

## NGHIÊN CỨU NHÂN GIỐNG *IN VITRO* LOÀI GỪNG ĐEN (*DISTICHOCHLAMYS CITREA*) BẢN ĐỊA

Phạm Thị Kim Hạnh, Trịnh Thùy Dương, Vũ Phương Linh, Lã Tuấn Nghĩa

Trung tâm Tài nguyên thực vật, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam

**Từ khóa:** Gừng đen  
(*Distichochlamys citrea*),  
nuôi cấy mô, *in vitro*,  
nhân giống

### TÓM TẮT

Gừng đen (*Distichochlamys citrea*) là một loài thực vật đặc hữu mới ở Việt Nam. Hiện nay, trong tự nhiên Gừng đen (*D. citrea*) được phân bố hẹp và số lượng ít. Tinh dầu được chiết xuất từ thân, rễ và lá với các hoạt chất hóa học như 1,8-cineole (30,7-43,7)%,  $\beta$ -citral (1,6-14)%,  $\alpha$ -citral (2,5- 20,9)% và neryl acetate (4,1-11,1)%,  $\alpha$ -pinene (1,8-4,5)%,  $\beta$ -pinene (2,8-7,0)%, D-limonene (1,2-3,3)%, Geraniol (4 , 0-5,9)%, Neryl acetate (4,1-11,1)%,... Hoạt chất trong Gừng đen rất tốt cho sức khỏe và có thể được sử dụng để làm dược liệu, mỹ phẩm, thực phẩm. Nhân giống Gừng đen *in vitro* hiệu quả bằng cách: Sau khi khử trùng, chồi được tái sinh trên môi trường (MS + 5g/l Agar + 30g đường + 100ml/l nước dừa + 1mg/l PVP + 2mg/l BAP + Kn 0,2 mg/l), chồi sau khi tái sinh được nhân lên trên môi trường: (MS + 5g/l Agar + 30g đường + 100ml/l nước dừa + 1mg/l BAP + 1g/l Casein + 0,2mg/lKn). Rễ được hình thành trên môi trường (MS + 30g đường + 100ml/l nước dừa + 0,5mg/l NAA). Cây trồng trong vườn ươm trên giá thể (mùn dừa: trấu hun: đất đồi sâu) tỷ lệ (2: 1: 1) và che 75% ánh sáng mặt trời. Sau khi trồng 10 ngày phun phân bón Grownmore (30N: 10P: 10K) nồng độ 0,5g/l; 7 ngày/lần. Sau 3 tháng, cây con phát triển tốt, với 2,7 chồi mới; 2 lá mở cây; Cao 138 mm; Lá dài 82 mm và rộng 52 mm. Lá màu xanh tự nhiên.

### Study on breeding of black ginger (*Distichochlamys citrea*) by *in vitro* method

**Keywords:**  
*Distichochlamys citrea*,  
*in vitro*, tissue culture,  
breeding

Black ginger (*Distichochlamys citrea*) is a new endemic plant species in Vietnam. In nature, *D. citrea* is narrowly distributed in small quantities. Essential oils could be extracted from stems, roots and leaves. The chemical active agents include: 1.8-cineole (30.7-43.7)%,  $\beta$ -citral (1.6-14)%,  $\alpha$ -citral (2.5-20.9)% and neryl acetate (4.1-11.1)%,  $\alpha$ -pinene (1.8-4.5)%,  $\beta$ -pinene (2.8-7.0)%, D-limonene (1.2-3.3)%, Geraniol (4.0-5.9)%, Neryl acetate (4.1-11.1)%,... Chemicals in ginger is considered to be good for health and can be used to make cosmetics, food. Effective breeding of black ginger by *in vitro* technique as follow: After sterilization, shoots were regenerated on the medium (MS + 5g/l Agar + 30g sugar + 100ml/l coconut water + 1mg/l PVP + 2mg/l BAP + Kn 0.2 mg/l). After regeneration, shoots were multiplied on the medium: (MS + 5g/l Agar + 30g sugar + 100ml/l coconut water + 1mg/l BAP + 1g/l Casein + 0.2mg/Kn). Roots were formed on the medium (MS + 30g sugar + 100ml/l coconut water + 0.5mg/l NAA). Young plants grown in a nursery with 75% sunlight cover. They were grown on a substrate (Coconut mulch: Husk: Hill land) with the ratio of 2: 1: 1, respectively. After 10 days, Grownmore fertilizer (30N: 10P: 10K) was added by spraying with 0.5g/l concentration and frequency of 7 days/time. After 3 months, the seedlings grown well with 2.7 new shoots; 138 mm high; leaves are 82 mm long and 52 mm wide.

## I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Gừng đen (*Distichochlamys citrea*) là loài đặc hữu của Việt Nam, được mô tả năm 1995 tại Vườn Quốc gia Bạch Mã (Newman, 1995). Những hiểu biết về chi này còn rất sơ khai, mới chỉ có những nghiên cứu về phân loại, vùng phân bố (ncbi.nlm.nih.gov) và hóa dược, còn các nghiên cứu khác chưa được thực hiện. Hiện nay Gừng đen đang ở dạng hoang dại trong tự nhiên, chỉ được tìm thấy ở các khu bảo tồn thiên nhiên (Vườn Quốc gia Bạch Mã và Vũ Quang,..) rất dễ bị khai thác ngoài ý muốn dẫn đến xói mòn nguồn gen, thậm chí những khu rừng có nguồn gen còn bị huỷ hoại. Hiện nay tại Vườn Quốc gia Bạch Mã, Vũ Quang nơi phát hiện ra gừng *Distichochlamys* chỉ còn 1 số lượng cây ít ỏi mọc phân tán.

