

NGHIÊN CỨU NHÂN GIỐNG IN VITRO CÂY GỪNG ĐEN (*DISTICHOCHLAMYS ORLOWII* K.LARSEN & M.F.NEWMAN)

Nguyễn Văn Tịnh¹, Nguyễn Thị Luyên¹, Cù Thị Ly Na², Lê Thương²

Ngày nhận bài: 13/10/2023; Ngày phản biện thông qua: 26/12/2023; Ngày duyệt đăng: 27/12/2023

TÓM TẮT

Loài Gừng đen *Distichochlamys orlowii* K.Larsen & M.F.Newman, một trong bốn loại gừng đen đặc hữu của Việt Nam, là loài cây thuốc quý cho sức khỏe con người. Trong tự nhiên, loài này có hệ số nhân thấp, tuy nhiên hiện chưa có bất cứ công bố nào về quy trình nhân giống và đặc biệt là nhân *in vitro* trên đối tượng này. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã xây dựng được quy trình nhân giống *in vitro* bằng công nghệ cấy mô tế bào thực vật để nhân giống loài cây này. Kết quả nghiên cứu cho thấy mẫu Gừng đen được khử trùng bằng Natri dichloroisocyanurate (NADCC) nồng độ 1%, trong 10 phút mang lại hiệu quả tối ưu với tỷ lệ mẫu sạch >85%, mẫu tái sinh đạt >80%. Môi trường MS, có bổ sung 1,5 mg/l BA (Benzyl Adenine) và 0,5 mg/l Kn (Kinetin) là môi trường thích hợp nhất để tái sinh chồi, với chiều cao chồi trung bình đạt 41,07 mm. Trong khi đó, môi trường MS có bổ sung 1,5 mg/l BA, 0,5 mg/l Kn, và 0,5 mg/l NAA (Naphthaleneacetate) là tối ưu nhất cho khả năng tăng sinh cụm chồi, đạt 2,87 chồi/mẫu và chiều cao trung bình chồi đạt 36,47 mm. Hơn thế nữa, môi trường MS, có bổ sung 1 mg/l NAA cho thấy khả năng phát sinh rễ sớm (11 ngày sau nuôi cấy) và số rễ cao nhất (8,40 rễ/mẫu). Các cây con Gừng đen hoàn chỉnh được huấn luyện trong giá thể Đất + Tro trấu + Mùn cưa (theo tỷ lệ 1:1:1) đạt tỷ lệ sống sót cao (98,33%) và đạt chiều cao trung bình 81,68 mm. Đây là nghiên cứu đầu tiên về nhân giống Gừng đen (*Distichochlamys orlowii* K.Larsen & M.F.Newman) bằng phương pháp *in vitro* ở Việt Nam, góp phần bảo tồn và phát triển loại cây dược liệu quý hiếm này.

Từ khóa: Cây dược liệu, Gừng đen Orlowi, Nhân giống *in vitro*, Tây Nguyên.

1. MỞ ĐẦU

Gừng đen (*Distichochlamys orlowii* K.Larsen & M.F.Newman) hay còn được gọi là gừng đen Orlow hoặc gừng đen lá tím, thuộc họ gừng (Zingiberaceae), được phát hiện lần đầu tiên vào năm 1995. Loài này phân bố trong một khu vực hẹp tại làng Burnley thuộc thị xã An Khê, tỉnh Gia Lai. Cây thân thảo lâu năm, thân rễ mang lá có bẹ nhỏ. Bẹ lá ôm thân ở gốc, bẹ và mặt dưới lá màu tím than, mặt trên lá xanh, gân nổi rõ. Cuống lá dài khoảng 10 – 14 cm, phiến hình trứng, kích thước 8 – 12 cm x 10 – 18 cm, mép nguyên, mặt trên có lông nhung mịn. Cụm hoa ở nách lá, 8 – 10 hoa, cao khoảng 5 cm (Larsen & Newman, 2001).

Đây là một trong những loài cây thuốc quý, một trong bốn loại gừng đen đặc hữu của Việt Nam (Newman, 1995). Gừng đen được coi là một vị thuốc có tác dụng đặc biệt như kích thích tiêu hóa, cải thiện chứng máu đông, tiêu mù, trị thương và tăng cường sức khỏe (Ty et al., 2015). Trong *D. orlowii* có chứa lượng đáng kể các hợp chất dễ bay hơi quý, như geranyl acetate (16.5%), β -elemene (9.2%), β -pinene (9.0%) and β -caryophyllene (7.9%) (Chau et al., 2017). Bên cạnh các hoạt chất tiềm năng đã nêu, trong cây gừng đen *D. orlowii* còn chứa rất nhiều các hoạt

chất đặc trưng khác của cây họ gừng (Chau et al., 2017), đây là những hợp chất có hoạt tính dược liệu cao đối với con người trong việc phòng và điều trị một số loại bệnh, như 1,8-cineole có tác dụng chống viêm (Juergens, 2014) và chống dị ứng (Nishida et al., 2005), β -elemene (Zhan et al., 2012), β -caryophyllene (Legault & Pichette, 2007) và 1,8-cineole (Juergens et al., 2004) có hoạt tính chống lại các dòng ung thư tế bào ở người. Ngoài ra geranyl acetate có tác dụng chống nhiễm trùng (Quintans-Júnior et al., 2013), kháng nấm và chống viêm (Gonçalves et al., 2012).

Với những giá trị dược liệu quan trọng, Gừng đen đang bị khai thác tràn lan và có nguy cơ tuyệt chủng. Nhu cầu sử dụng ngày càng rộng rãi dẫn đến việc di thực, nhân giống để bảo tồn và khai thác loài này là thực sự cần thiết. Tuy nhiên, ở Việt Nam và cả thế giới, chưa có công trình nghiên cứu nào công bố về việc nhân giống loài cây này. Theo phương pháp nhân giống truyền thống bằng củ có những hạn chế như dễ thoái hóa giống, hệ số nhân thấp, không đồng đều về chất lượng. Nhân giống bằng kỹ thuật nuôi cấy mô tế bào thực vật là phương pháp hiện đại và đảm bảo tối ưu về di truyền cũng như số lượng và sự đồng đều. Gần đây, một số công trình nghiên cứu đã thành công trong

¹Viện nghiên cứu Y sinh ứng dụng, trường Đại học Y dược Buôn Ma Thuột;

²Bộ môn Khoa học cơ bản, trường Đại học Y dược Buôn Ma Thuột;

Tác giả liên hệ: Nguyễn Văn Tịnh; ĐT: 0869340391; Email: nvtinh@bmtvietnam.com.

việc nhân giống cây họ gừng (Zingiberaceae) bằng công nghệ in vitro ở Việt Nam (Trần Việt Hà và cs, 2018; Trương Thị Bích Phượng và cs, 2018; Trương Thị Phương Lan và cs, 2017; Bùi Thị Thu Hương và cs, 2020; Nguyễn Thị Thúy Diễm, 2017; Phạm Thị Kim Hạnh và cs, 2020; Hồ Anh Chi và cs, 2023). Tuy nhiên, đối với mỗi loài cây khác nhau, điều kiện khử trùng cũng như điều kiện nuôi cấy và nuôi trồng sẽ khác nhau.

