

NGHIÊN CỨU ẢNH HƯỞNG CỦA HẠT NANO KẼM OXIT ĐẾN SỰ SINH TRƯỞNG VÀ PHÁT TRIỂN CỦA CÂY CẨM CHƯỚNG (*Dianthus caryophyllus* L.) *in vitro*

Đào Thị Sen*, Bùi Thị Thanh Hương, Nguyễn Thị Ngọc và Nguyễn Thị Hồng Hạnh

Khoa Sinh học, Trường Đại học Sư phạm Hà Nội

Tóm tắt. Nano kẽm oxit là một trong số các hạt nano được sử dụng nhiều trong các lĩnh vực bởi nhiều đặc tính nổi trội so với vật liệu thông thường. Nghiên cứu tiến hành đánh giá ảnh hưởng của nano kẽm oxit đến sự sinh trưởng và phát triển của cây cẩm chướng *in vitro* trên môi trường bổ sung nano kẽm oxit (0-20 mg/L) hoặc kết hợp với ZnSO₄ trong giai đoạn phát sinh chồi, dưỡng chồi và ra rễ. Chồi cẩm chướng *in vitro* cao khoảng 2 cm với 2 cặp lá là nguồn nguyên liệu. Kết quả được đánh giá sau 3 và 6 tuần nuôi cấy trên môi trường tương ứng cho thấy hạt nano kẽm oxit có tác dụng trong sự phát sinh chồi ở cây cẩm chướng *in vitro* ở nồng độ thấp (1 mg/L). Khi tăng nồng độ nano kẽm oxit hệ số nhân chồi giảm dần. Trong giai đoạn dưỡng chồi, nano kẽm oxit có tác dụng kích thích sự phát triển chiều cao, giảm hàm lượng chlorophyll. Công thức bổ sung 1 mg/L nano kẽm oxit thu được kết quả tốt nhất sau 6 tuần nuôi cấy đạt 2,15 chồi/mẫu, chiều cao trung bình đạt 6,15 cm/mẫu, hàm lượng chlorophyll tổng số là 361,75 µg/g. Thiếu kẽm ảnh hưởng lớn đến sự phát sinh rễ, khi bổ sung nano kẽm oxit giúp làm tăng số rễ và chiều dài rễ (công thức bổ sung 1 mg/L nano kẽm oxit cho rễ nhỏ và dài, đạt 10,1 rễ/mẫu so với môi trường loại bỏ hoàn toàn kẽm cho rễ nhỏ, ngắn, đạt 5,65 rễ/mẫu). Tuy nhiên, môi trường đối chứng MS cơ bản (chứa đầy đủ muối kẽm) cho kết quả tương đương hoặc tốt hơn ở một số chỉ tiêu (trung bình sau 6 tuần đạt 2,25 chồi/mẫu, chiều cao chồi 4,25 cm/mẫu, hàm lượng chlorophyll tổng số 751,50 µg/g, rễ to, dài đạt 14,6 rễ/chồi).

Từ khóa: Chlorophyll, *Dianthus caryophyllus* L., nano kẽm oxit, sinh trưởng và phát triển.

1. Mở đầu

Kẽm có vai trò trong dinh dưỡng cây trồng như là việc ảnh hưởng đến sự tổng hợp sinh học axit indol acetic; là thành phần thiết yếu của men metallo-enzymes carbonic, anhydrase, anoxhol dehydrogenase. Kẽm còn đóng vai trò quan trọng trong quá trình tổng hợp axit nucleic và protein. Đặc biệt, kẽm còn giúp cho việc tăng cường khả năng sử dụng đạm và lân trong cây. Trong nuôi cấy mô tế bào thực vật kẽm được bổ sung dưới dạng ion kẽm trong muối ZnSO₄ cung cấp cho cây.

Gần đây, với sự phát triển của công nghệ nano, các hạt nano kẽm oxit (NP ZnO) là một trong số các hạt nano được ứng dụng trong nhiều lĩnh vực. Các hạt NP ZnO có đặc tính hấp thụ và phản xạ UV đặc biệt. Chúng đang được sử dụng rộng rãi trong nhiều sản phẩm như sơn, vật liệu phủ, sản phẩm chăm sóc y tế. Trong lĩnh vực thực phẩm và nông nghiệp nano kẽm oxit cũng được sử dụng trong thuốc trừ sâu, thuốc diệt nấm và phân bón. Tác dụng của NP ZnO có khả năng cải thiện sự nảy mầm, tăng trưởng rễ, tăng trưởng chồi, trọng lượng khô của cây đậu xanh, đậu gà, cây cà chua và năng suất quả ở cây lạc... Tuy nhiên, hạt nano ZnO đã cho thấy

Ngày nhận bài: 19/8/2019. Ngày sửa bài: 29/9/2019. Ngày nhận đăng: 3/10/2019.

Tác giả liên hệ: Đào Thị Sen. Địa chỉ e-mail: sen.hnue@gmail.com

độc tính ở các cây như cải củ, cải dầu, cỏ Ý (*Lolium multiflorum*), xà lách, dưa chuột, cải xanh, ngô, lúa và khoai lang do sự huỷ bỏ các tác nhân chống oxy hóa ROS và tác nhân điều khiển chu kỳ tế bào, dẫn đến tổn thương DNA và gây chết tế bào [1, 2].

Trong nuôi cấy mô thực vật, nghiên cứu ảnh hưởng của hạt nano nói chung và nano kẽm nói riêng bước đầu thu được những kết quả có lợi như cải thiện và tăng cường sự nảy mầm của hạt, tăng trưởng và năng suất cây trồng tăng, tăng hàm lượng các hợp chất hoạt tính sinh học và giảm sự nhiễm sinh học... nhưng cũng có nhiều nghiên cứu chỉ ra các tác động bất lợi gây độc tế bào. Tác động của hạt nano phụ thuộc rất lớn vào loại hạt nano, loại cây trồng, thời gian tiếp xúc và nồng độ hạt nano sử dụng [2].

