

ẢNH HƯỞNG CỦA NGUỒN CARBON, ĐIỀU KIỆN CHIẾU SÁNG LÊN SỰ PHÁT SINH PHÔI THỨ CẤP CỦA CÂY BÁ BỆNH (*Eurycoma longifolia*)

Trần Trọng Tuấn^{1*}, Nguyễn Thị Duyệt¹, Nguyễn Thị Huyền Trang¹, Trịnh Thị Hương², Đặng Thị Kim Thúy¹, Trần Thị Mỹ Trâm¹, Nguyễn Thị Thu Hằng¹, Đỗ Đăng Giáp¹, Nguyễn Hải Sơn³

¹ Phòng Công nghệ tế bào thực vật - Viện Sinh học Nhiệt đới

² Khoa Công nghệ sinh học - Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm

³ Khoa Nông nghiệp và Thủy sản - Trường Đại học Cửu Long, Vĩnh Long

TÓM TẮT

Cây bá bệnh (*Eurycoma longifolia*) là một loại dược liệu quý ở nước ta và các nước khác trong khu vực Đông Nam Á, đặc biệt bá bệnh được biết đến như 1 loại sâm của Malaysia. Đã có nhiều nghiên cứu trên cây bá bệnh với nhiều mục đích khác nhau như: y học, hợp chất thứ cấp, nhân giống và sinh thái... Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành khảo sát các yếu tố như loại và nồng độ đường, điều kiện chiếu sáng ảnh hưởng đến khả năng hình thành phôi thứ cấp của cây bá bệnh. Kết quả nghiên cứu cho thấy, mẫu lớp mỏng phôi vô tính được cảm ứng phát sinh phôi ở trên môi trường MS có bổ sung các nguồn carbon khác nhau như fructose, glucose và sucrose. Các mẫu cấy đạt tỷ lệ phát sinh phôi cao nhất khi được nuôi cấy trên môi trường có bổ sung fructose 30%, cho tỷ lệ phát sinh phôi thứ cấp là 100% với số phôi là 7,1 phôi/mẫu. Trong quá trình phát sinh phôi thứ cấp, ánh sáng cũng đóng vai trò quan trọng, đặc biệt là ánh sáng đơn sắc với bước sóng là 629 nm đối với ánh sáng LED đỏ và 462 nm đối với ánh sáng LED xanh. Ở nghiệm thức sử dụng ánh sáng đỏ kết hợp với ánh sáng xanh theo tỷ lệ 80:20 cho kết quả phát sinh phôi thứ cấp cũng như số phôi hình thành đạt cao nhất với tỷ lệ là 100% và số lượng phôi hình thành là 16,54 phôi/mẫu.

Từ khóa: ánh sáng đơn sắc, cây bá bệnh, fructose, môi trường khoáng, phôi vô tính

GIỚI THIỆU

Cây bá bệnh là một loại cây dược liệu thuộc họ Thanh thất có tên khoa học là *Eurycoma longifolia*, phân bố ở khu vực Đông Nam Á như Malaysia, Việt Nam, Lào, Indonesia, Thái Lan, Myanmar, Cambodia (Shaheed *et al.*, 2016). Cây bá bệnh có nhiều công dụng khác như lá cây được sử dụng để trị ngứa, trái dùng để điều trị kiết lỵ (Ang *et al.*, 2001). Các chiết xuất từ rễ được dùng để điều trị các bệnh như rối loạn chức năng tinh dịch, lão hóa, ung thư, sốt rét, tiểu đường, lo âu, căng thẳng, táo bón, đau nhức, bệnh bạch cầu, loãng xương, giang mai, sưng các tuyến, chúng cũng được sử dụng như thuốc kháng sinh, dùng kích thích thèm ăn, bồi bổ sức khỏe và giúp phục hồi thể lực (Fiaschetti *et al.*, 2010).

Bên cạnh nghiên cứu về các tác chiết các chất có hoạt tính và thử nghiệm hoạt tính sinh học, thì nuôi cấy mô loại cây này cũng đã được nghiên cứu. Năm 2000, Aziz và đồng tác giả đã nghiên cứu cảm ứng tạo phôi soma từ lá mầm cây bá bệnh trên môi trường MS bổ sung chất điều hòa khác nhau là NAA và 2,4-D. Năm 2005, Hussein đã nghiên cứu vi nhân giống cây bá bệnh bằng phương pháp tái sinh cây từ phôi vô tính. Đến năm 2006, Hussein và đồng tác giả đã nghiên cứu tạo chồi bất định thành công từ nuôi cấy rễ và thân của cây bá bệnh. Năm 2010, Mahmood và đồng tác giả đã nghiên cứu cảm ứng mô sẹo từ các cơ quan của cây bá bệnh. Nguồn mẫu được sử dụng là lá, cuống lá, cuống thân, rễ chính, rễ xơ, lá mầm và nuôi cấy trên môi trường có bổ sung chất điều hòa sinh trưởng khác nhau như 2,4-D, IAA (axit β -indolyaxetic), NAA, picloram, dicamba. Iriawati và đồng tác giả (2012) tiến hành nghiên cứu về sự tổng hợp các chất thứ cấp của phôi bá bệnh. Trong nghiên cứu này mô sẹo phát sinh từ hạt được nuôi cấy tăng sinh trên môi trường MS có bổ sung 2,25 mg/l 2,4-D và 2,0 mg/l KIN. Sau khi tăng sinh, mô sẹo được nuôi cấy cảm ứng phát sinh phôi trên môi trường MS có bổ sung 1,0 hoặc 2,25 mg/l 2,4-D và 2,0 mg/l BAP hoặc 2,0 mg/l KIN. Sau đó tiến hành khảo sát sự tổng hợp của hợp chất thứ cấp trong phôi và mô sẹo. Kết quả của nghiên cứu cho thấy cả trong phôi và các mô sẹo có khả năng sinh phôi đều có chứa các hợp chất thứ cấp như: alkaloid, dẫn xuất terpenoid và phenol.

