

NGHIÊN CỨU TÁC ĐỘNG CỦA NANO KẼM OXIDE VÀ NANO COBALT ĐỐI VỚI QUÁ TRÌNH NẢY MẦM Ở HẠT ĐẬU TƯƠNG (*GLYCINE MAX (L.) MERR*)

Phạm Thị Hòe¹, Trần Mỹ Linh¹ ✉, Nguyễn Tường Vân², Ngô Quốc Bưu³, Nguyễn Chi Mai¹, Lê Quỳnh Liên¹, Ninh Khắc Bản¹, Lê Thị Thu Hiền⁴, Nguyễn Hoài Châu³

¹Viện Hóa sinh biển, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

³Viện Công nghệ môi trường, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

⁴Viện Nghiên cứu Hệ gen, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

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

Ngày nhận bài: 23.11.2017

Ngày nhận đăng: 02.7.2018

TÓM TẮT

Công nghệ nano và vật liệu nano đã được ứng dụng thành công ở một số nước nhằm tăng sản lượng và chất lượng cây trồng. Ở Việt Nam, một số nghiên cứu đã tập trung và đánh giá hiệu quả mang lại khi sử dụng các hạt nano kim loại ở nhiều loài cây trồng khác nhau. Trong nghiên cứu này, ảnh hưởng của nano kẽm oxide (ZnO) và nano cobalt (Co) đối với quá trình nảy mầm của hạt đậu tương (*Glycine max (L.) Merr*), một loại cây trồng quan trọng ở Việt Nam được đánh giá thông qua các chỉ tiêu về tốc độ nảy mầm, sự phát triển rễ mầm và mức độ biểu hiện của một số gen quan trọng. Kết quả cho thấy, xử lý hạt giống đậu tương ĐT26 với các dung dịch nano kim loại đã thúc đẩy tốc độ nảy mầm và tăng cường sự phát triển rễ mầm, đồng thời không làm ảnh hưởng tới sự phát sinh hình thái của cây mầm. Trong các nồng độ nano thử nghiệm, nano ZnO 50 mg/L và nano Co 0,05 mg/L cho tác động tốt nhất tới quá trình nảy mầm và sự phát triển rễ mầm. Phân tích một số gen mã hóa cho các enzyme đóng vai trò quan trọng trong quá trình nảy mầm ở đậu tương như: Aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase 2 (*ACS2*), Lipoxygenase 3 (*LOX9-03*), Lipoxygenase 7 (*LOX9-07*), Amylase 8 (*AMY8*), Saccharogen amylase (*AMYS*), Alpha-glucan dikinase (*α -GLU*), Urease 2 (*URE02*), Urease 14 (*URE14*). Kết quả cho thấy, mức độ biểu hiện của hầu hết các gen được tăng cường ở các mẫu rễ mầm thuộc các lô xử lý với nano kim loại so với đối chứng.

Từ khóa: Đậu tương ĐT26, nano cobalt, nano kẽm oxide, quá trình nảy mầm

MỞ ĐẦU

Cây đậu tương (*Glycine max (L.) Merr.*) là một trong những cây trồng mũi nhọn trong chiến lược phát triển kinh tế của nước ta. Đậu tương được sử dụng làm thực phẩm cho người, thức ăn cho gia súc, nguyên liệu cho công nghiệp,... Tuy nhiên, do năng suất còn thấp và diện tích trồng suy giảm nên Việt Nam phải nhập khẩu lượng lớn đậu tương từ các nước khác. Do vậy, việc tăng năng suất và sản lượng đậu tương là đòi hỏi cấp thiết hiện nay của ngành trồng trọt ở nước ta. Nghiên cứu ứng dụng các thành tựu khoa học công nghệ hiện đại vào sản xuất nông nghiệp sẽ là một trong những giải pháp hữu hiệu nhất để giải quyết vấn đề này.

Công nghệ nano là lĩnh vực nhằm tạo ra và ứng

dụng các vật liệu có kích thước trong khoảng từ 1-100 nm. Vật liệu có cấu trúc nano biểu hiện các đặc tính khác biệt, thường là vượt trội hơn so với các vật liệu truyền thống (Roduner, 2006). Công nghệ nano được ứng dụng hiệu quả trong nông nghiệp tại một số quốc gia, và đã đạt được thành tựu đáng kể trong một số lĩnh vực quan trọng như lai tạo các giống cây trồng mới, phát triển các vật liệu mới như phân bón nano, thuốc trừ sâu nano thay thế hóa chất nông nghiệp truyền thống, chế phẩm nano xử lý các chất thải nông nghiệp, cảm biến nano phát hiện mầm bệnh và giám sát điều kiện môi trường trên đồng ruộng (Moraru *et al.*, 2003). Hiện nay, các nhà khoa học đang tập trung phát triển hạt nano của các kim loại như Co, sắt (Fe), đồng (Cu), kẽm (Zn),... bởi chúng có các đặc tính lý hóa rất đặc biệt đồng thời cũng là những nguyên tố cần thiết cho sự sinh trưởng

