

Nghiên cứu lưu giữ *in vitro* nguồn gen khoai môn sọ bản địa *Colocasia esculenta* (L.) Schott

Vì Thị Xuân Thủy*, Vũ Thị Nụ, Phayvong Duangneun, Trần Thị Mừng, Trần Thị Hồng Xuân

Trường Đại học Tây Bắc

Ngày nhận bài 31/8/2020; ngày chuyển phản biện 4/9/2020; ngày nhận phản biện 8/10/2020; ngày chấp nhận đăng 15/10/2020

Tóm tắt:

Hiện nay, nuôi cấy *in vitro* được ứng dụng để tạo ra số lượng cá thể lớn, giống nhau về mặt di truyền, đồng đều về sinh trưởng, phát triển và sạch bệnh trong thời gian ngắn. Hơn nữa, phương pháp này còn có thể bảo quản lâu dài nguồn gen quý, hiếm, đặc biệt là với các đối tượng nhân giống vô tính và khó bảo quản như khoai môn sọ. Nghiên cứu trình bày kết quả lưu giữ nguồn gen khoai môn sọ bản địa Cụ Cang (Sơn La) bằng kỹ thuật nuôi cấy *in vitro*. Kết quả cho thấy, thời gian khử trùng củ con khoai môn sọ Cụ Cang tối ưu trong $HgCl_2$ 0,2% là 11 phút kép (9 phút lần 1 và 2 phút lần 2), cho kết quả 62,83% lượng mẫu sạch và đảm bảo chồi sinh trưởng. Cây *in vitro* được bảo quản trong môi trường 1/2 MS + agar 8 g/l + mannitol 1 g/l là phù hợp nhất, cây vừa sinh trưởng chậm, thời gian cấy chuyển dài (11 tháng) và vẫn đảm bảo chồi sinh trưởng. Nuôi cấy chồi trong môi trường 1/2 MS + saccharose 90 g/l + agar 8 g/l là tối ưu cho khoai môn sọ Cụ Cang *in vitro* tạo củ, với khối lượng củ cao nhất đạt 1,58 g.

Từ khóa: bảo quản *in vitro*, cấy chuyển, khoai môn sọ Cụ Cang, nguồn gen.

Chỉ số phân loại: 4.6

Đặt vấn đề

Khoai môn sọ là một trong những cây nông nghiệp ngắn ngày có lịch sử trồng trọt lâu đời, được thuần hóa đầu tiên ở Ấn Độ và Đông Nam Á, sau đó phát triển ra khắp thế giới [1]. Ngoài là cây lương thực, khoai môn sọ còn là cây thực phẩm có hàm lượng dinh dưỡng cao, là cây trồng có khả năng chế biến thành nhiều loại sản phẩm khác nhau cũng như có giá trị dược liệu... [2]. Ở nước ta, khoai môn sọ là cây lấy củ quan trọng (chi đứng sau khoai tây, khoai lang và sắn) với diện tích trồng đạt khoảng 15.000 ha/năm [3], phân bố ở nhiều tỉnh/thành phố, đặc biệt là các tỉnh miền núi [4, 5].

Khoai môn sọ là cây thân củ (cây con được phát triển từ củ) nên củ con thường được dùng làm giống cho vụ sau. Với đặc điểm củ khoai môn sọ có hàm lượng dinh dưỡng cao nên gặp nhiều khó khăn trong bảo quản củ làm giống (củ dễ bị nhiễm mầm bệnh, gây hao tổn một lượng lớn giống) [6]. Hiện nay, phương pháp nuôi cấy *in vitro* được ứng dụng để trong một thời gian ngắn có thể tạo ra những cá thể giống nhau về kiểu gen, đồng đều về sinh trưởng, phát triển và sạch bệnh. Hơn nữa, phương pháp này còn có thể bảo quản lâu dài nguồn gen quý, hiếm, đặc biệt là với các đối tượng nhân giống vô tính và khó bảo quản như khoai môn sọ [4].

Trên thế giới, nhiều nhà khoa học đã nghiên cứu bảo quản *in vitro* khoai môn sọ. Trong đó, Zhou và cs (1999) [7] đã tạo được củ *in vitro* khi nuôi cấy cây khoai môn trong môi trường cơ bản MS lỏng chứa saccharose ở nồng độ 8-10% và BAP 22-44 μM . Kết quả cho tỷ lệ chồi sống đạt 99-100%, khi đưa ra môi trường ngoài ống nghiệm và trong điều kiện nhiệt độ thấp (4°C) bảo quản được

10 tháng. Nghiên cứu của Hussain và cs (2006) [8] cho thấy, củ khoai môn *in vitro* trong môi trường nuôi cấy có bổ sung saccharose 8-10%, BAP 22 μM , α -NAA 0,6 μM và agar 0,8%, ở nhiệt độ 25°C có thể bảo quản lên đến 15 tháng. Cây *in vitro* khoai môn được nuôi trong môi trường chứa saccharose 3% thời gian bảo quản được 6 tháng. Nghiên cứu của Bhuiyan và cs (2016) [9] cho biết, giống khoai môn Bilashi' (*Colocasia esculenta* var. *globulifera*) nuôi cấy trong môi trường MS cơ bản mô phân sinh và chồi bên có thể bảo quản tới 24 tháng mới phải cấy chuyển khi bổ sung vào môi trường lượng 4% manitol.

