

## VAI TRÒ CỦA NANO BẠC TRONG NÂNG CAO TẦN SUẤT HÌNH THÀNH TẾ BÀO ĐƠN CÂY HOA SALEM (*LIMONIUM SINUATUM* (L.) MILL)

Đỗ Mạnh Cường<sup>1,2</sup>, Lê Thành Long<sup>3</sup>, Hoàng Thanh Tùng<sup>1</sup>, Vũ Quốc Luận<sup>1</sup>, Vũ Thị Hiền<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Nhật Linh<sup>1</sup>, Trương Thị Bích Phượng<sup>2</sup>, Dương Tấn Nhựt<sup>1,✉</sup>

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

<sup>2</sup>Trường Đại học Khoa học, Đại Học Huế

<sup>3</sup>Viện Sinh học nhiệt đới, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

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

Ngày nhận bài: 10.3.2018

Ngày nhận đăng: 02.7.2018

### TÓM TẮT

Trong nghiên cứu này, nano bạc ở nồng độ và thời gian xử lý khác nhau được sử dụng để khử các tác nhân gây nhiễm và cảm ứng mẫu cây ban đầu làm vật liệu cho nuôi cấy huyền phù tế bào cây salem. Kết quả cho thấy mẫu cây lá được khử trùng bằng nano bạc nồng độ 0,2 g/L trong 20 phút cho hiệu quả khử trùng cao nhất (tỷ lệ sống đạt 73,33%) so với HgCl<sub>2</sub> (56,66%) và Ca(ClO)<sub>2</sub> (64,44%), khi nuôi cấy trên môi trường ½MS có bổ sung 20 g/L sucrose; 1 mg/L picloram và 2,5 g/L gelrite. Ngoài ra, mẫu này cảm ứng hình thành mô sẹo xốp rất tốt (mô sẹo màu trắng sữa, tạo nhiều cấu trúc giống phôi). Quá trình hình thành huyền phù tế bào từ các mô sẹo này cũng được ghi nhận khi cấy trên môi trường tương tự có bổ sung 1,2 mg/L nano bạc, trong điều kiện nuôi cấy lỏng lắc, hiệu quả cao nhất đạt ở ngày thứ 20 (49088 tế bào/mL) cao gấp 2,5 lần đối chứng (19361 tế bào/ml). Những tế bào này sinh trưởng, phát triển và có thể tái sinh tốt nhất từ ngày thứ 16 đến ngày thứ 20. Huyền phù tế bào này tái sinh chồi cao nhất trên môi trường ½MS có bổ sung 20 g/l sucrose; 1 mg/Lzeatin; 2,5 g/L gelrite và 1,6 mg/L nano bạc (67,77%) so với đối chứng không có bổ sung nano bạc (40,00%). Nghiên cứu này cho thấy rằng, việc sử dụng nano bạc trong vi nhân giống cây salem như là một tác nhân tích cực cho hiệu quả khử trùng, cảm ứng mẫu cây, phát sinh huyền phù tế bào, tái sinh mô sẹo và chồi. Bên cạnh đó, kết quả cũng ghi nhận có hiện tượng ức chế sự phát triển của mẫu cây khi sử dụng nano bạc ở nồng độ cao và trong thời gian dài.

**Từ khóa:** Salem, nano bạc, khử trùng, huyền phù tế bào, nuôi cấy *in vitro*

### MỞ ĐẦU

Salem (*Limonium sinuatum* (L.) Mill) là một trong những loài hoa cắt cành có giá trị trang trí cao, được trồng trên toàn thế giới nhờ sự phong phú về màu sắc hoa, nên được sử dụng cho cả hoa tươi và hoa khô (Harazy *et al.*, 1985; McTaggart, Liberato, 2006). Theo thống kê của Viện Thống kê Polynesia thuộc Pháp (Institut statistique de polynésie française, ISPF) 2014, các quốc gia trồng, tiêu thụ và xuất khẩu hoa salem lớn nhất trên thế giới giai đoạn 2007-2013 là Hà Lan, Nhật Bản và Mexico. Trong đó, tổng sản lượng hoa ở Hà Lan vào năm 2012 là 7945 triệu cành, hoa salem chiếm 67 triệu cành. Nhật Bản, diện tích trồng hoa salem lên đến 212 ha với sản lượng thu được 120 triệu cành vào năm 2012. Mexico, trong tổng số gần 16000 ha diện

tích hoa cắt cành có 123 ha hoa salem. Cây salem được du nhập vào Việt Nam từ trước năm 1975. Hiện nay, salem được trồng nhiều ở Đà Lạt (Đa Thiện, Thái Phiên) và Đơn Dương, sản phẩm chủ yếu được tiêu thụ trong nước và hướng tới xuất khẩu. Nhu cầu thị trường ngày càng tăng, nhưng vi nhân giống cây salem vẫn còn tồn tại nhiều hạn chế: quy trình nhân giống chưa ổn định; hệ số nhân, tỷ lệ ra rễ còn thấp; tỷ lệ trồng thành công và năng suất của cây thương phẩm không cao. Trong khi đó, các nhà khoa học thực vật đã tham gia vào việc nghiên cứu nhân giống hiệu quả ở quy mô lớn và tiến hành lai tạo giống nhằm hướng tới mở rộng hơn nữa sự đa dạng màu sắc và hình dạng hoa. Vi nhân giống salem đã thành công bằng phương pháp nuôi cấy tái sinh chồi trực tiếp từ mẫu lá non, mắt ngủ non của cành hoa (Amo-Marco, Ibanez, 1998; Seelye *et al.*,

1994); tái sinh chồi gián tiếp thông qua mô sẹo từ huyền phù tế bào (Kunitake, Mii, 1990; Igawa *et al.*, 2002). Trong đó, nuôi cấy tái sinh trực tiếp chồi là phương pháp hình thành chồi từ mầm ngủ hoặc chồi bất định từ mẫu lá nhưng không hình thành các tế bào mô sẹo; nuôi cấy tái sinh gián tiếp là phương pháp hình thành khối tế bào mô sẹo không tổ chức nên tạo được nguồn mẫu nhiều, ổn định và chất lượng hơn so với phương pháp tái sinh trực tiếp; các cây hình thành có tính đồng nhất về mặt di truyền, sinh lý, hình thái (Igawa *et al.*, 2002). Mặc dù phương pháp này có nhiều ưu điểm, nhưng giai đoạn tạo nguồn mẫu *in vitro* để tái sinh đạt hiệu quả không cao do dễ bị nhiễm nấm, nhiễm khuẩn hoặc bị chết; huyền phù tế bào khó tái sinh mô sẹo và hình thành chồi.

