

## Genome-wide association analysis for grain yield of 8 progenic populations F<sub>2,3</sub> under drought and well-water conditions

Do Van Dung, Thayil Vinayan Madhumal, Gajanan Saykhedkar, Raman Babu, Dang Ngoc Ha, Le Quy Kha, Nguyen Chi Thanh, Zaidi Pervez Haider

### Abstract

The evaluation of grain yield of 8 BP groups including 790 F<sub>2,3</sub> generation lines on farm under drought and well watering conditions showed that the yield of these groups in drought was from 0.74 to 1.37 tons.ha<sup>-1</sup>, reduced by 22.0% - 48.6 against under well-watering by 1.21 - 2.51 tons.ha<sup>-1</sup>. The genotypic variance of BP2, BP6, BP7 and BP8 groups under drought ranged from 0.10 to 0.23 and the genetic coefficient varied from 0.55 to 0.69, higher than other groups, which proved that it is able to select F<sub>2,3</sub> families for developing new generation pure lines and for further breeding of drought tolerance hybrid maize varieties. By genotyping analysis and the use of 39,846 SNP for 8 BP populations, 15 key gene regions controlling the trait of grain yield, linked with 15 molecular markers (SNP) on chromosomes 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9,10 were identified as suitable molecular markers for breeding programs of drought tolerance maize varieties.

**Keywords:** Maize, F<sub>2,3</sub>, drought, optimal condition, SNP marker, GWAS

Ngày nhận bài: 28/1/2019

Ngày phản biện: 6/2/2019

Người phản biện: TS. Vương Huy Minh

Ngày duyệt đăng: 11/3/2019

## ỨNG DỤNG KỸ THUẬT NUÔI CẤY LỚP MỎNG TRONG NHÂN NHANH *IN VITRO* CÂY RIÊNG BẢN ĐỊA BẮC KẠN

Vũ Xuân Dương<sup>1</sup>, Đặng Trọng Lương<sup>2</sup>, Đỗ Tuấn Khiêm<sup>3</sup>, Phạm Thanh Loan<sup>1</sup>, Trịnh Thị Thanh Hương<sup>2</sup>

### TÓM TẮT

Riêng bản địa Bắc Kạn (*Alpinia coriandriodora* D. Fang), là cây quý hiếm, có giá trị kinh tế cao được sử dụng làm gia vị và dược liệu. Nghiên cứu này xây dựng quy trình nhân giống cây riêng bản địa Bắc Kạn thông qua tạo callus từ lát cắt chồi nhằm tăng hiệu suất nhân chồi *in vitro*. Môi trường Murashige & Skoog (MS) bổ sung 0,5 mg/l TDZ và 3 mg/l 2,4D được sử dụng để tạo callus từ lát cắt chồi, tỉ lệ tạo callus đạt 75,56%, callus có bề mặt khô, chắc, màu trắng sáng. Môi trường MS có bổ sung 2,0 mg/l Vitamin B1 và 3,0 mg/l BAP có tỷ lệ tái sinh tạo chồi đạt cao nhất là 78,89%, số chồi đạt 9,71 chồi/callus. Môi trường MS có bổ sung 2,0 mg/l BAP, 1,0 mg/l Ki, 0,2 mg/l  $\alpha$ -NAA và 100 ml/l nước dừa là phù hợp để nhân chồi *in vitro*, hệ số nhân chồi sau 4 tuần đạt 6,32 lần, chồi mập, thân lá xanh đậm, sinh trưởng phát triển tốt. Môi trường MS có bổ sung 0,6 mg/l  $\alpha$ -NAA có hiệu quả tái sinh rễ và tạo cây hoàn chỉnh tốt nhất với thời gian ra rễ từ 19 - 21 ngày, trung bình chiều cao cây đạt 9,63 cm, số lá/cây đạt 5,33 lá, số rễ đạt 5,51 rễ/chồi và chiều dài rễ đạt 4,43 cm. Trên giá thể 100% cát mịn, sau 30 ngày ra ngôi tỉ lệ cây sống cao nhất đạt 95,56%, cây sinh trưởng phát triển tốt.

**Từ khóa:** Nhân giống, callus, riêng bản địa Bắc Kạn (*Alpinia coriandriodora* D. Fang), gừng đá

### I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây riêng bản địa ở tỉnh Bắc Kạn (tên thường gọi là gừng núi đá, gừng đá, gừng núi) có tên khoa học là *Alpinia coriandriodora* D. Fang (Duong *et al.*, 2019) được trồng từ lâu đời trên các nương rẫy, rừng núi đất đá xen kẽ, là loài cây quý hiếm. Hiện nay, cây riêng bản địa được trồng chủ yếu theo kinh nghiệm, diện tích manh mún, nhỏ lẻ ở các huyện nên sản phẩm

chưa mang tính hàng hóa, chưa có lượng giống đủ lớn để phát triển thành vùng trồng tập trung. Việc nhân và giữ giống vẫn theo kinh nghiệm của người dân, do vậy củ giống không đảm bảo về chất lượng, nhiễm bệnh nhiều và dần thoái hóa.

Trên thế giới, cây họ gừng đã được nghiên cứu nhân giống *in vitro* khá phổ biến ở các nước như Ấn Độ, Sri Lanka, Malaysia, Trung Quốc,...

