

Nhân giống in vitro loài Nưa konjac (*Amorphophallus konjac*) ở Việt Nam để bảo tồn và phục vụ sản xuất

Trần Văn Tiến^{1,2*}, Nguyễn Văn Dư³, Nguyễn Công Sỹ³, Hà Văn Huân⁴, Nguyễn Minh Quang⁴

¹Học viện Hành chính Quốc gia

²Học viện KH&CN, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam

³Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật

⁴Trường Đại học Lâm nghiệp

Ngày nhận bài 13/3/2017; ngày chuyển phân biên 20/3/2017; ngày nhận phân biên 17/4/2017; ngày chấp nhận đăng 21/4/2017

Tóm tắt:

Nưa konjac (*Amorphophallus konjac*) là một trong những loài Nưa có giá trị kinh tế được trồng ở nhiều nước trên thế giới như Trung Quốc, Nhật Bản... Củ Nưa konjac có chứa glucomannan là nguyên liệu cho công nghiệp chế biến thực phẩm và thực phẩm chức năng. Ở Việt Nam, loài Nưa konjac được tìm thấy mọc tự nhiên một số tỉnh phía Bắc như Lào Cai, Hà Giang... Hàm lượng glucomannan phân tích ở củ Nưa konjac Việt Nam là 44,97% khối lượng khô, gần tương đương với các giống Nưa konjac đang trồng ở Trung Quốc (hàm lượng khoảng 45-55%). Trong bài báo này, các tác giả trình bày kết quả nhân giống in vitro loài Nưa konjac ở Việt Nam để bảo tồn và phục vụ sản xuất. Kết quả nghiên cứu cho thấy, chồi đỉnh được khử trùng tốt nhất khi sử dụng dung dịch Javen 60% (NaClO) trong 12 phút, tỷ lệ mẫu sạch in vitro đạt 100%, tỷ lệ mẫu sạch tái sinh đạt 100%, thời gian mẫu nảy chồi là sau 15 ngày nuôi. Công thức môi trường dinh dưỡng thích hợp nhất để tái sinh chồi Nưa konjac in vitro là MS + 2 mg/l BAP + 0,2 mg/l Kinetin + 8 g/l agar + 30 g/l sucrose, trung bình đạt 5,22 chồi/mẫu và chiều cao trung bình của chồi là 3,84 cm, chất lượng chồi tốt. Công thức môi trường ra rễ tốt nhất là 1/2 MS + 8 g/l agar + 14 g/l sucrose + 0,4 mg/l IBA + 1 g/l than hoạt tính, tỷ lệ chồi ra rễ đạt 100%, số rễ trung bình/chồi là 4,98, chiều dài trung bình của rễ đạt 2,67 cm, sau 7 ngày nuôi chồi bắt đầu ra rễ. Giá thể thích hợp nhất cho trồng cây Nưa konjac in vitro là 50% đất + 30% cát + 20% trấu hun, tỷ lệ cây sống cao nhất đạt 94,07% (sau 4 tuần trồng). Cây khỏe mạnh, sinh trưởng và phát triển bình thường.

Từ khóa: *Amorphophallus konjac*, đỉnh sinh trưởng, nhân giống in vitro, tái sinh chồi.

Chỉ số phân loại: 4.6

Mở đầu

Konjac (*Amorphophallus konjac*) là một loài trong chi Nưa (*Amorphophallus*) thuộc họ Ráy (*Araceae*). Củ Nưa konjac có chứa glucomannan, một loại đường polysacharid tan trong nước [1]. Các sản phẩm được làm từ bột củ Nưa konjac có chứa đường glucomannan có nhiều tác dụng khác nhau như bổ sung dinh dưỡng, điều chỉnh nồng độ đường, làm giảm tỷ lệ mỡ máu, giảm sự thèm ăn ở người béo phì [1, 2]. Với giá trị của đường glucomannan, rất nhiều quốc gia trên thế giới (như Trung Quốc, Nhật Bản, New Zealand...) đã tiến hành trồng Nưa konjac với diện tích lên tới nhiều ngàn ha nhằm phát triển kinh tế. Ở Trung Quốc, năm 1998 có khoảng 30 ngàn ha đất trồng Nưa konjac [3]. Ở Nhật Bản từ những năm 70 của thế kỷ trước, hàng trăm tấn Nưa konjac đã được thu hoạch, đem về nguồn lợi kinh tế gần 2 tỷ yên [4].