Cẩm chướng (*Dianthus caryophyllus* L.) là loại hoa cắt cành đẹp và phổ biến cho năng suất và giá trị kinh tế cao ở Việt Nam. Cẩm chướng còn là hai loại cây điển hình trong nuôi cấy mô thực vật vì chúng có thời gian sinh trưởng ngắn, tốc độ sinh trưởng nhanh và dễ dàng nuôi cấy. Vì vậy, nghiên cứu này được thực hiện nhằm đánh giá ảnh hưởng của nano kẽm oxit lên sự sinh trưởng và phát triển của cây cẩm chướng *in vitro*, góp phần đánh giá vai trò thay thế, bổ sung hạt nano kẽm oxit trong nuôi cấy mô là cần thiết.

2. Nội dung nghiên cứu

2.1. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1.1. Vật liệu

Cây cẩm chướng *in vitro*.

Hạt nano kẽm oxit (Sigma- Aldrich, Mỹ) được cung cấp bởi Viện Công nghệ Môi trường - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

2.1.2. Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp chuẩn bị môi trường và điều kiện nuôi cấy

Môi trường nuôi cấy là môi trường MS [3] và MS cải biên loại bỏ thành phần muối kẽm và MS cải biên có giữ 1/2 muối kẽm tương ứng có bổ sung 30 g/L sucrose; 7,0 g/L agar; các chất điều hòa sinh trưởng và nano tương ứng với các nồng độ khác nhau tùy theo từng thí nghiệm (Bảng 1). Các hạt nano kẽm oxit được phân tán trong nước cất khử ion và siêu âm (300 W, 40 kHz) trong 30 phút [4]. Các mẫu thí nghiệm được nuôi cấy trong phòng nuôi với nhiệt độ $25 \pm 2^\circ\text{C}$, độ ẩm 55 - 60%, sử dụng ánh sáng đèn led trắng, thời gian chiếu sáng 16h/ngày.

Bảng 1. Thành phần môi trường nuôi cấy

Tên môi trường	Thành phần
Nhân chồi	MS + 30 g/L sucrose + 7 g/L agar + 0,5 mg/LBAP + 30 ml/L nước dừa, pH 5,7
Dưỡng chồi	MS + 30 g/L sucrose + 7 g/L agar + 30 ml/L nước dừa, pH 5,7
Ra rễ	MS + 30 g/L sucrose + 7 g/L agar, pH 5,7

Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần, mỗi thí nghiệm cấy 03 bình/nghiệm thức, mỗi bình cấy 5 mẫu.

Nghiên cứu ảnh hưởng của hạt nano ZnO ở giai đoạn nhân chồi

Các mẫu đoạn thân cây cẩm chướng *in vitro* với 2 đốt/đoạn sử dụng cho môi trường nhân chồi được cấy vào môi trường nhân chồi trong 2 công thức là MS cải biên (không có muối kẽm kí hiệu MS Zn) và MS cải biên giữ 1/2 lượng muối kẽm trong môi trường (kí hiệu: MS 1/2Zn) bổ sung các hạt nano với các nồng độ khác nhau (0; 1; 5; 10; 20 mg/L), đối chứng là môi trường nhân chồi chứa MS cơ bản nhằm khảo sát ảnh hưởng của các hạt nano đến quá trình phát sinh chồi *in vitro*. Số liệu thí nghiệm được thu nhận sau 3 tuần và 6 tuần nuôi cấy. Các chỉ tiêu được thu nhận là số chồi/mẫu, đặc điểm chồi.

Nghiên cứu ảnh hưởng của hạt nano ZnO ở giai đoạn dưỡng chồi

Mẫu là các chồi cây cẩm chương có hình thái tương đương và có chiều cao khoảng 2cm, với 2 cặp lá được đưa vào môi trường MS cải biên MS Zn và MS 1/2 Zn bổ sung các hạt nano với các nồng độ khác nhau (0; 1; 5; 10; 20 mg/L) có kí hiệu lần lượt tương ứng là: Zn0, Zn1, Zn5, Zn10, Zn20 và 1/2Zn0, 1/2Zn1, 1/2Zn5, 1/2Zn10, 1/2Zn20, đối chứng là môi trường dưỡng chồi chứa MS cơ bản (kí hiệu ĐC) nhằm khảo sát ảnh hưởng của các hạt nano ZnO ở giai đoạn dưỡng chồi. Số liệu thí nghiệm được thu nhận sau 3 tuần và 6 tuần nuôi cấy. Các chỉ tiêu được thu nhận là chiều cao chồi, chất lượng chồi, hàm lượng diệp lục, khối lượng khô.

Nghiên cứu ảnh hưởng của hạt nano ZnO đến khả năng ra rễ

Các chồi có chiều cao khoảng 3 cm, hình thái tương đương được cấy vào môi trường ra rễ MS Zn và MS 1/2 Zn bổ sung các hạt nano với các nồng độ khác nhau với các nồng độ khác nhau (0; 1; 5; 10; 20 mg/L), đối chứng là môi trường ra rễ chứa MS cơ bản nhằm khảo sát ảnh hưởng của các hạt nano ZnO ở giai đoạn ra rễ. Số liệu thí nghiệm được thu nhận sau 3 tuần nuôi cấy. Các chỉ tiêu được thu nhận là số rễ/mẫu, đặc điểm rễ nhằm đánh giá khả năng ra rễ của chồi *in vitro*.

Phương pháp xác định hàm lượng diệp lục

Mẫu cây sau 6 tuần trên môi trường dưỡng chồi sẽ được đưa ra khỏi bình cấy, cân khối lượng tươi và các định hàm lượng diệp lục. Hàm lượng diệp lục được xác định theo phương pháp của Hall và Rao (1999) và được xác định theo công thức: [5]

Công thức tính diệp lục a $\mu\text{g/mL}$	$11,77 \times \text{OD664} - 2,29 \times \text{OD647}$
Công thức tính diệp lục b $\mu\text{g/mL}$	$20,03 \times \text{OD647} - 4,77 \times \text{OD664}$
Công thức tính diệp lục tổng số a+b $\mu\text{g/mL}$	$7 \times \text{OD664} - 17,04 \times \text{OD647}$

Phương pháp xác định hàm lượng vật chất khô

Lấy mẫu chồi cây cẩm chương *in vitro* ra khỏi bình nuôi cấy và cân ngay bằng cân phân tích. Sau đó sấy ở 105°C trong 2 h đầu, 70 – 80°C trong 48 h tiếp theo. Cân lại mẫu bằng cân phân tích. Hàm lượng chất khô tuyệt đối được xác định theo công thức:

$$\text{Hàm lượng chất khô tuyệt đối (\%)} = (\text{Khối lượng khô} \times 100) / \text{Khối lượng tươi.}$$

Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu thí nghiệm được xử lý theo phương pháp thống kê sinh học bằng chương trình Excels và phần mềm xử lý thống kê SPSS phiên bản 16.0. Sự sai khác giữa các giá trị được xác định bằng Tukey's-b với $\alpha = 0,05$.

