

NGHIÊN CỨU SỰ SINH TRƯỞNG VÀ PHÁT TRIỂN CỦA CÂY CÚC (*Chrysanthemum* sp.) *IN VITRO* TRÊN MÔI TRƯỜNG CÓ SỬ DỤNG NANO SẮT

Dương Tấn Nhựt¹, Nguyễn Việt Cường¹, Hoàng Thanh Tùng¹, Nguyễn Thị Thanh Hiền¹,
Đỗ Mạnh Cường¹, Vũ Thị Hiền¹, Nguyễn Bá Nam¹, Nguyễn Phúc Huy¹, Vũ Quốc Luận¹,
Nguyễn Hoài Châu², Ngô Quốc Bưu²

¹*Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam*

²*Viện Công nghệ Môi trường, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam*

Email¹: duongtannhut@gmail.com

Ngày gửi bài: 25.07.2014

Ngày chấp nhận: 09.10.2015

TÓM TẮT

Các tính chất mới của nano kim loại, trong đó có nano sắt đã biến chúng trở thành một nguồn vật liệu mới được ứng dụng trong nhiều ngành công nghiệp, nông nghiệp, y tế... Tuy nhiên, ảnh hưởng của nano sắt đến các loài thực vật đặc biệt là trong nuôi cấy mô thực vật hầu như chưa được nghiên cứu. Vì vậy, nghiên cứu này được tiến hành nhằm xác định ảnh hưởng của nano sắt riêng lẻ ở các nồng độ từ 0 - 35 mg/l hoặc kết hợp với Fe-EDTA đến sự sinh trưởng và phát triển của cây cúc (*Chrysanthemum* sp.) *in vitro*. Chồi cúc *in vitro* cao khoảng 2cm với 2 cặp lá và các đoạn thân cây cúc với 2 đốt/đoạn là nguồn vật liệu trong thí nghiệm này. Sau 30 ngày nuôi cấy kết quả cho thấy, tất cả chồi từ các đoạn thân cây cúc trên môi trường sử dụng nano sắt riêng lẻ (thay thế cho Fe-EDTA) với nồng độ từ 0 - 15 mg/l có hiện tượng vàng lá với hàm lượng chlorophyll trong lá thấp hơn đáng kể (từ 8,433 - 24,667 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) so với chồi cúc trên môi trường MS bình thường (39,567 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). Trong khi đó, việc kết hợp nano sắt với Fe-EDTA cho thấy kết quả tốt hơn, các chồi sinh trưởng tốt và không bị vàng lá. Sau 1 tháng nuôi cấy, các chỉ tiêu thu được từ các chồi trên môi trường bổ sung 15 mg/l nano sắt là cao nhất. Mặt khác, sự thay thế Fe-EDTA bằng nano sắt trong môi trường nuôi cấy có ảnh hưởng đến hình thái rễ của cây cúc *in vitro*, nhưng không giúp cây sinh trưởng tốt hơn so với môi trường ra rễ cúc bình thường. Rễ cúc trong các môi trường này nhỏ và ít lông hút hơn so với rễ của cây cúc trên môi trường kết hợp nano sắt với Fe-EDTA. Nồng độ 10 mg/l nano sắt và 35 mg/l Fe-EDTA là sự kết hợp giúp cây cúc sinh trưởng tốt nhất.

Từ khóa: Chlorophyll, *Chrysanthemum* sp., Fe-EDTA, nano sắt, sinh trưởng và phát triển.

In vitro Growth and Development of *Chrysanthemum* sp. on the Iron Nano Supplemented Media

ABSTRACT

The novel properties of nano metals including iron nano have made them a source of new materials which are applied in a various fields in industry, agriculture and medicine. However, the effects of iron nano on plant tissue culture have hardly been investigated. This study was conducted to determine the effects of individual iron nano with concentrations from 0 - 35 mg/l or in combination with Fe-EDTA on the growth and development of *Chrysanthemum* sp. cultured *in vitro*. *In vitro* *Chrysanthemum* shoots (2 cm high, 2 pairs of leaves) and *Chrysanthemum* stem segments (2 node/segment) were used as the source materials for this experiment. After 30 days of culture, all shoots from stem segments on iron nano media (0 - 15 mg/l) appeared interveinal chlorosis with chlorophyll content of leaves significantly lower (from 8.433 to 24.667 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) in comparison to shoot-inducing MS media shoots (39.567 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). The combination of iron nano and Fe-EDTA, in contrast, showed better results. Shoots developed well without interveinal chlorosis. After 1 month of culture, all parameters of shoots on media supplemented with 15 mg/l iron nano were highest. On the other hand, the replacement of Fe-EDTA with iron nano affected the root morphology but did not promote the growth of *Chrysanthemum* (in comparison to the control). Roots in these medium were small and had less root hair than the roots of *Chrysanthemum* plantlets on iron nano combined with Fe-EDTA media. 10 mg/l iron nano and 35 mg/l Fe-EDTA appeared as the best combination for the growth of *Chrysanthemum* plantlets.

Keywords: *Chrysanthemum* sp., Fe-EDTA, growth and development, iron nano, chlorophyll.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Sắt là một nguyên tố cần thiết cho hệ thống các enzyme để thực hiện phản ứng oxy hóa khử và chuỗi vận chuyển điện tử trong cây, tổng hợp chất diệp lục, duy trì cấu trúc của lục lạp. Sắt cũng có vai trò điều hòa hô hấp, quang hợp, khử nitrat và sulfat - những phản ứng cần thiết để thực vật phát triển và sinh sản (Eskandari, 2011). Hiện nay, trong nuôi cấy mô tế bào thực vật, sắt chủ yếu được sử dụng dưới dạng chelate (Fe-EDTA) cho phép giải phóng từ từ và liên tục ion sắt vào môi trường nuôi cấy và hạn chế sự kết tủa của sắt thành dạng oxide (Slater et al., 2008).

