

NANO BẠC TRONG KHỬ TRÙNG MÔI TRƯỜNG NUÔI CÂY *IN VITRO* CÂY HOA CÚC (*CHRYSANTHEMUM MORIFOLIUM* RAMAT CV. JIMBA)

Dương Tấn Nhựt^{1,✉}, Hoàng Thanh Tùng^{1,2}, Lương Thiện Nghĩa¹, Nguyễn Duy Anh¹, Nguyễn Phúc Huy¹, Nguyễn Bá Nam¹, Vũ Quốc Luận¹, Vũ Thị Hiền¹

¹Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế

✉ Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: duongtannhut@gmail.com

Ngày nhận bài: 20.10.2016
Ngày nhận đăng: 09.12.2016

TÓM TẮT

Phương pháp nhân giống *in vitro* được chứng minh là phương pháp hữu hiệu để nhân giống cây trồng với số lượng lớn trong thời gian ngắn và trở thành một công cụ hữu hiệu cho công tác chọn, tạo giống cây trồng. Tuy nhiên, phương pháp này vẫn còn những tồn tại mà nổi bật lên là vấn đề nhiễm vi sinh vật trong quá trình nuôi cấy, chúng làm giảm chất lượng, tăng khả năng mất nguồn giống. Khử trùng môi trường nuôi cấy là vấn đề bắt buộc đối với quá trình vi nhân giống, đây là giai đoạn tiêu tốn nhiều điện năng và trải qua nhiều công đoạn. Bên cạnh đó, việc hấp khử trùng môi trường trong một thời gian làm giảm hoạt tính của các chất điều hòa sinh trưởng thực vật cũng như thành phần dinh dưỡng của môi trường. Nghiên cứu này hướng đến việc ứng dụng nano bạc như một biện pháp thay thế cho phương pháp khử trùng môi trường truyền thống. Trong nghiên cứu này, chúng tôi bổ sung các nồng độ khác nhau của nano bạc (0 - 5 ppm), đường (0 - 30 g/l) và than hoạt tính (0 - 1g/l) vào môi trường nuôi cấy *in vitro* cây hoa cúc và không hấp khử trùng môi trường nhằm đánh giá khả năng diệt trùng môi trường cũng như cảm ứng sự sinh trưởng và phát triển của cây. Kết quả ghi nhận được cho thấy, bổ sung 4 ppm nano bạc, không bổ sung than hoạt tính và nồng độ đường từ 0 - 20 g/l vào môi trường nuôi cấy không cây mẫu cho hiệu quả khử trùng 100% sau 4 tuần. Cây cúc cho sự sinh trưởng và phát triển tốt trong môi trường bổ sung 4 ppm nano bạc, 20 g/l đường, 5 g/l agar và không hấp khử trùng.

Từ khóa: đường, khử trùng, nano bạc, than hoạt tính, vi nhân giống, vi sinh vật

MỞ ĐẦU

Hiện nay, nuôi cấy mô, tế bào và cơ quan thực vật đã được ứng dụng rất rộng rãi để nhân giống một số loài cây có giá trị kinh tế, khó nhân giống cũng như là công cụ để ứng dụng trong nghiên cứu cơ bản của công nghệ sinh học thực vật (Gamborg, 2002). Vi nhân giống được chứng minh là phương pháp có hiệu quả trong nhân nhanh số lượng cây giống trong thời gian ngắn, có thể sản xuất cây giống sạch bệnh và có thể sản xuất các hợp chất thứ cấp. Bên cạnh một số thuận lợi thì phương pháp này vẫn còn tồn tại một số hạn chế như khả năng nhiễm vi sinh vật trong nuôi cấy *in vitro* (nấm và vi khuẩn), chúng sinh trưởng và ức chế sự sinh trưởng của thực vật bởi việc sử dụng dung dịch dinh dưỡng có trong môi trường nuôi cấy (Cassells, 1991). Ngoài ra, để có môi

trường lí tưởng cho sự sinh trưởng và phát triển của cây thì yếu tố vô trùng môi trường rất quan trọng. Chúng ta cần phải khử trùng các bình chứa môi trường nuôi cấy (thủy tinh hay túi nylon...), nấu môi trường; sau đó khử trùng môi trường ở 121°C, áp suất 1 atm và khoảng thời gian từ 20 - 40 phút tùy theo thể tích môi trường (có thể từ 20 - 80 ml nếu là môi trường thí nghiệm ở các bình nuôi cấy có thể tích từ 100 - 500 ml). Việc chuẩn bị môi trường nuôi cấy phải trải qua nhiều công đoạn không những mất thời gian, nhân công lao động mà còn tốn chi phí điện năng cho việc hấp khử trùng môi trường.

Tác động kháng vi sinh vật của nano bạc đã được chú ý từ rất lâu và ngày nay các hạt nano bạc có kích thước rất nhỏ (< 20 nm) đã được ứng dụng trong lĩnh vực y sinh, y dược. Có một vài nghiên cứu tác động của nano bạc lên thực vật như khử trùng mẫu cấy

(Mahna *et al.*, 2013), tỷ lệ này mầm của một số loài thực vật (Rezvani *et al.*, 2012), sinh lý cũng như hình thái của thực vật (Syu *et al.*, 2014). Cho đến nay, chưa có bất kỳ công bố nào tập trung nghiên cứu tác động của nano bạc lên khả năng khử trùng môi trường nuôi cấy *in vitro*. Trong nghiên cứu này, chúng tôi bổ sung nano bạc vào môi trường nuôi cấy *in vitro* cây hoa cúc và không hấp khử trùng nhằm đánh giá khả năng diệt trùng môi trường cũng như cảm ứng sự sinh trưởng và phát triển của cây.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Thực vật

Nguồn mẫu được sử dụng trong thí nghiệm là các chồi *in vitro* (1,5 cm) của cây cúc trắng (*Chrysanthemum morifolium* Ramat cv. Jimba) 1 tháng tuổi hiện có tại phòng Sinh học phân tử và Chọn tạo giống cây trồng (Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên).

