

NGHIÊN CỨU NHÂN GIỐNG *IN VITRO* THẢO QUẢ (*Amomum aromaticum* Roxb.)

Nguyễn Thanh Hải^{1*}, Nguyễn Thị Dinh¹, Nguyễn Thị Thơm²,
Nguyễn Thị Ngọc Hân¹, Nguyễn Thị Lâm Hải¹, Đinh Trường Sơn¹,
Đặng Thị Thanh Tâm¹, Nguyễn Thị Thùy Linh¹, Phạm Thị Thu Hằng¹

¹Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

²Trung tâm nghiên cứu Lâm sản ngoài gỗ, Viện Khoa học Lâm nghiệp

*Tác giả liên hệ: nthaicnsh@vnua.edu.vn

Ngày nhận bài: 05.10.2018

Ngày chấp nhận đăng: 23.10.2019

TÓM TẮT

Thảo quả (*Amomum aromaticum* Roxb.) là một loại dược liệu quý trong y học cổ truyền cũng như trong tây y. Nó cũng được sử dụng làm gia vị trong chế biến thực phẩm. Do vậy, việc nhân nhanh cây thảo quả phục vụ bảo tồn và sản xuất là rất cần thiết. Nghiên cứu được tiến hành nhằm xây dựng quy trình nhân giống *in vitro* cây thảo quả từ đoạn thân ngầm mang mắt ngủ. Thời gian thích hợp nhất trong năm để thu mẫu đoạn thân ngầm mang mắt ngủ thảo quả là từ tháng 4 đến tháng 6. Xử lý HgCl₂ nồng độ 0,1% trong 8 phút là thích hợp nhất cho việc khử trùng đoạn thân ngầm mang mắt ngủ thảo quả với tỉ lệ mẫu sạch bệnh và bật chồi đạt 26,67%. Môi trường MS bổ sung 1,0 mg/L BAP là môi trường thích hợp nhất trong giai đoạn nhân nhanh, với hệ số nhân là 4,13 chồi/mẫu, chiều cao chồi trung bình 5,4 cm và chất lượng chồi tốt sau 6 tuần nuôi cấy. Môi trường ra rễ thích hợp cho chồi thảo quả là MS có bổ sung 0,5 mg/L IBA với tỉ lệ ra rễ đạt 100%, số rễ trung bình đạt 5,5 rễ/chồi và chiều dài rễ trung bình đạt 6,1 cm sau 8 tuần nuôi cấy.

Từ khóa: *Amomum aromaticum* Roxb., nhân giống *in vitro*, thảo quả.

Study on Micropropagation of Cardamom (*Amomum aromaticum* Roxb.)**ABSTRACT**

Cardamom (*Amomum aromaticum* Roxb.) is one of the precious medicinal herbs. It also has been used as a spice in food processing. The aim of this study was to establish a protocol for *in vitro* propagation of *Amomum aromaticum* Roxb. from rhizome buds, producing materials for mass-scale production as well as conservation. The most suitable time to collect rhizome buds of *Amomum aromaticum* Roxb. samples for *in vitro* propagation was from April to June. The rhizome buds were best sterilized with 0.1% HgCl₂ in 8 minutes. The highest shoot multiplication rate (4.13 shoot/explant; length of shoots 5.4 cm) was obtained on MS medium supplemented with 1.0 mg/L BAP after 6 weeks of culture. 100% of the shoots produced roots within 8 weeks on MS medium containing 0.5 mg/L IBA.

Keywords: *Amomum aromaticum* Roxb., rhizome buds, micropropagation.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây thảo quả còn được gọi là cây dò ho, thảo đậu khấu hay mắc hấu, có tên khoa học là *Amomum aromaticum* Roxb., thuộc chi Sa nhân (*Amomum*), họ Gừng (*Zingiberaceae*). Cây thảo quả một trong những loại lâm sản ngoài gỗ có giá trị của Việt Nam. Trong y học cổ truyền dân gian, hạt thảo quả được dùng làm thuốc chữa đau bụng, đầy chướng, nấc, nôn ọe, tiêu chảy, sốt rét, hôi miệng và sâu răng (Jafri & cs., 2001;

Đỗ Tất Lợi, 2005; Verma & cs., 2010). Ngoài ra, thảo quả được sử dụng rộng rãi trong nhiều món ăn như một loại gia vị (Rahmatullah & cs., 2009). Parihar & cs. (2012) đã chỉ ra rằng dịch chiết thảo quả có hoạt tính kháng khuẩn *Klebsiella pneumoniae* gây ra bội nhiễm ở đường hô hấp. Bên cạnh đó, dịch chiết từ thảo quả cũng tăng cường phản ứng miễn dịch đồng thời tăng số lượng đại thực bào và tế bào lympho ở chuột. Nghiên cứu của Le & cs. (2017) đã cho thấy dầu tinh chiết từ thảo quả còn có

hoạt tính kháng bệnh do nhiễm kí sinh trùng Leishmania. Những nghiên cứu này một lần nữa khẳng định giá trị của loài lâm sản này.

Với những giá trị như trên, việc nhân giống thảo quả phục vụ bảo tồn và sản xuất quy mô lớn là rất cần thiết. Hiện nay, các vùng trồng thảo quả lớn và lâu đời của Việt Nam như Hà Giang, Lào Cai và Lai Châu chủ yếu nhân giống bằng hạt và bằng nhánh con của cây (Nguyễn Bá Hoạt & Nguyễn Duy Thuận, 2005). Tuy nhiên, các phương pháp này đem lại hiệu quả chưa cao, chưa đáp ứng đủ nhu cầu đầu vào của sản xuất. Phương pháp nhân giống bằng công nghệ nuôi cấy mô tế bào thực vật hứa hẹn tạo ra được số lượng cây lớn trong thời gian ngắn, cây con sạch bệnh và chất lượng đồng đều hơn so với phương pháp truyền thống.

