

NHÂN GIỐNG CÂY GỪNG ĐEN (*DISTICHOCHLAMYS ORLOWII* K.LARSEN & M.F.NEWMAN) BẰNG PHƯƠNG PHÁP LÁT CẮT MỎNG

Trần Thị Hà Trang¹, Nguyễn Thị Luyện¹, Trần Thị Thịnh², Trần Ngọc Thảo¹, Nguyễn Văn Tịnh¹

Ngày nhận bài: 16/06/2026; Ngày phản biện thông qua: 21/07/2026; Ngày duyệt đăng: 07/08/2026

TÓM TẮT

Gừng đen (*Distichochlamys orlowii* K.Larsen & M.F.Newman) là loài dược liệu đặc hữu quý hiếm của Việt Nam có nhiều hoạt tính sinh học tiềm năng như kháng viêm, chống oxy hóa và ngăn ngừa ung thư. Nghiên cứu này ứng dụng kỹ thuật lát cắt mỏng (Thin Cell Layer - TCL) nhằm xây dựng quy trình nhân giống *in vitro* hiệu quả. Kết quả định danh bằng mã vạch DNA sử dụng trình tự gen *MatK* kết hợp với đặc điểm hình thái đã khẳng định mẫu nghiên cứu thuộc loài *D. orlowii*. Lát cắt mỏng từ đốt thân (0,5 mm) cho khả năng tạo callus tối ưu (100%) trên môi trường Murashige and Skoog (MS) bổ sung 1,0 mg/L 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) và 0,7 mg/L Benzyladenine (BA). Callus tái sinh chồi hiệu quả nhất (95%) trên môi trường MS chứa 1,5 mg/L BA và 0,5 mg/L (Kinetin) Kn. Hệ số nhân cụm chồi cao nhất (10,0 chồi/cụm) đạt được khi bổ sung thêm 0,5 mg/L Naphthalene axit axetic (NAA) vào môi trường tái sinh sau 28 ngày nuôi cấy. Chồi tạo rễ hoàn chỉnh (100%) trên môi trường MS có 1,0 mg/L NAA. Cây con sau nuôi cấy thích nghi tốt trên giá thể hỗn hợp (đất : tro trấu : xơ dừa = 1:1:1v/v), đạt tỷ lệ sống 85%. Kết quả nghiên cứu đã thiết lập thành công quy trình nhân giống *in vitro* thông qua kỹ thuật lát cắt mỏng tế bào theo chiều ngang (tTCL), tạo cơ sở cho việc bảo tồn và phát triển nguồn dược liệu quý *D. orlowii*.

Từ khóa: *D. orlowii*, Gừng đen, Lát cắt mỏng, *MatK*, Nhân giống *in vitro*.

1. MỞ ĐẦU

Tây Nguyên là khu vực có tính đa dạng sinh học cao, đặc biệt là nguồn tài nguyên cây dược liệu với hơn 1.713 loài đã được ghi nhận (Nguyễn Văn Sinh, 2021). Trong số đó, các loài thuộc họ Gừng (Zingiberaceae) đóng vai trò quan trọng trong y học cổ truyền và công nghiệp dược phẩm.

Chi Gừng đen (*Distichochlamys* M.F.Newman) là một chi thực vật đặc hữu của Việt Nam, được mô tả lần đầu tiên vào năm 1995 và bổ sung vào năm 2001 (Newman, 1995; Larsen, 2001). Hiện nay, chi này bao gồm 4 loài chính: *Distichochlamys citrea* M.F.Newman, *Distichochlamys orlowii* K.Larsen & M.F.Newman, *Distichochlamys rubrostriata* W.J.Kress & Rehse và *Distichochlamys benenica* Q.B. Nguyen & Škorničk. Về mặt di truyền, chi *Distichochlamys* được xác định có mối quan hệ gần gũi với chi *Scaphochlamys* và *Boesenbergia*. Loài Gừng đen Orlow (*D. orlowii*) hay còn gọi là gừng đen lá tím, lần đầu tiên được phát hiện tại An Khê, Gia Lai vào năm 2001 (Larsen, 2001). Đây là cây thân rễ nhỏ (8-10 mm), có đặc điểm hình thái đặc trưng với lá vẩy màu đỏ, bẹ lá mỏng màu đỏ nhạt và phiến lá hình trái xoan rộng có gân lông chim nổi rõ. Về thành phần hóa học, trong tinh dầu của *D. orlowii* chứa hàm lượng cao các hợp chất dễ bay hơi quý giá như geranyl acetate (16,5%), beta-elemene (9,2%), beta-pinene (9,0%) và beta-caryophyllene (7,9%) (Chau et al., 2017). Các nghiên cứu dược lý hiện đại đã chứng minh các hoạt chất này có khả năng kháng viêm, chống dị ứng, kháng nấm và đặc biệt là hoạt tính chống ung thư trên các dòng tế bào người (Nishida et al., 2005; Legault and Pichette,

2007; Zhan et al., 2012; Juergens, 2014).

Mặc dù có giá trị dược liệu cao, nhưng trong tự nhiên, loài gừng này có phạm vi phân bố hạn chế (chủ yếu ở Gia Lai, Quảng Nam và Nghệ An), hệ số nhân giống thấp và đang đứng trước nguy cơ tuyệt chủng do khai thác quá mức. Sự gia tăng về nhu cầu tiêu thụ các sản phẩm dược liệu tự nhiên và thực phẩm chức năng từ nguồn nguyên liệu này trên thị trường hiện nay càng làm trầm trọng thêm áp lực lên quần thể tự nhiên, đặt ra yêu cầu cấp thiết về một quy trình nhân giống quy mô lớn nhằm đáp ứng chuỗi cung ứng thương mại. Những năm gần đây, một số nghiên cứu nuôi cấy mô về loài *D. orlowii* đã bắt đầu được công bố. Nguyễn Văn Tịnh và cộng sự (2023), lần đầu tiên công bố quy trình nhân giống *in vitro* loài này từ đốt thân. Nghiên cứu xác định môi trường MS bổ sung 1,5 mg/L BA và 0,5 mg/L Kn tối ưu cho tái sinh chồi; khi bổ sung thêm 0,5 mg/L NAA sẽ giúp tăng sinh cụm chồi hiệu quả (2,87 chồi/mẫu). Cây con ra rễ tốt nhất trong môi trường có 1,0 mg/L NAA và đạt tỷ lệ sống 98,33% khi được huấn luyện trên giá thể đất, tro trấu, mùn cưa. Trương Hồng Ngọc và cộng sự (2023) sử dụng mẫu đỉnh chồi từ cây giâm hom 3 tháng tuổi (nguồn gốc Vườn quốc gia Bạch Mã). Kết quả cho thấy nồng độ 1,5 mg/L BA tối ưu cho tái sinh (2,46 chồi/mẫu) và việc bổ sung 40 g/L khoai tây nghiền giúp tăng hệ số nhân lên 5,56 chồi/mẫu sau 8 tuần. Chồi ra rễ đạt 100% khi sử dụng 0,5 mg/L IBA.