<sup>1</sup> Viện Nghiên cứu Ứng dụng và phát triển, Trường Đại học Hùng Vương - Phú Thọ

<sup>2</sup> Viện Di truyền Nông nghiệp; <sup>3</sup> Sở Khoa học và Công nghệ tỉnh Bắc Kạn

(Rakkimuthu *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2011; Das *et al.*, 2013). Bên cạnh các công trình nghiên cứu tái sinh chồi trực tiếp từ mẫu củ, nhiều tác giả đã công bố các công trình nghiên cứu tái sinh cây từ lát cắt thân, mảnh rễ, ... thông qua giai đoạn tạo thể chồi và callus, làm tăng hệ số nhân chồi (Lincy *et al.*, 2009; Hossain *et al.*, 2010; Kale and Namdeo, 2015; Nguyễn Phương Quý và *ctv.*, 2017). Năm 2014, Viện Di truyền Nông nghiệp đã nhân giống thành công loài gừng đá Bắc Kạn thông qua tạo chồi trực tiếp từ mắt ngủ. Phương pháp này có nhiều ưu điểm như dễ thực hiện, thời gian hoàn thiện quy trình ngắn, tự nhiên hệ số nhân chồi chưa cao (Đặng Trọng Lương và *ctv.*, 2014). Nghiên cứu này xây dựng quy trình nhân nhanh cây riêng bản địa Bắc Kạn thông qua tạo callus từ lát cắt chồi nhằm tăng hiệu quả nhân chồi *in vitro*.

## II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu nghiên cứu

- Vật liệu sử dụng để nghiên cứu quy trình nhân giống *in vitro* riêng Bắc Kạn là chồi mới tái sinh từ cây mẹ khỏe mạnh, sạch bệnh.

- Các hóa chất sử dụng làm thí nghiệm gồm: Các hóa chất trong thành phần môi trường Murashige & Skoog (MS), các chất điều hòa sinh trưởng thuộc nhóm auxin ( $\alpha$ -NAA) và cytokinin (BAP, TDZ, kinetin), đường sacaroza, agar, nước dừa.

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

Bố trí thí nghiệm: Mỗi thí nghiệm được bố trí 3 lần lặp lại, mỗi công thức thí nghiệm trên 30 mẫu.

Điều kiện thí nghiệm: Số giờ chiếu sáng: 16 giờ sáng/8 giờ tối; cường độ chiếu sáng: 2000 lux; nhiệt độ phòng nuôi cây:  $25 \pm 2$  °C, độ ẩm trung bình: 60% - 70%.

#### 2.2.1. Nghiên cứu tạo callus

Chồi được khử trùng bằng dung dịch NaOCl 2,5% và 0,5 ml Tween20 trong thể tích 200 ml, thời gian khử trùng 20 phút. Sau khi xử lý hóa chất mẫu được rửa sạch bằng nước cất vô trùng ít nhất 6 lần, tách bỏ bẹ lá bên ngoài, cắt hai đầu tiếp xúc hóa chất, sau đó để ráo nước, cắt thành lát mỏng kích thước 0,5 - 1 mm trước khi cấy vào môi trường MS.

Sau 2 tuần nuôi cấy, các mẫu sạch - sống được chuyển sang môi trường MS có bổ sung 3% đường sucrose, 6 g/l agar, 0,5 mg/l TDZ thay đổi thành phần chất điều hòa sinh trưởng 2,4D từ 1,0 - 4,0 mg/l. Mẫu được nuôi cấy trong điều kiện tối hoàn toàn để cảm ứng tạo callus. Theo dõi tỷ lệ % callus được tạo ra và hình thái của callus để đánh giá sự phù hợp của môi trường. Thời gian đánh giá: Sau 8 tuần nuôi cấy.

#### 2.2.2. Nghiên cứu tái sinh chồi từ callus

Callus được cấy chuyển vào môi trường MS có bổ sung 2 mg/l Vitamin B1 và hàm lượng BAP thay đổi từ 1 - 5 mg/l. Trong một tuần đầu nuôi cấy trong điều kiện tối hoàn toàn, sau đó nuôi trong điều kiện chiếu sáng 16 giờ sáng/8 giờ tối. Sau 8 tuần nuôi cấy, theo dõi các chỉ tiêu: Tỷ lệ tái sinh tạo chồi (%); số chồi/callus (chồi).

#### 2.2.3. Nghiên cứu nhân nhanh chồi

- Ảnh hưởng của BAP và Kinetin đến khả năng nhân nhanh chồi *in vitro*: Sử dụng môi trường MS có bổ sung 0,2 mg/l  $\alpha$ -NAA, 1,0 mg/l Ki, hàm lượng BAP thay đổi từ 1 - 5 mg/l.

- Ảnh hưởng của nước dừa (ND) đến khả năng nhân nhanh chồi *in vitro*: Sử dụng môi trường MS có bổ sung 0,2 mg/l  $\alpha$ -NAA; 2,0 mg/l BAP; 1,0 mg/l Ki; thay đổi hàm lượng nước dừa từ 10 - 25%.

Sau 4 tuần nuôi cấy, tiến hành theo dõi các chỉ tiêu sau: Hệ số nhân chồi; chiều cao trung bình chồi; số lá trung bình/chồi; hình thái chồi.