Như vậy, nhiều nghiên cứu khoa học đã chỉ ra các tính chất dược lý vượt trội của một số hợp chất tồn tại trong các cây họ Gừng. Tuy nhiên, hiện nay có rất ít các nghiên cứu trong nước cũng như trên thế giới về đặc điểm thực vật, thành phần hóa học và các tác dụng sinh học cũng như quy trình nhân giống của loài *D. orlowii*. Do đó, việc tiến hành nghiên cứu quy trình nhân giống của loài *D. orlowii* là rất cần thiết.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành áp dụng công nghệ nuôi cấy mô tế bào thực vật để bước đầu nhân giống loài cây Gừng đen (*Distichochlamys orlowii* K.Larsen & M.F.Newman) đặc hữu của khu vực Tây Nguyên. Nghiên cứu đã xây dựng thành công quy trình nhân giống *in vitro* cây Gừng và góp phần vào nhiệm vụ bảo tồn các loài cây dược liệu quý của khu vực Tây Nguyên nói riêng và Việt Nam nói chung.

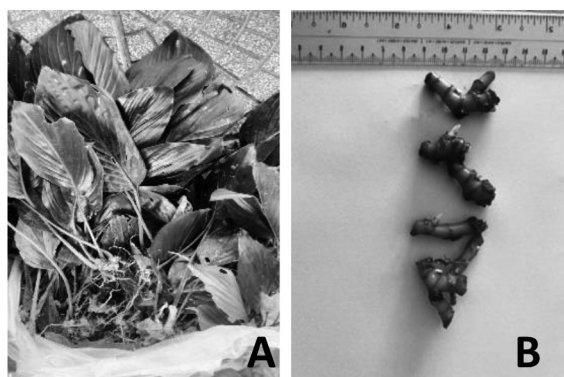
2. NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Cây Gừng đen (*Distichochlamys orlowii* K.Larsen & M.F.Newman) được thu thập tại Rừng quốc gia Konkakinh, huyện K'pang, tỉnh Gia Lai (tọa độ từ 14°09' đến 14°30' vĩ bắc và từ 108°16' đến 108°28' kinh đông).

Đặc điểm hình thái: Cây thân thảo lâu năm, thân rễ mang lá có bẹ nhỏ. Bẹ lá ôm thân ở gốc, bẹ và mặt dưới lá màu tím than, mặt trên lá xanh, gân nổi rõ. Cuống lá dài khoảng 10 – 14 cm, phiến hình trứng, kích thước 8 – 12 cm x 10 – 18 cm, mép nguyên, mặt trên có lông nhung mịn. Củ được xử lý bảo quản ngay sau khi thu thập.

Chuẩn bị vật liệu nghiên cứu: Chọn củ Gừng đen đã già, không bị sâu bệnh. Xử lý củ với thuốc trừ bệnh Ridomil Gold 68WG trong 60 phút (10g Ridomil/2 lít nước). Sau đó ủ củ trong cát ẩm đã được xử lý bệnh, thời gian ủ khoảng 20 ngày, cho đến khi củ nảy chồi mầm đạt yêu cầu để lấy mẫu (Kích thước chồi từ 0,5 - 1 cm).



Hình 1. Mẫu Gừng đen thu hái về (A) và củ Gừng đen sau khi xử lý nảy mầm (B)

2.2. Môi trường và điều kiện nuôi cấy

Môi trường nền MS (Murashige & Skoog, 1962) bổ sung agar (8 g/L), đường sucrose (30 g/L), than hoạt tính (0,5 g/l), chất điều hòa sinh trưởng (CĐHST) như BA (loại chứa 99% hoạt chất của Merck), Kinetin (loại chứa 99% hoạt chất của Merck), NAA (loại chứa 99% hoạt chất của Merck). Tùy thuộc vào các thí nghiệm mà có hoặc không có bổ sung các CĐHST ở các nồng độ khác nhau.

Môi trường nuôi cấy được điều chỉnh pH=5,8 trước khi hấp khử trùng ở điều kiện 1,2 atm, 121 °C trong 20 phút.

Điều kiện nuôi cấy trong phòng thí nghiệm được đảm bảo ở nhiệt độ 25 ± 2 °C, cường độ ánh sáng 2.000 - 3.000 lux, thời gian chiếu sáng 10 - 12h và chu kỳ cây chuyên 20 ngày.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Xác định thời gian xử lý và nồng độ chất khử trùng thích hợp

Các chồi mầm gừng đen được rửa sạch bề mặt dưới vòi nước chảy, sau đó được ngâm trong nước xà phòng loãng 15 phút và tiếp tục được rửa sạch dưới vòi nước chảy trong 15 phút. Các chồi này được ngâm trong dung dịch khử trùng, tráng qua nước cất vô trùng và cồn 70° trong 30 giây.

Dung dịch khử trùng được sử dụng trong nghiên cứu này bao gồm Javel (NaOCl) (nồng độ 20%, 30%) và/hoặc Natri dichloroisocyanurate (NADCC) (nồng độ 0,5%, 1%, 1,5%) với thời gian xử lý trong 10 và 20 phút.

Khảo sát 15 mẫu/nghiệm thức, mỗi nghiệm thức lặp lại 3 lần. Ghi nhận phần trăm mẫu sạch, sống sau 2 tuần khử trùng và nuôi cấy.

2.3.2. Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng lên khả năng bật chồi của Gừng đen

Mẫu sau xử lý, được nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung sucrose 30 g/L, vitamin MS và agar 8 g/L. Các chồi hữu hiệu sau đó được nuôi cấy

trong các môi trường khác nhau để đánh giá khả năng tái sinh.

Thí nghiệm tái sinh chồi được thực hiện trong môi trường MS bổ sung BA (0; 0,5; 1,0; 1,5 và 2,0 mg/L), Kn (0,5; 1 mg/l) để tìm ra môi trường thích hợp nhất.