2.2. Kết quả và thảo luận

2.2.1. Ảnh hưởng của hạt nano ZnO ở giai đoạn nhân chồi

Mẫu đoạn thân cây cẩm chương với 2 đốt/đoạn sau được cấy vào môi trường thí nghiệm sẽ được theo dõi trong 3 tuần và 6 tuần. Kết quả được thể hiện rõ trong bảng sau:

Bảng 2. Ảnh hưởng của hạt nano ZnO đến khả năng tạo chồi sau 3 tuần nuôi cấy

Công thức môi trường	Số chồi trung bình	Đặc điểm chồi	Công thức môi trường	Số chồi trung bình	Đặc điểm chồi
Zn0	1,25 ^a ± 0,07	Chồi nhỏ, thân mảnh	½ Zn0	1,45 ^a ± 0,14	Chồi nhỏ, trắng, thấp
Zn1	2,15 ^c ± 0,07	Chồi to, cao, xanh	½ Zn1	2,45 ^c ± 0,04	Chồi nhỏ, trắng, cao
Zn5	1,75 ^b ± 0,14	Chồi to, ngắn, xanh	½ Zn5	1,35 ^a ± 0,21	Chồi nhỏ, trắng
Zn10	1,65 ^b ± 0,04	Chồi to, ngắn, xanh	½ Zn10	1,55 ^a ± 0,14	Chồi nhỏ, trắng, thấp

Zn20	1,85 ^b ± 0,04	Chồi to, ngắn, xanh	½ Zn20	1,40 ^a ± 0,04	Chồi nhỏ, trắng, thấp
ĐC	2,25 ^c ± 0,07	Chồi to, cao, xanh	ĐC	2,25 ^c ± 0,07	Chồi to, cao, xanh

Ghi chú: Những chữ cái (a, b, c) trong cùng một cột thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê với $P = 0,05$

Kết quả trình bày trong bảng 2 cho thấy, sau 3 tuần nuôi cây đã có sự khác biệt rõ rệt về số lượng chồi trung bình ở các công thức có nồng độ nano ZnO khác nhau và công thức đối chứng.

Kết quả cho thấy tỷ lệ tạo chồi của mẫu giảm rõ rệt trong môi trường MS không kẽm và không bổ sung hạt nano. Cụ thể, khi tăng hàm lượng hạt nano từ 0 mg/L lên 1 mg/L thì số lượng chồi trung bình tăng từ 1,25 lên 2,15. Khi hàm lượng nano kẽm tiếp tục tăng lên cao như ở công thức Zn5, Zn10 và Zn20 thì lượng chồi trung bình giảm dần. Tuy nhiên, khi so với mẫu ĐC là môi trường MS bình thường không bổ sung hạt nano thì khi thay thế hoàn toàn kẽm trong môi trường bằng hạt nano kẽm ở các nồng độ khác nhau đã làm giảm lượng chồi của mẫu. Xét về chất lượng chồi thì mẫu Zn1 và mẫu đối chứng cho chất chồi có chất lượng cao nhất, mẫu Zn0 cho chồi có chất lượng thấp nhất.

Tương tự như vậy đối với các mẫu trong môi trường MS ½ kẽm, số chồi trung bình cũng thấp nhất ở công thức ½ Zn0 và cao nhất ở công thức ½ Zn1 khi hàm lượng nano trong môi trường ở mức 5mg/L. Sau đó lượng chồi giảm dần khi tiếp tục tăng hàm lượng nano kẽm trong môi trường lên mức 5 – 10 – 20 mg/L. Cụ thể khi tăng nồng độ nano kẽm từ 0 mg/L lên 5 mg/L thì số chồi trung bình tăng từ 1,45 lên 2,45 và chất lượng chồi cũng tăng, chồi cao hơn. Sau đó hàm lượng nano tăng thì số chồi trung bình lại giảm. Số chồi trung bình cao nhất là ở công thức ½ Zn1 với số chồi trung bình là 2,45 và thấp nhất là ở công thức 0 khi không bổ sung hạt nano. Tuy nhiên khi so các mẫu thí nghiệm với mẫu đối chứng ta có thể thấy được số chồi trung bình ở mẫu đối chứng là cao nhất với 2,25 chồi/cây. Các công thức ½ Zn5 – ½ Zn10 và ½ Zn20 cho số chồi trung bình tương ứng là 1,35 – 1,55 và 1,4.

Như vậy, khi thay thế kẽm trong môi trường bằng hạt nano kẽm với hàm lượng 1 mg/L sẽ cho kết quả tốt nhất, tuy nhiên khi so với mẫu đối chứng thì không có sự khác biệt có ý nghĩa. So sánh với kết quả nghiên cứu của Hira Zafar và cộng sự (2016) với đối tượng cây cải *Brassica nigra* với các hàm lượng hạt nano thí nghiệm tương tự (0; 1; 5; 10; 20) cho kết quả hạt nano kẽm gây kích thích phát triển chồi khi xử lý hạt của mẫu bằng 1 mg/L nano rồi đem gieo, kết quả này có sự khác biệt với kết quả của chúng tôi khi thử trên đối tượng là cây hoa cải chường [6].

Mẫu thí nghiệm sau khi được lấy số liệu sau 3 tuần nuôi cây sẽ tiếp tục được theo dõi thêm 3 tuần. Kết quả thí nghiệm sau 6 tuần được thể hiện qua bảng 3.