Tuy nhiên, các phương pháp nhân giống truyền thống vẫn còn hạn chế về hệ số nhân. Kỹ thuật lát cắt mỏng với khả năng cô lập các lớp tế bào đích có tiềm năng tái sinh cao đã được chứng minh hiệu quả

¹Trường Đại học Y dược Buôn Ma Thuột;

²Trường THPT Chi Lăng;

Tác giả liên hệ: Nguyễn Văn Tịnh; Email: nvting@bmu.edu.vn.

trên nhiều đối tượng dược liệu (Lê Hùng Lĩnh và cộng sự, 2017). Nhờ việc giảm kích thước mẫu cây, kỹ thuật này tối đa hóa diện tích tiếp xúc của các lớp tế bào đích với môi trường dinh dưỡng và chất điều hòa sinh trưởng thực vật (CDHSTTV), từ đó kích thích quá trình phân chia và biệt hóa đồng đều hơn so với các phương pháp sử dụng đốt thân hay đỉnh chồi truyền thống (Trần Nguyên Chất và cộng sự, 2017). Nghiên cứu này được thực hiện nhằm ứng dụng kỹ thuật tTCL để xây dựng quy trình nhân nhanh cây *D. orlowii* với hệ số nhân vượt trội, góp phần vào chiến lược bảo tồn và phát triển bền vững nguồn dược liệu đặc hữu này.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Vật liệu nghiên cứu là cây Gừng đen (*Distichochlamys orlowii* K.Larsen & M.F.Newman) *in vitro* khỏe mạnh, có đầy đủ thân, rễ, lá, chiều cao trung bình từ 4-5 cm. Nguồn mẫu này được cung cấp bởi Viện Nghiên cứu Y sinh ứng dụng, Trường Đại học Y Dược Buôn Ma Thuột, có nguồn gốc từ Vườn quốc gia Kon Ka Kinh, tỉnh Gia Lai. Dòng cây *in vitro* này đã được lưu giữ, ổn định di truyền và duy trì sinh trưởng qua 3 lần cấy chuyển (mỗi chu kỳ cấy chuyển kéo dài 45 ngày) trước khi sử dụng làm nguyên liệu cho các thí nghiệm tiếp theo.

2.2. Phương pháp định danh mẫu thực vật bằng chỉ thị phân tử

- Tách chiết DNA: DNA tổng số được tách chiết từ mẫu lá tươi bằng phương pháp CTAB cải tiến của Doyle và Doyle (1987). Mẫu được nghiền trong nitor lỏng, xử lý với dung dịch CTAB nồng độ gấp 2 lần (CTAB 2% w/v), beta-mercaptoethanol và ủ ở 65°C trong 60 phút. Protein và tạp chất được loại bỏ bằng chloroform, DNA được kết tủa bằng isopropanol lạnh, rửa bằng ethanol 70% và hòa tan trong dung dịch TE (pH 8.0).

- Phản ứng PCR: Sử dụng cặp mồi đặc hiệu cho vùng gen lục lạp *MatK*: mồi xuôi (5'-ATGTCACGTCGAGGTACTGC-3') và mồi ngược (5'-AGCTCTATTGCTCTGCCA-3'). Phản ứng PCR có tổng thể tích 15 µl, thực hiện trên máy GeneAmp PCR System 2700 với chu trình nhiệt: 94°C/4 phút; 35 chu kỳ (94°C/60s, 54°C/40s, 72°C/60s); và kết thúc ở 72°C/10 phút.

- Phân tích trình tự: Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1%, tinh sạch và giải trình tự. Kết quả được so sánh trên ngân hàng gen NCBI bằng công cụ BLAST và xây dựng cây phát sinh loài bằng phần mềm MEGA 11.

2.3. Phương pháp nuôi cấy lát cắt mỏng và tạo callus

- Chuẩn bị mẫu cây: Từ cây *in vitro* 4-5 cm, tiến hành cắt ngang các bộ phận: lá, thân (phần giữa), đốt thân (vị trí chuyển tiếp thân - rễ) và rễ thành các lát

cắt mỏng theo chiều ngang có độ dày khoảng 0,5 mm.

- Bố trí thí nghiệm: Các lát cắt được nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung 2,4-D (0,0; 0,5; 1,0 mg/L) kết hợp với BA (0,0; 0,7; 1,5; 2,0 mg/L). Mỗi thí nghiệm thực khảo sát 30 mẫu (10 mẫu/bình, lặp lại 3 lần).

- Chỉ tiêu theo dõi: Thời gian bắt đầu xuất hiện callus, tỷ lệ tạo callus (%), kích thước và đặc điểm hình thái callus sau 6 tuần nuôi cấy.

2.4. Phương pháp tái sinh và nhân nhanh cụm chồi

- Tái sinh chồi: Sử dụng các khối callus rời có kích thước đồng đều (đường kính khoảng 5,0 mm, khối lượng khoảng 100 mg) chất lượng tốt nhất từ đốt thân, cấy chuyển sang môi trường MS bổ sung BA (0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 mg/L) phối hợp với Kn (0,5; 1,0 mg/L).

- Nhân nhanh cụm chồi: Các chồi đơn hoặc cụm chồi nhỏ (chiều cao đạt khoảng 1,5-2,0 cm, có từ 1-2 lá) thu được từ bước tái sinh được chuyển sang môi trường MS chứa nồng độ BA và Kn tối ưu, đồng thời bổ sung thêm NAA ở các nồng độ (0; 0,1; 0,2; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 mg/L) để tăng hệ số nhân.

- Chỉ tiêu theo dõi: Tỷ lệ mẫu tái sinh (%), số chồi/mẫu, chiều cao chồi (mm) và số lá/chồi sau 6 tuần nuôi cấy.

2.5. Phương pháp tạo cây hoàn chỉnh *in vitro* và huấn luyện *ex vitro*

- Tạo rễ (*in vitro*): Chồi khỏe mạnh cao 3-4 cm được cấy vào môi trường MS bổ sung NAA (0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 mg/L). Theo dõi thời gian ra rễ, số rễ/chồi và chiều dài rễ sau 4 tuần.

- Huấn luyện cây con (*ex vitro*): Cây con có bộ rễ hoàn chỉnh được tập nắng (che lưới khoảng 75%) trong 10 ngày. Sau đó, cây được rửa sạch agar và trồng trên các loại giá thể. Giá thể bao gồm: đất thịt pha cát, tro trấu và mụn dừa, được xử lý với thuốc trừ nấm Ridomil Gold 68WG (Metalaxyl M 40 g/kg, Mancozeb 640 g/kg). Các công thức thí nghiệm bao gồm: (1) Đất thịt pha cát; (2) Hỗn hợp Đất : Tro trấu : Xơ dừa (tỷ lệ 1:1:1 v/v); (3) Xơ dừa; (4) Tro trấu. Đánh giá tỷ lệ sống (%) và sinh trưởng sau 4 tuần.

