



NHÂN GIỐNG CÂY THỦY XƯƠNG BỒ (*ACORUS CALAMUS L.*) BẰNG KỸ THUẬT NUÔI CÂY MÔ

Nguyễn Văn Ấy¹, Thái Lê Tường Vy², Trần Duy Bình³, Lê Kim Yến⁴ và Hoàng Thị Kiều Khanh⁴

¹ Khoa Nông nghiệp & Sinh học Ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ

² Lớp Hoa viên cây cảnh K.36, Khoa Nông nghiệp & Sinh học Ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ

³ Lớp CH. CN Sinh học K.19, Viện Nghiên cứu & Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

⁴ Lớp Sinh học K.36, Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ

Thông tin chung:

Ngày nhận: 25/05/2013

Ngày chấp nhận: 30/10/2013

Title:

Propagation of *Acorus calamus L.* by plant tissue culture technique

Từ khóa:

Cây thủy xương bồ (*Acorus calamus L.*), nuôi cấy mô, BA, IBA, thuần dưỡng

Keywords:

Acorus calamus L., Plant tissue culture, BA, IBA, acclimatization

ABSTRACT

Acorus calamus L. is one of the precious herbs. The study on propagation of *Acorus calamus L.* by plant tissue culture technique was carried out to determine the suitable media for in vitro proliferation of this plant. Three experiments were conducted at the laboratory of plant tissue culture and net house of Plant Physiology and Biochemistry Department, College of Agriculture and Applied Biology, Can Tho University, from December 2012 to April 2013. The results showed that: (i) MS medium supplemented with BA (2-4 mg/L) was effective for rapid proliferation of shoots in vitro (3.13-4.67 shoots after a 4 week culture); (ii) Solid MS medium or MS supplemented with activated charcoal (2 g/L) gave highest rate of in vitro root induction (100%); and (iii) Acclimatization of micropropagated plants which were planted in (or not) plastic pots containing rice husk ashes or coconut (fiber) dust showed a high survival rate (97.87-98.89%), and most seedlings grew very well.

TÓM TẮT

Cây thủy xương bồ (*Acorus calamus L.*) là một trong những loại thảo dược quý. Nghiên cứu “Nhân giống cây thủy xương bồ (*Acorus calamus L.*) bằng kỹ thuật nuôi cấy mô” nhằm xác định môi trường thích hợp trong nhân giống in vitro loại cây này. Đề tài gồm 3 thí nghiệm được tiến hành tại phòng nuôi cấy mô và nhà lưới của Bộ môn Sinh lý-Sinh hóa, Khoa Nông nghiệp và Sinh học Ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ, từ tháng 12/2012 đến 04/2013. Kết quả thí nghiệm cho thấy: (i) Trong giai đoạn nhân chồi, có thể sử dụng môi trường MS bổ sung BA (2-4 mg/L) để nhân chồi sẽ cho tỉ lệ tạo chồi cao (3,13-4,67 chồi sau 4 tuần nuôi cấy), các chồi đều phát triển tốt trong điều kiện in vitro; (ii) Môi trường có hiệu quả cho sự tạo rễ in vitro chồi thủy xương bồ là môi trường MS không hoặc bổ sung than hoạt tính 2 g/l (tỉ lệ tạo rễ cao, 100%), các cây con có thể thuần dưỡng trong điều kiện nhà lưới; và (iii) ở giai đoạn thuần dưỡng, có thể sử dụng giá thể tro hoặc xơ dừa kết hợp trùm hoặc không trùm bọc nylon để thuần dưỡng sẽ cho tỉ lệ sống cao (97,87-98,89%), các cây con sinh trưởng và phát triển tốt.

1 MỞ ĐẦU

Hiện nay xu hướng sử dụng các loại thực vật, động vật trong tự nhiên để thay thế các loại dược phẩm thông thường ngày càng phổ biến rộng rãi. Cây thủy xương bồ (*Acorus calamus* L.) là một trong những loài thực vật dùng làm thuốc rất quan trọng của nhiều quốc gia như Ấn Độ, Trung Quốc, Nhật Bản. Cây thủy xương bồ thường được sử dụng làm thuốc chữa một số bệnh thông thường như cảm cúm và các vấn đề về tiêu hóa... (Phạm Hoàng Hộ, 1999). Trong tự nhiên, cây *Acorus calamus* L. rất hiếm khi có hạt, việc sinh sản của cây chủ yếu là sinh sản vô tính nhờ nảy chồi từ bộ phận sinh dưỡng (Paithankar, 2012).

