

BƯỚC ĐẦU KHẢO SÁT ẢNH HƯỞNG CỦA ÁNH SÁNG LED (LIGHT EMITTING DIODE) ĐẾN KHẢ NĂNG TÁI SINH CÂY CÀ PHÊ VỎI (*Coffea canephora*) QUA PHÔI SOMA

Nguyễn Thị Mai¹, Phan Thanh Bình¹, Phan Hồng Khôi², Đỗ Thị Gấm^{2*},
Nguyễn Khắc Hưng³, Phạm Bích Ngọc³, Chu Hoàng Hà³, Hà Thị Thanh Bình⁴

¹Viện nghiên cứu KHKT Nông Lâm Nghiệp Tây Nguyên, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam

²Trung tâm Phát triển Công nghệ cao, Viện Hàn lâm KH & CN Việt Nam,

*honggamitc@gmail.com

³Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm KH & CN Việt Nam

⁴Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển công nghệ Hóa sinh, Liên hiệp các hội KH & KT Việt Nam

TÓM TẮT: Cà phê là cây công nghiệp quan trọng trong nền nông nghiệp của Việt Nam. Tuy nhiên, hiện nay nhiều diện tích canh tác cà phê đang ở trong tình trạng già cỗi do thâm canh cao, khai thác quá mức dẫn đến giảm năng suất cũng như hiệu quả kinh tế. Các diode phát quang (Light Emitting Diode-LED) đang được ứng dụng rộng rãi trong nuôi cấy mô thực vật do có hiệu quả chiếu sáng cao, thuận tiện cho việc thiết kế và lắp đặt, chi phí năng lượng thấp. Nghiên cứu được thực hiện với mục đích khảo sát khả năng ứng dụng đèn LED trong nuôi cấy *in vitro* cây cà phê vối năng suất cao giống TR11. Sau 6 tháng nuôi cấy, các mảnh lá nuôi cấy dưới các điều kiện ánh sáng khác nhau đều phát sinh mô sẹo. Tuy nhiên, các mẫu lá nuôi cấy dưới điều kiện ánh sáng LED 4 (41%R: 21%B: 38%W) cho tỷ lệ tạo mô sẹo có khả năng phát sinh phôi cao nhất (81,48% tổng số mẫu mô sẹo). Các ánh sáng LED nhìn chung cho tỷ lệ nảy mầm của phôi soma cao hơn cũng như thời gian nảy mầm ngắn hơn so với ánh sáng đối chứng. Có 95% số phôi nảy mầm ở ánh sáng LED 2 (58%R: 21%B: 21%W) sau 20 ngày nuôi cấy và chỉ 83,22% số phôi nảy mầm sau 30 ngày sinh trưởng dưới ánh sáng trắng. Mặc dù ánh sáng LED gây bất lợi đến giai đoạn phát triển từ cây mầm thành cây hoàn chỉnh, tuy nhiên, kết quả theo dõi ở điều kiện nhà lưới cho thấy các cây nuôi cấy dưới đèn LED vẫn có khả năng sinh trưởng tốt sau 2 tháng ra cây. Kết quả nghiên cứu cho thấy, ánh sáng LED có khả năng thay thế ánh sáng huỳnh quang với hiệu quả cao hơn trong một số giai đoạn tái sinh cây cà phê vối như tạo mô sẹo từ mảnh lá và phát sinh cây mầm từ phôi soma.

Từ khóa: *Coffea canephora*, ánh sáng led, cà phê vối, *in vitro*, phôi soma.

MỞ ĐẦU

Việt Nam là nước dẫn đầu về sản lượng cà phê vối, *Coffea canephora* trên thế giới. Tính đến 2013 cả nước có khoảng trên 620 ngàn ha với sản lượng khoảng 1,5 triệu tấn/năm [9]. Tuy nhiên, hiện nay diện tích cà phê già cỗi chiếm tỷ lệ khá cao (khoảng 20-30%), phần lớn diện tích cà phê già cỗi này được tái canh để có thể khai thác hiệu quả diện tích đất tự nhiên. Diện tích cà phê cần được tái canh tại Tây Nguyên (vùng canh tác cà phê chủ yếu) ước tính vào khoảng 20-30 ngàn ha/năm. Để đáp ứng nhu cầu tái canh với diện tích lớn, việc cung cấp cùng một lúc số lượng lớn vật liệu đồng nhất với nhau và có đặc tính di truyền giống cây mẹ thông qua công nghệ nuôi cấy mô là rất cần thiết.

