Tạp chí KHLN Số 4/2021
©: Viện KHLNVN - VAFS
ISSN: 1859 - 0373 Đăng tải tại: www.vafs.gov.vn

NGHIÊN CỨU PHÁT TRIỂN NGUỒN GEN CÂY GỪNG ĐEN (*Distichochlamys citrea*) TẠI VÙNG ĐỒI NÚI THÀNH PHỐ HÀ NỘI

Phạm Thị Kim Hạnh[1], Hồ Thị Loan[2], Nguyễn Thị Thu Dung[3], Nguyễn Thị Duyên[4]

[1] Trung tâm Tài nguyên thực vật
[2]Viện Sinh thái và tài nguyên sinh vật
[3]Trung tâm Thực nghiệm và chuyển giao giống cây rừng
[4]Viện Hóa công nghiệp

TÓM TẮT

Gừng đen (*Distichochlamys citrea*) là loài cây dược liệu quý, được phát hiện năm 1995 tại Vườn Quốc gia Bạch Mã. Kết quả đánh giá 38 chỉ tiêu về kích thước các bộ phận của cây trồng 1 năm tuổi ở vùng đồi núi xã Ba Trại, huyện Ba Vì, thành phố Hà Nội cho thấy có sự tương đồng với nơi xuất xứ ở Vườn Quốc gia Bạch Mã. Nghiên cứu mối quan hệ di truyền chi Gừng đen thông qua giải trình tự đoạn gen Matk và 1 phần gen ITS của 15 mẫu Gừng đen của 3 vùng phân bố đã xác định được 11 mẫu ở Vườn Quốc gia Bạch Mã, huyện A Lưới thuộc loài *Distichochlamys citrea*, 4 mẫu Vườn Quốc gia Vũ Quang thuộc chi Gừng đen *Distichochlamys* sp. Kỹ thuật trồng Gừng đen phù hợp ở vùng đồi Ba Vì là vào mùa xuân, mật độ 6 cây/m^2, độ che sáng 75%, liều lượng phân bón [0,6 kg Phân chuồng hoai + 20 mg/lB1 + 20 mg/l humic]/cây hoặc [0,45 kg phân chuồng hoai + 2 g NPK_{hh} tỷ lệ (13N: 21K_2O_5:13P_2O)] cho cây sinh trưởng tốt. Đã định danh được 30 cấu tử trong tinh dầu Gừng đen, thành phần chính là 1,8 - Cineole (17,37%), Trans-Geraniol (27,89%), nhóm citral (9,51%), nhóm Pinene (8,18%), Geranyl acetate (9,82%), β-Myrcene (2,06%), α-Terpinene (2,27%), Linalool (2,29%), β-Sesquiphellandrene (3,91%), endo-Borneol (2,32%), Terpinene-4 - ol (3,94%) và 1 số cấu tử với hàm lượng thấp hơn, các cấu tử này chiếm hơn 90% khối lượng tinh dầu và có thể ứng dụng trong dược phẩm, mỹ phẩm, hương liệu.

Từ khóa: Gừng đen (*Distichochlamys citrea*), đặc điểm sinh học, quan hệ di truyền, thành phần hóa học tinh dầu, vùng đồi núi Hà Nội

Research on development of *Distichochlamys citrea* gene resource on hilly-mountainous areas Hanoi city

Distichochlamys citrea is a precious medicinal plant, discovered in 1995 at Bach Ma National Park. Results of assessment on sizes of 38 biological plant parts of *Distichochlamys citrea* planted 1 year on hilly-mountainous area of Ba Trai commune, Ba Vi district, Hanoi city show that there are similar features compared with *Distichochlamys citrea* planted in original Bach Ma National Park. Research on genetic relation of genus *Distichochlamys* was conducted through sequencing of Matk gene fragment and part of ITS gene of 15 samples of Black Ginger from 3 distribution regions, 11 samples in Bach Ma National Park, A Luoi district) belonging to *Distichochlamys citrea* species were identified, 4 samples of Vu Quang National Park belonging to the genus *Distichochlamys* also were recorded. Suitable techniques of *Distichochlamys citrea* is to plant in spring, density 6 plants/m^2, direct light shading ratio 75%, fertilizer dosage [0.6 kg Farmyard manure + 20 mg/lB1 + 20 mg/l humic]/plant or [0.45 kg farmyard manure + 2 g NPKhh ratio (13N: 21K_2O_5:13P_2O_5)]. 30 components of essential oil were identified, the main components are 1.8 - Cineole (17.37%), Trans-Geraniol (27.89%), citral group (9.51%), Pinene group (8.18%), Geranyl acetate (9.82%), β-Myrcene (2.06%), α-Terpinene (2.27%), Linalool (2.29%), β-Sesquiphellandrene (3.91%), endo-Borneol (2.32%), Terpinene-4 - ol (3.94%) and a number of components of low content with more than 90% oil weigh and can be applied in pharmaceuticals, cosmetics, fragrances.

Keywords: *Distichochlamys citrea*, biological characteristics, genetic relation, chemical component of essential oil, hilly-mountainous areas of Hanoi city

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây Gừng đen có tên khoa học là *Distichochlamys citrea*, thuộc Chi Gừng đen (Distichochlamys), họ Gừng (Zingiberaceae) (Nguyễn Quốc Bình, 2005). Đây là loài cây thân thảo mọc cụm được F.M. Newman mô tả hình thái năm 1995 tại Vườn Quốc gia Bạch Mã. Gừng đen loài dược liệu quý, đặc hữu của Việt Nam, tinh dầu có chứa hoạt chất có tiềm năng sinh học cao như: *1,8 - cineole, α-pinene, β-pinene, D-limonene, α-citral và β-citral, Geraniol, Neryl acetate,...* 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,... dùng làm hương liệu và dược phẩm (Phạm Việt Tý, 2014). Vì vậy, đây là một nguồn gen rất quý, hiếm của Việt Nam,

Vì là cây mới được phát hiện nên các nghiên cứu về loài cây này còn rất ít. Các công trình hầu hết mới chỉ tập trung bước đầu vào mô tả một số đặc điểm hình thái (Newman M.F., 1995), (Nguyễn Quốc Bình, 2005), phân loại (Ngamriabsakul C *et al*., 2004), điều tra giá trị sử dụng và một vài nghiên cứu về các hoạt chất hóa học trong tinh dầu của thân rễ gừng *Dystichochlamys.* Các nghiên cứu về đặc điểm sinh học, kỹ thuật trồng, mô hình hóa chưa được tiến hành.

Qua khảo sát sơ bộ tại các vùng phân bố của Gừng đen ở tỉnh Thừa thiên - Huế (Bạch Mã, A Lưới), Hà Tĩnh (Vũ Quang),... cho thấy cây hoang dại sinh trưởng trong điều kiện độ cao từ 100 - 1.500 m, dưới tán rừng tự nhiên, nơi có ẩm độ trung bình đến cao. So sánh với sinh thái vùng đồi núi của Hà Nội (Sóc Sơn, Ba Vì) thấy có sự phù hợp về sinh thái. Trung tâm Tài nguyên Thực vật đã đưa một số lượng cây về trồng, bước đầu cho thấy cây thích nghi và sinh trưởng ổn định có thể phát triển được ở vùng đồi núi thành phố Hà Nội. Việc thuần dưỡng và phát triển Gừng đen rất có ý nghĩa về khoa học và thực tiễn cho thành phố Hà Nội, góp phần bổ sung nguồn nguyên liệu mới cho ngành dược và an sinh xã hội.

Theo Quyết định số 1976/QĐ-TTg ngày 30/10/2013 của Thủ tướng Chính phủ đã phê duyệt quy hoạch tổng thể phát triển cây dược liệu đến năm 2020 và định hướng đến năm 2030, trong đó đã chỉ rõ đến năm 2020 xây dựng được quy trình trồng cho 60 cây dược liệu và năm 2030 xây dựng được quy trình trồng 120 cây dược liệu, trong đó có cây gừng nhằm nâng cao giá trị gia tăng cho ngành nông nghiệp, phục vụ phát triển ngành dược liệu và kinh tế bền vững. Vì vậy, việc phát triển cây Gừng đen - cây dược liệu mới là rất cần thiết. Xuất phát từ những lý do trên, Sở KHCN Hà Nội đã giao Trung tâm Tài nguyên thực vật triển khai thực hiện đề tài "Nghiên cứu phát triển nguồn gen loài Gừng đen tại vùng đồi núi ở Hà Nội" với mục đích: Phát triển được nguồn gen loài Gừng đen có năng suất và chất lượng cao, góp phần phát triển kinh tế cho vùng đồi núi Hà Nội.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Vật liệu nghiên cứu là cây Gừng đen hoang dại được tuyển chọn và thu thập tại Vườn Quốc gia Bạch Mã, đưa về vùng đồi núi Hà Nội (xã Ba Trại, Huyện Ba Vì) trồng để mô tả đánh giá các đặc điểm sinh học, xác định quan hệ di truyền, nghiên cứu các kỹ thuật trồng và chăm sóc, đánh giá chất lượng tinh dầu trong thân rễ.

Các vật liệu khác gồm: Trấu ủ mục, phân chuồng hoai, phân đầu trâu bình điền (NPK) có thành phần: N: 13% - P_2O_5: 21% - K_2O: 13% - Canxi (CaO): 1% - MgO: 0,6% - S: 6% - Fe: 90ppm - Zn:15ppm - Cu: 10ppm - Bo (B): 90ppm.

