

Oyster mushroom cultivation technique using fermentation substrate

Truong Binh Nguyen, Nguyen Hoang Mai,
Phan Hoang Dai, Ngo Thuy Tram, Le Ba Dung

Abstract

Rice straw and cotton seed hulls showed as good materials for composting to grow some species of oyster mushroom in Dalat city. After mixing with 5% of spawn, each 5 kg of spawned compost was packed into one plastic bag in ex-vitro condition. Low ratio contamination was recorded in both of rice straw compost and cotton seed hulk compost. Colonization of mycelia was performed from 17 - 25 days in room temperature. Ten holes in bags (8 slits and 2 air holes) were suitable to achieve high yield and quality of mushroom products.

Keywords: Oyster mushroom, cultivation, fermentation, rice straw, cotton seed hull

Ngày nhận bài: 18/1/2019

Ngày phản biện: 9/2/2019

Người phản biện: TS. Phạm Nguyễn Đức Hoàng

Ngày duyệt đăng: 14/2/2019

LƯU GIỮ *IN VITRO* NGUỒN GEN KHOAI SỌ TRONG ĐIỀU KIỆN SINH TRƯỞNG CHẬM

Hoàng Thị Huệ¹, Lê Tuấn Nghĩa¹, Nguyễn Thị Mỹ Châu¹,
Nguyễn Hoài Thu¹, Trần Thị Thùy Dương¹

TÓM TẮT

Lưu giữ *in vitro* cây khoai sọ có vai trò quan trọng trong việc duy trì giống và cũng có nhiều ưu điểm so với phương pháp truyền thống. Mục đích của nghiên cứu này là tối ưu hóa việc bảo quản khoai sọ trong điều kiện sinh trưởng chậm. Kết quả lưu giữ *in vitro* nguồn gen khoai sọ Bắc Giang cho thấy: Môi trường tối ưu cho lưu giữ cây khoai sọ *in vitro* là MS + 6 g/l agar + Mannitol 10 g/l hoặc nuôi dưới điều kiện nhiệt độ thấp 10°C trên môi trường MS bổ sung Mannitol 10 g/l.

Từ khóa: Lưu giữ *in vitro*, sinh trưởng chậm, khoai sọ, D-mannitol, ABA

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Khoai môn sọ [*Colocasia esculenta* (L) Schott] là cây trồng lấy củ quan trọng, có giá trị dinh dưỡng cao và tiềm năng kinh tế lớn, được trồng ở hầu hết các vùng sinh thái của Việt Nam. Trong tự nhiên, cây khoai sọ được phát triển từ thân củ và thường được bảo tồn theo tập đoàn trên đồng ruộng. Tuy nhiên, bảo tồn theo phương pháp truyền thống này gặp rất nhiều khó khăn do chịu tác động của nhiều nhân tố như sâu bệnh, điều kiện thực địa, sự biến đổi khí hậu... dẫn đến tình trạng thoái hóa giống và tăng nguy cơ thất thoát nguồn gen.

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 *ctv.*, 2004; Nguyễn Thị Ngọc Huệ *et al.*, 2010). Bảo tồn *in vitro*

đặc biệt quan trọng trong việc nhân giống, lưu giữ đối với các loài sinh sản vô tính và mang lại những lợi thế riêng biệt: giúp duy trì các nguồn gen sạch bệnh; có khả năng nhân nhanh các nguồn gen quý hiếm, có lợi cho nghiên cứu và sản xuất; thuận lợi khi trao đổi nguồn gen...

Nhiều nguồn gen khoai sọ địa phương đang được nông dân lưu giữ và gieo trồng thể hiện tính ưu việt về khả năng thích nghi cao với điều kiện sinh thái khó khăn, có chất lượng. Trung tâm Tài nguyên thực vật đã nghiên cứu và đánh giá, phát hiện nhiều mẫu giống khoai sọ địa phương có chất lượng cao và có tiềm năng năng suất, trong đó có nguồn gen Khoai sọ rừng, nguồn gốc tại Bắc Giang.

Xuất phát từ những yêu cầu thực tế trên, nghiên cứu lưu giữ *in vitro* trong điều kiện sinh trưởng chậm nhằm tối ưu hóa việc bảo tồn sự đa dạng di truyền của tập đoàn nguồn gen khoai môn sọ tại Ngân hàng gen cây trồng Quốc gia được tiến hành.

