

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 CÂY *IN VITRO*

Nguyễn Bá Nam¹, Nguyễn Đình Lâm², Dương Tấn Nhựt^{1,*}

¹*Viện Sinh học Tây Nguyên, Viện KHCNVN, Tp. Đà Lạt*

²*Viện Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp Miền Nam*

*Email: duongtannhut@gmail.com

Đến Tòa soạn: 22/6/2012; Chấp nhận đăng: 3/12/2012

TÓM TẮT

Ánh sáng là yếu tố quan trọng trong sự sinh trưởng của thực vật như ánh sáng tác động đến quá trình quang hợp, quang phát sinh hình thái và đáp ứng hướng sáng. Trong nghiên cứu này, các nguồn chiếu sáng khác nhau được sử dụng để nghiên cứu tác động của chúng đến khả năng tái sinh chồi từ các mẫu cây lá và lớp mỏng tế bào thân cắt dọc của cây Cúc (*Chrysanthemum morifolium* Ramat. cv. “Jimba”) *in vitro*. Lá Cúc được cắt thành hình tròn (Bằng dụng cụ tự tạo) có đường kính 0,8 cm và thân được cắt thành từng lớp mỏng có kích thước là 10 mm với độ dày từ 0,5 - 0,6 mm. Hai nguồn mẫu này được cấy trên môi trường MS có bổ sung 30 g/l sucrose, 8 g/l agar, 0,5 mg/l NAA và 2 mg/l BA và nuôi cấy dưới các điều kiện chiếu sáng khác nhau: 100 % LED đỏ, 100 % LED xanh, 50 % LED đỏ + 50 % LED xanh, 70 % LED đỏ + 30 % LED xanh, 80 % LED đỏ + 20 % LED xanh, 90 % LED đỏ + 10 % LED xanh, ánh sáng đèn huỳnh quang (Neon) và trong tối. Kết quả thu được sau bốn tuần nuôi cấy cho thấy, 70% ánh sáng LED đỏ kết hợp với 30 % ánh sáng LED xanh là tỉ lệ phù hợp cho sự tái sinh chồi trực tiếp từ mẫu lá và gián tiếp từ lớp mỏng tế bào thân cây Cúc so với các điều kiện chiếu sáng còn lại. Những chồi thu được dưới điều kiện chiếu sáng này là nguồn mẫu thích hợp phục vụ cho quy trình nhân giống cây Cúc.

Từ khóa: *Chrysanthemum morifolium* Ramat. cv. “Jimba”, LED đỏ, LED xanh, nuôi cấy *in vitro*, tái sinh chồi.

1. GIỚI THIỆU

Sự thành công trong quá trình nghiên cứu tái sinh thực vật *in vitro* có được nhờ tìm ra các điều kiện nuôi cấy thích hợp cho sự phát triển của tế bào và mô thực vật. Các yếu tố đóng vai trò quan trọng như môi trường, nhiệt độ, pH, độ ẩm và thành phần khí đã được nghiên cứu chi tiết [1], nhưng có ít nghiên cứu tập trung đánh giá nhu cầu cần thiết của ánh sáng trong quá trình sinh trưởng và biệt hóa mẫu cây [1]. Mặc dù, vấn đề này được tìm hiểu khá kỹ đối với cây phát

triển ngoài tự nhiên. Chất lượng ánh sáng kiểm soát phần lớn đặc tính của cây trồng như kích thước, kết cấu, hình dáng màu sắc lá, thời gian ra hoa, hương vị của quả [2], trọng lượng khô, chiều cao cây [3], độ dài của lá và số lượng lục lạp trong mỗi tế bào [4]. Sự sinh trưởng và phát triển của thực vật biểu hiện qua các mức độ, sinh lí, hình thái và giải phẫu khác nhau dưới các vùng quang phổ khác nhau [5]. Ánh sáng đỏ có vai trò quan trọng trong quang hợp và tổng hợp tinh bột ở thực vật, ánh sáng xanh lại thể hiện vai trò trong hình thành chlorophyll, phát triển lục lạp, đóng mở khí khổng và quang phát sinh hình thái [6]. Chất lượng ánh sáng ảnh hưởng đến cấu trúc lá [7]. Hầu hết các nguồn chiếu sáng sử dụng trong nghiên cứu nuôi cây mô tế bào thực vật đều sử dụng đèn huỳnh quang (thiết bị phục vụ chiếu sáng cho con người). Tuy nhiên, vùng quang phổ phát ra từ chúng rất rộng, không phải là ngưỡng thích hợp ở một số loài thực vật. Gần đây, đèn đơn sắc (LED) phát triển như nguồn chiếu sáng cho cây trồng bởi chúng có bước sóng xác định, thể tích và khối lượng nhỏ, cấu trúc đặc, tuổi thọ cao và ít tỏa nhiệt [8]. LED đã được sử dụng trong các nghiên cứu quang sinh học bao gồm tổng hợp chlorophyll, quang hợp và quang phát sinh hình thái [9, 10]. Một vài nghiên cứu đã thành công khi ứng dụng hệ thống chiếu sáng đơn sắc trong sinh trưởng và phát triển cây trồng [8, 10]. Tanaka và đồng tác giả đã cho thấy sự sinh trưởng lá, hàm lượng chlorophyll, trọng lượng chồi và rễ đều có ảnh hưởng khi cây Địa lan *in vitro* sinh trưởng dưới đèn LED [11]. Tương tự, Lian và đồng tác giả nghiên cứu ảnh hưởng của LED xanh, LED đỏ, LED xanh kết hợp LED đỏ lên sự tái sinh chồi từ vẩy củ *Lilium oriental* hybrid ‘Pesaro’ [12]. Ngoài ra, còn một số kết quả khả quan khi ứng dụng hệ thống chiếu sáng đơn sắc trên một số đối tượng trong nuôi cấy mô tế bào thực vật như Bạch đàn, Hồ điệp, Chuối, Lan ý, Dâu tây... [13].

