

SINH TRƯỞNG, PHÁT TRIỂN VÀ HÀM LƯỢNG CHLOROPHYLL TRONG CHỖI CÂY CÚC (*CHRYSANTHEMUM MORIFOLIUM* RAMAT. CV. "JIMBA") NUÔI CÂY *IN VITRO* DƯỚI ÁNH SÁNG LED

Nguyễn Thanh Sang¹, Nguyễn Bá Nam¹, Hoàng Thanh Tùng¹, Nguyễn Phúc Huy¹, Nguyễn Thị Kim Loan¹, Nguyễn Ngọc Thảo¹, Vũ Đức Trung¹, Nguyễn Văn An², Trần Thị Minh Loan², Nguyễn Văn Kết², Dương Tấn Nhựt¹

¹Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Trường Đại học Đà Lạt, Bộ Giáo dục và Đào tạo

Ngày nhận bài: 01.5.2014

Ngày nhận đăng: 16.6.2014

TÓM TẮT

Tác động của các điều kiện chiếu sáng khác nhau đến sự nhân chồi; sinh trưởng, phát triển và tổng hợp chlorophyll a và b của cây cúc *in vitro* đã được trình bày trong nghiên cứu này. Các đốt thân và các chồi đỉnh cúc được nuôi cấy dưới các điều kiện chiếu sáng khác nhau bao gồm LED đỏ, LED xanh, LED vàng, LED xanh lá cây, LED trắng và LED đỏ kết hợp với LED xanh theo nhiều tỷ lệ khác nhau (10:90, 20:80, 30:70, 40:60, 50:50, 60:40, 70:30, 80:20 và 90:10). Kết quả thu được sau 4 tuần nuôi cấy trên môi trường nhân chồi cho thấy, chiều dài lá, chiều rộng lá, khối lượng tươi và khối lượng khô của chồi đạt tốt nhất ở 50% LED đỏ và 50% LED xanh. Sau 6 tuần nuôi cấy trên môi trường tạo cây cho thấy, khối lượng tươi, khối lượng khô, chiều dài lá và chiều rộng lá của cây đạt tốt nhất ở 70% LED đỏ và 30% LED xanh. Bên cạnh đó, hàm lượng chlorophyll a và chlorophyll b của cây đạt cao nhất ở 70% LED đỏ và 30% LED xanh. Như vậy, kết quả từ nghiên cứu cho thấy khả năng nhân chồi tốt nhất là các đốt thân được nuôi cấy ở 50% LED đỏ và 50% LED xanh và sự hình thành cây tốt nhất là các chồi đỉnh nuôi cấy ở 70% LED đỏ và 30% LED xanh.

Từ khóa: Chlorophyll a, chlorophyll b, cây cúc, sinh trưởng, LED

MỞ ĐẦU

Trong điều kiện môi trường vi nhân giống, cường độ dòng photon quang hợp có vai trò quan trọng trong quá trình sinh trưởng và quang hợp ở nhiều loài thực vật (Cui *et al.*, 2000; Kozai *et al.*, 1997). Tuy nhiên, chất lượng ánh sáng cũng đóng vai trò quan trọng trong quá trình quang phát sinh hình thái, quang hợp và tổng hợp protein (Wang *et al.*, 2001), ảnh hưởng đến sinh tổng hợp chlorophyll (Tripathy, Brown, 1995). Sự sinh trưởng của thực vật biểu hiện qua các mức độ sinh lý, hình thái khác nhau dưới các vùng quang phổ khác nhau (Barreiro *et al.*, 1992). Hiện nay, hầu hết các nghiên cứu nuôi cấy mô tế bào thực vật sử dụng nguồn chiếu sáng là đèn huỳnh quang, không những tiêu tốn nhiều điện năng, phát nhiệt, tuổi thọ thấp..., đèn huỳnh quang còn phát ra những bước sóng không cần thiết cho sự sinh trưởng của thực vật (Kim *et al.*, 2004). Vì vậy, ánh sáng đơn sắc LED là một nguồn năng lượng đầy hứa hẹn cho các phòng

nuôi cấy mô với khả năng nâng cao quá trình tăng trưởng sinh học nhờ vào những ưu điểm như kích thước và thể tích nhỏ, tuổi thọ cao, cấu trúc đặc, an toàn và vùng quang phổ được kiểm soát (Nhut *et al.*, 2003).

Trong ngành công nghiệp hoa cắt cành, cúc là loài hoa có giá trị kinh tế cao, đứng thứ hai sau hoa hồng (Teixeira da Silva, 2004). Trong vi nhân giống, ảnh hưởng của LED đối với cây cúc đã được nghiên cứu nhiều như ảnh hưởng đến sự sinh trưởng của chồi, sự kéo dài đốt thân, tốc độ quang hợp và đặc điểm khí khổng của cây cúc *in vitro* (Kim *et al.*, 2004, Nhựt, Nam, 2009) cũng như sự phát sinh hình thái của chồi cúc *in vitro* (Kurilcik *et al.*, 2008; Nam *et al.*, 2012). Tuy nhiên, hầu như có rất ít nghiên cứu về ảnh hưởng của LED đến sự tích lũy hàm lượng chlorophyll a và b trong cây cúc nuôi cấy *in vitro*. Trong nghiên cứu này, ảnh hưởng của ánh sáng LED khác nhau lên quá trình sinh trưởng và khả năng tích lũy chlorophyll a và b của cây cúc nuôi cấy *in vitro* đã được khảo sát.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguồn mẫu

Nguồn mẫu sử dụng trong nghiên cứu nhân chồi là những đốt thân có chiều cao khoảng 1 cm. Nguồn mẫu sử dụng trong nghiên cứu tạo cây là những chồi đỉnh cao khoảng 2,5 cm. Tất cả các nguồn mẫu *in vitro* trên hiện có tại Phòng Sinh học phân tử và Chọn tạo giống cây trồng (Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên).

