

ẢNH HƯỞNG CỦA ÁNH SÁNG LED ĐẾN SỰ SINH TRƯỞNG, PHÁT TRIỂN CỦA CÂY LAN KIM TUYẾN (*ANOECTOCHILUS ROXBURGHII*) *IN VITRO*

Đỗ Thị Gấm^{1,2}, Chu Hoàng Hà¹, Phạm Bích Ngọc¹, Nguyễn Khắc Hưng¹, Phan Hồng Khôi², Hà Thị Thanh Bình³, Nguyễn Như Chương⁴, Lương Tú Nam⁴, Nguyễn Thị Thúy Bình⁵

¹Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Trung tâm Phát triển Công nghệ cao, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

³Trung tâm Nghiên cứu và phát triển công nghệ Hóa sinh, VUSTA

⁴Trung tâm Ứng dụng Khoa học và Công nghệ tỉnh Lâm Đồng

⁵Học Viện Nông nghiệp Việt Nam, VNUA

✉ Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: chuoangha@ibt.ac.vn

Ngày nhận bài: 16.12.2015

Ngày nhận đăng: 15.12.2016

TÓM TẮT

Gần đây, công nghệ chiếu sáng LED đang phát triển không ngừng và được ứng dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực mới. Để thay thế cho các nguồn chiếu sáng truyền thống, đèn LED đã được thử nghiệm làm nguồn chiếu sáng nhân tạo trong nuôi cấy mô tế bào của nhiều loại cây trồng khác nhau nhằm tiết kiệm năng lượng và nâng cao hiệu quả của quá trình nuôi cấy. Trong nghiên cứu này, ảnh hưởng của các loại đèn LED có bước sóng và cường độ chiếu sáng khác nhau đến sự sinh trưởng phát triển của các chồi cây lan Kim tuyến *in vitro* đã được đánh giá phân tích. Các chồi lan Kim tuyến được nuôi cấy dưới các điều kiện chiếu sáng khác nhau như: đèn LED đỏ đơn sắc (R), đèn LED xanh đơn sắc (B), đèn kết hợp LED xanh, LED đỏ và LED trắng ấm (W) theo các tỷ lệ khác nhau (BRW 1, BRW 2, BRW 3 và BR). Sau 3 tháng nuôi cấy, kết quả cho thấy đèn LED B có cường độ chiếu sáng ở mức cao ($79 \pm 3 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) gây ức chế đến sự sinh trưởng phát triển của cây lan Kim tuyến. Ngược lại đèn LED BR có cường độ chiếu sáng ở mức thấp ($30 \pm 1 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) lại ảnh hưởng tích cực lên sự sinh trưởng và phát triển của cây lan Kim tuyến. Chiều cao cây (5,88 cm), chiều dài rễ (1,33 cm), trọng lượng tươi (0,169 g/cây), diện tích lá ($0,82 \text{ cm}^2$), trọng lượng tươi của lá (18,33 mg/lá) của cây *in vitro* đều cao hơn cây ở điều kiện chiếu sáng bằng đèn huỳnh quang T5 (đối chứng). Ngoài ra hàm lượng chlorophyll a, chlorophyll b và chlorophyll tổng số (tương ứng là 285,40 $\mu\text{g/g}$, 196,40 $\mu\text{g/g}$, 481,80 $\mu\text{g/g}$) của lá cũng đều cao hơn so với cây ở công thức đối chứng và ở các công thức đèn LED còn lại. Như vậy, qua quá trình khảo sát chúng tôi nhận thấy ánh sáng LED kết hợp theo tỷ lệ BR = 1:4 có cường độ chiếu sáng là 30 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ phù hợp cho sự sinh trưởng của cây lan Kim tuyến và có khả năng ứng dụng làm nguồn sáng thay thế đèn huỳnh quang trong nuôi cấy *in vitro* cây lan Kim tuyến.

Từ khóa: lan Kim tuyến, đèn LED, nuôi cấy *in vitro*, diệp lục, cường độ chiếu sáng.

MỞ ĐẦU

Chi lan Kim tuyến *Anoectochilus*, thuộc họ Lan - *Orchidaceae* có khoảng 40-50 loài, được biết đến không chỉ bởi giá trị làm cảnh, mà còn bởi giá trị làm thuốc. Trong y học cổ truyền Trung hoa, lan Kim tuyến được dùng để điều trị bệnh tiêu đường, làm tan khối u, giảm lipase huyết, chữa viêm gan, viêm phế quản, phong thấp, đau nhức xương khớp. Ở Việt Nam, các loài lan Kim tuyến phân bố rộng nhưng với số lượng cá thể không nhiều, tái sinh chậm và đòi hỏi điều kiện sống ngặt nghèo. Hiện

tại, ở nước ta đã thống kê được 12 loài lan Kim tuyến, trong đó loài *Anoectochilus roxburghii* Wall. Ex Lindl (tên đồng nghĩa là *Anoectochilus setaceus* Blume) là loài thường gặp nhất và có giá trị thương mại cao gấp hàng chục lần các loài khác. Do là nguồn dược thảo quý, có giá trị kinh tế cao nhưng số lượng ít, mọc rải rác và bị khai thác cạn kiệt nên cây lan Kim tuyến trong tự nhiên có nguy cơ bị tuyệt chủng nếu không có biện pháp bảo tồn hiệu quả. Vì vậy, bên cạnh việc bảo tồn các quần thể lan Kim tuyến còn sót lại trong tự nhiên hoặc ở các vườn quốc gia và khu bảo tồn thiên nhiên, cần phải nghiên cứu quy trình nhân giống

một số loài lan Kim tuyến của Việt Nam để đáp ứng được định hướng bảo tồn và phát triển loài lan này (Thúy *et al.*, 2015).