Bảng 3. Ảnh hưởng của hạt nano ZnO đến khả năng tạo chồi sau 6 tuần nuôi cấy

Công thức môi trường	Số chồi trung bình	Đặc điểm chồi	Công thức môi trường	Số chồi trung bình	Đặc điểm chồi
Zn0	2,60 ^b ± 0,04	Chồi nhỏ, thân mảnh	½ Zn0	1,85 ^a ± 0,07	Chồi nhỏ, trắng, thấp
Zn1	3,65 ^d ± 0,14	Chồi to, cao, xanh	½ Zn1	2,70 ^c ± 0,14	Chồi nhỏ, trắng, cao
Zn5	3,25 ^c ± 0,11	Chồi to, ngắn, xanh	½ Zn5	2,35 ^{b±} 0,04	Chồi nhỏ, trắng
Zn10	3,35 ^c ± 0,07	Chồi to, ngắn, xanh	½ Zn10	2,25 ^{b±} 0,07	Chồi nhỏ, trắng, thấp
Zn20	2,15 ^a ± 0,21	Chồi to, ngắn, xanh	½ Zn20	2,30 ^{b±} 0,04	Chồi nhỏ, trắng, thấp
ĐC	4,75 ^e ± 0,07	Chồi to, cao, xanh	ĐC	4,75 ^{d±} 0,07	Chồi to, cao, xanh

Ghi chú: Những chữ cái (a, b,c,d,e) trong cùng một cột thể hiện sự sai khác có ý nghĩa với $\alpha = 0,05$

Bảng 3 cho thấy được sự khác biệt rõ rệt hơn về số lượng chồi trung bình mẫu. Ở chỉ tiêu số chồi trung bình, trong số các mẫu từ Zn0 đến Zn20 ta có thể thấy mẫu có số chồi thấp nhất là ở công thức MS cải biên bổ sung 20 mg/L nano ZnO với 2,15 chồi/ mẫu. Trong khi đó, công thức có số chồi trung bình cao nhất là MS Zn 1 mg/L với 3,65 chồi. Tuy nhiên, khi so sánh các mẫu với mẫu đối chứng thì chỉ tiêu số chồi trung bình ở mẫu đối chứng vẫn là cao nhất. Tương tự như vậy, với số chồi trung bình, trong 5 mẫu thí nghiệm với môi trường MS ½ kẽm, mẫu có số chồi thấp nhất là mẫu ½ Zn0 với 1,85 chồi và mẫu có số chồi cao nhất là mẫu ½ Zn1 với 2,7 chồi/mẫu. Khi so sánh 5 mẫu thí nghiệm với mẫu đối chứng ĐC thì mẫu đối chứng vẫn có số chồi trung bình nhiều nhất là 4,75 chồi.

Như vậy kết quả thu được sau 3 tuần và 6 tuần theo dõi đối với chỉ tiêu về số chồi trung bình là không đổi. Công thức cho kết quả tốt nhất với môi trường nhân chồi là công thức đối chứng. vậy khi thay thế kẽm trong môi trường bằng hạt nano kẽm thì nano kẽm ức chế sự phát sinh chồi của mẫu.



MS Zn1



Đối chứng

Hình 1. Mẫu chồi in vitro sau 6 tuần trên các môi trường nhân chồi

2.2.2. Ảnh hưởng của hạt nano ZnO ở giai đoạn dưỡng chồi

Bảng 4. Ảnh hưởng của hạt nano ZnO sau 3 tuần nuôi cấy ở giai đoạn dưỡng chồi

Công thức	Chiều cao trung bình	Đặc điểm chồi	Công thức	Chiều cao trung bình	Đặc điểm chồi
Zn0	2,35 ^c ± 0,07	Chồi xanh, thấp	½ Zn0	2,55 ^b ± 0,07	Chồi trắng, nhỏ, thấp
Zn1	2,70 ^b ± 0,04	Chồi xanh, cao, to	½ Zn1	2,75 ^b ± 0,07	Chồi trắng, nhỏ, cao
Zn5	2,55 ^b ± 0,11	Chồi xanh, cao, to	½ Zn5	2,42 ^b ± 0,11	Chồi trắng, nhỏ, thấp
Zn10	2,35 ^c ± 0,07	Chồi xanh, cao, to	½ Zn10	1,98 ^a ± 0,04	Chồi trắng, nhỏ, thấp
Zn20	2,15 ^a ± 0,04	Chồi xanh, cao, to	½ Zn20	2,12 ^a ± 0,04	Chồi trắng, nhỏ, thấp
ĐC	2,65 ^b ± 0,07	Chồi xanh, cao, to	ĐC	2,65 ^b ± 0,07	Chồi xanh, cao, to

Ghi chú: Những chữ cái (a, b, c) trong cùng một cột thể hiện sự sai khác có ý nghĩa với $\alpha = 0,05$

Trong thí nghiệm này, mẫu cấy chồi được sử dụng là những đoạn chồi có chất lượng tương đương và có chiều cao khoảng 2cm. Mẫu sẽ được cấy vào các bình môi trường dưỡng

chồi với hàm lượng nano kẽm đã được bổ sung như công thức thí nghiệm trên. Kết quả được thể hiện ở Bảng 4.

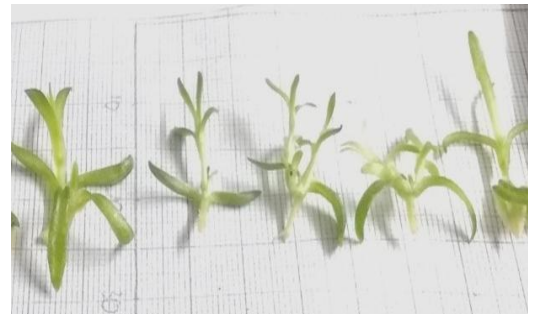
Từ kết quả Bảng 4 ta thấy đối với môi trường dưỡng chồi, khi trong môi trường loại bỏ hoàn toàn kẽm và thay thế hoàn toàn bằng hạt nano thì chiều cao cây sau 3 tuần nuôi cấy có sự khác biệt rõ rệt. Ta dễ dàng nhận thấy với công thức Zn1 thì chiều cao trung bình của mẫu là cao nhất (2,70 cm) tương ứng với hàm lượng nano kẽm trong môi trường là 1 mg/L. Chiều cao trung bình của mẫu ở các công thức có sự chênh lệch với mẫu đối chứng một cách rõ ràng. Ta có thể thấy với công thức Zn0 chỉ tiêu theo dõi đạt giá trị thấp nhất. Khi tăng hàm lượng NZnO lên 1 mg/L thì chiều cao chồi đạt giá trị cao nhất và sau đó giảm dần khi tiếp tục tăng hàm lượng hạt nano bổ sung. Tuy nhiên khi so sánh cả 5 nghiệm thức với mẫu đối chứng nhận thấy cây cải chường phát triển tốt nhất trong môi trường MS bình thường, khi thay thế hoàn toàn kẽm trong môi trường bằng hạt nano kẽm thì hầu hết các công thức chiều cao chồi giảm ngoại trừ đối Zn1.

