



ẢNH HƯỞNG CỦA NANO BẠC LÊN KHẢ NĂNG CẢM ỨNG MÔ SẼO VÀ TÁI SINH CHỒI TỪ MẪU LÁ CÂY DÂU TÂY (*FRAGARIA X ANANASSA*) NUÔI CẤY *IN VITRO*

Đỗ Mạnh Cường^{1,2}, Trương Thị Bích Phượng², Dương Tấn Nhựt^{1,*}

¹Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam,
116 Xô Viết Nghệ Tĩnh, Đà Lạt, Lâm Đồng, Việt nam

²Trường Đại học Khoa học, Đại Học Huế, 77 Nguyễn Huệ, Huế, Việt Nam

Tóm tắt. Trong nghiên cứu này, ảnh hưởng của nano bạc lên khả năng cảm ứng hình thành mô sẹo và tái sinh chồi từ mẫu lá *ex vitro* thông qua khử trùng cũng như sinh trưởng, phát triển của chồi dâu tây khi bổ sung trực tiếp vào môi trường nuôi cấy được khảo sát. Các mẫu lá khử trùng trong nano bạc ở nồng độ, thời gian khác nhau được so sánh với mẫu đối chứng khử trùng trong HgCl₂, Ca(ClO₂). Tất cả các mẫu lá này được nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung 1 mg/L TDZ, 0,1 mg/L IBA, 30 g/L sucrose và 8,5 g/L agar thu được như sau: nghiệm thức cho tỷ lệ nhiễm thấp nhất (22,22 %) khi được khử trùng ở nồng độ 0,5 g/L nano bạc trong 20 phút; tỷ lệ tái sinh chồi (64,44 %), số chồi/mẫu (21 chồi) và số chồi cao trên 1,5 cm (6,66 chồi) đạt cao nhất ở nồng độ 0,2 g/L nano bạc trong 20 phút. Các chồi này được tiếp tục nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung 0,02 mg/L NAA cho chiều cao cây (6,75 cm), chiều dài rễ (5,13 cm), khối lượng tươi (0,71 g) cao nhất ở nghiệm thức bổ sung 1 mg/L nano bạc; số rễ (6,33 rễ) nhiều nhất ở nghiệm thức bổ sung 2 mg/L nano bạc; khối lượng khô (80,61 mg) và giá trị SPAD (34,49) đạt cao nhất ở nghiệm thức bổ sung 1 mg/L nano bạc.

Từ khoá: dâu tây, *in vitro*, khử trùng, nano bạc, tái sinh chồi

1 Mở đầu

Dâu tây (*Fragaria x ananassa*) thuộc họ Rosaceae là một trong những cây ăn trái quan trọng của thế giới, chứa nhiều khoáng chất cần thiết cho nhu cầu dinh dưỡng của con người. Dâu tây được trồng thương mại tại nhiều nước như Canada, Hoa Kỳ, Nhật Bản... [22]. Tại Việt Nam, dâu tây được trồng chủ yếu ở Đà Lạt và một số địa điểm tại đồng bằng sông Hồng. Dâu tây có khả năng cung cấp 4 nhóm chất chính: vitamin (A, B1, B2); các chất khoáng (Ca, P, Fe...); amino acid (tryptophan, threonine, isoleucine...); chất béo (bão hoà, bão hoà đơn, bão hoà đa) [22]. Việc sử dụng dâu tây hoặc các sản phẩm từ dâu tây giúp cơ thể chống lại mệt mỏi, giảm stress, chữa các bệnh về răng lợi, tăng sức đề kháng, chống nhiễm trùng, chữa bệnh về tim mạch và giảm thiểu sự lão hóa cơ thể [22]. Dâu tây thường được nhân giống bằng cách tách thân bò hoặc tách cây con từ cây mẹ. Phương pháp nhân giống này cho hệ số nhân không cao và cây con bị nhiễm một số