Thí nghiệm về khả năng tạo cụm chồi được thực hiện trong môi trường MS bổ sung BA và Kn với nồng độ tối ưu ghi nhận ở thí nghiệm tạo chồi, bổ sung thêm NAA ở các nồng độ khác nhau (0; 0,1; 0,2; 0,5; 1; 1,5; 2 mg/L) để tìm ra môi trường thích hợp nhất để tạo cụm chồi.

Khảo sát 10 mẫu/nghiệm thức, mỗi nghiệm thức lặp lại 3 lần. Chỉ tiêu theo dõi: số chồi/mẫu, chiều cao chồi (cm) và đặc điểm chồi được ghi nhận sau 4 tuần nuôi cấy.

2.3.3. Ảnh hưởng của NAA đến sự hình thành rễ của cây Gừng đen

Các cụm chồi Gừng đen hình thành trên môi trường thích hợp được tách ra thành các chồi và cấy trên các môi trường khác nhau. Thí nghiệm ra rễ được thực hiện trong môi trường MS, có bổ sung than hoạt tính 0,5 g/l và NAA (0; 0,5; 1; 1,5; 2 mg/l).

Khảo sát 10 mẫu/nghiệm thức, mỗi nghiệm thức lặp lại 3 lần. Chỉ tiêu theo dõi: Thời gian xuất hiện rễ (ngày), số rễ/mẫu, chiều dài rễ, các chỉ tiêu được ghi nhận sau 8 tuần nuôi cấy.

2.3.4. Ảnh hưởng của các loại giá thể lên sự sinh trưởng của cây gừng đen in vitro ở giai đoạn vườn ươm

Cây con được huấn luyện trong điều kiện nhà lưới. Các cây con in vitro tái sinh hoàn chỉnh (đạt

chiều cao trung bình từ 45 - 60 mm, có từ 2 - 3 lá) được tập nắng bằng cách chuyển bình nuôi ra vườn ươm có che nắng 50% trong khoảng 7 ngày. Sau đó, lấy cây ra khỏi môi trường, rửa sạch agar và trồng trực tiếp trên giá thể. Giá thể bao gồm đất thịt pha cát, tro trấu và mụn dừa, được xử lý với thuốc trừ nấm Ridomil Gold 68WG. Thí nghiệm được thực hiện trên các giá thể: Đất + tro trấu (tỉ lệ 1:1), đất + tro trấu + mụn dừa (1:1:1), mụn dừa + đất (1:1), mụn dừa + tro trấu (1:1).

Khảo sát 15 mẫu/nghiệm thức, mỗi nghiệm thức lặp lại 3 lần. Theo dõi tỉ lệ phần trăm cây sống sót (%) và chiều cao của cây ngoài vườn ươm sau 8 tuần trồng trong điều kiện ex vitro.

2.3.5. Phương pháp xử lý số liệu

Tất cả các số liệu được thu thập và xử lý bằng phần mềm Excel và SPSS 26.0.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của nồng độ hóa chất và thời gian đến kết quả khử trùng

Kết quả xử lý thống kê ở Bảng 1 cho thấy, việc sử dụng Javel và NADCC ở các nồng độ khác nhau, thời gian xử lý khác nhau sẽ ảnh hưởng đến tỷ lệ mẫu sạch và tỷ lệ tái sinh chồi khác nhau. Sử dụng chất khử trùng NADCC 1%, trong 10 phút mang lại hiệu quả khử trùng tốt nhất đối với mẫu chồi Gừng đen. Theo đó, tỷ lệ mẫu sạch đạt 82,22% và tỷ lệ tái sinh chồi hữu hiệu đạt tới 80,98%. Mặc dù, khi tăng nồng độ NADCC lên 1,5% hoặc tăng thời gian khử trùng lên 20 phút, tỷ lệ mẫu sạch tăng lên đến 88 - 90% nhưng tỷ lệ mẫu sạch hữu hiệu cho tái sinh chồi lại giảm xuống. Nguyên nhân có thể là do các hóa chất nồng độ cao đã làm tổn thương lớp biểu mô của mẫu.

Bảng 1. Kết quả khử trùng mẫu Gừng đen

Chất khử trùng	Thời gian khử trùng (phút)	Mẫu không nhiễm (%)	Mẫu tái sinh (%)
Javel (20%)	10	28,89 ± 3,84 ^d	76,67 ± 2,88 ^{ab}
	20	60,00 ± 6,66 ^{bc}	51,85 ± 3,20 ^c
Javel (30%)	10	64,44 ± 3,84 ^{bc}	34,44 ± 5,09 ^d
	20	88,89 ± 3,84 ^{ab}	27,47 ± 3,96 ^d
NADCC (0,5%)	10	48,89 ± 3,84 ^c	82,14 ± 6,18 ^{ab}
	20	73,33 ± 6,66 ^b	72,58 ± 2,50 ^{ab}
NADCC (1%)	10	82,22 ± 3,84 ^{ab}	80,98 ± 5,22 ^a
	20	84,44 ± 3,84 ^{ab}	63,25 ± 2,69 ^{bc}
NADCC (1,5%)	10	86,67 ± 6,66 ^{ab}	51,50 ± 6,22 ^c
	20	91,11 ± 3,84 ^a	39,01 ± 3,60 ^{cd}
P-value		<0,01	<0,01

Ghi chú: Giá trị trung bình ± SD; Các chữ cái khác nhau trên cùng một cột chỉ ra sự sai khác có ý nghĩa thống kê của các trung bình mẫu với p-value < 0,01 (Tukey's HSD test).

Cho đến nay, NADCC được coi như là một trong những chất khử trùng hữu hiệu và được sử dụng rộng rãi trong công nghệ nuôi cấy mô tế bào thực vật. Tuy nhiên, tùy thuộc vào đặc điểm của từng loại mẫu cấy, ở các loại thực vật khác nhau, từng độ tuổi cây lấy mẫu khác nhau, vị trí lấy mẫu trên thân mẹ khác nhau thì nồng độ và thời gian khử trùng khác nhau cũng sẽ cho ra các kết quả khử trùng khác nhau. Do đó, việc lựa chọn nồng độ và thời gian khử trùng thích hợp sẽ vừa đảm bảo được tỷ lệ mẫu sạch cao mà khả năng chồi nảy mầm, tái sinh cũng hiệu quả hơn. Hồ Anh Chi và cs, 2023 đã khử trùng mẫu gừng đen D. Citrea bằng 3% H₂O₂ trong 180 phút kết hợp 0,1% HgCl₂ trong 7 phút cho tỷ lệ mẫu sạch đạt 70% sau 4 tuần nuôi cấy. Tuy nhiên HgCl₂ là một chất gây độc, có thể có hại cho sức khỏe nên hiện nay nhiều nhà khoa học hạn chế sử dụng chất này. Thay vào đó, nghiên cứu của Nguyễn Thị Hồng Nhung và cs (2017) cho thấy NADCC đã được chứng minh là mang lại hiệu quả khử trùng cao đối với mẫu của các cây thân củ. Theo đó, NADCC (1%) được sử dụng để ngâm củ hoa Lay on trong 15 phút

mang lại hiệu quả khử trùng cao nhất. Kết quả của nghiên cứu này hoàn toàn trùng khớp với ghi nhận của chúng tôi trên đối tượng Gừng đen.