#### 2.2.4. Nghiên cứu tạo cây con hoàn chỉnh

Sử dụng môi trường MS và ½ MS có bổ sung 10% nước dừa, thay đổi hàm lượng  $\alpha$ -NAA từ 0,2 - 0,8 mg/l. Sau 6 tuần nuôi cấy, cây được lấy ra quan sát theo các chỉ tiêu: Số rễ trung bình/cây; chiều dài rễ; chiều cao cây; số lá/cây.

#### 2.2.5. Giá thể ra ngôi

CT1: 100% cát mịn; CT2: đất phù sa - cát mịn (1 : 1); CT3: đất phù sa - cát mịn - trấu hun (1 : 1 : 1); CT4: đất phù sa - cát mịn - trấu hun - phân vi sinh (1 : 1 : 1 : ¼).

Chỉ tiêu đánh giá: Tỷ lệ cây sống, số rễ/mẫu, chiều dài rễ/mẫu, số lá/mẫu, chiều dài lá/mẫu. Thời điểm đánh giá: sau 15, 30 ngày.

#### 2.2.6. Xử lý số liệu

Các số liệu được tính toán theo phương pháp phân tích thống kê toán học. Quá trình xử lý số liệu được thực hiện trên máy tính với ứng dụng Data Analysis của chương trình Excel 2007. Dùng hàm thống kê Anova để phân tích phương sai một nhân tố và hai nhân tố với ba lần lặp. Kiểm định  $LSD_{0,05}$  bằng phần mềm IRRISTAT 5.0.

### 2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện từ tháng 02/2017 đến tháng 10/2018 tại Bộ môn Kỹ thuật di truyền - Viện Di truyền Nông nghiệp và Trung tâm Công nghệ sinh học - Trường Đại học Hùng Vương.

### III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Tạo callus từ lát cắt chồi

Sử dụng môi trường MS có bổ sung 3% đường sucrose, 6 g/l Agar, 0,5 mg/l TDZ, thay đổi thành phần 2,4D để nghiên cứu môi trường tạo callus từ lát cắt chồi.

**Bảng 1.** Ảnh hưởng của tổ hợp TDZ và 2,4D đến khả năng tái sinh tạo callus của lát cắt chồi (sau 8 tuần nuôi cấy)

Công thức	Chất ĐHST (mg/l)		Tỉ lệ tạo callus (%)	Hình thái callus
	TDZ	2,4D		
ĐC	-	0	32,22	Bề mặt callus khô, chắc, màu trắng sáng
CT1	0,5	1,0	34,44	
CT2	0,5	2,0	44,44	
CT3	0,5	3,0	75,56	
CT4	0,5	4,0	54,44	
LSD <sub>0,05</sub>			5,05	
P-value			<0,001	

Kết quả nghiên cứu cho thấy, khi tăng nồng độ 2,4D từ 1,0 mg/l đến 3,0 mg/l và giữ nguyên nồng độ TDZ ở mức 0,5 mg/l, tỷ lệ callus được tạo ra tăng từ 34,44% lên 75,56%. Tuy nhiên, khi tăng nồng độ 2,4D lên 4,0 mg/l, tỷ lệ mẫu tạo callus giảm xuống còn 54,44%, nhiều mẫu không có khả năng tạo callus và bị hóa đen.

Như vậy, để tạo callus từ lát cắt chồi cây riêng bản địa Bắc Kạn có thể sử dụng phối hợp 0,5 mg/l TDZ và 3 mg/l 2,4D, tỉ lệ tạo callus đạt 75,56%, callus có bề mặt khô, chắc, màu trắng sáng. Kết quả nghiên cứu này phù hợp với công bố trước đó khi nghiên cứu nhân giống loài *Curcuma kwangsiensis* Lindl. và *Alpinia purpurata* thông qua con đường tạo callus (Zhang *et al.*, 2011; Kale and Namdeo, 2015). Các tác giả trên cũng đưa ra kết luận việc sử dụng 2,4D phối hợp với TDZ hoặc Ki có hiệu quả rõ rệt trong việc hình thành callus từ lát cắt chồi cây họ Gừng, và nồng độ 2,4D phù hợp thường dao động trong khoảng 2,0 - 3,0 mg/l. Callus được nhân sinh khối trên môi trường MS có bổ sung 3 mg/l 2,4D trước khi chuyển sang môi trường tái sinh chồi.

#### 3.2. Tái sinh chồi từ callus

Môi trường MS bổ sung 2,0 mg/l vitamin B1, hàm lượng BAP điều chỉnh tăng dần từ 1,0 mg/l đến 5,0 mg/l được sử dụng để đánh giá ảnh hưởng của nồng độ BAP đến khả năng cảm ứng tái sinh chồi.