Gần đây, trong lĩnh vực công nghệ nano, sắt kim loại kích thước nano được quan tâm nghiên cứu nhiều, vì nó có ứng dụng rất đa dạng trong sản xuất và đời sống. Nano sắt được dùng nhiều trong công nghệ thông tin và truyền thông làm vật liệu chế tạo linh kiện điện tử và cảm biến. Ngày càng có nhiều thông tin về ứng dụng các sensor trên cơ sở nano sắt trong y học. Gần đây nano sắt và nano sắt phủ kim loại được ứng dụng rộng rãi và rất hiệu quả để xử lý nước và các chất độc hại (Zhang, 2003). Một số nghiên cứu đã được tiến hành như nghiên cứu của Zhu et al. (2008) về sự hấp thu, vận chuyển và tích lũy của nano Fe_3O_4 trên cây bí ngô; nghiên cứu về độc tính của nano sắt/sắt oxide và đồng/dồng oxide trên cây rau diếp (Trujillo-Reyes et al., 2014) hay nghiên cứu của Racuciu and Creagna (2006) về ảnh hưởng nano sắt từ phủ tetramethylammonium hydroxide lên sự phát triển ở cây ngô. Tuy nhiên, ảnh hưởng của nano sắt đến các loài thực vật đặc biệt là trong nuôi cấy mô thực vật vẫn còn rất hạn chế.

Với thời gian sinh trưởng ngắn, tốc độ sinh trưởng nhanh và dễ nuôi cấy, cúc đã trở thành một loài cây điển hình cho các nghiên cứu khoa học trong lĩnh vực nuôi cấy mô ở Việt Nam và trên thế giới. Bên cạnh đó, cúc cũng là một loài cây có giá trị kinh tế cao trong ngành trồng hoa. Vì vậy, nghiên cứu này được thực hiện nhằm đánh giá ảnh hưởng của nano sắt lên sự sinh trưởng và phát triển của cây cúc *in vitro*, góp phần cải thiện chất lượng cây giống hoa cúc, đáp ứng nhu cầu thị trường.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Nguồn mẫu và nguyên liệu

Nguồn mẫu được sử dụng cho thí nghiệm là các chồi và đoạn thân cây cúc *in vitro* hiện có tại phòng Sinh học phân tử và Chọn tạo giống cây trồng (Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên).

Nano sắt do Viện Công nghệ môi trường cung cấp có kích thước trung bình từ 40 - 80nm.

2.2. Môi trường và điều kiện nuôi cấy

Môi trường nuôi cấy là môi trường MS (Muraghige and Skoog, 1962) và MS cải biến loại bỏ Fe-EDTA có bổ sung 30,0 g/l sucrose; 8,0 g/l agar; các chất điều hòa sinh trưởng và nano sắt với các nồng độ khác nhau tùy theo từng thí nghiệm. Tất cả các môi trường nuôi cấy này được điều chỉnh về pH = 5,8; sau đó toàn bộ môi trường được hấp khử trùng trong nồi hấp khử trùng ở nhiệt độ 121°C, áp suất 1atm trong thời gian 20 phút.

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 huỳnh quang với cường độ 40 - 45 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, thời gian chiếu sáng 16h/ngày.

2.3. Bố trí thí nghiệm

Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần, mỗi thí nghiệm cấy 10 bình/nghiệm thức, mỗi bình cấy 3 mẫu.

2.3.1. Khảo sát ảnh hưởng của nano sắt lên sự sinh trưởng và phát triển của cây cúc nuôi cấy *in vitro*

Các chồi cúc có chiều cao khoảng 2cm với 2 cặp lá được cấy vào môi trường MS cải biến (không có Fe-EDTA) bổ sung nano sắt với các nồng độ khác nhau (0, 2, 5, 10, 15, 20, 35 mg/l) nhằm khảo sát ảnh hưởng của nano sắt lên khả năng ra rễ của cây cúc *in vitro*.

Các đoạn thân cúc với 2 đốt/đoạn được cấy vào môi trường MS cải biến (không có Fe-EDTA) bổ sung 0,2 mg/l BA và nano sắt với các nồng độ khác nhau (0, 2, 5, 10, 15, 20, 35 mg/l) nhằm khảo sát ảnh hưởng của nano sắt lên khả năng nhân chồi của cây cúc *in vitro*.

2.3.2. Khảo sát ảnh hưởng của nano sắt kết hợp với Fe-EDTA lên sự sinh trưởng và phát triển của cây cúc *in vitro*

Các chồi cúc có chiều cao khoảng 2cm với 2 cặp lá được cấy vào môi trường MS (có Fe-EDTA) bổ sung nano sắt với các nồng độ khác nhau (0, 2, 5, 10, 15, 20, 35 mg/l) nhằm khảo sát ảnh hưởng của nano sắt lên khả năng ra rễ của cây cúc *in vitro*.

Các đoạn thân cúc với 2 đốt/đoạn được cấy vào môi trường MS (có Fe-EDTA) bổ sung nano sắt với các nồng độ khác nhau (0, 2, 5, 10, 15, 20, 35 mg/l) nhằm khảo sát ảnh hưởng của nano sắt lên khả năng nhân chồi của cây cúc *in vitro*.

2.4. Chỉ tiêu theo dõi và xử lý số liệu

Số liệu thí nghiệm được thu nhận sau 15 và 30 ngày nuôi cấy. Các chỉ tiêu được thu nhận là chiều cao cây (cm), số lá/cây, chiều rộng lá (cm), số rễ/cây, chiều dài rễ (cm), trọng lượng tươi và trọng lượng khô của cây (mg), trọng lượng tươi và trọng lượng khô của rễ (mg), SPAD - hàm lượng chlorophyll trong lá ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$), số chồi/mẫu, chiều cao chồi, số lá/chồi, trọng lượng tươi và trọng lượng khô của cụm chồi (mg) cây cúc sau 30 ngày nuôi cấy.

