

NGHIÊN CỨU NHÂN GIỐNG *IN VITRO* CÂY SÂM ĐÁ (*Curcuma singularis* Gagnep.)

Dương Phú Tiến¹, Trần Thị Yên Nhi^{1*}, Nguyễn Văn Toàn¹, Nguyễn Trần Phước Huy¹,
Vũ Thị Thúy Hằng¹, Phạm Trần Thủy Tiên¹, Trịnh Thị Minh Trâm¹, Nguyễn Hồng Tường Vy²,
Trịnh Thị Hương³, Nguyễn Thanh Thuý¹, Nguyễn Thị Huệ¹, Vương Thị Hồng Loan¹

¹Trung tâm Ươm tạo Doanh nghiệp Nông nghiệp Công nghệ cao Thành phố Hồ Chí Minh

²Trung tâm Giáo dục nghề nghiệp – Giáo dục thường xuyên huyện Củ Chi

³Trường Đại học Công Thương Thành phố Hồ Chí Minh

TÓM TẮT

Sâm đá (*Curcuma singularis* Gagnep.) là loài dược liệu quý, được sử dụng làm thuốc tăng cường sinh lực, bồi bổ sức khỏe, điều trị bệnh thấp khớp và bổ thận. Củ sâm đá có nhiều dược chất có tác dụng y học như saponin, polyphenol, alkaloid ... có khả năng ngừa ung thư, ngừa oxy hóa, ức chế vi sinh vật. Việc khai thác và sử dụng sâm đá cho mục đích thương mại và y học đã dẫn đến nguy cơ tuyệt chủng loài. Cây sâm đá trong tự nhiên chỉ phân bố một vùng nhỏ thuộc tỉnh Gia Lai vào mùa mưa. Phương pháp nhân giống cây sâm đá trong tự nhiên chủ yếu bằng củ nên phụ thuộc nhiều vào điều kiện tự nhiên và hiệu quả nhân giống thấp. Nghiên cứu này được thực hiện để đánh giá tác động của nồng độ các chất điều hoà sinh trưởng thực vật khác nhau (BA, NAA, IBA) đến khả năng sinh trưởng của cây sâm đá. Kết quả cho thấy môi trường này chồi trực tiếp từ củ là MS bổ sung 0,2 mg/L GA₃; 1,0 mg/L BA và 1,5 mg/L NAA với tỷ lệ nảy chồi 76,67%; 1,0 chồi/củ. Môi trường MS bổ sung 2,0 mg/L BA kết hợp 0,2 mg/L IBA là thích hợp cho nhân nhanh chồi cây sâm đá *in vitro* với 8,1 chồi/mẫu, chiều cao chồi đạt 12,2 cm. Cây sâm đá *in vitro* hoàn chỉnh được nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung 0,1 mg/L BA; 1,0 mg/L IBA; nước dừa 10% (v/v).

Từ khóa: Chất điều hòasinh trưởng thực vật, *Curcuma singularis*, nhân giống *in vitro*.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Sâm đá có tên khoa học là *Curcuma singularis* Gagnep., thuộc chi *Curcuma*, họ Zingiberaceae. Sâm đá là loại cây thân thảo, nảy chồi và sinh trưởng trong suốt mùa mưa. Sâm đá thường mọc thành cụm, cây cao từ 30 – 50 cm, lá đơn, mọc cách, khi trưởng thành mỗi cây có 4 – 6 lá. Thân ngầm, phân nhánh, có đốt ngắn, thân ngầm non có màu trắng, khi già có màu hơi vàng, mùi thơm dịu. Mỗi thân ngầm có từ 2 – 4 củ dạng ô van dài. Củ còn non màu vàng nhạt, vỏ mỏng, củ già có màu nâu nhạt, có mùi thơm nhẹ, củ dẻo và dính. Hoa Sâm đá mọc dạng cụm, có từ 4 – 8 hoa (Leong-Skorničková, Trần, 2013).

Sâm đá là loài dược liệu quý, có công dụng tăng cường sinh lực, bồi bổ sức khỏe, chữa thấp khớp và bổ thận. Thuốc sắc của rễ và củ sâm đá được sử dụng như một thức uống để tăng cường sức khỏe nam giới và cải thiện tình trạng cơ thể (Cuong, 2018). Trong củ sâm đá có nhiều dược chất có tác dụng y học như saponin, polyphenol, alkaloid... có khả năng kháng ung thư, kháng oxy hóa, ức chế vi sinh vật (Nguyen *et al.*, 2017).

