

Khử trùng môi trường nuôi cấy mô và kích thích sinh trưởng cây chuối ở giai đoạn ra rễ và vườn ươm bằng hạt nano bạc chitosan nồng độ thấp

Vũ Thị Huyền*, Lê Thị Hiền

Khoa Công nghệ Nông nghiệp, Trường Đại học Công nghệ, Đại học Quốc gia Hà Nội, 144 Xuân Thủy, phường Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 19/10/2024; ngày chuyển phản biện 22/10/2024; ngày nhận phản biện 15/11/2024; ngày chấp nhận đăng 20/11/2024

Tóm tắt:

Chuối là loại cây ăn quả chủ lực của Việt Nam. Để tạo ra một số lượng lớn cây giống chuối sạch bệnh và đồng nhất về mặt di truyền, hiện nay đang sử dụng công nghệ nuôi cấy mô. Môi trường nuôi cấy mô được khử trùng ở nhiệt độ và áp suất cao. Trong bài báo này, hạt nano bạc chitosan (AgCS) tổng hợp được với kích thước 54 nm được sử dụng để khử trùng môi trường nuôi cấy mà không dùng nhiệt. Với nồng độ AgCS là 0,25 và từ 0,5 ppm trở lên, tỷ lệ môi trường không nhiễm vi sinh sau 4 tuần tương ứng là 96,7 và 100%. Khảo sát ảnh hưởng của AgCS (0,25-4 ppm) lên cây chuối ở giai đoạn ra rễ cho thấy, AgCS 0,25 ppm làm tăng chiều dài rễ (70%) và khối lượng tươi (30%). Cây chuối ngoài vườn ươm từ cây *in vitro* nuôi cấy trên môi trường có bổ sung AgCS 0,25 và 0,5 ppm đều sinh trưởng tốt hơn đối chứng. AgCS (0,25-0,5 ppm) làm tăng số rễ mới (khoảng 5 lần), chiều dài rễ mới (1,1-3 lần), chiều dài thân (1,4-1,7 lần) và khối lượng tươi (2,4-4,5 lần). Như vậy, AgCS vừa có khả năng khử trùng môi trường, vừa kích thích sinh trưởng cây chuối nuôi cấy mô giai đoạn ra rễ và giai đoạn vườn ươm.

Từ khóa: cây chuối, hạt nano bạc chitosan, khử trùng môi trường, kích thích sinh trưởng, nuôi cấy mô thực vật.

Chỉ số phân loại: 1.6, 2.9, 4.6

Sterilising of tissue culture media and growth stimulation of banana seedlings at rooting and *ex vitro* nursery stages using chitosan silver nanoparticles at low concentration

Thi Huyen Vu*, Thi Hien Le

Faculty of Agriculture Technology, VNU University of Engineering and Technology, 144 Xuan Thuy Street, Cau Giay Ward, Hanoi, Vietnam

Received 19 October 2024; revised 15 November 2024; accepted 20 November 2024

Abstract:

Banana is a major fruit crop in Vietnam. Plant tissue culture technology is used to produce a large number of disease-free and genetically identical banana seedlings. Tissue culture media are generally thermally sterilised at high temperature and pressure. In this study, the synthesised highly stable silver chitosan nanoparticles (AgCS) with an average size of 54 nm were utilised for sterilising plant tissue culture media without thermal treatment. After four weeks, the percentage of uncontaminated culture media at concentrations of 0.25 and ≥ 0.5 ppm reached 96.7 and 100%, respectively. Investigation of the effects of AgCS (0.25-4 ppm) on tissue-cultured banana plantlets at the rooting stage showed that AgCS at 0.25 ppm increased root length and fresh weight by 70 and 30%, respectively. The *ex vitro* banana plantlets derived from *in vitro* cultures supplemented with AgCS 0.25 and 0.5 ppm grew better than the control. AgCS (0.25-0.5 ppm) increased the number of new roots (about 5 times), root length (1.1-3 times), pseudostem length (1.4-1.7 times), and fresh weight (2.4-4.5 times). In conclusion, AgCS can be used as a culture medium steriliser and plant growth stimulant for *in vitro* and *ex vitro* banana plantlets.

Keywords: banana seedlings, culture media sterilant, growth stimulation, plant tissue culture, silver chitosan nanoparticles.

