

ĐÁNH GIÁ HIỆU QUẢ THAY THẾ Fe-EDTA BẰNG NANO SẮT TRONG VI NHÂN GIỐNG CÂY SALEM (*LIMONIUM SINUATUM* (L.) MILL)

Đỗ Thị Hiền¹, Đỗ Mạnh Cường^{1,2}, Hoàng Thanh Tùng¹, Nguyễn Bá Nam¹, Vũ Quốc Luận¹, Dương Tấn Nhựt¹,✉

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 gửi bài: 06.3.2017

Ngày nhận đăng: 03.4.2017

TÓM TẮT

Hiện nay, vi nhân giống Salem vẫn còn gặp nhiều khó khăn như: lá cây *in vitro* và *ex vitro* dễ bị hoại tử do nấm, vi khuẩn và virus nội sinh; cây con phát triển chậm, tỉ lệ sống của cây con thấp ở giai đoạn vườn ươm. Nghiên cứu này bước đầu thử nghiệm vật liệu nano sắt hóa trị 0 (nZVI) thay thế cho Fe-EDTA trong môi trường nuôi cấy *in vitro* cây Salem, một loại cây hoa cắt cành có giá trị cao trên thế giới, nhằm đánh giá khả năng nhân nhanh chồi, sinh trưởng cây con *in vitro* và thuần hóa *ex vitro* của cây. Kết quả thu được cho thấy, khi gia tăng nồng độ nZVI (10-200 μ M) bổ sung vào môi trường cấy ươm phát sinh chồi với 0,4 mg/L BA, 0,2 mg/L NAA, hệ số nhân chồi tăng so với sử dụng Fe-EDTA sau 5 tuần nuôi cấy. Trong giai đoạn ra rễ, tốc độ tăng trưởng của cây con trên môi trường $\frac{1}{2}$ MS bổ sung nZVI với 0,4 mg/L NAA kém hơn các cây trên môi trường sử dụng Fe-EDTA. Tuy nhiên, sau 4 tuần nuôi trồng ngoài vườn ươm, các cây con *in vitro* trên môi trường bổ sung nZVI cho hiệu quả tăng trưởng và tỷ lệ sống cao vượt trội so với đối chứng sử dụng Fe-EDTA. Nano sắt với nồng độ 50 μ M bổ sung vào môi trường nuôi cấy cho hệ số nhân chồi *in vitro*, chiều cao cây con, trọng lượng tươi, chiều dài rễ, chỉ số chlorophyll và tỷ lệ sống sót ngoài điều kiện vườn ươm tốt nhất (8,33 chồi; 11,67 cm; 2,89 g; 5,67 cm; 24,3; 99,17%; tương ứng). Nghiên cứu này cho thấy rằng việc sử dụng nano sắt trong môi trường vi nhân giống cho hiệu quả nhân nhanh và chất lượng cây giống *ex vitro* tốt hơn so với sử dụng muối sắt Fe-EDTA.

Từ khóa: *Ex vitro*, Fe-EDTA, *in vitro*, nano sắt, Salem.

GIỚI THIỆU

Salem (*Limonium sinuatum* (L.) Mill) là một trong những loài hoa cắt cành có giá trị trang trí cao thuộc chi *Limonium*. Loài hoa này được trồng trên toàn thế giới nhờ sự phong phú về màu sắc, cành hoa được sử dụng cho cả cắm hoa tươi và hoa khô (Harazy *et al.*, 1985; McTaggart, Liberato, 2006). Vi nhân giống Salem là kỹ thuật đã được sử dụng rộng rãi, hiệu quả nhất để sản xuất lượng lớn cây giống đồng nhất, nâng cao năng suất cây trồng so với nhân giống truyền thống từ nhiều thập niên qua (Harazy *et al.*, 1985; Gabryszewska *et al.*, 1992). Tuy nhiên, vi nhân giống Salem vẫn còn gặp nhiều khó khăn như: lá cây *in vitro* và *ex vitro* dễ bị hoại tử do nấm, vi khuẩn và virus nội sinh dẫn đến yêu cầu kỹ thuật cao trong giai đoạn tái sinh; cây con chậm phát triển, khó thuần dưỡng khiến tỉ lệ sống của cây con trong giai đoạn vườn ươm thấp (Gabryszewska *et al.*, 2000; McTaggart, Liberato, 2006; Tstu-Hwie *et al.*, 2005).

Vì vậy, cải thiện môi trường, kỹ thuật nuôi cấy nhằm tối ưu hóa sinh học cho cây, nâng cao năng suất, chất lượng cây giống, đồng thời làm giảm chi phí sản xuất cây nuôi cấy mô luôn là những giải pháp được quan tâm nhiều trong vi nhân giống.

Trong môi trường nuôi cấy *in vitro*, sắt (Fe^{2+}) là một khoáng vi lượng cần thiết cho sự tăng trưởng mô, tế bào thực vật; hoạt động như một cofactor của các enzyme và tham gia vào các quá trình quan trọng như quang hợp, sao chép DNA và hô hấp (Eskandari, 2011). Để đáp ứng được nhu cầu sử dụng Fe^{2+} của thực vật, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ thường được dùng kết hợp với EDTA (Etylendiamin Tetra Acetate) tạo phức hợp Fe-EDTA, nhằm ổn định các ion sắt, tăng cường khả năng hòa tan, hấp thu và bảo vệ chúng khỏi quá trình oxy hóa. Đây là dạng chelate không bị kết tủa và được giải phóng dần tùy theo nhu cầu của thực vật. Tuy nhiên, Fe-EDTA thường ổn định ở mức pH dưới 6,0; nếu pH trên 6,5 thì khoảng 50% sắt không hiệu quả

(Slater *et al.*, 2008). Thêm vào đó giá thành của EDTA tương đối cao dẫn đến chi phí sản xuất cây giống cũng gia tăng. Vì vậy, việc sử dụng các dạng sắt có tính tan cao và cách thức bổ sung mới cho cây trồng có thể là một trong những giải pháp tốt cho vấn đề này.

