

ẢNH HƯỞNG CỦA CƯỜNG ĐỘ VÀ SỰ THAY ĐỔI GIAI ĐOẠN CHIẾU SÁNG GIỮA LED ĐỎ VÀ LED XANH LÊN QUÁ TRÌNH SINH TRƯỞNG VÀ PHÁT TRIỂN CỦA CÂY CÚC (*CHRYSANTHEMUM MORIFOLIUM* RAMAT. CV. “JIMBA”) *IN VITRO*

Hoàng Thanh Tùng^{1,2}, Nguyễn Thanh Sang¹, Nguyễn Xuân Tuấn¹, Nguyễn Bá Nam¹, Nguyễn Phúc Huy¹, Vũ Thị Hiền¹, Vũ Quốc Luận¹, Dương Tấn Nhựt¹

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

²Trường Đại học khoa học, Đại học Huế

Ngày nhận bài: 19.5.2015

Ngày nhận đăng: 30.6.2015

TÓM TẮT

Tác động của cường độ và sự thay đổi giai đoạn chiếu sáng khác nhau giữa LED đỏ và LED xanh đến quá trình 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 chồi đỉnh Cúc được nuôi cấy dưới các cường độ chiếu sáng bao gồm 30, 45 và 60 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ở điều kiện chiếu sáng kết hợp giữa 70% LED đỏ với 30% LED xanh; sự thay đổi giai đoạn chiếu sáng giữa LED đỏ và LED xanh theo thời gian như: tuần đầu LED đỏ, tuần sau LED xanh và ngược lại; 2 tuần đầu LED đỏ, 2 tuần sau LED xanh và ngược lại. Kết quả thu được sau 6 tuần nuôi cấy cho thấy, cường độ 60 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ có ảnh hưởng tốt lên quá trình sinh trưởng và phát triển của cây Cúc; tuy nhiên, hàm lượng chlorophyll a và b đạt cao nhất ở cường độ 45 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Các mẫu nuôi cấy sinh trưởng và phát triển tốt nhất dưới giai đoạn chiếu sáng thay đổi hàng tuần giữa LED xanh và LED đỏ (tuần đầu chiếu sáng LED xanh, tuần sau chiếu sáng LED đỏ). Như vậy, kết quả từ nghiên cứu cho thấy cường độ 60 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ và sự thay đổi giai đoạn chiếu sáng hàng tuần với tuần đầu LED xanh, tuần sau LED đỏ có ảnh hưởng tốt lên quá trình sinh trưởng và phát triển của cây Cúc *in vitro*. Tỷ lệ sống sót, sự sinh trưởng và phát triển của cây Cúc dưới điều kiện chiếu sáng 70R:30B và 50R:50B là tốt hơn những cây ở điều kiện chiếu sáng đèn huỳnh quang sau 4 tuần ở vườn ươm.

Từ khóa: cây Cúc, chlorophyll a, chlorophyll b, cường độ, giai đoạn chiếu sáng, LED

MỞ ĐẦU

Cúc là loài hoa gắn liền với văn hóa phương Đông và phương Tây, có giá trị kinh tế cao, không chỉ đa dạng về màu sắc, hình dáng mà còn dễ nhân giống, có thể điều khiển sự ra hoa theo ý muốn và hoa có độ bền lâu. Cúc rất thích hợp và thực sự đang được ưa chuộng như một loại cây cảnh có giá trị cả về vật chất lẫn tinh thần như dùng làm hoa trang trí mang đến cảnh quan đẹp mắt, dễ chịu, dùng trong ẩm thực như trà hoa Cúc, vị thuốc, nguyên liệu pha chế thuốc trừ sâu (Đông, Lộc, 2003). Hiện nay, Cúc đã được nghiên cứu nhiều nhằm cải tiến chất lượng cây Cúc, làm cho Cúc ngày một đa dạng về màu sắc và hình dáng, cũng như tăng khả năng chống chịu nấm bệnh và thích nghi tốt với môi trường. Nhân giống cây hoa Cúc bằng nuôi cấy mô tế bào thực vật là biện pháp phổ biến nhất. Tuy nhiên, hầu hết các phòng nuôi cấy mô tế bào thực vật đều sử dụng nguồn chiếu sáng là đèn huỳnh quang, không những phát ra những bước

sóng không cần thiết cho sự sinh trưởng của thực vật, tuổi thọ thấp, phát nhiệt và tiêu tốn nhiều điện năng nên chi phí sản xuất tăng cao (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. Việc sử dụng đi-ốt phát quang như một nguồn bức xạ cho thực vật được đặc biệt chú trọng trong những năm gần đây do tiềm năng của nó trong ứng dụng thương mại rất lớn. Hệ thống bức xạ LED có một số ưu điểm vượt trội so với những hệ thống chiếu sáng hiện đang được sử dụng rộng rãi trong nuôi cấy mô (Nhut, 2002). Sự phát sáng cực đại của LED đỏ và xanh với độ dài sóng thích hợp tạo hiệu quả quang hợp tối đa (McCree, 1972). LED là nguồn sáng có tuổi thọ dài, dễ thay đổi do đó góp phần giảm chi phí điện năng. LED sinh nhiệt ít do đó giảm thiểu nhu cầu sử dụng hệ thống làm lạnh trong việc tạo điều kiện thuận lợi cho nhân giống vô tính thương mại với chi phí hiệu quả.

