

KHẢO SÁT NANO BẠC LÀM CHẤT KHỬ TRÙNG MẪU MÓI TRONG NHÂN GIỐNG VÔ TÍNH CÂY AFRICAN VIOLET (*SAINTPAULIA IONANTHA* H. WENDL.)

Dương Tấn Nhựt^{1, ✉}, Dương Bảo Trinh², Đỗ Mạnh Cường¹, Hoàng Thanh Tùng¹, Nguyễn Phúc Huy¹, Vũ Thị Hiền¹, Vũ Quốc Luận¹, Lê Thị Thu Hiền³, Nguyễn Hoài Châu⁴

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

²Trường Đại học công nghệ Thành phố Hồ Chí Minh

³Viện Nghiên cứu hệ gen, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

⁴Viện Công nghệ môi trường, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

✉ Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: duongtannhut@gmail.com

Ngày gửi bài: 09.3.2017

Ngày nhận đăng: 20.01.2018

TÓM TẮT

Khử trùng mẫu cấy là giai đoạn vô cùng quan trọng của quá trình tạo nguồn mẫu ban đầu trong nuôi cấy *in vitro*. Các chất khử trùng hiện nay thường có tính độc cao gây ảnh hưởng trực tiếp hoặc gián tiếp cho sức khỏe con người và môi trường. Nhiều nghiên cứu đã chứng minh nano bạc không chỉ kháng khuẩn hiệu quả mà còn an toàn cho con người. Do đó, nano bạc đang được sử dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực khác nhau như y học, dược phẩm, mỹ phẩm, sinh học, nông nghiệp. Tuy nhiên, các báo cáo về ảnh hưởng của nano bạc trong giai đoạn khử trùng mẫu cấy thực vật vẫn còn hạn chế. Trong nghiên cứu này, các chất khử trùng thông dụng và nano bạc đã được sử dụng để khử trùng mẫu cây African violet (*Saintpaulia ionantha* H. Wendl.) với dãy nồng độ, thời gian khử trùng khác nhau để khảo sát khả năng khử trùng và cảm ứng mẫu cấy của nano bạc trong giai đoạn khử trùng mẫu. Sau khi khử trùng, chúng tôi tiến hành theo dõi và đánh giá sự sinh trưởng, phát triển của mẫu cấy qua các giai đoạn khác nhau. Kết quả cho thấy, mẫu cấy được khử trùng bằng nano bạc ở nồng độ 0,05% trong 15 phút cho hiệu quả tốt nhất mà không có tác động xấu đến sự sinh trưởng và phát triển của mẫu cấy. Nano bạc kích thích sự cảm ứng của mẫu cấy. Đây là nghiên cứu đầu tiên về khả năng khử trùng cũng như vai trò của nano bạc lên sự sinh trưởng và phát triển của cây African violet (*Saintpaulia ionantha* H. Wendl.).

Từ khóa: African violet, khử trùng, kích thích mẫu cấy, nano bạc, nuôi cấy *in vitro*

MỞ ĐẦU

Đưa mẫu từ môi trường *ex vitro* vào *in vitro* là giai đoạn vô cùng khó khăn bởi vì ở giai đoạn này mẫu cấy thông thường sẽ dễ bị nhiễm nấm, khuẩn, bị chết hoặc mẫu cấy phát triển chậm, gây tổn kém và mất thời gian cho người thực hiện công việc này. Có rất nhiều nguyên nhân dẫn đến tình trạng trên, một trong số đó là các thao tác trong quy trình khử trùng mẫu (Abdi *et al.*, 2012). Loại, nồng độ và thời gian khử trùng mẫu cấy chưa phù hợp là nguyên nhân chính dẫn đến sự thất bại trong giai đoạn vào mẫu ban đầu. Phần lớn các chất khử trùng mẫu đang được sử dụng hiện nay [HgCl_2 , $\text{Ca}(\text{ClO})_2$...] là các chất mang tính tẩy rửa cao, cũng như 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 nhưng

vẫn không hiệu quả trong khử trùng mẫu (Ines *et al.*, 2013). Ngoài ra, hầu hết các chất được sử dụng trong khử trùng mẫu cấy hiện nay đều có tác động xấu tới sức khỏe con người (WHO, 2000). Việc tìm ra một loại chất khử trùng mới an toàn cho sức khỏe, hiệu quả trong khử trùng mẫu và có tác dụng kích thích mẫu cấy là việc vô cùng cần thiết.

Bạc và các muối bạc đã được sử dụng phổ biến trong khử trùng y khoa nhờ đặc tính kháng nấm, khuẩn mà không gây ảnh hưởng đến sức khỏe và sự tăng sinh của các mô biểu bì (Abdi *et al.*, 2012). Mặt khác, ion bạc còn đóng vai trò quan trọng trong việc tác động phát sinh phôi soma, tạo chồi và tạo rễ (Bais *et al.*, 2000), ảnh hưởng tích cực trong điều chỉnh quá trình sinh lý bao gồm cả hình thái của mẫu cấy (Halevy *et al.*, 1981). Do đó, ion bạc đã được sử dụng trong nuôi cấy mô thực vật nhằm kích thích

mẫu cây cũng như hạn chế số lượng mẫu nhiễm (Russell *et al.*, 1994; Abdi *et al.*, 2012). Tuy nhiên, các ion bạc luôn đi kèm với các cation tồn tại ở dạng muối như bạc nitrate, bạc thiosulphate..., điều này ảnh hưởng đến hiệu quả hấp thu và khử trùng của ion bạc.

Để khắc phục tình trạng trên, công nghệ nano ra đời với các đặc tính ưu việt như: tăng hiệu quả tiếp xúc bề mặt nên ion dễ dàng bám dính xâm nhập vào tế bào vi sinh vật hay thực vật hơn, dễ dàng vận chuyển trong thực vật giúp chúng nhanh chóng được hấp thu và cho hiệu quả cao hơn, hứa hẹn sẽ mang lại nhiều thành công vượt trội trong lĩnh vực nuôi cấy mô tế bào thực vật (Husen, Siddiqi, 2014). Nhiều nghiên cứu chứng minh nano bạc có khả năng khử trùng đã được thực hiện, tuy nhiên chưa có nghiên cứu nào mang tính hệ thống và đầy đủ về ảnh hưởng của nano bạc trong việc khử trùng cũng như phát sinh hình thái của mẫu cây từ giai đoạn *ex vitro* đến giai đoạn *in vitro*.

Mục đích của nghiên cứu này nhằm khảo sát và đánh giá khả năng thay thế các chất khử trùng thông dụng bằng nano bạc trong giai đoạn khử trùng mẫu cây và cảm ứng sinh trưởng, phát triển của cây African violet.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Nguồn mẫu và nguyên liệu

Mẫu lá và cuống lá của những cây hoa African violet 6 tháng tuổi (10 cm) sinh trưởng và phát triển tốt, không bị sâu bệnh, được chọn làm nguồn mẫu ban đầu. Dung dịch nano bạc do Viện Công nghệ môi trường cung cấp có kích thước trung bình từ ≤ 20 nm (Chau *et al.*, 2008).