Sau khi lấy ra khỏi bình nuôi cấy, rễ cúc được cắt ra khỏi cây, riêng cụm chồi thì để nguyên. Sau đó, trọng lượng của mỗi phần được thu nhận ngay khi mẫu đang còn tươi. Đây là Trọng lượng tươi của mẫu. Trọng lượng khô của mẫu là trọng lượng không đổi của các phần trên sau khi được sấy khô 3 ngày trong tủ sấy ở nhiệt độ 60°C . Các chỉ tiêu này được thu nhận bằng cân phân tích có giới hạn đo nhỏ nhất là 0,001g. Hàm lượng chlorophyll trong lá được đo bằng máy SPAD-502 (Minolta Co., Ltd., Osaka, Nhật Bản).

Tất cả các số liệu sau khi thu thập ứng với từng chỉ tiêu theo dõi, được xử lý bằng phần mềm MicroSoft Excel 2010 và phần mềm phân tích thống kê SPSS 16.0 theo phương pháp Duncan test với $\alpha = 0,05$ (Duncan, 1995).

3. KẾT QUẢ

3.1. Ảnh hưởng của nano sắt lên sự nhân chồi của cây cúc *in vitro*

Kết quả ở bảng 1 cho thấy ảnh hưởng của nano sắt ở các nồng độ khác nhau trên môi trường MS cải biên không có Fe-EDTA lên sự nhân chồi của cây cúc *in vitro* sau 15 và 30 ngày nuôi cấy.

Sau 15 ngày nuôi cấy, chồi cúc trên các môi trường bổ sung nano sắt từ 0 - 35 mg/l không có sự khác biệt về các chỉ tiêu số chồi/mẫu, chiều cao chồi, số lá/chồi, chiều rộng lá, trọng lượng tươi và khô của chồi (Bảng 1). Riêng hàm lượng chlorophyll trong lá có sự khác biệt rõ rệt. Trong đó, lá của các chồi cúc trên môi trường bổ sung từ 0, 2, 5, 10, 15, 20 và 35 mg/l nano sắt có hàm lượng chlorophyll lần lượt thấp hơn so với chồi trên môi trường đối chứng (MS bình thường) 6,6; 5,3; 4,9; 4,6; 2,8; 2,0 và 1,3 lần. Đặc biệt, các chồi trên môi trường bổ sung từ 0 - 15 mg/l nano sắt đều có hiện tượng vàng lá.

Hiện tượng này được biểu hiện rõ ràng hơn vào ngày thứ 30. Chồi cúc trên môi trường không bổ sung sắt nhỏ, sinh trưởng kém, lá có màu vàng trắng và hình thái lá biến dị, rìa lá mất răng cưa (Hình 1a). Ở các nghiệm thức sử dụng từ 2 - 15 mg/l, hiện tượng vàng lá rõ rệt hơn, nhất là ở mép lá và phần phiến lá nằm giữa các gân lá xanh (Hình 1a). Chiều cao chồi, số lá/chồi, chiều rộng lá, trọng lượng tươi và khô của chồi ở các nghiệm thức sử dụng từ 0 - 15 mg/l nano sắt đều thấp hơn rõ rệt so với các nghiệm thức còn lại (Bảng 1).

Trong khi đó, chồi cúc sinh trưởng trên môi trường bổ sung 20 và 35 mg/l không có hiện tượng vàng lá (Hình 1a). Chồi sinh trưởng trên hai môi trường này có màu xanh với các chỉ tiêu theo dõi đều tốt hơn các môi trường bổ sung từ 0 đến 15 mg/l nano sắt và chồi cây thuộc nghiệm thức sử dụng 35 mg/l nano sắt là tốt nhất. Tuy nhiên, khi so sánh nghiệm thức tốt nhất này với đối chứng (môi trường MS, Hình 1b) thì kết quả không có sự khác biệt (Bảng 1).

Bảng 1. Ảnh hưởng của nano sắt lên sự nhân chồi của cây cúc *in vitro*

Nồng độ nano sắt (mg/l)	Số chồi/mẫu	Chiều cao chồi (cm)	Số lá/chồi	Chiều rộng lá (cm)	Trọng lượng tươi của cụm chồi (g)	Trọng lượng khô của cụm chồi (g)	SPAD (-g/cm ²)	Hình thái mẫu cây (ngày thứ 30)							
0*	1,000 ^{***}	1,917 ^a	4,267 ^a	5,000 ^a	6,000 ^{bc}	1,167 ^a	0,159 ^b	0,617 ^a	0,013 ^a	0,047 ^a	39,433 ^a	39,567 ^a	Chồi ít nhưng to và có màu xanh đậm. Rễ nhiều và nhỏ		
0	1,333 ^{ab}	1,667 ^{ab}	0,700 ^d	1,000 ^e	4,000 ^{ab}	5,333 ^c	0,800 ^a	0,700 ^{bc}	0,271 ^a	0,334 ^b	0,020 ^a	0,021 ^d	5,933 ^f	8,433 ^d	Chồi nhỏ. Phiến lá mất răng cưa và có màu vàng nhạt
2	1,667 ^{ab}	1,667 ^{ab}	0,833 ^{cd}	1,100 ^e	4,333 ^{ab}	5,333 ^c	0,767 ^a	0,833 ^{bc}	0,263 ^a	0,354 ^b	0,020 ^a	0,027 ^{cd}	7,500 ^{df}	10,867 ^d	Chồi nhỏ. Phiến lá biến dạng và có màu vàng nhạt
5	2,333 ^{ab}	2,333 ^{ab}	1,033 ^{bcd}	1,733 ^{de}	4,333 ^{ab}	6,667 ^{bc}	0,667 ^a	0,833 ^{bc}	0,265 ^a	0,377 ^b	0,018 ^a	0,029 ^d	8,067 ^a	20,300 ^c	Chồi nhỏ. Phiến lá có màu vàng xanh nhạt
10	2,667 ^a	2,667 ^{ab}	1,367 ^b	2,433 ^{cd}	4,000 ^{ab}	7,333 ^b	0,733 ^a	0,867 ^b	0,267 ^a	0,406 ^b	0,019 ^a	0,032 ^{bc}	8,600 ^a	24,500 ^c	Chồi nhỏ. Rìa lá có màu vàng nhạt
15	2,667 ^a	3,000 ^a	1,433 ^b	2,567 ^c	3,667 ^{ab}	7,333 ^b	0,600 ^a	1,267 ^a	0,288 ^a	0,430 ^b	0,020 ^a	0,037 ^b	13,933 ^{ef}	24,667 ^c	Chồi nhỏ. Phiến lá to, rìa lá có màu vàng nhạt
20	2,000 ^{ab}	2,667 ^{ab}	1,200 ^{bc}	3,200 ^{bc}	3,667 ^{ab}	7,667 ^b	0,633 ^a	0,900 ^b	0,227 ^a	0,462 ^b	0,015 ^d	0,038 ^b	19,533 ^c	32,267 ^b	Chồi nhỏ nhưng cao. Phiến lá nhỏ có màu xanh nhạt
35	2,667 ^{ab}	2,667 ^{ab}	1,333 ^b	3,367 ^b	3,000 ^a	11,000 ^a	0,700 ^a	0,867 ^b	0,283 ^a	0,647 ^a	0,016 ^c	0,052 ^a	29,867 ^a	39,067 ^a	Chồi to, cao. Phiến lá bình thường, màu xanh đậm