Trên thế giới, việc nhân giống *in vitro* đã được thực hiện trên một số loài thuộc chi *Amomum* như *Amomum longiligulare* (Rao & cs., 2003), *Amomum krekevanh* (Tefera & Wannakrairej, 2004) và *Amomum subulatum* Roxb. (Sajina & cs., 1997; Pradhan & cs., 2014; Poudel & cs., 2018). Tại Việt Nam, phương pháp nuôi cấy mô tế bào thực vật cũng đã được sử dụng để nhân giống một số loài thuộc chi này như cây sa nhân tím - *Amomum longiligulare* (Đặng Ngọc Phúc & cs., 2011), cây sa nhân thu thập tại huyện A Lưới, tỉnh Thừa Thiên Huế (Trương Thị Bích Phượng & cs., 2017). Nghiên cứu này được thực hiện với mục đích bước đầu xây dựng qui trình nhân nhanh *in vitro* cây thảo quả *Amomum aromaticum* Roxb.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Vật liệu dùng trong nuôi cấy là đoạn thân ngâm mang mắt ngủ cây thảo quả 6-8 năm tuổi được cung cấp bởi Trung tâm Nghiên cứu Lâm sản ngoài gỗ.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Khử trùng và nuôi cấy khởi động

Đoạn thân ngâm mang mắt ngủ cây thảo quả được cắt thành đoạn chiều dài 3-5 cm, rửa sạch dưới vòi nước chảy. Mẫu được cắt bỏ vảy

thừa và ngâm trong dung dịch xà phòng loãng (1%, v/v) trong 10 phút rồi rửa trực tiếp dưới vòi nước chảy. Sau đó, mẫu được lắc trong dung dịch $HgCl_2$ (0,05% hoặc 0,1%) hoặc $Ca(ClO)_2$ (5% hoặc 10%) trong 4, 8 hoặc 12 phút. Sau giai đoạn khử trùng với hoá chất, mẫu được rửa sạch với nước cất vô trùng 5 lần (Đặng Ngọc Phúc & cs., 2011). Mẫu cấy sau khi khử trùng, cắt hai đầu chiều dài còn 1,5-2 cm chứa mắt ngủ được cấy vào môi trường MS (Murashige & Skoog, 1962) để phát sinh tạo chồi.

2.2.2. Nhân nhanh

Chồi nảy mầm từ đoạn thân ngâm mang mắt ngủ có chiều cao 2,0-2,5 cm, lá xanh bóng và sinh trưởng khỏe mạnh được sử dụng để tiến hành nhân nhanh.

Chồi được nuôi cấy trong các môi trường khác nhau MS, WPM (Lloyd & McCown, 1980) và B5 (Gamborg & cs., 1968) để lựa chọn môi trường nền tối ưu để nhân nhanh chồi.

Chồi được nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung riêng rẽ benzylaminopurine (BAP: 0,25; 0,50; 0,75 và 1,00 mg/L), kinetin (0,50; 1,00; 1,50 và 2,00 mg/L) ở các nồng độ khác nhau để lựa chọn nồng độ chất điều tiết sinh trưởng tối ưu để nhân nhanh chồi.

2.2.3. Ra rễ cho chồi *in vitro*

Các chồi có chiều cao 4,5-5,0 cm, sinh trưởng và phát triển tốt được cấy chuyển sang môi trường MS bổ sung riêng rẽ indole-3-butyric acid (IBA) và 1-Naphthaleneacetic acid (α -NAA) ở các nồng độ khác nhau để kích thích ra rễ.

2.2.4. Môi trường và điều kiện nuôi cấy

Tất cả các môi trường nuôi cấy rắn được bổ sung 6,3 g/L agar và 30 g/L đường sucrose, pH 5,8. Môi trường nuôi cấy được khử trùng ở 1,1 atm, nhiệt độ 121°C trong 20 phút. Các mẫu được nuôi cấy trong điều kiện *in vitro*, 16h sáng/8h tối, cường độ ánh sáng 2.000-2.500 lux, nhiệt độ 25-27°C.

2.2.5. Bố trí thí nghiệm và xử lý số liệu

Các thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên, mỗi công thức 3 lần lặp lại, mỗi lần lặp

28-45 mẫu/công thức. Số liệu được xử lý thống kê, phân tích phương sai (ANOVA) trên phần mềm SPSS 16.0.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Nuôi cấy khởi động

3.1.1. Ảnh hưởng của loại, nồng độ hóa chất và thời gian khử trùng đến hiệu quả tạo vật liệu khởi đầu

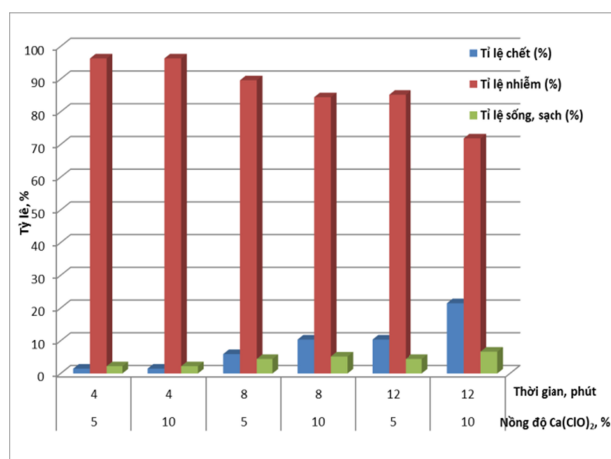
Khâu vào mẫu đóng vai trò quan trọng trong một quy trình nhân giống *in vitro*. Thảo quả có chồi nằm sát mặt đất và thân khí sinh bò dưới mặt đất, do đó đoạn thân của thảo quả thường chứa nhiều vi khuẩn và nấm mốc, gây khó khăn cho việc khử trùng mẫu. Trong nghiên cứu này, HgCl_2 hoặc $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ ở các nồng độ khác nhau đã được sử dụng để khử trùng mẫu.

Kết quả nghiên cứu cho thấy khi sử dụng $\text{Ca}(\text{ClO})_2$, việc tăng nồng độ và thời gian khử trùng làm tăng hiệu quả khử trùng mẫu với tỷ lệ mẫu sống và sạch bệnh biến đổi từ 2,22% đến 6,67%. Ở nồng độ 5%, tỷ lệ mẫu sống và sạch bệnh đều là 4,44% sau 8 phút và 12 phút khử trùng. Nồng độ $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ 10% cho kết quả khử trùng tốt hơn, tỷ lệ mẫu sống và sạch bệnh lần lượt là 5,19% sau 8 phút và 6,67% sau 12 phút. Tuy nhiên, tỷ lệ này vẫn thấp hơn so với khi khử trùng bằng HgCl_2 . Sử dụng HgCl_2 tùy từng nồng

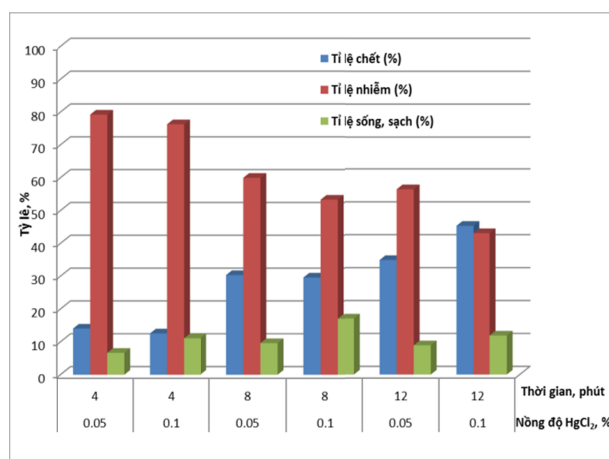
độ và thời gian khử trùng khác nhau, tỷ lệ mẫu sống và sạch bệnh biến đổi từ 6,67% đến 17,04% (Hình 1). Qua đó có thể kết luận, việc khử trùng mẫu đoạn thân ngâm mang mắt ngủ thảo quả bằng HgCl_2 0,1% trong 8 phút cho kết quả tốt nhất với 17,04% mẫu sống và sạch bệnh.