Hiện nay, hình thức nhân giống cây bá bệnh chủ yếu là thông qua hạt tuy nhiên, phương pháp này hệ số nhân giống thấp bởi số lượng hạt trên cây hạn chế và mỗi năm cây chỉ cho hạt một lần do đó không đáp ứng kịp thời với nhu cầu thực tế. Từ những vấn đề trên, chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu phương pháp nuôi cấy phôi vô tính dưới tác động của đèn LED và nguồn carbon khác nhau nhằm tạo ra sinh khối phôi lớn, đồng nhất về mặt di truyền để phục vụ công tác nhân giống loài cây này.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Phôi vô tính nuôi tại Phòng Công nghệ tế bào thực vật - Viện Sinh học Nhiệt đới được sử dụng làm vật liệu nghiên cứu ban đầu.

Môi trường và điều kiện nuôi cấy

Môi trường nuôi cấy là môi trường MS (Murashige và Skoog, 1962) có bổ sung 1,5 mg/l 2,4-D kết hợp với 2,5 mg/l KIN. Môi trường được hấp khử trùng bằng autoclave ở nhiệt độ 121°C, 1 atm, trong thời gian 15 phút.

Điều kiện tại phòng nuôi cấy mô của phòng Công nghệ tế bào thực vật - Viện Sinh học Nhiệt đới: nhiệt độ phòng từ 25 ± 2°C; thời gian chiếu sáng là 12 giờ/ngày, cường độ chiếu sáng 40 ± 2 μmol m⁻² s⁻¹.

Thiết lập hệ thống chiếu sáng tự động

Đèn huỳnh quang: thí nghiệm sử dụng đèn huỳnh quang tiêu chuẩn có kích thước 1,2 m, công suất 36 W/h (Philip, Vietnam), đèn này được sử dụng làm nghiệm thức đối chứng. Khoảng cách từ đèn đến nắp bình là 25 cm

Đèn LED: thí nghiệm sử dụng đèn LED loại dây dán 5050 RGB (Công Ty TNHH Điện Tử ELEK), điện áp 12 V, công suất 4 W/m, cường độ ánh sáng từ 26 - 30 μmol m⁻² s⁻¹, cuộn 5 m, 60 đèn/m. Đèn LED thường được sử dụng kèm theo bộ nguồn 12 V với 1 bộ điều khiển và thu phát tín hiệu. Mỗi kệ đựng mẫu cây được thiết kế 4 dây đèn LED song song với nhau, cách nhau 10 cm, nối với nguồn điện và bộ thu phát tín hiệu. Khoảng cách từ các dây đèn LED xuống bình nuôi cấy là 30 cm. Màu sắc của đèn được điều khiển bằng phần mềm Smartcolor (Được thiết kế bởi công ty ELEK, Việt Nam).

Phần mềm Smartcolor được lập trình dựa vào mô hình màu RGB trong đó các loại ánh sáng như ánh sáng đỏ, ánh sáng xanh lục và ánh sáng xanh lam được tổ hợp theo nhiều phương thức khác nhau để tạo thành các màu khác nhau.

Khi biểu diễn dưới dạng số, các giá trị RGB trong mô hình 24 bpp (bits per pixel) thông thường được ghi bằng cặp ba số nguyên giữa 0 và 255, mỗi số đại diện cho cường độ của màu đỏ, xanh lục, xanh lam. Số lượng màu tối đa sẽ là: 256 x 256 x 256 = 16.777.216. Ví dụ: (0, 0, 0) là màu đen; (255, 255, 255) là màu trắng; (255, 0, 0) là màu đỏ; (0, 255, 0) là màu xanh lục; (0, 0, 255) là màu xanh lam; (255, 255, 0) là màu vàng; (0, 255, 255) là màu xanh ngọc; (255, 0, 255) là màu hồng cánh sen.

Bước sóng đo được của ánh sáng đỏ là 629 nm và ánh sáng xanh dương là 462 nm.

