

ĐÁNH GIÁ ẢNH HƯỞNG CỦA CƯỜNG ĐỘ ÁNH SÁNG, NỒNG ĐỘ ĐƯỜNG VÀ MẬT ĐỘ MẪU CÂY ĐẾN SỰ SINH TRƯỞNG CỦA CÂY HOA CHUÔNG (*Sinningia speciosa*) BẰNG PHƯƠNG PHÁP BỀ MẶT ĐÁP ỨNG RSM (RESPONSE SURFACE METHOD)

Đỗ Đăng Giáp¹, Trần Trọng Tuấn¹, Nguyễn Thị Huyền Trang¹, Nguyễn Thị Xuân Trang¹, Nguyễn Thị Thu Hằng¹, Hoàng Văn Nam^{1,2}, Ngô Thị Thanh Nhân², Võ Thanh Phúc², Liêu Mỹ Đông³, Đặng Thị Kim Thúy^{1*}

¹Viện Sinh học Nhiệt đới, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VAST)

²Khoa Kỹ thuật Hóa học, Trường Đại học Bách Khoa, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh

³Khoa Công nghệ Thực phẩm, Trường Đại học Công Thương Thành phố Hồ Chí Minh

TÓM TẮT

Trong nghiên cứu này, phương pháp bề mặt đáp ứng (RSM) được sử dụng để phân tích và tối ưu hóa quá trình tăng trưởng *in vitro* của cây hoa chuông (*Sinningia speciosa*). Theo đó, chồi đỉnh của cây hoa chuông *in vitro* được nuôi cấy với các mật độ khác nhau (5, 10 và 15 mẫu/bình) trên môi trường MS có bổ sung đường ở các nồng độ khác nhau (0, 15 và 30 g/L). Tất cả các bình mẫu được nuôi cấy ở điều kiện chiếu sáng với cường độ ánh sáng khác nhau (45, 60 và 75 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Kết quả đánh giá ảnh hưởng của sự kết hợp cường độ ánh sáng, nồng độ đường và mật độ mẫu cây lên quá trình tăng trưởng của cây hoa chuông *in vitro* cho thấy cường độ chiếu sáng 60 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, nồng độ đường 15 g/L, mật độ mẫu 10 mẫu/bình cho hiệu quả nuôi cấy tốt nhất. Thông qua phân tích bằng phương pháp bề mặt đáp ứng, các chỉ tiêu sinh trưởng của mẫu cây hoa chuông như số lá, số rễ, diện tích lá, chiều cao cây, có tương quan chặt chẽ với các yếu tố khảo sát nhưng các yếu tố khảo sát này lại không tác động đến khả năng nhân chồi của mẫu cây. Quy trình đã cơ bản tạo ra những cây con phát triển tốt, đồng đều sau 6 tuần nuôi cấy. Việc sử dụng phương pháp mô hình hóa cho phép dự đoán các điều kiện tăng trưởng thực vật tốt nhất là sự kết hợp giữa nồng độ đường 14,66 g/L, cường độ ánh sáng 68,37 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ và mật độ mẫu cây 10,78 mẫu/bình. Tuy nhiên, các thông số này cần có thực nghiệm kiểm chứng để so sánh và đánh giá hiệu quả của mô hình hóa.

Từ khóa: Cây hoa chuông, cường độ ánh sáng, *in vitro*, mật độ mẫu cây, mô hình hóa, nồng độ đường.

MỞ ĐẦU

Cây hoa chuông (*Sinningia speciosa*) thuộc họ Gesneriaceae có nguồn gốc từ Brazil. Đây là một loại hoa chậu được trồng phổ biến trên thế giới. Ngoài việc nhân giống ngoài tự nhiên bằng hạt, thân, củ,... hoa chuông còn được nhân giống vô tính bằng kỹ thuật nuôi cấy mô tế bào thực vật *in vitro* nhằm tạo cây giống sạch bệnh, đồng nhất về kiểu hình, ổn định di truyền và sản xuất được ở quy mô lớn (Sharma, Sharma, 2013). Trong nuôi cấy *in vitro*, thành phần môi trường và nồng độ các chất khoáng đa lượng, vi lượng, vitamin, acid amin,...có ảnh hưởng rất lớn đến các mô, tế bào thực vật. Tuy nhiên, các thành phần môi trường và các yếu tố ảnh hưởng khác rất nhiều nên việc thiết kế thực nghiệm cho từng mục đích nuôi cấy cụ thể đòi hỏi chuyên môn cao và tốn nhiều thời gian. Hildebrandt và đồng tác giả (1946) chỉ ra rằng cần có hơn 16000 phương pháp xử lý khác nhau để thiết kế một môi trường nuôi cấy mới. Ngoài ra, Murashige và Skoog (1962) đã dành khoảng năm năm để thiết lập và phát triển môi trường nuôi cấy bằng cách sử dụng 81 nghiệm thức kết hợp các nguyên tố đa lượng, vi lượng và vitamin ở các nồng độ khác nhau.

Phương pháp bề mặt đáp ứng là một công cụ thống kê hữu ích để thiết kế thí nghiệm, phân tích kết quả và tìm ra các điều kiện tối ưu (Kathiresan *et al.*, 2007). Phương pháp này là cần thiết để xác định mức độ ảnh hưởng của một yếu tố hoặc nhiều yếu tố kết hợp hiệu quả nuôi cấy tối ưu bằng cách giảm thiểu số lần thử nghiệm. Các nghiên cứu về tối ưu hóa môi trường nuôi cấy mô đã được thực hiện ở một số loài như *Centella asiatica*, *Dianthus caryophyllus* L., *Citrus sinensis* L., *Decalepis hamiltonii* Wight. & Arn (Lu *et al.*, 2004).

Trong những năm qua, nhiều nghiên cứu nhằm tìm ra các điều kiện tối ưu cho quá trình nuôi cấy cây hoa chuông trong điều kiện nuôi cấy *in vitro* đã được thực hiện. Ở Việt Nam, Dương Tấn Nhựt và đồng tác giả (2005), Trần Ngọc Trỗi và đồng tác giả (2017) và Phúc Võ Thanh và đồng tác giả (2022) đã tiến hành nghiên cứu nhân nhanh *in vitro* cây hoa chuông bằng phương pháp nuôi cấy đốt thân và xử lý ra rễ *ex vitro*, xác định ảnh hưởng của hệ thống chiếu sáng đơn sắc đến quá trình nhân giống *in vitro* cây hoa chuông cũng như có những khảo sát về một số yếu tố ảnh hưởng đến sinh trưởng của cây hoa chuông và cây sâm bố chính trong hệ thống vi thủy canh. Trên thế giới, một số nghiên cứu về nhân giống *in vitro* cây hoa chuông cũng đã được thực hiện như