1 **2** **2**

Hình 1. Gừng đen (*Distichochlamys citrea*)
1. Cây; 2. Thân rễ. 3. Tinh dầu thân rễ

2.2. Phương pháp nghiên cứu, kỹ thuật sử dụng

- ***Nghiên cứu đặc điểm sinh học***: Đặc điểm hình thái lá, thân rễ, cấu trúc hoa, tập tính sinh trưởng và phát triển của cây thực hiện theo phương pháp của Trung tâm Tài nguyên thực vật (điền thông tin theo form mô tả) và Viện Tài nguyên và Di truyền thực vật quốc tế IPGRI năm 1996.

- ***Xác định quan hệ di truyền:*** Bằng cách thu thập 15 mẫu cây Gừng đen đại diện ở các vùng phân bố mang về để giải trình tự gen.

Kí hiệu mẫu	Địa điểm	Ký hiệu trình tự gen matK	Ký hiệu trình tự gen ITS	Kí hiệu mẫu	Địa điểm	Ký hiệu trình tự gen matK	Ký hiệu trình tự gen ITS
GD1	Bạch Mã	GD1MATK	GD1ITS	GD9	A Lưới	GD9MATK	GD9ITS
GD2	Bạch Mã	GD2MATK	GD2ITS	GD10	Vũ Quang	GD10MATK	GD10ITS
GD3	A Lưới	GD3MATK	GD3ITS	GD11	Vũ Quang	GD11MATK	GD11ITS
GD4	A Lưới	GD4MATK	GD4ITS	GD12	Vũ Quang	GD12MATK	GD12ITS
GD5	A Lưới	GD5MATK	GD5ITS	GD13	Vũ Quang	GD13MATK	GD13ITS
GD6	Bạch Mã	GD6MATK	GD6ITS	GD14	Bạch Mã	GD14MATK	GD14ITS
GD7	Bạch Mã	GD7MATK	GD7ITS	GD15	Bạch Mã	GD15MATK	GD15ITS
GD8	A Lưới	GD8MATK	GD8ITS				

Tách ADN tổng số*:* Mẫu lá được nghiền trong nitơ lỏng (-196^{o}C) thành dạng bột mịn, lấy 100 mg bột mẫu để tách ADN tổng số bằng Dneasy plant mini kit (Qiagen, Đức).

Thiết kế mồi: Khảo sát các trình tự trên ngân hàng gen để thiết kế mồi. Một phần của gen lục lạp vùng, gen ITS (internal transcribed spacer) được sử dụng để xác định tên loài của các mẫu thu được. Sử dụng kỹ thuật PCR để nhân bản đoạn gen đích. Sản phẩm PCR được điện di kiểm tra trên gel Agarose 1% và tinh sạch bằng Qiaquyck gel extraction kit (Qiagen, Đức). Giải trình tự trực tiếp sản phẩm PCR sử dụng mồi và bộ hóa chất BigDye terminator cycler v3.1, đọc kết quả trên hệ thống ABI 3100 Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Mỹ).

Phân tích kết quả: Sử dụng các phần mềm Blast để so sánh với các trình tự của loài trên ngân hàng gen. Phần mềm Mega 6.0.6 để phân tích trình tự thu được và so sánh với một số trình tự tương đồng của một số loài để so sánh với các trình tự tương đồng của loài trên thế giới đã được công bố trên ngân hàng gen.

- Xây dựng một số kỹ thuật trồng và chăm sóc

Điều kiện thí nghiệm:

+ Cây được trồng dưới tán cây Bách xanh và Kim giao có tỉa tán để có tỷ lệ ánh sáng trực xạ khoảng 75%.

+ Đất trồng có độ mùn cao, tầng canh tác dày 20 - 30 cm, không bị ngập úng, độ ẩm đất 60 - 85%. Ô thí nghiệm rộng 1,0 m, có rãnh để thoát nước và lối đi rộng 0,2 m. Làm đất bằng cách xới lớp đất mặt sâu khoảng 15 - 20 cm, phun thuốc phòng trừ nấm và côn trùng (Vicarben 50SC, Vitashield 40EC) ở phần đất xung quanh ô thí nghiệm tránh sự xâm nhập sâu bệnh từ bên ngoài. Giữ ẩm đất thường xuyên 60 - 85%.

+ Các yếu tố kỹ thuật canh tác khác như tưới nước, làm cỏ,... đồng nhất ở các công thức thí nghiệm.

Thí nghiệm 1: *Ảnh hưởng của mật độ trồng đến sinh trưởng, phát triển của Gừng đen dưới tán cây.*

- Sử dụng cây giống và phân chuồng ủ hoai, phân đầu trâu NPK như phần vật liệu. Phân bón lót (3 kg trấu ủ mục + 2,4 kg phân chuồng ủ hoai + 3 g NPK_{hh})/m^2 (trước khi trồng 10 ngày). Bón thúc lần 1: 3 g NPK_{hh}/m^2 (sau khi trồng 2 tháng). Bón thúc lần 2: 3 g NPK_{hh}/m^2 (sau khi trồng 5 tháng). Bón thúc lần 3:3 g NPK_{hh}/m^2 (sau khi trồng 7 tháng). Thí nghiệm được bố trí theo các công thức:

CT1: 4 cây/m^2 (cự ly 50 × 50 cm)
CT2: 5 cây/m^2 (cự ly 40 × 50 cm)
CT3: 6 cây/m^2 (cự ly 40 × 40 cm)
CT4: 8 cây/m^2 (cự ly 30 × 40 cm)
CT5: 11 cây/m^2 (cự ly 30 × 30 cm)

Thí nghiệm 2: *Ảnh hưởng của phân bón đến sinh trưởng, phát triển Gừng đen dưới tán cây*

Công thức	CT0	CT1	CT2	CT3	CT4	CT5
Bón lót: Trấu ủ mục (kg)+ Phân chuồng hoai (kg)+ NPKhh (g)	0	0,5+ 0+ 2	0,5+ 0,15+ 1,5	0,5+ 0,3+ 1	0,5+ 0,45+ 0,5	0,5+ 0,3+ 0
Bón thúc 1: NPKhh (g)	0	2	1,5	1	0,5	20 mg/l (0,2l) B1
Bón thúc 2: NPKhh (g)	0	2	1,5	1	0,5	0,3 kg PHC
Bón thúc 3: NPKhh (g)	0	2	1,5	1	0,5	20 mg/l (0,2l) Humic

Mật độ trồng 6 cây/m^2. Thời gian bón tương tự như thí nghiệm 1. Các yếu tố thí nghiệm khác là đồng nhất.

- Phương pháp đánh giá chất lượng *Gừng đen* ***trồng tại mô hình***

Thí nghiệm 3: *Xác định hàm lượng tinh dầu thân rễ và lá cây trồng mô hình*

Lấy 200 gam mẫu Gừng đen (thân rễ hoặc lá) đã sơ chế, xay nhỏ với 500 ml nước, tiến hành chưng cất lôi cuốn hơi nước trong thời gian khoảng 4 - 6 giờ. Tách riêng phần tinh dầu thu được vào lọ có nắp đậy kín để tránh tinh dầu bay hơi. Cuối cùng, phần tinh dầu được làm khô bằng natri sunfat khan và được bảo quản trong lọ nắp đậy kín tại 5^oC đến khi phân tích tiếp. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần (đối với từng mẫu) để tính hàm lượng tinh dầu của thân rễ Gừng đen.

Thí nghiệm 4: *Xác định thành phần hóa học trong tinh dầu của Gừng đen cây trồng mô hình*

Phân tích các thành phần hóa học của tinh dầu bằng phương pháp sắc ký khí - khối phổ liên hợp (GC/MS) trên hệ thống thiết bị GCMS. Hệ thống GC-2010 được lắp với cột tách mao

quản Equity®-5 của hãng Supelco (Mỹ) (với chiều dài 30 m, đường kính trong 0,25 mm, lớp phim mỏng 0,25 µm) cùng với đầu dò khối phổ MS QP2010 Plus. Chế độ ion hóa va đập điện tử (EI) được sử dụng với năng lượng 70 eV. Khí mang heli tinh khiết 99,99% được sử dụng với tốc độ dòng 1,78 mL/phút. Kiểu bơm mẫu split với tỷ lệ chia dòng 1:30, mẫu được bơm tự động với thể tích 1 µL. Nhiệt độ vòi phun 250^0C, nhiệt độ giao diện khối phổ 250^0C, nhiệt độ buồng ion hóa 300^0C. Điện thế đầu dò 0,82 kV. Chế độ quét toàn bộ, dải quét 40÷350 amu. Chương trình nhiệt độ lò sắc ký khí: nhiệt độ đầu 40^0C (giữ đẳng nhiệt trong 1 phút), tăng 3^0C/phút đến 285^0C (giữ đẳng nhiệt trong 5 phút).

Việc xác định các thành phần trong tinh dầu được thực hiện bằng cách so sánh thời gian lưu, mô hình phân mảnh khối lượng của chúng với cơ sở dữ liệu phổ chuẩn đã được công bố ở thư viện NIST 0.5 và NIST 0.5s.

