

## **LƯU GIỮ *IN VITRO* NGUỒN GEN KHOAI MÔN BẢN ĐỊA (*Colocasia esculenta* (L) Schott)**

Vũ Ngọc Lan<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Phương Dung<sup>2</sup>, Nguyễn Văn Phú<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Viện Sinh học Nông nghiệp, Học viện Nông nghiệp Việt Nam*  
<sup>2</sup>*Khoa Nông học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam*

Email\* : vnlan@vnua.edu.vn

Ngày gửi bài: 06.11.2013

Ngày chấp nhận: 04.06.2015

### TÓM TẮT

Khoai môn, khoai sọ (*Colocasia esculenta* (L) Schott) thuộc họ Ráy (Araceae), có lịch sử trồng trọt lâu đời và giữ một vai trò quan trọng trong sản xuất lương thực ở những nước nông nghiệp nghèo, chậm hoặc đang phát triển, trong đó có Việt Nam. Hiện nay, phương pháp nuôi cấy mô được xem như một công cụ quan trọng để nhân giống sạch bệnh, bảo quản dài hạn nguồn gen và cũng là phương tiện để trao đổi giống đối với khoai môn sọ, đặc biệt là lưu giữ những nguồn gen phân bố tại miền núi hoặc các dạng hoang dại khó lưu giữ trên đồng ruộng. Kết quả nghiên cứu bảo quản *in vitro* nguồn gen khoai môn Bắc Kạn cho thấy: Nguồn vật liệu ban đầu cho bảo quản *in vitro* khoai môn là củ con. Khử trùng tối ưu là nhúng củ trong HgCl<sub>2</sub> 0,1% 7 phút + HgCl<sub>2</sub> 0,1% 1 phút. Môi trường bảo quản cây *in vitro* là MS + 6 g/l agar + 2g/l manitol; hoặc nuôi cây trong điều kiện nhiệt độ thấp 5°C vừa làm chậm sinh trưởng, kéo dài thời gian cấy chuyển, vừa đảm bảo trạng thái sinh trưởng cây tốt. Môi trường bảo quản củ *in vitro* thích hợp là MS + 90 g/l saccharose + 6 g/l agar + 2 g/l alar + chiếu sáng 16 h/ngày.

Từ khóa: Củ, Khoai môn (*Colocasia esculenta* Schott), lưu giữ *in vitro*, sinh trưởng chậm

### ***In vitro* maintenance of indigenous taro (*Colocasia esculenta* var. *esculenta* (L) Schott)**

### ABSTRACT

*Colocasia esculenta* (L) Schott belonging to Araceae family has a long history of cultivation and plays an important role in food production of the poor agricultural and slow developing countries, in including Viet Nam. Tissue culture method is considered as an important method for producing disease-free and long-term conservation of genetic resources and the means for exchange of taro germplasm, especially for conservation of genetic resource distributed in mountainous areas or wild relatives that are difficult to maintain in field conditions. Results of *in vitro* maintenance of Bac Kan taro showed that the suitable materials used for micropropagation were tubers. The most suitable disinfection was achieved by dipping taro tubers in 0.1% HgCl<sub>2</sub> for 7 minutes + 0.1% HgCl<sub>2</sub> in 1 minute. Optimum medium for *in vitro* taro plantlet maintenance was MS + 6 g/l agar + 2g/l mannitol, or cultured under conditions of low temperature (5°C). These culture conditions not only reduced the growth of *in vitro* plants and prolonged the time for conservation but also sustained good growth of *in vitro* plants. The medium used for maintenance of *in vitro* tubers was MS + 90g/l saccharose + 6g/l agar + Alar 2g/l and photoperiod 16h/day.

Keywords: *In vitro* maintenance, slow growth, taro (*Colocasia esculenta* (L.) Schott), tubers.

#### 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Khoai môn sọ (*Colocasia esculenta* (L) Schott) thuộc họ Ráy (Araceae) có vai trò quan trọng trong sản xuất lương thực ở những nước

nông nghiệp nghèo, chậm hoặc đang phát triển. Ở Việt Nam, khoai môn - sọ phân bố khắp các vùng sinh thái, gắn liền với đời sống văn hóa, phong tục tập quán của mỗi địa phương đặc biệt ở Cao Bằng, Lạng Sơn, Sơn La, Lai Châu,

Quảng Ninh và Quảng Trị. Khoai môn - sọ là cây cho củ, làm thực phẩm, nguyên liệu của ngành dược và để làm giống. Củ khoai môn - sọ thuộc loại giàu dinh dưỡng nên rất khó lưu giữ, nhất là trong bảo quản củ làm giống. Công tác bảo tồn nguồn gen khoai môn - sọ trên thế giới được quan tâm từ những năm 1990 tới nay; bảo quản, lưu giữ chủ yếu là bảo quản ex-situ dưới dạng tập đoàn nguồn gen trên đồng ruộng, trồng trong chậu vại tại các cơ quan nghiên cứu. Hiện nay, phương pháp nuôi cấy mô được xem là một công cụ quan trọng để nhân giống sạch bệnh, bảo quản dài hạn nguồn gen đối với những cây nhân giống vô tính như khoai môn - sọ, đặc biệt là những nguồn gen miền núi hoặc các dạng khó lưu giữ trên đồng ruộng (Nguyễn Thị Ngọc Huệ và cs., 2004, 2010).