Hình 2. Mẫu chồi Gừng đen 2 tuần tuổi nuôi cấy trong môi trường MS

3.2. Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến khả năng tái sinh chồi

3.2.1. Ảnh hưởng của Cytokinin (BA và Kn) đến khả năng tái sinh chồi gừng đen

Các mẫu chồi sạch ở thí nghiệm trên được đưa vào môi trường MS bổ sung BA và Kn để đánh giá khả năng tái sinh chồi.

Bảng 2. Ảnh hưởng của Cytokinin (BA và Kn) đến khả năng tái sinh chồi Gừng đen

Thí nghiệm	Chất ĐHST (mg/l)		Chiều cao trung bình chồi (mm)	Đặc điểm chồi
	BA	Kn		
Đ/C	0	0	13,26±0,32 ^c	Chồi nhỏ, yếu, lá màu trắng xanh
S1	0,5	0	24,70±0,55 ^d	Chồi nhỏ, yếu, lá xanh nhạt
S2	1,0	0	28,03± 0,30 ^{cd}	Chồi trung bình, lá xanh nhạt, lá yếu
S3	1,5	0	36,47±0,55 ^b	Chồi trung bình, lá nhạt, mỏng
S4	2,0	0	30,87±0,64 ^c	Chồi nhỏ, lá xanh đậm
S5	0,5	0,5	29,57±0,47 ^c	Chồi nhỏ, lá xanh đậm
S6	1,0	0,5	28,37±0,32 ^c	Chồi trung bình, lá xanh nhạt
S7	1,5	0,5	41,07±0,73 ^a	Chồi mập, lá xanh đậm, to khỏe
S8	2,0	0,5	30,53±0,92 ^c	Chồi mập, lá xanh nhạt, yếu,
S9	0,5	1,0	27,83±2,20 ^{cd}	Chồi nhỏ, lá xanh đậm
S10	1,0	1,0	25,33± 0,35 ^d	Chồi nhỏ, lá xanh đậm
S11	1,5	1,0	28,07±1,04 ^{cd}	Chồi trung bình, xanh nhạt
S12	2,0	1,0	23,80±1,35 ^d	Chồi trung bình, lá mỏng, dị dạng
<i>P-value</i>			<0,01	

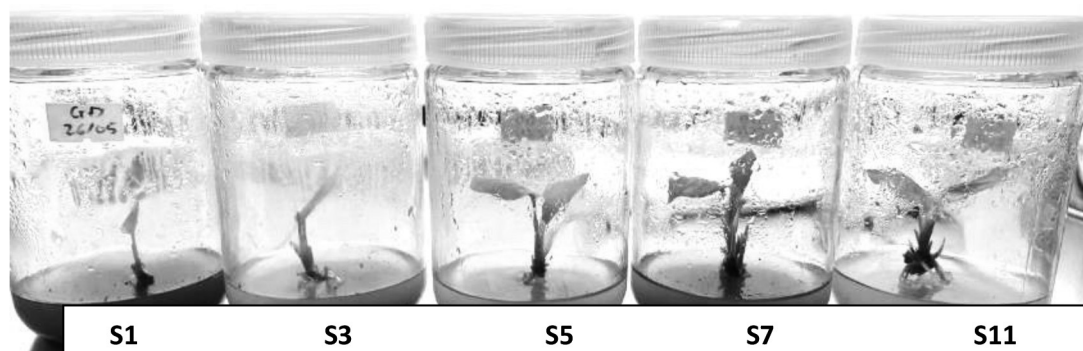
Ghi chú: Giá trị trung bình ± SD; Các chữ cái khác nhau trên cùng một cột chỉ ra sự sai khác có ý nghĩa thống kê của các trung bình mẫu với p-value < 0,01 (Tukey's HSD test).

Kết quả xử lý thống kê ở bảng 2 cho thấy, khi môi trường MS không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng, chồi vẫn phát sinh, nhưng chiều cao chồi thấp (13,26 mm) và chồi nhỏ, yếu, lá xanh nhạt. Khi môi trường chỉ bổ sung BA nồng độ từ 0,5 - 2,0 mg/l chồi bắt đầu có sự phát triển đáng kể, tuy nhiên khi bổ sung thêm Kn vào môi trường,

chồi phát triển tốt hơn. Môi trường MS bổ sung BA 1,5 mg/l và Kn 0,5 mg/l giúp chồi có sự tái sinh tốt nhất (chiều cao trung bình 41,07 mm, hình thái chồi mập, lá xanh đậm). Tuy nhiên, khi tăng nồng độ BA lên hơn 1,5 mg/l và Kn hơn 0,5 mg/l, nhận thấy chồi bắt đầu yếu, lá mỏng và có hiện tượng biến dạng. Kết quả này có thể do hàm lượng

Cytokinin trong môi trường quá cao gây sự kìm hãm khả năng tái sinh và phát triển của chồi. Điều này tương đồng với các nghiên cứu trước đó về quy trình nhân giống in vitro cây họ gừng. Theo Hồ Anh Chi và cs., 2023, môi trường cơ bản MS bổ sung 2,0 mg/L BAP + 0,2 mg/L NAA thích hợp để tái sinh chồi gừng đen D. Citrea. Tuy nhiên, trong nghiên cứu của chúng tôi BA độc lập lại cho kết quả tái sinh chồi thấp. Ở một nghiên cứu khác, lát cắt ngang thân củ cây gừng (*Zingiber officinale* Rosc.) tái sinh chồi tốt ở môi trường MS có bổ

sung 1,0 mg/l Kinetin, và chồi nhân nhanh ở môi trường MS + 0,9 mg/l Kinetin (Trương Thị Bích Phượng và cs, 2018). Mặt khác, loài gừng đen (*Distichochlamys citrea*) cũng đã được nhóm tác giả Phạm Thị Kim Hạnh và cs (2020) nhân giống thành công bằng công nghệ in vitro. Theo đó, tỷ lệ chồi tái sinh cao trên môi trường MS có bổ sung 100 ml/l nước dừa + 1 mg/l PVP + 2 mg/l BAP + 0,2 mg/l Kinetin. Các kết quả trên chỉ ra rằng, sự khác biệt về sinh thái, sinh lý giữa các loài đều ảnh hưởng đến quá trình phát sinh hình thái của chúng.