Trong nhân giống *in vitro*, ánh sáng là một nhân tố quan trọng ảnh hưởng đến toàn bộ quá trình sinh trưởng và phát triển của cây thông qua cường độ, quang kỳ và bước sóng của ánh sáng. Theo Debergh và đồng tác giả (1992) cường độ chiếu sáng, ngoài việc có tác dụng điều hòa kích thước lá và thân cũng như con đường phát sinh hình thái, còn ảnh hưởng đến sự hình thành sắc tố và hiện tượng mọng nước (hiện tượng thủy tinh thể) của cây con *in vitro*. Chất lượng ánh sáng ảnh hưởng đến một số đặc tính hình thái như sự kéo dài cây cúc và cây cà chua (Mortensen, Stromme, 1987), hình thái giải phẫu lá và kích thước lá ở cây phong (Soebo *et al.*, 1995) và sự phát sinh rễ giả ở cây lê (Bertazza *et al.*, 1995). Nguồn sáng nhân tạo sử dụng phổ biến trong nhân giống cây trồng thường là đèn sợi đốt, đèn huỳnh quang (FL) và đèn phóng điện cao áp (HID)..., tuy nhiên vùng quang phổ phát ra từ chúng rất rộng và không phải là ngưỡng thích hợp cho một số loài thực vật. Hiện nay, việc sử dụng hệ thống phát sáng bằng các điện cực (LED - light emitting diode) làm nguồn sáng cho cây trồng đã được chú ý đặc biệt, vì có nhiều ưu điểm như: có bước sóng xác định, tiết kiệm điện năng, ít tỏa nhiệt, tuổi thọ cao và có thể dễ dàng tổ hợp các loại LED có bước sóng (hay màu sắc) khác nhau để tạo ra nguồn sáng có chất lượng mong muốn. Để chế tạo đèn LED cho cây trồng người ta thường sử dụng 2 chùm sáng là chùm màu đỏ (Red) và màu xanh (Blue) bởi 2 chùm sáng này có vùng bước sóng tương ứng là 610-720nm và 400-520nm. Khi đó quang phổ đèn LED sẽ gần trùng với quang phổ hấp phụ của chlorophyll a và chlorophyll b nên các loài thực vật sẽ hấp thụ được tối đa năng lượng từ ánh sáng đèn LED, trong khi hiệu suất sử dụng đối với năng lượng mặt trời và các nguồn sáng trắng chỉ vào khoảng 35%. Tuy nhiên, tỉ lệ giữa ánh sáng xanh và đỏ sẽ rất khác nhau ở từng loài thực vật và từng thời kỳ sinh trưởng. Vì vậy, đã có nhiều công trình nghiên cứu được tiến hành nhằm tìm ra tỷ lệ giữa ánh sáng LED đỏ và ánh sáng LED xanh phù hợp với sinh trưởng và phát triển của từng loại cây trồng, hướng tới việc nâng cao chất lượng cây giống và giảm giá thành trong sản xuất thương mại. Hahn *et al.* (2000) đã cho biết tốc độ quang hợp của cây *Rehmannia glutinose* nuôi cấy *in vitro* rất cao dưới hệ thống LED hỗn hợp (50% LED đỏ và 50% LED xanh), còn ở dưới hệ thống chỉ có đèn LED xanh hay LED đỏ đơn sắc thì tốc độ quang hợp lại rất thấp. Nhiều đối tượng khác như Chuối,

Eucalyptus citriodora, *Phalaenopsis*, *Spathiphyllum*, ... đã tăng trưởng tốt dưới điều kiện 80% ánh sáng LED đỏ và 20% ánh sáng LED xanh (Nhut *et al.*, 2003; Nhut *et al.*, 2005; Nhựt, 2011). Gần đây với sự ra đời của ánh sáng LED trắng, một số công trình nghiên cứu đã cho biết sự phối hợp giữa ánh sáng LED đỏ, LED xanh và ánh sáng LED trắng cũng ảnh hưởng rất nhiều đến tốc độ sinh trưởng và chất lượng của cây trồng. Nghiên cứu của Kuan *et al.*, (2013) trên cây xà lách (*Lactuca sativa*) cho biết trọng lượng tươi của thân lá, rễ, hàm lượng chlorophyll a, chlorophyll b cũng như các chỉ số về độ ngọt, độ giòn và màu sắc lá của các cây nuôi cấy dưới đèn huỳnh quang và đèn LED RBW đều tốt hơn đèn LED RB.

Ở nước ta, các công trình nghiên cứu về lan Kim tuyến còn rất ít, bước đầu mới có một số công trình nghiên cứu về nhân giống *in vitro* lan Kim tuyến. Trong khi Nguyễn Quang Thạch *et al.*, (2012) công bố nghiên cứu về kỹ thuật nhân giống loài lan Kim tuyến (*Anoetochilus setaceus* Blume) *in vitro* nhằm bảo tồn nguồn dược liệu quý, thì Phùng Văn Phê *et al.*, (2010) thông báo nghiên cứu đặc điểm hình thái, phân bố của loài lan Kim tuyến *Anoetochilus setaceus* Blume ở Vườn Quốc gia Tam Đảo, tỉnh Vĩnh Phúc... Trên thực tế, chưa có nghiên cứu về ứng dụng hệ thống chiếu sáng LED trong nhân giống *in vitro* cây lan Kim tuyến. Do đó, chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu ảnh hưởng của các loại đèn LED có bước sóng và cường độ chiếu sáng khác nhau đến quá trình nhân giống *in vitro* cây lan Kim tuyến, với mong muốn là tìm được nguồn chiếu sáng thích hợp để từ đó có thể xây dựng được quy trình nhân giống cây lan Kim tuyến hiệu quả, giảm chi phí sản xuất, nâng cao chất lượng cây giống và tỷ lệ sống sót của cây lan Kim tuyến ngoài vườn ươm.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu

Mẫu chồi cây lan Kim tuyến (*Anoetochilus roxburghii*) có chiều cao đồng đều 1,5 cm do phòng Công nghệ tế bào Thực vật, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam cung cấp được sử dụng làm vật liệu nuôi cấy.

Các loại đèn LED sử dụng trong thí nghiệm có bước sóng, cường độ chiếu sáng khác nhau từ 30 - 79 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ do Trung tâm Phát triển công nghệ cao, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam cung cấp.

Hệ thống chiếu sáng đèn huỳnh quang (FL) sử

dùng đèn T5 dài 1,2m, có cường độ chiếu sáng là $46 \pm 1 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ do công ty Cổ phần Bóng đèn phích

nước Rạng Đông cung cấp được sử dụng làm nguồn chiếu sáng đối chứng.

Bảng 1. Thông tin về các loại đèn LED NN sử dụng trong thí nghiệm.

| TT | Tên đèn | Tỉ lệ LED màu | Cường độ ánh sáng ($\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) | Khoảng cách chiếu sáng (từ đèn xuống mặt giàn) |
|----|-----------------|-----------------|--|--|
| 1 | FL | | 46±1 | 40 cm |
| 2 | LED đỏ (Red) | 100 %, LED đỏ | 51±7 | 40 cm |
| 3 | LED xanh (Blue) | 100 %, LED xanh | 79±3 | 40 cm |
| 4 | BRW 1 | B:R:W = 1:4:2 | 53±7 | 40 cm |
| 5 | BRW 2 | B:R:W = 1:5:1 | 45±12 | 40 cm |
| 6 | BRW 3 | B:R:W = 1:2:2 | 49±5 | 40 cm |
| 7 | BR | B:R = 1: 4 | 30±1 | 40 cm |

Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp bố trí thí nghiệm: các chồi lan Kim tuyến *in vitro* được cấy vào môi trường Knudson C (Kauthet *et al.*, 2006) cơ bản có bổ xung 10% nước dừa, 10% dịch chiết khoai tây, 0,5 mg/l NAA, 0,5 mg/l BA, 7,5 g/l aga và 1,0 g/l than hoạt tính. Tất cả các môi trường đều được điều chỉnh pH = 5,7-5,8 trước khi khử trùng ở nhiệt độ 121°C, áp suất 1 atm trong 30 phút. Các thí nghiệm được nuôi cấy trong điều kiện nhiệt độ 22°C, độ ẩm 75- 80%, chiếu sáng 16 giờ/ngày, dưới các điều kiện chiếu sáng khác nhau như: đèn LED đỏ đơn sắc (R) (có bước sóng 630nm); đèn LED xanh đơn sắc (B) (có bước sóng 450 nm) và đèn do LED xanh đơn sắc và đỏ đơn sắc phối hợp với LED trắng (W) (vùng quang phổ rộng) theo nhiều các tỉ lệ khác nhau (BRW 1 = 1:4:2, BRW 2 = 1:5:1, BRW 3 =1:2:2); đèn LED BR, do LED B kết hợp với LED R (gồm $R_{660\text{nm}}/R_{630\text{nm}} = 1/1$) theo tỷ lệ 1:4 và đèn T5, khoảng cách giữa đèn chiếu sáng và bình cây là 40 cm. Mỗi công thức chiếu sáng khảo sát với 10 bình, mỗi bình cấy 6 chồi. Sau 3 tháng, đánh giá ảnh hưởng của điều kiện nuôi cấy đến chiều cao cây (cm), số lá/ cây, số rễ/cây, chiều dài rễ (cm), khối lượng tươi, diện tích lá, hàm lượng chlorophyll a, chlorophyll b và chlorophyll tổng ($\mu\text{g/g}$)...

Hàm lượng chlorophyll a, chlorophyll b và hàm lượng carotenoid được xác định theo phương pháp quang phổ của Lichtentaler và Wellburn (Wellburn 1994; Dere *et al.*, 1998; Costache *et al.*, 2012). Lấy toàn bộ các lá của 10 cây lan Kim tuyến, nghiền nhỏ, trộn đều và cân lấy 1g lá (khối lượng tươi) cho vào bình thủy tinh kín chứa 20ml acetone và đặt ở điều kiện tối trong vòng 24 giờ để chiết hoàn toàn lượng chlorophyll trong mẫu. Phân tích quang phổ hấp thụ

bằng máy đo quang phổ UV/VIS Camspec M108. Độ hấp phụ (OD) được đo ở bước sóng 470, 662 và 645nm. Hàm lượng ($\mu\text{g/g}$) các chất được tính theo các công thức như sau:

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

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

$$\text{Carotenoid (Car)} = (1000 * A_{470} - 2,27 * \text{Ca} - 81,4 * \text{Cb}) / 227$$

Phương pháp đo diện tích lá: cắt rời các lá (ở vị trí 1-4, tính từ trên ngọn xuống dưới) của tất cả các cây ở các công thức đèn và đo diện tích lá theo phương pháp của Hsien (Hsien and Arnold, 2014).