Chi chú: Thí nghiệm sử dụng môi trường MS cải biến đa loại bỏ Fe-EDTA, riêng nghiệm thức đối chứng (*) sử dụng môi trường MS. Mỗi chỉ tiêu theo dõi gồm hai cột số liệu, số liệu ở cột thứ nhất được thu nhận vào ngày thứ 15, số liệu ở cột thứ hai được thu nhận vào ngày thứ 30. (***) Các chữ cái khác nhau (a,b,...) trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở $\alpha = 0,05$ (Duncan's test).

Nghiên cứu sự sinh trưởng và phát triển của cây cúc (*Chrysanthemum* sp.) *in vitro* trên môi trường có sử dụng nano sắt



Hình 1. Sự sinh trưởng và phát triển của cây cúc *Chrysanthemum* trên môi trường có sử dụng nano sắt sau 30 ngày nuôi cấy

Ghi chú: (a) Chồi cúc *in vitro* trên môi trường chỉ sử dụng nano sắt với các nồng độ khác nhau (từ trái qua phải, 0, 2, 5, 10, 15, 20 và 35 mg/l), (b) Chồi cúc *in vitro* trên môi trường kết hợp Fe-EDTA và nano sắt với các nồng độ khác nhau (từ trái qua phải, 0, 2, 5, 10, 15, 20 và 35 mg/l), (c, c₁) Cây cúc *in vitro* trên môi trường chỉ sử dụng nano sắt với các nồng độ khác nhau (từ trái qua phải, 0, 2, 5, 10, 15, 20 và 35 mg/l), (d, d₁) Cây cúc *in vitro* trên môi trường kết hợp Fe-EDTA và nano sắt với các nồng độ khác nhau (từ trái qua phải, 0, 2, 5, 10, 15, 20 và 35 mg/l). Hình thái rễ của cây cúc *in vitro* nuôi cấy trên môi trường không có nano sắt và Fe-EDTA (e), môi trường MS không có Fe-EDTA bổ sung 20 mg/l nano sắt (f), môi trường MS bình thường (g) và môi trường MS bình thường bổ sung 10 mg/l nano sắt (h).

3.2. Ảnh hưởng của nano sắt kết hợp với Fe-EDTA lên sự nhân chồi của cây cúc *in vitro*

Sự nhân chồi của cây cúc *in vitro* dưới ảnh hưởng của các nồng độ nano sắt khác nhau sau 15 và 30 ngày nuôi cấy được thể hiện qua các chỉ tiêu trong bảng 2.

Kết quả cho thấy, các chỉ tiêu chiều cao chồi, số lá/chồi và chiều rộng lá đều không có sự khác biệt rõ rệt giữa các nghiệm thức sau 15 ngày nuôi cấy. Riêng hai chỉ tiêu trọng lượng tươi và trọng lượng khô của cụm chồi đạt cao nhất ở nghiệm thức bổ sung 15 mg/l nano sắt (Bảng 2). Kết quả này bước đầu cho thấy khả năng tích lũy chất hữu cơ của cây cúc trên môi trường bổ sung 15 mg/l nano sắt là tốt hơn so với các nghiệm thức còn lại. Điều này được chứng tỏ một cách rõ ràng hơn sau 1 tháng nuôi cấy.

Ở ngày thứ 30, trên môi trường bổ sung nano sắt với nồng độ tăng dần, sự sinh trưởng của cây cúc tăng lên và đạt kết quả cao nhất ở nghiệm thức bổ sung 15 mg/l. Khi nồng độ của sắt nano tăng lên đến 20 và 35 mg/l thì sự sinh trưởng của chồi cúc giảm (Bảng 2, Hình 1b). Không có sự khác biệt ở các chỉ tiêu chiều cao chồi và số lá/chồi ở ba nghiệm thức bổ sung 5, 10 và 15 mg/l nano sắt. Thêm vào đó, chiều rộng lá lớn nhất thuộc về chồi của cây cúc trên môi trường bổ sung 10 mg/l (Bảng 2). Tuy nhiên, khi xét đến các chỉ tiêu số chồi/mẫu, trọng lượng tươi và trọng lượng khô của chồi cũng như hàm lượng chlorophyll trong lá của chồi, là những chỉ tiêu đáng quan tâm nhất trong nuôi cấy nhân chồi, thì nghiệm thức bổ sung 15 mg/l nano sắt vẫn là nghiệm thức tốt nhất. Các chồi cúc trên môi trường này to, sinh trưởng tốt, lá màu xanh đậm (Hình 1b). Riêng nghiệm thức đối chứng không bổ sung nano sắt, tuy chồi cây sinh trưởng tốt, lá xanh và to, nhưng số chồi trung bình của mẫu thuộc nghiệm thức này chỉ bằng 1/3 so với nghiệm thức bổ sung 15 mg/l nano sắt (Bảng 2). Vì vậy, trong thí nghiệm này, nồng độ 15 mg/l nano sắt bổ sung vào môi trường là tốt nhất cho sự nhân lên của chồi cúc trong điều kiện *in vitro*.