Hệ thống nuôi cấy

Các hệ thống chiếu sáng được sử dụng bao gồm

Hệ thống chiếu sáng LED (Light-emitting diode) LED đỏ (R) (610 - 760 nm), LED xanh (B) (450 - 500 nm), LED vàng (Y) (570 - 590 nm), LED xanh lá cây (G) (500 - 570 nm), LED trắng (W) (vùng quang phổ rộng) và LED đỏ kết hợp với LED xanh theo các tỷ lệ (10:90, 20:80, 30:70, 40:60, 50:50, 60:40, 70:30, 80:20 và 90 10).

Hệ thống chiếu sáng đèn huỳnh quang (FL) được sử dụng làm nguồn chiếu sáng đối chứng

Môi trường và điều kiện nuôi cấy

Môi trường được sử dụng trong thí nghiệm nhân chồi là môi trường MS (Murashige, Skoog, 1962) có bổ sung 0,2 mg/l BA, 30 g/l sucrose và 8 g/l agar. Môi trường sử dụng trong thí nghiệm tạo cây là môi trường MS có bổ sung 30 g/l sucrose và 8 g/l agar. Tất cả môi trường được điều chỉnh về pH 5,7 - 5,8 trước khi hấp khử trùng bằng autoclave ở 121°C, 1 atm trong 30 phút

Các mẫu được nuôi cấy ở điều kiện nhiệt độ 25 ± 2°C, độ ẩm 55 - 60%, quang kỳ 16 giờ/ngày, cường độ chiếu sáng 40 - 45 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

Bố trí thí nghiệm

Ảnh hưởng của điều kiện chiếu sáng LED lên sự nhân chồi

Các đốt thân cục được nuôi cấy trong bình thủy tinh (250 ml) có chứa 40 ml môi trường MS có bổ sung 0,2 mg/l BA, 30 g/l sucrose và 8 g/l agar, sau đó, các bình này được đặt dưới các hệ thống chiếu sáng khác nhau được nêu ở trên. Sau 4 tuần nuôi cấy, ghi nhận các chỉ tiêu: số chồi/mẫu, chiều cao chồi (cm), số lá/chồi, chiều dài lá (cm), chiều rộng lá (cm), khối lượng tươi (g), khối lượng khô (g).

Ảnh hưởng của điều kiện chiếu sáng LED lên sự sinh trưởng, phát triển và hàm lượng chlorophyll a và b

Các chồi đỉnh cục được cấy trong bình thủy tinh (250 ml) có chứa 40 ml môi trường MS có bổ sung 30 g/l sucrose và 8 g/l agar; sau đó, các bình này được đặt dưới các hệ thống chiếu sáng khác nhau. Sau 6 tuần nuôi cấy, ghi nhận các chỉ tiêu: chiều cao cây (cm), số lá, chiều dài lá (cm), chiều rộng lá (cm), khối lượng tươi (g), khối lượng khô (g), hàm lượng chlorophyll a và b ($\mu\text{g/g}$)

Xác định hàm lượng chlorophyll

Hàm lượng chlorophyll a và b được đánh giá bằng phương pháp phân tích quang phổ hấp phụ của dịch chiết lá trong dung dịch acetone 1 g lá cục (khối lượng tươi) được cho vào bình thủy tinh kín chứa 50 ml acetone và đặt ở điều kiện tối trong vòng 24 h để dung dịch chiết hoàn toàn lượng chlorophyll trong mẫu trước khi phân tích quang phổ hấp phụ bằng máy đo quang phổ UV - 2900 (Hitachi, Nhật Bản). Độ hấp phụ (OD) được đo ở bước sóng 662 và 645 nm. Hàm lượng chlorophyll a và b được tính theo công thức (Lichtenthaler, Wellburn, 1985):

$$\text{Chlorophyll a} = (11,75 \cdot A_{662} - 2,35 \cdot A_{645})$$

$$\text{Chlorophyll b} = (18,61 \cdot A_{645} - 3,96 \cdot A_{662})$$

Xử lý số liệu

Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên, đơn yếu tố với 3 lần lặp lại. Các số liệu thu được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel[®] 2013 và phần mềm SPSS 16.0 với Duncan's test ở mức $\alpha = 0,05$ (Duncan, 1995).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết quả

Ảnh hưởng của điều kiện chiếu sáng LED lên sự nhân chồi

Sau 4 tuần nuôi cấy, các chỉ tiêu về sự nhân chồi của cây cục ở các điều kiện chiếu sáng khác nhau được ghi nhận trong bảng 1. Kết quả thu được cho thấy, ở các điều kiện chiếu sáng khác nhau, số chồi hình thành trên mỗi mẫu, chiều cao chồi và số lá trên mỗi chồi tuy có sự khác nhau nhưng không có ý nghĩa về mặt thống kê. Tuy nhiên ở 50% LED đỏ và 50% LED xanh mẫu cấy đạt kết quả cao nhất về chiều dài lá (0,867 cm), chiều rộng lá (0,800 cm) cũng như về khối lượng tươi (0,976 g) và khối lượng khô (0,068 g) của chồi. Dưới các điều kiện chiếu sáng LED vàng, LED xanh lá cây,