Môi trường nuôi cấy

Môi trường được sử dụng trong thí nghiệm là môi trường MS (Murashige, Skoog, 1962) có bổ sung 30 g/l sucrose và 9 g/l agar; pH môi trường được điều chỉnh về 5,8 trước khi hấp khử trùng bằng autoclave ở 121°C, 1 atm trong thời gian 30 phút và bổ sung các chất điều hòa sinh trưởng ở tỉ lệ khác nhau theo từng giai đoạn của thí nghiệm (Trần Trung Hiếu, 2006).

Phương pháp

Khảo sát vai trò của nano bạc trong khử trùng và cảm ứng mẫu cây

Lá African violet chọn từ vườn ươm được xử lý sơ bộ và khử trùng bằng dung dịch nano bạc với các nồng độ 0,025%, 0,05% và 0,1% có bổ sung vài giọt Tween-80 trong các khoảng thời gian 5 phút, 10 phút, 15 phút, 20 phút và 30 phút. Nghiệm thức đối chứng sử dụng chất khử trùng calcium hypochlorite $[Ca(ClO)_2]$ 10% trong thời gian 10 phút và dung dịch mercury chloride $HgCl_2$ 0,1% trong thời gian 5 phút (Phạm Tấn Trường, Võ Thị Bạch Mai, 2008).

Mẫu cây sau khi khử trùng được chia thành 4 loại mẫu cây gồm: mẫu cuống lá cắt ngang (dày 1 mm), mẫu cuống lá cắt dọc (dài 1 cm), mẫu lá có chứa gân chính giữa (0,5 x 0,5 cm), mẫu phiến lá (0,5 x 0,5 cm); và cây lên môi trường MS có bổ sung 0,1 mg/l BA + 0,1 mg/l NAA. Riêng mẫu lá, đặt mặt dưới tiếp xúc với môi trường.

Khảo sát vai trò của nano bạc trong phát sinh hình thái mẫu cây

Các mô sẹo (1 x 1 cm) thu từ thí nghiệm trước được cấy lên môi trường tái sinh chồi có bổ sung 0,2 mg/l BA (Trần Trung Hiếu, 2006). Sau 1 tháng, các chồi đơn *in vitro* cao khoảng 1 cm được tách ra từ các mẫu cây và được cấy lên môi trường tạo cây hoàn chỉnh có bổ sung 0,5 mg/l BA + 0,2 mg/l NAA + 1 g/l than hoạt tính (Trần Trung Hiếu, 2006). Thí nghiệm này nhằm theo dõi sự phát sinh hình thái của các mẫu cây được khử trùng bằng nano bạc so với chất khử trùng thông dụng.

Khảo sát ảnh hưởng của nano bạc lên khả năng sinh trưởng và phát triển của mẫu cây ở giai đoạn vườn ươm

Các cây African violet nuôi cấy *in vitro* được khử trùng bằng nano bạc và các chất khử trùng thông dụng được rửa sạch agar, sau đó trồng vào vỉ với giá thể là xơ dừa trộn với đất mùn theo tỉ lệ 1:1. Trong tuần đầu sau khi trồng, tưới phun sương 2 lần/ngày vào sáng sớm và chiều mát, sau đó tưới 1 lần/ngày. Thí nghiệm này nhằm so sánh khả năng sống sót của cây khử trùng bằng nano bạc với các chất khử trùng khác.

Điều kiện nuôi cấy

Thí nghiệm *in vitro* được tiến hành ở điều kiện nhiệt độ $25 \pm 2^\circ C$, thời gian chiếu sáng 16 giờ/ngày với cường độ chiếu sáng $45 \mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ dưới ánh sáng huỳnh quang và độ ẩm trung bình 55 – 60%. Thí nghiệm *ex vitro* được tiến hành ở điều kiện nhiệt độ 17 – 25°C, độ ẩm trung bình 70 – 80% và sử dụng ánh sáng tự nhiên có che sáng 40%.

Quan sát mô học

Mẫu chồi và mô sẹo được cắt mỏng và nhuộm kép, tạo thành tiêu bản theo phương pháp của Trần Công Khánh (1981). Quan sát dưới kính hiển vi quang học (Olympus, Japan) vật kính x10, x40.

Chỉ tiêu theo dõi và xử lý số liệu

Số chồi (chồi/mẫu), số lá (lá/mẫu), đường kính lá (cm), số rễ (rễ/mẫu), khối lượng tươi (g), khối lượng khô (g), tỉ lệ mẫu sống (%), đặc điểm hình thái của mẫu cấy. Tiến hành bố trí thí nghiệm theo phương pháp hoàn toàn ngẫu nhiên, đơn yếu tố. Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần, thí nghiệm vào mẫu được tiến hành trên 20 bình \times 1 mẫu/nghiệm thức. Các thí nghiệm *in vitro* được tiến hành trên 10 bình \times 3

mẫu/nghiệm thức. Thí nghiệm *ex vitro* được bố trí 30 cây trên 1 nghiệm thức. Số liệu được thu nhận sau 15 ngày đối với thí nghiệm khử trùng và 30 ngày với tất cả các thí nghiệm. Số liệu được xử lý bằng phần mềm Statgraphics Centurion XV theo phương pháp DMRT (Duncan, 1995) ở mức ý nghĩa 5%.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Vai trò của nano bạc trong khử trùng và cảm ứng mẫu cấy African violet

Sau 15 ngày nuôi cấy, kết quả ghi nhận được cho thấy khả năng khử trùng mẫu cấy của nano bạc và các chất khử trùng thông dụng là khác nhau (Bảng 1).

Bảng 1. Khả năng khử trùng mẫu cấy African violet của nano bạc và các chất khử trùng thông dụng sau 15 ngày nuôi cấy.

Chất khử trùng	Nồng độ (%)	Thời gian khử trùng (phút)	Tỉ lệ sống (%)		Tình trạng mẫu cấy
			Lá	Cuống	
Nano bạc	0,025	5	0,00 ^{ab}	0,00 ^e	Nhiễm
		10	0,00 ^e	0,00 ^e	Nhiễm
		15	0,00 ^e	0,00 ^e	Nhiễm
		20	25,00 ^d	25,00 ^c	Đa số mẫu nhiễm, mẫu xanh
		30	0,00 ^e	0,00 ^e	Chết
	0,05	5	0,00 ^e	0,00 ^e	Nhiễm
		10	56,67 ^{bc}	61,67 ^a	Vẫn còn mẫu nhiễm, mẫu lá nhiễm nhiều, mẫu xanh
		15	71,67 ^a	63,33 ^a	Vẫn còn mẫu nhiễm, mẫu xanh
		20	75,00 ^a	46,67 ^b	Vẫn còn mẫu nhiễm, mẫu xanh, mẫu cuống chết nhiều
		30	0,00 ^e	0,00 ^e	Chết
	0,1	5	25,00 ^d	18,33 ^d	Đa số mẫu chết, mẫu xanh
		10	0,00 ^e	0,00 ^e	Chết
		15	0,00 ^e	0,00 ^e	Chết
		20	0,00 ^e	0,00 ^e	Chết
		30	0,00 ^e	0,00 ^e	Chết
HgCl ₂	0,1	5	53,33 ^c	48,33 ^b	Vẫn còn mẫu nhiễm, mẫu xanh. Mẫu cuống chết nhiều
Ca(ClO) ₂	10	10	60,00 ^b	50,00 ^b	Vẫn còn mẫu nhiễm, mẫu xanh hơi ngả vàng Mẫu cuống chết nhiều

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 DMRT.

