

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**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Hà Nội - 2023

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

LUẬN ÁN TIẾN SĨ CÔNG NGHỆ SINH HỌC
Mã số : 9 42 02 01

Xác nhận của Học viện
Khoa học và Công nghệ

Thầy hướng dẫn 1

Thầy hướng dẫn 2



* Nguyễn Thị Trung

TS. Hoàng Thanh Tùng

GS.TS. Dương Tấn Nhựt

Hà Nội - 2023

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan 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**” là nghiên cứu của tôi và sự hướng dẫn khoa học của TS. Hoàng Thanh Tùng và GS.TS. Dương Tấn Nhựt tại Phòng Sinh học Phân tử và Chọn tạo giống cây trồng (VNCKHTN). Các số liệu, kết quả và đánh giá được đưa ra trong luận án chưa từng được công bố trước đây. Luận án này được thực hiện bởi sự hỗ trợ kinh phí của đề tài “*Thiết lập phương pháp mới trong khử trùng mẫu, môi trường nuôi cấy và khắc phục một số hiện tượng bất thường trong vi nhân giống trên một số đối tượng cây trồng có giá trị kinh tế*”, Mã số: 106.01-2019.301 của Quỹ Phát triển Khoa học và Công nghệ Quốc gia (NAFOSTED) và nhiệm vụ Phát triển nhóm nghiên cứu xuất sắc hạng I về “*Nghiên cứu ảnh hưởng của một số hạt nano kim loại lên sự phát sinh hình thái, sinh trưởng - phát triển, sinh lý - sinh hóa và tích lũy hợp chất thứ cấp của một số cây trồng có giá trị kinh tế nuôi cấy in vitro*”, Mã số: NCXS01.03/22-24 thuộc Chương trình Phát triển Nhóm nghiên cứu xuất sắc tại Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Tôi xin chịu hoàn toàn trách nhiệm với Học viện Khoa học và Công nghệ về lời cam đoan này.

Hà Nội, ngày 22 tháng 11 năm 2023

Nghiên cứu sinh



Huỳnh Gia Bảo

LỜI CẢM ƠN

Mỗi bước đi trong chặng đường đời của chúng ta, đặc biệt là trên con đường tìm kiếm tri thức, sự hiện diện của mỗi người trong cả quá trình hay trong một giai đoạn cuộc sống đều mang một ý nghĩa thiêng liêng, đều là một dấu ấn sẽ theo ta đến suốt cuộc đời. Đối với riêng tôi, để hoàn thành luận án này, chắc hẳn không thể không kể đến sự giúp đỡ tận tình, sự quan tâm và động viên từ chính quý Thầy cô, các anh chị và các bạn tại phòng Sinh học Phân tử và Chọn tạo giống cây trồng.

Lời đầu tiên, tôi xin được bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc nhất đến Thầy, GS.TS. Dương Tấn Nhựt. Một người Thầy không chỉ dạy cho tôi kiến thức trong giảng dạy, trong nghiên cứu khoa học mà còn cho tôi nhiều bài học về kỹ năng, về thái độ trong học tập và cuộc sống hằng ngày. Một vài ngôn từ sẽ không thể diễn đạt hết công lao của Thầy đối với sự nghiệp trồng người. Phía sau những buổi làm việc cần mẫn, những cuộc họp với lời răn dạy nghiêm khắc hay những buổi sinh hoạt đầm ấm, vui vẻ cùng phòng thí nghiệm là những buổi trị liệu trong chặng đường chiến đấu với bệnh tật của Thầy, bất cứ ai cũng phải nể phục trước nghị lực phi thường ấy. Bên cạnh đó, Thầy còn là người Thầy rất tâm lý, trong suốt thời gian làm luận án, tôi còn nhận được sự động viên cũng như cảm thông, chia sẻ từ Thầy khi gặp khó khăn trong công việc và cuộc sống.

Đồng thời, tôi xin gửi lời cảm ơn chân thành nhất đến người Thầy, cũng là người em đã dành rất nhiều thời gian và kinh nghiệm để giúp tôi hoàn thành luận án này, TS. Hoàng Thanh Tùng. Bản thân tôi thực sự may mắn khi nhận được sự hướng dẫn nhiệt tình và tâm huyết từ cả hai người Thầy vừa có tâm vừa có tầm. Tôi đã được Thầy chỉ dạy những bước đi chập chững đầu tiên và cơ bản nhất trong nghiên cứu. Mặc dù tuổi đời còn rất trẻ, nhưng ở Thầy tôi nhìn thấy được tầm hiểu biết sâu rộng, sự nghiêm túc và nỗ lực trong công việc cũng như sự thân thiện, hài hước trong cuộc sống hằng ngày.

Tôi xin cảm ơn Ban giám đốc, cán bộ và nhân viên Học viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã tạo điều kiện thuận lợi cho tôi trong quá trình học tập.

Tôi xin cảm ơn Ban lãnh đạo Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên (VNCKHTN) đã giúp đỡ và tạo điều kiện thuận lợi cho tôi trong quá trình học tập và thực hiện đề tài. Tôi cũng xin cảm ơn tới các cán bộ, nhân viên và các anh chị học viên, nghiên cứu sinh tại VNCKHTN. Cảm ơn mọi người đã dành thời gian để chỉ bảo, giúp đỡ tôi trong suốt thời gian nghiên cứu.

Xin cảm ơn Ban điều hành của Công ty cổ phần bệnh viện Hy Vọng nói chung và IVFMD BU nói riêng đã tạo điều kiện giúp đỡ và cho phép tôi san sẻ thời gian để có điều kiện vừa công tác tại Bệnh viện vừa hoàn thành luận án tiến sĩ.

Cuối cùng, sẽ là thiếu sót lớn khi không bày tỏ lời cảm ơn đến gia đình, những người đồng hành quan trọng nhất trong cuộc đời tôi. Dù cho có bao nhiêu mệt mỏi, bao nhiêu muộn phiền sau những ngày làm việc thì khi trở về nhà với gia đình, tôi như được nạp thêm năng lượng và có thêm động lực để tiếp tục cố gắng.

Xin chân thành cảm ơn!

Hà Nội, ngày 22 tháng 11 năm 2023

Nghiên cứu sinh



Huỳnh Gia Bảo

MỤC LỤC

Lời cam đoan	i
Lời cảm ơn.....	ii
Mục lục	iv
Danh mục chữ viết tắt	viii
Danh mục bảng	x
Danh mục hình	xii
LỜI MỞ ĐẦU	1
CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU	
1.1. Khử trùng môi trường nuôi cấy <i>in vitro</i>	5
1.2. Khử trùng mẫu cấy	6
1.3. Nano bạc và ứng dụng	9
1.3.1. Giới thiệu chung	9
1.3.2. Đặc tính kháng khuẩn của nano bạc	9
1.3.3. Ảnh hưởng của AgNPs lên sự sinh trưởng thực vật	10
1.3.4. Hấp thụ, vận chuyển và chuyển hóa nano bạc trên thực vật	11
1.3.5. Nano bạc trong nghiên cứu vi nhân giống thực vật	12
1.4. Nano đồng và ứng dụng.....	16
1.4.1. Ảnh hưởng của đồng lên sinh trưởng thực vật	16
1.4.2. Nano đồng trong vi nhân giống thực vật	17
1.5. Hiện tượng bất thường trong vi nhân giống	18
1.5.1. Hiện tượng thủy tinh thể	18
1.5.2. Sự tích lũy khí ethylene	18
1.5.3. Hiện tượng rụng cơ quan	19

1.5.4. Hiện tượng hóa nâu	19
1.5.5. Stress oxy hóa	19
1.6. Tổng quan về các đối tượng nghiên cứu	20
1.6.1. Cây Cúc	20
1.6.2. Cây Thu hải đường.....	21
1.6.3. Cây Tử linh lan	22
CHƯƠNG 2: VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	
2.1. Vật liệu	24
2.1.1. Vật liệu thực vật	24
2.1.2. Dung dịch nano kim loại	24
2.1.3. Hệ thống nuôi cấy	24
2.1.4. Thiết bị và dụng cụ	25
2.1.5. Điều kiện nuôi cấy	25
2.2. Nội dung nghiên cứu	25
2.2.1. Ảnh hưởng của AgNPs lên khử trùng mẫu cấy, môi trường nuôi cấy và vi nhân giống cây hoa Cúc	25
2.2.2. Ảnh hưởng của AgNPs và CuNPs lên khả năng khử trùng mẫu cấy và sinh trưởng tiếp theo của cây Thu hải đường.....	26
2.2.3. Ảnh hưởng của AgNPs lên khả năng tái sinh chồi và hạn chế một số hiện tượng bất thường trong nuôi cấy <i>in vitro</i> của cây Tử linh lan	26
2.3. Phương pháp nghiên cứu	27
2.3.1. Bố trí thí nghiệm	27
2.3.1.1. Ảnh hưởng của AgNPs lên khử trùng mẫu cấy, môi trường nuôi cấy và vi nhân giống cây hoa Cúc	27
2.3.1.2. Ảnh hưởng của AgNPs và CuNPs lên khả năng khử trùng mẫu cấy và sinh trưởng tiếp theo của cây Thu hải đường.....	29

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 <i>in vitro</i> của cây Tử linh lan	31
2.3.2. Xác định hàm lượng khí ethylene bằng phương pháp sắc ký khí	32
2.3.3. Xác định hoạt độ của enzyme kháng oxy hóa bằng phương pháp phân tích phổ tử ngoại	32
2.3.4. Xác định hàm lượng đường và tinh bột bằng phương pháp phân tích phổ tử ngoại	33
2.3.5. Giải phẫu hình thái	34
2.3.6. Xử lý số liệu	34
2.4. Địa điểm và thời gian nghiên cứu	35
2.4.1. Địa điểm nghiên cứu	35
2.4.2. Thời gian nghiên cứu	35
CHƯƠNG 3: 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 hoa Cúc	36
3.1.1. Ảnh hưởng của AgNPs lên khử trùng môi trường nuôi cấy	36
3.1.2. Khử trùng mẫu cấy bằng AgNPs và cảm ứng mô sẹo	38
3.1.3. Tái sinh chồi trên môi trường bổ sung AgNPs không hấp khử trùng	41
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	43
3.1.5. Nhân giống cây cúc trong các hệ thống nuôi cấy khác nhau	45
3.1.6. Thích nghi và sinh trưởng tiếp theo ở giai đoạn vườn ươm	48
3.1.7. Đánh giá hiệu quả kinh tế của AgNPs lên khả năng khử trùng mẫu cấy, môi trường nuôi cấy và vi nhân giống cây hoa Cúc	50
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	51

3.2.1. Ảnh hưởng của AgNPs và CuNPs lên khử trùng mẫu cây	51
3.2.2. Ảnh hưởng của AgNPs và CuNPs lên cảm ứng tạo phôi.....	55
3.2.3. Ảnh hưởng của AgNPs và CuNPs lên sinh trưởng của phôi soma.....	58
3.2.4. Tạo cây hoàn chỉnh và sinh trưởng tiếp theo ở điều kiện vườn ươm	67
3.3. Ảnh hưởng của AgNPs lên khả năng tái sinh chồi và hạn chế một số hiện tượng bất thường trong nuôi cấy <i>in vitro</i> của cây Tử linh lan	70
3.3.1. Đánh giá khả năng tái sinh chồi của các nguồn mẫu khác nhau và ghi nhận hiện tượng bất thường	70
3.3.2. AgNPs gia tăng hiệu quả tái sinh chồi và khắc phục một số hiện tượng bất thường	73
CHƯƠNG 4: KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	
4.1. Kết luận	80
4.2. Kiến nghị	81
DANH MỤC CÔNG TRÌNH LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN	82
TÀI LIỆU THAM KHẢO	83

DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT

AgNPs	:	Nano bạc (Silver nanoparticles)
APX	:	Ascorbate peroxidase
AuM	:	Hệ thống nuôi cấy bình thủy tinh
AuM1	:	Hệ thống nuôi cấy bình thủy tinh 250 mL
AuM2	:	Hệ thống nuôi cấy bình thủy tinh 500 mL
BA	:	6-Benzylaminopurine
Ca(ClO) ₂	:	Canxi hypoclorit
CAT	:	Catalase
CDHSTTV	:	Chất điều hòa sinh trưởng thực vật
CMC	:	Carboxymethyl cellulose
CuNPs	:	Nano đồng (Copper nanoparticles)
DNS	:	Axit 3,5-dinitrosalicylic
DW	:	Khối lượng khô (Dry weight)
EDTA	:	Axit Ethylene diamine-tetracetic
GOPOD	:	Glucose oxidase-peroxidase
H ₂ O ₂	:	Hydrogen peroxide
HgCl ₂	:	Thủy ngân clorua
MS	:	Môi trường Murashige và Skoog (1962)
MS0	:	Môi trường MS bổ sung 30 g/L sucrose và 8 g/L agar
NAA	:	Axit 1-Naphtaleneacetic
NaBH ₄	:	Natri borohydrit
NaClO	:	Natri hypoclorit
NoM	:	Hệ thống nuôi cấy hộp nhựa

NoM1	:	Hệ thống nuôi cấy hộp nhựa vuông 5 L
NoM2	:	Hệ thống nuôi cấy hộp nhựa hình chữ nhật 15 L
PDA	:	Thạch dextrose khoai tây (Potato Dextrose Agar)
ROS	:	Stress oxy hóa gốc oxy tự do
SAM	:	S-adenosyl-L-methionine
SOD	:	Superoxide dismutase
SPAD	:	Chỉ số Chlorophyll tổng
VNCKHTN	:	Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên
WA	:	Thạch nước (Water agar)

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1.	Điều kiện hấp khử trùng môi trường nuôi cấy	5
Bảng 1.2.	Hiệu quả về nồng độ và thời gian của các tác nhân vô trùng	7
Bảng 1.3.	Nghiên cứu của AgNPs trong vi nhân giống thực vật ở Việt Nam	15
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	37
Bảng 3.1.2.	Nấm gây nhiễm trên môi trường chứa mẫu cấy sau 1 tuần nuôi cấy	38
Bảng 3.1.3.	Tái sinh chồi cây Cúc trên môi trường MS0 có/không hấp khử trùng (bổ sung 4 ppm AgNPs) sau 4 tuần nuôi cấy	42
Bảng 3.1.4.	Sinh trưởng của cây Cúc trên môi trường MS0 chứa 4 mg/L AgNPs và nồng độ agar khác nhau (không hấp khử trùng) sau 4 tuần	43
Bảng 3.1.5.	Sinh trưởng của cây Cúc <i>in vitro</i> trong các hệ thống nuôi cấy khác nhau sau 4 tuần nuôi cấy	46
Bảng 3.1.6.	Sự sinh trưởng của cây Cúc có nguồn gốc từ các hệ thống khác nhau ở điều kiện vườn ươm	49
Bảng 3.2.1.	Tỷ lệ sống sót của mẫu cấy cuống hoa thu được từ quá trình khử trùng bằng các chất khử trùng khác nhau (AgNPs, CuNPs, HgCl ₂ và Ca(ClO) ₂)	52
Bảng 3.2.2.	Tỷ lệ sống sót của mẫu cấy cuống lá thu được từ quá trình khử trùng bằng các chất khử trùng khác nhau (AgNPs, CuNPs, HgCl ₂ và Ca(ClO) ₂)	53
Bảng 3.2.3.	Tỷ lệ sống sót của mẫu cấy đoạn thân thu được từ quá trình khử trùng bằng các chất khử trùng khác nhau (AgNPs, CuNPs, HgCl ₂ và Ca(ClO) ₂)	54
Bảng 3.2.4.	Ảnh hưởng của các chất khử trùng lên tỷ lệ cảm ứng tạo phôi cây Thu hải đường từ các nguồn mẫu khác nhau sau 4 tuần	56

Bảng 3.2.5. 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	59
Bảng 3.2.6. 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	63
Bảng 3.2.7. Sinh trưởng của cây Thu hải đường <i>in vitro</i> tái sinh từ phôi soma sau 16 tuần nuôi cấy.....	67
Bảng 3.2.8. Thích nghi và sinh trưởng tiếp theo của cây Thu hải đường ở điều kiện vườn ươm sau 16 tuần	68
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.....	70
Bảng 3.3.2. Ảnh hưởng của AgNPs lên sự tái sinh chồi và sinh trưởng của cụm chồi cây Tử linh lan sau 4 tuần nuôi cấy.....	74
Bảng 3.3.3. Ảnh hưởng của AgNPs lên sự tái sinh chồi và sinh trưởng của cụm chồi cây Tử linh lan sau 8 tuần nuôi cấy.....	74
Bảng 3.3.4. Hàm lượng khí ethylene trong đĩa nuôi cấy và enzyme chống oxy hóa của cụm chồi cây Tử linh lan trên môi trường có bổ sung AgNPs sau 8 tuần nuôi cấy	78

DANH MỤC HÌNH

Hình 2.1.	Sơ đồ mô tả cách cắt mẫu cây của cây Thu hải đường	30
Hình 3.1.1.	Môi trường nuôi cấy MS0 quan sát sau 4 tuần.....	35
Hình 3.1.2.	Tỷ lệ cảm ứng mô sẹo của mẫu lá cây Cúc khử trùng bằng các chất khử trùng khác nhau sau 4 tuần	40
Hình 3.1.3.	Sự tái sinh chồi của cây Cúc trên môi trường MS0 bổ sung/không bổ sung 4 mg/L AgNPs sau 4 tuần	41
Hình 3.1.4.	Sự sinh trưởng của cây Cúc trên môi trường MS0 bổ sung 4 ppm AgNPs và nồng độ agar khác nhau (không hấp khử trùng) sau 4 tuần nuôi cấy.....	44
Hình 3.1.5.	Sinh trưởng của chồi cây Cúc trong hệ thống NoM1 và NoM2.....	45
Hình 3.1.6.	Sự sinh trưởng và ra hoa của cây Cúc thu nhận từ các hệ thống nuôi cấy khác nhau ở điều kiện vườn ươm.....	48
Hình 3.2.1.	Dư lượng Cu trong mẫu cây Thu hải đường sau khi khử trùng mẫu cây với CuNPs	58
Hình 3.2.2.	Cảm ứng tạo phôi của cây Thu hải đường từ các chất khử trùng mẫu cấy khác nhau (AgNPs, CuNPs và HgCl ₂) sau 8 tuần.....	60
Hình 3.2.3.	Hình thái giải phẫu của mẫu cấy cảm ứng tạo phôi thu nhận từ mẫu cấy được khử trùng bằng AgNPs.....	61
Hình 3.2.4.	Phát sinh phôi soma thu nhận từ cảm ứng tạo phôi có nguồn gốc từ mẫu cấy khử trùng bằng CuNPs	64
Hình 3.2.5.	Cây Thu hải đường <i>in vitro</i> tái sinh từ phôi soma sau 16 tuần nuôi cấy.....	69
Hình 3.2.6.	Cây Thu hải đường ở điều kiện vườn ươm sau 16 tuần	69
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.....	71

- Hình 3.3.2.** Ảnh hưởng của AgNPs lên khả năng tái sinh chồi cây Tử linh lan sau 4 và 8 tuần nuôi cấy.....75
- Hình 3.3.3.** Ảnh hưởng của 2 mg/L AgNPs lên khả năng hạn chế một số hiện tượng bất thường trong giai đoạn tái sinh chồi cây Tử linh lan sau 8 tuần nuôi cấy.....75

LỜI 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 [1]. 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 1 atm 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 [2], nảy mầm của một số cây trồng [3], sinh lý cũng như hình thái của thực vật [4] cũng đã được chỉ ra. Tuy nhiên, ảnh hưởng của AgNPs lên khả năng khử trùng môi trường nuôi cấy mô mà không hấp tiệt 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*.

Trong quá trình thực hiện thí nghiệm, mỗi đối tượng cây trồng có các chương trình phát sinh hình thái khác nhau cũng như AgNPs và CuNPs có những tác động khác nhau phụ thuộc vào giai đoạn nuôi cấy cũng như mẫu cấy của từng loại cây trồng:

Đối với cây Cúc, AgNPs có hiệu quả khử trùng mẫu cấy cũng như khử trùng môi trường nuôi cấy không hấp tiệt trùng. Ngoài ra, mẫu cấy có thể sinh trưởng trên môi trường bổ sung AgNPs ở nồng độ cao. Bên cạnh đó, qua đánh giá trạng thái môi trường nuôi cấy không hấp tiệt trùng thì độ cứng môi trường là lớn hơn so với hấp tiệt trùng; vì vậy, thí nghiệm ảnh hưởng của nồng độ agar cũng như đưa ra các hệ thống nuôi cấy khác nhau cũng được khảo sát.

Đối với cây Thu hải đường, CuNPs được sử dụng như một chất khử trùng mới và chưa được công bố trước đây. CuNPs được sử dụng để khử trùng mẫu cấy và so sánh với các chất khử trùng khác cũng như đánh giá dư lượng Cu trong mẫu cấy (sau khi khử trùng) tác động đến sinh trưởng tiếp theo của mẫu cấy (cảm ứng tạo phôi, phát sinh phôi và sinh trưởng tiếp theo).

Đối với cây Tử linh lan, nghiên cứu này đánh giá vai trò của AgNPs trong việc khắc phục một số hiện tượng bất thường trong nuôi cấy mô và gia tăng sinh trưởng của mẫu cấy.

Do đó, trên 3 đối tượng nghiên cứu khác nhau, 3 vấn đề có những điểm tương đồng và cũng có những điểm khác biệt được giải quyết trong luận án này. Vì vậy, cách trình bày luận án theo đối tượng nghiên cứu có thể giải quyết trọn vẹn từng bài toán trên từng đối tượng cây trồng cụ thể.

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 cây Cúc.

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 cây Thu hải đường và cây Tử linh lan.

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 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. Khử trùng môi trường nuôi cấy *in vitro*

Môi trường lý tưởng hay tối ưu cho sự sinh trưởng của cây trồng nuôi cấy mô cần được vô trùng; do đó, chúng phải được hấp tiệt trùng. Ngoài ra, các bình chứa môi trường nuôi cấy mô (bình thủy tinh, tam giác, túi nylon,...) cũng cần được hấp tiệt trùng. Môi trường nuôi cấy mô sau khi chuẩn bị cần được đun sôi nhằm hòa tan các thành phần môi trường và được hấp tiệt trùng bằng nồi hấp ở nhiệt độ 121°C, áp suất khoảng 1 atm trong khoảng thời gian từ 20 đến 40 phút tùy theo thể tích môi trường nuôi cấy mô (từ 20 đến 80 mL nếu là môi trường ở các bình nuôi cấy có thể tích từ 100 đến 500 mL). Bên cạnh đó, chuẩn bị môi trường nuôi cấy mô cần trải qua nhiều giai đoạn; do đó, nó sẽ mất thời gian, công lao động, điện năng cho việc hấp tiệt trùng môi trường.

Hầu hết môi trường nuôi cấy mô đều được tiệt trùng bằng nồi hấp (autoclave). Nồi hấp là một thiết bị khử trùng bằng áp suất hơi nước. Đối với thể tích môi trường nhỏ, có thể sử dụng một nồi áp suất mà hoạt động của nó theo nguyên tắc giống với nồi hấp. Thời gian hấp khác nhau đối với thể tích môi trường khác nhau (Bảng 1.1). Thời gian hấp kéo dài có thể ảnh hưởng xấu đến khả năng đông của agar và chất lượng của môi trường [5].

Bảng 1.1. Điều kiện hấp khử trùng môi trường nuôi cấy [5].

TT	Thể tích môi trường/ bình (mL)	Thời gian tối thiểu ở 121°C (phút)
1	20 - 50	15
2	75	20
3	250 - 500	25
4	1.000	30
5	1.500	35
6	2.000	40

Hơn nữa, Leifert và cộng sự (1994) báo cáo rằng, vi khuẩn *Bacillus* có thể tồn tại sau khi hấp tiệt trùng ở khoảng 120°C [6]. Do đó, nên ủ môi trường sau khi hấp ở nhiệt độ 30 đến 35°C trong khoảng 24 đến 48 giờ trước khi sử dụng để đánh giá xem nấm, vi khuẩn,...có trong môi trường nuôi cấy mô hay không [6]. Bên cạnh đó, hấp tiệt trùng môi trường sẽ ảnh hưởng đến sự thay đổi pH của môi trường và làm biến tính các thành phần của môi trường như đường, chất điều hòa sinh trưởng thực vật (CDHSTTV), dịch chiết hữu cơ,...[7, 8]. Các CDHSTTV nhạy cảm với nhiệt như Gibêrelin có thể mất hầu hết hoạt tính của chúng. Ngoài ra, một số vitamin bị phân hủy khi hấp tiệt trùng nhiệt độ cao. Thời gian khử trùng quá lâu có thể làm thay đổi tính chất của agar và nó cũng có thể dẫn đến tạo ra các sản phẩm độc hại như 5-(hydroxymethyl)-2-furaldehyde và phenolics [9] dẫn đến làm giảm hiệu quả của môi trường lên sự sinh trưởng của mẫu cấy. Do đó, việc xác định thời gian tối ưu cho hấp tiệt trùng môi trường nuôi cấy và nhận biết mức độ nhạy nhiệt độ cao của các hóa chất được sử dụng là điều rất cần thiết.

1.2. Khử trùng mẫu cấy

Toàn bộ quá trình nuôi cấy mô luôn luôn được tiến hành trong điều kiện vô trùng; do đó, điều kiện vô trùng là một trong những yếu tố quan trọng và có thể quyết định sự thành công của quá trình nuôi cấy. Các phương pháp khử trùng khác nhau đã được sử dụng để đảm bảo điều kiện vô trùng như sử dụng nhiệt độ cao để khử trùng môi trường, dụng cụ; sử dụng tia bức xạ UV để khử trùng tủ cấy; sử dụng phương pháp lọc để duy trì luồng không khí vô trùng, cho khu vực làm việc trong tủ cấy; sử dụng hóa chất để khử trùng mẫu cấy. Trong đó, việc vô trùng mẫu cấy để loại bỏ hoàn toàn các tác nhân gây nhiễm nhưng vẫn duy trì được sức sống của mẫu cấy là điều rất quan trọng.

Mặt khác, mẫu cấy từ điều kiện bên ngoài đưa vào môi trường nuôi cấy mô là rất khó khăn vì chúng rất dễ bị nhiễm nấm, khuẩn,...mẫu cấy dễ bị hóa nâu hoặc hoại tử, mẫu cấy sinh trưởng chậm; điều này làm tốn chi phí và mất thời gian để thực hiện công việc này. Một trong những nguyên nhân dẫn đến các khó khăn trên có thể là do các thao tác hay chất khử trùng sử dụng trong quy trình khử trùng mẫu [10]. Loại, nồng độ của hoá chất và thời gian khử trùng mẫu cấy chưa phù hợp là một trong

những nguyên nhân chính dẫn đến sự thất bại trong giai đoạn vào mẫu ban đầu. Các chất khử trùng mẫu cấy hiện nay đang được sử dụng hiện nay như canxi hypoclorit ($\text{Ca}(\text{ClO})_2$), natri hypoclorit (NaClO), ethanol, hydrogen peroxide (H_2O_2), thủy ngân clorua (HgCl_2), thuốc diệt nấm và thuốc kháng sinh, clo dioxide, isothiocyanate, đều có tính tẩy rửa cao (ức chế sinh trưởng của nấm và vi khuẩn theo cơ chế ăn mòn vách và thành tế bào); do đó, nó sẽ gây tổn thương mẫu cấy và không hiệu quả trong khử trùng mẫu cấy [11-13]. Ngoài ra, hạn chế của một số chất khử trùng đang được sử dụng hiện nay là ảnh hưởng đến sức khỏe con người [14]. Vì vậy, việc đề xuất một chất khử trùng có hiệu quả trong khử trùng mẫu cấy tương tự các chất khử trùng truyền thống và gia tăng sinh trưởng tiếp theo của mẫu cấy là rất cần thiết.

Khi khử trùng mẫu cấy, mẫu cấy cần phải được nhúng toàn bộ trong dung dịch khử trùng nhằm diệt vi sinh vật; loại bỏ cát, bụi,...trên bề mặt mẫu cấy; sau đó, mẫu cấy được rửa lại bằng dung dịch xà phòng loãng và nước máy. Mẫu cấy sau khi xử lý được rửa sạch vài lần bằng nước cất vô trùng và loại bỏ những mẫu cấy không còn nguyên vẹn trước khi cấy mẫu cấy lên môi trường nuôi cấy phù hợp. Ngoài ra, chất kháng sinh thường ít khi được sử dụng do hiệu quả khử trùng không cao và hạn chế sinh trưởng của mẫu cấy. Bên cạnh đó, một số chất làm giảm sức căng bề mặt (Fotoflo, teepol, tween 80, dung dịch diệt nấm khuẩn,...) cũng được sử dụng để gia tăng hiệu quả khử trùng mẫu cấy. Các chất ức chế vi sinh vật gồm nhiều loại, nồng độ và thời gian khác nhau được sử dụng để xử lý mẫu cấy (Bảng 1.2) [15].

Bảng 1.2. Hiệu quả về nồng độ và thời gian của các tác nhân khử trùng mẫu cấy [15].

TT	Tác nhân khử trùng mẫu cấy	Nồng độ	Thời gian xử lý (phút)
1	$\text{Ca}(\text{ClO})_2$	10%	5 - 30
2	NaClO	2%	5 - 30
3	H_2O_2	12%	5 - 15
4	Nước brom	2%	2 - 10
5	HgCl_2	1%	2 - 10
6	Chất kháng sinh	50 mg/L	30 - 60

Kiến thức và hiểu biết đúng đắn về ảnh hưởng tiêu cực hay tích cực của các tác nhân khử trùng khác nhau sẽ giúp chọn các tác nhân khử trùng tốt nhất cho loài và mẫu cây cụ thể [16]. Các muối của axit hypochlorous, chẳng hạn như NaClO, là một chất oxy hóa mạnh và rất hiệu quả trong việc tiêu diệt vi khuẩn. Ethanol là một chất khử trùng mạnh và nó cũng gây tổn thương đến mẫu cây. Dung dịch ethanol với nồng độ 70% được dùng để làm biến tính protein nhanh chóng và bất hoạt các virus. Để tăng hiệu quả, ethanol được sử dụng trước hoặc sau khi xử lý bằng NaClO trong vài phút hoặc chỉ trong vài giây. HgCl₂ chủ yếu là ức chế vi khuẩn và có phổ hoạt động rộng. Các hợp chất thủy ngân liên kết với các nhóm sulfhydryl sẽ ảnh hưởng đến hoạt động của enzyme [17]. Mặc dù HgCl₂ là một chất khử trùng hiệu quả, nhưng nó là một hóa chất có gây tổn thương mạnh đối với mẫu cây. Vì vậy, chúng ta cần phải cẩn thận trong việc xử lý chất này vì HgCl₂ có thể ảnh hưởng tới sức khỏe con người; do đó, chúng ta cần hết sức cẩn thận trong việc loại bỏ dung dịch HgCl₂ sau khi sử dụng. Kết quả là, nó đã không được sử dụng thường xuyên cho đến ngày nay. H₂O₂ là một chất oxy hóa, ở nồng độ thấp, H₂O₂ có các hoạt tính diệt nấm và diệt khuẩn và có hiệu quả trong việc khử trùng hạt giống. Việc sử dụng Tween 20 làm chất hoạt động bề mặt cải thiện khả năng thấm ướt của mẫu cây và hạt giống để tăng hiệu quả của quy trình khử trùng. Thuốc kháng sinh rất độc đối với mẫu cây và hiếm khi được sử dụng vì không đủ và có tác dụng phụ đối với sự phát triển của mẫu cây [18]. Sử dụng kháng sinh liên tục có thể dẫn đến sự sinh trưởng của các vi khuẩn có tính kháng kháng sinh.

Mặt khác, khử trùng mẫu cây từ điều kiện bên ngoài chủ yếu sử dụng các dung dịch/chất khử trùng mẫu cây có tính ăn mòn và tẩy rửa cao, gây tổn thương và hạn chế sinh trưởng của mẫu cây. Do đó, việc nghiên cứu khả năng khử trùng, kháng khuẩn, nấm của các chất khử trùng khác thay thế kháng sinh hay HgCl₂ mang lại lợi ích vô cùng lớn và là một bước ngoặt mới trong vi nhân giống thực vật.

1.3. Nano bạc và ứng dụng

1.3.1. Giới thiệu chung

Nano bạc (AgNPs) là nano kim loại sử dụng nhiều nhất trong nông nghiệp. Đây là một nano kim loại có cấu trúc dạng nano core - shell, trong đó phần lõi là các nguyên tử bạc (Ag^0), phần vỏ phủ là các chitosan hoặc lớp nano silica hay vàng, CMC, polymer,...[19].

