

ẢNH HƯỞNG CỦA CÁC CHẤT ĐIỀU HÒA SINH TRƯỞNG TRONG NHÂN GIỐNG *IN VITRO* CÂY ĐỊA LIỄN (*Kaempferia galanga* L.)

Đinh Trường Sơn¹, Chu Đình Thực¹, Trần Văn Hải¹, Phạm Hồng Hiến²,
Phạm Thị Thu Hằng¹, Nguyễn Thanh Hải¹, Nguyễn Thị Lâm Hải¹, Đặng Thị Thanh Tâm^{1*}

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

²Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam

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

Ngày nhận bài: 08.03.2021

Ngày chấp nhận đăng: 16.06.2021

TÓM TẮT

Nghiên cứu này được tiến hành nhằm xác định ảnh hưởng của các chất điều hòa sinh trưởng đến quá trình nhân nhanh *in vitro* cây dược liệu Địa liên (*Kaempferia galanga* L.), một cây dược liệu có giá trị ở Việt Nam. Để tạo vật liệu khởi đầu, chồi mầm từ thân củ có kích thước 2-3cm được khử trùng bề mặt bằng dung dịch thủy ngân clorua (HgCl₂) 0,1% trong 10 phút. Để tìm được môi trường nhân nhanh tối ưu, nghiên cứu đã xác định được ảnh hưởng của BA, Kinetin, tổ hợp BA và NAA hoặc IAA đến sự nhân nhanh chồi Địa liên *in vitro*. Môi trường tối ưu để nhân nhanh chồi Địa liên là môi trường MS bổ sung tổ hợp 2 mg/l BA và 0,5 mg/l NAA. Hệ số nhân chồi đạt 5,03 chồi/mẫu cấy sau 4 tuần nuôi cấy. Chồi *in vitro* có thân lá và rễ phát triển tốt. Sau 5 chu kỳ nhân nhanh liên tiếp, hệ số nhân chồi vẫn được duy trì và không xuất hiện hình thái bất thường. Môi trường tối ưu đề xuất trong nghiên cứu này có thể được sử dụng trong nuôi cấy mô để nhân giống và bảo tồn các kiểu gen cây Địa liên thu thập ở Việt Nam.

Từ khóa: Địa liên, *Kaempferia galanga* L., nhân giống *in vitro*, cây dược liệu.

Effects of Plant Growth Regulators on *in vitro* Propagation of *Kaempferia galanga* L.

ABSTRACT

The study aims to develop a simple protocol for *in vitro* regeneration of *Kaempferia galanga* L., a local medicinal plant in Vietnam. The rhizome buds (2-3cm) were collected as initial explants and surface sterilized with 0.1% HgCl₂ for 10m. Initial *in vitro* shoots were cultured in MS medium supplement with different plant regulators including BA, Kinetin, NAA and IAA. The combination of 2 mg/l BA and 0.5 mg/l NAA induced the highest shoot multiplication with a mean of 5.03 shoots per explant after 4 weeks of culture. In this optimal shoot induction medium, *in vitro* shoots also induced vigorous shoots and roots after five cycles of multiplication. The proposed medium is an efficient medium for *in vitro* rapid propagation or conservation of *K. galanga* L.

Keywords: *Kaempferia galanga* L., *in vitro* propagation, medicinal plant.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây Địa liên hay còn gọi là sơn nài, tam nài, thiên liên, sa khương có tên khoa học là *Kaempferia galanga* L., thuộc họ gừng *Zingiberaceae* được sử dụng như một loại thuốc trong y học cổ truyền trong nhiều thế kỷ. Địa liên có vị cay, tính ôn, vào các kinh tâm, tỳ, vị, có tác dụng ôn trung, tán hàn, trừ thấp, tiêu thực, bạt khí độc (Đỗ Huy Bích & cs., 2004). Địa