2.6. Môi trường và điều kiện nuôi cấy

Các hóa chất sử dụng trong nghiên cứu nuôi cấy mô thực vật và sinh học phân tử đều thuộc loại tinh khiết được cung cấp bởi các hãng Merck (Đức), Sigma-Aldrich (Mỹ) và Duchefa Biochemie (Hà Lan). Môi trường cơ bản là MS có bổ sung agar (8 g/L), đường sucrose (30 g/L), than hoạt tính (0,5 g/L), pH được điều chỉnh về 5,8 trước khi hấp khử trùng ở 121°C (1,2 atm) trong 20 phút. Điều kiện phòng nuôi: Nhiệt độ 25 ± 2°C, cường độ sáng 2.500 lux, thời gian chiếu sáng 10-12 giờ/ngày, độ ẩm không khí được kiểm soát từ 80-85% thông qua hệ thống phun sương tự động định kỳ 4 lần/ngày (mỗi lần 5 phút). Để đảm bảo tính thống nhất về mặt

phương pháp và thống kê, tất cả các thí nghiệm từ mục 2.3 đến mục 2.5 đều được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên, theo dõi tối thiểu trên 30 mẫu cho mỗi nghiệm thức và lặp lại độc lập 3 lần.

2.7. Xử lý số liệu

Số liệu được thu thập và tính toán giá trị trung bình, độ lệch chuẩn (SD) bằng Microsoft Excel 2016. Các phân tích thống kê được thực hiện bằng phần mềm SPSS 26.0 thông qua phép phân tích phương sai hai nhân tố (Two-way ANOVA). Sự khác biệt giữa các nghiệm thức được xác định bằng kiểm định Duncan ở mức ý nghĩa $P < 0,01$ hoặc $P < 0,05$.

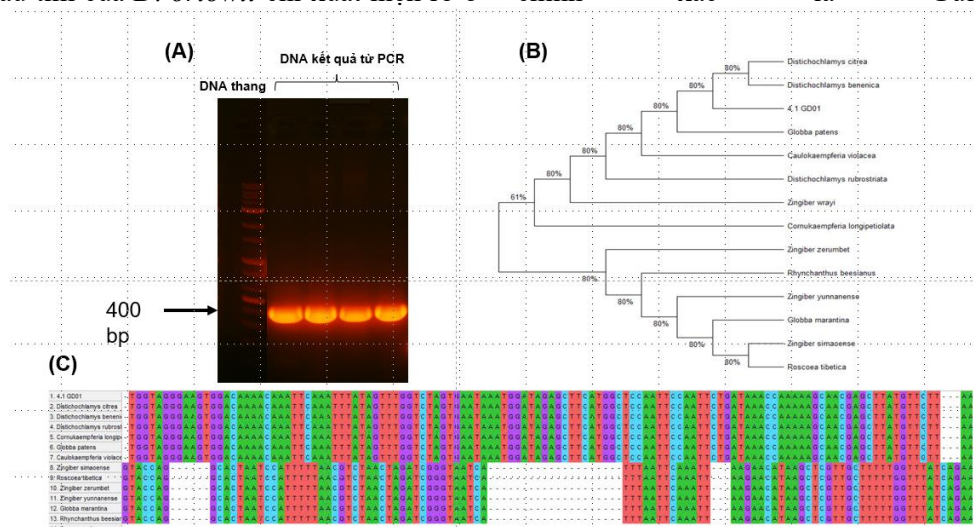
3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả định danh loài Gừng đen bằng phương pháp giải trình tự gen

Việc định danh các loài thuộc chi *Distichochlamys* dựa trên hình thái truyền thống gặp nhiều thách thức do sự tương đồng về cấu trúc lá và hoa giữa các loài, đặc biệt là đặc điểm gân lá nổi và mặt bụng màu tím của *D. orlowii* chỉ xuất hiện rõ ở

giai đoạn trưởng thành. Kết quả điện di sản phẩm PCR với cặp mồi *MatK-F/R* tại nhiệt độ bắt cặp 54°C cho thấy một băng vạch duy nhất có kích thước khoảng 330 bp (Hình 3.1 A).

Kết quả so sánh bằng công cụ BLAST trên NCBI cho thấy trình tự nucleotide của mẫu nghiên cứu (4.1 GD01) đạt độ tương đồng cao nhất (99,15%) với loài *D. orlowii*. Cây phát sinh loài được xây dựng theo phương pháp Neighbor-Joining (Hình 3.1 B) cho thấy mẫu nghiên cứu nằm chung trong một nhánh tiến hóa có quan hệ di truyền rất gần với các loài thuộc chi *Distichochlamys* (*D. rubrostriata*, *D. citrea*, *D. benenica*) và các chi liên đới như *Globba patens*, *Caulokaempferia violacea*; đồng thời phân tách độc lập hoàn toàn với nhóm các loài thuộc chi *Zingiber* (*Zingiber wrayi*, *Zingiber zerumbet*, *Zingiber simaoense*) với độ tin cậy cao. Kết hợp giữa đặc điểm hình thái và kết quả phân tích chỉ thị phân tử lục lập, mẫu nghiên cứu được xác định chính xác là Gừng đen.



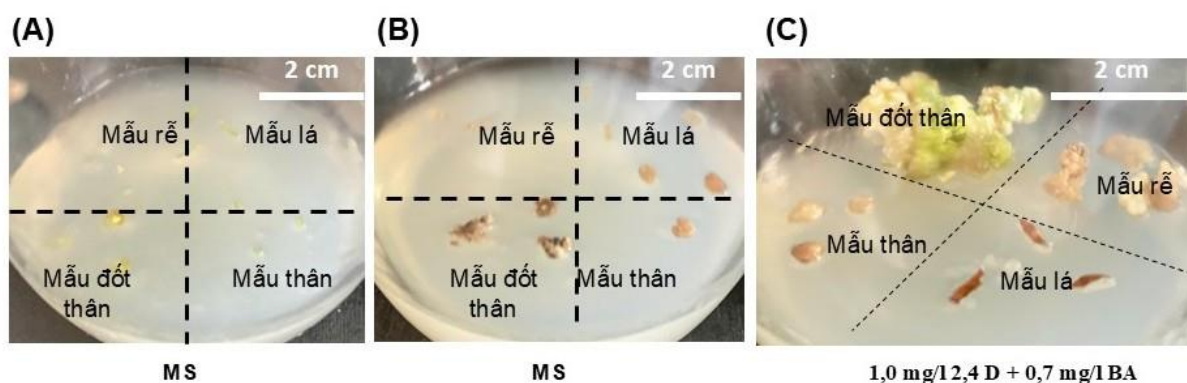
Hình 3.1. Kết quả sinh học phân tử xác định thành phần loài.

Ghi chú: (A) Ảnh điện di sản phẩm PCR nhân đoạn gen *MatK* của mẫu nghiên cứu trên gel agarose 1%, DNA thang chuẩn 2 kbp. (B) Cây phát sinh loài so sánh giữa mẫu nghiên cứu (ký hiệu 4.1 GD01) (*D. orlowii*) với các loài thuộc chi gần. (C) Kết quả Alignment giữa trình tự gen của mẫu nghiên cứu (Ký hiệu 4.1 GD01) với các loài thuộc chi *Distichochlamys* và các loài thuộc chi *Zingiber*.

