Ảnh hưởng của các hạt nano cobalt, đồng và molybden trioxide lên giai đoạn ra rễ *in vitro* của cây Dâu tây (*Fragaria* × *ananassa* Duch.)

Đỗ Mạnh Cường[1], Hồ Cẩm Khánh Hoà[1], Phan Lê Hà Nguyễn[1, 2], Nguyễn Thị Thanh Thúy[1], Nguyễn Thị Như Mai[1], Hoàng Thanh Tùng[3], Hoàng Đắc Khải[1], Vũ Quốc Luận[1], Hoàng Thị Như Phương[3], Nguyễn Hoài Châu[4], Ngô Quốc Bưu[4], Dương Tấn Nhựt[1*]

[1]Viện Khoa học Sự sống, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, 9/621 Võ Nguyên Giáp, phường Linh Xuân, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam
[2]Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, 18 Hoàng Quốc Việt, phường Nghĩa Đô, Hà Nội, Việt Nam
[3]Trường Đại học Đà Lạt, 1 Phù Đổng Thiên Vương, phường Lâm Viên, tỉnh Lâm Đồng, Việt Nam
[4]Viện Công Nghệ Môi trường, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, 18 Hoàng Quốc Việt, phường Nghĩa Đô, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 21/5/2024; ngày chuyển phản biện 28/5/2024; ngày nhận phản biện 5/6/2024; ngày chấp nhận đăng 10/6/2024

Tóm tắt:

Nghiên cứu này đã chứng minh được tác động tích cực của CoNPs, CuNPs và MoO_3NPs lên khả năng ra rễ *in vitro* của cây Dâu tây (*Fragaria* × *ananassa* Duch.). Kết quả cho thấy, cây Dâu tây được nuôi cấy trên môi trường Murashige và Skoog (MS) thay thế muối $CoCl_2.6H_2O$ bằng 6,2 µl/l CoNPs (tỷ lệ 1:1) sau 30 ngày nuôi cấy cho chiều cao cây, số lá, số rễ, chiều dài rễ, trọng lượng tươi, trọng lượng khô và SPAD cao nhất (tương ứng là: 4,80 cm, 13 lá/cây, 15,67 rễ/cây, 1,97 cm, 248,33 mg, 25,56 mg, 48,70) so với môi trường MS cơ bản (không có CoNPs) và các nghiệm thức còn lại. Ngoài ra, môi trường MS thay thế muối $CuSO_4.5H_2O$ bằng 6,4 µl/l CuNPs (tỷ lệ 1:1) là tối ưu nhất về số lá (15 lá/cây), số rễ (16,67 rễ/cây), chiều dài rễ (2,5 cm), trọng lượng tươi (224,60 mg), trọng lượng khô (22,86 mg) so với các nghiệm thức còn lại sau 30 ngày nuôi cấy. Những phát hiện từ nghiên cứu này về việc thay thế các muối vô cơ ($CoCl_2.6H_2O$, $CuSO_4.5H_2O$ và $Na_2MoO_4.2H_2O$) trong môi trường MS bằng CoNPs, CuNPs và MoO_3NPs giúp mở ra các hướng nghiên cứu mới và cải thiện quá trình vi nhân giống của cây Dâu tây.

Từ khóa: **cây Dâu tây, nano cobalt, nano đồng, nano molybden trioxide, ra rễ.**

Chỉ số phân loại: **4.1, 4.6**

Effect of cobalt, copper and molybdenum trioxide nanoparticles on *in vitro* rooting stage efficiency of strawberry (*Fragaria* × *ananassa* Duch.)

Manh Cuong Do[1], Cam Khanh Hoa Ho[1], Le Ha Nguyen Phan[1, 2], Thi Thanh Thuy Nguyen[1], Thi Nhu Mai Nguyen[1], Thanh Tung Hoang[3], Dac Khai Hoang[1], Quoc Luan Vu[1], Thi Nhu Phuong Hoang[3], Hoai Chau Nguyen[4], Quoc Buu Ngo[4], Tan Nhut Duong[1*]

