

NGHIÊN CỨU ẢNH HƯỞNG CỦA ĐÈN LED TRONG QUY TRÌNH VI NHÂN GIỐNG LAN GIẢ HẠC DI LINH TALY

ĐÀO QUỐC HUNG¹, ĐỖ ĐĂNG GIÁP², TRẦN THỊ THANH TÂM¹, NGUYỄN THỊ KIM KHOA¹,
NGUYỄN VĂN ĐỆ¹, ĐỖ ĐỨC THĂNG²

¹ Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, Trường Đại học Công nghiệp thành phố Hồ Chí Minh

² Viện Sinh học Nhiệt đới
hungdao1610@gmail.com

Tóm tắt: Lan giả hạc (*Dendrobium anosmum*) Di Linh Taly có nguồn gốc ở huyện Di Linh, tỉnh Lâm Đồng, là loài lan quý, có giá trị kinh tế cao, đang được nhiều người sưu tầm. Các mẫu protocorm-like bodies (PLB) lan giả hạc Di Linh Taly đã được khảo sát bằng nuôi cấy *in vitro* dưới đèn FL (huỳnh quang) và dưới đèn diode phát ánh sáng xanh dương kết hợp với đỏ (LED BR 30:35), sau đó các cây tái sinh hoàn chỉnh *in vitro* được thuần dưỡng ở vườn ươm 1 tháng. Protocorm-like bodies được nuôi bằng đèn LED BR có tỷ lệ phát sinh chồi 38 – 42%, gấp 3,8 - 4,2 lần so với nuôi bằng đèn FL (10%). Chồi lan giả hạc này được nuôi dưới đèn LED BR có số rễ/chồi là 3,67 – 5,16, nhiều hơn có ý nghĩa thống kê so với nuôi dưới FL (1,95 rễ/chồi). Chiều dài rễ ở LED BR là 3,42 – 4,14 mm trong khi đó ở FL là 2,97 mm. Các loại cây lan *in vitro* đều thích nghi tốt khi thuần dưỡng ở vườn ươm. Đèn LED 30R:35R đã ảnh hưởng có ý nghĩa đến sinh trưởng, phát triển chồi và rễ lan giả hạc Di Linh Taly, làm tăng hiệu quả nhân giống *in vitro*.

Từ khóa: light-emitting diode (LED), *Dendrobium anosmum*, lan giả hạc Di Linh Taly, protocorm-like bodies, nhân giống *in vitro*, thuần dưỡng

EFFECTS OF LIGHT-EMITTING DIODES IN MICROPROPAGATION OF *Dendrobium anosmum* DI LINH TALY

Abstract: *Dendrobium anosmum* Di Linh Taly originated from Di Linh District, Lam Dong Province is a precious orchid, of high economic value, and in great demand of collectors. Protocorm-like bodies (PLB) *Dendrobium anosmum* Di Linh Taly were investigated by *in vitro* culture under FL (fluorescent lamp) and under light-emitting diodes with blue and red combination (LED BR 30:35). The *in vitro* regenerated plantlets were hardened under greenhouse environment for 1 month. Percentage of PLB producing shoots was 38 – 42% under LED 30B:35R, 3.8 – 4.2 times more than that under FL (10%). The number of roots per shoot under LED 30B:35R was 3.67 – 5.16, significantly more than that under FL (1.95 roots per shoot). Root length under LED 30B:35R was 3.42 – 4.14 mm while that under FL was 2.97 mm. The *in vitro* plantlets all were well acclimated under greenhouse environment. The LED 30B:35R could significantly promote growth and development of shoots and roots *Dendrobium anosmum* Di Linh Taly, increasing cost effectiveness in micropropagation.

Key words: light-emitting diode (LED), *Dendrobium anosmum* Di Linh Taly, protocorm-like bodies, micropropagation, hardening

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Lan Giả Hạc còn được gọi là Lương Diễm Hạc, Giả Hạc Tím, hay Lan Phi Điệp có tên khoa học là *Dendrobium anosmum*. Lan Giả Hạc Di Linh Taly có nguồn gốc ở huyện Di Linh, tỉnh Lâm Đồng, là loài lan quý, có giá trị kinh tế cao, đang được nhiều người sưu tầm. Với cách nhân giống truyền thống bằng cách tách chồi và giâm những đoạn thân cho hệ số nhân giống thấp [1]. Trong khi đó phương pháp nhân giống *in vitro* cho phép nhân nhanh, tạo được cây con trẻ hóa, sạch bệnh và có hiệu quả kinh tế cao.