¹ Trung tâm Tài nguyên thực vật

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Các chồi có kích thước trung bình 0,5 cm được tách ra từ các cây con *in vitro* có chiều cao trung bình 6 - 7 cm, khỏe mạnh, không nhiễm nấm bệnh, không có biến dị về mặt hình thái của mẫu giống Khoai sọ rừng thu thập tại Bắc Giang (ký hiệu: 387). Đây là giống khoai sọ khó bảo quản ngoài tự nhiên, ở trong nhà lưới cũng như trên đồng ruộng theo phương pháp truyền thống; hiện đang được lưu giữ *in vitro* tại Ngân hàng gen cây trồng Quốc gia.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp bố trí thí nghiệm

- Các thí nghiệm được tiến hành ở điều kiện 25°C ± 2, thời gian chiếu sáng 16 h/ngày với cường độ chiếu sáng 2.000 - 2.500 lux, độ ẩm 50 - 70%. Sử dụng môi trường nền cơ bản là MS có bổ sung 6 g/l agar và 30 g/l saccharose, pH = 5,8.

- Thí nghiệm được bố trí 3 lần nhắc lại theo kiểu ngẫu nhiên hoàn toàn, 30 ống/1 công thức, 1 cây/1 ống nghiệm có đường kính trong 25 mm × 150 mm chiều cao, với 15 ml môi trường. Các thí nghiệm được theo dõi, đánh giá khả năng sinh trưởng sau mỗi tháng và khả năng duy trì sự sống sau 2, 4, 6, 8, 12, 18, 24 tháng lưu giữ.

- Các thí nghiệm được bố trí như sau:

Thí nghiệm 1: Ảnh hưởng của hàm lượng D-Mannitol đến khả năng hạn chế sự sinh trưởng và thời gian cấy chuyển cây khoai sọ *in vitro*: Nuôi cấy trên nền môi trường MS có bổ sung Manitol với 6 công thức nồng độ: 0 (ĐC), 10 g, 20 g, 30 g, 40 g.

Thí nghiệm 2: Ảnh hưởng của nồng độ axit abscisic (ABA) đến khả năng hạn chế sự sinh trưởng và thời gian cấy chuyển cây khoai sọ *in vitro*: Tiến hành nuôi cấy trên môi trường ½ MS với 5 công thức bổ sung ABA với nồng độ: 0 (ĐC), 1 mg/l, 2 mg/l, 3 mg/l, 4 mg/l, 5 mg/l, 6 mg/l.

Thí nghiệm 3: Ảnh hưởng của nhiệt độ đến khả năng hạn chế sự sinh trưởng và thời gian cấy chuyển của cây khoai sọ *in vitro*: Chồi cây khoai sọ sau khi nuôi cấy 2 tuần ở điều kiện bình thường được đặt trong tủ sinh trưởng ở 6 công thức: 0°C, 5 ± 1°C, 10 ± 1°C, 15 ± 1°C, 20 ± 1°C, 25 ± 1°C (ĐC).

Thí nghiệm 4: Ảnh hưởng của tổ hợp các chất hạn chế sự sinh trưởng và nhiệt độ đến thời gian cấy chuyển cây khoai sọ *in vitro*: Sau khi tìm ra được nồng độ mannitol, ABA và nhiệt độ có hiệu quả lưu giữ tốt nhất (thí nghiệm 1, 2, 3). Tiến hành nuôi cấy con trên môi trường MS với 3 công thức: Bổ sung nồng độ

Mannitol tối ưu ở thí nghiệm 1, bổ sung ABA tối ưu ở thí nghiệm 2, không có chất bổ sung cùng đặt ở nhiệt độ tối ưu nhất của thí nghiệm 3 (ĐC).

Thí nghiệm 5: Ảnh hưởng của thời gian chiếu sáng đến sự sinh trưởng của cây khoai sọ *in vitro*: Trên nền môi trường MS với 5 công thức có thời gian chiếu sáng khác nhau: 16 h/ngày (ĐC), 12 h/ngày, 8 h/ngày, 4 h/ngày, để tối hoàn toàn.