Trong nghiên cứu của Sajina & cs. (1997), Pradhan & cs. (2014) và Poudel & cs. (2018) khi nghiên cứu nhân nhanh *in vitro* cây thảo quả lớn (*Amomum subulatum* Roxb.) đều sử dụng đoạn thân ngâm mang mắt ngủ để vào mẫu. Tuy nhiên, trong cả 3 nghiên cứu đều không đưa ra kết quả về tỷ lệ mẫu sống và sạch bệnh. Trong cả ba nghiên cứu nêu trên đều mô tả phương pháp khử trùng là sử dụng HgCl_2 0,1% với thời gian biến đổi từ 5 đến 10 phút. Kết quả này hoàn toàn phù hợp với kết quả nghiên cứu của chúng tôi.

Kết quả khử trùng của chúng tôi thấp hơn rất nhiều so với nghiên cứu của Đặng Ngọc Phúc & cs. (2011), khi sử dụng HgCl_2 0,1% để khử trùng đỉnh sinh trưởng và đoạn thân của cây *Amomum longiligulare* T.L.Wu cùng thuộc chi Sa nhân tương tự như thảo quả. Kết quả nghiên cứu này cho thấy thời gian khử trùng mẫu trong 5-18 phút cho tỷ lệ mẫu sống và sạch bệnh dao động từ 53,33% đến 91,11%. Thời gian khử trùng tối ưu là 12 phút đối với cả mẫu đỉnh sinh trưởng và đoạn thân lần với tỷ lệ mẫu sống và sạch bệnh lần lượt là 91,11% và 86,67%.



A



B

Ghi chú: A - Sử dụng $\text{Ca}(\text{ClO})_2$; B - Sử dụng HgCl_2

Hình 1. Ảnh hưởng của thời gian khử trùng đến hiệu quả tạo vật liệu khởi đầu

Bảng 1. Ảnh hưởng của thời vụ lấy mẫu và thời gian khử trùng đến khả năng tạo vật liệu ban đầu sau 6 tuần nuôi cấy

Thời vụ	Thời gian (phút)	Tỉ lệ nhiễm (%)	Tỉ lệ chết (%)	Tỉ lệ sống (%)
Tháng 1-3	6	76,00	8,00	16,00
	8	70,00	10,00	20,00
Tháng 4-6	6	62,96	11,11	25,93
	8	60,00	13,33	26,67
Tháng 7-9	6	71,43	10,71	17,86
	8	67,86	10,71	21,43
Tháng 10-12	6	75,00	10,71	14,29
	8	73,33	16,67	10,00

3.1.2. Ảnh hưởng của thời gian khử trùng và thời vụ lấy mẫu đến hiệu quả tạo vật liệu khởi đầu

Thí nghiệm trên đã xác định việc khử trùng đoạn thân ngầm mang mắt ngủ thảo quả đạt hiệu quả cao nhất khi sử dụng HgCl_2 0,1% trong vòng 8 phút. Thời gian khử trùng ngắn hơn (4 phút) hay dài hơn (12 phút) đều khiến tỉ lệ mẫu sống sạch bệnh giảm xuống (Hình 1). Tuy nhiên, tỉ lệ mẫu sống và sạch bệnh thu được từ công thức tối ưu ở thí nghiệm trên vẫn còn thấp. Thời vụ thu thập mẫu có thể ảnh hưởng đến chất lượng mẫu ban đầu, khả năng bật chồi của mẫu. Do vậy, trong thí nghiệm này, mẫu được thu thập ở các thời vụ khác nhau để xác định thời điểm thu mẫu tốt nhất để tạo vật liệu khởi đầu. Bên cạnh đó, kết quả cũng cho thấy việc kéo dài thời gian khử trùng làm tăng tỉ lệ mẫu chết nên trong thí nghiệm này, các mẫu ban đầu được tiến hành khử trùng trong 6 hoặc 8 phút.

Việc giảm thời gian khử trùng xuống 6 phút nhằm mục đích tăng tỉ lệ sống cho mẫu. Kết quả thu được cho thấy 3 trong 4 công thức thí nghiệm thời vụ lấy mẫu thời gian khử trùng ngắn (6 phút) dù giúp cho tỉ lệ mẫu chết giảm xuống nhưng lại làm tỉ lệ nhiễm tăng lên so với việc khử trùng ở thời gian dài hơn (8 phút) (Bảng 1).

Mẫu thu thập trong giai đoạn tháng 4-6 đạt hiệu quả vào mẫu cao nhất, khi sử dụng HgCl_2 0,1% trong thời gian 8 phút, tỉ lệ mẫu sống, sạch bệnh đạt 26,67%. Tháng 4 đến

tháng 6 là thời điểm thu mẫu tốt nhất theo chúng tôi do tháng 1 đến tháng 3 là mùa xuân, cây sinh trưởng và phát triển tốt. Tuy nhiên, tại vùng trồng thảo quả, thời tiết ẩm mưa nhiều tạo điều kiện cho vi sinh vật phát triển nên mẫu lấy từ thân ngầm tuy sinh trưởng phát triển tốt nhưng khi vào mẫu tỉ lệ nhiễm sẽ cao. Sau giai đoạn trên thân ngầm mang mắt ngủ đang tích lũy đủ dinh dưỡng, thời tiết tháng 4 đến tháng 6 không ẩm, mưa nhiều như giai đoạn trước, lượng vi sinh vật giảm nên việc vào mẫu sẽ thuận lợi hơn, tỉ lệ nhiễm giảm, tỉ lệ mẫu sống và sạch bệnh tăng.

Tỉ lệ sống của mẫu ngoài chịu ảnh hưởng của các yếu tố ngoại cảnh, như thời điểm lấy mẫu, vị trí lấy mẫu, mẫu bị nhiễm vi sinh vật từ đất, còn chịu ảnh hưởng của đặc tính giống loài. Do vậy, tỉ lệ sống thấp thu được trong nghiên cứu này có thể do khả năng thích ứng với điều kiện nuôi cấy *in vitro* của thảo quả thấp. Trong nghiên cứu này có thể kết luận rằng, mẫu thu vào giai đoạn tháng 4 đến tháng 6 được khử trùng với HgCl_2 0,1% trong thời gian 8 phút cho hiệu quả tốt nhất. Công thức khử trùng này được sử dụng để tạo vật liệu ban đầu cho các nghiên cứu nhân nhanh tiếp theo.

