

NÂNG CAO TẦN SUẤT TÁI SINH CHỒI CỦA CÂY TỬ LINH LAN (*Saintpaulia ionantha* Wendl.) NUÔI CÂY *IN VITRO* DƯỚI ĐÈN LEDs

Lê Thế Biên¹, Hoàng Thanh Tùng¹, Hoàng Đắc Khải¹, Đỗ Mạnh Cường¹, Vũ Quốc Luận¹, Nguyễn Bá Nam¹, Trịnh Thị Hương², Bùi Văn Thế Vinh^{3,✉}, Dương Tấn Nhựt^{1,✉}

¹Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm Thành phố Hồ Chí Minh

³Trường Đại học Công nghệ Thành phố Hồ Chí Minh – HUTECH

✉Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: duongtannhut@gmail.com; bvt.vinh@hutech.edu.vn

Ngày nhận bài: 23.4.2021

Ngày nhận đăng: 19.8.2021

TÓM TẮT

Tử linh lan (*Saintpaulia ionantha* Wendl.) là một loài hoa nhỏ, có màu sắc rất đa dạng. Chúng được sử dụng để trồng trang trí trong nhà và các văn phòng. Hiện nay, nhân giống *in vitro* đã đạt được một số kết quả nhất định; tuy nhiên, chất lượng chồi cũng như hệ số nhân chồi chưa cao. Trong nghiên cứu này vai trò của ánh sáng LEDs lên sự nhân nhanh chồi cũng như gia tăng chất lượng chồi của cây Tử linh lan nuôi cấy *in vitro* đã được khảo sát. Các lá của cây hoa Tử linh lan được cắt thành các mẫu hình vuông không chứa gân chính (1 cm × 1 cm) và cuống lá có đường kính 3 mm được cắt bằng kỹ thuật lớp mỏng tế bào theo chiều dọc (ITCL) dày 2 mm được sử dụng làm vật liệu nghiên cứu ảnh hưởng của các điều kiện chiếu sáng đơn sắc (LEDs); đối chứng là đèn huỳnh quang trắng (FL) lên khả năng nhân chồi, tăng sinh chồi và tạo cây hoàn chỉnh. Qua kết quả của nghiên cứu nhận thấy rằng chất lượng của ánh sáng ảnh hưởng đến sự tái sinh, sinh trưởng và phát triển của cây hoa Tử linh lan nuôi cấy *in vitro*. Trong hai loại mẫu cây thì điều kiện chiếu sáng có sự kết hợp giữa 7R + 3B là tối ưu cho sự tái sinh chồi từ phiến lá với tỷ lệ tái sinh: 67,25%; số chồi: 9,33 chồi/mẫu. Hệ số nhân nhanh chồi (số chồi: 10,00 chồi/mẫu; khối lượng tươi: 150,07 mg; khối lượng khô: 98,64 mg) và khả năng tạo thành cây Tử linh lan hoàn chỉnh (khối lượng tươi: 2,17 g; khối lượng khô: 0,09 g; số lá: 20,33 lá/cây) cũng đạt cao nhất dưới điều kiện chiếu sáng 7R + 3B.

Từ khóa: Tử linh lan, nhân chồi, lá, đèn LED

ĐẶT VẤN ĐỀ

Tử linh lan là một loài hoa nhỏ có nguồn gốc từ khu rừng mưa ở biên giới Kenya và Tanzania (Châu Phi), thuộc chi *Saintpaulia* với 12 loài và hoa có màu sắc rất đa dạng như trắng, hồng, đỏ, tím, xanh tím và lá dày, đẹp có nhiều lông nhung. Chúng có thể nở hoa liên tục nếu gặp điều kiện thích hợp nên rất được ưa chuộng để trồng trang trí trong nhà và các văn phòng (Ioannou, 1987). Cho tới nay, nhân giống *in vitro* trên đối tượng này đã đạt được một số kết quả nhất định như phát sinh phôi *in vitro* tác động bởi các chất điều hòa sinh trưởng (Ioannou, 1987); nuôi cấy chồi Tử linh lan trên môi trường MS (Murashige, Skoog, 1962) có bổ sung Naphthaleneacetic acid (NAA) và Gibberellic acid (GA₃) (Paiva *et al.*, 1997); và nuôi cấy mô sẹo (Paiva *et al.*, 1997). Dương Tấn Nhựt và đồng tác giả (2007) đã nghiên cứu tái sinh chồi từ cuống lá và phiến lá của cây hoa Tử linh lan trên môi

trường MS có bổ sung 30 g/L sucrose; 0,5 mg/L Benzylaminopurine (BA); 0,1 mg/L NAA; 8 g/L agar dưới điều kiện chiếu sáng đèn huỳnh quang. Tuy nhiên, kết quả ghi nhận được cho thấy số chồi/mẫu dao động từ 5,8 - 8,0 chồi, các chồi có kích thước nhỏ (< 1 cm) và không đồng đều sau 30 ngày nuôi cấy.