Cúc là cây hoa có giá trị kinh tế quan trọng trong ngành công nghiệp hoa cắt cành (sau cây hoa Hồng) [14]. Vì nhân giống cây hoa Cúc sử dụng nguồn chiếu sáng LED đã được nghiên cứu ở nhiều nơi. Kim và đồng tác giả nghiên cứu sự sinh trưởng của chồi, sự kéo dài đốt thân, tốc độ quang hợp và đặc điểm khí khổng của cây Cúc nuôi cấy *in vitro* dưới các vùng quang phổ khác nhau của đèn LED [15]. Kurilcik và đồng tác giả nghiên cứu ảnh hưởng của hệ thống chiếu sáng đơn sắc lên sự phát sinh hình thái của chồi Cúc nuôi cấy *in vitro* [16]. Gần đây, Nhựt và Nam đã nghiên cứu sự sinh trưởng và phát triển của chồi Cúc nuôi cấy *in vitro* dưới các tỉ lệ khác nhau của hệ thống chiếu sáng đơn sắc [17]. Tuy nhiên, ảnh hưởng của ánh sáng LED đến sự tái sinh chồi từ các mẫu cấy khác nhau của cây Cúc chưa được nghiên cứu kỹ. Trong bài báo này, chúng tôi nghiên cứu ảnh hưởng của ánh sáng đơn sắc với tỉ lệ khác nhau 100, 90, 80, 70, 50, 0 % ánh sáng LED đỏ phối hợp với các tỉ lệ tương ứng của ánh sáng LED xanh 0, 10, 20, 30, 50, 100 % lên khả năng tái sinh chồi từ mẫu cấy lá và lớp mỏng tế bào đoạn thân cắt dọc. Mục đích của nghiên cứu này nhằm tìm ra điều kiện chiếu sáng phù hợp cho quá trình tái sinh chồi Cúc từ các mẫu cấy khác nhau phục vụ cho công tác nhân giống.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu

Lá Cúc (*Chrysanthemum morifolium* Ramat. cv. “Jimba”) từ những cây Cúc ba tuần tuổi nuôi cấy *in vitro* được cắt thành hình tròn bằng dụng cụ tự tạo [18] có đường kính 0,8 cm, thân được cắt thành từng lớp mỏng có kích thước là 10 mm và độ dày từ 0,5 - 0,6 mm được cấy trên môi trường cảm ứng tạo chồi. Môi trường được sử dụng trong thí nghiệm là môi trường MS [19] có bổ sung 30 g/l sucrose, 8 g/l agar, 0,5 mg/l NAA và 2 mg/l BA [20]; pH của môi trường được chỉnh về 5,7; sau đó, môi trường được đổ vào bình thủy tinh 250 ml (30 ml/bình). Hấp khử trùng môi trường ở 121°C atm trong 30 phút.

2.2. Phương pháp

2.2.1. Điều kiện nuôi cấy in vitro và hệ thống chiếu sáng

Mẫu được cấy vào trong bình 250 ml chứa 30 ml môi trường nuôi cấy. Riêng mẫu lá, mặt dưới tiếp xúc với môi trường. Mỗi thí nghiệm khảo sát với 15 bình và mỗi bình cấy 2 mẫu. Mẫu được nuôi cấy ở nhiệt độ $22 \pm 2^\circ\text{C}$, quang kỳ 16 giờ/ngày, cường độ chiếu sáng 2500 lux, độ ẩm tương đối 75 – 80 %. Chiếu sáng bằng hệ thống chiếu sáng đơn sắc sử dụng hai loại đèn LED ánh sáng đỏ (có bước sóng 650 nm) và LED ánh sáng xanh (có bước sóng 450 nm). Tùy vào nghiệm thức sẽ phối hợp tỉ lệ đèn khác nhau (100, 90, 80, 70, 50, 0 % ánh sáng LED đỏ phối hợp với 0, 10, 20, 30, 50, 100 % ánh sáng LED xanh). Ngoài ra, thí nghiệm còn được bố trí trong tối và dưới đèn huỳnh quang (đối chứng).

2.2.2. Quan sát mô học

Những mẫu cây từ lá và lớp mỏng tế bào thân Cúc dưới điều kiện chiếu sáng 70 % ánh sáng LED đỏ kết hợp với 30 % ánh sáng LED xanh được sử dụng để quan sát mô học. Mẫu được tạo các lát mỏng khoảng 10 - 15 μm theo chiều ngang đi qua chồi, sau đó ngâm trong javen 10 % trong 15 phút, rửa sạch mẫu bằng nước cất, tiếp tục ngâm mẫu trong acid acetic 45 % trong 15 phút để cố định mẫu, rửa lại bằng nước cất 6 lần, ngâm mẫu đã ráo trong phẩm nhuộm 2 màu carmine trong 5 phút, rửa lại mẫu bằng nước cất 2 lần, cuối cùng đặt mẫu trong lamen, nhỏ 1 giọt nước hay glycerine và đậy lam kính lại. Quan sát dưới kính hiển vi quang học với vật kính $\times 10$.

2.2.3. Các chỉ tiêu theo dõi

Tỉ lệ tái sinh chồi, số lượng chồi/mẫu, chiều cao trung bình của chồi và tỉ lệ chồi lớn hơn 1 cm được ghi nhận sau bốn tuần nuôi cấy mẫu lá và lớp mỏng tế bào từ thân Cúc.

2.2.4. Xử lí số liệu

Mỗi thí nghiệm được lặp lại ba lần, số liệu được xử lí bằng phần mềm Microsoft excel và Duncan's test [21] với $\alpha = 0,05$.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả

3.1.1. Ảnh hưởng của điều kiện chiếu sáng lên khả năng tái sinh chồi từ mẫu lá Cúc in vitro

Những số liệu thu được sau bốn tuần nuôi cấy thể hiện ảnh hưởng của các điều kiện chiếu sáng lên khả năng tái sinh chồi bất định từ mẫu lá nuôi cấy *in vitro* được trình bày ở bảng 1.

