BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ

★★★★★

PHAN LÊ HÀ NGUYÊN

NGHIÊN CỨU THAY THẾ MỘT SỐ MUỐI KIM LOẠI VI LƯỢNG BẰNG NANO KIM LOẠI TRONG VI NHÂN GIỐNG CÂY HOA (CÚC, ĐỒNG TIỀN VÀ TỬ LINH LAN)

LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC ỨNG DỤNG

Hà Nội – 2026

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ

Phan Lê Hà Nguyễn

NGHIÊN CỨU THAY THẾ MỘT SỐ MUỐI KIM LOẠI VI LƯỢNG BẰNG NANO KIM LOẠI TRONG VI NHÂN GIỐNG CÂY HOA (CÚC, ĐỒNG TIỀN VÀ TỬ LINH LAN)

LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC ỨNG DỤNG

Ngành: Công nghệ sinh học

Mã số: 9 42 02 01

Xác nhận của Học viện Khoa học và Công nghệ

KT. GIÁM ĐỐC
PHÓ GIÁM ĐỐC

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ

Nguyễn Thị Trung

Thầy hướng dẫn 1

GS.TS. Dương Tấn Nhựt

Thầy hướng dẫn 2

PGS.TS. Vũ Quốc Luận

Hà Nội - 2026

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan luận án: "**Nghiên cứu thay thế một số muối kim loại vi lượng bằng nano kim loại trong vi nhân giống cây hoa (cúc, đồng tiền và tử linh lan)**" là công trình nghiên cứu của chính mình dưới sự hướng dẫn khoa học của tập thể hướng dẫn. Luận án sử dụng thông tin trích dẫn từ nhiều nguồn tham khảo khác nhau và các thông tin trích dẫn được ghi rõ nguồn gốc. Các kết quả nghiên cứu của tôi được công bố chung với các tác giả khác đã được sự nhất trí của đồng tác giả khi đưa vào luận án. Các số liệu, kết quả được trình bày trong luận án là hoàn toàn trung thực và chưa từng được công bố trong bất kỳ một công trình nào khác ngoài các công trình công bố của tác giả. Luận án được hoàn thành trong thời gian tôi làm nghiên cứu sinh tại Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Hà Nội, ngày 28 tháng 6 năm 2026

Nghiên cứu sinh

Phan Lê Hà Nguyễn

LỜI CẢM ƠN

"Đi học lại nhé!" đã rất nhiều lần câu nói ấy được người Thầy - Giáo sư, Tiến sĩ Dương Tấn Nhựt động viên tôi trong suốt mười năm qua.

Giữa cuộc sống đầy lo toan, con người bận chạy theo những cám dỗ phù du mà quên mất đi những ước mơ và khát vọng của bản thân. "Con muốn sau này được đi dạy" – có lẽ nếu không có Thầy, tôi đã quên mất giấc mơ ấp ủ từ thời là một cậu sinh viên chân ướt chân ráo lên xin thực tập tại Viện Sinh học Tây Nguyên. Con xin cảm ơn Thầy đã luôn nhớ, nhắc nhở và tạo điều kiện để con được giữ gìn giấc mơ đó.

Đối với tôi; Giáo sư, Tiến sĩ Dương Tấn Nhựt là người Thầy, Người Cha, người đồng hành trong suốt mười lăm năm nay trong học tập, công việc và cuộc sống. "Sống trong đời sống, cần có một tấm lòng" – Câu hát của Thầy đã thể hiện tất cả những điều Thầy đã hy sinh và dành cho các thế hệ sinh viên, chưa một lần Thầy tôi ích kỷ điều gì cho bản thân mình, cả đời Thầy phấn đấu vì thế hệ đi sau và vì những học sinh thương yêu. Con xin cảm ơn Thầy vì đã là tấm gương sáng để con noi theo trong suốt chặng đường vừa qua. Cảm ơn Thầy – một nhân cách sống – một tấm gương về đạo đức – nhiệt huyết trong mọi việc.

Tôi xin gửi lời cảm ơn đến PGS. TS. Vũ Quốc Luận – cũng là người Thầy, người Anh đã hướng dẫn tôi trong các chặn đường cử nhân, cao học và nghiên cứu sinh. Thầy là người luôn lặng lẽ dõi theo và giúp đỡ tôi bất cứ khi nào.

Tôi xin gửi lời cảm ơn chân thành đến Học viện khoa học và công nghệ Việt nam, Viện nghiên cứu khoa học Tây Nguyên đã tạo điều kiện tốt nhất để tôi có thể học tập, nghiên cứu và hoàn thành luận án này.

Hơn mười năm bôn ba kinh doanh, quay trở lại con đường học tập với tôi thật sự là một thử thách lớn: cả về kiến thức, thời gian và sự tập trung. "Anh thật sự may mắn khi Tùng đồng hành và đã không nề hà giúp đỡ những lúc anh cần. Là một nhà khoa học – thời gian một ngày đối với em có lẽ là không đủ, nhưng em vẫn dành thời gian để nhiệt tình hỗ trợ anh, điều đó là một sự hy sinh quá to lớn. Nếu không có sự hy sinh của em, có lẽ anh đã không bao giờ có cơ hội để hoàn thành cuốn luận án này"

Tôi xin gửi lời cảm ơn đến em Mai, Cường và tất cả các anh, chị, em tại phòng sinh học phân tử và chọn tạo giống cây trồng.

Con cảm ơn Bố, Mẹ đã luôn yêu thương, ủng hộ và tin tưởng con. Con cảm ơn sự hy sinh mà Bố, Mẹ đã giành cho con suốt 39 năm qua. Dù đã trưởng thành, nhưng con biết những bước đi của con chưa bao giờ làm Bố, Mẹ thôi lo lắng. Con xin lỗi vì những đêm làm Mẹ thức trắng, xin lỗi vì đã không biết chăm lo nhiều hơn cho gia đình. Nhưng con hứa từ nay Bố, Mẹ có thể an tâm và tự hào vì con. Con hy vọng cuốn luận án này sẽ là món quà thiêng liêng nhất thay cho lời cảm ơn của con gửi đến Bố, Mẹ.

Thời gian thực hiện luận án, cũng là giai đoạn khó khăn nhất trong sự nghiệp và cuộc sống của tôi. Có những lúc, tôi nghĩ rằng mình sẽ gục ngã và không thể bước tiếp. Thật may mắn khi bên cạnh tôi có một gia đình nhỏ luôn động viên và yêu thương tôi hết mực. "Anh cảm ơn những sự hy sinh của vợ trong suốt quãng thời gian qua. Cảm ơn em vì đã chu toàn cả việc công ty, nhà cửa và con cái. Cảm ơn vì những vất vả em đã phải chịu đựng một mình. Bố cũng cảm ơn con gái vì đã là nguồn động lực lớn nhất để bố tiếp tục phấn đấu trong cuộc sống''.

Cuối cùng, Tôi xin gửi lời cảm ơn đến Tiến sĩ Milan Hluchy, Stepan Hluchy, anh Đỗ Thành Trung và các đồng nghiệp của tôi tại công ty Biocont Việt Nam đã tạo điều kiện thuận lợi cho tôi trong suốt quá trình học tập.

Xin trân trọng cảm ơn!

Hà Nội, ngày 28 tháng 6 năm 2026

Nghiên cứu sinh

Phan Lê Hà Nguyễn

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

Giải thích một số thuật ngữ được dùng trong luận án xiv

LỜI MỞ ĐẦU 1

CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU 5

1.1. Môi trường nuôi cấy MS 5

1.1.1. Thành phần môi trường nuôi cấy MS 5

1.1.2. Sự hấp thu, vận chuyển và dự trữ khoáng chất trong thực vật 6

1.2. Một số hạn chế của phương pháp nuôi cấy *in vitro* 13

1.2.1. Thủy tinh thể 13

1.2.2. Tích lũy ethylene 14

1.2.3. Vàng lá, rụng lá và enzyme thủy phân cellulase, pectinase 15

1.2.4. Hóa nâu mẫu cấy 16

1.2.5. Stress oxy hóa và hệ thống kháng oxy hóa của thực vật 17

1.3. Nano kim loại 17

1.3.1. Giới thiệu 17

1.3.2. Các phương pháp tổng hợp hạt nano 18

1.3.3. Nano kim loại trong thực vật 19

1.3.4. An toàn của các nano kim loại 22

1.4. Nano kim loại trong vi nhân giống thực vật 23

1.4.1. Khử trùng mẫu cấy 23

1.4.2. Phát sinh hình thái *in vitro* 23

1.4.3. Biến dị dòng soma 24

1.4.4. Chuyển hóa hoạt chất thứ cấp 25

1.4.5. Một số nghiên cứu về nano kim loại tại Việt Nam 26

1.5. Nano kim loại sắt, cobalt và molypden trong vi nhân giống 26

1.5.1. Nano sắt trong nuôi cấy *in vitro* 27

1.5.2. Nano cobalt trong nuôi cấy *in vitro* 30

1.5.3. Nano molypden trong nuôi cấy *in vitro* 32

1.6. Sơ lược về các đối tượng nghiên cứu 33

1.6.1. Cây cúc 33

1.6.2. Cây đồng tiền 34

1.6.3. Cây tử linh lan 37

CHƯƠNG 2: VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU 39

2.1. Vật liệu 39

2.1.1. Vật liệu thực vật 39

2.1.2. Dung dịch nano kim loại 39

2.1.3. Thiết bị và dụng cụ 40

2.1.4. Điều kiện nuôi cấy 41

2.1.4. Môi trường nuôi cấy 41

2.2. Nội dung nghiên cứu 42

2.2.1 Nghiên cứu thay thế muối $Na_2MoO_4.2H_2O$ bằng MoO_3NPs trong vi nhân giống cây cúc 42

2.2.2. Nghiên cứu thay thế muối $CoCl_2.6H_2O$ bằng CoNPs trong vi nhân giống cây cúc, đồng tiền và tử linh lan 42

2.2.3. Nghiên cứu thay thế muối hoặc $FeSO_4.7H_2O$ bằng FeNPs trong vi nhân giống cây cúc, đồng tiền và tử linh lan 43

2.3. Phương pháp nghiên cứu 43

2.3.1. Bố trí thí nghiệm 43

2.3.1.1. Nghiên cứu thay thế muối $Na_2MoO_4.2H_2O$ bằng MoO_3NPs trong vi nhân giống cây cúc 43

2.3.1.2. Nghiên cứu thay thế muối $CoCl_2.6H_2O$ bằng CoNPs trong vi nhân giống cây cúc, đồng tiền và tử linh lan 44

2.3.1.3. Nghiên cứu thay thế muối $FeSO_4.7H_2O$ bằng FeNPs trong vi nhân giống cây cúc, đồng tiền và tử linh lan 45

2.3.2. Một số phương pháp nghiên cứu 46

2.3.2.1. Xác định hoạt độ enzyme kháng oxy hoá 46

2.3.2.2. Hấp thụ kim loại 47

2.3.2.3. Ethylene trong bình nuôi cấy 49

2.3.2.4. Hoạt độ enzyme thủy phân 50

2.3.2.5. Giải phẫu hình thái thực vật 52

2.3.2.6. Phân tích thống kê 52

2.3.2.7. Phương pháp quy đổi nồng độ muối sang nồng độ Nano kim loại 52

2.4. Địa điểm và thời gian nghiên cứu 53

2.4.1. Địa điểm nghiên cứu 53

2.4.2. Các đơn vị phối hợp thực hiện nghiên cứu 53

2.4.3. Thời gian nghiên cứu 53

CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN 54

3.1. Nghiên cứu thay thế muối $Na_2MoO_4.2H_2O$ bằng MoO_3NPs trong vi nhân giống cây cúc 54

3.1.1. Cảm ứng mô sẹo và tái sinh chồi của mẫu lá 54

3.1.2. Nhân nhanh chồi của mẫu đốt thân và chồi ngọn cây cúc nuôi cấy trên môi trường thay thế $Na_2MoO_4.2H_2O$ bằng MoO_3NPs..... 56

3.2. Nghiên cứu thay thế muối $CoCl_2.6H_2O$ bằng CoNPs trong vi nhân giống cây cây tử linh lan, đồng tiền và cúc 72

3.2.1. Tái sinh chồi từ mẫu lá và sự sinh trưởng của chồi cây tử linh lan trên môi trường thay thế $CoCl_2.6H_2O$ bằng CoNPs..... 72

3.2.2. Sự sinh trưởng của chồi cây đồng tiền nuôi cấy trên môi trường thay thế $CoCl_2.6H_2O$ bằng CoNPs..... 75

3.2.3. Ra rễ *in vitro* của mẫu chồi cây đồng tiền nuôi cấy trên môi trường thay thế $CoCl_2.6H_2O$ bằng CoNPs..... 79

3.2.4. Ra rễ *in vitro* của mẫu chồi cây cúc nuôi cấy trên môi trường thay thế $CoCl_2.6H_2O$ bằng CoNPs..... 87

3.3. Nghiên cứu thay thế muối $FeSO_4.7H_2O$ bằng FeNPs trong vi nhân giống cây cúc, đồng tiền và tử linh lan 92

3.3.1. Ảnh hưởng của FeNPs đến quá trình ra rễ *in vitro* của chồi ngọn cây cúc 82

3.2.2. Ảnh hưởng của FeNPs đến quá trình ra rễ *in vitro* của mẫu chồi cây đồng tiền..... 95

3.3.3. Ảnh hưởng của FeNPs đến quá trình ra rễ *in vitro* của mẫu chồi cây tử linh lan 99

CHƯƠNG 4: KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ 101

4.1. Kết luận 101

4.2. Kiến nghị 102

DANH MỤC CÔNG TRÌNH LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN 103

TÀI LIỆU THAM KHẢO 104

DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT

AC0	:	Môi trường nhân nhanh chồi tử linh lan
AgNPs	:	Nano bạc (Argentum nanoparticles)
APX	:	Ascorbate peroxidase
AR0	:	Môi trường ra rễ cây tử linh lan
AuNPs	:	Nano vàng (Aurum nanoparticles)
BA	:	6-Benzylaminopurine
B5	:	Môi trường Gamborg (1968)
$Ca(ClO)_2$	:	Canxi hypoclorit
CAT	:	Catalase
CC0	:	Môi trường nhân nhanh chồi cúc
CĐHSTTV	:	Chất điều hòa sinh trưởng thực vật
CMC	:	Chất ổn định (Carboxymethyl cellulose)
CNSH	:	Công nghệ sinh học
CoNPs	:	Nano cobalt (Cobalt nanoparticles)
CR0	:	Môi trường ra rễ cây cúc
CS0	:	Môi trường cảm ứng mô sẹo và tái sinh chồi cúc
CuNPs	:	Nano đồng (Cuprum nanoparticles)
DC0	:	Môi trường nhân nhanh chồi đồng tiền
DR0	:	Môi trường ra rễ cây đồng tiền
FeNPs:	:	Nano sắt (Ferrum nanoparticles)
MoO_3NPs	:	Nano molypden (Molypdenum trioxide nanoparticles)
MS	:	Môi trường Murashige và Skoog (1962)
MT	:	Môi trường
NAA	:	Axit 1-Naphthaleneacetic

$NaBH_4$	:	Natri borohydrit
NPs	:	Hạt Nano (Nano particles)
ROS	:	Các loại Oxy phản ứng (Reactive Oxygen Species)
SAM	:	S-adenosyl-L-methionine
SH	:	Môi trường Schenk và Hildebrandt (1972)
SOD	:	Superoxide dismutase
SPAD	:	Chỉ số Chlorophyll tổng

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1. Thành phần và nồng độ dinh dưỡng trong môi trường nuôi cấy MS 6

Bảng 1.2. Các kiểu phát sinh hình thái trên môi trường có bổ sung NPs 24

Bảng 1.3. Tổng hợp một số nghiên cứu về vai trò của FeNPs trong vi nhân giống những năm gần đây 29

Bảng 1.4. Tổng hợp một số nghiên cứu về vai trò của CoNPs trong vi nhân giống những năm gần đây 31

Bảng 1.5. Một số nghiên cứu vi nhân giống cây đồng tiền trong nước và trên thế giới 35

Bảng 3.1. Ảnh hưởng của MoO_3NPs lên cảm ứng mô sẹo và tái sinh chồi của mẫu lá cây cúc sau 30 ngày nuôi cấy 54

Bảng 3.2. Ảnh hưởng của MoO_3NPs lên nhân nhanh chồi của mẫu đốt thân cây cúc sau 30 ngày nuôi cấy 56

Bảng 3.3. Ảnh hưởng của MoO_3NPs lên nhân nhanh chồi của mẫu chồi ngọn cây cúc sau 30 ngày nuôi cấy 57

Bảng 3.4. Sự sinh trưởng và ra rễ cây cúc có nguồn gốc từ mẫu đốt thân nuôi cấy trên môi trường thay thế muối $Na_2MoO_4.2H_2O$ bằng MoO_3NPs sau 15 ngày nuôi cấy 69

Bảng 3.5. Ảnh hưởng của CoNPs lên sự tái sinh chồi và sinh trưởng của cụm chồi sau 60 ngày nuôi cấy 72

Bảng 3.6. Hàm lượng khí ethylene trong đĩa nuôi cấy và hoạt độ enzyme kháng oxy hóa của cụm chồi trên môi trường có bổ sung CoNPs sau 60 ngày nuôi cấy 74

Bảng 3.7. Sự sinh trưởng của chồi cây đồng tiền trên môi trường thay thế $CoCl_2.6H_2O$ bằng CoNPs sau 30 ngày nuôi cấy 78

Bảng 3.8. Sinh trưởng và ra rễ *in vitro* của cây đồng tiền trên môi trường thay thế $CoCl_2.6H_2O$ bằng CoNPs sau 30 ngày nuôi cấy 82

Bảng 3.9. Hoạt độ enzyme kháng oxy hóa và thủy phân của cây đồng tiền sau 30 ngày nuôi cấy 82

Bảng 3.10. Thích nghi của cây đồng tiền sau 15 ngày trồng ở vườn ươm 86

Bảng 3.11. Sự sinh trưởng và phát triển của cây đồng tiền sau 84 ngày ở vườn ươm 86

Bảng 3.12. Ảnh hưởng của CoNPs lên khả năng ra rễ *in vitro* và sinh trưởng của cây cúc sau 15 ngày nuôi cấy 90

Bảng 3.13. Hoạt độ enzyme kháng oxy hóa của cây cúc sau 15 ngày nuôi cấy. 91

Bảng 3.14. Ảnh hưởng của FeNPs lên ra rễ *in vitro* của mẫu chồi ngọn cây cúc sau 30 ngày nuôi cấy 93

Bảng 3.15. Sự sinh trưởng của cây đồng tiền trên môi trường thay thế $FeSO_4.7H_2O$ bằng FeNPs sau 30 ngày nuôi cấy 97

Bảng 3.16. Hoạt độ enzyme kháng oxy hóa và thủy phân của cây đồng tiền sau 30 ngày nuôi cấy 98

Bảng 3.17. Ảnh hưởng của FeNPs lên khả năng hấp thu K, Ca, Mg trong nuôi cấy *in vitro* cây đồng tiền 99

Bảng 3.18. Hoạt độ enzyme kháng oxi hóa và thủy phân của cây tử linh lan sau 30 ngày nuôi cấy 100

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1. Con đường sinh tổng hợp ethylene trong thực vật.....15

Hình 1.2. Con đường vận chuyển nano kim loại trong thực vật.....20

Hình 1.3. Sự tích lũy nano kim loại trong tế bào.....21

Hình 2.1. Ảnh TEM và hàm phân bố mật độ mẫu FeNPs.....39

Hình 2.2. Ảnh TEM và hàm phân bố mật độ mẫu CoNPs.....40

Hình 2.3. Ảnh TEM và hàm phân bố mật độ mẫu MoO_3NPs.....40

Hình 2.4 Phương pháp xác định hoạt độ ezyme kháng oxy hóa (SOD, CAT, APX).....47

Hình 2.5. Phương pháp phân tích quang phổ hấp thụ nguyên tử.....49

Hình 2.6. Phương pháp phân tích nồng độ Ethylene trong bình nuôi cấy.....50

Hình 2.7. Phương pháp phân tích hoạt tính Cellulase.....51

Hình 2.8. Phương pháp phân tích hoạt tính Pectinase.....52

Hình 3.1. Chồi được tái sinh từ mẫu cấy lá (A) nhân nhanh chồi từ mẫu đoạn thân (B) của cây cúc sau 30 ngày nuôi cấy trên môi trường thay thế muối $NaMoO_4$ bằng MoO_3NPs ở các nồng độ khác nhau. 55

Hình 3.2. Chồi được nhân nhanh từ mẫu cấy chồi ngọn cây cúc sau 30 ngày nuôi cấy trên môi trường thay thế muối $NaMoO_4$ bằng MoO_3NPs ở các nồng độ khác nhau.....58

Hình 3.3. Hoạt độ của enzyme kháng oxy hóa (SOD, APX và CAT) của mẫu cấy lá (A) và mẫu đoạn thân (B) sau 30 ngày nuôi cấy.....60

Hình 3.4. Hoạt độ của enzyme kháng oxy hóa (SOD, APX và CAT) trong chồi cây hoa cúc sau 30 ngày nuôi cấy trên môi trường thay thế muối $NaMoO_4$ bằng MoO_3NPs 61

Hình 3.5. Dư lượng Mo trong mẫu cấy lá (A) và đoạn thân (B) cây cúc sau 30 ngày nuôi cấy trên môi trường thay thế $Na_2MoO_4.2H_2O$ bằng MoO_3NPs 63

Hình 3.6. Dư lượng Mo trong mẫu chồi ngọn cây cúc được nuôi cấy trên môi trường thay thế muối $Na_2MoO_4.2H_2O$ bằng MoO_3NPs 64

Hình 3.7. Hấp thụ khoáng đa lượng (Ca, Mg và K) và vi lượng (Cu và Fe) trong giai đoạn tái sinh chồi của mẫu cấy lá (A, C) và nhân nhanh chồi của mẫu đoạn thân (B, D) cây cúc trên môi trường thay thế $Na_2MoO_4.2H_2O$ bằng MoO_3NPs 65

Hình 3.8. Khả năng hấp thu khoáng đa lượng (Ca, Mg và K) và vi lượng (Cu và Fe) của mẫu chồi ngọn cây cúc nuôi cấy trên môi trường thay thế muối $Na_2MoO_4.2H_2O$ bằng MoO_3NPs 67

Hình 3.9. Ảnh hưởng của dư lượng MoO_3NPs lên khả năng ra rễ *in vitro* sau 15 ngày nuôi cấy 70

Hình 3.10. Ảnh hưởng của MoO_3NPs lên khả năng ra rễ *in vitro* của cây cúc sau 15 ngày nuôi cấy 71

Hình 3.11. Ảnh hưởng của dư lượng MoO_3NPs lên khả năng sinh trưởng của cây cúc *in vitro* sau 15 ngày nuôi cấy 71

Hình 3.12. Chồi có nguồn gốc từ mẫu cấy lá cây tử linh lan được nuôi cấy trên môi trường thay thế $CoCl_2.6H_2O$ bằng CoNPs ở các nồng độ khác nhau sau 60 ngày (hàng trên) và 30 ngày (hàng dưới) 73

Hình 3.13. Ảnh hưởng của 4,65 μg/L CoNPs lên khả năng khắc phục một số hiện tượng bất thường trong giai đoạn tái sinh chồi cây tử linh lan sau 60 ngày nuôi cấy 73

Hình 3.14. Một số hiện tượng bất thường trong vi nhân giống cây đồng tiền 76

Hình 3.15. Tỷ lệ xuất hiện các hiện tượng bất thường trong quá trình nhân giống cây đồng tiền trên môi trường thay thế $CoCl_2.6H_2O$ bằng CoNPs sau 30 ngày nuôi cấy 77

Hình 3.16. Sự tích lũy khí ethylene trong bình nuôi cấy cây đồng tiền trên môi trường thay thế $CoCl_2.6H_2O$ bằng CoNPs sau 30 ngày nuôi cấy.....80

Hình 3.17. Ra rễ *in vitro* của cây đồng tiền trên môi trường thay thế $CoCl_2.6H_2O$ bằng CoNPs sau 30 ngày nuôi cấy.....81

Hình 3.18. Hình thái hoa của cây đồng tiền sau 84 ngày ở vườn ươm 85

Hình 3.19. Hình thái cây cúc ở giai đoạn ra rễ *in vitro* trên môi trường nuôi cấy thay thế $CoCl_2.6H_2O$ bằng CoNPs ở các nồng độ khác nhau sau 2 tuần nuôi cấy 89

Hình 3.20. Ảnh hưởng của FeNPs lên khả năng tích lũy chlorophyll của cây cúc sau 30 ngày nuôi cấy 92

Hình 3.21. Sự sinh trưởng của cây cúc trên môi trường thay thế $FeSO_4.7H_2O$ bằng FeNPs sau 30 ngày nuôi cấy.....94

Hình 3.22. Ảnh hưởng của FeNPs lên sự hình thành rễ và hình thái khí khổng của cây đồng tiền sau 30 ngày nuôi cấy 96

GIẢI THÍCH MỘT SỐ THUẬT NGỮ ĐƯỢC DÙNG TRONG LUẬN ÁN

Dư lượng: Thuật ngữ 'dư lượng' (residue) được sử dụng trong luận án này chỉ lượng dinh dưỡng không được cây hấp thu và chuyển hóa hết, vẫn còn tích tụ lại trong mẫu sau giai đoạn nuôi cấy.

Dung dịch nano: dịch phân tán nano, là một dạng huyền phù hoặc dung dịch chứa các hạt vật liệu có kích thước ở cấp độ nanomet. Trong luận án này, dung dịch nano chỉ dung dịch có chứa các hạt nano MoO_3NPs (35,5 ± 1,7 nm), CoNPs (14,6 ± 2,5 nm), FeNPs (4,4 ± 0,6 nm).

LỜI MỞ ĐẦU

Lý do chọn đề tài

Trong những năm gần đây, công nghệ nano đã trở thành một trong những lĩnh vực phát triển mạnh mẽ nhất của khoa học hiện đại, với nhiều ứng dụng trong y học, môi trường, vật liệu và nông nghiệp. Trong lĩnh vực công nghệ sinh học thực vật, các hạt nano kim loại được quan tâm nhờ kích thước siêu nhỏ, diện tích bề mặt lớn và khả năng tương tác hiệu quả với hệ thống sinh học của tế bào thực vật. Những đặc tính này giúp hạt nano có thể tham gia vào quá trình hấp thu dinh dưỡng, điều hòa trao đổi chất, tăng cường khả năng chống chịu stress và cải thiện sinh trưởng của cây trồng.

Nuôi cấy mô tế bào thực vật là phương pháp nhân giống hiện đại có khả năng tạo ra số lượng lớn cây giống đồng nhất trong thời gian ngắn. Tuy nhiên, quá trình nuôi cấy *in vitro* vẫn tồn tại nhiều hạn chế như hiện tượng thủy tinh thể, vàng lá, rụng lá, hóa nâu mẫu cấy, tích lũy ethylene và stress oxy hóa. Bên cạnh đó, hiệu quả của quá trình nuôi cấy phụ thuộc rất lớn vào thành phần môi trường dinh dưỡng, đặc biệt là các nguyên tố vi lượng như sắt (Fe), molypden (Mo) và cobalt (Co), vốn giữ vai trò quan trọng trong hoạt động enzyme, quang hợp, hô hấp và quá trình phát sinh hình thái của thực vật.

Cho đến nay, phần lớn các nghiên cứu về nano trong nuôi cấy mô thực vật tập trung vào việc bổ sung hạt nano như các chất kích thích sinh trưởng, chất khử trùng hoặc chất cảm ứng sinh tổng hợp hợp chất thứ cấp. Nhiều nghiên cứu đã chứng minh khả năng của nano kim loại trong việc cải thiện sinh trưởng, hạn chế nhiễm vi sinh vật và giảm một số rối loạn sinh lý trong điều kiện nuôi cấy in vitro. Tuy nhiên, việc sử dụng nano kim loại như một nguồn dinh dưỡng để thay thế trực tiếp các muối vi lượng truyền thống trong môi trường nuôi cấy vẫn còn rất hạn chế và chưa được nghiên cứu một cách hệ thống. Đây chính là khoảng trống khoa học quan trọng cần được làm sáng tỏ.

Xuất phát từ thực tiễn đó, luận án "Nghiên cứu thay thế một số muối kim loại vi lượng bằng nano kim loại trong vi nhân giống cây hoa (cúc, đồng tiền và tử linh lan)" được thực hiện nhằm đánh giá khả năng sử dụng nano sắt (FeNPs), nano

molypden (MoO_3NPs) và nano cobalt (CoNPs) thay thế các muối vi lượng tương ứng trong môi trường Murashige và Skoog (MS). Nghiên cứu tập trung trên ba đối tượng cây hoa có giá trị kinh tế cao là cúc, đồng tiền và tử linh lan, đồng thời đánh giá toàn diện ảnh hưởng của các hạt nano đến quá trình phát sinh hình thái, sinh trưởng, hấp thu dinh dưỡng khoáng, hoạt động của hệ enzyme kháng oxy hóa, sự tích lũy ethylene, hoạt động enzyme thủy phân và khả năng thích nghi của cây ở giai đoạn vườn ươm.

Mục tiêu nghiên cứu

Mục tiêu tổng quát

Xác định khả năng sử dụng nano sắt (FeNPs), nano cobalt (CoNPs) và nano molypden (MoO_3NPs) thay thế các muối vi lượng tương ứng trong môi trường nuôi cấy mô thực vật; đồng thời làm rõ ảnh hưởng của chúng đến sinh trưởng, phát triển, đặc điểm sinh lý – sinh hóa và hiệu quả vi nhân giống của một số loài cây hoa, làm cơ sở khoa học cho việc ứng dụng công nghệ nano trong cải tiến môi trường nuôi cấy và nâng cao chất lượng cây giống *in vitro*.

Mục tiêu cụ thể

- Xác định nồng độ thích hợp của nano sắt (FeNPs), nano cobalt (CoNPs) và nano molypden (MoO_3NPs) để thay thế các muối vi lượng tương ứng trong môi trường nuôi cấy đối với cây cúc, đồng tiền và tử linh lan *in vitro*.
- Đánh giá ảnh hưởng của việc thay thế các muối vi lượng bằng nano kim loại đến quá trình phát sinh hình thái, sinh trưởng và phát triển của cây trong các giai đoạn nhân chồi, tạo cây hoàn chỉnh và thích nghi ngoài vườn ươm.
- Đánh giá khả năng của nano kim loại trong việc hạn chế hoặc khắc phục một số hiện tượng bất thường thường gặp trong nuôi cấy mô thực vật như sinh trưởng kém, vàng lá, rụng lá, hóa nâu, tích lũy ethylene, lão hóa sớm và giảm chất lượng cây giống *in vitro*.
- Xác định ảnh hưởng của nano kim loại đến khả năng hấp thu, vận chuyển và tích lũy các nguyên tố dinh dưỡng khoáng trong cây nuôi cấy *in vitro*.
- Đánh giá tác động của nano kim loại đến một số đặc tính sinh lý – sinh hóa liên quan đến sinh trưởng và khả năng chống chịu stress của cây, bao gồm hoạt

động của hệ enzyme chống oxy hóa, enzyme thủy phân, hàm lượng sắc tố quang hợp và sự hình thành ethylene.

- Làm sáng tỏ cơ sở khoa học của việc sử dụng nano kim loại như nguồn cung cấp vi lượng thay thế các muối vô cơ truyền thống trong môi trường nuôi cấy mô thực vật, góp phần nâng cao hiệu quả vi nhân giống và chất lượng cây giống.

Nội dung nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu

- Ba loại cây trồng nuôi cấy *in vitro*: Cúc, đồng tiền và tử linh lan.
- Ba loại NPs (MoO_3NPs, CoNPs và FeNPs) được sử dụng thay thế các muối kim loại truyền thống trong MT MS ($Na_2MoO_4.2H_2O$, $CoCl_2.6H_2O$ và $FeSO_4.7H_2O$).

Phạm vi nghiên cứu

Nghiên cứu tập trung vào việc sử dụng MoO_3NPs, CoNPs và FeNPs ở các nồng độ khác nhau để thay thế các muối kim loại tương ứng trong MT nuôi cấy MS. Từ đó, đánh giá sự phát sinh hình thái, sinh trưởng, các chỉ tiêu sinh lý và sinh hóa của mẫu cấy trong nuôi cấy *in vitro* cây cúc, đồng tiền và tử linh lan. Bên cạnh đó, đề tài còn nghiên cứu thêm về ảnh hưởng của các nano kim loại này khi cây được chuyển sang giai đoạn vườn ươm.

Ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài

Ý nghĩa khoa học

Những kết quả nghiên cứu sẽ đưa ra dẫn chứng khoa học mới về vai trò của NPs trong cải thiện sinh trưởng của cây cúc, đồng tiền và tử linh lan. Đồng thời, đề tài cũng khắc phục một số vấn đề bất thường thường gặp trong quá trình nuôi cấy *in vitro*. Kết quả nghiên cứu sẽ trở thành nguồn tài liệu quý giá, hỗ trợ trong việc giảng dạy và nghiên cứu CNSH thực vật.

Ý nghĩa thực tiễn

Kết quả của đề tài đã cho thấy triển vọng của việc sử dụng NPs thay thế cho các muối kim loại vi lượng giúp cải thiện hiệu quả của MT nuôi cấy. Với ưu điểm sử dụng

lượng vật liệu ít hơn nhưng mang lại hiệu quả nuôi cấy cao hơn, đồng thời giúp gia tăng tỷ lệ sống, chất lượng của cây con (thông qua việc khắc phục một số hiện tượng bất thường trong vi nhân giống) – việc ứng dụng NPs trong MT nuôi cấy *in vitro* sẽ là một hướng đi đầy triển vọng đồng thời mở ra hướng nghiên cứu về sự hấp thu, vận chuyển, sử dụng và tác động các NPs trong thực vật.

Những đóng góp mới của luận án

- Luận án đã cung cấp những bằng chứng khoa học mới về khả năng sử dụng nano sắt (FeNPs), nano cobalt (CoNPs) và nano molypden (MoO_3NPs) thay thế các muối vi lượng tương ứng trong môi trường nuôi cấy mô thực vật, mở ra hướng tiếp cận mới trong cải tiến thành phần dinh dưỡng của môi trường nuôi cấy.
- Luận án đã làm sáng tỏ cơ sở sinh lý – sinh hóa của việc sử dụng nano kim loại trong nuôi cấy *in vitro* thông qua việc chứng minh vai trò của chúng đối với khả năng hấp thu dinh dưỡng khoáng, điều hòa hoạt động của hệ enzyme chống oxy hóa, enzyme thủy phân và giảm tích lũy ethylene, qua đó góp phần hạn chế các rối loạn sinh lý thường gặp trong điều kiện nuôi cấy mô.
- Luận án đã xác định được các nồng độ thích hợp của FeNPs, CoNPs và MoO_3NPs cho quá trình vi nhân giống cây cúc, đồng tiền và tử linh lan; đồng thời chứng minh việc thay thế các muối vi lượng truyền thống bằng nano kim loại có thể nâng cao hiệu quả nhân giống, cải thiện chất lượng cây giống và tăng khả năng thích nghi của cây ở giai đoạn vườn ươm.

CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. MÔI TRƯỜNG NUÔI CẤY MS

1.1.1. Thành phần môi trường nuôi cấy MS

MT Murashige và Skoog (MS), phát triển bởi Toshio Murashige và Folke Skoog vào năm 1962, là một trong những MT nuôi cấy mô phổ biến và quan trọng nhất cho đến ngày nay [1]. MT này được thiết kế với sự cân bằng giữa các nguyên tố vi lượng và đa lượng, đáp ứng nhu cầu dinh dưỡng thiết yếu cho sự sinh trưởng của mô thực vật trong điều kiện *in vitro*.

MT MS bao gồm các thành phần chính sau:

1. **Muối vô cơ**: Đây là nguồn cung cấp dinh dưỡng thiết yếu như nitơ (N), phốt pho (P), ka li (K), ma giê (Mg), can xi (Ca), lưu huỳnh (S) và các vi lượng như sắt (Fe), kẽm (Zn), man gan (Mn), đồng (Cu), mô lýp đen (Mo), cobalt (Co) và bo (B). Các nguyên tố này có vai trò rất quan trọng trong việc thúc đẩy sinh trưởng của mô thực vật.
2. **Nguồn carbon**: Sucrose thường được sử dụng với nồng độ từ 2 - 3%, cung cấp nguồn năng lượng thiết yếu cho sinh trưởng của mô thực vật nuôi cấy *in vitro*.
3. **Vitamin**: Bao gồm các loại vitamin như thiamine (vitamin B1), pyridoxine (vitamin B6) và nicotinic acid. Chúng kích thích quá trình phân chia tế bào và giúp mô sinh trưởng nhanh chóng.
4. **Hormone thực vật**: Tùy thuộc vào loại cây và giai đoạn nuôi cấy, các CĐHSTTV như auxin (IAA, NAA) và cytokinin (BA, kinetin) có thể được bổ sung để thúc đẩy sự phát sinh hình thái, tái sinh chồi hoặc rễ.

MT MS được xem là "*MT cơ bản*" cho việc nuôi cấy tế bào, mô và cơ quan thực vật vì sự cân bằng tương đối hoàn hảo của các yếu tố dinh dưỡng. Chính nhờ tính đa dụng và hiệu quả, MT này đang được sử dụng rộng rãi trong các nghiên cứu CNSH thực vật như nhân giống *in vitro*, bảo tồn nguồn gen và sản xuất các hợp chất sinh học giá trị cao.

Bảng 1.1. Thành phần và nồng độ dinh dưỡng trong môi trường nuôi cấy MS

Thành phần	Nồng độ (mg/L)
Muối vô cơ	
NH_4NO_3	1650
KNO_3	1900
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	440
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	370
KH_2PO_4	170
Vi lượng	
H_3BO_3	6,2
$MnSO_4 \cdot H_2O$	16,9
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	8,6
KI	0,83
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,25
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,025
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0,025
Fe EDTA	
Fe EDTA ($Na_2EDTA \cdot Fe$)	36,7
Nguồn Carbon	
Sucrose	20000
Vitamin và chất bổ sung	
Thiamine-HCl (B1)	0,1
Pyridoxine-HCl (B6)	0,5
Nicotinic acid (B3)	0,5
Glycine	2,0
Myo-inositol	100
CĐHSTTV Không bắt buộc (tùy mục đích)	N/A
Chất đông đặc (nếu cần)	
Agar	6000 - 8000

1.1.2. Sự hấp thu, vận chuyển và dự trữ khoáng chất trong thực vật

Chất khoáng muốn đi vào cây thì trước hết phải được hấp phụ trên bề mặt rễ và sau đó ion khoáng đi qua chất nguyên sinh để vào trong tế bào và được vận chuyển từ tế bào này qua tế bào khác rồi đến tất cả các bộ phận của cây.

1.1.2.1. Sự trao đổi chất khoáng của rễ trong đất

Các chất khoáng trước hết phải hòa tan trong dung dịch đất rồi mới có thể được rễ cây hấp thụ thông qua bề mặt lông hút. Sự hấp thụ này diễn ra nhờ quá trình trao đổi ion giữa đất và rễ, trong đó các ion khoáng được giữ lại trên bề mặt rễ. Có hai cơ chế trao đổi ion chính là trao đổi trực tiếp khi rễ tiếp xúc với keo đất và trao đổi gián tiếp thông qua axit cacbonic trong dung dịch đất.

Trong quá trình hô hấp, rễ cây giải phóng CO_2, chất này kết hợp với nước tạo thành axit cacbonic yếu và nhanh chóng phân ly thành H^+ và HCO_3^-. Các ion H^+ sẽ trao đổi với các cation trong đất, còn HCO_3^- sẽ trao đổi với các anion. Quá trình trao đổi này tuân theo nguyên tắc cân bằng hóa trị và đương lượng giữa các ion [2].

Phương thức trao đổi tiếp xúc (trực tiếp)

Các lông hút của rễ chui sâu vào các khe nhỏ trong đất và tiếp xúc trực tiếp với các hạt keo đất. Tại đây, các ion H^+ và HCO_3^- do rễ tiết ra sẽ tham gia trao đổi trực tiếp với các cation và anion đang bám trên bề mặt keo đất. Nhờ cơ chế trao đổi trực tiếp này, rễ cây có thể hấp thụ được lượng chất khoáng lớn hơn so với phần khoáng hòa tan trong dung dịch đất. Vì vậy, lượng chất khoáng dễ tiêu trong dung dịch đất thường thấp hơn so với khả năng khai thác dinh dưỡng thực tế của cây [2].

Phương thức trao đổi axit cacbonic thông qua dung dịch đất (gián tiếp)

Các chất khoáng dễ tiêu trong dung dịch đất là nguồn dinh dưỡng mà rễ cây có thể hấp thụ một cách thuận lợi nhất, tuy nhiên quá trình hấp thụ vẫn diễn ra thông qua môi trường dung dịch đất. Trong quá trình hoạt động sống, rễ cây liên tục thải CO_2 vào dung dịch đất, CO_2 này hòa tan và phân ly tạo thành các ion H^+ và HCO_3^-.

Các ion H^+ có vai trò trao đổi với các cation như K^+ (hoặc các cation khác) đang bám trên bề mặt keo đất, từ đó giải phóng chúng vào dung dịch đất. Sau khi được giải phóng, các cation này di chuyển tự do đến lông hút và thực hiện trao đổi với ion H^+ trên bề mặt rễ để được hấp thụ. Ngoài ra, K^+ cũng có thể kết hợp với HCO_3^- trong dung dịch đất rồi di chuyển đến lông hút để trao đổi trực tiếp với H^+ của rễ.

Đối với các anion, ion HCO_3^- trong dung dịch đất sẽ trao đổi với các anion đang bị giữ trên keo đất, làm chúng được giải phóng vào dung dịch. Sau đó, các anion này di chuyển đến bề mặt rễ và trao đổi với HCO_3^- của rễ, nhờ đó được hấp thụ và giữ lại trong cây [2].

1.1.2.2. Sự xâm nhập chất khoáng vào tế bào

Sau khi được hấp phụ trên bề mặt rễ, các chất khoáng sẽ được đưa vào bên trong tế bào rễ và tiếp tục vận chuyển đến các bộ phận phía trên mặt đất của cây. Trong quá trình này, các ion khoáng phải đi xuyên qua chất nguyên sinh, đặc biệt là vượt qua hai lớp màng quan trọng gồm màng sinh chất (plasmalemma) và màng không bào (tonoplast).

Các màng này có cấu trúc chặt chẽ, trong đó thành phần lipid đóng vai trò quyết định tính thấm của màng đối với các ion. Do màng mang bản chất lipid, những chất có khả năng hòa tan trong lipid sẽ dễ dàng đi qua màng hơn so với các chất khác.

Có rất nhiều quan điểm giải thích sự xâm nhập của chất khoáng vào trong tế bào, nhưng chung quy thuộc 2 loại cơ chế: cơ chế xâm nhập thụ động và cơ chế xâm nhập chủ động [2].

Sự xâm nhập chất khoáng thụ động

Đặc trưng của cơ chế thụ động là:

- Quá trình xâm nhập chất khoáng không cần cung cấp năng lượng không liên quan đến trao đổi chất và tự diễn ra.
- Phụ thuộc vào sự chênh lệch nồng độ ion trong và ngoài tế bào (gradient nồng độ). Nồng độ bên ngoài lớn hơn bên trong tế bào.
- Chỉ vận chuyển các ion có tính thấm đối với màng, nghĩa là phải có tính tan trong màng lipit.

❖ *Sự khuếch tán chất tan vào trong tế bào*

Khuếch tán là quá trình các phân tử di chuyển từ nơi có nồng độ cao đến nơi có nồng độ thấp cho đến khi đạt trạng thái cân bằng trong hệ thống.

Tốc độ xâm nhập của các chất tan vào tế bào phụ thuộc vào ba yếu tố chính. Thứ nhất, khả năng hòa tan trong lipid của ion (K) càng cao thì tốc độ xâm nhập càng lớn. Thứ hai, khối lượng phân tử của chất tan (M) càng nhỏ thì quá trình đi qua màng càng thuận lợi. Thứ ba, sự chênh lệch nồng độ giữa hai môi trường càng lớn thì tốc độ khuếch tán càng nhanh.

Ba yếu tố này là điều kiện cần để một ion có thể đi vào tế bào theo cơ chế khuếch tán. Nếu thiếu một trong các yếu tố trên, quá trình khuếch tán sẽ diễn ra rất yếu hoặc không xảy ra.

Tuy nhiên, ngay cả khi các điều kiện khuếch tán đều được đảm bảo, tốc độ khuếch tán tự nhiên vẫn diễn ra chậm hơn rất nhiều so với sự di chuyển của chất tan trong tế bào. Điều này cho thấy trong tế bào tồn tại một cơ chế hỗ trợ giúp tăng tốc quá trình khuếch tán. Cơ chế đó được gọi là khuếch tán có xúc tác, giúp các chất tan di chuyển nhanh hơn qua màng.

❖ *Sự khuếch tán có xúc tác*

Tồn tại một số cơ chế hỗ trợ làm tăng đáng kể tốc độ khuếch tán, được gọi là khuếch tán có xúc tác. Đây vẫn là hình thức vận chuyển thụ động vì không tiêu tốn năng lượng của quá trình trao đổi chất.

Một số cơ chế chính gồm:

- **Ionophor**: là các hợp chất hữu cơ nằm trên màng có khả năng liên kết chọn lọc với ion và vận chuyển chúng qua màng mà không cần năng lượng. Nhiều ionophor đã được nghiên cứu có nguồn gốc từ vi sinh vật, như valinomycin từ *Streptomyces* hay nonactin từ *Actinomyces*. Khi hoạt động, các chất này làm tăng tính thấm của màng, giúp ion đi qua dễ dàng hơn nhờ sự liên kết có tính đặc hiệu cao giữa ionophor và ion.
- **Kênh ion**: trên màng sinh chất và màng không bào tồn tại nhiều cấu trúc dạng lỗ xuyên màng có kích thước đủ lớn để ion đi qua. Các kênh này có tính chọn lọc, mỗi loại ion thường có kênh riêng và có khả năng đóng – mở tùy theo điều kiện của tế bào, giúp điều hòa quá trình vận chuyển ion.
- **Thế xuyên màng**: sự di chuyển ion qua màng tạo ra chênh lệch điện thế giữa hai phía màng, thường dao động khoảng 50–200 mV và phía trong tế bào thường mang điện âm. Nhờ điện thế này, các cation có thể đi vào trong theo gradient điện trường, còn các anion có thể kết hợp với H^+ để chuyển thành dạng cation rồi mới đi qua màng vào trong tế bào [2].

Sự xâm nhập chất khoáng chủ động

Trong nhiều trường hợp, cây vẫn có thể hấp thụ ion khoáng dù nồng độ ion bên trong tế bào cao hơn bên ngoài, tức là diễn ra ngược chiều gradient nồng độ. Hiện

tượng này không thể được giải thích bằng cơ chế khuếch tán hay khuếch tán có xúc tác. Thêm vào đó, quá trình tích lũy ion sẽ bị giảm mạnh khi hoạt động trao đổi chất của cây bị ức chế, chẳng hạn như khi thiếu oxy trong môi trường hoặc khi sử dụng các chất ức chế hô hấp.

Điều đó cho thấy việc hấp thụ và tích lũy ion khoáng phụ thuộc vào năng lượng do quá trình trao đổi chất cung cấp, và đây là một quá trình mang tính chọn lọc và chủ động của tế bào.

Vận chuyển tích cực (active transport) khác với vận chuyển thụ động (passive transport) ở một số đặc điểm cơ bản sau:

- Có sử dụng năng lượng từ quá trình trao đổi chất của tế bào.
- Có khả năng vận chuyển chất ngược chiều gradient nồng độ (từ nơi có nồng độ thấp đến nơi có nồng độ cao).
- Có thể đưa vào tế bào những ion khoáng không thấm hoặc thấm rất kém qua màng lipid.
- Mang tính đặc hiệu cao đối với từng loại tế bào và từng loại chất được vận chuyển.

Hiện nay có nhiều giả thuyết nhằm giải thích cơ chế vận chuyển tích cực, trong đó quan niệm chất mang được chấp nhận rộng rãi nhất.

❖ *Quan niệm chất mang*

Theo quan điểm này, trên màng sinh chất và màng không bào tồn tại các chất chuyên biệt có vai trò vận chuyển ion từ ngoài vào trong tế bào, được gọi là chất mang. Chúng có khả năng liên kết với các ion ở mặt ngoài màng và sau đó giải phóng chúng ở phía bên trong.

Phức hợp trung gian giữa chất mang và ion đóng vai trò như một phương tiện giúp ion dễ dàng đi qua màng. Để hình thành phức hợp này, chất mang trước hết phải được hoạt hóa nhờ năng lượng ATP thông qua enzym photphokinaza. Vì vậy, đây là một dạng vận chuyển tích cực, có liên quan trực tiếp đến hoạt động trao đổi chất của tế bào.

Sau khi được hoạt hóa, chất mang có thể liên kết thuận lợi với ion và đưa chúng vào bên trong tế bào. Tiếp đó, nhờ enzym photphataza, ion sẽ được tách ra khỏi phức hợp để giải phóng vào trong tế bào.

Quá trình này có thể chia làm 3 giai đoạn: 1. Hoạt hóa chất mang – 2. Tạo phức hệ ion-chất mang – 3. Giải phóng ion.

Trong 3 giai đoạn, chỉ có giai đoạn đầu tiên cần năng lượng để hoạt hóa chất mang. Phương thức kết hợp giữa chất mang và ion cũng tương tự như kết hợp giữa enzyme và cơ chất khi tiến hành xúc tác phản ứng hóa học.

Như vậy, sự xâm nhập chất khoáng vào tế bào được thực hiện bởi 2 cơ chế: bị động và chủ động. Tùy theo trường hợp cụ thể, điều kiện cụ thể mà cơ chế nào chiếm ưu thế. Nhìn chung, cả 2 cơ chế này đều diễn ra song song trong cây. Nếu một trong 2 phương thức bị ức chế thì cũng có nghĩa sự hút khoáng bị ức chế. Ví dụ khi cây bị yếm khí thì sự hút khoáng cũng bị ngừng trệ [2].

1.1.2.3. Sự vận chuyển chất khoáng trong cây

Sự vận chuyển trong các tế bào

Sau khi được hấp thu, các khoáng chất được vận chuyển từ rễ đến mọi bộ phận khác của cây qua hai con đường chính:

- *Con đường gian bào (Apoplast):*

Con đường apoplast là con đường vận chuyển khoáng chất qua khoảng không gian giữa các tế bào, chủ yếu qua các vách tế bào mà không đi qua màng tế bào. Các khoáng chất di chuyển qua đây từ ngoài vào trong rễ rồi vào các mạch gỗ (xylem).

Dòng chảy qua apoplast: Khoáng chất di chuyển qua apoplast thông qua khuếch tán từ nồng độ cao (trong đất) đến nồng độ thấp (trong rễ và mô xylem). Tuy nhiên, sự vận chuyển qua apoplast có thể bị kiểm soát khi ion đi qua nội bì trong rễ, nơi có vành đai Caspary, ngăn cản sự di chuyển tự do của khoáng chất qua không gian giữa các tế bào [3].

Vành đai Caspary nằm ở lớp nội bì của rễ giúp ngăn cản các ion đi qua apoplast tự do, buộc chúng phải đi qua màng tế bào nội mô và có sự chọn lọc trong quá trình vận chuyển khoáng chất. Sau khi khoáng chất vượt qua lớp này, chúng có thể đi vào xylem và vận chuyển lên bộ phận hay cơ quan khác của cây [3].

Ưu điểm của con đường apoplast: Con đường apoplast cho phép khoáng chất di chuyển nhanh chóng mà không cần trao đổi ion trong tế bào. Tuy nhiên, quá trình này không có sự kiểm soát chặt chẽ như con đường symplast, khiến cho con đường

apoplast trở nên kém hiệu quả trong việc vận chuyển các ion cần điều khiển sự hấp thu một cách cụ thể [4].

- *Con đường qua cầu liên bào (Symplast)*

Con đường symplast cho phép các chất hoà tan và ion đi từ tế bào này sang tế bào khác qua cầu nối tế bào chất (plasmodemata) mà không cần phải ra ngoài MT tế bào.

Vận chuyển qua cầu nối tế bào chất: Các ion khoáng chất như K^+, Ca^{2+}, Mg^{2+}, và NO_3^- có thể di chuyển qua cầu nối tế bào chất giữa các tế bào trong rễ hoặc mô khác của cây. Quá trình này giúp các ion di chuyển từ các tế bào của mạch vỏ (cortex) vào các tế bào của mạch gỗ (xylem) mà không cần phải đi qua lớp màng tế bào [2].

Dòng chảy trong symplast: con đường symplast đảm bảo sự chuyển động của các ion theo chiều từ rễ lên mạch gỗ (xylem), và chúng thường di chuyển qua các tế bào có khả năng trao đổi ion với nhau, đặc biệt là trong điều kiện cây cần duy trì sự ổn định nội môi [3].

Vai trò của sự bơm ion: trong quá trình vận chuyển khoáng chất qua symplast, các ion được bơm vào trong tế bào và đi qua các cầu nối tế bào chất nhờ vào các cơ chế sinh lý, trong đó có sự tham gia của bơm proton H^+. Bơm proton làm tăng sự tích tụ của các ion trong tế bào giúp sự di chuyển thuận lợi của các ion khoáng.

Sự vận chuyển trong mạch xylem

Các chất khoáng tan trong nước rồi đi vào mạch gỗ và theo dòng thoát hơi nước mà đi lên các bộ phận trên mặt đất, đến tất cả các cơ quan cần thiết. Đây là dòng vận chuyển chất khoáng chủ yếu trong cây. Tốc độ vận chuyển chất khoáng trong mạch gỗ phụ thuộc vào quá trình thoát hơi nước của lá, tức là phụ thuộc vào dòng nước đi lên cây [2].

Sự vận chuyển trong mạch floem (libe)

Một bộ phận các ion cũng có thể tách ra từ các tế bào nhu mô hoặc từ mạch gỗ vào hệ thống dẫn chất đồng hóa – hệ thống mạch libe – để cùng tham gia với các chất đồng hóa phân phối đến các bộ phận của cây. Người ta phát hiện nhiều ion khoáng trong dịch vận chuyển của mạch rây với nồng độ rất khác nhau. Một số chất khoáng có khả năng di động rất lớn thì dễ dàng xuất hiện trong mạch libe như K, Na, P, S,

Mg, Cl... cũng có một số chất không di động như Ca, B, Ag... ít khi thấy chúng trong mạch libe [2].

1.1.2.4. Sự dinh dưỡng khoáng ngoài rễ

Phần lớn các chất khoáng trong đất được cây hấp thụ thông qua hệ rễ. Tuy nhiên, ngoài rễ, các cơ quan khác của cây, đặc biệt là lá, cũng có khả năng hấp thụ khoáng khi tiếp xúc với dung dịch dinh dưỡng.

Các ion khoáng khi xâm nhập vào lá thường đi qua khí khổng hoặc thấm qua lớp cutin mỏng trên bề mặt lá. Mức độ hấp thụ qua lá phụ thuộc vào nhiều yếu tố như thành phần, nồng độ và độ pH của dung dịch khoáng. Bên cạnh đó, tuổi của lá cũng ảnh hưởng đến khả năng hấp thụ. Với cùng một nguyên tố, tốc độ thấm vào lá còn thay đổi tùy thuộc vào dạng hóa học mà cây tiếp nhận.

1.2. MỘT SỐ HẠN CHẾ CỦA NUÔI CẤY *IN VITRO*

Nuôi cấy *in vitro* mặc dù mang lại nhiều lợi ích nhưng vẫn có một số hạn chế như thoái hóa giống, dị dạng, hiện tượng bất thường (thủy tinh thể, rụng lá, khí khổng biến dạng, nhiễm vi sinh vật, mẫu cấy bị hóa nâu). Nguyên nhân của những bất thường này thường liên quan đến việc mẫu cấy sinh trưởng trong MT kín, vô trùng, dẫn đến sự thay đổi trong quá trình sinh trưởng của cây trước khi chuyển ra điều kiện vườn ươm.

1.2.1. Thủy tinh thể

Khi các chồi *in vitro* được nuôi cấy trong MT ẩm độ cao và thiếu không gian thoáng khí, chúng thường có những biểu hiện bất thường về hình thái và sinh lý mẫu cấy. Hiện tượng thủy tinh thể còn được gọi là thủy tinh hóa, tích lũy nước quá mức, trong suốt như thủy tinh [6]. Những bất thường này thường dẫn đến sự biệt hóa và khả năng hóa gỗ kém của mô, các tế bào lá bao quanh bởi thành tế bào mỏng và nguyên sinh chất nghèo dinh dưỡng. Khi quan sát dưới kính hiển vi, lá bị hiện tượng thủy tinh thể hóa thường thiếu mô giậu, chứa nhiều nước trong nguyên sinh chất, và lục lạp có nhiều hạt tinh bột lớn nhưng hàm lượng lục lạp lại thấp hơn lá bình thường [7]. Ở một số loài cây, hiện tượng này còn khiến mô biểu bì và lớp lông sừng trên lá bị khiếm khuyết, làm giảm khả năng mở và đóng của khí khổng, dẫn đến giảm khả năng thích nghi với điều kiện thay đổi [8]. Những cây bị hiện tượng này thường có tỷ

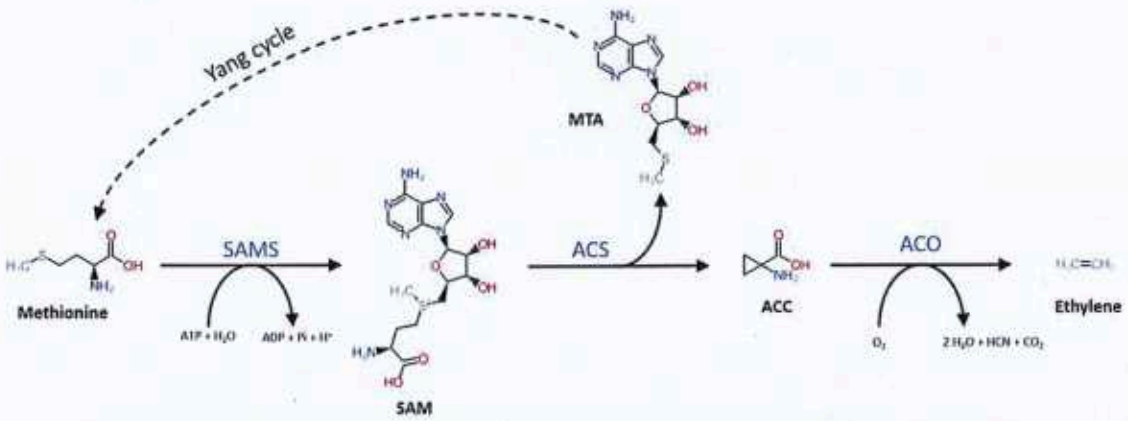
lệ sống thấp và khả năng đáp ứng của rễ kém trong quá trình vi nhân giống thương mại [9].

Thủy tinh thể, một rối loạn sinh lý và hình thái ở cây trồng *in vitro* làm giảm chất lượng cây giống, đã được ghi nhận ở hoa hướng dương [10], *Scrophularia yoshimurae* [11], hoa cẩm chướng [6], *Turbinicarpus valdezianus* [12] và hoa hồng [13]. Nguyên nhân của quá trình này là do nhiều yếu tố như MT, loại và nồng độ CĐHSTTV [14], độ ẩm tương đối và tích tụ khí ethylene [11] hệ thống nuôi cấy và tạo gel [15].

Hiện tượng thủy tinh thể thường phụ thuộc vào loại cây, sự tích lũy ethylene, nồng độ CO_2, độ ẩm trong bình nuôi cấy (>95%), nhiệt độ, và chất điều hòa sinh trưởng. Những tổn thương ở mô cây và điều kiện kín khí trong nuôi cấy *in vitro* làm gia tăng sự tích lũy ethylene từ đó dẫn đến các stress sinh học và những biến đổi sinh lý bất lợi. Ethylene làm tăng tính thấm của màng tế bào và tăng sự giữ nước nội bào làm mô cây bị ngậm nước từ đó tăng nguy cơ thủy tinh thể [16]. Các biện pháp như điều chỉnh nồng độ chất đông, nguồn carbon, khoáng chất, tỷ lệ NH_4^+, hoặc điều kiện nuôi cấy có thể giúp giảm thiểu hiện tượng này, nhưng cũng có thể làm giảm tỷ lệ nhân giống và tăng nguy cơ nhiễm vi sinh vật [17]. Tăng nồng độ Ca^{2+} đã chứng minh hiệu quả trong việc giảm hiện tượng thủy tinh thể, nhưng lại cản trở quá trình hóa gỗ của cây [18].

1.2.2. Tích lũy khí ethylene

Ethylene (C_2H_4) là một hợp chất hữu cơ được sử dụng rộng rãi và là một loại hormone thực vật. C_2H_4 tham gia vào các quá trình sinh trưởng của cây (nảy mầm, hình thành chồi và rễ, rụng lá và quả, ra hoa, và chín quả). Ethylene cũng có vai trò trong các phản ứng stress như hạn hán, thừa nước, mầm bệnh, và độ mặn [19]. Quá trình tổng hợp ethylene ở thực vật được diễn ra như hình 1.1.



Hình 1.1. Con đường sinh tổng hợp ethylene trong thực vật [12].

Sự tích lũy khí ethylene trong túi hay bình nuôi cấy kín khí gây ra những bất lợi, làm chậm sinh trưởng của cây, ảnh hưởng đến sự phát sinh hình thái, sinh trưởng và chất lượng cây giống. Điều này cho thấy sự quan trọng của việc kiểm soát nồng độ khí ethylene để cải thiện hiệu quả của quá trình nuôi cấy *in vitro* [20].

Sự sản sinh của ethylene có vai trò đáng kể đối với sự biệt hóa, sinh trưởng và khả năng đáp ứng với stress sinh học hay phi sinh học của cây trồng nuôi cấy *in vitro* trong suốt chu kỳ sống của chúng. Các mẫu cấy *in vitro* thường sản sinh ra khí ethylene do bị tổn thương trong quá trình cấy chuyền và do nhiều điều kiện stress khác nhau trong quá trình nuôi cấy. Lượng ethylene sản sinh ra phụ thuộc vào giai đoạn tăng trưởng, mẫu cấy và nồng độ CĐHSTTV [21].

1.2.3. Vàng lá, rụng lá và enzyme thủy phân cellulase, pectinase

Vàng và rụng lá

Cây trồng *in vitro* chịu ảnh hưởng của stress sinh học và phi sinh học và có tác động tiêu cực đến sự sinh trưởng, chất lượng cây giống và khả năng thích nghi, sống sót khi chuyển ra vườn ươm. Bên cạnh thủy tinh thể, mẫu cấy còn phải đối mặt với tình trạng vàng và rụng lá. Sự rụng cơ quan được dùng để mô tả sự tách rời của các bộ phận thực vật như lá, hoa, quả, hoặc hạt khỏi cây [22].

Trong quá trình vi nhân giống, hiện tượng rụng lá thường do tác động của hormone như ethylene hoặc auxin. Đặc biệt, trong điều kiện nuôi cấy kín với độ ẩm cao, ethylene có xu hướng tích tụ, trở thành yếu tố chính thúc đẩy hiện tượng rụng lá [23]. Tuy nhiên, các nghiên cứu cho thấy auxin có thể ức chế sự rụng lá. Sự rụng lá bị ức chế bởi dòng auxin, khiến ethylene không thể gây ra tác động ở giai đoạn đầu.

Các tế bào ở vùng rụng sẽ nhạy cảm hơn và ethylene được sản sinh ra nhiều hơn, vai trò ức chế của auxin giảm đi do auxin từ lá suy giảm và sự vận chuyển theo cực bị phá bỏ. Điều này lý giải tại sao lá non thường sản sinh ra nhiều ethylene, nhưng sự rụng lá ghi nhận chủ yếu ở lá già do ethylene rút ngắn giai đoạn đầu và hạn chế quá trình chuyển hóa auxin [24].

