

NGHIÊN CỨU NUÔI CẤY MÔ CÂY NỬA (*TACCA LEONTOPEALOIDES* (L.) KUNTZE) TỪ ĐỈNH SINH TRƯỞNG

Phạm Thị Mận⁽¹⁾, Phạm Văn Bốn⁽¹⁾, Vũ Thị Thu Thanh⁽¹⁾,
Nguyễn Thị Linh⁽¹⁾, Trương Thị Thùy Trang⁽¹⁾, Ninh Văn Tuấn⁽¹⁾

(1) Trung tâm Ứng dụng Khoa học Kỹ thuật Lâm nghiệp Nam Bộ

Ngày nhận bài 4/5/2023; Ngày gửi phản biện 10/5/2023; Chấp nhận đăng 21/7/2023

Liên hệ email: ptm.cnsh40@gmail.com

<https://doi.org/10.37550/tdmu.VJS/2023.04.446>

Tóm tắt

Vật liệu nuôi cấy ban đầu là chồi đỉnh được lấy sau khi nảy mầm khoảng 2 tuần. Sử dụng dung dịch javel (3,5-6,5%) để khử trùng mẫu. Môi trường nuôi cấy cơ bản là MS và ½ MS. Môi trường nhân chồi là MS được bổ sung đồng thời BA (0,5-2,0mg/l) và NAA (0,1-0,3mg/l). Môi trường ra rễ là ½ MS bổ sung IBA (0,0-1,0mg/l) hoặc NAA (0,0-1,0mg/l). Kết quả cho thấy, mẫu được xử lý bằng dung dịch javel 6,5% trong 15 phút cho kết quả tốt nhất, tỷ lệ mẫu sạch đạt 62,2% và tất cả mẫu sạch đều bật chồi; Môi trường MS + BA 1,5mg/l + NAA 0,2mg/l cho số lượng chồi cao nhất (4,1 chồi/cụm, chồi hữu hiệu là 3,7 chồi/cụm). Môi trường ra rễ tốt nhất là ½ MS + IBA 1,0mg/l cho 95,6% chồi ra rễ, số rễ là 2,9 rễ/chồi và chiều dài rễ là 5,0cm; Giá thể gồm 50% đất tầng mặt + 50% xơ dừa cho tỷ lệ sống của cây Nửa mô ở vườn ương là 69,4% sau 6 tuần cấy. Kết quả nghiên cứu cho thấy triển vọng tốt để sản xuất cây giống Nửa bằng phương pháp nuôi cấy mô. Tuy vậy, cần đánh giá khả năng thích ứng, sinh trưởng và năng suất của cây Nửa mô ngoài ruộng trước khi sản xuất cây giống mô công nghiệp.

Từ khóa: củ huyền, in-vitro, khử trùng, nhân chồi, ra rễ

Abstract

RESEARCH ON TISSUE CULTURE FOR ARROWROOT (*TACCA LEONTOPEALOIDES* (L.) KUNTZE) USING APEX BUD

Cultured material were 2-week apex buds of *Tacca leontopetaloides* (L.) Kuntze. Using javel solution (3.5-6.5%) to sterilized the culture samples. Shoot regeneration medium was MS added BA (0.5-2.0mg/l) and NAA (0.1-0.3mg/l) simultaneously. Rooting medium was ½ MS supplemented with IBA (0.0-1.0mg/l) or NAA separately (0.0-1.0mg/l). Research results showed that, sterilized apex bud samples in javel solution at a concentration of 6.5% for 15 minutes gave the best results, the percentage of sterilized samples is 62.2% and all of them are budding; MS medium added BA 1.5mg/l and NAA 0.2mg/l simultaneously gave the highest number of shoots (4.1 shoots/cluster, effective shoots was 3.7 shoots/cluster). Best rooting medium ½ MS associated with IBA 1.0mg/l

gave 95.6% rooting shoots, the number of roots was 2.9 roots/bud and the root length was 5cm; The medium consisting of 50% topsoil and 50% coconut fiber gave a survival rate of 69.4% and mean shoot height of 5.6cm after 6 weeks. The research results indicated the prospect for the production of T. leontopetaloides seedlings in-vitro. However, it is necessary to evaluate the adaptability, growth and yield of the tissue seedlings in field before deciding to produce tissue seedlings industrially.

1. Giới thiệu

Nưa (*Tacca leontopetaloides* (L.) Kuntze) là loài cây trồng tương đối phổ biến của tỉnh Trà Vinh, được trồng rải rác ở nhiều nơi trong tỉnh nhưng tập trung nhiều ở xã An Quảng Hữu (Trà Cú) sản xuất tinh bột làm thực phẩm. Trước đây, người dân địa phương trồng Nưa chủ yếu để chế biến tinh bột sử dụng trong gia đình làm thực phẩm, thuốc dân gian. Hiện nay, sản phẩm tinh bột Nưa của Trà Vinh đã được chế biến theo hướng công nghiệp và đã được thương mại hóa. Tinh bột Nưa của Trà Vinh được người tiêu dùng rất ưa chuộng và đã được bán đi nhiều địa phương trong cả nước. Tuy nhiên, địa phương đang gặp khó khăn trong việc mở rộng quy mô sản xuất do thiếu nguồn giống. Vật liệu giống Nưa để trồng hiện nay vẫn là củ nguyên vẹn. Vì vậy, việc nghiên cứu tìm ra phương pháp nhân giống nhằm tăng khả năng cung cấp giống Nưa cho địa phương là cần thiết..