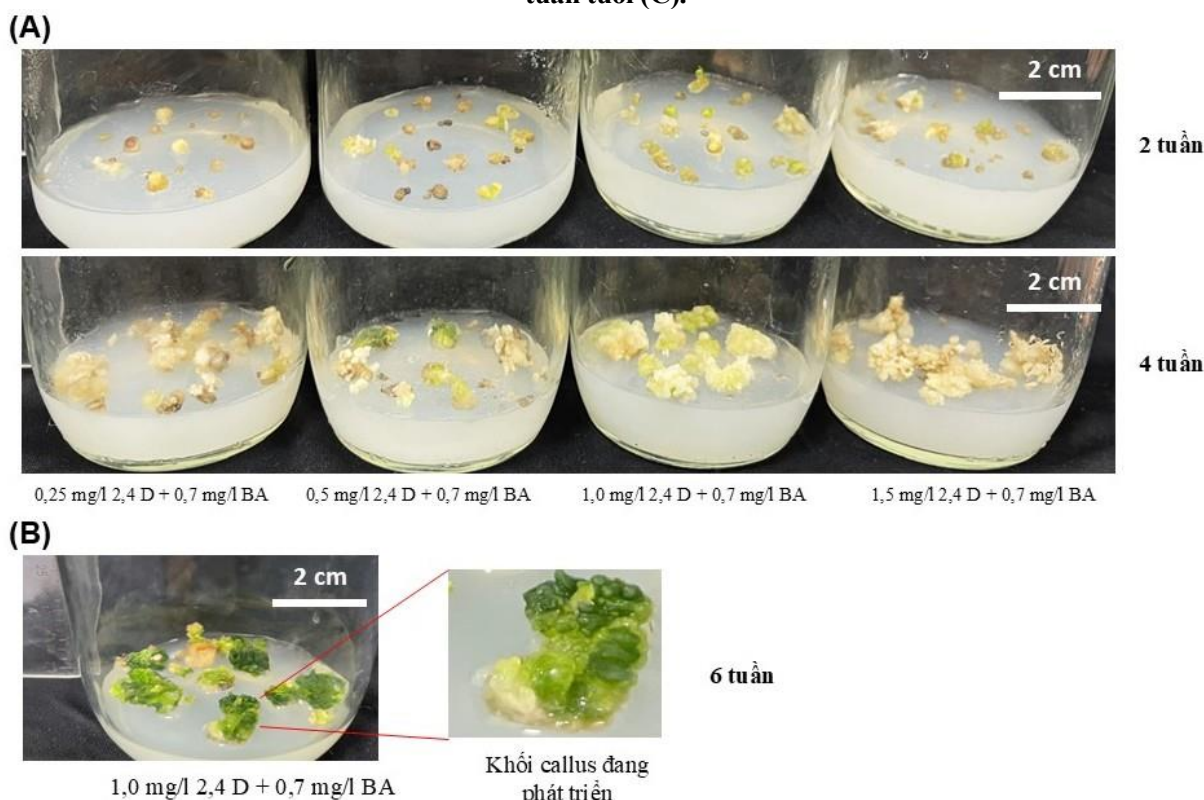
3.2. Ảnh hưởng của vị trí lát cắt và nồng độ CĐHSTTV đến khả năng tạo callus

Quá trình cảm ứng callus là bước khởi đầu then chốt để tái biệt hóa mô. Kết quả khảo sát trên 4 loại mẫu cây (lá, thân, đốt thân, rễ) cho thấy sự khác biệt rõ rệt về tiềm năng tạo callus (Hình 3.2). Mẫu lá và thân hoàn toàn không hình thành callus mà bị hóa nâu và chết mô. Mẫu rễ bắt đầu tạo callus sau 20-26 ngày nhưng tỷ lệ thấp (cao nhất đạt 65%), callus nhỏ, mềm và có màu vàng nâu. Trong khi đó, mẫu đốt thân thể hiện ưu thế vượt trội với tỷ lệ tạo callus đạt 100% trên môi trường MS bổ sung 1,0 mg/L 2,4-D và 0,7 mg/L BA sau 22 ngày nuôi cấy. Callus thu được có cấu trúc cứng chắc, màu xanh đậm và phát

triển mạnh với kích thước đạt $6,0 \pm 0,3$ mm (Hình 3.3). Tế bào tại vị trí đốt thân (vùng chuyển tiếp thân-rễ) có mức độ biệt hóa thấp và khả năng phân chia mạnh hơn so với các mô lá đã biệt hóa hoàn toàn. Sự phối hợp giữa auxin (2,4-D) và cytokinin (BA) đã phá vỡ trạng thái cân bằng hormone nội sinh, thúc đẩy sự tăng sinh mô sẹo chất lượng cao. Kết quả này tương đồng với nghiên cứu của Lê Hùng Lĩnh (2017) trên Sâm Lai Châu và Raomai (2014) trên cây *Paris polyphylla*, cho thấy các mẫu cây gần đỉnh sinh trưởng hoặc vùng mô non có khả năng phân chia mạnh và ít chứa hợp chất ức chế hơn so với các mô đã biệt hóa hoàn toàn.



Hình 3.2. Ảnh hưởng của vị trí lát cắt và nồng độ ĐHSTTV đến sự hình thành callus từ cây *D. orlowii* *in vitro*. Hình thái mẫu từ các vị trí cắt khác nhau trong môi trường MS 0 tuần tuổi (A) và 4 tuần tuổi (B). Hình thái mẫu từ các vị trí cắt khác nhau trong môi trường MS bổ sung 1,0 mg/L 2,4-D và 0,7 mg/L BA 4 tuần tuổi (C).



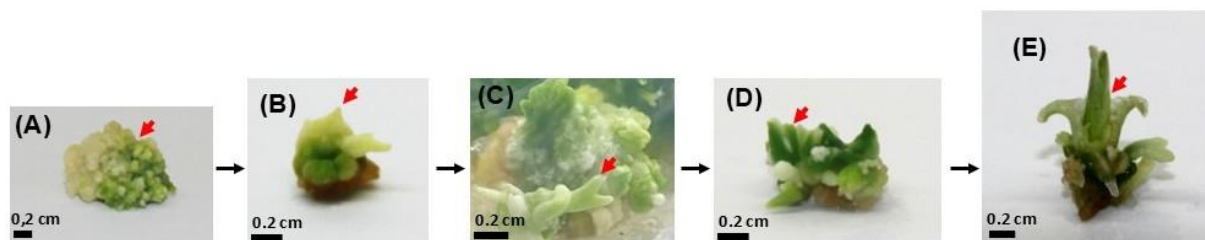
Hình 3.3. Sự khác biệt về hình thái callus trên các môi trường khác nhau theo thời gian (A). Môi trường MS bổ sung 1,0 mg/L 2,4-D và 0,7 mg/L BA cho kết quả tạo callus tốt nhất (B).