Việc khai thác và sử dụng sâm đá cho mục đích thương mại và y dược đã làm loài dược liệu này trong tự nhiên không còn nhiều và có nguy cơ tuyệt chủng. Cây sâm đá trong tự nhiên chỉ phân bố một vùng nhỏ thuộc tỉnh Gia Lai trong một số tháng mưa (Tân, Vinh, 2015). Phương pháp nhân giống truyền thống cây sâm đá trong tự nhiên chủ yếu bằng củ và thân ngầm nên phụ thuộc vào điều kiện tự nhiên, nhân giống bằng củ dễ bị côn trùng trong đất xâm hại, dẫn đến hiệu quả nhân giống thấp và năng suất cây trồng giảm.

Phương pháp nuôi cấy mô tế bào thực vật mang lại hiệu quả cao trong việc nhân giống cây trồng, cho hệ số nhân giống cao, tạo ra số lượng lớn cây giống trong thời gian ngắn, sản xuất cây giống không phụ thuộc vào điều kiện tự nhiên. Cho đến nay, có ít công trình nghiên cứu về vi nhân giống cây sâm đá, phần lớn là các nghiên cứu về vi nhân giống các loài cùng chi *Curcuma*.

Mục đích của nghiên cứu này nhằm xác định các điều kiện thích hợp cho nhân giống *in vitro* cây sâm đá để áp dụng cho sản xuất quy mô lớn cây giống sâm đá chất lượng cao và đáp ứng nhu cầu thị trường về giống cây này.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Củ sâm đá (*Curcuma singularis* Gagnep.) được cung cấp từ bộ sưu tập cây dược liệu của Trung tâm Sâm và dược liệu Thành phố Hồ Chí Minh, củ có đường kính 2 – 3 cm, dài 5 – 6 cm.

Hoá chất: Môi trường MS (Murashige, Skoog, 1968), BA (benzyladenin), NAA (Naphthaleneacetic Acid), IBA (Indole-3-Butyric Acid), HgCl₂, Tween 20 được sản xuất bởi công ty Duchefa biochemie (Hà Lan).

Điều kiện thí nghiệm

Tiến hành theo dõi thí nghiệm trong điều kiện nhiệt độ: $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, cường độ chiếu sáng: 2000 lux, thời gian chiếu sáng: 12 giờ/ngày.

Thí nghiệm được tiến hành tại Trung tâm Ươm tạo Doanh nghiệp Nông nghiệp Công nghệ cao, Ấp 1, xã Phạm Văn Cội, huyện Củ Chi, TP. Hồ Chí Minh.

Phương pháp nghiên cứu

Tạo vật liệu khởi đầu

Củ sâm đá được rửa sạch dưới vòi nước chảy chậm 10 phút để loại bỏ đất bám bên ngoài. Lắc mẫu với xà phòng loãng trong 20 phút, rửa lại với nước sạch. Khử trùng với cồn 70° trong 30 giây, rửa lại với nước vô trùng. Khử trùng mẫu bằng dung dịch HgCl₂ 0,1% trong 11 phút, có bổ sung 3 – 4 giọt Tween 20. Rửa mẫu lại bằng nước cất vô trùng, loại bỏ các phần bị tổn thương do chất khử trùng gây ra và cấy mẫu vào môi trường nuôi cấy MS cơ bản không bổ sung chất điều hoà sinh trưởng thực vật. Sau 2 tuần nuôi cấy, mẫu củ sống vô trùng được sử dụng để bố trí thí nghiệm tiếp theo.

Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ chất điều hoà sinh trưởng thực vật đến khả năng nảy chồi từ mẫu củ cây sâm đá in vitro

Mẫu củ sâm đá *in vitro* sống vô trùng được cấy vào môi trường MS có bổ sung 0,2 mg/L GA₃, bổ sung BA ở các nồng độ khác nhau (1,0; 2,0; 3,0 mg/L) kết hợp với NAA ở các nồng độ khác nhau (0,5; 1,0; 1,5 mg/L). Các mẫu được cấy trên môi trường MS không bổ sung chất điều hoà sinh trưởng thực vật được sử dụng làm nghiệm thức đối chứng. Thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên 1 yếu tố (CRD) với ba lần lặp lại/1 nghiệm thức. Mỗi nghiệm thức có 10 bình, mỗi bình có 1 mẫu. Sau 8 tuần nuôi cấy, các chỉ tiêu thời gian bắt đầu cảm ứng nảy chồi (ngày), tỷ lệ mẫu nảy chồi (%), số chồi (chồi/mẫu), chiều cao chồi (cm) được ghi nhận.

Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ chất điều hoà sinh trưởng thực vật đến khả năng nhân chồi cây sâm đá in vitro

Chồi sâm đá *in vitro* cao 2 cm, được tách ra từ mẫu củ và cấy chuyển sang môi trường MS cơ bản có bổ sung BA ở các nồng độ khác nhau (0,5; 1,0; 2,0; 3,0 mg/L) kết hợp với NAA (0; 0,2 mg/L) hoặc IBA (0; 0,2 mg/L). Các mẫu được cấy trên môi trường MS không bổ sung chất điều hoà sinh trưởng thực vật được sử dụng làm nghiệm thức đối chứng. Thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên 1 yếu tố (CRD) với ba lần lặp lại/1 nghiệm thức. Mỗi nghiệm thức có 3 bình, mỗi bình có 3 mẫu. Sau 8 tuần nuôi cấy, các chỉ tiêu số chồi (chồi/mẫu), chiều cao chồi (cm) được ghi nhận.

Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ chất điều hoà sinh trưởng thực vật đến khả năng tạo rễ cây sâm đá in vitro

Chồi sâm đá *in vitro* cao 4 cm được tách ra từ cụm chồi và cấy chuyển sang môi trường MS có bổ sung nồng độ BA (0; 0,1 mg/L) kết hợp với NAA (0; 0,5; 1,0; 2,0 mg/L) hoặc IBA (0; 0,5; 1,0; 2,0 mg/L). Các mẫu được cấy trên môi trường MS không bổ sung chất điều hoà sinh trưởng thực vật được sử dụng làm nghiệm thức đối chứng. Thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên 1 yếu tố (CRD) với ba lần lặp lại/1 nghiệm thức. Mỗi nghiệm thức có 3 bình, mỗi bình có 3 mẫu. Sau 8 tuần nuôi cấy, các chỉ tiêu tỷ lệ tạo rễ (%), số rễ (rễ/cây), chiều dài rễ (cm), chiều cao cây (cm) được ghi nhận.

Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ nước dừa và thành phần khoáng đa lượng của môi trường MS đến sự sinh trưởng của cây sâm đá in vitro

Cây sâm đá *in vitro* cao 5 cm được cấy vào môi trường MS hoặc ½ MS (môi trường MS giảm ½ thành phần khoáng đa lượng) có bổ sung các nồng độ nước dừa (0%; 5%; 10%). Thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên 2 yếu tố với ba lần lặp lại/1 nghiệm thức. Mỗi nghiệm thức có 5 bình, mỗi bình có 3 mẫu. Sau 8 tuần nuôi cấy, các chỉ tiêu chiều cao cây (cm), số lá (lá/cây), chiều dài rễ (cm), màu sắc lá và hình thái cây được ghi nhận.

Phương pháp xử lý số liệu

Các số liệu thu thập được xử lý bằng các phần mềm: Thống kê mô tả, tính toán số liệu thô bằng phần mềm Excel 2013 (Microsoft Office, Microsoft Corporation, U.S.). Phân tích phương sai ANOVA 1 yếu tố và ANOVA 2 yếu tố để xem xét sự khác biệt có ý nghĩa thống kê hay không giữa các nghiệm thức bằng phần mềm xử lý thống kê Statgraphics 18.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

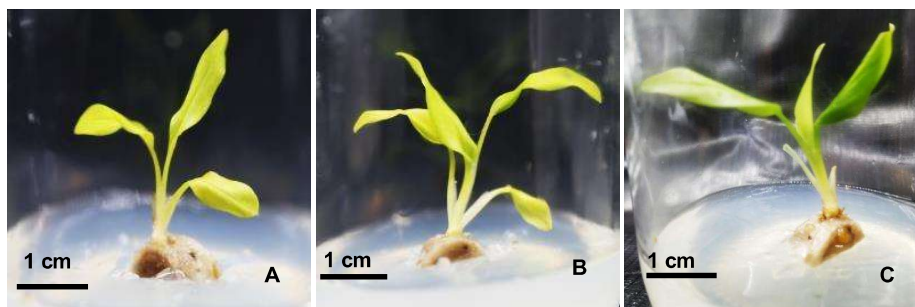
Ảnh hưởng của nồng độ chất điều hòa sinh trưởng thực vật đến khả năng nảy chồi từ mẫu củ cây sâm đá *in vitro*

Bảng 1. Ảnh hưởng của nồng độ NAA và BA đến khả năng nảy chồi từ mẫu củ sâm đá *in vitro*

