

ẢNH HƯỞNG CỦA ÁNH SÁNG ĐƠN SẮC VÀ LOẠI MẪU CÂY LÊN QUÁ TRÌNH CẤM ỨNG VÀ TÁI SINH CHỒI TỪ NUÔI CÂY LỚP MÔNG TẾ BÀO CÂY HOA THU HẢI ĐƯỜNG (*BEGONIA* SPP.)

Lê Thế Biên, Nguyễn Bá Nam, Ngô Thanh Tài, Hoàng Văn Cường, Dương Tấn Nhựt*

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

TÓM TẮT

Trong nghiên cứu này, các điều kiện chiếu sáng và loại mẫu khác nhau đã được sử dụng để tìm hiểu tác động của chúng đến quá trình cảm ứng và tái sinh chồi từ nuôi cấy lớp mỏng tế bào cây hoa Thu hải đường (*Begonia* spp.). Cây hoa Thu hải đường 6 tháng tuổi được lựa chọn để tách nhận phát hoa, cuống lá, thân có đường kính lần lượt là 3 mm, 3 mm, 10 mm. Các bộ phận này được khử trùng trước khi cắt thành lớp mỏng tế bào theo chiều ngang (ITCL) để thu được các mẫu dày 2 mm rồi đem cấy vào môi trường cảm ứng và tái sinh chồi (MS có bổ sung 30 g/l đường sucrose; 0,2 mg/l NAA; 0,1 mg/l TDZ và 8 g/l agar). Sau đó các mẫu được nuôi cấy trong 8 tuần dưới 6 điều kiện chiếu sáng khác nhau (100% LED đỏ, 100% LED xanh, 90% LED đỏ + 10% LED xanh, 80% LED đỏ + 20% LED xanh, 70% LED đỏ + 30% LED xanh, 50% LED đỏ + 50% LED xanh và ánh sáng huỳnh quang). Kết quả cho thấy thời gian để mẫu cảm ứng (14 ngày), tỉ lệ mẫu cảm ứng (81,82%), số chồi (39 chồi/mẫu), trọng lượng tươi của chồi (58,35 mg) và trọng lượng khô của chồi (4,47 mg) là cao nhất khi nuôi cấy lớp mỏng tế bào phát hoa của cây Thu hải đường dưới tỉ lệ 80% LED đỏ + 20% LED xanh.

Từ khóa: *Begonia* spp., LED đỏ, LED xanh, quá trình cảm ứng, sự tái sinh chồi

MỞ ĐẦU

Lịch sử phát triển của công nghệ nuôi cấy mô tế bào thực vật gắn liền với sự cải tiến không ngừng của các điều kiện nuôi cấy. Ngày nay vai trò các yếu tố như khoảng dài lượng, vi lượng, nguồn cacbohydrat, chất điều hòa sinh trưởng, giá thể... tác động đến quá trình nuôi cấy đã được nghiên cứu khá đầy đủ thì yếu tố ánh sáng chưa được đề cập nhiều (Thorpe *et al.*, 1994). Đèn huỳnh quang là nguồn sáng được sử dụng phổ biến trong vi nhân giống, tuy nhiên đèn huỳnh quang lại tỏa nhiệt mạnh và có vùng quang phổ phát ra rộng, không phải là nguồn hấp thụ thích hợp của một số loài thực vật (Kim *et al.*, 2004). Vì thế, sự ra đời của đèn LED (Light-emitting diodes) với những ưu điểm như kích thước nhỏ, cấu trúc rắn, tuổi thọ cao, tỏa nhiệt ít và có bước sóng xác định được xem là thiết bị chiếu sáng đầy triển vọng cho các phòng nuôi cấy mô (Buta *et al.*, 1991). Gần đây, các nghiên cứu về vai trò của ánh sáng đối với sự tăng trưởng sinh học ở thực vật đang tập trung vào đèn LED. Có thể kể đến như: ảnh hưởng của LED lên quá trình quang hợp (Jannasch *et al.*, 1994) và sự phát sinh hình thái (Hoenecke *et al.*, 1992). Tanaka và đồng tác giả (1998) đã công bố rằng các chỉ tiêu sinh trưởng và phát triển, hàm lượng chlorophyll ở cây *Elaenia* in vitro đều chịu tác động bởi LED.