nghiên cứu của Pang và đồng tác giả (2006), Xu và đồng tác giả (2009), Sharma và Sharma (2013). Tuy nhiên, các nghiên cứu này sử dụng các phương pháp thường quy là thay đổi nồng độ của một yếu tố và cố định các thông số còn lại. Phương pháp này không đánh giá được sự tương quan qua lại khi thay đổi nhiều thông số khác nhau. Để khắc phục vấn đề này, việc ứng dụng phương pháp nuôi cấy mô tế bào thực vật để nghiên cứu thực nghiệm kết hợp phương pháp đáp ứng bề mặt RSM (Response Surface Method) nhằm dự đoán những điều kiện tối ưu của môi trường nuôi cấy hướng đến nhân giống cây hoa chuông một cách hiệu quả và kinh tế hơn. Đây là phương pháp sử dụng toán học và xử lý thống kê cho phép nghiên cứu sự tương tác giữa các yếu tố ảnh hưởng đến hiệu quả của quy trình, đồng thời đưa ra dự đoán về giá trị tối ưu của các yếu tố.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên liệu

Chồi đỉnh của cây hoa chuông *in vitro* có một cặp lá mở (1 – 1,5 cm) được nuôi cấy trên môi trường MS (Murashige và Skoog, 1962).

Phương pháp nghiên cứu

Bố trí thí nghiệm

Nghiên cứu ảnh hưởng của sự kết hợp cường độ ánh sáng, nồng độ đường và mật độ mẫu cấy lên quá trình phát triển của cây hoa chuông *in vitro*

Chồi cây hoa chuông *in vitro* có chiều cao 1,0 - 1,5 cm được cấy lên môi trường MS có bổ sung 6,5 g/L agar và đường ở các nồng độ 0 – 30 g/L. Các bình nuôi cấy được cấy với các mật độ nuôi cấy khác nhau (5, 10 và 15 mẫu/bình). Tất cả các thí nghiệm được đặt trong phòng nuôi cấy với điều kiện chiếu sáng ở các cường độ ánh sáng khác nhau (45, 60 và 75 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Sau 6 tuần nuôi cấy, các số liệu được ghi nhận là số rễ, chiều cao chồi, số lá, diện tích lá, khối lượng tươi, khối lượng khô.

Tối ưu hóa các yếu tố cường độ ánh sáng, nồng độ đường và mật độ mẫu cấy đến sự hình thành lá và rễ của cây hoa chuông nuôi cấy *in vitro*

Phương pháp bề mặt đáp ứng sử dụng thiết kế Box-Behnken để tối ưu hóa các yếu tố: Nồng độ đường (A), Cường độ ánh sáng (B), Mật độ mẫu cấy (C). Thiết kế thực nghiệm gồm 17 thí nghiệm với 3 biến (A, B, C) ở 3 mức (-1; 0; 1). Các biến độc lập được mã hóa -1 và 1 ở mức thấp và cao. Phạm vi thực hiện và giá trị được thể hiện trong Bảng 1. Tất cả các thí nghiệm được thực hiện ba lần, số lá và số rễ hình thành trung bình thu được dưới dạng biến phụ thuộc (Y). Phương trình đa thức bậc hai sau đây được sử dụng để nghiên cứu ảnh hưởng của các biến đến số lá và số rễ hình thành:

$$Y = \beta_0 + \beta_1A + \beta_2B + \beta_3C + \beta_{11}A^2 + \beta_{22}B^2 + \beta_{33}C^2 + \beta_{12}AB + \beta_{13}AC + \beta_{23}BC$$

Trong đó Y là số lá và số rễ hình thành, β_0 là hằng số; β_1 , β_2 và β_3 là hệ số của các biến tuyến tính, β_{11} , β_{22} và β_{33} là hệ số của các thuật toán bậc hai, và β_{12} , β_{13} và β_{23} là hệ số chéo giữa các biến tương ứng.

Bảng 1. Phạm vi thực nghiệm, mức độ và mã của các biến độc lập

Biến phụ thuộc	Đơn vị	Kí hiệu	Phạm vi và mức giá trị		
			-1	0	+1
Nồng độ đường	g/l	A	0	15	30
Cường độ ánh sáng	$\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	B	45	60	75
Mật độ mẫu cấy	mẫu/bình	C	5	10	15

Môi trường và điều kiện nuôi cấy:

Môi trường nuôi cấy là môi trường khoáng cơ bản MS có bổ sung đường với các nồng độ khác nhau (0 g/L, 15 g/L và 30 g/L) và 6,5 g/L agar. Tất cả môi trường được chỉnh pH về mức 5,8; hấp khử trùng ở nhiệt độ 121°C với áp suất 1 atm trong thời gian 20 phút. Các bình mẫu được đặt trong phòng nuôi cấy ở nhiệt độ 25 ± 2°C, độ ẩm 70 - 80%, thời gian chiếu sáng 12 giờ/ngày với các cường độ chiếu sáng khác nhau 45, 60 và 75 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

Phương pháp lấy số liệu

Chiều cao chồi (cm/mẫu): Được xác định bằng cách dùng thước đo từ gốc đến đỉnh của chồi.

Số rễ/mẫu (rễ/mẫu): Được xác định bằng cách đếm tổng số rễ của mỗi mẫu.

Số lá/mẫu (lá/mẫu): Được xác định bằng cách đếm tổng số lá mở của mỗi mẫu.

Diện tích lá (cm^2 /lá): Chọn 2 cặp lá số 2 và 3 từ chồi đỉnh xuống, diện tích lá được xác định bằng máy đo diện tích lá Li-cor LI-3100C.

Khối lượng tươi (gram/mẫu): Được xác định bằng cách cân sinh khối tươi của mỗi mẫu trên cân phân tích 03 số lẻ.

Khối lượng khô (gram/mẫu): Sinh khối tươi của mỗi mẫu được làm khô đến khối lượng không đổi. Mẫu sinh khối khô được cân trên cân phân tích để xác định khối lượng.