Nồng độ BA (mg/L)	Nồng độ NAA (mg/L)	Thời gian bắt đầu cảm ứng nảy chồi (ngày)	Tỷ lệ nảy chồi (%)	Chiều cao chồi (cm)
-	-	41,33 ± 1,53 ^a	33,33 ± 5,77 ^{de}	1,80 ± 0,10 ^{gh}
1,0	-	38,67 ± 0,58 ^{abc}	33,33 ± 5,77 ^{de}	1,83 ± 0,21 ^{gh}
2,0	-	36,00 ± 1,00 ^{cd}	33,33 ± 5,77 ^{de}	1,83 ± 0,06 ^{gh}
3,0	-	34,67 ± 0,58 ^{de}	33,33 ± 5,77 ^{de}	1,83 ± 0,21 ^{gh}
-	0,5	39,00 ± 1,00 ^{ab}	33,33 ± 5,77 ^{de}	1,83 ± 0,21 ^{gh}
1,0	0,5	35,67 ± 1,53 ^d	36,67 ± 5,77 ^d	1,83 ± 0,06 ^{gh}
2,0	0,5	35,67 ± 1,53 ^d	46,67 ± 5,77 ^c	1,90 ± 0,00 ^g
3,0	0,5	32,00 ± 1,00 ^{ef}	53,33 ± 5,77 ^c	2,17 ± 0,15 ^{ef}
-	1,0	37,33 ± 1,53 ^{bcd}	33,33 ± 5,77 ^{de}	2,27 ± 0,15 ^{de}
1,0	1,0	34,67 ± 2,31 ^{de}	46,67 ± 5,77 ^c	2,17 ± 0,06 ^{ef}
2,0	1,0	34,67 ± 2,08 ^{de}	46,67 ± 5,77 ^c	2,47 ± 0,38 ^{cd}
3,0	1,0	32,00 ± 1,73 ^{ef}	63,33 ± 5,77 ^b	2,40 ± 0,10 ^{cde}
-	1,5	35,67 ± 1,52 ^d	33,33 ± 5,77 ^{de}	2,50 ± 0,10 ^{bcd}
1,0	1,5	32,00 ± 1,00 ^{ef}	76,67 ± 5,77 ^a	2,67 ± 0,06 ^{abc}
2,0	1,5	32,00 ± 1,00 ^{ef}	76,67 ± 5,77 ^a	2,77 ± 0,12 ^{ab}
3,0	1,5	32,00 ± 1,73 ^{ef}	76,67 ± 5,77 ^a	2,90 ± 0,10 ^a

Các trung bình có cùng ký tự không khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$.

Theo kết quả Bảng 1, nồng độ NAA và BA có tương tác ảnh hưởng đến khả năng nảy chồi trực tiếp từ mẫu củ cây sâm đá. Môi trường bổ sung 0,2 mg/L GA₃; 1,0 mg/L BA kết hợp 1,5 mg/L NAA cho kết quả nảy chồi từ củ tốt nhất với các chỉ tiêu: Thời gian nảy chồi đạt 32,00 ngày với tỷ lệ nảy chồi 76,67%, 1,0 chồi/củ, chiều cao chồi là 2,67 cm. Kết quả này phù hợp với kết quả nghiên cứu của Beura và đồng tác giả (2017) đã bổ sung GA₃, BA và NAA vào môi trường nuôi cấy nảy chồi từ mẫu thân rễ trên loài *Curcuma longa*, Jitsopakul và đồng tác giả (2017) cũng đã nghiên cứu bổ sung BA vào môi trường nuôi cấy nảy chồi từ mầm chồi chính trên loài *Curcuma singularis* Gagnep. Việc bổ sung GA₃ vào môi trường MS chứa BA và NAA đã kéo dài chồi nách ở loài *Curcuma longa* (Beura *et al.*, 2017), tác dụng kích thích của GA₃ trong sự kéo dài của mẫu cấy có thể do GA₃ thúc đẩy cả quá trình phân chia tế bào và kéo dài tế bào ở vùng cận đỉnh của chồi (Meenakshi *et al.*, 2001). Do đó, môi trường MS bổ sung 0,2 mg/L GA₃; 1,0 mg/L BA và 1,5 mg/L NAA là phù hợp để nảy chồi từ củ sâm đá *in vitro*.



Hình 1. Chồi sâm đá *in vitro* nảy từ mẫu củ sau 8 tuần theo dõi

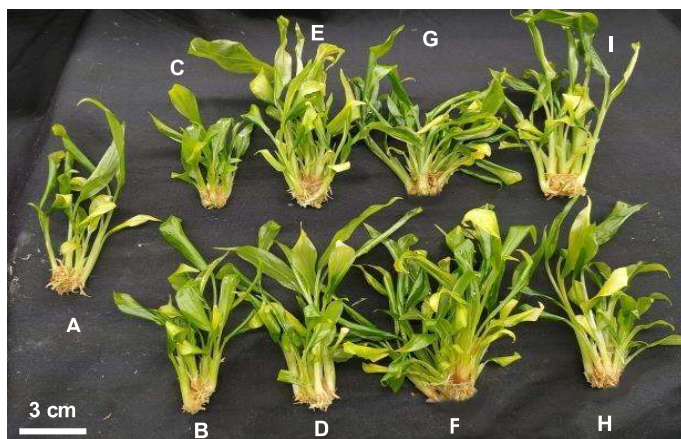
- A. Chồi được nảy từ củ trên môi trường có bổ sung 1,5 mg/L NAA kết hợp 3,0 mg/L BA.
- B. Chồi được nảy từ củ trên môi trường có bổ sung 1,5 mg/L NAA kết hợp 2,0 mg/L BA.
- C. Chồi được nảy từ củ trên môi trường có bổ sung 1,5 mg/L NAA kết hợp 1,0 mg/L BA.

