

NGHIÊN CỨU ẢNH HƯỞNG CỦA NANOAG VÀ HỢP CHẤT HỮU CƠ TRONG TÁI SINH CHỒI *IN VITRO* CÂY SÂM CAU (*Curculigo orchioides* Gaertn.)

Nguyễn Đình Sỹ^{1*}, Dương Nguyễn Phương Dung¹, Nguyễn Ngọc Hữu²,
Trần Văn Cường², Trần Thị Phương Hạnh¹, Nguyễn Văn Minh², Phan Xuân Huyền³

¹Khoa Khoa học tự nhiên và Công nghệ, Trường Đại học Tây Nguyên;

²Khoa Nông nghiệp, Trường Đại học Tây Nguyên;

³Viện Khoa học sự sống, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

*Tác giả liên hệ: ndsy@ttn.edu.vn

Nhận bài: 25/02/2025 Hoàn thành phản biện: 25/04/2025 Chấp nhận bài: 16/05/2025

TÓM TẮT

Sâm cau (*Curculigo orchioides* Gaertn.) chứa các hợp chất phenolic, lignans, saponin triterpenoid, flavone và sesquiterpene giúp ngăn ngừa một số bệnh như ung thư, loãng xương, tiểu đường, huyết áp cao hoặc điều trị một số bệnh như hen suyễn, chữa bệnh huyết trắng, chữa tinh lạnh, liệt dương, xương khớp, suy nhược cơ thể, loét dạ dày tá tràng, tiêu chảy. Hiện nay nguồn nguyên liệu sâm cau ngoài tự nhiên đang dần cạn kiệt. Nghiên cứu nhân giống *in vitro* cây sâm cau nhằm giải quyết các vấn đề thiếu hụt nguồn cây giống, giảm giá thành, đáp ứng nhu cầu tiêu dùng trong nước và xuất khẩu. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của nanoAg và hợp chất hữu cơ trong nhân giống *in vitro* cho thấy sử dụng nanoAg nồng độ 20% (v/v) và lắc trong 20 phút cho tỷ lệ mẫu sống không nhiễm đạt 81,6%, và có 1,6% mẫu cảm ứng tạo mô sẹo. Môi trường bổ sung 10% (v/v) nước dừa, 10 g/L tinh bột khoai tây và 10 g/L tinh bột chuối cho khả năng tạo chồi cao nhất với kết quả là 18,8 chồi/ mẫu, 5,44 lá/cây, chiều cao đạt 7,17 cm, trọng lượng tươi 7,67 g, hàm lượng chlorophyll a đạt 0,422 mg/g, chlorophyll b đạt 0,298 mg/g.

Từ khóa: *Curculigo orchioides*, Hợp chất hữu cơ, *In vitro*, NanoAg

STUDY ON THE EFFECT OF SILVER NANOPARTICLES AND ORGANIC COMPOUNDS IN *IN VITRO* SHOOT REGENERATION OF

Curculigo orchioides GAERTN

Nguyen Dinh Sy^{1*}, Duong Nguyen Phuong Dung¹, Nguyen Ngoc Huu²,
Tran Van Cuong², Tran Thi Phuong Hanh¹, Nguyen Van Minh², Phan Xuan Huyen³

¹Faculty of Natural Science and Technology, Taynguyen University;

²Faculty of Agriculture and Forestry, Taynguyen University;

³Institute of Life Sciences, Vietnam Academy of Science and Technology.

*Corresponding author: ndsy@ttn.edu.vn

Received: 25/02/2025

Revised: 25/04/2025

Accepted: 16/05/2025

ABSTRACT

Curculigo orchioides Gaertn. contains phenolic compounds, lignans, triterpenoid saponins, flavones and sesquiterpenes that help prevent diseases such as cancer, osteoporosis, diabetes, and hypertension or treat some diseases such as asthma, leucorrhea, cold sperm, impotence, bones and joints, physical weakness, duodenal ulcers, diarrhea. Recently, the natural source of *C. orchioides* has been gradually depleted. *In vitro* propagation studies of *C. orchioides* have been conducted to address the shortage of planting materials, reduce production costs, and meet both domestic and export demands. The results on the effects of nanoAg and organic compounds in *in vitro* propagation showed that using 20% (v/v) nanoAg with 20 minutes of shaking achieved an aseptic survival rate of 81.6%, with 1.6% of explants inducing callus formation. The culture medium supplemented with 10% (v/v) coconut water, 10 g/L potato starch and 10 g/L banana powder exhibited the highest shoot formation efficiency with the results of 18.8 buds/sample, 5.44 leaves/plant, a height of 7.17 cm, a fresh weight of 7.67 g, and pigment contents of 0.422 mg/g chlorophyll a, 0.298 mg/g chlorophyll b.

Keywords: *Curculigo orchioides*, *In vitro*, NanoAg, Organic compounds

1. MỞ ĐẦU

Sâm cau (*Curculigo orchoides* Gaertn.), thuộc họ Hypoxidaceae, là một trong những loài dược liệu quý được sử dụng phổ biến trong các bài thuốc nam của các nước Đông Á và Tây Á, trong đó có Việt Nam. Nguyễn Duy Thuần và Nguyễn Thị Phương Lan (2001) nhận thấy thân rễ sâm cau mọc hoang ở Hà Giang (Việt Nam) chứa một số chất có tác dụng kháng oxy hóa *in vitro* tương đối cao (64,1%) và tăng cường sinh lực như polyphenol, phytosterol, đường khử, saponin, chất béo, carotene. He và cs. (2015) đã chiết xuất và phân tích những hợp chất có trong thân rễ sâm cau gồm nhóm phenol và phenolic glycoside, nhóm lignan và glycoside lignan, nhóm triterpenoid saponin, flavone và sesquiterpene. Sâm cau có tác dụng chữa một số bệnh như bệnh vàng da, hen suyễn, làm thuốc bổ, ngăn ngừa loãng xương, trị đái tháo đường (Nagesh và Shanthamma, 2016), kháng oxy hóa nhờ hợp chất phenol và phenolic glycoside (Wu và cs., 2005), tác dụng điều hòa miễn dịch (Bafna và Mishra, 2006), tác dụng tăng cường chức năng sinh lý, kích thích hành vi tình dục thỏ đực (Thakur và Dixit, 2007). Tác dụng kháng tiểu đường bằng giảm đáng kể nồng độ đường trong máu (Avinash, 2013). Nghiên cứu tác dụng kháng ung thư ở điều kiện *in vitro* cho thấy dịch chiết sâm cau đã ức chế tế bào ung thư phổi dòng tế bào MCF-7 (Singh và Gupta, 2008); hơn nữa nghiên cứu lâm sàng trên động vật cho kết quả rằng hợp chất curculigoside có khả năng ức chế sự tiến triển của khối u di căn gây ra (Murali và Kuttan, 2016).