3.2. Nhân nhanh chồi

3.2.1. Ảnh hưởng của môi trường nền đến khả năng nhân chồi của thảo quả

Môi trường cơ bản là nguồn cung cấp dinh dưỡng cho mẫu cấy trong thời gian nuôi cấy *in*

vitro. Do vậy, chúng có vai trò quan trọng quyết định khả năng sống, phân chia và phân hóa của các mẫu cấy. Mỗi loại môi trường có thành phần dinh dưỡng khác nhau. Việc xác định môi trường nuôi cấy cơ bản phù hợp là tiền đề để có thể thiết kế các thí nghiệm nhằm xác định môi trường nhân chồi, xác định môi trường ra rễ cho các đối tượng nghiên cứu.

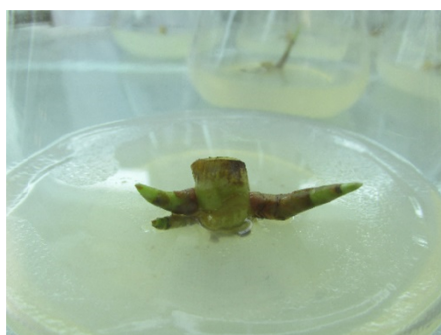
Môi trường MS là tương đối thích hợp cho quá trình nuôi cấy mô thảo quả. Sử dụng môi trường này cho hệ số nhân chồi cao hơn các môi trường còn lại. Khi sử dụng môi trường MS cho nhân chồi thảo quả thí nghiệm cho hệ số nhân chồi đạt 2,47 chồi/cụm, các chồi mới tạo được khi nuôi cấy trong môi trường này cũng có chất lượng khá tốt (chồi mập, lá xanh đậm), chiều cao trung bình của chồi đạt 3,37 cm. Trong khi đó, môi trường WPM số chồi/cụm trung bình là 1,91 cm và chiều cao trung bình là 3,37 cm, chất lượng chồi kém (chồi cao mảnh, lá xanh nhạt) và môi trường B5 thấp nhất với số chồi/cụm là 1,64; chiều cao trung bình là 2,82 cm, chất lượng chồi kém (chồi thấp, mảnh, lá xanh nhạt) (Bảng 2, Hình 3).

3.2.2. Ảnh hưởng cytokinin đến khả năng nhân chồi của thảo quả

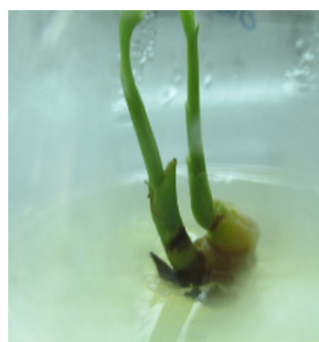
Trong các chất điều tiết sinh trưởng thuộc nhóm cytokinin, BAP và kinetin được sử dụng rất phổ biến trong nhân nhanh chồi *in vitro* nói chung cũng như các loài thuộc chi *Amomum* (Sajina & cs., 1997; Đặng Ngọc Phúc & cs., 2011; Pradhan & cs., 2014; Poudel & cs., 2018). Nghiên cứu này tiến hành đánh giá tác động riêng rẽ của kinetin và BAP đến khả năng nhân nhanh *in vitro* chồi thảo quả.

a. Ảnh hưởng của kinetin đến khả năng tạo chồi của thảo quả

Kết quả nghiên cứu cho thấy bổ sung kinetin ở nồng độ thấp (0,5-1,0 mg/L) vào môi trường nuôi cấy thì số chồi/mẫu tăng lên so với khi nuôi cấy trên môi trường không bổ sung kinetin. Ở nồng độ 1,0 mg/L kinetin, số chồi/mẫu đạt cao nhất với 3,02 chồi/mẫu, chất lượng chồi tốt, chồi mập, khỏe, lá dày, màu xanh đậm. Khi tăng nồng độ kinetin lên 1,5-2,0 mg/L số chồi thu được giảm xuống còn 2,53-2,56 chồi/mẫu. Các chồi thu được có đường kính thân nhỏ, lá mỏng màu xanh nhạt (Bảng 3).



14 ngày



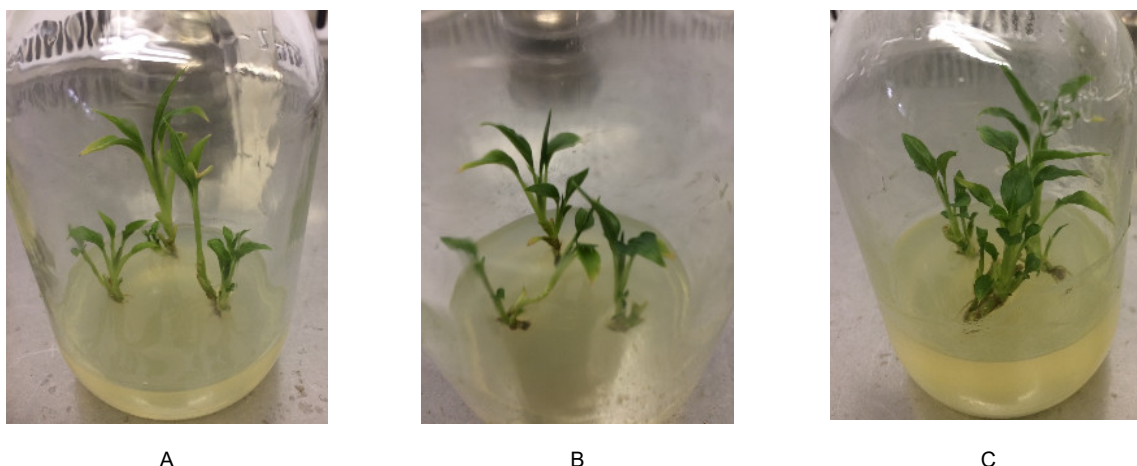
21 ngày

Hình 2. Mẫu thảo quả sau khử trùng

Bảng 2. Ảnh hưởng của môi trường nền đến khả năng tạo chồi và sinh trưởng của thảo quả sau 6 tuần nuôi cấy

Môi trường	Số chồi/cụm chồi	Chiều cao chồi (cm)
WPM	1,91 ^b	3,37 ^b
MS	2,47 ^c	3,34 ^b
B5	1,64 ^a	2,82 ^a

Ghi chú: Trên cùng một cột, các chữ cái khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$)



Ghi chú: A: Môi trường WPM; B: Môi trường B5; C: Môi trường MS

Hình 3. Chồi của thảo quả trong các môi trường khác nhau sau 6 tuần nuôi cấy

Việc sử dụng kinetin trong nhân nhanh chồi *in vitro* cũng đã được thực hiện trên một số đối tượng thuộc chi *Amomum*. Theo nghiên cứu của Pradhan & cs. (2014), trên đối tượng thảo quả lớn (*Amomum subulatum* Roxb.), hệ số chồi/mẫu cao nhất lên tới 9,34 trong môi trường nuôi cấy được bổ sung 3,0 mg/L kinetin. Môi trường thích hợp để nhân nhanh *in vitro* chồi cây *Amomum longiligulare* là môi trường có 1,0 mg/L kinetin với hệ số nhân 5,67 (Đặng Ngọc Phúc & cs., 2011).

