

NGHIÊN CỨU THIẾT LẬP QUY TRÌNH NHÂN GIỐNG *IN VITRO* CÂY GỪNG ĐEN (*DISTICHOCHLAMYS CITREA* M.F. NEWMAN)*

Hồ Anh Chi, Hồ Nhật Quang, Trần Vũ Ngọc Thi,
Nguyễn Đức Tuấn, Phan Thị Thúy Hằng, Phan Văn Trí,
Ngô Thị Bảo Châu, Trương Thị Bích Phượng**,
Lê Nguyễn Thới Trung***,
Phạm Quốc Tuấn, Nguyễn Vũ Linh****

1. Mở đầu

Chi Gừng đen (*Distichochlamys*) thuộc họ Gừng (*Zingiberaceae*) là chi thực vật đặc hữu của Việt Nam, loài *Distichochlamys citrea* được miêu tả lần đầu tiên bởi M. F. Newman vào năm 1995. Nghiên cứu của Phạm Việt Tý và cộng sự¹ về dược chất cho thấy thành phần của thân, rễ, lá *Distichochlamys citrea* có chứa 77 hoạt chất sinh học. Trong tinh dầu lá gừng đen có thành phần chính β -sesquiphellandrene, chất này có khả năng ức chế mạnh đối với Rhinovirus IB trên mô hình thử nghiệm *in vitro*². Dẫn xuất oxy hóa của monoterpene được xác định là nhóm chất chính của các mẫu tinh dầu, trong đó, 1,8-cineole có thể được xem là cấu tử đặc trưng của tinh dầu thân rễ gừng đen. Các nghiên cứu trước đây đã chứng minh 1,8-cineole có tác dụng ức chế dòng tế bào ung thư máu HL-60 ở người³, điều trị ho, đau cơ bắp, chứng loạn thần kinh chức năng, bệnh thấp khớp, hen suyễn⁴....

* Đây là kết quả của đề tài khoa học và công nghệ do Quỹ Phát triển KHCN tỉnh Thừa Thiên Huế tài trợ, mã số QPTKHCN.2021-KC.01.

** Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế. Tác giả liên hệ gửi và sửa bài.

*** Bảo tàng Thiên nhiên Duyên hải miền Trung, Sở KH&CN Thừa Thiên Huế.

**** Vườn Quốc gia Bạch Mã, tỉnh Thừa Thiên Huế.

¹ Phạm Việt Tý, Hồ Việt Đức, Lê Quyet Thang (2015). "Chemical composition of the essential oils of *Distichochlamys citrea* leaves collected from central Vietnam". *Journal of Science*, 8(4), pp. 60-65.

² Denyer C. V. et al. (1994). "Isolation of antirhinoviral sesquiterpenes from ginger (*Zingiber officinale*)". *Journal of Natural Products*, 57, pp. 658-662.

³ Moteki H. et al. (2002). "Specific induction of apoptosis by 1,8 cineole in two human leukemia cell lines, but not a in human stomach cancer cell line". *Oncol Rep*, 9, pp. 757-760.

⁴ Baser K. H.C., Buchbauer G. (2010). "Handbook of essential oils: science, technology, and application". *CRC Press Taylor & Francis Group*, pp. 213-214.

Qua khảo sát ban đầu, trên địa bàn tỉnh Thừa Thiên Huế và một số tỉnh miền Trung, đặc biệt tại các huyện miền núi, gừng đen mọc dưới tán rừng tự nhiên với số lượng ít. Cây gừng đen ở dạng hoang dại, rất dễ bị khai thác ngoài ý muốn dẫn đến xói mòn nguồn gen, thậm chí những khu rừng có nguồn gen còn bị hủy hoại. Hiện nay, tại Vườn quốc gia Bạch Mã (tỉnh Thừa Thiên Huế) và Vườn quốc gia Vũ Quang (tỉnh Hà Tĩnh) nơi phát hiện ra gừng đen chi *Distichochlamys* chỉ còn một số lượng cây ít ỏi, mọc phân tán⁵.