Năm 2014, 2015, 2017 Trường Đại học sư phạm Huế và Đại học Vinh đã chiết xuất được tinh dầu dưới dạng lỏng, không màu, nhẹ hơn nước và có mùi thơm đặc trưng từ thân rễ của gừng *D. citrea* đạt (0,4-0,6)% (v<sub>mL</sub>/w<sub>g</sub>, theo trọng lượng). Phân tích thành phần tinh dầu rễ, thân có chứa 77 hoạt chất chính có tiềm năng sinh học, trong đó thành phần chính là: 1,8-cineole dao động (30,7- 43,7)%, β-citral (1,6-14)%, α-citral (2,5-20,9)% và neryl acetate (4,1-11,1)%, α-pinene (1,8-4,5)%, β-pinene (2,8-7,0)%, D-limonene (1,2-3,3)%, Geraniol (4,0-5,9)%, Neryl acetate (4,1-11,1)%. Phân tích tinh dầu lá có thành phần chính β-Sesquiphellandrene (6,53 - 54,95%) và β-Pinene (18,26 - 35,35%) (Phạm Việt Tý *et al.*, 2014; 2015; Le thi Huong, 2017). Các hoạt chất này có tác dụng bảo vệ dạ

dày, chống viêm, chống nhiễm vi khuẩn, phòng chống ung thư, co giật, căng thẳng, chóng mặt, run rẩy chân tay, động kinh,... Ngoài ra, tinh dầu còn được sử dụng làm hương liệu và mỹ phẩm giúp làm đẹp da, tạo mùi hương (Moteki *et al.*, 2002; Juergens *et al.*, 2014; Baser *et al.*, 2010; Zhan YH, 2012; Sabri Erbaş *et al.*, 2016; Chaying Guan *et al.*, 2014). Đây là nguồn dược liệu và hương liệu, thực phẩm chức năng quý đặc hữu của Việt Nam có tiềm năng khai thác lớn.

Gừng đen là loài cây mới có tiềm năng khai thác để làm hương liệu, dược liệu, thực phẩm chức năng nhưng số lượng hạn chế trong tự nhiên. Vì vậy, việc thuần dưỡng và phát triển loài cây này rất có ý nghĩa về khoa học, bổ sung nguồn nguyên liệu mới cho ngành dược và an sinh xã hội. Áp dụng công nghệ sinh học (nhân giống *in vitro*) vào việc thuần dưỡng và nhân giống cây Gừng đen có ưu điểm là chủ động về nguồn giống (Phá vỡ đặc tính mùa vụ, có thể nhân liên tục trong *in vitro* không phụ thuộc vào mùa vụ), cây có chất lượng đồng đều, sạch bệnh, sinh trưởng tốt, biến dị thấp, đặc biệt tạo được số lượng cây lớn trong thời gian ngắn, tạo nguồn nguyên liệu lớn ổn định cho các nghiên cứu về dược liệu, hương liệu và thực phẩm chức năng.

## II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu

- Củ của giống Gừng đen (*D.citrea*) được thu từ rừng của Khu bảo tồn thiên nhiên Bạch Mã, cho nảy chồi trên cát sạch ẩm tại Trung tâm Tài nguyên thực vật.
- Chồi sạch sâu bệnh.



Hình 1. Cây Gừng đen; Chồi từ củ đưa vào nuôi cấy *in vitro*

## 2.2. Phương pháp bố trí thí nghiệm

- *Pha chế môi trường nuôi cấy in vitro*: Môi trường cơ bản: MS (Murashige & Skoog, 1962). Bổ sung nước dừa 100ml/l, agar 5g/l, VTM,... tùy theo thí nghiệm. Môi trường nuôi cấy có pH = 5,8 và được khử trùng 120°C trong 19 phút.

- Điều kiện nuôi cấy: Mẫu nuôi cấy ở  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , ánh sáng 2.500 lux, chu kỳ 10-12h/ngày. Mẫu được quan sát trên máy ảnh soi nổi và máy ảnh kỹ thuật số.

Phương pháp nghiên cứu được thể hiện qua các thí nghiệm:

*Thí nghiệm 1*: Nghiên cứu ảnh hưởng của chất khử trùng đến tỷ lệ sống của mẫu *in vitro*. Mẫu được khử trùng riêng lẻ hoặc phối hợp giữa  $\text{H}_2\text{O}_2$  (20%) và  $\text{NaClO}_2$  (20%) trong 3; 5; 10; 15 phút. Môi trường nuôi cấy mẫu ban đầu: MS.

*Thí nghiệm 2*: Nghiên cứu môi trường tái sinh và nhân chồi *in vitro*: Môi trường MS, bổ sung BAP (0-3)mg/l riêng lẻ hoặc phối hợp với kinetin (0-3)mg/l.

*Thí nghiệm 3*: Nghiên cứu môi trường nhân nhanh chồi: Môi trường MS bổ sung BAP 1mg/l riêng lẻ hoặc kết hợp Casein (1g/l) và Kinetin (0-2)mg/l

*Thí nghiệm 4*: Ảnh hưởng của NAA đến hình thành rễ của cây gừng đen *in vitro*. Cây chồi trên môi trường bổ sung NAA (0-2) mg/l.