Kết quả cho thấy chỉ 3 ngày sau nuôi cấy, tất cả mẫu cấy ở nghiệm thức khử trùng bằng nano bạc ở nồng độ 0,025% trong thời gian 5 phút đã xuất hiện nấm và vi khuẩn. Trong khi đó, các mẫu cấy khử

trùng bằng nano bạc ở nồng độ 0,1% trên 5 phút hóa nâu.

Đến ngày thứ 7, mẫu cấy được khử trùng bằng nano bạc và HgCl₂ đã bắt đầu cảm ứng với môi

trường trong khi đó mẫu cây khử trùng bằng $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ sau 15 ngày mới có dấu hiệu cảm ứng. Khi khử trùng bằng nano bạc, nồng độ 0,05% trong thời gian 15 phút cho kết quả khử trùng tốt nhất ở cả mẫu lá (71,67%) và cuống lá (63,33%). Tỷ lệ này cao hơn khi so sánh với khử trùng bằng HgCl_2 (5 phút) trên mẫu lá (53,33%) và cuống lá (48,33%) African violet. Tương tự, kết quả trên cũng có sự khác biệt rõ rệt khi sử dụng chất khử trùng $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ (10 phút) để khử trùng mẫu lá (60,00%) và cuống lá (50,00%) African violet.

Nghiên cứu của Phạm Tấn Trường và Võ Thị Bạch Mai (2008) đã chỉ ra rằng mẫu cây African violet khi khử trùng bằng HgCl_2 0,1% trong thời gian 5 phút và $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ 10% trong 10 phút sẽ đạt tỷ lệ sống sót 50%, có thể thấy tỷ lệ này thấp hơn khi so sánh với nano bạc.

Sau 30 ngày nuôi cấy, kết quả cho thấy 100% các mẫu cây sống sót từ giai đoạn khử trùng có sự cảm ứng rõ rệt với môi trường nuôi cấy. Quan sát hình thái mẫu cây cảm ứng tạo thành (Hình 1 và Bảng 2), nhận thấy hầu hết các mẫu cây lá và mẫu cuống lá cắt dọc có xu hướng tạo sẹo xốp có khả năng tạo phôi (Hình 1i), nhiều sơ khởi chồi (Hình 1e). Trong khi, các mẫu cây cuống lá cắt ngang lại có sự khác biệt rõ ràng về hình thái cảm ứng giữa các nghiệm thức. Cụ thể, mẫu cây cuống lá cắt ngang khử trùng bằng các chất khử trùng thông dụng hình thành khối mô sẹo cứng màu xanh nhạt (HgCl_2) hoặc vàng nâu [$\text{Ca}(\text{ClO})_2$], khác biệt với mô sẹo xốp có sơ khởi chồi, chồi hình thành sớm (Hình 1f, g, h) và phát triển nhanh vượt trội khi khử trùng bằng nano bạc (Hình 1a3, b3, c3, d3).

Ngoài ra, có thể quan sát thấy các mẫu cây ở nghiệm thức sử dụng $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ có sự ức chế so với mẫu cây khử trùng bằng HgCl_2 hoặc khử trùng bằng nano bạc. Các mẫu cây được khử trùng bằng HgCl_2 phát sinh hình thái tương tự nhưng có phần phát triển chậm hơn các mẫu cây khử trùng bằng nano bạc. Đặc biệt, mẫu phiến lá và lá chứa gân chính khử trùng bằng nano bạc xuất hiện rõ rệt, các chồi cao vượt trội (Hình 1c3, d3).

Nano bạc làm tăng cường hoạt tính hóa học của bạc do cấu trúc đạt kích thước tới hạn, điều này sẽ cho phép một lượng lớn nguyên tử có thể tương tác với mục tiêu làm nâng cao hiệu quả tác động bề mặt. Mặt khác, do tác dụng theo nhiều cơ chế khác nhau nên nano bạc có khả năng diệt khuẩn khá hiệu quả (Chaloupka *et al.*, 2010). Công dụng của nano bạc trong nuôi cấy mô tế bào thực vật để ngăn chặn

nhễm khuẩn đã được nghiên cứu trên nhiều đối tượng khác nhau (Sondi, Salopek, 2004; Kim *et al.*, 2007; Navarro *et al.*, 2008). Tuy nhiên, nồng độ, thời gian và phương pháp xử lý nano bạc của mỗi loại cây trồng là khác nhau, điều này đã được báo cáo qua nhiều công bố (Rostami, Shahsavari, 2009; Gharati *et al.*, 2010; Fakhrfeshani *et al.*, 2012).

Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng nano bạc (kích thước > 20 nm) trong khử trùng bề mặt mẫu cây African violet. Trước đó, tác dụng khử trùng bề mặt mẫu cây của nano bạc đã được báo cáo đầu tiên bởi Abdi và đồng tác giả (2012) trong khử trùng bề mặt mẫu cây *Valeriana officinalis* L. Theo đó, các tác giả đã kết luận rằng sử dụng nano bạc (kích thước 35 nm) nồng độ 0,012% trong 180 phút sẽ cho kết quả khử trùng tốt nhất. Kết quả này tương đồng với kết quả của chúng tôi về khả năng khử trùng của nano bạc, tuy có sự khác biệt về kích thước hạt nano, nồng độ và thời gian khử trùng.

