

Tìm hiểu sự tăng trưởng hành *in vitro* ở Lily Sorbonne

- Trần Thanh Thắng
- Trần Thanh Hương

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM

(Bài nhận ngày 12 tháng 12 năm 2016, nhận đăng ngày 10 tháng 04 năm 2017)

TÓM TẮT

Trong nghiên cứu này, ảnh hưởng của điều kiện sáng và tối, nồng độ sucrose và các chất điều hòa tăng trưởng thực vật thay đổi trên sự tăng trưởng hành (còn gọi là “củ”) từ chồi Lily trong điều kiện nuôi cấy *in vitro* được khảo sát. Các biến đổi hình thái, sinh lý và sinh hóa trong quá trình tăng trưởng của hành được phân tích. Điều kiện sáng giúp chồi phát triển thành cây trong khi điều kiện tối giúp tạo hành. Sucrose (90 g/L) giúp tế bào vây hành gia tăng kích thước và tích lũy tinh bột. 6-Benzylaminopurine (BA 1,5 mg/L) kích thích phân chia tế bào, giúp gia tăng số lớp tế bào nhu mô và số vây hành. Sự phối hợp sucrose 90 g/L và BA 1,5 mg/L trong điều kiện

tối cảm ứng mạnh sự phân chia, tăng rộng và tích lũy tinh bột của tế bào nhu mô, từ đó giúp gia tăng kích thước và số lượng vây hành, kích thước và trọng lượng của hành. Trong sự tăng trưởng hành có sự gia tăng cường độ hô hấp, hoạt tính zeatin và tích lũy tinh bột. Mối liên hệ giữa điều kiện sáng và tối, nồng độ sucrose, các chất điều hòa tăng trưởng thực vật, cường độ hô hấp, sự tích lũy tinh bột và sự tăng trưởng hành được thảo luận. Môi trường MS có sự phối hợp sucrose 90 g/L, BA 1,5 mg/L và zeatin 0,5 mg/L thích hợp cho sự tăng trưởng *in vitro* cho hành Lily, đặc biệt là sự gia tăng số vây hành (chiều rộng 2,5 cm, chiều dài 2,7 cm; 16-17 số vây).

Từ khóa: chất điều hòa tăng trưởng thực vật, điều kiện tối, Lily, sucrose, tăng trưởng *in vitro* củ hành

MỞ ĐẦU

Lily là một trong những loài hoa đẹp, được ưa chuộng và có giá trị kinh tế cao. Trong tự nhiên, cây Lily có thể phát triển từ hạt hoặc hành (còn gọi là “củ”). Tuy nhiên, sự nảy mầm của hạt Lily cần thời gian khá dài (khoảng 2 tháng). Bên cạnh đó, tỉ lệ nảy mầm của hạt thấp và cây con sau khi nảy mầm tăng trưởng chậm dẫn đến thời gian cần để cây ra hoa bị kéo dài. Do đó, trong sản xuất, hành Lily thường được sử dụng làm giống vì giúp rút ngắn thời gian để thu hoạch hoa [1]. Sự tạo hành giống có thể được thực hiện nhờ phương pháp giâm vây hành trong vườn ươm hay *in vitro*. Việc sử dụng kỹ thuật nuôi cấy *in vitro* có khả năng cung cấp một số lượng lớn hành giống. Do vậy, bên cạnh sự tạo cây *in vitro*, sự tạo hành giống là một trong những phương pháp được

đặc biệt chú ý. Vấn đề đặt ra hiện nay là các hành thu được nhờ kỹ thuật nuôi cấy *in vitro* thường có kích thước nhỏ (1–1,3 cm), số lượng vây hành ít (5–7 vây) [2]. Khi chuyển ra vườn ươm, các hành này tăng trưởng chậm. Sự tăng trưởng của các hành có nguồn gốc *in vitro* chủ yếu là do sự gia tăng kích thước của các vây hành có sẵn, sự tạo vây hành mới rất ít. Trong sản xuất hoa Lily cắt cành, kích thước và số vây của hành giống là một trong những yếu tố quyết định chất lượng và thời gian thu hoạch hoa [3]. Chính vì vậy, nghiên cứu tập trung vào tìm hiểu các biến đổi hình thái trong quá trình tăng trưởng *in vitro* của hành Lily, phân tích vài yếu tố sinh lý và sinh hóa ảnh hưởng đến quá trình này, đặc biệt là sự gia tăng kích

thước và số vảy của hành, làm cơ sở khoa học cho việc cải thiện chất lượng hành giống.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Chồi Lily *in vitro* 4 tuần tuổi có chiều rộng và chiều cao khoảng 0,8-1 cm (có nguồn gốc từ sự nuôi cấy vảy hành *in vitro*), tăng trưởng trên môi trường Murashige và Skoog căn bản với sucrose 30 g/L (MS) [4].

Khảo sát ảnh hưởng của điều kiện chiếu sáng trên sự tăng trưởng hành Lily *in vitro*

Các chồi Lily *in vitro* 4 tuần tuổi được cô lập và cấy vào erlen 250 mL chứa 30 mL môi trường MS. Các mẫu cấy được đặt nuôi trong tối hoặc ở điều kiện ánh sáng 2000 ± 200 lux (12/24 giờ), nhiệt độ 22 ± 2 °C và ẩm độ 58 ± 3 %. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần, mỗi lần 5 erlen, mỗi erlen gồm 5 mẫu cấy. Sau 8 tuần nuôi cấy, số lá, chiều dài lá, chiều rộng và chiều cao hành, số vảy/hành, số rễ, trọng lượng tươi và khô của hành được xác định.

Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ sucrose trên sự tăng trưởng của hành Lily *in vitro*

Các chồi 4 tuần tuổi được cô lập và cấy vào trong bình nuôi cấy 100 mL chứa 30 mL môi trường MS với sucrose ở các nồng độ 30, 60, 90 hay 120 g/L. Các mẫu cấy được đặt nuôi trong tối, ở 22 ± 2 °C và ẩm độ 58 ± 3 %. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần, mỗi lần 15 bình nuôi cấy, mỗi bình nuôi cấy gồm 1 mẫu cấy. Sau 8 tuần nuôi cấy, chiều rộng và chiều cao hành, số vảy/hành, trọng lượng tươi và khô của hành được xác định.