Ở Việt Nam, nghiên cứu nhân giống, lưu giữ *in vitro* khoai môn sọ đã được một số nhà khoa học quan tâm. Trần Thị Lệ và cs (2011) [6] đã nghiên cứu quy trình nhân giống *in vitro* hai giống khoai môn sọ Hà Tĩnh và Tây Nguyên, kết quả cho thấy, thời gian khử trùng thích hợp cho chồi khoai môn sọ là 12 phút với $HgCl_2$ 0,2%, môi trường MS bổ sung BAP 3 mg/l thích hợp nhất cho quá trình tái sinh chồi từ mẫu và tạo đa chồi. Nghiên cứu lưu giữ *in vitro* nguồn gen khoai môn sọ bản địa thu thập từ Bắc Kạn của Vũ Ngọc Lan và cs (2015) [4] cho thấy, khi xử lý vật liệu khởi đầu trong $HgCl_2$ 0,1% 7 phút + $HgCl_2$ 0,1% 1 phút cho kết quả tỷ lệ mẫu nhiễm thấp nhất. Cây *in vitro* được nuôi trong môi trường cơ bản MS chứa agar 6 g/l và manitol 2 g/l cho kết quả bảo quản tốt nhất (quá trình sinh trưởng, phát triển diễn ra chậm, thời gian giữa các lần cấy chuyển dài và trạng thái sinh trưởng cây *in vitro* đảm bảo). Môi trường nuôi cấy cơ bản MS bổ sung saccharose 90 g/l, agar 6 g/l, thời gian chiếu sáng 16h/ngày cho kết quả tạo củ *in vitro* tốt nhất.

*Tác giả liên hệ: Email: xuanthuy@u.tnb.edu.vn

Study on *in vitro* conservation of indigenous taro gene (*Colocasia esculenta* (L.) Schott)

Thi Xuan Thuy Vi*, Thi Nu Vu, Phayvong Duangneun,
Thi Mung Tran, Thi Hong Xuan Tran

Tay Bac University

Received 31 August 2020; accepted 15 October 2020

Abstract:

Currently, *in vitro* culture is used to produce a large number of plants that are genetically similar, uniform in growth, and disease-free in a short time. This method can preserve the precious and rare genetic resources in the long term, especially with asexual and difficult to preserve objects such as the taro plant. This study presents the results of the storage of native taro genome Cu Cang (Son La province) using *in vitro* culture techniques. The results showed that the optimal sterilization of root taro in the $HgCl_2$ 0.2% was 11 minutes (9 minutes for the first time and 2 minutes for the second time), reaching 62.83% of clean samples and ensure shoots grow. *In vitro* taro plants preserved in 1/2 MS + agar 8 g/l + mannitol 1 g/l was the most suitable, plants grow slowly, transfer time was long, and still ensure shoots growth. *In vitro* Cu Cang taro shoots were cultured in 1/2 MS + saccharose 90 g/l + agar 8 g/l was the most suitable for tuber production, with the highest tuber weight reaching 1.58 g.

Keywords: Cu Cang taro, genetic resources, *in vitro* preservation, transplanted.

Classification number: 4.6

Các kết quả nghiên cứu nêu trên là cơ sở để chúng tôi tiến hành nghiên cứu bảo quản, lưu giữ *in vitro* khoai môn sọ bản địa *Colocasia esculenta* (L.) Schott thu thập từ Sơn La, gọi là khoai môn sọ Cù Cang - nguồn gen bản địa quý, có chất lượng cao, đã được đưa vào danh sách các loại nguồn gen cây trồng quý hiếm của Việt Nam hạn chế trao đổi với quốc tế, nhằm lưu giữ và cung cấp nguồn giống sạch bệnh phục vụ sản xuất ở quy mô lớn.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu

Củ con của cây khoai môn sọ Cù Cang (*Colocasia esculenta* (L.) Schott) được thu thập ở huyện Thuận Châu, tỉnh Sơn La thuộc nhóm khoai môn sọ [10] (hình 1).



Hình 1. Hình ảnh củ khoai môn sọ Cù Cang (Sơn La) sử dụng làm vật liệu nghiên cứu.

Phương pháp nghiên cứu

Nghiên cứu tạo vật liệu nuôi cấy khởi đầu: củ con khoai môn sọ Cù Cang không sâu bệnh được phơi nắng 3-4 ngày, sau đó rửa sạch dưới vòi nước chảy, rửa lại với xà phòng loãng trong 20 phút. Tiếp theo lắc trong cồn 70° trong 2 phút, rửa lại 3 lần với nước cất vô trùng. Sử dụng dung dịch $HgCl_2$ 0,2% để thẩm dò khả năng khử trùng mẫu củ ở các khoảng thời gian khác nhau (5-16 phút), sau đó nuôi cấy trên môi trường MS [11]. Thí nghiệm được tiến hành với 30 bình/công thức, 1 mẫu cây/bình. Tiến hành theo dõi các chỉ tiêu: tỷ lệ mẫu nhiễm (%), tỷ lệ mẫu sống tạo cây (%), tỷ lệ mẫu chết (%).