Điều kiện chiếu sáng trong thí nghiệm được thiết lập như sau:

- **FL:** Ánh sáng đèn huỳnh quang (Đối chứng sử dụng trong nuôi cấy *in vitro*)
- **100R:** 100% ánh sáng đèn LED đỏ (với tỷ lệ RGB lần lượt là 255,0,0)
- **100B:** 100% ánh sáng đèn LED xanh (với tỷ lệ RGB lần lượt là 0,0,255)
- **90R:10B:** 90% ánh sáng LED đỏ + 10% ánh sáng LED xanh (với tỷ lệ RGB lần lượt là 229,0,26).
- **80R:20B:** 80% ánh sáng LED đỏ + 20% ánh sáng LED xanh (với tỷ lệ RGB lần lượt là 204,0,51).
- **70R:30B:** 70% ánh sáng LED đỏ + 30% ánh sáng LED xanh (với tỷ lệ RGB lần lượt là 178,0,77).
- **60R:40B:** 60% ánh sáng LED đỏ + 40% ánh sáng LED xanh (với tỷ lệ RGB lần lượt là 153,0,102).
- **50R:50B:** 50% ánh sáng LED đỏ + 50% ánh sáng LED xanh (với tỷ lệ RGB lần lượt là 128,0,127).
- **40R:60B:** 40% ánh sáng LED đỏ + 60% ánh sáng LED xanh (với tỷ lệ RGB lần lượt là 102,0,153).
- **30R:70B:** 30% ánh sáng LED đỏ + 70% ánh sáng LED xanh (với tỷ lệ RGB lần lượt là 77,0,178).
- **20R:80B:** 20% ánh sáng LED đỏ + 80% ánh sáng LED xanh (với tỷ lệ RGB lần lượt là 51,0,204).
- **10R:90B:** 10% ánh sáng LED đỏ + 90% ánh sáng LED xanh (với tỷ lệ RGB lần lượt là 26,0,229).

Tùy vào mục của từng thí nghiệm mà các mẫu cây sẽ được đặt dưới các loại ánh sáng và tỷ lệ ánh sáng khác nhau.

Bố trí thí nghiệm

Ảnh hưởng của loại và nồng độ carbohydrate (sucrose, fructose và glucose) lên sự hình thành phôi thứ cấp của cây bá bệnh

Mục đích thí nghiệm: Khảo sát sự phát sinh phôi thứ cấp từ mẫu cây lát mỏng phôi vô tính của cây bá bệnh trong môi trường bổ sung các loại đường khác nhau như sucrose, fructose và glucose. Từ đó xác định sự ảnh hưởng của sucrose, fructose và glucose lên quá trình phát sinh phôi thứ cấp của phôi cây bá bệnh.

Quy mô thí nghiệm: 3 mẫu/bình x 3 bình/ô cơ sở x 15 NT x 3 LLL = 405 mẫu.

Cách thực hiện: Các phôi vô tính hình cầu được cắt lát mỏng có kích thước 2 x 2 x 0,5 mm (dọc x ngang x bề dày) được cấy lên môi trường đã được chuẩn bị trước. Các bình mẫu được đặt trong phòng thí nghiệm có cường độ ánh sáng 40 ± 2 μmol m⁻² s⁻¹ với nhiệt độ được duy trì ở 25 ± 2°C và độ ẩm của phòng thí nghiệm đảm bảo trong khoảng từ 70 - 80%, thời gian chiếu sáng là 12 giờ/ngày.

Bố trí thí nghiệm: Thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên, 2 yếu tố với 15 nghiệm thức, 3 lần lặp lại.

Chỉ tiêu theo dõi: Sau 40 ngày nuôi cấy tiến hành thu thập số liệu với các chỉ tiêu về tỷ lệ hình thành phôi, số lượng phôi hình thành.

Khảo sát sự ảnh hưởng của điều kiện chiếu sáng lên sự phát sinh phôi thứ cấp từ phôi vô tính cây bá bệnh

Cách tiến hành: Phôi vô tính cây bá bệnh được cấy lên môi trường MS bổ sung 1,5 mg/l 2,4-D kết hợp với 2,5 mg/l KIN. Sau đó, mẫu cấy được đặt dưới các điều kiện chiếu sáng khác nhau như 100% LED đỏ, 100% LED đỏ; 90% LED đỏ + 10% LED xanh; 80% LED đỏ + 20% LED xanh, 70% LED đỏ + 30% LED xanh; 60% LED đỏ + 40% LED xanh; 50% LED đỏ + 50% LED xanh. Thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên và đèn huỳnh quang được sử dụng làm nghiệm thức đối chứng.

Chỉ tiêu theo dõi: Sau 40 ngày nuôi cấy tiến hành thu thập số liệu với các chỉ tiêu về tỷ lệ hình thành phôi, số lượng phôi hình thành.