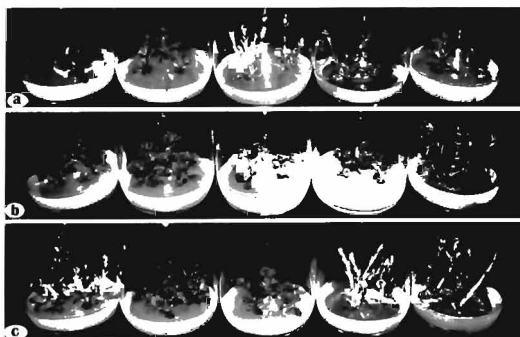
LED trắng và LED đỏ, các chồi hình thành cao hơn hẳn so với các nghiệm thức khác; tuy nhiên, các đốt thân bị kéo dài, lá rất nhỏ cả về chiều dài lá cũng như chiều rộng lá (Bảng 1, Hình 1). Các chồi hình thành dưới điều kiện chiếu sáng đèn huỳnh quang và các tỷ lệ LED đỏ

kết hợp với LED xanh thì to khỏe, các lá to hơn hẳn so với các nghiệm thức khác. Điều này cho thấy, sự kết hợp giữa LED đỏ và LED xanh có ảnh hưởng tốt lên sự nhân chồi cây cúc và ở tỷ lệ 50:50 là điều kiện chiếu sáng thích hợp nhất.

Bảng 1. Ảnh hưởng của điều kiện chiếu sáng LED lên sự nhân chồi:

Điều kiện chiếu sáng	Số chồi/mẫu	Chiều cao chồi (cm)	Số lá/chồi	Chiều dài lá (cm)	Chiều rộng lá (cm)	Khối lượng tươi (g)	Khối lượng khô (g)
FL	1,667bc*	1,900fg	7,333cd	0,733b	0,667b	0,508de	0,032cde
Y	2,333ab	3,067d	6,667de	0,333d	0,233a	0,395fg	0,033cde
G	2,000abc	3,267c	8,667bc	0,533c	0,433d	0,452ef	0,027efg
W	2,333ab	2,367e	7,667cd	0,667b	0,533cd	0,412fg	0,023fgh
B	1,667bc	1,967f	8,667bc	0,633bc	0,433d	0,349ghi	0,022gh
10R:90B	2,000abc	1,867fg	8,333bc	0,633bc	0,567bc	0,409fg	0,028def
20R:80B	2,333ab	1,700h	8,333bc	0,700b	0,667b	0,507de	0,030cde
30R:70B	1,667bc	1,533i	6,667de	0,700b	0,600bc	0,373gh	0,025fgh
40R:60B	1,667bc	1,167k	5,667e	0,667b	0,533cd	0,291i	0,021h
50R:50B	2,667a	3,400c	9,667ab	0,867a	0,800a	0,976a	0,068a
60R:40B	2,333ab	2,967d	10,667a	0,733b	0,567bc	0,859b	0,052b
70R:30B	2,333ab	1,900fg	8,667bc	0,633bc	0,633bc	0,557d	0,035c
80R:20B	1,333c	1,767gh	7,667cd	0,667b	0,533cd	0,328hi	0,021h
90R:10B	2,000abc	3,833b	6,667de	0,533c	0,433d	0,568d	0,034cd
R	2,000abc	5,533a	10,333a	0,367d	0,267e	0,702c	0,050b

Ghi chú: *Các chữ cái khác nhau (a, b, ...) trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở $\alpha = 0,05$ (Duncan's test)

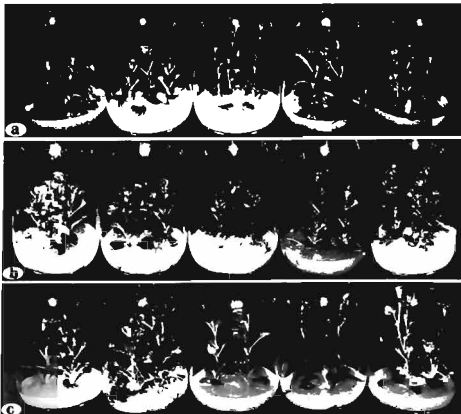


Hình 1. Ảnh hưởng của điều kiện chiếu sáng LED lên sự nhân chồi: a: Điều kiện chiếu sáng FL, B, Y, G, W (từ trái sang phải), b: Điều kiện chiếu sáng 10R:90B, 20R:80B, 30R:70B, 40R:60B, 50R:50B (từ trái sang phải), c: Điều kiện chiếu sáng 60R:40B, 70R:30B, 80R:20B, 90R:10B, R (từ trái sang phải).

Bảng 2. Ảnh hưởng của điều kiện chiếu sáng LED lên sự sinh trưởng, phát triển và hàm lượng chlorophyll a, b.

