

Nano bạc nâng cao hiệu quả tái sinh chồi từ mẫu cây cánh hoa Thu hải đường (*Begonia × tuberhybrida* Voss) thông qua con đường tổng hợp carbohydrate

Hoàng Đắc Khải¹, Nguyễn Viết Hưng¹, Hoàng Thanh Tùng², Vũ Quốc Luận¹, Đỗ Mạnh Cường¹, Nguyễn Thị Như Mai¹, Hoàng Thị Như Phương², Đoàn Văn Thu¹, Đỗ Thanh Tuấn¹, Dương Tấn Nhựt^{1*}

¹Viện Khoa học Sự sống, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, 9/621 Võ Nguyên Giáp, phường Linh Trung, TP Thủ Đức, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

²Trường Đại học Đà Lạt, 1 Phủ Đổng Thiên Vương, phường 8, TP Đà Lạt, tỉnh Lâm Đồng, Việt Nam

Ngày nhận bài 20/3/2022; ngày chuyển phản biện 23/3/2022; ngày nhận phản biện 11/4/2022; ngày chấp nhận đăng 19/4/2022

Tóm tắt:

Nghiên cứu này được thực hiện nhằm tối ưu hóa hiệu quả tái sinh chồi từ mẫu cây cánh hoa Thu hải đường trên môi trường bổ sung nano bạc (AgNPs). Kết quả cho thấy, các mẫu cánh hoa được nuôi cấy trên môi trường bổ sung 0,8 mg/l Thidiazuron (TDZ) cho hiệu quả tái sinh chồi cao hơn đáng kể so với các loại cytokinin khác được sử dụng. Trong khi đó, bổ sung 1,5 mg/l AgNPs kết hợp 0,8 mg/l TDZ đã gia tăng số lượng chồi tái sinh cao gấp 1,67 lần so với đối chứng không bổ sung AgNPs. Sự hiện diện của 1,5 mg/l AgNPs trong môi trường nuôi cấy đã kích thích gia tăng sinh khối tươi và khô của cụm chồi (421,49 và 24,73 mg, tương ứng) cao hơn đáng kể so với nghiệm thức đối chứng (241,92 và 12,49 mg, tương ứng). Phân tích hàm lượng carbohydrate trong mẫu cây bằng UV-Vis cho thấy, trong hầu hết các giai đoạn tái sinh *in vitro* cây Thu hải đường, AgNPs đã kích thích gia tăng sự tích lũy tinh bột (ngày 5, 10, 20 và 25) và đường (ngày 15, 20 và 25) trong mẫu cây. Các kết quả hiện tại chỉ ra rằng, AgNPs thúc đẩy quá trình tích lũy tinh bột và chuyển hóa thành đường trong mẫu cây cánh hoa Thu hải đường, tạo ra nguồn năng lượng cần thiết cho quá trình tái sinh chồi *in vitro*.

Từ khóa: nano bạc, Thu hải đường, tinh bột, vi nhân giống.

Chỉ số phân loại: 1.4, 4.6

Silver nanoparticles enhanced shoot regeneration from *Begonia × tuberhybrida* Voss petal explants via carbohydrate synthesis pathway

Dac Khai Hoang¹, Viet Hung Nguyen¹, Thanh Tung Hoang², Quoc Luan Vu¹, Manh Cuong Do¹, Thi Nhu Mai Nguyen¹, Thi Nhu Phuong Hoang², Van Thu Doan¹, Thanh Tuan Do¹, Tan Nhut Duong^{1*}

¹Institute of Life Science, Vietnam Academy of Science and Technology, 9/621 Vo Nguyen Giap Street, Linh Trung Ward, Thu Duc City, Ho Chi Minh City, Vietnam

²Dalat University, 1 Phu Dong Thien Vuong Street, Ward 8, Da Lat City, Lam Dong Province, Vietnam

Received 20 March 2022; revised 11 April 2022; accepted 19 April 2022

Abstract:

This study was carried out to optimise the shoot regeneration efficiency from *Begonia × tuberhybrida* Voss petals on medium supplemented with silver nanoparticles (AgNPs). The results showed that the petal explants cultured on the medium supplemented with 0.8 mg/l Thidiazuron (TDZ) had significantly higher bud regeneration efficiency than other cytokinins investigated. Meanwhile, the addition of 1.5 mg/l AgNPs combined with 0.8 mg/l TDZ increased the number of regenerated shoots 1.67-fold higher than the control without adding AgNPs. The presence of 1.5 mg/l AgNPs in the culture medium stimulated a significantly higher increase in the fresh and dry biomass of shoot clusters (421.49 and 24.73 mg, respectively) compared to the control (241.92 and 12.49 mg, respectively). Analysis of the carbohydrate content in explants by UV-Vis showed that during most of the *in vitro* regeneration stages, AgNPs stimulated the accumulation of starch (days 5, 10, 20 and 25) and sugars (days 15, 20 and 25) in the explants. The present results indicate that AgNPs promote starch accumulation and conversion to sugar in *Begonia × tuberhybrida* Voss petal explants, which provide the necessary energy source for *in vitro* shoot regeneration.

Keywords: *Begonia × tuberhybrida* Voss, micropropagation, silver nanoparticles, starch.