Nuôi cấy mô tế bào thực vật được ứng dụng rộng rãi trong nhân giống nhiều loài thực vật. Ưu điểm của phương pháp này là tạo ra cây sạch bệnh, không đòi hỏi diện tích nhiều như duy trì cây gốc trong tự nhiên, cây con tạo ra có đặc điểm di truyền giống cây mẹ,... đặc biệt là tạo ra số lượng cây nhiều trong thời gian ngắn (Nguyễn Bảo Toàn, 2010). Vì vậy, nghiên cứu “nhân giống cây thủy xương bồ (*Acorus calamus* L.) bằng kỹ thuật nuôi cấy mô” nhằm tìm ra môi trường nhân giống *in vitro* thích hợp cho cây thủy xương bồ, làm cơ sở cho các nghiên cứu và ứng dụng về dược tính trên loại cây này, góp phần đáp ứng nhu cầu bảo tồn và sử dụng trong thực tế.

2 PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1 Phương tiện

2.1.1 Địa điểm và thời gian

Thí nghiệm được thực hiện tại Phòng Nuôi cấy mô và tế bào thực vật của Bộ môn Sinh lý-Sinh hóa, Khoa Khoa Nông nghiệp và Sinh học Ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ, từ 12/2012 đến 04/2013.

2.1.2 Vật liệu thí nghiệm

Mẫu thí nghiệm là các chồi *in vitro* của cây thủy xương bồ, có chiều dài khoảng 3 cm (4 tuần tuổi), được nuôi cấy tại Phòng thí nghiệm Nuôi cấy mô, Bộ môn Sinh lý-Sinh hóa, Khoa Nông nghiệp và Sinh học Ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ.

2.1.3 Thiết bị và dụng cụ

Sử dụng các trang thiết bị và dụng cụ thuộc phòng Nuôi cấy mô và tế bào thực vật, Bộ môn Sinh lý-Sinh hóa.

Phòng nuôi cấy mô (âm độ: 55%, nhiệt độ: $26 \pm 2^\circ\text{C}$, cường độ sáng 1.500 lux, chu kỳ quang

16 giờ/ngày). Nhà lưới có cường độ ánh sáng: 3200 – 5000 lux, ẩm độ trung bình: 62,5% và nhiệt độ $30 \pm 1^\circ\text{C}$.

2.1.4 Hoá chất

- Các khoáng đa lượng gồm: NH_4NO_3 , KNO_3 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, CaCl_2 , KH_2PO_4 .
- Các khoáng vi lượng gồm: H_3PO_4 , MnSO_4 , $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, KI.
- Các chất hữu cơ: agar, đường sucrose, nước dừa tươi,...
- Chất điều hoà sinh trưởng: Benzyl adenine (BA), Indole-3-butyric acid (IBA).

2.2 Phương pháp

Môi trường nuôi cấy là môi trường cơ bản MS (Murashige & Skoog, 1962) bổ sung: thiamin 1 mg/L; pyridoxin 1 mg/L; nicotinic acid 1 mg/L; đường sucrose 30 g/l, nước dừa 100 ml/l và agar 7,5 g/l, chất điều hoà sinh trưởng thực vật (tùy theo thí nghiệm), pH của môi trường nuôi cấy được điều chỉnh bằng 5,8.

2.2.1 Thí nghiệm 1: Ảnh hưởng của BA trong môi trường MS đặc lên sự tạo chồi *in vitro* cây thủy xương bồ

Chọn các chồi thủy xương bồ ngọn có chiều cao tương đương nhau (2 cm), số lá (3 lá) để bố trí thí nghiệm. Thí nghiệm được bố trí theo thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên một nhân tố gồm 5 nghiệm thức, với 5 lần lặp lại, mỗi lần lặp lại là 1 keo, mỗi keo cây 3 mẫu cây. Các nghiệm thức như sau:

1. Nghiệm thức: Đối chứng (MS không bổ sung BA)
2. Nghiệm thức 1: BA 2 mg/L
3. Nghiệm thức 2: BA 3 mg/L
4. Nghiệm thức 3: BA 4 mg/L
5. Nghiệm thức 4: BA 5 mg/L

Chỉ tiêu theo dõi: Số chồi (>1 cm), số lá, chiều cao chồi (cm) gia tăng theo thời gian.