Ứng dụng của các hạt nano sắt oxit và nano sắt hóa trị 0 đã cho thấy một số hiệu quả tác động tích cực lên các giai đoạn sinh trưởng khác nhau của một số loài thực vật như lúa mì (Mitra *et al.*, 2015), húng quế (Peyvandi *et al.*, 2011), cúc vạn thọ (Amuamuha *et al.*, 2012) trên quy mô đồng ruộng. Bên cạnh những tác động tiêu cực lên thực vật như giảm tỷ lệ nảy mầm, khả năng hấp thu các chất dinh dưỡng lên chồi, giảm hàm lượng chlorophyll khi sử dụng ở nồng độ cao (Wang *et al.*, 2016, Martínez-Fernandez *et al.*, 2017, Ma *et al.*, 2013a,b), các nhà khoa học đã chứng minh được ở nồng độ thấp, nano sắt cho thấy khả năng thúc đẩy phát sinh hình thái, tăng trưởng và kéo dài rễ, tăng khả năng chống chịu với các stress sinh học và phi sinh học của thực vật với ưu điểm kích thước nhỏ, diện tích bề mặt lớn làm tăng khả năng tiếp xúc, bám dính, hấp thu và vận chuyển sắt trong cây (Kim *et al.*, 2014; Zuverza-Mena *et al.*, 2016; Schopfer *et al.*, 2001). Tuy nhiên, các nghiên cứu này chỉ mới ứng dụng nano sắt trực tiếp lên cây trồng ngoài đồng ruộng. Việc sử dụng nano sắt trong nhân giống *in vitro* để nghiên cứu ảnh hưởng của các hạt nano sắt lên cây trồng vẫn chưa được quan tâm nghiên cứu và thử nghiệm nhiều. Chính vì thế, trong nghiên cứu này, nano sắt được bổ sung trực tiếp vào môi trường nuôi cấy *in vitro* nhằm đánh giá hiệu quả thay thế Fe-EDTA trong nhân chồi, ra rễ và tạo cây giống Salem hoàn chỉnh.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Nguồn mẫu là các chồi *in vitro* của cây Salem trắng (*Limonium sinuatum* (L.) Mill) khỏe mạnh 1 tháng tuổi, có sẵn tại phòng Sinh học phân tử và Chọn tạo giống cây trồng thuộc Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên.

Nguyên liệu sắt khảo sát là dung dịch nano sắt hóa trị 0 (nZVI-nano zerovalent iron) do Viện Công nghệ Môi trường cung cấp với các hạt nano sắt kích thước trung bình 20-60 nm.

Môi trường và điều kiện nuôi cấy

Môi trường nuôi cấy *in vitro* là môi trường MS

cơ bản (Muraghige, Skoog, 1962) có hoặc không có Fe-EDTA, bổ sung nano sắt với các nồng độ khác nhau và các chất điều hòa sinh trưởng tùy thuộc từng mục đích thí nghiệm. Tất cả các môi trường nuôi cấy đều bổ sung 7,5 g/l agar, 30 g/l đường và được điều chỉnh về pH = 5,8; sau đó toàn bộ môi trường được hấp khử trùng trong Autoclave ở nhiệt độ 121°C, áp suất 1 atm trong thời gian 30 phút. Mẫu sau khi được bố trí, nuôi cấy tại phòng nuôi với nhiệt độ $25 \pm 2^\circ\text{C}$, độ ẩm 55-60%, sử dụng ánh sáng đèn huỳnh quang với cường độ $40\text{-}45 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, thời gian chiếu sáng 16h/ngày.

Nhân chồi *in vitro*

Chồi Salem đơn cao 1,5 cm tách từ cụm chồi *in vitro* với 1 cặp lá được cấy lên môi trường MS đã loại bỏ Fe-EDTA, bổ sung 0,4 mg/L BA, 0,2 mg/L NAA (Feng, 2002) và nZVI với các nồng độ khác nhau (0; 10; 25; 50; 75; 100; 150; 200 μM) nhằm khảo sát khả năng nhân nhanh chồi *in vitro*. Mỗi nghiệm thức bố trí khảo sát 10 bình với 3 chồi/bình. Môi trường đối chứng là môi trường MS có Fe-EDTA và không bổ sung nano sắt.

Ra rễ *in vitro*

Các chồi đơn Salem *in vitro* cao 3 cm với 2 cặp lá được nuôi cấy trên môi trường $\frac{1}{2}$ MS không có Fe-EDTA, bổ sung 0,4 mg/L NAA (Feng, 2002) và nZVI với các nồng độ khác nhau (0; 10; 25; 50; 75; 100; 150; 200 μM) nhằm đánh giá khả năng phát sinh rễ, sinh trưởng và phát triển cây con hoàn chỉnh. Mỗi nghiệm thức bố trí khảo sát 10 bình với 3 chồi/bình. Môi trường đối chứng là môi trường MS có Fe-EDTA và không bổ sung nano sắt.

Thuần hóa ngoài điều kiện vườn ươm

Cây con hoàn chỉnh sinh trưởng, phát triển tốt sau 2 tuần nuôi cấy *in vitro* được huấn luyện thích nghi với điều kiện tự nhiên. Sau đó, cây con được trồng trên giá thể đất perlite trong vườn ươm 4 tuần với điều kiện nhiệt độ 18-25°C, độ ẩm 65-70%, ánh sáng tự nhiên, che phủ bằng lưới đen 50%, pH đất khoảng 6,5 và tưới phun sương mỗi ngày 1 lần, tránh nước đọng nhiều làm cây con bị thối ngọn và rễ. Mỗi nghiệm thức bố trí 40 cây. Đối chứng là các cây con Salem có nguồn gốc từ nuôi cấy *in vitro* được nuôi cấy trên môi trường có Fe-EDTA và không bổ sung nano. Tốc độ tăng trưởng và tỷ lệ sống sót được theo dõi nhằm đánh giá chất lượng của cây giống *in vitro*.

Chỉ tiêu theo dõi

Đối với thí nghiệm *in vitro*, các chỉ tiêu về sinh

trưởng, phát triển của chồi và cây con: Số chồi (chồi/mẫu), chiều cao chồi (cm), chiều cao cây (cm), chiều dài rễ (cm), số rễ/cây, số lá/cây, chiều rộng lá (cm), trọng lượng tươi (mg), trọng lượng khô (mg) và hàm lượng chlorophyll *a*, *b* của cây Salem được ghi nhận sau 5 tuần nhân chồi và 2 tuần nuôi cấy ra rễ.