Thí nghiệm 6: Đánh giá tỷ lệ sống của các mẫu sau khi lưu giữ *in vitro*: Các thí nghiệm có hiệu quả tối ưu nhất được chọn cấy chuyển sang môi trường MS có bổ sung 10% nước dừa để đánh giá tỷ lệ sống sau lưu giữ *in vitro*.

2.2.2. Phương pháp xử lý số liệu

Sử dụng phần mềm IRRISTAT 5.0 và Excel 2010.

2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu được tiến hành từ năm 2015 đến 2017 tại Bộ môn Đa dạng Sinh học nông nghiệp, Trung tâm Tài nguyên thực vật - An Khánh, Hoài Đức, Hà Nội.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của hàm lượng D-Mannitol đến khả năng hạn chế sự sinh trưởng và thời gian cấy chuyển định kỳ của nguồn gen khoai sọ *in vitro*

D-Mannitol là đường sáu, đồng phân của Sorbitol được sử dụng như một tác nhân tăng áp suất thẩm thấu để bảo tồn sinh trưởng chậm đối với thực vật. Mannitol được sử dụng làm giảm sự trao đổi chất, giảm sự phân chia của mô tế bào thực vật.

Bảng 1. Ảnh hưởng của hàm lượng D-Mannitol đến khả năng sinh trưởng của nguồn gen khoai sọ *in vitro* (sau 8 tuần theo dõi)

Chỉ tiêu	Hàm lượng Mannitol (g/l)					CV (%)	LSD _{0,05}
	0	1	2	3	4		
Số lá	7,0	5,9	4,5	3,0	1,7	1,7	0,1
Cao cây (cm)	11,0	4,6	2,9	1,8	1,1	1,6	0,9
Chất lượng cây	+++	+++	++	+	+		

Ghi chú: (+) Cây nhỏ, yếu; (++) cây trung bình, lá nhỏ; (+++) cây tốt, xanh đậm.

Nghiên cứu bổ sung Mannitol vào môi trường nuôi cấy cho thấy, có hiệu quả rõ rệt trong việc hạn chế sự sinh trưởng của cây. Nồng độ Mannitol càng tăng thì khả năng sinh trưởng của cây càng giảm mạnh (Bảng 1).



Hình 1. Ảnh hưởng của hàm lượng Mannitol đến khả năng sinh trưởng của cây khoai sọ *in vitro* sau 12 tuần

Khi bổ sung Mannitol ở nồng độ thấp nhất 10 g/l hiệu quả hạn chế sự sinh trưởng giảm đáng kể; đặc biệt chỉ số chiều cao cây (4,6 cm) giảm bằng 41,8% so với ĐC. Khi tiếp tục tăng nồng độ lên 20 g/l chiều cao càng giảm (giảm 26,3% so với ĐC) nhưng thời gian lưu giữ cây cũng giảm và chỉ sau 6 tháng cây có hiện tượng già hóa: một số lá bị héo úa, rể hóa nâu. Theo quan sát sau 6 tháng ở nồng độ 10 g/l cây vẫn xanh, sau 7 tháng cây bắt đầu xuất hiện sự già hóa như: lá vàng, rể bắt đầu hóa nâu... và chỉ khoảng 40% số cây có thể duy trì thời gian bảo quản đến 8 tháng.

Nồng độ Mannitol càng cao (≥ 30 g/l) thì khả năng hạn chế sự sinh trưởng của cây càng giảm mạnh đồng thời gây ảnh hưởng xấu đến chất lượng cũng như rút ngắn chu kỳ sống của cây và chỉ sau 2 tháng lá vàng úa, rể hóa nâu; thậm chí gây chết mẫu khi ở nồng độ 40 g/l.

Như vậy, hàm lượng Mannitol 10 g/l là thích hợp nhất, vừa đảm bảo hạn chế sự sinh trưởng cây, kéo dài thời gian cấy chuyển định kỳ mà vẫn đảm bảo khả năng tái sinh cây sau chu kỳ bảo quản. Kết quả nghiên cứu này hoàn toàn thích hợp với kết quả của Besembinder JJE trên cây khoai sọ ở điều kiện môi trường MS + 10 - 20 g/l Mannitol, tại 9°C là thích hợp nhất để hạn chế sự sinh trưởng của cây (Besembinder *et al.*, 1993). Kết quả nghiên cứu của Vũ Ngọc Lan và cộng tác viên (2015) khi sử dụng Mannitol ở nồng độ 2% trên cây khoai môn Bắc Kạn cho hiệu quả hạn chế sự sinh trưởng tốt nhất.