Phương pháp theo dõi các chỉ tiêu

Tỷ lệ mẫu hình thành phôi thành được tính bằng công thức:

$$\text{Tỷ lệ mẫu hình thành phôi (\%)} = \frac{\text{Số mẫu hình thành phôi}}{\text{Tổng số mẫu}} * 100$$

Số lượng phôi trung bình hình thành được tính theo công thức

$$\text{Số lượng phôi hình thành} = \frac{\text{Tổng số phôi hình thành}}{\text{Tổng số mẫu}}$$

Phương pháp bố trí thí nghiệm và xử lý số liệu

Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên (Completely Randomized Design-CRD). Trung bình các chỉ tiêu theo dõi giữa các thí nghiệm được xử lý bằng phương pháp phân tích phương sai (ANOVA), sau đó được thống kê với độ tin cậy $p \leq 95\%$ bằng phần mềm Minitab 16.0.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Ảnh hưởng của loại và nồng độ carbohydrate (sucrose, fructose và glucose) lên sự hình thành phôi thứ cấp của cây bá bệnh

Dựa vào kết quả bảng 1 cho thấy, loại và nồng độ đường đã có sự tác động tích cực đến sự hình thành phôi thứ cấp của cây bá bệnh. Trong nghiệm thức đối chứng không bổ sung đường, mẫu cấy không có sự hình thành phôi thứ cấp và đã chết sau 40 ngày nuôi cấy. Tỷ lệ hình thành phôi thứ cấp trong các nghiệm thức thay đổi phụ thuộc vào loại và nồng độ đường được bổ sung vào môi trường nuôi cấy. Đối với yếu tố loại đường thì đường sucrose cho tỷ lệ hình thành phôi thứ cấp cao hơn so với các loại đường còn lại. Xét về yếu tố nồng độ đường thì nồng độ đường ở mức 30 g/l là cho tỷ lệ hình thành phôi thứ cấp cao nhất. Nghiệm thức cho tỷ lệ hình thành phôi thứ cấp cao nhất là nghiệm thức bổ sung fructose với nồng độ ở mức 30 g/l. Đối với loại đường là fructose thì tỷ lệ hình thành phôi thứ cấp cao nhất tại nồng độ 30 g/l. Đối với loại đường là sucrose thì nồng độ ở mức 50 g/l chỉ tỷ lệ hình thành phôi thứ cấp cao nhất. Tương tự đối với loại đường là glucose, tỷ lệ hình thành phôi thứ cấp đạt giá trị cao nhất tại nồng độ 50 g/l. Trong tất cả các nghiệm thức, nghiệm thức có tỷ lệ phát sinh phôi thứ cấp cao nhất là nghiệm thức bổ sung 30 g/l fructose.

Bảng 1. Ảnh hưởng của loại và nồng độ đường lên tỷ lệ hình thành phôi thứ cấp của mẫu cấy sau 40 ngày (Đơn vị tính: %)

Loại đường (Đ)	Nồng độ (g/l) (B)					Trung bình Đ
	0	30	50	70	90	
Fructose	0 ^h	100,0 ^a	74,6 ^{bcd}	51,9 ^{ef}	22,2 ^g	49,7 ^B
Sucrose	0 ^h	72,5 ^{dce}	96,3 ^{ab}	77,8 ^{bc}	72,5 ^{cde}	63,8 ^A
Glucose	0 ^h	65,1 ^{cde}	77,8 ^{bc}	55,6 ^{cdf}	37,0 ^{fg}	47,1 ^B
Trung bình B	0 ^D	79,2 ^A	82,9 ^A	61,8 ^B	43,9 ^C	
$F_B = 77,8^{**}$ $F_D = 5,7^{**}$ $F_{B \cdot D} = 6,8^{**}$ $Cv = 20,0\%$						

Số liệu tỷ lệ tạo mô sẹo được chuyển đổi theo công thức (\sqrt{x}) trước khi xử lý thống kê. Những chữ số khác nhau (a,b,c...) thể hiện sự khác biệt về mặt thống kê ở mức xác suất $p < 0,01$ (**).

Ảnh hưởng của loại và nồng độ đường lên số lượng phôi vô tính hình thành từ mẫu cấy phát sinh phôi thứ cấp của cây bá bệnh

Kết quả bảng 2 cho thấy, số lượng phôi thứ cấp hình thành trong các nghiệm thức chịu ảnh hưởng bởi loại và nồng độ đường bổ sung vào môi trường nuôi cấy. Xét về yếu tố loại đường thì đường sucrose cho số lượng phôi vô tính hình thành cao nhất. Xét về yếu tố nồng độ thì mức nồng độ đường cho số lượng phôi cao nhất là mức 50 g/l, tuy nhiên, về mặt thống kê thì số lượng phôi thứ cấp ở mức nồng độ 30 g/l và 50 g/l là tương đương nhau. Trong tất cả các nghiệm thức, nghiệm thức có số lượng phôi cao nhất là nghiệm thức bổ sung 30 g/l fructose với số lượng phôi thứ cấp trung bình là 7,1 phôi/mẫu.

Bảng 2. Ảnh hưởng của loại và nồng độ đường lên số lượng phôi vô tính hình thành sau 40 ngày nuôi cấy (Đơn vị tính: phôi/mẫu)

Loại đường (Đ)	Nồng độ (g/l) (B)					Trung bình Đ
	0	30	50	70	90	
Fructose	0 ^g	7,1 ^a	4,2 ^{bcd}	1,9 ^{ef}	0,4 ^{gh}	2,7 ^B
Sucrose	0 ^g	3,2 ^{cde}	5,4 ^b	4,4 ^{bc}	4,2 ^{bcd}	3,4 ^A
Glucose	0 ^g	3,2 ^{cde}	3,3 ^{cde}	1,5 ^{fg}	2,8 ^{d^{ef}}	2,4 ^B
Trung bình B	0 ^C	4,53 ^A	4,62 ^A	2,61 ^B	2,49 ^B	

$F_B = 90,8^{**}$ $F_D = 12,1^*$ $F_{B \times D} = 21,1^{**}$ $Cv = 20,86\%$

Những chữ số khác nhau (a,b,c...) thể hiện sự khác biệt về mặt thống kê ở mức xác suất $p < 0,01$ (**).