Mỗi công thức thí nghiệm được lặp lại ba lần. Các số liệu được xử lý với phần mềm Microsoft excell 2007 và Statgraphic XV theo phương pháp Duncan với $\alpha = 0,05$.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Ảnh hưởng của ánh sáng LED đến hình thái chồi cây lan Kim tuyến

Sau 3 tháng theo dõi, các kết quả thu được cho thấy các ánh sáng LED có tác động đáng kể đến toàn bộ hình thái cây lan Kim tuyến, bao gồm cả phần thân, lá và rễ cây. Ánh sáng đơn sắc LED xanh và LED đỏ có ảnh hưởng trái ngược nhau đến hình thái của cây lan Kim tuyến (Bảng 2 và Hình 1A). Trong khi ánh sáng đỏ đơn sắc có khả năng kích thích chiều cao cây (đạt tới 6,12 cm) thì ánh sáng xanh đơn sắc lại gây hiệu ứng cây thấp lùn, các chồi sinh trưởng dưới ánh sáng này có chiều cao thấp nhất trong các công thức đèn thí nghiệm chỉ đạt 3,87cm. Một số các cây con nuôi cấy ở công thức đèn LED B còn có hiện

tượng thân mỏng nước, lá có màu xanh nhạt, còn một số cây thì lại có hiện tượng bị bạch tạng ở cả thân và lá. Ở công thức đèn LED R, mặc dù có chiều cao vượt trội nhưng các cây con thu được có thân màu xanh nhạt, mảnh, yếu, lá mỏng và vàng hơn so với các cây được nuôi dưới công thức đèn huỳnh quang và các đèn LED khác. Kết quả nghiên cứu này cũng phù hợp với thí nghiệm của Appelgen (1991) nuôi cây cây Quỳ thiên trúc *Pelargonium*, trong khi ánh sáng đỏ làm tăng chiều cao thân chồi, thì ánh sáng xanh lại có tác dụng ngược lại gây ức chế.

Khi kết hợp ánh sáng xanh đơn sắc và đỏ đơn sắc với ánh sáng trắng (LED trắng âm) theo nhiều tỷ lệ khác nhau, thì nhận thấy các chồi cây sinh trưởng ở điều kiện đèn BRW 2 và BRW 3 có chiều cao không khác biệt về mặt thống kê, tương ứng là 4,76 cm và 4,41 cm. Còn ở trường hợp kết hợp giữa ánh sáng đơn sắc xanh và đỏ theo tỷ lệ BR =1: 4 (cường độ ánh sáng là $30 \pm 1 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), các chồi lan Kim tuyến có chiều cao (5,88 cm) vượt trội hơn hẳn so với công thức đối chứng và các công thức LED phối hợp khác.

Bảng 2. Ảnh hưởng của các điều kiện chiếu sáng đến sinh trưởng và phát triển của cây lan Kim tuyến.

| Điều kiện chiếu sáng | Cường độ ánh sáng ($\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) | Chiều cao cây (cm) | Số lá/cây | Số rễ/cây | Dài rễ (cm) | Trọng lượng tươi (g/cây) | Trọng lượng khô (%) |
|----------------------|--|--------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|---------------------|
| FL | 46±1 | 5.57 ^{cd} | 5.26 ^d | 4.33 ^e | 1.23 ^{bc} | 0.158 ^{cd} | 17.38 |
| R | 51±7 | 6.126 ^e | 4.53 ^b | 4.07 ^{de} | 1.21 ^{bc} | 0.112 ^{ab} | 13.09 |
| B | 79±3 | 3.87 ^a | 3.93 ^a | 3.13 ^{ab} | 0.93 ^a | 0.095 ^a | 12.18 |
| BRW 1 | 53±7 | 5.18 ^c | 4.66 ^b | 3.66 ^{cd} | 1.23 ^{bc} | 0.129 ^{bc} | 14.23 |
| BRW 2 | 45±12 | 4.76 ^b | 4.83 ^{bc} | 3.50 ^{bc} | 1.38 ^c | 0.120 ^{ab} | 15.55 |
| BRW 3 | 49±5 | 4.405 ^b | 3.84 ^a | 2.94 ^a | 1.18 ^b | 0.105 ^{ab} | 13.80 |
| BR | 30±1 | 5.88^{de} | 5.20^{cd} | 3.53^{bc} | 1.33^c | 0.169^d | 16.83 |

Ghi chú: Kết quả trung bình của 3 lần lặp lại; các chữ cái khác nhau trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt ở mức có ý nghĩa với $\alpha=5\%$.

Bên cạnh sự thay đổi về chiều cao của chồi, ánh sáng LED cũng ảnh hưởng tới số lá/cây cũng như diện tích lá của cây lan Kim tuyến. Qua kết quả ở bảng 2 có thể thấy công thức đèn huỳnh quang và đèn LED BR có số lá/cây là lớn nhất, tương ứng là 5,26 và 5,20 lá/cây. Trong số những công thức nghiên cứu, các cây lan Kim tuyến được chiếu sáng ở công thức đèn LED BR được đánh giá là có lá phát triển đồng đều hơn và có diện tích lá ($0,82 \text{ cm}^2$) lớn hơn các công thức đèn khác (Bảng 3). Công thức đèn LED B và BRW 3 cho số lá ít nhất, tương ứng là 3,93 lá/cây và 3,84 lá/cây. Ngoài ra diện tích lá ở các công thức này cũng thấp hơn so với công thức đèn đối chứng và các đèn LED còn lại. Đặc biệt ở công thức đèn LED B các lá còn có hiện tượng bị bạch tạng và không rõ vân kim tuyến. Các lá của cây lan Kim tuyến sinh trưởng ở điều kiện ánh sáng đèn huỳnh quang và đèn LED BR có trọng lượng tươi đạt 18,1 mg/lá và 18,33 mg/lá, cao hơn các điều kiện ánh sáng LED khác. Kết quả này cho thấy các cây lan Kim tuyến sinh trưởng ở điều kiện ánh sáng đỏ đơn sắc, xanh đơn sắc và điều kiện LED xanh và đỏ có phối hợp ánh sáng LED trắng âm thì các lá đều mỏng và có màu nhạt hơn so với điều kiện ánh sáng huỳnh quang và BR (Hình 1A) và công thức có