- *Bố trí thí nghiệm và xử lý số liệu:* Thí nghiệm bố trí theo kiểu chia ô, 3 lần lặp với dung lượng mẫu/lần lặp n = 10 khóm; 30 cây. Số liệu sau khi thu thập được tính toán, xử lý theo chương trình thống kê sinh học Iristart, cropstart.

- *Các chỉ tiêu đánh giá*: Mỗi công thức thí nghiệm chỉ theo dõi chỉ tiêu có ảnh hưởng rõ nhất đến tốc độ sinh trưởng và năng suất của cây. Các chỉ tiêu theo dõi là đồng nhất. Sau 8, 12 tháng xác định các chỉ tiêu sinh trưởng và năng suất. Cách đo các chỉ tiêu sinh trưởng như sau:

- Số lá/cây (lá): Đếm tổng số lá/cây sau lần theo dõi.
- Chiều rộng phiến lá (mm): Đo chỗ rộng nhất của lá lớn nhất.
- Chiều dài phiến lá (mm): Đo từ gốc phiến lá đến hết chiều dài lá.
- Chiều dài cuống lá (mm): Đo từ gốc đến bắt đầu phiến lá.
- Màu sắc phiến lá được quan sát bằng mắt thường.
- Tỷ lệ sống: (Tổng số cây sống*100)/tổng số cây theo dõi.
- Số cây/khóm: Trung bình số cây của 10 khóm đại diện.
- Khối lượng cây/khóm (g): Trung bình khối lượng cây của 10 khóm đại diện.
- Khối lượng củ (thân)/khóm (g): Trung bình khối lượng củ của 10 khóm đại diện.
- Khối lượng rễ/khóm (g): Trung bình khối lượng rễ của 10 khóm đại diện.
- Diện tích lá: Trung bình DTL của 30 cây đại diện theo phương pháp của Shouichi Yoshida và CS năm 1964 trong công thức 1: DTL (cm^2/cây) = KDR. Trong đó K = 0,725, D = chiều dài lá, R = chiều rộng lá.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Kết quả nghiên cứu đặc điểm sinh học cây Gừng đen trồng tại Ba Vì, Hà Nội.

1. Dạng cây: Thân thảo, thân ngầm dạng củ.
2. Chiều cao cây (trung bình): (25 - 35) cm.
3. Chiều dài phiến lá (trung bình): (15 - 22) cm.
4. Chiều rộng phiến lá (trung bình): (8 - 11) cm.
5. Tỷ lệ D/R (trung bình): 1,6 - 2,2.
6. Hình dạng phiến lá: Gốc phiến dạng nêm hay tròn, bằng nhau hay không, đầu có mũi nhọn ngắn, lưỡi lá dài 4 - 5 mm.
7. Phiến lá: Mặt trên: Nhẵn, lá non màu xanh nhạt sau đó dần chuyển sang màu xanh đậm. Lá bóng. Mặt dưới: Có lông rất thưa, mảnh, lá màu xanh nhạt, bạc.
8. Màu gân lá: Màu xanh cùng màu với mặt dưới lá.
9. Dạng mép lá: Liền phẳng.
10. Kiểu gân trên mặt lá: Lõm dưới lá và lồi ở phía trên.
11. Mật độ của gân trên mặt lá: 8 - 12.

12. Chiều dài cuống lá (trung bình): (15 - 20) cm

13. Hình dạng và màu sắc cuống lá: Lõm lòng máng, màu xanh hoặc đỏ tím.

14. Dạng lá bắc: Các lá bắc xếp 2 hàng, xòe ra, cỡ (2,1 - 2,5) cm × (0,8 - 1) cm, màu hồng đỏ sẫm, mặt ngoài có lông, nhẵn và bóng ở mặt trong, ít lợp lên nhau; mỗi lá bắc bao 3 hoa, thường chỉ có 1 hoa nở; các lá bắc con hình ống, dài (1,9 - 2,3) cm, xẻ xiên vát xuống 1/2 chiều dài, màu hồng.

15. Số lá đến khi ra hoa: (1 - 4) lá.

16. Thời gian ra thân (lá lộc) mới: Mùa xuân, sau đó cây hình thành mầm hoa ở thân mới.

17. Sự hình thành hoa: Có, cụm hoa mọc ở bẹ lá thấp nhất, cuống cụm hoa dài (1,2 - 2,0) cm; toàn bộ hoa và cụm hoa dài (4,5 - 8,0) cm.

18. Dạng đài hoa: Hình ống, dài 8 - 9 mm, màu trắng, có lông thưa, đầu chia thành 2 - 3 răng nhọn.

19. Dạng tràng hoa: Có phần dưới hình ống, dài đến 2,8 - 3 cm, màu trắng phía gốc, màu vàng nhạt ở giữa đến đầu; phần trên chia thành 3 thùy dạng trái xoan, cỡ (13 - 15) mm × (4 - 5) mm, 2 thùy bên hơi rộng hơn thùy lưng, cuộn lại khi hoa nở.

20. Dạng cánh môi: Gần như hình tam giác, cỡ (2,05 × 2,05) cm, màu vàng, đầu xẻ sâu xuống hơn 1/2 chiều dài thành 2 thùy, các thùy xòe ra, chân thùy có 2 chấm đỏ.

21. Dạng bao phấn: Bao phấn 2 ô, dài 4 - 5 mm, song song; trung đới kéo dài lên phía trên thành mào tròn, dài 1 mm, màu vàng.

22. Dạng nhụy: Vòi nhụy dài (2,6 - 3,5) mm, vòi nhụy màu trắng, núm nhụy dạng phễu màu vàng nhạt.

23. Dạng nhị: Nhị lép bên dạng trái xoan hẹp, cỡ (1,8 - 2 × 0,5) cm, màu vàng, có lông tuyến ở mặt trong gốc.

24. Thời gian ra hoa: Kéo dài từ đầu tháng 5 đến tháng 8.

25. Sự hình thành quả hạt: có nhưng rất hiếm gặp.

26. Dạng quả: Quả hình bầu dục dạng bầu có 3 ô có lông dày, nhọn 2 đầu.

27. Số hạt trên quả (trung bình): 3 - 9.

28. Dạng hạt: Hạt tròn, màu trắng.

29. Màu vỏ củ: Trắng đục hơi vàng nhẹ.

30. Màu vảy củ: Trắng đục hơi vàng nhẹ.

31. Màu thịt củ: Trắng đục hoặc trong, mọng.

32. Độ xơ của củ: 1 - Nạc; 2 - Trung bình; 3 - Xơ. Dạng 2 - Trung bình.

33. Kích thước củ: Củ đơn (0,5 - 1,5) cm × (0,5 - 1,2) cm.

34. Khối lượng củ trên khóm: Củ đơn (0,5 - 3,93) g; khóm củ (2 - 15) g.

35. Số đốt trên củ: (1 - 4) đốt.

36. Tập tính sinh sản vô tính bằng củ: Dạng phân nhánh thứ cấp I, hiếm có phân nhánh thứ cấp II, III.

37. Thời gian giữ lá trên cây hơn 1 năm.

38: Cây có tinh dầu, trong tinh dầu chứa hoạt chất chính (1,8-cineole, β-citral, a-citral, geranyl acetate, α-pinene, β-pinene, D-limonene, Geraniol, Terpinene-4-ol, β-Sesquiphellandrene, β-Pinene,...).

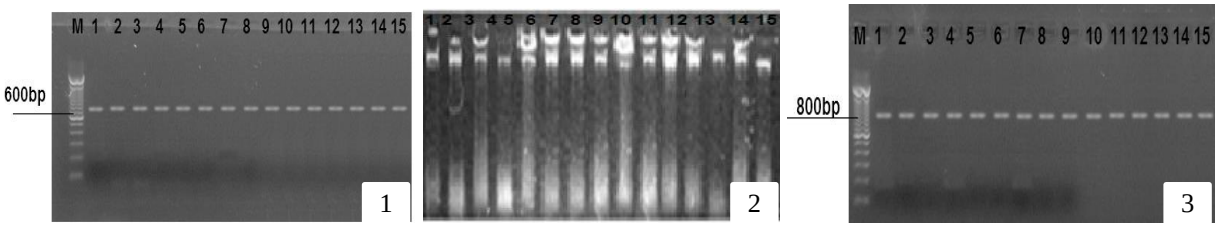
3.2. Nghiên cứu xác định mối quan hệ di truyền bằng kỹ thuật sinh học phân tử

Kết quả tách chiết và nhân bản ADN Gừng đen 15 mẫu Gừng đen đại diện cho 3 vùng phân bố như sau:

- *Kết quả phân tích trên phần mềm BLAST:*

Kết quả giải trình tự ADN (gen ITIS và Martk) của 15 mẫu (GD1 đến GD15) Gừng đen, phân tích trên phần mềm BLAST và so

sánh độ tương đồng của 15 mẫu (GD1 - GD15) với các mẫu trên ngân hàng trình tự (Genbank) cho thấy: Trình tự gen MatK của 15 mẫu Gừng đen có tương đồng rất cao 99,8 - 100% ở gen matK so với chi khác trong họ gừng ở Genbank. Vậy là, đối với cây Gừng đen việc giải trình tự 1 phần gen matK chưa biểu hiện rõ đến loài, kết quả giải trình tự cho thấy kiểu gen MatK có độ tương đồng rất cao với mẫu chi *Kaempferia, Haniffia, Distichochlamys* sp., có thể các gen trong lục lạp ít có sự biến đổi, do đó không có sự sai khác nhiều giữa các chi, các loài trong họ Gừng. Kết quả giải trình tự gen ITS của 15 mẫu Gừng đen đều tương đồng cao so với loài *Distichochlamys citrea* (97, 32 - 99, 66%) và có hệ số tương đồng thấp hơn so với *Distichochlamys* sp. (96 - 97)%, hệ số tương đồng thấp nhất với họ hàng của chúng là *Scaphochlamys biloba* (93 - 94)%. Điều này cũng cho thấy khả năng cao các mẫu Gừng đen là loài *D. citrea*. Tuy nhiên, để xác định sâu hơn về sự khác biệt giữa các cây ở các điều kiện sống khác nhau xem biến đổi về cấu trúc di truyền thì đề tài phân tích sâu hơn về trình tự gen của từng mẫu và so sánh với nhau.



