

Ảnh hưởng của thidiazuron và ánh sáng đơn sắc trên sự phát triển cụm chồi *in vitro* cây Hồ trượng căn (*Polygonum cuspidatum* Sieb et Zucc)

Đoàn Phan Phương Thảo¹, Lê Anh Tuấn^{2,*}, Phan Ngô Hoang¹



Use your smartphone to scan this QR code and download this article

TÓM TẮT

Hồ trượng căn (*Polygonum cuspidatum* Sieb et Zucc) là một loại dược liệu chứa nhiều hợp chất resveratrol thuộc nhóm phenolic có hoạt tính chống oxy hóa, kháng khuẩn, ngăn ngừa ung thư, HIV và bảo vệ tế bào thần kinh. Trong nghiên cứu này, các khúc cắt đoạn thân mang chồi nách được nuôi cấy *in vitro* trên môi trường MS bổ sung TDZ 0,1 mg/L cho số chồi phát sinh nhiều nhất, đạt từ 8–9 chồi/cụm sau 8 tuần nuôi cấy; các chồi có nguồn gốc phát sinh từ sự phân hóa vùng ngoại vi của mô phân sinh chồi bên. Cụm chồi tăng trưởng liên tục 8 tuần dưới các ánh sáng LED xanh hoặc đỏ đơn sắc có chiều cao cây, trọng lượng tươi và trọng lượng khô đều cao hơn so với đối chứng dưới ánh sáng huỳnh quang ở cùng cường độ 50 $\mu\text{mol photon/m}^2/\text{giờ}$. LED xanh làm giảm số lượng chồi/cụm và cường độ hô hấp của mẫu cấy so với dưới LED đỏ và huỳnh quang; hàm lượng đường và phenolic tổng số trong lá hoặc thân, cũng như hàm lượng resveratrol của cụm chồi luôn cao hơn so với hai điều kiện ánh sáng còn lại, sau 8 tuần. Khi xử lý mẫu cấy 1 tuần ở cường độ ánh sáng tăng gấp đôi (100 $\mu\text{mol photon/m}^2/\text{giờ}$), hàm lượng phenolic tổng và resveratrol trong cụm chồi tăng trưởng dưới LED xanh cao có khác biệt so với hai nghiệm thức còn lại. Vai trò các chất điều hòa tăng trưởng nội sinh của cụm chồi dưới các điều kiện ánh sáng khác nhau cũng được phân tích và thảo luận.

Từ khoá: Hồ trượng căn, LED, phenolic, thidiazuron, resveratrol

¹Khoa Sinh học – Công nghệ sinh học, Trường ĐH Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM, Việt Nam

²TT Nghiên cứu Ứng dụng Công nghệ cao trong Nông nghiệp, Trường ĐH Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM, Việt Nam

Liên hệ

Lê Anh Tuấn, TT Nghiên cứu Ứng dụng Công nghệ cao trong Nông nghiệp, Trường ĐH Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM, Việt Nam
Email: latuan@hcmus.edu.vn

Lịch sử

- Ngày nhận: 26-8-2019
- Ngày chấp nhận: 14-02-2020
- Ngày đăng: 10-6-2020

DOI: 10.32508/stdjns.v4i2.833



Bản quyền

© ĐHQG Tp.HCM. Đây là bài báo công bố mở được phát hành theo các điều khoản của the Creative Commons Attribution 4.0 International license.



MỞ ĐẦU

Hồ trượng căn là một loại dược liệu chứa nhiều hợp chất có hoạt tính sinh học như: flavonoid, phenolic, anthraquinone và stilbene. Trong đó, resveratrol là một hợp chất thuộc nhóm stilbene chiếm lượng lớn trong cây và đặc biệt được chú ý nhờ tác dụng tích cực trong điều trị ung thư máu, ung thư tuyến tiền liệt, chống suy giảm trí nhớ và HIV^{1,2}. Trong các nghiên cứu trước, quy trình vi nhân giống cây Hồ trượng căn thường sử dụng cùng lúc nhiều loại cytokinin riêng lẻ hoặc phối hợp với auxin, qua nhiều lần cấy chuyển, thời gian nuôi cấy dài, nhưng tỷ lệ nhân chồi và chất lượng chồi chưa cao^{3,4}.

Ánh sáng vừa là nguồn năng lượng cho quang hợp, vừa là tín hiệu ảnh hưởng lên sự phát sinh hình thái ở thực vật thông qua các thể nhận ánh sáng như phytochrome (nhạy với ánh sáng đỏ và đỏ xa), cryptochrome và phototropin (nhạy với ánh sáng xanh). Ánh sáng đỏ cảm ứng sự tăng trưởng, tạo sơ khởi lá, kéo dài thân, cần ra hoa và đáp ứng với phytochrome giúp thay đổi cấu trúc giải phẫu, trong khi ánh sáng xanh cảm ứng nhiều quá trình tăng trưởng và cử động ở thực vật bao gồm cử động lục lạp, tính hướng sáng,

cử động khí khổng, cần kéo dài đoạn dưới lá mầm, kích thích tổng hợp chlorophyll và carotenoid⁵. Nhiều nghiên cứu cho thấy ánh sáng đơn sắc xanh hoặc đỏ có tác động tích cực lên sự phát sinh chồi, cải thiện chất lượng cây con và rút ngắn quy trình nhân giống ở *Chrysanthemum morifolium* Ramat. cv. “Jimba” và *Coffea canephora*^{6,7}. Hơn nữa, ánh sáng có vai trò kiểm soát các con đường biến dưỡng ở thực vật, sự gia tăng các hợp chất thứ cấp thường được ghi nhận khi thực vật tăng trưởng dưới các điều kiện stress ánh sáng cao, thiếu hoặc dư thừa phổ ánh sáng quang hợp^{8,9}. Xử lý ánh sáng đơn sắc hoặc kết hợp ánh sáng xanh và đỏ ở tỷ lệ thích hợp trong nuôi trồng *Lactuca sativa*, *Brassica oleracea* var. *acephala* hay *Solanum lycopersicum* giúp gia tăng tích lũy các chất chuyển hóa sơ cấp, cũng như hàm lượng anthocyanin, polyphenol và flavonoid so với ánh sáng trắng¹⁰. Trong bài báo này, sự phát sinh cụm chồi từ nuôi cấy đoạn thân mang chồi nách cây Hồ trượng căn *in vitro* dưới tác dụng của BA hay TDZ riêng lẻ được thực hiện. Đồng thời, bước đầu tìm hiểu tác động của ánh sáng LED xanh hoặc đỏ lên sự tăng trưởng và biến đổi các hợp chất biến dưỡng của cụm chồi trong mục tiêu