b. Ảnh hưởng của BAP đến khả năng nhân nhanh chồi thảo quả

Kết quả thực nghiệm cho thấy môi trường không bổ sung BAP cho hệ số nhân chồi thấp, chất lượng chồi kém. Khi bổ sung BAP, hệ số nhân chồi tăng lên rõ rệt, chất lượng chồi tốt, chồi mập, lá dày, xanh đậm. Ở nồng độ 1,0 mg/L BAP, hệ số nhân chồi đạt cao nhất với 4,13 chồi/mẫu. Khi tăng nồng độ BAP tăng lên từ 1,5-2,0 mg/L, hệ số nhân chồi giảm xuống còn 3,11-3,18 chồi/mẫu. Hệ số nhân chồi này cũng đã cao hơn hệ số nhân chồi đạt được cao nhất khi sử dụng kinetin ở thí nghiệm trên. Bên cạnh đó, chiều cao chồi ở thí nghiệm sử dụng BAP cũng cải thiện hơn đáng kể so với thí nghiệm sử dụng kinetin (Bảng 3, 4).

Tác động tích cực của BAP đến sự nhân nhanh chồi *in vitro* cũng đã được ghi nhận trên

một số loài thuộc chi *Amomum*. Trong nghiên cứu nhân giống *in vitro* cây thảo quả lớn (*Amomum subulatum* Roxb.), Sajina & cs. (1997) đã đánh giá tác động riêng lẻ của BAP cũng như tác động phối hợp của BAP và IBA hoặc α -NAA đến hiệu quả nhân nhanh chồi từ vật liệu chồi mọc từ thân rễ trong điều kiện *in vitro*. Các tác giả đã chỉ ra khi bổ sung 1,0 mg/L BAP hệ số nhân chồi đạt cao nhất với 10-12 chồi/mẫu. Tương tự, khi đánh giá tác động riêng lẻ của BAP hoặc kinetin lên sự nhân nhanh chồi *in vitro* của *Amomum longiligulare* T.L.Wu, Đặng Ngọc Phúc & cs. (2011) cũng cho thấy nồng độ 1,0 mg/L BAP hoặc kinetin cho hệ số nhân chồi tốt nhất, nhưng hệ số nhân chồi đạt được khi bổ sung BAP cao hơn so với khi bổ sung kinetin, tương ứng 5,67 chồi/mẫu và 5,33 chồi/mẫu. Trong khi đó, khi sử dụng BAP hoặc kinetin để nhân nhanh chồi *Amomum subulatum* từ chồi thì Pradhan & cs. (2014) lại kết luận rằng việc bổ sung 1,0 mg/L BAP hoặc kinetin đều không có tác dụng nhân nhanh chồi. Tuy nhiên, khi tăng nồng độ BAP hoặc kinetin lên đến 3,0 mg/L thì hệ số nhân chồi lại tăng lên tương ứng 11,02 chồi/mẫu và 9,34 chồi/mẫu.

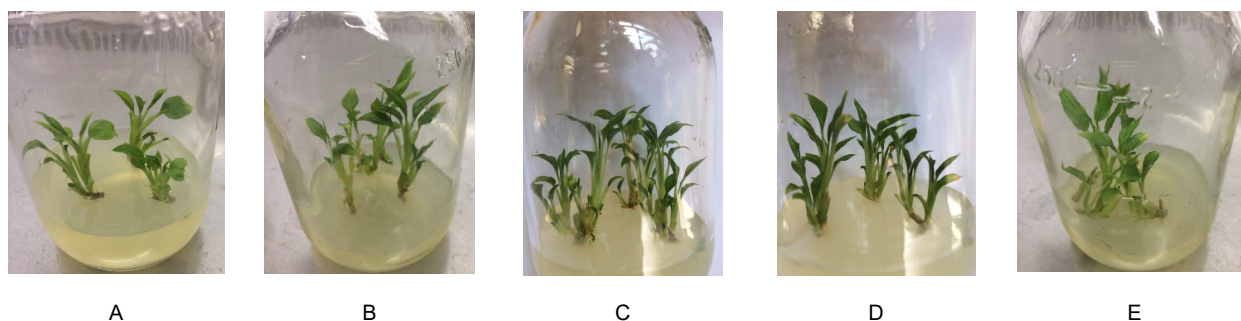
Kết quả nghiên cứu cho thấy môi trường MS bổ sung 1,0 mg/L BAP là môi trường tốt nhất để tiến hành nhân nhanh chồi thảo quả *in vitro* với hệ số nhân chồi 4,13 chồi/mẫu và chiều cao chồi trung bình 5,4 cm sau 6 tuần nuôi cấy.

Bảng 3. Ảnh hưởng của kinetin đến khả năng nhân nhanh chồi của thảo quả sau 6 tuần nuôi cấy

Kinetin (mg/L)	Chỉ tiêu theo dõi		
	Số chồi/mẫu	Chiều cao chồi (cm)	Chất lượng chồi
0,0 (ĐC)	2,02 ^a	3,2 ^a	+
0,5	2,18 ^a	3,8 ^b	++
1,0	3,02 ^c	3,2 ^a	+++
1,5	2,56 ^b	3,6 ^b	++
2,0	2,53 ^b	3,6 ^b	++

Ghi chú: Trên cùng một cột, các chữ cái khác nhau thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$);

+: chồi nhỏ, lá mỏng màu xanh nhạt; ++: chồi vừa, lá mỏng màu xanh nhạt; +++: chồi mập, lá dày màu xanh đậm



Ghi chú: A: 0 mg/L kinetin (ĐC); B: 0,5 mg/L kinetin; C: 1,0 mg/L kinetin; D: 1,5 mg/L kinetin; E: 2,0 mg/L kinetin

Hình 4. Ảnh hưởng của kinetin đến sự nhân nhanh chồi thảo quả sau 6 tuần nuôi cấy

Bảng 4. Ảnh hưởng của BAP đến khả năng nhân nhanh chồi thảo quả sau 6 tuần nuôi cấy

BAP (mg/L)	Chỉ tiêu theo dõi		
	Số chồi/mẫu	Chiều cao chồi (cm)	Chất lượng chồi
0,0 (ĐC)	2,02 ^a	3,2 ^a	+
0,5	3,16 ^{b,c}	4,4 ^b	++
1,0	4,13 ^d	5,4 ^c	+++
1,5	3,18 ^c	5,9 ^c	++
2,0	3,11 ^b	6,4 ^d	++

