

Nano bạc gia tăng hiệu quả tái sinh chồi và hạn chế một số hiện tượng bất thường của cây African violet (*Saintpaulia ionantha* Wendl.) nuôi cấy *in vitro*

Huỳnh Gia Bảo^{1,2}, Nguyễn Thị Như Mai¹, Hoàng Đắc Khải¹, Đỗ Mạnh Cường¹, Hoàng Thanh Tùng^{1,2}, Dương Tấn Nhựt^{1,2*}

¹Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam,
116 Xô Viết Nghệ Tĩnh, phường 7, TP Đà Lạt, tỉnh Lâm Đồng, Việt Nam

²Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam,
18 Hoàng Quốc Việt, phường Nghĩa Đô, quận Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 3/8/2022; ngày chuyển phân biện 6/8/2022; ngày nhận phân biện 26/8/2022; ngày chấp nhận đăng 29/8/2022

Tóm tắt:

Bài báo nghiên cứu tác động của nano bạc (AgNPs) lên sự tái sinh chồi, khắc phục hiện tượng bất thường, sự biến động khí ethylene (ET) và hoạt tính enzyme chống oxy hóa trong giai đoạn tái sinh chồi của cây African violet. Kết quả cho thấy, mẫu gân lá chính cho hiệu quả tái sinh chồi tối ưu hơn so với mẫu lá nguyên với tỷ lệ tái sinh chồi 66,00%, 5,33 chồi/mẫu và chiều cao chồi 0,73 cm sau 8 tuần nuôi cấy. Ở giai đoạn tái sinh, chồi của cây African violet trên cả mẫu cấy gân lá chính và mẫu lá nguyên đều xuất hiện một số hiện tượng thủy tinh thể lần lượt là 20,00 và 19,67%; mô sẹo ở mép lá lần lượt là 21,67 và 22,33%; hoại tử mẫu cấy lần lượt là 14,67 và 12,33%; hóa nâu mẫu cấy và môi trường nuôi cấy lần lượt là 20,33 và 15,67%. Ngoài ra, khi bổ sung 2 mg/l AgNPs vào môi trường tái sinh chồi làm gia tăng hiệu quả tái sinh chồi và sinh trưởng của cụm chồi, khắc phục hiện tượng thủy tinh thể, mô sẹo ở mép lá, hoại tử mẫu cấy, hóa nâu mẫu cấy và môi trường nuôi cấy, giảm sự tích lũy khí ET và gia tăng hoạt tính của APX (ascorbate peroxidase), CAT (catalase) trong giai đoạn tái sinh chồi của cây African violet.

Từ khóa: ethylene, hóa nâu, hoại tử mẫu cấy, nano bạc, thủy tinh thể.

Chỉ số phân loại: 1.6, 1.7, 4.6

Silver nanoparticles enhanced shoot regeneration efficiency and limited some abnormal phenomena of African violet (*Saintpaulia ionantha* Wendl.) cultured *in vitro*

Gia Bao Huynh^{1,2}, Thi Nhu Mai Nguyen¹, Dac Khai Hoang¹, Manh Cuong Do¹, Thanh Tung Hoang^{1,2}, Tan Nhut Duong^{1,2*}

¹Taynguyen Institute of Scientific Research, Vietnam Academy of Science and Technology,
116 Xo Viet Nghe Tinh Street, Ward 7, Da Lat City, Lam Dong Province, Vietnam

²Graduate University of Science and Technology, Vietnam Academy of Science and Technology,
18 Hoang Quoc Viet Street, Nghia Do Ward, Cau Giay District, Hanoi, Vietnam

Received 3 August 2022; revised 26 August 2022; accepted 29 August 2022

Abstract:

This article investigated the effects of silver nanoparticles (AgNPs) on shoot regeneration, abnormal growth, ethylene (ET) gas fluctuations, and antioxidant enzyme activity during the shoot regeneration of African violet. The results showed that using the main leaf vein explant significantly improved shoot regeneration efficiency compared to the whole leaf explant, with a shoot regeneration rate of 66.00%, an average of 5.33 shoots per explant, and shoot height reaching 0.73 cm after eight weeks of cultivation. At shoot regeneration time, both the main leaf vein and whole leaf explants exhibited vitrification (20.00 and 19.67%, respectively), callus formation at the leaf edges (21.67 and 22.33%, respectively), necrosis (14.67 and 12.33%, respectively), and browning of explants and the culture medium (20.33 and 15.67%, respectively). Furthermore, adding 2 mg/l AgNPs into the regeneration environment enhanced shoot regeneration efficiency and growth, mitigated vitrification, callus formation, necrosis, browning of explants and the culture medium, reduced ethylene gas accumulation and increased the activities of ascorbate peroxidase (APX), catalase (CAT) during African violet shoot regeneration.

Keywords: browning, ethylene, necrosis, silver nanoparticles, vitrification.