và phát triển của cây (Roduner, 2006; Ruttkay-Nedecký *et al.*, 2017). Trong đó, Zn ảnh hưởng đến sự tạo thành nhiều loại hợp chất quan trọng trong cây như tinh bột, protein, vitamin, một số hormone và enzyme,... Zn là thành phần bắt buộc của enzyme carbonic anhydrase và cũng là thành phần của alcohol dehydrogenase, glutamate dehydrogenase, lactate dehydrogenase tham gia vào quá trình chuyển hoá các hợp chất chứa nhóm hydro sunfua. Co tác động đến sự tăng trưởng và trao đổi chất của thực vật, là thành phần trung tâm của vitamin cobanlamin (vitamin B12). Co cần cho việc ra hoa, quả, chống sâu bệnh, nắng nóng, ảnh hưởng tốt đến độ bền vững của chlorophyll và quá trình tổng hợp carotenoid (Palit *et al.*, 1994).

Những nghiên cứu về ảnh hưởng của các hạt nano kim loại trên một số loại cây trồng như lúa mì (Maslobrod *et al.*, 2013), cà chua (Panwar *et al.*, 2011; Maslobrod *et al.*, 2013), lạc (Prasad *et al.*, 2012), ... đã cho thấy chúng có hiệu quả tích cực đối với sự phát triển của cây trồng. Prasad *et al.*, (2012) đã chứng minh rằng hạt nano ZnO (1000 ppm) làm tăng tỷ lệ nảy mầm, thúc đẩy sự phát triển của rễ và sức sống của cây lạc. Gần đây, theo Sayadiazar *et al.*, (2016) xử lý hạt đậu gà với nano Fe 5 mg/L đã thể hiện tác động cải thiện tỷ lệ nảy mầm và thúc đẩy sự phát triển của cây con. Nghiên cứu của Polischuk *et al.*, (2000) cho thấy việc xử lý hạt giống với dung dịch nano kim loại trước khi gieo hạt có thể làm tăng hàm lượng protein lên tới 40%, tùy thuộc loại hạt nano được sử dụng; các hạt nano kim loại cũng là một nguồn bổ sung của các điện tử hoạt động tự do để kích thích quá trình trao đổi chất. Hơn nữa, liều lượng dung dịch nano sử dụng để xử lý hạt trước khi gieo thấp hơn nhiều so với việc sử dụng các phân bón vi lượng truyền thống nên sẽ giảm thiểu tối đa dư lượng trong môi trường.

Ở Việt Nam, công nghệ nano bước đầu cũng đã được nghiên cứu và ứng dụng trong nông nghiệp. Các nhà khoa học thuộc Viện Công nghệ môi trường (Viện CNMT) hợp tác với các nhà khoa học Liên bang Nga đã chế tạo thành công các hạt nano kim loại Ag, Fe, Co, Cu và nano ZnO dưới dạng bột siêu phân tán. Sau quá trình nghiên cứu, các nhà khoa học của Viện CNMT đã đưa ra quy trình xử lý hạt giống với hạt nano kim loại trước khi gieo. Theo báo cáo của Trịnh Văn Tuyên (2012), sử dụng nano Fe để xử lý hạt giống ngô trước khi gieo làm tăng tỉ lệ nảy mầm tăng 14%; diện tích bề mặt lá tăng 22,2%; khối lượng lá tăng 25%; khối lượng rễ tăng 27,3%; độ dài rễ tăng 28,3% và độ dài thân tăng 17,2%; so với đối

chúng. Theo công bố mới đây của Quoc Buu Ngo *et al.*, (2014), khi xử lý hạt giống đậu tương ĐT51 trước gieo trồng với các dung dịch nano kim loại Fe, Co và Cu đã làm tăng tỷ lệ nảy mầm 25%, tăng hàm lượng diệp lục từ 7-15%, gia tăng số lượng nốt sần từ 20-49% và tăng năng suất 16% so với đối chứng. Kết quả của các nghiên cứu trên đã cho thấy ảnh hưởng tích cực của việc xử lý hạt giống với dung dịch nano trước khi gieo đối với toàn bộ quá trình sinh trưởng phát triển và năng suất ở đậu tương. Việc xử lý hạt giống không làm ảnh hưởng tới quá trình sinh trưởng và hình thái của cây đậu tương và các cây trồng khác ở cả điều kiện phòng thí nghiệm và trên đồng ruộng (Ngo Quoc Buu *et al.*, 2014; Areeba *et al.*, 2016). Điều này phù hợp với kết quả của các công bố trước đây trên thế giới về hiệu quả của nano kim loại đối với quá trình nảy mầm và sinh trưởng phát triển của cây trồng. Tuy nhiên, cơ chế tác động của hạt nano kim loại với đối với mỗi giai đoạn sinh trưởng phát triển và các quá trình sinh lý, sinh hóa, di truyền ở các đối tượng cây trồng vẫn còn chưa được làm sáng tỏ, đặc biệt là giai đoạn nảy mầm, có ý nghĩa khởi đầu và quan trọng trong toàn bộ chu trình sống của thực vật. Do đó, nghiên cứu này tập trung đánh giá tác động của hai loại hạt nano ZnO và nano Co đối với quá trình nảy mầm ở giống đậu tương ĐT26 dựa trên phân tích các chỉ tiêu trong quá trình nảy mầm như tỷ lệ nảy mầm, hình thái và tốc độ phát triển rễ mầm và đánh giá mức độ biểu hiện của 8 gen liên quan tới quá trình nảy mầm bao gồm: Gen mã hóa enzyme Aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase là enzyme chủ chốt trong con đường sinh tổng hợp ethylene, hormone có liên quan tới sự phá ngủ nghỉ, có vai trò kích thích nảy mầm ở giai đoạn sớm (Corbineau *et al.*, 2014); một số gen liên quan tới quá trình trao đổi chất và giải phóng năng lượng từ các chất dự trữ trong hạt như Lipoxygenase (trao đổi chất lipid), Urease (tổng hợp protein), β -amylase và Alpha-glucan dikinase (trao đổi chất carbohydrate) (Han *et al.*, 2013). Các kết quả của nghiên cứu sẽ là cơ sở khoa học cho việc phát triển và ứng dụng công nghệ nano trong trồng trọt, góp phần xây dựng nền nông nghiệp bền vững ở Việt Nam.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Giống đậu tương ĐT26 được cung cấp bởi Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Đậu đỗ - Viện Cây lương thực và Cây thực phẩm. Hạt nano ZnO và nano Co được cung cấp bởi Viện Công nghệ

