

NGHIÊN CỨU NHÂN GIỐNG *IN VITRO* CÂY NGẢI ĐEN (*Kaempferia parviflora* Wall. ex Baker)

Đào Thùy Dương^{1*}, Nguyễn Thị Thu¹, Chu Huy Tường¹,
Phan Thị Khánh Linh¹, Phạm Hồng Nhung¹, Nguyễn Tiến Đạt¹, Lê Đức Thắng¹

¹ Viện Nghiên cứu và Phát triển Vùng

* Email: daothuyduong2712@gmail.com

TÓM TẮT

Nghiên cứu này nhằm xác định vật liệu khởi đầu và ảnh hưởng của các chất điều hòa sinh trưởng đến quá trình nhân nhanh chồi cây ngải đen (*Kaempferia parviflora* Wall. ex Baker) bằng kỹ thuật nuôi cấy *in vitro*. Kết quả cho thấy, vật liệu khởi đầu thích hợp được tạo từ mầm của củ ngải đen già hoặc chồi mới hình thành từ đoạn thân của cây ngải đen, được khử trùng bằng dung dịch HgCl₂ 0,1% trong 15 phút. Giai đoạn nhân nhanh chồi sử dụng môi trường MS + inositol 100 mg/l + đường 30 g/l + agar 5,2 g/l, pH 5,6 - 5,8 bổ sung BA 3,0 mg/l cho hiệu quả tốt nhất: Chồi mập, sinh trưởng khỏe với hệ số nhân chồi đạt 4,5 lần, chiều cao chồi đạt 5,82 cm sau 6 tuần nuôi cấy. Huấn luyện cây non bằng cách đặt bình nuôi cấy ở hành lang 3 ngày, sau đó mở nắp đặt ở nhà lưới 3 ngày trước khi rửa và ươm trồng cho tỷ lệ sống cao, thời gian ra rễ mới nhanh (8 ngày). Giá thể thích hợp trồng cây con *in vitro* gồm: Đất, vụn xơ dừa, trấu hun (2: 1: 1) sau 3 tuần ươm trồng tỷ lệ sống đạt 95,78%, chiều cao cây trung bình đạt 13,35 cm.

Từ khóa: *In vitro*, ngải đen, nhân nhanh ngải đen.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Ngải đen hay còn gọi là sâm thái (*Kaempferia parviflora*) là một loại cây thuốc thuộc họ Zingiberaceae, phân bố nhiều ở vùng nhiệt đới châu Á. Từ lâu, ngải đen đã được sử dụng trong y học dân gian để điều trị các triệu chứng như: Đau nhức, áp xe, tiêu chảy, bệnh gút, tăng huyết áp và nhiễm trùng [1]. Nhiều nghiên cứu đã chứng minh rằng, chiết xuất cây ngải đen có khả năng chống loét dạ dày [2], chống dị ứng [3, 4], chống ung thư [5, 6], chống viêm [7] và chống béo phì [8].

Hiện nay, ngải đen thường được nhân giống bằng thân, rễ. Tuy nhiên, phương pháp này thường tốn nhiều thời gian và gặp hạn chế về mặt số lượng, do thân, rễ thường được sử dụng làm nguyên liệu

cho các sản phẩm thương mại [9]. Để khắc phục các hạn chế này, một số nghiên cứu trên thế giới đã tập trung ứng dụng kỹ thuật nuôi cấy mô cây để tạo nguồn cây giống ngải đen với số lượng lớn, đồng đều và sạch bệnh [10, 11]. Tại Việt Nam, nghiên cứu của Nguyễn Thị Thúy Diễm (2017) nhằm mục đích thiết lập quy trình vi nhân giống cây ngải đen [12]. Mục tiêu của nghiên cứu này là nghiên cứu cụ thể phương pháp tạo vật liệu khởi đầu và ảnh hưởng của các chất điều hòa sinh trưởng đến quá trình nhân nhanh chồi, góp phần hoàn thiện kỹ thuật nhân giống *in vitro* cây ngải đen.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu



Hình 1. Củ ngải đen được lấy làm vật liệu

Củ mầm của cây ngải đen được lấy từ nguồn giống ngải đen của nhiệm vụ quỹ gen cấp nhà nước: “Khai thác và phát triển nguồn gen cây thuốc Sâm tố nữ (*Pueraria candollei* Grah. ex Benth. var. *mirifica* Airy Shaw & Suv.) và ngải đen (*Kaempferia parviflora* Wall. ex Baker)”, tên loài đã được định danh qua kết quả nghiên cứu của nhiệm vụ trên; các hóa chất thông dụng trong nuôi cấy mô thực vật: Chất khử trùng, các chất thành phần môi trường nuôi cấy, các chất điều hòa sinh trưởng.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Điều kiện nuôi cấy

Chu kỳ chiếu sáng 16 giờ sáng/8 giờ tối, nhiệt độ $24 \pm 2^\circ\text{C}$, độ ẩm $60 \pm 5\%$.