Hiện nay, AgNPs được tổng hợp từ nhiều cách khác nhau như phương pháp quang, khử hoá học, điện hóa học, bay hơi - ngưng tụ, tổng hợp sinh học (phương pháp sử dụng vi khuẩn *Bacillus licheniformis* để khử các muối bạc thành AgNPs) [20]. Trong đó, khử hóa học là phương pháp được xem là đơn giản nhất để chế tạo AgNPs; mặt khác, sản phẩm nano thu được từ phương pháp này có tính ổn định cấu trúc cao do đó dễ dàng phân tán đều trong nước hay các dung môi hữu cơ [21].

1.3.2. Đặc tính kháng khuẩn của AgNPs

AgNPs được sử dụng rộng rãi như một chất kháng khuẩn và sử dụng để khử trùng mẫu cấy. Một số nghiên cứu [22-24] đã tóm tắt những phát hiện gần đây và đề xuất cơ chế tác động của AgNPs đối với vi khuẩn, nấm,... Khả năng kháng khuẩn của AgNPs phụ thuộc vào các yếu tố như hình dạng hạt, kích thước, hàm lượng bạc kim loại, quy trình tổng hợp và chất phủ của hạt nano [24].

Cơ chế hoạt động của AgNPs trên vi khuẩn vẫn chưa được biết đến, nhưng cơ chế tác động của AgNPs đã được chỉ ra là các thay đổi về cấu trúc và hình thái trong các tế bào vi khuẩn. AgNPs được chứng minh có hiệu quả kháng khuẩn hiệu quả hơn các muối bạc do diện tích bề mặt tiếp xúc rất lớn, cho phép gắn kết tốt hơn với vi sinh vật. AgNPs có kích thước nhỏ hơn 10 nm tương tác dễ dàng với vi khuẩn và tạo ra hiệu ứng điện tử và gia tăng hoạt tính của các hạt nano. Vì vậy, hiệu quả kháng khuẩn của AgNPs phụ thuộc vào kích thước của các hạt nano [25]. Các hạt nano gắn với màng tế bào và đi vào bên trong vi khuẩn. Vi khuẩn có màng tế bào bao gồm các protein chứa lưu huỳnh và các hạt nano tương tác với các protein trong các tế bào cũng như các hợp chất có chứa photpho như DNA. AgNPs tấn công vào chuỗi hô hấp, sự phân chia tế bào của tế bào vi khuẩn; sau đó, tế bào bị tổn thương và chết. Sau khi gắn

vào màng tế bào, AgNPs có thể xâm nhập vào tế bào vi khuẩn, giải phóng các ion bạc và tăng cường hoạt động diệt khuẩn [25-28].

Các hạt nano có hình dạng hạt khác nhau cũng ảnh hưởng tới hiệu quả kháng khuẩn thông qua ức chế sự sinh trưởng của vi khuẩn [25]. Ngoài ra, kết hợp AgNPs với thuốc kháng sinh sẽ có những ảnh hưởng khác nhau đến vi sinh vật [27]. Các hoạt tính kháng khuẩn của kháng sinh (*Amoxicillin*, *Clindamycin*, *Erythromycin*, *Penicillin*, *Vancomycin*,...) tăng lên khi bổ sung thêm AgNPs. Shrivastava và cộng sự (2007) nghiên cứu tổng hợp AgNPs có kích thước từ 10 đến 15 nm và tác động phụ thuộc liều lượng lên các vi sinh vật gram âm và gram dương [28]. Các tác giả cho thấy rằng, với một lượng AgNPs nhất định hoạt động ức chế các vi khuẩn gram âm là cao hơn so với vi khuẩn gram dương. Hoạt tính kháng khuẩn của AgNPs lên thực vi khuẩn cho thấy cả hai loại ion bạc và AgNPs đều ảnh hưởng lên sự hình thành cũng như phát triển của bào tử. Tuy nhiên, AgNPs có hiệu quả cao hơn, nó gia tăng sự tiếp xúc trực tiếp của bạc và hạn chế khả năng tồn tại của bào tử [29]. Ngoài ra, 100 mg/L AgNPs cho hiệu quả khử trùng mẫu cây thông qua ức chế vi khuẩn và phenol cao hơn so các nồng độ khác trong giai đoạn khử trùng của cây Hoa hồng [30].

1.3.3. Ảnh hưởng của AgNPs lên sự sinh trưởng thực vật

AgNPs ảnh hưởng lên sự sinh trưởng của thực vật thông qua các mức độ khác nhau (sinh trưởng, sinh lý, sinh hóa,...) có thể theo hướng tiêu cực hay tích cực tùy theo loài thực vật và đặc điểm của AgNPs (loại, kích thước, cấu trúc,...). AgNPs ở các kích thước khác nhau (1 - 20 nm) và nồng độ khác nhau (1 - 100 mg/L) có tác động không giống nhau lên khả năng nảy mầm của một số cây trồng [31]. Các kết quả khác gần đây cũng ghi nhận được cho thấy rằng AgNPs với kích thước khác nhau có ảnh hưởng đến nhiều loài thực vật. AgNPs có kích thước nhỏ hơn 5 nm ức chế sự nảy mầm hạt Lúa mạch (*Secale cereale*); trong khi đó, AgNPs (5 - 10 nm) có tác dụng ít hơn AgNPs ở nồng độ thấp; tuy nhiên, AgNPs (> 20 nm) sẽ ức chế khả năng nảy mầm cây Lúa mạch. Ngoài ra, sự nảy mầm của hạt Lanh (*Linum usitatissimum*) không bị tác động bởi kích thước và nồng độ của AgNPs.

AgNPs cho thấy có độc tính lên sự nảy mầm của hạt Dưa leo (*Cucumis sativus*), không tác động lên sự nảy mầm của hạt cây Rau diếp (*Lactuca sativa*), nhưng lại cho thấy kích thích nảy mầm của hạt cây Nhũ hương (*Boswellia ovalifoliolata*), một loài thảo dược quý hiếm đang có nguy cơ tuyệt chủng, lên đến 90% so với không bổ sung AgNPs (70%) [32].

Trên Đậu tây (*Phaseolus vulgaris*) và Ngô (*Zea mays*), nồng độ của AgNPs thấp hơn từ 20 đến 60 mg/L có ảnh hưởng tích cực đến sự sinh trưởng của cây con nuôi cấy *in vitro* như chiều cao cây, chiều dài rễ, diện tích lá, chlorophyll, carbohydrate, protein,...; ngược lại, nồng độ cao hơn (80 và 100 mg/L) của AgNPs cho thấy ức chế sự sinh trưởng của cây [33]. Ngoài ra, AgNPs cũng có hiệu quả kháng khuẩn cao, do đó có hiệu quả kiểm soát và ngăn ngừa các bệnh gây hại đến cây trồng [34]. Quá trình lão hoá như vàng và rụng lá, tích lũy ethylene, hoá nâu,... thường được gây ra bởi stress oxy hóa gốc oxy tự do (ROS) và AgNPs được biết đến có thể làm chậm quá trình này. Ngoài ra, AgNPs còn làm gia tăng khả năng hấp thụ ánh sáng của thực vật qua lá. Khi bổ sung AgNPs, cây trồng không những kháng vi sinh vật mà còn hấp thụ ánh sáng với bước sóng khoảng từ 390 đến 420 nm; điều này dẫn đến gia tăng hiệu quả quang hợp [35].

Ngoài ra, AgNPs cho thấy khả năng kích thích tăng trưởng, ra hoa, ngăn chặn sự già hóa, rụng lá và các cơ quan sinh sản, tăng năng suất cây trồng của nhiều loài thực vật như Mù tạt Ấn Độ (*Brassica juncea*) [35], Lúa mì (*Triticum sp.*) [36], Đậu xanh (*Vigna radiata*) [37]. Ngâm hạt Bông (*Gossypium sp.*) trong AgNPs, cây sinh trưởng tốt và có thể giảm lượng phân bón cho đất đi một nửa [38]. Ảnh hưởng của AgNPs và bạc nitrate lên sự rụng quả và năng suất hạt trong cây Lưu ly (*Myosotis sp.*) trên đồng ruộng cũng đã được nghiên cứu [39]. Các kết quả tương tự cũng được chỉ ra bởi Pokhrel và Dubey (2013) trên cây Ngô (*Zea mays*) và cây Bắp cải (*Brassica oleracea*) [40]. Tuy nhiên, các đánh giá về nồng độ, phương thức bổ sung và thời gian xử lý của AgNPs để xác định sự sinh trưởng, phát triển và năng suất của cây trồng theo hướng thân thiện với môi trường và hệ sinh thái vẫn chưa có nhiều nghiên cứu.

1.3.4. Hấp thụ, vận chuyển và chuyển hóa AgNPs trên thực vật

Việc hấp thụ và phân bố của AgNPs trong cây đã được khảo sát ở Mù tạt Ấn Độ (*Brassica juncea*) và cây cỏ Linh lăng (*Medicago sativa*). Trái ngược với Mù tạt, cỏ

Linh lăng cho thấy hiệu quả hấp thu AgNPs tốt hơn [41]. Trong một nghiên cứu khác, AgNPs dường như không tích tụ bạc ở bất kỳ hình thức nào trong cây Mù tạt Ấn Độ [42]. Sự hấp thụ thông qua lớp biểu bì, lông hút và vận chuyển bạc vào trong các mô mạch của rau xà lách đã được chứng minh khi phun các AgNPs với đường kính hạt là 38,6 nm. Các con đường vận chuyển dường như bao gồm cả vận chuyển qua khoảng gian bào và qua tế bào chất. Các chuyển hóa trong thực vật bao gồm sự hòa tan hạt nano, sự chuyển đổi Ag^+ trong AgNPs, và sự kết hợp các ion Ag^+ với các nhóm thiol [43].

1.3.5. AgNPs trong nghiên cứu vi nhân giống thực vật

Trong vòng 2 thập kỉ vừa qua, vật liệu nano đã được sử dụng nhiều hơn trong nghiên cứu nuôi cấy mô với vai trò như một vật liệu mới; điển hình như AgNPs - một nano kim loại đã được sử dụng trên nhiều đối tượng cây trồng khác nhau. Tuy nhiên, hầu hết các công bố trước đây là tập trung vào ứng dụng AgNPs trong khử trùng mẫu cấy và tạo nguồn mẫu nuôi cấy mô; do đó, việc đưa ra những tiềm năng ứng dụng rộng hơn của AgNPs lên hiệu quả vi nhân giống cần được nghiên cứu nhiều hơn.

El-Kosary và cộng sự (2020) đã báo cáo rằng AgNPs có thể là chất khử trùng thay thế cho các chất khử trùng khác để khử trùng mẫu cấy và có tác động tích cực trong việc hạn chế các nguồn lây nhiễm khác nhau mà không gây ra các tổn thương cho mẫu cấy [44]. Ngoài ra, cơ chế kháng khuẩn của AgNPs là do sự bám dính, sau đó xâm nhập vào bên trong và phá hủy cầu nối disulfua của màng tế bào vi khuẩn, tiếp đó, các ion bạc sẽ tiếp tục xâm nhập vào nhân phá hủy liên kết nội phân tử DNA của vi khuẩn [45].

Abdi (2012) đã tiến hành khử trùng bề mặt và khử trùng nguồn nhiễm nội sinh (*Xanthomonas* sp.) của mẫu đốt thân cây hoa Nữ lang (*Valeriana officinalis*), cho thấy rằng các mẫu cấy khử trùng với 100 $\mu\text{g/ml}$ AgNPs trong 180 phút có khả năng ức chế khuẩn nội sinh và ngoại sinh của mẫu cấy mà không có bất kỳ tác động bất lợi nào lên sự sinh trưởng của cây con ở giai đoạn tiếp theo [10]. Hiệu quả kháng nấm và khuẩn trong giai đoạn khử trùng cũng đã được chứng minh trên cây *Araucaria excelsa*; tuy nhiên, môi trường nuôi cấy mô được bổ sung trực tiếp AgNPs vào sẽ ức chế sự gây nhiễm của các vi khuẩn nội sinh [46].

Bên cạnh đó, AgNPs còn được xem như một chất kích kháng giúp kích thích gia tăng sự sản sinh các chất có hoạt tính sinh học của thực vật. Điển hình như kích thích tổng hợp paclitaxel trên cây Thông đỏ (*Taxus wallichiana*) [47], tanshinone của cây Đan sâm (*Salvia miltiorhiza*) [48], phenol của cây rau Đắng biển (*Bacopa monnieri*) [49], artemisinin của cây Thanh hao (*Artemisia annua*) [50],... Tuy nhiên, các sản phẩm thu nhận được có chứa dư lượng AgNPs; do đó, những nghiên cứu về ảnh hưởng của dư lượng này lên chất lượng sản phẩm và sức khỏe của con người cần được nghiên cứu thêm.

AgNPs còn được biết đến như một chất kích thích sinh trưởng và ngăn chặn sự lão hóa của thực vật *in vitro*. Sarmast và cộng sự (2012) đã cho rằng AgNPs có tác động tích cực trong vi nhân giống cây Tùng bách tán (*Araucaria heterophylla*), cây sinh trưởng tốt với sự duy trì màu xanh lá đậm hơn so với nghiệm thức không bổ sung AgNPs, các chỉ tiêu sinh trưởng khác cũng gia tăng đáng kể so với đối chứng. Một số kết quả tương đồng cũng được ghi nhận trên cây Chùm ớt (*Pyrostegia venusta*) [46], cây hoa Hồng (*Rosa* sp.) [51]; hơn nữa, AgNPs đã được xác định có hiệu quả cao trong việc ức chế ethylene, từ đó giảm hiện tượng rụng lá và nâng cao hiệu quả vi nhân giống [46].

Ngoài ra, AgNPs có thể hạn chế sự tích lũy của ethylene tương tự như AgNO_3 theo hai con đường đó là (1) ion bạc đi vào tế bào thực vật và tham gia thay thế cho thụ thể sinh tổng hợp ethylene đó là ion đồng; (2) ion bạc sẽ phản ứng trực tiếp với khí ethylene được tạo ra trong bình nuôi cấy như một phản ứng hóa học bình thường [52] từ đó giúp điều chỉnh hàm lượng ethylene có trong bình hoặc túi nuôi cấy tùy thuộc vào nồng độ của AgNPs được sử dụng. Ngoài ra, AgNPs còn được chứng minh như chất ức chế sự tổng hợp ethylene bằng cách ức chế hoạt động của S-adenosyl-L-methionine - SAM (là tiền chất sinh tổng hợp ethylene) dẫn đến SAM được chuyển hóa thành các polyamine nhiều hơn trong thực vật (không theo con đường sinh tổng hợp ethylene) [53].

Đặc tính kháng nấm của AgNPs cũng được một số nhà nghiên cứu trong nước quan tâm. Hiệu quả kháng nấm *Phytophthora capsici* của chế phẩm keo AgNPs có kích thước hạt khác nhau, khả năng kháng nấm của chế phẩm gia tăng khi kích thước hạt nano giảm [54]. Lê Thanh Sơn và Nguyễn Đình Cường (2014) đã đánh giá khả năng diệt vi khuẩn trong không khí của các tấm lọc phủ AgNPs, màng phủ AgNPs có thể kháng vi khuẩn sau 1 ngày tiếp xúc và màng polypropylene là phù hợp nhất [55]. Ngoài ra, các sản phẩm từ tự nhiên thay thế cho các loại hóa chất được ưu tiên sử dụng như phức hệ nanochitosan - tinh dầu nghệ và AgNPs có hoạt tính đối kháng vi khuẩn gram âm và gram dương đã được sử dụng để bảo quản quả tươi sau thu hoạch. Nanochitosan, nanochitosan - tinh dầu nghệ và phức hợp nanochitosan - AgNPs - tinh dầu nghệ có hoạt tính ức chế sinh trưởng của 2 chủng vi khuẩn (*Bacillus cereus* và *Listonella damsela*) và có khả năng diệt khuẩn [56].

Cho đến nay, sử dụng AgNPs làm tác nhân khử trùng mẫu cấy hay bổ sung vào môi trường nuôi cấy mô nhằm đánh giá khả năng sinh trưởng trên các đối tượng cây trồng, hiện tượng bất thường (thủy tinh thể, vàng và rụng lá,...) trong nuôi cấy mô, sản xuất cây giống với số lượng lớn,... đã có một số thành công nhất định (Bảng 1.3). Trong giai đoạn khử trùng mẫu cấy, AgNPs là tác nhân khử trùng mẫu lá cây Dâu tây, Sâm Ngọc Linh, Đồng tiền, Hồng môn, Tử linh lan, Chanh dây vàng và tím [57-60, 62, 63], mẫu đế hoa cây Đồng tiền [59], mẫu nhánh rong Bắp sú [61]. AgNPs được đánh giá có hiệu quả khử trùng tương tự hoặc cao hơn so với $HgCl_2$ hay $Ca(ClO)_2$. Bên cạnh đó, mẫu cấy cho khả năng phát sinh hình thái hiệu quả hơn. Mặt khác, AgNPs bổ sung vào môi trường nuôi cấy mô trên nhiều đối tượng cây trồng khác nhau nhằm gia tăng sinh khối tế bào đơn cây Salem [64], tái sinh chồi cây Dâu tây và hoa Hồng [51, 57], cảm ứng tạo phôi cây Sâm Ngọc Linh [58], tạo cây hoàn chỉnh và thích nghi của cây Cúc, Dâu tây, Đồng tiền và Hồng môn [57, 60, 65]. Bên cạnh đó, AgNPs còn kích thích sự hình thành rễ thứ cấp của cây Sâm Ngọc Linh [66], sản xuất cây giống cây Dâu tây [67], hạn chế hiện tượng bất thường trong nuôi cấy mô cây hoa Hồng [68], cây Đồng tiền [69], giảm sự tích lũy khí ethylene và hoạt độ của các enzyme thủy phân cây hoa Hồng [68], hay bổ sung AgNPs vào môi trường vi thủy canh cây Cúc nhằm hạn chế sự sinh trưởng của nấm và vi khuẩn [70, 71]. Tuy nhiên

cần tiến hành các nghiên cứu chuyên sâu và quy mô rộng hơn để đánh giá hiệu quả tác động của AgNPs lên sinh lý mẫu cây thực vật.

Bảng 1.3. Nghiên cứu của AgNPs trong vi nhân giống thực vật ở Việt Nam.

TT	Nội dung nghiên cứu	Loài / đối tượng	Nguồn mẫu	Nồng độ AgNPs (mg/L)	Nguồn
1	Khử trùng mẫu cây	Dâu tây	Lá	200	[57]
		Sâm Ngọc Linh		200	[58]
		Đồng tiền	Lá, đế hoa	200	[59]
		Hồng môn	Lá	100 - 200	[60]
		Rong bắp sù	Nhánh rong		[61]
		Tử linh lan	Lá	500	[62]
		Chanh dây tím và vàng		100	[63]
2	Tế bào đơn	Salem	Mô sẹo	200	[64]
3	Tái sinh chồi	Dâu Tây	Lá	0,2	[57]
		Hoa Hồng	Chồi	2	[51]
4	Cảm ứng tạo phôi	Sâm Ngọc Linh	Mô sẹo	1,6	[58]
5	Tạo cây hoàn chỉnh và sinh trưởng tiếp theo	Dâu tây	Chồi	0,5	[57]
		Cúc Dâu tây		5 - 10	[65]

		Đồng tiền			
		Hồng môn		7	[60]
		Sâm Ngọc Linh	Phôi	1,2	[58]
6	Rễ thứ cấp	Sâm Ngọc Linh	Rễ bất định	1 - 3	[66]
7	Sản xuất cây giống	Dâu tây	Chồi	0,5	[67]
8	Khắc phục hiện tượng bất thường trong nuôi cấy <i>in vitro</i>	Hoa hồng	Chồi	3	[68]
		Đồng tiền	Chồi	5	[69]
9	Ethylene và enzyme thủy phân	Hoa hồng	Chồi	3	[68]
10	Hệ thống nuôi cấy	Vi thủy canh Thủy canh <i>in vitro</i> Bán rắn	Chồi	7,5	[70], [71]

1.4. Nano đồng và ứng dụng

1.4.1. Ảnh hưởng của đồng lên sinh trưởng thực vật

Trong lục lạp, đồng (Cu) chiếm khoảng 50% và được liên kết với plasto-cyanin ở chuỗi truyền điện tử của quang hệ thống I và II. Nồng độ của plasto-cyanin sẽ giảm nếu không có sự có mặt của ion Cu. Ngoài ra, lục lạp thiếu 2 protein điều hoà hoạt động của plastoquinone (tổng hợp chúng cần có enzyme laccase là enzyme chứa ion Cu). Vì vậy, thiếu Cu sẽ dẫn đến giảm hiệu quả của quá trình quang hợp [72, 73].

Enzyme superoxide dismutaza (Cu-Zn.SOD) chứa ion Cu và ion kẽm (Zn) có thể điều chỉnh anion superoxide O_2^- trong quá trình quang hô hấp. Do đó ion Cu có chức năng bảo vệ mạnh mẽ trước các tác nhân oxy hóa có hại cho cây. Các enzyme SOD chứa Cu - Zn được phát hiện ở stroma. Trong mẫu lá, SOD có hàm lượng khoảng 90% ở lục lạp và khoảng 5% tập trung ở ti thể. Ngoài ra, thiếu ion Cu sẽ dẫn đến sự thay đổi cấu trúc lục lạp. Mặt khác, ion Cu có vai trò trong chuỗi truyền và vận chuyển điện tử của ti thể. Bên cạnh đó, ion Cu ảnh hưởng đến sự tổng hợp chlorophyll, trong khi sự dư thừa hoặc thiếu hụt ion Cu sẽ ảnh hưởng đến bộ máy quang hợp, điều này dẫn đến chlorophyll bị tác động bởi ion Cu và tùy từng loài thực vật khác nhau.

Cho đến nay đã có những nghiên cứu về ảnh hưởng tiêu cực của CuNPs đối với cây trồng như ức chế sự nảy mầm của hạt, giảm chiều cao chồi và chiều dài rễ, giảm tốc độ quang hợp và hô hấp, thay đổi về hình thái cũng như enzyme [74]. Rajput và cộng sự (2018) đã tổng hợp các nghiên cứu của nhiều nhóm tác giả về ảnh hưởng tiêu cực của CuNPs đến khả năng nảy mầm của hạt và sự sinh trưởng của nhiều loại cây trồng khác nhau như Bí xanh, Cà chua, Cà rốt, Cỏ linh lăng, Củ cải, Dưa chuột, Đậu gà, Đậu xanh, Đậu tây, Đậu tương, Hành tây, Khoai lang, Lúa, Lúa mạch, Lúa mì, Mù tạt, Ngô, Ngô, Rau diếp, Rau bó xôi,... Sự sinh trưởng của cây trồng bị giảm do sự thiếu hụt hay dư thừa ion Cu.

1.4.2. Nano đồng trong vi nhân giống thực vật

Mặc dù muối đồng sulphate có trong môi trường nuôi cấy mô thực vật như một chất khoáng vi lượng nhưng ion Cu chỉ chiếm 1 tỉ trọng rất nhỏ (ví dụ nồng độ 0,1 μM trong môi trường nuôi cấy MS và chỉ bằng 1/1000 lần so với ion sắt). Nên hiệu quả của ion Cu và nano đồng (CuNPs) trong nuôi cấy mô thực vật là chưa thật sự rõ ràng. Một số nghiên cứu cho thấy CuNPs kích thích sự sinh trưởng của cây Rau diếp [75]. Trong một nghiên cứu khác, Lee và cộng sự (2008) cho rằng CuNPs làm gia tăng sinh trưởng ở cây Đậu và Lúa mì; cây Đậu có sự nhạy cảm nhiều hơn so với cây Lúa mì trong xử lý với CuNPs [76].

Có rất ít thông tin về tác dụng tích cực của CuNPs đối với thực vật. Tuy nhiên, một số kết quả đầy hứa hẹn về việc sử dụng CuNPs đã được báo cáo trên một số cây trồng như Húng tây [77-78], cây Bạc hà [79], cây Lúa [80]. Tuy nhiên, những nghiên

cứu về CuNPs trong nuôi cấy mô thực vật nói chung và đặc biệt trong khử trùng mẫu cấy và cảm ứng của mẫu cấy vẫn còn chưa có nhiều công bố.

1.5. Hiện tượng bất thường trong vi nhân giống

Nuôi cấy mô có nhiều thuận lợi trong nhân giống các cây trồng khác nhau như cây hoa, cây rau, cây thân gỗ, cây dược liệu,...; tuy nhiên, phương pháp này vẫn còn tồn tại một số nhược điểm chưa khắc phục được như cây bị dị dạng, thoái hóa, các hiện tượng bất thường như (nhiễm nấm - khuẩn, thủy tinh thể, vàng và rụng lá, hóa nâu,...). Nguyên nhân của các hiện tượng này có thể là do mẫu cấy được nuôi cấy trong bình/túi nuôi cấy được đậy kín có độ ẩm cao (> 95%); ngoài ra, mẫu cấy sinh trưởng trong điều kiện vô trùng sẽ ảnh hưởng đến các giai đoạn tiếp theo của cây con khi chuyển sang giai đoạn thích nghi ở vườn ươm hay đồng ruộng [1].

1.5.1. Hiện tượng thủy tinh thể

Hiện tượng này có thể được mô tả bằng nhiều thuật ngữ khác nhau như sự mọng nước, dư thừa nước quá mức, mẫu cấy sáng như thủy tinh [81]. Nguyên nhân của hiện tượng này có thể là do sự hóa gỗ kém của mẫu cấy và nó có thể gây ra sự thay đổi của lớp lông sừng và mô biểu bì. Ngoài ra, hiện tượng này có thể làm thay đổi hướng phát triển của các sợi cellulose (nằm trên vách của tế bào) dẫn đến ảnh hưởng tới khả năng đóng hoặc mở của khí khổng [82].

1.5.2. Sự tích lũy khí ethylene

Sự sinh trưởng của thực vật bao gồm sự nảy mầm, phát sinh hình thái, tái sinh chồi và ra rễ, vàng và rụng lá, ra hoa,... và có sự sản sinh ra khí ethylene. Bên cạnh đó, các stress như lũ lụt, hạn hán, mầm bệnh, mặn,... được gây ra bởi các phản ứng trung gian của ethylene [83]. Ethylene ở thực vật được sinh tổng hợp thông qua con đường sinh hóa bao gồm 2 bước: (1) S-adenosyl-L-methionine (SAM) được biến đổi thành axit 1-aminocyclopropane-1-carboxylic (ACC) với tác nhân xúc tác là enzyme ACC synthase (ACS); (2) ACC biến đổi thành ethylene (enzyme ACC oxidase - ACO là tác nhân xúc tác) [83].

1.5.3. Hiện tượng rụng cơ quan

Hiện tượng rụng cơ quan (lá, hoa, quả,...) là hiện tượng mà các cơ quan của cây bị tách rời ra khỏi cơ thể của chúng [84]. Trong nuôi cấy mô, lá vàng và rụng khỏi cơ quan của thực vật có thể là do tác động bởi sự bổ sung auxin ngoại sinh và sự tích lũy của khí ethylene (mẫu cấy được nuôi cấy trong bình được đậy kín có độ ẩm cao và sinh trưởng trong điều kiện dị dưỡng) [85]. Ngoài ra, mô cấy được nuôi cấy ở độ ẩm cao sẽ bị ảnh hưởng bởi khí ethylene và có thể là do auxin ngoại sinh bổ sung từ môi trường nuôi cấy hay nội sinh từ mẫu cấy có khả năng kích thích sự vàng và rụng lá [51].

1.5.4. Hiện tượng hóa nâu

Hiện tượng hóa nâu được ghi nhận bao gồm hóa nâu mẫu cấy và đôi khi là môi trường nuôi cấy mô cũng được xuất hiện trong vi nhân giống thực vật. Hiện tượng này là hiện tượng mà mẫu cấy chuyển sang màu nâu, nâu đen hoặc đen dẫn đến mẫu bị tổn thương hoặc hoại tử. Nguyên nhân có thể là do phenol được tổng hợp trong suốt quá trình sinh trưởng của mô cấy và gây ra stress oxy hóa, làm cho mô cấy hoặc môi trường nuôi cấy hóa nâu. Hiện tượng hóa nâu có thể phụ thuộc kiểu gen, sinh lý của mẫu cấy, điều kiện nuôi cấy,...[68, 69].

1.5.5. Stress oxy hóa

Stress oxy hóa là hiện tượng do tác động của điều kiện nuôi cấy như thành phần môi trường, ánh sáng, độ ẩm, ethylene,...dẫn đến thay đổi hàm lượng của các gốc oxy phản ứng (ROS) [86]. Để hạn chế những tổn thương do stress oxy hóa gây ra, hàm lượng ROS sẽ được thực vật điều chỉnh và kiểm soát một cách phù hợp với việc gia tăng hoạt động của các enzyme chống oxy hóa như superoxide disutase (SOD), catalase (CAT) và ascorbate peroxidase (APX) [86].

1.6. Tổng quan về các đối tượng nghiên cứu

1.6.1. Cây hoa Cúc

Cây hoa Cúc (*Chrysanthemum morifolium*) là cây trồng quan trọng và có lịch sử lâu đời trên thế giới. Cây hoa Cúc được phát hiện ở các nước châu Á (Nhật Bản, Trung Quốc,...) và đây là loại hoa trồng chậu và cắt cành được ưa chuộng ở rất nhiều nước trên thế giới vì chúng có sự đa dạng về màu sắc (trắng, đỏ, xanh, vàng,...), dễ trồng và chăm sóc, kiểm soát nở hoa theo thời gian và hoa của chúng có thể bảo quản vài tháng. Do đó, cây hoa Cúc là một trong những cây hoa cắt cành hay trồng chậu phổ biến trên thế giới, chỉ đứng thứ hai về giá trị thương phẩm sau cây hoa Hồng; do đó, cây hoa Cúc được trồng ở hầu hết các nơi trên thế giới. Ngoài ra, giá trị thương mại được ước tính khoảng 150 triệu đôla Mỹ [87].

Ngoài ra, cây hoa Cúc dễ dàng chăm sóc, có thể chống chịu được các điều kiện bất lợi như lạnh hay nóng và có thể sử dụng làm cảnh quan, khuôn viên,... Hiện nay, cây hoa Cúc có thể được trồng ở các cánh đồng lớn, trồng trong nhà kính, trồng trong các chậu có kích thước khác nhau lấy hoa để trang trí. Do đó, các nghiên cứu nhằm gia tăng sản lượng hay chất lượng của chúng được khảo sát nhằm làm cho hoa đa dạng (màu sắc, hình dạng, kích thước), tăng khả năng kháng bệnh của cây con, thích nghi và sinh trưởng tốt với các vùng sinh thái khác nhau để gia tăng giá trị kinh tế cho người nông dân và các doanh nghiệp. Ở Việt Nam, cây hoa Cúc tươi hoặc được phơi khô (chủ yếu là cánh hoa) được sử dụng để pha trà hoặc nấu nước uống. Ngoài ra, cây hoa Cúc được sử dụng như là một vị thuốc đông y có thể chữa được một số bệnh như đau đầu, ho, cảm cúm, nghẹt mũi, sơ phong tiết nhiệt, kháng viêm, gia tăng hệ miễn dịch,...

Lâm Đồng là một trong những tỉnh thành có diện tích trồng cây hoa Cúc lớn nhất cả nước. Những năm 2010, Lâm Đồng mới có sản lượng cây hoa Cúc khoảng 1 tỷ cành và tăng lên khoảng hơn 2 tỷ cành vào năm 2018. Cây hoa Cúc trồng tại Lâm Đồng được tiêu thụ chủ yếu là trong nước (khoảng 90%), được cung cấp cho hầu hết các tỉnh/thành trong cả nước. Ngoài ra, cây hoa Cúc đã được xuất khẩu sang một số nước trên thế giới như Nhật Bản (khoảng 60%), Úc (khoảng 3%), Trung Quốc (khoảng 2%) và một số nước ở châu Âu, châu Á,...với số lượng nhỏ. Tuy nhiên, cây hoa Cúc được xuất khẩu chủ yếu bởi các công ty có vốn đầu tư nước ngoài của Nhật

Bản, Hà Lan,...hoặc một số công ty trong nước (Dalat Hasfarm, Innova, Bonnie Farm,...). Trong đó, công ty Dalat Hasfarm xuất khẩu cây hoa Cúc chiếm phần lớn tổng sản lượng hoa cắt cành xuất khẩu của tỉnh Lâm Đồng. Ngoài ra, khoảng 180 triệu cành, giá trị khoảng 22 triệu đôla Mỹ (2010); xuất khẩu khoảng 215 triệu cành đạt giá trị khoảng 29 triệu đôla (2014); xuất khẩu khoảng 250 triệu cành và giá trị ước tính khoảng 57 triệu đôla (2022) của tỉnh Lâm Đồng [88]. Bên cạnh đó, diện tích gieo trồng cây hoa Hồng nhiều nhất (khoảng 30% vào năm 1997). Ngoài ra, diện tích trồng cây Cúc khoảng 40% (với diện tích khoảng 2.500 ha năm 2021) và cao hơn cây hoa Hồng (khoảng 30%).