Đối với môi trường dưỡng chồi khi loại bỏ ½ lượng kẽm và bổ sung hạt nano thì chiều cao trung bình của cây đạt giá trị cao nhất ở công thức 1 là 2,75 cm và có sự giảm dần khi hàm lượng NZnO bổ sung trong môi trường tăng lên.

Ở cả 2 nhóm môi trường MS không kẽm và MS ½ kẽm nhận thấy công thức cho kết quả tốt nhất ở hàm lượng NZnO là 1mg/L và có xu hướng giảm dần khi tăng hàm lượng NZnO. Tuy nhiên về đánh giá cảm quan, khi mẫu được cấy trong môi trường MS không kẽm thì chồi có chất lượng tốt hơn so với mẫu trong MS ½ kẽm.



MS ½ Zn1



MS Zn1

Hình 2. Mẫu cải chường sau 3 tuần nuôi cấy trên môi trường dưỡng chồi

Có thể thấy sự khác biệt rõ rệt về chất lượng chồi ở mẫu Zn1 so với mẫu thí nghiệm ½ Zn1. Ở mẫu Zn1, chồi phát triển cao, lá và thân mập, ngọn xanh, còn với mẫu trong CT ½ Zn1 chồi phát triển cao tuy nhiên lá mỏng, nhỏ, có hiện tượng trắng lá. Có sự khác biệt như vật có thể là do trong môi trường ở các công thức ½ kẽm, lượng kẽm quá cao dẫn đến gây ức chế sinh trưởng của chồi, làm cho chồi có chất lượng kém hơn so với mẫu Zn1 vì bản thân môi trường có ½ kẽm thường mà hàm lượng nano được bổ sung vào vẫn tương đương với môi trường MS không kẽm. Lượng kẽm quá cao trong môi trường dẫn đến chất lượng của chồi bị giảm, chồi kém xanh và thân mảnh hơn so với mẫu trong môi trường MS loại bỏ hoàn toàn kẽm.

Bảng 5. Ảnh hưởng của hạt nano ZnO sau 6 tuần nuôi cấy ở giai đoạn dưỡng chồi

Công thức môi trường	Chiều cao trung bình	Đặc điểm chồi	Công thức môi trường	Chiều cao trung bình	Đặc điểm chồi
Zn0	3,55 ^a ± 0,07	Chồi xanh, thấp	½ Zn0	3,35 ^b ± 0,07	Chồi trắng, nhỏ, thấp
Zn1	6,15 ^e ± 0,07	Chồi xanh, cao, to	½ Zn1	4,20 ^c ± 0,14	Chồi trắng, nhỏ, cao
Zn5	5,87 ^d ± 0,11	Chồi xanh, cao, to	½ Zn5	2,88 ^a ± 0,04	Chồi trắng, nhỏ, thấp

Zn10	5,30 ^c ± 0,14	Chồi xanh, cao, to	½ Zn10	2,88 ^a ± 0,11	Chồi trắng, nhỏ, thấp
Zn20	5,50 ^c ± 0,14	Chồi xanh, cao, to	½ Zn20	2,82 ^a ± 0,11	Chồi trắng, nhỏ, thấp
ĐC	4,25 ^b ± 0,14	Chồi xanh, cao, to	ĐC	4,25 ^c ± 0,07	Chồi xanh, cao, to

Ghi chú: Những chữ cái (a, b, c) trong cùng một cột thể hiện sự sai khác có ý nghĩa với $\alpha = 0,05$

Đối với chồi phát triển trên môi trường MS không kẽm (các công thức từ Zn0 đến Zn20 có sự khác biệt về chỉ tiêu chiều cao trung bình của mẫu sau 3 tuần (bảng 4) và 6 tuần (bảng 5) nuôi cấy. Ở giai đoạn 3 tuần nuôi cấy, mẫu đối chứng cho kết quả chiều cao trung bình là cao nhất (2,65 cm) nhưng sau 6 tuần nuôi cấy mẫu ĐC cho kết quả chiều cao trung bình thấp hơn so với mẫu trên công thức bổ sung nano kẽm oxit 1 – 5 – 10 – 20 mg/L. Kết quả cho thấy chiều cao trung bình của cây thấp nhất là ở mẫu Zn0 khi môi trường loại bỏ kẽm và không bổ sung hạt nano. Khi tăng hàm lượng nano lên 1 mg/L thì chiều cao trung bình đạt giá trị cao nhất là 6,15 cm sau đó giảm dần.



MS Zn1



MS ½ Zn1

Hình 3. Mẫu cấy chồi sau 6 tuần nuôi cấy trên môi trường dưỡng chồi

Xét trong môi trường MS ½ kẽm (các công thức từ ½ Zn0 đến ½ Zn20), mẫu cho kết quả tốt nhất là mẫu ½ Zn1 với chiều cao cây đạt 4,2 cm. Các mẫu còn lại chiều cao có xu hướng giảm dần khi tăng nồng độ nano. Tuy nhiên khi so sánh với mẫu đối chứng thì hầu hết các công thức thí nghiệm đều có chiều cao trung bình thấp hơn mẫu đối chứng. Sau 6 tuần nuôi cấy, chiều cao trung bình của mẫu thí nghiệm trong môi trường MS không kẽm (từ Zn0 đến Zn20) tăng cao hơn so với mẫu đối chứng, tuy nhiên trong môi trường MS ½ kẽm, chiều cao của mẫu sau 6 tuần nuôi cấy lại thấp hơn so với đối chứng. Bên cạnh đó, giữa 2 nhóm môi trường Zn và 1/2 Zn có sự khác biệt rõ rệt về ảnh hưởng đến chiều cao của cây cấy chồi, MS không kẽm vượt trội hơn so với môi trường MS ½ kẽm. Về đặc điểm chồi, ở MS không kẽm thì chồi xanh và mập hơn so với mẫu ở môi trường MS ½ kẽm. Điều này có thể do sự khác biệt về hàm lượng kẽm trong hai công thức. Điều này có thể do sự dư thừa kẽm ảnh hưởng đến sự phát triển về đặc điểm, hình thái chồi. Như vậy, từ kết quả thí nghiệm 2 cho thấy hạt nano kẽm oxit có tác dụng kích thích sinh trưởng chiều cao ở cây hoa cấy chồi khi được bổ sung với lượng 1mg/L.

