

SẢN XUẤT CÂY DÂU TÂY (*Fragaria × ananassa*) IN VITRO TRONG HỆ THỐNG NUÔI CÂY QUY MÔ LỚN CÓ BỔ SUNG NANO BẠC

Trần Thị Thương¹, Hoàng Thanh Tùng¹, Hoàng Đắc Khải¹, Vũ Thị Hiền¹, Vũ Quốc Luận¹, Đỗ Mạnh Cường¹, Nguyễn Bá Nam², Nguyễn Hoài Châu³, Bùi Văn Thế Vinh⁴, Dương Tấn Nhựt¹✉

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

²Trường Đại học Đà Lạt

³Viện Công nghệ Môi trường, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

⁴Trường Đại học Công nghệ Thành phố Hồ Chí Minh (HUTECH)

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

Ngày nhận bài: 14.9.2020

Ngày nhận đăng: 15.10.2020

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện nhằm đánh giá khả năng sinh trưởng của cây Dâu tây ở giai đoạn ra rễ trên môi trường nuôi cấy có bổ sung nano bạc (AgNPs) cũng như sự biến động của khí ethylene trong bình nuôi cấy. Ngoài ra, các hệ thống nuôi cấy khác nhau lần đầu tiên được sử dụng để sản xuất cây Dâu tây ở quy mô lớn. Kết quả nghiên cứu cho thấy, chồi *in vitro* có kích thước 3 cm nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung 0,02 mg/L NAA, 1 g/L than hoạt tính, 30 g/L sucrose, 8 g/L agar và 0,5 mg/L AgNPs cho thời gian ra rễ sớm hơn khoảng 4 ngày và các chỉ tiêu sinh trưởng như chiều cao cây (5,60 cm), khối lượng tươi (242,67 mg), khối lượng khô (34,67 mg), số rễ/cây (6,67), chiều dài rễ (3,40 cm), SPAD (39,30 nmol/cm²) cao hơn so với đối chứng sau 15 ngày nuôi cấy. Bên cạnh đó, bổ sung 0,5 mg/L AgNPs làm giảm hàm lượng khí ethylene trong bình nuôi cấy (0,06 ppm) so với đối chứng (0,15 ppm) sau 15 ngày nuôi cấy. Với mật độ 10 cây/bình nuôi cấy thủy tinh (250 mL) với 40 mL môi trường cho hiệu quả sinh trưởng tối ưu hơn so với các mật độ nuôi cấy chồi khác sau 15 ngày nuôi cấy. Hệ thống nuôi cấy hộp nhựa hình vuông (đài × rộng × cao: 19 cm × 19 cm × 7 cm; thể tích 2,5 L) chứa 250 mL môi trường MS bổ sung 0,5 mg/L AgNPs có thể sản xuất được 100 cây giống khỏe mạnh; trong khi đó, hệ thống hộp nhựa hình chữ nhật (34 cm × 23 cm × 13 cm; thể tích 10 L) có thể sản xuất 200 cây giống. Những cây con có nguồn gốc nuôi cấy trên môi trường chứa 0,5 mg/L AgNPs trong hệ thống nuôi cấy hộp nhựa cho khả năng thích nghi và sinh trưởng tốt sau 30 và 60 ngày ở điều kiện vườn ươm.

Từ khóa: Cây Dâu tây, ethylene, hệ thống nuôi cấy, nano bạc, mật độ chồi.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Vi nhân giống cây Dâu tây là phương pháp tối ưu nhằm sản xuất cây giống sạch bệnh, đồng nhất với số lượng lớn (Mir *et al.*, 2010). Các nghiên cứu trước đây thường tập trung nghiên cứu về chất điều hòa sinh trưởng lên quá trình tạo nguồn mẫu *in vitro*, hình thành mô sẹo, sinh trưởng, phát triển của chồi và tạo cây hoàn chỉnh *in vitro* (Munir *et al.*, 2015; Wafaa và Wahdan, 2017; Palei *et al.*, 2017; Nguyễn Trần Đông