Ảnh hưởng của nồng độ chất điều hòa sinh trưởng thực vật đến khả năng nhân chồi cây sâm đá *in vitro*
Bảng 2. Ảnh hưởng của nồng độ chất điều hòa sinh trưởng thực vật đến khả năng nhân chồi cây sâm đá *in vitro*

Nồng độ BA (mg/L)	Nồng độ NAA (mg/L)	Nồng độ IBA (mg/L)	Số chồi (chồi/mẫu)	Chiều cao chồi (cm)
-	-	-	3,6 ± 0,1 ^h	6,2 ± 0,3 ^h
0,5	0,2	-	4,2 ± 0,2 ^g	7,5 ± 0,5 ^g
0,5	-	0,2	5,0 ± 0,1 ^f	8,1 ± 0,1 ^f
1,0	0,2	-	5,5 ± 0,2 ^{ef}	8,7 ± 0,2 ^e
1,0	-	0,2	6,2 ± 0,1 ^{cd}	9,4 ± 0,4 ^d
2,0	0,2	-	7,1 ± 0,4 ^b	10,4 ± 0,4 ^c
2,0	-	0,2	8,1 ± 0,3 ^a	12,2 ± 0,2 ^a
3,0	0,2	-	5,8 ± 0,4 ^{de}	9,6 ± 0,1 ^d
3,0	-	0,2	6,6 ± 0,5 ^{bc}	11,2 ± 0,2 ^b

Các trung bình có cùng ký tự không khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$.

Kết quả Bảng 2 cho thấy nồng độ chất điều hòa sinh trưởng thực vật thay đổi làm ảnh hưởng rõ rệt đến nhân chồi sâm đá *in vitro*. Ở các nghiệm thức có bổ sung chất điều hòa sinh trưởng thực vật, các chỉ tiêu theo dõi đều cao hơn so với nghiệm thức đối chứng, điều này chứng tỏ BA kết hợp với NAA hoặc IBA có tác động đến khả năng nhân chồi. Khả năng nhân chồi của mẫu cây sâm đá *in vitro* trên các môi trường có bổ sung IBA hiệu quả hơn so với các môi trường có bổ sung NAA. Môi trường bổ sung 2,0 mg/L BA kết hợp 0,2 mg/L IBA cho kết quả tốt nhất với 8,1 chồi/mẫu, chiều cao chồi đạt 12,2 cm, hình dáng cây phát triển tốt, khỏe, lá màu xanh. Kết quả này cao hơn kết quả nghiên cứu của Jitsopakul và đồng tác giả (2017) khi nhân giống *Curcuma singularis* Gagnep. trên môi trường MS chỉ bổ sung 2,0 mg/L BA. Các nghiên cứu đã cho thấy sự kết hợp giữa cytokinin và auxin có hiệu quả trong việc nhân chồi ở loài *Curcuma aromatic* (Sharmin *et al.*, 2013) và *Curcuma caesia* L. (Wahengbam *et al.*, 2015). Tóm lại, môi trường MS bổ sung 2,0 mg/L BA kết hợp 0,2 mg/L IBA là phù hợp để nhân chồi cây sâm đá *in vitro*.


Hình 2. Cụm chồi sâm đá *in vitro* sau 8 tuần nuôi cấy trên các môi trường nhân chồi

- A. Đối chứng B. 0,2 mg/L IBA + 0,5 mg/L BA C. 0,2 mg/L NAA + 0,5 mg/L BA
 D. 0,2 mg/L IBA + 1,0 mg/L BA E. 0,2 mg/L NAA + 1,0 mg/L BA F. 0,2 mg/L IBA + 2,0 mg/L BA
 G. 0,2 mg/L NAA + 2,0 mg/L BA H. 0,2 mg/L IBA + 3,0 mg/L BA I. 0,2 mg/L NAA + 3,0 mg/L BA

Ảnh hưởng của nồng độ chất điều hòa sinh trưởng thực vật đến khả năng tạo rễ cây sâm đá *in vitro*
Bảng 3. Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng thực vật đến khả năng tạo rễ sâm đá *in vitro*