Nhiều công trình nghiên cứu về vai trò của

ánh sáng đơn sắc (LED) đối với cây Cúc đã chỉ ra rằng ánh sáng LED thích hợp cho sinh trưởng và phát triển của cây hơn là ánh sáng huỳnh quang như ảnh hưởng đến sự sinh trưởng của chồi, sự kéo dài đốt thân, tốc độ quang hợp, đặc điểm khí khổng của cây Cúc *in vitro* (Kim *et al.*, 2004; Nhựt, Nam, 2009), sự phát sinh hình thái của chồi Cúc *in vitro* (Nam *et al.*, 2012), sinh trưởng và phát triển (Kurilcik *et al.*, 2008; Heo *et al.*, 2010). Tuy nhiên, các nghiên cứu trên cây Cúc dưới tác động của ánh sáng LED chỉ được tiến hành riêng lẻ ở một số tỷ lệ nhất định hoặc ở một số giai đoạn nhất định, hầu như có rất ít nghiên cứu về ảnh hưởng của cường độ và thay đổi thời gian chiếu sáng giữa LED đỏ và LED xanh đến quá trình sinh trưởng và phát triển cũng như sự thay đổi hàm lượng chlorophyll a và b. Vì vậy, chúng tôi tiến hành nghiên cứu: “Ảnh hưởng của cường độ và sự thay đổi giai đoạn chiếu sáng giữa LED đỏ và LED xanh lên quá trình sinh trưởng và phát triển của cây Cúc (*Chrysanthemum morifolium* Ramat. cv. “Jimba”) *in vitro*”.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguồn mẫu

Nguồn mẫu sử dụng trong nghiên cứu này là những chồi đỉnh Cúc (*Chrysanthemum morifolium* Ramat. Cv. “Jimba”) *in vitro* cao khoảng 2,5 cm. Tất cả các nguồn mẫu hiện có tại Phòng Sinh học phân tử và Chọn tạo giống cây trồng (Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên).

Môi trường nuôi cấy

Môi trường được sử dụng trong các thí nghiệm là môi trường MS (Murashige, Skoog, 1962) có bổ sung 30 g/l sucrose và 8 g/l agar (Smaranda, 2005). Tất cả môi trường được điều chỉnh về pH 5,8 trước khi hấp khử trùng bằng autoclave ở 121°C, 1 atm trong thời gian 20 phút.

Điều kiện nuôi cấy

Điều kiện *in vitro*

Các mẫu được nuôi trên các môi trường và đặt trong điều kiện phòng nuôi ở điều kiện nhiệt độ $25 \pm 2^\circ\text{C}$, độ ẩm 55 - 60%, quang kỳ 16 giờ/ngày, cường độ chiếu sáng $40 - 45 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (ngoại trừ thí nghiệm khảo sát cường độ ánh sáng LED).

Điều kiện vườn ươm

Các thí nghiệm ở vườn ươm được tiến hành ở

điều kiện nhiệt độ khoảng $20 - 25^\circ\text{C}$, độ ẩm trung bình khoảng 70 - 85% và sử dụng ánh sáng tự nhiên.

Hệ thống nguồn chiếu sáng

Hệ thống chiếu sáng bao gồm: LED xanh (B) (450 - 500 nm), LED đỏ (R) (610 - 760 nm) và LED đỏ kết hợp với LED xanh theo các tỷ lệ 50:50 và 70:30, đèn huỳnh quang (FL).

Bố trí thí nghiệm

Khảo sát ảnh hưởng của cường độ ánh sáng LED lên quá trình sinh trưởng và phát triển của cây Cúc *in vitro*

Các chồi đỉnh cao khoảng 2,5 cm 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 cường độ ánh sáng 30, 45 và $60 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (cường độ ánh sáng được điều chỉnh bằng khoảng cách từ đèn đến mẫu cây, tương ứng với khoảng cách 20 cm, 15 cm và 10 cm; cường độ này được đo bằng máy LI-250A Lighting meter (LICOR Biosciences UK Ltd.)) ở điều kiện chiếu sáng (70% LED đỏ kết hợp với 30% LED xanh) tốt nhất đến quá trình sinh trưởng và phát triển của cây Cúc *in vitro* (Sang *et al.*, 2014). Các cường độ chiếu sáng trên là cường độ tổng thể của 70% LED đỏ kết hợp với 30% LED xanh. Mỗi nghiệm thức cấy 30 bình, mỗi bình cấy 3 mẫu. Sau 6 tuần nuôi cấy, ghi nhận các chỉ tiêu: chiều cao cây (cm), số lá/cây, chiều dài lá (cm), chiều rộng lá (cm), khối lượng tươi (g), khối lượng khô (mg), hàm lượng chlorophyll a và b ($\mu\text{g/g}$).

Khảo sát ảnh hưởng của giai đoạn chiếu sáng khác nhau của ánh sáng LED đỏ và LED xanh lên quá trình sinh trưởng và phát triển của cây Cúc *in vitro*

Các chồi đỉnh cao khoảng 2,5 cm 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 điều kiện chiếu sáng khác nhau như FL, 50R:50B, sự thay đổi giai đoạn giữa 1 tuần đầu LED xanh, 1 tuần sau LED đỏ (B1) và ngược lại (R1), 2 tuần đầu LED xanh, 2 tuần sau LED đỏ (B2) và ngược lại (R2). Mỗi nghiệm thức cấy 30 bình, mỗi bình cấy 3 mẫu. Sau 6 tuần nuôi cấy, ghi nhận các chỉ tiêu: chiều cao cây (cm), số lá/cây, chiều dài lá (cm), chiều rộng lá (cm), số rễ, chiều dài rễ (cm), khối lượng tươi (g), khối lượng khô (mg), hàm lượng chlorophyll a và b ($\mu\text{g/g}$).