Khử trùng kép: mẫu được xử lý trong dung dịch $HgCl_2$ 0,2% trong thời gian xác định, được rửa lại nhiều lần trong nước cất vô trùng, sau đó tiếp tục xử lý mẫu trong dung dịch $HgCl_2$ 0,2% lần 2.

Nghiên cứu ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến tốc độ sinh trưởng cây khoai môn sọ Cù Cang *in vitro*: chồi khoai môn sọ *in vitro* được nuôi cấy trên 3 môi trường tương ứng với 3 công thức: môi trường MS, môi trường 1/2 MS và môi trường 1/4 MS, các môi trường bổ sung agar 8 g/l. Thí nghiệm tiến hành với 30 bình/công thức, 1 cây/bình, các chỉ tiêu theo dõi gồm: thời gian bật mầm (ngày), số chồi/cây, chất lượng chồi, chiều cao cây (cm), số lượng lá (lá/cây).

Nghiên cứu ảnh hưởng của hàm lượng saccharose đến sinh trưởng của cây khoai môn sọ Cù Cang *in vitro*: chồi khoai môn sọ *in vitro* được nuôi cấy trong môi trường 1/2 MS + agar 8 g/l và bổ sung saccharose với 5 công thức tương ứng với các nồng độ (2, 3, 4, 5 và 6%). Thí nghiệm tiến hành với 30 bình/công thức, 1 cây/bình, các chỉ tiêu theo dõi: thời gian bật mầm (ngày), số chồi/cây, chất lượng chồi, chiều cao cây (cm), số lượng lá (lá/cây).

Nghiên cứu ảnh hưởng của hàm lượng mannitol đến sinh trưởng của cây khoai môn sọ Cù Cang *in vitro*: chồi khoai môn sọ *in vitro* được nuôi cấy trong môi trường 1/2 MS + agar 8 g/l bổ sung mannitol với các nồng độ: 0, 1, 2 và 3% tương ứng với các công thức thí nghiệm. Thí nghiệm tiến hành với 30 bình/công thức, 1 cây/bình, các chỉ tiêu theo dõi gồm: thời gian bật mầm (ngày), số chồi/cây, chất lượng chồi, chiều cao cây (cm), số lượng lá (lá/cây).

Nghiên cứu ảnh hưởng của hàm lượng saccharose đến khả năng tạo củ khoai môn sọ Cù Cang *in vitro*: cây khoai môn sọ *in vitro* được cấy trên môi trường 1/2 MS + agar 8 g/l + α -NAA 0,5 mg/l, sau 4 tuần nuôi cấy khi cây *in vitro* có bộ rễ đầy đủ bổ sung dung dịch saccharose (vô trùng) với các nồng độ: 0, 30, 60, 90, 120 và 150 g/l. Thí nghiệm tiến hành 10 bình/công thức, 6 cây/bình, chỉ tiêu theo dõi gồm: tỷ lệ mẫu tạo củ (%), khối lượng củ (g).

Điều kiện nuôi cấy: các mẫu nghiên cứu được nuôi trong điều kiện thời gian chiếu sáng 12h/ngày, ánh sáng có cường độ 2.000-2.500 lux, nhiệt độ phòng nuôi 22°C, pH môi trường nuôi cấy 5,8.

Kết quả và thảo luận

Khử trùng mẫu vật, tạo vật liệu khởi đầu *in vitro*

Khử trùng tạo vật liệu khởi đầu là giai đoạn rất quan trọng, quyết định đến thành công trong nuôi cấy *in vitro*. Thành công của giai đoạn khử trùng vật liệu ban đầu phụ thuộc vào đối tượng nghiên cứu, phương pháp lấy mẫu, giai đoạn lấy mẫu, chất khử trùng và thời gian khử trùng... Hơn nữa, ở bước khử trùng mẫu vật yêu cầu không chỉ đạt lượng mẫu nhiễm thấp mà còn cần tỷ lệ mẫu sống cao và sinh trưởng tốt [12]. Củ khoai môn sọ nằm dưới mặt đất, các mắt củ không được bảo vệ bởi các vảy đủ lớn, vỏ củ xù xì và độ nhớt lớn nên giai đoạn khử trùng để tạo vật liệu ban đầu gặp nhiều bất lợi, dễ nhiễm khuẩn, nấm [13] (tỷ lệ mẫu nhiễm có thể lên đến 60-70%) [14, 15].

Sử dụng HgCl₂ 0,2% để khử trùng củ con khoai môn sọ Cụ Cang ở các thời gian khác nhau. Kết quả sau 4 tuần nuôi cấy trên môi trường MS được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Ảnh hưởng của thời gian xử lý HgCl₂ 0,2% đến hiệu quả khử trùng mẫu củ con khoai môn sọ Cụ Cang sau 4 tuần nuôi cấy.