Classification numbers: 1.4, 4.6

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

1. Đặt vấn đề

Thu hải đường (*Begonia*) là một trong những chi thực vật đa dạng nhất trong giới thực vật [1, 2]. Hiện nay, hơn 1800 loài đã được công nhận và theo dự đoán, tổng số loài thực sự trên thế giới có thể lên đến 2500 loài [2]. Dựa trên sự đa dạng về màu sắc, hình dáng và kích thước của hoa và lá, nhiều loài Thu hải đường từ lâu đã được nhân trồng rộng rãi như một loại hoa chậu cảnh mang lại giá trị kinh tế cao. Cho đến nay, nuôi cấy thực vật *in vitro* đã trở thành phương thức nhân giống chủ đạo trên nhiều đối tượng cây trồng khác nhau nhằm tạo ra các cây giống sạch bệnh có chất lượng đồng đều với hệ số nhân giống lớn trong thời gian ngắn [3]. Trong vi nhân giống cây Thu hải đường, các nguồn mẫu cấy ban đầu thường được sử dụng như lá [4, 5], cuống lá [5-7], thân [6, 8], phát hoa [9, 10] hay cuống hoa [11, 12]. Tuy nhiên, nguồn mẫu cấy cánh hoa vẫn chưa được nghiên cứu nhiều, trong khi cánh hoa là nguồn mẫu cấy có nhiều ưu điểm như là số lượng nhiều, không làm tổn hại cây mẹ khi thu mẫu [13]. Nghiên cứu đầu tiên nuôi cấy thành công cánh hoa Thu hải đường được thực hiện bởi F.M. Velasco và cs (2018) [13]; tuy nhiên, hiệu quả tái sinh của quy trình chỉ đạt mức trung bình. Do đó, các nghiên cứu tiếp theo cần được thực hiện để nâng cao tần số tái sinh từ mẫu cấy cánh hoa Thu hải đường.

Những năm gần đây, AgNPs đã được sử dụng trong nuôi cấy *in vitro* để làm chất khử trùng bề mặt mẫu cấy [6, 14-18]; ngoài ra, AgNPs cũng được bổ sung vào môi trường nuôi cấy để tăng hiệu quả tái sinh *in vitro* trên các đối tượng cây trồng khác nhau như hoa Đồng tiền [19], Trầu tiên [20]; lan Hồ điệp [21]; Dâu tây [22]; sâm Ngọc Linh [23]. Các nghiên cứu cho thấy rằng, bổ sung AgNPs vào môi trường nuôi cấy ở nồng độ thích hợp đã giúp tăng hiệu quả tái sinh. Tuy nhiên, ảnh hưởng của AgNPs lên sự thay đổi hàm lượng carbohydrate trong mẫu cấy thực vật chưa được nghiên cứu trước đây, mặc dù carbohydrate tổng hợp trong mẫu cấy liên quan trực tiếp đến hiệu quả tái sinh *in vitro* [7]. Do đó, nghiên cứu này được thực hiện nhằm đánh giá tác động của AgNPs trong môi trường nuôi cấy lên hiệu quả tái sinh chồi và sự thay đổi về hàm lượng carbohydrate trong mẫu cấy cánh hoa trong suốt giai đoạn tái sinh *in vitro* cây Thu hải đường.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu thực vật

Nguồn mẫu được sử dụng trong các thí nghiệm là các cánh hoa tầng thứ 2 (tính từ ngoài vào, đường kính 3 cm) được thu nhận từ hoa cây Thu hải đường 4 tháng tuổi được trồng tại vườn ươm Phòng Sinh học Phân tử và Chọn tạo giống cây trồng, Viện Khoa học Sự sống.

2.2. Dung dịch nano bạc (AgNPs)

Dung dịch nano bạc (AgNPs) nồng độ 500 ppm với các hạt có kích thước trung bình ≤ 20 nm do Viện Công nghệ Môi trường tổng hợp theo phương pháp của H.N. Chau và cs (2008) [24] được sử dụng trong các thí nghiệm có liên quan.

2.3. Môi trường nuôi cấy

Môi trường nuôi cấy sử dụng trong nghiên cứu này là môi trường MS cơ bản bổ sung 8 g/l agar, 30 g/l sucrose, pH 5,8. Các chất điều hòa sinh trưởng thực vật và AgNPs với các nồng độ khác nhau được bổ sung vào môi trường tùy theo mục đích từng thí nghiệm. Môi trường được hấp khử trùng ở nhiệt độ 121°C, áp suất 1 atm trong thời gian 30 phút.

2.4. Phương pháp nghiên cứu

Khử trùng bề mặt mẫu cấy: Cánh hoa Thu hải đường đã thu nhận được rửa bằng dung dịch tẩy rửa Sunlight (Unilever, Việt Nam) và rửa dưới vòi nước chảy trong 20 phút, ngâm với cồn 70° trong 30 giây, rửa lại bằng nước vô trùng 4 lần. Sau đó, các mẫu tiếp tục được khử trùng bằng dung dịch 40 g/l $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ trong thời gian 15 phút [13]. Cuối cùng, các cánh hoa được rửa sạch lại bằng nước cất vô trùng 4 lần để sử dụng cho các thí nghiệm.

Phương pháp nhuộm màu tinh bột: Mẫu cấy cánh hoa Thu hải đường ở giai đoạn 0 và 5 ngày nuôi cấy được rửa sạch bằng nước cất, cắt thành lát mỏng (30-40 μm) và đặt lên lam kính đã có sẵn một giọt nước. Tiếp theo, mẫu được nhuộm bằng dung dịch kali-iodua trong 5 phút; cuối cùng, mẫu được rửa sạch lại bằng nước cất và quan sát dưới kính hiển vi quang học (Leica, Mỹ) [8].