Trước năm 1980, sâm cau được khai thác ở các tỉnh vùng núi phía bắc như Sơn La, Hòa Bình, và gần đây người dân cũng đã khai thác ở các tỉnh vùng Tây Nguyên như Đắk Nông. Cùng với những nghiên cứu chứng minh hoạt tính dược liệu cao trong

dịch chiết sâm cau và nhu cầu sử dụng dược liệu tăng mạnh trong thời gian gần đây nên người dân đã khai thác ồ ạt và tận thu nên cây sâm cau đang trở nên cạn kiệt. Sâm cau đã được đưa vào danh lục đỏ cây thuốc Việt Nam và danh lục đỏ của Liên minh Quốc tế Bảo tồn thiên nhiên và Tài nguyên thiên nhiên, viết tắt là IUCN (International Union for Conservation of Nature and Natural Resources (Nguyễn Tập, 2001; 2006). Trong tự nhiên, sâm cau được nhân giống bằng phương pháp gieo hạt hoặc tách mầm con nhưng tỉ lệ khá thấp. Những nghiên cứu vi nhân giống *in vitro* cho hệ số nhân chồi cao hơn gấp nhiều lần (Võ Châu Tuấn và cs., 2011). Nguyễn Thị Lài và cs. (2018) đã nghiên cứu nhân giống *in vitro* cây sâm cau sau 6 tuần cho kết quả 20,8 chồi/mẫu và 5,2 lá/cây với mẫu cây là đỉnh sinh trưởng. Nghiên cứu khử trùng và tái sinh chồi từ đoạn thân, Trương Thị Bích Phượng và cs. (2018) đã khử trùng bằng $HgCl_2$ 0,1% trong thời gian 16 phút cho kết quả tỷ lệ mẫu sống đạt 69,08%, đoạn thân cho tỉ lệ mẫu tái sinh là 96,46% và số chồi/mẫu cao nhất đạt 2,65 khi mẫu được cấy lên môi trường MS cơ bản bổ sung 3,5 mg/L BAP. Hơn nữa, chồi cây sâm cau có thể phát sinh từ lá hoặc từ đỉnh sinh trưởng khi sử dụng các chất điều hòa cytokinin riêng lẻ (BAP; KIN hoặc TDZ) với tỉ lệ mẫu phát sinh chồi đạt trên 85%. Dhenuka và cs. (1999) nghiên cứu quy trình tái sinh gián tiếp từ các mẫu cây lá thông qua giai đoạn mô sẹo xanh (MS bổ sung 6-benzylaminopurine (9 μM), mô sẹo phát sinh khối khi được cấy chuyển sang môi trường MS với 1,1 μM BAP. Sự ra rễ được quan sát thấy trong môi trường MS có bổ sung NAA (5,3 μM), IBA (1,2 μM), và cả trên môi trường MS không có phytohormone. Saranjeet và Bhutani (2012) nghiên cứu bổ sung 10% nước dừa vào môi trường *in vitro* đã thúc đẩy quá trình nhân nhanh protocorm và hình thành chồi. Những nghiên cứu nhân giống trước đây sử

dụng nhiều chất gây độc như HgCl_2 và các chất điều hòa sinh trưởng thực vật, điều này ảnh hưởng đến chất lượng nguồn giống, đặc biệt là các giống cây làm dược liệu. Trong những năm gần đây, sử dụng môi trường có bổ sung các hợp chất hữu cơ tự nhiên như nước dừa, tinh bột củ quả đã làm tăng khả năng sinh trưởng và phát triển của thực vật *in vitro*. Kong Inthachak Maitouy và cs. (2022) khảo sát ảnh hưởng của ba loại cơ chất hữu cơ là nước dừa, khoai tây và chuối xanh đến sinh trưởng của chồi lan hải chó đốm *in vitro* với hàm lượng nước dừa từ 50 ml/L đến 200 ml/L, dịch nghiền khoai tây và chuối xanh với hàm lượng từ 50g đến 200 g/L và nhận thấy chúng đều có tác động làm tăng sự nhân chồi hơn so với đối chứng. Đinh Trường Sơn và cs. (2023) xác định nồng độ nước dừa 40 ml/L hoặc chuối 20 g/L hoặc khoai tây 30 g/L được bổ sung vào môi trường nuôi cấy đều làm tăng hệ số nhân chồi *in vitro* ở chuối tiêu Nam Mỹ. Trong nghiên cứu này chúng tôi sử dụng nanoAg để khử trùng và hợp chất hữu cơ để tạo chồi nhằm cung cấp nguồn cây giống sâm cau đạt chuẩn, đồng thời giảm giá thành nhằm cung cấp đủ số lượng cây giống và sản xuất quy mô lớn để đáp ứng nhu cầu sử dụng hiện nay.

2. NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Cây sâm cau (*Curculigo orchoides* Gaertn) được tuyển chọn và thu thập tại vùng công viên địa chất thuộc địa phận huyện Krông Nô, tỉnh Đắk Nông. Môi trường nuôi cấy cơ bản gồm khoáng và vitamin MS (Murashige và Skoog, 1962) (Ducefa), đường sucrose (Công ty đường Biên Hòa), than hoạt tính (Công ty Xilon), agar (Công ty Hạ Long). Chế phẩm nanoAg 500 ppm có kích thước trung bình < 20 nm (Viện Công nghệ sinh học và Môi trường, trường Đại học Tây Nguyên). Chất hữu cơ bao gồm tinh bột khoai tây (Công ty Intermix), tinh bột chuối (Công ty Kiên Minh) và nước dừa trái.