liên phân bố chủ yếu ở Đông Nam Á và Trung Quốc (Kumar, 2020). Tinh dầu trong thân và rễ cây Địa liên là hợp chất bay hơi, được sử dụng làm gia vị, đồ uống và công nghiệp mỹ phẩm. Nhiều thành phần của cao chiết thân và rễ Địa liên chứa ethyl-p-methoxycinnamate, ethyl cinnamate, 3-carene, camphene, borneol, cineol, kaempferol và kaempferide được báo cáo có các đặc tính sinh học như kháng khuẩn, kháng vi sinh, kháng ung thư, diệt ấu trùng, diệt amip và

có các hoạt tính dược lý như giảm căng mạch máu và chống viêm (Shetu & cs., 2018; Yao & cs., 2018; Kumar, 2020). Giá trị của cây Địa liên đã được đông y và y dược hiện đại chứng minh và sử dụng. Chính vì thế, trên thế giới cũng như trong nước, Địa Liên được đánh giá là cây dược liệu quý và có giá trị kinh tế cao.

Ở nước ta, Địa liên thường mọc tự nhiên và được trồng ở một số tỉnh phía Bắc như Hải Dương, Hưng Yên, Quảng Ninh và ngoại thành Hà Nội. Hiện nay, Địa liên là nguyên liệu ổn định cho các làng nghề thuốc nam như Ninh Hiệp (Hà Nội), Nghĩa Trai (Hưng Yên), Lục Yên (Yên Bái), Mẫu Sơn (Lạng Sơn)... mỗi năm cho thu hoạch hàng nghìn tấn sản phẩm, cung cấp cho ngành dược liệu trong nước và tham gia xuất khẩu. Theo định hướng phát triển cây dược liệu ở nước ta đến năm 2030 của chính phủ, cây Địa liên là một trong 28 cây dược liệu bản địa được chú trọng phát triển ở các vùng quy hoạch trồng cây dược liệu của cả nước (Quyết định 1976/QĐ-TTĐ, 2013).

Hiện nay, nguồn giống chính của các vùng trồng là củ giống từ vụ trước để lại cho vụ trồng sau. Thực tế này dẫn đến việc tồn trữ và giữ giống hàng năm gặp nhiều khó khăn và rất tốn kém, làm giảm hiệu quả kinh tế. Cho đến nay, việc ứng dụng kỹ thuật nuôi cấy mô tế bào thực vật trong việc nhân giống cây trồng đã đạt được rất nhiều thành tựu và cho hiệu quả ứng dụng cao. Đây được đánh giá là hướng sản xuất được các cây giống sạch bệnh với số lượng lớn, giúp bảo quản và lưu giữ giống tốt mà ít tốn kém hơn, đồng thời chủ động được nguồn giống phục vụ sản xuất ở quy mô lớn. Trên thế giới, đối tượng cây thuốc Địa liên thu thập ở Ấn Độ, Bangladesh cũng đã được nghiên cứu nhân giống *in vitro*, tái sinh cây từ lá và thân củ, tạo rễ củ trong ống nghiệm (Shirin & cs., 2000; Chithra & cs., 2005; Rahman & cs., 2005; Parida & cs., 2010). Tuy nhiên, đối với nguồn gen bản địa của Việt Nam chưa có nghiên cứu nào được tiến hành. Từ cơ sở khoa học và thực tiễn trên, chúng tôi đã tiến hành đề tài nghiên cứu ảnh hưởng của các chất điều hòa sinh trưởng thực vật trong nhân giống *in vitro* cây dược liệu Địa liên để phục vụ công tác lưu giữ và nhân giống trong điều kiện *in vitro*.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Tạo mẫu sạch và nuôi cấy khởi động