Ảnh hưởng của cytokinin lên hiệu quả tái sinh chồi *in vitro*: Các cánh hoa cây Thu hải đường được cấy trên môi trường MS có bổ sung cytokinin (CK) riêng lẻ ở các nồng độ khác nhau gồm 6-Benzyladenine - BA (0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 mg/l), Kinetin - KIN (0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 mg/l) hoặc Thidiazuron - TDZ (0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 mg/l), đối chứng là môi trường MS không bổ sung CK. Các chỉ tiêu theo dõi gồm tỷ lệ tái sinh chồi (%), số chồi/mẫu, khối lượng tươi và khô của cụm chồi (mg) được ghi nhận sau 60 ngày nuôi cấy.

Ảnh hưởng của nano bạc lên hiệu quả tái sinh chồi *in vitro*: Các cánh hoa cây Thu hải đường được nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung 0,8 mg/l TDZ (kết quả tốt nhất từ thí nghiệm 1) và AgNPs với các nồng độ khác nhau (0; 0,5;

1,0; 1,5; 2,0; 2,5 ppm), nhằm khảo sát tác động của AgNPs đến khả năng tái sinh chồi *in vitro*. Đối chứng là các cánh hoa được nuôi cấy trên môi trường không bổ sung AgNPs. Các chỉ tiêu theo dõi gồm tỷ lệ tái sinh chồi (%), số chồi/mẫu, khối lượng tươi và khô của cụm chồi (mg) được ghi nhận sau 60 ngày nuôi cấy.

Xác định hàm lượng tinh bột trong mẫu cây bằng phương pháp phân tích quang phổ tử ngoại khả kiến (UV-Vis): Hàm lượng tinh bột trong mẫu cây nghiệm thức tối ưu và đối chứng trong thí nghiệm 2 được định lượng như mô tả của B. Fernandes và cs (2012) [25]. Theo đó, tinh bột trong mẫu được thủy phân thành maltodextrin bởi α -amylase (3000 U/ml) và sau đó được thủy phân thành glucose bằng amyloglucosidase (3300 U/ml). Hàm lượng glucose trong mẫu được xác định bằng cách sử dụng thuốc thử GOPOD (glucose oxidase-peroxidase) sản phẩm có độ hấp thụ tối đa ở 510 nm, D-glucose được sử dụng làm đối chứng. Dung dịch mẫu trắng được chuẩn bị gồm 0,1 ml nước cất có bổ sung 3,0 ml GOPOD. Tổng hàm lượng tinh bột (I) (% w/w DW) được xác định theo công thức: $I = A \times F / W \times 90$. Trong đó: A là hệ số hấp thụ của dung dịch thử so với mẫu trắng; F là hệ số chuyển đổi từ giá trị độ hấp thụ sang giá trị glucose; W là khối lượng mẫu thử (mg).

Xác định hàm lượng đường khử trong mẫu cây bằng phương pháp phân tích quang phổ tử ngoại khả kiến (UV-Vis): Hàm lượng đường khử của mẫu cây nghiệm thức tối ưu và đối chứng trong thí nghiệm 2 được xác định bằng cách sử dụng thuốc thử 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) tạo ra sản phẩm có độ hấp thụ cực đại ở bước sóng 540 nm, nước cất được sử dụng làm đối chứng. D-glucose được sử dụng để xây dựng đường chuẩn [26]. Hàm lượng đường (S) (mg/g DW) được xác định theo công thức: $S = A \times n \times V/m$. Trong đó: A là hàm lượng đường khử trong dung dịch mẫu đã pha loãng (mg/g); n là hệ số pha loãng; V là thể tích dung dịch chuẩn (ml); m là khối lượng mẫu thử (g).

2.5. Điều kiện thí nghiệm

Mẫu trong các bình nuôi cấy được đặt trong phòng nuôi ở nhiệt độ 25±2°C, độ ẩm tương đối 55-60%, chiếu sáng bằng đèn huỳnh quang với cường độ 40-45 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ và thời gian chiếu sáng được thiết lập 16 giờ/ngày.

2.6. Xử lý số liệu

Số liệu sau khi thu thập ứng với từng chỉ tiêu theo dõi được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel 2010 và phân tích thống kê SPSS 16.0 dựa trên tiêu chuẩn phép thử Duncan với $p < 0,05$ [27].

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Ảnh hưởng của cytokinin lên khả năng tái sinh chồi của mẫu cánh hoa Thu hải đường nuôi cấy *in vitro*