Khảo sát ảnh hưởng của các chất điều hòa tăng trưởng thực vật trên sự tăng trưởng hành Lily *in vitro*

Các chồi 4 tuần tuổi được cô lập và cấy vào trong bình nuôi cấy 100 mL chứa 30 mL môi trường MS hay MS có bổ sung indole-3-acetic acid (IAA) hay 6-Benzylaminopurine (BA) ở các nồng độ 0,5; 1,0; 1,5 hay 2,0 mg/L. Các mẫu cấy được đặt nuôi trong tối, ở

nhiệt độ 22 ± 2 °C và ẩm độ 58 ± 3 %. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần, mỗi lần 15 bình nuôi cấy, mỗi bình nuôi cấy gồm 1 mẫu cấy. Sau 8 tuần nuôi cấy, chiều rộng và chiều cao hành, số vảy/hành, trọng lượng tươi và khô của hành được xác định.

Khảo sát ảnh hưởng của sự phối hợp sucrose và BA trên sự tăng trưởng của hành Lily *in vitro*

Các chồi 4 tuần tuổi được cô lập và cấy vào trong bình nuôi cấy 100 mL chứa 30 mL môi trường MS hay MS với sucrose 90 g/L và BA 1,5 mg/L, riêng lẻ hay phối hợp. Các mẫu cấy được đặt nuôi trong tối, ở nhiệt độ 22 ± 2 °C và ẩm độ 58 ± 3 %. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần, mỗi lần 15 bình nuôi cấy, mỗi bình nuôi cấy gồm 1 mẫu cấy. Sau 8 tuần nuôi cấy, chiều rộng và chiều cao hành, số vảy/hành, trọng lượng tươi và khô của hành, tỉ lệ mẫu tạo rễ được xác định.

Xác định trọng lượng tươi và trọng lượng khô của hành Lily *in vitro*

Trọng lượng tươi và trọng lượng khô của mẫu cấy được xác định bằng cân phân tích (PA213, Ohaus, USA). Trọng lượng tươi được xác định bằng cách cân trực tiếp. Trọng lượng khô được xác định sau khi mẫu được sấy liên tục ở 110 °C trong 5 phút và 70 °C cho đến khi trọng lượng không đổi [5].

Quan sát các biến đổi hình thái

Sự tăng trưởng của vảy hành được xác định sau sự cắt bằng tay qua vị trí giữa của vảy hành ngoài cùng và nhuộm với phẩm nhuộm hai màu đỏ carmin-xanh idod. Dưới kính hiển vi quang học (CKX41, Olympus, Japan), xác định bề dày của vảy hành, số lớp tế bào nhu mô, bề rộng trung bình của tế bào nhu mô. Sự hiện diện của hạt tinh bột trong tế bào được quan sát nhờ nhuộm với dung dịch I_2KI .

Phân tích các biến đổi sinh hóa và sinh lý

Xác định hàm lượng đường tổng số và tinh bột trong hành Lily *in vitro*

Đường tổng số và tinh bột có trong hành được ly trích nhờ dung dịch ethanol, thực hiện phản ứng màu với H_2SO_4 , phenol và xác định hàm lượng nhờ so

sánh với đường chuẩn sucrose (hàm lượng đường tổng số) hay glucose (hàm lượng tinh bột) bằng máy đo quang phổ (UV-2602, USA) ở bước sóng 490 nm [6]. Kết quả là giá trị trung bình của 3 lần lặp lại.

Đo cường độ hô hấp

Cường độ hô hấp ($\mu\text{mol O}_2/\text{g}$ trọng lượng tươi/giờ) của mẫu cây được xác định bằng điện cực oxygen dựa trên sự giảm tỉ lệ oxygen trong buồng đo (LeafLab2, Hansetech) theo thời gian, ở nhiệt độ 22°C, trong tối. Kết quả là giá trị trung bình của 5 lần lặp lại.

Ly trích và đo hoạt tính chất điều hòa tăng trưởng thực vật

Các chất điều hòa tăng trưởng thực vật: auxin (IAA), cytokinin (zeatin), gibberellin và abscisic acid (ABA) có trong mẫu cây được ly trích và cô lập bằng cách sử dụng các dung môi thích hợp và thực hiện sắc ký trên bản mỏng silica gel 60 F254 (mã số 1.05554, Merck), ở nhiệt độ 29 °C với dung môi di chuyển chloroform:methanol:acetic acid (80:15:5 v/v). Vị trí của các hormone tăng trưởng thực vật được phát hiện nhờ quan sát trực tiếp dưới tia UV. Hoạt tính các hormone tăng trưởng thực vật được đo bằng sinh trắc nghiệm: diệp tiêu lúa (*Oryza sativa* L.) cho auxin và abscisic acid, từ diệp dưa leo (*Cucumis sativus* L.) cho cytokinin và cây mầm xà lách (*Lactuca sativa* L.) cho gibberellin [7, 8].

Áp dụng các chất điều hòa tăng trưởng thực vật trên sự tăng trưởng hành Lily *in vitro*

Các chồi 4 tuần tuổi có chiều rộng và chiều cao khoảng 0,8-1 cm tăng trưởng trên môi trường MS được cô lập và cấy vào trong erlen 100 mL chứa 30 mL môi trường MS với sucrose 90 g/L và BA 1,5 mg/L hay MS với sucrose 90 g/L, BA 1,5 mg/L và zeatin 0,5 mg/L. Các mẫu cây được đặt nuôi trong tối

ở nhiệt độ 22 ± 2 °C và ẩm độ 58 ± 3 %. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần, mỗi lần 15 bình nuôi cấy, mỗi bình nuôi cấy gồm 1 mẫu cây. Sau 8 tuần nuôi cấy, chiều rộng và chiều cao hành, số vảy/hành, trọng lượng tươi và khô của hành được xác định.

Chuyển cây và hành Lily *in vitro* ra vườn ươm

Các cây *in vitro* 4 tuần tuổi cao 5–6 cm mang 2-3 lá, có 5–6 rễ với chiều dài 2-3 cm và hành *in vitro* 8 tuần tuổi có bề rộng 2,5, chiều cao 2,7 cm, trọng lượng 2,5 g, gồm 15–16 vảy hành được chuyển sang phòng tăng trưởng với ánh sáng 2000 ± 200 lux (12/24h), nhiệt độ 30 ± 2 °C và ẩm độ 77 ± 3 %. Sau 1 tuần, các cây và hành được trồng trong túi chứa tro trấu, đất và phân chuồng (tỉ lệ 1:1:1) và đặt trong vườn ươm với ánh sáng 19000 ± 500 lux, nhiệt độ 30 ± 5 °C và ẩm độ 77 ± 3 %. Phần trăm mẫu sống và phát triển được xác định sau 4 tuần.