Nồng độ BA (mg/L)	Nồng độ NAA (mg/L)	Nồng độ IBA (mg/L)	Tỷ lệ chồi tạo rễ (%)	Số rễ (rễ/cây)	Chiều dài rễ (cm)	Chiều cao cây (cm)
-	-	-	100,0 ± 0,0	5,7 ± 0,2 ^g	2,5 ± 0,1 ^g	4,3 ± 0,3 ^e
-	0,5	-	100,0 ± 0,0	6,8 ± 0,3 ^f	3,2 ± 0,2 ^f	4,7 ± 0,2 ^e

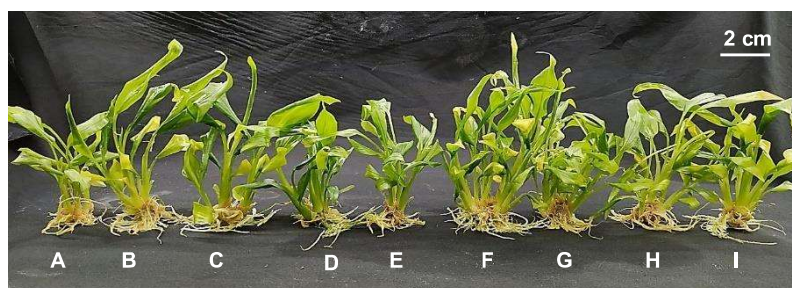
CÔNG NGHỆ TẾ BÀO

-	-	0,5	100,0 ± 0,0	7,7 ± 0,2 ^e	4,1 ± 0,1 ^e	5,8 ± 0,3 ^d
0,1	0,5	-	100,0 ± 0,0	8,5 ± 0,3 ^d	4,9 ± 0,2 ^d	5,9 ± 0,2 ^d
0,1	-	0,5	100,0 ± 0,0	9,7 ± 0,4 ^c	5,3 ± 0,3 ^{bc}	6,9 ± 0,4 ^c
0,1	1,0	-	100,0 ± 0,0	11,3 ± 0,3 ^b	5,6 ± 0,1 ^b	7,7 ± 0,2 ^b
0,1	-	1,0	100,0 ± 0,0	12,7 ± 0,3 ^a	6,4 ± 0,2 ^a	8,9 ± 0,2 ^a
0,1	2,0	-	100,0 ± 0,0	8,1 ± 0,1 ^{de}	4,3 ± 0,2 ^e	6,2 ± 0,2 ^d
0,1	-	2,0	100,0 ± 0,0	9,3 ± 0,3 ^c	5,2 ± 0,2 ^{cd}	7,2 ± 0,2 ^c

Các trung bình có cùng ký tự không khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$.

Kết quả Bảng 3 cho thấy, nồng độ chất điều hòa sinh trưởng thực vật thay đổi làm ảnh hưởng rõ rệt đến khả năng tạo rễ cây sâm đá *in vitro* sau 8 tuần nuôi cấy. Ở nghiệm thức đối chứng không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng thực vật, tỷ lệ chồi tạo rễ là 100%, tuy nhiên cây kém phát triển so với các nghiệm thức còn lại (Hình 3). Ở các nghiệm thức có bổ sung BA kết hợp với NAA hoặc IBA đều cho kết quả các chỉ tiêu theo dõi cao hơn so với nghiệm thức đối chứng hoặc nghiệm thức bổ sung IBA hoặc NAA riêng lẻ.

Trên các môi trường có bổ sung cytokinin (0,1 mg/L BA), mẫu chồi cây sâm đá có xu hướng tạo rễ nhiều hơn. Ở các nghiệm thức bổ sung 0,1 mg/L BA kết hợp với IBA cho thấy sự tác động hình thành rễ mạnh hơn so với môi trường có bổ sung NAA. Môi trường MS bổ sung 0,1 mg/L BA kết hợp 1,0 mg/L IBA cho hiệu quả tạo rễ cây sâm đá *in vitro* tốt nhất với 100% mẫu hình thành rễ, có trung bình 12,7 rễ/cây, chiều dài rễ đạt 6,4 cm và chiều cao cây đạt 8,9 cm. Beura và đồng tác giả (2017) đã cho thấy sự kết hợp giữa cytokinin (BA) và auxin (NAA) có hiệu quả trong việc tạo rễ loài *Curcuma longa* L. Cv. Roma. Abraham và đồng tác giả (2011) đã bổ sung kết hợp NAA và BA vào môi trường nuôi cấy cho hiệu quả tốt nhất trong việc tạo rễ loài *Curcuma mangga*. Như vậy, trong nghiên cứu này, môi trường MS có bổ sung 0,1 mg/L BA kết hợp với 1,0 mg/L IBA là phù hợp để tạo rễ sâm đá *in vitro*.



