

Evaluation of chemical components of rhizomes and micropropagation from
Kaempferia rotunda L.

Trung T. Pham*, Trang T. H. Phan, Quyen T. Nguyen, Anh T. Ton,
Phong V. Nguyen, & Minh T. L. Tran*

Faculty of Biological Sciences, Nong Lam University, Ho Chi Minh City, Vietnam

ARTICLE INFO

Research Paper

Received: April 14, 2022

Revised: August 16, 2022

Accepted: August 23, 2022

Keywords

Chemical components

In vitro

Kaempferia rotunda L.

Micropropagation

*Corresponding authors

Pham Thi Trung

Email: pttrung612@gmail.com

Tran Thi Le Minh

Email: ttminh@hcmuaf.edu.vn

ABSTRACT

In this study, the extracts of *Kaempferia rotunda* L. were investigated by GC/MS (Gas chromatography/mass spectrometry). There were 25 compounds in tuberous rhizome: alpha-pinene (4.48%), camphene (20.85%), pentadecane (15.47%), camphor (10.15%), alpha terpinolene (1.01%), bornyl acetate (5.65%), alpha-selinene (2.32%), gamma-curcumene (3.22%), heptadecane (3.80%), alpha-cedrene (3.64%), alpha-amorphene (4.92%), alpha-curcumine (2.68%), benzyl-benzoate (7.56%), eucalyptol (1.01%), and some important other compounds. The protocol for *in vitro* propagation was conducted. The MS medium supplemented with 2 mg/L of Benzyl adenine and 0.2 mg/L of Kinetin gave the highest number of shoots (4.67 shoots/explant). The MS 1/2 medium supplemented with 0.5 mg/L of Naphthalene acetic acid was suitable for plantlet formation (shoot height: 12.05 cm and 14.56 roots/explant). The greenhouse-acclimated *in vitro* plants reached a 100% survival rate.

Cited as: Pham, T. T., Phan, T. T. H., Nguyen, Q. T., Ton, A. T., Nguyen, P. V., & Tran, M. T. L. (2022). Evaluation of chemical components of rhizomes and micropropagation from *Kaempferia rotunda* L. *The Journal of Agriculture and Development* 21(4), 36-42.

Khảo sát thành phần hóa học và nhân giống *in vitro* từ củ tam thất nam (*Kaempferia rotunda* L.)

**Phạm Thị Trưng*, Phan Thị Huyền Trang, Nguyễn Thị Quyên, Tôn Trang Ánh,
Nguyễn Vũ Phong & Trần Thị Lệ Minh***

Khoa Học Sinh Sọc, Trường Đại Học Nông Lâm TP.HCM, TP. Hồ Chí Minh

THÔNG TIN BÀI BÁO

Bài báo khoa học

Ngày nhận: 14/04/2022
 Ngày chỉnh sửa: 16/08/2022
 Ngày chấp nhận: 23/08/2022

Từ khóa

In vitro
 Tam thất nam
 Thành phần hóa học
 Vi nhân giống

***Tác giả liên hệ**

Phạm Thị Trưng
 Email: pttrung612@gmail.com
 Trần Thị Lệ Minh
 Email: ttlminh@hcmuaf.edu.vn

TÓM TẮT

Nghiên cứu nhằm khảo sát thành phần hoạt chất trong củ tam thất nam và xây dựng được quy trình nhân giống cây tam thất nam *in vitro*. Kết quả phân tích thành phần hóa học từ củ tam thất nam trên máy GC-MS thu được các hợp chất bao gồm 25 chất: alpha-pinene (4,48%), camphene (20,85%), pentadecane (15,47%), camphor (10,15%), alpha-terpinolene (1,01%), bornyl acetate (5,65%), alpha-selinene (2,32%), gamma-curcumene (3,22%), heptadecane (3,80%), alpha-cedrene (3,64%), alpha-amorphene (4,92%), alpha-curcumine (2,68%), benzyl-benzoate (7,56%), eucalyptol (1,01%) và một số hợp chất quan trọng khác. Môi trường MS bổ sung BA 2 mg/L và Kinetin 0,2 mg/L phù hợp để nhân chồi, đạt 4,67 chồi/mẫu. Môi trường MS $\frac{1}{2}$ bổ sung NAA 0,5 mg/L thích hợp tạo rễ và tạo cây *in vitro* hoàn chỉnh, chiều cao chồi đạt 12,05 cm và số rễ 14,56 rễ/mẫu. Cây tam thất nam *in vitro* được đem trồng ngoài vườn ươm với tỷ lệ sống 100%.