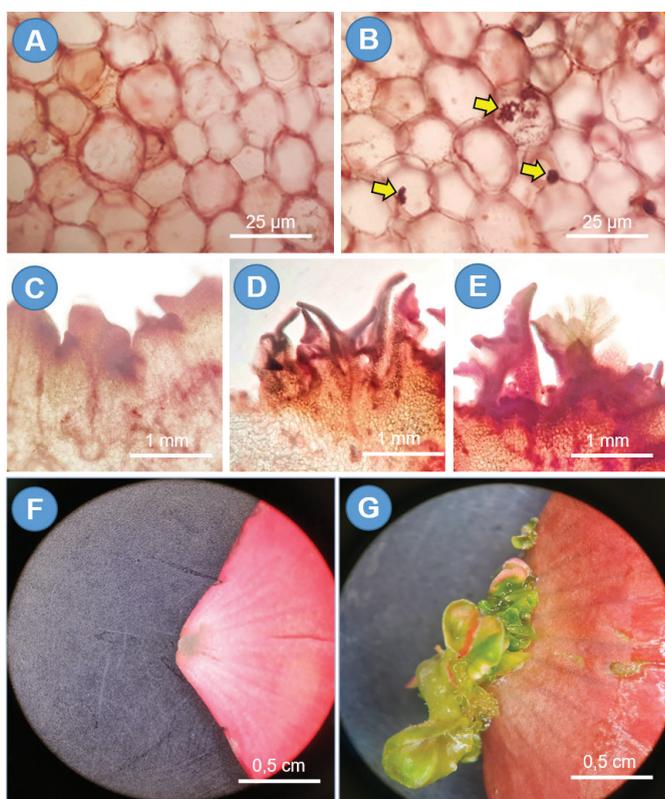
Kết quả ghi nhận được cho thấy, mẫu cánh hoa cây Thu hải đường được nuôi cấy trên môi trường bổ sung các loại CK khác nhau (BA, KIN, TDZ) cho khả năng tái sinh chồi khác nhau (bảng 1).

Bảng 1. Ảnh hưởng của cytokinin lên khả năng tái sinh chồi của mẫu cánh hoa cây Thu hải đường sau 60 ngày nuôi cấy.

CK	Nồng độ (mg/l)	Tỷ lệ tái sinh (%)	Số chồi/mẫu	Cụm chồi	
				Khối lượng tươi (mg)	Khối lượng khô (mg)
ĐC	0,0	-	-	-	-
	0,5	34,44 ^{gh}	4,00 ^f	53,91 ^h	1,95 ^{fg}
	1,0	44,45 ^{de}	4,78 ^{ef}	63,49 ^{gh}	2,76 ^{ef}
	1,5	68,89 ^b	7,11 ^d	100,24 ^f	4,55 ^d
BA	2,0	34,44 ^{gh}	1,70 ^g	21,64 ⁱ	0,95 ^h
	2,5	32,22 ^{hi}	2,00 ^g	25,69 ⁱ	1,10 ^h
	0,5	20,00 ^k	5,89 ^e	76,32 ^g	3,54 ^e
	1,0	35,56 ^{gh}	7,22 ^d	96,26 ^f	4,54 ^d
KIN	1,5	48,89 ^{cd}	8,00 ^d	103,58 ^f	4,33 ^d
	2,0	37,78 ^{fg}	4,67 ^{ef}	62,38 ^{gh}	2,29 ^{fg}
	2,5	42,22 ^{ef}	3,56 ^f	46,24 ^h	1,67 ^{gh}
	0,2	28,89 ⁱ	9,22 ^c	124,38 ^e	6,14 ^c
TDZ	0,4	53,33 ^c	11,33 ^b	151,87 ^d	7,31 ^b
	0,6	66,67 ^b	12,00 ^b	158,25 ^{cd}	7,35 ^b
	0,8	75,56 ^a	17,00 ^a	241,92 ^a	12,49 ^a
	1,0	65,56 ^b	12,00 ^b	170,80 ^b	7,17 ^b

Các giá trị trong cùng một cột được đi kèm với các chữ cái khác nhau biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa ở mức $p < 0,05$ trong phép thử Duncan. ĐC: Đối chứng.

Trên môi trường không bổ sung CK (đối chứng), mẫu cây không cảm ứng tái sinh chồi. Đối với môi trường nuôi cấy bổ sung BA, hiệu quả tái sinh chồi (tỷ lệ tái sinh chồi, số chồi/mẫu, khối lượng tươi và khô của cụm chồi) tăng tỷ lệ thuận khi tăng nồng độ BA 0,5-1,5 mg/l. Ở nồng độ 1,5 mg/l BA, tỷ lệ tái sinh chồi đạt cao nhất (68,89%). Ngược lại, khi nồng độ BA vượt quá 1,5 mg/l, hiệu quả tái sinh chồi giảm đáng kể (bảng 1). Trên môi trường bổ sung 1,5 mg/l KIN, hiệu quả tái sinh chồi cao hơn các nồng độ KIN khác; tuy nhiên, tỷ lệ tái sinh chồi chỉ đạt 48,89% (bảng 1). Trong khi đó, môi trường bổ sung TDZ cho hiệu quả tái sinh chồi cao hơn đáng kể so với các nghiệm thức sử dụng BA và KIN. Cụ thể, nghiệm thức 0,8 mg/l TDZ cho tỷ lệ tái sinh chồi (75,56%), số chồi/mẫu (17,00 chồi), khối lượng tươi cụm chồi (241,92 mg) và khối lượng khô cụm chồi (12,49 mg) đạt cao nhất (bảng 1). Chồi thu được trong nghiệm thức này có màu xanh đậm và kích thước đồng đều (hình 1G).