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 khoẻ của con người (Abdi *et al.*, 2012). Mặt khác, các ion bạc còn đóng vai trò quan trọng trong sự phát triển của mô sẹo, tái tạo và phát sinh phôi soma, tái sinh chồi trong nuôi cấy *in vitro* (Bais *et al.*, 2000). Tuy nhiên, các ion bạc luôn đi kèm với các cation tồn tại ở dạng muối ( $\text{AgNO}_3$ ,  $\text{Ag}_2\text{SO}_4$ ) điều này ảnh hưởng đến hiệu quả khử trùng và hấp thu 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. Do đó, hiệu quả tác động cao (Sondi, Salopek-Sondi, 2004; Shah, Belozeroova, 2008).

Vì vậy, chúng tôi thực hiện nghiên cứu này, nhằm khảo sát và đánh giá khả năng thay thế hoàn toàn các chất khử trùng thông dụng ( $\text{HgCl}_2$ ,  $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ ) bằng nano bạc trong giai đoạn khử trùng mẫu cây và ảnh hưởng của nồng độ nano bạc lên sự phát sinh huyền phù tế bào, tái sinh chồi, sinh trưởng và phát triển của cây salem trong điều kiện *in vitro*.

## VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Vật liệu

#### Nguồn mẫu

Lá của cây salem (*Limonium sinuatum* (L.) Mill) *ex vitro* khoảng 3 tháng tuổi sinh trưởng và

phát triển tốt, không bị sâu bệnh hiện có tại vườn ươm của Phòng Sinh học Phân tử và Chọn tạo giống cây trồng (Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên) được chọn làm nguồn mẫu ban đầu.

#### Vật liệu nano

Dung dịch nano bạc do Viện Công nghệ môi trường cung cấp với các hạt nano bạc có kích thước trung bình  $\leq 20$  nm được thiết lập theo tỷ lệ:  $\text{AgNO}_3 = 700 - 1000$  ppm,  $\beta$ -chitosan = 250 - 300 ppm,  $\text{NaBH}_4 = 200$  ppm, tỷ lệ mol  $\text{NaBH}_4 / \text{AgNO}_3 = 1/4$ , tốc độ nhỏ giọt  $\text{NaBH}_4 = 10 - 12$  giọt/phút (Chau *et al.*, 2008).

#### Môi trường nuôi cấy

Môi trường nuôi cấy là môi trường MS (Muraghige, Skoog, 1962) có bổ sung chất điều hoà sinh trưởng và chất làm đông tùy theo từng giai đoạn phát triển của cây. Tất cả các môi trường nuôi cấy được điều chỉnh về pH = 5,8; đối với thí nghiệm hình thành mô sẹo và tái sinh chồi được nuôi cấy trong bình thủy tinh 250 ml chứa 40 ml môi trường; riêng đối với thí nghiệm phát sinh huyền phù tế bào thì được nuôi cấy trong bình tam giác 250 ml chứa 100 ml môi trường lỏng. Sau đó, toàn bộ môi trường được hấp khử trùng ở nhiệt độ  $121^\circ\text{C}$ , áp suất 1 atm trong thời gian 20 phút.

## Phương pháp

### Khử trùng và tạo mô sẹo

Lá non của cây salem 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). Nghiệm thức đối chứng sử dụng chất khử trùng calcium hypochlorite ( $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ ) 60 g/L trong thời gian 10 phút và dung dịch mercury chloride ( $\text{HgCl}_2$ ) 1 g/L trong thời gian 5 phút (Ngô Xuân Bình, 2010). Những mẫu lá này sau khi khử trùng được cắt thành hình tròn có đường kính 1 cm bằng dụng cụ cắt (Dương Tấn Nhật, 2012), sau đó được cấy trên môi trường  $1/2$ MS có bổ sung 20 g/L sucrose, 1 mg/l picloram, 2,5 g/L gelrite (Igawa *et al.*, 2002). Mỗi nghiệm thức tiến hành trên 30 bình, mỗi bình cấy 1 mẫu. Thí nghiệm này nhằm theo dõi: tỷ lệ sống (%), khối lượng tươi (g), khối lượng khô (g), hình thái mẫu cây để nghiên cứu vai trò của nano bạc trong khử trùng và cảm ứng tạo mô sẹo sau 4 tuần nuôi cấy.

### Phát sinh huyền phù tế bào

Để nghiên cứu quá trình hình thành huyền phù tế bào, các mô sẹo xộp từ nghiệm thức tốt nhất ở trên được cấy vào môi trường lỏng ½MS có bổ sung 20 g/L sucrose, 1 mg/L picloram, (Igawa *et al.*, 2002) và nano bạc được bổ sung với các tỷ lệ khác nhau (0,0; 0,4; 0,8; 1,2; 1,6; 2,0 mg/L). Mỗi nghiệm thức tiến hành trên 5 bình, mỗi bình cấy 0,1 g mô sẹo xộp. Tất cả nghiệm thức được đặt trên máy lắc (Hermle, Đức) với tốc độ 100 vòng/phút, để nghiên cứu ảnh hưởng của nano bạc đến tần suất phát sinh và hình thái tế bào đơn được nuôi cấy lỏng lắc vào những khoảng thời gian khác nhau (0, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28 ngày).

### Tái sinh chồi

Huyền phù tế bào thu nhận từ nghiệm thức tốt nhất ở thí nghiệm trên được cấy vào môi trường ½MS có bổ sung 20 g/L sucrose, 1 mg/L zeatin, 2,5 g/L gelrite (Igawa *et al.*, 2002) và nano bạc được bổ sung với các tỷ lệ khác nhau (0; 0,4; 0,8; 1,2; 1,6; 2 mg/L). Mỗi nghiệm thức tiến hành trên 30 bình, mỗi bình cấy 0,5 ml thể tích huyền phù tế bào. Các chỉ tiêu theo dõi: tỷ lệ mẫu tái sinh (%), số chồi/bình, chiều cao chồi (cm), tỷ lệ chồi > 1,5 cm (%) được xác định nhằm khảo sát ảnh hưởng của nano bạc ở những nồng độ khác nhau lên sự tái sinh chồi gián tiếp từ huyền phù tế bào thông qua mô sẹo sau 4 tuần nuôi cấy.

### Điều kiện nuôi cấy

Điều kiện *in vitro*, các thí nghiệm được tiến hành trong điều kiện nhiệt độ phòng  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , chu kỳ chiếu sáng 16 giờ/ngày, cường độ  $40 - 45 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  dưới ánh sáng đèn huỳnh quang, độ ẩm trung bình 55 - 60 %.

### Xác định mật độ tế bào

Xác định mật độ tế bào trong các bình nuôi cấy trên theo các bước sau đây: (1) Huyền phù tế bào salem (1 mL) được thu nhận cho vào eppendorf, ly tâm 1500 vòng/phút trong 5 phút ở nhiệt độ phòng để loại bỏ dịch môi trường; (2) Mẫu sau khi ly tâm được cố định trong paraformaldehyde 4% trong 15 phút, ly tâm 1500 vòng/phút trong 5 phút ở nhiệt độ phòng để loại bỏ dịch nổi; (3) Dịch tế bào được ủ với triton X100 nồng độ 0,1% trong 30 phút, ly tâm 1500 vòng/phút trong 5 phút ở nhiệt độ phòng để loại bỏ dịch nổi; (4) Các tế bào được thu nhận và nhuộm với thuốc nhuộm acridine orange nồng độ 30

$\mu\text{g/ml}$  trong 30 phút, ly tâm 1500 vòng/phút trong 5 phút ở nhiệt độ phòng để loại bỏ dịch nổi; (5) Các tế bào được cố định trên lame và quan sát dưới kính hiển vi điện tử huỳnh quang để xác định mật độ tế bào đơn.