1. Đặt Vấn Đề

Cây tam thất nam (*Kaempferia rotunda* L.) không chỉ nổi bật với những cánh hoa màu tím nở vào mùa xuân mà còn có những dược tính quý như điều trị bệnh quai bị, ức chế khối u (Mohanty & ctv, 2008). Củ tam thất nam có vị cay nồng, đắng, hơi hăng, mùi thơm mạnh, tính bình. Củ và lá non đều ăn được. Ở Java, lá non và củ được dùng làm gia vị. Người ta dùng củ để làm thuốc chữa đau bụng, hành kinh loạn kì, đau dạ dày, đại tiện ra máu, lở loét... Ở Ấn Độ, người ta dùng lá làm thuốc đắp vào vết thương. Củ dùng làm thuốc lợi cho hệ tiêu hóa, dùng đắp tiêu sưng, trị bệnh quai bị. Do củ thơm nên còn được dùng làm mỹ phẩm. Bên cạnh những giá trị không gì có thể thay thế được trong việc bảo vệ sức khỏe con người, tam thất nam có giá thành rất cao,

mang lại lợi ích kinh tế to lớn cho người nông dân.

Mặt khác, tiến trình phát triển của công nghệ sinh học thực vật trong bốn thập niên qua đã đạt nhiều thành tựu nổi bật. Kỹ thuật nuôi cấy *in vitro* đã được phát triển và ứng dụng trong quá trình vi nhân giống các loài thực vật nói chung và dược liệu nói riêng.

Hiện nay nhu cầu làm thuốc và làm cây cảnh của cây tam thất nam ngày càng tăng, nên việc tìm hiểu và nghiên cứu để bảo tồn và phát triển loài cây này thật sự cấp thiết. Cây phân bố nhiều ở các khu vực châu Á, ở Việt Nam được trồng nhiều ở các tỉnh phía bắc. Nghiên cứu thực hiện xây dựng quy trình nhân giống *in vitro* và khảo sát thành phần hóa học thực vật từ củ tam thất nam (*Kaempferia rotunda* L.) nhằm mục đích tạo ra nguồn cây con đồng nhất làm cây giống đồng thời

tạo nguồn cây *in vitro* phong phú dùng làm nguồn vật liệu cho những nghiên cứu sau này.

2. Vật Liệu và Phương Pháp Nghiên Cứu

2.1. Vật liệu

Mẫu củ tam thất nam 1 năm tuổi được phân tích thành phần hoạt chất. Củ được trồng tại vườn thực nghiệm, Trường Đại học Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh được lựa chọn để tạo nguồn vật liệu ban đầu.

Môi trường nuôi cấy: Môi trường khoáng cơ bản MS (Murashige & Skoog, 1962) có bổ sung đường saccharose 30 g/L, agar 8 g/L và chất điều hòa sinh trưởng tùy theo các nghiệm thức thí nghiệm, pH môi trường được điều chỉnh về 5,8 trước khi hấp khử trùng.

2.2. Phương pháp

2.2.1. Ly trích và phân tích thành phần hóa học từ tinh dầu củ tam thất nam

Ly trích tinh dầu: Tinh dầu tam thất nam được ly trích bằng phương pháp tẩm trích với dung môi petroleum - ether Củ tam thất nam khô được nghiền thành bột mịn. Cân 5 g nguyên liệu khô cho vào 100 mL petroleum ether, ủ trong 15 giờ. Sau đó lọc bỏ cặn, cô quay dưới áp suất thấp và thu được tinh dầu củ tam thất nam.

2.2.2. Phương pháp sắc ký khí GC

Tinh dầu tam thất nam được xác định thành phần hóa học bằng phương pháp sắc ký GC-MS.