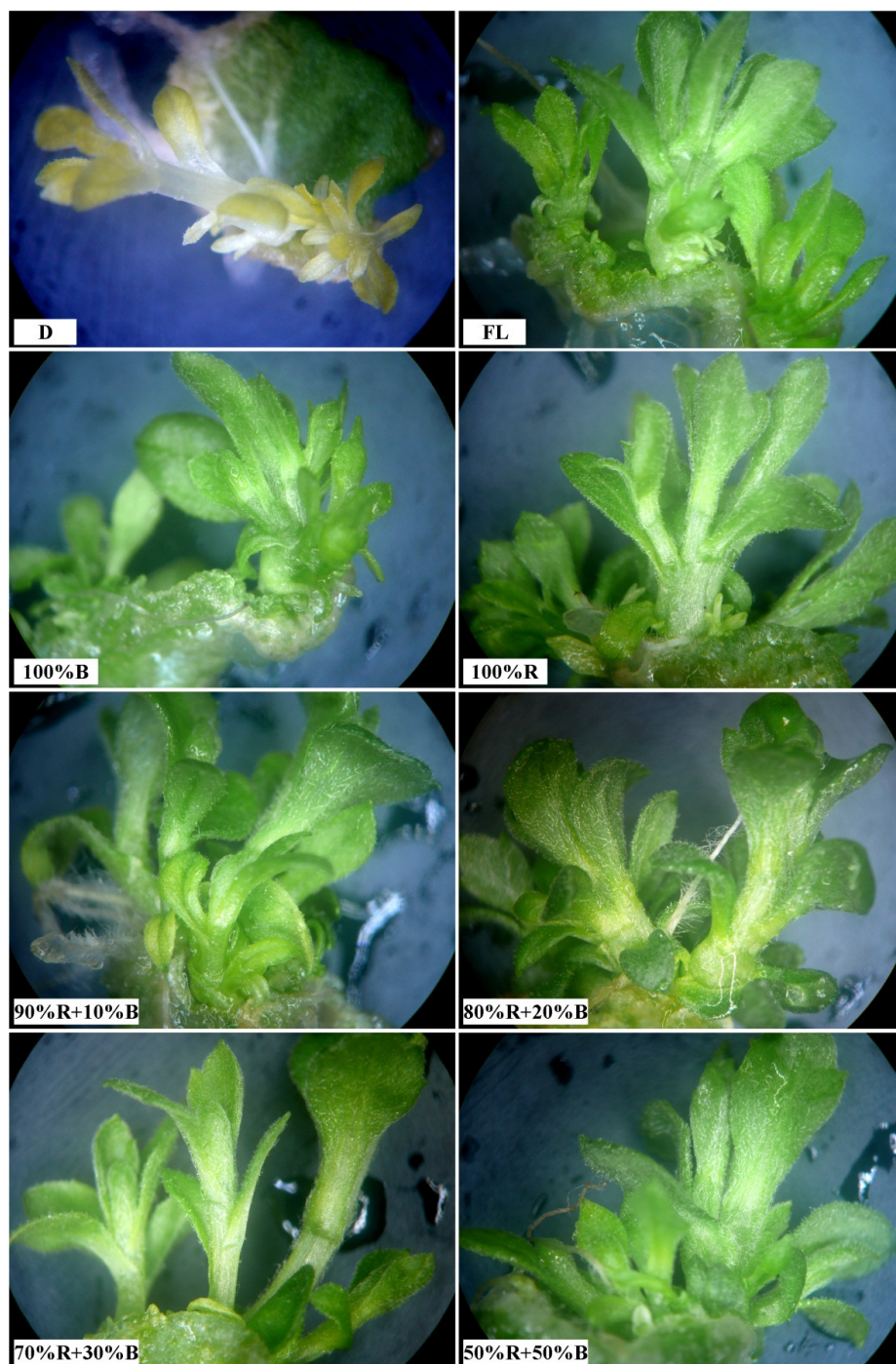
Kết quả cho thấy, quá trình tái sinh chồi từ mẫu lá có thể xảy ra trực tiếp không qua giai đoạn mô sẹo và trong điều kiện không chiếu sáng. Ở điều kiện tối, mẫu lá cũng có khả năng tạo chồi. Tuy nhiên, các chỉ tiêu theo dõi như tỉ lệ tái sinh chồi (45,23 %) hay số chồi/mẫu (3,00 chồi) đều thấp hơn so với các điều kiện chiếu sáng khác (bảng 1).

Bảng 1. Ảnh hưởng của các điều kiện chiếu sáng lên khả năng tái sinh chồi từ mẫu lá Cúc *in vitro*.

Các điều kiện chiếu sáng	Tỉ lệ mẫu tái sinh chồi	Số chồi/mẫu	Chiều cao trung bình của chồi	Tỉ lệ chồi > 1 cm (%)
Tối	45,23c*	3,00c	1,04b	45,83c
Neon	85,00b	4,80b	1,27b	73,00b
100 % LED xanh	50,67c	3,60c	1,00b	36,09d
100 % LED đỏ	95,04a	7,40a	1,02b	40,49cd
90 % LED đỏ + 10 % LED xanh	87,12b	5,00b	1,24b	67,80b
80% LED đỏ + 20 % LED xanh	84,92b	4,75b	1,19b	71,87b
70 % LED đỏ + 30 % LED xanh	85,33b	4,60b	1,52a	81,33a
50 % LED đỏ + 50 % LED xanh	75,81bc	3,60c	0,87c	50,00c