Ở Việt Nam, loài Nưa konjac được tìm thấy mọc tự nhiên ở phía Bắc (Hà Giang, Lào Cai). Hàm lượng đường glucomannan phân tích từ các mẫu củ 3 năm tuổi thu hái trong tự nhiên bằng phương pháp so màu của M. Chua và cs đạt

44,97% trọng lượng khô. Như vậy, hàm lượng glucomannan của loài Nưa konjac ở Việt Nam là cao gần tương đương với các giống Nưa konjac có hàm lượng glucomannan cao đang trồng sản xuất ở Trung Quốc (hàm lượng glucomannan đạt 45-55% trọng lượng khô) [3]. Ở tỉnh Hà Giang và Lào Cai, người dân địa phương đã khai thác sử dụng loài cây này để chế biến các món ăn truyền thống từ lâu đời, nhưng do không được bảo tồn và định hướng phát triển nên số lượng cá thể loài Nưa konjac trong tự nhiên ở 2 tỉnh này ngày càng suy giảm.

Ngày nay, kỹ thuật nuôi cấy mô tế bào thực vật được áp dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực, đặc biệt là nhân nhanh và bảo tồn các loài thực vật quý hiếm, các giống cây trồng có giá trị kinh tế cao. Trong những năm qua, các nghiên cứu về loài Nưa konjac tập trung chủ yếu về đặc điểm sinh học, hóa học, chế biến bột glucomannan, tìm hiểu tri thức bản địa về khai thác sử dụng củ trong chế biến thực phẩm và thực phẩm chức năng của các tác giả như Võ Văn Chi (1999), Đỗ Tất Lợi (2005), Nguyễn Văn Dư (2012)... [5-7]. Cho đến nay, chưa có

*Tác giả liên hệ: Email: vantienbvn@gmail.com

In vitro propagation of *Amorphophallus konjac* species in Vietnam for conservation and production

Van Tien Tran^{1,2}, Van Du Nguyen³, Cong Sy Nguyen³,
Van Huan Ha⁴, Minh Quang Nguyen⁴

¹National Academy of Public Administration (NAPA)

²Graduate University of Science and Technology (GUST),

Vietnam Academy of Science and Technology (VAST)

³Institute of Ecology and Biological Resources (IEBR)

⁴Vietnam National University of Forestry (VNUF)

Received 13 March 2017; accepted 21 April 2017

Abstract:

Amorphophallus konjac is a species with high economic values; it is grown in some countries including China, Japan, and so on. Glucomanan in the tuber of *A. konjac* is a material for food industry and functional food processing. In Vietnam, *A. konjac* is found naturally growing in Ha Giang and Lao Cai provinces. The content of glucomanan in tubers of Vietnamese *A. konjac* is 44.97% (dry weight), nearly equal to that of the *A. konjac* variety in China with 45-55%. In this paper, we present the results of in vitro propagation of *A. konjac* species in Vietnam for conservation and production. The results showed that the top bud was sterilized effectively by using 60% sodium hypochlorite (NaOCl) in 12 minutes. The pure rate of in vitro samples was 100%, the regenerated rate of clean samples was 100%, and the time for budding was after 15 days. The best nutrient medium for bud regeneration of *A. konjac* was: MS + 2 mg/l BAP + 0.2 mg/l Kinetin + 8 g/l agar + 30 g/l sucrose, the average number of buds was 5.22 buds per sample, and the average height of bud was 3.84 cm with high quality. The best nutrient medium for rooting was 1/2 MS + 8 g/l agar + 14 g/l sucrose + 0.4 mg/l IBA + 1 g/l activated carbon, with the rooting rate of 100%, the average roots as 4.98 roots/shoot, the average length of roots as 2.67cm, after 7 days of culture. The most appropriate substrate for planting in vitro *A. konjac* was 50% soil + 30% sand + 20% rice hull ash, which provided the highest survival rates at 94.07%. After 4 weeks of planting, the trees grew and developed normally.

Keywords: *Amorphophallus konjac*, apical meristems, bud regeneration, in vitro propagation.

Classification number: 4.6

nghiên cứu nào thực hiện nhân giống nuôi cấy mô tế bào loài Nưa konjac ở Việt Nam nhằm bảo tồn và phát triển loài cây có giá trị kinh tế này.

Từ những cơ sở trên có thể thấy, việc nghiên cứu nhân giống in vitro loài Nưa konjac ở Việt Nam để phục vụ bảo tồn và sản xuất giống là rất cần thiết. Bài báo trình bày các kết quả về nhân giống in vitro loài Nưa konjac ở Việt Nam nhằm tạo ra số lượng lớn cá thể loài có hàm lượng glucomanan cao và sạch bệnh đáp ứng nhu cầu sản xuất trên quy mô lớn.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu

Củ cây Nưa konjac (*Amorphophallus konjac*) thu được ở huyện Phó Bảng, tỉnh Hà Giang. Đoạn chồi đỉnh dài 2-3 cm của chồi củ được sử dụng để làm vật liệu nhân giống.



Hình 1. Củ cây Nưa konjac.