Ánh sáng là yếu tố rất cần thiết cho quá trình quang hợp của cây. Các loại nguồn sáng có thể sử dụng trong nuôi cấy mô thực vật gồm có đèn dây tóc (IB), đèn huỳnh quang (TFL), đèn kim loại halogen (MHL), đèn natri cao áp (HPS). Từ lâu đèn huỳnh quang đã được sử dụng phổ biến nhất trong vi nhân giống nhiều loại cây trồng. Loại ánh sáng từ TFL này có dải bước sóng rộng từ 350 – 750 nm, trong đó có những phổ ánh sáng không cần thiết, chất lượng thấp đối với kích thích sự sinh trưởng của cây. Loại nguồn sáng này sử dụng điện năng cao với hiệu quả đầu ra thấp, dẫn đến làm tăng giá thành sản xuất. Hiện nay công nghệ

diode phát sáng (light-emitting diode, LED) đang được nghiên cứu và ứng dụng trong kỹ thuật vi nhân giống bởi vì nó có nhiều ưu điểm hơn hẳn các nguồn chiếu sáng thông thường. Sử dụng đèn LED cho phép lựa chọn phổ ánh sáng phù hợp cho từng loại cây, tiết kiệm điện năng, tỏa nhiệt rất thấp, bền, tuổi thọ bóng đèn cao, kích thước bóng đèn nhỏ, do đó giảm giá thành nhân giống *in vitro* [2].

Ánh sáng đơn sắc hay kết hợp các loại ánh sáng đơn sắc được chứng minh là có ảnh hưởng đến sinh trưởng và phát triển của cây. Ánh sáng đỏ cảm ứng kéo dài đỉnh chồi [3], phát triển đặc điểm hình thái như làm vàng chồi, làm tăng chiều cao chồi, độ dài lông và phát sinh rễ. Trong khi đó ánh sáng xanh dương kích thích tổng hợp chlorophyll và phát triển khí khổng [4]. Sử dụng đèn LED kết hợp giữa ánh sáng đỏ và ánh sáng xanh dương kích thích sinh trưởng củ con *Lilium*, cho củ to hơn, làm tăng sinh khối khô, tươi và tích lũy chất khô nhiều hơn [5].

Mục đích của nghiên cứu này là khảo sát ảnh hưởng của đèn LED kết hợp ánh sáng xanh dương và đỏ trong quy trình nhân giống *in vitro* lan giả hạc Di Linh Taly, làm cơ sở cho việc ứng dụng đèn LED trong nuôi cấy mô loại lan này.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu này được thực hiện từ tháng 12/2019 đến tháng 6/2020 ở Phòng Thí nghiệm Trọng điểm phía Nam về Công nghệ Tế bào Thực vật, Viện Sinh học Nhiệt Đới, 9/621 Xa lộ Hà Nội, Quận Thủ Đức, Thành phố Hồ Chí Minh.

2.2. Vật liệu

Mẫu protocorm-like bodies (PLB) Lan giả hạc Di Linh Taly (*Dendrobium anosmum*) *in vitro* được sử dụng làm vật liệu nghiên cứu do Viện Sinh học Nhiệt đới (9/621 Xa lộ Hà Nội, Phường Linh Trung, Quận Thủ Đức, Thành phố Hồ Chí Minh) cung cấp.

Các loại đèn chiếu sáng sử dụng gồm đèn huỳnh quang (FL) và đèn diode phát sáng (LED) kết hợp ánh sáng xanh dương và đỏ (Bảng 1).

Bảng 1. Các loại đèn chiếu sáng sử dụng trong nhân giống *in vitro* lan giả hạc Di Linh Taly

Loại đèn	Tỉ lệ ánh sáng xanh dương : đỏ	Cường độ ánh sáng ($\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)
FL	Huỳnh quang	24,5
LED 1	30B : 35R	53,6
LED 2	30B : 35R	51,8

Ánh sáng xanh dương (blue, B); ánh sáng đỏ (red, R)

2.3. Bố trí thí nghiệm

Thí nghiệm 1 và thí nghiệm 2 được thực hiện trong phòng thí nghiệm. Mỗi thí nghiệm thực hiện 3 bình, mỗi bình cấy 5 mẫu. Các bình này được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên. Môi trường nuôi cấy là MS bổ sung 30g/L đường sucrose, 0,2g/L nấm men, 0,2g/L peptone, 0,2 mg/L BA, 10% nước dừa.

Thí nghiệm 1: Ảnh hưởng của đèn LED trong giai đoạn phát sinh chồi từ PLB lan giả hạc Di Linh Taly. Mẫu PLB lan giả hạc Di Linh Taly được cấy vào môi trường môi trường MS bổ sung, rồi nuôi ở ba điều kiện chiếu sáng:

FL (Huỳnh quang)

LED 1 (30B:35R, cường độ $53,6 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)

LED 2 (30B:35R, cường độ $51,8 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)

Chiều cao chồi, số chồi, hình thái chồi, khối lượng tươi, khối lượng khô được xác định sau 5 tuần nuôi cấy.

Thí nghiệm 2: Ảnh hưởng của đèn LED trong giai đoạn tái sinh cây hoàn chỉnh từ chồi lan giả hạc Di Linh Taly

Chồi lan giả hạc Di Linh Taly ở thí nghiệm 1 được cấy vào môi trường môi trường MS bổ sung, rồi nuôi ở ba điều kiện chiếu sáng:

FL (Huỳnh quang)

LED 1 (30B:35R, cường độ $53,6 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)

LED 2 (30B:35R, cường độ $51,8 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)

Chiều dài rễ, số rễ/chồi, số lá, số chồi, chiều cao cây, hàm lượng chlorophyll, hàm lượng carotenoid được khảo sát sau 6 tuần nuôi cấy.