3.3. Khả năng tái sinh chồi và nhân nhanh cụm chồi từ callus

3.3.1. Tái sinh chồi từ callus

Quá trình phát sinh hình thái từ mô sẹo được khảo sát qua hai giai đoạn: cảm ứng phôi hóa và tái sinh chồi thực sự. Kết quả giải phẫu cho thấy, khi duy trì callus trên môi trường cảm ứng mô sẹo (MS bổ sung 1,0 mg/L 2,4-D và 0,7 mg/L BA), tế bào bề mặt callus bắt đầu có xu hướng phân hóa và trải qua các giai đoạn phát sinh phôi soma sớm (Hình 3.4). Tuy nhiên, để các phôi này phát triển hoàn chỉnh thành chồi khỏe mạnh và tăng hệ số nhân, cần phải loại bỏ hoàn toàn auxin mạnh (2,4-D) ra khỏi môi trường nhằm giải phóng sự ức chế phân hóa đỉnh

sinh trưởng. Do đó, các khối callus phôi hóa này tiếp tục được cấy chuyển sang môi trường tái sinh chuyên biệt (MS có bổ sung kết hợp cytokinin BA và Kn ở các nồng độ khác nhau) nhằm kích thích tối đa sự phát triển của hệ thống chồi (Bảng 3.2). Khối callus ban đầu chuyển biến từ giai đoạn phôi hình trứng, hình tim, đến hình cá đuôi trước khi bước vào giai đoạn tạo chồi sớm và muộn với sự xuất hiện của các đỉnh sinh trưởng màu xanh lục đậm. Sự kết hợp hài hòa giữa hàm lượng auxin và cytokinin nêu trên đã kích thích hiệu quả sự phân hóa tế bào, tạo tiền đề hình thành hệ thống chồi hoàn chỉnh có khả năng phát triển thành cây con *in vitro* khỏe mạnh (Hình 3.4).



Hình 3.4. Hình thái callus trên các môi trường MS bổ sung 1,0 mg/L 2,4 D + 0,7 mg/L BA ở các giai đoạn sinh trưởng và phát triển khác nhau. (A) Giai đoạn phôi hình cầu. (B) Giai đoạn phôi hình tim. (C) Giai đoạn phôi hình cá đuôi. (D) Giai đoạn tạo chồi sớm. (E) Giai đoạn tạo chồi muộn

Callus cứng, xanh đậm từ đốt thân được sử dụng để khảo sát khả năng tái sinh hình thái. Kết quả cho thấy BA đóng vai trò chủ đạo so với Kn. Môi trường MS bổ sung 1,5 mg/L BA và 0,5 mg/L Kn cho hiệu

quả cao nhất với tỷ lệ tái sinh đạt 95%, hệ số 5,0 chồi/mẫu. Chồi hình thành có đặc điểm mập, khỏe, xanh đậm với chiều cao trung bình 40,0 mm sau 25 ngày (Bảng 3.2).

Bảng 3.1. Ảnh hưởng của nồng độ BA và Kn đến khả năng tái sinh chồi từ callus *D. Orlowii* sau 6 tuần nuôi cấy

BA (mg/L)	Kn (mg/L)	Tỷ lệ tái sinh (%)	Số chồi/mẫu	Chiều cao trung bình chồi (mm)	Thời gian hình thành chồi (ngày)	Số lá/chồi	Hình thái chồi
0,0	0,5	20 ± 2 ^c	1,5 ± 0,1 ^e	15 ± 0,5 ^e	35 ± 0,8 ^e	1 ± 0,2 ^e	Nhỏ, yếu, xanh nhạt
0,0	1,0	25 ± 2 ^c	1,8 ± 0,1 ^e	17 ± 0,5 ^e	34 ± 0,8 ^e	1 ± 0,2 ^e	Nhỏ, yếu, xanh nhạt
0,5	0,5	50 ± 3 ^d	2,5 ± 0,2 ^d	25 ± 0,6 ^d	30 ± 0,7 ^d	2 ± 0,3 ^d	Trung bình, xanh nhạt
0,5	1,0	55 ± 3 ^d	2,8 ± 0,2 ^d	27 ± 0,6 ^d	29 ± 0,6 ^d	2 ± 0,3 ^d	Trung bình, xanh nhạt
1,0	0,5	70 ± 4 ^c	3,5 ± 0,2 ^c	32 ± 0,7 ^c	28 ± 0,6 ^c	3 ± 0,3 ^c	Mập, xanh đậm
1,0	1,0	75 ± 4 ^c	3,8 ± 0,2 ^c	34 ± 0,7 ^c	27 ± 0,6 ^c	3 ± 0,3 ^c	Mập, xanh đậm
1,5	0,5	95 ± 3 ^a	5,0 ± 0,3 ^a	40 ± 0,8 ^a	25 ± 0,5 ^a	3 ± 0,4 ^a	Mập, khỏe, xanh đậm
1,5	1,0	90 ± 3 ^{ab}	4,8 ± 0,3 ^{ab}	38 ± 0,8 ^{ab}	26 ± 0,5 ^{ab}	3 ± 0,4 ^a	Mập, khỏe, xanh đậm
2,0	0,5	85 ± 4 ^b	4,5 ± 0,3 ^b	36 ± 0,7 ^b	27 ± 0,6 ^{bc}	3 ± 0,3 ^b	Mập, xanh đậm, hơi yếu
2,0	1,0	80 ± 4 ^b	4,2 ± 0,3 ^b	35 ± 0,7 ^b	28 ± 0,6 ^{bc}	3 ± 0,3 ^b	Mập, xanh đậm, hơi yếu
P-value		<0,010	<0,01	<0,01	<0,01	<0,05	

Ghi chú: Các giá trị được biểu thị dưới dạng giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn (SD). Các chữ cái (a, b, c, d, e) thể hiện sự khác biệt thống kê theo phân tích Duncan ở mức ý nghĩa $P < 0,01$ và $P < 0,05$

Số liệu từ Bảng 3.2 cho thấy vai trò quyết định của việc phối hợp các chất thuộc nhóm cytokinin đến khả năng tái sinh chồi. Khi nồng độ BA tăng dần từ 0,5 mg/L lên 1,5 mg/L kết hợp với Kn, tỷ lệ tái sinh chồi tăng từ 50% lên đạt đỉnh 95% (ở nghiệm thức MS bổ sung 1,5 mg/L BA và 0,5 mg/L Kn). Sự kết hợp giữa một cytokinin hoạt tính mạnh (BA) kích thích phân chia lớp tế bào ngoại vi và một cytokinin hoạt tính nhẹ hơn (Kn) giúp ổn định sự kéo dài của đốt thân chồi bên đã tạo ra sự đồng vận tối ưu, cho hệ số tái sinh đạt 5,0 chồi/mẫu với chiều cao chồi vượt trội (40,0 mm). Tuy nhiên, khi tăng nồng độ BA lên quá cao (2,0 mg/L), tỷ lệ tái sinh chồi có xu hướng giảm nhẹ (xuống còn 80%-85%)

và xuất hiện hiện tượng chồi bị dị dạng hoặc thủy tinh hóa nhẹ.

3.3.2. Nhân nhanh cụm chồi

Để tối ưu hóa hệ số nhân giống, NAA được bổ sung vào môi trường tái sinh tối ưu (Bảng 3.3). Tại nồng độ 0,5 mg/L NAA kết hợp với 1,5 mg/L BA và 0,5 mg/L Kn, hệ số nhân chồi đạt mức cao nhất 10,0 ± 0,5 chồi/cụm sau 28 ngày. Chồi phát triển to khỏe và đồng đều (Hình 3.5). Hệ số nhân từ callus (10,0) cao hơn đáng kể so với phương pháp nhân chồi từ mầm củ truyền thống (2,87 chồi/mẫu) của các nghiên cứu trước đó. Cụ thể, hệ số nhân chồi (10,0) đạt kết quả khá khả quan so với nghiên cứu trên cây Gừng gió của Trần Việt Hà và cộng sự (2018) (4,08 lần) hay trên cây Gừng ta của Trương Thị Bích

Phượng và cộng sự (2018) (7,14 chồi/mẫu). Điều này chứng minh ưu thế của kỹ thuật lát cắt mỏng trong việc khai thác tối đa tiềm năng tái sinh của tế

bào đốt thân khi được tiếp xúc trực tiếp với nồng độ chất ĐHSTTV phù hợp.

