



## NHÂN GIỐNG *IN VITRO* CÂY SA NHÂN (*Amomum sp.*) Ở HUYỆN A LƯỚI, TỈNH THỪA THIÊN HUẾ

Trương Thị Bích Phượng<sup>1</sup>, Thân Trọng Bảo Khánh<sup>1</sup>, Phạm Phú Bình<sup>1</sup>, Nguyễn Đức Tuấn<sup>1</sup>,  
Nguyễn Thị Huệ<sup>2</sup>, Nguyễn Thị Thu Liên<sup>2</sup>, Nguyễn Thị Tân<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế

<sup>2</sup> Viện Công nghệ Sinh học, Đại học Huế

<sup>3</sup> Trường Đại học Y Dược, Đại học Huế

**Tóm tắt:** Cây sa nhân là một loài dược liệu quý, hiện đang được nhiều người quan tâm phát triển trồng nhằm tạo nguồn dược liệu. Trong bài báo này, chúng tôi trình bày kết quả thí nghiệm nhân giống *in vitro* cây sa nhân (*Amomum sp.*) thu ở huyện A Lưới, tỉnh Thừa Thiên Huế. Đỉnh sinh trưởng và gốc thân của cây tự nhiên được khử trùng bằng HgCl<sub>2</sub> 0,15% trong thời gian từ 15-18 phút, sau đó ngâm trong dung dịch nano bạc 40 ppm trong 12 phút. Đối với đỉnh chồi, thời gian khử trùng HgCl<sub>2</sub> 16 phút cho tỷ lệ mẫu sống cao nhất, đạt 40% và đối với gốc thân, thời gian khử trùng HgCl<sub>2</sub> 17 phút cho tỷ lệ mẫu sống cao nhất, đạt 42,86%. Mẫu được nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung riêng lẻ chất kích thích sinh trưởng (KTST) BAP, KIN (kinetin). Sau 4 tuần nuôi cấy, khả năng tái sinh chồi tốt nhất đạt được trên môi trường bổ sung BAP 2,0 mg/l (1,83 chồi/mẫu gốc thân và 2,75 chồi/mẫu chồi đỉnh bổ đôi) hoặc trên môi trường bổ sung kinetin 3,0 mg/l (1,60 chồi/mẫu gốc thân và 2,0 chồi/mẫu chồi đỉnh bổ đôi). Gốc thân *in vitro* được cấy lên môi trường nhân nhanh bổ sung riêng lẻ các chất kích thích sinh trưởng BAP và kinetin hoặc phối hợp BAP với NAA. Sau 10 tuần nuôi cấy, môi trường bổ sung BAP 1,0 mg/l cho số chồi lớn nhất đạt 9,83 chồi/mẫu. Chồi *in vitro* được cảm ứng rễ trên môi trường MS bổ sung NAA hay IBA. Rễ được cảm ứng tốt nhất trên môi trường MS có bổ sung 0,6 mg/l NAA cho số rễ cao nhất (7,17 rễ/chồi) và rễ phát triển nhanh về chiều dài trên môi trường bổ sung 0,4 mg/l IBA (3,89 cm). Cây con *in vitro* được huấn luyện thích nghi và trồng trên giá thể xơ dừa với tỷ lệ sống sót 94,44% sau 1 tháng và 72,22% sau 2 tháng.

**Từ khóa:** Cây dược liệu, chồi đỉnh, gốc thân, nhân giống *in vitro*, sa nhân

### 1 Mở đầu

Sa nhân thuộc chi Sa nhân (*Amomum*), họ Gừng (Zingiberaceae). Đây là một cây thuốc quý, hiện nay đang được quan tâm rất nhiều. Quả sa nhân chứa tinh dầu với nhiều hợp chất hóa học giá trị như camphen,  $\beta$ -pinen, limonen, camphor, borneol, saponin... (Minh *et al.*, 1994). Tinh dầu sa nhân có tác dụng kháng khuẩn và nấm (Li *et al.*, 2011). Sa nhân được sử dụng trong nhiều bài thuốc đông y như: Chữa có thai bị lạnh bụng, đầy hơi, tiểu tiện không thông; chữa tiêu chảy; chữa ăn không tiêu, nôn mửa, đau bụng; chữa đau nhức răng; chữa tê thấp... (Lợi, 2003).

\* Liên hệ: [ttbphuongdt@gmail.com](mailto:ttbphuongdt@gmail.com)

Để bảo tồn các giống cây trồng quý và cung cấp nguyên liệu sa nhân cho các công ty dược phẩm trong nước và xuất khẩu, nhiều địa phương trong cả nước đã nghiên cứu xây dựng mô hình trồng sa nhân. Nhưng nguồn giống chủ yếu được gieo từ hạt nên quần thể cây giống không đồng đều. Nếu trồng bằng thân ngầm thu thập từ những cây tự nhiên thì hệ số nhân rất thấp và không đủ giống cung cấp cho sản xuất. Những điều này đã gây trở ngại cho việc xây dựng vùng nguyên liệu sa nhân.

Công nghệ nuôi cấy mô và tế bào thực vật được xem là phương án có triển vọng nhất để nhân nhanh, bảo tồn và phát triển nhiều nguồn gen cây thuốc quý hiếm. Nuôi cấy mô tế bào thực vật cho phép tạo ra một số lượng lớn cây con sạch bệnh, đồng nhất về mặt di truyền, đồng thời mang lại hiệu quả kinh tế cao, có thể tạo ra một số lượng lớn cây trong một thời gian ngắn với chi phí tương đối. Nhờ đó mà chủ động trong sản xuất và cung cấp nguồn giống quanh năm mà không bị phụ thuộc vào thời vụ và các điều kiện khác. Kỹ thuật nuôi cấy mô tế bào thực vật đã khắc phục được những nhược điểm của các kỹ thuật nhân giống truyền thống.