### 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<sup>®</sup> 2017 và phần mềm phân tích thống kê SPSS 16.0 theo phương pháp Duncan's test với  $\alpha = 0,05$  (Duncan, 1955).

## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### Khử trùng và tạo mô sẹo

Sau 4 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 ( $\text{HgCl}_2$  và  $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ ) (Bảng 1 và Hình 1).

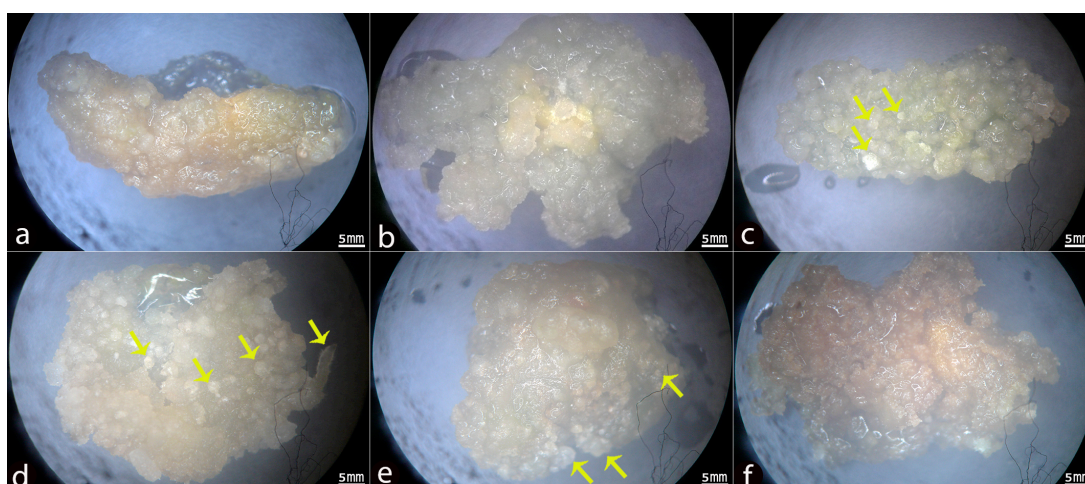
Theo quan sát, tất cả các mẫu lá ở nghiệm thức khử trùng bằng nano bạc nồng độ 0,05 g/L trong 5 phút, 10 phút và 0,1 g/l trong 5 phút không ghi nhận được tỷ lệ sống (Bảng 1) do các mẫu đã bị nhiễm nấm; ở các nghiệm thức còn lại trừ mẫu bị nhiễm trong quá trình khử trùng, còn lại các mẫu sống đều cảm ứng tạo mô sẹo. Trong đó, mẫu lá ở nghiệm thức khử trùng bằng nano bạc có dấu hiệu cảm ứng tạo mô sẹo sớm nhất trong tuần đầu tiên, trừ các mẫu khử trùng bằng nano bạc ở thời gian 30 phút sự cảm ứng tạo mô sẹo xuất hiện ở tuần thứ 2. Sau đó, các mẫu lá nghiệm thức sử dụng  $\text{Ca}(\text{ClO})_2$  nồng độ 60 g/L ở thời gian 10 phút và  $\text{HgCl}_2$  nồng độ 1 g/L ở thời gian 5 phút chỉ mới có dấu hiệu cảm ứng tạo mô sẹo lần lượt sau tuần thứ 2 và tuần thứ 3. Điều này cho thấy, chất điều hoà sinh trưởng là yếu tố cảm ứng mẫu cấy, nano bạc ở nồng độ và thời gian thích hợp có vai trò kích thích mẫu cấy mẫu cấy tốt hơn so với  $\text{Ca}(\text{ClO})_2$  và  $\text{HgCl}_2$ .

Sau tuần thứ 4, tỷ lệ sống sót của mẫu cấy ở nghiệm thức 0,2 g/L trong 20 phút và 0,5 g/L trong 15 phút cho tỷ lệ sống sót cao nhất 73,33%, cao hơn so với khử trùng bằng  $\text{Ca}(\text{ClO})_2$  (64,44%) và  $\text{HgCl}_2$  (56,66%). Tỷ lệ sống sót của các mẫu cấy giảm khi thay đổi nồng độ hay thời gian khử trùng bằng nano bạc (Bảng 1).

**Bảng 1.** Khả năng khử trùng mẫu cấy của nano bạc và các chất khử trùng thông dụng sau 4 tuần nuôi cấy.

Chất Khử trùng	Nồng độ (g/L)	Thời gian khử trùng (phút)	Tỷ lệ sống (%)	Khối lượng tươi (g)	Khối lượng khô (g)	Hình thái mẫu
Nano bạc	0,05	5	0,00 <sup>f</sup>	0,00 <sup>f</sup>	0,00 <sup>d</sup>	Mẫu nhiễm
		10	0,00 <sup>f</sup>	0,00 <sup>f</sup>	0,00 <sup>d</sup>	Mẫu nhiễm
		15	27,77 <sup>e</sup>	0,52 <sup>e</sup>	0,34 <sup>c</sup>	Mô sẹo xốp
		20	28,88 <sup>e</sup>	0,53 <sup>de</sup>	0,35 <sup>c</sup>	Mô sẹo xốp
		30	26,66 <sup>e</sup>	0,54 <sup>cd</sup>	0,36 <sup>c</sup>	Mô sẹo hoá nâu
	0,1	5	0,00 <sup>f</sup>	0,00 <sup>f</sup>	0,00 <sup>d</sup>	Mẫu nhiễm
		10	30,00 <sup>e</sup>	0,53 <sup>de</sup>	0,35 <sup>c</sup>	Mô sẹo xốp
		15	31,11 <sup>e</sup>	0,54 <sup>cd</sup>	0,36 <sup>c</sup>	Mô sẹo xốp
		20	53,33 <sup>d</sup>	0,64 <sup>b</sup>	0,44 <sup>b</sup>	Mô sẹo xốp
		30	28,88 <sup>e</sup>	0,55 <sup>c</sup>	0,35 <sup>c</sup>	Mô sẹo hoá nâu
	0,2	5	28,89 <sup>e</sup>	0,54 <sup>cd</sup>	0,36 <sup>c</sup>	Mô sẹo xốp
		10	54,44 <sup>d</sup>	0,64 <sup>b</sup>	0,45 <sup>c</sup>	Mô sẹo xốp
		15	63,33 <sup>bc</sup>	0,73 <sup>a</sup>	0,51 <sup>a</sup>	Mô sẹo xốp
		20	73,33 <sup>a</sup>	0,74 <sup>a</sup>	0,52 <sup>a</sup>	Mô sẹo xốp, màu trắng sữa
		30	30,00 <sup>e</sup>	0,53 <sup>de</sup>	0,35 <sup>c</sup>	Mô sẹo hoá nâu
0,5	5	28,89 <sup>e</sup>	0,52 <sup>e</sup>	0,34 <sup>c</sup>	Mô sẹo xốp	
	10	55,55 <sup>cd</sup>	0,65 <sup>b</sup>	0,44 <sup>b</sup>	Mô sẹo xốp	
	15	73,33 <sup>a</sup>	0,73 <sup>a</sup>	0,51 <sup>a</sup>	Mô sẹo xốp, màu xanh	
	20	64,44 <sup>b</sup>	0,53 <sup>a</sup>	0,35 <sup>a</sup>	Mô sẹo hoá nâu	
	30	31,11 <sup>e</sup>	0,53 <sup>de</sup>	0,35 <sup>c</sup>	Mô sẹo hoá nâu	
HgCl <sub>2</sub>	1	5	56,66 <sup>bcd</sup>	0,64 <sup>b</sup>	0,44 <sup>b</sup>	Mô sẹo cứng, ngả vàng
Ca(ClO) <sub>2</sub>	60	10	64,44 <sup>b</sup>	0,53 <sup>cd</sup>	0,37 <sup>c</sup>	Mô sẹo xốp, màu trắng đục