Thời gian khử-trùng	Tỷ lệ mẫu nhiễm (%)	Tỷ lệ mẫu sống (%)	
		Tỷ lệ mẫu sống tạo cây	Tỷ lệ mẫu chết
5 phút	76,46 ^a	22,32 ^a	1,22 ^a
8 phút	63,17 ^b	27,12 ^b	9,71 ^b
11 phút	40,06 ^c	40,33 ^c	19,61 ^c
Lần 1 trong 9 phút, lần 2 trong 2 phút (kép)	26,98 ^d	62,83 ^d	10,19 ^d
Lần 1 trong 11 phút, lần 2 trong 3 phút (kép)	12,28 ^e	58,64 ^e	29,08 ^e

Các chữ cái khác nhau trong cột biểu thị sự sai khác có ý nghĩa thống kê với p<0,05 (Duncan's test).

Kết quả bảng 1 cho thấy, khi tăng thời gian ngâm mẫu từ 5 phút lên 14 phút (kép) thì lượng mẫu nhiễm giảm rõ rệt (từ 76,46 xuống còn 12,28%), điều này cho thấy HgCl₂ 0,2% có khả năng khử trùng mẫu tốt. Tuy nhiên, khi xử lý mẫu trong thời gian dài sẽ ảnh hưởng đến sức sống của mẫu, tỷ lệ mẫu chết khi khử trùng trong 5 phút là 1,22% nhưng khi kéo dài thời gian khử trùng lên 14 phút (kép) thì tỷ lệ mẫu chết tăng lên 29,08%. Khi khử trùng mẫu ở 11 phút đơn và 11 phút kép (9 phút lần 1 và 2 phút lần 2) thì tỷ lệ mẫu nhiễm lần lượt là 40,06 và 26,98%, tỷ lệ cây sống cũng khác nhau rõ rệt ở 11 phút đơn là 40,33%, trong khi đó ở 11 phút kép tăng lên 62,83%. Có thể thấy, dùng HgCl₂ 0,2% khử trùng kép có hiệu quả hơn hẳn khi khử trùng 1 lần, ít ảnh hưởng đến sức sống của mẫu. Khi tăng thời gian xử lý lên 14 phút (11 phút lần 1 và 3 phút lần 2), tỷ lệ mẫu nhiễm còn 12,28% nhưng tỷ lệ mẫu sống chỉ còn 58,64% và tỷ lệ mẫu chết sau 4 tuần nuôi cấy là 29,08%. Như vậy, khử trùng củ khoai môn sọ Cụ Cang bằng HgCl₂ 0,2% ở 11 phút kép (9 phút lần 1 và 2 phút lần 2) cho tỷ lệ mẫu nhiễm thấp, tỷ lệ sống cao và sinh trưởng tốt nhất.

Lưu giữ, bảo quản *in vitro* nguồn gen cây khoai môn sọ Cụ Cang

Trong lưu giữ, bảo quản nguồn gen *in vitro*, mục tiêu không

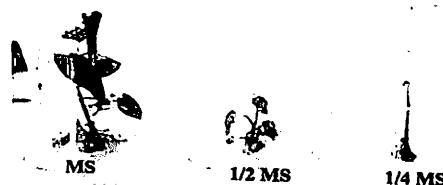
phải là nhân lên với lượng lớn cây con, bởi cây chuyên liên tục sẽ tăng chi phí, cây lại nhanh già hóa sinh lý. Mục tiêu của bảo quản, lưu giữ mẫu cây *in vitro* là làm chậm quá trình sinh trưởng của mẫu nhưng vẫn đảm bảo được độ sinh trưởng của cây [15]. Chính vì vậy, các môi trường dinh dưỡng khác nhau, các chất làm chậm sinh trưởng của cây *in vitro* đã được sử dụng trong nghiên cứu này.

Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến sinh trưởng cây khoai môn sọ Cụ Cang *in vitro*: để lựa chọn được môi trường nuôi cấy mà cây *in vitro* vừa sinh trưởng chậm nhưng vẫn đảm bảo chồi có khả năng tái sinh, các môi trường MS, 1/2 MS và 1/4 MS được sử dụng, kết quả được trình bày ở bảng 2 và hình 2.

Bảng 2. Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến khả năng sinh trưởng của cây khoai môn sọ Cụ Cang *in vitro* sau 8 tuần nuôi cấy.

Môi trường	Thời gian bật mầm (ngày)	Số chồi/cây (chồi)	Trạng thái chồi	Chiều cao cây (cm)	Số lá/cây (lá)
MS	6,12 ^a	3,16 ^a	***	12,08 ^a	6,73 ^a
1/2 MS	8,32 ^b	1,83 ^b	**	4,98 ^b	3,68 ^b
1/4 MS	11,46 ^c	0,91 ^c	*	4,12 ^c	1,02 ^c

***: chồi sinh trưởng tốt, mập, bẹ lá màu xanh, lá màu xanh thẫm, phiến lá lớn; **: chồi sinh trưởng trung bình, màu xanh, bẹ lá màu xanh, lá màu xanh, phiến lá trung bình; *: chồi sinh trưởng kém, nhỏ màu đen, bẹ lá màu trắng, lá màu vàng, phiến lá rất nhỏ. Các chữ cái khác nhau trong cột biểu thị sự sai khác có ý nghĩa thống kê với p<0,05 (Duncan's test).