Trên thế giới chưa có bất kỳ công bố nào về nhân giống *in vitro* các loài thuộc chi *Distichochlamys*. Ở Việt Nam, Phạm Thị Kim Hạnh và cộng sự đã có công bố nghiên cứu nhân giống *in vitro* cây gừng đen thuộc loài *Distichochlamys citrea*.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã xác định được điều kiện tối ưu cho các giai đoạn nuôi cấy *in vitro* cây gừng đen *Distichochlamys citrea* (D.) và xây dựng được quy trình nhân giống *in vitro* cây gừng đen *D. citrea*, tạo được nguồn giống có khả năng sản xuất đại trà loài cây này.

2. Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên liệu

Thân rễ mang mắt ngủ của cây gừng đen *D. citrea* do Vườn quốc gia Bạch Mã (tỉnh Thừa Thiên Huế) cung cấp.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Chuẩn bị và khử trùng mẫu

Mẫu thân rễ (1,0-1,5 cm) có chứa mắt ngủ được mang về cắt bỏ lá, bẹ lá và đoạn thân rễ già. Rửa đoạn thân rễ nhiều lần dưới vòi nước chảy, sau đó rửa lại với nước xà phòng 3 lần, mỗi lần 15 phút. Tiếp đến rửa lại bằng nước cất vô trùng 3 lần, mỗi lần 10 phút trước khi đưa vào tủ cấy.

Đoạn thân rễ mang mắt ngủ được khử trùng sơ bộ với 70% EtOH trong 1 phút 30 giây. Sau đó, thân rễ được khử trùng bằng các phương pháp khác nhau:

- 0,1% HgCl₂ (7; 9; 11; 13; 15 phút);
- 60% Javel (3% NaClO) (5; 10; 15; 20; 25; 30; 35 phút);
- 3% H₂O₂ (60; 90; 120; 150; 180 phút);
- Kết hợp 60% Javel (5 hoặc 15 phút) với 0,1% HgCl₂ (5; 6; 7; 8; 9 phút);

⁵ Phạm Thị Kim Hạnh, Trịnh Thùy Dương, Vũ Phương Linh, Lê Tuấn Nghĩa (2020). "Nghiên cứu nhân giống *in vitro* loài gừng đen (*Distichochlamys citrea*) bản địa". Tạp chí Khoa học Lâm nghiệp, 3, tr. 22-32.

- Kết hợp 3% H₂O₂ (180 phút) với 0,1% HgCl₂ (7; 9; 11; 13; 15 phút);
- Khử trùng gián đoạn 0,1% HgCl₂ lần một (4; 5; 6; 7 phút) và lần hai (5; 4; 3; 2 phút).

Sau khi khử trùng, rửa sạch mẫu lại với nước cất vô trùng 8 lần, mỗi lần 5 phút trước khi cấy để loại bỏ hết dư lượng chất khử trùng còn bám trên mẫu.

Hiệu quả của thời gian khử trùng được đánh giá thông qua tỷ lệ mẫu nhiễm, tỷ lệ mẫu sống và tỉ lệ mẫu chết sau 4 tuần theo dõi.

Tái sinh chồi *in vitro*: Mẫu sạch thu được sau thí nghiệm khử trùng được cấy lên môi trường MS bổ sung chất kích thích sinh trưởng 6-Benzylaminopurine (BAP) (0,5-3,0 mg/L), Kinetin (KIN) (0,5-3,0 mg/L) hoặc bổ sung kết hợp chất BAP/KIN nồng độ tối ưu với 1-Naphthaleneacetic acid (NAA) (0,1-0,5 mg/L) với nồng độ khác nhau để xác định nồng độ chất kích thích sinh trưởng (KTST) thích hợp cho quá trình tái sinh chồi *in vitro* của gừng đen. Tỷ lệ cảm ứng tạo chồi, số chồi trung bình/mẫu được thu nhận sau 8 tuần nuôi cấy.