Hình 1. Các giai đoạn tái sinh chồi *in vitro* từ mẫu cây cánh hoa Thu hải đường trên môi trường bổ sung 0,8 mg/l TDZ. (A) Quan sát mô học cho thấy không có sự tích lũy tinh bột trong mẫu cây ban đầu; (B) Các hạt tinh bột tích lũy trong mô (mũi tên) sau 5 ngày nuôi cấy; (C) Sự hình thành chồi sơ khởi sau 15 ngày nuôi cấy; (D) Sự hình thành chồi hai lá mầm đã bắt đầu xuất hiện tại góc mẫu cây cánh hoa (hình 1C). Các chồi hai lá mầm đã xuất hiện sau 20 ngày nuôi cấy (hình 1D) và các chồi hình thành phát thể lá rõ ràng sau 30 ngày nuôi cấy (hình 1E và 1G), ngược lại không có sự tái sinh chồi trong nghiệm thức đối chứng đã được quan sát (hình 1F).

Quan sát mô học cho thấy, sau 5 ngày nuôi cấy trên môi trường bổ sung 0,8 mg/l TDZ, sự tích lũy các hạt tinh bột đã được quan sát thấy trong mẫu cây cánh hoa, trong khi, sự tích lũy này hầu như không được ghi nhận trong mẫu cây ban đầu (hình 1A và 1B). Sự tích lũy tinh bột là điều kiện cần thiết cho sự tái sinh *in vitro* của mẫu cây [7]. Sau 15 ngày nuôi cấy, các chồi sơ khởi đã bắt đầu xuất hiện tại góc mẫu cây cánh hoa (hình 1C). Các chồi hai lá mầm đã xuất hiện sau 20 ngày nuôi cấy (hình 1D) và các chồi hình thành phát thể lá rõ ràng sau 30 ngày nuôi cấy (hình 1E và 1G), ngược lại không có sự tái sinh chồi trong nghiệm thức đối chứng đã được quan sát (hình 1F).

A. Awal và cs (2013) [12] đã báo cáo rằng, các mẫu cây cánh hoa Thu hải đường (*B. x hiemalis* Fotsch) đã không có khả năng tái sinh chồi trên môi trường MS bổ sung BA hoặc TDZ ở tất cả các nồng độ được khảo sát. Trong khi, nghiên cứu của F.M. Velasco và cs (2018) [13] đã tái sinh chồi cây Thu hải đường (*B. eliator*) gián tiếp thông qua mô sẹo từ mẫu cây cánh hoa thành công trên hai giống ‘Heidi’ và ‘Gloriosa’, với tỷ lệ tái sinh lần lượt là 57,2 và 46,4%. Các

kết quả này chỉ ra rằng, kiểu gen là một trong những yếu tố quan trọng quyết định đến khả năng tái sinh *in vitro* của mẫu cây cánh hoa Thu hải đường. Trong nghiên cứu này, cánh hoa Thu hải đường nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung 0,8 mg/l TDZ cho tỷ lệ tái sinh chồi đạt tối ưu (75,56%).

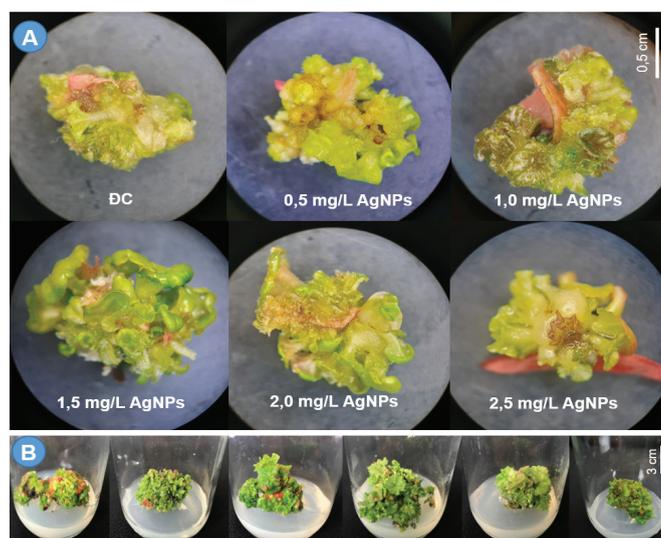
3.2. Ảnh hưởng của nano bạc (AgNPs) lên khả năng tái sinh chồi của mẫu cánh hoa Thu hải đường nuôi cấy *in vitro*

Kết quả ghi nhận được cho thấy, AgNPs có ảnh hưởng đáng kể lên khả năng tái sinh chồi từ mẫu cây cánh hoa nuôi cấy *in vitro* sau 30 và 60 ngày nuôi cấy (bảng 2 và hình 2A, 2B). Ở nồng độ AgNPs thấp (0,5 mg/l), hiệu quả tái sinh chồi không có sự khác biệt đáng kể so với đối chứng không bổ sung AgNPs. Trong khi đó, trên môi trường có chứa 1,5 mg/l AgNPs, các chỉ tiêu tái sinh và sinh trưởng như tỷ lệ tái sinh (78,89%), số lượng chồi (28,44 chồi/mẫu), khối lượng tươi (421,49 mg), khối lượng khô (24,73 mg) đạt cao nhất (bảng 2 và hình 2B). Tuy nhiên, hiệu quả tái sinh và sinh trưởng của mẫu cây đã giảm đáng kể khi bổ sung AgNPs với nồng độ

Bảng 2. Ảnh hưởng của nano bạc (AgNPs) lên khả năng tái sinh chồi của mẫu cánh hoa cây Thu hải đường sau 60 ngày nuôi cấy.