Điều kiện trên GC/MS: Cột ZB-5 MS: 30 m × 0,25 mm × 0,25 μm, chương trình nhiệt: 90°C (giữ trong 1 phút), tăng 10°C/phút đến 180°C (giữ trong 1 phút), thời gian phân tích 11 phút. Inlet 240°C, tỉ lệ chia dòng 1:20. Khí mang là He, tốc độ dòng 1,4 mL/phút. Thể tích mẫu bơm 1 μL. Nhiệt độ buồng bơm mẫu 230°C (Sereena & ctv., 2011).

2.2.3. Phương pháp chuẩn bị mẫu chồi tam thất nam

Mẫu củ tam thất nam mang chồi non đã rửa sạch bùn đất. Loại bỏ một phần vỏ bên ngoài. Cho mẫu vừa cắt vào erlen và lắc với xà phòng đã được pha loãng trong 10 phút, rửa sạch xà phòng dưới vòi nước chảy. Lắc mẫu với dung dịch Sodium Hypochlorite 10% trong 10 phút, rửa lại

bằng nước cất. Lau mẫu bằng cồn 96°, cho mẫu vào bình tam giác. Đưa mẫu vào tủ cấy vô trùng, chuyển mẫu vào erlen có chứa cồn 70% lắc đều mẫu trong 1 phút, rửa lại 3 lần bằng nước cất vô trùng. Lắc mẫu với dung dịch vitamin C trong 20 phút, rửa bằng nước cất 3 lần. Lắc mẫu với dung dịch HgCl₂ 0,1% trong 4 phút, rửa mẫu bằng nước cất 5 lần. Lắc mẫu trong kháng sinh 20 phút, rửa bằng nước cất 3 lần. Cấy mẫu trên môi trường MS và theo dõi trong 4 tuần.

Mẫu sạch thu được sau 4 tuần nuôi cấy sẽ được sử dụng làm nguồn vật liệu ban đầu cho các thí nghiệm.

Điều kiện nuôi cấy: Nhiệt độ phòng sáng là 26 ± 2°C, ẩm độ tương đối phòng là 60 ± 5%, thời gian chiếu sáng là 16 giờ/ngày, cường độ ánh sáng là 2000 lux.

2.2.4. Nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ Benzyl adenine (BA) và Kinetin lên sự nhân chồi cây tam thất nam *in vitro*

Mẫu thí nghiệm là các chồi *in vitro* tái sinh trên môi trường tạo vật liệu sạch khởi đầu. Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 8 nghiệm thức, 3 lần lặp lại, mỗi lần lặp lại cấy 9 mẫu. Nghiệm thức đối chứng không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng, các nghiệm thức còn lại có bổ sung (0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5 mg/L) BA và 0,2 mg/L Kinetin. Theo dõi các chỉ tiêu sau 30 ngày: Chiều cao chồi (cm), số chồi (chồi/mẫu).

2.2.5. Nghiên cứu ảnh hưởng của Naphthalene acetic acid (NAA) lên khả năng tạo rễ của chồi tam thất nam *in vitro*

Thí nghiệm bố trí theo kiểu một yếu tố hoàn toàn ngẫu nhiên với 6 nghiệm thức, 3 lần lặp lại, mỗi lần lặp lại cấy 5 mẫu. Nghiệm thức đối chứng không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng, các nghiệm thức còn lại có bổ sung (0,1; 0,3; 0,5; 0,7; 1 mg/L) NAA. Thí nghiệm sử dụng các chồi tam thất nam *in vitro* đồng đều có chiều cao từ 2,5 - 3,5 cm Các chồi này được nuôi cấy trên môi trường MS 1/2. Theo dõi các chỉ tiêu sau 30 ngày: Chiều cao chồi (cm), số rễ (rễ/mẫu), chiều dài rễ (cm), số lá (lá).

2.2.6. Thuần hóa và trồng cây tam thất nam *in vitro*

Khảo sát khả năng thích ứng của cây tam thất nam *in vitro* với điều kiện ngoài vườn ươm. Theo dõi chỉ tiêu sau 4 tháng: tỉ lệ cây sống (%) và

quan sát hình thái của cây con ngoài vườn ươm.