Các nhà khoa học trên thế giới đã dùng chồi đỉnh, chồi nách và mắt ngủ của củ khoai môn - sọ làm vật liệu nuôi cấy mô để nhân giống cây con và củ *in vitro* sạch bệnh và bảo quản dài hạn. Các nghiên cứu này được thực hiện trên môi trường nuôi cấy MS có bổ sung nồng độ khác nhau các yếu tố dinh dưỡng khác nhau: đường (sucrose, saccarose, manitol), muối (NaCl), chất điều tiết sinh trưởng (IAA, NAA, BA, TDZ, BAP...)... Zhou et al. (1999) đã tiến hành nghiên cứu tạo củ *in vitro* cây khoai môn - sọ trên môi trường MS lỏng có bổ sung 8 - 10% saccarose và 22 - 44 $\mu$ M BA, tỷ lệ sống của chồi sau khi đưa ra khỏi ống nghiệm và bảo quản ở nhiệt độ 4°C trong vòng 10 tháng là 99 - 100%. Takagi et al. (2005) tiến hành bảo tồn củ *in vitro* trên môi trường MS có hàm lượng 120 g/l saccharose. Các nghiên cứu của Hussain và Tyagi (2006) cho thấy, có thể kéo dài thời gian bảo quản củ khoai môn - sọ *in vitro* trong môi trường có bổ sung 8 - 10% saccarose, 22 $\mu$ M BAP, 0,6 $\mu$ M  $\alpha$ -NAA và 0,8% agar trong 15 tháng ở 25  $\pm$  2°C, bảo quản cây nuôi cấy dạng chồi tối đa là 6 tháng trong môi trường chứa 3% saccharose.

Ở nước ta, việc nghiên cứu nhân giống và lưu giữ nguồn gen cây khoai môn - sọ bằng nuôi cấy mô hiện nay chưa được nghiên cứu nhiều. Để phục tráng giống và làm sạch bệnh của các dòng, giống khoai môn sọ bị thoái hóa hoặc bị

nh nhiễm bệnh, Nguyễn Thị Ngọc Huệ và Đinh Thế Lộc đã sử dụng phương pháp nhân giống *in vitro* trên môi trường tạo chồi MS + 10 mg/l IAA, tạo rễ MS + 1 mg/l  $\alpha$ NAA và đem trồng vào khay 1 tháng trước khi trồng trên đồng ruộng. Nghiên cứu của Dương Tấn Nhựt và cộng sự (2003) cho thấy, môi trường nhân nhanh thích hợp là MS + 2 mg/l BA + 0,5 mg/l IAA + 3% sucrose và môi trường ra rễ là MS + 0,1 mg/l BA + 1% sucrose. Nguyễn Gia Tài (2009) nghiên cứu chế độ khử trùng khác nhau ảnh hưởng tới tỷ lệ sống sót và nhiễm bệnh của mẫu cấy ban đầu (sử dụng HgCl<sub>2</sub> 0,1% 12 phút + Johnson 30 phút cho tỷ lệ mẫu sạch đạt trên 70%).

Để góp phần phục vụ công tác nghiên cứu chọn tạo giống cũng như bảo tồn nguồn gen khoai môn - sọ Việt Nam, nhiệm vụ nghiên cứu một số điều kiện bảo quản, lưu giữ *in vitro* nguồn gen khoai môn Bắc Kạn đã được thực hiện.

## 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### 2.1. Vật liệu nghiên cứu

Vật liệu là củ khoai môn (*Colocasia esculenta* var. *esculenta* (L) Schott) mã số 15 thu thập tại Bắc Kạn năm 2010, là giống khoai môn miền núi cho năng suất cao nhưng khó bảo quản ngoài tự nhiên, ở trong nhà lưới cũng như trên đồng ruộng theo phương pháp truyền thống;

Mẫu nghiên cứu là chồi, cây con *in vitro*, củ *in vitro*.

Môi trường nuôi cấy: Murashige-Skoog, 1962 (MS); White (B5); Robert Ernst, 1979 (RE). Các yếu tố ảnh hưởng đến nhân bảo quản giống *in vitro*: Saccharose, Mannitol, NaCl, Alar...

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.1. Chọn mẫu và xử lý

Củ cây khoai môn (*Colocasia esculenta* (L)) Schott được tiến hành khử trùng bằng HgCl<sub>2</sub> 0,1% theo 5 công thức (1 lần 5 phút; 1 lần 7 phút; 1 lần 9 phút; kép lần 1-7 phút và lần 2 - 1 phút; kép lần 1 - 7 phút và lần 2 - 3 phút), với 10 bình/công thức, 1 mẫu cấy/bình

### 2.2.2. Phương pháp nuôi cấy

- *Điều kiện nuôi cấy*: Mẫu nuôi trong thời gian chiếu sáng 12 h/ngày, cường độ ánh sáng 800lux - 2.300lux, nhiệt độ phòng nuôi 25 ± 2°C; pH môi trường 5,8. Môi trường nuôi cấy được khử trùng ở nhiệt độ 121°C; 1,5atm trong 20 phút.

- *Bố trí thí nghiệm*:

Thí nghiệm 1. Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến tốc độ sinh trưởng cây khoai môn *in vitro*: Tiến hành với 3 công thức nền môi trường nuôi cấy MS (giàu dinh dưỡng), B5 (dinh dưỡng trung bình) và White (nghèo) có bổ sung 6 g/l agar, 30 bình/1 công thức, 1 cây/bình

Thí nghiệm 2. Ảnh hưởng của hàm lượng saccharose đến thời gian cấy chuyển cây khoai môn *in vitro*: Nuôi cấy trên nền môi trường MS + 6g/l agar bổ sung lượng saccharose với 4 công thức nồng độ (2%, 3%, 4%, 5%), 30 bình/công thức, 1 cây/bình.

Thí nghiệm 3. Ảnh hưởng của hàm lượng mannitol đến thời gian cấy chuyển cây khoai môn *in vitro*: Nuôi cấy các chồi cây khoai môn trên môi trường MS + 6g/l agar có bổ sung manitol với 3 công thức nồng độ: 1%, 2%, 3% , 30 bình/công thức, 1 cây/bình.

Thí nghiệm 4. Ảnh hưởng của nồng độ muối NaCl đến thời gian cấy chuyển cây khoai môn *in vitro*: Tiến hành trên môi trường MS + 6 g/l agar với 3 công thức bổ sung muối NaCl với nồng độ: 0,9%, 1,2% và 1,5%.

