

TÁC ĐỘNG CỦA NANO BẠC LÊN SỰ HẠN CHẾ KHÍ ETHYLENE VÀ HOẠT ĐỘNG ENZYME THỦY PHÂN TRONG VI NHÂN GIỐNG CÂY HOA HỒNG (*Rosa hybrida* L. ‘Baby Love’)

Hà Thị Mỹ Ngân^{1,2}, Hoàng Thanh Tùng², Ngô Đại Nghiệp¹, Bùi Văn Lệ¹, Dương Tấn Nhựt² ✉

¹Trường Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

²Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

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

Ngày nhận bài: 12.02.2019

Ngày nhận đăng: 17.9.2019

TÓM TẮT

Vi nhân giống cây hoa hồng (*Rosa hybrida* L. ‘Baby Love’) thường gặp phải một số hiện tượng bất thường như vàng lá, rụng lá, thùy tinh thể... Những hiện tượng này gây ảnh hưởng đến chất lượng của các chồi nuôi cấy cũng như tỉ lệ sống của cây khi chuyển ra điều kiện vườn ươm. Nguyên nhân là do sự tích tụ của khí ethylene trong bình nuôi cấy kín, dẫn đến sự gia tăng hoạt độ của enzyme cellulase và pectinase làm phá vỡ sự liên kết của thành tế bào và cảm ứng cho sự rụng cơ quan xảy ra. Trong nghiên cứu này, tác động của nano bạc (AgNPs) lên việc khắc phục những hiện tượng bất thường trên cũng như ảnh hưởng của nó lên sự sinh trưởng và phát triển của chồi và cây hoa hồng nuôi cấy *in vitro* được đánh giá. Kết quả sau 6 tuần nhân chồi *in vitro* cho thấy việc bổ sung 2 ppm AgNPs cho hiệu quả nhân chồi tối ưu với các chỉ tiêu về số chồi/mẫu (6,67 chồi), chiều cao chồi (3,06 cm), khối lượng tươi (451,00 mg), khối lượng khô (58,33 mg), SPAD (32,28) và tỷ lệ tích lũy chất khô (12,93%) cao hơn so với đối chứng không sử dụng AgNPs. Bổ sung 3 ppm AgNPs vào môi trường nuôi cấy ra rễ *in vitro* giúp cây con sinh trưởng, phát triển tốt, hạn chế hiện tượng vàng lá và rụng lá với các chỉ tiêu về chiều cao cây (3,06 cm), số lá (6,33), chiều dài lá (1,50 cm), chiều rộng lá (1,50 cm), khối lượng tươi (137,67 mg), khối lượng khô (13,00 mg), số rễ (4,33), SPAD (39,37), tỷ lệ tích lũy chất khô (9,40%), sự tích lũy khí ethylene (C₂H₄) trong bình nuôi cấy (0,30 ppm), hoạt độ enzyme cellulase (0,14 UI/mL) và hoạt độ enzyme pectinase (0,40 UI/mL) tốt hơn so với các nghiệm thức còn lại và có sự khác biệt rõ rệt so với đối chứng sau 4 tuần nuôi cấy. Ngoài ra, cây con từ nghiệm thức này cũng cho tỷ lệ sống cao (93,33%) khi chuyển ra điều kiện vườn ươm. Mặt khác, 5 ppm AgNPs cảm ứng hiện tượng ra hoa *in vitro* sớm ở cây hoa hồng nuôi cấy *in vitro*. Tuy nhiên, khi sử dụng AgNPs ở nồng độ cao (7 ppm) đã ức chế sự sinh trưởng, phát triển, gây độc và thậm chí gây chết các chồi nuôi cấy.

Từ khóa: Cellulase, ethylene, hoa hồng, pectinase, rụng lá.

GIỚI THIỆU

Hoa hồng (*Rosa hybrida* L. ‘Baby Love’) thuộc chi *Rosa*, họ Rosaceae, là một trong những loài hoa trang trí phổ biến nhất. Hiện nay, ngoài được trồng chậu, hoa hồng còn là hoa cắt cành thương mại quan trọng có giá trị kinh tế cao. Hoa hồng thường được nhân giống bằng phương pháp giâm cành, ghép hoặc gieo hạt, tuy nhiên hiệu quả nhân giống thấp, tiềm ẩn nguy cơ thoái hóa giống và lây lan sâu bệnh hại... (Senapati, Rout, 2008). Kỹ thuật nhân giống *in vitro* đã giúp khắc phục những hạn chế của phương pháp nhân giống truyền thống, giúp tạo ra số lượng lớn cây giống sạch bệnh, đồng nhất về mặt di truyền và không phụ thuộc mùa vụ, có thể đáp ứng được nguồn

cây giống quanh năm (Bhojwani, Dantu, 2013). Bên cạnh rất nhiều lợi ích thì phương pháp vi nhân giống hoa hồng với những đặc trưng như điều kiện nuôi cấy kín, ánh sáng, nhiệt độ, môi trường dinh dưỡng đặc biệt, độ ẩm cao và sự tích lũy khí ethylene trong bình nuôi cấy đã gây nên hiện tượng thùy tinh thể, vàng và rụng lá chồi hoa hồng *in vitro*, tác động xấu đến sự sinh trưởng, phát triển và giảm tỷ lệ sống của cây con hoa hồng khi chuyển ra vườn ươm (Khosh-Khui, Teixeira da Silva, 2006).

Trong vi nhân giống thực vật, rụng cơ quan, đặc biệt là rụng lá ở các chồi nuôi cấy là tiến trình không mong muốn và thường liên quan tới tác động của khí ethylene và auxin. Thực vật tổng hợp ethylene sử

dùng một con đường sinh hóa với hai bước bắt đầu từ S-adenosyl-L-methionine (SAM). SAM được chuyển thành ACC (l-aminocyclo-propane carboxylic acid) bằng enzyme ACC synthase (ACS). ACC sau đó được chuyển thành ethylene bởi enzyme ACC oxidase (ACO) (Chang, 2016). Trong vi nhân giống hoa hồng, ethylene là yếu tố quan trọng điều khiển sự rụng lá (Brown, 1997) thông qua sự kích thích tạo nên các enzyme thủy phân với hai đại diện chính là pectinase và cellulase sẽ phá vỡ sự liên kết của thành tế bào và cảm ứng cho sự rụng cơ quan xảy ra (Greenberg *et al.*, 1975; MacDonald *et al.*, 2011). Bên cạnh đó, sự tích tụ khí ethylene trong bình nuôi cấy còn gây nên hiện tượng thủy tinh thể ở các chồi nuôi cấy, gây những bất thường về hình thái và cấu trúc giải phẫu của thực vật cũng như làm giảm tỷ lệ sống ở giai đoạn vườn ươm (Phan, Letouze, 1983).

Bạc (Ag) là một kim loại không được bổ sung thường quy vào môi trường nuôi cấy như một yếu tố dinh dưỡng mà chỉ được thêm vào trong ngăn ngừa một số tác nhân vi sinh, khắc phục các hiện tượng bất thường trong vi nhân giống thực vật dưới dạng ion Ag^+ trong muối nitrat bạc ($AgNO_3$), bạc thiosulfat (Ag_2SO_4). Ion Ag^+ có thể ngăn ngừa sự tổng hợp và hoạt động của khí ethylene bằng cách làm đảo lộn vùng bám dính ở thụ thể của ethylene. Thụ thể ETR1 có thể liên kết với ethylene thông qua một trung tâm hoạt động là tiểu phần có 1 ion đồng (Cu^{2+}). Sự thay thế Cu^{2+} bằng Ag^+ khiến cho thụ thể không thể liên kết với ethylene và ngăn ngừa các tín hiệu ức chế của ethylene lên thực vật (Kumar *et al.*, 2009). Với kích thước cực kì nhỏ (1 - 100 nm), AgNPs đã cho thấy hiệu quả tác động và hoạt tính cao hơn so với các vật liệu khối ở kích thước ion (Yin *et al.*, 2011). Do đó, AgNPs hiện nay đang được ứng dụng trong rất nhiều lĩnh vực của khoa học và công nghệ. Trong vi nhân giống thực vật, AgNPs đã được chứng minh là có khả năng kháng lại các tác nhân vi sinh (nấm, vi khuẩn...) (Sarmast *et al.*, 2011; Arab *et al.*, 2014; Spinoso-Castillo *et al.*, 2017) và ức chế hoạt động của khí ethylene, cải thiện sinh trưởng, phát triển và chất lượng cây giống (Sarmast *et al.*, 2015; Thao *et al.*, 2015). Tuy nhiên, cho đến nay các nghiên cứu về sử dụng AgNPs để ức chế sự hình thành enzyme thủy phân cellulase, pectinase cũng như xác định hàm lượng khí ethylene tích tụ trong bình nuôi cấy vẫn còn rất hạn chế. Vì vậy, nghiên cứu này được tiến hành nhằm mục đích xác định nồng độ AgNPs tối ưu cho sự tăng trưởng, phát triển và khắc phục hiện tượng vàng lá, rụng lá, thủy tinh thể của chồi hoa hồng nuôi cấy *in vitro* thông