3. Kết Quả và Thảo Luận

3.1. Kết quả phân tích và đánh giá thành phần hóa học từ tinh dầu củ tam thất nam

Để xác định chất lượng củ dùng trong dược liệu, nhằm tiến đến xây dựng quy trình nhân giống *in vitro*. Tinh dầu củ tam thất nam được xác định thành phần bằng phương pháp GC-MS (Bảng 1). Tinh dầu được thu bằng cách ly trích qua dung môi petroleum-ether, sau đó bơm vào hệ thống GC-MS.

Bảng 1. Thành phần các hợp chất được phân tích bằng hệ thống GC-MS từ tinh dầu củ tam thất nam *Kaempferia rotunda* L.

Số thứ tự	Tên chất phân tích	Tỷ lệ hàm lượng (%)
1	Tricylene	0,80
2	Alpha - pinene	4,48
3	Camphene	20,85
4	β - pinene	1,32
5	β - mycrene	0,87
6	limonen	0,81
7	Eucalyptol	1,01
8	α - copaene	0,40
9	Pentadecane	15,47
10	Camphor	10,15
11	α - terpinolene	1,60
12	Bornyl acetate	5,65
13	Epizonaren	0,86
14	α - selinene	2,32
15	α - gurjunene	0,54
16	Salicylal	0,50
17	Gamma-curcumene	3,22
18	Germacrene-D	0,39
19	Heptadecane	3,80
20	β - selinene	0,62
21	β - bisabolene	0,54
22	α - cedrene	3,64
23	α - amorphene	4,92
24	α - curcumene	2,68
25	Benzyl benzoate	7,56

Thành phần hóa học của củ tam thất nam ở Indonesia được phân tích bằng hệ thống GC-MS bao gồm các hợp chất chính là benzyl benzoate (69,7%; 20,2%), n-pentadecane (22,9%;53,8%) và camphene (1,0%; 6,2%). Ở Ấn Độ, thành phần

hóa học chủ yếu trong tinh dầu củ tam thất nam được phân tích bằng GC-MS gồm có n-dodecane (33,1%), stearaldehyde (37,9%), kaurenol (12,6%), bornyl-acetate (30,12%), benzyl benzoate (16,6%) và camphene (7,55%), camphor (7,18%), bomeol (5,93%), 1,8-cineole (4,25%), borneol (5,93%) (Sereena & ctv., 2011). Vì điều kiện thổ nhưỡng và khí hậu, môi trường sống khác nhau theo từng quốc gia nên dẫn đến thành phần hoá học trong củ tam thất nam khác nhau. Củ tam thất nam đạt chất lượng vật liệu khởi đầu.

3.2. Thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của BA và kinetin lên sự nhân chồi cây tam thất nam *in vitro*

Thí nghiệm sử dụng BA kết hợp với kinetin để kích thích quá trình phân chia tế bào và phát sinh chồi tam thất nam và sau 30 ngày nuôi cấy kết quả thu được như ở Bảng 2. Theo Theo Nigar and Mohammad (2012), khi bổ sung chất điều hòa sinh trưởng thực vật BA vào môi trường nuôi cấy thì BA có khả năng kích thích tạo nhiều chồi nhưng lại không có khả năng kích thích kéo dài chồi, BA có tác dụng phá vỡ miền trạng của chồi ngọn và kích thích sự hoạt động của các chồi bên. Ngược lại, kinetin mặc dù cho sự tăng sinh chồi ít hơn nhưng lại kích thích chồi phát triển mạnh hơn. Do đó, thí nghiệm được tiến hành bằng cách kết hợp giữa hai chất điều hòa sinh trưởng thực vật BA và kinetin.