3.3. Ảnh hưởng của nano sắt lên sự ra rễ của cây cúc *in vitro*

Các chỉ tiêu theo dõi của cây cúc nuôi cấy trên môi trường sử dụng nano sắt với các nồng

độ khác thay thế cho Fe-EDTA sau 15 và 30 ngày nuôi cấy được trình bày trong bảng 3.

Giống như giai đoạn nhân chồi, hầu hết các chỉ tiêu theo dõi của cây trên các nghiệm thức khác nhau sau 15 ngày nuôi cấy chưa có sự khác biệt rõ rệt ngoại trừ số rễ/cây, chiều dài rễ, trọng lượng tươi và trọng lượng khô của rễ là đạt cao nhất ở nghiệm thức bổ sung 5 mg/l nano sắt (Bảng 3). Tuy nhiên, sau 30 ngày nuôi cấy các chỉ tiêu này không có sự khác biệt. Số liệu bảng 3 cho thấy, số rễ, chiều dài rễ, trọng lượng tươi và trọng lượng khô của rễ ở các nghiệm thức có bổ sung nano sắt (0 - 35 mg/l) không có sự khác biệt rõ ràng sau 1 tháng nuôi cấy. Rễ của cây trong các nghiệm thức này đều dài, nhỏ, ít lông hút (Bảng 3, Hình 1c). Một điều đáng chú ý là trong các nghiệm thức trên, chỉ có cây cúc trên môi trường bổ sung 20 mg/l nano sắt là có thêm rễ phụ (Hình 1e, f). Số lá/cây, chiều rộng lá, trọng lượng tươi và khô của cây cũng như hàm lượng chlorophyll trong lá cũng đạt cao nhất ở nghiệm thức này (Bảng 3).

Mặt khác, khi đem so sánh nghiệm thức tốt nhất này với đối chứng (MS bình thường) không sử dụng nano sắt, dễ dàng nhận thấy sự khác biệt về hình thái rễ. Rễ cúc trên môi trường đối chứng tuy ít hơn, ngắn hơn nhưng nhiều lông hút hơn (Hình 1f, g). Các chỉ tiêu còn lại là số lá, trọng lượng tươi, trọng lượng khô của cây và chỉ số SPAD đều không có sự khác biệt giữa hai nghiệm thức này (Bảng 3). Tóm lại, sự thay thế Fe-EDTA bằng nano sắt trong môi trường nuôi cấy có ảnh đến hình thái rễ của cây cúc *in vitro*, nhưng không giúp cây sinh trưởng tốt hơn so với môi trường ra rễ cúc bình thường (môi trường đối chứng).

3.4. Ảnh hưởng của nano sắt kết hợp với Fe-EDTA lên sự ra rễ của cây cúc *in vitro*

Bảng 4 cho thấy kết quả của thí nghiệm ảnh hưởng của nano sắt ở các nồng độ khác nhau bổ sung vào môi trường MS (có Fe-EDTA) sau 15 và 30 ngày nuôi cấy.

Khi nồng độ sắt nano bổ sung vào môi trường nuôi cấy tăng lên, sự sinh trưởng và phát triển của cây cúc *in vitro* tăng dần và đạt cao nhất ở nghiệm thức bổ sung 10 mg/l nano sắt. Các chỉ tiêu như số lá/cây (7,667); chiều rộng lá (1,567cm); trọng lượng tươi của rễ (0,174g) và

Bảng 2. Ảnh hưởng của nano sắt kết hợp với Fe-EDTA lên sự nhân chồi của cây cúc *in vitro*

Nồng độ nano sắt (mg/l)	Số chồi/mẫu	Chiều cao chồi (cm)	Số lá/chồi	Chiều rộng lá (cm)	Trọng lượng tươi của cụm chồi (g)	Trọng lượng khô của cụm chồi (g)	SPAD ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Hình thái mẫu cây (ngày thứ 30)
0	1,000 ^{cd}	1,917 ^a	5,000 ^a	6,000 ^b	0,600 ^a	1,167 ^a	39,567 ^a	Chồi ít nhưng to và có màu xanh đậm. Rễ nhiều và nhỏ
2	1,667 ^c	2,000 ^b	4,667 ^{ab}	6,333 ^b	0,533 ^a	0,833 ^b	35,267 ^b	Chồi thấp, lá nhỏ. Rễ nhỏ và ít
5	2,333 ^{ab}	2,333 ^b	4,333 ^{ab}	8,000 ^a	0,500 ^a	0,900 ^b	35,667 ^b	Chồi cao nhưng nhỏ, lá nhỏ. Rễ nhỏ và ít
10	2,333 ^{ab}	2,333 ^b	4,333 ^{ab}	8,333 ^a	0,567 ^a	1,167 ^a	35,733 ^b	Chồi cao nhưng nhỏ, lá to. Không có rễ
15	2,667 ^a	3,667 ^a	3,667 ^{ab}	8,667 ^a	0,633 ^a	0,933 ^b	40,033 ^a	Chồi nhiều, cao to, lá nhỏ. Không có rễ
20	2,333 ^{ab}	2,333 ^b	3,333 ^b	6,667 ^a	0,867 ^b	0,629 ^b	34,500 ^b	Chồi thấp, lá nhỏ. Không có rễ
35	2,000 ^{ab}	2,000 ^b	3,333 ^b	6,000 ^a	0,800 ^b	0,038 ^c	34,067 ^b	Chồi thấp, lá nhỏ. Không có rễ

Ghi chú: Mỗi chỉ tiêu theo dõi gồm hai cột số liệu, số liệu cột thứ nhất được thu nhận vào ngày thứ 15, số liệu ở cột thứ hai được thu nhận vào ngày thứ 30. (*) Các chữ cái khác nhau (a, b,...) trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở $\alpha = 0,05$ (Duncan's test).