qua khả năng ức chế hoạt động của khí ethylene, giảm hoạt độ enzyme cellulase và pectinase.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Vật liệu thực vật

Các chồi hoa hồng (*Rosa hybrida* L. 'Baby Love') *in vitro* 6 tuần tuổi tách từ cụm chồi nuôi cấy trên môi trường MS (Murashige, Skoog, 1962) bổ sung 8 g/L agar, 30 g/L đường được sử dụng làm nguồn mẫu. Chồi khỏe mạnh, có độ đồng đều cao và 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

AgNPs với kích thước nhỏ hơn 20 nm dưới dạng dung dịch và được thiết lập theo tỷ lệ: $[AgNO_3] = 750 - 1000$ ppm, $[\beta\text{-chitozan}] = 250 - 300$ ppm, $[NaBH_4] = 200$ ppm, tỷ lệ mol $[NaBH_4]/[AgNO_3] = 1/4$, tốc độ nhỏ giọt của $NaBH_4$ là 10 - 12 giọt/min, do Viện Công nghệ môi trường cung cấp (Chau *et al.*, 2008).

Môi trường và điều kiện nuôi cấy

Môi trường MS cơ bản, 1/2 MS (môi trường MS cơ bản giảm đa lượng một nửa) bổ sung 8 g/L agar, 30 g/L sucrose, AgNPs với các nồng độ khác nhau và các chất điều hòa sinh trưởng tùy thuộc từng mục đích thí nghiệm được sử dụng làm môi trường cho các thí nghiệm nuôi cấy *in vitro*. Môi trường nuôi cấy được điều chỉnh về pH = 5,8 trước khi được hấp khử trùng ở nhiệt độ 121°C, áp suất 1atm trong thời gian 30 min. Mẫu được nuôi cấy tại phòng nuôi với nhiệt độ $25 \pm 2^\circ C$, độ ẩm 55-60%, sử dụng ánh sáng đèn huỳnh quang với cường độ $40-45 \mu mol.m^{-2}.s^{-1}$, thời gian chiếu sáng 16h/ngày.

Phương pháp

Nhân chồi *in vitro*

Chồi cây hoa hồng *in vitro* được cắt bỏ đỉnh, sau đó cắt thành các đốt (1 cm) và cấy lên môi trường MS có bổ sung 1,5 mg/L BA, 0,2 mg/L NAA (Senapati, Rout, 2008) và AgNPs với các nồng độ khác nhau (1; 2; 3; 5; 7 ppm). Đối chứng là môi trường MS không bổ sung AgNPs. Sau 6 tuần nuôi cấy, các chỉ tiêu về sinh trưởng và phát triển của chồi được đánh giá: số chồi/mẫu, chiều cao chồi (cm), chiều dài lá (cm), chiều rộng lá (cm), khối lượng tươi

(mg), khối lượng khô (mg), SPAD (chỉ số chlorophyll) và tỷ lệ tích lũy chất khô.

Ra rễ *in vitro*

Các chồi đơn hoa hồng *in vitro* cao khoảng 1,5 cm được nuôi cấy trên môi trường ½ MS bổ sung 0,2 mg/L IBA (Senapati, Rout, 2008) và AgNPs với các nồng độ khác nhau (1; 2; 3; 5; 7 ppm). Đối chứng là các chồi nuôi cấy trên môi trường không bổ sung AgNPs. Sau 4 tuần nuôi cấy, các chỉ tiêu về sinh trưởng và phát triển của cây con được đánh giá: chiều cao cây (cm), chiều dài rễ (cm), số rễ/cây, số lá/cây, chiều dài lá (cm), chiều rộng lá (cm), khối lượng tươi (mg), khối lượng khô (mg), SPAD, tỉ lệ tích lũy chất khô, hàm lượng khí ethylene (ppm), hoạt độ enzyme cellulase và pectinase (UI/mL).

Thuần hóa ở điều kiện vườn ươm

Cây con *in vitro* sinh trưởng và phát triển tốt từ thí nghiệm tạo cây hoàn chỉnh được thu nhận, rửa sạch agar và sau đó được trồng trên giá thể đất perlite trong chậu nhựa ở vườn ươm với điều kiện nhiệt độ ban ngày $25 \pm 2^\circ\text{C}$ và $15 \pm 2^\circ\text{C}$ vào ban đêm, độ ẩm trung bình 75-80%, sử dụng ánh sáng tự nhiên có che sáng 40%. Tỷ lệ sống (%) và các chỉ tiêu sinh trưởng như chiều cao cây (cm), số lá/cây, chiều dài lá (cm), chiều rộng lá (cm) và SPAD được theo dõi nhằm đánh giá chất lượng của cây giống *in vitro* dưới tác động của AgNPs sau 4 tuần thuần dưỡng.

Đo hàm lượng khí ethylene trong bình nuôi cấy

Hàm lượng khí ethylene tích lũy trong bình nuôi cấy cây hoa hồng *in vitro* được xác định bằng phương pháp sắc kí khí (GC) với đầu dò ion hóa ngọn lửa (FID). Tiến hành thu nhận 1 cm³ (1 mL) khí từ bình nuôi cấy bằng một ống tiêm không rò rỉ khí, lượng khí này sau đó được bơm vào GC bằng phương pháp thủ công. Hệ thống GC sử dụng một cột thép không gỉ (3 m × 1,5 mm) chứa đầy Porapack R (chất hấp phụ) có kích thước hạt 80 - 100 Mesh; nhiệt độ phát hiện cột (60°C), kim phun (90°C) và ngọn lửa ion hóa (90°C); độ nhạy điện kế 1×10^{-12} Am/V; khí ni tơ (N₂) được sử dụng làm khí mang (55 cm³/min) (Cristescu *et al.*, 2012). Hệ thống GC (GC – CP 3380), ống tiêm (BD Tuberculin syringe 1 mL), kim tiêm (BD PrecisionGlide Needle) và miếng dán ngăn rò rỉ khí chuyên dụng được sử dụng cho thí nghiệm này.