Đèn huỳnh quang là nguồn chiếu sáng được sử dụng phổ biến trong nhân giống thực vật. Ánh sáng huỳnh quang là sự phối trộn của nhiều vùng quang phổ từ những vùng ánh sáng có bước sóng ngắn 320 nm đến bước sóng dài 800 nm. Có những vùng bước sóng ngắn không có lợi cho sự sinh trưởng của thực vật. Hiện nay, nguồn chiếu sáng đơn sắc (LEDs) đang được chú trọng trong nông nghiệp nói chung cũng như trong vi nhân giống thực vật nói riêng (Gupta, 2017). Ánh sáng đèn LED đỏ và LED xanh kết hợp với với các tỷ lệ khác nhau được sử dụng làm nguồn sáng để nghiên cứu ảnh hưởng của chúng lên sự sinh trưởng

và phát triển của một số loại cây hoa nhân giống *in vitro* có giá trị kinh tế (Tung *et al.*, 2018). Từ đó, xác định được tỷ lệ ánh sáng phù hợp với sự tái sinh, sinh trưởng và phát triển của từng loại cây hoa để nâng cao chất lượng cây con. Vì vậy, vai trò của ánh sáng LEDs ảnh hưởng lên quá trình tái sinh chồi, gia tăng chất lượng chồi cũng như sự sinh trưởng và phát triển của cây Từ linh lan *in vitro* được nghiên cứu.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Mẫu thực vật

Cuống lá, phiến lá non của cây hoa Từ linh lan 6 tháng tuổi, khỏe mạnh trồng tại vườn ươm Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên được thu nhận để làm mẫu nuôi cấy. Các mẫu lá của cây hoa Từ linh lan được cắt thành các mẫu hình vuông không chứa gân chính (1 cm × 1 cm). Các cuống lá có đường kính 3 mm được cắt bằng kỹ thuật lớp mỏng tế bào theo chiều dọc (ITCL) dày 2 mm (Dương Tấn Nhựt *et al.*, 2007).

Khử trùng mẫu cấy

Nguồn mẫu được rửa sạch dưới vòi nước máy 30 min rồi ngâm trong dung dịch nước rửa chén Sunlight® loãng 10 min và sau đó rửa sạch lại bằng nước máy 4 - 5 lần. Mẫu đã khử trùng sơ bộ được cho vào bình tam giác, đậy nắp kín và đưa vào tủ cấy để lắc với cón 70° trong 30 s rồi rửa lại bằng nước cất vô trùng 3 - 4 lần. Tiếp theo, khử trùng chúng với dung dịch HgCl₂ 0,1% (có bổ sung 2-3 giọt Tween 80) trong thời gian 6 min. Cuối cùng rửa lại mẫu bằng nước cất vô trùng 4 - 5 lần.

Môi trường nuôi cấy

Môi trường tái sinh chồi là MS có bổ sung 0,5 mg/L BA kết hợp với 0,1 mg/L NAA; 30 g/L sucrose và 8 g/L agar (Dương Tấn Nhựt *et al.*, 2007). Môi trường nhân chồi là MS có bổ sung 0,2 mg/L BA kết hợp với 0,1 mg/L NAA; 30 g/L sucrose; 1 g/L AC; 8 g/L agar (Dương Tấn Nhựt *et al.*, 2007). Môi trường ra rễ là MS bổ sung 30 g/L sucrose; 1 g/L AC và 8 g/L agar (Dương Tấn Nhựt *et al.*, 2007). Các môi trường có điều chỉnh pH 5,7 - 5,8 được cho vào các bình thủy tinh có thể tích 100 mL hoặc 250 mL tùy theo thí nghiệm rồi đem hấp khử trùng ở nhiệt độ 121°C, áp suất 1 atm trong thời gian 30 min.

Hệ thống chiếu sáng

Hệ thống LEDs được thiết kế bằng cách kết hợp các đèn LED đỏ và LED xanh loại 3V theo các tỷ lệ: 100% LED đỏ (R), 100% LED xanh (B), 90% LED đỏ + 10% LED xanh (9R + 1B), 80% LED đỏ + 20% LED

xanh (8R + 2B), 70% LED đỏ + 30% LED xanh (7R + 3B), 50% LED đỏ + 50% LED xanh (5R + 5B). Ánh sáng được dùng trong thí nghiệm đối chứng là đèn tube huỳnh quang trắng (FL) có kích thước 1,2 m, công suất 40 W (Công ty bóng đèn Rạng Đông, Việt Nam).

Điều kiện nuôi cấy

Mẫu cấy được đặt trong phòng nuôi *in vitro* dưới các điều kiện chiếu sáng khác nhau với cường độ 45 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ và nuôi cấy ở nhiệt độ $25 \pm 2^\circ\text{C}$, quang kỳ 16 h/ngày, độ ẩm tương đối 50 - 60%.

Tái sinh chồi từ các nguồn mẫu khác nhau

Các mẫu phiến lá và cuống lá của cây hoa Từ linh lan được cấy vào bình 100 mL chứa 40 mL môi trường tái sinh chồi rồi đặt dưới 7 điều kiện chiếu sáng là: R, B, 9R + 1B, 8R + 2B, 7R + 3B, 5R + 5B và FL trong 8 tuần.

Tăng sinh chồi

Các cụm chồi của cây hoa Từ linh lan thu được ở nghiệm thức cho kết quả tốt nhất trong thí nghiệm tái sinh chồi được tách thành các cụm nhỏ có số chồi và chiều cao chồi đều nhau. Sau đó các cụm chồi nhỏ này được chuyển vào bình 250 mL chứa 40 mL môi trường nhân chồi rồi đặt dưới 7 điều kiện chiếu sáng là: R, B, 9R + 1B, 8R + 2B, 7R + 3B, 5R + 5B và FL trong 8 tuần.

Khối lượng tươi của cụm chồi (mg/mẫu) được xác định bằng cách cân khối lượng của cụm chồi. Khối lượng khô của cụm chồi (mg/mẫu) xác định bằng cách đem các mẫu đã xác định khối lượng tươi ở trên sấy ở nhiệt độ 60°C cho đến khi khối lượng không đổi, cân và tính khối lượng trung bình.