Classification numbers: 1.6, 2.9, 4.6

*Tác giả liên hệ: Email: huyenvu@vnu.edu.vn

1. Mở đầu

Chuối là một trong 14 loại cây ăn quả thuộc Đề án Phát triển cây ăn quả chủ lực đến năm 2030 do Bộ trưởng Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn phê duyệt theo Quyết định số 4085/QĐ-BNN-TT Hà Nội, ngày 27/10/2022. Theo đó, Việt Nam định hướng phát triển khoảng 165-175 ngàn ha chuối với sản lượng 2,6-3 triệu tấn/năm, trong đó chú trọng áp dụng đồng bộ các quy trình sản xuất tiên tiến trong sản xuất. Trong quy trình trồng chuối, việc phát triển số lượng lớn cây chuối sạch bệnh và đồng nhất về mặt di truyền là một điều cần thiết. Để đáp ứng được điều đó, hiện nay đang sử dụng công nghệ nuôi cấy mô tế bào thực vật.

Vô trùng là một trong những yếu tố quan trọng trong quy trình nuôi cấy mô tế bào thực vật để đảm bảo cây nuôi cấy mô khỏe mạnh với tỷ lệ cao là tiền đề tăng hiệu suất sản xuất cây giống sạch bệnh. Hiện nay, môi trường nuôi cấy mô thường được khử trùng bằng nhiệt độ và áp suất cao (khoảng 121°C và 1 atm) trong 20 phút, với tổng thời gian khử trùng khoảng 2,5 giờ [1]. Trong trường hợp này, tỷ lệ nhiễm vi sinh của các mẫu cấy vẫn chiếm trên 10% có thể do thao tác cấy mẫu hoặc do môi trường xung quanh [2]. Vì vậy, với sự phát triển nhanh chóng của lĩnh vực công nghệ nano sinh học thực vật, có một số công trình nghiên cứu sử dụng các vật liệu nano như nano bạc [3], nano oxit kẽm [4] để khử trùng môi trường nuôi cấy mô và khử trùng mẫu cấy, kết hợp với khử trùng nhiệt để giảm tỷ lệ nhiễm vi sinh xuống tối thiểu. Bổ sung hạt nano bạc nồng độ 4 ppm vào môi trường nuôi cấy mô cây hoa cúc mà không khử trùng nhiệt có thể làm cho môi trường nuôi cấy mô cây hoa cúc không bị nhiễm vi sinh trong vòng 4 tuần [1].

Không những vậy, một số hạt nano với nồng độ phù hợp còn kích thích sinh trưởng và phát triển của cây nuôi cấy mô. Khử trùng mẫu cấy bằng nano bạc nồng độ 250 ppm trong vòng 15 đến 20 phút kết hợp với khử trùng môi trường bằng nano bạc cho thấy tăng một số chỉ tiêu về hóa sinh của cây cúc nuôi cấy mô [1]. Bổ sung hạt nano đồng nồng độ 9 ppm vào môi trường ra rễ của cây chuối làm tăng số lá, chiều dài rễ và chỉ số diệp lục tố [5].

Hạt nano bạc với các chất làm bền khác nhau có thể ảnh hưởng không giống nhau lên các cây nuôi cấy mô. Thông thường, các hạt nano bạc với chất làm bền bằng polyme tương thích sinh học sẽ ít gây ảnh hưởng tiêu cực đến tế bào thực vật hơn là hạt nano bạc được làm bền bằng polyme tổng hợp hoặc các chất làm bền hữu cơ khác. Trong số các polyme có nguồn gốc tự nhiên và tương thích sinh học với thực vật, chitosan đang được quan tâm nghiên cứu ứng dụng trong nuôi cấy mô thực vật [6].

Một yếu tố quan trọng khi sử dụng hạt nano bạc trong môi trường nuôi cấy mô thực vật là cần xác định khoảng nồng độ hạt của hạt nano bạc, sao cho trong khoảng nồng độ này, hạt nano bạc có tác dụng khử trùng môi trường, đồng thời không ảnh hưởng tiêu cực đến cây nuôi cấy mô. Trong công trình của S.M. Tamimi và cs (2023) [7], nồng độ nano bạc 12 ppm trong môi trường nuôi cấy mô kích thích sinh trưởng của cây chuối nuôi cấy mô, trong khi nồng độ 15 ppm ức chế sự phát triển. Trong khi đó, trong công trình của P. Siriporn và cs (2024) [8], hạt nano bạc nồng độ 100 ppm trong môi trường nuôi cấy kích thích cây phát triển tốt hơn so với đối chứng.