Bảng 3. Ảnh hưởng của nano sắt lên sự ra rễ của cây cúc *in vitro*

Nồng độ nano sắt (mg/l)	Chiều cao cây (cm)	Số lá/cây	Chiều rộng lá (cm)	Số rễ/cây	Chiều dài rễ (cm)	Trọng lượng tươi của cây (g)	Trọng lượng khô của cây (g)	Trọng lượng tươi của rễ (g)	Trọng lượng khô của rễ (g)	SPAD ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Hình thái mẫu cây (ngày thứ 30)
0*	3,100 ^{abc++} 4,367 ^{bc}	5,333 ^b 10,333 ^b	1,100 ^a 1,333 ^b	3,667 ^b 4,667 ^b	0,967 ^d 1,867 ^b	0,311 ^a 0,884 ^a	0,027 ^a 0,055 ^a	0,023 ^a 0,046 ^d	-	0,001 ^d 32,667 ^{bc}	Cây thấp, có chồi, lá xanh nhạt, Rễ ít, ngắn và có lông hút
0	2,767 ^{bc} 3,867 ^c	8,000 ^b 9,000 ^b	1,100 ^a 1,267 ^b	8,333 ^b 13,000 ^a	2,900 ^{abc} 3,067 ^a	0,198 ^b 0,283 ^d	0,016 ^a 0,024 ^d	0,053 ^b 0,079 ^{cd}	0,002 ^b 0,008 ^b	29,500 ^d 30,133 ^c	Cây nhỏ, thấp và lá xanh nhạt. Rễ nhiều nhưng lông hút rất ít và nhỏ
2	2,867 ^{bc} 4,200 ^{bc}	6,000 ^b 10,000 ^b	1,067 ^a 1,333 ^b	9,667 ^b 14,333 ^a	3,367 ^a 3,000 ^{abc}	0,219 ^a 0,398 ^{cd}	0,020 ^a 0,027 ^{cd}	0,055 ^b 0,090 ^{bc}	0,002 ^b 0,012 ^{ab}	29,633 ^d 30,200 ^c	Cây nhỏ, lá xanh nhạt. Rễ nhiều nhưng nhỏ và ít lông hút
5	3,767 ^a 4,700 ^{abc}	8,000 ^b 10,333 ^b	1,300 ^a 1,367 ^b	14,333 ^a 16,333 ^a	3,367 ^a 3,500 ^a	0,242 ^b 0,440 ^c	0,024 ^{bc} 0,030 ^{cd}	0,096 ^a 0,173 ^a	0,006 ^a 0,016 ^a	30,733 ^{cd} 32,667 ^b	Cây nhỏ, lá xanh nhạt. Rễ nhiều nhưng nhỏ và ít lông hút
10	3,533 ^{ab} 4,767 ^{abc}	7,000 ^{ab} 10,667 ^b	1,267 ^a 1,400 ^b	10,667 ^b 15,000 ^a	3,167 ^{ab} 3,000 ^a	0,253 ^{ab} 0,474 ^c	0,025 ^{bc} 0,033 ^c	0,057 ^b 0,125 ^b	0,011 ^a 0,002 ^{bc}	32,200 ^{bc} 33,833 ^b	Cây nhỏ, lá xanh nhạt. Rễ nhiều nhưng nhỏ và ít lông hút
15	2,733 ^c 4,967 ^{ab}	7,000 ^{ab} 11	1,267 ^a 1,433 ^{ab}	9,000 ^b 14,667 ^a	2,467 ^{bc} 3,333 ^a	0,490 ^c 0,257 ^{ab}	0,025 ^{bc} 0,035 ^c	0,055 ^b 0,108 ^{bc}	0,010 ^b 0,002 ^{bc}	33,967 ^b 34,000 ^c	Cây nhỏ, lá xanh nhạt. Rễ nhiều nhưng nhỏ và ít lông hút
20	2,767 ^{bc} 5,567 ^a	6,867 ^{ab} 13,867 ^a	1,233 ^a 1,633 ^b	10,000 ^b 14,667 ^a	2,400 ^{bc} 3,567 ^a	0,240 ^b 0,653 ^b	0,023 ^c 0,045 ^c	0,050 ^b 0,106 ^{bc}	0,012 ^{ab} 0,001 ^{bc}	37,033 ^a 39,733 ^a	Cây tốt, lá xanh đậm. Rễ nhiều và có rễ phụ nhưng ít lông hút
35	2,367 ^c 4,600 ^{abc}	6,333 ^{ab} 10,000 ^b	0,967 ^a 1,467 ^{ab}	11,000 ^b 14,333 ^a	2,300 ^c 3,267 ^a	0,230 ^a 0,493 ^c	0,021 ^d 0,035 ^c	0,050 ^b 0,104 ^{bc}	0,011 ^a 0,001 ^{cd}	32,600 ^{bc} 33,233 ^b	Cây nhỏ, lá nhiều nhưng xanh nhạt. Rễ nhiều nhưng nhỏ và ít lông hút

Ghi chú: Thí nghiệm sử dụng môi trường MS cải biến (dải loại bỏ Fe-EDTA), riêng nghiệm thức đối chứng (*) sử dụng môi trường MS. Mỗi chỉ tiêu theo dõi gồm hai cột số liệu, số liệu ở cột thứ nhất được thu nhận vào ngày thứ 15, số liệu cột thứ hai được thu nhận vào ngày thứ 30. (-) Trọng lượng quá nhỏ không thể thu nhận được. (***) Các chữ cái khác nhau (a,b,...) trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở $\alpha = 0,05$ (Duncan's test).