Nồng độ AgNPs (mg/l)	Tỷ lệ tái sinh (%)	Số chồi	Cụm chồi	
			Khối lượng tươi (mg)	Khối lượng khô (mg)
0,0	75,56 ^{bc}	17,00 ^c	241,92 ^c	12,49 ^c
0,5	73,33 ^c	17,11 ^c	244,12 ^c	12,85 ^c
1,0	78,89 ^{ab}	21,44 ^b	309,47 ^b	17,12 ^b
1,5	78,89 ^{ab}	28,44 ^a	421,49 ^a	24,73 ^a
2,0	65,55 ^d	13,89 ^d	183,22 ^d	9,48 ^d
2,5	48,89 ^e	9,34 ^e	120,18 ^e	5,82 ^e

Các giá trị trong cùng một cột được đi kèm với các chữ cái khác nhau biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa ở mức $p < 0,05$ trong phép thử Duncan.



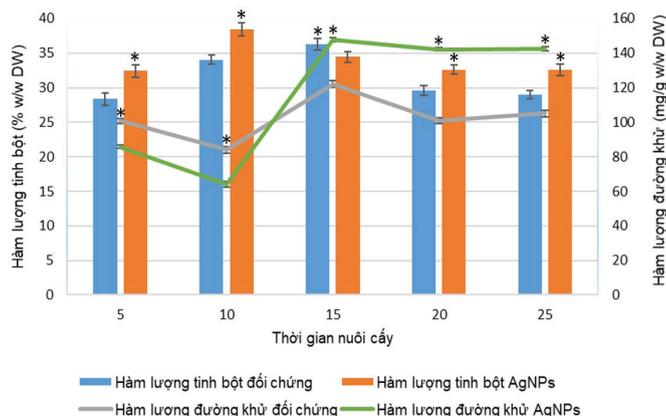
Hình 2. Ảnh hưởng của nano bạc (AgNPs) lên sự tái sinh chồi *in vitro* từ mẫu cây cánh hoa Thu hải đường. (A) Sự tái sinh chồi sau 30 ngày nuôi cấy; (B) Sự tái sinh chồi sau 60 ngày nuôi cấy. ĐC: Đối chứng.

cao (2,0 mg/l và 2,5 mg/l). Như vậy, việc bổ sung 1,5 mg/l AgNPs vào môi trường nuôi cấy đã gia tăng số lượng chồi tái sinh cao gấp 1,67 lần so với đối chứng.

Kết quả của nghiên cứu này tương đồng với các nghiên cứu ứng dụng AgNPs cho mục đích gia tăng hiệu quả tái sinh *in vitro* trên nhiều đối tượng cây trồng như cây hoa Đồng tiền [19], cây Dâu tây [22], lan Hồ điệp [21], cây Trầu tiên [20]; cây Chuối [28]; cây sâm Ngọc Linh [23]. Bên cạnh đó, các cơ chế sinh hóa có liên quan cũng đã được chứng minh. Theo đó, việc bổ sung AgNPs vào môi trường nuôi cấy có tác dụng ức chế hoạt động của enzyme sinh tổng hợp etylen; do đó, giảm sự sản sinh quá mức khí etylen trong bình nuôi cấy gây ức chế sự nhân nhanh chồi cây Dâu tây [22]. Tuy nhiên, ảnh hưởng của AgNPs lên sự thay đổi hàm lượng carbohydrate trong mẫu cây thực vật chưa được nghiên cứu trước đây, mặc dù carbohydrate tổng hợp trong mẫu cây liên quan trực tiếp đến hiệu quả tái sinh *in vitro* [7]. Do đó, nghiên cứu sâu hơn được thực hiện trong thí nghiệm tiếp theo nhằm đánh giá tác động AgNPs lên sự thay đổi về hàm lượng carbohydrate trong mẫu cây cánh hoa Thu hải đường trong suốt giai đoạn tái sinh *in vitro*.

3.3. Ảnh hưởng của nano bạc (AgNPs) lên sự thay đổi hàm lượng carbohydrate trong mẫu cây cánh hoa cây Thu hải đường

Kết quả phân tích UV-Vis cho thấy rằng, tổng hàm lượng tinh bột tích lũy trong mẫu cây tăng lên rõ rệt ở giai đoạn đầu nuôi cấy ở cả nghiệm thức bổ sung 1,5 mg/l AgNPs và đối chứng (hình 3). Hàm lượng tinh bột đạt mức cao nhất ở ngày nuôi cấy thứ 10 trong nghiệm thức có bổ sung AgNPs (38,42%), trong khi đó, ở nghiệm thức đối chứng không bổ sung AgNPs, hàm lượng tinh bột đạt mức cao nhất (38,28%) ở thời điểm muộn hơn (ngày thứ 15). Các kết quả chỉ ra rằng, AgNPs đẩy nhanh sự tích lũy tinh bột trong mô cây, tương ứng với sự hình thành chồi sơ khởi sớm hơn so với nghiệm thức đối chứng.



Hình 3. Sự thay đổi hàm lượng carbohydrate trong mẫu cây cánh hoa cây Thu hải đường nuôi cấy trên môi trường bổ sung nano bạc (AgNPs) và đối chứng (không bổ sung AgNPs). Dấu * biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa ở mức $p < 0,05$ trong phép thử Duncan.