2.2. Nội dung và phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Ảnh hưởng của nanoAg và thời gian khử trùng lên khả năng tạo mẫu lá vô trùng từ cây sâm cau

Cây sâm cau sau khi thu thập được tiến hành khử trùng theo các bước như sau: lá (không quá già cũng không quá non) được lựa chọn và được lau bằng bông gòn thấm nước xà phòng; rửa sạch dưới vòi nước chảy; lắc trong dung dịch cồn 70° trong 1 phút; rửa mẫu bằng nước cất vô trùng trong buồng cấy; khử trùng mẫu bằng dung dịch nanoAg (500 ppm) được pha theo nồng độ và thời gian khử trùng theo Bảng 1.

Bảng 1. Phương pháp bố trí thí nghiệm khử trùng

Nghiệm thức	Nồng độ (%)	Thời gian khử trùng (phút)
Ag05.10	5	10
Ag05.15	5	15
Ag05.20	5	20
Ag10.10	10	10
Ag10.15	10	15
Ag10.20	10	20
Ag15.10	15	10
Ag15.15	15	15
Ag15.20	15	20
Ag20.10	20	10
Ag20.15	20	15
Ag20.20	20	20

Mẫu lá được cắt thành hình vuông 1,5 x 1,5 cm và được cấy vào môi trường với thành phần khoáng MS có bổ sung đường sucrose 30 g/L, agar 8 g/L, được điều chỉnh pH=5,8 trước khi hấp khử trùng ở 121°C, 1 atm, trong 20 phút. Nhiệt độ phòng nuôi 25 ± 1°C, độ ẩm tương đối 70 ± 5%, thời gian chiếu sáng 12 giờ/ngày, cường độ ánh sáng 2000 lux. Thí nghiệm bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên gồm 12 nghiệm thức với 5 đĩa/nghiệm thức và 5 mẫu/đĩa, và được lặp lại 3 lần. Các

chỉ tiêu như tỷ lệ (%) mẫu sống không nhiễm nấm khuẩn; tỷ lệ (%) mẫu cảm ứng tạo mô sẹo; tỷ lệ (%) mẫu nhiễm khuẩn; tỷ lệ (%) mẫu nhiễm nấm; tỷ lệ (%) mẫu chết không nhiễm được thu nhận sau 14 ngày và 21 ngày nuôi cấy.

2.2.2. Ảnh hưởng của một số chất hữu cơ lên khả năng phát sinh chồi cây sâm cau *in vitro*

Lá sâm cau vô trùng được lựa chọn sẽ được cấy chuyển sang môi trường thí nghiệm được bố trí theo Bảng 2.

Bảng 2. Bố trí thí nghiệm ảnh hưởng của nguồn hữu cơ

Nghiệm thức	Nước dừa (100 ml/L)	Tinh bột khoai tây (10 g/L)	Tinh bột chuối (10 g/L)
Đối chứng	-	-	-
H1	+	-	-
H2	-	-	+
H3	-	+	-
H4	+	+	-
H5	+	-	+
H6	-	+	+
H7	+	+	+

Mẫu lá (1,5 cm x 1,5 cm) và được cấy vào môi trường với thành phần khoáng MS có bổ sung đường sucrose 30 g/L, agar 8 g/L và các thành phần hữu cơ với nồng độ và hàm lượng theo bảng 2. Mỗi bình chứa 50 ml môi trường. Môi trường được chỉnh pH = 5,8 trước khi hấp khử trùng ở 121°C, 1 atm, trong 20 phút. Nhiệt độ phòng nuôi 25 ± 1°C, độ ẩm tương đối 70 ± 5%, thời gian chiếu sáng 12 giờ/ngày, cường độ ánh sáng 4000 lux. Thí nghiệm bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên gồm 8 nghiệm thức với 5 bình/nghiệm thức và 5 mẫu/bình, và được lặp lại 3 lần. Chỉ tiêu theo dõi được ghi nhận sau 90 ngày nuôi cấy: % mẫu bật chồi; số chồi/mẫu; số lá/chồi; chiều cao chồi; hàm lượng diệp lục tố (chlorophyll a và b).

2.3. Phương pháp phân tích sắc tố bằng đo quang phổ

Chlorophyll có phổ hấp thu ánh sáng cực đại ở các bước sóng 645 nm, 663 nm, độ hấp thu ở bước sóng này biểu thị cho cường độ của sắc tố hay lượng chlorophyll có trong dung dịch. Công thức tính lượng chlorophyll như sau (Rajalakshmi, 2014):

Chlorophyll a = 12,7(A663) – 2,69(A645)

Chlorophyll b = 22,9(A645) – 4,68(A663)

2.4. Phương pháp lấy số liệu

Các chỉ tiêu được lấy đồng thời cùng một thời điểm, đo đếm toàn bộ số mẫu đã bố trí và so sánh các nghiệm thức với nhau bao gồm: Chiều cao cây (mm) được tính bằng cách đo từ gốc đến đỉnh lá dài nhất; số lá/cây được tính bằng cách đếm hết số lá mở hình thành trên một mẫu; chiều dài rễ (mm) được đo từ gốc rễ đến hết chiều dài rễ; số rễ/cây được tính bằng cách đếm hết số rễ hình thành trên một mẫu.

2.5. Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu được phân tích bằng phép thử ANOVA (MSTATC, Đại học Michigan, Mỹ) 1 nhân tố (là tổ hợp 2 yếu tố nồng độ NanoAg và thời gian lắc). Biểu đồ được vẽ bằng Microsoft Office Excel 2021.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của nanoAg và thời gian khử trùng lên khả năng tạo mẫu vô trùng từ cây sâm cau

Khử trùng mẫu nuôi cấy là giai đoạn đầu tiên và hết sức quan trọng của quy trình nhân giống *in vitro* với mục đích tạo được mẫu cấy không nhiễm nấm khuẩn khi vào nuôi cấy *in vitro*. Giai đoạn này cần đảm bảo tỷ lệ mẫu nhiễm nấm khuẩn thấp đồng thời

tỷ lệ mẫu sống cao, mô tồn tại, sinh trưởng và phân hóa tốt. Trong thí nghiệm này, chúng tôi tiến hành nghiên cứu khả năng khử trùng của dung dịch nanoAg ở nồng độ 5%, 10%, 15%, 20% với mức thời gian khác nhau 10,

15, 20 phút. Các chỉ tiêu được theo dõi ở ngày thứ 14 và ngày thứ 21. Kết quả có sự khác biệt có ý nghĩa về thống kê được thể hiện ở Bảng 3 và Bảng 4.