**Bảng 2.** Ảnh hưởng của tổ hợp chất điều hòa sinh trưởng BAP và Vitamin B1 đến khả năng tái sinh chồi từ callus (sau 8 tuần nuôi cấy)

Công thức	VTM B1	BAP	Tỷ lệ tái sinh tạo chồi (%)	Số chồi/callus (chồi)
ĐC	2,0	0	15,56	4,85
CT1	2,0	1,0	41,11	5,92
CT2	2,0	2,0	55,56	7,40
CT3	2,0	3,0	78,89	9,71
CT4	2,0	4,0	61,11	7,09
CT5	2,0	5,0	32,22	5,66
LSD <sub>0,05</sub>			2,67	0,16
P-value			<0,001	<0,001

Ở công thức đối chứng không bổ sung BAP, tỉ lệ bật chồi chỉ đạt 15,56% và hệ số bật chồi thấp đạt 4,85 chồi/callus. Khi nồng độ BAP tăng từ 1,0 mg/l đến 3,0 mg/l, tỷ lệ bật chồi tăng từ 41,11% lên 78,89%, hệ số bật chồi tăng từ 5,92 đến 9,71 chồi/callus. Tuy nhiên, khi tăng hàm lượng BAP lên 4,0 mg/l và 5,0 mg/l, tỉ lệ bật chồi có xu hướng giảm. Kết quả trên cũng cho thấy hiệu quả việc tái sinh chồi từ callus cao hơn hẳn so với tái sinh chồi trực tiếp từ chồi đỉnh và mắt ngủ (Đặng Trọng Lương và *ctv.*, 2014). Như vậy, môi trường MS có bổ sung 2,0 mg/l Vitamin B1 và 3,0 mg/l BAP là phù hợp để tái sinh chồi từ callus, tỷ lệ bật chồi đạt 78,89%, hệ số tái sinh chồi đạt 9,71 chồi/callus.

#### 3.3. Nhân chồi *in vitro*

##### 3.3.1. Ảnh hưởng của BAP và Ki đến khả năng tái sinh và nhân nhanh chồi *in vitro*

Trong nghiên cứu này sử dụng phối hợp giữa BAP, Ki và  $\alpha$ -NAA để nghiên cứu môi trường nhân chồi, trong đó hàm lượng  $\alpha$ -NAA và Ki giữ nguyên ở các công thức (0,2 mg/l  $\alpha$ -NAA; 1,0 mg/l Ki), thay đổi nồng độ BAP từ 1,0 mg/l đến 3,0 mg/l.

Kết quả nghiên cứu cho thấy, môi trường MS có bổ sung 2,0 mg/l BAP; 1,0 mg/l Ki và 0,2 mg/l  $\alpha$ -NAA có hệ số nhân chồi cao nhất đạt 5,98 lần, chiều cao trung bình chồi đạt 6,07 cm sau 4 tuần nuôi cấy. Khi tiếp tục tăng hàm lượng BAP lên 2,5 mg/l và 3,0 mg/l thì hệ số nhân chồi có xu hướng giảm. Kết quả trên phù hợp với các nghiên cứu trước đó của Kochuthressia khi nghiên cứu nhân giống loài *Alpinia purpurata* (Kochuthressia *et al.*, 2010) và Das khi nghiên cứu trên các đối tượng *Zingiber moran* và *Z. zerumbet* (Das *et al.*, 2013).

**Bảng 3.** Ảnh hưởng của tổ hợp BAP và Kinetin đến khả năng nhân nhanh chồi riêng bản địa Bắc Kạn (sau 4 tuần nuôi cấy)

Công thức	Chất ĐTST (mg/l)		HSN (lần)	Chiều cao chồi (cm)	Số lá/chồi (lá)	Hình thái chồi
	BAP	Ki				
1	1,0	1,0	5,07	5,00	4,33	Chồi nhỏ, thân và lá xanh nhạt
2	1,5	1,0	5,60	5,37	4,67	Chồi nhỏ, thân và lá xanh đậm
3	2,0	1,0	5,98	6,07	4,67	Chồi mập, lá to, sinh trưởng phát triển tốt, thân lá xanh đậm
4	2,5	1,0	5,77	5,47	4,33	Chồi mập, thân lá xanh đậm, sinh trưởng phát triển tốt.
5	3,0	1,0	5,04	4,60	4,00	Chồi nhỏ, thân và lá xanh nhạt
<i>LSD</i> <sub>0,05</sub>			0,16	0,22	1,00	
<i>P-value</i>			<0,001	<0,001	0,5121	

Riêng chỉ tiêu số lá/chồi có sự khác biệt nhưng không có ý nghĩa thống kê giữa các công thức (mức độ tin cậy 95%). Tuy nhiên, hình thái chồi ở các công thức có sự khác biệt. Khi hàm lượng BAP ở mức dưới 1,5 mg/l hình thái chồi có kích thước nhỏ, thân và lá xanh nhạt. Khi hàm lượng BAP từ 2,0 mg/l trở lên hình thái chồi thu được mập, thân lá xanh đậm, sinh trưởng phát triển tốt. Khi hàm lượng BAP vượt mức 3,0 mg/l hình thái chồi có xu hướng nhỏ, thân và lá xanh nhạt.

**3.3.2. Ảnh hưởng của nước dừa đến khả năng tái sinh và nhân nhanh chồi in vitro**

Tác dụng tích cực của nước dừa trong nuôi cấy mô, tế bào thực vật đã được nhiều tác giả ghi nhận (Al-Khayri *et al.*, 1992; Boase *et al.*, 1993). Trong nghiên cứu này sử dụng môi trường MS có bổ sung 2,0 mg/l BAP, 1,0 mg/l Ki, 0,2 mg/l α-NAA và thay đổi hàm lượng nước dừa từ 10% đến 25%.