Nhân chồi *in vitro*: Đoạn thân (1,0-2,0 cm) thu được từ chồi *in vitro* được cấy lên môi trường MS cơ bản bổ sung chất KTST BAP (0,5-3,0 mg/L), KIN (0,5-3,0 mg/L), Thidiazuron (TDZ) (0,2-1,0 mg/L) riêng lẻ hoặc bổ sung BAP phối hợp với NAA và KIN phối hợp với NAA để thăm dò khả năng nhân chồi *in vitro* của mẫu. Bên cạnh đó để tăng khả năng sinh trưởng và nhân chồi, chúng tôi khảo sát kết hợp chất KTST phối hợp với khoai tây (20-100 g/L). Kết quả thí nghiệm thu được sau 8 tuần nuôi cấy.

Đánh giá khả năng nhân nhanh của chồi dựa vào các chỉ tiêu: số chồi/mẫu, chiều cao chồi (cm), số lá/chồi.

Tạo cây *in vitro*: Các chồi thu được từ các thí nghiệm trên được tách riêng rẽ và cấy trên môi trường cơ bản MS bổ sung chất kích thích sinh trưởng NAA (0,5-2,5 mg/L) hoặc Indole-3-butyric acid (IBA) (0,5-2,5 mg/L) để thăm dò khả năng hình thành và phát triển của rễ từ chồi *in vitro*. Khả năng tạo rễ được xác định qua các chỉ tiêu: tỷ lệ chồi ra rễ (%), số rễ/chồi, kích thước rễ (cm) sau 8 tuần nuôi cấy.

Đánh giá ảnh hưởng của giá thể đến sinh trưởng của cây con ra ngôi

Cây *in vitro* hoàn chỉnh sau khi huấn luyện được trồng trên các giá thể khác nhau để thích nghi dần với điều kiện tự nhiên.

Giá thể sử dụng gồm: đất tribat, đất sạch phù sa có bổ sung tro trấu, xơ dừa, vỏ đậu phộng (1:1:1:1), đất: cát (1:1).

Theo dõi các chỉ tiêu sinh trưởng sau 12 tuần ra ngôi.

Xây dựng quy trình nhân giống cây gừng đen *D. citrea*

Dựa trên kết quả thu được từ các thí nghiệm, tiến hành xây dựng quy trình nhân giống cây gừng đen *D. citrea*.

Xác định tổng thời gian của quá trình nhân giống *in vitro* cây gừng đen đến khi tạo ra cây con ở vườn ươm.

Điều kiện thí nghiệm: Mẫu được nuôi cấy ở điều kiện nhiệt độ $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, cường độ ánh sáng 2.000-3.000 lux và thời gian chiếu sáng là 10-12 giờ/ngày.

Môi trường cơ bản MS: MS + 30 g/L saccharose + 8 g/L agar.

Cây con ra ngôi ở vườn ươm có độ che sáng 70%, nhiệt độ vườn ươm khoảng 25-30°C, tưới nước 2-3 lần/ngày tùy theo điều kiện thời tiết, đảm bảo đất trong bầu đủ ẩm.

Xử lý số liệu: Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần, mỗi lần lặp quan sát khoảng 30 mẫu. Kết quả thí nghiệm được phân tích Duncan's test bằng phần mềm SPSS 22.0 với mức xác suất có ý nghĩa $p < 0,05$.