Trong môi trường nuôi cấy bổ sung fructose, khi nồng độ fructose tăng lên thì số lượng phôi giảm dần, số lượng phôi thứ cấp hình thành cao nhất tại mức nồng độ 30 g/l. Đối với các nghiệm thức bổ sung sucrose, mức nồng độ 50 g/l cho số lượng phôi thứ cấp đạt giá trị cao nhất với 5,4 phôi/mẫu. Trong các nghiệm thức bổ sung glucose, số lượng phôi thứ cấp hình thành ít hơn so với các loại đường khác. Trong đó, số lượng phôi thứ cấp đạt giá trị cao nhất của các nghiệm thức bổ sung glucose là ở nồng độ 50 g/l với số lượng phôi trung bình là 3,3 phôi/mẫu. Trong nghiệm thức đối chứng (không bổ sung đường) mẫu cấy không nhận được nguồn carbohydrate cần thiết cho sự sinh trưởng và phát triển. Do đó, mẫu không hình thành phôi thứ cấp và có dấu hiệu hóa nâu và chết sau 40 ngày nuôi cấy.

Từ kết quả của thí nghiệm cho thấy, đường có vai trò quan trọng trong sự sinh trưởng và phát sinh phôi thứ cấp từ phôi vô tính của cây bá bệnh. Trong ba loại đường được khảo sát thì sucrose là loại đường cho tỷ lệ hình thành phôi thứ cấp cũng như số lượng phôi thứ cấp hình thành cao nhất, tuy nhiên fructose ở nồng độ thấp cho khả năng kích thích số lượng phôi hình thành cao hơn sucrose. Kết quả này tương tự với kết quả của nghiên cứu ảnh hưởng của đường lên sự phát sinh phôi vô tính của cây xà lách (*Fuminori*, 1996). Nghiên cứu cho thấy fructose ở nồng độ thấp có tác động sự hình thành phôi cao hơn so với đường sucrose. Ngoài ra, trong nghiên cứu về sự ảnh hưởng của đường glucose và sucrose lên sự phát sinh phôi trên cây *T. indica*. Kết quả đã cho thấy đường có tác động lên sự phát sinh phôi của cây *T. indica* và trong hai loại đường khảo sát thì đường sucrose có tác động phát sinh phôi cao hơn so với glucose (Dennis, 2006). Điều này cho thấy tùy thuộc vào loài thực vật mà tác động của các loại đường khác nhau cũng khác nhau.

Ảnh hưởng của điều kiện chiếu sáng lên sự phát sinh phôi thứ cấp từ phôi vô tính của cây bá bệnh

Ánh sáng là một trong những yếu tố chính trong quá trình sinh trưởng và phát triển, tác động đến các đặc điểm phát sinh hình thái của thực vật. Một số nghiên cứu trước đây thường được đặt trong ánh sáng có cường độ và thời gian chiếu sáng phù hợp nhất, nhưng thông thường chế độ chiếu sáng của thí nghiệm nuôi cấy *in vitro* thường không phải là ánh sáng tối ưu nhất cho một mô cấy phát triển, mà chỉ là đủ ánh sáng để cây tồn tại hay chỉ thích hợp với một thời điểm nhất định trong thí nghiệm và chế độ ánh sáng được chọn có phạm vi rộng cho nhiều loại cây (George *et al.*, 2008). Các diode phát quang - LED có thể khắc phục được những nhược điểm này, với lợi thế lựa chọn được bước sóng xác định, thể tích và khối lượng nhỏ, cấu trúc đặc, tuổi thọ cao và ít tỏa nhiệt. Ánh sáng LED đã và đang được ứng dụng trong các phòng nuôi cấy mô cũng như trong các nhà kính công nghệ cao. Nhiều nghiên cứu đã ứng dụng thành công hệ thống chiếu sáng đơn sắc trong kích thích sinh trưởng, phát triển ở cây trồng. Tanaka và đồng tác giả (1998) 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 và đồng tác giả (2002) nghiên cứu ảnh hưởng của LED xanh dương, LED đỏ, LED xanh dương kết hợp LED đỏ lên sự tái sinh chồi từ vảy củ *Liliumoriental hydrib* '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,... (Nguyễn Bá Nam và đồng tác giả, 2012).

Kết quả bảng 3 cho thấy, phôi vô tính cây bá bệnh khi nuôi cấy *in vitro* trong các điều kiện chiếu sáng khác nhau đã ảnh hưởng khác nhau lên sự sinh trưởng và phát sinh hình thái phôi. Trong 8 nghiệm thức được khảo sát với các điều kiện chiếu sáng khác nhau, nhìn chung, sự sinh trưởng của phôi vô tính cây bá bệnh trong điều kiện chiếu sáng bằng đèn huỳnh quang, đèn LED đỏ, đèn LED đỏ và kết hợp đèn LED xanh dương và đỏ với tỷ lệ khác nhau có sự khác biệt ý nghĩa về mặt thống kê.