môi trường, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam với kích thước hạt 20-60 nm, độ tinh sạch > 95%.

Phương pháp

Khử trùng hạt đậu tương

Hạt đậu tương không bị sâu mọt và đồng đều về kích thước được lựa chọn và khử trùng bề mặt hạt bằng khí Clorine (100 mL dung dịch NaOCl : 3 mL HCl 38%) trong 4 giờ (h) (Clough, Bent, 1998).

Xử lý hạt đậu tương với các dung dịch nano

Các dung dịch nano ZnO và nano Co được pha

trong nước cất khử ion theo các nồng độ nghiên cứu và được phân tán bằng phương pháp siêu âm (200 W, 37 kHz) trong 30 min. Hạt đậu tương được trộn với dung dịch nano theo tỷ lệ 100 g hạt với 35 mL dung dịch, ủ trong 30 min, ở nhiệt độ phòng. Các nồng độ dung dịch nano thử nghiệm: Dung dịch nano ZnO 25 mg/L, 50 mg/L và 500 mg/L; dung dịch nano Co 0,05 mg/L, 0,5 mg/L và 2,5 mg/L. Đối chứng âm là hạt đậu tương xử lý với nước cất khử ion. Hạt đã xử lý được này mầm trên các hộp nhựa (10 x 20 x 15cm) chứa 450 mL môi trường thạch Agar (5 g/L), 12 h sáng/12 h tối, ở nhiệt độ phòng. Mỗi lô thí nghiệm gồm 3 hộp (50 hạt/hộp). Thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

Bảng 1. Thông tin gen đích và trình tự các mồi được sử dụng trong phản ứng RT-PCR.

Gen đích	Mã số gen	Trình tự mồi
Actin	Glyma.19g32990	GACCTTCAACACCCCTGCTA ATGGATGGCTGGAACAGAAC
Aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase 2	Glyma.08G018000	GTAGAACAAGAGGAAACAGAGTC AGATACAAGATGGATACGCTTC
Lipoxygenase 3	Glyma.03G237300	GCGTGCTTCACCCTATTTAT CTGTGTCATCTTCCTTGATAGTAG
Lipoxygenase 7	Glyma.07G007000	GAAGATGTGCGTAGTCTCTATGA CAGTAGGTAGGCTGTTTATCCT
Amylase 8	Glyma.09G21700	GTATCCTGGTATCGGTGAGTT CTGGAAGATGAAATCCTAAGC
Saccharogen amylase	Glyma.05G219200	GTTTACGATTGGAGAGGGTATG CCTGTGAAGAGAATGAAGGATA
Alpha-glucan dikinase	Glyma.04G096500	GGAATAGCTATCTAACTGGAGGA CTATTCCCTGCAAAGTTATCTC
Urease 2	Glyma.02G163900	GACGGTAGAGGAAGAATAATGAG TGTAACCTTAGTGGAAACCTTG
Urease 14	Glyma.14G039400	G TTCAGTCCCCTTAGTGTCTAAT ATACAGTCTCTAAACCCAGAGAAG

Xác định ảnh hưởng của hạt nano kim loại tới tỷ lệ nảy mầm, tốc độ nảy mầm và sự phát triển rễ mầm

Tỷ lệ nảy mầm của hạt được xác định tại các thời điểm 15 h, 24 h và 48 h (kể từ khi xử lý hạt). Tỷ lệ nảy mầm (X) được tính theo công thức:

$$X (\%) = \frac{\text{Số hạt nảy mầm}}{\text{Tổng số hạt nghiên cứu}} \times 100$$

Tốc độ nảy mầm (theo h) của hạt được tính theo công thức (Salimi, 2015).

$$GR = \sum \frac{X_n}{Y_n (X_n - X_{n-1})}$$

Ghi chú: Trong đó: GR: Tốc độ nảy mầm, X_n : Phần trăm số hạt nảy mầm tại thời điểm n, Y_n : Số h quan sát tính từ lúc xử lý hạt.