Classification numbers: 1.6, 1.7, 4.6

*Tác giả liên hệ: Email: duongtannhut@gmail.com

1. Đặt vấn đề

Công nghệ nano đã được ứng dụng rộng rãi trong các lĩnh vực khác nhau và có ảnh hưởng đáng kể trên thế giới. Bên cạnh đó, công nghệ nano cũng đã được ứng dụng cho nghiên cứu các hệ thống sinh học. Trong nông nghiệp, nano kim loại đã được chứng minh có tác động tích cực đối với thực vật nuôi cấy *in vitro*, bao gồm việc tăng tỷ lệ nảy mầm [1], kích thích sự phát triển [2] và tăng cường tổng hợp các hợp chất thứ cấp có giá trị như dược phẩm, chất dinh dưỡng và hóa chất nông nghiệp, bao gồm các hợp chất phenol và flavonoid [3]. Nhóm nghiên cứu của chúng tôi đã đạt được những kết quả đáng khích lệ trong việc sử dụng AgNPs như một tác nhân khử trùng môi trường nuôi cấy *in vitro* [4], khử trùng mẫu cây thực vật như African violet [5], rong Bắp sú [6], Cúc trắng [4] và bổ sung vào môi trường nuôi cấy để thúc đẩy sự phát triển của Đậu tây [7], Hồng môn [8] và sâm Ngọc Linh [9], cũng như hạn chế vi sinh vật trong hệ thống vi thủy canh [10]. Ngoài ra, các loại nano khác cũng đã được nghiên cứu trên các đối tượng thực vật khác nhau, chẳng hạn như nano coban giúp khắc phục hiện tượng vàng và rụng lá ở cây hoa Hồng [11] và nano sắt cải thiện khả năng ra rễ ở cây hoa Cẩm chướng trong điều kiện nuôi cấy *in vitro* [12]. Tuy nhiên, tác động của các loại nano kim loại (bổ sung hoặc thay thế) đối với sự phát triển và sinh trưởng, khắc phục hiện tượng bất thường, cải thiện khả năng ra rễ *in vitro*, gia tăng tỷ lệ sống sót, cùng với các chỉ tiêu sinh lý-sinh hóa như sự biến động ET và hoạt tính enzyme chống oxy hóa (APX, CAT) vẫn cần được nghiên cứu thêm, đặc biệt là đối với cây hoa African violet.

African violet (thuộc chi *Saintpaulia*) có nguồn gốc từ các khu rừng mưa ở châu Phi với màu sắc hoa đa dạng. Loài hoa này có lá dày, đẹp và phủ lông nhung, có khả năng nở hoa liên tục khi điều kiện thuận lợi, do đó rất được ưa chuộng trong việc trồng trang trí nội thất và văn phòng [13]. Đã có một số kết quả tích cực trong việc nhân giống *in vitro* cây African violet, bao gồm phát sinh phôi soma [13], tái sinh chồi [14] và cảm ứng mô sẹo [15]. D.T. Nhut và cs (2007) [16] đã tái sinh chồi thành công cây African violet; tuy nhiên sau 30 ngày nuôi cấy, số lượng chồi thu được dao động 5,8-8,0 chồi/mẫu, kích thước chồi nhỏ hơn 1 cm và không đồng đều. Hiện tại, ứng dụng nano kim loại trong việc vi nhân giống cây African violet vẫn còn rất hạn chế. D.T. Nhut và cs (2018) [5] chỉ mới dừng lại ở việc sử dụng AgNPs như một chất khử trùng thay thế cho các chất khử trùng truyền thống. Do đó, nghiên cứu về ảnh hưởng của AgNPs đối với quá trình tái sinh chồi, hiện tượng bất thường, sự biến động khí ET và hoạt động của enzyme chống oxy hóa trong giai đoạn tái sinh chồi của cây African violet là điều cần thiết.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu thực vật

Nguồn mẫu ban đầu của nghiên cứu này là các mẫu lá của cây African violet *in vitro* 12 tuần tuổi.

2.2. Dung dịch nano bạc

Dung dịch AgNPs có kích thước nhỏ hơn 20 nm với nồng độ 1000 mg/l [17]. AgNPs với các nồng độ khác nhau được chuẩn bị cho thí nghiệm tái sinh chồi. AgNPs được sử dụng trong các thí nghiệm do Viện Công nghệ Môi trường, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam cung cấp.

2.3. Ghi nhận hiện tượng bất thường ở giai đoạn tái sinh chồi cây African violet

Các mẫu lá nguyên *in vitro* với đường kính 10 mm và mẫu gân lá chính với kích thước 1×10 mm của cây African violet được thu nhận và cấy trên đĩa petri nhựa có chứa môi trường tái sinh chồi. Môi trường MS [14] có chứa 0,2 mg/l BA, 0,1 mg/l NAA, 8 g/l agar, 30 g/l sucrose và 1 g/l than hoạt tính [16] (MSS), được bọc kín bằng màng parafilm M nhằm đánh giá khả năng tái sinh chồi từ mẫu lá nguyên và mẫu gân lá chính, đồng thời ghi nhận một số hiện tượng bất thường trong quá trình tái sinh. Tỷ lệ tái sinh chồi (%), số lượng chồi/mẫu, chiều cao chồi (cm), hiện tượng thủy tinh thể (%), tỷ lệ mô sẹo ở mép lá (%), tỷ lệ hoại tử mẫu cây (%), tỷ lệ hóa nâu của mẫu cây và môi trường nuôi cấy (%) được ghi nhận sau 8 tuần nuôi cấy. Hình thái mẫu cây được quan sát và ghi nhận bằng kính hiển vi soi nổi (x10).