Khảo sát ảnh hưởng của điều kiện chiếu sáng đến sự sinh trưởng và phát triển của cây cúc ở điều kiện vườn ươm

Các cây Cúc thu nhận từ nuôi cấy chồi Cúc (3 cm) dưới điều kiện chiếu sáng khác nhau (đèn huỳnh quang, 70R:30B và 50R:50B (thu nhận ở thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của giai đoạn chiếu sáng khác nhau của ánh sáng LED đỏ và LED xanh) sau 6 tuần nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung 30 g/l sucrose, 8 g/l agar; sau đó, được rửa sạch agar, trồng theo từng lỗ riêng lẻ vào các chậu nhựa nhỏ có đường kính 4,5 cm, cao 7,5 cm có chứa giá thể đất trộn xơ dừa theo tỷ lệ 50:50. Trong tuần đầu tưới phun sương 2 lần/ngày, sau đó tưới 1 lần/ngày. Sau 4 tuần, ghi nhận các chỉ tiêu: tỷ lệ sống sót (%), chiều cao cây (cm), chiều dài lá (cm), chiều rộng lá (cm), số rễ/cây, chiều dài rễ (cm), khối lượng tươi (g), khối lượng khô (mg) và chỉ số SPAD (đo bằng máy SPAD - 502 của Nhật Bản).

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 Cúc (khối lượng tươi) được cho vào bình thủy tinh kín chứa 50 ml acetone và đặt ở điều kiện tối trong vòng 24 giờ 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):

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

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

Bố trí thí nghiệm và xử lý số liệu

Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 3 lần lặp lại. Các số liệu được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel® 2013 và phần mềm SPSS 16.0 theo Duncan's test ở mức P = 0,05 (Duncan, 1995).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Ảnh hưởng của cường độ ánh sáng LED lên quá trình sinh trưởng và phát triển của cây cúc in vitro

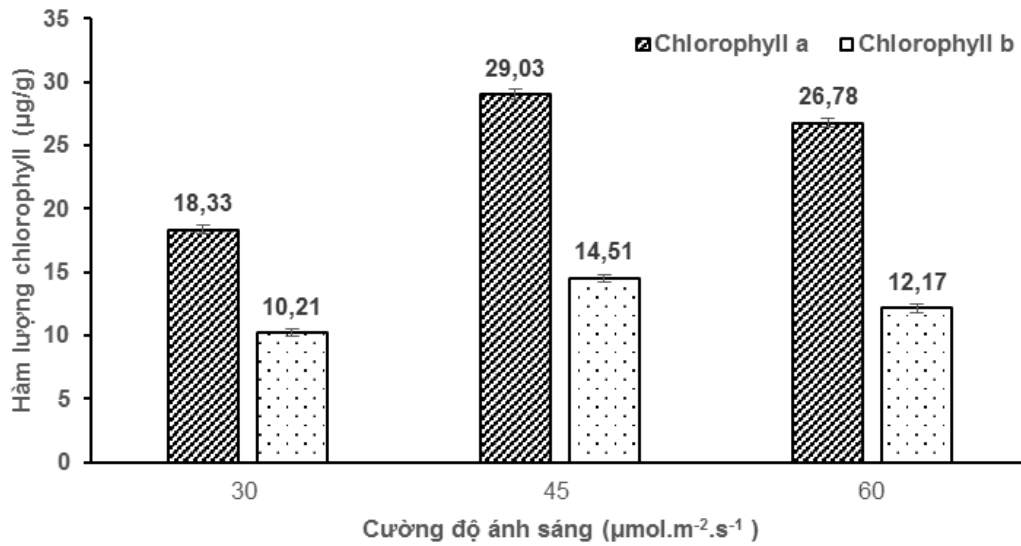
Sau 6 tuần nuôi cấy, kết quả thu được cho thấy cường độ ánh sáng khác nhau ở cùng một điều kiện chiếu sáng ảnh hưởng không giống nhau lên quá trình sinh trưởng và phát triển của cây Cúc *in vitro* thể hiện ở bảng 1, hình 1 và 2.

Cường độ ánh sáng LED 30 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ có ảnh hưởng thấp đến quá trình sinh trưởng và phát triển của cây Cúc nuôi cấy *in vitro* với các chỉ tiêu về chiều cao chồi (6,57 cm), số lá (10,67 lá), số rễ (10,67 rễ), chiều dài rễ (1,57 cm), khối lượng tươi (0,83 g) (Bảng 1); cây phát triển yếu, thân mảnh và lá có màu xanh nhạt hơn so với các cường độ còn lại (Hình 2). Cường độ chiếu sáng tăng có ảnh hưởng rõ rệt đến quá trình sinh trưởng và phát triển của cây Cúc, các chỉ tiêu thu được tăng dần khi tăng cường độ chiếu sáng. Đặc biệt, ở cường độ 60 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ có ảnh hưởng tốt lên quá trình sinh trưởng và phát triển của cây Cúc với chiều cao (7,73 cm), số lá (13,67 lá), số rễ (17,33 rễ), chiều dài rễ (2,63 cm), khối lượng tươi (1,43 g), khối lượng khô (105,07 mg) là cao nhất (Bảng 1). Chiều dài và chiều rộng lá cũng là chỉ tiêu quan trọng để đánh giá khả năng sinh trưởng của thực vật, tuy có sự khác nhau giữa các nghiệm thức nhưng không có ý nghĩa về mặt thống kê. Tuy các chỉ tiêu về sinh trưởng và phát triển của các cây khi nuôi cấy ở cường độ chiếu sáng 45 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ thấp hơn so với cường độ chiếu sáng 60 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ nhưng lại cho hàm lượng chlorophyll a (29,03 $\mu\text{g/g}$) và chlorophyll b (14,51 $\mu\text{g/g}$) là cao nhất (Hình 1). Như vậy, qua kết quả thu được cho thấy, điều kiện chiếu sáng kết hợp giữa LED đỏ với LED xanh theo tỷ lệ 70:30 ở cường độ ánh sáng 60 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ là thích hợp cho quá trình sinh trưởng và phát triển của cây Cúc *in vitro*.