Xử lý thống kê

Kết quả thí nghiệm được phân tích bằng chương trình thống kê SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) sử dụng cho Windows phiên bản 15.0. Sự khác biệt có ý nghĩa ở mức 95 % của giá trị được thể hiện bởi các mẫu tự hoặc chữ số kèm theo.

KẾT QUẢ

Ảnh hưởng của điều kiện chiếu sáng nồng độ sucrose các chất điều hòa tăng trưởng trên sự tăng trưởng hành Lily *in vitro*

Sau 8 tuần nuôi cấy trên môi trường MS ở điều kiện sáng, các chồi phát triển theo hướng tạo cây với sự hình thành lá thật; ở điều kiện tối chồi phát triển theo hướng tạo hành (Bảng 1, Hình 3A-B). Trong tối, chiều rộng và chiều cao hành, số vảy/hành, trọng lượng tươi và khô của hành cao hơn so với mẫu cây được đặt ở điều kiện có ánh sáng. Số rễ không có sự khác biệt ở cả hai điều kiện nuôi cấy.

Bảng 1. Ảnh hưởng của điều kiện chiếu sáng trên sự tăng trưởng hành trên môi trường MS sau 8 tuần nuôi cấy

Chỉ tiêu theo dõi	Điều kiện chiếu sáng		T-Test
	Sáng	Tối	
Chiều rộng hành (cm)	1,00 ± 0,00	1,78 ± 0,02	+
Chiều cao hành (cm)	1,17 ± 0,17	2,37 ± 0,03	+
Số lá/cây	2,33 ± 0,33	-	
Chiều dài lá (cm)	5,43 ± 0,17	-	
Số vảy/hành	5,33 ± 0,33	6,05 ± 0,12	+
Số rễ/mẫu cấy	5,67 ± 1,67	6,00 ± 1,00	
Trọng lượng tươi của hành (mg)	442,67 ± 8,19	1229,51 ± 77,90	+
Trọng lượng khô của hành (mg)	111,33 ± 6,45	1163,56 ± 37,03	+

(+), Các số trung bình trong hàng khác biệt có ý nghĩa ở mức $p \leq 0,05$ (T-Test).

(-), Không có sự tạo lá.

Sau 8 tuần nuôi cấy trên môi trường có nồng độ sucrose khác nhau, chiều rộng hành, số vảy/hành, trọng lượng tươi và khô của hành đạt cao nhất ở hành tăng trưởng trên môi trường với sucrose 90 g/L.

Chiều cao của hành cao hơn ở mẫu cấy tăng trưởng trên môi trường với sucrose 60 g/L hay 90 g/L. (Bảng 2, Hình 3B-D).

Bảng 2. Ảnh hưởng của sucrose ở các nồng độ thay đổi trên sự tăng trưởng hành sau 8 tuần nuôi cấy trong tối

Nồng độ sucrose trong môi trường MS (g/L)	Chiều rộng hành (cm)	Chiều cao hành (cm)	Số vảy/hành	Trọng lượng tươi của hành (mg)	Trọng lượng khô của hành (mg)
30	1,78 ± 0,02 ^b	2,37 ± 0,03 ^b	6,05 ± 0,12 ^c	1229,51 ± 77,90 ^c	463,36 ± 31,89 ^b
60	1,86 ± 0,03 ^b	2,84 ± 0,04 ^a	6,92 ± 0,16 ^b	2160,56 ± 62,54 ^b	556,91 ± 63,79 ^b
90	2,22 ± 0,03 ^a	2,92 ± 0,03 ^a	8,85 ± 0,14 ^a	2487,45 ± 51,54 ^a	763,56 ± 37,03 ^a
120	1,07 ± 0,07 ^c	1,11 ± 0,06 ^c	5,20 ± 0,14 ^d	449,85 ± 33,29 ^d	131,29 ± 34,64 ^c

Các số trung bình trong cột với các mẫu tự khác nhau khác biệt có ý nghĩa ở mức $p \leq 0,05$.

Sau 8 tuần nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung IAA hay BA ở các nồng độ thay đổi (0,5–2,0 mg/L), chiều rộng, chiều cao, trọng lượng tươi và khô

của hành đều không có sự gia tăng so với đối chứng. Tất cả các xử lý với BA đều giúp hành gia tăng số vảy. Số vảy hành cao nhất khi xử lý BA 1,5 mg/L (Bảng 3, Hình 3E).

Bảng 3. Ảnh hưởng của IAA và BA ở các nồng độ thay đổi trên sự tăng trưởng của hành sau 8 tuần nuôi cấy trong tối.

Chất điều hòa tăng trưởng thực vật	Nồng độ (mg/L)	Chiều rộng hành (cm)	Chiều cao hành (cm)	Số vảy/hành	Trọng lượng tươi của hành (mg)	Trọng lượng khô của hành (mg)
Đôi chứng (MS)		$1,78 \pm 0,02^a$	$2,37 \pm 0,03^a$	$6,05 \pm 0,12^e$	$1229,51 \pm 77,90^a$	$463,36 \pm 31,89^a$
IAA	0,5	$1,22 \pm 0,01^b$	$1,45 \pm 0,03^d$	$6,03 \pm 0,27^e$	$721,27 \pm 14,44^{cd}$	$145,75 \pm 33,71^c$
	1,0	$1,22 \pm 0,02^b$	$1,52 \pm 0,04^d$	$5,99 \pm 0,13^e$	$666,46 \pm 20,64^d$	$148,36 \pm 30,83^c$
	1,5	$1,19 \pm 0,01^b$	$1,71 \pm 0,02^{cd}$	$7,00 \pm 0,07^d$	$672,17 \pm 26,60^d$	$162,65 \pm 28,36^c$
	2,0	$1,18 \pm 0,07^b$	$1,70 \pm 0,33^{cd}$	$6,27 \pm 0,10^e$	$686,23 \pm 8,44^d$	$159,46 \pm 33,44^c$
BA	0,5	$1,76 \pm 0,03^a$	$2,13 \pm 0,05^{ab}$	$11,68 \pm 0,24^c$	$734,48 \pm 15,18^{cd}$	$157,91 \pm 33,93^c$
	1,0	$1,72 \pm 0,07^a$	$2,17 \pm 0,03^{ab}$	$12,14 \pm 0,14^{bc}$	$783,34 \pm 3,61^c$	$231,97 \pm 35,56^{bc}$
	1,5	$1,74 \pm 0,03^a$	$2,16 \pm 0,10^{ab}$	$13,84 \pm 0,26^a$	$960,67 \pm 7,28^b$	$282,04 \pm 34,19^b$
	2,0	$1,75 \pm 0,01^a$	$2,03 \pm 0,05^{abc}$	$12,56 \pm 0,3^b$	$809,39 \pm 9,89^c$	$209,12 \pm 58,19^{bc}$

Các số trung bình trong cột với các mẫu tự khác nhau khác biệt có ý nghĩa ở mức $p \leq 0,05$.

