

ẢNH HƯỞNG CỦA NANO BẠC LÊN SỰ PHÁT SINH CHỒI VÀ RA RỄ CỦA CÂY DẠ YẾN THẢO (*PETUNIA HYBRIDA* L.) *IN VITRO*

EFFECTS OF SILVER NANOPARTICLES ON THE SHOOT MULTIPLICATION AND ROOT FORMATION OF *PETUNIA HYBRIDA* L. CULTURED *IN VITRO*

Lê Bảo Phúc^{1,2}, Võ Trang Anh Thu^{1,2}, Võ Thanh Phúc^{1,2*}

¹Trường Đại học Bách khoa Tp. Hồ Chí Minh

²Đại học Quốc gia Tp. Hồ Chí Minh

*Tác giả liên hệ: vothanphuc@hcmut.edu.vn

(Nhận bài: 06/8/2022; Chấp nhận đăng: 26/9/2022)

Tóm tắt - Dạ Yến Thảo (*Petunia hybrida* L.) là loài hoa rất được ưa chuộng vì màu sắc rực rỡ và đa dạng. Kỹ thuật vi nhân giống đã được áp dụng trên loài cây này nhằm tạo ra lượng lớn cây con đồng nhất trong thời gian ngắn. Trong nghiên cứu này, nano bạc được bổ sung trước và sau khi hấp khử trùng vào môi trường nuôi cấy, nhằm tăng hiệu quả nhân chồi và nâng cao chất lượng cây con Dạ Yến Thảo. Kết quả cho thấy, môi trường có BA 0,75 mg/L, bổ sung nano bạc 5 mg/L trước hấp khử trùng là phù hợp cho quá trình nhân chồi Dạ Yến Thảo (5,29 chồi/mẫu, chiều cao chồi trung bình là 1,81 cm). Môi trường có NAA 0,1 mg/L, bổ sung nano bạc 5 mg/L sau hấp khử trùng là phù hợp cho giai đoạn ra rễ của Dạ Yến Thảo (chiều cao cây 8,67 cm; 17,43 rễ/mẫu). Các cây trong nghiệm thức này có bộ rễ khoẻ mạnh, rễ nhiều, dài và có nhiều rễ thứ cấp.

Từ khóa - Nano bạc; Dạ Yến Thảo; vi nhân giống

1. Đặt vấn đề

Dạ Yến Thảo (*Petunia hybrida* L.) còn có tên gọi khác là Yến Thảo hoa hay Dã Yến Thảo, là loài cây thân thảo có nguồn gốc từ các nước miền Nam châu Mỹ. Loài cây này ra rất nhiều hoa, thời gian ra hoa quanh năm với nhiều màu sắc và kiểu dáng khác nhau [1]. Dạ Yến Thảo được trồng với mục đích chủ yếu là làm hoa cảnh trang trí, thường trồng trong các chậu hoa treo hoặc leo trên giàn. Nếu chăm sóc tốt, cây có thể ra hoa quanh năm [2]. Hiện nay, loài hoa này được trồng chủ yếu từ hạt hoặc phương pháp giâm cành. Tuy nhiên, các phương pháp nhân giống truyền thống này không đem lại hiệu quả cao như tỉ lệ hạt nảy mầm thấp (khoảng 60%), cây giâm cành có sức sống yếu hơn cây gieo bằng hạt và mau tàn hơn [1]. Nhiều nghiên cứu áp dụng phương pháp vi nhân giống đã được thực hiện trên loài hoa này. Các nghiên cứu tập trung chủ yếu tìm hiểu ảnh hưởng của các chất điều hòa sinh trưởng lên quá trình nhân chồi và ra rễ *in vitro* của cây [1, 3], xác định phương pháp khử trùng và nguồn vật liệu khởi đầu cho nhân giống *in vitro* cây hoa Dạ Yến Thảo [4],...

Benzyladenine (BA) và 1-naphthalene acetic acid (NAA) là những chất điều hòa sinh trưởng thực vật được sử dụng rộng rãi trong nuôi cấy mô thực vật. BA thuộc nhóm cytokinin, có tác dụng kích thích sự phân chia tế bào và điều khiển sự phát sinh hình thái. Bổ sung hợp chất này vào môi trường nuôi cấy sẽ phá vỡ trạng thái hưu miên của chồi ngọn và kích thích sự hoạt động của các chồi bên.

Abstract - *Petunia hybrida* L. is a very popular plant because of its colorful variety of flowers. Micropropagation techniques have been applied to this plant to create a large number of homogenous plantlets in a short time. In this study, silver nanoparticles were added to the medium before and after autoclave to increase shoot multiplication and improve the quality of *Petunia hybrida* L. plantlets. Results showed that the medium with BA 0.75 mg/L, supplemented with silver nanoparticles 5 mg/L before autoclave was suitable for shoot multiplication (5.29 shoots per sample; the average height of shoots was 1.81 cm). The medium with NAA 0.1 mg/L, supplemented with silver nanoparticles 5 mg/L after autoclave was suitable for the rooting stage of *Petunia hybrida* L. (the average height of plantlets was 8.67 cm with 17.43 roots per sample). Explants cultured on this medium had healthy, long, and many secondary roots.

Key words - Silver nanoparticles; *Petunia hybrida* L.; micropropagation

NAA là thuộc nhóm auxin, có tác dụng kích thích tạo rễ ở nồng độ thấp và giúp hình thành mô sẹo ở nồng độ cao [5].