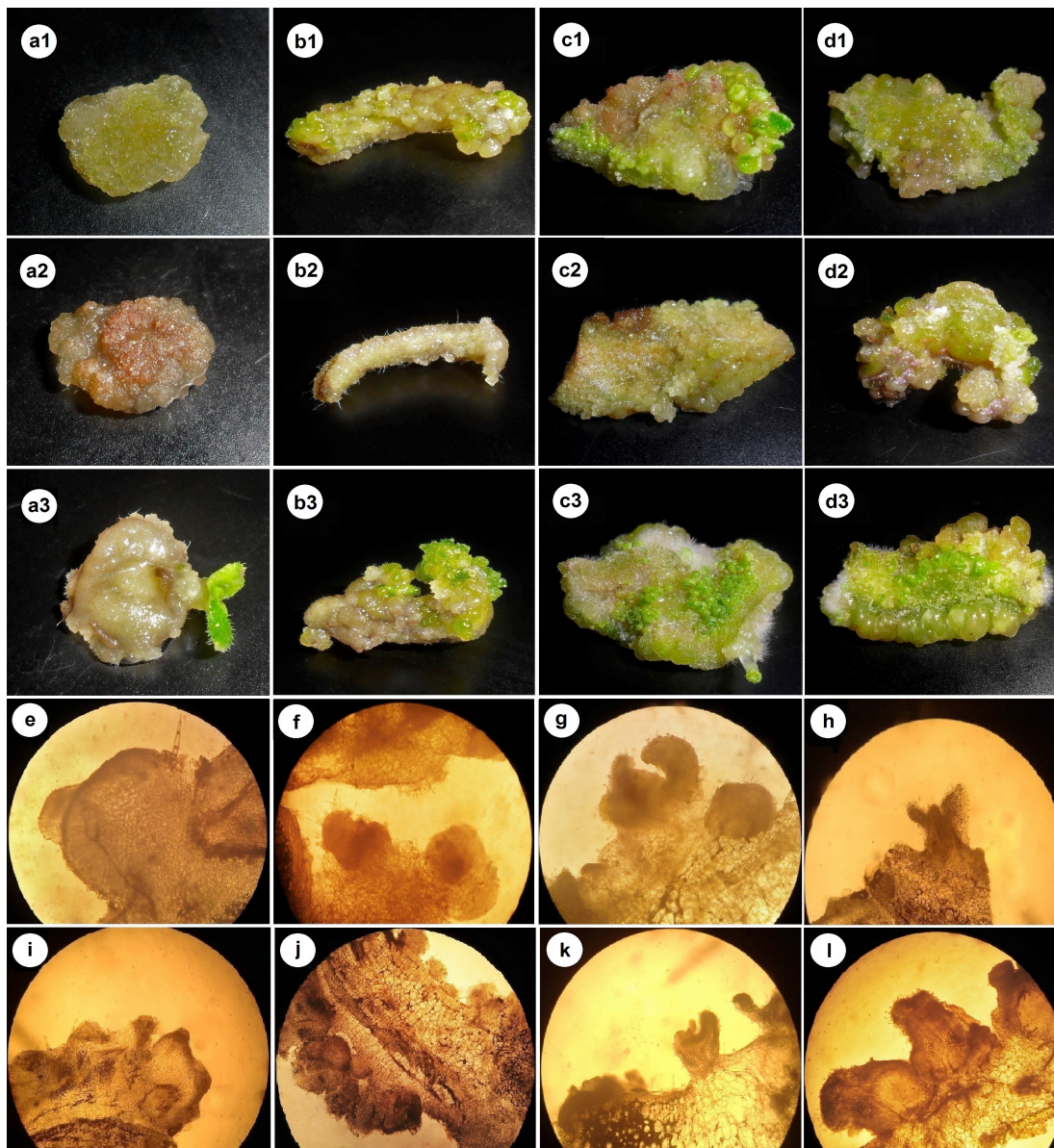
Gần đây, Dương Tấn Nhựt và đồng tác giả (2017) đã bổ sung nano bạc vào môi trường nuôi cấy hoa cúc để thay thế giai đoạn hấp khử trùng mà không gây ảnh hưởng đến sự sinh trưởng và phát triển của cây. Vì thế, nano bạc được đánh giá là một chất khử trùng hiệu quả và an toàn với thực vật.

Trong khi chất điều hòa sinh trưởng liên quan trực tiếp đến giai đoạn đầu của quá trình tái sinh, thì mẫu cây và tác động ức chế/ kích thích của các chất khử trùng lên mẫu cây lại có vai trò như chiếc chìa khóa điều khiển tốc độ cảm ứng và khả năng phát triển của mẫu cây. Nghiên cứu này đã làm rõ vai trò của chất khử trùng đến hình thái cảm ứng của mẫu cây. Kích thước nhỏ của các hạt nano giúp chúng tăng hiệu quả tương tác tiếp xúc bề mặt, dễ dàng xâm nhập, tác động tận sâu bên trong tế bào (Sondi, Salopek, 2004; Kim *et al.*, 2007; Navarro *et al.*, 2008; Nasser *et al.*, 2013) tăng hiệu quả khử trùng, tạo ra sự khác biệt trong cảm ứng và phát triển mẫu cây.

Mặt khác, tại các phòng thí nghiệm hiện nay chủ yếu sử dụng các loại natri hypochlorite, calcium hypochlorite, mercury chloride,... có tính tẩy rửa và ăn mòn cao nên có khả năng gây độc và ức chế mẫu cây (Ines *et al.*, 2013) đây là lý do chính khiến các mẫu cây khi sử dụng các chất khử trùng thông dụng cảm ứng chậm hơn so với mẫu cây ở nghiệm thức sử dụng nano bạc. Ngoài ra, khi có sự tác động của nano bạc, gene mã hóa cho auxin trong tế bào thực vật sẽ được kích thích (Syua *et al.*, 2014) khiến lượng auxin nội sinh

tăng lên, do đó các mẫu cấy ở nghiệm thức sử dụng nano bạc xuất hiện rễ tơ, chồi cao và rõ ràng

hơn so với khối mô sẹo chứa sơ khởi chồi ở các nghiệm thức còn lại.



Hình 1. Sự cảm ứng khác nhau giữa các mẫu cấy khử trùng bằng nano bạc và các chất khử trùng thông dụng sau 30 ngày nuôi cấy. Ghi chú: (a1, a2, a3) Mẫu cuống lá cắt ngang [lần lượt khử trùng bằng: HgCl_2 , $\text{Ca}(\text{ClO})_2$, nano bạc], (b1, b2, b3) Mẫu cuống lá cắt dọc [lần lượt khử trùng bằng: HgCl_2 , $\text{Ca}(\text{ClO})_2$, nano bạc], (C) Mẫu phiến lá [lần lượt khử trùng bằng: HgCl_2 , $\text{Ca}(\text{ClO})_2$, nano bạc], (D) Mẫu lá chứa gân chính [lần lượt khử trùng bằng: HgCl_2 , $\text{Ca}(\text{ClO})_2$, nano bạc], (E) Khối mô sẹo có sự hình thành sơ khởi chồi quan sát dưới vật kính x40, (F) Sơ khởi chồi phát triển thành cấu trúc chồi quan sát dưới vật kính x40, (G) Chồi chưa phân biệt rõ mô phân sinh đỉnh quan sát dưới vật kính x40, (H) Chồi có cấu trúc hoàn chỉnh với mô phân sinh đỉnh chồi và hai lá mầm quan sát dưới vật kính x10, (I) Khối sẹo xốp có khả năng hình thành phôi quan sát dưới vật kính x10, (J) Phôi soma hình cầu phát sinh thông qua mô sẹo quan sát dưới vật kính x40, (K) Phôi hình thủy lồi phát sinh thông qua mô sẹo quan sát dưới vật kính x40, (L) Phôi hai lá mầm phát sinh thông qua mô sẹo quan sát dưới vật kính x40.

Bảng 2. Sự phát sinh hình thái khác nhau giữa nano bạc và chất khử trùng thông dụng sau 30 ngày nuôi cấy.