3. Kết quả nghiên cứu

3.1. Khử trùng mẫu

Qua nghiên cứu với các dung dịch chất khử trùng khác nhau gồm: 0,1% HgCl_2 (7; 9; 11; 13; 15 phút); 60% Javel (3% NaClO) (5; 10; 15; 20; 25; 30; 35 phút); 3% H_2O_2 (60; 90; 120; 150; 180 phút); kết hợp 60% Javel (5 hoặc 15 phút) với 0,1% HgCl_2 (5; 6; 7; 8; 9 phút); kết hợp 3% H_2O_2 (180 phút) với 0,1% HgCl_2 (7; 9; 11; 13; 15 phút); khử trùng gián đoạn 0,1% HgCl_2 lần một (4; 5; 6; 7 phút) và lần hai (5; 4; 3; 2 phút), chúng tôi nhận thấy việc kết hợp 3% H_2O_2 và 0,1% HgCl_2 đã cho hiệu quả tích cực trong việc khử trùng mẫu gừng đen. Khả năng vô trùng mẫu cây của 3% H_2O_2 kết hợp với 0,1% HgCl_2 được đánh giá dựa trên tỷ lệ mẫu nhiễm, tỷ lệ mẫu sống và tỷ lệ mẫu chết sau 4 tuần nuôi cấy. Kết quả được trình bày ở Bảng 1.

Bảng 1: Ảnh hưởng thời gian khử trùng bằng 3% H_2O_2 (180 phút) kết hợp với 0,1% HgCl_2 sau 4 tuần nuôi cấy

Thời gian khử trùng (phút)		Tỷ lệ mẫu sạch (%)	Tỷ lệ mẫu nhiễm (%)	Tỷ lệ mẫu chết (%)
H_2O_2	HgCl_2			
180	7	70,0	18,9	11,1
180	9	61,1	16,7	22,2
180	11	54,4	15,6	30,0
180	13	50,0	12,2	37,8
180	15	30,0	10,0	60,0

Kết quả trình bày ở Bảng 1 cho thấy khử trùng bằng 3% H₂O₂ trong 180 phút kết hợp 0,1% HgCl₂ trong 7 phút cho 70% mẫu sạch.

Tác giả Phạm Thị Kim Hạnh và cs. (2020) tiến hành khử trùng mẫu chồi non bật từ củ bằng 20% NaClO trong 5 phút, cấy vào môi trường không đường, sau 3 ngày, đem ra khử trùng lần 2 bằng 20% H₂O₂ trong 3 phút. Kết quả thu được 73% mẫu sạch sau 20 ngày nuôi cấy. Chúng tôi nhận thấy, phương pháp khử trùng này tuy cho tỷ lệ mẫu sạch tốt nhưng phức tạp, tốn công và khó có thể áp dụng vào thực tế sản xuất. Khử trùng mẫu gừng đen bằng kết hợp 2 chất khử trùng khác nhau 3% H₂O₂ trong 180 phút kết hợp 0,1% HgCl₂ trong 7 phút thu được kết quả khả quan, với 70% mẫu sạch sau 4 tuần nuôi cấy. Phương pháp khử trùng này đã khắc phục được các hạn chế của phương pháp tác giả Phạm Thị Kim Hạnh và cs. (2020) sử dụng.

3.2. Tái sinh chồi

Qua nghiên cứu môi trường tái sinh chồi bổ sung các chất KTST BAP (0,5-3,0 mg/L); KIN (0,5-3,0 mg/L); bổ sung kết hợp chất BAP/KIN nồng độ tối ưu với NAA (0,1-0,5 mg/L), chúng tôi đã xác định được môi trường thích hợp nhất cho tái sinh chồi *in vitro* cây gừng đen. Kết quả được trình bày ở Bảng 2.

Bảng 2: Ảnh hưởng của chất KTST đến khả năng tái sinh chồi

BAP (mg/L)	NAA (mg/L)	Tỷ lệ mẫu tạo chồi (%)	Số chồi trên mẫu (chồi)
2,0	0,0	62,2	2,04 ^{bc}
	0,1	70,0	2,04 ^{bc}
	0,2	82,2	2,22^a
	0,3	76,7	2,17 ^{ab}
	0,4	58,9	1,96 ^c
	0,5	52,2	1,74 ^d

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

Kết quả Bảng 2 cho thấy, môi trường cơ bản MS bổ sung 2 mg/L BAP kết hợp 0,2 mg/L NAA thích hợp cho tái sinh chồi *in vitro*. Sau 8 tuần, có 82,2% mẫu tái sinh, với 2,22 chồi/mẫu.