Trích dẫn bài báo này: Thảo D P P, Tuấn L A, Hoang P N. Ảnh hưởng của thidiazuron và ánh sáng đơn sắc trên sự phát triển cụm chồi *in vitro* cây Hồ trượng căn (*Polygonum cuspidatum* Sieb et Zucc). *Sci. Tech. Dev. J. - Nat. Sci.*; 4(2):468-477.

cải thiện nguồn giống và chất lượng cây con để phục vụ cho ngành dược liệu trong tương lai.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Các đoạn thân 0,5 cm mang chồi nách cây Hồ trượng căn *in vitro* từ vị trí thứ 2 đến thứ 4 (tính từ ngọn), có nguồn gốc từ cây *in vitro* 4 tuần tuổi được cô lập và đặt nuôi trên môi trường MS, đường 30 g/l, agar 6 g/l. Điều kiện phòng nuôi cấy: $27 \pm 2^\circ\text{C}$, ẩm độ $65 \pm 5\%$, đèn huỳnh quang với cường độ ánh sáng $50 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{giờ}$, quang kì 12/12 giờ.

Khảo sát ảnh hưởng cytokinin trên sự phát sinh chồi từ đoạn thân mang chồi nách cây Hồ trượng căn *in vitro*

Các đoạn thân mang chồi nách được cô lập và đặt nuôi trên các môi trường: MS (đối chứng); MS bổ sung BA 0,2 hay 0,5 mg/L; hoặc TDZ 0,025; 0,05; 0,1 hay 0,5 mg/L. Các mẫu cấy được cấy chuyển 2 tuần/lần, đặt nuôi dưới đèn huỳnh quang với cường độ $50 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{giờ}$, quang kì 12/12 giờ. Hình thái chồi, số chồi và cường độ hô hấp của mẫu được xác định theo thời gian.

Anh hưởng của nguồn sáng LED xanh, LED đỏ đến sự phát sinh chồi

Các đoạn thân mang chồi nách được cô lập và đặt nuôi trên môi trường MS bổ sung TDZ 0,1 mg/L, dưới các điều kiện đèn huỳnh quang, LED xanh (450 nm) hay đỏ (660 nm) ở cùng cường độ ánh sáng $50 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{giờ}$ (LI-250A - LI-190R Quantum Sensor, LI-Cor, USA), quang kì 12/12 giờ. Hình thái, số chồi, chiều cao chồi, trọng lượng tươi (TLT), trọng lượng khô (TLK), hoạt tính các chất điều hòa tăng trưởng thực vật nội sinh của mẫu được xác định theo thời gian. Sau 8 tuần, hàm lượng phenolic tổng và resveratrol trong lá và thân được xác định.

Anh hưởng của nguồn sáng LED xanh, LED đỏ đến sự tích lũy hợp chất biến dưỡng của cụm chồi

Các cụm chồi cây Hồ trượng căn *in vitro* 8 tuần trên môi trường MS bổ sung TDZ 0,1 mg/L, dưới đèn huỳnh quang với cường độ $50 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{giờ}$ được chuyển sang các điều kiện đèn huỳnh quang, LED xanh hay đỏ với cường độ $100 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{giờ}$, quang kì 12/12 giờ. Sau 1 tuần, cường độ hô hấp, hàm lượng đường tổng số, phenolic tổng và resveratrol của mẫu cấy được xác định.

Phân tích hình thái giải phẫu

Cấu trúc ngọn chồi, nguồn gốc phát sinh chồi được phân tích sau sự giải phẫu dọc qua mô phân sinh, nhuộm với thuốc nhuộm 2 màu đỏ aceto carmin - xanh iode và quan sát trực tiếp dưới kính hiển vi quang học (vật kính X10; X40).

Xác định cường độ hô hấp

Cường độ hô hấp của cụm chồi ($\mu\text{mol O}_2/\text{g TLT}/\text{phút}$) được xác định bằng điện cực oxygen dựa trên sự giảm tỷ lệ oxygen trong buồng đo (LD2, Leaflab 2 system, Hansatech-Anh), trong điều kiện tối ở nhiệt độ $27 \pm 0,2^\circ\text{C}$. Kết quả là giá trị của 5 lần lặp lại.

Ly trích và xác định hàm lượng đường tổng số

0,1 g mẫu tươi (lá hoặc thân của cụm chồi *in vitro*) được cô lập và ly trích trong 10 mL ethanol tuyệt đối, đun cách thủy trong 15 phút, ly tâm với tốc độ 6000 vòng/phút (5 phút) và thu dịch nổi. Phần bã sau khi ly tâm được hòa với ethanol 80%, đun cách thủy 15 phút, ly tâm 6000 vòng/phút (5 phút) và thu dịch nổi, lặp lại 2 lần. Toàn bộ dịch trích được đun cách thủy để bay hơi hoàn toàn ethanol, dịch cô cạn được định mức đủ 10 ml bằng nước cất. 1 mL dịch trích được thực hiện phản ứng màu với 1 mL phenol 5%, 5 mL acid sulfuric đậm đặc, lắc đều và đo mật độ quang ở bước sóng 490 nm (GENESYS-30, Thermo ScientificTM, Mỹ). Hàm lượng đường tổng số (mg/g TLT) được xác định dựa trên đường chuẩn sucrose¹¹.