2.2.2 Thí nghiệm 2: Ảnh hưởng của IBA và than hoạt tính trong môi trường MS đặc lên sự tạo rễ *in vitro* cây thủy xương bồ

Các mẫu chồi trong thí nghiệm này có kích cỡ tương tự như ở thí nghiệm 1. Thí nghiệm bố trí theo thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên hai nhân tố (IBA và than hoạt tính) với 12 nghiệm thức, 5 lần lặp lại, mỗi lần lặp lại là 1 keo chứa 3 mẫu chồi (Bảng 1).

Bảng 1: Các nghiệm thức của thí nghiệm 2

Than hoạt tính (g/l)	Nồng độ IBA (mg/L)					
	0	0,1	0,5	1	1,5	2
0	ĐC	NT1	NT2	NT3	NT4	NT5
2	NT6	NT7	NT8	NT9	NT10	NT11

ĐC: nghiệm thức đối chứng. NT: nghiệm thức

Chỉ tiêu theo dõi: Tỷ lệ % chồi tạo rễ, số rễ, chiều dài rễ (≥ 1 cm), số lá, chiều cao chồi gia tăng theo thời gian thí nghiệm.

2.2.3 Thí nghiệm 3: Ảnh hưởng của các loại giá thể và điều kiện ẩm độ lên sự thuần dưỡng cây thủy xương bồ ở điều kiện nhà lưới

Chọn các cây thủy xương bồ có kích cỡ và số rễ tương đương nhau, rửa sạch agar và đem trồng vào các chậu nhựa có kích thước 5x6 cm, theo các nghiệm thức của thí nghiệm. Các chậu được đặt vào khay có đục lỗ. Trong tuần đầu tiên thuần dưỡng, phun sương cho cây (30 phút/lần/ngày). Sau thời điểm 2 tuần trở đi, tưới 3 lần/ngày. Bố trí thí nghiệm: theo thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên 2 nhân tố gồm loại 3 loại giá thể và trong điều kiện có/không trùm bao nylon, với 6 nghiệm thức, mỗi nghiệm thức 5 lần lặp lại, mỗi lần lặp lại 9 cây (Bảng 2).

Bảng 2: Các nghiệm thức của thí nghiệm 3

Có/không trùm bao	Loại giá thể		
	Tro trấu	Xơ dừa	Phân rơm
Có trùm bao nylon	NT1	NT2	NT3
Không trùm bao nylon	NT4	NT5	NT6

NT: nghiệm thức

Chỉ tiêu theo dõi: Tỷ lệ sống (%) của cây sau khi thuần dưỡng, số lá, chiều cao cây (cm), số rễ, chiều dài rễ của cây theo thời gian thuần dưỡng.

2.2.4 Xử lý số liệu

Số liệu sau khi lấy được xử lý bằng phần mềm thống kê MINITAB, phép thử Tukey's.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Ảnh hưởng của BA trong môi trường MS đặc lên sự tạo chồi in vitro cây thủy xương bồ

3.1.1 Sự hình thành chồi

Kết quả ở Bảng 3 cho thấy số chồi thủy xương bồ có sự gia tăng ở các nghiệm thức có sự gia tăng theo thời gian. Trong đó, các nghiệm bổ sung BA đều có sự hình thành chồi nhiều hơn so với nghiệm thức đối chứng (không bổ sung BA). Vào thời điểm 1 và 3 tuần nuôi cấy, nghiệm thức MS bổ

sung BA nồng độ 2, 3 và 4 mg/L luôn có số chồi nhiều nhất (lần lượt là 2, 2,4, 2,6 chồi vào 1 tuần nuôi cấy và 2,47, 2,6, 2,86 chồi vào 3 tuần nuôi cấy), khác biệt ý nghĩa thống kê ở mức 5% so với nghiệm thức đối chứng (MS không bổ sung BA) và nghiệm thức còn lại. Đến 4 tuần sau khi cấy, số chồi gia tăng nhiều nhất trong môi trường MS bổ sung BA 4 mg/L (đạt 4,67 chồi) khác biệt với mức ý nghĩa 5% về mặt thống kê so với các nghiệm thức đối chứng (0,06 chồi).