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.** Sự cảm ứng khác nhau giữa các mẫu cấy khử trùng bằng nano bạc và các chất khử trùng thông dụng sau 4 tuần nuôi cấy. **a.** Mẫu cấy được khử trùng bằng HgCl<sub>2</sub> nồng độ 1 g/L trong 5 phút; **b.** Mẫu cấy được khử trùng bằng Ca(ClO)<sub>2</sub> nồng độ 60 g/L trong 10 phút; **c.** Mẫu cấy được khử trùng bằng nano bạc nồng độ 0,2 g/L trong 20 phút; **d.** Mẫu cấy được khử trùng bằng nano bạc nồng độ 0,5 g/L trong 15 phút; **e.** Mẫu cấy được khử trùng bằng nano bạc nồng độ 0,1 g/L trong 10 phút; **f.** Mẫu cấy được khử trùng bằng nano bạc nồng độ 0,2 g/L trong 30 phút.

Sau 4 tuần nuôi cấy, các mẫu sống sót từ giai đoạn khử trùng có sự cảm ứng khác nhau trên môi trường. Hình 1c và 1d cho thấy sự phát triển của mô sẹo xộp có cấu trúc giống phôi rất tốt. Nghiệm thức ở nồng độ 0,2 g/L ở 20 phút cho kết quả tốt nhất, nhiều sơ khởi phôi có màu trắng sữa, xuất hiện rõ bất định (Hình 1d), đạt khối lượng tươi và khối lượng khô lần lượt 0,74 (g); 0,52 (g). Kết quả này cao hơn rất nhiều khi so sánh với khối lượng tươi và khối lượng khô của mô sẹo ở nghiệm thức được khử trùng với  $\text{Ca}(\text{ClO})_2$  (lần lượt 0,53 g; 0,37 g) và  $\text{HgCl}_2$  (lần lượt 0,64 g; 0,44 g). Còn nghiệm thức sử dụng nano bạc nồng độ 0,5 g/l ở thời gian 15 phút cho sự phát triển của mô sẹo xộp có cấu trúc giống phôi nhưng có màu xanh (Hình 1c). Các nghiệm thức được khử trùng bằng nano bạc đều cho sự phát sinh mô sẹo xộp có cấu trúc giống phôi, khối lượng tươi và khối lượng khô giảm dần khi nồng độ và thời gian khử trùng bằng nano bạc thay đổi (Hình 1e). Bên cạnh đó, các mẫu cây được khử trùng bằng  $\text{HgCl}_2$  lại cho sự phát sinh mô sẹo cứng, có màu ngả vàng (Hình 1a);  $\text{Ca}(\text{ClO})_2$  là các mô sẹo xộp, có màu trắng đục (Hình 1b) và đều không ghi nhận được các mô sẹo cấu trúc giống phôi. Điều này có thể thấy, tất cả những thay đổi về chất, nồng độ và thời gian các ion kim loại dùng khử trùng mẫu cây đều có thể dẫn đến hình thành những tín hiệu ion kim loại khác nhau ảnh hưởng đến tế bào (Dean *et al.*, 2012). Đây có thể là nguyên nhân chính khiến sự phát sinh hình thái mẫu cây khi khử trùng bằng nano bạc khác biệt với khử trùng bằng  $\text{HgCl}_2$  và  $(\text{Ca}(\text{ClO}_2)_2)$ . Ngoài ra, có thể quan sát thấy nghiệm thức sử dụng nano bạc ở nồng độ 0,5 g/L trong 20 phút và tất cả các nồng độ trong thời gian 30 phút có sự ức chế và sau 4 tuần nuôi cấy mẫu bị hoá nâu, úa và chết (Hình 1f).

Vì vậy, nano bạc được nhìn nhận như một tác nhân mới trong nuôi cấy mô tế bào thực vật dùng khử trùng mẫu cây. Ngoài ra, nhờ vào tác dụng diệt khuẩn của nano bạc hiệu quả theo nhiều cơ chế khác

nhau (Chaloupka *et al.*, 2010) cộng với cấu trúc hạt đạt kích thước tới hạn sẽ cho phép một lượng lớn nguyên tử có thể tương tác tiếp xúc bề mặt, dễ dàng xâm nhập, tác động sâu bên trong tế bào làm tăng đáng kể hiệu quả khử trùng, tạo ra sự khác biệt trong tốc độ cảm ứng và phát triển của mẫu cây so với những vật liệu thô (Navarro *et al.*, 2008; Shah, Belozerovala, 2008; Nasser *et al.*, 2013). Mặt khác, trong quy trình khử trùng mẫu hiện nay chủ yếu sử dụng  $(\text{Ca}(\text{ClO})_2)$ ,  $(\text{HgCl}_2)$  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 lí do khiến mẫu cây khi sử dụng các chất khử trùng này cảm ứng chậm hơn so với mẫu cây ở nghiệm thức sử dụng nano bạc. Tác dụng khử trùng bề mặt mẫu cây của nano bạc đã được báo cáo đầu tiên bởi Abdi *et al.*, (2012) trong khử trùng bề mặt mẫu cây *Valeriana officinalis* L. Theo đó, tác giả đã kết luận rằng sử dụng nano bạc (kích thước 35 nm) nồng độ 0,012 g/L trong 180 phút sẽ cho kết quả khử trùng tốt nhất. Công dụng của nano bạc trong nuôi cấy mô thực vật đã được nghiên cứu trên nhiều đối tượng khác nhau (Navarro *et al.*, 2008; Rostami, Shahsavari, 2009; Arab, 2014). Tuy nhiên, cách tiếp cận vấn đề, nồng độ, thời gian và đặc biệt phương pháp là khác nhau. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng nano bạc (kích thước  $\leq 20$  nm) để khử trùng bề mặt mẫu lá. Kết quả cho thấy, nano bạc có thể thay thế hoàn toàn chất khử trùng thông dụng ở giai đoạn tạo nguồn mẫu *in vitro*. Tóm lại, sử dụng nano bạc nồng độ 0,2 g/L ở thời gian 20 phút cho hiệu quả khử trùng tối ưu nhất, mẫu lá cảm ứng tạo mô sẹo nhanh và phát triển tốt, không có dấu hiệu ức chế.