Thuật ngữ “Nưa” được sử dụng cho nhiều loài khác nhau, phần lớn thuộc chi Nưa (*Amorphophallus*), họ Ráy (*Araceae*). Kết quả phân tích di truyền (Phạm Thị Mận, 2022) đã chỉ ra, cây Nưa được trồng ở Trà Cú (Trà Vinh) có tên khoa học là *Tacca leontopetaloides* (L.) Kuntze, thuộc họ Ráy (*Taceae*), còn có tên là củ Huyện (Quan Thi Hong Vu và cs, 2017). Ở Việt Nam, hiện có rất ít tài liệu nghiên cứu về phân bố của loài cây này, một số tài liệu đã đề cập nhưng chưa có sự thống nhất, chủ yếu được tham khảo từ trên Internet. Trên thế giới, chúng được tìm thấy ở nhiều nước nằm trong khu vực nhiệt đới châu Phi, châu Á, châu Úc và các đảo ở khu vực Thái Bình Dương (Edwards và cs). Đây là loài cây có nhiều công dụng và đã được sử dụng rộng rãi ở những nơi chúng phân bố. Tinh bột củ Nưa được sử dụng làm thực phẩm (uống giải khát, làm bánh), sản xuất bao bì sinh học, hồ vôi (Ukpabi và cs, 2009). Củ tươi có vị đắng được sử dụng để điều trị bệnh đường tiêu hóa như dạ dày, chủ yếu là tiêu chảy và kiết lỵ, nhiễm giun guinea, viêm gan và là một loại thuốc trị rắn cắn (Brand – Miller và cs, 1993; Kay, 1987). Dịch chiết từ vỏ củ có khả năng kháng khuẩn với các chủng vi khuẩn *Staphylococcus aureus*, *E. Coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* (Quan Thi Hong Vu và cs., 2017).

Vật liệu giống để trồng phổ biến nhất đối với cây Nưa là bằng củ do hạt của loài cây này có khả năng nảy mầm rất thấp (Kay, 1987; Spennemann, 1994). Nhân giống Nưa trong môi trường *in-vitro* với vật liệu nhân giống ban đầu là từ hạt cũng đã được thực hiện (Cepkova, 2015). Tác giả đã chỉ ra được môi trường nhân chồi tốt nhất là môi trường MS bổ sung zeatin với nồng độ, 1mg/l cho 4,1 chồi/mẫu; môi trường ra rễ là MS bổ sung zeatin 0,1mg/l kết hợp với NAA 0,05mg/l cho 5 rễ/cây. Tương tự, Borokini và cs. (2011) cũng đã chỉ ra, tỷ lệ hạt nảy mầm trong môi trường *in-vitro* là 57% cao hơn đáng kể so

với gieo ở điều kiện thông thường chỉ đạt 20%. Sự tăng trưởng chồi tốt nhất là ở môi trường MS + BAP (0,1mg/l) + NAA (0,01mg/l). Môi trường ra rễ tốt nhất là MS + IBA (0,1mg/l). Tuy nhiên, đến nay chưa tìm thấy công trình nào công bố về nhân giống loài cây này từ đỉnh sinh trưởng. Vì vậy, chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu nuôi cấy mô cây Nưa, vật liệu ban đầu là đỉnh sinh trưởng với kỳ vọng là nâng cao hệ số nhân giống, đồng thời tạo ra nguồn vật liệu giống chất lượng cao cho địa phương.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Củ Nưa có nguồn gốc từ xã An Quảng Hữu, huyện Trà Cú, tỉnh Trà Vinh. Mẫu cây được sử dụng là đỉnh sinh trưởng (mầm) khoảng 2 tuần tuổi. Đỉnh sinh trưởng được tách ra khỏi củ có kích thước 1,5-2,0cm, sau đó được lột 2-3 lớp lá mầm bên ngoài để tiến hành khử trùng.

Môi trường nuôi cấy cơ bản là MS (Murashige và Skoog, 1962), nước javel (NaClO) thương mại có nồng độ ban đầu 10%, nhóm cytokinin sử dụng BA (Benzyl Adenin) hãng Sigma (Mỹ), nhóm auxin sử dụng IBA (Indole – 3 – Butyric Acid) và NAA (Naphthalene Acetic Acid) hãng Merck (Đức).



Hình 1. Vật liệu ban đầu (Đỉnh sinh trưởng)

2.2. Phương pháp nghiên cứu

a. Thí nghiệm về khử trùng mẫu

Hóa chất được sử dụng để khử trùng là dung dịch javel thương mại. Thí nghiệm 2 nhân tố (nồng độ và thời gian xử lý) được bố trí theo khối ngẫu nhiên đầy đủ với 3 lần lặp lại. Nồng độ ở 3 mức là: 6,5%; 5,0%; 3,5% và thời gian xử lý gồm 2 mức là 13 phút và 15 phút. Mỗi nghiệm thức thí nghiệm bố trí 15 chồi/lặp. Mẫu được cấy trên môi trường MS.

Các chỉ tiêu đo đếm bao gồm: Tỷ lệ mẫu sạch, số lượng mẫu bật chồi, thời gian bật chồi.