**Bảng 4.** Ảnh hưởng của hàm lượng nước dừa đến hiệu quả nhân chồi (sau 4 tuần nuôi cấy)

CT	Nước dừa (ml/l)	Hệ số nhân (lần)	Chiều cao chồi (cm)	Số lá/chồi (lá)	Hình thái chồi
1	0	5,91	5,87	4,67	Chồi mập, thân lá xanh đậm, sinh trưởng phát triển tốt.
2	100	6,32	5,90	5,00	Chồi mập, thân lá xanh đậm, sinh trưởng phát triển tốt.
3	150	5,69	5,77	4,33	Chồi mập, thân lá xanh đậm
4	200	4,71	5,27	3,67	Chồi trung bình, thân lá xanh nhạt
5	250	3,71	4,67	3,33	Chồi nhỏ, thân lá xanh nhạt, một số lá vàng.
<i>LSD</i> <sub>0,05</sub>		0,14	0,38	0,81	
<i>P-value</i>		<0,001	<0,001	0,0142	

Kết quả nghiên cứu cho thấy, hàm lượng nước dừa có ảnh hưởng đến hệ số nhân chồi riêng bản địa Bắc Kạn. Trong đó, hệ số nhân chồi đạt cao nhất 6,32 lần khi bổ sung 100 ml/l nước dừa. Cùng với nồng độ này chất lượng chồi thu được tốt, chồi mập, lá to, thân lá xanh đậm, sinh trưởng phát triển tốt. Khi tăng hàm lượng nước dừa từ 150 ml/l đến 250 ml/l cho thấy hệ số nhân chồi có xu hướng giảm, đặc biệt khi bổ sung 250 ml/l nước dừa vào

môi trường hệ số nhân chồi chỉ còn 3,71 lần, chồi thu được nhỏ, thân lá xanh nhạt, một số lá vàng. Đối với chỉ tiêu chiều cao trung bình chồi và số lá trung bình/chồi, khi thay đổi hàm lượng nước dừa từ 0 đến 150 ml/l thì không thấy có sự sai khác có ý nghĩa với mức tin cậy 95%. Tuy nhiên, khi tăng hàm lượng nước dừa lên 200 ml/l và 250 ml/l đã làm ảnh hưởng rõ rệt đến chiều cao chồi và chất lượng chồi.

**3.4. Kết quả tái sinh rễ tạo cây hoàn chỉnh *in vitro***

Sau 2 - 4 lần nhân, chồi đạt kích thước 4 - 4,5 cm, được chuyển sang môi trường tạo cây hoàn chỉnh. Cả hai loại môi trường gốc MS và ½ MS có bổ sung

chất điều hòa sinh trưởng α-NAA với hàm lượng từ 0,2 đến 1,0 mg/l được sử dụng để đánh giá khả năng tái sinh rễ và tạo cây hoàn chỉnh trên cây riêng bản địa Bắc Kạn.

**Bảng 5.** Ảnh hưởng của môi trường MS và α-NAA đến khả năng tái sinh rễ và tạo cây hoàn chỉnh (sau 6 tuần nuôi cấy)

Công thức	MT gốc	Chất ĐHST α-NAA (mg/l)	Tỉ lệ chồi ra rễ (%)	Chiều cao TB/cây (cm)	Số lá TB/cây (lá)	Số rễ TB (Rễ/chồi)	Chiều dài TB rễ (cm)
ĐC	½MS	0	90	6,70	2,67	2,48	2,30
CT1	½MS	0,2	100	7,47	3,33	2,90	3,10
CT2	½MS	0,4	100	8,47	3,67	3,69	3,37
CT3	½MS	0,6	100	9,27	4,00	4,49	3,63
CT4	½MS	0,8	100	9,27	4,33	4,93	4,17
CT5	½MS	1,0	100	8,70	3,67	4,13	4,03
CT6	MS	0,2	100	8,30	3,33	3,78	3,13
CT7	MS	0,4	100	8,87	4,67	4,53	3,67
CT8	MS	0,6	100	9,63	5,33	5,51	4,43
CT9	MS	0,8	100	8,63	4,67	4,94	4,23
CT10	MS	1,0	100	8,53	4,33	4,06	4,00
<i>LSD</i> <sub>0,05</sub>				0,27	0,92	0,18	0,24
<i>P-value</i>				<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

Kết quả nghiên cứu cho thấy môi trường MS có bổ sung 0,6 mg/l α-NAA có hiệu quả tái sinh rễ và tạo cây hoàn chỉnh tốt nhất với thời gian ra rễ từ 19 - 21 ngày, chiều cao TB/cây là 9,63 cm, số lá TB/cây là 5,33 lá, số rễ TB là 5,51 rễ/chồi và chiều dài TB rễ là 4,43 cm. Kết quả nghiên cứu này phù hợp với các công bố trước đó của Yesmin và Nguyễn Phương Quý khi nghiên cứu nhân giống loài *Zingiber officinale* (Yesmin *et al.*, 2016; Nguyễn Phương Quý và *ctv.*, 2017).

Khi so sánh các công thức sử dụng môi trường gốc là ½ MS và MS cho thấy: với cùng nồng độ α-NAA các chỉ tiêu hình thái chồi và rễ của cây trên môi trường MS tốt hơn so với trên môi trường ½ MS. Trên cả môi trường ½ MS và môi trường MS, khi tăng hàm lượng α-NAA từ 0,2 mg/l đến 0,6 mg/l các chỉ tiêu về hình thái chồi và rễ có xu hướng tăng về số lượng và chất lượng. Tuy nhiên, khi tăng hàm lượng α-NAA lên 0,8 mg/l và 1,0 mg/l thấy rằng các chỉ tiêu về hình thái chồi và rễ có xu hướng giảm cả về số lượng và chất lượng.