*Thí nghiệm 5*: Nghiên cứu ảnh hưởng của trạng thái môi trường đến sinh trưởng của cây hoàn chỉnh. Cây chồi trên môi trường [0 (lông); 2,5 (bán lông); 5 (Đặc)] g/l Agar.

*Thí nghiệm 6*: Nghiên cứu phương pháp huấn luyện cây trước khi ra cây ngoài vườn ươm (huấn luyện bằng cách đưa cây con từ từ ra môi trường để cây thích nghi dần tăng tỷ lệ sống của cây).

*Thí nghiệm 7*: Nghiên cứu ảnh hưởng giá thể đến sinh trưởng và phát triển của cây con ngoài vườn ươm. Giá thể sử dụng là mùn dừa, đất đồi sâu, trấu hun với các tỷ lệ khác nhau.

*Thí nghiệm 8*: Nghiên cứu ảnh hưởng của phân bón lá đến sinh trưởng và phát triển của cây con ngoài vườn ươm (phân bón Komic, Growmor, Đầu trâu). Liều lượng 0,5g/l; 7 ngày phun phân bón/lần. Thành phần Đầu trâu: 30%N; 15% $\text{P}_2\text{O}_5$ ; 15% $\text{K}_2\text{O}$ ; 0.05%Ca; MgO: 500 ppm; B,Cu,Zn: 1.850 ppm; TE: 1.859ppm; Growmore: 30%N; 10% $\text{P}_2\text{O}_5$ ; 10% $\text{K}_2\text{O}$ ; Fe: 330 ppm; Mn: 50 ppm; Zn: 70 ppm; Cu: 70 ppm; B: 20 ppm; Mo: 0,5ppm + TE; Komic: 30%N; 20% $\text{P}_2\text{O}_5$ ; 10% $\text{K}_2\text{O}$ ; MgO: 800 ppm; Zn: 200 ppm; Mn: 30 ppm; B: 50 ppm; Cu: 100 ppm.

Cây con ngoài vườn sống trong điều kiện ánh sáng tán xạ.

- *Các chỉ tiêu đánh giá*: Số lá/cây (lá); chiều rộng và dài phiến lá, chiều dài rễ, chiều cao chồi (mm), màu sắc lá; Tỷ lệ cây sống, chết,

chồi, rễ tạo thành (%),... Số ngày bắt đầu ra lá mới: Đếm số ngày trước khi cây *in vitro* bắt đầu ra lá mới đầu tiên. Các chỉ tiêu theo dõi là đồng nhất. Ở từng thí nghiệm chỉ đưa ra các chỉ tiêu có ảnh hưởng rõ nhất đến tốc độ sinh trưởng của cây.

Thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên 3 lần lặp với dung lượng mẫu/lần lặp  $n \geq 30$ , dung lượng mẫu ở thí nghiệm 1 với  $n=15$ /lần lặp; số liệu sau khi thu thập được tính

toán, xử lý theo chương trình thống kê sinh học IRISTART.

### III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Nghiên cứu phương pháp chọn mẫu và chất khử trùng

Thí nghiệm tách các chồi bật từ củ, rửa sạch và đưa vào khử trùng bằng  $H_2O_2$ ,  $NaClO$  nồng độ 20%. Kết quả như sau:

**Bảng 1.** Nghiên cứu ảnh hưởng của chất khử trùng đến tỷ lệ sống của mẫu *in vitro* (sau 20 ngày nuôi cấy)

Hóa chất	Thời gian (phút)	Tỷ lệ mẫu sống (%)		Tỷ lệ Mẫu chết (%)
		tỷ lệ mẫu sạch	Mẫu nhiễm	
$H_2O_2$	3	40	53	7
	5	53	27	20
	10	33	20	47
	15	0	20	80
$NaClO$	3	40	60	0
	5	53	20	27
	10	40	23	47
	15	7	33	60
$NaClO + H_2O_2$	5	73	14	13
	3			

Kết quả sau 10 ngày nuôi cấy đã xác định được mẫu sống, chết. Khử trùng thời gian 3 phút  $H_2O_2$  và  $NaClO$  thì tỷ lệ mẫu sống đạt cao nhất, giảm dần khi thời gian khử trùng tăng lên. Tuy nhiên, quan sát cho thấy các mẫu vẫn sống nhưng bị nhiễm, tỷ lệ nhiễm cũng tỷ lệ nghịch với thời gian khử trùng. Tỷ lệ mẫu không nhiễm khi khử trùng bằng hóa chất đơn lẻ đạt cao nhất ở thời gian 5 phút đạt 53% mẫu sống không nhiễm, nếu tiếp tục tăng thời gian khử trùng thì tỷ lệ mẫu sống không nhiễm giảm. Thí nghiệm cải tiến phương pháp bằng cách sau khi khử trùng bằng  $NaClO$  trong 5

phút và cấy mẫu vào môi trường không bổ sung đường, sau 3 ngày lấy mẫu và khử trùng lại bằng  $H_2O_2$  trong 3 phút thì tỷ lệ sống đạt 73% cao hơn hẳn so với khử trùng bằng hóa chất đơn lẻ.

#### 3.2. Nghiên cứu môi trường tái sinh và nhân chồi

Mẫu sau khi khử trùng được cấy vào môi trường: (MS + 5g/l Agar + 30g đường + 100ml/l nước dừa + 1mg/l PVP + BAP (0-3mg/l)), mục đích tìm ra môi trường phù hợp nhất để tái sinh cây.