Bảng 3: Ảnh hưởng của BA trong môi trường MS đặc lên sự hình thành chồi của cây thủy xương bồ theo thời gian (tuần sau khi cấy)

Nồng độ BA (mg/L)	Thời gian (tuần sau khi cấy)		
	1	3	4
Đối chứng	0,00 b	0,06 c	0,06 c
2	2,00 a	2,47 ab	3,13 ab
3	2,40 a	2,60 a	3,33 ab
4	2,60 a	2,86 a	4,67 a
5	0,66 b	1,47 b	1,80 bc
F	*	*	*
CV (%)	34,95	62,00	69,48

Các số có chữ theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê qua phép thử Tukey; ns không khác biệt; * khác biệt có ý nghĩa 5%

Số chồi có sự gia tăng qua các thời gian nuôi cấy. Nồng độ BA càng cao tới một ngưỡng nhất định sẽ kích thích sự hình thành chồi thủy xương bồ cụ thể là ở nồng độ BA 4 mg/L. Ngược lại khi môi trường không bổ sung BA không có sự hình thành chồi cây thủy xương bồ. Tuy nhiên khi nồng độ BA tăng qua ngưỡng cho phép sẽ ức chế sự hình thành chồi cây thủy xương bồ, cụ thể là ở nghiệm thức BA 5 mg/L.

3.1.2 Sự hình thành số lá

Số lá có sự thay đổi theo các thời gian sau khi cấy. Kết quả ở Bảng 4 cho thấy vào thời điểm 1 tuần sau khi cấy, số lá gia tăng nhanh (4,8 lá) trong môi trường MS bổ sung BA 4 mg/L và thấp nhất trong môi trường đối chứng (MS không bổ sung BA) là 0,47 lá, khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5%. Sau 3 tuần nuôi cấy, số lá gia tăng nhiều trong môi trường MS bổ sung BA với các nồng độ

2, 3, 4 và 5 mg/L, số lá lần lượt là 11,73; 8; 11,53 và 4 lá) và thấp nhất ở nghiệm thức đối chứng (1,33 lá), khác biệt với mức ý nghĩa 5% về mặt thống kê. Đến 4 tuần sau khi bố trí thí nghiệm, số lá hình thành nhiều nhất (10 lá) ở nghiệm thức bổ sung BA 4 mg/L và thấp nhất trong môi trường đối chứng 0,6 lá, khác biệt với mức ý nghĩa 5% về mặt thống kê so với các nghiệm thức còn lại.

Số lá hình thành nhiều nhất ở nghiệm thức MS bổ sung BA 4 mg/L. Số lá tăng tỉ lệ thuận với sự gia tăng của số chồi. Nồng độ BA cao ở một ngưỡng giới hạn sẽ kích thích sự tạo thành chồi thủy xương bồ dẫn đến số lá cũng gia tăng. Tuy nhiên, khi nồng độ BA cao quá ngưỡng sẽ làm giảm sự hình thành chồi thủy xương bồ dẫn đến số lá cũng giảm cụ thể ở nghiệm thức chứa BA 5 mg/L.

Bảng 4: Ảnh hưởng của BA trong môi trường MS đặc lên sự hình thành lá của cây thủy xương bồ theo thời gian (tuần sau khi cấy)

Nồng độ BA (mg/L)	Thời gian sau khi cấy (tuần)		
	1	3	4
Đối chứng	0,47 b	1,33 c	1,93 d
2	4,73 a	11,73 a	15,87 ab
3	4,07 a	8,00 b	13,66 bc
4	4,80 a	11,53 a	21,53 a
5	2,73 ab	4,00 c	9,13 c
F	*	*	*
CV (%)	51,20	61,82	58,82

Các số có chữ theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê qua phép thử Tukey; ns không khác biệt thống kê; * khác biệt có ý nghĩa 5%

3.1.3 Chiều cao của chồi

Chất điều hòa sinh trưởng thuộc nhóm cytokinin có tác dụng kích thích sự hình thành chồi. Đối với cây thủy xương bồ khi nuôi cấy trong môi trường MS bổ sung BA đã kích thích sự tạo chồi bên. Số chồi gia tăng dẫn đến số lá cũng gia tăng. Sự gia tăng nồng độ BA ở một ngưỡng nhất định tỉ lệ thuận với sự hình thành chồi và tỉ lệ nghịch với sự gia tăng chiều cao chồi qua các thời gian khảo sát. Theo kết quả Bảng 5 cho thấy, thời điểm 1 tuần sau khi cấy. Chiều cao chồi gia tăng khác biệt ở mức ý nghĩa 5% giữa các nghiệm thức MS bổ sung BA (2, 3, 4 và 5 mg/L) với nghiệm thức đối chứng. Chiều cao chồi gia tăng nhiều nhất đạt 3,49 cm ở nghiệm thức đối chứng so với các nghiệm thức bổ sung BA 2, 3, 4 và 5 mg/L (chiều cao chồi lần lượt là 1,13; 1,40; 1,93 và 1,73 cm).

