An Giang University Journal of Science – 2017, Vol. 16 (4), 1 – 12

Tạp chí Khoa học Trường Đại học An Giang
ISSN 0866 - 8086

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

Nguyễn Thi Thúy Diễm[1]
[1]*Trường Đại học An Giang*

Thông tin chung:
Ngày nhận bài: 03/01/2017
Ngày nhận kết quả bình duyệt: 16/02/2017
Ngày chấp nhận đăng: 08/2017

Title:
Effects of plant growth regulators on shoot regeneration and rooting for nursing of in vitro plants of Black Ginger (Kaempferia parviflora)

Keywords:
Kaempferia parviflora, shoot proliferation, in vitro, nursing

Từ khóa:
Gừng đen, nhân chồi, nuôi cấy mô, thuần dưỡng

ABSTRACT

The study was conducted to establish a micro-propagation process of black ginger (Kaempferia parviflora). Some experiments were carried out over the three stages, including multiplication of shoots, rooting, and domestication of seedlings. The findings showed that shoots were multiplied on MS medium supplemented by 1.5 mg/L BA and 0,5 mg/L NAA, reaching 4.2 shoots/sample after 8 weeks. The optimal medium for in vitro rooting was MS medium containing 1.0 mg/L NAA or 1.5 mg/L NAA that could lead to 100% of rooting, with a mean of 19.71 – 20.57 roots/sample and 2.71 – 2.86 leaf/sample after 6 weeks. Nursing black ginger by shoot proliferation together with coconut coir soil mixture (1:1) has pushed the process to achieve the best results.

TÓM TẮT

Nghiên cứu này được thực hiện nhằm mục đích thiết lập quy trình vi nhân giống cây gừng đen (Kaempferia parviflora). Các thí nghiệm được thực hiện với giai đoạn: nhân chồi, tạo cây hoàn chỉnh và thuần dưỡng cây con. Kết quả cho thấy, chồi cây gừng đen nhân nhanh trong môi trường MS bổ sung 1,5 mg/L BA kết hợp 0,5 mg/L TDZ đạt 4,2 chồi/mẫu cấy sau 8 tuần nuôi cấy. Môi trường ra rễ thích hợp nhất là môi trường MS có bổ sung 1,0 mg/L NAA hoặc 1,5 mg/L NAA, cho tỷ lệ chồi ra rễ đạt 100%, 19,71 – 20,57 rễ/mẫu cấy, 2,71 – 2,86 lá/mẫu cấy sau 6 tuần nuôi cấy. Thuần dưỡng cây gừng đen nuôi cấy mô với giá thể đất kết hợp mụn dừa (1:1) đạt kết quả tốt nhất.

1. GIỚI THIỆU

Gừng đen (*Kaempferia parviflora)* còn được gọi là ngải đen, sâm thái, địa liền đen thuộc họ gừng (Zingiberaceae). Đây là một trong những loài cây thuốc quý, có trong kế hoạch "Triển khai thực hiện quy hoạch bảo tồn và phát triển cây dược liệu ứng dụng công nghệ cao tỉnh An Giang năm 2015 – 2016" căn cứ theo Quyết định số 1434/QĐ-UBND ngày 22/07/2015 (Uỷ ban Nhân dân tỉnh An Giang, 2015).

Gừng đen đã được sử dụng như một loại thuốc dân gian có tác dụng như: kích thích tiêu hóa, cải thiện lưu lượng máu và tăng cường sức khỏe. Các chiết xuất hoạt chất sinh học trong củ gừng đen có tác dụng kháng khuẩn rất mạnh giúp điều trị bệnh dị ứng (Tewtrakul và cs., 2007), chống loét dạ dày (Rujjanawate và cs., 2005), chống viêm (Panthong và cs., 1989), kháng ký sinh trùng sốt rét và kháng nấm (Yenjai và cs., 2004),... Ngoài ra, theo Trisomboon (2009), củ gừng đen còn được xem như là nhân sâm Thái, có khả năng tăng cường sinh lực, tăng mật độ tinh trùng và tăng cường sức

đề kháng của cơ thể đối với stress, làm giảm triglycerides, ngăn ngừa bệnh tiểu đường.

Trên thế giới, cây gừng đen vẫn chưa được trồng với quy mô lớn và chưa có nhiều nghiên cứu về nuôi cấy mô. Dheeranupattana và cs., (2003) đã nghiên cứu về sự cảm ứng tạo chồi *Kaempferia parviflora in vitro,* kết quả số chồi thu được tương đối thấp, đạt 2,4 chồi/mẫu cấy. Alveno (2012) cũng tiến hành nhân giống *in vitro* cây *K. parviflora*, nhưng kết quả vẫn còn hạn chế. Ở Việt Nam chưa có công trình công bố kết quả nghiên cứu nuôi cấy *in vitro* cây gừng đen. Do đó, nghiên cứu này được thực hiện nhằm bước đầu xây dựng quy trình nhân giống *in vitro* cây gừng đen và tạo ra số lượng cây giống lớn, sạch bệnh, đồng đều phục vụ cho sản xuất.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Phương tiện

2.1.1 Địa điểm và thời gian thực hiện

Thí nghiệm được thực hiện tại phòng thí nghiệm nuôi cấy mô của Bộ môn Khoa học Cây trồng, Khoa Nông nghiệp & Tài nguyên Thiên nhiên, Trường Đại học An Giang, từ tháng 11 năm 2015 đến tháng 11 năm 2016.

2.1.2 Nguyên vật liệu

Đối tượng nghiên cứu là củ gừng đen (*Kaempferia parviflora*) được thu thập tại Hội Đông y huyện Tịnh Biên, An Giang và được đem về ươm tại khu thực nghiệm, Khoa Nông Nghiệp và Tài nguyên Thiên nhiên, Trường Đại học An Giang.

(A) **(B)**

Hình 1. (A) Cây gừng đen; (B) Chồi non của cây gừng đen được ươm từ củ

Chuẩn bị vật liệu nghiên cứu: Chọn củ gừng đen đã già, không bị nhiễm bệnh. Xử lý củ với thuốc trừ bệnh Antracol 70WP trong 120 phút. Sau đó, ủ củ trong tro trấu đã được xử lý bệnh. Thời gian ủ khoảng 20 ngày.