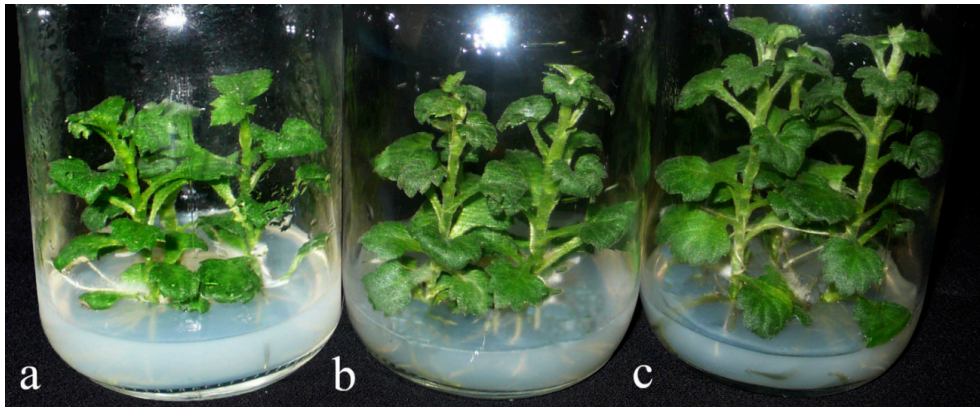
Bảng 1. Ảnh hưởng của cường độ ánh sáng LED lên quá trình sinh trưởng và phát triển của cây Cúc *in vitro*.

Cường độ ($\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)	Chiều cao cây (cm)	Số lá/cây	Chiều dài lá (cm)	Chiều rộng lá (cm)	Số rễ	Chiều dài rễ (cm)	Khối lượng tươi (g)	Khối lượng khô (mg)
30	6,57c*	10,67b	1,63b	1,47b	10,67c	1,57c	0,83c	73,57b
45	7,23b	12,67a	1,67ab	1,57ab	14,67b	2,10b	1,27b	86,27b
60	7,73a	13,67a	1,77a	1,63a	17,33a	2,63a	1,43a	105,07a

Ghi chú: * Những chữ cái khác nhau (a, b, c...) được nêu trong các cột biểu diễn sự khác nhau có ý nghĩa với p = 0,05 trong Duncan's test.



Hình 1. Ảnh hưởng của cường độ ánh sáng LED lên hàm lượng chlorophyll của cây Cúc *in vitro*.



Hình 2. Ảnh hưởng của cường độ ánh sáng LED lên quá trình sinh trưởng và phát triển của cây Cúc *in vitro*. a, b, c: cường độ chiếu sáng lần lượt là 30, 45, 60 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

Chất lượng cây giống *in vitro* không những chịu ảnh hưởng của loại, tỷ lệ ánh sáng (Kim *et al.*, 2004) mà còn chịu ảnh hưởng nhiều của cường độ chiếu sáng (Jeon *et al.*, 2005; Ali *et al.*, 2005). Cường độ ánh sáng điều hòa kích cỡ lá và thân cũng như con đường phát sinh hình thái của chúng cũng như sự hình thành sắc tố của cây con *in vitro*. Chúng tăng theo cường độ chiếu sáng và hiện tượng bão hòa ánh sáng xuất hiện sau khi cường độ chiếu sáng đạt đến điểm bão hòa ánh sáng, khác nhau từ loài này đến loài khác (Zhong *et al.*, 1991). Chất lượng ánh sáng có ảnh hưởng đáng kể lên sự phát triển, phát sinh

hình thái của cây *in vitro* (Morgan, Smith, 1981). Sự chiếu sáng với cường độ ánh sáng và chất lượng phổ ánh sáng khác nhau có tác động đáng kể lên sự sinh trưởng của mô sẹo của *Cistanche deserticola* và sự sinh tổng hợp phenylethanoid glycosides (Ouyang *et al.*, 2003).

Trong thí nghiệm này, kết quả cho thấy rằng khi tăng cường độ ánh sáng thì sự sinh trưởng của cây Cúc *in vitro* cũng tăng theo. Kết quả thí nghiệm tương đương với kết quả của Lee và cộng sự (2007) trên đối tượng Sâm Ấn Độ *in vitro* (*Withania*

Somnifera (L.) Dunal.), khi tăng cường độ ánh sáng từ 15 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ lên 60 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ cũng làm gia tăng chiều cao, chiều dài rễ, số rễ, số lá, khối lượng tươi và khối lượng khô và hàm lượng chlorophyll của chồi, và giảm dần ở cường độ 90 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Nhut và cộng sự (2005) đã báo cáo rằng điều kiện chiếu sáng 90% LED đỏ kết hợp với 10% LED xanh ở cường độ 60 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ thích hợp cho sự sinh trưởng và phát triển của cây Lan ý với các chỉ tiêu như chiều cao cây, chiều dài rễ và khối lượng tươi cao hơn so với các cây sinh trưởng và phát triển dưới cường độ 45 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ và 75 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Nhut và cộng sự (2003) chỉ ra rằng Đậu tây được nuôi cấy dưới điều kiện chiếu sáng 90% LED đỏ kết hợp với 10% LED xanh ở cường độ chiếu sáng 60 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ sẽ sinh trưởng và phát triển tốt hơn so với cường độ 45 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ và 75 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Cường độ ánh sáng có quan hệ mật thiết tới quá trình quang hợp của cây, khi cường độ ánh sáng tăng khả năng quang hợp của cây cũng tăng theo (Long *et al.*, 1994). Tuy vậy, cường độ quang hợp cũng bị giới hạn bởi nồng độ CO_2 và quá trình dị dưỡng của cây trong môi trường *in vitro* có sự có mặt của đường. Trong thí nghiệm của chúng tôi ở nghiệm thức 60 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ cũng cho thấy rằng hàm lượng chlorophyll a và b bị giảm, nguyên nhân có thể là do cường độ quang hợp đạt quá mức bão hòa hoặc là biện pháp bảo vệ của cây trồng khi hấp thụ ánh sáng quá mức (Demmig-Adams, Adams III, 1992).