Những năm gần đây, công nghệ nano phát triển như một lĩnh vực khoa học mới và những khám phá từ công nghệ này được áp dụng vào nhiều lĩnh vực như y học, môi trường và cả khoa học cây trồng [6]. Trong đó, nổi bật nhất là ứng dụng của nano bạc trong vi nhân giống thực vật. Nano bạc là những hạt nano có kích thước từ 1 – 100 nm. Với ưu điểm kích thước siêu nhỏ, nano bạc có diện tích bề mặt lớn giúp tăng khả năng tiếp xúc với không gian bên ngoài, sự bám dính lên bề mặt tế bào gia tăng dẫn đến hiệu quả tác động và hoạt tính của nano bạc cũng tăng [7]. Theo nhiều nghiên cứu, nano bạc không những có hiệu quả kháng lại các tác nhân vi sinh (vi khuẩn, nấm,...) cao mà còn được biết đến với những tác động tích cực lên sự sinh trưởng, phát triển và khắc phục được một số hiện tượng bất thường ở cây trồng nuôi cấy *in vitro* [8]. Những tác động của nano bạc lên thực vật có thể do kích thước của hạt nano. Nhiệt độ cao trong quá trình hấp khử trùng có thể thúc đẩy sự kết tụ của các hạt nano, từ đó tạo ra các hạt có kích thước lớn hơn [9].

Hiện nay, chưa có nghiên cứu về ảnh hưởng của nano bạc lên sự sinh trưởng của cây Dạ Yến Thảo. Mục đích của nghiên cứu này nhằm khảo sát và đánh giá tác động của nano bạc được bổ sung vào môi trường trước và sau khi hấp khử trùng đến khả năng tạo chồi và rễ của cây Dạ Yến Thảo *in vitro*.

¹ Ho Chi Minh City University of Technology (HCMUT) (Le Bao Phuc, Vo Trang Anh Thu, Vo Thanh Phuc)

² Vietnam National University Ho Chi Minh City (Le Bao Phuc, Vo Trang Anh Thu, Vo Thanh Phuc)

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu và điều kiện nuôi cấy

Nguồn mẫu thực vật được sử dụng trong các thí nghiệm là cây con Dạ Yến Thảo *in vitro* (*Petunia hybrida* L.) 3 tuần tuổi, được cung cấp bởi Viện Sinh học Nhiệt đới thành phố Hồ Chí Minh. Mẫu cây được sử dụng trong các thí nghiệm là các mẫu khỏe mạnh, không nhiễm, không úa vàng.

Dung dịch nano bạc (nồng độ 1 g/L) với các hạt có kích thước khoảng 20 - 30 nm do Trung tâm Nghiên cứu và Triển khai Công nghệ Bức xạ thành phố Hồ Chí Minh cung cấp.

Các khoáng chất trong môi trường MS được cung cấp bởi công ty Xilong (Trung Quốc). Các chất điều hòa sinh trưởng thực vật (BA, NAA,...) được cung cấp bởi công ty Himedia (Ấn Độ).

Các thí nghiệm được tiến hành ở điều kiện nhiệt độ 25 ± 2 °C, cường độ ánh sáng 2500 - 2600 lux, sử dụng ánh sáng trắng từ đèn LED nuôi cấy mô Rạng Đông, thời gian chiếu sáng 12 giờ/ ngày.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Khảo sát ảnh hưởng của nano bạc kết hợp với BA trong quá trình nhân chồi *in vitro* Dạ Yến Thảo

Cây con Dạ Yến Thảo *in vitro* (3 tuần tuổi) được cắt thành các đoạn thân mang chồi bên (1 cm), được cắt ngắn bớt phần lá. Môi trường nuôi cấy là môi trường Murashige Skoog (MS) [10] bổ sung sucrose 30 g/L; agar 6 g/L; BA 0,75 mg/L. Nano bạc với các nồng độ khác nhau (1, 5, 10, 20 mg/L) được bổ sung vào môi trường nuôi cấy trước và sau khi hấp khử trùng. Đối chứng là các mẫu nuôi cấy trên môi trường không bổ sung nano bạc.

2.2.2. Khảo sát ảnh hưởng của nano bạc lên quá trình nhân chồi *in vitro* Dạ Yến Thảo

Tiến hành tương tự Mục 2.2.1, trong đó môi trường nuôi cấy là môi trường MS bổ sung sucrose 30 g/L; agar 6 g/L. Nano bạc với các nồng độ khác nhau (1, 5, 10, 20 mg/L) được bổ sung vào môi trường nuôi cấy trước và sau khi hấp khử trùng. Đối chứng là các mẫu nuôi cấy trên môi trường không bổ sung nano bạc.

2.2.3. Khảo sát ảnh hưởng của nano bạc kết hợp với NAA đến sự ra rễ của Dạ Yến Thảo *in vitro*

Mẫu cây là chồi Dạ Yến Thảo *in vitro* cao 2 cm. Môi trường nuôi cấy là môi trường MS bổ sung sucrose 30 g/L; agar 6 g/L; NAA 0,1 mg/L. Nano bạc với các nồng độ khác nhau (1, 5, 10, 20 mg/L) được bổ sung vào môi trường nuôi cấy trước và sau khi hấp khử trùng. Đối chứng là các chồi nuôi cấy trên môi trường không bổ sung nano bạc.

2.3. Bố trí thí nghiệm và phân tích dữ liệu

Thí nghiệm được bố trí ngẫu nhiên. Mỗi nghiệm thức được tiến hành với 10 mẫu, lặp lại 3 lần. Các chỉ tiêu sinh trưởng như số chồi/mẫu cây, chiều cao chồi, số rễ và chiều dài rễ, hình thái mẫu được ghi nhận sau 3 tuần nuôi cấy. Chồi cao từ 1 cm trở lên được tính là 1 chồi.

Số liệu được xử lý thống kê bằng phần mềm SPSS phiên bản 2019. Sự sai khác giữa các giá trị trung bình được đánh giá bằng phương pháp phân tích phương sai một chiều (One way ANOVA) và Duncan's test.