Hình 2. Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến sinh trưởng cây khoai môn sọ Cụ Cang *in vitro*.

Cây khoai môn sọ Cụ Cang *in vitro* được nuôi cấy ở môi trường 1/2 và 1/4 MS sinh trưởng chậm hơn so với môi trường MS (bảng 2 và hình 2). Cây *in vitro* nuôi trên môi trường MS sau 6,12 ngày đã bật mầm, sau 8 tuần nuôi cấy đạt 3,16 chồi/cây, chồi sinh trưởng tốt, mập, màu xanh, bẹ lá mập màu xanh, lá màu xanh thẫm, phiến lá to, cây cao 12,08 cm và có 6,73 lá/cây. Khi nuôi trên môi trường 1/2 MS cây bật mầm sau 8,32 ngày, sau 8 tuần nuôi cấy có 1,83 chồi/cây, chồi màu xanh, sinh trưởng trung bình, bẹ lá màu xanh, kích thước vừa phải, lá màu xanh, phiến lá trung bình, cây cao 4,98 cm (thấp hơn 2,42 lần so với cây trồng trên môi trường MS) và đạt 3,68 lá/cây. Cây nuôi trên môi trường 1/4 MS sau 11,46 ngày bật mầm (chậm hơn với cây nuôi trên môi trường MS 5,34 ngày), sau 8 tuần nuôi cấy có 0,91 chồi/cây, chồi sinh trưởng kém, màu đen, bẹ lá mảnh màu trắng, lá hơi vàng, phiến lá rất nhỏ, cây cao 4,12 cm và chỉ có 1,02 lá/cây (thấp hơn 6,59 lần so với cây nuôi trên môi trường MS và 3,61 lần so với cây nuôi trên môi trường 1/2 MS). Như vậy, môi trường 1/2 MS và 1/4 MS làm chậm quá trình sinh trưởng, tái sinh của cây khoai môn sọ Cụ Cang *in vitro*. Tuy nhiên, khi nuôi trên môi trường 1/4 MS do dinh dưỡng thấp nên cây sinh trưởng kém, chồi không đảm bảo chất lượng cho tái sinh sau bảo quản. Môi trường nuôi cấy 1/2 MS đã đáp ứng được mục đích là cây *in vitro* sinh trưởng chậm để tăng khoảng thời gian giữa các lần cấy chuyên, đồng thời chồi vẫn đảm bảo tái sinh cây sau

thời gian bảo quản. Do đó, các nghiên cứu tiếp theo chúng tôi sử dụng môi trường nuôi cấy 1/2 MS có bổ sung agar 8 g/l.

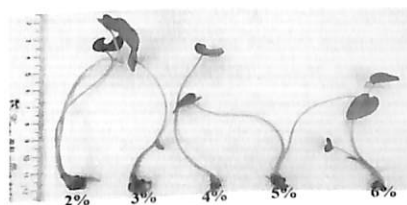
Ảnh hưởng của hàm lượng saccharose đến sinh trưởng cây khoai môn sọ Cù Cang *in vitro*: sinh trưởng của chồi khoai môn sọ Cù Cang *in vitro* được nuôi ở môi trường 1/2 MS + agar 8 g/l có bổ sung saccharose với các nồng độ 2, 3, 4, 5 và 6% tương ứng với 5 công thức thí nghiệm. Bảng 3 và hình 3 thể hiện kết quả sau 8 tuần nuôi cấy.

Bảng 3. Ảnh hưởng của hàm lượng saccharose đến khả năng sinh trưởng của cây khoai môn sọ Cù Cang *in vitro* sau 8 tuần nuôi cấy.

Hàm lượng saccharose (%)	Thời gian bật mầm (ngày)	Số chồi/cây (chồi)	Trạng thái chồi	Chiều cao cây (cm)	Số lá/cây (lá)
2	8,26 ^a	1,92 ^a	***	6,17 ^a	2,98 ^a
3	8,58 ^a	1,83 ^a	***	5,86 ^a	3,01 ^b
4	10,42 ^b	1,64 ^b	**	4,12 ^b	2,87 ^{ab}
5	11,76 ^c	1,45 ^c	**	4,44 ^b	2,77 ^{ab}
6	13,52 ^d	1,01 ^d	*	3,43 ^c	2,65 ^c

***: chồi sinh trưởng trung bình, màu xanh, bẹ lá màu xanh, lá màu xanh, phiến lá trung bình; **: chồi sinh trưởng chậm, màu xanh nhạt, bẹ lá màu xanh nhạt, lá màu xanh, phiến lá trung bình; *: chồi sinh trưởng chậm, màu xanh nhạt, bẹ lá màu xanh nhạt, lá màu xanh nhạt, phiến lá nhỏ. Các chữ cái khác nhau trong cột biểu thị sự sai khác có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$ (Duncan's test).