Ly trích và xác định hàm lượng phenolic tổng

0,1 g mẫu lá tươi được nghiền với 10 mL methanol 70%, giữ yên 1 giờ trong bể ổn nhiệt 70°C , ly tâm ở 6000 vòng/phút (5 phút) và thu dịch nổi. 0,5 mL dịch trích được bổ sung 2,5 mL Folin 10% và lắc đều, sau đó thêm 2 mL Na_2CO_3 2%. Hỗn hợp được ủ 15 phút trong tối ở 50°C và đo mật độ quang ở bước sóng 765 nm. Hàm lượng phenolic tổng (mg/g TLT) được xác định dựa trên đường chuẩn acid gallic¹².

Ly trích và xác định hàm lượng resveratrol

0,02 g mẫu lá khô được nghiền trong ethanol 95%, giữ yên 1 giờ trong bể ổn nhiệt 70°C , ly tâm ở 6000 vòng/phút (5 phút) và thu dịch nổi; phần cặn được chiết với ethanol 95%, lặp lại 2 lần. Tất cả dịch trích được định mức đến 25 mL bằng ethanol 95%. 1 mL dịch trích được bổ sung 0,2 mL FeCl_3 0,5% và 0,5 mL dung dịch 2,2-bipyridyl 0,5%, tổng dịch phản ứng được định mức lên 5 mL bằng nước cất, ủ 5 phút ở nhiệt độ phòng. Hàm lượng resveratrol của mẫu giữa các nghiệm thức được so sánh thông qua độ hấp thụ OD ở bước sóng 522 nm¹³.

Hoạt tính các chất điều hòa tăng trưởng thực vật nội sinh

Các chất điều hòa tăng trưởng thực vật auxin (IAA), cytokinin (zeatin), gibberelin (GA_3) và acid abscisic (ABA) của các cụm chồi 4 tuần được ly trích và cô lập bằng các dung môi thích hợp và thực hiện sắc ký trên bản mỏng silica gel F_{254} (1,0554, Merck) với hệ dung môi di chuyển chloroform:methanol:acid acetic (80:15:5 theo thể tích), ở nhiệt độ $30 \pm 2^\circ C$. Vị trí của các hormon tăng trưởng thực vật trên bản sắc ký được phát hiện nhờ quan sát trực tiếp dưới UV 254 nm dựa trên vị trí IAA, zeatin, GA_3 và ABA tinh khiết. Hoạt tính tương đương của các hormon tăng trưởng thực vật được xác định bằng sinh trắc nghiệm¹⁴.

Xử lý số liệu

Tất cả các thí nghiệm được lặp lại với 5 mẫu/nghiệm thức, số liệu ghi nhận từ các thí nghiệm được xử lý bằng phần mềm Microsoft Office Excel 2010 và thống kê bằng SPSS 16.0 dùng cho Windows. Sự phân hạng, chia nhóm theo công thức Duncan dựa trên những khác biệt có ý nghĩa ở mức $p \leq 0,05$ của các giá trị được biểu hiện bằng các mẫu tự khác nhau kèm theo sau số trung bình.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Ảnh hưởng cytokinin trên sự phát sinh chồi từ đoạn thân mang chồi nách cây Hồ trượng căn *in vitro*

Sau 8 tuần nuôi cấy, trên các môi trường có bổ sung BA hay TDZ, mẫu cấy đều có sự xuất hiện chồi mới, các chồi xuất hiện ngay sau sự tạo khối mô sẹo ở gốc thân của mẫu cấy từ tuần thứ 4 và số lượng chồi gia tăng theo thời gian (Bảng 1, Hình 1 B-E). Trong khi đó, trên môi trường MS (đối chứng) chỉ có sự tăng trưởng của chồi nách có sẵn, không có sự gia tăng số lượng chồi hay hình thành mô sẹo (Hình 1 A). Sự phát sinh chồi mới từ mô hay tế bào thông qua con đường phân chia và phân hóa để tạo cơ quan hay tái lập tăng trưởng của các chồi bên đã được hình thành tại các vị trí nách lá⁵. Trong nghiên cứu này, sự xuất hiện chồi mới đồng thời với sự tăng trưởng của các chồi bên để tạo cụm chồi. Thông thường, các chồi bên này không phát triển do tác động ức chế bởi chồi ngọn (hiện tượng ưu thế ngọn), trong vi nhân giống sự bổ sung các chất điều hòa tăng trưởng thực vật như cytokinin vào môi trường nuôi cấy đã giúp các chồi này phá bỏ ưu thế ngọn, gỡ sự ngủ của các chồi nách, kích thích tạo chồi và tăng trưởng chồi để hình thành cụm chồi.

Dưới kính hiển vi, các lát cắt dọc qua ngọn chồi tăng trưởng trên môi trường MS đối chứng, cấu trúc mô

phân sinh bên có dạng vòm với các tế bào có kích thước nhỏ bắt màu đậm và hai phác thể lá hai bên (Hình 2 A). Trong khi đó, dưới tác động của TDZ sau 7 ngày nuôi cấy có sự thay đổi cấu trúc vùng ngoại vi của mô phân sinh bên (Hình 2 B) dẫn đến sự xuất hiện một số phác thể chồi xuất hiện và phát triển tạo cụm chồi (Hình 2 C).

Về nguyên tắc, cytokinin ảnh hưởng lên sự sinh tổng hợp acid nucleic, protein, chlorophyll ở thực vật, kích thích sự phân bào, gia tăng kích thước tế bào; tác động của cytokinin lên quá trình phát sinh chồi phụ thuộc vào loại, nồng độ của cytokinin được sử dụng. Trong sự tạo cụm chồi cây Hồ trượng căn *in vitro*, số lượng chồi luôn đạt giá trị cao trên các môi trường có bổ sung TDZ so với việc bổ sung BA; mỗi mẫu cấy có thể đạt từ 8-9 chồi trên môi trường bổ sung TDZ 0,1 mg/L, các chồi to khỏe, phát triển đồng đều, có màu xanh đậm (Hình 1 F, Bảng 1). Trong khi đó, nghiệm thức bổ sung BA, số lượng chồi chỉ đạt từ 2-3 chồi/mẫu cấy (Bảng 1). TDZ được xem là một hợp chất tổng hợp có hoạt tính cytokinin mạnh đã được sử dụng trên nhiều nghiên cứu nhằm thúc đẩy quá trình phân nhánh của chồi cây hai lá mầm; TDZ còn có tác động giải phóng các chồi bên và kích thích hình thành chồi ở *Vitex trifolia* L.¹⁵. Tác động của TDZ lên sự phát sinh chồi có thể thông qua hiệu ứng kích thích sự tích lũy cytokinin nội sinh, thúc đẩy quá trình chuyển đổi nhóm cytokinin nội sinh thành các dạng có hoạt tính sinh học cao hơn, hoặc tăng cường sự tích lũy và chuyển vị của dòng auxin nội sinh^{16,17}.