Trên thế giới có một số công trình nghiên cứu nhân giống *in vitro* chi Sa nhân (*Amomum*). Rao và cs (2003) đã nuôi cấy *in vitro* *Amomum longiligulare* T.L.Wu, kết quả số chồi thu được tương đối thấp, chỉ đạt 3,7 chồi/mẫu. Một loài có giá trị khác thuộc chi Sa nhân là *Amomum villosum* Lour cũng đã được Ping (2004); Hong và Na (2005) nhân giống *in vitro* từ chồi rễ. *Amomum krervanh* Pierre ex Gagnep là cây dược liệu phổ biến ở Thái Lan và Campuchia đã được nhiều tác giả quan tâm nghiên cứu nhân giống *in vitro* từ chồi nách (Tefera *et al.*, 2004; Rao *et al.*, 2004). *Amomum tsao-ko* Crevost et Lemaire đã được Hongdong (2006) nuôi cấy *in vitro* và nhân nhanh từ chồi đỉnh. Pradhan và cs (2014); đã tiến hành nghiên cứu vi nhân giống *in vitro* cây *Amomum subutalum* cv. Ramsey. Purohit và cs (2016) nghiên cứu nhân giống *in vitro* và phân tích độ tin cậy di truyền cây *Amomum subutalum* Roxb.

Ở Việt Nam, có rất ít công trình công bố kết quả nghiên cứu nuôi cấy *in vitro* cây sa nhân. Vịnh và cs (2006) đã nghiên cứu áp dụng công nghệ phi vô tính, hạt nhân tạo trong nhân nhanh sa nhân. Đặng Ngọc Phúc và cs (2011) đã nhân giống *in vitro* cây sa nhân tím (*Amomum longiligulare* T.L.Wu). Trương Thị Bích Phượng và cs (2015) đã nuôi cấy callus cây sa nhân trắng (*Amomum xanthioides* Wall).

Trong bài báo này chúng tôi nghiên cứu nhân giống *in vitro* cây sa nhân (*Amomum sp.*) thu ở A Lưới, nhằm góp phần bảo tồn tài nguyên di truyền thực vật và làm cơ sở cho việc cung cấp nguồn cây giống chất lượng cao để mở rộng vùng dược liệu sa nhân ở địa phương và trong nước.

## 2 Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

### 2.1 Nguyên liệu

Mẫu được Khoa Y học Cổ truyền, Trường Đại học Y Dược, Đại học Huế cung cấp. Nguyên liệu nuôi cấy ban đầu là đỉnh chồi và gốc thân của cây sa nhân (*Amomum sp.*) mọc tự nhiên thu ở xã Hồng Thủy, huyện A Lưới, tỉnh Thừa Thiên Huế.

### 2.2 Vô trùng mẫu nuôi cấy

Gốc thân (0,5 cm) và đỉnh chồi (0,5 cm) của cây sa nhân khỏe mạnh được rửa sạch bụi đất trong dung dịch xà phòng loãng 3 lần và rửa lại nhiều lần dưới vòi nước chảy. Mẫu được rửa lại bằng nước cất vô trùng 5 lần trước khi đưa vào tủ cấy. Trong tủ cấy, mẫu vật được lắc với dung dịch khử trùng HgCl<sub>2</sub> 0,15% trong khoảng thời gian từ 15-18 phút, sau đó lắc kỹ bằng nước cất khử trùng để loại bỏ hết HgCl<sub>2</sub> còn bám trên mẫu, rồi ngâm trong dung dịch nano bạc 40 ppm trong 12 phút.

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

### 2.3 Tái sinh chồi

Mẫu sau khi khử trùng được cấy lên môi trường MS (Murashige and Skoog, 1962) có 3% sucrose, 0,8% agar và bổ sung KTST KIN từ 1,0-4,0 mg/l; BAP (6-benzyl amino purine) từ 1,0-4,0 mg/l riêng lẻ để thăm dò khả năng tái sinh chồi. Các chỉ tiêu theo dõi gồm số chồi và chiều cao chồi được thu sau 4 tuần nuôi cấy.

### 2.4 Nhân chồi

Đoạn thân (1,0-2,0 cm) thu được từ chồi *in vitro* được cấy lên môi trường dinh dưỡng cơ bản MS có 3% sucrose, 0,8% agar và bổ sung các chất KTST BAP (0,5-3,0 mg/l); KIN (0,5-3,0 mg/l) riêng lẻ hoặc phối hợp với NAA (naphthaleneacetic acid) từ 0,2-0,4 mg/l để thăm dò khả năng tạo cụm chồi *in vitro* của mẫu. Các chỉ tiêu theo dõi gồm số chồi, chiều cao chồi và số rễ được thu sau 10 tuần nuôi cấy.

### 2.5 Tạo rễ

Chồi *in vitro* có kích thước từ 2,0-3,0 cm, có từ 3-4 lá thu được từ các thí nghiệm trên, được tách riêng lẻ và cấy lên môi trường cơ bản MS có 3% sucrose, 0,8% agar và bổ sung các

chất KTST NAA (0,2-1,0 mg/l); hoặc IBA (indole butyric acid) từ 0,2-1,0 mg/l riêng lẻ để thăm dò khả năng hình thành và phát triển của rễ. Các chỉ tiêu theo dõi gồm tỷ lệ % chồi tạo rễ, số rễ và chiều dài rễ được thu sau 5 tuần nuôi cấy.

## 2.6 Điều kiện nuôi cấy

Các thí nghiệm được tiến hành ở điều kiện nhiệt độ  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , cường độ ánh sáng 2000 - 3000 lux, thời gian chiếu sáng 16 giờ/ngày.