Tạo nguồn nguyên liệu cho các thí nghiệm: thu hoạch các chồi mầm được ươm từ củ gừng đen, sau đó làm sạch bề mặt mẫu cấy bằng vòi nước chảy mạnh để loại bỏ tro trấu bám vào. Chồi được ngâm trong nước xà phòng loãng 15 phút; rồi rửa sạch dưới vòi nước chảy trong 15 phút. Các chồi này sẽ được ngâm trong dung dịch $Ca(OCl)_2$ 20% trong 15 phút, rửa sạch lại mẫu 3 lần với nước cất vô trùng. Các chồi sau khi được khử trùng tách bỏ các lớp bẹ lá, các vảy còn bao quanh củ, tách lấy đỉnh chồi và cấy vào các keo chứa môi trường MS không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng.

2.1.3 Môi trường và điều kiện nuôi cấy

Môi trường nền là môi trường MS (Murashige & Skoog, 1962) có thêm agar (8 g/L), đường sucrose

(30 g/L), agar (8 g/L), nước dừa tươi (100 mL/L), chất điều hoà sinh trưởng (CĐHST) như BA (loại chứa 99% hoạt chất của Merck), TDZ (loại chứa 99% hoạt chất của Sigma - Aldrich), 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. pH môi trường là 5,7 - 5,8.

Điều kiện nuôi cấy: thời gian chiếu sáng 16 giờ/ngày, nhiệt độ 25 ^{0}C – 26 ^{0}C. Các cây con *in vitro* được chuyển ra vườn ươm trong điều kiện không quá 32 ^{0}C, ẩm độ trung bình 80% và sử dụng ánh sáng tự nhiên.

2.1.4 Chuẩn bị giá thể

Giá thể bao gồm đất thịt pha cát, tro trấu và mụn dừa, được xử lý với thuốc trừ nấm Dithane M - 45 80 WP. Tùy theo từng nghiệm thức mà phối trộn các loại giá thể với nhau theo tỷ lệ nhất định. Các giá thể trước khi tiến hành thí nghiệm cần:

- Đất: xử lý với vôi bột 10%
- Tro trấu: xả với nước sạch nhiều lần (4 lần).
- Mụn dừa được trộn với vôi bột 10% và ngâm trong 3 ngày, sau đó xả lại 3 lần bằng nước sạch.

2.2 Phương pháp nghiên cứu

2.2.1 Thí nghiệm 1: Ảnh hưởng của BA, TDZ và NAA đến sự nhân chồi gừng đen

Các chồi gừng đen *in vitro* được cắt bỏ rễ, lá, khoảng 15 mm cấy vào môi trường nền có bổ sung BA (0,5 - 3 mg/L) với TDZ (0,5 mg/L); BA hoặc TDZ (0,5 - 3 mg/L) phối hợp NAA (1,0 mg/L). Thí nghiệm được bố trí theo thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên, mỗi nghiệm thức lặp lại 5 lần, mỗi lần lặp lại là 2 keo tương đương với 2 mẫu cấy. Chỉ tiêu theo dõi: Thời gian xuất hiện chồi (ngày), số chồi/mẫu, số rễ/mẫu, số lá/mẫu. Thời gian lấy chỉ tiêu 2, 4, 6 và 8 tuần sau khi cấy (TSKC).

2.2.2 Thí nghiệm 2: Ảnh hưởng của NAA đến sự hình thành rễ của cây gừng đen

Các chồi gừng đen *in vitro* (20 – 25 mm) được cấy trên môi trường MS có 30 g/L đường, 8 g/L agar, 0,5 g/L than hoạt tính và bổ sung NAA (0,5 – 3 mg/L). Thí nghiệm được bố trí theo thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên, mỗi nghiệm thức lặp lại 5 lần, mỗi lần lặp lại là 2 keo tương đương với 2 mẫu cấy. Chỉ tiêu theo dõi: Thời gian xuất hiện rễ (ngày), tỷ lệ chồi ra rễ (%), số rễ/mẫu cấy, số lá/mẫu cấy. Thời gian lấy chỉ tiêu 1, 2, 3, 4, 5 và 6 TSKC.

2.2.3 Thí nghiệm 3: Ảnh hưởng của các loại giá thể lên sự sinh trưởng của cây gừng đen in vitro ở giai đoạn vườn ươm.

Các cây con *in vitro* tái sinh hoàn chỉnh (đạt chiều cao trung bình từ 60 - 65 mm, có từ 2 - 3 lá) được huấn luyện thích nghi bằng cách chuyển bình nuôi cấy ra vườn ươm trong khoảng 7 ngày. Sau đó, lấy cây ra khỏi môi trường, rửa sạch agar và trồng trực tiếp trên giá thể đất + tro trấu (1:1), đất + tro trấu + mụn dừa (1:1:1), mụn dừa + đất (1:1), mụn dừa + tro trấu (1:1). Thí nghiệm được bố trí theo thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên, 1 nhân tố với 4 nghiệm thức, 5 lần lặp lại, mỗi lần lặp lại quan sát 5 cây. Chỉ tiêu theo dõi: Tỷ lệ cây sống (%), biến động về chiều cao và số lá/cây (giá trị sau cùng – giá trị ban đầu), đặc điểm của cây,... Thời gian lấy chỉ tiêu: 4 tuần sau khi trồng.

2.3 Phân tích dữ liệu

Các số liệu phân tích được nhập vào máy và dùng phần mềm Excel để xử lý số liệu. Phân tích thống kê các số liệu bằng phần mềm SPSS phiên bản 16.0 và dùng phép thử Duncan để so sánh sự khác biệt giữa các nghiệm thức.

3. Kết quả và thảo luận

3.1 Ảnh hưởng của BA, TDZ, NAA lên quá trình nhân chồi gừng đen

3.1.1 Sự gia tăng số chồi gừng đen

Kết quả thu được ở Bảng 1 cho thấy, vào thời điểm 10 ngày sau khi cấy, tất cả các nghiệm thức đều xuất hiện chồi. Thời gian hình thành chồi sớm nhất khi các chồi được nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung BA kết hợp TDZ (vào ngày thứ 5 và 6 sau khi cấy). Số chồi thu được ở thời điểm 2, 4, 6 và 8 TSKC giữa các nghiệm thức có sự gia tăng và khác biệt có ý nghĩa thống kê.