2.2.3. Ảnh hưởng của hạt nano ZnO ở giai đoạn ra rễ

Kẽm là một nguyên tố vi lượng quan trọng, tham gia và có tác động đến nhiều quá trình sinh lý sinh hóa như dinh dưỡng khoáng, quá trình hô hấp, quang hợp, tổng hợp các hợp chất hữu cơ, quá trình vận chuyển, tạo mô mới và khả năng chịu hạn của cây.

Hạt nano ZnO có tác động gây ức chế sự phát sinh chồi ở giai đoạn nhân chồi tuy nhiên lại có tác động kích thích tăng trưởng về mặt chiều cao ở giai đoạn dưỡng chồi. Thí nghiệm này tiến hành bổ sung hạt nano kẽm vào môi trường ra rễ của mẫu cây cẩm chương với hàm lượng tương ứng 0 – 1 – 5 – 10 – 20 mg/L và theo dõi sau 6 tuần nuôi cấy. Kết quả được thể hiện trên Bảng 6.

Bảng 6. Ảnh hưởng của hạt nano ZnO đến sự tạo rễ của cây cẩm chương sau 6 tuần nuôi cấy

Công thức môi trường	Số rễ trung bình	Đặc điểm rễ	Công thức môi trường	Số rễ trung bình	Đặc điểm rễ
Zn0	5,65 ^a ± 0,07	Rễ nhỏ, ngắn	½ Zn0	7,85 ^b ± 0,07	Rễ nhỏ, ngắn
Zn1	10,10 ^d ± 0,04	Rễ nhỏ, dài	½ Zn1	9,60 ^c ± 0,14	Rễ nhỏ, dài
Zn5	7,40 ^c ± 0,14	Rễ nhỏ, ngắn	½ Zn5	9,45 ^c ± 0,35	Rễ nhỏ, ngắn
Zn10	7,10 ^{bc} ± 0,14	Rễ nhỏ, ngắn	½ Zn10	5,70 ^a ± 0,14	Rễ nhỏ, ngắn
Zn20	6,50 ^b ± 0,42	Rễ nhỏ, ngắn	½ Zn20	5,60 ^a ± 0,28	Rễ nhỏ, ngắn
ĐC	14,60 ^e ± 0,14	Rễ to, dài	ĐC	14,60 ^d ± 0,14	Rễ to, dài

Ghi chú: Những chữ cái (a, b, c, d, e) trong cùng một cột thể hiện sự sai khác có ý nghĩa với $\alpha = 0,05$

Qua Bảng 6 ta thấy hạt nano ZnO có tác động kích thích khả năng tạo rễ của cây hoa cẩm chương nhưng xét về số rễ và đặc điểm rễ đều không vượt trội hơn môi trường đối chứng MS cơ bản. Công thức MS cải biên bổ sung 1 mg/L nano kẽm oxit cho số rễ nhiều nhất trong các công thức thí nghiệm, khi tăng nồng độ nano kẽm oxit số lượng rễ giảm dần, chiều dài rễ cũng ngắn hơn. Công thức Zn1 cho kết quả tốt nhất. Thiếu kẽm ảnh hưởng đến sự phát sinh và hình thái rễ mẫu cây cẩm chương *in vitro*. Tuy nhiên, hàm lượng nano cao cũng hạn chế sự phát triển, phát sinh rễ. Các nghiên cứu chỉ ra rằng sự tiếp xúc trực tiếp của rễ với các hạt nano kim loại trong môi trường hạn chế sự phát triển của rễ [7]. Tác dụng ức chế cũng phụ thuộc vào tính thấm của tế bào đối với hạt nano kim loại; nội hóa trong các mô rễ, phương pháp gây độc tế bào và genotoxic; và sự phụ thuộc nồng độ [8, 9, 10]. Rễ tiếp xúc trực tiếp với các hạt nano kim loại và sự tích tụ trong mô rễ hoặc trên bề mặt rễ là nguyên nhân khiến chiều dài rễ ngắn hơn. Sự hiện diện của các hạt nano kim loại trong môi trường thạch cũng tạo ra ảnh hưởng tiêu cực đến độ giãn dài của rễ vì môi trường thạch không xốp, ít oxy hòa tan, khả năng hút nước của rễ giảm [11]. Lin và Xing (2007) và Manzo và cs (2011) cũng báo cáo kết quả tương tự đối với đậu ở nồng độ cao hơn (2000 mg/L) trong khi đối với (bí ngòi) không có trường hợp tiêu cực nào được quan sát [12, 13, 14]. Người ta cho rằng các hạt nano kim loại ảnh hưởng đến sự phân chia tế bào phân bào bằng cách ngăn chặn sự khởi đầu quá trình phân bào [15].

Xét các mẫu trong môi trường MS ½ kẽm ta cũng thu được kết quả tương tự. Số rễ trung bình cao nhất khi trong môi trường có nano kẽm oxit là công thức ½ Zn1 sau đó giảm dần ở các công thức ½ Zn5 – ½ Zn10 – ½ Zn20. Tuy nhiên khi so sánh với mẫu đối chứng thì mẫu đối chứng vẫn cho kết quả tốt nhất.