Củ Địa liên được thu từ vùng trồng cây dược liệu huyện Ba Chẽ, Quảng Ninh. Chồi mầm sử dụng để vào mẫu nuôi cấy khởi động là chồi có kích thước 2-3cm bật ra từ củ Địa liên ngâm trên cát ẩm. Chồi mầm sau khi được tách từ củ được loại bỏ phần thân lá chết và mô bệnh, sau đó rửa sạch bằng xà phòng loãng trong 5 phút. Sau khi rửa sạch xà phòng, chồi mầm được ngâm trong dung dịch KMnO_4 0,1% trong 20 phút, tráng lại nhiều lần bằng nước sạch, lần cuối rửa lại bằng nước cất vô trùng. Mẫu cấy tiếp tục được khử trùng sơ qua với dung dịch cồn 70° trong 2 phút rồi tráng lại 2 lần bằng nước cất vô trùng. Sau đó mẫu được chuyển sang bình không đã hấp khử trùng và tiến hành khử trùng bề mặt mẫu với các chất khử trùng Presept 0,5% và HgCl_2 0,1% trong khoảng thời gian 5-10 phút. Môi trường khoáng cơ bản Murashige và Skoog được sử dụng cho tất cả các thí nghiệm của nghiên cứu (Murashige & Skoog, 1962). Mẫu sau khử trùng được cấy trên môi trường khởi động MS + 1 mg/l BA + 30 g/l sucrose + 6,5 g/l agar, pH = 5,8. Mẫu cấy Địa liên được nuôi ở nhiệt độ từ 24-25°C, quang chu kỳ 16 giờ sáng và 8 giờ tối, cường độ ánh sáng 2.500 lux, độ ẩm 60-70%.

2.2. Nhân nhanh chồi và tạo cây hoàn chỉnh

Các chồi *in vitro* sau khi thu được từ giai đoạn nuôi cấy khởi động được dùng để cấy lên môi trường dinh dưỡng cơ bản MS có bổ sung các chất điều tiết sinh trưởng 6-Benzylaminopurine (BA) (1-3 mg/l), Kinetin (1-3 mg/l), kết hợp với NAA; IAA (nồng độ 0 mg/l; 0,1 mg/l và 0,5 mg/l). Tất cả các công thức môi trường thí nghiệm đều bổ sung 30 g/l sucrose và 6,5 g/l agar, pH = 5,8. Chồi Địa liên trong thí nghiệm này được nuôi ở nhiệt độ từ 24-25°C, quang chu kỳ 16 giờ sáng và 8 giờ tối, cường độ ánh sáng 2500 lux, độ ẩm 60-70%.

2.3. Bố trí thí nghiệm và xử lý số liệu

Các chỉ tiêu theo dõi được sử dụng trong nghiên cứu bao gồm: chiều cao chồi được tính theo chiều dài được đo từ gốc đến đỉnh chồi

(thân giả) (cm); khối lượng chồi trung bình (g) (được tính theo tổng khối lượng chồi trong cùng một công thức chia cho số chồi ban đầu sau thời gian nuôi cấy); hệ số nhân chồi (hệ số trung bình của tổng số chồi của một mẫu cấy sau mỗi đợt nuôi cấy trên tổng số chồi ban đầu của mẫu cấy). Số mẫu sử dụng cho mỗi công thức tối thiểu là 30 mẫu.

Số liệu được phân tích phương sai (ANOVA) một nhân tố với mức $P < 0,05$; phân tích hậu kiểm với Tukey test, sử dụng phần mềm Graphpad Prism version 8.2.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của chất khử trùng và thời gian khử trùng đến hiệu quả nuôi cấy khởi động chồi mầm Địa liên

Chồi mầm Địa liên sau khi làm sạch và khử trùng bằng dung dịch Presept 0,5% và HgCl_2 0,1% với 3 công thức khác nhau về thời gian

được cấy trên môi trường nuôi cấy khởi động trong 4 tuần.