Dung dịch nano bạc

Các hạt nano bạc có kích thước trung bình ≤ 20 nm được thiết lập theo tỷ lệ: AgNO_3 : 750 - 1000 ppm, β -chitozan: 250 - 300 ppm, NaBH_4 : 200 ppm, tỷ lệ mol $\text{NaBH}_4/\text{AgNO}_3$: $\frac{1}{4}$ và với tốc độ nhỏ giọt của NaBH_4 là 10 - 12 giọt/phút (Chau *et al.*, 2008).

Môi trường nuôi cấy

Môi trường nuôi cấy được sử dụng trong các thí nghiệm là MS (Muraghige, Skoog, 1962) có hoặc không bổ sung đường, than hoạt tính và bổ sung nồng độ nano bạc khác nhau. Tất cả các môi trường nuôi cấy được điều chỉnh về pH = 5,8; đun sôi để hòa tan các chất khoáng với nhau.

Phương pháp nghiên cứu

Khả năng khử trùng môi trường nuôi cấy không cấy mẫu *in vitro*

Bổ sung nano bạc vào môi trường nuôi cấy

Môi trường nuôi cấy MS bổ sung nồng độ khác nhau của nano bạc (0, 1, 2, 3, 4 và 5 ppm) và không bổ sung đường cũng như than hoạt tính. Đun môi trường khoảng 4 phút cho đến lúc sôi trào lên; sau đó, rót 40 ml môi trường vào bình thủy tinh loại 250 ml và đậy nắp bình để thu nhận số liệu về tỷ lệ nhiễm của môi trường nuôi cấy sau 1, 2, 3 và 4 tuần.

Bổ sung đường và than hoạt tính

Môi trường nuôi cấy MS bổ sung nồng độ nano bạc tối ưu ở thí nghiệm trên kết hợp với các nồng độ khác nhau của đường (0, 10, 20 và 30 g/l) và than hoạt tính (0 và 1 g/l). Sau đó, môi trường được đun sôi và rót 40 ml môi trường vào bình thủy tinh loại 250 ml và đậy nắp bình. Môi trường sau khi đông thì có cấy mẫu và không cấy mẫu để thu nhận số liệu về tỷ lệ nhiễm của môi trường nuôi cấy sau 1, 2, 3 và 4 tuần.

Quan sát sự biểu hiện của nấm khuẩn trên môi trường nuôi cấy trên tổng số 30 bình nuôi cấy (3 lần lặp lại với 10 bình/nghiệm thức). Tỷ lệ nhiễm được tính dựa trên tỉ số giữa tổng của các bình nuôi cấy bị nhiễm nấm khuẩn và tổng của tất cả các bình nuôi cấy của nghiệm thức đó (30 bình).

Khả năng khử trùng môi trường nuôi cấy có cấy mẫu *in vitro*

Thí nghiệm được thiết lập như thí nghiệm bổ sung đường (S) và than hoạt tính (AC). Môi trường sau khi rót vào bình thủy tinh 250 ml (chứa 40 ml môi trường nuôi cấy MS), đậy nắp bình và để ngoài; sau đó, cấy các mẫu chồi cúc *in vitro* (1,5 cm) và tiến hành ghi nhận số liệu về tỷ lệ nhiễm của mẫu nuôi cấy sau thời gian theo dõi 1, 2, 3 và 4 tuần.

Khả năng tăng trưởng của cây cúc *in vitro* trên môi trường không khử trùng

Các mẫu cây sau khi cấy vào bình môi trường nuôi cấy 4 tuần được ghi nhận số liệu về các chỉ tiêu sinh trưởng và phát triển của cây trên môi trường bổ sung nano bạc, đường và than hoạt tính không hấp khử trùng.

Ảnh hưởng của nồng độ agar lên sự sinh trưởng của cây cúc *in vitro*

Môi trường nuôi cấy MS bổ sung nồng độ nano bạc và đường tối ưu ở thí nghiệm trên kết hợp với các nồng độ agar khác nhau (3, 4, 5, 6, 7 và 8 g/l). Môi trường sau khi rót vào bình thủy tinh 250 ml (chứa 40 ml môi trường), đậy nắp bình và để ngoài; sau đó, cấy các mẫu chồi cúc *in vitro* (1,5 cm) và tiến hành ghi nhận số liệu về các chỉ tiêu sinh trưởng và phát triển sau 4 tuần nuôi cấy.

Điều kiện nuôi cấy

In vitro: điều kiện phòng thí nghiệm với nhiệt độ $25 \pm 2^\circ\text{C}$, quang chu kỳ 16 h/ngày, cường độ chiếu sáng $40 - 45 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ của ánh sáng huỳnh quang và độ ẩm trung bình 55 - 60%.

Ex vitro: điều kiện vườn ươm với nhiệt độ 17 - 27°C, ánh sáng tự nhiên, che phủ 50% sáng trong tuần đầu và độ ẩm khoảng 70 - 80%.