## 2.7 Chuyển cây ra vườn ươm

Các cây sa nhân *in vitro* hoàn chỉnh (cao 4,0-7,0 cm, có 3-5 lá) được huấn luyện thích nghi bằng cách chuyển bình nuôi cấy ra vườn ươm trong khoảng 5 ngày, sau đó mở nắp bình nuôi cấy khoảng 2 ngày. Cây con *in vitro* được chuyển ra khỏi bình nuôi cấy, rửa sạch agar, cắt ngắn rễ (cao 5-8 cm) được tách riêng, sau đó đem trồng trực tiếp trên 3 loại giá thể khác nhau: cát, xơ dừa, cát trộn đất (tỷ lệ 1: 1). Đánh giá tỷ lệ sống của cây sau 1 tháng và 2 tháng chuyển ra vườn ươm.

## 2.8 Xử lý thống kê

Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần, mỗi lần lặp quan sát 15 mẫu/công thức đối với nuôi cấy *in vitro* và tính tỷ lệ phần trăm trên 36 mẫu/công thức đối với trồng cây ra vườn ươm. Kết quả thí nghiệm được phân tích Duncan's test bằng phần mềm SPSS 16.0 với mức xác suất có ý nghĩa  $p < 0,05$ .

# 3 Kết quả và thảo luận

## 3.1 Vô trùng mẫu nuôi cấy

Mẫu gốc thân sa nhân (0,5 cm) và đỉnh chồi (0,5 cm) sau khi khử trùng được cấy trên môi trường. Kết quả ảnh hưởng của thời gian khử trùng bằng  $\text{HgCl}_2 0,15\%$  đến khả năng vô trùng mẫu sau 4 tuần nuôi cấy được trình bày ở bảng 1.

**Bảng 1.** Ảnh hưởng thời gian khử trùng đỉnh chồi và gốc thân sa nhân bằng HgCl<sub>2</sub> 0,15 % và ngâm với nano bạc 40 ppm, 12 phút

Thời gian khử trùng bằng HgCl <sub>2</sub> (phút)	Đỉnh chồi			Gốc thân		
	Tỷ lệ mẫu nhiễm (%)	Tỷ lệ mẫu chết (%)	Tỷ lệ mẫu sống (%)	Tỷ lệ mẫu nhiễm (%)	Tỷ lệ mẫu chết (%)	Tỷ lệ mẫu sống (%)
15	45,00	17,50	37,50	68,97	10,34	20,69
16	33,33	26,67	40,00	57,78	17,78	24,44
17	25,93	40,74	33,33	35,71	21,43	42,86
18	21,43	64,28	14,29	22,86	42,85	34,29

Kết quả trình bày ở bảng 1 cho thấy, công thức khử trùng HgCl<sub>2</sub> trong thời gian 16 phút cho tỷ lệ mẫu chồi đỉnh sống, không nhiễm cao nhất là 40,00% với tỷ lệ mẫu chết là 26,67%, tỷ lệ mẫu nhiễm là 33,33 %. Đối với mẫu gốc thân, khử trùng HgCl<sub>2</sub> trong thời gian 17 phút cho tỷ lệ mẫu sống, không nhiễm cao nhất là 42,86%, tỷ lệ mẫu nhiễm là 35,71%, tỷ lệ mẫu chết là 21,43 %. Khử trùng thời gian dài (18 phút) làm tăng tỉ lệ mẫu chết (64,28% đối với mẫu chồi đỉnh và 42,85% đối với mẫu gốc thân). Phần gốc thân nằm dưới đất nên bẩn, chứa nhiều vi khuẩn và nấm mốc, tỷ lệ mẫu nhiễm cao hơn so với mẫu chồi đỉnh.

Họ Gừng (Zingiberaceae) có thân ngầm nằm sát mặt đất và thân khí sinh bò dưới mặt đất. Đặc điểm này làm cho đỉnh sinh trưởng và đoạn thân thường chứa nhiều vi khuẩn và nấm mốc gây khó khăn trong quá trình khử trùng mẫu. Đặng Ngọc Phúc và cs (2011) đã nghiên cứu nhân giống *in vitro* cây sa nhân tím cho thấy thời gian khử trùng HgCl<sub>2</sub> 12 phút cho tỷ lệ mẫu sống cao nhất, đạt 91,11% đối với đỉnh sinh trưởng và 86,67% đối với đoạn thân. Nguyễn Văn Hồng, Trần Thị Tý (2013) đã nghiên cứu kỹ thuật nhân giống cây sa nhân tím (*Amomum longiligulare* T.L.Wu) bằng phương pháp nuôi cấy mô tế bào thực vật. Kết quả cho thấy khử trùng đối với các mẫu vật có nguồn gốc từ chồi tối ưu nhất là trong 15 phút cho tỷ lệ mẫu sống không nhiễm cao nhất đạt 60,33%; tỷ lệ mẫu nhiễm là 32,34% và tỷ lệ mẫu chết là 9,33%. Kết quả nghiên cứu này tương đối phù hợp với kết quả nghiên cứu của chúng tôi.

### 3.2 Tái sinh chồi

Mẫu gốc thân và chồi đỉnh sau khi khử trùng được cấy lên môi trường MS bổ sung 1-4 mg/l BAP hoặc 1-4 mg/l KIN. Kết quả ảnh hưởng của chất KTST đến khả năng tạo chồi từ gốc thân và chồi đỉnh sau 4 tuần theo dõi được trình bày ở bảng 2.