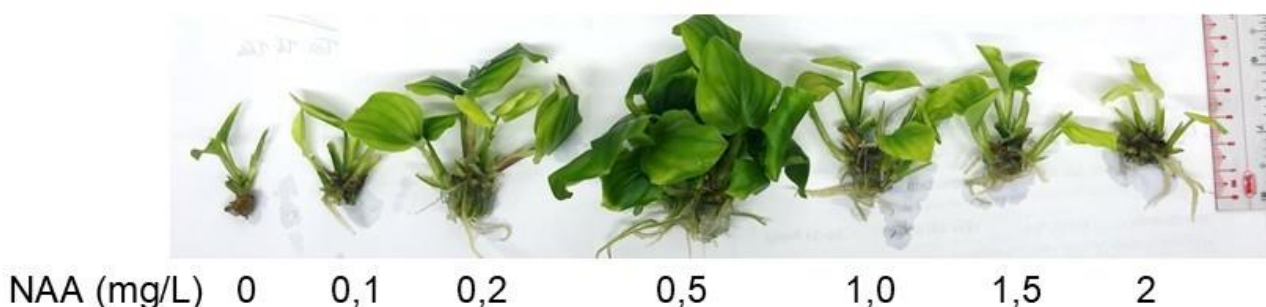
Bảng 3.2. Ảnh hưởng của nồng độ NAA kết hợp với BA và Kn tối ưu đến khả năng nhân nhanh cụm chồi cây *D. orlowii* sau 6 tuần nuôi cấy

NAA (mg/L)	Tỷ lệ tái sinh (%)	Số chồi/mẫu	Chiều cao trung bình chồi (mm)	Thời gian hình thành chồi (ngày)	Số lá/chồi	Hình thái chồi (kích thước, độ đồng đều)
0,0	15 ± 2 ^c	1,2 ± 0,1 ^c	13,8 ± 0,3 ^c	35 ± 0,8 ^c	1 ± 0,2 ^c	Nhỏ, ít chồi, ngắn
0,1	30 ± 3 ^d	2,0 ± 0,1 ^d	24,0 ± 0,4 ^d	32 ± 0,7 ^d	2 ± 0,3 ^d	Nhỏ, ít chồi
0,2	75 ± 4 ^b	3,8 ± 0,2 ^b	36,0 ± 0,7 ^b	29 ± 0,6 ^b	3 ± 0,3 ^b	To khỏe, không đồng đều
0,5	100 ± 0 ^a	10 ± 0,5 ^a	40,0 ± 0,8 ^a	28 ± 0,5 ^a	4 ± 0,4 ^a	To khỏe, đồng đều
1,0	70 ± 4 ^c	3,5 ± 0,2 ^c	29,5 ± 0,3 ^c	30 ± 0,6 ^c	3 ± 0,3 ^b	To, không đồng đều
1,5	60 ± 3 ^d	3,0 ± 0,2 ^d	27,0 ± 0,4 ^d	31 ± 0,6 ^d	3 ± 0,3 ^b	Trung bình, không đồng đều
2,0	50 ± 3 ^e	2,5 ± 0,2 ^e	25,0 ± 0,5 ^e	32 ± 0,7 ^e	2 ± 0,3 ^d	Trung bình, yếu, không đồng đều
P-value	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,05	

Ghi chú: Các giá trị được biểu thị dưới dạng giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn (SD). Các chữ cái (a, b, c, d, e) thể hiện sự khác biệt thống kê theo phân tích Duncan ở mức ý nghĩa $P < 0,01$ và $P < 0,05$.

Hệ số nhân chồi (10,0 chồi/cụm) đạt được trong nghiên cứu này hoàn toàn vượt trội so với các phương pháp nhân giống bằng đốt thân thông thường. Về mặt cơ chế sinh lý thực vật, việc sử dụng các lát cắt mỏng tế bào theo chiều ngang có độ dày cực mỏng (0,5 mm) đã phá vỡ hoàn toàn cấu trúc giải phẫu nguyên vẹn của đốt thân, từ đó triệt tiêu

hoàn toàn hiện tượng ưu thế ngọn tồn tại trong mô. Đồng thời, tTCL giúp giải phóng các tế bào mô phân sinh bên tiếp xúc trực tiếp, đồng đều và tối đa với các ĐHSTTV trong môi trường dinh dưỡng, kích hoạt đồng loạt nhiều trung tâm phân chia tế bào phát sinh phôi hóa để tái sinh cụm chồi mật độ cao.



Hình 3.5. Ảnh hưởng của nồng độ NAA đến khả năng tạo cụm chồi trong môi trường cơ bản MS bổ sung 1,5 mg/L BA, 0,5 mg/L Kn.

Mặc dù hệ thống nhân giống gián tiếp qua giai đoạn callus (từ tTCL) thường tiềm ẩn nguy cơ biến dị soma do quá trình giải biệt hóa tế bào, trong nghiên cứu này, các dòng callus được kiểm soát chặt chẽ ở chu kỳ cấy chuyển ngắn (không quá 3 chu kỳ) và chồi tái sinh có hình thái lá, bẹ lá hoàn toàn đồng nhất với cây mẹ (Hình 3.5). Việc giới hạn số lần cấy chuyển callus và duy trì nồng độ auxin ở mức tối thiểu là giải pháp then chốt giúp duy trì tính ổn định di truyền của nguồn giống *D. orlowii* in vitro

3.4. Ảnh hưởng của nồng độ NAA đến khả năng tạo cây hoàn chỉnh

Giai đoạn ra rễ được thực hiện trên môi trường MS bổ sung NAA ở các nồng độ khác nhau (Bảng

3.4). Môi trường MS chứa 1,0 mg/L NAA là tối ưu nhất với 100% chồi ra rễ sau 16 ngày. Trung bình mỗi chồi tạo ra 10,0 rễ với chiều dài rễ đạt $4,5 \pm 0,3$ cm, rễ mập, khỏe và phân nhánh nhiều (Hình 3.6). NAA ở nồng độ thích hợp đã thúc đẩy sự phân chia tế bào tại vùng tượng tầng gốc chồi. Tuy nhiên, nếu nồng độ NAA tăng lên 2,0 mg/L, hiệu quả ra rễ giảm và xuất hiện hiện tượng tạo callus tại gốc chồi, gây bất lợi cho sự sinh trưởng của cây con. Nhu cầu NAA cho sự ra rễ có sự khác biệt giữa các loài; trong khi *D. orlowii* đạt tối ưu ở 1,0 mg/L NAA, thì cây Gừng ta cần tới 2,0 mg/L NAA để đạt tỷ lệ ra rễ cao (Trương Thị Bích Phượng và cộng sự, 2018).