Hình 3. Mẫu chồi gừng đen ở các môi trường MS bổ sung các nồng độ Cytokinin khác nhau (Chồi gừng đen sau 8 tuần nuôi cấy ở các nghiệm thức khác nhau)

Môi trường S1: Chồi nhỏ, yếu, lá xanh nhạt; Môi trường S3: Chồi trung bình, lá nhạt, mỏng; Môi trường S5: Chồi nhỏ, lá xanh đậm; môi trường S7: Chồi mập, lá xanh đậm, to khỏe; Môi trường S11: Chồi trung bình, xanh nhạt.

3.2.2. Ảnh hưởng của sự kết hợp Cytokinin và Auxin đến khả năng tạo cụm chồi gừng đen

Trong nghiên cứu này, sau khi thu được các chồi tái sinh từ mẫu củ, các chồi này sẽ được nghiên cứu nhân nhanh (nhân chồi thành các cụm chồi). Môi trường MS có bổ sung BA 1,5 mg/L và Kn

0,5/L là thích hợp để tái sinh chồi gừng đen. Công thức môi trường này tiếp tục sử dụng để kết hợp cùng NAA nhằm tăng hiệu quả nhân nhanh chồi. Trong thí nghiệm này, rễ cũng được hình thành ở các cụm chồi, tuy nhiên rễ còn ngắn và yếu.

Bảng 3. Ảnh hưởng của sự kết hợp Cytokinin và Auxin đến khả năng tạo cụm chồi gừng đen

Nghiệm thức	NAA (mg/l)	Số chồi/mẫu	Chiều cao trung bình chồi (mm)	Đặc điểm cụm chồi
Đ/C	0	1,17±0,05 ^c	13,53±0,23 ^c	Cụm chồi nhỏ, ít chồi, ngắn
C1	0,1	1,43±0,05 ^d	23,57±0,32 ^{dc}	Cụm chồi nhỏ, ít chồi
C2	0,2	1,73±0,05 ^c	28,53±0,41 ^c	Cụm chồi trung bình, chồi không đồng đều
C3	0,5	2,87±0,11 ^a	36,47±0,83 ^a	Cụm chồi to khỏe, đồng đều
C4	1,0	2,80±0,10 ^a	28,30±0,20 ^{cd}	Cụm chồi to, không đồng đều
C5	1,5	2,30±0,10 ^b	24,27±0,32 ^d	Cụm chồi nhỏ, chồi ngắn, không đều
C6	2,0	1,40±0,10 ^d	32,50±0,26 ^b	Cụm chồi biến dạng, không đồng đều, rễ nhiều
P-value		<0,01	<0,01	

Ghi chú: Giá trị trung bình ± SD; Các chữ cái khác nhau trên cùng một cột chỉ ra sự sai khác có ý nghĩa thống kê của các trung bình mẫu với p-value < 0,01 (Tukey's HSD test).

Năm 2018, nhóm tác giả Trần Việt Hà và cs nghiên cứu trên cây gừng gió cho thấy hệ số nhân chồi đạt 4,08 lần/chu kỳ cấy mẫu trong môi trường có NAA thấp hơn (MS có bổ sung 1,2 mg/l BAP; 0,5 mg/l Kinetin và 0,2 mg/l NAA). Kết quả này

khá phù hợp với dữ liệu phân tích trong Bảng 3, hệ số nhân chồi đạt cao nhất và chồi sinh trưởng mạnh nhất ở môi trường MS có bổ sung 1,5 mg/l BA, 0,5 mg/l Kn và 0,5 mg/l NAA. Với cùng nồng độ Cytokinin, khi tăng hoặc giảm nồng độ Auxin

thì kết quả tạo cụm chồi đều không cao bằng. Đặc biệt khi tăng NAA lên 2,0 mg/L, cụm chồi bắt đầu có hiện tượng biến dạng, yếu, rễ nhiều, có thể do nồng độ NAA cao đã kìm hãm sự tái sinh chồi và kích thích khả năng ra rễ. Khi không bổ sung NAA, thì khả năng tái sinh cụm chồi thấp (1,17 chồi/mẫu), chồi ngắn hơn so với các nghiệm thức có bổ sung. Tuy nhiên, trái ngược với kết quả nghiên cứu của chúng tôi, nhóm tác giả Phạm Thị Kim Hạnh và cs (2020) đã khẳng định rằng, loài Gừng đen (*Distichochlamys citrea*) có thể nhân chồi đạt tỷ lệ cao mà không cần bổ sung NAA. Theo đó, các chồi có thể được nhân lên trong môi trường MS + 100 ml/l nước dừa + 1 mg/l BAP + 1 g/l Casein + 0,2 mg/l Kinetin. Bên cạnh đó Hồ Anh Chi và cs., 2023, cho biết môi trường cơ bản MS bổ sung kết hợp 2,0 mg/L BAP, 0,2 mg/L NAA và 60 g/L khoai tây cho kết quả nhân chồi tốt nhất. Kết hợp giữa các kết quả nghiên cứu trên cho thấy rằng, đối với từng đối tượng mẫu thực vật khác nhau thì khả năng nhân chồi hay tạo cụm chồi sẽ đòi hỏi sự bổ sung với thành phần và nồng độ của các chất điều hòa sinh trưởng khác nhau.



Hình 4. Gừng đen phát sinh cụm chồi sau 2 tuần nuôi cấy trên môi trường kết hợp Cytokinin và Auxin (Cụm chồi Gừng đen bắt đầu hình thành trên môi trường MS có bổ sung 1,5mg/l BA, 0,5mg/l Kn và 0,5mg/l NAA)

Bảng 4. Ảnh hưởng của NAA đến khả năng ra rễ của gừng đen

Nồng độ (mg/l)	Thời gian xuất hiện rễ (NSNC)	Số rễ/mẫu	Chiều dài rễ (mm)
0	14	1,76± 0,11 ^c	20,20± 0,79 ^c
0,1	12	3,16± 0,05 ^d	41,29± 0,22 ^d
0,5	11	7,13± 0,05 ^b	52,06± 0,31 ^b
1	11	8,40± 0,10 ^a	57,88± 0,21 ^a
1,5	10	6,48± 0,16 ^c	46,60± 0,22 ^c
<i>P-value</i>		<0,01	<0,01

Ghi chú: Giá trị trung bình ± SD; Các chữ cái khác nhau trên cùng một cột chỉ ra sự sai khác có ý nghĩa thống kê của các trung bình mẫu với *p-value* < 0,01 (Tukey's HSD test).