cường độ chiếu sáng ở mức cao như LED B ($79 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) là không phù hợp cho sinh trưởng của cây lan Kim tuyến. Khi phân tích chỉ tiêu khối lượng tươi, chúng tôi cũng nhận thấy các chồi lan Kim tuyến sinh trưởng ở điều kiện ánh sáng LED BR cũng có khối lượng tươi cao nhất (0,169 g/cây) trong các công thức nghiên cứu và sự khác biệt này được đánh giá là có ý nghĩa thống kê.

Ảnh hưởng khác nhau của ánh sáng LED đến hình thái cũng như sự phát triển đã được ghi nhận trên nhiều đối tượng thực vật khác nhau. Các nghiên cứu cho thấy ánh sáng đỏ và xanh đơn sắc thường có tác động trái ngược nhau đến hình thái của thực vật. Ánh sáng đỏ đơn sắc thường có tác động kích thích kéo dài thân trong khi ánh sáng xanh đơn sắc lại gây ức chế đến sự phát triển của chồi cây. Bên cạnh đó, sự kết hợp giữa ánh sáng đỏ và xanh ở tỷ lệ thích hợp là cần thiết cho sự sinh trưởng và phát triển của thực vật (Dương Tân Nhut *et al.*, 2003; Dương Tấn Nhựt và Nguyễn Bá Nam 2009; Moreira, Debergh, 1997). Trên cây lan Kim tuyến, chúng tôi cũng ghi nhận sự ảnh hưởng tiêu cực của ánh sáng LED xanh và LED đỏ đơn sắc đến hình thái cây, còn ở điều kiện ánh sáng kết hợp BR nhận thấy sự phát

triển hình thái của lan Kim tuyến là tốt nhất. Như vậy kiểu đèn LED kết hợp giữa ánh sáng LED B và LEDR theo tỷ lệ 1:4, đặc biệt vùng ánh sáng đỏ trong đèn lại được phối hợp giữa LED R630nm và LED R660nm theo tỷ lệ 1:1 được đánh giá là có tác dụng kích thích sự phát triển hình thái cây lan Kim tuyến tốt hơn so với các kiểu đèn trong thí nghiệm.

Ảnh hưởng của ánh sáng LED đến sự phát triển rễ của cây lan Kim tuyến

Ánh sáng không chỉ tác động đến hình thái chồi của cây lan Kim tuyến mà còn ảnh hưởng tới quá trình phát triển của rễ cây lan Kim tuyến. Trong các công thức thí nghiệm, các cây sinh trưởng ở điều kiện ánh sáng huỳnh quang có số lượng rễ/cây nhiều nhất. Chỉ tiêu này thấp nhất là ở công thức BRW 3 và công thức LED B (Bảng 2). Công thức đèn LED BR và đèn BRW 2 có số rễ tương đương nhau là 3,5 rễ/cây. Mặc dù các điều kiện đèn LED thử nghiệm không có tác động rõ rệt đến số lượng rễ nhưng lại có ảnh hưởng đáng kể đến chiều dài của các rễ tạo thành. Các chồi được nuôi cấy dưới đèn LED BR và BRW 2 có chiều

dài rễ là tương đương nhau là 1,33 cm và 1,38 cm và được đánh giá là dài nhất trong tất cả các công thức thí nghiệm. Các chồi lan Kim tuyến sinh trưởng trong điều kiện đèn LED B có chiều dài rễ là ngắn nhất (0,93 cm). Chiều dài rễ ở công thức đèn LED R và BRW1 không có sự khác biệt về mặt thống kê so với đèn huỳnh quang (Bảng 2). Từ kết quả trên có thể thấy công thức đèn LED BR có khả năng kích thích sự phát triển chiều dài của rễ cây lan Kim tuyến.

Ảnh hưởng của ánh sáng LED đến một số chỉ tiêu sinh lý của cây lan Kim tuyến

Các ánh sáng LED khác nhau có ảnh hưởng khác nhau lên sự tích lũy các sắc tố quang hợp ở chồi cây lan Kim tuyến. Kết quả ở bảng 3 cho thấy các chồi lan Kim tuyến sinh trưởng dưới đèn LED BR có hàm lượng diệp lục tổng số (Chl tổng số) cao nhất là 481.8µg/g, trong khi đó ở đèn LED BRW 3 lại có hàm lượng Chl tổng số thấp nhất, chỉ là 177 µg/g. Các công thức đèn LED còn lại là BRW 1, BRW 2, R, B có hàm lượng Chl tổng số là tương đương nhau và đều thấp hơn so với đèn BR và đèn huỳnh quang.