Do đó, trong công trình này nghiên cứu sử dụng hạt nano bạc được làm bền bằng chitosan - một polyme tương thích sinh học với thực vật để khử trùng môi trường nuôi cấy mô cây chuối trong vòng 4 tuần mà không kết hợp với khử trùng nhiệt. Đồng thời, nghiên cứu ảnh hưởng của nano bạc chitosan tại các nồng độ xung quanh nồng độ khử trùng được môi trường nuôi cấy lên sinh trưởng và phát triển của cây chuối nuôi cấy mô, trong giai đoạn ra rễ và giai đoạn vườn ươm.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Các vật liệu sử dụng: AgNO_3 (Fisher Chemical), NaBH_4 (Weng Jiang Reagent) và chitosan (Bio Basic). Nguồn mẫu chồi chuối được sử dụng là các chồi *in vitro* của cây chuối già Nam Mỹ (*Cavendish bananas*) được nhân đủ số lượng thí nghiệm tại Phòng thí nghiệm nuôi cấy mô (Khoa Công nghệ Nông nghiệp, Trường Đại học Công nghệ, Đại học Quốc gia Hà Nội), mẫu 4 tuần tuổi và chiều cao cây khoảng 2 cm.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp tổng hợp hạt nano bạc chitosan: Hạt nano bạc chitosan (AgCS) được tổng hợp theo phương pháp khử dung dịch bạc nitrat bằng chất khử NaBH_4 , sử dụng chất làm bền chitosan được mô tả ở công trình [9], trong đó thể tích tổng hợp là 200 ml, nồng độ của bạc nitrat, chitosan và NaBH_4 lần lượt là 4,95 mM, 500 $\mu\text{g/ml}$, 9,9 mM. Hạt nano bạc sau khi tổng hợp được đặc trưng bằng quang phổ kế hấp thụ trong vùng UV-Vis (nano Thermo Scientific NanoDrop 8000). Phân bố kích thước hạt và thế zeta được đo bằng thiết bị tán xạ ánh sáng động (SZ-100Z2).

Phương pháp nghiên cứu ảnh hưởng của hạt nano bạc chitosan đến khả năng khử trùng môi trường: Môi trường MS được bổ sung 30 g/l đường, 5 g/l agar và hạt nano bạc chitosan với các nồng độ khác nhau (0; 0,25; 0,5; 1; 2; 3; 4 ppm); mỗi nồng độ hạt nano tương ứng với một nghiệm thức. Sau đó không hấp khử trùng môi trường bằng nhiệt độ cao mà chỉ đun trên bếp từ, vừa đun vừa khuấy cho đến khi sôi (tổng thời gian đun là khoảng 1 phút). Đổ môi trường ra các túi nylon (50 ml/túi, túi không khử trùng trước đó), gấp miệng túi và cài lại bằng ghim. Mỗi nghiệm thức làm 10 túi môi trường và lặp lại 3 lần. Mẫu đối chứng được chuẩn bị tương tự, nhưng không bổ sung hạt nano bạc chitosan và được hấp khử trùng bằng nhiệt (118°C trong 20 phút), (tổng thời gian hấp khử trùng là khoảng 2,5 giờ). Sau đó, các mẫu môi trường nuôi cấy mô được để trên giá nuôi cấy trong điều kiện nhiệt độ $25 \pm 2^\circ\text{C}$, độ ẩm trung bình 55-60% và theo dõi số túi không bị nhiễm vi sinh sau 4 tuần. Tỷ lệ mẫu không bị nhiễm vi sinh được xác định theo công thức sau:

$$D = \frac{n_D \times 100}{n} (\%)$$

trong đó: D là tỷ lệ % mẫu không nhiễm; n_D là số mẫu không bị nhiễm; n là tổng số mẫu.

Phương pháp nghiên cứu ảnh hưởng của hạt nano bạc chitosan lên cây chuối nuôi cấy mô ở giai đoạn ra rễ: Môi trường sử dụng trong thí nghiệm này là môi trường MS, bổ sung 30 g/l đường

saccharose, 5 g/l agar và AgCS với các nồng độ 0,25; 0,5; 1; 2 và 4 ppm. Môi trường này không khử trùng bằng nhiệt, mà chỉ đun sôi và đổ vào các túi nilon (túi không được khử trùng nhiệt) với thể tích 50 ml/túi, gấp miệng túi và cài lại bằng ghim. Môi trường đối chứng là môi trường MS, bổ sung 30 g/l đường, 5 g/l agar, không bổ sung AgCS và hấp khử trùng ở 118°C trong 20 phút; sau đó đổ vào các túi nilon đã được khử trùng ở cùng điều kiện trên. Mỗi công thức môi trường làm 10 túi.

