



ẢNH HƯỞNG CỦA AgNO_3 ĐẾN QUÁ TRÌNH TÁI SINH IN VITRO CÂY NGHỆ ĐEN (*Curcuma zedoaria* Roscoe)

Trương Thị Phương Lan^{1,2*}, Lê Thị Anh Thư², Ngô Thị Sen²

¹ Trường Đại học Y Dược, Đại học Huế, 6 Ngô Quyền, Huế, Việt Nam

² Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế, 77 Nguyễn Huệ, Huế, Việt Nam

Tóm tắt. Nghệ đen (*Curcuma zedoaria* Roscoe) là một loài cây thuốc quý với thành phần hoạt chất chính là curcumin. Để tạo nguồn nguyên liệu cho quá trình nuôi cấy tế bào huyền phù cây nghệ đen, quá trình nhân giống *in vitro* loài cây này đã được nghiên cứu. Kết quả cho thấy môi trường nhân chồi thích hợp đối với mẫu nuôi cấy là chồi *in vitro* đã được hủy đỉnh sinh trưởng là môi trường MS có BAP 3 mg/L và AgNO_3 1,5 mg/L với số chồi trung bình thu được là 4,4 chồi/mẫu; chiều cao đạt 1,2 cm. Môi trường MS có NAA 2 mg/L và AgNO_3 1,5 mg/L thích hợp cho chồi *in vitro* tạo rễ; số rễ trung bình thu được là 27 và chiều dài rễ là 0,8 cm. Môi trường MS có BAP 3 mg/L, IBA 0,5 mg/L, và AgNO_3 1,5 mg/L vừa có thể tạo rễ lẫn phát sinh chồi mới, số chồi trung bình là 3,3 (cao 7,2 cm) và số rễ trung bình là 6,3 (dài 0,6 cm); đây là môi trường mang lại hiệu quả cao nhất. Cây nghệ đen nhân giống *in vitro* là nguồn nguyên liệu trực tiếp để nuôi cấy tạo callus – giai đoạn trung gian của quá trình nuôi cấy tế bào huyền phù loài cây này.

Từ khóa: AgNO_3 , *Curcuma zedoaria*, nhân giống *in vitro*, nghệ đen

1 Đặt vấn đề

Cây nghệ đen (*Curcuma zedoaria* Roscoe) thuộc họ Gừng (Zingiberaceae) là một loài thân thảo, được trồng phổ biến ở các nước Đông Nam Á, Trung Quốc, Ấn Độ và Nhật Bản [4]. Ở Việt Nam, người ta thường gặp nghệ đen mọc tự nhiên ở nhiều địa phương miền núi và trung du phía Bắc (Hà Giang, Lào Cai, Yên Bái...) và một số tỉnh miền Trung [1]. Từ xưa, nghệ đen được dùng như một loại dược liệu quý để chữa nhiều bệnh. Curcumin (hoạt chất sinh học chính của nghệ đen) có tác dụng chống đông máu và hạ huyết áp; sodium curcuminat có tác dụng chống co thắt ruột; curcuminoid và sesquiterpene có tác dụng kháng viêm. Ngoài ra, curcumin còn có hoạt tính kháng khuẩn, chống oxy hóa bảo vệ tế bào, kìm hãm sự phát sinh khối u và một số dạng ung thư ở chuột như ung thư ruột kết, ung thư dạ dày, ung thư vú và ung thư buồng trứng [8].

Trong tự nhiên, nghệ đen là loài nhân giống bằng thân rễ (rhizome), do phải mất một thời gian dài để tạo củ nên hệ số nhân kém; năng suất thu hoạch thường thấp, đặc biệt là phụ thuộc rất lớn vào điều kiện đất đai, khí hậu và mùa vụ nên khó có đủ nguồn nguyên liệu để sản xuất một lượng lớn các hoạt chất sinh học quý dùng trong bào chế dược phẩm [5]. Nuôi cấy tế bào huyền phù thực vật từ lâu đã được xem là một phương thức thay thế có nhiều tiềm năng