Bảng 3. Ảnh hưởng của nồng độ nanoAg và thời gian lắc đến tỷ lệ tạo mẫu *in vitro* vô trùng ở ngày thứ 14

Nghiệm thức	Tỷ lệ mẫu sống không nhiễm nấm khuẩn (%)	Tỷ lệ mẫu nhiễm khuẩn (%)	Tỷ lệ mẫu nhiễm nấm (%)
Ag5.10	18,7 ± 1,2 ^k	1,6 ± 0 ^a	78,3 ± 1,3 ^a
Ag5.15	23,2 ± 0,8 ^l	0,8 ± 0 ^b	76,8 ± 0,8 ^a
Ag5.20	44,8 ± 0,8 ^h	0,0 ± 0 ^c	55,2 ± 0,8 ^c
Ag10.10	34,2 ± 2,3 ⁱ	1,6 ± 0 ^a	65,2 ± 2,4 ^b
Ag10.15	57,9 ± 1,2 ^f	0,0 ± 0 ^c	35,5 ± 4,6 ^e
Ag10.20	68,0 ± 0,8 ^d	0,0 ± 0 ^c	32,0 ± 0,8 ^f
Ag15.10	55,7 ± 0,5 ^g	0,0 ± 0 ^c	44,3 ± 0,5 ^d
Ag15.15	64,8 ± 0,8 ^e	0,0 ± 0 ^c	35,2 ± 0,8 ^e
Ag15.20	82,0 ± 0,4 ^c	0,0 ± 0 ^c	17,2 ± 0,4 ^g
Ag20.10	66,4 ± 0,8 ^{de}	0,0 ± 0 ^c	33,6 ± 0,8 ^{ef}
Ag20.15	86,4 ± 1,1 ^b	0,0 ± 0 ^c	13,6 ± 1,1 ^h
Ag20.20	91,7 ± 0,9 ^a	0,0 ± 0 ^c	07,5 ± 0,9 ⁱ

Trung bình trong cùng một cột có chữ cái khác nhau thể sự sai khác có ý nghĩa thống kê với $p < 0,01$.

Sau 14 ngày theo dõi, tỷ lệ mẫu sống không nhiễm đạt giá trị cao nhất 91,73 khi cho 20% dung dịch nanoAg khử trùng trong 20 phút (Ag20.20), tiếp đến là nghiệm thức Ag20.15 đạt 86,4%. Ag15.20 đạt 82%, Ag10.20 đạt 68%, Các nghiệm thức còn lại cho kết quả thấp hơn, nghiệm thức Ag5.10 cho kết quả thấp nhất là 18,7 % mẫu sống không nhiễm. Sau 14 ngày, tỷ lệ mẫu chết không nhiễm (%) và tỷ lệ mẫu tạo mô sẹo (%) không có sự khác biệt và bằng 0%.

Trong giai đoạn khử trùng, nồng độ chất khử trùng và thời gian luôn là 02 yếu tố quan trọng, và đối với mẫu lá sâm cau, số mẫu bị nhiễm tỉ lệ nghịch với thời gian khử trùng nhưng tỉ lệ thuận với tỷ lệ mẫu chết.

Tiếp tục theo dõi khả năng tạo mẫu vô trùng sau 21 ngày cho thấy khả năng khử trùng mẫu cây của nanoAg ở các nồng độ và thời gian xử lý khác nhau có sự khác biệt (Bảng 4).

Bảng 4. Ảnh hưởng của nồng độ nanoAg và thời gian lắc đến tỷ lệ tạo mẫu *in vitro* vô trùng ở ngày thứ 21

Nghiệm thức	Tỷ lệ mẫu sống không nhiễm nấm khuẩn (%)	Tỷ lệ mẫu nhiễm khuẩn (%)	Tỷ lệ mẫu nhiễm nấm (%)	Tỷ lệ mẫu chết không nhiễm (%)	Tỷ lệ mẫu tạo mô sẹo (%)
Ag5.10	13,6 ± 0,8 ^k	1,6 ± 0 ^a	85,6 ± 0,8 ^a	0,0 ± 0 ^b	0,0 ± 0 ^c
Ag5.15	15,2 ± 0,8 ^j	0,8 ± 0 ^b	84,0 ± 0,8 ^a	0,0 ± 0 ^b	0,0 ± 0 ^c
Ag5.20	37,6 ± 0,8 ^h	0,0 ± 0 ^c	62,4 ± 0,8 ^c	0,0 ± 0 ^b	0,0 ± 0 ^c
Ag10.10	31,2 ± 1,4 ⁱ	1,6 ± 0 ^a	68,3 ± 1,2 ^b	0,0 ± 0 ^b	0,0 ± 0 ^c
Ag10.15	38,4 ± 0,8 ^h	0,8 ± 0 ^b	61,0 ± 0,5 ^c	0,0 ± 0 ^b	0,0 ± 0 ^c
Ag10.20	58,7 ± 1,7 ^e	0,0 ± 0 ^c	38,0 ± 4,2 ^f	0,0 ± 0 ^b	0,8 ± 0 ^b
Ag15.10	42,4 ± 1,6 ^g	0,0 ± 0 ^c	57,6 ± 1,6 ^d	0,0 ± 0 ^b	0,0 ± 0 ^c
Ag15.15	54,9 ± 0,5 ^f	0,0 ± 0 ^c	45,1 ± 0,5 ^e	0,0 ± 0 ^b	0,0 ± 0 ^c
Ag15.20	68,8 ± 1,6 ^c	0,0 ± 0 ^c	30,4 ± 1,6 ^{gh}	0,8 ± 0 ^a	0,8 ± 0 ^b
Ag20.10	67,2 ± 0,8 ^d	0,0 ± 0 ^c	32,0 ± 4,0 ^g	0,0 ± 0 ^b	0,8 ± 0 ^b
Ag20.15	71,7 ± 1,2 ^b	0,0 ± 0 ^c	28,3 ± 1,2 ^h	0,0 ± 0 ^b	0,8 ± 0 ^b
Ag20.20	81,6 ± 0,8 ^a	0,0 ± 0 ^c	17,6 ± 0,8 ⁱ	0,8 ± 0 ^a	1,6 ± 0 ^a

Trung bình trong cùng một cột có chữ cái khác nhau thể sự sai khác có ý nghĩa thống kê với $p < 0,01$.