Bảng 1. Hiệu quả của BA, TDZ, NAA lên sự gia tăng số chồi ở 2, 4, 6 và 8 tuần sau khi cấy

Nồng độ (mg/L)			Thời gian xuất hiện chồi (ngày)	Số chồi/mẫu cấy			
BA	TDZ	NAA		2 TSKC	4 TSKC	6 TSKC	8 TSKC
0	0	0	10	1,0 d	1,0 e	1,0 e	1,0 f
0,5	0,5	0	6	1,4 cd	1,6 cde	2,0 bcde	2,0 cdef
1,0	0,5	0	6	2,0 bc	2,4 abc	2,6 abc	3,0 bc
1,5	0,5	0	5	2,8 a	3,0 ab	3,4 a	4,2 a
2,0	0,5	0	5	1,4 cd	2,0 bcde	2,6 abc	3,0 bc
2,5	0,5	0	5	2,4 ab	3,2 a	3,4 a	3,6 ab
3,0	0,5	0	5	1,4 cd	1,8 cde	2,8 ab	2,8 bcd
0,5	0	1,0	7	1,6 bcd	2,2 abcd	2,2 abcde	2,6 bcde
1,0	0	1,0	9	1,6 bcd	2,2 abcd	2,4 abcd	2,6 bcde
1,5	0	1,0	7	1,4 cd	2,0 bcde	2,2 abcde	2,4 bcde
2,0	0	1,0	7	1,4 cd	1,6 cde	1,8 bcde	2,0 cdef
2,5	0	1,0	7	1,4 cd	2,0 bcde	2,4 abcd	2,8 bcd
3,0	0	1,0	7	1,0 d	1,6 cde	2,2 abcde	2,2 cdef
0	0,5	1,0	7	1,4 cd	1,8 cde	2,2 abcde	2,4 bcde
0	1,0	1,0	9	1,0 d	1,2 de	1,6 bcde	1,6 def
0	1,5	1,0	8	1,0 d	1,4 cde	1,8 bcde	1,8 cdef
0	2,0	1,0	9	1,2 cd	1,2 de	1,2 de	1,4 ef
0	2,5	1,0	7	1,0 d	1,2 de	1,6 bcde	1,6 def
0	3,0	1,0	7	1,4 cd	1,4 cde	1,4 cde	1,6 def

Chú thích: Các chữ cái khác nhau trên cùng một cột chỉ ra sự sai khác có ý nghĩa thống kê của trung bình mẫu với p < 0,05 (Duncan's test); TSKC = Tuần sau khi cấy; BA = 6-benzyl adenine; TDZ = Thidiazuron; NAA = Naphthalene acetic acid.

Khi bổ sung BA kết hợp NAA vào môi trường nuôi cấy có khả năng kích thích tạo chồi gừng đen. Hiệu quả tạo chồi của tổ hợp BA và NAA sau 4 tuần nuôi cấy đạt 2,2 chồi/mẫu cấy trên môi trường MS bổ sung 0,5 mg/L BA kết hợp 1,0 mg/L NAA. Đến 8 TSKC, số chồi thu được trên các môi trường có BA với NAA vẫn không tăng cao chỉ đạt 2,8 chồi/mẫu cấy trên môi trường 2,5 mg/L BA kết hợp 1,0 mg/L NAA. Theo các kết quả nghiên cứu trên đối tượng một số cây thuộc họ gừng như cây gừng (Huỳnh Trường Huê, 2009), cây *Hedychium coronarium* J. Koenig (Pritam Mohanty và cs., 2013), cây *Kaempferia galanga* (Anbazhagan và cs., 2015),... cho thấy việc kết hợp BA và NAA vào môi trường nuôi cấy ở nồng độ thích hợp sẽ kích thích sự phát sinh chồi và nhân chồi. Trong thí nghiệm này thì hiệu quả tạo chồi của tổ hợp BA với NAA còn thấp, có thể do môi trường nuôi cấy đã sử dụng NAA ở nồng độ cao (1,0 mg/L) nên gây ức chế hiệu quả tạo chồi của BA hoặc môi trường nuôi cấy ở các nghiệm thức này chưa đạt tỷ lệ BA/NAA thích hợp để có tỷ lệ nhân chồi cao.

Tương tự, trường hợp bổ sung TDZ với NAA vào môi trường nuôi cấy, không những số chồi không cao mà có xu hướng giảm khi tăng nồng độ TDZ từ 1,0 – 3,0 mg/L. Số chồi cao nhất trong tổ hợp TDZ với NAA chỉ đạt 2,4 chồi/mẫu cấy trên môi trường có 0,5 mg/L TDZ kết hợp với 1,0 mg/L NAA. Có thể thấy rằng, nồng độ TDZ cao đã gây ức chế quá trình tái sinh chồi từ mẫu cấy của cây gừng đen. Điều này cũng phù hợp với nhận định của Khawar và cs. (2004), ở nồng độ TDZ thấp sẽ kích thích quá trình tái sinh chồi tốt hơn nồng độ cao.

Trên môi trường bổ sung TDZ kết hợp BA đã làm gia tăng số chồi gừng đen. Trong tổ hợp với 0,5 mg/L TDZ, khi tăng nồng độ BA từ 0,5 – 1,5 mg/L thì số chồi thu được tăng. Môi trường bổ sung 1,5 mg/L BA kết hợp 0,5 mg/L TDZ cho số chồi phát sinh nhiều nhất, đạt 4,2 chồi/mẫu cấy (Hình 1A). Khi tiếp tục tăng nồng độ BA lên 2,0 – 3,0 mg/L thì sự gia tăng số chồi có xu hướng giảm.