Từ kết quả Bảng 2 thấy tất cả các nghiệm thức với dãy nồng độ phối hợp khác nhau thì đều có sự thay đổi rõ rệt số lượng chồi và chiều cao chồi so với đối chứng. Số lượng chồi tăng dần khi kết hợp nồng độ kinetin 0,2 mg/L với các mức nồng độ từ 0,5 mg/L đến 2 mg/L BA. Số lượng chồi và chiều cao chồi đạt giá trị lớn nhất ở mức nồng độ BA 2 mg/L kết hợp với kinetin 0,2 mg/L (Số chồi gấp 3,24 lần và chiều cao chồi gấp 1,59 lần so với đối chứng). Sau đó số lượng chồi giảm dần khi nồng độ BA đạt từ 2,5 mg/L đến 3,5 mg/L. Điều này cũng cho thấy rằng ở nồng độ BA cao gây ức chế sự phát sinh chồi đồng thời làm giảm khả năng tăng chiều cao của chồi tam thất nam *in vitro*. Kết quả này tương tự như nghiên cứu của Greetha & ctv. (1997), môi trường MS bổ sung kinetin 0,5 mg/L và BA 0,5 mg/L cho tỷ lệ nhân chồi 5 (chồi/mẫu). Môi trường MS bổ sung kinetin 0,5 mg/L và BA 1,0 mg/L cho tỷ lệ nhân chồi thấp hơn khoảng 3 (chồi/mẫu). Chồi trong nghiệm thức D4 được trình bày qua Hình 1.

Bảng 2. Ảnh hưởng của Benzyl adenine (BA) và Kinetin lên sự nhân chồi tam thất nam *in vitro*

Nghiệm thức	Nồng độ Kinetin (mg/L)	Nồng độ BA (mg/L)	Số lượng chồi/mẫu	Chiều cao chồi (cm)
D 0	0	0	1,44 ^d ± 0,11	1,84 ^b ± 0,23
D 1	0,2	0,5	2,11 ^{cd} ± 0,40	1,90 ^b ± 0,42
D 2	0,2	1	2,70 ^{bc} ± 1,05	1,75 ^b ± 0,45
D 3	0,2	1,5	3,40 ^{ab} ± 0,56	2,03 ^b ± 0,06
D 4	0,2	2	4,67 ^a ± 0,11	2,92 ^a ± 0,44
D 5	0,2	2,5	3,15 ^{bc} ± 0,39	1,99 ^b ± 0,31
D 6	0,2	3	2,52 ^{bcd} ± 0,17	1,61 ^b ± 0,22
D 7	0,2	3,5	2,04 ^{cd} ± 0,23	1,83 ^b ± 0,21
	CV		17,40%	16,16%

Các số trung bình trong cột với các mẫu tự khác nhau thì khác biệt nhau, sự khác biệt có ý nghĩa ở mức $P \leq 0,05$.

Bảng 3. Ảnh hưởng của Naphthalene acetic acid (NAA) lên khả năng tạo rễ của chồi tam thất nam *in vitro*

Nghiệm thức	Nồng độ NAA (mg/L)	Chiều cao trung bình cây (cm)	Số rễ trung bình/cây
B 0	0	10,43 ^{ab} ± 2,03	6,83 ^b ± 1,48
B 1	0,1	11,70 ^a ± 1,39	10,45 ^{ab} ± 2,04
B 2	0,3	10,69 ^a ± 1,75	12,56 ^{ab} ± 3,44
B 3	0,5	12,05 ^a ± 0,73	14,56 ^a ± 1,18
B 4	0,7	11,51 ^a ± 0,88	11,00 ^{ab} ± 1,67
B 5	1,0	8,16 ^b ± 0,38	9,17 ^b ± 0,76
	CV	13,64%	18,31%

Các số trung bình trong cột với các mẫu tự khác nhau thì khác biệt nhau, sự khác biệt có ý nghĩa ở mức $P \leq 0,05$.

**Hình 1.** Chồi tam thất nam *Kaempferia rotunda* L. *in vitro* sau 4 tuần nuôi cấy (nghiệm thức D4).

3.3. Nghiên cứu ảnh hưởng của NAA lên khả năng tạo rễ của chồi tam thất nam *in vitro*

Từ kết quả thí nghiệm nhân chồi, chọn những mẫu chồi non tốt nhất, cao từ 2,5 - 3,5 cm cấy vào các môi trường tạo rễ. Khảo sát và thu được kết quả sau 4 tuần nuôi cấy như ở Bảng 3.