Xử lý số liệu

Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần với 10 bình/nghiệm thức. Tất cả các số liệu sau khi thu thập ứng với từng chỉ tiêu theo dõi, được xử lý bằng Microsoft Excel 2010 và phần mềm phân tích thống kê SPSS 16.0 theo phương pháp Duncan test với $P < 0,05$ (Duncan, 1995).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Khử trùng môi trường nuôi cấy không cấy mẫu

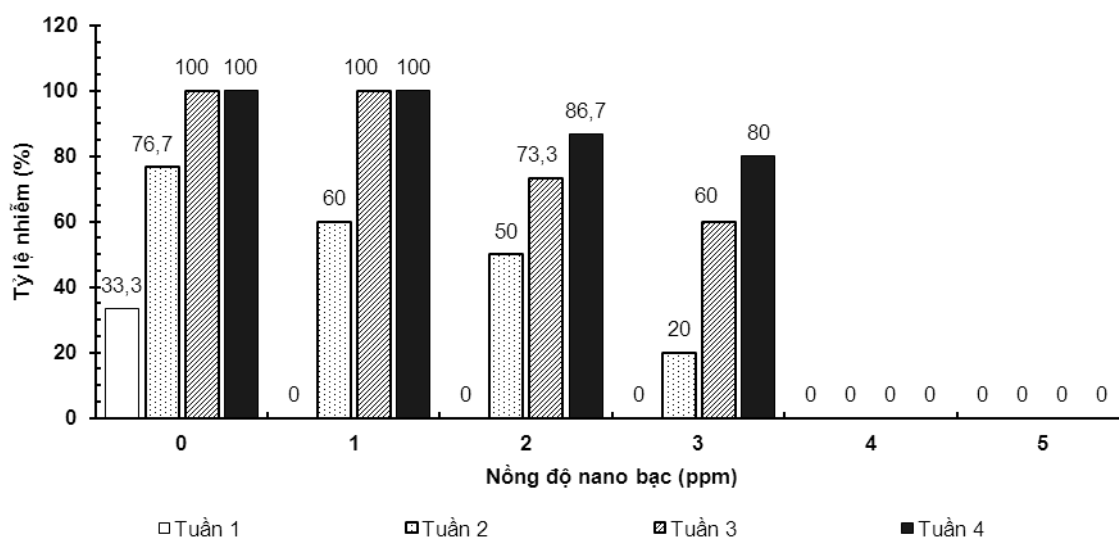
Bổ sung nano bạc vào môi trường nuôi cấy

Sau 1, 2, 3 và 4 tuần theo dõi, tỷ lệ nhiễm của môi trường nuôi cấy *in vitro* bổ sung các nồng độ

nano bạc khác nhau được ghi nhận ở hình 1.

Sau 1 tuần theo dõi, kết quả cho thấy môi trường nuôi cấy không bổ sung nano bạc cho tỷ lệ nhiễm của môi trường là 33,3%; trong khi đó, ở các nghiệm thức bổ sung nano bạc ở các nồng độ 1, 2, 3, 4 và 5 ppm không ghi nhận được tỷ lệ nhiễm của môi trường nuôi cấy *in vitro* (Hình 1).

Đến tuần theo dõi thứ 2, chỉ còn môi trường nuôi cấy bổ sung 4 và 5 ppm nano bạc là không ghi nhận được tỷ lệ nhiễm, các nghiệm thức còn lại đều cho tỷ lệ nhiễm khác nhau từ 20% đến 76,7%. Sau 3 và 4 tuần theo dõi, 2 nghiệm thức bổ sung 4 và 5 ppm nano bạc vẫn chưa ghi nhận được tỷ lệ nhiễm của môi trường (Hình 1), các nghiệm thức khác đều cho tỷ lệ nhiễm rất cao từ 60% - 100%. Từ những kết quả ghi nhận ở trên, chúng tôi nhận thấy việc bổ sung 4 ppm nano bạc vào môi trường nuôi cấy cho hiệu quả khử trùng môi trường.



Hình 1. Ảnh hưởng của nano bạc đến khả năng khử trùng môi trường nuôi cấy *in vitro* không đường.

Bổ sung đường và than hoạt tính vào môi trường nuôi cấy

Ảnh hưởng của nano bạc đến khả năng khử trùng môi trường nuôi cấy *in vitro* có bổ sung đường ở các nồng độ khác nhau được ghi nhận sau 1, 2, 3 và 4 tuần nuôi cấy thể hiện ở hình 3. Sau 1 và 2 tuần, kết quả ghi nhận cho thấy chưa quan sát được các bình nuôi cấy có tỷ lệ nhiễm ở các nồng độ đường và than hoạt tính khác. Sang tuần nuôi cấy thứ 3, việc bổ sung nồng độ đường 0, 10, 20 g/l và không bổ sung than hoạt tính không ghi nhận được tỷ lệ nhiễm của

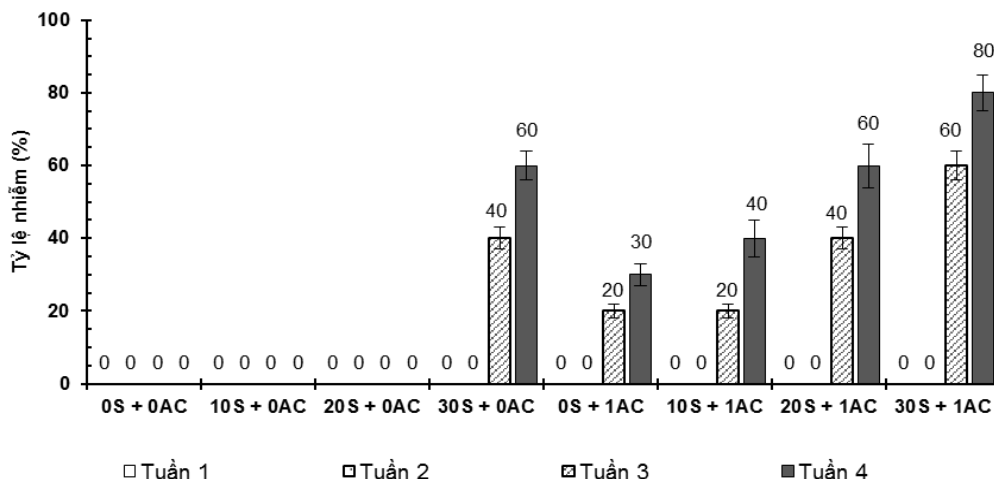
bình nuôi cấy. Tuy nhiên, khi tăng nồng độ đường lên tới 30 g/l thì kết quả ghi nhận được cho thấy tỷ lệ nhiễm của môi trường nuôi cấy là 40% (Hình 2).