Qua kết quả thí nghiệm cho thấy, ở 8 TSKC, hiệu quả tạo chồi trên môi trường có bổ sung BA kết hợp với TDZ cao hơn môi trường bổ sung BA với NAA và TDZ với NAA. Khi bổ sung BA hoặc TDZ kết hợp 1,0 mg/L NAA vào môi trường nuôi cấy cho thấy không những số lượng chồi thu được không nhiều, mà các chồi được tạo thành trên những môi trường này sinh trưởng phát triển chậm và rất nhỏ. Đa số các chồi này không thể sử dụng làm vật liệu chuyển sang môi trường ra rễ tạo cây hoàn chỉnh. Trong khi đó chồi trên môi trường bổ sung BA và TDZ, sinh trưởng và phát triển tốt hơn, cây cao, mập, lá màu xanh đậm. Theo Zhang và cs. (2011), sự có mặt của TDZ và BA trong môi trường nuôi cấy có tác dụng thúc đẩy quá trình nhân chồi cây *Curcuma soloensis*, nhưng nếu bổ sung TDZ kết hợp với NAA thêm vào môi trường nuôi cấy cho thấy không cải thiện được số lượng chồi. Kết quả này cũng phù hợp với các kết quả nghiên cứu trên cây *Kaempferia marginata* của Saensouk và cs. (2016); cây gừng của Huỳnh Trường Huê và Nguyễn Thị Thúy Diễm (2013); cây tam thất gừng của Hoàng Kim Thành (2014), việc bổ sung TDZ kết hợp với BA vào môi trường nuôi cấy cho hiệu quả nhân chồi cao và chất lượng chồi tốt. Do đó, môi trường thích hợp để nhân chồi gừng đen là MS bổ sung 1,5 mg/l BA kết hợp 0,5 mg/l TDZ.

3.1.2 Sự gia tăng số lá của chồi gừng đen

Kết quả Bảng 2 cho thấy, sự gia tăng số lá ở các TSKC có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các nghiệm thức. Môi trường có 1,5 mg/L BA kết hợp 0,5 mg/L TDZ có khả năng tạo ra lá nhiều nhất so với các môi trường khác đạt 5,4 lá/mẫu cấy qua 8 TSKC.

Bảng 2. Hiệu quả của BA, TDZ, NAA lên sự gia tăng số lá ở 2, 4, 6 và 8 tuần sau khi cấy

Nồng độ (mg/L)			Số lá/mẫu cấy 2 TSKC	Số lá/mẫu cấy 4 TSKC	Số lá/mẫu cấy 6 TSKC	Số lá/mẫu cấy 8 TSKC
BA	TDZ	NAA				
0	0	0	1,0 abc	1,2 cd	1,6 cde	2,0 cdefg
0,5	0,5	0	1,2 ab	2,0 abc	2,4 abcde	3,4 bcd
1,0	0,5	0	1,0 abc	1,8 bcd	3,0 abc	3,0 bcdef
1,5	0,5	0	1,4 a	2,6 a	3,6 a	5,4 a
2,0	0,5	0	1,4 a	2, 0abc	3,0 abc	3,6 bc
2,5	0,5	0	1,0 abc	2,4 ab	2,8 abcd	3,4 bcd
3,0	0,5	0	1,0 abc	1,8 bcd	3,2 ab	4,0 ab
0,5	0	1,0	0,8 abcd	1,4 cd	1,8 bcde	3,2 bcde
1,0	0	1,0	1,0 abc	1,6 cd	2,0 bcde	3,0 bcdef
1,5	0	1,0	1,2 ab	1,8 bcd	2,0 bcde	2,4 bcdefg
2,0	0	1,0	0,6 bcde	1,0 d	1,4 de	2,0 cdefg
2,5	0	1,0	0,8 abcd	1,4 cd	1,8 bcde	2,0 cdefg
3,0	0	1,0	0,0 e	1,0 d	1,2 e	1,8 defg
0	0,5	1,0	0,4 cde	1,0 d	1,0 e	1,4 fg

Nồng độ (mg/L)			Số lá/mẫu cấy 2 TSKC		Số lá/mẫu cấy 4 TSKC		Số lá/mẫu cấy 6 TSKC		Số lá/mẫu cấy 8 TSKC	
BA	TDZ	NAA								
0	1,0	1,0	0,2	de	1,0	d	1,2	e	1,6	efg
0	1,5	1,0	0,6	bcde	1,0	d	1,0	e	1,0	g
0	2,0	1,0	0,6	bcde	1,0	d	1,0	e	1,0	g
0	2,5	1,0	0,0	e	1,0	d	1,6	cde	1,6	efg
0	3,0	1,0	0,4	cde	1,0	d	1,2	e	1,4	fg

Chú thích: Các chữ cái khác nhau trên cùng một cột chỉ ra sự sai khác có ý nghĩa thống kê của trung bình mẫu với p < 0,05 (Duncan's test); TSKC = Tuần sau khi cấy; BA = 6-benzyl adenine; TDZ = Thidiazuron; NAA = Naphthalene acetic acid.

Qua kết quả ở các tuần nuôi cấy cho thấy, số lá ở hầu hết các môi trường BA kết hợp TDZ có khả năng tạo thành nhiều hơn so với môi trường có bổ sung BA với NAA, TDZ với NAA. Sự gia tăng số lá trên môi trường bổ sung TDZ kết hợp NAA cho kết quả thấp nhất trong 3 nhóm tổ hợp và thấp hơn so với môi trường không bổ sung CĐHST. Do đó, có thể thấy rằng, việc bổ sung TDZ và NAA vào môi trường nuôi cấy không làm gia tăng số lá trên chồi gừng đen.

Trong tổ hợp với 1,0 mg/L NAA khi tăng nồng độ BA từ 0,5 - 2,5 mg/L, số lá tạo thành có xu hướng giảm từ 3,2 lá xuống còn 2,0 lá. Khi tiếp tục tăng nồng độ BA lên 3,0 mg/L thì số lá có khuynh hướng tiếp tục giảm hơn so với nghiệm thức đối chứng. Điều này cho thấy, sự kết hợp BA và NAA ở nồng độ cao có biểu hiện ức chế sự gia tăng số lá ở cây gừng đen. Kết quả này cũng khá phù hợp với nghiên cứu trên cây gừng của Huỳnh Trường Huê (2009), khi sử dụng BA và NAA ở nồng độ cao (3 mg/L và 1 mg/L) cho thấy số lá tạo thành thấp hơn so với môi trường có 1 mg/L BA và 1 mg/L NAA. Theo Alveno (2012), sự gia tăng số lá của cây *Kaempferia parviflora* trên môi trường MS bổ sung BAP ở nồng độ 5 ppm thấp hơn so với môi trường bổ sung BAP ở nồng độ 1,25 ppm.