Phương pháp xử lý số liệu

Các số liệu thí nghiệm thu thập được xử lý thống kê bằng phần mềm SPSS Statistics 20 với độ tin cậy $p \leq 95\%$. Phần mềm Design-Expert 11.0 được dùng để đánh giá ảnh hưởng của các yếu tố đến số lá và số rễ hình thành bằng phương pháp bề mặt đáp ứng RSM.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Nghiên cứu ảnh hưởng của sự kết hợp cường độ ánh sáng, nồng độ đường và mật độ mẫu cấy lên quá trình phát triển của cây hoa chuông *in vitro*

Sau 6 tuần nuôi cấy, kết quả thu được cho thấy cường độ ánh sáng, nồng độ đường và mật độ mẫu cấy khác nhau có ảnh hưởng khác nhau lên quá trình sinh trưởng của cây hoa chuông *in vitro* (Bảng 2 và Bảng 3). Các chỉ tiêu tăng dần khi tăng cường độ chiếu sáng lên $60 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, nồng độ đường 15 g/L, mật độ mẫu 10 mẫu/bình và bắt đầu giảm dần khi tiếp tục tăng các yếu tố trên. Cường độ ánh sáng $45 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ và môi trường không bổ sung đường ở cả 3 mật độ nuôi cấy đều không ảnh hưởng đáng kể đến quá trình sinh trưởng của cây hoa chuông *in vitro* với các chỉ tiêu về số lá (2,8 - 4 lá/cây), diện tích lá ($0,55 - 0,72 \text{ cm}^2/\text{lá}$), khối lượng tươi (0,56 - 0,61 g/cây), khối lượng khô (0,04 - 0,05 g/cây) và hầu như cây không phát triển rễ (0,60 - 1,33 rễ/cây); cây phát triển yếu, thân mảnh, khoảng cách giữ các đốt thân dài, lá nhỏ hơn so với các điều kiện nuôi cấy còn lại. Ở cường độ chiếu sáng $60 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, nồng độ đường 15 g/L, mật độ mẫu 10 mẫu/bình có ảnh hưởng đáng kể lên quá trình sinh trưởng của cây hoa chuông *in vitro* với số lá (6,40 lá/cây), số rễ (6,73 rễ/cây), diện tích lá ($1,87 \text{ cm}^2/\text{lá}$), khối lượng tươi (1,53 g/cây) là cao nhất. Cũng ở điều kiện nuôi cấy này, hoa chuông sinh trưởng tốt, cây đồng đều về mặt khối lượng, thân cây to, lá cây to và đậm màu hơn. Mặc dù chiều cao chồi (4,72 cm/chồi) đạt giá trị lớn nhất được tìm thấy ở điều kiện nuôi cấy với cường độ chiếu sáng $60 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, nồng độ đường 0 g/L, mật độ mẫu 15 mẫu/bình nhưng hoa chuông trong bình phát triển không đồng đều (cây nhỏ, cây to,...) có thể là do sự hấp thu dinh dưỡng của mỗi mẫu cấy là khác nhau nên đã dẫn đến tình trạng trên. Từ các kết quả thu được cho thấy, cường độ chiếu sáng $60 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, nồng độ đường 15 g/L, mật độ mẫu 10 mẫu/bình là thích hợp cho quá trình sinh trưởng của cây hoa chuông *in vitro*.

Bảng 2. Ảnh hưởng của sự kết hợp cường độ ánh sáng, nồng độ đường và mật độ mẫu cấy lên quá trình tăng trưởng của cây hoa chuông *in vitro* sau 6 tuần nuôi cấy

STT	CDAS ($\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)	Nồng độ đường (g/L)	Mật độ mẫu cấy (mẫu/bình)	Số lá/mẫu	Số rễ/mẫu	Chiều cao chồi (cm/chồi)
1	45	0	5	$3,20 \pm 1,01^{\text{lk}}$	$1,07 \pm 0,88^{\text{k-m}}$	$2,57 \pm 0,15^{\text{b-d}}$
2	60	0	5	$5,47 \pm 0,92^{\text{c-e}}$	$2,07 \pm 0,96^{\text{j}}$	$2,21 \pm 0,10^{\text{cd}}$
3	75	0	5	$4,40 \pm 1,35^{\text{g-i}}$	$2,00 \pm 0,85^{\text{ij}}$	$1,83 \pm 0,10^{\text{d}}$
4	45	0	10	$2,80 \pm 1,01^{\text{k}}$	$0,45 \pm 0,52^{\text{m}}$	$3,17 \pm 0,18^{\text{bc}}$
5	60	0	10	$4,53 \pm 0,92^{\text{f-i}}$	$3,67 \pm 1,11^{\text{f-h}}$	$2,51 \pm 0,15^{\text{b-d}}$
6	75	0	10	$4,27 \pm 0,70^{\text{g-i}}$	$3,20 \pm 1,01^{\text{h}}$	$2,41 \pm 0,15^{\text{cd}}$
7	45	0	15	$4,00 \pm 0,00^{\text{hi}}$	$0,60 \pm 0,63^{\text{lm}}$	$3,36 \pm 0,91^{\text{bc}}$
8	60	0	15	$5,33 \pm 0,98^{\text{d-f}}$	$3,13 \pm 0,92^{\text{h}}$	$4,72 \pm 0,08^{\text{a}}$
9	75	0	15	$4,53 \pm 0,92^{\text{f-i}}$	$3,33 \pm 0,98^{\text{gh}}$	$2,44 \pm 0,10^{\text{cd}}$
10	45	15	5	$2,80 \pm 1,01^{\text{k}}$	$1,33 \pm 0,82^{\text{j-l}}$	$2,61 \pm 0,17^{\text{b-d}}$
11	60	15	5	$6,13 \pm 1,19^{\text{bc}}$	$5,13 \pm 1,19^{\text{c}}$	$2,59 \pm 0,13^{\text{b-d}}$
12	75	15	5	$5,47 \pm 0,92^{\text{b-d}}$	$4,93 \pm 1,22^{\text{c}}$	$2,23 \pm 0,10^{\text{cd}}$
13	45	15	10	$3,73 \pm 1,28^{\text{k}}$	$1,53 \pm 0,64^{\text{i-k}}$	$3,72 \pm 0,99^{\text{b}}$
14	60	15	10	$6,40 \pm 0,83^{\text{a}}$	$6,73 \pm 0,70^{\text{a}}$	$2,53 \pm 0,16^{\text{cd}}$
15	75	15	10	$4,93 \pm 1,03^{\text{d-g}}$	$5,00 \pm 1,07^{\text{c}}$	$2,41 \pm 0,17^{\text{cd}}$
16	45	15	15	$5,73 \pm 1,03^{\text{b-d}}$	$0,93 \pm 0,70^{\text{k-m}}$	$3,69 \pm 0,38^{\text{b}}$
17	60	15	15	$6,37 \pm 0,92^{\text{b}}$	$4,67 \pm 0,82^{\text{cd}}$	$2,57 \pm 0,18^{\text{b-d}}$
18	75	15	15	$5,47 \pm 0,92^{\text{c-e}}$	$6,00 \pm 1,20^{\text{b}}$	$2,27 \pm 0,14^{\text{cd}}$
19	45	30	5	$3,10 \pm 1,03^{\text{k}}$	$1,13 \pm 0,92^{\text{k-m}}$	$2,37 \pm 0,10^{\text{cd}}$