Hàm lượng chlorophyll *a* và *b* được đánh giá bằng phương pháp phân tích quang phổ hấp thụ của dịch chiết lá trong dung dịch acetone bằng máy đo quang phổ UV-2900 (Hitachi, Nhật Bản). Độ hấp thụ (OD) được đo ở bước sóng 662 và 645 nm.

Đối với thí nghiệm vườn ươm, các chỉ tiêu về tỷ lệ sống sót (%), chiều cao cây (cm), chiều dài rễ (cm), chiều rộng lá (cm), số lá/cây, SPAD (chỉ số chlorophyll) của cây con được ghi nhận sau 1 tháng nuôi trồng trong điều kiện vườn ươm. Hàm lượng chlorophyll trong lá được đo bằng máy SPAD-502 (Minolta Co., Ltd., Osaka, Nhật Bản) chuyên dụng cho phân tích chỉ số chlorophyll cây trồng ngoài đồng ruộng.

Xử lý số liệu

Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Tất cả các số liệu sau khi thu thập ứng với từng chỉ tiêu theo dõi được xử lý bằng phần mềm MicroSoft Excel 2010 và phần mềm phân tích thống kê SPSS 16.0 theo phương pháp Duncan's test với $\alpha = 0,05$ (Duncan, 1995).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Ảnh hưởng của nano sắt lên khả năng nhân nhanh chồi cây Salem nuôi cấy *in vitro*

Giai đoạn nhân nhanh là giai đoạn quan trọng trong quá trình vi nhân giống cây trồng, quyết định hiệu quả nhân giống *in vitro*. Sau 5 tuần nuôi cấy, các chỉ tiêu đánh giá ảnh hưởng của nano sắt lên khả năng nhân nhanh chồi Salem nuôi cấy *in vitro* được ghi nhận và trình bày ở bảng 1. Nhìn chung, quá trình tăng sinh chồi có sự khác biệt ở các nghiệm thức tùy thuộc vào loại nguyên liệu sắt và nồng độ nano sắt. Số lượng chồi gia tăng khi tăng nồng độ nano sắt bổ sung vào môi trường nuôi cấy.

Bảng 1. Ảnh hưởng của nano sắt lên khả năng nhân nhanh chồi cây Salem *in vitro*.

Nồng độ nano sắt (μM)	Số chồi (chồi/mẫu)	Chiều cao chồi (cm)	Trọng lượng tươi (g)/cụm chồi	Trọng lượng khô (mg)/cụm chồi	Hình thái chồi
0*	5,00 ^{c**}	6,20 ^a	1,61 ^{ab}	76,00 ^{bc}	Chồi ít, cao. Lá ít, nhỏ, dài và có màu xanh
0	4,00 ^c	2,93 ^e	0,85 ^b	48,33 ^c	Chồi ít, thấp. Lá ít, nhỏ, ngắn, lá non có màu hồng
10	5,67 ^{bc}	750 ^{cd}	1,41 ^{ab}	89,00 ^{ab}	Chồi thấp. Lá nhỏ, lá non có màu hồng
25	6,33 ^{abc}	3,63 ^{de}	1,53 ^{ab}	93,33 ^{ab}	Chồi cao. Lá nhỏ, lá non có màu hồng
50	8,33 ^{ab}	5,43 ^b	2,34 ^a	137,00 ^a	Chồi nhiều, cao to. Lá to, non có màu hồng
75	7,00 ^{abc}	4,40 ^c	2,26 ^a	129,00 ^a	Chồi cao. Lá nhỏ, lá non có màu hồng
100	6,00 ^{abc}	3,60 ^{de}	1,82 ^a	99,00 ^{ab}	Chồi thấp. Lá nhỏ, lá non có màu hồng
150	6,67 ^{abc}	3,57 ^{de}	2,00 ^a	101,00 ^{ab}	Chồi thấp. Lá nhiều, nhỏ, lá non có màu hồng
200	9,00 ^a	3,53 ^{de}	2,22 ^a	97,33 ^{ab}	Chồi nhiều, thấp và nhỏ. Lá nhiều, nhỏ, lá non có màu hồng

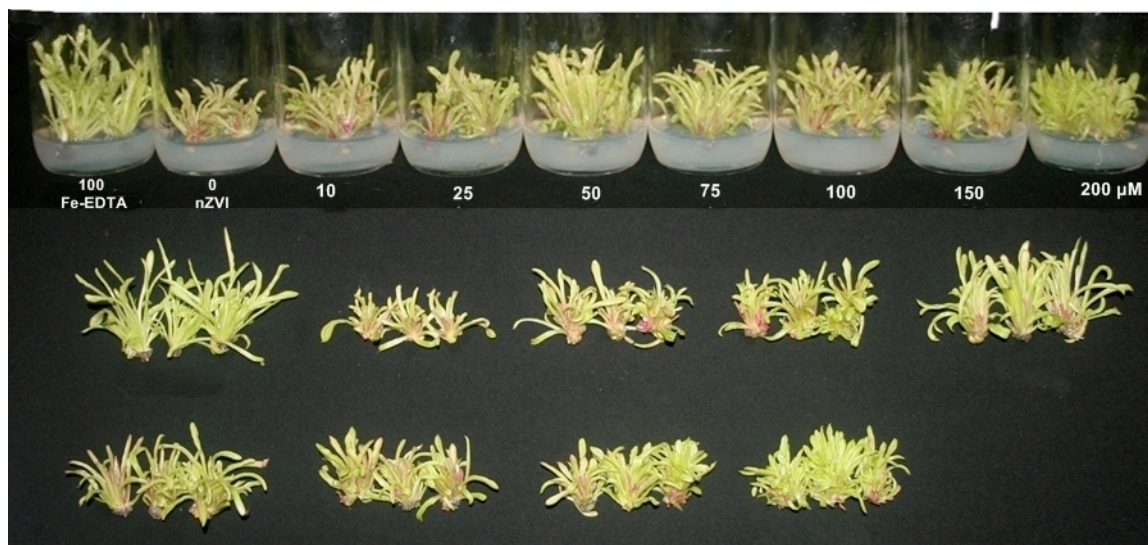
Ghi chú: Thí nghiệm sử dụng môi trường MS cải biên đã loại bỏ Fe-EDTA bổ sung nano sắt (nZVI), riêng nghiệm thức đối chứng (*) sử dụng môi trường MS bình thường có Fe-EDTA. (**) Các chữ cái khác nhau (a,b,...) trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở $\alpha = 0,05$ (Duncan's test).