**Hình 1.** Hình thái cây hoàn chỉnh sau 6 tuần nuôi cấy

Ghi chú: A: Cây hoàn chỉnh trên môi trường ½MS; B: Cây hoàn chỉnh trên môi trường MS.

### 3.5. Giai đoạn ra ngôi

Kết quả thí nghiệm cho thấy các giá thể ra ngôi khác nhau có ảnh hưởng đến tỉ lệ sống cũng như khả

năng sinh trưởng và phát triển của cây giống nuôi cấy mô. Sau 30 ngày ra ngôi tại vườn ươm cây đủ tiêu chuẩn xuất vườn.

**Bảng 6.** Sinh trưởng và phát triển của cây con (sau 30 ngày ra ngôi) trên các công thức giá thể

Công thức	Giá thể	Tỷ lệ cây sống (%)	Chiều cao TB (cm)	Số lá TB (lá/cây)	Số rễ TB (rễ/cây)
1	100% Cát mịn	95,56	9,67	5,67	6,00
2	Đất phù sa - Cát mịn (1 : 1)	82,22	9,43	5,67	5,67
3	Đất phù sa - Cát mịn - Trấu hun (1:1:1)	73,33	9,40	5,33	5,33
4	Đất phù sa - Cát mịn - Trấu hun - Phân vi sinh (1:1:1:¼)	80,00	9,37	5,67	5,67
<i>LSD</i> <sub>0,05</sub>		6,18	0,15	1,15	1,10
<i>P-value</i>		<0,001	0,0234	0,8592	0,4871

Cả 4 loại giá thể đều cho tỉ lệ cây sống đạt trên 80% sau 15 ngày ra ngôi, trong đó tỉ lệ cao nhất đạt được ở công thức CT1 là 97,78% (100% cát mịn), các công thức CT2 [Đất phù sa - Cát mịn (1 : 1)], CT3 [Đất phù sa - Cát mịn - Trấu hun (1 : 1 : 1)], CT4 [Đất phù sa - Cát mịn - Trấu hun - Phân vi sinh (1 : 1 : 1 : ¼)] tỉ lệ cây sống lần lượt là 88,89%; 81,11%; 86,67%. Sau 30 ngày ra ngôi tỉ lệ cây sống duy trì ổn định và công thức CT1 vẫn cho tỉ lệ cao nhất đạt 95,56%, các công thức CT2, CT3, CT4 lần lượt đạt 82,22%; 73,33%; 80,00%.

Trên giá thể 100% cát mịn, chất lượng cây được cải thiện đáng kể. Chiều cao cây, số lá trung bình và số rễ trung bình/cây của cây sau 15 ngày đạt 9,43 cm; 5,33 lá/cây; 5,33 rễ/cây so với chiều cao cây, số lá trung bình và số rễ/cây lúc đầu là 9,2 cm; 5 lá/cây và 5 rễ/cây. Đến ngày thứ 30 chiều cao trung bình của cây đạt 9,67 cm, số lá trung bình là 5,67 lá/cây và số rễ trung bình trên cây đạt 6,00 rễ/cây (Hình 2).

\* Các bước thực hiện quy trình:

- Vật liệu sử dụng: Chồi mới tái sinh từ cây mẹ khỏe mạnh, sạch bệnh.

- Khử trùng mẫu: Dung dịch NaOCl 2,5% và 0,5ml Tween20 trong thời gian 20 phút.

- Môi trường tạo callus: MS có bổ sung 3% đường sucrose, 6 g/l Agar, 3 mg/l 2,4D và 0,5 mg/l TDZ. Trong một tuần đầu nuôi cấy trong điều kiện tối hoàn toàn, sau đó nuôi trong điều kiện chiếu sáng 16 giờ sáng/8 giờ tối. Callus được nhân sinh khối trên môi trường MS có bổ sung 3 mg/l 2,4D.

- Môi trường tái sinh chồi: MS + 3% đường sucrose + 6 g/l agar + 2 mg/l vitamin B1 và 3,0 mg/l BAP, pH = 5,8.

- Môi trường nhân chồi *in vitro*: MS + 3% đường sucrose + 6 g/l agar + 2 mg/l BAP + 1 mg/l Ki + 0,2 mg/l α-NAA + 100 ml/l nước dừa, pH = 5,8.

- Môi trường ra rễ *in vitro*: MS + 3% đường sucrose + 6 g/l agar + 0,4 mg/l α-NAA, pH = 5,8.

### IV. KẾT LUẬN

Lát cắt chồi cây riêng bản địa Bắc Kạn phát sinh callus tốt trên môi trường MS có bổ sung 0,5 mg/l TDZ và 3,0 mg/l 2,4D, tỉ lệ tạo callus đạt 75,56%, callus có bề mặt khô, chắc, màu trắng sáng.

Môi trường MS có bổ sung 2,0 mg/l Vitamin B1 và 3,0 mg/l BAP phù hợp để tái sinh chồi từ callus, tỷ lệ bật chồi đạt cao nhất là 78,89%, hệ số tái sinh chồi đạt 9,71 chồi/callus. Môi trường bổ sung 2,0 mg/l BAP, 1,0mg/l Ki, 0,2 mg/l α-NAA và 100 ml/l nước dừa phù hợp để nhân chồi *in vitro*, hệ số nhân chồi sau 4 tuần đạt 6,32 lần, chồi mập, thân lá xanh đậm, sinh trưởng phát triển tốt.