Hình 2. Ảnh điện di sản phẩm ADN

1: Điện di AND tổng số; 2,3. điện di sản phẩm PCR nhân bản gen ITS và Martk

Chú giải: vạch điện di từ 1 - 15 tương ứng với các mẫu Gừng đen GD1 - GD15 phân tích.

M: 100 bp DNA ladder

Kết quả so sánh 15 trình tự gen MatK của 15 mẫu Gừng đen cho thấy các mẫu Gừng đen có ít sự biến đổi về trình tự gen, chỉ só 4 nucleotid ở 4 vị trí (40, 282, 297, 536) trong gen, vì vậy ít thể hiện sự đa dạng di truyền.

Kết quả so sánh trình tự 1 phần gen ITS của 15 mẫu Gừng đen cho thấy các mẫu Gừng đen có nhiều hơn 19 vị trí nucleotide biến đổi, vị trí biến đổi của các trình tự gen ITS của các mẫu từ GD1 - GD9 và từ GD14 - GD15 ít sự biến đổi, trung bình 1 mẫu có 4 sự biến đổi và tương tự như nhau, mẫu từ GD10 - GD13 biến đổi nhiều hơn, trung bình 1 mẫu có 10 sự biến đổi và tương tự như nhau. Sự biến đổi này có thể thể hiện sự đa dạng di truyền hơn của các mẫu trong các điều kiện sống khác nhau hoặc các loài khác nhau.

Như vậy, ở các mẫu Gừng đen nghiên cứu vùng gen ITS biến đổi phong phú hơn so với vùng gen MatK. Để tìm hiểu sự phân hóa các các mẫu nghiên cứu đã tính khoảng cách di truyền và xây dựng cây phát sinh chủng loại dựa trên 15 trình tự gen MatK và gen ITS của các mẫu nghiên cứu.

- *Khoảng cách di truyền*

Khoảng cách di truyền phản ánh sự biến đổi tiến hóa phân tử giữa các mẫu nghiên cứu. Khoảng cách di truyền giữa các mẫu Gừng đen ở các gen được trình bày trong hình 3 và 4.

Gen MatK khoảng cách di truyền giữa các mẫu Gừng đen nghiên cứu rất nhỏ từ 0% đến 0,4%. Khoảng cách di truyền giữa trình tự được định danh *D. citrea* có mã hiệu Genbank

AB55291 với các trình tự của mẫu thuộc chi *Distichoclamys* nhưng chưa được định danh đến loài từ 0,1 - 0,4%. Khoảng cách di truyền của các mẫu nghiên cứu với mẫu có trình tự được định danh *D. citrea* từ 0 - 0,2%. Do đó, có thể thấy ở một phần gen MatK chưa ghi nhận được sự phân hóa di truyền ở mức độ loài giữa các mẫu Gừng đen.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1. GD1MATK																	
2. GD2MATK	0.001																
3. GD3MATK	0.000	0.001															
4. GD4MATK	0.001	0.000	0.001														
5. GD5MATK	0.002	0.001	0.002	0.001													
6. GD6MATK	0.002	0.004	0.002	0.004	0.002												
7. GD7MATK	0.001	0.002	0.001	0.002	0.004	0.004											
8. GD8MATK	0.001	0.002	0.001	0.002	0.004	0.004	0.000										
9. GD9MATK	0.002	0.004	0.002	0.004	0.002	0.000	0.004	0.004									
10. GD10MATK	0.000	0.001	0.000	0.001	0.002	0.002	0.001	0.001	0.002								
11. GD11MATK	0.001	0.002	0.001	0.002	0.004	0.001	0.002	0.002	0.001	0.001							
12. GD12MATK	0.000	0.001	0.000	0.001	0.002	0.002	0.001	0.001	0.002	0.000	0.001						
13. GD13MATK	0.001	0.002	0.001	0.002	0.004	0.001	0.002	0.002	0.001	0.001	0.000	0.001					
14. GD14MATK	0.000	0.001	0.000	0.001	0.002	0.002	0.001	0.001	0.002	0.000	0.001	0.000	0.001				
15. GD15MATK	0.000	0.001	0.000	0.001	0.002	0.002	0.001	0.001	0.002	0.000	0.001	0.000	0.001	0.000			
16. AB552951.1 Distichochlamys citrea	0.000	0.001	0.000	0.001	0.002	0.002	0.001	0.001	0.002	0.000	0.001	0.000	0.001	0.000	0.000		
17. HM367639.1 Distichochlamys sp. XYM 441-1	0.004	0.005	0.004	0.005	0.006	0.006	0.005	0.005	0.006	0.004	0.005	0.004	0.005	0.004	0.004	0.004	
18. AB553309.1 Distichochlamys sp. AS18	0.001	0.002	0.001	0.002	0.004	0.004	0.002	0.002	0.004	0.001	0.002	0.001	0.002	0.001	0.001	0.001	0.002

Hình 3. Khoảng cách di truyền gen Matk giữa các mẫu Gừng đen

Tuy nhiên, ở vùng gen ITS khoảng cách di truyền giữa các mẫu nghiên cứu cho thấy sự biến đổi di truyền rõ ràng ở mức độ loài. Khoảng cách di truyền giữa các mẫu ở hình 4.

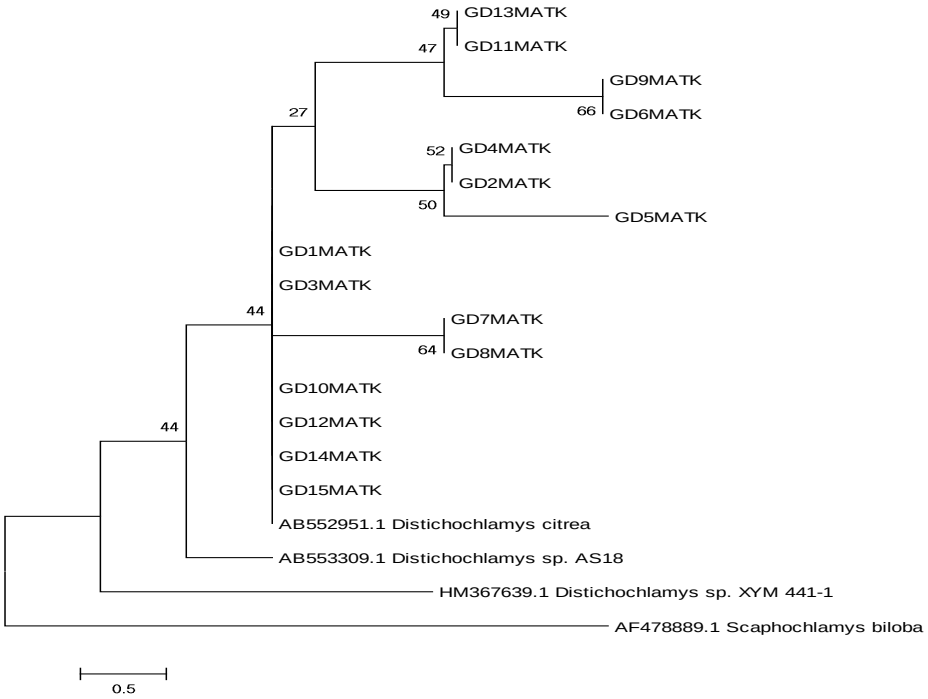
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
1. GD1ITS																							
2. GD2ITS	0.000																						
3. GD3ITS	0.005	0.005																					
4. GD4ITS	0.005	0.005	0.000																				
5. GD5ITS	0.005	0.005	0.000	0.000																			
6. GD6ITS	0.007	0.007	0.005	0.005	0.005																		
7. GD7ITS	0.007	0.007	0.005	0.005	0.005	0.000																	
8. GD8ITS	0.009	0.009	0.011	0.011	0.011	0.005	0.005																
9. GD9ITS	0.009	0.009	0.011	0.011	0.011	0.005	0.005	0.000															
10. GD10ITS	0.016	0.016	0.021	0.021	0.021	0.023	0.023	0.025	0.025														
11. GD11ITS	0.016	0.016	0.021	0.021	0.021	0.023	0.023	0.025	0.025	0.000													
12. GD12ITS	0.016	0.016	0.021	0.021	0.021	0.023	0.023	0.025	0.025	0.000	0.000												
13. GD13ITS	0.016	0.016	0.021	0.021	0.021	0.023	0.023	0.025	0.025	0.000	0.000	0.000											
14. GD14ITS	0.005	0.005	0.000	0.000	0.000	0.005	0.005	0.011	0.011	0.021	0.021	0.021	0.021										
15. GD15ITS	0.005	0.005	0.000	0.000	0.000	0.005	0.005	0.011	0.011	0.021	0.021	0.021	0.021	0.000									
16. Distichochlamys citrea.AB552946	0.009	0.009	0.011	0.011	0.011	0.005	0.005	0.004	0.004	0.021	0.021	0.021	0.021	0.011	0.011								
17. AF478744.1 Distichochlamys citrea	0.007	0.007	0.009	0.009	0.009	0.004	0.004	0.005	0.005	0.023	0.023	0.023	0.023	0.009	0.009	0.005							
18. AJ388282.1 Distichochlamys citrea	0.014	0.014	0.016	0.016	0.016	0.011	0.011	0.012	0.012	0.030	0.030	0.030	0.030	0.016	0.016	0.013	0.011						
19. Distichochlamys citrea.AY424757	0.007	0.007	0.011	0.011	0.011	0.005	0.005	0.007	0.007	0.023	0.023	0.023	0.023	0.011	0.011	0.007	0.005	0.012					
20. Distichochlamys rubrostriata.HM236130	0.018	0.018	0.023	0.023	0.023	0.021	0.021	0.023	0.023	0.009	0.009	0.009	0.009	0.023	0.023	0.020	0.021	0.029	0.021				
21. Distichochlamys sp.HM367635	0.021	0.021	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.027	0.027	0.012	0.012	0.012	0.012	0.025	0.025	0.023	0.025	0.032	0.025	0.011			
22. Distichochlamys sp.AB552947	0.020	0.020	0.025	0.025	0.025	0.023	0.023	0.025	0.025	0.011	0.011	0.011	0.011	0.025	0.025	0.021	0.023	0.030	0.023	0.002	0.013		
23. Distichochlamys sp.AF478745	0.023	0.023	0.029	0.029	0.029	0.027	0.027	0.029	0.029	0.014	0.014	0.014	0.014	0.029	0.029	0.025	0.027	0.034	0.027	0.005	0.016	0.004	