Rễ mầm tại thời điểm 15 h, 18 h, 21 h và 24 h (tính từ khi xử lý hạt) được quan sát hình thái và đo chiều dài. Tại mỗi thời điểm, rễ mầm của 30 hạt/ lô thí nghiệm được đo chiều dài bằng thước thẳng có độ chia nhỏ nhất 0,1 mm. Số liệu được xử lý bằng

phần mềm Microsoft Excel 2010 và GrapPad Prism 5.0, sử dụng Turkey test với $p < 0,05$.

Tách chiết RNA tổng số và tổng hợp cDNA

RNA tổng số của các mẫu rễ mầm đậu tương thu tại thời điểm 18 h và 48 h (sau khi xử lý hạt) được tách chiết bằng phương pháp Trizol theo mô tả của Rio *et al.*, (2010), làm sạch và đo nồng độ bằng máy đo quang phổ Nanodrop (Thermoscientific). Sau đó, cDNA được tổng hợp trên khuôn RNA sử dụng Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermoscientific), thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Lượng RNA làm khuôn mẫu cho một phản ứng tổng hợp cDNA là 3 μ g.

RT – PCR

RT-PCR được thực hiện với khuôn là cDNA vừa được tổng hợp từ RNA của mẫu rễ mầm đậu tương. Các cặp mồi đặc hiệu cho các gen quan tâm được thiết kế sử dụng phần mềm thông dụng (Lasergene, USA), dựa trên những thông tin trình tự hệ gen đậu tương trên Ngân hàng Gen quốc tế (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>).

Thành phần phản ứng gồm: 2,5 μ L Buffer 10X (Sigma, Mỹ), 2 μ L dNTP mix 2,5 mM (Sigma, Mỹ), 2 μ L MgCl₂ 25 mM (Sigma, Mỹ), 0,5 μ L mỗi xuôi và 0,5 μ L mỗi ngược 10 pm, 0,5 μ L Dream Taq polymerase 5u/ μ L (Sigma, Mỹ), 1 μ L cDNA và bổ sung nước cho đủ thể tích 25 μ L. Chu trình nhiệt: 95°C trong 10 min; tiếp theo 35 chu kỳ (95°C trong 45 s, nhiệt độ gắn mồi phù hợp (54 hoặc 56 °C) trong 45 s, 72°C trong 1 min); 72°C trong 7 min. Trình tự của các cặp mồi đặc hiệu cho mỗi đoạn gen cần phân tích được thể hiện ở bảng 1.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Ảnh hưởng của hạt nano ZnO và nano Co đến tốc độ nảy mầm của hạt đậu tương

Tỷ lệ nảy mầm là tiêu chí quan trọng đầu tiên để đánh giá khả năng nảy mầm của hạt giống. Kết quả đánh giá các chỉ tiêu nảy mầm ở các lô thí nghiệm cho thấy, việc xử lý hạt đậu tương với nano ZnO và nano Co ở các nồng độ khác nhau làm tăng tỷ lệ nảy mầm và tốc độ nảy mầm của hạt (Bảng 2).

Tác động của hạt nano ZnO đến tỷ lệ nảy mầm của hạt đậu tương được thể hiện rõ nhất ở thời điểm 15 h sau khi xử lý. Tỷ lệ nảy mầm ở các lô hạt được xử lý với nano ZnO nồng độ 25 mg/L và 500 mg/L lần lượt là 39,47% và 49,33%, đạt cao nhất (57,62%) ở nồng độ 50 mg/L; trong khi lô đối chứng chỉ đạt 39,19%. Đến thời điểm 24 h và 48 h, tỷ lệ nảy mầm ở lô đối chứng và các lô xử lý với dung dịch nano ZnO không có sự khác biệt rõ rệt. Mặc dù, tốc độ nảy mầm ở các lô xử lý với nano ZnO 50 mg/L và 500 mg/L vẫn cao hơn so với lô đối chứng. Tốc độ nảy mầm của hạt đạt cao nhất ở lô xử lý với nano ZnO 50 mg/L (GR= 0,364) (Bảng 1).

Tương tự như nano ZnO, sự tác động của nano Co đến tỷ lệ nảy mầm cũng chỉ được thể hiện rõ nhất ở mốc 15 h sau khi xử lý. Trong các nồng độ thử nghiệm, nano Co với nồng độ thấp nhất 0,05 mg/L cho tỷ lệ nảy mầm và tốc độ nảy mầm cao nhất (50%, GR= 0,310), cao hơn so với lô đối chứng (39,19%, GR= 0,296) (Bảng 2).

Bảng 2. Ảnh hưởng của hạt nano ZnO và nano Co đến tỷ lệ nảy mầm và tốc độ nảy mầm của hạt.