Thời gian đo đếm: Theo dõi thời gian bật chồi hàng ngày, thu thập số liệu trong vòng 30 ngày kể từ khi vô mẫu.

b) Thí nghiệm nhân chồi

Sử dụng đồng thời 2 chất BA và NAA để bổ sung vào môi trường MS. NAA sử dụng 3 cấp từ 0,1-0,3mg/l và BA với 4 cấp nồng độ từ 0,5-2,0mg/l. Bố trí thí nghiệm 2 nhân tố theo khối ngẫu nhiên đầy đủ với 3 lần lặp. Mỗi nghiệm thức gồm 15 chồi/lặp.

Các chỉ tiêu theo dõi: Tổng số chồi/cụm, số lượng chồi hữu hiệu/cụm và chiều cao chồi.

Thời gian đo đếm: Sau 30 ngày cây chuyên.

c) *Thí nghiệm ra rễ*

*** Thí nghiệm sử dụng IBA**

IBA với 6 cấp nồng độ, từ 0,0-1,0mg/l được bổ sung vào môi trường ½ MS. Thí nghiệm được bố trí theo khối ngẫu nhiên đầy đủ, với 3 lần lặp. Mỗi nghiệm thức gồm 15 chồi/lặp.

Chỉ tiêu theo dõi: Tỷ lệ chồi ra rễ, số rễ trung bình chồi, chiều dài trung bình/rễ.

Thời gian đo đếm: Sau 30 ngày cây chuyên.

*** Thí nghiệm sử dụng NAA**

NAA với 6 cấp nồng độ, từ 0,0-1,0mg/l được bổ sung vào môi trường ½ MS. Thí nghiệm được bố trí theo khối ngẫu nhiên đầy đủ, với 3 lần lặp. Mỗi nghiệm thức gồm 15 chồi/lặp.

Chỉ tiêu theo dõi: Tỷ lệ chồi ra rễ, số rễ trung bình chồi, chiều dài trung bình/rễ.

Thời gian đo đếm: Sau 30 ngày cây chuyên.

d) *Thí nghiệm về giá thể ươm cây Nưa mô ở vườn ươm*

Thí nghiệm gồm 5 nghiệm thức: (1) 100% đất tầng mặt; (2) 70% đất tầng mặt + 30% tro trấu; (3) 70% đất tầng mặt + 30% xơ dừa; (4) 50% đất tầng mặt + 50% tro trấu; (5) 50% đất tầng mặt + 50% xơ dừa.

Bố trí thí nghiệm 1 nhân tố theo khối ngẫu nhiên đầy đủ với 3 lần lặp lại. Sử dụng cây mô mầm đã được huấn luyện, có bộ rễ khỏe mạnh, cây đồng đều (cao 5-7cm).

Các chỉ tiêu theo dõi: Tỷ lệ sống và chiều cao cây.

Thời gian đo đếm: Sau khi cây 6 tuần.

Địa điểm, điều kiện bố trí thí nghiệm

Các thí nghiệm được tiến hành tại Văn phòng Trung tâm Ứng dụng Khoa học Kỹ thuật Lâm nghiệp Nam Bộ, thành phố Thủ Dầu Một, tỉnh Bình Dương.

Điều kiện nuôi cấy trong phòng thí nghiệm với cường độ ánh sáng 2.000-3.000 lux, thời gian chiếu sáng 10 h/ngày, nhiệt độ $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ và chu kỳ cấy chuyên là 30 ngày. Môi trường được điều chỉnh pH 5,7-5,8, hấp khử trùng ở điều kiện áp suất 1,2 atm, nhiệt độ 121°C trong thời gian 20 phút.

Chế độ ươm cây ngoài vườn: Sau khi cấy vào giá thể cây được che kín bằng nylon trắng, ở trên được tủ lớp lưới đen có cường độ che bóng 70% trong thời gian 2 tuần đầu, sau đó lưới đen và nylon khi cây đã đủ điều kiện thích nghi với điều kiện tự nhiên. Tưới bằng hệ thống tự động với phép phun sương. Chế độ tưới 1 lần/ngày trong thời gian 5 phút.

Phương pháp phân tích và xử lý số liệu

Pháp phân tích ANOVA theo giá trị trung bình của các nghiệm thức để xác định mức độ sai khác giữa chúng. Trong trường hợp các nghiệm thức có sự khác biệt ý nghĩa ($P < 0,05$), sử dụng phương pháp trắc nghiệm Duncan để xếp hạng các nghiệm thức theo thứ tự từ lớn đến nhỏ.

Việc tính toán và phân tích số liệu được thực hiện trên 2 phần Excel 2019 và Genstat 12th Edition (International VSNi).

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Ảnh hưởng của nồng độ javel và thời gian khử trùng đến tỷ lệ sống và chất lượng mẫu cấy

Khử trùng là công đoạn đầu tiên và rất quan trọng trong nuôi cấy mô tế bào. Việc khử trùng giúp tạo ra mẫu sạch làm vật liệu ban đầu để tiến hành các công đoạn tiếp theo. Hiện nay, clorua thủy ngân ($HgCl_2$) là hóa chất đang được sử dụng phổ biến nhất trong giai đoạn khử trùng. Tuy nhiên, hóa chất này lại rất độc hại cho người sử dụng và khó khăn trong quá trình xử lý chất thải. Do vậy, trong nghiên cứu này, chúng tôi nghiên cứu sử dụng javel ($NaClO$) thương mại để khử mẫu. Kết quả được tổng hợp ở bảng 1.