Ghi chú: Trên cùng một cột, các giá trị mang chữ cái khác nhau thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$);

+: chồi nhỏ, lá mỏng màu xanh nhạt; ++: chồi vừa, lá mỏng màu xanh; +++: chồi mập, lá dày màu xanh đậm

3.3. Tạo cây hoàn chỉnh

Giai đoạn ra rễ *in vitro* là khâu quan trọng nhằm chuẩn bị cho cây có thể tự hấp thụ nước, quang hợp trong môi trường tự nhiên. Chồi *in vitro* cần ít nhất 2 tuần mới hoàn chỉnh hệ thống rễ như lông hút, tượng tầng libe gỗ thứ cấp. Giai đoạn này vừa làm cho cây có kích thước lớn, vừa giúp cây ra rễ (Debergh &

Maene, 1981). IBA và α -NAA là hai chất điều tiết sinh trưởng thực vật thuộc nhóm auxin thường được sử dụng trong giai đoạn ra rễ *in vitro* chỉ *Amomum* (Đặng Ngọc Phúc & cs., 2011; Pradhan & cs., 2014; Trương Thị Bích Phượng & cs., 2017). Trong nghiên cứu này, IBA và α -NAA cũng được sử dụng để kích thích sự ra rễ *in vitro* từ chồi thảo quả.

3.3.1. Ảnh hưởng của IBA đến sự ra rễ của thảo quả

Việc bổ sung IBA vào môi trường nuôi cấy kích thích quá trình ra rễ *in vitro*, làm tăng tỉ lệ ra rễ, số rễ/chồi cũng như chiều dài rễ so với môi trường không bổ sung IBA. Khi bổ sung IBA, 100% chồi tạo rễ và các mẫu đều không phát sinh tạo callus. Số rễ thu được cao nhất đạt 5,5 rễ/chồi trên môi trường có bổ sung 0,50 mg/L IBA. Ở môi trường này, rễ có chất lượng tốt, rễ mập, nhiều lông hút. Tuy nhiên, khi tăng nồng độ IBA lên đến 0,75-1,00 mg/L, mặc dù tỉ lệ chồi ra rễ vẫn đạt ở mức 100% nhưng các rễ tạo thành lại mảnh hơn, ít lông hút và số rễ cũng giảm xuống chỉ còn 4,3-4,5 rễ/chồi. Như vậy, trong thí nghiệm này, môi trường có bổ sung 0,50 mg/L IBA là môi trường tốt nhất cho sự ra rễ ở thảo quả (Bảng 5, Hình 6).

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi phù hợp với nghiên cứu của Sajina & cs. (1997) khi sử dụng IBA ở nồng độ 0,5 mg/L và 1,0 mg/L để kích thích ra rễ cho chồi cây thảo quả lớn (*Amomum subulatum* Roxb.). Số lượng rễ trung bình/chồi lần lượt là 3 rễ/chồi và 5 rễ/chồi. Theo nghiên cứu của Poudel & cs. (2018), nồng độ IBA thích hợp để tạo rễ cho chồi thảo quả lớn (*Amomum subulatum* Roxb.) là 1,0 mg/L, cho số lượng rễ trung bình lớn nhất đạt 4,8 rễ/chồi.

Khi sử dụng IBA để kích thích sự ra rễ ở *Amomum longiligulare* T.L.Wu, Đặng Ngọc Phúc & cs. (2011) cũng chỉ ra việc bổ sung IBA đã kích thích quá trình ra rễ *in vitro*, với 100% chồi ra rễ so với tỉ lệ 80% thu được ở môi trường không bổ sung IBA. Môi trường bổ sung 0,5 mg/L IBA cho số rễ lớn nhất với 14,69 chồi/rễ,

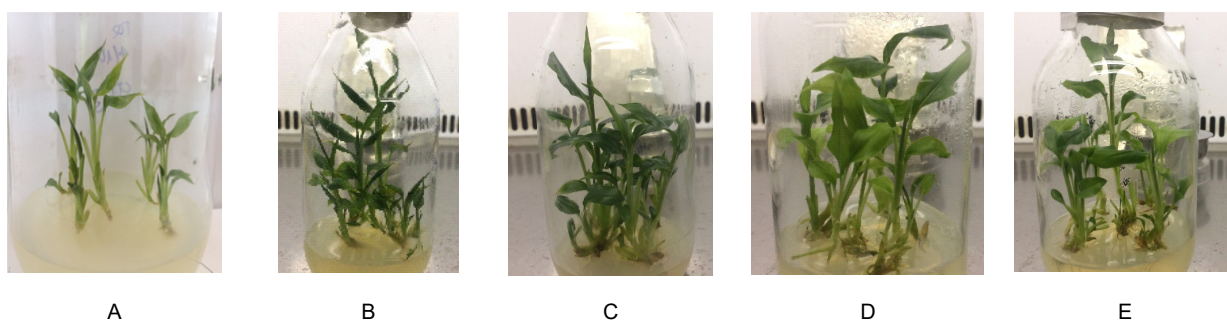
khi tăng nồng độ IBA lên 0,75-1,00 mg/L thì số lượng rễ cũng giảm xuống.

3.3.2. Ảnh hưởng của α -NAA đến sự ra rễ của thảo quả

Tương tự như IBA ở thí nghiệm trên, việc bổ sung α -NAA cũng kích thích sự ra rễ với tỉ lệ 100% chồi ra rễ. Số rễ/chồi cũng tăng lên, dao động trong khoảng 3,2-3,9 rễ/chồi so với 2,3 rễ trên chồi trên môi trường không bổ sung α -NAA (Bảng 6). Số rễ cũng như chiều dài rễ đạt cao nhất trên môi trường có bổ sung 0,50 mg/L α -NAA với 3,9 rễ/chồi và chiều dài rễ trung bình 4,0 cm. Trên môi trường này, rễ có nhiều lông hút, mập, phân nhánh, chiều dài vừa phải. Khi tăng nồng độ α -NAA lên 0,75-1,00 mg/L, rễ trở nên mảnh hơn, số rễ giảm xuống còn 3,2-3,6 rễ/chồi, lông hút ít, có màu vàng nhạt (Bảng 6, Hình 7).

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi phù hợp với nghiên cứu của Sajina & cs. (1997) khi sử dụng α -NAA ở nồng độ 0,5 mg/L và 1,0 mg/L để kích thích ra rễ cho chồi cây thảo quả lớn (*Amomum subulatum* Roxb.), số lượng rễ trung bình/chồi lần lượt là 3 rễ/chồi và 6 rễ/chồi. Theo nghiên cứu của Poudel & cs. (2018) nồng độ α -NAA thích hợp để tạo rễ cho chồi thảo quả lớn (*Amomum subulatum* Roxb.) là 1,5 mg/L cho số lượng rễ trung bình lớn nhất đạt 3,4 rễ/chồi.