* Liên hệ: duongtannhut@gmail.com

bệnh do nấm, vi khuẩn, virus từ cây mẹ, từ đó dẫn đến làm giảm năng suất và chất lượng của quả. Vi nhân giống cây dâu tây đã được nghiên cứu với nhiều phương pháp khác nhau: nuôi cấy đỉnh sinh trưởng để loại bỏ vi khuẩn và virus [17], phát sinh phôi vô tính làm giảm tối đa các biến dị di truyền [23]. Các phương pháp này đã tạo ra nhiều thuận lợi hơn nhân giống truyền thống nhưng vẫn còn tồn tại một vài hạn chế; nuôi cấy đỉnh sinh trưởng đôi khi cần phải được kết hợp với xử lý nhiệt và hoá học đòi hỏi kỹ thuật và thiết bị khá phức tạp [15]; nếu phát sinh phôi vô tính thì quá trình tái sinh sau đó đạt được với tần số tương đối thấp [5] và còn phụ thuộc nhiều vào nhân tố như kiểu giống, nồng độ của các chất điều hoà sinh trưởng được sử dụng, nguồn mẫu và quang kỳ... Bên cạnh đó, phương pháp tái sinh chồi bất định từ mẫu lá dâu tây luôn cho hiệu quả tái sinh cao nhất [11, 13] và mô sẹo tái sinh từ mẫu lá tạo nhiều chồi nhất [14]. Tuy nhiên, trong phương pháp này, giai đoạn khử trùng mẫu lá khá quan trọng; chất khử trùng, nồng độ và thời gian là những yếu tố then chốt trong quy trình khử trùng mẫu cấy. Phần lớn các chất khử trùng mẫu đang được sử dụng hiện nay như là HgCl_2 , $\text{Ca}(\text{ClO})_2$, NaOCl ... là những chất mang tính tẩy rửa cao, kháng vi sinh vật theo cơ chế ăn mòn vách, thành tế bào vi khuẩn và nấm nên thường gây ảnh hưởng đến mẫu cấy dẫn đến hiệu quả khử trùng không cao, khả năng tái sinh mô sẹo và chồi không tốt [9].

Trong những năm gần đây, các ion bạc ở dạng muối bạc nitrate, bạc thiosulphate được ứng dụng nhiều trong nuôi cấy mô tế bào thực vật nhờ đặc tính kháng nấm, kháng khuẩn mà không gây ảnh hưởng đến sức khỏe của con người [1]. Mặt khác, các ion bạc còn đóng vai trò quan trọng trong sự phát triển của mô sẹo, tái sinh chồi trong nuôi cấy *in vitro* [2], hình thành rễ và tạo cây hoàn chỉnh trong vi nhân giống [16]. Tuy nhiên, các ion bạc luôn đi kèm với các cation tồn tại ở dạng muối (bạc nitrate, bạc thiosulphate); điều này ảnh hưởng đến hiệu quả khử trùng và hấp thu, chuyển hoá của ion bạc.

Để khắc phục tình trạng trên, dung dịch nano bạc gồm các ion có kích thước từ 1 đến 20 nm và với kích thước cực kỳ nhỏ này, các hạt nano có diện tích bề mặt lớn làm tăng khả năng tiếp xúc và sự bám dính trên bề mặt tế bào dẫn đến hiệu quả tác động cao [18, 20].

Vì vậy, chúng tôi thực hiện nghiên cứu này, nhằm khảo sát và đánh giá khả năng thay thế các chất khử trùng thông dụng [HgCl_2 , $\text{Ca}(\text{ClO})_2$] bằng nano bạc trong giai đoạn khử trùng mẫu cấy, cảm ứng mô sẹo, tái sinh chồi và thăm dò ảnh hưởng của nồng độ nano bạc khác nhau lên sự sinh trưởng và phát triển của chồi dâu tây trong điều kiện nuôi cấy *in vitro*.

2 Vật liệu và phương pháp

2.1 Vật liệu

Nguồn mẫu: Lá của cây dâu tây (*Fragaria x ananassa*) *ex vitro* khoảng 3 tháng tuổi sinh trưởng và phát triển tốt, không bị sâu bệnh hiện có tại vườn ươm của Công ty Thái Dương – S.U.N, Đà Lạt được chọn làm nguồn mẫu ban đầu.

Vật liệu nano: Dung dịch nano bạc do Viện Công nghệ Môi trường, Hà Nội cung cấp với các hạt nano bạc có kích thước trung bình ≤ 20 nm [3].

Môi trường nuôi cấy: Môi trường nuôi cấy là môi trường Murashige và Skoog – MS [10] có bổ sung 30 g/L sucrose, 8,5 g/L agar. Tất cả các môi trường nuôi cấy được điều chỉnh về pH = 5,8; các thí nghiệm được nuôi cấy trong bình thủy tinh 250 mL chứa 40 mL môi trường. Sau đó, toàn bộ môi trường được hấp khử trùng ở nhiệt độ 121 °C, áp suất 1 atm trong thời gian 20 phút.