3.2. Ảnh hưởng của nồng độ axit abscisic (ABA) đến khả năng hạn chế sinh trưởng và thời gian cấy chuyển của nguồn gen khoai sọ *in vitro*

Axit abscisic là một chất làm chậm tăng trưởng nội sinh và nó thường được sử dụng để giảm tốc độ tăng trưởng của cây trong bảo tồn *in vitro* (Gopalet *et al.*, 2004). Mặt khác, trong quá trình lưu trữ, ABA có xu hướng thay đổi quá trình chuyển hóa carbohydrate của các tế bào để tăng khả năng chống chịu nổi bật với các điều kiện bất lợi (Shibli *et al.*, 2004; Shibli *et al.*, 2006).

Bảng 2. Ảnh hưởng của nồng độ axit abscisic (ABA) đến khả năng sinh trưởng của nguồn gen khoai sọ *in vitro* (sau 8 tuần theo dõi)

Chỉ tiêu	Hàm lượng axit abscisic (mg/l)							CV (%)	LSD _{0,05}
	0	1	2	3	4	5	6		
Số lá/cây	6,0	5,2	4,0	2,6	1,9	1,7	1,5	2,7	0,1
Chiều cao cây (cm)	10,0	9,0	8,0	6,5	3,7	2,3	1,8	0,4	0,2
Chất lượng cây	+++	+++	++	++	++	++	++		

Ghi chú: (++) Cây trung bình, lá nhỏ và xanh; (+++) cây xanh đậm, nhiều lá.

Sự sinh trưởng phát triển của cây khoai sọ *in vitro* trong các môi trường có nồng độ ABA có xu hướng giảm so với ĐC, nồng độ ABA càng cao càng làm giảm sự sinh trưởng của cây (Bảng 2). Nồng độ ABA 1 - 2 mg/l có hiệu quả hạn chế sự sinh trưởng cây nhưng các chỉ số chênh lệch không đáng kể so với ĐC. Khi tăng nồng độ ≥ 3 mg/l sự tăng trưởng chiều cao, số lá mới bắt đầu giảm mạnh và giảm mạnh nhất ở nồng độ 6 mg/l (chiều cao cây đạt 1,8 cm và 1,5 lá/cây).

Tuy nhiên, sau 4 tháng lưu giữ, trạng thái sinh trưởng chồi yếu đi khi nuôi cấy ở nồng độ ≥ 5 mg/l và có hiện tượng già hóa với biểu hiện lá héo, vàng úa, rể hóa nâu, giảm sức sống. Nồng độ 4 mg/l tác dụng hạn chế sinh trưởng không phải hiệu quả nhất (chiều cao đạt là 3,7 cm và số lá đạt 1,9 lá/cây) nhưng cây có thể duy trì thời gian lưu giữ đến 6 tháng mới xuất hiện sự già hóa, suy giảm sức sống và đảm bảo được khả năng tái sinh mẫu sau chu kỳ bảo quản. Do đó, nồng độ 4 mg/l là thích hợp nhất, vừa hạn

chế sự sinh trưởng của cây, vừa kéo dài thời gian cây chuyển định kỳ đồng thời đảm bảo khả năng tái sinh cây. Hiệu quả hạn chế sự sinh trưởng của cây khi sử dụng ABA đã được công bố của tác giả Du Yun-peng và cộng tác viên (2012) trên cây hoa ly được lưu giữ sinh trưởng chậm thành công ở nồng độ 3,0 mg/l ABA và báo cáo của Villaluz Z. Acedo và Catherine C. Arradaza khi nuôi cấy khoai từ vạc ở nồng độ 1 - 2 mg/l ABA (Villaluz Z. Acedo and Catherine C. Arradaza, 2006).