Xác định hoạt độ enzyme cellulase

Phương pháp này dựa vào sự thủy phân cơ chất carboxymethyl cellulose (CMC) bởi enzyme cellulase, lượng đường khử sinh ra sau đó sẽ tham gia vào phản ứng tạo màu với 3,5-Dinitrosalicylic acid (DNS), màu sinh ra sau phản ứng được xác định bằng phương pháp so màu trên máy quang phổ ở bước sóng 540 nm. Một đơn vị hoạt độ cellulase được tính bằng số μg glucose tạo ra bởi 1 mL dịch enzyme được ủ ở 40°C trong 15 min (Zhang *et al.*, 2009), sau đó dựa theo đường chuẩn glucose để tính nồng độ đường khử sinh ra theo công thức:

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

Trong đó,

H: Hoạt độ enzyme (UI/mL)

C: Nồng độ glucose tạo ra ($\mu\text{g/mL}$)

V: Tổng thể tích phản ứng (mL)

L: Độ pha loãng

v: Thể tích dịch enzyme cho vào phản ứng (mL)

t: Thời gian ủ (min)

Xác định hoạt độ enzyme pectinase

Cây hoa hồng nuôi cấy *in vitro* (1 g) được nghiền trong đệm, sau đó tiến hành lọc và thu được dịch chiết enzyme. Dịch chiết này được tác dụng với cơ chất là pectin, sản phẩm tạo thành là acid D-galacturonic được hiện màu với thuốc thử DNS và đem đo mật độ quang ở bước sóng 575 nm, một đơn vị hoạt độ pectinase là số μmol acid D-galacturonic được tạo ra bởi 1 mL dịch enzyme ở 37°C trong 60 min (Vatanparast *et al.*, 2014). Dựa theo đường chuẩn acid D-galacturonic để tính nồng độ đường khử sinh ra:

$$H \text{ (UI/mL)} = \frac{C.V.L}{v.t}$$

Trong đó

H: Hoạt độ enzyme (UI/mL)

C: nồng độ acid D-galacturonic tạo ra ($\mu\text{mol/mL}$)

L: độ pha loãng

V: tổng thể tích phản ứng (mL)

v: thể tích dịch enzyme cho vào phản ứng (mL)

t: thời gian ủ (min)

Hàm lượng chlorophyll (chl) trong lá được đo bằng máy SPAD-502 (Minolta Co., Ltd., Osaka, Nhật Bản)

Tỉ lệ tích lũy chất khô (TLCK) được tính bằng công thức:

$$\text{Tỉ lệ tích lũy chất khô (\%)} = \frac{\text{Khối lượng khô mẫu}}{\text{Khối lượng tươi mẫu}} \times 100 \%$$

Xử lý số liệu

Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần với 10 bình nuôi cấy (bình thủy tinh 250 mL chứa 40 mL môi trường). 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 $P \leq 0,05$ (Duncan, 1955).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Ảnh hưởng của AgNPs lên sự sinh trưởng và khả năng nhân nhanh chồi hoa hồng nuôi cấy *in vitro*

Sau 6 tuần nuôi cấy, kết quả ghi nhận được cho

thấy khả năng nhân chồi và sự tăng trưởng của chồi trên môi trường có bổ sung AgNPs ở các nồng độ khác nhau có sự khác biệt so với đối chứng không bổ sung AgNPs. Hiệu quả nhân chồi đạt cao nhất ở nghiệm thức bổ sung 2 ppm AgNPs (6,67 chồi/mẫu), chồi ở nghiệm thức này cao, khỏe, lá to và có màu xanh đậm, không xuất hiện vàng lá, rụng lá (Hình 1A). Bên cạnh đó, các chỉ tiêu về sinh trưởng như chiều cao chồi (3,06 cm), chiều dài lá (1,17 cm), chiều rộng lá (0,70 cm), khối lượng tươi (451,00 mg) và khối lượng khô (58,33 mg) của chồi ở nghiệm thức này đều cao hơn so với đối chứng không bổ sung AgNPs và tối ưu nhất so với các nghiệm thức còn lại (Bảng 1).

Bảng 1. Ảnh hưởng của AgNPs lên quá trình nhân chồi hoa hồng *in vitro* sau 6 tuần nuôi cấy.

AgNPs (ppm)	Số chồi	Chiều cao chồi (cm)	Chiều dài lá (cm)	Chiều rộng lá (cm)	Khối lượng tươi (mg)	Khối lượng khô (mg)	SPAD	TLCK
0	3,00 ^{bc}	1,33 ^{cd}	0,50 ^c	0,43 ^b	171,00 ^d	10,00 ^d	24,50 ^c	5,84 ^e
1	3,33 ^{bc}	1,67 ^{bc}	0,63 ^{bc}	0,50 ^{ab}	194,67 ^c	16,67 ^c	24,77 ^c	8,55 ^c
2	6,67^a	3,06^a	1,17^a	0,70^a	451,00^a	58,33^a	32,28^a	12,93^a
3	4,00 ^b	1,83 ^b	0,83 ^b	0,57 ^{ab}	238,00 ^b	23,67 ^b	28,20 ^b	9,95 ^b
5	2,33 ^{cd}	1,23 ^{cd}	0,53 ^c	0,47 ^b	191,67 ^c	14,33 ^c	21,13 ^d	7,47 ^d
7	1,67 ^d	1,17 ^d	0,47 ^c	0,37 ^b	123,33 ^e	6,33 ^d	14,90 ^e	5,13 ^e

Ghi chú: (*) Những ký tự khác nhau (a, b, c...) trong cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa với độ tin cậy $P \leq 0,05$ trong phép thử Duncan.

Hàm lượng chl tổng trong lá (32,28) thu được khi chồi hoa hồng nuôi cấy trên môi trường có bổ sung 2 ppm AgNPs cao hơn rất nhiều so với đối chứng (24,50). Những kết quả này cho thấy AgNPs giúp cải thiện sinh trưởng, gia tăng hệ số nhân chồi và có vai trò quan trọng trong quá trình tổng hợp các sắc tố quang hợp giúp lá xanh tốt, chồi khỏe mạnh, không bị vàng lá, rụng lá (Hình 1C, D). Kết quả tương tự đã được báo cáo bởi Spinoso-Castillo và đồng tác giả (2017) khi sử dụng AgNPs trong vi nhân giống cây vani lá phẳng trong hệ thống ngập chìm tạm thời, kết quả cho thấy AgNPs ở nồng độ 25 – 50 mg/L giúp gia tăng số lượng, chiều cao chồi cũng như hàm lượng chl. Saeideh và Rashid (2014)

khi áp dụng 50 mg/L AgNPs trong quá trình nảy mầm hạt đậu xanh *ex vitro* đã giúp gia tăng đáng kể hàm lượng chl-tổng, chl-a, chl-b của lá và trọng lượng tươi của rễ nhưng không ảnh hưởng đến trọng lượng tươi chồi. Một số nghiên cứu còn cho thấy AgNPs hoạt động như một chất điều hòa tăng trưởng, giúp gia tăng tỉ lệ và khả năng nảy mầm cũng như sự sinh trưởng của thực vật (Sharon *et al.*, 2010).

Bên cạnh đó, số liệu ghi nhận được còn cho thấy tỉ lệ tích lũy chất khô của các chồi hoa hồng nuôi cấy trên môi trường có bổ sung 2 ppm AgNPs đạt cao nhất (12,93%) và cao gấp 2,21 lần so với đối chứng (5,84%) (Bảng 1). Trong vi nhân giống thực vật,

TLCK phản ánh mức độ tích lũy nước trong cơ thể thực vật, TLCK cao chứng tỏ thực vật sinh trưởng, phát triển tốt và không bị hiện tượng thủy tinh thể. Kết quả nghiên cứu cho thấy AgNPs không chỉ giúp cải thiện chất lượng chồi thông qua việc gia tăng các chỉ tiêu về sinh trưởng, phát triển mà còn giúp khắc phục hiện tượng thủy tinh thể các chồi nuôi cấy thông qua việc gia tăng trọng lượng khô của chồi (Hình 1B). Kết quả này tương tự như nghiên cứu của Homaei và Ehsanpour (2015) trên cây khoai tây nuôi cấy *in vitro*.