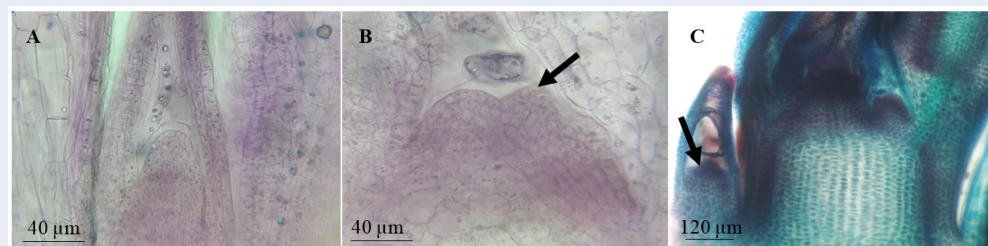
Tuy nhiên, hiệu quả kích thích tạo chồi của TDZ khi được bổ sung vào môi trường nuôi cấy thường tối ưu ở nồng độ nhất định, ở nồng độ cao TDZ sẽ gây hiệu ứng ức chế sự phát triển của chồi. Trong thí nghiệm này, khi tăng nồng độ TDZ lên 0,5 mg/L thì số chồi không có khác biệt so với môi trường bổ sung TDZ 0,1 mg/L, các chồi thấp và lá có màu xanh nhạt (Hình 1 G, Bảng 1). Có thể thấy môi trường MS bổ sung TDZ 0,1 mg/l là tối ưu trong thí nghiệm và đây là cơ sở để chọn làm môi trường nền trong những thí nghiệm tiếp theo.

Ảnh hưởng của nguồn sáng LED xanh 450 nm và đỏ 660 nm trên sự phát sinh chồi

Sau 8 tuần tăng trưởng dưới các nguồn sáng khác nhau, cụm chồi cây Hồ trượng căn *in vitro* có biểu hiện khác biệt về hình thái và số chồi. Phiến và cuống lá của các cụm chồi dưới LED xanh hay đỏ đều có màu xanh nhạt; gân lá gia tăng các sắc tố hồng (Hình 3 B và C). Dưới nguồn sáng LED đỏ, chiều cao của cụm chồi gia tăng so với các cụm chồi dưới LED xanh và đối chứng huỳnh quang. Số lượng chồi/cụm không



Hình 1: Cụm chồi cây Hổ trượng căn trên các môi trường: MS (A); BA 0,2 mg/L (B); BA 0,5 mg/L (C); TDZ 0,025 mg/L (D); TDZ 0,05 mg/L (E); TDZ 0,1 mg/L (F) hay TDZ 0,5 mg/L (G) sau 8 tuần nuôi cấy.



Hình 2: Mô phân sinh bên cây Hổ trượng căn *in vitro* trước (A) (X40); sau 7 ngày (B) (X40) và 14 ngày (C) (X10) trên môi trường bổ sung TDZ 0,1 mg/L

Bảng 1: Số chồi/cụm của cây Hổ trượng căn *in vitro* trên môi trường khác nhau theo thời gian.

Nghiệm thức	Số chồi		
	Tuần 4	Tuần 6	Tuần 8
MS (ĐC)	1,00 ± 0,00 ^{b1}	1,00 ± 0,00 ^{d1}	1,00 ± 0,00 ^{d1}
BA 0,2 mg/L	1,40 ± 0,24 ^{b1}	1,60 ± 0,24 ^{d1}	1,80 ± 0,20 ^{d1}
BA 0,5 mg/L	1,80 ± 0,20 ^{b2}	2,40 ± 0,24 ^{c12}	3,20 ± 0,37 ^{c1}
TDZ 0,025 mg/L	3,00 ± 0,32 ^{a2}	4,20 ± 0,20 ^{b1}	4,40 ± 0,40 ^{bc1}
TDZ 0,05 mg/L	3,40 ± 0,24 ^{a2}	4,40 ± 0,24 ^{b1}	4,80 ± 0,20 ^{b1}
TDZ 0,1 mg/L	3,60 ± 0,24 ^{a3}	5,40 ± 0,24 ^{a2}	7,40 ± 0,40 ^{a1}
TDZ 0,5 mg/L	3,80 ± 0,58 ^{a2}	5,80 ± 0,37 ^{a1}	7,20 ± 0,86 ^{a1}

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

có sự khác biệt ở cả hai điều kiện LED đỏ và đối chứng. Ngược lại, theo thời gian, các cụm chồi dưới LED xanh có số lượng chồi luôn thấp hơn so với các nghiệm thức còn lại (Bảng 2 và Bảng 3).