Như vậy, việc bổ sung tổ hợp BA hoặc TDZ kết hợp NAA thêm vào môi trường nuôi cấy không ảnh hưởng đến sự gia tăng số lá. Ngược lại, các chồi gừng đen được nuôi trên môi trường có bổ sung BA kết hợp TDZ có khả năng tạo số lá nhiều. Điều này cho thấy ảnh hưởng tích cực của BA và TDZ trong quá trình tạo lá.

3.1.3 Sự hình thành rễ của chồi gừng đen

Kết quả Bảng 3 cho thấy, số rễ/mẫu cấy ở các môi trường đều tăng theo thời gian và sự khác biệt giữa các nghiệm thức có ý nghĩa thống kê. Sau 8 tuần nuôi cấy, đa số chồi được nuôi trên các môi trường đều gia tăng số rễ, trừ môi trường bổ sung 2,5 mg/L TDZ với 1,0 mg/L NAA là không xuất hiện rễ. Môi trường bổ sung 1,5 mg/L BA với 0,5 mg/L TDZ cho số rễ nhiều nhất đạt 11,6 rễ/mẫu cấy. Sự hình thành rễ trên môi trường không bổ sung CĐHST có thể là do hàm lượng auxin nội sinh có trong mẫu cấy gây cảm ứng sự ra rễ. Kết quả này phù hợp với các nghiên cứu trên các cây họ gừng như cây sa nhân tím (Đặng Ngọc Phúc và cs., 2011), cây gừng (Huỳnh Trường Huê & Nguyễn Thị Thúy Diễm, 2013); cây riềng nếp (*Alpinia galanga*) (Nongmaithem và cs., 2014)... các chồi con có thể ra rễ khi được nuôi cấy trên môi trường không có CĐHST.

Bảng 3. Hiệu quả của BA, TDZ, NAA lên sự gia tăng số rễ ở 2, 4, 6 và 8 tuần sau khi cấy

Nồng độ (mg/L)			Số rễ/mẫu cấy 2 TSKC	Số rễ/mẫu cấy 4 TSKC	Số rễ/mẫu cấy 6 TSKC	Số rễ/mẫu cấy 8 TSKC
BA	**TDZ**	**NAA**				
0	0	0	1,4 bcd	2,2 cde	3,2 bcde	3,8 bcdef
0,5	0,5	0	3,6 a	6,2 ab	7,6 ab	10,8 ab
1,0	0,5	0	2,8 abc	3,8 abc	5,8 abc	8,8 abcd
1,5	0,5	0	3,0 ab	6,4 a	8,6 a	11,6 a
2,0	0,5	0	1,4 bcd	2,4 cde	3,4 bcde	4,8 abcdef
2,5	0,5	0	1,0 bcd	1,6 cde	3,8 bcde	6,2 abcdef
3,0	0,5	0	0,4 d	1,8 cde	4,6 abcde	8,0 abcde
0,5	0	1,0	0,0 d	2,2 cde	4,2 abcde	6,4 abcdef
1,0	0	1,0	1,8 abcd	3,4 bcd	5,6 abc	10,2 abc
1,5	0	1,0	0,8 cd	3,0 cde	5,0 abcd	9,8 abc
2,0	0	1,0	0,2 d	1,2 cde	2,8 bcde	3,2 cdef
2,5	0	1,0	0,8 cd	1,4 cde	2,6 cde	3,4 cdef
3,0	0	1,0	0,2 d	1,0 cde	3,0 bcde	3,6 cdef
0	0,5	1,0	0,2 d	0,6 de	1,6 cde	2,0 def
0	1,0	1,0	0,2 d	0,2 de	0,2 de	0,2 f
0	1,5	1,0	0,0 d	1,4 cde	1,6 cde	1,6 ef
0	2,0	1,0	0,2 d	0,4 de	0,6 de	0,8 f
0	2,5	1,0	0,0 d	0,0 e	0,0 e	0,0 f
0	3,0	1,0	0,0 d	0,0 e	0,4 de	0,4 f

Chú thích: Các chữ cái khác nhau trên cùng một cột chỉ ra sự sai khác có ý nghĩa thống kê của trung bình mẫu với $p < 0,05$ (Duncan's test); TSKC = Tuần sau khi cấy; BA = 6-benzyl adenine; TDZ = Thidiazuron; NAA = Naphthalene acetic acid.

Qua kết quả về sự hình thành rễ trên chồi gừng đen nhận thấy, các chồi được nuôi trên môi trường bổ sung BA kết hợp TDZ cho kết quả tốt nhất với bộ rễ to, khỏe và dài hơn so với các rễ hình thành trên môi trường BA hay TDZ kết hợp với NAA. Ở môi trường có bổ sung BA kết hợp với TDZ hoặc NAA thì khi tăng nồng độ BA từ 2 - 3,0 mg/L thì số rễ/mẫu cấy hình thành ít hơn so với các môi trường bổ sung BA ở nồng độ thấp hơn (0,5; 1,0; 1,5 mg/L). Kết quả này phù hợp với nghiên cứu trên cây gừng, khi sử dụng BA ở nồng độ cao (2,0 – 3,0 mg/L) kết hợp 1,0 mg/L NAA (Huỳnh Trường Huê, 2009) hay BA ở nồng độ 2,0; 2,5 mg/L kết hợp 0,5 mg/L TDZ (Huỳnh Trường Huê & Nguyễn Thị Thúy Diễm, 2013) có biểu hiện ức chế việc tạo rễ cây gừng.