2.2 Phương pháp

Khử trùng và tái sinh chồi: Lá của cây dâu tây được rửa sạch dưới vòi nước máy sau đó ngâm với cồn 70 % trong 30 giây, rửa lại với nước cất vô trùng 3 lần và khử trùng bằng dung dịch nano bạc với các nồng độ khác nhau (0,05; 0,1; 0,2; 0,5 g/L), trong các khoảng thời gian thay đổi (5, 10, 15, 20, 30 phút). Mẫu ở nghiệm thức đối chứng được khử trùng bằng dung dịch $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ nồng độ 60 g/L trong thời gian 10 phút và HgCl_2 nồng độ 1 g/L trong thời gian 5 phút [12]. Những mẫu lá này sau khi khử trùng được cắt thành hình tròn có đường kính 1 cm bằng dụng cụ cắt [7], sau đó được cấy trên môi trường MS có bổ sung 1 mg/L TDZ, 0,1 mg/L IBA, 30 g/L sucrose và 8,5 g/L agar [21]. Mỗi nghiệm thức tiến hành trên 30 bình, mỗi bình cấy 1 mẫu. Thí nghiệm này nhằm theo dõi tỷ lệ nhiễm (%), tỷ lệ tái sinh chồi (%), số chồi/mẫu (chồi), số chồi cao > 1,5 cm (chồi), hình thái chồi để nghiên cứu vai trò của nano bạc trong khử trùng, cảm ứng tạo mô sẹo và tái sinh chồi sau 6 tuần nuôi cấy.

Sinh trưởng và phát triển: Chồi thu nhận từ nghiệm thức tốt nhất ở thí nghiệm trên được cấy vào môi trường MS chứa 0,02 mg/L NAA, 30 g/L sucrose, 1 g/L than hoạt tính, 8,5 g/L agar [8] và nano bạc được bổ sung với các nồng độ khác nhau (0; 0,5; 1,0; 1,5; 2 mg/L). Mỗi nghiệm thức tiến hành trên 30 bình, mỗi bình cấy 5 chồi để nghiên cứu ảnh hưởng của nano bạc đến quá trình sinh trưởng, phát triển và tạo cây con hoàn chỉnh thông qua các chỉ tiêu theo dõi: chiều cao cây (cm), số rễ, chiều dài rễ (cm), khối lượng tươi (g), khối lượng khô (mg), giá trị SPAD (hàm lượng chlorophyll) sau 4 tuần nuôi cấy.

2.3 Điều kiện nuôi cấy

Các thí nghiệm được tiến hành trong điều kiện nhiệt độ phòng (25 ± 2 °C), chu kỳ chiếu sáng 16 giờ/ngày, cường độ $40\text{--}45 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ dưới ánh sáng đèn huỳnh quang, độ ẩm trung bình 55–60 %.

2.4 Xác định chỉ tiêu tăng trưởng

Chiều cao cây (cm) được xác định bằng cách đo chiều dài từ gốc đến phiến lá của lá đầu tiên; chiều dài rễ (cm) được xác định bằng cách đo chiều dài từ gốc đến chóp rễ; khối lượng tươi (g) được xác định bằng cách cân khối lượng cây tươi; khối lượng khô (mg): cân mẫu đã được xác định khối lượng tươi ở trên sấy ở nhiệt độ 60 °C cho đến khi khối lượng không đổi; giá trị SPAD được xác định bằng SPAD-502 (Minilta Co., Ltd., Japan).

2.5 Công thức tính được tiến hành khi thu nhận số liệu

Tỷ lệ nhiễm = Số mẫu cấy nhiễm × 100/ Tổng số mẫu cấy thí nghiệm

Tỷ lệ tái sinh chồi = Số mẫu cấy tái sinh × 100/ Tổng số mẫu cấy thí nghiệm

2.6 Xử lý số liệu

Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Tất cả các số liệu sau khi thu thập ứng với từng chỉ tiêu theo dõi được xử lý bằng phần mềm MicroSoft Excel® 2017 và phần mềm phân tích thống kê SPSS 16.0 theo phương pháp Duncan’s test với α = 0,05 [6].