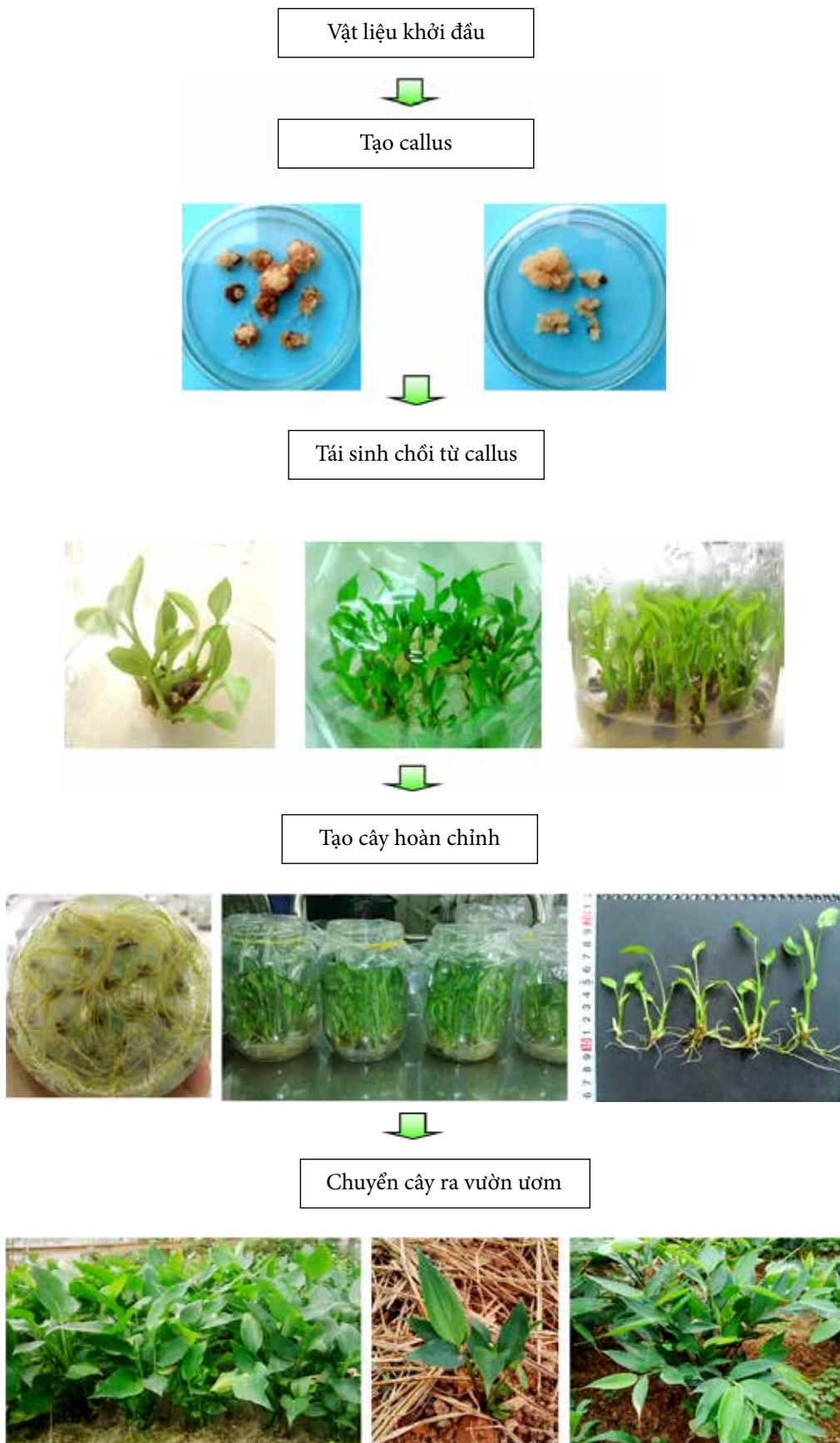
Môi trường MS có bổ sung 0,6 mg/l α-NAA có hiệu quả tái sinh rễ và tạo cây hoàn chỉnh tốt nhất với thời gian ra rễ từ 19 - 21 ngày, chiều cao cây đạt 9,63 cm, số lá trung bình/cây đạt 5,33 lá, số rễ trung bình là 5,51 rễ/chồi và chiều dài trung bình rễ là 4,43 cm.

Trên giá thể 100% cát mịn, sau 30 ngày ra ngôi tỉ lệ cây sống cao nhất đạt 95,56%, chiều cao cây đạt 9,67 cm, số lá trung bình 5,67 lá/cây, số rễ trung bình 6,00 rễ/cây, cây sinh trưởng phát triển tốt.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

Trịnh Thị Thanh Hương, Nguyễn Thị Liễu, Trần Thị Thúy, Đặng Trọng Lương và Đỗ Tuấn Khiêm, 2014. Nghiên cứu nhân nhanh cây gừng đá quý hiếm Bắc Kạn bằng kỹ thuật nuôi cấy *in vitro*. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*, số 22 (Kỳ 2): 33-40.