Kết quả thể hiện trong bảng 1 cho thấy, chất khử trùng Presept (0,5%) sử dụng để làm sạch bề mặt chồi mầm Địa liên trong khoảng thời gian 5-10 phút là không đủ tác động để diệt hết tế bào nấm khuẩn; tất cả mẫu đều bị nhiễm nấm và vi khuẩn sau 3-7 ngày vào mẫu. Như vậy, chất khử trùng Presept với nồng độ và thời gian đã khảo sát không phù hợp để sử dụng cho việc khử trùng bề mặt chồi mầm Địa liên. Đối với chất khử trùng là dung dịch HgCl_2 0,1%, khi khử trùng trong thời gian 5 phút cho tỉ lệ mẫu sạch tương đối cao (78%) và có 72% mẫu có khả năng tái sinh. Tiếp tục tăng thời gian khử trùng lên 8 và 10 phút, tỉ lệ mẫu sạch và tỉ lệ mẫu tái sinh cũng tăng theo. Khi tăng thời gian khử trùng lên 10 phút, tỉ lệ mẫu sạch tăng lên 96%, trong đó 92% mẫu có khả năng tái sinh. Như vậy với chồi mầm Địa liên có thể sử dụng chất khử trùng HgCl_2 0,1% trong thời gian 10 phút là phù hợp để tạo mẫu sạch cho quá trình nuôi cấy *in vitro*.

Bảng 1. Tác động của chất khử trùng và thời gian khử trùng đến hiệu quả nuôi cấy khởi động chồi mầm Địa liên (theo dõi sau 4 tuần)

Công thức	Chất khử trùng	Thời gian (phút)	Tỉ lệ mẫu sạch (%)	Tỉ lệ tái sinh (%)
CT1	Presept 0,5%	5	0	-
CT2		8	0	-
CT3		10	0	-
CT4	HgCl_2 0,1%	5	78	72
CT5		8	82	76
CT6		10	96	92

Ghi chú: Môi trường nền: MS + 1 mg/l BA + 30 g/l sucrose + 6,5 g/l agar (pH = 5,8).

Bảng 2. Ảnh hưởng của BA và Kinetin đến khả năng nhân nhanh *in vitro* chồi cây Địa liên (sau 4 tuần nuôi cấy)

Công thức	BA (mg/l)	Kinetin (mg/l)	Hệ số nhân TB (chồi/mẫu)	Chiều cao chồi TB (cm)	Hình thái chồi
CT1 (ĐC)	0	0	$1,25^a \pm 0,2$	$2,2^a \pm 0,25$	*
CT2	1	-	$2,33^b \pm 0,12$	$2,90^b \pm 0,28$	*
CT3	2	-	$3,63^d \pm 0,13$	$3,16^b \pm 0,41$	*
CT4	3	-	$3,27^{cd} \pm 0,17$	$2,97^b \pm 0,34$	*
CT5	-	1	$2,03^b \pm 0,39$	$3,31^b \pm 0,27$	*
CT6	-	2	$3,11^c \pm 0,12$	$3,36^b \pm 0,42$	*
CT7	-	3	$2,89^c \pm 0,40$	$3,25^b \pm 0,36$	*

Ghi chú: Các chữ cái khác nhau ở các số liệu trong cùng một cột thì sai khác có ý nghĩa ở độ tin cậy $P < 0,05$; * : chồi *in vitro* phát triển rõ.

3.2. Ảnh hưởng của các chất điều hòa sinh trưởng thuộc nhóm cytokinin đến khả năng nhân nhanh *in vitro* chồi cây Địa liên

Trong nuôi cấy mô tế bào thực vật, tác động chung của các chất thuộc nhóm cytokinin là kích thích sự phân chia tế bào dẫn đến kích thích các chồi tăng nhanh về số lượng. Trong thí nghiệm này, các chồi mầm *in vitro* của giai đoạn nuôi cấy khởi động được cấy lên môi trường MS có bổ sung BA và Kinetin trong 4 tuần.