* Liên hệ: huylangon06@yahoo.com.vn

Nhận bài: 22-06-2017; Hoàn thành phản biện: 15-08-2017; Ngày nhận đăng: 14-11-2017

trong sản xuất các hợp chất chuyển hóa thứ cấp có giá trị cao nhờ tính đồng nhất của quần thể tế bào *in vitro*, sự sẵn có một lượng lớn nguyên liệu, và tốc độ sinh trưởng nhanh của chúng [6]. Nhân giống *in vitro* cây nghệ đen thành công sẽ cung cấp nguồn nguyên liệu bước đầu trong quá trình nuôi sinh khối tế bào cây này. Loc và cs. [3], Stanly và Keng [11], Shahinozzaman và cs. [10] đã thành công trong việc nhân giống *in vitro* cây nghệ đen, nhưng các tác giả chưa sử dụng AgNO_3 trong quá trình nuôi cấy [3, 10, 11]. Theo Kumar và cs. [2] và Sandra và Maira [9], AgNO_3 khi được bổ sung vào môi trường nuôi cấy mô thực vật có tác dụng ức chế hoạt động của ethylene nội sinh, vì thế quá trình sinh trưởng của tế bào sẽ được thuận lợi hơn [2, 9].

Trong bài báo này, chúng tôi trình bày một số kết quả về nghiên cứu ảnh hưởng của AgNO_3 lên khả năng tái sinh *in vitro* cây nghệ đen nhằm nâng cao hiệu quả nuôi cấy, cung cấp nguyên liệu cho việc thiết lập các hệ thống nuôi cấy tế bào huyền phù sau này để khảo sát quá trình chuyển hóa của các hợp chất thuộc nhóm curcuminoid.

2 Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1 Đối tượng nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu là cây nghệ *in vitro* sinh trưởng trên môi trường cơ bản MS (Murashige và Skoog, 1962) [7] có bổ sung sucrose 2 %, agar 0,8 % và NAA (naphthaleneacetic acid) 2 mg/L do bộ môn Công nghệ sinh học, Trường đại học Khoa học, Đại học Huế cung cấp.

2.2 Phương pháp nghiên cứu

Các loại môi trường sử dụng cho nuôi cấy được điều chỉnh pH đến 5,8 và khử trùng ở nhiệt độ 121 °C, áp suất 1 atm trong 20 phút. Các thí nghiệm nuôi cấy được thực hiện ở 25 ± 2 °C, cường độ chiếu sáng 2000 lux và thời gian chiếu sáng 12 giờ/ngày. Kết quả nghiên cứu được đánh giá sau 4 tuần.

Tái sinh chồi

Các chồi *in vitro* (chiều cao ~ 2 cm) bình thường được cấy lên môi trường MS có sucrose 2 %, agar 0,8 %, BAP (benzylaminopurine) 3 mg/L kết hợp với AgNO_3 ở các nồng độ 0,5–2 mg/L.

Các chồi *in vitro* (chiều cao ~ 2 cm) sau khi hủy đỉnh sinh trưởng được cấy lên môi trường MS có sucrose 2 %, agar 0,8 %, BAP 3 mg/L, CW (nước dừa) 20 % [3] kết hợp với AgNO_3 ở các nồng độ 0,5–2,5 mg/L.

Tạo rễ

Ảnh hưởng của một số chất kích thích sinh trưởng nhóm auxin lên khả năng tạo rễ của chồi *in vitro* đã được khảo sát để phát triển thành cây hoàn chỉnh.

Các chồi *in vitro* (chiều cao ~ 3 cm) tách từ cụm chồi được cấy lên môi trường MS bổ sung sucrose 2 %, agar 0,8 %, NAA 2 mg/L hoặc BAP 3 mg/L + IBA (indoleacetic acid) 0,5 mg/L [3], kết hợp với AgNO₃ ở các nồng độ 0,5–2,5 mg/L.

2.3 Xử lý thống kê

Các thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên, mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần, mỗi lần lặp quan sát ít nhất 6 mẫu. Kết quả thí nghiệm được tính trung bình và phân tích ANOVA bằng Duncan's test ($p < 0,05$).