Trong nghiên cứu này, hoạt tính GA₃ của cụm chồi tăng trưởng dưới LED đỏ cao hơn hẳn so với đối chứng ở cường độ 50 μmol photon/m²/giờ (Bảng 4), dẫn đến các mẫu cây tăng trưởng dưới điều kiện này có chiều cao chồi gia tăng so với đối chứng; kết quả này cũng tương tự công bố trong nghiên cứu trên *Morus alba* L.¹⁸. Công bố của Hong và cộng sự (2012) trên *Arabidopsis thaliana* cho thấy ánh sáng đỏ thông qua thể nhận tín hiệu phytochrome đã cảm ứng sự sinh tổng hợp gibberelin và auxin ở lá, các hormone tăng trưởng này giúp gia tăng sự sinh tổng hợp vách tế bào, dẫn đến sự kéo dài đoạn dưới lá mầm ở loài cây này¹⁹. Hoạt tính zeatin nội sinh không có sự khác biệt giữa hai nghiệm thức LED đỏ và huỳnh quang (Bảng 4), có thể vì vậy cụm chồi dưới LED đỏ vẫn duy trì được số lượng chồi/cụm tương đương với huỳnh quang (Bảng 2). Ngược lại, hoạt tính zeatin và GA₃ giảm thấp nhất dưới các cụm chồi được nuôi liên tục dưới LED xanh. Ánh sáng xanh với bước sóng ngắn, mức năng lượng cao có thể là một yếu tố stress phi sinh học đối với cây Hồ trượng cần *in vitro*, dẫn đến giảm sự phát sinh chồi mới so với các nghiệm thức còn lại (Bảng 2). Công bố của Appelgren và cộng sự (2003) cũng ghi nhận ánh sáng xanh là tín hiệu cản sự phân chia và tạo chồi trên *Lactuca sativa* L.²⁰. Ngoài ra, ABA được xem như là một tín hiệu giúp thúc đẩy sự tích lũy đường từ môi trường nuôi cấy giúp chồi phát triển mạnh. Vì vậy, sự gia tăng hoạt tính ABA nội sinh ở cụm chồi dưới LED đỏ so với huỳnh quang phần nào giúp mô cấy tăng hấp thu đường từ đó cung cấp nguồn carbon cho sự phát triển của chồi (Bảng 4). Cùng với gia tăng số lượng chồi theo thời gian, cường độ hô hấp cũng có xu hướng thay đổi ở cụm chồi dưới LED xanh sau 4 và 6 tuần nuôi cấy. Trong khi đó, cường độ hô hấp của các cụm chồi dưới LED đỏ không có khác biệt so với huỳnh quang (Bảng 5).

Trọng lượng tươi và trọng lượng khô của cụm chồi tăng trưởng dưới các ánh sáng đơn sắc đều đạt giá trị cao hơn so với nguồn sáng huỳnh quang (Bảng 6). Ánh sáng xanh và đỏ có vai trò tích cực trong con đường biến dưỡng sơ cấp giúp cho sự tăng trưởng của mô và tế bào, có thể do ánh sáng xanh (450 nm) hay ánh sáng đỏ (660 nm) gần với đỉnh hấp thu cực đại của diệp lục tố do đó là nguồn năng lượng hiệu quả cho quang hợp, giúp gia tăng sự tích lũy sinh khối ở cây Hồ trượng cần *in vitro*.

Một số nghiên cứu trước cũng chỉ ra rằng ánh sáng đỏ đóng vai trò quan trọng trong sự kéo dài thân và chồi, đáp ứng phytochrome và thay đổi cấu trúc giải

phẫu ở *Capsicum annum* L.²¹. Trong khi đó, ánh sáng xanh lại có vai trò quan trọng trong quá trình tổng hợp chlorophyll, sự mở của khí khẩu, tổng hợp các enzyme, sự trưởng thành của lục lạp và quá trình quang hợp⁹.

Ảnh hưởng của tác động ánh sáng LED xanh và đỏ trên sự tích lũy hợp chất biến dưỡng của cụm chồi cây Hồ trượng cần *in vitro*

Cụm chồi khi được xử lý 1 tuần dưới LED xanh với cường độ ánh sáng tăng gấp đôi (100 μmol photon/m²/giờ), cường độ hô hấp của cụm chồi thấp hơn so với hai nghiệm thức còn lại (Bảng 7). Trong khi đó, hàm lượng đường tổng số trong lá của cụm chồi ở nghiệm thức này cao hơn hẳn so với đối chứng (Bảng 8), khi xét kết quả cường độ hô hấp của cả hai kiểu nuôi cấy (Bảng 5 và Bảng 7) cho thấy đường như ở mẫu cấy dưới LED xanh, sản phẩm của quá trình quang hợp không ưu tiên đi vào con đường hô hấp tế bào để cung cấp năng lượng cho quá trình phát sinh chồi mới như dưới ánh sáng đỏ và huỳnh quang mà rẽ nhánh sang các con đường biến dưỡng khác.

Kết quả phân tích hợp chất thứ cấp cho thấy hàm lượng phenolic tổng số và resveratrol trong lá của cụm chồi dưới LED xanh cao có khác biệt so với hai nghiệm thức còn lại (Bảng 9). Hơn nữa, hàm lượng resveratrol tăng mạnh ở nghiệm thức này khi xử lý ngắn 1 tuần với cường độ ánh sáng tăng gấp đôi (Bảng 10). Đường được tạo ra từ quá trình quang hợp có thể là nguyên liệu để tạo tiền chất cho quá trình sinh tổng hợp các chất biến dưỡng thứ cấp thông qua con đường glyco giải trong cytosol. Theo Hasan và Bae (2017), các hợp chất phenolic, resveratrol có vai trò phòng vệ khi thực vật gặp những điều kiện môi trường thay đổi như: ánh sáng cao, nhiễm bệnh, thiếu dinh dưỡng hay tránh động vật ăn cỏ²². Sự gia tăng hàm lượng resveratrol dưới tác động ánh sáng xanh cũng được ghi nhận tương tự ở *Vitis labruscana* Bailey và *Glycine max* L.^{23,24}. Sự gia tăng các hợp chất thứ cấp có thể là cách đáp ứng giúp cụm chồi cây Hồ trượng cần duy trì tăng trưởng dưới điều kiện ánh sáng này.

KẾT LUẬN

Môi trường MS bổ sung TDZ 0,1 mg/L thích hợp cho sự phát sinh chồi *in vitro* cây Hồ trượng cần, chồi mới có nguồn gốc từ sự phân hóa vùng ngoại vi của mô phân sinh chồi bên, số chồi đạt từ 8–9 chồi/cụm sau 8 tuần. Cụm chồi *in vitro* tăng trưởng liên tục 8 tuần dưới nguồn sáng LED xanh hoặc đỏ với cường độ ánh sáng 50 μmol photon/m²/giờ, có sự gia tăng sinh khối như chiều cao chồi, trọng lượng tươi và trọng



Hình 3: Cụm chồi cây Hồ trường căn in vitro tăng trưởng sau 8 tuần dưới nguồn sáng: Huỳnh quang (A); LED xanh (B) và LED đỏ (C).

