

**BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO**

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM**

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Huỳnh Gia Bảo

**NGHIÊN CỨU TÁC DỤNG CỦA NANO BẠC VÀ NANO
ĐỒNG TRONG KHỬ TRÙNG MẪU, KHỬ TRÙNG MÔI
TRƯỜNG NUÔI CÂY VÀ VI NHÂN GIỐNG MỘT SỐ CÂY
TRỒNG CÓ GIÁ TRỊ KINH TẾ**

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Mã số: 9 42 02 01

HÀ NỘI – 2023

Công trình được hoàn thành tại: Học viện Khoa học và Công nghệ,
Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Người hướng dẫn khoa học:

1. Người hướng dẫn 1: TS. Hoàng Thanh Tùng
2. Người hướng dẫn 2: GS.TS. Dương Tấn Nhựt

Phản biện 1: PGS.TS. Phạm Văn Hiền

Phản biện 2: PGS.TS. Phạm Bích Ngọc

Phản biện 3: PGS.TS. Quách Ngô Diễm Phương

Luận án được bảo vệ trước Hội đồng đánh giá luận án tiến sĩ cấp Học viện, họp tại Học viện Khoa học và Công nghệ - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam vào hồi ... giờ ..., ngày ... tháng ... năm 2023

Có thể tìm hiểu luận án tại:

- Thư viện Học viện Khoa học và Công nghệ
- Thư viện Quốc gia Việt Nam

MỞ ĐẦU

Lý do chọn đề tài

Hiện nay, kỹ thuật nuôi cấy mô hay vi nhân giống được sử dụng rất rộng rãi để nhân giống các loài cây trồng khác nhau (cây hoa, cây rau, cây cảnh,...) và là công cụ hữu ích được sử dụng trong nghiên cứu sinh trưởng, sinh lý – sinh hóa của thực vật. Kỹ thuật nuôi cấy mô có thể sử dụng để sản xuất số lượng lớn cây giống sạch bệnh trong thời gian ngắn và sản xuất sinh khối chứa các chất có hoạt tính thứ cấp,... Bên cạnh những thuận lợi mang lại thì kỹ thuật nuôi cấy mô vẫn còn một số hạn chế như nhiễm nấm, vi khuẩn,... chúng sinh trưởng và làm hạn chế sự sinh trưởng của mô cấy do chúng sử dụng môi trường dinh dưỡng. Bên cạnh đó, môi trường nuôi cấy tối ưu hay lý tưởng cho sự sinh trưởng của mẫu cấy cần phải hấp khử trùng. Các bình nuôi cấy (túi nylon hay chai thủy tinh) chứa môi trường cũng cần được hấp khử trùng, môi trường được đun sôi; sau đó khử trùng môi trường nuôi cấy mô ở nhiệt độ 121°C với áp suất 15 psi trong khoảng thời gian từ 20 đến 40 phút. Ngoài ra, các bước chuẩn bị môi trường cần trải qua nhiều giai đoạn khác nhau và tốn nhiều công lao động, điện năng, thời gian,... cho việc hấp khử trùng môi trường.

Nano bạc (AgNPs) có tác dụng kháng các vi sinh vật (nấm, vi khuẩn,...) và được sử dụng trong nghiên cứu hay ứng dụng trong nhiều lĩnh vực như y dược, y sinh,... Các nghiên cứu về tác động của AgNPs lên thực vật như khử trùng mẫu cấy, nảy mầm của một số cây trồng, sinh lý cũng như hình thái của thực vật cũng đã được chỉ ra. Tuy nhiên, ảnh hưởng của AgNPs lên khả năng khử trùng môi trường nuôi cấy mô mà không hấp khử trùng vẫn chưa được công bố trước đây. Trong luận án này, AgNPs được bổ sung vào môi trường nuôi cấy (không hấp khử trùng) nhằm đánh giá khả năng khử trùng môi trường nuôi cấy và cảm ứng sinh trưởng tiếp theo của mẫu cấy cây Cúc. Ngoài ra, những nghiên cứu trước đây chưa ghi nhận vai trò của nano đồng (CuNPs) trong giai đoạn khử trùng và cảm ứng của

mẫu cấy; vì vậy, nghiên cứu này cũng đánh giá ảnh hưởng của AgNPs và CuNPs trong giai đoạn khử trùng mẫu cấy và sinh trưởng tiếp theo, cảm ứng tạo phôi,...trên cây Thu hải đường. Bên cạnh đó, vai trò của AgNPs lên khả năng sinh trưởng và các hiện tượng bất thường ở giai đoạn nhân nhanh chồi cây Tử linh lan cũng được chỉ ra trong luận án này. Đề tài “**Nghiên cứu tác dụng của nano bạc và nano đồng trong khử trùng mẫu, khử trùng môi trường nuôi cấy và vi nhân giống một số cây trồng có giá trị kinh tế**” hướng tới giải quyết một số vấn đề còn hạn chế của nuôi cấy mô. Đây là định hướng nghiên cứu chưa được quan tâm nhiều ở trên thế giới cũng như tại Việt Nam. Kết quả của nghiên cứu sẽ góp phần đưa ra một hướng nghiên cứu mới trong vi nhân giống thực vật.

Mục tiêu của đề tài

Mục tiêu tổng quát

Luận án được thực hiện nhằm đưa ra được giải pháp mới để khắc phục một số hạn chế đang gặp phải trong vi nhân giống như khử trùng môi trường nuôi cấy, khử trùng mẫu cấy, cải thiện sinh trưởng tiếp theo của mẫu cấy, khắc phục một số hiện tượng bất thường của cây Cúc, cây Thu hải đường và cây Tử linh lan nuôi cấy *in vitro*.

Mục tiêu cụ thể

Xác định hiệu quả của AgNPs lên khả năng khử trùng môi trường nuôi cấy *in vitro* thay thế hấp tiệt trùng cũng như sinh trưởng tiếp theo của mẫu cấy cây Cúc. Xác định hiệu quả của AgNPs và CuNPs thay thế các chất khử trùng truyền thống như thủy ngân clorua (HgCl_2) hay canxi hypochlorite ($\text{Ca}(\text{ClO})_2$) và ảnh hưởng của chúng lên sự sinh trưởng tiếp theo của mẫu cấy cây Thu hải đường. Xác định hiệu quả của AgNPs lên sự sinh trưởng và hạn chế một số hiện tượng bất thường trong giai đoạn tái sinh chồi cây Tử linh lan.

Đối tượng và phạm vi nghiên cứu của đề tài

Đối tượng nghiên cứu

Ba loại cây trồng (Cúc, Thu hải đường và Tử linh lan) được sử dụng làm đối tượng nghiên cứu của luận án.

Hai loại vật liệu nano (AgNPs và CuNPs) được sử dụng làm vật liệu để khử trùng mẫu cấy và môi trường hoặc bổ sung vào môi trường nuôi cấy *in vitro*.

Phạm vi nghiên cứu

Luận án đánh giá hiệu quả của AgNPs và CuNPs lên khả năng khử trùng môi trường nuôi cấy mô, mẫu cấy và khả năng sinh trưởng tiếp theo của mẫu cấy, các chỉ tiêu sinh lý - sinh hóa của cây Cúc, Thu hải đường và Tử linh lan nuôi cấy *in vitro*.

Ý nghĩa khoa học và thực tiễn

Ý nghĩa khoa học

Luận án này đã đánh giá được hiệu quả của AgNPs hoặc CuNPs lên khử trùng môi trường nuôi cấy mô thay thế hấp tiệt trùng, cảm ứng phát sinh hình thái, sinh trưởng tiếp theo và hạn chế một số hiện tượng bất thường trong nuôi cấy *in vitro* cây trong nuôi cấy cây Cúc, cây Tử linh lan và cây Thu hải đường.

Ý nghĩa thực tiễn

Luận án đã sử dụng AgNPs là chất khử trùng môi trường nuôi cấy mô thay thế chất khử trùng truyền thống và không ảnh hưởng đến sinh trưởng tiếp theo của mẫu cấy. Ngoài ra, AgNPs và CuNPs có thể sử dụng làm chất khử trùng mẫu cấy thay thế cho các chất khử trùng truyền thống và gia tăng sinh trưởng tiếp theo của mẫu cấy.