Thu hải đường (*Begonia* spp.) là một loài hoa rất được ưa chuộng bởi sự đa dạng về chủng loại và phong phú về màu sắc hoa. Hơn nữa, chúng rất thích hợp với điều kiện trồng trong nhà nên được lựa chọn để trang trí cho các cao ốc, văn phòng ở các đô thị lớn. Việc sử dụng lớp mỏng tế bào cây hoa Thu hải đường để tái sinh chồi đã được nghiên cứu. Tuy nhiên, các nghiên cứu này chỉ mới tập trung tìm hiểu về ảnh hưởng của các chất điều hòa sinh trưởng, loại mẫu và kích thước của mẫu cây dưới điều kiện chiếu sáng huỳnh quang (Nhựt *et al.*, 2005). Trong nghiên cứu này, bằng việc kết hợp LED xanh và LED đỏ theo những tỉ lệ thích hợp, chúng tôi tìm hiểu ảnh hưởng của ánh sáng đơn sắc lên quá trình cảm ứng và tái sinh chồi từ nuôi cấy lớp mỏng tế bào (ITCL) phát hoa, cuống lá và thân của cây Thu hải đường. Từ đó, tìm ra điều kiện chiếu sáng phù hợp nhất cho quá trình cảm ứng và tái sinh chồi Thu hải đường từ các loại mẫu cây khác nhau để phục vụ cho công tác nhân giống.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguồn mẫu

Phát hoa, cuống lá, thân của cây hoa Thu hải đường 6 tháng tuổi có đường kính lần lượt là 3 mm, 1mm và 10 mm được khử trùng bằng cách rửa sạch dưới vòi nước máy 30 phút rồi ngâm trong dung dịch nước rửa chén Sunlight® loãng khoảng 10 phút và sau đó rửa sạch lại bằng nước máy 4-5 lần. Các mẫu đã khử trùng sơ bộ được cho vào bình tam giác, đầy nắp kín và đưa vào tủ cấy. Sau đó, mẫu được ngâm trong cồn 70° khoảng 30 giây rồi rửa lại bằng nước cất 3-4 lần. Tiếp theo, tác khử trùng mẫu với dung dịch HgCl₂ 0,1% (bổ sung thêm vài giọt Tween 80) trong thời gian 6 phút. Cuối cùng rửa lại mẫu với nước cất 4-5 lần.

Sau khi khử trùng hẳn hành cắt mẫu theo chiều ngang lớp mỏng tế bào (ITCL) để thu được mẫu phát hoa, mẫu cuống lá, và mẫu thân có độ dày 2 mm.

Môi trường và điều kiện nuôi cấy

Môi trường cảm ứng và tái sinh chồi Thu hải đường là MS (Murashige và Skoog, 1962) có bổ sung 30 g/l đường sucrose; 0,2 mg/l NAA; 0,1 mg/l TDZ và 8 g/l agar (Nhựt *et al.*, 2005). Môi trường được điều chỉnh về pH 5,8 rồi hấp khử trùng ở 121 °C, 1 atm trong 30 phút.

Các mẫu được nuôi cấy trong bình thủy tinh loại 100 ml với 20 ml môi trường trong mỗi bình. Mỗi nghiệm thức gồm 20 bình, mỗi bình cấy 1 mẫu.

Nguồn sáng được sử dụng trong thí nghiệm là ánh sáng đơn sắc và đối chứng là đèn huỳnh quang (FL) với thời gian chiếu sáng 16h/ngày, cường độ chiếu sáng 40-45 $\mu\text{mol/m}^2/\text{s}$, nhiệt độ 25±2°C, độ ẩm tương đối 50-60%.

Thiết bị chiếu sáng đơn sắc được thiết kế bằng cách kết hợp đèn LED đỏ ($\lambda=650$ nm) và đèn LED xanh ($\lambda=450$ nm) với tỉ lệ lần lượt là: 100% LED đỏ, 100% LED xanh, 90% LED đỏ + 10% LED xanh, 80% LED đỏ + 20% LED xanh, 70% LED đỏ + 30% LED xanh, 50% LED đỏ + 50% LED xanh (Tanaka *et al.*, 1998).