Tạo cây hoàn chỉnh

Các chồi của cây hoa Từ linh lan ở nghiệm thức cho kết quả tốt nhất ở thí nghiệm tăng sinh chồi được thu nhận và chuyển vào bình 250 mL chứa 40 mL môi trường ra rễ rồi đặt dưới 7 điều kiện chiếu sáng là: R, B, 9R + 1B, 8R + 2B, 7R + 3B, 5R + 5B và FL trong 4 tuần.

Xử lý số liệu

Các thí nghiệm đều được bố trí theo kiểu thí nghiệm hoàn toàn ngẫu nhiên, mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần, số liệu được xử lý bằng phần mềm SPSS 16.0 (SPSS Inc., Chicago, TL, USA) với phép thử Duncan's test ở mức ý nghĩa $\alpha = 0,05$ (Duncan, 1955) để xác định sự khác biệt về giá trị trung bình.

KẾT QUẢ

Tái sinh chồi từ các nguồn mẫu *ex vitro* khác nhau

Mẫu phiến lá

Kết quả thu được cho thấy sự tái sinh chồi từ mẫu phiến lá của cây hoa Tử linh lan bắt đầu bằng việc mẫu cây đáp ứng với môi trường nuôi cấy dưới các điều kiện chiếu sáng khác nhau. Trong những ngày đầu, mẫu cây cong lên và xuất hiện các u lồi xung

quanh vết cắt. Mức độ đáp ứng tùy thuộc vào từng điều kiện chiếu sáng, mẫu cây đặt dưới ánh sáng R đáp ứng sớm nhất với thời gian là 12 ngày (Bảng 1). Sự cảm ứng mẫu cây giảm khi tăng tỷ lệ B và thời gian cảm ứng mẫu cây chậm nhất trong điều kiện chiếu sáng FL (20,33 ngày). Dưới điều kiện 7R + 3B, mẫu cây cảm ứng sau 17 ngày (Hình 1c1).

Bảng 1. Ảnh hưởng của các điều kiện chiếu sáng khác nhau lên sự tái sinh chồi từ phiến lá cây hoa Tử linh lan sau 8 tuần nuôi cấy.

| Điều kiện chiếu sáng | Thời gian cảm ứng (ngày) | Tỷ lệ mẫu tái sinh chồi (%) | Số chồi/mẫu | Khối lượng tươi của cụm chồi (mg) | Khối lượng khô của cụm chồi (mg) |
|----------------------|--------------------------|-----------------------------|-------------|-----------------------------------|----------------------------------|
| R | 12,00e* | 75,00a | 10,67a | 61,11d | 2,53f |
| B | 18,33b | 40,00c | 4,33e | 55,19e | 5,63c |
| 9R + 1B | 14,33d | 62,50b | 7,33d | 108,41b | 3,40e |
| 8R + 2B | 15,67c | 58,82b | 8,33c | 109,81b | 6,10b |
| 7R + 3B | 17,00bc | 67,25ab | 9,33b | 117,75a | 8,26a |
| 5R + 5B | 19,67ab | 46,67c | 5,00e | 97,79c | 2,06g |
| FL | 20,33a | 43,75c | 3,33f | 50,09f | 4,33d |

*Những ký tự khác nhau (a, b, c...) trong cùng một cột thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê của trung bình mẫu với $\alpha = 0,05$ trong phép thử Duncan.

Tỷ lệ mẫu tái sinh và số chồi thu được khi nuôi cấy mẫu phiến lá cũng có sự khác biệt. Dưới điều kiện LED đỏ, cả 2 chỉ tiêu này là cao nhất (75% và 10,67 chồi/mẫu; tương ứng) (Bảng 1). Tỷ lệ tái sinh và số chồi thì cũng thu được hiệu quả rất thấp khi mẫu cây đặt dưới điều kiện chiếu sáng B (Bảng 1). Tuy nhiên, sự kết hợp giữa 7R + 3B lại cho hiệu quả về mặt chất lượng chồi tái sinh rất tốt thể hiện ở chỉ tiêu khối lượng tươi (117,75 mg/chồi) và khối lượng khô (8,26 mg/chồi). Trong khi đó chất lượng chồi cảm ứng khi nuôi cấy dưới các điều kiện chiếu sáng khác cho chất lượng kém hơn (Bảng 1 và Hình 1a). Nhìn chung, nếu xét về tổng thể thì mẫu phiến lá khi nuôi cấy dưới điều kiện chiếu sáng 7R + 3B cho hiệu quả tái sinh chồi tối ưu nhất về chỉ tiêu chất lượng chồi và tỷ lệ cảm ứng

mẫu cây và số chồi/mẫu không có sự khác biệt quá lớn so với mẫu cây dưới điều kiện B (67,25% và 9,33 chồi/mẫu so với 75% và 10,67 chồi/mẫu; tương ứng) (Bảng 1 và Hình 1c2).