Những nghiên cứu trước đây cũng đã chứng minh được vai trò quan trọng của NAA trong quá trình ra rễ của chồi các cây thân củ in vitro. NAA

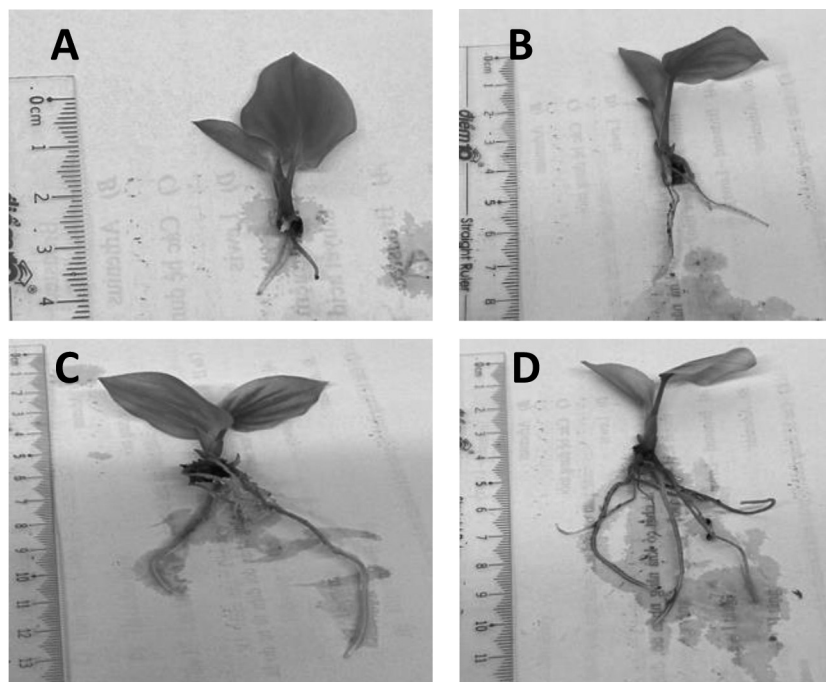
3.3. Ảnh hưởng của NAA đến khả năng ra rễ của gừng đen

Kết quả phân tích thống kê ở Bảng 4 cho thấy, khi tăng nồng độ Auxin (NAA) từ 0,1 lên 1,0 mg/l thì số lượng rễ/chồi và chiều dài rễ cũng tăng theo. Tuy nhiên, khi nồng độ NAA trên 1 mg/l thì lại kìm hãm sự phát sinh và chiều dài của rễ cây Gừng đen in vitro. Điều này tương đồng với khẳng định của tác giả Rout và cs (2001), cho rằng khi sử dụng NAA ở nồng độ cao sẽ làm ức chế rễ và làm cho cây chậm tăng trưởng. Thực tế, cây Gừng đen nuôi cấy mô có thể ra rễ trên môi trường MS không bổ sung NAA, nhưng rễ sẽ phát triển yếu và mảnh hơn so với rễ được cảm ứng trên môi trường có bổ sung NAA. Trong nghiên cứu này (Bảng 4), nồng độ NAA 1 mg/l là thích hợp nhất cho việc phát sinh và tăng trưởng của rễ cây Gừng đen nuôi cấy mô, cho số rễ/chồi đạt 8,40 và chiều dài rễ đạt 52,06 mm.

với nồng độ 0,2 mg/l là thích hợp nhất để cây ra rễ 100%, tỷ lệ ra rễ đạt 5,7 rễ/cây Gừng gió (*Zingiber zerumbet*) (Trần Việt Hà và cs, 2018). Tác giả

Trương Thị Bích Phượng và cs (2018) lại cho rằng, để có tỷ lệ ra rễ cao, môi trường MS cần được bổ sung 3,0 mg/l BAP và 2,0 mg/l NAA, đạt 12,80 rễ/chồi đối với cây Gừng (*Zingiber officinale* Rosc.). Thêm vào đó, môi trường MS có bổ sung 3 mg/l BAP và 0,5 mg/l IBA lại kích hoạt sự phát sinh của cả rễ và chồi mới, trong khi đó môi trường MS chỉ có 2 mg/l NAA lại rất thích hợp cho sự phát sinh rễ đạt tới 27 rễ/chồi (Trương Thị Phương Lan và cs, 2017). Ở đối tượng loài Gừng đen

(*Distichochlamys citrea*) cũng đã được nhóm tác giả Phạm Thị Kim Hạnh và cs (2020) chứng minh tỷ lệ ra rễ đạt tối đa khi chồi được cấy trên môi trường MS + 100 ml/l nước dừa + 0,5 mg/l NAA. Trong khi đó, kết quả của nhóm tác giả Hồ Anh Chi và cs., 2023 cho thấy, môi trường cơ bản MS bổ sung 0,5 mg/L IBA thích hợp cho chồi in vitro ra rễ. Điều này một lần nữa khẳng định, các yếu tố ảnh hưởng đến phát sinh hình thái trên mỗi loài thực vật khác nhau sẽ có các đặc điểm riêng biệt.



Hình 5. Gừng đen trên các môi trường bổ sung NAA ở các nồng độ khác nhau (A: Gừng đen trên môi trường MS bổ sung 0,1mg/l NAA; B: Gừng đen trên môi trường MS bổ sung 0,5mg/l NAA; C: Gừng đen trên môi trường MS bổ sung 1 mg/l NAA; D: Gừng đen trên môi trường MS bổ sung 1,5 mg/l NAA)

3.4. Ảnh hưởng của giá thể huấn luyện tới tỷ lệ sống và sinh trưởng của cây gừng đen

Cây Gừng đen nuôi cấy mô đạt tiêu chuẩn sẽ được huấn luyện trong các loại giá thể khác nhau để đảm bảo độ ẩm và duy trì sự sống trước khi thích ứng với điều kiện môi trường ex vitro để tiếp tục sinh trưởng và phát triển. Trong nghiên cứu này, kết quả được ghi nhận ở Bảng 5 cho thấy, sau

8 tuần trồng trên các loại giá thể khác nhau, tỷ lệ cây sống sót khá cao (trừ giá thể đất) đạt 88,33% - 98,33%. Điều này cho thấy, loài gừng đen này có khả năng thích nghi cao với điều kiện vườn ươm. Trong 5 loại giá thể được khảo sát, giá thể phối trộn giữa Đất, Tro trấu và Mùn dừa theo tỷ lệ 1:1:1 cho tỷ lệ sống cao nhất đạt 98,33%, cây sinh trưởng tốt, chiều cao cây vượt trội đạt 81,68 mm.