CÔNG NGHỆ TẾ BÀO

20	60	30	5	4,80 ± 1,01 ^{e-h}	4,73 ± 0,80 ^{cd}	1,72 ± 0,11 ^d
21	75	30	5	5,10 ± 1,67 ^{d-g}	4,13 ± 1,06 ^{d-f}	2,17 ± 0,11 ^{cd}
22	45	30	10	2,40 ± 0,83 ^k	1,45 ± 0,92 ^{i-k}	2,81 ± 0,23 ^{b-d}
23	60	30	10	4,93 ± 1,28 ^{d-g}	4,87 ± 1,06 ^{cd}	2,37 ± 0,21 ^{cd}
24	75	30	10	4,93 ± 1,03 ^{d-g}	4,40 ± 0,74 ^{c-e}	2,39 ± 0,14 ^{cd}
25	45	30	15	4,67 ± 0,98 ^{e-h}	0,60 ± 0,63 ^{lm}	3,13 ± 0,41 ^{bc}
26	60	30	15	6,40 ± 0,83 ^b	4,73 ± 0,88 ^{cd}	2,47 ± 0,24 ^{cd}
27	75	30	15	4,67 ± 0,98 ^{e-h}	3,93 ± 0,96 ^{eg}	2,33 ± 0,12 ^{cd}

Những chữ cái khác nhau (a, b, c...) trong cùng một cột biểu diễn sự khác nhau có ý nghĩa với $\alpha = 0,05$ trong phép thử Duncan's test.

Bảng 3. Ảnh hưởng của sự kết hợp cường độ ánh sáng, nồng độ đường và mật độ mẫu cấy lên quá trình tăng trưởng của cây hoa chuông *in vitro* sau 6 tuần nuôi cấy (tiếp theo)

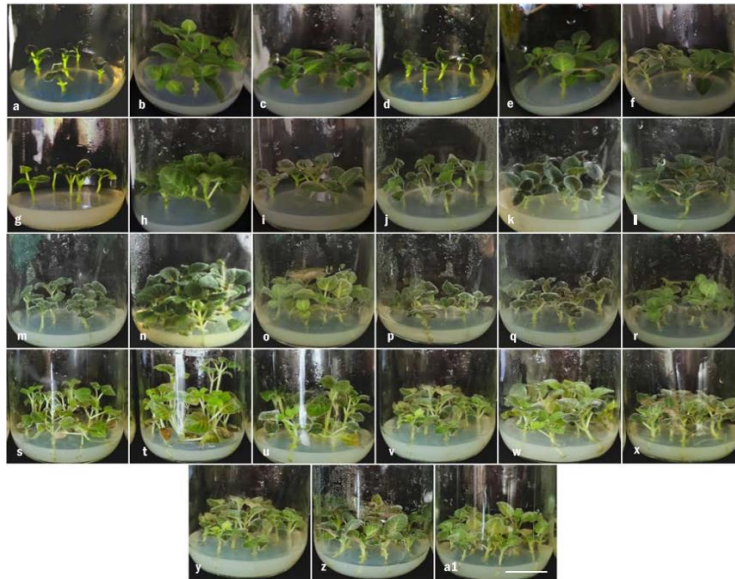
STT	CDAS ($\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)	Nồng độ đường (g/L)	Mật độ mẫu cấy (mẫu/bình)	Diện tích lá ($\text{cm}^2/\text{lá}$)	Khối lượng tươi (g/cây)	Khối lượng khô (g/cây)
1	45	0	5	0,55 ± 0,06 ^l	0,56 ± 0,04 ^{ij}	0,04 ± 0,00 ^g
2	60	0	5	1,68 ± 0,10 ^{d-f}	1,21 ± 0,05 ^g	0,10 ± 0,01 ^d
3	75	0	5	1,53 ± 0,12 ^{gi}	1,45 ± 0,02 ^{bc}	0,12 ± 0,01 ^b
4	45	0	10	0,59 ± 0,05 ^l	0,61 ± 0,05 ⁱ	0,04 ± 0,00 ^g
5	60	0	10	1,64 ± 0,12 ^{d-f}	1,24 ± 0,03 ^{fg}	0,01 ± 0,00 ^d
6	75	0	10	1,50 ± 0,09 ^{h-j}	1,43 ± 0,04 ^{bc}	0,12 ± 0,01 ^b
7	45	0	15	0,72 ± 0,14 ^k	0,57 ± 0,06 ^{ij}	0,04 ± 0,00 ^g
8	60	0	15	1,80 ± 0,22 ^{ab}	1,26 ± 0,06 ^{e-g}	0,10 ± 0,00 ^d
9	75	0	15	1,56 ± 0,20 ^{f-h}	0,70 ± 0,05 ^h	0,05 ± 0,00 ^e
10	45	15	5	0,62 ± 0,05 ^{kl}	0,55 ± 0,01 ^{ij}	0,05 ± 0,01 ^{ef}
11	60	15	5	1,75 ± 0,09 ^{b-d}	1,29 ± 0,02 ^{d-f}	0,10 ± 0,01 ^d
12	75	15	5	1,40 ± 0,15 ^j	1,47 ± 0,01 ^{a-c}	0,11 ± 0,01 ^{bc}
13	45	15	10	0,60 ± 0,05 ^l	0,59 ± 0,06 ⁱ	0,05 ± 0,01 ^{e-g}
14	60	15	10	1,87 ± 0,16 ^a	1,53 ± 0,05 ^a	0,11 ± 0,01 ^b
15	75	15	10	1,68 ± 0,08 ^{c-e}	1,50 ± 0,02 ^{ab}	0,13 ± 0,00 ^a
16	45	15	15	0,57 ± 0,11 ^l	0,55 ± 0,03 ^{ji}	0,04 ± 0,00 ^{fg}
17	60	15	15	1,78 ± 0,25 ^{a-c}	1,31 ± 0,02 ^{d-e}	0,10 ± 0,01 ^{cd}
18	75	15	15	1,46 ± 0,12 ^{h-j}	1,24 ± 0,03 ^{fg}	0,10 ± 0,00 ^d
19	45	30	5	0,56 ± 0,07 ^l	0,57 ± 0,03 ^{ji}	0,04 ± 0,00 ^{fg}
20	60	30	5	1,72 ± 0,07 ^{b-e}	1,31 ± 0,05 ^{de}	0,1 ± 0,01 ^{cd}
21	75	30	5	1,65 ± 0,06 ^{d-f}	1,43 ± 0,02 ^{bc}	0,12 ± 0,00 ^b
22	45	30	10	0,59 ± 0,04 ^l	0,57 ± 0,03 ^{ji}	0,05 ± 0,01 ^f
23	60	30	10	1,62 ± 0,09 ^{e-g}	1,33 ± 0,01 ^d	0,12 ± 0,01 ^b
24	75	30	10	1,42 ± 0,24 ^j	1,49 ± 0,02 ^{ab}	0,12 ± 0,00 ^b
25	45	30	15	0,63 ± 0,10 ^{kl}	0,51 ± 0,04 ⁱ	0,04 ± 0,00 ^g
26	60	30	15	1,65 ± 0,28 ^{d-f}	1,43 ± 0,02 ^{bc}	0,12 ± 0,00 ^b
27	75	30	15	1,44 ± 0,15 ^{ji}	1,2 ± 0,05 ^g	0,10 ± 0,00 ^d

Những chữ cái khác nhau (a, b, c...) trong cùng một cột biểu diễn sự khác nhau có ý nghĩa với $\alpha = 0,05$ trong phép thử Duncan's test.