Giống cà phê vối TR11 là một trong những

giống cao sản đang được canh tác tại Tây Nguyên. Giống TR11 đã được cấp công nhận làm giống quốc gia vào ngày 4 tháng 5 năm 2011. TR11 được tuyển chọn từ tập đoàn giống cà phê vối tại Đắk Lắk (Viện KHKTNLN Tây Nguyên) từ năm 1996. Đây là giống cà phê sinh trưởng nhanh, cây cao, tán rộng, phân cành ít, năng suất cao, vào khoảng 5-7 tấn/ha với chất lượng hạt cao với tỷ lệ hạt loại 1 hơn 90% [2]. Hiện nay, cây cà phê giống TR11 đang được nhân giống bằng phương pháp nuôi cấy mô *in vitro* nhằm cung cấp lượng lớn cây giống đồng nhất có chất lượng cao.

Các phòng nuôi cấy mô thực vật hiện đang sử dụng bóng đèn huỳnh quang làm nguồn sáng nhân tạo, tuy nhiên, đèn huỳnh quang có một số nhược điểm như: tuổi thọ bóng thấp, điện năng tiêu thụ cao, nhiệt lượng phát sinh trong quá

trình sử dụng lớn. Các diode phát quang (LED) có thể khắc phục được những nhược điểm này, với lợi thế lựa chọn được bước sóng ánh sáng sử dụng, ánh sáng LED đã đang được ứng dụng trong các phòng nuôi cây mô cũng như trong các nhà kính công nghệ cao. Tuy nhiên, ánh sáng là nhân tố quan trọng đối với quá trình sinh trưởng phát triển của thực vật, do đó cần khảo sát kỹ lưỡng ảnh hưởng của ánh sáng LED đến thực vật trước khi ứng dụng trên quy mô lớn.

Nhiều nghiên cứu đã ứng dụng thành công hệ thống chiếu sáng đơn sắc trong kích thích sinh trưởng, phát triển ở cây trồng [1, 10]. Tanaka et al. (1998) [8] đã cho thấy sự sinh trưởng lá, hàm lượng chlorophyll, khối lượng chồi và rễ đều có ảnh hưởng khi cây địa lan *in vitro* sinh trưởng dưới đèn LED. Tương tự, Lian et al. (2002) [6] nghiên cứu ảnh hưởng của LED xanh, LED đỏ, LED xanh kết hợp LED đỏ lên sự tái sinh chồi từ vẩy củ *Liliumoriental hybrid* 'Pesaro'. Ngoài ra, nhiều kết quả khả quan khi ứng dụng hệ thống chiếu sáng đơn sắc trong nuôi cấy mô tế bào thực vật đã được ghi nhận ở một số đối tượng như bạch đàn, hồ điệp, chuối, lan ý, dâu tây... [7].

Hiện nay, trên thế giới cũng như trong nước chưa có nghiên cứu nào đánh giá mức độ ảnh hưởng của các điều kiện ánh sáng khác nhau đặc biệt là ánh sáng LED đến cây cà phê với cũng như giống cao sản TR11. Do đó, chúng tôi tiến hành nghiên cứu này với mục đích đánh giá khả năng ứng dụng của ánh sáng LED trong nhân giống *in vitro* cây cà phê với giống TR11.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Giống cà phê với năng suất cao TR11 *in vitro* do Viện Khoa học Kỹ thuật Nông Lâm Nghiệp Tây Nguyên cung cấp.

Phương pháp bố trí thí nghiệm: Tiến hành đánh giá ảnh hưởng của ánh sáng LED đến các giai đoạn tái sinh *in vitro* cây cà phê. Cây cà phê TR11 được tái sinh theo phương pháp tạo phôi gián tiếp qua mô sẹo trải qua các giai đoạn: (1) hình thành mô sẹo từ lá cây *in vitro*; (2) quá trình nảy mầm và sinh trưởng của cây mầm và (3) huấn luyện cây trưởng thành. Mỗi điều kiện khảo sát với 10 bình tam giác 250 ml chứa 50 ml môi trường. Tiến hành đánh giá ảnh hưởng

của ánh sáng LED đến cây cà phê qua các chỉ tiêu hình thái và sinh lý của mẫu nuôi cấy như: tỷ lệ mẫu phát sinh mô sẹo; thời gian cảm ứng tạo mô sẹo, hình thái mô sẹo; tỷ lệ mô sẹo phát sinh phôi; tỷ lệ mẫu tạo cây hoàn chỉnh.

Điều kiện ánh sáng khảo sát: Hệ thống đèn LED khảo sát bao gồm các đèn LED do ánh sáng LED đỏ (R), LED xanh (B) và LED trắng (W) kết hợp theo tỷ lệ khác nhau: LED 1 (72%R: 14%B: 14%W), LED 2 (58%R: 21%B: 21%W), LED 3 (21%R: 21%B: 58%W), LED 4 (41%R: 21%B: 38% W), LED 5 (80% R: 20% B) và ánh sáng trắng huỳnh quang đối chứng.