Kết quả ở bảng 2 cho thấy khi bổ sung BA và Kinetin vào môi trường nuôi cấy đã kích thích mẫu cấy phát triển chồi, gia tăng hệ số nhân chồi và chiều cao chồi của mẫu cấy. Đối với các công thức môi trường có bổ sung BA, hệ số nhân chồi tăng từ 2,33-3,63 chồi/mẫu cấy. Đối với nhóm công thức môi trường có bổ sung Kinetin, hệ số nhân chồi có sự khác biệt so với đối chứng và dao động trong khoảng 2,03 chồi/mẫu cấy đến 3,11 chồi/mẫu cấy. Khi so sánh hiệu quả kích thích mẫu cấy tạo chồi của BA và Kinetin có thể thấy rằng BA có tác động tốt hơn trong các nồng độ khảo sát. Như vậy, môi trường nuôi cấy cơ bản MS có bổ sung 2 mg/l BA là môi trường thích hợp để nhân nhanh chồi Địa liên, với hệ số nhân là 3,63 chồi/mẫu cấy. Đây là công thức môi trường có giá trị khác biệt có ý nghĩa với độ tin cậy $P < 0,05$ so với các công thức môi trường khác. Đối với chỉ tiêu chiều cao chồi, tất cả các công thức môi trường có bổ sung cytokinin đều thu được chồi có chiều cao lớn hơn công thức đối chứng nhưng không có sự sai khác có ý nghĩa thống kê giữa các công thức này.

Trong điều kiện nuôi cấy *in vitro*, chồi Địa liên ở tất cả các công thức có hoặc không bổ sung chất điều tiết sinh trưởng thuộc nhóm cytokinin đều phát sinh rễ (Hình 1). Hiện tượng này cũng được ghi nhận ở các nghiên cứu khác trên đối tượng cây Địa liên thu thập ở các vùng sinh thái khác như Ấn Độ (Shirin & cs., 2000; Chithra & cs., 2005; Parida & cs., 2010). Sự hình thành rễ trong quá trình nhân chồi cây Địa liên đã làm thay đổi quy trình nhân giống của đối tượng này khi không cần giai đoạn nuôi cấy bổ sung các chất điều hòa sinh trưởng thuộc nhóm auxin để tạo cây hoàn chỉnh.

3.3. Ảnh hưởng của BA và α -NAA hoặc IAA đến khả năng nhân nhanh chồi *in vitro* cây Địa liên

Kế thừa kết quả nghiên cứu từ thí nghiệm 2, hai nồng độ BA thích hợp được lựa chọn để nghiên cứu kết hợp với các chất điều tiết sinh trưởng thuộc nhóm auxin là 2 mg/l và 3 mg/l. Trên nền môi trường có chứa BA, các chất α -NAA (0,1; 0,5 mg/l) và IAA (0,1; 0,5 mg/l) lần lượt được bổ sung.

Số liệu ở bảng 3 cho thấy, sự kết hợp BA và α -NAA (0,1; 0,5 mg/l) trong môi trường nuôi cấy có tác dụng làm tăng hệ số nhân chồi và sự sinh trưởng của chồi *in vitro*. Ở tất cả các công thức kết hợp giữa BA và α -NAA đều cho hệ số nhân chồi và chiều cao chồi cao hơn các công thức đối chứng. Môi trường có 2 mg/l BA kết hợp 0,5 mg/l α -NAA cho hệ số nhân chồi và chiều cao chồi tốt nhất; đạt $5,03 \pm 0,10$ chồi/mẫu cấy và chồi có chiều cao trung bình $6,22 \pm 0,17$ cm. Chỉ tiêu hệ số nhân chồi của công thức môi trường này là có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $P < 0,05$. Đặc trưng hình thái của mẫu cấy trên môi trường này là bên cạnh hệ số nhân cao thì thân lá và rễ của chồi *in vitro* cũng phát triển mạnh. Khi kéo dài thời gian nuôi cấy lên 5 tuần, chồi *in vitro* có rễ dài, lá phát triển to và mở, phát triển hình thái hoàn chỉnh (Hình 2). Khi tăng nồng độ BA lên 3 mg/l kết hợp cùng α -NAA thì cũng giúp gia tăng hệ số nhân chồi so với đối chứng, tuy nhiên các giá trị này lại nhỏ hơn công thức tối ưu. Ngược lại với sự kết hợp giữa BA và NAA, khi kết hợp BA và IAA lại không làm thay đổi hệ số nhân chồi. Tất cả các công thức kết hợp BA và IAA đều cho hệ số nhân chồi không có sự sai khác có ý nghĩa thống kê với công thức đối chứng. Kết quả của nghiên cứu này khác với kết quả thu được của Senarath & cs. (2017) trên nguồn gen cây Địa liên thu thập ở Philippines khi kết hợp BA và IAA cho hệ số nhân chồi tối ưu đạt 12 chồi/mẫu cấy. Như vậy ảnh hưởng của các chất điều tiết sinh trưởng đối với các kiểu gen cây Địa liên khác nhau là khác nhau. Đối với nguồn vật liệu Địa liên thu thập ở miền bắc Việt Nam, môi trường kết hợp BA 2 mg/l và α -NAA 0,5 mg/l là môi trường tối ưu để nhân nhanh trong điều kiện *in vitro*.