Phương pháp nghiên cứu

Các thí nghiệm được bố trí theo kiểu ngẫu nhiên hoàn toàn. Số mẫu của mỗi công thức thí nghiệm phải đủ lớn (≥ 30). Thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Kết quả nghiên cứu được xử lý để thu giá trị trung bình và phân tích Duncan's test bằng phần mềm SPSS 20.0 với mức xác suất có ý nghĩa $\alpha = 0,05$ và phần mềm Microsoft Office Excel 2007. Thời điểm thu thập số liệu sau 2 tuần nuôi cấy.

Các môi trường thí nghiệm được chỉnh pH = 5,8, sau đó khử trùng ở 120°C trong thời gian 20 phút. Các mẫu cấy được nuôi ở điều kiện ánh sáng trắng 12 giờ/ngày, cường độ 3.000 lux, nhiệt độ 25-27°C.

Nghiên cứu được tiến hành với 7 thí nghiệm như sau:

Thí nghiệm 1 - Ảnh hưởng hóa chất và thời gian khử trùng đến khả năng tạo mẫu sạch in vitro:

Khử trùng mẫu: Đoạn chồi đỉnh dài 2-3 cm được lấy từ chồi cây Nưa konjac, chọn chồi từ củ 2-3 năm tuổi, không thối, sức sống của cây tốt. Đoạn chồi đỉnh được đựng trong ống phancol, lắc rửa mạnh bằng nước sạch và dung dịch nước xà phòng để loại bỏ chất bẩn bám trên bề mặt. Tiếp tục rửa

bằng nước cất vô trùng trong tủ cấy, lắc mạnh trong 1-2 phút để loại bỏ các chất bẩn bám trên bề mặt, lặp lại 3 lần. Sau đó tiến hành rửa bằng cồn 70% trong 30 giây rồi rửa sạch bằng nước cất vô trùng (rửa 3 lần). Sử dụng hóa chất HgCl_2 0,1% để khử trùng trong 4-8 phút và NaClO (Javel) 60% với thời gian 6-18 phút, sau đó rửa lại 4-5 lần bằng nước cất vô trùng.

Cấy mẫu vào môi trường: Đoạn chồi đỉnh sau khi xử lý được đưa vào đĩa vô trùng, dùng giấy thấm vô trùng để thấm khô nước trên bề mặt mẫu, sau đó tách lớp bao bọc bên ngoài, loại phần mô tổn thương và cắt thành đoạn 1 cm cấy lên môi trường MS (Murashige and Skoog Medium) + 8 g/l agar + 30 g/l sucrose.

Thí nghiệm 2 - Ảnh hưởng môi trường dinh dưỡng đến khả năng tái sinh chồi Nưa konjac in vitro: Trong thí nghiệm này, chúng tôi sử dụng chồi của cây mầm in vitro để cấy vào các loại môi trường dinh dưỡng cơ bản khác nhau, gồm: Môi trường MS, WPM (Woody Plant Medium), B5 (Gamborg Medium), N6 (Chu Medium), các loại môi trường này đều được bổ sung 0,5 mg/l BAP + 8 g/l agar + 30 g/l sucrose nhằm xác định môi trường dinh dưỡng thích hợp cho tái sinh chồi Nưa konjac in vitro.

Thí nghiệm 3 - Ảnh hưởng nồng độ BAP đến khả năng tái sinh chồi Nưa konjac in vitro: Đối với cây Nưa konjac, chúng tôi nghiên cứu ảnh hưởng của hàm lượng BAP đến sự tạo thành chồi mới ở dải nồng độ 0,5-3,0 mg/l. Thí nghiệm được tiến hành với 7 công thức, mỗi công thức được tiến hành trên môi trường dinh dưỡng cơ bản đã xác định được ở thí nghiệm 2, bổ sung 8 g/l agar + 30 g/l sucrose và chất điều hòa sinh trưởng ở các nồng độ khác nhau.

Thí nghiệm 4 - Ảnh hưởng nồng độ BAP và Kinetin đến khả năng tái sinh chồi Nưa konjac in vitro: Nồng độ BAP tối ưu cho tái sinh chồi in vitro được sử dụng để tiếp tục nghiên cứu ảnh hưởng tổ hợp giữa BAP và Kinetin đến khả năng nhân nhanh chồi. Công thức môi trường MS + 8 g/l agar + 30 g/l sucrose + nồng độ BAP thích hợp nhất ở thí nghiệm 3 và kinetin được bổ sung ở các nồng độ khác nhau 0,2-1,0 mg/l.

Thí nghiệm 5 - Ảnh hưởng môi trường dinh dưỡng đến khả năng ra rễ của chồi Nưa konjac in vitro: Chồi được tạo ra với số lượng lớn, đủ tiêu chuẩn (đạt kích thước 3-5 cm) được cắt và cấy chuyển sang môi trường tạo rễ là: Công thức môi trường MS (1962) và 1/2 MS (các chất khoáng đa lượng và vi lượng giảm 1/2) + 8 g/l agar + 0,5 mg/l IBA + 1 g/l than hoạt tính và bổ sung sucrose với các hàm lượng khác nhau (12-20 g/l).