Bảng 3.4. Ảnh hưởng của nồng độ NAA đến khả năng tạo cây *D. orlowii* hoàn chỉnh

Nồng độ NAA (mg/L)	Thời gian tạo rễ (ngày)	Số rễ/mẫu	Chiều dài rễ (cm)	Đường kính rễ (mm)	Hình thái rễ
0,0	25 ± 1,0 ^c	1,0 ± 1,0 ^c	1,0 ± 0,2 ^c	0,4 ± 0,1 ^c	Ngắn, mảnh, yếu
0,5	15 ± 0,5 ^a	6 ± 1,0 ^b	3,8 ± 0,2 ^b	1,0 ± 0,1 ^b	Dài, mảnh, khỏe, phân nhánh
1,0	16 ± 0,5 ^b	10 ± 1,0 ^a	4,5 ± 0,3 ^a	1,2 ± 0,1 ^a	Dài, mập, khỏe, phân nhánh
1,5	18 ± 0,8 ^c	4 ± 1,0 ^c	3,0 ± 0,2 ^c	0,8 ± 0,1 ^c	Dài, mập, ít nhánh
2,0	20 ± 1,0 ^d	2 ± 1,0 ^d	2,0 ± 0,2 ^d	0,6 ± 0,1 ^d	Dài, mập, yếu, ít nhánh
P-value	<0,01	<0,01	<0,01	<0,05	

Ghi chú: Các giá trị được biểu thị dưới dạng giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn (SD). Các chữ cái (a, b, c, d, e) thể hiện sự khác biệt thống kê theo phân tích Duncan ở mức ý nghĩa $P < 0,01$ và $P < 0,05$



NAA (mg/L) 0,0 0,5 1,0 1,5 2,0

Hình 3.6. Ảnh hưởng của nồng độ NAA đến khả năng tạo rễ cây *D. orlowii* in vitro

3.5. Ảnh hưởng của giá thể đến tỷ lệ sống của cây *Gừng đen*

Cây con *in vitro* có bộ rễ hoàn chỉnh được đưa ra vườn ươm để thích nghi (Bảng 3.5). Sau 4 tuần huấn luyện, giá thể hỗn hợp (đất thịt + tro trấu + xơ dừa tỷ lệ 1:1:1 v/v) cho kết quả tốt nhất với tỷ lệ sống đạt $85 \pm 4\%$. Cây sinh trưởng khỏe mạnh, đạt chiều cao trung bình $6,5 \pm 0,4$ cm và hình thành thêm 4,5 lá mới (Hình 3.7). Giá thể phối trộn đảm bảo được độ tơi xốp, thoáng khí của tro trấu, khả năng giữ ẩm của xơ dừa và nguồn dinh dưỡng từ đất thịt. Điều này hỗ trợ tối ưu cho bộ rễ non yếu của cây *in vitro* chuyển sang trạng thái tự dưỡng. Kết quả này tương đồng với nghiên cứu của Nguyễn Văn Tịnh và cộng sự (2023), khẳng định giá thể phối trộn giữa đất và các thành phần hữu cơ như tro trấu, mùn của giúp cây *D.*

orlowii thích nghi tốt nhất khi chuyển sang trạng thái tự dưỡng.

Mặc dù tỷ lệ sống đạt 85% là kết quả rất khả quan đối với một loài thuộc họ Gừng nhân giống qua tTCL, vẫn có khoảng 15% cây con bị chết trong quá trình huấn luyện. Phân tích thực tế cho thấy, nguyên nhân chủ yếu dẫn đến sự hao hụt này là do hiện tượng thối gốc rễ gây ra bởi một số chủng nấm đất cơ hội xâm nhiễm vào giai đoạn tuần đầu tiên khi cây mới chuyển từ môi trường vô trùng sang tự dưỡng. Ngoài ra, cây con tái sinh qua giai đoạn callus thường có lớp sáp ngoại bì mỏng hơn và hoạt động của khí khổng chưa hoàn toàn tự chủ so với cây nhân giống trực tiếp, dẫn đến hiện tượng mất nước đột ngột ở một số mẫu có bộ rễ chưa kịp phân nhánh hoàn chỉnh để hút nước hiệu quả.

Bảng 3.5. Ảnh hưởng của các loại giá thể đến tỷ lệ sống và sinh trưởng của cây *D. Orlowii* in vitro sau 4 tuần huấn luyện trong nhà lưới

Giá thể	Tỷ lệ sống sót (%)	Chiều cao cây (cm)	Số lá/cây	Tình trạng cây
Đất thịt pha cát	60 ± 3,0 ^b	5,0 ± 0,3 ^b	3,5 ± 0,2 ^b	Khá yếu, hơi vàng lá
Hỗn hợp (đất + tro + xơ dừa)	85 ± 4,0 ^a	6,5 ± 0,4 ^a	4,5 ± 0,3 ^a	Khỏe mạnh, xanh đậm, đồng đều
Xơ dừa	75 ± 4,0 ^{ab}	6,0 ± 0,4 ^{ab}	4,0 ± 0,2 ^{ab}	Khỏe, xanh tốt, ít vàng
Tro trấu	45 ± 3,0 ^c	4,0 ± 0,2 ^c	3,0 ± 0,2 ^c	Yếu, lá nhỏ, úa nhẹ
P-value	<0,01	<0,01	<0,01	

Ghi chú: Các giá trị được biểu thị dưới dạng giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn (SD). Các chữ cái (a, b, c, d, e) thể hiện sự khác biệt thống kê theo phân tích Duncan ở mức ý nghĩa $P < 0,01$.



Đất sạch

Đất : Tro trấu : Xơ dừa
(tỷ lệ 1:1:1)

Xơ dừa

Tro trấu

Hình 3.7. Sinh trưởng của cây *D. orlowii* in vitro trên giá thể hỗn hợp (đất + tro trấu + xơ dừa) sau 4 tuần huấn luyện trong nhà lưới

4. KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu đã xác định chính xác đối tượng nghiên cứu là loài *D. orlowii* dựa trên đặc điểm hình thái kết hợp với phân tích trình tự gen lục lạp matK. Quy trình tái sinh và nhân giống in vitro đã được thiết lập thành công. Mẫu lát cắt mỏng đột thân cho khả năng cảm ứng callus tối ưu trên môi trường MS bổ sung 1,0 mg/L 2,4-D và 0,7 mg/L BA, đạt tỷ lệ tạo callus 100% sau 22 ngày nuôi cấy. Callus thu được sinh trưởng tốt, màu xanh đậm, có độ cứng cao, với kích thước trung bình $6,0 \pm 0,3$ mm.

Môi trường MS bổ sung 1,5 mg/L BA và 0,5 mg/L Kn cho hiệu quả tái sinh chồi cao nhất, đạt tỷ lệ $95 \pm 3\%$ sau 25 ngày nuôi cấy, với số chồi trung bình $5,0 \pm 0,3$ chồi/mẫu, chiều cao chồi $40,0 \pm 0,8$ mm và $3 \pm 0,4$ lá/chồi.