Khi tăng nồng độ đường trong môi trường nuôi cấy thì các vi sinh vật có thêm nguồn carbon để sử dụng và tiếp tục sinh trưởng, có lẽ vì thế mà tỷ lệ nhiễm của môi trường ở nồng độ 30 g/l lại cao hơn so với các nồng độ đường từ 0 - 20 g/l. Đến tuần thứ 4, bổ sung nồng độ đường 0, 10, 20 mg/l và không bổ sung than hoạt tính không ghi nhận được tỷ lệ nhiễm, các tỷ lệ khác thì tỷ lệ nhiễm tương đương

với số liệu ghi nhận trong tuần thứ 3 (Hình 2).

Trong khi đó, môi trường nuôi cấy bổ sung 30 g/l đường cho tỷ lệ nhiễm tăng lên đến 60%. Khi môi

trường nuôi cấy bổ sung thêm than hoạt tính, tỷ lệ nhiễm của môi trường ghi nhận được cũng là khác nhau (Hình 2).

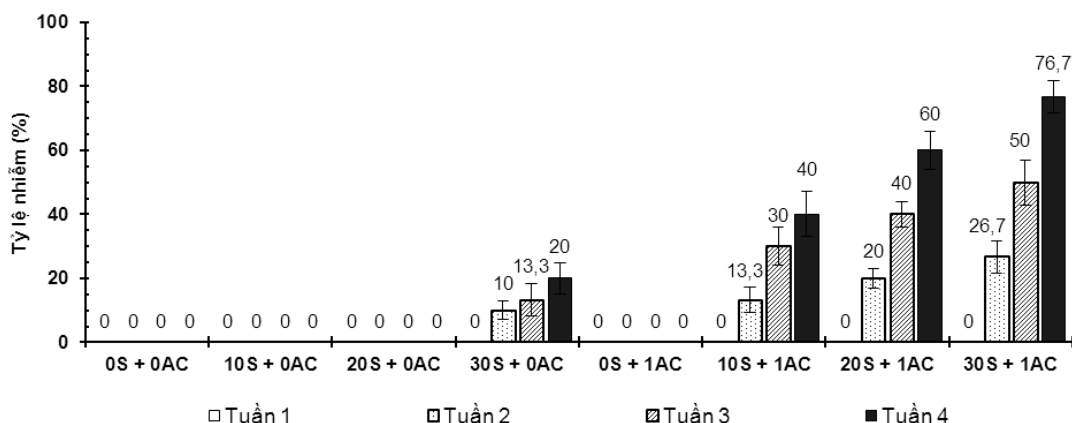


Hình 2. Khả năng khử trùng môi trường có bổ sung 4 ppm nano bạc và đường ở các nồng độ khác nhau không cấy mẫu.

Sau 1 và 2 tuần nuôi cấy, kết quả chưa ghi nhận được tỷ lệ nhiễm của môi trường. Đến tuần nuôi cấy thứ 3, tỷ lệ nhiễm của môi trường có sự khác nhau khi bổ sung các nồng độ đường khác nhau. Không bổ sung và bổ sung đường thì tỷ lệ nhiễm là 20%, tăng nồng độ đường lên 20 - 30 g/l thì tỷ lệ nhiễm tăng từ 40 - 60%. Sau 4 tuần nuôi cấy, tất cả môi trường bổ sung than hoạt tính (1 g/l) đều ghi nhận tỷ lệ nhiễm và tăng theo nồng độ của đường bổ sung vào môi trường nuôi cấy (30 - 80%) (Hình 2). Vì vậy, môi trường nuôi cấy bổ sung 4 ppm nano bạc, nồng độ đường từ 0 - 20 g/l và không bổ sung than hoạt tính cho khả năng khử trùng môi trường là tối ưu hơn so với các nghiệm thức còn lại.

Khả năng khử trùng môi trường nuôi cấy có cấy mẫu *in vitro*

Ở nghiệm thức cấy mẫu có bổ sung 4 ppm nano bạc và không bổ sung than hoạt tính, kết quả ghi nhận cho thấy các bình nuôi cấy bổ sung 0, 10 và 20 g/l đường không có tỷ lệ nhiễm sau 4 tuần nuôi cấy. Nồng độ đường tăng lên tới 30 g/l thì tỷ lệ nhiễm của mẫu ghi nhận được từ 10 - 20% sau 2 - 4 tuần nuôi cấy. Ở nghiệm thức bổ sung than hoạt tính, ngoại trừ nghiệm thức không bổ sung đường không ghi nhận tỷ lệ nhiễm, các nghiệm thức còn lại đều ghi nhận tỷ lệ nhiễm từ 13,3 - 76,7% sau 2 - 4 tuần nuôi cấy (Hình 3).



Hình 3. Khả năng khử trùng môi trường có bổ sung 4 ppm nano bạc và đường ở các nồng độ khác nhau có cấy mẫu.