	HgCl ₂	Ca(ClO) ₂	Nano bạc
Cuống lá cắt ngang	Khối mô sẹo cứng xanh	Khối mô sẹo cứng vàng nâu	Mô sẹo xốp trắng, cấu trúc rời rạc, xuất hiện một vài sơ khởi chồi, từ diệp lớn xanh đậm. Ít sẹo và chồi
Cuống lá cắt dọc	Mẫu cấy xanh nhạt. Sẹo hình thành nhiều sơ khởi chồi, xuất hiện phôi hình cầu	Mẫu cấy vàng nhạt. Ít sẹo, các sẹo hình thành sơ khởi chồi. Không quan sát thấy phôi	Mô sẹo xốp xanh, cấu trúc rời rạc, hình thành nhiều sơ khởi chồi và chồi qua mô sẹo. Xuất hiện các phôi hình cầu, phôi hình thủy lôi, phôi 2 lá mầm
Phiến lá	Mẫu cấy xanh. Sẹo xốp có khả năng tạo phôi, hình thành nhiều sơ khởi chồi và chồi qua mô sẹo, xuất hiện ít phôi soma hình cầu phát sinh gián tiếp qua mô sẹo	Mẫu cấy vàng xám, có mô chết, sẹo xốp có khả năng tạo phôi, hình thành nhiều sơ khởi chồi qua mô sẹo, xuất hiện ít phôi soma hình cầu phát sinh gián tiếp qua mô sẹo	Mẫu cấy xanh. Sẹo xốp có khả năng tạo phôi, hình thành nhiều sơ khởi chồi và chồi qua mô sẹo, xuất hiện nhiều phôi hình cầu và thủy lôi, phôi soma phát sinh gián tiếp qua mô sẹo, nhiều chồi hình thành từ phôi, nhiều rễ tơ
Lá có chứa gân chính	Hình thành sẹo xốp có khả năng tạo phôi trên cả mô lá và gân lá, hình thành nhiều sơ khởi chồi và chồi qua mô sẹo ở mô lá	Hình thành sẹo xốp có khả năng tạo phôi trên mô lá, gân lá không phát sinh hình thái, hình thành nhiều sơ khởi chồi và chồi qua mô sẹo ở mô lá	Hình thành sẹo xốp có khả năng tạo phôi trên cả mô lá và gân lá, hình thành nhiều sơ khởi chồi và chồi qua mô sẹo ở mô lá, xuất hiện rễ tơ

Trong nghiên cứu này, khi so sánh hình thái phát sinh từ các loại mẫu cấy, có thể nhận thấy mẫu cấy lá phát triển ổn định, khó bị ức chế hơn mẫu cấy cuống. Quan sát giải phẫu mô học, nhận thấy các tế bào mô vách và bó mạch libe ở cuống lá hay gân chính sẽ cho lượng sẹo xốp có hình thành sơ khởi chồi thấp so với tế bào mô đậu ở lá, nên mẫu lá thích hợp sử dụng trong công tác nhân giống hơn. Tóm lại, sử dụng nano bạc ở nồng độ 0,05% khử trùng mẫu lá trong 15 phút cho hiệu quả khử trùng tối ưu nhất, mẫu cây cảm ứng nhanh và không có dấu hiệu ức chế.

Vai trò của nano bạc trong phát sinh hình thái mẫu cấy

Sau 30 ngày nuôi cấy, nhìn chung, tổng số chồi tái sinh của hai nghiệm thức sử dụng HgCl₂ và Ca(ClO)₂ không có khác biệt về mặt thống kê. Trong khi đó, các cụm chồi tái sinh từ mẫu cấy African violet khử trùng bằng nano bạc lại có sự khác biệt rõ rệt về hình thái và sự phát triển (Bảng 3 và Hình 2). Cụm chồi tái sinh từ nghiệm thức sử dụng HgCl₂ gồm các chồi lớn (1 – 1,5 cm), rất ít chồi vừa (0,5 – 1 cm) và nhỏ (< 0,5 cm), chồi xanh, cụm chồi phát triển với xu hướng tăng kích thước các chồi ban đầu mà không tăng số lượng chồi như ở nghiệm thức sử dụng nano bạc. Đối với cụm chồi tái sinh từ mẫu cấy khử trùng bằng Ca(ClO)₂, các chồi đơn chủ yếu là các chồi có kích thước vừa (0,5 – 1 cm). Nhưng nhìn chung, về hình thái cụm chồi, cụm chồi của hai nghiệm thức đối chứng trên có sự tương đồng nhất

định, khác hoàn toàn với cụm chồi của nghiệm thức sử dụng nano bạc (Hình 2 và Bảng 3).

Cụ thể hơn, tổng số chồi phát sinh từ mẫu cấy khử trùng bằng nano bạc (88 chồi) khác biệt đáng kể so với cụm chồi thu từ mẫu cấy khử trùng bằng HgCl₂ (37,67 chồi), Ca(ClO)₂ (41,67 chồi). Tuy nhiên, số chồi kích thước 1 – 1,5 cm ở nghiệm thức HgCl₂ cao hơn (7,33 chồi) trong khi ở nghiệm thức sử dụng nano bạc lại không có chồi đạt kích thước này. Bước vào giai đoạn tái sinh chồi, yếu tố quan trọng nhất là hệ số nhân chồi; vì vậy, có thể kết luận rằng cụm chồi tái sinh từ mẫu cấy khử trùng bằng nano bạc sinh trưởng và phát triển tốt nhất ở giai đoạn này.

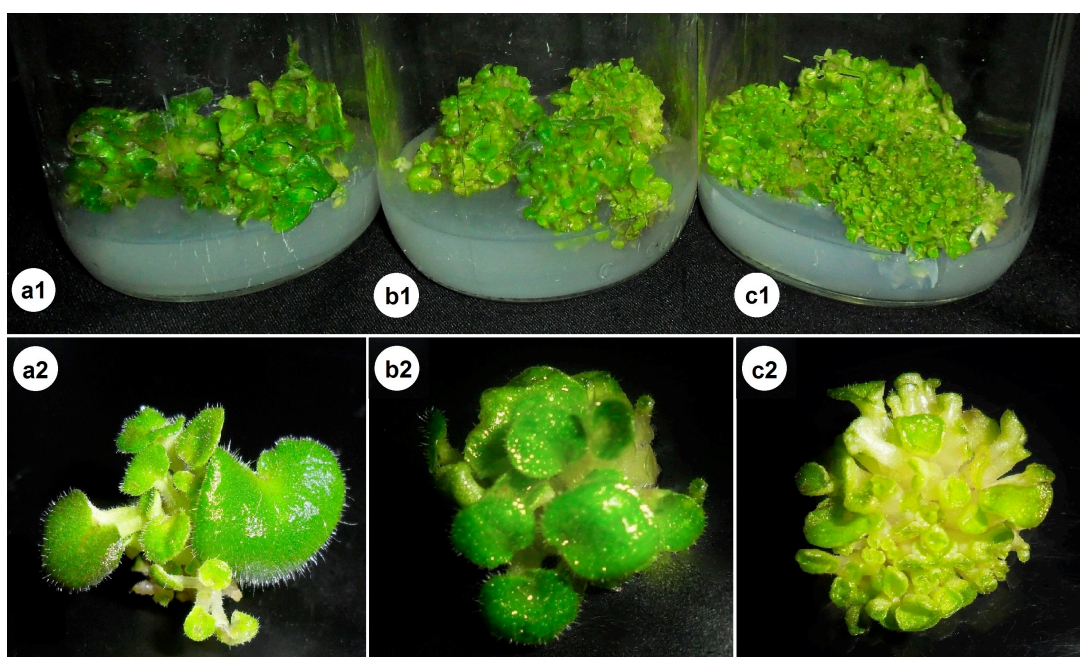
Khác với giai đoạn tái sinh chồi, hình thái cây ở các nghiệm thức trong giai đoạn tạo cây hoàn chỉnh phát triển tương đối đồng đều. Sau 30 ngày nuôi cấy ở giai đoạn này, các chỉ tiêu về số lá, chiều cao cây, số rễ, chiều dài rễ giữa các nghiệm thức không có sự khác biệt theo ý nghĩa thống kê (Bảng 4).