3 Kết quả nghiên cứu và thảo luận

3.1 Ảnh hưởng của BAP và AgNO₃ lên khả năng tái sinh chồi

Chồi không hủy đỉnh sinh trưởng

Kết quả cho thấy tất cả môi trường thăm dò đều có khả năng tái sinh chồi (Bảng 1). Ở môi trường đối chứng (ĐC), chồi đỉnh bắt đầu kéo dài từ ngày thứ 3 và sau đó xuất hiện các chồi mới từ ngày thứ 5. Trên các môi trường có bổ sung AgNO₃, chồi đỉnh bắt đầu kéo dài và hình thành các chồi mới muộn hơn 1 ngày.

Bảng 1. Ảnh hưởng của BAP 3 mg/L và AgNO₃ (0,5–2,0 mg/L) lên khả năng tạo chồi mới của chồi *in vitro* không hủy đỉnh sinh trưởng

AgNO ₃ (mg/L)	Tỷ lệ tạo chồi (%)	Số chồi/mẫu	Chiều cao chồi (cm)
ĐC	100	2,3 ^{ab}	3,8 ^{ab}
0,5	100	2,5 ^{ab}	4,6 ^a
1,0	100	3,0 ^{ab}	4,4 ^{ab}
1,5	100	3,3^a	4,1^{ab}
2,0	100	2,0 ^b	3,6 ^b

Chú thích: ĐC: đối chứng không bổ sung AgNO₃. Các chữ cái khác nhau trên cùng một cột chỉ sự sai khác có ý nghĩa thống kê của các trung bình mẫu với $p < 0,05$ (Duncan's test). Các chú thích này dùng chung cho các Bảng 2–4.

Nhìn chung, môi trường có bổ sung AgNO₃ cho tỷ lệ tạo chồi mới cao hơn hoặc tương đương ĐC. Số lượng chồi tăng dần (2,5–3,3 chồi) và chiều cao chồi khá đồng đều (4,1–4,6 cm, $p > 0,05$) ở các nồng độ AgNO₃ 0,5–1,5 mg/L. Khi tăng AgNO₃ lên 2 mg/L, số lượng và chiều cao chồi có xu hướng giảm (2 chồi/3,6 cm). Trên tất cả môi trường, các chồi mới hình thành có hiện tượng tạo rễ nhưng không mạnh. Chồi hình thành trên môi trường bổ sung AgNO₃ 1,5 mg/L có màu xanh đậm hơn ĐC; ở các môi trường khác chồi có màu xanh tương đương hoặc nhạt hơn (Hình 1). AgNO₃ khi được bổ sung vào môi trường nuôi cấy mô thực vật có tác

dụng ức chế hoạt động của ethylene nội sinh; do đó quá trình sinh trưởng của tế bào vì thế sẽ được thuận lợi hơn [2, 9]. Các kết quả thu được của chúng tôi cũng phù hợp với nhận định trên.



Hình 1. Tái sinh chồi mới từ chồi *in vitro* trên môi trường có BAP 3 mg/L và AgNO₃ 1,5 mg/L sau 4 tuần nuôi cấy

Chồi được hủy đỉnh sinh trưởng

Tương tự như thí nghiệm trên, số liệu cũng cho thấy tất cả môi trường được thăm dò đều có khả năng tái sinh chồi (Bảng 2). Ở môi trường ĐC, chồi mới xuất hiện từ ngày thứ 5, còn trên các môi trường có AgNO₃ chồi mới hình thành sớm hơn ở ngày thứ 3.

Các môi trường có AgNO₃ đều cho tỷ lệ tạo chồi mới cao hơn ĐC. Số lượng chồi tăng dần (2,8–4,4 chồi), nhưng chiều cao của chúng thì tương đương nhau (1,1–1,4 cm, $p > 0,05$) khi AgNO₃ được bổ sung ở các nồng độ 0,5–1,5 mg/L. Nếu tăng AgNO₃ lên 2–2,5 mg/L thì số lượng và chiều cao chồi giảm rõ rệt. Hiện tượng tạo rễ của các chồi mới tái sinh cũng xảy ra ở tất cả môi trường nhưng không đáng kể. Các chồi ở môi trường có AgNO₃ 1,5 mg/L có màu xanh đậm hơn ĐC, còn ở các môi trường khác chồi có màu xanh nhạt hơn (Hình 2).