Đặt các mẫu chồi chuối vào các túi môi trường với mật độ 5 chồi/túi. Các túi nuôi cấy này sau đó được đặt lên các giàn nuôi cấy mô, với thời gian chiếu sáng 16 giờ/ngày, nhiệt độ $25 \pm 2^\circ\text{C}$, độ ẩm trung bình 55-60%. Thu nhận các chỉ tiêu như tổng số rễ/cây, chiều dài rễ, chiều dài thân, số lá, chiều dài lá, chiều rộng lá, hàm lượng diệp lục, khối lượng tươi sau 4 tuần. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

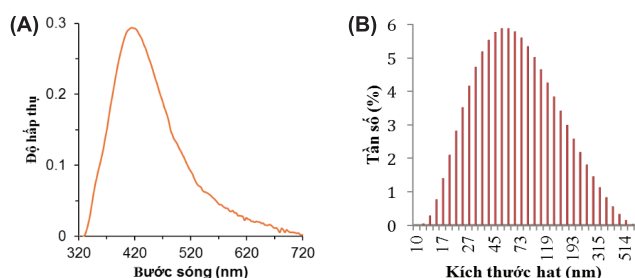
Phương pháp nghiên cứu ảnh hưởng của hạt nano bạc chitosan lên cây chuối nuôi cấy mô ở giai đoạn ex vitro ngoài vườn ươm: Cây in vitro hoàn chỉnh sau khi thu các chỉ tiêu (đối với mẫu trên môi trường có bổ sung AgCS 0,25 và 0,5 ppm và mẫu đối chứng) được đưa ra vườn ươm trồng trên giá thể xơ dừa và trấu hun với tỷ lệ 1/1. Tưới nước giữ ẩm cho cây 2 lần/ngày. Tiếp tục đánh giá tác động của AgCS bổ sung trong môi trường ở giai đoạn trước lên sự phát triển của cây con thông qua các chỉ tiêu như tổng số rễ/cây, số rễ mới, chiều dài rễ mới, chiều dài thân, chiều dài lá, chiều rộng lá, khối lượng tươi sau 4 tuần.

Phương pháp phân tích và xử lý số liệu: Các số liệu được xử lý thô bằng phần mềm Microsoft Excel, sau đó phân tích kiểm định ANOVA và Duncan ở mức $p < 0,05$ bằng phần mềm SPSS.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Tính chất hạt nano bạc

Dung dịch keo nano bạc chitosan (AgCS) có màu nâu ánh cam. Phổ hấp thụ UV-Vis của dung dịch keo AgCS pha loãng 10 lần có bước sóng hấp thụ cực đại $\lambda_{\text{max}} = 415 \text{ nm}$ đặc trưng cho hạt nano bạc và độ hấp thụ cực đại đạt 0,281; tương đương với độ hấp thụ cực đại của dung dịch gốc là 2,81 (hình 1A). Hạt AgCS có kích thước thủy động lực học trung bình là $54 \pm 1 \text{ nm}$ (hình 1B). Dung dịch keo AgCS sau khi pha loãng 10 lần có giá trị thế zeta trung bình là $+30,0 \pm 1,5 \text{ mV}$; thể hiện hạt nano bạc mang điện tích dương và dung dịch keo AgCS có độ ổn định cao.



Hình 1. Phổ hấp thụ UV-Vis (A) và phổ phân bố kích thước hạt phân tích bằng phương pháp tán xạ ánh sáng động (B) của dung dịch keo AgCS.

3.2. Khả năng khử trùng môi trường nuôi cấy mô thực vật của AgCS

Kết quả thí nghiệm về khả năng khử trùng môi trường nuôi cấy mô của AgCS mà không khử trùng ở nhiệt độ và áp suất cao được trình bày ở bảng 1. Kết quả thực nghiệm cho thấy, 100% mẫu môi trường với nồng độ AgCS từ 0,5 đến 4 ppm không bị nhiễm vi sinh vật trong 4 tuần (bảng 1). Bốn tuần là thời gian cần thiết thông thường cho một giai đoạn nuôi cấy mô tế bào thực vật (vào mẫu, nhân chồi, nhân nhanh, ra rễ). Mẫu môi trường bổ sung AgCS 0,25 ppm thì tỷ lệ không nhiễm vi sinh đạt $96,7 \pm 3,3\%$, cao hơn mẫu đối chứng được khử trùng bằng nhiệt độ, đạt $90 \pm 10\%$. Mẫu môi trường không khử trùng bằng nhiệt, đồng thời không bổ sung AgCS tỷ lệ không bị nhiễm vi sinh chỉ đạt $60 \pm 10\%$, vì điều kiện nuôi cấy mô cũng là điều kiện thuận lợi cho vi sinh vật phát triển trên môi trường giàu dinh dưỡng như MS.