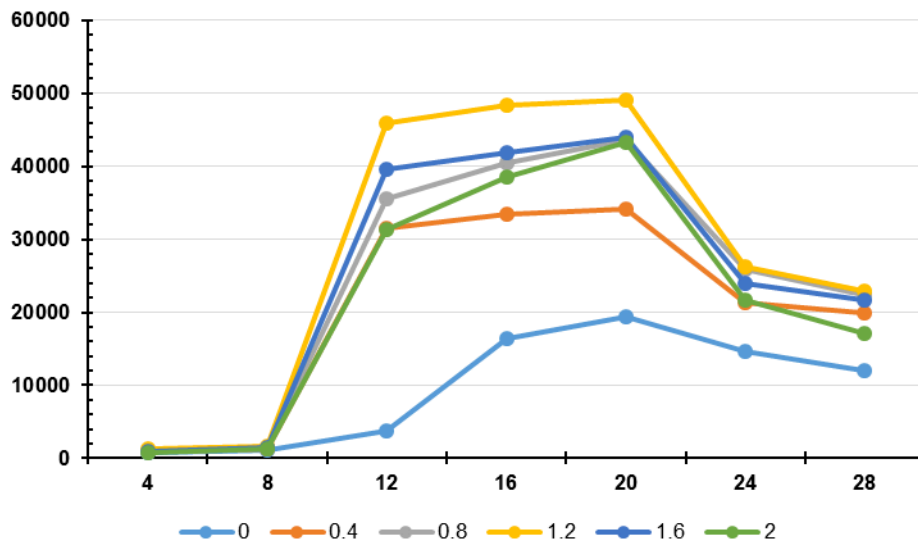
### Phát sinh huyền phù tế bào

Nano bạc không chỉ tác động lên khả năng khử trùng và cảm ứng mẫu cây. Trong nghiên cứu này nano bạc còn ảnh hưởng đến sự phát sinh huyền phù tế bào sau 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28 ngày nuôi cấy (Bảng 2, Biểu đồ 1, Hình 2).

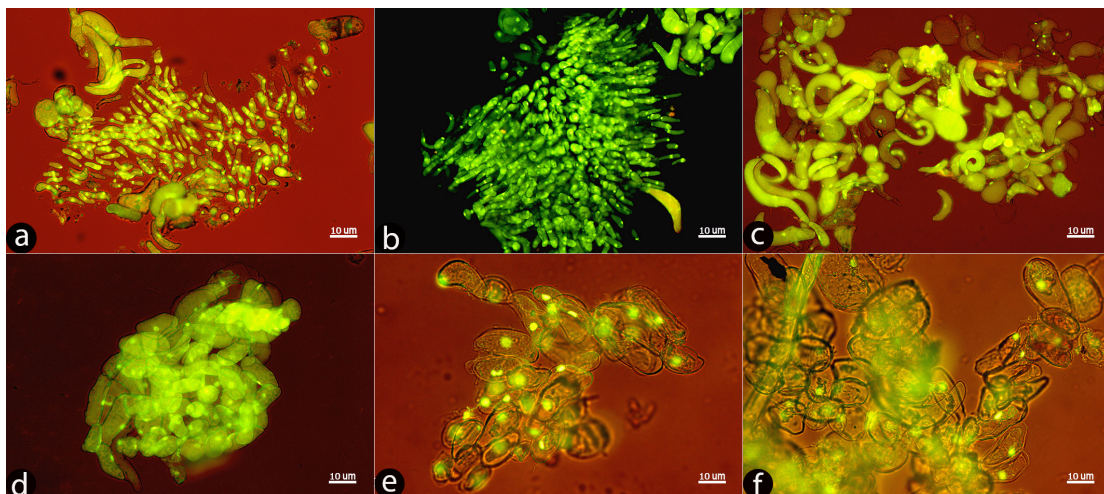
**Bảng 2.** Ảnh hưởng của nano bạc đến số lượng tế bào trong nuôi cấy huyền phù tế bào.

Nồng độ (mg/L)	Mật độ tế bào (tế bào/mL) sau thời gian nuôi cấy (ngày)						
	4	8	12	16	20	24	28
0,0	751 <sup>b</sup>	1086 <sup>c</sup>	3673 <sup>c</sup>	16337 <sup>d</sup>	19361 <sup>c</sup>	14639 <sup>c</sup>	12008 <sup>c</sup>
0,4	989 <sup>ab</sup>	1251 <sup>bc</sup>	31543 <sup>b</sup>	33385 <sup>c</sup>	34228 <sup>b</sup>	21321 <sup>b</sup>	19964 <sup>ab</sup>
0,8	902 <sup>ab</sup>	1419 <sup>ab</sup>	35517 <sup>ab</sup>	40463 <sup>b</sup>	43639 <sup>a</sup>	25963 <sup>a</sup>	22406 <sup>b</sup>
1,2	1350 <sup>a</sup>	1623 <sup>a</sup>	45850 <sup>a</sup>	48434 <sup>a</sup>	49088 <sup>a</sup>	26294 <sup>a</sup>	22858 <sup>a</sup>
1,6	1020 <sup>ab</sup>	1433 <sup>ab</sup>	39529 <sup>ab</sup>	41909 <sup>b</sup>	43989 <sup>a</sup>	24041 <sup>a</sup>	21623 <sup>ab</sup>
2,0	700 <sup>b</sup>	1299 <sup>bc</sup>	31416 <sup>b</sup>	38630 <sup>bc</sup>	43254 <sup>a</sup>	21611 <sup>b</sup>	17049 <sup>b</sup>

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.



**Biểu đồ 1.** Các giai đoạn sinh trưởng và phát triển huyền phù tế bào salem dưới tác dụng của các nồng độ nano bạc khác nhau (0; 0,4; 0,8; 1,2; 1,6; 2 mg/L) sau các khoảng thời gian nuôi cấy khác nhau (4, 8, 12, 16, 20, 24, 28 ngày).