Gần đây, tác động của AgNPs trong nuôi cấy mô của cây hoa Cúc đã được nghiên cứu như đánh giá sự sinh trưởng và phát triển của cây [65], AgNPs trong môi trường vi thủy canh [70, 71] hạn chế nhiễm vi sinh vật và gia tăng sinh trưởng của cây Cúc. Tuy nhiên, các nghiên cứu về việc bổ sung AgNPs vào môi trường nuôi cấy hay khử trùng mẫu cấy *ex vitro* cũng như đánh giá sự sinh trưởng tiếp theo, các chỉ tiêu sinh lý hay sinh hóa cần được nghiên cứu.

1.6.2. Cây Thu hải đường

Cây Thu hải đường thuộc họ Begoniaceae được phân bố rộng khắp trên thế giới từ vùng cận nhiệt đới và nhiệt đới ở châu Mỹ cho đến châu Phi và châu Á, với hơn 2.000 loài được ghi nhận [89]. Thu hải đường là một loài hoa có lá và hoa rất đẹp, chúng được trồng lần đầu tiên ở nước Anh vào năm 1777. Đây là loài cây thân thảo, mọng nước, lá có phiến lệch rất rõ ở phần gốc, có lá kèm sớm rụng và mọc cách. Cụm hoa sim hai ngã, cuống hoa dài, hoa đơn tính. Cho đến nay, có rất nhiều loài mới hình thành tạo nên sự phong phú về màu sắc (đỏ, trắng, vàng, cam, hồng,...) nên hoa Thu hải đường rất được ưa thích để trồng làm cảnh. Ngoài ra, chúng còn được biết tới như một nguồn thực phẩm và dược phẩm có giá trị [89].

Thu hải đường thích hợp với điều kiện có bóng râm. Nếu ánh sáng với cường độ cao, cây sẽ bị bỏng lá và sinh trưởng chậm. Nhiệt độ thích hợp từ 18 đến 21°C, độ ẩm là 60 - 70%, riêng giai đoạn cây con độ ẩm thích hợp là 90 - 95% [89]. Hoa Thu hải đường được sử dụng làm hoa trang trí trong gia đình, hoa trồng trong chậu và giỏ treo phổ biến ở Mỹ với tổng giá trị ghi nhận khoảng 60 triệu đôla Mỹ [90]. Ở Việt

Nam, Thu hải đường được canh tác chủ yếu ở Lâm Đồng và một số vùng trồng hoa nhằm cung cấp hoa trồng chậu cũng như hoa trang trí. Hiện nay, Công ty Dalat Hasfarm dành khoảng 5 - 10 ha trong tổng diện tích canh tác hoa khoảng 50 ha để trồng loài hoa này với nhiều màu sắc khác nhau. Bên cạnh đó, khoảng $\frac{3}{4}$ sản lượng hoa Thu hải đường của công ty được xuất khẩu đi các nước trên thế giới như Hàn Quốc, Nhật Bản, Thái Lan, Đài Loan,...

Với nhu cầu cung cấp hoa chậu cây Thu hải đường ngày càng mở rộng, các nghiên cứu để gia tăng chất lượng cây con cung cấp cho ngành sản xuất hoa chậu thương mại cũng được chú ý [91]; xây dựng quy trình nuôi cấy mô cây Thu hải đường [92]; nghiên cứu các loại mẫu và chất điều hòa sinh trưởng thực vật lên sự sinh trưởng của cây *Begonia rex* [93].

Bên cạnh đó, đây cũng là loại cây đã được chọn là vật liệu cho nhiều nghiên cứu sinh lý - sinh hóa thực vật trong điều kiện nuôi cấy mô [94-96]. Tuy nhiên, vai trò của nano kim loại như AgNPs và CuNPs trong khử trùng mẫu cấy *ex vitro*, cảm ứng tạo phôi và chỉ tiêu sinh lý hay sinh hóa, thích nghi và ra hoa vẫn chưa được nghiên cứu.

1.6.3. Cây Tử linh lan

Cây Tử linh lan (*Saintpaulia ionantha*) thuộc chi *Saintpaulia* (12 loài), một loài hoa nhỏ được phát hiện ở các rừng mưa ở một số nước như Kenya, Tanzania,... Cây Tử linh lan có nhiều màu sắc khác nhau (đỏ, trắng, tím, xanh, hồng,...), lá dày và nhiều lông. Cây Tử linh lan nở hoa quanh năm nếu có điều kiện khí hậu phù hợp nên chúng được trồng phổ biến làm hoa chậu trang trí trong các công ty, cơ quan hay nhà ở [97].

Cây Tử linh lan thích hợp với nhiệt độ phòng, không nên để cây ở ngoài trời dưới nhiệt độ cao. Chúng ra hoa rất đẹp và có thể điều chỉnh sự ra hoa bằng cách tia chồi. Ngoài ra, cây hoa này không thể sống trong điều kiện lạnh ẩm, cho nên không để chậu hoa ngâm nước và tránh làm ướt lá dẫn tới bị thối hoa và lá. Tuy nhiên, nên tưới toàn bộ cây bằng nước ấm mỗi tháng một lần, hạn chế làm phần đỉnh cây quá ẩm và phải để lá khô hoàn toàn trước khi đưa ra ánh sáng [97].

Với nhiều màu sắc khác nhau và hoa rất đẹp nên chúng được trồng ở rất nhiều nơi trên khắp thế giới. Chúng có thể sinh trưởng và phát triển từ sự nảy mầm của hạt giống hoặc giâm cành với khoảng hơn 1.000 giống khác nhau được ghi nhận. Đây là loài hoa có màu sắc phong phú, hoa có thể có cánh đơn hoặc cánh kép và có thể nở hoa dưới bất cứ loại ánh sáng nào (ánh sáng tự nhiên hay đèn huỳnh quang) hay có thể trồng hoa trong phòng lạnh. Cây hoa Tử linh lan mang lại doanh thu ước tính trên 220 triệu đôla Mỹ mỗi năm và được xếp trong nhóm các loài hoa như: Hồng, Cúc, Đồng tiền, Trạng nguyên,... Ở một số nước châu Âu, hoa Tử linh lan có trên 1.000 loài với hơn 1.500 màu sắc khác nhau.

Vi nhân giống đã thành công trên cây hoa Tử linh lan như phát sinh hình thái [97]; cảm ứng mô sẹo và tái sinh chồi [98]. Tái sinh chồi từ mẫu lá hay cuống lá của cây hoa Tử linh lan dưới đèn huỳnh quang cũng đã được nghiên cứu [99]. Tuy nhiên, hiệu quả nhân chồi với các chỉ tiêu như số chồi/mẫu (5 - 8 chồi: kích thước của các chồi thường nhỏ hơn 1 cm và không đều) sau 4 tuần nuôi cấy [99]. Gần đây, vai trò của các loại ánh sáng khác nhau trong cải thiện chất lượng chồi cũng được ghi nhận [100].

Hiện nay, nano kim loại sử dụng trong vi nhân giống cây Tử linh lan còn rất hạn chế. Trong đó, Dương Tấn Nhựt và cộng sự (2018) mới chỉ dừng lại nghiên cứu ảnh hưởng của AgNPs lên khử trùng mẫu cấy và so sánh với các chất khử trùng như $HgCl_2$ [62]; do đó, ảnh hưởng của AgNPs lên sự phát sinh hình thái, sinh trưởng và một số chỉ tiêu sinh lý hay sinh hóa của cây Tử linh lan là cần thiết.

CHƯƠNG 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

2.1.1. Vật liệu thực vật

Cây Cúc (*Chrysanthemum morifolium*) 4 tuần tuổi và cây Thu hải đường (*Begonia tuberosus*) 8 tuần tuổi thu nhận tại vườn ươm và cây Tử linh lan (*Saintpaulia ionantha*) 8 tuần tuổi *in vitro* tại Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên (Lâm Đồng, Việt Nam) với các bộ phận khác nhau được sử dụng làm vật liệu ban đầu cho các thí nghiệm. Tùy theo mục đích thí nghiệm, vật liệu ban đầu được sử dụng là khác nhau.

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 [101]; trong khi đó, dung dịch CuNPs có kích thước hạt từ 20 đến 60 nm [102].

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 [103] 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 (Công ty đường TTC, Đồng Nai, Việt Nam) và 8 g/L agar (Công ty Vietxoco, Hồ Chí Minh, Việt Nam). 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

Máy cất nước, cân điện tử 2 và 3 chữ số thập phân, nồi hấp, máy đo pH, tủ cấy, đĩa cấy, dao cấy, panh cấy, bình thủy tinh (250 và 500 mL), bịch nylon, dây thun, găng tay, ống nylon,... Các dụng cụ được hấp tiệt trùng bằng nồi hấp ở 121°C, 1 atm trong 30 phút. Đèn UV bước sóng 254 nm, kính hiển vi soi nổi Nikon SMZ 800 (Nikon, Nhật Bản), kính hiển vi quang học 2 thị kính Leica DM 2000 (Leica, Mỹ), máy kiểm tra chlorophyll (SPAD-502, Minolta Co., Ltd., Osaka, Nhật Bản).

2.1.5. Điều kiện nuôi cấy

In vitro: Các mẫu cây được cấy vào bình thủy tinh/hộp nhựa và đặt trong phòng sáng đã cài đặt nhiệt độ khoảng $25 \pm 2^\circ\text{C}$, độ ẩm tương đối 55 - 60%, đặt dưới ánh sáng đèn huỳnh quang với quang chu kỳ 12 giờ/ngày và cường độ ánh sáng khoảng 40 - 45 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$.

Ex vitro: Cây con *in vitro* và trồng ở nhà kính Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên với nhiệt độ ban ngày là $25 \pm 5^\circ\text{C}$ và ban đêm là $15 \pm 5^\circ\text{C}$, độ ẩm trung bình khoảng 75 - 80% với ánh sáng tự nhiên được che sáng bằng lưới đen 40%, pH của đất khoảng 6 - 7. Cây con được trồng trên các chậu nhựa chứa đất sạch (Công ty Trang Trại Việt, Hồ Chí Minh, Việt Nam) trong 2 tuần; sau đó, cây được trồng trong túi nylon đen (kích thước 20 × 20 × 15 cm) với giá thể đất perlite và đất mùn (tỷ lệ 1:1) cho đến khi ra hoa.

2.2. Nội dung nghiên cứu

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

Đối với cây Cúc, ảnh hưởng của AgNPs lên khử trùng môi trường nuôi cấy không hấp tiệt trùng, khử trùng mẫu cây *ex vitro* và sinh trưởng tiếp theo chưa được nghiên cứu. Ngoài ra, độ đông đặc của môi trường nuôi cấy không hấp tiệt trùng khi bổ sung AgNPs cũng thay đổi; do đó, ảnh hưởng của nồng độ agar cũng như đưa ra các hệ thống nuôi cấy khác nhau cũng được khảo sát. Các nội dung nghiên cứu tập trung trên cây Cúc bao gồm:

- + Ảnh hưởng của AgNPs lên khử trùng môi trường nuôi cấy mô.
- + Ảnh hưởng của AgNPs lên khử trùng mẫu cấy và cảm ứng mẫu cấy.
- + Định danh vi sinh vật gây nhiễm trong giai đoạn khử trùng mẫu cấy.
- + Tái sinh chồi trên môi trường bổ sung AgNPs và không hấp tiệt trùng.
- + Ảnh hưởng của hàm lượng agar lên sinh trưởng của cây Cúc trong môi trường bổ sung AgNPs không hấp tiệt trùng.
- + Nhân giống cây Cúc trong các hệ thống nuôi cấy khác nhau.
- + Thích nghi và ra hoa ở giai đoạn vườn ươm.
- + Đánh giá hiệu quả kinh tế của AgNPs lên khử trùng mẫu cấy, môi trường nuôi cấy mô và nhân giống cây hoa Cúc.

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

Đối với cây Thu hải đường, vai trò của nano kim loại như AgNPs và CuNPs trong khử trùng mẫu cấy *ex vitro*, cảm ứng tạo phôi và chỉ tiêu sinh lý hay sinh hóa, thích nghi và ra hoa vẫn chưa được nghiên cứu. Ngoài ra, CuNPs được sử dụng như một chất khử trùng mới và chưa được công bố trước đây. CuNPs được sử dụng để khử trùng mẫu cấy và so sánh với các chất khử trùng khác cũng như đánh giá dư lượng Cu trong mẫu cấy (sau khi khử trùng) tác động đến sinh trưởng tiếp theo của mẫu cấy (cảm ứng tạo phôi, phát sinh phôi và sinh trưởng tiếp theo). Các nội dung nghiên cứu tập trung trên cây Thu hải đường bao gồm:

- + Ảnh hưởng của AgNPs và CuNPs lên khử trùng mẫu cấy.
- + Sinh trưởng của phôi soma.
- + Tạo cây hoàn chỉnh và thích nghi ở điều kiện vườn ươm.

2.2.3. 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

Đối với cây Tử linh lan, nano kim loại sử dụng trong vi nhân giống cây Tử linh lan còn rất hạn chế và chỉ dừng lại nghiên cứu ảnh hưởng của AgNPs lên khử trùng mẫu cấy và so sánh với các chất khử trùng như HgCl_2 [62]; do đó, nghiên cứu ảnh hưởng của AgNPs lên sự phát sinh hình thái, khắc phục một số hiện tượng bất thường

trong nuôi cấy mô và gia tăng sinh trưởng của mẫu cây cây Tử linh lan là cần thiết.

Các nội dung nghiên cứu tập trung trên cây Tử linh lan bao gồm:

- + Đánh giá khả năng tái sinh chồi của các nguồn mẫu khác nhau và ghi nhận hiện tượng bất thường.
- + Ảnh hưởng của AgNPs lên khả năng tái sinh chồi và hiện tượng bất thường.

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 hoa Cúc

Thí nghiệm 1.1: Ảnh hưởng của AgNPs lên khử trùng môi trường nuôi cấy mô

Chuẩn bị môi trường MS chứa 30 g/L sucrose và 8 g/L agar (MS0); sau đó, 30 mL môi trường MS0 được đổ vào bình 250 mL (AuM1) và hấp tiệt trùng ở 121°C và 1 atm trong thời gian 20 phút. Môi trường MS0 được bổ sung các nồng độ AgNPs khác nhau (1, 2, 3, 4, 5 mg/L) và pH 5,8 trước khi đun sôi trong 4 phút để hòa tan agar (không hấp tiệt trùng) được sử dụng như là phương pháp xử lý để khảo sát tác dụng khử trùng môi trường nuôi cấy mô của AgNPs. Môi trường MS0 bổ sung AgNPs sau khi đun sôi sẽ được rót 30 mL môi trường vào bình AuM1 (bình và nắp bình được hấp tiệt trùng bằng nồi hấp tiệt trùng) để ghi nhận tỷ lệ nhiễm (%) của môi trường nuôi cấy mô được hấp tiệt trùng bằng nồi hấp hay bổ sung AgNPs và không hấp tiệt trùng sau 1 - 4 tuần.

Thí nghiệm 1.2: Ảnh hưởng của AgNPs lên khử trùng và cảm ứng mẫu cấy

Cảm ứng mẫu cấy

Các mẫu lá thu nhận từ vườn ươm của cây Cúc (4 tuần tuổi) với đọt thứ 3 và thứ 4 từ trên xuống đã được rửa sơ bộ bằng nước máy khoảng 30 phút; sau đó, mẫu lá được khử trùng với AgNPs ở các nồng độ khác nhau (125, 250 hoặc 500 mg/L) và thêm 2 giọt Tween-80 trong 5, 10, 15, 20 hoặc 30 phút. Mẫu lá được rửa bằng nước cất vô trùng 2 - 3 lần trong 5 phút. Nghiệm thức đối chứng là chất khử trùng HgCl₂ (1.000 mg/L) và nước khử trùng trong 5 phút. Tiếp theo, các mẫu lá được cắt thành hình vuông (5 mm × 5 mm) và được nuôi cấy trên môi trường MS0 bổ sung 2 mg/L 6-

Benzylaminopurine (BA), 0,5 mg/L axit 1-Naphthaleneacetic (NAA) [104]. Tỷ lệ cảm ứng mô sẹo (%) được thu nhận sau 4 tuần nuôi cấy.

Định danh vi sinh vật gây nhiễm trong giai đoạn khử trùng mẫu cấy

Môi trường nuôi cấy mô có cấy mẫu được thu nhận để xác định nấm và vi khuẩn có trong môi trường bằng phương pháp thử định lượng ISO 16266, Bergey, NHS-F15 (vi khuẩn) và ISO 21527-1 (nấm). Môi trường PDA được chuẩn bị bằng 24 g dextrose khoai tây (Difco, Hoa Kỳ), 15 g bacto agar (Difco, Hoa Kỳ) và đổ đầy nước cất đến 1.000 mL. Môi trường WA được chuẩn bị bằng 15 g bacto agar (Difco, Hoa Kỳ) và đổ đầy nước cất đến 1.000 mL. Vi sinh vật gây nhiễm trên môi trường chứa mô cấy được thu nhận sau 1 tuần. Các vi sinh vật được thu nhận bằng kính hiển vi soi nổi sau mỗi 24 giờ cho đến một tuần. Mỗi khuẩn lạc được phân lập và đánh giá đặc điểm hình thái bằng kính hiển vi với độ phóng đại 1000 lần [105].

Thí nghiệm 1.3: Tái sinh chồi từ nuôi cấy cụm mô sẹo trên môi trường bổ sung AgNPs và không hấp khử trùng

Cụm mô sẹo 4 tuần tuổi thu nhận từ thí nghiệm 1.2 được cắt thành các mẫu nhỏ hình vuông (5 mm × 5 mm); sau đó, chúng được nuôi cấy trên môi trường MS0 không hấp tiệt trùng bổ sung 0,2 mg/L BA và nồng độ AgNPs tối ưu ở thí nghiệm 1.1. Đối chứng là cụm mô sẹo được nuôi cấy trên môi trường MS0 đã được hấp tiệt trùng có hoặc không bổ sung 0,2 mg/L BA [106]. Tỷ lệ tái sinh chồi (%), chiều cao chồi (cm), số chồi/mẫu, khối lượng tươi cụm chồi (g) được thu nhận sau 4 tuần nuôi cấy.

Thí nghiệm 1.4: Ảnh hưởng của hàm lượng agar lên sinh trưởng của cây con trong môi trường chứa AgNPs không hấp tiệt trùng

Các chồi Cúc (1,5 cm) được cấy trên môi trường MS0 bổ sung nồng độ AgNPs tối ưu từ thí nghiệm 1.1, bổ sung hàm lượng agar khác nhau (3, 4, 5, 6, 7 và 8 g/L) và không tiệt trùng. Các chồi được cấy trên môi trường MS0 chứa 8 g/L agar (hấp tiệt trùng) được sử dụng làm đối chứng. Các chỉ tiêu sinh trưởng của cây bao gồm chiều cao cây (cm), số lá/cây, số rễ/cây, chiều dài rễ (cm), khối lượng tươi (g), chiều rộng lá (cm) và chỉ số SPAD (chlorophyll tổng) được thu nhận sau 4 tuần nuôi cấy.

Thí nghiệm 1.5: Nhân giống cây Cúc trong các hệ thống nuôi cấy khác nhau

Cây con có nguồn gốc nuôi cấy *in vitro* (chiều cao 5,0 cm) thu nhận từ nghiệm thức 1.4 được cắt thành 4 đoạn; trong đó có 1 chồi ngọn (chồi với một cặp lá, chiều dài khoảng 1,5 cm) và 3 đoạn thân đã loại bỏ lá (chiều dài 1,0 cm). Các chồi/đoạn thân được đặt trong hệ thống bình thủy tinh 500 mL AuM2 (20 chồi hoặc đoạn thân/bình), hệ thống hộp nhựa NoM1 (169 chồi hoặc đoạn thân/hộp) và hệ thống hộp nhựa NoM2 (330 chồi hoặc đoạn thân/hộp) chứa môi trường nuôi cấy tối ưu ở nghiệm thức 1.3 và 1.4. Chiều cao cây (cm), số rễ/cây, chiều dài rễ (cm), số lá/cây, chiều rộng lá (cm), khối lượng tươi (g), chỉ số SPAD, hàm lượng APX (U/g) và SOD (U/g) được thu nhận sau 4 tuần nuôi cấy.

Thí nghiệm 1.6: Thích nghi và sinh trưởng tiếp theo ở giai đoạn vườn ươm

Cây Cúc (300 cây con mỗi hệ thống nuôi cấy) 4 tuần tuổi có nguồn gốc từ thí nghiệm 1.5 được trồng ở điều kiện nhà kính. Tỷ lệ sống sót (%), chiều cao cây (cm), số rễ/cây, chiều dài rễ (cm), số lá/cây, chiều dài lá (cm), chiều rộng lá (cm), khối lượng tươi (g), thời gian ra nụ (tuần), thời gian bung nụ (tuần) và thời gian ra hoa (tuần) sau 16 tuần trồng ở vườn ươm.

Thí nghiệm 1.7: Đánh giá hiệu quả kinh tế của AgNPs lên khử trùng mẫu cấy, môi trường nuôi cấy và nhân giống cây Cúc

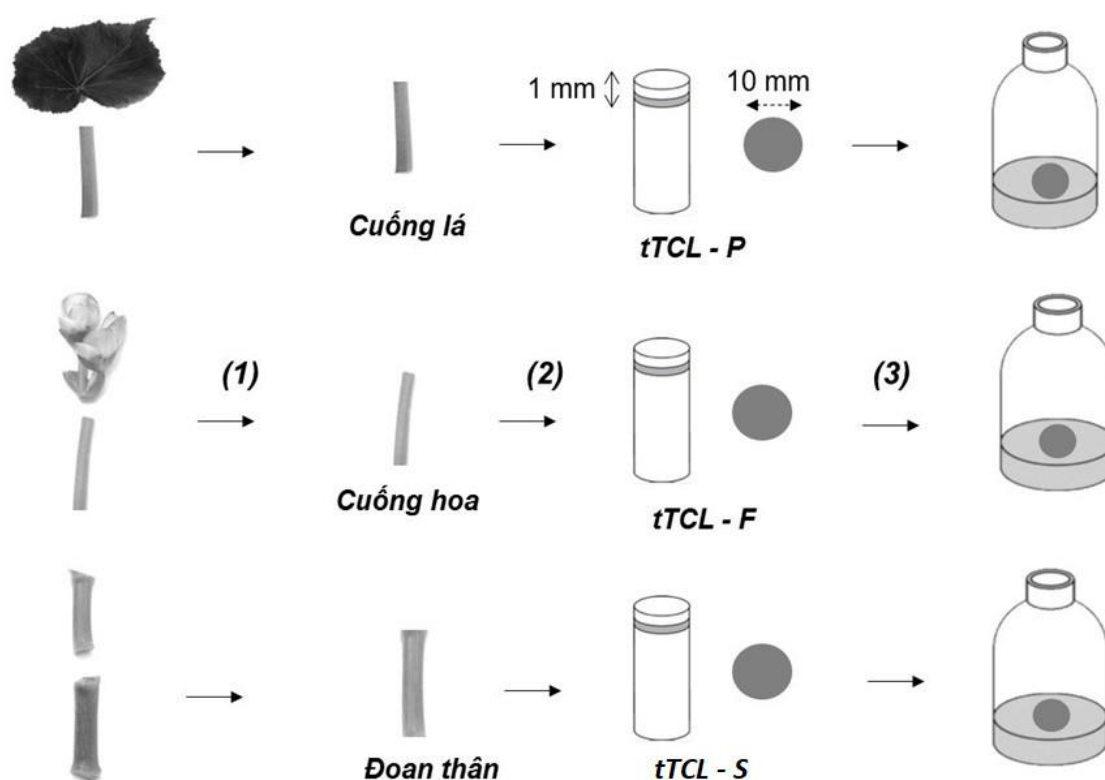
Ước lượng giá thành của 10.000 cây con của mỗi hệ thống nuôi cấy (bình thủy tinh chứa môi trường có hấp diệt trùng và hộp nhựa chứa môi trường nuôi cấy bổ sung AgNPs không hấp diệt trùng) được so sánh hiệu quả kinh tế dựa trên chi phí sản xuất thực tế.

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

Thí nghiệm 2.1: Ảnh hưởng của AgNPs và CuNPs lên khả năng khử trùng mẫu cấy

Các mẫu cấy khác nhau (cuống lá, cuống hoa và đoạn thân) của cây Thu hải đường được rửa dưới vòi nước máy 15 phút; sau đó, các mẫu cấy ngâm 15 phút trong dung dịch xà phòng loãng ở nồng độ 0,01%; rửa lại mẫu 30 phút dưới vòi nước máy.

Các mẫu cây sau khi khử trùng sơ bộ được đưa vào tủ cấy và tiếp tục khử trùng bằng cồn 70° khoảng 30 giây, rửa lại 3 lần với nước cất vô trùng. Mẫu cây sau khi rửa được tiếp tục khử trùng bằng dung dịch AgNPs và CuNPs (50, 100, 200, 300 và 400 mg/L) thêm vài giọt Tween-80 để tiếp tục khử trùng mẫu trong khoảng 10 phút. Trong khi đó, mẫu cây được khử trùng với 1.000 mg/L HgCl₂ trong 6 phút và 60.000 mg/L Ca(ClO)₂ khoảng 10 phút như là nghiệm thức đối chứng. Sau khi khử trùng, các mẫu cây được đặt cắt nhỏ (Hình 2.1) và nuôi cấy trên môi trường MS0 chứa 0,1 mg/L TDZ và 0,2 mg/L NAA [92] để đánh giá khả năng cảm ứng tạo phôi.



Hình 2.1. Sơ đồ mô tả cách cắt mẫu cây của cây Thu hải đường.

(1): Thu nhận mẫu cuống lá, cuống hoa và đoạn thân; (2): Cắt mẫu tTCL (1 mm); (3): Cây mẫu tTCL trên môi trường cảm ứng mẫu cây; **tTCL-P**: Mẫu cây cuống lá; **tTCL-F**: Mẫu cây cuống hoa; **tTCL-S**: Mẫu cây đoạn thân.

Mẫu cây cuống lá, cuống hoa và đoạn thân sau khi khử trùng với CuNPs được thu nhận để xác định dư lượng đồng (Cu) bằng phương pháp đo quang phổ hấp thụ nguyên tử [107]. Mẫu phân tích (50 mg/mẫu) được chuyển đổi thành hơi của các nguyên tử hoặc ion tự do bằng cách sử dụng nguồn năng lượng thích hợp. Sau đó, cặn lắng được phân tích bằng phương pháp vô cơ ướt và đo bằng AAS-6800 (Shimadzu, Nhật Bản). Phân tích dư lượng Cu trong mẫu cây bằng phương pháp vô cơ hóa ướt để

chuyên nano thành dạng nguyên tử riêng lẻ; sau đó, tính dư lượng ion đồng (Cu) trong các mẫu được đo bằng phương pháp vô cơ ướt chuyên dạng nano thành dạng nguyên tử.

Thí nghiệm 2.2: Sinh trưởng của phôi soma

Mẫu cây cảm ứng tạo phôi (4 tuần tuổi) của cây Thu hải đường thu nhận từ thí nghiệm 2.1 được cắt thành các mẫu nhỏ hình vuông (5 mm × 5 mm) và nuôi cấy trên môi trường ½ MS chứa 0,2 mg/L TDZ và 0,2 mg/L NAA [92] để đánh giá sự sinh trưởng của phôi soma. Tỷ lệ phát sinh phôi (%), tổng số phôi, hình dạng phôi soma (hình cầu, hình tim, hình thủy lôi và hai lá mầm), enzyme (CAT và APX), hàm lượng tinh bột và đường được thu nhận sau 8 tuần nuôi cấy.

Thí nghiệm 2.3: Tạo cây hoàn chỉnh và sinh trưởng tiếp theo

Các phôi hai lá mầm riêng lẻ (1,5 cm) của cây Thu hải đường thu nhận từ thí nghiệm 2.2 và được nuôi cấy trên môi trường MS0 để đánh giá khả năng ra rễ và sinh trưởng của cây con. Chiều cao cây (cm), số lá/cây, số rễ/cây, chiều dài rễ (cm), khối lượng tươi và khô (mg), SPAD được thu nhận sau 16 tuần nuôi cấy.

Các cây con (10 cm) được trồng ở điều kiện nhà kính để đánh giá khả năng thích nghi và ra hoa. Tỷ lệ sống sót (%), số lá/cây, chiều cao cây (cm), SPAD, tỷ lệ ra hoa (%), thời gian nở hoa (ngày) và đường kính hoa (cm) trong điều kiện vườn ươm được ghi nhận sau 16 tuần trồng.

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

Thí nghiệm 3.1: Đánh giá khả năng tái sinh chồi của các nguồn mẫu khác nhau và ghi nhận hiện tượng bất thường

Mẫu lá nguyên (đường kính 10 mm) và mẫu gân lá chính (1 mm × 10 mm: rộng × dài) được thu nhận từ cây Tử linh lan nuôi cấy mô được cấy trên đĩa Petri (đường kính 60 mm và chiều cao 15 mm, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Đức) chứa môi trường MS0 bổ sung 0,1 mg/L NAA, 0,2 mg/L BA và 1 g/L than hoạt tính [99] được bao kín bởi màng parafilm M (Bemis, Mỹ) nhằm mục đích đánh giá khả năng tái sinh chồi của mẫu lá nguyên và mẫu gân lá chính cũng như ghi nhận hiện tượng bất thường trong

giai đoạn tái sinh chồi. Các chỉ tiêu như tỷ lệ tái sinh chồi (%), chiều cao chồi (cm), số chồi/mẫu, hiện tượng thủy tinh thể (%), mô sẹo ở mép lá (%), hoại tử mẫu cây (%), hóa nâu mẫu cây/môi trường nuôi cấy (%) được thu nhận sau 8 tuần. Hình thái mẫu cây được quan sát và ghi nhận dưới kính hiển vi soi nổi (độ phóng đại 10x).

Thí nghiệm 3.2: Ảnh hưởng của AgNPs lên sự tái sinh chồi và các hiện tượng bất thường

Nguồn mẫu tái sinh chồi tối ưu ở thí nghiệm 3.1 được cấy trên môi trường MS0 chứa 0,1 mg/L NAA, 0,2 mg/L BA, 1 g/L than hoạt tính [99] và bổ sung AgNPs (1, 2, 3, 4 mg/L) có hấp khử trùng. Đối chứng là mẫu cây được cấy trên môi trường MS0 không bổ sung AgNPs và có hấp khử trùng. Các chỉ tiêu như tỷ lệ tái sinh chồi (%), chiều cao chồi (cm), số chồi/mẫu, khối lượng tươi và khô của cụm chồi (mg) được thu nhận sau 4 tuần; bên cạnh đó, số chồi (tổng số chồi, chồi có kích thước > 1 cm), chiều cao chồi (cm), khối lượng tươi và khô (mg), SPAD được thu nhận sau 8 tuần.

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

Khí trong bình nuôi cấy (1 mL) được thu nhận trực tiếp bằng ống tiêm và bơm vào hệ thống GC. Định lượng khí ethylene bằng phương pháp sắc ký khí. Cột thép không gỉ (3 m × 1,5 mm) chứa chất hấp phụ Porapak P với kích thước hạt 80 - 100 Mesh. Trong đó, nhiệt độ được điều chỉnh tùy thuộc vài vị trí như cột là 60°C, kim phun là 90°C và ngọn lửa ion hóa là 90°C. Khí mang là khí nitơ với lưu lượng 55 mL/phút [108].

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

Mẫu tươi (300 mg) được thu nhận từ các thí nghiệm khác nhau và đặt trong cối sứ; sau đó, chúng được nghiền trong nitơ lỏng thành bột mịn và đồng nhất mẫu trong 2 mL dung dịch đệm phosphate 0,1 M chứa 0,1 mM axit ethylene diamine tetracetic. Hỗn hợp chứa mẫu được ly tâm với tốc độ 15.000 rpm khoảng 20 phút ở 4°C. Phần dịch nổi phía trên được thu nhận và bảo quản trong điều kiện lạnh (4°C) trong khoảng 24h để xác định hoạt tính của các enzyme chống oxy hóa bao gồm SOD, CAT và APX.