Việc bổ sung TDZ ở nồng độ 1,0 - 3,0 mg/L vào môi trường nuôi cấy cho thấy số rễ giảm rõ rệt. Trên môi trường MS có bổ sung 2,5 mg/L TDZ với 1,0 mg/L NAA không thấy có sự xuất hiện rễ, trong khi đó ở môi trường MS có bổ sung TDZ ở nồng độ 3,0 mg/L với 1,0 mg/L NAA lại có sự cảm ứng rễ ở 6 TSKC nhưng rễ hình thành rất ít và nhỏ chỉ đạt 0,4 rễ/mẫu cấy, có thể do việc thêm TDZ ở nồng độ cao đã làm giảm hoạt tính của NAA hay gây ức chế sự tạo rễ trên chồi gừng đen.

Kết quả nghiên cứu này cho thấy cũng phù hợp với nhận định của Mutui và cs. (2005); Suci Rahayu và Widiati Hadi Adil (2012), khi sử dụng môi trường có bổ sung TDZ không chỉ ảnh hưởng về số lượng, sự tăng trưởng của rễ mà còn có vai trò ức chế sự hình thành rễ.

Tóm lại, qua kết quả khảo sát ảnh hưởng của BA, TDZ, NAA lên quá trình tạo chồi cây gừng đen trong 8 tuần nuôi cấy cho thấy, môi trường có bổ sung tổ hợp BA với TDZ đạt hiệu quả tạo chồi cao hơn so với các môi trường bổ sung BA kết hợp NAA và TDZ kết hợp NAA. Và để tạo ra các chồi đảm bảo cả về số lượng và chất lượng thì sử dụng môi trường MS bổ sung 1,5 mg/L BA kết hợp 0,5 mg/L TDZ là hiệu quả nhất.

3.2 Ảnh hưởng của NAA lên quá trình nhân chồi gừng đen

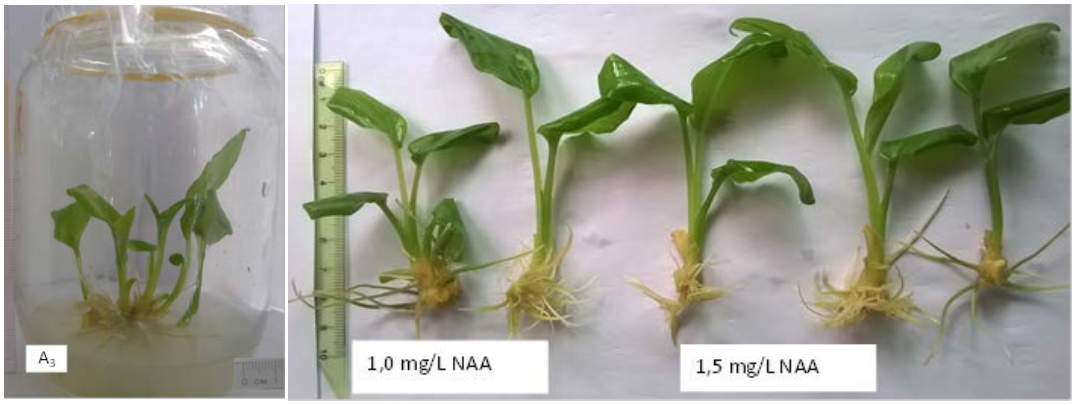
Kết quả ở Bảng 4 cho thấy ở thời điểm 11 ngày sau khi cấy, các mẫu cấy đều có sự phản ứng và rễ xuất hiện ở tất cả các môi trường nuôi cấy. Vào thời điểm 4 TSKC, số rễ và số lá ở các nghiệm thức có sự gia tăng và không khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các nghiệm thức. Ở giai đoạn 6 TSKC, số rễ thu được ở môi trường MS bổ sung NAA nồng độ 1,0 và 1,5 mg/L cao nhất (đạt 19,71 - 20,57 rễ với 2,71 - 2,86 lá) (Hình 1B). Rễ có nhiều lông hút, mập, màu xanh. Những cây *in vitro* này khi chuyển ra vườn ươm có khả năng sống rất cao. Kết quả này cũng tương tự với kết quả nghiên cứu của Mongkolchaipak và cs. (2006), môi trường bổ sung 1,0 mg/L NAA kích thích chồi *K. parviflora* tạo rễ tốt.

Bảng 4. Hiệu quả của NAA lên khả năng tạo rễ thời điểm 4 và 6 tuần sau khi cấy

NAA (mg/L)	Thời gian xuất hiện rễ (ngày)	4 TSKC		6 TSKC	
		Số rễ	Số lá	Số rễ	Số lá
0	11	9,71	1,71	13,43 b	2,0 c
0,5	10	8,14	2,00	16,29 ab	2,43 bc
1,0	9	12,00	2,00	20,57 a	2,71 ab
1,5	9	9,43	2,57	19,71 a	2,86 a
2,0	9	9,29	1,86	14,00 b	2,14 c
2,5	9	9,00	1,29	13,86 b	2,00 c
3,0	9	9,18	1,86	12,29 b	2,14 c

Chú thích: Các chữ cái khác nhau trên cùng một cột chỉ ra sự sai khác có ý nghĩa thống kê của trung bình mẫu với p < 0,05 (Duncan's test); TSKC = Tuần sau khi cấy; NAA = Naphthalene acetic acid.

Qua kết quả trên nhận thấy, ở 6 TSKC, khi tăng nồng độ NAA từ 0,5 mg/L lên 1,5 mg/L thì số lượng rễ và số lá tăng lên cao, khi tăng tiếp nồng độ NAA lên 2,0 mg/L đến 3,0 mg/L số lượng rễ và số lá có xu hướng giảm. Khi sử dụng NAA ở nồng độ cao rễ bị ức chế nên tăng trưởng rất chậm (Rout và cs., 2001). Ngoài ra, các chồi gừng đen *in vitro* vẫn có thể ra rễ trên môi trường MS không có bổ sung NAA, nhưng đa số rễ cảm ứng trên môi trường này phát triển yếu và mảnh hơn so với rễ cảm ứng trên môi trường có bổ sung NAA. Những cây có bộ rễ như thế khi chuyển ra đất dễ bị chết.