Trong các nghiệm thức đèn đơn sắc đều cho tỷ lệ hình thành phôi đạt 100%. Đã có nhiều nghiên cứu ứng dụng thành công hệ thống chiếu sáng đơn sắc trong kích thích sinh trưởng, phát triển ở cây trồng. Ánh sáng đơn sắc của đèn LED được phát ra từ diode bán dẫn cho ánh sáng có quang phổ hẹp. Hai màu đỏ và xanh dương trên đèn LED ở bước sóng tương ứng là 660 nm và 460 nm. Quang phổ đèn LED gần trùng với quang phổ hấp thụ cực đại diệp lục tố của cây. Do đó, cây có thể hấp thụ tối đa để chuyển năng lượng ánh sáng đơn sắc thành năng lượng tế bào cho cây sử dụng (Dương Tấn Nhựt *et al.*, 2003).

Khi kết hợp hai đèn LED đỏ và LED xanh dương theo những tỷ lệ khác nhau lại có sự khác biệt về tỷ lệ hình thành phôi. Ở nghiệm thức với tỷ lệ 80% LED đỏ + 20% LED xanh dương và 50% LED đỏ + 50% LED xanh dương, 100% phôi vô tính được nuôi cấy đã phát sinh phôi mới. Ở nghiệm thức với tỷ lệ 70% LED đỏ + 30% LED xanh dương cho tỷ lệ hình thành phôi trung bình là 87,5%. Còn ở nghiệm thức với tỷ lệ đèn 90% LED đỏ + 10% LED xanh dương và 60% LED đỏ + 40% LED xanh dương cho tỷ lệ hình thành phôi thấp nhất trong tất cả các nghiệm thức được khảo sát (85%).

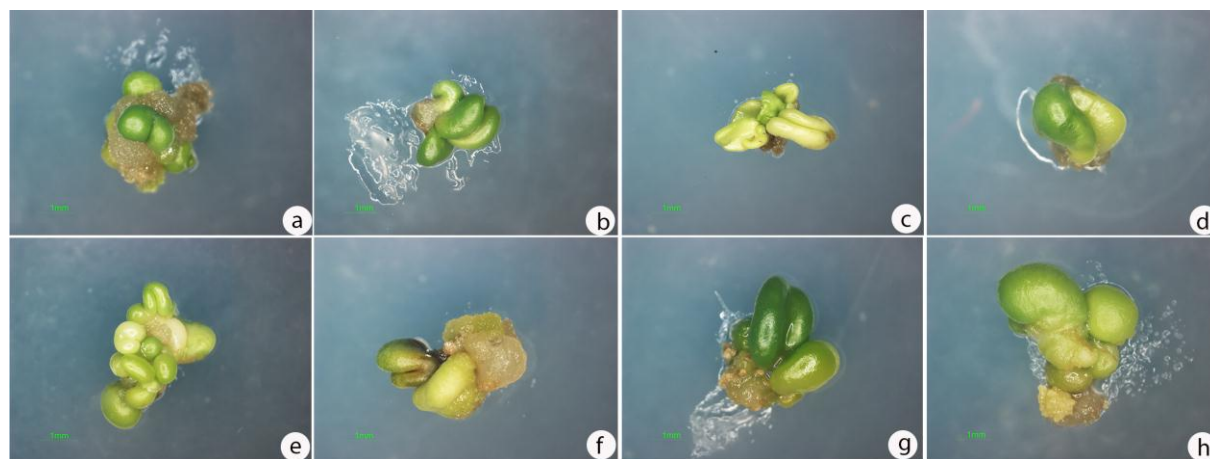
Bảng 3. Ảnh hưởng của các chế độ chiếu sáng khác nhau lên tỷ lệ hình thành phôi của cây bá bệnh sau 40 ngày nuôi cấy

Loại đèn	Tỷ lệ hình thành phôi (%)	Số lượng phôi trung bình (phôi)
LED đỏ 100%	100 ^a	11,76 ^d
LED xanh 100%	100 ^a	6,47 ^f
LED đỏ 90% + LED xanh 10%	85 ^b	6,94 ^f
LED đỏ 80% + LED xanh 20%	100 ^a	16,54 ^a
LED đỏ 70% + LED xanh 30%	87,5 ^b	12,94 ^c
LED đỏ 60% + LED xanh 40%	85 ^b	8,58 ^e
LED đỏ 50% + LED xanh 50%	100 ^a	11,82 ^d
Đèn huỳnh quang (ĐC)	100 ^a	14,50 ^b
CV (%)	7,68	30,84

Số liệu là giá trị trung bình của 3 lần lặp lại; CV: hệ số biến thiên; các kí tự a, b, c... theo sau khác nhau biểu hiện sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức $P \leq 0,05$.