Điều kiện chiếu sáng	Chiều cao (cm)	Số lá/chồi	Chiều dài lá (cm)	Chiều rộng lá (cm)	Khối lượng tươi (g)	Khối lượng khô (g)	Chlorophyll a ($\mu\text{g/g}$)	Chlorophyll b ($\mu\text{g/g}$)
FL	4,167k*	13,667ab	1,433cd	1,233bc	0,812de	0,041cd	21,716c	10,619c
Y	6,900d	9,667e	0,833h	0,667g	0,255i	0,013i	6,009p	3,043p
G	5,767f	11,333cde	1,567b	1,367b	0,963bc	0,044cd	9,409m	4,507m
W	5,567fg	10,333e	1,167f	1,000def	0,422h	0,025h	7,433n	3,746n
B	4,333k	10,667de	1,367de	1,167bcd	0,530g	0,028gh	14,263i	6,838i
10R:90B	4,633j	12,333bcd	1,033g	0,900f	0,811de	0,044cd	9,717l	4,789l
20R:80B	5,267hi	10,667de	1,200f	1,00def	0,691fg	0,040de	10,246k	5,251k
30R:70B	5,033i	10,333e	1,267ef	1,00def	0,724ef	0,048bc	12,803j	6,237j
40R:60B	5,167i	12,333bcd	1,367de	1,167bcd	0,948bc	0,053b	15,869g	7,648g
50R:50B	5,433gh	14,333a	1,533bc	1,233bc	0,639fg	0,039def	17,821f	9,032f
60R:40B	6,167e	12,667abc	1,800b	1,367b	0,983b	0,043cd	18,804e	9,765e
70R:30B	7,333c	13,000abc	1,723a	1,600a	1,250a	0,070a	29,199a	14,567a
80R:20B	6,233e	11,333cde	1,333de	1,133cde	0,550g	0,035ef	23,752b	11,491b
90R:10B	8,267b	13,667ab	1,200f	0,933ef	0,870cd	0,048bc	19,799d	10,187d
R	8,867a	10,667de	0,967g	0,833g	0,549g	0,033fg	14,837h	7,327h

Ghi chú: *Các chữ cái khác nhau (a, b ...) trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở $\alpha = 0,05$ (Duncan's test)



Hình 2. Ảnh hưởng của điều kiện chiếu sáng LED lên sự sinh trưởng và phát triển của cây cúc nuôi cấy *in vitro*. a: Điều kiện chiếu sáng FL, B, Y, G, W (từ trái sang phải), b: Điều kiện chiếu sáng 10R:90B, 20R:80B, 30R:70B, 40R:60B, 50R:50B (từ trái sang phải), c: Điều kiện chiếu sáng 60R:40B, 70R:30B, 80R:20B, 90R:10B, R (từ trái sang phải).

Ảnh hưởng của điều kiện chiếu sáng LED lên sự sinh trưởng, phát triển và hàm lượng chlorophyll a và b

Sau 6 tuần nuôi cấy, kết quả thu được cho thấy các điều kiện chiếu sáng khác nhau ảnh hưởng không giống nhau lên sự sinh trưởng và phát triển của cây được nuôi cấy *in vitro* (Bảng 2, Hình 2).

Trong thí nghiệm này, các chồi cúc sinh trưởng và phát triển ở 70% LED đỏ và 30% LED xanh tốt hơn so với các điều kiện chiếu sáng khác. Các chỉ tiêu ở nghiệm thức này đều cao hơn so với các nghiệm thức còn lại như khối lượng tươi (1,250 g), khối lượng khô (0,070 g), chiều dài lá (1,723 cm), chiều rộng lá (1,600 cm), chlorophyll a (29,199 µg/g), chlorophyll b (14,567 µg/g).

Ở điều kiện chiếu sáng LED đỏ chiều cao chồi đạt cao nhất (8,867 cm) nhưng các cây con thu được lại có thân mảnh, lá hơi vàng và hàm lượng chlorophyll thấp hơn so với những cây được nuôi dưới điều kiện chiếu sáng kết hợp LED đỏ và LED xanh (ở các tỷ lệ 40:60, 50:50, 60:40, 70:30, 80:20 và 90:10) (Bảng 2). Chồi cúc sinli, tương tự như khu nuôi cấy dưới điều kiện LED vàng, bị vóng và các đốt bị kéo dài không đều nhau, lá rất nhỏ và các chỉ tiêu đạt được là thấp nhất về khối lượng tươi (0,255 g), khối lượng khô (0,013 g), chlorophyll a (6,009 µg/g), chlorophyll b (3,043 µg/g).

THẢO LUẬN

Vì nhân giống ra đời từ rất lâu và đã đáp ứng một lượng lớn cây giống có chất lượng cho ngành nông nghiệp, mang lại lợi nhuận đáng kể cho các phòng thí nghiệm nhân giống lớn nhỏ trên toàn thế giới. Tuy nhiên, chất lượng của cây giống phụ thuộc rất nhiều vào quá trình nuôi cấy *in vitro*. Hình thái và sinh lý của thực vật được nuôi cấy *in vitro* được điều hòa bởi các nhân tố vi môi trường như: nhiệt độ, độ ẩm, ánh sáng và nguồn carbon. Ánh sáng là một nhân tố quan trọng trong số đó, nó ảnh hưởng đến toàn bộ quá trình sinh trưởng và phát triển của thực vật *in vitro*. Ánh sáng điều khiển sự sinh trưởng và phát triển của thực vật thông qua hai con đường: quang hợp và quang phát sinh hình thái. Khi nuôi cấy dưới các điều kiện chiếu sáng khác nhau, thực vật sẽ thay đổi bộ máy quang hợp để thích nghi với từng điều kiện chiếu sáng nhất định nhằm duy trì khả năng quang hợp (Walters *et al.*, 2003). LED là nguồn chiếu sáng có những đặc tính tốt hơn so với các nguồn chiếu sáng khác như:

đèn huỳnh quang, đèn hơi kim loại, đèn natri cao áp. Đối với từng loài thực vật khác nhau, sự ảnh hưởng của các điều kiện chiếu sáng khác nhau lên sự sinh trưởng và phát triển cũng khác nhau. Nghiên cứu của Moeria da Silva, Debergh (1997), Hoenecke *et al.*, (1992) chỉ ra rằng LED đỏ kích thích sự kéo dài đốt thân, chiều dài lá của cây *Azorina vidalii* (Wats) Feer và cây rau diếp. Tuy nhiên, nghiên cứu của Hahn *et al.* (2000) cho kết quả ngược lại, ánh sáng đỏ không phù hợp với sự kéo dài thân và sự tăng trưởng của cây *Rehmannia glutinosa*, khối lượng tươi và tốc độ quang hợp của cây cũng thấp hơn so với điều kiện chiếu sáng LED xanh. Việc lá của cây con địa lan được tái sinh dưới LED đỏ kéo dài hơn hẳn so với dưới điều kiện chiếu sáng khác nhau trong nghiên cứu của Hoenecke *et al.*, (1992) dễ dàng được giải thích do tác dụng của ánh sáng đỏ trong sự kéo dài tế bào thực vật, trong đó có tế bào thân và lá, như trên đối tượng cúc và cà chua (Mortensen, Stromme, 1987). Trong khi đó, thành phần ánh sáng xanh chiếm ưu thế lại ức chế sự kéo dài lá nhưng lại mở rộng lá theo chiều ngang. Điều này tương tự như sự ức chế kéo dài trục hạ diệp ở cây diếp cá (Volmaro *et al.*, 1998) hay sự giảm chiều cao đáng kể của *Antirrhinum* (Khattak *et al.*, 2005). Điều này được giải thích thông qua tác động của ánh sáng xanh lên sự thay đổi nồng độ hormone nội sinh, dẫn đến sự mất cân bằng nồng độ của các chất nội sinh này trong thực vật (Volmaro *et al.*, 1998).

Đã có nhiều nghiên cứu về ảnh hưởng của LED lên sự sinh trưởng của chồi, sự kéo dài đốt thân, tốc độ quang hợp và đặc điểm khí khổng của cây cúc *in vitro* (Kim *et al.*, 2002) cũng như sự phát sinh hình thái của chồi cúc *in vitro* (Kurilcik *et al.*, 2008). Sự tái sinh chồi trực tiếp từ các mẫu cấy lá và gián tiếp từ lớp mỏng tế bào thân cắt dọc của cây cúc (*Chrysanthemum morifolium* Ramat. cv. "Jimba") đạt tốt nhất ở 70% LED đỏ và 30% LED xanh (Nam *et al.*, 2012). Dương Tấn Nhựt, Nguyễn Bá Nam (2009) đã cho thấy ở điều kiện chiếu sáng 90% LED đỏ và 10% LED xanh có ảnh hưởng tốt lên sự sinh trưởng và phát triển của cây hoa cúc (*Chrysanthemum morifolium* cv. "Nút"). Trong nghiên cứu này của chúng tôi, sự kết hợp 50% LED đỏ và 50% LED xanh thích hợp cho nhân chồi và sự kết hợp 70% LED đỏ và 30% LED xanh thích hợp cho sự sinh trưởng và phát triển của cây con. Kết quả này có sự khác biệt với nghiên cứu của Dương Tấn Nhựt, Nguyễn Bá Nam (2009); Nguyễn Bá Nam *et al.*, (2012) có thể là do sự khác nhau về giống cây cúc và nguồn vật liệu nuôi cấy ban đầu.

Các nguồn mẫu khác nhau và các đối tượng thực vật khác nhau thì cần có điều kiện chiếu sáng khác nhau. Trên đối tượng lan hải thi tỷ lệ 80% LED đỏ và 20% LED xanh thích hợp cho sự sinh trưởng và phát triển của chồi (Nhut, 2002; Tanaka, Sakanishi, 1980). Trong khi đó sự sinh trưởng và phát triển của cây dâu tây đạt tốt nhất ở 70% LED đỏ và 30% LED xanh (Nhut *et al.*, 2003). Những tác giả trên đều cho rằng sự kết hợp giữa LED đỏ và LED xanh cho kết quả sinh trưởng và phát triển tốt đối với hầu hết tất cả các loại cây trồng (thông thường tỷ lệ LED đỏ nhiều hơn LED xanh). Ánh sáng đỏ có bổ sung ánh sáng xanh với một tỷ lệ thích hợp có tác dụng thúc đẩy tốt nhất sự sinh trưởng ở nhiều đối tượng như khoai tây, cà chua, dâu tây, chuối, *Eucalyptus citriodora*, *Phalaenopsis*, *Spathiphyllum* (Nhut, 2002). Khi sử dụng ánh sáng đỏ mà không bổ sung ánh sáng xanh, cây con tái sinh thường có biểu hiện thất thường như: khí khổng bất thường, xuất hiện thùy tinh thể (Nhut, 2002).