Phương pháp xử lý số liệu: Mỗi thí nghiệm được lặp lại ba lần số liệu được xử lý với phần mềm Microsoft excell 2007 và Statgraphic XV theo phương pháp Duncan với $\alpha = 0,05$.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Ảnh hưởng của ánh sáng LED đến khả năng tạo mô sẹo từ lá cây cà phê *in vitro*

Các mẫu lá bánh tẻ được cấy trên môi trường tạo mô sẹo và nuôi cấy dưới những điều kiện chiếu sáng khác nhau bao gồm ánh sáng LED, huỳnh quang và điều kiện tối, thời gian theo dõi trong 6 tháng. Sau 2 tháng nuôi cấy trên các dàn đèn LED, hầu hết các mẫu lá của giống cà phê với TR11 bắt đầu tạo mô sẹo, tuy nhiên, phản ứng tạo callus ở giai đoạn này vẫn chưa rõ ràng, một số mẫu hóa nâu và chết. Trong khi các mẫu lá được nuôi cấy cùng thời điểm và đặt trong tối thì có các phản ứng tạo callus rất mạnh.

Tiếp tục theo dõi phản ứng tạo callus của mẫu lá cà phê, chúng tôi nhận thấy có 5 dạng callus chủ yếu phát sinh như sau: callus màu trắng, mọng nước; calus màu xám, bờ; callus màu đen, cứng; callus màu vàng tươi, dạng hạt hoặc vàng nhạt, bờ. Tuy nhiên, theo Ducos et al. (1993) [3] chỉ những callus màu vàng (tươi hoặc nhạt), dạng hạt hoặc bờ mới có khả năng phát sinh thành phôi soma (Embryogenic callus).

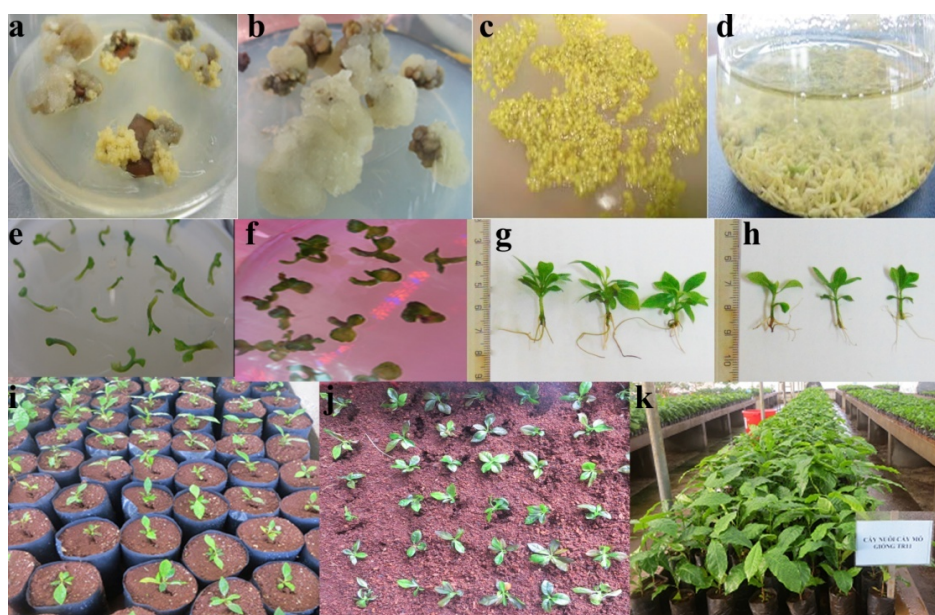
Sau 6 tháng nuôi cấy, các mẫu nuôi cấy trong điều kiện tối, ánh sáng huỳnh quang, và các ánh sáng LED 1, 2, 4 đều có tỷ lệ mẫu phát sinh mô sẹo cao (dao động từ 88,15% đến

94,45%) (bảng 1). Mặt khác, ánh sáng LED 3 và LED 5 có tỷ lệ tạo thành mô sẹo thấp, chỉ có 61,11% số mẫu lá tạo sẹo ở ánh sáng LED 3 và 57,78% ở LED 5 (bảng 1).

Bảng 1. Ảnh hưởng của điều kiện chiếu sáng đến khả năng phát sinh mô sẹo phôi

Điều kiện chiếu sáng	Tỷ lệ mẫu tạo sẹo (%)	Tỷ lệ các kiểu mô sẹo tạo thành			Khối lượng tươi	
		Vàng tươi, dạng hạt (%)	Vàng tươi dạng bờ (%)	Các dạng mô sẹo không phát sinh phôi (%)	Vàng tươi, dạng hạt (g)	Vàng tươi dạng bờ (g)
Tối	91,49	28,15	20,37	42,92	0,06 ^{*a}	0,08 ^{*a}
Huỳnh quang	92,22	10,74	0	81,48	0,03 ^{*b}	-
LED 1	88,15	0	56,30	31,85	-	0,48 ^{bc}
LED 2	94,45	0	67,78	26,67	-	0,56 ^{bc}
LED 3	61,11	0	0	61,11	-	-
LED 4	92,96	0	81,48	11,48	-	0,68 ^b
LED 5	57,78	0	0	57,78	-	-

(*) Kết quả trung bình của 3 lần lặp lại; các chữ cái khác nhau trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt ở mức $\alpha = 5\%$.