Saccharose là nguồn carbon hữu cơ được sử dụng phổ biến trong nuôi cấy *in vitro*. Nhiều nghiên cứu cho thấy, nồng độ saccharose trong môi trường nuôi cấy thích hợp cho đa số các loại cây trồng nằm trong khoảng 2-3% [2, 4, 8]. Kết quả ở bảng 3 và hình 3 cho thấy, hàm lượng saccharose trong môi trường nuôi cấy có ảnh hưởng đến sinh trưởng, phát triển của khoai môn sọ Cù Cang *in vitro*. Trong môi trường nuôi cấy có nồng độ saccharose cao thì sinh trưởng của khoai môn sọ Cù Cang *in vitro* có xu hướng giảm, hàm lượng saccharose càng tăng thì càng ức chế sự sinh trưởng của cây. Ở nồng độ saccharose 2 và 3% các chỉ số sinh trưởng của cây *in vitro* không có sự sai khác về mặt thống kê với độ tin cậy 95%. Khi hàm lượng saccharose tăng lên, các chỉ số sinh trưởng có xu hướng giảm. Môi trường nuôi cấy chứa saccharose 6% thì cây *in vitro* sinh trưởng chậm một cách rõ rệt, cây bật mầm sau 13,52 ngày (chậm hơn với nồng độ 2% là 5,26 ngày), chồi sinh trưởng chậm, lá màu xanh nhạt và phiến lá nhỏ, chiều cao cây đạt 3,43 cm, giảm 1,80 lần so với chiều cao cây nuôi trên môi trường saccharose 2%.



Hình 3. Ảnh hưởng của hàm lượng saccharose đến sinh trưởng cây khoai môn sọ Cù Cang *in vitro*.

Như vậy, môi trường nuôi cấy chứa hàm lượng saccharose trên 3% đều làm cây khoai môn sọ Cù Cang *in vitro* sinh trưởng chậm, tuy nhiên cây lại bị già sinh lý sớm, nên khả năng tái sinh của cây sau thời gian bảo quản bị ảnh hưởng. Kết quả nghiên cứu của Vũ Ngọc Lan và cs (2015) [4] khi nghiên cứu lưu giữ *in vitro*

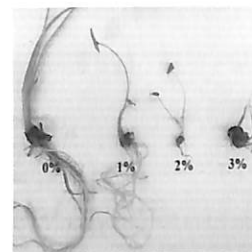
khoai môn bản địa Bắc Kạn cũng cho kết quả khi tăng hàm lượng saccharose trong môi trường nuôi cấy thì làm chậm sinh trưởng của cây *in vitro*, thậm chí khi hàm lượng đường tăng quá cao có thể làm cây trồng bị thoái hóa. Như vậy, sử dụng saccharose với hàm lượng cao để làm chậm sự sinh trưởng cây khoai môn sọ Cù Cang *in vitro* là không phù hợp.

Ảnh hưởng của hàm lượng mannitol đến sinh trưởng cây khoai môn sọ Cù Cang *in vitro*: mannitol là chất thường được sử dụng trong bảo quản, lưu giữ mẫu *in vitro* bởi nó có tác dụng kìm hãm sinh trưởng của mẫu cây. Khi bổ sung mannitol vào môi trường nuôi cấy sẽ làm tăng áp suất thẩm thấu của môi trường, dẫn đến làm giảm khả năng hấp thu nước, chất dinh dưỡng từ môi trường của mẫu cây và làm chậm quá trình phân chia của tế bào [14, 16]. Chính vì vậy, nghiên cứu tác động của nồng độ mannitol tới sinh trưởng cây khoai môn sọ Cù Cang *in vitro* đã được tiến hành với chồi *in vitro* được nuôi ở môi trường 1/2 MS + agar 8 g/l chứa mannitol với các nồng độ khác nhau. Kết quả sau 8 tuần nuôi cấy được trình bày ở bảng 4 và hình 4.

Bảng 4. Ảnh hưởng của hàm lượng mannitol đến khả năng sinh trưởng của cây khoai môn sọ Cù Cang *in vitro* sau 8 tuần nuôi cấy.

Hàm lượng mannitol (%)	Thời gian bật mầm (ngày)	Số chồi/cây (chồi)	Trạng thái chồi	Chiều cao cây (cm)	Số lá/cây (lá)
0	7,96 ^a	2,09 ^a	***	6,67 ^a	3,58 ^a
1	8,58 ^b	1,53 ^b	***	3,16 ^a	2,21 ^b
2	10,42 ^c	1,04 ^c	**	2,92 ^b	1,87 ^{ab}
3	13,76 ^d	0,85 ^d	*	0,84 ^b	0,77 ^{ab}

***: chồi sinh trưởng trung bình, màu xanh, bẹ lá màu xanh, lá màu xanh, phiến lá trung bình; **: chồi sinh trưởng chậm, màu xanh nhạt, bẹ lá màu xanh nhạt, lá màu xanh nhạt, phiến lá nhỏ; *: chồi không sinh trưởng, màu đen, bẹ lá màu trắng, lá màu vàng, phiến lá rất nhỏ. Các chữ cái khác nhau trong cột biểu thị sự sai khác có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$ (Duncan's test).