Hoạt độ SOD được xác định thông qua phản ứng pyrogallol với quá trình oxy hóa với sự hiện diện của oxy trong không khí, tạo ra sản phẩm và hấp thụ bước sóng 320 nm. SOD trong mẫu xúc tác phản ứng phân hủy các gốc peroxide (-O-O-), ngăn chặn quá trình tự oxy hóa của pyrogallol. Tỷ lệ ức chế phản ánh hoạt động của superoxide effutase trong mẫu. Một đơn vị hoạt độ của enzyme (U/g) là sự ức chế 50% quá trình tự oxy hóa pyrogallol, được xác định bởi sự thay đổi độ hấp thụ ở 320 nm theo công thức: Đơn vị enzyme (U/g) = (% bị ức chế/50) × tỷ lệ pha loãng [109].

Hoạt độ CAT trong mẫu thử được xác định bằng cách cho mẫu phản ứng với 100 μ L 65 mM H₂O₂ trong 2 phút, H₂O₂ còn lại sau khi phản ứng sẽ được kết hợp với 100 μ L ammonium molybdate (NH₄Mo₇O₂₄) tạo phức hợp màu vàng và hấp thụ bước sóng 405 nm. Đơn vị hoạt độ CAT (U/g) tương đương với 1 μ mol H₂O₂ thủy phân trong 1 phút [110].

Hoạt độ APX được kiểm tra theo phương pháp của Nakano và Asada (1981) [111]. Enzyme APX trong mẫu sẽ oxy hóa và làm giảm sự hấp thụ tối đa của ascorbate ở bước sóng 290 nm. Trong đó, đơn vị của hoạt độ APX (U/g) được tính bởi độ hấp thụ tối đa của ascorbate (290 nm) với sự hiện diện của 0,5 mM H₂O₂ trong 3 phút. Lượng ascorbate oxy hóa được tính trực tiếp với hệ số hấp thụ là 2,8 mM/cm. Một đơn vị hoạt độ enzyme (U/g) là lượng APX cần thiết để oxy hóa 1 μ mol ascorbate trong 1 phút ở điều kiện thí nghiệm.

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

Mẫu cụm phôi soma tươi (300 mg) của cây Thu hải đường được thu nhận; sau đó, rửa trong nước cất, làm đông khô và nghiền bằng cối và chày trước khi phân tích tinh bột. Sự phân hủy của mẫu được thực hiện trong 5 phút và được theo dõi bằng cách quan sát dưới kính hiển vi. Các mẫu cấy được lấy ra khỏi cối và chày bằng dung môi axeton. Tinh bột trong mẫu được thủy phân thành maltodextrin bởi α -amylase (3000 Um/L) và sau đó được thủy phân thành glucose bởi amyloglucosidase (3300 Um/L). Dung dịch trắng được chuẩn bị bằng 0,1 mL nước cất với việc bổ sung 3 mL GOPOD (glucose oxidase-peroxidase). Tổng hàm lượng tinh bột (I) (% w/w DW) được xác định theo công thức: $I = A \times F / W \times 90$; trong đó, *A* là hệ số hấp thụ của dung dịch

thử so với mẫu trắng; F là hệ số chuyển đổi từ giá trị độ hấp thụ sang giá trị glucose và W là khối lượng của mẫu thử (mg) [112].

Mẫu cụm phôi soma tươi (300 mg) của cây Thu hải đường được thu nhận cắt thành từng miếng nhỏ bằng dao (độ dày 0,2 - 0,3 cm) sau đó được đông lạnh, nghiền bằng cối và chày trước khi phân tích đường. Tất cả các mẫu đã đồng nhất được bảo quản trong túi nhựa (-18°C). Đường trong mẫu được kiểm tra bằng cách sử dụng thuốc thử GOPOD với độ hấp thụ tối đa ở bước sóng 510 nm và D-glucose được sử dụng làm đối chứng. Hàm lượng đường của mẫu được xác định bằng cách sử dụng thuốc thử axit 3,5-dinitrosalicylic dựa trên độ hấp thụ ở bước sóng 540 nm, trong khi nước cất được sử dụng làm đối chứng. Trong đó, xây dựng đường chuẩn để tính toán hàm lượng đường dựa trên D-glucose. Hàm lượng đường (S) (mg/g DW) được xác định theo công thức: $S = A \times n \times V/m$; trong đó, A là hàm lượng đường khử trong dung dịch mẫu đã pha loãng (mg / g); n là hệ số pha loãng; V là thể tích dung dịch chuẩn (mL) và m là khối lượng của mẫu thử (g) [113].

2.3.5. Giải phẫu hình thái

Hình thái mẫu cây được giải phẫu, nhuộm kép và quan sát dưới kính hiển vi quang học [114] bao gồm các bước sau: (1) Các mẫu cây ở các thí nghiệm khác nhau và đối chứng được cắt thành các lát mỏng (30 - 40 μ m); (2) Ngâm mẫu đã cắt 15 phút trong Javel 10%; sau đó, rửa mẫu cây bằng nước cất vô trùng cho đến khi sạch Javel (6 lần); (3) Các mẫu ngâm 15 phút trong axit acetic 45%, rửa lại bằng nước cất cho đến khi sạch axit acetic (6 lần); (4) Nhuộm mẫu bằng hỗn hợp dung dịch xanh methylene và đỏ carmin trong 3 - 5 phút; rửa lại các mẫu bằng nước cất đến khi mẫu không còn phẩm nhuộm (2 - 5 phút); (5) Mẫu được lên lam kính có bổ sung 1 giọt nước hoặc glycerine; sau đó đặt lamel và quan sát và chụp hình dưới kính hiển vi quang học (độ phóng đại 40x).

2.3.6. Xử lý số liệu

Tất cả các thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Các số liệu thu nhận được xử lý bằng Microsoft Excel 2016 và SPSS 18.0 với các phép thử phù hợp với từng thí nghiệm trong từng loại cây với $p < 0,05$ [115].

2.4. Địa điểm và thời gian nghiên cứu

2.4.1. Địa điểm nghiên cứu

Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên: Thực hiện tất cả các thí nghiệm nghiên cứu liên quan đến luận án.

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên Tp. Hồ Chí Minh: Phân tích nấm và khuẩn trong môi trường nuôi cấy mô.

Viện Cây ăn quả miền Nam: Phân tích hàm lượng khí ethylene.

Trường Đại học Y dược Tp. Hồ Chí Minh: Phân tích hoạt độ enzyme kháng oxy hóa.

Viện Nghiên cứu Hạt nhân Đà Lạt: Phân tích dư lượng kim loại trong mẫu cây.

Trường Đại học Tây Nguyên: Xác định hàm lượng đường và tinh bột.

2.4.2. Thời gian nghiên cứu

Thời gian tiến hành luận án trong 3 năm: Từ 10/2019 đến 10/2022.

CHƯƠNG 3. 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 hoa Cúc

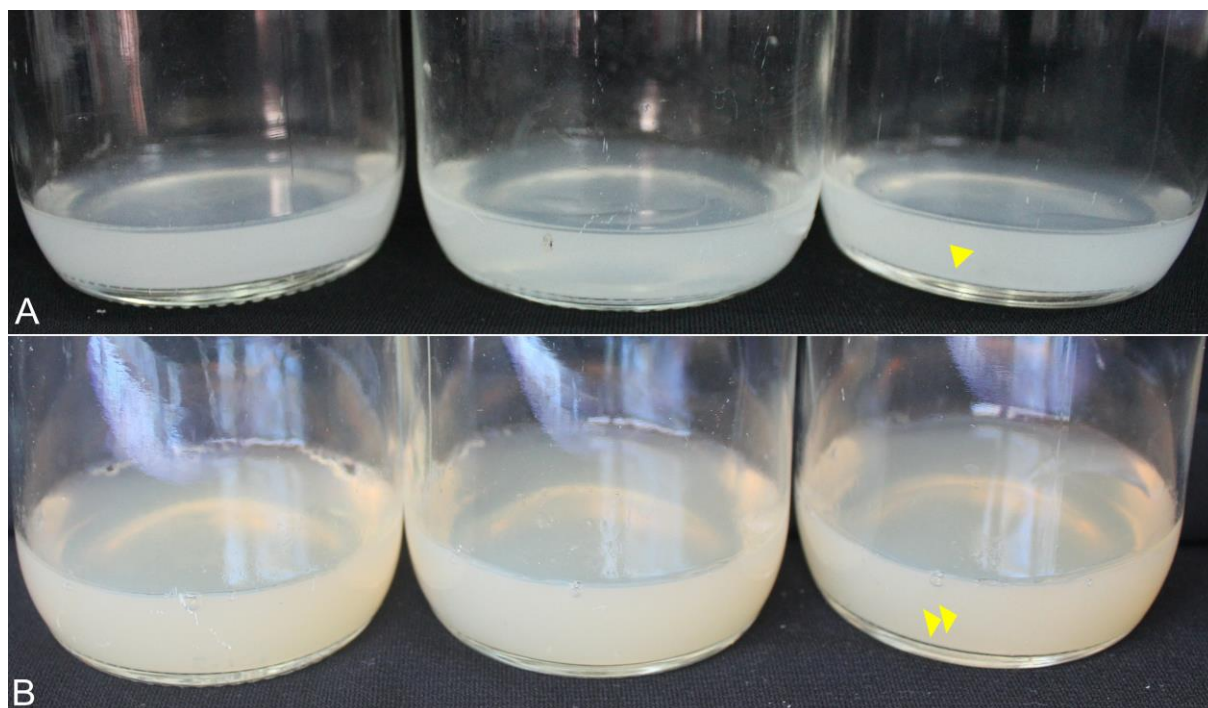
3.1.1. Ảnh hưởng của AgNPs lên khử trùng môi trường nuôi cấy

Hiệu quả của việc bổ sung AgNPs lên khử trùng môi trường nuôi cấy mô không hấp tiệt trùng được thu nhận ở Bảng 3.1.1. Tỷ lệ nhiễm của môi trường là 33,33% của môi trường MS0 (không hấp tiệt trùng và không bổ sung AgNPs) sau tuần đầu tiên; trong khi đó, môi trường MS0 bổ sung 1 - 5 mg/L AgNPs không ghi nhận bất kỳ tỷ lệ nhiễm nào. Sau 4 tuần quan sát cho thấy, không bổ sung AgNPs và bổ sung 1 - 3 mg/L AgNPs đều ghi nhận tỷ lệ nhiễm của môi trường từ 80 đến 100%; trong khi đó, môi trường MS0 bổ sung 4 hoặc 5 mg/L AgNPs, tỷ lệ nhiễm vi sinh vật là không được ghi nhận (Bảng 3.1.1). Do đó, việc bổ sung 4 mg/L AgNPs vào môi trường MS0 không hấp tiệt trùng (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 tiệt trùng sau 1, 2, 3 và 4 tuần nuôi cấy.

Môi trường MS0	AgNPs (mg/L)	Tỷ lệ nhiễm của môi trường (%)			
		Sau tuần thứ nhất	Sau tuần thứ hai	Sau tuần thứ ba	Sau tuần thứ tư
Không hấp tiệt 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 tiệt trùng (Đối 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



Hình 3.1.1. Môi trường nuôi cấy MS0 quan sát sau 4 tuần.

A: Môi trường MS0 được khử trùng bằng nồi hấp tiệt trùng; **B:** Môi trường MS0 bổ sung 4 mg/L AgNPs và không hấp tiệt trùng. *Mũi tên đơn:* Môi trường màu trắng; *Mũi tên kép:* Môi trường hơi ngả vàng.

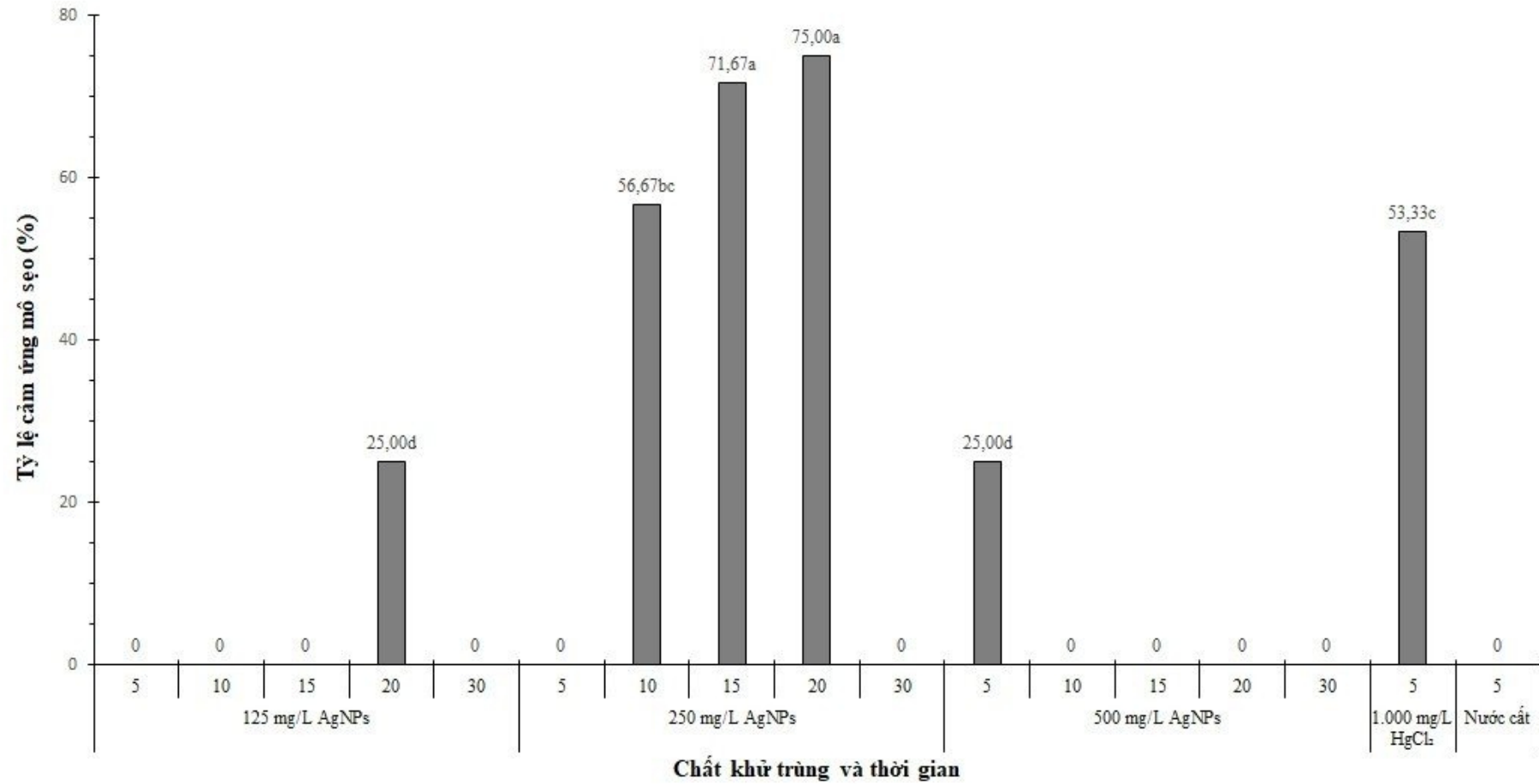
Khử trùng môi trường là bước cần thiết trước khi nuôi cấy mô. Trong đó, hấp tiệt trùng môi trường bằng nồi hấp ở 121°C và 1 atm khoảng 15 - 30 phút là một quy trình tiêu chuẩn trong khử trùng môi trường. Tuy nhiên, quá trình này có thể có những ảnh hưởng không tích cực đến thành phần của môi trường nuôi cấy mô. Ví dụ như hấp tiệt trùng đường cùng với các thành phần môi trường khác làm tăng sự phân hủy của chúng [9] và độ pH của môi trường có thể thay đổi trước và sau khi hấp [116]. Mặt khác, tác dụng kháng khuẩn của AgNPs đã được ứng dụng trong nhiều năm ở lĩnh vực y tế [117] và chưa được chỉ ra trong việc khử trùng môi trường. Kết quả nghiên cứu này ghi nhận môi trường nuôi cấy mô bổ sung AgNPs có tác động tích cực trong khử trùng môi trường và được thay thế cho bước hấp tiệt trùng thông thường. Ở nồng độ thích hợp, AgNPs hạn chế sự phát triển của vi sinh vật. Ngoài ra, AgNPs được sử dụng làm chất khử trùng có thể không cần phải tiệt trùng môi trường ở nhiệt độ cao đối với môi trường nuôi cấy *in vitro*, điều này có thể ảnh hưởng tới sinh trưởng tiếp theo của mẫu cấy trên môi trường không hấp tiệt trùng.

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 HgCl₂. 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 HgCl₂. 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 HgCl₂ (53,3%) sau 4 tuần (Hình 3.1.2).

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 cấy 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 cấy; do đó, mẫu cấy bị nhiễm hoặc hoại tử dẫn đến không thể cảm ứng mô sẹo (Hình 3.1.2).

AgNPs đã được sử dụng thành công trong nông nghiệp, xử lý hạt giống và nuôi cấy mô để ngăn ngừa nhiễm nấm và khuẩn ở nhiều loài thực vật khác nhau [23, 118]. Hơn nữa, phương pháp, nồng độ và thời gian xử lý AgNPs đối với mỗi loài là khác nhau [119, 120]. Kết quả nghiên cứu này cho thấy AgNPs có thể khử trùng mẫu cấy *ex vitro* trực tiếp mà không cần đến các chất khử trùng khác. Các chất khử trùng như natri hypoclorit, canxi hypoclorit, HgCl₂,... có thể gây độc, ảnh hưởng đến chất lượng mẫu cấy [121, 122]. Ngoài ra, với hệ thống nuôi cấy vi thủy canh trong nhân giống số lượng lớn của cây hoa Cúc, AgNPs làm giảm hiệu quả sự phát triển của 11 loài vi khuẩn và nấm [70]. Trong nghiên cứu này, AgNPs đã hạn chế sự sinh trưởng của 5 loài vi khuẩn và nấm. Tuy nhiên, cơ chế chính xác ảnh hưởng của AgNPs đối với nấm và vi khuẩn vẫn chưa được biết rõ. Dựa trên những thay đổi về hình thái và cấu trúc có trong tế bào vi sinh vật, AgNPs được gắn vào màng tế bào và xâm nhập vào vi sinh vật. Sau khi xâm nhập, AgNPs tương tác với protein tế bào và các hợp chất chứa photpho như DNA, tấn công chuỗi hô hấp, dẫn đến chết tế bào [22, 23].



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

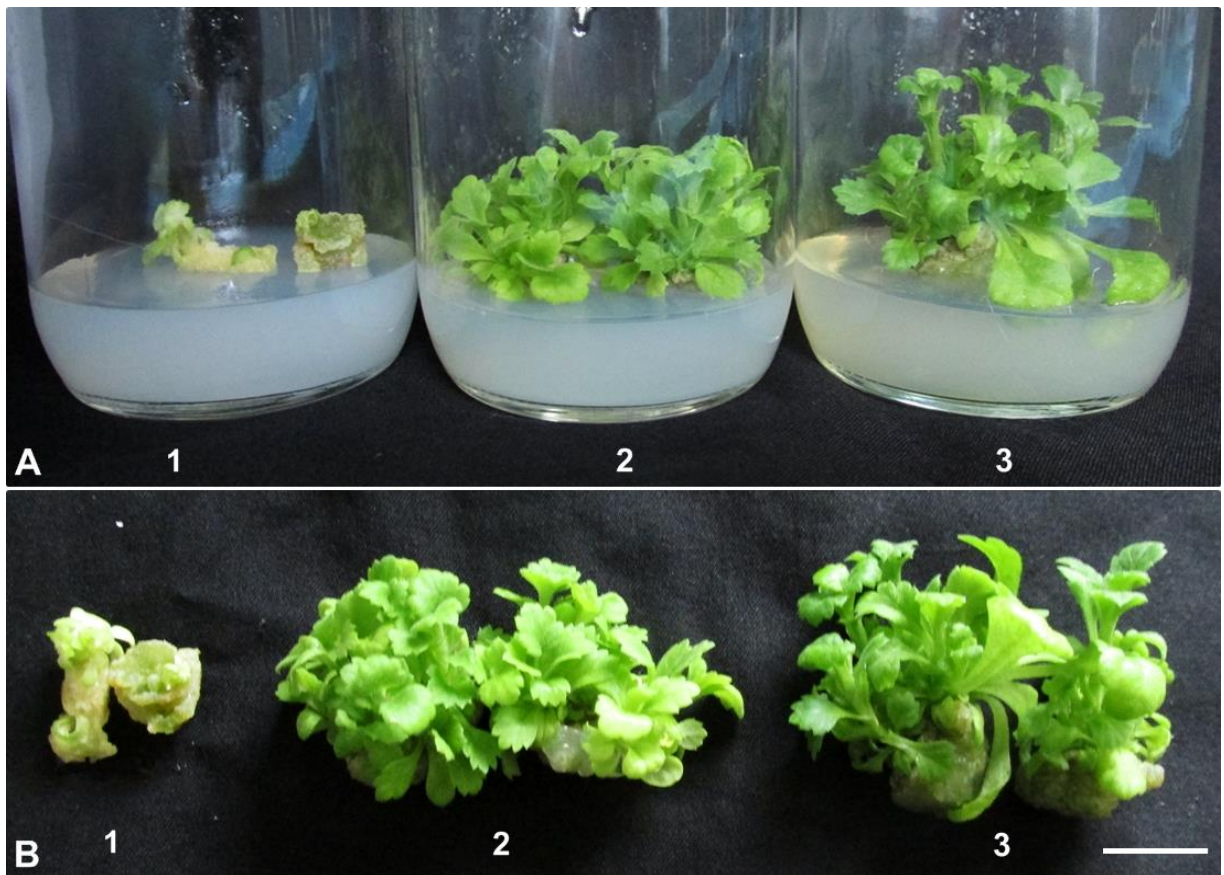
Kết quả ghi nhận được cho thấy, tất cả mẫu lá rửa bằng nước cất đều bị nhiễm nấm và vi khuẩn sau 4 - 7 ngày nuôi cấy. Trong nghiên cứu này, môi trường nuôi cấy MS được phân lập và ghi nhận 1 loài vi khuẩn (*Pseudomonas* sp.) và 4 loài nấm (*Aspergillus aculeatus*, *Fusarium* sp., *Penicillium* sp. và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

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 bàn chải 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). Môi trường MS0 chứa 0,2 mg/L BA không bổ sung AgNPs (có hấp tiệt trùng), có tới 7 chồi nhỏ/mẫu với chiều cao dưới 1 cm và chỉ ghi nhận 2,33 chồi/mẫu (chiều cao > 1 cm). Ở nghiệm thức 4 mg/L AgNPs (không hấp tiệt trùng), số chồi có kích thước lớn hơn 1 cm (6,33 chồi) là cao hơn so với số chồi ghi nhận ở môi trường MS0 không bổ sung AgNPs (Bảng 3.1.3 và Hình 3.1.3).



Hình 3.1.3. Sự tái sinh chồi của cây Cúc 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 tiệt trùng; **A₂, B₂:** Chồi thu nhận trên môi trường MS0 chứa 0,2 mg/L BA và hấp tiệt trùng; **A₃, B₃:** Chồi thu nhận trên môi trường MS0 chứa 0,2 mg/L BA, 4 mg/L AgNPs và không hấp tiệt trùng. *Thước đo: 1 cm.*

Bảng 3.1.3. Tái sinh chồi cây Cúc 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

Ngoài ra, môi trường MS0 chứa 0,2 mg/L BA bổ sung 4 mg/L AgNPs ghi nhận số chồi có kích thước lớn hơn 1 cm (6,33 chồi), chiều cao chồi (1,50 cm) và khối lượng tươi (1,32 g) tốt hơn so với các chồi trên môi trường MS0 chỉ chứa 0,2 mg/L BA không bổ sung AgNPs (2,33 chồi; 0,46 cm; 1,16 g; tương ứng). Bổ sung 4 mg/L AgNPs vào môi trường nuôi cấy đã cho thấy những tác động tích cực lên sự sinh trưởng của chồi Cúc như số chồi và chất lượng chồi (Bảng 3.1.3). Ảnh hưởng tích cực của AgNPs trong vi nhân giống cũng đã được chỉ ra trong các nghiên cứu khác nhau trên một số cây trồng như *Capsicum frutescens* [35] và *Swertia chirata* [123]. Ngoài ra, một số nghiên cứu cũng đã chỉ ra rằng việc bổ sung AgNPs vào môi trường nuôi cấy giúp gia tăng hiệu quả phát sinh hình thái và sinh trưởng trên nhiều đối tượng cây trồng khác nhau như cây Salem, Dâu tây, Hoa hồng, Sâm Ngọc Linh [51, 57, 58, 64]. Trong giai đoạn tái sinh chồi, bổ sung 0,2 mg/L AgNPs (cây Dâu tây) và 2 mg/L AgNPs (cây Hoa hồng) đã gia tăng hiệu quả tái sinh chồi cũng như chất lượng chồi [51, 57]. 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

3.1.3). Hơn nữa, AgNPs cũng thúc đẩy sự phát triển của chồi thông qua các chỉ tiêu sinh trưởng như số chồi, chiều cao chồi và khối lượng tươi. Như được trình bày trong Bảng 3.1.3, mặc dù tổng số chồi được tái sinh là tương tự giữa môi trường MS0 khử trùng bằng AgNPs và môi trường hấp khử trùng; tuy nhiên, chất lượng chồi là khác nhau và có nhiều chồi lớn hơn trong môi trường chứa 4 mg/L AgNPs. Các chồi lớn có thể được chuyển sang giai đoạn ra rễ sớm hơn, trong khi các chồi nhỏ sẽ cần phát triển lâu hơn để đạt được kích thước tương ứng.

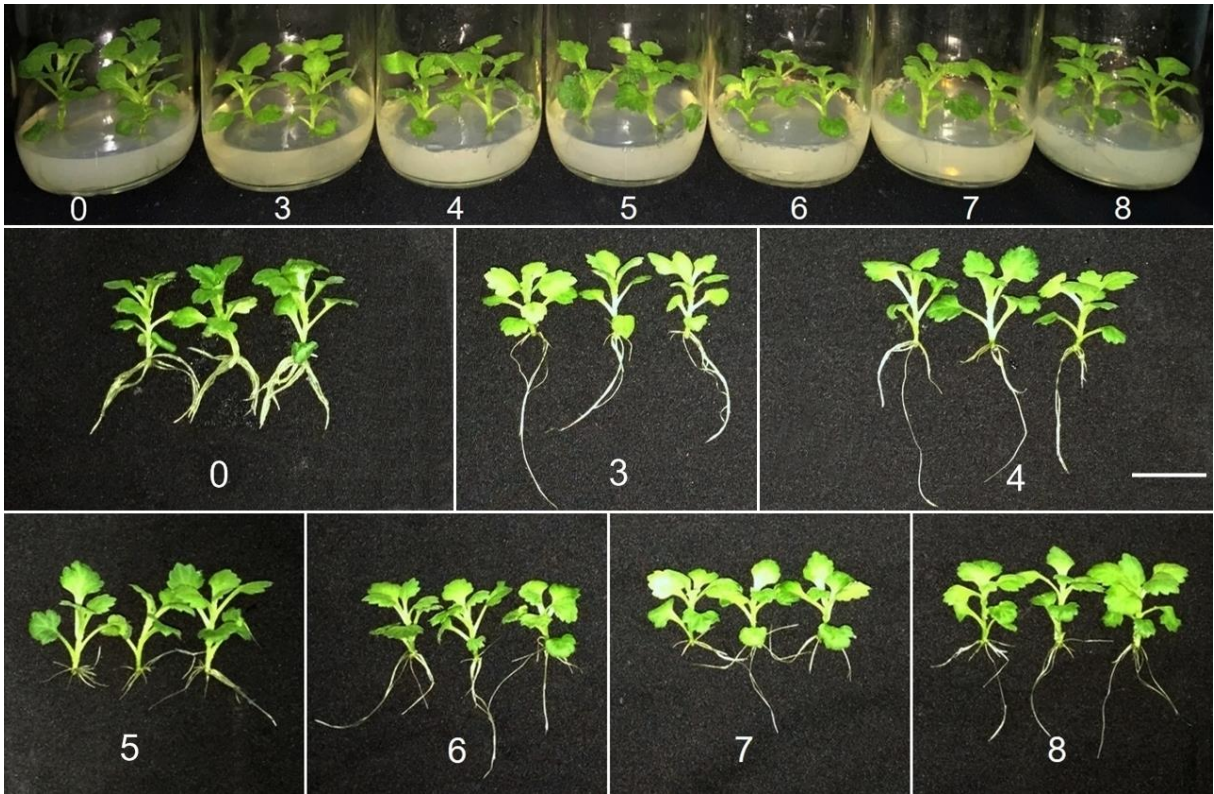
3.1.4. Ảnh hưởng của nồng độ agar lên sự sinh trưởng của cây con trong môi trường bổ sung AgNPs không hấp khử trùng

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). 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 từ 6 - 8 g/L (Bảng 3.1.4).

Bảng 3.1.4. Sinh trưởng của cây Cúc trên 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 ^y	4	4,11ab	7,67ab	1,30a	9,67b	3,23b	0,36ab	37,63a
	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 Cúc trên 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 (đối 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*

Hơn nữa, môi trường MS0 chứa 4 g/L agar và 4 mg/L AgNPs ghi nhận kết quả về sinh trưởng tương đương với đối chứng (môi trường MS0 chứa 8 g/L agar và không bổ sung AgNPs). Ngoài ra, môi trường MS0 chứa 4 mg/L AgNPs chỉ sử dụng một nửa hàm lượng agar so với môi trường MS0 không bổ sung AgNPs (4 g/L so với 8 g/L); điều này cho thấy việc không hấp tiệt trùng môi trường nuôi cấy bằng nồi hấp có thể giảm hàm lượng một nửa mà không ảnh hưởng đến trạng thái đông của môi trường nuôi cấy.

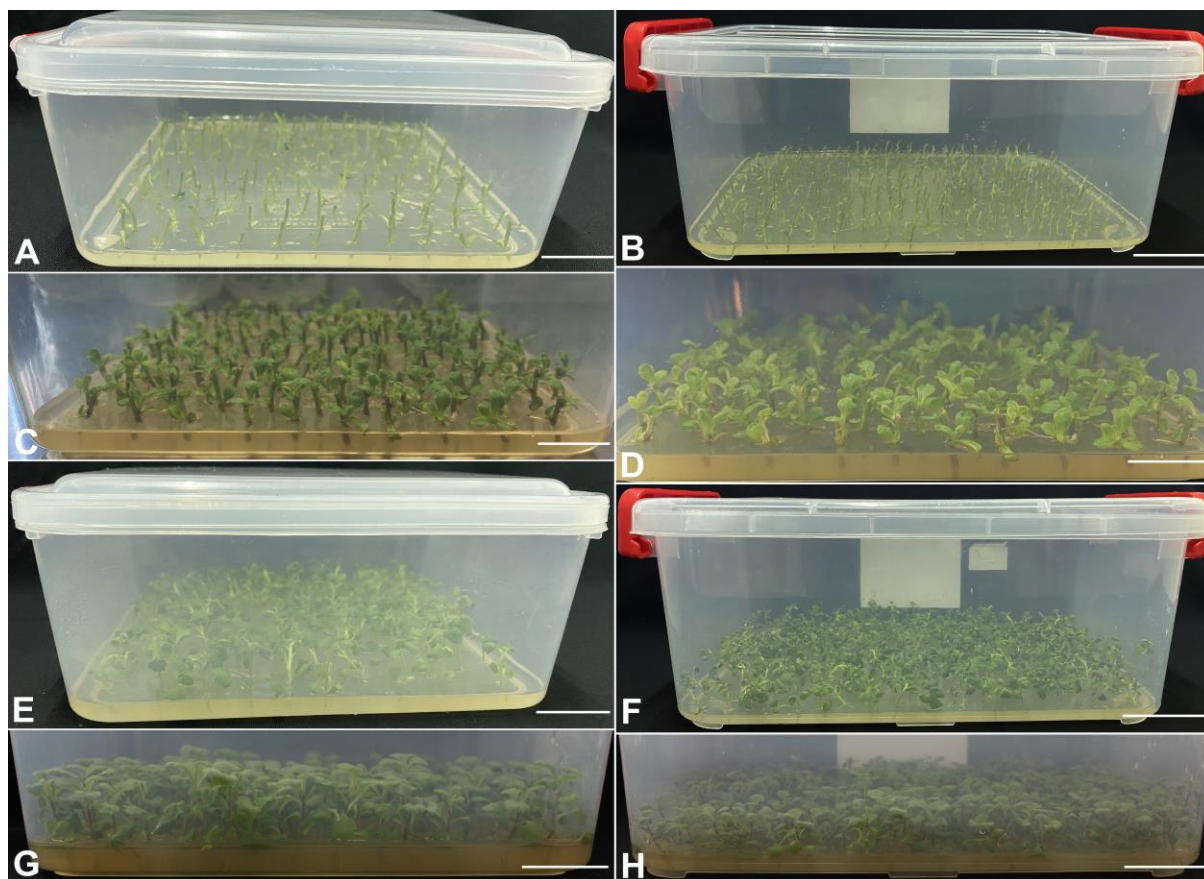
Agar là chất tạo đông thường dùng cho môi trường nuôi cấy. Hơn nữa, giá thành của agar tiếp tục tăng trong thời gian gần đây. Vì vậy, để giảm chi phí vận hành tổng thể, sự sinh trưởng của các mẫu cây ở các hàm lượng agar khác nhau và xác định xem liệu việc giảm agar có khả thi hay không được đánh giá trong nghiên cứu này. Bảng 3.1.4 cho thấy các cây con thu nhận ở nghiệm thức 4 g/L agar cho sự sinh trưởng

tương đồng so với cây con trong điều kiện đối chứng (8 g/L agar). Mặc dù kết quả tương tự nhau giữa hai nghiệm thức này, nhưng một nửa hàm lượng agar có thể giảm được chi phí hóa chất trong nhân giống cây thương mại.