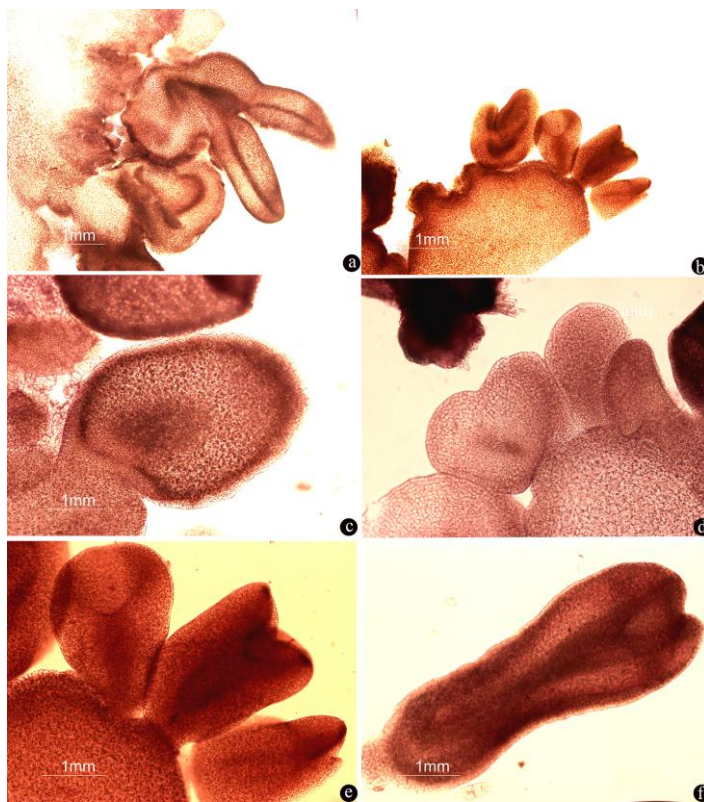
Tuy nhiên, về số lượng phôi trung bình giữa các nghiệm thức lại có sự khác biệt đáng kể. Ánh sáng đỏ có vai trò quan trọng trong quang hợp và tổng hợp tinh bột ở thực vật, ánh sáng xanh lại thể hiện vai trò trong hình thành chlorophyll, phát triển lục lạp, đóng mở khí khổng và quang phát sinh hình thái (Tennessee, 1994; Tripathy, 1995). Trong thí nghiệm này, giữa 8 nghiệm thức được khảo sát có sự khác biệt ý nghĩa về mặt thống kê. Nghiệm thức đèn huỳnh quang (14,5 phôi/mẫu cấy) cho ra số phôi trung bình cao hơn 100% LED đỏ và 100% LED xanh dương (Hình 1a,b,c). Trong 3 nghiệm thức nêu trên, nghiệm thức sử dụng 100% LED xanh dương cho ra số phôi trung bình thấp nhất (6,47 phôi/mẫu cấy) cũng là nghiệm thức có số phôi trung bình thấp nhất trong 8 nghiệm thức đèn được khảo sát trong thí nghiệm này. Ở các nghiệm thức sử dụng đèn LED với các tỷ lệ kết hợp khác nhau có số lượng phôi trung bình hình thành khác nhau. Ở nghiệm thức với tỷ lệ 80% LED đỏ + 20% LED xanh dương cho số lượng phôi trung bình cao nhất trong các nghiệm thức kết hợp tỷ lệ đèn LED khác nhau và cũng là nghiệm thức có số phôi trung bình cao nhất trong tất cả các nghiệm thức được khảo sát (16,54 phôi/mẫu cấy) (Hình 1e). Ở nghiệm thức với tỷ lệ 90% LED đỏ + 10% LED xanh dương cho số lượng phôi trung bình thấp nhất so với các nghiệm thức kết hợp tỷ lệ LED xanh dương và đỏ (6,94 phôi/mẫu cấy), không có sự khác biệt ý nghĩa về mặt thống kê so với nghiệm thức sử dụng 100% LED xanh dương.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi cũng ghi nhận sự hình thành phôi gián tiếp thông qua mô sẹo (Hình 2a,b) và sự đa dạng về cấu trúc phôi trong quá trình phát triển như phôi hình cầu, phôi hình tim, phôi hình thủy lôi (Hình 2c, d, e,f).



Hình 1. Hình thái phôi hình thành sau 40 ngày nuôi cấy phôi cây bá bệnh

a) Đèn huỳnh quang; b) 100% LED đỏ; c) 100% LED xanh; d) 90% LED đỏ + 10% LED xanh; e) 80% LED đỏ + 20% LED xanh; f) 70% LED đỏ + 30% LED xanh; g) 60% LED đỏ + 40% LED xanh; h) 50% LED đỏ + 50% LED xanh.



Hình 2. Hình thái giải phẫu phôi vô tính dưới kính soi nổi
a,b. phôi hình thành từ mô sẹo; c. phôi hình cầu; d. phôi hình tim; e,f. phôi hình thủy lồi.

KẾT LUẬN

Thành phần và nồng độ carbohydrate có ảnh hưởng đến sự phát sinh phôi thứ cấp từ phôi vô tính bá bệnh. Đường fructose ở nồng độ 30 g/l thích hợp cho sự phát sinh phôi từ mẫu cấy lớp mỏng phôi, với số lượng phôi đếm được trung bình là 7,1 phôi/mẫu.

Tỷ lệ đèn 80% LED đỏ + 20% LED xanh dương là tốt nhất cho sự phát sinh phôi thứ cấp từ phôi vô tính của cây bá bệnh.