2.4. Ảnh hưởng của nano bạc lên hiệu quả tái sinh chồi

Trong thí nghiệm, nguồn mẫu tối ưu cho quá trình tái sinh chồi được cấy trên môi trường MSS có chứa AgNPs ở các nồng độ khác nhau. Mẫu đối chứng được nuôi cấy trên môi trường MSS không bổ sung AgNPs. Tỷ lệ tái sinh chồi (%), số lượng chồi/mẫu, chiều cao chồi (cm), khối lượng tươi và khô của cụm chồi (mg) sau 4 tuần nuôi cấy. Ngoài ra, số lượng chồi/mẫu (tổng số chồi và chồi có kích thước lớn hơn 1 cm), chiều cao chồi (cm), SPAD (chỉ số đánh giá hàm lượng diệp lục trong lá), khối lượng tươi và khô của cụm chồi (mg) được thu thập sau 8 tuần nuôi cấy.

2.5. Xác định hàm lượng khí ethylene trong đĩa petri bằng phương pháp sắc ký khí

Khí ET được thu thập trực tiếp trong đĩa petri được bọc bằng màng parafilm M bằng ống tiêm không rò rỉ khí (dung tích 1 ml) và sau đó bơm thủ công vào hệ thống GC (sử dụng cột thép không gỉ có kích thước 3 m × 1,5 mm chứa chất hấp phụ Porapack P với kích thước hạt 80-100 Mesh) để phân tích. Nhiệt độ của cột, kim phun và ngọn lửa ion hóa được duy trì lần lượt ở 60 và 90°C. Khí nitơ (với tốc độ 55 ml/phút) được sử dụng làm khí mang, giúp vận chuyển khí cần phân tích đến cột sắc ký [18]. Đĩa petri chứa mẫu

cây được nuôi cấy trên môi trường bổ sung AgNPs tối ưu và môi trường đối chứng (không có AgNPs) được thu thập sau 8 tuần nuôi cấy để đánh giá sự biến động của khí ET.

2.6. Xác định hoạt độ của enzyme chống oxy hóa bằng phương pháp UV-Vis

Các cụm chồi tươi (300 mg) từ các thí nghiệm được nghiền thành bột mịn trong nitor lỏng. Sau đó, mẫu được hòa tan trong 2 ml dung dịch đệm phosphate 0,1 M, pH 7,4 chứa 0,1 mM EDTA. Hỗn hợp mẫu được ly tâm ở 15.000 vòng/phút trong 20 phút ở nhiệt độ 4°C. Phần nổi phía trên sau ly tâm được giữ lại (bảo quản ở 4°C) để phân tích CAT và APX.

Hoạt tính CAT được xác định bằng cách phản ứng mẫu với 100 µl H₂O₂ 65 mM trong 2 phút. Phức hợp màu vàng tạo thành giữa H₂O₂ và ammonium molybdate (NH₄Mo₇O₂₄) được đo ở bước sóng 405 nm, với 1 đơn vị hoạt tính (U/g) tương đương với việc phân hủy 1 µmol H₂O₂ trong 1 phút [19].

Hoạt tính APX được đo bằng cách theo dõi sự giảm hấp thụ của ascorbate ở bước sóng 290 nm khi enzyme APX oxy hóa ascorbate, với sự hiện diện của 0,5 mM H₂O₂ trong 3 phút. Một đơn vị hoạt tính enzyme (U/g) tương đương với lượng APX cần thiết để oxy hóa 1 µmol ascorbate trong 1 phút [20].

2.7. Xử lý số liệu

Số liệu ghi nhận trong thí nghiệm được xử lý bằng phần mềm Microsoft excel 2016 và SPSS 20.0, phép thử Duncan và LSD với mức ý nghĩa p<0,05 [21]. Mỗi nghiệm thức được lặp lại ngẫu nhiên 3 lần với 100 mẫu/nghiệm thức.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Hiện tượng bất thường ở giai đoạn tái sinh chồi cây African violet

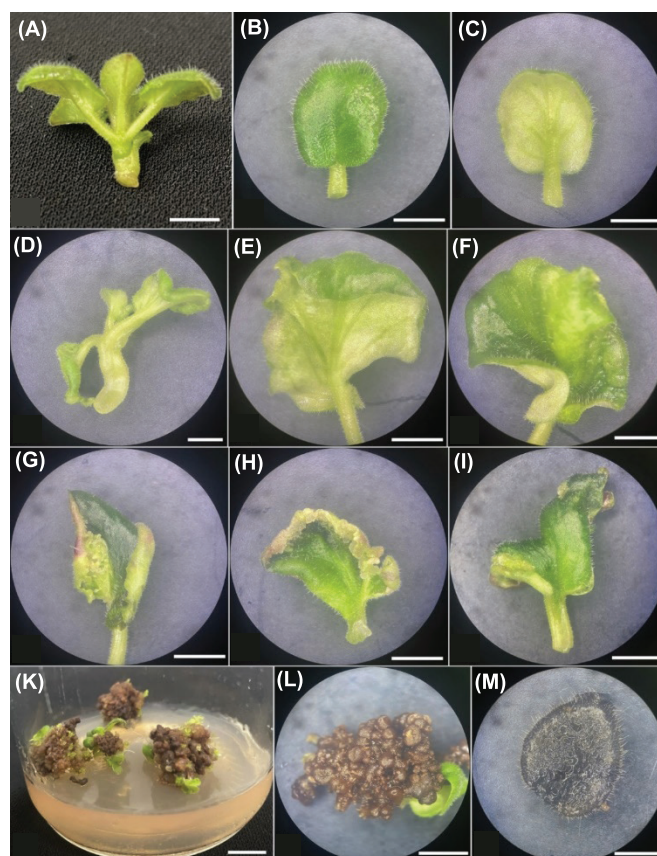
Sau 8 tuần nuôi cấy, hiện tượng thủy tinh thể, sự hình thành mô sẹo ở mép lá, hoại tử mẫu cấy, hiện tượng hóa nâu của mẫu cấy và môi trường nuôi cấy. Những hiện tượng này được quan sát ở các mẫu chứa gân lá chính và lá nguyên của cây African violet (bảng 1).