Thí nghiệm 5. Ảnh hưởng của nhiệt độ làm chậm sự sinh trưởng của cây khoai môn *in vitro*: Chồi cây khoai môn sau khi nuôi cấy được đặt trong tủ nuôi ở 4 công thức: 5°C, 10°C, 15°C 25°C (ĐC).

Thí nghiệm 6. Ảnh hưởng của hàm lượng saccharose đến khả năng tạo củ khoai môn *in vitro*: Cây con được cấy sang môi trường MS + 6 g/l agar, sau 2 tuần khi cây đã có bộ rễ hoàn chỉnh, bổ sung dung dịch đường vô trùng với nồng độ khác nhau, đặt cây ở điều kiện ánh sáng phòng thí nghiệm. Tiến hành nuôi cấy với 5 công thức, 15 bình/công thức, 5 cây/bình, nuôi cấy trong điều kiện 16 giờ chiếu sáng, nhiệt độ 25°C

Thí nghiệm 7. Ảnh hưởng của quang chu kỳ đến khả năng tạo củ khoai môn *in vitro*: Cây con sau 2 tuần trên môi trường MS + 6 g/l agar, khi đã có bộ rễ hoàn chỉnh, bổ sung dung dịch đường 90 g/l, đặt cây trong 3 công thức chiếu sáng khác nhau: 0 giờ/ngày, 8 giờ/ngày, 16 giờ/ngày. Mỗi công thức tiến hành với 15 bình, mỗi bình 5 cây.

Thí nghiệm 8. Ảnh hưởng của chất kìm hãm sinh trưởng đến khả năng hình thành củ khoai môn *in vitro*: Khi cây con *in vitro* trong môi trường MS khoảng 2 tuần, có bộ rễ hoàn chỉnh bổ sung 90 g/l saccharose + chiếu sáng 16/24h có bổ sung Alar (B9) theo các công thức khác nhau. Mỗi công thức tiến hành 15 bình, mỗi bình 5 cây

*Các chỉ tiêu theo dõi gồm*: tỷ lệ mẫu nhiễm (%), tỷ lệ mẫu sống (%) tạo cây, thời gian bật mầm (ngày), số chồi/cây, trạng thái chồi, chiều cao cây (cm), tốc độ tăng trưởng cây (cm/tuần), số lá/cây, số rễ/cây, tỷ lệ mẫu hình thành củ (%), khối lượng TB (g) của củ.

Xử lý số liệu: sử dụng phần mềm IRRISTAT 5.0 và Excel 2003.

Nghiên cứu được thực hiện tại Bộ môn Sinh lý thực vật, Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội năm 2011-2012 (nay là Học viện Nông nghiệp Việt Nam).

## 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1. Xác định điều kiện khử trùng mẫu tạo nguồn mẫu sạch khoai môn sọ *in vitro*

Theo nghiên cứu của Chand et al. (1998) tỷ lệ mẫu nhiễm khuẩn khi vào mẫu môn sọ có thể lên tới 60%. Theo nghiên cứu của Ưông Thị Thảo (2007), khử trùng mẫu môn sọ với chế độ khử trùng kép trong NaOCl 10% 30 phút + HgCl<sub>2</sub> 0,1% 10 phút tỷ lệ nhiễm lên tới 63,6%. Nguyên nhân, do củ nằm dưới đất, không có vảy củ lớn bảo vệ các mắt ngủ, vỏ củ xù xì và có độ nhớt cao nên khi bị nhiễm khuẩn, việc khử trùng rất khó khăn để có thể làm sạch hoàn toàn mẫu cấy.

Kết quả về tỷ lệ mẫu nhiễm và mẫu sạch, sống được thể hiện ở bảng 1. Khi sử dụng HgCl

**Bảng 1. Ảnh hưởng của HgCl<sub>2</sub> 0,1% đến hiệu quả khử trùng mẫu (sau 4 tuần nuôi cấy)**

Công thức	Tỷ lệ mẫu nhiễm (%)	Tỷ lệ mẫu sạch (%)	
		Tỷ lệ mẫu sống tạo cây	Tỷ lệ mẫu chết
CT1: HgCl <sub>2</sub> 0,1% 5 phút	61,91	33,33	4,76
CT2: HgCl <sub>2</sub> 0,1% 7 phút	38,10	61,90	0,00
CT3: HgCl <sub>2</sub> 0,1% 9 phút	33,33	66,67	0,00
CT4: Lần 1 HgCl <sub>2</sub> 0,1% 7 phút, lần 2 trong 1 phút	19,10	71,40	9,50
CT5: Lần 1 HgCl <sub>2</sub> 0,1% 7 phút, lần 2 trong 3 phút.	9,52	61,90	28,58

0,1% riêng rẽ, tỷ lệ mẫu nhiễm cao. Khi tăng thời gian ngâm mẫu, lượng mẫu nhiễm giảm đáng kể (từ 61,91% xuống 33,33%), điều này chứng tỏ HgCl 0,1% có tác dụng khử trùng tốt nhưng khi ngâm mẫu lâu sẽ ảnh hưởng đến sức sống của mẫu. Sử dụng HgCl 0,1% kép có hiệu quả hơn hẳn khử trùng đơn, tỉ lệ mẫu nhiễm giảm mạnh (từ 19,10% xuống 9,52%), trong đó CT4 (HgCl<sub>2</sub> 0,1% 7 phút + HgCl<sub>2</sub> 0,1% 1 phút) cho lượng mẫu sạch và mẫu sống cao nhất đạt 71,40%.