**Bảng 2.** Ảnh hưởng của BAP và KIN đến khả năng tái sinh chồi từ gốc thân sau 4 tuần

Công thức		Số chồi/mẫu	Chiều cao chồi (cm)
Chất KTST	Nồng độ (mg/l)		
Đối chứng	0,0	0,00	0,00
BAP	1,0	0,75 <sup>b</sup>	0,83 <sup>cd</sup>
	<b>2,0</b>	<b>1,83<sup>a</sup></b>	<b>1,60<sup>ab</sup></b>
	3,0	0,83 <sup>b</sup>	0,66 <sup>d</sup>
	4,0	0,67 <sup>b</sup>	0,44 <sup>de</sup>
	KIN	1,0	0,75 <sup>b</sup>
KIN	2,0	0,80 <sup>b</sup>	1,32 <sup>bc</sup>
	<b>3,0</b>	<b>1,60<sup>a</sup></b>	<b>2,07<sup>a</sup></b>
	4,0	0,67 <sup>b</sup>	0,68 <sup>d</sup>

**Chú thích:** Từ bảng 2 đến bảng 6

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).

Môi trường cơ bản MS bổ sung 2 mg/l BAP ảnh hưởng tốt nhất đến khả năng tạo chồi *in vitro* từ gốc thân sa nhân, đạt 1,83 chồi/mẫu, chiều cao trung bình 1,60 cm, chồi khỏe (Hình 1a). Khi tăng nồng độ BAP lên 4 mg/l thì một số gốc thân mất khả năng tái sinh chồi. Môi trường bổ sung KIN 3 mg/l, thích hợp cho gốc thân tái sinh chồi (1,60 chồi/mẫu gốc thân).

Môi trường cơ bản MS bổ sung 2 mg/l BAP ảnh hưởng tốt nhất đến khả năng tạo chồi *in vitro* từ đỉnh chồi sa nhân bổ đôi, đạt 2,75 chồi/mẫu, chiều cao trung bình 1,33 cm, chồi khỏe, màu xanh nhạt (Hình 1b). Khi tăng nồng độ BAP lên 4 mg/l thì một số gốc thân mất khả năng

tái sinh chồi. Môi trường bổ sung KIN 3 mg/l, thích hợp cho chồi đỉnh bổ đôi tái sinh chồi (2,0 chồi/mẫu).

**Bảng 3.** Ảnh hưởng của BAP và KIN đến khả năng tái sinh chồi từ chồi đỉnh bổ đôi sau 4 tuần

Công thức		Số chồi/mẫu	Chiều cao chồi (cm)
Chất KTST	Nồng độ (mg/l)		
Đối chứng	0,0	0,00	0,00
BAP	1,0	0,75 <sup>c</sup>	0,56 <sup>cd</sup>
	<b>2,0</b>	<b>2,75<sup>a</sup></b>	<b>1,33<sup>ab</sup></b>
	3,0	1,40 <sup>bc</sup>	0,90 <sup>bc</sup>
	4,0	0,80 <sup>c</sup>	0,56 <sup>cd</sup>
	KIN	1,0	0,75 <sup>c</sup>
KIN	2,0	1,75 <sup>b</sup>	1,06 <sup>bc</sup>
	<b>3,0</b>	<b>2,00<sup>b</sup></b>	<b>1,88<sup>a</sup></b>
	4,0	1,00 <sup>c</sup>	0,89 <sup>bc</sup>

### 3.3 Nhân chồi

Đoạn gốc thân kích thước 1,0-2,0 cm từ chồi *in vitro* được sử dụng làm nguyên liệu cho quá trình nhân chồi. Chúng tôi nghiên cứu ảnh hưởng riêng lẻ của các chất KTST nhóm cytokinin (BAP, KIN) và ảnh hưởng của tổ hợp cytokinin kết hợp với auxin (BAP và NAA) đến khả năng nhân chồi *in vitro*.

#### Ảnh hưởng riêng lẻ của BAP, KIN đến khả năng nhân nhanh chồi

Kết quả ảnh hưởng riêng lẻ của BAP, KIN đến khả năng nhân chồi sau 10 tuần nuôi cấy được thể hiện ở bảng 4.

**Bảng 4.** Ảnh hưởng của BAP và KIN đến khả năng nhân chồi sau 10 tuần

Công thức		Số chồi/mẫu	Chiều cao chồi (cm)	Số rễ/chồi
Chất KTST	Nồng độ (mg/l)			
Đối chứng	0,0	1,20 <sup>e</sup>	1,33 <sup>e</sup>	1,50 <sup>d</sup>
	0,5	6,83 <sup>b</sup>	2,94 <sup>cd</sup>	7,17 <sup>a</sup>
	1,0	<b>9,83<sup>a</sup></b>	<b>2,95<sup>cd</sup></b>	<b>4,17<sup>bc</sup></b>
	1,5	5,21 <sup>bc</sup>	3,46 <sup>bc</sup>	3,79 <sup>bc</sup>
	2,00	3,58 <sup>cd</sup>	3,98 <sup>bc</sup>	3,67 <sup>bc</sup>
	2,50	3,38 <sup>cd</sup>	3,88 <sup>bc</sup>	3,54 <sup>bc</sup>
	3,00	2,91 <sup>de</sup>	3,63 <sup>bc</sup>	3,00 <sup>cd</sup>
BAP	0,5	3,08 <sup>d</sup>	3,69 <sup>bc</sup>	3,92 <sup>bc</sup>
	1,0	3,67 <sup>cd</sup>	5,74 <sup>a</sup>	4,75 <sup>b</sup>
	1,5	3,54 <sup>cd</sup>	4,16 <sup>b</sup>	4,08 <sup>bc</sup>
	2,0	3,06 <sup>d</sup>	3,73 <sup>bc</sup>	4,06 <sup>bc</sup>
	2,5	2,82 <sup>de</sup>	2,66 <sup>cd</sup>	3,91 <sup>bc</sup>
	3,0	2,36 <sup>de</sup>	2,39 <sup>d</sup>	2,79 <sup>cd</sup>
	KIN	0,5	3,08 <sup>d</sup>	3,69 <sup>bc</sup>
1,0		3,67 <sup>cd</sup>	5,74 <sup>a</sup>	4,75 <sup>b</sup>
1,5		3,54 <sup>cd</sup>	4,16 <sup>b</sup>	4,08 <sup>bc</sup>
2,0		3,06 <sup>d</sup>	3,73 <sup>bc</sup>	4,06 <sup>bc</sup>
2,5		2,82 <sup>de</sup>	2,66 <sup>cd</sup>	3,91 <sup>bc</sup>
3,0		2,36 <sup>de</sup>	2,39 <sup>d</sup>	2,79 <sup>cd</sup>

Kết quả trình bày ở bảng 4 cho thấy, môi trường đối chứng có hệ số nhân chồi thấp chỉ đạt 1,2 chồi/mẫu, chồi nhỏ và yếu; lá mỏng, có màu xanh nhạt.