Trước khi xảy ra sự phân tách, nồng độ ethylene trong vùng rụng thường tăng lên, kích thích biểu hiện gen mã hóa các enzyme thủy phân (pectinase và cellulase) thành tế bào [25]. Sự tác động này sẽ làm sự hóa gỗ kém và kích thích sự hình thành các enzyme phân phá hủy thành tế bào và tầng rời xuất hiện nhanh hơn. Tầng rời này gồm các tế bào nhu mô đặc biệt với cấu trúc yếu hơn, dễ dẫn đến sự phân tách cơ quan khi gặp điều kiện thuận lợi.

Cellulase và pectinase

Cellulose, một polysaccharide tự nhiên dồi dào, góp phần tạo độ cứng cho vách tế bào. Các enzyme cellulase (exoglucanase, endoglucanase, và β-glucosidase) thủy phân cellulose thành glucose và các sản phẩm khác, phá vỡ liên kết β-1,4-d-glycosid, làm giảm độ cứng của vách tế bào và gây ra hiện tượng rụng cơ quan, đặc biệt là lá trong quá trình vi nhân giống [26].

Pectin có vai trò quan trọng giúp gắn kết giữa các tế bào thực vật. Pectin rất phong phú trong vách tế bào sơ cấp và màng trung gian của thực vật. Nhóm enzyme pectinase (bao gồm pectin methylesterase, polygalacturonase, pectinlyase, và pectatelyase) có khả năng phân hủy pectin, làm giảm độ liên kết và sức mạnh của vách tế bào, dẫn đến sự chết tế bào và hiện tượng rụng cơ quan [27].

Để khắc phục hiện tượng rụng cơ quan, các chất như aminoethoxyvinylglycine (AVG) – chất ức chế sinh tổng hợp ethylene, và 1-methyl-cyclopropene (1-MCP) – chất làm chậm quá trình rụng đã được sử dụng. Tuy nhiên, AVG có thể gây độc cho mẫu cấy, trong khi 1-MCP chủ yếu sử dụng trong công nghệ sau thu hoạch [26; 27].

1.2.4. Hóa nâu mẫu cấy

Hiện tượng hóa nâu thường gặp ở một số loài thực vật vi nhân giống, khi cả mẫu cấy và MT nuôi cấy chuyển sang màu nâu sẫm hoặc đen, dẫn đến hoại tử và thậm chí gây chết mẫu cấy. Nguyên nhân là do sự phenol hóa trong quá trình nuôi

cấy, tạo ra các hợp chất gây độc cho thực vật. Mức độ hóa nâu mẫu cấy phụ thuộc vào loài thực vật, kiểu gen, tuổi mô cấy và thành phần MT nuôi cấy.

Các biện pháp như cấy chuyền thường xuyên, nuôi cấy trong tối, bổ sung chất kháng oxy hóa (acid ascorbic, cystein-HCl, polyvinylpyrolidone, than hoạt tính) được sử dụng để hạn chế hiện tượng này [20].

1.2.5. Stress oxy hóa và hệ thống kháng oxy hóa của thực vật

Trong quá trình nuôi cấy *in vitro*, cây con phải đối mặt với stress oxy hóa do các điều kiện bất lợi như hàm lượng dinh dưỡng, độ ẩm, ethylene, cường độ ánh sáng, và nhiệt độ trong bình kín. Những yếu tố này làm tăng hàm lượng gốc oxy phản ứng (ROS) bao gồm hydrogen peroxide (H_2O_2), gốc tự do superoxide (O^{2-}) và hydroxyl (OH^-). ROS điều hòa các quá trình tế bào ở nồng độ thấp và ngược lại chúng có thể gây đột biến DNA, gây biến tính các protein, oxy hóa lipid, làm giảm quang hợp và gây chết tế bào ở nồng độ cao [6; 28].

Thực vật có cơ chế chống lại stress oxy hóa thông qua các enzyme kháng oxy hóa như ascorbate peroxidase (APX), catalase (CAT), và superoxide dismutase (SOD), giúp bảo vệ tế bào khỏi tác động tiêu cực của ROS. Nhờ hoạt động của các enzyme này, cây có thể duy trì sự cân bằng ROS, tăng khả năng chịu đựng và sống sót dưới các điều kiện stress [29].

Để khắc phục những hạn chế này, việc tối ưu hóa MT nuôi cấy *in vitro* và nâng cao chất lượng cây giống là mục tiêu quan trọng của vi nhân giống các cây trồng thương mại.

1.3. NANO KIM LOẠI

1.3.1. Giới thiệu

Vật liệu nano, với kích thước cực nhỏ trong khoảng từ 1 đến 100 nm, đã được phát hiện và công nhận từ những năm 50 của thế kỷ XIX. Ngày nay, vật liệu nano nổi lên như một loại vật liệu tiên tiến, là giải pháp thay thế hiệu quả cho các vật liệu truyền thống, tạo nên một lĩnh vực công nghệ riêng biệt – Công nghệ nano. Nano với kích thước siêu nhỏ, sở hữu những đặc tính vượt trội, chẳng hạn như diện tích bề mặt lớn hơn, khả năng tương tác bề mặt tốt, và hiệu ứng plasmon cộng hưởng. Điều này

đã giúp chúng được nghiên cứu và ứng dụng trong sinh học, nông nghiệp, y học, MT, năng lượng và cả khoa học cây trồng, mang đến nhiều hiệu quả và ứng dụng đột phá [30; 31].

Trong lĩnh vực khoa học cây trồng, nano đang dần phổ biến và ứng dụng rộng rãi để thúc đẩy quá trình sinh trưởng, tăng năng suất, tăng khả năng chống chịu stress và bệnh tật của cây trồng. Bằng cách cung cấp dinh dưỡng dưới dạng vật liệu nano, thông qua việc bón phân hay phun trực tiếp lên lá, cây có thể sử dụng và chuyển hóa dinh dưỡng một cách hiệu quả, giúp tăng chất lượng và năng suất cây trồng nhằm đáp ứng nhu cầu lương thực [32].

Các kim loại vi lượng như sắt (Fe), đồng (Cu), cobalt (Co), mangan (Mn), kẽm (Zn), và molypden (Mo) có vai trò quan trọng trong sự sinh trưởng của cây, việc sử dụng chúng dưới dạng NPs đang được sự quan tâm nhờ khả năng nâng cao hiệu quả hấp thu và khắc phục các bệnh lý bất thường ở cây trồng cả trên đồng ruộng và trong điều kiện nuôi cấy *in vitro* [33]. Các NPs mang lại lợi thế vượt trội so với dạng ion kim loại thông thường nhờ hai đặc điểm chính:

- **Hiệu quả bề mặt**: Ở kích thước nano, bề mặt tiếp xúc được gia tăng, giúp NPs tương tác hiệu quả hơn so với vật liệu thông thường cùng khối lượng.
- **Kích thước nhỏ**: NPs có kích thước cực kỳ nhỏ, mang tính chất đặc biệt về điện, từ, và quang, vượt ra khỏi giới hạn của các vật liệu vĩ mô truyền thống. Điều này giúp chúng cải thiện khả năng hấp thu và vận chuyển trong thực vật, mở ra những tiềm năng mới trong ứng dụng [34].

1.3.2. Các phương pháp tổng hợp hạt nano

Hạt nano kim loại có thể được tổng hợp bằng nhiều phương pháp [35, 36], thường chia thành hai nhóm chính:

- **Phương pháp từ dưới lên (Bottom-up)**: Khởi đầu từ các nguyên tử hoặc phân tử nhỏ, chúng được tập hợp để tạo thành hạt nano.
- **Phương pháp từ trên xuống (Top-down)**: Vật liệu kích thước lớn được sử dụng, sau đó được xử lý và làm nhỏ đến kích thước nano.

Các phương pháp tổng hợp bao gồm tổng hợp hóa học, vật lý, sinh học, và quang hóa, mỗi phương pháp có ưu điểm riêng nhưng cần đảm bảo hiệu quả về kích thước, hình dạng, và tính tiện dụng.

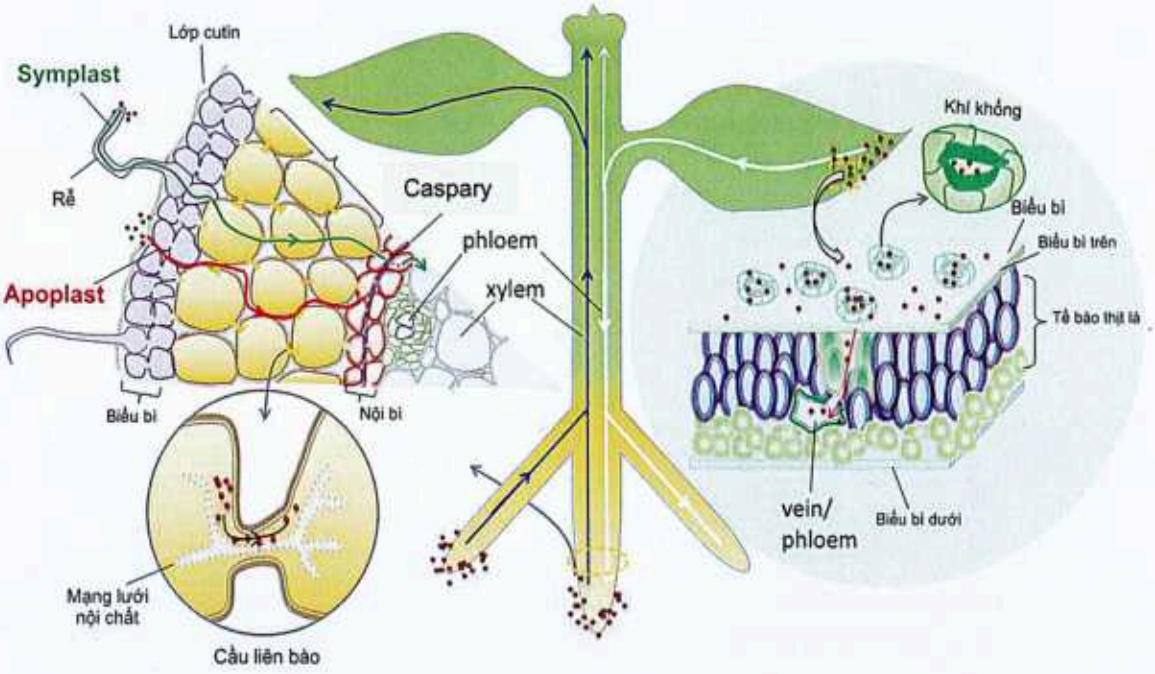
- **Tổng hợp vật lý**: Phương pháp này thường sử dụng quá trình bay hơi - ngưng tụ để tạo ra các hạt nano kim loại. Dù hiệu quả, nhưng nó đòi hỏi nhiều năng lượng và không gian. Tuy nhiên, nhiều phương pháp đang được phát triển để nâng cao hiệu suất và giảm chi phí sản xuất.
- **Tổng hợp hóa học**: Hạt nano được hình thành dưới những điều kiện đặc biệt, với sự tham gia của các chất kiểm soát bề mặt (SCAs) nhằm điều chỉnh kích thước và mật độ.
- **Tổng hợp sinh học**: Thay vì dùng hóa chất, các vi khuẩn, nấm, tảo, hoặc thực vật được sử dụng để sản xuất NPs. Phương pháp này thân thiện với MT và an toàn [35; 36].

Việc tổng hợp nano bằng thực vật đã trở thành một hướng đi mới với khả năng tự nhiên để tạo ra NPs như vàng, bạc, kẽm, titan, và sắt – những NPs được ứng dụng trong y học và các ngành công nghiệp khác.

1.3.3. Nano kim loại trong thực vật

NPs có thể được cây trồng hấp thu qua rễ hoặc lá. Khi hấp thu qua rễ, các hạt nano xâm nhập vào biểu mô, di chuyển vào mạch gỗ (xylem) và sau đó đến các cơ quan khác của cây thông qua con đường gian bào (apoplast) hoặc con đường tế bào chất (symplast). Khi hấp thu qua lá, các hạt nano thâm nhập qua khí khổng, đi vào hệ thống mạch lá và được vận chuyển qua mạch rây (phloem). Khả năng hấp thu và vận chuyển này phụ thuộc vào cấu trúc, hình dáng, và đặc tính của NPs, cũng như đặc điểm của loài thực vật [37].

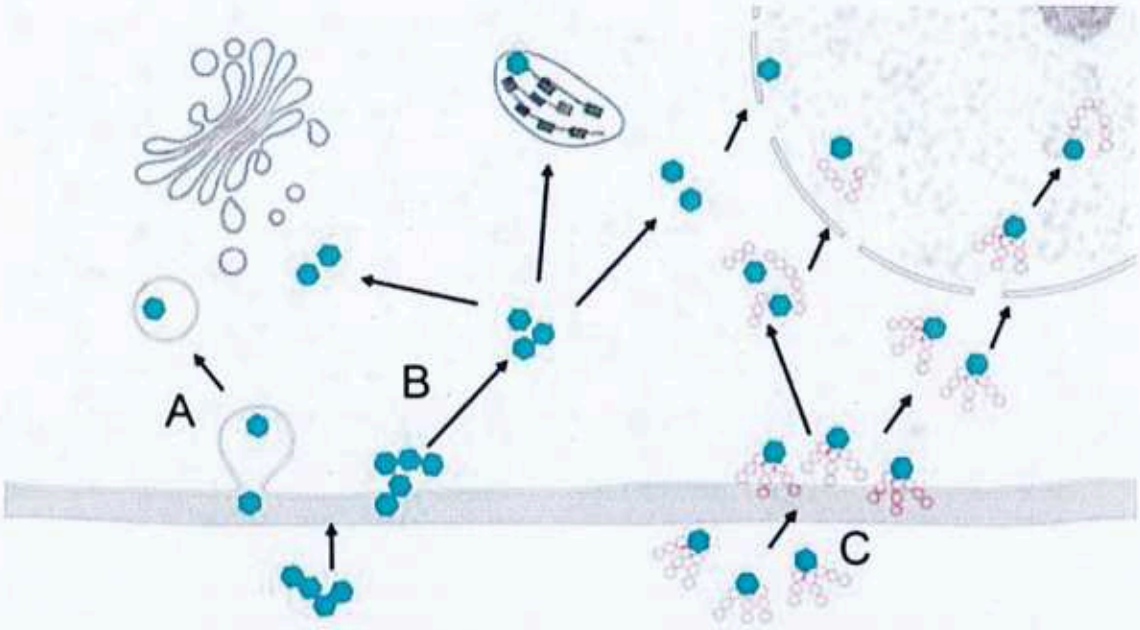
Nhờ những đặc tính độc đáo của mình, nano kim loại mở ra hướng đi mới nhằm ứng dụng vào nông nghiệp, giúp cây trồng cải thiện hấp thu dinh dưỡng và cải thiện khả năng chống chịu stress, tăng chất lượng và năng suất cây trồng, đáp ứng nhu cầu về lương thực và thực phẩm.



Hình 1.2. Con đường vận chuyển nano kim loại trong thực vật [39].

Hiện nay, các nghiên cứu đều chỉ ra rằng NPs có khả năng di chuyển bên trong thực vật, xuyên qua các mô và tiến đến hệ thống mạch gỗ (xylem). Khi nói về sự vận chuyển của hạt nano qua rễ, một điểm cần đặc biệt chú ý là sự ngăn cản của dải Caspary ở nội bì của rễ cây, làm hạn chế con đường vận chuyển qua không gian gian bào (apoplast). Dù cơ chế chính xác mà NPs vượt qua dải Caspary vẫn chưa được hiểu rõ, nhưng một khi đã vào hệ thống mạch, chúng sẽ di chuyển đến các mô hay cơ quan bên trên theo dòng chảy của nước và chất dinh dưỡng trong cây [37].

Hạt nano khi tiếp xúc với màng tế bào có thể được hấp thu qua quá trình nhập bào và sau đó tồn tại bên trong các túi nhỏ trong tế bào. Tuy nhiên, phần lớn các hạt nano có khả năng xâm nhập trực tiếp qua màng tế bào và sau đó tồn tại trong tế bào chất hoặc được chuyển đến các bào quan khác như lạp thể hoặc nhân tế bào (Hình 1.3) [37].



Hình 1.3. Sự tích lũy nano kim loại trong tế bào [37].

Các hạt nano tiếp xúc với màng tế bào có thể được hấp thu thông qua quá trình nhập bào và tồn tại ở trong các túi bên trong các tế bào (Hình 1.3A). Tuy nhiên, hầu hết các hạt nano xuyên qua màng tế bào một cách trực tiếp (Hình 1.3B), sau đó, các hạt này tồn tại trong tế bào chất hoặc chuyển sang các bào quan khác (lạp thể hoặc nhân) (Hình 1.3C) [37].

NPs mang lại hiệu quả động lực học và khả năng tương tác vượt trội so với các dạng kim loại nhờ vào những đặc tính lý hóa độc đáo của chúng. Khi tồn tại trong các hệ thống sinh học hoặc MT, hạt nano sẽ tương tác với các thành phần khác và trải qua những biến đổi về tính chất lý hóa, chẳng hạn như bị bao bọc bởi các phân tử hữu cơ tự nhiên hoặc sinh học, phân rã, hay trải qua quá trình phản ứng oxy hóa khử [38].

NPs còn chịu tác động từ sự tương tác vật lý với các ion vô cơ, phân tử sinh học và chất hữu cơ, dẫn đến sự thay đổi về trạng thái kết đám và tính chất hóa học bề mặt. Rễ cây thường tiết ra một lượng lớn các hợp chất, bao gồm ion vô cơ, phân tử hữu cơ nhỏ (như phenol, aldehyde, amino acid, và acid hữu cơ), và các pectin cao phân tử (như polysaccharide và acid béo), tạo ra một MT xung quanh gọi là "vùng bầu rễ". Vùng này có vai trò đáng kể trong sự điều chỉnh tác động và độc tính của kim loại, giúp tạo thành dạng phức chất hữu cơ bao bọc và giữ chặt ion kim loại (chelate) khi nồng độ kim loại vượt quá giới hạn hấp thu ở rễ [39]. Do đó, hạt nano kim loại thường chịu tác động khi tiếp xúc với chất tiết từ rễ, đặc biệt khi chúng tương tác trực tiếp

với rễ cây. Sự chuyển hóa này có thể ảnh hưởng đến vai trò và chức năng của hạt nano trong cơ thể thực vật [40].

Quá trình hấp thu hạt nano trong cây được đặc trưng bởi ba yếu tố chính: (1) **Tính chọn lọc** – một số khoáng chất được ưu tiên hấp thu, trong khi các chất khác bị hạn chế hoặc loại trừ; (2) **Sự tích tụ** – nồng độ các nguyên tố trong tế bào có thể cao hơn nhiều so với MT bên ngoài; và (3) **Tính chất kiểu gen** – sự khác biệt rõ rệt giữa các loài thực vật về khả năng hấp thu hạt nano [37].

1.3.4. An toàn của các hạt nano kim loại

Hiện nay, ảnh hưởng tích cực của NPs lên con người, động vật hay MT đang là mối quan tâm lớn do chúng có kích thước rất bé cho phép chúng dễ dàng xâm nhập hay thậm chí là tương tác với các tế bào bên trong cơ thể. Điều này dẫn đến việc nghiên cứu các cơ chế tác động, sự tích lũy và tính an toàn của NPs trở thành một lĩnh vực ngày càng được chú ý.

Đến thời điểm hiện tại, NPs đã được ứng dụng rộng rãi trong y học và đời sống hàng ngày nhờ khả năng kháng khuẩn, diệt khuẩn, và điều trị bệnh của chúng. Cơ quan Bảo vệ Môi trường Hoa Kỳ (EPA), lượng AgNPs (hạt nano bạc) được sử dụng hiệu quả cho mục đích phòng bệnh là từ 100 đến 200 μg mỗi ngày cho một người, và không nên vượt quá 350 μg mỗi ngày. Đặc biệt, sử dụng AgNPs bổ sung vào trong bữa ăn hoặc nước uống đã được chứng minh là không gây ra hiện tượng Argyria – tình trạng da xanh xao do ngộ độc bạc [41].

Ngoài ra, các loại hạt nano khác như CoNPs và FeNPs cũng được cho là có tiềm năng trong các lĩnh vực khác nhau và chúng thân thiện với môi trường, ít gây độc cho sinh vật. Chính vì vậy, NPs ngày càng được ứng dụng rộng rãi trong khoa học sự sống và góp phần giảm dịch bệnh, dư lượng thuốc bảo vệ thực vật hóa học, đồng thời nâng cao chất lượng sản phẩm [42].

Mặc dù NPs có tiềm năng ứng dụng rất lớn, nhưng việc kiểm soát và đánh giá cẩn trọng tác động của chúng đối với các tác nhân khác nhau và MT xung quanh là điều cần thiết nhằm đảm bảo sự an toàn và hiệu quả khi sử dụng NPs trong các lĩnh vực khác nhau.

1.4. NANO KIM LOẠI TRONG VI NHÂN GIỐNG THỰC VẬT

1.4.1. Khử trùng mẫu cấy

Sự có mặt của vi sinh vật là một thách thức nghiêm trọng trong quá trình nuôi cấy mô, có thể gây thất bại hoàn toàn cho hệ thống nuôi cấy ngay từ giai đoạn khởi đầu. Các nguồn mẫu cấy và MT thí nghiệm chưa được vô trùng thường là nguyên nhân gây ô nhiễm. Vì vậy, việc khử trùng bề mặt mẫu cấy là một bước vô cùng quan trọng trong quy trình nuôi cấy *in vitro*, bởi nấm và vi khuẩn có khả năng sinh trưởng nhanh trong MT nuôi cấy.

Hiện nay, một số chất như bromine lỏng, calcium hypochlorite, ethanol, hydrogen peroxide, sodium hypochlorite, thủy ngân chloride, bạc nitrate, kháng sinh và thuốc nấm đang được sử dụng phổ biến để khử trùng mẫu cấy. Tuy nhiên, độc tính của một số chất kháng sinh đối với tế bào, mô, và cơ quan nuôi cấy đã được báo cáo ở một số loại cây trồng [43]. Thêm vào đó, một số chất khử trùng không chỉ không loại bỏ hoàn toàn tạp chất mà còn gây ảnh hưởng đến sự phát sinh cơ quan do tính độc của chúng.

Trong bối cảnh này, NPs như AgNPs, nhôm oxide, đồng oxide, sắt oxide, vàng, magiê oxide, nickel, silicon, silicon dioxide, titanium dioxide, và kẽm oxide đã được chứng minh là có tiềm năng trong việc hạn chế nhiều loại vi sinh vật [44; 45]. Đây là một hướng đi mới hứa hẹn trong việc sử dụng NPs để khử trùng mẫu cấy mà ít gây hại đến sự sinh trưởng bình thường của cây trồng.

1.4.2. Phát sinh hình thái *in vitro*

NPs được bổ sung vào MT nuôi cấy có tác động tích cực đến sự sinh trưởng của mô sẹo, chồi, phôi và tạo rễ. Tuy nhiên, tác dụng kích thích hay ức chế của các nồng độ NPs trên từng mẫu nuôi cấy cần phải được nghiên cứu cụ thể và kỹ lưỡng. Các nghiên cứu gần đây về ảnh hưởng của NPs đối với sự phát sinh hình thái của cây trồng đã được thể hiện trong Bảng 1.2 cung cấp thêm về tiềm năng và hiệu quả của việc sử dụng nano kim loại trong quá trình nuôi cấy mô thực vật.

Bảng 1.2. Các kiểu phát sinh hình thái trên môi trường có bổ sung NPs

TT	Đối tượng	Kiểu phát sinh hình thái	Môi trường, loại và nồng độ nano	Nguồn tham khảo
1	*Tecomella undulata*	Chồi và mô sẹo	MS + 2,5 mg/L BAP + 0,1 mg/L IAA + 10 mg/L AgNPs	[46]
2	*Brassica juncea*	Chồi	MS + 50 mg/L AgNPs	[47]
3	*Arabidopsis thaliana*	Nảy mầm của hạt, sinh trưởng cây con	MS + FeNPs	[48]
4	*Verbena bipinnatifida*	Chồi, rễ	MS + 5 µg/L CuNPs	[49]
5	*Menta longifolia*	Chồi, rễ	MS + 0,5 mg/L CuNPs + 0,8 mg/L CoNPs	[50]
6	*Stevia rebaudiana*	Rễ	MS + 1 mg/L ZnNPs	[51]
7	*Solanum nigrum*	Mô sẹo	MS + 5 mg/L BA + 3 mg/L NAA + 8 mg/L AgNPs	[52]
8	*Arabidopsis thaliana*	Tăng sinh khối cây con	½ MS + 250 mg/L Cerium oxide + 50 - 500 mg/L Indium oxide	[53]
9	*Musa* sp.	Phôi sinh dưỡng	MS + 100 mg/L ZnNPs	[54]

1.4.3. Biến dị dòng soma

Biến dị dòng soma có thể mang lại những đột biến có lợi, có hại hoặc trung tính trong nuôi cấy *in vitro*. Hiện tượng này thường liên quan đến các thay đổi về nhiễm sắc thể (số lượng, cấu trúc), trình tự DNA, methyl hóa DNA, quá trình trao đổi chéo,

nguyên phân, và sự kích hoạt các yếu tố chuyển vị [57]. Một số biến dị này lại sở hữu các đặc điểm có lợi như thay đổi kích thước cây, màu sắc hoa, tạo khảm lá, thời điểm chín quả, sự tổng hợp các hoạt chất thứ cấp và chống chịu với stress sinh học hoặc phi sinh học [55].

Ngoài ra, độc tính của NPs có thể xuất hiện khi chúng được sử dụng ở nồng độ cao. Việc sử dụng NPs có thể ảnh hưởng đến chỉ số phân bào, tính toàn vẹn của DNA, sự biến đổi protein, và biểu hiện của DNA trong thực vật [35]. Chẳng hạn, cấu trúc nhiễm sắc thể trong mô sẹo của cây *Linum usitatissimum* đã bị ảnh hưởng đáng kể khi được nuôi cấy trên MT MS chứa hạt nano carbon [55]. Việc bổ sung nano carbon không chỉ làm gia tăng số lượng tế bào đa bội mà còn làm tăng mức độ methyl hóa DNA trong các mô sẹo nuôi cấy trên MT này. Biến dị soma xuất hiện với tần suất cao ở mô sẹo hoặc chồi thu nhận ở MT nuôi cấy có chứa nano vàng (AuNPs) hoặc AgNPs. Sự bổ sung AuNPs vào MT nuôi cấy *in vitro* cũng gây ra các biến dị về hình thái bên ngoài và giải phẫu của mô sẹo, thông qua việc thay đổi các protein và đặc tính DNA trong mô sẹo của cây *Solanum nigrum* [52].

1.4.4. Chuyển hóa hoạt chất thứ cấp

Hoạt chất thứ cấp có thể thu nhận từ thực vật và giúp chúng tồn tại và thích nghi với MT xung quanh. Kỹ thuật nuôi cấy tế bào, mô và cơ quan thực vật đã được chứng minh là có lợi thế cho việc thu nhận các hoạt chất có hoạt tính sinh học. Hàm lượng của các chất này trong tế bào và cơ quan nuôi cấy có thể được cải thiện nhờ việc điều chỉnh điều kiện nuôi cấy, bổ sung tiền chất, các chất kích thích (elicitor), và điều chỉnh MT nuôi cấy [56].

Việc bổ sung NPs vào MT nuôi cấy đóng vai trò như nguồn dinh dưỡng và là chất kích thích sinh tổng hợp. Ví dụ, bổ sung nano nhôm oxide (10 - 100 µg/L) trong nuôi cấy huyền phù tế bào thuốc lá đã giúp tăng hàm lượng phenolic [57]. Hàm lượng tinh dầu ghi nhận trong mô sẹo của cây cúc *Calendula officinalis* nuôi cấy trên MT MS chứa 0,3 mg/L AgNPs cũng gia tăng [58]. Kết hợp của AuNPs và AgNPs (tỷ lệ 1:3) đã gia tăng sự tích lũy các hợp chất phenol và flavonoid của mô sẹo cây *Prunella vulgaris* [59]. Ngoài ra, hình dạng của AgNPs ảnh hưởng đến việc sản xuất anthocyanin ở cây *Arabidopsis* [60] và tích lũy saponin ở cây sâm Ngọc Linh chuyển gen [61].

1.4.5. Một số nghiên cứu về nano kim loại tại Việt Nam

Trong những năm gần đây, nhóm nghiên cứu của GS.TS. Dương Tấn Nhựt tại Viện Khoa học sự sống đã tiên phong đánh giá việc sử dụng AgNPs trong MT nuôi cấy *in vitro* trên các loại cây như hoa cúc, dâu tây, đồng tiền, hoa hồng, và hồng môn [62; 63]. Các nghiên cứu đã đánh giá tác động của AgNPs trong việc hạn chế các hiện tượng thủy bất thường và tăng tỷ lệ sống của cây đồng tiền trong quá trình nuôi cấy *in vitro* [63]. Đáng chú ý, tác dụng của AgNPs và CoNPs trong việc làm giảm hiện tượng vàng lá và rụng lá cây hoa hồng cũng đã được nghiên cứu [14].

Nghiên cứu đánh giá tác động của FeNPs lên sự ra rễ *in vitro* của cây cẩm chướng cũng đã được thực hiện [64]. Ngoài ra, sự kết hợp giữa AgNPs, ánh sáng đèn LED và hệ thống vi thủy canh trên cây cúc đã giúp hạn chế các loài vi sinh vật gây hại và cải thiện chất lượng cây trồng [65]. AgNPs bổ sung vào MT nuôi cấy cũng đã cải thiện sinh trưởng của cây dâu tây *in vitro*, giảm thiểu sự hình thành ethylene trong quá trình nuôi cấy, giảm tỷ lệ nhiễm vi sinh vật và tăng số lượng ngó của cây dâu tây [66].

1.5. NANO KIM LOẠI SẮT, COBALT VÀ MOLYPDEN TRONG VI NHÂN GIỐNG

Trong quá trình vi nhân giống thực vật, MT nuôi cấy với các khoáng chất vi lượng và đa lượng có vai trò quan trọng và ảnh hưởng trực tiếp đến sinh trưởng và các hoạt động sinh lý - sinh hóa của cây trồng. Thiếu hụt các khoáng chất này có thể khiến cây không hoàn thành chu trình sống. Thông thường, các dưỡng chất khoáng này tồn tại dưới dạng muối (KCl, NaCl, $CaCl_2$), dạng axit (HCl, H_3PO_4), hay dạng kiềm (NH_3, NH_2OH). Ngoài ra, chúng tồn tại dưới dạng ion tự do (HCO_3^-, NO_3^-, Cl^-, H^+), hoặc ion kim loại (Ca^{2+}, K^+, Fe^{2+}, Co^{2+}) trong tế bào.

Những nguyên tố khoáng này không chỉ điều tiết các hoạt động sinh lý của cây trồng mà còn là thành phần quan trọng trong cấu trúc của enzyme và chất hữu cơ của tế bào. Các kim loại như Fe, Co, và Mo đã được chứng minh có ảnh hưởng tích cực đến sinh trưởng của cây trồng. Trong đó, một số kim loại được coi là thiết yếu cho cây trồng và xuất hiện ở hầu hết các mô, cơ quan thực vật [67]. Mặc dù khoáng chất là nguồn dinh dưỡng quan trọng, chúng thường tồn tại ở dạng phức hợp, khiến việc

hấp thụ trở nên khó khăn. Cùng với công nghệ nano, nhiều khoáng chất đã được tổng hợp dưới dạng nano với kích thước nhỏ; do đó, chúng tăng khả năng hấp thu so với muối vô cơ, mở ra khả năng ứng dụng to lớn cho thực vật nuôi cấy *in vitro*.

1.5.1. Nano sắt trong nuôi cấy *in vitro*

Sắt (một kim loại chuyển tiếp) có vai trò quan trọng trong các sinh vật sống và tham gia chính quá trình oxi hóa khử. Trong cây trồng, sắt chủ yếu tồn tại dưới dạng phức hợp, và lượng Fe^{2+} và Fe^{3+} tự do rất thấp (chỉ khoảng 10 - 100 mM). Thực vật thường ưu tiên hấp thụ Fe^{2+}; vì vậy, Fe^{3+} được khử thành Fe^{2+} ở bề mặt rễ trước khi đi vào tế bào chất. Fe vận chuyển qua hệ mạch xylem và di chuyển dưới dạng phức hợp sắt-carbohydrate hoặc sắt-peptide. Vai trò của Fe trong thực vật là tạo ra các liên kết Fe. Khoảng 80% Fe được tìm thấy trong lá xanh và nằm trong lục lạp; thiếu Fe làm giảm quá trình quang hợp, khiến cây ngừng phát triển, và lá non trở nên vàng [48].

Ngoài ra, Kim và cộng sự (2014) chỉ ra rằng Fe có vai trò trong việc kéo dài vách tế bào, kích thích sự hình thành của rễ và chuỗi truyền điện tử. Fe được gắn vào thiol (-SH) của cystein và lưu huỳnh vô cơ sẽ trở thành chất mang trong phản ứng chuỗi truyền điện tử, góp phần tổng hợp $NADP^+$ trong quá trình quang hợp [48].

FeNPs là NPs với cấu trúc lõi - vỏ, với lõi là các nguyên tử sắt (Fe^0) và vỏ có thể là hợp chất sắt oxit/hydroxit hoặc các chất phủ phổ biến như CMC [68]. Với kích thước siêu mịn (1 - 100 nm), FeNPs có khả năng vượt trội hơn so với sắt thông thường về mặt hấp thu qua bề mặt, hoạt tính xúc tác, cũng như khả năng vận chuyển và lưu trữ trong không gian giới hạn [30].

Tổng hợp FeNPs có thể thực hiện bằng nhiều phương pháp nhưng chủ yếu là các phương pháp nghiền, khử nhiệt carbon, khử hóa học, siêu âm, điện hóa, và sinh học. Trong số đó, phương pháp khử hóa học là cách đơn giản nhất để chế tạo FeNPs và mang lại sản phẩm có cấu trúc đồng nhất [69]. Điểm khác biệt nổi bật giữa hạt nano sắt và sắt thông thường nằm ở kích thước siêu nhỏ của nó (1 - 100 nm), giúp FeNPs có khả năng hấp thu qua bề mặt và hoạt tính xúc tác mạnh mẽ hơn hạt sắt thông thường, làm tăng hiệu quả của nuôi cấy *in vitro* [70].

Ứng dụng của FeNPs trong vi nhân giống

Trong quá trình vi nhân giống thực vật, Fe là một nguyên tố vi lượng cần thiết và thường được bổ sung dưới dạng muối $FeSO_4.7H_2O$ với các nồng độ khác nhau, chẳng hạn như 27,8 mg/L trong công thức MS và B5, hoặc 15 mg/L trong công thức SH. Việc thay thế $FeSO_4.7H_2O$ bằng hạt nano sắt (FeNPs) trong MT nuôi cấy giúp cây hấp thụ sắt một cách hiệu quả hơn và linh hoạt hơn, phụ thuộc giai đoạn sinh trưởng của cây cũng như từng loài cây trồng khác nhau [71].

Các nghiên cứu cho rằng sử dụng FeNPs ở nồng độ thấp mang lại tác động tích cực cho cây trồng. FeNPs không chỉ thúc đẩy quá trình hình thành mô, tăng cường phát triển và kéo dài rễ mà còn giúp cây trồng gia tăng chống chịu các điều kiện stress sinh học hoặc phi sinh học [72]. Một ví dụ cụ thể là nghiên cứu trên cây chanh Volkamer, bổ sung FeNPs vào MT MS, cây hấp thu Fe hiệu quả hơn, giảm hiện tượng lá vàng và tăng đáng kể các chỉ số sinh dưỡng như sinh khối và chỉ số chlorophyll so với cây ở đối chứng [70]. Dù vậy, vẫn cần thêm nghiên cứu để hiểu rõ hơn về hiệu quả của FeNPs sử dụng trong nuôi cấy *in vitro*.

Dương Tấn Nhựt và cộng sự (2015) cho rằng nghiệm thức bổ sung 15 - 35 mg/L FeNPs giúp tăng gấp 2 đến 2,7 lần hiệu quả nhân chồi ở cây hoa cúc nuôi cấy *in vitro*. Điều này là do FeNPs gia tăng hấp thu và kích thích quá trình sinh hóa cần thiết cho sự phát triển của cây. Tuy nhiên, ở nồng độ thấp hơn (0 - 15 mg/L), FeNPs lại không mang lại hiệu quả thúc đẩy sinh trưởng, có thể do không đủ dinh dưỡng cần thiết cho sự sinh trưởng của chồi và cây hoa cúc [73].

Tương tự, Đỗ Thị Hiền và cộng sự (2017) khi nghiên cứu trên cây hoa Salem (*Limonium sinuatum* (L.) Mill) đã cho thấy rằng việc nghiệm thức 50 µM FeNPs gia tăng hiệu quả nhân chồi lên mức cao nhất trong các nồng độ được thử nghiệm. Ở giai đoạn ra rễ, FeNPs không chỉ cải thiện chiều dài rễ và chiều cao cây mà còn tăng khối lượng tươi - khô và chlorophyll. Quan trọng hơn, FeNPs còn giúp tăng tỷ lệ sống sót khi cây chuyển từ giai đoạn nuôi cấy sang thuần dưỡng trong vườn ươm, khẳng định tiềm năng ứng dụng thực tiễn của FeNPs trong vi nhân giống thực vật [74].

Ngoài ra, sử dụng FeNPs ở nồng độ cao có tác động tiêu cực lên sự sinh trưởng của cây trồng, chẳng hạn như giảm tỷ lệ nảy mầm, giảm hàm lượng chlorophyll, và

làm chậm quá trình sinh trưởng ở một số cây trồng. Nguyên nhân có thể là do sự tích tụ FeNPs ở bề mặt của rễ làm cản trở hấp thu nước và khoáng. Dù vậy, hiểu biết về độc tính của FeNPs đối với sự phát triển thực vật vẫn còn hạn chế và cần nghiên cứu sâu hơn [72].

Bảng 1.3. Tổng hợp một số nghiên cứu về vai trò của FeNPs trong vi nhân giống những năm gần đây

Tác giả, năm	**Cây trồng**	**Nội dung nghiên cứu**	**Kết quả chính**	**Tài liệu tham khảo**
Ranjan *et al.* (2021)	Chuối (*Musa spp.*)	Nano sắt bổ sung trong MT nhân chồi	Tăng số chồi/cụm và tốc độ sinh trưởng chồi	[75]
Al-Mayahi (2021)	Chà là (*Phoenix dactylifera*)	So sánh nano Fe và Fe-EDTA trong nuôi cấy mô	Nano Fe tăng sinh khối callus và tỷ lệ tái sinh chồi	[76]
Ghosh *et al.* (2021)	Dâu tây (*Fragaria × ananassa*)	Fe_3O_4 nanoparticles trong cảm ứng callus	Tăng sinh trưởng callus và phát sinh chồi	[77]
Rahman *et al.* (2022)	Khoai tây (*Solanum tuberosum*)	Nano Fe trong MT MS	Tăng số rễ và chiều dài chồi so với MT chuẩn	[78]
Singh *et al.* (2022)	Nghệ (*Curcuma longa*)	Fe_3O_4 nanoparticles trong nuôi cấy callus	10–15 mg/L FeNPs tăng tỷ lệ cảm ứng callus đến 80%	[79]
Hameed *et al.* (2022)	Lúa (*Oryza sativa*)	Nano sắt trong nuôi cấy callus	Tăng sinh trưởng callus và tăng hàm lượng chlorophyll	[80]
Sharma *et al.* (2023)	Nghệ (*Curcuma longa*)	FeNPs kết hợp chất điều hòa sinh trưởng	Tăng chiều dài chồi, số rễ và sinh khối mô	[81]
Ullah *et al.* (2024)	Lúa (*Oryza sativa*)	Nano Fe ảnh hưởng đến sinh lý và enzyme chống oxy hóa	Tăng chlorophyll và hoạt tính enzyme SOD, CAT, POD	[82]

Khan *et al.* (2024)	Lan (*Phalaenopsis sp.*)	Nano Fe trong MT tái sinh chồi	Tăng tỷ lệ tái sinh chồi và sinh trưởng cây con	[83]
Ahmad *et al.* (2025)	Chuối (*Musa spp.*)	Nano Fe trong giai đoạn nhân chồi	Tăng số chồi/cụm và tỷ lệ sống khi acclimatization	[84]
Zhang *et al.* (2025)	Dứa (*Ananas comosus*)	Nano Fe trong nuôi cấy mô	Tăng chiều dài chồi và hàm lượng chlorophyll	[85]
Kumar *et al.* (2025)	Khoai tây (*Solanum tuberosum*)	FeNPs trong giai đoạn ra rễ	Tăng số rễ và sinh khối cây con	[86]

1.5.2. Nano cobalt trong nuôi cấy *in vitro*

Co, một nguyên tố cần thiết cho cây trồng, đặc biệt quan trọng đối với họ đậu nhờ vai trò hỗ trợ các vi sinh vật cố định đạm. Trong cây trồng, Co tồn tại dưới dạng ion (Co^{2+}) hoặc như một thành phần quan trọng để tổng hợp các vitamin như B12, cần thiết cho cả thực vật, động vật và con người. Cobalt còn kích thích sự phát triển của cây, như kéo dài thân, cuống, phát triển rễ, tăng khối lượng khô, cùng với việc gia tăng chlorophyll a, b và chlorophyll tổng [87].

Co đã được chứng minh giúp tăng khả năng hấp thụ khoáng của thực vật, thúc đẩy sự nảy mầm của hạt, tái sinh, tăng trưởng mẫu cấy, và cải thiện các chỉ số sinh hóa cơ bản của tinh dầu trong suốt quá trình phát triển [50]. Co tham gia vào các quá trình chuyển hóa quan trọng, bao gồm hoạt động của enzyme glycolysis phosphoglucomutase, enzyme arginase, leghemoglobin. Đặc biệt, Co còn có vai trò ức chế tổng hợp khí ethylene thông qua ức chế enzyme ACC (enzyme trong quá trình biến đổi ACC thành ethylene [88].

CoNPs là một dạng NPs với với phần lõi là nguyên tử cobalt (Co^0) và phần vỏ được phủ carbon hoặc các thành phần khác như CMC, polyme [89]. CoNPs thường có kích thước từ 20 - 60 nm và diện tích bề mặt dao động từ 30 - 70 m^2/g, mang lại khả năng hấp thu qua bề mặt và hoạt tính xúc tác mạnh.

Ứng dụng của nano cobalt trong vi nhân giống

CoNPs có tác động tích cực đến sự nảy mầm và sinh trưởng của cây trồng. Phạm Thị Hoè và cộng sự (2018) phát hiện rằng xử lý hạt đậu tương (*Glycine max*) với CoNPs ở nồng độ 0,05 mg/L trong 18 giờ giúp tỷ lệ và tốc độ nảy mầm đạt cao nhất (50%) so với đối chứng (39,19%), đồng thời tăng chiều dài rễ mầm. Ngoài ra, CoNPs kích thích sự biểu hiện của các gene mã hóa enzyme kích thích nảy mầm của cây đậu tương, góp phần thúc đẩy quá trình này. Các cây con phát triển từ hạt được xử lý CoNPs không gặp bất kỳ hiện tượng biến dị hay khiếm khuyết nào [90].

Trong một nghiên cứu khác, Fouad và Hafez (2018) so sánh hiệu quả của CoNPs và ion Co^{2+} trong việc kích thích sự tổng hợp hợp chất alkaloids trên cây Dừa cạn (*Catharanthus roseus*) nuôi cấy *in vitro*. Kết quả cho thấy CoNPs vượt trội hơn trong việc kích thích biểu hiện gene CrMPK3 liên quan đến quá trình sinh tổng hợp alkaloids [91].

CoNPs không chỉ giúp cây hấp thu dinh dưỡng tốt hơn, mà còn tăng khả năng tái sinh, sinh trưởng tiếp theo và thành phần tinh dầu của cây bạc hà có nguồn gốc nuôi cấy *in vitro* [50]. Việc bổ sung 4,65 µg/L CoNPs trong MT nuôi cấy cây hoa hồng (*Rosa hybrida* L. 'Baby Love') đã giúp khắc phục tình trạng vàng và rụng lá trong quá trình nhân chồi và ra rễ. CoNPs không chỉ ức chế sự sinh tổng hợp khí ethylene và các enzyme thủy phân (pectinase và cellulase), mà còn thúc đẩy quá trình sinh trưởng, cải thiện chất lượng cây hoa hồng *in vitro* và gia tăng khả năng thích nghi, tỷ lệ sống sót khi chuyển cây con sang điều kiện vườn ươm [14].

Bảng 1.4. Tổng hợp một số nghiên cứu về vai trò của CoNPs trong vi nhân giống những năm gần đây

Tác giả, năm	Cây trồng	Nội dung nghiên cứu	Kết quả chính	Tài liệu tham khảo
Shkopinskij *et al.* (2018)	Nho (Vitis vinifera)	Ứng dụng CuNPs và CoNPs trong vi nhân giống cây ghép nho	Tăng tỷ lệ hình thành chồi và cải thiện sinh trưởng cây con trong nuôi cấy mô.	[92]
Ghorbanpour *et al.* (2022)	Cây dược liệu	Nghiên cứu ứng dụng NPs trong	CoNPs kích thích hình thành callus và	[93]

		nuôi cấy mô thực vật	tăng tích lũy hợp chất thứ cấp.	
Yadav *et al.* (2024)	Đậu bắp (*Abelmoschus esculentus*)	Ứng dụng NPs (Cu, Ni, Co oxide) kết hợp vermicompost	Tăng tỷ lệ nảy mầm và chỉ số vigor của cây con.	[94]
Wang *et al.* (2025)	Ngô (*Zea mays*)	Nghiên cứu Co_3O_4NPs như chất kích thích sinh trưởng và chống stress	Tăng hoạt động enzyme chống oxy hóa và khả năng chịu stress của cây.	[95]
Truong Hoai Phong *et al.* (2025)	Chanh dây tím (*Passiflora edulis*)	Đánh giá ảnh hưởng CoNPs lên các giai đoạn vi nhân giống	CoNPs 0.3 mg/L tăng tỷ lệ tạo chồi, ra rễ và tỷ lệ sống sau thích nghi của cây con.	[96]

1.5.3. Nano molypden trong nuôi cấy *in vitro*

Mo có vai trò quan trọng trong chuyển hóa N và tổng hợp protein của thực vật. Để có hoạt tính sinh học, Mo cần liên kết với đồng yếu tố molypden (Moco) thông qua các cơ chế sinh tổng hợp phức tạp [97]. Các enzyme quan trọng nhất của thực vật đòi hỏi Mo bao gồm nitrat reductase (NR), xanthine dehydrogenase (XDH) và aldehyde oxidase (AO) [98]. Mo tham gia vào quá trình cố định, chuyển hóa, và hấp thu N, đặc biệt đóng vai trò quan trọng trong việc khử nitrat (NO_3^-) thành nitrit (NO_2^-), một bước thiết yếu trong quá trình đồng hóa nitơ của thực vật [99; 100]. Khi thiếu hụt Mo, cây trồng có thể gặp khó khăn trong việc chuyển hóa nitrat, dẫn đến sự tích lũy nitrat trong mô và ảnh hưởng đến hoạt động của nitrat reductase và glutamine synthetase, từ đó làm giảm khả năng chuyển nitrat thành nitơ hữu cơ [101]. Cung cấp dinh dưỡng Mo hợp lý đã được chứng minh giúp cải thiện sinh khối và tăng cường hoạt động enzyme trong quá trình chuyển hóa nitơ của cây dâu tây [102].

Mặc dù nghiên cứu về việc sử dụng nano molypden (nano-Mo) trong nông nghiệp còn hạn chế, một số kết quả ban đầu rất đáng chú ý. Li và cộng sự (2018) cho rằng các nano molybdenum disulphide (MoS_2) có khả năng thúc đẩy quá trình đồng hóa nitơ, giúp cây lúa phát triển mạnh mẽ hơn thông qua việc tăng cường các phản ứng sinh hóa liên quan đến enzyme [103]. Taran và cộng sự (2014) cũng phát hiện rằng việc ngâm hạt đậu xanh trong dung dịch nano-Mo trong 1 - 2 giờ có thể gia tăng sinh trưởng và năng suất của cây [104].

Nano molypden dioxide (MoO_3NPs) được đánh giá cao hơn so với các dạng nano-Mo khác (ví dụ MoS_2), bởi vì chúng dễ dàng chuyển hóa thành molybdate hoặc các phức hợp molypden hòa tan trong điều kiện axit [105; 106]. Điều này đặc biệt quan trọng vì thực vật thường tiết ra lượng lớn axit hữu cơ để thích ứng với áp lực MT như mất cân bằng dinh dưỡng, điều kiện khắc nghiệt và ngộ độc kim loại nặng [107]. Các axit hữu cơ giúp sự hấp thu và vận chuyển chất dinh dưỡng thuận lợi, giúp cây trồng hấp thụ chất dinh dưỡng hiệu quả hơn tại vùng rễ [108]. Do đó, có thể cho rằng MoO_3NPs có thể trở thành nguồn bổ sung Mo hiệu quả hơn, đặc biệt khi kết hợp với sự hiện diện của axit hữu cơ trong rễ, từ đó thúc đẩy sinh trưởng của cây trồng. Tuy nhiên, vai trò của MoO_3NPs đối với thực vật cần có thêm các nghiên cứu chuyên sâu để làm rõ cơ chế và hiệu quả thực sự của chúng.

1.6. SƠ LƯỢC VỀ ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

1.6.1. Cây cúc

Cây cúc (*Chrysanthemum morifolium*) là một loài hoa có vai trò quan trọng ở trên thế giới. Cây cúc đa dạng về các màu sắc, hình dạng, khả năng nhân giống dễ dàng, và thời gian tươi lâu, hoa cúc được ưa chuộng hầu hết các nước ở phương đông và phương tây [109]

Cây không đòi hỏi chăm sóc nhiều và chịu được các điều kiện khí hậu khắc nghiệt và có thể mang lại cảnh quan đẹp. Cúc có thể trồng các chậu có kích thước khác nhau hoặc thành cụm ngoài vườn, và ngày càng được nghiên cứu nhằm cải thiện chất lượng hoa, tạo ra nhiều loại hoa mới với khả năng kháng bệnh và thích nghi tốt hơn với MT [110].

Với vị trí quan trọng trong ngành hoa cắt cành, cây cúc đứng thứ hai chỉ sau hoa hồng trên thị trường quốc tế [110]. Không chỉ mang giá trị trang trí, hoa cúc còn được sử dụng trong y học (giảm sốt, chống viêm, tăng cường hệ miễn dịch, giảm cảm cúm, đau đầu) [111].

Lâm Đồng là tỉnh ở Tây Nguyên có diện tích trồng hoa cúc lớn nhất cả nước với khoảng 3000 hecta và sản lượng đạt 1.3 tỷ cành/năm. Đây là loại cây mang lại thu nhập ổn định cho người nông dân [112]. Sự phát triển này đã khiến cây cúc trở thành cây trồng thương mại được ưu tiên vi nhân giống (tạo cây giống số lượng lớn, đồng

nhất di truyền, kiểm soát bệnh, bảo tồn nguồn gen). Tuy nhiên, phương pháp vi nhân giống cây cúc vẫn gặp một số hạn chế như sự biến đổi hình thái, sinh lý bất thường, làm giảm sinh trưởng ở giai đoạn tiếp theo [113]. Một số nghiên cứu đã ứng dụng AgNPs trong nuôi cấy *in vitro* cây cúc nhằm hạn chế sự nhiễm khuẩn và thúc đẩy sinh trưởng [45]. Tuy nhiên, FeNPs và MoO_3NPs trong nuôi cấy cây cúc vẫn cần có thêm các nghiên cứu để hiểu rõ hơn về ảnh hưởng của chúng.

1.6.2. Cây đồng tiền

Cây đồng tiền (*Gerbera jamesonii* "Revolution yellow"), có nguồn gốc từ Nam Phi và được du nhập vào Việt Nam từ đầu thế kỷ XX, là loại cây thân thảo lâu năm, đa dạng về màu sắc và có thể thích nghi với điều kiện khí hậu ôn hòa hoặc nhiệt đới núi cao [114]. Đặc điểm của cây là hệ rễ chùm, lá mọc cụm sát đất với phiến lá hình ngọn giáo, cụm hoa là tập hợp của nhiều bông nhỏ với cánh lớn hình lưỡi bên ngoài và cánh nhỏ hình ống bên trong.

Hoa đồng tiền còn có tiềm năng y học nhờ chứa các dẫn xuất coumarin có khả năng kháng đông máu, điều trị tắc nghẽn bạch huyết. Do vậy, các bộ phận của cây đều có thể được sử dụng làm thuốc [115]. Hoa đồng tiền được tiêu thụ mạnh và tạo nguồn thu nhập ổn định cho người nông dân. Tuy nhiên, các giống hoa hiện nay ở Việt Nam chủ yếu phải nhập khẩu và giá thành cao [116].

Trước nhu cầu thị trường lớn, nuôi cấy *in vitro* đã được áp dụng trên cây đồng tiền để tạo ra giống sạch bệnh, có hệ số nhân cao và tỷ lệ sống sót cao sau khi trồng ngoài tự nhiên. Phương pháp này giúp tăng chất lượng cây giống và cải thiện hiệu quả kinh tế. Các nghiên cứu tập trung vào việc nhân giống *in vitro*, tạo nền tảng quan trọng cho việc ứng dụng kỹ thuật vi nhân giống quy mô thương mại. Cũng như nhiều loài thực vật khác, quy trình vi nhân giống cây đồng tiền trải qua bốn giai đoạn chính: tạo nguồn mẫu ban đầu, nhân nhanh chồi, ra rễ *in vitro*, và thích nghi, thuần dưỡng cây trong điều kiện vườn ươm (Bảng 1.5).

Bảng 1.5. Một số nghiên cứu vi nhân giống cây đồng tiền trong nước và trên thế giới.

TT	Nội dung	Nguồn mẫu	MT	Kết quả	Tác giả
1	Tạo nguồn mẫu *in vitro* và cảm ứng tạo mô sẹo	Lá và cuống lá	MS + 3 mg/L BA	Cảm ứng mô sẹo 95% và 97%	[117]
		Lá non *in vitro*	MS + 2 mg/L BA + 0,25 mg/L ABA	Cảm ứng mô sẹo 36,6%	[118]
		Cụm hoa (non và trưởng thành)	MS + 10 mg/L BA + 1 mg/L IAA	Cảm ứng mô sẹo 85,26% và 26,7%;	[119]
		Chồi đỉnh và cánh hoa	MS + 1,5 mg/L KIN + 1 mg/L BA	Tỷ lệ tái sinh 87%	[120]
		Phân đoạn lá có gân giữa, nụ hoa	MS + 5 mg/L BA + 1 mg/L NAA	Tỷ lệ tái sinh 85%	[121]
		Chồi đỉnh, lá non, cuống lá non và cánh hoa non	MS + 1,5 mg/L TDZ + 0,25 mg/L BA	Cảm ứng mô sẹo 51,1%	[122]
2	Nhân nhanh chồi	Chồi đơn *in vitro*	MS + 1 mg/L BA	13 chồi/mẫu	[117]
			MS + 1 mg/L BA + 0,1 mg/L IAA	22,13 chồi/mẫu	[119]
			MS + 1,5 mg/L KIN + 1 mg/L BA	12,33 chồi/mẫu	[120]
			MS + 0,7 mg/L BA + 0,7 mg/L KIN + 0,5 mg/L IBA	10,67 chồi/mẫu	[123]
			MS + 5 mg/L BA + 1 mg/L NAA	7,75 chồi/ mẫu	[121]
			MS + 0,25 mg/L BA	7,5 chồi/mẫu	[122]

3	Ra rễ *in vitro*	Chồi 2 – 3 lá	MS + 1 mg/L BA + 0,1 mg/L IAA	Tỉ lệ ra rễ 80,00 %	[117]
		Chồi 3 cm	MS + 40 µg /L NAA	Tỉ lệ ra rễ 100 %	[118]
		Chồi 1,5 cm	½ MS + 1 mg/L IBA	Tỉ lệ ra rễ 96,23 %	[119]
		Chồi 2 - 3 cm	Tiền xử lý IBA 2000 mg/L trong 30 giây	Tỉ lệ ra rễ 100 %	[120]
		Chồi 3 cm	MS + 0,5 mg/L NAA + 1,5 mg/L AC	Số rễ đạt 2,1 rễ/cây	[122]
		Chồi 2 - 3 lá	MS + 0,9 mg/L IBA	Tỉ lệ ra rễ 100 %	[123]

Giai đoạn tạo nguồn mẫu nuôi cấy in vitro

Trong quá trình này, các bộ phận khác nhau như lá, cuống lá [117; 121; 122], lá non [119], hoa non và trưởng thành [119], chồi đỉnh và cánh hoa [120; 122] được sử dụng làm nguồn mẫu ban đầu. Tuy nhiên, tỷ lệ tái sinh thấp và ảnh hưởng tiêu cực từ các chất khử trùng truyền thống như $HgCl_2$ hay $Ca(OCl)_2$ vẫn là vấn đề cần giải quyết. Hiện tại, AgNPs được sử dụng như một chất thay thế các chất khử trùng truyền thống đang dần trở thành một hướng nghiên cứu được quan tâm.

Giai đoạn nhân nhanh chồi

Trong giai đoạn này, cytokinin thường được sử dụng để kích thích chồi phát triển [118; 119; 123]. Tuy nhiên, cytokinin với nồng độ cao gây ra những bất thường về hình thái và sinh trưởng của mẫu cấy [63]. Ngoài ra, 2 mg/L $AgNO_3$ bổ sung vào MT nuôi cấy đã làm giảm hiện tượng bất thường về hình thái và nâng cao hiệu quả nhân nhanh chồi [124]. Mặc dù vậy, cây con phát triển chậm và vẫn gặp phải tình trạng già hóa mẫu, có thể do ảnh hưởng của khí ethylene trong quá trình nuôi cấy.

Giai đoạn ra rễ in vitro

Ra rễ là một trong những bước quan trọng để đảm bảo sự sống sót của cây con trong vườn ươm [119]. Nhiều nghiên cứu đã tiến hành thử nghiệm bổ sung các chất

như BA kết hợp IAA [117], NAA [117], IBA [119; 123], hoặc tiền xử lý chồi với IBA [120]. Bên cạnh đó, bổ sung 8 mg/L $AgNO_3$ giúp cải thiện tỷ lệ sống và giảm hiện tượng thủy tinh thể, góp phần tăng chất lượng cây đồng tiền *in vitro* [123].

Giai đoạn thích nghi và sinh trưởng tiếp theo

Huấn luyện thành công ở vườn ươm quyết định sự thành công của toàn bộ quá trình vi nhân giống [124]. Cây giống chuyển ra vườn ươm thường đối mặt với điều kiện khắc nghiệt và các tác nhân gây bệnh. Do đó, việc cải thiện chất lượng cây con trước khi đưa ra vườn ươm là rất quan trọng, bao gồm việc tạo MT cứng cáp, kích thích tạo rễ, và sử dụng hệ thống thoáng khí. Việc bổ sung NPs như AgNPs, nano CoNPs và FeNPs đã cho thấy hiệu quả tích cực trong nhân giống nhiều loại cây trồng khác nhau [63].

Nano kim loại trong nuôi cấy in vitro cây đồng tiền

Quy trình vi nhân giống cây đồng tiền đã được hoàn thiện và ứng dụng trong sản xuất thực tế. Tuy nhiên, vấn đề bất thường như thủy tinh thể, vàng lá vẫn còn tồn tại. Một số nghiên cứu đã áp dụng việc bổ sung 2 mg/L $AgNO_3$ trong giai đoạn nhân nhanh chồi và 8 mg/L $AgNO_3$ trong giai đoạn ra rễ để giảm thiểu hiện tượng thủy tinh thể [123], hay sử dụng 1 g/L than hoạt tính (AC) để hạn chế hiện tượng vàng, xoăn lá và thủy tinh thể [123; 124]. Mặc dù AC đã giảm thiểu bất thường, nhưng khả năng ra rễ bị suy giảm, làm cây yếu và giảm hiệu quả nhân giống [124].

CoNPs và FeNPs đã được chứng minh là không chỉ kích thích sinh trưởng mà còn hạn chế hiện tượng bất thường của thực vật nuôi cấy *in vitro*. Tuy nhiên, hiệu quả của chúng phụ thuộc vào NPs (nồng độ, nguồn gốc) và loài thực vật cụ thể.

1.6.3. Cây tử linh lan

Cây tử linh lan hay "African Violet," có nguồn gốc từ các khu rừng mưa nhiệt đới nằm ở biên giới Kenya và Tanzania nổi bật bởi hoa đa dạng màu sắc. Lá cây dày, bóng mượt, phủ một lớp lông nhung mềm mại, tạo nên vẻ ngoài rất hấp dẫn. Loài cây này có thể nở hoa liên tục trong điều kiện thích hợp, do đó rất được sử dụng để trang trí trong nhà, văn phòng, và các không gian nội thất khác [125].

Loài cây này thường phát triển tốt trên các vùng đất giàu mùn, trong các khe đá, hoặc thậm chí sống biểu sinh trên nhánh cây. Cây tử linh lan ưa thích nhiệt độ phòng và phát triển tốt dưới ánh sáng huỳnh quang. Tỉa chồi còn có thể giúp điều khiển chu kỳ ra hoa và có thể trang trí nội thất. Tuy nhiên, loài này không chịu được điều kiện lạnh ẩm, vì vậy nên tránh tưới nước quá nhiều [125].

Với sự sinh trưởng ổn định, tử linh lan đã trở thành loài hoa mang lại giá trị kinh tế lớn. Cây tử linh lan đã đạt doanh thu 21 triệu USD/năm, xếp thứ 7 trong các loài hoa phổ biến, sau hoa hồng, ly ly, đỗ quyên, cúc, trạng nguyên... (Hội Cây hoa cảnh Mỹ, 2004). Đặc biệt tại Đức, Pháp, Ý, đã có hơn 1.000 giống tử linh lan với hơn 1.500 màu sắc khác nhau.

Nghiên cứu về vi nhân giống cây tử linh lan đã thu được một số kết quả về phát sinh hình thái *in vitro* [126, 127]. Tái sinh chồi từ các nguồn mẫu kháu nhau dưới ánh sáng huỳnh quang cũng đã được nghiên cứu, nhưng hiệu quả nhân chồi chưa cao với số lượng chồi/mẫu nhỏ hơn 8 (chiều cao chồi < 1 cm) sau 30 ngày nuôi cấy [128]. Ảnh hưởng của ánh sáng đơn sắc trong việc cải thiện chiều cao chồi cũng được ghi nhận [128]. Tuy nhiên, việc sử dụng NPs trong nhân giống *in vitro* cây tử linh lan vẫn còn hạn chế. Tác động của AgNPs ở giai đoạn khử trùng mẫu cấy và so sánh với chất khử trùng $HgCl_2$ chỉ mới thực hiện [129]. Do đó, các nghiên cứu về ảnh hưởng của FeNPs và CoNPs lên sự phát sinh hình thái *in vitro*, sinh trưởng, sinh lý và sinh hóa của cây tử linh lan cần được làm rõ thêm. Điều này sẽ tìm ra vai trò mới của NPs trong việc cải thiện hiệu quả vi nhân giống và tạo điều kiện để loài hoa này phát triển mạnh mẽ hơn trong sản xuất thương mại.