Ion bạc được biết đến như là chất ức chế sự tổng hợp ethylene (Halevy, 1981), gia tăng sự tái sinh ở thực vật (Songstad *et al.*, 1988, Chi *et al.*, 1991) trong điều kiện nuôi cấy *in vitro*. Sự ảnh hưởng của bạc trong nhân giống *in vitro* cũng đã được nghiên cứu bởi Sharma *et al.* (2008) trên đối tượng *Capsicum frutescens* Mill, các mô phản ứng đồng thời làm tăng chiều dài chồi và số chồi tối đa khi có sự tác động của bạc.

Bảng 3. Sự sinh trưởng, phát triển của cụm chồi tái sinh từ mẫu cấy lá cây African violet khử trùng bằng nano bạc so với các chất khử trùng thông dụng sau 30 ngày nuôi cấy.

Chất khử trùng	Khối lượng tươi (g)	Khối lượng khô (g)	Số chồi cao < 0,5 cm	Số chồi cao 0,5 – 1 cm	Số chồi cao 1 – 1,5 cm	Tổng số chồi (chồi/mẫu)
HgCl ₂	3,006 ^{b*}	0,095 ^c	6,00 ^b	24,33 ^c	7,33 ^a	37,67 ^b
Ca(ClO) ₂	2,725 ^c	0,103 ^b	9,67 ^b	28,33 ^b	3,67 ^b	41,67 ^b
Nano bạc	4,117 ^a	0,233 ^a	52,00 ^a	36,00 ^a	0,00 ^c	88,00 ^a

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 DMRT.



Hình 2. Mẫu lá cây African violet khử trùng bằng nano bạc và các chất khử trùng thông dụng trong giai đoạn tái sinh chồi sau 30 ngày nuôi cấy. Ghi chú: (a1,a2) Hình thái cụm chồi African violet in vitro tái sinh từ mẫu lá khử trùng bằng HgCl₂, (b1,b2) Hình thái cụm chồi African violet in vitro tái sinh từ mẫu lá khử trùng bằng Ca(ClO)₂, (c1,c2) Hình thái cụm chồi African violet in vitro tái sinh từ mẫu lá khử trùng bằng nano bạc.

Bảng 4. Sự sinh trưởng, phát triển và tạo cây hoàn chỉnh của chồi tái sinh từ mẫu cấy lá cây African violet khử trùng bằng nano bạc so với các chất khử trùng thông dụng.

Chất khử trùng	Khối lượng tươi (g)	Khối lượng khô (g)	Chiều cao (cm)	Số lá	Đường kính lá (cm)	Số rễ	Chiều dài rễ (cm)
HgCl ₂	1,149 ^{a*}	0,052 ^a	3,43 ^a	10 ^a	0,97 ^a	22,33 ^a	1,40 ^a
Ca(ClO) ₂	1,137 ^a	0,054 ^a	3,43 ^a	10 ^a	0,97 ^a	23,67 ^a	1,47 ^a
Nano bạc	1,134 ^a	0,055 ^a	3,46 ^a	10 ^a	1,03 ^a	23,67 ^a	1,50 ^a

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 DMRT.

Tác động của nano bạc lên sự phát triển của mẫu cây cũng đã được Saber và các đồng tác giả (2014) báo cáo, các tác giả nhận thấy hàm lượng phenol tiết ra trong nuôi cấy hoa hồng giảm khi sử dụng nano bạc sau khử trùng bề mặt mẫu cây và giúp mẫu cây phát triển ổn định. Nghiên cứu của Dương Tấn Nhựt và đồng tác giả (2014) đã cho thấy nano bạc có kích thích sự sinh trưởng và phát triển của cây cúc, dâu tây, đồng tiền nuôi cấy *in vitro*. Có rất nhiều báo cáo về ảnh hưởng tích cực và tiêu cực đến sự tăng trưởng – phát triển của thực vật (Syua *et al.*, 2014). Tuy nhiên, ở nghiên cứu này, nano bạc có tác động tích cực đến sự phát sinh hình thái tạo chồi.

Hiện nay, có rất nhiều nghiên cứu về hấp thụ, vận chuyển và tích lũy các loại nano kim loại trong hệ thống cây trồng. Các nano kim loại có thể dễ dàng thâm nhập vào lớp biểu bì gốc, khí khổng hoặc nội mạc tế bào. Cuối cùng, chúng di chuyển vào mạch xylem theo phloem đến và tích lũy tại các bộ phận của cây (Sondi, Salopek, 2004; Kim *et al.*, 2007; Navarro *et al.*, 2008). Kurepa và đồng tác giả (2010) đã nhận thấy sự tích lũy của hạt nano trong các tế bào của rễ và lá cây *Arabidopsis* khi nghiên cứu với nano TiO₂. Trong một nghiên cứu khác về sự hấp thụ của hạt nano, Coredor và đồng tác giả (2009) cũng cho kết quả tương tự với nano Fe₃O₄ ở cây bí đỏ. Các ion kim loại đóng vai trò cơ bản trong sinh học bằng cách sử dụng các nguyên tố thiết yếu trong quá trình hô hấp, tăng trưởng, sao chép gen,... Tất cả các sự thay đổi về nồng độ ion kim loại trong tế bào đều có thể dẫn đến sự hình thành các tín hiệu ion kim loại tương trưng khác nhau ảnh hưởng đến chức năng của tế bào (Dean *et al.*, 2012). Đây có thể chính là nguyên nhân khiến cụm chồi thu được từ mẫu lá khử trùng bằng nano bạc phát triển khác biệt hoàn toàn với nghiệm thức của các chất khử trùng truyền thống, do hàm lượng ion bạc trong quá trình khử trùng bằng nano bạc đã thâm thấu sâu và tích trữ ở

nội bào mẫu cây.

Trong quá trình sinh trưởng, nano kim loại đã được chuyển hóa và sử dụng để hỗ trợ cho các quá trình trao đổi chất (Larue *et al.*, 2014). Với kết quả thu được trong giai đoạn tạo cây hoàn chỉnh, có thể đặt giả thiết: Sau một khoảng thời gian nhất định, các nano bạc đã được tích trữ sẽ dần được sử dụng hết, vì thể hình thái cây con tạo thành của các nghiệm thức ở giai đoạn tiếp theo không có xuất hiện sự khác biệt.

Ảnh hưởng của nano bạc lên khả năng sinh trưởng và phát triển của cây ở giai đoạn vườn ươm

Hiệu quả khử trùng và kích thích mẫu cây trong giai đoạn vào mẫu ban đầu của nano bạc so với các chất khử trùng thông dụng đã được chứng minh. Tuy nhiên, để củng cố thêm khả năng thay thế của nano bạc so với các chất khử trùng thông dụng, các cây African violet được trồng thử nghiệm ở giai đoạn *ex vitro*.