Bảng 1. Ảnh hưởng của nồng độ javel và thời gian xử lý đến tỷ lệ mẫu sạch và thời gian bật chồi

Nghiệm thức	Nồng độ (%)	Thời gian xử lý (phút)	Thời gian bật chồi (ngày)	Tỷ lệ mẫu sạch	Tỷ lệ mẫu sạch bật chồi
KT1	5,0	13	12,1 ^{cd}	37,8 ^c	100
KT2	5,0	15	13,3 ^{bc}	42,2 ^{bc}	100
KT3	3,5	13	10,7 ^{de}	13,3 ^d	100
KT4	3,5	15	10,1 ^e	17,8 ^d	100
KT5	6,5	13	14,7 ^b	48,9 ^b	100
KT6	6,5	15	17,2^a	62,2^a	100
<i>Trung bình</i>			<i>13,0</i>	<i>37,0</i>	<i>100</i>
<i>P ($\alpha = 0,05$) nồng độ (ND)</i>			<i>< 0,001</i>	<i>< 0,001</i>	
<i>P ($\alpha = 0,05$) thời gian xử lý (TG)</i>			<i>0,028</i>	<i>0,005</i>	
<i>Tương tác (ND \times TG)</i>			<i>0,035</i>	<i>0,257</i>	

Kết quả phân tích thống kê cho thấy, nồng độ javel và thời gian xử lý là có ảnh hưởng ý nghĩa ($P < 0,001$) đến thời gian bật chồi và tỷ lệ mẫu sạch (Bảng 1).

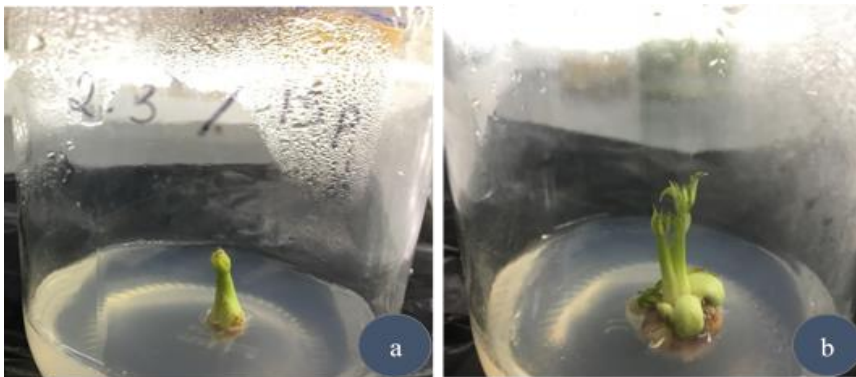
Thời gian bật chồi tăng khi nồng độ javel và thời gian xử lý tăng lên. Hai nghiệm thức có nồng độ javel cao nhất (6,5%) cũng là 2 nghiệm thức có thời gian bật chồi lâu nhất (14,7 ngày và 17,2 ngày lần lượt cho thời gian xử lý 13 phút và 15 phút), cao hơn rõ rệt so với các nghiệm thức có nồng độ thấp hơn (chỉ từ 10,1-13,3 ngày). Tăng thời gian xử lý cũng làm tăng thời gian bật chồi, tuy nhiên sự khác biệt giữa 2 mức thời gian xử lý chỉ thực sự có ý nghĩa ở nồng độ javel 6,5% (Bảng 1). Qua đó cho thấy, khi nồng độ javel càng tăng cao thì ảnh hưởng của thời gian xử lý đến thời gian bật chồi càng được thể hiện

rõ. Nồng độ javel và thời gian xử lý tăng có thể đã làm tổn thương mẫu nặng hơn, dẫn đến thời gian phục hồi (bật chồi) muộn hơn. Sự tương tác giữa nồng độ javel (NĐ) và thời gian xử lý (TG) là có ý nghĩa ($P = 0,035$) đến thời gian bật chồi.

Tỷ lệ mẫu sạch cao hơn khi nồng độ javel và thời gian xử lý mẫu tăng lên. Nghiệm thức KT6 có tỷ lệ mẫu sạch cao nhất (62,2%), khác biệt có ý nghĩa với tất cả các nghiệm thức còn lại (13,3-48,9%). Tăng thời gian xử lý mẫu lên 15 phút có tỷ lệ mẫu sạch bệnh cao hơn so với xử lý 13 phút. Tuy nhiên, sự khác biệt giữa 2 mức thời gian xử lý chỉ được thấy rõ ở nồng độ 6,5% (KT5 và KT6). Điều đó cho thấy, nồng độ tăng thì ảnh hưởng của thời gian xử lý đến tỷ lệ mẫu sạch càng lớn hơn. Sự tương tác giữa nồng độ nước javel (NĐ) với thời gian xử lý (TG) là không có ý nghĩa ($P = 0,257$) với tỷ lệ mẫu sạch (Bảng 1).

Tỷ lệ mẫu sạch có thể bật chồi đều đạt 100% ở tất cả các nghiệm thức (Bảng 1). Như vậy, mặc dù, việc tăng nồng độ và thời gian xử lý mẫu có thể làm mẫu tổn thương nặng hơn, kéo dài thời gian bật chồi nhưng mẫu vẫn có thể phục hồi được. Trong nghiên cứu này, nghiệm thức có nồng độ javel cao nhất và thời gian xử lý mẫu cao nhất (KT6) có tỷ lệ mẫu sạch cao nhất nên chưa thể kết luận đây đã phải là ngưỡng tối ưu hay chưa. Tuy nhiên, khi xem xét đến thời gian bật chồi thì có thể thấy KT6 có thể đã tiệm cận ngưỡng tối ưu, bởi thời gian bật chồi kéo dài hơn đáng kể so với nghiệm thức có nồng độ javel thấp nhất (KT3 và KT4), 17,2 ngày so với 10,1-10,7 ngày. Chứng tỏ, nồng độ javel 6,5% và với thời gian xử lý 15 phút đã làm tổn thương mẫu nặng hơn. Việc tăng nồng độ javel và thời gian xử lý lên nữa có thể vẫn giúp tăng tỷ lệ mẫu sạch nhưng cũng có thể làm mất khả năng bật chồi của mẫu.