Bảng 5. Ảnh hưởng của giá thể huấn luyện đến cây Gừng đen nuôi cấy mô ở giai đoạn vườn ươm

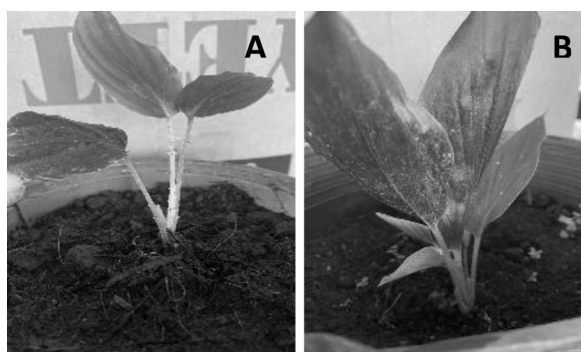
Nghiệm thức	Giá thể	Tỷ lệ sống sót (%)	Chiều cao cây (mm)
Đ/C	Đất	68,33±5,77 ^b	50,66±1,12 ^c
NT1	Đất + Tro trấu (1:1)	88,33±2,89 ^a	60,01±0,89 ^d
NT2	Đất + Tro trấu + Mùn dừa (1:1:1)	98,33±2,89 ^a	81,68±0,93 ^a
NT3	Mùn dừa + Đất (1:1)	95,00±5,00 ^a	71,74±0,55 ^b
NT4	Mùn dừa + Tro trấu (1:1)	91,67±2,89 ^a	68,24±1,25 ^c
<i>P-value</i>		< 0,01	< 0,01

Ghi chú: Giá trị trung bình ± SD; Các chữ cái khác nhau trên cùng một cột chỉ ra sự sai khác có ý nghĩa thống kê của các trung bình mẫu với *p-value* < 0,01 (Tukey's HSD test).

Kết quả của nghiên cứu này khá tương đồng với nhiều nghiên cứu trước đây trên các đối tượng thân củ, thuộc khác họ gừng (Zingiberaceae). Điển hình là nghiên cứu của nhóm tác giả Trần Việt Hà và cs (2018) chỉ ra rằng giá thể thích hợp để huấn luyện và chuyển ra trồng ở điều kiện nhà lưới của cây Gừng gió (*Zingiber zerumbet*) là Đất: Trấu hun: Bột xơ dừa (50%:25%:25%) đạt tỷ lệ sống 95,78%). Đáng chú ý, loài Gừng đen

(*Distichochlamys citrea*) in vitro cũng sinh trưởng, phát triển tốt trong điều kiện ex vitro có độ chiếu sáng 75% trên nền giá thể Mùn cưa:trấu hun:đất đồi sâu (2:1:1) (Phạm Thị Kim Hạnh và cs (2020).

Tóm lại, ngoài trừ giá thể đất, các loại giá thể khác có độ toi xốp cao, khả năng giữ và thoát nước tốt, thông thoáng giúp rễ cây gừng đen in vitro có khả năng sinh trưởng, phát triển tốt hơn.



Hình 6. Gừng đen sau 4 và 8 tuần huấn luyện ngoài nhà lưới (A: Gừng đen Ex vitro trên giá thể Đất + Tro trấu + Mùn dừa (1:1:1) sau 4 tuần huấn luyện; B: Gừng đen Ex vitro trên giá thể Đất + Tro trấu + Mùn dừa (1:1:1) sau 8 tuần huấn luyện).

4. KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu cho thấy NADCC nồng độ 1%, được sử dụng để khử trùng mẫu cây gừng đen trong 10 phút mang lại hiệu quả tối ưu với tỷ lệ mẫu sạch > 85%, mẫu tái sinh đạt > 80%. Môi trường MS bổ sung 1,5 mg/l BA và 0,5 mg/l Kn là môi trường thích hợp nhất để tái sinh chồi, với chiều cao chồi đạt 41,07 mm. Trong khi đó, môi trường MS bổ sung 1,5 mg/l BA, 0,5 mg/l Kn, và

0,5 mg/l NAA là tối ưu nhất cho khả năng tái sinh cụm chồi, đạt 2,87 chồi/mẫu và chiều cao trung bình chồi đạt 36,47 mm. Môi trường MS bổ sung 1 mg/l NAA cho khả năng phát sinh rễ sớm (11 ngày sau nuôi cấy) và tỷ lệ ra rễ cao nhất (8,40 rễ/mẫu). Ngoài ra, các cây con hoàn chỉnh gừng đen được huấn luyện trong giá thể Đất + Tro trấu + Mùn cưa (1:1:1) đạt tỷ lệ sống sót cao (98,33%) và đạt chiều cao 81,68 mm.

STUDY ON IN VITRO PROPAGATION OF BLACK GINGER (*DISTICHOCHLAMYS ORLOWII* K.LARSEN & M.F.NEWMAN)

Nguyen Van Tinh¹, Nguyen Thi Luyen¹, Cu Thi Ly Na², Le Thuong²

Received Date: 13/10/2023; Revised Date: 26/12/2023; Accepted for Publication: 27/12/2023

ABSTRACT

Black ginger (*Distichochlamys orlowii* K.Larsen & M.F.Newman), one of four types of black ginger endemic to Vietnam. It is one of the valuable medicinal plants for human health. In nature, this species has a low multiplication coefficient, however there are currently no publications on the breeding process and especially *in vitro* propagation on this specie. Here, we have built an *in vitro* propagation process using plant tissue culture technology to propagate the plant. Research results showed that Black ginger samples disinfected with Sodium dichloroisocyanurate (NADCC) at 1% concentration for 10 minutes bring optimal efficiency with the rate of clean samples more than 85%, regenerated samples reaching more than 80%. The MS medium, supplemented with 1.5 mg/l BA (Benzyl Adenine) and 0.5 mg/l Kn (Kinetin), was the most suitable medium for shoot regeneration, with an average shoot height of 41.07 mm. Meanwhile, MS medium supplemented with 1.5 mg/l BA, 0.5 mg/l Kn, and 0.5 mg/l NAA (Naphthaleneacetate) was the most optimal for shoot cluster proliferation, reaching 2.87 buds/sample and average bud height reached 36.47 mm. Furthermore, MS medium, supplemented with 1 mg/l NAA, showed the ability to produce early roots (11 days after culture) and the highest number of roots (8.40 roots/sample). Black ginger plantlet trained in a substrate of Soil + Rice Husk Ash + Sawdust (in a ratio of 1:1:1) achieved a high survival rate (98.33%) and reached an average height of 81.68 mm. This was the first study on propagation Black ginger (*Distichochlamys orlowii* K.Larsen & M.F.Newman) using *in vitro* technology in Vietnam, in which contributing to the conservation and development of this rare medicinal plant.