Bảng 2. Ảnh hưởng của BAP 3 mg/L và AgNO₃ (0,5–2,5 mg/L) lên khả năng tạo chồi mới của chồi *in vitro* đã hủy đỉnh sinh trưởng

AgNO ₃ (mg/L)	Tỷ lệ tạo chồi (%)	Số chồi/mẫu	Chiều cao chồi (cm)
ĐC	100	2,5 ^c	0,9 ^c
0,5	100	2,8 ^{bc}	1,1 ^{bc}
1,0	100	3,5 ^b	1,4 ^a
1,5	100	4,4^a	1,2^b
2,0	100	3,0 ^{bc}	1,1 ^{bc}
2,5	100	2,8 ^{bc}	0,9 ^c



Hình 2. Tái sinh chồi mới từ chồi *in vitro* đã hủy đỉnh sinh trưởng trên môi trường có bổ sung 3 mg/L BAP kết hợp với 1,5 mg/L AgNO_3 sau 4 tuần nuôi cấy

3.2. Ảnh hưởng của chất kích thích sinh trưởng và AgNO_3 lên khả năng tạo rễ

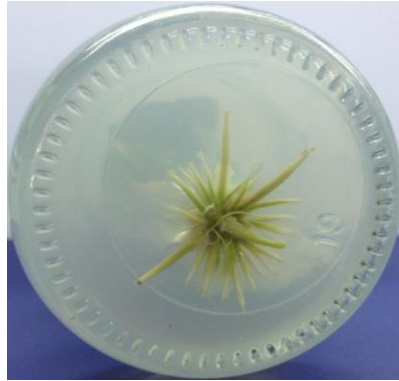
Ảnh hưởng của NAA và AgNO_3

Nhìn chung, tất cả môi trường thăm dò đều có khả năng tạo rễ (Bảng 3). Trên môi trường ĐC rễ xuất hiện ở ngày thứ 5, còn ở các môi trường có AgNO_3 rễ hình thành sớm hơn, chỉ sau 3 ngày nuôi cấy và số lượng cũng nhiều hơn.

Số lượng rễ tăng 20–27 rễ và chiều dài rễ trong khoảng 0,7–0,8 cm ($p > 0,05$) ở môi trường có AgNO_3 0,5–1,5 mg/L (Bảng 3 và Hình 3), khi tăng AgNO_3 lên 2–2,5 mg/L, số lượng rễ giảm rõ rệt (20,8–18,8 rễ) và tương đương với ĐC (18,3 rễ), nhưng chiều dài của chúng thay đổi không đáng kể (0,6–0,8 cm, ĐC là 0,6 cm). Ở môi trường có bổ sung 0,5–2 mg/L AgNO_3 , ngoài khả năng tạo rễ còn có sự hình thành một vài chồi non. So với nghiên cứu trước đây của Loc và cs. [3] thì kết quả thu được của chúng tôi tốt hơn, số rễ/mẫu nhiều hơn (27,0 so với 18,5), rễ tạo thành cũng dài hơn (0,80 so với 0,51 cm).

Bảng 3. Ảnh hưởng của NAA 2 mg/L và AgNO_3 (0,5–2,5 mg/L) lên khả năng tạo rễ của chồi *in vitro*

AgNO_3 (mg/L)	Tỷ lệ tạo rễ (%)	Số rễ/mẫu	Chiều dài rễ (cm)
ĐC	100	18,3 ^c	0,6 ^c
0,5	100	20,0 ^{bc}	0,7 ^{bc}
1,0	100	22,5 ^b	0,7 ^{ab}
1,5	100	27,0^a	0,8^a
2,0	100	20,8 ^{bc}	0,8 ^a
2,5	100	18,8 ^c	0,6 ^c



Hình 3. Tạo rễ từ chồi *in vitro* trên môi trường có bổ sung NAA 2 mg/L và AgNO₃ 1,5 mg/L sau 4 tuần nuôi cấy

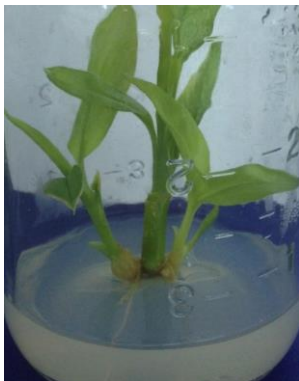
Ảnh hưởng của BAP, IBA và AgNO₃

Kết quả nghiên cứu cho thấy tất cả môi trường thăm dò đều có khả năng tạo rễ và chồi mới từ chồi *in vitro* sau 5 ngày nuôi cấy (Bảng 4).