Kết quả nghiên cứu cho thấy nồng độ 200 μM nano sắt bổ sung vào môi trường nuôi cấy cho hệ số

nhân chồi cao nhất (9,00 chồi/mẫu). Tuy nhiên, chồi ở nghiệm thức này thấp và nhỏ, lá nhiều, mảnh và

yếu. Trong khi đó, chồi thu được từ nghiệm thức bổ sung 50 μM nano sắt có chất lượng chồi tốt hơn, chồi cao, khỏe; lá to; số lượng chồi nhiều hơn so với các nghiệm thức bổ sung nano sắt khác, kể cả nghiệm thức đối chứng chứa Fe-EDTA (Hình 1). Khi bổ sung 50 μM nano sắt, tổng số chồi trung bình thu được là 8,33 chồi/mẫu với chiều cao 5,43 cm/chồi, trọng lượng tươi 2,34 g/cụm chồi và trọng lượng khô

0,137 g/cụm chồi (Bảng 1). Trong khi đó, môi trường chứa Fe-EDTA cho số chồi trung bình 5 chồi/mẫu. Kết quả này tương tự như nghiên cứu của Feng (2002) trên cây Salem khi sử dụng môi trường MS chứa Fe-EDTA và bổ sung 0,4 mg/L BA, 0,2 mg/L NAA cho tỷ lệ nhân chồi gấp 5 lần môi trường MS không có chất điều hòa sinh trưởng sau 5 tuần nuôi cấy.



Hình 1. Chồi Salem *in vitro* sinh trưởng trên môi trường sử dụng nano sắt.

Tuy nhiên, cho đến nay, các nhà khoa học chỉ mới ghi nhận được khả năng hấp thu và chuyển vị sắt của rễ không đáng kể lên chồi bí ngô, hắc mạch, *Arabidopsis*, hoa hướng dương khi sử dụng nano sắt thay thế cho Fe-EDTA (Zhu *et al.*, 2008; Corredor *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2011a,b; Ma *et al.*, 2013a,b; Martínez-Fernández *et al.*, 2017). Nhật và đồng tác giả (2015) đã nghiên cứu ảnh hưởng của nano sắt lên sinh trưởng và phát triển cây cúc *in vitro*. Kết quả thu được cho thấy khi bổ sung nano sắt với nồng độ 15-35 mg/l cho hiệu quả nhân chồi gấp 2-2,7 lần khi sử dụng Fe-EDTA, chồi trên các môi trường này sinh trưởng tốt hơn so với chồi trên môi trường có hàm lượng nano thấp (0-15 mg/l). Trong nghiên cứu này, khi tăng hàm lượng nano bổ sung vào môi trường (25-200 μM), chồi sinh trưởng tốt hơn và hệ số nhân chồi tăng lên rõ rệt. Tại nồng độ 50 μM cho hiệu quả nhân chồi và hình thái chồi tốt nhất so với các nghiệm còn lại.

Ảnh hưởng của nano sắt lên sự ra rễ, sinh trưởng và phát triển cây con Salem *in vitro*

Sau 2 tuần nuôi cấy, các chỉ tiêu đánh giá ảnh

hưởng của loại nguyên liệu sắt và nồng độ nano sắt lên khả năng ra rễ, sinh trưởng và phát triển cây con Salem nuôi cấy *in vitro* được trình bày ở bảng 2. Nhìn chung, chồi trên cả hai môi trường có Fe-EDTA và nano sắt đều được cảm ứng ra rễ do đều bổ sung một lượng auxin như nhau, tuy nhiên các chồi Salem nuôi cấy trên môi trường được bổ sung nano sắt có tốc độ sinh trưởng kém hơn so với chồi trên môi trường chứa Fe-EDTA.

Kết quả thu được cho thấy, chồi nuôi cấy trong môi trường bổ sung nano sắt có rễ màu vàng nâu, kích thước trung bình của rễ ngắn hơn (0,4-0,6 cm) so với các nghiệm thức đối chứng (0,6-0,63 cm), chồi xanh nhạt, trọng lượng tươi cây thấp (1,12-1,69 g/cây) so với đối chứng có Fe-EDTA là 1,76 g/cây) và hàm lượng chlorophyll *a*, *b* tổng hợp được rất thấp. Đặc biệt tại nồng độ 10 μM , hàm lượng chlorophyll *a* giảm gần 50% (2,96 $\mu\text{g/g}$) so với cây nuôi cấy trong môi trường sử dụng Fe-EDTA (4,79 $\mu\text{g/g}$). So với đối chứng có Fe-EDTA, trọng lượng khô của cây giảm đến 40% khi bổ sung nano sắt với nồng độ cao 200 μM . Tuy nhiên, tại nồng độ nano

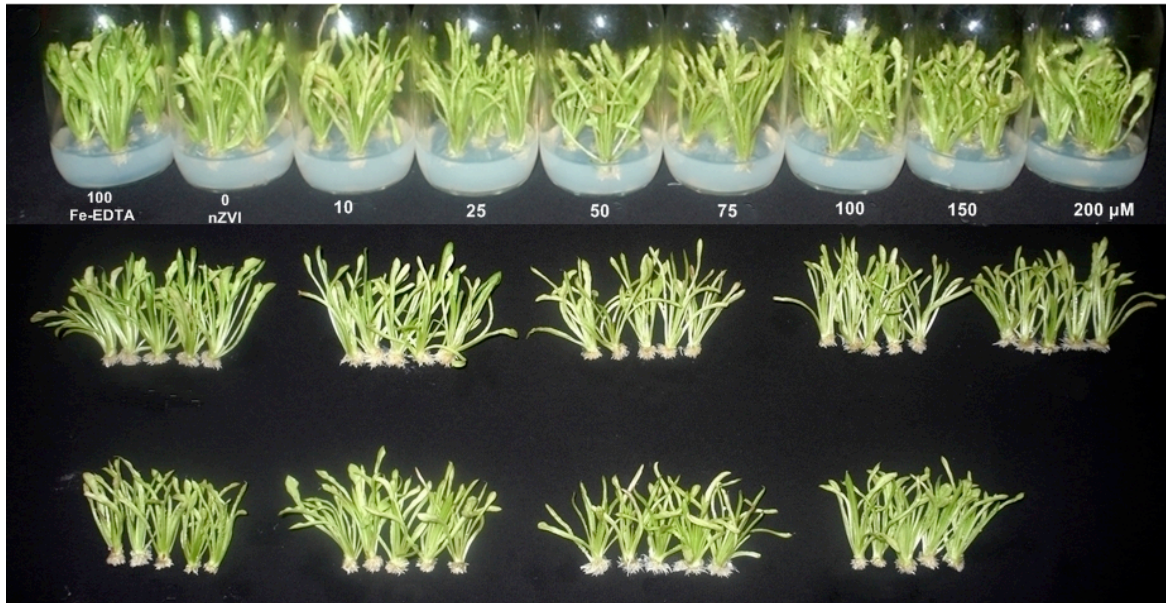
sắt thấp 50 μM trọng lượng tươi (1,60 g/cây), trọng lượng khô (98,00 mg/cây) và hàm lượng chlorophyll *a* (4,02 $\mu\text{g/g}$), chlorophyll *b* (1,86 $\mu\text{g/g}$) gia tăng gần