Đối với sự sinh trưởng của thực vật, ánh sáng là một trong những yếu tố rất quan trọng góp phần cung cấp năng lượng xúc tác cho nhiều quá trình sinh học và sinh lý của thực vật, bao gồm quá trình tạo chất dinh dưỡng, quang hợp và quá trình sinh sản của thực vật. Trong đó, quang hợp là quá trình tiêu biểu ở thực vật, chuyển hóa quang năng thành hóa năng để thực hiện quá trình tổng hợp chất hữu cơ (Singh *et al.*, 2014). Từ đó cây sẽ có đủ năng lượng để phát triển lá, rễ, chiều cao chồi cũng như các yếu tố khác. Khi không nhận đủ ánh sáng có thể khiến các quá trình sinh học trong cây bị trì trệ từ đó dẫn đến hiện tượng cây phát triển kém, mọc ít lá, rễ hoặc lá non bị vàng và khô. Khi cường độ ánh sáng quá mạnh cũng sẽ ảnh hưởng đến quá trình phát triển của thực vật, nó có thể gây ra sự oxy hóa các tế bào, làm cháy lá dẫn đến giảm khả năng hấp thụ nước và chất dinh dưỡng ở thực vật (Tang *et al.*, 2022). Trong nghiên cứu này, cường độ ánh sáng trung bình (khoảng $60 - 70 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) cũng đưa ra những kết quả tối ưu cho đa số các chỉ tiêu theo dõi quá trình sinh trưởng của cây hoa chuông so với các cường độ ánh sáng còn lại. Kết quả này cũng tương đồng với nghiên cứu của Akincilar và đồng tác giả (2015) về ảnh hưởng của ánh sáng đến sự sinh trưởng *in vitro* và nở hoa của cây hoa hồng khi nuôi cấy ở cường độ ánh sáng trung bình (khoảng $50 - 70 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) cho ra những cây con có thân cao, khỏe và nhiều nụ hoa hơn so với cả cường độ ánh sáng quá thấp hoặc quá cao. Tương tự, nghiên cứu của Nhut và đồng tác giả (2003) cũng ghi nhận cây dâu tây *in vitro* sinh trưởng tốt nhất ở chế độ sáng 70% đèn LED đỏ kết hợp 30% LED xanh dương với cường độ ánh sáng tối ưu là $60 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

Trong quá trình nuôi cấy *in vitro*, hiệu suất của quá trình quang hợp ở cây con thường khá thấp do cường độ ánh sáng yếu, độ ẩm không khí cao và thiếu trao đổi khí; vì vậy, cây con cần được bổ sung thêm các loại carbohydrate để cung cấp nguồn carbon và năng lượng cho sự phát triển của chúng trong nuôi cấy *in vitro* (Kozai *et al.*, 1997). Sucrose là loại carbohydrate thường được bổ sung thêm vào môi trường nuôi cấy. Nó là một loại disaccharide có chức năng vận chuyển phân tử, có độ hòa tan cao trong nước và dễ dàng đi qua màng tế bào (Javed, Ikram, 2008). Sucrose ảnh hưởng đến sự phát triển của tế bào bằng cách duy trì áp suất thẩm thấu trong tế bào, giúp tăng sự phát triển hoặc kích thước của cây con. Khi cây được chuyển từ môi trường có nồng độ đường sucrose cao qua môi trường nuôi cấy không bổ sung đường, cây con chưa thích nghi việc chuyển hóa CO_2 trong không khí thành năng lượng tự dưỡng. Bên cạnh đó, thí nghiệm được tiến hành trong bình kín nên sự trao đổi khí kém, hàm lượng CO_2 trong bình nuôi cấy thấp dẫn đến cây bị stress và chậm tăng trưởng. Trong khi đó, những cây được nuôi cấy trong môi trường có nồng độ đường sucrose 15 g/L và 30 g/L thì phát triển tốt hơn. Nguyên nhân là do khi cây nuôi cấy ở môi trường có đường, cây sử dụng cả hai nguồn carbon (đường sucrose trong môi trường và CO_2 trong không khí) để quang hợp nên cây có sự tăng trưởng tốt hơn.

Bên cạnh cường độ ánh sáng và nồng độ đường, mật độ mẫu cấy cũng có ảnh hưởng đến sự phát triển của cây con nuôi cấy *in vitro*. Mật độ mẫu cấy có mối tương quan mật thiết đối với thể tích môi trường nuôi cấy cũng như sự cạnh tranh dinh dưỡng giữa các mẫu cấy. Kết quả của thí nghiệm cho thấy được mật độ 10 mẫu/bình là mật độ tối ưu cho sự phát triển của cây hoa chuông, với các chỉ tiêu như số lá, số rễ, chiều cao thân đều ở mức tốt nhất trong cả ba mật độ nuôi cấy được thí nghiệm. Ở mật độ 5 mẫu/bình thì số lá, số rễ của mẫu cấy phát triển không được tốt nhưng diện tích lá lại có sự phát triển một cách đáng kể, ở mật độ 15 mẫu/bình thì các chỉ số quan sát được đều ở mức thấp. Nguyên nhân của hiện tượng này có thể là do mẫu cấy có sự cạnh tranh dinh dưỡng hoặc chịu ảnh hưởng bởi không gian nuôi cấy. Theo nghiên cứu của Yildiz và đồng tác giả (2011) ghi nhận khi tăng mật độ mẫu cấy trụ dưới lá mầm cây *Linum usitatissimum* thì số chồi và chiều cao chồi cũng có sự gia tăng. Ngược lại, khi mật độ mẫu cấy quá thấp dẫn đến việc tích lũy quá nhiều nước, đường sucrose và chất dinh dưỡng khiến mẫu cấy bị stress thẩm thấu làm giảm các chỉ tiêu sinh trưởng. Nghiên cứu của Trần Thị Bích Hạnh và đồng tác giả (2013) cũng đã ghi nhận rằng mật độ mẫu cấy cũng ảnh hưởng đến sự phát triển của chồi lan Kim Hải trong nuôi cấy *in vitro*. Ở mật độ mẫu cấy 4 - 5 mẫu/bình cho kết quả tốt nhất về chiều cao chồi, số lá, số rễ, chiều dài rễ. Tuy nhiên, các chỉ tiêu tăng trưởng giảm dần khi tăng mật độ mẫu cấy. Nghiên cứu của Prabhuling và Sathyanarayana (2017) về mật độ mẫu cấy cây chuối cũng chỉ ra khi mật độ từ 3 đến 5 mẫu sẽ có những chất kích thích sinh trưởng được giải phóng khiến cho sự phát triển của cây chuối tăng lên đáng kể.