Phuong, Bùi Thị Thu Hằng, 2017). Tuy nhiên, bên cạnh những ưu điểm mang lại thì hệ thống vi nhân giống còn gặp phải một số khó khăn như việc nhiễm vi sinh vật (vi khuẩn, nấm); ngoài ra với một số đặc điểm như: bình nuôi cấy kín với độ ẩm cao, cường độ ánh sáng thấp, sử dụng đường làm nguồn năng lượng,... có thể làm xuất hiện một số hiện tượng bất thường (hiện tượng thủy tinh thể, vàng lá, hiện tượng hóa nâu, hình thành mô sẹo ở gốc rễ,...) ở các cây nhân giống *in vitro*. Một trong những vấn đề thường gặp

trong vi nhân giống cây Dầu tây là hiện tượng thủy tinh thể (hiện tượng tích lũy nước quá mức trong cây) với các biểu hiện hình thái như: cây bị mọng nước, thân giòn, dễ gãy, lá vàng úa, biến dạng cong hoặc xoắn; cây sinh trưởng và phát triển chậm dẫn đến giảm chất lượng cây giống và tỉ lệ sống sót thấp khi chuyển ra vườn ươm (Hdider, Desjardins, 1993; Palei *et al.*, 2015). Điều này có thể giải thích là do trong quá trình sinh trưởng và phát triển, mẫu cây sản sinh ra và tích lũy khí ethylene quá mức trong các bình nuôi cấy kín (Gaspar *et al.*, 1992). Nhằm khắc phục các bất thường trong vi nhân giống, gia tăng sinh trưởng và phát triển để nâng cao chất lượng cây giống, một số kỹ thuật như sử dụng bình thoáng khí và bổ sung than hoạt tính vào môi trường nuôi cấy đã được nghiên cứu (Hdider, Desjardins, 1993; Mir *et al.*, 2019). Tuy nhiên, một số hiện tượng bất thường của cây Dầu tây vẫn chưa được giải quyết triệt để.

Hiện nay, công nghệ nano là một lĩnh vực mới mang lại nhiều hứa hẹn với những ứng dụng to lớn trong rất nhiều lĩnh vực khác nhau như y tế, công nghệ thông tin, năng lượng, điện tử, khoa học môi trường, khoa học đời sống và bao gồm cả khoa học cây trồng (Iqbal *et al.*, 2020). Trong các hạt nano, hạt nano bạc (AgNPs) được sử dụng rộng rãi do đặc tính kháng khuẩn của chúng. Trong lĩnh vực nuôi cấy mô tế bào thực vật, đã có nhiều nghiên cứu chứng minh vai trò khử trùng của AgNPs được thực hiện (Pirtarighat *et al.*, 2019; Timoteo *et al.*, 2019). Bên cạnh khả năng kháng vi sinh vật với hiệu quả cao, AgNPs còn được biết đến với khả năng cải thiện sinh trưởng, phát triển của thực vật khi được bổ sung vào môi trường vi nhân giống ở một số loại cây trồng như cây Lúa mì (Razzaq *et al.*, 2016), cây hoa Cúc (Nghia *et al.*, 2017), cây hoa Đồng tiền (Hà Thị Mỹ Ngân *et al.*, 2019), cây Lan Hồ điệp (Đồng Huy Giới, Bùi Thị Thu Hương, 2019), cây hoa Lily (Salachna *et al.*, 2019), cây Chuối (El-Mahdy *et al.*, 2019), cây Xương rồng (Ali *et al.*, 2019), cây hoa Cẩm chướng (Zia *et al.*, 2020) và cây hoa Hồng (Duong Tấn Nhựt *et al.*, 2015; Ngan *et al.*, 2020). Tuy nhiên, trên cây Dầu tây vẫn chưa có nghiên cứu về ảnh hưởng của AgNPs lên quá trình vi nhân giống nói chung cũng như quá trình ra rễ và cải thiện

chất lượng cây giống nói riêng. Ngoài ra, tác động của AgNPs lên sự biến động khí ethylene trong bình nuôi cấy vẫn chưa được nghiên cứu trên cây Dầu tây.