Bảng 1. Một số hiện tượng bất thường của mẫu cấy cây African violet sau 8 tuần nuôi cấy.

Chỉ tiêu theo dõi	Mẫu lá nguyên	Mẫu gân lá chính
Tỷ lệ tái sinh chồi (%)	40,00±1,15*	66,00±2,08
Số chồi/mẫu	2,67±0,33	5,33±0,33
Chiều cao chồi (cm)	0,50±0,60	0,73±0,06
Thủy tinh thể (%)	20,00±1,15	19,67±1,20
Mô sẹo ở mép lá (%)	21,67±1,67	22,33±1,45
Hoại tử mẫu cấy (%)	14,67±0,88	12,33±1,45
Hóa nâu mẫu cấy và môi trường nuôi cấy (%)	20,33±0,88	10,67±0,67

*: các giá trị thể hiện giá trị trung bình ± sai số chuẩn trong phép thử LSD với p<0,05.

Kết quả ghi nhận được, mẫu gân lá chính cho hiệu quả tái sinh chồi tối ưu hơn so với mẫu lá nguyên với các chỉ tiêu như tỷ lệ tái sinh chồi (66,00%), số chồi/mẫu (5,33 chồi) và chiều cao chồi (0,73 cm) (bảng 1). Kết quả nghiên cứu này trên cây kiwi cũng cho kết quả tương đồng, mẫu gân lá chính cho hiệu quả tái sinh tối ưu hơn so với mẫu lá nguyên [22]. Vì vậy, việc sử dụng mẫu gân lá chính cho hiệu quả tái sinh chồi tối ưu so với mẫu lá nguyên. Ngoài ra, ở giai đoạn tái sinh chồi của cây African violet trên cả 2 mẫu cây gân lá chính và mẫu lá nguyên đều xuất hiện hiện tượng thủy tinh thể (lần lượt là 20,00 và 19,67%), mô sẹo ở mép lá (lần lượt là 21,67 và 22,33%), hoại tử mẫu cấy (lần lượt là 14,67 và 12,33%), hóa nâu mẫu cấy và môi trường nuôi cấy (lần lượt là 20,33 và 15,67%) (bảng 1 và hình 1).



Hình 1. Một số hiện tượng bất thường trong giai đoạn tái sinh chồi của cây African violet sau 4 tuần nuôi cấy. (A, B, C) Mẫu cấy sinh trưởng bình thường; (D, E, F) Hiện tượng thủy tinh thể; (G, H, I) Hiện tượng hình thành mô sẹo ở mép lá; (K, L, M) Hóa nâu mẫu cấy và môi trường nuôi cấy. Thước đo: 1 cm, ngoại trừ A: 0,5 cm.

Hiện tượng thủy tinh thể chủ yếu được ghi nhận trong nuôi cấy *in vitro* và đã được ghi nhận khi nuôi cấy cây Cẩm chương [23] và cây Xương rồng [24]. Nguyên nhân dẫn đến hiện tượng thủy tinh thể trong nhân giống *in vitro* là do môi trường nuôi cấy, loại và nồng độ chất điều hòa sinh trưởng thực vật [25], độ ẩm tương đối và sự tích lũy khí ET [26], hệ thống nuôi cấy và các chất làm đông như agar hay gelrite trong môi trường nuôi cấy [27]. Đối với cây African violet, hiện tượng bất thường ghi nhận ở giai đoạn tái

sinh chồi là khoảng 20% trên cả 2 loại mẫu cây (gân lá chính và lá nguyên) với các đặc điểm của chồi như chồi và lá có hiện tượng mọng nước và biến dạng (hình 1D-1F). Trong nghiên cứu này, hiện tượng mô sẹo xuất hiện ở mép lá lần đầu tiên ghi nhận trong nuôi cấy *in vitro*, điều này có thể là do trong giai đoạn tái sinh chồi, các chồi được tạo thành có kích thước nhỏ và các lá nằm gần và tiếp xúc với môi trường nuôi cấy; do đó, các mẫu lá có hiện tượng hình thành mô sẹo (hình 1G-1I).

Bên cạnh đó, hiện tượng hoại tử mẫu cây, hóa nâu mẫu cây và môi trường nuôi cấy cũng được ghi nhận trong giai đoạn tái sinh chồi (hình 1K-1M); trong đó, mẫu gân lá nuôi cấy trên môi trường MSS ghi nhận các hiện tượng này thấp hơn so với mẫu lá nguyên. Điều này có thể là do mẫu gân lá chính có vết thương sau khi cắt mẫu nên khả năng tiếp xúc, hấp thu dinh dưỡng tốt hơn so với mẫu lá nguyên. Ở điều kiện nuôi cấy trong bình kín, độ ẩm cao trong bình nuôi cấy, thành phần môi trường nuôi cấy và sự tích lũy các khí (đặc biệt là khí ET) đã làm xuất hiện một số hiện tượng không mong muốn trong quá trình nuôi cấy *in vitro* [4, 12]. Do đó, việc cải tiến sự sinh trưởng và phát triển của mẫu cây cũng như khắc phục một số hiện tượng bất thường là việc làm cần thiết trong nhân giống thực vật trong điều kiện *in vitro*.