Ảnh hưởng của giai đoạn chiếu sáng khác nhau của ánh sáng LED đỏ và LED xanh lên quá trình sinh trưởng và phát triển của cây Cúc *in vitro*

Sự thay đổi các giai đoạn chiếu sáng khác nhau giữa LED đỏ và LED xanh có ảnh hưởng khác nhau

Bảng 2. Ảnh hưởng của giai đoạn chiếu sáng khác nhau của ánh sáng LED đỏ và LED xanh lên quá trình sinh trưởng và phát triển của cây Cúc *in vitro*.

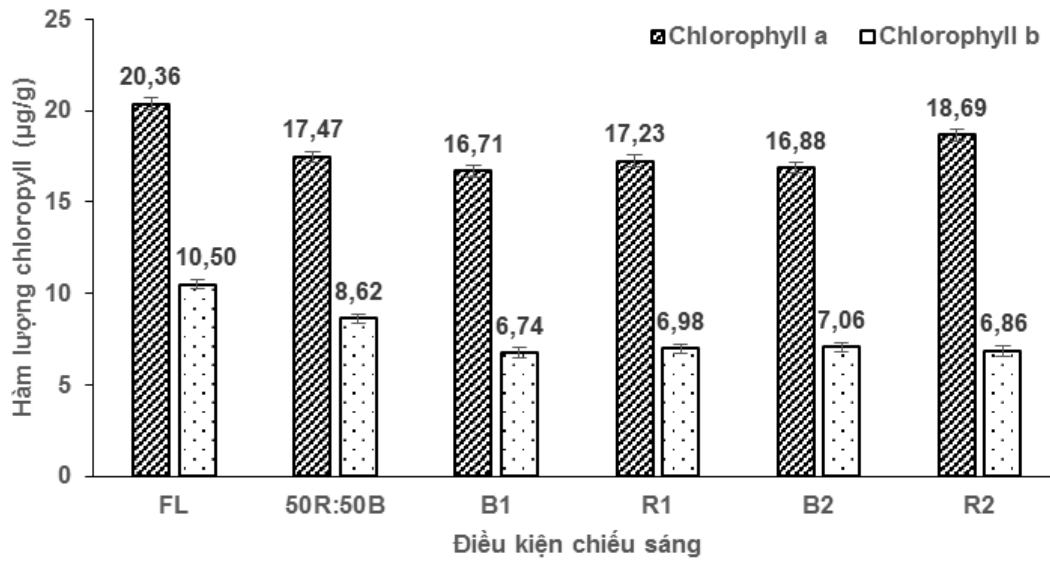
Điều kiện chiếu sáng	Chiều cao cây (cm)	Số lá/cây	Chiều dài lá (cm)	Chiều rộng lá (cm)	Số rễ	Chiều dài rễ (cm)	Khối lượng tươi (g)	Khối lượng khô (mg)
FL	4,27d*	7,77cd	1,30b	1,13bc	8,67c	2,17a	0,62b	40,67b
50R:50B	5,47c	9,33b	1,47a	1,27ab	11,67a	1,83b	0,63b	42,67b
B1	6,13b	12,33a	1,53a	1,37a	12,00a	1,83b	0,74a	53,67a
R1	6,77a	9,77b	1,23b	1,07c	11,67a	2,07ab	0,64b	41,67b
B2	6,90a	8,67bc	1,03c	0,87d	10,67ab	1,97ab	0,49c	32,67c
R2	7,10a	7,33d	0,83d	0,73d	9,67bc	1,97ab	0,47c	31,67c

Ghi chú: *Những chữ cái khác nhau (a, b, c...) được nêu trong các cột biểu diễn sự khác nhau có ý nghĩa với $p = 0,05$ trong Duncan's test.

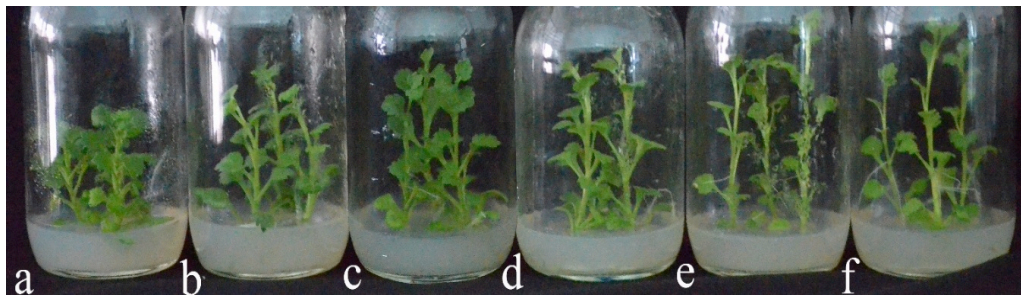
đến quá trình sinh trưởng và phát triển của cây Cúc sau 6 tuần nuôi cấy về các chỉ tiêu như chiều cao, số lá, chiều dài lá, chiều rộng lá, số rễ, chiều dài rễ, khối lượng tươi và khối lượng khô (Bảng 2, Hình 3 và 4).