Thí nghiệm 3 được thực hiện ở trong nhà lưới. Cây lan giả hạc tái sinh in vitro ở ba điều kiện chiếu sáng (FL, LED 1 và LED 2) được chuyển ra phòng ánh sáng tự nhiên 10 ngày. Những cây lan này được rửa sạch, để ráo nước trong 1 ngày ở nhà lưới, trồng trên giá thể dớn trắng 1 tháng. Cây được chăm sóc như nhau, được tưới 2 ngày/lần, tưới ướt đẫm giá thể. Vườn ươm được chiếu bằng ánh sáng tự nhiên, có mái vòm che, lưới bao xung quanh, phun sương tự động 3h/lần, mỗi lần 5 phút.

Số lá, số rễ, chiều cao cây, tỷ lệ cây sống được xác định sau 1 tháng thuần dưỡng.

Phương pháp xác định sinh khối, hàm lượng chlorophyll và carotenoid

Các mẫu lan tươi (g/bình) được xác định khối lượng bằng cân phân tích CP224S (Sartorius, Germany), sau đó được đem sấy ở nhiệt độ 50°C trong 48 giờ bằng tủ sấy SANYO MOV- 112 (Japan) và xác định khối lượng khô.

Hàm lượng chlorophyll và carotenoid được xác định bằng phương pháp đo màu. Mẫu lá lan (0,25g) sau 6 tuần được nuôi cấy được cắt nhuyễn, cho vào 3 ống nghiệm chứa 10ml acetone 80%, bịt kín, đặt ở nhiệt độ phòng trong 72 giờ, và đo mật độ quang ở các bước sóng 470nm, 645nm và 663nm bằng máy đo UV- VIS (Agilent). Mỗi nghiệm thức được thực hiện 3 lần lặp. Hàm lượng chlorophyll a, b và carotenoid được tính theo công thức của Arnon [6]:

$$\text{Chlorophyll a (mg.g}^{-1}\text{)} = \frac{(12,7.A_{663} - 2,69.A_{645}).V}{m}$$

$$\text{Chlorophyll b (mg.g}^{-1}\text{)} = \frac{(22,9.A_{645} - 4,68.A_{663}).V}{m}$$

$$\text{Chlorophyll tổng} = \text{Chlorophyll a} + \text{Chlorophyll b}$$

$$\text{Carotenoid (mg.g}^{-1}\text{)} = \frac{[1000.A_{470} - 1,82.(12,25.A_{663} - 2,97.A_{645}) - 85,02.(21,5.A_{645} - 5,1.A_{663})].V}{198.m}$$

Trong đó:

A_{470} , A_{645} , A_{663} lần lượt là độ hấp phụ (A) được đo ở bước sóng 470, 645 và 663 nm

m là khối lượng mẫu (g)

V là thể tích acetone 80% (ml)

Phân tích số liệu: Phân tích phương sai (ANOVA) được thực hiện bằng phần mềm Statgraphics XV.I (Statgraphics Technologies, Hoa Kỳ). Các chỉ tiêu nghiên cứu ở các nghiệm thức được so sánh sự sai khác kiểm định LSD $\alpha = 0.05$ (Least Significant Difference).

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của đèn LED đến sinh trưởng và phát triển chồi từ PLB lan giả hạc Di Linh Taly