Lời cảm ơn: Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn Sở Khoa Học và Công Nghệ Thành Phố Hồ Chí Minh đã hỗ trợ kinh phí để thực hiện nghiên cứu này (theo hợp đồng số 64/2018/HĐ-SKHCHN ký ngày 21/6/2018).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Ang H, Ikeda S, and Gan EK (2001). Evaluation of the potency activity of aphrodisiac in *Eurycoma longifolia* Jack. *Phytother Res* 15: 435-436.
- Aziz S, Akeng G and Kandasamy K (2000). Induction of somatic embryos from cotyledonary tissue of Tongkat Ali (*Eurycoma longifolia*). *J Trop Med Plants* 1: 53-59.
- Dennis TT (2006). Effect of sugars, gibberellic acid and abscisic acid on somatic embryogenesis in *Tylophora indica* (Burm. f.) Merrill *Chin J Biotech* 22 (3): 465-471.
- Fuminori K, Ichiro O, Koichi S, and Takashi H (1996). Improvement on the efficiency of somatic embryogenesis from spinach root tissues by applying various sugars. *Japan Soc Hort Sci* 65 (1): 67-72.
- Hussein S, Ibrahim R, Kiong ALP, Fadzillah NM and Daud SK (2005). Multiple shoots formation of an important tropical medicinal plant (*Eurycoma longifolia* Jack). *Plant Biotechnol* 22: 349-351.
- Lian ML, Murthy HH, Paek KY (2002). Effects of light-emitting diodes (LEDs) on the *in vitro* induction and growth of bulblets of *Lilium oriental* hybrid 'Pesaro'. *Sci Hort* 94: 365-370.
- Mahmood M, Normi R, and Subramaniam S (2010). Optimization of suitable auxin application in arecalcitrant woody forest plant of *Eurycoma longifolia* (Tongkat Ali) for callus induction. *Afr J Biotechnol* 9: 8417-8428.
- Murashige T and Skoog F (1992). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 15: 473-497.

Nhut DT, Takamura T, Watanabe H, Okamoto K and Tanaka M (2003). Responses of strawberry plantlets cultured *in vitro* under superbright red and blue light emitting diodes (LEDs). *Plant Cell, Tissue Organ Cult* 73: 43-52.

Shaheed UR, Kevin CH, Hye HY (2016). Review on a traditional herbal medicine: *Eurycoma longifolia* Jack (Tongkat Ali): Its traditional uses. *Chemistry. Evidence-Based Pharmacology and Toxicology. Molecules* 21: 331.

Tanaka M, Takamura T, Watanabe H, Endo M, Yanagi T, Okamoto K (1998). *In vitro* growth of *Cymbidium* plantlets cultured under superbright red and blue light-emitting diodes (LEDs). *J Hort Sci Biotech* 73: 39-44.

Tennessen DJ, Singaas EL, Sharkey TD (1994). Light-emitting diodes as a light source for photosynthesis research. *Photo Res* 39: 85-92.

Tripathy BC, Brown CS (1995). Root-shoot interaction in greening of wheat seedlings grown under red light. *Plant Physiol* 107: 407-411.

EFFECTS OF CARBOHYDRATE, LIGHTING CONDITIONS ON THE SECONDARY SOMATIC EMBRYOGENESIS OF *EURYCOMA LONGIFOLIA*

Tran Trong Tuan^{1*}, Nguyen Thi Duoc¹, Nguyen Thi Huyen Trang¹, Trinh Thi Huong², Dang Thi Kim Thuy¹, Tran Thi My Tram¹, Nguyen Thi Thu Hang¹, Do Dang Giap¹, Nguyen Hai Son³

¹ *Plant Cell Technology Department, Institute of Tropical Biology*

² *Faculty of Biotechnology, HOCHIMINH City University of Food Industry*

³ *Faculty of Agriculture and Fisheries, CuuLong University - Vinh Long*

SUMMARY

Ba benh (*Eurycoma longifolia*) is one of the well-known folk herbal plants in Vietnam and the other countries in Southeast Asia region, especially it is known as a Malaysian ginseng. There have been many studies on *E. longifolia* with different purposes such as medicine, chemical constituents, propagation, and ecology... In this study, the factors that affect secondary somatic embryogenesis of *E. longifolia* were carried out. The results showed that the somatic embryogenesis was induced on MS medium with different carbohydrate sources such as fructose, glucose and sucrose. The embryogenesis rate was the highest when explants were cultured on medium supplemented with 30 g/l fructose, with the embryogenesis rate of 100% and the number of somatic embryos of 7.1 embryos/explants. The lighting condition also plays an important role during the process of secondary embryogenesis, especially monochromatic light with a wavelength of 629 nm for red LED and 462 nm for blue LED. In the experiment applied red LED and blue LED at the ratio of 80:20, the results showed that the secondary embryogenesis rate as well as number of somatic embryos formed were the highest with 100% and 16.54 embryos/explant, respectively.

Keywords: Monochromatic light, *Eurycoma longifolia*, fructose, mineral media, asexual embryo.

* Author for correspondence: Tel: 0938020553; Email: tuan216@gmail.com