**Hình 2.** Sự phát sinh hình thái của tế bào trong các giai đoạn khác nhau. **a, b, c.** Hình thái tế bào trong môi trường không có bổ sung nano bạc ở các giai đoạn: lần lượt thích nghi (ngày thứ 8), tăng trưởng (ngày thứ 16), suy vong (ngày thứ 24); **d, e, f.** Hình thái tế bào trong môi trường có bổ sung nano bạc nồng độ 1,2 mg/L ở các giai đoạn: lần lượt thích nghi (ngày thứ 8), tăng trưởng (ngày thứ 16), suy vong (ngày thứ 24).

Kết quả ghi nhận được cho thấy, quá trình phát triển của các tế bào đơn salem trong môi trường lỏng cũng trải qua 4 giai đoạn theo đúng chu kỳ sinh trưởng của nhiều loài thực vật. Từ khi bắt đầu nuôi cấy đến ngày thứ 8 các tế bào đã trải qua giai đoạn thích nghi. Ở giai đoạn này sự sinh trưởng của tế bào khá chậm, các tế bào có kích thước tương đối nhỏ, đồng nhất (Hình 2a). Đặc biệt, trong nghiệm thức có

bổ sung nano bạc xuất hiện các tế bào với nội chất đậm đặc, bắt màu thuốc nhuộm rất đậm, các tế bào này chiếm số lượng lớn trong dịch huyền phù tế bào (Hình 2d). Trong giai đoạn này mật độ tế bào đạt cao nhất ở nghiệm thức bổ sung 1,2 mg/L nano bạc ngày thứ 8 (1623 tế bào/mL) và cao hơn so với đối chứng (1086 tế bào/mL). Tiếp theo là giai đoạn tăng trưởng của tế bào kéo dài từ ngày nuôi cấy thứ 8 đến

ngày thứ 12 đối với các nghiệm thức bổ sung nano bạc và đến ngày thứ 16 đối với nghiệm thức đối chứng. Ở giai đoạn này, sự phân chia tế bào diễn ra với tốc độ lớn nhất, số lượng tế bào tăng lên rất nhanh, các tế bào thành cụm từ vài chục đến vài trăm tế bào (Hình 2b). Mật độ tế bào đạt cao nhất ở nghiệm thức nồng độ 1,2 mg/L nano bạc ngày thứ 12 (45850 tế bào/ml) so với nghiệm thức đối chứng ngày thứ 16 (16337 tế bào/ml). Trong giai đoạn này, các tế bào bắt đầu xuất hiện không bào, ban đầu là nhiều túi nhỏ, sau đó liên kết với nhau thành các túi to và cuối cùng thành một không bào trung tâm chiếm hầu hết thể tích của tế bào, dồn ép chất nguyên sinh và nhân ra sát thành tế bào (Hình 2e). Đặc biệt, các tế bào đơn được nuôi cấy trong nghiệm thức bổ sung nano bạc có kích thước to hơn so với nghiệm thức đối chứng (Hình 2). Điều này cho thấy đã có sự tác động của nano bạc trong quá trình phát triển tế bào. Ở giai đoạn ổn định của nghiệm thức có bổ sung nano bạc được bắt đầu từ ngày thứ 12, còn ở nghiệm thức đối chứng từ ngày thứ 16 cùng kéo dài đến ngày thứ 20 và mật độ tế bào đều đạt cao nhất ở ngày thứ 20 (lần lượt 49088; 19361 tế bào/ml). Điều này cho thấy, gen quy định thời điểm phát sinh huyền phù tế bào đạt tối ưu, nano bạc chỉ có vai trò kích thích phân bào, làm tăng số lượng tế bào. Vì vậy, việc duy trì huyền phù tế bào phải được thực hiện vào giai đoạn đầu của pha ổn định, vào lúc tế bào phân chia và phát triển nhanh chóng, nếu vượt qua giai đoạn này thì sức sống của huyền phù sẽ giảm xuống. Do đó, ngày nuôi cấy thứ 16 đến ngày 20 là thích hợp nhất cho việc cấy chuyển huyền phù tế bào salem. Kết quả trên có thể cho thấy, nano bạc đã được chuyển hoá và sử dụng để hỗ trợ cho quá trình trao đổi chất và sự phát triển của tế bào (Larue *et al.*, 2014), nano bạc có thể dễ dàng thâm nhập vào lớp biểu bì gốc, khí khổng hoặc nội mạc tế bào (Sondi, Salopek, 2004; Kim *et al.*, 2007; Navarro *et al.*, 2008). Vậy các nano bạc đóng một vai trò thiết yếu trong quá trình hô hấp, tăng trưởng, sao chép gen, nhân đôi tế bào (Dean *et al.*, 2012). Sau đó, mật độ tế bào giảm nhanh đến ngày thứ 24 và giảm chậm đến ngày 28, điều này chứng tỏ các tế bào bước vào giai đoạn suy vong và dẫn đến chết hẳn. Nguyên nhân có thể là do ảnh hưởng một số yếu tố như sự cạn kiệt chất dinh dưỡng, sự tăng mật độ tế bào, sự tích lũy các chất độc. Quan sát biểu đồ cho thấy, trong môi trường có bổ sung nano bạc nồng độ 1,2 mg/L, không những mật độ tế bào là cao nhất mà đỉnh của đường cong sinh trưởng còn rộng nhất từ ngày 12 đến ngày 20 so với đối chứng từ ngày 16 đến ngày 20 (Biểu đồ 1).

Ion bạc được biết đến như là chất ức chế tổng hợp

khí 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*. Tuy nhiên, trong nghiên cứu của chúng tôi, nano bạc có tác động tích cực ở mức độ tế bào, cụ thể là trong sự phát sinh huyền phù tế bào, hình thái và chất lượng tế bào. Chỉ tiêu mật độ tế bào đạt tỷ lệ cao nhất ở ngày thứ 20 ở nghiệm thức bổ sung nano bạc nồng độ 1,2 mg/L. Thời gian cấy chuyển tốt nhất từ ngày thứ 16 đến ngày 20.

### Tái sinh chồi

Sau 4 tuần nuôi cấy kết quả ghi nhận được cho thấy, các chỉ tiêu theo dõi của nghiệm thức bổ sung nano bạc có khác biệt đáng kể so với nghiệm thức đối chứng (Bảng 2 và Hình 3).