Bảng 3. Ảnh hưởng của các điều kiện chiếu sáng đến một số chỉ tiêu sinh lý của cây lan Kim tuyến.

| Điều kiện chiếu sáng | Chl a (µg/g) | Chl b (µg/g) | Chl tổng số (µg/g) | Car (µg/g) | Chl a/b | Chl/ Car | Diện tích lá (cm ²) | Trọng lượng tươi của lá (mg/lá) |
|----------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------|--------------------------|-------------|-------------|---------------------------------|---------------------------------|
| FL | 251.30 ^c | 184.70 ^c | 436.00 | 65.20 ^{bc} | 1.36 | 6.69 | 0.79 ^{bc} | 18.10 ^b |
| R | 148.60 ^b | 144.80 ^{bc} | 343.00 | 48.00 ^{ab} | 1.37 | 7.15 | 0.67 ^{abc} | 14.20 ^{ab} |
| B | 154.00 ^b | 81.50 ^a | 235.50 | 28.60 ^a | 1.89 | 8.23 | 0.58 ^a | 9.97 ^a |
| BRW 1 | 147.90 ^b | 109.60 ^{ab} | 257.50 | 39.80 ^a | 1.35 | 6.47 | 0.64 ^{abc} | 16.49 ^b |
| BRW 2 | 162.90 ^b | 122.00 ^{ab} | 284.90 | 39.50 ^a | 1.34 | 7.21 | 0.66 ^{abc} | 15.37 ^{ab} |
| BRW 3 | 95.00 ^a | 82.00 ^a | 177.00 | 29.30 ^a | 1.16 | 6.04 | 0.61 ^{ab} | 14.66 ^{ab} |
| BR | 285.40^c | 196.40^c | 481.80 | 73.80^c | 1.45 | 6.53 | 0.82^c | 18.33^b |

Ghi chú: Kết quả trung bình của 3 lần lặp lại; các chữ cái khác nhau trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt ở mức ý nghĩa với α=5%.

Bên cạnh sự ảnh hưởng đến hàm lượng diệp lục tổng số của chồi lan Kim tuyến, các ánh sáng LED cũng tác động đến tỷ lệ giữa diệp lục a và b. Kết quả thu được ở bảng 3 cho thấy tỷ số chlorophyll a/b (Chl a/b) ở các chồi lan Kim tuyến sinh trưởng dưới các điều kiện ánh sáng khác nhau đều nằm trong khoảng từ 1,16 đến 1,89. Theo Lê Đức Diên (1967) cây chịu bóng thường có tỷ lệ diệp lục a/b nhỏ hơn 3, cây trung bình là 3, cây ưa sáng là lớn hơn 3. Như vậy cây lan Kim tuyến là cây có khả năng chịu bóng, điều này cũng phù hợp với đặc điểm phân bố tự nhiên của cây lan Kim tuyến, thường mọc ở các vùng núi cao, phân bố ở tầng thấp của rừng, dưới các

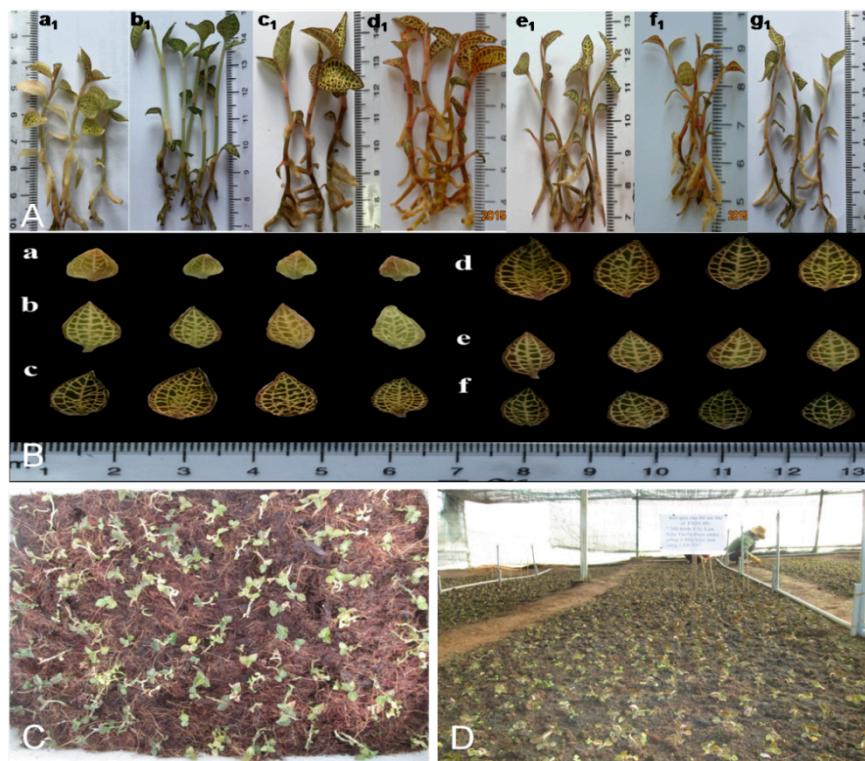
tán cây cao, thu nhận ánh sáng khuếch tán.