2.4. Các chỉ tiêu theo dõi

Số lượng chồi/ mẫu cây: Đếm tất cả các chồi (≥ 1 cm) phát sinh từ mẫu.

Chiều cao chồi (cây): Tính từ gốc thân đến chồi ngọn bằng thước có chia vạch đến mm.

Số lượng rễ/ cây: Đếm tất cả các rễ trên mẫu.

Chiều dài rễ: Đo từ vị trí cổ rễ (chỗ nối liền rễ và thân) đến chóp rễ của các rễ chính bằng thước có chia vạch mm.

3. Kết quả nghiên cứu và khảo sát

3.1. Ảnh hưởng của nano bạc kết hợp với BA lên quá trình nhân chồi của Dạ Yến Thảo

Kết quả thí nghiệm sau 3 tuần nuôi cấy được trình bày tại Bảng 1. Ở cả hai trường hợp bổ sung nano bạc trước và sau khi hấp khử trùng, khi nồng độ nano bạc tăng từ 1 - 5 mg/L, các chỉ tiêu sinh trưởng có xu hướng tăng và đạt giá trị cao nhất tại nghiệm thức bổ sung nano bạc 5 mg/L. Nghiệm thức bổ sung nano bạc 5 mg/L trước khi hấp khử trùng cho kết quả tốt nhất thí nghiệm với 5,29 chồi/mẫu và chiều cao chồi 1,81 cm. Nồng độ nano bạc cao hơn 5 mg/L hạn chế sự sinh trưởng của chồi Dạ Yến Thảo ở cả hai trường hợp bổ sung trước và sau khi hấp khử trùng.

Bảng 1. Ảnh hưởng của nano bạc kết hợp với BA 0,75 mg/L lên quá trình nhân chồi *in vitro* sau 3 tuần nuôi cấy

Nano bạc (mg/L)		Chỉ tiêu		
		Số chồi/ mẫu	Chiều cao chồi (cm)	Hình thái mẫu
Đối chứng	0	2,14±0,56 ^{bc}	1,50±0,21 ^{ab}	++
	1	3,14±0,68 ^b	1,47±0,32 ^{abc}	++
Trước khi hấp khử trùng	5	5,29±1,11 ^a	1,81±0,51 ^a	+++
	10	1,14±0,21 ^{cd}	0,74±0,22 ^{cd}	++
	20	1,57±0,81 ^{cd}	0,94±0,22 ^{bcd}	++
Sau khi hấp khử trùng	1	1,43±0,27 ^{cd}	0,97±0,39 ^{bcd}	+
	5	1,86±0,90 ^{bc}	1,31±0,18 ^{abc}	++
	10	0,29±0,19 ^d	0,34±0,10 ^d	+
	20	1,29±0,11 ^{cd}	1,13±0,36 ^{abc}	+

Ghi chú: Các chữ cái a, b, c,...trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa với $P < 0,05$ trong phép thử Duncan.

+++ : Chồi phát triển, lá xanh đậm;

++ : Chồi không phát triển, lá xanh đậm;

+ : Chồi không phát triển, lá xanh nhạt

Nhìn chung, hiệu quả nhân chồi trong trường hợp bổ sung nano bạc sau khi hấp khử trùng môi trường kém hơn trường hợp bổ sung trước khi hấp.

Đối với trường hợp bổ sung nano bạc trước khi hấp khử trùng, mẫu cây ở các nghiệm thức đều phát triển các cụm chồi xanh tốt. Đặc biệt, các chồi ở nghiệm thức bổ sung nano bạc 5 mg/L cao hơn các nghiệm thức còn lại. Ngoài ra, ở đối chứng và nghiệm thức bổ sung nano bạc 1, 10 và 20 mg/L thu được nhiều chồi thấp hơn 1 cm (Hình 1). Tốc độ nhân chồi ở các nghiệm thức bổ sung nano bạc sau hấp khử trùng chậm hơn dẫn đến số chồi và chiều cao chồi thấp hơn so với trường hợp bổ sung trước hấp.

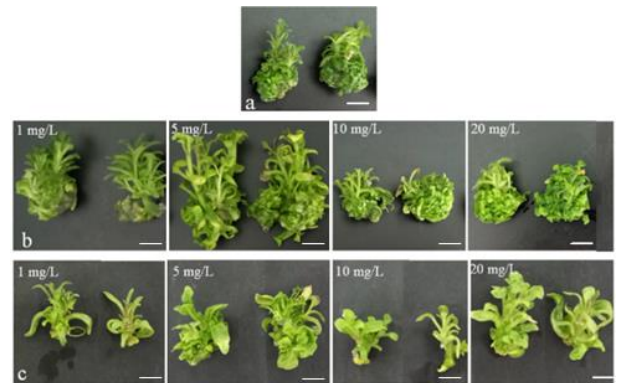
Khi được bổ sung vào môi trường vi nhân giống, nano bạc có thể hoạt động như là một chất ức chế hormone