Bảng 2: Số chồi cây Hồ trường căn in vitro trên môi trường MS bổ sung TDZ 0,1 mg/L dưới các nguồn sáng khác nhau theo thời gian

Nghiệm thức	Số chồi		
	Tuần 4	Tuần 6	Tuần 8
Huỳnh quang	3,75 ± 0,25 ^{a2}	6,00 ± 0,41 ^{a2}	8,00 ± 0,71 ^{a1}
LED xanh	1,05 ± 0,29 ^{b2}	2,50 ± 0,29 ^{b2}	4,50 ± 0,87 ^{b1}
LED đỏ	3,50 ± 0,29 ^{a2}	5,75 ± 1,03 ^{a12}	8,25 ± 0,85 ^{a1}

Bảng 3: Chiều cao của cụm chồi cây Hồ trường căn in vitro trên môi trường MS bổ sung TDZ 0,1 mg/L dưới các nguồn sáng khác nhau theo thời gian

Nghiệm thức	Chiều cao (cm)		
	Tuần 4	Tuần 6	Tuần 8
Huỳnh quang	1,66 ± 0,12 ^{c2}	1,96 ± 0,14 ^{b2}	2,94 ± 0,17 ^{c1}
LED xanh	2,32 ± 0,23 ^{b2}	3,02 ± 0,30 ^{a1}	3,36 ± 0,10 ^{b1}
LED đỏ	3,35 ± 0,22 ^{a2}	3,48 ± 0,26 ^{a2}	4,12 ± 0,07 ^{a1}

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

Bảng 4: Hoạt tính chất điều hòa tăng trưởng thực vật nội sinh của cụm chồi cây Hồ trường căn in vitro 4 tuần tuổi dưới các nguồn sáng khác nhau

Nghiệm thức	Hoạt tính (mg/L)			
	IAA	ABA	Zeatin	GA3
Huỳnh quang	4,08 ± 0,93 ^a	1,92 ± 0,13 ^b	0,53 ± 0,02 ^a	0,05 ± 0,00 b
LED xanh	0,85 ± 0,16 ^b	1,29 ± 0,22 ^c	0,33 ± 0,03 ^b	0,03 ± 0,00 c
LED đỏ	1,45 ± 0,46 ^b	2,50 ± 0,12 ^a	0,49 ± 0,04 ^a	0,09 ± 0,00 a

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

Bảng 5: Cường độ hô hấp của cụm chồi cây Hồ trường căn *in vitro* dưới các nguồn sáng khác nhau theo thời gian

Nghiệm thức	Cường độ hô hấp ($\mu\text{mol O}_2/\text{g TLT}/\text{phút}$)	
	Tuần 4	Tuần 6
Huỳnh quang	$0,12 \pm 0,01^{ab}$	$0,14 \pm 0,01^a$
LED xanh	$0,08 \pm 0,02^b$	$0,04 \pm 0,02^b$
LED đỏ	$0,18 \pm 0,06^a$	$0,09 \pm 0,06^{ab}$

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

Bảng 6: Trọng lượng của cụm chồi cây Hồ trường căn *in vitro* tăng trưởng dưới các nguồn sáng khác nhau

Nghiệm thức	Trọng lượng tươi (g)		Trọng lượng khô (g)	
	Tuần 4	Tuần 6	Tuần 4	Tuần 6
Huỳnh quang	$0,14 \pm 0,02^b$	$0,28 \pm 0,05^b$	$0,011 \pm 0,001^c$	$0,011 \pm 0,001^c$
LED xanh	$0,23 \pm 0,04^{ab}$	$0,58 \pm 0,09^{ab}$	$0,020 \pm 0,003^b$	$0,018 \pm 0,003^b$
LED đỏ	$0,32 \pm 0,03^a$	$0,81 \pm 0,17^a$	$0,030 \pm 0,002^a$	$0,029 \pm 0,002^a$

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

Bảng 7: Cường độ hô hấp của cụm chồi sau 1 tuần xử lý dưới các nguồn sáng khác nhau với cường độ $100 \mu\text{mol photon}/\text{m}^2/\text{giây}$

Nghiệm thức	Cường độ hô hấp ($\mu\text{mol O}_2/\text{g TLT}/\text{phút}$)
Huỳnh quang	$0,14 \pm 0,01^a$
LED xanh	$0,07 \pm 0,02^b$
LED đỏ	$0,11 \pm 0,02^{ab}$

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

Bảng 8: Hàm lượng đường tổng số trong lá và thân của cụm chồi sau 1 tuần xử lý dưới các nguồn sáng khác nhau với cường độ $100 \mu\text{mol photon}/\text{m}^2/\text{giây}$

Nghiệm thức	Hàm lượng đường tổng số (mg/g TLT)	
	Lá	Thân
Huỳnh quang ($50 \mu\text{mol}$)	$25,96 \pm 3,27^b$	$14,64 \pm 0,94^a$
Huỳnh quang ($100 \mu\text{mol}$)	$20,38 \pm 2,02^b$	$10,20 \pm 0,34^c$
LED xanh ($100 \mu\text{mol}$)	$37,42 \pm 2,04^a$	$13,06 \pm 0,33^{ab}$
LED đỏ ($100 \mu\text{mol}$)	$24,75 \pm 0,54^b$	$11,93 \pm 0,22^{bc}$

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

Bảng 9: Hàm lượng phenolic và resveratrol trong lá của cụm chồi tăng trưởng dưới các nguồn sáng khác nhau, cường độ $50 \mu\text{mol photon}/\text{m}^2/\text{giây}$, liên tục 8 tuần