3 Kết quả và thảo luận

3.1 Khử trùng và tái sinh chồi

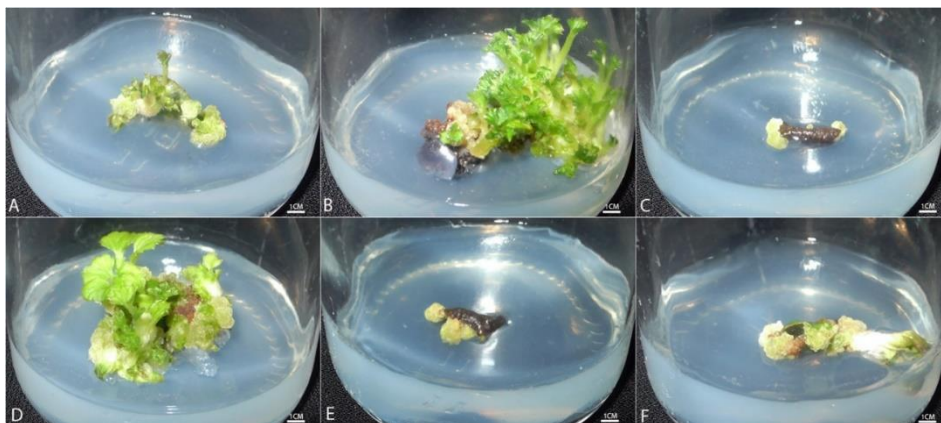
Sau 6 tuần nuôi cấy, kết quả ghi nhận cho thấy khả năng khử trùng mẫu cấy của nano bạc ở các nồng độ và thời gian xử lý khác nhau có sự khác biệt so với các chất khử trùng thông dụng [HgCl₂ và Ca(ClO)₂] (Bảng 1) và quá trình hình thành chồi từ lá dâu tây là một quá trình chuyển tiếp gồm 3 giai đoạn: cảm ứng mô sẹo, tái sinh chồi và sự tăng trưởng của chồi (Hình 1)

Bảng 1. Khả năng khử trùng mẫu cấy của nano bạc và các chất khử trùng thông dụng sau 6 tuần nuôi cấy

Chất Khử trùng	Nồng độ (g/L)	Thời gian khử trùng (phút)	Tỷ lệ nhiễm (%)	Tỷ lệ tái sinh chồi (%)	Số chồi/ mẫu	Chồi cao > 1,5 cm	Hình thái chồi
Nano bạc	0,05	5	100,00 ^e	-	-	-	Mẫu nhiễm nấm
		10	100,00 ^f	-	-	-	
		15	100,00 ^f	-	-	-	Mẫu nhiễm nấm, khuẩn
		20	100,00 ^f	-	-	-	
		30	100,00 ^f	-	-	-	
	0,1	5	100,00 ^f	-	-	-	Mẫu nhiễm nấm
		10	73,33 ^e	22,22 ^d	10,00 ^c	0,00 ^c	
		15	63,33 ^{de}	30,00 ^{cd}	12,33 ^{bc}	0,00 ^c	Chồi lớn
		20	60,00 ^{de}	33,33 ^{bcd}	11,33 ^{bc}	0,00 ^c	
		30	100,00 ^f	-	-	-	Mẫu nhiễm nấm, khuẩn
	0,2	5	100,00 ^f	-	-	-	Mẫu nhiễm nấm
		10	60,00 ^{de}	34,44 ^{bcd}	10,66 ^c	0,00 ^c	
		15	37,78 ^{bc}	56,66 ^{abc}	15,66 ^{abc}	4,00 ^b	Chồi lớn
		20	28,89 ^{ab}	64,44 ^a	21 ^a	6,66 ^a	

Chất Khử trùng	Nồng độ (g/L)	Thời gian khử trùng (phút)	Tỷ lệ nhiễm (%)	Tỷ lệ tái sinh chồi (%)	Số chồi/mẫu	Chồi cao > 1,5 cm	Hình thái chồi
0,5		30	100,00 ^f	–	–	–	Mẫu nhiễm nấm, khuẩn
		5	100,00 ^f	–	–	–	Mẫu nhiễm nấm
		10	48,88 ^{cd}	45,55 ^{abcd}	13,00 ^{bc}	0,00 ^c	Chồi lớn
		15	36,66 ^{bc}	61,11 ^{ab}	13,33 ^{abc}	4,00 ^b	
		20	22,22 ^a	57,78 ^{abc}	19 ^{ab}	4,66 ^b	
		30	100,00 ^f	–	–	–	Mẫu nhiễm nấm, khuẩn
HgCl ₂	1	5	49,99 ^{cd}	46,66 ^{abcd}	16,33 ^{abc}	0,00 ^c	Chồi nhỏ
Ca(ClO) ₂	60	10	38,89 ^{bc}	56,66 ^{abc}	13,66 ^{abc}	0,00 ^c	

Ghi chú: *Những chữ cái khác nhau (a, b, c...) trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa ở mức $\alpha = 0,05$ trong phép thử Duncan.



Hình 1. Hình thành mô sẹo và tái sinh chồi từ lá

A, B. Mô sẹo và chồi ở nghiệm thức khử trùng bằng nano bạc nồng độ 0,2 g/L trong 20 phút sau 3 và 6 tuần nuôi cấy; *C, D.* Mô sẹo và chồi ở nghiệm thức khử trùng bằng Ca(ClO)₂ sau 3 và 6 tuần nuôi cấy; *E, F.* Mô sẹo và chồi ở nghiệm thức khử trùng bằng HgCl₂ sau 3 và 6 tuần nuôi cấy.