Những đóng góp mới của luận án

AgNPs bổ sung vào môi trường nuôi cấy được giảm một nửa hàm lượng agar có hiệu quả khử trùng môi trường nuôi cấy và không cần hấp tiệt trùng bằng nồi hấp.

AgNPs và CuNPs có thể sử dụng làm tác nhân khử trùng mẫu cấy thay chất khử trùng truyền thống và cải thiện sinh trưởng tiếp theo của mẫu cấy.

AgNPs gia tăng hiệu quả tái sinh chồi, giảm hiện tượng bất thường và giảm sự tích lũy ethylene, gia tăng hoạt tính enzyme chống oxy hóa của mẫu cấy nuôi cấy *in vitro*.

CHƯƠNG I: TỔNG QUAN TÀI LIỆU

L luận án đã tham khảo và tổng kết về 6 vấn đề chính với các nội dung liên quan đến: (1) Khử trùng môi trường nuôi cấy *in vitro*; (2) Khử trùng mẫu cấy; (3) Nano bạc và ứng dụng; (4) Nano đồng và ứng dụng; (5) Hiện tượng bất thường trong vi nhân giống; (6) Tổng quan về các đối tượng nghiên cứu.

CHƯƠNG II: VẬT LIỆU, NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

2.1.1. Vật liệu thực vật

Cây Cúc (*Chrysanthemum morifolium*) 4 tuần tuổi, Thu hải đường (*Begonia tuberosus*) 8 tuần tuổi và Tử linh lan (*Saintpaulia ionantha*) 8 tuần tuổi với các bộ phận khác nhau được sử dụng làm vật liệu ban đầu cho các thí nghiệm.

2.1.2. Dung dịch nano kim loại

AgNPs và CuNPs được tổng hợp bằng phương pháp hóa học với nồng độ ban đầu là 1.000 mg/L và sản xuất bởi Viện Công nghệ Môi trường (VAST, Hà Nội, Việt Nam). Dung dịch AgNPs có kích thước hạt khoảng 20 nm; trong khi đó, dung dịch CuNPs có kích thước hạt từ 20 đến 60 nm.

2.1.3. Hệ thống nuôi cấy

Hệ thống nuôi cấy bình thủy tinh (AuM) là hệ thống đối chứng bao gồm bình thủy tinh thể tích 250 mL (AuM1) chứa 30 mL môi trường MS và bình thủy tinh thể tích 500 mL (AuM2) chứa 60 mL môi trường MS. Môi trường MS được bổ sung 30 g/L sucrose và 8 g/L agar. Hệ thống nuôi cấy AuM được hấp tiệt trùng.

Hệ thống nuôi cấy hộp nhựa (NoM) bao gồm hộp nhựa hình vuông 5 L (kích thước miệng hộp: 21,5 cm × 21,5 cm; chiều cao hộp: 8,5 cm) (NoM1) chứa 250 mL môi trường và hộp nhựa hình chữ nhật 15 L (kích thước miệng hộp: 24,0 cm × 35,0 cm; kích thước đáy hộp: 22,5 cm × 33,0 cm; chiều cao hộp: 13,5 cm) (NoM2) chứa 500 mL môi trường MS bổ sung 30 g/L sucrose và agar (theo thí

nghiệm ảnh hưởng của nồng độ agar tối ưu). Hệ thống nuôi cấy NoM được bổ sung AgNPs và không hấp tiệt trùng.

2.1.4. *Thiết bị và dụng cụ*

2.1.5. *Điều kiện nuôi cấy*

2.2. Nội dung nghiên cứu

Ảnh hưởng của AgNPs lên khử trùng mẫu cấy, môi trường nuôi cấy và vi nhân giống cây Cúc.

Ảnh hưởng của AgNPs và CuNPs lên khả năng khử trùng mẫu cấy và sinh trưởng tiếp theo của cây Thu hải đường.

Ảnh hưởng của AgNPs lên khả năng tái sinh chồi và hạn chế một số hiện tượng bất thường trong nuôi cấy *in vitro* của cây Tử linh lan.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. *Bố trí thí nghiệm*

2.3.1.1. *Ảnh hưởng của AgNPs lên khử trùng mẫu cấy, môi trường nuôi cấy và vi nhân giống cây Cúc*

2.3.1.2. *Ảnh hưởng của AgNPs và CuNPs lên khử trùng mẫu cấy và sinh trưởng tiếp theo của cây Thu hải đường*

2.3.1.3. *Ảnh hưởng của AgNPs lên khả năng tái sinh chồi và hạn chế một số hiện tượng bất thường trong nuôi cấy *in vitro* của cây Tử linh lan*

2.3.2. *Xác định hàm lượng khí ethylene bằng phương pháp sắc ký khí*

2.3.3. *Xác định hoạt độ của enzyme kháng oxy hóa bằng phương pháp phân tích phổ tử ngoại*

2.3.4. *Xác định hàm lượng đường và tinh bột bằng phương pháp phân tích phổ tử ngoại*

2.3.5. *Giải phẫu hình thái*

2.3.6. *Xử lý số liệu*

2.4. Địa điểm và thời gian nghiên cứu

CHƯƠNG III: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của AgNPs lên khử trùng môi trường nuôi cấy, khử trùng mẫu cấy và vi nhân giống cây cúc

3.1.1. Ảnh hưởng của AgNPs lên khử trùng môi trường nuôi cấy

Hiệu quả của việc bổ sung AgNPs lên khử trùng môi trường nuôi cấy mô không hấp tiết trùng được thu nhận ở Bảng 3.1.1. Do đó, môi trường MS0 bổ sung 4 mg/L AgNPs không hấp tiết trùng bằng nồi hấp (Hình 3.1.1) có hiệu quả khử trùng môi trường nuôi cấy tương tự như môi trường được hấp khử trùng và được sử dụng trong các thí nghiệm tiếp theo.

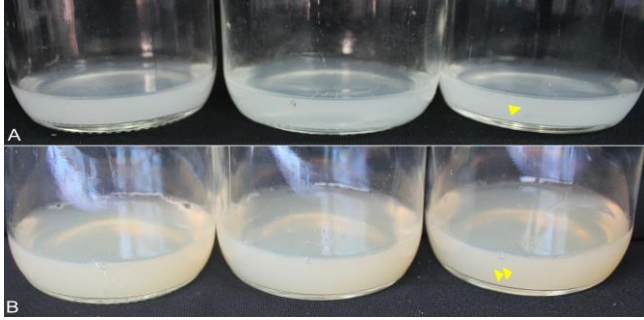
Bảng 3.1.1. Ảnh hưởng của AgNPs lên khử trùng môi trường nuôi cấy MS0 không hấp khử trùng sau 1, 2, 3 và 4 tuần nuôi cấy.

Môi trường MS0	AgNPs (mg/L)	Tỷ lệ nhiễm của môi trường (%)			
		Tuần thứ nhất	Tuần thứ hai	Tuần thứ ba	Tuần thứ tư
Không hấp tiết trùng	0	33,33a*	76,67a	100,00a	100,00a
	1		60,00b		
	2		50,00c	73,33b	86,67b
	3		20,00d	60,00c	80,00b
	4	_**			
	5		_**	_**	_**
Hấp tiết trùng (Đôi chứng)	0				

*Chữ cái khác nhau cùng một cột ghi nhận sự khác biệt với ý nghĩa thống kê $p < 0,05$ trong phép thử Duncan; **Không ghi nhận tỷ lệ nhiễm

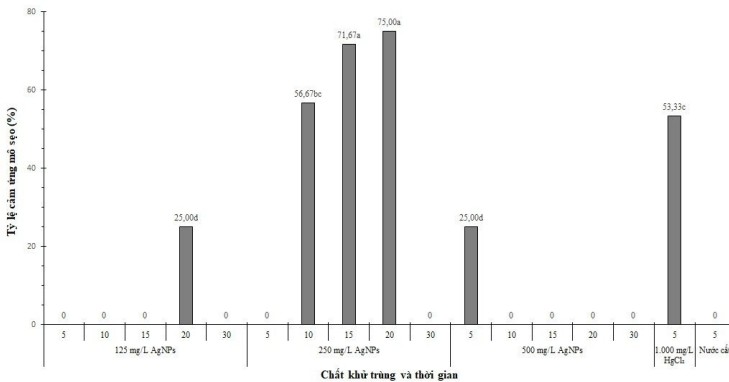
3.1.2. Khử trùng mẫu cấy bằng AgNPs và cảm ứng mô sẹo

Các mẫu lá khử trùng với AgNPs ghi nhận cảm ứng mô sẹo nhanh hơn so với mẫu lá khử trùng với 1.000 mg/L $HgCl_2$. Mô sẹo được cảm ứng khi mẫu lá khử trùng với AgNPs chỉ sau 2 tuần nuôi cấy so với 3 tuần đối với mẫu lá khử trùng bằng 1.000 mg/L $HgCl_2$. Mẫu lá khử trùng với 250 mg/L AgNPs trong 15 và 20 phút ghi nhận tỷ lệ cảm ứng mô sẹo cao nhất (71,67% - 75,00%) so với những mẫu lá khử trùng bằng 1.000 mg/L $HgCl_2$ (53,3%) sau 4 tuần (Hình 3.1.2).