Trong giai đoạn tiếp theo, tổng lượng tinh bột trong mẫu cây sau 15, 20 và 25 ngày nuôi cấy không có sự khác biệt đáng kể về mặt thống kê được ghi nhận ở nghiệm thức bổ sung AgNPs (34,43, 34,63 và 34,60%, tương ứng). Kết quả tương tự về hàm lượng tinh bột cũng được ghi nhận trên mẫu đối chứng ở ngày thứ 20 và 25 (29,58 và 29,00%, tương ứng).

Phân tích lượng đường khử trong mẫu cây ở nghiệm thức 1,5 mg/l AgNPs cho thấy hàm lượng đường đạt cực đại ở ngày nuôi cấy thứ 15 (147,80 mg/g), tương ứng với giai đoạn suy giảm hàm lượng tinh bột. Trong giai đoạn tiếp theo, hàm lượng có sự suy giảm trong mẫu cây ở ngày nuôi cấy thứ 20 và 25; tuy nhiên, hàm lượng đường vẫn duy trì mức >140 mg/g (hình 3). Kết quả tương tự cũng được ghi nhận đối với nghiệm thức đối chứng, sự gia tăng hàm lượng đường cao nhất được ghi nhận ở ngày nuôi cấy thứ 15 và giảm dần sau đó ở ngày thứ 20 và 25 (hình 3).

So sánh hàm lượng tinh bột giữa hai nghiệm thức cho thấy AgNPs đã kích thích gia tăng sự tích lũy tinh bột trong mẫu cây ở hầu hết các giai đoạn tái sinh *in vitro* cây Thu hải đường (5, 10, 20 và 25 ngày). Trong khi đó, so với đối chứng mẫu cây ở nghiệm thức bổ sung AgNPs có hàm lượng đường thấp hơn ở giai đoạn 5 và 10 ngày nuôi cấy nhưng cao hơn đáng kể ở giai đoạn 15, 20 và 25 ngày nuôi cấy (bảng 2). Kết quả chứng minh rằng, tinh bột được tích lũy trong mô và chuyển hóa thành đường là yếu tố cần thiết cho các giai đoạn tái sinh và phát triển chồi *in vitro*.

Theo A. Bach và cs (2018) [29], đường trong mô thực vật là nguồn nguyên liệu để tổng hợp polysaccharide và cung cấp năng lượng cần thiết cho quá trình phân chia và dẫn dài của tế bào. Trong nuôi cấy *in vitro*, hàm lượng carbohydrate là nguồn năng lượng cần thiết cho quá trình biệt hóa và tăng sinh tế bào trong suốt quá trình phát sinh cơ quan của thực vật [8, 29]. Trong nghiên cứu này, AgNPs trong môi trường nuôi cấy đã thúc đẩy quá trình tích lũy tinh bột và chuyển hóa thành đường trong mẫu cây cánh hoa tạo ra nguồn năng lượng cần thiết cho quá trình tái sinh chồi *in vitro* cây Thu hải đường.