Tuy nhiên giữa các nghiệm thức bổ sung BA lại không khác biệt nhau.

Tương tự ở thời điểm 1 tuần, sau 3 tuần nuôi cấy chiều cao chồi gia tăng nhiều nhất (3,07 cm) ở nghiệm thức đối chứng so với nghiệm thức MS bổ sung BA 2, 3, 4 và 5 mg/L (lần lượt là 2,53; 2,56; 3,69 và 3,16 cm), khác biệt với mức ý nghĩa 5% về mặt thống kê. Chiều cao chồi tiếp tục gia tăng sau 4 tuần nuôi cấy. Trong nghiệm thức đối chứng có chiều cao chồi gia tăng nhiều nhất đạt 1 cm và chiều cao chồi thấp nhất (0,33 cm), khác biệt với mức ý nghĩa 5%.

Bảng 5: Ảnh hưởng của BA trong môi trường MS đặc lên sự tăng trưởng chiều cao chồi của cây thủy xương bồ theo thời gian (tuần sau khi cấy)

Nồng độ BA (mg/L)	Thời gian (tuần sau khi cấy)		
	1	3	4
Đối chứng	3,49 a	6,56 a	7,56 a
2	1,13 b	2,53 b	3,35 c
3	1,40 b	2,56 b	3,21 c
4	1,93 b	3,69 b	5,25 b
5	1,73 b	3,16 b	3,49 c
F	*	*	*
CV (%)	48,14	44,4	40,29

Các số có chữ theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê qua phép thử Tukey; ns không khác biệt thống kê; * khác biệt có ý nghĩa 5%

Chiều cao chồi có sự gia tăng qua các thời gian nuôi cấy. Chiều cao chồi tỉ lệ nghịch với sự gia tăng nồng độ BA. Trong nghiệm thức đối chứng không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng (BA) chiều cao chồi gia tăng nhanh qua các thời gian nuôi cấy. Nồng độ BA càng cao số chồi hình thành càng nhiều ngược lại ức chế sự tăng trưởng về chiều cao chồi. Cụ thể ở nghiệm thức MS + BA 5 mg/L chiều cao chồi gia tăng ít nhất qua các thời gian nuôi cấy.

3.2 Ảnh hưởng của IBA và than hoạt tính trong môi trường MS đặc lên sự tạo rễ in vitro cây thủy xương bồ

3.2.1 Tỉ lệ % chồi tạo rễ

Sự hình thành rễ của cây phụ thuộc vào nồng độ auxin (nội sinh hoặc ngoại sinh). Có thể là do cây thủy xương bồ có hàm lượng auxin nội sinh cao nên ngoài các nghiệm thức bổ sung auxin (IBA) cây còn tạo rễ tốt trong điều kiện đối chứng (các nghiệm thức đều có tỉ lệ tạo rễ, 100%). Kết quả thống kê ở Bảng 6 cho thấy không có sự khác biệt thống kê giữa các nghiệm thức MS bổ sung IBA

hay than hoạt tính so với nghiệm thức đối chứng (không bổ sung IBA và than hoạt tính), cũng như không có sự tương tác có ý nghĩa về mặt thống kê

giữa 2 nhân tố nồng độ IBA và than hoạt tính lên tỷ lệ % tạo rễ của cây thủy xương bồ ở thời điểm 4 tuần sau khi cấy.

Bảng 6: Ảnh hưởng của IBA và than hoạt tính lên tỉ lệ % hình thành rễ của cây thủy xương bồ vào thời điểm 4 tuần sau khi cấy

Than hoạt tính (g/L)	Nồng độ IBA (mg/L)						Trung bình (Than hoạt tính)
	0	0,1	0,5	1	1,5	2	
0	100	100	100	100	100	100	100
2	100	100	100	100	100	100	100
Trung bình (IBA)	100	100	100	100	100	100	
F _{IBA}							ns
F _{Than hoạt tính}							ns
F _{IBA x than hoạt tính}							ns
CV (%)							0,00

Các số có chữ theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê qua phép thử Tukey; ns không khác biệt thống kê; * khác biệt có ý nghĩa 5%