Hình 3.1.1. Môi trường nuôi cấy MS0 quan sát sau 4 tuần. **A:** Môi trường MS0 được khử trùng bằng nồi hấp tiết trùng; **B:** Môi trường MS0 bổ sung 4 mg/L AgNPs và không hấp tiết trùng. *Mũi tên đơn:* Môi trường màu trắng; *Mũi tên kép:* Môi trường hơi ngả vàng.

Kết quả ghi nhận được cho thấy, tất cả mẫu lá rửa bằng nước cất đều bị nhiễm nấm và vi khuẩn sau 4 - 7 ngày nuôi cấy. Trong nghiên cứu này, môi trường nuôi cấy MS được phân lập và ghi nhận 1 loài vi khuẩn (*Pseudomonas* sp.) và 4 loài nấm (*Aspergillus aculeatus*, *Fusarium* sp., *Penicillium* sp. và *Trichoderma* sp.) dựa trên hình thái của tế bào (Bảng 3.1.2).



Hình 3.1.2. Tỷ lệ cảm ứng mô sẹo của mẫu lá khử trùng bằng các chất khử trùng khác nhau sau 4 tuần.

Bên cạnh đó, AgNPs ở nồng độ 125 mg/L và các thời gian từ 5 đến 15 phút, hay AgNPs ở nồng độ 500 mg/L với các thời gian từ 10 đến 30 phút thì không ghi nhận cảm ứng mô sẹo. Điều này có thể là

do các mẫu cây được khử trùng với AgNPs ở nồng độ thấp không cho hiệu quả khử trùng nấm và vi khuẩn hay nồng độ AgNPs quá cao lại gây độc và tổn thương mẫu cây; do đó, mẫu cây bị nhiễm hoặc hoại tử dẫn đến không thể cảm ứng mô sẹo (Hình 3.1.2).

Bảng 3.1.2. Nấm và vi khuẩn gây nhiễm trên môi trường chứa mẫu cây sau 1 tuần nuôi cấy.

TT	Đặc điểm của khuẩn lạc	Hình thái của tế bào	Phân loại
1	Sợi nấm: dày và trắng, màu vàng cam xen giữa màu hồng. Bào tử: màu hồng xanh (giữa), hơi hồng (trung tâm). Khuẩn lạc: xanh lam (mặt trên), nâu hồng pha vàng nhạt (mặt dưới). Sợi: trắng	Sợi nấm: Phân nhánh, có vách ngăn. Cơ quan sinh sản: Hình bán chài cân đối và dày đặc. Bào tử: Hình elip đến hình cầu	<i>Fusarium</i> sp.
2	Sợi nấm: dày, trắng Bào tử: đen	Sợi nấm: Phân nhánh, vách ngăn. Cơ quan sinh sản: Hình cầu. Bào tử: Hình cầu	<i>Aspergillus</i> sp.
3	Sợi nấm: mịn và trắng sữa. Bào tử: xanh lam	Sợi nấm: Phân nhánh, vách ngăn. Cơ quan sinh sản: Phân nhánh. Bào tử: Hình cầu	<i>Trichoderma</i> sp.
4	Sợi nấm: dày và màu trắng sữa, nhô ra màu xanh lam có chia thùy (giữa)	Sợi nấm: Mỏng, nhiều nhánh, có vách ngăn. Bào tử: Hình elip	<i>Penicillium</i> sp.
5	Khuẩn lạc: tròn, hồng, bề mặt nhẵn, bóng, bề mặt thạch lồi, viền đều. Kích thước khuẩn lạc: <1 mm	Bào tử: Hình bầu dục. Gram +	<i>Pseudomonas</i> sp.

3.1.3. Tái sinh chồi trên môi trường bổ sung AgNPs không hấp tiệt trùng

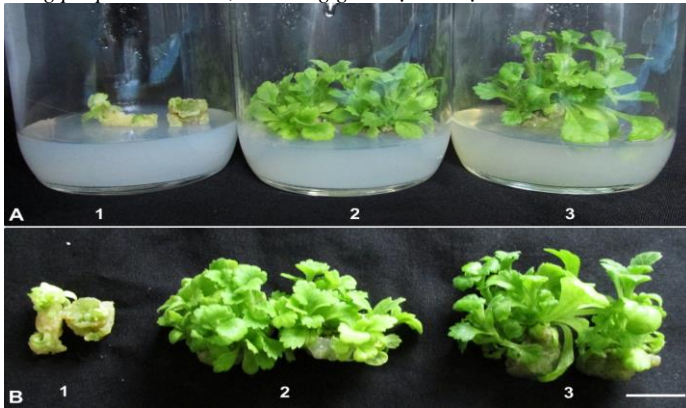
Tổng số chồi ghi nhận được khi mẫu mô sẹo nuôi cấy trên môi trường MS0 bổ sung 4 mg/L AgNPs (không hấp tiệt trùng) và môi trường MS0 không bổ sung AgNPs (hấp tiệt trùng) chứa 0,2 mg/L BA không có sự khác biệt rõ ràng sau 4 tuần. Tuy nhiên, các chỉ tiêu về sinh trưởng khác có sự khác biệt rõ ràng (Hình 3.1.3). Nghiên cứu

này đã ghi nhận được mẫu lá nuôi cấy trên môi trường bổ sung 4 mg/L AgNPs đã gia tăng hiệu quả cảm ứng mô sẹo và tái sinh chồi (Hình 3.1.2 và Bảng 3.1.3).

Bảng 3.1.3. Tái sinh chồi trên môi trường MS0 có/không hấp tiết trùng (bổ sung 4 mg/L AgNPs) sau 4 tuần nuôi cấy.

Nghiệm thức	Tỷ lệ tái sinh chồi (%)	Số chồi/mẫu			Chiều cao chồi (cm)	Khối lượng tươi (g)
		Tổng số chồi	< 1 cm	> 1 cm		
MS0 + 4 mg/L AgNPs + 0,2 mg/L BA (không hấp tiết trùng)	100,00a*	10,00a	3,67b	6,33a	1,50a	1,32a
MS0 + 0,2 mg/L BA (hấp tiết trùng)		9,33ab	7,00a	2,33b	0,46b	1,16b
MS0 (hấp tiết trùng)	***	***	***	***	***	***

* Chữ cái khác nhau cùng một cột ghi nhận sự khác biệt với ý nghĩa thống kê $p < 0,05$ trong phép thử Duncan; **Không ghi nhận số liệu.



Hình 3.1.3. Sự tái sinh chồi trên môi trường MS0 bổ sung/không bổ sung 4 mg/L AgNPs sau 4 tuần. **A₁, B₁**: Chồi thu nhận trên môi trường MS0 không bổ sung AgNPs, BA và hấp tiết trùng; **A₂, B₂**: Chồi thu nhận trên môi trường MS0 chứa 0,2 mg/L BA và hấp tiết trùng; **A₃, B₃**: Chồi thu nhận trên môi trường MS0 chứa 0,2 mg/L BA, 4 mg/L AgNPs và không hấp tiết trùng. *Thước đo: 1 cm.*

3.1.4. Ảnh hưởng của nồng độ agar lên sự sinh trưởng của cây con trong môi trường bổ sung AgNPs không hấp khử trùng

Cây con thu nhận từ các chồi (1,5 cm) nuôi cấy trên môi trường MS0 bổ sung 4 mg/L AgNPs với hàm lượng agar khác nhau được thu nhận sau 4 tuần nuôi cấy (Bảng 3.1.4 và Hình 3.1.4).