Thí nghiệm 6 - Ảnh hưởng nồng độ IBA đến khả năng ra rễ của chồi Nưa konjac in vitro: Sau khi xác định được môi trường dinh dưỡng thích hợp cho ra rễ của chồi Nưa konjac in vitro, chúng tôi tiến hành nghiên cứu ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng IBA đến khả năng ra rễ của chồi. Thí nghiệm được bố trí sử dụng môi trường dinh dưỡng thích hợp đã xác

định được ở thí nghiệm 5, bổ sung IBA với các nồng độ khác nhau (0-1 mg/l).

Thí nghiệm 7 - Ảnh hưởng của giá thể đến tỷ lệ sống của cây Nưa konjac in vitro ở vườn ươm: Để xác định ảnh hưởng của thành phần giá thể trồng cây đến tỷ lệ sống và sinh trưởng của cây Nưa konjac in vitro khi đưa ra trồng thử nghiệm ở vườn ươm, chúng tôi tiến hành thử nghiệm với 4 công thức là 100% đất tầng B, 100% cát, 50% đất + 50% cát, 50% đất tầng B + 30% cát + 20% trấu hun.

Kết quả và thảo luận

Ảnh hưởng hóa chất và thời gian khử trùng đến khả năng tạo mẫu sạch in vitro

Trong thí nghiệm này sử dụng HgCl_2 0,1% để khử trùng với thời gian 4, 6 và 8 phút và NaClO (Javel) 60% trong 6, 12 và 18 phút. Kết quả thí nghiệm được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Ảnh hưởng của loại hóa chất và thời gian khử trùng đến khả năng tạo mẫu sạch in vitro.

Hóa chất	Thời gian (phút)	Tổng số mẫu cấy (mẫu)	Mẫu sạch		Mẫu sạch tái sinh		Thời gian mẫu này chồi (ngày)
			Số mẫu sạch (mẫu)	Tỷ lệ mẫu sạch (%)	Số mẫu sạch này chồi	Tỷ lệ mẫu sạch này chồi (%)	
HgCl_2 0,1%	4	30	26,00	86,67	21,33 ^c	71,11	16
	6	30	27,33	91,11	13,67 ^a	45,56	21
	8	30	30,00	100,00	3,67 ^c	12,22	25
Javen 60% (NaClO)	6	30	22,67	75,56	21,67 ^c	72,22	15
	12	30	30,00	100,00	30 ^a	100,00	15
	18	30	30,00	100,00	25 ^b	83,33	19

(a,b,c,...): Những chữ cái khác nhau được nêu trong các cột biểu diễn sự khác nhau có ý nghĩa $\alpha = 0,05$ trong Duncan's test.

Kết quả bảng 1 cho thấy, khi khử trùng bằng HgCl_2 0,1% cho tỷ lệ mẫu sạch cao (86,67-100%) nhưng tỷ lệ mẫu tái sinh lại thấp. Khi tăng thời gian khử trùng thì tỷ lệ mẫu này chồi giảm xuống rất thấp (chỉ đạt 12,22% ở công thức khử trùng bằng HgCl_2 0,1% trong 8 phút) và thời gian phôi củ này mầm cũng chậm hơn. Ở công thức khử trùng bằng HgCl_2 0,1% trong 4 phút tỷ lệ mẫu sạch đạt 86,67%, tỷ lệ mẫu này chồi đạt cao nhất (71,11%) và thời gian tái sinh chồi thấp (16 ngày).

Khi khử trùng mẫu với hoá chất Javen 60% đem lại kết quả tốt hơn, cho tỷ lệ mẫu sạch và tỷ lệ mẫu tái sinh cao. Với thời gian khử trùng 12 phút, tỷ lệ mẫu sạch và tái sinh đạt cao nhất (100%), sau 15 ngày nuôi cấy mẫu này chồi. Với thời gian khử trùng là 6 và 18 phút cho tỷ lệ mẫu tái sinh thấp hơn, chỉ đạt 72,22 và 83,33%.



Hình 2. Đỉnh sinh trưởng Nưa konjac nảy chồi trên môi trường MS (A: Mẫu khử trùng bằng Javen 60% trong 12 phút; B: Mẫu khử trùng bằng HgCl₂ 0,1% trong 4 phút).

Ảnh hưởng của môi trường dinh dưỡng đến khả năng tái sinh chồi Nưa konjac in vitro

Trong thí nghiệm này, chúng tôi sử dụng chồi của cây mầm in vitro để cấy vào các loại môi trường dinh dưỡng cơ bản khác nhau. Kết quả thí nghiệm được thu thập sau 3 tuần nuôi cấy và được thông kê trong bảng 2.

Bảng 2. Ảnh hưởng của môi trường dinh dưỡng đến khả năng tái sinh chồi Nưa konjac in vitro.