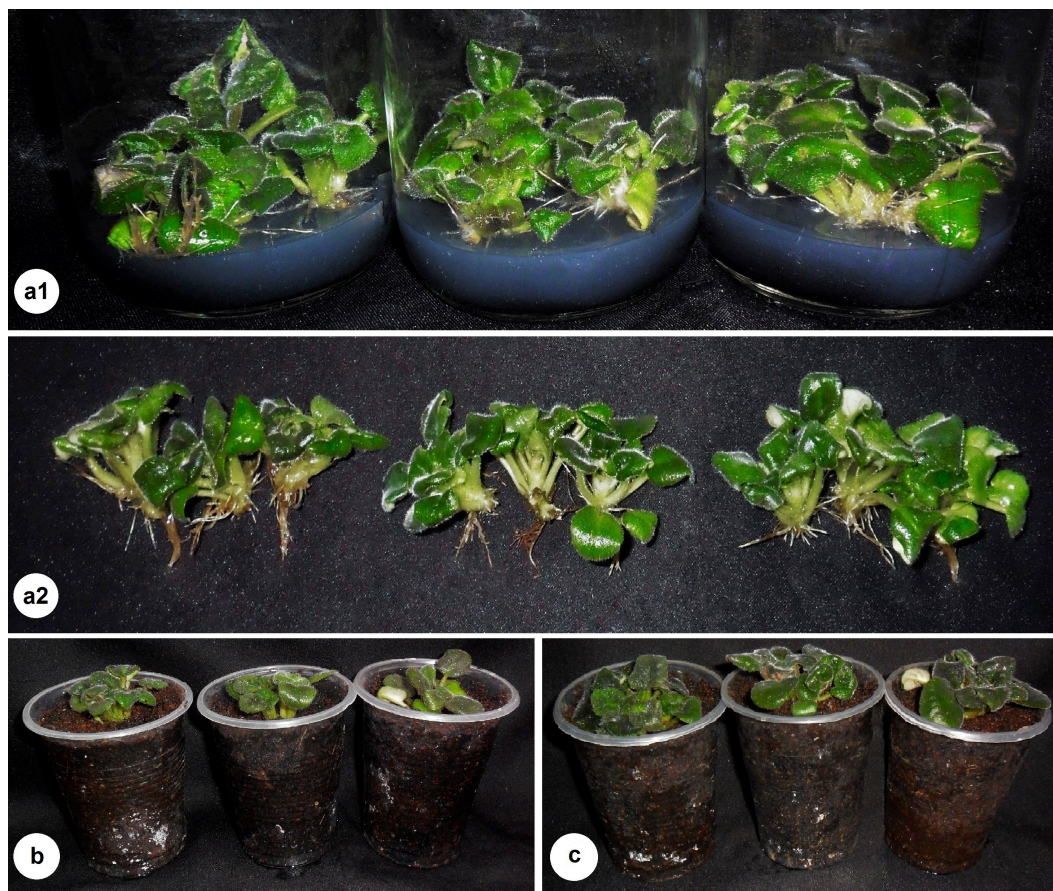
Kết quả ghi nhận được cho thấy, sau 4 tuần ở giai đoạn vườn ươm, các chỉ tiêu theo dõi của nghiệm thức nano bạc như số lá (10 lá), số rễ (23,67 rễ), chiều dài rễ (1,5 cm), chiều cao cây (3,46 cm) hoàn toàn không có sự khác biệt giữa các cây của các nghiệm thức khác (Bảng 5). Kết quả này tương tự như ở giai đoạn tạo cây hoàn chỉnh của thí nghiệm trước đó.

Cây của các nghiệm thức đều có tỉ lệ sống sót 100% cho khả năng thích nghi và phát triển tốt, khỏe mạnh, cứng cáp, lá đều và xanh. Các lá có xu hướng vươn dài và tỏa ra rất đẹp (Hình 3). Kết quả này, một lần nữa có thể khẳng định về khả năng thay thế và sự an toàn của chất khử trùng nano bạc trong nhân giống cây African violet.

Bảng 5. Sự thích nghi, sinh trưởng của mẫu cây lá cây African violet khử trùng bằng nano bạc so với các chất khử trùng thông dụng sau 4 tuần ở điều kiện *ex vitro*.

Chất khử trùng	Tỉ lệ sống sót (%)	Chiều cao (cm)	Số lá	Đường kính lá (cm)	Số rễ	Chiều dài rễ (cm)
HgCl ₂	100 ^a	4,45 ^a	15,00 ^a	1,97 ^a	34,33 ^a	1,97 ^a
Ca(ClO) ₂	100 ^a	4,43 ^a	15,00 ^a	1,97 ^a	32,67 ^a	1,97 ^a
Nano bạc	100 ^a	4,47 ^a	15,00 ^a	2,03 ^a	33,67 ^a	1,97 ^a

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 DMRT.



Hình 3. Cây con tái sinh từ mẫu cây lá cây African violet khử trùng bằng nano bạc so với các chất khử trùng thông dụng không có sự khác biệt. Ghi chú: [từ trái qua phải, HgCl_2 , $\text{Ca}(\text{ClO})_2$, nano bạc](a1,a2) Mẫu cây cây African violet khử trùng bằng nano bạc và các chất khử trùng thông dụng trong giai đoạn tạo cây hoàn chỉnh, (b) Cây African violet trồng ở điều kiện vườn ươm, (c) Cây African violet sau 30 ngày trồng tại vườn ươm ở các nghiệm thức chất khử trùng khác nhau.

KẾT LUẬN

Kết quả cho thấy có thể sử dụng nano bạc nồng độ 0,05% trong 15 phút để thay thế các chất khử trùng thông dụng trong nhân giống cây hoa African violet. Ngoài ra, nano bạc kích thích mẫu cây cắm ứng nhanh, tác động đến sự phát sinh hình thái, mà hoàn toàn không gây ra bất kỳ tác động tiêu cực nào đến mẫu cây.

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 hạt 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 kinh tế cao ở Việt nam" thuộc Hợp phần IV: "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

- Abdi G (2012) Evaluation the potential of Nano silver for removal of bacterial contaminants in valerian (*Valeriana officinalis* L.) tissue culture. *J Biol Environ* 6(17): 199–205.
- Bais HP, Sudha G, Suresh B, Ravishankar GA (2000) AgNO_3 influences *in vitro* root formation in *Decalepisha miltonii* Wight and Arn. *Curr Sci* 79: 894–898.
- Bilkey PC, Cocking EC (1982) A non-enzymatic method for isolation of protoplasts from callus of *Saintpaulia ionantha* (African violet). *Plant Physiol* 105: 285–288.