Kết quả thu được từ Bảng 1 cũng cho thấy, AgNPs khi sử dụng ở nồng độ cao (5 ppm, 7 ppm) thì tất cả các chỉ tiêu ghi nhận được đều giảm, đặc biệt ở nồng độ 7 ppm các chỉ tiêu này giảm đáng kể và thấp hơn so với đối chứng. AgNPs có vai trò tiềm

năng trong cải thiện chất lượng cây vi nhân giống, khắc phục một số hạn chế và hiện tượng bất thường trong nuôi cấy mô khi sử dụng ở nồng độ thích hợp; tuy nhiên, khi sử dụng ở nồng độ cao lại ức chế sự sinh trưởng và gây độc cho mẫu cấy (Razavizadeh, Rostami, 2015; Krupa-Malkiewicz *et al.*, 2018). Trong nuôi cấy *in vitro* cây vani lá phẳng, AgNPs ở nồng độ 25 và 50 mg/L đã kích thích sự tăng trưởng của chồi nuôi cấy, trong khi ức chế tăng trưởng đáng kể đã được phát hiện ở nồng độ 100 và 200 mg/L nano này (Spinoso-Castillo *et al.*, 2017). Qua đó cho thấy, AgNPs không những giúp gia tăng số lượng, chiều cao, chất lượng chồi mà còn giúp gia tăng hàm lượng diệp lục và tỉ lệ tích lũy chất khô; giữ chồi xanh tốt, khắc phục hiện tượng vàng lá và thủy tinh thể trong vi nhân giống cây hoa hồng trong nghiên cứu này.



Hình 1. Ảnh hưởng của AgNPs lên quá trình nhân chồi cây hoa hồng *in vitro* sau 6 tuần nuôi cấy. **A.** Ảnh hưởng của AgNPs với các nồng độ khác nhau (0; 1; 2; 3; 5; 7 ppm) lên quá trình nhân chồi; **B, C.** Hiện tượng thủy tinh thể và vàng lá ở nghiệm thức đối chứng; **D.** Hình thái chồi hoa hồng bình thường trên môi trường bổ sung AgNPs.

Khắc phục hiện tượng vàng lá và gia tăng khả năng tạo cây hoàn chỉnh cây hoa hồng nuôi cấy *in vitro* trên môi trường có bổ sung AgNPs

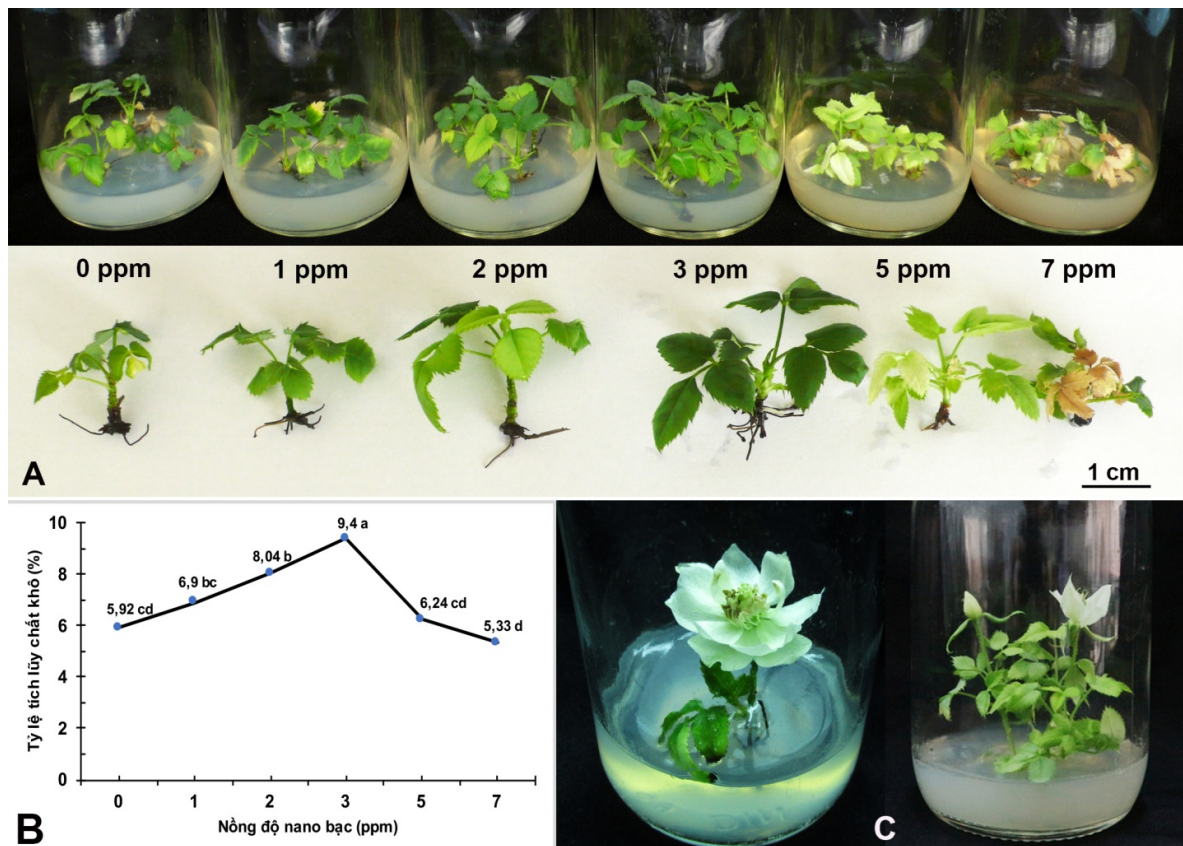
Tạo cây hoàn chỉnh là giai đoạn quan trọng trong tiến trình vi nhân giống thực vật, nó quyết định chất lượng cây giống cũng như sự sinh trưởng và

thích ứng ở giai đoạn vườn ươm. Sau 4 tuần nuôi cấy của AgNPs lên khả năng ra rễ, sinh trưởng và phát triển cây con hoa hồng nuôi cấy *in vitro* (Bảng 2).

Bảng 2. Ảnh hưởng của AgNPs lên quá trình ra rễ, sự sinh trưởng, phát triển và khắc phục hiện tượng vàng lá cây con hoa hồng *in vitro* sau 4 tuần nuôi cấy.

AgNPs (ppm)	Chiều cao cây (cm)	Số lá	Chiều dài lá (cm)	Chiều rộng lá (cm)	Khối lượng tươi (mg)	Khối lượng khô (mg)	Số rễ	Chiều dài rễ (cm)	SPAD
0	1,83 ^{cd}	4,00 ^b	0,90 ^b	0,57 ^{cd}	84,00 ^{cd}	5,00 ^{cd}	2,67 ^b	1,30 ^a	31,97 ^d
1	2,17 ^c	4,33 ^b	1,00 ^b	0,73 ^c	91,67 ^c	6,33 ^c	3,67 ^a	0,80 ^b	33,83 ^c
2	3,07 ^b	5,00 ^b	1,30 ^a	1,00 ^b	116,00 ^b	9,33 ^b	2,33 ^b	0,70 ^{bc}	36,33 ^b
3	3,60^a	6,33^a	1,50^a	1,20^a	137,67^a	13,00^a	4,33^a	0,63^{bc}	39,37^a
5	1,67 ^{de}	3,67 ^b	0,83 ^{bc}	0,50 ^d	74,67 ^d	4,67 ^{cd}	1,00 ^c	0,43 ^c	24,10 ^e
7	1,23 ^e	2,33 ^c	0,63 ^c	0,47 ^d	56,33 ^e	3,00 ^d	0,00 ^d	0,00 ^d	20,73 ^f

Ghi chú: (*) Những ký tự khác nhau (a, b, c...) trong cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa với độ tin cậy $P \leq 0,05$ trong phép thử Duncan



Hình 2. Ảnh hưởng của AgNPs lên quá trình ra rễ và khắc phục hiện tượng vàng lá chồi cây hoa hồng sau 4 tuần nuôi cấy *in vitro*. **A.** AgNPs ở các nồng độ khác nhau lên quá trình ra rễ cây Hoa Hồng; **B.** Tỷ lệ tích lũy chất khô cây hoa hồng nuôi cấy *in vitro*; **C.** Ra hoa *in vitro* trên môi trường bổ sung 5 ppm AgNPs.