[1]Institute of Life Sciences, Vietnam Academy of Science and Technology, 9/621 Vo Nguyen Giap Street, Linh Xuan Ward, Ho Chi Minh City, Vietnam
[2]Graduate University of Science and Technology, Vietnam Academy of Science and Technology, 18 Hoang Quoc Viet Street, Nghia Do Ward, Hanoi, Vietnam
[3]Da Lat University, 1 Phu Dong Thien Vuong Street, Lam Vien Ward, Lam Dong Province, Vietnam
[4]Institute of Environmental Technology, Vietnam Academy of Science and Technology, 18 Hoang Quoc Viet Street, Nghia Do Ward, Hanoi, Vietnam

Received 21 May 2024; revised 5 June 2024; accepted 10 June 2024

Abstract:

This study has demonstrated the positive effects of CoNPs, CuNPs and MoO_3NPs on the *in vitro* rooting ability of strawberry (*Fragaria* × *ananassa* Duch.). The results indicated that strawberry plants cultured on Murashige and Skoog (MS) medium, in which $COCl_2.6H_2O$ was replaced with 6.2 µl/l CoNPs (1:1 ratio), resulted in the best growth indicators of plant height, number of leaves, number of roots, root length, fresh weight, dry weight and soil plant analysis development (SPAD) after 30 days of culture (4.80 cm; 13 leaves/plantlet; 15.67 roots/plantlet; 1.97 cm; 248.33 mg; 25.56 mg; 48.70; respectively), which were higher than those observed in plants cultured on the basal MS medium (without CoNPs) and the other treatments. In addition, MS medium supplemented with 6.4 µl/l CuNPs replacing $CuSO_4.5H_2O$ salt (ratio 1:1) gave optimal results in terms of number of leaves (15 leaves/plantlet), number of roots (16.67 roots/plantlet), root length (2.5 cm), fresh weight (224.60 mg), dry weight (22.86 mg) compared to the remaining treatments after 30 days of culture. These findings are promising and open up exciting possibilities for further research and advancements in Strawberry micropropagation.

Keywords: **cobalt nanoparticles, copper nanoparticles, *Fragaria* × *ananassa* Duch., molybdenum trioxide, rooting stage.**

Classification numbers: **4.1, 4.6**

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

1. Đặt vấn đề

Cây Dâu tây (*Fragaria x ananassa* Duch.) thuộc họ Hoa hồng (Rosaceae), là một trong những loại cây ăn quả phổ biến và được trồng rộng rãi trên toàn cầu. Nó được biết đến với hương vị thơm ngon và ngọt ngào, màu đỏ rực rỡ và mùi thơm. Chính vì tầm quan trọng về kinh tế nên nhu cầu cây Dâu tây chất lượng cao trong ngành nông nghiệp ngày càng tăng, tuy nhiên, các phương pháp nhân giống Dâu tây thông thường như chia nhánh và ươm hạt bị hạn chế do tỷ lệ nhân giống chậm và dễ nhiễm bệnh. Bên cạnh đó, sự phụ thuộc vào mùa vụ và điều kiện sinh trưởng cũng là một số yếu tố hạn chế khác trong quá trình nhân giống [1].

Ngày nay, vi nhân giống đã trở thành một kỹ thuật quan trọng trong nhân giống thương mại nhiều loài thực vật vì những ưu điểm như: tạo ra một số lượng lớn các cây đồng nhất trong thời gian ngắn, đặc biệt đây là một trong những kỹ thuật có thể tạo ra cây con sạch virus thông qua nuôi cấy mô phân sinh [2-4]. Tuy nhiên, trong quá trình vi nhân giống, vẫn ghi nhận một số hiện tượng bất thường ở thực vật như hoại tử đầu chồi, lá bị vàng và rụng, khí khổng bị rối loạn chức năng, làm giảm chất lượng chồi, cây con và tỷ lệ sống trong điều kiện vườn ươm [5]. Một trong những vấn đề thường gặp trong nhân giống *in vitro* cây Dâu tây là hiện tượng thủy tinh thể, cây sinh trưởng và phát triển chậm dẫn đến làm giảm tỷ lệ sống sót của cây con khi chuyển ra điều kiện vườn ươm do chất lượng cây con giảm [6].