**Bảng 2.** Ảnh hưởng của BAP đến sinh trưởng cây *in vitro* (sau 45 ngày)

Nồng độ BAP (mg/l)	Tỷ lệ mẫu tạo chồi (%)	Số ngày bật chồi	Số chồi trung bình/mẫu	Tình trạng chồi
Đ/C	26,6	20	1	Khỏe, xanh, ra rễ
0,5	26,6	17	1	Khỏe, xanh, ra rễ
1,0	40,0	15	1,3	Khỏe, xanh, ra rễ
1,5	40,0	15	1,5	Chồi khỏe, xanh
2,0	50,0	15	1,8	Khỏe, xanh
2,5	56,7	11	1,8	Khỏe, xanh
3,0	43,3	10	1,1	Nứt bung gốc, lá bao xốp
<i>LSD</i> <sub>0,05</sub>			0,2	
<i>CV</i> (%)			0,1	

Sau 10-20 ngày nuôi cấy mẫu có biểu hiện hồi phục và phát triển chồi. Cây sinh trưởng trên môi trường bổ sung BAP (0-1,5)mg/l chồi đưa vào sau 15-20 ngày hồi phục và phát triển, chồi xanh hơn, lá mở ra, cây sau 3 tuần đã đẻ nhánh. Nếu bổ sung BAP (2-2,5)mg/l chồi sinh trưởng và phát triển tốt hơn, sau 2 tuần thấy có biểu hiện bật thêm chồi mới, chồi cũ và mới khỏe và xanh, sau 6 tuần có hệ số nhân chồi đạt 1,8 lần. Cây sinh trưởng trên môi trường bổ sung 3 mg/l BAP có ra chồi mới nhưng tỷ lệ giảm đồng thời xuất hiện vết nứt bung ở gốc, lá cứng mọng nước và bao xốp, có thể cây đã dư thừa chất điều tiết sinh trưởng gây biến dị hình thái và hóa già nhanh hơn.

BAP là chất điều hòa sinh trưởng thuộc nhóm Xytokinin có tác dụng kích thích sự phân chia tế bào, kích thích sự phát sinh chồi, tăng hệ số nhân. Tuy nhiên nếu bổ sung BAP ở nồng độ cao sẽ tạo chồi bất định, chồi thủy tinh thể và mọng nước (Đỗ Năng Vịnh, 2005).

Để tăng hệ số nhân thí nghiệm bổ sung Kinetin kết hợp với BAP, bổ sung tỷ lệ phù hợp BAP và Kinetin có tác dụng kích thích sinh trưởng, trẻ hóa cây, ức chế sự ra rễ, tăng hệ số nhân, tạo lá xanh tự nhiên (Đỗ Năng Vịnh, 2005). Vì vậy, để cải thiện hệ số nhân và chất lượng cây, thí nghiệm bổ sung vào môi trường [(2; 2,5)mg/l BAP + Kinetin (0-1)mg/l]. Kết quả như sau.

**Bảng 3.** Ảnh hưởng kết hợp của BAP và Kinetin quá trình nhân chồi

Nồng độ	Nồng độ Kinetin (mg/l)	Số chồi ban đầu	Hệ số nhân sau 45 ngày	Đặc điểm chồi, rễ
BAP (2 mg/l)	0,0	1	1,8	Chồi sinh trưởng bình thường, mập
	0,2	1	2,1	Chồi sinh trưởng bình thường, mập
	0,5	1	1,9	Chồi sinh trưởng bình thường
	1,0	1	1,6	Chồi bị kéo dài, lá xanh nhạt, có điểm hóa nâu ở đầu lá non
BAP (2,5 mg/l)	0	1	1,8	Chồi sinh trưởng bình thường
	0,2	1	2,0	Chồi sinh trưởng bình thường
	0,5	1	1,9	Chồi bị kéo dài, lá xanh nhạt
	1,0	1	1,5	Chồi bị kéo dài, lá xanh nhạt, có điểm hóa nâu ở đầu lá non
<i>LSD</i> <sub>0,05</sub>			0,1	
<i>CV</i> (%)			0,2	

MT cơ bản: MS + 5g/l Agar + 30g đường + 100ml/l nước dừa.



**Hình 2.** Chồi tái sinh

Kết quả sau 45 ngày nuôi cấy cho thấy: Bổ sung vào môi trường 0,2 mg/l Kinetin kết hợp với 2mg/l BAP đã kích thích sự sinh trưởng của cây và cải thiện tăng hệ số nhân từ 1,8 lần lên 2,1 lần, sau 15-20 ngày các gốc có biểu hiện bật chồi mới. Nếu tiếp tục tăng lượng Kinetin  $\geq 0,5$  chồi bị kéo dài, lá biến dạng, màu lá xanh nhạt hơn, có điểm hóa nâu ở đầu lá đồng thời hệ số nhân giảm đáng kể. Thí nghiệm lựa chọn môi

trường (MS + 5g/l Agar + 30g đường + 100ml/l nước dừa + 2mg/l BAP + 0,2mg/l Kn) để tái sinh cây. Kết quả thống kê cho sự khác nhau về hệ số nhân giữa các công thức có ý nghĩa.

### 3.3. Nghiên cứu môi trường nhân nhanh chồi

Chồi sau tái sinh, nếu tiếp tục cấy chuyển sang môi trường tái sinh cây có biểu hiện sinh trưởng kém, lá kèm bên ngoài bị nứt xốp trắng, có thể BAP dùng với nồng độ cao trong thời gian dài thường gây ức chế sinh trưởng do tồn dư trong mẫu vật nhiều. Vì vậy, thí nghiệm giảm nồng độ BAP đồng thời bổ sung Casein 1g/l và Kinetin (0-2)mg/l để tìm ra môi trường phù hợp để nhân nhanh chồi. Casein đây là dịch chiết thủy phân protein dạng hữu cơ có ảnh hưởng rất tốt đến sinh trưởng và phát triển của cây, để tăng sinh trưởng và chất lượng chồi nên bổ sung (0,05-0,1)% Casein (<http://www.ebook.edu.vn>). Kết quả được thể hiện trong bảng 4.