ethylene. Hormone này tích lũy trong các bình nuôi cấy và ảnh hưởng đến sự tăng trưởng và phát triển của thực vật [9]. Các nghiên cứu trước đây cũng chứng minh được hiệu quả của nano bạc trong giai đoạn nhân chồi *in vitro*. Kết quả nghiên cứu trên cây Đồng tiền *Gerbera jamesonii* của Hà Thị Mỹ Ngân và các cộng sự [8] ghi nhận hiệu quả nhân chồi cao nhất ở nghiệm thức bổ sung nano bạc 2 mg/L vào môi trường MS kết hợp BA 0,7 mg/L, Kinetin 0,7 mg/L và Indole-3-Butyric Acid 0,5 mg/L. Khi tiếp tục tăng nồng độ nano bạc đến 5 và 7 mg/L thì các chỉ tiêu sinh trưởng giảm rõ rệt so với nghiệm thức bổ sung nano bạc 2 mg/L [8]. Đối với cây dâu tây *Fragaria ananassa*, Hoàng Thanh Tùng và các cộng sự [11] ghi nhận chỉ với nồng độ nhỏ nano bạc 0,2 mg/L bổ sung vào môi trường MS kết hợp với BA 0,5 mg/L đã cho kết quả nhân chồi tốt nhất (12,67 chồi và chiều cao chồi 3,93 cm). Nghiệm thức bổ sung nano bạc 0,4 và 0,6 mg/L cho hiệu quả nhân chồi thấp hơn so với nghiệm thức bổ sung nano bạc 0,2 mg/L [11].

Bổ sung nano bạc ở nồng độ phù hợp sẽ giúp cho cây sinh trưởng và phát triển tốt. Tuy nhiên, khi nano bạc được bổ sung ở nồng độ cao hơn, các hạt nano này có thể gây độc cho cây trồng. Ở nghiệm thức bổ sung nano bạc với nồng độ cao, các chỉ tiêu sinh trưởng giảm xuống do hàm lượng Gốc tự do chứa oxi (Reactive Oxygen Species - ROS) được sản sinh ra trong tế bào quá cao. ROS luôn được tạo ra như là một sản phẩm phụ của con đường trao đổi chất bình thường ở những bào quan như ty thể, lục lạp, peroxisome [12]. Tuy nhiên, khi tiếp xúc với nano bạc ở nồng độ cao, lượng ROS tạo ra quá nhiều dẫn đến dư thừa và gây ra quá trình oxy hóa các phân tử sinh học thực vật thông qua việc chuyển điện tử [13]. Điều này gây ra quá trình peroxy hoá lipid, làm hỏng tính thấm của màng, thay đổi cấu trúc các thành phần tế bào, tổn thương DNA dẫn đến gây chết tế bào và ức chế sinh trưởng ở thực vật [14]. Ngoài ra, sự hấp thụ của nano bạc vào mô thực vật có thể gây ức chế quá trình vận chuyển các chất trong tế bào bằng cách làm tắc nghẽn các lỗ màng hoặc các cầu liên bào có kích thước nhỏ, do đó ức chế dòng vận chuyển của nước và chất dinh dưỡng trong tế bào [15].

Ảnh hưởng của nano bạc đến thực vật có thể do kích thước của hạt nano. Nhiệt độ cao trong quá trình hấp khử trùng có thể thúc đẩy sự kết tụ của các hạt nano, do đó tạo ra các hạt có kích thước lớn hơn. Trong nghiên cứu của Timoteo và cộng sự, dung dịch nano bạc dưới tác động của nhiệt độ trong quá trình hấp khử trùng ghi nhận kích thước hạt tăng so với khi không xử lý nhiệt [9]. Hạt bạc càng lớn sẽ càng khó xâm nhập vào tế bào thực vật. Nguyên nhân có thể liên quan đến kích thước của các lỗ trên thành tế bào thực vật (5 – 20 nm) [16] nhỏ hơn so với kích thước của các hạt nano sau hấp. Kích thước tương đối lớn của các hạt này có thể ngăn cản chúng xâm nhập vào thành tế bào thực vật. Vì vậy, các hạt có kích thước lớn ít tác động mạnh đến sự sinh trưởng của thực vật hơn so với kích thước nhỏ [9]. Awad [17] đã khảo sát ảnh hưởng của việc bổ sung nano oxit kẽm trước và sau hấp khử trùng trong vi nhân giống cây *Phoenix dactylifera* L.; Kết quả cho thấy, việc bổ sung nano trước và sau hấp khử trùng đều làm tăng khả năng nhân chồi so với đối chứng. Như vậy, mặc dù sau khi hấp khử trùng, hạt nano gia tăng kích thước nhưng chúng vẫn

kích thích sự phát triển của thực vật [17]. Các hạt nano kích thước lớn (40 -50 nm) vẫn có thể xâm nhập vào mô thực vật và đi qua màng tế bào bằng con đường như các kênh trao đổi ion, protein màng, con đường liên bào,... Các hạt nano giải phóng ra các ion Ag^+ nhờ vào chênh lệch thế điện hóa trong dung dịch. Các ion này có thể xâm nhập vào tế bào qua các kênh trao đổi ion [18].



Hình 1. Các mẫu cây trên các trường MS bổ sung nano bạc kết hợp với BA 0,75 mg/L trong quá trình nhân chồi *in vitro* sau 3 tuần nuôi cấy. a: đối chứng; b: nano bạc bổ sung trước hấp khử trùng; c: nano bạc bổ sung sau hấp khử trùng (thanh kích thước 1 cm)

Khi bổ sung nano bạc sau khi hấp khử trùng, nano bạc không bị ảnh hưởng bởi nhiệt độ cao, chúng vẫn giữ được kích thước ban đầu, nhỏ hơn so với nano bạc bổ sung trước khi hấp khử trùng. Do đó, tác động của nano bạc bổ sung sau hấp đến sự sinh trưởng của thực vật cũng sẽ mạnh mẽ hơn. Đây có thể là nguyên nhân dẫn đến trong thí nghiệm này, chỉ cần nồng độ nhỏ nano bạc bổ sung sau hấp khử trùng đã có thể gây ra sự khác biệt trong quá trình sinh trưởng của thực vật. Nồng độ nano bạc 1 mg/L bổ sung sau hấp khử trùng đã làm giảm khả năng nhân chồi so với nghiệm thức đối chứng. Nồng độ này có thể đã hơi cao nên gây độc đối với mẫu cây. Trong khi đó, nano bạc được bổ sung trước hấp ở nồng độ cao hơn mới thấy rõ sự ảnh hưởng lên thực vật.