Keywords: Central Highlands, *In vitro* propagation, Medicinal plants, Orlowii black ginger.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tài liệu tiếng Việt

- Bùi Thị Thu Hương, Nguyễn Thị Bắc và Đồng Huy Giới (2020). Nghiên cứu nhân giống *in vitro* cây Nghệ đỏ (*Curcuma longa* L.) từ củ. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Lâm nghiệp*, 2, 3-9.
- Hồ Anh Chi, Hồ Nhật Quang, Trần Vũ Ngọc Thi và cs (2023). Nghiên cứu thiết lập quy trình nhân giống *in vitro* cây gừng đen (*Distichochlamys citrea* M.F. Newman). *Tạp chí Nghiên cứu và Phát triển*, số 3 (185).
- Nguyễn Thị Hồng Nhung, Bùi Thị Hồng, và Đặng Văn Đông (2017). Xây dựng quy trình tạo củ *in vitro* dòng lai hoa Lay ơn. *Tạp chí Khoa học Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam*, 12, 52-56.
- Nguyễn Thị Thúy Diễm (2017). Ảnh hưởng của các chất điều hòa sinh trưởng lên sự phát sinh chồi, rễ và loại giá thể phù hợp cho sự sinh trưởng của cây Gừng đen (*Kaempferia parviflora*) ở vườn ươm. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học An Giang*, 16, 1-12.
- Phạm Thị Kim Hạnh, Trịnh Thùy Dương, Vũ Phương Linh, và Lê Tuấn Nghĩa (2020). Nghiên cứu nhân giống *In vitro* loài Gừng đen (*Distichochlamys citrea*) bản địa. *Tạp chí Khoa học Lâm nghiệp*, số 3.
- Trần Việt Hà, Nguyễn Văn Việt, Đoàn Thị Thu Hương, Nguyễn Thị Huyền, Đinh Văn Hùng và Sounthone Douangmala (2018). Ứng dụng kỹ thuật nuôi cấy *In vitro* trong nhân giống cây gừng gió (*Zingiber zerumbet*). *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Lâm nghiệp*, 6, 10-16.
- Trương Thị Bích Phượng, Trần Thị Bích Nga, Nguyễn Đức Tuấn, Ngô Thị Minh Thu, và Trần Thị Thu Hà (2018). Nghiên cứu nhân giống *In vitro* cây gừng (*Zingiber officinale* Rosc.) ở Huế. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn*, 6, 107-113.
- Trương Thị Phương Lan, Lê Thị Anh Thư, và Ngô Thị Sen (2017). Ảnh hưởng của AgNO₃ đến quá trình

¹Applied Biomedical Research Institute, Buon Ma Thuot Medical University;

²Department of Basic Sciences, Buon Ma Thuot Medical University;

Corresponding author: Nguyen Van Tinh; Tel: 0869340391; Email: nvtinh@bmtvietnam.com

tái sinh in vitro cây nghệ đen (*Curcuma zedoaria* Roscoe). *Tạp chí Khoa học Đại học Huế: Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*, 126, 65-73.

Tài liệu tiếng Anh

- Chau, D. T., Hung, N. V., Dai, D. N., & Ogunwande, I. A. (2017). Volatile constituents of *Distichochlamys citrea* MF Newman and *Distichochlamys orlowii* K. Larsen MF Newman (*Zingiberaceae*) from Vietnam. *J Med Plants Res*, 11(9), 188-193.
- Goncalves, M. J., Cruz, M. T., Tavares, A. C., Cavaleiro, C., Lopes, M. C., Canhoto, J., & Salgueiro, L. (2012). Composition and biological activity of the essential oil from *Thapsia minor*, a new source of geranyl acetate. *Ind Crops Prod*, 35(1), 166-171.
- Larsen, K & Newman M.F. (2001). *Distichochlamys orlowii* K.Larsen & M.F.Newman, *Nat. Hist. Bull. Siam Soc.* 49(1): 77.
- Legault, J., & Pichette, A. (2007). Potentiating effect of β -caryophyllene on anticancer activity of α -humulene, isocaryophyllene and paclitaxel. *J Pharm Pharmacol*, 59(12), 1643-1647.
- Juergens, U. (2014). Anti-inflammatory Properties of the Monoterpene 1.8-cineole: Current Evidence for Co-medication in Inflammatory Airway Diseases. *Drug Res*, 64(12), 638-646. doi:10.1055/s-0034-1372609.
- Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-497.
- Newman, M. F. (1995). *Distichochlamys*, a new genus from Vietnam. *Edinb J Bot*, 52(1), 65-69.
- Nishida, N., Tamotsu, S., Nagata, N., Saito, C. and Sakai, A. (2005). Allelopathic effects of volatile monoterpenoids produced by *Salvia leucophylla*: inhibition of cell proliferation and DNA synthesis in the root apical meristem of *Brassica campestris* seedlings. *J Chem Ecol*, 31:1187-1203.
- Quintans-Júnior, L., Moreira, J. C., Pasquali, M. A., Rabie, S., Pires, A. S., Schröder, R., ... & Gelain, D. P. (2013). Antinociceptive activity and redox profile of the monoterpenes. *Int Sch Res Notices*, 459530, 11.
- Rout, G. R., Palai, S. K., Samantaray, S. & Dá, P. (2001). Effect of growth regulation and culture conditions on shoot multiplication and rhizome formation in ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) *in vitro*. *In vitro Cell Dev Biol Plant*, 37, 814-819.
- Ty, P. V., Duc, H. V., & Thang, L. Q. (2015). Chemical composition of essential oil from the rhizomes of *Distichochlamys citrea* collected in Central Vietnam. *Journal of Sciences, An Giang University*, 8(4), 60-65.
- Zhan, Y. H., Liu, J., Qu, X. J., Hou, K. Z., Wang, K. F., Liu, Y. P., & Wu, B. (2012). β -Elemene induces apoptosis in human renal-cell carcinoma 786-0 cells through inhibition of MAPK/ERK and PI3K/Akt/mTOR signalling pathways. *APJCP*, 13(6), 2739-2744.