Môi trường dinh dưỡng	Tổng số mẫu cấy ban đầu (chồi)	Số mẫu tái sinh chồi	Tỷ lệ mẫu tái sinh chồi (%)	Số chồi Trung bình/mẫu
1/2 MS	45	37,67 ^a	83,70	1,81 ^b
MS	45	41,33 ^a	91,85	2,45 ^a
WPM	45	39,33 ^a	87,41	1,82 ^b
B5	45	30,33 ^b	67,41	1,58 ^b
N6	45	25,67 ^c	57,04	1,34 ^b

Kết quả bảng 2 cho thấy, ở công thức môi trường MS thì mẫu cấy có khả năng tái sinh tốt nhất (đạt 91,85%), số chồi trung bình/mẫu đạt 2,45 và chất lượng chồi tốt (chồi mập, khỏe mạnh, lá xanh đậm, phát triển nhanh).

Trong các môi trường còn lại thì môi trường WPM cho tỷ lệ mẫu tái sinh cao hơn cả (đạt 87,41%), số chồi trung bình là 1,82. Với môi trường 1/2 MS cho số chồi trung bình/mẫu chỉ đạt 1,81, tỷ lệ tái sinh đạt 83,7% và chất lượng chồi ở mức trung bình (chồi yếu, lá xanh vàng, phiến lá hẹp, mỏng); còn môi trường B5 và N6 cho tỷ lệ mẫu tái sinh thấp, chất lượng chồi kém.

Ảnh hưởng của BAP đến khả năng tái sinh chồi Nưa konjac in vitro

Trong thí nghiệm này, chúng tôi sử dụng môi trường cơ bản MS có bổ sung chất điều hòa sinh trưởng BAP với các nồng độ khác nhau: 0; 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5 và 3,0 mg/l. Kết quả thí nghiệm được thu thập sau 3 tuần nuôi cấy và được thể hiện ở bảng 3.

Bảng 3. Ảnh hưởng của BAP đến khả năng tái sinh chồi Nưa konjac in vitro.

BAP (mg/l)	Tổng số mẫu cấy (mẫu)	Số mẫu tái sinh chồi (mẫu)	Tỷ lệ mẫu tái sinh chồi (%)	Số chồi trung bình/mẫu (chồi)	Chiều cao trung bình chồi (cm)
0	45	24,67 ^c	54,81	1,23 ^c	1,51 ^d
0,5	45	36,33 ^c	80,74	1,92 ^c	1,47 ^d
1	45	40,33 ^b	89,63	1,66 ^d	1,72 ^c
1,5	45	41,33 ^b	91,85	2,29 ^b	2,25 ^b
2	45	45,00 ^a	100,00	2,75 ^a	2,96 ^c
2,5	45	33,33 ^d	74,07	1,67 ^d	1,29 ^e
3	45	32,33 ^d	71,85	1,27 ^e	1,18 ^e

Kết quả bảng 3 cho thấy, công thức môi trường cho tỷ lệ mẫu tái sinh chồi cao nhất là 2 mg/l BAP (đạt 100%), tỷ lệ mẫu tái sinh chồi thấp nhất là công thức đối chứng (0 mg/l BAP), đạt 54,81%. Các công thức môi trường nồng độ BAP khác đều cho tỷ lệ mẫu tái sinh đạt trên 70%. Từ kết quả thu được có thể khẳng định, BAP ở các nồng độ khác nhau có ảnh hưởng mạnh mẽ tới khả năng phát sinh chồi của mẫu cấy. Khi tăng hàm lượng BAP cao hơn 2 mg/l ở các thí nghiệm sau thì số mẫu tái sinh chồi và chiều cao của chồi đều giảm, đồng thời thấy xuất hiện khối mô sẹo rất lớn.

Ảnh hưởng tổ hợp của BAP và Kinetin đến khả năng tái sinh chồi

Nhằm xác định các loại chất điều hòa sinh trưởng với nồng độ thích hợp cho tái sinh chồi Nưa konjac, trong môi trường nuôi cấy ngoài bổ sung chất điều hòa sinh trưởng là BAP, chúng tôi đã nghiên cứu ảnh hưởng của tổ hợp BAP với Kinetin bằng cách sử dụng công thức môi trường có hàm lượng 2 mg/l BAP và bổ sung thêm Kinetin ở các nồng độ khác nhau (0,2; 0,4; 0,6; 0,8 và 1,0 mg/l). Kết quả thí nghiệm được thu sau 3 tuần nuôi được thể hiện ở bảng 4.

Bảng 4. Ảnh hưởng tổ hợp của BAP và Kinetin đến khả năng tái sinh chồi Nưa konjac in vitro.