Theo quan sát, tất cả các mẫu lá ở nghiệm thức khử trùng bằng nano bạc trong 5 phút đều bị nhiễm nấm 100 % trong tuần đầu tiên; ở các nghiệm thức bổ sung nano bạc nồng độ 0,05 g/L còn lại và tất cả các nghiệm thức khử trùng nano bạc trong thời gian 30 phút, 100 % mẫu cấy bị nhiễm nấm và nhiễm khuẩn trong 4 tuần nuôi cấy (Bảng 1). Điều này cho thấy nano bạc ở nồng độ thấp (0,05 g/L) hoặc thời gian ngắn (5 phút), dài (30 phút) đều không có hiệu quả trong quá trình khử trùng. Khi nồng độ nano bạc trong khoảng 0,1–0,5 g/L và thời gian khử trùng từ 10 đến 20 phút, tỷ lệ nhiễm đạt thấp nhất ở nghiệm thức khử trùng bằng nano bạc nồng độ 0,5 g/L trong thời gian 20 phút (22,22 %); tỷ lệ này thấp hơn so với nghiệm thức đối chứng (HgCl₂: 49,99 % và Ca(ClO)₂: 38,89 %).

Bên cạnh đó, mẫu lá ở nghiệm thức khử trùng bằng nano bạc nồng độ 0,2 g/L trong 20 phút cảm ứng tạo mô sẹo sớm nhất trong tuần đầu tiên và phát sinh chồi ở tuần thứ 2 (Hình 1A); nhanh hơn so với các nghiệm thức bổ sung nano bạc ở nồng độ và thời gian khác (các mô sẹo xuất hiện rải rác ở tuần thứ 2, phát sinh chồi ở tuần thứ 3) và nghiệm thức đối chứng (các mô sẹo xuất hiện ở tuần thứ 3 (Hình 1C và 1E), phát sinh chồi ở tuần thứ 4). Quan sát tỷ lệ tái sinh của thí nghiệm này cho thấy nghiệm thức khử trùng bằng nano bạc ở nồng độ 0,2 g/L trong 20 phút là tốt nhất (64,44 %), cao hơn nghiệm đối chứng [HgCl₂, Ca(ClO)₂] (tương ứng 46,66 %, 56,66 %). Điều này có thể do HgCl₂ và Ca(ClO)₂ đều là các chất mang tính tẩy rửa cao, kháng vi sinh vật theo cơ chế ăn mòn vách, thành tế bào vi khuẩn, nấm nên thường gây ảnh hưởng không tốt đến khả năng tái sinh mẫu cấy [9]. Mặc dù, tỷ lệ nhiễm của nghiệm thức khử trùng bằng nano bạc ở nồng độ 0,5 g/L trong 20 phút (22,22 %) có thấp hơn so với nghiệm thức 0,2 g/L trong 20 phút (28,89 %), nhưng tỷ lệ mẫu tái sinh mới là yếu tố quyết định trong nghiên cứu này. Từ điều này có thể thấy nồng độ là yếu tố quyết định đến hiệu quả khử trùng; thời gian là yếu tố chi phối tỷ lệ tái sinh trong khử trùng mẫu cấy.

Sau 6 tuần nuôi cấy, số lượng chồi hình thành và số chồi > 1,5 cm ở nghiệm thức khử trùng bằng nano bạc nồng độ 0,2 g/L ở thời gian 20 phút (tương ứng 21 chồi; 6,66 chồi) cao hơn đáng kể so với đối chứng [HgCl₂ (tương ứng 16,66 chồi; 0,00 chồi), Ca(ClO)₂ (tương ứng 13,66 chồi; 0,00 chồi)]. Các chồi hình thành ở nghiệm thức đối chứng (HgCl₂, Ca(ClO)₂) có sự phân nhánh khá cao, từ một chồi hình thành thêm 2–3 chồi khác (Hình 1D) làm cho hình thái chồi có hình dạng không bình thường, dễ bị hiện tượng thủy tinh thể và không ghi nhận được lượng chồi > 1,5 cm. Những chồi ở nghiệm thức khử trùng bằng nano bạc ở nồng độ 0,2 g/L trong thời gian 20 phút có sự hình thành chồi đơn rõ ràng, các chồi to, khoẻ, tách nhau ra riêng biệt (Hình 1B). Đây là nguồn vật liệu tốt cho quá trình vi nhân giống. Ở nghiệm thức khử trùng bằng HgCl₂, ngoài sự hình thành chồi tương tự như mẫu ở nghiệm thức khử trùng bằng Ca(ClO)₂, kết quả cũng ghi nhận có hiện tượng tái sinh chồi bất thường (Hình 1F). Điều này cho thấy tất cả những thay đổi về chất, nồng độ và thời gian các ion kim loại dùng khử trùng mẫu cấy đều có thể dẫn đến hình thành những tín hiệu ion kim loại khác nhau ảnh hưởng đến tế bào [4]. Vậy có thể thấy nano bạc ở nồng độ 0,2 g/L ở thời gian 20 phút không những có chức năng tái sinh mà còn có vai trò quan trọng trong sinh trưởng và phát triển của chồi nuôi cấy *in vitro*. Kết quả này hoàn toàn phù hợp với nghiên cứu của Sharma và cs. trên đối tượng *Capsicum frutescens* Mill [19], các mô phản ứng mạnh làm tăng chiều dài chồi và số chồi tối đa khi có sự tác động của nano bạc.