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

Sự hiện diện của các chất điều hòa sinh trưởng trong môi trường nuôi cấy là nhân tố cảm ứng tạo chồi từ mẫu lá Cúc *in vitro*. Vì vậy, có thể khẳng định ánh sáng chỉ có vai trò trong quá trình kích thích hơn là cảm ứng hình thành chồi. Ánh sáng LED đỏ có khả năng kích thích tạo chồi cao nhất với tỉ lệ mẫu tái sinh chồi lên đến 95,04 % (bảng 1; hình 1). Tỉ lệ này giảm khi sự hiện diện của ánh sáng LED đỏ trong điều kiện chiếu sáng giảm, thay vào đó, là sự gia tăng tỉ lệ của ánh sáng LED xanh. Trong các tỉ lệ kết hợp giữa các loại ánh sáng thì tỉ lệ 50% ánh sáng LED xanh và 50 % LED đỏ cho khả năng tạo chồi thấp nhất (75,81 %) (bảng 1; hình 1). Chứng tỏ ánh sáng xanh ức chế quá trình cảm ứng tạo chồi. Đối với chỉ tiêu so sánh chiều cao trung bình của chồi, dưới tỉ lệ 70 % ánh sáng LED đỏ kết hợp với 30 % ánh sáng LED xanh lại cho chiều cao trung bình chồi tốt nhất (1,52 cm) với 81,33 % chồi cao hơn 1 cm (bảng 1). Ngoài ra, lá của các chồi dưới điều kiện này xanh đậm hơn. Mặc dù, số lượng chồi/mẫu cũng như là tỉ lệ tái sinh chồi không cao nhưng chiều cao chồi và chất lượng chồi dưới tỉ lệ 70 % ánh sáng LED đỏ kết hợp với 30 % ánh sáng LED xanh tốt hơn so với các điều kiện chiếu sáng khác.



Hình 1. Ảnh hưởng của các điều kiện chiếu sáng khác nhau lên khả năng tái sinh chồi từ mẫu lá Cúc nuôi cây *in vitro*. D: điều kiện tối; FL: ánh sáng đèn huỳnh quang; B: ánh sáng đèn LED xanh; R: ánh sáng đèn LED đỏ.

3.1.2. Ảnh hưởng của các điều kiện chiếu sáng lên khả năng tái sinh chồi từ lớp mỏng tế bào thân Cúc *in vitro*

Sau 4 tuần nuôi cấy, các chỉ tiêu theo dõi như tỉ lệ tái sinh chồi, số chồi/mẫu và chiều cao chồi của lớp mỏng tế bào cắt dọc thân dưới các điều kiện chiếu sáng khác nhau được thể hiện ở bảng 2.

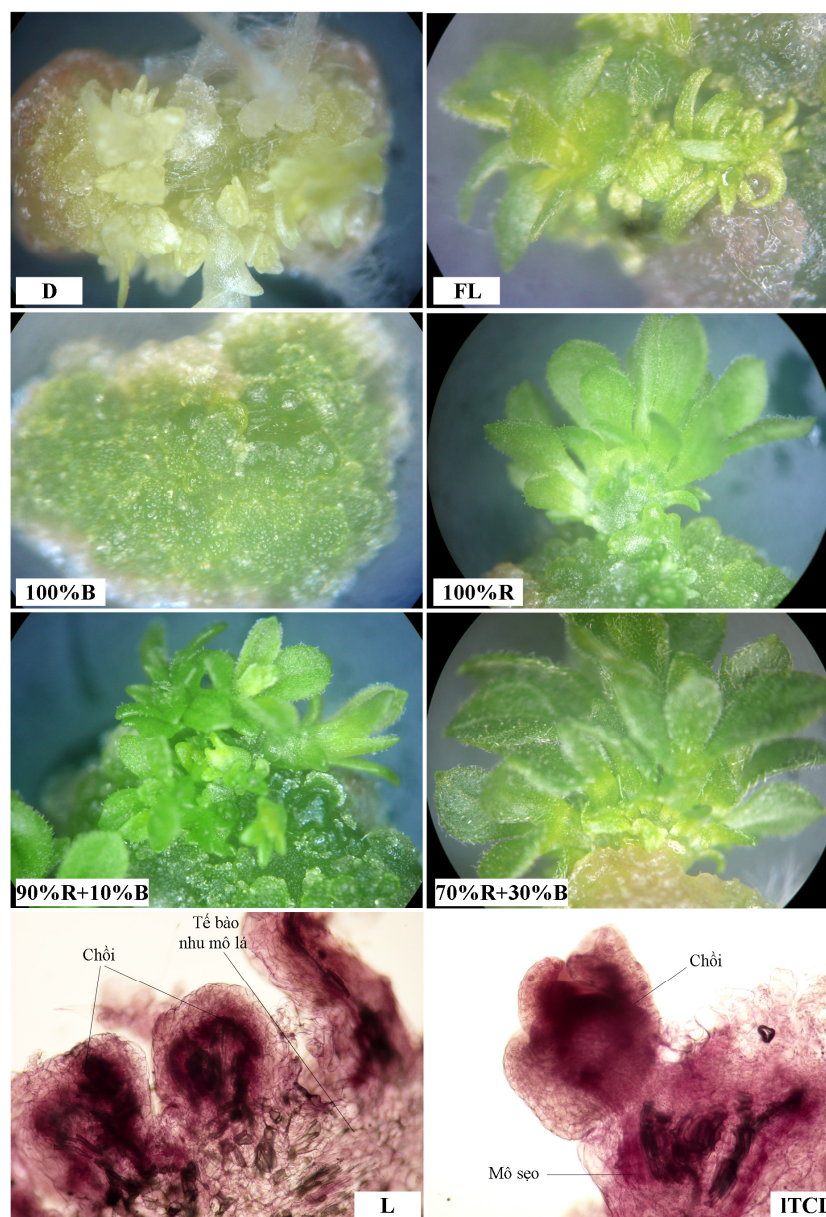
Khác với quá trình tạo chồi trực tiếp từ mẫu lá, sự tái sinh chồi từ lớp mỏng tế bào thân phải trải qua giai đoạn tạo mô sẹo. Điều này làm cho các chỉ tiêu so sánh sự hình thành chồi từ lớp mỏng tế bào thân đều thấp hơn so với từ lá ở tất cả các điều kiện chiếu sáng. Đặc biệt, dưới điều kiện 100 % ánh sáng LED xanh, mẫu cấy chỉ tạo thành mô sẹo, sự hình thành chồi bị ức chế hoàn toàn (bảng 2; hình 2).