Bảng 3.1.4. Sinh trưởng của cây con trong môi trường MS0 chứa 4 mg/L AgNPs và nồng độ agar khác nhau (không hấp khử trùng) sau 4 tuần.

AgNPs (mg/L)	Hàm lượng agar (g/L)	Chiều cao cây (cm)	Số lá/cây	Chiều rộng lá (cm)	Số rễ/cây	Chiều dài rễ (cm)	Khối lượng tươi (g)	SPAD
0 ^x	8	4,33a*	8,33a	1,23ab	12,33a	2,57c	0,39a	36,53a
	3	3,87bc	7,67ab	1,13bc	7,67c	3,83a	0,35ab	30,8c
	4	4,11ab	7,67ab	1,30a	9,67b	3,23b	0,36ab	37,63a
4 ^y	5	4,17ab	6,67bc	1,33a	10,00b	2,40c	0,37ab	33,07b
	6	3,63cd	7,00bc	1,27ab	10,33b	2,36c	0,29c	32,7bc
	7	3,47cd	6,67bc	1,23ab	8,33bc	2,23c	0,25c	34,3ab
	8	3,00d	8,00ab	1,13bc	9,67bc	2,13c	0,27c	33,77ab

* Chữ cái khác nhau cùng một cột ghi nhận sự khác biệt với ý nghĩa thống kê $p < 0,05$ trong phép thử Duncan; x: hấp khử trùng; y: không hấp khử trùng.

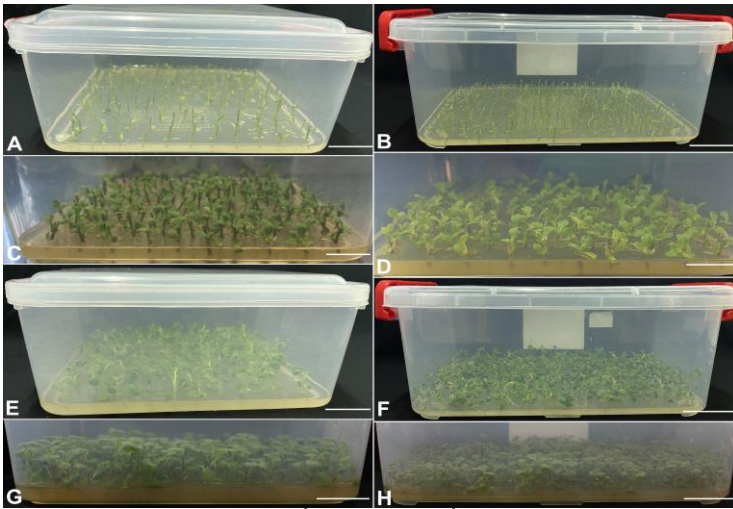


Hình 3.1.4. Sự sinh trưởng của cây con trong môi trường MS0 bổ sung 4 mg/L AgNPs và nồng độ agar khác nhau (không hấp khử trùng) sau 4 tuần nuôi cấy. **0:** Cây con trên môi trường MS0 bổ sung 8 g/L agar (không bổ sung AgNPs) được hấp tiệt trùng (đôi chứng); **3, 4, 5, 6, 7, 8:** Cây con ở nghiệm thức bổ sung hàm lượng agar khác nhau (3, 4, 5, 6, 7, 8 g/L; tương ứng), 4 mg/L AgNPs và không hấp tiệt trùng. *Thước đo: 2 cm*

Trong các hàm lượng agar khác nhau (3 - 8 g/L), cây con thu nhận trên môi trường MS0 chứa 4 - 5 g/L agar cho sự sinh trưởng của của cây là cao hơn so với các hàm lượng agar khác (Bảng 3.1.4).

3.1.5. Nhân giống cây Cúc trong các hệ thống nuôi cấy khác nhau

Trong cả 3 hệ thống nuôi cấy, tất cả mẫu cây đoạn thân đều ghi nhận tái sinh chồi (100%) sau 2 tuần nuôi cấy. Ngoài ra, các chỉ tiêu sinh trưởng như khối lượng tươi, chiều cao chồi và số lượng lá cũng không có sự khác biệt giữa 3 hệ thống nuôi cấy (dữ liệu không được hiển thị). Tuy nhiên, mẫu chồi ngọn ghi nhận khối lượng tươi, chiều cao cây, số rễ và SPAD trong hệ thống hộp nhựa NoM1 và NoM2 cao hơn so các chỉ tiêu này ở hệ thống nuôi cấy bình thủy tinh AuM2 sau 4 tuần nuôi cấy (Bảng 3.1.5; Hình 3.1.5), điều này cho thấy tác động tích cực của AgNPs lên sự sinh trưởng của cây Cúc ở giai đoạn ra rễ trong cả 3 hệ thống nuôi cấy.



Hình 3.1.5. Sinh trưởng của chồi trong hệ thống NoM1 và NoM2. **A:** Đoạn thân nuôi cấy trong hệ thống hộp nhựa 5 L NoM1; **B:** Đoạn thân nuôi cấy trong hệ thống hộp nhựa 15 L NoM2; **C:** Chồi 1 tuần tuổi trong hệ thống hộp nhựa 5 L NoM1; **D:** Chồi 1 tuần tuổi trong hệ thống hộp nhựa 15 L NoM2; **E:** Chồi trong hệ thống hộp nhựa 5 L NoM1; **F:** Chồi nuôi cấy trong hệ thống hộp nhựa 15 L NoM2; **G:** Cây 2 tuần tuổi trong hệ thống hộp nhựa 5 L NoM1; **H:** Cây 2 tuần tuổi trong hệ thống hộp nhựa 15 L NoM2. *Thước đo: A, C, E, G - 3 cm; B, D, F, H - 5 cm.*

Bảng 3.1.5. Sinh trưởng của cây Cúc trong các hệ thống nuôi cấy khác nhau sau 4 tuần nuôi cấy.

		Hệ thống nuôi cấy		
Chỉ tiêu sinh trưởng		NoM1	NoM2	AuM2
Chiều cao cây (cm)		4,02a*	3,95a	3,76b
Số lá/ cây		7,33a	7,20a	7,35a
Chiều rộng lá (cm)		2,30a	2,27a	2,22a
Số rễ/cây		13,17a	13,50a	11,33b
Chiều dài rễ (cm)		2,88a	3,04a	2,45b
Khối lượng tươi (g)		0,55a	0,52a	0,45b
SPAD		38,45a	37,22a	34,37b
APX (U/g)	Rễ	1,21a	1,38a	0,54b
	Lá	1,53a	1,67a	0,44b
SOD (U/g)	Rễ	21,01a	24,27a	11,61b
	Lá	12,69a	13,32a	7,54b

* Chữ cái khác nhau cùng một hàng ghi nhận sự khác biệt với ý nghĩa thống kê $p < 0,05$ trong phép thử Duncan.

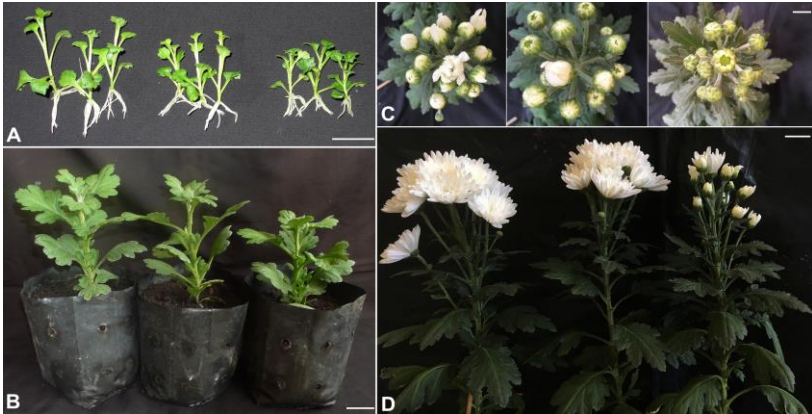
3.1.6. Thích nghi và sinh trưởng tiếp theo ở giai đoạn vườn ươm

Kết quả được thu nhận ở Bảng 3.1.6 và Hình 3.1.6 cho thấy chiều cao cây, số lá, chiều rộng lá, chiều dài lá và tỷ lệ sống sót của cây ở hệ thống nuôi cấy hộp nhựa NoM1 và NoM2 cao hơn so với các chỉ tiêu của cây con trong HTNC AuM2 sau 16 tuần trồng ở điều kiện vườn ươm. Cây con thu nhận từ hệ thống nuôi cấy hộp nhựa NoM1 và NoM2 ở vườn ươm sinh trưởng nhanh hơn. Ngoài ra, hoa bắt đầu nở sớm hơn một tuần so với hoa trong hệ thống bình thủy tinh 500 mL AuM2 (Bảng 3.1.6; Hình 3.1.6C). Sau 16 tuần trồng ở vườn ươm, cây con từ hệ thống hộp nhựa NoM1 và NoM2 bắt đầu nở hoa (Hình 3.1.6D).