So với công bố của H.T. Tung và cs (2021) [1] đã khử trùng được 100% môi trường nuôi cấy mô cây hoa cúc khi sử dụng hạt nano bạc chitosan ở nồng độ 4 ppm mà không kết hợp với dùng nhiệt (không công bố các đặc trưng về kích thước, độ hấp thụ và thế zeta của hạt nano này), thì trong công trình này hạt nano bạc chitosan ở nồng độ 0,25-0,5 ppm đã có thể khử trùng được môi trường nuôi cấy mô với tỷ lệ cao.

Ngoài ra, một số công trình kết hợp giữa khử trùng môi trường nuôi cấy mô bằng nhiệt với hạt nano bạc để khử trùng môi trường nuôi cấy. Với hạt nano bạc sử dụng chất làm bền polyvinylpyrrolidone (PVP) có kích thước trung bình 70 nm, tại nồng độ 5 ppm có thể làm giảm tỷ lệ nhiễm xuống 50% [3]. Trong khi đó, hạt nano bạc (không công bố chất làm bền) kích thước 5 nm có thể khử trùng được 88,4% môi trường khi bổ sung hạt nano bạc 3 ppm vào môi trường đã khử trùng nhiệt [2].

Bảng 1. Khả năng khử trùng môi trường nuôi cấy mô sau 4 tuần của AgCS.

	Nồng độ AgCS bổ sung vào môi trường (ppm)	Tỷ lệ mẫu không bị nhiễm (%)
Đối chứng có khử trùng bằng nhiệt 0	0	90 ± 10
	0,25	60 ± 10
Không khử trùng bằng nhiệt	0,25	$96,7 \pm 3,3$
	0,5	100 ± 0
	1	100 ± 0
	2	100 ± 0
	4	100 ± 0

Như vậy, môi trường nuôi cấy mô bổ sung AgCS với nồng độ từ 0,5 ppm trở lên không bị nhiễm vi sinh sau 4 tuần. Đây là nồng độ thấp nhất của hạt nano bạc có thể khử trùng môi trường nuôi cấy mô MS bổ sung 30 g/l saccharose cho đến thời điểm này.

3.3. Ảnh hưởng của hạt nano bạc lên cây chuối nuôi cấy mô giai đoạn ra rễ

Một yếu tố quan trọng khi sử dụng hạt nano bạc trong môi trường nuôi cấy mô thực vật là cần xác định khoảng nồng độ hạt của hạt nano bạc, sao cho trong khoảng nồng độ này, hạt nano bạc có tác dụng khử trùng môi trường, đồng thời ảnh hưởng tích cực đến cây nuôi cấy mô (cây chuối *in vitro*) trong môi trường đó.

Các chỉ số sinh trưởng phát triển của cây chuối nuôi cấy trong môi trường ra rễ có bổ sung AgCS với các nồng độ từ 0,25 đến 4 ppm và không khử trùng bằng nhiệt được thu thập sau 4 tuần nuôi, so sánh với cây chuối đối chứng nuôi trong môi trường ra rễ khử trùng bằng nhiệt. Sau 4 tuần, một số chỉ tiêu sinh trưởng của cây được thu thập và xử lý thống kê cho kết quả có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (bảng 2). Cây chuối trong môi trường bổ sung AgCS, với nồng độ 0,25 ppm có chiều dài rễ tăng 1,7 lần, hàm lượng diệp lục tăng 1,2 lần và khối lượng tươi tăng 1,3 lần so với cây đối chứng. Các chỉ tiêu tổng số rễ/cây, chiều dài thân, số lá, chiều dài lá, chiều rộng lá ở mẫu nghiên cứu và mẫu đối chứng là tương đương.

Bảng 2. Ảnh hưởng của hạt nano bạc lên một số chỉ tiêu sinh trưởng của cây chuối nuôi cấy mô ở giai đoạn ra rễ.