2.2.2. Tạo vật liệu khởi đầu và nuôi cấy khởi động

Các bộ phận của cây được sử dụng để làm vật liệu khởi đầu trong nghiên cứu này bao gồm: Mầm của củ ngải đen già; mầm củ bánh tẻ; đoạn thân chứa chồi mới hình thành. Tất cả mẫu vật liệu được rửa dưới vòi nước máy 5 phút sau đó rửa sạch qua nước cất 3 lần. Nuôi cấy mẫu chồi trên môi trường MS + inositol 100 mg/l + đường 30 g/l + agar 5,2 g/l, pH = 5,6 - 5,8 để thu chồi tái sinh.

Sau khi lựa chọn được vật liệu khởi đầu, mẫu được xử lý qua HgCl_2 0,1%. Tiếp tục tiến hành nghiên cứu ảnh hưởng của thời gian khử trùng bằng HgCl_2 0,1% trong các công thức lần lượt là 5, 10, 15 và 20 phút và được tráng lại 3 lần với nước cất.



Hình 2. Lựa chọn và khử trùng củ ngải đen



Hình 3. Nuôi cấy khởi động mẫu chồi ngải đen

2.2.3. Nhân nhanh chồi

Khảo sát ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng thuộc nhóm cytokinin đến khả năng hình thành chồi *in vitro* bằng cách cấy chuyển mẫu chồi đã được tái sinh vào môi trường MS* (MS + inositol 100 mg/l + đường 30 g/l + agar 5,2 g/l, pH 5,6 - 5,8) được bổ sung riêng rẽ các chất điều tiết sinh trưởng: BA, kinetin ở các dải nồng độ 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 mg/l và thidiazuron (TDZ) ở các dải nồng độ 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 mg/l. Thí nghiệm lặp lại 3 lần với 30 mẫu/công thức thí nghiệm. Các mẫu được theo dõi ở thời điểm 6 tuần sau khi cấy (TSKC).

Chỉ tiêu theo dõi: Đặc điểm của chồi, chiều cao trung bình và hệ số nhân chồi. Trong đó, hệ số nhân chồi được tính bằng tổng số chồi thu được chia cho tổng số chồi ban đầu (tổng số mẫu).

2.2.4. Tạo cây hoàn chỉnh

Khảo sát ảnh hưởng của các chất điều hòa sinh trưởng α -NAA đến khả năng ra rễ *in vitro* bằng cách nuôi cấy mẫu chồi ngải đen (20 - 25 mm, có khoảng 2 - 3 lá) trên môi trường nền: MS + 30 g/l sucrose + 6,5 g/l agar (pH = 5,8) được bổ sung α -NAA ở các dải nồng độ: 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 mg/l. Các mẫu được theo dõi ở thời điểm sau 6

TKSC, thí nghiệm lặp lại 5 lần liên tiếp, 30 mẫu/công thức. Chỉ tiêu theo dõi: Chiều dài rễ trung bình, tỷ lệ chồi ra rễ, số rễ/chồi, số lá/chồi.

2.2.5. Huấn luyện cây con và ra cây ngoài vườn ươm

Khảo sát huấn luyện thích nghi cây con trước khi đưa ra ngoài vườn ươm bằng 4 cách khác nhau: (1) Đưa cây trực tiếp ra vườn ươm; (2) Đưa bình nuôi cấy ra hành lang, để nơi thoáng mát, tránh ánh sáng trực tiếp 3 ngày trước khi ươm trồng; (3) Để bình nuôi cấy 3 ngày ở hành lang, nơi thoáng mát, tránh ánh sáng trực tiếp, sau đó thêm 3 ngày ở nhà lưới trước ươm trồng; (4) Bình nuôi cấy ở hành lang, để nơi thoáng mát, tránh ánh sáng trực tiếp 3 ngày sau đó mang ra nhà lưới, mở nắp bình 3 ngày trước khi ươm trồng. Thí nghiệm được lặp lại 5 lần liên tiếp, 5 mẫu/công thức. Chỉ tiêu theo dõi: Tỷ lệ cây sống, thời gian xuất hiện rễ mới, chiều cao cây, đường kính cây, tỷ lệ cây con hỏng do không thích nghi được.

Sau huấn luyện thích nghi, cây con với bộ rễ hoàn chỉnh, chiều cao trung bình từ 60 – 65 mm,

có từ 2 - 3 lá được lấy ra khỏi môi trường, rửa sạch agar và trồng trực tiếp trên 3 công thức giá thể khác nhau: (1) 100% đất; (2) đất: vụn xơ dừa: trấu hun (2: 1: 1); (3) 100% cát sạch.