**Bảng 4.** Ảnh hưởng của Kinetin và Casein đến hệ số nhân và sinh trưởng của cây *in vitro* Gừng đen *D.citrea* (sau 45 ngày)

Chất ĐHST và Casein	Chiều rộng lá (mm)	Chiều dài lá (mm)	Hệ số nhân	Số chồi mở lá	Tình trạng chồi
1mg/l BAP + 0g/l Casein + 0mg/l Kn	15	48	1,9	1	Sinh trưởng bình thường, lá mở, xanh nhạt mỏng
1mg/l BAP + 1g/l Casein + 0mg/l Kn	22	67	3,1	1,7	Sinh trưởng tốt, lá mở, xanh tự nhiên dày
1mg/l BAP + 1g/l Casein + 0,2mg/l Kn	24	70	3,2	1,9	Sinh trưởng tốt, lá mở, xanh tự nhiên dày
1mg/l BAP + 1g/l Casein + 0,5mg/l Kn	23	71	3,0	1	Sinh trưởng bình thường, lá mở, xanh dày
1mg/l BAP + 1g/l Casein + 0,8mg/l Kn	20	72	2,9	1	Sinh trưởng bình thường, lá mở, xanh mỏng
1mg/l BAP + 1g/l Casein + 1,0mg/l Kn	18	57	2,5	1	Sinh trưởng kém, nứt xốp lá kèm, lá mở, xanh mỏng
1mg/l BAP + 1g/l Casein + 2,0mg/l K	15	46	2,4	1	Sinh trưởng kém, nứt xốp lá kèm, lá đóng, xanh nhạt mỏng
<i>LSD</i> <sub>0,05</sub>	0,96	0,19	0,02		
<i>CV</i> (%)	1,0	0,2	0,5		



**Hình 3.** Chồi nhân *in vitro*

Kết quả thí nghiệm cho thấy Casein ảnh hưởng rất tốt đến sinh trưởng cây Gừng đen *in vitro*. Khi bổ sung 1g/l Casein vào môi trường nuôi cấy thì cây có hệ số nhân là 3,1 lần; số lá mở 1,7 lá; dài lá 67 mm; rộng lá 22 mm vượt trội so với không bổ sung (hệ số nhân 1 lần; số lá mở 1 lá; dài lá 48 mm; rộng lá 15 mm), đặc biệt chất lượng chồi (Chồi sinh trưởng tốt, lá mở, xanh tự nhiên dày) tốt

hơn hẳn so với không bổ sung (Chồi sinh trưởng bình thường, lá mở, xanh nhạt mỏng). Để tăng chất lượng cây và hệ số nhân thí nghiệm bổ sung Kinetin. Kết quả cho thấy bổ sung 0,2mg/l Kn + 1mg/l BAP + 1g/l Casein đã kích thích sinh trưởng, tăng hệ số nhân đến 3,2 lần; số lá mở 1,9 lá; dài lá 70mm; rộng lá 24mm. Các nồng độ Kinetin khác ảnh hưởng kém hơn đến sinh trưởng cây.

**3.4. Nghiên cứu môi trường tạo rễ và phát triển cây hoàn chỉnh**

Trong quá trình nhân chồi, các cụm chồi này cũng đồng thời ra rễ. Tuy nhiên, các rễ này nhỏ, mảnh, dài khi ra cây bên ngoài không ra được rễ mới trên rễ cũ mà dễ bị thối gây bệnh chết cho cây. Vì vậy trong quá trình nhân luôn phải loại bỏ các rễ kém chất lượng để cây đã tập trung ra chồi. Chồi đạt kích thước dài 70mm, chất lượng chồi tốt, lá mở hơn 2/3 hoặc mở hết, xanh tự nhiên tách riêng từng chồi ra và cấy trên môi trường bổ sung NAA (0-2,0mg/l). Kết quả tạo rễ của cây như sau.

**Bảng 5.** Ảnh hưởng của NAA đến hình thành rễ cây Gừng đen *in vitro* (sau 25 ngày)

Công thức	Ngày xuất hiện rễ đầu tiên	Số rễ TB/cây	Chiều dài rễ (mm)	Nhận xét rễ cây
Đ/C	17	0,6	3	Rễ mảnh, ngắn có rễ phụ
0,2mg/l NAA	15	1,3	4	Rễ mảnh, ngắn có rễ phụ
0,5mg/l NAA	12	1,7	10	Rễ to, cứng, trắng
0,8mg/l NAA	10	1,5	11	Rễ to, cứng, trắng
1,0mg/l NAA	8	1	14	Rễ nhỏ, cứng trắng
2,0mg/l NAA	16	0,7	6	Rễ ngắn, nhỏ hơi nâu
LSD <sub>0,05</sub>			0,1	
CV (%)			0,7	

Kết quả so sánh và thống kê cho thấy: Bổ sung vào môi trường NAA đã ảnh hưởng tích cực đến sự ra rễ của cây, các chỉ tiêu sinh trưởng như ngày xuất hiện rễ đầu tiên giảm, số rễ TB/cây tăng lên, chiều dài rễ tăng lên, chất lượng rễ to, cứng, trắng tốt hơn. Cây ra rễ trên các nồng độ NAA cũng khác nhau, trong đó môi trường (MS + 5g/l Agar + 30g đường + 100ml/l nước dừa + 0,5mg/l NAA) tạo rễ và

sinh trưởng tốt, sau 10-12 ngày cây ra được 1,7 rễ; rễ to, cứng, trắng, ngắn 10 cm.