3.2. Nano bạc gia tăng hiệu quả tái sinh chồi và khắc phục một số hiện tượng bất thường

Sau 4 và 8 tuần nuôi cấy, AgNPs có hiệu quả lên khả năng tái sinh chồi, khắc phục hiện tượng thủy tinh thể, mô sẹo mép lá, hoại tử mẫu cây, hóa nâu mẫu cây và môi trường nuôi cấy, sự biến động khí ET, enzyme chống oxy hóa (bảng 2, 3 và hình 2, 3).

Bảng 2. Ảnh hưởng của nano bạc lên sự tái sinh chồi và sinh trưởng của cụm chồi sau 4 tuần nuôi cấy.

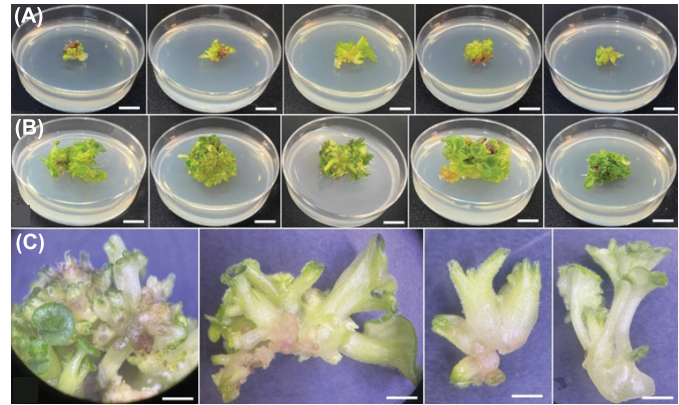
AgNPs (mg/l)	Tỷ lệ tái sinh chồi (%)	Số chồi/mẫu	Chiều cao chồi (cm)	Khối lượng tươi cụm chồi (mg)	Khối lượng khô cụm chồi (mg)
0	67,67 ^a	5,67 ^b	0,47 ^{bc}	282,67 ^c	36,00 ^d
1,0	79,00 ^{bc}	6,00 ^b	0,53 ^{ab}	467,67 ^b	60,67 ^b
2,0	89,33 ^a	6,00 ^b	0,67 ^a	581,33 ^a	72,67 ^a
3,0	82,33 ^b	7,67 ^a	0,43 ^{bc}	409,00 ^b	50,33 ^c
4,0	76,33 ^c	5,00 ^b	0,30 ^c	409,33 ^b	42,33 ^{cd}

*: trong cùng một cột, các ký tự (a, b, c, d) thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở p<0,05 (Duncan's test).

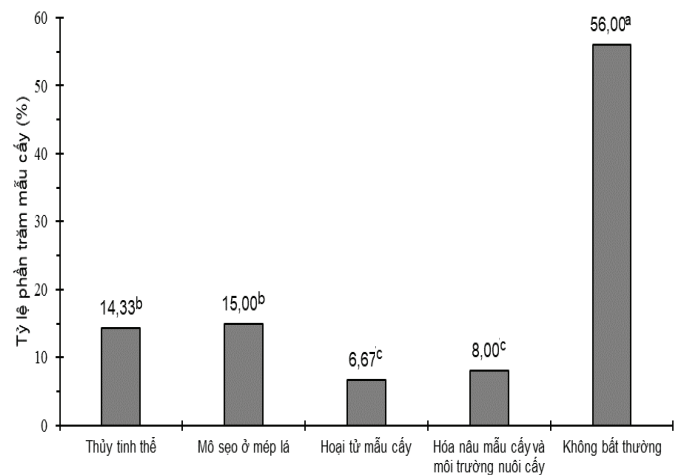
Bảng 3. Ảnh hưởng của nano bạc lên sự tái sinh chồi và sinh trưởng của cụm chồi sau 8 tuần nuôi cấy.

AgNPs (mg/l)	Số chồi/mẫu		Chiều cao chồi (cm)	SPAD	Khối lượng tươi cụm chồi (mg)	Khối lượng khô cụm chồi (mg)
	Tổng số chồi	Chồi >1 cm				
0	7,33 ^{bc*}	1,67 ^{bc}	0,73 ^c	27,33 ^a	1020,33 ^d	120,00 ^e
1,0	10,67 ^a	2,33 ^b	0,80 ^{bc}	27,67 ^a	1198,33 ^c	134,33 ^b
2,0	10,00 ^a	5,67 ^a	1,30 ^a	30,00 ^a	1476,00 ^a	160,67 ^a
3,0	8,00 ^b	1,33 ^d	0,93 ^b	28,00 ^a	1358,00 ^b	147,00 ^{ab}
4,0	6,00 ^c	1,00 ^e	0,73 ^c	25,33 ^a	977,67 ^d	110,67 ^c

*: trong cùng một cột, các ký tự (a, b, c, d, e) thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở p<0,05 (Duncan's test). SPAD: chỉ số đánh giá hàm lượng diệp lục trong lá.



Hình 2. Ảnh hưởng của nano bạc lên khả năng tái sinh chồi cây African violet sau 4 và 8 tuần nuôi cấy. (A) Cụm chồi sau 4 tuần nuôi cấy; (B) Cụm chồi sau 8 tuần nuôi cấy; (C) Hình thái chồi. Thước đo: 2 cm.