Môi trường Murashige và Skoog (MS) là một trong những môi trường nuôi cấy nổi tiếng và được sử dụng rộng rãi nhất trong nuôi cấy mô tế bào thực vật. Cobalt (Co), đồng (Cu) và molybden (Mo) là những vi lượng thiết yếu, đóng vai trò quan trọng trong quá trình sinh trưởng, phát triển và trao đổi chất của thực vật [7, 8]. Trong quá trình vi nhân giống thực vật, các nguyên tố này thường được thêm vào môi trường nuôi cấy để tăng cường khả năng hấp thụ chất dinh dưỡng của thực vật và hỗ trợ các quá trình sinh lý khác nhau, bao gồm hạt nảy mầm, tái sinh chồi và sự phát triển của mẫu cấy. Sự hiện diện của chúng trong môi trường nuôi cấy có thể làm tăng hàm lượng chất dinh dưỡng và ảnh hưởng đến các chỉ số sinh hóa khác nhau trong quá trình sinh trưởng và phát triển của cây trồng. Giống như nhiều chất dinh dưỡng thiết yếu khác, Co, Cu, Mo thường được cung cấp ở dạng muối vô cơ trong môi trường nuôi cấy mô thực vật. Mặc dù các muối vô cơ này có thể cung cấp các chất dinh dưỡng vi lượng cần thiết cho sự phát triển của thực vật, nhưng việc hấp thụ và sử dụng chúng của thực vật trong điều kiện nuôi cấy *in vitro* đôi khi có thể gặp khó khăn do chúng thường tồn tại ở dạng muối vô cơ với kích thước hạt lớn [9].

Để khắc phục vấn đề này, nhiều nghiên cứu đã ứng dụng công nghệ nano trong vi nhân giống cây trồng nhằm cải thiện môi trường nuôi cấy cũng như tăng khả năng sinh trưởng và phát triển chất lượng cây con. Công nghệ nano là một lĩnh vực khoa học, kỹ thuật và công nghệ đa ngành liên quan đến vật liệu, cấu trúc và thiết bị ở cấp độ nano. Các nghiên cứu gần đây đã chỉ ra rằng, các hạt nano cobalt và đồng (CoNPs, CuNPs) có thể là nguồn vi chất dinh dưỡng tiềm năng để thay thế muối vô cơ trong môi trường nuôi cấy [10-12]. Việc thay thế $CoCl_2.6H_2O$ bằng CoNPs trong môi trường MS đã cho thấy những kết quả tích cực trong việc cải thiện khả năng ra rễ, cũng như khắc phục các hiện tượng bất thường trong quá trình nhân giống *in vitro* cây hoa đồng tiền [13]. Tuy nhiên, nghiên cứu về việc thay thế các muối vô cơ bằng CuNPs và molybdenum trioxide (MoO_3NPs) trong môi trường nuôi cấy còn hạn chế. Đặc biệt, việc thay thế 3 loại nano (CuNPs, CoNPs và MoO_3NPs) trong môi trường ra rễ *in vitro* ở cây Dâu tây vẫn chưa được thực hiện. Chính vì vậy trong nghiên cứu này, tác động đơn lẻ của 3 loại nano kim loại (CoNPs, CuNPs, MoO_3NPs) trong việc thay thế 3 loại muối vô cơ ($CoCl_2.6H_2O$, $CuSO_4.5H_2O$, MoO_3NPs) trong môi trường tạo rễ *in vitro* lên khả năng ra rễ, sinh trưởng và phát triển của cây Dâu tây đã được thực hiện.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Chồi cây Dâu tây *in vitro* một tháng tuổi (*Fragaria × ananassa* Duch.) có chiều cao 3 cm và chất lượng tốt tại Phòng Sinh học Phân tử và Chọn tạo giống cây trồng, Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên được sử dụng làm vật liệu ban đầu.

2.2. Dung dịch nano kim loại

Nano CoNPs, CuNPs và MoO_3NPs (500 ppm) với kích thước trung bình 20-60 nm được cung cấp bởi Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

2.3. Môi trường nuôi cấy

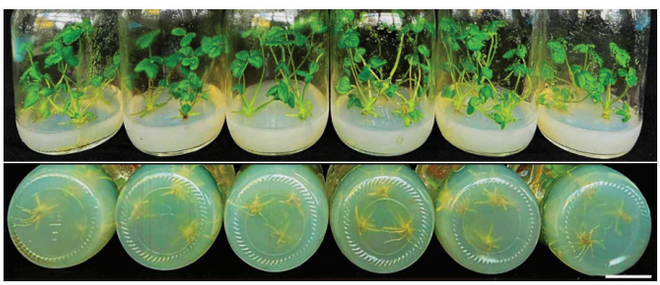
Môi trường nuôi cấy với nguyên liệu ban đầu là môi trường MS [14] (Sigma-Aldrich, Mỹ) có bổ sung 30 g/l sucrose (Đồng Nai), 8 g/l agar (Việt Xô, Công ty Phan Trần, TP Hồ Chí Minh).