Bảng 2. Ảnh hưởng của các điều kiện chiếu sáng lên khả năng tái sinh chồi từ lớp mỏng tế bào thân Cúc *in vitro*.

Các điều kiện chiếu sáng	Tỉ lệ mẫu tái sinh chồi	Số chồi/mẫu	Chiều cao trung bình của chồi (cm)	Tỉ lệ chồi > 1 cm (%)
Tối	25,50c*	2,25b	0,71b	11,00c
Neon	43,25a	4,00ab	0,86ab	27,78b
100 % LED xanh	0d	0c	0d	0d
100 % LED đỏ	23,00c	2,33b	0,66b	13,33c
90 % LED đỏ + 10 % LED xanh	25,46c	2,50b	0,43c	0d
80 % LED đỏ + 20 % LED xanh	36,27b	3,00b	0,78b	28,33b
70 % LED đỏ + 30 % LED xanh	50,59a	5,25a	0,96a	43,92a
50 % LED đỏ + 50 % LED xanh	24,23c	2,25b	0,42c	0d

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

Trong thí nghiệm này, ánh sáng LED đỏ không thể hiện vai trò trong kích thích tạo chồi, dưới điều kiện 100 % ánh sáng đỏ tỉ lệ tạo chồi là 23,00 % và số chồi/mẫu là 2,33 chồi (bảng 2). Tuy nhiên, sự kết hợp giữa ánh sáng LED đỏ và ánh sáng LED xanh lại cho hiệu quả trong khả năng tạo chồi. Dưới điều kiện 70 % ánh sáng LED đỏ kết hợp với 30% ánh sáng LED xanh, các chỉ tiêu so sánh như tỉ lệ mẫu tái sinh chồi (50,59 %), số chồi/mẫu (5,25 chồi), chiều cao trung bình của chồi (0,96 cm) cũng như tỉ lệ chồi lớn hơn 1 cm (43,92 %) đều cao hơn so với các điều kiện chiếu sáng khác (bảng 2; hình 2). Qua kết quả thu được từ bảng 1 và bảng 2 cho thấy, mẫu cấy có nguồn gốc khác nhau thể hiện đến khả năng tái sinh chồi không giống nhau. Mẫu cấy lá có khả năng hình thành chồi trực tiếp từ nhu mô của mẫu lá trong khi đó mẫu cấy từ thân hình thành chồi gián tiếp thông qua mô sẹo. Ánh sáng chỉ có vai trò kích thích nâng cao tần suất tái sinh chồi.



Hình 2. Ảnh hưởng của các điều kiện chiếu sáng khác nhau lên khả năng tái sinh chồi từ lớp mỏng tế bào thân Cúc cắt dọc nuôi cấy *in vitro*. **D:** điều kiện tối; **FL:** ánh sáng đèn huỳnh quang; **B:** ánh sáng đèn LED xanh; **R:** ánh sáng đèn LED đỏ; **L, ITCL:** lần lượt là hình thái giải phẫu sự tái sinh chồi trực tiếp của mẫu lá và tái sinh chồi gián tiếp từ lớp mỏng tế bào thân cắt dọc dưới điều kiện 70 % ánh sáng LED đỏ kết hợp 30 % ánh sáng LED xanh.

3.2. Thảo luận

Quá trình tái sinh từ các mẫu cấy thực vật thông qua tính toàn thể của tế bào để hình thành phôi vô tính hay một cây mới hoàn chỉnh trong nuôi cấy *in vitro* phụ thuộc vào nhiều yếu tố như

kiểu gen, chất điều hòa sinh trưởng thực vật và loại mẫu cây [22, 23]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi cũng nhận thấy, mẫu cây có nguồn gốc khác nhau quyết định đến khả năng tái sinh. Mẫu cây lá Cúc có khả năng hình thành chồi trực tiếp trong khi đó mẫu cây từ thân hình thành chồi gián tiếp thông qua mô sẹo, mặc dù được cấy trên cùng môi trường. Ảnh hưởng của nguồn mẫu cây lên khả năng hình thành chồi cũng đã được nghiên cứu trên nhiều đối tượng như Khoai tây [24]; *Saussurea obvallata* (dc.) Edgew [25]; *Aristolochia fimbriata* [26]. Một số tác giả khác tập trung nghiên cứu độ tuổi [27] và điều kiện sinh lý của mẫu cây cũng như các yếu tố ảnh hưởng đến khả năng tái sinh của mẫu cây [28]. Trong nghiên cứu này, chồi hình thành trực tiếp dọc theo vết cắt của lá. Quá trình đáp ứng của mô do sự tạo vết thương với sự hiện diện của các chất điều hòa sinh trưởng đã kích thích tế bào phân chia liên tục từ đó có thể hình thành nên các hình thái khác nhau như chồi bất định, rễ bất định hoặc phôi [29]. Trái với mẫu cây lá, mẫu cây từ thân lại hình thành mô sẹo trước khi khởi tạo chồi. Kết quả này cũng tương tự như nhận định của Wu và đồng tác giả [30], các mô từ những bộ phận thân hoặc trụ dưới hoa có xu hướng hình thành mô sẹo trước khi hình thành chồi. Ngoài ra, Eck và Kitto kết luận rằng sự tái sinh chồi bắt nguồn từ nhu mô nằm dưới lớp cutin và lớp biểu bì của lá khi quan sát hình thái giải phẫu trong quá trình nghiên cứu tái sinh chồi trực tiếp từ lá Bạc hà [31]. Trong lớp mỏng tế bào cắt dọc thân, sự hiện diện của tế bào nhu mô là rất thấp. Vì vậy, quá trình tái sinh chồi muốn diễn ra thì các tế bào trong mẫu cây phải phân biệt hóa thành tế bào sơ khởi, do đó, callus được hình thành. Có thể kết luận, tùy thuộc vào loại mẫu cây mà khả năng hình thành chồi có thể trực tiếp hoặc gián tiếp thông qua mô sẹo.