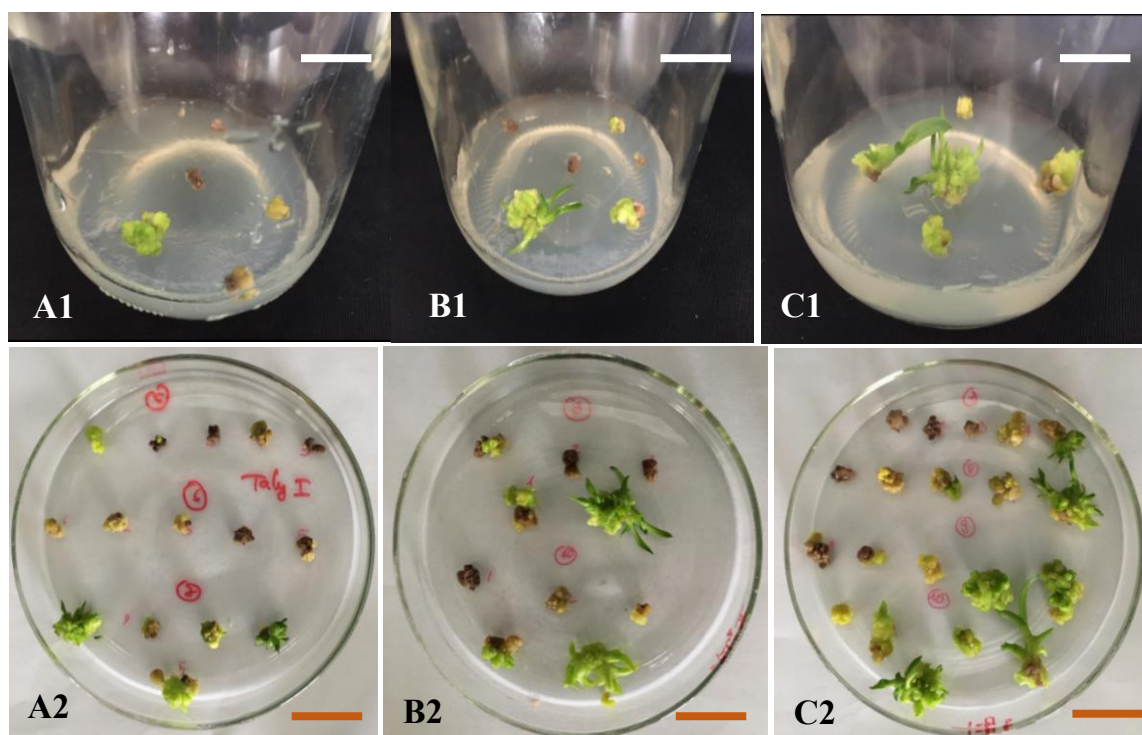
Dựa theo số liệu thống kê mô tả và quan sát sinh thái (Bảng 2 và Hình 1), sự sinh trưởng và phát triển chồi từ protocorm-like bodies (PLB) lan giả hạc Di Linh Taly in vitro được nuôi dưới đèn LED khỏe mạnh hơn được nuôi dưới đèn huỳnh quang (FL). Số chồi phát sinh từ PLB ở nghiệm thức có chiếu sáng bằng đèn LED là 10 – 11, cao hơn 3,3 – 3,6 lần so với ở nghiệm thức FL (3 chồi). Ở tuần thứ 5 sau nuôi cấy mẫu cây ở FL chủ yếu đang phát triển ở dạng protocorm (87%). Kích thước chồi ở LED 1 cho 60% chồi nhỏ hơn 0,5 cm, 40% chồi 0,5 – 2 cm và ở LED 2 cho 55% chồi nhỏ hơn 0,5 cm, 36% chồi 0,5 – 2 cm, 9% chồi lớn hơn 2 cm trong khi đó ở FL chỉ cho chồi nhỏ hơn 0,5 cm (100%). Ánh sáng màu xanh dương có bước sóng 400 đến 500 nm, có năng lượng tương đối cao, có tác động mạnh đến sinh trưởng của cây. Lin và cộng sự nghiên cứu nhân giống in vitro lan thạch học thiết bì (*Dendrobium officianle*) cho thấy PLB được nuôi cấy dưới LED ánh sáng xanh dương hay dưới LED ánh sáng xanh dương kết hợp ánh sáng đỏ (LED BR) khỏe mạnh hơn, phát sinh nhiều chồi hơn so với được nuôi dưới LED ánh sáng đỏ, huỳnh quang hay trong tối. Ánh sáng xanh dương được cho là nhân tố điều hòa sinh trưởng, tác động đến sự biệt hóa PLB, là điều kiện ánh sáng tốt nhất kích thích phát sinh chồi [7].

Bảng 2. Ảnh hưởng của đèn LED đến sinh trưởng và phát triển chồi lan giả hạc Di Linh Taly sau 5 tuần nuôi cấy PLB in vitro.

Ánh sáng	FL	LED 1	LED 2
Số mẫu cây	50	50	50
Số mẫu sống	30	24	29
Tỷ lệ mẫu sống	60%	48%	58%
PLB	26 ^a	11 ^b	15 ^b

Hình thái chồi	Tỷ lệ PLB	87%	46%	52%
	Cụm	1	3	3
	Tỷ lệ tạo cụm	3%	13%	10%
	Chồi	3 ^a	10 ^b	11 ^b
	Tỷ lệ tạo chồi	10%	42%	38%
Kích thước chồi	Chồi < 0,5 cm	3 ^a	6 ^b	6 ^b
	Tỷ lệ chồi < 0,5 cm	100%	60%	55%
	Chồi 0,5-2 cm	0	4	4
	Tỷ lệ chồi 0,5- 2 cm	0%	40%	36%
	Chồi > 2 cm	0	0	1
	Tỷ lệ chồi > 2 cm	0%	0%	9%

Các ký tự khác nhau (a, b) thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa ($p \leq 0,05$).



Hình 1. Chồi lan giả hạc Di Linh Taly 5 tuần sau nuôi cấy PLB in vitro

A1, A2: được chiếu sáng bằng FL

B1, B2: được chiếu sáng bằng LED 1

C1, C2: được chiếu sáng bằng LED 2

Tỷ lệ mẫu sống không có sự khác biệt đáng kể giữa nghiệm thức chiếu sáng bằng đèn LED và huỳnh quang (Hình 1). Tỷ lệ mẫu bị nâu hóa và dẫn đến hoại tử sớm lên tới 40 – 52% (Bảng 2). Hiện tượng nâu hóa thường có liên quan trực tiếp đến hoạt động enzyme oxy hóa polyphenol mà không liên quan đến hàm lượng phenol nội sinh [7]. Khi bị stress như vết cắt trong lúc cấy mẫu thì các hợp chất phenol sinh ra, theo đó các enzyme peroxidase oxy hóa các hợp chất phenol thành quinone, là hợp chất có phản ứng mạnh và độc đối với mô thực vật.