3.2.2 Sự hình thành số rễ

Theo kết quả ở Bảng 7, số rễ sau 4 tuần nuôi cấy có sự khác biệt về mặt thống kê ở mức 5% giữa các nghiệm thức bổ sung IBA so với nghiệm thức đối chứng. Nghiệm thức đối chứng hình thành rễ nhiều nhất (12,17 rễ) so với các nghiệm thức bổ sung IBA với các nồng độ 0,1; 0,5; 1; 1,5 và 2 mg/L (số rễ lần lượt là 8,03; 6,37; 10,13; 8,40 và 11,37 rễ). Bảng 7 cũng cho thấy than hoạt tính không ảnh hưởng nhiều đến sự thành lập rễ của cây thủy xương bồ. Tuy nhiên, bổ sung IBA kết hợp

với than hoạt tính có ảnh hưởng tới sự thành lập rễ của cây thủy xương bồ. Nghiệm thức đối chứng cho số rễ nhiều nhất (12,27 rễ) và nghiệm thức cho số rễ hình thành thấp nhất (4,73 rễ) là nghiệm thức IBA 0,5 mg/L không bổ sung than hoạt tính, khác biệt ở mức ý nghĩa 5%. Tuy nhiên, nghiệm thức đối chứng khác biệt không có ý nghĩa so với nghiệm thức MS bổ sung than hoạt tính, MS + IBA 1 mg/L, MS + IBA 2 mg/L có và không bổ sung than hoạt tính 2 g/l vào thời điểm 4 tuần (số rễ lần lượt là 12,07; 11,20; 11,80 và 10,93 rễ).

Bảng 7: Ảnh hưởng của IBA và than hoạt tính lên sự hình thành số rễ cây thủy xương bồ vào thời điểm 4 tuần sau khi cấy

Than hoạt tính (g/L)	Nồng độ IBA (mg/L)						Trung bình (Than hoạt tính)
	0	0,1	0,5	1	1,5	2	
0	12,27 a	7,87 b	4,73 c	11,20 ab	7,87 b	11,80 a	9,29
2	12,07 a	8,20 b	8,00 b	8,93 b	8,93 b	10,93 ab	9,53
Trung bình (IBA)	12,17 a	8,03 c	6,37 c	10,13 b	8,40 bc	11,37 ab	
F _{IBA}							*
F _{Than hoạt tính}							ns
F _{IBA x than hoạt tính}							*
CV (%)							16,75

Các số có chữ theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê qua phép thử Tukey; ns không khác biệt thống kê; * khác biệt có ý nghĩa 5%

3.2.3 Chiều dài rễ

Kết quả ở Bảng 8 cho thấy chiều dài rễ ở các nghiệm thức có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5%. Trong đó nghiệm thức đối chứng và nghiệm thức IBA 0,1 mg/L kích thích sự tăng trưởng về chiều dài của rễ cây thủy xương bồ nhiều nhất lần lượt là 5,32 và 5,34 cm so với các nghiệm thức bổ sung IBA ở nồng độ cao hơn (0,5; 1; 1,5 và 2 mg/L), chiều dài rễ lần lượt là 3,54; 4,55; 3,55 và

3,90 cm. Bên cạnh đó, than hoạt tính cũng ảnh hưởng đến sự tăng trưởng chiều dài rễ của cây thủy xương bồ. Nghiệm thức có môi trường MS bổ sung than hoạt tính 2 g/l ra rễ dài hơn (5,47 cm) môi trường không có than hoạt tính (3,26 cm), khác biệt với mức ý nghĩa 5% về mặt thống kê. Ngoài ra, kết hợp giữa nồng độ chất điều hòa sinh trưởng với than hoạt tính cũng ảnh hưởng đến chiều dài của rễ của cây thủy xương bồ. Nghiệm thức đối chứng kết hợp 2 g/l than hoạt tính và nghiệm thức IBA

0,1 mg/L kết hợp với than hoạt tính 2 mg/L có chiều dài rễ dài hơn các nghiệm thức còn lại (chiều dài rễ lần lượt là 6,04 và 6,13 cm). Sự tương tác giữa nồng độ IBA và than hoạt tính ảnh hưởng đến sự tăng trưởng của rễ cây thủy xương bồ với mức ý nghĩa 5 % về mặt thống kê.