Hàm lượng carotenoid (Car) cũng là sắc tố quan trọng trong quá trình quang hợp, ngoài chức năng dẫn chuyển năng lượng photon đến chlorophyll, carotenoid còn có vai trò bảo vệ các sắc tố diệp lục khỏi sự quang oxy hóa gây ra bởi ánh sáng và oxy. Mức độ ảnh hưởng bởi quá trình quang oxy hóa lên diệp lục có thể thấy qua tỷ lệ giữa chlorophyll tổng số và carotenoid (Goins *et al.*, 1997). Hàm lượng Car cao nhất là ở công thức đèn LED BR và thấp nhất là ở công thức LED xanh và các công thức LED kết hợp. Kết quả ở bảng 3 còn cho thấy tỷ số Chlorophyll tổng số/Carotenoid (Chl/ Car) ở hầu

hết các công thức đèn thí nghiệm là khác biệt so với công thức đèn đối chứng. Phân tích hàm lượng carotenoid của các chồi sinh trưởng ở các công thức chiếu sáng khác nhau, cho thấy hàm lượng carotenoid tăng cao ở điều kiện ánh sáng LED BR, như vậy có thể thấy ánh sáng LED BR đóng vai trò thúc đẩy khả năng thu nhận năng lượng từ các photon ánh sáng. Dựa trên kết quả đánh giá bước đầu về hàm lượng các sắc tố quang hợp cũng như tỷ lệ giữa các loại sắc tố có thể suy ra rằng ánh sáng LED BR có khả năng tăng cường sự hình thành các sắc tố quang hợp của chồi lan Kim tuyến và ánh sáng LED xanh không tạo được điều

kiện để hình thành sắc tố, khiến cho hàm lượng diệp lục trong các chồi cây đều giảm thấp hơn so với đối chứng.

Sự thay đổi về hàm lượng các sắc tố quang hợp đồng thời dẫn đến sự thay đổi về trao đổi chất cũng như hàm lượng chất khô tích lũy. Trọng lượng khô của cây ở công thức đèn huỳnh quang là cao nhất và được đánh giá là tương đương với công thức đèn LED BR. Trong khi đó, trọng lượng khô của các chồi sinh trưởng dưới đèn LED B, R, BRW1, BRW2 và BRW 3 đều thấp hơn so với công thức đối chứng và công thức đèn BR.



Hình 1. A: Ảnh hưởng của các điều kiện chiếu sáng đến hình thái cây lan Kim Tuyến (a₁ – g₁: Blue, Red, FL, BR, BRW1, BRW2, BRW 3). B: Ảnh hưởng của các điều kiện chiếu sáng đến diện tích lá cây lan Kim Tuyến (a-f: Blue, Red, FL, BR, BRW1, BRW2. Các lá ở vị trí 1-4, tính từ ngọn xuống dưới); C: Cây lan Kim Tuyến được huấn luyện trên giá thể. D: Cây lan Kim Tuyến trồng trong nhà lưới.

KẾT LUẬN

Các kết quả nghiên cứu đã chỉ ra rằng ở các điều kiện chiếu sáng bằng đèn LED khác nhau có ảnh hưởng đáng kể đến sự sinh trưởng và phát triển của cây lan Kim tuyến *in vitro*. Trong điều kiện chiếu sáng kết hợp BR với tỷ lệ 1:4 và có cường độ sáng là 30±1

$\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (ở khoảng cách 40 cm), cây lan Kim tuyến *in vitro* phát triển tốt nhất với chiều cao cây là 5,88 cm, chiều dài rễ 1,33 cm, khối lượng tươi 0,169 g/cây, diện tích lá 0,82 cm² và hàm lượng chlorophyll a, chlorophyll a và chlorophyll tổng số tương ứng là 285,40 $\mu\text{g/g}$, 196,40 $\mu\text{g/g}$, 481,80 $\mu\text{g/g}$. Điều đó cho thấy đèn LED BR với các chỉ số như trên có thể sử

dụng để thay thế đèn huỳnh quang T5 trong quá trình nhân giống *in vitro* cây lan Kim tuyến.

Lời cảm ơn: *Tập thể tác giả xin chân thành cảm ơn đề tài “Nghiên cứu phát triển công nghệ chiếu sáng LED phục vụ nông nghiệp Tây Nguyên”, mã số TN3/C09 thuộc chương trình Tây Nguyên 3 và Phòng Công nghệ Tế bào Thực vật, Viện Công nghệ sinh học đã cung cấp kinh phí, thiết bị, vật liệu để thực hiện các nghiên cứu.*