So sánh giữa thủy ngân và javel (Trần Văn Tiến, 2017), đã thử nghiệm đồng thời thủy ngân ($HgCl_2$) và nước javel để khử trùng mẫu cấy cho cây Nưa (*Amorphaphollus konjac*) một loài có đặc điểm sinh học tương tự như đối với cây Nưa (*T. leontopetaloides*) và tác giả đã đưa ra kết luận rằng, sử dụng nước javel cho hiệu quả cao hơn so với thủy ngân. Nghiệm thức tốt nhất của 2 chất đều cho tỷ lệ mẫu sạch là tương đương nhau nhưng tỷ lệ mẫu bật chồi khi sử dụng javel là 100%, trong khi dùng thủy ngân tỷ lệ mẫu bật chồi chỉ là 12,2%. Như vậy, kết hợp kết quả trong nghiên cứu này với nghiên cứu trước đây có thể nói, sử dụng javel để khử trùng mẫu vừa cho kết quả tốt và an toàn hơn cho người sử dụng và môi trường.



Hình 2. Mẫu cấy vô trùng trong môi trường MS
(a: mẫu cấy bật chồi sau 17 ngày; b: sau 30 ngày vào cấy mẫu)

3.2. Ảnh hưởng của nồng độ BA và NAA khả năng nhân chồi

Cytokinin là các chất hoạt hóa sự phân chia tế bào. Cytokinin ảnh hưởng rõ rệt và rất đặc trưng lên sự phân hóa cơ quan của thực vật, đặc biệt là sự phân hóa chồi. Cytokinin kết hợp với auxin điều chỉnh hiện tượng ưu thế ngọn, giải phóng các chồi bên khỏi sự ức chế tương quan của chồi ngọn. Sự kết hợp giữa auxin và cytokinin trong môi trường nhân chồi với liều lượng và tỷ lệ hợp lý có tác dụng kích thích các chồi phát triển đồng đều về số lượng và chất lượng chồi (Nguyễn Kim Thanh và Nguyễn Thuận Châu, 2005). Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng BA và NAA với các hàm lượng khác nhau để bổ sung vào môi trường MS nhằm đánh giá ảnh hưởng đến khả năng sinh chồi của Nưa. Kết quả được tổng hợp ở bảng 2.

Bảng 2. Ảnh hưởng của nồng độ BA và NAA đến khả năng nhân chồi

Nghiệm thức	Nồng độ (mg/l)		Số chồi	Số chồi hữu hiệu	Chiều cao chồi
	BA	NAA			
NC1	0,5	0,1	2,1 ^e	2,1 ^{de}	8,5 ^a
NC2	0,5	0,2	2,4 ^{de}	2,2 ^{cde}	7,6 ^b
NC3	0,5	0,3	2,2 ^e	2,1 ^{de}	4,3 ^e
NC4	1,0	0,1	2,5 ^{bcd}	2,4 ^{bcd}	8 ^{ab}
NC5	1,0	0,2	2,9 ^b	2,7 ^b	7,1 ^c
NC6	1,0	0,3	2,8 ^{bc}	2,6 ^{bc}	4,2 ^e
NC7	1,5	0,1	2,9 ^b	2,7 ^b	8 ^{ab}
NC8	1,5	0,2	4,1^a	3,7^a	5,6^b
NC9	1,5	0,3	2,5 ^{bcd}	2,3 ^{cd}	3,6 ^f
NC10	2,0	0,1	2,4 ^{cde}	2,3 ^{cd}	8 ^b
NC11	2,0	0,2	2,8 ^{bc}	2,4 ^{bcd}	5,6 ^d
NC12	2,0	0,3	2,1 ^e	1,8 ^{de}	3,4 ^f
<i>Trung bình</i>			2,6	2,4	6,2
<i>P (α = 0,05) (BA)</i>			< 0,001	< 0,001	< 0,001
<i>P (α = 0,05) NAA</i>			< 0,001	< 0,001	< 0,001
<i>Tương tác (BA x NAA)</i>			< 0,001	< 0,001	< 0,001