Sau 8 tuần nuôi cấy, sự phối hợp sucrose 90 g/L và BA 1,5 mg/L giúp gia tăng số vảy/hành, trọng lượng tươi và khô của hành. Chiều rộng và chiều cao của hành không có sự thay đổi (Bảng 4, Hình 3F).

Bề dày vảy hành, số lớp và kích thước trung bình của tế bào nhu mô ở giữa vảy hành ngoài cùng gia

tăng so với ở thời điểm bắt đầu nuôi cấy. Bề dày vảy hành và bề rộng trung bình của tế bào nhu mô cao nhất ở hành tăng trưởng trên môi trường MS với sucrose 90 g/L. Số lớp tế bào nhu mô cao nhất ở hành tăng trưởng trên môi trường MS có bổ sung BA 1,5 mg/L riêng lẻ hay phối hợp với sucrose 90 g/L (Bảng 5, Hình 4).

Bảng 4. Ảnh hưởng của sự phối hợp sucrose và BA trên sự tăng trưởng của hành sau 8 tuần nuôi cấy trong tối

Xử lý	Chiều rộng hành (cm)	Chiều cao hành (cm)	Số vảy/hành	Trọng lượng của hành (mg)	
				Tươi	Khô
Sucrose 90 g/L	$2,22 \pm 0,03$	$2,22 \pm 0,03$	$8,85 \pm 0,14$	$2487,45 \pm 51,54$	$763,56 \pm 37,03$
Sucrose 90 g/L và BA 1,5 mg/L	$2,12 \pm 0,23$	$2,81 \pm 0,13$	$14,04 \pm 0,68$	$2651,18 \pm 69,61$	$878,91 \pm 64,87$
T-Test			+	+	+

(+), Các số trung bình trong cột khác biệt có ý nghĩa ở mức $p \leq 0,05$ (T-Test).

Bảng 5. Ảnh hưởng của sucrose và BA trên sự tăng trưởng của vảy hành ngoài cùng khi nuôi cấy trong tối.

Thời gian (tuần)	Môi trường nuôi cấy	Bề dày vảy (μm)	Số lớp tế bào nhu mô	Bề rộng trung bình tế bào nhu mô (μm)
0		$1767,82 \pm 32,45^c$	$16,67 \pm 0,67^c$	$67,67 \pm 5,67^c$
8	MS với sucrose 30 g/L	$2536,32 \pm 46,72^b$	$19,30 \pm 1,42^b$	$95,54 \pm 10,89^b$
	MS với sucrose 90 g/L	$2956,41 \pm 55,22^a$	$20,00 \pm 1,52^b$	$125,15 \pm 11,48^a$
	MS với sucrose 30 g/L và BA 1,5 mg/L	$2708,46 \pm 73,35^b$	$23,30 \pm 1,63^a$	$88,04 \pm 9,58^b$
	MS với sucrose 90 g/L và BA 1,5 mg/L	$2784,05 \pm 48,12^b$	$23,00 \pm 1,33^a$	$98,86 \pm 13,13^b$

Các số trung bình trong cột với các mẫu tự khác nhau khác biệt có ý nghĩa ở mức $p \leq 0,05$.

Bảng 6. Ảnh hưởng của sự phối hợp sucrose, BA và zeatin trên sự tăng trưởng hành sau 8 tuần nuôi cấy trong tối

Xử lý	Chiều rộng hành (cm)	Chiều cao hành (cm)	Số vảy/hành	Trọng lượng của hành (mg)	
				Tươi	Khô
Đối chứng *	2,12 ± 0,23	2,81 ± 0,13	14,04 ± 0,68	2651,18 ± 69,61	878,91 ± 64,87
Zeatin 0,5 mg/L	2,51 ± 0,05	2,78 ± 0,08	16,50 ± 0,65	2580,26 ± 58,42	825,00 ± 54,52
T-Test	+		+		

(+), Các số trung bình trong cột khác biệt có ý nghĩa ở mức $p \leq 0,05$ (T-Test)

(*), MS với sucrose 90 g/L và BA 1,5 mg/L.

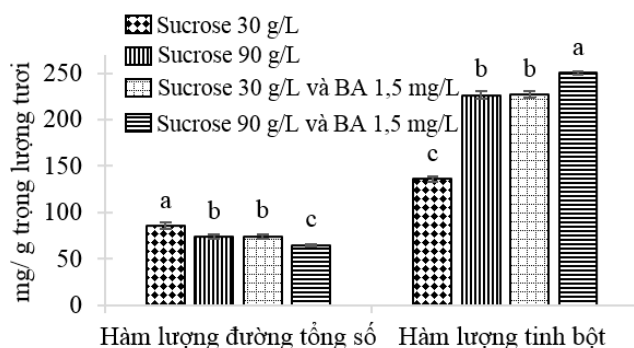
Sự bổ sung zeatin 0,5 mg/L vào môi trường MS với sucrose 90 g/L và BA 1,5 mg/L giúp gia tăng chiều rộng và số vảy của hành. Chiều cao của hành, trọng lượng tươi và khô của hành không có sự thay đổi (Bảng 7, Hình 3G).

Các biến đổi về sinh hóa, sinh lý trong hành lily

Hàm lượng đường tổng số đạt cao nhất ở hành tăng trưởng trên môi trường với sucrose 30 g/L, giảm dần ở hành tăng trưởng trên môi trường với sucrose 90 g/L hay sucrose 30 g/L và BA 1,5 mg/L, và thấp nhất trên môi trường MS có sự phối hợp bổ sung sucrose 90 g/L với BA 1,5 mg/L. Hàm lượng tinh bột cao nhất ở hành tăng trưởng trên môi trường có sự

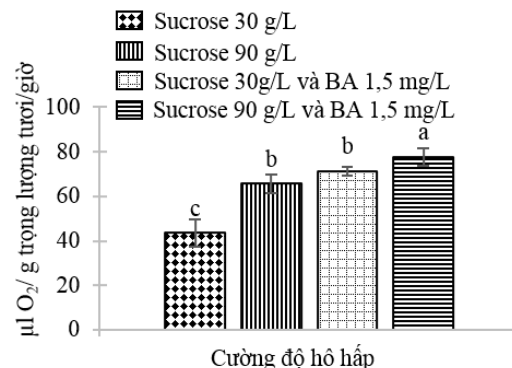
phối hợp bổ sung sucrose 90 g/L và BA 1,5 mg/L, giảm dần ở hành tăng trưởng trên môi trường với sucrose 90 g/L hay sucrose 30 g/L và BA 1,5 mg/L, và thấp nhất ở hành tăng trưởng trên môi trường với sucrose 30 g/L (Hình 1).