Chương 2: VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. VẬT LIỆU

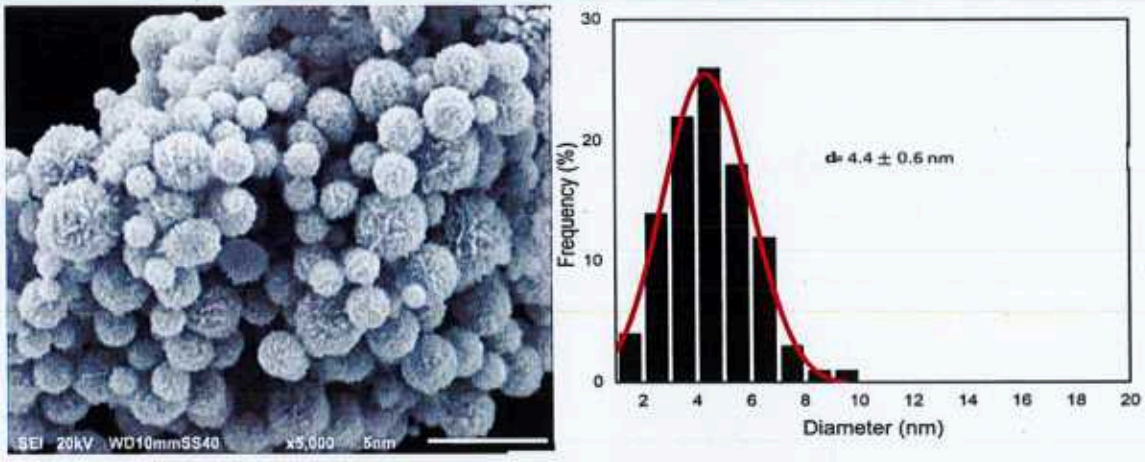
2.1.1. Vật liệu thực vật

Vật liệu thực vật là các mẫu cấy *in vitro* 30 ngày tuổi bao gồm lá, đoạn thân và chồi ngọn cây cúc (*Chrysanthemum morifolium* Ramat cv. "Jimba"); chồi cây đồng tiền (*Gerbera jamesonii* "Revolution Yellow"); lá và chồi cây tử linh lan (*Saintpaulia ionantha* Wendl.). Các mẫu cấy có kích thước đồng đều và được thu nhận tại phòng sinh học phân tử - Viện Khoa học sự sống.

2.1.2. Dung dịch nano kim loại

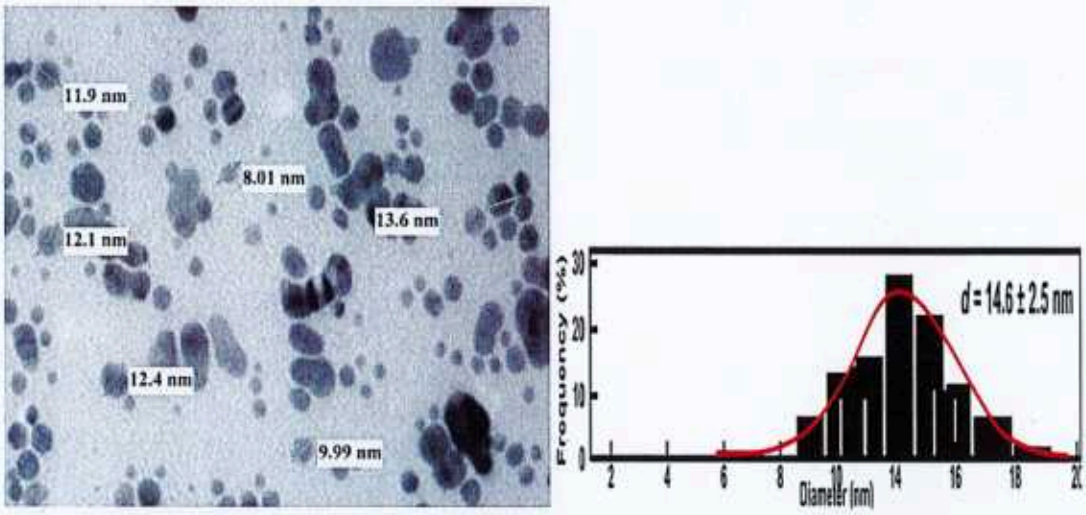
Dung dịch NPs (FeNPs, CoNPs và MoO_3NPs) được sản xuất bởi Viện Công nghệ môi trường (VAST, Hà Nội, Việt Nam) [130, 131].

FeNPs (4,4 ± 0,6 nm, 1.000 mg/L) được tạo ra theo phương pháp khử tiền chất $FeSO4.7H_2O$ với chất khử là sodium borohydride ($NaBH_4$) và chất ổn định là carboxymethyl cellulose (CMC) (hình 2.1).



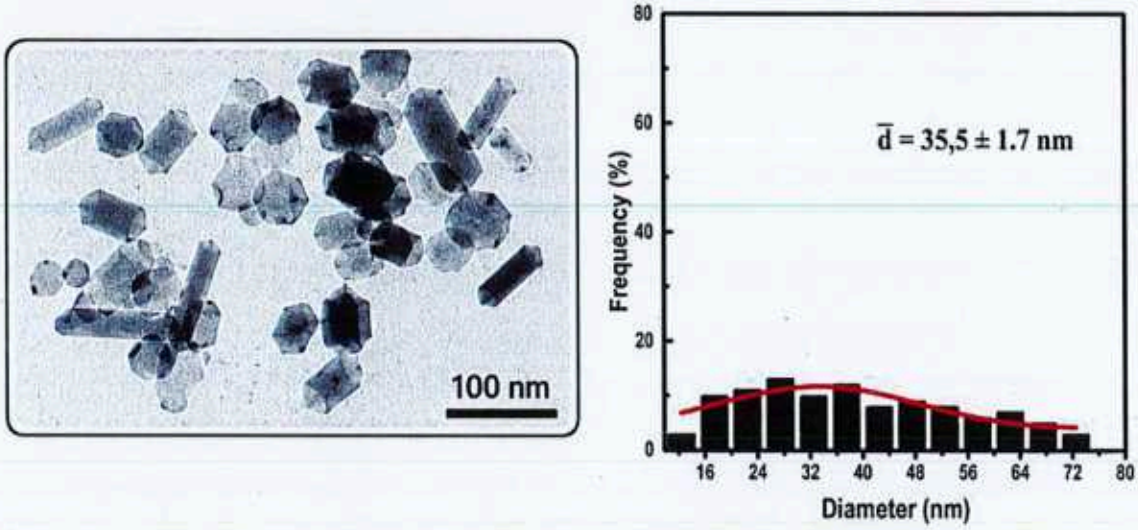
Hình 2.1. Ảnh TEM và hàm phân bố mật độ mẫu FeNPs

CoNPs (14,6 ± 2,5 nm, 1.000 mg/L) được tạo ra theo phương pháp khử tiền chất $CoCl_2.6H_2O$ với chất khử là $NaBH_4$ và chất ổn định là CMC (hình 2.2).



Hình 2.2. Ảnh TEM và hàm phân bố mật độ mẫu CoNPs

MoO_3NPs (35,5 ± 1,7 nm, 1.000 mg/L) được tạo ra theo phương pháp khử tiền chất $(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$ với chất khử là $NaBH_4$ và chất ổn định là CMC (hình 2.3).



Hình 2.3. Ảnh TEM và hàm phân bố mật độ mẫu MoO_3NPs

2.1.3. Thiết bị và dụng cụ

Một số thiết bị và dụng cụ của phòng thí nghiệm như máy cất nước, nồi hấp tiệt trùng, máy đo pH, cân điện tử, tủ cấy vô trùng, dao, đĩa và panh cấy, bình nuôi cấy, túi nylon, dây thun, găng tay,... được hấp bằng nồi hấp tiệt trùng ở 121°C, 1 atm trong thời gian 30 phút. Đèn UV, kính hiển vi soi nổi (Nikon SMZ 800, Nhật Bản), kính hiển vi quang học 2 thị kính (Leica DM 2000, Mỹ), máy SPAD (SPAD-502, Minolta Co., Ltd., Nhật Bản). Thiết bị dùng trong phân tích hàm lượng khí ethylene là hệ thống GC-CP 3380.

Thiết bị, hóa chất dùng trong phân tích hoạt độ enzyme: máy đo mật độ quang (OD), bếp ổn nhiệt, thuốc thử dinitrosalicylic acid (DNS), carboxymethyl cellulose (CMC), glucose, acid D-galacturonic.

Một số hóa chất và thiết bị cho phân tích enzyme kháng oxy hóa (UV-2900, Hitachi, Nhật Bản), khả năng hấp thu dinh dưỡng khoáng và tỷ lệ hấp thu nano kim loại (AAS-6650, Shimazdu, Nhật Bản).

2.1.4. Điều kiện nuôi cấy

Phòng thí nghiệm: Phòng nuôi cây được thiết lập nhiệt độ khoảng 25 ± 2°C, độ ẩm tương đối khoảng từ 55% đến 60%. Mẫu cấy trong bình thủy tinh được đặt dưới đèn huỳnh quang (quang chu kỳ 12 giờ/ngày và cường độ ánh sáng từ 40 đến 45 $\mu mol/m^2/s$).

Vườn ươm: Vườn ươm có nhiệt độ ban ngày 25 ± 5°C và ban đêm là 15 ± 5°C, độ ẩm trung bình khoảng 80%. Cây con được trồng trên các chậu nhựa chứa đất sạch trong 15 ngày; sau đó, chuyển cây ra túi nylon đen (20 cm × 20 cm × 15 cm) chứa giá thể kết hợp perlite và mùn (tỷ lệ 1:1) cho đến khi ra hoa. Cây được đặt dưới ánh sáng tự nhiên được che sáng bằng lưới đen 40% tại Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên (nay là Viện Khoa học sự sống).

2.1.5. Môi trường nuôi cấy

2.1.5.1. Cây cúc

- Cảm ứng mô sẹo và tái sinh chồi [CS0]: MS bổ sung 2 mg/L BA và 0,5 mg/L axit 1-naphthaleneacetic (NAA), 30 g/L sucrose và 8 g/L agar [132].
- Nhân nhanh chồi [CC0]: MS bổ sung 0,2 mg/L BA, 30 g/L sucrose và 8 g/L agar [132].
- Ra rễ *in vitro* [CR0]: MS chứa 30 g/L sucrose và 8 g/L agar [132].

2.1.5.2. Cây đồng tiền

- Nhân nhanh chồi [DC0]: MS bổ sung 0,7 mg/L BA, 0,7 mg/L Kinetin (KIN), 0,5 mg/L IBA, 30 g/L sucrose và 8 g/L agar [119].
- Ra rễ *in vitro* [DR0]: MS bổ sung 1 mg/L IBA, 30 g/L sucrose và 8 g/L agar [120].

2.1.5.3. Cây tử linh lan

- Nhân nhanh chồi [AC0]: MS bổ sung 0,2 mg/L BA kết hợp với 0,1 mg/L NAA, 30 g/L sucrose và 8 g/L agar [129].
- Ra rễ *in vitro* [AR0]: MS chứa 30 g/L sucrose và 8 g/L agar [129].

2.2. NỘI DUNG NGHIÊN CỨU

Các NPs (MoO_3NPs, CoNPs, FeNPs) được sử dụng để thay thế các muối kim loại tương ứng trong MT nuôi cấy MS trong quá trình nuôi cấy cây cúc, đồng tiền và tử linh lan từ đó đánh giá hiệu quả của các NPS đến:

- Quá trình cảm ứng mô sẹo, tái sinh chồi, nhân nhanh chồi và ra rễ.
- Hoạt động của các enzyme kháng oxy hóa, enzyme thủy phân, SPAD.
- Khả năng hấp thu khoáng đa lượng và dư lượng
- Hạn chế các hiện tượng bất thường trong nuôi cấy *in vitro*
- Sự sinh trưởng tiếp theo ở giai đoạn vườn ươm

2.2.1. Nghiên cứu thay thế muối $Na_2MoO_4.2H_2O$ bằng MoO_3NPs trong vi nhân giống cây cúc

Nghiên cứu thay thế muối $Na_2MoO_4.2H_2O$ bằng MoO_3NPs trong giai đoạn cảm ứng mô sẹo và sinh trưởng tiếp theo của mẫu lá cây cúc.

Nghiên cứu thay thế muối $Na_2MoO_4.2H_2O$ bằng MoO_3NPs trong giai đoạn nhân chồi và sinh trưởng tiếp theo của mẫu đoạn thân và chồi ngọn cây cúc.

2.2.2. Nghiên cứu thay thế muối $CoCl_2.6H_2O$ bằng CoNPs trong vi nhân giống cây cúc, đồng tiền và tử linh lan

Nghiên cứu thay thế muối $CoCl_2.6H_2O$ bằng CoNPs trong giai đoạn ra rễ của mẫu chồi cây cúc.

Nghiên cứu thay thế muối $CoCl_2.6H_2O$ bằng CoNPs trong giai đoạn nhân chồi của mẫu chồi cây đồng tiền.

Nghiên cứu thay thế muối $CoCl_2.6H_2O$ bằng CoNPs trong giai đoạn ra rễ của mẫu chồi cây đồng tiền.

Nghiên cứu thay thế muối $CoCl_2.6H_2O$ bằng CoNPs trong giai đoạn nhân chồi của mẫu lá cây tử linh lan.

2.2.3. Nghiên cứu thay thế muối $FeSO_4.7H_2O$ bằng FeNPs trong vi nhân giống cây cúc, đồng tiền và tử linh lan

Nghiên cứu thay thế muối $FeSO_4.7H_2O$ bằng FeNPs trong giai đoạn ra rễ của mẫu chồi ngọn cây cúc.

Nghiên cứu thay thế muối $FeSO_4.7H_2O$ bằng FeNPs trong trong giai đoạn ra rễ của mẫu chồi cây đồng tiền.

Nghiên cứu thay thế muối $FeSO_4.7H_2O$ bằng FeNPs trong giai đoạn ra rễ của mẫu chồi cây tử linh lan.

2.3. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.3.1. Bố trí thí nghiệm

Các thí nghiệm được thiết kế trên cơ sở kế thừa các quy trình vi nhân giống đã được tối ưu cho cây cúc, đồng tiền và tử linh lan [119, 120, 130, 132]. Môi trường MS được sử dụng làm nền đối chứng và được giữ nguyên các thành phần dinh dưỡng, chất điều hòa sinh trưởng cũng như điều kiện nuôi cấy. Trong từng thí nghiệm, chỉ thay thế muối vi lượng nghiên cứu bằng nano kim loại tương ứng nhằm đánh giá riêng biệt ảnh hưởng của nano đến quá trình sinh trưởng, phát triển và các đáp ứng sinh lý – sinh hóa của cây nuôi cấy *in vitro*.

Nguồn mẫu cấy là nguồn mẫu *in vitro* đã ổn định qua nhiều lần cấy chuyền, sẵn có tại phòng sinh học phân tử và chọn tạo giống cây trồng – Viện khoa học sự sống.

2.3.1.1. Nghiên cứu thay thế muối $Na_2MoO_4.2H_2O$ bằng MoO_3NPs trong vi nhân giống cây cúc

Thí nghiệm 1. Nghiên cứu thay thế muối $Na_2MoO_4.2H_2O$ bằng MoO_3NPs trong giai đoạn phát sinh hình thái của mẫu lá cây cúc

Mẫu lá được cắt thành hình vuông với kích thước mỗi cạnh 5 mm và nuôi cấy trên MT CS0 và thay thế $Na_2MoO_4.2H_2O$ bằng MoO_3NPs với các nồng độ thay đổi (37,25; 74,50; 149,00; 223,50 và 298,00 µg/L; tương ứng với ¼, ½, 1, $^3/_2$ và 2 lần

nồng độ $Na_2MoO_4.2H_2O$ hiện tại trong MT MS cơ bản). Đối chứng âm (-) là MT CS0 được loại bỏ muối $Na_2MoO_4.2H_2O$ và đối chứng dương (+) là MT CS0. Sau 30 ngày, tỷ lệ mẫu cấy không hoặc có cảm ứng mô sẹo và tái sinh chồi (%), số chồi trên mỗi mẫu (chồi), chiều cao chồi (cm) và khối lượng tươi (mg) được ghi nhận.

Thí nghiệm 2. Nghiên cứu thay thế muối $Na_2MoO_4.2H_2O$ bằng MoO_3NPs trong quá trình nhân nhanh chồi của mẫu đoạn thân và chồi ngọn cây cúc

Mẫu đoạn thân hoặc chồi ngọn (1 cm) được nuôi cấy trên MT CC0 thay thế $Na_2MoO_4.2H_2O$ bằng MoO_3NPs ở các nồng độ khác nhau (37,25; 74,50; 149,00; 223,50 và 298,00 µg/L). Đối chứng âm (-) là MT CC0 đã loại bỏ muối $Na_2MoO_4.2H_2O$ và đối chứng dương (+) là MT CC0. Sau 30 ngày, thời gian cảm ứng mẫu cấy (ngày), tỷ lệ tái sinh chồi (%), số lượng chồi/mẫu, khối lượng tươi (mg) và chỉ số SPAD (thu được bằng Máy đo diệp lục Konica Minolta SPAD-502 Plus SPAD 502, Nhật Bản).

Tiếp theo, chồi cúc 30 ngày tuổi thu được từ nghiệm thức MoO_3NPs được chuyển sang MT MS loại bỏ $Na_2MoO_4.2H_2O$ để đánh giá dư lượng MoO_3NPs lên sự hình thành rễ. Sau 15 ngày, chiều cao cây (cm), số rễ, chiều dài rễ (cm), số lá, khối lượng tươi (mg) và SPAD được ghi nhận.

2.3.1.2. Nghiên cứu thay thế muối $CoCl_2.6H_2O$ bằng CoNPs trong vi nhân giống cây cúc, đồng tiền và tử linh lan

Thí nghiệm 3. Nghiên cứu thay thế muối $CoCl_2.6H_2O$ bằng CoNPs trong giai đoạn nhân chồi của mẫu lá cây tử linh lan

Mẫu lá được cắt thành hình vuông với kích thước mỗi cạnh 5 mm được nuôi cấy trên MT AC0 loại bỏ 0,025 mg/L $CoCl_2.6H_2O$ và bổ sung CoNPs (0; 1,55 µg/L; 3,1 µg/L; 4,65 µg/L; 6,2 µg/L; 12,4 µg/L - hàm lượng CoNPs tương ứng với ¼, ½, ¾, 1 và 2 lần $CoCl_2.6H_2O$ trong MT AC0). Đối chứng (+) là MT AC0 và MT AC0 loại bỏ $CoCl_2.6H_2O$ được sử dụng làm đối chứng (-). Sau 30 ngày, tỷ lệ mẫu cấy tái sinh chồi (%), số chồi trên mỗi mẫu, chiều cao chồi (cm), khối lượng tươi và khối lượng khô của cụm chồi (mg) được ghi nhận; bên cạnh đó, số chồi (tổng số chồi và chồi có kích thước > 1 cm), chiều cao chồi (cm), SPAD, khối lượng tươi và khô của cụm chồi (mg) được ghi nhận sau 60 ngày.

Thí nghiệm 4. Nghiên cứu thay thế muối $CoCl_2.6H_2O$ bằng CoNPs trong giai đoạn nhân nhanh chồi của mẫu chồi cây đồng tiền

Mẫu chồi (1 cm) được nuôi cấy trên MT DC0 bổ sung CoNPs (0; 1,55 µg/L; 3,1 µg/L; 4,65 µg/L; 6,2 µg/L; 12,4 µg/L); trong đó, đối chứng (-) là MT DC0 loại bỏ $CoCl_2.6H_2O$ và đối chứng (+) là MT DC0. Sau 30 ngày, số lượng chồi (tổng số chồi, chồi cao hơn 2 cm), kích thước lá [chiều dài và chiều rộng của lá (cm)], SPAD, khối lượng tươi và khô (mg), tỷ lệ khối lượng khô và tỷ lệ các hiện tượng hình thái bất thường (thủy tinh thể và vàng lá) được ghi nhận.

Thí nghiệm 5. Nghiên cứu thay thế muối $CoCl_2.6H_2O$ bằng CoNPs trong giai đoạn ra rễ của mẫu chồi cây đồng tiền

Mẫu chồi (2,5 cm) được nuôi cấy trên MT DR0 bổ sung CoNPs (0; 1,55 µg/L; 3,1 µg/L; 4,65 µg/L; 6,2 µg/L; 12,4 µg/L) và đối chứng (-) là chồi nuôi cấy trên MT DR0 loại bỏ $CoCl_2.6H_2O$, đối chứng (+) là chồi nuôi cấy trên MT DR0. Sau 30 ngày nuôi cấy, chiều cao cây (cm), số rễ trên cây con, chiều dài rễ (cm), số lá trên cây con, kích thước lá [chiều dài và chiều rộng của lá (cm)], giá trị SPAD, khối lượng tươi và khô (mg) và tỷ lệ các hiện tượng bất thường (thủy tinh thể, vàng lá và mẫu hóa nâu) được ghi nhận.

Thí nghiệm 6. Nghiên cứu thay thế muối $CoCl_2.6H_2O$ bằng CoNPs trong giai đoạn ra rễ của mẫu chồi cây cúc

Mẫu chồi ngọn (1 cm) của cây cúc *in vitro* 30 ngày tuổi được nuôi cấy trên MT MS thay thế $CoCl_2.6H_2O$ bằng CoNPs (0; 1,55 µg/L; 3,1 µg/L; 4,65 µg/L; 6,2 µg/L; 12,4 µg/L). Đối chứng âm (-) là MT MS đã loại bỏ muối $CoCl_2.6H_2O$ và đối chứng dương (+) là MT MS. Các chỉ tiêu sinh trưởng của cây như chiều cao cây (cm), số rễ/cây, chiều dài rễ (cm), số lá/cây, khối lượng tươi (mg), SPAD và đường kính thân (mm) được ghi nhận sau 15 ngày nuôi cấy.

2.3.1.3. Nghiên cứu thay thế muối $FeSO_4.7H_2O$ bằng FeNPs trong vi nhân giống cây cúc, đồng tiền và tử linh lan

Thí nghiệm 7. Nghiên cứu thay thế muối $FeSO_4.7H_2O$ bằng FeNPs trong giai đoạn ra rễ của chồi ngọn cây cúc

Chồi ngọn (1 cm) của cây cúc *in vitro* 30 ngày tuổi với 1 cặp lá được nuôi cấy trên MT CR0 thay thế $FeSO_4.7H_2O$ bằng FeNPs ở các nồng độ khác nhau (1,4; 2,8; 4,2; 5,6; 11,2 mg/L tương ứng với ¼, ½, ¾, 1 và 2 lần nồng độ $FeSO_4.7H_2O$ có trong MT MS). Đối chứng âm (-) là MT CC0 đã loại bỏ muối $FeSO_4.7H_2O$ và đối chứng dương (+) là MT CC0. Sau 30 ngày, số lượng chồi/mẫu, số lá, số đốt, chiều dài lá (cm), chiều cao chồi (cm), khối lượng tươi (mg) và SPAD được ghi nhận.

Thí nghiệm 8. Nghiên cứu thay thế muối $FeSO_4.7H_2O$ bằng FeNPs lên khả năng ra rễ của mẫu chồi cây đồng tiền

Mẫu chồi (2,5 cm) được nuôi cấy trên MT DR0 loại bỏ $FeSO_4.7H_2O$ và thay thế bằng FeNPs (1,4; 2,8; 4,2; 5,6; 11,2 mg/L). Đối chứng âm (-) là MT DR0 đã loại bỏ muối $FeSO_4.7H_2O$ và đối chứng dương (+) là MT DR0. Sau 30 ngày nuôi cấy, chiều cao cây (cm), số rễ, chiều dài rễ (cm), số lá, kích thước lá [chiều dài và chiều rộng của lá (cm)], giá trị SPAD, khối lượng tươi và khô (mg) và tỷ lệ các hiện tượng hình thái bất thường (thủy tinh thể, vàng lá và mẫu hóa nâu) được ghi nhận.

Thí nghiệm 9. Nghiên cứu thay thế muối $FeSO_4.7H_2O$ bằng FeNPs trong giai đoạn ra rễ của mẫu chồi cây tử linh lan

Mẫu chồi (1 cm) của cây tử linh lan được nuôi cấy trên MT AR0 loại bỏ $FeSO_4.7H_2O$ và bổ sung các nồng độ FeNPs khác nhau (1,4; 2,8; 4,2; 5,6; 11,2 mg/L). Đối chứng (-) là MT AR0 loại bỏ $FeSO_4.7H_2O$ và đối chứng (+) là MT AR0. Sau 30 ngày nuôi cấy, chiều cao cây (cm), số rễ Chiều dài rễ (cm), số lá, chiều dài lá (cm), khối lượng tươi (mg), khối lượng khô (mg) và SPAD được ghi nhận.

2.3.2. Một số phương pháp nghiên cứu

2.3.2.1. Xác định hoạt độ enzyme kháng oxy hóa

- **Xử lý mẫu**

Nguồn mẫu sử dụng để phân tích hoạt độ enzyme kháng oxy hóa (SOD, CAT, APX) đối với cây cúc là chồi 30 ngày tuổi có nguồn gốc từ mẫu cấy lá, đoạn thân (thí nghiệm 2), và chồi ngọn (thí nghiệm 3), chồi được nuôi cấy trên MT ra rễ sau 15 ngày (thí nghiệm 6); đối với cây đồng tiền là mẫu cấy chồi 30 ngày tuổi (thí nghiệm 4, 8); đối với cây tử linh lan là mẫu cấy chồi 60 ngày tuổi (thí nghiệm 3) và 30 ngày tuổi (thí nghiệm 9).

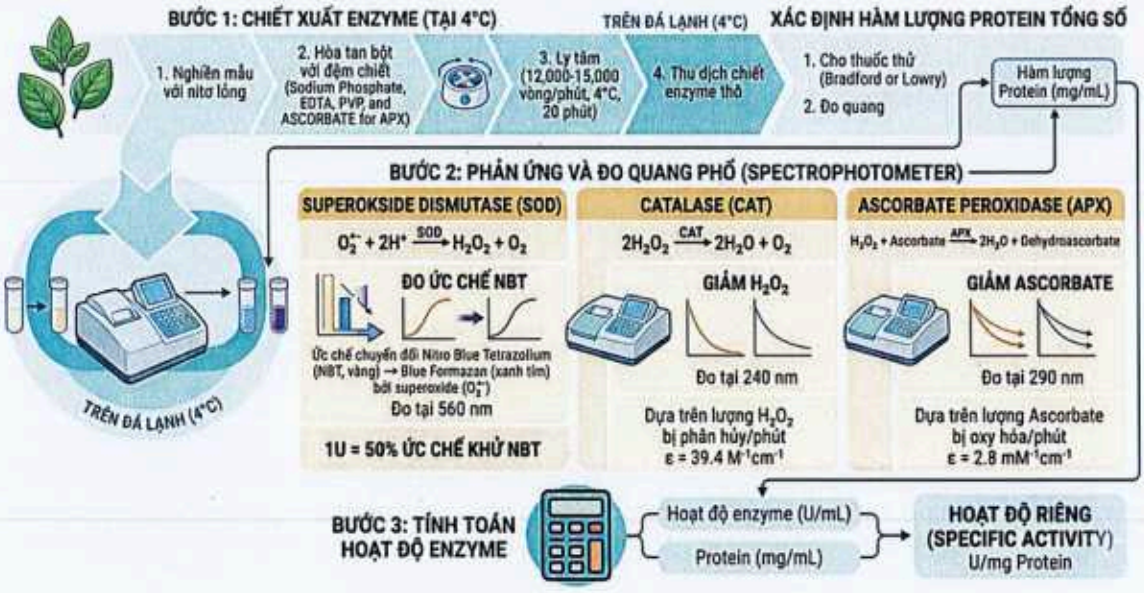
Mẫu tươi: 300 mg → nghiền thành bột bằng nitơ lỏng → đồng nhất hóa bằng phân tán siêu âm (Dung dịch sử dụng: 2 mL phosphate 0,1 M (pH 7,4) + Chất bổ sung: 0,1 mM EDTA)

- ***Mục đích:*** chiết xuất SOD, CAT, APX
- ***Chuyển sang ống ly tâm:*** 15.000 rpm, 20 phút, 4°C
- ***Kết quả ly tâm:*** *thu thập chất nổi phía trên → bảo quản trên băng → đánh giá hoạt độ của các enzyme.*

SOD: Phân tích hoạt độ SOD theo phương pháp do Marklund và Marklund mô tả [133].

CAT: Mẫu thử phản ứng với 100 µL H_2O_2 (65 mM) trong 2 phút để đánh giá hoạt độ CAT, sau đó mang phần H_2O_2 còn lại phản ứng với 100 µL $NH_4Mo_7O_{24}$ để tạo ra phức hợp màu vàng ổn định có khả năng hấp thụ tốt nhất ở bước sóng 405 nm. Một đơn vị hoạt độ CAT (U/g prot) tương đương với 1 µmol H_2O_2 thủy phân trong 1 phút [134].

APX: Hoạt độ APX được tính toán dựa theo phương pháp của Nakano và Asada [135].



Hình 2.4. Phương pháp xác định hoạt độ ezyme kháng oxy hóa (SOD, CAT, APX)

2.3.2.2. Hấp thụ kim loại

Phương pháp quang phổ hấp thụ nguyên tử (AAS) được sử dụng để đánh giá sự hấp thu K, Ca, Mg, Fe, Cu và dư lượng Co, Mo [136].

Mẫu chồi cây cúc, đồng tiền và tử linh lan được thu hoạch và rửa sạch bằng nước khử ion nhằm loại bỏ tạp chất bề mặt. Mẫu sau đó được sấy khô ở 60 °C đến khối lượng không đổi và nghiền mịn.

Khoảng 0,2 g mẫu khô được cân chính xác và cho vào bình tiêu hủy. Thêm 5 mL axit nitric đậm đặc (HNO_3, cấp phân tích) và tiến hành gia nhiệt ở 120 °C cho đến khi mẫu gần khô. Sau đó, bổ sung 2 mL hydrogen peroxide (H_2O_2 30%) để hoàn tất quá trình oxy hóa, tiếp tục gia nhiệt cho đến khi thu được dung dịch trong suốt. Dung dịch sau tiêu hủy được làm nguội, định mức đến 25 mL bằng nước khử ion và lọc qua màng lọc 0,45 µm trước khi phân tích.

Chuẩn bị dung dịch chuẩn

Dung dịch chuẩn gốc (1000 mg/L) của các nguyên tố K, Ca, Mg, Fe và Cu được sử dụng để pha dãy dung dịch chuẩn làm việc trong khoảng nồng độ thích hợp (ví dụ: 0–10 mg/L đối với Fe, Cu; 0–50 mg/L đối với K, Ca, Mg) bằng phương pháp pha loãng nối tiếp với dung dịch HNO_3 1% (v/v). Các dung dịch chuẩn được chuẩn bị mới trước mỗi lần phân tích.

Phân tích bằng thiết bị

Hàm lượng các nguyên tố được xác định bằng máy quang phổ hấp thụ nguyên tử, sử dụng đèn cathode rỗng đặc trưng cho từng nguyên tố. Các phép đo được thực hiện trong điều kiện tối ưu theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Các bước sóng phân tích được lựa chọn như sau: K (766,5 nm), Ca (422,7 nm), Mg (285,2 nm), Fe (248,3 nm) và Cu (324,8 nm). Ngọn lửa không khí – axetylen được sử dụng cho quá trình nguyên tử hóa. Đối với các nguyên tố kiềm và kiềm thổ (K, Ca, Mg), có thể bổ sung chất giải phóng (ví dụ: lanthanum chloride) nhằm hạn chế nhiễu hóa học.

Đường chuẩn được thiết lập từ các dung dịch chuẩn tương ứng và mẫu trắng được sử dụng để hiệu chỉnh tín hiệu nền.

Định lượng và xử lý số liệu

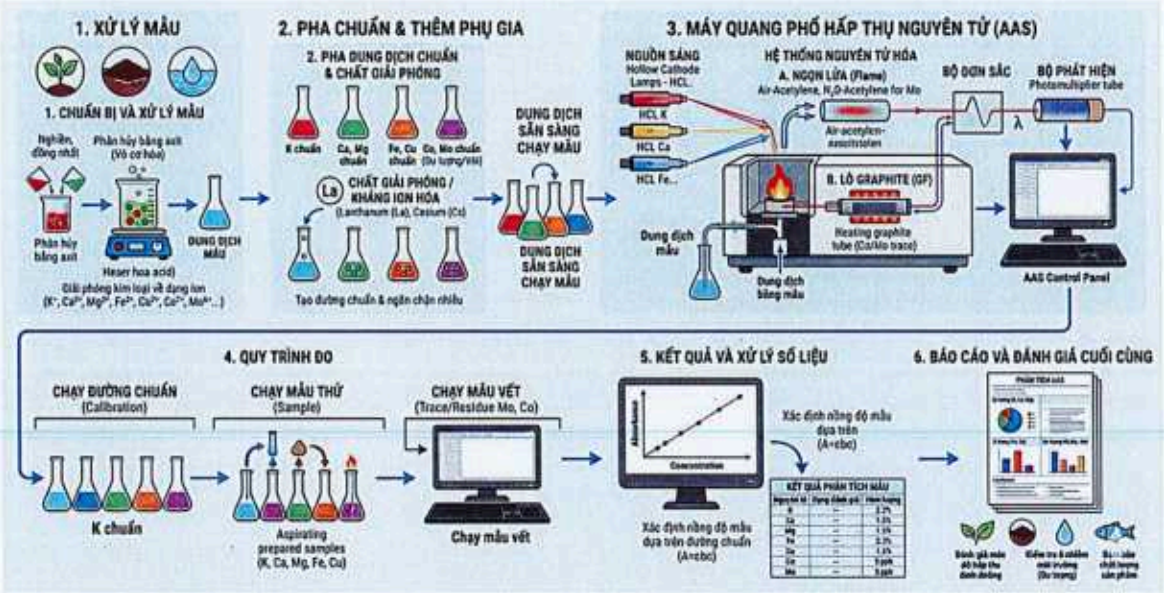
Giá trị độ hấp thụ được ghi nhận và sử dụng để xây dựng đường chuẩn giữa nồng độ và tín hiệu hấp thụ. Nồng độ các nguyên tố trong mẫu được xác định dựa trên phương trình hồi quy tuyến tính của đường chuẩn.

Hàm lượng nguyên tố trong mẫu được tính theo công thức:

$$C = (C_{đo} \times V) / m$$

Trong đó:

- *C*: hàm lượng nguyên tố trong mẫu (mg/kg khối lượng khô)
- $C_{(đo)}$: nồng độ xác định từ đường chuẩn (mg/L)
- *V*: thể tích dung dịch sau tiêu hủy (L)
- *m*: khối lượng mẫu khô (kg)

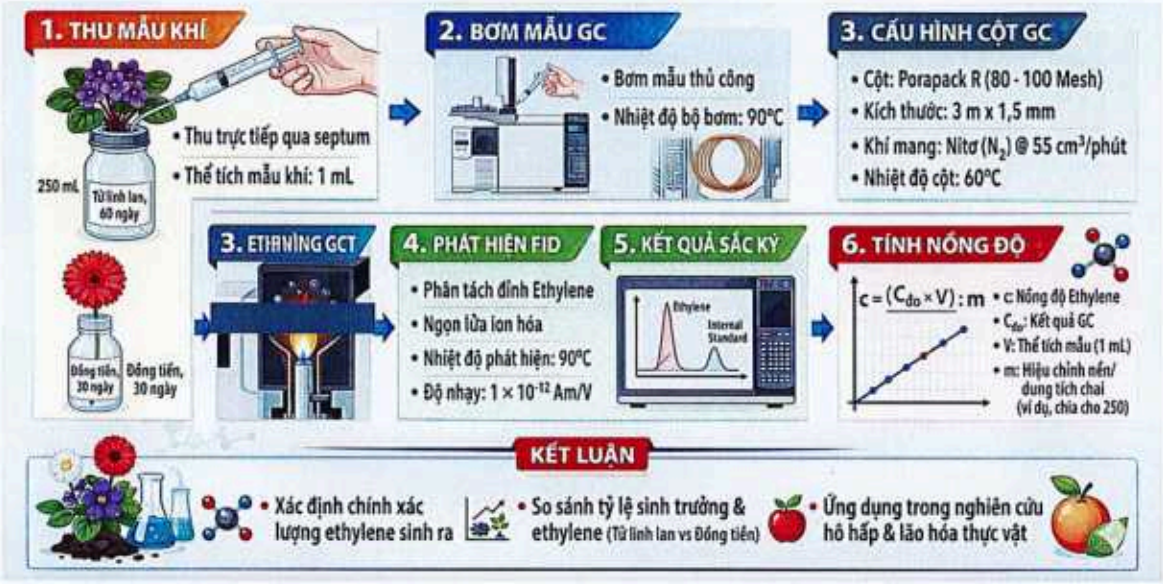


Hình 2.5. Phương pháp phân tích quang phổ hấp thụ nguyên tử

2.3.2.3. Ethylene trong bình nuôi cấy

Nghiên cứu này sử dụng phương pháp sắc ký khí với đầu dò ion hóa ngọn lửa (FID). Hệ thống GC (GC-CP 3380), ống tiêm (BD Tuberculin syringe 1 mL), kim tiêm (BD PrecisionGlide Needle) và miếng dán ngăn rò rỉ khí chuyên dụng (Becton Dickinson cung cấp).

Khí ethylene (1 mL) được thu thập trực tiếp từ chai 250 mL nuôi cấy cây tử linh lan 60 ngày (thí nghiệm 3) và cây đồng tiền 30 ngày (thí nghiệm 4) bằng ống tiêm. Sau đó, mẫu khí được bơm thủ công vào máy sắc ký khí để phân tích. Cột sắc ký (3 m × 1,5 mm) sử dụng Porapack R (80 - 100 Mesh). Nhiệt độ phát hiện của cột là 60°C, bộ bơm là 90°C và ngọn lửa ion hóa 90°C. Độ nhạy điện kế 1 × 10 - 12 Am/V. Khí Nitơ được sử dụng làm khí mang để đẩy mẫu qua cột (55 cm^3/phút) [137].



Hình 2.6. Phương pháp phân tích nồng độ Ethylene trong bình nuôi cấy

2.3.2.4. Hoạt độ enzyme thủy phân

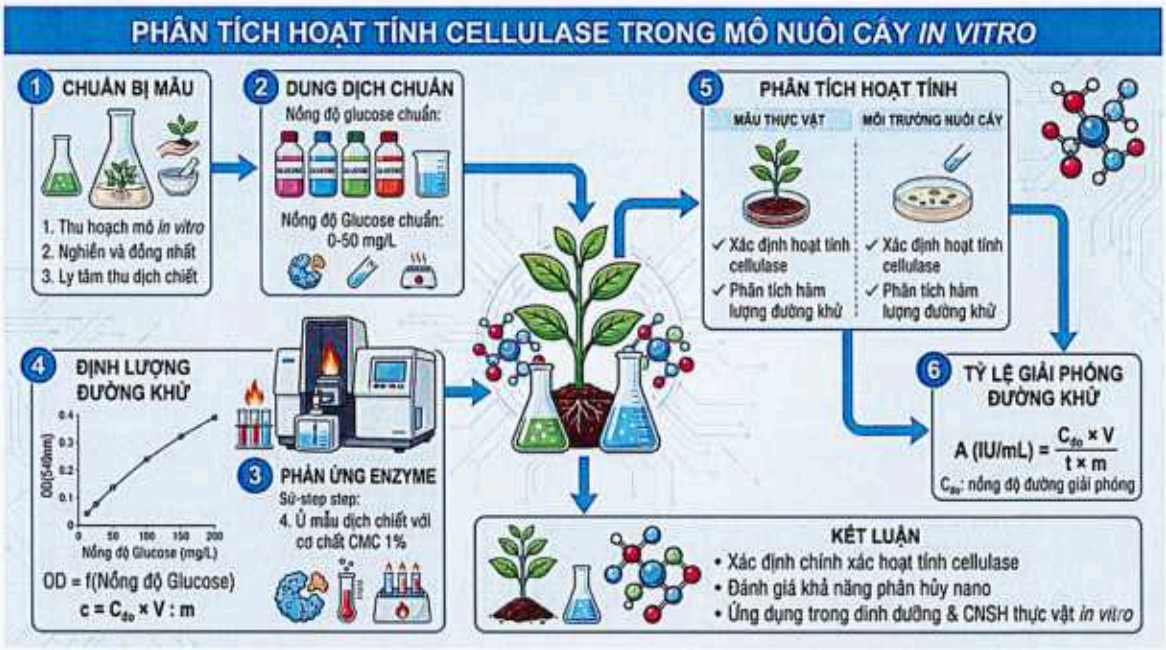
Cellulase

Phương pháp này dựa vào sự thủy phân cơ chất carboxymethyl cellulose (CMC) bởi enzyme cellulase ở pH = 5 và nhiệt độ 40 °C. Lượng đường khử sinh ra tạo phản ứng màu với thuốc thử DNS. Màu sinh ra sau phản ứng được xác định bằng phương pháp so màu trên máy quang phổ ở bước sóng 540 nm. Một đơn vị hoạt độ enzyme cellulase được tính bằng số mg glucose tạo ra bởi 1 mL (hay 1 g chế phẩm) ở 40 °C trong 15 phút [138].

Đem đo mật độ quang phổ ở bước sóng 540 nm dựa theo đường chuẩn glucose để tính nồng độ đường khử sinh ra:

$$H\ (UI/mL) = C.V.L\ /\ 180.v.t$$

Trong đó: C: nồng độ glucose tạo ra (µg/mL), V: tổng thể tích phản ứng (mL), L: độ pha loãng, v: thể tích chế phẩm enzyme cho vào phản ứng (mL), t: thời gian ủ.



Hình 2.7. Phương pháp phân tích hoạt tính cellulase

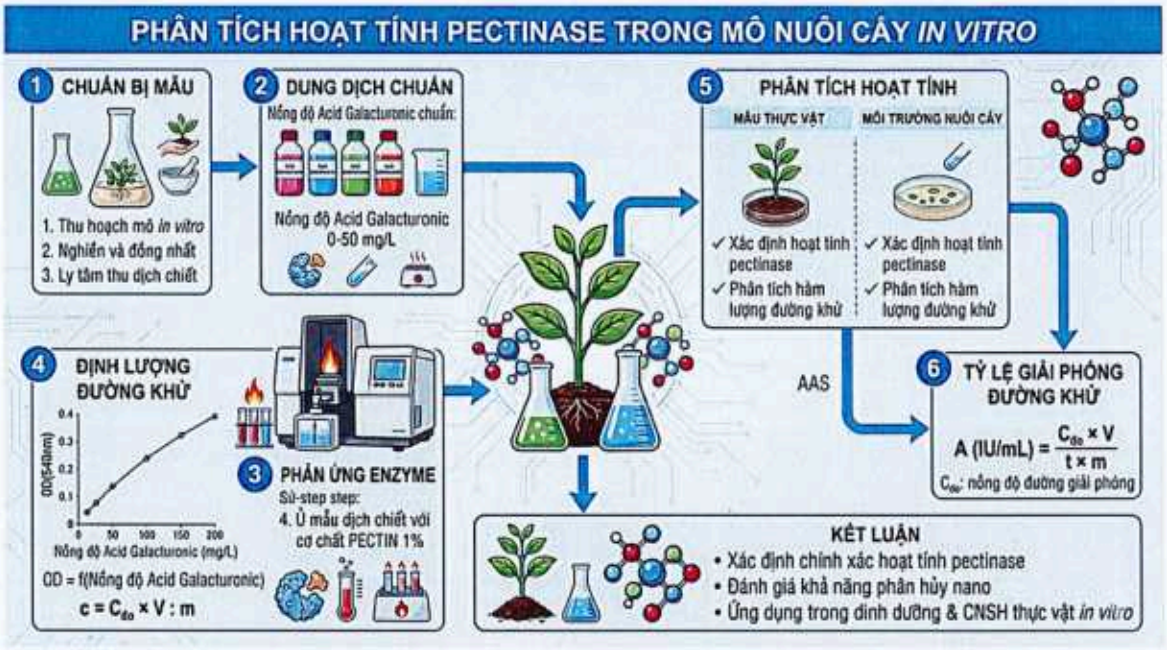
Pectinase

Enzyme tác dụng với cơ chất là pectin, sản phẩm tạo thành là acid D-galacturonic có phản ứng tạo màu với thuốc thử DNS, đo mật độ quang ở bước sóng 575 nm. Một đơn vị hoạt độ pectinase là số µmol acid D-galacturonic tạo ra bởi 1 mL dịch enzyme ở 37 °C trong 60 phút [139].

Dựa theo đường chuẩn acid D-galacturonic để tính nồng độ đường khử sinh ra theo công thức:

$$H\ (UI/mL) = C.V.L\ /\ v.t$$

Trong đó: C: nồng độ acid D-galacturonic (µmol/mL), L: độ pha loãng, V: tổng thể tích phản ứng (mL), v: thể tích enzyme cho vào phản ứng (mL), t: thời gian ủ.



Hình 2.8. Phương pháp phân tích hoạt tính pectinase

2.3.2.5. Giải phẫu hình thái thực vật

Mẫu cấy được cắt nhỏ; sau đó nhuộm màu và quan sát dưới kính hiển vi soi nổi [142]. Mẫu được cắt ngang (1 - 2 µm) → Tẩy bằng nước Javel 10% (15 phút) → rửa bằng nước cất 3 lần → rửa lại bằng axit axetic 45% (8 - 10 phút) → rửa bằng nước cất (3 lần). Mẫu được nhuộm bằng carmine (Sigma-Aldrich, Mỹ) trong 3 phút và rửa bằng nước cất 3 lần. Cuối cùng, các mẫu được quan sát và ghi nhận dưới kính hiển vi quang học (Keynce, Nhật Bản) với vật kính ×10.

2.3.2.6. Phân tích thống kê

Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần với 10 bình nuôi cấy (3 mẫu/bình). Các phân tích chỉ tiêu sinh lý, sinh hóa được lặp lại 3 lần, mỗi lần sử dụng 300mg mẫu cấy. Số liệu được xử lý bằng các phần mềm như Microsoft Excel 2016 và SPSS 20.0 theo phép thử Duncan's test với $P < 0,05$ [140].

2.3.2.7. Phương pháp quy đổi nồng độ muối sang nồng độ nano kim loại

Để quy đổi nồng độ muối kim loại trong MT MS sang nồng độ của Nano kim loại ta thực hiện các bước như sau:

Bước 1: Xác định khối lượng mol (Phân tử khối)

Bước 2: Tính tỷ lệ khối lượng

Tỷ lệ khối lượng = Tổng khối lượng mol của nguyên tố / khối lượng mol hợp chất

Bước 3: Tính nồng độ kim loại

Nồng độ kim loại = Lượng hợp chất ban đầu × Tỷ lệ khối lượng

2.4. ĐỊA ĐIỂM VÀ THỜI GIAN NGHIÊN CỨU

2.4.1. Địa điểm nghiên cứu

- Phòng sinh học phân tử và chọn tạo giống cây trồng - Viện Khoa học sự sống: Thực hiện tất cả các thí nghiệm nghiên cứu liên quan đến nuôi cấy *in vitro*.

2.4.2. Các đơn vị phối hợp thực hiện nghiên cứu

- Trường Đại học Y dược Tp. Hồ Chí Minh: Phân tích hoạt độ enzyme CAT, APX và SOD
- Viện Nghiên cứu Cây ăn quả miền Nam: Phân tích hàm lượng khí ethylene trong bình nuôi cấy.
- Viện Nghiên cứu Hạt nhân Đà Lạt: Phân tích dư lượng các kim loại trong mẫu cấy *in vitro*.

2.4.3. Thời gian nghiên cứu

- Thời gian thực hiện: 6 năm (6/2019 - 6/2025).

Chương 3: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. NGHIÊN CỨU THAY THẾ MUỐI $Na_2MoO_4.2H_2O$ BẰNG MoO_3NPS TRONG VI NHÂN GIỐNG CÂY CÚC

3.1.1. Cảm ứng mô sẹo và tái sinh chồi thông qua nuôi cấy mẫu lá

Kết quả cho thấy tất cả mẫu cấy (100%) đều ghi nhận hình thành mô sẹo từ các mẫu lá trên MT CS0 (đối chứng dương) hoặc nghiệm thức xử lý với MoO_3NPs; trong khi đó, các mẫu lá trên MT CS0 loại bỏ $Na_2MoO_4.2H_2O$ (đối chứng âm) không ghi nhận cảm ứng mô sẹo (Bảng 3.1; Hình 3.1A).

Bảng 3.1. Ảnh hưởng của MoO_3NPs lên cảm ứng mô sẹo và tái sinh chồi của mẫu lá cây cúc sau 30 ngày nuôi cấy

MoO_3NPs (µg/L)	Tỷ lệ (%)		Số chồi/ mẫu cấy	Chiều cao chồi (cm)	Khối lượng tươi của mẫu cấy (mg)
	Cảm ứng mô sẹo [x]	Tái sinh chồi [y]			
(-)	0,00 ± 0,00b*				163 ± 2,08e
(+)					183 ± 1,15e
37,25		0,00 ± 0,00b	0,00 ± 0,00b	0,00 ± 0,00b	770 ± 2,89d
74,50					800 ± 5,68d
149,00	100,00 ± 0,00a				960 ± 6,56b
223,50		33,33 ± 0,00a	1,00 ± 0,00a	1,14 ± 0,06a	1210 ± 3,22a
298,00		0,00 ± 0,00b	0,00 ± 0,00b	0,00 ± 0,00b	890 ± 2,65c

**Giá trị trung bình ± SD (Sai số chuẩn) và các chữ cái (a, b,...) trong một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với p<0,05 (Duncan's test).*

(-) *Đối chứng âm: MT CS0 loại bỏ $Na_2MoO_4.2H_2O$.*

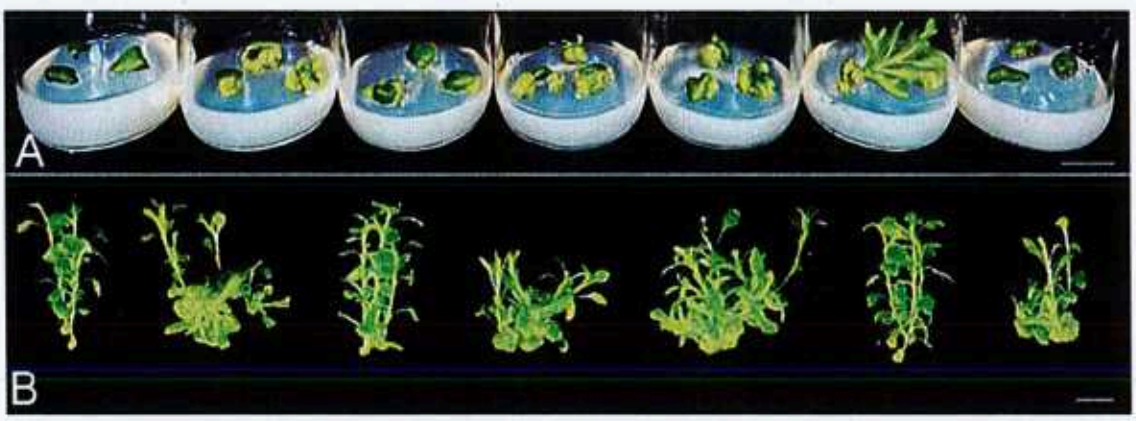
(+) *Đối chứng dương: MT CS0.*

[x]: 15 ngày sau nuôi cấy; [y]: 30 ngày sau nuôi cấy

Cây Cúc là loại cây dễ hình thành mô sẹo và tái sinh chồi, tuy nhiên mô sẹo không được hình thành ở những mẫu cấy lá được nuôi cấy trên MT loại bỏ $Na_2MoO_4.2H_2O$, điều này cho thấy tầm quan trọng của nguyên tố vi lượng Mo đến khả năng phát sinh mô sẹo của cây hoa Cúc.

Mẫu lá ở nghiệm thức 223,50 µg/L MoO_3NPs cho thấy khả năng tái sinh chồi (33,33%), với trung bình 1 chồi trên mỗi mẫu và chiều cao chồi (1,14 cm) sau 30 ngày (Bảng 1). Ngoài ra, khối lượng tươi (1210 mg) ghi nhận ở nghiệm thức 223,50 µg/L MoO_3NPs cũng cao nhất so với nghiệm thức MoO_3NPs khác và đối chứng.

Molypden là một vi chất cần thiết cho sự sinh trưởng của thực vật và được yêu cầu như một kim loại có hoạt tính xúc tác trong xúc tác enzyme [141, 142]. Việc bổ sung MoO_3NPs với nồng độ thích hợp (gấp 1,5 lần mol tương đương $Na_2MoO_4.2H_2O$ trong MT CS0) có thể gián tiếp kích thích tái sinh chồi thông qua mô sẹo với tỷ lệ 33,33%. Trong vi nhân giống, vai trò của Mo hoặc MoO_3NPs vẫn chưa được nghiên cứu đầy đủ. Trong thí nghiệm này, có thể một phần MoO_3NPs ở nồng độ cao (223,50 µg/L) đã được cây sử dụng làm nguồn dinh dưỡng vi lượng trong thực vật, lượng MoO_3NPs còn lại không được cây sử dụng hết đã tác động lên cây như một dạng chất kích thích sinh trưởng, kích thích quá trình tái sinh chồi thông qua mô sẹo. Tuy nhiên, ở nồng độ cao hơn (298,00 µg/L) MoO_3NPs lại không phù hợp và gây ức chế quá trình này.



(-) (+) 37,25 µg/L 74,50 µg/L 149,00 µg/L 223,50 µg/L 298,00 µg/L

Hình 3.1. Chồi được tái sinh từ mẫu cấy lá (A) nhân nhanh chồi từ mẫu đoạn thân (B) của cây cúc sau 30 ngày nuôi cấy trên MT thay thế muối $NaMoO_4$ bằng MoO_3NPs ở các nồng độ khác nhau.

(-) Đối chứng âm: MT loại bỏ $Na_2MoO_4.2H_2O$

(+) Đối chứng dương: MT chứa $Na_2MoO_4.2H_2O$. *Thước đo: 2 cm*

3.1.2. Nhân nhanh chồi của mẫu đốt thân và chồi ngọn cây cúc nuôi cấy trên môi trường thay thế $Na_2MoO_4.2H_2O$ bằng MoO_3NPs

Đối với mẫu đốt thân, tất cả mẫu cấy ở nghiệm thức MoO_3NPs và đối chứng (có/không có $Na_2MoO_4.2H_2O$) ghi nhận tỷ lệ tái sinh chồi 100% sau 30 ngày (Bảng 3.2; Hình 3.1B).

Bảng 3.2. Ảnh hưởng của MoO_3NPs lên nhân nhanh chồi của mẫu đốt thân cây cúc sau 30 ngày nuôi cấy

MoO_3NPs (µg/L)	Tỷ lệ tái sinh chồi (%)	Số chồi/mẫu			Chiều cao chồi (cm)	Khối lượng tươi của chồi (mg)
		Tổng	≥ 2 cm	< 2 cm		
(-)	100 ± 0,00a	3,33 ± 0,06d*	1,33 ± 0,58c	2,00 ± 1,00b	2,40 ± 0,10c	260 ± 6,02e
(+)		7,33 ± 1,53ab	2,67 ± 0,58b	4,67 ± 1,15a	2,77 ± 0,06b	690 ± 6,02d
37,25		4,67 ± 0,58cd	0,33 ± 0,58c	4,33 ± 0,58a	1,60 ± 0,10e	1160 ± 17,10bc
74,5		6,00 ± 1,00bc	0,67 ± 0,58c	5,33 ± 1,53a	1,70 ± 0,10e	1120 ± 2,89c
149		7,00 ± 1,00ab	5,00 ± 1,00a	2,00 ± 1,00b	3,23 ± 0,25a	1870 ± 9,71a
223,5		7,00 ± 1,00ab	2,67 ± 0,58b	4,33 ± 0,58a	2,10 ± 0,10d	1370 ± 4,73b
298		8,00 ± 1,00a	2,67 ± 0,58b	5,33 ± 1,14a	1,63 ± 0,06e	1370 ± 23,39b

**Giá trị trung bình ± SD (Sai số chuẩn) và các chữ cái (a, b,...) trong một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với p<0,05 (Duncan's test).*

(-) Đối chứng âm: MT CC0 loại bỏ $Na_2MoO_4.2H_2O$

(+) Đối chứng dương: MT CC0 chứa $Na_2MoO_4.2H_2O$

Số lượng chồi trên mỗi mẫu (7,00 - 8,00 chồi) thu được tối ưu ở nghiệm thức bổ sung gấp 1 - 2 lần nồng độ MoO_3NPs; tuy nhiên, chồi lớn hơn 2 cm là tối ưu nhất

ở nghiệm thức 149,00 µg/L MoO_3NPs với số lượng chồi được ghi nhận là 5 chồi/mẫu. Điều này cho thấy MoO_3NPs ảnh hưởng lên sự tái sinh chồi và chất lượng chồi. Ngoài ra, như chiều cao chồi (3,23 cm) và khối lượng tươi (1870 mg) cũng tối ưu ở nghiệm thức này (Bảng 3.2).

Đối với mẫu chồi ngọn, kết quả cho thấy ở nghiệm thức (-), sự vắng mặt của Mo đã gây ảnh hưởng đến sự sinh trưởng tiếp theo của chồi cây cúc sau 30 ngày; chồi thu được từ nghiệm thức này có kích thước nhỏ, hình thành mô sẹo dưới gốc, lá nhỏ, cụp và vàng (Hình 3.2).

Bảng 3.3. Ảnh hưởng của MoO_3NPs lên nhân nhanh chồi của mẫu chồi ngọn cây cúc sau 30 ngày nuôi cấy

MoO_3NPs (µg/L)	**Số chồi**	**Chiều cao chồi (cm)**	**Số lá**	**Số đốt**	**Chiều dài lá (cm)**	**SPAD**	**Khối lượng tươi của chồi (mg)**
(-)	1,00 ± 0,00b*	3,17 ± 1,00b	8,67 ± 4,67bc	3,67 ± 0,58c	1,10 ± 0,00ab	14,00 ± 4,36b	230 ± 4,88b
(+)	1,67 ± 0,58b	4,90 ± 0,36a	12,00 ± 7,00ab	4,67 ± 0,58c	1,17 ± 0,15ab	29,07 ± 4,29a	630 ± 14,71ab
37,25	1,67 ± 0,58b	3,67 ± 0,58b	7,67 ± 3,37c	7,00 ± 0,00b	1,17 ± 0,06ab	15,00 ± 5,53b	260 ± 1,64b
74,5	1,67 ± 0,58b	5,13 ± 0,32a	10,33 ± 8,00ab	8,00 ± 0,00ab	1,20 ± 0,20ab	29,60 ± 4,29a	740 ± 12,92a
149	3,00 ± 0,00a	5,40 ± 0,17a	14,00 ± 8,67a	8,67 ± 0,58a	1,30 ± 0,17a	31,17 ± 12,97a	980 ± 6,73a
223,5	1,00 ± 0,00b	3,10 ± 0,56b	8,67 ± 0,58bc	5,00 ± 0,00c	1,07 ± 0,06ab	25,93 ± 8,59ab	510 ± 1,64ab
298	1,00 ± 0,00b	2,93 ± 0,81b	6,67 ± 0,58c	4,33 ± 0,58c	0,97 ± 0,15b	24,07 ± 6,95ab	190 ± 2,95b

**Giá trị trung bình ± SD (Sai số chuẩn) và các chữ cái (a, b,...) trong một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p<0,05$ (Duncan's test).*

(-) Đối chứng âm: MT CC0 loại bỏ $Na_2MoO_4.2H_2O$.

(+) Đối chứng dương: MT CC0 chứa $Na_2MoO_4.2H_2O$.

(-) (+) 37,25 µg/L 74,5 µg/L 149 µg/L 223,5 µg/L 298 µg/L

Hình 3.2. Chồi được nhân nhanh từ mẫu cấy chồi ngọn cây cúc sau 30 ngày nuôi cấy trên môi trường thay thế muối $NaMoO_4$ bằng MoO_3NPs ở các nồng độ khác nhau.

(-) Đối chứng âm: MT CC0 loại bỏ $Na_2MoO_4.2H_2O$.

(+) Đối chứng dương: MT CC0 chứa $Na_2MoO_4.2H_2O$.

Thước đo = 2 cm.

Khi nồng độ MoO_3NPs trong MT tăng lên (37,25 – 149,00 µg/L) thì sự sinh trưởng của các chồi cây cúc cũng tốt hơn. Đặc biệt, ở nghiệm thức 149,00 µg/L MoO_3NPs, số lượng chồi (3,00 chồi/mẫu), chiều cao chồi (5,4 cm), số lá (14,00 lá/chồi), số đốt (8,67 đốt/chồi), chiều dài lá (1,30 cm), SPAD (31,17) và khối lượng tươi (980 mg) thu được cao nhất khi so sánh với các nghiệm thức khác. Tuy nhiên, khi nồng độ MoO_3NPs quá cao (223,5 - 298 µg/L), khả năng sinh trưởng của các chồi cúc lại giảm dần (Bảng 3.3).

Mo, một ion kim loại thiết yếu được thực vật hấp thụ tự nhiên, là thành phần chính của một số enzyme (nitrat reductase, xanthine dehydrogenase và aldehyde oxidase) trong thực vật [143]. Nồng độ của Mo trong đất nông nghiệp dao động từ 0,2 đến 5,0 mg/kg [144], và nồng độ cao hơn 1000 mg/kg (hoặc 1000 ppm) trong khối lượng khô có thể gây độc [145]. Thiếu Mo gây ra sự tích tụ nitrat trong thực vật [146]. Hơn nữa, MoO_3NPs có thể được dùng làm phân bón bổ sung vi lượng để dễ dàng cung cấp Mo cho cây trồng trong điều kiện thiếu hụt [147]. Mặc dù có rất ít nghiên cứu về MoO_3NPs nhưng chúng đã cho thấy tác dụng đối với sự nảy mầm của hạt, enzyme kháng oxy hóa [148], đa dạng của vi sinh vật vùng rễ [149], phát sinh hình thái, hàm lượng dinh dưỡng và cân bằng ion của thực vật [150]. Đáng chú ý, nghiên cứu này đã tìm ra vai trò mới của MoO_3NPs đối với sự sinh trưởng của cây con. Những phát hiện của nghiên cứu này góp phần hiểu biết về ảnh hưởng của MoO_3NPs đối với sự sinh trưởng của cây con, làm sáng tỏ vai trò tiềm năng của

MoO_3NPs như một loại phân bón và bổ sung vi lượng cho sự sinh trưởng của cây trồng.