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

Trong cả 3 hệ thống nuôi cấy (NoM1, NoM2 và AuM2), 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 và 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.

Hoạt độ APX và SOD của cây Cúc thu nhận trên môi trường MS0 khử trùng bằng 4 mg/L AgNPs trong 3 hệ thống nuôi cấy (NoM1, NoM2 và AuM2) được trình bày trong Bảng 3.1.5. Trong hệ thống NoM1 và NoM2, hoạt độ của enzyme trong rễ và lá của cây con cao hơn đáng kể so với trong hệ thống AuM2. Tác dụng thúc đẩy của AgNPs cũng có thể là do khả năng gây ra các hoạt động của enzyme chống oxy hóa [124]. Như thể hiện trong Bảng 3.1.5, hoạt độ APX và SOD cao hơn khi có môi trường MS0 bổ sung 4 mg/L AgNPs. Mặc dù việc bổ sung AgNPs có thể làm tăng các enzyme này, một số tác nhân khác như loại môi trường, thành phần trong môi trường và việc xử lý mẫu cây cũng có thể là các yếu tố góp phần. Ngoài ra, tác dụng thúc đẩy của AgNPs lên sự sinh trưởng của cây hoa Cúc có thể là do tác dụng của nó đối với ethylene. Ethylene được biết là có những ảnh hưởng tiêu cực hay tích cực lên sự phát triển của cây trồng trong ống nghiệm [124]. Hơn nữa, ion bạc được biết là có khả năng ức chế khả năng phản ứng của cây với ethylene. Bạc thay thế đồng trong các thụ thể ethylene [125], hoạt động như một chất ức chế ethylene [4]. Bạc tác động lên khí ethylene có thể thúc đẩy sự phát triển *in vitro* ở hoa Cúc. Sự xen kẽ giữa các loại oxy phản ứng, chất chống oxy hóa và phụ gia môi trường có thể tạo ra phản ứng tích cực của mẫu cây, cho phép cân bằng hoặc tăng cường sự phát triển [126].



Hình 3.1.5. Sinh trưởng của chồi cây Cúc 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.*

AgNPs bổ sung trong môi trường nuôi cây mô có thể tiết kiệm chi phí. Ngoài ra, AgNPs có hiệu quả như một chất khử trùng mẫu cây và môi trường nuôi cấy (không hấp tiệt trùng), điều này cho phép dễ dàng xử lý môi trường hay mẫu cây và phát triển một hệ thống nhân giống số lượng lớn hơn (Hình 3.1.5).

Hơn nữa, việc hấp khử trùng môi trường thông thường là không cần thiết, điều này sẽ làm giảm chi phí điện năng và giảm bớt công lao động của quá trình chuẩn bị môi trường. Sử dụng hệ thống nuôi cấy lớn có thể giảm không gian vật lý cần thiết để

duy trì các mẫu cây. Hệ thống hộp nhựa 5 L NoM1 và hộp nhựa 15 L NoM2 có thể chứa 169 và 330 đoạn thân, chiếm ít diện tích hơn nếu cùng một số lượng mẫu được nuôi cấy bằng các bình nuôi cấy thông thường như bình thủy tinh 500 mL chứa khoảng 20 đoạn thân; do đó, việc sử dụng không gian nuôi hiệu quả hơn.

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

Chỉ tiêu sinh trưởng		Hệ thống nuôi cấy		
		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.

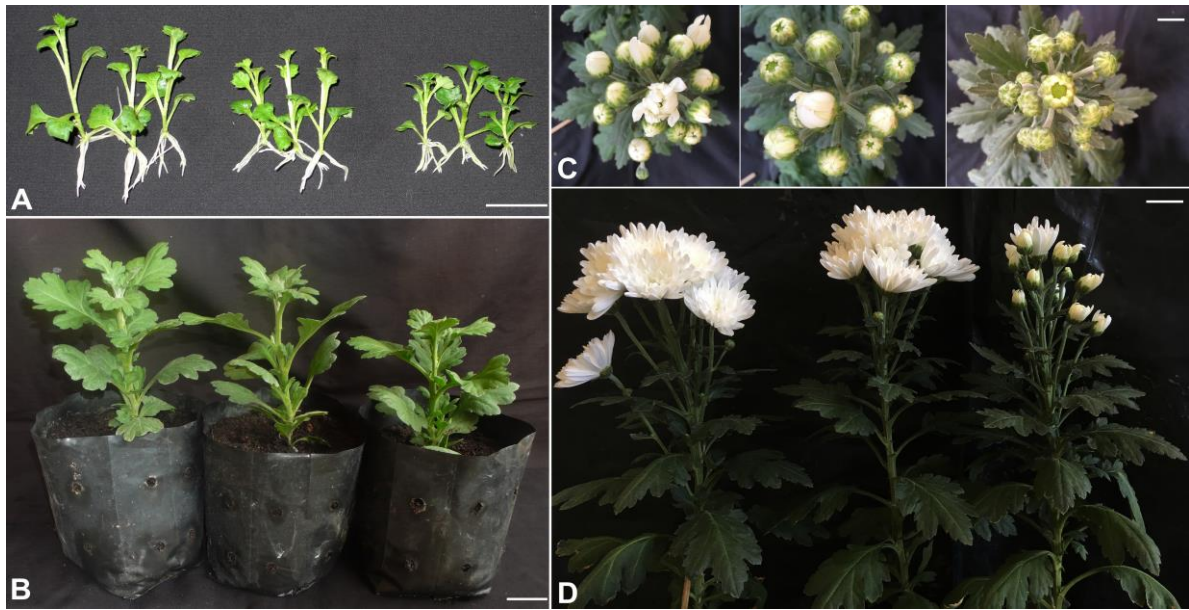
NoM: Hệ thống nuôi cấy hộp nhựa

NoM1: Hệ thống nuôi cấy hộp nhựa vuông 5 L

NoM2: Hệ thống nuôi cấy hộp nhựa hình chữ nhật 15 L

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 và 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). Trong nghiên cứu này, cây con có nguồn gốc trong hệ thống nuôi cấy hộp nhựa NoM1 và NoM2 (bổ sung 4 mg/L AgNPs) đã thúc đẩy sự sinh trưởng của cây con trồng ở giai đoạn tiếp theo tốt hơn so với cây con có nguồn gốc ở hệ thống nuôi cấy bình thủy tinh AuM2 (không bổ sung AgNPs).



Hình 3.1.6. Sự sinh trưởng và ra hoa của cây Cúc thu nhận từ các hệ thống nuôi cấy 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.

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

Chỉ tiêu sinh trưởng	Hệ thống nuôi cấy		
	NoM1	NoM2	AuM2
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.

Kết quả cho thấy AgNPs có thể được xem là một chất bổ sung hữu ích trong nuôi cấy mô cây hoa Cúc và có thể giảm thiểu việc sử dụng nôi hấp để hấp môi trường. Bổ sung AgNPs vào môi trường nuôi cấy có thể giảm giá thành cây giống. AgNPs có thể ứng dụng như một chất khử trùng môi trường nuôi cấy mô mà không phải hấp tiệt trùng thông thường. Cây hoa Cúc nuôi cấy trên môi trường MS0 bổ sung

4 mg/L AgNPs và 4 g/L agar cho thấy sự sinh trưởng và thích nghi tốt ở điều kiện vườn ươm. Ngoài ra, hệ thống nuôi cấy lớn sẽ tối ưu việc sử dụng không gian vật lý cần thiết cho sự sinh trưởng của cây trồng.

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

Cây hoa 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 [122, 123].

Trong giai đoạn tái sinh chồi, để có thể thu nhận 10.000 chồi thì nghiệm thức không sử dụng 4 mg/L AgNPs cần khoảng 4292 mẫu (2,33 chồi/mẫu có kích thước lớn hơn 1 cm) và môi trường nuôi cấy bổ sung 4 mg/L AgNPs (không hấp tiệt trùng) cần 1580 mẫu (6,33 chồi/mẫu có kích thước lớn hơn 1 cm). Ngoài ra, với bình nuôi cấy thủy tinh 500 mL (chứa 60 mL môi trường MS) thì ước lượng nghiệm thức đối chứng cần khoảng 86 lít môi trường MS và nghiệm thức 4 mg/L AgNPs cần 32 lít môi trường MS (mỗi lít môi trường có chi phí khoảng 12.000 đồng [127]).

Tương ứng với lượng môi trường tính toán thì ước lượng các CDHSTTV bao gồm NAA (43 mg và 16 mg; tương ứng) và BA (172 mg và 64 mg; tương ứng). Năng lượng cho tủ cấy (16 kW) và thấp sáng 1 bóng điện thấp 12 giờ/ngày trong 4 tuần (121 kW) và 2,5 công lao động (mỗi công lao động hiện nay có thể cấy được 4.000 mẫu/ngày) là tương đương nhau ở cả 2 điều kiện nuôi cấy. Ngoài ra, năng lượng cho nồi hấp tiệt trùng ở điều kiện đối chứng là 25 kW; trong khi đó, bổ sung 4 mg/L AgNPs không phải sử dụng nồi hấp tiệt trùng. Bên cạnh đó, đối chứng cần bổ sung 688 g agar (8 g/L).

Trong giai đoạn sinh trưởng, môi trường nuôi cấy cần cho cả 2 nghiệm thức (80 L môi trường MS), năng lượng cho tủ cấy (16 kW) và thấp sáng 1 bóng điện thấp 12 giờ/ngày trong 4 tuần (121 kW) và công lao động (2,5 công) là tương đương nhau. Ngoài ra, nghiệm thức đối chứng cần năng lượng cho nồi hấp tiệt trùng (25 kW) trong khi nghiệm thức 4 mg/L AgNPs thì không. Bên cạnh đó hàm lượng agar của nghiệm

thức 4 mg/L AgNPs giảm một nửa so với nghiệm thức không bổ sung AgNPs (640 g agar và 320 g agar; tương ứng).

Với giai đoạn tái sinh chồi và sinh trưởng - phát triển thì giá thành ước tính cho sản xuất 10.000 cây giống Cúc ở đối chứng (4.842.943 đồng) cao hơn khoảng 1.244.527 đồng so với bổ sung 4 mg/L AgNPs (3.598.416 đồng). Do đó, chi phí trung bình cho 1 cây giống ở nghiệm thức bổ sung 4 mg/L AgNPs là khoảng 359,84 đồng thấp hơn khoảng 124,45 đồng so với đối chứng (484,29 đồng).

Vì vậy, có nhiều cách để ước lượng giá thành sản xuất cho mỗi cây giống [128]. Ngoài ra, các chi phí để sản xuất cây giống bao gồm nhân công, môi trường, thiết bị phòng nuôi cấy - bảo dưỡng và các chi phí khác (65%, 7%; 17%; 11%; tương ứng) [129]. Vì vậy, tiết kiệm môi trường nuôi cấy cũng có thể tiết kiệm được chi phí sản xuất cây giống. Bên cạnh đó, giá hóa chất và chi phí điện năng cũng ảnh hưởng đến giá thành sản xuất cây giống [130]. Giá thành của mỗi cây giống có thể hạ xuống nếu chúng ta tiết kiệm được hóa chất (agar, CDHSTTV) cũng như tiết kiệm năng lượng cho hấp tiệt trùng môi trường nuôi cấy.

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

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

Tỷ lệ sống sót của 3 loại mẫu cây (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 (Bảng 3.2.1, 3.2.2 và 3.2.3). 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.

Đối với mẫu cây cuống lá, hiệu quả khử trùng của 100 - 300 mg/L AgNPs cho tỷ lệ sống sót từ 75,53% - 80,00% hoặc 50 - 200 mg/L CuNPs (73,33% - 75,53%; tương ứng) cao hơn so với 1.000 mg/L HgCl₂ (71,13%) và 60.000 mg/L Ca(ClO)₂ (62,20%) (Bảng 3.2.1). Kết quả này cho thấy, nồng độ và thời gian khử trùng mẫu cây bằng AgNPs hoặc CuNPs ảnh hưởng lên hiệu quả khử trùng mẫu cây.

Bảng 3.2.1. Tỷ lệ sống sót của mẫu cây cuống hoa thu được từ quá trình khử trùng bằng các chất khử trùng khác nhau (AgNPs, CuNPs, HgCl₂ và Ca(ClO)₂).

Chất khử trùng	Nồng độ (mg/L)	Tỷ lệ sống sót (%)			
		Tuần thứ 1	Tuần thứ 2	Tuần thứ 3	Tuần thứ 4
AgNPs	50	95,53a	93,33a	91,13a	88,87ab
	100	97,80a	97,80a	95,53a	91,13a
	200	95,53a	93,33a	93,33a	93,33a
	300	100,00a	97,80a	93,33a	93,33a
	400	82,20b	77,80b	75,53b	73,33c
CuNPs	50	93,33a	88,89ab	84,44 abc	77,80bc
	100	93,33a	88,89ab	84,44 abc	81,13bc
	200	95,53a	88,89ab	84,44 abc	84,44abc
	300	95,53a	88,89ab	88,89abc	88,89ab
	400	93,33a	91,13a	82,20bc	73,33c
HgCl ₂	1.000	95,53a	95,53a	95,53a	93,33a
Ca(ClO) ₂	60.000	82,20b	82,20b	80,00b	77,80bc

*Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$ (Duncan's test).

Đối với mẫu cây cuống hoa, kết quả cho thấy sử dụng 50 - 300 mg/L AgNPs (88,87% - 93,33%) hoặc 200 - 300 mg/L CuNPs (84,44% - 88,89%) hoặc 1.000 mg/L HgCl₂ (93,33%) tối ưu so với 400 mg/L AgNPs (73,33%) hoặc các nồng độ khác của CuNPs (73,33 - 81,13%) hoặc 60.000 mg/L Ca(ClO)₂ (77,80%) sau 4 tuần (Bảng 3.2.2).

Đối với mẫu đoạn thân, 50 - 300 mg/L AgNPs cũng cho tỷ lệ mẫu sống (77,80% - 86,67%) hoặc 100 - 300 mg/L CuNPs ghi nhận tỷ lệ mẫu sống (77,80%) là cao hơn các nồng độ khác của AgNPs (73,33%) hoặc CuNPs (71,13%). Mặt khác,

HgCl₂ và Ca(ClO)₂ cũng ghi nhận tỷ lệ sống sót của mẫu cao (77,80%, 84,47%; tương ứng) (Bảng 3.2.3).

Bảng 3.2.2. Tỷ lệ sống sót của mẫu cây cuống lá thu được từ quá trình khử trùng bằng các chất khử trùng khác nhau (AgNPs, CuNPs, HgCl₂ và Ca(ClO)₂).

Chất khử trùng	Nồng độ (mg/L)	Tỷ lệ sống sót (%)			
		Tuần thứ 1	Tuần thứ 2	Tuần thứ 3	Tuần thứ 4
AgNPs	50	77,80c	75,53c	68,87de	60,00c
	100	95,53a	82,20ab	77,80abcd	75,53ab
	200	88,87ab	82,20ab	80,00abc	75,53ab
	300	88,87ab	84,47ab	82,20ab	80,00a
	400	77,80c	75,53bc	71,13cde	62,20c
CuNPs	50	88,87ab	80,00abc	75,53abcd	73,33ab
	100	95,53a	84,47ab	80,00abc	75,53ab
	200	95,53a	84,47ab	80,00abc	75,53ab
	300	93,33	84,47ab	82,20ab	71,13b
	400	88,87ab	82,20ab	77,80abcd	71,13b
HgCl ₂	1.000	95,53a	86,67a	84,47a	71,13b
Ca(ClO) ₂	60.000	82,20bc	75,53bc	73,33bcd	62,20c

*Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$ (Duncan's test).

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.

Bảng 3.2.3. Tỷ lệ sống sót của mẫu cây đoạn thân thu được từ quá trình khử trùng bằng các chất khử trùng khác nhau (AgNPs, CuNPs, HgCl₂ và Ca(ClO)₂).

Chất khử trùng	Nồng độ (mg/L)	Tỷ lệ sống sót (%)			
		Tuần thứ 1	Tuần thứ 2	Tuần thứ 3	Tuần thứ 4
AgNPs	50	84,47bc	80,00bc	77,80bc	77,80ab
	100	91,13ab	86,67ab	86,67ab	84,47ab
	200	91,13ab	88,87a	88,87a	86,67a
	300	91,13ab	88,87a	88,87a	86,67a
	400	80,00c	77,80c	75,53c	73,33b
CuNPs	50	88,87ab	80,00abc	75,53 abcd	73,33ab
	100	95,53a	84,47ab	80,00abc	75,53ab
	200	95,53a	84,47ab	80,00abc	75,53ab
	300	93,33a	84,47ab	82,20ab	71,13b
	400	88,87ab	82,20ab	77,80abcd	71,13b
HgCl ₂	1.000	88,87ab	84,47abc	77,80bc	77,80ab
Ca(ClO) ₂	60.000	95,53a	91,13a	86,67ab	84,47ab

*Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$ (Duncan's test).

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 (Bảng 3.2.1, 3.2.2 và 3.2.3). Nồng độ quá cao của CuNPs cũng ảnh hưởng đến khả năng khử trùng mẫu cây.

AgNPs và CuNPs đã chứng minh có hiệu quả để khử trùng mẫu cây và cảm ứng tạo phôi. Tuy nhiên, mỗi loại mẫu cây phản ứng khác nhau với nồng độ AgNPs và CuNPs thích hợp. Hiệu quả của AgNPs tùy thuộc vào sự kết hợp của thành phần hóa học, kích thước, độ phủ, nồng độ tương tác cũng như đối tượng cây trồng được sử dụng [4]. Việc ứng dụng AgNPs trong nuôi cấy mô thực vật để ngăn ngừa nhiễm nấm

và vi khuẩn cũng được ghi nhận [126]. Cũng như nghiên cứu trên cây hoa Nữ lang *Valeriana officinalis* ở điều kiện vườn ươm sau đó cho thấy hiệu quả của AgNPs giúp giảm tỷ lệ nhiễm nội sinh *Xanthomonas* của mẫu đốt thân trong nuôi cấy mô. Tuy nhiên, nghiên cứu về khả năng kháng nấm, khuẩn của AgNPs trong nuôi cấy mô còn rất ít; vì vậy, kết quả nghiên cứu này là tiên phong để bổ sung thêm dữ liệu về khả năng kháng vi khuẩn và nấm của AgNPs. Mặt khác, kết quả một số nghiên cứu cho thấy AgNPs có hiệu quả trong việc gia tăng sự sinh trưởng của thực vật cũng như giảm một số vi sinh vật (3 loài nấm và 8 loài vi khuẩn) trong môi trường vi thủy canh [70].

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 3.2.4). 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.

Đối với mẫu cây cuống lá, 100 - 300 mg/L AgNPs hoặc 100 - 200 mg/L CuNPs cho tỷ lệ cảm ứng tạo phôi (35,53% - 40,00%), cao hơn so với sử dụng HgCl₂ và Ca(ClO)₂ (17,80% và 22,20%; tương ứng) (Bảng 3.2.4). Đối với mẫu cuống hoa và đoạn thân, 200 - 300 mg/L AgNPs hoặc CuNPs ghi nhận tỷ lệ cảm ứng tạo phôi là tương đương nhau (35,53% - 46,67%). Sự gia tăng nồng độ AgNPs và CuNPs từ 50 - 200 mg/L cho thấy sự gia tăng tỷ lệ cảm ứng tạo phôi; trong khi đó, khi nồng độ AgNPs và CuNPs quá cao (400 ppm) thì hiệu quả cảm ứng tạo phôi lại giảm đi (Bảng 3.2.4). Vì vậy, AgNPs và CuNPs có hiệu quả để khử trùng mẫu cây và cảm ứng tạo phôi. Tuy nhiên, mỗi loại mẫu cây phản ứng khác nhau với nồng độ AgNPs hoặc CuNPs thích hợp.

Nồng độ AgNPs tăng từ 50 - 200 mg/L cho thấy sự gia tăng cảm ứng tạo phôi của mẫu cây cuống hoa và đoạn thân; cao nhất là 40% trong cả hai trường hợp. Nồng độ AgNPs tăng từ 200 lên 300 mg/L không có sự khác biệt về tỷ lệ cảm ứng tạo phôi ở cả hai loại mẫu cây này (lần lượt là 35,53% và 42,20%). Tuy nhiên, ở 400 mg/L AgNPs, tỷ lệ cảm ứng tạo phôi trong mẫu cây cuống hoa và đoạn thân không cao (lần lượt là 20,00% và 28,87%) (Bảng 3.2.4).

Bảng 3.2.4. Ảnh hưởng của các chất khử trùng lên tỷ lệ cảm ứng tạo phôi cây Thu hải đường từ các nguồn mẫu khác nhau sau 4 tuần.

Chất khử trùng	Nồng độ (mg/L)	Tỷ lệ phần trăm mẫu cây 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.

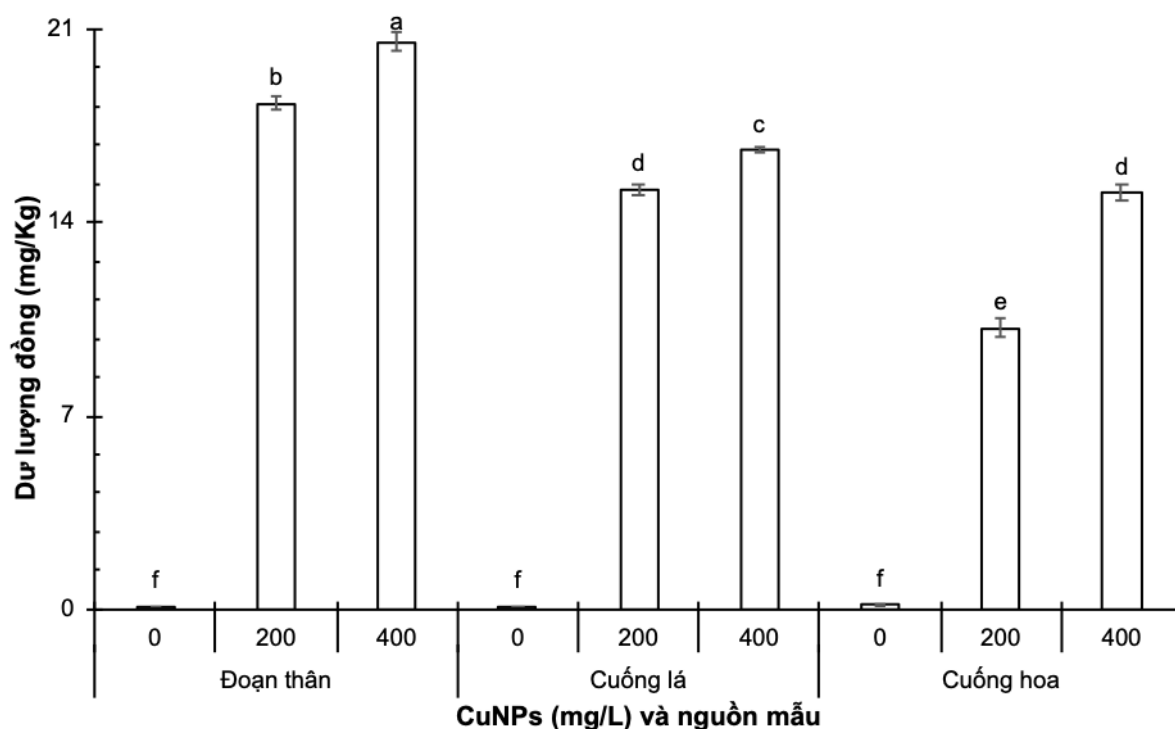
Ngoài ra, tỷ lệ cảm ứng tạo phôi thu được từ khử trùng mẫu cây cuống lá với 100 - 200 mg/L CuNPs hoặc mẫu cây cuống hoa và đoạn thân với 200 - 300 mg/L CuNPs cao gấp khoảng 2 - 3 lần so với khử trùng mẫu cây với HgCl₂ hoặc Ca(ClO)₂ sau 4 tuần (Bảng 3.2.4). Kết quả này cho thấy CuNPs có ảnh hưởng tích cực lên khử trùng mẫu cây và cảm ứng tạo phôi. Tuy nhiên, hiệu quả khử trùng mẫu cây của mỗi nồng độ CuNPs phụ thuộc vào loại mẫu cụ thể. Các mẫu cây khác nhau như cuống lá, đoạn thân, lá mầm có khả năng để cảm ứng tạo phôi ở một số loài. Bên cạnh đó, tùy thuộc vào loài, tỷ lệ cảm ứng tạo phôi cũng khác nhau [131, 132]. Kết quả của nghiên cứu này cũng cho thấy hiệu quả cảm ứng tạo phôi từ nguồn mẫu khác nhau khử trùng

bằng HgCl_2 , $\text{Ca}(\text{ClO})_2$, AgNPs hoặc CuNPs sau 4 tuần là khác nhau. Các chất khử trùng như HgCl_2 và $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ được sử dụng để khử trùng mẫu cấy có những ưu điểm và nhược điểm. Do tác dụng kháng khuẩn của chúng, đặc biệt là AgNPs và CuNPs trở thành chất khử trùng được sử dụng trong nuôi cấy mô. Ngoài ra, AgNPs hiệu quả hơn và thân thiện với môi trường, đồng thời tương thích với nhiều loại mô [28-30]. Một số nghiên cứu gần đây cho thấy AgNPs có hiệu quả trong khử trùng mẫu cấy của cây trồng nuôi cấy mô như cây Sâm, Dâu tây và Rong bắp sù [57, 58, 61]. Nghiên cứu của Khiêm và Hậu (2018) cho thấy khử trùng mẫu lá cây Thu hải đường bằng $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ cho tỷ lệ sống sót của mẫu đạt 24,3%, thấp hơn so với mẫu cấy được khử trùng với AgNPs (cao hơn 90%) [133].

Bên cạnh Ag, Cu còn được sử dụng khá phổ biến trong nông nghiệp, mỹ phẩm, môi trường, diệt nấm, thực phẩm, công nghiệp hóa chất, phụ gia nhiên liệu, công nghiệp dệt may, xử lý nước thải,...[134]. Trong nông nghiệp, CuNPs với nồng độ thích hợp có vai trò trong sự nảy mầm của hạt giống Lúa (*Oryza sativa*) [135], Ngò (*Coriandrum sativum*) [136], Lúa mạch (*Secale cereale*) [137], Cải (*Brassia nigra*) [138] và ảnh hưởng đến sự sinh trưởng và phát sinh hình thái của các loại thực vật như Rau diếp (*Lactuca sativiva*) [139], Cỏ linh lăng (*Medicago sativa*) [140], Khoai lang (*Ipomoea batatas*) [141],... Hơn nữa, CuNPs là chất chống nấm hiệu quả, chống lại *Fusarium oxysporum* [142, 143]. Tuy nhiên, CuNPs sử dụng trong khử trùng mẫu cấy chưa được ghi nhận trước đây trong nuôi cấy mô. Do đó, nghiên cứu này cho thấy ứng dụng của CuNPs trong khử trùng mẫu cấy và bổ sung thêm tài liệu cho các nghiên cứu trong tương lai. Khử trùng mẫu cấy của các nano kim loại phụ thuộc vào kích thước cũng như thành phần hóa học và quan trọng nhất là nồng độ của nano [144]. Hơn nữa, chưa có công bố nào ghi nhận trọng lượng phân tử và nguyên tử sử dụng làm dung dịch hạt nano ảnh hưởng đến khử trùng mẫu cấy.

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.



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

Trong lục lạp, Cu chiếm khoảng 50% và được liên kết với plasto-cyanin trong chuỗi truyền điện tử ở giữa quang hệ thống I và II. Với sự vắng mặt của Cu, nồng độ của plasto-cyanin sẽ giảm. Ngoài ra, màng lục lạp sẽ thiếu 2 protein điều hoà biểu hiện các plasto-quinone. Do đó, quá trình quang hợp sẽ giảm hiệu quả nếu thiếu Cu. Cu có ảnh hưởng lớn đến sự tổng hợp chlorophyll, trong khi sự dư thừa hoặc thiếu hụt của nó sẽ ảnh hưởng đến bộ máy quang hợp, điều này cho thấy chlorophyll bị ảnh hưởng bởi Cu và tùy từng loài thực vật khác nhau [72, 73].

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 và Hình 3.2.2, 3.2.3). 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 3.2.5).

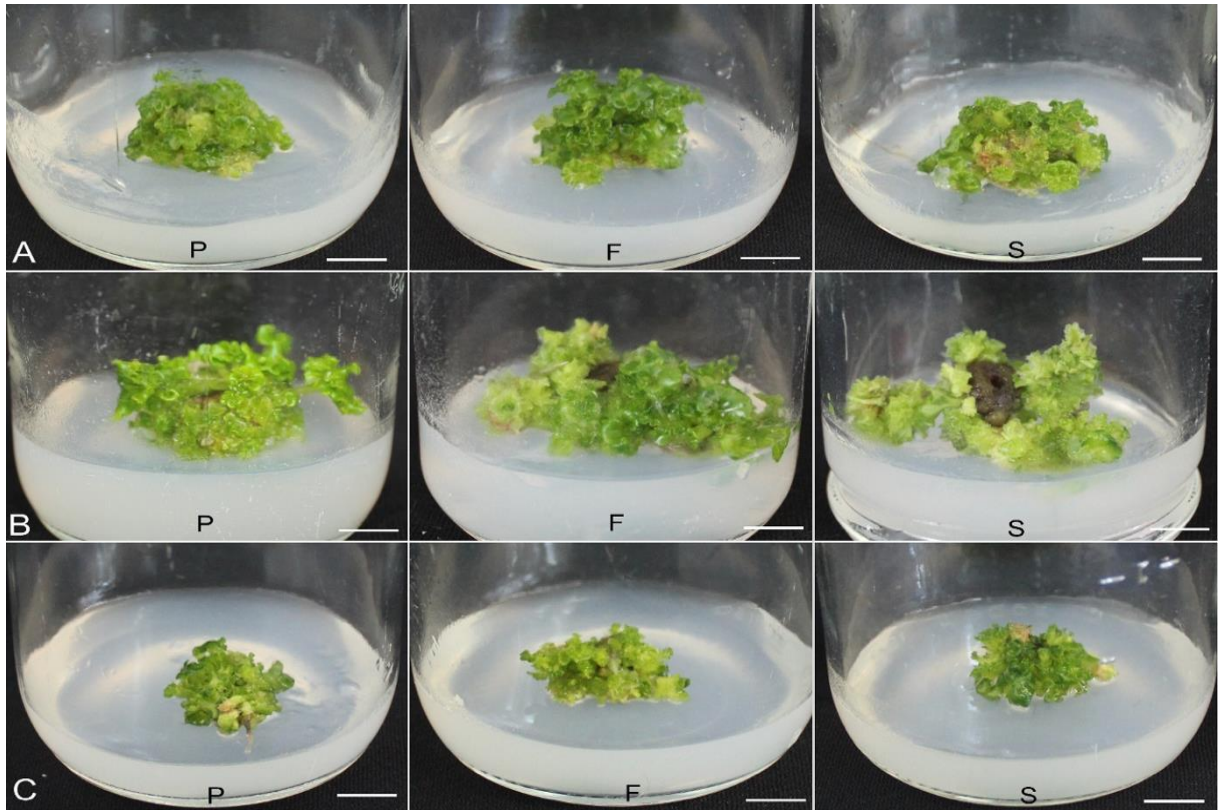
Bảng 3.2.5. Sự phát sinh phôi soma của cây Thu hải đường thu nhận từ các chất khử trùng mẫu cây khác nhau (AgNPs, CuNPs và HgCl₂) sau 8 tuần.