Các nghiệm thức đối chứng, MS + than hoạt tính 2 g/l, MS + IBA 0,1 mg/L, MS + IBA 0,1 g/l và than hoạt tính 2 g/l, MS + IBA 0,5 mg/L và than

hoạt tính, MS + IBA 1 mg/L, MS + IBA 1 mg/L và than hoạt tính, MS + IBA 1,5 mg/L và than hoạt tính và nghiệm thức MS + IBA 2 mg/L và than hoạt tính cho số rễ tốt nhất nhưng khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê. Kết quả này tương tự kết quả đã nghiên cứu năm 2010 của Ahmed là chất điều hòa sinh trưởng thuộc nhóm auxin IBA với nồng độ 1 mg/L kích thích sự tăng trưởng của rễ tốt nhất.

Bảng 8: Ảnh hưởng của IBA và than hoạt tính lên sự tăng trưởng chiều dài rễ sau 4 tuần

Than hoạt tính (g/l)	Nồng độ IBA (mg/L)						Trung bình (Than hoạt tính)
	0	0,1	0,5	1	1,5	2	
0	4,60 ab	4,55 ab	1,63 c	4,11 ab	1,79 c	2,92 bc	3,26 b
2	6,04 a	6,13 a	5,46 a	4,97 ab	5,32 a	4,89 ab	5,47 a
Trung bình (IBA)	5,32 a	5,34 a	3,54 b	4,55 ab	3,55 b	3,90 b	
F _{IBA}				*			
F _{Than}				*			
F _{IBA x than hoạt tính}				*			
CV (%)				21,01			

Các số có chữ theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê qua phép thử Tukey; ns không khác biệt thống kê; * khác biệt có ý nghĩa 5%

Tương tự số rễ chiều dài rễ cũng gia tăng trong môi trường không bổ sung hoặc bổ sung với một nồng độ thấp IBA. Than hoạt tính có tác dụng làm tối môi trường tạo điều kiện thích hợp cho sự phát triển của rễ. Ngoài ra than hoạt tính còn có tác dụng hấp thu các chất điều hòa sinh trưởng có trong môi trường tạo điều kiện thích hợp cho sự phát triển của rễ. Theo kết quả thí nghiệm cho thấy, cây thủy xương bồ được trồng trong môi trường không bổ sung IBA số rễ được tạo ra nhiều hơn so với các môi trường bổ sung IBA. Than hoạt tính không ảnh hưởng đến sự tạo rễ mà chỉ ảnh hưởng đến chiều dài của rễ. Môi trường bổ sung than hoạt tính làm gia tăng chiều dài rễ của cây.

3.3 Ảnh hưởng của các loại giá thể và điều kiện ẩm độ lên sự thuần dưỡng cây thủy xương bồ ở điều kiện nhà lưới

3.3.1 Tỷ lệ sống

Kết quả ở Bảng 9 cho thấy tỷ lệ sống của các cây thủy xương bồ sau 6 tuần thuần dưỡng trong điều kiện nhà lưới. Trong đó giữa các loại giá thể, giá thể xơ dừa có tỷ lệ sống cao nhất (98,89% sau 6 tuần thuần dưỡng) và thấp nhất là giá thể phân rom (đạt 62,22%), khác biệt về mặt thống kê với mức ý nghĩa 5%. Tuy nhiên, nghiệm thức tro và xơ dừa lại không khác biệt về mặt thống kê.

Bảng 9: Ảnh hưởng của các loại giá thể điều kiện ẩm độ lên tỷ lệ sống của cây thủy xương bồ trong điều kiện nhà lưới

Loại giá thể	Sau 6 tuần thuần dưỡng		
	Trùm bao nylon	Không trùm bao nylon	Trung bình (giá thể)
Tro	97,78 a	97,78 a	97,78 a
Xơ dừa	97,78 a	100 a	98,89 a
Phân rom	84,44 b	40 b	62,22 b
Trung bình (có/không trùm nylon)	93,33 a	79,26 b	
F _{loại giá thể}			*
F _{có/không trùm nylon}			*
F _{loại giá thể x có/không trùm nylon}			*
CV (%)			8,48

Các số có chữ theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê qua phép thử Tukey; ns không khác biệt thống kê; * khác biệt có ý nghĩa 5%

Trong điều kiện trùm bao nylon tỉ lệ sống (93,33%) cao hơn trong điều kiện không trùm bao (79,26%), khác biệt với mức ý nghĩa 5%. Việc trùm bao nylon, ẩm độ bên trong sẽ cao và hạn chế được sự thoát hơi nước của cây thủy xương bồ vì thế tỉ lệ sống của cây cao trong điều kiện này. Mặt khác, Bảng 9 cũng cho thấy có sự tương tác giữa loại giá thể và điều kiện có hoặc không trùm bao, khác biệt với mức ý nghĩa 5% về mật thống kê. Nghiệm thức xơ dừa không trùm bao nylon có tỉ lệ sống đạt 100%, cao nhất so với các nghiệm thức còn lại và tỉ lệ sống thấp nhất là nghiệm thức phân rơm không trùm bao đạt 40%. Tuy nhiên, các nghiệm thức tro và xơ dừa trong điều kiện trùm bao nylon hoặc không trùm bao nylon đều không khác biệt nhau về mật thống kê.