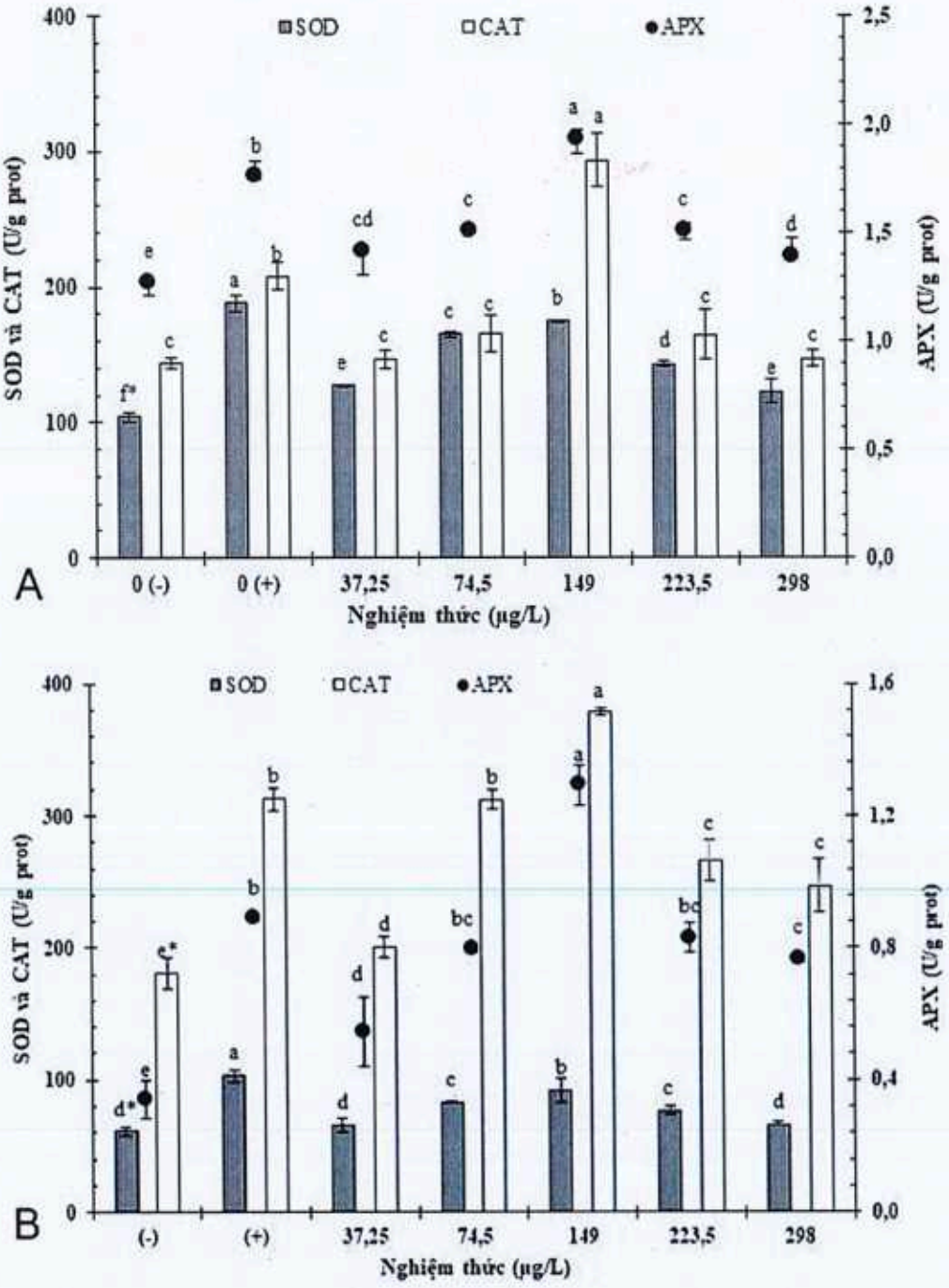
Kết quả của nghiên cứu đã chứng minh vai trò của MoO_3NPs lên sự phát sinh hình thái *in vitro*, sinh trưởng tiếp theo của mẫu cấy cây cúc và có vai trò thay thế cho $Na_2MoO_4.2H_2O$ trong MT MS, qua đó giúp bổ sung vi lượng ở dạng nano nhằm cải thiện khả năng sinh trưởng của cụm chồi hay cây ở điều kiện *in vitro*.

Enzyme kháng oxy hóa

Đối với giai đoạn tái sinh chồi từ mẫu lá, tác dụng tối ưu của MoO_3NPs trong việc gia tăng hoạt độ của các enzyme kháng oxy hóa cũng được ghi nhận trong nghiên cứu này. Hoạt độ của enzyme kháng oxy hóa ở nghiệm thức bổ sung 149,00 µg/L MoO_3NPs tốt hơn so với chúng ở nghiệm thức đối chứng (+) (trừ SOD) và các nghiệm thức bổ sung khác. Sự tăng trưởng của cây cũng giảm tương tự khi Mo không được bổ sung vào MT dinh dưỡng cũng phản ánh hoạt độ của hệ enzyme kháng oxy hóa giảm mạnh. Ngoài ra, hoạt động của các enzyme này bị ức chế do dư thừa Mo (Hình 3.3A).

Đối với giai đoạn nhân nhanh chồi từ mẫu đốt thân, các kết quả tương đồng được ghi nhận trong nhân chồi cây cúc, SOD, CAT và APX giảm do thừa hoặc thiếu Mo trong MT nuôi cấy (Hình 3.2). Ngược lại, nồng độ tối ưu (đối chứng (+) và 149,00 µg/L MoO_3NPs) cho thấy tác dụng tích cực đối với sự tăng trưởng và các chỉ tiêu sinh lý và sinh hóa (Hình 3.3B). Cụ thể, tác dụng có lợi của Mo tốt hơn đáng kể khi nó hiện diện ở dạng hạt nano so với dạng ion.

Ở mẫu chồi ngọn, hoạt độ của enzyme ở nghiệm thức bổ sung 149,00 µg/L MoO_3NPs cao hơn so với đối chứng (+) (ngoại trừ SOD) và các nghiệm thức MoO_3NPs khác. Sự tăng trưởng của cây cũng giảm tương tự khi Mo không được bổ sung vào MT dinh dưỡng cũng phản ánh hoạt động của hệ enzyme kháng oxy hóa giảm mạnh. Ngoài ra, hoạt động của các enzym này bị ức chế khi có quá nhiều Mo (Hình 3.4). Kết quả này cho thấy tác dụng tích cực của MoO_3NPs đối với sự tăng trưởng và các chỉ tiêu sinh lý và sinh hóa.

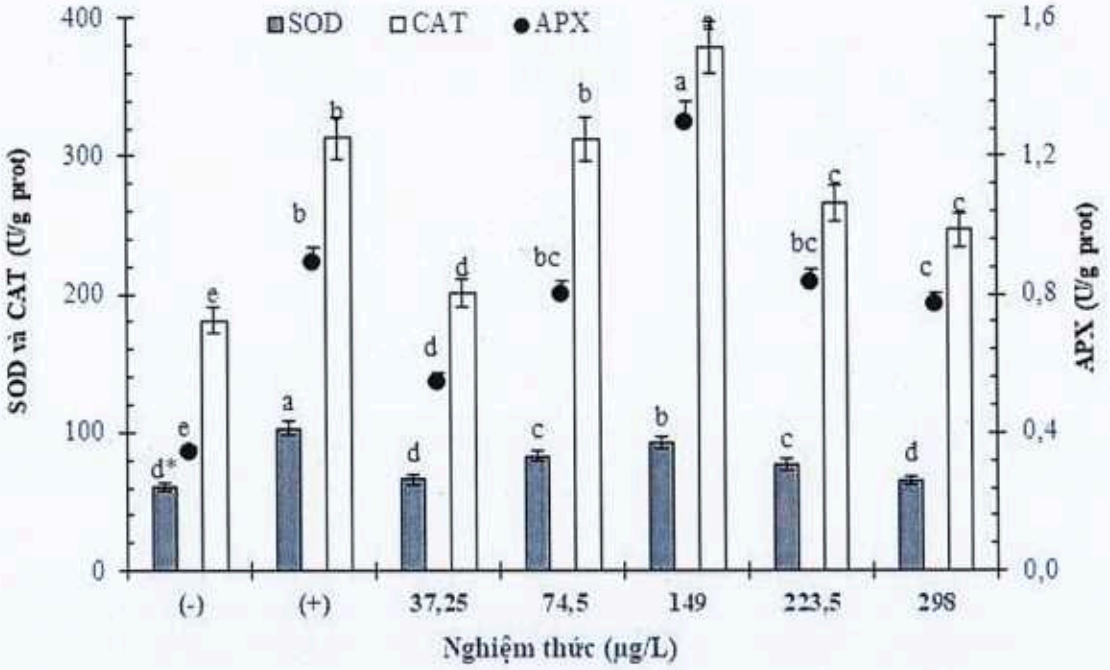


Hình 3.3. Hoạt độ của enzyme kháng oxy hóa (SOD, APX và CAT) của mẫu cấy lá (A) và mẫu đoạn thân (B) sau 30 ngày nuôi cấy.

(-) Đối chứng âm: MT loại bỏ $Na_2MoO_4.2H_2O$.

(+) Đối chứng dương: MT chứa $Na_2MoO_4.2H_2O$.

**Giá trị trung bình ± SD (Sai số chuẩn) và các chữ cái (a, b,...) trong một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p<0,05$ (Duncan's test).*



Hình 3.4. Hoạt độ của enzyme kháng oxy hóa (SOD, APX và CAT) trong chồi cây cúc sau 30 ngày nuôi cấy trên môi trường thay thế muối $Na_2MoO_4.2H_2O$ bằng MoO_3NPs.

(-) Đối chứng âm: MT loại bỏ $Na_2MoO_4.2H_2O$.

(+) Đối chứng dương: MT chứa $Na_2MoO_4.2H_2O$.

**Giá trị trung bình ± SD (Sai số chuẩn) và các chữ cái (a, b,...) trong một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p<0,05$ (Duncan's test).*

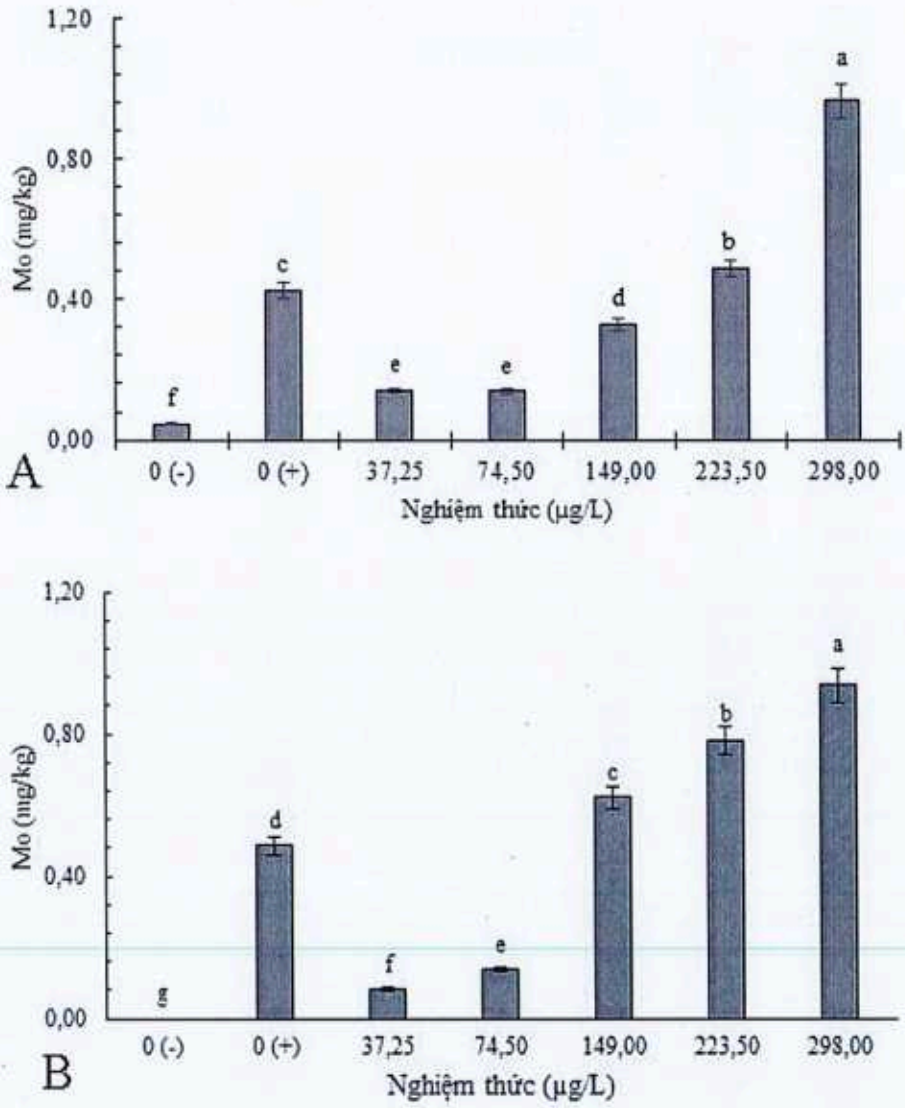
Mo có tác động lên các enzyme chịu trách nhiệm cho quá trình dị hóa purine, sinh tổng hợp ureide, sinh tổng hợp ABA và oxy hóa sulfite trong cây họ đậu [151, 152]. Việc sử dụng phân bón Mo thông thường, chẳng hạn như ammonium heptamolybdate, ammonium dimolybdate và natri molybdate, gây lo ngại do độ tinh khiết thấp hơn của chúng, đưa các hợp chất khác vào đất. Trong khi đó, hạt nano Mo có độ tinh khiết 99%, làm giảm khả năng tích hợp các yếu tố không mong muốn [153, 154]. Ngoài ra, Mo có vai trò trong sinh tổng hợp Moco và enzyme molybdo, ảnh hưởng đến quá trình chuyển đổi GTP và điều chỉnh biểu hiện gen [155, 156].

Dư lượng Mo của cây cúc nuôi cấy trên môi trường thay thế muối $Na_2MoO_4.2H_2O$ bằng MoO_3NPs

Dữ liệu thu được sau 30 ngày nuôi cấy cho thấy dư lượng Mo trong cây cúc khi nuôi cấy trên MT thay thế $Na_2MoO_4.2H_2O$ bằng MoO_3NPs và các nghiệm thức đối chứng (Hình 3.5, 3.6). Kết quả trong giai đoạn phát sinh hình thái và nhân chồi cho

thấy, nồng độ Mo tăng dần theo nồng độ thêm vào. Trong nghiệm thức đối chứng (-), hàm lượng của Mo được phát hiện ngay cả khi không có $Na_2MoO_4.2H_2O$, cho thấy sự tích tụ còn sót lại từ MT nuôi cấy trước đó. Đáng chú ý, các mẫu lá vẫn duy trì màu xanh của chúng và các chồi cây cúc phát triển mạnh mà không bị chuyển sang màu nâu (Hình 3.1). Tuy nhiên, nồng độ Mo này không đủ cho cả quá trình phát sinh hình thái và nhân chồi (Hình 3.1). Ngoài ra, nghiên cứu này còn chứng minh rằng các chất dinh dưỡng được hấp thụ hiệu quả và nhanh chóng hơn bởi các mẫu ở kích thước hạt nano khi nồng độ Mo trong MT nuôi cấy là 149,00 µg/L (Hình 3.7). Những phát hiện này cho thấy rằng MoO_3NPs thay thế muối ion trong MT nuôi cấy đã gia tăng khả năng hấp thụ, bổ sung vi khoáng cho thực vật để hỗ trợ quá trình sinh tổng hợp và các hoạt động quan trọng.

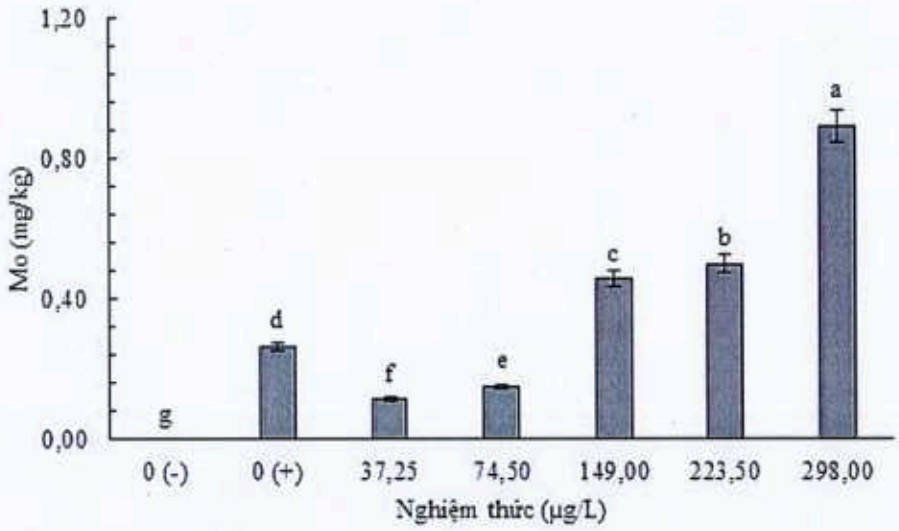
Kết quả phân tích dư lượng Mo trong chồi cây cúc nuôi cấy trên MT thay thế $Na_2MoO_4.2H_2O$ bằng MoO_3NPs được ghi nhận ở hình 3.6. Dư lượng Mo tăng dần theo nồng độ Mo có trong MT nuôi cấy. Dư lượng Mo vẫn được phát hiện ở MT không có $Na_2MoO_4.2H_2O$ (nghiệm thức (-)); điều này cho thấy sự tích tụ Mo vẫn còn sót lại từ giai đoạn nuôi cấy trước đó. Tuy nhiên, nồng độ Mo này không đủ cho sinh trưởng của chồi (Hình 3.6). Bên cạnh đó, các chất dinh dưỡng (Ca, Mg, K, Cu, Fe) được hấp thụ nhanh hơn bởi các mẫu thực vật khi ở kích thước NPs.



Hình 3.5. Dư lượng Mo trong mẫu cấy lá (A) và mẫu đoạn thân (B) cây cúc sau 30 ngày nuôi cấy trên môi trường thay thế muối $Na_2MoO_4.2H_2O$ bằng MoO_3NPs.

(-) Đối chứng âm: MT loại bỏ $Na_2MoO_4.2H_2O$.

(+) Đối chứng dương: MT chứa $Na_2MoO_4.2H_2O$.



Hình 3.6. Dư lượng Mo trong mẫu chồi ngọn cây cúc được nuôi cấy trên môi trường nuôi cấy thay thế muối $Na_2MoO_4.2H_2O$ bằng MoO_3NPs.

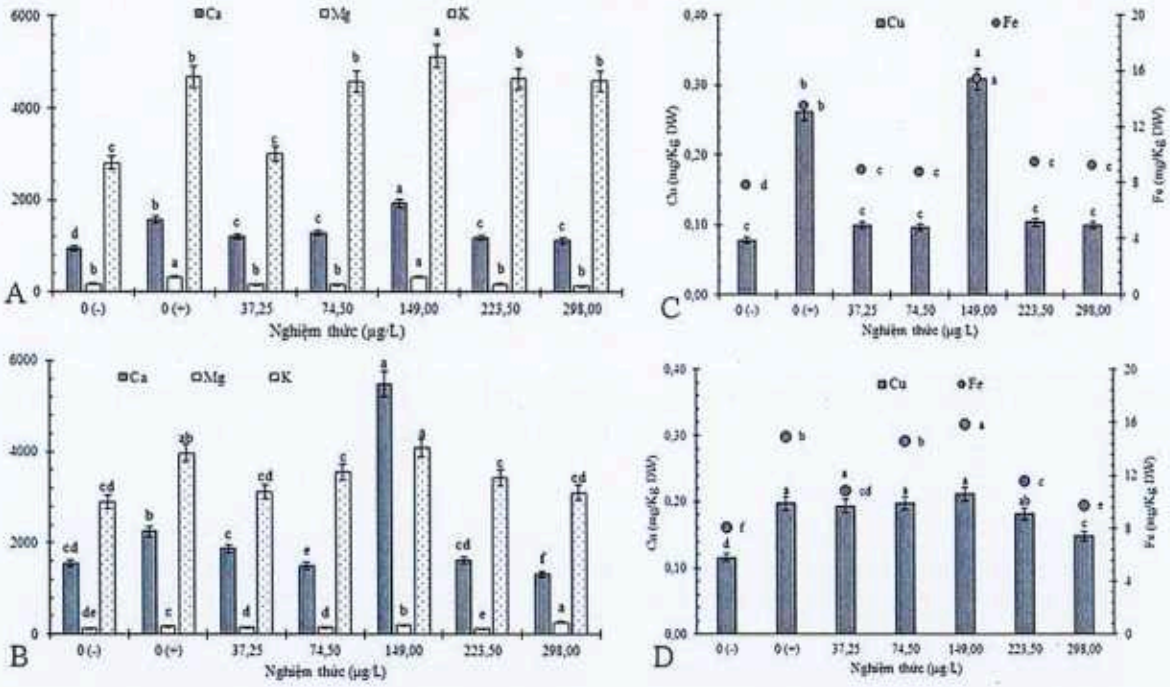
(-) *Đối chứng âm: MT loại bỏ $Na_2MoO_4.2H_2O$.*

(+) *Đối chứng dương: MT chứa $Na_2MoO_4.2H_2O$.*

Khả năng hấp thụ khoáng của cây cúc nuôi cấy trên môi trường thay thế muối $Na_2MoO_4.2H_2O$ bằng MoO_3NPs

Tác động tích cực của Mo đối với sự hấp thụ chất dinh dưỡng đã được quan sát thấy trong nghiên cứu này (Hình 3.7, 3.8). Khả năng hấp thu dinh dưỡng của hoa cúc ở đối chứng (-) là thấp nhất. Ngoài ra, khả năng hấp thu khoáng chất Ca, Mg, K, Cu, Fe tăng dần theo nồng độ MoO_3NPs trong MT nuôi cấy (37,25 - 149 µg/L), thể hiện khả năng hấp thu dinh dưỡng thiết thực. Kết quả tối ưu được ghi nhận ở nghiệm thức 149 µg/L MoO_3NPs. Mặc dù nồng độ Mo trong nghiệm thức đối chứng dương tương đương với nghiệm thức 149 µg/L MoO_3NPs, hiệu quả hấp thụ chất dinh dưỡng trong nghiệm thức này không tối ưu (Hình 3.7, 3.8). Vì vậy, ở mức độ nano, Mo có tác động tích cực lên sự hấp thụ khoáng. Tuy nhiên, nồng độ MoO_3NPs quá cao (223,5 và 298 µg/L) gây độc hại và làm giảm khả năng hấp thu của cây cúc (Hình 3.7, 3.8).

d



Hình 3.7. Hấp thụ khoáng đa lượng (Ca, Mg và K) và vi lượng (Cu và Fe) trong giai đoạn tái sinh chồi của mẫu cấy lá (A, C) và nhân nhanh chồi của mẫu đoạn thân (B, D) cây cúc trên môi trường nuôi cấy thay thế muối $Na_2MoO_4.2H_2O$ bằng MoO_3NPs.

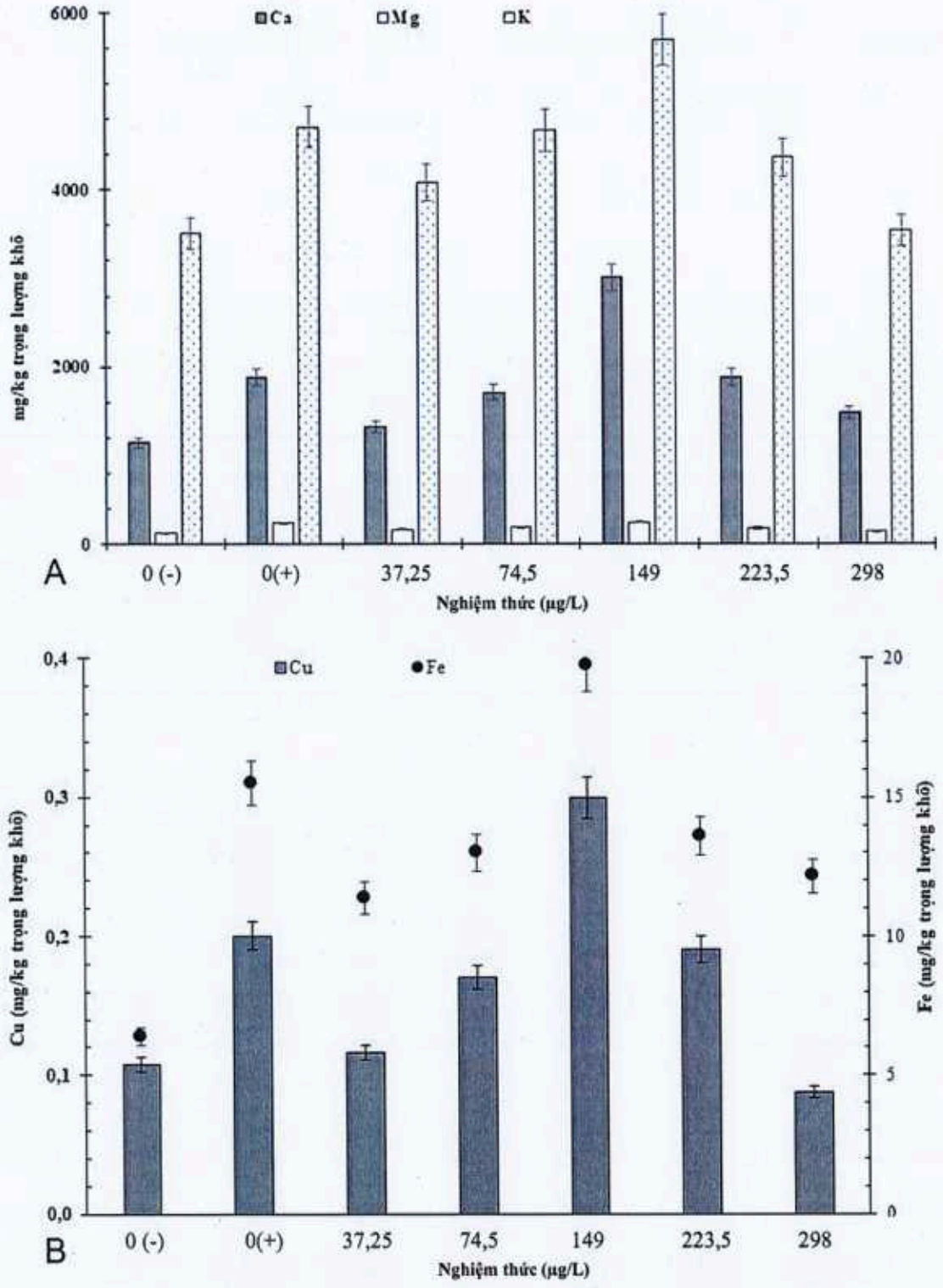
(-) Đối chứng âm: MT loại bỏ $Na_2MoO_4.2H_2O$.

(+) Đối chứng dương: MT chứa $Na_2MoO_4.2H_2O$.

Đối với mẫu cấy đoạn thân, khả năng hấp thụ chất dinh dưỡng đã được quan sát thấy trong nghiên cứu này (Hình 3.7, 3.8). Chồi cây cúc ở nghiệm thức (-) ghi nhận khả năng hấp thu các khoáng là thấp nhất. Trong đó, khả năng hấp thu khoáng (Ca, Mg, K, Cu, Fe) tăng dần theo sự tăng của MoO_3NPs trong MT nuôi cấy (37,25 – 149,00 µg/L). Ở nghiệm thức 149,00 µg/L MoO_3NPs ghi nhận khả năng hấp thu khoáng cao hơn các nghiệm thức khác (Hình 3.7, 3.8). Ở nồng độ MoO_3NPs quá cao (223,50 hoặc 298,00 µg/L) khả năng hấp thu chất dinh dưỡng ở đối tượng này lại giảm và làm giảm khả năng sinh trưởng (Hình 3.7, 3.8).

Kết quả nghiên cứu cho thấy các nguyên tố vi lượng Mo ở dạng nano có khả năng thúc đẩy đáng kể sự hấp thu các nguyên tố dinh dưỡng khác trong cây. Hiện tượng này phản ánh một cơ chế điều hòa phức hợp, trong đó các đặc tính vật lý – hóa học độc đáo của vật liệu nano tương tác với hệ thống sinh lý thực vật ở nhiều cấp độ.

Trước hết, kích thước nano và diện tích bề mặt riêng lớn làm tăng khả năng xâm nhập và phân bố của các vi lượng trong mô thực vật. Các hạt nano có thể đi vào rễ thông qua con đường apoplast, symplast hoặc cơ chế tương tự endocytosis, từ đó nâng cao sinh khả dụng so với dạng ion truyền thống [157]. Điều này đặc biệt quan trọng đối với các nguyên tố như Zn, Fe và Mo – là cofactor của các enzyme then chốt trong đồng hóa dinh dưỡng. Sự gia tăng hoạt tính của các enzyme như nitrate reductase và nitrogenase dẫn đến tăng cường chuyển hóa nitơ và tổng hợp protein, từ đó làm gia tăng nhu cầu nội tại đối với các nguyên tố dinh dưỡng khác [158]. Tuy nhiên, cần lưu ý rằng hiệu ứng này phụ thuộc mạnh vào liều lượng và dạng nano; ở nồng độ cao, NPs có thể gây ức chế enzyme do stress oxy hóa [159]. NPs có khả năng điều hòa hệ thống vận chuyển qua màng tế bào. Một số nghiên cứu cho thấy NPs có thể ảnh hưởng đến tính linh động của màng sinh chất và hoạt động của các kênh ion, từ đó làm tăng dòng vận chuyển dinh dưỡng vào tế bào [157]. Một yếu tố quan trọng khác là tác động của NPs lên cấu trúc hệ rễ và vùng rễ. Các nghiên cứu gần đây cho thấy NPs có thể kích thích sinh trưởng rễ thông qua điều hòa hormone như auxin, làm tăng diện tích hấp thu [160]. Ngoài ra, NPs còn làm tăng hiệu suất quang hợp thông qua việc cải thiện hàm lượng diệp lục và hoạt tính enzyme quang hợp [161]. Sự gia tăng quang hợp tạo ra nhu cầu dinh dưỡng cao hơn, hình thành cơ chế phản hồi dương thúc đẩy hấp thu khoáng. Đồng thời, khả năng tăng cường hệ thống chống oxy hóa giúp cây giảm stress phi sinh học, duy trì chức năng hấp thu trong điều kiện bất lợi [159].



Hình 3.8. Khả năng hấp thu khoáng đa lượng (Ca, Mg và K) và vi lượng (Cu và Fe) của mẫu chồi ngọn cây cúc nuôi cấy trên môi trường thay thế muối $Na_2MoO_4.2H_2O$ bằng MoO_3NPs.

(-) *Đối chứng âm: MT loại bỏ $Na_2MoO_4.2H_2O$.*

(+) *Đối chứng dương: MT chứa $Na_2MoO_4.2H_2O$.*

Các chất dinh dưỡng thiết yếu, bao gồm N, P, K, Cu, Fe, Mn, Zn và Mo, rất quan trọng cho sự sinh trưởng và năng suất của cây trồng [162, 163]. Sự thiếu hụt các chất dinh dưỡng đa lượng và vi lượng này làm gián đoạn sự phát triển của cây trồng, dẫn đến sản lượng cây trồng giảm đáng kể [164]. Mo gia tăng hoạt độ enzyme kháng oxy hóa, sản xuất axit abscisic (ABA), đồng hóa N và dinh dưỡng Fe, dẫn đến cải thiện sinh trưởng của cây và giảm stress oxy hóa [165-167]. Hàm lượng Mo không đủ có thể làm giảm hiệu quả của phân bón nitơ (N), dẫn đến năng suất cây trồng và trái cây giảm, đặc trưng là lá bất thường và tăng trưởng chậm [168]. Mo không thể thiếu trong quá trình chuyển hóa N, bao gồm cố định N, khử nitrat và đồng hóa N [153]. Ở cà chua, Mo hỗ trợ hấp thu Fe, trong khi ở cây lúa, phát triển trong MT giàu Fe sẽ tăng cường hấp thu Mo [154].

Sinh trưởng tiếp theo của cây cúc

Sau 15 ngày nuôi cấy, dư lượng MoO_3NPs còn lại trong mẫu chồi đã ảnh hưởng đến giai đoạn ra rễ *in vitro* của cây cúc (Hình 3.10 và 3.11). Nghiệm thức 149,00 µg/L MoO_3NPs vẫn cho thấy ưu thế ở tất cả các chỉ tiêu ở giai đoạn ra rễ: chiều cao cây (16,83 ± 0,25 cm), số lá/cây (13,67 ± 0,58), số rễ/cây (16,33 ± 0,58), chiều dài rễ (11,57 ± 0,21 cm), SPAD (57,93 ± 1,80) và khối lượng tươi (410 ± 50 mg). Trong thí nghiệm này, mặc dù dư lượng Mo ở nghiệm thức (+) cao hơn khi so sánh với MoO_3NPs ở nồng độ 37,25 và 74,50 µg/L, sự ra rễ và sinh trưởng của cây ở nghiệm thức này này không tối ưu bằng những cây ở nghiệm thức MoO_3NPs. Cây con ở nghiệm thức (+) có màu vàng, lá nhỏ, cụp; trong khi đó, ở các nghiệm thức thay thế $Na_2MoO_4.2H_2O$ bằng MoO_3NPs cây con có màu xanh đậm, lá to (Hình 3.9). Điều này có thể giải thích là do cấu trúc đặc biệt của Mo ở dạng nano có kích thước nhỏ và bề mặt tiếp xúc lớn hơn, từ đó giúp MoO_3NPs tăng cường hiệu quả tương tác so với $Na_2MoO_4.2H_2O$. Bên cạnh đó, cơ chế phóng thích từ từ giúp duy trì MoO_3NPs ở nồng độ tối ưu với thời gian dài hơn so với Mo^{2+} ở dạng ion [6].

Bảng 3.4. Sự sinh trưởng và ra rễ cây cúc có nguồn gốc từ mẫu đốt thân nuôi cấy trên môi trường thay thế muối $Na_2MoO_4.2H_2O$ bằng MoO_3NPs sau 15 ngày nuôi cấy

MoO_3NPs (µg/L)	Tỷ lệ ra rễ (%)	Chiều cao cây (cm)	Chiều dài rễ (cm)	SPAD	Khối lượng tươi của cây (mg)
(-)	100	9,17 ± 0,15e*	4,77 ± 0,31e	32,9 ± 1,97de	260 ± 30cd
(+)		10,3 ± 0,44d	5,63 ± 0,15d	40,97 ± 0,72b	350 ± 10b
37,25		9,3 ± 0,20e	5,37 ± 0,21d	31,1 ± 0,70e	280 ± 0,00cd
74,50		14,03 ± 0,21b	6,53 ± 0,21c	41,43 ± 1,19b	350 ± 30b
149,00		16,83 ± 0,25a	11,57 ± 0,21a	57,93 ± 1,80a	410 ± 50a
223,50		12,57 ± 0,15c	8,07 ± 0,21b	35,17 ± 1,55cd	320 ± 20bc
298,00		10,23 ± 0,25d	6,37 ± 0,25c	36,5 ± 1,6c	230 ± 60d

**Giá trị trung bình ± SD (Sai số chuẩn) và các chữ cái (a, b,...) trong một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với p<0,05 (Duncan's test).*

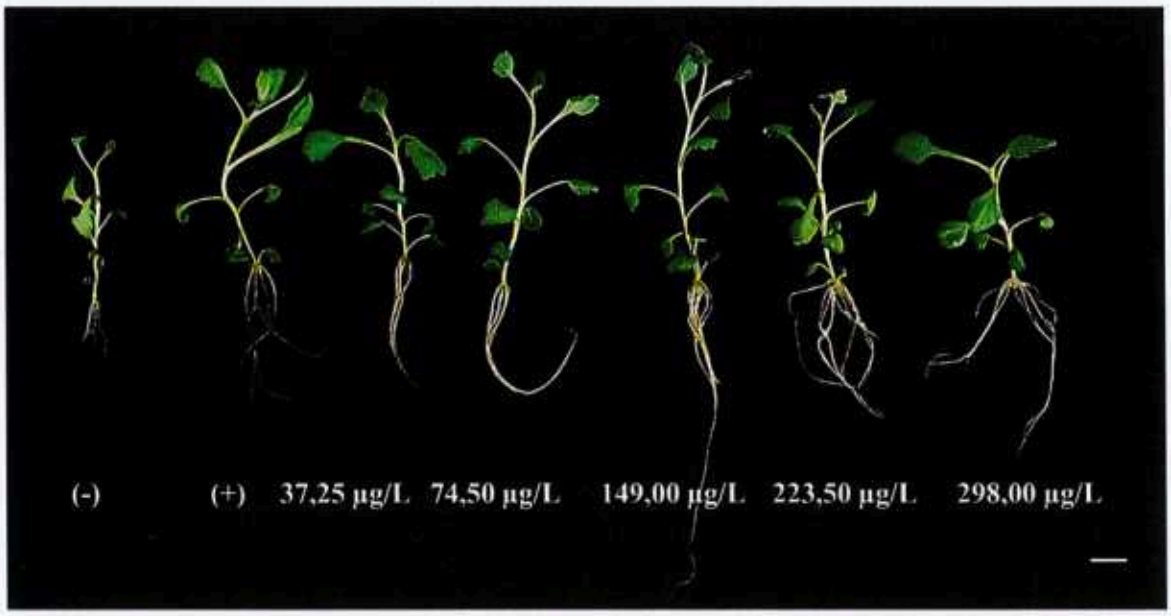
(-) *Đối chứng âm: MT CR0 loại bỏ $Na_2MoO_4.2H_2O$.*

(+) *Đối chứng dương: MT CR0 chứa $Na_2MoO_4.2H_2O$.*

Rễ có vai trò quan trọng để cây lấy nước, hấp thu chất dinh dưỡng từ các nguồn phân bố không đều và phản ứng với các yếu tố sinh học hoặc phi sinh học. Hệ thống rễ bị ảnh hưởng đáng kể bởi các tín hiệu N khác nhau và nguồn N có trong vùng rễ. Mo rất quan trọng cho quá trình đồng hóa và chuyển hóa nitơ. Mo góp phần đáng kể giúp gia tăng sự sinh trưởng của rễ lúa mì bằng cách thúc đẩy sản xuất oxide nitric, tạo điều kiện cho sự hấp thu và đồng hóa N hiệu quả cũng như điều chỉnh các biểu hiện gen NRT [169]. Trong khi đó, MoO_3NPs giúp tăng cường sự phát triển của cây lúa và sử dụng nitrat mà không gây độc tế bào [170]. Việc bổ sung Na_2MoO_4 và MoO_3NPs làm tăng các enzyme chuyển hóa nitơ quan trọng, thúc đẩy quá trình đồng hóa nitơ và hoạt động của enzyme. Việc bổ sung nguồn Mo đã cải thiện thể tích rễ, diện tích bề mặt và khả năng hấp thu chất dinh dưỡng, tăng axit hữu cơ có trọng lượng phân tử thấp và khả năng oxy hóa khử của rễ cho thấy khả năng thích ứng tốt hơn. Nhìn chung, MoO_3NPs có tiềm năng lớn làm phân bón molypden, thúc đẩy tăng

trưởng của cây lúa, nâng cao hiệu quả sử dụng nitơ và giảm thất thoát nitơ vào môi trường [170].

Nghiên cứu này đã chứng minh vai trò của MoO_3NPs như là sự thay thế cho $Na_2MoO_4.2H_2O$ trong nuôi cấy cây cúc ở các giai đoạn phát sinh hình thái *in vitro*. Tùy theo từng giai đoạn sinh trưởng, nồng độ MoO_3NPs tối ưu sẽ kích thích sinh trưởng, thay đổi sinh lý - sinh hóa liên quan đến sự hấp thụ các nguyên tố khoáng kim loại và sự thay đổi hoạt độ enzyme SOA, CAT và APX của mẫu cấy.

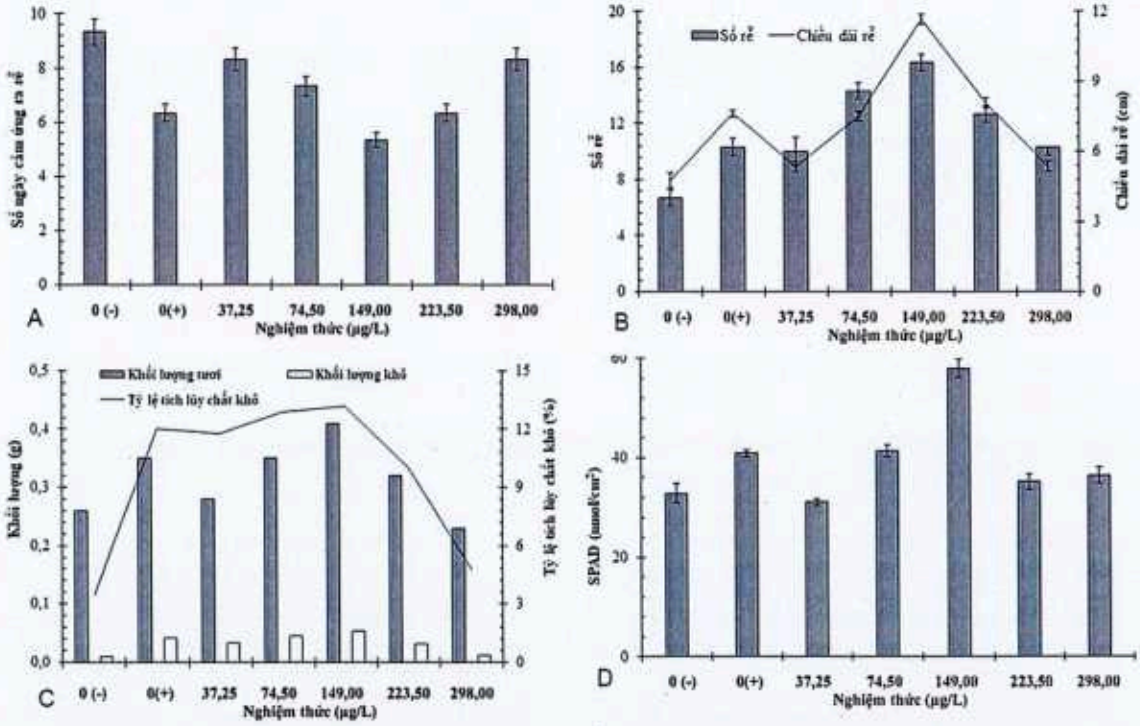


Hình 3.9. Ảnh hưởng của dư lượng MoO_3NPs lên khả năng ra rễ *in vitro* sau 15 ngày nuôi cấy.

(-) Đối chứng âm: Chồi thu được từ MT CR0 loại bỏ $Na_2MoO_4.2H_2O$.

(+) Đối chứng dương: Chồi thu được từ MT CR0 chứa $Na_2MoO_4.2H_2O$.

Thước đo = 2 cm.



Hình 3.10. Ảnh hưởng của dư lượng MoO_3NPs lên khả năng ra rễ *in vitro* của cây cúc sau 15 ngày nuôi cấy.

(-) Đối chứng âm: MT loại CR0 bỏ $Na_2MoO_4.2H_2O$.

(+) Đối chứng dương: MT CR0 chứa $Na_2MoO_4.2H_2O$.

(-) (+) 37,25 µg/L 74,50 µg/L 149,00 µg/L 223,50 µg/L 298,00 µg/L

Hình 3.11. Ảnh hưởng của dư lượng MoO_3NPs lên khả năng sinh trưởng của cây cúc *in vitro* sau 15 ngày nuôi cấy.

(-) Đối chứng âm: MT CR0 loại bỏ $Na_2MoO_4.2H_2O$.

(+) Đối chứng dương: MT CR0 chứa $Na_2MoO_4.2H_2O$.

Thước đo = 5 cm.

3.2. NGHIÊN CỨU THAY THẾ MUỐI $CoCl_2.6H_2O$ BẰNG CoNPs TRONG VI NHÂN GIỐNG CÂY TỬ LINH LAN, ĐỒNG TIỀN VÀ CÚC

3.2.1. Tái sinh chồi từ mẫu lá và sự sinh trưởng của chồi cây tử linh lan trên môi trường thay thế $CoCl_2.6H_2O$ bằng CoNPs

Sau 60 ngày, CoNPs có hiệu quả lên khả năng tái sinh chồi, khắc phục một số hiện tượng hình thái bất thường, sự thay đổi hàm lượng khí ethylene, enzyme kháng oxy hóa (Bảng 3.5; Hình 3.12 và 3.13) của mẫu cấy lá cây tử linh lan. Nghiệm thức 4,65 µg/L CoNPs cho hiệu quả tái sinh chồi tốt nhất với tổng số chồi trung bình lên đến 13,00 chồi/mẫu, số lượng chồi có kích thước > 1 cm đạt 7,67 chồi, chiều cao chồi (1,37 cm), khối lượng tươi (1535 mg) và khối lượng khô cụm chồi (212 mg). Chỉ số SPAD không có sự khác biệt giữa các nghiệm thức bổ sung CoNPs và đối chứng.

Bảng 3.5. Ảnh hưởng của CoNPs lên sự tái sinh chồi và sinh trưởng của cụm chồi sau 60 ngày nuôi cấy

CoNPs (µg/L)	Số chồi/mẫu		Chiều cao chồi (cm)	SPAD	Khối lượng tươi cụm chồi (mg)	Khối lượng khô cụm chồi (mg)
	Tổng số chồi	> 1 cm				
(+)	7,33c*	1,33e	0,67cd	27,00b	1047c	118e
(-)	6,67c	2,67d	0,43e	27,67b	760d	124de
1,55	9,33b	4,33c	0,57de	29,00ab	1360b	162c
3,10	10,67b	6,33b	0,80bc	28,33b	1384b	187b
4,65	13,00a	7,67a	1,37a	31,33a	1535a	212a
6,20	6,67c	4,67b	0,97b	26,67b	800 d	136d

**Giá trị trung bình ± SD (Sai số chuẩn) và các chữ cái (a, b,...) trong một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với p<0,05 (Duncan's test).*

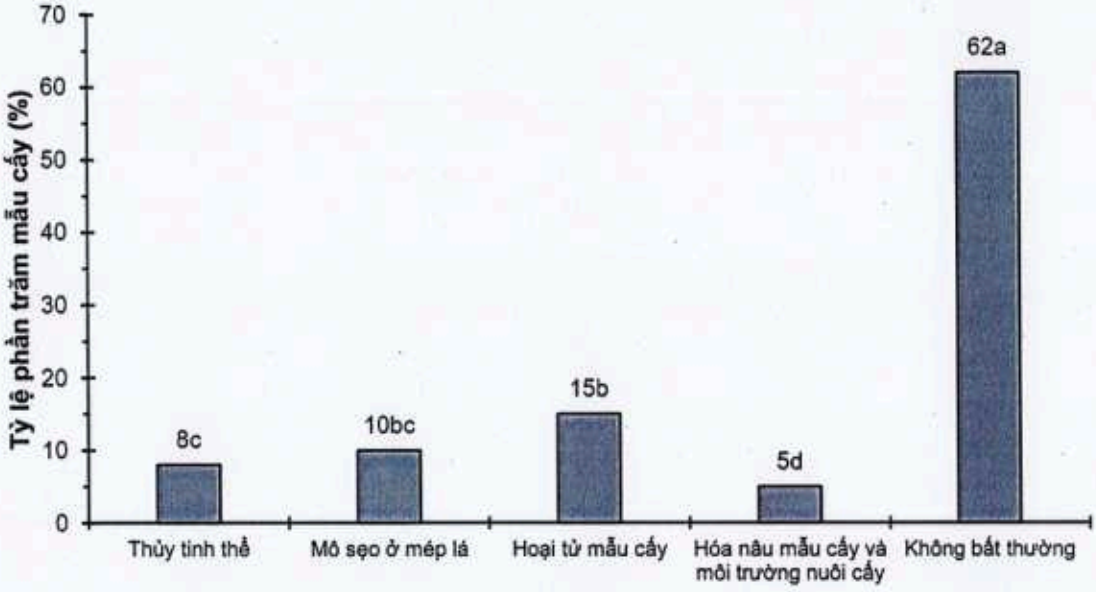
(-) *Đối chứng âm: MT AC0 loại bỏ $CoCl_2$.*

(+) *Đối chứng dương: MT AC0 chứa $CoCl_2$.*

(-) (+) 1,55 µg/L 3,10 µg/L 4,65 µg/L 6,20 µg/L

Hình 3.12. Chồi có nguồn gốc từ mẫu cấy lá cây tử linh lan được nuôi cấy trên môi trường thay thế $CoCl_2.6H_2O$ bằng CoNPs ở các nồng độ khác nhau sau 60 ngày (hàng trên) và 30 ngày (hàng dưới).

Thước đo = 1cm



Hình 3.13. Ảnh hưởng của 4,65 µg/L CoNPs lên khả năng khắc phục một số hiện tượng bất thường trong giai đoạn tái sinh chồi cây tử linh lan sau 60 ngày nuôi cấy.

Ngoài ra, khí ethylene thu nhận trong trong đĩa nuôi cấy và hoạt độ enzyme kháng oxy hóa ở nghiệm thức bổ sung CoNPs cũng ghi nhận sự khác biệt có ý nghĩa sau 60 ngày (Bảng 3.6). Nghiệm thức 4,65 µg/L CoNPs ghi nhận hàm lượng ethylene thấp hơn so với đối chứng (0,87 ppm so với 1,37 ppm); trong khi đó, hoạt độ enzyme CAT (105,67 U/g) và hoạt độ APX (2,00 U/g) lại cao hơn so với đối chứng (Bảng 3.6). Hơn nữa, hiện tượng bất thường về hình thái trong giai đoạn tái sinh chồi như

thủy tinh thể (8%), mô sẹo ở mép lá (10%), hoại tử mẫu cấy (15%), hóa nâu mẫu cấy và MT nuôi cấy (5%) giảm ở nghiệm thức bổ sung 4,65 µg/L CoNPs so với đối chứng được ghi nhận.

Bảng 3.6. Hàm lượng khí ethylene trong đĩa nuôi cấy và hoạt độ enzyme kháng oxy hóa của cụm chồi trên môi trường có bổ sung CoNPs sau 60 ngày nuôi cấy

CoNPs (µg/L)	Ethylene (ppm)	CAT (U/g)	APX (U/g)
(+)	1,37 ± 0,02a*	80,00 ± 1,00d	0,55 ± 0,01e
(-)	1,28 ± 0,02b	87,33 ± 2,08c	0,93 ± 0,03d
1,55	1,19 ± 0,01c	97,33 ± 1,52b	1,26 ± 0,03c
3,10	1,11 ± 0,02d	98,33 ± 2,08b	1,57 ± 0,06b
4,65	0,87 ± 0,06e	105,67 ± 1,15a	2,00 ± 0,04a
6,20	1,31 ± 0,02b	80,33 ± 2,51d	1,27 ± 0,47c

**Giá trị trung bình ± SD (Sai số chuẩn) và các chữ cái (a, b,...) trong một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với p<0,05 (Duncan's test).*

(-) *Đối chứng âm: MT AC0 loại bỏ $CoCl_2$.*

(+) *Đối chứng dương: MT AC0 chứa $CoCl_2$.*

CoNPs thay thế $CoCl_2.6H_2O$ trong MT giúp gia tăng chiều cao chồi và số chồi trên cây bạc hà [50], cây hoa hồng [13]. Ngoài ra, hiệu quả của CoNPs trong việc hạn chế một số hiện tượng hình thái bất thường, gia tăng hiệu quả nhân chồi thông qua gia tăng khả năng sinh trưởng của chồi, giảm khí ethylene và tăng CAT và APX. Kết quả này cũng tương đồng nghiên cứu về tác động của CoNPs làm tăng CAT, APX và SOD ở giai đoạn nhân nhanh chồi cây hoa hồng và đồng tiền [13, 63]. Kết quả nghiên cứu này cũng cho thấy 6,2 µg/L CoNPs làm giảm thủy tinh thể và vàng lá so với đối chứng (không có CoNPs), trong đó 6,2 mg/L CoNPs làm giảm những điều này từ 2 đến 3 lần so với đối chứng (Hình 3.13A). Sự sinh trưởng và năng suất như hàm lượng diệp lục, đường, tinh bột, axit amin, hàm lượng protein, khoáng vĩ mô và vi lượng đều tăng so với đối chứng [171]. Trong nghiên cứu này, lá (không xử lý CoNPs) chuyển sang màu vàng, trong khi lá vẫn xanh và không xuất hiện hình thái bất thường

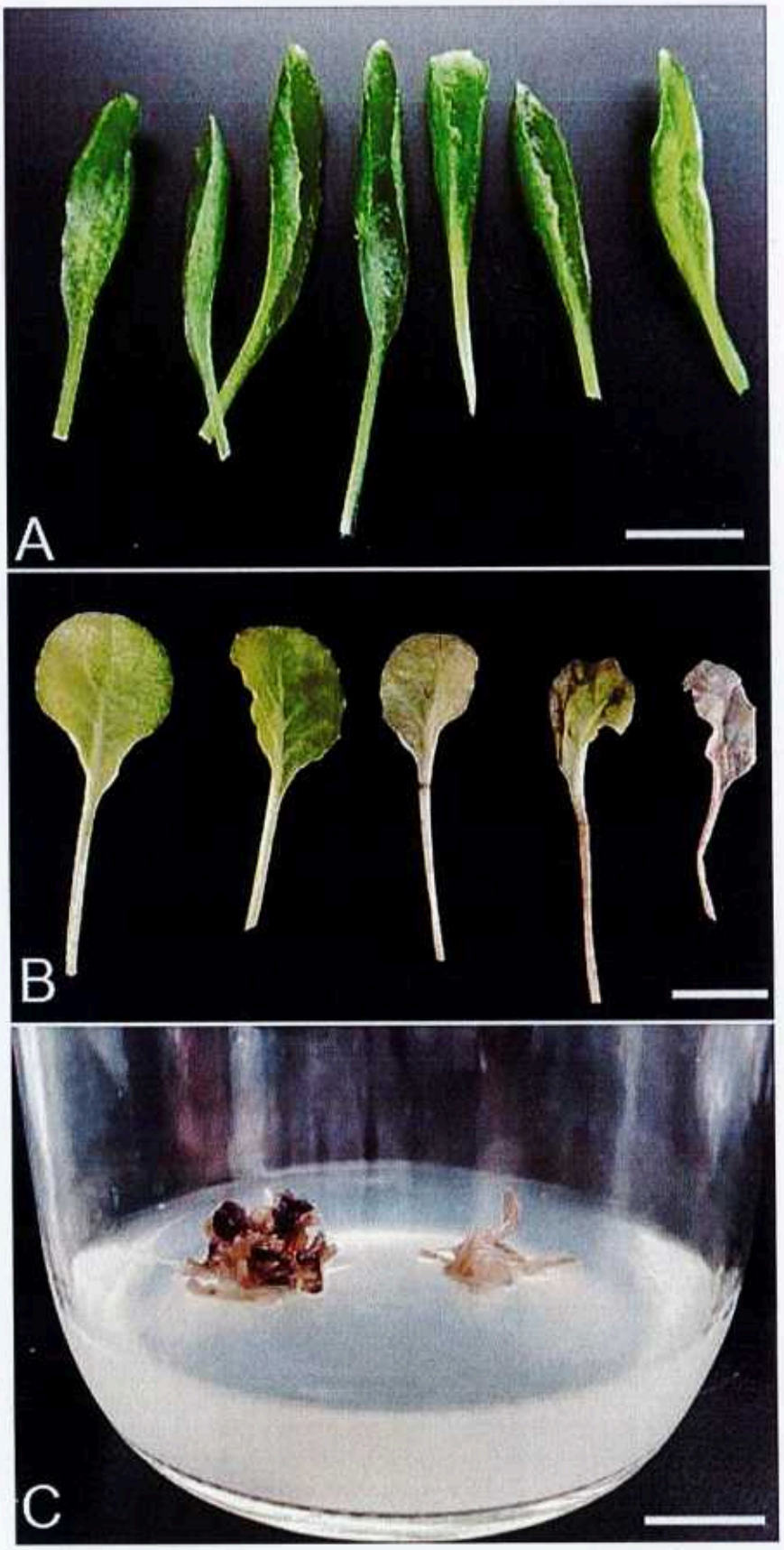
(xử lý CoNPs), chứng tỏ CoNPs ức chế tổng hợp ethylene, làm chậm lão hóa của cụm chồi [172].

3.2.2. Sự sinh trưởng của chồi cây đồng tiền được nuôi cấy trên môi trường thay thế $CoCl_2.6H_2O$ bằng CoNPs

Hiện tượng bất thường trong vi nhân giống cây đồng tiền

Trong quá trình nhân chồi và ra rễ *in vitro*, các hiện tượng bất thường như thủy tinh thể (Hình 3.14A), vàng lá (Hình 3.14B) và mẫu hóa nâu (Hình 3.14C) được quan sát và ghi nhận sau 30 ngày. Hiện tượng thủy tinh thể (23,33% ở giai đoạn nhân chồi và 27,67% ở giai đoạn ra rễ *in vitro*) và vàng lá (23,33% ở giai đoạn nhân chồi và 20,00% ở giai đoạn ra rễ *in vitro*) là cao hơn hơn so với nghiệm thức được bổ sung 6,2 µg/L CoNPs ở giai đoạn nhân chồi và 4,65 µg/L CoNPs ở giai đoạn ra rễ.

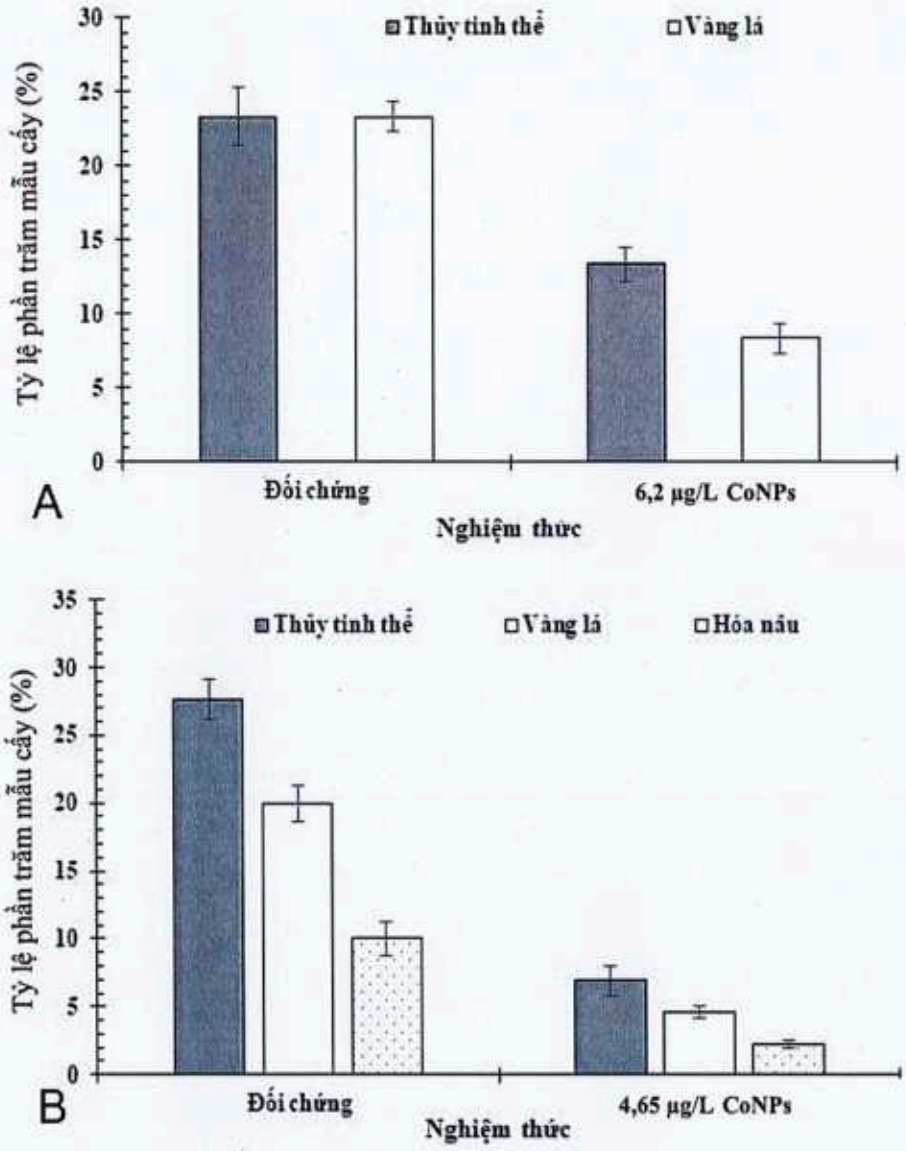
MT DC0 bổ sung CoNPs đã ảnh hưởng đến nhân chồi và giảm các bất thường như thủy tinh thể và vàng lá sau 30 ngày (Bảng 3.7; Hình 3.15A). Số lượng chồi cao nhất thu được ở MT DC0 bổ sung 6,20 µg/L CoNPs ghi nhận số lượng chồi lớn hơn 2 cm với 6,67 chồi, trong khi các chỉ tiêu sinh trưởng của chồi tối ưu hơn so với các nghiệm thức CoNPs khác (Bảng 3.7).



Hình 3.14. Một số hiện tượng bất thường trong vi nhân giống cây đồng tiền.

A: Thủy tinh thể; **B:** Vàng lá; **C:** Hóa nâu mẫu cấy

Thước đo = 1 cm.



Hình 3.15. Tỷ lệ xuất hiện các hiện tượng bất thường trong quá trình nhân giống cây đồng tiền trên môi trường thay thế $CoCl_2.6H_2O$ bằng CoNPs sau 30 ngày nuôi cấy

A: giai đoạn nhân chồi, **B:** giai đoạn ra rễ

Hơn nữa, hiện tượng hóa nâu hoặc hoại tử mẫu cũng ảnh hưởng tiêu cực đến hiệu quả nhân giống. Trong nghiên cứu này, hiện tượng hóa nâu mẫu cấy ghi nhận ở mức nghiêm trọng là mẫu cấy chuyển sang màu nâu hoặc đen, hoại tử (Hình 3.14C). Hiện tượng bất thường này đã được quan sát thấy ở chuối do phenol hình thành từ vết thương của mẫu vật tùy thuộc vào loài, tuổi của mô hoặc cơ quan, MT dinh dưỡng và một số yếu tố khác [173, 174]. Màu nâu của mẫu cấy có thể do loài, kiểu gen, tuổi của mẫu cấy, mùa và MT [175].

Bảng 3.7. Sự sinh trưởng của chồi cây đồng tiền trên MT thay thế $CoCl_2.6H_2O$ bằng CoNPs sau 30 ngày nuôi cấy

CoNPs (µg/L)	Số chồi/mẫu		Chiều cao chồi (cm)	Kích thước lá (cm)		SPAD	Cụm chồi		Tỷ lệ tích lũy chất khô (%)
	Tổng	> 2 cm		Dài	Rộng		Khối lượng tươi (mg)	Khối lượng khô (mg)	
(+)	5,67 ± 0,33d*	4,00 ± 0,00ab	2,50 ± 0,06b	0,73 ± 0,07ab	0,50 ± 0,03ab	22,57 ± 0,80c	453,33 ± 14,53d	42,80 ± 1,53d	9,44 ± 0,25bc
(-)	6,00 ± 0,58cd	0 ± 0,00e	1,80 ± 0,06d	0,60 ± 0,06bc	0,43 ± 0,03bc	25,37 ± 1,62b	303,33 ± 17,64e	24,63 ± 1,50e	8,12 ± 0,34cd
1,55	11,00 ± 0,58a	1,67 ± 0,33d	2,17 ± 0,09c	0,53 ± 0,03c	0,33 ± 0,00c	26,29 ± 0,46b	693,33 ± 8,82c	60,80 ± 0,74c	8,77 ± 0,21bc
3,10	7,33 ± 0,33bc	2,67 ± 0,33c	2,67 ± 0,09b	0,73 ± 0,03ab	0,60 ± 0,06a	25,20 ± 0,17b	853,33 ± 33,83a	87,13 ± 4,51a	10,21 ± 0,47ab
4,65	8,00 ± 0,00b	3,33 ± 0,33bc	3,1 ± 0,06a	0,80 ± 0,03a	0,60 ± 0,03a	29,70 ± 0,32a	886,67 ± 8,82b	91,67 ± 6,24b	11,34 ± 0,42a
6,20	8,67 ± 0,58b	6,67 ± 0,33a	3,30 ± 0,06a	0,77 ± 0,063a	0,47 ± 0,03b	29,33 ± 0,52a	863,33 ± 33,83c	88,07 ± 4,01c	10,20 ± 0,34ab
12,40	8,67 ± 0,41b	2,67 ± 0,33c	2,53 ± 0,09b	0,57 ± 0,03c	0,33 ± 0,02c	23,33 ± 0,61bc	690,00 ± 39,71c	54,00 ± 3,36c	9,28 ± 0,41bcd

**Giá trị trung bình ± SD (Sai số chuẩn) và các chữ cái (a, b,...) trong một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với p<0,05 (Duncan's test).*

(+) *Đối chứng dương: Chồi nuôi cấy trên MT DC0.*

(-) *Đối chứng âm: Chồi nuôi cấy trên MT loại bỏ $CoCl_2.6H_2O$.*

Kết quả sau 30 ngày nuôi cấy cho thấy nồng độ Co ở dạng nano tối ưu cho sự sinh trưởng của chồi hoa đồng tiền với số chồi trung bình đạt 8,00-11,00 chồi/mẫu và số chồi cao hơn 2cm lên đến 6,67 chồi (CoNPs 6,20 µg/L). Trong khi đó, nghiệm thức loại bỏ Co khỏi MT nuôi cấy không ghi nhận chồi cao hơn 2cm, điều này đã khẳng định vai trò của Co đối với sự sinh trưởng và chất lượng của chồi cây đồng tiền. nghiệm thức chứa Co ở dạng muối cũng cho tổng số chồi và số chồi trên 2 cm thấp hơn so với Co ở dạng nano (lần lượt là 5,67 chồi/mẫu và 4 chồi). Sự ưu việt của CoNPs cũng đã được chứng minh qua các nghiên cứu của Cường và cộng sự (2025) trên cây dâu tây khi CoNPs giúp gia tăng số lượng lá, số rễ và sinh khối cây con *in vitro* [176], Kumar và cộng sự (2023) cũng ghi nhận số chồi thu được của cây khoai

tây là cao hơn trên MT có chứa CoNPs [177], Ramesh và cộng sự (2022) cho thấy CoNPs giúp gia tăng sự sinh trưởng của rễ và chồi trên cây đậu bắp [178].