MS1: Môi trường ra rễ (môi trường MS cải biên - CoNPs) là môi trường MS đã loại bỏ $CoCl_2.6H_2O$ và bổ sung CoNPs ở các nồng độ khác nhau (1,55; 3,10; 6,20; 9,30; 12,4 µl/l, tương ứng với 1/4, 1/2, 1, 3/2 và 2 lần nồng độ $CoCl_2.6H_2O$ có trong môi trường MS cơ bản) và 0,2 mg/l NAA (1-Naphthaleneacetic acid; Sigma-Aldrich, Mỹ).

%§QJ ¦QK KmãQJ FëD FiF QJKLÊP WKD\ ĐR ÁQK VÁQJ WUX QJKLÊP WUR QJ QJKLÊP WUR QJ QJKLÊP WUR QJ QJKLÊP WUR QJ QJKLÊP WUR QJ QJKLÊP WUR QJ QJKLÊP WUR QJ
1D0R2 +2 ÿÃQ Võ VLQK vitro mÃ QJUD UÉ FëD Fk\ 'kX Wk\
VDX QJj\ QX{L F©\

MoO_3NPs (µl/l)	Chiều cao cây (cm)	Số lá	Số rễ	Chiều dài rễ (cm)	SPAD	Trọng lượng tươi (mg)	Trọng lượng khô (mg)
ĐC*	4,63±0,36^{e**}	10,00±1,00^{e}	10,66±1,15^{f}	1,49±0,16^{f}	41,57±0,97^{d}	210,66±5,36^{e}	21,67±1,19^{e}
37,25	5,73±0,09^{c}	15,00±1,73^{d}	13,67±1,76^{d}	1,92±0,05^{d}	40,83±0,50^{d}	383,33±6,96^{c}	40,26±0,69^{c}
74,50	6,16±0,15^{ab}	20,67±1,45^{a}	18,67±1,20^{b}	2,75±0,29^{b}	43,56±0,48^{b}	433,67±4,09^{b}	45,53±1,04^{ab}
149,00	6,36±0,09^{a}	21,33±2,03^{a}	20,33±1,03^{a}	3,01±0,03^{a}	45,23±1,09^{a}	452,33±5,12^{a}	47,49±1,26^{a}
223,50	6,03±0,09^{b}	18,33±1,18^{c}	16,00±1,00^{c}	2,51±0,23^{c}	42,23±1,25^{c}	421,00±5,81^{b}	44,11±1,12^{b}
298,00	5,46±0,12^{d}	14,33±1,00^{d}	11,33±0,88^{e}	1,77±0,03^{e}	39,23±0,88e	360,67±4,48^{d}	37,87±1,08^{d}

ÕL FKíQJ 0{L WUmáQJ 06 NK{QJ Fy QDQR PRO\EGHQ WULR[LGH WUXQJ
EuQK “6(VDL VÕ FKX-Q Yj FiF FKó FiL NKiF QKDX ĐR ÁE«QJ WURQJ F•QJ
PÝW FÝW WKÇ KLËQ Võ NKiF ELËW Fy ê QJK-D WKÒQJ NI YßL S WKñ
QJKLËP 'XQFDQ Q



+uQK ¦QK KmãQJ FëD FiF QJKLÊP WKD\ ĐR ÁQK VÁQJ WUX QJKLÊP WUR QJ QJKLÊP WUR QJ QJKLÊP WUR QJ QJKLÊP WUR QJ QJKLÊP WUR QJ QJKLÊP WUR QJ QJKLÊP WUR QJ
1D0R2 +2 ÿÃQ Võ VLQK vitro mÃ QJUD UÉ FëD Fk\ 'kX Wk\
VDX QJj\ QX{L F©\
WUiL VDQJ SK§L %DU FP ÕL FKíQJ 0{L WUmáQJ 06 NK{QJ Fy QDQR
PRO\EGHQ WULR[LGH