Trong quy trình nhân giống *in vitro* hoàn chỉnh

thì tạo rễ là bước quan trọng cuối cùng trước khi đưa cây con ra vườn ươm. Có rất nhiều loại Auxin được sử dụng cho giai đoạn tạo rễ trong đó NAA là chất điều hòa sinh trưởng thực vật được dùng nhiều nhất và có hoạt tính mạnh. Một số nghiên cứu cũng chỉ ra rằng trong môi trường có bổ sung NAA với nồng độ 1 mg/L cho kết quả tạo rễ tối ưu nhất (Abdulmalik & ctv., 2012; Jiraporn & ctv., 2013).

Trong nghiên cứu này, kết quả thu được từ Bảng 3 cho thấy, số lượng rễ phụ thuộc vào nồng độ NAA bổ sung vào môi trường nuôi cấy. Ở nghiệm thức đối chứng, mẫu chồi vẫn tạo rễ, tuy nhiên số lượng rễ tạo ra thấp (6,83 rễ/mẫu). Khi tăng nồng độ NAA từ 0,1 đến 0,5 mg/L thì số lượng rễ/mẫu cũng tăng dần lên và số lượng rễ đạt cao nhất ở nồng độ NAA 0,5 mg/L với 14,56 rễ/mẫu, chiều cao đạt 12,05 cm/mẫu, cây phát triển khỏe mạnh; Tuy nhiên nếu tiếp tục tăng nồng độ NAA lên 1 mg/L thì số lượng rễ giảm (9,17 rễ/mẫu), đồng thời cây phát triển kém, thấp hơn so với các nghiệm thức khác. Điều này được giải thích do auxin không những kích thích sự

tăng trưởng của chồi non mà còn khởi phát cho sự tạo mới chồi. Ở nồng độ thấp thì auxin khởi phát mô phân sinh ngọn, nồng độ auxin cao vượt ngưỡng làm ngăn cản sự phát triển của lá hay mô phân sinh bên (Taiz & Zeiger, 2002), do đó mà chiều cao cây giảm dần khi nồng độ NAA tăng. Do đó, nồng độ NAA 0,5 mg/L được chọn là phù hợp cho quá trình hình thành rễ cây tam thất nam *in vitro* hoàn chỉnh.

Kết quả nghiên cứu của Greetha & ctv. (1997) chỉ ra rằng, môi trường cơ bản MS được sử dụng để nuôi cấy loài cây này. Môi trường MS có bổ sung 0,5 mg/L kinetin và 1,5% sucrose, 0,7% agar cũng được sử dụng để nuôi cấy. Chồi và rễ phát triển tốt ở môi trường MS bổ sung với 0,5 mg/L NAA và 1,0 mg/L BA, số rễ tạo ra trên môi trường này là 5 (rễ/cây). Sau đó, cây đã được chuyển ra vườn ươm với tỷ lệ sống cao khoảng 95%.

Kết hợp kết quả các yếu tố số lượng rễ, chiều cao thân và số lá, nhận thấy môi trường MS 1/2 bổ sung 0,5 mg/L NAA phù hợp cho việc tạo bộ rễ cây tam thất nam *in vitro* hoàn chỉnh trước khi đưa ra ngoài vườn ươm (Hình 2).

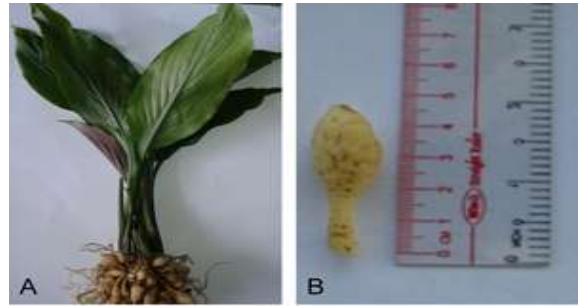


Hình 2. Cây tam thất nam *Kaempferia rotunda* L. *in vitro* hoàn chỉnh trong thí nghiệm tạo rễ.