3.2 Sinh trưởng và phát triển

Các nồng độ nano bạc khác nhau có ảnh hưởng khác nhau đến quá trình tăng trưởng và phát triển của chồi dâu tây sau 4 tuần nuôi cấy *in vitro* (Bảng 2 và Hình 2).

Theo quan sát, nghiệm thức bổ sung nano bạc nồng độ 1 mg/L cho chiều cao cây, khối lượng tươi rất cao (tương ứng 6,75 cm; 0,71 g) gấp 2 lần so với nghiệm thức đối chứng

(trung ứng 3,96 cm; 0,30 g). Các cây này yếu, thân bị mọng nước và có hiện tượng thủy tinh thể, nên khi so sánh khối lượng khô và giá trị SPAD của nghiệm thức này (trung ứng 65,19 mg; 30,31) thì lại thấp hơn so với nghiệm thức bổ sung nano bạc nồng độ 0,5 mg/L (trung ứng 80,61 mg; 34,49). Kết quả cũng ghi nhận chiều dài rễ của nghiệm thức bổ sung nano bạc ở nồng độ 1 mg/L và 1,5 mg/L rất cao (trung ứng 5,13 cm và 4,66 cm), nhưng các rễ này giòn, dễ bị đứt gãy khi có tác động. Nghiệm thức bổ sung nano bạc nồng độ 2 mg/L cho chiều dài rễ ngắn nhất (0,96 cm) trong các nghiệm thức nhưng có số rễ lại nhiều nhất (6,33 rễ), cao gấp 3 lần so với đối chứng (2,66 rễ). Về hình thái, những cây sinh trưởng trong môi trường bổ sung nano bạc nồng độ 0,5 mg/L có cuống lá to, lá mở rộng và có màu xanh đậm so với các nghiệm thức khác có cây yếu, cuống lá nhỏ, lá mỏng và có màu xanh nhạt. Những điều này có thể chứng minh tất cả các thay đổi về nồng độ nano bạc khác nhau có thể dẫn đến hình thành những tín hiệu khác nhau ảnh hưởng đến enzyme tế bào, tác động đến các bộ phận khác nhau của cây [4].

Bảng 2. Ảnh hưởng của nano bạc đến sinh trưởng và phát triển của chồi dâu tây sau 4 tuần nuôi cấy

Nồng độ (mg/L)	Chiều cao cây (cm)	Số rễ	Chiều dài rễ (cm)	Khối lượng tươi (g)	Khối lượng khô (mg)	Giá trị SPAD
0,0	3,96 ^b	2,66 ^c	3,10 ^{ab}	0,30 ^{bc}	40,10 ^c	27,40 ^c
0,5	4,63 ^b	5,00 ^{ab}	1,60 ^{bc}	0,46 ^b	80,61^a	34,49^a
1,0	6,75^a	4,00 ^{bc}	5,13^a	0,71^a	65,19 ^b	30,31 ^{ab}
1,5	4,72 ^b	4,33 ^{bc}	4,46 ^a	0,44 ^b	73,35 ^{ab}	29,98 ^{ab}
2,0	3,49 ^b	6,33^a	0,96 ^c	0,26 ^c	38,98 ^c	28,44 ^c

Ghi chú: Những chữ cái khác nhau (a, b, c...) trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa ở mức $\alpha = 0,05$ trong phép thử Duncan.