Nghiên cứu tái sinh chồi của chúng tôi đạt kết quả tốt hơn nghiên cứu của Phạm Thị Kim Hạnh và cs. (2020). Các tác giả này sử dụng môi trường MS bổ sung 2,0-2,5 mg/L BAP + 100 mL/L nước dừa + 1 mg/L Polyvinylpyrrolidone (PVP) để tái sinh chồi, sau 45 ngày, thu được 40-50% mẫu tạo chồi, với 1,8 chồi/mẫu.

3.3. Nhân nhanh chồi *in vitro*

Đây là giai đoạn tạo ra số lượng lớn chồi đồng đều làm nguyên liệu để tạo cây *in vitro*.

Trong các thí nghiệm bổ sung các chất KTST vào môi trường để nhân nhanh chồi, BAP (0,5-3,0 mg/L), KIN (0,5-3,0 mg/L), TDZ (0,2-1,0 mg/L) riêng lẻ, kết hợp chất BAP/KIN nồng độ tối ưu với NAA; kết hợp chất KTST phối hợp với khoai tây, chúng tôi thu được kết quả nhân nhanh chồi tốt nhất trên môi trường MS + 2 mg/L BAP + 0,2 mg/L NAA + 60 g/L khoai tây sau 8 tuần nuôi cấy.

Kết quả đánh giá hiệu quả của khoai tây đến khả năng nhân nhanh chồi trên môi trường bổ sung chất KTST kết hợp với khoai tây được thể hiện ở Bảng 3.

Bảng 3: Hiệu quả của khoai tây đến khả năng nhân nhanh chồi

BAP (mg/L)	NAA (mg/L)	Khoai tây (g/L)	Số chồi/mẫu (chồi)	Chiều cao chồi (cm)	Số lá
2,0	0,2	0	2,2 ^d	3,5 ^c	2,0 ^a
		20	2,5 ^c	3,7 ^b	2,0 ^a
		40	2,9 ^b	3,9 ^a	2,0 ^a
		60	3,6^a	3,9^a	2,0^a
		80	2,7 ^b	3,6 ^{bc}	1,9 ^a
		100	1,9 ^e	3,3 ^d	1,6 ^b

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

Kết quả ở Bảng 3 cho thấy, bổ sung khoai tây với nồng độ 60 g/L vào môi trường MS + 2 mg/L BAP + 0,2 mg/L NAA đã làm gia tăng đáng kể số chồi/mẫu, tuy nhiên, chiều cao và số lá/chồi không có thay đổi rõ rệt. Sau 8 tuần nuôi cấy thu được 3,6 chồi/mẫu, với chiều cao 3,9 cm và 2 lá/chồi.

Kết quả nghiên cứu nhân chồi của chúng tôi có số chồi đạt 3,6 chồi/mẫu, cao hơn so với nghiên cứu của Phạm Thị Kim Hạnh và cs. (2020). Nhóm tác giả tiến hành nhân nhanh chồi trên môi trường MS + 1 mg/L BAP + 0,2 mg/L KIN + 1 g/L casein + 100 mL/L nước dừa, sau 45 ngày, thu được 3,1 chồi/mẫu.

Bên cạnh đó, xét về hiệu quả kinh tế, việc sử dụng khoai tây để thay thế cho nước dừa và casein sẽ làm giảm chi phí, phù hợp để đưa vào sản xuất cây giống ở quy mô lớn.

3.4. Ra rễ *in vitro*

Các chồi *in vitro* khoẻ mạnh, đạt kích thước từ 4-5 cm, lá mở hết hoặc mở hơn 2/3, xanh tự nhiên, được tách riêng rễ và cấy trên môi trường MS có bổ sung (0,3-1,5 mg/L) IBA/NAA để tạo cây hoàn chỉnh. Kết quả ảnh hưởng chất KTST đến khả năng ra rễ *in vitro* được thể hiện ở Bảng 4.