Nhiệt độ vườn ươm từ 25 - 30°C, tưới nước giữ ẩm (độ ẩm từ 85 - 90%), điều chỉnh ánh sáng cho cây quang hợp, che giảm từ 7 - 10 ngày sau khi đưa ra ngoài vườn ươm, độ tàn che 50 - 60%. Sau 2 tuần tiến hành tưới dung dịch urê và clorua kali định kỳ 7 ngày/lần, liều lượng tưới 1 lít/m² nồng độ 0,05%. Các mẫu được đánh giá ở thời điểm sau 3 tuần sau khi trồng, các thí nghiệm được lặp lại 5 lần liên tiếp, 5 mẫu/công thức. Các chỉ tiêu theo dõi: Tỷ lệ cây sống, chiều cao cây, chất lượng cây con (quan sát đặc điểm lá).

2.2.6. Xử lý số liệu

Thu thập và xử lý kết quả bằng phần mềm Microsoft Excel 2003 và phần mềm IRRISTAT 5.0.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Lựa chọn vật liệu khởi đầu và ảnh hưởng của một số chất khử trùng

Bảng 1. Kết quả nghiên cứu nguồn vật liệu khởi đầu sau 10 ngày nuôi cấy

Công thức	Bộ phận vào mẫu	Tỷ lệ mẫu PSHT (%)	Tỷ lệ tạo chồi (%)	Tỷ lệ mẫu protocorm (%)	Chất lượng chồi
CT1	Mầm củ bánh tẻ	13,33	10,3	3,0	Kém
CT2	Mầm củ củ ngải đen già	23,1	14,0	9,0	Tốt
CT3	Đoạn thân chứa chồi mới hình thành	22,67	13,7	8,67	Tốt
LSD _{0,05}		0,98	0,63	0,34	
CV%		4,2	1,56	5,3	

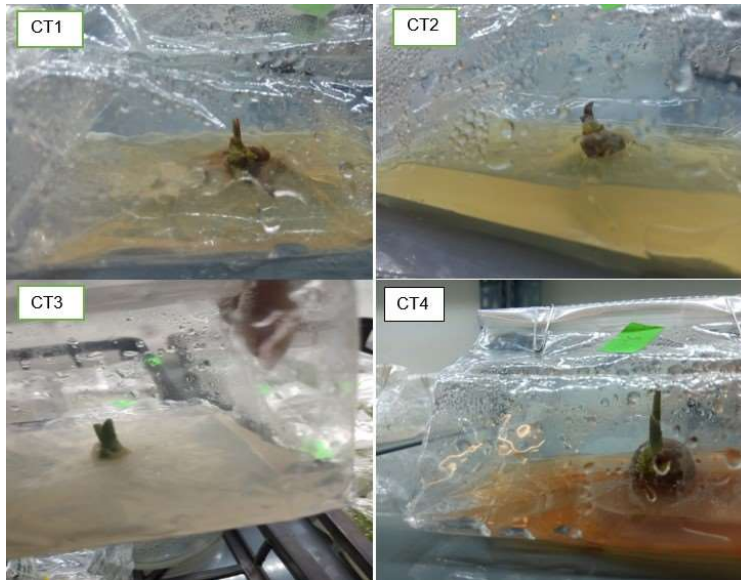
Ghi chú: PSHT là phát sinh hình thái; CT là công thức

Bảng 1 cho thấy, tỷ lệ tạo chồi và tạo protocorm giữa các công thức là khác nhau. Tuy nhiên, giữa CT2 và CT3 không cho thấy sự sai biệt. Dựa trên kết quả nghiên cứu có thể nhận thấy, CT2, CT3 sử dụng cơ quan là mầm củ củ ngải đen già và đoạn thân có chứa chồi mới hình thành là vật liệu khởi đầu thích hợp để sử dụng làm vật liệu khởi đầu cho quy trình nhân giống *in vitro* cây ngải đen. Trong phần thí nghiệm tiếp theo, đã lựa chọn mầm củ củ ngải đen già làm vật liệu khởi đầu.

Khử trùng vật liệu nuôi cấy là giai đoạn đầu tiên của quy trình nhân giống *in vitro*. Mục đích của giai đoạn này là phải tạo được nguyên liệu thực vật vô trùng để đưa vào nuôi cấy *in vitro*. Phương pháp dùng các chất hóa học có hoạt tính diệt nấm và vi khuẩn được lựa chọn để nghiên cứu tạo vật liệu sạch. Sử dụng HgCl₂ 0,1% trong các công thức lần lượt là 5, 10, 15 và 20 phút để xử lý mẫu, sau thời gian 10 ngày nuôi cấy. Kết quả nghiên cứu được thể hiện ở bảng 2.