Tỷ lệ ra rễ đạt 100% ở tất cả các nghiệm thức có/không có MoO_3NPs. Kết quả cho thấy, ở tất cả các nghiệm thức có MoO_3NPs, các chỉ tiêu sinh trưởng của cây Dâu tây đều tốt hơn so với nghiệm thức đối chứng (bảng 3). Tương ứng với sinh trưởng *in vitro*, các cây con nuôi cấy trên môi trường bổ sung 149 µl/l MoO_3NPs có sinh trưởng và phát triển tốt hơn so với các nghiệm thức còn lại (bảng 3, hình 3). Chiều cao cây cao nhất (6,36 cm) được ghi nhận ở nồng độ 149 µl/l MoO_3NPs. Ngoài ra, trong nghiên cứu này cũng ghi nhận rằng cây con *in vitro* được nuôi cấy trên môi trường chứa 149 µl/l MoO_3NPs cho số lượng rễ tối đa (20,33 rễ/cây con) với chiều dài rễ (3,01 cm) cao nhất so với đối chứng sau 30 ngày nuôi cấy. Hơn nữa, những cây con này cho thấy sự phát triển tốt, lá màu xanh đậm, nhiều rễ và kích thước đồng đều (hình 3). Tuy nhiên, khi tăng nồng độ MoO_3NPs lên 298 µl/l thì chiều cao cây (5,46 cm), số lượng rễ (11,33 rễ/cây con) và chiều dài rễ (1,77 cm) giảm mạnh (bảng 3). Ngoài ra, hình thái bất thường của lá đã được quan sát thấy ở các nghiệm thức 37,25 và 74,5 µl/l MoO_3NPs. Hiện tượng này lần đầu tiên được mô tả bởi D.I. Arnon và cs (1939) [17], cây thiếu Mo phát triển một kiểu hình đặc trưng bao gồm các tổn thương và thay đổi hình thái của lá (được gọi là ‘đuôi roi’) và sau đó được phân tích chi tiết bởi nhóm của R.J. Fido và cs (1977) [18].

Tất cả những kết quả này chỉ ra rằng, các MoO_3NPs có thể kích thích hoặc ức chế sự phát triển của cây con tùy thuộc vào các nồng độ khác nhau được sử dụng. Kết quả cho thấy, môi trường MS bổ sung 149 µl/l NP MoO_3NPs thay thế $Na_2MoO_4.2H_2O$ là tối ưu cho sự sinh trưởng và ra rễ *in vitro* của cây Dâu tây.

4. Kết luận

Môi trường MS bổ sung 6,2 µl/l CoNPs thay thế $CoCl_2.6H_2O$ là môi trường tối ưu cho sự phát triển và ra rễ *in vitro* của cây Dâu tây.

Môi trường MS bổ sung 6,4 µl/l CuNPs thay thế $CuSO_4.5H_2O$ là môi trường tối ưu cho sự sinh trưởng và ra rễ *in vitro* của cây Dâu tây.

Môi trường MS bổ sung 149 µl/l MoO_3NPs thay thế $Na_2MoO_4.2H_2O$ là môi trường tối ưu cho sự phát triển và ra rễ *in vitro* của cây Dâu tây.

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. Các tác giả xin chân thành cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] D.I. Arnon, P.R. Stout (1939) “The essentiality of certain elements in minute quantity for plants with special reference to copper”, *Plant Physiology,* **14(2)**, pp.371-375, DOI: 10.1104/pp.14.2.371.

[2] I. Iliev, A. Gajdosova, G. Libiakova, et al. (2010), *Plant Micropropagation. Plant Cell Culture: Essential Methods*, UK: John Wiley and Sons, Publications International Ltd, pp.1-23.

[3] J.I. Mir, N. Ahmed, R. Rashid, et al. (2010) “Micropropagation of strawberry (*Fragaria × ananassa*)”, *Crop Improvement,* **37(2)**, pp.153-156.

[4] A.A. Mozafari, M. Gerdakaneh (2012), "Influence of media and growth regulators on regeneration and morphological characteristics of strawberry cvs Kurdistan and Merck (*Fragaria × ananassa* Duch.)", *International Journal of Plant Physiology and Biochemistry*, **4(5)**, pp.99-104, DOI: 10.5897/IJPPB11.008.