Sinh khối chồi phát sinh từ PLB được nuôi dưới LED cao hơn có ý nghĩa thống kê so với được nuôi dưới FL. Sau 5 tuần nuôi cấy PLB sinh khối tươi chồi ở nghiệm thức LED 1 và LED 2 tương ứng là 0,212 và 0,247 g trong khi đó ở FL là 0,141 g, bằng khoảng 57 – 67% so với ở LED. Tương tự, sinh khối khô chồi lan ở LED 1 và LED 2 lần lượt là 0,020 và 0,026 g còn ở FL chỉ là 0,015 g, bằng 55 - 71% so với LED (Bảng 3). Ánh sáng đỏ kích thích làm tăng sinh khối tươi trong khi đó ánh sáng đỏ kết hợp với ánh sáng xanh dương làm tăng tích lũy vật chất khô. Kết quả nghiên cứu của Lin và cộng sự cho thấy sinh khối tươi

và sinh khối khô của chồi trên 5mm của lan thạch học thiết bị đạt cao nhất khi mẫu lan được nuôi dưới LED đỏ. Sinh khối tươi của loại chồi này ở LED đỏ cao gấp gần 2 lần so với ở FL, LED BR hoặc trong tối. Trong khi đó sự tích lũy chất khô chồi lan đạt cao nhất ở RED BR và thấp nhất ở LED đỏ [8]. Xu và cộng sự nghiên cứu nhân giống in vitro PLB lan vũ nữ (*Oncidium*) cho thấy dưới LED đỏ PLB tăng trưởng mạnh nhất, hàm lượng carbohydrate nhiều nhất và tỉ lệ biệt hóa thấp nhất trong khi đó dưới LED xanh dương PLB có tỉ lệ biệt hóa cao nhất [9].

Bảng 3. Ảnh hưởng của đèn LED đến sinh khối chồi phát sinh từ PLB lan giả hạc Di Linh Taly sau 5 tuần nuôi cấy in vitro.

Ánh sáng	Khối lượng tươi (g)	Khối lượng khô (g)
FL	0,141 ^b	0,015 ^b
LED 1	0,212 ^{ab}	0,020 ^{ab}
LED 2	0,247 ^a	0,026 ^a

Các ký tự khác nhau (a, b) thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa ($p \leq 0,05$) dựa theo kiểm định LSD.

3.2. Ảnh hưởng của đèn LED trong quy trình tái sinh cây hoàn chỉnh từ chồi lan giả hạc Di Linh Taly in vitro

Chồi lan được nuôi dưới đèn LED sinh trưởng và phát triển nhanh hơn so với nuôi dưới đèn huỳnh quang (FL). Tỷ lệ chồi phát sinh rễ ở LED là 80 – 91% cao hơn hẳn so với ở FL (chỉ có 53%). Số rễ/chồi ở đèn LED là 3,67 – 5,16 cao gấp 1,9 – 2,7 lần so với ở FL (1,95 rễ/chồi). Tương tự, chiều dài rễ ở LED 1 và LED 2 tương ứng là 4,14 mm và 3,42 mm, cao hơn 1,2 -1,4 lần so với ở FL (12,97 mm) (Bảng 4). Kết hợp ánh sáng xanh dương và đỏ (LED BR) có ảnh hưởng làm tăng tỉ lệ chồi phát sinh rễ và kéo dài rễ. Trong giai đoạn tái sinh cây hoàn chỉnh in vitro từ chồi lan vũ nữ (*Onchidium*), tỉ lệ chồi phát sinh rễ được nuôi dưới LED BR cao hơn rất nhiều so với được nuôi dưới LED xanh dương, LED đỏ hoặc nuôi dưới huỳnh quang. Chiều dài rễ ở LED BR, LED xanh dương hay LED đỏ đều dài hơn so với ở FL [10].