Bố trí thí nghiệm

Các mẫu lớp mỏng tế bào từ phát hoa, cuống lá và thân của cây Thu hải đường được cấy vào môi trường cảm ứng và tái sinh chồi. Sau đó các mẫu được nuôi cấy dưới 6 điều kiện chiếu sáng khác nhau trong 8 tuần (Hình 1e). Mục tiêu của các thí nghiệm là xác định được loại ánh sáng thích hợp cho quá trình cảm ứng và tái sinh chồi từ lớp mỏng tế bào phát hoa, cuống lá và thân cây Thu hải đường.

Chỉ tiêu theo dõi

Thời gian mẫu cảm ứng, tỉ lệ cảm ứng của mẫu, số chồi/mẫu, trọng lượng tươi của chồi, trọng lượng khô của chồi được ghi nhận sau 8 tuần nuôi cấy.

Xử lý số liệu

Mỗi thí nghiệm được lập lại 3 lần, mỗi nghiệm thức gồm 20 bình, mỗi bình cấy 1 mẫu. Số liệu được xử lý bằng phần mềm SPSS 16.0 với phép thử Duncan ở mức ý nghĩa $\alpha = 0,05$.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết quả

Ảnh hưởng của các điều kiện chiếu sáng lên quá trình cảm ứng và tái sinh chồi từ nuôi cấy lớp mỏng tế bào phát hoa của cây Thu hải đường

Số liệu thu được sau 8 tuần nuôi cấy thể hiện ảnh hưởng của các điều kiện chiếu sáng lên quá trình cảm ứng và tái sinh chồi từ nuôi cấy lớp mỏng tế bào phát hoa của cây Thu hải đường được trình bày ở Bảng 1.

Bảng 1. Ảnh hưởng của các điều kiện chiếu sáng lên quá trình cảm ứng và tái sinh chồi từ lớp mỏng tế bào phát hoa của cây Thu hải đường

Điều kiện chiếu sáng	Thời gian để mẫu cảm ứng (ngày)	Tỉ lệ mẫu cảm ứng (%)	Số chồi/mẫu	Trọng lượng tươi của chồi (mg)	Trọng lượng khô của chồi (mg)
100% LED đỏ	21	29,41	19,33g*	26,67g	1,52g
100% LED xanh	20	33,33	29,67d	35,05e	1,74f
90% LED đỏ + 10% LED xanh	17	58,33	31,67c	51,40c	3,10e
80% LED đỏ + 20% LED xanh	14	81,82	39,00a	58,35a	4,47a
70% LED đỏ + 30% LED xanh	16	66,67	34,00b	52,74b	3,42b
50% LED đỏ + 50% LED xanh	18	46,15	23,33f	40,50d	1,98e
FL	19	40,00	25,33e	31,65f	2,39d

*Các chữ cái khác nhau (a, b, c, ...) trong các cột biểu diễn sự sai khác có ý nghĩa với $\alpha = 0,05$ trong Duncan's test.

Kết quả thu được cho thấy, ánh sáng có tác động lên quá trình cảm ứng và tái sinh chồi của mẫu lớp mỏng tế bào phát hoa của cây Thu hải đường. Sau 8 tuần nuôi cấy dưới điều kiện 100% ánh sáng LED đỏ, thời gian để mẫu bắt đầu cảm ứng (21 ngày) là dài nhất và tỉ lệ mẫu cảm ứng (29,41%), số chồi (19,33 chồi), trọng lượng tươi của chồi (26,07 mg), trọng lượng khô của chồi (1,52 mg) là thấp nhất. Điều này, cho thấy ánh sáng LED đỏ không hiệu quả cho quá trình cảm ứng và tái sinh chồi của mẫu lớp mỏng tế bào phát hoa của cây Thu hải đường. Kết quả cũng cho thấy, dưới điều kiện 80% ánh sáng LED đỏ kết hợp với 20% ánh sáng LED xanh thì tất cả các chỉ tiêu so sánh đều tốt hơn các điều kiện chiếu sáng còn lại (Bảng 1, Hình 1c-d). Khi các mẫu được nuôi cấy dưới các điều kiện 90% ánh sáng LED đỏ kết hợp với 10% ánh sáng LED xanh, 70% ánh sáng LED đỏ kết hợp với 30% ánh sáng LED xanh thì các chỉ tiêu so sánh đều cao hơn khi nuôi cấy dưới ánh sáng huỳnh quang (Bảng 1). Kết quả nghiên cứu này cho thấy 80% ánh sáng LED đỏ kết hợp với 20% ánh sáng LED xanh là nguồn sáng thích hợp nhất cho quá trình cảm ứng và tái sinh chồi của mẫu lớp mỏng tế bào phát hoa của cây Thu hải đường.