4. Kết luận

Nghiên cứu này chỉ ra rằng, AgNPs được bổ sung vào môi trường nuôi cấy giúp tăng khả năng tái sinh chồi và sinh trưởng của chồi Thu hải đường trong điều kiện nuôi cấy *in vitro*. Mẫu cây cánh hoa Thu hải đường được nuôi cấy trong môi trường MS có bổ sung 0,8 mg/l TDZ và 1,5 mg/l AgNPs cho tỷ lệ tái sinh chồi, số chồi và khối lượng cụm chồi đạt tối ưu. Xét trên khía cạnh sinh hóa, AgNPs có tác dụng trong việc gia tăng tích lũy tinh bột và chuyển thành đường trong mẫu cây để cung cấp nguồn năng lượng cần thiết cho giai đoạn tái sinh chồi và tăng sinh cụm chồi. Các thông tin từ nghiên cứu hiện tại đề xuất ứng dụng AgNPs phục vụ cho công tác vi nhân giống cây Thu hải đường và nhiều đối tượng cây trồng có giá trị kinh tế khác.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được thực hiện từ kinh phí hỗ trợ của Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam theo mã số NCXS01.03/22-24. Các tác giả xin chân thành cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] T. Phutthai, M. Hughes (2016), "A new species and a new record in *Begonia* sect. *Platycentrum* (Begoniaceae) from Thailand", *Garden's Bulletin, Singapore*, **68**(1), pp.99-107.
- [2] H. Tian, B. Lv, T. Ding, et al. (2018), "Auxin-BR interaction regulates plant growth and development", *Frontiers in Plant Science*, **8**, DOI: 10.3389/fpls.2017.02256.
- [3] D.T. Nhut (2011), *Plant Biotechnology: Basic Research and Application Episode 1*, Agricultural Publishing House, Ho Chi Minh City, 532pp (in Vietnamese).
- [4] D.V. Khiem, L.T.N. Lan, D.T. Nhut (2004), "Rapid micropropagation of *Begonia tuberosa* by young leaf tissue culture and acclimatization in greenhouse", *Academia Journal of Biology*, **26**(3), pp.56-63 (in Vietnamese).
- [5] S. Kumaria, M. Kehie, S.S.D. Bhowmik, et al. (2012), "In vitro regeneration of *B. rubrovenia* var. *meisneri*. C.B. Clarke - A rare and endemic ornamental plant of Meghalaya, India", *Indian Journal of Biotechnology*, **11**(3), pp.300-303.
- [6] H.T. Tung, H.T. Van, H.G. Bao, et al. (2021a) "Silver nanoparticles enhanced efficiency of explant surface disinfection and somatic embryogenesis in *Begonia tuberosa* via thin cell layer culture", *Vietnam Journal of Biotechnology*, **19**(2), pp.337-347.
- [7] H.D. Khai, N.Q. Vinh, D.M. Dung, et al. (2021), "Alterations in endogenous hormone levels and energy metabolism promoted the induction, differentiation and maturation of *Begonia* somatic embryos under clinorotation", *Plant Science*, **312**, DOI: 10.1016/j.plantsci.2021.111045.
- [8] B.S. Mangat, M.K. Pelekis, A.C. Cassells (1990), "Changes in the starch content during organogenesis in *in vitro* cultured *Begonia rex* stem explants", *Physiologia Plantarum*, **79**(2), pp.267-274.
- [9] D.T. Nhut, N.T. Hai, M.X. Phan, et al. (2005), "Shaking culture systems and bioreactor in micropropagation of *Begonia tuberosa*", *Vietnam Journal of Biotechnology*, **3**(3), pp.363-372.
- [10] L.T. Bien, N.B. Nam, N.T. Tai, et al. (2013), "Effect of light-emitting diodes and explant types on shoot induction and regeneration from transverse thin cell layer of *Begonia* spp", *Vietnam National Biotechnology Conference*, pp.701-705 (in Vietnamese).
- [11] Y.Y. Mendi, P. Curuk, E. Kocaman, et al. (2009), "Regeneration of begonia plantlets by direct organogenesis", *African Journal of Biotechnology*, **8**(9), pp.1860-1863.
- [12] A. Awal, A.B.A. Ahmed, R.M. Taha, et al. (2013), "Effect of adenine, sucrose and plant growth regulators on the indirect organogenesis and on *in vitro* flowering in *Begonia × hiemalis* Fotsch" *Australian Journal of Crop Science*, **7**(5), pp.691-698.
- [13] F.M. Velasco, H.G. Rosas, A.M.C. González, et al. (2018), "In vitro cultivation of petals of four varieties of *Begonia elatior*", *Revista Mexicana De Ciencias Agrícolas*, **9**(6), pp.1207-1216, DOI: 10.29312/remexca.v9i6.1585.
- [14] 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 (in Vietnamese).
- [15] T. Hieu, H.T. Tung, C.D. Nguyen (2018), "Establishing aseptic explant source for *Passiflora edulis* Sims. and *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*", *Hue University Journal of Science: Natural Science*, **127**(1C), pp.71-84 (in Vietnamese).
- [16] D.M. Cuong, H.T. Tung, H.D. Khai, et al. (2020), "Increasing the somatic embryogenesis frequency of *Panax vietnamensis* Ha et Grushv. by disinfection of leaf explant using nano silver and the addition of nano silver in culture medium", *Vietnam Journal of Biotechnology*, **18**(3), pp.517-527 (in Vietnamese).
- [17] 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 Applied Sciences*, **2**, DOI: 10.1007/s42452-020-03948-9.
- [18] 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.
- [19] H.T.M. Ngan, T.D.H. Trinh D.M. Cuong, et al. (2019), "Limitation of hyperdricity and enhanced survival rate of *Gerbera jamesonii* plantlets cultured in vitro on medium supplemented with silver nanoparticles", *Vietnam Journal of Biotechnology*, **17**(1), pp.115-124.
- [20] B.T.T. Phuong, N.P. Lan, D.T.K. Trang, et al. (2020), "Effect of nanosilver on the *in vitro* propagation of *Asarum glabrum* Merr.", *Vietnam Journal of Science and Technology - MOST*, **62**(6), pp.19-23 (in Vietnamese).
- [21] D.H. Gioi, B.T.T. Huong (2019), "Study on use of silver nanoparticles in *Phalaenopsis* orchid (*Phalaenopsis* sp.) tissue culture", *Vietnam National University of Forestry*, **1**, pp.19-24 (in Vietnamese).
- [22] 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.
- [23] 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 Tiss Organ Culture*, **146**, pp.577-588.
- [24] H.N. Chau, L.A. Bang, N.Q. Buu, et al. (2008), "Some results in manufacturing of nanosilver and investigation of its application for disinfection", *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, **9**(2), pp.241-248.
- [25] B. Fernandes, G. Dragone, A.P. Abreu, et al. (2012) "Starch determination in *Chlorella vulgaris* - A comparison between acid and enzymatic methods", *Journal of Applied Phycology*, **24**, pp.1203-1208.
- [26] T. Krivorotova, J. Sereikaite (2014), "Determination of fructan exohydrolase activity in the crude extracts of plants", *Electronic Journal Biotechnology*, **17**, pp.329-333.
- [27] D.B. Duncan (1955), "Multiple range and multiple F tests", *Biometrics*, **11**(1), pp.1-42.
- [28] B.T.T. Huong, T.D. Xuan, K.H. Trung, et al. (2021), "Influences of silver nanoparticles *in vitro* morphogenesis of specialty king banana (*Musa* spp.) in Vietnam", *Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology*, **22**(33-34), pp.163-175.
- [29] A. Bach, A. Kapczyńska, K. Dziurka, et al. (2018), "The importance of applied light quality on the process of shoot organogenesis and production of phenolics and carbohydrates in *Lachenalia* sp. cultures *in vitro*", *South African Journal of Botany*, **114**, pp.14-19.