3.3. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến khả năng hạn chế sinh trưởng và thời gian cây chuyển nguồn gen khoai sọ *in vitro*

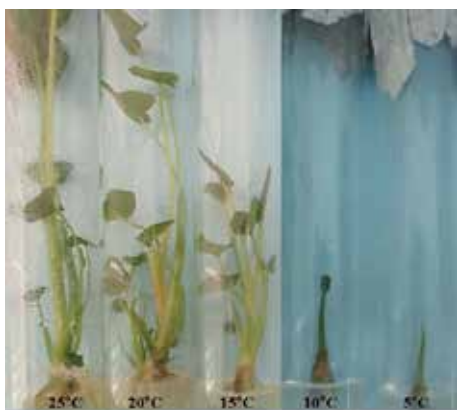
Bảo quản trong điều kiện nhiệt độ thấp là một trong những phương pháp đơn giản và hiệu quả trong bảo tồn *in vitro*. Trong điều kiện nhiệt độ thấp, tốc độ tăng trưởng giảm, nhiều hoạt động sinh hóa hầu như không diễn ra hoặc chậm lại, chẳng hạn như: carbohydrate chuyển vị, quá trình hô hấp và tổng hợp protein (Taiz and Zeiger, 2002).

Bảng 3. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến khả năng sinh trưởng nguồn gen khoai sọ *in vitro* (sau 8 tuần theo dõi)

Chỉ tiêu theo dõi	Nhiệt độ (± 1°C)					CV (%)	LSD _{0,05}
	25	20	15	10	5		
Số lá/cây	7,0	6,6	5,8	2,3	0,8	1,9	0,8
Chiều cao cây (cm)	11,0	10,2	6,9	3,5	1,1	27	1,0
Chất lượng cây	+++	+++	+++	++	+		

Ghi chú: (+): Cây nhỏ, hầu như không có lá; (++) : cây nhỏ, lá rất nhỏ và ít; (+++): cây xanh đậm, nhiều lá.

Bảng 3 cho thấy nhiệt độ có tác dụng hạn chế sự sinh trưởng của cây. Nhiệt độ càng thấp sự sinh trưởng chiều cao cây càng giảm, thời gian cây chuyển định kỳ giữa các lần cấy chuyển càng dài.



Hình 2. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến khả năng sinh trưởng cây khoai sọ *in vitro* sau 2 tháng

Tác dụng hạn chế sự sinh trưởng tỏ ra hiệu quả khi giảm nhiệt độ xuống ≤ 15°C; thông số quan tâm nhất trong việc hạn chế sự sinh trưởng là chiều cao, ở 10°C giảm bằng 31,8% và ở 5°C giảm bằng 10% so với ĐC. Số lá/cây cũng giảm mạnh (2,3 lá/cây và 0,8 lá/cây), đồng thời rút ngắn được số lần cấy chuyển.

Tuy nhiên, ở nhiệt độ 5°C có tác dụng hạn chế sự sinh trưởng mạnh nhất nhưng sau 8 tháng cây bắt đầu xuất hiện hiện tượng héo và có một số cây mất khả năng tái sinh sau chu kỳ bảo quản. Trong khi đó, nhiệt độ 10 °C sau 12 tháng cây mới bắt đầu xuất hiện sự già hóa, vẫn đảm bảo được khả năng tái sinh sau chu kỳ bảo quản.

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. Trong nghiên cứu này, ngưỡng nhiệt độ 10°C có hiệu quả duy trì tốt nhất để bảo quản cây *in vitro*. Điều này phù hợp với kết quả nghiên cứu của Shahid Ali và cộng tác viên (2016), lưu giữ thành công cây khoai tây ở nhiệt độ 10°C. Tương tự, Ciobaniui và Constantinovici (2012) cũng cho rằng việc bảo tồn khoai tây, nhiệt độ thấp (6 - 12°C) có hiệu quả hạn chế sinh trưởng tối ưu.

3.4. Ảnh hưởng của tổ hợp các chất hạn chế sự sinh trưởng và nhiệt độ đến thời gian cây chuyển nguồn gen khoai sọ *in vitro*

Kế thừa kết quả các nghiên cứu trước: nhiệt độ (10°C), chất gây áp suất thẩm thấu (Mannitol 10 g/l), chất gây ức chế sinh trưởng ABA (4 mg/l) là các nhân tố hạn chế sự sinh trưởng hiệu quả nhất đã được xác định qua các thí nghiệm 1, 2, 3.