	Đối chứng khử trùng bằng nhiệt	0,25 ppm	0,5 ppm	1 ppm	2 ppm	4 ppm
Tổng số rễ/cây	6,400±0,053 ^a	6,400±0,416 ^a	3,467±0,437 ^a	3,778±0,188 ^a	3,573±0,053 ^a	3,575±0,003 ^a
Chiều dài rễ (cm)	12,433±0,220 ^a	20,960±0,421 ^a	17,420±0,240 ^a	17,840±0,175 ^b	17,789±0,033 ^b	17,761±0,010 ^b
Chiều dài thân (cm)	2,667±0,033 ^a	2,667±0,035 ^a	2,247±0,178 ^a	2,320±0,024 ^a	2,304±0,016 ^a	2,309±0,002 ^a
Số lá	3,867±0,133 ^a	4,067±0,291 ^b	3,267±0,176 ^a	3,368±0,042 ^a	3,373±0,020 ^a	3,362±0,004 ^a
Chiều dài lá (cm)	4,720±0,083 ^a	4,858±0,013 ^a	3,773±0,085 ^a	3,917±0,062 ^a	3,874±0,011 ^a	3,870±0,002 ^a
Chiều rộng lá (cm)	1,980±0,020 ^a	1,887±0,027 ^a	1,833±0,007 ^a	1,838±0,002 ^a	1,838±0,001 ^a	1,838±0,003 ^a
Hàm lượng diệp lục (SPAD)	37,687±0,079 ^a	44,313±0,569 ^b	37,800±0,510 ^a	38,647±0,473 ^a	38,279±0,104 ^a	38,245±0,008 ^a
Khối lượng tươi (g)	1,984±0,044 ^a	2,484±0,218 ^b	1,629±0,106 ^a	1,763±0,052 ^{ab}	1,736±0,009 ^{ab}	1,732±0,002 ^{ab}

Các chữ a, b, c trên cùng một hàng thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa ở mức $p < 0,05$ theo phép thử Duncan.

Cây chuối nuôi cấy trong môi trường bổ sung AgCS với nồng độ 0,5 ppm trở lên có chiều dài rễ tăng lên 1,4 lần. Tuy nhiên, tổng số rễ/cây, chiều cao cây, số lá, chiều dài lá, chiều rộng lá, khối lượng tươi giảm và có hàm lượng diệp lục tương đương so với mẫu đối chứng. Kết quả này cho thấy, AgCS với nồng độ 0,25 ppm có hiệu quả kích thích sinh trưởng cây chuối nuôi cấy mô ở giai đoạn ra rễ tốt hơn các nồng độ còn lại.

Hiệu quả kích thích sinh trưởng và phát triển cây chuối ở giai đoạn ra rễ của một số loại hạt nano bạc khác cũng đã được công bố trước đó. Trong môi trường bổ sung hạt nano bạc 12 ppm, có khử trùng ở 121°C trong 15 phút, làm tăng số rễ 3,3 lần, chiều dài rễ 3,9 lần và hàm lượng diệp lục 1,3 lần [7].

Trong một nghiên cứu khác, hạt nano bạc nồng độ 3 ppm được bổ sung vào sau khi môi trường khử trùng bằng nhiệt làm tăng chiều cao, khối lượng tươi, số lá, số rễ và hàm lượng diệp lục [2]. Trong khi đó, hạt nano bạc chitosan mà chúng tôi sử dụng với nồng độ khá thấp (0,25 ppm) cũng làm tăng chiều dài rễ, hàm lượng diệp lục và khối lượng tươi. Điều này cho thấy, các loại hạt nano bạc khác nhau với cách thức bổ sung vào môi trường nuôi cấy khác nhau sẽ tác động không giống nhau lên các chỉ tiêu sinh trưởng và phát triển của cây chuối *in vitro*. Mỗi loại hạt nano bạc với quy trình ứng dụng khác nhau sẽ có nồng độ tối ưu riêng cho sự phát triển của cây chuối.

Bên cạnh đó, cây chuối trong môi trường có bổ sung AgCS 0,25 và 0,5 ppm có bộ rễ màu trắng và có rễ tơ tương tự so với cây đối chứng (hình 2). Trong khi đó, cây chuối trong môi trường bổ sung AgCS nồng độ 1, 2 và 4 ppm có ít rễ tơ hơn đối chứng, các rễ mới sinh ra nằm trong môi trường có màu đen và các rễ mới không nằm trong môi trường có màu trắng.



Hình 2. Cây chuối nuôi cấy mô ở giai đoạn ra rễ trên môi trường có bổ sung hạt nano bạc chitosan với các nồng độ 0,25-4 ppm.

Như vậy, AgCS với nồng độ 0,25 ppm bổ sung vào môi trường nuôi cấy mô không những có khả năng khử trùng môi trường nuôi cấy mô đạt 96,7±3,3% mà còn có khả năng tăng một số chỉ tiêu sinh trưởng quan trọng của cây chuối *in vitro* ở giai đoạn ra rễ.