Nghiệm thức	Hàm lượng phenolic tổng (mg/g TLT)	Resveratrol (Giá trị OD)
Huỳnh quang	$4,27 \pm 0,64^b$	$0,232 \pm 0,009^b$
LED xanh	$8,33 \pm 1,00^a$	$0,286 \pm 0,003^a$
LED đỏ	$4,36 \pm 0,46^b$	$0,172 \pm 0,010^c$

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

Bảng 10: Hàm lượng phenolic và resveratrol trong lá cây Hồ trường căn *in vitro* sau 1 tuần xử lý dưới các nguồn sáng khác nhau với cường độ 100 $\mu\text{mol photon/m}^2/\text{giây}$

Nghiệm thức	Hàm lượng phenolic tổng (mg/g TLT)	Resveratrol (Giá trị OD)	Hàm lượng resveratrol* ($\mu\text{g/g TLT}$)
Huỳnh quang	3,420 \pm 0,320 ^{ab}	0,208 \pm 0,002 ^b	0,14
LED xanh	4,770 \pm 0,740 ^a	0,221 \pm 0,003 ^a	0,56
LED đỏ	3,000 \pm 0,260 ^b	0,207 \pm 0,005 ^b	-

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

*Kết quả phân tích được thực hiện tại PTN Phân tích Trung tâm, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên.

-Không ghi nhận kết quả.

lượng khô so với đối chứng huỳnh quang. Cả hai kiểu nuôi cấy liên tục 8 tuần ở cường độ ánh sáng 50 $\mu\text{mol photon/m}^2/\text{giây}$ hay xử lý 1 tuần với cường độ ánh sáng tăng gấp đôi, cụm chồi dưới LED xanh có cường độ hô hấp giảm, hàm lượng đường tổng số, hàm lượng phenolic và resveratrol trong lá và thân cao hơn so với hai nghiệm thức còn lại.

DANH MỤC CÁC TỪ VIẾT TẮT

ABA: acid abscisic

BA: Benzyl adenin

GA₃: acid gibberellin

IAA: Acid indol acetic

LED (Light Emitting Diode): Điốt phát quang

MS: Murashige và Skoog

TDZ: Thidiazuron

TLK: Trọng lượng khô

TLT: Trọng lượng tươi

XUNG ĐỘT LỢI ÍCH

Các tác giả đồng ý không có bất kì xung đột lợi ích nào liên quan đến các kết quả đã công bố.

ĐÓNG GÓP CỦA CÁC TÁC GIẢ

Đoàn Phan Phương Thảo và Lê Anh Tuấn thực hiện các thí nghiệm, xử lý các dữ liệu và viết bản thảo. Phan Ngô Hoàng góp phần thảo luận các kết quả thí nghiệm, hoàn chỉnh bản thảo.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm tác giả chân thành cảm ơn Lương y Nguyễn Đức Nghĩa đã cung cấp mẫu vật thí nghiệm. TT Nghiên cứu Ứng dụng Công nghệ cao trong Nông nghiệp; Bộ môn Sinh lý thực vật, khoa Sinh học – Công nghệ sinh học thuộc Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM đã tạo điều kiện thực hiện nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Liu GS, Zhang ZS, Yang B, He W. The antioxidant resveratrol from *Polygonum cuspidatum* reverses memory impairment and brain oxidative stress in SAMP8 mice. *Advanced*

Materials Research. 2011;422:470–473. Available from: <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.422.470>.

- Zeng X, Pan X, Xu X, Lin J, Que F, Tian Y, et al. Resveratrol reactivates latent HIV through increasing histone acetylation and activating heat shock factor 1. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2017;65:4384–4394. PMID: 28471170. Available from: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b00418>.
- Sásik R, Eliáš P. Rhizome regeneration of *Fallopia japonica* (Japanese knotweed) (Houtt.) Ronse Decr. I. Regeneration rate and size of regenerated plants. *Folia Oecologica*. 2006;33:57–63.
- Yu S, Zhang D, Yang S. Application of TDZ and CPPU to tissue culture of *Polygonum cuspidatum*. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*. 2006;12:13–17.
- Việt BT. Sinh lý thực vật đại cương. NXB Đại học Quốc gia TP HCM. 2016;p. 753.
- Nam NB, Lâm ND, Nhựt DT. Ảnh hưởng của loại mẫu cấy và hệ thống chiếu sáng đơn sắc lên khả năng tái sinh chồi cây hoa Cúc (*Chrysanthemum morifolium* Ramat. cv. "Jimba") nuôi cấy *in vitro*. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*. 2012;50:595–606.
- Mai NT, Bình PT, Gám DT, Khôi PH, Hung NK, Ngọc PB, et al. Bước đầu khảo sát ảnh hưởng của ánh sáng LED (Light Emitting Diode) đến khả năng tái sinh cây cà phê vối (*Coffea canephora*) qua phôi soma. *Tạp chí Sinh học*. 2017;38:228–235. Available from: <https://doi.org/10.15625/0866-7160/v38n2.7115>.
- Darko E, Heydarizadeh P, Schoefs B, Sabzaljan MR. Photosynthesis under artificial light: The shift in primary and secondary metabolism. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2014;369:1–7. PMID: 24591723. Available from: <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0243>.
- Tuấn LA, Hoàng PN, Kim S, Kiệt DT. Tìm hiểu ảnh hưởng của ánh sáng đỏ đơn sắc trên sự quang hợp và tích lũy phenolic ở lá cây lười rần (*Hedyotis corymbosa* (L.) Lam). *Tạp chí Phát triển Khoa học và Công nghệ - Khoa học Tự nhiên*. 2019;3:128–135.
- Hasan MM, Bashir T, Ghosh R, Lee SK, Bae H. An overview of LEDs' effects on the production of bioactive compounds and crop quality. *Molecules*. 2017;22:1–12. PMID: 28846620. Available from: <https://doi.org/10.3390/molecules22091420>.
- Coombs J, Hind G, Leegood RC, Tieszen LL, Vonshak A. Analytical Techniques. in *Techniques in Bioproductivity and Photosynthesis*. 1985;p. 219–228. Available from: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-031999-5.50027-3>.
- Sen S, De B, Devanna N, Chakraborty R. Total phenolic, total flavonoid content, and antioxidant capacity of the leaves of *Meyna spinosa* Roxb., an Indian medicinal plant. *Chinese Journal of Natural Medicines*. 2013;11:149–157. Available from: [https://doi.org/10.1016/S1875-5364\(13\)60042-4](https://doi.org/10.1016/S1875-5364(13)60042-4).
- Rajendran V, Dhanaraju MD. Method development for quantification of oxidation complexes of nadolol and resveratrol by visible spectrophotometry. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2015;7:304–307.