Hình 3. Ảnh hưởng của nano bạc ở nồng độ 2 mg/l lên khả năng khắc phục một số hiện tượng bất thường trong giai đoạn tái sinh chồi cây African violet sau 8 tuần nuôi cấy. Các ký tự (a, b, c) thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở p<0,05 (Duncan's test).

Kết quả ghi nhận nghiệm thức bổ sung 2 mg/l AgNPs sau 4 tuần nuôi cấy cho tỷ lệ tái sinh chồi (89,33%), khối lượng tươi và khô của cụm chồi (tương ứng là 581,33 và 72,67 mg) cao hơn các nghiệm thức bổ sung AgNPs khác và đối chứng (bảng 2). Ngoài ra, nghiệm thức bổ sung 3 mg/l AgNPs ghi nhận số chồi/mẫu (7,67 chồi) cao hơn các nghiệm thức còn lại (bảng 1 và hình 2A).

Sau 8 tuần nuôi cấy, nghiệm thức bổ sung 1 và 2 mg/l AgNPs cho hiệu quả tái sinh chồi tốt nhất với tổng số chồi ghi nhận lần lượt là 10,67 chồi/mẫu và 10 chồi/mẫu. Tuy nhiên, số chồi có kích thước >1 cm ghi nhận ở nghiệm thức bổ sung 2 mg/l AgNPs lại cao hơn với 5,67 chồi (bảng 3 và hình 2B và 2C). Ngoài ra, các chỉ số như chiều cao chồi (1,30 cm), khối lượng tươi của cụm chồi (1476 mg) và khối lượng khô của cụm chồi (160,67 mg) đạt tối ưu khi bổ sung 2 mg/l AgNPs (bảng 3). Chỉ số SPAD không có sự khác biệt đáng kể giữa các nghiệm thức.

Ngoài ra, hàm lượng khí ET và hoạt tính enzyme chống oxy hóa của cụm chồi được nuôi cấy trên môi trường có bổ sung AgNPs sau 8 tuần nuôi cấy cũng ghi nhận sự khác biệt có ý nghĩa (bảng 4). Nghiệm thức bổ sung 2 mg/l AgNPs ghi nhận hàm lượng khí ET thấp hơn so với đối chứng (1,15 so với 1,36 ppm); trong khi đó, hoạt tính enzyme của CAT và APX lại gia tăng hơn so với đối chứng (bảng 4). Hơn nữa, ghi nhận hiện tượng bất thường trong giai đoạn tái sinh chồi cho thấy hiện tượng thủy tinh thể (14,33%), mô sẹo ở mép lá (15%), hoại tử mầm cây (6,67%) và hóa nâu mầm cây và môi trường nuôi cấy (8,00%) giảm ở nghiệm thức bổ sung 2 mg/l AgNPs so với nghiệm thức đối chứng (bảng 1 và hình 3).

Bảng 4. Sự tích lũy khí ethylene trong đĩa nuôi cấy và hoạt tính catalase và ascorbate peroxidase của cụm chồi trên môi trường có bổ sung nano bạc sau 8 tuần nuôi cấy.

AgNPs (mg/l)	Khí ET (ppm)	Hoạt tính CAT (U/g)	Hoạt tính APX (U/g)
0	1,36 ^{ab}	77,31 ^c	0,29 ^e
1,0	1,45 ^a	82,32 ^d	1,11 ^b
2,0	1,15 ^c	101,51 ^a	2,37 ^a
3,0	1,32 ^{bc}	88,09 ^b	0,94 ^c
4,0	1,44 ^a	86,90 ^c	0,40 ^d

*: trong cùng một cột, các ký tự (a, b, c, d, e) thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở $p < 0,05$ (Duncan's test). ET: ethylene, APX: ascorbate peroxidase, CAT: catalase.

Khí ET là hormone thực vật duy nhất tồn tại ở dạng khí và có hoạt tính sinh học ở nồng độ rất thấp (0,01-1,0 ppm). Độ nhạy cảm của cây với khí ET có thể thay đổi tùy thuộc vào loài và kiểu đáp ứng. Thực vật từ lâu đã được biết đến có khả năng sản xuất ET, một hormone dạng khí có tác động mạnh đến quá trình phát triển và tăng trưởng, có thể hỗ trợ hoặc đối kháng với các hormone khác [28]. Đã có nhiều nghiên cứu chỉ ra rằng, sự hình thành và hoạt động của ET bị ức chế bởi AgNPs; AgNPs ngăn chặn sự liên kết của khí ET với các thụ thể trong tế bào thực vật, từ đó ngăn chặn quá trình nhận diện và hoạt động của khí ET [29]. Bên cạnh đó, AgNPs có thể hạn chế sự tích lũy khí ET trong bình nuôi cấy chồi dâu tây [4]. Ngoài ra, nồng độ AgNPs ảnh hưởng đến sự sinh trưởng của thực vật có sự khác biệt tùy theo loại cây trồng [4, 28, 29].