Tóm lại, trong thí nghiệm này, nghiệm thức bổ sung nano bạc 5 mg/L trước khi hấp khử trùng cho hiệu quả nhân chồi tốt nhất.

3.2. Ảnh hưởng của nano bạc lên quá trình nhân chồi của Dạ Yến Thảo

Sau 3 tuần nuôi cấy, kết quả thí nghiệm được trình bày tại Bảng 2.

Trong trường hợp bổ sung nano bạc trước khi hấp khử trùng, hiệu quả nhân chồi tốt nhất được ghi nhận tại nghiệm thức bổ sung nano bạc 5 mg/L với số chồi/mẫu là 4,67 chồi. Khi tiếp tục tăng nồng độ nano bạc cao hơn 5 mg/L, chỉ tiêu số chồi/mẫu có xu hướng giảm và đạt thấp nhất tại nghiệm thức bổ sung nano bạc 20 mg/L. Chiều cao chồi đạt cao nhất tại các nghiệm thức bổ sung nano bạc từ 5 – 20 mg/L. Về mặt hình thái, các cây ở các nghiệm thức bổ sung nano bạc trước khi hấp khử trùng đều phát triển tốt, thân cây cao, lá thon dài màu xanh đậm. Rễ ở các cây trong thí nghiệm này đều dài, màu trắng đục và có nhiều rễ thứ cấp. Tuy nhiên, cây ở nghiệm thức bổ sung nano bạc 20 mg/L có thân ốm hơn so với những nghiệm thức còn lại (Hình 2b).

Bảng 2. Ảnh hưởng của nano bạc lên quá trình nhân chồi *in vitro* sau 3 tuần nuôi cấy

Nano bạc (mg/L)		Chỉ tiêu		
		Số chồi/mẫu	Chiều cao chồi (cm)	Hình thái mẫu
Đối chứng	0	3,42±0,38 ^{bc}	4,23±0,62 ^{ab}	+++
	1	4,00±0,90 ^{abc}	4,08±0,64 ^{ab}	++
Trước khi hấp khử trùng	5	4,67±0,63 ^a	4,54±0,21 ^a	+++
	10	4,50±0,25 ^{ab}	4,75±0,61 ^a	+++
	20	3,17±0,98 ^c	5,17±0,86 ^a	++
Sau khi hấp khử trùng	1	3,50±0,55 ^{abc}	3,29±0,41 ^b	++
	5	1,17±0,98 ^d	1,08±0,20 ^c	+
	10	0,67±0,13 ^d	0,56±0,28 ^c	+
	20	0,50±0,15 ^d	0,50±0,25 ^c	+

Ghi chú: Các chữ cái a, b, c,... trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa với $P < 0,05$ trong phép thử Duncan.

+++ : Cây cao, to khỏe; lá xanh tốt; rễ nhiều và dài;

++ : Cây cao, to khỏe; lá xanh tốt; rễ ít và dài;

+ : Cây không phát triển; lá biến dạng; hầu như không có rễ;

Trong trường hợp bổ sung nano bạc sau khi hấp khử trùng môi trường, hiệu quả nhân chồi kém hơn so với đối chứng và trường hợp trước khi hấp. Kết quả cao nhất được ghi nhận tại nghiệm thức bổ sung nano bạc 1 mg/L với số chồi/mẫu là 3,50 và chiều cao chồi là 3,29 cm. Khi tiếp tục tăng nồng độ nano bạc, các chỉ tiêu sinh trưởng càng giảm mạnh. Hình thái cây có sự khác biệt giữa các nghiệm thức. Cây ở nghiệm thức bổ sung nano bạc 1 mg/L có chồi cao và xanh. Lá mỏng, thon dài và có màu xanh đậm. Cây xuất hiện rễ bất định và rễ cây dài. Khi tăng nồng độ nano bạc từ 5 – 20 mg/L, chất lượng cây giảm rõ rệt. Ở nghiệm thức bổ sung nano bạc 5 mg/L, chồi thấp và hầu như không hình thành rễ, lá có màu xanh nhạt ngả vàng và phiến lá dày. Ở các nghiệm thức bổ sung nano bạc 10 và 20 mg/L, chồi không phát triển và không xuất hiện rễ, lá biến dạng và khô cứng (Hình 2c).

Kết quả nhân chồi ở thí nghiệm 1 và thí nghiệm 2 có sự khác biệt. Ở thí nghiệm 1, mẫu cấy tạo được nhiều chồi hơn nhưng chồi có kích thước nhỏ. Nguyên nhân có thể do tác động của BA, chất điều hòa sinh trưởng thực vật thuộc nhóm cytokinin, có khả năng kích thích quá trình nhân chồi ở thực vật. Nghiên cứu của Miri trên đối tượng *Zingiber officinale* cho thấy BA làm tăng số chồi con tạo thành [19]. Iiyama và cộng sự cũng ghi nhận tác động tích cực của BA trong giai đoạn nhân chồi *in vitro* cây *Melaleuca alternifolia* [20].

Ở thí nghiệm 2 này, dù không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng thực vật, kết quả vẫn cho thấy nano bạc ở nồng độ phù hợp có ảnh hưởng tích cực lên quá trình nhân chồi cây Dạ Yến Thảo. Một số nghiên cứu đã báo cáo rằng nano bạc có thể ảnh hưởng đến nồng độ chất điều hòa sinh trưởng nội sinh của thực vật. Tuy nhiên, mức độ ảnh hưởng của nano bạc vẫn chưa được làm rõ, phụ thuộc vào loài thực vật chịu tác động và nồng độ nano bạc sử dụng. Vinković và cộng sự nhận thấy, sự tích tụ nano bạc trên đối tượng cây *Capsicum annuum* L. dẫn đến sự gia tăng đáng kể nồng độ cytokinin nội sinh trong lá [21].