### 3.2. Bảo quản *in vitro* nguồn gen cây khoai môn Bắc Cạn

#### 3.2.1. Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến khả năng làm chậm sinh trưởng cây khoai môn *in vitro*

Để bảo quản lưu giữ mẫu cấy *in vitro* trong phòng thí nghiệm, nghiên cứu làm chậm sinh trưởng của mẫu cấy là cần thiết. Tùy vào đối tượng, mục đích nghiên cứu mà sử dụng các môi trường dinh dưỡng khác nhau, trong lưu giữ giống không nhất thiết phải nhân lên với lượng lớn, việc cấy nhân liên tục sẽ rất tốn kém và làm cho cây chóng già hóa sinh lý.

Kết quả ở bảng 2 cho thấy, khi nuôi cấy trên môi trường có hàm lượng dinh dưỡng thấp (B5 và White) sự sinh trưởng của cây khoai môn - sọ *in vitro* kém hơn so với MS. Cây trên MS có trạng thái chồi sinh trưởng tốt, dọc mập, lá xanh, bản lá to trong khi trên môi trường White lá có hiện tượng vàng úa 2 - 3 lá ngoài, rễ ít - kém phát triển, các lá còn lại nhỏ, kém xanh; đặc biệt trên môi trường B5 sang đến tuần thứ 8 có nhiều cây chết.

**Bảng 2. Ảnh hưởng của các nền môi trường nuôi cấy đến khả năng sinh trưởng của cây khoai môn *in vitro* (Sau 7 tuần nuôi cấy)**

Chỉ tiêu theo dõi	Môi trường dinh dưỡng			LSD 0,05	CV (%)	
	MS (ĐC)	B5	White			
Chồi	- Thời gian bật mầm (ngày)	3,36	5,02	5,16	0,16	2,7
	- Số chồi/cây (chồi)	1,35	0,90	0,85		
	- Trạng thái chồi	***	*	**		
Chiều cao	- Chiều cao cây (cm)	12,02	0,58	0,50	0,16	3,4
	- Tốc độ tăng trưởng (cm/tuần)	1,64	0,30	0,31		
	- % so với ĐC	100	18,17	18,87		
Số lá	- Số lá (lá/cây)	4,08	0,64	0,16	0,13	5,9
	- Tốc độ tăng trưởng (lá/tuần)	1,58	0,58	0,45		
	- % so với ĐC	100	36,46	28,52		

Ghi chú: \*: chồi sinh trưởng kém, lá gãy mảnh, lá nhỏ, kém xanh; \*\*: lá phát triển ở mức trung bình; \*\*\*: lá phát triển tốt, mập mập, bản lá to, xanh đậm

Như vậy, mặc dù môi trường B5 và White có tác dụng làm hạn chế sự sinh trưởng của cây khoai môn - sọ *in vitro* nhưng cũng làm trạng thái cây kém đi rõ rệt. Điều này không phù hợp với mục đích sinh trưởng chậm cây khoai môn - sọ *in vitro* để kéo dài thời gian giữa các lần cấy chuyển, vì trạng thái chồi là yếu tố quyết định đến khả năng tái sinh cây sau chu kỳ bảo quản. Vì vậy, môi trường MS + 6 g/l agar được lựa chọn cho các nghiên cứu tiếp theo.

### 3.2.2. Ảnh hưởng của hàm lượng saccharose đến thời gian cấy chuyển cây khoai môn - sọ *in vitro*

Đường cung cấp nguồn carbon hữu cơ cho các quá trình sinh lý của mẫu nuôi cấy mô thực vật. Theo các kết quả nghiên cứu đã công bố, nồng độ đường trong môi trường từ 2 - 3% là thích hợp cho sự sinh trưởng của cây *in vitro* trên nhiều đối tượng cây trồng khác nhau. Kết quả theo dõi ảnh hưởng của hàm lượng saccharose đến thời gian cấy chuyển cây khoai môn - sọ *in vitro* trình bày ở bảng 3 cho thấy:

Sự sinh trưởng phát triển của cây khoai môn *in vitro* trong các môi trường có nồng độ đường cao có xu hướng giảm so với đối chứng, nồng độ đường càng cao càng làm giảm sự sinh trưởng của cây. Ở nồng độ đường 3% các chỉ tiêu đều ở mức cao, giảm không đáng kể so với ĐC. Ở

hàm lượng 5% có tác dụng hạn chế sinh trưởng chiều cao cây mạnh nhất; thời gian mọc mầm 5,26 ngày; tốc độ tăng trưởng chiều cao, số lá đều giảm ở mức thấp (1,13 cm/tuần và 1,28 lá/cây/tuần, giảm bằng 52,07% và 74,58%) nhưng trạng thái sinh trưởng chồi ở mức trung bình và có hiện tượng già hóa tương tự ở 4%.

Như vậy, hàm lượng đường cao > 3% đều có tác dụng hạn chế sinh trưởng cây khoai môn - sọ *in vitro* nhưng cây lại già hóa nhanh gây ảnh hưởng đến chất lượng cây sau chu kỳ bảo quản, thậm chí có khả năng dẫn đến thoái hóa giống ngay trong điều kiện bảo quản *in vitro*. Điều này hoàn toàn không phù hợp với mục đích duy trì sinh trưởng chậm. Việc sử dụng nồng độ đường cao trong môi trường nuôi cấy nhằm mục đích duy trì sinh trưởng chậm cây khoai môn - sọ *in vitro* kém hiệu quả cả về thời gian và chất lượng chồi trong bảo quản.