bằng với đối chứng có Fe-EDTA và cũng là cao nhất so với các nghiệm thức bổ sung nano sắt còn lại (Bảng 2, Hình 2).

Bảng 2. Ảnh hưởng của nồng độ nano sắt lên sự ra rễ, sinh trưởng và phát triển của cây Salem *in vitro*.

Nồng độ nano sắt (μM)	Trọng lượng tươi cây (g)	Trọng lượng khô cây (mg)	Chiều cao cây (cm)	Số lượng rễ/cây	Chiều dài rễ (cm)	Chl <i>a</i> ($\mu\text{g/g}$)	Chl <i>b</i> ($\mu\text{g/g}$)
0*	1,76 ^{a**}	98,67 ^a	6,47 ^a	16,67 ^a	0,63 ^{ab}	4,79 ^a	1,88 ^a
0	1,51 ^{ab}	91,67 ^a	6,10 ^{ab}	17,67 ^a	0,60 ^{ab}	2,96 ^g	1,45 ^{bc}
10	1,15 ^b	69,67 ^c	5,93 ^{ab}	7,67 ^b	0,40 ^c	3,02 ^g	1,34 ^c
25	1,16 ^b	73,33 ^{bc}	6,03 ^{ab}	9,67 ^b	0,47 ^{bc}	3,81 ^c	1,59 ^{abc}
50	1,60 ^a	98,00 ^a	6,27 ^a	16,47 ^a	0,47 ^{bc}	4,02 ^b	1,86 ^a
75	1,46 ^{ab}	94,67 ^a	6,17 ^{ab}	15,33 ^a	0,53 ^{bc}	3,46 ^d	1,51 ^{bc}
100	1,69 ^a	90,67 ^{ab}	6,27 ^a	18,00 ^a	0,53 ^{bc}	3,37 ^e	1,74 ^{ab}
150	1,32 ^{ab}	73,00 ^{bc}	6,10 ^{ab}	16,33 ^a	0,63 ^{ab}	3,20 ^f	1,71 ^{ab}
200	1,12 ^b	62,67 ^c	5,50 ^b	18,33 ^a	0,53 ^a	3,21 ^f	1,67 ^{ab}

Ghi chú: Thí nghiệm sử dụng môi trường 1/2MS đã loại bỏ Fe-EDTA, riêng nghiệm thức đối chứng (*) sử dụng môi trường MS có Fe-EDTA. (**) Các chữ cái khác nhau (a,b,..) trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở $\alpha = 0,05$ (Duncan's test).



Hình 2. Cây con Salem *in vitro* sinh trưởng trên môi trường sử dụng nano sắt.

Martínez-Fernandez và đồng tác giả (2016) đã tìm thấy sự giảm các nguyên tố đa lượng (Ca, K, Mg và S) trong cây hoa hướng dương khi nghiên cứu tác động của nano sắt lên thực vật. Hiện tượng này là do tác động ngăn chặn hấp thu nước của rễ bởi các hạt nano sắt kích thước lớn hơn phủ bề mặt rễ, khóa

các lỗ chân lông rễ, dẫn đến giảm khả năng hấp thụ các chất dinh dưỡng hòa tan trong nước ở rễ. Vì vậy, khi bổ sung nano sắt vào môi trường thường làm giảm tích lũy chlorophyll ở lá, hiệu quả này liên quan tới việc giảm hấp thu và vận chuyển các chất dinh dưỡng hòa tan, đặc biệt là Mg vì đây là chất

đinh dưỡng quan trọng có liên quan tới quá trình tổng hợp chlorophyll. Kết quả này cũng tương tự với nghiên cứu Trujillo-Reyes đồng tác giả (2014), Wang đồng tác giả (2016) khi nghiên cứu hấp thụ nano sắt trên cây rau diếp, lúa. Ngược lại, đối với nhiều hạt nano sắt có kích thước nhỏ hơn so với kích thước của xylem dễ dàng đi đến được xylem của rễ và vận chuyển vào trong cây. Nếu các hạt nano sắt được tổng hợp để bổ sung vào môi trường có kích thước nhỏ hơn 50 nm, chúng có thể được hấp thụ và vận chuyển trong cây (Corredor *et al.*, 2009; González-Melend *et al.*, 2008; Ma *et al.*, 2013a).

Theo nghiên cứu này, kết quả cho thấy rằng chỉ cần cung cấp một lượng nano sắt thấp (50 μM), cây con sẽ sinh trưởng và phát triển bình thường như khi bổ sung Fe-EDTA. Theo Kim đồng tác giả (2014) khi xử lý hạt cho nảy mầm với nano sắt nồng độ thấp ở cây *Arabidopsis thaliana* cho thấy sự gia tăng nhập bào (endocytosis) của rễ so với xử lý với nồng độ cao. Kết quả này cũng tương tự như nghiên cứu của Cosgrove (2000) và Nakayama đồng tác giả. (2012), khi cho rằng nano sắt ở nồng độ thấp thúc đẩy hấp thụ ở rễ và tăng trưởng một số loài thực vật. Điều này cho thấy kích cỡ nano, nồng độ sử dụng cũng là các nhân tố có ảnh hưởng đến hiệu quả hấp thụ và chuyển hóa chất dinh dưỡng trong cây.