Kết quả ghi nhận được cho thấy chồi cây hoa hồng nuôi cấy trên môi trường bổ sung 3 ppm AgNPs cho các chỉ tiêu về chiều cao cây (3,06 cm), số lá (6,33), chiều dài lá (1,50 cm), chiều rộng lá (1,50 cm), khối lượng tươi (137,67 mg), khối lượng khô (13,00 mg), số rễ (4,33) đạt cao nhất so với các nghiệm thức còn lại và cao hơn rất nhiều so với đối chứng (Hình 2A, Bảng 2). Homaeae và Ehsanpour (2015) nghiên cứu trên đối tượng khoai tây nuôi cấy *in vitro* đã báo cáo rằng nồng độ 2 mg/L AgNPs (với kích thước hạt 20 nm) hoạt động như một chất ổn định giúp gia tăng trọng lượng khô của chồi và diện tích lá. Nghiên cứu khác còn cho thấy ảnh hưởng tích cực của AgNPs đến các thông số sinh trưởng của cây như độ dài chồi và rễ, diện tích bề mặt lá, chất diệp lục, carbohydrate và protein đã được ghi nhận trên một số cây trồng có giá trị kinh tế như đậu và ngô (Salama, 2012). Gần đây, các nhà nghiên cứu còn chỉ ra rằng khi AgNPs được kết hợp với các hợp chất khác nhau, nó có thể tác động khác nhau lên thực vật, chẳng hạn như khi AgNPs được kết hợp với sắt thì hiệu quả cải thiện sản lượng ở cây ngô một cách đáng kể đã được ghi nhận (Berahmand *et al.*, 2012; Tripathi *et al.*, 2017).

Chồi cây hoa hồng nuôi cấy trên môi trường bổ sung 3 ppm AgNPs tăng trưởng, phát triển tốt, lá có màu xanh đậm, không bị vàng lá thể hiện qua hàm lượng chl tổng (39,37) và tỷ lệ tích lũy chất khô (9,40%) cao nhất (Bảng 2, Hình 2B). Vai trò của AgNPs trong ức chế hoạt động của khí ethylene đã được ghi nhận qua rất nhiều nghiên cứu. Ion Ag^+ khóa thụ thể ethylene từ đó ức chế hoạt động của hormone này, giúp cây con hoa hồng chống lại quá trình già hóa của mô, rút ngắn thời gian cây chuyển và hạn chế sự thoái hóa giống. Hơn nữa, những cây con trên môi trường có bổ sung AgNPs xanh tốt, không bị thủy tinh thể, do đó cho tỷ lệ sống ở giai đoạn thuần dưỡng vườn ươm cao vì ít bị mất nước và không mất quá nhiều thời gian cho quá trình thích nghi (Sarmast *et al.*, 2015).

Hiện tượng ra hoa *in vitro* cũng đã được ghi nhận khi các chồi hoa hồng nuôi cấy trên môi trường có bổ sung 5 ppm AgNPs (Hình 2C), tuy nhiên, hoa nhỏ và nhạt màu hơn so với hoa ở điều kiện *ex vitro*. Các nghiên cứu gần đây đã cho thấy Polyamines (PA) đóng một vai trò quan trọng trong sự phát triển và phân chia tế bào cũng như có liên quan đến sinh lý của sự ra hoa, tổng hợp chất chuyển hóa và phản ứng với sự nhiễm virus. Sinh tổng hợp PA có liên quan chặt chẽ với sinh tổng hợp ethylene vì cả hai đều cạnh tranh với cùng một tiền chất SAM (S-adenosyl-L-

methionine). AgNPs là một chất ức chế hoạt động ethylene mạnh, do đó giúp tăng hoạt động arginine decarboxylase (ADC), từ đó làm tăng PA nội sinh trong mẫu mô nuôi cấy và cảm ứng hiện tượng ra hoa *in vitro* (Evans, Malmberg, 1989). Ion bạc đã được ghi nhận cảm ứng sự ra hoa *in vitro* sớm ở cây rau diếp xoăn ở nồng độ 40 μ M (Bais *et al.*, 2000), cây rì rì cát ở nồng độ 11,7 μ M (Chithra *et al.*, 2004).

Cây con hoa hồng trên môi trường bổ sung 3 ppm AgNPs sinh trưởng tốt, không bị vàng lá, hình thành nhiều rễ, tuy nhiên rễ lại ngắn hơn (0,63 cm) so với đối chứng (1,30 cm) và chóp rễ có hiện tượng hóa đen. Trong tất cả các nghiệm thức có sử dụng AgNPs, chiều dài rễ của cây hoa hồng nuôi cấy *in vitro* thu được đều thấp hơn so với đối chứng (Hình 3A). Kết quả này chứng tỏ AgNPs đã ức chế sự kéo dài rễ hoa hồng vì nhân giống, đây là một tác động không mong muốn của AgNPs trong giai đoạn cảm ứng ra rễ ở đối tượng hoa hồng vì nó có thể làm ảnh hưởng đến khả năng thích nghi, đòi hỏi nhiều thời gian hơn cho quá trình cảm ứng tạo rễ mới cũng như giảm tỉ lệ sống của cây con ở giai đoạn vườn ươm. Kết quả này tương tự như nghiên cứu của Ehsanpour và Nejati (2013) trên cây khoai tây nuôi cấy *in vitro*, cho thấy AgNPs ở tất cả các nồng độ giúp gia tăng diện tích lá và hàm lượng chl nhưng lại làm giảm chiều dài rễ và chiều cao thân. Sự giảm tỷ lệ sống và sinh khối sau khi xử lý AgNPs đã được báo cáo là có liên quan đến sự dị dạng của rễ và ức chế sự hình thành chồi trong nuôi cấy hoa cúc và thuốc lá (Ehsanpour, Nejati, 2013).

Bên cạnh đó, khi sử dụng AgNPs ở nồng độ cao (7 ppm) tất cả các chỉ tiêu thu được đều giảm, sự hình thành rễ không được ghi nhận, chồi vàng úa, gốc hóa nâu và có dấu hiệu chết. AgNPs có tác động tích cực lên việc kiểm soát bệnh hại trên thực vật do các hoạt động kháng nấm và vi khuẩn của chúng, tuy nhiên, người ta cũng nhận thấy rằng chúng cũng có thể có gây độc cho cây trồng. AgNPs khi sử dụng ở nồng độ cao (100 ppm) đã làm giảm hàm lượng diệp lục và carotenoid ở cây cà chua nuôi cấy *in vitro* (Razavizadeh, Rostami, 2015). Các AgNPs với kích thước 25 nm ở nồng độ cao đã được quan sát có khả năng phá vỡ thành tế bào và không bào của các tế bào rễ cây lúa, AgNPs không thể xâm nhập vào các tế bào rễ của lúa ở nồng độ thấp (30 μ g/mL), trong khi nồng độ cao hơn (60 μ g/mL) có thể phá hủy cấu trúc tế bào và hạn chế khả năng phát triển của rễ cây lúa (Rastogi *et al.*, 2017). Qua đó cho thấy, AgNPs khi sử dụng ở nồng độ cao đã gây tác động tiêu cực

đến sự sinh trưởng và phát triển của thực vật, thậm chí gây chết mẫu như trong thí nghiệm này.

Ảnh hưởng của AgNPs lên sự tích lũy khí ethylene trong bình nuôi cấy, hoạt độ enzyme thủy phân cellulase và pectinase trong cây hoa hồng nuôi cấy in vitro

Sau 4 tuần nuôi cấy ra rễ của chồi cây Hoa Hồng, nghiên cứu cũng tiến hành thu nhận và định lượng hàm lượng khí ethylene trong bình nuôi cấy. Kết quả trình bày ở Bảng 3 cho thấy hàm lượng khí ethylene trong bình nuôi cấy giảm rõ rệt khi sử dụng AgNPs, đặc biệt ở nồng độ 3 ppm AgNPs bổ sung vào môi trường nuôi cấy đã giúp giảm rõ rệt lượng khí ethylene (0,30 ppm) so với đối chứng (0,79 ppm).

Ethylene là một hormone thực vật ở dạng khí có hoạt tính sinh học hoạt động với nồng độ rất thấp khoảng 0,01 đến 1,0 ppm. Độ nhạy cảm thấp hay cao đã được quan sát tùy thuộc vào loài và kiểu đáp ứng. Trong vi nhân giống Hoa Hồng, ethylene được coi là một hormone chủ chốt trong việc điều chỉnh sự khởi đầu quá trình lão hóa của lá, là yếu tố chính liên quan đến hiện tượng rụng lá mặc dù nó không phải là yếu tố duy nhất; hơn nữa, sự tích tụ hormone này trong bình nuôi cấy dẫn đến hiện tượng già hóa của mô (Brown, 1997), gây dị dạng thân và còn gây nên hiện tượng thủy tinh thể (Reid, 1995).