BAP (mg/l)	Kinetin (mg/l)	Tổng số mẫu cấy (mẫu)	Số mẫu tái sinh chồi (mẫu)	Tỷ lệ mẫu tái sinh (%)	Số chồi trung bình/mẫu (chồi)	Chiều cao trung bình chồi (cm)
2	0,20	40	40,00 ^a	100,00	5,22 ^a	3,84 ^a
	0,40	40	36,67 ^b	91,67	3,35 ^b	3,36 ^b
	0,60	40	34,33 ^b	85,83	2,74 ^c	3,29 ^b
	0,80	40	30,33 ^c	75,83	2,63 ^c	3,20 ^b
	1,00	40	29,67 ^c	74,17	2,33 ^d	2,79 ^c

Kết quả bảng 4 cho thấy, sự khác nhau giữa ảnh hưởng tổ hợp của Kinetin và BAP đến khả năng tái sinh chồi so với ảnh hưởng riêng rẽ của BAP. Sau khi nuôi cấy 3 tuần, công thức MS + 2 mg/l BAP + 0,2 mg/l Kinetin cho tỷ lệ mẫu tái sinh chồi cao nhất (đạt 100%), số chồi trung bình/mẫu cấy

là 5,22, chiều cao trung bình của chồi đạt 3,84 cm. Khi tăng hàm lượng Kinetin lên 1,0 mg/l cho tỷ lệ mẫu tái sinh, số chồi trung bình/mẫu và chiều cao trung bình của chồi thấp nhất. Các công thức môi trường khác (hàm lượng Kinetin 0,4; 0,6 và 0,8 mg/l) cho tỷ lệ mẫu tái sinh chồi trên 75% nhưng số chồi trung bình/mẫu và chiều cao chồi lại thấp và giảm dần khi hàm lượng Kinetin bổ sung vào môi trường tăng dần. Từ số liệu thu được có thể thấy, công thức bổ sung hàm lượng 2 mg/l BAP + 0,2 mg/l Kinetin cho số chồi trung bình gấp 1,90 lần và chiều cao chồi trung bình gấp 1,71 lần so với công thức tốt nhất khi sử dụng riêng rẽ BAP.



Hình 3. Chồi Nưa konjac trên môi trường bổ sung 2 mg/l BAP + 0,2 mg/l Kinetin sau 2 tuần nuôi cấy.

Ảnh hưởng của môi trường dinh dưỡng đến khả năng ra rễ của chồi Nưa konjac in vitro

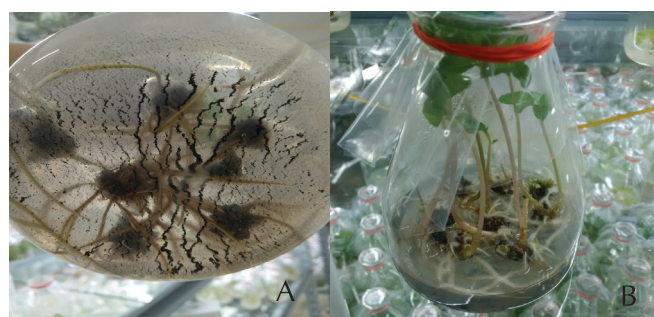
Nhằm xác định công thức môi trường dinh dưỡng để chồi Nưa konjac ra rễ đạt hiệu quả cao nhất, chúng tôi sử dụng 8 công thức môi trường khác nhau, gồm: Môi trường MS và 1/2 MS (giảm 1/2 hàm lượng các chất khoáng đa lượng và vi lượng) + 8 g/l agar + 0,5 mg/l IBA + 1 g/l than hoạt tính + đường sucrose với các hàm lượng khác nhau (12, 14, 16 và 20 g/l). Số liệu được thu thập sau 4 tuần nuôi cấy trên môi trường ra rễ và được thống kê trong bảng 5.

Bảng 5. Ảnh hưởng của môi trường dinh dưỡng đến khả năng ra rễ của chồi Nưa konjac in vitro.

Môi trường	Sucrose	Tổng số mẫu cây (mẫu)	Số chồi ra rễ (chồi)	Tỷ lệ chồi ra rễ (%)	Thời gian bắt đầu ra rễ (ngày)	Số rễ trung bình/chồi (rễ)	Chiều dài trung bình rễ (cm)
1/2 MS	12	45	37,33 ^{cd}	82,96	9	4,43 ^c	1,76 ^d
	14	45	45,00 ^a	100,00	7	4,98 ^a	2,67 ^a
	16	45	45,00 ^a	100,00	9	4,56 ^{bc}	2,09 ^c
	20	45	42,33 ^{ab}	94,07	9	4,10 ^d	2,13 ^c
MS	12	45	35,33 ^d	78,52	14	3,88 ^d	1,78 ^d
	14	45	45,00 ^a	100,00	7	4,81 ^{ab}	2,22 ^{bc}
	16	45	45,00 ^a	100,00	9	4,57 ^{bc}	2,29 ^{bc}
	20	45	40,33 ^{bc}	89,63	9	4,44 ^c	2,10 ^c