Hình 4. Ảnh hưởng của hàm lượng mannitol đến sinh trưởng cây khoai môn sọ Cù Cang *in vitro*.

Kết quả bảng 4 và hình 4 cho thấy, môi trường nuôi cấy chứa mannitol có tác động lớn đến việc làm cây khoai môn sọ Cù Cang *in vitro* sinh trưởng chậm. Môi trường nuôi cấy bổ sung mannitol càng cao thì càng làm chậm quá trình sinh trưởng, phát triển của cây *in vitro*. Khi môi trường nuôi cấy chứa mannitol 1% thì chồi sinh trưởng trung bình, màu xanh, cao 3,16 cm với 2,21 lá/cây. Khi tăng nồng độ lên 2% thì chồi biểu hiện sự già hóa, sinh trưởng chậm, lá xanh nhạt và chiều cao đạt 2,92 cm. Khi nồng độ mannitol trong môi trường là 3% thì chồi thể hiện sự thoái hóa, chuyển sang màu đen và không sinh trưởng.

Như vậy, môi trường nuôi cấy chứa hàm lượng mannitol 1% là phù hợp nhất cho mục đích làm cây *in vitro* sinh trưởng chậm, chồi

vừa đảm bảo chất lượng cho tái sinh sau thời gian lưu giữ, có hệ số nhân đạt 1,53 chồi/cây, và đạt 2,21 lá/cây. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi thu được khác với Vũ Ngọc Lan và cs (2015) [4] nghiên cứu lưu giữ *in vitro* nguồn gen khoai môn bản địa Bắc Kạn cho kết quả môi trường MS bổ sung mannitol 2% là thích hợp nhất. Sự khác biệt này rất có thể liên quan đến hàm lượng dinh dưỡng của môi trường nuôi cấy, chúng tôi sử dụng môi trường 1/2 MS, trong khi Vũ Ngọc Lan và cs sử dụng môi trường MS đủ và giống khoai môn sọ khác nhau.

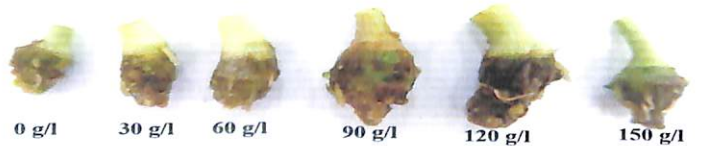
Tạo củ *in vitro* và lưu giữ, bảo quản nguồn gen cây khoai môn sọ Cù Cang

Trong lưu giữ bảo quản *in vitro* khoai môn sọ, tạo củ *in vitro* rất có ý nghĩa bởi củ *in vitro* có thể bảo quản được trong thời gian dài, thời gian bảo quản củ *in vitro* có thể lên đến 15 tháng, trong khi đó bảo quản chồi tối đa chỉ được 6 tháng [8]. Các nghiên cứu cho thấy, hàm lượng saccharose trong môi trường nuôi cấy có ảnh hưởng đến khả năng tạo củ *in vitro* khoai môn sọ [4]. Kết quả hình thành củ *in vitro* của khoai môn sọ Cù Cang (Sơn La) sau 8 tuần nuôi cấy trong môi trường chứa nồng độ saccharose khác nhau được trình bày ở bảng 5 và hình 5.

Bảng 5. Ảnh hưởng của hàm lượng saccharose đến hình thành củ *in vitro* của khoai môn sọ Cù Cang sau 8 tuần nuôi cấy.

Hàm lượng saccharose (g/l)	Tỷ lệ mẫu hình thành củ (%)	Khối lượng trung bình của củ (g)
0	69,85	0,26 ^a
30	100	0,59 ^b
60	100	0,89 ^c
90	100	1,58 ^d
120	100	1,46 ^e
150	100	0,92 ^e

Các chữ cái khác nhau trong cột biểu thị sự sai khác có ý nghĩa thống kê với p<0,05 (Duncan's test).



Hình 5. Ảnh hưởng của hàm lượng saccharose đến hình thành củ *in vitro* của khoai môn sọ Cù Cang.

Kết quả hình 5 cho thấy, các chồi chỉ tạo củ cái, không tạo củ con (nhánh). Qua bảng 5 cho thấy, chồi *in vitro* khoai môn sọ được nuôi trong 1/2 MS số mẫu hình thành củ đạt 69,85%. Các môi trường bổ sung saccharose với các nồng độ khác nhau đều hình thành củ, cho thấy saccharose có ảnh hưởng rõ rệt lên sự tạo củ *in vitro* của khoai môn sọ. Khối lượng trung bình của củ khoai môn sọ *in vitro* tăng dần từ 0,26 đến 1,58 g khi nồng độ đường tăng dần từ 0 đến 90 g/l. Ở môi trường chứa saccharose 90 g/l khối lượng củ đạt 1,58 g, cao hơn khối lượng củ ở môi trường không bổ sung saccharose 6,08 lần. Khi tăng hàm lượng saccharose khối lượng củ *in vitro* có xu hướng giảm dần (từ 1,46 g ở hàm lượng 120 g/l giảm còn 0,92 g ở hàm lượng 150 g/l). Như vậy, khoai môn sọ Cù Cang được nuôi trong 1/2 MS bổ sung hàm lượng saccharose 90 g/l là môi trường thích hợp nhất để tạo củ *in vitro*.