Kết quả ghi nhận được khi cấy mẫu vào môi trường không khử trùng cũng cho thấy, bổ sung 4 ppm nano bạc, không bổ sung than hoạt tính và bổ sung 0 - 20 g/l đường cho hiệu quả khử trùng môi trường là tối ưu so với các nghiệm thức khác và tương tự với khả năng khử trùng môi trường khi không cấy mẫu cục *in vitro*.

Than hoạt tính trong môi trường nuôi cấy tham gia vào một số hoạt động kích thích tăng trưởng của cây như hấp thụ các chất độc (ethylene) hiện diện trong môi trường, thúc đẩy tăng trưởng, tạo môi trường tối cho cây phát triển, tuy nhiên than hoạt tính cũng hấp thụ các vitamin, các ion kim loại và chất điều hòa sinh trưởng thực vật (Thomas, 2008). Chính vì vậy, khi bổ sung 1 g/l than hoạt tính vào môi trường nuôi cấy nó đã hấp thụ nano bạc và làm giảm tác động của nano bạc lên tỷ lệ nhiễm; kết quả chúng ta ghi nhận được là tỷ lệ nhiễm tăng khi môi trường có than hoạt tính.

Khả năng tăng trưởng của cây cúc *in vitro* trên môi trường không khử trùng

Sự tăng trưởng của cây cúc *in vitro* nuôi cấy trên môi trường MS không hấp khử trùng bổ sung 4 ppm nano bạc và các nồng độ khác nhau của đường và than hoạt tính được ghi nhận sau 4 tuần nuôi cấy cho thấy có sự khác biệt về sự tăng trưởng giữa các nồng độ đường và than hoạt tính khác nhau (Bảng 1). Khi

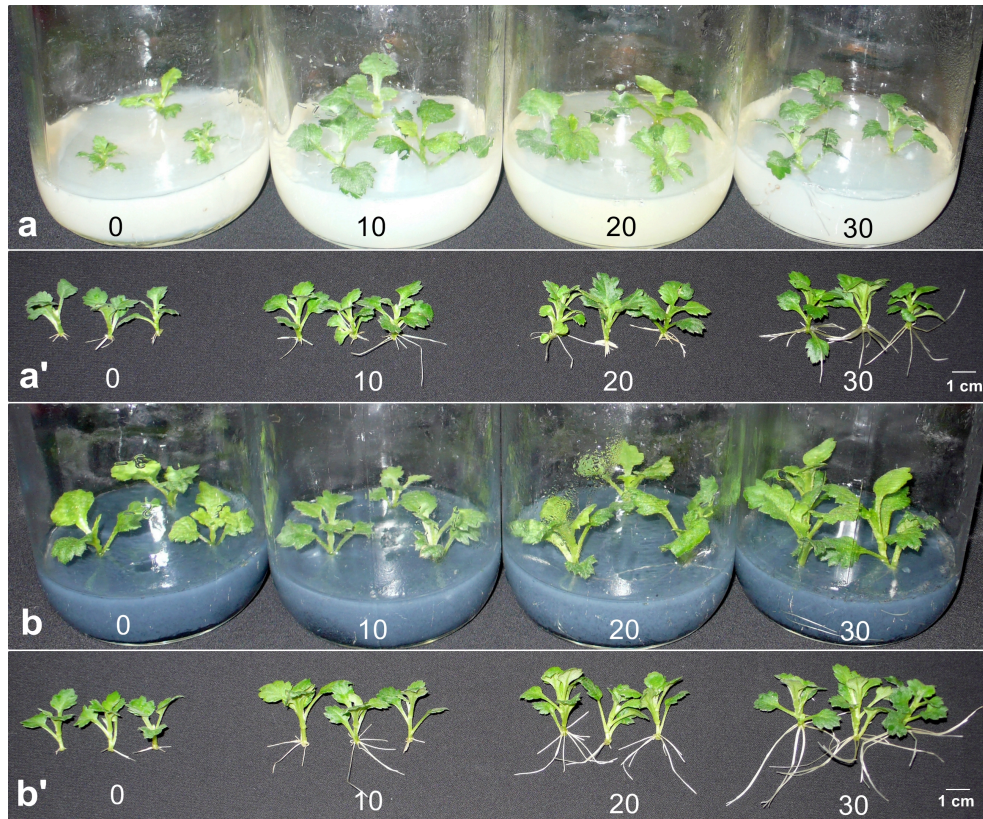
tăng nồng độ đường trong môi trường nuôi cấy không hấp khử trùng, sự tăng trưởng của cây cúc tăng tỷ lệ thuận với với sự gia tăng nồng độ đường (Hình 4). Kết quả cũng cho thấy có sự khác biệt về sự sinh trưởng giữa môi trường không bổ sung than hoạt tính và có bổ sung 1 g/l (Hình 4). Trên môi trường có bổ sung nano bạc, than hoạt tính và 30 g/l đường, sự sinh trưởng của cây cúc tối ưu hơn các nồng độ đường khác như chiều cao cây (4,63 cm), chiều dài rễ (1,52 cm) số rễ (9,66 rễ), chiều dài rễ (3,63 cm), khối lượng tươi (0,324 g), khối lượng khô (0,026 g) và chỉ số chlorophyll (đo bằng máy SPAD 502, Japan) (39,28) (Bảng 1).

Tuy nhiên, khi môi trường không hấp khử trùng có bổ sung đường và than hoạt tính thì tỷ lệ nhiễm của môi trường sau 4 tuần nuôi cấy là 40 - 75% (Hình 3). Tỷ lệ nhiễm này là rất cao, nó ảnh hưởng tới chất lượng cây sống cũng như số lượng cây giống sạch bệnh còn lại chỉ còn khoảng 20 - 40% khi chuyển ra vườn ươm. Đối với môi trường không hấp khử trùng có bổ sung nano bạc và 30 g/l đường, không bổ sung than hoạt tính thì sự sinh trưởng của cây cúc cũng tương đối tốt và tương đương với cây cúc nuôi cấy trên môi trường có bổ sung than hoạt tính nhưng tỷ lệ nhiễm của mẫu sau 4 tuần nuôi cấy là 20% cũng ảnh hưởng tới số lượng cây giống sạch bệnh (Hình 3).