Ảnh hưởng của các điều kiện chiếu sáng lên quá trình cảm ứng và tái sinh chồi từ nuôi cấy lớp mỏng tế bào cuống lá cây Thu hải đường

Kết quả của thí nghiệm cho thấy, ánh sáng 100% LED đỏ và 100% LED xanh ức chế hoàn toàn quá trình cảm ứng và tái sinh chồi từ nuôi cấy lớp mỏng tế bào cuống lá Thu hải đường. Khi kết hợp ánh sáng LED đỏ và LED xanh thì hiệu quả quá trình cảm ứng và tái sinh chồi tùy thuộc vào tỉ lệ của mỗi loại ánh sáng LED. Các mẫu được nuôi cấy dưới điều kiện chiếu sáng có sự kết hợp giữa 80% ánh sáng LED đỏ với 20% ánh sáng LED xanh và 70% ánh sáng LED đỏ với 30% ánh sáng LED xanh lại cho hiệu quả cao trong quá trình cảm ứng và tái sinh chồi. Tuy nhiên, dưới điều kiện ánh sáng có 90% ánh sáng LED đỏ kết hợp với 10% ánh sáng LED xanh và 50% ánh sáng LED đỏ kết hợp với 50% ánh sáng LED xanh thì quá trình cảm ứng và tái sinh chồi không xảy ra (Bảng 2, Hình 1a). Ở thí nghiệm này, các mẫu lớp mỏng tế bào từ cuống lá của cây Thu hải đường cũng có quá trình cảm ứng và tái sinh chồi hiệu quả nhất khi được nuôi cấy dưới điều kiện 80% ánh sáng LED đỏ với 20% ánh sáng LED xanh với các chỉ tiêu so sánh đều cao hơn các nghiệm thức còn lại (Bảng 2)

Ảnh hưởng của các điều kiện chiếu sáng lên quá trình cảm ứng và tái sinh chồi từ nuôi cấy lớp mỏng tế bào thân cây Thu hải đường

Trong thí nghiệm này, ánh sáng LED đã thể hiện vai trò trong quá trình cảm ứng của mẫu và kích thích tạo chồi, dưới điều kiện 100% ánh sáng LED đã thời gian để mẫu cảm ứng là ngắn nhất với 16 ngày, tỉ lệ mẫu cảm ứng và số chồi/mẫu cũng cao nhất với 64,71% và 46,67 chồi (Bảng 3). Khi giảm tỉ lệ ánh sáng LED đỏ và tăng tỉ lệ ánh sáng LED xanh thì các chỉ tiêu so sánh kể trên cũng giảm theo. Điều đó chứng tỏ ánh sáng LED xanh ức chế quá trình cảm ứng và tái sinh chồi từ lớp mỏng tế bào thân của cây Thu hải đường. Ở điều kiện chiếu sáng có 80% ánh sáng LED đỏ kết hợp với 20% ánh sáng LED xanh cho chồi tái sinh có chất lượng tốt nhất với trọng lượng khô cao nhất là 4,90 mg (Bảng 3, Hình 1b).

Bảng 2. Ảnh hưởng của các điều kiện chiếu sáng lên quá trình cảm ứng và tái sinh chồi từ lớp mỏng tế bào nuôi cấy hoa cây Thu hải đường.