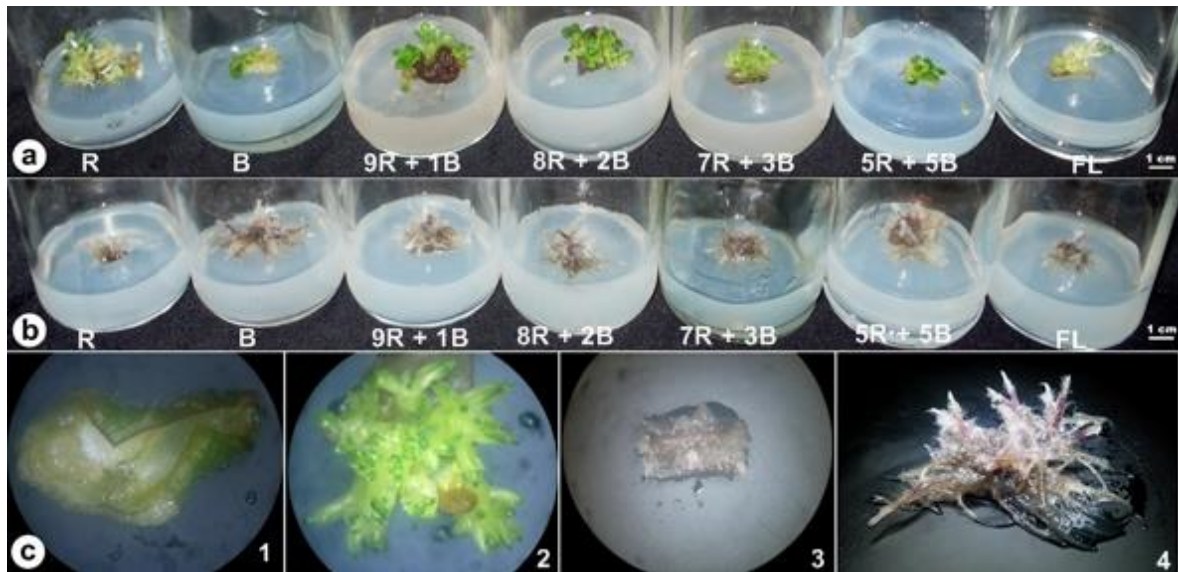
Mẫu cuống lá

Sau 8 tuần nuôi cấy mẫu cuống lá của cây hoa Tử linh lan dưới các điều kiện chiếu sáng khác nhau thì mẫu cây có sự đáp ứng với môi trường tái sinh. Tuy nhiên, sự hình thành chồi đã không diễn ra, thay vào đó là sự xuất hiện của các rễ bất định (Bảng 2 và Hình 1b). Sự cảm ứng rễ nhanh nhất khi nuôi cấy mẫu cuống lá dưới điều kiện chiếu sáng R sau 14 ngày nuôi cấy (Hình 1c3) và tối ưu khi dưới điều kiện ánh sáng B sau 8 tuần nuôi cấy (Hình 1c4).

Bảng 2. Ảnh hưởng của điều kiện chiếu sáng lên sự cảm ứng mẫu cây từ cuống lá cây hoa Tử linh lan sau 8 tuần nuôi cấy.

| Điều kiện chiếu sáng | Thời gian cảm ứng (ngày) | Tỷ lệ mẫu tái sinh rễ (%) |
|----------------------|--------------------------|---------------------------|
| R | 14,00c* | 67,00b |
| B | 18,67a | 60,00b |
| 9R + 1B | 14,67c | 70,00ab |
| 8R + 2B | 15,33c | 75,33ab |
| 7R + 3B | 15,33c | 80,66a |
| 5R + 5B | 17,00ab | 40,67c |
| FL | 18,00a | 30,00c |

*Những ký tự khác nhau (a, b, c...) trong cùng một cột thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê của trung bình mẫu với $\alpha = 0,05$ trong phép thử Duncan.



Hình 1. Ảnh hưởng các điều kiện chiếu sáng khác nhau lên sự cảm ứng mẫu cấy từ phiến lá và cuống lá của cây hoa Tử linh lan sau 8 tuần nuôi cấy. **a:** Sự tái sinh chồi từ phiến lá dưới các điều kiện chiếu sáng khác nhau; **b:** Sự tái sinh rễ từ mẫu cuống lá dưới các điều kiện chiếu sáng khác nhau; **c:** Cảm ứng mẫu cấy dưới điều kiện chiếu sáng 7R + 3B quan sát dưới kính hiển vi soi nổi với độ phóng đại 10x (**c1:** Mẫu phiến lá cảm ứng sau 17 ngày nuôi cấy; **c2:** Mẫu phiến lá cảm ứng chồi sau 8 tuần nuôi cấy; **c3:** Mẫu cuống lá cảm ứng sau 14 ngày nuôi cấy; **c4:** Mẫu cuống lá cảm ứng rễ sau 8 tuần nuôi cấy).

Trong các nghiên cứu về phát sinh hình thái chồi, bên cạnh các nguồn mẫu như mẫu lá (phiến lá, gân lá), mẫu chồi bên thì mẫu cuống lá cũng thường được sử dụng để nghiên cứu quá trình tái sinh chồi. Tuy nhiên, mỗi loại cây trồng đều đáp ứng với sự phát sinh hình thái chồi hay rễ khác nhau. Trong nghiên cứu này, mẫu cuống lá khi nuôi cấy dưới điều kiện chiếu sáng khác nhau chỉ có phát sinh hình thái rễ. Điều này không phù hợp với mục đích tái sinh chồi mà nghiên cứu đặt ra. Như vậy, từ kết quả thu được cho thấy sự tái sinh chồi Tử linh lan tốt nhất là từ mẫu phiến lá được nuôi cấy dưới điều kiện chiếu sáng 7R + 30B (Hình 1c2). Các chồi này được sử dụng làm mẫu cấy cho thí nghiệm tiếp theo.

Tăng sinh chồi

Sau 8 tuần nuôi cấy, kết quả ghi nhận được cho thấy khả năng tái sinh chồi bị tác động bởi các điều kiện chiếu sáng khác nhau (Bảng 3 và Hình 2). Chỉ tiêu theo dõi số chồi/mẫu cây khi nuôi cấy dưới điều kiện chiếu sáng LED kết hợp (9R + 1B; 8R + 2B; 7R + 3B) cho hiệu quả tốt hơn so với ánh sáng đối chứng là đèn FL (Bảng 3). Ngoài ra, điều kiện chiếu sáng cũng có ảnh hưởng rất lớn đến sự kéo dài chồi. Chiều cao chồi đạt cao nhất (2,70 cm/chồi) dưới điều kiện R; tuy nhiên, các chồi dưới điều kiện chiếu sáng R rất mảnh và yếu ớt. Tỷ lệ R giảm dần (9R + 1B; 8R + 2B; 7R + 3B; 5R + 5B) kéo theo sự giảm dần về chiều cao

của chồi (2,03 cm; 1,77 cm; 1,50 cm; 1,27 cm; tương ứng) (Bảng 3).