Hình 1. Ảnh hưởng của ánh sáng đến các giai đoạn sinh trưởng của cây cà phê

a. Mô sẹo dạng vàng tươi, hạt; b. Mô sẹo dạng trắng, mỏng nước; c. Mô sẹo tăng sinh trong muôi lòng dưới đèn huỳnh quang; d. Phôi dạng thùy lõi phát sinh dưới ánh sáng huỳnh quang; e-f. Phôi hai lá mầm dưới ánh sáng trắng và LED 2; g-h. Cây tạo lá thật dưới ánh sáng huỳnh quang và LED 2; i-j. Cây cà phê sau 2 tháng huấn luyện trong nhà lưới của cây nuôi dưới đèn huỳnh quang và LED 5; k. Cây cà phê TR11 sau 6 tháng rèn luyện ngoài tự nhiên.

Ánh sáng không chỉ ảnh hưởng tới tỷ lệ mẫu phát sinh mô sẹo mà còn tác động tới chất lượng mô sẹo tạo thành. Sau 6 tháng nuôi cấy dưới các điều kiện ánh sáng khác nhau, điều kiện đèn LED 4 có tỷ lệ mẫu mô sẹo có khả năng phát sinh phôi cao nhất (81,48%), bao gồm cả hai

loại mô vàng tươi dạng hạt và vàng nhạt bờ (hình 1a). Trong khi đó, các mẫu lá nuôi cấy dưới ánh sáng LED 3 và LED 5 (hình 1b) không có khả năng tạo thành dạng mô sẹo có khả năng phát sinh phôi (bảng 1). Ngoài ra, các mẫu được nuôi cấy dưới điều kiện ánh sáng huỳnh quang có tỷ lệ mô sẹo phôi thấp nhất (10,74%). Tuy nhiên, qua quá trình theo dõi chúng tôi nhận thấy chỉ có các mẫu lá nuôi cấy dưới điều kiện tối và huỳnh quang mới tạo dạng sẹo vàng tươi dạng hạt (bảng 1). Đây là dạng mô sẹo có tiềm năng phát sinh phôi cao hơn cả.

Bên cạnh sự ảnh hưởng đến tỷ lệ mô sẹo tạo thành, ánh sáng cũng ảnh hưởng lớn tới khối lượng của khối mô sẹo tạo thành. Các khối mô sẹo có khả năng phát sinh phôi được tạo thành dưới các điều kiện ánh sáng LED 1, 2 và 4 đều có khối lượng lớn hơn so với các mẫu mô sẹo tạo thành dưới ánh sáng huỳnh quang và điều kiện tối (bảng 1).

Như vậy ánh sáng LED có ảnh hưởng lớn đến khả năng phát sinh mô sẹo cũng như tỷ lệ mô sẹo có khả năng phát sinh phôi.

Nhân nhanh sinh khối mô sẹo trong điều kiện nuôi cấy lỏng lác

Các mẫu mô sẹo phát sinh phôi này được chuyển sang môi trường nhân nhanh mô sẹo và nuôi cấy dưới điều kiện lỏng lác với mục đích thu lượng lớn mô sẹo phôi cho giai đoạn cảm ứng tạo phôi. Các mẫu thí nghiệm được nuôi cấy dưới điều kiện ánh sáng LED 4 (kiểu đèn cho tỷ lệ mô sẹo phôi lớn nhất).

Kết quả theo dõi cho thấy, với 100 mg mẫu mô sẹo ban đầu, sau 10 tuần nuôi cấy, các mẫu mô được nuôi cấy dưới điều kiện ánh sáng huỳnh quang khả năng tăng sinh khối nhanh hơn so với các mẫu nuôi cấy dưới ánh sáng LED 4. Khối lượng tươi trung bình của các mẫu nuôi cấy dưới ánh sáng huỳnh quang đạt 891,32 mg. Trong khi đó khối lượng tươi ở các mẫu nuôi cấy dưới ánh sáng LED 4 chỉ đạt 552,48 mg.

Không chỉ ảnh hưởng tới khối lượng mô sẹo tạo thành, ánh sáng còn ảnh hưởng đến hình thái mô sẹo tạo thành. Các mô sẹo được nuôi cấy dưới ánh sáng LED có màu vàng nâu và có màu vàng chanh khi nuôi cấy dưới ánh sáng đèn huỳnh quang (hình 1c).

