP 5,0 mg/l + NAA 0,5 mg/l + Kinetin 0,3 mg/l); **F** - Nhân chồi (BAP 5,0 mg/l + NAA 0,5 mg/l + TDZ 0,5 mg/l); **G, H** - Chồi kéo dài, ra rễ; **I, K** - Cây ra rễ; **M** - Cây trồng trên giá thể đất + trấu hun (3:1).

Kết quả bảng 6 cho thấy hiệu quả nhân nhanh chồi sau 30 ngày nuôi cấy, hệ số nhân chồi dao động từ 3,36 đến 5,11 chồi. Qua theo dõi cho thấy, môi trường có BAP 5,0 mg/l kết hợp NAA 0,5 mg/l và TDZ 0,5 mg/l cho hệ số nhân chồi cao nhất, hệ số nhân nhanh chồi đạt 5,11 chồi. Nhưng khi tăng nồng độ TDZ từ 1,0 - 1,5 mg/l cho thấy hệ số nhân chồi giảm từ 3,73 xuống 3,51 chồi. Hình thái chồi thu

được khá tốt khi bổ sung TDZ từ 0,3-0,5mg/l, công thức 2 và 3, chồi xanh, mập. Ở các công thức còn lại chồi thu được có chất lượng thấp hơn, chồi xanh, nhỏ. Điều này cho thấy bổ sung TDZ 0,5mg/l kết hợp với BAP 0,5mg/l và NAA 0,5mg/l cho hiệu quả nhân chồi tốt nhất.

Kết quả bảng 7 cho thấy sự kết hợp của BAP, kinetin, NAA và TDZ có hiệu quả tốt đến nhân chồi. Hệ số nhân chồi thu được từ 4,31 -

5,11 chồi, chồi xanh, mập. Trong đó, sự kết hợp giữa BAP 5,0 mg/l + NAA 0,5 mg/l + TDZ 0,5 mg/l cho hiệu quả nhân chồi tốt nhất (hình 1-f).

Ảnh hưởng của giá thể đến khả năng sinh trưởng của cây con giai đoạn vườn ươm

Bảng 8 thể hiện kết quả sinh trưởng và phát triển của cây con trên giá thể khác nhau. Tổng số cây ra trên mỗi công thức là 50 cây, sau 20 ngày theo dõi các chỉ tiêu như số cây sống, chiều cao cây và số lá/cây cho kết quả tốt nhất khi cây con được cấy trong giá thể là đất + trấu (3:1), số cây sống đạt 50/50 (100%), chiều cao cây từ 13 - 15 cm với 5 - 7 lá/cây (hình 1-h,i). Với giá thể đất cho số cây sống cao thứ 2 với 40/50 cây sống, chiều cao cây đạt 5 - 7 cm và số lá/cây là 5 - 6 lá. Giá thể đất + cát cho kết quả số cây sống thấp nhất với 30/50 cây sống, chiều cao cây đạt 8 - 10 cm và thu được 5 - 6 lá/cây.

KẾT LUẬN

Vật liệu được khử trùng bằng $HgCl_2$ 0,1% trong 10 phút có kết quả tốt nhất, cho tỷ lệ mẫu sống không nhiễm 71,11%. Mẫu được tái sinh trên môi trường MS có bổ sung BAP 5,0 mg/l thu được 108 chồi tái sinh sau 14 ngày. Kết quả nhân nhanh chồi trên môi trường có bổ sung BAP, NAA, Kinetin, TDZ đạt được kết quả như sau: (i) môi trường bổ sung BAP 5,0 mg/l + NAA 0,5 mg/l có 194 chồi tái sinh, hệ số nhân chồi 4,31 chồi; (ii) môi trường có BAP 5,0 mg/l + NAA 0,5 mg/l + Kinetin 0,3 mg/l thu được 212 chồi, hệ số nhân 4,71 chồi; (iii) trên môi trường BAP 5,0 mg/l + NAA 0,5 mg/l + TDZ 0,5 mg/l thu được 230 chồi tái sinh, ứng với hệ số nhân chồi 5,11 chồi. Phần lớn chồi thu được sau quá trình nhân nhanh đều có chất lượng tốt, chồi có biểu hiện xanh, mập. Sau khi tạo cây hoàn chỉnh, cây con được trồng trên giá thể thích hợp đất : trấu hun (3:1).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Behera K. K., Pani D. and Shahoo S. (2010). "Effect of plant growth regulator on in vitro multiplication of turmeric (*Curcuma longa* L.cv.Ranga)". *International Journal of Biological Technology*, 1(1): 16 - 23.
2. Đặng Ngọc Hùng, Vũ Thị Phương, Bùi Thị Thùy (2013). "Nghiên cứu nhân giống cây tam thất bắc (*panax pseudoginseng*) bằng phương pháp giâm hom chồi củ tại huyện Hoàng Su Phì, tỉnh Hà Giang". *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*, 108(08): 135 - 139.
3. Đỗ Tất Lợi (1996). *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*. Nxb Khoa học Kỹ Thuật, Hà Nội.
4. Đỗ Tất Lợi (2004). *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*. Nxb Y học.
5. Greetha S.P., Manjula C., John C.Z., Minoo D., Nirmal Babu K. and Ravindran P.N. (1997). "Micorpropagation of *Kaempferia* spp. (*K. galanga* L. And *K. rotunda* L.)". *Journal of Species and Aromatic Crops*, 6(2): 129 - 135.
6. Hamirah M.N., Sani H.B., Boyce P.C. and Sim S.L. (2010). "Micropropagation of red ginger (*Zingiber montanum* Koenig), a medicinal plant". *Aspac J. Mol. Biol. Biothechnol*, 18(1): 127 - 130.
7. Nayak S., Parida R. and Mohanty S (2011). "Evaluation of genetic fidelity of in vitro propagated greater Galangal (*Alpinia galanga* L.) using DNA based markers". *International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences*, 1(3): 124 - 133.
8. Nhut D.T., Huy N.P., Luan V.Q., Binh N.V., Nam N.B., Thuy L.K.N., Ha D.T.N., Chien H.X., Huong T.T., Cuong H.V., Cuong L.K. and Hien V.T. (2011). "Shoot regeneration and micropropagation of *Panax vietnamensis* Ha et Grushv. from ex vitro leaf-derived callus". *African Journal of Biotechnology* Vol. 10(84), pp. 19499-19504.
9. Nhut D.T., Huy N.P., Chien H.X., Luan T.C., Vinh B.T. and Thao L.B. (2012). In vitro culture of petiole longitudinal thin cell layer explants of Vietnamese ginseng (*Panax Vietnamensis* HA et Grushv) and preliminary analysis of saponin content. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*, vol 3, 178 - 190.
10. Nguyễn Thị Liễu, Nguyễn Trung Thành, Nguyễn Văn Kết (2011). Nghiên cứu khả năng tạo rễ bất định của sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis*, Ha et Grushv.) trong nuôi cấy in vitro. *Tạp chí Khoa học ĐHQGHN, Khoa học Tự nhiên và Công nghệ*, 27, 30-36.
11. Nguyễn Minh Đức, Nguyễn Thới Nhâm, Đoàn Tô Tuyết Trinh (1999). Thành phần hóa học của cây tam thất trồng ở Việt Nam. *Tạp chí dược liệu*, tập 4, số 3, 68 - 73.
12. Rahman M.M., Amin M.N., Jahan H.S. and Ahmed R. (2004). "In vitro regeneration of plantlets of *Curcuma longa* Linn. a valuable spice