Bảng 4: Ảnh hưởng của chất KTST đến khả năng ra rễ của chồi *in vitro*

Chất KTST	Nồng độ (mg/L)	Tỷ lệ chồi tạo rễ (%)	Số rễ/chồi	Chiều dài rễ (cm)
	0,0	100	1,3 ^e	3,2 ⁱ
IBA	0,3	100	2,2 ^c	5,3 ^e
	0,5	100	3,2^a	7,1^a
	0,7	100	2,8 ^b	6,1 ^c
	1,0	100	2,2 ^c	5,6 ^d
	1,5	100	1,7 ^d	4,6 ^g
NAA	0,3	100	1,8 ^d	4,5 ^g
	0,5	100	2,6 ^b	6,7 ^b
	0,7	100	2,1 ^c	6,4 ^c
	1,0	100	1,7 ^d	5,0 ^f
	1,5	100	1,3 ^e	3,7 ^h

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

Qua nghiên cứu chúng tôi nhận thấy, tất cả các môi trường đều hình thành rễ; môi trường bổ sung IBA cho hiệu quả tốt hơn môi trường bổ sung NAA về các chỉ tiêu số rễ/chồi và chiều dài rễ. Sau 8 tuần nuôi cấy, số rễ đạt được tốt nhất là 3,2 rễ/chồi với chiều dài 7,1 cm ở môi trường bổ sung 0,5 mg/L IBA.

3.5. Đánh giá ảnh hưởng của giá thể đến sinh trưởng của cây con ra ngôi

Cây sinh trưởng tốt, rễ dài, mập, trắng được để trong nhà 3-5 ngày, sau đó đưa ra nhà lưới 3-5 ngày để huấn luyện thích nghi. Sau đó, cây được đưa ra khỏi bình nuôi cấy, rửa sạch agar bám vào rễ, rồi cấy vào bầu. Cây được trồng trong nhà lưới có mái che và có độ che nắng 70%, nhiệt độ nhà lưới khoảng 25-30°C, tưới phun sương nhẹ để giữ ẩm 2-3 lần/ngày tùy thuộc điều kiện thời tiết. Đánh giá ảnh hưởng của giá thể đến sự sinh trưởng của cây con sau 12 tuần.

Bảng 5: Ảnh hưởng giá thể đến sự sinh trưởng của cây con ở vườn ươm

Giá thể	Tỷ lệ sống (%)	Chiều cao (cm)	Số lá mới	Sâu bệnh hại
CT1	92	10,3 ^a	2,0 ^a	-
CT2	84	8,5 ^b	1,4 ^b	-
CT3	76	6,7 ^c	1,0 ^c	-

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

Kí hiệu: CT1: Đất sạch tribat

CT2: Đất phù sa : tro trấu : mùn dừa : vỏ đậu phộng (1:1:1:1)

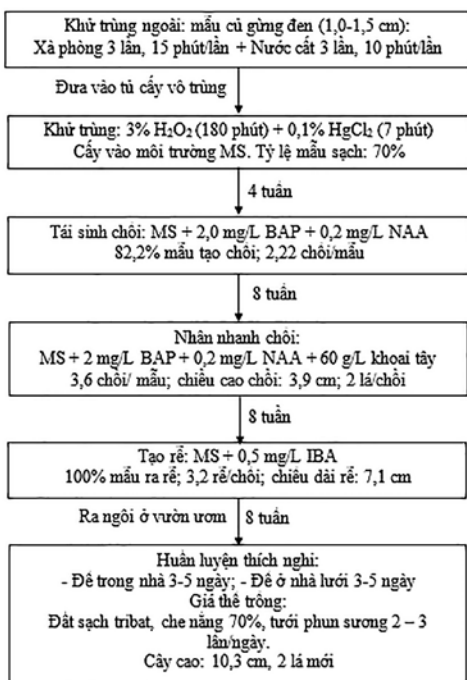
CT3: Đất phù sa : cát (1:1)

Sâu bệnh hại: Có: + Không: -

Từ Bảng 5 có thể thấy, sử dụng đất sạch tribat cho kết quả tốt nhất, sau 12 tuần, tỷ lệ mẫu sống đạt 92%, chiều cao cây trung bình đạt 10,3 cm; có thêm 2 lá mới.