3.4. Cây chuối *ex vitro* giai đoạn vườn ươm

Vì cây chuối *in vitro* trong môi trường ra rễ với AgCS 0,25 và 0,5 ppm có bộ rễ trắng và một số chỉ số sinh trưởng tốt hơn so với cây đối chứng, nên các cây này đã được lựa chọn để trồng ngoài vườn ươm (cây chuối *ex vitro*) và theo dõi một số chỉ tiêu sinh trưởng và phát triển.

Kết quả cho thấy, một số chỉ tiêu như số rễ mới/cây, chiều dài rễ mới, chiều dài lá, chiều rộng lá và khối lượng tươi có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê. Cụ thể là, cây *in vitro* được ra rễ tạo cây hoàn chỉnh trên môi trường có bổ sung AgCS 0,25 và 0,5 ppm đều cho cây con *ex vitro* ngoài vườn ươm sinh trưởng tốt hơn so với mẫu đối chứng về tổng số rễ/cây, số rễ mới/cây, chiều dài rễ mới, chiều dài thân, chiều dài lá, chiều rộng lá và khối lượng tươi (bảng 3).

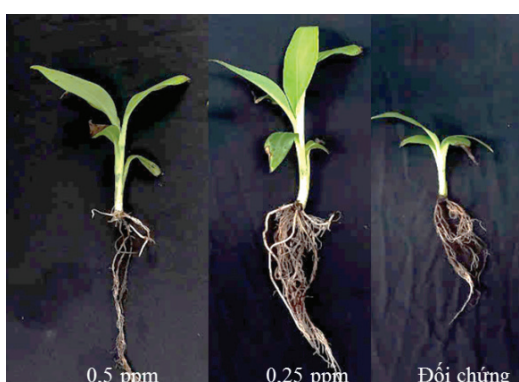
Bảng 3. Ảnh hưởng của hạt nano bạc lên một số chỉ tiêu sinh trưởng của cây chuối nuôi cấy mô ở giai đoạn vườn ươm.

	Đối chứng khử trùng bằng nhiệt	0,25 ppm	0,5 ppm
Tổng số rễ/cây	6,50±0,50 ^a	10,00±0,50 ^c	8,50±0,25 ^b
Số rễ mới/cây	1,00±0,50 ^a	4,50±0,50 ^b	5,00±1,00 ^b
Chiều dài rễ mới (cm)	5,25±0,25 ^a	15,75±1,25 ^b	6,00±0,50 ^a
Chiều dài thân (cm)	4,50±0,50 ^a	7,75±0,25 ^c	6,25±0,75 ^b
Chiều dài lá (cm)	5,50±0,50 ^a	9,75±0,25 ^b	8,00±0,50 ^b
Chiều rộng lá (cm)	2,00±0,10 ^a	3,50±0,10 ^b	2,70±0,30 ^{ab}
Khối lượng tươi (g)	1,74±0,02 ^a	7,77±0,23 ^c	4,20±0,63 ^b

Các chữ a, b, c trên cùng một hàng thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa ở mức $p < 0,05$ theo phép thử Duncan.

Cây con *ex vitro* ngoài vườn ươm từ cây nuôi trong môi trường ra rễ có bổ sung AgCS 0,25 ppm và 0,5 ppm có tổng số rễ/cây tăng 1,5 và 1,3 lần, số rễ mới/cây tăng 4 và 5 lần, chiều dài rễ mới tăng 3 và 1,1 lần, chiều dài thân tăng 1,7 và 1,4 lần, chiều dài và chiều rộng lá tăng 1,8 và 1,4 lần, khối lượng tươi tăng 4,5 và 2,4 lần so với cây *ex vitro* đối chứng nuôi cấy trên môi trường khử trùng bằng nhiệt. Kết quả này cho thấy hiệu quả vượt trội so với công bố trước đây đã sử dụng hạt nano bạc để tưới cho cây chuối con ngoài vườn ươm [2]. Từ đây cũng có thể thấy, liệu pháp mà chúng tôi sử dụng là bổ sung nano bạc vào giai đoạn ra rễ của cây và không cần tưới bổ sung hạt nano bạc ở vườn ươm có hiệu quả tốt hơn.

Bên cạnh đó, cây con ngoài vườn ươm phát triển từ cây *in vitro* trên môi trường có bổ sung AgCS không có sự khác biệt về hình thái lá so với cây đối chứng nuôi cấy trên môi trường khử trùng bằng nhiệt (hình 3).



Hình 3. Cây chuối nuôi cấy mô ở giai đoạn vườn ươm phát triển từ cây ra rễ trên các môi trường có bổ sung hạt nano bạc chitosan nồng độ 0,25 và 0,5 ppm.