Các nghiên cứu đã cho thấy AgNPs có khả năng ức chế sự hình thành và hoạt động của khí ethylene bằng cách ngăn chặn sự liên kết của ethylene với các thụ thể trong tế bào thực vật và do đó, ngăn chặn sự nhận biết và hoạt động của khí ethylene (Razavizadeh, Rostami, 2015). Kết quả ghi nhận được khi tiến hành nghiên cứu trên đối tượng cây đậu cho thấy, AgNPs đã ức chế sự lão hóa của lá do tác động của 2,4-D thông qua ức chế hoạt động của khí ethylene mà không gây bất kỳ tổn thương vật lý nào liên quan đến cây con (Karuppanapandian *et al.*, 2011). Một nghiên cứu khác cũng cho thấy sự tích tụ khí ethylene đã giảm đáng kể khi sử dụng AgNO₃, Ag₂SO₄ như là chất ức chế khi nuôi cấy *in vitro* một số giống cherry (Sarpoulou *et al.*, 2016). AgNPs đã trở thành trọng tâm của các nghiên cứu gần đây không chỉ do tính chất mới lạ của chúng, khác biệt lớn với vật liệu khối, mà còn vì ứng dụng tiềm năng của chúng trong một loạt các nghiên cứu sinh học thực vật.

Kết quả ghi nhận được cũng cho thấy, AgNPs bổ sung ở các nồng độ (1, 2, 3, 5 ppm) đã có hiệu quả trong việc giảm sự hình thành và hoạt tính của các

enzyme thủy phân. Đặc biệt ở nghiệm thức bổ sung 3 ppm AgNPs hoạt độ enzyme pectinase (0,40 UI/mL) và cellulase (0,14 UI/mL) thu được có sự khác biệt rõ rệt so với đối chứng. Tuy nhiên, nồng độ AgNPs cao lại làm gia tăng hàm lượng hai enzyme thủy phân này so với đối chứng. Kết quả xác định hoạt độ enzyme ghi nhận thông qua phản ứng hiện màu của dịch thủy phân với thuốc thử DNS, mật độ quang được đo ở các bước sóng khác nhau 575 nm và 540 nm (Bảng 3).

Lá già là một kiểu chết tế bào được lập trình, nó cấu thành giai đoạn phát triển cuối cùng của lá. Nó là một quá trình thoái hóa bắt đầu bởi một loạt các sự kiện xuống cấp, bao gồm thoái hóa diệp lục và peroxid hóa lipid, cũng như tăng hoạt động của một số enzyme thủy phân (Karuppanapandian *et al.*, 2011). Trong vi nhân giống thực vật nói chung và hoa hồng nói riêng sự già hóa của lá, sự rụng lá là một tiến trình không mong muốn có liên quan tới tác động của ethylene và auxin vì nó gây giảm chất lượng và giảm tỷ lệ sống của cây giống. Khi có sự rụng cơ quan xảy ra, các tế bào ở vùng rụng bắt đầu phân chia và tạo thành lớp phân tách chức năng, kích thích sự tạo nên các enzyme phân hủy thành tế bào của tầng rời, đặc biệt là sự huy động các enzyme thủy phân như enzyme pectinase và cellulase sẽ phân hủy thành tế bào làm cho lớp màng giữa của thành tế bào bị suy yếu và bị hòa tan, khiến các cơ quan trở nên rời rạc, không dính nhau và lá chỉ còn giữ lại được bằng bó mạch mỏng manh và dễ dàng rụng (Mishra *et al.*, 2008; MacDonald *et al.*, 2011).

Trong nhân giống *in vitro* cây Hoa Hồng, rụng lá do hoạt động của enzyme cellulase và pectinase gây ảnh hưởng đến chất lượng cây giống vì nó làm giảm sự sinh trưởng, phát triển cũng như tỉ lệ sống của cây con hoa hồng ở giai đoạn vườn ươm. Do đó, hạn chế sự hình thành của các enzyme này bằng các chất ức chế enzyme là việc làm cần thiết để cải thiện hiệu quả vi nhân giống Hoa Hồng. Các nghiên cứu gần đây cho thấy, enzyme thủy phân (cellulase, pectinase) có thể bị ức chế bởi các kim loại nặng như thủy ngân, bạc, crom, coban và đồng; các kim loại này có thể liên kết chặt chẽ với các vị trí hoạt động của enzyme thủy phân để làm giảm hoạt động của chúng (Sharma, 2012). Như chúng ta đã biết, AgNPs được biết đến với vai trò kháng vi sinh vật, gia tăng sinh trưởng và kìm hãm sự hoạt động của khí ethylene; tuy nhiên, có rất ít nghiên cứu về khả năng ức chế sự hình thành và hoạt động của enzyme thủy phân pectinase và cellulase khi thực vật được nuôi cấy trên môi

trường có sự hiện diện của AgNPs. Trong nghiên cứu này, khi đánh giá tác động của AgNPs lên khả năng ức chế hoạt động của hai enzyme thủy phân, kết quả thu nhận được đã cho thấy AgNPs có vai trò tiềm năng trong hạn chế sự lão hóa mô, cơ quan

thực vật đặc biệt là vai trò trong hạn chế sự vàng lá, rụng lá cây con hoa hồng nuôi cấy *in vitro* vì AgNPs đã giúp làm giảm sự hình thành của enzyme cellulase và pectinase so với đối chứng khi không sử dụng vật liệu nano này.

Bảng 3. Ảnh hưởng của AgNPs lên sự tích lũy khí ethylene, hoạt độ enzyme pectinase, cellulase trong vi nhân giống Hoa Hồng.

AgNPs (ppm)	Hàm lượng khí ethylene (ppm)	Hoạt độ pectinase (UI/mL)	Hoạt độ cellulase (UI/mL)
0	0,79 ^e	0,61 ^b	1,23 ^e
1	0,66 ^d	0,59 ^b	0,77 ^c
2	0,45 ^b	0,36 ^a	0,38 ^b
3	0,30^a	0,40^a	0,14^a
5	0,57 ^c	0,60 ^b	0,84 ^d
7	0,96 ^f	0,96 ^c	1,84 ^f

Ghi chú: (*) Những ký tự khác nhau (a, b, c...) trong cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa với độ tin cậy $P \leq 0,05$ trong phép thử Duncan.

Khả năng thích nghi và sinh trưởng của cây hoa hồng nuôi cấy *in vitro* ở giai đoạn vườn ươm

Sau 4 tuần thuần dưỡng ở điều kiện vườn ươm, các chỉ tiêu về tỷ lệ sống, khả năng thích nghi của cây con hoa hồng có nguồn gốc từ nuôi cấy *in vitro* trên môi trường có bổ sung AgNPs ở các nồng độ khác nhau đã được ghi nhận ở Bảng 4.

Tỷ lệ sống của cây con hoa hồng ở nghiệm thức bổ sung 3 ppm AgNPs đạt 93,33% cao hơn rất nhiều so với đối chứng (76,67%). Ngoài ra, các chỉ tiêu về chiều cao cây (12,33 cm), số lá mới (8,33) thu được là tối ưu nhất so với các nghiệm thức còn lại. Cây con có nguồn gốc từ nuôi cấy *in vitro* trên môi trường có 3 ppm AgNPs sinh trưởng tốt, cây khỏe, lá xòe rộng và có màu xanh đậm với chỉ số SPAD (41,33) cao hơn so với đối chứng (36,27). Nồng độ AgNPs cao (7 ppm) gây độc cho cây hoa hồng vì nhân giống, làm cây già úa, không hình thành rễ *in vitro*, do đó khi thuần dưỡng ở điều kiện vườn ươm

những cây con này sinh trưởng kém và khó thích nghi với tỷ lệ sống đạt thấp hơn so với các nghiệm thức còn lại (64,00%) (Bảng 4, Hình 3A).