3.6. Xây dựng quy trình nhân giống in vitro cây gừng đen *D. citrea*

Từ các kết quả nghiên cứu, chúng tôi tiến hành xây dựng quy trình nhân giống in vitro cây gừng đen *D. citrea*:



Hình 1: Sơ đồ quy trình nhân giống in vitro cây gừng đen *D. citrea*.

Mẫu được nuôi cấy ở điều kiện nhiệt độ 25 ± 2^oC, cường độ ánh sáng 2.000 - 3.000 lux và thời gian chiếu sáng là 10-12 giờ/ngày.

Môi trường cơ bản MS: MS + 30 g/L saccharose + 8 g/L agar

Xử lý mẫu cấy: Mẫu củ (1,0-1,5 cm) có chứa mắt ngủ được mang về cắt bỏ lá, bẹ lá, đoạn thân rễ già. Rửa mẫu nhiều lần dưới vòi nước chảy, sau đó rửa lại với nước xà phòng 3 lần, mỗi lần 15 phút. Tiếp đến rửa lại bằng nước cất vô trùng 3 lần, mỗi lần 10 phút trước khi đưa vào tủ cấy.

Khử trùng mẫu cấy: Đoạn mẫu củ mang mắt ngủ được khử trùng với 70 % ethanol trong 1 phút 30 giây. Sau đó, mẫu được khử trùng bằng 3% H₂O₂ trong 180 phút kết hợp với 0,1% HgCl₂ trong 7 phút. Sau khi khử

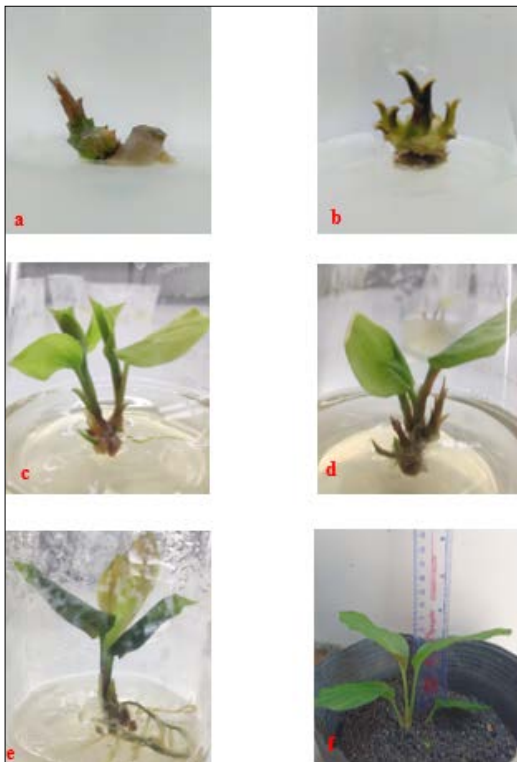
trùng, rửa sạch mẫu lại với nước cất vô trùng 8 lần, mỗi lần 5 phút trước khi cấy để loại bỏ hết dư lượng $HgCl_2$ còn bám trên mẫu. Tiến hành cấy bỏ những phần tiếp xúc với chất khử trùng rồi cấy vào môi trường cơ bản MS để tạo mẫu vô trùng.

Tái sinh chồi: Mẫu sạch thu được từ giai đoạn tạo mẫu vô trùng được cấy chuyển sang môi trường MS bổ sung 2,0 mg/L BAP kết hợp 0,2 mg/L NAA để tạo chồi tái sinh. Thu chồi tái sinh sau 8 tuần nuôi cấy.