Lô thí nghiệm	Nồng độ (mg/L)	Tỷ lệ nảy mầm (X%)			Tốc độ nảy mầm (GR)
		15 h	24 h	48 h	
Đối chứng	0	39,19 ^a	80,26 ^a	93,42 ^a	0,296
	25	39,47 ^a	75,16 ^a	91,58 ^a	0,27
Nano ZnO	50	57,62 ^c	82,27 ^a	94,74 ^a	0,364
	500	49,33 ^b	76,78 ^a	92,17 ^a	0,308
	0,05	50,00 ^b	80,41 ^a	95,36 ^a	0,310
Nano Co	0,5	40,00 ^a	79,80 ^a	92,17 ^a	0,306
	2,5	40,79 ^a	80,54 ^a	94,12 ^a	0,295

Ghi chú: Số liệu trong mỗi ô thể hiện giá trị trung bình của 3 lần lặp lại thí nghiệm; các chữ cái a,b,c trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các lô thí nghiệm và lô đối chứng với $p < 0,05$.

Như vậy, nano ZnO và nano Co có tác động thúc đẩy hạt nảy mầm sớm hơn so với đối chứng. Kết quả thu được cũng phù hợp với một số công bố trước đây. Cụ thể, Prasad *et al.*, (2012), sử dụng hợp chất nano ZnO để xử lý với hạt lạc trước khi gieo với những liều lượng khác nhau, đã xác định ở liều lượng 1000 ppm làm gia tăng tỷ lệ nảy mầm, sức sống cây con và năng suất cao hơn 34% so với nghiệm thức xử lý với muối kẽm sulfate. Gần đây, Ngo Quoc Buu *et al.*, (2014) cũng cho thấy, xử lý hạt giống đậu tương ĐT51 với nano Co làm tăng tỷ lệ nảy mầm 25% so với đối chứng.

Ảnh hưởng của hạt nano ZnO và nano Co đến sự phát triển của rễ mầm đậu tương

Rễ là một cấu trúc quan trọng cần thiết cho sự sống còn của thực vật. Đặc biệt trong giai đoạn nảy mầm, sự phát triển rễ mầm đảm bảo cho cây bắt đầu hấp thu được nước và các chất dinh dưỡng từ đất để sinh trưởng và phát triển. Kết quả phân tích hình thái và tốc độ phát triển rễ mầm đậu tương cho thấy ở các lô xử lý với hạt nano ZnO và nano Co, rễ mầm xuất hiện sớm hơn và phát triển nhanh hơn so với lô đối chứng.

Đối với hạt nano ZnO, sau 15 h chiều dài rễ mầm đạt từ 8,82 – 9,26 mm, trong khi đối chứng chỉ đạt 7,53 mm. Có thể nhận thấy, sự phát triển rễ mầm tỷ lệ thuận với nồng độ xử lý nano ZnO. Ở nồng độ thử nghiệm thấp nhất đối với nano ZnO 25 mg/L, chiều dài rễ mầm dài hơn đáng kể (8,82 mm) so với đối chứng (7,53 mm). Chiều dài rễ mầm đạt cao nhất (9,26 mm) ở nồng độ nano ZnO thử nghiệm cao nhất là 500 mg/L. Sau 18 h, chiều dài rễ mầm ở lô hạt

được xử lý với nano ZnO đạt 10,81 -10,96 mm cao hơn nhiều so với đối chứng (8,98 mm). Từ 21 đến 24 h, tốc độ tăng trưởng của rễ mầm dưới tác dụng của nano ZnO vẫn được duy trì và cao hơn so với đối chứng. Chiều dài rễ mầm đạt 15,51 mm với nồng độ nano ZnO 500 mg/L, trong khi chiều dài rễ mầm ở lô đối chứng chỉ có 12,56 mm (Bảng 3).

Đối với hạt nano Co, ở thời điểm 15 h chiều dài rễ mầm cao nhất (9,10 mm) ở nồng độ nano Co thử nghiệm nhỏ nhất 0,05 mg/L; ở nồng độ 0,5 mg/L và 2,5 mg/ chiều dài rễ mầm lần lượt đạt 8,46 mm; 8,52 mm; cao hơn nhiều so với đối chứng (7,53 mm). Đến thời điểm 18 giờ, tốc độ tăng trưởng rễ mầm ở lô hạt được xử lý với nano Co bị chậm lại so với lô xử lý với nano ZnO nhưng chiều dài rễ mầm vẫn đạt 9,34 mm, cao hơn so với đối chứng (8,98 mm). Từ 21 giờ đến 24 h, chiều dài rễ mầm ở lô xử lý với nano Co 0,05 mg/L đạt 13,54 mm; cao hơn 2 nồng độ nano Co còn lại (12,55 mm và 13,21 mm) và đối chứng (12,56 mm) (Bảng 3).