Hình 1. Chồi Địa liên *in vitro* trên môi trường MS không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng hình thành rễ sau 4 tuần nuôi cấy

Bảng 3. Ảnh hưởng của BA và α -NAA đến khả năng nhân nhanh chồi Địa liên *in vitro* (sau 4 tuần nuôi cấy)

Công thức	BA (mg/l)	α -NAA (mg/l)	IAA (mg/l)	Hệ số nhân TB (chồi/mẫu)	Chiều cao chồi TB (cm)
ĐC 1	2	-	-	$3,32^a \pm 0,17$	$3,92^a \pm 0,24$
ĐC 2	3	-	-	$3,09^a \pm 0,28$	$4,05^a \pm 0,27$
CT1	2	0,1	-	$4,5^b \pm 0,22$	$5,45^c \pm 0,12$
CT2	2	0,5	-	$5,03^c \pm 0,10$	$6,22^d \pm 0,17$
CT3	3	0,1	-	$4,57^b \pm 0,16$	$4,97^b \pm 0,14$
CT4	3	0,5	-	$3,47^a \pm 0,12$	$4,85^b \pm 0,10$
CT5	2	-	0,1	$3,00^a \pm 0,14$	$4,24^a \pm 0,17$
CT6	2	-	0,5	$3,65^a \pm 0,23$	$4,52^a \pm 0,24$
CT7	3	-	0,1	$3,23^a \pm 0,12$	$4,24^a \pm 0,12$
CT8	3	-	0,5	$3,33^a \pm 0,16$	$4,33^a \pm 0,12$

Ghi chú: Các chữ cái khác nhau ở các số liệu trong cùng một cột thì sai khác có ý nghĩa ở độ tin cậy $P < 0,05$.

3.4. Ảnh hưởng của số lần cấy chuyển đến hệ số nhân chồi *in vitro* trên môi trường tối ưu

Trong nhân giống *in vitro*, mẫu cấy qua một số chu kỳ nhân giống (lần cấy chuyển nhân nhanh) sẽ bắt đầu xuất hiện các hiện tượng thoái hóa như giảm hệ số nhân, cây bị bạch tạng, thân lá không phát triển bình thường. Trong thí nghiệm này, chúng tôi nghiên cứu phản ứng của chồi Địa liên *in vitro* khi được nuôi cấy liên tục trên môi trường có chứa chất điều tiết sinh trưởng. Thí nghiệm được bố trí nuôi cấy trên môi trường MS + 30 g/l sucrose +

2 mg/l BA + 0,5 mg/l α -NAA + 6,5 g/l agar (pH = 5,8) và được cấy chuyển 5 lần liên tiếp. Kết quả thí nghiệm được tổng hợp và trình bày trong bảng 4.