Quy trình nhân giống loài *A. coriandriodora* D. Fang bằng kỹ thuật nuôi cấy lớp mỏng



Hình 2. Quy trình nhân giống loài *Alpinia coriandriodora* bằng kỹ thuật nuôi cấy lớp mỏng

- Nguyễn Phương Quý, Phạm Thị Kim Hạnh, Lê Quỳnh Mai và Lê Khả Tường, 2017. Nhân giống vô tính giống gừng trâu [*Zingiber officinale* (Willd.) Roscoe] 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.
- Al-Khayri, J. M., Huang, F. H., Morelock, T. E., & Busharar, T. A., 1992. Spinach tissue culture improved with coconut water. *HortScience*, 27 (4): 357-358.
- Boase, M. R., Wright, S., & McLeay, P. L., 1993. Coconut milk enhancement of axillary shoot growth *in vitro* of kiwifruit. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural science*, 21 (2): 171-176.
- Das, A., Kesari, V., & Rangan, L., 2013. Micropropagation and cytogenetic assessment of *Zingiber* species of Northeast India. *3 Biotech*, 3 (6): 471-479.
- Duong, V. X., Binh, N. Q., Luong, D. T., Trong, N. D., Bang, C. P., Chinh, V. T., Xing-er, Y., Nian-he, X., 2019. *Alpinia coriandriodora* D. Fang, A New Record for Flora of Vietnam. *Journal of Tropical and Subtropical Botany*, 27 (1): 99-101.
- Hossain, A., Hassan, L., Patwary, A. K., Mia, M. S., Shah, A. H., & Batool, F., 2010. Establishment of a suitable and reproducible protocol for *in vitro* regeneration of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). *Pak. J. Bot*, 42 (2): 1065-1074.
- Kale, V. M., & Namdeo, A. G., 2015. Micropropagation of *Alpinia purpurata* using low cost media for quantification of rutin. *Der Pharmacia Lettre*, 7 (5): 50-57.
- Kochuthressia, K. P., Britto, S. J., Raj, L. J. M., Jaseentha, M. O., & Senthilkumar, S. R., 2010. Efficient regeneration of *Alpinia purpurata* (Vieill.) K. Schum. plantlets from rhizome bud explants. *Int Res J Plant Sci*, 1 (2): 43-47.
- Lincy, A. K., Remashree, A. B., & Sasikumar, B., 2009. Indirect and direct somatic embryogenesis from aerial stem explants of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.). *Acta Botanica Croatica*, 68 (1): 93-103.
- Rakkimuthu, R., Jacob, J., & Aravinthan, K. M., 2011. *In vitro* micropropagation of *Alpinia zerumbet* Variegata, an important medicinal plant, through rhizome bud explants. *Research in Biotechnology*, 2 (1).
- Yesmin, S., Hashem, A., Khatun, M. M., Nasrin, S., Tanny, T., & Islam, M. S., 2016. *In vitro* clonal propagation of BARI Ada-1 (*Zingiber officinale* Rosc.). *Jahangirnagar University Journal of Biological Sciences*, 4 (2): 53-57.
- Zhang, S., Liu, N., Sheng, A., Ma, G., & Wu, G., 2011. *In vitro* plant regeneration from organogenic callus of *Curcuma kwangsiensis* Lindl. (Zingiberaceae). *Plant Growth Regulation*, 64 (2): 141-145.

## Application of thin cell layer culture technique for *in vitro* propagation of Bac Kan local alpinia

Vu Xuan Duong, Dang Trong Luong, Do Tuan Khiem, Pham Thanh Loan, Trinh Thi Thanh Huong

### Abstract

Bac Kan local alpinia (*Alpinia coriandriodora*, D. Fang) is a rare and highly economic species which is used for spices and medicinal purposes. This study established the protocol for *in vitro* propagation of *A. coriandriodora* by creating callus from cutting buds to develop multiple shoots. The Murashige and Skoog medium (MS) supplemented with 0.5 mg l<sup>-1</sup> TDZ and 3mg l<sup>-1</sup> 2,4D was suitable for creating callus from cutting buds in which the callus production rate reached 75.56% and the calluses had dry, firm and bright-white color surfaces. The highest rate of shoots regeneration was induced on the MS medium supplemented with 2.0 mg/l Vitamin B1 and 3.0 mg/l BAP, reaching 78.89% and 9.71 shoots/callus. The MS medium supplemented with 2.0 mg/l BAP, 1.0 mg/l Ki, 0.2 mg/l α-NAA and 100 ml/l coconut water was suitable to multiply *in vitro* shoots with a shoot multiplication rate of 6.32 folds after 4 weeks of culture, fat shoots, dark green leaf stalks and good growth. The MS medium supplemented with 0.6 mg/l α-NAA was effective in regenerating roots and creating complete plants with rooting time ranging from 19 to 21 days; the average height of plants was 9.63 cm, the average number of leaves was 5.33, the average number of roots was 5.51 roots/shoot and the root length was 4.43 cm. On the substrate of 100% fine sand, the highest rate of survival plantlet reached 95.56% after 30 days transferred to soil, and the plants grew well.

**Keywords:** Propagation, callus, Bac Kan local alpinia (*Alpinia coriandriodora*), stone ginger

Ngày nhận bài: 19/2/2019  
Ngày phản biện: 25/2/2019

Người phản biện: TS. Đinh Trường Sơn  
Ngày duyệt đăng: 11/3/2019