Hình 3. Cụm chồi sâm đá *in vitro* ra rễ sau 8 tuần nuôi cấy

- | | | |
|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| A. Đối chứng | B. 0,5 mg/L IBA | C. 0,5 mg/L NAA |
| D. 0,1 mg/L BA + 0,5 mg/L IBA | E. 0,1 mg/L BA + 0,5 mg/L NAA | F. 0,1 mg/L BA + 1,0 mg/L IBA |
| G. 0,1 mg/L BA + 1,0 mg/L NAA | H. 0,1 mg/L BA + 2,0 mg/L IBA | I. 0,1 mg/L BA + 2,0 mg/L NAA |

Ảnh hưởng của nồng độ nước dừa và thành phần khoáng đa lượng của môi trường MS đến sự sinh trưởng của cây sâm đá *in vitro*

Bảng 4. Ảnh hưởng của nồng độ nước dừa và thành phần khoáng đa lượng của môi trường MS đến sự sinh trưởng của cây sâm đá *in vitro*

Nồng độ nước dừa (%)	Chỉ tiêu theo dõi							
	Chiều cao cây (cm)		Số lá (lá/cây)		Chiều dài rễ (cm)		Màu sắc và hình thái cây	
	Môi trường		Môi trường		Môi trường		Môi trường	
	MS	½ MS	MS	½ MS	MS	½ MS	MS	½ MS
-	8,9 ± 0,4 ^b	6,4 ± 0,1 ^e	4,0 ± 0,2 ^b	3,5 ± 0,2 ^c	4,4 ± 0,4 ^d	4,0 ± 0,4 ^d	Xanh, khỏe	Xanh, khỏe
5	9,3 ± 0,2 ^{ab}	7,5 ± 0,3 ^d	4,5 ± 0,3 ^a	3,9 ± 0,3 ^{bc}	6,6 ± 0,6 ^b	5,5 ± 0,3 ^c	Xanh, khỏe	Xanh, khỏe
10	9,7 ± 0,3 ^a	8,1 ± 0,2 ^c	4,9 ± 0,2 ^a	4,7 ± 0,2 ^a	8,7 ± 0,7 ^a	7,0 ± 0,3 ^b	Xanh, khỏe	Xanh, khỏe

Các trung bình có cùng ký tự không khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$.

Trong thí nghiệm này, thành phần khoáng đa lượng của môi trường MS ảnh hưởng rõ rệt đến sự sinh trưởng của cây sâm đá *in vitro* sau 8 tuần nuôi cấy. Cây sâm đá được nuôi cấy trên môi trường MS có kết quả chiều cao

cây, số lá và chiều dài rễ cao hơn hẳn so với trên môi trường $\frac{1}{2}$ MS. Bên cạnh đó, khi bổ sung thêm nồng độ nước dừa vào môi trường nuôi cấy, môi trường MS bổ sung 10% nước dừa cho các kết quả về tăng trưởng cây *in vitro* tốt nhất với chiều cao cây đạt 9,7 cm, cây có trung bình 4,9 lá và chiều dài rễ trung bình đạt 8,7 cm, hình thái cây xanh khỏe, tăng trưởng đồng đều.



Hình 4. Cây sâm đá phát triển trên các môi trường thí nghiệm sau 8 tuần

- | | | |
|---------------------|-----------------------------------|------------------------------------|
| A. MS | B. MS + nước dừa 5% | C. MS + nước dừa 10% |
| D. $\frac{1}{2}$ MS | E. $\frac{1}{2}$ MS + nước dừa 5% | F. $\frac{1}{2}$ MS + nước dừa 10% |