Bảng 1. Khảo sát khả năng sinh trưởng của cây cúc trên môi trường MS có bổ sung nano bạc, đường và than hoạt tính.

Nồng độ đường (g/l)	Nồng độ AC (g/l)	Chiều cao cây (cm)	Số lá	Chiều rộng lá (cm)	Chiều dài lá (cm)	Số rễ	Chiều dài rễ (cm)	Khối lượng tươi cây (g)	Khối lượng khô cây (g)	SPAD
0	0	3,20 ^d	4,66 ^{bc}	0,84 ^d	1,02 ^c	0,33 ^e	0,06 ^d	0,174 ^b	0,008 ^{de}	26,33 ^e
10		3,43 ^{cd}	7,00 ^{ab}	0,96 ^{cd}	1,16 ^{bc}	7,00 ^{bc}	0,56 ^d	0,192 ^b	0,010 ^d	30,24 ^{cd}
20		3,76 ^{bc}	7,00 ^{ab}	1,13 ^{bc}	1,20 ^b	7,33 ^{abc}	2,63 ^b	0,280 ^b	0,016 ^{bc}	35,67 ^{bc}
30		4,38 ^{ab}	7,33 ^a	1,19 ^{bc}	1,22 ^b	8,33 ^{ab}	2,73 ^b	0,298 ^{ab}	0,018 ^{bc}	37,56 ^{ab}
0	1	3,66 ^{bcd}	3,66 ^c	1,26 ^{ab}	1,33 ^{ab}	2,33 ^d	0,33 ^d	0,207 ^b	0,009 ^{de}	27,21 ^{de}
10		3,96 ^{bc}	5,66 ^b	1,32 ^{ab}	1,37 ^{ab}	6,33 ^{bc}	1,60 ^c	0,217 ^b	0,012 ^d	32,58 ^c
20		4,20 ^{ab}	7,00 ^{ab}	1,40 ^a	1,43 ^{ab}	7,66 ^{ab}	2,90 ^{ab}	0,311 ^b	0,021 ^b	36,35 ^{abc}
30		4,63 ^a	7,33 ^a	1,46 ^a	1,52 ^a	9,66 ^a	3,63 ^a	0,324 ^a	0,026 ^a	39,28 ^a

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



Hình 4. Cây cúc nuôi cấy trên môi trường không hấp khử trùng có bổ sung 4 ppm nano bạc và nồng độ khác nhau của đường và than hoạt tính. **a, a'**: cây cúc nuôi cấy trên môi trường không bổ sung than hoạt tính; **b, b'**: cây cúc nuôi cấy trên môi trường bổ sung 1 g/l than hoạt tính.

Vì vậy, môi trường nuôi cấy bổ sung 4 ppm nano bạc, 20 g/l đường và không bổ sung than hoạt tính cho tỷ lệ nhiễm thấp (0%) và sự sinh trưởng của cây cũng khá tốt là môi trường phù hợp cho sự sinh trưởng của cây cúc cũng như khả năng diệt trùng môi trường mà không cần trải qua giai đoạn hấp khử trùng.

Trong nghiên cứu này, môi trường nuôi cấy bổ sung 4 ppm nano bạc cho thấy số rễ và chiều dài rễ tăng tỷ lệ thuận với sự gia tăng nồng độ đường (Bảng 1). Nghiên cứu trước đây của Dương Tấn Nhựt và đồng tác giả (2014) cũng chỉ ra rằng nano bạc có tác dụng tăng khả năng ra rễ cũng như kéo dài rễ.

Cúc là loài rất dễ ra rễ và cho sự sinh trưởng nhanh trong điều kiện *in vitro*, chính vì vậy sau 4 tuần nuôi cấy chúng ta có thể ghi nhận số liệu và chuyển cây ra vườn ươm để tiếp tục theo dõi. Đó là lý do giải thích vì sao trong nghiên cứu này chúng tôi chỉ theo dõi tỷ lệ nhiễm của môi trường nuôi cấy cũng như sự sinh trưởng và phát triển của cây sau 4 tuần nuôi cấy. Khi chuyển ra vườn ươm, sau khoảng

1 tuần thích nghi thì cây Cúc cho thấy sự sinh trưởng và phát triển tốt. Tỷ lệ sống sót của cây cúc được nuôi cấy trên môi trường bổ sung nano bạc và 20 g/l đường là 100% và sự sinh trưởng và phát triển tốt sau 2 tuần

Nano bạc đã được chứng minh có tính kháng khuẩn cao, ảnh hưởng tới sinh sản và hô hấp của thực vật (Abdi *et al.*, 2008; Lok *et al.*, 2007). Theo nghiên cứu của Mahna và đồng tác giả (2013), nano bạc có vai trò trong khử trùng mẫu cấy ban đầu như hạt giống hay chồi cây, kết quả cho thấy nano bạc có hiệu quả khử trùng lên tới 100% và có thể thay thế thủy ngân như là một chất khử trùng mẫu.

Trong nuôi cấy mô thực vật, nano bạc không chỉ có vai trò làm tăng cường khả năng sinh trưởng, phát triển (chiều dài chồi và rễ, diện tích lá), tăng cường các quá trình biến dưỡng trong cây (tổng hợp chlorophyll, tăng hàm lượng carbohydrate, protein và tổng hợp các enzyme oxy hóa) của cải *Brassica juncea*, đậu và ngô (Salama, 2012; Sharma *et al.*,

2012) mà còn tăng cường khả năng hình thành rễ, ức chế hình thành ethylene ở cây *Crocus sativus* (Rezvani *et al.*, 2012).