Bảng 4. Ảnh hưởng của đèn LED đến sinh trưởng và phát triển rễ từ chồi lan giả hạc Di Linh Taly sau 6 tuần nuôi cấy in vitro

Ánh sáng	Mẫu cây	Tỷ lệ chồi hình thành rễ	Số rễ/chồi	Chiều dài rễ (mm)
FL	36	53% (19)	1,95 ^c	2,97 ^b
LED 1	35	91% (32)	5,16 ^a	4,14 ^a
LED 2	30	80% (24)	3,67 ^b	3,42 ^{ab}

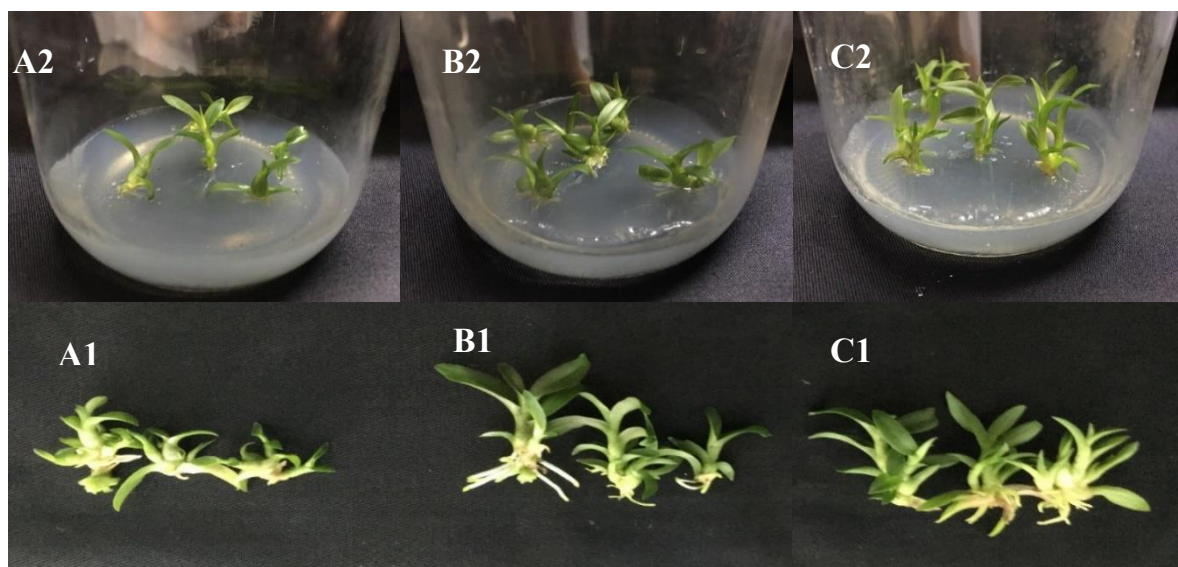
Các ký tự khác nhau (a, b, c) thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa ($p \leq 0,05$) dựa theo kiểm định LSD.

Sự sinh trưởng và phát triển của chồi lan giai đoạn tái sinh cây hoàn chỉnh ở nghiệm thức được chiếu sáng bằng đèn LED tốt hơn so với ở được chiếu sáng bằng đèn huỳnh quang (FL). Số chồi/mẫu cây và số lá/chồi ở LED 1 là 2,60 và 3,52, ở LED 2 là 3,20 và 3,44 cao hơn ở FL (2,17 và 2,98). Chiều dài chồi không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa 3 nghiệm thức nghiên cứu nhưng chỉ tiêu này ở LED 2 là 11,93 mm, dài hơn 33% so với ở FL, 8,98 mm, (Bảng 5). Điều này cũng được khẳng định thêm khi quan sát hình thái chồi. Cây lan in vitro được chiếu sáng bằng đèn LED có thân cao hơn, lá dài và có diện tích rộng hơn so với cây được chiếu sáng bằng FL (Hình 2). Khi nghiên cứu nhân giống lan vũ nữ trong giai đoạn tạo rễ in vitro thì ánh sáng đỏ kích thích kéo dài chồi còn ánh sáng xanh dương ức chế kéo dài chồi [10]. Tuy nhiên, khi sử dụng LED kết hợp hai loại ánh sáng đơn sắc này (xanh dương và đỏ) trong nuôi cấy in vitro lan hồ điệp (*Phalaenopsis*) thì sinh khối chồi, chiều cao chồi và chiều dài lá tăng lên đáng kể so với ánh sáng huỳnh quang [11].

Bảng 5. Ảnh hưởng của đèn LED đến sinh trưởng và phát triển chồi lan giả hạc Di Linh Taly sau 6 tuần nuôi cấy in vitro

Ánh sáng	Số chồi/mẫu cây	Chiều dài chồi (mm)	Số lá/chồi
FL	2,17 ^b	8,98 ^{ab}	2,98 ^b
LED 1	2,60 ^b	7,81 ^b	3,52 ^a
LED 2	3,20 ^a	11,93 ^a	3,44 ^{ab}

Các ký tự khác nhau (a, b) thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa ($p \leq 0,05$) dựa theo kiểm định LSD.