2.2.4. Ảnh hưởng của hạt nano kẽm đến hàm lượng diệp lục và khối lượng khô

Để đánh giá ảnh hưởng của hạt nano kẽm đến sự sinh trưởng và phát triển của cây hoa cẩm chương *in vitro* chúng tôi tiến hành xác định hàm lượng diệp lục và phần trăm chất khô của cây

khí được nuôi cấy trong môi trường dưỡng chồi MS không kẽm và MS ½ kẽm có bổ sung hạt nano với các hàm lượng khác nhau. Kết quả thu được như sau:

Bảng 7. Ảnh hưởng của hạt nano ZnO đến hàm lượng diệp lục, % chất khô sau 6 tuần nuôi cấy trên môi trường MS 1/2 Zn

MS 1/2 Zn	Hàm lượng diệp lục a($\mu\text{g/g}$)	Hàm lượng diệp lục b($\mu\text{g/g}$)	Hàm lượng diệp lục tổng số ($\mu\text{g/g}$)	% chất khô
0	157,06 ^a ± 93,82	154,33 ^a ± 34,49	311,39 ^a ± 228,31	12,49% ^a ± 1,79
1	136,03 ^a ±46,98	149,11 ^a ±72,01	285,15 ^a ± 119,0	12,52% ^a ± 1,83
5	181,65 ^a ±69,70	142,46 ^a ±72,93	324,12 ^a ± 142,64	7,81% ^b ± 1,88
10	169,51 ^a ±86,05	168,43 ^a ±98,31	337,95 ^a ± 184,37	8,99% ^b ± 1,41
20	140,90 ^a ±32,44	110,48 ^a ±11,08	414,86 ^a ± 30,32	8,81% ^b ± 0,51
ĐC	450,75 ^b ±29,89	300,75 ^b ±29,89	751,50 ^b ± 63,34	8,16% ^b ± 1,13

Ghi chú: Những chữ cái (a, b, c) trong cùng một cột thể hiện sự sai khác có ý nghĩa với $\alpha = 0,05$

Từ kết quả trên Bảng 7 ta thấy hàm lượng diệp lục ở các công thức nano khác nhau hầu như không có khác biệt nhưng lại khác biệt lớn so với đối chứng. Trong bảng ta thấy lượng diệp lục tổng số của các mẫu thí nghiệm từ mẫu 1 đến mẫu 20 có xu hướng tăng khi nồng độ nano tăng. Cụ thể ở công thức Zn1 lượng diệp lục là 285,15 $\mu\text{g/g}$, khi lượng nano tăng lên ở công thức 5 – 10 – 20 thì hàm lượng diệp lục cũng tăng lên lần lượt là 324,12 – 337,95 – 414,86 ($\mu\text{g/g}$). Tuy nhiên nếu so sánh mẫu thí nghiệm với mẫu đối chứng thì mẫu đối chứng chứa lượng diệp lục cao hơn đạt 751,5 $\mu\text{g/g}$.

Phần trăm chất khô trong cây thì hầu như không có sự khác biệt giữa mẫu thí nghiệm và mẫu đối chứng, nhiều nhất trong mẫu Zn0 và mẫu Zn1 (>10%), ở các mẫu còn phần trăm chất khô tương đối đồng đều (từ 8-9%). Như vậy có thể thấy hàm lượng diệp lục và phần trăm chất khô trong cây ít bị ảnh hưởng bởi các nồng độ nano kẽm khác nhau trong thí nghiệm. Tuy nhiên trong môi trường MS ½ Zn có bổ sung hạt nano thì lượng diệp lục trong cây giảm. Điều này giải thích tại sao chồi có hiện tượng bị trắng ở các thí nghiệm với MS ½ kẽm có bổ sung nano.

Bảng 8. Ảnh hưởng của hạt nano ZnO đến hàm lượng diệp lục, % chất khô sau 6 tuần nuôi cấy trên môi trường MS Zn

MS Zn	Hàm lượng diệp lục a($\mu\text{g/g}$)	Hàm lượng diệp lục b($\mu\text{g/g}$)	Hàm lượng diệp lục tổng số ($\mu\text{g/g}$)	% chất khô
0	272,34 ^a ± 93,82	154,33 ^a ± 34,49	435,13 ^a ± 115,12	9,51% ^a ± 1,39
1	230,76 ^a ±46,98	149,11 ^a ±72,01	361,75 ^a ± 25,48	12,28% ^b ± 1,49
5	291,03 ^a ±69,70	142,46 ^a ±72,93	445,83 ^a ± 136,86	9,01% ^a ± 0,26
10	267,95 ^a ±86,05	168,43 ^a ±98,31	414,86 ^a ± 30,32	8,84% ^a ± 1,03
20	209,08 ^a ±32,44	110,48 ^a ±11,08	314,85 ^a ± 83,12	8,14% ^a ± 0,47
ĐC	450,75 ^b ±29,89	300,75 ^b ±29,89	751,50 ^b ± 63,34	8,16% ^a ± 1,13

Ghi chú: Những chữ cái (a, b, c) trong cùng một cột thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê với $\alpha = 0,05$

Từ Bảng 8 cho ta thấy khi thay đổi hàm lượng hạt nano kẽm oxit trong môi trường thì hàm lượng diệp lục trong lá không có sự thay đổi khác biệt. Mẫu có hàm lượng diệp lục cao nhất là mẫu đối chứng. Như vậy trong môi trường có hạt nano thì nồng độ nano không ảnh hưởng đến

lượng diệp lục của mẫu. Đối với phần trăm chất khô, mẫu có phần trăm chất khô cao nhất là mẫu 1 với 12,28%, các mẫu còn lại không có sự khác biệt có ý nghĩa về chỉ tiêu này.

3. Kết luận

Kết quả nghiên cứu cho thấy, nano kẽm oxit ảnh hưởng đến sự phát sinh chồi ở cây cà chua *in vitro*. Khi tăng nồng độ nano kẽm oxit hệ số nhân chồi giảm dần. Công thức thí nghiệm cho hệ số nhân chồi tốt nhất là MS không muối kẽm có bổ sung 1 mg/L nano kẽm oxit đạt 2,15 chồi/mẫu sau 6 tuần nuôi cấy, đối chứng đạt 2,25 chồi/mẫu. Hạt nano kẽm oxit có tác dụng kích thích sự phát triển chiều cao đối với cây cà chua khi được bổ sung vào môi trường MS đã loại bỏ hoàn toàn muối kẽm. Công thức MS không muối kẽm có bổ sung 1 mg/L nano kẽm oxit cũng cho kết quả cao nhất sau 6 tuần nuôi cấy là 6,15 cm/mẫu, đối chứng đạt 4,25 cm/mẫu. Bổ sung nano kẽm oxit kích thích sự phát sinh rễ ở cây cà chua *in vitro*. Khi tăng nồng độ nano kẽm oxit, số rễ/mẫu giảm dần. Công thức MS không muối kẽm có bổ sung 0 mg/L nano kẽm oxit cho kết quả thấp nhất đạt 5,65 rễ/chồi, đối chứng đạt 14,6 rễ/chồi.