Trong nghiên cứu này, bổ sung than hoạt tính vào môi trường nuôi cấy có cây mẫu thì sự sinh trưởng và phát triển của cây là rất tốt (Bảng 1 và hình 5). Nhiều nghiên cứu cho thấy rằng bổ sung than hoạt tính giúp tăng khả năng phát sinh cơ quan (Park, Hahn, 2000), gia tăng sự phát triển rễ (Pan, Staden, 1998). Tuy nhiên, khi trong môi trường có bổ sung than hoạt tính thì tỷ lệ nhiễm của mẫu cây lại tăng lên (Hình 4). Kết quả nghiên cứu về mối tương quan giữa tỷ lệ nhiễm của mẫu cây và sự có mặt của than hoạt tính trong môi trường nuôi cấy hầu như chưa được đưa ra bởi các nghiên cứu trước đây.

Ảnh hưởng của nồng độ agar lên sự sinh trưởng của cây cúc *in vitro* trên môi trường không hấp khử trùng

Sau 4 tuần nuôi cấy, các chỉ tiêu về sinh trưởng và phát triển của cây Cúc được ghi nhận (Bảng 2).

Khi nồng độ agar trong môi trường giảm, chiều dài rễ tăng dần. Chiều dài rễ tốt nhất ở nghiệm thức bổ sung 3 g/l agar (4,03 cm), dài hơn nhiều so với đối chứng (2,57 cm) và ở nghiệm thức bổ sung 8 g/l agar chiều dài rễ chỉ đạt 2,13 cm (Bảng 2). Agar ở nồng độ thấp tương ứng với độ cứng của môi trường thấp, tạo điều kiện cho sự kéo dài rễ. Chiều rộng lá tăng khi giảm lượng agar trong môi trường và đạt cao nhất ở nồng độ 5 g/l agar (1,43 cm), sau đó giảm còn 1,13 cm ở nghiệm thức 3 g/l agar.

Do sở hữu tính chất liên kết với các phân tử nước (H_2O) và hấp thu các hợp chất từ môi trường; vì thế, agar có thể ảnh hưởng đến tính chất vật lý như hạn chế sự kéo dài rễ và rễ trở nên dày hơn nhờ sự trương phồng tỏa tròn của tế bào. Khả năng giữ nước và lượng nước được thể hiện trên bề mặt môi trường thay đổi tỷ lệ nghịch với nồng độ agar, điều này dẫn đến chu vi bề mặt rễ liên kết với các phân tử nước ở dạng lỏng giảm theo (Pierik, 1997). Cameron và đồng tác giả (1974) chỉ ra rằng cây con *Radiata pine* có rễ kéo dài trên môi trường agar, rễ khô héo và hóa đen khi chuyển ra đất.



Hình 5 Ảnh hưởng của nồng độ agar lên sự sinh trưởng và phát triển của cây cúc *in vitro* trên môi trường không hấp khử trùng. a, b: cây cúc sinh trưởng trên môi trường bổ sung nồng độ agar khác nhau (3, 4, 5, 6, 7, 8 g/l).

Bảng 2 Ảnh hưởng của nồng độ agar lên sự sinh trưởng và phát triển của cây Cúc *in vitro* trên môi trường không khử trùng sau 4 tuần nuôi cấy.

Nồng độ agar (g/l)	Chiều cao cây (cm)	Số lá	Chiều rộng lá (cm)	Số rễ	Chiều dài rễ (cm)	Khối lượng tươi cây (g)	Khối lượng khô cây (g)	SPAD
ĐC	3,33 ^a	8,67 ^a	1,20 ^c	12,33 ^a	2,57 ^c	0,585 ^a	0,020 ^a	36,53 ^a
3	2,87 ^{bc}	7,67 ^{abc}	1,13 ^c	7,67 ^c	4,03 ^a	0,275 ^{bc}	0,012 ^b	30,8 ^c
4	3,07 ^{ab}	6,67 ^{bc}	1,40 ^{ab}	9,67 ^{bc}	3,23 ^b	0,275 ^{bc}	0,015 ^b	33,63 ^{abc}
5	3,17 ^{ab}	6,33 ^c	1,43 ^a	10,33 ^{ab}	2,40 ^c	0,366 ^b	0,016 ^{ab}	36,07 ^a
6	2,63 ^{cd}	7,00 ^{bc}	1,27 ^{bc}	10,33 ^{ab}	2,36 ^c	0,261 ^c	0,012 ^b	32,7 ^{bc}
7	2,47 ^d	6,67 ^{bc}	1,23 ^c	8,33 ^{bc}	2,23 ^c	0,253 ^c	0,012 ^b	34,3 ^{ab}
8	3,00 ^{ab}	8,00 ^{ab}	1,13 ^c	9,67 ^{abc}	2,13 ^c	0,267 ^{bc}	0,013 ^b	33,77 ^{abc}

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

KẾT LUẬN

Nano bạc có hiệu quả trong việc khử trùng môi trường nuôi cấy *in vitro* không hấp khử trùng. Cây cúc cho sự tăng trưởng tốt khi nuôi cấy trên môi trường không hấp khử trùng bổ sung 4 ppm nano bạc, 20 g/l đường và 5 g/l agar.