Từ các mẫu mô sẹo thu được ở ánh sáng đèn huỳnh quang và LED4, chúng tôi tiếp tục nuôi cấy trong điều kiện lỏng lác với thời gian 8 tuần để theo dõi quá trình phát sinh phôi soma từ mô sẹo cà phê.

Ảnh hưởng của ánh sáng LED đến quá trình phát sinh phôi soma

Nhiều nghiên cứu chỉ ra phương pháp nuôi cấy lỏng có hiệu quả nhân sinh khối phôi soma cao hơn so với nuôi cấy trên môi trường đặc [3, 4]. Trong quá trình tái sinh phôi gián tiếp qua mô sẹo, giai đoạn cảm ứng tạo thành phôi dạng thủy lôi là giai đoạn quan trọng trong cả quá trình nuôi cấy. Mô sẹo phân hóa trong môi trường lỏng qua các giai đoạn hình cầu, hình tim và cuối cùng ở dạng phôi hình thủy lôi. Sự phân hóa của tế bào thành phôi soma bị chi phối bởi môi trường và tác nhân kích thích nuôi cấy [5].

Sau 8 tuần nuôi cấy, các tế bào tiền phôi bắt đầu được hình thành và sau 12 tuần phôi dạng thủy lôi được hình thành (hình 1d). Với 2 (g) mẫu mô sẹo ban đầu, tổng khối lượng phôi trung bình tạo thành ở đèn huỳnh quang là 21,6 (g) và ở đèn LED 4 là 18,34 (g). Bên cạnh đó, tỷ lệ cũng như khối lượng phôi dạng thủy lôi tạo thành ở đèn huỳnh quang cũng cao vượt trội hơn so với ánh sáng LED 4. Trong khi ở ánh sáng huỳnh quang có đến 80,8% là dạng phôi thủy lôi với khối lượng tươi trung bình đạt 17,45 (g), còn ở ánh sáng LED 4, chỉ có 30,97% tỷ lệ phôi dạng thủy lôi với khối lượng tươi trung bình là 5,68 (g).

Qua các thí nghiệm khảo sát, chúng tôi bước đầu đánh giá được ảnh hưởng của các điều kiện ánh sáng khác nhau đến khả năng phát sinh mô sẹo và cảm ứng tạo phôi ở cây cà phê. Mặc dù, ánh sáng LED 4 có tác động tích cực đến quá trình phát sinh mô sẹo phôi ở cây cà phê nhưng không có hiệu quả cao trong giai đoạn kích phát sinh phôi soma trong điều kiện nuôi cấy lỏng như ánh sáng trắng. Có thể thấy điều kiện ánh sáng phù hợp cho tạo mô sẹo có thể không phù hợp cho giai đoạn phát sinh phôi ở khối mô sẹo.

Tác động của ánh sáng LED đến quá trình nảy mầm của phôi soma

Các phôi dạng thủy lôi có màu trắng, có kích thước 2-3 mm được cấy chuyển sang môi trường đặc và nuôi cấy dưới các điều kiện ánh

sáng khác nhau. Kết quả cho thấy, các mẫu phôi nuôi cấy dưới các điều kiện ánh sáng LED có thời gian phát sinh lá mầm ngắn hơn, cũng như tỷ lệ phôi tạo lá mầm cao hơn so với các mẫu phôi được nuôi cấy dưới ánh sáng huỳnh quang (bảng 2). Thời gian nảy mầm trung bình của các phôi sinh trưởng dưới ánh sáng huỳnh quang là

30 ngày, trong khi các phôi nuôi cấy dưới các điều kiện ánh sáng LED nảy mầm sau 20 ngày nuôi cấy. Sau 20 ngày nuôi cấy, hầu hết các mẫu phôi nuôi cấy dưới ánh sáng LED đều đã nảy mầm và hai lá mầm mở rộng. Trái lại, hai lá mầm của các mẫu sinh trưởng dưới ánh sáng trắng vẫn chưa mở rộng (hình 1e, f)

Bảng 2. Ảnh hưởng của ánh sáng đến khả năng nảy mầm của phôi soma cây cà phê

Các điều kiện chiếu sáng	Tỷ lệ phôi phát sinh lá mầm (%)	Thời gian nảy mầm	Khối lượng tươi (mg)	Diện tích lá mầm (cm ²)
Huỳnh quang	83,22	30	9,07 ^{*a}	0,064 ^{*a}
LED 1	91,89	20	13,76 ^b	0,116 ^c
LED 2	95,00	20	13,82 ^b	0,104 ^{bc}
LED 3	90,00	20	11,50 ^{ab}	0,091 ^b
LED 4	93,33	20	12,36 ^b	0,103 ^{bc}
LED 5	84,78	20	13,71 ^b	0,122 ^c

(*) Kết quả trung bình của 3 lần lặp lại; các chữ cái khác nhau trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt ở mức $\alpha = 5\%$.