Bảng 3.1.6. Sự sinh trưởng của cây con có nguồn gốc từ các hệ thống khác nhau sau 16 tuần trồng ở điều kiện vườn ươm.

Hệ thống nuôi cấy	NoM1	NoM2	AuM2
Chỉ tiêu sinh trưởng			
Tỷ lệ sống sót (%)	100,00a*	100,00a	85,67b
Chiều cao cây (cm)	14,71a	14,23a	12,38b
Khối lượng tươi (g)	3,42a	3,67a	2,61b
Số rễ/cây	18,33ab	20,67a	17,33ab
Chiều dài rễ (cm)	6,97a	7,33a	6,87a
Số lá/cây	14,33ab	14,67ab	12,33b
Chiều dài lá (cm)	3,79a	3,93a	3,24b
Chiều rộng lá (cm)	3,21ab	3,47a	2,97b
Thời gian ra nụ (tuần)	12,21ab	12,47ab	13,14a
Thời gian bung nụ (tuần)	14,68b	14,76b	15,53a
Thời gian ra hoa (tuần)	16,13b	15,91b	17,01a

* Chữ cái khác nhau cùng một hàng ghi nhận sự khác biệt với ý nghĩa thống kê $p < 0,05$ trong phép thử Duncan.



Hình 3.1.6. Sự sinh trưởng và ra hoa của cây con thu nhận từ các hệ thống khác nhau ở điều kiện vườn ươm. **A:** Cây con *in vitro* 4 tuần tuổi; **B, C, D:** Cây thu nhận sau 4 tuần, 12 tuần và 16 tuần trồng ở vườn ươm và ra hoa (Hệ thống hộp nhựa 5 L NoM1, hộp nhựa 15 L NoM2 và bình thủy tinh 500 mL AuM2 từ trái sang phải; tương ứng). *Thước đo: 2 cm.*

3.1.7. Dự tính hiệu quả kinh tế của AgNPs lên khả năng khử trùng mẫu cấy, môi trường nuôi cấy và vi nhân giống cây Cúc

Cây Cúc nuôi cấy mô bao gồm các giai đoạn khác nhau như khử trùng mẫu cấy, phát sinh hình thái và thích nghi ở vườn ươm. Hiện nay, các cơ sở nuôi cấy mô tại Lâm Đồng cho giá thành mỗi cây giống nuôi cấy mô dao động khoảng 500 - 1.000 đồng. Trong nghiên

cứu này, ước lượng để sản xuất 10.000 cây giống Cúc nuôi cấy mô thì giá thành là khoảng 5 triệu đồng (Bảng 3.1.7).

Bảng 3.1.7. Ước lượng chi phí sản xuất 10.000 cây giống Cúc.

	Đơn giá (đồng)	Đối chứng		4 mg/L AgNPs		Hiệu quả
		Số lượng	Thành tiền (1)	Số lượng	Thành tiền (2)	(2) – (1)
I. Giai đoạn tái sinh						
Hệ số nhân chồi (chồi/mẫu)		2,33		6,33		
(1) Môi trường MS (lít)	12.000	86	1.032.000	32	384.000	-648.000
(2) CDHSTTV (mg)						
(a) NAA (0,5 mg/L)	73	43	3.139	16	1.168	-1.971
(b) BA (2 mg/L)	2.057	172	353.804	64	131.648	-222.156
(3) Năng lượng (kW)						
(a) Năng lượng cho nồi hấp	2.200	25	55.000	0	0	-55.000
(b) Năng lượng cho tủ cấy	2.200	16	35.200	16	35.200	0
(c) Năng lượng cho thắp sáng 1 bóng điện thắp 12h/ngày trong 28 ngày	2.200	121	266.200	121	266.200	0
(4) AgNPs (mL)	200	0	0	128	25.600	25.600
(5) Agar (g)	400	688	275.200	128	51.200	-224.000
(6) Công lao động	250.000	2,5	625.000	2,5	625.000	0
II. Giai đoạn sinh trưởng						

(1) Môi trường MS (lít)	12.000	80	960.000	80	960.000	0
(2) CDHSTTV (mg)						
(3) Năng lượng (kW)						
(a) Năng lượng cho nồi hấp	2.200	25	55.000	0	0	-55.000
(b) Năng lượng cho tủ cấy	2.200	16	35.200	16	35.200	0
(c) Năng lượng cho thấp sáng 1 bóng điện thấp 12h/ngày trong 28 ngày	2.200	121	266.200	121	266.200	0
(4) AgNPs (mL)	200	0	0	320	64.000	64.000
(5) Agar (g)	400	640	256.000	320	128.000	-128.000
(6) Công lao động	250.000	2,5	625.000	2,5	625.000	0
Chi phí sản xuất 10.000 cây giống Cúc (chưa tính chi phí khấu hao thiết bị và tỉ lệ thất thoát do nhiễm)			4.842.943		3.598.416	-1.244.527
Chi phí trung bình cho 1 cây giống			484,29		359,84	-124,45

Ghi chú: Giá thành dựa trên giá hiện tại các công ty hóa chất cung cấp.

3.2. Ảnh hưởng của AgNPs và CuNPs lên khả năng khử trùng mẫu cấy và sinh trưởng tiếp theo của cây thu hải đường

3.2.1. Ảnh hưởng của AgNPs và CuNPs lên khử trùng mẫu cấy

Tỷ lệ sống sót của 3 loại mẫu cấy (cuống lá, cuống hoa và đoạn thân) khử trùng bằng AgNPs, CuNPs, HgCl₂ và Ca(ClO)₂ được thu

nhận sau 1 - 4 tuần nuôi cấy. Kết quả cho thấy rằng, tùy thuộc vào loại mẫu cây và chất khử trùng được sử dụng thì tỷ lệ sống sót của mẫu cây có sự khác biệt. Nhìn chung, 50 - 300 mg/L AgNPs ghi nhận hiệu quả khử trùng cao đối với cả 3 loại mẫu cây. Những nồng độ AgNPs này cho thấy hiệu quả khử trùng mẫu cây bằng hoặc cao hơn so với 1.000 mg/L HgCl₂ hoặc 60.000 mg/L Ca(ClO)₂ sau 4 tuần. Mặt khác, khi tăng nồng độ AgNPs lên 400 mg/L nhiều mẫu không bị nhiễm vi sinh nhưng mẫu chuyển sang màu nâu đen hoặc hoại tử. Do đó, tỷ lệ mẫu sống sót của mẫu cây cuống lá (62,20%), cuống hoa (73,33%) và đoạn thân (73,33%) là thấp ở nồng độ cao của AgNPs. Đối với khử trùng mẫu cây bằng CuNPs, nồng độ 50 - 200 mg/L CuNPs khử trùng mẫu cuống lá, nồng độ 200 - 300 mg/L CuNPs khử trùng mẫu cuống hoa và nồng độ 100 - 300 mg/L CuNPs khử trùng mẫu đoạn thân cho hiệu quả tương tự so với các nồng độ AgNPs tối ưu.