Bảng 2. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của thời gian khử trùng bằng HgCl₂ 0,1% đến khả năng tạo vật liệu sạch nấm, vi khuẩn của ngải đen (sau 10 ngày nuôi cấy)

Công thức	Thời gian (phút)	Tổng số mẫu/Công thức	Tỷ lệ mẫu chết (%)	Tỷ lệ mẫu sạch (%)	Tỷ lệ mẫu nhiễm (%)
CT1	5	45	15,6	48,9	35,5
CT2	10	45	4,4	75,6	20,0
CT3	15	45	6,7	82,2	11,1
CT4	20	45	49,0	42,2	8,8
LSD _{0,05}				7,3	
CV%				6,2	



Hình 4. Kết quả ảnh hưởng của thời gian khử trùng ở các công thức đến vật liệu vào mẫu ngải đen

Với giá trị LSD_{0,05} đạt 7,3 thì các CT3, CT4 so với CT1 có sự sai khác có ý nghĩa ở mức độ tin cậy 95%. Khi tăng thời gian khử trùng mẫu từ 5 - 15 phút thì tỷ lệ mẫu sạch tăng dần từ 48,9 - 82,2%. Thời gian khử trùng lên đến 20 phút thì tỷ lệ mẫu sạch lại giảm xuống chỉ còn 42,2% (thấp nhất trong các công thức còn lại).

Như vậy, trên đối tượng ngải đen sử dụng HgCl₂ 0,1% trong thời gian 15 phút cho hiệu quả tạo mẫu sạch cao nhất (đạt 82,2%).

3.2. Nhân nhanh chồi: Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng thuộc nhóm cytokinin đến khả năng hình thành chồi *in vitro*

Bảng 3. Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng thuộc nhóm cytokinin đến khả năng nhân nhanh ngải đen *in vitro* ở 6 TSKC

Công thức	Môi trường và nồng độ BA, kinetin, TDZ	Hệ số nhân chồi (lần)	Chiều cao chồi (cm)	Đặc điểm chồi
Đối chứng	0	2,30 ^e	3,75 ^d	Chồi nhỏ, sinh trưởng kém, mất sức sống ở đầu lá
CT1	MS* + BA 1,00 mg/l	3,20 ^d	4,59 ^c	Chồi xanh, sinh trưởng bình thường, có biểu hiện mất màu

				xanh ở đầu lá
CT2	MS* + BA 2,00 mg/l	3,76 ^c	5,10 ^c	Chồi xanh, sinh trưởng bình thường
CT3	MS* + BA 3,00 mg/l	4,50 ^b	5,82 ^{ab}	Chồi mập xanh, sinh trưởng tốt, lá mở xanh
CT4	MS* + BA 4,00 mg/l	5,30 ^a	6,30 ^a	Chồi xanh nhạt, cứng, lá màu xanh trắng
LSD _{0,05}		0,34	0,51	
CT5	MS* + kinetin 1,00 mg/l	2,80 ^d	4,43 ^c	Chồi xanh, sinh trưởng bình thường, có biểu hiện mất màu xanh ở đầu lá
CT6	MS* + kinetin 2,00 mg/l	3,30 ^c	4,48 ^b	Chồi xanh, sinh trưởng bình thường, lá xanh nhạt
CT7	MS* + kinetin 3,00 mg/l	3,90 ^b	5,11 ^{ab}	Chồi xanh, mập, sinh trưởng tốt
CT8	MS* + kinetin 4,00 mg/l	4,30 ^a	5,31 ^a	Chồi xanh, mập, sinh trưởng tốt
LSD _{0,05}		0,37	0,33	
CT9	MS* + TDZ 0,50 mg/l	2,60 ^d	4,50 ^c	Chồi xanh, sinh trưởng bình thường, có biểu hiện mất màu xanh ở đầu lá
CT10	MS* + TDZ 1,00 mg/l	3,20 ^b	4,80 ^b	Chồi xanh, sinh trưởng bình thường, lá xanh nhạt
CT11	MS* + TDZ 1,50 mg/l	4,30 ^a	5,48 ^a	Chồi xanh, mập, sinh trưởng tốt
CT12	MS* + TDZ 2,00 mg/l	2,80 ^c	4,68 ^{bc}	Chồi xanh, sinh trưởng tốt
LSD _{0,05}		0,34	0,47	

Ghi chú: Các giá trị mang cùng chữ cái thể hiện sự sai khác không có ý nghĩa và ngược lại, theo tiêu chuẩn LSD ở mức ý nghĩa $\alpha = 0,05$

Tính chung, BA, kinetin, TDZ đều có khả năng kích thích tăng sinh chồi *in vitro* cây ngải đen. Bổ sung BA vào môi trường MS* với hàm lượng 1 - 4 mg/l cho hệ số nhân chồi của cây ngải đen biến thiên tăng dần từ 3,20 - 5,30 lần, chiều cao trung bình chồi tăng dần từ 4,59 - 6,3 cm. Tương tự, khi bổ sung kinetin theo nồng độ tăng dần 1 - 4 mg/l cho hệ số nhân chồi tăng từ 2,80 - 4,30 lần, chiều cao trung bình chồi tăng từ 4,43 - 5,31 cm. Với TDZ, hệ số nhân chồi và chiều cao trung bình chồi

tăng dần theo mức bổ sung từ nồng độ 0,5 - 1,5 mg/l và bắt đầu giảm ở mức nồng độ 2 mg/l.