Tỷ lệ phôi phát sinh lá mầm ở ánh sáng trắng đối chứng là 83,22%, trong khi đó có đến 95% mẫu nảy mầm ở đèn LED 2; 93,33% ở LED 4; 91,89% ở LED 1 và 90% ở LED 3. Trong các kiểu đèn LED thí nghiệm, các mẫu sinh trưởng dưới đèn LED 5 có tỷ lệ phôi nảy mầm thấp nhất (84,78%).

Bên cạnh sự ảnh hưởng đến thời gian nảy mầm, ánh sáng LED còn có tác động tích cực đến khối lượng của phôi cũng như diện tích lá mầm. Khối lượng tươi trung bình của các mẫu dưới ánh đèn huỳnh quang chỉ đạt 9,07 mg. Trong khi đó, khối lượng trung bình ở các giàn đèn LED đều cao hơn so với ánh sáng huỳnh quang (bảng 2). Do có thời gian nảy mầm sớm hơn nên diện tích lá mầm của phôi sinh trưởng dưới ánh sáng LED cũng lớn hơn so với cây dưới ánh sáng huỳnh quang (bảng 2).

Ảnh hưởng của ánh sáng LED đến quá trình tạo cây cà phê hoàn chỉnh in vitro

Sau thời gian 4 tháng nuôi cấy, tỷ lệ phôi mầm phát triển thành cây có lá thật ở ánh sáng trắng cao hơn so với các ánh sáng LED khảo sát (bảng 3). Tỷ lệ này ở đèn huỳnh quang đạt 63,78% trong khi chỉ đạt 29,11% ở đèn LED. Bên cạnh đó, các mầm sinh trưởng dưới điều kiện ánh sáng trắng có thời gian phát sinh lá thật

(sau 21 ngày) cũng như rễ (sau 14 ngày), ngắn hơn so với các ánh sáng LED thí nghiệm (phát sinh lá thật sau 30 ngày và tạo rễ sau 20 ngày nuôi cấy).

Các ánh sáng cũng ảnh hưởng tới hình thái cây cà phê tạo thành. Chiều cao cây trung bình của cây sinh trưởng dưới ánh sáng trắng là 1,35 cm (bảng 3) tương tự với các chồi sinh trưởng dưới ánh sáng LED 1, LED 2 và LED 5. Mặt khác, sự kết hợp các kiểu ánh sáng ở đèn LED 4 lại gây ức chế đến khả năng tăng chiều cao của cây (bảng 3). Số cặp lá tạo thành/cây cũng có sự khác biệt rõ ràng giữa các kiểu đèn khảo sát. Các ánh sáng LED phần lớn cho chỉ tiêu số lá/cây thấp hơn so với ánh sáng trắng (hình 1g, h), tuy nhiên, số liệu thống kê cho thấy, chỉ có các chồi sinh trưởng dưới hai kiểu đèn LED1 và LED 2 có số lá trung bình/cây tương đương với các chồi ở ánh sáng trắng. Ngoài ra, ánh sáng LED có tác động bất lợi đến quá trình phát sinh rễ ở cây cà phê, số lượng rễ tạo thành ở các chồi sinh trưởng dưới ánh sáng LED đều thấp hơn so với dưới ánh sáng huỳnh quang, bên cạnh đó, chiều dài rễ cũng có sự khác biệt lớn giữa các công thức đèn. Mặc dù số lượng cũng như chiều dài rễ tạo thành có sự sai khác giữa ánh sáng LED và huỳnh quang nhưng đối với cây cà phê khi đưa ra huấn luyện tạo cây hoàn chỉnh trong

nhà kính chỉ cần để một rễ cọc dài khoảng 1-1,5 cm. Do đó, chúng tôi ghi nhận rễ cây cà phê tạo thành ở cả ánh sáng LED và huỳnh quang sau 4

tháng nuôi cấy đều đủ chất lượng để chuyển sang giai đoạn huấn luyện cây trong vườn ươm (giai đoạn 3).

Bảng 3. Ảnh hưởng của ánh sáng đến sinh trưởng của cây cà phê *in vitro* và vườn ươm.

Các điều kiện chiếu sáng	Tỷ lệ phôi mầm tạo cây có lá thật (%)	Cây <i>in vitro</i> sau 4 tháng		Cây trong vườn ươm sau 2 tháng	
		Chiều cao cây (cm)	Số cặp lá/cây	Cao cây (cm)	Số cặp lá
Huỳnh quang	63,78	1,35 ^a	3,22 ^{ab}	2,16 ^a	4,04 ^a
LED 1	37,78	1,40 ^a	3,56 ^a	1,90 ^{ab}	3,15 ^{bc}
LED 2	39,22	1,48 ^a	3,11 ^b	1,78 ^{cb}	3,22 ^{bc}
LED 3	34,33	1,28 ^{ab}	2,67 ^c	1,52 ^c	2,89 ^c
LED 4	29,11	0,83 ^b	2,00 ^d	1,78 ^{ab}	3,56 ^b
LED 5	33,67	1,37 ^a	2,22 ^d	1,89 ^{ab}	4,18 ^a

(*) Kết quả trung bình của 3 lần lặp lại; các chữ cái khác nhau trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt ở mức $\alpha = 5\%$.