Môi trường cơ bản MS bổ sung BAP (0,5-3,0 mg/l) đã kích thích phát sinh chồi *in vitro*. Môi trường bổ sung BAP 0,5 mg/l, số chồi thu được đạt 6,83 chồi/mẫu (Hình 1d). Môi trường bổ sung BAP 1,0 mg/l, số chồi thu được cao nhất (9,83 chồi/mẫu). Chất lượng chồi tốt, chồi mập, khỏe; lá dày, xanh đậm (Hình 1e). Tiếp tục tăng nồng độ BAP lên 1,5-3,0 mg/l số chồi thu được giảm.

So với BAP, môi trường bổ sung KIN (0,5-3,0 mg/l), cho nhân chồi kém hơn, số chồi thu được cao nhất chỉ đạt 3,67 chồi/mẫu trên môi trường bổ sung 1,0 mg/l (Hình 1c); nhưng chiều



cao chồi tốt hơn (đạt 4,75 cm). Môi trường bổ sung 2,5-3,0 mg/l KIN số chồi thu được không sai khác so với đối chứng.

Sajina và cs (1997) nghiên cứu nhân giống *in vitro* *Amomum subulatum* Roxb từ chồi thân rễ (rhizome bud). Kết quả cho thấy môi trường MS bổ sung BAP 1,0 mg/l cho số chồi lớn nhất, đạt 10-12 chồi/mẫu nuôi cấy.

### Ảnh hưởng của BAP kết hợp với NAA đến khả năng nhân chồi

Kết quả ảnh hưởng của BAP kết hợp với NAA đến khả năng nhân chồi sau 10 tuần nuôi cấy được trình bày ở bảng 5.

**Bảng 5.** Ảnh hưởng của BAP kết hợp với NAA lên khả năng nhân chồi sau 10 tuần

Chất KTST (mg/l)		Số chồi/mẫu	Chiều cao chồi (cm)	Số rễ/chồi
BAP	NAA			
0,0	0,0	1,20 <sup>e</sup>	1,33 <sup>e</sup>	1,50 <sup>e</sup>
0,5	0,2	2,36 <sup>d</sup>	3,22 <sup>bc</sup>	5,07 <sup>a</sup>
	0,4	2,38 <sup>d</sup>	4,17 <sup>ab</sup>	5,13 <sup>a</sup>
1,0	0,2	3,50 <sup>c</sup>	3,38 <sup>b</sup>	3,94 <sup>b</sup>
	0,4	3,17 <sup>cd</sup>	3,64 <sup>b</sup>	3,67 <sup>bc</sup>
1,5	0,2	4,54 <sup>b</sup>	3,59 <sup>b</sup>	3,08 <sup>cd</sup>
	0,4	2,70 <sup>cd</sup>	3,53 <sup>b</sup>	3,50 <sup>bc</sup>
2,0	0,2	5,09 <sup>b</sup>	3,92 <sup>b</sup>	2,91 <sup>cd</sup>
	0,4	2,60 <sup>cd</sup>	2,49 <sup>cd</sup>	3,10 <sup>bcd</sup>
2,5	0,2	<b>6,86<sup>a</sup></b>	<b>4,95<sup>a</sup></b>	<b>2,79<sup>cd</sup></b>
	0,4	2,38 <sup>d</sup>	2,35 <sup>cd</sup>	3,00 <sup>cd</sup>
3,0	0,2	2,78 <sup>cd</sup>	2,37 <sup>cd</sup>	2,56 <sup>c</sup>
	0,4	2,33 <sup>d</sup>	2,20 <sup>d</sup>	2,78 <sup>cd</sup>

Kết quả trình bày ở bảng 5 cho thấy, môi trường bổ sung kết hợp BAP (0,5-3,0 mg/l) với NAA 0,2 hoặc 0,4 mg/l đã kích thích tạo chồi *in vitro*. Trên các môi trường nuôi cấy bổ sung kết hợp BAP (0,5-3,0 mg/l) với NAA 0,2 hoặc 0,4 mg/l, các công thức môi trường có kết hợp BAP với 0,2 mg/l NAA thích hợp cho nhân chồi, Số chồi/mẫu cao nhất (6,86 chồi/mẫu) thu được trên môi trường bổ sung 2,5 mg/l BAP kết hợp 0,2 mg/l NAA. Chồi phát triển thành cụm; thân mập; lá dày, màu xanh đậm; chất lượng chồi tốt (Hình 1f). Trên môi trường bổ sung riêng lẻ 2,5 mg/l BAP (bảng 4), số chồi thu được chỉ đạt 3,38 chồi/mẫu, thấp hơn nhiều so với môi trường bổ sung kết hợp BAP 2,5 mg/l với NAA 0,2 mg/l. Môi trường bổ sung phối hợp BAP 0,5 mg/l và NAA 0,4 mg/l, mẫu tạo chồi kém (2,38 chồi/mẫu), nhưng chồi phát triển nhanh (cao 4,17 cm) và tạo rễ tốt (5,13 rễ/chồi). Sau 5 tuần nuôi cấy trên môi trường cùng với quá trình tạo chồi còn có sự hình thành callus màu trắng đục. Tiếp tục theo dõi trong 12 tuần cho thấy callus bắt đầu phát triển phôi.