Ở tuần thứ 1, tất cả các nghiệm thức có sự cảm ứng hình thành mô sẹo rất sớm. Nhưng sự tái sinh chồi trong các nghiệm thức bổ sung nano bạc được ghi nhận ở tuần thứ 2 so với nghiệm thức đối chứng là tuần thứ 3. Như vậy, quá trình tái sinh chồi Salem từ huyền phù tế bào là gián tiếp thông qua mô sẹo. Sự hiện diện của chất điều hoà sinh trưởng trong môi trường nuôi cấy là yếu tố cảm ứng tạo mô sẹo. Vì vậy, có thể khẳng định nano bạc chỉ có vai trò trong quá trình cảm ứng hình thành chồi. Sau 4 tuần nuôi cấy các chỉ tiêu theo dõi của nghiệm thức bổ sung 1,6 mg/L nano bạc cao hơn đáng kể so với đối chứng. Tỷ lệ mẫu tái sinh của nghiệm thức bổ sung 1,6 mg/L nano bạc (67,77%) cao hơn so với nghiệm thức đối chứng (40,00%). Ở nồng độ 0,8 mg/L nano bạc, tỷ lệ mẫu tái sinh (47,77%), thấp hơn so với nồng độ 1,6 mg/L nano bạc (67,77%) nhưng số chồi/mẫu cao nhất (6,66 chồi), cao gần gấp 3 lần so với đối chứng, vậy hệ số nhân chồi của nồng độ 0,8 mg/L nano bạc (318,14 chồi) có cao hơn nhưng không đáng kể so với nghiệm thức bổ sung 1,6 mg/L nano bạc (315,8 chồi). Tuy nhiên, các chồi hình thành ở nồng độ 0,8 mg/L nano bạc có sự phân nhánh khá cao, từ một chồi hình thành thêm 2-3 chồi khác (Hình 3) làm cho hình thái chồi có hình dạng không bình thường, dễ bị hiện tượng thuỷ tinh thể. Những chồi ở nghiệm thức bổ sung 1,6 mg/L nano bạc có sự hình thành chồi đơn rõ ràng, các chồi to, khoẻ, tách nhau ra riêng biệt đây là nguồn vật liệu tốt cho quá trình vi nhân giống. Hơn nữa, chiều cao chồi và tỷ lệ chồi > 1,5 cm ở nghiệm thức bổ sung 1,6 mg/L nano bạc (lần lượt 1,83 cm; 78,33%) cũng cao hơn so với nghiệm thức đối chứng (lần lượt 0,9 cm; 0%). Điều này chứng tỏ, nano bạc ở nồng độ tối ưu trong thí nghiệm này không chỉ có tác dụng tái sinh mà còn có vai trò quan trọng trong sinh trưởng và

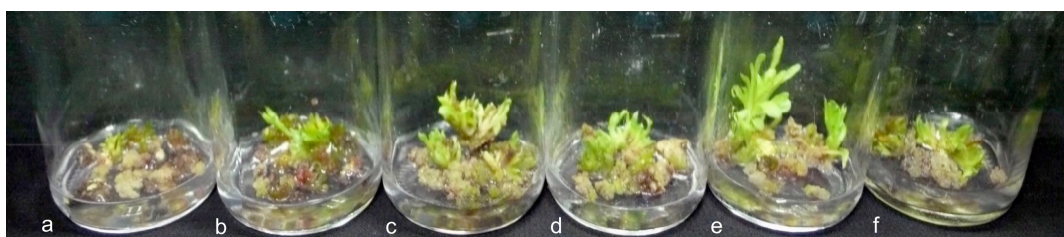
phát triển của chồi nuôi cấy *in vitro*. Kết quả cũng ghi nhận số liệu ở các chỉ tiêu này giảm khi nồng độ nano bạc giảm. Kết quả này hoàn toàn phù hợp với nghiên cứu của Sharma và đtg. (2008) trên đối tượng *Capsicum frutescens* Mill, các mô phản ứng mạnh làm tăng chiều dài chồi và số chồi tối đa khi có sự tác động của nano bạc. Ở nồng độ 2,0 mg/L nano

bạc, các chỉ tiêu giảm so với nồng độ 1,6 mg/L. Điều này cho thấy, nếu nano bạc ở nồng độ cao có thể gây ức chế sự phát triển chồi, sự hình thành chồi vẫn xảy ra sớm nhưng các chồi chậm phát triển ở những tuần tiếp theo. Các mô sẹo bắt đầu hoá nâu và chết dần ở tuần thứ 3, cho hệ số tái sinh chồi không cao, chất lượng chồi không tốt.

**Bảng 2.** Khả năng kích thích tái sinh chồi của nano bạc sau 4 tuần nuôi cấy.

Nồng độ (mg/L)	Tỷ lệ mẫu tái sinh (%)	Số chồi/bình	Chiều cao chồi (cm)	Tỷ lệ chồi > 1,5 cm (%)
0,0	40,00 <sup>b*</sup>	2,33 <sup>c</sup>	0,90 <sup>b</sup>	0,00 <sup>c</sup>
0,4	45,55 <sup>ab</sup>	3,00 <sup>bc</sup>	1,06 <sup>b</sup>	52,77 <sup>ab</sup>
0,8	47,77 <sup>ab</sup>	6,66 <sup>a</sup>	1,20 <sup>b</sup>	30,15 <sup>bc</sup>
1,2	59,99 <sup>ab</sup>	4,00 <sup>bc</sup>	1,33 <sup>ab</sup>	66,66 <sup>ab</sup>
1,6	67,77 <sup>a</sup>	4,66 <sup>b</sup>	1,83 <sup>a</sup>	78,33 <sup>a</sup>
2,0	66,66 <sup>a</sup>	3,66 <sup>bc</sup>	1,26 <sup>ab</sup>	63,89 <sup>ab</sup>

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 3.** Sự kích thích tái sinh chồi của các nồng độ nano bạc khác nhau sau 4 tuần nuôi cấy. a: 0 mg/l; b: 0,4 mg/l; c: 0,8 mg/l; d: 1,2 mg/l; e: 1,6 mg/l; f: 2 mg/l.

Kết quả cho thấy, những nồng độ nano bạc khác nhau kích thích quá trình tạo chồi khác nhau. Tác động của nano bạc trong nhân giống *in vitro* cũng được nghiên cứu bởi Nhật và đồng tác giả (2014) có tác dụng kích thích sự sinh trưởng và phát triển trên cây cúc, dâu tây, đồng tiền nuôi cấy *in vitro*. Trong nghiên cứu của chúng tôi, nano bạc nồng độ 1,6 mg/L thích hợp cho quá trình tái sinh chồi từ huyền phù tế bào thông qua mô sẹo và chất điều hoà sinh trưởng thực vật là yếu tố cảm ứng tạo mô sẹo.

## 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 ( $HgCl_2$ ,  $Ca(ClO)_2$ ) trong vi nhân giống cây hoa salem. Bên cạnh đó, nano bạc còn có tác dụng kích thích mẫu cấy cảm ứng nhanh, tác động đến sự phát sinh hình thái và hoàn toàn không gây ra bất kỳ tác động tiêu cực nào đến mẫu cấy. Ngoài ra, nano bạc nồng độ 1,2 mg/L thích hợp cho sự phát triển huyền

phụ tế bào. Trong khi khả năng hình thành, sinh trưởng và phát triển của chồi là 1,6 mg/L nano bạc.

**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

- 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.
- Amo-Marco JB, Ibanez MR (1998) Micropropagation of *Limonium cavannillesii* Erben, a threatened satice, from



inflorescence stems. *Plant Growth Reg* 24: 49–54.