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Appelgren M (1991) Effect of light quality on stem elongation of Pelargonium. *Sci Hort* 45: 345-351.
- Bertazza G, Baradil R, Predieri S (1995) Light effects on *in vitro* rooting of pear cultivars of different rhizogenic ability. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 41: 139-143.
- Costache MA, Campeanu G and Neata G (2012) Studies concerning the extraction of chlorophyll and total carotenoids from vegetables. *Romanian Biotechnological Letters* 17(5): 7702-7708.
- Debergh P, Aitken-Christie J, Cohen D, Grout B, Von Arnold S, Zimmerman R, Ziv M (1992) Reconsideration of the term “vitrification” as used in micropropagation. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 30: 135-140.
- Dere S, Gunes T and Sivaci R (1998) Spectrophotometric determination of Chlorophyll –A, B and Total Carotenoid contents of some Algae species using different solvents. *Turk J Botany* 22: 13-17.
- Dương Tấn Nhựt (2011) Công nghệ sinh học thực vật: Nghiên cứu cơ bản và ứng dụng, NXB Nông nghiệp. Tập 1: 37-45.
- Dương Tấn Nhựt, 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): 93-100.
- Goins GD, Yorio NC, Sanwo MM, Brown CS (1997) Photomorphogenesis, photosynthesis, and seed yield of wheat plants grown under light emitting diodes (LEDs) with or without supplemental blue lighting. *J Exp Bot* 48: 1407 - 1413.
- Hsien ME, Arnold JB (2014) Easy leaf area: Automated digital image analysis for rapid and accurate measurement of leaf area. *Appl Plant Sci* 2 (7).
- Lin KH, Huang MY, Huang WD, Hsu MH, Yang ZW, Chi Yang M (2013) The effects of red, blue, and white light-emitting diodes on the growth, development, and edible quality of hydroponically grown lettuce (*Lactuca sativa* L.var. capitata). *Sci Hort* 150: 86-91.
- Lê Đức Diên (1967) Tuyển tập sinh lý thực vật. Nhà xuất bản Khoa Học, 356 trang.
- Moreira DH, Debergh PC (1997) The effect of light quality on the morphogenesis of *in vitro* cultures of *Azorina vidalii* (Wats.) Feer. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 51: 187-193.
- Mortensen LM, Stromme E (1987) Effects of light quality on some greenhouse crops. *Sci Hort* 33: 27-36.
- Nguyễn Quang Thạch, Phí Thị Cẩm Miện (2012) Nghiên cứu kỹ thuật nhân giống loài lan Kim tuyến (*Anoectochilus setaceus* Blume) bảo tồn nguồn dược liệu quý. *Tạp chí Khoa học và Phát triển* 10(4): 597 – 603.
- 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.
- Như DT, Takamura T, Watanabe H, Tanaka M (2003) Efficiency of a novel culture system by using lightemitting diodes (LEDs) on *in vitro* and subsequent of micropropagated banana. *Acta Hort* 616: 121 - 128.
- Kauth PJ, Vendrame WA, Kane ME (2006) *In vitro* seed culture and seedling development of *Calopogon tuberosus*. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 85:91-102.
- Phùng Văn Khê, Nguyễn Trung Thành, Vương Duy Hưng (2010) Đặc điểm hình thái, phân bố của loài lan Kim tuyến *Anoectochilus setaceus* Blume ở vườn quốc gia Tam Đảo, tỉnh Vĩnh Phúc. *Tạp chí Khoa học ĐHQGHN, Khoa học Tự nhiên và Công nghệ* 26: 104-109.
- Soebo A, Krekling T, Appelgren M (1995) Light quality effects photosynthesis and leaf anatomy of birch plantlets *in vitro*. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 41:177-185.
- Trần Thị Hồng Thúy, Đỗ Thị Gám, Nguyễn Khắc Hưng, Phạm Bích Ngọc, Chu Hoàng Hà (2015) Nghiên cứu nhân nhanh *in vitro* loài lan Kim tuyến (*Anoectochilus setaceus* Blume) thông qua cảm ứng tạo protocorm like bodies. *Tạp chí Sinh học* 37(1): 76-83.
- Wellburn AR (1994) The spectral determination of chlorophyll a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *J Plant Physiol* 144: 307 – 313.

EFFECT OF LED LIGHT ON *IN VITRO* GROWTH AND DEVELOPMENT OF *ANOECTOCHILUS ROXBURGHII*

Do Thi Gam^{1,2}, Chu Hoang Ha¹, Pham Bich Ngoc¹, Nguyen Khac Hung¹, Phan Hong Khoi², Ha Thi Thanh Binh³, Nguyen Nhu Chuong⁴, Luong Tu Nam⁴, Nguyễn Thị Thúy Bình⁵

¹*Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology*

²*Center for High Technology Development, Vietnam Academy of Science and Technology*

³*Centre for Research and Technological development of Biochemistry, VUSTA*

⁴*Lam Dong Center for Science Application and Technology Transfer*

⁵*Vietnam National University of Agriculture, VNUA*

SUMMARY

Recently, LED lighting technology has been developed fast and strongly. It has been widely used in many new fields. LEDs have been tested as an artificial light source during micropagation and tissue culture of various plants species as an alternative to traditional light sources to save energy and improve the efficiency of the culture process. In this study, effects of LED light at different wavelengths and luminous intensities on growth of *Anoectochilus roxburghii*'s buds *in vitro* were investigated. *Anoectochilus*'s buds were cultured under the different light conditions, such as LED in monochromatic red (R), LED in monochromatic green (B), LED in the green and red light combining with warm white light (W) in different ratios (BRW 1, BRW2, BRW3 and BR). After 3 months of culture, the results showed LED B at strong luminous intensity ($79 \pm 3 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) inhibited the growth and development of *Anoectochilus roxburghii*. In contrast, BR LED with low luminous intensity ($30 \pm 1 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) had made a positive effect on growth and development of *Anoectochilus roxburghii*. The plant height (5,88 cm), root length (1,33 cm), fresh plant weight (0,169 g/plant), leaf area (0,82 cm²), fresh leaf weight (18,33 mg/leaves) of plants *in vitro* were found higher than those of plants grown under T5 fluorescent lighting conditions (as control). Besides, chlorophyll a, chlorophyll b and total chlorophyll content of leaves (285,40 $\mu\text{g/g}$, 196,40 $\mu\text{g/g}$, 481,80 $\mu\text{g/g}$ respectively) were higher than in the control and other versions of LED combine. The results also showed that the LED light with combined ratio of BR = 1: 4 at luminous intensity of 30 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ were suitable for the growth of *Anoectochilus roxburghii*. Therefore, BR LED (1:4) light condition should be replaced fluorescent light sources *in vitro* culture of *Anoectochilus roxburghii* in future.

Keywords: *Anoectochilus roxburghii*, LED lighting, plant culture *in vitro*, chlorophyll, luminous intensity.