Tuy nhiên, chồi ra rễ trên môi trường bổ sung agar có nhược điểm là chiều dài rễ không đồng đều nhiều lông rễ, khi ra ngoài vườn rễ bị hỏng. Môi trường giảm agar trong *in vitro* cũng làm cây dễ hấp thụ các chất dinh dưỡng hơn, ra rễ đồng đều và ít lông rễ hơn.



**Bảng 6.** Ảnh hưởng của trạng thái môi trường đến sinh trưởng của cây Gừng đen (*D.citrea*) sau 20 ngày

Trạng thái môi trường (Agar)	Số lượng cây / bình cấy	Ngày ra rễ đầu tiên	Cao cây (mm)	Số rễ TB/cây	Dài phiến lá (mm)	Rộng lá (mm)	Dài rễ (mm)	Nhận xét cây
Lỏng (0g/l)	15	10	76	2,1	55	27,6	13	Cây sinh trưởng tốt, rễ dài mập, trắng cứng
Bán lỏng (2g/l)	10	10	73	1,9	54	27,2	11	Cây sinh trưởng bình thường, rễ ngắn mập, trắng cứng
Đặc (5g/l)	10	12	72	1,7	50	27,0	10	Cây sinh trưởng bình thường, rễ ngắn, trắng cứng
<i>LSD</i> <sub>0,05</sub>			0,28	0,10	0,50	0,68	0,20	
<i>CV</i> (%)			0,2	2,5	0,5	0,3	0,9	

Kết quả so sánh và thống kê cho thấy: Trạng thái vật lý của môi trường đã ảnh hưởng lớn đến khả năng tạo cây hoàn chỉnh, trong đó môi trường lỏng có nhiều ưu điểm nhất bao gồm: Số lượng cây/bình cấy (15 cây), chiều cao cây (76 mm), chiều dài phiến lá (55 mm), chiều rộng phiến lá (27,6 mm), chiều dài rễ (13 mm) cao hơn so với môi trường bán lỏng và đặc, ngày xuất hiện rễ ngắn hơn 2 ngày. Như vậy ra rễ tạo cây hoàn chỉnh trên môi trường lỏng tốt hơn hẳn môi trường đặc. Môi trường bán lỏng cây dễ đổ khó cấy hơn, thời gian cấy lâu hơn. Sau 20 ngày có thể đưa cây ra ngoài vườn ươm.

**Hình 4.** Tạo cây hoàn chỉnh

### 3.5. Nguyên cứu thời vụ và phương pháp huấn luyện cây trước khi đưa ra ngoài vườn ươm

Cây *in vitro* được nuôi cấy trong phòng trong một thời gian dài với các điều kiện nhân tạo,

khi đưa cây ngay ra ngoài vườn ươm cây dễ bị sốc do chưa kịp thời thích nghi với điều kiện bên ngoài như nhiệt độ, ánh sáng, dinh dưỡng, đặc biệt cây Gừng đen là cây ưa mát và ánh sáng thấp. Cây được đưa vào các thời vụ khác nhau. Kết quả là vụ Hè tỷ lệ cây chết cao không phụ thuộc vào chế độ huấn luyện chỉ đạt 15% cây sống, vụ Thu cây có tỷ lệ sống thấp chỉ đạt xấp xỉ 30%, chỉ có vụ đầu Đông và đầu Xuân, khi thời tiết có ánh sáng thấp nhiệt độ dao động từ 15-25°C cây con *in vitro* có biểu hiện sống tốt hơn khi đưa ra ngoài vườn. Để tăng tỷ lệ sống và sinh trưởng cây thí nghiệm tập huấn cây như sau:

**Hình 5.** Cây chuẩn bị đưa ra vườn ươm



**Bảng 7.** Ảnh hưởng của phương pháp huấn luyện cây trước khi đưa ra vườn ươm

Thời vụ	Công thức thí nghiệm	Tỷ lệ cây chết (%)			Tỷ lệ cây sống (%)	Số ngày bắt đầu ra chồi mới ( ngày)	Sinh trưởng cây sau 2 tháng
		Sau 10 ngày	Sau 20 ngày	Sau 40 ngày			
Đầu đông (tháng 9-10)	CT1	36	14	6	44	22	Cây sinh trưởng bình thường
	CT2	24	10	4	62	20	Cây sinh trưởng tốt
	<b>CT3</b>	18	10	0	72	<b>15</b>	Cây sinh trưởng tốt
	CT4	20	12	4	64	20	Cây sinh trưởng tốt
Đầu xuân (tháng 1-2)	CT1	34	12	6	48	15	Cây sinh trưởng tốt
	CT2	20	10	4	66	15	Cây sinh trưởng tốt
	<b>CT3</b>	18	8	0	74	<b>10</b>	Cây sinh trưởng tốt
	CT4	22	10	6	62	15	Cây sinh trưởng tốt

CT1: Đưa trực tiếp cây ra ngoài vườn ươm

CT2: Để bình cây nhiệt độ trong nhà 7 ngày

CT3: Để bình cây nhiệt độ trong nhà 3 ngày sau đó đưa ra ngoài vườn 4 ngày

CT4: Để bình cây ra nhiệt độ ngoài vườn 7 ngày.