Các kết quả nghiên cứu trên đã khẳng định, tác động của nano ZnO và nano Co sử dụng trong nghiên cứu có vai trò trong việc thúc đẩy sự nảy mầm hạt tương và sự phát triển của rễ mầm ít nhất trong vòng 24 h sau khi xử lý hạt giống và gieo hạt trong điều kiện nảy mầm. Nano ZnO thể hiện tác động tốt hơn nano Co đối với sự tăng trưởng của rễ mầm. Trong các nồng độ thử nghiệm, nano ZnO 50 mg/L và 500 mg/L, nano Co 0,05 mg/L thể hiện tác động tốt nhất đối với sự phát triển rễ mầm đậu tương.

Bảng 3. Ảnh hưởng của hạt nZnO và nCo đến chiều dài rễ mầm đậu tương.

Lô thí nghiệm	Nồng độ (mg/L)	Chiều dài rễ mầm (mm)			
		15 h	18 h	21 h	24 h
Đối chứng	0	7,53 ^a	8,98 ^a	10,65 ^a	12,56 ^a
	25	8,82 ^b	10,38 ^{bc}	12,50 ^b	15,11 ^b
Nano ZnO	50	9,08 ^{bc}	10,96 ^c	12,84 ^{bc}	15,18 ^b
	500	9,26 ^c	10,81 ^c	13,06 ^c	15,51 ^c
	0,05	9,10 ^c	9,34 ^b	11,12 ^a	13,54 ^a
Nano Co	0,5	8,46 ^b	8,90 ^a	10,14 ^a	12,55 ^a
	2,5	8,52 ^b	9,12 ^a	11,12 ^a	13,21 ^a

Ghi chú: Số liệu trong mỗi ô thể hiện giá trị trung bình của 30 mẫu; các chữ cái a,b,c trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các lô thí nghiệm và lô đối chứng với p<0,05.

Ảnh hưởng của hạt nano ZnO và nano Co đến mức độ biểu hiện của một số gen liên quan đến quá trình nảy mầm của hạt

Sự nảy mầm của hạt là một quá trình sinh lý phức tạp, được điều khiển bởi các yếu tố bên ngoài

như nhiệt độ, ánh sáng, độ ẩm,... và các yếu tố bên trong như nồng độ của các hormone thực vật (Miransari, 2014). Các yếu tố môi trường và tín hiệu hormone có sự tương tác với nhau để điều khiển quá trình nảy mầm thông qua việc điều khiển sự hoạt

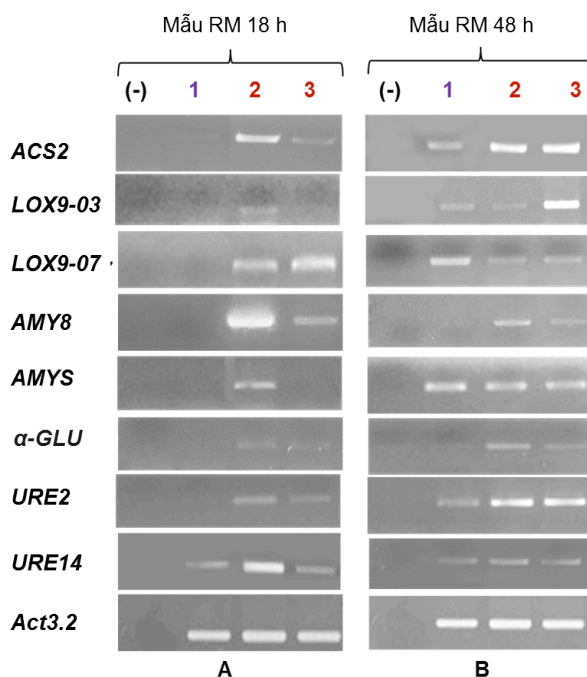
động của các gen liên quan (Chen *et al.*, 2008). Để tìm hiểu tác động của việc xử lý nano kim loại tới khả năng nảy mầm và phát triển rễ mầm ở đậu tương, bước đầu 8 gen mã hóa cho các enzyme đóng vai trò quan trọng trong quá trình nảy mầm ở giai đoạn sớm được lựa chọn: Gen mã hóa enzyme Aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase, Lipoxygenase, Urease, β -amylase và Alpha-glucan dikinase. Mẫu rễ mầm của các lô thí nghiệm tại hai mốc 18 h và 48 h được lựa chọn để phân tích mức độ biểu hiện của 8 gen trên.

Việc xử lý hạt đậu tương trước khi gieo với dung dịch nano ZnO 50 mg/L và nano Co 0,05 mg/L làm tăng cường sự biểu hiện của 8 gen nghiên cứu ở các mẫu rễ mầm giai đoạn 18 h và 48 h tuổi (Hình 1). Ở mẫu rễ mầm 18 h, biểu hiện của các gen *ACS2*, *LOX9-07*, *AMY8*, α -*GLU*, *URE02* ở các lô xử lý với dung dịch nano ZnO và nano Co đều được tăng cường trong khi mẫu đối chứng không xử lý nano cả 5 gen đều không biểu hiện. Đặc biệt, 2 gen *LOX9-03* và *AMYS* chỉ biểu hiện ở mẫu rễ mầm của lô xử lý với nano ZnO 50 mg/L. Mức độ biểu hiện của các gen *ACS2*, *UMY8* và *URE14* đều được tăng cường biểu hiện rõ rệt ở lô xử lý với nano ZnO 50 mg/L, so

với nano Co 0,05 mg/L và lô đối chứng (Hình 1A).