Sự tăng trưởng lá, hàm lượng chlorophyll của chồi chịu ảnh hưởng của bức xạ đèn LED. Ánh sáng đỏ thúc đẩy sự tăng trưởng lá nhưng làm giảm lượng chlorophyll, chlorophyll lại được phục hồi dưới ánh sáng xanh (Tanaka *et al.*, 1998). Ánh sáng xanh có vai trò quan trọng trong sinh tổng hợp chlorophyll, mở khí khổng, tổng hợp các enzyme, thời kỳ chín của chloroplast và quang hợp (Tibbitts *et al.*, 1983). LED đỏ và LED xanh đã được sử dụng để nghiên cứu trong nhiều khía cạnh của quang sinh học như là sự tổng hợp chlorophyll (Tripathy, Brown, 1995), quang hợp (Tennissen *et al.*, 1994). Theo nghiên cứu của Dương Tấn Nhựt (2011) cho thấy dưới LED đỏ thì hàm lượng chlorophyll trong lá của cây con giảm đi. Senger (1982) đã nhấn mạnh vai trò của ánh sáng xanh lên sự phát triển của chlorophyll, sự hình thành chlorophyll và sự mở khí khổng.

Sự sinh trưởng và phát triển của thực vật có thể được thúc đẩy bằng cách gia tăng tốc độ quang hợp dưới vùng quang phổ là đỉnh hấp thụ của các sắc tố quang hợp, vùng quang phổ này thường là giao thoa giữa hai loại LED xanh (450 nm) và LED đỏ (660 nm). LED xanh và LED đỏ phối hợp tạo ra bước sóng có ngưỡng phù hợp cho quá trình hấp thụ năng lượng thông qua chlorophyll a và b nên đã làm tăng tốc độ quang hợp cho thực vật (McCree, 1972). Ding *et al.* (2010) cũng cho thấy kết quả tương tự khi nuôi cấy *in vitro* cây hoa mẫu đơn (*Paeonia suffruticosa* cv. 'Wu Long Peng Sheng'), hàm lượng chlorophyll a và b tăng khi tỷ lệ LED đỏ tăng từ 0 đến 80% và đạt cao nhất ở LED đỏ và LED xanh theo các tỷ lệ 60R:40B, 70R:30B, 80R:20B.

Trong nghiên cứu của chúng tôi, hàm lượng chlorophyll dưới LED đỏ thấp hơn so với đèn huỳnh quang và các điều kiện chiếu sáng kết hợp giữa LED đỏ và LED xanh theo các tỷ lệ khác nhau như: 40:60, 50:50, 60:40, 70:30, 80:20 và 90:10. Sự kết hợp giữa 70% LED đỏ và 30% LED xanh cho thấy hàm lượng chlorophyll a và b là cao nhất và giảm dần khi tăng tỷ lệ LED đỏ và giảm tỷ lệ LED xanh và giảm mạnh ở tỷ lệ 90% LED đỏ và 10% LED xanh. Điều này có thể giải thích là do LED xanh dường như có liên hệ với hệ thống phytochrome hoặc thông qua một thụ quan ánh sáng xanh gây ra các phản ứng của thực vật (Gaba, Black, 1987). Các phytochrome này kiểm soát sự phiên mã của một số gene bao gồm tiểu phần nhỏ của rubisco, protein gắn kết chlorophyll a hoặc b (Dương Tấn Nhựt, 2011). LED vàng cho hệ số nhân chồi cao hơn nhưng lại ức chế sự sinh trưởng của chồi hơn so với LED đỏ. Trong khi đó LED xanh lá cây lại thúc đẩy sự sinh trưởng của cây cúc nuôi cấy *in vitro* (Miler, Zalewska, 2006). LED xanh lá cây có tác động tích cực lên sự sinh trưởng và phát triển của cây với khối lượng tươi và khối lượng khô cao hơn so với LED đỏ. Tuy nhiên, hàm lượng chlorophyll a và b ở hai điều kiện chiếu sáng này lại tương đối thấp so với các điều kiện chiếu sáng khác. Điều này có thể là do bước sóng của LED vàng và LED xanh lá cây không phù hợp với vùng quang phổ hấp thụ cực đại của chlorophyll a (662 nm) và chlorophyll b (645 nm) (Lichtentaler, Wellburn, 1985) Dưới điều kiện LED trắng thì sự sinh trưởng và phát triển cũng như hàm lượng chlorophyll là thấp hơn; nguyên nhân có thể là do sự thay đổi quang hóa trong môi trường nuôi cấy hơn là do chức năng cảm quang của mô thực vật (Hangarter, Stasinopoulos, 1991).

Grimstad (1991) đã so sánh hiệu quả tương đối của 6 loại đèn huỳnh quang khác nhau lên sự tăng trưởng và phát triển của cây Rau Diếp trong phòng nuôi cấy thì thấy rằng có sự khác biệt đáng kể về khối lượng khô, sự tạo lá. Tuy nhiên, trong nhà kính thì sự khác biệt này không đáng kể và hầu như không có sự khác biệt về sự phát triển của cây trồng; khối lượng khô cao nhất liên quan tới các nguồn đèn phát ra nhiều ánh sáng xanh, đó cũng như đó xa. Các cây trồng dưới các đèn này có hàm lượng chlorophyll trong lá cao. Các kết quả nghiên cứu của Miyashita *et al.*, (1994) về ảnh hưởng của ánh sáng đỏ lên sự tăng trưởng và phát sinh hình thái của cây con khoai tây cũng như ảnh hưởng của tỷ lệ cường độ ánh sáng đỏ/cường độ photon quang hợp cho thấy LED đỏ có thể sử dụng để kiểm soát sự phát sinh hình thái cây con trong vi nhân giống. Chiều cao chồi và hàm lượng chlorophyll ở cây con tăng khi

tăng dòng photon đỏ trong khi không có sự khác biệt đáng kể về khối lượng khô và diện tích lá.