### 3.2.3. Ảnh hưởng của hàm lượng mannitol đến thời gian cấy chuyển cây khoai môn - sọ *in vitro*

Mannitol là chất trung tính không xâm nhập vào tế bào nhưng có tác dụng làm tăng áp suất thẩm thấu của môi trường nuôi cấy. Khi bổ sung mannitol vào môi trường nuôi cấy sẽ có tác dụng làm giảm khả năng hút nước, hút khoáng của bộ rễ và làm giảm tốc độ phân chia của tế

**Bảng 3. Ảnh hưởng của hàm lượng saccaroza đến thời gian cấy chuyển cây khoai môn - sọ *in vitro* (Sau 7 tuần nuôi cấy)**

Chỉ tiêu theo dõi	Nồng độ đường (%)				LSD 0,05	CV (%)	
	ĐC (2)	3	4	5			
Chồi	- Thời gian bật mầm (ngày)	3,74	4,30	4,86	5,26	0,4	6,7
	- Số chồi/cây (chồi)	1,60	1,80	3,07	2,73		
	- Trạng thái chồi	***	***	**	**		
Chiều cao	- Chiều cao cây (cm)	12,74	11,98	11,42	5,48	0,55	3,9
	- Tốc độ tăng trưởng (cm/tuần)	2,17	2,07	1,73	1,13		
	- % so với ĐC	100	95,39	79,72	52,07		
Số lá	- Số lá (lá/cây)	4,84	3,78	2,90	2,38	0,26	5,6
	- Tốc độ tăng trưởng (lá/tuần)	1,72	1,45	1,36	1,28		
	- % so với ĐC	100	84,55	78,90	74,58		

Ghi chú: \*: chồi sinh trưởng kém, lá gãy mảnh, lá nhỏ, kém xanh; \*\*: lá phát triển ở mức trung bình; \*\*\*: lá phát triển tốt, mập mạp, bản lá to, lá xanh đậm

bào thực vật. Vì thế mannitol có ý nghĩa rất lớn đối với hoạt động duy trì quỹ gen thực vật qua phương thức bảo quản sinh trưởng chậm (Jarret, Gawel, 1991, Roca et al., 1989).

Kết quả đánh giá ảnh hưởng của hàm lượng mannitol đến thời gian cấy chuyển cây khoai môn - sọ *in vitro* tại thời điểm sau 14 tuần nuôi cấy được trình bày ở bảng 4.

Việc bổ sung mannitol vào môi trường nuôi cấy có hiệu quả rõ rệt trong việc duy trì sinh trưởng chậm của cây khoai môn - sọ *in vitro*.

Trong đó nồng độ mannitol 2% là thích hợp nhất, vừa đảm bảo hạn chế được sự tăng trưởng về chiều cao, vừa đảm bảo trạng thái chồi tốt, có hệ số nhân chồi (mặc dù thấp 1,10) với số lá/cây khá cao sẽ tạo điều kiện thích hợp cho việc nhân nhanh sau khi phục hồi sinh trưởng. Theo kết quả nghiên cứu của Gopal and Nain Sukh Chauhan (2010), cây khoai môn - sọ *in vitro* được bảo quản *in vitro* 18 tháng mà không cần cấy chuyển khi sử dụng mannitol 20g/l ở nhiệt độ thấp  $7 \pm 1^{\circ}\text{C}$  và chu kỳ chiếu sáng 16h.

**Bảng 4. Ảnh hưởng của hàm lượng mannitol đến thời gian cấy chuyển cây khoai môn - sọ *in vitro* (Sau 14 tuần nuôi cấy)**

Chỉ tiêu theo dõi	Nồng độ manitol (%)				LSD 0,05	CV (%)	
	ĐC (0)	1	2	3			
Chồi	- Thời gian bật mầm (ngày)	4,58	4,94	5,86	6,16	0,17	2,3
	- Số chồi/cây (chồi)	2,20	1,00	1,10	0,75		
	- Trạng thái chồi	***	**	**	*		
Chiều cao	- Chiều cao cây (cm)	10,35	3,44	3,04	0,00	0,10	1,8
	- Tốc độ tăng trưởng (cm/tuần)	1,47	0,72	0,57	0,25		
	- % so với ĐC	100	49,21	39,09	17,11		
Số lá	- Số lá (lá/cây)	4,12	1,66	1,48	0,00	0,87	3,6
	- Tốc độ tăng trưởng (lá/tuần)	1,16	0,72	0,67	0,37		
	- % so với đối chứng	100	62,32	57,64	32,02		

Ghi chú: \*: chồi sinh trưởng kém, lá gãy mảnh, lá nhỏ, kém xanh; \*\*: lá phát triển ở mức trung bình; \*\*\*: lá phát triển tốt, mập mạp, bản lá to, lá xanh đậm



**Hình 1. Ảnh hưởng của mannitol đến thời gian cấy chuyển cây khoai môn - sọ *in vitro***

**3.3.4. Ảnh hưởng của nồng độ muối NaCl đến thời gian cây chuyển cây khoai môn sọ *in vitro***

NaCl có tác dụng làm tăng áp suất thẩm thấu của môi trường nuôi cấy, nhưng lại có khả năng xâm nhập vào tế bào. Hàm lượng muối cao trong mô liên quan đến sự tăng canxioxalate, chlorophyll, protein và một số alkaloid thứ cấp (Nyman, 1984). Khi bổ sung NaCl vào môi trường nuôi cấy sẽ có tác dụng làm giảm khả

năng hút nước, hút khoáng của bộ rễ cây. Việc bổ sung NaCl vào môi trường nuôi cấy vừa giúp đánh giá được khả năng chịu hạn mặn, vừa đánh giá sự sinh trưởng chậm của cây khoai môn - sọ *in vitro* trong điều kiện nuôi cấy thông thường.

Kết quả đánh giá ảnh hưởng của hàm lượng NaCl khác nhau đến thời gian cây chuyển cây khoai môn *in vitro* tại thời điểm sau 7 ngày nuôi cấy được trình bày ở bảng 5.