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).

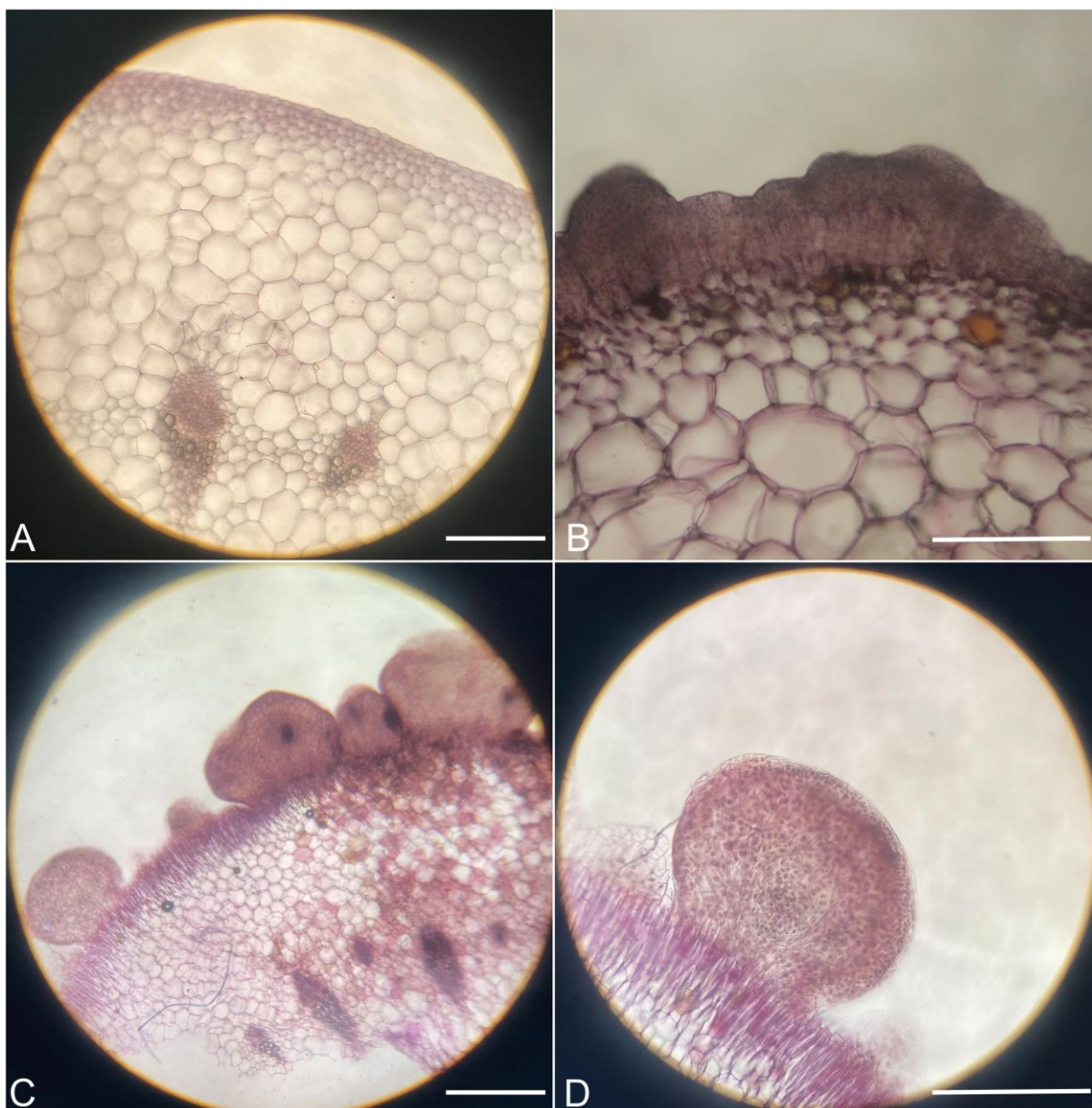
Tổng số phôi soma của 3 loại mẫu cây có nguồn gốc từ khử trùng mẫu cây với 200 mg/L AgNPs hoặc CuNPs cao hơn so với những phôi soma thu nhận từ khử trùng bằng HgCl₂. Trong đó, mẫu cây từ cuống hoa và đoạn thân được khử trùng mẫu cây với AgNPs hoặc CuNPs có tổng số phôi soma cũng như phôi soma ở hình dạng hai lá mầm cao hơn mẫu cây có nguồn gốc từ cuống lá (Bảng 3.2.2).



Hình 3.2.2. Cảm ứng tạo phôi của cây Thu hải đường từ các chất khử trùng mẫu cây khác nhau (AgNPs, CuNPs và HgCl₂) sau 8 tuần.

A: AgNPs; **B:** CuNPs; **C:** HgCl₂; **P:** Mẫu cuống lá; **F:** Mẫu cuống hoa; **S:** Mẫu đoạn thân (*Thước đo: 1 cm*).

Nghiên cứu này đã chỉ ra sự hình thành phôi soma với đầy đủ các hình dạng (hình cầu, hình tim, hình thủy lôi và hai lá mầm); trong khi đó, Nhựt và cộng sự [72, 87] chỉ mô tả khả năng tái sinh chồi từ các nguồn mẫu khác nhau. Vì vậy, kết quả nghiên cứu này có ý nghĩa trong việc chứng minh sự phát sinh hình thái thông qua phát sinh phôi soma cũng như vai trò của AgNPs hoặc CuNPs trong việc tăng hiệu quả phát sinh phôi soma cũng như thời gian của phát sinh phôi soma là nhanh hơn so với nguồn mẫu được khử trùng mẫu cây bằng chất khử trùng thông thường.



Hình 3.2.3. Hình thái giải phẫu của mẫu cây cảm ứng tạo phôi thu nhận từ mẫu cây được khử trùng bằng AgNPs.

A: Mẫu cây ban đầu; **B:** Mô sẹo có khả năng phát sinh phôi ở ngày thứ 14; **C, D:** Phôi soma hình cầu ở tuần thứ 4 (*Thước đo: 1 mm - Mẫu cây được quan sát dưới kính hiển vi soi nổi với độ phóng đại là 40x*).

Trong nghiên cứu này, AgNPs và CuNPs có thể sử dụng để thay thế các chất khử trùng thông dụng trong khử trùng mẫu cây. Cả 3 loại mẫu cây cuống lá, cuống hoa và đoạn thân được khử trùng bằng 200 - 300 mg/L AgNPs hoặc 200 mg/L CuNPs ghi nhận cảm ứng tạo phôi là cao hơn. Hơn nữa, 200 mg/L AgNPs hoặc CuNPs ảnh hưởng lên sự gia tăng phát sinh phôi soma với các hình dạng phôi đầy đủ so với khử trùng mẫu cây bằng HgCl₂.

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 3.2.6). Cả 3 loại mẫu cây khử trùng bằng CuNPs, CAT và APX cao hơn so với khử trùng mẫu cây với HgCl_2 hoặc AgNPs. APX thu được từ mẫu cuống hoa khử trùng bằng CuNPs là cao nhất trong khi CAT không khác biệt đáng kể giữa 3 loại mẫu cây (Bảng 3.2.6). Bên cạnh đó, hàm lượng carbohydrate của các cụm phôi sau 8 tuần ghi nhận sự khác biệt có ý nghĩa giữa các nghiệm thức khử trùng mẫu cây (Bảng 3.2.6).

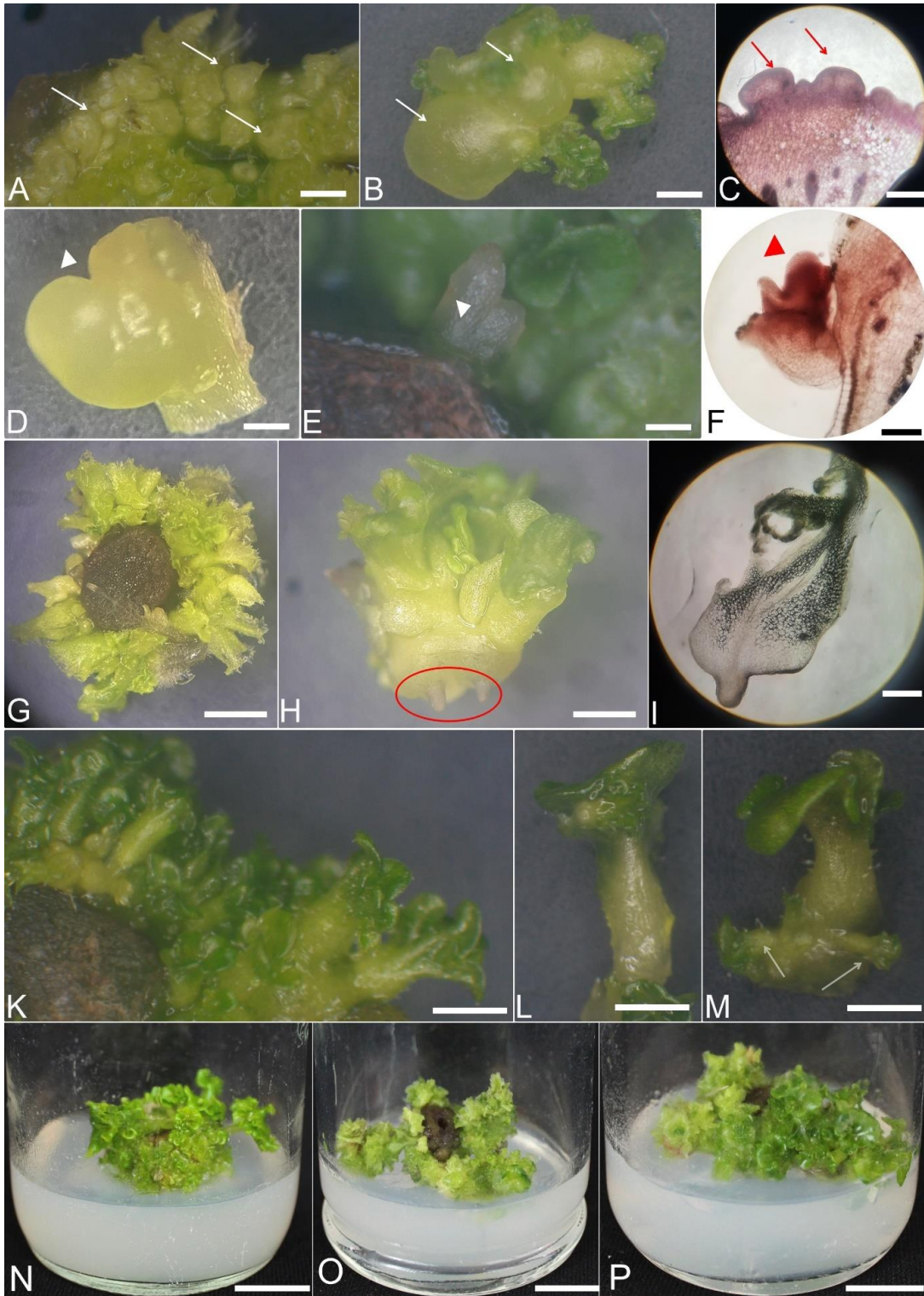
Các cụm phôi thu nhận từ cuống hoa và đoạn thân được khử trùng bằng CuNPs cho thấy sự tích lũy tinh bột cao hơn và đường thấp hơn so với khử trùng mẫu cây với HgCl_2 hoặc AgNPs. Ngoài ra, CuNPs (nồng độ 5 μM và kích thước 20 - 40 nm) đã được chứng minh là tăng cường tái sinh cây Húng quế (*Ocimum basilicum*) thông qua hình thành phôi soma (36 - 84%) và số lượng cây con tái sinh trên mỗi mẫu cây (7,4 - 18,7 cây) so với nghiệm thức đối chứng (0,1 μM $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) [144]. Hơn nữa, mức độ Cu tăng lên trong môi trường đã tăng cường sự tái sinh thông qua hình thành phôi soma ở các cây khác nhau, chẳng hạn như Lúa mì (*Triticum* sp.) [145, 146].

Gần đây, ảnh hưởng của CuNPs trong việc điều trị bệnh héo *Fusarium* (vì CuNPs làm giảm sự phát triển *Fusarium oxysporum* f. Sp. Lycopersic ở cây Cà chua) và thúc đẩy sự phát triển của cây Cà chua cũng được nghiên cứu [147]. Do đó, nghiên cứu này cho thấy vai trò của CuNPs trong việc gia tăng sự hình thành phôi soma qua trung gian khử trùng mẫu cây và dư lượng Cu trong mẫu sẽ ảnh hưởng đến sự phát triển tiếp theo.

Bảng 3.2.6. 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 3.2.4. 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 thùy lồi; **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*).

Kết quả của nghiên cứu này cho thấy vai trò của CuNPs trong việc khử trùng mẫu cấy dẫn đến gia tăng hiệu quả hình thành phôi soma với mẫu cấy khử trùng bằng HgCl_2 . Nghiên cứu trước đây đã ghi nhận và mô tả quá trình hình thành phôi soma với các hình dạng khác nhau trên cây Thu hải đường dưới điều kiện clinostat 2D và nuôi cấy mô, nguồn mẫu được sử dụng là cuống lá đã được khử trùng với HgCl_2 [96]. Ngoài ra, các nghiên cứu trước đây chủ yếu tập trung đánh giá ảnh hưởng của mẫu cấy, chất điều hòa sinh trưởng thực vật, ánh sáng, nguồn dinh dưỡng,... đến sự hình thành phôi soma. Tuy nhiên, ảnh hưởng của khử trùng mẫu cấy đối với sự hình thành phôi soma vẫn chưa được ghi nhận. Vai trò của CuNPs làm chất khử trùng mẫu cấy với hiệu quả tương tự HgCl_2 và gia tăng sự hình thành phôi soma cũng được ghi nhận. Ngoài ra, CuNPs không chỉ đóng vai trò trong khử trùng mẫu cấy của mẫu cuống hoa và đoạn thân mà còn làm tăng hiệu quả hình thành phôi soma thông qua số lượng và số phôi soma hình thủy lôi và hai lá mầm là tốt hơn so với mẫu cấy khử trùng bằng HgCl_2 và tương đương với mẫu cấy khử trùng bằng AgNPs (Bảng 3.2.5). Hình thái của phôi soma trải qua đầy đủ các hình dạng như hình cầu, hình tim, hình thủy lôi và hai lá mầm (Hình 3.2.4A-M).

Để khắc phục stress oxy hóa, thực vật có cơ chế kiểm soát và điều chỉnh mức ROS một cách thích hợp, bao gồm tăng hoạt độ enzyme chống oxy hóa như CAT và APX [51]. Các nghiên cứu về ảnh hưởng của các nano kim loại như AgNPs, nano sắt, nano titan đối với sự thay đổi oxy hóa và cấu trúc của thực vật hoặc rễ [148, 149] được chỉ ra trên một số cây trồng khác nhau. Hơn nữa, CuNPs thu được kết quả tốt hơn đồng sulphate trong thực vật về hình thái, chỉ số SPAD và hoạt động của enzyme chống oxy hóa [150]. Tuy nhiên, sự thay đổi hoạt tính enzyme chống oxy hóa do ảnh hưởng của CuNPs tương tác với các thành phần môi trường nuôi cấy khác nhau đến sự hình thành cụm phôi soma hoặc cấu trúc của phôi soma vẫn còn rất hạn chế. Ở phôi soma, CAT và APX đã được thay đổi sau khi các mẫu cấy khác nhau được khử trùng bằng CuNPs (Bảng 3.2.3), điều này cho thấy rằng sau khi khử trùng bằng CuNPs, phản ứng stress được tăng lên với việc làm tăng hoạt tính của enzyme chống oxy hoá và thúc đẩy quá trình cảm ứng tạo phôi.

Cảm ứng, biệt hóa, phát triển của phôi soma liên quan đến sự thay đổi hàm lượng carbohydrate (tinh bột, đường,...) như một nguồn năng lượng chuyển hóa [151]. Các nghiên cứu về sự tích lũy nhiều tinh bột trong mẫu cấy có tác động lên việc gia tăng sinh trưởng của mẫu cấy [152, 153] vì tinh bột là nguồn năng lượng hỗ trợ sự trao đổi chất cũng như sinh trưởng của mô cấy [152]. Kết quả của nghiên cứu ghi nhận tinh bột tích lũy cao hơn và đường thấp hơn trong phôi soma thu được từ mẫu cuống hoa và đoạn thân khử trùng bằng CuNPs. Điều này chứng tỏ hàm lượng tinh bột tích lũy của mẫu cấy được khử trùng bằng CuNPs tốt hơn. Tích lũy tinh bột là phản ứng trao đổi chất đầu tiên của quá trình nuôi cấy; trong đó, mẫu cấy chuyển đổi đường có trong môi trường thành tinh bột để lưu trữ trong các mô và mô phân sinh sau đó được hình thành [154]. Ngoài ra, mức độ tích lũy tinh bột và đường trong phôi soma thu được từ khử trùng mẫu cuống lá với CuNPs tương tự như khi khử trùng bằng $HgCl_2$ hoặc AgNPs.

Cu có ảnh hưởng lớn đến sự tổng hợp chlorophyll, trong khi sự dư thừa hoặc thiếu hụt của nó sẽ ảnh hưởng đến bộ máy quang hợp [150]. Sự gia tăng hàm lượng chlorophyll cũng đã được ghi nhận khi xử lý CuNPs ở cây Đậu xanh (*Vigna radiata*) [150] và cây Chùm ngây (*Moringa oleifera*) [155]. Ngược lại, với oxit đồng, hàm lượng chlorophyll đã giảm trong cây Cà chua (*Solanum lycopersicum*) và cây Bắp cải (*Brassica oleracea*) [156]. Điều này cho thấy chlorophyll bị ảnh hưởng bởi loại hạt nano và loài thực vật. Ngoài ra, CuNPs cải thiện hoạt động quang hợp ở cây Cà chua [147].

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

Sự thích nghi và sinh trưởng tiếp theo ở giai đoạn vườn ươm của cây con sau 16 tuần nuôi cấy được ghi nhận ở Bảng 3.2.7 và Hình 3.2.5A-C. Kết quả ghi nhận cho thấy các chỉ tiêu sinh trưởng của cây con không có sự khác biệt như số lá trên cây con, chiều dài rễ, SPAD; trong khi đó, có sự khác biệt về chiều cao cây con, số lượng rễ, khối lượng tươi và khô ở cây con lấy từ mẫu cấy được khử trùng với AgNPs và CuNPs. Ngoài ra, cây con có nguồn gốc từ phôi soma phát triển tốt và không có bất thường về hình thái trong quá trình hình thành rễ (Hình 3.2.5A-C).

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 3.2.8). Tuy nhiên, chỉ số SPAD cao hơn và thời gian bắt đầu ra hoa ngắn hơn ở cây con lấy từ mẫu cấy được khử trùng với AgNPs và CuNPs. Mặt khác, cây con được trồng ở vườn ươm không có sự bất thường về hình thái (Hình 3.2.6A-C).

Bảng 3.2.7. Sinh trưởng của cây Thu hải đường *in vitro* tái sinh từ phôi soma sau 16 tuần nuôi cấy.

Nghiệm 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 3.2.8. Thích nghi và sinh trưởng tiếp theo của cây Thu hải đường ở điều kiện vườn ươm sau 16 tuần.

Nghiệm 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

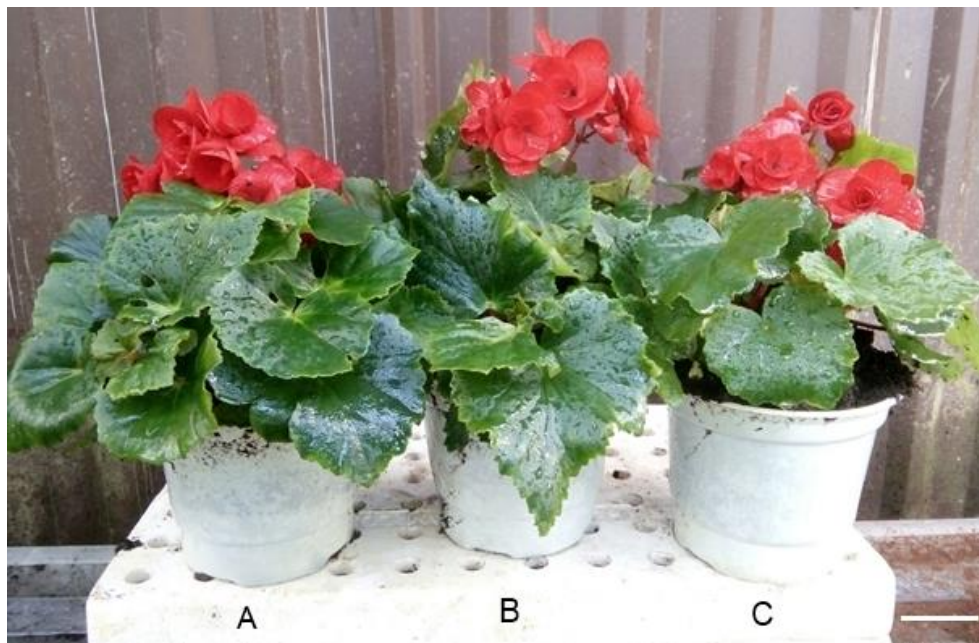
* Chữ cái khác nhau cùng một cột ghi nhận sự khác biệt với ý nghĩa thống kê $p < 0,05$ trong phép thử Duncan.

Cây con thu nhận từ phôi soma không cho thấy sự khác biệt có ý nghĩa về chỉ tiêu sinh trưởng (ngoại trừ chiều cao cây con, số lượng rễ, khối lượng tươi và khô). Điều này cho thấy cây con có tích lũy chất khô tốt hơn nhờ sự tích lũy tinh bột và tăng hoạt tính của enzyme chống oxy hóa (CAT và APX) ở giai đoạn hình thành phôi soma sẽ tăng trưởng trong giai đoạn tiếp theo. Ngoài ra, cây con thu nhận từ khử trùng mẫu cấy bằng AgNPs và CuNPs cho thấy ra hoa sớm hơn và chỉ số SPAD cao hơn.

Kết quả cho thấy AgNPs và CuNPs được ứng dụng như một chất khử trùng mẫu cấy ở cây Thu hải đường. Ngoài ra, AgNPs và CuNPs có ảnh hưởng tích cực đối với sự sinh trưởng tiếp theo của cây Thu hải đường. Do đó, các cây trồng nuôi cấy mô khác cần được nghiên cứu nhằm để đánh giá rõ hơn vai trò của AgNPs và CuNPs sử dụng thay thế một số chất khử trùng khác và sự phát sinh cơ quan, sinh lý - sinh hóa cũng như sự sinh trưởng tiếp theo của mẫu cấy.



Hình 3.2.5. Cây Thu hải đường *in vitro* tái sinh từ phôi soma sau 16 tuần nuôi cấy.
A, B, C: Cây con thu nhận từ khử trùng mẫu cây bằng AgNPs, CuNPs và HgCl_2 (Thước đo: 2 cm).



Hình 3.2.6. Cây Thu hải đường ở điều kiện vườn ươm sau 16 tuần.
A, B, C: Cây con thu nhận từ khử trùng mẫu cây bằng AgNPs, CuNPs; HgCl_2 (Thước đo: 5 cm).

3.3. 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

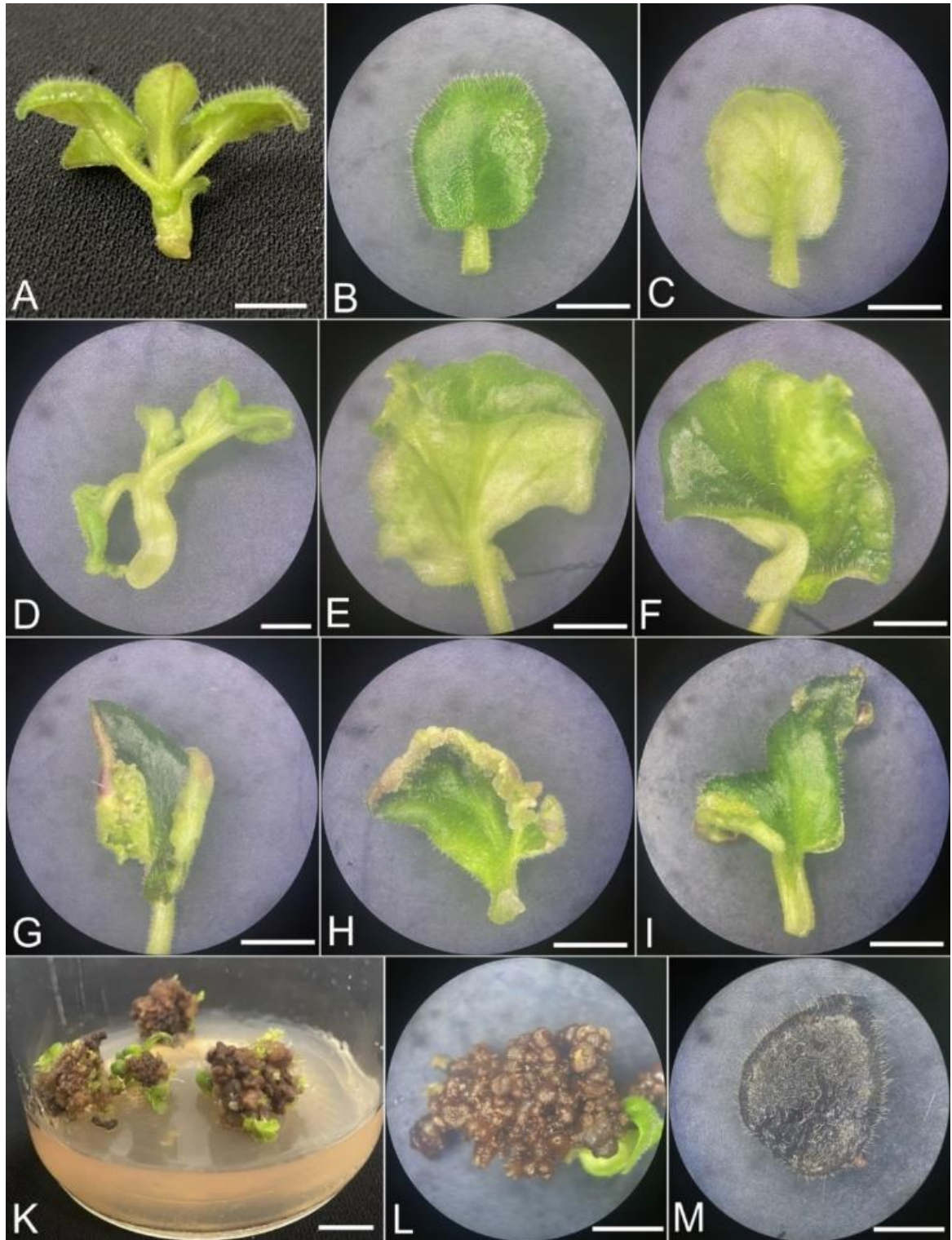
3.3.1. Đánh giá khả năng tái sinh chồi của các nguồn mẫu khác nhau và ghi nhận hiện tượng bất thường

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). Kết quả ghi nhận trên cây Kiwi cũng tương đồng, mẫu gân chính của lá cho hiệu quả tái sinh tối ưu so với mẫu lá nguyên [157]. 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 như thủy tinh thể, hình thành mô sẹo ở mép lá, hoại tử mẫu cấy, hóa nâu mẫu cấy và môi trường nuôi cấy trong giai đoạn tái sinh chồi của mẫu cấy chứa gân chính của lá và mẫu lá nguyên của cây Tử linh lan được ghi nhận ở Bảng 3.3.1 sau 8 tuần.

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
Tỷ lệ mẫu tái sinh chồi (%)	40,00 ± 1,15*	66,00 ± 2,08
Số chồi/mẫu	2,67 ± 0,33	5,33 ± 0,33
Chiều cao chồi (cm)	0,50 ± 0,60	0,73 ± 0,06
Thủy tinh thể (%)	20,00 ± 1,15	19,67 ± 1,20
Mô sẹo ở mép lá (%)	21,67 ± 1,67	22,33 ± 1,45
Hoại tử mẫu cấy (%)	14,67 ± 0,88	12,33 ± 1,45
Hóa nâu mẫu cấy và môi trường nuôi cấy (%)	20,33 ± 0,88	10,67 ± 0,67

*Các giá trị trong bảng thể hiện dữ liệu trung bình ± SE (sai số chuẩn) trong phép thử LSD với $p < 0,05$.



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).

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 cấy (14,67% và 12,33%; tương ứng), mẫu cấy và môi trường nuôi cấy hóa nâu (20,33% và 15,67%; tương ứng) (Bảng 3.3.1 và Hình 3.3.1). Hiện tượng thủy tinh thể là một trong những hiện tượng bất thường chủ yếu được ghi nhận trong nuôi cấy mô và đã được ghi nhận khi nuôi cấy cây Cẩm chướng (*Dianthus caryophyllus*) [158] và cây Xương rồng (*Euphorbia antiquorum*) [159]. Nguyên nhân dẫn đến hiện tượng thủy tinh thể trong vi nhân giống là sự kết hợp của nhiều yếu tố như môi trường, loại và nồng độ CĐHSTTV [160], độ ẩm và khí ethylene [161], hệ thống nuôi cấy và các chất làm đông như agar hay gelrite trong môi trường nuôi cấy mô [162]. 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 cấy (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).

Bên cạnh đó, hiện tượng hoại tử mẫu cấy và môi trường nuôi cấy hóa nâu cũng được ghi nhận trong giai đoạn tái sinh chồi (Hình 3.3.1K-M); trong đó, mẫu gân chính của lá ghi nhận các hiện tượng này thấp hơn so với mẫu lá nguyên. Điều này có thể là do mẫu gân chính của lá có vết thương sau khi cắt mẫu nên khả năng tiếp xúc, hấp thu dinh dưỡng tốt hơn so với mẫu lá nguyên. Với điều kiện nuôi cấy là bình kín, độ ẩm trong bình cao hơn 95%, thành phần môi trường nuôi cấy và sự tích lũy các khí (đặc biệt là khí ethylene) đã dẫn đến các hiện tượng bất thường trong quá trình nuôi cấy mô [51, 57]. Do đó, việc tìm ra một vật liệu mới giúp gia tăng sự sinh trưởng của mẫu cấy cũng như hạn chế một số hiện tượng bất thường là rất cần thiết trong nhân giống một số cây trồng.

3.3.2. Ảnh hưởng của AgNPs gia lên 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). Môi trường MS bổ sung AgNPs đã cải thiện tỷ lệ tái sinh chồi so với nghiệm thức không bổ sung AgNPs sau 4 tuần nuôi cấy. Trong đó, nghiệm thức 2 mg/L AgNPs ghi nhận tỷ lệ tái sinh chồi (89,33%), chiều cao chồi (0,67 cm), khối lượng tươi và khô của cụm chồi (581,33 mg và 72,67 mg; tương ứng) là cao hơn các nghiệm thức AgNPs khác (Bảng 3.3.2). Ngoài ra, nghiệm thức bổ sung 3 mg/L AgNPs ghi nhận số chồi/mẫu (7,67 chồi) là cao hơn các nghiệm thức còn lại (Bảng 3.3.2 và Hình 3.3.2A).