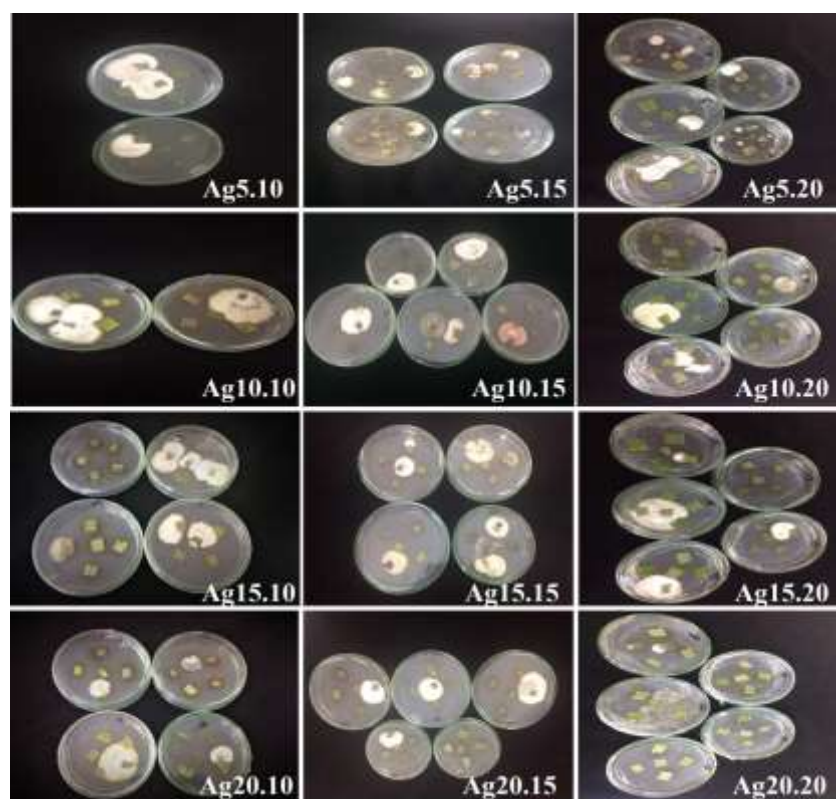
Nghiệm thức Ag20.20 cho tỷ lệ mẫu sống không nhiễm cao nhất là 81,6%, tiếp đến là Ag20.15 (71,73%), Ag15.20 (68,8%), Ag20.10 (67,2%), Ag10.20 (58,67%), Ag15.15 (54,93%), các nghiệm thức còn lại cho kết quả thấp hơn. Tỷ lệ mẫu sống không nhiễm tăng khi thời gian khử trùng và nồng độ khử trùng tăng và đạt giá trị cao nhất với thời gian khử trùng là 20p nồng độ 20%. Các nghiệm thức Ag5.10, Ag5.15, Ag10.10, Ag10.15 có tỷ lệ nhiễm khuẩn là 1,6% và 0,8%. Nghiệm thức Ag20.20 cho khả năng kháng nấm cao nhất với chỉ số nhiễm nấm thấp 17,6 %, Ag20.15 (28,27%), Ag15.20 (30,4%), Ag20.10 (32%). Ag5.10 và Ag5.15 cho tỷ lệ nhiễm nấm cao nhất 85,6% và 84%.

Sử dụng nanoAg nồng độ 15% và 20% cho kết quả khử trùng cao, trong đó khả năng kháng khuẩn cao hơn kháng nấm. NanoAg làm tăng cường hoạt tính hóa học của bạc do cấu trúc đạt kích thước tới hạn, điều này sẽ cho phép một lượng lớn nguyên tử có thể tương tác với mục tiêu làm nâng cao hiệu quả tác động bề mặt. Như vậy, tác dụng diệt nấm khuẩn của nanoAg hiệu quả theo nhiều cơ chế khác nhau (Chaloupka và cs., 2010). Tùy thuộc vào kích thước, cấu trúc, nồng độ và tùy thuộc vào loài thực vật mà nanoAg ảnh hưởng đến sự sinh trưởng,

phát triển của cây trồng thông qua kích thích những biến đổi đáng kể ở mức độ sinh lý và ở mức phân tử theo hướng tích cực hoặc tiêu cực

Thời gian khử trùng có ảnh hưởng lớn đến hiệu quả khử trùng. Ở mốc thời gian 15 phút và 20 phút đủ thời gian gây chết cho nấm và vi khuẩn. Khi nâng thời gian khử trùng mẫu lên 20 phút giảm tỷ lệ mẫu sống không nhiễm vì tỷ lệ mẫu chết tăng. Do mẫu ngâm lâu trong dung dịch khử trùng, dung dịch khử trùng ngấm vào các tế bào của mẫu gây nên hiện tượng hoại tử mẫu dẫn đến mẫu chết. Ag15.20, Ag20.20 có 0,8% mẫu chết không nhiễm. Tuy nhiên khi ngâm mẫu lâu trong nanoAg lại giúp cho mẫu có cảm ứng mô sẹo: Ag20.20 là 1,6%, Ag10.20, Ag15.20, Ag20.10, Ag20.15 có 0,8%, tuy nhiên cảm ứng tạo mô sẹo là không đáng kể.

Đỗ Mạnh Cường và cs. (2018) đã bổ sung nanoAg (≤ 20 nm) vào môi trường *in vitro* và bỏ qua khâu hấp khử trùng, kết quả không gây ảnh hưởng đến sự sinh trưởng và phát triển của cây dâu tây. Hơn nữa, nghiên cứu của Dương Tấn Nhựt và cs. (2018) đã chứng minh rằng nanoAg kích thích sự tăng trưởng của một số cây trồng như cây cúc, dâu tây, đồng tiền nuôi cấy *in vitro*. Vì thế, nanoAg được đánh giá là một chất khử trùng hiệu quả và an toàn với thực vật.