14. Yokota T, Murofushi N, Takahashi N. Extraction, purification and identification. in *Hormonal Regulation of Development*. 1980;p. 113–201. Available from: https://doi.org/10.1007/978-3-642-67704-5_3.
15. Ahmed MR, Anis M. Role of TDZ in the quick regeneration of multiple shoots from nodal explant of *Vitex trifolia* L.-An important medicinal plant. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2012;168:957–966. PMID: 23065400. Available from: <https://doi.org/10.1007/s12010-012-9799-0>.
16. Thomas JC, Katterman FR. Cytokinin activity induced by thidiazuron. *Plant Physiology*. 1986;81:681–683. PMID: 16664878. Available from: <https://doi.org/10.1104/pp.81.2.681>.
17. Murch SJ, Saxena PK. Molecular fate of thidiazuron and its effects on auxin transport in hypocotyls tissues of *Pelargonium × hortorum* Bailey. *Plant Growth Regulation*. 2001;35:269–275. Available from: <https://doi.org/10.1023/A:1014468905953>.
18. Hu J, Dai X, Sun G. Morphological and physiological responses of *Morus alba* seedlings under different light qualities. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*. 2016;44:382–392. Available from: <https://doi.org/10.15835/nbha44210486>.
19. Hong GJ, Xue XY, Mao YB, Wang LJ, Chen XY. Arabidopsis MYC2 interacts with DELLA proteins in regulating sesquiterpene synthase gene expression. *Plant Cell*. 2012;24:2635–2648. PMID: 22669881. Available from: <https://doi.org/10.1105/tpc.112.098749>.
20. Hunter DC, Burritt DJ. Light quality influences adventitious shoot production from cotyledon explants of Lettuce (*Lactuca sativa* L.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*. 2004;40:215–220. Available from: <https://doi.org/10.1079/IVP2003492>.
21. Schuerger AC, Brown CS, Stryjewski EC. Anatomical features of Pepper plants (*Capsicum annum* L.) grown under red light-emitting diodes supplemented with blue or far-red light. *Annals of Botany*. 1997;79:273–282. PMID: 11540425. Available from: <https://doi.org/10.1006/anbo.1996.0341>.
22. Hasan MM, Bae H. An overview of stress-induced resveratrol synthesis in grapes: Perspectives for resveratrol-enriched grape products. *Molecules*. 2017;22:1–18. PMID: 28216605. Available from: <https://doi.org/10.3390/molecules22020294>.
23. Ahn SY, Kim SA, Choi SJ, Yun HK. Comparison of accumulation of stilbene compounds and stilbene related gene expression in two grape berries irradiated with different light sources. *Horticulture Environment and Biotechnology*. 2015;56:36–43. Available from: <https://doi.org/10.1007/s13580-015-0045-x>.
24. Azad M, Kim W, Park C, Cho D. Effect of artificial LED light and far infrared irradiation on phenolic compound, isoflavones and antioxidant capacity in soybean (*Glycine max* L.) sprout. *Foods*. 2018;7:174. PMID: 30360363. Available from: <https://doi.org/10.3390/foods7100174>.

Effect of thidiazuron and monochromatic light on shoot development *in vitro* culture of *Polygonum cuspidatum* Sieb et Zucc

Doan Phan Phuong Thao¹, Le Anh Tuan², Phan Ngo Hoang¹



Use your smartphone to scan this QR code and download this article

ABSTRACT

Polygonum cuspidatum Sieb. et Zucc, a medicinal plant, contains many phenolic compounds such as resveratrol. It has antioxidant, antibacterial, anti-cancer, HIV, and neuron protective properties. In this study, stem segments having an auxiliary bud were cultured *in vitro* on MS medium supplemented with TDZ at 0.1 mg/L for obtaining the highest number of shoots (8–9 shoots/cluster after eight weeks). The bud shoots were originated from the differentiation in the periphery of the lateral meristem. After eight weeks, the shoots cultured under the monochromatic light showed that the plant height, fresh and dry weight was higher than those grown under the fluorescent light at the same intensity of 50 $\mu\text{mol photon/m}^2/\text{sec}$. Blue LED reduced the number of shoots/cluster, and respiration intensity of the inoculum compared to the red LED or fluorescent light conditions. However, after eight weeks, the total sugar and phenolic content in leaves and stems, as well as the resveratrol content of shoots under blue light, were always higher than under red LED or fluorescent light. Moreover, when samples were exposed under the one-week blue light condition at a double intensity (100 $\mu\text{mol photon/m}^2/\text{sec}$), the shoot clusters growing under blue LED also had a remarkably high total phenolic content and significantly high resveratrol levels compared to the two other treatments. The roles of endogenous growth regulators in shoot clusters under different lighting conditions were also analyzed and discussed.

Key words: Light-emitting diodes, phenolics, *Polygonum cuspidatum* Sieb et Zucc, thidiazuron, resveratrol

¹Faculty of Biology and Biotechnology, University of Science, VNU-HCM

²Research Center for Hi-Tech in Agriculture Applications, University of Science, VNU-HCM

History

- Received: 26-8-2019
- Accepted: 14-02-2020
- Published: 10-06-2020

DOI : 10.32508/stdjns.v4i2.833



Copyright

© VNU-HCM Press. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International license.



Cite this article : Thao D P P, Tuan L A, Hoang P N. Effect of thidiazuron and monochromatic light on shoot development *in vitro* culture of *Polygonum cuspidatum* Sieb et Zucc. *Sci. Tech. Dev. J. - Nat. Sci.*; 4(2):468-477.