Khi tăng nồng độ BAP 3,0 mg/l, số chồi thu được thấp nhất và chiều cao trung bình của chồi và số rễ/chồi đều giảm. Chất lượng chồi không tốt, đường kính thân nhỏ; lá dài mỏng, màu xanh nhạt.

### 3.4 Tạo rễ

#### Ảnh hưởng NAA và IBA đến khả năng cảm ứng rễ

Chồi *in vitro* (2,0-3,0 cm; 3-4 lá) thu được từ các thí nghiệm trên được tách riêng lẻ và cấy lên môi trường cảm ứng rễ bổ sung riêng lẻ NAA hoặc IBA với nồng độ từ 0,2 -1,0 mg/l. Kết quả sau 5 tuần nuôi cấy được trình bày ở bảng 6.

Môi trường đối chứng không bổ sung chất KTST có 100% chồi tạo rễ với 1,5 rễ/chồi. Điều này cho thấy, chồi *in vitro* có thể ra rễ ngay trên môi trường cơ bản MS không bổ sung chất KTST. Tuy nhiên, rễ cảm ứng trên môi trường đối chứng phát triển yếu, mảnh, có ít lông tơ. Những cây *in vitro* này khi chuyển ra đất dễ bị chết.

Trên môi trường bổ sung NAA (0,2-1,0 mg/l), 100% chồi tạo rễ. Trên môi trường MS bổ sung NAA 0,6 mg/l, số rễ thu được cao nhất, đạt 7,17 rễ/chồi. Rễ ngắn, mập, phân nhánh, có nhiều lông hút (Hình 1g). Những cây *in vitro* này khi chuyển ra vườn ươm có khả năng sống rất cao. Khi tăng nồng độ NAA lên 1,0 mg/l, rễ trở nên mảnh hơn, số rễ giảm (2,88 rễ/chồi), lông hút ít, mảnh.

Trên môi trường bổ sung IBA (0,2-1,0 mg/l), 100% chồi tạo rễ. Số rễ thu được cao nhất đạt 4,67 rễ/chồi trên môi trường MS bổ sung 0,6 mg/l IBA. Rễ dài, phân nhánh, mập. Khi tăng nồng độ IBA 1,0 mg/l, rễ trở nên mảnh hơn, số rễ giảm (2,72 rễ/chồi), ít lông hút và có màu trắng sẫm.

Theo Đặng Ngọc Phúc và cs (2011), rễ chồi *in vitro* cây sa nhân tím (*Amomum longiligulare* T.L.Wu) được cảm ứng tốt nhất trên môi trường MS có bổ sung 0,5 mg/l NAA. Kết quả này tương tự kết quả nghiên cứu của chúng tôi.

**Bảng 6.** Ảnh hưởng của NAA và IBA đến khả năng tạo rễ sau 5 tuần nuôi cấy

Công thức		Tỉ lệ ra rễ	Số rễ/chồi	Chiều dài rễ (cm)
Chất KTST	Nồng độ (mg/l)	(%)		
Đối chứng	0,00	100	1,50 <sup>e</sup>	0,64 <sup>d</sup>
	0,20	100	3,75 <sup>cd</sup>	1,62 <sup>bc</sup>
	0,40	100	5,63 <sup>b</sup>	1,74 <sup>bc</sup>
	0,60	<b>100</b>	<b>7,17<sup>a</sup></b>	<b>1,66<sup>bc</sup></b>
	0,80	100	3,08 <sup>d</sup>	1,35 <sup>c</sup>
	1,00	100	2,88 <sup>d</sup>	1,26 <sup>c</sup>
NAA	0,20	100	3,27 <sup>d</sup>	3,62 <sup>a</sup>
	0,40	100	3,71 <sup>cd</sup>	3,89 <sup>a</sup>
	0,60	100	4,67 <sup>bc</sup>	2,17 <sup>b</sup>
	0,80	100	3,15 <sup>d</sup>	1,90 <sup>bc</sup>
	1,00	100	2,72 <sup>d</sup>	1,88 <sup>bc</sup>
	IBA			

### 3.5 Chuyển cây ra vườn ươm

Cây con *in vitro* hoàn chỉnh có chiều cao khoảng 4,0-7,0 cm, với 3-5 lá, sau khi huấn luyện thích nghi với thay đổi nhiệt độ, độ ẩm, sự mất nước được trồng trực tiếp trên 3 loại giá thể khác nhau: cát, xơ dừa, cát trộn đất (tỷ lệ 1: 1). Kết quả sau 1 tháng và 2 tháng theo dõi được thể hiện ở bảng 7.

**Bảng 7.** Ảnh hưởng của giá thể đến khả năng sinh trưởng và phát triển của cây con *in vitro* ở vườn ươm

Giá thể	Số cây	Tỷ lệ cây sống sau 1 tháng (%)	Tỷ lệ cây sống sau 2 tháng (%)
Cát	36	88,89	63,89
Xơ dừa	36	94,44	72,22
Cát + đất (50:50)	36	91,67	58,33

Kết quả trình bày ở bảng 7 cho thấy, tỷ lệ sống của cây con *in vitro* trên các loại giá thể đạt 88,89%-94,44% sau 1 tháng trồng và đạt 58,33%-72,22% sau 2 tháng trồng. Trong 3 loại giá thể nghiên cứu, giá thể xơ dừa có tỷ lệ sống cao nhất đạt 94,44% sau 1 tháng trồng và đạt 72,22% sau 2 tháng trồng (Hình 1h), giá thể cát trộn đất (tỷ lệ 1:1) có tỷ lệ sống thấp nhất sau 2 tháng trồng chỉ đạt 58,33%. Kết quả này có thể do giá thể cát trộn đất chặt và giữ nước nên cây con *in vitro* dễ bị úng và gây thối rễ.