Bảng 4. Ảnh hưởng của tổ hợp các chất hạn chế sự sinh trưởng và nhiệt độ đến khả năng sinh trưởng nguồn gen khoai sọ *in vitro* (sau 8 tuần theo dõi)

Chỉ tiêu theo dõi	Nhiệt độ (°C)	Chất bổ sung			CV (%)	LSD _{0,05}
		0	10 g/l Mannitol	4 mg/l ABA		
Số lá/cây	10 ± 1	2,3	1,6	1,5	1,1	0,6
Chiều cao cây (cm)		3,5	2,0	1,9	1,9	1,0
Chất lượng cây		+++	++	++		

Ghi chú: (+) cây nhỏ, hầu như không có lá (++) cây và lá nhỏ, xanh; (+++) cây tốt, dục mập, lá xanh đậm, bản lá to, nhiều lá.

Theo kết quả nghiên cứu (Bảng 4), ở công thức có bổ sung Mannitol và ABA, các chỉ số theo dõi đều thấp hơn so với ĐC. Điều này chứng tỏ việc bổ sung Mannitol và ABA vào môi trường nuôi cấy ở

nhệt độ thấp có tác dụng hạn chế tốt hơn sự sinh trưởng của cây so với ĐC. Tuy nhiên, khi xét về thời gian lưu giữ ở công thức có bổ sung ABA chỉ sau 8 tháng (có thời gian lưu giữ ngắn hơn so với ĐC là 4 tháng) cây đã xuất hiện tượng lá héo, rễ hóa nâu và chỉ có khoảng 50% mẫu có khả năng sống sót đến 9 tháng. Trong khi đó, ở công thức có bổ sung Mannitol thời gian lưu giữ lên đến 18 tháng và có khoảng 30% cây có thể duy trì thời gian lưu giữ đến 24 tháng. Điều này cũng phù hợp với kết quả nghiên cứu của Besembinder JE trên cây khoai sọ ở điều kiện môi trường MS + 10 - 20 g/l Mannitol, 9°C là thích hợp nhất để hạn chế sự sinh trưởng của cây (Besembinder *et al.*, 1993). Tương tự với nghiên cứu của Gopal và Nain Sukh Chauhan (2010), mẫu khoai sọ *in vitro* được bảo quản 18 tháng mà không

cần cấy chuyển khi sử dụng Mannitol 20 g/l ở nhiệt độ thấp $7 \pm 1^\circ\text{C}$.

Như vậy, điều kiện tốt nhất vừa hạn chế sự sinh trưởng, đồng thời giúp kéo dài thời gian cấy chuyển định kỳ của mẫu khoai sọ là nuôi cấy ở nhiệt độ 10°C và bổ sung 10 g/l Mannitol.

3.5. Ảnh hưởng của thời gian chiếu sáng đến khả năng sinh trưởng của cây khoai sọ *in vitro*

Ánh sáng là điều kiện cần thiết cho sự sinh trưởng và phát triển của các loại cây trồng. Ánh sáng đem năng lượng cần thiết cho phản ứng quang tổng hợp, nhờ vậy mà cây tạo ra được chất dinh dưỡng. Khi ánh sáng ít (vì cường độ sáng yếu hoặc thời gian chiếu ánh sáng ngắn) thì cây không tạo ra đủ dưỡng liệu để sống.

Bảng 5. Ảnh hưởng của thời gian chiếu sáng đến khả năng sinh trưởng của nguồn gen khoai sọ *in vitro* (sau 8 tuần theo dõi)

Chỉ tiêu	Thời gian chiếu sáng (h /ngày)					CV (%)	LSD _{0,05}
	16	12	8	4	Tối		
Số lá/cây	7,0	6,8	6,7	6,0	2,0	1,2	0,7
Chiều cao cây (cm)	11,0	10,7	10,5	10,0	10,1	3,0	0,6
Chất lượng cây	++++	++++	+++	++	+		

Ghi chú: (+) Cây yếu, đống thân nhỏ và dài, lá - thân mất màu xanh; (++) cây yếu, dọc lá nhỏ không hoặc kém xanh, xuất hiện lá úa, rễ ít kém phát triển; (+++) cây tốt, lá to trung bình và xanh nhạt; (++++) cây tốt, lá xanh đậm, bản lá to, nhiều lá.