Các tính trạng chiều cao chồi (3,10 cm), kích thước lá (0,80 x 0,60 cm), SPAD (29,70), khối lượng tươi cụm chồi (886,67 mg), khối lượng khô (91,67) và tỷ lệ tích lũy chất khô (11,34%) thu được ở nghiệm thức CoNPs 4,65 µg/L cũng cao hơn so với nghiệm thức đối chứng. Điều này cho thấy CoNPs ở nồng độ 4,65 µg/L là tối ưu cho sự sinh trưởng của chồi cây hoa đồng tiền.

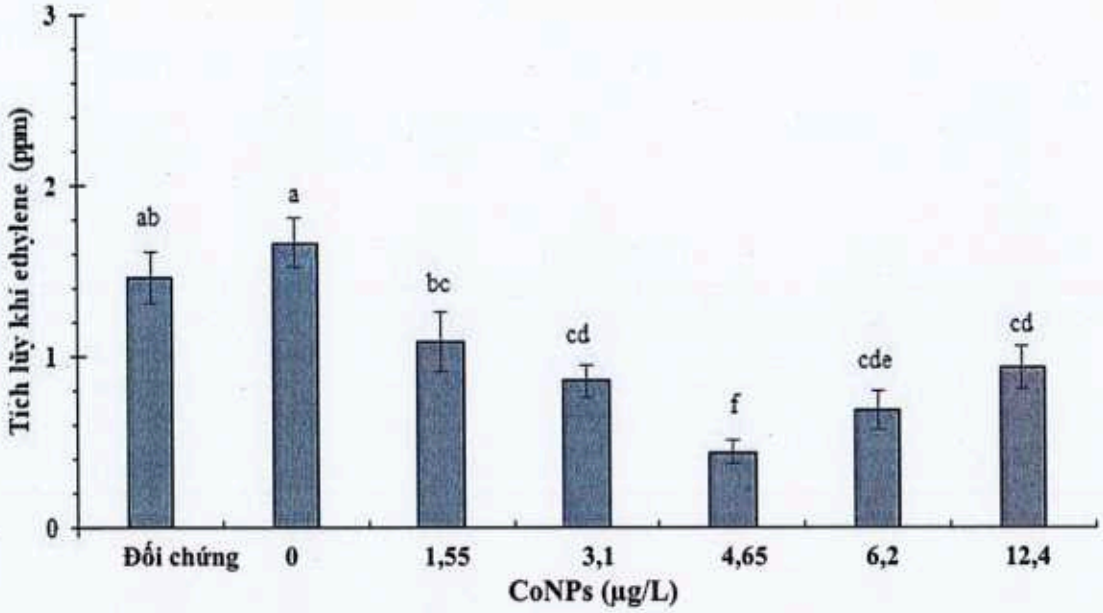
3.2.3. Ra rễ *in vitro* của mẫu chồi cây đồng tiền nuôi cấy trên môi trường thay thế $CoCl_2.6H_2O$ bằng CoNPs

Ra rễ *in vitro* đạt 100% ở tất cả các nghiệm thức có bổ sung CoNPs và đối chứng (không có CoNPs) sau 7 ngày. Tuy nhiên, thời gian ra rễ *in vitro* (5,33 ngày) của chồi ở nghiệm thức DR0 bổ sung 4,65 µg/L CoNPs sớm hơn 2 ngày so với trên MT đối chứng (7,33 ngày). Tùng và cộng sự [66] chỉ ra rằng AgNPs có cảm ứng ra rễ *in vitro* cây dâu tây sớm hơn khoảng 3 ngày so với đối chứng (không có AgNPs). Ngoài ra, 4,65 µg/L CoNP làm giảm hiệu quả quá trình thủy tinh thể, vàng lá và hóa nâu của mẫu so với đối chứng (không có CoNPs), trong đó 4,65 µg/L CoNPs làm giảm hiệu quả quá trình thủy tinh thể, vàng lá và hóa nâu của mẫu gấp 5 lần so với đối chứng (Hình 3.15B).

Trong nghiên cứu này, CoNPs ở nồng độ tối ưu không chỉ làm tăng hiệu quả ra rễ *in vitro* và SOD, CAT và APX mà còn làm giảm các hiện tượng bất thường, tích tụ khí ethylene, cellulase và pectinase sau 30 ngày (Bảng 3.8 và 3.9). Cây con ở nghiệm thức 4,65 µg/L CoNPs cho thấy sự cải thiện về các chỉ tiêu sinh trưởng cùng với việc giảm các hiện tượng bất thường về hình thái (thủy tinh thể, vàng lá và hóa nâu của mẫu), tích lũy ethylene, SOD, CAT và APX đã giảm (Bảng 3.8 và 3.9; Hình 3.16 và 3.17).

Kết quả cho thấy nghiệm thức DR0 bổ sung 4,65 µg/L CoNPs là tối ưu cho việc khắc phục hiện tượng bất thường về hình thái của mẫu cấy cây đồng tiền sau 30 ngày. Ngoài ra, hiệu quả quang hợp được cải thiện đáng kể, thể hiện qua giá trị SPAD cao hơn (55,77) so với các nghiệm thức CoNPs khác (Bảng 3.8). Cây con có lá màu xanh đậm và giảm màu vàng của lá và màu nâu của mẫu. Ngoài ra, enzyme thủy phân (pectinase và cellulase) của cây con ở nghiệm thức CoNPs cũng khác nhau đáng kể

sau 30 ngày (Bảng 3.9). Trên MT DR0 có 4,65 µg/L CoNPs, enzyme cellulase giảm 9 lần và enzyme pectinase giảm 5 lần; trong khi đó, APX, CAT và SOD tăng gấp 1,5 đến 3 lần so với đối chứng. Ngoài ra, chồi ở nghiệm thức DR0 bổ sung 4,65 µg/L CoNPs ghi nhận ethylene giảm đáng kể (1,5 - 2 lần) so với nghiệm thức không có CoNPs.



Hình 3.16. Sự tích lũy khí ethylene trong bình nuôi cấy cây đồng tiền trên môi trường thay thế $CoCl_2.6H_2O$ bằng CoNPs sau 30 ngày nuôi cấy

Hình 3.17. Ra rễ *in vitro* của cây đồng tiền trên MT thay thế $CoCl_2.6H_2O$ bằng CoNPs sau 30 ngày nuôi cấy.

A: Rễ của cây ở nghiệm thức CoNPs ($CoCl_2.6H_2O$; 0; 1,55; 3,10; 4,65; 6,20; 12,40 µg/L; trái qua phải) sau 30 ngày nuôi cấy. *Thước đo = 2 cm.*

B, C: Ra rễ *in vitro* (đối chứng; 4,65 µg/L CoNPs; trái qua phải) sau 7 ngày và sau 30 ngày nuôi cấy. *Thước đo = 1 cm.*

D, E: Cây ở nghiệm thức 4,65 µg/L CoNPs sau 30 ngày nuôi cấy. *Thước đo = 2 cm.*

Bảng 3.8. Sinh trưởng và ra rễ *in vitro* của cây đồng tiền trên môi trường thay thế $CoCl_2.6H_2O$ bằng CoNPs sau 30 ngày nuôi cấy

CoNPs (µg/L)	Chiều cao cây (cm)	Số rễ/ cây	Chiều dài rễ (cm)	Số lá/ cây	Chiều dài lá (cm)	Chiều rộng lá (cm)	SPAD	Khối lượng tươi của cây (mg)	Khối lượng khô của cây (mg)
(+)	5,83d ± 0,03*	7,33 ± 0,33e	4,33 ± 0,09a	6,33 ± 0,33ab	1,20 ± 0,06e	0,90 ± 0,03d	43,27 ± 0,50c	396,67 ± 29,63f	32,67 ± 2,94e
(-)	6,03 ± 0,12d	13,33 ± 0,33c	2,37 ± 0,07e	6,67 ± 0,33ab	1,50 ± 0,063d	0,87 ± 0,06d	41,40 ± 0,47cd	596,67 ± 29,06e	77,67 ± 0,29d
1,55	6,37 ± 0,09c	20,33 ± 0,33b	2,60 ± 0,06d	6,67 ± 0,88ab	1,47 ± 0,07d	1,00 ± 0,07cd	46,77 ± 0,54b	1123,33 ± 20,28d	131,13 ± 2,87c
3,10	7,23 ± 0,03a	20,33 ± 0,67b	3,13 ± 0,03c	6,33 ± 0,33ab	1,87 ± 0,03c	1,13 ± 0,09bc	48,33 ± 0,58b	1630,00 ± 32,15b	172,73 ± 3,33a
4,65	7,40 ± 0,06a	22,33 ± 0,67a	3,83 ± 0,07b	6,33 ± 0,33ab	2,97 ± 0,09a	1,37 ± 0,06a	55,77 ± 0,23a	1743,33 ± 17,64a	180,77 ± 0,87a
6,20	7,37 ± 0,07a	14,33 ± 0,88c	3,70 ± 0,06b	6,00 ± 0,58ab	2,37 ± 0,12b	1,20 ± 0,09abc	47,80 ± 0,21b	1230,00 ± 26,46c	150,00 ± 3,16b
12,40	6,97 ± 0,09b	11,67 ± 0,33d	2,73 ± 0,07d	5,00 ± 1,15c	1,67 ± 0,09cd	1,27 ± 0,04ab	41,90 ± 0,78cd	1130,00 ± 37,46d	138,40 ± 4,74c

**Giá trị trung bình ± SD (Sai số chuẩn) và các chữ cái (a, b,...) trong một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với p<0,05 (Duncan's test).*

(+) *Đối chứng dương: Chồi nuôi cấy trên MT DR0.*

(-) *Đối chứng âm: Chồi nuôi cấy trên MT loại bỏ $CoCl_2.6H_2O$.*

Bảng 3.9. Hoạt độ enzyme kháng oxy hóa và thủy phân của cây đồng tiền sau 30 ngày nuôi cấy

CoNPs (µg/L)	Hoạt độ enzyme kháng oxy hóa (U/g)			Hoạt độ enzyme thủy phân (UI/mL)	
	SOD	CAT	APX	Cellulase	Pectinase
(-)	21,24 ± 0,25c*	206,77 ± 5,31c	0,26 ± 0,02c	1,40 ± 0,05a	0,55b ± 0,07b
4,65	50,36 ± 1,04a	348,92 ± 8,10a	0,72 ± 0,05a	0,15 ± 0,02c	0,10 ± 0,01c
12,40	42,69 ± 0,53b	293,50 ± 7,24b	0,52 ± 0,06b	1,13 ± 0,03b	0,67 ± 0,05a

**Giá trị trung bình ± SD (Sai số chuẩn) và các chữ cái (a, b,...) trong một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với p<0,05 (Duncan's test).*

(-) *Đối chứng âm: Chồi nuôi cấy trên MT loại bỏ $CoCl_2.6H_2O$.*

Nghiên cứu này làm nổi bật vai trò quan trọng của cobalt dạng nano (CoNPs) trong việc điều hòa các quá trình sinh lý thực vật, đặc biệt là sinh tổng hợp ethylene, phát sinh hình thái *in vitro* và đáp ứng với stress oxy hóa. Kết quả cho thấy CoNPs hiệu quả hơn so với dạng ion cobalt truyền thống trong việc điều chỉnh các quá trình này, từ đó cải thiện sinh trưởng và phát triển của cây trong điều kiện nuôi cấy *in vitro*.

Một trong những cơ chế chính giải thích các kết quả quan sát được là khả năng ức chế sinh tổng hợp ethylene. Cobalt được biết đến với vai trò ức chế enzyme 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) oxidase, từ đó hạn chế quá trình chuyển ACC thành ethylene [88]. Sự tích lũy ethylene là một yếu tố bất lợi phổ biến trong nuôi cấy mô, thường gây ra các rối loạn sinh lý như vàng lá, rụng lá và giảm hiệu quả tái sinh. Trong bối cảnh này, hiệu quả ức chế ethylene mạnh hơn của CoNPs, như đã ghi nhận ở *Swertia chirata* [172], cho thấy dạng nano có thể làm tăng sinh khả dụng và khả năng vận chuyển nội bào của cobalt, giúp tương tác hiệu quả hơn với enzyme đích so với dạng ion.

Ngoài vai trò điều hòa ethylene, cobalt còn ảnh hưởng đến quá trình quang hợp theo cơ chế phụ thuộc liều lượng. Các nghiên cứu trước đây cho thấy nồng độ Co thấp làm tăng hàm lượng chlorophyll (a, b) và carotenoid, trong khi nồng độ cao gây ức chế do làm gián đoạn hoạt động của các enzyme tham gia sinh tổng hợp sắc tố như 5-aminolevulinic acid dehydratase và các enzyme liên quan đến protoporphyrin [171]. Phản ứng hai pha này cho thấy hiệu quả của CoNPs phụ thuộc mạnh vào nồng độ, đồng thời nhấn mạnh tầm quan trọng của việc tối ưu liều lượng. Ở mức thích hợp, Co đã được chứng minh là cải thiện các chỉ tiêu sinh trưởng như chiều cao cây, số lá, sinh khối, cũng như tăng cường quang hợp và hô hấp ở các loài cây như đậu phộng và anh đào [179–181].

Các rối loạn sinh lý trong nuôi cấy *in vitro* do ethylene gây ra có liên quan chặt chẽ đến sự hoạt hóa của các enzyme phân giải thành tế bào, đặc biệt là cellulase và pectinase. MacDonald và cộng sự [185] đã chứng minh rằng ethylene làm tăng đáng kể hoạt tính cellulase ở *Abies balsamea*, và các kết quả tương tự cũng được ghi nhận ở bông và đậu [182]. Sự gia tăng hoạt động của các enzyme này thúc đẩy quá trình lão hóa mô và gây ra hiện tượng vàng lá, rụng lá. Trong nghiên cứu này, việc xử lý

bằng CoNPs đã làm giảm tích lũy ethylene, từ đó ức chế hoạt động của các enzyme thủy phân và góp phần duy trì tính toàn vẹn mô, cải thiện chất lượng cây con.

Một khía cạnh quan trọng khác là tác động của CoNPs lên hệ thống stress oxy hóa. Các nanoparticle có thể ảnh hưởng đến sự hình thành các loại oxy phản ứng (ROS), đóng vai trò vừa là tác nhân gây hại vừa là tín hiệu sinh học. Ở nồng độ thích hợp, CoNPs có thể kích thích mức ROS vừa phải, từ đó hoạt hóa hệ thống enzyme chống oxy hóa như superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) và ascorbate peroxidase (APX) [184–186]. Sự gia tăng hoạt tính của các enzyme này, đặc biệt ở nồng độ 4,65 µg/L CoNPs, cho thấy vai trò bảo vệ chống lại stress oxy hóa, đồng thời góp phần cải thiện khả năng tạo rễ và phát triển cây *in vitro*. Tuy nhiên, ở nồng độ cao, CoNPs có thể gây tích lũy ROS quá mức và dẫn đến độc tính tế bào, do đó cần kiểm soát chặt chẽ liều lượng sử dụng.

Tổng hợp lại, CoNPs tác động đến sinh lý thực vật thông qua nhiều cơ chế phối hợp, bao gồm điều hòa sinh tổng hợp ethylene, kiểm soát hoạt động enzyme và tăng cường hệ thống chống oxy hóa. Những tác động này góp phần cải thiện quá trình phát sinh hình thái in vitro và giảm các rối loạn sinh lý. Tuy nhiên, sự biến động về đáp ứng của cây tùy thuộc vào nồng độ, kích thước hạt và điều kiện thí nghiệm cho thấy cần có thêm các nghiên cứu ở cấp độ phân tử để làm rõ cơ chế tác động cũng như đánh giá ảnh hưởng lâu dài. Trong nghiên cứu này, nồng độ CoNPs 4,65 µg/L cho hoạt độ của enzyme kháng oxy hóa (SOD, CAT, APX) là cao nhất, đồng thời ức chế hoạt độ của enzyme thủy phân (cellulase và pectinase).

Sinh trưởng tiếp theo ở điều kiện vườn ươm

Sau 15 ngày trồng, tỷ lệ sống của cây con (có nguồn gốc từ 4,65 µg/L CoNPs) cao hơn so với cây con ở đối chứng (Bảng 3.10). Hơn nữa, các chỉ tiêu sinh trưởng của cây con ở nghiệm thức 4,65 µg/L CoNPs đều tốt hơn so với cây ở đối chứng. Ngoài ra, sự hình thành nụ hoa và ra hoa của cây con có nguồn gốc từ 4,65 µg/L CoNPs ghi nhận sớm hơn khoảng 7 ngày so với cây con ở đối chứng (Bảng 3.11). Sự phát triển của cây con thu được ở nghiệm thức 4,65 µg/L CoNPs trong giai đoạn ra hoa cho thấy chiều cao cây (20,07 cm), khối lượng tươi và khô (2524 mg, 294 mg; tương ứng), đường kính hoa (7,57 cm) và chiều dài cuống (21,47 cm) là cao hơn (Bảng 3.11; và Hình 3.18).

Hình 3.18. Hình thái hoa của cây đồng tiền sau 84 ngày ở vườn ươm

A: Hoa của cây con có nguồn gốc từ đối chứng (không có CoNPs).

B: Hoa của cây con có nguồn gốc từ CoNPs 4,65 µg/L.

Thước đo = 2 cm.

Bảng 3.10. Thích nghi của cây đồng tiền sau 15 ngày trồng ở vườn ươm

Nghiệm thức	Tỷ lệ sống sót (%)	Chiều cao cây (cm)	Số rễ/ cây	Chiều dài rễ (cm)	Số lá/ cây	Kích thước lá (cm)		SPAD	Khối lượng tươi của cây (mg)	Khối lượng khô của cây (mg)
						Dài	Rộng			
(-)	83,33 ± 3,52b*	3,70 ± 0,40b	4,67 ± 1,15a	7,50 ± 0,68b	6,67 ± 0,33a	1,87 ± 0,17b	1,63 ± 0,18a	47,40 ± 2,40b	2191,77 ± 33,83b	342,40 ± 5,68a
4,65 µg/L CoNPs	100,00 ± 0,00a	5,20 ± 0,32a	5,33 ± 0,88a	8,90 ± 0,85a	7,67 ± 0,58a	2,47 ± 0,23a	1,97 ± 0,23a	58,60 ± 1,45a	2458,50 ± 29,82a	363,07 ± 3,93a

**Giá trị trung bình ± SD (Sai số chuẩn) và các chữ cái (a, b,...) trong một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với p<0,05 (Duncan's test);*

(-)*: không bổ sung CoNPs.*

Bảng 3.11. Sự sinh trưởng và phát triển của cây đồng tiền sau 84 ngày ở vườn ươm

Nghiệm thức	Chiều cao cây (cm)	Số lá/ cây	Khối lượng tươi của cây (mg)	Khối lượng khô của cây (mg)	Thời gia ra hoa (tuần)		Đường kính hoa (cm)	Chiều dài cuống hoa (cm)
					Ra nụ	Ra hoa		
(-)	15,60 ± 0,38b*	11,67 ± 0,67b	1417 ± 21b	124 ± 35b	10,73 ± 0,15a	12,17 ± 0,13a	6,20 ± 0,06b	16,40 ± 0,15b
4,65 µg/L CoNPs	20,07 ± 0,32a	13,33 ± 0,88a	2524 ± 37a	294 ± 54a	9,97 ± 0,15a	11,17 ± 0,15b	7,57 ± 0,09a	21,47 ± 0,27a

** Giá trị trung bình ± SD (Sai số chuẩn) và các chữ cái (a, b,...) trong một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với p<0,05 (Duncan's test);*

(-)*: không bổ sung CoNPs.*

CoNPs đã cải thiện tỷ lệ sống sót và sinh trưởng tiếp theo của cây con được ở điều kiện vườn ươm. Đặc biệt, nghiệm thức 4,65 µg/L CoNPs cải thiện chất lượng cây con, đồng thời tăng khả năng thích nghi, sinh trưởng của cây con trong điều kiện vườn ươm tốt hơn so với đối chứng. Phản ứng với Co đã được nghiên cứu ở một số loài thực vật và được phát hiện phụ thuộc vào nồng độ CoNPs [171, 187, 188]. Kết quả nghiên đã chứng minh vai trò của CoNPs trong việc tăng cường tăng trưởng *in vitro*, gia tăng thích nghi, sinh trưởng và ra hoa trong nhà kính.

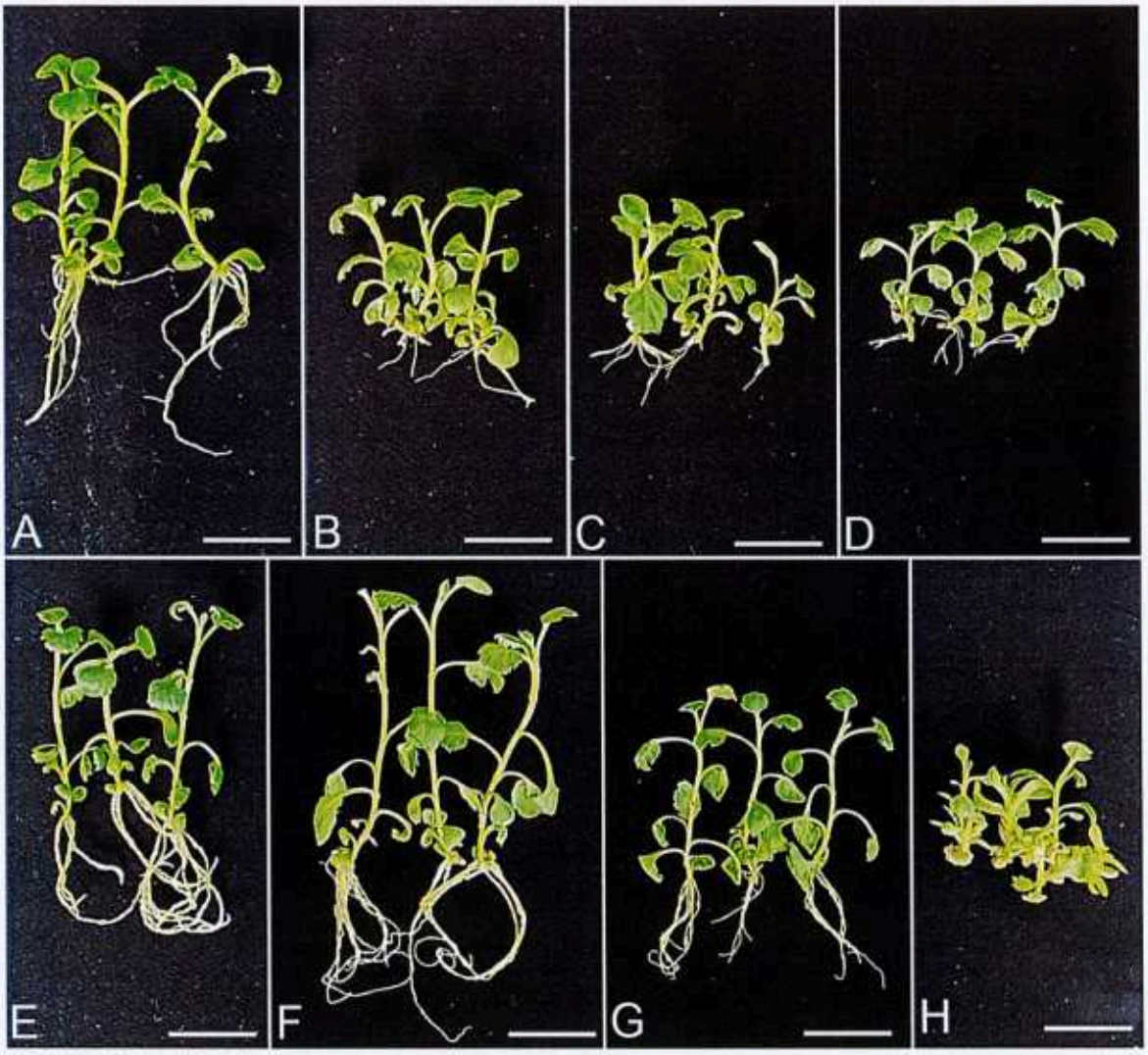
Kết quả cho thấy 4,65 µg/L CoNPs có hiệu quả gia tăng hiệu quả nhân chồi, ra rễ *in vitro* cũng như giảm hiện tượng bất thường về hình thái như thủy tinh thể, vàng lá và hóa nâu của mẫu cấy, cũng như các giai đoạn thích nghi, sinh trưởng và ra hoa của chúng. Ngoài ra, CoNPs làm giảm sự tích lũy ethylene, hoạt động của enzyme cellulase và pectinase và tăng hoạt động kháng oxy hóa.

3.2.4. Ra rễ *in vitro* của mẫu chồi cây cúc nuôi cấy trên môi trường thay thế $CoCl_2.6H_2O$ bằng CoNPs

CoNPs với các nồng độ khác nhau ảnh hưởng lên khả năng ra rễ và sinh trưởng của mẫu chồi ngọn cây cúc sau 15 ngày (Bảng 3.12; Hình 3.19). Kết quả cho thấy mẫu chồi ngọn ở nghiệm thức đối chứng dương, MS loại bỏ $CoCl_2.6H_2O$ và bổ sung CoNPs ở nồng độ 1,55 - 6,20 µg/L đều ghi nhận tỷ lệ ra rễ là 100%; trong khi đó, nghiệm thức 12,40 µg/L CoNPs không ghi nhận ra rễ *in vitro*, ngoài ra các mẫu chồi ngọn còn ghi nhận hiện tượng hình thành mô sẹo ở gốc (Hình 3.19H). Điều này cho thấy, CoNPs với nồng độ cao sẽ ảnh hưởng đến sự ra rễ của cây. Trong các nồng độ CoNPs, nghiệm thức 4,65 µg/L CoNPs ghi nhận chiều cao cây (9,10 cm), chiều dài rễ (8,67 cm), khối lượng tươi (435,33 mg) là tối ưu nhất so với các nghiệm thức CoNPs khác và đối chứng (+) hoặc (-) (Bảng 3.12). Đối với chỉ tiêu số rễ/cây, nghiệm thức 4,65 - 6,20 µg/L CoNPs và đối chứng (+) ghi nhận cao hơn các nghiệm thức khác; trong khi đó, chỉ tiêu đường kính thân, nghiệm thức 3,10 - 4,65 µg/L CoNPs và đối chứng (+) ghi nhận được cao hơn các nghiệm thức bổ sung CoNPs khác (Bảng 3.12). Ngoài ra, kết quả cho thấy không có sự khác biệt về SPAD. Tóm lại, mẫu chồi ngọn cây cúc nuôi cấy ở nghiệm thức 4,65 µg/L CoNPs cho khả năng ra rễ và sinh trưởng của cây tối ưu hơn các nghiệm thức khác.

CoNPs giúp gia tăng khả năng ra rễ của một số cây trồng nuôi cấy *in vitro* như cây hoa hồng cũng như khắc phục một số hiện tượng hình thái bất thường đã được công bố [57]. Tuy nhiên, mỗi đối tượng cây trồng và giai đoạn sinh trưởng khác nhau thì nồng độ CoNPs tối ưu là khác nhau như 6,20 µg/L CoNPs ở giai đoạn tái sinh chồi và nhân nhanh chồi hay 4,65 µg/L CoNPs ở giai đoạn ra rễ trên cây hoa hồng.

Kết quả phân tích hoạt độ enzyme kháng oxy hóa của cây cúc sau 15 ngày nuôi cấy cũng ghi nhận sự khác biệt giữa các nghiệm thức CoNPs và đối chứng (Bảng 3.13). Các stress đều có thể làm gia tăng ROS và kích thích phản ứng bảo vệ của thực vật. Bổ sung CoNPs vào MT ảnh hưởng lên sự thay đổi SOD và CAT, gia tăng ở nghiệm thức không bổ sung (đối chứng -) đến nghiệm thức 4,65 µg/L CoNPs và sau đó giảm (Bảng 3.13). Trong khi đó, APX không có sự khác biệt. Việc xử lý bằng CoNPs gây ra stress oxy hóa biểu hiện bằng những thay đổi về hàm lượng ROS đã được ghi nhận trên các cây trồng như đồng tiền, hoa hồng, lúa, African violet [14, 189]. Trong nghiên cứu này, 4,65 µg/L CoNPs đã làm tăng hiệu quả ra rễ *in vitro*, sinh trưởng của cây và thay đổi hoạt động enzyme kháng oxy hóa.



Hình 3.19. Hình thái cây cúc ở giai đoạn ra rễ *in vitro* trên môi trường nuôi cấy thay thế $CoCl_2.6H_2O$ bằng CoNPs ở các nồng độ khác nhau sau 2 tuần nuôi cấy.

A: Đối chứng dương (MT MS).

B: Đối chứng âm (MT MS loại bỏ muối $CoCl_2$).

C: 0,775 µg/L CoNPs.

D: 1,55 µg/L CoNPs.

E: 3,10 µg/L CoNPs.

F: 4,65 µg/L CoNPs.

G: 6,20 µg/L CoNPs.

H: 12,40 µg/L CoNPs.

Thước đo: 2 cm.

Bảng 3.12. Ảnh hưởng của CoNPs lên khả năng ra rễ *in vitro* và sinh trưởng của cây cúc sau 15 ngày nuôi cấy

CoNPs (µg/L)	Tỷ lệ ra rễ (%)	Chiều cao cây (cm)	Số lá/ cây	Số rễ/ cây	Chiều dài rễ (cm)	Khối lượng tươi của cây (mg)	SPAD	Đường kính thân (mm)
(+)	100	7,17 ± 0,58b*	9,67 ± 1,15bc	7,67 ± 1,52bc	5,03 ± 2,62b	252,67 ± 29,50de	39,03 ± 3,81	1,13 ± 0,09abc
(-)		4,77 ± 0,30c	10,33 ± 1,52ab	4,33 ± 0,58d	2,10 ± 0,52cd	206,33 ± 27,02f	39,93 ± 5,88	0,97 ± 0,05c
0,775		4,53 ± 0,87c	8,00 ± 1,00c	5,33 ± 2,08d	1,77 ± 0,46cde	207,00 ± 8,66f	36,93 ± 2,71	1,02 ± 0,12abc
1,55		4,73 ± 0,59c	8,67 ± 0,58bc	4,33 ± 1,52d	1,27 ± 0,15de	218,67 ± 17,47ef	38,53 ± 0,61	1,00 ± 0,15bc
3,10		7,01 ± 0,59b	10,00 ± 0,00ab	6,67 ± 0,58cd	5,96 ± 0,23b	322,67 ± 20,03bc	40,57 ± 0,25	1,08 ± 0,06abc
4,65		9,10 ± 0,36a	11,67 ± 1,15a	9,00 ± 1,00ab	8,67 ± 0,76a	435,33 ± 24,09a	42,10 ± 2,02	1,22 ± 0,05a
6,20		6,23 ± 0,25b	9,00 ± 1,00bc	10,33 ± 1,52a	3,67 ± 0,96b	285,00 ± 8,18cd	37,57 ± 1,61	0,99 ± 0,07bc
12,40	-	3,77 ± 0,64c	8,00 ± 1,00c	-	-	361,00 ± 32,07b	35,23 ± 3,04	1,18 ± 0,17ab
							ns	

**Giá trị trung bình ± SD (Sai số chuẩn) và các chữ cái (a, b,...) trong một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với p<0,05 (Duncan's test).*

ns: non-significant – sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê.

(+) Đối chứng dương: MT CR0; (-) Đối chứng âm: MT CR0 loại bỏ muối $CoCl_2$.

Bảng 3.13. Hoạt độ enzyme kháng oxy hóa của cây cúc sau 15 ngày nuôi cấy

CoNPs (µg/L)	SOD (U/g)	CAT (U/g)	APX (U/g)
(+)	141,03 ± 7,72a*	330,60 ± 9,38b	0,47 ± 0,06
(-)	92,02 ± 2,56e	295,27 ± 16,70de	0,45 ± 0,04
0,775	89,79 ± 7,01e	278,95 ± 6,60e	0,43 ± 0,07
1,55	102,18 ± 11,13cd	321,17 ± 3,65bc	0,54 ± 0,06
3,10	116,80 ± 17,20bc	335,98 ± 13,38b	0,49 ± 0,04
4,65	132,11 ± 8,12ab	367,61± 9,33a	0,54 ± 0,06
6,20	124,04 ± 6,72b	276,93± 14,05e	0,46 ± 0,07
12,40	100,86 ± 3,98cd	306,71± 7,75cd	0,43 ± 0,07
			ns

**Giá trị trung bình ± SD (Sai số chuẩn) và các chữ cái (a, b,...) trong một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với p<0,05 (Duncan's test).*

ns: non-significant – sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê.

(+) *Đối chứng dương: MT CR0.*

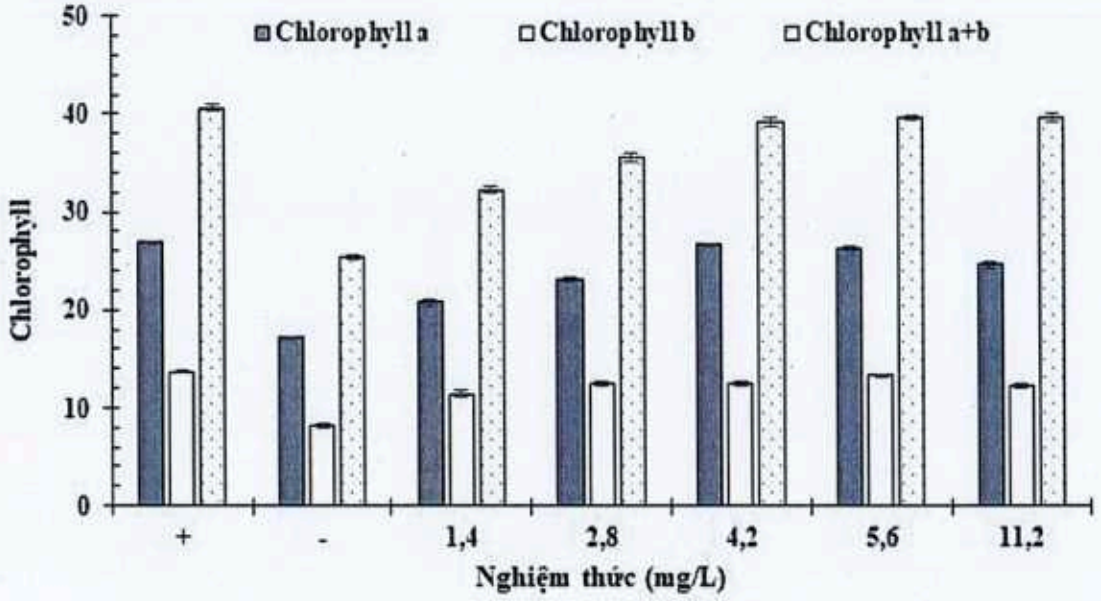
(-) *Đối chứng âm: MT CR0 loại bỏ muối* $CoCl_2$

3.3. NGHIÊN CỨU THAY THẾ MUỐI $FeSO_4.7H_2O$ BẰNG FeNPs TRONG VI NHÂN GIỐNG CÂY CÚC, ĐỒNG TIỀN VÀ TỬ LINH LAN

3.3.1. Ảnh hưởng của FeNPs đến quá trình ra rễ *in vitro* của chồi ngọn cây cúc

Bảng 3.14 và Hình 3.20 cho thấy ảnh hưởng của FeNPs lên sinh trưởng của chồi cúc sau 30 ngày. Chiều cao cây, chiều dài lá, chiều rộng lá, số rễ không có sự khác biệt rõ ràng. Tuy nhiên, khối lượng tươi, khối lượng khô, chiều dài rễ, SPAD có sự khác biệt. Ngoài ra, nghiệm thức 4,2 mg/L FeNPs cho kết quả gia tăng số lá, khối lượng tươi, khối lượng khô là tốt nhất so với mẫu đối chứng.

Kết quả này cho thấy sự sinh trưởng của cây cúc trên môi trường bổ sung 4,2 mg/L FeNPs là tốt hơn so với các nghiệm thức khác. Ở tất cả các nghiệm thức có xử lý FeNPs cho kết quả chỉ số hàm lượng chlorophyll thu được đều thấp hơn ở mẫu đối chứng (Fe-EDTA trong MS) (Bảng 3.14).



Hình 3.20. Ảnh hưởng của FeNPs lên khả năng tích lũy chlorophyll của cây cúc sau 30 ngày nuôi cấy.

(+) Đối chứng dương: MT CR0.

(-) Đối chứng âm: MT CR0 loại bỏ $FeSO_4.7H_2O$.

Bảng 3.14. Ảnh hưởng của FeNPs đến sự sinh trưởng của mẫu chồi ngọn cây cúc sau 30 ngày nuôi cấy

FeNPs (mg/L)	Chiều cao cây (cm)	Số lá	Số rễ	Chiều dài rễ (cm)	Khối lượng tươi (mg)
(-)	4,40 ± 0,30cd*	13,33 ± 0,58ab	13,33 ± 0,58b	3,30 ± 0,30d	694 ± 5g
(+)	4,80 ± 0,30ab	11,33 ± 1,53c	12,33 ± 0,58bc	6,20 ± 0,10a	1016 ± 7c
1,4	4,20 ± 0,30d	11,00 ± 1,00c	11,00 ± 1,00c	4,10 ± 0,40bc	806 ± 5e
2,8	4,20 ± 0,20d	12,67 ± 0,58bc	13,00 ± 1,00b	3,90 ± 0,30bc	786 ± 5f
4,2	5,00 ± 0,20ab	14,67 ± 0,58a	15,67 ± 0,58a	4,3 ± 0,30b	1445 ± 13a
5,6	5,20 ± 0,40a	11,00 ± 1,00c	12,33 ± 1,15bc	4,20 ± 0,30b	1078 ± 7b
11,2	4,50 ± 0,30bc	12,33 ± 1,49bc	13,33 ± 1,51b	3,60 ± 0,30cd	934 ± 5d

**Giá trị trung bình ± SD (Sai số chuẩn) và các chữ cái (a, b,...) trong một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p<0,05$ (Duncan's test).*

(+) *Đối chứng dương: MT CR0.*

(-) *Đối chứng âm: MT CR0 loại bỏ $FeSO_4.7H_2O$.*

Ở nghiệm thức không bổ sung FeNPs cho kết quả chlorophyll thấp nhất, quan sát hình thái thấy lá cây bị thiếu sắc tố, hình thái lá thay đổi (Hình 3.20 và 3.21). Ở những nghiệm thức với nồng độ FeNPs tăng dần lên trên 5,6 mg/L, chiều cao cây, sinh khối, chlorophyll điều có xu hướng giảm trở lại. Kết quả này cho thấy Fe thiết yếu cho sự sinh tổng hợp chlorophyll. Vai trò của Fe trong đời sống thực vật, Fe không những tham gia vào sự sinh tổng hợp chlorophyll bằng cách làm thành phần cấu tạo các protein [4Fe–4S], FX, FA, FB (PsbA, PsbB, PsbC) trong quang hệ thống I mà còn tham gia vào các protein Cyt b559, Cyt b6 f complex, ... với vai trò chủ yếu trong vận chuyển điện tử [190]. Ngoài ra, sắt là cơ chất để tạo thành trung tâm hoạt động của protein glutamyl-tRNA reductase góp phần vào tổng hợp 5-aminolevulinic

acid là một tiền chất của chlorophyll [191]... Bổ sung sắt ở cả 2 dạng Fe-EDTA hoặc FeNPs đều giúp cho lượng chlorophyll tổng số cao hơn so với đối chứng.

(+) (-) 1,4 mg/L 2,8 mg/L 4,2 mg/L 5,6 mg/L 11,2 mg/L

Hình 3.21. Ra rễ *in vitro* của cây cúc trên môi trường thay thế $FeSO_4.7H_2O$ bằng FeNPs sau 30 ngày nuôi cấy.

(+) Đối chứng dương: MT CR0

(-) Đối chứng âm: MT CR0 loại bỏ $FeSO_4.7H_2O$

A: Sự phát triển của cây; B: Chiều dài rễ

Thước đo = 2 cm

Việc bổ sung FeNPs với nồng độ ít hơn (4,2 mg/L) có hiệu quả hơn so với Fe-EDTA (5,6 mg/L) cho thấy FeNPs cho hiệu quả tốt hơn sắt ở dạng ion. Điều này là do FeNPs có khả năng xâm nhập và hiệu quả tương tác bề mặt cao hơn sắt ở dạng Fe-EDTA, do đó tối ưu hoá hiệu quả của sắt trong MT nuôi cấy. Libralato và cộng sự [192] khảo sát tác động của FeNPs so với các dạng Fe khác, cho thấy FeNPs có hiệu quả đáng kể trong tăng trưởng sinh khối ở cả 3 cây *Lepidium sativum*, *Sinapis alba* và *Sorghum saccharatum* và có thể thay thế cho Fe-EDTA truyền thống, cây con trong MT MS có bổ sung FeNPs cải thiện đáng kể các đặc điểm sinh trưởng của cây như sinh khối, chlorophyll so với đối chứng. FeNPs ở nhiều dạng khác nhau sẽ có những tác động khác nhau lên thực vật, trong đó Fe° được cho là có khả năng thúc đẩy sinh trưởng chồi và rễ trên cây họ đậu, tuy nhiên FeNPs ở nồng độ cao (0,32 mM) lại gây độc cho cây [193]. FeNPs ở nồng độ thấp giúp cây gia tăng hấp thu nước trong MT, giúp cho cây sinh trưởng tốt hơn ở giai đoạn ra rễ. Sự tập trung quá mức của FeNPs ở bề mặt rễ còn khiến cho sự hấp thu các chất dinh dưỡng khác (canxi, magie,

mangan...) bị cản trở khiến cho sinh trưởng của thực vật bị ức chế [194]. Ở nghiên cứu này, 4,2 mg/L FeNPs thay thế Fe-EDTA cho kết quả sinh trưởng tối ưu.

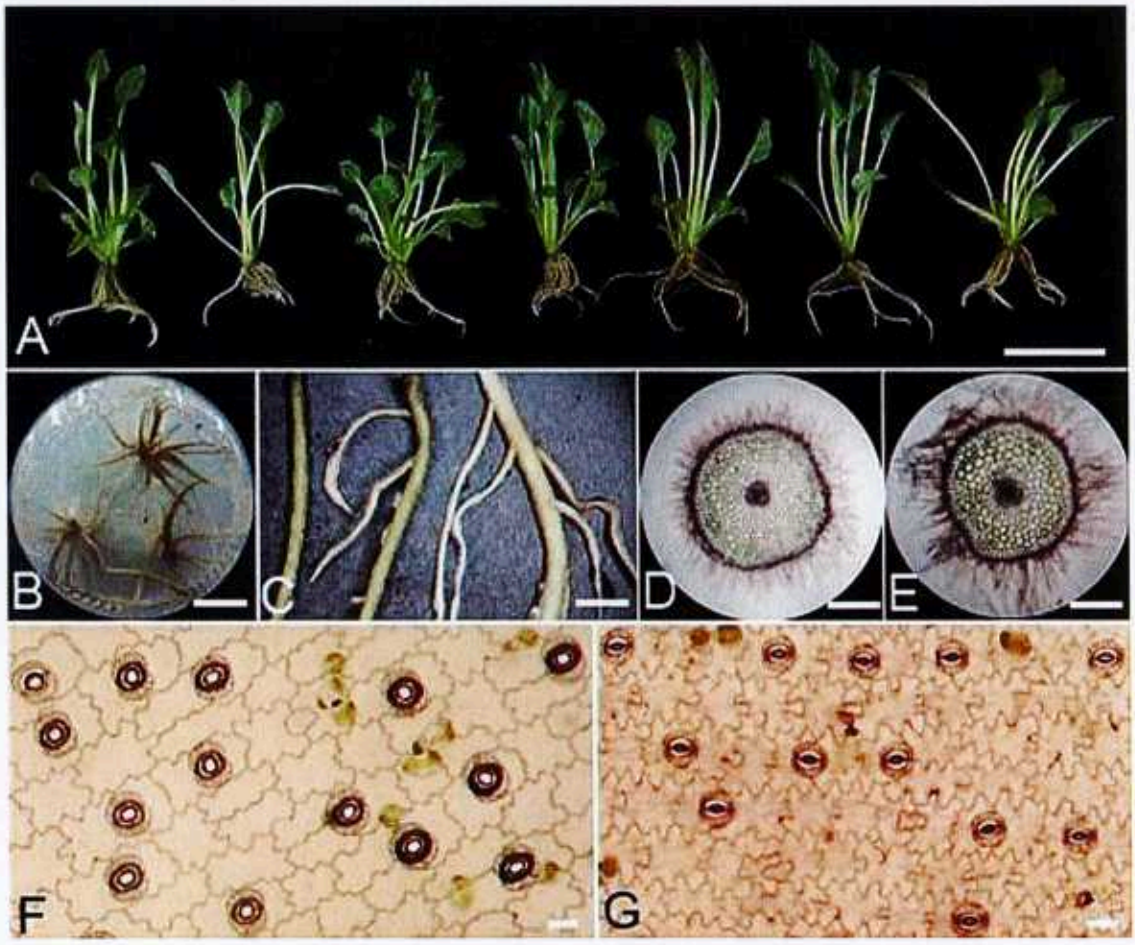
3.3.2. Ảnh hưởng của FeNPs đến quá trình ra rễ *in vitro* của mẫu chồi cây đồng tiền

Kết quả ghi nhận được cho thấy, tỷ lệ ra rễ của cây đồng tiền đạt 100% ở tất cả nghiệm thức sau 30 ngày. Bổ sung FeNPs ảnh hưởng lên khả năng ra rễ và sinh trưởng của cây đồng tiền sau 30 ngày (Bảng 3.15; Hình 3.22A-C). Chiều cao cây (5,83 cm) thu nhận ở nghiệm thức 5,6 mg/L FeNPs là cao hơn so với các cây có nguồn gốc bổ sung FeNPs ở nồng độ khác và tương đồng với cây đối chứng dương (5,83 cm) sau 30 ngày nuôi cấy (Bảng 3.15). Khối lượng tươi và khô đều tăng tỷ lệ thuận với nồng độ từ 0 - 4,2 mg/L FeNPs và cao hơn đối chứng. Không có sự khác biệt về chỉ tiêu khối lượng tươi và khối lượng khô; tuy nhiên, số rễ (13,00 rễ), chiều dài rễ (5,27 cm), chiều dài lá (2,07 cm), chiều rộng lá (1,83 cm) và SPAD (41,47) ở các cây có nguồn gốc nồng độ 5,6 mg/L FeNPs là cao hơn so với các cây có nguồn gốc nồng độ 4,2 mg/L FeNPs.

Khí khổng của các mẫu lá sinh trưởng trên MT bổ sung NPs có hình elip với độ mở của khí khổng hẹp (4,50 µm) (Hình 3.22F). Trong khi đó, khí khổng đối chứng có hình cầu, độ mở khí khổng rất rộng (10,33 µm) (Hình 3.22G). Hình dạng và độ mở của khí khổng ảnh hưởng trực tiếp đến khả năng thích nghi của cây con ở vườn ươm. Rễ ở các MT chứa FeNPs có sự hình thành lông hút nhiều hơn so với $FeSO_4.7H_2O$ (Hình 3.22D, E). Ở các cây có nguồn gốc 11,2 mg/L FeNPs, sự hình thành rễ không tối ưu cũng như rễ có màu nâu hay hoại tử, cây con phát triển chậm. Kết quả tương đồng được ghi nhận trên cây salem [89], cây cẩm chướng [64]. Do đó, nồng độ 5,6 mg/L FeNPs là thích hợp cho giai đoạn ra rễ cây đồng tiền. Nồng độ FeNPs này tương đương với nồng độ của $FeSO_4.7H_2O$; tuy nhiên, FeNPs cho thấy hiệu quả sinh trưởng và hình thành nhiều lông hút hơn so với $FeSO_4.7H_2O$.

Hoạt độ riêng SOD, CAT và APX của cây con có nguồn gốc bổ sung 5,6 mg/L FeNPs ở giai đoạn ra rễ *in vitro* là cao hơn (41,32 U/g; 308,70 U/g; 0,55 U/g; tương ứng) so với cây trên MT MR0 (Đối chứng) và MR0 loại bỏ $FeSO_4.7H_2O$ sau 30 ngày nuôi cấy. Trong khi đó, hoạt độ enzyme thuỷ phân lại cho kết quả ngược lại (Bảng 3.16). Điều này cho thấy việc bổ sung FeNPs gia tăng SOD, CAT và APX và giảm

hoạt độ enzyme thủy phân; qua đó, thúc đẩy ra rễ *in vitro* và sinh trưởng của cây đồng tiền. Kết quả nghiên cứu cho thấy mối tương quan giữa nồng độ FeNPs với SOD, CAT và APX, tương tự như nghiên cứu trước đây về ảnh hưởng của Fe_2O_3NPs trên dưa hấu [196]. Nghiên cứu cho thấy rằng việc bổ sung Fe_2O_3NPs dẫn đến sự gia tăng hoạt độ của các enzyme đó. Tuy nhiên, ở nồng độ cao của Fe_2O_3NPs làm giảm hoạt độ của enzyme SOD và APX. Những thay đổi trong các enzyme kháng oxy hóa có thể dẫn đến sự thay đổi hoạt động trao đổi chất, sinh lý – sinh hóa của mẫu cấy.



Hình 3.22. Ảnh hưởng của FeNPs lên sự hình thành rễ và hình thái khí khổng của cây đồng tiền sau 30 ngày nuôi cấy.

A: Cây con ở nghiệm thức 5,6 mg/L FeNPs (*Thước đo: 2 cm*).

B: Rễ ở nghiệm thức 5,6 mg/L FeNPs (*Thước đo: 2 cm*).

C: Rễ dưới kính hiển vi soi nổi: MS-Fe; MR0; 5,6 mg/L FeNPs (*Thước đo: 0,2 cm*).

D, E: Lát cắt ngang rễ: MR0; 5,6 mg/L FeNPs (*Thước đo: 0,1 cm*).

F, G: Khí khổng: MR0; 5,6 mg/L FeNPs (*Thước đo: 20* μM).

Bảng 3.15. Sự sinh trưởng của cây đồng tiền trên môi trường thay thế $FeSO_4.7H_2O$ bằng FeNPs sau 30 ngày nuôi cấy

FeNPs (mg/L)	Chiều cao cây (cm)	Số rễ	Chiều dài rễ (cm)	Số lá	Chiều dài lá (cm)	Chiều rộng lá (cm)	Khối lượng tươi cây (mg)	Khối lượng khô cây (mg)	SPAD
(+)	5,83 ± 0,03a*	7,33 ± 0,33de	4,33 ± 0,09c	6,33 ± 0,33cd	1,20 ± 0,06d	0,90 ± 0,03c	396,67 ± 29,63d	32,67 ± 0,50f	33,27 ± 2,94b
(-)	3,70 ± 0,26d	6,33 ± 0,58e	4,67 ± 0,15b	5,33 ± 0,58d	1,53 ± 0,06c	1,20 ± 0,10b	786,67 ± 3,05c	88,47 ± 5,53de	7,43 ± 0,76f
1,4	3,90 ± 0,20cd	11,67 ± 0,58bc	2,63 ± 0,58e	6,67 ± 0,58bc	1,59 ± 0,10c	1,20 ± 0,10b	890,00 ± 4,00bc	99,53 ± 2,90cd	15,60 ± 0,56e
2,8	4,17 ± 0,06bc	11,00 ± 0,58c	2,63 ± 0,20e	8,00 ± 1,00a	1,70 ± 0,10b	1,03 ± 0,06bc	960,00 ± 6,24b	100,70 ± 2,17bc	30,27 ± 0,80c
4,2	4,40 ± 0,26b	11,33 ± 1,00bc	4,10 ± 0,10d	7,33 ± 0,58abc	1,73 ± 0,58b	1,17 ± 0,06b	1066,67 ± 4,72a	118,03 ± 12,54ab	33,17 ± 1,84b
5,6	5,83 ± 0,25a	13,00 ± 1,52a	5,27 ± 0,06a	7,67 ± 0,58ab	2,07 ± 0,15a	1,83 ± 0,11a	1188,67 ± 8,14a	124,03 ± 13,85a	41,47 ± 1,58a
11,2	4,27 ± 0,20bc	8,33 ± 0,58d	2,37 ± 0,06f	6,33 ± 0,58cd	1,43 ± 0,06c	1,10 ± 0,10b	713,33 ± 3,51cd	80,77 ± 0,70e	27,40 ± 1,77d

**Giá trị trung bình ± SD (Sai số chuẩn) và các chữ cái (a, b,...) trong một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với p<0,05 (Duncan's test).*

(+) *Đối chứng dương: MT DR0.*

(-) *Đối chứng âm: MT DR0 loại bỏ $FeSO_4.7H_2O$.*

Bảng 3.16. Hoạt độ enzyme kháng oxy hóa và thủy phân của cây đồng tiền sau 30 ngày nuôi cấy

Nghiệm thức	Hoạt độ enzyme kháng oxy hoá (U/g)			Hoạt độ enzyme thuỷ phân (UI/mL)	
	SOD	CAT	APX	Cellulase	Pectinase
(+)	19,84 ± 1,53b*	156,60 ± 11,79c	0,20 ± 0,02c	1,46 ± 0,11a	0,79 ± 0,10a
(-)	21,95 ± 0,75b	214,32 ± 7,06b	0,28 ± 0,02b	1,44 ± 0,04a	0,58 ± 0,03b
5,6 mg/L FeNPs	41,32 ± 0,99a	308,70 ± 5,66a	0,55 ± 0,26a	0,26 ± 0,03b	0,22 ± 0,02c

**Giá trị trung bình ± SD (Sai số chuẩn) và các chữ cái (a, b,...) trong một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với p<0,05 (Duncan's test).*

(+) *Đối chứng dương: MT DR0.*

(-) *Đối chứng âm: MT DR0 loại bỏ $FeSO_4.7H_2O$.*

Khả năng hấp thu K, Ca và Mg

Các nguyên tố khoáng là thành phần cơ bản cấu trúc nên tế bào, mô và cơ quan thực vật. Dinh dưỡng khoáng mà cây cần với hàm lượng cao nhất đó là K, Ca, Mg và chúng có vai trò quan trọng trong sinh trưởng và phát triển của thực vật. Do đó, khi gia tăng sự hấp thu của các kim loại này sẽ giúp cây sinh trưởng tốt hơn. Kết quả sau 30 ngày cho thấy 5,6 mg/L FeNPs giúp gia tăng sự hấp thu khoáng K, Mg và Ca trong cây đồng tiền nuôi cấy *in vitro* so với nghiệm thức MS-Fe và MR0 (Bảng 3.17).

FeNPs trong MT nuôi cấy *in vitro* có ảnh hưởng đến sự hình thành, kéo dài và hấp thu khoáng của rễ. Sự hấp thu K trong cây lúa mì đã gia tăng đáng kể khi sử dụng FeNPs [197]. Sự giảm hàm lượng các nguyên tố Ca, K và Mg cũng đã được tìm thấy trong cây hướng dương khi bổ sung FeNPs ở hàm lượng cao dẫn đến cây sinh trưởng và phát triển chậm [72]. Như vậy có thể thấy, FeNPs ở nồng độ cao có thể có tác động tiêu cực và hạn chế hấp thu khoáng của rễ bởi vì các hạt FeNPs (> 50 nm) có thể tập trung ở bề mặt rễ, khóa các lỗ trên thành tế bào biểu mô rễ, làm

giảm khả năng hấp thu dinh dưỡng và giảm sự tổng hợp các chất diệp lục trong lá do có liên quan đến làm giảm hấp thu Mg - một khoáng chất quan trọng tham gia vào quá trình tổng hợp chất diệp lục.

Bảng 3.17. Ảnh hưởng của FeNPs lên khả năng hấp thu K, Ca, Mg trong nuôi cấy *in vitro* cây đồng tiền

Nghiệm thức	K (mg)	Mg (mg)	Ca (mg)
(+)	175,24 ± 4,64c*	33,85 ± 2,08c	21,35 ± 0,56b
(-)	233,98 ± 8,16b	45,00 ± 5,00b	24,67 ± 0,58b
5,6 mg/L FeNPs	436,04 ± 5,36a	60,33 ± 0,58a	42,33 ± 2,72a

**Giá trị trung bình ± SD (Sai số chuẩn) và các chữ cái (a, b,...) trong một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với p<0,05 (Duncan's test).*

(+) *Đối chứng dương: MT DR0.*

(-) *Đối chứng âm: MT DR0 loại bỏ $FeSO_4.7H_2O$.*

Các chồi nuôi cấy trên MT bổ sung 5,6 mg/L FeNPs cảm ứng ra rễ *in vitro* sớm hơn khoảng 2 ngày so với chồi nuôi cấy trên MT đối chứng; ngoài ra, ở nghiệm thức 5,6 mg/L FeNPs các chỉ tiêu sinh trưởng, SOD, CAT và APX cao hơn và cellulase và pectinase thấp hơn các nghiệm thức khác sau 30 ngày.

3.3.3. Ảnh hưởng của FeNPs đến quá trình ra rễ *in vitro* của mẫu chồi cây tử linh lan trên môi trường thay thế $FeSO_4.7H_2O$ bằng FeNPs

Tỷ lệ ra rễ của chồi cây tử linh lan đạt 100% ở tất cả các nghiệm thức sau 30 ngày ở điều kiện vườn ươm. Sử dụng FeNPs thay thế $FeSO_4.7H_2O$ không cho sự khác biệt ở các tính trạng về sinh trưởng của cây như: chiều cao cây, số rễ, chiều dài rễ, số lá, chiều dài lá cũng như khối lượng tươi và khối lượng khô.

Tuy nhiên, hoạt độ enzyme kháng oxi hóa và thủy phân sau 30 ngày cho thấy sự khác biệt (Bảng 3.18). SOD, CAT và APX ở nghiệm thức 5,6 mg/L FeNPs ở giai đoạn ra rễ *in vitro* là cao hơn (41,32 U/g; 308,70 U/g; 0,55 U/g; tương ứng) so với cây đối chứng và MT MR0 loại bỏ $FeSO_4.7H_2O$ sau 30 ngày. Trong khi đó, hoạt độ enzyme thuỷ phân lại cho kết quả ngược lại (Bảng 3.18). Điều này cho thấy việc bổ

sung FeNPs đã làm gia tăng hoạt độ enzyme kháng oxi hóa và giảm hoạt độ enzyme thủy phân; qua đó, thúc đẩy ra rễ *in vitro* và sinh trưởng của cây con sau 30 ngày.

Bảng 3.18. Hoạt độ enzyme kháng oxi hóa và thủy phân của cây tử linh lan sau 30 ngày nuôi cấy.

Nghiệm thức	Hoạt độ enzyme kháng oxi hoá (U/g)			Hoạt độ enzyme thuỷ phân (UI/mL)	
	SOD	CAT	APX	Cellulase	Pectinase
(+)	19,69 ± 1,27c*	150,67 ± 6,02c	0,22 ± 0,02b	1,47 ± 0,07a	0,82 ± 0,07a
(-)	21,98 ± 0,77b	218,00 ± 8,88b	0,26 ± 0,01b	1,43 ± 0,06a	0,63 ± 0,06b
5,6 mg/L FeNPs	41,50 ± 0,58a	312,33 ± 10,73a	0,56 ± 0,05a	0,26 ± 0,01b	0,21 ± 0,02c

**Giá trị trung bình ± SD (Sai số chuẩn) và các chữ cái (a, b,...) trong một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p<0,05$ (Duncan's test).*

(+) *Đối chứng dương: MT AR0.*

(-) *Đối chứng âm: MT AR0 loại bỏ $FeSO_4.7H_2O$.*

CHƯƠNG 4: KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

4.1. KẾT LUẬN

Luận án "nghiên cứu thay thế một số muối kim loại vi lượng bằng nano kim loại trong vi nhân giống cây hoa (cúc, đồng tiền và tử linh lan) đã đánh giá được hiệu quả của việc thay thế các muối kim loại vi lượng ($FeSO_4.7H_2O$, $Na_2MoO_4.2H_2O$, $CoCl_2.6H_2O$) trong MT nuôi cấy MS bằng các NPs tương ứng (FeNPs, MoO_3NPs và CoNPs) trên ba loại cây trồng là cúc, đồng tiền, và tử linh lan. Các NPs được sử dụng trong nghiên cứu này đã giúp cải thiện các chỉ tiêu về sinh trưởng, phát triển trên các đối tượng cây trồng (cúc, đồng tiền và tử linh lan), bên cạnh đó còn giúp khắc phục một số hiện tượng bất thường trong nhân giống *in vitro* như vàng lá, thủy tinh thể. Kết quả đã cho thấy tiềm năng của việc sử dụng NPs thay thế cho các muối vi lượng thường dùng trong MT nuôi cấy MS.

Đối với cây cúc:

- **MoO_3NPs 223,50 µg/L** cho tỷ lệ cảm ứng mô sẹo đạt 100% và tái sinh chồi đạt 33,33%.
- **MoO_3NPs 149,00 µg/L** cho hiệu quả tối ưu trong giai đoạn nhân nhanh và sinh trưởng chồi, thông qua tăng khả năng ra rễ, cải thiện hình thái và thúc đẩy hấp thu khoáng đa lượng (Ca, Mg, K) và vi lượng (Cu, Fe).
- **CoNPs 4,65 µg/L** trong giai đoạn ra rễ giúp cải thiện sinh trưởng cây cúc, làm tăng chiều cao cây, số lá, số rễ và sinh khối. đồng thời góp phần điều hòa ethylene và cải thiện trạng thái sinh lý của cây nuôi cấy.
- **FeNPs 4,6 mg/L** giúp tăng tích lũy chlorophyll, thúc đẩy hình thành rễ.

Đối với cây đồng tiền:

- **CoNPs 6,2 µg/L** giúp tăng hệ số nhân chồi, cải thiện chiều cao và chất lượng chồi; đồng thời làm giảm các hiện tượng bất thường như **thủy tinh thể và vàng lá**.
- **CoNPs 4,65 µg/L** thúc đẩy hình thành rễ, nâng cao khả năng thích nghi và sinh trưởng của cây ở điều kiện vườn ươm.

- **FeNPs 5,6 mg/L** giúp tăng hấp thu Fe, cải thiện phát triển rễ, nâng cao hoạt động enzyme kháng oxy hóa và chất lượng cây đồng tiền nuôi cấy.

Đối với cây tử linh lan:

- **CoNPs 4,65 µg/L** giúp tăng số lượng chồi, chiều cao và sinh khối chồi; đồng thời hạn chế rõ rệt các bất thường hình thái trong quá trình nuôi cấy. CoNPs làm giảm tích lũy ethylene và tăng hoạt độ enzyme kháng oxy hóa, góp phần nâng cao sức sống và chất lượng mẫu cấy tử linh lan.
- **FeNPs 5,6 mg/L** giúp tăng hoạt độ enzyme kháng oxy hóa và cải thiện trạng thái sinh trưởng của cây tử linh lan *in vitro* trong giai đoạn ra rễ.