Hình 1. Cây con hoa chuông sau 6 tuần nuôi cấy *in vitro* (thanh kích thước 2 cm)

- a, b, c: Nồng độ đường 0 g/L, mật độ mẫu cấy 5 mẫu/bình, cường độ ánh sáng lần lượt là 45, 60 và 75 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.
 d, e, f: Nồng độ đường 15 g/L, mật độ mẫu cấy 5 mẫu/bình, cường độ ánh sáng lần lượt là 45, 60 và 75 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.
 g, h, i: Nồng độ đường 30 g/L, mật độ mẫu cấy 5 mẫu/bình, cường độ ánh sáng lần lượt là 45, 60 và 75 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.
 j, k, l: Nồng độ đường 0 g/L, mật độ mẫu cấy 10 mẫu/bình, cường độ ánh sáng lần lượt là 45, 60 và 75 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.
 m, n, o: Nồng độ đường 15 g/L, mật độ mẫu cấy 10 mẫu/bình, cường độ ánh sáng lần lượt là 45, 60 và 75 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.
 p, q, r: Nồng độ đường 30 g/L, mật độ mẫu cấy 10 mẫu/bình, cường độ ánh sáng lần lượt là 45, 60 và 75 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.
 s, t, u: Nồng độ đường 0 g/L, mật độ mẫu cấy 15 mẫu/bình, cường độ ánh sáng lần lượt là 45, 60 và 75 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.
 v, w, x: Nồng độ đường 15 g/L, mật độ mẫu cấy 15 mẫu/bình, cường độ ánh sáng lần lượt là 45, 60 và 75 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.
 y, z, a1: Nồng độ đường 30 g/L, mật độ mẫu cấy 15 mẫu/bình, cường độ ánh sáng lần lượt là 45, 60 và 75 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

Tối ưu hóa các yếu tố cường độ ánh sáng, nồng độ đường và mật độ mẫu cấy đến sự hình thành lá và rễ của cây hoa chuông nuôi cấy *in vitro*

Phương pháp bề mặt đáp ứng đã dự đoán tác động đơn lẻ cũng như tương tác của ba yếu tố: cường độ ánh sáng, nồng độ đường và mật độ mẫu cấy lên sự hình thành số lá và số rễ. Hệ số tương quan và kết quả ANOVA cho từng chỉ tiêu được thể hiện trong Bảng 5. Hệ số tương quan của các chỉ tiêu đều tiến gần 1 (0,98).

Bảng 4. Số liệu thống kê điều kiện nuôi cấy hoa chuông bằng phương pháp bề mặt đáp ứng của phần mềm Design Expert 11.0

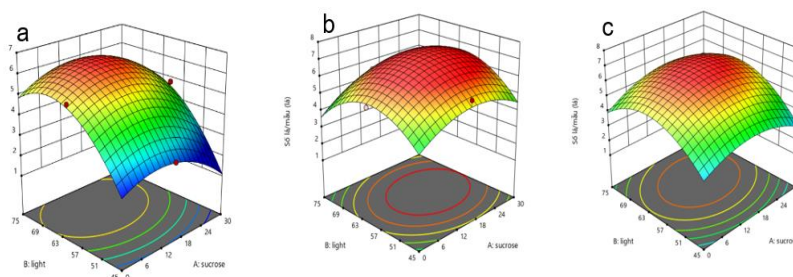
Run	Nồng độ đường g/L	CDAS $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	Mật độ mẫu cấy Mẫu/bình	Số lá/mẫu	Số rễ/mẫu
1	0	75	10	4,30	3,20
2	15	60	10	6,40	6,73
3	15	45	15	5,73	0,93
4	15	75	15	5,47	6,00
5	15	45	5	2,80	1,33
6	0	60	5	5,47	2,07
7	0	60	15	5,33	3,13
8	15	60	10	6,40	6,73
9	30	60	5	4,80	4,73
10	15	75	5	5,47	4,93

11	15	60	10	6,40	6,73
12	30	60	15	6,40	4,73
13	30	45	10	2,40	1,46
14	15	60	10	6,40	6,73
15	15	60	10	6,40	6,73
16	30	75	10	4,93	4,40
17	0	45	10	2,80	0,46

Bảng 5. Số liệu thống kê ANOVA và hồi quy tuyến tính của các chỉ tiêu được phân tích bằng phương pháp bề mặt đáp ứng sử dụng phần mềm Design Expert 11.0

Chỉ tiêu theo dõi	R ²	F-value	p-value	
Số lá/cây	0,98	37,41	< 0.0001	significant
Số rễ/cây	0,98	38,17	< 0.0001	significant

Significant: các nghiệm thức có ý nghĩa thống kê



Hình 2. Biểu đồ 3D ảnh hưởng của ánh sáng, nồng độ đường ở 3 mật độ mẫu cây lên sự hình thành số lá của cây hoa chuông *in vitro* sau 6 tuần nuôi cấy, trong đó (a): mật độ 5 mẫu/bình, (b): mật độ 10 mẫu/bình, (c): mật độ 15 mẫu/bình

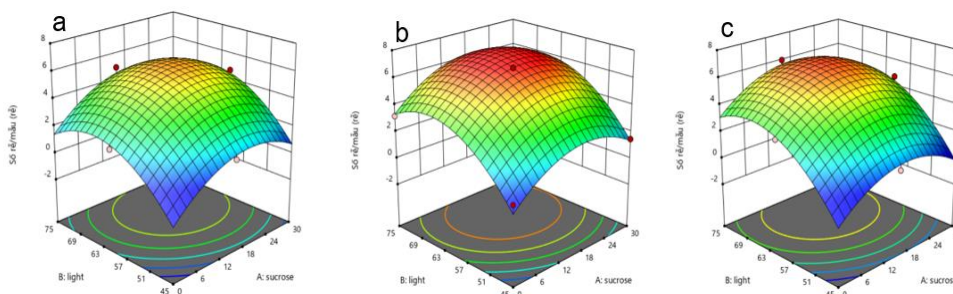
Liên quan đến sự phát triển của lá, sự khác biệt đã được quan sát thấy khi so sánh số lá thu được ở 3 mật độ nuôi cấy khác nhau. Ở mật độ mẫu cây thấp (5 mẫu/bình), số lá thu được cao nhất ở mức ánh sáng trung bình và có xu hướng giảm dần khi cường độ ánh sáng giảm; nồng độ đường không ảnh hưởng đáng kể đến hình thành số lá ở mật độ nuôi cấy này. Với mật độ mẫu cây trung bình, tác động mạnh mẽ của cường độ ánh sáng và nồng độ đường lên sự phát triển của lá cây đã được quan sát. Lá cây phát triển mạnh ở mức ánh sáng và nồng độ đường trung bình, ít phát triển hơn khi tăng hay giảm hai yếu tố trên. Giá trị cao nhất (6,40 lá/mẫu) đạt được ở nồng độ đường 15 g/L, cường độ ánh sáng trung bình (55 - 70 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Tương tự với mật độ mẫu cây trung bình, ở mật độ mẫu cây cao, số lá trên một mẫu có giá trị cao khi môi trường nuôi cấy có bổ sung đường và cường độ ánh sáng ở mức trung bình.