Bảng 5 cho thấy, ở điều kiện không có ánh sáng, cây rất ít lá, lóng thân kéo dài, sắc tố diệp lục của cây giảm mạnh nên cây không thể quang hợp và sau 4 tuần nuôi cấy cây mất sắc tố diệp lục chuyển màu trắng.

Trong điều kiện chiếu sáng 4 h/ngày kích thích phát triển lá, rễ và màu sắc diệp lục của cây đều tăng nhưng chất lượng chưa đạt yêu cầu. Khi thời gian chiếu sáng tăng dần từ 8 - 16 h/ngày, chất lượng cây được cải thiện rõ rệt về chỉ tiêu số lá/cây, chiều cao và chất lượng cây. Tuy nhiên thời gian chiếu sáng giữa các công thức 8 h, 12 h và 16 h/ngày cho kết quả không có sai khác về mặt thống kê (Bảng 5), vì vậy thời gian chiếu sáng 8 h/ngày là phù hợp nhất

cho mục đích lưu giữ *in vitro* dạng chồi vừa đảm bảo chất lượng cây trong bảo quản đồng thời giảm được chi phí điện năng.

3.6. Đánh giá tỷ lệ sống của các mẫu sau khi lưu giữ *in vitro*

Mục đích của lưu giữ *in vitro* sinh trưởng chậm là tăng hiệu quả lưu giữ mà vẫn đảm bảo sự ổn định di truyền, không gây thất thoát nguồn gen thông qua việc sử dụng các tác nhân vật lý, hóa học để hạn chế tốc độ tăng trưởng, kéo dài thời gian giữa các lần cấy chuyển. Do đó, việc lưu giữ an toàn các nguồn gen, đảm bảo tỷ lệ sống cao sau chu kỳ bảo quản là yếu tố quan trọng trong lưu giữ *in vitro*.

Bảng 6. Kết quả đánh giá đánh giá tỷ lệ sống của các mẫu *in vitro* sau khi lưu giữ ở các điều kiện khác nhau (sau 8 tuần theo dõi)

Chỉ tiêu	Các yếu tố hạn chế sự sinh trưởng tối ưu				
	ĐC	10 g/l Mannitol	4 mg/l ABA	Nhiệt độ 10°C	Nhiệt độ 10°C + 10 g/l Mannitol
Tỷ lệ sống (%) trên môi trường tái sinh	100	100	100	100	100
Chất lượng cây	+++	++	++	++	++

Ghi chú: (++) Cây bình thường, lá xanh, vừa phải; (+++) cây tốt, lá xanh đậm, nhiều lá.

Bảng 6 cho thấy mẫu thí nghiệm sau chu kỳ bảo quản đều có tỷ lệ sống cao, đạt 100% ở các công thức khác nhau, mặc dù chất lượng cây thấp hơn một chút so với đối chứng, tuy nhiên vẫn đảm bảo yêu cầu không có sự khác biệt về hình thái so với mẫu ĐC sau 8 tuần theo dõi. Điều này có thể giải thích do cây vừa chịu tác động của các yếu tố hạn chế sinh trưởng, dư lượng của chất hạn chế sinh trưởng vẫn còn tồn dư nên thời gian phục hồi sinh trưởng cần dài hơn.

Trên cơ sở tổng hợp và so sánh các kết quả nghiên cứu, thấy rằng: Lưu giữ ở điều kiện phòng 25°C ± 2 trên môi trường MS có bổ sung 1% Mannitol hoặc lưu giữ ở điều kiện nhiệt độ thấp 10°C ± 1 trên môi trường MS có bổ sung 1% Mannitol, thời gian chiếu sáng 8 h/ngày với cường độ 2000 - 2500 lux, độ ẩm 50 - 70% cho hiệu quả hạn chế sự sinh trưởng tốt nhất, vừa kéo dài thời gian lưu giữ vừa đảm bảo khả năng sống cao cây sau chu kỳ bảo quản.

IV. KẾT LUẬN

Điều kiện lưu giữ *in vitro* dạng chồi cây khoai sọ phù hợp nhất vừa làm chậm sinh trưởng, kéo dài thời gian cấy chuyển, vừa đảm bảo trạng thái sinh trưởng cây tốt.