Kết quả thu được cho thấy, các mẫu nuôi cấy liên tục dưới các giai đoạn chiếu sáng khác nhau cho các chỉ tiêu về chiều rộng lá, số rễ, chiều dài rễ tuy có sự khác nhau nhưng không có ý nghĩa về mặt thống kê. Tuy nhiên, các mẫu nuôi cấy dưới giai đoạn chiếu sáng thay đổi hàng tuần giữa LED xanh và LED đỏ (tuần đầu chiếu sáng LED xanh, tuần sau chiếu sáng LED đỏ) cho kết quả tốt nhất lên quá trình sinh trưởng và phát triển của cây Cúc với các chỉ tiêu về số lá (12,33 lá), chiều dài lá (1,53 cm), khối lượng tươi (0,74 g), khối lượng khô (53,67 mg) cao nhất so với các nghiệm thức còn lại. Chỉ tiêu thu được về sinh trưởng và phát triển cũng thay đổi theo giai đoạn chiếu sáng như chiều cao cây đạt giá trị cao đối với các nghiệm thức có thời gian nuôi cấy dưới giai đoạn chiếu sáng với ánh sáng LED đỏ nhiều hơn và cao nhất là ở điều kiện chiếu sáng thay đổi giữa hai tuần đầu là LED đỏ và 2 tuần sau là LED xanh (7,10 cm); tuy nhiên, cây phát triển với hình dạng mảnh, bị vóng và yếu, hình dạng lá nhỏ và không đồng đều. Điều kiện chiếu sáng đèn huỳnh quang tác động đến quá trình sinh trưởng và phát triển của cây Cúc thấp hơn các điều kiện khác nhưng hàm lượng chlorophyll a (20,36 $\mu\text{g/g}$) và chlorophyll b (10,50 $\mu\text{g/g}$) ở nghiệm thức này lại đạt giá trị cao nhất (Hình 3).

Qua số liệu thu được ở bảng 2 cho thấy, giai đoạn chiếu sáng thay đổi 1 tuần đầu LED xanh và 1 tuần sau LED đỏ thích hợp cho quá trình sinh trưởng và phát triển của cây Cúc *in vitro*.



Hình 3. Ảnh hưởng của giai đoạn chiếu sáng khác nhau của ánh sáng LED đỏ và LED xanh lên hàm lượng chlorophyll của cây Cúc *in vitro*.



Hình 4. Ảnh hưởng của giai đoạn chiếu sáng khác nhau của ánh sáng LED đỏ và LED xanh lên quá trình sinh trưởng và phát triển của cây Cúc *in vitro*. a: FL, b: 50R:50B, c: thay đổi 1 tuần xanh và 1 tuần đỏ, d: thay đổi 1 tuần đỏ và 1 tuần xanh, e: thay đổi 2 tuần xanh và 2 tuần đỏ, f: thay đổi 2 tuần đỏ và 2 tuần xanh.

Ánh sáng là yếu tố quan trọng trong quá trình sinh trưởng và phát triển của thực vật. Thực vật không chỉ phản ứng với cường độ ánh sáng mà còn phụ thuộc vào chất lượng và màu sắc của ánh sáng thông qua các quang thụ thể hoạt động dưới các vùng quang phổ đặc trưng (Zhang, Folta, 2012; Liu, 2012). 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).

Sự tăng trưởng lá, hàm lượng chlorophyll của chồi chịu ảnh hưởng của bức xạ đèn LED. Ánh sáng LED đỏ thúc đẩy sự tăng trưởng lá nhưng làm giảm lượng chlorophyll, chlorophyll lại được phục hồi dưới ánh sáng LED xanh (Tanaka *et al.*, 1998). Ánh sáng LED 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 (Tennessen *et al.*, 1994). Theo nghiên cứu của Dương Tân 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 LED xanh lên sự hình thành chlorophyll, sự phát triển của chlorophyll và sự mở khí khổng.

Như vậy, ánh sáng là nguồn năng lượng của quá trình quang hợp và có vai trò điều khiển nhiều mặt khác trong quá trình sinh trưởng và phát triển của thực vật, do đó thách thức lớn trong việc nuôi cấy mô, tế bào thực vật là xác định điều kiện chiếu sáng thích hợp cho từng loại cây trồng. Điều khiển sự sinh trưởng và phát triển bằng cách thay đổi chất lượng

ánh sáng là một kỹ thuật quan trọng trong vi nhân giống (Kozai *et al.*, 1992).

Khảo sát ảnh hưởng của điều kiện chiếu sáng đến sự sinh trưởng và phát triển của cây cúc ở điều kiện vườn ươm

Sau 6 tuần nuôi cấy, các cây Cúc *in vitro* sinh trưởng dưới các điều kiện chiếu sáng khác nhau như đèn huỳnh quang, 70R:30B và 50R:50B được ghi nhận ở bảng 3 và hình 5a.

Bảng 3. Ảnh hưởng của điều kiện chiếu sáng khác nhau của ánh sáng LED đỏ và LED xanh lên quá trình sinh trưởng và phát triển của cây Cúc ở điều kiện *in vitro*.

Điều kiện chiếu sáng	Chiều cao cây (cm)	Số lá/cây	Chiều dài lá (cm)	Chiều rộng lá (cm)	Số rễ/cây	Chiều dài rễ (cm)	Khối lượng tươi (g)	Khối lượng khô (mg)	SPAD
FL	4,75c*	7,77b	1,30ab	1,13b	10,67b	2,27a	0,62b	40,67b	35,33b
70R:30B	6,37a	12,33a	1,33ab	1,23a	14,33a	2,18ab	0,76a	64,00a	42,67a
50R:50B	6,08b	12,33a	1,43a	1,29a	12,00ab	2,03ab	0,72a	53,67ab	34,33b

Ghi chú: *Những chữ cái khác nhau (a, b, c...) được nêu trong các cột biểu diễn sự khác nhau có ý nghĩa với p = 0,05 trong Duncan's test.



Hình 5. Cây cúc dưới các điều kiện chiếu sáng khác nhau ở điều kiện *in vitro* và vườn ươm. a. cây Cúc ở điều kiện *in vitro* sau 6 tuần nuôi cấy (FL, 70R:30B và 50R:50B; từ trái sang phải); b. cây Cúc ở điều kiện vườn ươm sau 4 tuần (FL, 70R:30B và 50R:50B; từ trái sang phải).