Hình 4. Khoảng cách di truyền gen ITS giữa các mẫu Gừng đen

Ở gen ITS, khoảng cách di truyền giữa các mẫu Gừng đen 0 - 2,5%, trong đó các mẫu GD1 - GD13 có khoảng cách di truyền lớn từ 1,6% đến 2,5% với các mẫu còn lại. Các mẫu GD1 - GD9 và GD14, GD15 có khoảng cách di truyền 0 -1,1%. Khoảng cách di truyền giữa các mẫu được định danh là *D. citrea* từ 0,5 - 1,3% và khoảng cách di truyền từ các trình tự được định danh *D. citrea* với trình tự được định danh là *D. rubrostriata* và với các trình tự chưa được định danh từ 2% đến 3,4%. Như vậy, trong 15 mẫu Gừng đen nghiên cứu có thể thuộc 2 loài. Hình ảnh trên cây phát sinh chủng loại cho thấy rõ hơn sự phân hóa giữa các mẫu nghiên cứu

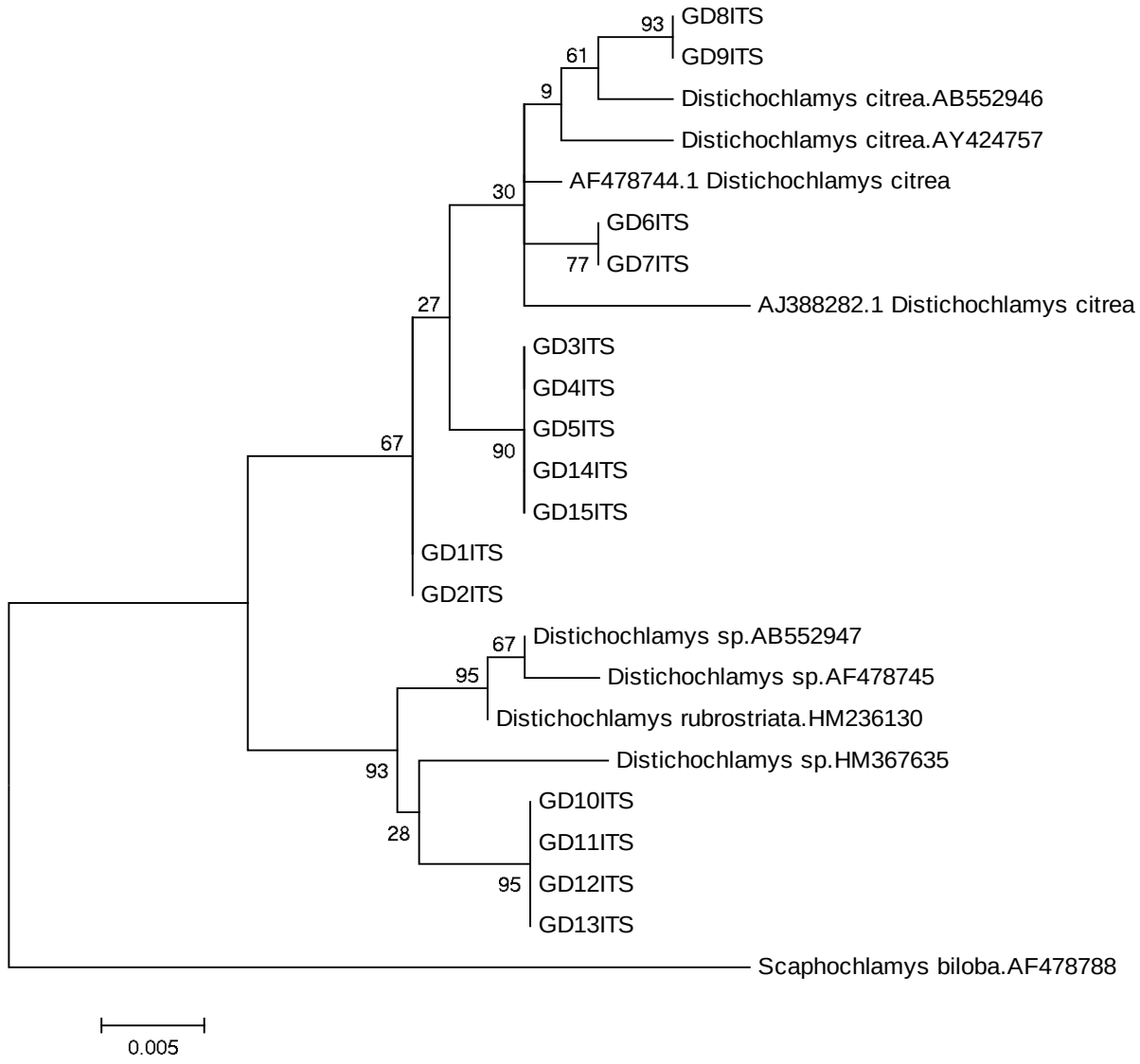
- Cây phát sinh chủng loại

Để tìm hiểu vị trí phân loại của mẫu Gừng đen, đã sử dụng 15 trình tự của gen MatK, gen ITS trong nghiên cứu này và các trình tự tương đồng của các các loài trong chi Gừng đen đã được công bố trong ngân hàng trình tự ADN (Genbank), trình tự của loài *Scaphoclamys biloba* được sử dụng làm gốc nhóm minh họa rõ hơn cho mối quan hệ di truyền giữa các trình tự nghiên cứu với các trình tự tham khảo được trình bày ở hình 5 và 6.



Hình 5. Cây phát sinh chủng loại NJ (Neighbor-Joining) theo trình tự gen MatK của các mẫu Gừng đen nghiên cứu và tham khảo
(Số ở gốc nhánh là giá trị bootstrap với 1000 lần thử)

Hình 5 cho thấy các trình tự nghiên cứu và trình tự tham khảo được định danh là *D. citrea* tập trung ở 1 nhánh của cây phát sinh chủng loại. Tuy nhiên, sự phân hóa này không rõ ràng nên giá trị bootstrap nhỏ hơn 50%. Kết quả này một lần nữa cho thấy ở một phần gen MatK không ghi nhận được sự phân hóa di truyền giữa các loài trong chi Gừng đen. Kết quả nghiên cứu này cũng phù hợp với nghiên cứu của các Kress và đồng tác giả (2002) và Ngamriabsakul và đồng tác giả (2004), Yen và đồng tác giả (2016). Tuy nhiên, cây phát sinh chủng loại được xây dựng dựa trên trình tự gen ITS cho thấy sự phân hóa rõ ràng giữa các mẫu nghiên cứu.



Hình 6. Cây phát sinh chủng loại NJ (Neighbor-Joining) theo trình tự gen ITS của các mẫu nghiên cứu và tham khảo (Số ở gốc nhánh là giá trị bootstrap với 1000 lần thử)

Cây phát sinh chủng loại được chia thành 2 nhánh lớn với giá trị bootstrap 67% và 93%. Nhánh 1 gồm các trình tự Gừng đen có ký hiệu GD1 - GD9 và GD14,15 cùng với các trình tự của loài *D. citrea* nên có thể nhận định các mẫu này thuộc loài Gừng đen *D. citrea.* Như vậy, có thể thấy màu sắc lá của loài này rất đa dạng. Nhánh 2 gồm các trình tự GD10 - GD13, *D. rubrostriata* và các trình tự tham khảo của loài Gừng đen chưa được định danh đến loài. Nhánh này lại phân thành 2 nhánh nhỏ và trình tự GD10 - GD13 cùng với trình tự có mã hiệu HM367635 chưa được định danh đến loài tập trung ở 1 nhánh với giá trị bootstrap 28% cho thấy sự phân hóa này không rõ ràng, do đó khó có thể khẳng định mẫu GD10 - GD13 thuộc loài nào.