Nhân nhanh chồi: Chồi sau khi tái sinh được cấy sang môi trường MS + 2 mg/L BAP + 0,2 mg/L NAA + 60 g/L khoai tây để nhân nhanh chồi. Thu cụm chồi *in vitro* sau 8 tuần nuôi cấy.

Tạo rễ: Các chồi *in vitro* khoẻ mạnh, đạt kích thước từ 4-5 cm, lá mở hết hoặc mở hơn 2/3, xanh tự nhiên, được tách riêng rẽ và cấy trên môi trường MS có bổ sung 0,5 mg/L IBA để tạo cây hoàn chỉnh. Thu cây *in vitro* sau 8 tuần nuôi cấy.

Huấn luyện thích nghi và ra ngôi cây con ở vườn ươm



Cây sinh trưởng tốt, rễ dài, mập, trắng được để trong nhà 3-5 ngày, sau đó đưa ra nhà lưới 3-5 ngày để huấn luyện thích nghi. Sau đó, cây được đưa ra khỏi bình nuôi cấy, rửa sạch agar bám vào rễ, rồi cấy vào chậu chứa giá thể đất sạch tribat. Cây được trồng trong nhà lưới có mái che và có độ che nắng 70%, nhiệt độ nhà lưới khoảng 25-30°C, tưới phun sương nhẹ để giữ ẩm 2-3 lần/ngày tùy thuộc điều kiện thời tiết. Sau 12 tuần, cây đạt chiều cao trung bình 10,3 cm, có 2 lá mới, cây khoẻ mạnh, không sâu bệnh. Tổng thời gian hoàn thành quy trình nhân giống bằng nuôi cấy mô cây gừng đen: 28 tuần từ vào mẫu cho đến ra vườn ươm và 12 tuần để cây có thể đưa vào sản xuất.

Hình 2: Các giai đoạn nhân giống *in vitro* cây gừng đen *D. citrea*. Hình a, b: chồi tái sinh *in vitro*; Hình c, d: cụm chồi *in vitro*; Hình e: cây *in vitro*; Hình f: cây con 3 tháng tuổi.

4. Kết luận

Kết quả nghiên cứu cho thấy khử trùng mẫu bằng 3% H₂O₂ trong 180 phút kết hợp 0,1% HgCl₂ trong 7 phút cho tỷ lệ mẫu sạch đạt 70% sau 4 tuần nuôi cấy. Môi trường cơ bản MS bổ sung 2,0 mg/L BAP + 0,2 mg/L NAA thích hợp để tái sinh chồi gừng đen, đạt 82,2% mẫu tái sinh chồi, với 2,22 chồi/mẫu sau 8 tuần nuôi cấy. Môi trường cơ bản MS bổ sung kết hợp 2,0 mg/L BAP, 0,2 mg/L NAA và 60 g/L khoai tây cho kết quả nhân chồi tốt nhất, sau 8 tuần nuôi cấy, số chồi đạt 3,6 chồi/mẫu, chiều cao chồi trung bình đạt 3,9 cm; 2 lá/chồi. Môi trường cơ bản MS bổ sung 0,5 mg/L IBA thích hợp cho chồi *in vitro* ra rễ, sau 8 tuần nuôi cấy, 100% chồi tạo rễ, số rễ trung bình đạt 3,2 rễ/chồi, rễ dài 7,1 cm. Cây con được trồng vào giá thể đất sạch tribat cho tỷ lệ sống khoảng 92%. Sau 12 tuần, cây cao trung bình 10,3 cm, có 2 lá mới. Chúng tôi đã xây dựng được quy trình nhân giống *in vitro* và ra ngôi cây gừng đen ở vườn ươm nhằm tạo nguồn nguyên liệu cho sản xuất cây gừng đen trên quy mô lớn.

H A C, H N Q, T V N T, N Đ T,
P T T H, P V T, N T B C,
T T B P, L N T T, P Q T, N V L.