Trong khi, mẫu cây và chất điều hòa sinh trưởng ảnh hưởng trực tiếp đến giai đoạn đầu của quá trình tái sinh thì ánh sáng lại có vai trò kích thích nâng cao tần suất tái sinh chồi. Nghiên cứu này đã làm rõ ảnh hưởng của chất lượng quang phổ đến sự phát sinh hình thái của các mẫu nuôi cấy. Điều này đã được chứng minh ở các nghiên cứu trước như sự hình thành chồi nách ở cây Nho [32]; cấu trúc và kích thước lá ở cây “Birch” [33]; sự hình thành rễ ở cây Lê [34]; kéo dài thân cây Cúc [35]. Ánh sáng là năng lượng cho quang hợp, nó điều chỉnh nhiều hoạt động sống và phát triển ở thực vật. Vấn đề ở đây là phải cung cấp, kiểm soát ánh sáng với lượng và chất một cách hiệu quả [36]. Ánh sáng đèn LED là một nguồn năng lượng đầy hứa hẹn cho phòng nuôi cấy mô và nâng cao khả năng tăng trưởng sinh học nhờ vào kích thước nhỏ, có cấu trúc rắn, an toàn và tuổi thọ cao [8]. Tanaka và đồng tác giả [11] đã chứng minh sự sinh trưởng của *Cymbidium* có thể được cải thiện khi được nuôi cấy bằng phương pháp quang tự dưỡng không bổ sung đường dưới sự chiếu sáng của đèn LED (ánh sáng LED đỏ và ánh sáng LED xanh kết hợp). Nhut và đồng tác giả cũng đã chứng minh được cây Đậu tây *in vitro* phát triển tốt nhất khi được nuôi cấy với nguồn chiếu sáng đèn LED (70 % ánh sáng LED đỏ + 30 % ánh sáng LED xanh) với cường độ chiếu sáng là $60 \mu\text{mol}/\text{m}^2.\text{s}$ [37]. Jao và đồng tác giả nghiên cứu ảnh hưởng của ánh sáng đèn LED lên sự sinh trưởng và hình thành thân của cây *Zantedeschia* [38]. Trong nghiên cứu của Heo và đồng tác giả cũng cho thấy với nguồn chiếu sáng đèn LED, cây Nho tăng khả năng sinh trưởng và tổng hợp carbohydrate [39]. Kết quả của nghiên cứu này cũng cho thấy, các chỉ tiêu từ tỉ lệ tái sinh chồi, số chồi/mẫu đến chiều cao chồi đều có sự khác biệt có ý nghĩa dưới điều kiện chiếu sáng LED đỏ và LED xanh kết hợp so với ánh sáng đèn huỳnh quang. Sự kết hợp đó đã làm gia tăng tỉ lệ tạo chồi cũng như các dẫn chứng chứng minh chất lượng chồi. Đặc biệt, dưới điều kiện 70 % ánh sáng LED đỏ kết hợp với 30 % ánh sáng LED xanh. Ngoài ra, từng loại ánh sáng cũng thể hiện các đặc tính riêng trong vai trò kích thích hình thành chồi. Ánh sáng LED đỏ làm gia tăng tỉ lệ hình thành chồi và số chồi/mẫu ở mẫu lá, điều này lại không được thể hiện ở mẫu từ thân. Trong khi đó, ánh sáng LED xanh kích thích không đáng kể số lượng chồi trong thí nghiệm với mẫu lá nhưng lại ức chế hoàn toàn sự hình thành chồi ở lớp mỏng tế bào thân. Sự khác biệt này có thể giải thích do sự mất cân bằng của năng lượng ánh sáng đến quang hệ thống I và II hay các thụ thể ánh sáng chịu trách nhiệm trong

quang phát sinh hình thái như: phytochrome, cryptochrome, phototropin... [9]. Ánh sáng đỏ kích thích sự kéo dài chồi ở cây Cúc [15], cây *Pelargonium* và *Azorina vidalii* (Wats.) Feer [40, 41] nhưng lại ức chế kéo dài chồi ở cây Vạn thọ và Kim ngân [42]. Ánh sáng xanh làm giảm chiều cao cây và chiều dài đốt của cây *Azorina vidalii* (Wats.) Feer [41], ức chế sự sinh trưởng và thay đổi cấu trúc giải phẫu của thân và lá cây Tiêu [4]. Mặt khác, ánh sáng xanh lại làm gia tăng số lượng chồi của cây Nho [32]. Vai trò ức chế hoặc kích thích dưới các điều kiện chiếu sáng khác nhau phụ thuộc vào mối quan hệ giữa các điểm thụ thể ánh sáng đỏ/xanh, đặc điểm sinh trưởng của từng loài, từng loại mẫu và ngay cả độ tuổi của mẫu cây [15].

4. KẾT LUẬN

Với những ưu điểm của đèn LED như có tuổi thọ cao, cấu trúc đặc, an toàn, phát nhiệt ít, tiêu thụ điện năng thấp và đặc biệt, có thể phát ra nhiều dãy bước sóng tùy thuộc vào cấu trúc bán dẫn nên đèn LED có nhiều điểm thuận lợi trong nghiên cứu sự phát sinh hình thái, sinh trưởng và phát triển ở thực vật *in vitro* lẫn *ex vitro*. Thông qua kết quả này có thể khẳng định, ánh sáng đèn LED có vai trò quan trọng đến quá trình phát sinh hình thái của thực vật nuôi cấy *in vitro* nói chung và cây Cúc nói riêng. 70 % ánh sáng LED đỏ kết hợp với 30 % ánh sáng LED xanh là tỉ lệ phù hợp cho sự tái sinh chồi trực tiếp từ mẫu lá và gián tiếp từ lớp mỏng tế bào thân cây Cúc. Những chồi thu được dưới điều kiện chiếu sáng này là nguồn mẫu thích hợp phục vụ cho quy trình nhân giống cây Cúc.