Trong nuôi cấy mô tế bào thực vật, cytokinin là nhóm chất điều tiết sinh trưởng đóng vai trò quan trọng đến sự hình thành mô và tạo thành các chồi mới [13]. Hiệu quả của mỗi loại cytokinin khác nhau tùy thuộc vào từng loài cây và giai đoạn nuôi cấy [14]. Sau 6 TSKC, hệ số nhân chồi ở công thức đối chứng đạt thấp nhất, chỉ 2,3 lần. Ở các công thức có bổ sung chất điều hòa sinh trưởng, khi

tăng dần nồng độ BA, kinetin, hoặc TDZ, hệ số nhân chồi cũng tăng và đạt giá trị cao nhất ở nồng độ 4 mg/l BA; 4 mg/l kinetin và 1,5 mg/l TDZ. Điều này khẳng định cytokinin có ảnh hưởng rõ rệt đến quá trình nhân nhanh chồi ngải đen, trong đó, BA là loại cytokinin hiệu quả nhất, cho các hệ số nhân chồi cao nhất lần lượt là 4,5 lần (BA 3 mg/l) và 5,3 lần (BA 4 mg/l).

Khi đánh giá chất lượng chồi, tiến hành quan sát chiều dài chồi và các đặc điểm của lá. Trong môi trường MS* bổ sung BA (từ 0 – 4 mg/l), CT4 (BA 4 mg/l) cho chiều dài trung bình chồi cao nhất 6,30 cm, nhưng không có sự sai khác có ý nghĩa so với CT3 (BA 3 mg/l), với chiều cao chồi đạt 5,82 cm. Tuy nhiên, chồi ở CT4 (BA 4 mg/l) có biểu hiện lá xanh nhạt dần chuyển sang trắng cho thấy, BA ở nồng độ cao hơn có thể gây giảm sinh

trưởng, điều này cũng đã được ghi nhận ở kết quả nghiên cứu của Labrooy và cs (2020) [15]. Với kinetin, CT8 (kinetin 4 mg/l) cho chiều dài trung bình chồi cao nhất (5,31 cm), không sai khác có ý nghĩa so với CT7 (kinetin 3 mg/l, 5,11 cm), nhưng cao hơn có ý nghĩa so với công thức đối chứng (3,75 cm), CT5 (kinetin 1 mg/l, 4,43 cm) và CT6 (kinetin 2 mg/l, 4,48 cm). Đối với TDZ, CT11 (MS* + TDZ 1,5 mg/l) cho chiều cao chồi cao nhất, đạt 5,48 cm. Tuy nhiên, ở CT12, khi tăng nồng độ TDZ lên 2 mg/l, hệ số nhân chồi và chiều cao chồi giảm so với CT11 (TDZ 1,5 mg/l) và CT10 (TDZ 1,0 mg/l), mặc dù vẫn cao hơn CT9 (TDZ 0,5 mg/l). Điều này cho thấy, nồng độ TDZ cao có thể gây ức chế sự phát triển của chồi. Kết quả này cũng tương đối phù hợp với các kết quả của Park và cs (2021) [10], Prathanturarug và cs (2007) [11].



Hình 5. Mẫu ngải đen nuôi cấy trên môi trường bổ sung chất điều hòa sinh trưởng BA ở các nồng độ khác nhau sau 6 TSKC

Như vậy, dựa trên hệ số nhân chồi và chất lượng chồi, có thể khẳng định rằng CT3 (MS* + BA 3 mg/l) là tối ưu, với hệ số nhân chồi đạt 4,5 lần,

chiều dài chồi 5,82 cm và chồi phát triển khỏe mạnh. Các nghiên cứu gần đây cũng khẳng định BA là loại cytokinin cho hiệu quả tốt trong việc kích

thích hình thành chồi, đặc biệt ở nồng độ phù hợp [9, 10, 14].

3.3. Tạo cây hoàn chỉnh: Ảnh hưởng của α -NAA đến khả năng kích thích ra rễ của chồi ngải đen *in vitro*

Sau 6 TSKC, tất cả các công thức đều cho thấy, sự hình thành rễ. Đối với công thức đối chứng không bổ sung α -NAA, rễ vẫn được hình thành, điều đó chứng tỏ auxin nội sinh được sản sinh ở chồi và di chuyển xuống dưới để kích thích quá trình tạo rễ [16]. Tuy nhiên, khi bổ sung α -NAA vào môi trường nuôi cấy, tỷ lệ ra rễ được cải

thiện đáng kể. Ở CT3 và CT4, khi tăng nồng độ α -NAA tới 1,5 mg/l và 2,0 mg/l thì số lượng rễ giảm. Điều này có thể do auxin nồng độ cao gây ức chế sự giãn dài tế bào, ảnh hưởng đến cấu trúc rễ và làm chậm hoặc ngăn cản quá trình phát triển rễ [17]. Nồng độ α -NAA phù hợp cho nhân giống *in vitro* ở những loại cây giống khác nhau là khác nhau, có loại thích hợp ở nồng độ thấp nhưng cũng có loại thích hợp ở nồng độ cao. Trong nghiên cứu này, môi trường nuôi cấy MS bổ sung 0,5 - 1 mg/l α -NAA được xác định là phù hợp nhất cho quá trình tái sinh rễ *in vitro* chồi ngải đen.