Sau 4 tuần nuôi cấy, cường độ hô hấp đạt cao nhất ở mẫu cấy tăng trưởng trên môi trường có sự phối hợp sucrose 90 g/L và BA 1,5 mg/L, thấp hơn ở mẫu cấy tăng trưởng trên môi trường với sucrose 90 g/L, sucrose 30 g/L và BA 1,5 mg/L, và thấp nhất ở mẫu cấy tăng trưởng trên môi trường với sucrose 30 g/L (Hình 2).



Hình 1. Hàm lượng đường tổng số và tinh bột trong hành sau 8 tuần nuôi cấy trong tối.

Trong cùng một chỉ tiêu nghiên cứu, các mẫu tự khác nhau khác biệt có ý nghĩa ở mức $p \leq 0,05$



Hình 2. Cường độ hô hấp của hành sau 4 tuần nuôi cấy trong tối.

Sau 4 tuần nuôi cấy, hoạt tính IAA trong mẫu cây tăng trưởng trên các môi trường khác nhau không có sự khác biệt. Hoạt tính zeatin đạt cao nhất ở mẫu cây tăng trưởng trên môi trường với sucrose 90 g/L và BA 1,5 mg/L, thấp hơn ở mẫu cây tăng trưởng trên môi trường với sucrose 30 g/L và BA 1,5 mg/L và

thấp nhất ở mẫu cây tăng trưởng trên môi trường với sucrose 30 hay 90 g/L. Hoạt tính gibberellin đạt cao nhất ở mẫu cây tăng trưởng trên môi trường với sucrose 30 g/L. Hoạt tính ABA đạt cao nhất ở mẫu cây tăng trưởng trên môi trường với sucrose 90 g/L (Bảng 7).

Bảng 7. Hoạt tính các chất điều hòa tăng trưởng thực vật trong hành tăng trưởng trên các môi trường khác nhau sau 4 tuần nuôi cấy trong tối

Môi trường nuôi cấy	Hoạt tính các chất điều hòa tăng trưởng thực vật nội sinh (mg/L)			
	IAA	Zeatin	Gibberellin	ABA
MS với sucrose 30 g/L	0,63 ± 0,02 ^a	0,19 ± 0,02 ^c	1,51 ± 0,01 ^a	0,48 ± 0,01 ^b
MS với sucrose 90 g/L	0,64 ± 0,01 ^a	0,17 ± 0,02 ^c	1,14 ± 0,02 ^b	0,60 ± 0,01 ^a
MS với sucrose 30 g/L và BA 1,5 mg/L	0,61 ± 0,02 ^a	0,42 ± 0,02 ^b	1,14 ± 0,01 ^b	0,43 ± 0,01 ^c
MS với sucrose 90 g/L và BA 1,5 mg/L	0,65 ± 0,02 ^a	0,69 ± 0,01 ^a	0,08 ± 0,01 ^c	0,45 ± 0,01 ^c

Các số trung bình trong cột với các mẫu tự khác nhau khác biệt có ý nghĩa ở mức $p \leq 0,05$.

Sự phát triển của cây và hành Lily sau khi chuyển ra vườn ươm

Sau 4 tuần chuyển các cây và hành *in vitro* ra vườn ươm, số cây con sống đạt 70 %, số hành sống đạt 100 %. Các cây có chiều cao 10–12 cm với 5–6 lá (Hình 4A); Mỗi hành gồm 15-16 vảy, chiều rộng và chiều cao hành đạt 2,7–3 cm (Hình 4B).

THẢO LUẬN

Khi được đặt ở điều kiện có ánh sáng, các chồi Lily tăng trưởng theo hướng tạo cây với sự hình thành các lá có màu xanh của diệp lục tố. Ngược lại, khi được đặt trong tối, các chồi không hình thành các lá dạng này mà chủ yếu là sự tăng trưởng của các lá dạng vảy hành, dẫn đến sự gia tăng kích thước và trọng lượng của hành (Bảng 1, Hình 3A-B). Có lẽ, ánh sáng đã hoạt hóa phytochrome làm kích thích sự biểu hiện của gene sinh tổng hợp gibberellin [9]. Gibberellin có vai trò hoạt hóa các enzyme thủy giải tinh bột dự trữ thành đường, nguồn cơ chất cho hô hấp tế bào, cung cấp năng lượng cho các hoạt động phân chia tế bào để tạo lá mới. Trong khi đó, ở điều kiện tối, các phytochrome không được hoạt hóa, các

chồi tiếp tục tăng trưởng, hấp thu sucrose từ môi trường nuôi cấy và dự trữ trong các vảy lá ở dạng tinh bột [10]. Như vậy, để tăng trưởng hành, các chồi Lily *in vitro* cần được nuôi cấy trong điều kiện tối.

Sự tăng trưởng của hành là do sự gia tăng số lượng và kích thước của vảy hành (Bảng 4, Hình 1). Sự gia tăng kích thước của vảy hành do sự phân chia, gia tăng bề rộng tế bào và tổng hợp tinh bột (Bảng 5, Hình 4, 5A). Quá trình này cần năng lượng được cung cấp bởi hoạt động hô hấp của tế bào. Kết quả phân tích hàm lượng đường tổng số và tinh bột cho thấy giữa tinh bột và đường có sự tương quan nghịch. Trên cùng một môi trường nuôi cấy, hàm lượng tinh bột trong hành cao thì hàm lượng đường tổng số thấp (Hình 1). Sự tương quan nghịch này có thể do nhu cầu sử dụng sucrose trong tế bào cho mục đích dự trữ ở dạng tinh bột trong các vảy hành (Hình 5B). Theo Hans và cộng sự (2011), sự tích lũy tinh bột cần nhiều năng lượng để hoạt hóa các enzyme gắn các đơn vị glucose vào chuỗi polyglucan [11]. Do đó, các hành tích lũy nhiều tinh bột luôn có cường độ hô hấp cao hơn (Hình 2). Sucrose là nguồn nguyên liệu cho các hoạt động biến dưỡng, cung cấp năng lượng và