Sau 8 tuần nuôi cấy, cụm chồi tiếp tục sinh trưởng trên môi trường có bổ sung AgNPs và đối chứng (Bảng 3.3.3). Nghiệm thức 1 và 2 mg/L AgNPs cho hiệu quả tốt nhất với tổng số chồi ghi nhận được (10,67 chồi/mẫu và 10 chồi/mẫu); tuy nhiên, số chồi (> 1 cm) ghi nhận được ở nồng độ 2 mg/L AgNPs lại cao hơn (5,67 chồi) (Bảng 3.3.3 và Hình 3.3.2B-C). Ngoài ra, chiều cao chồi (1,30 cm), khối lượng tươi và khô cụm chồi (1476,00 mg và 160,67 mg; tương ứng) ghi nhận tối ưu ở nghiệm thức 2 mg/L AgNPs (Bảng 3.3.3). SPAD không có sự khác biệt rõ ràng giữa các nghiệm thức AgNPs và đối chứng, tuy nhiên hàm lượng khí ethylene và enzyme chống oxy hóa của cụm chồi trên môi trường chứa AgNPs sau 8 tuần nuôi cấy thì ghi nhận sự khác biệt có ý nghĩa (Bảng 3.3.4). Hàm lượng ethylene ở nghiệm thức 2 mg/L AgNPs thấp hơn so với đối chứng (1,15 mg/L so với 1,36 mg/L); trong khi đó, hoạt tính enzyme CAT và APX lại gia tăng hơn so với nghiệm thức đối chứng (Bảng 3.3.4). Hơn nữa, ghi nhận hiện tượng bất thường trong giai đoạn tái sinh chồi cho thấy hiện tượng thủy tinh thể (14,33%), mô sẹo ở mép lá (15%), hoại tử mẫu cấy (6,67%), mẫu cấy và môi trường nuôi cấy hóa nâu (8,00%) giảm ở nồng độ 2 mg/L AgNPs so với nghiệm thức không bổ sung AgNPs (Bảng 3.3.1 và Hình 3.3.3).

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

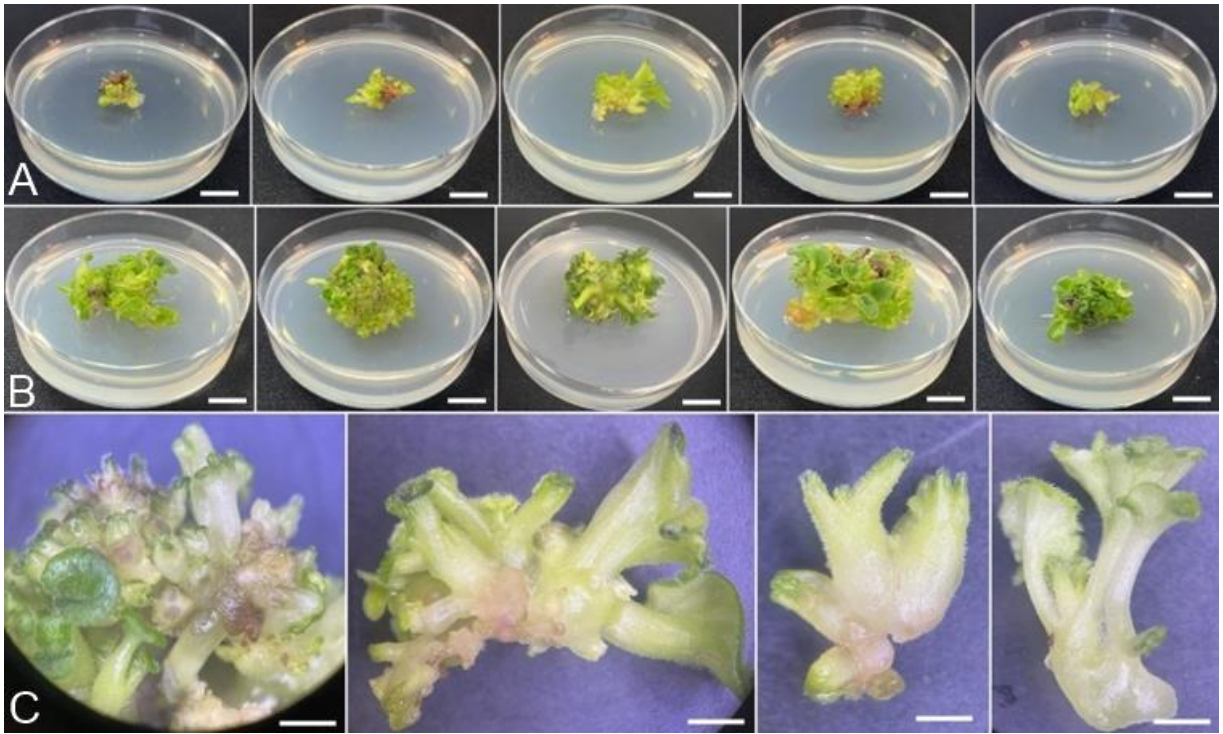
AgNPs (mg/L)	Tỷ lệ tái sinh chồi (%)	Số chồi/mẫu	Chiều cao chồi (cm)	Khối lượng tươi cụm chồi (mg)	Khối lượng khô cụm chồi (mg)
0	67,67d*	5,67b	0,47bc	282,67c	36,00d
1	79,00bc	6,00b	0,53ab	467,67b	60,67b
2	89,33a	6,00b	0,67a	581,33a	72,67a
3	82,33b	7,67a	0,43bc	409,00b	50,33c
4	76,33c	5,00b	0,30c	409,33b	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 cây Tử linh lan sau 8 tuần nuôi cấy.

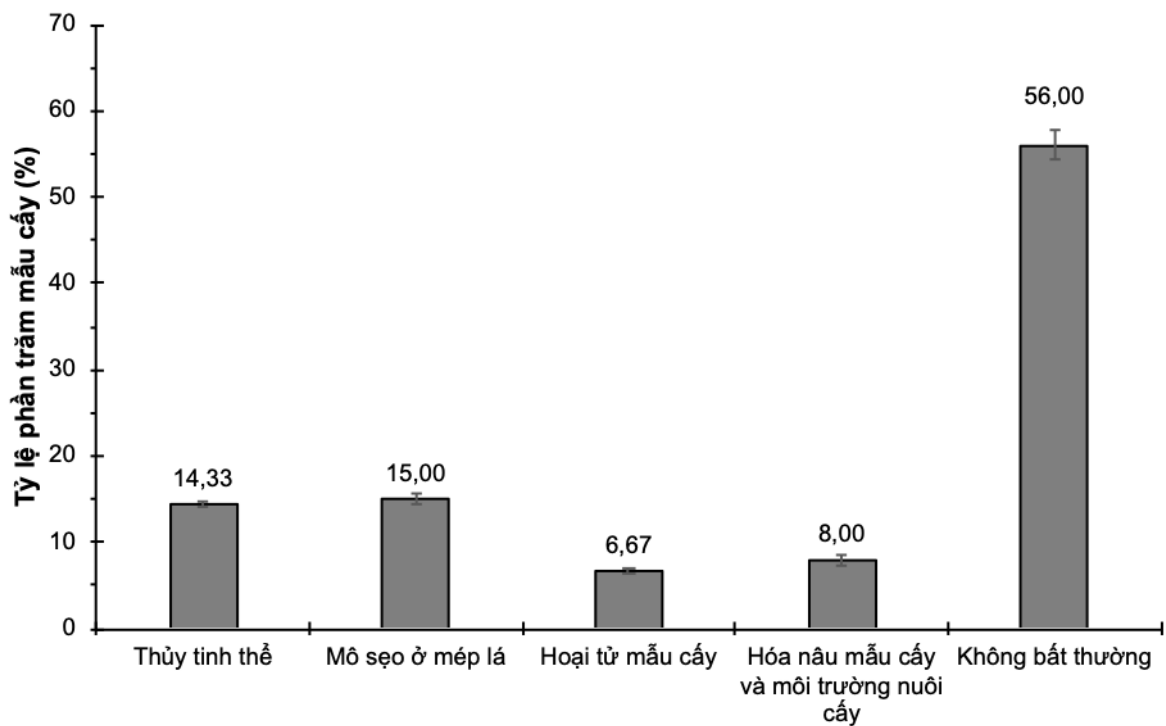
AgNPs (mg/L)	Số chồi/mẫu		Chiều cao chồi (cm)	SPAD	Khối lượng tươi (mg)	Khối lượng khô (mg)
	Tổng	Chồi > 1 cm				
0	7,33bc*	1,67bc	0,73c	27,33a	1020,33d	120,00c
1	10,67a	2,33b	0,80bc	27,67a	1198,33c	134,33b
2	10,00a	5,67a	1,30a	30,00a	1476,00a	160,67a
3	8,00b	1,33d	0,93b	28,00a	1358,00b	147,00ab
4	6,00c	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 Tử 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 khả năng hạn chế một số hiện tượng bất thường trong giai đoạn tái sinh chồi cây Tử linh lan sau 8 tuần nuôi cấy.

Ethylene là một hormone duy nhất ở dạng khí, điều chỉnh một số quá trình sinh lý ở cây trồng, được chứng minh là đóng một vai trò quan trọng trong hệ thống bảo vệ của thực vật chống lại các yếu tố stress phi sinh học và sinh học và có hoạt tính ở nồng độ từ 0,01 đến 1,0 mg/L. Sự tác động được ghi nhận phụ thuộc vào loài thực vật, kiểu đáp ứng,... Từ lâu thực vật được biết là có thể sản xuất ra ethylene; nó được coi là một phytohormone điều chỉnh các quá trình phát triển và tăng trưởng khác nhau, hỗ trợ hoặc đối kháng với những hormone khác [163]. Ethylene có vai trò ức chế sự sinh trưởng thực vật, tùy thuộc vào loài, mô và loại tế bào thực vật, giai đoạn phát triển. Trong bình nuôi cấy kín, khi hàm lượng ethylene cao sẽ ức chế phát sinh hình thái của mẫu cấy, nó còn được xem là một trong các nguyên nhân gây ra hiện tượng thủy tinh thể trong nuôi cấy mô ở một số loài thực vật. Do đó, một số kỹ thuật như sử dụng bình thoáng khí, màng Millipore, than hoạt tính, hoặc các chất có tác dụng ức chế ethylene như: Cobalt, Ag^+ , Aminoethoxyvinylglycine được sử dụng trong nuôi cấy mô. Ngoài ra, Ag là một kim loại ít được thêm vào môi trường nuôi cấy mà chỉ được bổ sung vào môi trường nuôi cấy mô để ngăn ngừa và xử lý một số bệnh trên cây trồng ở dạng ion Ag^+ có trong muối bạc nitrate ($AgNO_3$). Bạc được chứng minh là có thể hạn chế sự tổng hợp ethylene và làm thay đổi vùng hoạt động của ethylene. Ngoài ra, ETR1 có thể liên kết với ethylene qua trung tâm hoạt động của 1 tiểu phần có Cu^+ . Bên cạnh đó, sự thay thế Cu^+ bằng Ag^+ làm cho ETR1 không thể liên kết với ethylene; dẫn đến ngăn chặn các tín hiệu ức chế của ethylene. Nguyên nhân là do có sự tương đồng về trạng thái oxy hóa - khử, hình dạng, Cu^+ và Ag^+ trong quá trình tạo thành phức chất với ethylene. Miyazaki và Yang (1987) đã báo cáo ảnh hưởng của $AgNO_3$ lên SAM - là một tiền chất để tạo thành ethylene, từ đó ngăn chặn những tác động tiêu cực của ethylene lên cây như stress, hiện tượng bất thường. Bên cạnh đó, polyamine có vai trò thiết yếu như phát sinh hình thái, tổng hợp protein, phân chia tế bào, nhân đôi DNA và giúp cây chống lại các tác nhân stress phi sinh học hay sinh học. Một số báo cáo đã cho thấy mối liên hệ chặt chẽ giữa các polyamine, ethylene và SAM. Trong mối liên hệ này, ethylene hay polyamine đều có chung một tiền chất là SAM để có thể sinh tổng hợp nên chúng; vì vậy, sử dụng các chất ức chế tổng hợp ethylene như $AgNO_3$, cobalt chlorua sẽ làm cho SAM không sinh tổng hợp ethylene và đồng nghĩa với việc SAM sẽ tổng hợp polyamine nhiều hơn và dẫn đến gia tăng sự phát sinh hình thái thực

vật. AgNPs kích thước nhỏ hơn 20 nm và diện tích bề mặt lớn sẽ gia tăng khả năng tiếp xúc và sự bám dính lên bề mặt tế bào làm cho hiệu quả tác động của AgNPs cao hơn so với Ag^+ . AgNPs tác động đến khả năng sinh trưởng của cây trồng thông qua các biến đổi ở mức độ sinh lý và phân tử theo các hướng khác nhau phụ thuộc vào đối tượng cây trồng, cấu trúc và nồng độ AgNPs. Ngoài ra, AgNPs có hiệu quả cao trong việc kháng nấm và vi khuẩn cũng như sự sinh trưởng, phát sinh hình thái của cây nuôi cấy mô. Gần đây, AgNPs có khả năng cải thiện sinh trưởng của các cây trồng thông qua quá trình biến dưỡng (chlorophyll, protein, carbohydrate, enzyme chống oxy hóa,...). Bên cạnh đó, hiệu quả kháng vi sinh vật cao dựa trên tính chất vật lý của AgNPs là có thể hấp thu ánh sáng ở bước sóng từ 390 đến 420 nm. Vì vậy, thực vật sinh trưởng trên môi trường nuôi cấy mô bổ sung AgNPs ghi nhận sinh khối cao hơn, giảm hiện tượng vàng và rụng lá, lá màu xanh đậm hơn so với cây được nuôi cấy trên môi trường không bổ sung AgNPs. Gần đây, AgNPs được chứng minh có hiệu quả ức chế sự hoạt động của ethylene [160]. Ngoài ra, AgNPs được chứng minh là giảm tích lũy ethylene trong các bình nuôi cấy của chồi cây Dâu tây [57]. Ngoài ra, tùy theo đối tượng cây trồng khác nhau mà nồng độ AgNPs tác động lên sinh trưởng là không giống nhau [57, 164].

Hoạt tính của enzyme CAT và APX trong chồi ở nghiệm thức AgNPs ở nồng độ tối ưu có sự gia tăng. Hoạt tính của CAT và APX được ghi nhận gia tăng trên cây Cải bẹ xanh trong môi trường bổ sung AgNPs (25 - 50 mg/L) và cây sinh trưởng mạnh [35]. Ngoài ra, môi trường nuôi cấy cây Lúa và Cải bẹ xanh chứa AgNPs ghi nhận sự tăng mạnh biểu hiện gen *FSD1* của SOD, CAT và APX; do đó, làm giảm đáng kể sự tích lũy gốc H_2O_2 và kích thích sự sinh trưởng của cây [165]. Trong nghiên cứu này, bổ sung AgNPs giúp gia tăng khả năng tái sinh chồi, hạn chế một số hiện tượng bất thường, giảm tích lũy khí ethylene, gia tăng hoạt tính enzyme chống oxy hóa (Bảng 3.3.2, 3.3.3, 3.3.4 và Hình 3.3.2, 3.3.3). Từ những kết quả trên cho thấy, bổ sung 2 mg/L AgNPs giúp gia tăng hiệu quả tái sinh chồi cũng như hạn chế tỷ lệ mẫu có hiện tượng thủy tinh thể, mô sẹo ở mép lá, hoại tử mẫu cấy và hóa nâu mẫu cấy và môi trường nuôi cấy mô của cây Tử linh lan.

Bảng 3.3.4. Hàm lượng khí ethylene trong đĩa nuôi cấy và enzyme chống oxy hóa của cụm chồi cây Tử linh lan 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.

Stress sinh học và phi sinh học có thể làm tăng sản xuất các ROS và thúc đẩy phản ứng phòng vệ của cây trồng trong vi nhân giống. SOD, CAT và APX là 3 enzyme kháng oxy hóa thiết yếu đóng vai trò quan trọng như là yếu tố bảo vệ. Ở nồng độ thấp, ROS nội sinh là tín hiệu để điều chỉnh quá trình ly giải tế bào (apoptosis), kích hoạt các yếu tố phiên mã (NFkB, p38-MAP, kinase), điều chỉnh sự biểu hiện của các gen mã hóa cho các enzyme kháng oxy hóa. Tuy nhiên, khi hàm lượng ROS tăng lên quá mức, ROS gây biến tính protein, oxy hóa lipid, giảm quang hợp và thậm chí gây chết tế bào. Sau đó thực vật có cơ chế điều chỉnh hàm lượng ROS một cách hiệu quả bởi sự gia tăng hoạt tính enzyme kháng oxy hóa (CAT, SOD và APX) để giảm thiểu độc tính của ROS cũng như tăng cường khả năng chống chịu của thực vật nuôi cấy.

Ảnh hưởng của AgNPs bổ sung vào môi trường cho sự nảy mầm cây Lúa (*Oryza sativa*) được ghi nhận ở mức độ phân tử như sự tăng mạnh biểu hiện gen *FSD1* của SOD trong rễ và lá ở cả nồng độ cao và thấp, đặc biệt là ở rễ [165]. Tuy nhiên, sự biểu hiện các gen CAT và APX lại không thay đổi đáng kể cả ở rễ và lá; do đó, H₂O₂

không được chuyển hóa triệt để thành H_2O và O_2 . Với chức năng phân giải H_2O_2 thành H_2O và O_2 , hoạt tính của CAT và APX gia tăng đã làm giảm lượng H_2O_2 gây độc cho hệ rễ của thực vật nuôi cấy. Với chức năng phân giải H_2O_2 thành H_2O và O_2 , hoạt tính của CAT và APX gia tăng đã làm giảm lượng H_2O_2 gây độc cho hệ rễ của thực vật nuôi cấy [165].

Tóm lại, bổ sung 2 mg/L AgNPs có hiệu quả lên sự nhân nhanh chồi và sinh trưởng của cụm chồi, hạn chế 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 khí ethylene và gia tăng hoạt tính enzyme chống oxy hóa (CAT và APX) trong giai đoạn tái sinh chồi.

CHƯƠNG 4. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

4.1. Kết luận

Trong nghiên cứu này, AgNPs được chứng minh có hiệu quả lên khử trùng môi trường nuôi cấy mô so với phương pháp hấp tiệt trùng thông thường. Ngoài ra, AgNPs hoặc CuNPs có hiệu quả khử trùng mẫu cấy, gia tăng sinh trưởng của mẫu cấy (cảm ứng mô sẹo, cảm ứng tạo phôi, tái sinh chồi, ra rễ *in vitro*, thích nghi ở vườn ươm) và sinh lý - sinh hoá (enzyme kháng oxy hoá, tinh bột và đường) của mẫu cấy. Mặt khác, AgNPs bổ sung trong môi trường nuôi cấy mô giúp hạn chế các hiện tượng bất thường của mẫu cấy. Tùy theo từng đối tượng nghiên cứu cụ thể mà AgNPs hoặc CuNPs có tác động khác nhau trong khử trùng mẫu, khử trùng môi trường nuôi cấy và vi nhân giống:

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 cũng như gia tăng hoạt độ APX và SOD của cây.

AgNPs và CuNPs khử trùng mẫu cấy và sinh trưởng tiếp theo của mẫu cấy: Mẫu lá cây hoa 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 một số chất khử trùng khác trong vi nhân giống.

DANH MỤC CÔNG TRÌNH 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 Tử linh lan (*Saintpaulia ionantha* Wendl.) nuôi cấy *in vitro*. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam* (Bản B) – Chấp nhận đăng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] A. Cassells, *Problems in tissue culture: culture contamination. Micropropagation*. Springer, 1991, 31-44.
- [2] N. Mahna, S.Z. Vahed, S. Khani, *Plant in vitro culture goes nano: Nanosilver-mediated decontamination of ex vitro explants*, J. Nanom. Nanotech., 2013, 161 (4), 1-4.
- [3] N. Rezvani, A. Sorooshzadeh, N. Farhadi, *Effect of nanosilver on growth of saffron in flooding stress*, World Aca. Sci. Eng. Tech., 2012, 6 (1), 517-522.
- [4] Y.Y. Syu, J.H. Hung, J.C. Chen, H.W. Chuang, *Impacts of size and shape of silver nanoparticles on Arabidopsis plant growth and gene expression*, Plant Physiol. Biochem., 2014, 83C, 57-64.
- [5] S.S. Bhojwani, P.K. Dantu, *Plant Tissue Culture: An Introductory Text*. Springer, London, UK, 2013.
- [6] C. Leifert, C.E. Morris, W.M. Waites, *Ecology of microbial saprophytes and pathogens in tissue culture and field-grown plants: Reasons for contamination problems in vitro*, Crit. Rev. Plant Sci., 1994, 13 (2), 139-183.
- [7] J.V. Bragt, D.A.A. Mossel, R.M.L. Pierik, H. Veldstra, *Effects of sterilization on components in nutrient media*. In: H. Veenman, N.V. Zonon (Eds.) Misc. Papers 9. Wageningen, the Netherlands, 1971, 38-104.
- [8] E. Ball, *Hydrolysis of sucrose by autoclaving media, a neglected aspect in the technique of culture of plant tissues*, Bull. Torrey Bot. Club., 1953, 80, 409-411.
- [9] X.J. Wang, K.C. Hsiao, *Sugar degradation during autoclaving: Effects of duration and solution volume on breakdown of glucose*, Physiol. Plant., 1995, 94, 415-418.
- [10] G. Abdi, *Evaluation the potential of nano silver for removal of bacterial contaminants in Valerian (Valeriana officinalis L.) tissue culture*, J. Biol. Environ., 2012, 6 (17), 199-205.
- [11] M. Ines, D. Krunoslav, T. Vesna, V. Marija, P. Ankica, C. Zlatko, P. Boris, J. Zorica, *In vitro sterilization procedures for micropropagation of Oblaciska sour cherry*, J. Agric. Sci., 2013, 58 (2), 117-126.

- [12] M.F. Lazo-Javalera, R. TroncosoRojas, M.E.T. Hernandez, M.A. Martinez-Tellez, A.I. Vargas, M.A. Islas-Osuna, M. Rivera-Dominguez, *Surface disinfection procedure and in vitro regeneration of grapevine (Vitis vinifera L.) axillary buds*. Springer Plus 5, 2016, 453.
- [13] Y. Duan, H. Zhang, M. Sun, F. Zhao, T. Xue, J. Xue, *Use of chlorine dioxide to sterilize medium for tissue culture of potato*, Sci. Reports, 2019, 9, 10232.
- [14] WHO, *Air Quality Guidelines for Europe*, 2nd ed. World Health Organization Regional Office for Europe. Copenhagen, Denmark, 2000.
- [15] M.R. Siegel, *Biological and biochemical considerations in the use of selective and nonselective fungicides*. In: J. Street (Ed.) Pesticide Selectivity. Marcel Dekker Inc., New York, USA, 1975, 21-46.
- [16] S. Leelavathy, P.D. Sankar, *Curbing the menace of contamination in plant tissue culture*, J. Pure Appl. Microbiol., 2016, 10 (3), 2145-2152.
- [17] C.R. Phillips, B. Warshowsky, *Chemical disinfectants*, Ann. Rev. Microbiol., 1958, 12, 525-550.
- [18] J.A. Teixeira da Silva, N.T. Duong, T. Michi, F. Seiichi, *The effect of antibiotics on the in vitro growth response of chrysanthemum and tobacco stem transverse thin cell layers (tTcLs)*, Sci. Hortic., 2003, 97, 397-410.
- [19] D. O'Carroll, B. Sleep, M. Krol, H. Boparai, C. Kocur, *Nanoscale zero valent iron and bimetallic particles for contaminated site remediation*, Adv. Water Res., 2013, 51 (1), 104-122.
- [20] N.R. Panyala, E.M. Pena-Méndez, J. Havel, *Silver or silver nanoparticles: a hazardous threat to the environment and human health*, J. Appl. Biom., 2008, 6 (3), 117-129.
- [21] S. Bekkeri, *A review on metallic silver nanoparticles*, IOSR J. Pharm., 2014, 4 (7), 38-44.
- [22] S.P. Deshmukh, S.M. Patil, S.B. Mullani, S.D. Delekar, *Silver nanoparticles as an effective disinfectant: A review*, Mater Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl., 2019, 97, 954-965.

- [23] S.A. Ahmad, S.S. Das, A. Khatoon, M.T. Ansari, M. Afzal, H. Md, A.K. Nayak, *Bactericidal activity of silver nanoparticles: A mechanistic review*, Mater Sci. Technol., 2020, 3, 756-769.
- [24] A. Hamad, K.S. Khashan, A. Hadi, *Silver nanoparticles and silver ions as potential antibacterial agents*, J. Inorg. Org. Polym., 2020, 30, 4811-4828.
- [25] J.R. Morones, J.L. Elechiguerra, A. Camacho, K. Holt, J.B. Kouri, J.T. Ramírez, M.J. Yacaman, *The bactericidal effect of silver nanoparticles*, Nanotechnol., 2005, 16 (10), 2346-2353.
- [26] I. Sondi, B. Salopek-Sondi, *Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on E. coli as a model for Gram-negative bacteria*, J. Coll. Inter. Sci., 2004, 275 (1), 177-82.
- [27] A.R. Shahverdi, A. Fakhimi, H.R. Shahverdi, S. Minaian, *Synthesis and effect of silver nanoparticles on the antibacterial activity of different antibiotics against Staphylococcus aureus and Escherichia coli*, Nanomed., 2007, 3 (2), 168-71.
- [28] S. Shrivastava, T. Bera, A. Roy, G. Singh, P. Ramachandrarao, D. Dash, *Characterization of enhanced antibacterial effects of novel silver nanoparticles*, Nanotechnol., 2007, 18 (22), 1-9.
- [29] S.M. Ouda, *Antifungal activity of silver and copper nanoparticles on two plant pathogens, Alternaria alternata and Botrytis cinerea*, Res. J. Microbiol., 2014, 9, 34-42.
- [30] S. Shokri, A. Babaei, M. Ahmadian, S. Hessami, M.M. Arab, *The effects of different concentrations of NanoSilver on elimination of Bacterial contaminations and phenolic exudation of Rose (Rosa hybrida L.) in vitro culture*, Intl. J. Farm. Alli. Sci., 2014, 3 (1), 50-54.
- [31] Y.S. El-Temsah, E.J. Joner, *Impact of Fe and Ag nanoparticles on seed germination and differences in bioavailability during exposure in aqueous suspension and soil*, Envir. Toxicol., 2012, 27 (1), 42-49.
- [32] N. Savithramma, S. Ankanna, G. Bhumi, *Effect of Nanoparticles on Seed germination and seedling growth of Boswellia ovalifoliolata – An endemic and endangered medicinal tree taxon*, Nano. Vision., 2012, 2 (1,2,3), 61-68.

- [33] H.M.H. Salama, *Effects of silver nanoparticles in some crop plants, common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and corn (*Zea mays* L.)*, Int. Res. J. Biotech., 2012, 3 (10), 190-197.
- [34] F. Ashrafi, A.S. Ghasemi, S.A. Babanejad, M. Rahimof, *Optimization of carbon nanotubes for nitrogen gas adsorption*, Res. J. Appl. Sci. Eng. Tech., 2010, 2 (6), 547-551.
- [35] P. Sharma, D. Bhatt, M.G. Zaidi, P.P. Saradhi, P.K. Khanna, S. Arora, *Silver nanoparticle-mediated enhancement in growth and antioxidant status of *Brassica juncea**, Appl. Biochem. Biotech., 2012, 167, 2225-2233.
- [36] A. Razzaq, R. Ammara, H.M. Jhanzab, T. Mahmood, A. Hafeez, S. Hussain, *A novel nanomaterial to enhance growth and yield of wheat*, J. Nanosci. Tech., 2016, 2 (1), 55-58.
- [37] S. Najafi, R. Jamei, *Effect of silver nanoparticles and $Pb(NO_3)_2$ on the yield and chemical composition of mung bean (*Vigna radiata*)*, J. Stress Physiol. Biochem., 2010, 1 (1), 316-325.
- [38] A.V. Vakhrouchev, V.B. Golubchikov, *Numerical investigation of the dynamics of nanoparticle systems in biological processes of plant nutrition*, J. Physics: Conf., 2007, 61, 31-35.
- [39] S.M. Seif, A. Sorooshzadeh, H. Rezazadehs, H.A. Naghdibadi, *Effect of nanosilver and silver nitrate on seed yield of borage*, J. Medic. Plant Res., 2011, 5 (2), 171-175.
- [40] L.R. Pokhrel, B. Dubey, *Evaluation of developmental responses of two crop plants exposed to silver and zinc oxide nanoparticles*, Sci. Total Environ., 2013, 452-453, 321-332.
- [41] A.T. Harris, R. Bali, *On the formation and extent of uptake of silver nanoparticles by live plants*, J. Nanopart. Res., 2008, 10 (4), 691-695.
- [42] R. Haverkamp, A. Marshall, *The mechanism of metal nanoparticle formation in plants: limits on accumulation*, J. Nanopart. Res., 2009, 11 (6), 1453-1464.
- [43] C. Larue, H. Castillo-Michel, S. Sobanska, L. Ce'cillon, S. Bureau, V. Barthe`s, *Foliar exposure of the crop *Lactuca sativa* to silver nanoparticles: evidence for*

- internalization and changes in Ag speciation.*, J. Hazard Mater., 2014, 264, 98-106.
- [44] S. El-Kosary, A.A. Allatif, R. Stino, M. Hassan, A.A. Kinawy, *Effect of silver nanoparticles on micropropagation of date palm (Phoenix dactylifera L., Cv. Sewi and Medjool)*, Plant Arch., 2020, 2, 9701-9076.
- [45] Y. Dong, H. Zhu, Y. Shen, W. Zhang, L. Zhang, *Antibacterial activity of silver nanoparticles of different particle size against Vibrio natriegens*, PloS One, 2019, 14 (9), p.e0222322.
- [46] M. Aghdaei, H. Salehi, M.K. Sarmast, *Effects of silver nanoparticles on Tecomella undulata (Roxb) Seem, micropropagation*, Adv. Hortic. Sci., 2012, 26 (1), 21-24.
- [47] H.K. Choi, J.H. Yun, S.L. Kim, J.S. Son, H.R. Kim, J.H. Kim, H.J. Choi, S.S. Hong, *Enhanced production of paclitaxel by semi-continuous batch process (SCBP) in suspension culture of Taxus chinensis*, Enzyme Microb. Tech., 2001, 29 (10), 583-586.
- [48] J.L. Zhao, L.G. Zhou, J.Y. Wu, *Effects of biotic and abiotic elicitors on cell growth and tanshinone accumulation in Salvia miltiorrhiza cell cultures*, App. Microb. Biotech., 2010, 87 (1), 137-144.
- [49] C. Krishnaraj, E.G. Jagan, R. Ramachandran, S.M. Abirami, N. Mohan, P.T. Kalaichelvan, *Effect of biologically synthesized silver nanoparticles on Bacopa monnieri (Linn.) Wettst. plant growth metabolism*, Proc. Biochem., 2012, 47 (4), 651-658.
- [50] B. Zhang, L.P. Zheng, W.Y. Li, J.W. Wang, *Stimulation of artemisinin production in Artemisia annua hairy roots by Ag-SiO₂ core shell nanoparticles*, Curr. Nanosci., 2013, 9 (3), 363-370.
- [51] H.T.M. Ngan, D.M. Cuong, H.T. Tung, D.N. Ngo, D.T. Nhut, *The effect of cobalt and silver nanoparticles on overcoming leaf abscission and enhanced growth of Rose (Rosa hybrida L. 'Baby Love') plantlets cultured in vitro*, Plant Cell. Tiss. Org. Cult., 2020, 145, 1-13.