Trái lại với ánh sáng R, ánh sáng B lại hạn chế sự kéo dài chồi, chiều cao chồi Tử linh lan đạt thấp nhất (0,86 cm/chồi) dưới điều kiện chiếu sáng B. Mặc dù chiều cao chồi không phải là cao nhất nhưng các mẫu nuôi cấy dưới điều kiện chiếu sáng 7R + 3B lại cho các chỉ tiêu quan trọng như số chồi, khối lượng tươi và khối lượng khô của chồi là tốt nhất (10,00 chồi/mẫu; 150,07 mg/chồi; 98,64 mg/chồi; tương ứng) (Bảng 3).

Như vậy, sự tăng sinh chồi là tốt nhất khi chồi được nuôi cấy dưới điều kiện ánh sáng có tỷ lệ kết hợp giữa 7R với 3B, đây cũng là điều kiện ánh sáng thích hợp nhất cho cả sự tái sinh và tăng sinh chồi Tử linh lan nuôi cấy *in vitro*.

Tạo cây hoàn chỉnh

Kết quả thu được sau 4 tuần nuôi cấy cho thấy, mỗi điều kiện chiếu sáng có tác động khác nhau lên sự sinh trưởng và phát triển của chồi của cây hoa Tử linh lan (Bảng 4 và Hình 3). Nhìn chung, các chỉ tiêu theo dõi như số lá, khối lượng tươi và khối lượng khô của cây đều đạt hiệu quả cao khi chồi được nuôi cấy dưới điều kiện chiếu sáng có sự kết hợp giữa R và B. Các chỉ tiêu này đạt hiệu quả cao nhất khi chồi được nuôi cấy dưới điều kiện chiếu sáng có sự kết hợp giữa

7R + 3B. Ngoài ra, cây con ở điều kiện chiếu sáng này lá đồng đều, có màu xanh đậm, cây con khỏe mạnh (Bảng 4 và Hình 3). Các chỉ tiêu số rễ (30,67 rễ/chồi), chiều cao cây (2,53 cm), chiều dài rễ (2,27 cm) của cây đều đạt cao nhất dưới điều kiện chiếu sáng R (Bảng 4). Số rễ, chiều cao cây, chiều dài rễ giảm dần khi tỷ lệ R giảm đi. Điều này chứng tỏ ánh sáng R cũng có vai trò lớn trong sự tạo rễ, kéo dài thân và rễ ở cây Tử linh lan nuôi cấy *in vitro*. Tuy nhiên, ánh sáng B lại ức chế sự tạo rễ, kéo dài thân và rễ. Ở điều kiện chiếu sáng B, các chỉ tiêu số rễ (14,33 rễ/chồi), chiều cao cây (1,17 cm), chiều dài rễ (0,53 cm) của

cây là thấp nhất. Số rễ, chiều cao cây, chiều dài rễ giảm dần khi tỷ lệ hiện diện của ánh sáng B tăng lên trong các điều kiện chiếu sáng (Bảng 4 và Hình 3).

Như vậy, từ kết quả thu được cho thấy rằng sự tạo cây hoàn chỉnh từ chồi Tử linh lan là tốt nhất từ chồi được nuôi cấy dưới điều kiện chiếu sáng 7R + 3B. Cây con được tạo ra dưới các điều kiện chiếu sáng này đều khỏe mạnh, các chỉ tiêu về chất lượng như khối lượng tươi (2,17 g/cây), khối lượng khô (0,09 g/cây) và số lá (20,33 lá/cây) của cây đều đạt cao nhất, lá có màu xanh đậm, đồng đều.

Bảng 3. Ảnh hưởng của các điều kiện chiếu sáng lên sự tăng sinh của chồi cây hoa Tử linh lan sau 8 tuần nuôi cấy

| Điều kiện chiếu sáng | Số chồi/mẫu | Chiều cao chồi (cm) | Khối lượng tươi của cụm chồi (mg) | Khối lượng khô của cụm chồi (mg) |
|----------------------|-------------|---------------------|-----------------------------------|----------------------------------|
| R | 5,00d* | 2,70a | 95,00d | 41,74f |
| B | 3,67d | 0,86g | 113,75c | 60,42c |
| 9R + 1B | 6,67c | 2,03b | 100,11d | 52,85d |
| 8R + 2B | 8,00b | 1,77c | 128,38b | 63,00b |
| 7R + 3B | 10,00a | 1,50d | 150,07a | 98,64a |
| 5R + 5B | 5,00d | 1,27e | 78,67f | 47,07e |
| FL | 2,67e | 1,07f | 89,22e | 52,85d |

*Những ký tự khác nhau (a, b, c...) trong cùng một cột thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê của trung bình mẫu với $\alpha = 0,05$ trong phép thử Duncan.



Hình 2. Ảnh hưởng của các điều kiện chiếu sáng khác nhau lên sự tăng sinh chồi Tử linh lan sau 8 tuần nuôi cấy.