các cơ chất cần thiết cho việc xây dựng cấu trúc tế bào cũng như tổng hợp tinh bột. Theo Bùi Trang Việt (2016), sự hấp thu sucrose giúp tế bào gia tăng áp suất thẩm thấu, hấp thu nước và tăng trưởng [5]. Do đó, sự tăng nồng độ sucrose (từ 30 g/L – 90 g/L) giúp tăng bề rộng trung bình của tế bào nhu mô dẫn đến sự tăng bề dày vảy hành và kích thước hành (bảng 5). Đồng thời với sự tăng kích thước là sự tăng trọng lượng tươi và khô của hành (Bảng 2, Hình 3B-C). Tuy nhiên, ở nồng độ sucrose cao (120 g/L), nước từ trong tế bào di chuyển ra ngoài dẫn đến khả năng biến dưỡng của mô cây giảm, các hành ngừng tăng trưởng (Bảng 2, Hình 3D). Tác động của sucrose ở nồng độ cao dẫn đến sự giảm hoạt động biến dưỡng của tế bào cũng được ghi nhận bởi Yoshiji và Tsuyoshi (1979) [10]. Ngoài ra, hành tăng trưởng trên môi trường có nồng độ sucrose cao có sự gia tăng hoạt tính ABA đồng thời với sự giảm hoạt tính gibberellin (Bảng 6). Sự tương quan thuận giữa ABA nội sinh và sự gia tăng tích lũy tinh bột đã được ghi nhận khi các cơ quan thực vật như hành hay củ đi vào trạng thái ngủ [5]. Ngược với ABA, gibberellin ở nồng độ cao có vai trò cản dòng dinh dưỡng di chuyển về các cơ quan dự trữ và hoạt hóa enzyme thủy giải tinh bột thành đường dẫn đến ức chế sự tăng trưởng của hành [12]. Điều này cũng được ghi nhận ở các giống trồng Lily như *L. amabile*, *L. bulbiferum*, *L. callosum* [13]. Như vậy, trong trường hợp của hành Lily Sorbonne, sự gia tăng hoạt tính ABA là chưa đủ mà cần phải có sự giảm hoạt tính gibberellin hay nói cách khác là sự tăng tỉ lệ ABA/gibberellin.

Trong sự tạo hành ở nhiều giống trồng Lily, sự dùng auxin và cytokinin riêng lẻ có vai trò kích thích gia tăng kích thước và trọng lượng của hành [14 – 15]. Tuy nhiên, trong nghiên cứu này, việc bổ sung IAA riêng lẻ vào môi trường nuôi cấy không giúp gia tăng kích thước cũng như trọng lượng của hành (Bảng 3). Kết quả phân tích hoạt tính IAA nội sinh cũng không cho thấy sự khác biệt ở các hành tăng trưởng trên các môi trường nuôi cấy khác nhau. Điều

này có thể do sự khác biệt về kiểu gene của các giống trồng. Khác với IAA, sự bổ sung BA giúp gia tăng số lớp tế bào nhu mô đồng thời với sự gia tăng số vảy của hành (Bảng 5-6, Hình 3E). Theo Bùi Trang Việt (2016), cytokinin có vai trò kích thích sự phân chia tế bào, hoạt hóa các enzyme tổng hợp tinh bột đồng thời ức chế enzyme thủy giải tinh bột. Ngoài ra, cytokinin còn cảm ứng sự huy động dòng dinh dưỡng vào cơ quan dự trữ, khởi phát liên hệ nguồn-bể mới giúp dòng dinh dưỡng theo libe để di chuyển tới nơi nhập bằng cách kích thích sự biến dưỡng tại bể [5]. Do đó, sự bổ sung BA 1,5 mg/L vào môi trường MS với sucrose 90 g/L kích thích mạnh sự gia tăng số lớp tế bào nhu mô, số vảy hành, trọng lượng tươi và khô của hành (Bảng 4-5). BA tác động lên sự tăng trưởng của hành thông qua sự tích lũy các N6-2-isopentenyl adenine (cytokinin nội sinh dạng tự do) và cả N6-2-isopentenyl adenosine (cytokinin dạng liên kết) [16]. Có lẽ, chính sự tạo các cytokinin nội sinh này đã kích thích sự phân chia tế bào tại vùng nhu mô của vảy hành đồng thời với vùng bên của mô phân sinh ngọn chồi dẫn đến sự gia tăng số lớp tế bào nhu mô và số vảy của hành. Chính vì vậy, sự phối hợp sucrose, BA và zeatin (một cytokinin tự nhiên) cho kích thước, số vảy hành, trọng lượng tươi và khô của hành cao nhất (Bảng 6, Hình 3G). Trên môi trường này, hành đạt kích thước 2,5-2,7 cm với 14–16 vảy hành (Bảng 6), cao hơn so với kích thước (1–1,3 cm) và số vảy hành (5-7 vảy) (Kumar và cs, 2007) [2]. Khi chuyển sang điều kiện nhà lưới, các cây tiếp tục hình thành lá mới trong khi các hành tiếp tục gia tăng kích thước mà không có sự gia tăng số vảy tương tự như ghi nhận của Mei-Lan và cs (2003) trên giống trồng Casablanca [3].

KẾT LUẬN

Chồi *in vitro* Lily Sorbonne phát triển thành cây với lá thật khi được nuôi cấy ở điều kiện sáng và tạo hành ở điều kiện tối. Sucrose 90 g/L giúp tế bào vảy hành gia tăng kích thước và tích lũy tinh bột. BA 1,5 mg/L kích thích phân chia tế bào, giúp gia tăng số lớp tế bào nhu mô và số vảy hành. Sự gia tăng cường độ

hồ hấp, hoạt tính zeatin và tích lũy tinh bột cần thiết cho quá trình tăng trưởng hành. Môi trường MS có sự

phối hợp sucrose 90 g/L, BA 1,5 mg/L và zeatin 0,5 mg/L thích hợp cho sự tăng trưởng của hành.