Như vậy, đã giải trình tự thành công trình tự một phần gen MatK và vùng gen ITS của 15 mẫu Gừng đen. Vùng gen ITS thích hợp để định loại chi Gừng đen hơn gen MatK. Các mẫu GD1 - GD9, GD14 và GD15 thuộc loài Gừng đen *D. Citrea*

3.3. Nghiên cứu một số kỹ thuật trồng và chăm sóc cây Gừng đen

3.3.1. Nghiên cứu ảnh hưởng của mật độ trồng đến sinh trưởng và năng suất của Gừng đen dưới tán cây

Kết quả nghiên cứu cho thấy: Sinh trưởng cây đạt cao nhất khi trồng ở mật độ (5 - 6) cây/m^2, tỷ lệ lá cân đối. Tăng mật độ cây lên 8 và 11 cây/m^2, sinh trưởng kém hơn, tỷ lệ (D/R) mất cân đối hơn. Mật độ 4 cây/m^2 mặc dù kích thước lá lớn nhưng nhìn chung sinh trưởng vẫn kém hơn. Khi mật độ tăng lên, có sự cạnh tranh ánh sáng và sinh dưỡng nên sinh trưởng giảm. Ngoài ra, trong tự nhiên Gừng đen thường sống thành quần thể theo đám, vì vậy mật độ thưa không tạo được tiểu sinh thái phù hợp nên cây sinh trưởng kém.

Bảng 1. Ảnh hưởng của mật độ trồng đến sinh trưởng của cây (sau 8 tháng trồng)

Mật độ (khóm/m^2)	Số cây/khóm (cây)	Số lá/cây (lá)	Chiều dài cuống lá (cm)	Chiều dài TB phiến lá (cm)	Chiều rộng TB phiến lá (cm)	Tỷ lệ (D/R)
11 (30 × 30 cm)	2,2	2,1	15,2	15,8	6,9	2,29
8 (40 × 30 cm)	3,1	2,7	15,8	15,1	7,1	2,13
6 (40 × 40 cm)	3,2	2,8	16,7	16,2	8,5	1,90
5 (40 × 50 cm)	2,9	2,5	16,1	16,5	8,6	1,92
4 (50 × 50 cm)	2,8	2,6	14,3	15,9	8,1	1,96
$LSD_{0,05}$	*0,11*	*0,36*	*0,64*	*0,46*	*0,30*	
CV (%)	*2,3*	*7,9*	*2,7*	*1,6*	*2,1*	

Bảng 2. Ảnh hưởng của mật độ trồng đến năng suất của cây (sau 12 tháng trồng)

Mật độ (cây/m^2)	Khối lượng cây/khóm (g)	Khối lượng củ/khóm (g)	Khối lượng rễ/khóm (g)	Tổng khối lượng rễ củ/khóm	Năng suất lý thuyết cây/ha (kg)	Năng suất lý thuyết củ,rễ/ha (kg)
11(30 × 30 cm)	59,2	7,0	5,7	12,7	6512	1400
8 (40 × 30 cm)	85,4	10,5	9,2	19,7	6832	1576
6 (40 × 40 cm)	105,0	13,8	12,7	26,5	6300	1588
5 (40 × 50 cm)	111,0	13,9	12,5	26,4	5550	1320
4 (50 × 50 cm)	109,5	13,0	12,1	25,1	4381	1004
$LSD_{0,05}$	*4,5*	*1,4*	*1,6*	*3,0*	*270*	*182*
CV (%)	*2,6*	*6,8*	*8,4*	*7,8*	*2,3*	*7,9*

Kết quả tính năng suất của cây trồng 12 tháng cho thấy: Mật độ cây trồng 8, 11 cây/m^2 cho năng suất thấp, củ và cây nhỏ hơn so với các công thức khác. Năng suất của cây trồng mật độ 6, 5 cây/m^2 là tương đương. Tuy nhiên, so sánh năng suất lý thuyết của công thức trồng 6 cây (1.588 kg/ha) > 5 cây (1.320 kg/ha) và sự khác nhau ở mức có ý nghĩa. Như vậy, mật độ 6 cây/m^2 là phù hợp để trồng Gừng đen dưới tán cây ở Ba Vì, Hà Nội.

3.3.2. Nghiên cứu ảnh hưởng của phân bón đến sinh trưởng và năng suất của Gừng đen dưới tán cây

Cây Gừng đen là cây hoang dại, chưa có nghiên cứu về ảnh hưởng của phân bón đến sinh trưởng và năng suất. Vì vậy, thí nghiệm bước đầu áp dụng lượng phân bón cho cây Nghệ với NPK tỷ lệ (13N: $21P_2O_5$: $13K_2O$) cho năng suất cao (Lê Khả Tường, 2016) kết hợp phân chuồng hoai nhằm tìm ra lượng phân bón phù

hợp để tăng năng suất và chất lượng của cây Gừng đen. Đặc điểm cây Gừng đen khi chuyển vùng sinh thái từ độ cao 500 m xuống trồng ở độ cao 100 m đã lụi lá, cháy lá, sinh trưởng yếu hơn so với vùng xuất xứ. Vì vậy, thí nghiệm thử phun lên lá sau trồng 10 ngày chế phẩm B1 nhằm tăng sức đề kháng của cây tạo độ bền cho lá tăng khả năng chống chịu khi chuyển vùng sinh thái. Chế phẩm humic là chất hữu cơ dạng dung dịch nên khi bón cây Gừng đen có hệ rễ to ăn nổi dễ dàng hấp thụ tăng hiệu quả bón phân. Kết quả ở bảng 3.

Bảng 3. Ảnh hưởng của phân bón đến phát triển thân lá cây Gừng đen (8 tháng)

Công thức	Thời gian đẻ nhánh (ngày)	Số cây /khóm (cây)	Chiều cao cây (cm)	Số lá/cây	Tổng diện tích lá/khóm (cm^2)
CT0	40	2,4	31	2,1	439
CT1	35	2,1	26	1,8	298
CT2	25	2,6	31	2,2	527
CT3	20	3,0	32	2,4	750
CT4	20	3,1	33	2,7	851
CT5	20	3,2	34	2,8	889
$LSD_{0,05}$	*2,8*	*0,10*	*1,2*	*0,12*	*19,15*
CV (%)	*6,0*	*1,9*	*2,5*	*3,1*	*1,7*

Kết quả cho thấy: Sự sinh trưởng của cây tỷ lệ thuận với liều lượng phân hữu cơ nhưng tỷ lệ nghịch với liều phân vô cơ, phân bón hữu cơ bón lót đã kích thích đẻ nhánh nhanh hơn. Cây sinh trưởng tốt ở công thức CT5 (không có phân vô cơ) và CT4 (lượng phân vô cơ thấp 2 g NPK_{hh}), các công thức phân bón khác sinh trưởng kém hơn, thậm chí bón 8 g NPK_{hh} ức chế sinh trưởng, cây chỉ đẻ thêm 1 nhánh mới, 1 số lá vàng úa rồi chết 1 số lá khác bị cháy đầu lá, cây sinh trưởng chậm, lá nhỏ, ra ít lá. Để xác định lượng phân bón cho cây có năng suất cao. Thí nghiệm tiếp tục theo dõi ảnh hưởng của 5 công thức phân bón đến năng suất cây Gừng đen 12 tháng trồng.

Bảng 4. Ảnh hưởng phân bón đến năng suất củ Gừng đen (12 tháng trồng)

Công thức	Khối lượng cây/khóm (g)	Khối lượng củ /khóm (g)	Khối lượng rễ/ khóm (g)	Tổng khối lượng củ rễ/ khóm (g)	Năng suất lý thuyết (kg/ha)	Năng suất lý thuyết củ rễ (kg/ha)	Hiện trạng thân (củ)
CT0	58	7,7	7,2	14,9	3456	893	Củ còn cuống lá tươi, rễ lớn, dạng thân
CT1	34	5,0	4,4	9,4	2040	564	Củ còn cuống lá tươi, rễ lớn, dạng thân
CT2	55	7,9	6,5	14,4	3312	806	Củ còn cuống lá tươi, rễ lớn, dạng thân
CT3	84	11,7	9,3	21,0	5040	1260	Củ còn cuống lá tươi, rễ lớn, dạng củ
CT4	106	13,9	12,2	26,1	6336	1564	Củ còn cuống lá tươi, rễ lớn, dạng củ
CT5	112	15,3	14,4	29,7	6732	1785	Củ còn cuống lá tươi, rễ lớn, dạng củ
$LSD_{0,05}$	*4,2*	*0,5*	*0,7*	*0,9*	*257*	*52*	
CV (%)	*3,2*	*2,6*	*4,4*	*2,5*	*3,2*	*2,5*	

Kết quả tính năng suất sau 12 tháng trồng có xu thế tương tự như sinh trưởng, công thức không bón phân và bón lượng NPK cao 8 g/cây cho năng suất thấp. Tăng lượng phân hữu cơ và giảm lượng phân vô cơ thì năng suất tăng lên, năng suất của cây ở công thức CT5 (0,6 kg PHC + 20 mg/lB1 + 20 mg/l humic) cao gấp 2 lần và CT4 (0,45 kg PCH + 2 g NPK_{hh}) cao gấp 1,8 lần so với đối chứng, thân phình dạng củ rõ ràng, rễ to và đầu rễ phìn dạng u màu trắng trong có mùi vị tương tự củ. Điều này cũng phù hợp với diễn biến sinh lý và sinh thái, cây Gừng đen sống dưới tán rừng có độ mùn cao và là cây đang được thuần hóa, chưa quen với việc hấp thu phân vô cơ. Vì vậy, liều 8 g/khóm đã gây ngộ độc rễ dẫn đến đẻ nhánh và số lá ít, năng suất thấp. Khi bón PCH có độ mùn cao cây ra nhánh nhiều hơn, số lá/cây lớn hơn, đặc biệt tốc độ sinh trưởng của cây nhanh hơn, tích lũy dinh dưỡng nhiều hơn, là cơ sở tạo năng suất cao hơn.