plant in Bangladesh". *Asian Journal of Plant Sciences*, 3(3): 306 - 309.

13. Sách đỏ Việt Nam, phần II thực vật (2007). NXB Khoa học tự nhiên và công nghệ.

14. Shahinozzaman M., Faruq M. O., Azad M. A. K. and Amin M. N. (2013). "Studies on in vitro propagation of an important medicinal plant - *Curcuma zedoaria* Roscoe using rhizome explants". *Persian Gulf Crop Protection Available online*, 2(4): 1- 6.

15. Seran T.H. and Sathyagowri S. (2011), "In vitro plant regeneration of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) with emphasis on initial culture establishment", *Int. J. Med. Arom. Plant*, 1(3): 195 - 202.

16. Vũ Thị Bạch Phượng, Quách Ngô Diễm Phương, Bùi Văn Lê (2013). "Nghiên cứu nuôi cấy in vitro nguồn nguyên liệu có hoạt tính kháng oxy hóa của cây thỏ tam thất" (*Gynura pseudo-china* (L) DC)". Báo cáo Hội nghị Khoa học Công nghệ Sinh học toàn quốc 2013.

17. Zhang Y.H. and Zhong J.J. (1997). "Hyperproduction of ginseng saponin and polysaccharide by high density cultivation of *Panax notoginseng* cells". *Enzyme and Microbial Technology* 21:59-63.

18. Zuraida A.R. (2013). Improved in vitro propagation of *Curcuma caesia*, a valuable medicinal plant. *J. Trop. Agric. and Fd. Sc.* 41(2): 273 - 281.

SUMMARY

PROPAGATION OF PLANT NOTOGINGSENG (*Stablianthus thorelli* Gagnep) BY IN VITRO METHOD

La Van Hien^{1*}, Duong Huu Khoa¹, Bui Dinh Lam¹, Ngo Xuan Binh^{1,2}

¹College of Agriculture and Forestry – TNU,

²Ministry of science and technology

Study on the regeneration capacity of notoginseng (*Stablianthus thorelli* Gagnep) was performed on MS (Murashige Skoog) medium that supplemented various growth regulations (BAP, kinetin, TDZ, and NAA). The results showed that the highest of sterilization efficiency of tubers (71.11%) was obtained at treatment of HgCl₂ 0.1% for 10min. The efficiency of shoot regeneration was the highest on MS medium with BAP 5.0mg/l of supplement, 108 shoots were generated after 14 days of culture. The effect of BAP, kinetin, TDZ, and NAA on shoot multiplication of notoginseng were determined: (i) supplement of BAP 5.0mg/l and NAA 0.5mg/l into MS medium could be generated 4.31 shoots/sample; (ii) the number of shoot regeneration was increased when adding of either kinetin 0.3mg/l or TDZ 0.5mg/l into MS medium containing BAP 5.0mg/l and NAA 0.5mg/l, 4.71 and 5.11 shoots/sample respectively. Plant were then transplanted in mixture soil (soil and rice husk, 3:1).

Keywords: invitro, multiplication, growth regulation , regeneration, ontoginseng

Ngày nhận bài: 29/5/2015; Ngày phản biện: 18/6/2015; Ngày duyệt đăng: 31/10/2015

Phản biện khoa học: TS. Trần Văn Chí – Trường Đại học Nông Lâm – ĐHTN

* Email: hienensh87@gmail.com