Kết quả so sánh cho thấy: Phương pháp tập huấn cây gừng đen (*D.citrea*) trước khi đưa ra vườn ươm có ảnh hưởng đến khả năng sinh trưởng của cây. Cây được tập huấn trước khi đưa ra vườn có tỷ lệ sống cao hơn, sinh trưởng tốt hơn so với không được tập huấn. Phương pháp tập huấn để bình cây ra nhiệt độ bình thường trong phòng 3 ngày sau đó đưa ra ngoài vườn 4 ngày có tỷ lệ sống và sinh trưởng tốt nhất. Nên đưa cây ra vào tháng 1 đầu vụ Xuân hoặc tháng 10 đầu vụ Đông.

### 3.6. Nghiên cứu ảnh hưởng của giá thể đến sinh trưởng và phát triển cây con sau *in vitro* ngoài vườn

Cây gừng (*D.citrea*) sống dưới tán rừng, chỗ khe núi, có ẩm độ cao và lớp thảm mục dày. Vì vậy, thí nghiệm sử dụng một số loại giá thể vùng lập địa cây sống. Cây sau nuôi cấy *in vitro* sau khi được huấn luyện trồng vào vụ xuân trong điều kiện ánh sáng tán xạ. Kết quả như sau:

**Bảng 8.** Ảnh hưởng của giá thể đến tỷ lệ sống và sinh trưởng của cây con gừng đen (*D.citrea*) trong vườn ươm (vụ Xuân, sau 2,5 tháng)

Công thức	Tỷ lệ sống (%)	Số chồi mới bật	Chiều cao chồi lá mới (mm)	Độ mờ lá
CT1: Mùn dừa	74	1	81	1/3
CT2: Đất đồi sâu	79	1	43	1/5
CT3: Trấu hun	75	1	67	1/4
CT4: Đất mùn bề mặt	73	2	86	1/2
CT5: (Mùn dừa: Trấu hun: Đất đồi sâu) tỷ lệ (2:1:1)	87	2,1	97	1
CT6: (Mùn dừa: Đất đồi sâu) tỷ lệ (1:1)	82	2	83	1/2
CT7: (Trấu hun: Đất đồi sâu) tỷ lệ (1:1)	72	1	54	1/3
CT8: (Mùn dừa: Đất mùn bề mặt) tỷ lệ (1:1)	74	2	89	2/3
CT9: (Trấu hun: Đất mùn bề mặt) tỷ lệ (1:1)	76	2	85	1/2
LSD <sub>0.05</sub>			1,55	
CV(%)			1,2	

Kết quả so sánh và thống kê cho thấy: Sinh trưởng của cây tốt hơn trên các giá thể có chất hữu cơ và kém hơn khi trồng vào các giá thể đơn lẻ. Cây sinh trưởng tốt nhất khi trồng trên giá thể (Mùn dừa: Trấu hun: Đất đồi sâu) tỷ lệ (2:1:1), cây đạt tỷ lệ sống (87%), ra 2,1 chồi mới và 1 lá mở hoàn toàn, chiều dài chồi mới (97 mm), cây có lá bắc đỏ tím, lá màu xanh tự nhiên.

### 3.7. Nghiên cứu ảnh hưởng của phân bón đến sinh trưởng và phát triển cây con sau *in vitro* ngoài vườn

Cây (sau *in vitro*) sau khi thích nghi với môi trường tự nhiên cần dinh dưỡng để sinh trưởng khỏe và chống lại sâu bệnh hại. Vì vậy, sau trồng cây 10 ngày thí nghiệm phun 3 loại phân (Growmore, Đầu trâu, Komix) liều lượng 0,5g/l, 7 ngày phun/lần, nhằm xác định loại phân bón phù hợp cho sinh trưởng của cây giai đoạn vườn ươm.

**Bảng 9.** Ảnh hưởng của phân bón lá đến sinh trưởng và phát triển cây con ngoài vườn (sau 3 tháng - vụ Xuân)

Công thức	Số chồi mới/khóm	Số chồi mở lá/khóm	Chiều cao chồi lá mới (mm)	Chiều dài lá mới (mm)	Chiều rộng lá mới (mm)	Màu sắc lá
Đ/C (nước sạch)	2,1	1	91	51	33	Xanh, mỏng
Growmore (30N:10P:10K)	2,7	2	138	82	52	Xanh tự nhiên, dày
Đầu trâu (30N:15P:10K)	2,9	2	125	76	50	Xanh tự nhiên, dày
Komix (30N:20P:10K)	2,6	2	120	71	46	Xanh tự nhiên, dày
<i>LSD<sub>0,05</sub></i>			2,9	1,9	1,3	
<i>CV(%)</i>			1,3	1,4	1,6	

Kết quả so sánh và phân tích thống kê cho thấy: Cây sinh trưởng tốt khi phun phân bón Growmore (30N:10P:10K) hoặc Đầu trâu (30N:15P:10K). Ưu điểm của phân Growmore là chiều cao chồi lá mới 138 mm; chiều dài lá mới 82 mm; chiều rộng lá mới 52 cm cao hơn so với phân Đầu trâu chỉ đạt chiều cao chồi lá mới 125 mm, chiều dài lá mới 76 mm, chiều rộng lá mới 50 cm. Nhược điểm là số chồi mới/khóm

khi bón phân Growmore (2,7 chồi) kém hơn so với phân Đầu trâu (2,9 chồi). Tuy nhiên, sau 3 tháng cây bắt đợt mầm tiếp theo thì công thức bón phân Growmore bắt mầm nhiều hơn so với phân Đầu trâu. Có thể khi bón phân growmore đợt 1 cây có chiều cao chồi; dài và rộng lá lớn hơn đã tích lũy năng lượng dự trữ tốt hơn cho lần bắt mầm tiếp theo.