Bảng 4. Ảnh hưởng của nano sắt kết hợp với Fe-EDTA lên sự ra rễ của cây cúc *in vitro*

Nồng độ nano sắt (mg/l)	Chiều cao cây (cm)	Số lá/cây	Chiều rộng lá (cm)	Số rễ/cây	Chiều dài rễ (cm)	Trọng lượng tươi của cây (g)	Trọng lượng khô của cây (g)	Trọng lượng tươi của rễ (g)	Trọng lượng khô của rễ (g)	SPAD ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Hình thái màu cây (ngày thứ 30)										
0	3,100 ^{ab}	4,367 ^b	5,333 ^b	10,333 ^{bc}	1,100 ^{bc}	1,333 ^b	4,667 ^c	3,667 ^c	0,967 ^d	1,867 ^d	0,311 ^b	0,884 ^a	0,027 ^b	0,055 ^a	0,023 ^d	0,046 ^c	-	0,001 ^c	32,667 ^{bc}	40,633 ^b	Cây thấp, có chồi, lá xanh đậm. Rễ ít, ngắn và có lông hút
2	3,167 ^a	4,567 ^a	6,667 ^{ab}	9,000 ^c	1,133 ^{bc}	1,367 ^b	11,667 ^{ab}	10,333 ^b	2,333 ^{bc}	3,233 ^{ab}	0,275 ^b	0,456 ^c	0,021 ^c	0,025 ^c	0,097 ^a	0,118 ^a	0,006 ^b	0,009 ^b	30,400 ^c	32,267 ^a	Cây thấp, lá xanh nhạt. Rễ nhiều, dài, nhỏ và có lông hút
5	3,400 ^a	5,300 ^a	7,667 ^a	11,333 ^b	1,367 ^a	1,383 ^b	13,333 ^a	13,333 ^a	3,267 ^a	3,300 ^a	0,430 ^a	0,484 ^c	0,029 ^a	0,027 ^a	0,114 ^a	0,132 ^a	0,008 ^a	0,010 ^b	34,533 ^b	35,533 ^a	Cây cao, lá xanh nhạt. Rễ rất nhiều, dài, nhỏ và có lông hút
10	3,067 ^{ab}	5,467 ^b	7,667 ^a	14,333 ^a	1,300 ^{ab}	1,567 ^a	11,333 ^{ab}	13,667 ^a	2,700 ^b	2,733 ^{bc}	0,264 ^b	0,738 ^b	0,020 ^{cd}	0,049 ^{ab}	0,096 ^a	0,174 ^a	0,006 ^b	0,014 ^a	39,300 ^a	45,167 ^a	Thân cây to, lá xanh đậm. Rễ nhiều, to và rất nhiều lông hút
15	2,733 ^{bc}	4,600 ^b	6,667 ^{ab}	10,333 ^{bc}	1,067 ^c	1,350 ^b	11,000 ^b	14,000 ^b	2,433 ^{bc}	2,467 ^c	0,262 ^b	0,668 ^b	0,019 ^d	0,043 ^b	0,079 ^b	0,133 ^b	0,003 ^c	0,011 ^b	35,000 ^b	36,867 ^c	Cây thấp, lá xanh nhạt. Rễ nhiều, dài, nhỏ và có lông hút
20	2,600 ^c	4,033 ^b	6,333 ^{ab}	9,667 ^{bc}	1,033 ^c	1,333 ^b	10,667 ^b	13,667 ^a	2,633 ^b	3,000 ^{ab}	0,259 ^b	0,493 ^c	0,016 ^c	0,029 ^c	0,075 ^{bc}	0,108 ^a	0,002 ^{cd}	0,010 ^b	33,067 ^{bc}	34,967 ^a	Cây thấp, lá xanh nhạt. Rễ nhiều, dài, nhỏ và có lông hút
35	2,467 ^c	4,567 ^b	5,667 ^b	9,333 ^c	1,033 ^c	1,133 ^c	10,000 ^b	12,667 ^{ab}	2,133 ^c	3,067 ^{ab}	0,255 ^b	0,427 ^c	0,016 ^c	0,024 ^c	0,060 ^c	0,066 ^c	0,001 ^d	0,009 ^b	32,867 ^{bc}	33,367 ^a	Cây cao nhưng nhỏ, lá xanh nhạt. Rễ nhiều, dài, nhỏ và có lông hút

Chi chú: Mỗi chỉ tiêu theo dõi gồm hai cột số liệu, số liệu ở cột thứ nhất được thu nhận vào ngày thứ 15, số liệu ở cột thứ hai được thu nhận vào ngày thứ 30.(-) Trong lượng quá nhỏ không thể thu nhận được.(*) Các chữ cái khác nhau (a,b,...) trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở $\alpha = 0,05$ (Duncan's test).

trọng lượng khô của rễ (0,014 g) của nghiệm thức này đều là cao nhất và khác biệt so với các nghiệm thức còn lại. Cây cúc sinh trưởng trên môi trường bổ sung 10 mg/l nano sắt có thân to, lá xanh đậm với hàm lượng chlorophyll trong lá $45,167 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (Bảng 4, Hình 1d, d₁). Rễ cây cúc trên môi trường này dài, to và có nhiều lông hút hơn hẳn so với các nghiệm thức còn lại (Hình 1h). Khi nồng độ nano sắt tăng lên đến 15, 20 và 35 mg/l, sinh trưởng của cây cúc giảm dần (Bảng 4, Hình 1d, d₁).

4. THẢO LUẬN

Chồi cúc trên các môi trường chỉ sử dụng nano sắt có hiện tượng vàng lá. Đây là hiện tượng tiêu biểu chứng tỏ cây bị thiếu sắt được Eskandari (2011) mô tả khi nghiên cứu về vai trò và cơ chế hấp thụ sắt của thực vật. Thiếu sắt ảnh hưởng nhiều đến quá trình tổng hợp diệp lục tố cũng như hệ thống các enzyme trong phản ứng oxy hóa khử và chuỗi vận chuyển điện tử (Eskandari, 2011). Vì sắt là nguyên tố đóng vai trò chính trong các quá trình đó nên nano sắt có ảnh hưởng đến sự sinh trưởng và phát triển của các chồi cúc thuộc các nghiệm thức này. Một điều đáng chú ý là hàm lượng sắt đơn chất trong môi trường MS đối chứng là 5,6 mg/l (Muraghiye and Skoog, 1962), thấp hơn 6,25 lần so với hàm lượng nano sắt (35 mg/l) trong nghiệm thức tốt nhất của thí nghiệm nhân chồi chỉ sử dụng nano sắt. Tuy nhiên, không có sự khác biệt nào về mặt thống kê giữa hai nghiệm thức này. Điều này có thể được giải thích là do chồi cúc trên môi trường chưa có rễ nên hạn chế việc hấp thụ sắt vào cây. Do đó, nồng độ sắt nano trong môi trường phải đủ lớn mới đáp ứng được nhu cầu của mẫu cấy. Tuy nhiên, hiện tại chưa có nghiên cứu nào nói rõ về các biến đổi của nano sắt trong môi trường nuôi cấy, đặc biệt sau quá trình hấp thụ trùng. Vì vậy, cần có thêm các nghiên cứu sâu hơn mới có thể kết luận được nguyên nhân của hiện tượng trên. Bên cạnh đó, việc kết hợp 15 mg/l nano sắt và 35 mg/l Fe-EDTA lại cho kết quả tốt trong việc nhân chồi ở cây cúc. Kết quả nghiên cứu tương tự cũng được Seif et al. (2011) báo cáo khi sử dụng nano bạc trên cây lưu ly. Nano bạc có ảnh