Hình 2. Khả năng hình thành rễ và tạo cây con hoàn chỉnh

(A: Cây ở trong bình nuôi cấy, B: Cây khi được lấy ra ngoài) ở các nồng độ nano bạc khác nhau (0,0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 mg/L, từ trái qua phải) sau 4 tuần nuôi cấy

Tạo được cây hoàn chỉnh, có chất lượng tốt trong *in vitro* là việc rất quan trọng quyết định khả năng sống sót của cây con trong điều kiện *ex vitro*, đảm bảo cây có thể sinh trưởng và phát triển tốt ở các giai đoạn tiếp theo. Ảnh hưởng của bạc nitrate đến sự sinh trưởng và phát triển của cây nuôi cấy *in vitro* đã được nghiên cứu; bổ sung 0,4 mg/L bạc nitrate đã dẫn đến sự kéo dài rễ cây *Decalepis hamiltonii* [2, 16]; các cây con thu được trên môi trường bổ sung 0,4 mg/L bạc nitrate có rễ dài, cây con phát triển tốt nhất và có tỷ lệ sống sót 100 % khi thuần hoá ngoài vườn ươm. Vì vậy, trong thí nghiệm này nghiệm thức bổ sung nano bạc nồng độ 0,5 mg/L được lựa chọn, cho cây con đạt tiêu chuẩn chất lượng tốt, chuẩn bị cho giai đoạn thuần hoá ngoài vườn ươm.

4 Kết luận

Việc sử dụng nano bạc nồng độ 0,2 g/L trong 20 phút có thể thay thế các chất khử trùng thông dụng (HgCl_2 , $\text{Ca}(\text{ClO})_2$) trong vi nhân giống cây dâu tây. Bên cạnh đó, nano bạc còn có tác dụng kích thích mẫu cấy cảm ứng nhanh, tác động tốt đến sự hình thành mô sẹo, tái sinh chồi và hoàn toàn không gây ra bất kỳ tác động tiêu cực nào đến mẫu cấy. Ngoài ra, bổ sung nano bạc ở nồng độ 0,5 mg/L vào môi trường nuôi cấy thích hợp cho sự sinh trưởng phát triển và tạo cây hoàn chỉnh chuẩn bị cho giai đoạn thuần hoá ngoài vườn ươm.

Lời cảm ơn: Để hoàn thành nghiên cứu này, nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn sự tài trợ kinh phí của đề tài “Nghiên cứu tác động của nano kim loại lên khả năng tái sinh, sinh trưởng, phát triển và tích lũy hoạt chất trong quá trình nhân giống một số cây trồng có giá trị cao ở Việt Nam” thuộc hợp phần: “Nghiên cứu cơ chế tác động và đánh giá an toàn sinh học của các chế phẩm nano được nghiên cứu trong dự án”, mã số: VAST.TĐ.NANO.04/15-18.

Tài liệu tham khảo

1. Abdi G. (2012), Evaluation the potential of Nano silver for removal of bacterial contaminants in valerian (*Valeriana officinalis* L.) tissue culture. *Journal of Biodiversity and Environmental Science* 6(17): 199–205.
2. Bais H. P., Sudha G., Suresh B., Ravishankar G. A. (2000), Silver nitrate influences *in vitro* root formation in *Decalepis hamiltonii* Wight and Arn. *Current Science* 79(6): 894–898.
3. Chau H. N., Bang L. A., Buu N. Q., Dung T. T. N., Ha H. T., Quang D. V. (2008), Some results in manufacturing of nanosilver and investigation of its application for disinfection. *Advances in Natural Sciences* 9: 241–248.
4. Dean K. M., Qin Y., Palmer A. E. (2012), Visualizing metal ions in cells: an overview of analytical techniques, approaches, and probes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1823(9): 1406–1415.
5. Donnoli M. I., Scafato P., Superchi S., Rosini C. (2001), Synthesis and stereochemical characterization of optically active 1,2-diarylethane-1,2-diols: useful chiral controllers in the Ti-mediated enantioselective sulfoxidation. *Chirality* 13(5): 258–265.
6. Duncan D. B. (1995), Multiple ranges and multiple F test. *Biometrics* 11: 1–42.