Bảng 4. Ảnh hưởng của NAA đến khả năng tái sinh rễ của chồi ngải đen *in vitro* ở 6 TSKC

Công thức	Môi trường	Số lá/chồi	Số rễ/chồi	Chiều dài rễ (cm)	Tỷ lệ ra rễ (%)
Đối chứng	MS nền	3,20 ± 0,16	2,30 ± 0,13	1,82 ± 0,08	70
CT1	MS nền + 0,5 mg/l α -NAA	4,20 ± 0,19	3,50 ± 0,17	2,46 ± 0,19	100
CT2	MS nền + 1,00 mg/l α -NAA	5,20 ± 0,20	4,60 ± 0,21	3,56 ± 0,24	100
CT3	MS nền + 1,50 mg/l α -NAA	5,00 ± 0,14	3,20 ± 0,26	4,10 ± 0,21	98
CT4	MS nền + 2,00 mg/l α -NAA	4,80 ± 0,20	2,80 ± 0,19	3,20 ± 0,15	87
		<i>P</i> -value (ANOVA) > 0,05			

Ghi chú: Môi trường nền: MS + 30 g/l sucrose + 6,5 g/l agar (pH = 5,8)



Hình 6. Mẫu ngải đen giai đoạn ra rễ ở 6 TSKC

Kết quả nghiên cứu cho thấy, trong điều kiện nuôi cấy *in vitro*, chồi ngải đen trong giai đoạn nhân nhanh ở tất cả các công thức đều có hình thành rễ. Điều này cũng được ghi nhận trong nghiên cứu khác trên cây địa liền thuộc họ gừng [18]. Sự hình thành rễ trong quá trình nhân chồi cây cho thấy, tiềm năng không cần giai đoạn nuôi

cấy bổ sung các chất điều hòa sinh trưởng thuộc nhóm auxin để tạo cây hoàn chỉnh.

3.4. Huấn luyện cây con và ra cây ngoài vườn ươm

Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của thời gian huấn luyện cây con trước khi ra cây được thể hiện ở bảng 5.

Bảng 5. Ảnh hưởng của thời gian huấn luyện cây con trước khi ra ngoài vườn ươm đến tỷ lệ sống và chất lượng cây *in vitro*

Công thức	Tỷ lệ sống (%)	Xuất hiện rễ mới sau (ngày)	Chiều cao cây (cm)	Đường kính cây (mm)	Tỷ lệ cây con không đủ tiêu chuẩn (%)
CT1 (Đối chứng)	58,42	12	4,87	2,57	22,4
CT2	65,31	12	6,23	3,04	18,1
CT3	74,46	10	6,31	3,68	11,6
CT4	82,52	8	7,25	4,57	5,2

Kết quả tổng hợp cho thấy, CT4 có tỷ lệ cây sống cao nhất, đạt 82,52%, vượt trội so với CT1 (Đối chứng), CT2 và CT3. Thời gian xuất hiện rễ mới đầu tiên ở CT4 cũng nhanh nhất, chỉ sau 8

ngày. Bên cạnh đó, cây ở CT4 có kích thước lớn nhất về cả đường kính và chiều cao, đồng thời có tỷ lệ nhiễm bệnh thấp nhất, trung bình chỉ 5,2%, so với mức từ 11,6 - 22,4% ở các công thức còn lại.

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

Công thức	Thành phần giá thể	Chiều cao cây (cm)	Tỷ lệ sống (%)	Chất lượng cây con
CT1	Đất	19,24	72,22	Lá xanh nhạt, cây sinh trưởng bình thường
CT2	Đất: vụn xơ dừa: trấu hun (2: 1: 1)	33,35	95,78	Lá xanh đậm, cây sinh trưởng tốt
CT3	Cát sạch	10,45	84,67	Lá xanh nhạt, cây sinh trưởng bình thường