Đối với mẫu rễ mầm 48 h, hầu hết các gen phân tích đều được biểu hiện mạnh ở cả 2 lô xử lý với dung dịch nano, so với lô đối chứng (trừ gen *LOX9-07* không có sự khác biệt). Mức độ biểu hiện của gen *AMYS* ở lô xử lý và không xử lý nano là tương đương (Hình 1B).

Các kết quả trên cho thấy, ảnh hưởng của mỗi loại hạt nano kim loại đến sự biểu hiện gen của cùng một gen có sự phân hóa rõ rệt. Hạt nano ZnO và nano Co đã có tác động tích cực làm tăng cường mức độ biểu hiện của 8 gen mã hóa các enzyme có vai trò quan trọng trong quá trình nảy mầm là *ACS2*, *LOX9-03*, *LOX9-07*, *AMY8*, *AMYS*, α -*GLU*, *URE02* và *URE14* ở giai đoạn sớm. Đây có thể là một trong những nguyên nhân làm đẩy nhanh tốc độ nảy mầm và sự phát triển rễ mầm ở các lô xử lý với hạt nano. Theo Landa *et al.*, (2012), nano ZnO 100 mg/L có tác động tăng cường biểu hiện của 660 gen và làm giảm mức độ biểu hiện của 826 gen ở rễ cây *Arabidopsis thaliana*; các gen được tăng cường biểu hiện chủ yếu là gen liên quan đến khả năng chống chịu điều kiện bất lợi.



Hình 1. Ảnh hưởng của hạt nano ZnO và nano Co đến mức độ biểu hiện của một số gen ở các mẫu rễ mầm đậu tương 18 h (A) và 48 h tuổi (B). 1. Mẫu đối chứng không xử lý nano, 2. Nano ZnO 50mg/L, 3. Nano Co 0,05 mg/L. *ACS2*: Aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase 2, *LOX9-03*: Lipoxygenase 3, *LOX9-07*: Lipoxygenase 7, *AMY8*: Amylase 8, *AMYS*: Saccharogen amylase, α -*GLU*: Alpha-glucan dikinase, *URE2*: Urease 2, *URE14*: Urease 14; (-): Đối chứng âm cho PCR.

KẾT LUẬN

Hai loại hạt nano ZnO và nano Co sử dụng trong nghiên cứu có tác động tích cực đến quá trình nảy mầm ở đậu tương giống ĐT26 như tăng tỷ lệ nảy mầm và tốc độ nảy mầm của hạt, kích thích sự phát triển rễ mầm và không làm ảnh hưởng đến sự phát sinh hình thái rễ mầm. Trong các nồng độ thử nghiệm, nano ZnO 50 mg/L và nano Co 0,05 mg/L cho hiệu quả tăng cường tốt nhất. Đặc biệt, kết quả phân tích gen đã cho thấy việc xử lý với nano nồng độ thích hợp đã ảnh hưởng đến mức độ biểu hiện của 8 gen mã hóa cho các enzyme quan trọng ở giai đoạn nảy mầm là *ACS2*, *LOX9-03*, *LOX9-07*, *AMY8*, *AMYS*, *α -GLU*, *URE02* và *URE14*.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu được hoàn thành với sự tài trợ kinh phí của Dự án KHCN trọng điểm cấp Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam “Nghiên cứu ứng dụng công nghệ nano trong nông nghiệp” (mã số VAST.TĐ.NANO-NN/15-18).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Areeba F, Heena F, Asad A, Abudul M, Adnan A, Iffat Z A (2016) Role of nanoparticles in growth and development of plants: A review. *Int J Pharm Bio Sci* 7(4): 22–37.

Chen H, Zhang J, Neff MM, Hong S W, Zhang H, Deng XW, Xiong L (2008) Integration of light and abscisic acid signaling during seed germination and early seedling development. *Proc Natl Acad Sci USA* 105(11): 4495–4500.

Corbineau F, Xia Q, Bailly C, El-Maarouf-Bouteau H (2014) Ethylene, a key factor in the regulation of seed dormancy. *Front Plant Sci*: 5.

Clough SJ, Bent A F (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 16(6): 735–743.

Dowling A, Clift R, Grobert N, Hutton D, Oliver R, O'Neill O, Seaton A (2004) *Nanoscience and nanotechnologies: opportunities and uncertainties*. Royal Society and Royal Academy of Engineering, London.

Han C, Yin X, He D, Yang P (2013) Analysis of proteome profile in germinating soybean seed, and its comparison with rice showing the styles of reserves mobilization in different crops. *PLoS One* 8(2): e56947.

Maslobrod SN, Mirgorod YA, Borodina VG, Borsch NA. (2013) Stimulation of seed viability by means of dispersed solutions of copper and silver nanoparticles. *J Nano*

Electron Phys 5(4): 4018–1.

Miransari M, Smith DL (2014). Plant hormones and seed germination. *Environ Exp Bot* 99: 110–121.