4.2. KIẾN NGHỊ

Tiếp tục nghiên cứu về tác động của FeNPs, CoNPs, MoO_3NPs lên các giai đoạn khác của cây cúc, cây tử linh lan và cây đồng tiền.

Cần có những chuyên sâu hơn về vai trò, sự hấp thu, vận chuyển và sử dụng NPs trong cây trồng, cũng như ảnh hưởng của NPs đến khả năng hấp thu các chất khoáng đa lượng, trung lượng và vi lượng trong thực vật.

Tiếp tục nghiên cứu thay thế các muối kim loại khác trong MT MS bằng nano kim loại, từ đó hướng đến việc thay thế hoàn toàn các muối kim loại bằng nano kim loại.

DANH MỤC CÔNG TRÌNH LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

[1]. Nhut DT, Ngan HTM, Mai NTN, **Nguyen PLH**, Le BV, Tung HT. 2022. Chapter 15: Enhanced growth and overcoming abnormal phenomena in micropropagation by nanoparticles. In: Nhut DT, Tung HT, Yeung EC (2022) Plant tissue culture: New techniques and application in horticultural species of tropical region. Springer, Singapore.

[2]. Tung HT, **Nguyen PLH**, Lich TV, Ngan HTM, Cuong DM, Luan VQ, H Khai HD, Mai NTN, Vinh BVT, Nhut DT. 2022. Enhanced shoot and plantlet quality of *Gerbera* (*Gerbera jamesonii* Revolution Yellow) cultivar on medium containing silver and cobalt nanoparticles. *Scientia Horticulturae*, 306: 111445. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2022.111445

[3]. **Nguyễn PLH**, Tùng HT, Lịch TV, Ngân HTM, Cường ĐM, Luận VQ, Khải HĐ, Mai NTN, Vinh BVT, Nhựt DT. 2022. Ảnh hưởng của nano sắt lên khả năng ra rễ *in vitro* của cây hoa đồng tiền (*Gerbera jamesonii var* Revolution Yellow). Hội nghị công nghệ Sinh học Toàn quốc, Đăk Lăk, 178-182.

[4]. Tùng HT, **Nguyễn PLH**, Cường ĐM, Luận VQ, Khải HĐ, Mai NTN, Thúy NTT, Vinh BVT, Nhựt DT. 2022. Ảnh hưởng của nano coban lên hiện tượng bất thường, sinh trưởng, tích lũy khí ethylen và hoạt tính enzyme kháng oxy hóa trong giai đoạn tái sinh chồi cây tử linh lan (*Saintpaulia ionantha* Wendl.). Hội nghị công nghệ Sinh học Toàn quốc, Đăk Lăk, 183-188.

[5]. **Nguyen PLH**, Thuy NTT, Mai NTN, Hoa HCK, Khai HD, Tung HT, Cuong DM, Luan VQ, Phuong HTN, Vinh NQ, Dung DM, Nhut DT. 2024. The role of MoO_3NPs on regeneration, growth and development of chrysanthemum cultured *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 158:4. https://doi.org/10.1007/s11240-024-02806-5

[6]. **Nguyễn PLH**, Thúy NTT, Mai NTN, Tùng HT, Khải HĐ, Cường ĐM, Luận VQ, Phương HTN, Châu NH, Bưu NQ, Nhựt DT. 2024. Vai trò của nano molybdenum trioxide thay thế natri molybdate dehydrat trong môi trường nuôi cấy lên khả năng sinh trưởng và phát triển của cây hoa cúc nuôi cấy *in vitro*. *Tạp chí Khoa học và công nghệ Việt Nam 67 (11)*, pp 12-18.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Murashige T, Skoog F (1962), A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, *Physiologia Plantarum* 15, pp. 473-497.
2. Tan HM, Sang QV, Thanh KN (2006), Giáo trình sinh lý thực vật, *NXB Đại học sư phạm*, pp. 214-223
3. Marschner H (2012), Mineral Nutrition of Higher Plants (3rd ed.), *Academic Press*.
4. Ryan MH, Galloway RE (2000), Mineral nutrition of plants: The role of major macronutrients in plant growth, *Plant and Soil* 204(2), pp. 201-214.
5. Fageria NK (2005), Growth and Mineral Nutrition of Field Crops (2nd ed.), *CRC Press*.
6. Kharrazi M, Tehranifar A, Nemati S, Bagheri A, Sharifi A (2011), *In vitro* culture of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) focusing on the problem of vitrification, *Journal of Biological and Environmental Sciences* 5(13), pp. 1-6.
7. Ziv M (1991), Vitrification: morphologycal and physiological disorders of *in vitro* plants, In: Debergh PC, Zimmerman RH (eds), Micropropagation, technology and application, *Kluwer Academic Publishers*, *Dordrecht*, *the Nertherlands*, pp. 45-69.
8. Debergh PC, Read PE (1991), Micropropagation, In: Debergh PC, Zimmerman RH (eds), Micopropagation Technology and Application, *Kluwer Academic Publishers*, *Dordrecht*, pp. 1-14.
9. Gaspar T, Franck T, Bisbis B, Kevers C, Jouve L, Hausman JF, Dommes J (2002), Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures, *Plant Growth Regulation* 37(1), pp. 263-285.
10. Mayor ML, Nestares G, Zorzoli R, Picardi LA (2003), Reduction of vitrification in sunflower tissue culture, *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 72 (10), pp. 99-103.
11. Lai CC, Lin HM, Nalawade SM (2005), Vitrification in shoot cultures of *Scrophularia yoshimurae* can be effectively reduced by ventilation of culture vessels, *Plant Physiology* 162 (2), pp. 355-361.

12. García-Osuna OH, Benavides-Mendoza A, Escobedo-Bocardo L (2011), Vitrification control of *in vitro* shoot of *Turbinicarpus valdezianus* (Möller) GL&F, *Phyton* 80 (5), pp. 175-179.

13. Ngan HTM, Cuong DM, Tung HT, Nghiep ND, Le BV, Nhut DT (2020), 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 Tissue and Organ Culture* 141 (2), pp. 393-405.

14. Yến NTK, Huy NP, Cương HV, Linh NTN, Nam NB, Luận VQ, Nhựt DT (2013), Ảnh hưởng của than hoạt tính và nuôi cấy thoáng khí lên khả năng sinh trưởng và phát triển của cây hoa đồng tiền (*Gerbera jamesonii*) *in vitro* và *ex vitro*, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ* 51 (4), tr. 435-446.

15. Rahman M (2016), Establishment of *in vitro* regeneration protocol of *Gerbera jamesonii* from different explants, *The Doctoral dissertation, BRAC University*.

16. De Klerk GJ, Van Den Dries N, Krens FA (2017), Hyperhydricity: underlying mechanisms, *Acta Horticulturae*,

17. Bahmani R, Karami O, Gholami M (2009), Influence of carbon sources and their concentrations on rooting and hyperhydricity of apple rootstock MM.106, *Applied Science* 6(11), pp. 1513-1517.

18. Mayor ML, Nestares G, Zorzoli R, Picardi LA (2003), Reduction of hyperhydricity in sunflower tissue culture, *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 72(10), pp. 99-103.

19. Chang C (2016), How do plants respond to ethylene and what is its importance?, *BMC Biology* 14(1), pp. 1-7.

20. Binder BM, Chang C, Schaller GE (2012), Perception of ethylene by plants - ethylene receptors, In: McManus MT (ed), Annual plant reviews vol. 44: The plant hormone ethylene, *Oxford, Wiley-Blackwell*, pp. 117-145.

21. Tholen D, Poorter H, Voesenek L (2006), Ethylene and plant growth, In: Naffes AK (ed), Ethylene action in plants, *Springer-Verlag Berlin Heidelberg*, pp. 35-46.

22. Gonzalez-Carranza ZH, Shahid AA, Zhang L, Liu Y, Nnsuwan U, Robert A (2012), A novel approach to dissect the abscission process in *Arabidopsis*, *Plant Physiology* 160(6), pp. 1342-1356.

23. Agustí J, Merelo P, Cercás M, Tadeo F (2009), Comparative transcriptional survey between laser-micro dissected cells from laminar abscission zone and petiolar cortical tissue during ethylene-promoted abscission in citrus leaves, *BMC Plant Biology* 9, pp. 1-20.

24. Tucker ML, Burke A, Murphy CA, Thai VK, Ehrenfried ML (2007), Gene expression profiles for cell wall-modifying proteins associated with soybean cyst nematode infection, petiole abscission, root tips, flowers, apical buds, and leaves, *Journal of Experimental Botany* 58(12), pp. 3395-3406.

25. MacDonald MT, Lada RR, Dorais M, Pepin S (2011), Endogenous and exogenous ethylene induces needle abscission and cellulase activity in post-harvest balsam fir (*Abies balsamea* L.), *Trees* 25(5), pp. 940-947.

26. Vatanparast M, Hosseininaveh V, Ghadamyari M, Sajjadian SM (2014), Plant cell wall degrading enzymes, pectinase and cellulase, in the digestive system of the red palm weevil *Rhynchophorus ferrugineus*, *Plant Production Science* 50(4), pp. 190-198.

27. Merelo P, Agustí J, Arbona V (2017), Corrigendum: cell wall remodeling in abscission zone cells during ethylene-promoted fruit abscission in citrus, *Frontiers in Plant Science* 8(3), pp. 23-29.

28. Khosh-Khui M, Teixeira da Silva JA (2006), *In vitro* culture of the Rosa species, In: Teixeira da Silva JA (ed), Floriculture, ornamental and plant biotechnology: Advances and Topical Issues, *Global science books*, *UK* 2, pp. 514-526.

29. Zhu-Salzman K, Salmon RA, Ahn JE, Koiwa H (2004), Transcriptional regulation of sorghum defense determinants against a phloem-feeding aphid, *Plant Physiology* 134(1), pp. 420-431.

30. Monica RC, Cremonini R (2009), Nanoparticles and higher plants, *Caryologia* 62(2), pp. 161-165.

31. Nair R, Varghese SH, Nair BG, Maekawa T, Yoshida Y, Kumar DS (2010), Nanoparticulate material delivery to plants, *Plant Science* 179(3), pp. 154-163.

32. Campos EVR, De Oliveira JL, Fraceto LF (2014), Applications of controlled release systems for fungicides, herbicides, acaricides, nutrients, and plant

growth hormones: a review, *Advanced Science, Engineering and Medicine* 6(20), pp. 373-387.

33. Puig S, Penarrubia L (2009), Placing metal micronutrients in context: transport and distribution in plants, *Current Opinion in Plant Biology* 12(3), pp. 299-306.

34. Khan Y, Sadia H, Ali Shah SZ, Khan MN, Shah AA, Ullah N, Ullah MF, Bibi H, Bafakeeh OT, Khedher NB, Eldin SM (2022), Classification, synthetic, and characterization approaches to nanoparticles, and their applications in various fields of nanotechnology: A review, *Catalysts* 12 (11), pp. 1386.

35. Srivastava S, Usmani Z, Atanasov AG, Singh VK, Singh NP, Abdel-Azeem AM, Prasad R, Gupta G, Sharma M, Bhargava A (2021), Biological nanofactories: Using living forms for metal nanoparticle synthesis, *Mini Review in Medicinal Chemistry* 21 (2), pp. 245-265.

36. Vijayaram S, Razafindralambo H, Sun YZ, Vasantharaj S, Ghafarifarsani H, Hoseinifar SH, Raeeszadeh M (2024), Applications of green synthesized metal nanoparticles - A review, *Biological Trace Element Research* 202 (1), pp. 360-386.

37. Shukla PK, Misra P, Kole C (2016), Uptake, translocation, accumulation, transformation, and generational transmission of nanoparticles in plants, In: Kole C, Kumar DS, Khodakovskaya MV (eds), *Plant nanotechnology: Principles and practices*, pp. 183-218.

38. Libralato G, Devoti AC, Zanella M, Sabbioni E, Micetic I, Manodori L, Pigozzo A, Manenti S, Groppi F, Volpi Ghirardini A (2016), Phytotoxicity of ionic, micro-and nano-sized iron in three plant species, *Ecotoxicology and Environmental Safety* 123, pp. 81-88.

39. Bais HP, Weir TL, Perry LG, Gilroy S, Vivanco J (2006), The role of root exudates in rhizosphere parent with plants and other organisms, *Annual Review of Plant Biology* 57, pp. 233-266.

40. Nel AE, Mädler L, Velegol D (2009), Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface, *Nature Materials* 8(14), pp. 543-557.

41. Arif N, Yadav V, Singh S, Singh S, Ahmad P, Mishra RK, Sharma S, Tripathi DK, Dubey N, Chauhan DK (2016), Influence of high and low levels of plant-

beneficial heavy metal ions on plant growth and development, *Frontiers in Environmental Science* 4(2), pp. 69-75.

42. Aziz EE, Gad N, Badran N (2007), Effect of cobalt and nickel on plant growth, yield and flavonoids content of *Hibiscus sabdariffa* L, *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* 1(2), pp. 73-78.
43. Leifert C, Cassells AC (2001), An improved surface disinfection method for shoot expiants from Iris rhizomes infected with bacterial soft rot (Erwinia carotovora subsp, carotovora), *In vitro Cellular and Developmental Biology – Plant* 37, pp. 133-138.
44. Beyth N, Houri-Haddah Y, Domb A, Khan W, Hazan R (2015), Alternative antimicrobial approach: Nano-antimicrobial materials, *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* 246012.
45. Tung HT, Bao HG, Buu NQ, Chau NH, Nhut DT (2022), The use of silver nanoparticles as a disinfectant and media additive in plant micropropagation, In: Nhut DT, Tung HT, Yeung EC, Plant tissue culture: New techniques and application in horticultural species of tropical region, *Springer*, *Singapore*, pp. 287-302.
46. Aghdaei M, Salehi H, Sarmast MK (2012), Effects of silver nanoparticles on *Tecomella undulata* (Roxb.), *Advances in Horticultural Science* 26, pp. 21-24.
47. Sharma P, Bhatt D, Zaidi MGH, Saradhi PP, Khanna PK, Arora S (2012), Silver nanoparticle-mediated enhancement in growth and antioxidant status of *Brassica juncea*, *Applied Biochemistry and Biotechnology* 167, pp. 2225-2233.
48. Kim JH, Lee Y, Kim EJ, Gu S, Sohn EJ, Seo YS, An HJ, Chang YS (2014), Exposure of iron nanoparticles to Arabidopsis thaliana enhances root elongation by triggering cell wall loosening, *Environmental Science and Technology* 48 (6), 3477348.
49. Genady EA, Qaid EA, Fahmy AH (2016), Copper sulfate nanoparticales *in vitro* applications on *Verbena bipinnatifida* Nutt. stimulating growth and total phenolic content increasments, *International Journal of Pharmaceutical Research and Allied Sciences* 5, pp. 196-202.

50. Talankova-Sereda TE, Liapina KV, Shkopinskij EA, Ustinov AI, Kovalyova AV, Dulnev PG, Kucenko NI (2016), The influence of Cu and Co nanoparticles on growth characteristics and biochemical structure of *Mentha longifolia in vitro*, *Nanoscience and Nanoengineering* 4 (2), pp. 31-39.

51. Javed R, Usman M, Yucesan B, Zia M, Gurel E (2017), Effect of zinc oxide (ZnO) nanoparticles on physiology and steviol glycosides production in micropropagated shoots of *Stevia rebaudiana* Bertoni, *Plant Physiology and Biochemistry* 110, pp. 94-99.

52. Ewais EA, Desouky SA, Elshazly EH, Ewais EA, Desouky SA, Elshazly EH (2015), Evaluation of callus responses of *Solanum nigrum* L. exposed to biologically synthesized silver nanoparticles, *Nanoscience and Nanotechnology* 5, pp. 45-56.

53. Ma C, Chhikara S, Xing B, Musante C, White JC, Dhankher OP (2013), Physiological and molecular response of *Arabidopsis thaliana* (L.) to nanoparticle cerium and indium oxide exposure, *ACS Sustainable Chemistry and Engineering* 1, pp. 768-778.

54. Helaly MN, El-Hoseimy H (2011), Combined effects between genotypes and salimity on sweet orange during the developments stages of its micropropagation, *Research Journal of Botany* 6 (2), pp. 38-67.

55. Bairu MW, Aremu AO, Van Staden J (2011), Somaclonal variation in plants causes and detection methods, *Plant Growth Regulation* 63, pp. 147-173.

56. Jeongn BR, Sivanesan I (2015), Direct adventitious shoot regeneration, *in vitro* flowering, fruiting, secondary metabolite content and antioxidant activity of *Scrophularia takesimensis* Nakai, *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 123, pp. 607-618.

57. Poborilova Z, Opatrilova R, Babula P (2013), Toxicity of aluminium oxide nanoparticles demonstrated using a BY-2 plant cell suspension culture model, *Environmental and Experimental Botany* 91, pp. 1-11.

58. Mohammed Al-oubaidiB HK, Mohammed-Ameen AS (2014), The effect of ($AgNO_3$) NPS on increasing of secondary metabolites of *Calendula officinalis*

L. *in vitro*, *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics* 5, pp. 267-272.

59. Fazal H, Abbasi BH, Ahmad N, Ali M (2016), Elicitation of medicinally important antioxidant secondary metabolites with silver and gold nanoparticles in callus cultures of *Prunella vulgaris* L., *Applied Biochemistry and Biotechnology* 180, pp. 1076-1092.

60. Syu Y, Hung JH, Chen JC, Chuang H (2014), Impacts of size and shape of silver nanoparticles on *Arabidopsis* plant growth and gene expression, *Plant Physiology and Biochemistry* 83, pp. 57-64.

61. Nhut DT, Duc HH, Hoang NH, Ngan HTM, Diem LT, Tung HT, Khai HD, Mai NTN, Cuong DM, Luan VQ, Tuan TT, Giap DD, Khang NN, Binh NV, Ha CH, Ngoc PB, Huong TT (2022), Efficient transgenic plantlet regeneration from hairy roots via somatic embryogenesis and hardening plantlets of *Panax vietnamensis* by iron nanoparticles-supplied culture, *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 151 (2), pp. 335-345.

62. Nhựt DT, Tâm HT, Hiền NTT, Cương LK, Luận VQ, Nam NB, Huy NP, Hiền VT, Hương TT, Hoàng NH, Tuấn NX, Sang NT, Cường NV, Châu NH, Bưu NQ (2014), 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* 12 (1), tr. 103-111.

63. Ngân HTM, Trinh TĐH, Cường ĐM, Tùng HT, Linh NTN, Hiền VT, Nguyễn PLH, Luận VQ, Lệ BV, Nhựt DT (2018), Hạn chế hiện tượng thủy tinh thể và gia tăng tỉ lệ sống của cây con hoa đồng tiền (*Gerbera jamesonii*) nuôi cấy *in vitro* trong môi trường có bổ sung nano bạc, *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 17 (1), tr. 115-124.

64. Ngan HTM, Tung HT, Le BV, Nhut DT (2020), Evaluation of root growth, antioxidant enzyme activity and mineral absorbability of carnation (*Dianthus caryophyllus* "Express golem") plantlets cultured in two culture systems supplemented with iron nanoparticles, *Scientia Horticulturae* 272, 109612.

65. Tung HT, Nam NB, Huy NP, Luan VQ, Hien VT, Phuong TTB, Dung TL, Loc NH, Nhut DT (2018), A system for largae scale production of Chrysanthemum using microponics with the supplement of silver nano particles under light-emitting diodes, *Scientia Horticulturae* 232, pp. 153-161.

66. Tung HT, Thuong TT, Cuong DM, Luan VQ, Hien VT, Hieu T, Nam NB, Phuong HTN, Vinh BVT, Khai HD, Nhut DT (2021), Silver nanoparticles improved explant disinfection, *in vitro* growth, runner formation and limited ethylene accumulation during micropropagation of strawberry *(Fragaria × ananassa)*, *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 145 (2), pp. 393-403.

67. Yruela I (2013), Transition metals in plant photosynthesis, *Metallomics* 5 (9), pp. 1090-1109.

68. O'Carroll D, Sleep B, Krol M, Boparai H, Kocur C (2013), Nanoscale zero valent iron and bimetallic particles for contaminated site remediation, *Advances in Water Resources* 51(1), pp. 104-122.

69. Jamei MR, Khosravi MR, Anvaripour B (2013), Investigation of ultrasonic effect on synthesis of nano zero valent iron particles and comparison with conventional method: ultrasonic effect on synthesis of nZVI particles, *Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering* 8(5), pp. 767-774.

70. Saeedi S, Mousani M, Mogharab MHG (2016), *In vitro* analysis of the efficacy of Fe oxide nanoparticles in prevention of iron deficiency chlorosis in citrus rootstock (*Citrus volkameriana*), *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences* 4 (5), pp. 484-492.

71. Slater A, Scott NW, Fowler MR (2008), Plant tissue culture. In: Plant Biotechnology: The Genetic Manipulation of Plants, *Oxford University Press* 41, pp. 37-53.

72. Martínez-Fernández D, Barroso D, Komárek M (2016), Root water transport of *Helianthus annuus* L. under iron oxide nanoparticle exposure, *Environmental Science and Pollution Research* 23 (6), pp. 1732-1741.

73. Nhựt DT, Cường NV, Tùng HT, Hiền NTT, Cường ĐM, Hiền VT, Nam NB, Huy NP, Luận VQ, Châu NH, Bưu NQ (2015), Nghiên cứu sự sinh trưởng và

phát triển của cây cúc (*Chrysanthemum* sp.) *in vitro* trên môi trường có sử dụng nano sắt, *Tạp chí Khoa học và Phát triển* 13(7), tr. 1162-1172.

74. Hiền ĐT, Cường ĐM, Tùng HT, Nam NB, Luận VQ, Nhựt DT (2017), Đánh giá hiệu quả thay thế Fe-EDTA bằng nano sắt trong vi nhân giống cây Salem (*Limonium sinuatum* (L.) Mill), *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 15(3), tr. 525-533.
75. Ranjan A, Sinha R, Singh R (2021), Iron oxide nanoparticles enhance shoot proliferation in *Musa paradisiaca* tissue culture, *Scientia Horticulturae*, 289, 110443.
76. Al-Mayahi AMW (2021), Effect of nano-iron and nano-zinc on in vitro growth and development of date palm (*Phoenix dactylifera* L.), *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 146, 437–447.
77. Ghosh S, Biswas AK, Bandyopadhyay M (2021), Effect of iron oxide nanoparticles on callus induction and regeneration in strawberry (*Fragaria × ananassa*), *Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology*, 22, 58–66.
78. Rahman MM, Hossain MA, Islam MS (2022), Application of iron nanoparticles in potato (*Solanum tuberosum* L.) tissue culture for improved plant regeneration, *Journal of Plant Growth Regulation*, 41, 2185–2194.
79. Singh S, Sharma R, Gupta P (2022), Iron oxide nanoparticles mediated callus induction and plant regeneration in *Curcuma longa*, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 149, 231–242.
80. Hameed A, Fatima N, Shahid M (2022), Iron nanoparticles improve callus growth and physiological characteristics in rice tissue culture, *Plant Physiology and Biochemistry*, 180, 182–191.
81. Sharma S, Thakur M, Sharma P (2023), Nanotechnology-assisted plant tissue culture: effects of Fe_3O_4 nanoparticles on callus induction and regeneration of *Curcuma longa*, *Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology*, 24, 12–20.
82. Ullah J, Gul A, Khan I, Shehzad J, Kausar R, Ahmed MS, Batool S, Hasan M, Ghorbanpour M, Mustafa G (2024), Green synthesized iron oxide nanoparticles as a potential regulator of callus growth, plant physiology, antioxidative and microbial contamination in *Oryza sativa* L, *BMC Plant Biology*, 24, 939.

83. Khan I, Ahmad A, Gul S (2024), Application of iron nanoparticles improves shoot regeneration in *Phalaenopsis* orchid tissue culture, *Scientia Horticulturae*, 325, 112563.

84. Ahmad N, Hussain I, Ali S (2025), Nano-iron mediated enhancement of shoot multiplication in banana (*Musa spp.*) micropropagation, *Journal of Plant Biotechnology*, 52, 145–153.

85. Zhang Y, Liu Q, Chen X (2025), Iron oxide nanoparticles improve chlorophyll synthesis and growth of pineapple (*Ananas comosus*) cultured in vitro, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 161, 85–96.

86. Kumar R, Patel M, Singh J (2025), Iron nanoparticle-induced rooting enhancement in potato (*Solanum tuberosum* L.) micropropagation, *Plant Biotechnology Reports*, 19, 211–220.

87. Nadia G (2012), Role and importance of cobalt nutrition on groundnut (*Arachis hypogaea*) production, *World Applied Sciences Journal* 20 (3), pp. 359-367.

88. Thao NP, Khan MIR, Thu NBA, Hoang XLT, Asgher M, Naffees AK, Son PTL (2015), Role of ethylene and its cross talk with other signaling molecules in plant responses to heavy metal stress, *Plant Physiology* 169 (1), pp. 73-84.

89. Zola AS, Ribeiro RU, Bueno JMC, Zanchet D, Arroyo PA (2014), Cobalt nanoparticles prepared by three different methods, *Journal of Experimental Nanoscience* 9(4), pp. 398-405.

90. Hòe PT, Linh TM, Vân NT, Bưu NQ, Mai NC, Liên LQ, Bản NK, Hiền LTT, Châu NH (2018), Nghiên cứu tác động của nano kẽm oxide và nano cobalt đối với quá trình nẩy mầm ở hạt Đậu tương (*Glycine max* (L.) Merr), *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 16(3), tr. 501–508.

91. Fouad AF, Hafez RM (2018), Effect of cobalt nanoparticles and cobalt ions on alkaloids production and expression of CrMPK3 gene in *Catharanthus roseus* suspension cultures, *Cellular and Molecular Biology* 64(12), pp. 62-69.

92. Shkopinskij E, Talankova-Sereda TE, Liapina KV, Dulnev PG (2018), Metal nanoparticles in grape micropropagation and grafting, International Journal of Biosensors & Bioelectronics, 4(5), 208–212.

93. Ghorbanpour M, Varma A, Manika K (2022), Nanotechnology in plant tissue culture: Applications and prospects, Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 148, 1–16.

94. Yadav R, Singh A, Srivastava PK, Choubey AK (2024), Metal oxide nanoparticles and vermicompost improve seed germination and growth of okra (*Abelmoschus esculentus* L.), *Journal of Plant Nutrition, 47*(14), 2150–2162.

95. Wang Y, Tariq T, Mahmood F, Ghorbanpour M, Mustafa G, Hasan M (2025), A nano-bioengineered cobalt oxide biostimulant mediated regulation of physiological, biochemical, and antioxidant mechanisms in maize (*Zea mays* L.), *Scientific Reports, 15*, Article 16140.

96. Phong TH, Mai NTN, Cuong DM, Luan VQ, Tung HT, Phuong HTN, Nhut DT. (2025), Cobalt nanoparticles enhance the efficiency of in vitro propagation in purple passion fruit *(Passiflora edulis* Sims), *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 162(2), 21.

97. Liu L, Xiao W, Li L, Li DM, Gao DS, Zhu CY, Fu XL (2017), Effect of exogenously applied molybdenum on its absorption and nitrate metabolism in strawberry seedling, *Plant Physiology and Biochemistry* 115, pp. 200-211.

98. Sun XC, Tan QL, Nie ZJ, Hu CX, An YQ (2014), Differential expression of proteins in response to molybdenum deficiency in winter wheat leaves under low-temperature stress, *Plant Molecular Biology Reporter* 32, pp. 1057-1069.

99. Ma HL, Mao PP, Imran S, Raza T, Gao R, Lin YY (2021), Rice planting increases biological nitrogen fixation in acidic soil and the influence of light and flood layer thickness, *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* 21, pp. 341-348.

100. Moussa MG, Hu CX, Elyamine AM, Ismael MA, Rana MS, Imran M, Syaifudin M, Tan QL, Marty C, Sun XC (2021), Molybdenum-induced effects on nitrogen uptake efficiency and recovery in wheat (*Triticum aestivum* L.) using 15N-labeled nitrogen with different N forms and rates, *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* 184, pp. 613-621.

101. Liu L, Shi HM, Li SX, Sun MY, Zhang R, Wang YM, Ren FS (2020), Integrated analysis of molybdenum nutrition and nitrate metabolism in strawberry, *Frontiers in Plant Science* 11, pp. 1117.

102. Liu L, Zhang R, Yang C, Li L, Gao DS (2016), Effect of sodium molybdate foliar sprays on key enzymes activities of nitrogen metabolism and 15N absorption, distribution and utilization of strawberry seedling, *Plant Physiology* 52 (7), pp. 1035-1044.

103. Li YD, Jin Q, Yang DS, Cui JH (2018), Molybdenum sulfide induce growth enhancement effect of rice (*Oryza sativa* L.) through regulation the synthesis of chlorophyll and the expression of aquaporin gene, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 66, pp. 4013-4021.

104. Taran NY, Gonchar OM, Lopatko KG, Batsmanova LM, Patyka MV, Volkogon MV (2014), The effect of colloidal solution of molybdenum nanoparticles on the microbial composition in rhizosphere of *Cicer arietinum* L., *Nanoscale Research Letters* 9, pp. 289-297.

105. Hong MH, Ouyang LZ, Ye JS, Liu JW, Yao XD, Wang H, Shao HY, Zhu M (2017), Hydrogen generation via hydrolysis of magnesium with seawater using Mo, MoO_2, MoO_3 and MoS_2 as catalysts, *Journal of Materials Chemistry A* 5, pp. 8566-8575.

106. Whiffen VML, Smith KJ (2010), Hydrodeoxygenation of 4-methylphenol over unsupported MoP, MoS_2, and MoOx catalysts, *Energy Fuels* 24, pp. 4728-4737.

107. Shang HP, Guo HY, Ma CX, Li CY, Chefetz B, Polubesova T, Xing BS (2019), Maize (*Zea mays* L.) root exudates modify the surface chemistry of CuO nanoparticles: Altered aggregation, dissolution and toxicity, *Science of the Total Environment* 690, pp. 502-510.

108. Chai YN, Schachtman DP (2022), Root exudates impact plant performance under abiotic stress, *Trends in Plant Sciece* 27, pp. 80-91.

109. Internet 1. https://vi.wikipedia.org/wiki/Chi_Cúc

110. Teixera da Silva JA (2004), Ornamental chrysanthemums: improvement by biotechnology – Review of plant biotechnology and applied genetics, *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 79, pp. 1-18.

111. Thạch NQ, Đông ĐV (2002), Cây hoa Cúc và kỹ thuật trồng. *NXB. Nông nghiệp, Hà Nội.*

112. Internet 2. http://lamdongtv.vn/tin-tuc-n20508/lam-dong-nhan-giong-hoa-cuc-trien-vong.

113. Tung HT, Bao HG, Cuong DM, Ngan HT, Hien VT, Luan VQ, Vinh BVT, Phuong HTN, Nam NB, Trieu LN, Truong NK, Hoang PND, Nhut DT (2021), Silver nanoparticles as the sterilant in large-scale micropropagation of chrysanthemum, *In vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 57, pp. 897-906.

114. Kanwar J, Kumar S (2008), *In vitro* propagation of Gerbera - A review, *Horticultural Science* 35 (1), pp. 35-44.

115. Broek VDL, Haydu JJ, Hodges AW, *Neves EM (2004)*, Production, marketing and distribution of cut flowers in the United States and Brazil, *Annual Report of Florida Agricultural Experiment Station, University of Florida*, pp. 1-19.

116. Sở Khoa học và Công nghệ Lâm Đồng (2018), Để hoa Đà Lạt trở thành thương hiệu mạnh.

117. Kumar S, Kanwar JK, Sharma DR (2004), *In vitro* regeneration of *Gerbera jamesonii* Bolus from leaf and petiole explants, *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology* 13(1), pp. 73-75.

118. Hussein GM, Ismail IA, El-Saied HM, El-Miniawy SM, Abdallah NA (2008), *In vitro* regeneration of Gerbera, *Agriculture and Forestry Research* 58 (1/2), pp. 97-102.

119. Bhatia R, Singh KP, Singh MC (2012), *In vitro* mass multiplication of Gerbera (*Gerbera jamesonii*) using capitulum explant, *the Indian Journal of Agricultural Sciences* 82 (9), pp. 768-774.

120. Minerva G, Kumar S (2013), Micropropagation of Gerbera (*Gerbera jamesonii Bolus*), In: Lambardi M, Jain SM, Ozudogru EA (Eds), Protocols for

micropropagation of selected economically - important horticultural plants, *Methods in Molecular Biology, Springer* 994, pp. 305-316.

121. Winarto B, Aziz MA, Rashid AA, Ismail MR (2016), Effect of permeable vessel closure and gelling agent on reduction of vitrification in *in vitro* culture of carnation, *Indonesian Journal of Agricultural Science* 5 (1), pp. 11-17.

122. Nhựt DT (2013), Công nghệ Sinh học Thực Vật, tập 5. *Nhà xuất bản Nông Nghiệp, TP. Hồ Chí Minh.*

123. Yến NTK, Huy NP, Cương HV, Nhựt DT (2012), Ảnh hưởng của bạc nitrate ($AgNO_3$) lên khả năng sinh trưởng và phát triển của cây hoa đồng tiền (*Gerbera jamesonii*) nuôi cấy *in vitro*, *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 10 (4A), tr. 953-960.

124. Winarto B, Yufdy MP (2017), Establishment of *in vitro* propagation protocol of *Gerbera jamesonii* Bolus Ex Hook f.: explant and media selection to plantlet acclimatization, *Journal of Agricultural Science* 28 (1), pp. 32-40.

125. Zeljković S, Gidas JD, Parađiković N, Mladenović E (2021), Micropropagation of African violet (*Saintpaulia ionantha* H. Wendl.), *16th International Symposium on Agriculture* 4, pp. 403-407.

126. Kazemian M, Ghasemi Omran VO, Kazemi ME, Kolahi M (2021), Regeneration of pinwheel phenotype and evaluation of anthocyanin in African violet (*Saintpaulia ionantha Wendl.*) periclinal chimera, *Journal of Plant Molecular Breeding* 7 (2), pp. 39-49.

127. Nhựt DT, Uyên PN, Anh TTL, Hải NT, Đôn NT (2007), Ứng dụng hệ thống nuôi cấy ngập chìm tạm thời trong nhân nhanh chồi hoa African violet (*Saintpaulia ionantha* H. Wendl), *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 5 (3), tr. 371-381.

128. Biên LT, Tùng HT, Khải HĐ, Cường ĐM, Luận VQ, Nam NB, Hương TT, Vinh BVT, Nhựt DT (2021), Nâng cao tần suất tái sinh chồi của cây African violet (*Saintpaulia ionantha* Wendl.) nuôi cấy *in vitro* dưới đèn LEDs, *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 19 (4), tr. 717-724.

129. Nhựt DT, Trinh DB, Cường ĐM, Tùng HT, Huy NP, Hiền VT, Luận VQ, Hiền LTT, Châu NH (2018), Khảo sát nano bạc làm chất khử trùng mẫu mới trong

nhân giống vô tính cây African violet (*Saintpaulia ionantha* H. Wendl.), *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 16 (1), tr. 87-97.

130. Chau NH, Bang LA, Buu NQ, Dung TTN, Ha HT, Quang DV (2008), Some results in manufacturing of nanosilver and investigation of its application for disinfection, *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology* 9 (2), pp. 241-248.

131. Chau NH, Buu NQ, Tua TV (2023), Application of nanotechnology in agriculture, *Publishing House for Science and Technology, VAST, Vietnam*, 335p.

132. Teixeira da Silva JA, Fukai S (2003), Chrysanthemum organogenesis through thin cell layer technology and plant growth regulator control, *Asian Journal of Plant Sciences* 2, pp. 505-514.

133. Marklund S, Marklund G (1974), Involvement of the superoxide anion radical in the autooxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase, *European Journal of Biochemistry* 47 (3), pp. 469-474.

134. Goth L (1991), A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range, *Clinica Chimica Acta* 196 (2-3), pp. 143-151.

135. Nakano Y, Asada K (1981), Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts, *Plant Cell Physiology* 22 (5), pp. 867- 880.

136. Kojuncu Ý, Bundalevska LM, Ay Ü, Čundeva K, Stafilov T, Akçin G (2004), Atomic absorption spectrometry determination of Cd, Cu, Fe, Ni, Pb, Zn, and TI traces in seawater following flotation separation, *Separation Science and Technology* 39 (11), pp. 2751-2765.

137. Cristescu SM, Mandon J, Arslanov D, De Pessemier J, Hermans C, Harren FJ (2012), Current methods for detecting ethylene in plants, *Annals of Botany* 111 (3), pp. 347-360.

138. Zhang YP, Hong J, Ye X (2009), Cellulase assays, In: Mielenz JR, (Ed.), Biofuels: Methods in molecular biology (Methods and Protocols), *Humana Press, Totowa* 581, pp. 213-231.

139. Peterson RL, Peterson CA, Melville LH (2008), Teaching plant anatomy through creative laboratory exercises, *NRC Research Press, Ottawa, Canada.*

140. Duncan DB (1955), Multiple range and multiple F test, *Biometrics* 11 (1), pp. 1-42.

141. Rana MS, Bhantana P, Sun XC, Imran M, Shaaban M, Moussa MG, Saleem MH, Elyamine AM, Binyamin R, Alam M, Afzal J, Khan I, Din IU, Ahmad I, Younas M, Kamran M, Hu C (2020), Molybdenum as an essential element for crops: An overview, *Journal of Science and Technology Research* 24 (5), pp. 18535-18547.

142. Rana MS, Bhantana P, Imran M, Saleem MH, Moussa MG, Khan Z, Khan I, Alam M, Abbas M, Binyamin R, Afzal J, Syaifudin M, Din IU, Younas M, Ahmad I, Shah MA, Hu C (2020), Molybdenum potential vital role in plants metabolism for optimizing the growth and development, *Annals of Environmental Science and Toxicology* 4 (1), pp. 32-44.

143. Barker AV, Pilbeam DJ (2015), (Eds.), Handbook of Plant Nutrition, *CRC Press*, pp. 110-121.

144. Scheffer F, Schachtschabel P (2002), Textbook of Soil Science, *Auflage Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, German* 15, 593p.

145. Marschner H (2012), Marschner's Mineral Nutrition of higher plants 3rd Edition, *Academic Press, London.*

146. Moussa MG, Sun X, Ismael MA, Elyamine AM, Rana MS, Syaifudin M, Hu C (2022), Molybdenum-induced effects on grain yield, macro–micro-nutrient uptake, and allocation in Mo-inefficient winter wheat, *Journal of Plant Growth Regulation* 41 (4), pp. 1516-1531.

147. Sharma PK, Raghubanshi AS, Shah K (2021), Examining the uptake and bioaccumulation of molybdenum nanoparticles and their effect on antioxidant activities in growing rice seedlings, *Environmental Science and Pollution Research* 28, pp. 13439-13453.

148. Taran N, Batsmanova L, Kosyk O, Smirnov O, Kovalenko M, Honchar L, Okanenko A (2016), Colloidal nanomolybdenum influence upon the

antioxidative reaction of chickpea plants (*Cicer arietinum* L.), *Nanoscale Research Letters* 11, pp. 1-5.

149. Thomas E, Rathore I, Tarafdar J (2017), Bioinspired production of molybdenum nanoparticles and its effect on chickpea (*Cicer arietinum* L.), *Journal of Bionanoscience* 11 (2), pp. 153-159.

150. Ahmed T, Noman M, Rizwan M, Ali S, Ijaz U, Nazir MM, Haithloul HAS, Alghanem SM, Abdulmajeed AM, Li B (2022), Green molybdenum nanoparticles-mediated bio-stimulation of Bacillus sp. strain ZH16 improved the wheat growth by managing in planta nutrients supply, ionic homeostasis and arsenic accumulation, *Journal of Hazardous Materials* 423, 127024.

151. Kaiser BN, Gridley KL, Ngaire BJ, Phillips T, Tyerman SD (2005), The role of molybdenum in agricultural plant production, *Annals of Botany* 96 (5), pp. 745-754.

152. Mendel RR, Schwarz G (2011), Molybdenum cofactor biosynthesis in plants and humans, *Coordination Chemistry Reviews* 255 (9-10), pp. 1145-1158.

153. Heidarzade A, Esmaeili M, Bahmanyar M, Abbasi R (2016), Response of soybean (Glycine max) to molybdenum and iron spray under well-watered and water deficit conditions, *Journal of Experimental Biology and Agricultural Science* 4 (1), pp. 37-46.

154. Trong LV, Thinh BB, Hung N (2020), Impacts of molybdenum on drought tolerance of some maize (*Zea mays* L.) cultivars at seedling stage, *Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology* 21 (19-20), pp. 70-77.

155. Tejada-Jiménez M, Chamizo-Ampudia A, Galván A, Fernández E, Llamas Á (2013), Molybdenum metabolism in plants, *Metallomics* 5 (9), pp. 1191-1203.

156. Bittner F (2014), Molybdenum metabolism in plants and crosstalk to iron, *Frontiers in Plant Science* 5, pp. 28.

157. Nair R, Varghese SH, Nair BG, Maekawa T, Yoshida Y, Kumar DS (2010), Nanoparticulate material delivery to plants, *Plant Science* 179(3), pp. 154-163.

158. Marschner P (2012), *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants* (3rd ed.), Academic Press.

159. Dimkpa CO, McLean JE, Latta DE, Manangón E, Britt DW, Johnson WP, Boyanov MI, Anderson AJ (2012), CuO and ZnO nanoparticles: phytotoxicity and nutrient uptake, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 1970–1978.

160. Raliya R, Saharan V, Dimkpa C, Biswas P (2017), Nanofertilizer for precision agriculture, *Scientific Reports*, 7, 1–11.

161. Tripathi DK, Singh S, Singh S, Srivastava PK, Singh VP, Singh S, Prasad SM, Dubey NK, Chauhan DK (2017), Nanomaterials in plant science, *Frontiers in Plant Science*, 8, 1–14.

162. Kumar S, Mohapatra T (2021), Interaction between macro-and micro-nutrients in plants, *Frontiers in Plant Science* 12, 665583.

163. Guha S, Sharma H, Deshwal GK, Rao PS (2021), A comprehensive review on bioactive peptides derived from milk and milk products of minor dairy species, *Food Production, Processing and Nutritrion* 3(1), pp. 1-21.

164. Tripathi DK, Singh S, Mishra S, Chauhan DK, Dubey NK (2015), Micronutrients and their diverse role in agricultural crops: advances and future prospective, *Acta Physiologiae Plantarum* 37, pp. 1-14.

165. Zhang M, Hu C, Zhao X, Tan Q, Sun X, Cao A, Cui M, Zhang Y (2012), Molybdenum improves antioxidant and osmotic-adjustment ability against salt stress in Chinese cabbage (*Brassica campestris* L. ssp. pekinensis), *Plant and Soil* 355, pp. 375-383.

166. Wu MH, Li L, Liu N, Wang DJ, Xue YC, Tang L (2018), Molybdenum disulfide (MoS_2) as a co-catalyst for photocatalytic degradation of organic contaminants: A review, *Process Safety and Environmental Protection* 118, pp. 40-58.

167. Sun X, Hu C, Tan Q, Liu J, Liu H (2009), Effects of molybdenum on expression of cold-responsive genes in abscisic acid (ABA)-dependent and ABA-independent pathways in winter wheat under low-temperature stress, *Annals of Botany* 104 (2), pp. 345-356.

168. Gao Y, Chen C, Tan X, Xu H, Zhu K (2016), Polyaniline-modified 3D-flower-like molybdenum disulfide composite for efficient adsorption/photocatalytic reduction of Cr (VI), *Journal of Colloid and Interface Science* 476, pp. 62-70.

169. Imran M, Sun X, Hussain S, Rana MS, Saleem MH, Riaz M, Tang X, Khan, Hu C (2021), Molybdenum supply increases root system growth of winter wheat by enhancing nitric oxide accumulation and expression of NRT genes, *Plant and Soil* 459, pp. 235-248.

170. Zhang H, Wang R, Chen Z, Pu J, Wang J, Zhang H, Yang Y (2022), Nanoscale molybdenum oxide improves plant growth and increases nitrate utilisation in rice (*Oryza sativa* L.), *Food and Energy Security* 11, (2), e383.

171. Jaleel CA, Changxing Z, Jayakumar K, Iqbal M (2009), Low concentration of cobalt increases growth, biochemical constituents, mineral status and yield in Zea mays, *Journal of Scientific Research* 1 (1), pp. 128-137.

172. Saha N, Gupta SD (2018), 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 and Organ Culture* 134 (2), pp. 289-300.

173. Babaei N, Ashikin N, Abdullah P, Saleh G, Abdullah TL (2013), Control of contamination and explant browning in *Curculigo latifolia in vitro* cultures, *Journal of Medicinal Plants Research* 7 (8), pp. 448-454.

174. Jones AMP, Saxena PK (2013), Inhibition of phenylpropanoid biosynthesis in *Artemisia annua* L. A novel approach to reduce oxidative browning in plant tissue culture, *PLoS One* 8, pp. 1-13.

175. Bhojwani SS, Dantu PK (2013), Plant tissue culture: An introductory text, *Springer, India*, pp. 260-263.

176. Do MC, Ho CKH, Nguyen PLH, Hoang DK, Vu QL, Duong TN (2025), Effects of cobalt, copper and molybdenum trioxide nanoparticles on in vitro rooting of strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.), *Vietnam Journal of Science and Technology*, 67(8), 75–80.

177. Kumar R, Patel M, Singh J (2023), Application of cobalt nanoparticles for improving growth of potato (*Solanum tuberosum* L.) under in vitro conditions, *Plant Biotechnology Reports*, 17, 533–542.

178. Ramesh K, Subramanian P, Kumar V (2022), Synthesis and characterization of cobalt oxide nanoparticles and their effect on growth of okra (*Abelmoschus esculentus* L.), *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management*, 18, 100682.

179. Basu M, Bhadoria P, Mahapatra S (2006), Influence of microbial culture in combination with micronutrient in improving the groundnut productivity under alluvial soil of India, *Acta Agriculturae Slovenica* 87 (2), pp. 435-444.

180. Sarropoulou V, Dimassi-Theriou K, Therios I (2016), Effect of the ethylene inhibitors silver nitrate, silver sulfate, and cobalt chloride on micropropagation and biochemical parameters in the cherry rootstocks CAB-6P and Gisela 6, *Turkish Journal of Biology* 40 (3), pp. 670-683.

181. Aziz EE, Gad N, Badran N (2007), Effect of cobalt and nickel on plant growth, yield and flavonoids content of *Hibiscus sabdariffa* L., *Australian Journal of Basic Applied Sciences* 1 (2), pp. 73-78.

182. MacDonald MT, Lada RR, Dorais M, Pepin S (2011), Endogenous and exogenous ethylene induces needle abscission and cellulase activity in post-harvest balsam fir (*Abies balsamea* L.), *Trees* 25 (5), pp. 940-947.

183. Mishra A, Khare S, Trivedi PK, Nath P (2008), Ethylene induced cotton leaf abscission is associated with higher expression of cellulase (GhCel1) and increased activities of ethylene biosynthesis enzymes in abscission zone, *Plant Physiology and Biochemistry* 46 (1), pp. 54-63.

184. Radville L, Chaves A, Preisser EL, Variation in plant defense against invasive herbivores: evidence for a hypersensitive response in eastern hemlocks (*Tsuga canadensis*), *Journal of Chemical Ecology* 37 (6), pp. 592-597.

185. Ahmad P, Sarwat M, Sharma S (2008), Reactive oxygen species, antioxidants and signalling in plants, *Journal of Plant Biology* 51 (3), pp. 167-173.

186. Zhu-Salzman K, Salmon RA, Ahn JE, Koiwa H (2004), Transcriptional regulation of sorghum defense determinants against a phloem-feeding aphid, *Plant Physiology* 134 (1), pp. 420-431.

187. Shah SH, Ali S, Ali GM (2013), A novel approach for rapid *in vitro* morphogenesis in tomato (*Solanum lycopersicum* Mill.) with the application of cobalt chloride, *European Academic Research* 1 (2), pp. 2702-2721.

188. Prazak R (2014), Influence of cobalt concentration on the growth and development of *Dendrobium kingianum* Bidwill orchid in an *in vitro* culture, *Journal of Elementology* 19 (2), pp. 495-506.

189. Iqbal J, Abbasi BA, Batool R, Khalil A, Hameed S, Kanwal S, Ullah I, Mahmood T (2019), Biogenic synthesis of green and cost effective cobalt oxide nanoparticles using *Geranium wallichianum* leaves extract and evaluation of *in vitro* antioxidant, antimicrobial, cytotoxic and enzyme inhibition properties, *Materials Research Express* 6 (11), pp. 40-47.

190. Mamyandi D, Sinha SK, White JC (2009), Assay dependent phytotoxicity of nanoparticles to plants, *Environmental Science and Technology* 43 (24), pp. 9473-9479.

191. Kumari M, Mukherjee A, Chandrasekaran N (2009), Genotoxicity of silver nanoparticles in *Allium cepa*, *Science of the Total Environment* 407 (19), pp. 5243-5246.

192. Libralato G, Costa DA, Zanella M, Sabbioni E, Mičetić I, Manodori L, Pigozzo A, Manenti S, Groppi F, Volpi GA (2006), Phytotoxicity of ionic, micro- and nano-sized iron in three plant species, *Ecotoxicology and Environmental Safety* 123, pp. 81-88.

193. Farooqui A, Tabassum H, Ahmad A, Mabood A, Adnan A, Iffat AF (2016), Role of nanoparticles in growth and development of plants: a review, *International Journal of Pharmaceutical and Bio-medicinal Science* 7 (4), pp. 22-37.

194. Musante C, White JC (2012), Toxicity of silver and copper to *Cucurbita pepo*: differential effects of nano and bulk-size particles, *Environmental Toxicology* 27 (9), pp. 510-517.

195. Li J, Chang PR, Huang J (2013), Physiological effects of magnetic iron oxide nanoparticles towards watermelon, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 13 (8), pp. 5561-5567.

196. Joseph S, Anawar HM, Storer P (2015), Effects of enriched biochars containing magnetic iron nanoparticles on mycorrhizal colonization, plant growth, nutrient uptake and soil quality improvement, *Pedosphere* 25 (5), pp. 749-760.

VIỆN HÀN LÂM
KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VN
HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ
*

ĐẢNG CỘNG SẢN VIỆT NAM

Số 07 - QĐ/HVKHCN

Hà Nội, ngày 14 tháng 4 năm 2026

QUYẾT ĐỊNH
về việc thành lập Hội đồng đánh giá luận án tiến sĩ cấp Học viện

---

- Căn cứ Quyết định số 44-QĐ/VHLKHCNVN ngày 01/04/2026 của Chủ tịch Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam ban hành Quy chế Tổ chức và hoạt động của Học viện Khoa học và Công nghệ;
- Căn cứ Thông tư số 08/2017/TT-BGDĐT ngày 04/04/2017 của Bộ Giáo dục và Đào tạo ban hành Quy chế tuyển sinh và đào tạo trình độ tiến sĩ;
- Căn cứ Quyết định số 1948/QĐ-HVKHCN ngày 28/12/2018 của Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ về việc ban hành Quy định đào tạo trình độ tiến sĩ tại Học viện Khoa học và Công nghệ;
- Căn cứ Quyết định số 566/QĐ-HVKHCN ngày 01/06/2020 của Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ về việc công nhận nghiên cứu sinh trúng tuyển đợt 1 năm 2020, Chương trình thông thường;
- Căn cứ Quyết định số 1110/QĐ-HVKHCN ngày 29/10/2025 của Giám đốc Học viện về việc gia hạn thời gian học tập lần 3: 06 tháng từ 01/12/2025-01/06/2026 cho NCS Phan Lê Hà Nguyễn;
- Xét đề nghị của Trưởng phòng Đào tạo.

GIÁM ĐỐC HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ
QUYẾT ĐỊNH

Điều 1. Thành lập Hội đồng đánh giá luận án tiến sĩ cấp Học viện cho nghiên cứu sinh Phan Lê Hà Nguyễn với đề tài:

Nghiên cứu thay thế một số muối kim loại vi lượng bằng nano kim loại trong vi nhân giống cây hoa (cúc, đồng tiền và tử linh lan)

Ngành: Công nghệ sinh học Mã số: 9 42 02 01

Danh sách thành viên Hội đồng đánh giá luận án kèm theo Quyết định này.

Điều 2. Hội đồng có trách nhiệm đánh giá luận án tiến sĩ theo đúng quy chế hiện hành của Bộ Giáo dục và Đào tạo, Học viện Khoa học và Công nghệ.

Quyết định có hiệu lực kể từ ngày ký đến trước ngày 01/06/2026. Hội đồng tự giải thể sau khi hoàn thành nhiệm vụ.

Điều 3. Trưởng phòng Tổ chức - Hành chính, Trưởng phòng Đào tạo, Trưởng phòng Kế toán, các thành viên có tên trong danh sách Hội đồng và nghiên cứu sinh có tên tại Điều 1 chịu trách nhiệm thi hành Quyết định này.

Nơi nhận:
- Như Điều 3,
- Lưu hồ sơ NCS,
- Lưu VT,ĐT,MT.13.

GIÁM ĐỐC

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

GS.TS. Vũ Đình Lãm

DANH SÁCH HỘI ĐỒNG ĐÁNH GIÁ LUẬN ÁN TIẾN SĨ CẤP HỌC VIỆN

(Kèm theo Quyết định số 07 - QĐ/HVKHCN ngày 14 / 4 /2026

của Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ)

Cho luận án của nghiên cứu sinh: Phan Lê Hà Nguyễn

Về đề tài: Nghiên cứu thay thế một số muối kim loại vi lượng bằng nano kim loại trong vi nhân giống cây hoa (cúc, đồng tiền và tử linh lan)

Ngành: Công nghệ sinh học Mã số: 9 42 02 01

Thầy hướng dẫn: 1. GS.TS. Dương Tấn Nhựt
- Viện Khoa học sự sống, Viện Hàn lâm KHCNVN

2. PGS.TS. Vũ Quốc Luận
- Viện Khoa học sự sống, Viện Hàn lâm KHCNVN

TT	Họ và tên, học hàm, học vị	Chuyên ngành	Cơ quan công tác	Trách nhiệm trong Hội đồng
1	PGS.TS. Nguyễn Du Sanh	Sinh lý học thực vật	Trường Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia TP.HCM	Chủ tịch
2	PGS.TS. Trương Thị Bích Phượng	Sinh lý học thực vật	Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế	Phản biện 1
3	PGS.TS. Hoàng Thị Kim Hồng	Sinh lý học thực vật	Trường Đại học Duy Tân, Đại học quốc gia TP.HCM	Phản biện 2
4	PGS.TS. Trần Thanh Hương	Sinh lý học thực vật	Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học quốc gia TP.HCM	Phản biện 3
5	TS. Nguyễn Bá Nam	Khoa học cây trồng	Trường Đại học Đà Lạt, Bộ Giáo dục và Đào tạo	Ủy viên - Thư ký
6	PGS.TS. Trịnh Thị Hương	Sinh lý học thực vật	Trường Đại học Công thương TP.HCM, Bộ Công thương	Ủy viên
7	PGS.TS. Trịnh Ngọc Nam	Công nghệ sinh học	Trường Đại học Công nghiệp TP.HCM, Bộ Công thương	Ủy viên

(Hội đồng gồm 07 thành viên)./.

BẢN NHẬN XÉT PHẢN BIỆN LUẬN ÁN TIẾN SĨ

Họ và tên người phản biện luận án: **Nguyễn Du Sanh**

Học hàm, học vị: **PGS.TS**

Cơ quan công tác: **Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Tp. Hồ Chí Minh**

Họ và tên nghiên cứu sinh: **Phan Lê Hà Nguyễn**

Tên đề tài luận án: ***Nghiên cứu thay thế một số muối kim loại vi lượng bằng nano kim loại trong vi nhân giống cây (hoa cúc, đồng tiền và tử linh lan).***

Ý KIẾN NHẬN XÉT

1. Tính cần thiết, thời sự, ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài

Kỹ thuật nuôi cấy mô đã phát triển rất nhanh và đem đến các kết quả ứng dụng vượt bậc. Việc sử dụng các nano kim loại (NPs) thay thế cho các muối kim loại vi lượng truyền thống trong nuôi cấy mô cho thấy chúng rất có hiệu quả ngoài việc khử trùng môi trường, mẫu vật, chúng còn tác động lên sự phát sinh hình thái với hàm lượng ít hoặc tương đương đã được chứng minh trên một số loài thực vật. Việc theo dõi cách tác động của các nano kim loại (NPs) càng ngày càng được quan tâm, được nghiên cứu trên nhiều đối tượng thực vật. Luận án được thực hiện không ngoài mục đích đó. Nhân giống *in vitro* cúc (*Chrysanthemum morifolium*), đồng tiền (*Gerbera jamesonii*), tử linh lan (*Saintpaulia ionantha*), là ba loài hoa chủ đạo ở vùng Dalat (Lâm đồng). Các kết quả thu nhận sẽ vừa có ý nghĩa khoa học lẫn thực tiễn và vừa có tính thời sự (xu hướng sử dụng các NPs trong nuôi cấy mô).

2. Sự không trùng lặp của đề tài nghiên cứu so với các công trình, luận văn, luận án đã công bố ở trong và ngoài nước; tính trung thực, rõ ràng và đầy đủ trong trích dẫn tài liệu tham khảo

Bản thân chưa thấy có sự trùng lắp về nội dung của công trình và luận án được công bố trước đây. Đây là một công trình nghiên cứu khá chi tiết về ảnh hưởng của ba NPS (Mo, Co, Fe) lên sự phát sinh hình thái của ba đối tượng cúc, đồng tiền và tử linh lan nuôi cấy *in vitro* (có so sánh với đối chứng (-) và (+). Các kết quả thí nghiệm thu nhận được trình bày rõ; Các ghi nhận và các lý giải có liên quan được trích dẫn.

3. **Sự phù hợp giữa tên đề tài với nội dung, giữa nội dung với ngành và mã số ngành**

Nội dung luận án phù hợp với tên của đề tài, thuộc luận án tiến sĩ sinh học ứng dụng, ngành Công nghệ sinh học Thực vật. Mã số: 942 02 01.

4. **Độ tin cậy và tính hiện đại của phương pháp đã sử dụng để nghiên cứu**

Phương pháp nghiên cứu trong luận án là các phương pháp thường được sử dụng trong nghiên cứu về phát sinh hình thái thực vật *in vitro* (tạo mô sẹo, tạo chồi, nhân nhanh chồi, tạo rễ) cũng như xác định hoạt tính enzyme, sự hấp thu các chất khoáng, lượng khí ethylen tạo ra, bên cạch các thay đổi về hình thái của mẫu cấy trong quá trình nuôi cấy mô; Các kỹ thuật sinh hóa hiện đại để xác định các thay đổi trong quá trình phát sinh hình thái. Địa điểm nghiên cứu là các đơn vị có uy tín, có trang thiết bị hàng đầu trong nước cũng như thời gian thực hiện 6 năm (tr.50).

5. **Kết quả nghiên cứu mới của tác giả; những đóng góp mới cho sự phát triển khoa học chuyên ngành; đóng góp mới phục vụ cho sản xuất, kinh tế, quốc phòng, xã hội và đời sống; ý nghĩa khoa học, giá trị và độ tin cậy của những kết quả đó**

Nghiên cứu đã chứng minh các nano kim loại (MoO_3NPs, CoNPs, FeNPs) thay thế được các muối kim loại vi lượng truyền thống với hàm lượng bằng hoặc thấp hơn. Chúng có tác dụng tốt trong sự phát sinh hình thái (mô sẹo, tạo và nhân chồi, tạo rễ) trên ba đối tượng nghiên cứu: cúc, đồng tiền, tử linh lan. Các số liệu thể hiện qua hoạt độ các enzyme kháng oxy hóa, thủy phân; sự hấp thu các ion kim loại (K, Ca, Mg, Fe, Cu) cũng như dư lượng của Co và Mo; lượng khí ethylen thoát ra cũng như sự thay đổi hình thái trong quá trình nuôi cấy *in vitro*. Ngoài ra chúng còn giúp cây con sinh trưởng tốt và có thể kích thích tạo hoa sớm (đồng tiền). Số liệu được ghi nhận và có phân tích thống kê. Các kết quả ghi nhận được lý giải qua các trích dẫn.

6. **Ưu điểm và nhược điểm về nội dung, kết cấu và hình thức của luận án**

Ưu điểm:

Thí nghiệm nhiều (có 9 thí nghiệm), công phu, thời gian dài (6 năm); Số liệu đa dạng; Phương pháp sử dụng kỹ thuật sinh hóa hiện đại; Ít lỗi in ấn. Luận án có 124 trang ghi nhận việc sử dụng dung dịch nano kim loại (MoO_3NPs, CoNPs, FeNPs) thay thế cho các muối kim loại vi lượng truyền thống (Mo, Co, Fe), có tác động lên quá trình phát sinh hình thái từ các bộ phận của 3 đối tượng khảo cứu: cúc (*Chrysanthemum morifolium*), đồng tiền (*Gerbera jamesonii*), tử linh lan (*Saintpaulia ionantha*) khi nuôi cấy *in vitro*. Luận án bao gồm phần **Mở đầu** 4 trang nêu lý do, mục tiêu, ý nghĩa cũng như đối tượng nghiên cứu. **Chương 1**: Tổng quan tài liệu 34 trang trình bày các kiến thức có liên quan đến nội dung luận án. **Chương 2**: 12 trang gồm vật liệu, nội dung và phương pháp nghiên cứu. **Chương 3**: 47 trang trình bày kết quả và thảo luận sự tác động của ba dung dịch nano kim loại (MoO_3NPs, CoNPs, FeNPs) lên sự phát sinh hình thái của 3 đối tượng

cúc, đồng tiền, tử linh lan khi nuôi cấy *in vitro* qua 9 thí nghiệm cùng các phân tích đo đạc về hoạt độ enzyme kháng oxy hóa, thủy phân; sự hấp thu các ion kim loại (K, Ca, Mg, Fe, Cu) cũng như dư lượng của Co và Mo; lượng khí ethylen thoát ra cũng như sự thay đổi hình thái trong quá trình nuôi cấy *in vitro*. Phần **Kết luận và kiến nghị** 3 trang nêu khái quát kết quả của nội dung luận án cũng như cần triển khai thêm khi có điều kiện giúp hoàn chỉnh những giới hạn mà nội dung chưa làm sáng tỏ hết. Phần **danh mục công trình** công bố ghi nhận có 6 công trình được công bố có liên quan đến luận án trên sách, tạp chí, hội nghị trong và ngoài nước từ 2022-2024 bằng tiếng Việt và tiếng Anh (1 trang). Phần **tài liệu tham khảo** có 13 trang với 200 tài liệu cập nhật được dẫn chứng có liên quan đến nội dung luận án.

Nội dung luận án trình bày ảnh hưởng của từng loại NPs (Mo, Co, Fe) lên các bộ phận được dùng làm mẫu vật của 3 đối tượng cúc, đồng tiền và tử linh lan nuôi cấy *in vitro*. Theo dõi tác động của chúng trên sự phát sinh hình thái từ các mẫu vật này. Các số liệu ghi nhận có tính thống kê. Có bảng, hình đi kèm nên dễ theo dõi. Tài liệu tham khảo phong phú và có tính cập nhật.

Những hạn chế của luận án

Tuy nhiên cũng còn vài lỗi in ấn: Danh mục chữ viết tắt có vài sai sót. Danh mục bảng, hình bị nhầm trang so với phần nội dung (từ phần nội dung); Các từ diễn đạt trong luận án cần thống nhất một kiểu (Việt hóa hoặc thông dụng trong công bố khoa học); Cây tử linh lăng cần cho tên khoa học (tr.37), bình nuôi cấy cần cho thể tích bình cũng như thể tích dung dịch (tr.40) vì có đo lượng khí ethylen trong bình (tr.48); cần ghi rõ phần vật liệu đem phân tích (tr.47→ 49); Xem lại bảng 3.2 tr.53 (đơn vị ở cột 3); Mỗi thí nghiệm hay mỗi mẫu thực vật đem thí nghiệm với một NPs (Mo, Co; Fe) cần có một kết luận sơ bộ. Kết luận nên cô đọng và nêu bật vai trò của các NPs thay thế các muối kim loại vi lượng truyền thống.