Qua bảng 3 cho ta thấy, hầu hết các chỉ tiêu sinh trưởng ở điều kiện chiếu sáng LED là cao hơn so với đối chứng là đèn huỳnh quang. Dưới điều kiện chiếu sáng 70R:30B kết quả ghi nhận được cho thấy chiều cao cây (6,37 cm) và chỉ số SPAD (42,67) là cao hơn so với 2 điều kiện chiếu sáng là đèn huỳnh quang và 50R:50B.

Để đánh giá tác động của điều kiện chiếu sáng đến sự sinh trưởng, phát triển cũng như tỉ lệ sống sót của cây, chúng tôi tiến hành đưa những cây Cúc dưới các điều kiện chiếu sáng này ra vườn ươm. Kết quả bảng 4 cho thấy, sau 4 tuần trồng trong điều kiện vườn ươm, các cây Cúc có nguồn gốc từ hệ thống chiếu sáng đơn sắc đều sinh trưởng và phát triển tốt (Hình 5b).

Với bộ rễ phát triển tốt trong điều kiện *in vitro*, cây có nguồn gốc từ hệ thống chiếu sáng kết hợp LED đỏ và LED xanh với tỉ lệ 70:30 sinh trưởng và phát triển tốt nhất ở điều kiện vườn ươm. Các chỉ tiêu sinh trưởng như tỷ lệ sống sót (96,97%), chiều cao cây (9,40 cm), chiều dài lá (4,10 cm), chiều rộng lá (3,35 cm), chiều dài rễ (5,60 cm), khối lượng tươi (2,44 g) và khối lượng khô (250,00 mg) đều cao hơn so với các cây có nguồn gốc từ các hệ thống chiếu sáng khác. Chỉ số SPAD ở cả 3 điều kiện chiếu sáng không có sự khác biệt, điều này có thể là do khi chuyển ra vườn ươm, các cây Cúc được đặt dưới cùng điều kiện chiếu sáng là ánh sáng tự nhiên, chính vì vậy sự tác động của ánh sáng tới các cây này là không có sự khác biệt.

Bảng 4. Ảnh hưởng của điều kiện chiếu sáng khác nhau của ánh sáng LED đỏ và LED xanh lên quá trình sinh trưởng, phát triển và tỉ lệ sống sót của cây Cúc ở điều kiện vườn ươm.

Điều kiện chiếu sáng	Tỉ lệ sống sót (%)	Chiều cao cây (cm)	Chiều dài lá (cm)	Chiều rộng lá (cm)	Số rễ/cây	Chiều dài rễ (cm)	Khối lượng tươi (g)	Khối lượng khô (mg)	SPAD
FL	88,67b	7,43c	3,30c	2,93b	23,67a	5,33ab	1,66c	168,34b	47,45ab
70R:30B	96,67a	9,40a	4,10a	3,35a	25,00a	5,60a	2,44a	250,00a	50,67a
50R:50B	95,33a	8,27b	3,73b	3,18ab	24,67a	4,93b	2,25b	233,67ab	46,33ab

Ghi chú: *Những chữ cái khác nhau (a, b, c...) được nêu trong các cột biểu diễn sự khác nhau có ý nghĩa với $p = 0,05$ trong Duncan's test.

KẾT LUẬN

Cường độ và giai đoạn chiếu sáng ảnh hưởng khác nhau lên quá trình 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 cường độ 60 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ là thích hợp cho quá trình sinh trưởng phát triển; tuy nhiên hàm lượng chlorophyll a và b đạt cao nhất ở cường độ 45 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Trong khi đó, giai đoạn chiếu sáng thay đổi 1 tuần đầu LED xanh và 1 tuần sau LED đỏ thích hợp cho quá trình sinh trưởng và phát triển của cây Cúc *in vitro*. Cây cúc dưới điều kiện chiếu sáng LED sau khi chuyển sang vườn ươm 4 tuần có tỉ lệ sống sót, sinh trưởng và phát triển tốt hơn so với cây ở điều kiện chiếu sáng là đèn huỳnh quang.

Lời cảm ơn: Các tác giả xin chân thành cảm ơn Chương trình Tây Nguyên 3 (TN3/C09) đã hỗ trợ kinh phí thực hiện đề tài này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Ali MB, Hahn EJ, Paek KY (2005) Effect of light intensities on antioxidant enzymes and malondialdehyde content during short-term acclimatization on micropropagated *Phalaenopsis* plantlet. *Environ Exp Bot* 54: 109-120.
- Demmig-Adams B, Adams III WW (1992) Photoprotection and other responses of plants to high light stress. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 43: 599-626.
- 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*. NXB. Nông Nghiệp, Tp. Hồ Chí Minh.
- 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. "Nút") nuôi cấy *in vitro*. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 7(1): 91-98.