**Bảng 5. Ảnh hưởng của hàm lượng NaCl đến thời gian cây chuyển cây khoai môn - sọ *in vitro* (Sau 7 tuần nuôi cấy)**

Chỉ tiêu theo dõi	Nồng độ NaCl (%)				LSD 0,05	CV (%)	
	ĐC (0)	0,9	1,2	1,5			
Chồi	- Thời gian bật mầm (ngày)	3,68	5,48	5,84	4,81	0,14	2,1
	- Số chồi/cây (chồi)	1,30	1,00	1,00	1,00		
	- Trạng thái chồi	***	**	*	*		
Chiều cao	- Chiều cao cây (cm)	9,10	5,00	4,52	6,97	0,21	2,5
	- Tốc độ tăng trưởng (cm/tuần)	2,04	1,24	1,06	1,29		
	- % so với ĐC	100	60,57	51,76	63,39		
Số lá	- Số lá (lá/cây)	3,92	2,64	2,52	3,08	0,13	3,2
	- Tốc độ tăng trưởng (lá/tuần)	1,53	1,06	1,05	1,01		
	- % so với ĐC	100	69,40	68,28	66,04		

Ghi chú: \*: dọc lá gãy mảnh, lá nhỏ, kém xanh; \*\*: dọc lá mập trung bình, lá xanh; \*\*\*: dọc lá , mập, lá xanh, bản lá to



**Hình 2. Ảnh hưởng của NaCl đến thời gian cây chuyển cây khoai môn - sọ *in vitro***

Các công thức thí nghiệm có thời gian mọc mầm chậm hơn so với ĐC 1 - 2 ngày, giữa các công thức không có sự khác biệt lớn về chênh lệch thời gian bật mầm, số chồi/cây. Các công thức đều không phân chồi và trạng thái chồi đều ở mức trung bình kém, trạng thái chồi càng yếu khi nồng độ muối càng tăng. Như vậy, việc bổ sung NaCl không có tác dụng trong việc duy trì sinh trưởng chậm cây khoai môn trong bảo quản *in vitro*.

### **3.3.5. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến tốc độ sinh trưởng của cây khoai môn *in vitro***

Nhiệt độ ảnh hưởng toàn diện đến các chức năng sinh lý của cây, làm ảnh hưởng đến sinh trưởng phát triển của cây và ảnh hưởng đến hoạt tính của các enzyme xúc tác cho mọi phản ứng hoá sinh trong cây. Mỗi enzyme có nhiệt độ tối ưu cho hoạt tính xúc tác của mình và đa số enzyme đều bị giảm hoạt tính ở nhiệt độ thấp theo hệ số Q10 từ 2 - 2,5. Vì vậy, nhiệt độ thấp là một trong số yếu tố hạn chế khả năng sinh trưởng phát triển của cây.

Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của nhiệt độ đến thời gian cấy chuyển cây khoai môn *in vitro* tại thời điểm sau 14 ngày nuôi cấy được trình bày ở bảng 6.

Nhiệt độ càng thấp, thời gian mọc mầm của cây càng dài và sự sinh trưởng của cây càng bị hạn chế. Thời gian mọc mầm của cây kéo dài từ 7,66 (ở 15°C) đến 13,60 ngày (ở 5°C), chậm hơn so với ĐC 4,12 ngày (ở 15°C) và 10,06 ngày (ở 5°C). Nhiệt độ bảo quản càng thấp thì tốc độ sinh trưởng chiều cao cây càng giảm, nhiệt độ 5°C là ngưỡng nhiệt độ có hiệu quả làm chậm sinh trưởng tốt nhất. Tốc độ tăng trưởng chiều cao cây trung bình từ 0,24 cm/tuần, giảm bằng 11,78% so với ĐC và thấp hơn hẳn 2 công thức 15°C (26,52%) và 10°C (21,37%). Tốc độ tăng trưởng số lá/cây cũng giảm dần khi ngưỡng nhiệt độ bảo quản được hạ thấp dần (cao nhất ở 15°C là 0,35 lá/cây/tuần, giảm bằng 22,86%; thấp nhất là ở 5°C, 0,23 lá/cây/tuần, thấp hơn ở

15°C và 10°C từ 0,11 - 0,13 lá/cây/tuần, giảm bằng 14,91% so với ĐC).

Như vậy, điều kiện nhiệt độ thấp có tác dụng làm chậm sinh trưởng của cây khoai môn *in vitro*, cây giảm sinh trưởng nhưng vẫn đảm bảo không bị già hóa. Ngưỡng nhiệt độ 5°C có hiệu quả duy trì tốt nhất để bảo quản cây *in vitro*. Kết quả này phù hợp với kết quả nghiên cứu của Zhou et al. (2006), cây khoai môn - số lưỡng bội hình thành củ và sự tạo củ có thể bảo quản ở 4°C đến 10 tháng.

### **3.3. Bảo quản *in vitro* nguồn gen khoai môn bằng củ *in vitro***

#### **3.3.1. Ảnh hưởng của hàm lượng saccharose đến khả năng tạo củ khoai môn *in vitro***

Các nghiên cứu cho thấy, việc sử dụng nồng độ đường cao trong tạo củ cây khoai môn *in vitro* có thể kéo dài thời gian bảo quản, sự tạo củ khoai môn - sọ *in vitro* trong môi trường có bổ sung 8-10% saccharose, 22μM BAP, 0,6μM α-NAA và 0,8% agar có thể bảo quản củ trong 15 tháng ở 25 ± 2°C, trong khi đó cây nuôi cấy dạng chồi có thể bảo quản tối đa là 6 tháng trong môi trường chứa 3% saccharose (Hussain and Tyagi, 2006).

Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của hàm lượng saccharose đến khả năng tạo củ khoai môn Bắc Cạn *in vitro* được trình bày ở bảng 7 cho biết, khối lượng trung bình của củ tăng dần từ 0,25 - 3,08g khi nồng độ đường tăng dần từ 30 - 90 g/l. Nhưng khi nồng độ đường tiếp tục tăng lên đến 150 g/l thì khối lượng củ giảm chỉ còn 1,18g. Khối lượng củ cao nhất là 3,08g khi nồng độ đường là 90g/l, gấp 12,32 lần đối chứng 30g/l sucrose (0,25g/củ). Tại tất cả các công thức đều không có sự hình thành củ con mà chỉ xuất hiện các chồi nhỏ trên củ cái. Như vậy, nồng độ đường thích hợp cho hình thành củ khoai môn sọ *in vitro* là 90 g/l.