MS + 10 g/l Mannitol + 6 g/l agar + 30 g/l saccharose, điều kiện nhiệt độ 25°C ± 2, thời gian chiếu sáng 8 h/ngày với cường độ 2.000 - 2.500 lux, độ ẩm 50 - 70%; hoặc

MS + 10 g/l Mannitol + 6g/l agar + 30g/l saccharose, điều kiện nhiệt độ 10°C ± 1, thời gian chiếu sáng 8 h/ngày với cường độ 2.000 - 2.500 lux, độ ẩm 50 - 70%.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Nguyễn Thị Ngọc Huệ, Nguyễn Văn Viết, 2004. *Tài nguyên di truyền khoai môn - sọ ở Việt Nam*. Nhà xuất bản Nông nghiệp. Hà Nội.

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

Ciobaniui IB, Constantinovici D., 2012. The effects of sorbital and conservation period on the *in vitro* evaluation of *Solanum tuberosum* L. plantlets. *Cercetări Agronomice în Moldova*, 45(3):151.

Du Yun-peng, Li Wen-yuan, Zhang Ming-fang, He Heng-bin and Jia Gui-xia., 2012. The establishment of a slow-growth conservation system *in vitro* for two wild lily species. *African Journal of Biotechnology*, 11(8): 1981-1990.

J.J.E. Bessembinder., G. Staritsky, E.A. Zandvoort, 1993. Long-term *in vitro* storage of *Colocasia esculenta* under minimal growth conditions. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 33: 121-127.

J. Gopal., Chamail A, Sarkar D., 2004. *In vitro* production of microtubers for conservation of potato germplasm: effect of genotype, abscisic acid and sucrose. *In vitro Cellular Development Biology Plant*, 40(5): 485-490.

J. Gopal and Nain Sukh Chauhan., 2010. Slow growth *in vitro* conservation of potato germplasm at low temperature. *Potato Research*, 53: 141-149.

Nguyen Thi Ngoc Hue, Nguyen Van Viet, Vu Linh Chi, M.S Prana., 2010. Taro germplasm collection in Viet Nam. In: *The Global diversity of taro: Ethnobotany and conservation*, p.60-68.

Shahid Ali, Shazia Erum, Faisal Nouroz, Naeem Khan, Asif Mehmood, Sayed Haider Ali Shah, Aamir Raheem, and Aish Muhammad., 2016. *In vitro* conservation of exotic potato genotypes through different incubated temperatures, aerophilic and micro-aerophilic conditions. *International Journal of Biodiversity and Conservation*, 8(7): 147-152.

Shibli, R. A., Al-Ababneh, S. and Smith, M., 2004. Cryopreservation of plant germplasm: A review. *Dirasat Agricultural Sciences*, 31: 60-73.

Shibli R., Shatnawi M., Subaih W., Ajlouni M., 2006. *In vitro* conservation and cryopreservation of plant genetic resources: A review. *World Journal of Agricultural Sciences*, 2: 372-382.

Taiz, L. and Zeiger, E. 2002. *Plant Physiology*, 3rd ed. Sinauer Associates Pubilsher, Hardcover.

Villaluz Z. Acedo and Catherine C. Arradaza., 2012. Development of *In vitro* Slow Growth Culture for Yam (*Dioscorea alata* L.). *Annals of Tropical Research*, 34 (1): 79-95.

***In vitro* conservation of taro under slow-growth conditions**

Hoang Thi Hue, La Tuan Nghia, Nguyen Thi My Chau,
Nguyen Hoai Thu, Tran Thi Thuy Duong

Abstract

In vitro conservation of taro plays a vital role in maintenance of variety and also has many advantages over the conventional method. The aim of this work was to optimize *in vitro* preservation of taro under slow-growth conditions. Results of *in vitro* maintenance of Bac Giang taro showed that: Optimum medium for *in vitro* taro plantlet maintenance was MS + 6 g/l agar + 10 g/l mannitol, or cultured under conditions of low temperature at 10°C on MS medium supplemented with 10 g/l mannitol.

Keywords: *In vitro* conservation, slow growth, taro, D- mannitol, ABA

Ngày nhận bài: 6/1/2018
Ngày phản biện: 14/1/2018

Người phản biện: PGS.TS. Lê Hùng Linh
Ngày duyệt đăng: 14/2/2019