Qua các khảo nghiệm, chúng tôi đã đánh giá được ảnh hưởng của các kiểu đèn đến phôi soma cây cà phê trong giai đoạn 2, quá trình nảy mầm và sinh trưởng của cây mầm. Tỷ lệ các cây mầm phát triển thành cây trưởng thành ở các kiểu ánh sáng LED thấp hơn nhiều so với ánh sáng huỳnh quang. Cùng với hiện tượng thời gian phát sinh lá thật dài hơn ở các mầm sinh trưởng dưới ánh sáng LED có thể thấy nhu cầu sử dụng ánh sáng khác nhau của cây cà phê ở các giai đoạn sinh trưởng. Trong quá trình hình thành lá thật, cây không chỉ sử dụng các phổ ánh sáng đơn sắc thí nghiệm mà còn có thể cần đến các phổ sóng khác trong dải bước sóng do ánh sáng huỳnh quang cung cấp.

Các chồi cây 4 tháng tuổi tiếp tục được đánh giá khả năng sinh trưởng trong điều kiện nhà lưới, với mục đích khảo sát ảnh hưởng của các điều kiện ánh sáng đến chất lượng cây nuôi cấy mô ngoài tự nhiên.

Đánh giá khả năng sinh trưởng trong vườn ươm của cây cà phê nuôi cấy *in vitro* dưới các ánh sáng khác nhau

Cây cà phê vối nuôi cấy dưới ánh sáng LED có thời gian thích nghi với điều kiện nhà lưới lâu hơn 1 tháng so với ánh sáng huỳnh quang. Khi chuyển cây từ điều kiện *in vitro* ra vườn ươm, trong khi cây nuôi cấy dưới ánh sáng trắng có thể thích nghi ngay thì cây nuôi cấy dưới đèn LED phải nuôi dưới điều kiện tự nhiên 1 tháng trong trong bình nuôi trước khi chuyển

sang giá thể. Khi không có giai đoạn thích nghi, các cây nuôi cấy dưới đèn LED đều có hiện tượng đen, nâu chồi và chết sau 4 tuần trồng trên giá thể.

Sau giai đoạn tập thích nghi, các chồi cà phê được chuyển ra giá thể. Qua 2 tuần theo dõi, chúng tôi nhận thấy không còn hiện tượng vàng lá và nâu lá ở những cây khảo sát (hình 1j). Sau 8 tuần trồng trong nhà lưới, sinh trưởng của cây nuôi cấy dưới ánh sáng LED và cây nuôi cấy dưới ánh sáng trắng không khác nhau (bảng 3). Kết quả cho thấy có thể một số chỉ tiêu đánh giá sinh trưởng của cây nuôi cấy trong điều kiện *in vitro* dưới đèn LED thấp hơn so với đèn huỳnh quang nhưng khả năng sinh trưởng của cây giống trong điều kiện nhà lưới của những cây nuôi cấy dưới đèn LED vẫn được đảm bảo (hình 1 i, j, k).

KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu đã đánh giá bước đầu về ảnh hưởng của ánh sáng LED đến tái sinh cây cà phê với giống TR11, một cây công nghiệp quan trọng của Việt Nam. Việc sử dụng các ánh sáng LED làm rõ nhu cầu ánh sáng của cây cà phê trong từng giai đoạn không giống nhau. Ánh sáng LED tác động tích cực đến các giai đoạn tạo mô sẹo phôi từ lá với hiệu quả cao (81,48% mẫu lá tạo mô sẹo phôi ở LED 4) và giai đoạn nảy mầm của phôi thủy lồi thành cây mầm với tỷ lệ nảy mầm lên đến 95% sau 20

ngày nuôi cấy ở LED 2. Mặc dù có thời gian huấn luyện dài hơn nhưng các cây nuôi cấy dưới ánh sáng LED sinh trưởng trên giá thể tương đương với ánh sáng trắng. Điều này cho thấy tiềm năng ứng dụng công nghệ chiếu sáng LED trong nuôi cấy mô cây cà phê với ưu điểm giảm thiểu chi phí năng lượng với chất lượng cây tương đương với quy trình nuôi cấy dưới ánh sáng trắng.