Hình 2. Cây lan giả hạc Di Linh Taly sau 6 tuần nuôi cấy in vitro

A1, A2: Cây được chiếu sáng bằng FL
B1, B2: Cây được chiếu sáng bằng LED 1
C1, C2: Cây được chiếu sáng bằng LED 2

Cây lan ở LED 2 có hàm lượng chlorophyll tổng đạt cao nhất 0,994 mg/g trong khi đó ở FL lại thấp nhất 0,569 mg/g. Hàm lượng carotenoid ở nghiệm thức LED 2 là 0,313 mg/g, cao hơn có ý nghĩa thống kê so với ở nghiệm thức FL 0,245 mg/g (Bảng 6). Chlorophyll a, b là các sắc tố quang hợp hấp thụ ánh sáng đỏ ở bước sóng tương ứng là 660, 640 nm và ánh sáng xanh dương ở vùng bước sóng lân lượt 400 – 450, 425 – 475 nm. Carotenoid gồm các sắc tố có trong tế bào thực vật, hấp thụ năng lượng ánh sáng sử dụng cho quang hợp và bảo vệ chlorophyll khỏi sự phá hủy của ánh sáng. Carotenoid hấp thụ tối ưu ở vùng ánh sáng xanh dương với bước sóng 400-500 nm. Hàm lượng chlorophyll và carotenoid của cây được sinh ra nhiều hơn ở nghiệm thức chiếu sáng bằng đèn LED xanh dương và đỏ (LED BR) có thể là do sự kích thích của ánh sáng xanh dương kết hợp với ánh sáng đỏ. Nghiên cứu trước đây cũng có kết quả tương tự với nghiên cứu này. Khi nghiên cứu nhân giống in vitro lan thạch học thiết bì Lin và cộng sự chỉ ra rằng hàm lượng chlorophyll tổng, a, b ở LED BR cao hơn rất nhiều so với ở LED đơn sắc (xanh dương hoặc đỏ), huỳnh quang hoặc trong tối. Hàm lượng chlorophyll được hình thành nhiều nhất ở LED 2B:1R (tỉ lệ ánh sáng xanh dương và đỏ là 2:1) trong khi đó hàm lượng carotenoid cao nhất ở LED 1B:2R (tỉ lệ ánh sáng xanh dương và đỏ là 1:2) [7]. Kết quả nghiên cứu vi nhân giống *Stevia rebaudiana* của Marco và cộng sự cũng cho thấy hàm lượng các sắc tố quang hợp chlorophyll a, b, a + b và carotene thu được dưới ánh sáng đèn LED BR cao hơn dưới đèn huỳnh quang [12].

Bảng 6. Ảnh hưởng của đèn LED đến hàm lượng chlorophyll và carotenoid mẫu lá lan giả hạc Di Linh Taly sau 6 tuần nuôi cấy chồi

Ánh sáng	Chlorophyll a (mg/g)	Chlorophyll b (mg/g)	Chlorophyll tổng (mg/g)	Carotenoid (mg/g)
FL	0,569 ^c	0,309 ^c	0,877 ^c	0,245 ^d
LED 1	0,617 ^c	0,303 ^c	0,920 ^c	0,292 ^{cd}
LED 2	0,652 ^c	0,341 ^c	0,994 ^c	0,313 ^c

Các ký tự khác nhau (c, d) thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa ($p \leq 0,05$) dựa theo kiểm định LSD.

3.3. Sự sinh trưởng và phát triển cây lan giả hạc Di Linh Taly khi thuần dưỡng ở vườn ươm

Cây lan giả hạc Di Linh Taly nuôi cây *in vitro* dưới điều kiện chiếu sáng khác nhau (LED hay FL) được đưa ra thuần dưỡng ở vườn ươm cho thấy khả năng thích nghi của chúng không có sự khác nhau. Hầu hết các chỉ tiêu được khảo sát như chiều dài rễ, số chồi mới, chiều dài chồi gốc và số lá/chồi không sai khác có ý nghĩa thống kê giữa 3 loại cây lan tái sinh *in vitro* này (LED 1, LED 2, FL). Số rễ/chồi và chiều dài chồi mới ở những cây có nguồn từ đèn LED nhiều hơn và dài hơn so với cây có nguồn từ đèn huỳnh quang FL (Bảng 7 và Hình 3). Kết quả này tương tự với nghiên cứu của Ramírez-Mosqueda và cộng sự về loài lan vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks) [13]. Các cây con lan vanilla nhân giống *in vitro* với các nguồn chiếu sáng khác nhau (LED xanh dương, LED đỏ, LED xanh dương kết hợp với đỏ, LED trắng, đèn huỳnh quang) được thuần dưỡng ở vườn ươm 8 tuần đã thích nghi tốt, tỉ lệ sống 100%, không có sự khác biệt có ý nghĩa về sự sinh trưởng và phát triển.

Bảng 7. Sinh trưởng và phát triển các loại cây lan giả hạc Di Linh Taly sau 1 tháng thuần dưỡng ở vườn ươm

Nguồn mẫu cây <i>in vitro</i>	Số rễ/chồi	Chiều dài rễ (mm)	Số chồi mới	Chiều dài chồi gốc (mm)	Chiều dài chồi mới (mm)	Số lá/chồi
Cây có nguồn từ FL	4,37 ^b	4,12 ^a	1,53 ^a	14,77 ^a	8,09 ^b	4,11 ^a
Cây có nguồn từ LED 1	5,65 ^a	4,14 ^a	1,44 ^a	13,20 ^a	7,74 ^b	4,06 ^a
Cây có nguồn từ LED 2	5,05 ^{ab}	4,37 ^a	1,11 ^a	15,04 ^a	10,30 ^a	3,94 ^a

Các ký tự khác nhau (a, b) thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa ($p \leq 0,05$) dựa theo kiểm định LSD.