Đáp ứng của thực vật với AgNPs đã được nghiên cứu trên nhiều đối tượng. AgNPs ở nồng độ 40 ppm đã giúp gia tăng số lượng, chiều dài rễ, khối lượng khô, khối lượng tươi của rễ và lá cây nghệ tây *ex vitro* ở điều kiện ngập úng (Rezvani *et al.*, 2012). Dykman và Shchyogolev (2018) sử dụng AgNPs trên cây lúa, kết quả cho thấy AgNPs ở nồng độ 30 mg/mL đã nảy mầm với sự gia tăng sự sinh trưởng của rễ, khi tăng nồng độ và kích thước của AgNPs đã ức chế sự nảy mầm của hạt lúa và sự tăng trưởng của cây con. Nghiên cứu của Lamsal và đồng tác giả (2011) đã cho thấy hiệu quả gia tăng tỷ lệ sống của cây dưa leo và bí khi sử dụng AgNPs (100 ppm), AgNPs không những giúp gia tăng sinh trưởng, phát triển cây con mà còn có khả năng kháng lại bệnh mốc sương, đây là một trong những loại bệnh gây tỷ lệ chết cây con cao ở họ bầu bí.

Bảng 4. Sự sinh trưởng và phát triển của cây con hoa hồng sau 4 tuần thuần dưỡng ở điều kiện vườn ươm.

AgNPs (ppm)	Tỷ lệ sống (%)	Chiều cao cây (cm)	Số lá mới	Chiều dài lá (cm)	Chiều rộng lá (cm)	SPAD
0	76,67 ^c	6,00 ^{cd}	4,67 ^{cd}	2,83 ^c	1,93 ^{bc}	36,27 ^c
1	78,33 ^{bc}	7,67 ^{bc}	5,33 ^{bc}	3,26 ^b	2,17 ^{bc}	38,40 ^{bc}
2	85,00 ^{ab}	8,67 ^b	6,33 ^b	3,50 ^b	2,30 ^b	39,23 ^{ab}
3	93,33^a	12,33^a	8,33^a	4,17^a	2,93^a	41,33^a
5	73,67 ^c	5,67 ^d	4,33 ^{cd}	2,50 ^{cd}	1,73 ^c	31,20 ^d
7	64,00 ^d	5,00 ^d	3,67 ^d	2,10 ^d	1,17 ^d	25,63 ^e

(*) Những ký tự khác nhau (a, b, c...) trong cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa với độ tin cậy $P \leq 0,05$ trong phép thử Duncan



Hình 3. Sự sinh trưởng và phát triển của cây hoa hồng có nguồn gốc từ nuôi cấy *in vitro* trên môi trường có bổ sung AgNPs ở các nồng độ khác nhau sau 4 tuần và 6 tuần thuần dưỡng ở điều kiện vườn ươm. **A.** Cây con hoa hồng sau 4 tuần thuần dưỡng; **B.** Cây con hoa hồng sau 6 tuần thuần dưỡng (đối chứng; 3 ppm AgNPs, từ trái qua phải).

Trong nghiên cứu này, AgNPs đã cho thấy có khả năng cải thiện tỷ lệ sống của cây con Hoa Hồng. Dưới cùng một điều kiện chăm sóc, các cây hoa hồng có nguồn gốc từ cây *in vitro* trên môi trường có bổ sung AgNPs có chất lượng tốt, tỷ lệ sống cao hơn hẳn so với các cây ở môi trường đối chứng (Hình 3B), AgNPs bổ sung vào môi trường nuôi cấy giúp gia tăng khả năng thích nghi, sinh trưởng và phát

triển của cây con *ex vitro* một cách vượt trội.

KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, AgNPs sử dụng trong vi nhân giống hoa hồng đã giúp cải thiện hệ số nhân chồi, gia tăng sự sinh trưởng và phát triển của chồi nuôi cấy; bên cạnh đó, AgNPs còn hạn chế hiện

trạng vàng lá, rụng lá chồi nuôi cấy thông qua ức chế hoạt động của khí ethylene và hoạt độ enzyme thủy phân cellulase và pectinase, đây là hai enzyme quan trọng trong tiến trình cảm ứng sự rụng và già hóa của mô. Cây con có nguồn gốc từ nuôi cấy *in vitro* trên môi trường có bổ sung AgNPs cho tỷ lệ sống, khả năng thích nghi cao ở giai đoạn vườn ươm.

Lời cảm ơn: 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 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

- Arab MM, Yadollahi A, Hosseini-Mazinani M, Bagheri S (2014) Effects of antimicrobial activity of silver nanoparticles on *in vitro* establishment of G×N15 (hybrid of almond×peach) rootstock. *Genet Eng Biotechnol J* 12(2): 103-110.
- Bais HP, Sudha GS, Ravishankar GA (2000) Putrescine and silver nitrate influences shoot multiplication, *in vitro* flowering and endogenous titers of polyamines in *Cichorium intybus* L. cv. Lucknow local. *J Plant Growth Regul* 19(2): 238-248.
- Berahmand AA, Panahi AG, Sahabi H, Feizi H, Moghaddam PR, Shahtahmassebi N, Fotovat A, Karimpour H, Gallehgir O (2012) Effects silver nanoparticles and magnetic field on growth of fodder maize (*Zea mays* L.). *Biol Trace Elem Res* 149(3): 419-424.
- Bhojwani SS, Dantu PK (2013) *Plant tissue culture: an introductory text*. Springer, Dordrecht: 39-50.
- Brown KM (1997) Ethylene and abscission. *Physiol Planta* 100(3): 567-576.
- Chang C (2016) Q&A: How do plants respond to ethylene and what is its importance? *BMC Biol* 14(1):1-7.
- 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 Appl Sci* 9(2): 241-248.
- Chithra M, Martin K, Sunandakumari C, Madhusoodanan P (2004) Silver nitrate induced rooting and flowering *in vitro* on rare rheophytic woody medicinal plant, *Rotula aquatica* Lour. *Indian J Biotechnol* 3: 418-421.
- Cristescu SM, Mandon J, Arslanov D, De Pessemier J, Hermans C, Harren FJ (2012) Current methods for detecting ethylene in plants. *Ann Bot* 111(3): 347-360.
- Dykman LA, Shchyogolev SY (2018) *The effect of gold and silver nanoparticles on plant growth and development*. In Saylor Y, Irby V, eds. *Metal Nanoparticles*. Nova Science Publishers, Inc: 263-300.
- Ehsanpour AA, Nejati Z (2013) Effect of nanosilver on potato plant growth and protoplast viability. *Biol Lett* 50(1): 35-43.
- Evans PT, Malmberg RL (1989) Do polyamines have roles in plant development? *Ann Rev Plant Biol* 40(1): 235-269.
- Greenberg J, Goren R, Riov J (1975) The role of cellulase and polygalacturonase in abscission of young and mature Shamouti orange fruits. *Physiol Planta* 34(1): 1-7.
- Homaee MB, Ehsanpour AA (2015) Physiological and biochemical responses of potato (*Solanum tuberosum*) to silver nanoparticles and silver nitrate treatments under *in vitro* conditions. *Indian J Plant Physiol* 20(4): 353-359.
- Karuppanapandian T, Wang HW, Prabakaran N, Jeyalakshmi K, Kwon M, Manoharan K, Kim W (2011) 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid-induced leaf senescence in mung bean (*Vigna radiata* L. Wilczek) and senescence inhibition by co-treatment with silver nanoparticles. *Plant Physiol Biochem* 49(2): 168-177.
- Khosh-Khui M, Teixeira da Silva JA (2006) *In vitro* culture of the *Rosa* species. In Teixeira da Silva JA, ed. *Floriculture, ornamental and plant biotechnology: Advances and Topical Issues*. Global science books, UK 2: 514-526.
- Kumar V, Parvatam G, Ravishankar GA (2009) AgNO₃ - a potential regulator of ethylene activity and plant growth modulator. *Electron J Biotechnol* 12(2): 1-15.
- Lamsal K, Kim SW, Jung JH, Kim YS, Kim KS, Lee YS (2011) Inhibition effects of silver nanoparticles against powdery mildews on cucumber and pumpkin. *Mycobiology* 39(1): 26-32.
- MacDonald MT, Lada RR, Dorais M, Pepin S (2011) Endogenous and exogenous ethylene induces needle abscission and cellulase activity in post-harvest balsam fir (*Abies balsamea* L.). *Trees* 25(5): 947-952.
- Mishra A, Khare S, Trivedi PK, Nath P (2008) Ethylene induced cotton leaf abscission is associated with higher expression of cellulase (GhCell1) and increased activities of ethylene biosynthesis enzymes in abscission zone. *Plant Physiol Biochem* 46(1): 54-63.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Planta* 15(3): 473-497.
- Phan C, Letouze R (1983) A comparative study of chlorophyll, phenolic and protein contents, and of