Lời cảm ơn: Công trình được thực hiện trong khuôn khổ đề tài cấp nhà nước “Nghiên cứu phát triển công nghệ chiếu sáng LED phục vụ nông nghiệp Tây Nguyên”, mã số TN3/C09 thuộc chương trình Tây Nguyên 3 “Khoa học và công nghệ phục vụ phát triển kinh tế-xã hội vùng Tây Nguyên”-TN3/C09. Các thí nghiệm được tiến hành có sự dụng trang thiết bị của Phòng thí nghiệm trọng điểm Công nghệ gen, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Các loại đèn LED sử dụng trong thí nghiệm đều do Trung tâm Phát triển Công nghệ cao cung cấp.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bula R. J., Morrow R. C., Tibbitts T. W., Ignatius R. W., Martin T. S., Barta D. J., 1991. Light emitting diodes as a radiation source for plants. Hort Sci., 26(8): 203-205
2. Chế Thị Đa, Nguyễn Thị Thanh Mai, 2011. Kết quả sản xuất thử các giống cà phê vối. Sở Khoa học và Công nghệ tỉnh Đắk Lắk: Thông tin Khoa học và Công nghệ, 33(112): 5-8.
3. Ducos J. P., Zamarripa A., Eskes A., Pétiard V., 1993. Production of somatic embryos of coffee in a bioreactor. ASIC (Ed) Proceeding of 15th Colloquium of International Coffee Science Association. ASIC, Vevey, Switzerland: 89-96
4. Ducos J. P., Charles L., Vincent P., 2007. Bioreactors for Coffee Mass Propagation by Somatic Embryogenesis. Intl. J. Plant Dev. Biol., 1(1): 1-12
5. Gaj M. D., 2004. Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana*. Plant Growth Regul., 43(1): 27-47.
6. Lian M. L., Murthy H. H., Paek K. Y., 2002. Effects of light-emitting diodes (LEDs) on the in vitro induction and growth of bulblets of *Lilium orientalybrid* ‘Pesaro’. Sci. Hortic., 94(12): 365-370.
7. Dương Tấn Nhựt, 2011. Công nghệ sinh học thực vật: Nghiên cứu cơ bản và ứng dụng. Nxb. Nông nghiệp. 536 trang.
8. Tanaka M., Takamura T., Watanabe H., Endo M., Yanagi T., Okamoto K., 1998. In vitro growth of *Cymbidium* plantlets cultured under super bright red and blue light-emitting diodes (LEDs). J. Hortic. Sci. Biotechnol., 73(11): 39-44.
9. Tổng cục Thống kê, 2013. Chương 6: Nông, Lâm nghiệp và Thủy sản: Niên giám thống kê 2013. Nxb. Thống kê, Hà Nội, trang: 421.
10. Tripathy B. C., Brown C. S., 1995. Root-shoot interaction in greening of wheat seedlings grown under red light. Plant Physiol., 107(10): 407-411.

EFFECTS OF LIGHT EMITTING DIODES – LED ON REGENERATION ABILITY OF *Coffea canephora* MEDIATED VIA SOMATIC EMBRYOGENESIS

Nguyen Thi Mai¹, Phan Thanh Binh¹, Do Thi Gam², Phan Hong Khoi²,
Nguyen Khac Hung³, Pham Bich Ngoc³, Chu Hoang Ha³, Ha Thi Thanh Binh⁴

¹The Western Highlands Agriculture & Forestry Science Institute, VAAS

²Center for High Technology Development, VAST

³Institute of Biotechnology, VAST

⁴Centre for Research and Technological development of Biochemistry, VUSTA

SUMMARY

Coffea canephora is one of the most important industrial plants in Viet Nam. However, over culturing and exploitation have caused the decline of coffee's yield and commercial benefits. Light Emitting Diodes-LED has been widely applied in micropropagation with various advantages, such as highly efficiency, easily design and low cost. This paper aims to evaluate the applied ability of LEDs light on in vitro regeneration of high yield *Coffea Canephora* TR11. After 6 months, leaves explants cultured under both LEDs light and flourescent light induced callus cluster. Nevertheless, explants cultured under LED 4 (41%R: 21%B: 38%W) condition showed the highest percentage of embryogenesis-like callus, which accounted for approximately 81.48%. LED lights not only enhanced the germination percentage of *C. canephora* somatic embryos, but also shortened the germination times. It was accounted for about 95% of somatic embryos germinated after 20 days cultured under LED 2 (58%R: 21%B: 21%W), in comparision, only 83.22% of embryos developed after 30 days cultured under control light. On the other hand, LED lights seemed to inhibited the mature ability of coffe seedlings. However, the green-house training results showed that LED lights-originated plantlets still adapted and developed as well as those cultured under flourescent condition. This preliminary results revealed the application ability of LED lights on in vitro micropropagation of coffee plants, especially *C. canephora* TR11 specie.

Keywords: *Coffea canephora*, LED lights, light emitting diode, micro propagation, somatic embryogenesis.

Ngày nhận bài: 21-9-2015