- [52] X. Zhao, X. Qu, D.E. Matthews, G.E. Schaller, *Effect of ethylene pathway mutations upon expression of the ethylene receptor ETR1 from Arabidopsis*, Plant Physiol., 2002, 130 (4), 1983-1991.
- [53] N.P. Thao, M.I.R. Khan, N.B.A. Thu, X.L.T. Hoang, M. Asgher, N.A. Khan, L.S.P. Tran, *Role of ethylene and its cross talk with other signaling molecules in plant responses to heavy metal stress*, Plant Physiol., 2015, 169 (1), 73-84.
- [54] Lê Quang Luân, Nguyễn Huỳnh Phương Uyên, Phan Hồ Giang, *Nghiên cứu hiệu ứng kháng nấm Phytophthora capsici gây bệnh chết nhanh ở cây hồ tiêu của chế phẩm nano bạc-chitosan chế tạo bằng phương pháp chiếu xạ*, Tạp chí Sinh học, 2014, 36 (1SE), 152-157.
- [55] Lê Thanh Sơn, Nguyễn Đình Cường, *Nghiên cứu chế tạo và đánh giá khả năng diệt khuẩn trong không khí của tấm lọc tấm nano bạc*, Tạp chí phân tích Hóa, Lý và Sinh học, 2014, 19 (4), 15-20.
- [56] Nguyễn Thị Kim Cúc, Trần Thị Kim Dung, Nguyễn Mai Anh, Nguyễn Thị Ngoan, Phạm Việt Cường, *Đánh giá hoạt tính đối kháng vi khuẩn của phức hệ nanochitosan - tinh dầu nghệ và nano bạc*, Tạp chí Khoa học và Công nghệ, 2014, 52 (2), 177-184.
- [57] H.T. Tung, T.T. Thuong, D.M. Cuong, V.Q. Luan, V.T. Hien, T. Hieu, N.B. Nam, H.T.N. Phuong, B.V.T. Vinh, H.D. Khai, D.T. Nhut, *Silver nanoparticles improved explant disinfection, in vitro growth, runner formation and limited ethylene accumulation during micropropagation of strawberry (Fragaria × ananassa)*, Plant Cell Tiss. Org. Cult., 2021, 145 (2), 393-403.
- [58] D.M. Cuong, P.C. Du, H.T. Tung, H.T.M. Ngan, V.Q. Luan, T.H. Phong, H.D. Khai, T.T.B. Phuong, D.T. Nhut, *Silver nanoparticles as an effective stimulant in micropropagation of Panax vietnamensis - a valuable medicinal plant*, Plant Cell Tiss. Org. Cult., 2021, 146 (3), 577-588.
- [59] Vũ Thị Hiền, Hoàng Thanh Tùng, Hoàng Đắc Khải, Vũ Quốc Luận, Đỗ Mạnh Cường, Trần Văn Lịch, Dương Tấn Nhựt, *Ảnh hưởng của nano bạc lên khả năng khử trùng các loại mẫu cấy khác nhau của cây hoa đồng tiền (Gerbera jamesonii) nuôi cấy in vitro*, Tạp chí Công nghệ Sinh học, 2021, 19 (3), 1-11.

- [60] H.T. Tung, P.T. Suong, H.D. Khai, V.Q. Luan, D.M. Cuong, V.T. Hien, N.B. Nam, H.T.M. Ngan, L.T. Bien, T.H. Phong, D.T. Nhut, *Protocorm-like body formation, stem elongation and enhanced growth of Anthurium andraeanum 'Tropical' plantlet on medium containing silver nanoparticles. In vitro Cell. Dev. Biol. - Plant*, 2021, 58, 70-79.
- [61] V.T. Mo, L.K. Cuong, H.T. Tung, T.V. Huynh, L.T. Nghia, C.M. Khanh, N.N. Lam, D.T. Nhut, *Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from the seaweed Kappaphycus striatus*, *Acta Physiol. Plant.*, 2020, 42, 104.
- [62] Dương Tấn Nhựt, Dương Bảo Trinh, Đỗ Mạnh Cường, Hoàng Thanh Tùng, Nguyễn Phúc Huy, Vũ Thị Hiền, Vũ Quốc Luận, Lê Thị Thu Hiền, Nguyễn Hoài Châu, *Khảo sát nano bạc làm chất khử trùng mẫu mới trong nhân giống vô tính cây Tử linh lan (Saintpaulia ionantha H. Wendl.)*, *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 2018, 16 (1), 87-97.
- [63] Trần Hiếu, Hoàng Thanh Tùng, Cao Đăng Nguyên, Dương Tấn Nhựt, *Tạo nguồn mẫu in vitro cho giống chanh dây tím (Passiflora edulis Sims.) và vàng (Passiflora edulis f. flavicarpa)*, *Tạp chí Khoa học Đại học Huế: Khoa học Tự nhiên*, 2018, 127 (1C), 71-84.
- [64] Đỗ Mạnh Cường, Lê Thành Long, Hoàng Thanh Tùng, Vũ Quốc Luận, Vũ Thị Hiền, Nguyễn Thị Nhật Linh, Trương Thị Bích Phượng, Dương Tấn Nhựt, *Vai trò của nano bạc trong khử trùng, cảm ứng mẫu cấy ban đầu và nâng cao tần suất hình thành tế bào đơn cây hoa salem (Limonium sinuatum (L.) Mill)*, *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 2018, 16 (3), 481-490.
- [65] Dương Tấn Nhựt, Hồ Thanh Tâm, Nguyễn Thị Thanh Hiền, Lê Kim Cương, Vũ Quốc Luận, Nguyễn Bá Nam, Nguyễn Phúc Huy, Vũ Thị Hiền, Trịnh Thị Hương, Nguyễn Hồng Hoàng, Nguyễn Xuân Tuấn, Nguyễn Thanh Sang, Nguyễn Văn Cường, Nguyễn Hoài Châu, Ngô Quốc Bửu, *Khảo sát ảnh hưởng của nano bạc lên sự sinh trưởng và phát triển của cây cúc, dâu tây, đồng tiền nuôi cấy in vitro*, *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 2014, 12 (1), 103-111.
- [66] Nguyễn Thị Nhật Linh, Nguyễn Hoàng Lộc, Dương Tấn Nhựt, *Ảnh hưởng của các nano kim loại lên sự tăng trưởng rễ bên của sâm Ngọc Linh (Panax vietnamensis) trong nuôi cấy in vitro*, *Tạp chí đại học Huế*, 2017.

- [67] Trần Thị Thương, Hoàng Thanh Tùng, Hoàng Đắc Khải, Vũ Thị Hiền, Vũ Quốc Luận, Đỗ Mạnh Cường, Nguyễn Bá Nam, Nguyễn Hoài Châu, Bùi Văn Thế Vinh, Dương Tấn Nhựt, *Sản xuất cây dâu tây (Fragaria × ananassa) in vitro trong hệ thống nuôi cấy quy mô lớn có bổ sung nano bạc*, Tạp chí Công nghệ Sinh học, 2021, 19 (3), 481-493.
- [68] Hà Thị Mỹ Ngân, Hoàng Thanh Tùng, Ngô Đại Nghiệp, Bùi Văn Lê, Dương Tấn Nhựt, *Tác động của nano bạc lên sự hạn chế khí ethylene và hoạt độ enzyme thủy phân trong vi nhân giống cây hoa hồng (Rosa hybrida L. 'Baby Love')*, Tạp chí Công nghệ Sinh học, 2019, 17 (3), 505-517.
- [69] Hà Thị Mỹ Ngân, Trần Đào Hồng Trinh, Đỗ Mạnh Cường, Hoàng Thanh Tùng, Nguyễn Thị Nhật Linh, Trần Hiếu, Vũ Thị Hiền, Vũ Quốc Luận, Phan Lê Hà Nguyễn, Bùi Văn Lê, Dương Tấn Nhựt, *Hạn chế hiện tượng thủy tinh thể và gia tăng tỷ lệ sống của chồi cây hoa đồng tiền (Gerbera jamesonii) nuôi cấy in vitro dưới tác động của nano bạc*, Tạp chí Công nghệ Sinh học, 2019, 17 (1), 115-124.
- [70] H.T. Tung, N.B. Nam, N.P. Huy, V.Q. Luan, V.T. Hien, T.T.B. Phuong, T.D. Le, D.T. Nhut, *A system for large scale production of Chrysanthemum using microponics with the supplement of silver nanoparticles under light-emitting diodes*, Sci. Hortic., 2018, 232, 153-161.
- [71] L.T. Nghia, H.T. Tung, N.P. Huy, V.Q. Luan, D.T. Nhut, *The effects of silver nanoparticles on growth of Chrysanthemum morifolium Ramat. cv. "Jimba" in different cultural systems*, Vietnam J. Sci. Tech., 2017, 55 (4), 493-504.
- [72] E.A. Pilon-Smits, C.F. Quinn, W. Tapken, M. Malagoli, M. Schiavon, *Physiological functions of beneficial elements*, Curr. Opi. Plant Biol., 2009, 12 (3), 267-274.
- [73] S. Puig, L. Penarrubia, *Placing metal micronutrients in context: transport and distribution in plants*, Curr. Opi. Plant Biol., 2009, 12 (3), 299-306.
- [74] V.D. Rajput, T. Minkina, S. Suskova, S. Mandzhieva, V. Tsitsuashvili, V. Chaplugin, A. Fedorenko, *Effects of copper nanoparticles (CuO NPs) on crop plants: A mini review*, Bio. Nano. Sci., 2015, 8, 36-42.

- [75] V. Shah, I. Belozeroва, *Influence of metal nanoparticles on the soil microbial community and germination of lettuce seeds*, Water Air Soil Poll., 2009, 197 (1), 143-148.
- [76] W.M. Lee, Y.J. An, H. Yoon, H.S. Kweon, *Toxicity and bioavailability of copper nanoparticles to the terrestrial plants mung bean (*Phaseolus radiatus*) and wheat (*Triticum aestivum*), plant agar test for water-insoluble nanoparticles*, Envir. Toxic. Chem., 2008, 27 (9), 1915-1921.
- [77] E.A. Genady, S.S. Ahmed, A.H. Fahmy, R.M. Ashour, *Copper sulfate nanoparticles enhance growth parameters, flavonoid content and antimicrobial activity of *Ocimum basilicum* Linnaeus*, J. Am. Sci., 2017, 13 (4), 108-114.
- [78] A.S. Ibrahim, A.H. Fahmy, S.S. Ahmed, *Copper nanoparticles elevate regeneration capacity of (*Ocimum basilicum* L.) plant via somatic embryogenesis*, Plant Cell Tiss. Org. Cult., 2019, 136, 41-50.
- [79] T.E. Talankova-Sereda, K.V. Liapina, E.A. Shkopinskij, A.I. Ustinov, A.V. Kovalyova, P.G. Dulnev, N.I. Kucenko, *The influence of Cu and Co nanoparticles on growth characteristics and biochemical structure of *Mentha longifolia* in vitro*, Nanosci. Nanoeng., 2016, 4, 31-39.
- [80] S. Anwaar, Q. Maqbool, N. Jabeen, M. Nazar, F. Abbas, B. Nawaz, T. Hussain, S.Z. Hussain, *The effect of green synthesized CuO nanoparticles on callogenesis and regeneration of *Oryza sativa* L.*, Front Plant Sci., 2016, 7, 1330-1338.
- [81] M. Kharrazi, A. Tehranifar, S. Nemati, A. Bagheri, A. Sharifi, *In vitro culture of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) focusing on the problem of vitrification*, J. Biol. Environ. Sci., 2011, 5 (13), 1-6.
- [82] M.P. Marques, J. Martins, L.A.E.B de Carvalho, M.R. Zuzarte, R.M.F. da Costa, J. Canhoto, *Study of physiological and biochemical events leading to vitrification of *Arbutus unedo* L. cultured in vitro*, Trees, 2021, 35, 241-253.
- [83] C. Chang, *How do plants respond to ethylene and what is its importance ?*, BMC Biol., 2016, 14 (1), 1-7.

- [84] S.K. Dutta, G. Gurung, A. Yadav, R. Laha, V.K. Mishra, *Factors associated with citrus fruit abscission and management strategies developed so far: A review*, New Zealand J. Crop Hortic. Sci., 2022, 2040545, 1-22.
- [85] Y. Liang, C. Jiang, Y. Liu, Y. Gao, J. Lu, P. Aiwaiti, Z. Fei, C.Z. Jiang, B. Hong, C. Ma, J. Gao, *Auxin regulates sucrose transport to repress petal abscission in rose (Rosa hybrida)*, Plant Cell, 2020, 32 (11), 3485-3499.
- [86] T.T. Ho, H.N. Murthy, S.Y. Park, *Methyl jasmonate induced oxidative stress and accumulation of secondary metabolites in plant cell and organ cultures*, Int. J. Mol. Sci., 2020, 21 (3), 1-18.
- [87] J. Su, J. Jiang, F. Zhang, Y. Liu, L. Ding, S. Chen, F. Chen, *Current achievements and future prospects in the genetic breeding of chrysanthemum: a review*, Hortic. Res., 2019, 6, 1-19.
- [88] Sở Công thương Lâm Đồng, *Tình hình sản xuất hoa Lâm Đồng*, 2022.
- [89] Dương Tấn Nhựt, Ngô Thị Thu Hà, Phan Xuân Huyền, Trịnh Thị Lan Anh, Nguyễn Thành Hải, Nguyễn Ngọc Thi, Nguyễn Trịnh Trâm, Nguyễn Văn Bình, Vũ Quốc Luận, *Ảnh hưởng của vị trí mẫu cấy lên quá trình phát sinh hình thái của lớp mỏng tế bào phát hoa cây Thu hải đường (Begonia tuberosa)*, Kỷ yếu Hội nghị Khoa học toàn quốc 2005-Công nghệ sinh học trong nghiên cứu cơ bản hướng 8.2. Bộ Khoa học và Công nghệ, 2005, 279-283.
- [90] M.D.D. Angeles, R.R. Rubite, K.F. Chung, I.E. Buot Jr, D.N. Tandang, *Begonia normaaguilariae (section Baryandra, Begoniaceae), a new species from the limestone forests of Samar Island, Philippines*, Phytotaxa, 2022, 541 (1), 49-56.
- [91] F.J. Espino, R. Linacero, J. Rueda, A.M. Vazquez, *Shoot regeneration in four Begonia genotypes*, Biol. Plant., 2004, 48 (1), 101-104.
- [92] D.T. Nhut, N.T. Hai, M.X. Phan, *A highly efficient protocol for micropropagation of Begonia tuberosa*. In: S.M. Jain, S. Ochatt (Eds.) *Protocols for in vitro propagation of ornamental plants*. Humana Press, USA, 2010, 15-20.

- [93] K. Sara, G. Yousef, N. Ghorbanali, A. Roghayeh, S.K. Behzad, Y. Mohammad, *Effect of explant type and growth regulators on in vitro micropropagation of Begonia rex*. Inter. Res. J. Appl. Bas. Sci., 2012, 3, 896-901.
- [94] H.G. Rosas, A.M.C. González, E.A. Acuña, *In vitro cultivation of petals of four varieties of Begonia elatior*. Rev. Mex. Cien. Pec., 2018, 9 (6), 1207-1216.
- [95] J.M. Aswathy, K. Murugan, *Micropropagation and genetic fidelity of in vitro grown plantlets of Begonia malabarica Lam.*, Trop. Life Sci. Res., 2019, 30 (3), 36-58.
- [96] H.D. Khai, L.T. Bien, N.Q. Vinh, D.M. Dung, N.D. Nghiep, N.T.N. Mai, H.T. Tung, V.Q. Luan, D.M. Cuong, D.T. Nhut, *Alterations in endogenous hormone levels and energy metabolism promoted the induction, differentiation and maturation of Begonia somatic embryos under clinorotation*. Plant Sci., 2021, 111045.
- [97] S. Zeljković, J.D. Gidas, N. Parađiković, E. Mladenović, *Micropropagation of African violet (Saintpaulia ionantha H. Wendl.)*, 16th Inter. Symp. Agr., 2021, 4, 403-407.
- [98] M. Kazemian, V.O. Ghasemi Omran, M.E. Kazemi, M., Kolahi, *Regeneration of pinwheel phenotype and evaluation of anthocyanin in African violet (Saintpaulia ionantha Wendl.) periclinal chimera*, J. Plant Mol. Breed., 2021, 7 (2), 39-49.
- [99] Dương Tấn Nhựt, Phan Nhã Uyên, Trịnh Thị Lan Anh, Nguyễn Thành Hải, Nguyễn Trịnh Đôn, *Ứng dụng hệ thống nuôi cấy ngập chìm tạm thời trong nhân nhanh chồi hoa Tử linh lan (Saintpaulia ionantha H. Wendl)*, Tạp chí Công nghệ Sinh học, 2007, 5 (3), 371-381.
- [100] Lê Thế Biên, Hoàng Thanh Tùng, Hoàng Đắc Khải, Đỗ Mạnh Cường, Vũ Quốc Luận, Nguyễn Bá Nam, Trinh Thị Hương, Bùi Văn Thế Vinh, Dương Tấn Nhựt, *Nâng cao tần suất tái sinh chồi của cây tử linh lan (Saintpaulia ionantha Wendl.) nuôi cấy in vitro dưới đèn LEDs*, Tạp chí Công nghệ Sinh học, 2021, 19 (4), 717-724.

- [101] N.H. Chau, L.A. Bang, N.Q. Buu, T.T.N. Dung, H.T. Ha, D.V. Quang, *Some results in manufacturing of nanosilver and investigation of its application for disinfection*, Adv. Nat. Sci.: Nanosci. Nanotech., 2008, 9 (2), 241-248.
- [102] Q.B. Ngo, T.H. Dao, G.C. Nguyen, X.T. Tran, T.V. Nguyen, T.D. Khuu, T.H. Huynh, *Effects of nanocrystalline powders (Fe, Co and Cu) on the germination, growth, crop yield and product quality of soybean (Vietnamese species DT-51)*, Adv. Nat. Sci.: Nanosci. Nanotech., 2014, 5 (1), 15-21.
- [103] T. Murashige, F. Skoog, *A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures*. Plant Physiol., 1962, 1 (3), 473-497.
- [104] J.A. Teixeira da Silva, S. Fukai, *Chrysanthemum organogenesis through thin cell layer technology and plant growth regulator control*, Asian J. Plant Sci., 2003, 2, 505-514.
- [105] A.G. Proctor, *Mycological method*. In: Collins CH, Lyne PM (Eds) *Microbiological Methods, 4th editions*. Butter Worths, UK, 1977.
- [106] I.U. Haq, J. Khan, M. Alam, M.S. Khattak, *In vitro culture of Chrysanthemum*, Sarhad J. Agric., 1998, 14, 211-213.
- [107] K. Ykbal, M.B. Jozica, A.Y. Umit, C. Katarina, S. Trajce, A. Gosel. *Atomic absorption spectrometry determination of Cd, Cu, Fe, Ni, Pb, Zn and Tl traces in seawater following flotation separation*, Sep. Sci. Technol., 2004, 39(11), 2751-2765.
- [108] S.M. Cristescu, J. Mandon, D. Arslanov, J. De Pessemier, C. Hermans, F.J. Harren, *Current methods for detecting ethylene in plants*, Annals Bot., 2012, 111 (3), 347-360.
- [109] S. Marklund, G. Marklund, *Involvement of the superoxide anion radical in the autooxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase*, Eur. J. Biochem., 1974, 47(3), 469-474.
- [110] L. Goth, *A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range*, Clin. Chim. Acta, 1991, 196 (2-3), 143-151.
- [111] Y. Nakano, K. Asada, *Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts*, Plant Cell Physiol., 1981, 22 (5), 867-880.

- [112] B. Fernandes, G. Dragone, A.P. Abreu, P. Geada, J. Teixeira, A. Vicente, *Starch determination in Chlorella vulgaris - a comparison between acid and enzymatic methods*, J. App. Phycol., 2012, 24, 1203-1208.
- [113] T. Krivorotova, J. Sereikaite, *Determination of fructan exohydrolase activity in the crude extracts of plants*, Electron. J. Biotechnol., 2014, 17, 329-333.
- [114] R.L. Peterson, C.A. Peterson, L.H. Melville, *Teaching plant anatomy through creative laboratory exercises*. NRC Research Press, Ottawa, Canada, 2008.
- [115] D.B. Duncan, *Multiple range and multiple F test*, Biometrics, 1955, 11, 1-42.
- [116] E.F. George, G.J. de Klerk, *The components of plant tissue culture media: I: macro- and micro-nutrients*. In: E.F. George, M.A. Hall, G.J. de Klerk (Eds.) *Plant propagation by tissue culture*, 3 edn. Springer, Dordrecht, 2008, 65-114.
- [117] S. Maiti, D. Krishnan, G. Barman, S.K. Ghosh, J.K. Laha, *Antimicrobial activities of silver nanoparticles synthesized from Lycopersicon esculentum extract*, J. Anal. Sci. Technol., 2014, 5, 1-7.
- [118] M.M. Arab, A. Yadollahi, M. Hosseini-Mazinani, *Effects of antimicrobial activity of silver nanoparticles on in vitro establishment of GXN15 (hybrid of almond x peach) rootstock*, J. Gen. Eng. Biotech., 2014, 12, 103-110.
- [119] A.A. Rostami, A. Shahsavar, *Nano-silver particles eliminate the in vitro contaminations of olive 'Mission' explants*, Asian J. Plant Sci., 2009, 8, 505-509.
- [120] M. Fakhrfeshani, A. Bagheri, A. Sharifi, *Disinfecting effects of nano silver fluids in Gerbera (Gerbera jamesonii) capitulum tissue culture*, J. Biol. Environ. Sci., 2012, 6, 121-127.
- [121] M. Ines, D. Krunoslav, T. Vesna, V. Marija, P. Ankica, C. Zlatko, P. Boris, J. Zorica, *In vitro sterilization procedures for micropropagation of Oblaciska sour cherry*, J. Agric. Sci., 2013, 58, 117-126.
- [122] D.H. Kim, J. Gopal, L. Sivanesan, *Nanomaterials in plant tissue culture: the disclosed and undisclosed*, RSC Adv., 2017, 7, 36392-36505.
- [123] N. Saha, D. Gupta, *Promotion of shoot regeneration of Swertia chirata by biosynthesized silver nanoparticles and their involvement in ethylene*

- interceptions and activation of antioxidant activity*, Plant Cell Tiss. Org. Cult., 2018, 134, 289-300.
- [124] B.K. McDaniel, B.M. Binder, *Ethylene Receptor1 (ETR1) is sufficient and has the predominant role in mediating inhibition of ethylene responses by silver in Arabidopsis thaliana*, J. Biol. Chem., 2012, 287, 26094-26103.
- [125] D.S. Gupta, *Role of free radicals and antioxidants in in vitro morphogenesis*. In: D.S. Gupta (Ed.) *Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants*. CRC Press, New York, 2011, 229-247.
- [126] G. Abdi, H. Salehi, M. Khosh-Khuri, *Nano silver: A novel nanomaterial for removal of bacterial contamination in Valerian (V. officinalis) tissue culture*, Acta Physiol. Plant, 2008, 30, 709-714.
- [127] Nguyễn Bá Nam, *Nghiên cứu và ứng dụng hệ thống chiếu sáng đơn sắc trong nhân giống trên một số loại cây trồng có giá trị kinh tế*, Luận án Tiến sĩ Khoa học cây trồng, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam, 2016.
- [128] Hoàng Thanh Tùng, *Hoàn thiện hệ thống nhân giống vi thủy canh cây hoa cúc trắng (Chrysanthemum morifolium)*, Luận án Tiến sĩ Sinh lý học thực vật, Đại học Khoa học Huế, 2018.
- [129] R.E.A. Standaert-De Metsenaere, *Economic considerations*, In: P.C. Debergh, R.H. Zimmermann (Eds.), *Micropropagation: Technology and application*, Kluwer Academic Publish, Dordrecht, the Netherlands, 1991, 123-140.
- [130] U.K. Tomar, U. Negi, P.K. Dantu, *An overview of the economic factors influencing micropropagation*, My forest, 2007, 43, 523-532.
- [131] V. Savita, G.S. Virk, A. Nagpal, *Effect of explant type and different plant growth regulators on callus induction and plantlet regeneration in Citrus jambhiri Lush*, Inter J. Sci. Tech., 2010, 5, 97-106.
- [132] B.T. Shastree, V.J.E. Coroline, R. Savitha, *Micropropagation of Bryonopsis laciniosa L. Naud an endangered and medicinally important cucurbit*, Adv. Plant Sci., 2012, 25 (II), 373-376.
- [133] Đinh Văn Khiêm, Nguyễn Thị Thanh Hậu, *Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng lên khả năng hình thành mô sẹo cây thu hải đường (Begonia bataiensis)*, Tạp chí Khoa học Đại học Đà Lạt, 2018, 8 (3), 69-76.

- [134] M. Rafique, A.J. Shaikh, R. Rasheed, M.B. Tahir, H.F. Bakhat, M.S. Rafique, F. Rabbani, *A review on synthesis, characterization and applications of copper nanoparticles using green method*, Nano, 2017, 12, 4.
- [135] C. Peng, D. Duan, C. Xu, Y. Chen, L. Sun, H. Zhang, X. Yuan, L. Zheng, Y. Yang, J. Yang, X. Zhen, Y. Chen, J. Shi, *Translocation and biotransformation of CuO nanoparticles in rice (Oryza sativa L.) plants*, Envir. Pollution, 2015, 197, 99-107.
- [136] N. Zuverza-Mena, I.A. Medina-Velo, A.C. Barrios, W. Tan, J.R. Peralta-Videa, J.L. Gardea-Torresdey, *Copper nanoparticles/compounds impact agronomic and physiological parameters in cilantro (Coriandrum sativum)*, Envir. Sci. Proc. Impacts, 2015, 17, 1783-1793.
- [137] V.D. Rajput, T. Minkina, S. Mandzhieva, N. Duply, A. Fedorenko, S. Sushkova, V. Tsitsuashvili, *Influence of copper oxide nanoparticle on seed germination and seedling growth*, Inter. Sci. Conf. "Modern Technologies" Biod Plants, Rostov, Russia, 2017, 115-116.
- [138] H. Zafar, A. Ali, M. Zia, *CuO nanoparticles inhibited root growth from Brassica nigra seedlings but induced root from stem and leaf explants*, Appl. Biochem. Biotech., 2017, 181, 365-378.
- [139] M. Shams, E. Yildirim, G. Agar, S. Ercisli, A. Dursun, M. Ekinici, R. Kul, *Nitric oxide alleviates copper toxicity in germinating seed and seedling growth of Lactuca sativa L.*, Notulae Bot. Hort. Agr., 2018, 46 (1), 167-172.
- [140] J. Hong, C.M. Rico, L. Zhao, A.S. Adeleye, A.A. Keller, J.R. Peralta-Videa, J.L. Gardea-Torresdey, *Toxic effects of copper-based nanoparticles or compounds to lettuce (Lactuca sativa) and alfalfa (Medicago sativa)*, Envir. Sci. Proc. Impacts, 2015, 17, 177-185.
- [141] S.J. Bradfield, P. Kumar, J.C. White, S.D. Ebbs, *Zinc, copper, or cerium accumulation from metal oxide nanoparticles or ions in sweet potato: yield effects and projected dietary intake from consumption*, Plant Physiol. Biochem., 2017, 110, 128-137.

- [142] P.V. Viet, H.T. Nguyen, T.M. Cao, L. Hieu, *Fusarium antifungal activities of copper nanoparticles synthesized by a chemical reduction method*, J. Nanomater., 2016, 1957612, 1-7.
- [143] N. Pariona, A.I. Mtz-Enriquez, D. Sánchez-Rangel, G. Carrión, F. Paraguay-Delgado, G. Rosas-Saito, *Green-synthesized copper nanoparticles as a potential antifungal against plant pathogens*, RSC Adv., 2019, 9, 18835-18843.
- [144] A.S. Ibrahim, A.H. Fahmy, S.S. Ahmed, *Copper nanoparticles elevate regeneration capacity of (*Ocimum basilicum* L.) plant via somatic embryogenesis*, Plant Cell Tiss. Org. Cult., 2019, 136 (1), 41-50.
- [145] A.H. Fahmy, K. El-Mangoury, A.S. Ibrahim, S. Muthukrishnan, *Comparative evaluation of different reliable in vitro regeneration of various elite Egyptian wheat cultivars regarding callus induction and regeneration media influence*, Res. J. Agric. Biol. Sci., 2012, 8 (2), 325-335.
- [146] A.S. Ibrahim, *An efficient regeneration system via somatic embryogenesis in some Egyptian durum wheat cultivars mediated high throughput transformation of durum wheat using *Agrobacterium tumefaciens**, Res. J. Agric. Biol. Sci., 2012, 8 (3), 369-384.
- [147] D. Lopez-Lima, A.I. Mtz-Enriquez, G. Carrion, S. Basurto-Cereceda, N. Pariona, *The bifunctional role of copper nanoparticles in tomato: effective treatment for *Fusarium* wilt and plant growth promoter*, Sci. Hortic., 2021, 277, 109810.
- [148] J. Li, P.R. Chang, J. Huang, Y. Wang, H. Yuan, H. Ren, *Physiological effects of magnetic iron oxide nanoparticles towards watermelon*, J. Nanosci. Nanotech., 2013, 13 (8), 5561-5567.
- [149] H.S. Jiang, X.N. Qiu, G.B. Li, W. Li, L.Y. Yin, *Silver nanoparticles induced accumulation of reactive oxygen species and alteration of antioxidant systems in the aquatic plant *Spirodela polyrhiza**, Environ. Toxicol. Chem., 2014, 33 (6), 1398-1405.
- [150] S. Pradhan, P. Patra, S. Mitra, K.K. Dey, S. Basu, S. Chandra, P. Palit, A. Goswami, *Copper nanoparticle (CuNP) nanochain arrays with a reduced*

- toxicit response: A biophysical and biochemical outlook on Vigna radiata*, J. Agric. Food Che., 2015, 63, 2606-2617.
- [151] G. Wu, X. Wei, X. Wang, Y. Wei, *Changes in biochemistry and histochemical characteristics during somatic embryogenesis in Ormosia henryi Prain*, Plant Cell Tiss. Org. Cult., 2021, 144, 505-517.
- [152] D. Stoyanova-Koleva, M. Stefanova, M. Zhiponova, V. Kapchina-Toteva, *Effect of N 6-benzyladenine and indole-3-butyric acid on photosynthetic apparatus of Orthosiphon stamineus plants grown in vitro*, Biol. Plant., 2012, 56, 607-612.
- [153] I.L. Lai, C.W. Lin, T.Y. Chen, W.H. Hu, *Micropropagation shortens the time to blooming of Begonia montaniformis × Begonia ningmingensis var. Bella F1 Progeny*, HortSci., 2018, 53, 1855-1861.
- [154] B.S. Mangat, M.K. Pelekis, A.C. Cassells, *Changes in the starch content during organogenesis in in vitro cultured Begonia rex stem explants*, Physiol. Plant., 1990, 79, 267-274.
- [155] J. Valdés-Reyna, J. Pinedo-Espinoza, G. Cadenas-Pliego, H. Ortega-Ortíz, A. Hernández-Fuentes, A. Juárez-Maldonado, C. López-Palestina, *Foliar application of Cu nanoparticles modified the content of bioactive compounds in Moringa oleifera Lam*, Agronomy, 2018, 8, 167.
- [156] A. Singh, N.B. Singh, I. Hussain, H. Singh, *Effect of biologically synthesized copper oxide nanoparticles on metabolism and antioxidant activity to the crop plants Solanum lycopersicum and Brassica oleracea var. botrytis*, J. Biotechnol., 2017, 262, 11-27.
- [157] N.T.M. Hanh, H.T. Tung, H.D. Khai, D.M. Cuong, V.Q. Luan, N.T.N. Mai, T.T.L. Anh, B.V. Le, D.T. Nhut, *Efficient somatic embryogenesis and regeneration from leaf main vein and petiole of Actinidia chinensis Planch. via thin cell layer culture technology*, Sci. Hortic., 2022, 298: 110986.
- [158] Kharrazi M., A. Tehranifar, S. Nemati, A. Bagheri, A. Sharifi, *In vitro culture of carnation (Dianthus caryophyllus L.) focusing on the problem of vitrification*, J. Biol. Envir. Sci., 2011, 5 (13), 1-6.

- [159] O.H. García Osuna, A. Benavides Mendoza, L. Escobedo Bocardo, *Hyperhydricity control of in vitro shoot of Turbinicarpus valdezianus (Möller) GL&F*, *Phyton.*, 2011, 80 (5), 175-179.
- [160] C. Kevers, *Hyperhydricity of micropropagated shoots: A typically stress-induced change of physiological state*, *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 2004, 77 (5), 181-191.
- [161] C.C. Lai, H.M. Lin, S.M. Nalawade, *Hyperhydricity in shoot cultures of Scrophularia yoshimurae can be effectively reduced by ventilation of culture vessels*, *J. Plant Physiol.*, 2005, 162 (2), 355-361.
- [162] B. Winarto, A.A. Maheran, A.A. Rashid, M.R. Ismail, *Effect of permeable vessel closure and gelling agent on reduction of hyperhydricity in in vitro culture of carnation*, *Indonesian J. Agr. Sci.*, 2016, 5 (1), 11-17.
- [163] Muday G.K., A. Rahman, B.M. Binder, *Auxin and ethylene: collaborators or competitors?* *Trends Plant Sci.*, 2012, 17 (4), 181-195.
- [164] R. Razavizadeh, F. Rostami, *Risks and benefits assessments of silver nanoparticles in tomato plants under in vitro culture*, *J. Eng. Res.*, 2015, 3 (7), 51-55.
- [165] P.M.G. Nair, I.M. Chung, *Physiological and molecular level effects of silver nanoparticles exposure in rice (Oryza sativa L.) seedlings*, *Chemosphere*, 2014, 112, 105-113.