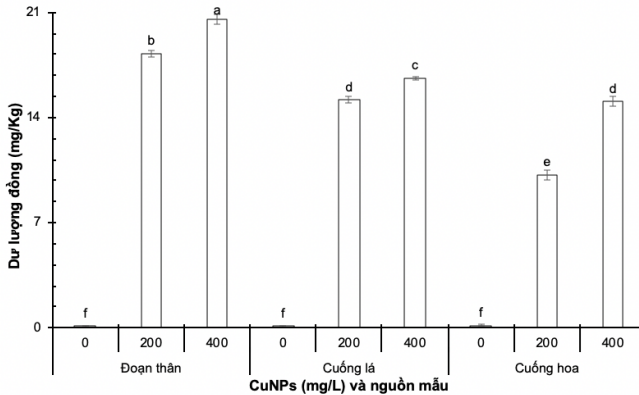
3.2.2. Ảnh hưởng của AgNPs và CuNPs lên cảm ứng tạo phôi

Khả năng cảm ứng tạo phôi của các mẫu cây khử trùng với AgNPs, CuNPs, HgCl₂ và Ca(ClO)₂ có sự khác biệt sau 4 tuần (Bảng 3.2.1). Nhìn chung, tất cả các mẫu cây khử trùng đều cảm ứng tạo phôi; trong đó, 200 - 300 mg/L AgNPs để khử trùng tất cả các mẫu cây cho tỷ lệ cảm ứng tạo phôi cao hơn các nồng độ khác; trong đó, 200 ppm CuNPs cũng cho hiệu quả tương tự. Ngoài ra, phân tích bằng phương pháp quang phổ hấp thụ nguyên tử cho thấy trong mẫu cuống lá, đoạn thân và cuống hoa hàm lượng Cu được ghi nhận từ 0,10 - 0,18 mg/Kg. Sau khi khử trùng bằng dung dịch CuNPs, dư lượng Cu trong mẫu cuống lá, cuống hoa và đoạn thân gia tăng tỷ lệ thuận với nồng độ của CuNPs từ 0 đến 400 mg/L (Hình 3.2.1). Trong số 3 loại mẫu, dư lượng Cu trong mẫu đoạn thân và cuống lá cao hơn so với mẫu cuống hoa (Hình 3.2.1). Điều này cho thấy rằng các mẫu cây khác nhau hấp thụ CuNPs khác nhau.

Bảng 3.2.1. Ảnh hưởng của các chất khử trùng lên tỷ lệ cảm ứng tạo phôi từ các nguồn mẫu khác nhau sau 4 tuần.

Chất khử trùng	Nồng độ (mg/L)	Tỷ lệ phần trăm mẫu cấy cảm ứng tạo phôi (%)		
		Cuống lá	Cuống hoa	Đoạn thân
AgNPs	50	22,20bc	20,00bc	13,33e
	100	37,80a	24,47b	22,20cd
	200	37,80a	40,00a	40,00a
	300	35,53a	35,53a	42,20a
	400	28,87b	20,00bc	28,87bc
CuNPs	50	31,13b	20,00bc	11,13e
	100	35,53a	22,20bc	26,67bc
	200	40,00a	42,20a	46,67a
	300	31,13b	40,00a	42,20a
	400	28,87b	22,20bc	26,67bc
HgCl ₂	1.000	17,80c	13,33c	20,00de
Ca(ClO) ₂	60.000	22,20bc	22,20bc	31,13b

* Chữ cái khác nhau cùng một cột ghi nhận sự khác biệt với ý nghĩa thống kê $p < 0,05$ trong phép thử Duncan.



Hình 3.2.1. Dư lượng Cu trong mẫu cây Thu hải đường sau khi khử trùng mẫu cây với CuNPs.

3.2.3. Ảnh hưởng của AgNPs và CuNPs lên sinh trưởng của phôi soma

Các hình dạng khác nhau của phôi soma có thu nhận từ mẫu cây được khử trùng bằng AgNPs, CuNPs và HgCl₂ được ghi nhận sau 8 tuần (Bảng 3.2.2). Sau tuần thứ nhất, các nghiệm thức đều hình thành

phôi soma (100%). Tuy nhiên, có sự khác biệt về số lượng phôi soma ở từng loại mẫu cây với các chất khử trùng mẫu cây khác nhau (Bảng 3.2.2). Enzyme chống oxy hóa (CAT và APX) của các phôi thu nhận từ khử trùng mẫu cây với $HgCl_2$, AgNPs và CuNPs là không giống nhau sau 8 tuần (Bảng 3.2.3).

Bảng 3.2.2. Sự phát sinh phôi soma của cây Thu hải đường thu nhận từ các chất khử trùng mẫu cây khác nhau (AgNPs, CuNPs và $HgCl_2$) sau 8 tuần.

Nguồn mẫu	Chất khử trùng	Tổng số phôi	Hình thái phôi soma			
			Cầu	Tim	Thủy lồi	Hai lá mầm
Cuống lá	$HgCl_2$	29,33bc* ^x	8,67b	7,67b	6,33c	6,67c
	AgNPs	32,00b	8,33b	5,00d	7,67ab	9,00b
	CuNPs	33,00b	10,33a	6,00cd	8,00ab	8,67b
Cuống hoa	$HgCl_2$	29,33bc	7,67bc	9,67b	6,33c	5,67cd
	AgNPs	36,33a	4,33e	9,67a	8,00ab	14,33a
	CuNPs	38,00a	5,33e	10,00a	8,67ab	14,00a
Đoạn thân	$HgCl_2$	30,67bc	10,33a	7,00bc	6,67bc	7,00c
	AgNPs	34,33ab	6,33d	5,00d	10,67a	12,33a
	CuNPs	36,67a	7,00bc	4,67d	9,33ab	12,67a

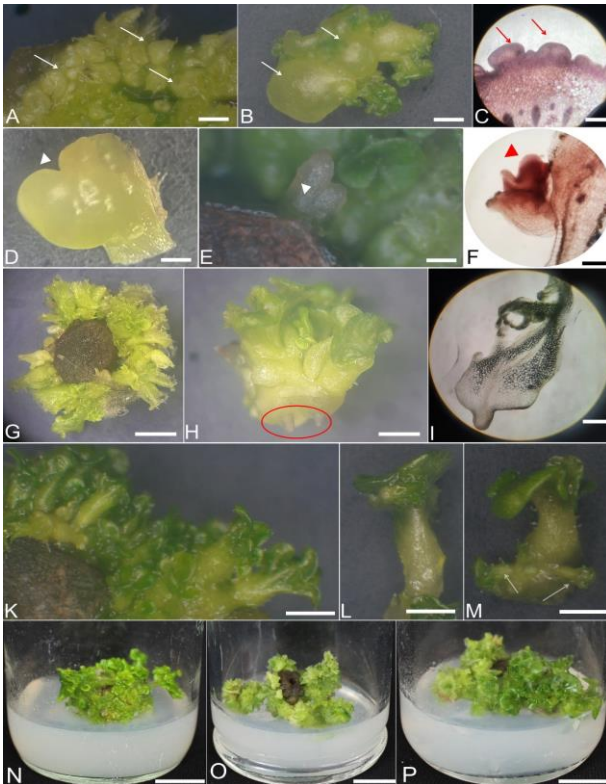
Ghi chú: * Chữ cái khác nhau cùng một cột ghi nhận sự khác biệt với ý nghĩa thống kê $p < 0,05$ trong phép thử Duncan; ^x Tổng số phôi là tổng số phôi ở tất cả các hình thái khác nhau (Cầu, tim, thủy lồi và hai lá mầm).

Bảng 3.2.3. Hoạt tính enzyme chống oxy hóa (CAT và APX), hàm lượng tinh bột và đường của cụm phôi Thu hải đường sau 8 tuần nuôi cấy.

Nguồn mẫu/ Chỉ tiêu	Chất khử trùng	$HgCl_2$	AgNPs	CuNPs
Cuống lá	CAT (U/g)	95,19b*	96,08b	100,06a
	APX (U/g)	0,40b	0,55a	0,58a
	Tinh bột (%)	33,24b*	36,11ab	39,26a
	Đường (mg/g)	75,98ab	68,45b	80,16a
Cuống hoa	CAT (U/g)	100,12a	102,33a	104,86a
	APX (U/g)	0,21c	0,50b	0,70a
	Tinh bột (%)	34,28b	38,23ab	40,87a

	Đường (mg/g)	90,24a	81,36b	70,09c
Đoạn thân	CAT (U/g)	102,44b	94,97b	112,88a
	APX (U/g)	0,24c	0,45b	0,66a
	Tinh bột (%)	37,24c	41,27b	45,58a
	Đường (mg/g)	90,24a	86,19ab	75,24b

* Chữ cái khác nhau cùng một hàng ghi nhận sự khác biệt với ý nghĩa thống kê $p < 0,05$ trong phép thử Duncan.