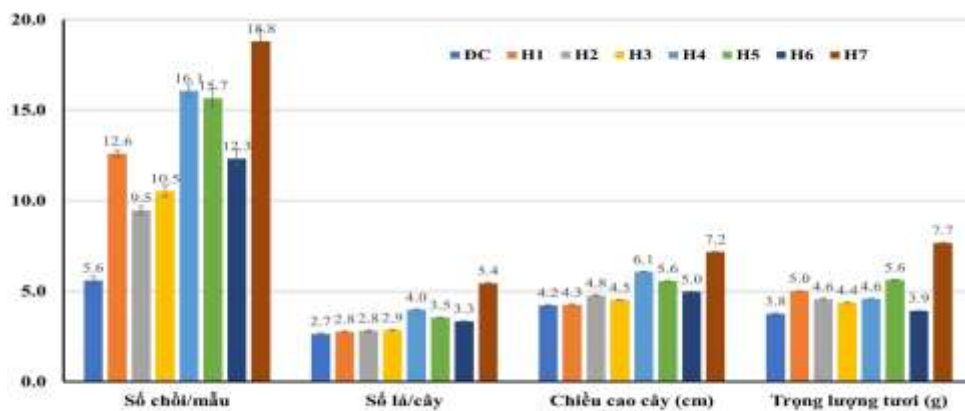


Hình 1. Ảnh hưởng của nồng độ nanoAg và thời gian lắc đến khả năng khử trùng mẫu lá sâm cau ở ngày thứ 21

3.2. Ảnh hưởng của một số thành phần hữu cơ lên khả năng nhân nhanh chồi từ lá sâm cau

Trong nuôi cấy *in vitro*, môi trường ngoài thành phần chính là muối khoáng, vitamin, nguồn carbon và phytohormon, các hợp chất hữu cơ như bột khoai tây, nước dừa, bột chuối, nước ép cà chua, táo, peptone, v.v được thêm vào trong môi

trường đóng vai trò quan trọng. Những chất hữu cơ này có hiệu quả đáng kể đối với sự nảy mầm và vi nhân giống của nhiều loài cây. Vì vậy, nghiên cứu này thực hiện với các chất bổ sung hữu cơ như tinh bột khoai tây, tinh bột chuối, nước dừa bổ sung vào môi trường nuôi cấy nhằm tìm ra môi trường hữu cơ thích hợp cho quá trình phát sinh chồi từ mẫu lá của cây sâm cau.

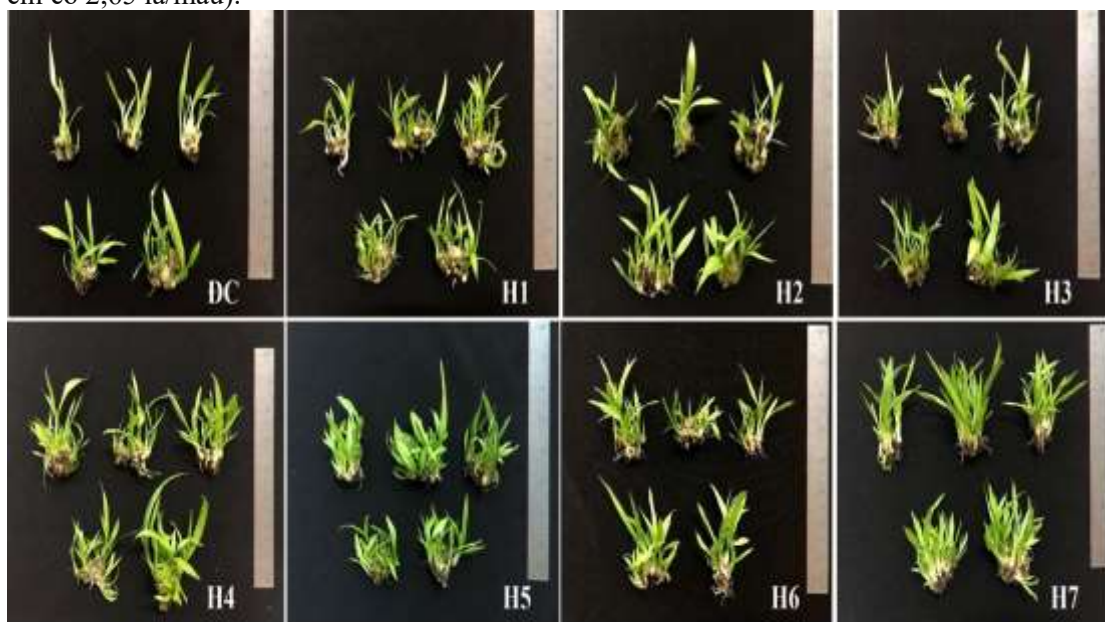


Hình 2. Ảnh hưởng của nguồn hữu cơ đến số chồi/mẫu, số lá/cây, chiều cao cây (cm), trọng lượng tươi (g) sau 90 ngày nuôi cấy.

Hình 2 cho thấy các nghiệm thức có bổ sung nguồn hữu cơ cho số chồi cao hơn nghiệm thức không sử dụng nguồn hữu cơ. Nghiệm thức H7 bổ sung đầy đủ nước dừa, khoai tây và bột chuối cho kết quả cao nhất là 18,8 chồi/mẫu, tiếp đến là nghiệm thức H4 (16,07 chồi/mẫu), H5 (15,67 chồi/mẫu), H6 (12,33 chồi/mẫu), H1 (12,6 chồi/mẫu), H3 (10,53 chồi/mẫu), H2 (9,47 chồi/mẫu), thấp nhất là nghiệm thức đối chứng chỉ có 5,60 chồi/mẫu. Số lá sau 90 nuôi cấy biến động từ 2,65 lá đến 5,44 lá. Nghiệm thức H7 có số lá cao nhất là 5,44 lá, tiếp đến là nghiệm thức H4 (3,97 lá/mẫu), H5 (3,54 lá/mẫu), H6 (3,34 lá/mẫu), H3 (2,85 lá/mẫu), H2 (2,81 lá/mẫu), H1 (2,76 lá/mẫu), thấp nhất là nghiệm thức đối chứng chỉ có 2,65 lá/mẫu).

Sau 90 ngày nuôi cấy môi trường H7 có bổ sung nước dừa, tinh bột khoai tây và tinh bột chuối cho kết quả chiều cao cây cao nhất là 7,17 cm, tiếp đến là nghiệm thức H4 (6,07 cm), H5 (5,56 cm), H6 (4,97 cm), H2 (4,75 cm), H3 (4,52 cm), H1 (4,25 cm), thấp nhất là nghiệm thức đối chứng đạt 4,22 cm.