(A) **(B)**

Hình 2. (A) Chồi gừng đen phát triển sau 8 tuần nuôi cấy trên các môi trường MS có bổ sung 1,5 mg/L BA kết hợp 0,5 mg/L TDZ; (B) Chồi gừng đen hoàn chỉnh trên môi trường MS có bổ sung 1,0 và 1,5 mg/L NAA ở 6 TSKC

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

Bảng 5. Hiệu quả của các loại giá thể đến khả năng sinh trưởng và phát triển của cây gừng đen in vitro ngoài vườn ươm sau khi trồng 4 tuần

Nghiệm thức	Tỷ lệ sống (%)	Chiều cao cây (cm)	Số lá gia tăng/cây
Đất + tro trấu (1:1)	95	32,4	1,1 b
Đất + tro trấu + mụn dừa (1:1: 1)	90	36,7	1,4 a
Mụn dừa + đất (1:1)	100	42,2	1,6 a
Mụn dừa + tro trấu (1:1)	95	37,0	1,5 a

Chú thích: Các chữ cái khác nhau trên cùng một cột chỉ ra sự sai khác có ý nghĩa thống kê của trung bình mẫu với p < 0,05 (Duncan's test).

Cây con với bộ rễ hoàn chỉnh được ươm trên 4 loại giá thể khác nhau. Kết quả ở Bảng 5 cho thấy, sau 4 tuần trồng tỷ lệ cây sống sót trên tất cả các giá thể khá cao đạt 90% - 100%. Điều này cho thấy, cây gừng đen có khả năng thích nghi cao với điều kiện vườn ươm. Trong 4 loại giá thể trồng thử nghiệm, giá thể mụn dừa kết hợp với đất (1:1) cho tỷ lệ sống cao nhất đạt 100%, cây cao, lá có màu xanh đậm, sinh trưởng và phát triển tốt (Hình 2). Khi trồng cây trên các loại giá thể có tro trấu thì tỷ lệ sống giảm. Đặc biệt, cây lại sinh trưởng chậm trên giá thể đất kết hợp với tro trấu tỉ lệ 1:1. Điều này có thể lý giải là do hàm lượng dinh dưỡng khoáng trong tro trấu cao nhưng chủ yếu là Kali. Vì vậy, giai đoạn đầu khi cây từ bình nuôi được đưa ra ngoài rễ còn yếu, rất nhạy cảm nên nồng độ muối (K^+) bên ngoài cao sẽ gây ngộ độc dẫn đết chết cây. Ngoài ra, có thể do giá thể đất và mụn dừa phối trộn với tỷ lệ 1:1 đã tạo độ tơi xốp, thông thoáng phù hợp với sự phát triển của bộ rễ cây gừng đen *in vitro*, khả năng giữ và thoát nước tốt, giúp hệ rễ cây phát triển mạnh, từ đó cây sinh trưởng và phát triển tốt.

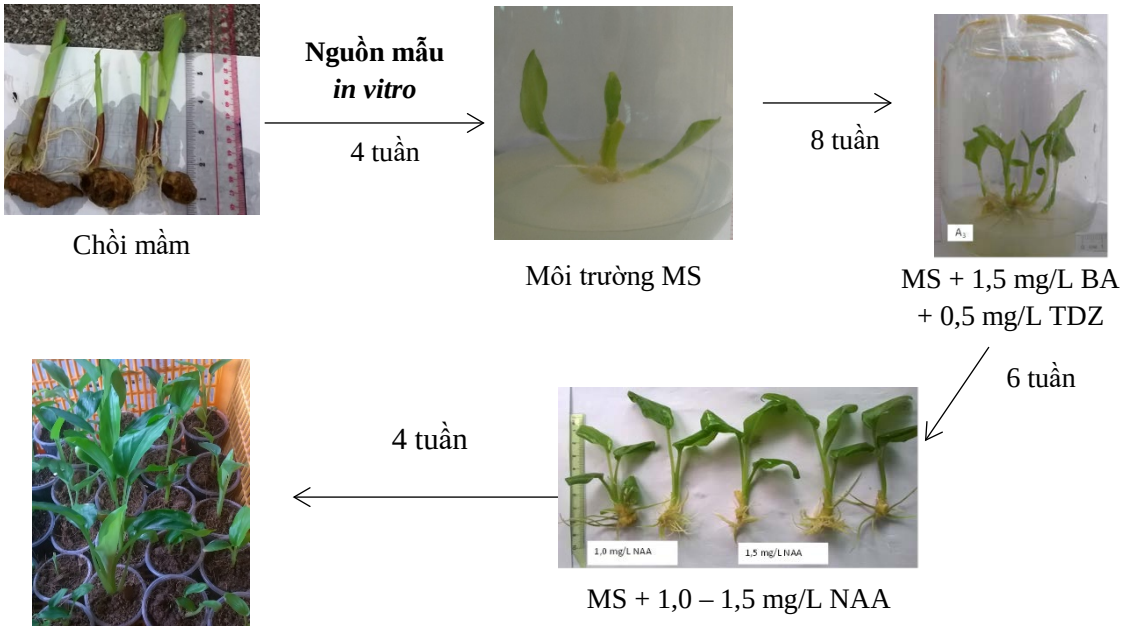
(A) **(B)**

Hình 3. Cây gừng đen in vitro phát triển ở vườn ươm sau 4 tuần trồng trên các loại giá thể: (A) mụn dừa: đất (1:1), (B) mụn dừa: tro trấu (1:1)

4. KẾT LUẬN

- Môi trường nhân chồi gừng đen tốt nhất là môi trường MS bổ sung 1,5 mg/L BA kết hợp 0,5 mg/L TDZ cho kết quả là 4,2 chồi sau 8 tuần nuôi cấy.
- Môi trường thích hợp để tạo rễ cho chồi gừng đen là MS bổ sung 1,0 mg/L hoặc 1,5 mg/L NAA.
- Giá thể thích hợp cho quá trình sinh trưởng của cây gừng đen ngoài vườn ươm là đất phối trộn với mụn dừa (1:1), đạt tỷ lệ cây sống 100%, cho chiều cao cây và số lá gia tăng tốt nhất (42,5 cm; 1,6 lá) sau 4 tuần trồng.