Hình 3.2.7. Phát sinh phôi soma thu nhận từ cảm ứng tạo phôi có nguồn gốc từ mẫu cây Thu hải đường khử trùng bằng CuNPs. **A, B, C:** Phôi hình cầu; **D, E, F:** Phôi hình tim; **G, H, I:** Phôi hình thủy lô; **K, L, M:** Phôi hai lá mầm; **N, O, P:** Cụm phôi soma thu nhận từ mẫu cuống lá, cuống hoa và đoạn thân (A - F, I: Thước đo 0,5 cm; G, H, K - P: Thước đo 1 cm).

3.2.4. Tạo cây hoàn chỉnh và sinh trưởng tiếp theo ở điều kiện vườn ươm

Con có nguồn gốc từ phôi soma phát triển tốt và không có bất thường về hình thái trong quá trình hình thành rễ (Bảng 3.2.4). Sau 16 tuần trồng ở vườn ươm, cây con ghi nhận tỷ lệ sống sót tốt và không có sự khác biệt đáng kể về sự sinh trưởng như chiều cao cây con và số lá trên cây con (Bảng 3.2.5).

Bảng 3.2.4. Sinh trưởng của cây Thu hải đường *in vitro* tái sinh từ phôi soma sau 16 tuần nuôi cấy.

Nghiệ m thức	Chiều cao cây (cm)	Số rễ/cây	Chiều dài rễ (cm)	Số lá/cây	SPAD	Khối lượng tươi (mg)	Khối lượng khô (mg)
HgCl ₂	9,83ab*	6,67b	6,00a	6,00a	43,72a	2019,55b	209,31c
AgNPs	10,35a	8,00a	5,10a	6,00a	44,34a	2316,05ab	227,23b
CuNPs	10,52a	7,67ab	5,21a	6,33a	46,89a	2395,13a	252,56a

* Chữ cái khác nhau cùng một cột ghi nhận sự khác biệt với ý nghĩa thống kê $p < 0,05$ trong phép thử Duncan.

Bảng 3.2.5. Thích nghi và sinh trưởng tiếp theo của cây Thu hải đường ở điều kiện vườn ươm sau 16 tuần.

Nghiệ m thức	Tỷ lệ sống sót (%)	Chiều cao cây (cm)	Số lá/cây	SPAD	Tỷ lệ ra hoa (%)	Thời gian nở hoa (ngày)	Đường kính hoa (cm)
HgCl ₂	87,67ab*	21,83b	14,33ab	45,35c		92,67a	2,51b
AgNPs	90,00a	23,15ab	13,67b	48,54b	100a	86,67b	2,70a
CuNPs	90,33a	23,96a	15,00a	52,14a		85,33bc	2,68a

* Chữ cái khác nhau cùng một cột ghi nhận sự khác biệt với ý nghĩa thống kê $p < 0,05$ trong phép thử Duncan.

3.3. Ảnh hưởng của AgNPs lên tái sinh chồi và hạn chế một số hiện tượng bất thường của cây Tử linh lan nuôi cấy *in vitro*

3.3.1. Đánh giá khả năng tái sinh chồi của các nguồn mẫu khác nhau và ghi nhận hiện tượng bất thường

Kết quả ghi nhận được cho thấy, mẫu gân chính của lá ghi nhận sự tái sinh chồi tối ưu hơn so với mẫu lá nguyên với tỷ lệ mẫu tái sinh chồi (66,00%), số chồi (5,33 chồi) và chiều cao chồi (0,73 cm) (Bảng 3.3.1). Vì vậy, việc sử dụng mẫu gân lá chính cho khả năng tái sinh chồi cao hơn so với mẫu lá nguyên. Một số hiện tượng bất

thường trong giai đoạn tái sinh chồi của mẫu cây chứa gân chính của lá và mẫu lá nguyên của cây Tử linh lan được ghi nhận ở Bảng 3.3.1.

Bảng 3.3.1. Sự sinh trưởng và hiện tượng bất thường trong giai đoạn tái sinh chồi của cây Tử linh lan sau 8 tuần.

Chỉ tiêu theo dõi	Mẫu lá nguyên	Mẫu gân chính của lá	LSD _{0,05}
Tỷ lệ mẫu tái sinh chồi (%)	40,00 ± 1,15*	66,00 ± 2,08	9,96
Số chồi/mẫu	2,67 ± 0,33	5,33 ± 0,33	1,72
Chiều cao chồi (cm)	0,50 ± 0,60	0,73 ± 0,06	0,10
Thủy tinh thể (%)	20,00 ± 1,15	19,67 ± 1,20	Ns
Mô sẹo ở mép lá (%)	21,67 ± 1,67	22,33 ± 1,45	Ns
Hoại tử mẫu cây (%)	14,67 ± 0,88	12,33 ± 1,45	0,50
Hóa nâu mẫu cây và môi trường nuôi cấy (%)	20,33 ± 0,88	10,67 ± 0,67	4,43

*Các giá trị trong bảng thể hiện dữ liệu trung bình ± SE (sai số chuẩn) trong phép thử LSD với $p < 0,05$; Ns: Khác biệt không có ý nghĩa thống kê.

Ngoài ra, ở giai đoạn tái sinh chồi trên cả 2 mẫu lá nguyên và mẫu gân lá chính đều xuất hiện hiện tượng thủy tinh thể (20,00% và 19,67%; tương ứng), mô sẹo ở mép lá (21,67% và 22,33%; tương ứng), hoại tử mẫu cây (14,67% và 12,33%; tương ứng), mẫu cây và môi trường nuôi cấy hóa nâu (20,33% và 15,67%; tương ứng) (Bảng 3.3.1 và Hình 3.3.1). Trên cây Tử linh lan, hiện tượng bất thường ghi nhận ở giai đoạn tái sinh chồi là khoảng 20% trên cả 2 loại mẫu cây (lá nguyên và gân chính của lá) với các đặc điểm như chồi và lá có hiện tượng mọng nước và biến dạng (Hình 3.3.1D-F). Trong nghiên cứu này, hiện tượng mô sẹo xuất hiện ở mép lá được ghi nhận trong nuôi cấy mô, đây có thể là do trong giai đoạn tái sinh chồi, các chồi được tạo thành có kích thước nhỏ và các lá nằm gần và tiếp xúc với môi trường nuôi cấy (môi trường MS chứa CĐHSTTV như BA và NAA); do đó, các mẫu lá hình thành mô sẹo (Hình 3.3.1G-I).

3.3.2. Ảnh hưởng của AgNPs gia tăng lên kết quả tái sinh chồi và khắc phục một số hiện tượng bất thường

Sau 4 và 8 tuần nuôi cấy, AgNPs có hiệu quả lên sự tái sinh chồi, hạn chế một số hiện tượng bất thường, sự biến động khí ethylene, enzyme chống oxy hóa (Bảng 3.3.2, 3.3.3, 3.3.4 và Hình 3.3.2, 3.3.3).



Hình 3.3.1. Một số hiện tượng bất thường trong giai đoạn tái sinh chồi của cây Tử linh lan sau 8 tuần nuôi cấy. **A, B, C:** Mẫu cây sinh trưởng bình thường; **D, E, F:** Mẫu cây thủy tinh thể; **G, H, I:** Mẫu cây hình thành mô sẹo ở mép lá; **K, L, M:** Mẫu cây và môi trường nuôi cấy hóa nâu (*Thước đo: 1 cm; Ngoại trừ A: 0,5 cm - Mẫu cây được chụp dưới kính hiển vi soi nổi ở độ phóng đại là 10x – trừ hình A và K*).

Bảng 3.3.2. Ảnh hưởng của AgNPs lên sự tái sinh chồi và sinh trưởng của cụm chồi sau 4 tuần nuôi cấy.