THẢO LUẬN

Kết quả cho thấy, các mẫu cấy được nuôi dưới các điều kiện chiếu sáng khác nhau cho hiệu quả tái sinh chồi khác biệt. Bên cạnh đó, trong cùng một điều kiện ánh sáng thì loài thực vật khác nhau, thậm chí cùng một loài nhưng tùy vị trí thu nhận mẫu mà sự tái sinh chồi hoàn toàn khác biệt. Ở cây hoa Tử linh lan, mẫu phiến lá hình thành chồi; trong khi đó, mẫu cuống lá lại xuất hiện rễ. Điều này cũng phù hợp với nhận định của Liu và đồng tác giả (2010) khi cho rằng quá trình tái sinh từ các mẫu cây thực vật thông qua tính toàn năng của tế bào để hình thành phôi vô tính hay một cây mới hoàn chỉnh trong nuôi cấy *in vitro* phụ thuộc vào nhiều yếu tố như kiểu gen, chất điều hòa sinh trưởng thực vật và loại mẫu cấy. Ảnh hưởng của nguồn mẫu cấy lên khả năng hình thành

chồi cũng đã được nghiên cứu trên cây Cúc (Lim *et al.*, 2012). Các tác giả khác tập trung nghiên cứu các yếu tố ảnh hưởng đến sự tái sinh của mẫu cấy như độ tuổi, điều kiện sinh lý của mẫu cấy và một số yếu tố khác (Palmer, Keller, 2011). Kết quả trong nghiên cứu này cũng phù hợp với nghiên cứu của Nguyễn Bá Nam và đồng tác giả (2012) khi tác giả cho rằng ở cùng một điều kiện chiếu sáng nhưng sự tái sinh chồi ở mẫu lá và mẫu thân cây hoa Cúc là hoàn toàn khác nhau. Kết quả nghiên cứu này cũng cho thấy, các chỉ tiêu như thời gian để mẫu cảm ứng, tỷ lệ tái sinh chồi của mẫu, khối lượng tươi và khối lượng khô của cụm chồi của mẫu cấy dưới điều kiện chiếu sáng kết hợp giữa 8R + 2B và 7R + 3B đều cao hơn so với ánh sáng đối chứng là FL. Các chồi Tử linh lan được tái sinh hiệu quả nhất từ mẫu phiến lá dưới điều kiện chiếu sáng 7R + 3B.

Bảng 4. Ảnh hưởng của các điều kiện chiếu sáng lên sự tạo cây hoàn chỉnh từ chồi cây hoa Tử linh lan nuôi cấy *in vitro* sau 4 tuần nuôi cấy

| Điều kiện chiếu sáng | Số lá/cây | Chiều cao của cây (cm) | Số rễ/cây | Chiều dài của rễ (cm) | Khối lượng tươi của cây (g) | Khối lượng khô của cây (g) |
|----------------------|-----------|------------------------|-----------|-----------------------|-----------------------------|----------------------------|
| R | 11,00d* | 2,53a | 30,67a | 2,27a | 0,45g | 0,01f |
| B | 9,00e | 1,17e | 14,33e | 0,53g | 0,61f | 0,02e |
| 9R + 1B | 10,33de | 2,27b | 28,00b | 2,03b | 0,75e | 0,03d |
| 8R + 2B | 12,67c | 1,80c | 25,00c | 1,87c | 1,74b | 0,06b |
| 7R + 3B | 20,33a | 1,57d | 23,67c | 1,73d | 2,17a | 0,09a |
| 5R + 5B | 16,33b | 1,40d | 20,00d | 1,43e | 1,12c | 0,04c |
| FL | 13,00c | 2,10b | 15,33e | 0,90f | 0,83d | 0,04c |

*Những ký tự khác nhau (a, b, c...) trong cùng một cột thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê của trung bình mẫu với $\alpha = 0,05$ trong phép thử Duncan.

**Hình 3.** Ảnh hưởng của ánh sáng đơn sắc lên sự tạo cây hoàn chỉnh từ chồi Tử linh lan sau 4 tuần nuôi cấy dưới các điều kiện chiếu sáng khác nhau (từ trái qua phải: R, B, 9R + 1B, 8R + 2B, 7R + 3B, 5R + 5B và FL).

Sau 8 tuần nuôi cấy trong môi trường tăng sinh chồi, các chồi Tử linh lan lại đạt chiều cao chồi cao nhất khi được nuôi cấy dưới điều kiện chiếu sáng là R và thấp nhất ở B. Kết quả này phù hợp với các nghiên cứu trên cây *A. distichum* (Lee *et al.*, 2014), Việt quất (Hung *et al.*, 2016), Tuy nhiên, chất lượng chồi khi nuôi cấy dưới điều kiện chiếu sáng R là không đạt. Dưới điều kiện chiếu sáng 7R + 3B các chỉ tiêu quan trọng như số chồi, khối lượng tươi và khối lượng khô của chồi là tốt nhất. So sánh với điều kiện chiếu sáng là đèn huỳnh quang, đèn LEDs có ý nghĩa trong cải thiện quá trình phát sinh chồi của nhiều loại cây trồng. Sự phối hợp B và R có ý nghĩa trong tái sinh chồi Mía (Silva *et al.*, 2016), cây Chà là (Al-Mayahi, 2016)... Kết quả của nghiên cứu cũng cho thấy sự tái sinh chồi và chất lượng của chồi nuôi cấy là tối ưu hơn so với nghiên cứu trước đây của Dương Tấn Nhựt và đồng tác giả (2007). Số chồi tạo ra nhiều hơn (10 chồi/mẫu) và các chồi có chiều cao tốt hơn (1,5 cm) cũng như các chồi mập, khỏe, có bộ lá xanh đậm và có thể sử dụng để chuyển tiếp qua giai đoạn tạo cây hoàn chỉnh mà không cần phải trải qua giai đoạn cấy chuyển mẫu.