Quy trình nhân giống *in vitro* cây gừng đen có thể tóm tắt như sau:



TÀI LIỆU THAM KHẢO

Alveno Vitho. (2012). *Multiple in vitro shoot induction of K. parviflora wall. Ex. Baker*. (Unpublished thesis dissertation). Bogor Agricultural University, Indonesia.

Anbazhagan, M., Balachandran, B., Sudharson, S., & Arumugam K. (2015). *In vitro* propagation of *Kaempferia galanga* (L.) - An endangered medicinal plant. *Int J Curr Sci. 15S*, 63-69.

Dheeranupattana, S., Phoonchuen, N., Saengnil, K. & Paratasilpin, T. (2003). *In vitro propagation of Kaempferia parviflora Wall. ex Baker*. Paper presented at the meeting of the 29th Congress on Science and Technology of Thailand, Khon Kean University, Thailand.

Đặng Ngọc Phúc, Nguyễn Thanh Tùng, Dương Thị Thùy Châu, Trương Thị Bích Phượng. (2011). Nhân giống *in vitro* cây Sa nhân tím (*Amomum Longiligulare* T.L.Wu). *Tạp chí Công nghệ Sinh học. 9* (4A), 689 - 698.

Hoàng Kim Thành. (2014). *Nghiên cứu nhân giống tam thất gừng (Stahlianthus thorelii Gagnep) bằng nuôi cấy in vitro*. **(**Luận văn tốt nghiệp ngành Công nghệ Sinh học không xuất bản). Trường Đại học Nông lâm Thái Nguyên, Thái Nguyên, Việt Nam.

Huỳnh Trường Huê. (2009). *Cải tiến qui trình nhân giống gừng (Zingiber officinale Rosc.) bằng phương pháp nuôi cấy mô*. (Đề tài nghiên cứu khoa học cấp trường không xuất bản). Trường Đại học An Giang, An Giang, Việt Nam.

Huỳnh Trường Huê & Nguyễn Thị Thúy Diễm. (2009). *Ảnh hưởng của các chất điều hòa sinh trưởng và nồng độ đường lên quá trình nhân nhanh chồi gừng in vitro*. (Đề tài nghiên cứu khoa học cấp trường không xuất bản). Trường Đại học An Giang, An Giang, Việt Nam.

Khawar, M. K., Sancak, C., Uranbey, S. & Ozcan, S. (2004). Effect of thidiazuron on shoot regeneration from different explants of Lentil (*Lens culinaris* Medik.) via organogenesis. *Turk. J. Bot. 28*, 421 - 426.

Mongkolchaipak, N. , Chansuwanit, N. & Suchantaboot, P. (2006). Plant tissue culture of *Kaempferia parviflora* Wall. ex Baker.

Bullentin of the Department of Medical Sciences. 48 (3), 145 – 155.

Mutui, T.M., Mibus H. & Serek, M. (2005). Effects of thidiazuron, ethylene, abscisic acid and dark storage on leaf yellowing and rooting of Pelargonium cuttings. *J. Of Hort. Science and Biotech*. *80*(5), 543 - 550.

Nongmaithem, M. S., Lukram, A. C., Yendrembam, P. D., Wahengbam, R. C. S. & Heigrujam, B. S. (2014). Micropropagation-an in vitro technique for the conservation of *Alpinia galanga*. *Advances in Applied Science Research. 5* (3), 259 - 263.

Panthong, A., Tassaneeyakul, W., Kanjanapothi, D., Tantiwachwuttikul, P., & Reutrakul, V. (1989). Anti-inflammatory activity of 5,7-dimethoxyflavone. *Planta Med. 55*, 133–136.

Pritam Mohanty, Shashikanta Behera, Swasti S. Swain, Durga P. Barik & Soumendra K. NaiK. (2013). Micropropagation of *Hedychium coronarium* J. Koenig through rhizome bud. *Physiology and Molecular Biology of Plants. 19* (4), 605 – 610.

Rout, G. R., Palai, S. K., Samantaray, S. & Das, 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.

Rujjanawate, C., Kanjanapothi, D., Amornlerdpison, D. & Pojanagaroon, S. (2005). Anti-gastric ulcer effect of *Kaempferia parviflora*. *J. Ethnopharmacol. 102*, 120 - 122.

Saensouk, P., Muangsan, N., Saensouk, S. & Sirinajun, P. (2016). In vitro propagation of *kaempferia marginata* Carey ex Roscoe, a native plant species to thailand. *The Journal of Animal & Plant Sciences. 26*(5), 1405 - 1410.

Suci Rahayu & Widiati Hadi Adil. (2012). The effect of BAP and thidiazuron on *in vitro* growth of java turmeric (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb). *Journal of Agricultural and Biological Science. 7* (10), 820 – 824.

Tewtrakul, S., Subhadhirasakul, S. & Kummee, S. (2007). Anti - Allergic Activity of Compounds from *Kaempferia parviflora*. *Journal of Ethnopharmacology*. 116, 191 – 1993. http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2007.10.042.

Trisomboon, H. (2009). *Kaempferia parviflora*: A Thai Herbal Plant, Neither Promote Reproductive Function Nor Increase Libido via Male Hormone. *Thai Journal of Physiological Sciences. 21*, 83 - 86.

Uỷ ban Nhân dân tỉnh An Giang. (2015). *Quyết định phê duyệt Kế hoạch triển khai thực hiện Quy hoạch bảo tồn và phát triển cây dược liệu ứng dụng công nghệ cao tỉnh An Giang năm 2015 – 2016* (số 1434/QĐ-UBND ngày 22/07/2015). An Giang: Uỷ ban Nhân dân tỉnh An Giang.

Yenjai, C., Prasanphen, K., Daodee, S., Wongpanich, V., & Kittakoop, P. (2004). Bioactive flavonoids from *Keampferia parviflora*. *Fitoterapia. 75*(1), 89 - 92.

Zhang, S., Liu, N., Sheng, A., Ma, G., & Wu, G. (2011). Direct and callus-mediated regeneration of *Curcuma soloensis* valeton (Zingiberaceae) and *ex vitro* performance of regenerated plants. *Sci. Horti. 130*, 899 - 905.