hưởng đáng kể lên sự tăng trưởng chồi, số lượng lá, chiều cao cây, trọng lượng khô, năng suất hạt cũng như hàm lượng polyphenol và tannin trong chồi của cây lưu ly.

Nghiên cứu của chúng tôi cũng cho thấy nano sắt có ảnh hưởng đến hình thái rễ của cây cúc nuôi cấy *in vitro*. Đặc biệt là trên môi trường bổ sung 10 mg/l nano sắt kết hợp với 35 mg/l Fe-EDTA (có sẵn trong môi trường MS), rễ cây có nhiều lông hút. Điều này cũng được Giordani quan sát thấy trên cây cà chua nuôi cấy thủy canh trong môi trường có bổ sung 500 mg/l TiO_2 ở dạng nano. Cây cà chua trên môi trường này có rất nhiều lông hút (Giordani et al., 2012). Tác giả giải thích rằng sự phân bố của nano TiO_2 trên bề mặt rễ làm giảm khả năng hấp thụ nước và chất dinh dưỡng của rễ. Số lượng lông hút tăng lên là một phản ứng thích nghi của cây làm tăng diện tích hấp thụ của rễ, từ đó cải thiện khả năng hấp thụ dinh dưỡng của cây (Giordani et al., 2012).

Một điều đáng chú ý là nồng độ nano sắt sử dụng trong nghiên cứu này khá cao, nghiệm thức bổ sung 35 mg/l nano sắt có hàm lượng sắt gấp 6,25 lần so với hàm lượng sắt đơn chất trong môi trường MS bình thường. Tuy vậy, không có bất kỳ sự bất thường nào về hình thái được quan sát trên cây cúc nuôi cấy trên các môi trường này. Trujillo-Reyes et al. (2014) cũng ghi nhận được điều này khi tiến hành thí nghiệm trên cây rau diếp (*Lactuca sativa*). Nồng độ 10 mg/l nano sắt và 20 mg/l nano oxide sắt (III) không có ảnh hưởng bất thường lên sự sinh trưởng và hàm lượng chlorophyll của rau diếp. Kết quả này khác hẳn so với nghiên cứu của Raciciu and Creagna (2006) về ảnh hưởng nano sắt từ phủ tetramethylammonium hydroxide lên sự phát triển ở cây *Zea mays*. Ở nồng độ cao (100 - 250 $\mu\text{L}/\text{L}$), dung dịch sắt từ này làm giảm 35% hàm lượng chlorophyll a và tỷ lệ giữa chlorophyll a và b.

5. KẾT LUẬN

Khi sử dụng riêng lẻ, nồng độ nano sắt thấp (0 - 15 mg/l) gây ra hiện tượng vàng lá trên chồi cúc, là biểu hiện của thiếu sắt. Nano sắt cũng làm cho rễ cúc dài nhỏ và tạo nhiều rễ phụ hơn.

Trong khi đó, khi kết hợp với Fe-EDTA, nano sắt cho kết quả khả quan hơn. Nồng độ 15 mg/l nano sắt kết trong môi trường MS bình thường cải thiện đáng kể số lượng chồi cúc *in vitro*. Sự kết hợp giữa 10 mg/l nano sắt và 35 mg/l Fe-EDTA (có sẵn trong môi trường MS) giúp cây cúc ra rễ nhiều hơn, rễ có nhiều lông hút hơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Duncan D.B. (1995). Multiple range and multiple F test. *Biometrics*, 11: 1 - 42.
- Eskandari H. (2011). The importance of iron (Fe) in plant products and mechanism of its uptake by plants. *J. Appl. Environ. Biol. Sci.*, 1(10): 448 - 452.
- Giordani T., Fabrizi A., Guidi L., Natali L., Giunti G., Ravasi F., Cavallini A. and Pardossi A. (2012). Response of tomato plants exposed to treatment with nanoparticles. *EQA*, 8: 27 - 38.
- Murashige T. and Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiol.*, 15: 473 - 497.
- Racuciu M. and Creanga D. (2006). TMA-OH coated magnetic nanoparticles internalize in vegetal tissue. *Romanian J. Phys.*, 52: 395 - 402.
- Seif S.M., Sorooshzadeh A.H., Rezazadeh S. and Naghdibadi H.A. (2011). Effect of nano-silver and silver nitrate on seed yield of borage. *J. Med. Plant Res.*, 5(2): 171 - 175.
- Slater A., Scott N.W. and Fowler M.R. (2008). Plant biotechnology: the genetic manipulation of plants. Chapter 2: Plant tissue culture. Oxford University Press, p. 41.
- Trujillo-Reyes J., Majumdar S., Botez C.E., Peralta-Videa J.R. and Gardea-Torresdeya J.L. (2014). Exposure studies of core-shell Fe/Fe₃O₄ and Cu/CuO NPs to lettuce (*Lactuca sativa*) plants: Are they a potential physiological and nutritional hazard?. *J. Hazard. Mater.*, 267: 255 - 263.
- Zhang W.Y. (2003). Nanoscale iron particles for environmental remediation: An overview. *J. Nanopart. Res.*, 5: 323.
- Zhu H., Han J., Xiao J.Q. and Jin Y. (2008). Uptake, translocation and accumulation of manufactured iron oxide nanoparticles by pumpkin plants. *J. Environ. Monit.*, 10: 713 - 717.