Kết quả phân tích thống kê cho thấy, nồng độ của cả BA và NAA đều có ảnh hưởng rất ý nghĩa ($P < 0,001$) đến số lượng chồi, số lượng chồi hữu hiệu và chiều cao chồi (Bảng 2). Khi phân tích riêng theo từng nhân tố/chất, BA ở nồng độ 1,5mg/l có tổng số chồi và số lượng chồi hữu hiệu trung bình cao nhất, lần lượt là 3,2 chồi/cụm và 2,9 chồi/cụm (vượt 23% và 16% so với giá trị trung bình thí nghiệm); NAA ở nồng độ 0,2mg/l có tổng số chồi và số lượng chồi hữu hiệu bình quân cao nhất, lần lượt là 3,0 chồi/cụm và 2,8 chồi/cụm, vượt 15,4% và 12,0% so với giá trị trung bình của thí nghiệm. BA ở nồng độ 1,5mg/l và NAA 0,2mg/l khi kết hợp với nhau (nghiệm thức NC8) cũng cho kết quả tốt nhất về khả năng sinh chồi (tổng số chồi là 4,1 chồi/cụm và chồi hữu hiệu là 3,7 chồi/cụm), cao hơn có ý nghĩa so với tất cả các nghiệm thức còn lại (tổng số chồi từ 2,1-2,9 chồi/cụm và số chồi hữu hiệu từ 1,8-2,7 chồi/cụm). Chiều cao chồi có xu hướng giảm khi tăng nồng độ của cả 2

chất. Chiều cao bình quân của chồi từ 6,8cm khi BA ở nồng độ 0,5mg/l giảm 5,6cm khi tăng BA lên nồng độ 2,0mg/l. Tương tự, chiều cao bình quân của chồi đạt 8,1cm khi NAA ở nồng độ 0,1mg/l và giảm xuống chỉ còn 3,9cm khi tăng NAA lên 0,3mg/l. Như vậy, có thể thấy khi bổ sung đồng thời BA và NAA giúp tăng số lượng chồi, nhưng lại làm cho chồi ngắn lại. Kết hợp giữa khả năng sinh chồi và chiều dài chồi có thể kết luận rằng, BA ở nồng độ 1,5mg/l kết hợp với NAA ở nồng độ 0,2mg/l là cho kết quả tốt nhất (Bảng 2). Sự tương tác giữa nồng độ BA và NAA là rất có ý nghĩa ($P < 0,001$) với cả 3 chỉ tiêu nghiên cứu (số lượng chồi, số lượng chồi hữu hiệu và chiều cao chồi).



Hình 3. Chồi Nưa sau 30 ngày nuôi cấy

3.3. Ảnh hưởng của nồng độ IBA hoặc NAA đến khả năng ra rễ

Tạo rễ là giai đoạn chuyển chồi từ môi trường nhân chồi sang môi trường tạo rễ để có được cây con hoàn chỉnh. Để cây con có tỷ lệ sống cao trong môi trường tự nhiên thì chất lượng bộ rễ là rất quan trọng. Trong môi trường *in-vitro*, auxin có vai trò quyết định đến khả năng ra rễ, thời gian ra rễ và chất lượng rễ của chồi (Nguyễn Kim Thanh và Nguyễn Thuận Châu, 2005). Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành bổ sung riêng rẽ IBA và NAA với hàm lượng khác nhau vào môi trường $\frac{1}{2}$ MS để đánh giá khả năng kích thích sự ra rễ của chồi Nưa. Kết quả thu được như sau:

* Ảnh hưởng của IBA

Nồng độ IBA có ảnh hưởng rất có ý nghĩa ($P < 0,001$) với cả 3 chỉ tiêu được nghiên cứu (Bảng 3). Tỷ lệ chồi ra rễ tăng từ 53,3% ở môi trường $\frac{1}{2}$ MS (R1.1) – không bổ sung IBA, tăng lên 66,7% khi bổ sung IBA với hàm lượng 0,2mg/l và lên 95,6% khi tăng hàm lượng IBA lên 1,0mg/l. Bổ sung IBA cũng giúp tăng số lượng rễ, từ 0,6 rễ/chồi ở môi trường $\frac{1}{2}$ MS cơ bản, tăng lên 0,8 rễ/chồi khi bổ sung IBA 0,2mg/l tăng dần và đạt 2,9 rễ/chồi khi bổ sung IBA 1,0mg/l. Chiều dài rễ cũng có xu hướng tăng tương tự như 2 chỉ tiêu trên, từ 4,1cm ở môi trường $\frac{1}{2}$ MS, tăng dần khi tăng hàm lượng IBA và đạt cao nhất ở nghiệm thức R1.6 (IBA 1,0mg/l) với 5,0cm. Trần Văn Tiến (2017) nghiên cứu ảnh hưởng của hàm lượng IBA (0,0-1,0 mg/l) đến khả năng ra rễ của cây chồi Nưa (*A. konjac*) *in-vitro* và tác giả đã chỉ ra rằng, hàm lượng IBA 0,4mg/l là cho kết quả tốt nhất (tỷ lệ chồi ra rễ đạt 100%, số rễ bình quân là 5,3 rễ/chồi và chiều dài rễ bình quân là 2,6 rễ/chồi). Qua đó cho thấy,

nhu cầu auxin là có sự khác biệt theo loài. Trong nghiên cứu này, với cả 3 chỉ tiêu nghiên cứu đều đạt cao nhất nghiệm thức IBA có hàm lượng cao nhất nên chưa thể kết luận đây là mức tối ưu. Tuy nhiên, với tỷ lệ mầm ra rễ đạt tới 95,6% cao gần gấp đôi, số lượng rễ tăng 4,8 lần và chiều dài rễ cũng tăng 1,2 lần so với đối chứng thì có thể nói, IBA ở nồng độ 1,0mg/l có thể đã tiệm cận ngưỡng tối ưu.