Moraru CI, Panchapakesan CP, Huang Q, Takhistov P, Sean L, Kokini JL (2003) Nanotechnology: a new frontier in food science. *Food Technol* 57(12): 24–29.

Ngo Quoc Buu, Dao Trong Hien, Nguyen Hoai Chau, Tran Xuan Tin, Nguyen Tuong Van, Khuu Thuy Duong, Huynh Thi Ha (2014) Effects of nanocrystalline powders (Fe, Co and Cu) on the germination, growth, crop yield and product quality of soybean (Vietnamese species DT-51). *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology* 5(1): 015016.

Panwar J, Jain N, Bhargaya A, Akhtar MS, Yun YS (2012) Positive effect of zinc oxide nanoparticles on tomato plants: A step towards developing nano-fertilizers. In *Proceedings of 3rd International Conference on Environmental Research and Technology (ICERT)*: 348–352.

Palit S, Sharma A, Talukder G (1994) Effects of cobalt on plants. *Botanic Rev* 60(2): 149–181.

Prasad TNKV, Sudhakar P, Sreenivasulu Y, Latha P, Munaswamy V, Reddy KR, Pradeep T (2012) Effect of nanoscale zinc oxide particles on the germination, growth and yield of peanut. *J Plant Nutr* 35(6): 905–927.

Landa P, Vankova R, Andriova J, Hodek J, Marsik P, Storchova H, Vanek T (2012) Nanoparticle-specific changes in *Arabidopsis thaliana* gene expression after exposure to ZnO, TiO₂ and fullerene soot. *J Hazard Mat* 241: 55–62.

Luong Thien Nghia, Hoang Thanh Tung, Nguyen Phuc Huy, Vu Quoc Luan, Duong Tan Nhut (2017) The effects of silver nanoparticles on growth of *Chrysanthemum morifolium* Ramat. cv." JIMBA" in different cultural systems. *Vietnam J Sci Technol* 55(4): 513.

Rio DC, Ares M, Hannon GJ, Nilsen TW (2010) Purification of RNA using TRIzol (TRI reagent). *Cold Spring Harbor Protocols*, 2010(6): pdb-prot5439.

Roduner E (2006) Size matters: Why nanomaterials are different. *Chem Soc Rev* 35(7): 583–592.

Ruttkey-Nedecky B, Krystofova O, Nejdil L, Adam V (2017) Nanoparticles based on essential metals and their phytotoxicity. *J Nanobiotechnol* 15(1): 33.

Salimi S (2015) Evaluation of soybean genotypes (*Glycine max* L.) to drought tolerance at germination stage. *Res J Environ Sci* 9(7): 349.

Sayadiazar Z, Mohammadzadeh M, Morsali R, Aghaee A (2016) The effect of nano-micronutrients seed priming on germinability of Kabuli chickpea. *Curr Opin Agricult* 5(1): 24.

EFFECTS OF NANOPARTICLES ZINC OXIDE AND NANO COBALT ON THE GERMINATION OF SOYBEAN (*GLYCINE MAX* (L.) MERR)

Phạm Thị Hoè¹, Tran My Linh¹, Nguyen Tuong Van², Ngo Quoc Buu³, Nguyen Chi Mai¹, Le Quynh Lien¹, Ninh Khắc Ban¹, Le Thi Thu Hien⁴, Nguyen Hoai Chau³

¹*Institute of Marine Biochemistry, Vietnam Academy of Science and Technology*

²*Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology*

³*Institute of Environmental Technology, Vietnam Academy of Science and Technology*

⁴*Institute of Genome Research, Vietnam Academy of Science and Technology*

SUMMARY

Nowaday, nanotechnology and nanomaterials have been applied widely as stimulators and micronutrients in agricultural production to increase productivity and quality of important crops. In order to promote the efficiency and stable use of nano metal products for such purpose in Vietnam, several studies have focused on evaluating new metal nanoparticles in different plant species. In this study, the effects of zinc oxide (ZnO) and cobalt (Co) nanoparticles on germination of soybean (*Glycine max* (L.) Merr), an important crop in Vietnam, were assessed through germination rate, root growth and the expression of important genes. The results showed that DT26 soybean seeds treated with metal nanoparticles at extremely low concentrations accelerated the germination rate and enhanced root growth, however did not affect morphogenesis. Nanoparticles of ZnO of 50 mg/L and Co of 0.05 mg/L provided the highest effect on both germination and root growth. Expression analysis of genes encoding key enzymes in germination process of soybean such as: Aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase 2 (*ACS2*), Lipoxygenase 3 (*LOX9-03*), Lipoxygenase 7 (*LOX9-07*), Amylase 8 (*AMY8*), Saccharogen amylase (*AMYS*), Alpha-glucan dikinase (*α-GLU*), Urease 2 (*URE02*), Urease 14 (*URE14*) indicated that the expression of most studied genes were increased significantly in primary roots of nano treated seeds compared to the control. The obtained results can be a scientific evident to support the application of nano products in agricultural practice.

Keywords: Cobalt nanoparticle, seed germination, soybean cultivar DT26, zinc oxide nanoparticle.