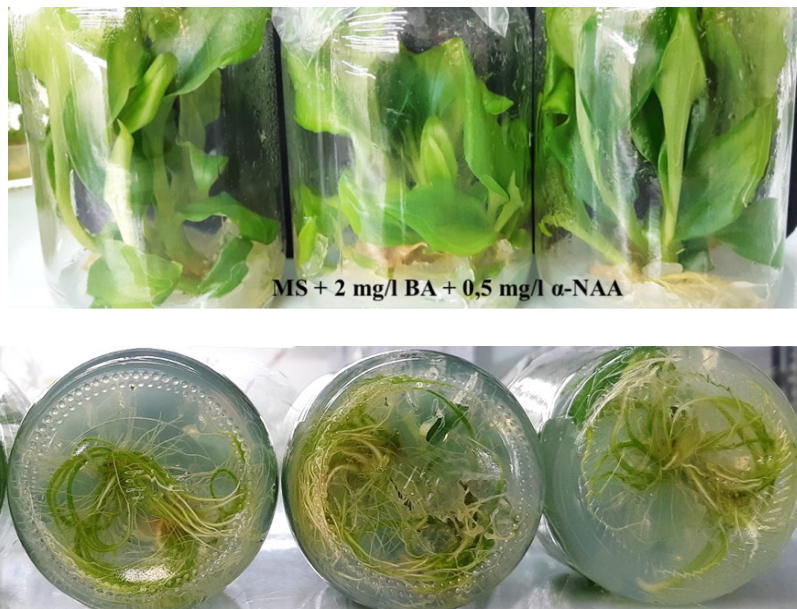
Số liệu ở bảng 4 cho thấy, sau 5 lần cấy chuyển hệ số nhân chồi của chồi Địa liên *in vitro* không bị giảm sút. Hệ số nhân chồi của các công thức không có sự sai khác có ý nghĩa về mặt thống kê với $P > 0,05$. Bên cạnh đó hình thái chồi về chiều cao và sự phát triển thân lá cũng được duy trì mà không có sự biến đổi lớn (Bảng 4, hình 3). Sau 5 tháng nuôi cấy trên môi trường có chứa chất điều hòa sinh trưởng, chồi Địa liên *in vitro* có lá xanh đậm, hình thái thân, lá và rễ không

xuất hiện các đột biến. Thông qua kết quả thí nghiệm này có thể thấy rằng, trên nền môi trường tối ưu (MS + 30 g/l sucrose + 2 mg/l BA + 0,5 mg/l α -NAA + 6,5 g/l agar (pH = 5,8)) hệ số nhân chồi dao động trong ngưỡng 4,8-5,2 chồi/mẫu cấy. Như vậy, từ một mẫu cấy ban đầu, sau 5 tháng nhân nhanh có thể thu được 2.500-3.800 chồi *in vitro*. Ưu điểm của môi trường nhân giống này là chồi *in vitro* đã có đủ thân lá rễ khỏe mạnh nên có thể đưa sang giai đoạn vườn ươm mà không tốn thời gian nuôi cấy tạo rễ.

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã xác định được phương pháp khử trùng bề mặt thích hợp với chồi mầm từ thân

củ cây Địa liên thu thập ở Quảng Ninh là sử dụng dung dịch thủy ngân clorua $HgCl_2$ 0,1% trong 10 phút. Môi trường tối ưu cho nhân nhanh chồi Địa liên *in vitro* là môi trường MS có bổ sung BA 2 mg/l, α -NAA 0,5 mg/l và sucrose 30 g/l với hệ số nhân chồi đạt 5,03 chồi/mẫu cấy. Chồi *in vitro* cây Địa liên vẫn giữ nguyên hệ số nhân chồi và hình thái không bị biến đổi sau 5 lần cấy chuyển liên tiếp trên môi trường nhân nhanh tối ưu. Kết quả của nghiên cứu đã xác định được một đường hướng nhân nhanh Địa liên trong điều kiện *in vitro* đơn giản, bỏ qua được giai đoạn tạo rễ cho chồi *in vitro*. Các kết quả nghiên cứu này có thể được áp dụng trong công tác nhân giống, bảo tồn nguồn gen cây thuốc Địa liên thu thập ở Việt Nam.