**Hình 6.** Cây sinh trưởng ngoài vườn

#### IV. KẾT LUẬN

1. Nhân giống gừng đen *in vitro* hiệu quả bằng cách: Khử trùng chồi mới bật từ củ sạch bằng NaClO 20% trong 5 phút và cấy vào môi trường MS không đường và chất điều hòa sinh trưởng, sau 3 ngày cây mẫu được lấy ra và khử trùng lần 2 bằng H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 20% trong 3 phút. Mẫu sau khử trùng cấy trên môi trường tái sinh chồi (MS + 5g/l Agar + 30g đường + 100ml/l nước dừa + 1mg/l PVP + 2mg/l BAP + Kn 0,2 mg/l). Chồi sau khi tái sinh được nhân lên trên môi trường: (MS + 5g/l Agar + 30g đường + 100ml/l nước dừa + 1mg/l BAP + 1g/l Casein + 0,2mg/lKn).

2. Cây con được hình thành tốt nhất trên môi trường (MS + 30g đường + 100ml/l nước dừa

+ 0,5mg/l NAA) sau 20 ngày, cây đạt 2,1 rễ/cây, rễ dài 12 mm, chiều cao cây 76 cm; chiều (rộng và dài) phiến lá (27; 55) mm, lá xanh tự nhiên, cây sinh trưởng tốt có thể đưa cây ra ngoài vườn ươm.

3. Trước khi đưa cây ra ngoài vườn huấn luyện cây *in vitro* bằng cách đưa bình cây ra nhiệt độ bình thường trong phòng 3 ngày sau đó đưa ra ngoài vườn 4 ngày.

4. Đưa cây *in vitro* ra ngoài vườn vào vụ Xuân trên giá thể (Mùn dừa: Trấu hun: Đất đồi sâu) tỷ lệ (2: 1: 1), ánh sáng tán xạ. Sau khi trồng 10 ngày phun phân bón Grownmore (30N: 10P: 10K) nồng độ 0,5g/l; 7 ngày/lần. Sau 3 tháng, cây con phát triển tốt đạt với 2,7 chồi mới; 2 lá mỡ/cây; cao 138 mm; lá dài 82 mm và rộng 52 mm. Lá màu xanh tự nhiên.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Đỗ Năng Vịnh, 2005. Công nghệ tế bào thực vật ứng dụng. NXB Nông nghiệp, Hà Nội.
2. Phạm Việt Tý, Hồ Đức Việt, Lê Quyết Thắng, 2015. Nghiên cứu thành phần hóa học của tinh dầu thân rễ gừng đen (*Distichochlamys citrea*) tại một số tỉnh miền Trung Việt Nam. Tạp chí khoa học Trường Đại học An Giang. J. Sci. Viet. 8(4):60-65.
3. Phạm Việt Tý, Nguyễn Thị Hoài, Nguyễn Việt Khấn, Hồ Việt Đức, 2014. Bước đầu nghiên cứu thành phần hóa học của tinh dầu gừng đen (*Distichochlamys citrea*) thu hái tại A Lưới - Thừa Thiên Huế, Tạp chí Y Dược học, Trường Đại học Y Dược, Đại học Huế, Số đặc biệt, tr. 43-48.
4. Chaying Guan,<sup>1\*</sup> Weiguo Liu,<sup>2\*</sup> Yongfang Yue,<sup>1</sup> Xiao-Jia Wang<sup>2</sup>, 2014. Inhibitory effect of  $\beta$ -elemene on human breast cancer cells. Int J Clin Exp Pathol. 7(7): 3948-3956.
5. Juergens UR, 2014. Anti-inflammatory properties of the monoterpene 1,8-cineole: current evidence for co-edication in inflammatory airway diseases. Drug Res. 64(12):638-646.
6. Le Thi Huong<sup>1</sup>, Dao T. M. Chau<sup>1</sup>, Nguyen V. Hung<sup>1</sup>, Do N. Dai<sup>2\*</sup> and Isiaka A. Ogunwande<sup>3</sup>, 2017. Volatile constituents of *Distichochlamys citrea* M. F. Newman and *Distichochlamys orlowii* K. Larsen & M. F. Newman (*Zingiberaceae*) from Vietnam. Journal of Medicinal Plants Research. Vol. 11(9), pp. 188-193.
7. Moteki, H., Hibasami, H., Yamada, Y., Katsuzaki, H., Imai, K., & Komia, T. 2002. Specific induction of apoptosis by 1,8 cineole in two human leukemia cell lines, but not a in human stomach cancer cell line. Oncol Rep 9, pp. 757-760.
8. Newman M.F., 1995. *Distichochlamys*, a new genus from Vietnam. Edinburgh Journal of Botany 52: 65-69.
1. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>. National Center for Biotechnology Information.
2. <http://www.ebook.edu.vn/>.

**Email tác giả liên hệ:** phamthikimhanh70@gmail.com

**Ngày nhận bài:** 11/04/2020

**Ngày phản biện đánh giá và sửa chữa:** 18/05/2020

**Ngày duyệt đăng:** 01/06/2020