Trong thí nghiệm này, hiệu quả nhân chồi tốt nhất thu

được tại nghiệm thức bổ sung nano bạc 5 mg/L trước khi hấp khử trùng. Từ các kết quả của thí nghiệm 1 và 2, môi trường bổ sung nano bạc 5 mg/L trước khi hấp khử trùng kết hợp với BA 0,75 mg/L là phù hợp cho quá trình nhân chồi của cây Dạ Yến Thảo.



Hình 2. Các mẫu cây trên các môi trường bổ sung nano bạc trong quá trình nhân chồi *in vitro* sau 3 tuần nuôi cấy.

a: đối chứng; b: nano bạc bổ sung trước hấp khử trùng;

c: nano bạc bổ sung sau hấp khử trùng (thanh kích thước 1 cm)

3.3. Ảnh hưởng của nano bạc kết hợp với NAA đến sự ra rễ của Dạ Yến Thảo

Sau 3 tuần nuôi cấy, kết quả ảnh hưởng của nano bạc đến sự ra rễ *in vitro* được trình bày ở Bảng 3. Rễ là mô đích đầu tiên tiếp xúc trực tiếp với các hạt nano bạc trong môi trường vì đây là bộ phận chịu trách nhiệm hấp thu liên tục các chất dinh dưỡng khoáng từ môi trường. Do đó, hiệu quả của xử lý bằng hạt nano bạc ở rễ nổi bật hơn so với ở chồi [22].

Đối với các nghiệm thức bổ sung nano bạc trước khi hấp khử trùng, các chỉ tiêu sinh trưởng có xu hướng tăng khi nồng độ nano bạc tăng đến 10 mg/L. Ở nghiệm thức bổ sung nano bạc với nồng độ cao hơn 10 mg/L, các chỉ tiêu sinh trưởng giảm xuống.

Đối với các nghiệm thức bổ sung nano bạc sau khi hấp khử trùng, các chỉ tiêu sinh trưởng có xu hướng tăng khi nồng độ nano bạc tăng đến 5 mg/L. Nghiệm thức bổ sung nano bạc 5 mg/L cũng là nghiệm thức cho kết quả tốt nhất ở thí nghiệm này với chiều cao cây và số rễ cao nhất (lần lượt là 8,67 cm và 17,43 rễ). Khi tăng nồng độ nano bạc hơn 5 mg/L, các chỉ tiêu sinh trưởng có xu hướng giảm xuống. So sánh hai nghiệm thức cho kết quả tốt nhất ở trường hợp trước và sau hấp khử trùng, chiều cao cây, số rễ và chiều dài rễ ở nghiệm thức bổ sung nano bạc 5 mg/L sau hấp vượt trội hơn nghiệm thức bổ sung nano bạc 10 mg/L trước hấp. Như đã đề cập ở thí nghiệm 3.1, vì có kích thước nhỏ hơn nên tác động của nano bạc bổ sung sau khi hấp khử trùng mạnh hơn nano bạc bổ sung trước khi hấp khử trùng. Vì vậy, bổ sung nano bạc ở nồng độ 10 mg/L trước khi hấp khử trùng chưa

kích thích cây sinh trưởng và ra rễ tốt như nghiệm thức bổ sung nano bạc 5 mg/L sau khi hấp.

Bảng 3. Ảnh hưởng của nano bạc kết hợp với NAA 0,1 mg/L lên quá trình ra rễ *in vitro* sau 3 tuần nuôi cấy

Nano bạc (mg/L)		Chỉ tiêu			
		Chiều cao cây (cm)	Số rễ	Chiều dài rễ (cm)	Hình thái mẫu
Đối chứng	0	5,93±1,13 ^{bc}	0,63±0,55 ^e	0,33±0,11 ^e	+
	1	4,99±1,00 ^c	5,43±1,51 ^{de}	1,36±0,23 ^{abc}	+
Trước khi hấp khử trùng	5	5,73±0,82 ^{bc}	0,86±0,69 ^e	0,84±0,60 ^{de}	+
	10	5,21±1,73 ^{bc}	17,00±1,23 ^{ab}	1,71±0,20 ^{abc}	++
	20	4,91±1,23 ^c	9,86±2,44 ^{cd}	1,55±0,44 ^{abc}	++
Sau khi hấp khử trùng	1	7,73±1,04 ^{ab}	4,43±2,23 ^e	1,13±0,13 ^{cd}	+
	5	8,67±1,75 ^a	17,43±2,52 ^a	2,06±0,43 ^{ab}	+++
	10	5,66±1,87 ^{bc}	12,00±5,77 ^{bc}	2,32±0,34 ^a	++
	20	5,94±2,12 ^{bc}	3,14±2,02 ^e	0,98±0,72 ^{de}	++

Ghi chú: Các chữ cái a, b, c... trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa với $P < 0,05$ trong phép thử Duncan.

+++ : Cây cao, thân to khỏe, lá xanh tốt, rễ nhiều và dài;

++ : Cây cao, thân to khỏe, lá xanh tốt, rễ nhiều và ngắn hoặc rễ ít và dài;

+ : Cây cao, thân to khỏe, lá xanh tốt, rễ ít và ngắn

Nhìn chung, cây ở tất cả các nghiệm thức đều có khả năng hình thành rễ. Thân cây to khỏe. Hình thái rễ tốt, to mập có màu trắng đục, nhiều lông hút. Đặc biệt, cây Dạ Yến Thảo sinh trưởng trên môi trường bổ sung nano bạc 5 mg/L sau khi hấp khử trùng có chiều cao phát triển vượt trội. Rễ cây ở nghiệm thức này dài và có nhiều rễ thứ cấp hơn so với các nghiệm thức còn lại (Hình 3c).