Môi trường có bổ sung AgNO₃ cho tỷ lệ tạo rễ và chồi cao hơn hoặc tương đương ĐC. Số lượng chồi cao nhất khi bổ sung AgNO₃ 0,5 mg/L (4,8 chồi), chiều cao chồi tăng dần (3,8–7,2 cm) ở nồng độ AgNO₃ 0,5–1,5 mg/L (Hình 4) và giảm khi AgNO₃ tăng 2–2,5 mg/L (6,6–6 cm). Số lượng rễ tăng (6–6,7 rễ), nhưng chiều dài lại giảm (1–0,4 cm) ở nồng độ AgNO₃ 0,5–2,5 mg/L (Bảng 4). So với môi trường tạo rễ chỉ sử dụng NAA, chồi được cấy lên môi trường chứa BAP và IBA có ít rễ hơn (6,3 so với 27 rễ/chồi) nhưng tạo được nhiều chồi. Sự tạo chồi trên môi trường này tốt hơn trong trường hợp không hủy đỉnh sinh trưởng (số chồi/mẫu cùng đạt 3,3 chồi; chiều cao chồi đạt 7,2 cm so với 4,1 cm). So với kết quả của Loc và cs. [3] trên cùng môi trường nhưng không có AgNO₃ thì số chồi tạo thành của chúng tôi ít hơn (3,3 so với 5,6 chồi/mẫu) nhưng chồi cao hơn (7,2 cm so với 6,14 cm). Việc đạt được hiệu quả tạo chồi và rễ trên cùng một môi trường sẽ rút ngắn thời gian nuôi cấy, mang lại hiệu quả cao hơn so với các nghiên cứu trước đây như của Loc và cs., Stanly và Keng hay Shahinozzaman và cs. [3, 10, 11].

Bảng 4. Ảnh hưởng của BAP 3 mg/L, IBA 0,5 mg/L và AgNO₃ (0,5–2,5 mg/L) lên khả năng tạo rễ và chồi của chồi *in vitro*

AgNO ₃ (mg/L)	Số chồi/mẫu	Chiều cao chồi (cm)	Số rễ/mẫu	Chiều dài rễ (cm)
ĐC	3,3 ^{ab}	3,4 ^c	5,0 ^{bc}	0,8 ^{ab}
0,5	4,8 ^a	3,8 ^{bc}	6,0 ^{ab}	1,0 ^a
1,0	3,5 ^{ab}	6,0 ^{ab}	6,7 ^a	0,7 ^{bc}
1,5	3,3^{ab}	7,2^a	6,3^{ab}	0,6^{bc}
2,0	3,0 ^{ab}	6,6 ^a	5,3 ^{bc}	0,6 ^{bc}
2,5	2,5 ^b	6,0 ^{ab}	4,0 ^c	0,4 ^c



Hình 4. Cây nghệ đen *in vitro* hoàn chỉnh phát triển từ chồi trên môi trường có bổ sung BAP 3 mg/L, IBA 0,5 mg/L và AgNO₃ 1,5 mg/L sau 4 tuần nuôi cấy

4 Kết luận

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy AgNO₃ 1,5 mg/L có khả năng cải thiện mức độ tạo chồi, nhân chồi và tạo rễ *in vitro* của cây nghệ đen, góp phần nâng cao hiệu suất nhân giống loại cây này. Môi trường nhân chồi thích hợp đối với mẫu chồi *in vitro* đã được hủy định sinh trưởng là MS cơ bản có bổ sung BAP 3 mg/L và AgNO₃ 1,5 mg/L, số chồi thu được là 4,4 chồi/mẫu, chiều cao đạt 1,2 cm. Môi trường MS có NAA 2 mg/L và AgNO₃ 1,5 mg/L thích hợp cho sự tạo rễ, số rễ trung bình thu được là 27 và chiều dài rễ là 0,8 cm. Môi trường MS có BAP 3 mg/L, IBA 0,5 mg/L và AgNO₃ 1,5 mg/L vừa có thể tạo rễ lần phát sinh chồi mới, số chồi trung bình là 3,3 (cao 7,2 cm) và số rễ trung bình là 6,3 (dài 0,6 cm), đây là môi trường mang lại hiệu quả cao nhất.