Đây là cây có tiềm năng phát triển làm nguyên liệu cho ngành dược, sản xuất tinh dầu, nếu bón phân hữu cơ và bổ sung các chế phẩm nông nghiệp công nghệ cao hữu cơ vào các giai đoạn phù hợp (chế phẩm B1 sau khi trồng đã tăng sức đề kháng, cây hồi phục nhanh hơn, sau 7 tháng bổ sung humic tạo sức bền của cây) đã tạo được năng suất cao hơn đồng thời góp phần tăng độ phì của đất, giảm ô nhiễm phân hóa học cho đất, có lợi cho môi trường. Cây Gừng đen sẽ thu được sản phẩm dạng hữu cơ an toàn để sản xuất tinh dầu và dược liệu. Tuy nhiên, cũng có thể áp dụng công thức CT4 (phân bón hữu cơ kết hợp lượng nhỏ phân vô cơ) để mở rộng sản xuất, giảm giá thành.

Kết quả điều tra thành phần sâu hại trên Gừng đen: Cây Gừng đen dạng hoang dại đưa từ Vườn Quốc Gia Bạch Mã về trồng tại vườn rừng Ba Vì không thấy xuất hiện sâu hại. Vào thời kỳ mùa xuân mưa phùn tháng (1 - 3) và mùa mưa nhiều tháng (7 - 8) có thấy xuất hiện bệnh héo gốc mốc trắng hại cây đang ra chồi mới nhưng mức độ phổ biến hẹp và gây hại nhẹ. Xử lý phun chế phẩm sinh học nấm đối kháng *Trichoderma haizaum,* sau 12 tháng không thấy xuất hiện bệnh.

3.4. Nghiên cứu hàm lượng và thành phần tinh dầu Gừng đen

Hiệu suất của quá trình chưng cất tinh dầu củ rễ Gừng đen đạt 0,49% (v^{ml}/w^{g}) theo nguyên liệu tươi. Tinh dầu thu được dưới dạng lỏng, màu vàng nhạt, nhẹ hơn nước và có mùi thơm đặc trưng. Phương pháp GC/MS chỉ ra sự có mặt của 30 cấu tử thuộc 4 nhóm gồm: Nhóm dẫn xuất oxy hóa của monoterpene (OM, 77,94%; 10 cấu tử), monoterpene (MH; 12,43%; 11 cấu tử), Nhóm sesquiterpene (SH; 9,49%; 7 cấu tử), Nhóm chất béo (AC;0,16%; 1 cấu tử). Trong đó 19 cấu tử chính có hàm lượng hơn 1%, chiếm 94,46% theo khối lượng; 11 cấu tử phụ có hàm lượng nhỏ hơn 1% chỉ chiếm 5,54% theo khối lượng.

Tính theo khối lượng, đến 91,96% tinh dầu thu được ứng dụng trong dược phẩm, mỹ phẩm, hương liệu, cụ thể như sau: 1,8 - Cineole (17,37%) được chứng minh ức chế dòng tế bào ung thư máu HL-60 ở người (Moteki H *et al.*, 2002) điều trị ho, đau cơ bắp, chứng loạn thần kinh chức năng, bệnh thấp khớp, hen suyễn, khả năng kháng viêm trong điều trị các bệnh về đường hô hấp, tác dụng chống oxy hóa (Başer K. H. C., Buchbauer G., 2010); Trans-Geraniol (27,89%) làm giảm đề kháng của tế bào ung thư ruột kết đối với thuốc 5 - Fluorouracil, góp phần nâng cao hiệu quả điều trị ung thư của thuốc (Carnesecchia S. *et al.*, 2004). Nhóm citral (9,51%) có tác dụng tích cực trong điều trị bệnh truyễn nhiễm do vi khuẩn tự cầu gây ra, gây chế các tế bào ung thư ú và ung thư bạch cầu (Martins H. B., Selis N., 2017), Linalool (2,29%) có tác dụng kháng khuẩn, an thần và chống viêm (Irina P. *et al.*, 2018),

Bảng 6. Thành phần hóa học tinh dầu củ rễ Gừng đen dòng Bạch Mã trồng tại Ba Vì

TT	Tên chất	Nhóm chất	Thời gian lưu (phút)	Hàm lượng (%)
1	α-Thujene	MH	6,66	0,28
2	α-Pinene	MH	6,88	2,49
3	Camphene	MH	7,34	1,13
4	β-Phellandrene	MH	8,12	1,49
5	β-Pinene	MH	8,24	1,30
6	6 - Methyl-5 - hepten-2 - one	AC	8,54	0,16
7	β-Myrcene	MH	8,69	2,06
8	α -terpinene	MH	9,63	0,41
9	Cymene	MH	9,92	0,42
10	D-Limonene	MH	10,11	1,89
11	1,8 - Cineole	OM	10,23	17,37
12	β-Ocimene	MH	10,43	0,09
13	γ-Terpinene	MH	11,27	0,89
14	Linalool	OM	12,99	2,27
15	endo-Borneol	OM	15,87	2,32
16	Terpinene-4 - ol	OM	16,39	3,94
17	α-Terpineol	OM	16,99	2,29
18	cis-Geraniol	OM	18,68	1,76
19	β-Citral	OM	19,24	3,57
20	trans-Geraniol	OM	19,92	27,89
21	cis,trans-Citral	OM	20,57	5,94
22	Fenchyl acetate	OM	21,22	0,77
23	Geranyl acetate	OM	25,47	9,82
24	β-Elemene	SH	25,81	1,05
25	β-Caryophyllene	SH	26,95	0,63
26	β-Selinene	SH	29,70	1,97
27	Guaia-1(10),11 - diene	SH	29,99	0,73
28	β-Bisabolene	SH	30,60	0,65
29	β-Sesquiphellandrene	SH	31,21	3,91
30	1,1,4,7 - Tetramethyldecahydro-1H-cyclopropa[e]azulene	SH	37,52	0,54
	Số lượng các cấu tử			30
	Aliphatic compound (AC)			0,16
	Monoterpene hydrocarbon (MH)			12,43
	Oxygenated monoterpene (OM)			77,94
	Sesquiterpene hydrocarbon (SH)			9,47
	Tổng:			**100,00**

endo-Borneol (2,32%) được xem là một tác nhân mới giúp cải thiện quá trình phân phối thuốc tới hệ thần kinh trung ương (Zhang Q. L. *et al*., 2017), Terpinene-4 - ol (3,94%) tác dụng chống oxy hóa, chống viêm, chống tăng sinh, kháng khuẩn, giảm đau, chống oxy hóa, chống ung thư, chống đông máu, hạ đường huyết (Shapira S. *et al*., 2016). Nhóm Pinene (8,18%) ức chế giãn phế quản ở người (Bahare S. *et al*., 2019). β-Myrcene (2,06%) tác dụng chống oxy hóa, bảo vệ tim mạch, ngăn ngừa và điều trị viêm loét dạ dày và tá tràng (Ciftci, O. *et al*., 2014). Cymene (0,42%) được sử dụng để ngăn ngừa ho và loại bỏ đờm (Joglekar M. M. *et al*., 2014). α-Terpinene (2,27%) có hoạt tính chống co giật, an thần giảm đau, chống ung thư, bảo vệ dạ dày, kháng nấm. β-Sesquiphellandrene (3,91%) có khả năng ức chế mạnh đối với virus Rhino IB (Denyer C. V. *et al*., 1994), ngoài ra β-Selinene (1,97%) có tác dụng chống oxy hóa, người dân Ấn Độ dùng nhiều trong y học cổ truyền (Mahesh C. *et al*., 2017), β-Elemene (1,05%) ức chế sự tăng sinh của tế bào ung thư bảo vệ rối loạn hệ miễn dịch, giảm sự tăng sinh, di cư và xâm lấn và tăng cường tính nhạy cảm phóng xạ của tế bào ung thư phổi (Bingtao Z., Xinbing S., 2019). β-Caryophyllene (0,63%) có lợi cho bệnh đại tràng, viêm xương khớp, bệnh tiểu đường, thiếu máu não, trầm cảm lo âu, xơ gan hóa (Saad S. Dahham *et al*., 2015); β-Bisabolene (0,65%) có tác dụng tích cực trong điều trị ung thư tuyến vú (Yeo S. *et al*., 2015). Ngoài các cấu tử có tác dụng chữa bệnh còn 1 số cấu tử dùng để làm hương liệu mỹ phẩm như: β-Phellandrene (1,49%), Camphene (1,13%) sử dụng trong điều chế nước hoa tổng hợp, phụ gia thực phẩm để tạo hương vị (Eggersdorfer. M., 2000). Geranyl acetate (9,82%) là một thành phần tự nhiên của hơn 60 loại tinh dầu và được sử dụng như hương liệu chủ yếu trong thành phần của nước hoa, các loại kem và xà phòng (https://www.scTHERirect.com).