KẾT LUẬN

Môi trường MS bổ sung 0,2 mg/L GA_3 ; 1,0 mg/L BA và 1,5 mg/L NAA là tốt nhất cho khả năng nảy chồi *in vitro* trực tiếp từ mẫu củ. Môi trường MS bổ sung 2,0 mg/L BA, 0,2 mg/L IBA thích hợp cho nhân chồi cây sâm đá *in vitro*. Môi trường MS bổ sung 0,1 mg/L BA kết hợp 1,0 mg/L IBA và nước dừa 10% (v/v) thích hợp cho tạo rễ và dưỡng cây sâm đá *in vitro*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Abraham F, Bhatt A, Keng CL, Indrayanto G, Sulaiman SF (2011). Effect of yeast extract and chitosan on shoot proliferation, morphology and antioxidant activity of *Curcuma mangga in vitro* plantlets. *Afr J Biotechnol*, 10(40), Article 40. <https://doi.org/10.5897/AJB10.1261>
- Beura S, Sahu A, Rout S, Beura R, Jagadev PN (2017). Standardization of plant bio-regulators for *in vitro* shoot proliferation of *Curcuma longa* L. Cv. Roma. *Int J Curr Microbiol Appl Sci*, 6: 386-394. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.605.044>
- Cuong N (2018). Initial research on chemical constituents of *Curcuma singularis* rhizomes. *Vietnam Journal of Science and Technology*, 54: 402. <https://doi.org/10.15625/2525-2518/54/2C/11868>
- Jitsopakul N, Sangyojarn P, Homchan P, Thammasiri K (2017). Micropropagation for conservation of Zingiberaceae in Surin province, Thailand. *Acta Horti*, 1167: 75-80. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2017.1167.11>
- Leong-Škorničková J, Trần HD (2013). Two new species of *Curcuma* subgen. Ecomata (Zingiberaceae) from southern Vietnam. *The Gardens' Bulletin, Singapore*, 65(2): 169-180.
- Meenakshi N, Sulikeri GS, Krishnamoorthy V, Hegde RV (2001). Standardization of chemical environment for multiple shoot induction of turmeric (*Curcuma longa* L.) for *in vitro* clonal propagation. *Crop Res Hisar*, 22(3): 449-453.
- Nguyen QB, Hoang AT, Nguyen VD, Tran TV, Nguyen PH, Nguyen MC, Nguyen TT (2017). A new record species for flora of Vietnam *Curcuma singularis* Gagnep. (Zingiberaceae). *VNU Journal of Science: Natural Sciences and Technology*, 33(1): 25-29.
- Sharmin S, Alam M, Sheikh M, Zaman R, Khalekuzzaman M, Mondal S, Haque M, Alam M, Alam I (2013). Micropropagation and antimicrobial activity of *Curcuma aromatica* Salisb., a threatened aromatic medicinal plant. *Turk J Biol*, 37(6): 698-708. <https://doi.org/10.3906/biy-1212-11>
- Tân PV, Vinh NQ (2015). Đặc điểm hình thái và hàm lượng polyphenol, saponin và alkaloid tổng số của củ cây sâm đá thu thập tại huyện Kbang, Gia Lai. *Hội Nghị Khoa Học Toàn Quốc Lần Thứ Sáu*, 1224-1227.
- Wahengbam RC, Singh B, Singh H, Surodhani D, Singh NW, Singh NM, Devi YP (2015). Conservation of *Curcuma caesia* by *in vitro* techniques. *Helix*, 3-4: 708-713.

STUDY ON MICROPROPAGATION OF *Curcuma singularis* Gagnep.

Duong Phu Tien¹, Tran Thi Yen Nhi^{1*}, Nguyen Van Toan¹, Nguyen Tran Phuoc Huy¹,
Vu Thi Thuy Hang¹, Pham Tran Thuy Tien¹, Trinh Thi Minh Tram¹, Nguyen Hong Tuong Vy²,
Trinh Thi Huong³, Nguyen Thanh Thuy¹, Nguyen Thi Hue¹, Vuong Thi Hong Loan¹

¹Center for Business Incubation of Agricultural High Technology

²Center for Vocational Education – Continuous Education of Cu Chi District

³Ho Chi Minh City University of Industry and Trade

SUMMARY

Curcuma singularis Gagnep. is a valuable medicinal herb used to increase vitality, boost health, treat rheumatism, and fortify the kidneys. The rhizomes of *Curcuma singularis* Gagnep. contain many medicinal substances, such as saponins, polyphenols, and alkaloids, that have anti-cancer, antioxidant, and microorganism-inhibiting properties. The usage of *Curcuma singularis* Gagnep. for commercial and medicinal purposes has led to the risk of extinction. *Curcuma singularis* Gagnep. grows in a small area of Gia Lai province during the rainy season. *Curcuma singularis* Gagnep. is primarily propagated using rhizomes, making its propagation efficiency dependent on natural conditions. This study was conducted to evaluate the effects of different concentrations of plant growth regulators (BA, NAA, IBA) on the growth of *Curcuma singularis* Gagnep. Result showed that the medium for shoot formation is MS supplemented with 0.2 mg/L GA₃, 1.0 mg/L BA and 1.5 mg/L NAA (76.67% regenerated rate, 1.0 shoots/explant). The shoot multiplication medium was MS supplemented with 2.0 mg/L BA, 0.2 mg/L IBA (8.1 shoot/explant, shoot height 12.2 cm). The *in vitro* plantlets of *Curcuma singularis* Gagnep. were successfully cultured on MS medium supplemented with 0.1 mg/L BA, 1.0 mg/L IBA and 10% (v/v) coconut water.

Keywords: Plant growth regulators, *Curcuma singularis* Gagnep., *in vitro*, propagation.

* Author for correspondence: Tel: +84 - 977133046; Email: ttynhi.ahbi@gmail.com