Những nghiên cứu trước đây đã cố gắng tìm ra mối quan hệ giữa tỷ lệ LED xanh và LED đỏ cho sự sinh trưởng, phát triển và tổng hợp chlorophyll ở thực vật nhưng vẫn chưa xác định rõ ràng mối liên hệ của 2 loại ánh sáng này.

KẾT LUẬN

Chất lượng ánh sáng ảnh hưởng đến quá trình nhân chồi cũng như sự sinh trưởng, phát triển và hàm lượng chlorophyll a và b của cây cúc nuôi cấy *in vitro*. Kết quả nghiên cứu này cho thấy LED đỏ và LED xanh kết hợp theo tỷ lệ 50:50 là thích hợp cho sự nhân chồi. Trong khi đó, sự kết hợp giữa LED đỏ và LED xanh theo tỷ lệ 70:30 là thích hợp cho quá trình sinh trưởng, phát triển và hàm lượng chlorophyll a và b của cây cúc nuôi cấy *in vitro*.

Lời cảm ơn: Các tác giả xin chân thành cảm ơn Quỹ phát triển Khoa học Công nghệ Quốc gia (Nafosted, mã số đề tài: 106.16-2012.32) đã hỗ trợ kinh phí thực hiện đề tài này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Barreiro R, Guiamet JJ, Beltrano J, Montaldi ER (1992) Regulation of the photosynthetic capacity of primary bean leaves by the red: far-red ratio and photosynthetic photon flux density of incident light. *Plant Physiol* 85: 97-101.

Cui YI, Hahn J, Kozai T, Paek KY (2000) Number of air exchanges, sucrose concentration, photosynthetic photon flux, and differences in photoperiod and dark period temperatures affect growth of *Rehmannia glutinosa* plantlets *in vitro*. *Plant Cell Tiss Org* 62: 219-226.

Ding Y, He S, Teixeira da Silva JA, Li G, Tanaka M (2010) Effects of a new light source (cold cathode fluorescent lamps) on the growth of tree peony plantlets *in vitro*. *Sci Hort* 125: 167-169.

Duncan DB (1995) Multiple range and multiple F test. *Biometrics* 11: 1-42.

Dương Tấn Nhật (2011) Công nghệ sinh học thực vật. Nghiên cứu cơ bản và ứng dụng. Tầm quan trọng của các loại ánh sáng lên sự sinh trưởng và phát triển của thực vật. Nhà Xuất Bản Nông Nghiệp: 22-48.

Dương Tấn Nhật, Nguyễn Bá Nam (2009) Ảnh hưởng của hệ thống chiếu sáng đơn sắc lên sự sinh trưởng và phát triển của cây hoa cúc (*Chrysanthemum morifolium* cv. "Núi") nuôi cấy *in vitro*. *Tap chí Công nghệ Sinh học* 7(1): 91-98.

Gaba V, Black M (1987) Photoreceptor interactions in plant photomorphogenesis: the limits of experimental techniques and their interpretations. *Photochem Photobiol* 45: 151-156.

Grimstad SO (1991) The efficiency of fluorescent lamps in young lettuce plant production. *Norwegian J Agri Sci* 5: 261-267.

Hahn EJ, Kozai T, Paek KY (2000) Blue and red light-emitting diodes with or without sucrose and ventilation affects *in vitro* growth of *Rehmannia glutinosa* plantlets. *J Plant Biol* 43: 247-250.

Hangarter RP, Stasinopoulos TC (1991) Repression of plant tissue culture growth by light is caused by photochemical change in the culture medium. *Plant Sci* 79: 253-257.

Hoenecke M, Bula RJ, Tibbitts TW (1992) Importance of "blue" photon levels for lettuce seedlings grown under red light-emitting diodes. *Sci Hort* 27: 427-430.

Khatak AM, Pearson S (2005) Light quality and temperature effects on *Antirrhinum* growth and development. *J Zhejiang Univ Sci* 6: 119-124.

Kim SJ, Hahn EJ, Heo JW, Paek KY (2004) Effects of LEDs on net photosynthetic rate, growth and leaf stomata of *Chrysanthemum* plantlets *in vitro*. *Sci Hort* 101: 143-151.

Kozai T, Kubota C, Jeong BR (1997) Environmental control for large-scale production of plants through *in vitro* techniques. *Plant Cell Tiss Org* 51: 49-56.

Kurlicik A, Canova RM, Dapkuniene S, Zilinskaite S, Kurlicik G, Tamulaitis G, Duchovskis P, Zukauskas A (2008) *In vitro* culture of *Chrysanthemum* plantlets using light-emitting diodes. *C Eur J Biol* 3(2): 161-167.