Study on the *in vitro* growth of Lily Sorbonne bulblet

• Tran Thanh Thang

• Tran Thanh Huong

University of Science, VNU-HCM

ABSTRACT

In this study, the effects of light and dark condition, sucrose concentration, and plant growth regulators on the in vitro growth of bulblet from Lily Sorbonne shoot were studied. Morphological, physiological and biochemical changes in the bulblet growth were analyzed. Shoots in the light condition developed into plant while shoots in continuous darkness formed bulblet. Sucrose (90 g/L) increased the size of scale and starch accumulation of bulb. 6-Benzylaminopurine (BA 1,5 mg/L) stimulated the division of parenchyma cell. The combination of 90 g/L sucrose and 1,5 mg/L BA in dark condition

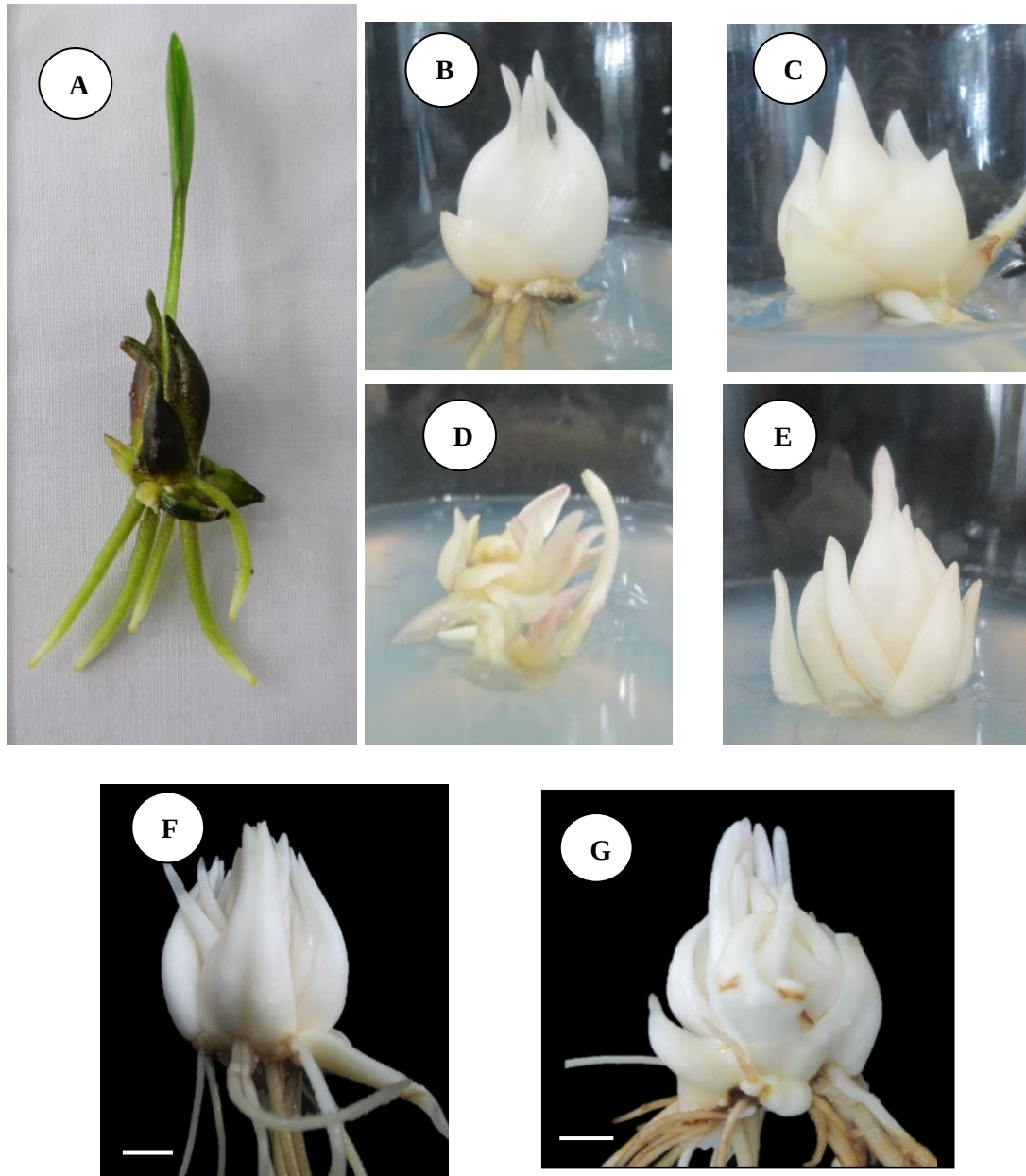
stimulated the division and size of the parenchyma cells, which increase the number and size of scales and size and weight of the bulblet. Respiratory rate, zeatin content and starch accumulation were increased in the bulblet growth. The correlation of light condition, sucrose concentration, plant hormone, respiration rate, starch accumulation, and bulblet growth were discussed. The combination of 90 g/L sucrose, 1.5 mg/L BA and 0.5 zeatin mg/L in dark strongly induced the growth of in vitro Lily bulblet, especially the number of scale.

Key words: Dark condition, in vitro bulblet growth, Lily, sucrose, plant growth regulators.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. T.T. Vân, V.T. Đông, Cơ sở khoa học và kỹ thuật sản xuất hoa Lily cắt cành, NXB Nông Nghiệp, Hà Nội (2005).
- [2]. S. Kumar, V. Awasthi, J.K. Kanwar J.K, Influence of growth regulators and nitrogenous compounds on *in vitro* bulblet formation and growth in oriental Lily, *Hort. Sci.*, 34, 2, 77–83 (2007).
- [3]. L. Mei-Lan, D. Chakrabarty, K.Y. Paek, Growth of *Lilium* Oriental hybrid 'Casablanca' bulblet using bioreactor culture, *Scientia Horticulturae*, 97, 41–48 (2003).
- [4]. T. Murashige, F. Skoog, A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, *Plant Physiol*, 15, 3, 473-497 (1962).
- [5]. B.T. Việt, Sinh lý thực vật đại cương, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc Gia Thành phố Hồ Chí Minh (tài liệu lưu hành nội bộ) (2016).
- [6]. J. Coombs, G. Hind, R.C. Leegood, L.L. Tieszen, A. Vonshak, Techniques in bioproductivity and