Như vậy, cây chuối *ex vitro* ngoài vườn ươm phát triển từ cây *in vitro* nuôi cấy trên môi trường có bổ sung AgCS 0,25 và 0,5 ppm sinh trưởng và phát triển tốt với một số chỉ tiêu cao hơn ở cây đối chứng.

4. Kết luận

Sử dụng hạt nano bạc chitosan (AgCS) với nồng độ 0,25-0,5 ppm để khử trùng môi trường nuôi cấy mô có thể đạt tỷ lệ vô trùng 96,7-100% trong 4 tuần là một phương pháp đơn giản, tiết kiệm chi phí và thời gian so với phương pháp khử trùng môi trường bằng nhiệt thường quy. Cho đến hiện nay, đây cũng là nồng độ thấp nhất của hạt nano bạc có thể khử trùng tuyệt đối môi trường nuôi cấy trong 4 tuần. Không những vậy, môi trường nuôi cấy bổ sung AgCS ở nồng độ 0,25-0,5 ppm còn có tác dụng kích thích sinh trưởng và phát triển của cây chuối nuôi cấy mô ở giai đoạn ra rễ và tạo sức bật giúp cây con tăng trưởng nhanh ở giai đoạn *ex vitro* ngoài vườn ươm. Với tiềm năng kép này, có thể nghiên cứu ứng dụng hạt nano bạc chitosan trong nuôi cấy mô cây chuối với quy mô công nghiệp để giảm chi phí sản xuất cây giống và tăng chất lượng cây giống; đồng thời có thể mở rộng với các đối tượng cây nuôi cấy mô khác.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Trường Đại học Công nghệ, Đại học Quốc gia Hà Nội theo đề tài mã số CN23.03. Các tác giả xin trân trọng cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] H.T. Tung, H.G. Bao, D.M. Cuong, et al. (2021), "Silver nanoparticles as the sterilant in large-scale micropropagation of chrysanthemum", *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, **57**, pp.897-906, DOI: 10.1007/s11627-021-10163-7.
- [2] M.H. Tra, D.M. Anh, D.T. Phat, et al. (2017), "Effect of silver nanoparticles amount on inoculating banana (*Musa nana* Lour) *in vitro*", *Journal of Science of Lac Hong University, Special Issue*, pp.149-152 (in Vietnamese).
- [3] I. Andújar, N. González, J.C.G. Ramos, et al. (2020), "Argovit™ silver nanoparticles reduce contamination levels and improve morphological growth in the *in vitro* culture of *Psidium friedrichsthalianum* (O. Berg) Nied", *SN Appl. Sci.*, **2**, DOI: 10.1007/s42452-020-03948-9.
- [4] K. Nazir, S.W. Hassan, M.I. Khan, et al. (2023), "The use of ZnO NPs and Ag NPs along with sterilizing agents for managing contamination in banana tissue culture", *Biomass Conv. Bioref.*, DOI: 10.1007/s13399-023-04623-w.
- [5] M. Hasanin, A.H. Hashem, I. Lashin, et al. (2023), "In vitro improvement and rooting of banana plantlets using antifungal nanocomposite based on myco-synthesized copper oxide nanoparticles and starch", *Biomass Conv. Bioref.*, **13**, pp.8865-8875, DOI: 10.1007/s13399-021-01784-4.
- [6] N. Coelho, A. Romano (2022), "Impact of chitosan on plant tissue culture: Recent applications", *Plant Cell Tiss. Organ. Cult.*, **148**, pp.1-13, DOI: 10.1007/s11240-021-02156-6.
- [7] S.M. Tamimi, H.O. Silver (2023), "Nanoparticles for enhancing the efficiency of micropropagation of banana (*Musa acuminata* L.)", *Trop Life Sci. Res.*, **34**(2), pp.161-175, DOI: 10.21315/tlsr2023.34.2.8.
- [8] P. Siriporn, L. Thitikamon, B. Thanyaporn, et al. (2024), "Effect of biosynthesised silver nanoparticles as sterilant on physiological and biochemical characteristics in micropropagation of *Musa sapientum* L.", *Adv. Nat. Sci. Nanosci. Nanotechnol.*, **15**(2), DOI: 10.1088/2043-6262/ad3b7d.
- [9] L.T. Hien, N.T.P. Hue, L.T. Duc, et al. (2022), "Synthesis of chitosan stabilized silver nanoparticles and evaluation of the *in vitro* antibacterial activity against *Xanthomonas Oryzae* PV. *oryzae* causing blight disease of rice", *VNU Journal of Science: Natural Sciences and Technology*, **38**(1), pp.1-9, DOI: 10.25073/2588-1140/vnunst.5223.