Lichtentaler HK, Wellburn AR (1985) Determination of total carotenoids, chlorophyll a và b of leaf in different solvents. *Biol Soc Trans* 11: 591-592.

McCree KJ (1972) The action spectra, absorbance and quantum yield of photosynthesis in crop plants. *Agr Met* 9: 191-196.

Miler N, Zalewska M (2006) The influence of light colour on micropropagation of *Chrysanthemum*. *Acta Hort* 725: 347-350.

Miyashita Y, Kimura Y, Kitaya Y, Kozai T (1994) Effects of red light on the growth and morphology of *Potato* plantlets *in vitro*: using light-emitting diodes (LEDs) as a light source for micropropagation. *Acta Hort* 418: 169-173.

Mocria da Silva MH, Debergh PC (1997) The effect of light quality on the morphogenesis of *in vitro* cultures of *Azorina vidalii* (Wats) Feer. *Plant Cell Tiss Org* 51: 187-193.

Mortensen LM, Stromme E (1987) Effects of light quality on some greenhouse crops. *Sci Hort* 33: 27-36.

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiol* 15: 473-497.

Nguyễn Bá Nam, Nguyễn Đình Lâm, Dương Tấn Nhựt (2012) Ảnh hưởng của loại mẫu cây 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*. *Tap chí Khoa học và Công nghệ* 50(6): 595-606.

Nhut DT (2002) *In vitro* growth and physiological aspects of some horticultural plantlets cultured under red and blue light-emitting diodes (LEDs). Ph. D Thesis, Kagawa Univ. Japan: 163-172.

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 Org* 73: 43-52.

Senger H (1982) The effect of blue light on plants and microorganisms *Photochem Photobiol* 35: 911-920.

Tanaka M, Sakanishi Y (1980) Clonal propagation of *Phalaenopsis* through tissue culture. In: Proceedings of the 9th World Orchid Conference: 215-221.

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

Teixeira da Silva JA (2004) Ornamental chrysanthemums.

improvement by biotechnology-Review of Plant Biotechnology and Applied Genetics. *Plant Cell Tiss Org* 79: 1-18.

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

Tibbitts TW, Morgan DC, Warrington IJ (1983) Growth of lettuce, spinach, mustard and wheat plants under four combinations of high-pressure sodium, metal halide, and tungsten halogen lamps at equal PPFD *J Amer Soc Hort Sci* 108: 622-630.

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

Volmaro C, Pontin M, Luna V, Baraldi R (1998) Blue light control of hypocotyl elongation in etiolated seedlings of *Lactuca sativa* (L.) cv. Grand Rapids related to exogenous growth regulators and endogenous IAA, GA₃, and abscisic acid *Plant Growth Reg* 26: 165-173

Walters RG, Shephard F, Rogers JJM, Rolfe SA, Horton P (2003) Identification of mutants of *Arabidopsis* defective in acclimation of photosynthesis to the light environment. *Plant Physiol* 131: 472-481.

Wang H, Ma LG, Li JM, Zhao HY, Deng XW (2001) Direct interaction of *Arabidopsis* cryptochromes with COP1 in light control development. *Science* 294: 154-158.

GROWTH, DEVELOPMENT AND CHLOROPHYLL CONTENTS OF *CHRYSANTHEMUM* (*C. MORIFOLIUM* RAMAT. CV. "JIMBA") SHOOTS CULTURED IN *IN VITRO* UNDER LIGHT-EMITTING DIODE

Nguyễn Thanh Sang¹, Nguyễn Bá Nam¹, Hoàng Thanh Tung¹, Nguyễn Phúc Huy¹, Nguyễn Thị Kim Loan¹, Nguyễn Ngọc Thảo¹, Vũ Đức Trung¹, Nguyễn Văn An², Trần Thị Minh Loan², Nguyễn Văn Kiệt², Dương Tấn Nhựt^{1*}

¹Tay Nguyen Institute for Scientific Research, Vietnam Academy of Science and Technology

²University of Da Lat

SUMMARY

In this study, the effects of different light conditions on the shoot multiplication; the growth and development as well as the contents of chlorophyll a and b of *Chrysanthemum* cultured *in vitro* were investigated. *Chrysanthemum* shoots were cultured under different light conditions, specifically red LED, blue LED, yellow LED, green LED, white LED, red and blue LED in combination (R:B = 10:90, 20:80, 30:70, 40:60, 50:50, 60:40, 70:30, 80:20, 90:10, respectively) After 4 weeks of culture, the results indicated the best light condition for shoot multiplication was 50% red LED plus 50% blue LED. The combination of 70% red LED and 30% blue LED gave the best results in term of fresh weight, dry weight, length and width of leaf (1.25 g; 0.07 g; 1.72 cm; 1.60 cm; respectively). In addition, the contents of chlorophyll a, b depended on different light conditions. The highest contents of chlorophyll a (29.20 µg/cm²) and chlorophyll b (14.57 µg/cm²) were obtained under 70% red LED and 30% blue LED. Thus, the best shoot multiplication was

* Author for correspondence: Tel: +84-63-3831056; Fax: +84-63-3831028; E-mail: duongtannhut@gmail.com

obtained under 50% red LED plus 50% blue LED; however, the combination of 70% red LED and 30% blue LED were optimal for the growth and development as well as the contents of chlorophyll a and b of *Chrysanthemum*.

Keywords: *chlorophyll a, chlorophyll b, chrysanthemum, growth, LED*