Hình 3. Cây lan giả hạc Di Linh Taly sau 4 tuần thuần dưỡng ở vườn ươm

- A. Cây có nguồn từ *in vitro* với FL
- B. Cây có nguồn từ *in vitro* với LED 1
- C. Cây có nguồn từ *in vitro* với LED 2

4. KẾT LUẬN

Đèn LED ánh sáng xanh dương/ đỏ (30B:35R) thích hợp trong quy trình nhân giống *in vitro* lan giả hạc Di Linh Taly. Đèn LED 30B:35R có tác động kích thích tạo chồi từ protocorm-like bodies và làm tăng số chồi đã phát sinh. Nó cũng rất hiệu quả trong kích thích hình thành rễ và làm tăng hàm lượng chất khô chồi lan giả nuôi cấy *in vitro*.

Có thể ứng dụng đèn LED trong nhân nhanh lan giả hạc Di Linh Taly in vitro. Tuy nhiên, cần nghiên cứu sâu hơn về tỉ lệ kết hợp giữa các loại ánh sáng đơn sắc, cường độ ánh sáng và quang kỳ thích hợp với giống cây này.

LỜI CẢM ƠN

Các tác giả chân thành cảm ơn Phòng Thí nghiệm Trọng điểm phía Nam về Công nghệ Tế bào Thực vật, Viện Sinh học Nhiệt Đới, 9/621 Xa lộ Hà Nội, Quận Thủ Đức, Thành phố Hồ Chí Minh đã hỗ trợ vật liệu, hóa chất, dụng cụ và các trang thiết bị để thực hiện nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Nguyễn Văn Vinh, Nguyễn Hữu Lê, *Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng thực vật lên sự phát sinh chồi và rễ phong lan giả hạc Dendrobium anosmum*. Tạp chí Khoa học và Công nghệ, 2009. 47 (5), p.99-107.
- [2] Gioia D. Massa, Hyeon-Hye Kttchim, Raymond M. Wheeler, Cary A. Mitchell, *Plant productivity in response to LED lighting*, Horticultural Science, 2008. 43 (7), p.1951-1956.
- [3] Bonnett HT, *Phytochrome regulation of endogenous bud development on root cultures of Convolvulus arvensis*, Planta, 1972. 106, p.325-330.
- [4] Poudel PR, Kataoka I, Mochioka R, *Effect of red- and blue-light-emitting diodes on growth and morphogenesis of grapes*, Plant Cell Tissue Organ Culture, 2008. 92, p.147-153.
- [5] Lian ML, Murhy HN, Paek KY, *Effects of light-emitting diodes (LEDs) on the in vitro induction and growth of bulblets of Lilium oriental hybrid 'Pesaro'*, Science of Horticulture, 2002. 94, p.365-370.
- [6] Arnon DI, *Copper enzymes in isolated chloroplasts polyphenol oxidase in Beta vulgaris*, Plant Physiology, 1949. 94, p.1-15.
- [7] Huang Li-Chun, Ya-Lin Lee, Bau-lian Huang, Ching-I Kuo, Jei-Fu Shaw, *High polyphenol oxidase activity and low titratable acidity in browning bamboo tissue culture*, In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant, 2002. 38, p.358-365.
- [8] Lin Yuan, Jia Li, Bo Li, Tao He, *Effects of light quality on growth and development of protocorm-like bodies of Dendrobium officinale in vitro*, Plant Cell Tissue Organ Culture, 2011. 105, p.329-335.
- [9] Xu ZG, Cui J, Di XR, *Effects of different spectral energy distribution on tissue culture of Oncidium in vitro*, Int J Autom Comput, 2009. 31, p.45-50.
- [10] Mengxi Liu, Xu Zhigang, Yang Yang, Feng Yijie, *Effects of different spectral lights on Oncidium PLBs induction, proliferation, and plant regeneration*, Plant Cell Tissue Organ Culture, 2011. 106, p.1-10.
- [11] Wongnok A, Piluek C, Techasilpitak T, Tantivivat S, *Effects of light-emitting diodes on micropropagation of Phalaenopsis orchids*, Proceeding IW on Ornamental Plants - Actual Horticulture, 2008. 788, p.149-156.
- [12] Marco A. Ramírez-Mosqueda, Lourdes G. Iglesias-Andreu, José R. Bautisa-Aguilar, *The effect of light quality on growth and development of in vitro plantlet of Stevia rebaudiana Bertoni*, Sugar Technology, 2016. 19(3), p.331-336.
- [13] Ramírez-Mosqueda MA, Iglesias-Andreu LG, Luna-Sánchez IJ, *Light quality affects growth and development of in vitro plantlet of Vanilla planifolia Jacks*, South African Journal of Botany, 2017. p.1-6.

Ngày nhận bài: 16/03/2021

Ngày chấp nhận đăng: 14/05/2021