AgNPs (mg/L)	Tỷ lệ tái sinh chồi (%)	Số chồi/mẫu	Chiều cao chồi (cm)	Khối lượng tươi cụm chồi (mg)	Khối lượng khô cụm chồi (mg)
0	67,67d*	5,67b	0,47bc	282,67c	36,00d
1	79,00bc	6,00b	0,53ab	467,67b	60,67b
2	89,33a	6,00b	0,67a	581,33a	72,67a
3	82,33b	7,67a	0,43bc	409,00b	50,33c
4	76,33c	5,00b	0,30c	409,33b	42,33cd

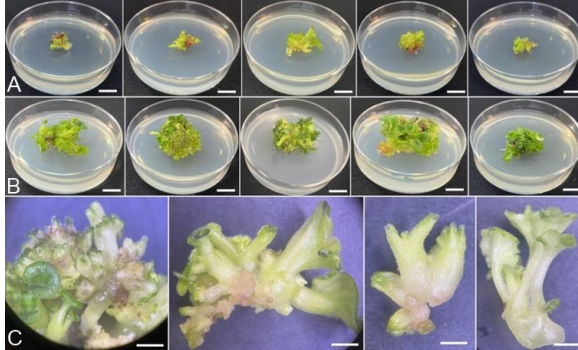
* Chữ cái khác nhau cùng một cột ghi nhận sự khác biệt với ý nghĩa thống kê $p < 0,05$ trong phép thử Duncan.

Bảng 3.3.3. Ảnh hưởng của AgNPs lên sự tái sinh chồi và sinh trưởng của cụm chồi sau 8 tuần nuôi cấy.

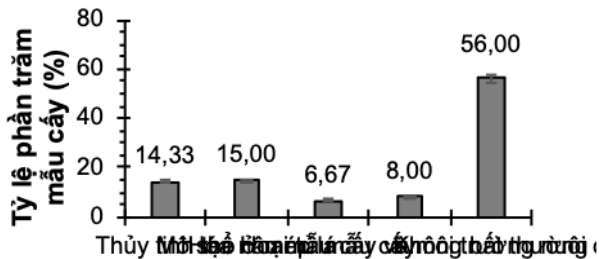
AgNPs (mg/L)	Số chồi/mẫu		Chiều cao chồi (cm)	SPAD	Khối lượng tươi (mg)	Khối lượng khô (mg)
	Tổng	Chồi > 1 cm				
0	7,33bc*	1,67bc	0,73c	27,33a	1020,33d	120,00c
1	10,67a	2,33b	0,80bc	27,67a	1198,33c	134,33b

2	10,00a	5,67a	1,30a	30,00a	1476,00a	160,67a
3	8,00b	1,33d	0,93b	28,00a	1358,00b	147,00ab
4	6,00c	1,00e	0,73c	25,33a	977,67d	110,67c

* Chữ cái khác nhau cùng một cột ghi nhận sự khác biệt với ý nghĩa thống kê $p < 0,05$ trong phép thử Duncan.



Hình 3.3.2. Ảnh hưởng của AgNPs lên khả năng tái sinh chồi cây Từ linh lan sau 4 và 8 tuần nuôi cấy. **A:** Cụm chồi sau 4 tuần nuôi cấy; **B:** Cụm chồi sau 8 tuần nuôi cấy; **C:** Hình thái chồi (Thước đo: 2 cm).



Hình 3.3.3. Ảnh hưởng của 2 mg/L AgNPs lên một số hiện tượng bất thường trong giai đoạn tái sinh chồi cây Từ linh lan sau 8 tuần nuôi cấy.

Bảng 3.3.4. Hàm lượng ethylene trong đĩa nuôi cấy và enzyme chống oxy hóa của cụm chồi trên môi trường có bổ sung AgNPs sau 8 tuần nuôi cấy.

AgNPs (mg/L)	Ethylene (mg/L)	CAT (U/g)	APX (U/g)
0	1,36ab	77,31e	0,29e
1	1,45a	82,32d	1,11b
2	1,15c	101,51a	2,37a
3	1,32bc	88,09b	0,94c
4	1,44a	86,90c	0,40d

* Chữ cái khác nhau cùng một cột ghi nhận sự khác biệt với ý nghĩa thống kê $p < 0,05$ trong phép thử Duncan.

CHƯƠNG 4: KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

4.1. Kết luận

AgNPs khử trùng môi trường nuôi cấy mô: Bổ sung 4 mg/L AgNPs vào môi trường nuôi cấy và giảm một nửa hàm lượng agar (4 g/L) có hiệu quả khử trùng môi trường nuôi cấy và không cần hấp tiệt trùng.

AgNPs và CuNPs khử trùng mẫu cấy và sinh trưởng tiếp theo của mẫu cấy: Mẫu lá cây Cúc được khử trùng với 250 mg/L AgNPs trong 15 -20 phút ghi nhận tỷ lệ cảm ứng mô sẹo tối ưu so với khử trùng mẫu cấy với 1.000 mg/L HgCl₂. Trong khi đó, các nguồn mẫu cuống lá, cuống hoa và đoạn thân cây Thu hải đường khử trùng với 200 mg/L AgNPs hoặc CuNPs có hiệu quả khử trùng mẫu cấy và cảm ứng tạo phôi tối ưu so với các chất khử trùng khác. Ngoài ra, số lượng phôi soma và số phôi soma có hình dạng hai lá mầm cao nhất được thu nhận với khử trùng mẫu cấy có nguồn gốc khử trùng bằng AgNPs hoặc CuNPs cũng như gia tăng hoạt tính enzyme chống oxy hóa CAT và APX.

AgNPs trong giai đoạn tái sinh chồi: Mẫu gân chính của lá cây Tử linh lan nuôi cấy trên môi trường bổ sung 2 mg/L AgNPs ghi nhận gia tăng sự tái sinh chồi và sinh trưởng của cụm chồi; giảm hiện tượng thủy tinh thể, mô sẹo ở mép lá, hoại tử mẫu cấy, mẫu cấy và môi trường hóa nâu; giảm sự tích lũy ethylene và gia tăng hoạt tính enzyme chống oxy hóa CAT và APX.

4.2. Kiến nghị

Nghiên cứu thêm vai trò của AgNPs và CuNPs trên nhiều cây trồng nuôi cấy mô khác.

Nghiên cứu vai trò của CuNPs thay thế muối đồng trong môi trường nuôi cấy mô.

DANH MỤC CÁC BÀI BÁO ĐÃ XUẤT BẢN LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. H.T. Tung, **H.G. Bao**, D.M. Cuong, H.T.M. Ngan, V.T. Hien, V.Q. Luan, B.V.T. Vinh, H.T.N. Phuong, N.B. Nam, L.N. Trieu, N.K. Truong, P.N.D. Hoang, D.T. Nhut (2021) Silver nanoparticles as the sterilant in large-scale micropropagation of chrysanthemum. *In Vitro Cell. Dev. Biol. - Plant* 57: 897-906.doi.org/10.1007/s11627-021-10163-7.
2. **H.G. Bao**, H.T. Tung, H.T. Van, L.T. Bien, H.D. Khai, N.T.N. Mai, V.Q. Luan, D.M. Cuong, N.B. Nam, B.V.T. Vinh, D.T. Nhut (2022) Copper nanoparticles enhanced surface disinfection, induction and maturation of somatic embryos in Tuberous begonias (*Begonia × tuberhybrida* Voss) cultured *in vitro*. *Plant Cell Tiss. Org Cult.* <https://doi.org/10.1007/s11240-022-02360-y>.
3. H.T. Tung, **H.G. Bao**, Ngo Quoc Buu, Nguyen Hoai Chau, D.T. Nhut (2022) The use of silver nanoparticles as a disinfectant and media additive in plant micropropagation. In: D.T. Nhut, H.T. Tung, E.C. Yeung (Eds.), *Plant tissue culture: New techniques and application in horticultural species of tropical region*. Springer, Singapore.
4. H.T. Tung, H.T. Van, **H.G. Bao**, L.T. Bien, H.D. Khai, V.Q. Luan, D.M. Cuong, T.H. Phong, D.T. Nhut (2021) Silver nanoparticles enhanced efficiency of explant surface disinfection and somatic embryogenesis in *Begonia tuberous* via thin cell layer culture. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 19(2): 337-347.
5. **H.G. Bảo**, H.T. Tùng, N.T.N. Mai, H.Đ. Khải, Đ.M. Cường, D.T. Nhựt (2022) Nano bạc gia tăng hiệu quả tái sinh chồi và hạn chế một số hiện tượng bất thường của cây *African violet* (*Saintpaulia ionantha* Wendl.) nuôi cấy *in vitro*. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam* (Bản B) – Chấp nhận đăng.