Câu hỏi:

- Sự phát sinh hình thái thường liên quan đến chất điều hòa sinh trưởng thực vật. Khi thay thế các muối kim loại vi lượng truyền thống bằng các nano kim loại (NPs) thì các NPs này có tác động đến các chất điều hòa sinh trưởng thực vật như thế nào để giúp sự phát sinh hình thái tốt hơn? (tác giả có đề cập tr.52; 58; 70).

7. Nội dung của luận án đã được công bố trên tạp chí, kỷ yếu Hội nghị Khoa học nào và giá trị của các công trình đã công bố

Có 6 công trình được công bố có liên quan đến luận án trên sách, tạp chí, hội nghị trong và ngoài nước từ 2022-2024. Trong đó có 3 công bố với tên tác giả đứng đầu: 01 trên tạp chí nước

ngoài (*Plant Cell, Tissue and Organ Culture năm 2024*); Hai trên tạp chí trong nước trong đó có 01 trên tạp chí chuyên ngành *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam 2024* và 01 trong *Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc 2022.*

8. **Kết luận chung cần khẳng định**

- Mức độ đáp ứng các yêu cầu đối với một luận án tiến sĩ ngành.

Luận án có đầy đủ các phần theo qui định của một luận án tiến sĩ. Nội dung phong phú cho thấy các NPs có thể thay thế các muối kim loại vi lượng truyền thống **không những có tác dụng tốt trong khử trùng mẫu mà còn có tác dụng kích thích phát sinh hình thái trên ba đối tượng nghiên cứu (mô sẹo, tạo nhân chồi, tạo rễ và có thể là kích thích tạo hoa sớm (Đồng tiền)).**

- Bản tóm tắt luận án có phản ánh trung thành nội dung cơ bản của luận án không.

Bản tóm tắt luận án thể hiện đầy đủ và trung thực của nội dung luận án.

- Luận án có thể đưa ra bảo vệ cấp Học viện để nhận bằng Tiến sĩ được hay không.

Luận án có thể được đưa ra bảo vệ cấp Học viện để nhận bằng Tiến sĩ Sinh học ứng dụng ngành Công nghệ Sinh học.

Tp. Hồ Chí Minh, ngày 06 tháng 05 năm 2026

Người viết nhận xét

Nguyễn Du Sanh

BẢN NHẬN XÉT PHẢN BIỆN LUẬN ÁN TIẾN SĨ

Họ và tên người phản biện luận án: **Trương Thị Bích Phượng**

Học hàm, học vị: PGS.TS

Cơ quan công tác: Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế

Họ và tên nghiên cứu sinh: **Phan Lê Hà Nguyễn**

Tên đề tài luận án: **Nghiên cứu thay thế một số muối kim loại vi lượng bằng nano kim loại trong vi nhân giống cây hoa (cúc, đồng tiền và tử linh lan)**

Ý KIẾN NHẬN XÉT

1. Tính cần thiết, thời sự, ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài

Hiện nay nghiên cứu ứng dụng các hạt nano trong nuôi cấy *in vitro* chủ yếu là bổ sung các hạt nano vào môi trường nuôi cấy nhằm tăng cường khả năng phát sinh hình thái, sinh trưởng, cải thiện năng suất cây trồng,... Các nghiên cứu trong việc sử dụng nano kim loại như nguồn dinh dưỡng thay thế trong môi trường nuôi cấy *in vitro*, đặc biệt nuôi cấy các loài cây cảnh có giá trị thương mại còn hạn chế. Trong bối cảnh công nghệ nano đang được ứng dụng rộng rãi trong nông nghiệp công nghệ cao, hướng nghiên cứu này mang tính thời sự và phù hợp với xu thế phát triển hiện nay.

Nghiên cứu được tiến hành theo hướng hệ thống, đánh giá trên nhiều nguyên tố vi lượng và 03 đối tượng cây trồng, bước đầu làm rõ các tác động sinh lý, sinh hóa liên quan đến hoạt động của enzyme, hấp thu khoáng và điều hòa ethylene. Những kết quả này góp phần bổ sung cơ sở khoa học cho việc ứng dụng nano trong nuôi cấy mô thực vật. Kết quả của nghiên cứu có khả năng ứng dụng trong cải tiến môi trường nuôi cấy, nâng cao chất lượng cây giống và giảm các hiện tượng bất thường trong vi nhân giống.

Đề tài vì vậy mà có ý nghĩa về lý luận khoa học đồng thời có giá trị thực tiễn cấp thiết.

2. Sự không trùng lặp của đề tài nghiên cứu so với các công trình, luận văn, luận án đã công bố ở trong và ngoài nước; tính trung thực, rõ ràng và đầy đủ trong trích dẫn tài liệu tham khảo

Đã có một số nghiên cứu trước đây ứng dụng các hạt nano trong nuôi cấy *in vitro* trong nghiên cứu phát sinh hình thái, sinh trưởng, năng suất ,... trên 3 đối tượng hoa cúc, đồng tiền và tử linh lan. Nghiên cứu của tác giả theo hướng sử dụng nano kim loại như nguồn dinh dưỡng thay thế các muối vi lượng trong môi trường nuôi cấy *in vitro*, thay vì chỉ đóng vai trò là chất bổ sung.

Trích dẫn tài liệu đảm bảo tính trung thực và có tham khảo các nguồn tài liệu liên quan. Đề tài không trùng lắp với các công trình đã công bố trong và ngoài nước. Số liệu được thể hiện đầy đủ, rõ ràng trong phần kết quả Luận án.

3. Sự phù hợp giữa tên đề tài với nội dung, giữa nội dung với ngành và mã số ngành.

Tên đề tài luận án phù hợp với nội dung nghiên cứu, phản ánh đúng các vấn đề trọng tâm của nghiên cứu, thể hiện rõ đối tượng (cúc, đồng tền và tử linh lan), phương pháp tiếp cận và phạm vi ứng dụng trong vi nhân giống cây hoa. Nội dung nghiên cứu của luận án phù hợp với ngành đào tạo và mã số ngành Công nghệ Sinh học 9420201. Nội dung nghiên cứu sát mục tiêu đề ra, tập trung vào việc thay thế các muối kim loại vi lượng bằng nano kim loại tương ứng trên ba đối tượng cây hoa.

4. Độ tin cậy và tính hiện đại của phương pháp đã sử dụng để nghiên cứu.

Trên nguồn vật liệu nghiên cứu là các mẫu cấy *in vitro* 30 ngày tuổi bao gồm lá, đoạn thân và chồi ngọn cây cúc; chồi cây đồng tiền; lá và chồi cây tử linh lan được nhân giống tại phòng Sinh học Phân tử và Chọn tạo giống cây trồng, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VAST), tác giả đã sử dụng các phương pháp nghiên cứu có tính cập nhật, phù hợp với mục tiêu đề tài, gồm kỹ thuật nuôi cấy *in vitro* kết hợp với các phân tích sinh lý, sinh hóa và hóa học: Phương pháp xác định hoạt độ ezyme kháng oxy hóa SOD, CAT và APX; phân tích nguyên tố bằng AAS; xác định ethylene bằng sắc ký khí và xác định hoạt độ enzyme thủy phân; Phương pháp Giải phẫu hình thái thực vật. Đây là các phương pháp hiện đại, có độ tin cậy cao và được sử dụng phổ biến trong lĩnh vực công nghệ sinh học thực vật. Các thí nghiệm được bố trí có đối chứng, có lặp lại, có xử lý thống kê, đảm bảo độ tin cậy của kết quả nghiên cứu.

5. Kết quả nghiên cứu mới của tác giả; những đóng góp mới cho sự phát triển khoa học chuyên ngành; đóng góp mới phục vụ cho sản xuất, kinh tế, quốc phòng, xã hội và đời sống; ý nghĩa khoa học, giá trị và độ tin cậy của những kết quả đó.

Luận án đã đạt được nhiều kết quả nghiên cứu mới có giá trị khoa học và thực tiễn. Nghiên cứu đánh giá hiệu quả của thay thế các muối kim loại vi lượng bằng nano kim loại trong môi trường nuôi cấy *in vitro*, xác định được ảnh hưởng của các dạng nano Fe, Co và Mo đến sinh trưởng, phát triển và một số chỉ tiêu sinh lý, sinh hóa của cây trồng, góp phần mở rộng hướng tiếp cận trong lĩnh vực công nghệ sinh học thực vật, đặc biệt trong nghiên cứu về vai trò của vật liệu nano trong hệ thống nuôi cấy mô.

Kết quả nghiên cứu có giá trị ứng dụng trong cải tiến môi trường nuôi cấy và nâng cao chất lượng nguồn giống cây trồng qua nhân giống *in vitro*, sản xuất giống chất lượng, phát triển cây trồng giá trị kinh tế.

6. Ưu điểm và nhược điểm về nội dung, kết cấu và hình thức của luận án.

Ưu điểm:

Mục tiêu và nội dung nghiên cứu phù hợp với tên đề tài luận án và chuyên ngành Công nghệ Sinh học. Nội dung nghiên cứu có tính liên ngành, kết hợp giữa công nghệ sinh học thực vật và vật liệu nano, tập trung vào thay thế các muối kim loại vi lượng (Fe, Co, Mo) trong môi trường nuôi cấy *in vitro* 03 đối tượng cây trồng, nhiều giai đoạn sinh trưởng, đồng thời kết hợp đánh giá ở các mức độ hình thái, sinh lý và sinh hóa. Bố cục luận án hợp lý, khoa học. Kết quả nghiên cứu phong phú, sự sắp xếp các phần hợp lý, số liệu đáng tin cậy. Phần kết luận tổng kết được các nội dung nghiên cứu của đề tài. Các kết quả luận án đạt được là rất lớn, có ý nghĩa khoa học và thực tiễn, dung lượng luận án đảm bảo. Kết quả của đề tài là cơ sở cho các nghiên cứu tiếp theo ứng dụng nano kim loại như một nguồn dinh dưỡng thay thế hiệu quả trong nhân giống *in vitro* các loài cây trồng có giá trị. Hình thức trình bày theo quy định, bảng, hình, biểu đồ thể hiện rõ nội dung khoa học, dữ liệu được trình bày khoa học, có xử lý thống kê, đảm bảo độ tin cậy.

Hình thức và Nội dung luận án đáp ứng yêu cầu của luận án Tiến sĩ.

Những hạn chế của luận án:

Tuy nhiên, luận án còn một số hạn chế cần chỉnh sửa, bổ sung:

- Danh mục chữ viết tắt: Sắp xếp theo alphabet, bổ sung các chữ viết tắt trong luận án: KIN, IBA, GC (Gas Chromatography), AAS (Atomic Absorption Spectroscopy)

Thống nhất trình bày có chú thích tiếng Anh NPs: Hạt Nano", nên thêm "Nanoparticles → nên bổ sung cột thuật ngữ tiếng Anh

+ SPAD (Soil Plant Analysis Development): "Chỉ số Chlorophyll tổng" → chính xác là "Chỉ số hàm lượng diệp lục tương đối" (là chỉ số tương đối phản ánh hàm lượng diệp lục trong lá cây)

+ "Molypden" → "Molybdenum"

- Sửa chính xác số trang của Bảng và Hình trong Danh mục Bảng và Danh mục Hình

- Lý do chọn đề tài: Các nhận định "bùng nổ công nghệ nano", "đang tận dụng và tiếp nhận…" → nên bổ sung trích dẫn cụ thể, hoặc số liệu hoặc công trình minh chứng để tăng tính học thuật.

Mục tiêu cụ thể viết mô tả dài → nên tách thành các mục tiêu độc lập, đo lường được:

+ Xác định ảnh hưởng của NPs đến…

+ Đánh giá vai trò của NPs trong…

+ Phân tích sự thay đổi của…

Tránh lẫn giữa mục tiêu và nội dung nghiên cứu (liệt kê: enzyme, ethylene, hấp thu khoáng...) là các nội dung nghiên cứu, không phải mục tiêu.

2.1.4. Điều kiện nuôi cấy (trang 41): gồm Phòng thí nghiệm và Vườn ươm → Điều kiện thí nghiệm/Điều kiện nuôi trồng

Vườn ươm: Giá thể: "perlite và mùn (tỷ lệ 1:1)" (trang 41) → cụ thể loại mùn: Rêu than bùn? Phân hữu cơ?

2.1.5. Môi trường nuôi cấy (trang 41): bổ sung pH môi trường? điều kiện khử trùng (nhiệt độ, thời gian khử trùng)

MS bổ sung 2 mg/L BA và 0,5 mg/L axit 1-naphthaleneacetic (NAA) (trang 41) → Thống nhất chữ viết tắt đầy đủ lần đầu.

Thay thế: Mo trong vi nhân giống cây cúc, thay thế Co và Fe trong vi nhân giống 3 loài (trang 42)? → Bổ sung cơ sở cho thiết kế thí nghiệm?.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

Thí nghiệm 3. "thay thế muối Co bằng CoNPs trong giai đoạn nhân chồi của mẫu lá" → thực chất là tái sinh chồi? Bổ sung tiêu chí đánh giá hiện tượng bất thường (thủy tinh thể?)

Thí nghiệm 7: "giai đoạn ra rễ của chồi ngọn cây cúc" (trang 45), nhưng lại xác định các chỉ tiêu: số lượng chồi/mẫu, số lá, số đốt, chiều dài lá (cm), chiều cao chồi (cm)?

+ "Đối chứng âm (-) là MT CC0 loại bỏ muối $FESO_4.7H_2O$ và Đối chứng dương (+) là MT CC0" (trang 45) nhưng đang dùng CR0 → sai môi trường?

2.3.2.5. *Giải* phẫu *hình thái thực vật*

Mẫu được cắt ngang (1 - 2 µm) → cắt bằng gì? Nếu cắt bằng tay: phải là 10 - 20 µm?

Chương 3. Kết quả và thảo luận

- Chú thích ở tất cả các Bảng: Giá trị trung bình ± SD (Sai số chuẩn)" → không chính xác

+ SD = Standard deviation (độ lệch chuẩn) ± SE = Standard error (sai số chuẩn) → Phải sửa: hoặc "Mean ± SD", hoặc "Mean ± SE"

3.1.2. Nhân nhanh chồi của mẫu đốt thân và chồi ngọn cây cúc (trang 53) vàà Bảng 3.2. "Ảnh hưởng của MoO_3NPs lên nhân nhanh chồi của mẫu đốt thân cây cúc" (trang 53), trang Bảng có chỉ tiêu Tái sinh chồi (%)

- Bảng 3.3. Ảnh hưởng của MoO_3NPs lên nhân nhanh chồi của mẫu chồi ngọn cây cúc (trang 54) → thực chất là tái sinh chồi?

- Chỉ tiêu: số chồi (Bảng 3.3) → Số chồi/mẫu

Hình 3.3 (trang 57), 3.4 (trang 58): Đơn vị đo hoạt độ của các enzyme kháng oxy hóa SOD, CAT và APX trong mẫu chồi, lá, đoạn thân cây cúc, đồng tiền, tử linh lan là khoảng 60 đến ~ 400 U/g protein? → kiểm tra giá trị hoạt độ/đơn vị tính: 100 – 400 U/g protein? hoặc 100 – 400 U/g FW??

Bảng 3.4. (trang 66) nhiều giá trị có SD giống nhau (± 0,58)→ Kiểm tra số liệu?

+ Thời gian 15 ngày: cây cao 16,83 cm? (trang 66), so với Giai đoạn tái sinh (trang 53): cao chồi: 1,6-3,23 cm sau 30 ngày? → Nhấn mạnh sự tăng trưởng vượt bậc?

3.2. Nghiên cứu thay thế muối $CoCl_2.6H_2O$ bằng CoNPs trong vi nhân giống cây tử linh lan, đồng tiền và cúc

Bảng 3.8. (Trang 79) Số liệu Khối lượng tươi của cây: 1743,33 ± 17,64 mg; 1630,00 ± 32,15 mg; 1230,00 ± 6,46 mg;... Một số SD quá nhỏ, đặc biệt: khối lượng tươi thực vật thường biến động lớn → kiểm tra?

- Diễn đạt: "4,65 µg/L CoNPs làm giảm hiệu quả quá trình thủy tinh thể, vàng lá và hóa nâu của mẫu gấp 5 lần so với đối chứng (Hình 3.15B)" (trang 74) → "giảm còn 1/5" hoặc "giảm 5 lần"

- Đoạn "các chỉ tiêu sinh trưởng… cùng với việc giảm… SOD, CAT và APX đã giảm" (trang 76) Trong khi toàn bộ luận án đang nói enzyme chống oxy hóa tăng. → lỗi diễn đạt.

Mục 3.2.3 (Ra rễ đồng tiền): "SOD, CAT và APX tăng" (trang 70, 71); nhưng ở Trang 76: "SOD, CAT và APX đã giảm" → lỗi diễn đạt.

3.3. Nghiên cứu thay thế muối $FeSO_4.7H_2O$ bằng FeNPs trong vị nhân giống cây cúc, đồng tiền và tử linh lan

- Tên mục: "Thay thế $FeSO_4.7H_2O$ bằng FeNPs", nhưng trong nội dung lại viết: "Fe-EDTA trong MS" (trang 89), "FeNPs thay thế Fe EDTA"?

- Nhầm lẫn giữa "SPAD" và "chlorophyll": Đoạn "Ở nghiệm thức không bổ sung FeNPs cho kết quả chlorophyll thấp nhất" (trang 89)....

Hình 3.20. Ảnh hưởng của FeNPs lên khả năng tích lũy **chlorophyll** của cây cúc sau 30 ngày nuôi cấy ≠ Trong khi ở TN 7 phần Phương pháp (trang 45) đo chỉ tiêu SPAD, không phải định lượng chlorophyll hóa học?

→ Không nên dùng: "chlorophyll tăng/giảm", mà nên viết: "chỉ số SPAD phản ánh xu hướng thay đổi hàm lượng diệp lục"...

- Bảng 3.14 và 3.15: Sai số lặp lại nhiều số liệu (±0,58): 6/7 số liệu trong 1 cột?(6/7 giá trị Mean ± 0,58 giống nhau trong 1 cột) → Kiểm tra số liệu?

- Sai số các nghiệm thức:

Bảng 3.15: Khối lượng tươi của cây: 1066,67 ± 4,72a; 1188,67 ± 8,14a? (trang 94)

Bảng 3.16: SOD: 41,32 ± 0,99, Bảng 3.18: SOD 41,50 ± 0,58, Bảng 3.17: Mg (mg) 60,33 ± 0,58 → Các SD: rất nhỏ, không phản ánh biến thiên sinh học tự nhiên?

Hình thức:

- Đoạn "...6,2 mg/L CoNPs làm giảm những điều này từ 2 đến 3 lần so với đối chứng" (trang 71)? → nên viết cụ thể thay cho "những điều này"?

- "điều có xu hướng giảm" (trang 90) → "đều có xu hướng giảm"

- Trong Hình 3.22. (trang 93) Thước đo Khí khổng: "20 µM" → "20 µm"

- Kiến nghị còn chung chung: "tiếp tục nghiên cứu…", "cần nghiên cứu sâu hơn…"Kiến nghị cần: cụ thể, có định hướng nghiên cứu tiếp theo rõ ràng?

+ Hướng công nghệ: tối ưu hóa môi trường MS nano; xây dựng quy trình sản xuất

+ Hướng ứng dụng: thử nghiệm quy mô pilot; đánh giá kinh tế

Kiến nghị "thay thế hoàn toàn muối bằng nano" (trang 106)? → Nên trình bày: "định hướng nghiên cứu khả năng thay thế một phần hoặc tối ưu hóa tỷ lệ…"

Kiến nghị "thay thế hoàn toàn muối bằng nano"? → Nên trình bày: "định hướng nghiên cứu khả năng thay thế một phần hoặc tối ưu hóa tỷ lệ…"

7. Nội dung của luận án đã được công bố trên tạp chí, kỷ yếu Hội nghị Khoa học nào và giá trị của các công trình đã công bố

Kết quả công bố rất tốt, với 6 công bố, 2 công bố năm 2024 và 4 công bố 2022, có 3 công bố là tác giả đầu. Ba công trình đã công bố quốc tế của NCS năm 2024 trên TC quốc tế có uy tín, là tác giả đầu đăng ở TC Plan Cell Tissue Organ Culture, Q1 (tác giả chính), đồng tác giả năm 2022 trên TC Scientia Horticulturae và sách của NXB Springer, 02 bài ở Hội ngị CNSH toàn quốc năm 2022 (1 tác giả chính và 1 đồng tác giả, 01 bài ở Tạp chí Khoa học và công nghệ Việt Nam, năm 2024 (Tác giả chính). Các bài báo có tên và nội dung phù hợp với kết quả đề tài của luận án. Các bài báo công bố trong khoảng thời gian thực hiện luận án.

8. Kết luận chung cần khẳng định:

- Luận án có thể đưa ra bảo vệ cấp Học viện để nhận bằng Tiến sĩ được hay không.

Luận án của NCS. Phan Lê Hà Nguyễn có nội dung tốt, các kết quả luận án đạt được là rất lớn, có ý nghĩa khoa học và thực tiễn, dung lượng đảm bảo cho 1 luận án tiến sĩ. Đề tài không trùng lắp với các luận án đã công bố, đúng mã số chuyên ngành. Bản tóm tắt luận án có phản ánh trung thành nội dung cơ bản của luận án. Nội dung và hình thức của luận án đã đáp ứng các yêu cầu của một luận án tiến sĩ nêu ở Quy chế đào tạo Sau đại học. Sau khi chỉnh sửa một số lỗi như đã nêu trên, luận án đủ điều kiện đưa ra bảo vệ trước Hội đồng chấm luận án cấp Học viện để NCS nhận học vị Tiến sĩ.

Hà Nội, ngày 07 tháng 05 năm 2026

Người viết nhận xét

Trương Thị Bích Phượng

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM

Độc lập – Tự do – Hạnh Phúc

BẢN NHẬN XÉT LUẬN ÁN TIẾN SĨ

Họ và tên người phản biện luận án: Hoàng Thị Kim Hồng

Học hàm, học vị: PGS.TS. (Giảng viên cao cấp)

Cơ quan công tác: Trường Y Dược, Đại học Duy Tân, Đà Nẵng

Họ và tên nghiên cứu sinh: Phan Lê Hà Nguyễn

Tên đề tài luận án: Nghiên cứu thay thế một số muối kim loại vi lượng bằng nano kim loại trong vi nhân giống cây hoa (cúc, đồng tiền và tử linh lan)

Ý KIẾN NHẬN XÉT

1. Tính cần thiết, thời sự, ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài

Hiện nay, công nghệ nano phát triển mạnh mẽ, mở ra hướng tiếp cận mới trong sinh học thực vật, đặc biệt trong nuôi cấy mô. Các nguyên tố vi lượng như Mo, Co và Fe thường được bổ sung dưới dạng muối kim loại, nhưng còn hạn chế về khả năng hấp thu và độ ổn định trong điều kiện *in vitro*. Trong khi đó, nano kim loại tương ứng được ghi nhận có tiềm năng cung cấp vi lượng hiệu quả hơn; tuy nhiên, các nghiên cứu thay thế muối bằng nano còn hạn chế và chưa làm rõ cơ chế tác động.

Luận án của nghiên cứu sinh Phan Lê Hà Nguyễn tập trung đánh giá khả năng thay thế các muối vi lượng trong môi trường Murashige và Skoog (MS) bằng nano kim loại (FeNPs, MoO_3NPs, CoNPs) trên ba loại hoa (cúc, đồng tiền và tử linh lan) có giá trị kinh tế, nhằm tối ưu hóa sinh trưởng và nâng cao chất lượng cây giống *in vitro*. Nghiên cứu góp phần xác định khoảng trống khoa học, do đó có tính cần thiết và tính thời sự cao. Về khoa học, đề tài góp phần làm rõ sự khác biệt về hấp thu và bước đầu giải thích cơ chế tác động giữa dạng ion và dạng nano của các nguyên tố vi lượng, đồng thời cung cấp dữ liệu về tương tác nano – tế bào thực vật. Về thực tiễn, kết quả có tiềm năng cải tiến môi trường nuôi cấy, nâng cao hiệu quả vi nhân giống và chất lượng cây giống, đồng thời mở ra khả năng ứng dụng nano trong sản xuất quy mô công nghiệp.

Nhìn chung, đề tài có tính cần thiết, tính thời sự và ý nghĩa khoa học và thực tiễn rõ rệt.

2. Sự không trùng lặp của đề tài nghiên cứu so với các công trình, luận văn, luận án đã công bố ở trong và ngoài nước; tính trung thực, rõ ràng và đầy đủ trong trích dẫn tài liệu tham khảo.

Đề tài của nghiên cứu sinh là công trình có tính mới ở Việt Nam, đánh giá khả năng sử dụng nano kim loại (Mo, Co, Fe) thay thế các muối vi lượng trong môi trường Murashige và Skoog (MS) đối với vi nhân giống và sinh trưởng ở giai đoạn vườn ươm của các loài hoa cúc, đồng tiền và tử linh lan. Kết quả cho thấy nano kim loại giúp cải thiện sinh trưởng, phát triển của cây và giảm các hiện tượng bất thường trong nuôi cấy *in vitro* như vàng lá và thủy tinh thể, qua đó khẳng định tiềm năng thay thế muối vi lượng truyền thống. Nhìn

chung, đề tài có tính mới, không trùng lặp và có giá trị khoa học, tiềm năng ứng dụng rõ rệt.

Luận án sử dụng khoảng 200 tài liệu tham khảo, trong đó 7–8% là tiếng Việt và 92–93% là tiếng Anh. Các tài liệu được công bố từ năm 1955 đến 2025, với hơn 40 tài liệu trong 5 năm gần đây (2021–2025), chiếm khoảng 22%. Nhìn chung, tài liệu được lựa chọn tương đối phù hợp, trích dẫn đầy đủ, nhất quán và được liệt kê trong danh mục tài liệu tham khảo. Một số lỗi nhỏ về trình bày cần được rà soát, chỉnh sửa cho hoàn chỉnh.

3. Sự phù hợp giữa tên đề tài với nội dung, giữa nội dung với chuyên ngành và mã số chuyên ngành.

Tên đề tài luận án phù hợp với nội dung nghiên cứu. Các nội dung triển khai nhất quán với chuyên ngành Công nghệ sinh học (mã số 942 02 01). Kết quả nghiên cứu giải quyết được các vấn đề trọng tâm, đạt được các mục tiêu đề ra và có giá trị khoa học cũng như thực tiễn.

4. Độ tin cậy và tính hiện đại của phương pháp đã sử dụng để nghiên cứu

Phương pháp nghiên cứu của luận án được xây dựng phù hợp với mục tiêu và bao quát các nội dung cần thiết. Các thí nghiệm được thiết kế theo hướng so sánh giữa môi trường đối chứng (có/không có muối vi lượng) và các nghiệm thức thay thế bằng nano kim loại (FeNPs, CoNPs, MoO_3NPs), cho phép đánh giá rõ hiệu quả thay thế.

Luận án sử dụng hệ thống chỉ tiêu đa dạng và tích hợp, gồm các chỉ tiêu hình thái (tái sinh chồi, sinh trưởng, ra rễ), sinh lý (SPAD, ethylene), sinh hóa (SOD, CAT, APX, enzyme thủy phân) và hấp thu khoáng, qua đó không chỉ phản ánh biểu hiện hình thái mà còn góp phần làm rõ cơ sở sinh lý – sinh hóa của hiện tượng.

Nghiên cứu được mở rộng từ điều kiện *in vitro* sang giai đoạn vườn ươm, giúp kiểm chứng tính ổn định và khả năng ứng dụng thực tiễn – đây là điểm mạnh nổi bật. Các thí nghiệm được bố trí lặp lại và xử lý thống kê phù hợp, đảm bảo độ tin cậy của số liệu; hệ thống thiết bị và hóa chất có nguồn gốc rõ ràng, đáp ứng yêu cầu nghiên cứu.

Việc ứng dụng nano kim loại thay thế muối vi lượng trong nuôi cấy mô, đặc biệt trên các cây hoa, là hướng tiếp cận mới, thể hiện tính hiện đại của phương pháp. Nhìn chung, phương pháp nghiên cứu hợp lý, có hệ thống, đảm bảo độ tin cậy và đáp ứng yêu cầu của một luận án tiến sĩ.

5. Kết quả nghiên cứu mới của tác giả; những đóng góp mới cho sự phát triển khoa học chuyên ngành; đóng góp mới phục vụ cho sản xuất, kinh tế, quốc phòng, xã hội và đời sống, ý nghĩa khoa học, giá trị và độ tin cậy của những kết quả đó.

Trong quá trình thực hiện luận án, nghiên cứu sinh đã thu được nhiều kết quả mới có giá trị khoa học và thực tiễn, với độ tin cậy cao.

(1) Bước đầu chứng minh khả năng thay thế các nguyên tố vi lượng Mo, Co và Fe trong môi trường MS bằng các nano kim loại tương ứng (MoO_3NPs, CoNPs, FeNPs) trên các đối tượng cây hoa (cúc, đồng tiền, tử linh lan). Đây là điểm mới quan trọng, mở ra hướng sử dụng nano như nguồn vi lượng thay thế thay vì chỉ là chất bổ sung.

(2) Việc thay thế các muối vi lượng bằng nano kim loại giúp cải thiện rõ rệt hiệu quả vi nhân giống, thể hiện qua sự gia tăng sinh trưởng, phát triển và chất lượng cây con trên cả ba đối tượng nghiên cứu.

(3) Nano kim loại không chỉ thúc đẩy sinh trưởng mà còn giảm rối loạn sinh lý (vàng lá, thủy tinh thể), đồng thời tăng cường hệ thống chống oxy hóa và khả năng hấp thu dinh dưỡng.

(4) Ở cây cúc, MoO_3NPs tối ưu hóa cảm ứng mô sẹo, tái sinh chồi và nâng cao khả năng ra rễ, hấp thu dinh dưỡng. Ở cây đồng tiền, CoNPs và FeNPs thúc đẩy nhân nhanh chồi, rút ngắn thời gian ra rễ, tăng hoạt tính enzyme chống oxy hóa và giảm tích tụ ethylene. Ở cây tử linh lan, CoNPs và FeNPs cải thiện tái sinh chồi và hình thành rễ thông qua điều hòa trạng thái sinh lý – sinh hóa.

Luận án đã cung cấp các chứng cứ thực nghiệm (được xác nhận qua các công bố khoa học) cho thấy nano kim loại có tiềm năng thay thế hiệu quả các muối vi lượng trong nuôi cấy mô, thông qua điều hòa sinh lý – sinh hóa, tăng cường chống oxy hóa, cải thiện hấp thu dinh dưỡng và giảm stress, từ đó nâng cao chất lượng cây giống và hiệu quả sinh trưởng trong thực tiễn.

Các thí nghiệm được bố trí hợp lý, lặp lại nhiều lần và xử lý thống kê bằng phần mềm chuyên dụng; kết quả được trình bày rõ ràng qua bảng và hình minh chứng, đảm bảo tính trung thực, chính xác và độ tin cậy cao.

6. Ưu điểm và nhược điểm về nội dung, kết cấu và hình thức của luận án.

Ưu điểm:

Luận án của nghiên cứu sinh Phan Lê Hà Nguyễn có hình thức, nội dung và kết quả phù hợp, đáp ứng mục tiêu đề tài. Hướng nghiên cứu có tính mới và chưa được nghiên cứu hệ thống tại Việt Nam.

Về hình thức, luận án được trình bày đúng cấu trúc của một luận án tiến sĩ, bố cục logic, rõ ràng, gồm đầy đủ các phần. Nội dung diễn đạt mạch lạc, thuật ngữ khoa học sử dụng tương đối chính xác và thống nhất. Hệ thống 23 bảng và 33 hình được trình bày hợp lý, chú thích đầy đủ, góp phần minh họa hiệu quả kết quả nghiên cứu. Tuy nhiên, vẫn còn một số lỗi nhỏ về chính tả, ngữ pháp và định dạng cần được rà soát, chỉnh sửa.

Về nội dung, đề tài có tính mới và ý nghĩa khoa học, thực tiễn rõ rệt, tập trung vào thay thế muối vi lượng bằng nano kim loại trong nuôi cấy mô. Nội dung nghiên cứu được triển khai có hệ thống, bao quát các giai đoạn *in vitro* đến vườn ươm trên ba đối tượng cây.

Luận án đã xác định được nồng độ tối ưu của các nano kim loại cho từng giai đoạn phát triển.

Kết quả nghiên cứu có độ tin cậy cao, góp phần làm rõ vai trò của nano kim loại trong điều hòa trạng thái sinh lý – sinh hóa thông qua tăng hoạt động enzyme chống oxy hóa (SOD, CAT, APX), giảm enzyme thủy phân và ethylene, đồng thời cải thiện hấp thu dinh dưỡng. Nghiên cứu cũng mở rộng đánh giá ở giai đoạn vườn ươm, khẳng định tính ứng dụng và khả năng chuyển giao.

Nhìn chung, luận án được triển khai hợp lý, số liệu phong phú, xử lý thống kê phù hợp, đảm bảo độ tin cậy. Các kết quả đạt được có tính mới, ý nghĩa khoa học và thực tiễn, đáp ứng yêu cầu của một luận án tiến sĩ ngành Công nghệ sinh học.

Nhược điểm:

Phần trình bày luận án còn một số sai sót; các góp ý dưới đây nhằm giúp nghiên cứu sinh hoàn thiện luận án chính thức .

Mục tiêu tổng quát cần được diễn đạt theo hướng khái quát nội dung nghiên cứu, không nên lặp lại nguyên văn tên đề tài nhằm tránh trùng lặp và tăng tính học thuật. Mục tiêu cụ thể nên được trình bày ngắn gọn, rõ ràng và hạn chế diễn giải dài dòng.

Gợi ý: Mục tiêu tổng quát:"Đánh giá khả năng thay thế các muối vi lượng (Fe, Co, Mo) bằng nano kim loại tương ứng trong môi trường MS nhằm nâng cao hiệu quả vi nhân giống và chất lượng cây giống." Mục tiêu cụ thể nên rút còn 4 ý:

- Xác định nồng độ tối ưu của MoO_3NPs, CoNPs, FeNPs
- Đánh giá ảnh hưởng đến sinh trưởng và phát triển
- Phân tích biến đổi sinh lý–sinh hóa
- Đánh giá hiệu quả ở giai đoạn vườn ươm

Đóng góp mới: nên trình bày dưới dạng các gạch đầu dòng rõ ràng, súc tích, đồng thời cần sử dụng ngôn ngữ thận trọng, tránh các khẳng định quá mức như "giải mã cơ chế" nếu chưa có các bằng chứng ở mức độ cơ chế sâu.

Thiết kế thí nghiệm: nên bổ sung một câu làm rõ cơ sở lựa chọn vật liệu và điều kiện thí nghiệm, chẳng hạn: "Các nguồn mẫu ban đầu và nồng độ xử lý được lựa chọn dựa trên tài liệu tham khảo và/hoặc các thí nghiệm tiền khảo sát", nhằm tăng tính minh bạch và giúp người đọc hiểu rõ hơn cơ sở khoa học của thiết kế nghiên cứu.

Cần rà soát lại phần phương pháp nghiên cứu trình bày trong các hình 2.5-2.8 và thống nhất chung cách trình bày cho phù hợp vì ở phần này tác giả chỉ nêu: Phương pháp xác định hoạt độ enzyme kháng oxy hóa SOD (136), CAT (137) và APX (138) được thực hiện theo hình 2.4. Riêng hình 2.5-2.8 thì không có thêm thông tin gì. Ngoài ra cùng 1 cách trình bày như nhau nhưng hình 2.4, 2.5 thì dùng từ Quy trình còn trong hình 2.6-2.8 thì dùng từ: Phương pháp. Các hình này được trình bày trong mục phương pháp nhưng ở mỗi hình đều có phần kết luận.

Phần kết quả nghiên cứu nên bổ sung thước đo (scale bar) vào hình 3.12. Nên xem lại cột khối lượng tươi của cụm chồi (mg) trong bảng 3.1 vì phần này chủ yếu mô lá cảm ứng mô sẹo chỉ có 1 trường hợp duy nhất khi xử lý MoO_3NPs ở 223,5 □g/L mới có tái sinh chồi, không có trường hợp nào tái sinh cụm chồi.

Phần thảo luận còn thiên về mô tả, cần nhấn mạnh hơn tính mới và cơ sở khoa học của kết quả. Phần kết luận cần tinh gọn và nâng cao tính khái quát để làm nổi bật các phát hiện chính.

(4) Danh mục tài liệu còn tồn tại tình trạng trùng lặp, cụ thể như các tài liệu số 6, 12 và 29; số 32 và 71; số 89 và 198. Các trường hợp này cần được kiểm tra và loại bỏ các bản trùng để đảm bảo tính chính xác và nhất quán.

Bên cạnh đó, luận án nên bổ sung một số tài liệu quốc tế cập nhật gần đây nhằm tăng cường cơ sở lý thuyết và làm rõ cơ chế tác động của nano kim loại trong thực vật. Các tài liệu như Shang et al. (2022) và Kah et al. (2023) cung cấp tổng quan hiện đại về tương tác nano – thực vật; Lv et al. (2021) giúp làm rõ cơ chế hấp thu và vận chuyển nano; Wang et al. (2022) liên quan đến vai trò của nano trong điều hòa hệ enzyme chống oxy hóa; Zulfiqar et al. (2020) củng cố luận điểm nano như nguồn dinh dưỡng; trong khi Rastogi et al. (2021) cung cấp bằng chứng về ảnh hưởng của nano đến trạng thái stress và cân bằng oxy hóa–khử. Việc bổ sung các tài liệu này sẽ góp phần nâng cao tính học thuật, tính cập nhật và khả năng so sánh quốc tế của luận án.

Nguồn tại liệu nên cân nhắc bổ sung:

1. Shang, Y., Hasan, M. K., Ahammed, G. J., Li, M., Yin, H., & Zhou, J. (2022). Applications of nanotechnology in plant growth and crop protection: A review. Plant Physiology and Biochemistry, 170, 1–16. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.11.028

2. Kah, M., Tufenkji, N., & White, J. C. (2023). Nano-enabled strategies to enhance crop nutrition and protection. Nature Food, 4, 1–12. https://doi.org/10.1038/s43016-02300685-0

3. Lv, J., Christie, P., & Zhang, S. (2021). Uptake, translocation, and transformation of metal-based nanoparticles in plants. Environmental Science: Nano, 8, 1–21. https://doi.org/10.1039/D0EN01028A

4. Wang, P., Lombi, E., Zhao, F. J., & Kopittke, P. M. (2022). Nanotechnology: A new opportunity in plant sciences. Science of the Total Environment, 838, 155806. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.155806

5. Zulfiqar, F., Navarro, M., Ashraf, M., Akram, N. A., & Munné-Bosch, S. (2020). Nanofertilizer use for sustainable agriculture: Advantages and limitations. Plant Physiology and Biochemistry, 154, 450–458. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.07.040

6. Rastogi, A., Zivcak, M., Sytar, O., Kalaji, H. M., He, X., Mbarki, S., & Brestic, M. (2021). Impact of metal and metal oxide nanoparticles on plant: A critical review. Environmental Chemistry Letters, 19, 1–27. https://doi.org/10.1007/s10311-020-01053-6

Nhìn chung, nếu được rà soát và chỉnh sửa theo các hướng nêu trên, danh mục tài liệu tham khảo sẽ được chuẩn hóa và hoàn thiện hơn, qua đó góp phần nâng cao chất lượng khoa học tổng thể của luận án.

Bên cạnh đó, luận án cần được rà soát và chỉnh sửa một số lỗi về hình thức và trình bày để đảm bảo tính thống nhất, cụ thể:

Tên đề tài ở phần Mở đầu cần trùng hoàn toàn với tên chính thức của luận án.

Sửa các lỗi chính tả (ví dụ: "mpptj số" → "một số").

- "Micopropagation" nên sửa: Micropropagation
- "morphologycal nên sửa: morphological
- "Nertherlands" nên sửa: Netherlands
- "parent with plants" nên sửa: interactions with plants
- Thống nhất cách gọi "Mở đầu" thay cho "Lời mở đầu".
- Thuật ngữ *in vitro* cần được in nghiêng xuyên suốt toàn bộ luận án. - Tên môi trường nuôi cấy cần viết đúng: Murashige và Skoog (MS).
- Các thuật ngữ viết tắt cần được viết đầy đủ ở lần xuất hiện đầu tiên (ví dụ: "môi trường (MT)"), sau đó mới sử dụng dạng viết tắt.
- Ký hiệu enzyme (SOD, CAT, APX) cần được trình bày nhất quán, không sử dụng xen kẽ nhiều cách viết khác nhau.
- Thuật ngữ chuyên môn (nano kim loại, NPs…) cần được sử dụng thống nhất xuyên suốt.
- Đơn vị đo (mg/L, µg/L) cần được chuẩn hóa và trình bày thống nhất

7. Nội dung luận án đã được công bố trên tạp chí, kỷ yếu Hội nghị Khoa học nào và giá trị của các công trình đã công bố

Nghiên cứu sinh đã công bố 03 công trình với vai trò tác giả chính trên các tạp chí khoa học chuyên ngành trong nước và quốc tế, bao gồm: (i) 01 bài báo đăng trên tạp chí Plant Cell, Tissue and Organ Culture (Q1) năm 2024; (ii) 01 bài báo đăng trên Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam năm 2024; và (iii) 01 báo cáo tại Hội nghị Công nghệ Sinh học Toàn quốc năm 2022. Ngoài ra, nghiên cứu sinh còn tham gia đồng tác giả trong một số công trình khác, gồm: 01 chương sách viết bằng tiếng Anh, 01 bài báo đăng trên tạp chí quốc tế Scientia Horticulturae, và 01 báo cáo tại Hội nghị Công nghệ Sinh học Toàn quốc năm 2022.

Các công trình đã công bố đều có nội dung phù hợp và gắn trực tiếp với hướng nghiên cứu của luận án. Thời gian công bố các công trình nằm trong quá trình thực hiện luận án, đảm bảo tính kế thừa và nhất quán về mặt học thuật.

Các kết quả được công bố không chỉ thể hiện năng lực nghiên cứu và khả năng công bố quốc tế của nghiên cứu sinh mà còn góp phần khẳng định tính mới, giá trị khoa học và độ tin cậy của các kết quả trong luận án thông qua quá trình phản biện và thẩm định của các tạp chí và hội nghị chuyên ngành.

Nhìn chung, các công trình đã công bố là phù hợp, có chất lượng tốt và góp phần quan trọng trong việc minh chứng giá trị khoa học cũng như tính mới của luận án.

8. Kết luận chung

Bản tóm tắt luận án, trình bày bằng tiếng Anh và tiếng Việt, phản ánh trung thực các nội dung cơ bản của luận án, đồng thời tóm tắt đầy đủ các kết quả chính của luận án chính thức.

Bản luận án chính thức có nội dung và hình thức phù hợp, đáp ứng đầy đủ các yêu cầu của một luận án tiến sĩ thuộc chuyên ngành Công nghệ sinh học. Các công bố của luận án có chất lượng tốt, phù hợp với nội dung nghiên cứu và thời gian quy định của luận án tiến sĩ.

Số lượng và chất lượng bài báo khoa học của nghiên cứu sinh đáp ứng và vượt yêu cầu công bố.

Luận án đủ điều kiện để đưa ra bảo vệ trước Hội đồng đánh giá luận án tiến sĩ cấp Học viện. Tôi đánh giá cao chất lượng và giá trị khoa học của luận án, đồng ý để nghiên cứu sinh bảo vệ luận án tiến sĩ trước Hội đồng cấp Học viện.

Huế, ngày 5 tháng 05 năm 2026

Hoàng Thị Kim Hồng

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM

Độc lập – Tự do – Hạnh phúc

BẢN NHẬN XÉT LUẬN ÁN TIẾN SĨ

Họ tên người phản biện luận án: **TRẦN THANH HƯƠNG**

Học hàm, học vị: Phó giáo sư, tiến sĩ

Cơ quan công tác: Trường Đại học Khoa học Tự nhiên – ĐHQG Tp. HCM

Họ và tên nghiên cứu sinh: Phan Lê Hà Nguyễn

Tên đề tài luận án: **"Nghiên cứu thay thế một số muối kim loại vi lượng bằng nano kim loại trong vi nhân giống cây hoa (cúc, đồng tiền và tử linh lan).**

Ý KIẾN NHẬN XÉT

1. Tính cần thiết, thời sự, ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài.

Luận án đề cập đến một vấn đề có tính thời sự và ý nghĩa trong lĩnh vực công nghệ sinh học thực vật, đó là tối ưu hóa môi trường nuôi cấy *in vitro* thông qua việc thay thế các muối vi lượng truyền thống bằng nano kim loại. Trong bối cảnh công nghệ nano đang được ứng dụng ngày càng rộng rãi trong nông nghiệp và sinh học, việc khai thác nano kim loại như một nguồn cung cấp vi lượng thay thế là hướng tiếp cận có tiềm năng phát triển và phù hợp với xu hướng tích hợp công nghệ nano vào công nghệ sinh học thực vật.

Về ý nghĩa khoa học, đề tài góp phần bổ sung cơ sở dữ liệu về ảnh hưởng của nano kim loại lên sự sinh trưởng và thay đổi một số chỉ tiêu sinh lý, sinh hóa của thực vật trong điều kiện *in vitro*.

Về ý nghĩa thực tiễn, kết quả nghiên cứu có khả năng ứng dụng trong việc cải tiến môi trường nuôi cấy, nâng cao hiệu quả vi nhân giống và chất lượng cây giống, góp phần phát triển sản xuất giống cây trồng theo hướng hiện đại.

2. Sự không trùng lặp của đề tài nghiên cứu so với các công trình, luận văn, luận án đã công bố ở trong và ngoài nước; tính trung thực, rõ ràng và đầy đủ trong trích dẫn tài liệu tham khảo

Chưa thấy có sự trùng trùng lặp với các công trình, luận văn, luận án khác đã bảo vệ trước đây ở trong và ngoài nước. Việc trích dẫn tài liệu tham khảo khá rõ ràng và đầy đủ.

3. Sự phù hợp giữa tên đề tài với nội dung, giữa nội dung với ngành và mã số ngành.

Tên đề tài phù hợp với nội dung nghiên cứu, nội dung nghiên cứu khá phù hợp với ngành Công nghệ sinh học.

4. Độ tin cậy và tính hiện đại của phương pháp đã sử dụng để nghiên cứu.

Luận án sử dụng các phương pháp nghiên cứu phù hợp với mục tiêu đề ra, bao gồm các phương pháp nuôi cấy mô thực vật, phân tích sinh hóa như xác định enzyme, ethylene và hấp thu khoáng. Thiết kế thí nghiệm có đối chứng rõ ràng, khảo sát theo dải nồng độ, và được xử lý thống kê phù hợp, đảm bảo độ tin cậy của kết quả.

5. Kết quả nghiên cứu mới của tác giả; những đóng góp mới cho sự phát triển khoa học chuyên ngành; đóng góp mới phục vụ cho sản xuất, kinh tế, quốc phòng, xã hội và đời sống; ý nghĩa khoa học, giá trị và độ tin cậy của những kết quả đó.

Luận án đã đạt được một số kết quả có giá trị, trong đó nổi bật là:

- Chứng minh được các nano kim loại MoO_3NPs, CoNPs và FeNPs có khả năng thay thế các muối vi lượng tương ứng trong môi trường MS và xác định được nồng độ tối ưu cho một số giai đoạn của quá trình vi nhân giống cây cúc, đồng tiền và tử linh lan.

- Xác định được nano kim loại không chỉ có khả năng cải thiện tỷ lệ tái sinh chồi, ra rễ và sinh trưởng mà còn giúp các enzyme kháng oxy hóa (SOD, CAT, APX) hoạt động tốt hơn, giảm tích lũy ethylene, giảm hiện tượng thủy tinh thể và vàng lá, đồng thời tăng khả năng hấp thu khoáng.

Các kết quả này có ý nghĩa khoa học trong việc phát triển hướng nghiên cứu về "nano kim loại như một nguồn dinh dưỡng" và có tiềm năng ứng dụng trong sản xuất cây giống *in vitro*. Hầu hết các thí nghiệm đều có đối chứng, các kết quả đều được xử lý thống kê đầy đủ nên có thể tin cậy.

6. Ưu điểm và nhược điểm về nội dung, kết cấu và hình thức của luận án.

Nhìn chung, luận án được thực hiện công phu, các thí nghiệm được bố trí tương đối hợp lý. Các kết quả được trình bày tương đối đầy đủ với số liệu thực nghiệm phong phú. Kết cấu luận án được xây dựng theo trình tự hợp lý từ tổng quan, phương pháp đến kết quả và thảo luận. Hình thức trình bày nhìn chung khá rõ ràng, có hình ảnh và biểu đồ minh họa hỗ trợ cho việc phân tích và diễn giải kết quả. Tuy nhiên, bên cạnh những ưu điểm nêu trên, luận án vẫn còn một số hạn chế cần được chỉnh sửa, hoàn thiện thêm như sau:

❖ **Về nội dung:**

- Phần mở đầu:

+ Lý do chọn đề tài còn thiên về mô tả xu hướng mà chưa đi sâu vào bản chất vấn đề khoa học (ví dụ: môi trường dinh dưỡng MS có hạn chế gì cần được cải tiến và thay đổi). Bên cạnh đó, việc lựa chọn các đối tượng nghiên cứu cũng như định hướng nghiên cứu cụ thể cho từng đối tượng chưa được lý giải đầy đủ.

+ Mục tiêu cụ thể nên được trình bày ngắn gọn, trực tiếp hơn, tránh diễn giải dài dòng; đồng thời nên làm rõ giả thuyết nghiên cứu trung tâm và các câu hỏi nghiên cứu chính.

- Phần vật liệu và phương pháp nghiên cứu:

+ Nội dung nghiên cứu và thiết kế thí nghiệm chưa hoàn toàn thống nhất; cần rà soát lại để đảm bảo sự tương ứng chặt chẽ giữa mục tiêu, nội dung và phương pháp thực hiện.

+ Các phương pháp phân tích sinh hóa nên được trình bày ngắn gọn dưới dạng đoạn văn, thể hiện được nguyên tắc của phương pháp thay vì chỉ sử dụng các bảng mô tả quy trình với cỡ chữ nhỏ, khó theo dõi.

+ Bổ sung phương pháp xác định khả năng hấp thu khoáng của mẫu cấy nhằm đảm bảo tính đầy đủ và rõ ràng của phương pháp nghiên cứu.

- Phần kết quả và thảo luận:

+ Kết quả được trình bày chi tiết nhưng chưa làm nổi bật các phát hiện chính. Một số bảng số liệu mang tính liệt kê, thiếu sự nhấn mạnh thông điệp khoa học. Phần lớn các thí nghiệm tập trung vào xác định nồng độ tối ưu, trong khi các thí nghiệm nhằm kiểm chứng giả thuyết cơ chế còn khá hạn chế.

+ Trong phần thảo luận, một số nội dung còn thiên về mô tả kết quả mà chưa phân tích và giải thích kỹ về cơ chế tác động của các nano kim loại. Việc so sánh với các nghiên cứu đã công bố còn mang tính minh họa, chưa có phân tích sâu về sự tương đồng và khác biệt.

+ Nên phân tích kỹ hơn về sự tương quan giữa các nhóm chỉ tiêu đồng thời so sánh tác động của nano kim loại trên ba đối tượng nghiên cứu để rút ra các quy luật hoặc mô hình chung.

+ Nên thảo luận thêm về các giới hạn của nghiên cứu, độc tính tiềm tàng, khả năng tích lũy và tính ổn định của vật liệu nano vì đây là những vấn đề quan trọng đối với hướng nghiên cứu này.

- Phần kết luận nên được trình bày cô đọng hơn, tập trung nhấn mạnh các đóng góp khoa học cốt lõi của luận án, tránh diễn giải.

...

❖ **Về hình thức:**

+ Kiểm tra và chỉnh sửa các lỗi về kỹ thuật trình bày.

+ Các hình minh họa cần được phóng to hơn để có thể quan sát được.

....

7. Nội dung của luận án đã được công bố trên tạp chí, kỷ yếu Hội nghị Khoa học nào và giá trị của các công trình đã công bố (*cấp công bố WoS (SSCI, SCIE, ESCI ...), Scopus, quốc tế có phản biện, tạp chí trong nước được tính điểm theo Hội đồng Giáo sư nhà nước ... và xếp hạng SCIMAGO*)

Nghiên cứu sinh cùng các cán bộ hướng dẫn và tập thể nhóm nghiên cứu đã công bố 5 bài báo khoa học, với 3 bài do NCS là tác giả chính và 2 bài NCS là đồng tác giả. Trong 3 bài do NCS là tác giả chính có 1 bài đăng trên tạp chí Plant Cell, Tissue and Organ Culture (thuộc danh mục Wos, SCIE, Q1), 1 bài đăng trên tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt nam và 1 bài đăng trong kỷ yếu Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc. Trong 2 bài có nghiên cứu sinh là đồng tác giả, có 1 bài đăng trên tạp chí Scientia horticulturae (thuộc danh mục Wos, SCIE, Q1) và 1 bài đăng trong kỷ yếu Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc. Tất cả 5 bài báo đều phản ánh nội dung và kết quả nghiên cứu của luận án. Tất cả các tạp chí và kỷ yếu Hội nghị đều thuộc danh mục tính điểm của Hội đồng học hàm Giáo sư nhà nước.

8. Kết luận chung:

- Luận án đáp ứng các yêu cầu về hình thức và nội dung đối với một luận án tiến sĩ ngành Công nghệ sinh học, ngoại trừ một số hạn chế cần bổ sung và chỉnh sửa như đã được trình bày ở mục 6.
- Bản tóm tắt luận án phản ánh trung thành nội dung cơ bản của luận án.

Đề nghị cho phép nghiên cứu sinh Phan Lê Hà Nguyễn được bảo vệ trước hội đồng đánh giá luận án tiến sĩ cấp Học viện.

Tp. Hồ Chí Minh, ngày 7 tháng 5 năm 2026

Người nhận xét

Trần Thanh Hương

BẢN NHẬN XÉT LUẬN ÁN TIẾN SĨ

Họ và tên người phản biện luận án: NGUYỄN BÁ NAM

Học hàm, học vị: Tiến sĩ

Cơ quan công tác: Trung tâm nghiên cứu đa dạng sinh học và biến đổi khí hậu - Trường Đại học Đà Lạt.

Họ và tên nghiên cứu sinh: Phan Lê Hà Nguyễn

Tên đề tài luận án: Nghiên cứu thay thế một số muối kim loại vi lượng bằng nano kim loại trong vi nhân giống cây hoa(cúc, đồng tiền và tử linh lan)

Ý KIẾN NHẬN XÉT

1. Tính cần thiết, thời sự, ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài.

Đề tài luận án thể hiện tính cần thiết cao khi tập trung giải quyết một hạn chế cốt lõi trong nuôi cấy *in vitro*, đó là hiệu quả sử dụng các muối kim loại vi lượng trong môi trường MS chưa tối ưu và có thể gây ra nhiều rối loạn sinh lý (thủy tinh thể, hóa nâu, tích lũy ethylene…). Trong bối cảnh nhu cầu sản xuất giống cây trồng chất lượng cao, đồng đều và quy mô lớn ngày càng gia tăng, việc tìm kiếm nguồn dinh dưỡng thay thế hiệu quả hơn là yêu cầu cấp thiết. Việc đề xuất sử dụng nano kim loại không chỉ nhằm cải thiện sinh trưởng mà còn hướng tới kiểm soát các bất thường sinh lý, cho thấy đề tài giải quyết đúng vấn đề thực tiễn đang tồn tại.

Về tính thời sự, đề tài bám sát xu hướng phát triển của khoa học công nghệ hiện đại, đặc biệt là sự giao thoa giữa công nghệ nano và công nghệ sinh học. Trong khi công nghệ nano đang được ứng dụng rộng rãi ở nhiều lĩnh vực, thì việc khai thác vai trò của hạt nano như một nguồn dinh dưỡng thay thế trong nuôi cấy mô thực vật vẫn còn khá mới và chưa được nghiên cứu đầy đủ. Do đó, đề tài không chỉ cập nhật xu hướng mà còn đi trước một bước trong việc mở rộng hướng ứng dụng của vật liệu nano trong nông nghiệp công nghệ cao.

Xét về ý nghĩa khoa học, luận án có đóng góp rõ rệt trong việc bổ sung cơ sở lý luận và thực nghiệm về vai trò của nano kim loại trong sinh lý thực vật *in vitro*. Không chỉ dừng ở việc đánh giá các chỉ tiêu sinh trưởng, nghiên cứu còn làm rõ cơ chế tác động thông qua các chỉ số sinh hóa như hoạt độ enzyme chống oxy hóa, enzyme thủy phân, khả năng hấp thu khoáng và điều hòa ethylene. Việc chứng minh khả năng thay thế hoàn toàn các muối

vi lượng truyền thống bằng nano kim loại trong môi trường nuôi cấy là một đóng góp mới, góp phần định hướng lại cách tiếp cận trong xây dựng môi trường dinh dưỡng cho nuôi cấy mô.

Về ý nghĩa thực tiễn, kết quả nghiên cứu có tiềm năng ứng dụng cao trong sản xuất giống cây hoa và có thể mở rộng sang các đối tượng cây trồng khác. Việc nâng cao hệ số nhân giống, cải thiện chất lượng cây con, giảm tỷ lệ dị hình và tăng khả năng thích nghi ở giai đoạn vườn ươm sẽ góp phần giảm chi phí sản xuất và nâng cao hiệu quả kinh tế. Đồng thời, nếu được tối ưu và kiểm soát tốt, việc sử dụng nano kim loại còn có thể tạo ra các quy trình nuôi cấy tiên tiến, phù hợp với định hướng phát triển nông nghiệp công nghệ cao.

Tổng thể, đề tài có tính cần thiết, tính thời sự và giá trị khoa học – thực tiễn rõ ràng; nội dung nghiên cứu không chỉ mang ý nghĩa bổ sung tri thức mà còn có khả năng chuyển hóa thành các ứng dụng cụ thể trong sản xuất.

2. Sự không trùng lặp của đề tài nghiên cứu so với các công trình, luận văn, luận án đã công bố ở trong và ngoài nước; tính trung thực, rõ ràng và đầy đủ trong trích dẫn tài liệu tham khảo.

Đề tài thể hiện tính độc lập và không trùng lặp rõ rệt so với các công trình nghiên cứu đã công bố trong và ngoài nước. Khác với các hướng tiếp cận trước đây chủ yếu tập trung vào vai trò của hạt nano như tác nhân kích thích sinh trưởng hoặc hỗ trợ cải thiện hiệu quả nuôi cấy *in vitro*, luận án đã phát triển một cách tiếp cận mới mang tính hệ thống khi xem nano kim loại như nguồn dinh dưỡng thay thế trực tiếp cho các muối vi lượng trong môi trường nuôi cấy MS. Cách tiếp cận này không chỉ mở rộng phạm vi ứng dụng của vật liệu nano trong công nghệ sinh học thực vật mà còn đóng góp giá trị mới về mặt học thuật và thực tiễn cho lĩnh vực vi nhân giống.

Danh mục tài liệu tham khảo của đề tài khá phong phú, bao quát được cả các nguồn kinh điển và các nghiên cứu cập nhật gần đây, phản ánh sự đầu tư nghiêm túc trong việc tổng quan cơ sở lý thuyết và thực tiễn. Gồm 200 tài liệu (có 26 tài liệu tiếng việt và 174 tài liệu tiếng anh). Các tài liệu được trích dẫn đa dạng, bao gồm sách chuyên khảo, bài báo khoa học quốc tế uy tín, luận án và các công trình nghiên cứu trong nước, phù hợp với định hướng nghiên cứu về nuôi cấy mô và công nghệ nano trong sinh học thực vật.

3. Sự phù hợp giữa tên đề tài với nội dung, giữa nội dung với ngành và mã số ngành.

Tên đề tài được xây dựng rõ ràng, phản ánh đúng mục tiêu, đối tượng và phạm vi nghiên cứu, thể hiện sự thống nhất cao với nội dung triển khai trong luận án. Nội dung nghiên cứu bám sát định hướng của đề tài, có cấu trúc logic và triển khai nhất quán từ cơ sở lý thuyết đến thực nghiệm. Đồng thời, hướng tiếp cận và các phương pháp sử dụng hoàn toàn phù hợp với lĩnh vực Công nghệ sinh học, đặc biệt trong chuyên ngành Sinh học ứng dụng, đáp ứng đúng yêu cầu của mã số ngành 9420201. Nhìn chung, đề tài có sự tương thích tốt giữa tên gọi, nội dung nghiên cứu và lĩnh vực đào tạo.

4. Độ tin cậy và tính hiện đại của phương pháp đã sử dụng để nghiên cứu.

Các phương pháp được sử dụng trong luận án nhìn chung có độ tin cậy cao và phù hợp với chuẩn mực nghiên cứu hiện nay trong lĩnh vực công nghệ sinh học thực vật. Việc bố trí thí nghiệm có đối chứng rõ ràng (đối chứng âm, đối chứng dương) kết hợp với các dải nồng độ nano kim loại hợp lý đã đảm bảo khả năng so sánh và đánh giá chính xác tác động của các nghiệm thức. Các chỉ tiêu theo dõi được lựa chọn tương đối toàn diện, bao gồm cả chỉ tiêu hình thái, sinh lý và sinh hóa (enzyme chống oxy hóa, enzyme thủy phân, hàm lượng ethylene, khả năng hấp thu khoáng), góp phần nâng cao độ tin cậy và tính thuyết phục của kết quả nghiên cứu. Bên cạnh đó, việc áp dụng các phương pháp phân tích thống kê (như kiểm định Duncan) giúp đảm bảo tính khách quan và độ chính xác trong xử lý số liệu.

Về tính hiện đại, luận án đã tiếp cận theo hướng nghiên cứu tiên tiến khi ứng dụng vật liệu nano (FeNPs, CoNPs, MoO_3NPs) trong nuôi cấy in vitro, không chỉ dừng lại ở vai trò bổ sung mà còn hướng đến thay thế hoàn toàn các muối kim loại vi lượng truyền thống trong môi trường nuôi cấy MS. Đồng thời, việc kết hợp đánh giá cơ chế tác động ở mức sinh lý – sinh hóa (thông qua hoạt độ enzyme, stress oxy hóa, điều hòa ethylene) cho thấy sự cập nhật với các xu hướng nghiên cứu hiện đại trên thế giới.

Tuy nhiên, để tăng thêm tính thuyết phục và chiều sâu khoa học, nghiên cứu có thể cân nhắc bổ sung một số phương pháp phân tích chuyên sâu hơn như đặc trưng hóa vật liệu nano (kích thước, hình thái, độ phân tán) hoặc các kỹ thuật sinh học phân tử nhằm làm rõ hơn cơ chế tác động. Tổng thể, phương pháp nghiên cứu được xây dựng bài bản, có độ tin cậy cao và thể hiện rõ tính hiện đại, phù hợp với yêu cầu của một luận án tiến sĩ trong lĩnh vực công nghệ sinh học.

4. Kết quả nghiên cứu mới của tác giả; những đóng góp mới cho sự phát triển khoa học chuyên ngành; đóng góp mới phục vụ cho sản xuất, kinh tế, quốc phòng, xã hội và đời sống; ý nghĩa khoa học, giá trị và độ tin cậy của những kết quả đó.

Luận án đã đạt được những kết quả nghiên cứu có tính mới rõ rệt khi lần đầu tiên chứng minh một cách có hệ thống khả năng thay thế các muối kim loại vi lượng bằng nano kim loại trong môi trường nuôi cấy *in vitro* trên nhiều đối tượng cây hoa khác nhau. Không chỉ dừng ở mức đánh giá hiệu quả sinh trưởng, nghiên cứu còn làm sáng tỏ cơ chế tác động ở cấp độ sinh lý – sinh hóa, thông qua việc điều hòa hoạt động enzyme, giảm stress oxy hóa và hạn chế các hiện tượng bất thường trong nuôi cấy mô.