**Bảng 6. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến thời gian cấy chuyển cây khoai môn - sọ *in vitro* (Sau 14 tuần nuôi cấy)**

Chỉ tiêu theo dõi	Nhiệt độ				LSD 0,05	CV (%)	
	25°C	15°C	10°C	5°C			
Chồi	- Thời gian bật mầm (ngày)	3,54	7,66	9,62	13,60	0,17	1,5
	- Số chồi/cây (chồi)	1,55	1,09	1,03	1,00		
	- Trạng thái chồi	***	***	***	***		
Chiều cao	- Chiều cao cây (cm)	15,64	7,67	5,81	2,68	0,14	1,3
	- Tốc độ tăng trưởng (cm/tuần)	2,37	0,63	0,51	0,24		
	- % so với ĐC	100	26,52	21,37	11,78		
Số lá	- Số lá (lá/cây)	5,22	4,13	3,42	2,04	0,20	4,0
	- Tốc độ tăng trưởng (lá/tuần)	1,55	0,35	0,34	0,23		
	- % so với ĐC	100	22,86	21,97	14,91		

Ghi chú: \*: chồi sinh trưởng kém, lá gãy mảnh, lá nhỏ, kém xanh; \*\*: lá phát triển ở mức trung bình; \*\*\*: lá phát triển tốt, mập mạp, bản lá to, lá xanh đậm

### 3.3.2. Ảnh hưởng của quang chu kỳ đến khả năng tạo củ khoai môn *in vitro*

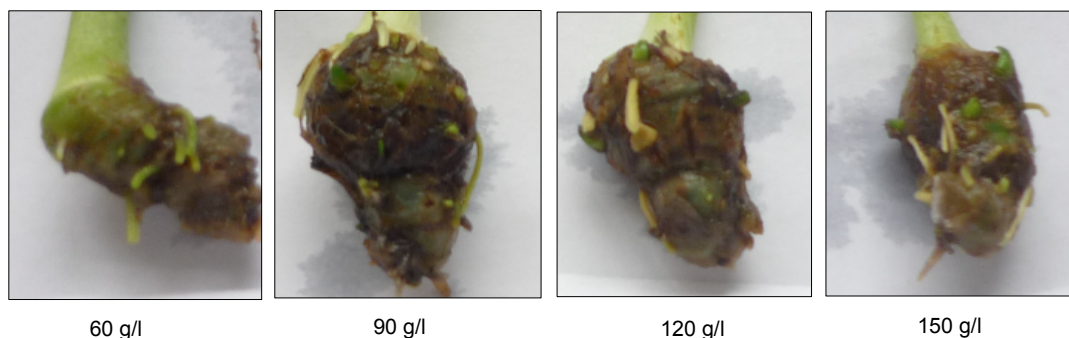
Kết quả thí nghiệm ở bảng 8 cho thấy, ánh sáng có ảnh hưởng đáng kể đến khả năng hình thành củ khoai môn *in vitro*. Khi thời gian chiếu sáng trong ngày tăng lên (0 - 16 giờ sáng/ngày), khối lượng củ cũng tăng lên từ 0 - 1,72g. Trong điều kiện tối hoàn toàn, củ không hình thành được, mặc dù nồng độ đường trong môi trường cao nhưng cây vẫn không thể tích lũy đủ dinh dưỡng để hình thành củ, các lông thân kéo dài

không phình củ, cây không thể quang hợp, sắc tố diệp lục trong thân lá giảm trầm trọng, sau 30 ngày cây phát triển cao và yếu, sắc tố diệp lục mất, cây chuyển thành màu trắng. Các cây trong điều kiện chiếu sáng không những tỷ lệ hình thành củ là 100% mà cây còn phát triển thân, lá, rễ, và màu sắc của cây đậm hơn. Đây cũng có thể là nguyên nhân dẫn đến cây hấp thu dinh dưỡng tốt hơn từ đó hình thành củ tốt hơn.

Trong đó, thời gian chiếu sáng thích hợp cho việc tạo củ khoai môn - sọ là 16 giờ sáng/ngày

**Bảng 7. Ảnh hưởng của nồng độ đường đến khả năng hình thành củ khoai môn - sọ *in vitro* (sau 8 tuần nuôi cấy)**

Công thức	Nồng độ đường (%)	Tỷ lệ mẫu hình thành củ (%)	Khối lượng TB của củ (g)
CT1: MS + 30 g/l Saccharose + 6g/l aga (Đối chứng)	30	100	0,25
CT2: MS + 60 g/l Saccharose + 6g/l aga	60	100	0,99
CT3: MS + 90 g/l Saccharose + 6g/l aga	90	100	3,08
CT4: MS + 120 g/l Saccharose + 6g/l aga	120	100	1,69
CT5: MS + 150 g/l Saccharose + 6g/l aga	150	100	1,18
CV (%)			3,4
LSD 0,05			0,71



**Hình 3. Ảnh hưởng của các nồng độ đường đến khả năng tạo củ khoai môn *in vitro***

**Bảng 8. Ảnh hưởng của thời gian chiếu sáng đến khả năng hình thành củ khoai môn *in vitro* (Sau 6 tuần nuôi cấy)**

CT	Tỷ lệ mẫu hình thành củ (%)	Khối lượng TB của củ (g)
CT1: Trong tối hoàn toàn	0	0,00
CT2: 8h sáng/ngày	100	0,91
CT3: 16h sáng/ngày	100	1,72