Tuy trong thí nghiệm này, môi trường được bổ sung 0,50 mg/L α -NAA là môi trường tốt nhất cho sự ra rễ, nhưng so với việc bổ sung IBA vào môi trường ở thí nghiệm trên thì số lượng rễ cũng như chiều dài rễ tốt nhất ở thí nghiệm này vẫn thấp hơn so với kết quả thu được khi bổ sung IBA vào môi trường ra rễ.



Ghi chú: A: 0 mg/L BAP (ĐC); B: 0,5 mg/L BAP; C: 1,0 mg/L BAP; D: 1,5 mg/L BAP; E: 2,0 mg/L BAP

Hình 5. Ảnh hưởng của BAP đến sự nhân nhanh chồi thảo quả sau 6 tuần nuôi cấy

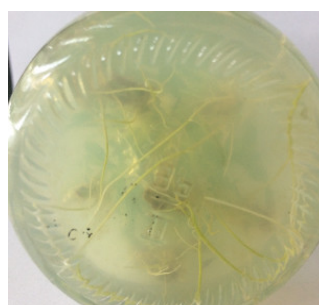
Bảng 5. Ảnh hưởng của IBA đến sự ra rễ của thảo quả sau 8 tuần nuôi cấy

IBA (mg/L)	Chỉ tiêu theo dõi			
	Tỉ lệ ra rễ (%)	Số rễ/chồi	Chiều dài rễ (cm)	Chất lượng rễ
0,0 (ĐC)	80	2,3 ^a	2,5 ^a	+
0,25	100	4,4 ^b	5,1 ^b	++
0,50	100	5,5 ^c	6,1 ^d	+++
0,75	100	4,3 ^b	5,4 ^{b,c}	++
1,0	100	4,5 ^b	5,8 ^{c,d}	++

Ghi chú: Trên cùng một cột, các giá trị mang chữ cái khác nhau thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$); +: mảnh, rất ít lông hút; ++: mảnh, ít lông hút; +++: mập, vừa, nhiều lông hút



A



B



C



D



E

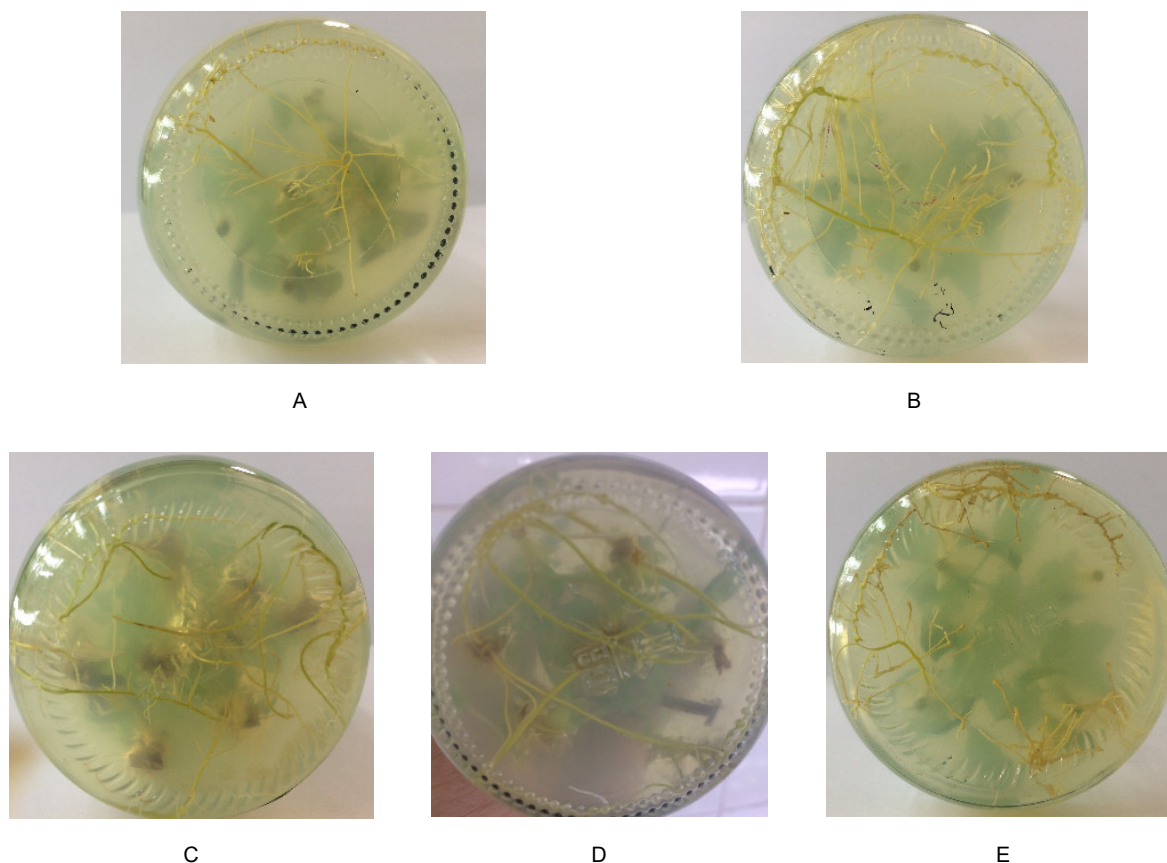
Ghi chú: A: 0 mg/L IBA (ĐC); B: 0,25 mg/L IBA; C: 0,50 mg/L IBA; D: 0,75 mg/L IBA; E: 1,00 mg/L IBA

Hình 6. Ảnh hưởng của IBA đến sự ra rễ của chồi thảo quả sau 8 tuần nuôi cấy

Bảng 6. Ảnh hưởng của α -NAA đến sự ra rễ của thảo quả sau 8 tuần nuôi cấy

α -NAA (mg/L)	Chỉ tiêu theo dõi			
	Tỉ lệ ra rễ (%)	Số rễ/chồi	Chiều dài rễ (cm)	Chất lượng rễ
0,0 (ĐC)	80	2,3 ^a	2,5 ^a	+
0,25	100	3,6 ^{b,c}	3,7 ^{b,c}	++
0,50	100	3,9 ^c	4,0 ^c	+++
0,75	100	3,6 ^{b,c}	3,6 ^{b,c}	++
1,0	100	3,2 ^b	2,9 ^a	++

Ghi chú: Trên cùng một cột, các giá trị mang chữ cái khác nhau thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$); +: mảnh, rất ít lông hút; ++: mảnh, ít lông hút; +++: mập, nhiều lông hút;



Ghi chú: A: 0 mg/L α -NAA (ĐC); B: 0,25 mg/L α -NAA; C: 0,50 mg/L α -NAA; D: 0,75 mg/L α -NAA; E: 1,00 mg/L α -NAA