Kết quả của thí nghiệm này cũng cho thấy ánh sáng R có tác dụng kéo dài thân khi chiều cao cây Tử linh lan đều đạt cao nhất khi được nuôi cấy dưới R, sự hiện diện của R càng nhiều trong điều kiện chiếu sáng

phối hợp với B thì chiều cao cây càng lớn. Trong khi đó, ánh sáng B lại có vai trò ngược lại so với R. Điều này cũng tương đồng với nghiên cứu trước đây của Lee và đồng tác giả (2014) trên đối tượng cây *A. distichum*. Ánh sáng B làm ức chế tăng trưởng và làm thay đổi hình thái giải phẫu thân và lá cây Tiêu nuôi cấy *in vitro* (Schuerger *et al.*, 1997). Mortensen và Stromme (1987) cũng quan sát thấy sự ức chế tăng trưởng dưới ánh sáng xanh ở nhiều loại cây trồng trong nhà kính. Trong khi đó, Kraepiel và Mipiniac (1997) nhấn mạnh tầm quan trọng của ánh sáng B trong việc đóng mở khí khổng. Sự kích thích hoặc ức chế kéo dài thân giữa các tỷ lệ R/B phụ thuộc vào thụ quan ánh sáng ở mỗi loài thực vật (Kim *et al.*, 2004). Tuy nhiên, một số nghiên cứu khác lại cho rằng chiều cao của cây là cao nhất khi được nuôi cấy dưới ánh sáng B và bị ức chế dưới ánh sáng R (Luan *et al.*, 2015). Sự khác nhau này có thể là do quá trình tương tác phối hợp khác nhau của các thụ quan nhận ánh sáng xanh và các phytochrome trong việc kích thích hay ức chế kéo dài chồi. Kim và đồng tác giả (2004) đã cho rằng sự kéo dài chồi có thể được kích thích hay ức chế bởi sự tương tác phối hợp giữa thụ quan tiếp nhận ánh sáng xanh và đỏ tùy thuộc theo từng loài thực vật. Ngoài vai trò kéo dài thân, ánh sáng R cũng được báo cáo có tác dụng trong việc tạo rễ và kéo dài rễ, trong khi ánh sáng B thì ngược lại. Kết quả thí

thực nghiệm này cũng cho thấy số rễ và chiều dài rễ đạt tốt nhất ở điều kiện chiếu sáng R và thấp nhất ở B. Moon và đồng tác giả (2006) cũng cho rằng sự ra rễ được kích thích bởi ánh sáng R và bị ức chế bởi ánh sáng B. Vai trò của ánh sáng LED lên quá trình cảm ứng rễ và phát triển rễ đã được nghiên cứu trên cây *R. glutinosa* (Manivannan *et al.*, 2015). Nhìn chung, các nghiên cứu đều cho rằng sự sinh trưởng và phát triển của thực vật có thể được thúc đẩy bằng cách gia tăng tốc độ quang hợp dưới vùng quang phổ là đỉnh hấp thụ của các sắc tố quang hợp, vùng quang phổ này thường là giao thoa giữa hai loại ánh sáng B (450 nm) và R (660 nm). Thông qua kết quả của nghiên cứu này cùng với các nghiên cứu về ảnh hưởng của đèn LED trên nhiều đối tượng thực vật được công bố trước đó đã làm rõ vai trò tích cực của đèn LED đối với sự tái sinh, sinh trưởng và phát triển trong điều kiện *in vitro*.

KẾT LUẬN

Chất lượng của ánh sáng ảnh hưởng đến sự tái sinh, sinh trưởng và phát triển của cây hoa Tử linh lan nuôi cấy *in vitro*. Điều kiện chiếu sáng có sự kết hợp giữa 7R + 3B là tối ưu cho sự tái sinh chồi từ phiến lá với tỷ lệ tái sinh chồi và số chồi/mẫu là cao hơn so với các điều kiện chiếu sáng khác. Dưới điều kiện chiếu sáng 7R + 3B thì hệ số nhân nhanh chồi và các chỉ tiêu sinh trưởng và phát triển cũng tối ưu hơn ở giai đoạn nhân chồi. Các cây Tử linh lan *in vitro* cho sự sinh trưởng và phát triển tốt dưới điều kiện chiếu sáng này.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu được sự hỗ trợ kinh phí từ Phòng Sinh học Phân tử và Chọn tạo giống cây trồng thuộc Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên (VAST).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Al-Mayahi AMW (2016) Effect of red and blue light emitting diodes "CRB-LED" on *in vitro* organogenesis of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cv. Alshakr. *World J Microbiol Biotechnol* 32: 160.

Duncan DB (1955) Multiple range and multiple F test. *Biometrics* 11: 1-42.

Dương Tấn Nhựt, Phan Nhã Uyên, Trịnh Thị Lan Anh, Nguyễn Thành Hải, Nguyễn Trịnh Đôn (2007) Ứng dụng hệ thống nuôi cấy ngập chìm tạm thời trong nhân nhanh chồi hoa African violet (*Saintpaulia ionantha* H. Wendl). *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 5(3): 371-381.

Gupta SD (2017) *Light Emitting Diodes for Agriculture - Smart Lighting*. Springer Nature Pte Ltd., p. 334.

Hung CD, Hong CH, Kim SK, Lee KH, Park JY, Dung CD, Nam MW, Choi DH, Lee HI (2016) *In vitro* proliferation

and *ex vitro* rooting of microshoots of commercially important rabbiteye blueberry (*Vaccinium ashei* Reade) using spectral lights. *Sci Hort* 211: 248-254.

Ioannou M (1987) Micropropagation of African violet from petiole and leaf blade tissue. *Tech Bull Agric Res Isnt* 92: 114-117.