Sau 90 ngày nuôi cấy, các chồi cây sâm cau trên môi trường có bổ sung nguồn hữu cơ ở các công thức khác nhau cho thấy có sự khác biệt đáng kể so với đối chứng (không bổ sung chất hữu cơ), trọng lượng tươi cao nhất là nghiệm thức H7 với 7,67 g/mẫu, thấp nhất là nghiệm thức đối chứng chỉ đạt 3,76 g/mẫu.



Hình 3. Ảnh hưởng của nguồn hữu cơ đến sự tạo chồi và sinh trưởng của sâm cau *in vitro*.

Có sự thay đổi hàm lượng diệp lục ở các nghiệm thức, chứng tỏ việc bổ sung nguồn hữu cơ có tác động đến sự sinh trưởng cây hỗ trợ việc tăng cường cường độ

quang hợp cho cây. Nghiệm thức H7, H5, H4 cho hàm lượng chlorophyll a và chlorophyll b cao hơn các nghiệm thức khác (Bảng 5).

Bảng 5. Ảnh hưởng của nguồn hữu cơ đến hàm lượng diệp lục tố a và b

Nghiem thức	Chlorophyll a (mg/g)	Chlorophyll b (mg/g)
Đối chứng	0,356 ± 0,002g	0,224 ± 0,008h
H1	0,378 ± 0,002e	0,242 ± 0,002f
H2	0,381 ± 0,002d	0,258 ± 0,003d
H3	0,369 ± 0,002f	0,250 ± 0,002e
H4	0,407 ± 0,001b	0,269 ± 0,001c
H5	0,403 ± 0,001c	0,280 ± 0,006b
H6	0,350 ± 0,002h	0,233 ± 0,003g
H7	0,422 ± 0,001a	0,298 ± 0,002a

Trung bình trong cùng một cột có chữ cái khác nhau thể sự sai khác có ý nghĩa thống kê với $p < 0,01$.

Overbeek và cs. (1941) đầu tiên giới thiệu nước dừa như một thành phần mới của môi trường dinh dưỡng cho các nuôi cấy mô sẹo, và từ đó nước dừa được sử dụng rộng rãi, bổ sung vào môi trường nhằm thúc đẩy sự cảm ứng tế bào và kích thích tăng trưởng của thực vật *in vitro*. Theo George và cs. (2008), nước dừa bao gồm nhiều axit amin, hợp chất đạm, hợp chất vô cơ, các axit hữu cơ, nguồn carbon, vitamin và có khả năng điều chỉnh sự phát triển như cytokinin và auxin. Yong và cs. (2009) cho thấy nước dừa chứa 94 % là nước và là chất thúc đẩy tăng trưởng của lá. Một trong số các thành phần quan trọng có trong nước dừa là phytohormone thực vật và đó là hợp chất thuộc nhóm cytokinin (Jean và cs., 2009). Ngoài ra, nước dừa đã được báo cáo là có khả năng làm tăng quá trình sinh trưởng và phát triển của hoa lan trong ống nghiệm do có sự liên quan sự hiện diện của một loại cytokinin (Bhasker, 1996). Kết quả này cũng trùng với nghiên cứu của Shantz và Steward (1952) khi bổ sung nước dừa đã kích thích quá trình nhân nhanh tế bào và mô thực vật. Nồng độ nước dừa trong môi trường từ 10 - 20 % là cần thiết cho quá trình tăng trưởng của mô sẹo ở một số loài cây (Burnet và Ibrahim, 1973). Saranjeet và Bhutani (2012) bổ sung 10% nước dừa vào môi trường đã thúc đẩy quá trình nhân nhanh protocorm và hình thành chồi. Chính vì vậy mà ở các nghiệm thức có bổ sung nước dừa cho tác động khác biệt lên sự tạo chồi và tăng trưởng chồi.

4. KẾT LUẬN

Mẫu lá khi được khử trùng bằng nanoAg (500 ppm) ở nồng độ 20% (v/v) và lắc trong 20 phút cho tỷ lệ không nhiễm nấm khuẩn và sống là cao nhất (đạt 81,6%) và có 1,6% mẫu cảm ứng tạo mô sẹo.

Môi trường MS bổ sung 10% (v/v) nước dừa, 10 g/L tinh bột khoai tây và 10 g/L tinh bột chuối cho khả năng tạo chồi cao nhất (18,8 chồi/mẫu) và kích thích sự sinh trưởng của cụm chồi *in vitro* (5,44 lá/mẫu, chiều cao đạt 7,17 cm, trọng lượng tươi 7,67 g/mẫu), đồng thời giúp tế bào tổng hợp diệp lục tố với hàm lượng là cao nhất (chlorophyll a 0,422 mg/g và chlorophyll b 0,298 mg/g).

LỜI CẢM ƠN

Kết quả nghiên cứu này được tài trợ bởi trường Đại học Tây Nguyên, đề tài cơ sở trọng điểm với mã số: T2024-04CBTD.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Tài liệu tiếng Việt

Đỗ Mạnh Cường, Trương Thị Bích Phượng và Dương Tấn Nhựt. (2018). Ảnh hưởng của nano bạc lên khả năng cảm ứng mô sẹo và tái sinh chồi từ mẫu lá cây dâu tây (*Fragaria x ananassa*) nuôi cấy *in vitro*. *Tạp chí Khoa học Đại học Huế: Khoa học Tự nhiên*, 127(1C), 61-70. DOI:10.26459/hueuni-jns.v127i1C.4893.

Nguyễn Thị Lại, Phạm Hương Sơn, Bùi Thị Thanh Phương, Phạm Minh Duy, Đỗ Thị Thơm, Nguyễn Thị Bình và Nguyễn Ích Tân. (2018). Nghiên cứu nhân giống *in vitro* cây sâm cau (*Curculigo orchoides* Gaertn.) từ nuôi cấy đỉnh sinh trưởng. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam*, 60(12), 50-55.