Ảnh hưởng của nano sắt lên khả năng thích nghi và tăng trưởng của cây con Salem ở giai đoạn vườn ươm

Kết quả theo dõi sau 4 tuần nuôi trồng ngoài vườn ươm cho thấy các cây con từ các nghiệm thức ra rễ *in vitro* bổ sung các nồng độ nano sắt khác nhau cho thấy sự khác biệt rõ rệt về khả năng sinh trưởng, phát triển giữa các nghiệm thức và đều tốt hơn rất nhiều so với các cây ở nghiệm thức đối chứng có Fe-EDTA (Bảng 3, Hình 3a). Nhìn chung, tất cả các cây có bổ sung nano sắt cho thấy sự gia tăng đáng kể chất lượng cây giống. Tại nồng độ nano sắt 50 μM , rễ sinh trưởng tốt nhất và chồi trên tăng trưởng rất mạnh về sinh khối và hàm lượng chlorophyll.

Trong nghiên cứu này, khi bổ sung 50 μM nano sắt vào môi trường nuôi cây *in vitro*, các chỉ tiêu sinh trưởng như chiều cao cây (11,67 cm), chiều dài rễ (5,67 cm), chiều rộng lá (1,6 cm), trọng lượng tươi (2,89 g), trọng lượng khô (154 mg) và chỉ số chlorophyll SPAD (24,3) đạt kết quả tốt nhất, cao hơn nhiều so với đối chứng có hoặc không có bổ sung Fe-EDTA và các nghiệm thức khác có bổ sung nano sắt. Tuy nhiên, khi bổ sung nano sắt với hàm

lượng cao (150-200 μM) vào trong môi trường nuôi cây *in vitro* lại cho kết quả sinh trưởng *ex vitro* kém dần (Bảng 3, Hình 3a).

Khi thuần hóa ở điều kiện vườn ươm, nano sắt cho thấy khả năng cải thiện tỷ lệ sống sót của thực vật nuôi cấy *in vitro*. Dưới cùng một điều kiện chăm sóc, các cây Salem có nguồn gốc từ cây *in vitro* trên môi trường có bổ sung nano sắt có tỷ lệ sống sót cao hơn hẳn so với các cây ở môi trường đối chứng. Khi bổ sung với một lượng nano sắt (10 μM) chỉ bằng 1/10 hàm lượng Fe-EDTA (100 μM) vào môi trường ra rễ *in vitro* đã cho thấy tỷ lệ sống sót vượt trội (90,00%), cao hơn rất nhiều so với có sử dụng sắt ion (69,17%) và không bổ sung sắt (45,83%). Đặc biệt, các cây Salem nuôi cấy từ môi trường *in vitro* bổ sung nano sắt 50 μM cho tỷ lệ sống sót cao nhất (99,17%) (Bảng 3).

Phản ứng của thực vật đối với nano sắt đã được nghiên cứu trên một số đối tượng cây trồng gần đây. Trong điều kiện *ex vitro*, sử dụng nano sắt cho thấy có ảnh hưởng tích cực lên sự ra rễ, tăng trưởng rễ, chiều cao cây, hàm lượng chlorophyll, khối lượng khô cây húng quế khi phun nano sắt lên cây đã được Peyvandi đồng tác giả (2011) chứng minh. Mitra đồng tác giả. (2015) đã nghiên cứu cho thấy khi sử dụng 0,04% dung dịch nano oxit sắt xịt lên lá lúa mì cho năng suất hạt, hàm lượng protein cao hơn so với đối chứng không bổ sung. Tương tự, khi thử nghiệm phân bón nano sắt trên rau bina và thu nhận kết quả gia tăng 58% khối lượng lá so với sử dụng dạng phân bón thông thường (Ladan *et al.*, 2012). Ở cúc vạn thọ (*Calendula officinalis*) Amuamuha và đồng tác giả (2012) cũng đã nghiên cứu ảnh hưởng của các nồng độ nano sắt khác nhau (1, 2 và 3 g/l) lên 3 giai đoạn sinh trưởng kéo dài thân, ra hoa và sau khi thu hoạch. Kết quả cây cho sản lượng hoa và hàm lượng tinh dầu cao nhất khi bổ sung 1g/l nano sắt tại giai đoạn sinh trưởng, kéo dài thân.

Trong nghiên cứu này, nguyên liệu nano sắt (nZVI) thay thế cho Fe-EDTA trong môi trường nhân giống *in vitro* được sử dụng với hàm lượng thấp nhưng lại cho hiệu quả nhân chồi, tỷ lệ sống sót cao hơn. Thêm vào đó, phương pháp bổ sung nano sắt cho cây là bổ sung trực tiếp dễ dàng vào môi trường như các chất điều hòa sinh trưởng. Trong khi đó, để có phức hợp Fe-EDTA, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ và Na_2EDTA phải pha chế riêng lẻ, gia nhiệt khi hòa tan và phương pháp pha trộn yêu cầu kỹ thuật, trình tự pha chế cũng như điều kiện bảo quản nghiêm ngặt. Vì vậy, việc sử dụng các hạt sắt dạng nano sẽ tiết kiệm được thời gian, năng lượng điện cũng như

nhân công lao động, do đó sẽ góp phần tiết kiệm chi phí sản xuất.

Tóm lại, khi bổ sung nano sắt vào môi trường nuôi cấy *in vitro*, khả năng thích nghi, sinh trưởng và

phát triển của cây con *ex vitro* gia tăng một cách vượt trội. Tại nồng độ 50 μM cây giống có chất lượng tốt nhất và cũng cho tỷ lệ sống sót cao hơn rất nhiều so với cây giống Salem khi sử dụng Fe-EDTA.

Bảng 3. Ảnh hưởng của nồng độ nano sắt lên khả năng thích nghi và tăng trưởng của cây Salem sau 4 tuần nuôi trồng trong điều kiện vườn ươm.