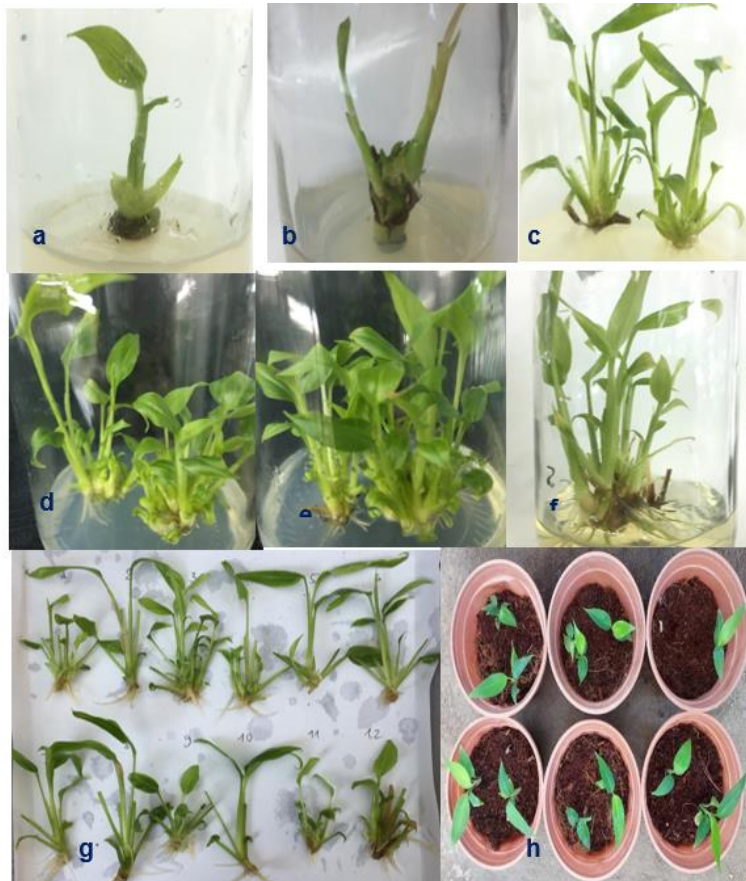
#### 4 Kết luận

Đinh chồi và gốc thân sa nhân thu ngoài tự nhiên ở huyện A Lưới được khử trùng bằng HgCl<sub>2</sub> 0,15% trong 16-17 phút, sau đó ngâm trong dung dịch nano bạc 40 ppm trong 12 phút. Môi trường MS bổ sung BAP 2,0 mg/l hoặc KIN 3,0 mg/l thích hợp nhất cho giai đoạn tái sinh chồi. Chồi *in vitro* được nhân nhanh tốt nhất trên môi trường MS bổ sung 1 mg/l BAP. Rễ được cảm ứng trên môi trường MS bổ sung 0,6 mg/l NAA. Cây con *in vitro* được trồng trên giá thể xơ dừa, với tỷ lệ sống sót đạt 72,22% sau 2 tháng.

#### Lời cảm ơn

Để hoàn thành nghiên cứu này, nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn sự tài trợ kinh phí của đề tài NCKH cấp Tỉnh của Tỉnh Thừa Thiên Huế cho đề tài “Điều tra thành phần loài và đề xuất mô hình phát triển cây Sa nhân (*Amomum sp.*) tại tỉnh Thừa Thiên Huế để tạo nguồn dược liệu”. Mã số: TTH.2016-KC.06

Cám ơn Bộ môn Vật lý chất rắn, Khoa Vật lý, Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế đã cung cấp dung dịch nano bạc cho nghiên cứu này.



**Hình 1.** Nhân giống *in vitro* cây sa nhân

- a. Tái sinh chồi từ gốc thân sau 4 tuần nuôi cấy    b. Tái sinh chồi từ đỉnh sinh trưởng bổ đôi 4 tuần nuôi cấy
- c. Cụm chồi trên môi trường MS có bổ sung 1 mg/l KIN sau 10 tuần nuôi cấy
- d, e. Cụm chồi trên môi trường MS có 0,5 mg/l BAP và 1,0 mg/l BAP sau 10 tuần nuôi cấy
- f. Cụm chồi trên môi trường MS có bổ sung 2,5 mg/l BAP và 0,2 mg/l NAA sau 10 tuần nuôi cấy
- g. Rễ phát triển trên môi trường MS có 0,4 mg/l NAA sau 5 tuần nuôi cấy
- h. Cây *in vitro* trồng trên giá thể xơ dừa sau 2 tháng