Kết quả bảng 5 cho thấy, sau 4 tuần nuôi cấy trên môi trường ra rễ có bổ sung đầy đủ các chất dinh dưỡng, chất điều hòa sinh trưởng và hàm lượng đường khác nhau cho kết quả chồi ra rễ với tỷ lệ rất khác nhau. Mẫu được nuôi cấy ở công thức 1/2 MS + 8 g/l agar + 0,5 mg/l IBA + 14 g/l sucrose cho hiệu quả cao nhất (đạt 100%), số lượng rễ trung bình/chồi đạt 4,98, chiều dài trung bình của rễ đạt 2,67 cm và thời gian chồi bắt đầu ra rễ là 7 ngày, chất lượng rễ tốt (rễ mập, khỏe mạnh), khả năng đâm xuyên mạnh, ít hình thành mô sẹo. Mẫu cấy cũng trên công thức môi trường như trên nhưng khi thay đổi hàm lượng đường (tăng/giảm) khác nhau đều cho kết quả thấp hơn. Trong đó, công thức môi trường hàm lượng đường giảm xuống còn 12 g/l cho tỷ lệ chồi ra rễ và chiều dài trung bình rễ thấp nhất (lần lượt là 82,96% và 1,76 cm).

Đối với công thức môi trường MS + 8 g/l agar + 14 g/l sucrose + 0,5 mg/l IBA cũng cho kết quả tương đối cao, tỷ lệ chồi ra rễ đạt 100%, số rễ trung bình/chồi là 4,81, chiều dài trung bình của rễ đạt 2,22 cm và thời gian chồi bắt đầu ra rễ là 7 ngày, nhưng rễ cây lại xuất hiện nhiều mô sẹo.



Hình 4. A: Rễ Nưa konjac trên môi trường 1/2 MS + 8 g/l agar + 14 g/l sucrose + 0,5 mg/l IBA sau 3 tuần nuôi cấy; B: Cây Nưa konjac in vitro hoàn chỉnh trên môi trường 1/2 MS + 8 g/l agar + 14 g/l sucrose + 0,5 mg/l IBA sau 5 tuần nuôi cấy.

Ảnh hưởng của nồng độ IBA đến khả năng ra rễ của chồi

Khi các chồi mang lá đạt tiêu chuẩn kích thước (dài 3-5 cm) được cắt và cấy chuyển sang môi trường tạo rễ. Sử dụng công thức môi trường dinh dưỡng ra rễ tốt nhất đã xác định được ở trên (môi trường 1/2 MS + 8 g/l agar + 14 g/l sucrose + 1 g/l than hoạt tính) bổ sung IBA với các nồng độ khác nhau để nghiên cứu ảnh hưởng của loại chất điều hòa sinh trưởng này đến khả năng ra rễ của chồi Nưa konjac trong điều kiện nuôi cấy in vitro. Sau 3 tuần nuôi kết quả nghiên cứu được thể hiện ở bảng 6.

Bảng 6. Ảnh hưởng của IBA đến khả năng ra rễ của chồi Nưa konjac in vitro.

IBA (mg/l)	Tổng số chồi cây (chồi)	Số chồi ra rễ (chồi)	Tỷ lệ chồi ra rễ (%)	Thời gian bắt đầu ra rễ (ngày)	Số rễ trung bình/chồi (rễ)	Chiều dài trung bình rễ (cm)
0,00	40	0,00 ^d	0,00	0,00	0,00 ^e	0,00 ^d
0,20	40	30,33 ^c	75,83	12,00	4,32 ^b	1,80 ^c
0,40	40	40,00 ^a	100,00	6,00	5,30 ^a	2,61 ^a
0,60	40	37,33 ^a	93,33	7,00	4,38 ^b	2,26 ^b
0,80	40	33,67 ^b	84,17	10,00	3,84 ^c	1,95 ^c
1,00	40	28,33 ^c	70,83	10,00	3,28 ^d	1,80 ^c

Kết quả bảng 6 cho thấy, sau 3 tuần nuôi cấy trên môi trường không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng chồi không ra rễ. Khi bổ sung chất điều hòa sinh trưởng IBA với hàm lượng khác nhau thì xuất hiện chồi ra rễ với tỷ lệ rất khác nhau. Công thức môi trường 0,4 mg/l IBA cho hiệu quả ra rễ tốt nhất (đạt 100%), số rễ trung bình/chồi là 5,3, chiều dài trung bình của rễ đạt 2,61 cm. Ở hàm lượng IBA thấp (0,2 mg/l) hoặc cao (0,6; 0,8 và 1,0 mg/l) đều cho hiệu quả tạo rễ kém hơn, nguyên nhân là do các chồi đều có khả năng tổng hợp auxin nội sinh nên khi bổ sung lượng auxin ngoại sinh nồng độ thấp có thể chưa đủ để kích thích ra rễ nhanh hoặc ở hàm lượng quá cao sẽ ức chế sự hình thành rễ.