Việc bổ sung thêm 0,5 mg/L NAA vào môi trường tái sinh đã nâng cao hệ số nhân chồi, đạt $10,0 \pm 0,5$ chồi/cụm sau 28 ngày với chiều cao trung bình $40,0 \pm 0,8$ mm và đạt $4 \pm 0,4$ lá/chồi. Môi trường MS chứa 1,0 mg/L NAA cho khả năng tạo rễ tối ưu với tỷ lệ ra rễ đạt 100%, trung bình $10,0 \pm 0,8$ rễ/chồi và chiều dài rễ đạt $4,5 \pm 0,3$ cm sau 16 ngày nuôi cấy.

Trong giai đoạn thích nghi ngoài nhà lưới, giá thể phối trộn đất thịt : tro trấu : xơ dừa theo tỷ lệ 1:1:1 (v/v) cho tỷ lệ sống cao nhất ($85 \pm 4\%$) sau 4 tuần huấn luyện, cây sinh trưởng ổn định với chiều cao trung bình đạt $6,5 \pm 0,4$ cm. Kết quả nghiên cứu đã xây dựng được quy trình nhân giống in vitro hoàn chỉnh cho *D. orlowii*, tạo cơ sở cho công tác bảo tồn và phát triển nguồn dược liệu quý này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Lê Hùng Linh và Đinh Xuân Tú (2017). Nghiên cứu quá trình tạo phôi vô tính từ mô sẹo trong nuôi cấy *In vitro* sâm lai châu (*Panax vietnamensis* var. *fuscidiscus*). *Tạp chí Khoa học Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam*, số 2 (75), tr. 76-80.
- Nguyễn Văn Sinh (2021). *Nghiên cứu, xây dựng cơ sở khoa học cho mô hình quản lý tổng hợp hệ sinh thái núi nam Trường Sơn nhằm bảo tồn và khai thác bền vững*. Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.
- Nguyễn Văn Tịnh và cộng sự (2023). Nghiên cứu nhân giống in vitro loài Gừng đen *Distichochlamys orlowii* K.Larsen & M.F.Newman. *Tạp chí Khoa học Tây Nguyên*, số 63, tr. 27-30.
- Trần Nguyên Chất, Bùi Minh Trí và Phạm Đức Toàn (2017). Ảnh hưởng của 2,4D và kiểu cắt lớp mỏng tế bào đến sự hình thành và phát triển mô sẹo ở cây gấc (*Momordica cochinchinensis* (Lour.) Spreng). *Bản B của Tạp Chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam*, 59(5).
- Trần Việt Hà và cộng sự (2018). Ứng dụng kỹ thuật nuôi cấy *In vitro* trong nhân giống cây gừng gió (*Zingiber zerumbet*). *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Lâm nghiệp*, số 6, tr. 10-16.
- Trương Hồng Ngọc và cộng sự (2023). Nghiên cứu nhân giống in vitro cây Gừng đen *Distichochlamys orlowii* K.Larsen & M.F.Newman. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ, Trường Đại học Khoa học, ĐH Huế*, số 2 (23), tr. 132-142.
- Trương Thị Bích Phượng và cộng sự (2018). Nghiên cứu nhân giống *In vitro* cây gừng (*Zingiber officinale* Rosc.) ở Huế. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn*, (6), tr. 107-113.
- Chau, D. T., Hung, N. V., Dai, D. N. (2017). Volatile constituents of *Distichochlamys citrea* M.F. Newman and *Distichochlamys orlowii* K. Larsen M.F. Newman (Zingiberaceae) from Vietnam. *Journal of Medicinal Plants Research*, 11(9), pp. 188-193.
- Doyle, J. J. and Doyle, J. L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical bulletin*, 19, pp. 11-15.
- Juergens, U. R. (2014). Anti-inflammatory properties of the monoterpene 1.8-cineole: current evidence for co-medication in inflammatory airway diseases. *Drug research*, 64(12), pp. 638-646.

- Larsen, K. (2001). A new species of *Distichochlamys* from Vietnam and some observations on generic limits in Hedychieae (Zingiberaceae). *Natural History Bulletin of the Siam Society*, 49, pp. 77-80.
- Legault, J. and Pichette, A. (2007). Potentiating effect of β -caryophyllene on anticancer activity of α -humulene, isocaryophyllene and paclitaxel. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 59(12), pp. 1643-1647.
- Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15(3), pp. 473-497.
- Newman, M. F. (1995). *Distichochlamys*, a new genus from Vietnam. *Edinburgh Journal of Botany*, 52(1), pp. 65-69.
- Nishida, N. et al. (2005). Allelopathic effects of volatile monoterpenoids produced by *Salvia leucophylla*: inhibition of cell proliferation and DNA synthesis in the root apical meristem of *Brassica campestris* seedlings. *Journal of chemical ecology*, 31(5), pp. 1187-1203.
- Raomai, S. et al. (2014). Plantlet regeneration of *Paris polyphylla* S.M. via thin cell layer culture and enhancement of steroidal saponins in mini-rhizome cultures using elicitors. *Plant growth regulation*, 75(1), pp. 341-353.
- Zhan, Y. H. et al. (2012). β -Elemene induces apoptosis in human renal-cell carcinoma 786-0 cells through inhibition of MAPK/ERK and PI3K/Akt/mTOR signalling pathways. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 13(6), pp. 2739-2744.

PROPAGATION OF BLACK GINGER (DISTICHOCHLAMYS ORLOWII K.LARSEN & M.F.NEWMAN) VIA THIN CELL LAYER (TCL) TECHNOLOGY

Tran Thi Ha Trang¹, Nguyen Thi Luyen¹, Tran Thi Thinh², Tran Ngoc Thao¹, Nguyen Van Tinh¹

Received Date: 16/06/2026; Revised Date: 21/07/2026; Accepted for Publication: 07/08/2026

ABSTRACT

Black ginger (*Distichochlamys orlowii* K.Larsen & M.F.Newman) is a rare and endemic medicinal plant of Vietnam, possessing various valuable biological activities such as anti-inflammatory, antioxidant, and anticancer properties. This study applied thin cell layer technology to establish an efficient *in vitro* micropropagation protocol. Species identification using DNA barcoding with the *matK* gene confirmed that the experimental specimens belonged to *D. orlowii*. Transverse thin cell layers (tTCLs) derived from stem nodes (0.5 mm in thickness) exhibited the highest callus induction frequency (100%) on Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with 1.0 mg/L 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and 0.7 mg/L benzyladenine (BA). Optimal shoot regeneration from callus (95%) was achieved on MS medium containing 1.5 mg/L BA and 0.5 mg/L Kinetin (Kn). The highest shoot multiplication coefficient (10.0 shoots per cluster) was recorded upon adding 0.5 mg/L alpha-naphthaleneacetic acid (NAA) to the regeneration medium. Complete *in vitro* rooting (100%) was successfully induced on MS medium supplemented with 1.0 mg/L NAA. Plantlets successfully acclimatized to an *ex vitro* substrate mixture (Soil: Husk Ash: Coconut Coir = 1:1:1 v/v) with a survival rate of 85%. This study successfully established an *in vitro* propagation protocol utilizing the TCL technique, laying the groundwork for conserving and developing the precious medicinal plant *D. orlowii*.

Keywords: Black ginger, *Distichochlamys orlowii*, *In vitro* propagation, *matK*, Thin cell layer.

¹Buon Ma Thuot Medical University;

²Chi Lang High School;

Corresponding author: Nguyen Van Tinh; Email: nvtinh@bmu.edu.vn.