Tỷ lệ sống của cây con trồng trên các công thức giá thể khác nhau dao động từ 72,2 - 95,78%. Đáng chú ý nhất, CT2 có thành phần giá thể (gồm đất, vụn xơ dừa và trấu hun với tỷ lệ 2: 1: 1) cho tỷ lệ cây sống và chiều cao cây trung bình cao nhất lần lượt là 95,78% và 33,35 cm. Lá cây có màu xanh đậm và khỏe mạnh, thể hiện sự sinh trưởng tốt. Điều này có thể là do vụn xơ dừa và trấu hun tạo độ thông thoáng, tạo điều kiện thuận lợi cho cây con thích nghi và phát triển trong giai đoạn đầu tại vườn ươm. Theo Nguyễn Thúy Diễm (2017)[12], giá thể lựa chọn là đất và mụn dừa phối trộn với tỷ lệ 1: 1 cho tỷ lệ sống đối với cây con *in vitro* 100%, chiều cao cây đạt 42,2 cm (sau khi trồng 4 tuần). Tuy nhiên, ở nghiên cứu này, giá thể được lựa chọn là đất: xơ dừa: trấu hun, với tỷ lệ 2: 1: 1 tỷ lệ sống cũng khá cao, đạt 95,78%, chiều cao cây đạt 33,35 cm (sau khi trồng 3 tuần). Điều này cho

thấy, thời điểm theo dõi khác nhau cho kết quả về chiều cao chênh lệch nhau, tuy nhiên tỷ lệ sống của 2 loại giá thể chênh lệch nhau không quá lớn. Vì vậy, giá thể đất: xơ dừa: trấu hun, với tỷ lệ 2: 1: 1 vẫn được xem là lựa chọn phù hợp để trồng cây con ngải đen *in vitro* tại vườn ươm.

4. KẾT LUẬN

Sử dụng mầm của củ ngải đen già hoặc chồi mới hình thành từ đoạn thân để làm vật liệu khởi đầu, được xử lý bằng HgCl₂ 0,1% trong thời gian 15 phút để đạt hiệu quả tạo mẫu sạch cao nhất, với tỷ lệ đạt 82,2% sau 10 ngày nuôi cấy. Môi trường nhân nhanh hiệu quả: MS + inositol 100 mg/l + đường 30 g/l + agar 5,2 g/l, pH 5,6 - 5,8 + 3,0 mg BA/l cho hệ số nhân chồi đạt 4,5 lần và chiều cao chồi đạt 5,82 cm. Môi trường MS + 0,5 - 1 mg/l α-NAA là phù hợp cho ra rễ *in vitro* chồi ngải đen. Huấn luyện cây con bằng cách để ở hành lang thoáng

mát, tránh ánh sáng trực tiếp trong 3 ngày. Sau đó, cây được chuyển ra nhà lưới, mở nắp bình 3 trong ngày trước khi ươm trồng. Quy trình này giúp rễ xuất hiện sớm (sau 8 ngày) và tỷ lệ sống đạt 82,52. Giá thể phù hợp để trồng cây ngải đen *in vitro* tại vườn ươm là hỗn hợp đất, vụn xơ dừa và trấu hun, hoặc chỉ gồm đất và vụn xơ dừa.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Hashiguchi Akiko, San Thawtar May, Duangsodsri Teerarat, Kusano Miyako, Watanabe Kazuo (2022). Biofunctional properties and plant physiology of *Kaempferia* spp.: Status and trends. *Journal of Functional Foods*, 92, 105029.
2. Rujjanawate, C Kanjanapothi, D Amornlerdpison, D Pojanagaroon. (2005). Anti - gastric ulcer effect of *Kaempferia parviflora*. *Journal of ethnopharmacology*, 102(1), 120 - 122.
3. Tewtrakul, Supinya Subhadhirasakul, Sanan Kummee, Sopa. (2008). Anti-allergic activity of compounds from *Kaempferia parviflora*. *Journal of ethnopharmacology* 116(1), 191 - 193.
4. Kobayashi, Shoko Kato, Taro Azuma, Toshiaki Kikuzaki, Hiroe Abe, Keiko. (2015). Anti - allergenic activity of polymethoxyflavones from *Kaempferia parviflora*. *Journal of functional foods*, 13, 100 - 107.
5. Paramee, Paramee, Suthasinee Sookkhee, Siriwoot Sakonwasun, Choompone Na Takuathung, Mingkwan Mungkornasawakul, Pitchaya Nimlamool, Wutigri Potikanond, Saranyapin. (2018). Anti - cancer effects of *Kaempferia parviflora* on ovarian cancer SKOV3 cells. *BMC complementary alternative medicine*, 18, 1 - 13.
6. Potikanond, Saranyapin Sookkhee, Siriwoot Na Takuathung, Mingkwan Mungkornasawakul, Pitchaya Wikan, Nitwara Smith, Duncan R Nimlamool, Wutigri (2017). *Kaempferia parviflora* extract exhibits anti - cancer activity against HeLa cervical cancer cells. *Frontiers in Pharmacology*, 8, 630.
7. Tewtrakul, Supinya Subhadhirasakul, Sanan Karalai, Chatchanok Ponglimanont, Chanita Cheenpracha, Sarot (2009). Anti - inflammatory effects of compounds from *Kaempferia parviflora* and *Boesenbergia pandurata*. *J Food Chemistry*, 115(2), 534 - 538.
8. Yoshino, Yoshino, Susumu Awa, Riyo Miyake, Yasuo Fukuhara, Ikuo Sato, Hisao Ashino, Toyotada Tomita, Shinpei Kuwahara, Hiroshige. (2018). Daily intake of *Kaempferia parviflora* extract decreases abdominal fat in overweight and preobese subjects: A randomized, double-blind, placebo - controlled clinical study. *Diabetes, Metabolic Syndrome*, 11, 447 - 458.
9. Khairudin, Khairudin, Nur Adilla Haid, Zainol Hakimian, Mansor. (2020). *In vitro* shoot and root induction of *Kaempferia parviflora* (Zingiberaceae) rhizome using 6-benzylaminopurine. *Journal of Tropical Plant Physiology*, 12(2), 23 - 32.
10. Park, Han - Yong Kim, Kyung - Su Ak, Gunes Zengin, Gokhan Cziaky, Zoltán Jekő, József Adaikalam, Kathalingam Song, Kihwan Kim, Doo - Hwan Sivanesan, Iyyakkannu (2021). Establishment of a rapid micropropagation system for *Kaempferia parviflora* Wall. Ex Baker: Phytochemical analysis of leaf extracts and evaluation of biological activities. *Plants*, 10(4), 698.
11. Prathanturarug, S., T. Apichartbuta, W. Chuakul and Saralamp (2007). Mass propagation of *Kaempferia parviflora* Wall. ex Baker by *in vitro* regeneration. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 82(2), 179 - 183.
12. 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(4), 1 - 12.
13. Šmeringai, Ján Schrupfová, Petra Procházková Pernisová, Markéta. (2023). Cytokinins-regulators of de novo shoot organogenesis. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1239133.
14. Pasternak, T. P. and D. J. P. Steinmacher. (2024). Plant growth regulation in cell and tissue culture *in vitro*. *Plants (Basel)*, 13(2): 327. Doi: 10.3390/plants13020327.