- Chaloupka K, Malam Y, Seifalian AM (2010) Nanosilver as a new generation of nanoparticle in biomedical applications. *Trends Biotechnol* 28(11): 580–588.
- Chi GL, Pua EC, Goh CJ (1991) Role of ethylene on de novo shoot regeneration from cotyledonary explants of *Brassica campestris* L. Pekinesis (Lour) Olsson *in vitro*. *Plant Physiol* 96: 178–183.
- Corredor E, Testillano PS, Coronado M, Gonzalez-Melendi P, Fernandez-Pacheco R, Marquina C, Ibarra MR, de la Fuente JM, Rubiales D, Perez-de-Luque A, Risueno MC (2009) Nanoparticle penetration and transport in living pumpkin plants: *in situ* subcellular identification. *BMC Plant Biology* 9–45.
- Dean KM, Qin Y, Palmer AE (2012) Visualizing metal ions in cells: an overview of analytical techniques, approaches, and probes. *Biochim Biophys Acta* 1823(9): 1406–1415.
- Ducan DB (1995) Multiple range and multiple F test, *Biometrics* 11: 1–42.
- Fakhrfeshani M, Bagheri A, Sharifi A (2012) Disinfecting effects of nano silver fluids in *Gerbera* (*Gerbera jamesonii*) capitulum tissue culture. *Adv Horti Sci* 6(17): 121–127.
- Halevy A, Mayak S (1981) Senescence and postharvest physiology of cut flower – part 2. *Hortic Rev* 3: 59–143.
- Husen A, Siddiqi KS (2014) Phytosynthesis of nanoparticles: concept, controversy and application. *Nano Res Lett* 9–229.
- Ines M, Krunoslav D, Vesna T, Marija V, Ankica P, Zlatko C, Boris P, Zorica J (2013) *In vitro* sterilization procedures for micropropagation of Oblaciska sour cherry. *J Agric Sci* 58(2): 117–126.
- Kim JS, Kuk E, Yu KN, Kim J, Park SJ, Lee HJ, Kim SH, Park YK, Park YH, Hwang CY, Kim YK, Lee SY, Jeong DH, Cho MH (2007) Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine* 3: 95–101.
- Kurepa J, Paunesku T, Vogt S, Arora H, Rabatic BM, Lu J, Wanzer MB, Woloschak GE, Smalle JA (2010) Uptake and distribution of ultrasmall anatase TiO₂ Alizarin red S nanoconjugates in *Arabidopsis thaliana*. *Nano Lett* 10(7): 2296–2302.
- Larue C, Castillo-Michel H, Sobanska S, Cécillon L, Bureau S and Barthès V (2014) Foliar exposure of the crop *Lactuca sativa* to silver nanoparticles: evidence for internalization and changes in Ag speciation. *J Hazard Mater* 264: 98–106.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiol* 15: 473–497.
- Nasser M, Sepideh ZV, Sajjad K (2013) Plant *in vitro* culture goes nano: nanosilver-mediated decontamination of *ex vitro* explants. *J Nanomed Nanotechnol* 4(2): 161–164.
- Navarro EAB, Behra R, Hartman NB, Filser J, Miao AJ, Quiagg A, Santschi PH, Sigg L (2008) Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nano particles to algae, plants, and fungi. *Ecotoxicology* 17: 372–386.
- Chau NH, Bang LA, Buu NQ, Dung TTN, Ha HT, Quang DV (2008) Some results in manufacturing of nanosilver and investigation of its application for disinfection. *J Chem Chem Eng* 9(2): 251–258.
- Phạm Tấn Trường, Võ Thị Bạch Mai (2008) Nhân giống vô tính cây *Saintpaulia* bằng phương pháp *in vitro*. *Tạp chí Phát triển Khoa học và Công nghệ* 11(7): 61–66.
- Robert K (1882) The etiology of tuberculosis. *Berl Tierarztl Wochenschr* 19(15): 221–230.
- Rodríguez FI, Esch JJ, Hall AE, Binder BM, Schaller GE, Bleeker AB (1999) A copper cofactor for the ethylene receptor ETR1 from *Arabidopsis*. *Science* 283(5404): 996–998.
- Rostami AA, Shahsavari A (2009) Nano-Silver particles eliminate the *in vitro* contaminations of olive 'Mission' explants. *Asian J Plant Sci* 8(7): 505–509.
- Russell AD, Hugo WB (1994) Antimicrobial activity and action of silver. *Prog Med Chem* 31: 351–371
- Saber S, Ali B, Marzieh A, Shahriar H, Mohammad MA (2014) The effects of different concentrations of Nano-Silver on elimination of Bacterial contaminations and phenolic exudation of Rose (*Rosa hybrida* L.). *Int J Farm All Sci* 3(1): 50–54.
- Sharma A, Kumar V, Giridhar P, Ravishankar GA (2008) Induction of *in vitro* flowering in *Capsicum frutescens* under the influence of silver nitrate and cobalt chloride and pollen transformation. *Electron J Biotechnol* 11(2): 84–89.
- Sondi I, Salopek-Sondi B (2004) Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study as a model for gram-negative bacteria. *J Colloid Interface Sci* 275: 177–182.
- Songstad DD, Ducan DR, Widholm JM (1988) Effect of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid silver nitrate and norbornadiene on plant regeneration from maize callus cultures. *Plant Cell Rep* 7(4): 262–265.
- Syua YY, Hungb JH, Chenb JC, Chuang HW (2014) Impacts of size and shape of silver nanoparticles on *Arabidopsis* plant growth and gene expression. *Plant Physiol Biochem* 83(2014): 57–64.
- Trần Công Khánh (1981). *Thực tập hình thái và giải phẫu thực vật*. NXB Đại học và Trung học chuyên nghiệp. HN: 44–105.
- Trần Trung Hiếu (2006) Nuôi cấy *in vitro* mô lớp mỏng tế bào lá *Saintpaulia ionantha* H. WendL., để thâm dò sự chuyển gen bằng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*. *Luận án thạc sĩ khoa học chuyên ngành vi sinh*. Trường Đại học Khoa học tự nhiên - Đại học Quốc gia Thành phố

STUDY ON SILVER NANOPARTICLES AS A NOVEL EXPLANT DISINFECTANT FOR MICROPROPAGATION OF AFRICAN VIOLET (*SAINTPAULIA IONANTHA* H. WENDL.)

Duong Tan Nhut¹, Duong Bao Trinh², Do Manh Cuong¹, Hoang Thanh Tung¹, Nguyen Phuc Huy¹, Vu Thi Hien¹, Vu Quoc Luan¹, Le Thi Thu Hien³, Nguyen Hoai Chau⁴

¹Tay Nguyen Institute for Scientific Research, Vietnam Academy of Science and Technology

²Ho Chi Minh City University of Technology

³Institute of Genome Research, Vietnam Academy of Science and Technology

⁴Institute of Environmental Technology, Vietnam Academy of Science and Technology

SUMMARY

Surface sterilization is one of the most important steps in preparation of explants for micropropagation, because microbial contaminations present a major challenge to the initiation and maintenance of viable *in vitro* cultures. Most of popular surface disinfectants are considered as highly toxic influence either directly or indirectly to health and environment. Previous studies have demonstrated that toxicity of nano silver (Ag nanoparticles) can destroy effectively microorganisms but it is safe for human health. So, the silver nanoparticles have been widely used in different fields of life, such as medicine, pharmaceuticals, cosmetics, biology and agriculture. However, reports on the effect of silver nanoparticles for surface sterilization of plant explants are still limited. Nano silver and typical disinfectants were tested for sterilization of African violet (*Saintpaulia ionantha* H. WENDL.), by varying their concentration and time of exposure. The aim of this study was to examine sterilization capacity and explant morphogenesis when using nano silver in micropropagation. After decontamination step, we evaluated the growth and development of explants in different stages of the micropropagation process of African violet. The results indicated that the treatment using nano silver agent at concentration of 0.05% for 15 minutes was the best for controlling the infection. Nano silver could be used to replace the commonly used decontamination substances without causing adverse effects on plant growth and development. This is the first report on *in vitro* establishment using nano silver to reduce bacterial infections and the growth and development of African violet (*Saintpaulia ionantha* H. WENDL.).

Keywords: African violet, decontamination, nano silver, stimulate explants, *in vitro* cultured