7. Dương Tấn Nhật (2012), *Thiết kế dụng cụ lấy mẫu trong nghiên cứu tái sinh và nhân giống vô tính cây Dâu tây*, Công nghệ Sinh học Thực vật. Nxb. Nông nghiệp, Hà Nội: 48–59.
8. Haddadi F., Aziz M. A., Saleh G., Rashid A. A., Kamaladini H. (2010), Micropropagation of strawberry cv. Camarosa: Prolific shoot regeneration from *in vitro* shoot tips using thidiazuron with N6-benzylamino-purine. *HortScience* 45: 453–456.
9. Ines M., Krunoslav D., Vensa T., Marija V., Ankica P., Zlatko C., Boris P., Zorica J. (2013), *in vitro* sterilization procedures for micropropagation of *Oblaciska sour* Cherry. *Journal of Agricultural Science* 58(2): 117–126.
10. Murashige T., Skoog F. (1962), A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473–497.
11. Nehra N. S., Stushnoff C., Kartha K. K. (1989), Direct shoot regeneration from leaf discs. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 114: 1014–1018.
12. Ngô Xuân Bình (2010), *Điều kiện và môi trường nuôi cấy mô tế bào thực vật*, Nuôi cấy mô tế bào thực vật - Cơ sở lý luận và ứng dụng. Nxb. Khoa học - Kỹ Thuật, Hà Nội: 26–48.
13. Passey A. J., Barrett K. J., James D. J. (2003), Adventitious shoot regeneration from seven commercial strawberry cultivars (*Fragaria x Ananassa Duch.*) using a range of explant types. *Plant Cell Reports* 21(5): 397–401.
14. Popescu A. N., Isac V. S., Coman M. S., Radulescu M. S. (1997), Somaclonal variation in plants regenerated by organogenesis from callus culture of strawberry (*Fragaria x Ananassa*). *Acta Horticulturae* 439(8): 89–96.
15. Posnette A. F., Jha A. (1960), The use of cutting and heat treatment to obtain virus free strawberry plants. *East Malling Research Station* 32: 282–288.
16. Reddy B. O., Giridhar P., Ra Vishankar G. A. (2001), *In vitro* rooting of *Decalepis hamiltonii* Wight and Arn., an endangered shrub by auxins and root-promoting agents. *Current Science* 81(11): 1479–1481.
17. Seemueller E., Merkle F. (1984), Eliminierung von Phytophthora fragariae durch Meristemkultur. *Gartenbauwissenschaft* 49: 227–230.
18. Shah V., Belozeroval I. (2008), Influence of metal nanoparticles on the soil microbial community and germination of lettuce seeds. *Water Air and Soil Pollution* 197: 143–148.
19. Sharma A., Kumar V., Giridhar P., Ravishankar G. A. (2008), Induction of *in vitro* flowering in *Capsicum frutescens* under the influence of silver nitrate and cobalt chloride and pollen transformation. *Electronic Journal of Biotechnology* 11(2): 84–89.
20. Sondi I., Salopek-Sondi B. (2004), Silver nano particles as antimicrobial agent: Case study on *E. coli* as a model for gram-negative bacteria. *Journal of Colloid and Interface Science* 275: 177–182.
21. Sutter E. G., Ahmadi H., Labavitch J. M. (1997), Direct regeneration of strawberry *Fragaria x Ananassa Duch.* From leaf discs. *Acta Horticulturae* 447: 243–245.
22. United States Department of Agriculture (1999), *Crop Profile for Strawberries in California*, U.S. Department of Agriculture, Pest Management Centers.
23. Zebrowska J., Hortynski J. A. (2002), Plant regeneration from leaf explants in strawberry (*Fragaria x Ananassa Duch.*). *Acta Horticulturae* 567: 313–315.

EFFECT OF NANOSILVER ON CALLUS INDUCTION AND SHOOT REGENERATION ABILITY FROM LEAF EXPLANTS OF STRAWBERRY (*FRAGARIA X ANANASSA*) CULTURED *IN VITRO*

Do Manh Cuong^{1,2}, Truong Thi Bich Phuong², Duong Tan Nhut^{1*}

¹Tay Nguyen Institute for Scientific Research, VAST, 116 Xo Viet Nghe Tinh, Da Lat, Lam Dong, Vietnam

²Hue University of Sciences, Hue University, 77 Nguyen Hue, Hue, Vietnam

Abstract. This study indicated the effect of nanosilver on inducing callus formation and shoot regeneration from *ex vitro* leaf explants via sterilization as well as its effect on the growth and development of strawberry's shoots when added directly to the culture medium. The leaf explants sterilized with nanosilver of different concentrations and durations were compared with the control treated with HgCl₂, Ca(ClO)₂. All these samples were cultured in the MS medium supplemented with 1 mg/L TDZ, 0.1 mg/L IBA, 30 g/L sucrose và 8.5 g/L agar. The result showed that the treatment with the lowest infection rate (22.22 %) was treated with 0.5 g/L nanosilver for 20 minutes. The shoot regeneration rate (64.44 %), the number of shoots per explant (21), and the number of shoots longer than 1.5 cm (6.66) were the highest when treated with 0.2 g/L nanosilver for 20 minutes. The shoots obtained above were further cultured in the MS medium supplemented with 0.02 mg/L NAA. The height of plantlets (6.75 cm), the length of roots (5.13 cm) and the fresh weight of seedlings (0.71 g) were the highest in the treatment supplemented with 1 mg/L nanosilver; the number of roots (6.33) was the highest in the treatment with 2 mg/L nanosilver; the highest fresh dry mass (80.61 mg) and SPAD value (34.49) were the highest in the treatment with 1 mg/L nanosilver.

Keywords: *in vitro*, nanosilver, shoot regeneration, sterilization, strawberry