15. Labrooy, Catherine Abdullah, Thohirah Lee Stanslas, Johnson. (2020). Influence of N6-benzyladenine and sucrose on *in vitro* direct regeneration and microrhizome induction of *Kaempferia parviflora* Wall. ex Baker, an important ethnomedicinal herb of Asia. *Tropical Life Sciences Research*, 31(1), 123.

16. Paul Overoorde, Hidehiro Fukaki and Tom Beeckman. (2010). Auxin control of root development. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(6), a001537.

17. Jie Yu, Wu Liu, Jie Liu, Peng Qin, Lin Xu (2017). Auxin control of root organogenesis from callus in tissue culture. *Frontiers*, 8, 1385.

18. Đinh Trường Sơn, Chu Đình Thực, Trần Văn Hải, Phạm Hồng Hiển, Nguyễn Thanh Hải, Phạm Thị Thu Hằng, Nguyễn Thị Lâm Hải, Đặng Thị Thanh Tâm (2021). Ảnh hưởng của các chất điều hòa sinh trưởng trong nhân giống *in vitro* cây địa liền (*Kaempferia galanga* L.). *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*, 19(8): 1097 - 1103.

RESEARCH ON *IN VITRO* PROPAGATION OF BLACK GINGER

(*Kaempferia parviflora* Wall. Ex Baker)

Dao Thuy Duong¹, Nguyen Thi Thu¹, Chu Huy Tuong¹,
Phan Thi Khanh Linh¹, Pham Hong Nhung¹, Nguyen Tien Dat¹, Le Duc Thang¹

¹*Institute of Regional Research and Development*

Summary

This study aims to determine the initial material and the effect of growth regulators on the micropropagation process of black ginger (*Kaempferia parviflora*) using tissue culture technique. The results showed that the suitable initial material was obtained from the buds of mature black ginger rhizomes or newly formed shoots from stem of the black ginger plant, which were sterilized with a 0.1% HgCl₂ solution for 15 minutes. The MS medium supplemented with 100 mg/L inositol, 30 g/L sucrose, 5.2 g/L agar, pH 5.6 - 5.8 and 3.0 mg/L BA was optimal for shoot multiplication, producing robust shoots with a multiplication rate of 4.5 and a height of 5.82 cm after 6 weeks of culture. Acclimatization involved placing culture bottles in a corridor for 3 days, then opening the lids and transferring to a net house for another 3 days before washing and planting, which resulted in a high survival rate and rapid root emergence within 8 days. A substrate mixture of soil, coconut coir and rice husk charcoal (2: 1: 1) was suitable for planting *in vitro* plantlets in the nursery, achieving a survival rate of 95.78% and an average plant height of 13.35 cm after 3 weeks.

Keywords: *In vitro*, *Kaempferia parviflora*, micropropagation.

Ngày nhận bài: 22/7/2024

Ngày chuyển phản biện: 12/8/2024

Ngày thông qua phản biện: 20/8/2024

Ngày duyệt đăng: 9/12/2024