### Tài liệu tham khảo

1. Nguyễn Văn Hồng, Trần Thị Tý (2013), Nghiên cứu kỹ thuật nhân giống cây sa nhân tím (*Amomum longiligulare* T.L.Wu) bằng phương pháp nuôi cấy mô tế bào thực vật, *Tạp chí Khoa học và công nghệ* 108(08): 105 - 112
2. Đỗ Tất Lợi (2003), *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*, Nhà xuất bản Y học.
3. Nguyễn Đức Minh, Ngô Văn Thông, Đỗ Thị Hoa Viên, Lê Ngọc Tú (1994), Nghiên cứu thành phần hóa học của hạt sa nhân *Amomum longiligulare* T.L.Wu, *Tạp chí Nông nghiệp và Công nghiệp Thực phẩm* 390 (12), 464\_465.
4. 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.
5. Trương Thị Bích Phượng, Nguyễn Thành, Nguyễn Đức Tuấn, Nguyễn Đức Chung (2016), Nuôi cấy callus sa nhân trắng (*Amomum xanthioides* L.), *Báo cáo Khoa học Hội nghị Quốc gia về Nghiên cứu và Giảng dạy Sinh học ở Việt Nam*, Hội nghị toàn quốc lần thứ hai, Nhà xuất bản Trường Đại học Khoa học Tự nhiên Hà Nội, 1168\_1175.
6. Đỗ Năng Vịnh, Trần Văn Minh, Dương Tấn Nhật, Nguyễn Thị Lý Anh, Đào Duy Thanh, Lê Huy Hàm, Cao Thị Huyền Trang, Hà Thị Thúy, Chu Bá Phúc, Dương Minh Nga, Đỗ Minh Phú, Phạm Thị Kim Hạnh (2005), Nghiên cứu áp dụng công nghệ phối vô tính, hạt nhân tạo trong nhân nhanh một số cây có giá trị kinh tế, *Báo cáo tổng kết đề tài KC 04.19*, 247\_285.
7. Hong H, Na TL (2005), Tissue culture and plantlet regeneration of *Amomum villosum*, *Plant physiology communications* 1, 57\_61.
8. Hongdong X, Lei N, Yuchai X (2006), Tissue culture and rapid propagation of *Amomum tsao-ko* Crevost et Lemaire, *Chinese wild plant resources* 3, 61\_63.
9. Li W, Wang JP, Shigematsu M, Lu GZ (2011), Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil from *Amomum Tsao-Ko* cultivated in Yunnan area, *Advanced Materials Research* 183, 910\_914.
10. Murashige T and Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, *Physiol. Plant* 15, 473\_97.
11. Ping JL (2004) Micropropagation of *Amomum villosum* Lour, *Subtropical Plant Science* 33, 37\_38.
12. Pradhan S., Pradhan S., Basistha B.C and Subba K B (2014), *In vitro* micropropagation of *Amomum subulatum* (Zingiberaceae), a major traditional cash crop of Sikkim Himalaya, *Int. J. LifeSc. Bt & Pharm. Res.*, April 2014, 3(2), 169\_180.
13. Purohit S., Nandi S.K., Paul S., Tariq M., Palni L.M.S (2016), Micropropagation and genetic fidelity analysis in *Amomum subulatum* Roxb.: A commercially important Himalayan plant, *J. Appl. Res. Med. Aromat. Plants*, 1\_6.
14. Rao M, Wenli Z, Fanhua W, Chenghe H (2004), Tissue Culture of *Amomum krervanh*, *Plant physiology communications* 2, 208\_211.
15. 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.

16. Sajina A, Mini MP, John ZC, Babu NK, Ravindran NP, Perter VK (1997), Micropropagation of large cardamom (*Amomum subulatum* Roxb), *Journal of Spices and Aromatic Crops* 6 (2), 145\_148.
17. Tefera W, Wannakrairoj S (2004), Micropropagation of Krawan (*Amomum krervanh* Pierre ex Gagnep), *ScienceAsia* 30, 9\_15.

## **IN VITRO PROPAGATION OF *Amomum* sp. FROM A LUOI DISTRICT OF THUA THIEN HUE PROVINCE**

**Truong Thi Bich Phuong<sup>1</sup>, Than Trong Bao Khanh<sup>1</sup>, Pham Phu Binh<sup>1</sup>, Nguyen Duc Tuan<sup>1</sup>,  
Nguyen Thi Hue<sup>2</sup>, Nguyen Thi Thu Lien<sup>2</sup>, Nguyen Thi Tan<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>University of Sciences, Hue University

<sup>2</sup>Institute of Biotechnology, Hue University

<sup>3</sup>University of Medicine and Pharmacy, Hue University

**Abstract:** *Amomum* is a precious medicinal plant, currently being developed and cultivated to produce the source of medicinal materials. This paper presents the obtained results of micropropagation of *Amomum* sp., originated in Hong Thuy commune, A Luoi district, Thua Thien Hue province. Shoot tips and stem bases were sterilized with HgCl<sub>2</sub> 0.15% in 15-18 minutes, then soaked nano silver solution 40 ppm in 12 minutes. Results indicated that highly effective sterilization occurred with HgCl<sub>2</sub> in 16 minutes for shoot tips (the highest rate of living explants was 40%) and in 17 minutes for stem bases (the highest rate of living explants was 42.86%). Then, shoot tips and stem bases were cultured in MS medium supplemented alone with BAP, kinetin. After 4 weeks of culture, the best regeneration buds achieved on MS medium supplemented with 2.0 mg/l BAP (1.83 shoots/stem base; 2.75 shoots/shoot tip were cut longitudinally into two pieces) or on MS medium supplemented with 3.0 mg/l kinetin (1.60 shoots/stem base; 2.0 shoots/shoot tip were cut longitudinally into two pieces). The shoot multiplication from *in vitro* stem base was achieved on MS medium supplemented alone with BAP, kinetin or in combination BAP with NAA. After 10 weeks of culture, the multiplication coefficient was greatest on MS medium supplemented with 1.0 mg/l BAP. The average number of shoots per explant was 9.83. *In vitro* shoots were transferred on MS medium supplemented with NAA or IBA for root initiation. The highest number of roots per shoot (7.17) was obtained on MS medium supplemented with 0.6 mg/l NAA. The longest roots (3.89 cm) observed in MS medium supplemented with IBA 0.4 mg/l. The plantlets were acclimatized and transplanted successfully in the coconut coir pots. The plantlet survival rate was 94.44% one month after transferring in pots and 72.22% two month after transferring in pots.

**Keywords:** *Amomum* sp., micropropagation, medicinal plant, shoot tip, stem base

\*Author for correspondence: E-mail: ttbphuongdt@gmail.com

PGS.TS. Trương Thị Bích Phượng

Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế

77 Nguyễn Huệ, Huế