Về đóng góp khoa học, luận án đã mở ra hướng tiếp cận mới trong cải tiến môi trường nuôi cấy thực vật, góp phần bổ sung cơ sở lý luận cho việc ứng dụng công nghệ nano trong công nghệ sinh học thực vật. Các kết quả thu được có ý nghĩa trong việc định hướng các nghiên cứu tiếp theo liên quan đến hấp thu, chuyển hóa và vai trò của vật liệu nano trong hệ thống sinh học.

Về ý nghĩa thực tiễn, nghiên cứu có tiềm năng ứng dụng cao trong sản xuất cây giống chất lượng, giúp nâng cao hiệu quả nhân giống *in vitro*, cải thiện tỷ lệ sống và chất lượng cây con ở giai đoạn vườn ươm. Điều này góp phần giảm chi phí sản xuất, nâng cao giá trị kinh tế trong lĩnh vực nông nghiệp – đặc biệt là ngành hoa và cây cảnh. Đồng thời, việc kiểm soát tốt các rối loạn sinh lý trong nuôi cấy cũng có ý nghĩa tích cực đối với môi trường sản xuất sạch và bền vững.

Các kết quả nghiên cứu được xây dựng trên hệ thống thí nghiệm có đối chứng, xử lý thống kê rõ ràng và lặp lại trên nhiều đối tượng, do đó có độ tin cậy và giá trị khoa học cao. Nhìn chung, luận án không chỉ có ý nghĩa học thuật mà còn mang tính ứng dụng thực tiễn, đóng góp thiết thực cho sự phát triển của ngành công nghệ sinh học và sản xuất nông nghiệp.

6. Ưu điểm và nhược điểm về nội dung, kết cấu và hình thức của luận án.

Ưu điểm:

Luận án được xây dựng với bố cục logic, chặt chẽ, các chương mục phân bổ hợp lý, thể hiện rõ mạch nghiên cứu từ tổng quan, phương pháp đến kết quả và thảo luận. Nội dung nghiên cứu có tính hệ thống và chiều sâu, triển khai trên nhiều đối tượng cây trồng và nhiều loại nano kim loại, qua đó tăng độ tin cậy và giá trị khái quát của kết quả.

Những hạn chế của luận án:

Bên cạnh những ưu điểm, luận án vẫn còn một số hạn chế nhất định. Phần thảo luận ở một số nội dung chưa thật sự sâu, chủ yếu dừng ở mức so sánh kết quả mà chưa khai thác triệt để cơ chế tác động ở mức phân tử. Một số nội dung giữa các phần còn có sự lặp lại nhất định do nghiên cứu trên nhiều đối tượng và vật liệu tương tự. Ngoài ra, việc thiếu các phân tích chuyên sâu về đặc tính vật liệu nano hoặc các kỹ thuật hiện đại hơn (như sinh học phân tử) phần nào hạn chế khả năng làm rõ bản chất cơ chế. Về hình thức, vẫn còn những điểm nhỏ cần chuẩn hóa thêm về cách trình bày thuật ngữ, ký hiệu và trích dẫn tài liệu để tăng tính thống nhất và chuyên nghiệp.

7. Nội dung của luận án đã được công bố trên tạp chí, kỷ yếu Hội nghị Khoa học nào và giá trị của các công trình đã công bố

Các công trình công bố bám sát nội dung chính của luận án, phản ánh rõ các kết quả cốt lõi và có giá trị khoa học cũng như giá trị ứng dụng thực tiễn, góp phần khẳng định độ tin cậy và đóng góp của nghiên cứu đối với lĩnh vực công nghệ sinh học thực vật.

8. Kết luận chung cần khẳng định: Luận án đủ điều kiện đưa ra bảo vệ trước Hội đồng đánh giá luận án tiến sĩ cấp Học viện và tôi đánh giá cao về chất lượng và giá trị của luận án này và đồng ý để NCS bảo vệ luận án tiến sĩ cấp Học viện.

Hà Nội, ngày 5 tháng 5 năm 2026

Người viết nhận xét

Nguyễn Bá Nam

BẢN NHẬN XÉT LUẬN ÁN TIẾN SĨ

Họ và tên người phản biện luận án: Trịnh Thị Hương
Học hàm, học vị: PGS.TS
Cơ quan công tác: Trường Đại học Công Thương TP.HCM
Họ và tên nghiên cứu sinh: Phan Lê Hà Nguyễn
Tên đề tài luận án: Nghiên cứu thay thế một số muối kim loại vi lượng bằng nano kim loại trong vi nhân giống cây hoa (cúc, đồng tiền và tử linh lan)

Ý KIẾN NHẬN XÉT

1. Tính cần thiết, thời sự, ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài

Đề tài tập trung vào việc thay thế muối kim loại vi lượng bằng nano kim loại trong nuôi cấy *in vitro* trên một số loại cây hoa có giá trị như cúc, đồng tiền, tử linh lan. Đây là hướng nghiên cứu có tính cần thiết và thời sự cao trong bối cảnh công nghệ nano đang phát triển mạnh và được ứng dụng rộng rãi trong sinh học và nông nghiệp.

Những kết quả của luận án đã đưa ra những dẫn chứng khoa học mới về vai trò của nano kim loại trong cải thiện sinh trưởng của cây cúc, đồng tiền, tử linh lan, cũng như khắc phục được một số vấn đề bất thường hay gặp trong nuôi cấy *in vitro* như: thuỷ tinh thể, vàng và rụng lá, tích tụ ethylene, hoá nâu môi trường,... Kết quả của luận án là nguồn tài liệu có giá trị hỗ trợ trong giảng dạy và nghiên cứu.

Về ý nghĩa thực tiễn, nghiên cứu cho thấy tiềm năng để nâng cao hiệu quả nhân giống cây trồng; giảm hiện tượng bất thường trong nuôi cấy; tăng chất lượng cây giống và khả năng thích nghi vườn ươm.

2. Sự không trùng lặp của đề tài nghiên cứu so với các công trình, luận văn, luận án đã công bố ở trong và ngoài nước; tính trung thực, rõ ràng và đầy đủ trong trích dẫn tài liệu tham khảo

Luận án không trùng lặp về nội dung với các công trình đã công bố, trong đó hướng nghiên cứu "thay thế muối vi lượng bằng nano" là tương đối mới, không trùng lặp với các nghiên cứu trước (chủ yếu chỉ bổ sung nano). Tổng quan tài liệu khá đầy đủ, có phân tích các nghiên cứu liên quan đến FeNPs, CoNPs, MoNPs.

Luận án thể hiện tính trung thực khoa học, bảng biểu, đồ thị, hình ảnh đầy đủ, rõ ràng, số liệu được phân tích bằng các phần mềm thống kê tin cậy. Các tài liệu tham khảo được trích dẫn rõ ràng, tương đối đầy đủ và phù hợp với nội dung nghiên cứu.

3. Sự phù hợp giữa tên đề tài với nội dung, giữa nội dung với ngành và mã số ngành

Tên đề tài phản ánh đúng nội dung nghiên cứu của đề tài. Nội dung đề tài phù hợp với chuyên ngành công nghệ sinh học.

4. Độ tin cậy và tính hiện đại của phương pháp đã sử dụng để nghiên cứu

Luận án sử dụng các phương pháp như: Nuôi cấy mô tế bào thực vật; Phân tích enzyme (SOD, CAT, APX); Đo ethylene; Phân tích hấp thu khoáng bằng phương pháp quang phổ hấp thụ nguyên tử (AAS); Quan sát hình thái, giải phẫu. Các phương pháp đa dạng, phù

hợp, có tính liên ngành, và có sử dụng các chỉ tiêu sinh lý – sinh hóa hiện đại. Tuy nhiên, luận án chưa đi sâu vào phân tích cơ chế ở mức tế bào.

5. Kết quả nghiên cứu mới của tác giả; những đóng góp mới cho sự phát triển khoa học chuyên ngành; đóng góp mới phục vụ cho sản xuất, kinh tế, quốc phòng, xã hội và đời sống; ý nghĩa khoa học, giá trị và độ tin cậy của những kết quả đó

Luận án đã đưa ra hướng tiếp cận mới trong lĩnh vực công nghệ sinh học thực vật khi chứng minh khả năng thay thế một số muối kim loại vi lượng trong môi trường nuôi cấy MS bằng các hạt nano kim loại (FeNPs, MoO_3NPs, CoNPs) trên ba đối tượng cây hoa có giá trị kinh tế (cúc, đồng tiền, tử linh lan), qua đó mở ra hướng mới trong cải tiến môi trường nuôi cấy *in vitro*. Kết quả nghiên cứu cho thấy các nano kim loại không chỉ nâng cao hiệu quả tái sinh, nhân nhanh chồi và tạo rễ *in vitro* mà còn giảm rõ rệt các hiện tượng bất thường sinh lý như vàng lá và thủy tinh thể. Đặc biệt, nghiên cứu đã làm sáng tỏ cơ chế tác động của nano thông qua việc tăng cường hệ enzyme chống oxy hóa, cải thiện hấp thu dinh dưỡng và điều hòa ethylene nội sinh, qua đó bổ sung cơ sở khoa học mới cho ứng dụng công nghệ nano trong nuôi cấy mô thực vật. Những kết quả này có đóng góp mới, có giá trị học thuật cao cho chuyên ngành công nghệ sinh học thực vật và mở rộng định hướng nghiên cứu về nano trong nhân giống cây trồng.

Về mặt ứng dụng, kết quả nghiên cứu cho thấy cây con thu được từ các nghiệm thức sử dụng nano kim loại có khả năng thích nghi tốt hơn, sinh trưởng ổn định và nâng cao chất lượng hoa trong điều kiện vườn ươm, mở ra tiềm năng của nano kim loại như một loại phân bón và bổ sung vi lượng cho sự sinh trưởng của cây trồng, có thể ứng dụng vào sản xuất giống cây hoa, góp phần nâng cao chất lượng cây giống, tăng hiệu quả kinh tế và đáp ứng nhu cầu sản xuất nông nghiệp công nghệ cao.

Các kết quả được xây dựng trên hệ thống thí nghiệm đa đối tượng, đa chỉ tiêu sinh lý, sinh hóa và được đối chứng rõ ràng, bảo đảm độ tin cậy, tính khoa học và khả năng ứng dụng thực tiễn cao.

6. Ưu điểm và nhược điểm về nội dung, kết cấu và hình thức của luận án

Ưu điểm:

Luận án có tính mới và tính thời sự cao khi kết hợp công nghệ nano với nuôi cấy mô tế bào thực vật nhằm cải tiến môi trường MS, mở ra hướng tiếp cận mới trong vi nhân giống cây trồng. Nội dung nghiên cứu được xây dựng logic, có tính hệ thống, triển khai trên ba đối tượng cây hoa có giá trị kinh tế, giúp tăng tính đại diện và khả năng khái quát hóa kết quả. Phương pháp nghiên cứu được lựa chọn phù hợp, kết hợp đồng bộ giữa đánh giá hình thái, sinh trưởng, sinh lý, sinh hóa và khả năng thích nghi *ex vitro*, qua đó làm rõ không chỉ hiệu quả mà còn cơ chế tác động của nano kim loại.

Luận án đã xác định được các nồng độ nano tối ưu cho từng giai đoạn phát sinh hình thái ở từng đối tượng nghiên cứu, tạo cơ sở thực tiễn rõ ràng cho ứng dụng sản xuất. Bên cạnh đó, luận án đã chứng minh được vai trò của nano trong việc giảm các rối loạn sinh lý như thủy tinh thể, vàng lá và tích tụ ethylene – đây là những vấn đề có ý nghĩa thực tiễn lớn trong nuôi cấy *in vitro*.

Số liệu nghiên cứu đầy đủ, được xử lý thống kê chặt chẽ, hình ảnh minh chứng rõ ràng, cho thấy độ tin cậy cao. Tổng thể, luận án có giá trị khoa học, tính ứng dụng thực tiễn tốt và đóng góp đáng kể cho định hướng phát triển công nghệ nhân giống thực vật hiện đại.

Những hạn chế của luận án:

Phần Mở đầu

Danh mục chữ viết tắt: nên bổ sung cột có cụm từ bằng tiếng Anh và bên cạnh là phiên nghĩa tiếng Việt.

Ghi tên đầy đủ của các cụm từ viết tắt ở lần xuất hiện đầu tiên. VD: MT, NPs.

Mục tiêu nghiên cứu:

- Cần phân biệt giữa mục tiêu tổng quát và mục đích nghiên cứu.

- Mục tiêu cụ thể: cần biên tập lại cho phù hợp, mục tiêu cụ thể cần xác định được các nội dung đạt được gì, chứ không diễn giải.

Phần nội dung nghiên cứu (Tr.2): Các tiểu mục con (Đối tượng NC, Phạm vi NC) chưa phù hợp.

- Ý nghĩa thực tiễn: nên được biên tập lại, NCS đang nhầm lẫn với ý nghĩa khoa học.

Chương 1: Tổng quan tài liệu

Phần tổng quan còn thiên về mô tả nhiều hơn, chưa đi sâu phân tích tổng hợp.

Bảng 1.1: Tên bảng là thành phần và nồng độ trong môi trường MS, do vậy chỉ nên đưa các thành phần của môi trường khoáng MS, không nên đưa các thành phần khác vào bảng như: carbon, vitamin, CĐHSTTV, agar.

Vì nội dung nghiên cứu thay thế muối $FeSO_4.7H_2O$ bằng FeNPs, do vậy trong bảng 1.1 nên bỏ hàng FeEDTA và ghi muối $Na_2EDTA.Fe$ dưới dạng 2 thành phần là $FeSO_4.7H_2O$ và EDTA (Tr.6).

Xem lại thuật ngữ: "sự khuếch tán có xúc tác" (Tr.9) chưa phù hợp khi sử dụng cụm từ "xúc tác".

Rà soát và viết thống nhất tên enzyme trong toàn bài. VD: enzym photphokinaza; phophataza (Tr. 10).

Chương 2: Vật liệu và phương pháp

Rà soát chỉnh sửa lại chữ (Hình/Bảng) trong dấu ngoặc có in hoa không, cần thống nhất trong bài.

Rà soát và bổ sung đầy đủ kích thước và thước đo (bar) trong các hình:

- Hình 2.1: Bổ sung kích thước của thang đo.

- Hình 2.2: bổ sung thang đo + kích thước của thang đo.

Phương pháp nghiên cứu:

Phương pháp đo diệp lục tố: cần chỉ rõ đo ở lá vị trí thứ mấy trên cây.

Phương pháp xác định hoạt độ các enzyme, hấp thụ kim loại, ethylene ở các hình từ 2.4 → 2.8 nên được biên tập dưới dạng mô tả phương pháp thực hiện các bước cụ thể từ chuẩn bị nguyên liệu, hoá chất, cách tiến hành thực hiện,... Trong các hình này vẫn còn để cả tiếng anh lẫn tiếng việt, nhiều từ tiếng anh chưa việt hoá.

Bổ sung phương pháp cố định quan sát sát hình thái khí khẩu.

Phương pháp quy đổi nồng độ muối sang nano kim loại, NCS nên trình bày chi tiết cách tính hơn. Trong quá trình quy đổi, NCS có tính toán đến sự thay đổi hàm lượng của nguyên tố Na trong muối $Na_2MoO_4.2H_2O$ khi thay thế bằng MoO_3NPs không? Tương tự, thay thế $CoCl_6.2H_20$ bằng CoNPs có tính toán đến sự thay đổi của khoáng Cl^- không?; thay thế $FeSO_4.7H_2O$ bằng FeNPs có tính toán đến sự thay đổi của nhóm SO_4 không? NCS cần làm rõ các điểm này, vì nếu không tính toán đến sự thay đổi các ion bị ảnh hưởng theo như Na^+, Cl^-, SO_4^{2-} thì những kết quả đạt được có thể không chỉ chịu tác động của các nano tương ứng mà còn bởi sự thay đổi về nồng độ của các nhóm này.

Phân tích thống kê: Cần làm rõ: "Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần với 10 bình nuôi cấy" thì 10 bình/nghiệm thức hay 10 bình/thí nghiệm?

Sửa $P < 0,05$ thành $P \leqq 0,05$.

Chương 3: Kết quả và thảo luận

Rà soát và chỉnh sửa lại ở tất cả các bảng số liệu: SD: là độ lệch chuẩn, không phải sai số chuẩn; sửa $P < 0,05$ thành $P \leqq 0,05$.

Cột tỷ lệ % trong các bảng số liệu đạt 100%, có bảng thì để phân hạng thống kê 100±00a (Bảng 3.2), có bảng thì chỉ để 100% cả cột (VD: Bảng 3.4). Cần rà soát và thống nhất lại cách trình bày.

Bảng 3.1: Bỏ cụm từ "sau 30 ngày nuôi cấy" vì số liệu ghi nhận sau cả 15 và 30 ngày.

Bảng 3.2: Xác định rõ khối lượng tươi chồi hay cụm chồi?

Xem lại các câu: "*Mo có vai trò trong sinh tổng hợp Moco*" (tr.58); " *từ đó nâng cao sinh khả dụng so với dạng ion truyền thống*" (tr.63).

Việt hoá từ "endocytosis" (nhập bào) (Tr.63).

Trong thảo luận: lưu ý khi sử dụng các cụm từ như: Một số nghiên cứu chỉ ra rằng, hay "các nghiên cứu cho thấy",... nhưng khi cuối câu thảo luận này thì chỉ có 1 tài liệu trích dẫn (VD. Tr.63). NCS rà soát và chỉnh sửa lại cho phù hợp. Ngoài ra, trong quá trình thảo luận, NCS cần lưu ý tách biệt giữa kết quả của nghiên cứu mình với kết quả trích dẫn từ công bố khác để thảo luận.

Hình 3.10: Vì sao không có thanh SD trong đồ thị của chỉ tiêu khối lượng như các chỉ tiêu khác?

Hình 3.13: Không có kết quả của cây đối chứng, do vậy không có cơ sở để khẳng định là bổ sung CoNP đã khắc phục được một số hiện tượng bất thường trong nuôi cấy tái sinh chồi cây tử linh lan.

Mục 3.2.2: Sửa các thuật ngữ "MT DC0" thành "đối chứng +" để dễ theo dõi kết qủa trong bài (Tr.72).

Hình 3.14: Nên bổ sung hình ảnh kết quả đối chứng là lá của cây phát triển ở hình A, B để có cơ sở so sánh.

Mục 3.2.3: NCS biện luận nghiệm thức DR0 và các số liệu là số ngày đi kèm theo nhưng không cung cấp số liệu trong bảng/đồ thị, do vậy cần rà soát và biên tập lại mục này cho phù hợp với kết quả trong đồ thị và bảng cung cấp trong luận án (tr.76).

Hình 3.16: làm rõ ở trục hoành "đối chứng và 0", nên biên tập lại thành "đối chứng + và đối chứng - " như các đồ thị trước đó để dễ theo dõi.

Bảng 3.9: Nên có kết quả của đối chứng + thì kết quả được ý nghĩa hơn.

Bảng 3.10 và 3.11: không sử dụng Duncan test trong trường hợp so sánh trùng bình của hai biến độc lập, NCS nên sử dụng so sánh T-test.

Hình 3.19: thống nhất sử dụng 15 ngày thay cho 2 tuần.

Bảng 3.17: Xem lại đơn vị tính mg tính trên đơn vị gì?

Tài liệu tham khảo

Xem lại tài liệu số [2] là tài liệu tiếng việt, do vậy viết lại tên tác giả tiếng việt.

Trích dẫn tài liệu số [120] ở hình 2.7 và 2.8 chưa đúng. Nội dung tài liệu số [120] không thể hiện phương pháp xác định hàm lượng enzym cellulase và pectinase. NCS cần kiểm tra lại trích dẫn tài liệu này.

7. Nội dung của luận án đã được công bố trên tạp chí, kỷ yếu Hội nghị Khoa học nào và giá trị của các công trình đã công bố

NCS đã công bố:

1 bài báo trên tạp chí Plant cell Tissue and Organ culture (Q1) (tác giả chính)

1 bài báo trên tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam-Bản B (tác giả chính)

1 bài báo trên tạp chí Scientia Horticulturae (đồng tác giả)

2 bài báo trong Hội nghị Công nghệ Sinh học Toàn quốc (1 tác giả chính, 1 đồng tác giả)

1 chương sách trên nhà xuất bản quốc tế uy tín (Springer) (đồng tác giả)

Những công trình đã công bố đáp ứng đủ điều kiện yêu cầu của chương trình tiến sĩ của Học viện Khoa học và Công nghệ - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

8. Kết luận chung cần khẳng định:

Luận án đáp ứng yêu cầu của một luận án tiến sĩ chuyên ngành công nghệ sinh học.

Hà Nội, ngày 5 tháng 5 năm 2026

Người viết nhận xét

Trịnh Thị Hương

CỘNG HOÀ XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập – Tự do – Hạnh phúc

BẢN NHẬN XÉT LUẬN ÁN TIẾN SĨ

Họ và tên người phản biện luận án: Trịnh Ngọc Nam
Học hàm, học vị: Phó giáo sư, Tiến sĩ
Cơ quan công tác: Trường Đại học Công nghiệp Thành phố Hồ Chí Minh
Họ và tên Nghiên cứu sinh: Phan Lê Hà Nguyễn
Tên đề tài luận án: Nghiên cứu thay thế một số muối kim loại vi lượng bằng nano kim loại trong vi nhân giống cây hoa (Cúc, Đồng tiền và Tử linh lan)
Ngành: Công nghệ Sinh học– 9420201

Ý KIẾN NHẬN XÉT

1. Tính cần thiết, thời sự, ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài

Vai trò của các loại hạt nano (NPs) trong nuôi cấy mô thực vật đã được nghiên cứu trong những năm gần đây nhằm mục đích bổ sung vào môi trường nuôi cấy giúp nâng cao hiệu quả tăng trưởng, phát sinh hình thái, đề kháng với stress… Mặc dù vậy, việc sử dụng NPs như là nguồn dinh dưỡng để thay thế cho các loại khoáng chất là thành phần của môi trường nuôi cấy lại chưa có nhiều nghiên cứu đề cập.

Nghiên cứu đánh giá hiệu quả của việc thay thế các khoáng kim loại bằng các hạt nano kim loại của Luận án, chính vì vậy, là rất cần thiết, vừa vẫn đảm bảo nhu cầu khoáng vừa, có hiệu quả gia tăng đối với quá trình nuôi cấy cây *in vitro*. Với vai trò phức tạp của từng loại khoáng đối với cấu trúc mô tế bào, các quá trình chuyển hoá, sinh trưởng phát triển và đề kháng, các nghiên cứu thay thế lại càng cần phải thực hiện cẩn trọng và toàn diện hơn.

Với vấn đề nghiên cứu đặt ra, cách tiếp cận nghiên cứu đối với từng NPs kim loại cho một số loại mẫu vật liệu thực vật trong nghiên cứu của Luận án là hợp lý và phù hợp với điều kiện nghiên cứu hiện tại, phù hợp với lĩnh vực công nghệ thực vật.

2. Sự không trùng lặp của đề tài nghiên cứu so với các công trình, luận án đã công bố ở trong và ngoài nước; tính trung thực, rõ ràng và đầy đủ trong trích dẫn tài liệu tham khảo

So với các nghiên cứu và công bố khác trong và ngoài nước, xét về tổng thể, Luận án không có trùng lặp. Các công bố của Luận án với nội dung cũng là duy nhất. Các trình dẫn đối với các luận cứ được trình bày khá đầy đủ trong các nội dung của Luận án.

3. Sự phù hợp giữa tên đề tài và nội dung, giữa nội dung với chuyên ngành và mã số chuyên ngành

Với mục tiêu, nội dung nghiên cứu của đề tài cho thấy có sự phù hợp cao với tên đề tài cũng như chuyên ngành được đào tạo Công nghệ sinh học của nghiên cứu sinh. Những nội dung nghiên cứu và phương pháp thực hiện phù hợp với đối tượng nghiên cứu của đề tài trong Luận án về đánh giá hiệu quả của sự thay thế một số muối khoáng trong thành phần môi trường nuôi cấy *in vitro* bằng các NPs đối với một số mẫu hoa cảnh (Cúc, Đồng tiền, Tử linh lan).

4. Độ tin cậy và tính hiện đại của phương pháp đã sử dụng để nghiên cứu

Luận án sử dụng các phương pháp nghiên cứu tiêu chuẩn và thường quy về nuôi cấy mô và sinh lý thực vật, kết hợp với việc sử dụng các kỹ thuật phân tích định lượng hiện đại trong phân tích một số thành phần kim loại tích luỹ trong mô nuôi cấy, hàm lượng khí ethylen sản sinh đã làm gia tăng độ tin cậy của nghiên cứu của Luận án. Các phương pháp thực nghiệm trong Luận án có số lần lặp lại cũng như số mẫu nghiên cứu lớn, và kết quả được phân tích thống kê phù hợp giúp gia tăng độ tin cậy cho các kết quả nghiên cứu của Luận án.

Mặc dù vậy, trong một số phương pháp thực nghiệm, Luận án chưa lý giải có sở của việc lựa chọn dải nồng độ NPs của các NPs, gồm MoO_3NPs, CoNPs, FeNPs, khảo sát để thay thế cho khoáng kim loại trong môi trường nuôi cấy MS.

5. Kết quả nghiên cứu, những đóng góp mới, ý nghĩa khoa học, giá trị thực tiễn và độ tin cậy của các kết quả đạt được

Luận án đã thực hiện các nội dung nghiên cứu và đạt được 3 kết quả nội bật, có tính mới:

Những kết quả đạt được tiêu biểu trong nghiên cứu của Luận án, bao gồm:

- Xác định hiệu quả của việc thay thế các khoáng kim loại vi lượng Na_2MoO_4, $CoCl_2$ và $FeSO_4$ trong môi trường nuôi cấy MS bằng các NPs kim loại đối với một số quá trình phát sinh hình thái và sinh trưởng ở 3 loại cây trồng (hoa cúc, đồng tiền và tử linh lan);
- Đánh giá ảnh hưởng của việc thay thế kể trên đối với hiệu quả gia tăng khả năng đề kháng đối với stress oxy hoá của mô thực vật nuôi cấy.
- Phân tích hiệu quả hấp thu một số loại muối khoáng đa lượng (Ca, Mg, K) và vi lượng (Cu, Fe) khi môi trường nuôi cấy có sự thay thế một số khoáng kim loại bằng NPs.

Với các kết quả này, nghiên cứu đã có những đóng góp mới có giá trị cho khoa học, bao gồm: khả năng thay thế một số khoáng kim loại bằng NPs kim loại tương ứng, hiệu quả của các NP kim loại trong quá trình phát sinh hình thái, sinh trưởng, hấp thu khoáng và đề kháng với stress oxy hoá.

6. Ưu điểm, nhược điểm bố cục, hình thức luận án, mức độ trung thực của tóm tắt luận án so với toàn văn luận án

- Luận án có bố cục phù hợp với một luận án tiến sĩ. Văn phong sử dụng đảm bảo tính khoa học.

- Phần Lý do chọn đề tài (trang 1), cần cung cấp các luận cứ cụ thể và chắc chắn hơn thay vì chỉ là những luận giải mang tính chủ quan của Nghiên cứu sinh.
- Phần mục tiêu cụ thể (trang 2): là những vấn đề cần đạt được đối với các nội dung nghiên cứu, không phải là những vấn đề cần thực hiện. Mục tiêu cụ thể nên được viết lại đúng đúng định dạng. Bên cạnh đó, nội dung Lý do chọn đề tài và Mục tiêu tổng quát chưa hợp logic, nếu theo nội dung trình bày trong Luận án, thì mục tiêu tổng quát không có quá nhiều khác biệt so với các nghiên cứu trước. Ngoài ra, việc sử dụng các NP để thay thế cho các muối của các loại Mo, Co và Fe trong môi trường nuôi cấy, nhưng những tác động của sự thay đổi này đối với các yếu tố, thành phần tế bào hoặc quá trình sinh hoá có vai trò trực tiếp của những nguyên tố khoáng chưa được làm rõ trong Luận án.
- Đối tượng nghiên cứu của Luận án (trang 2) cần viết lại, không phải là ba loại cây trồng hay ba loại NP của 3 kim loại. Đối tượng nghiên cứu chính của Luận án chính là hiệu quả thay thế các muối bằng kim loại của Mo, Co và Fe bằng các NP của những kim loại này trong môi trường nuôi cấy đối với sự sinh trưởng và phát triển của ba loại hoa cảnh (Cúc, Đồng tiền, Tử linh lan).
- Nội dung thảo luận đối với các kết quả của Luận án khá hạn chế, gần như chỉ là nhận xét đối với các kết quả. Vai trò của các NPs trong hiệu quả đối với các quá trình sinh trưởng, phát sinh hình thái và đáp ứng với stress trong môi trường nuôi cấy *in vitro* gần như chưa được thảo luận. Việc thay thế một số khoáng kim loại bằng NPs có hiệu quả rõ rệt đối với một số enzyme kháng oxy hoá là kết quả rất có giá trị của Luận án nhưng lại không có bất cứ thảo luận nào để làm rõ vai trò, hoặc thậm chí là những vấn đề có thể là hệ quả. Chẳng hạn, một số kết quả cho thấy khi thay thế khoáng kim loại bằng NP làm gia tăng hoạt tính các enzyme kháng oxy hoá, điều này có phải là do những NP gây độc dẫn đến stress oxy hoá mô nuôi cấy.
- Những kết luận của Luận án phù hợp với với mục tiêu đã đặt ra. Mặc dù vậy, những kết luận này được viết chưa mang tính đúc kết, vẫn là sự tóm tắt lại kết quả nghiên cứu, chưa có sự khẳng định đối với các mục tiêu đã đạt được so với đề ra ban đầu. Đặc biệt, cần kết luận khẳng định sự thay thế các khoáng kim loại bằng các NP có hiệu quả, có ảnh hưởng đến thực vật nuôi cấy *in vitro*.
- Việc sử dụng các công cụ AI hỗ trợ để mô tả quy trình thí nghiệm, như được trình bày trong Luận án có thể phù hợp trong xu thế hiện nay. Mặc dù vậy, ở từng bước trong quy trình, cần cẩn trọng vì nhiều hình ảnh không phù hợp và chưa chính xác về mặt khoa học.
- Hình 1.2 (trang 20) nên được Việt hoá

7. Mức độ công bố bài báo khoa học là kết quả chính của đề tài luận án và giá trị khoa học của các công trình đã công bố

Các kết quả nghiên cứu chính của luận án đã được công bố trong 6 công trình khoa học, bao gồm 1 chương sách, 2 bài báo đăng kỷ yếu hội nghị, 1 bài báo đăng tạp chí trong nước và 2 bài báo khoa học đăng trên tạp chí quốc tế: Tạp chí Plan Cell, Tissue and Organ Culture, thuộc danh mục SCIE, IF 3.0, rank Q1, và Tạp chí Scientia Horticulturae thuộc danh mục SCIE, IF 4.2, rank Q1, là những

tạp chí rất có uy tín trong lĩnh vực nuôi cấy mô thực vật. Trong đó, nghiên cứu sinh là tác giả chính của 1 bài báo đăng tạp chí trong nước và 1 tạp chí quốc tế, các công trình khác với vai trò là tham gia. Các công trình trình bày các kết quả có liên quan đến nội dung của Luận án. Nhìn chung, những công bố khoa học của luận án có chất lượng và giá trị cao, góp phần đưa được những thông tin khoa học giới thiệu với cộng đồng khoa học quốc tế. Đây là điều có ý nghĩa hết sức quan trọng.

8. Kết luận chung

- Mức độ đáp ứng yêu cầu của một luận án tiến sĩ theo quy định: với những nội dung nhận xét được nêu ra ở các phần kể trên, luận án mặc dù có một vài nội dung cần bổ sung và điều chỉnh nhưng nhìn chung những kết quả trình bày trong luận án đáp ứng được yêu cầu của một luận án tiến sĩ chuyên ngành.

- Bản tóm tắt luận án phản ánh trung thực nội dung cơ bản của luận án và đáp ứng đúng yêu cầu của một bản tóm tắt luận án.
- Đồng ý để Luận án được đưa ra bảo vệ trước hội đồng chấm luận án cấp Học viện để nhận bằng tiến sĩ.

Tp. Hồ Chí Minh, ngày 06 tháng 05 năm 2026

Người viết nhận xét

Trịnh Ngọc Nam

VIỆN HÀN LÂM
KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VN
HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ
*

ĐẢNG CỘNG SẢN VIỆT NAM

Đà Lạt, ngày 30 tháng 5 năm 2026

QUYẾT NGHỊ CỦA
HỘI ĐỒNG ĐÁNH GIÁ LUẬN ÁN TIẾN SĨ CẤP HỌC VIỆN

Căn cứ quyết định số 07-QĐ/HVKHCN ngày 14/04/2026của Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ về việc thành lập Hội đồng đánh giá luận án tiến sĩ cấp Học viện

Thời gian họp: 08h30, Thứ Bảy ngày 30 tháng 05 năm 2026

Địa điểm: Phòng họp tầng 1, Viện Khoa học sự sống (cơ sở Đà Lạt), 116, Xô Viết Nghệ Tĩnh, Phường Lang Biang, Đà Lạt để đánh giá luận án tiến sĩ.

Nghiên cứu sinh: **Phan Lê Hà Nguyễn**

Tên đề tài luận án: **Nghiên cứu thay thế một số muối kim loại vi lượng bằng nano kim loại trong vi nhân giống cây hoa (cúc, đồng tiền và tử linh lan)**

Ngành: Công nghệ sinh học

Mã số: 9 42 02 01

Người hướng dẫn 1: GS. TS. Dương Tấn Nhựt - Viện Khoa học sự sống, Viện Hàn lâm KHCNVN

Người hướng dẫn 2: PGS.TS. Vũ Quốc Luận - Viện Khoa học sự sống, Viện Hàn lâm KHCNVN

Số thành viên Hội đồng đánh giá luận án tiến sĩ cấp Học viện: 7/7

Sau khi nghe nghiên cứu sinh Phan Lê Hà Nguyễn trình bày nội dung luận án trong thời gian 30 phút, Hội đồng đã nghe các phản biện phát biểu nhận xét luận án; nghe Thư ký hội đồng đọc bản nhận xét của 2 phản biện độc lập; nghe các ý kiến nhận xét luận án của các thành viên khác trong Hội đồng. Hội đồng đã tiến hành thảo luận chung tại Hội trường, sau đó Hội đồng đã họp riêng và nhất trí quyết nghị như sau:

1. **Kết quả bỏ phiếu đánh giá luận án của Hội đồng:**

07/07 số phiếu tán thành

2. **Tính phù hợp của tên đề tài và sự không trùng lặp về nội dung luận án**

- Tên đề tài, nội dung và kết quả nghiên cứu của luận án phù hợp với ngành đào tạo.

nghiên cứu đã công bố trong và ngoài nước.

- Các tài liệu tham khảo của luận án có nội dung phù hợp và đã được trích dẫn trong luận án.

3. Những kết luận khoa học cơ bản, những điểm mới, đóng góp mới của luận án

Luận án đã chứng minh một cách có hệ thống khả năng thay thế các muối kim loại vi lượng truyền thống trên môi trường MS bằng các dạng nano kim loại (FeNPs, MoO_3NPs) trên ba loại cây (cúc, đồng tiền, tử linh lan), qua đó mở ra hướng tiếp cận mới trong cải tiến môi trường nuôi cấy:

- Xác định được nồng độ tối ưu của từng loại nano kim loại cho từng giai đoạn phát triển (cảm ứng mô sẹo, tái sinh chồi, nhân nhanh về ra rễ) ở từng đối tượng cây trồng.
- Cung cấp bằng chứng về cơ chế tác động sinh lý-sinh hoá của nano kim loại, thông qua việc gia tăng hoạt động của các enzyme kháng oxy hoá (SOD, CAT, APX) giảm hoạt động enzyme thuỷ phân (cellulase, pectinase) và hạn chế tích tụ ethylene, từ đó giảm các rối loạn sinh lý trong nuôi cấy *in vitro*.
- Nêu rõ vai trò của nano kim loại trong tăng cường khả năng hấp thu dinh dưỡng khoáng (đa lượng, vi lượng), góp phần cải thiện sinh trưởng và phát triển chất lượng cây con.
- Chứng minh được cây con thu được từ các nghiệm thức sử dụng nano kim loại có khả năng thích nghi tốt hơn, sinh trưởng ổn định và nâng cao chất lượng trong điều kiện vườn ươm, khẳng định tiềm năng ứng dụng thực tiễn của nghiên cứu.

4. Cơ sở khoa học, độ tin cậy của những luận điểm và những kết luận nêu trong luận án

Nghiên cứu ứng dụng các hạt nano (NPs) trong nuôi cấy *in vitro* hiện nay chủ yếu tập trung nghiên cứu tăng cường khả năng phát sinh hình thái, sinh trưởng, cải thiện năng suất cây trồng, cải thiện hiệu quả chuyển gen và bảo vệ trước tác động môi trường, và chưa có nhiều nghiên cứu ứng dụng NPs như nguồn dinh dưỡng thay thế các muối kim loại trong môi trường. Vì vậy, đề tài nghiên cứu có cơ sở khoa học và thực tiễn để thực hiện.

So với các nghiên cứu trước đây và công bố trong và ngoài nước, luận án không có tính trung lắp, các trích dẫn với với luận án trình bày đầy đủ và các phương pháp phân tích có độ tin cậy cao.

Các thí nghiệm được bố trí có đối chứng, có lặp lại, có xử lý thống kê, đảm bảo độ tin cậy của kết quả nghiên cứu.

5. Ý nghĩa về lý luận, thực tiễn và những đề nghị sử dụng các kết quả nghiên cứu của luận án

Ý nghĩa khoa học

Kết quả nghiên cứu đã đưa ra dẫn chứng khoa học mới về vai trò của NPs trong cải thiện sinh trưởng của cây cúc, đồng tiền và tử linh lan. Đồng thời, khi thay thế kim loại NPs giúp khắc phục một số vấn đề bất thường gặp trong quá trình nuôi cấy *in vitro*.

Ý nghĩa thực tiễn

Kết quả nghiên cứu cho thấy triển vọng của việc sử dụng NPs thay thế muối kim loại vi lượng giúp cải thiện hiệu quả môi trường nuôi cấy. Với ưu điểm sử dụng vật liệu ít hơn nhưng mang lại hiệu quả nuôi cấy cao hơn. Nghiên cứu mở ra một hướng đi triển vọng trong nghiên cứu hấp thu, vận chuyển và sử dụng NPs trong sản xuất cây giống.

6. Những thiếu sót về nội dung và hình thức của luận án

Điều chỉnh theo sự góp ý của thành viên hộp đồng ngày ra, còn một số vấn đề cần chỉnh sửa:

Tuy nhiên cũng còn vài lỗi in ấn: Danh mục chữ viết tắt có vài sai sót (sắp xếp theo ABC) Danh mục bảng, hình bị nhầm trang so với phần nội dung (từ phần nội dung); Các từ diễn đạt trong luận án cần thống nhất một kiểu (nênViệt hóa); Mỗi thí nghiệm hay mỗi mẫu thực vật đem thí nghiệm với một NPs (Mo, Co; Fe) cần có một kết luận sơ bộ. Kết luận nên cô đọng và nêu bật vai trò của các NPs thay thế các muối kim loại vi lượng truyền thống.

7. Mức độ đáp ứng các yêu cầu của luận án

Luận án đáp ứng được đưa ra bảo vệ cấp Học viện và đề nghị cấp bằng Tiến sĩ Sinh học ứng dụng ngành Công nghệ Sinh học cho Nghiên cứu sinh.

8. Những điểm cần bổ sung, sửa chữa (nếu có) trước khi nộp luận án cho Thư viện Quốc gia Việt Nam

Những điểm cần bổ sung, sửa chữa theo sự góp ý của thành viên hội đồng trước khi nộp luận án

- Mở đầu, một số nhận định
- Mục tiêu, mô tả ngắn gọn lại theo thứ tự từng mục tiêu.
- Mục tiêu tổng quát cần được diễn đạt theo hướng khái quát nội dung nghiên cứu.
- Mục tiêu cụ thể nên được trình bày ngắn gọn, rõ ràng và hạn chế diễn giải dài dòng.
- Đóng góp mới: nên trình bày dưới dạng các gạch đầu dòng rõ ràng, súc tích, đồng thời cần sử dụng ngôn ngữ thận trọng, tránh các khẳng định quá mức như "giải mã cơ chế" nếu chưa có các bằng chứng ở mức độ cơ chế sâu.
- Thiết kế thí nghiệm: nên bổ sung một câu làm rõ cơ sở lựa chọn vật liệu và điều kiện thí nghiệm, nguồn mẫu có sẵn (nồng độ, có sự kế thừa, nên trình bày nguồn gốc mẫu cấy.

- Cần rà soát lại phần phương pháp nghiên cứu trình bày trong các hình 2.5-2.8 và thống nhất chung cách trình bày cho phù hợp
- Kết quả nghiên cứu: thiếu thước đo, cho các hình
- Danh mục tài liệu còn trùng lặp. Danh mục tài liệu còn tồn tại tình trạng trùng lặp, cụ thể như các tài liệu số 6, 12 và 29; số 32 và 71; số 89 và 198.

9. Kết luận:

- Luận án đáp ứng đầy đủ các yêu cầu của một luận án Tiến sĩ ngành Công nghệ sinh học.
- Bản tóm tắt của luận án trung thành nội dung cơ bản của luận án.
- Nghiên cứu sinh Phan Lê Hà Nguyễn xứng đáng nhận học vị Tiến sĩ Sinh học ứng dụng.

Căn cứ kết quả bỏ phiếu, Hội đồng đánh giá luận án tiến sĩ cấp Học viện nhất trí đề nghị công nhận học vị Tiến sĩ Sinh học ứng dụng cho nghiên cứu sinh Phan Lê Hà Nguyễn.

THƯ KÝ	CHỦ TỊCH
TS. Nguyễn Bá Nam	PGS.TS. Nguyễn Du Sanh

XÁC NHẬN CỦA CƠ SỞ ĐÀO TẠO

KT. GIÁM ĐỐC
PHÓ GIÁM ĐỐC

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ

Nguyễn Thị Trung

VIỆN HÀN LÂM
KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VN
HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ
*

ĐẢNG CỘNG SẢN VIỆT NAM

Đà Lạt, ngày 30 tháng 5 năm 2026

BIÊN BẢN
HỘI ĐỒNG ĐÁNH GIÁ LUẬN ÁN TIẾN SĨ CẤP HỌC VIỆN

Căn cứ quyết định số 07-QĐ/HVKHCN ngày 14/04/2026của Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ về việc thành lập Hội đồng đánh giá luận án tiến sĩ cấp Học viện

Thời gian họp: 08h30, Thứ Bảy ngày 30 tháng 05 năm 2026

Địa điểm: Phòng họp tầng 1, Viện Khoa học sự sống (cơ sở Đà Lạt), 116, Xô Viết Nghệ Tĩnh, Phường Lang Biang, Đà Lạt để đánh giá luận án tiến sĩ.

Nghiên cứu sinh: **Phan Lê Hà Nguyễn**

Tên đề tài luận án: **Nghiên cứu thay thế một số muối kim loại vi lượng bằng nano kim loại trong vi nhân giống cây hoa (cúc, đồng tiền và tử linh lan)**

Ngành: Công nghệ sinh học

Mã số: 9 42 02 01

Người hướng dẫn 1: GS. TS. Dương Tấn Nhựt - Viện Khoa học sự sống, Viện Hàn lâm KHCNVN

Người hướng dẫn 2: PGS.TS. Vũ Quốc Luận - Viện Khoa học sự sống, Viện Hàn lâm KHCNVN

THAM DỰ BUỔI BẢO VỆ GỒM CÓ

- Đại diện cơ sở đào tạo
- Đại diện Cơ quan chủ quản của NCS
- Người nhà NCS

NỘI DUNG

1. Từ 08 giờ 30 đến 9 giờ 00:

- Đại diện cơ sở đào tạo tuyên bố lý do, đọc Quyết định thành lập Hội đồng đánh giá luận án cấp Học viện. Đề nghị Chủ tịch Hội đồng điều khiển buổi họp.

- Chủ tịch Hội đồng điều khiển buổi họp:

+ Tuyên bố số thành viên Hội đồng có mặt: 07/07 (có danh sách kèm theo).

+ Số khách mời tham dự buổi bảo vệ: 12 người.

+ Thư ký hội đồng đọc lý lịch khoa học và kết quả học tập của nghiên cứu sinh.

2. Từ 09 giờ 00 đến 09 giờ 30:

- Nghiên cứu sinh Phan Lê Hà Nguyễn trình bầy nội dung luận án (tối đa 30 phút).

3. Từ 9 giờ 30 đến 10 giờ 30:

- Phản biện 1: Đọc nhận xét luận án (kèm theo toàn văn nhận xét).
- Phản biện 2: Đọc nhận xét luận án (kèm theo toàn văn nhận xét).
- Phản biện 3: Đọc nhận xét luận án (kèm theo toàn văn nhận xét).

Các câu hỏi của thành viên Hội đồng và câu trả lời của nghiên cứu sinh: (ghi rõ họ tên, học vị, chức danh khoa học của người hỏi)

PGS.TS. Trương Thị Bích Phượng.

- **Câu hỏi: giữa Na_2EDTA hay loại bỏ chất này? Xem lại mâu thuẫn với phương pháp nghiên cứu?**

Câu trả lời: Vẫn giữ Na2EDTA trong quá trình nghiên cứu, mục đích nghiên cứu chủ yếu để thay thế các muối kim loại bằng nano kim loại. Vấn đề này không mẫu thuẫn.

PGS.TS. Hoàng Thị Kim Hồng.

- Câu hỏi: mục đích cơ chế đóng mở khí khẩu, và thời gian phân tích. Đặc điểm chung nhất cho 3 nguyên tố khi nghiên cứu trên 3 đối tượng?
- Trong 3 đối tượng nghiên cứu thì cây đồng tiền là đối tượng khó thuần hoá giai đoạn vườn ươm liên quan nhiều đến sự đóng mở khí khẩu, vì vậy nghiên cứu tập trung chỉ tiêu này cho đối tượng này.
- Trong 3 vi lượng khảo sát đều tác động đến sinh trưởng mẫu cấy, ảnh hưởng đến các enzyme kháng oxy hoá, ảnh hưởng đến sự hấp thu các chất. Giảm ROS tăng mật độ enzyme kháng oxy hoá.
- Ngoài ra, có đặc điểm riêng của các yếu tố nghiên cứu. Mo sinh tổng hợp đạm, Fe liên quan tổng hợp lục lạp, Co đong vai trò điều hoà sinh trưởng tổng hợp ethylene.

PGS.TS. Nguyễn Du Sanh

Câu hỏi: giải thích các yếu tố trong điều hoà đóng mở khí khẩu trong nuôi cấy mô.

Câu trả lời: do độ ẩm cao trong bình nuôi cấy, vô trùng, tích luỹ ethylene

NCS Phan Lê Hà Nguyễn ghi nhận góp ý và trả lời các câu hỏi của Hội đồng.

Từ 12 giờ 00 đến 12 giờ 15 : Nghỉ giải lao

4. Từ 12 giờ 15 đến 12 giờ 30: Họp hội đồng riêng

- Thông qua kết luận của Hội đồng (có văn bản kèm theo).
- Ghi phiếu nhận xét luận án.

Kết quả kiểm phiếu 07/07thành viên tán thành và đề nghị Học viện ra quyết định công nhận học vị Tiến sĩ Sinh học ứng dụng cho nghiên cứu sinh Phan Lê Hà Nguyễn

5. Từ 12 giờ 30 đến 12 giờ 40

- Chủ tịch Hội đồng đọc kết luận của hội đồng đánh giá luận án.
- Hội đồng kết thúc lúc 12 giờ 45 phút, ngày 30 tháng 5 năm 2026.

Thư ký Hội đồng	**Chủ tịch Hội đồng**
TS. Nguyễn Bá Nam	**PGS.TS. Nguyễn Du Sanh**

XÁC NHẬN CỦA CƠ SỞ ĐÀO TẠO

KT. GIÁM ĐỐC
PHÓ GIÁM ĐỐC

ĐẢNG CỘNG SẢN VIỆT NAM
HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ
VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

Nguyễn Thị Trung

(Mẫu 6-HV-Bản giải trình chỉnh sửa, bổ sung cấp HV)

VIỆN HÀN LÂM
KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VN
HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ
*

ĐẢNG CỘNG SẢN VIỆT NAM

BẢN GIẢI TRÌNH CHỈNH SỬA, BỔ SUNG LUẬN ÁN TIẾN SĨ CẤP HỌC VIỆN

Ngày 30 tháng 5 năm 2026, Học viện Khoa học và Công nghệ đã tổ chức đánh giá luận án tiến sĩ cấp Học viện cho nghiên cứu sinh Phan Lê Hà Nguyễn theo Quyết định số 07/QĐ-HVKHCN ngày 14 tháng 4 năm 2026 của Giám đốc Học viện.

Đề tài: NGHIÊN CỨU THAY THẾ MỘT SỐ MUỐI KIM LOẠI VI LƯỢNG BẰNG NANO KIM LOẠI TRONG VI NHÂN GIỐNG CÂY HOA (CÚC, ĐỒNG TIỀN VÀ TỬ LINH LAN)

Ngành: Sinh học ứng dụng Mã số: 9 42 02 01

Người hướng dẫn khoa học: GS.TS. Dương Tấn Nhựt và PGS.TS. Vũ Quốc Luận

Theo Biên bản của Hội đồng, NCS phải bổ sung và chỉnh sửa luận án các điểm sau đây:

STT	Nội dung đề nghị chỉnh sửa, bổ sung	Nội dung đã được chỉnh sửa, bổ sung *(Ghi rõ số trang/chương/mục... đã được chỉnh sửa)*
1	Danh mục chữ viết tắt có vài sai sót (sắp xếp theo ABC)	NCS đã chỉnh sửa lại danh mục chữ viết tắt và sắp xếp theo thứ tự ABC (trang viii)
2	Danh mục bảng, hình bị nhầm trang so với phần nội dung (từ phần nội dung)	NCS đã chỉnh sửa lại danh mục bảng (trang x) và danh mục hình (trang xii)
3	Các từ diễn đạt trong luận án cần thống nhất một kiểu (nênViệt hóa)	NCS đã chỉnh sửa lại MoNPs (nano molypden), CoNPs (nano coban)
4	Mỗi thí nghiệm hay mỗi mẫu thực vật đem thí nghiệm với một NPs (Mo, Co; Fe) cần có một kết luận sơ	NCS đã viết lại phần kết luận của luận án như sau: **Đối với cây cúc:**

	bộ. Kết luận nên cô đọng và nêu bật vai trò của các NPs thay thế các muối kim loại vi lượng truyền thống.	• **MoO_3NPs 223,50 µg/L** cho tỷ lệ cảm ứng mô sẹo đạt 100% và tái sinh chồi đạt 33,33%. • **MoO_3NPs 149,00 µg/L** cho hiệu quả tối ưu trong giai đoạn nhân nhanh và sinh trưởng chồi, thông qua tăng khả năng ra rễ, cải thiện hình thái và thúc đẩy hấp thu khoáng đa lượng (Ca, Mg, K) và vi lượng (Cu, Fe). • **CoNPs 4,65 µg/L** trong giai đoạn ra rễ giúp cải thiện sinh trưởng cây cúc, làm tăng chiều cao cây, số lá, số rễ và sinh khối. đồng thời góp phần điều hòa ethylene và cải thiện trạng thái sinh lý của cây nuôi cấy. • **FeNPs 4,6 mg/L** giúp tăng tích lũy chlorophyll, thúc đẩy hình thành rễ. **Đối với cây đồng tiền:** • **CoNPs 6,2 µg/L** giúp tăng hệ số nhân chồi, cải thiện chiều cao và chất lượng chồi; đồng thời làm giảm các hiện tượng bất thường như **thủy tinh thể và vàng lá**. • **CoNPs 4,65 µg/L** thúc đẩy hình thành rễ, nâng cao khả năng thích nghi và sinh trưởng của cây ở điều kiện vườn ươm. • **FeNPs 5,6 mg/L** giúp tăng hấp

		thu Fe, cải thiện phát triển rễ, nâng cao hoạt động enzyme kháng oxy hóa và chất lượng cây đồng tiền nuôi cấy. **Đối với cây tử linh lan:** • **CoNPs 4,65 µg/L** giúp tăng số lượng chồi, chiều cao và sinh khối chồi; đồng thời hạn chế rõ rệt các bất thường hình thái trong quá trình nuôi cấy. CoNPs làm giảm tích lũy ethylene và tăng hoạt độ enzyme kháng oxy hóa, góp phần nâng cao sức sống và chất lượng mẫu cấy tử linh lan. • **FeNPs 5,6 mg/L** giúp tăng hoạt độ enzyme kháng oxy hóa và cải thiện trạng thái sinh trưởng của cây tử linh lan *in vitro* trong giai đoạn ra rễ. (Trang 101, 102)
5	Mở đầu, một số nhận định	NCS đã viết lại phần mở đầu như sau: Trong những năm gần đây, công nghệ nano đã trở thành một trong những lĩnh vực phát triển mạnh mẽ nhất của khoa học hiện đại, với nhiều ứng dụng trong y học, môi trường, vật liệu và nông nghiệp. Trong lĩnh vực công nghệ sinh học thực vật, các hạt nano kim loại được quan tâm nhờ kích thước siêu nhỏ, diện tích bề mặt lớn và khả năng tương tác hiệu quả với hệ thống sinh học của tế bào thực vật. Những đặc tính này giúp hạt

		nano có thể tham gia vào quá trình hấp thu dinh dưỡng, điều hòa trao đổi chất, tăng cường khả năng chống chịu stress và cải thiện sinh trưởng của cây trồng. Nuôi cấy mô tế bào thực vật là phương pháp nhân giống hiện đại có khả năng tạo ra số lượng lớn cây giống đồng nhất trong thời gian ngắn. Tuy nhiên, quá trình nuôi cấy *in vitro* vẫn tồn tại nhiều hạn chế như hiện tượng thủy tinh thể, vàng lá, rụng lá, hóa nâu mẫu cấy, tích lũy ethylene và stress oxy hóa. Bên cạnh đó, hiệu quả của quá trình nuôi cấy phụ thuộc rất lớn vào thành phần môi trường dinh dưỡng, đặc biệt là các nguyên tố vi lượng như sắt (Fe), molypden (Mo) và cobalt (Co), vốn giữ vai trò quan trọng trong hoạt động enzyme, quang hợp, hô hấp và quá trình phát sinh hình thái của thực vật. Cho đến nay, phần lớn các nghiên cứu về nano trong nuôi cấy mô thực vật tập trung vào việc bổ sung hạt nano như các chất kích thích sinh trưởng, chất khử trùng hoặc chất cảm ứng sinh tổng hợp hợp chất thứ cấp. Nhiều nghiên cứu đã chứng minh khả năng của nano kim loại trong việc cải thiện sinh trưởng, hạn chế nhiễm vi sinh vật và giảm một số rối loạn sinh lý trong điều kiện nuôi cấy in vitro. Tuy nhiên, việc sử dụng nano kim loại như một nguồn dinh dưỡng để thay thế trực tiếp các muối vi lượng truyền

		thống trong môi trường nuôi cấy vẫn còn rất hạn chế và chưa được nghiên cứu một cách hệ thống. Đây chính là khoảng trống khoa học quan trọng cần được làm sáng tỏ. Xuất phát từ thực tiễn đó, luận án "Nghiên cứu thay thế một số muối kim loại vi lượng bằng nano kim loại trong vi nhân giống cây hoa (cúc, đồng tiền và tử linh lan)" được thực hiện nhằm đánh giá khả năng sử dụng nano sắt (FeNPs), nano molypden (MoO_3NPs) và nano cobalt (CoNPs) thay thế các muối vi lượng tương ứng trong môi trường Murashige và Skoog (MS). Nghiên cứu tập trung trên ba đối tượng cây hoa có giá trị kinh tế cao là cúc, đồng tiền và tử linh lan, đồng thời đánh giá toàn diện ảnh hưởng của các hạt nano đến quá trình phát sinh hình thái, sinh trưởng, hấp thu dinh dưỡng khoáng, hoạt động của hệ enzyme kháng oxy hóa, sự tích lũy ethylene, hoạt động enzyme thủy phân và khả năng thích nghi của cây ở giai đoạn vườn ươm (Trang 1, 2)
6	Mục tiêu, mô tả ngắn gọn lại theo thứ tự từng mục tiêu. Mục tiêu tổng quát cần được diễn đạt theo hướng khái quát nội dung nghiên cứu.	NCS đã viết lại phần mục tiêu tổng quát như sau: ***Mục tiêu tổng quát*** Xác định khả năng sử dụng nano sắt (FeNPs), nano cobalt (CoNPs) và nano molypden (MoO_3NPs) thay thế các

		muối vi lượng tương ứng trong môi trường nuôi cấy mô thực vật; đồng thời làm rõ ảnh hưởng của chúng đến sinh trưởng, phát triển, đặc điểm sinh lý – sinh hóa và hiệu quả vi nhân giống của một số loài cây hoa, làm cơ sở khoa học cho việc ứng dụng công nghệ nano trong cải tiến môi trường nuôi cấy và nâng cao chất lượng cây giống *in vitro*. (Trang 2)
7	Mục tiêu cụ thể nên được trình bày ngắn gọn, rõ ràng và hạn chế diễn giải dài dòng.	NCS đã viết lại phần mục tiêu cụ thể như sau: • Xác định nồng độ thích hợp của nano sắt (FeNPs), nano cobalt (CoNPs) và nano molypden (MoO_3NPs) để thay thế các muối vi lượng tương ứng trong môi trường nuôi cấy đối với cây cúc, đồng tiền và tử linh lan *in vitro*. • Đánh giá ảnh hưởng của việc thay thế các muối vi lượng bằng nano kim loại đến quá trình phát sinh hình thái, sinh trưởng và phát triển của cây trong các giai đoạn nhân chồi, tạo cây hoàn chỉnh và thích nghi ngoài vườn ươm. • Đánh giá khả năng của nano kim loại trong việc hạn chế hoặc khắc phục một số hiện tượng bất thường thường gặp trong nuôi cấy mô thực vật như sinh trưởng kém, vàng lá, rụng lá, hóa nâu, tích lũy

		ethylene, lão hóa sớm và giảm chất lượng cây giống *in vitro*. • Xác định ảnh hưởng của nano kim loại đến khả năng hấp thu, vận chuyển và tích lũy các nguyên tố dinh dưỡng khoáng trong cây nuôi cấy *in vitro*. • Đánh giá tác động của nano kim loại đến một số đặc tính sinh lý – sinh hóa liên quan đến sinh trưởng và khả năng chống chịu stress của cây, bao gồm hoạt động của hệ enzyme chống oxy hóa, enzyme thủy phân, hàm lượng sắc tố quang hợp và sự hình thành ethylene. • Làm sáng tỏ cơ sở khoa học của việc sử dụng nano kim loại như nguồn cung cấp vi lượng thay thế các muối vô cơ truyền thống trong môi trường nuôi cấy mô thực vật, góp phần nâng cao hiệu quả vi nhân giống và chất lượng cây giống. (Trang 2, 3)
8	Đóng góp mới: nên trình bày dưới dạng các gạch đầu dòng rõ ràng, súc tích, đồng thời cần sử dụng ngôn ngữ thận trọng, tránh các khẳng định quá mức như "giải mã cơ chế" nếu chưa có các bằng chứng ở mức độ	NCS đã chỉnh sửa phần đóng góp mới của luận án như sau: Những đóng góp mới của luận án • Luận án đã cung cấp những bằng chứng khoa học mới về khả năng sử dụng nano sắt (FeNPs), nano

	cơ chế sâu.	cobalt (CoNPs) và nano molypden (MoO_3NPs) thay thế các muối vi lượng tương ứng trong môi trường nuôi cấy mô thực vật, mở ra hướng tiếp cận mới trong cải tiến thành phần dinh dưỡng của môi trường nuôi cấy. • Luận án đã làm sáng tỏ cơ sở sinh lý – sinh hóa của việc sử dụng nano kim loại trong nuôi cấy in vitro thông qua việc chứng minh vai trò của chúng đối với khả năng hấp thu dinh dưỡng khoáng, điều hòa hoạt động của hệ enzyme chống oxy hóa, enzyme thủy phân và giảm tích lũy ethylene, qua đó góp phần hạn chế các rối loạn sinh lý thường gặp trong điều kiện nuôi cấy mô. • Luận án đã xác định được các nồng độ thích hợp của FeNPs, CoNPs và MoO_3NPs cho quá trình vi nhân giống cây cúc, đồng tiền và tử linh lan; đồng thời chứng minh việc thay thế các muối vi lượng truyền thống bằng nano kim loại có thể nâng cao hiệu quả nhân giống, cải thiện chất lượng cây giống và tăng khả năng thích nghi của cây ở giai đoạn vườn ươm. (Trang 4)

9	Thiết kế thí nghiệm: nên bổ sung một câu làm rõ cơ sở lựa chọn vật liệu và điều kiện thí nghiệm, nguồn mẫu có sẵn (nồng độ, có sự kế thừa, nên trình bày nguồn gốc mẫu cấy.	NCS đã bổ sung: Các thí nghiệm được thiết kế trên cơ sở kế thừa các quy trình vi nhân giống đã được tối ưu cho cây cúc, đồng tiền và tử linh lan [119, 120, 130, 132]. Môi trường MS được sử dụng làm nền đối chứng và được giữ nguyên các thành phần dinh dưỡng, chất điều hòa sinh trưởng cũng như điều kiện nuôi cấy. Trong từng thí nghiệm, chỉ thay thế muối vi lượng nghiên cứu bằng nano kim loại tương ứng nhằm đánh giá riêng biệt ảnh hưởng của nano đến quá trình sinh trưởng, phát triển và các đáp ứng sinh lý – sinh hóa của cây nuôi cấy *in vitro*. Nguồn mẫu cấy là nguồn mẫu *in vitro* đã ổn định qua nhiều lần cấy chuyền, sẵn có tại phòng sinh học phân tử và chọn tạo giống cây trồng – Viện khoa học sự sống. (Trang 43)
10	Cần rà soát lại phần phương pháp nghiên cứu trình bày trong các hình 2.5-2.8 và thống nhất chung cách trình bày cho phù hợp	NCS đã chỉnh sửa tất cả cách hình thành "phương pháp" thay vì "quy trình" đồng thời bổ sung phần diễn dãi cho các phương pháp sử dụng Trang (46-52)
11	Kết quả nghiên cứu: thiếu thước đo, cho các hình	NCS đã bổ sung thước đo cho hình 3.12 (Trang 73)
12	Danh mục tài liệu còn trùng lặp.	NCS đã xóa các tài liệu tham khảo số 12,

	Danh mục tài liệu còn tồn tại tình trạng trùng lặp, cụ thể như các tài liệu số 6, 12 và 29; số 32 và 71; số 89 và 198.	29, 71 và 198 và kiểm tra lại trích dẫn tài liệu tham khảo chính xác

Nghiên cứu sinh chân thành cảm ơn Quí thầy, cô trong Hội đồng đánh giá luận án tiến sĩ cấp Học viện đã góp ý và tạo cơ hội cho NCS hoàn thiện luận án của mình.

Xin trân trọng cảm ơn./.

Hà Nội, ngày 18 tháng 6 năm 2026

TẬP THỂ HƯỚNG DẪN **NGHIÊN CỨU SINH**

GS.TS. Dương Tấn Nhựt **PGS.TS. Vũ Quốc Luận** **Phan Lê Hà Nguyễn**

XÁC NHẬN CỦA HỌC VIỆN KHCN **CHỦ TỊCH HỘI ĐỒNG** **THƯ KÝ**

KT. GIÁM ĐỐC
PHÓ GIÁM ĐỐC

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ

Nguyễn Thị Trung

PGS.TS. Nguyễn Du Sanh **TS. Nguyễn Bá Nam**