Bằng cách áp dụng phân tích dữ liệu thử nghiệm, mô hình biểu diễn mối quan hệ giữa nồng độ đường, cường độ ánh sáng và mật độ mẫu cây đối với số lượng lá hình thành được biểu thị bằng phương trình bậc hai sau đây:

$$Y = -1,08A^2 - 1,7125B^2 + 0,18C^2 + 0,2575AB + 0,435AC - 0,7325BC + 0,07875A + 0,805B + 0,54875C + 6,4$$

Trong đó, Y là số lá/mẫu, A, B, C lần lượt là nồng độ đường, cường độ ánh sáng và mật độ mẫu.

Mô hình toán học và hệ số tương quan thu được cho thấy, số lá hình thành có tương quan rất chặt với nồng độ đường, cường độ ánh sáng và mật độ mẫu ($R = 0,98$).



Hình 3. Biểu đồ 3D ảnh hưởng của ánh sáng, nồng độ đường ở 3 mật độ mẫu cây lên sự hình thành rễ của cây hoa chuông *in vitro* sau 6 tuần nuôi cấy, trong đó (a): mật độ 5 mẫu/bình, (b): mật độ 10 mẫu/bình, (c): mật độ 15 mẫu/bình

Với sự phát triển của bộ rễ, biểu đồ 3D đã chỉ ra rằng, hầu như bộ rễ của cây hoa chuông không phát triển hay không có sự hiện diện của rễ khi nuôi cấy trong điều kiện ánh sáng thấp ở cả 3 mật độ nuôi cấy hay nồng độ đường. Rễ cây hoa chuông chỉ bắt đầu xuất hiện khi tăng cường độ ánh sáng lên mức trung bình và đây cũng là điều kiện ánh sáng tốt nhất đối với sự phát triển của bộ rễ. Số rễ cho thấy sự tác động độc lập đáng kể giữa cường độ ánh sáng, nồng độ đường và có sự tương đồng giữa các mật độ mẫu cấy. Giá trị cao nhất được tìm thấy ở cường độ ánh sáng trung bình ($55 - 70 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), nồng độ đường trung bình (15 g/L) và mật độ mẫu cấy trung bình (10 mẫu/bình). Việc tăng hay giảm cường độ ánh sáng và nồng độ đường làm giảm đi số lượng của chỉ tiêu này.

Bằng cách áp dụng phân tích dữ liệu thử nghiệm, mô hình biểu diễn mối quan hệ giữa nồng độ đường, cường độ ánh sáng và mật độ mẫu cấy đối với số lượng rễ hình thành được biểu thị bằng phương trình bậc hai sau đây:

$$Y = -1,99125A^2 - 2,35875B^2 - 1,07375C^2 + 0,05AB - 0,265AC + 0,3675BC + 0,8075A + 1,79375B + 0,21625C + 6,73$$

Trong đó, Y là số rễ/mẫu, A, B, C lần lượt là nồng độ đường, cường độ ánh sáng và mật độ mẫu cấy.

Mô hình toán học và hệ số tương quan thu được cho thấy, tỷ lệ rễ hình thành có tương quan rất chặt với nồng độ đường, cường độ ánh sáng và mật độ mẫu ($R = 0,98$).

Bảng 6. Điều kiện nuôi cấy tối ưu cho cây hoa chuông *in vitro* được dự đoán bằng phương pháp bề mặt đáp ứng

Stt	Nồng độ đường g/l	CDAS $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	Mật độ mẫu cấy mẫu/bình	Số lá/mẫu	Số rễ/mẫu
1	14,66	68,37	10,78	6,34	7,02

KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, phương pháp bề mặt đáp ứng (RSM) được sử dụng để phân tích và tối ưu hóa quá trình tăng trưởng *in vitro* của cây hoa chuông *Sinningia speciosa*. Sự tương tác của ba yếu tố nồng độ đường, cường độ ánh sáng và mật độ mẫu cấy (0 đến 30 g/L đường, cường độ ánh sáng 45 đến $75 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ và mật độ mẫu 5 đến 15 mẫu/bình) được thể hiện qua các chỉ tiêu tăng trưởng của cây hoa chuông *in vitro*. Kết quả đánh giá ảnh hưởng của sự kết hợp cường độ ánh sáng, nồng độ đường và mật độ mẫu cấy lên quá trình tăng trưởng của cây hoa chuông *in vitro* cho thấy cường độ chiếu sáng $60 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, nồng độ đường 15 g/L, mật độ mẫu 10 mẫu/bình cho hiệu quả nuôi cấy tốt nhất. Thông qua phân tích bằng phương pháp bề mặt đáp ứng, các chỉ tiêu sinh trưởng của mẫu cấy cây hoa chuông như số lá, số rễ, diện tích lá, chiều cao cây, có tương quan chặt chẽ với các yếu tố khảo sát nhưng các yếu tố khảo sát này lại không tác động đến khả năng nhân chồi của mẫu cấy (số liệu chưa được công bố). Quy trình đã cơ bản tạo ra những cây con phát triển tốt, đồng đều sau 6 tuần nuôi cấy. Việc sử dụng phương pháp mô hình hóa cho phép dự đoán các điều kiện tăng trưởng thực vật tốt nhất là sự kết hợp giữa nồng độ đường 14,66 g/L, cường độ ánh sáng $68,37 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ và mật độ mẫu cấy 10,78 mẫu/bình.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Akincilar B, Canli FA (2015). Effect of light intensity on *in vitro* growth and flowering of 'Aprikola' rose. *Cell & Plant Sci*, 5(1): 15 – 19.
- Javed F, Ikram S (2008). Effect of sucrose induced osmotic stress on callus growth and biochemical aspects of two wheat genotypes. *Pak J Bot*, 40(4): 1487 – 1495.
- Kathiresan S, Sarada R, Bhattacharya S, Ravishankar GA (2007). Culture Media Optimization for Growth and Phycoerythrin Production from *Porphyridium purpureum*. *Biotechnol Bioeng*, 96: 456-463.
- Kozai T, Kubota C, Ryoung Jeong B (1997). Environmental control for the large-scale production of plants through *in vitro* techniques. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, (51): 49 – 56.
- Lu WK, Chiu TY, Hung SH, Shih IL, Chang YN (2004). Use of Response Surface Methodology to Optimize Culture Medium for Production of Poly- γ -glutamic Acid by *Bacillus licheniformis*. *Intl J Appl Sci Eng*, 1: 49-58.
- Murashige T, Skoog F (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol Plant*, 15: 473-497.
- Nhut DT, Takamura T, Watanabe H, Okamoto K, Tanaka M (2003). Responses of strawberry plantlets cultured *in vitro* under superbright red and blue light-emitting diodes (LEDs). *Plant Cell Tiss Organ Cult*, (73): 43 – 52.
- Nhut DT, Teixeira da Silva JA, Aswth CR (2003). The importance of the explant on regeneration in thin cell layer technology. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant*, (39): 266 – 276.
- Pang JL, Wang LL, Hu JQ, Xiang TH, Liang HM (2006). Synergistic promotion of gibberellin and cytokinin on direct regeneration of floral buds from *in vitro* cultures of sepal segments in *Sinningia speciosa* Hiern. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant*, 42: 450-454.
- Prabhuling G, Sathyanarayan BN (2017) Optimization of explants density for tissue culture propagation of banana cv. 'GRANDE NAINÉ'. *Internat J Agric Sci*, 13(1): 71 – 76.
- Sharma S, Sharma M (2013). Improved protocol for *in vitro* propagation of gloxinia (*Sinningia* sp.). *J Cell Tissue Research*, 13(1): 3545-3548.