[5] M.N.T. Ha, T.T. Hoang, V.L. Bui, et al. (2020), "Some unusual phenomena in plant micropropagation and solutions to overcome them", *Journal of Biotechnology*, **18(2)**, pp.23-39.

[6] S. Palei, G.R. Rout, A.K. Das, et al. (2017), "Callus induction and indirect regeneration of Strawberry (*Fragaria × ananassa*) Duch. cv. Chandler", *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, **6(11)**, pp.1311-1318, DOI: 10.20546/ijcmas.2017.611.157.

[7] D.H. Kim, J. Gopal, I. Sivanesan (2017), "Nanomaterials in plant tissue culture: The disclosed and undisclosed", *The Royal Society of Chemistry*, **7**, pp.36492-36505, DOI: 10.1039/C7RA07025J.

[8] T.E.T. Sereda, K.V. Liapina, E.A. Shkopinskij, et al. (2016), "The Influence of Cu и Co nanoparticles on growth characteristics and biochemical structure of *Mentha longifolia in vitro*", *Nanophysics, Nanophotonics, Surface Studies, and Applications: Selected Proceedings of The 3rd International Conference Nanotechnology and Nanomaterials*, pp.427-436, DOI: 10.1007/978-3-319-30737-4_36.

[9] N.T.M. Ha, C.M. Do, T.T. Hoang, et al. (2020), "The effect of cobalt and silver nanoparticles on overcoming leaf abscission and enhanced growth of rose (*Rosa hybrida* L. "Baby Love") plantlets cultured *in vitro*", *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **141**, pp.393-405, DOI: 10.1007/s11240-020-01796-4.

[10] A.S. Fouad, R.M. Hafez (2018), "Effect of cobalt nanoparticles and cobalt ions on alkaloids production and expression of *CrMPK3* gene in *Catharanthus roseus* suspension cultures", *Cellular and Molecular Biology*, **64(12)**, pp.62-69, DOI: 10.14715/cmb/2018.64.12.13.

[11] E.A. Shkopinskij, T.E. Talankova-Sereda, K.V. Liapina (2018), "Effect of Cu and Co nanoparticles-based complex on stratification of grape grafts", *International Journal of Biosensors and Bioelectronics*, **4(2)**, pp.45-47, DOI: 10.15406/ijbsbe.2018.04.00094.

[12] S.A. Osman, D.M. Salama, M.E. A.E. Aziz, et al. (2020), "The influence of MoO_3-NPs on agro-morphological criteria, genomic stability of DNA, biochemical assay, and production of common dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.)", *Plant Physiology and Biochemistry*, **15**, pp.77-87, DOI: 10.1016/j.plaphy.2020.03.009.

[13] H.T. Tung, P.L.H. Nguyen, T.V. Lich, et al. (2022), "Enhanced shoot and plantlet quality of Gerbera (*Gerbera jamesonii* Revolution Yellow) cultivar on medium containing silver and cobalt nanoparticles", *Scientia Horticulturae*, **306**, DOI: 10.1016/j.scienta.2022.111445.

[14] T. Murashige, F. Skoog (1962), "A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures", *Physiologia Plantarum*, **15(3)**, pp.473-497, DOI: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.

[15] D.B. Duncan (1955), "Multiple range and multiple F tests", *Biometrics*, **11(1)**, pp.1-42, DOI: 10.2307/3001478.

[16] F. Perreault, M. Samadani, D. Dewez (2013), "Effect of soluble copper released from copper oxide nanoparticles solubilisation on growth and photosynthetic processes of *Lemna gibba* L.", *Nanotoxicology,* **8(4)**, pp.374-382, DOI: 10.3109/17435390.2013.789936.

[17] D.I. Arnon, P.R. Stout (1939), "The essentiality of certain elements in minute quantity for plants with special reference to copper", *Plant Physiology*, **14(2)**, DOI: 10.1104/pp.14.2.371.

[18] R.J. Fido, C.S. Gundry, E.J. Hewitt, et al. (1977), "Ultrastructural features of molybdenum deficiency and whiptail of cauliflower leaves: Effects of nitrogen source and tungsten substitution for molybdenum", *Functional Plant Biology*, **4(4)**, pp.675-689, DOI: 10.1071/PP9770675.