**Bảng 9. Ảnh hưởng của chất kim hãm sinh trưởng đến sự hình thành củ khoai môn *in vitro* (Sau 6 tuần nuôi cấy)**

CT	Thời gian phình củ (ngày)	Tỷ lệ mẫu hình thành củ (%)	Khối lượng trung bình của củ cái (g)	Khối lượng trung bình của củ con (g)	Khối lượng trung bình của củ (g)	Số củ con trung bình trên mẫu
CT1: MS	33	100	1,55	0	1,55	0
CT2: MS + 2g B9/lít	27	100	2,47	0	2,47	0
CT3: MS + 4g B9/lít	28	100	2,01	0	2,01	0
CT4: MS + 6g B9/lít	32	100	0,67	0	0,67	0
CT5: MS + 8g B9/lít	30	100	0,89	0,25	1,04	0,7
CV (%)					2,8	
LSD 0,05					0,71	

### 3.3.3. Ảnh hưởng của chất kim hãm sinh trưởng đến sự hình thành củ khoai môn *in vitro*

Chất điều tiết sinh trưởng là thành phần quan trọng trong môi trường nuôi cấy, nhờ chúng mà các nhà nghiên cứu có thể chủ động điều khiển quá trình phát sinh hình thái của thực vật *in vitro*. Alar -  $C_6H_{12}N_2O_3$  có hiệu quả rõ rệt lên sự ra hoa kết quả của cây, ức chế sinh trưởng và tăng tính chống chịu của cây với điều

kiện bất thuận. Sự hình thành củ là do cân bằng của GA/ABA, hàm lượng GA cao sẽ ức chế sự hình thành tia củ và phình to củ, còn hàm lượng ABA cao sẽ thuận lợi cho sự phình to của củ. Có thể sử dụng Alar là chất kháng GA để xúc tiến sự hình thành củ.

Theo số liệu ở bảng 9, Alar có ảnh hưởng đáng kể đến sự hình thành củ, thời gian phình củ, chất lượng củ cũng như sự hình thành của củ con. Khối lượng củ trung bình lớn nhất ở CT2

(2 g/l) là 2.47g tăng hơn gấp 1,6 lần so với ĐC và thời gian phình củ cũng là nhanh nhất 27 ngày. Tại các công thức thí nghiệm, duy nhất ở CT5 (8 g/l) có sự xuất hiện củ con nhưng khối lượng củ quá nhỏ gây khó khăn cho quá trình bảo quản. CT2 và CT3 đều cho khối lượng trung bình củ tăng cao cũng như thời gian phình củ sớm hơn so với ĐC và có ý nghĩa về mặt thống kê, nhưng sử dụng CT2 vừa tốn ít hóa chất lại đem lại hiệu quả hơn so với CT3.

Như vậy, môi trường tạo củ thích hợp nhất cho cây khoai môn *in vitro* là MS + 90 g/l Saccharose + 6 g/l aga + 2 g/l alar trong điều kiện chiếu sáng 16 h/ngày

#### 4. KẾT LUẬN

Vật liệu ban đầu cho lưu giữ bảo quản *in vitro* nguồn gen khoai môn Bắc Kạn (*Colocasia esculenta* (L) Schott) là củ khoai. Khử trùng tối ưu là nhúng củ trong HgCl<sub>2</sub> 0,1% 7 phút + HgCl<sub>2</sub> 0,1% 1 phút (cho lượng mẫu sạch và mẫu sống cao nhất đạt tỷ lệ lên tới 71,40%).

Lưu giữ, bảo quản bằng cây *in vitro*: môi trường bảo quản MS + 6 g/l agar + 2g/l manitol; hoặc nuôi cây trong điều kiện nhiệt độ thấp 5°C vừa làm chậm sinh trưởng, kéo dài thời gian cấy chuyển, vừa đảm bảo trạng thái sinh trưởng cây tốt.

Lưu giữ, bảo quản bằng củ *in vitro*: môi trường bảo quản thích hợp nhất là MS + 90 g/l saccharose + 6 g/l agar + 2g/l alar + chiếu sáng 16 h/ngày.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Nguyễn Thị Ngọc Huệ, Nguyễn Văn Việt (2004). Tài nguyên di truyền khoai môn - sọ ở Việt Nam. Nhà xuất bản Nông nghiệp, Hà Nội.
- Duong Tan Nhut, Nguyen Thi Dieu Huong, Dinh Van Khiem (2003). Study on tissue culture and its correlative factor of *Colocasia esculenta*, Horticulture digest.
- Nguyen Thi Ngoc Hue, Nguyen Van Viet, Vu Linh Chi and M.S Prana (2010). Taro germplasm collection in Viet Nam. In: The Global diversity of taro: Ethnobotany and conservation, p. 60-68.
- H. Chand, M. N. Pearson & P. H. Lovell (1998). Rapid vegetative multiplication *Colocasia esculenta* (L.) Schott (*taro*), p. 223 - 226.
- J. Gopal and Nain Sukh Chauhan (2010). *Slow growth in vitro conservation of potato germplasm at low temperature*. Potato Research, 53: 141-149.
- Jarret RL and Gawel N (1991). *Chemical and environmental growth regulation of sweet potato (Ipomoea batatas (L.) Lam.) in vitro*. Plant Cell Tiss. Org. Cult., 2: 153-160.
- L. P. Nyman, J. Arditti and T. J. Bradlel (1989). *Organic and inorganic constituents of salt tolerant taro (Colocasia esculenta var antiqourum) tissue culture in saline media*. Environmental and Experimental Botany, (4): 423-432.
- Su P.Zhou, Ye K. He and Shi J. Li (2006). *Induction and characterization of in vitro corm of diploid - taro*. Plant cell, Tissue and Organ Culture, 57: 443-449.
- Zhou Su P., Ye K. He and Shi J. Li (1999). *Induction and characterzation of in vitro corms of diploi - taro*, p. 173 - 178.
- Z Hussain and R K Tyagi (2006). *In vitro corm induction and genetic stability of regenerate plants in taro (Colocasia esculenta (L.) Schott)*. Indian of journal biotechnology, 5: 535-542.