Lời cảm ơn. Nghiên cứu được thực hiện nhờ sự hỗ trợ kinh phí từ đề tài SPHN 18-02 TĐ, xin chân thành cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Tejaswi Thunugunta, Lakshmana Reddy DC., Aswath C, Shivashankara KS, Laxman RH, Satisha GC, 2018. Impact of Zinc oxide nanoparticles on eggplant (*S.melongena*): Studies on growth and the accumulation of nanoparticles, IET Nanobiotechnology, 12 (6) DOI: 10.1049/iet-nbt.2017.0237
- [2] Seyed Mousa Mousavi Kouhi, Mehrdad Lahouti, 2018. *Application of ZnO Nanoparticles for Inducing Callus in Tissue Culture of Rapeseed*, Int. J. Nanosci. Nanotechnol., Vol. 14, No. 2, pp. 133-141.
- [3] Murashige T. and Skoog F., 1962) A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol Plantarum*, 15, 473-497
- [4] Boonyanitipong B., Kositsup B., Kumar P., Baruah S., Dutta J., 2011. Toxicity of ZnO and TiO₂ nanoparticles on germinating rice seed *Oryza sativa* L. *Int. J. Biosci. Biochem. Bioinform.* 1 282–285. 10.7763/IJBBB.2011.V1.5
- [5] Hall DO, Rao KK. 1999. *Photosynthesis*. 6th edn. 214 pp. Cambridge: Cambridge University Press.
- [6] Hira Zafar, Attarad A., Joham S. A., Ihsan U. H., Muhammad Zia, 2016. *Effect of ZnO Nanoparticles on Brassica nigra seedlings and stem explants: growth dynamics and antioxidative response*. *Frontiers in plant science*, volume 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00535>.
- [7] Wierzbicka, M., and Obidzinska, J., 1998. *The effect of lead on seed imbibitions and germination in different plant species*. *Plant Sci.* 137, 155–171. doi: 10.1016/S0168-9452(98)00138-1.
- [8] Kumari M., Khan S. S., Pakrashi S., Mukherjee A., and Chandrasekaran N. 2011. *Cytogenetic and genotoxic effects of zinc oxide nanoparticles on root cells of Allium cepa*. *J. Hazard Mater.* 190, 613–621. doi: 10.1016/j.jhazmat.2011.03.095.
- [9] Ma C., Liu H., Guo H., Musante C., Coskun S. H., Nelson B. C., White J. C., B. Xing and O. M. Dhankher, 2016. *Defense mechanisms and nutrient displacement in Arabidopsis thaliana upon exposure to CeO₂ and In₂O₃ nanoparticles*, *Environ. Sci.: Nano*, 1369–1379, DOI: 10.1039/c6en00189k.

- [10] Nair R., Varghes S. H., Nair B. G., Maekawa T., Yoshida Y., and Kumar D. S., 2010. *Nanoparticulate material delivery to plants*. Plant Sci. 179, 154163. doi:10.1016/j.plantsci.2010.04.012
- [11] Langerud B. R., and Sandvik M., 1987. *Development of containerized Picea abies (L.) Karst. seedlings grown with heavy watering on various peat, perlite and mineral wool mixtures*. New Forests 1, 89–99. doi: 10.1007/BF00030054.
- [12] Lin D. H., and Xing B. S., 2007. *Phytotoxicity of nanoparticles: inhibition of seed germination and root growth*. Environ. Pollut. 150, 243–250. doi: 10.1016/j.envpol.2007.01.016.
- [13] Manzo S., Rocco A., Carotenuto R., De Luca, P. F., Miglietta, M., Rametta, G., et al., 2011. *Investigation of ZnO nanoparticles' ecotoxicological effects towards different soil organisms*, Environ. Sci. Pollut. Res. 18, 756–763. doi: 10.1007/s11356-010-0421-0.
- [14] Stampoulis D., Sinha S. K., White J. C., 2009. *Assay-dependent phytotoxicity of nanoparticles to plants*. Environ. Sci. Technol. 43, 9472–9479. doi: 10.1021/es901695c.
- [15] Elghamery A. A., Elnahas A. I., Mansour M. M., 2000. The action of atrazine herbicide as an inhibitor of cell division on chromosomes and nucleic acids content in root meristems of *Allium cepa* and *Vicia faba*. Cytologia 55, 209–215.

ABSTRACT

Effect of ZnO nanoparticles on growth and development of *in vitro* *Dianthus caryophyllus* L.

Dao Thi Sen, Bui Thi Thanh Huong,
Nguyen Thi Ngoc and Nguyen Thi Hong Hanh

Faculty of Biology, Hanoi National University of Education

ZnO nanoparticles (NPs) have diverse properties when compared to respective chemicals due to their structure, surface to volume ratio, morphology, and reactivity. This study was conducted to determine the effects of ZnO nanoparticles with concentrations from 0 mg/L to 20 mg/L individually or in combination with ZnSO₄ on the growth and development of *in vitro* *Dianthus caryophyllus* L. The *in vitro* shoots (2 cm, 2 pairs of leaves) and stem segments (2 nodes/segment) were used as the source materials for this experiment. After 3 weeks and 6 weeks of culture, results showed that zinc oxide nanoparticles had the effect on stimulating shoot formation of *in vitro* *Dianthus caryophyllus* L. at low concentrations (1 mg/L). When the concentration of zinc oxide nanoparticles increased, the shoot multiplier decreased. In shoot extension stage, zinc oxide nanoparticles stimulated the length of shoots, appeared interveinal chlorosis with chlorophyll content significantly lower in comparison to the shoots on MS media. The medium formula with the addition of 1 mg/L zinc oxide nanoparticles obtained the best results after 6 weeks of culture with an average of 2.15 shoots/sample, average length of 6.15 cm/sample, total average chlorophyll content of 361.75 µg/g. When ZnO nanoparticles were used at a concentration of 1 mg/L, the root count increased, reaching 10.1 roots/sample with small and long roots. In MS medium with non zinc salts, roots were small, short, and reached 5.65 roots/sample. However, the basic MS control medium (containing full zinc salts) produced similar or the best all tested medium in some indicators (2.25 shoots/sample after 6 weeks, shoot length of 4.25 cm/sample, total chlorophyll content of 751.50 µg/g, large roots, reaching 14.6 roots/shoot).

Keywords: *Dianthus caryophyllus* L., ZnO nanoparticles, growth and development, chlorophyll.