Lời cảm ơn. Các tác giả xin chân thành cảm ơn Phòng Sinh học phân tử và chọn tạo giống cây trồng (Viện Sinh học Tây Nguyên) đã tạo điều kiện cho chúng tôi hoàn thành nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Thorpe T.A. - Morphogenesis and regeneration. In: Vasil I.K., Thorpe T.A. (Eds). Plant cell and tissue culture. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1994, pp. 17-36.
2. Eskins K., Warner K., Felker F. - Light quality during early seedling development influences the morphology and bitter taste intensity of mature lettuce (*Lactuca sativa*) leaves, J. Plant. Physiol. **147** (1996) 709-713.
3. Mortensen L. M., Stromme E. - Effects of light quality on some greenhouse crops, Sci. Hort. **33** (1987) 27-36.
4. Schuerger A. C., Brown C. S., Stryjewski E. C. - Anatomical features of pepper plants (*Capsicum annuum* L.) grown under red light-emitting diodes supplemented with blue or far-red light, Ann. Bot. **79** (1997) 273-28.
5. Barreiro R., Guamet J. J., Beltrano J., Montaldi E. R. - Regulation of the photosynthetic capacity of primary bean leaves by the red: far-red ratio and photosynthetic photon flux density of incident light, Physiol. Plant **85** (1992) 97-101.
6. Akoyunoglou G. - Anni H Blue light effect on chloroplast development in higher plant. In: Senger H. (Ed) Blue light effects in biological systems. Springer-Verlag, Berlin, 1984, pp. 397-406.
7. Boardman N. K. - Comparative photosynthesis of sun and shade plants, Ann. Rev. Plant. Physiol **28** (1977) 355-377.

8. Bula R. J., Morrow R. C., Tibbitts T. W., Ignatius R. W., Martin T. S., Barta D. J. - Light-emitting diodes as a radiation source for plants, *HortSci.* **26** (1991) 203-205.
9. Tennessen D. J., Singaas E. L., Sharkey T. D. - Light-emitting diodes as a light source for photosynthesis research, *Photo. Res.* **39** (1994) 85-92.
10. Tripathy B.C., Brown C.S. - Root-shoot interaction in greening of wheat seedlings grown under red light. *Plant Physiol.* **107** (1995) 407-411.
11. Tanaka M., Takamura T., Watanabe H., Endo M., Yanagi T., Okamoto K. - *In vitro* growth of *Cymbidium* plantlets cultured under superbright red and blue light-emitting diodes (LEDs), *J. Hort. Sci. Biotech.* **73** (1998) 39-44.
12. Lian M. L., Murthy H. H., Paek K. Y. - Effects of light-emitting diodes (LEDs) on the *in vitro* induction and growth of bulblets of *Lilium* oriental hybrid 'Pesaro', *Sci. Hort.* **94** (2002) 365-370.
13. Nhut D. T. - *In vitro* growth and physiological aspects of some horticultural plantlets cultured under red and blue light-emitting diodes (LEDs), Doctoral thesis, Kagawa University, Japan, 2002.
14. Teixeira da Silva J. A. - Ornamental chrysanthemums: improvement by biotechnology - Review of Plant Biotechnology and Applied Genetics, *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **79** (2004) 1-18.
15. Kim S. J., Hahn E. J., Heo J. W., Paek K. Y. - Effects of LEDs on net photosynthetic rate, growth and leaf stomata of chrysanthemum plantlets *in vitro*, *Sci. Hort.* **101** (2004) 143-151.
16. Kurilcik A., Canova R. M., Dapkuniene S., Zilinskaite S., Kurilcik G., Tamulaitis G., Duchovskis P., Zukauskas A. - *In vitro* culture of chrysanthemum plantlets using light-emitting diodes, *C. Euro. J. Biol.* **3** (2) (2008) 161-167.
17. Dương Tấn Nhựt, Nguyễn Bá Nam - 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) (2009) 93-100.
18. Vũ Thị Hiền, Thái Bảo Diệu Hiền, Hoàng Văn Thường, Lê Kim Cương, Nguyễn Thị Thu Sương, Lê Quang Công, Hà Thị Tuyết Phương, Hoàng Song Tùng, Hồ Hoàng Anh Kha, Trần Thị Hoàn Anh, Nguyễn Bá Nam, Nguyễn Thị Thúy Hằng, Nguyễn Văn Bình, Vũ Quốc Luận, Dương T. N. - Thiết kế dụng cụ lấy mẫu mới trong nghiên cứu tái sinh và nhân giống vô tính cây Dâu tây (*Fragaria* spp.), *Hội nghị Công nghệ sinh học toàn quốc khu vực phía nam*, 2009, tr 353-358.
19. Murashige T., Skoog F. - A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiol.* **15** (1962) 473-497.
20. Teixeira da Silva J. A., Fukai S. - Chrysanthemum organogenesis through thin cell layer technology and plant growth regulator control, *Asian J. Plant Sci.* **2** (6) (2003) 505-514.
21. Duncan D. B. - Multiple range and multiple F test, *Biometrics* **11** (1955) 1-42.
22. Ganeshan S., Caswell K. L., Kartha K. K., Chibbar R. N. - Shoot regeneration and proliferation, In: Khachatourians G. G., McHughen A., Scorza R., Nip W. K., Hui Y. H. (Eds.) *Transgenic plants and crops*. Marcel Dekker, Inc, New York, 2002, pp. 69-84.