Hình 3. Các mẫu cây trên các môi trường bổ sung nano bạc kết hợp với NAA 0,1 mg/L trong quá trình ra rễ *in vitro* sau 3 tuần nuôi cấy. a: đối chứng; b: nano bạc bổ sung trước hấp khử trùng; c: nano bạc bổ sung sau hấp khử trùng (thanh kích thước 1 cm)

Một số nghiên cứu khác cũng cho thấy tác động tích

cực của nano bạc lên quá trình ra rễ các loại cây hoa. Nghiên cứu của Hà Thị Mỹ Ngân và cộng sự ghi nhận bổ sung nano bạc 5 mg/L vào môi trường ra rễ cây hoa Đồng tiền *in vitro* là tối ưu nhất cho giai đoạn tạo cây hoàn chỉnh với các chỉ tiêu về tỉ lệ chất khô gấp 2,2 lần, số rễ (15 rễ), SPAD – hàm lượng chlorophyll tổng (39,96) đều cao hơn so với đối chứng [8]. Bên cạnh đó, nhóm tác giả trên khi nghiên cứu trên đối tượng cây hoa hồng cũng cho thấy, việc bổ sung nano bạc 3 mg/L vào môi trường ra rễ *in vitro* giúp cây con tăng trưởng, phát triển tốt, hạn chế hiện tượng vàng và rụng lá với các chỉ tiêu sinh trưởng tốt hơn so với các nghiệm thức còn lại. Cây con ở nghiệm thức này cho tỷ lệ sống cao (93,33%) khi chuyển ra điều kiện vườn ươm [23].

Nano bạc gây ảnh hưởng lên quá trình ra rễ bằng cách tác động vào mô phân sinh đỉnh và gây ra stress oxy hóa làm tăng nồng độ ROS và ROS được biết là ảnh hưởng đến sự phát triển của rễ [24]. Ở một nồng độ phù hợp, ROS có thể thúc đẩy sự kéo dài của rễ. Nồng độ nano bạc thấp tạo ra ROS, đẩy nhanh quá trình tăng sinh tế bào ở chóp rễ và thúc đẩy sự phát triển của rễ. Nồng độ nano bạc cao tạo ra nhiều ROS hơn dẫn đến dư thừa, ức chế sự phân chia tế bào và hạn chế sự phát triển của rễ [25]. Đây cũng chính là cơ chế gây độc cơ bản do nano bạc gây ra đối với tế bào thực vật. Hà Thị Mỹ Ngân và cộng sự cũng nhận thấy, khi sử dụng nano bạc ở nồng độ cao (7 mg/L), tất cả các chỉ tiêu sinh trưởng đều giảm, sự hình thành rễ không được ghi nhận, chồi vàng úa, gốc hóa nâu và có dấu hiệu chết [23].

Kết quả nghiên cứu của An Yan và cộng sự [14] đã đưa ra nhận xét về ảnh hưởng của nano bạc lên sự sinh trưởng của thực vật. Sự tương tác giữa thực vật và nano bạc rất phức tạp, không chỉ phụ thuộc vào các đặc tính của nano bạc (hình dạng, nồng độ, kích thước, chất ổn định bề mặt) mà còn bị ảnh hưởng bởi các loài thực vật bị tác động, giai đoạn phát triển của cây, các loại mô khác nhau [14]. Từ kết quả số liệu và hình ảnh trên, môi trường bổ sung nano bạc 5 mg/L sau khi hấp khử trùng là phù hợp cho quá trình ra rễ *in vitro* của cây Dạ Yến Thảo.

4. Kết luận

Môi trường MS có BA 0,75 mg/L và bổ sung nano bạc 5 mg/L trước khi hấp khử trùng cho hiệu quả nhân chồi tốt nhất (5,29 chồi/mẫu; chồi cao 1,81cm). Mẫu có số lượng chồi mới nhiều, các chồi to khỏe, lá xanh tốt.

Môi trường MS có bổ sung nano bạc 5 mg/L trước khi hấp khử trùng cũng cho hiệu quả nhân chồi tốt (4,67 chồi/mẫu; chồi cao 4,54 cm). Mẫu cây phát triển tốt, thân cây cao, lá thon, dài, màu xanh đậm.

Môi trường MS có NAA 0,1 mg/L, bổ sung nano bạc 5 mg/L sau khi hấp khử trùng cho kết quả ra rễ tốt nhất (cây có chiều cao là 8,67 cm; 17,43 rễ; chiều dài rễ 2,06 cm). Cây to khỏe, lá xanh tốt, rễ khỏe và nhiều lông hút.

Kết quả nghiên cứu cho thấy việc bổ sung nano bạc ở nồng độ phù hợp kết hợp với chất điều hoà sinh trưởng thực vật có ảnh hưởng tích cực lên quá trình nhân chồi và ra rễ cây Dạ Yến Thảo *in vitro*.