Tài liệu tham khảo

1. Đỗ Tất Lợi, *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*, Nxb. Y học, Hà Nội (2004).
2. Kumar V., Parvatam G., Ravishankar G. (2009), AgNO₃ – a potential regulator of ethylene activity and plant growth modulator, *Electronic Journal of Biotechnology* 12(2), 1–15.
3. Loc N. H., Duc D. T., Kwon T. H., Yang M. S. (2005), Micropropagation of zedoary (*Curcuma zedoaria* Roscoe) – a valuable medicinal plant. *Plant Cell Tiss. Organ Cult*, 81, 119–122.
4. Loc N. H., Tuan V. C., Binh D. H. N., Phuong T. T. B., Kim T. G., Yang M. S. (2009), Accumulation of sesquiterpenes and polysaccharides in cells of zedoary (*Curcuma zedoaria* Roscoe) cultured in a 10 L bioreactor, *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 14, 619–624.

5. Miachir J. I., Romani V. L. M., De Campos A. A. F., Mello M. O., Crocomo O. J., Melo M. (2004), Micropropagation and callogenesis of *Curcuma zedoaria* Roscoe. *Scientia Agricola*, 61(4), 427–432.
6. Moscatiello R., Baldan B., Navazio L. (2013), *Plant Cell Suspension Cultures*. In Maathuis F. J. M., ed. *Plant Mineral Nutrients: Methods and Protocols*, Humana Press, Totowa, N. J., Pages 77–93.
7. Murashige T., Skoog F. (1962), A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures, *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473–497.
8. Priosoeryanto B. P., Sumarny R., Rahmadini Y., Nainggolan G. R. M., Andany S. (2001), *Growth inhibition effect of plants extract (Mussaenda pubescens and Curcuma zedoaria) on tumour cell lines in vitro*. 2nd SEAG, South East Asian Germany Alumni-Network, Los Barios, Philippines, 27–31.
9. Sandra A. T., Maira O. (2013), Effect of culture medium consistence and silver nitrate on micropropagation of two potato (*Solanum tuberosum*) cultivars, *Revista Colombiana de Biotecnología*, 15, 55–62.
10. Shahinozzaman M., Faruq M. O., Kalam Azad M. A., Amin M. N. (2013), Studies on in vitro propagation of an important medicinal plant – *Curcuma zedoaria* Roscoe using rhizome explants, *Persian Gulf Crop Protection*, 2(2), 1–6.
11. Stanly C., Keng C. L. (2007), Micropropagation of *Curcuma zedoaria* Roscoe and *Zingiber zerumbet* Smith, *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 6(4), 555–560.

EFFECT OF AgNO₃ ON *IN VITRO* REGENERATION OF ZEDOARY (*Curcuma zedoaria* Roscoe)

Truong Thi Phuong Lan^{1,2*}, Le Thi Anh Thu², Ngo Thi Sen²

¹HU – University of Medicine and Pharmacy, 6 Ngo Quyen St., Hue, Viet Nam

²HU – University of Sciences, 77 Nguyen Hue St., Hue, Viet Nam

Abstract. Zedoary (*Curcuma zedoaria* Roscoe) is a valuable medicinal plant with curcumin as the main active compound. The *in vitro* propagation of *Curcuma zedoaria* was carried out to prepare materials for cells suspension culture. The results indicated that the optimal medium for *in vitro* shoot multiplication was MS supplemented with 3 mg/L BAP and 1.5 mg/L AgNO₃, with the multiplication of 4.4 shoots of 1.2 cm high in average. The medium supplemented with 2 mg/L NAA and 1.5 mg/L AgNO₃ was suitable for root generation with an average of 27 roots of 0.8 cm long. The medium containing 3 mg/L BAP, 0.5 mg/L IBA, and AgNO₃ 1.5 mg/L was able to generate shoots and roots with an average number of 3.3 (7.2 cm high) and 6.3 (0.6 cm long), respectively. The *in vitro* zedoary can be used as a material for direct callus production – an intermediate step of the process of cell suspension culture.

Keywords: AgNO₃, *Curcuma zedoaria*, *in vitro* propagation, zedoary