Hình 4. Rễ của chồi Nưa trong môi trường bổ sung IBA

Bảng 3. Ảnh hưởng của nồng độ IBA đến khả năng ra rễ của chồi Nưa

Nghiệm thức	Nồng độ (mg/l)	Tỷ lệ ra rễ (%)	Số lượng rễ	Chiều dài rễ (cm)
R1.1	0,0	53,3 ^e	0,6 ^d	4,1 ^b
R1.2	0,2	66,7 ^d	0,8 ^{cd}	4,2 ^b
R1.3	0,4	71,1 ^{cd}	1,0 ^{cd}	4,4 ^{ab}
R1.4	0,6	77,8 ^{bc}	1,4 ^c	4,4 ^{ab}
R1.5	0,8	84,4 ^b	2,1 ^b	4,9 ^a
R1.6	1,0	95,6^a	2,9^a	5,0^a
Trung bình		74,8	1,5	4,5
<i>P</i> ($\alpha = 0,05$)		< 0,001	< 0,001	< 0,001

*** Ảnh hưởng của NAA**

Tương tự với IBA, NAA cũng có ảnh hưởng rất rõ rệt ($P < 0,001$) đến cả 3 chỉ tiêu nghiên cứu (Bảng 4). Tỷ lệ chồi ra rễ chỉ đạt 53,3% trên môi trường ½ MS, tăng lên 62,2% khi bổ sung NAA với nồng độ 0,2mg/l và tỷ lệ chồi ra rễ tăng dần khi tăng hàm lượng NAA và đạt cao nhất là 91,1% ở nghiệm thức R2.6 (hàm lượng NAA cao nhất). Xu hướng tăng số lượng rễ là tương tự với tỷ lệ chồi ra rễ. Số lượng rễ ở môi trường MS cơ bản chỉ đạt 0,6 rễ/chồi, tăng lên 0,9 rễ/chồi khi bổ sung NAA 0,9mg/l, đạt cao nhất 1,8 rễ/chồi ở nghiệm thức R2.6. NAA cũng có tác dụng làm cho rễ dài hơn, từ 4,2cm, tăng dần lên theo hàm lượng NAA được bổ sung và đạt cao nhất 4,9cm ở hàm lượng 0,8mg/l sau đó lại giảm xuống (4,7cm) khi bổ sung hàm lượng NAA lên 1,0mg/l. Như vậy, khi bổ sung NAA lên hàm lượng 1,0mg/l có thể đã bắt đầu đã có sự ức chế đến khả năng kéo dài rễ. So với IBA, giá trị bình quân của các chỉ tiêu nghiên cứu khi dùng NAA có sự khác biệt không nhiều. Tỷ lệ chồi ra rễ, số lượng rễ/chồi và chiều dài rễ trung bình của NAA lần

lượt là 72,2%, 1,2 rễ/chồi và 4,6cm (Bảng 4), thấp hơn không đáng kể so với của IBA, lần lượt là 74,8%, 1,5 rễ/chồi và 4,5cm (Bảng 3). Tuy nhiên, khi xét 2 nghiệm thức tốt nhất của IBA (R1.6) và NAA (R2.6) thì thấy IBA có hiệu quả cao hơn ở cả 3 chỉ tiêu nghiên cứu (Bảng 3 và bảng 4).

Bảng 4. Ảnh hưởng của nồng độ NAA đến khả năng ra rễ của chồi Nưa

Nghiệm thức	Nồng độ (mg/l)	Tỷ lệ ra rễ (%)	Số lượng rễ	Chiều dài rễ (cm)
R2.1	0,0	53,3 ^c	0,6 ^d	4,2 ^c
R2.2	0,2	62,2 ^{bc}	0,9 ^{cd}	4,4 ^{bc}
R2.3	0,4	73,3 ^{ab}	1,0 ^{bcd}	4,8 ^a
R2.4	0,6	73,3 ^{ab}	1,4 ^{abc}	4,8 ^a
R2.5	0,8	80,0 ^{ab}	1,5 ^{ab}	4,9 ^a
R2.6	1,0	91,1^a	1,8^a	4,7^{ab}
<i>Trung bình</i>		72,2	1,2	4,6
<i>P (α = 0,05)</i>		< 0,001	< 0,001	< 0,001

3.4. Ảnh hưởng của giá thể đến tỷ lệ sống, sinh trưởng của chồi Nưa mô trong vườn ươm

Giá thể là một trong những nhân tố quan trọng ảnh hưởng tới khả năng sinh trưởng và phát triển của cây mô trong vườn ươm do cây mô mầm khi ra thường có thân và rễ rất mềm (non). Trong nghiên cứu này, chúng tôi thử nghiệm 5 nghiệm thức về giá thể. Sau 06 tuần cấy, kết quả được thể hiện trong bảng 5.

Bảng 5. Ảnh hưởng của giá thể đến tỷ lệ sống và chiều cao cây Nưa mô trong vườn ươm

Nghiệm thức	Thành phần	Tỷ lệ sống (%)	H (cm)
GT1	100% đất tầng mặt	53,7 ^{bc}	5,1
GT2	70% đất tầng mặt + 30% tro trấu	50,0 ^c	5,5
GT3	70% đất tầng mặt + 30% xơ dừa	65,7 ^{ab}	5,2
GT4	50% đất tầng mặt + 50% tro trấu	54,6 ^{bc}	5,8
GT5	50% đất tầng mặt + 50% xơ dừa	69,4 ^a	5,6
<i>Trung bình</i>		58,7	5,4
<i>P (α = 0,05)</i>		0,004	0,777