Nồng độ nano sắt (μM)	Trọng lượng tươi cây (g)	Trọng lượng khô cây (mg)	Chiều cao cây (cm)	Chiều dài rễ (cm)	Chiều rộng lá (cm)	SPAD	Tỷ lệ sống sót (%)
0*	0,98 ^{c**}	57,00 ^c	6,87 ^e	0,90 ^c	1,00 ^d	22,67 ^{ab}	69,17 ^c
0	0,92 ^c	52,00 ^c	8,00 ^{de}	0,90 ^c	0,93 ^d	18,13 ^c	45,83 ^d
10	1,87 ^b	121,33 ^{ab}	8,07 ^{de}	2,90 ^{bc}	1,10 ^{bcd}	24,00 ^a	90,00 ^b
25	2,06 ^b	123,67 ^{ab}	9,57 ^{bc}	2,03 ^c	1,17 ^{bcd}	22,73 ^{ab}	86,67 ^b
50	2,89 ^a	154,00 ^a	11,67 ^a	5,67 ^a	1,60 ^a	24,30 ^a	99,17 ^a
75	1,83 ^b	90,67 ^b	9,00 ^{cd}	5,17 ^a	1,40 ^{ab}	21,87 ^{ab}	91,83 ^{ab}
100	2,09 ^b	107,67 ^b	10,77 ^{ab}	4,83 ^{ab}	1,37 ^{ab}	21,30 ^{abc}	85,17 ^b
150	1,62 ^b	97,33 ^b	8,70 ^{cd}	2,70 ^{bc}	1,13 ^{bcd}	20,60 ^{bc}	83,33 ^b
200	1,01 ^c	55,00 ^c	8,93 ^{cd}	2,17 ^c	1,30 ^{abc}	18,47 ^c	70,83 ^c

Ghi chú: Thí nghiệm sử dụng mẫu cây nuôi cấy *in vitro* từ môi trường đã loại bỏ Fe-EDTA, riêng nghiệm thức đối chứng (*) từ môi trường có Fe-EDTA. (**) Các chữ cái khác nhau (a,b,...) trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở $\alpha = 0,05$ (Duncan's test).



Hình 3. Cây Salem *ex vitro* có nguồn gốc từ nuôi cấy *in vitro*. (a) cây 1 tháng tuổi ở điều kiện vườn ươm, cây trồng trong nhà kính 2 tháng (c), 3 tháng (d).

KẾT LUẬN

Mặc dù việc sử dụng các hạt nano sắt nZVI thay thế sắt ion ở dạng Fe-EDTA trong môi trường ra rễ Salem không làm tăng trưởng cây con *in vitro*, tuy nhiên, nano sắt đã cho thấy khả năng thúc đẩy nhân nhanh chồi, gia tăng tỷ lệ sống sót, tăng cường sinh trưởng vượt trội của cây con sau khi được chuyển sang trồng ngoài vườn ươm. Nano sắt ở nồng độ thấp 50 μM bổ sung vào môi trường nuôi cấy *in vitro* cho hệ số nhân chồi cao, bộ rễ cây Salem *ex vitro* phát triển mạnh, cây sống sót và sinh trưởng tốt hơn.

Lời cảm ơn: Các tác giả xin chân thành cảm ơn Chương trình “Nghiên cứu ứng dụng công nghệ nano trong nông nghiệp” của Viện Hàn lâm Khoa học Công nghệ Việt Nam đã hỗ trợ kinh phí và Phòng Sinh học Phân tử và Chọn tạo Giống cây trồng (Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên) đã tạo điều kiện cho chúng tôi hoàn thành nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Amuamuha L, Pirzad A, Hashem HH (2012) Effect of varying concentrations, time of nano iron foliar application on the yield, essential oil of Pot marigold. *Int Res J Appl Basic Sci* 3: 2085–2090.
- Corredor E, Testillano PS, Coronado M, Gonzalez-Melendi P, Fernández-Pacheco R, Marquina C, Ibarra MR, de la Fuente JM, Rubiales D, Perez-de-Luque A, Risueno MC (2009) Nanoparticle penetration, transport in living pumpkin plants: *in situ* subcellular identification. *BMC Plant Biol* 9: 45–56.
- Cosgrove DJ (2000) Loosening of plant cell walls by expansins. *Nature* 407: 321–326.
- Dương Tấn Nhật, Nguyễn Việt Cường, Hoàng Thanh Tùng, Nguyễn Thị Thanh Hiền, Đỗ Mạnh Cường, Vũ Thị Hiền, Nguyễn Bá Nam (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): 1162–1172.
- Eskandari H (2011) The importance of iron (Fe) in plant products, mechanism of its uptake by plants. *J Appl Environ Biol Sci* 1(10): 448–452.
- Feng XY (2002) Rapid propagation of *L. sinuatum* by tissue culture. *Guizhou Agricul Sci* 1(30): 9–13.
- Gabryszewska E, Kamińska M, Korbin M, Rudzińska-Langwald A (2000) Micropropagation of phytoplasma-affected *Limonium sinuatum* Mill. *Plants. Acta Soc Bot Po* 69: 109–113.
- Gabryszewska E, Podwyszynska M (1992) *Propagation of stative in vitro. Proc conf – New tendency in cultivation, applicaton of plant on dry bunches (in Polish)*, Skierniewice 9(12): 7–9.
- González-Melendi P, Fernández-Pacheco R, Coronado MJ, Corredor E, Testillano PS, Risueño MC, Marquina C, Ibarra MR, Rubiales D, Pérez-de-Luque A (2008) Nanoparticles as smart treatment-delivery systems in plants: assessment of different techniques of microscopy for their visualization in plant tissues. *Ann. Bot* 101: 187–195.
- Harazy A, Leshem B, Cohen A (1985) *In vitro* propagation of stative as an aid to breeding. *Hortsci* 20: 361–362.
- Kim JH, Lee YJ, Kim EJ, Gu SM, Sohn EJ, Seo YS, An HJ, Chang HS (2014) Exposure of iron nanoparticles to *Arabidopsis thaliana* enhances root elongation by triggering cell wall loosening. *Environ Sci Technol* 48: 3477–3485.
- Ladan MA, Vattani H, Baghaei N, Keshavarz N (2012) Effect of different levels of fertilizer nanoiron chelates on growth, yield characteristics of two varieties of spinach (*Spinacia oleracea* L.): varamin 88, viroflay. *Res J Appl Sci Eng Technol* 4(12): 4813–4818.
- Ma X, Chhikara S, Xing BS, Musante C, White JC, Dhankher OP (2013a) Physiological, molecular response of *Arabidopsis thaliana* (L.) to nanoparticle cerium, indium oxide exposure. *ACS Sustain Chem Eng* 1(7): 768–778.
- Ma X, Gurung A, Deng Y (2013b) Phytotoxicity, uptake of nanoscale zerovalent iron (nZVI) by two plant species. *Sci Total Environ* 443: 844–849.
- Martínez-Fernández D, Barroso D, Komárek M (2016a) Root water transport of *Helianthus annuus* L. under iron oxide nanoparticle exposure. *Environ Sci Pollut Res* 23: 1732–1741.
- Martínez-Fernández D, Vítková M, Michalková Z, Komárek M (2017) *Engineered nanomaterials for phytoremediation of metal/metalloids contaminated soils: implications for plant physiology*. In: Ansari A, Gill S, Gill R, Lanza G, Newman L (eds) *Phytoremediation*. Springer, Cham, pp 369–403.
- McTaggart AR, Liberato JR (2006) Cercosporoid fungi on stative (*Limonium sinuatum*) in Australia. *Australas Plant Dis Notes* 1: 37–39.
- Mitra B, Payam M, Behzad S (2015) The effect of iron nanoparticles spraying time, concentration on Wheat. *Biol Forum* 7(1): 679–683.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 15: 473–479.