- Dương Tấn Nhựt, Dương Bảo Trinh, Đỗ Mạnh Cường, Hoàng Thanh Tùng, Nguyễn Phúc Huy, Vũ Thị Hiền, Vũ Quốc Luận, Lê Thị Thu Hiền và Nguyễn Hoài Châu. (2018). Khảo sát nano bạc làm chất khử trùng mẫu mới trong nhân giống vô tính cây African violet (*Saintpaulia Ionantha* H. Wendl). *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 16(1), 87-97.
- Trương Thị Bích Phượng, Đỗ Thị Hoa Thắm, Bùi Lê Thanh Nhân và Nguyễn Đức Tuấn. (2018). Nghiên cứu tạo chồi *in vitro* cây sâm cau (*Curculigo orchoides* Gaertn.) ở Thừa thiên huế. *Tạp chí Y dược học Trường đại học Y dược Huế*, 1(8), 37-46.
- Kong Inthachak, Maitouy, Ienglorlath Dettaphone, Nguyễn Phương Quý, Trần Trung Kiên, Vũ Thị Xuân Quyên và Nguyễn Thị Mai Lan. (2022). Ảnh hưởng của chất hữu cơ bổ sung đến quá trình nhân nhanh chồi, đặc điểm hình thái, giải phẫu và hàm lượng sắc tố quang hợp loài lan hài chó đốm (*Paphiopedilum bellatulum*) trong nuôi cấy *in vitro*. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Trường Đại học Hùng Vương*, 26(1), 44-50.
- Đình Trường Sơn, Đặng Thu Hòa, Vũ Công Sơn, Nguyễn Thị Hoa, Vũ Thị Hiền và Đặng Thị Thanh Tâm. (2023). Đánh giá tác động của các chất hữu cơ đến giai đoạn nhân nhanh *in vitro* chuỗi tiêu Nam mỹ (*Musa acuminata*). *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp*, 21(5), 597-604.
- Nguyễn Tập. (2006). Danh lục đỏ cây thuốc Việt Nam. *Tạp chí Dược liệu*, 11(3), 97-105.
- Nguyễn Tập. (2001). Áp dụng khung phân hạng mới của IUCN-1994 để đánh giá tình trạng bị đe dọa đối với các loài cây cần bảo tồn ở Việt Nam hiện nay. *Tạp chí Dược liệu*, 6(2+3), 42-45.
- Nguyễn Duy Thuần và Nguyễn Thị Phương Lan. (2001). Bước đầu nghiên cứu cây sâm cau. *Tạp chí Dược liệu*, 6(6), 163-166.
- Võ Châu Tuấn, Nguyễn Thị Út và Trần Quang Dân. (2011). Nhân giống invitro cây sâm cau (*Curculigo orchoides* Gaertn.) - Một loài cây thuốc quý. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Đại học Đà Nẵng*, 6(47), 163-169.
- 2. Tài liệu tiếng nước ngoài**
- Avinash, P. (2013). Evaluation of effect of aqueous slurry of *Curculigo orchoides* Gaertn. rhizome in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Pharmacy Research*, 7(8), 747-753.
- Bafna, A. R., & Mishra, S. H. (2006). Immunostimulatory effect of methanol extract of *Curculigo orchoides* on immunosuppressed mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 104(1-2), 1-4.
- Bhasker, J. (1996). *Micropropagation of Phalaenopsis, Thrissur*. Unpublished doctoral dissertation, Kerala Agricultural University.
- Burnet, G., & Ibrahim, R. K. (1973). Tissue culture of Citrus peel and its potential for flavonoid synthesis, *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, 69, 152-162.
- Chaloupka, K., Malam, Y. & Seifalian, A. M. (2010). Nanosilver as a new generation of nanoparticle in biomedical applications. *Trends in Biotechnology*, 28(11), 580-588.
- Dhenuka, S., Balakrishna, P., & Anand, A. (1999). Indirect organogenesis from the leaf explants of medicinally important plant *Curculigo orchoides* Gaertn. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 8, 113-115.
- George, E. F., Hall, M. A., & De Klerk, G. J. (2008). *Plant Propagation by Tissue Culture*. Springer, Dordrecht, the Netherlands 1, 501.
- He, Y., Dong, X., Jia, X., Li, M., Yuan, T., Xu, H., Qin, L., Han, T., & Zhang, Q. (2015). Qualitative and quantitative analysis on chemical constituents from *Curculigo orchoides* using ultra high performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 102, 236-245.
- Jean, W. H., Yong, Liya G., Yan, F. N., & Swee, N. T. (2009). The Chemical Composition and Biological Properties of Coconut (*Cocos nucifera* L.) Water. *Molecules*, 14, 5144-5164.
- Murali, V. P., & Kuttan, G. (2016). Curculigoside augments cell-mediated immune responses in metastatic tumor-bearing animals. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 38(4), 264-269.
- Nagesh, K. S., & Shanthamma, C. (2016). An overview on tissue culture studies of *Curculigo orchoides* Gaertn: an endangered multipotential medicinal herb. *Journal of Medicinal Plants Studies*, 4(4), 119-123.
- Overbeek, J. V., Conklin, M. E., & Blakeslee, A. F. (1941). Factors in coconut milk essential for growth and development of

- very young *Datura* embryos. *Science*, 94, 350–351.
- Rao, K. S. & Mishra, S. H. (1996). Effect of rhizomes of *Curculigo orchoides* Gaertn. on drug induce hepatotoxicity. *Indian Drugs*, 33(9), 458-461.
- Saranjeet, K., & Bhutani, K. K. (2012). Organic growth supplement stimulants for *in vitro* multiplication of *Cymbidium pendulum*, *HortScience*, 9(1), 47-52.
- Singh, R., & Gupta, A. K. (2008). Antimicrobial and antitumor activity of the fractionated extracts of Kalimussli (*Curculigo orchoides*). *International Journal Green Pharmacy*, 2, 34-36
- Shantz, E. M., & Steward, F. C. (1952). Coconut milk factor: The growth promoting substance in coconut milk. *Journal of the American Chemical Society*, 74, 6133-6135.
- Thakur, M., & Dixit, V.K. (2007). Effect of some Vajikaran herbs on pendiculation activities and *in vitro* sperm count in male. *Sexuality and Disability*, 25(4), 203-207.
- Wu, Q., Fu, D. X., Hou, A. J., Lei, G. Q., Liu, Z. J., Chen, J. K., & Zhou, T. S. (2005). Antioxidative phenols and phenolic glycosides from *Curculigo orchoides*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 53(8), 1065-1067.
- Yong, J. W. H., Ge, L., Ng, Y. F., & Tan, S. N. (2009). The chemical composition and biology properties of coconut (*Cocos nucifera* L.) water. *Molecules*, 14, 5144-5164.