- hydroxycinnamate: CoA ligase activity of normal and 'vitreous' plants (*Prunus avium* L.) obtained *in vitro*. *Plant Sci Lett* 31(2-3): 323-327.
- Rastogi A, Zivcak M, Sytar O, Kalaji HM, He X, Mbarki S, Brestic M (2017) Impact of metal and metal oxide nanoparticles on plant: a critical review. *Front Chem* 5: 1-16.
- Razavizadeh R, Rostami F (2015) Risks and benefits assessments of silver nanoparticles in tomato plants under *in vitro* culture. *Eng Res J* 3(7): 51-55.
- Reid MS (1995) *Ethylene in plant growth, development and senescence*. In Davies PJ, ed. *Plant hormones*. Springer, Dordrecht: 486-508.
- Rezvani N, Sorooshzadeh A, Farhadi N (2012) Effect of nano-silver on growth of saffron in flooding stress. *World Acad Sci Eng Technol* 6(1): 517-522.
- Saeideh N, Rashid J (2014) Effect of silver nanoparticles and Pb(NO₃)₂ on the yield and chemical composition of mung bean (*Vigna radiata*). *J Stress Physiol Biochem* 10(1): 316-325.
- Salama HM (2012) Effects of silver nanoparticles in some crop plants, common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and corn (*Zea mays* L.). *Int Res J Biotechnol* 3(10): 190-197.
- Sarmast M, Niazi A, Salehi H, Abolmoghdam A (2015) Silver nanoparticles affect ACS expression in *Tecomella undulata* *in vitro* culture. *Plant Cell Tiss Org Cult* 121(1): 227-236.
- Sarmast M, Salehi H, Khosh-Khui M (2011) Nano silver treatment is effective in reducing bacterial contaminations of *Araucaria excelsa* R. Br. var. *glauca* explants. *Acta Biol Hung* 62(4): 477-484.
- Sarropoulou V, Dimassi-Therious K, Therios I (2016) Effect of the ethylene inhibitors silver nitrate, silver sulfate, and cobalt chloride on micropropagation and biochemical parameters in the cherry rootstocks CAB-6P and Gisela 6. *Turk J Biol* 40(3): 670-683.
- Senapati S, Rout G (2008) Study of culture conditions for improved micropropagation of hybrid rose. *Hort Sci* 35(1): 27-34.
- Sharma R (2012) *Enzyme inhibition: mechanisms and scope*. In Sharma R, ed. *Enzyme inhibition and bioapplications*. InTech, Rijeka, Croatia: 1-36.
- Sharon M, Choudhary AK, Kumar R (2010) Nanotechnology in agricultural diseases and food safety. *J Phytol* 2(4): 83-92.
- Spinoso-Castillo J, Chavez-Santoscoy R, Bogdanchikova N, Pérez-Sato J, Morales-Ramos V, Bello-Bello J (2017) Antimicrobial and hormetic effects of silver nanoparticles on *in vitro* regeneration of vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) using a temporary immersion system. *Plant Cell Tiss Org Cult* 129(2): 195-207.
- Thao NP, Khan MIR, Thu NBA, Hoang XLT, Asgher M, Khan NA, Tran L-SP (2015) Role of ethylene and its cross talk with other signaling molecules in plant responses to heavy metal stress. *Plant Physiol* 169(1): 73-84.
- Tripathi DK, Singh S, Singh S, Srivastava PK, Singh VP, Singh S, Prasad SM, Singh PK, Dubey NK, Pandey AC (2017) Nitric oxide alleviates silver nanoparticles (AgNps)-induced phytotoxicity in *Pisum sativum* seedlings. *Plant Physiol Biochem* 110: 167-177.
- Vatanparast M, Hosseinaveh V, Ghadamyari M, Sajjadian SM (2014) Plant cell wall degrading enzymes, pectinase and cellulase, in the digestive system of the red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* (Coleoptera: Curculionidae). *Plant Protect Sci* 50(4): 190-198.
- Yin L, Cheng Y, Espinasse B, Colman BP, Auffan M, Wiesner M, Rose J, Liu J, Bernhardt ES (2011) More than the ions: the effects of silver nanoparticles on *Lolium multiflorum*. *Environ Sci Technol* 45(6): 2360-2367.
- Zhang YP, Hong J, Ye X (2009) *Cellulase assays*. In Mielenz JR, ed. *Biofuels: Methods and Protocols*. Springer, Dordrecht: 213-231.

THE EFFECT OF SILVER NANOPARTICLES ON THE LIMITATION OF ETHYLENE GAS AND HYDROLYTIC ENZYMATIC ACTIVITY IN MICROPROPAGATION OF ROSE (*Rosa hybrida* L. 'Baby Love')

Ha Thi My Ngan^{1,2}, Hoang Thanh Tung², Ngo Dai Nghiep¹, Bui Van Le¹, Duong Tan Nhut²

¹University of Science, Vietnam National University Ho Chi Minh City, Ho Chi Minh City, Vietnam

²Tay Nguyen Institute for Scientific Research, Vietnam Academy of Science and Technology

SUMMARY

Micropropagation of rose (*Rosa hybrida* L. 'Baby Love') often encounter some abnormal phenomena such as yellow and abscission leaf, hyperhydricity, etc. These phenomena effect on the quality of shoots cultured *in vitro* as well as the survival rate of plantlets after transferred to greenhouse. This is due to the accumulation of

ethylene in culture vessel, which leads to an increase in enzyme activity of cellulase and pectinase resulted in disrupting the cell wall binding and inducing organ abscission. In this study, the effect of silver nanoparticles (AgNPs) to overcome these abnormal phenomena as well as its effect on the growth and development of shoots and plantlets in rose cultured *in vitro* were evaluated. The results showed that after 6 weeks of shoot culture, the medium supplemented with 2 ppm AgNPs was the most suitable for *in vitro* shoot multiplication with the highest number of shoots/explant (6.67 shoots), shoot height (3.06 cm), fresh weight (451.00 mg), dry weight (58.33 mg), SPAD (32.28) and dry mass ratio (12.33%). Adding 3 ppm AgNPs into *in vitro* rooting medium may improve the growth and develop involve in plant height (3.06 cm), number of leaves (6.33), leaf length (1.50 cm), leaf width (1.50 cm), fresh weight (137.67 mg), dry weight (13.00 mg), number of roots (4.33), SPAD (39.37), dry mass ratio (9.40%) of rose plantlet after 4 weeks of culture. After treatment with AgNPs, the abnormal phenomena including ethylene gas accumulation (0.30 ppm), cellulase enzyme activity (0.14 UI/mL) and pectinase enzyme activity (0.40 UI/mL) was reduced compare with the other treatments and the control. In addition, the high survival rate (93.33%) of plantlets was also observed after 4 weeks transferred to greenhouse. On the other hand, the treatment with 5 ppm AgNPs also induced early rose *in vitro* flowering; however, when using AgNPs at high concentrations (7 ppm) inhibited growth, development, toxicity and even death of explants.

Keywords: *Abscission, cellulase, ethylene, pectinase, rose.*