Điều kiện chiếu sáng	Thời gian để mẫu cảm ứng (ngày)	Tỉ lệ mẫu cảm ứng (%)	Số chồi/mẫu	Trọng lượng tươi của chồi (mg)	Trọng lượng khô của chồi (mg)
100% LED đỏ	Không cảm ứng	0	0c*	0d	0d
100% LED xanh	Không cảm ứng	0	0c	0d	0d
90% LED đỏ + 10% LED xanh	Không cảm ứng	0	0c	0d	0d
80% LED đỏ + 20% LED xanh	17	45,45	22,33a	50,71a	3,42a
70% LED đỏ + 30% LED xanh	19	41,18	19,00b	47,19b	2,47b
50% LED đỏ + 50% LED xanh	Không cảm ứng	0	0c	0d	0d
FL	21	37,50	15,67c	30,02c	1,99c

*Các chữ cái khác nhau (a, b, c, ...) trong các cột biểu diễn sự sai khác có ý nghĩa với $\alpha = 0,05$ trong Duncan's test.

Bảng 3. Ảnh hưởng của các điều kiện chiếu sáng lên quá trình cảm ứng và tái sinh chồi từ lớp mỏng tế bào thân cây Thu hải đường

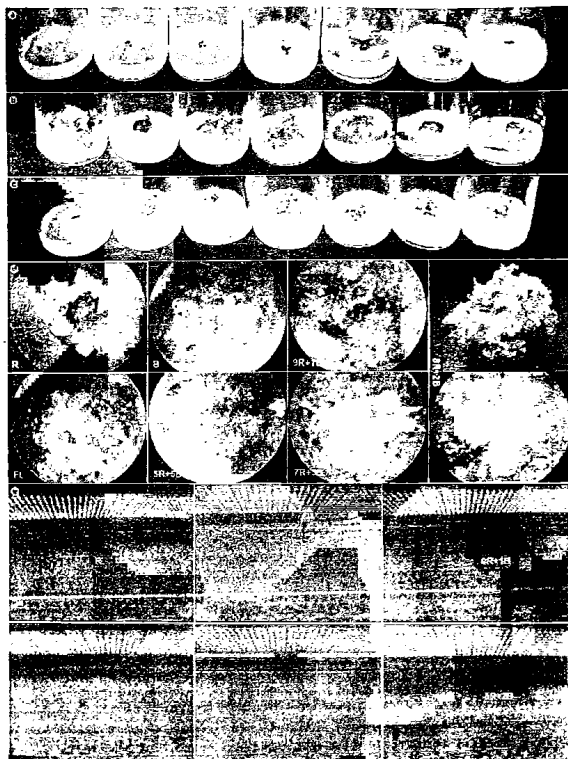
Điều kiện chiếu sáng	Thời gian để mẫu cảm ứng (ngày)	Tỉ lệ mẫu cảm ứng (%)	Số chồi/mẫu	Trọng lượng tươi của chồi (mg)	Trọng lượng khô của chồi (mg)
100% LED đỏ	16	64,71	46,67a*	64,05a	3,43b
100% LED xanh	21	22,22	9,67e	17,60e	1,49e
90% LED đỏ + 10% LED xanh	17	55,56	35,67b	52,63c	2,56c
80% LED đỏ + 20% LED xanh	18	52,63	21,33c	57,26b	4,90a
70% LED đỏ + 30% LED xanh	19	41,18	12,33d	19,75d	1,75d
50% LED đỏ + 50% LED xanh	20	31,25	10,67de	18,09e	1,12g
FL	21	29,42	8,33e	15,47f	1,21f

*Các chữ cái khác nhau (a, b, c, ...) trong các cột biểu diễn sự sai khác có ý nghĩa với $\alpha = 0,05$ trong Duncan's test.

Qua kết quả thu được ở Bảng 1, Bảng 2 và Bảng 3 cho thấy các loại mẫu cấy có khả năng đáp ứng với ánh sáng là khác nhau làm cho quá trình cảm ứng và tái sinh chồi có những khác biệt đáng kể.