Arab MM, Yadollahi A, Hosseini-Mazinani M, Bagheri S (2014) Effects of antimicrobial activity of silvernanoparticles on *in vitro* establishment of G x N15 (hybrid of almond x peach) rootstock. *J Gen Eng Biotech* 12: 103–110.

Bais HP, Sudha G, Suresh B, Ravishankar GA (2000) Silver nitrate influences *in vitro* root formation in *Decalepis hamiltonii* Wight and Arn. *Curr Sci* 79(6): 894–898.

Dương Tấn Nhựt (2012) *Thiết kế dụng cụ lấy mẫu trong nghiên cứu tái sinh và nhân giống vô tính cây Dầu tây*, Công nghệ Sinh học Thực vật, Nhà xuất bản Nông nghiệp, Hà Nội: 48–59.

Chaloupka K, Malam Y, Seifalian AM (2010) Nanosilver as a new generation of nanoparticle in biomedical applications. *Trends Biotechnol* 28(11): 580–588.

Chau HN, Bang LA, Buu NQ, Dung TTN, Ha HT, Quang DV (2008) Some results in manufacturing of nanosilver and investigation of its application for disinfection. *Adv Nat Sci* 9: 241–248.

Chi GL, Pua EC, Goh CJ (1991) Role of ethylene on de novo shoot regeneration from cotyledonary explants of *Brassica campestris* L. Pekinesis (four) Olsson *in vitro*. *Plant Physiol* 96: 178–183.

Dean KM, Qin Y, Palmer AE (2012) Visualizing metal ions in cells: an overview of analytical techniques, approaches, and probes. *Biochem Biophys Acta* 1823(9): 1406–1415.

Dương Tấn Nhựt, Hồ Thanh Tâm, Nguyễn Thị Thanh Hiền, Lê Kim Cương, Vũ Quốc Luận, Nguyễn Bá Nam, Nguyễn Phúc Huy, Vũ Thị Hiền, Trịnh Thị Hương, Nguyễn Hồng Hoàng, Nguyễn Xuân Tuấn, Nguyễn Việt Cường, Đỗ Mạnh Cường, Nguyễn Hoài Châu, Ngô Quốc Bửu (2014). Khảo sát ảnh hưởng của nano bạc lên sự phát triển và sinh trưởng của cây cúc, dầu tây, đồng tiền nuôi cấy *in vitro*. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 12(1): 103–111.

Halevy A, Mayak S (1981) Senescence and post harvest physiology of cut flower – part 2. *Hortic Rev* 3: 59–143.

Harazy A, Leshem B, Cohen A (1985) *In vitro* propagation of statice as an aid to breeding. *Hort Sci* 20: 361–362.

Igawa T, Hoshino Y, Mii M (2002) Efficient plant regeneration from cell cultures of ornamental statice, *Limonium sinuatum* Mill. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 38: 157–162.

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. *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, Hwany CY, Kim YK, Lee SY, Jeong DH, Cho MH (2007) Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine* 3: 95–101.

Kunitake H, Mii M (1990) Plant regeneration from cell culture-derived protoplasts of statice (*Limonium pezezii* Hubbard). *Plant Sci* 70: 115–119.

McTaggart AR, Liberato JR (2006) Cercosporoid fungi on statice (*Limonium sianuatum*) in Australia. *Australas Plant Dis Notes* 1: 37–39.

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 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.

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, Nhà xuất bản Khoa học - Kỹ thuật, Hà Nội: 26–48.

Rostami AA, Shahsavari A (2009) Nano-Silver particles eliminate the *in vitro* contamination of olive ‘Mission’ explants. *Asian J Plant Sci* 8(7): 505–509.

Samavi S, Hassanzadeh N, Faghihi M, Rezaee Danesh Y (2009) Effects of thyme (zaatar) essential oil and some chemical compounds in the control of citrus bacterial canker in Iran. *J Med Plant Pathol* 91(3): 691–696.

Seelye JF, Maddocks DJ, Burge GK, Morgan ER (1994) Shoot regeneration from leaf discs *Limonium perigrinum* using thidiazuron. *NZJ Crop Hort Sci* 22: 23–29.

Shah V and Belozerovala I (2008) Influence of metal nanoparticles on the soil microbial community and germination of lettuce seeds. *Water Air Soil Pollut* 197: 143–148.

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 and Salopek-Sondi B (2004) Silver nano particles as antimicrobial agent: Case study on *E. coli* 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): 262–256.

## THE ROLE OF NANOSILVER IN IMPROVING FREQUENCY OF SINGLE CELL FORMATION OF *LIMONIUM SINUATUM* (L.) MILL

Do Manh Cuong<sup>1,2</sup>, Le Thanh Long<sup>3</sup>, Hoang Thanh Tung<sup>1</sup>, Vu Quoc Luan<sup>1</sup>, Vu Thi Hien<sup>1</sup>, Nguyen Thi Nhat Linh<sup>1</sup>, Truong Thi Bich Phuong<sup>2</sup>, Duong Tan Nhut<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Tay Nguyen Institute for Scientific Research, Vietnam Academy of Science and Technology

<sup>2</sup>Hue University of Sciences, Hue University

<sup>3</sup>Institute of Tropical Biology, Vietnam Academy of Science and Technology

### SUMMARY

In this research, nanosilver with different concentrations and treatment time was used to sterilize infection agents and induce initial explants which were used as materials for cell suspension culture of *Limonium sinuatum*. The result showed that leaf explants sterilized with 0.2 g/L nanosilver for 20 minutes had highest effect (live rate 73.33%) comparing to HgCl<sub>2</sub> and Ca(ClO)<sub>2</sub> (56.66% and 64.44%, respectively). In addition, the leaf explants which were treated with nanosilver and cultured in ½ MS medium supplemented with 20 g/L sucrose, 1 mg/L picloram and 2.5 g/L gelrite also induced calli (friable calli, milk white color, embryogenic callus structure). Moreover, cell suspension formation process from these calli was also observed highest on the 20<sup>th</sup> day (49,088 cells/mL) in liquid shaking culture condition comparing to control treatment (19,361 cells/mL) when they were cultured on similar medium combined with 1.2 mg/L nanosilver. These cells had the best growth, development and regeneration from the 16<sup>th</sup> day to the 20<sup>th</sup> day. The ability of shoot and callus regeneration was highest (67.77%) in ½ MS medium which was supplemented with 20 g/L sucrose, 1 mg/L zeatin, 2.5 g/L gelrite and 1.6 mg/L nanosilver compared with control treatment having no nanosilver (40.00%). This research showed that in micropropagation of *Limonium sinuatum*, nanosilver was proved to be an effective agent for sterilization, explant induction, cell suspension origination, and callus and shoot regeneration. Beside that, nanosilver had negative impact on the development of explants when it was used with high concentration for extended period.

**Keywords:** *Limonium sinuatum*, nanosilver, sterilization, cell suspension, in vitro culture