Hình 5. A: Rễ Nưa konjac trên môi trường hàm lượng 0,4 mg/l IBA sau 2 tuần nuôi cấy; B: Cây Nưa konjac in vitro hoàn chỉnh trên môi trường hàm lượng 0,4 mg/l BAP.

Ảnh hưởng của giá thể đến tỷ lệ sống của cây Nưa konjac in vitro ở vườn ươm

Giai đoạn chuyển cây in vitro từ trong bình nuôi ra trồng ở vườn ươm là giai đoạn có ý nghĩa quan trọng, quyết định khả năng ứng dụng của toàn bộ quy trình nhân giống cây in vitro vào thực tiễn sản xuất. Một trong những yêu cầu của giai đoạn này là xác định được giá thể trồng cây phù hợp để cây Nưa konjac in vitro sinh trưởng và phát triển tốt nhất. Để xác định ảnh hưởng của thành phần giá thể trồng cây đến tỷ lệ sống và sinh trưởng của cây Nưa konjac in vitro khi đưa ra trồng thử nghiệm ở vườn ươm, chúng tôi tiến hành thử nghiệm với 4 công thức thí nghiệm. Sau 4 tuần trồng, kết quả nghiên cứu được tổng hợp ở bảng 7.

Bảng 7. Ảnh hưởng của loại giá thể đến tỷ lệ sống của cây Nưa konjac in vitro trồng ở vườn ươm.

Giá thể	Số cây cấy (cây)	Số cây sống (cây)	Tỷ lệ cây sống (%)
100% đất tầng B	45	28,67 ^c	63,70
100% cát	45	23,33 ^d	51,85
50% đất + 50% cát	45	35,33 ^b	78,52
50% đất tầng B + 30% cát + 20% trấu hun	45	42,33 ^a	94,07

Kết quả bảng 7 cho thấy, công thức giá thể 50% đất + 30% cát + 20% trấu hun cho tỷ lệ cây sống trung bình sau 4 tuần trồng cao nhất (đạt 94,07%), tiếp đó là công thức 100% đất tầng B và 50% đất + 50% cát, tỷ lệ cây sống đạt lần lượt là 78,52 và 63,7%. Với công thức 100% cát, tỷ lệ cây sống đạt thấp nhất (51,85%).

Kết luận

Công thức khử trùng vật liệu nuôi cấy tốt nhất là sử dụng dung dịch Javen 60% (NaClO) trong 12 phút, tỷ lệ mẫu sạch in vitro đạt 100%, tỷ lệ mẫu sạch tái sinh đạt 100%, thời gian mẫu nảy chồi là sau 15 ngày.

Công thức môi trường dinh dưỡng thích hợp nhất để tái sinh chồi Nưa konjac in vitro là MS + 2 mg/l BAP + 0,2 mg/l Kinetin + 8 g/l agar + 30 g/l sucrose, số chồi trung bình/mẫu đạt 5,22, chiều cao trung bình của chồi là 3,84 cm, chất lượng chồi tốt.

Công thức môi trường ra rễ tốt nhất là 1/2 MS + 8 g/l agar + 14 g/l sucrose + 0,4 mg/l IBA + 1 g/l than hoạt tính, tỷ lệ chồi ra rễ đạt 100%, số rễ trung bình/chồi là 4,98, chiều dài trung bình của rễ đạt 2,67 cm, sau 7 ngày nuôi chồi bắt đầu ra rễ.

Giá thể thích hợp nhất cho trồng cây Nưa konjac in vitro là 50% đất + 30% cát + 20% trấu hun, tỷ lệ cây sống cao nhất đạt 94,07% sau 4 tuần trồng. Cây khỏe mạnh, sinh trưởng và phát triển bình thường.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] S. Edison (2010), *Quality declared planting material: Protocols and standards for vegetatively propagated crops*, Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), pp.65-69.
- [2] M. Chua, K. Chan, J.T. Hocking, A.P. Williams, J.C. Perry, C.T. Baldwin (2012), "Methodologies for the extraction and analysis of konjac glucomannan from corms of *Amorphophallus konjac* K. Koch", *Carbohydrate Polymers*, **87**, pp.2202-2210.
- [3] P. Liu (2004), *Konjac*, China Agriculture Press, Bei Jing, 348p.
- [4] H. Kurihara (1979), "Trends and problems of konjac (*Amorphophallus konjac*) cultivation in Japan", *Japan Agricultural Research Quarterly*, **13**, pp.174-179.
- [5] Võ Văn Chi (1999), "Khoai nưa", *Từ điển cây thuốc Việt Nam*.
- [6] Đỗ Tất Lợi (1995), *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.
- [7] Nguyễn Văn Dư (1994), "Họ Ráy (Araceae Juss) trong hệ thực vật Việt Nam", *Tạp chí Sinh học*, **16(4)**, pp.108-115.