- Singh P, Patel RM (2014). Factors influencing *in vitro* growth and shoot multiplication of pomegranate. *The Bioscan*, 9(3): 1031 – 1035.
- Tang W, Guo H, Baskin CC, Xiong W, Yang C, Li Z, Song H, Wang T, Yin J, Wu X, Miao F, Zhong S, Tao Q, Zhao Y, Sun J (2022). Effect of light intensity on morphology, photosynthesis and carbon metabolism of alfalfa (*Medicago sativa*) seedlings. *Plants*, 11(13): 1688.
- Trần Ngọc Truồi, Nguyễn Đăng Nhật, Nguyễn Văn Đức, Trần Thị Triều Hà, Nguyễn Tiến Long, Lã Thị Thu Hằng (2017). Nghiên cứu ảnh hưởng của hệ thống chiếu sáng đơn sắc đến quá trình nhân giống *in vitro* cây hoa chuông (*Sinningia speciosa*). *Tạp chí Khoa học và công nghệ nông nghiệp Trường Đại học Nông Lâm Huế*, 1(1): 195-204.
- Trần Thị Bích Hạnh, Vũ Quốc Luận, Nguyễn Bá Nam, Lê Kim Cương, Nguyễn Phúc Huy, Dương Tấn Nhựt (2013). Ảnh hưởng của BA, KIN, TDZ, GA3 và mật độ mẫu cây lên sự sinh trưởng và phát triển của chồi lan kim hải (*Paphiopedilum Villosum*) nuôi cấy *in vitro*. *Hội nghị khoa học công nghệ sinh học toàn quốc*.
- Võ Thanh Phúc, Nguyễn Duy Linh, Nguyễn Duy (2022). Ảnh hưởng của hàm lượng khoáng và tiền xử lý auxin đến sinh trưởng của cây Hoa chuông (*Sinningia speciosa*) và Sâm Bò chính (*Hibiscus sagittifolius* Kurz) nuôi cấy vi thủy canh. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ, Đại học Đà Nẵng*, 43 – 48.
- Xu Q, Zhe Hu L, Li CY, Wang XY, Wang CY (2009). Tissue culture of *Sinningia speciosa* and analysis of the *in vitro*-generated tricusate whorled phyllotaxis (twp) variant. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant*, 45(5): 583-590.
- Yildiz M, Sağlık Ç, Telci C, Erkişçi EG (2011). The effect of *in vitro* competition on shoot regeneration from hypocotyl explants of *Linum usitatissimum*. *Turk J Bot*, (35): 211 – 218.

EVALUATION OF THE EFFECTS OF LIGHT INTENSITY, SUGAR CONCENTRATION AND INOCULUM DENSITY ON THE GROWTH OF *Sinningia speciosa* BY THE RESPONSE SURFACE METHOD

Do Dang Giap¹, Tran Trong Tuan¹, Nguyen Thi Huyen Trang¹, Nguyen Thi Xuan Trang¹, Nguyen Thi Thu Hang¹, Hoang Van Nam^{1,2}, Ngo Thi Thanh Nhan², Vo Thanh Phuc², Dang Thi Kim Thuy^{1*}

¹ Institute of Tropical Biology, Vietnam Academy of Science and Technology (VAST)

² Faculty of Food Science and Technology, Ho Chi Minh City University of Industry and Trade

³ Faculty of Chemical Engineering, Ho Chi Minh City University of Technology

SUMMARY

In this study, the response surface method was used to analyze and optimize the *in vitro* growth process of *Sinningia speciosa*. Accordingly, the shoots of *in vitro* Gloxinia were cultured at different densities (5, 10, and 15 samples/jar) on MS medium supplemented with sugar at various concentrations (0, 15, and 30 g/L). All sample jars were cultured under lighting conditions with various intensities (45, 60, and 75 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). The results of evaluating the effects of the combination of light intensity, sugar concentration, and inoculum density on the growth of *in vitro* Gloxinia showed that the light intensity of 60 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, sugar concentration of 15 g/L, and sample density of 10 samples/jar gave the best culture efficiency. Through analysis using the response surface method, growth indicators of Gloxinia, such as the number of leaves, number of roots, leaf area, and plant height, were closely correlated with survey factors. Still, these investigated factors did not affect the shoot multiplication ability of the explants. The process created well-developed, uniform plantlets after six weeks of culture. The modeling method that allowed for predicting the best plant growth conditions were a combination of sugar concentration of 14.66 g/L, light intensity 68.37 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, and culture density of 10.78 samples/jar. However, these parameters need to be experimentally verified to compare and evaluate the effectiveness of modeling.

Keywords: *Sinningia speciosa*, light intensity, *in vitro*, inoculum density, sugar concentration, modeling

* Author for correspondence: Tel: 0984921268; Email: dtkt Huy@gmail.com