23. Liu C., Callow P., Rowland L. J., Hancock J. F., Song G. - Adventitious shoot regeneration from leaf explants of southern highbush blueberry cultivars, *Plant Cell. Tiss. Org. Cult.* **103** (2010) 137-144.
24. Pereira A. M. S., Bertoni B. W., Gloria B. A., Araiyo R. B. A., Januario A. H., Loureno M. ., Franca S. C. - Micropropagation of pathomorphe umbellate via direct organogenesis from leaf explants, *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **60** (2000) 47-53.
25. Dhar U., Joshi M. - Efficient plant regeneration protocol through callus for *Saussurea obvallata* (dc.) Edgew. (Asteraceae): Effect of explant type, age and plant growth regulators, *Plant Cell. Rep.* **24** (2005) 195-200.
26. Bliss B.J., Landherr L., dePamphilis C.W., Ma H., Hu Y., Maximova S.N. - Regeneration and plantlet development from somatic tissues of *Aristolochia fimbriata*, *Plant. Cell. Tiss. Org. Cult.* **98** (2009) 105-114.
27. Palmer C. D., Keller W. A. - Plant regeneration from petal explants of *Hypericum perforatum* L, *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **105** (2011) 129-134.
28. Nagarathna K. C., Prakash H. S., Shetty H. S. - Genotypic effects on the callus formation from different explants of pearl millet B lines, *Adv. Plant Sci.* **4** (1991) 82-86.
29. Barakat M. N., Fattah R. S. A., Badr M., El-Torky M. G. - *In vitro* culture and plant regeneration derived from ray florets of *Chrysanthemum morifolium*. *Afr. J. Biotechnol.* **9** (2010) 1151-1158.
30. Wu X., Li X., Zhang X. - Molecular analysis of hormone regulated petal regeneration in *Petunia*. *Plant Cell Rep.* **27** (2008) 1169-1176.
31. Eck J. M., Kitto S. L. - Regeneration of peppermint and orange mint from leaf disks, *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **30** (1992) 41-49.
32. Chee R. - *In vitro* culture of *Vitis*: the effects of light spectrum, manganese, and potassium iodide on morphogenesis, *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **7** (1986) 121-134.
33. Soebo A., Krekling T., Appelgren M. - Light quality effects photosynthesis and leaf anatomy of birch plantlets *in vitro*, *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **41** (1995) 177-185.
34. Bertazza G., Baradil R., Predieri S. - Light effects on *in vitro* rooting of pear cultivars of different rhizogenic ability, *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **41** (1995) 139-143.
35. Zhiyu M., Shimizu H., Moriizumi S., Miyata M. - Effect of light intensity, quality and photoperiod on stem elongation of *Chrysanthemum* cv. Reagan, *Environ. Control Biol.* **45** (1) (2007) 19-25.
36. Langhans R. W., Dreesen D. R. - Challenges to plant growing in space, *HortSci.* **23** (1988) 286-293.
37. Nhut D. T., Takamura T., Watanabe H., Okamoto K., Tanaka M. - Responses of strawberry plantlets cultured *in vitro* under superbright red and blue light-emitting diodes (LEDs). *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **73** (2003) 43-52.
38. Jao R. C., Lai C. C., Fang W., Chang S. F. - Effects of red light on the growth of *Zantedeschia* plantlets *in vitro* and tuber formation using light-emitting diodes. *HortSci.* **40** (2005) 436-438.
39. Heo J. W., Shin K. S., Kim S. K., Paek K. Y. - Light quality affects *in vitro* growth of grape 'Teleki 5BB7', *J. Plant Biol.* **49** (2006) 276-280.

40. Appelgren M. - Effect of light quality on stem elongation of *Pelargonium*, Sci. Hort. **45** (1991) 345-351.
41. Moreira da Silva M. H., Degergh P. C. - The effect of light quality on the morphogenesis of *in vitro* cultures of *Azorina vidalii* (Wats.), Feer. Plant Cell Tiss. Org. Cult. **51** (1997) 187-198.
42. Heo J., Lee C., Chakrabarty D., Paek K. Y. - Growth responses of marigold and salvia bedding plants as affected by monochromic or mixture radiation provided by a light-emitting diode (LED), Plant Grow. Regul. **38** (2002) 225-230.

ABSTRACT

THE EFFECT OF EXPLANT TYPES AND LED-LIGHTS ON THE SHOOT REGENERATION OF CHRYSANTHEMUM (*CHRYSANTHEMUM MORIFOLIUM* CV. RAMAT. CV. "JIMBA") *IN VITRO*

Nguyen Ba Nam¹, Nguyen Dinh Lam², Duong Tan Nhut^{1,*}

¹Tay Nguyen Institute of Biology, VAST, Da Lat city

²Institute of Agricultural Science for Southern Vietnam

*Email: duongtannhut@gmail.com

Light is the key factor influencing on the plant growth. Plants react to light mainly via photosynthetic, photomorphogenetic, and phototropic responses. In this study, the effects of different light sources on the shoot regeneration ability of leaves and stem longitudinal thin cell layers from the three-week-old *in vitro* Chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium* Ramat. cv. "Jimba") were studied. The leaves were cut into round discs of 0.8 cm diameter. Longitudinal thin cell layer explants, 10 mm long and 0.5 - 0.6 mm thick, were excised from the stem. These explants were cultured on MS medium supplemented with 30 g/l sucrose, 8 g/l agar, 0.5 mg/l NAA and 2 mg/l BA and cultured under different 16-h photoperiod lighting conditions of 100 % red LED (Light-Emitting Diode), 100 % blue LED, 50 % red LED + 50 % blue LED, 70 % red LED + 30 % blue LED, 80 % red LED + 20% blue LED, 90 % red LED + 10 % blue LED, fluorescent lamps, and under darkness. 70 % of the red LED-light combined with 30 % blue LED-light is the most suitable lighting condition for shoot regeneration directly from leaf discs and indirectly from stem longitudinal thin cell layers. The present study suggested that the shoots regenerated under light-emitting diode system could be a promising source of explants for the process of Chrysanthemum propagation.

Keywords: blue LED, Chrysanthemum morifolium Ramat. cv. "Jimba", *in vitro* culture, red LED, shoot regeneration.