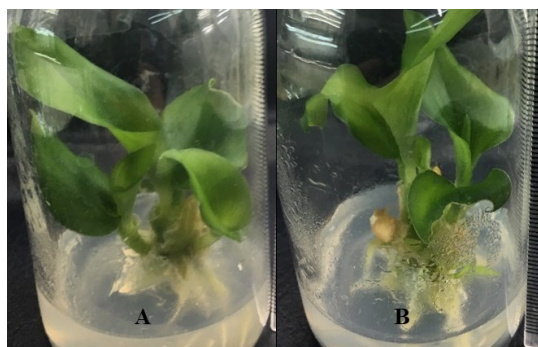


Hình 2. Hình thái chồi và rễ của cây Địa liên *in vitro* trên môi trường MS kết hợp 2 mg/l BA và 0,5 mg/l α -NAA (sau 5 tuần nuôi cấy)

Bảng 4. Nghiên cứu khả năng nhân nhanh chồi *in vitro* qua các lần cấy chuyển liên tiếp

Số lần cấy chuyển	Hệ số nhân (chồi/mẫu)	Chiều cao chồi (cm)	Hình thái chồi
Lần 1	4,98 ± 0,14	6,22 ± 0,27	Chồi <i>in vitro</i> to, sinh trưởng tốt, lá xanh đậm
Lần 2	5,22 ± 0,19	5,91 ± 0,15	
Lần 3	4,80 ± 0,20	5,86 ± 0,22	
Lần 4	5,11 ± 0,16	5,74 ± 0,26	
Lần 5	4,82 ± 0,21	5,88 ± 0,19	
P-value (ANOVA)	>0,05	>0,05	

Ghi chú: Môi trường nền: MS + 2 mg/l BA + 0,5 mg/l α -NAA + 30 g/l sucrose (pH = 5,8); thời gian nuôi cấy cho mỗi lần cấy chuyển là 4 tuần.



Hình 3. Hình thái chồi Địa liên *in vitro* ở lần cấy chuyển thứ nhất (A) và lần cấy chuyển thứ 5 (B) (sau 4 tuần nuôi cấy trên môi trường mới)

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được sử dụng nguồn kinh phí chương trình Việt - Bỉ, Học viện Nông nghiệp Việt Nam, mã số T2020-12-16VB. Nhóm nghiên cứu đề tài xin trân trọng cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Chithra M., Martin K.P., Sunandakumari C. & Madhusoodanan P. V. (2005). Protocol for rapid propagation, and to overcome delayed rhizome formation in field established *in vitro* derived plantlets of *Kaempferia galanga* L. *Scientia Horticulturae*. 104(1): 113-120.
- Đỗ Huy Bích, Đặng Quang Chung, Bùi Xuân Chương, Nguyễn Thượng Dong, Đỗ Trung Đàm, Phạm Văn Hiên, Vũ Ngọc Lộ, Phạm Kim Mãn & Đoàn Thị Nhu (2004). *Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam* (1). Nhà xuất bản Khoa học và kỹ thuật Hà Nội. tr. 782-785.
- Kumar A. (2020). Phytochemistry, pharmacological activities and uses of traditional medicinal plant *Kaempferia galanga* L. – An overview. *Journal of Ethnopharmacology*. 253: 112667.
- Murashige T. & Skoog F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*. 15(3): 473-497.
- Parida R., Mohanty S., Kuanar D. & Nayak S. (2010). Rapid multiplication and *in vitro* production of leaf biomass in *Kaempferia galanga* through tissue culture. *Electronic Journal of Biotechnology*. 13.
- Rahman M.M., Amin M.N., Ahamed T., Ahmad S., Habib A., Ahmed R., Ahmed M.B. & Ali M.R. (2005). *In vitro* rapid propagation of black thorn (*Kaempferia galanga* L.): A rare medicinal and aromatic plant of Bangladesh. *Journal of Biological Sciences*. 5: 300-304.
- Shetu H., Trisha K., Sikta S., Anwar R., Rashed S.S., Rashed B. & Dash P. (2018). Pharmacological importance of *Kaempferia galanga* (Zingiberaceae): A mini review. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 3: 32-39.
- Shirin F., Kumar S. & Mishra Y. (2000). *In vitro* plantlet production system for *Kaempferia galanga*, a rare Indian medicinal herb. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 63(3): 193-197.
- Yao F., Huang Y., Wang Y. & He X. (2018). Anti-inflammatory diarylheptanoids and phenolics from the rhizomes of kencur (*Kaempferia galanga* L.). *Industrial Crops and Products*. 125: 454-461.