Hình 7. Ảnh hưởng của α -NAA đến sự ra rễ của chồi thảo quả sau 8 tuần nuôi cấy

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi phù hợp với kết luận của Poudel & cs. (2018) về IBA có tác dụng tốt hơn α -NAA trong việc tạo rễ cho chồi thảo quả lớn (*Amomum subulatum* Roxb.). Tuy nhiên, khi đánh giá tác động riêng rẽ của IBA hoặc α -NAA đến sự ra rễ của *Amomum longiligulare* T.L.Wu, Đặng Ngọc Phúc & cs. (2011) lại cho thấy môi trường có bổ sung 0,50 mg/L α -NAA cho số rễ/chồi nhiều hơn so với môi trường có bổ sung IBA với nồng độ cho kết quả tốt nhất là 0,50 mg/L. Tương tự, nghiên cứu của Trương Thị Bích Phượng & cs. (2017) cũng kết luận rằng rễ của cây sa nhân (*Amomum* sp.) thu thập ở huyện A Lưới, tỉnh Thừa Thiên Huế được cảm ứng tốt nhất trên môi trường có bổ sung 0,60 mg/L α -NAA.

4. KẾT LUẬN

Thời gian thích hợp nhất trong năm để lấy mẫu thân ngầm mang mắt ngủ để vào mẫu thảo

quả là từ tháng 4 đến tháng 6. Sử dụng HgCl_2 0,1% để khử trùng trong thời gian 8 phút cho tỉ lệ mẫu sống, sạch bệnh cao nhất đạt 26,67%. Môi trường MS bổ sung 1,0 mg/L BAP là môi trường tốt nhất để tiến hành nhân nhanh chồi thảo quả *in vitro* với hệ số nhân chồi 4,13 chồi/mẫu và chiều cao chồi trung bình 5,4 cm sau 6 tuần nuôi cấy. Môi trường ra rễ thích hợp cho chồi thảo quả là môi trường MS có bổ sung 0,5 mg/L IBA với tỉ lệ ra rễ đạt 100%, số rễ trung bình đạt 5,5 rễ/chồi và chiều dài rễ trung bình đạt 6,1 cm sau 8 tuần nuôi cấy.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được thực hiện với sự hỗ trợ một phần kinh phí từ đề tài cấp Học viện: “Xây dựng quy trình nhân giống *in vitro* thảo quả (*Amomum aromaticum*)”, mã số: T2019-12-29VB.

Chúng tôi xin gửi lời cảm ơn đến Trung tâm nghiên cứu Lâm sản ngoài gỗ, Viện Khoa

học Lâm nghiệp đã cung cấp nguồn mẫu cây thảo quả.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Debergh P.C. & Maene L.J. (1981). A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. *Scientia Horticulturae*. 14(4): 335-345.
- Đặng Ngọc Phúc, Nguyễn Thanh Tùng, Dương Thị Thùy Châu & Trương Thị Bích Phượng (2011). Nhân giống *in vitro* cây dược liệu - Sa nhân tím (*Amomum longiligulare* T.L.Wu). *Tạp chí Công nghệ sinh học*. 9(4A): 681-688.
- Đỗ Tất Lợi (2005). Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam. Nhà xuất bản Y học, Hà Nội. tr. 404.
- Gamborg O.L., Miller R.A. & Ojima K. (1968). Nutrient requirement of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*. 50: 151-158.
- Jafri M.A., Farah K.J. & Singh S. (2001). Evaluation of the gastric antiulcerogenic effect of large cardamom (fruits of *Amomum subulatum* Roxb.). *Journal of Ethnopharmacology*. 75(2-3): 89-94.
- Le T.B., Beaufay C., Nghiem D.T., Mingeot-Leclercq M.P. & Quetin-Leclercq J. (2017). *In vitro* Anti-Leishmanial Activity of Essential Oils Extracted from Vietnamese Plants. *Molecules*. 22(7): 1071.
- Lloyd G. & McCown B. H. (1980). Commercially-feasible micropropagation of Mountain Laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *Combined Proceedings-International Plant Propagator's Society*. 30: 421-427.
- Murashige T. & Skoog F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*. 15(3): 473-497.
- Nguyễn Bá Hoạt & Nguyễn Duy Thuần (2005). Kỹ thuật trồng sử dụng và chế biến cây thuốc. Nhà xuất bản Nông nghiệp. tr. 221-227.
- Parihar L., Sharma L., Kapoor P. & Parihar P. (2012). Detection of antioxidant, immunomodulatory and antimicrobial activity of *Amomum aromticum* against *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Pharmacy Research*. 5(2): 901-905.
- Poudel K., Prasai H. & Shrestha J. (2018). Micropropagation and Acclimatization of Large Cardamom (*Amomum subulatum* Roxb.). *Turkish journal of agricultural and natural sciences*. 5(3): 231-235.
- Pradhan S., Pradhan S., Basistha B.C. & Subba K.B. (2014). *In vitro* micropropagation of *Amomum subulatum* (Zingiberaceae), a major traditional cash crop of Sikkim Himalaya. *International Journal of Life Sciences Biotechnology and Pharma Research*. 3(2): 169-180.
- Rahmatullah M., Noman A., Hossan M.S., Rashid M.H.O., Rahman T., Chowdhury M.H. & Jahan R. (2009). A survey of medicinal plants in two areas of Dinajpur district, Bangladesh including plants which can be used as functional foods. *American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture*. 3(4): 862-876.
- Rao M., Wenli Z., Fanhua W., Chunlin Q. & Guixiu H. (2003). *In vitro* culture of *Amomum longiligulare* T. L. Wu. *Chinese Journal of Tropical Agriculture*. 4: 1-4.
- Sajina A., Mini P.M., John C.Z., Nirmal Babu K., Ravindran P.N. & Peter K.V. (1997). Micropropagation of large cardamom (*Amomum subulatum* Roxb.). *Journal of Spices and Aromatic Crops*. 6(2): 145-148.
- Tefera W. & Wannakrairoj S. (2004). Micropropagation of Krawan (I Pierre ex Gagnep). *Science Asia*. 30: 9-15.
- Trương Thị Bích Phượng, Thân Trọng Bảo Khánh, Nguyễn Đức Tuấn, Nguyễn Thị Thu Liên & Nguyễn Thị Tân (2017). Nhân giống *in vitro* cây Sa nhân ở huyện A Lưới, tỉnh Thừa Thiên Huế. *Tạp chí Khoa học Đại học Huế: Khoa học Tự nhiên*. 126(1D): 32-57.
- Verma S.K., Rajeevan V., Bordia A. & Jain V. (2010). Greater cardamom (*Amomum subulatum* Roxb.) - A cardio-adaptogen against physical stress. *Journal of Herbal Medicine and Toxicology*. 4(2): 55-58.