3.3.2 Số lá mới hình thành

Kết quả Bảng 10 cho thấy số lá mới hình thành

Bảng 10: Ảnh hưởng của các loại giá thể và việc trùm bao hoặc không trùm bao nylon lên sự hình thành số lá sau 8 tuần thuần dưỡng

Có/Không trùm bao	Loại giá thể			Trung bình (Có/khôngtrùm bao)
	Tro	Xơ dừa	Phân rơm	
Có trùm bao	0,64 a	0,35 b	0,82 a	0,61
Không trùm bao	0,73 a	0,67 a	0,0 b	0,47
Trung bình (giá thể)	0,69	0,51	0,41	
F _{loại giá thể}			ns	
F _{có/không trùm bao}			ns	
F _{loại giá thể x có/không trùm bao}			*	
CV (%)			138,51	

Các số có chữ theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê qua phép thử Tukey; ns không khác biệt thống kê; * khác biệt có ý nghĩa 5%

4 KẾT LUẬN VÀ ĐỀ XUẤT

4.1 Kết luận

Qua kết quả thí nghiệm cho thấy:

- Trong giai đoạn nhân chồi, có thể sử dụng môi trường MS bổ sung BA nồng độ từ 2-4 mg/L để nhân chồi sẽ cho tỉ lệ tạo chồi cao (3,13 đến 4,67 chồi sau 4 tuần nuôi cấy), các chồi đều phát triển tốt trong điều kiện *in vitro*.

- Môi trường có hiệu quả đối với sự tạo rễ cây thủy xương bồ *in vitro* là môi trường MS không hoặc bổ sung than hoạt tính 2 g/l sẽ cho tỉ lệ tạo rễ cao 100%, các cây con có thể thuần dưỡng trong điều kiện nhà lưới.

- Trong giai đoạn thuần dưỡng, có thể sử dụng giá thể tro hoặc xơ dừa kết hợp trùm bọc nylon (hoặc không trùm bọc nylon) để thuần dưỡng sẽ cho tỉ lệ sống cao, sinh trưởng và phát triển tốt.

rất ít sau 8 tuần thuần dưỡng. Trong đó, số lá hình thành nhiều nhất là trên giá thể tro (0,69 lá) và thấp nhất trên giá thể phân rơm (0,41 lá), nhưng sự khác biệt này không có ý nghĩa về mật thống kê. Trong điều kiện trùm bao nylon số lá hình thành nhiều hơn trong điều kiện không trùm bao, nhưng khác biệt cũng không có ý nghĩa về mật thống kê. Sự tương tác giữa loại giá thể và điều kiện có hoặc không trùm bao nylon có ảnh hưởng lên sự phát triển của lá thủy xương bồ với mức ý nghĩa là 5% về mật thống kê. Nghiệm thức phân rơm được trùm bao nylon có số lá gia tăng nhiều nhất (0,82 lá) và số lá không gia tăng ở nghiệm thức phân rơm không trùm bao nylon. Sự tương tác giữa loại giá thể và điều kiện có hoặc không trùm bao nylon có ảnh hưởng lên sự phát triển của lá thủy xương bồ với mức ý nghĩa là 5% về mật thống kê.

4.2 Đề xuất

Tiếp tục trồng và theo dõi sự sinh trưởng của cây thủy xương bồ cấy mô trong điều kiện tự nhiên.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures, *Physiol plant* 15, pp.473-497.
2. Nguyễn Bảo Toàn. 2010. Giáo trình nuôi cấy mô và tế bào thực vật. NXB. Đại học Cần Thơ.
3. Phạm Hoàng Hộ. 1999. *Cây cỏ Việt Nam*. NXB Trẻ.
4. Paithankar. 2012. *Acorus calamus* L. – an overview. Vidyabharati college of Pharmacy, Amravati, India.