- photosynthesis, In: Measurement of starch and sucrose in leaves, Pergamon press (1987).
- [7]. H. Meidner, Class experiments in Plant Physiology, George Allen and Unwin, London, (1984).
- [8]. B.T. Việt, Tìm hiểu hoạt động của các chất điều hòa sinh trưởng thực vật thiên nhiên trong hiện tượng rụng "bông" và "trái non" Tiêu (*Piper nigrum* L.), *Tập san khoa học ĐHTH TPHCM* 1, 155–165, (1992).
- [9]. K. Carina, R. Quirin, D. Julia, B. Emmanouil, R. René, S. Claus, LLM-domain B-GATA transcription factors promote stomata development downstream from light signaling in *Arabidopsis thaliana* hypocotyls, *The Plant Cell*, 25, 8, (2016).
- [10]. N. Yoshiji, O. Tsuyoshi, *In vitro* bulblet formation from leaf segments of Lilies, especially *Lilium rubellum* Baker, *Sci. Horticulture*, 11, 379–389 (1979).
- [11]. W.H. Hans, P. Birgit, H. Fiona, Plant Biochemistry, Elsevier, London, (2011).
- [12]. P.J. Davies, Plant hormones, Kluwer Academic Publisher (1995).
- [13]. J.C. Antonio, C. Christoph, Sucrose and starch catabolism in the anther of *Lilium* during its development: a comparative study among the anther wall, locular xuid and microspore/pollen fractions, *Planta*, 225, 1573–1582 (2007).
- [14]. L. Bacchetta, P.C. Remotti, C. Bernardini, F. Saccardo, Adventitious shoot regeneration from leaf explants and stem nodes of *Lilium*, *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 74, 37–44, (2003).
- [15]. X. LingFei, M. FengWang, L. Dong, Plant regeneration from *in vitro* cultured leaves of Lanzhou lily (*Lilium davidii* var. unicolor), *Sci Hortic*, 119, 458–461 (2009).
- [16]. A. Carol, M. Václav, B. Alena, K. Miroslav, Endogenous cytokinin accumulation and cytokinin oxidase activity during shoot organogenesis of *Petunia hybrida*, *Physiologia Plantarum*, 105, 1, 141–147 (1999).



Hình 3. Các hành Lily tăng trưởng trên các môi trường khác nhau sau 8 tuần nuôi cây ở điều kiện sáng hay tối.

(A) Sucrose 30 g/L, sáng

(C) Sucrose 90 g/L, tối

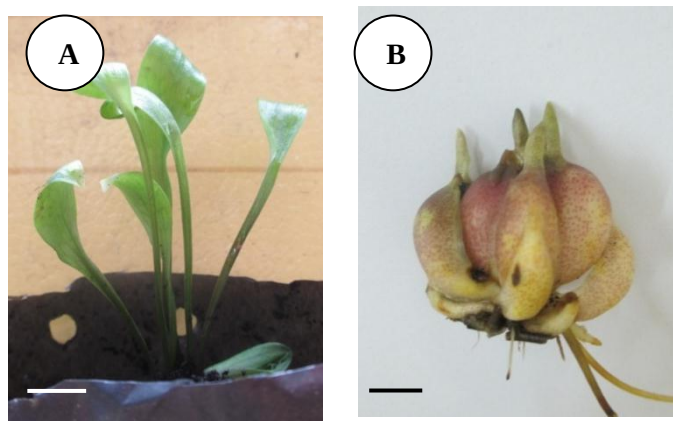
(E) BA 1,5 mg/L, tối

(G) Sucrose 90 g/L; BA 1,5 mg/L; zeatin 0,5 mg/l, tối

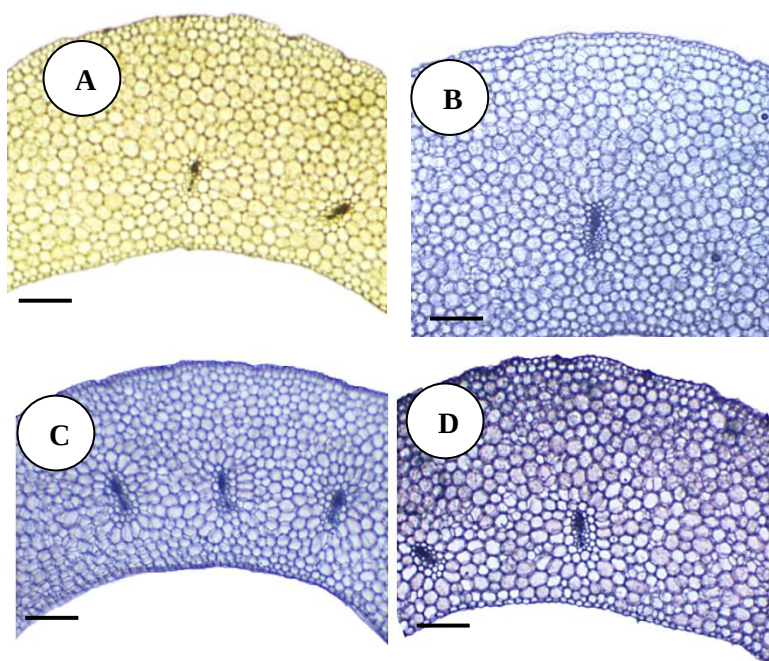
(B) Sucrose 30 g/L, tối

(D) Sucrose 120 g/L, tối

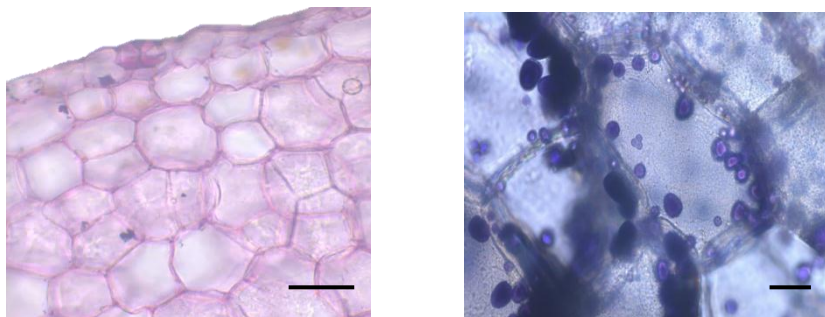
(F) Sucrose 90 g/L; BA 1,5 mg/L; tối



Hình 4. Sự tăng trưởng cây (A) và hành (B) Lily sau 4 tuần trong vườn ươm.



Hình 5. Ảnh hưởng của sucrose và BA trên sự tăng trưởng của vảy hành ngoài cùng sau 8 tuần nuôi cấy.
(A) MS với sucrose 30 g/L; (C) MS với sucrose 30 g/L và BA 1,5 mg/L
(B) MS với sucrose 90 g/L; (D) MS với sucrose 90 g/L và BA 1,5 mg/L



Hình 6. Sự phân chia của tế bào nhu mô (A) và sự hiện diện của các hạt tinh bột (B) ở vảy hành ngoài cùng sau 8 tuần nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung sucrose 90 g/L và BA 1,5 mg/L