Lời cảm ơn: Chúng tôi xin cảm ơn Trường Đại học Bách khoa, Đại học Quốc Gia tp. Hồ Chí Minh đã hỗ trợ cho nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Bùi Thị Cúc, Đồng Huy Giới, Bùi Thị Thu Hương, “Nhân nhanh *in vitro* cây Dạ Yến Thảo hoa hồng sọc tím (*Petunia hybrida* L.)”, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Lâm nghiệp*, 7, 2017, 3 – 10.
- [2] Phạm Hoàng Hộ, *Cây cỏ Việt Nam*, Nhà xuất bản Trẻ, 2000.
- [3] Natalija B., Aušra B., and Vaida J., “*In vitro* regeneration from leaf explants of *Petunia hybrida* L.”, *Propagation of Ornamental plants*, 15(2), 2015, 47 – 52.
- [4] Nguyễn Tiến Long, Lê Thị Thu Hằng, Trần Thị Triều Hà, Dương Thanh Thủy, Lê Như Cương, “Nghiên cứu tạo nguồn vật liệu khởi đầu trong nhân giống *in vitro* cây hoa Dạ Yến Thảo (*Petunia hybrida* L.)”, *Tạp chí Khoa học và Nông nghiệp Việt Nam*, 63(7), 2021, 53 – 56.
- [5] Nguyễn Đức Lương, Lê Thị Thủy Tiên, *Công nghệ tế bào*, Nhà xuất bản Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh, 2011.
- [6] Nair R., Varghese S.H., Nair B.G., Maekawa T., Yoshida Y., Kumar D.S., “Nanoparticulate material delivery to plants”, *Plant Science*, 179(3), 2010, 154 – 163.
- [7] Yin L., Cheng Y., Espinasse B., Colman B.P., Auffan M., Wiesner M., Rose J., Liu J., Bernhardt E.S., “More than the ions: the effects of silver nanoparticles on *Lolium multiflorum*”, *Environmental Science & Technology*, 45(6), 2011, 2360 – 2367.
- [8] Hà Thị Mỹ Ngân, Trần Đào Hồng Trinh, Đỗ Mạnh Cường, “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), 2019, 115 – 124.
- [9] Timoteo C.D.O., Paiva R., dos Reis M.V., “Silver nanoparticles in the micropropagation of *Campomanesia rufa* (O. Berg) Nied”, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 137(2), 2019, 359 - 368.
- [10] Murashige T., Skoog F., “A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures”. *Physiologia Plantarum*, 15 (3), 1962, 473 – 497.
- [11] Hoàng Thanh Tung, Trần Thị Thuong, Do Manh Cuong, “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, 2021, 393 – 403.
- [12] Ma C., White J.C., Dhankher O.P., Xing B., “Metal-based nanotoxicity and detoxification pathways in higher plants”, *Environ. Sci. Technol.*, 49(12), 2015, 7109 – 7122.
- [13] Carocho M., Ferreira I.C.F.R., “A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives”, *Food Chem. Toxicol.*, 51, 2013, 15 – 25.
- [14] An Y., Zhong C., “Impacts of Silver Nanoparticles on Plants: A Focus on the Phytotoxicity and Underlying Mechanism”, *International Journal of Molecular Sciences*, 20(5), 2019, 1003 – 1024.
- [15] Tripathi D.K., Tripathi A., Singh S., Singh Y., Vishwakarma K., Yadav G., Sharma S., Singh V.K., Mishra R.K., Upadhyay R.G., et al., “Uptake, accumulation and toxicity of silver nanoparticle in autotrophic plants, and heterotrophic microbes: A concentric review”, *Frontier. Microbiology*, 8(7), 2017, 1 – 16.
- [16] Carpita N.C., Gibeaut D.M., “Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth”, *The Plant Journal*, 3(1), 1993, 1 – 30.
- [17] Awad K.M., Al-Mayahi A.M., Mahdi M.A., Al-Asadi A.S., Abass M.H., “*In vitro* assessment of ZnO Nanoparticles on *Phoenix dactylifera* L. micropropagation”, *Scientific Journal of King Faisal University*, 21(1), 2020, 149 – 161.
- [18] Goswami P., Mathur J., “Positive and negative effects of nanoparticles on plants and their applications in agriculture”, *Plant Science Today*, 6 (2), 2019, 232-242.
- [19] Miri S. M., “Micropropagation, Callus Induction and Regeneration of *Ginger (Zingiber officinale* Rosc.)”, *Open Agriculture*, 5(1), 2019, 75 – 84.
- [20] Iiyama C M., & Cardoso J. C., “Micropropagation of *Melaleuca alternifolia* by shoot proliferation from apical segments”, *Trees*, 35(5), 2021, 1497 – 1509.
- [21] Vinković T., Novák O., Stnad M., Goessler W., Jurašin D. D., Paradiković N., & Vrček I. V., “Cytokinin response in pepper plants (*Capsicum annum* L.) exposed to silver nanoparticles”, *Environmental Research*, 156, 2017, 10 – 18.
- [22] Sharma P., Bhatt D., Zaidi M. G. H., Saradhi P. P., Khanna P. K., & Arora, S., “Silver Nanoparticle-Mediated Enhancement in Growth and Antioxidant Status of *Brassica juncea*”, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 167(8), 2012, 2225 – 2233.
- [23] Hà Thị Mỹ Ngân, Hoàng Thanh Tùng, Ngô Đại Nghiệp, “Tác động của nano bạc lên sự hạn chế khí ethylene và hoạt độ enzyme thủy phân trong vi nhân giống cây hoa hồng (*Rosa hybrida* L. ‘Baby Love’)”, *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 17(3), 2019, 505 – 517.
- [24] Dunand C., Crèvecoeur M., & Penel C., “Distribution of superoxide and hydrogen peroxide in *Arabidopsis* root and their influence on root development: possible interaction with peroxidases”, *New Phytologist*, 174(2), 2007, 332 – 341.
- [25] Wang L., Sun J., Lin L., Fu, Y., Alenius H., Lindsey K., & Chen C., “Silver nanoparticles regulate *Arabidopsis* root growth by concentration dependent modification of reactive oxygen species accumulation and cell division”, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 190, 2020, 110072.