Kim S, Hahn EJ, Heo JW, Paek KY (2004) Effect of LEDs on net photosynthetic rate, growth and leaf stomata of chrysanthemum plantlets *in vitro*. *Sci Hort* 101: 143-151.

Kraepiel Y, Mipiniac E (1997) Photomorphogenesis and phytohormones. *Plant Cell Environ* 20: 807-812.

Lee NN, Yong Eui Choi, Choi YE, Moon HK (2014) Effect of LEDs on shoot multiplication and rooting of rare plant *Abeliophyllum distichum* Nakai. *J Plant Biotechnol* 41: 94-99.

Lim KB, Kwon SJ, Lee SI, Hwang YJ, Naing AH (2012) Influence of genotype, explant source, and gelling agent on *in vitro* shoot regeneration of chrysanthemum. *Hortic Envi Biotech* 53(4): 329-335.

Liu C, Callow P, Rowland L, Hancock J, Song G (2010) Adventitious shoot regeneration from leaf explants of southern hightbush blueberry cultivars. *Plant Cell Tiss Org Cult* 103: 137-144.

Luan VQ, Huy NP, Nam NB, Huong TT, Hien VT, Hien NTT, Hai NT, Thinh DK, Nhut DT (2015) *Ex vitro* and *in vitro* *Paphiopedilum delenatii* Guillaumin stem elongation under light-emitting diodes and shoot regeneration via stem node culture. *Acta Physiol Planta* 37: 136.

Manivannan A, Soundararajan P, Halimah N, Ko CH, Jeong BR (2015) Blue LED light enhances growth, phytochemical contents, and antioxidant enzyme activities of *Rehmannia glutinosa* cultured *in vitro*. *Hortic Environ Biotechnol* 56(1): 105-113.

Moon HK, Park SY, Kim YW, Kim CS (2006). Growth of *Tsuru-rindo* (*Tripterospermum japonicum*) cultured *in vitro* under various sources of light-emitting diode (LED) irradiation. *Plant Biol* 49: 174-179.

Mortensen L, Stromme E (1987) Effects of light quality on some greenhouse crops. *Sci Hort* 33: 27-36.

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiol* 15: 473-497.

Nguyễn Bá Nam, Nguyễn Đình Lâm, Dương Tấn Nhựt (2012) Ảnh hưởng của loại mẫu cây và hệ thống chiếu sáng đơn sắc lên khả năng tái sinh chồi cây hoa Cúc (*Chrysanthemum morifolium* Ramat. cv. "Jimba") nuôi cấy *in vitro*. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ* 5 (50): 593-604.

Paiva PD, Jose SCBR, Pasqual M, Paiva R (1997) Effects of naphthalene acetic acid and GA₃ on the violet micropropagation. *Ceres* 44: 392-398.

Palmer CD, Keller WA (2011) Plant regeneration from petal

- explants of *Hypericum perforatum* L. *Plant Cell Tiss Org Cult* 105: 129-134.
- Schuerger AC, Brown CS, Stryjewski EC (1997) Anatomical features of Pepper plants (*Capsicum annum* L.) grown under red light-emitting diode supplemented with blue or far-red light. *Ann Bot* 79: 273-282.
- Silva MMA, de Oliveira ALB, Oliveira-Filho RA, Camara T, Willadino L, Gouveia-Neto A (2016) The effect of spectral light quality on *in vitro* culture of sugarcane. *Acta Sci Biol Sci* 38 (2): 157-161.
- Tung HT, Nam NB, Huy NP, Luan VQ, Hien VT, Phuong TTB, Dung LT, Nhut DT (2018) A system for large scale production of *Chrysanthemum* using microponics with the supplement of silver nanoparticles under light-emitting diodes. *Sci Hortic* 232: 153-161.

HIGH-FREQUENCY *IN VITRO* SHOOT REGENERATION OF *Saintpaulia ionantha* Wendl. BY LIGHT-EMITTING DIODES

Le The Bien¹, Hoang Thanh Tung¹, Hoang Dac Khai¹, Do Manh Cuong¹, Nguyen Ba Nam¹, Vu Quoc Luan¹, Trinh Thi Huong², Bui Van The Vinh³, Duong Tan Nhut¹

¹Tay Nguyen Institute for Scientific Research, Vietnam Academy of Science and Technology

²University of Food Industry, Ho Chi Minh City

³HUTECH University

SUMMARY

Saintpaulia ionantha Wendl. is a small flower, with a variety of colors, which are commonly grown indoors for decorative purposes. Currently, micropropagation of *S. ionantha* has been achieved certain results; however, the shoot quality as well as number of shoots regeneration was not high. In this study, the effect of LEDs system on the shoot multiplication and shoot quality of *S. ionantha* was conducted. The leaves were cut into square patterns without the main veins (1 cm × 1 cm), and the petiole (3 mm in diameter) was cut with a thick layer (2 mm) of longitudinal cell (ITCL), which were used as the initial materials. The explants were placed under LEDs conditions; and white fluorescent tube lamp (FL) was used as the control for shoot regeneration and rooting. The results found that the quality of light affects the regeneration, growth and development of *S. ionantha* shoots. The LED condition with a combination of 7R + 3B are optimal for high-frequency of shoot regeneration with the regeneration rate: 67.25%, and number of shoots: 9.33 shoots/explant from the leaves without the main veins. The higher shoot multiplication (number of shoots: 10.00 shoots/explant, fresh weight: 150.07 mg, dry weight: 98.64 mg) and rooting rate of plantlet (fresh weight: 2.17 g; dry weight: 0.09 g; leaf number: 20.33 leaves/plantlet) were also obtained under 7R + 3B condition.

Keywords: LEDs, leaves, *Saintpaulia ionantha*, shoot regeneration