IV. KẾT LUẬN

1. Gừng đen sinh trưởng và phát triển với 38 đặc điểm sinh học chính: Cây dạng thân ngầm, chiều cao 30 - 35 cm. Phiến lá cỡ (15 - 22) × (8 - 11) cm. Cuống lá dài (15 - 20) cm. Cụm hoa dài (8 - 9) cm. Các lá bắc màu hồng cỡ dài (2,1 - 2,5) × (0,8 - 1) cm, xoè ra, ít lợp lên nhau; mỗi lá bắc bao 3 hoa (1 hoa tiêu biến); các lá bắc dài (2,1 - 2,5) cm. Ống đài dài (8 - 9) mm. Ống tràng dài (2,8 - 3) cm. Cánh môi gần như hình tam giác, cỡ (2,05 × 2,05) cm, đầu xẻ sâu xuống hơn 1/2 chiều dài thành 2 thuỳ. Dưới gốc hoa, sát vòi nhị nhuỵ có 2 chấm đỏ. Bao phấn dài (4 - 5) mm; mào tròn 1 mm. Nhị lép bên cỡ (1,9 - 2 × 0,5) cm, màu vàng. Vòi nhụy màu trắng, núm nhụy dạng phễu màu vàng nhạt. Quả hiếm gặp.

2. Đánh giá mối quan hệ di truyền để định loại Gừng đen bằng phương pháp giải trình tự một phần gen MatK và vùng gen ITS đã xác định được gen ITS thích hợp để định loại chi Gừng đen hơn gen MatK. 11 mẫu Gừng đen thu thập ở Vườn Quốc gia Bạch Mã và huyện A lưới và thuộc loài Gừng đen (*Distichochlamys citrea).*

3. Kỹ thuật trồng Gừng đen phù hợp ở vùng đồi Ba Vì là trồng cây vào mùa xuân, mật độ 6 cây/m^2, dưới tán cây có độ che sáng 75% ánh sáng trực xạ, liều lượng phân bón [0,6 kg Phân chuồng hoai + 20 mg/lB1 + 20 mg/l humic]/cây hoặc [0,45 kg phân chuồng hoai + 2 g $NPK_{hh\ tỷ\ lệ}$ (13N: 21K_2O_5:13P_2O)], độ ẩm đất 60 - 85%. Cây sinh trưởng tốt.

4. Bằng phương pháp chưng cất lôi cuốn theo hơi nước củ rễ Gừng đen của cây trồng tại Ba Vì, Hà Nội, đã thu được tinh dầu ở mức 0,49%

(v^{ml}/w^{g}) theo nguyên liệu tươi. Từ tinh dầu thân định danh được 30 cấu tử, thành phần chính là 1,8 - Cineole (17,37%), Trans-Geraniol (27,89%), nhóm citral (9,51%), nhóm Pinene (8,18%), Geranyl acetate (9,82%), β-Myrcene (2,06%), α-Terpinene (2,27%), Linalool (2,29%), β-Sesquiphellandrene (3,91%), endo-Borneol (2,32%), Terpinene-4-ol (3,94%) và 1 số cấu tử với hàm lượng hấp hơn, các cấu tử này chiếm hơn 90% khối lượng tinh dầu và có thể ứng dụng trong dược phẩm, mỹ phẩm, hương liệu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Quốc Bình, 2005. *Họ Gừng (Zingiberaceae Lindl)*. Danh mục các loài thực vật Việt Nam. NXB Nông nghiệp, Hà Nội, tập 3: 487 - 508.
2. Lê Khả Tường, 2016. Kỹ thuật canh tác cây Nghệ vàng tại một số vùng trọng điểm phía Bắc. NXB Nông nghiệp, Hà Nội 2016.
3. Phạm Việt Tý, Nguyễn Thị Hoài, Nguyễn Viết Khẩn, 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. Bahare S., Shachi U., Ilkay E. O., 2019. Therapeutic Potential of α- and β-Pinene: A Miracle Gift of Nature, Biomolecules, 9(11): 738.
5. Başer K. H. C., Buchbauer G., 2010. Handbook of essential oils: science, technology, and applications, CRC Press Taylor & Francis Group, pp. 213 - 214.
6. Bingtao Z., Xinbing S., 2019. Molecular targets of β-elemene, a herbal extract used in traditional Chinese medicine, and its potential role in cancer therapy: A review, Biomedicine & Pharmacotherapy.
7. Carnesecchia S., Bras-Goonc R., Bradaiac A., 2004. Geraned a component of plant essential oils, modulates DNA synthesis and potentiales 5 - fluorouracil efficacy on human colon tumor xenografts, Cancer Lett, 215. 53 - 59.
8. Ciftci, O., Oztanir, MN và Cetin, A., 2014. Neuroprotective effects of β-myrcene following global cerebral ischemia/reperfusion-mediated oxidative and neuronal damage in a C57BL/J6 mouse. Neurochem. Res. 39(9), 1717 - 1723.
9. Denyer C. V., Jackson P., Loakes D. M., Ellis M. R., Young D. A., 1994. Isolation of antirhinoviral sesquiterpenes from ginger *(Zingiber officinale)*, J Nat Prod, 57(5), pp. 658 - 662.
10. Eggersdorfer. M., 2000. Terpenes. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. Weinheim: Wiley-VCH. doi:10.1002/14356007.a26_205.
11. Irina P., Paticia S., Ana C. S., Silva A. M., Eliana B. S., 2018. Linalool bioactive properties and potential applicability in drug delivery systems, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 171 (1): 566 - 578.
12. Joglekar M. M., Panaskar S. N., Arvindekar A. U, 2014. Inhibition of advanced glycation end product formation by cymene-A common food constituent. J. Funct. Foods 2014, 6, 107 - 115.
13. Kress WJ, Prince LM, Williams KJ, 2002. The phylogeny and a new classifcation of the gingers (Zingiberaceae): evidence from molecular data. American Journal of Botany 89(10): 1682 - 1696.
14. Mahesh C., Om P., Ravendra K., Rakesh K. B., Brij B., Mahesh K. and Anil K.P., 2017. β-Selinene-Rich Essential Oils from the Parts of *Callicarpa macrophylla* and their Antioxidant and Pharmacological Activities . Medicines, 4, 52.
15. Martins H. B., Selis N., 2017. Anti-Inflammatory Activity of the Essential Oil Citral in Experimental Infection with Staphylococcus aureus in a Model Air Pouch, Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.
16. Moteki H., Hibasami H., Yamada Y., Katsuzaki H., Imai K., Komiya 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: 757 - 760.

17. Newman M.F., 1995. Distichochlamys, a new genus from Vietnam. Edinburgh Journal of Botany 52: 65 - 69. 1995.
18. Ngamriabsakul C, Newman MF, Cronk QCB, 2004. The phylogeny of tribe Zingibereae (Zingiberaceae) based on ITS (nrDNA) and trnL-F (cpDNA) sequences. Edinburgh Journal of Botany 60(3): 483 - 507.
19. Saad S. Dahham, Yasser M. Tabana, Muhammad A. Iqbal, Mohamed B. K. Ahamed, Mohammed O. Ezzat, Aman S. A. Majid, and Amin M. S. A. Majid, 2015. The Anticancer, Antioxidant and Antimicrobial Properties of the Sesquiterpene β-Caryophyllene from the Essential Oil of Aquilaria crassna, 20, 11808 - 11829.
20. Shapira S., Pleban S., Kazanov D., Tirosh P., Arber N., 2016. Terpinen-4 - ol: A Novel and Promising Therapeutic Agent for Human Gastrointestinal Cancers, 11(6).
21. Yen Yen Sam, Atsuko Takano, Halijah Ibrahim, Eliška Záveská, Fazimah, 2016. AziBorneocola (Zingiberaceae), a new genus from Borneo. PhytoKeys 75: 31 - 55
22. Yeo S., Ali A. Y., Hayward O., Turnham D., 2015. β-Bisabolene, a Sesquiterpene from the Essential Oil Extract of Opoponax *(Commiphora guidottii), Exhibits Cytotoxicity* in Breast Cancer Cell Lines, Phytotherapy Research 30 (3).
23. Zhang Q. L., Bingmei M F., Zhang J., 2017. Borneol, a novel agent that improves central nervous system drug delivery by enhancing blood-brain barrier permeability, Drug Deliv 24(1):1037 - 1044.
24. https://www.scTHERirect.com/topics/agricestation-and-biological-scatics/geranyl-acetate.

Email tác giả liên hệ: phamthikimhanh70@gmail.com

Ngày nhận bài: 11/08/2021

Ngày phản biện đánh giá và sửa chữa: 13/08/2021

Ngày duyệt đăng: 19/08/2021