Kết quả của nghiên cứu cho thấy, ở nồng độ tối ưu, AgNPs giúp gia tăng hoạt tính CAT và APX. Hoạt tính của APX và CAT ghi nhận trên cây Cải bẹ xanh trong môi trường có bổ sung AgNPs (25-50 ppm) gia tăng và giúp cây cũng sinh trưởng và phát triển mạnh nhất [30]. Ngoài ra, bổ sung AgNPs vào môi trường nuôi cấy cây Lúa và Cải bẹ xanh ở mức độ phân tử ghi nhận được sự tăng mạnh biểu hiện gen FSD1 của SOD, CATa và APXa; do đó, làm giảm đáng kể sự tích lũy gốc H_2O_2 , giúp gia tăng sự sinh trưởng của cây [30, 31]. Trong nghiên cứu này, bổ sung AgNPs có hiệu quả lên khả năng tái sinh chồi, khắc phục một số hiện tượng bất thường, sự biến động khí ethylen, enzyme kháng oxy hóa (bảng 2, 3 và hình 2, 3). Từ những kết quả trên cho

thấy, bổ sung 2 mg/l AgNPs vào môi trường nuôi cấy đã giúp gia tăng hiệu quả tái sinh chồi cũng như hạn chế tỷ lệ mầm có hiện tượng thủy tinh thể, mô sẹo ở mép lá, hoại tử mầm cây, hóa nâu mầm cây và môi trường nuôi cấy của cây African violet.

4. Kết luận

Trong nghiên cứu này, việc bổ sung AgNPs (2 mg/l) có hiệu quả tích cực trong việc tái sinh chồi và sự sinh trưởng của cụm chồi, đồng thời giúp khắc phục hiện tượng thủy tinh thể, mô sẹo ở mép lá, hoại tử và hóa nâu của mầm cây và môi trường nuôi cấy. AgNPs còn giúp giảm sự tích lũy ET trong hệ thống nuôi cấy và gia tăng hoạt động của APX và CAT trong giai đoạn tái sinh chồi của cây African violet.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được hỗ trợ kinh phí bởi Chương trình phát triển nhóm nghiên cứu xuất sắc hạng I về “Nghiên cứu ảnh hưởng của một số hạt nano kim loại lên sự phát sinh hình thái, sinh trưởng - phát triển, sinh lý - sinh hóa và tích lũy hợp chất thứ cấp của một số cây trồng có giá trị kinh tế nuôi cấy *in vitro*” (mã số đề tài NCXS01.03/22-24) của Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam và Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên. Các tác giả xin chân thành cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] K. Gopinath, S. Gowri, V. Karthika, et al. (2014), “Green synthesis of gold nanoparticles from fruit extract of *Terminalia arjuna*, for the enhanced seed germination activity of *Gloriosa superba*”, *Journal of Nanostructures*, **4**(3), pp.1-11, DOI: 10.1007/s40097-014-0115-0.
- [2] H.M.H. Salama (2012), “Effects of silver nanoparticles in some crop plants, common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and corn (*Zea mays* L.)”, *International Journal of Biotechnology Research*, **3**(10), pp.190-197.
- [3] J.P. Giraldo, M.P. Landry, S.M. Faltermeier, et al. (2014), “Plant nanobionics approach to augment photosynthesis and biochemical sensing”, *Nature Materials*, **13**(4), pp.400-408, DOI: 10.1038/nmat3890.
- [4] H.T. Tung, H.G. Bao, D.M. Cuong, et al. (2021a), “Silver nanoparticles as the sterilant in large-scale micropropagation of chrysanthemum”, *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, **57**, pp.897-906, DOI: 10.1007/s11627-021-10163-7.
- [5] D.T. Nhut, D.B. Trinh, D.M. Cuong, et al. (2018), “Study on silver nanoparticles as a novel explant disinfectant for micropropagation of African violet (*Saintpaulia ionantha* H. Wendl.)”, *Vietnam Journal of Biotechnology*, **16**(1), pp.87-97, DOI: 10.15625/1811-4989/16/1/9807.
- [6] V.T. Mo, L.K. Cuong, H.T. Tung, et al. (2020), “Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from the seaweed *Kappaphycus striatus*”, *Acta Physiologiae Plantarum*, **42**, DOI: 10.1007/s11738-020-03102-3.