3.4. Thuần hóa và trồng cây tam thất nam ngoài vườn ươm

Cây tam thất nam *in vitro* sau thí nghiệm tạo rễ được đem ra trồng thử nghiệm ngoài vườn ươm để theo dõi tỷ lệ sống và sức sống và quan sát hình thái cây. Thử nghiệm được tiến hành trên giá thể đất sét pha cát. Cây có tỷ lệ sống cao (100%). Cây phát triển đồng đều, có sự nảy chồi và tạo được củ (Hình 3).

Cây tam thất nam là cây thân thảo, rễ chùm có nhiều rễ con hình sợi ngắn, củ có hình trứng không đều, màu nâu vàng, nhẵn nhều, có khi còn



Hình 3. Cây (hình A) và củ (hình B) tam thất nam 2 năm tuổi phát triển từ cây nuôi cấy *in vitro*.

sốt lại rễ con hoặc vết tích của rễ con, mặt cắt ngang gần tròn màu trắng ngà, đường kính 1 - 2 cm, có mùi thơm đặc trưng và vị cay.

4. Kết Luận

Thành phần hóa học từ tinh dầu của củ tam thất nam được phân tích bằng GC-MS. Kết quả thu được 25 chất có nhiều công dụng trong y học và công nghiệp nước hoa, mỹ phẩm, thực phẩm và nông nghiệp, cần thiết nhân nhanh số lượng lớn giống *in vitro*. Cây tam thất nam (*Kaempferia rotunda* L.) được nghiên cứu hoàn thiện quy trình nuôi cấy *in vitro*, từ giai đoạn khử trùng tạo vật liệu ban đầu, đến cây hoàn chỉnh và trồng ra đất. Môi trường MS bổ sung BA 2 mg/L và Kinetin 0,2 mg/L phù hợp để nhân chồi. Môi trường MS $\frac{1}{2}$ bổ sung NAA 0,5 mg/L thích hợp tạo rễ và tạo cây *in vitro* hoàn chỉnh. Cây tam thất nam *in vitro* được đem trồng ngoài vườn ươm với tỷ lệ sống 100% và tạo được củ.

Lời Cam Đoan

Chúng tôi cam đoan bài báo do nhóm tác giả thực hiện và không có bất kỳ mâu thuẫn nào giữa các tác giả.

Tài Liệu Tham Khảo (References)

- Abdulmalik, M. M., Usman, I. S., Olarewaju, J. D., & Aba, D.A. (2012). Effect of Naphthalene Acetic Acid (NAA) on *in vitro* rooting of regenerated microshoots of groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *Bayero Journal of Pure and Applied Sciences* 5(2), 128 – 131.
- Greetha, S. P., Manjunla, C., John C. Z., Mino D., Babu, K. L., & Ravindran, P. N. (1997). Micropropagation of *Kaempferia* spp. *Journal of Spices and Aromatic Crops* 6(2), 129-135.

- Jiraporn, P., Srisulak, D., Araya, J., & Sunanta, W. (2013). Effects of BA and NAA on micropropagation and stemona alkaloids production of *Stemona curtisii* Hook.f. *Chiang Mai Journal of Science* 40(3), 356-363.
- Mohanty, J. P., Nath, L. K., Bhuyan, N., & Mariappan, G. (2008). Evaluation of Antioxidant Potential of *Kaempferia rotunda* Linn. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences* 70, 362 – 364.
- Murashige, T., & Skoog, H. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Plant Physiology* 15, 473-497.
- Nigar, F., & Mohammad, A., 2012. Role of growth regulators on *in vitro* regeneration and histological analysis in Indian ginseng (*Withania somnifera* L.) Dunal. *Physiology and Molecular Biology of Plants* 18(1), 59–67. <https://dx.doi.org/10.1007/s12298-011-0099-x>.
- Sereena, K., Kumar, U. P., & Shree, A. B. R. (2011). Histochemical and phytochemical markers for the authentication of ayurvedic raw drug hallakam (*Kaempferia rotunda*) and its marketed adulterant. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* 36, 2952-2958. [https://dx.doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.2\(11\).2952-58](https://dx.doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.2(11).2952-58).
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2002). *Plant Physiology I* (3rd ed.). Massachusetts, USA: Sinauer Associates.