Kết quả nghiên cứu cho thấy, giá thể có ảnh hưởng có ý nghĩa (P = 0,004) đến tỷ lệ sống của cây mô Nưa nhưng ảnh hưởng không ý nghĩa (P = 0,777) đến chiều cao cây. Nghiệm thức GT5 cho tỷ lệ sống cao nhất (69,4%) cùng nhóm với GT3 (65,7%) nhưng cao có ý nghĩa so với các nghiệm thức còn lại (50,0-54,6%). Chiều cao cây sau 6 tuần tuổi đạt từ 5,1-5,8cm, trung bình là 5,4cm. So với chiều cao cây ở trong bình (thời điểm ra cây), chiều cao cây ở thời điểm điều tra là không có sự khác biệt đáng kể, thậm chí còn thấp hơn 5,5cm (Bảng 5) so với 6,2cm (Bảng 3). Sỡ dĩ như vậy, bởi Nưa là loài cây thân thảo, thân rất ngắn (2-3cm), cả vòng đời thường chỉ có 3-4 lá. Lá ra sau thường cao hơn lá ra trước. Khi cây được chuyển từ bình ra thì các lá sẵn có không phát triển cao lên nữa, một số lá mới được sinh ra nhưng vẫn có kích thước nhỏ và thấp. Vì vậy, cần thêm thời gian theo dõi để đánh giá khả năng sinh trưởng của chúng trong điều kiện tự nhiên trước khi đề xuất hướng phát triển cây mô cho loài cây này.

4. Kết luận và kiến nghị

Kết quả nghiên cứu bước đầu đã xác định được phương pháp khử trùng mẫu cây; môi trường nhân chồi; môi trường ra rễ; và giá thể ươm cây mô ngoài vườn cho nuôi cấy mô cây Nưa. Tuy vậy, tỷ lệ sống của cây Nưa mô ngoài vườn ươm còn tương đối thấp, cần tiếp tục nghiên cứu thêm về điều kiện ươm cây ngoài vườn để cải thiện tỷ lệ sống cho cây. Đồng thời, cần tiến hành trồng thử nghiệm cây Nưa nuôi cấy mô để đánh giá khả năng thích ứng, sinh trưởng và năng suất củ ngoài thực địa trước khi tiến hành sản xuất cây Nưa mô đại trà.

Lời cảm ơn

Kết quả nghiên cứu này thuộc đề tài: “Nghiên cứu kỹ thuật nhân giống, trồng cây Nưa (Amorphophallus sp.) tại huyện Trà Cú, tỉnh Trà Vinh”, giai đoạn 8/2021 – 8/2023. Chúng tôi xin chân thành cảm ơn Sở Khoa học và Công nghệ tỉnh Trà Vinh đã tài trợ kinh phí để thực hiện nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Borokini T., Lawyer E. F., Ayodele A. E. (2011). In vitro propagation of *Tacca leontopetaloides* (L.) Kuntze in Nigeria. *Egyptian Journal of Biology*, 11(13), 51-56.
- [2] Brand-Miller J., James K.W., Maggiore P. (1993). *Tables of composition of Australian Aboriginal Foods*. 1st Edition. Aboriginal Studies Press, Canberra.
- [3] Cepkova P. H., et al. (2015). Simplified in vitro propagation protocol for *Tacca leontopetaloides* (L.) Kuntze and assessment of genetic uniformity of regenerated plantlets. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 27(10),736-743.
- [4] Edwards S. et al. (1997). Flora of Ethiopia and Eritrea. Hydrocharitaceae to *Arecaceae* [The National Herbarium]. *Addis Ababa University and Uppsala* 6.
- [5] Kay D. (1987). *Root Crops*. 2nd Edition. In: Gooding E.G.B (edition.). Tropical Development and Research Institute, UK.
- [6] Phạm Thị Mận, Lê Thành Long, Phạm Văn Bốn (2022). *Định danh lại loài* (Báo cáo chuyên đề). Trung tâm Ứng dụng Khoa học Kỹ thuật Lâm nghiệp Nam Bộ.
- [7] Murashige T., Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant*, 15, 473-497.
- [8] Quan Thi Hong Vu, Phung Thi Kim Le, Huy Pham Hoang Vo, Triet Thanh Nguyen, Tam Kim Minh Nguyen (2017). Characteristics of *Tacca leontopetaloides* (L.) Kuntze collected from An Gian in Vietnam. *International Conference on Chemical Engineering, Food and Biotechnology (iccfb2017): Proceedings of the 3rd International Conference on Chemical Engineering, Food and Biotechnology*. <http://dx.doi.org/10.1063/1.5000190>.
- [9] Spennemann D. H. R (1994). Traditional arrowroot production and utilization in the Marshall Islands. *J. Ethnobiol*, 14, 211-234.
- [10] Nguyễn Kim Thanh và Nguyễn Thuận Châu (2005). *Giáo trình Sinh lý thực vật* (Dùng trong các trường THCN). NXB Hà Nội.
- [11] Trần Văn Tiên (2017). *Nghiên cứu thành phần, phân bố các loài nưa (Amorphophallus spp.) củ có glucomannan và chọn loài có triển vọng phát triển trồng ở một số tỉnh miền núi phía Bắc Việt Nam* (Luận án tiến sĩ). Học viện Khoa học và Công nghệ.
- [12] Ukpabi U.J., Ukenye E., Olojede A. O (2009). Raw-material potential of Nigerian wild Polynesian arrowroot (*Tacca leontopetaloides*) tubers and starch. *J. Food Technol*, 7, 135-138.