Thảo luận

Các nghiên cứu về vai trò của ánh sáng trong vi nhân giống trước đây đều khẳng định chất lượng, thời gian và cường độ chiếu sáng là những nhân tố quan trọng hàng đầu. Những nhân tố này tác động tới quá trình quang hợp, tăng trưởng và phát sinh hình thái thực vật. Vấn đề ở đây là phải cung cấp và kiểm soát lượng và chất của ánh sáng một cách hiệu quả (Langhans, Dreesen, 1988). Trong nghiên cứu này, thời gian (16h/ngày) và cường độ chiếu sáng ($40-45 \mu\text{mol/m}^2/\text{s}$) là cố định, cho nên sự khác biệt ở các điều kiện chiếu sáng thể hiện ở chất lượng ánh sáng. Sự kết hợp giữa ánh sáng LED đỏ và ánh sáng LED xanh thích hợp sẽ tạo ra dải quang phổ có chất lượng tốt nhất cho quá trình phát sinh hình thái của các mẫu nuôi cấy. Điều này lý giải vì sao ở điều kiện 80% LED đỏ và 20% LED xanh quá trình cảm ứng và tái sinh chồi cho kết quả cao nhất. Chất lượng ánh sáng có ảnh hưởng tới sự kéo dài thân ở cây Cúc (Zhizu et al., 2007), sự hình thành chồi nách ở cây Nho (Chee, 1986). Đèn LED có bước sóng phát ra rất đặc biệt, chiếu rộng của vạch quang phổ ngắn nên đã được sử dụng rất nhiều trong lĩnh vực nghiên cứu về quang sinh học như là sự quang hợp (Tennsensen et al., 1994) và phát sinh hình thái (Hoenecke, 1992),... Bula và đồng tác giả (1991) đã báo cáo rằng ánh sáng đèn LED là một nguồn năng lượng đầy hứa hẹn cho phòng nuôi cấy mô và nâng cao khả năng tăng trưởng sinh học nhờ vào kích thước nhỏ, có cấu trúc rắn, an toàn và tuổi thọ cao. Khi nuôi cấy cây *Cymbidium*, sự kết hợp giữa ánh sáng LED đỏ và ánh sáng LED xanh đã làm gia tăng quá trình quang hợp, nhờ đó sự sinh trưởng và phát triển của cây được cải thiện đáng kể (Tanaka et al., 1998). Như và đồng tác giả (2003) cũng đã chứng minh được cây Đậu tây in vitro sinh trưởng và phát triển tốt nhất khi được nuôi cấy dưới ánh sáng LED với tỉ lệ kết hợp là 70% ánh sáng LED đỏ và 30% ánh sáng LED xanh. Nam và đồng tác giả (2012) báo cáo rằng dưới điều kiện 70% ánh sáng LED đỏ kết hợp với 30% ánh sáng LED xanh đã cho hiệu quả tái sinh chồi Cúc là cao nhất.



Hình 1. Ảnh hưởng của ánh sáng đơn sắc và loại mẫu cây lên quá trình nảy mầm và tái sinh chồi từ nuôi cấy mô của Thu hải dương sau 8 tuần nuôi cấy. a,b,c: Quá trình nảy mầm và tái sinh chồi từ nuôi cấy mô của Thu hải dương dưới các điều kiện chiếu sáng khác nhau (từ trái qua phải: 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) và huỳnh quang (FL)); d: Chồi tái sinh từ nuôi cấy mô của Thu hải dương được quan sát dưới kính hiển vi soi nổi; e: Hệ thống ánh sáng đơn sắc

Kết quả của nghiên cứu này cũng cho thấy, các chỉ tiêu so sánh như thời gian mẫu nảy mầm, tỉ lệ mẫu nảy mầm, số chồi, trọng lượng tươi, trọng lượng khô của chồi đều có sự khác biệt có ý nghĩa dưới điều kiện chiếu sáng có sự kết hợp giữa LED đỏ với LED xanh so với các điều kiện chiếu sáng còn lại. Ở điều kiện 80% ánh sáng LED đỏ kết hợp với 20% ánh sáng LED xanh đã làm gia tăng số lượng cũng như chất lượng của chồi. Bên cạnh ảnh hưởng của các điều kiện chiếu sáng đến quá trình nảy mầm và tái sinh chồi thì từng loại mẫu khác nhau cũng cho những kết quả khác biệt. Ánh sáng