- Nakayama N, Smith RS, Mel T, Robinson S, Kimura S, Boudaoud A, Kuhlemeier C (2012) Mechanical regulation of auxin-mediated growth. *Curr Biol* 22: 1468–1476.
- Peyvandi M, Parandeh H, Mirza M (2011) Comparing the effect of iron Nano-chelate common iron chelate on growth parameters, antioxidant enzymes activity of basil (*Ocimum basilicum* L.). *Iranian J Mod Cell Mol Biotech* 1: 89–99.
- Schopfer P (2001) Hydroxyl radical-induced cell-wall loosening *in vitro*, *in vivo*: Implications for the control of elongation growth. *Plant J* 28: 679–688.
- Slater A, Scott NW, Fowler MR (2008) *Plant biotechnology: the genetic manipulation of plants*. Chapter 2: *Plant tissue culture*. Oxford University Press: 41.
- Trujillo-Reyes J, Majumdar S, Botez CE, Peralta-Videa JR, Gardea-Torresdey JL (2014) Exposure studies of core-shell Fe/Fe₃O₄, Cu/CuO NPs to lettuce (*Lactuca sativa*) plants: are they a potential physiological, nutritional hazard. *J Hazard Mater* 267: 255–263.
- Tstu-Hwie AL, Nai-Wen H, Rey-Yuh WU (2005) Control of leaf-tip necrosis of micropropagated ornamental statics by elimination of endophytic bacteria. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 41: 546–549.
- Wang H, Kou X, Pei Z, Xiao JQ, Shan X, Xing B (2011a) Physiological effects of magnetite (Fe₃O₄) nanoparticles on perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.), pumpkin (*Cucurbita mixta*) plants. *Nanotoxicology* 5: 30–42.
- Wang J, Fang Z, Cheng W, Yan X, Tsang PE, Zhao D (2016) Higher concentrations of nanoscale zero-valent iron (nZVI) in soil induced rice chlorosis due to inhibited active iron transportation. *Environ Pollut* 210: 338–345.
- Wang Z, Li J, Zhao J, Xing B (2011b) Toxicity, internalization of CuO nanoparticles to prokaryotic alga *Microcystis aeruginosa* as affected by dissolved organic matter. *Environ Sci Technol* 45: 6032–6040.
- Zhu H, Han J, Xiao JQ, Jin Y (2008) Uptake, translocation, accumulation of manufactured iron oxide nanoparticles by pumpkin plants. *Journal of Environ Monit* 10: 713–717.
- Zuverza-Mena N, Martínez-Fernández, Du W, Hernández-Viezas AJ, Bonilla-Bird, López-Moreno ML, Michael Komarek, Peralta-Videa JR, Gardea-Torresdey JL (2016) Exposure of engineered nanomaterials to plants: Insights into the physiological, biochemical responses-A review. *Plant Physiol Biochem* 110: 236–264.

INVESTIGATION OF THE Fe-EDTA SUBSTITUTION EFFECT OF IRON NANOPARTICLES IN *LIMONIUM SINUATUM* (L.) MILL MICROPROPAGATION

Do Thi Hien¹, Do Manh Cuong^{1,2}, Hoang Thanh Tung¹, Nguyen Ba Nam¹, Vu Quoc Luan¹, Duong Tan Nhut¹

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

²University of Sciences, Hue University

SUMMARY

At present, the micropropagation of *Limonium sinuatum* (L.) Mill still have many difficulties such as: *in vitro* and *ex vitro* leaves are susceptible to necrosis by fungal, bacterial and endogenous viruses; Seedlings grow slowly, the survival rate of seedlings is low at the nursery stage. In this study, we designed an *in vitro* experiment to investigate the effect of the Fe-EDTA substitution on the growth of shoot and roots, and acclimatization of explant in micropropagation (*Limonium sinuatum* (L.) Mill), one of the valuable special cut flowers in the world, by using nano zerovalent iron (nZVI) treatments. Our initial results showed that the number of shoot increased after 5 weeks of cultivation in range of nZVI concentration (10-200 μM) on MS medium with 0.4 mg/L BA and 0.2 mg/L NAA. In rooting period, the growth of plants cultured on ½ MS under nZVI treatments with 0.4 mg/L NAA was lower to those cultured on the medium replaced by Fe-EDTA. However, the micropropagated plantlets on the medium added nZVI gained higher growth efficient and survival rate than the controls replaced by Fe-EDTA after 4 weeks cultivating in the nursery. The supplementation of 50 μM nZVI to the medium for growing shoot and root showed the best results in number of shoots, *ex vitro* plantlet height, fresh weight, root length, chlorophyll concentration, and survival rate (8.33 shoots, 11.67 cm, 2.89 g, 5.67 cm, 24.3, and 99.17%, respectively). This study indicated that the replacement of Fe-EDTA by nano iron nZVI on micropropagation medium can improve the efficiency of micropropagation and plantlet quality better.

Keywords: *Ex vitro*, Fe-EDTA, *in vitro*, iron nanoparticle, *Statisce*