Lời cảm ơn: Để hoàn thành nghiên cứu này, nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn sự tài trợ kinh phí của đề tài “Nghiên cứu tác động của hạt nano kim loại lên khả năng tái sinh, sinh trưởng, phát triển và tích lũy hoạt chất trong quá trình nhân giống vô tính một số cây trồng có giá trị kinh tế cao ở Việt Nam” thuộc Hợp phần IV: “Nghiên cứu cơ chế tác động và đánh giá an toàn sinh học của các chế phẩm nano được nghiên cứu trong dự án”, mã số: VAST.TĐ.NANO.04/15-18.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Abdi G, Salehi H, Khosh-khuri M (2008) Nano silver: Anovel nanomaterial for removal of bacterial contamination in *Valerian (V. officinalis)* tissue culture. *Acta Physiol Planta J* 30: 709-714.

Cameron RJ, Rook DA (1974) Rooting stem cuttings of radiata pine: environmental and physiological aspects. *New Zealand J Forest Sci*, 298.

Cassells AC (1991) Problems in tissue culture: Culture contamination. In Debergh PC, Zimmerman RH, eds. Micropropagation: technology and

application Springer.

Chau HN, Bang LA, Buu NQ, Dung TTN, Ha HT, Quang DV (2008) Some results in manufacturing of nanosilver and investigation of its application for disinfection. *Adv Nat Sci: J Nanosci Nanotechol* 9(2): 241-248.

Duncan DB (1995) Multiple range and multiple F test. *Biometrics* 11: 1-42.

Dương Tấn Nhựt, Hồ Thanh Tâm, Nguyễn Thị Thanh Hiền, Lê Kim Cương, Vũ Quốc Luận, Nguyễn Bá Nam, Nguyễn Phúc Huy, Vũ Thị Hiền, Trịnh Thị Hương, Nguyễn Hồng Hoàng, Nguyễn Xuân Tuấn, Nguyễn Thanh Sang, Nguyễn Việt Cường, Đỗ Mạnh Cường, Nguyễn Hoài Châu, Ngô Quốc Bưu (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): 103-111.

Gamborg OL (2002) Plant tissue culture: Biotechnology Milestones. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 38: 84-92.

Lok CN, Ho CM, Chen R, He QY, Yu WY, Sun H, Tam PKH, Chiu JF, Che CM (2007) Silver nanoparticles: Partial oxidation and activities. *Biol Inor Chem* 12: 527-534.

Mahna N, Vahed SZ, Khani S (2013) Plant *in vitro* culture goes nano: Nanosilver-Mediated decontamination of *ex vitro* Explants. *J Nanomed Nanotechol* 4: 2.

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Planta* 15(3): 473-497.

Pan MJ, Staden VJ (1998) The use of charcoal in *in vitro* culture: Review. *J Plant Grow Regul* 26: 155-163.

Park KY, Hahn EJ (2000) Cytokinin, auxin and activated charcoal affect organogenesis and anatomical characteristics of shoot tip culture of *Lisianthus* (*Eustoma grandiflorum* Raf Shinn). *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 36(2): 128-132.

Rezvani N, Sorooshzadeh A, Farhadi N (2012) Effect of nano-silver on growth of saffron in flooding stress. *World Acad Sci Eng Technol* 1: 517-522.

Salama, HMH (2012) Effects of silver nanoparticles in some crop plants, common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and corn (*Zea mays* L.). *Inter Res J Biotech* 3(10): 190-197.

Sharma P, Bhatt D, Zaidi MG, Saradhi PP, Khanna PK., Arora S (2012) Silver nanoparticle-mediated enhancement in growth and antioxidant status of *Brassica juncea*. *Appl Biochem Biotech* 167: 2225-2233.

Syu YY, Hung JH, Chen JC, Chuang HW (2014) Impacts of size and shape of silver nanoparticles on *Arabidopsis* plant growth and gene expression. *Plant Physiol Bioch* 83: 57-64.

Thomas TD (2008) The role of activated charcoal in plant tissue culture. *Biotechnol Adv* 26(6): 618-631.

STERILIZING MEDIUM USING SILVER NANOPARTICLES IN MICROPROPAGATION OF *CHRYSANTHEMUM MORIFOLIUM* RAMAT CV. JIMBA

Duong Tan Nhat¹, Hoang Thanh Tung^{1,2}, Luong Thien Nghia¹, Nguyen Duy Anh¹, Nguyen Phuc Huy¹, Nguyen Ba Nam¹, Vu Quoc Luan¹, Vu Thi Hien¹

¹Tay Nguyen Institute for Scientific Research, Vietnam Academy of Science and Technology

²Hue University of Sciences, Hue University

SUMMARY

Micropropagation proved to be an effective method for large-scale plant multiplication in a short period and became an effective tool for plant breeding. However, there have been some drawbacks when applying this method, including microbial contamination which reduces plant quality and leads to losing stocks. Sterilization of culture media is a compulsory stage in micropropagation, which consumes a lot of power and time. Besides, autoclaved media might reduce the activity of plant growth regulators as well as the nutritional components. This study aims to investigate effects of nano-silver as an alternative for traditional medium sterilization method. In this study, the different concentrations of silver nanoparticles (0 - 5 ppm), sucrose (0 - 30 g/l) and activated charcoal (0 - 1 g/l) were added in non-autoclave *in vitro* medium to evaluate effectiveness of medium sterilization and parameter of plant's growth and development. The results showed that the addition of 4 ppm silver nanoparticles and 0 - 20 g/l sucrose into free activated charcoal culture medium resulted in a high disinfection percentage of 100% after 4 weeks. *In vitro Chrysanthemum* plants grew and developed well on non-sterilizing medium containing 4 ppm silver nanoparticles, 20 g/l sucrose and 5 g/l agar.

Keywords: activated charcoal, microorganisms, micropropagation, silver nanoparticles, sterilizing, sucrose.