Kết luận

Thời gian khử trùng củ con khoai môn sọ Cù Cang bằng HgCl₂ 0,2% phù hợp là 11 phút kép (9 phút lần 1 và 2 phút lần 2), lượng mẫu sạch và đảm bảo chồi sinh trưởng đạt 62.83%. Lưu giữ, bảo quản cây *in vitro* khoai môn sọ Cù Cang trong môi trường 1/2 MS + agar 8 g/l + mannitol 1 g/l là thích hợp, vừa làm cây sinh trưởng chậm, tăng thời gian giữa các lần cấy chuyển, đồng thời vẫn đảm bảo khả năng tái sinh chồi sau 11 tháng bảo quản. Môi trường thích hợp nhất để tạo củ *in vitro* khoai môn sọ Cù Cang là 1/2 MS + saccharose 90 g/l + agar 8 g/l, củ *in vitro* có khối lượng cao nhất đạt 1,58 g.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] Ramanatha, V. Rao, et al. (2010), *The global diversity of taro: Ethnobotany and conservation*, Biodiversity International.

[2] S. Lakhanpaul, et al. (2003), "Analysis of genetic diversity in Indian taro [*Colocasia esculenta* (L.) Schott] using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers". *Genetic Resources and Crop Evolution*, **50**, pp.603-609.

[3] Nguyen Thi Ngoc Hue, Nguyen Van Viet, Vu Linh Chi, M.S. Prana (2010), *The global diversity of taro: Ethnobotany and conservation*, Biodiversity International.

[4] Vũ Ngọc Lan, Nguyễn Thị Phương Dung, Nguyễn Văn Phú (2015), "Lưu giữ *in vitro* nguồn gen khoai môn bản địa (*Colocasia esculenta* (L.) Schott)", *Tạp chí Khoa học và Phát triển*, **13(4)**, tr.623-633.

[5] Đặng Thị Thanh Mai, Nguyễn Xuân Việt (2011), "Nghiên cứu sự tạo củ *in vitro* và sinh trưởng ở cây trồng từ củ *in vitro* của một số giống khoai môn sọ", *Tạp chí Khoa học, Trường Đại học Sư phạm Hà Nội*, **3**, tr.51-58.

[6] Trần Thị Lệ, Trần Thị Triệu Hà (2011), "Nghiên cứu quy trình nhân giống *in vitro* một số giống khoai sọ (*Colocasia antiquorum*)", *Tạp chí Khoa học, Đại học Huế*, **67**, tr.41-50.

[7] Su P. Zhou, et al. (1999), "Induction and characterization of *in vitro* corms of diploid - taro", *Plant Cell, Tissue and Organ. Culture*, **57**, pp.173-178.

[8] Z. Hussain, 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**, pp.535-542.

[9] M.K.R. Bhuiyan, M.J. Hossain, M.M. Haque (2016), "In vitro conservation of taro (*Colocasia esculenta* var. *globulifera*) as influenced by mannitol", *Bangladesh J. Agril. Res.*, **41**, pp.67-74.

[10] Vũ Thị Nụ (2012), "Nghiên cứu ảnh hưởng của một số biện pháp kỹ thuật đến sinh trưởng, năng suất khoai sọ Cù Cang tại Thuận Châu, Sơn La", *Tạp chí Khoa học, Trường Đại học Tây Bắc*, **7**, tr.35-41.

[11] T. Murashige, F. Skoog (1962), "A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures", *Physiol. Plant*, **15**, pp.473-497.

[12] Duong Tan Nhut, Nguyen Thi Dieu Huong, Dinh Van Kiem (2003), *Study on tissue culture and its correlative factor of Colocasia esculenta*, Horticulture Digest.

[13] M.B. Evelyn, et al. (2017), "Application of *in vitro* micropropagation technique for sustainable production of four local taro cultivars [*Colocasia esculenta* (L.) Schott] in Cameroon African", *Journal of Biotechnology*, **16**, pp.1638-1645.

[14] J. Gopal, Nain Sukh Chauhan (2010), "Slow growth in vitro conservation of potato germplasm at low temperature", *Potato Research*, **53**, pp.141-149.

[15] Vũ Ngọc Lan, Nguyễn Thị Lý Anh (2013), "Nhân giống *in vitro* loài lan bản địa *Dendrobium nobile* Lindl", *Tạp chí Khoa học và Phát triển*, **11(7)**, tr.917-925.

[16] R.L. Jarret, N. Gawel (1991), "Chemical and environmental growth regulation of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) *in vitro*", *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, **2**, pp.153-160.