- [7] H.T. Tung, T.T. Thuong, D.M. Cuong, et al. (2021b), “Silver nanoparticles improved explant disinfection, *in vitro* growth, runner formation and limited ethylene accumulation during micropropagation of strawberry (*Fragaria × ananassa*)”, *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, **145**(2), pp.393-403, DOI: 10.1007/s11240-021-02015-4.
- [8] H.T. Tung, P.T. Suong, H.D. Khai, et al. (2021c), “Protocorm-like body formation, stem elongation and enhanced growth of *Anthurium andraeanum* ‘Tropical’ plantlet on medium containing silver nanoparticles”, *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, **58**, pp.70-79, DOI: 10.1007/s11627-021-10217-w.
- [9] D.M. Cuong, P.C. Du, H.T. Tung, et al. (2021), “Silver nanoparticles as an effective stimulant in micropropagation of *Panax vietnamensis* - A valuable medicinal plant”, *Plant Cell Tissue Organ Culture*, **146**(3), pp.577-588, DOI: 10.1007/s11240-021-02095-2.
- [10] H.T. Tung, N.B. Nam, N.P. Huy, et al. (2018), “A system for large scale production of chrysanthemum using microponics with the supplement of silver nanoparticles under light-emitting diodes”, *Scientia Horticulturae*, **232**, pp.153-161, DOI: 10.1016/j.scienta.2017.12.063.
- [11] H.T.M. Ngan, D.M. Cuong, H.T. Tung, et al. (2020a), “The effect of coban and silver nanoparticles on overcoming leaf abscission and enhanced growth of rose (*Rosa hybrida* L. ‘Baby Love’) plantlets cultured *in vitro*”, *Plant Cell Tissue Organ Culture*, **141**(2), pp.393-405, DOI: 10.1007/s11240-020-01796-4.
- [12] H.T.M. Ngan, H.T. Tung, B.V. Le, et al. (2020b), “Evaluation of root growth, antioxidant enzyme activity and mineral absorbability of carnation (*Dianthus caryophyllus* ‘Express golem’) plantlets cultured in two culture systems supplemented with iron nanoparticles”, *Scientia Horticulturae*, **272**, DOI: 10.1016/j.scienta.2020.109612.
- [13] M. Ioannou (1987), “Micropropagation of African violet from petiole and leaf blade tissue”, *Technical Bulletin (Cyprus)*, **92**, pp.114-117.
- [14] T. Murashige, F. Skoog (1962), “A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures”, *Plant Physiology*, **15**, pp.473-497.
- [15] P.D. Paiva, S.C.B.R. Jose, M. Pasqual, et al. (1997), “Effects of naphthalene acetic acid and GA₃ on the violet micropropagation”, *Ceres*, **44**, pp.392-398, DOI: 10.20546/ijcmas.2018.703.036.
- [16] D.T. Nhut, P.N. Uyen, T.T.L. Anh, et al. (2007), “Temporary immersion system for rapid *in vitro* African violet (*Saintpaulia ionantha* H. Wendl)”, *Vietnam Journal of Biotechnology*, **5**(3), pp.371-381.
- [17] N.H. Chau, B.A. Le, Q.B. Ngo, et al. (2008), “Some results in manufacturing of nanosilver and investigation of its application for disinfection”, *Advances in Natural and Applied Sciences*, **9**(2), pp.241-248.
- [18] S.M. Cristescu, J. Mandon, D. Arslanov, et al. (2012), “Current methods for detecting ethylene in plants”, *Annals of Botany*, **111**(3), pp.347-360, DOI: 10.1093/aob/mcs259.
- [19] L. Goth (1991), “A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range”, *Clinica Chimica Acta*, **196**(2-3), pp.143-151, DOI: 10.1016/0009-8981(91)90067-m.
- [20] Y. Nakano, K. Asada (1981), “Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts”, *Plant and Cell Physiology*, **22**(5), pp.867-880, DOI: 10.1093/oxfordjournals.pcp.a076232.
- [21] D.B. Duncan (1955), “Multiple range and multiple F test”, *Biometrics*, **11**(1), pp.1-42.
- [22] N.T.M. Hanh, H.T. Tung, H.D. Khai, et al. (2022), “Efficient somatic embryogenesis and regeneration from leaf main vein and petiole of *Actinidia chinensis* planch. via thin cell layer culture technology”, *Scientia Horticulturae*, **298**, DOI: 10.1016/j.scienta.2022.110986.
- [23] M. Kharrazi, A. Tehranifar, S. Nemati, et al. (2011), “*In vitro* culture of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) focusing on the problem of vitrification”, *Journal of Biological and Environmental Sciences*, **5**(13), pp.1-6.
- [24] O.H.G. Osuna, A.B. Mendoza, L.E. Bocardo (2011), “Hyperhydricity control of *in vitro* shoot of *Turbinicarpus valdezianus* (Möller) GL&F”, *Phyton*, **80**(5), pp.175-179, DOI: 10.32604/phyton.2011.80.175.
- [25] C. Kevers (2004), “Hyperhydricity of micropropagated shoots: A typically stress-induced change of physiological state”, *Plant Cell Tissue Organ Culture*, **77**(5), pp.181-191, DOI: 10.1023/B:TICU.0000016825.18930.e4.
- [26] C.C. Lai, H.M. Lin, S.M. Nalawade (2005), “Hyperhydricity in shoot cultures of *Scrophularia yoshimurae* can be effectively reduced by ventilation of culture vessels”, *Journal of Plant Physiology*, **162**(2), pp.355-361, DOI: 10.1016/j.jplph.2004.07.015.
- [27] B. Winarto, M.A. Aziz, A.A. Rashid, et al. (2016), “Effect of permeable vessel closure and gelling agent on reduction of hyperhydricity in *in vitro* culture of carnation”, *Indonesian Journal of Agricultural Science*, **5**(1), pp.11-17, DOI: 10.21082/ijas.v5n1.2004.p11-19.
- [28] G.K. Muday, A. Rahman, B.M. Binder (2012), “Auxin and ethylene: Collaborators or competitors?”, *Trends in Plant Science*, **17**(4), pp.181-195, DOI: 10.1016/j.tplants.2012.02.001.
- [29] R. Razavizadeh, F. Rostami (2015), “Risks and benefits assessments of silver nanoparticles in tomato plants under *in vitro* culture”, *Journal of Engineering Research*, **3**(7), pp.51-55.
- [30] P. Sharma, D. Bhatt, M.G.H. Zaidi, et al. (2012), “Silver nanoparticle-mediated enhancement in growth and antioxidant status of *Brassica juncea*”, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **167**(8), pp.2225-2233, DOI: 10.1007/s12010-012-9759-8.
- [31] P.M.G. Nair, I.M. Chung (2014) “Physiological and molecular level effects of silver nanoparticles exposure in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings”, *Chemosphere*, **112**, pp.105-113, DOI: 10.1016/j.chemosphere.2014.03.056.