- Đặng Văn Đông, Đinh Thế Lộc (2003) *Công nghệ mới trồng hoa mới cho thu nhập cao - Hoa Cúc*. NXB. Lao động - xã hội, Hà Nội.
- Heo JW, Lee YB, Chang YS, Lee JT, Lee DB (2010) Effects of light quality and light type using an LED chamber system on *Chrysanthemum* growth and development cultured *in vitro*. *Korean J Environ Agr* 29(4): 374-380.
- Jeon MW, Ali MB, Hahn EJ, Paek KY (2005) Effect of photon flux density on the morphology, photosynthesis, and growth of a CAM orchid, *Doritaenopsis* during post-micropropagation acclimatization. *Plant Growth Regul* 45(2): 139-147.
- 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(1-2): 143-151.
- Kozai T, Fujawara K, Hayashi M, Aitken-Christie J (1992) *The in vitro environment and its control in micropropagation*. In Kubota K, Kozai T, eds. *Transplant production systems*. Klumer Academic Publishers, Dordrecht: 247-252.
- Kurilcik A, Canova RM, Dapkuniene S, Zilinskaite S, Kurilcik 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.
- Lee HS, Tewari RK, Hahn EJ, Paek KY (2007) Photon flux density and light quality induce changes in growth, stomatal development, photosynthesis and transpiration of *Withania Somnifera* (L.) Dunal. Plantlets. *Plant Cell Tiss Org* 90(2): 141-151.
- Lichtentaler HK, Wellburn AR (1985) Determination of total carotenoids, chlorophyll a và b of leaf in different solvents. *Biochem Soc Trans* 11, 591-592.
- Liu W (2012) Light environmental management for artificial protected horticulture. *Agrotechnol* 1: 1-4.
- Long SP, Humphries S, Falkowski PG (1994) Photoinhibition of photosynthesis in nature. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 45: 633-662.
- McCree KJ (1972) The action spectra, absorptance and quantum yield of photosynthesis in crop plants. *Agr Met* 9, 191-216.
- Morgan DC, Smith H (1981) Non- photosynthesis responses to light quality. *Plant Physiol* 12: 109-134.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15(3): 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*. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ* 50(6): 595-606.
- Nguyễn Thanh Sang, Nguyễn Bá Nam, Hoàng Thanh Tùng, Nguyễn Phúc Huy, Nguyễn Thị Kim Loan, Nguyễn Ngọc Thảo, Vũ Đức Trung, Nguyễn Văn An, Trần Thị Minh Loan, Nguyễn Văn Kết, Dương Tấn Nhựt (2014) Sinh trưởng, phát triển và hàm lượng chlorophyll trong chồi cây Cúc (*Chrysanthemum morifolium* Ramat. cv. “Jimba”) nuôi cấy *in vitro* dưới ánh sáng LED. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 12(2): 339-347.
- Như 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.
- Như 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(1): 43-52.
- Như DT, Takamura T, Watanabe H, Okamoto K, Tanaka M (2005) Artificial light source using light-emitting diodes (LEDs) in the efficient micropropagation of *Spathiphyllum* plantlets. *Acta Hort* 692: 137-142.
- Ouyang J, Wang X, Zhao B, Wang Y (2003) Light intensity and spectral quality influencing the callus growth of *Cistanche deserticola* and biosynthesis of phenylethanoid glycosides. *Plant Sci* 165(3): 657-661.
- Senger H (1982) The effect of blue light on plants and microorganisms. *Photochem Photobiol* 35(6): 911-920.
- Smaranda V (2005) *In vitro* multiplication of *Chrysanthemum morifolium* Ramat. *Biol veg*: 31-37.
- Tanaka M, Takamura T, Watanabe H, Endo M, Yanagi T, Okamoto K (1998) *In vitro* growth of *Cymbidium* plantlets cultured under superbright red and blue light-emitting diodes (LEDs). *J Hort Sci Biotech* 73(1): 39-44.
- Tennessen DJ, Singaas EL, Sharkey TD (1994) Light-emitting diodes as a light source for photosynthesis research. *Photosynth Res* 39: 85-92.
- Tibbitts TW, Morgan D.C, 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(2): 407-411.
- Zhang T, Folta KM (2012) Green light signaling and adaptive response. *Plant Signal Behav* 7: 75-78.
- Zhong JJ, Seki T, Kinoshita S, Yoshida T (1991) Effect of light irradiation on anthocyanin production by suspended culture of *Perilla frutescens*. *Biotechnol Bioeng* 38: 653-658.

THE EFFECTS OF INTENSITIES, LIGHTING PERIODS OF RED LED AND BLUE LED ON GROWTH, DEVELOPMENT ON *IN VITRO* CHRYSANTHEMUM (*CHRYSANTHEMUM MORIFOLIUM* RAMAT. CV. “JIMBA”)

Hoang Thanh Tung^{1,2}, Nguyen Thanh Sang¹, Nguyen Xuan Tuan¹, Nguyen Ba Nam¹, Nguyen Phuc Huy¹, Vu Thi Hien¹, Vu Quoc Luan¹, Duong Tan Nhut¹✉

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

²Hue University of Sciences, Hue University

SUMMARY

In this study, the influence of different LED lighting intensities, different lighting periods of red LED and blue LED on growth, development and chlorophyll a and b synthesis on *in vitro* *Chrysanthemum* were presented. Shoot tips were inoculated and were put under 70% red LED: 30% blue LED lighting condition with different LED lighting intensities: 30, 45 and 60 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$; different LED lighting periods: weekly intermittent lighting with red LED/blue LED (blue LED or red LED lighting for the first week), intermittent lighting with red LED/blue LED for each two weeks (blue LED or red LED lighting for the first two weeks). After 6 weeks of cultured, the results showed that LED lighting source with intensity 60 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ had the best stimulation on growth and development of *Chrysanthemum*; however, under intensity 45 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, chlorophyll a and b content still were the highest. In addition, weekly intermittent lighting with red LED and blue LED (blue LED was lighted at the first week) gave the best results on growth and development of *Chrysanthemum*. Thus, the most suitable LED lighting intensity for growth and development of *in vitro* *Chrysanthemum* was 60 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, and weekly intermittent lighting with red LED and blue LED (blue LED was lighted at the first week) will promote the growth and development of *in vitro* *Chrysanthemum*. The survival rates, growth and development of plants under 70% red LED: 30% blue LED and 50% red LED: 50% blue LED were higher than those of plants under Florescent, after 4 weeks of cultured in the greenhouse.

Keywords: *chlorophyll a, chlorophyll b, chrysanthemum, intensity, lighting periods*

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