Khi nhu cầu sản xuất cây Dầu tây tăng nhanh thì yêu cầu về cây giống cũng tăng theo. Tuy nhiên, các phương pháp nhân giống hiện nay chưa đáp ứng được nhu cầu về giống. Các hệ thống nuôi cấy thường ứng dụng trong giai đoạn ra rễ là các chai thủy tinh (250 - 500 mL) hay túi nylon (Duong Tấn Nhựt *et al.*, 2011) có thể nuôi cấy 10 - 20 cây; do đó, cần có những hệ thống nuôi cấy lớn hơn có thể sản xuất cây giống ở quy mô lớn nhưng vẫn đảm bảo chất lượng và sự đồng đều của cây giống. Vì vậy, nghiên cứu này được thực hiện nhằm đánh giá tác động của AgNPs và mật độ nuôi cấy lên khả năng ra rễ và sự biến động khí ethylene trong bình nuôi cấy cũng như đưa ra hệ thống nuôi cấy lớn có thể ứng dụng trong sản xuất thương mại.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Nguồn mẫu thực vật

Nguồn mẫu được sử dụng trong các thí nghiệm là các chồi cây Dầu tây *in vitro* có kích thước 3 cm, 30 ngày tuổi, sạch bệnh được cấy chuyển nhiều lần trên môi trường MS (Murashige, Skoog, 1962), hiện có sẵn tại Phòng Sinh học phân tử và Chọn tạo giống cây trồng, Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên.

Dung dịch nano bạc

Dung dịch AgNPs (500 ppm) với các hạt AgNPs có kích thước trung bình ≤ 20 nm, được thiết lập theo tỉ lệ: $[AgNO_3] \leq 1000$ ppm, $[\beta\text{-chitozan}] = 250 - 300$ ppm, $[NaBH_4] = 200$ ppm, tỉ lệ mol $[NaBH_4]/[AgNO_3] = 1/4$ và tốc độ nhỏ giọt của $NaBH_4$ là 10 - 12 giọt/phút được cung cấp bởi Viện Công nghệ Môi trường (Chau *et al.*, 2008).

Môi trường nuôi cấy

Môi trường MS bổ sung 0,02 mg/L NAA, 1 g/L than hoạt tính (AC), 30 g/L sucrose, 8 g/L

agar (Haddadi *et al.*, 2010) và các nồng độ AgNPs khác nhau. Môi trường nuôi cấy được điều chỉnh pH = 5,8 trước khi hấp khử trùng bằng autoclave ở 121°C, 1 atm trong thời gian 30min.

Hệ thống nuôi cấy

Bình nuôi cấy thủy tinh (BS0): Bình thủy tinh thể tích 250 mL có chứa 40 mL môi trường nuôi cấy. Mỗi bình nuôi cấy chứa 10 chồi (trừ thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của mật độ nuôi cấy).

Hộp nhựa hình vuông (Duy Tân, Việt Nam) (BS1): Hộp nhựa có kích thước 19 cm × 19 cm × 7 cm (dài × rộng × cao) với thể tích 2,5 L chứa 250 mL môi trường nuôi cấy. Mỗi bình nuôi cấy chứa 100 chồi.

Hộp nhựa hình chữ nhật (Duy Tân, Việt Nam) (BS2): Hộp nhựa có kích thước 34 cm × 23 cm × 13 cm (dài × rộng × cao) với thể tích 10 L chứa 500 mL môi trường nuôi cấy. Mỗi bình nuôi cấy chứa 200 chồi.

Phương pháp

Khảo sát ảnh hưởng của AgNPs đến khả năng ra rễ của cây Dâu tây

Chồi cây Dâu tây (3 cm) với 4 lá được cấy trên môi trường MS bổ sung 0,02 mg/L NAA, 30 g/L sucrose, 1 g/L AC, 8 g/L agar (Haddadi *et al.*, 2010) và các nồng độ khác nhau của AgNPs (0,25; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 mg/L). Đối chứng là môi trường ra rễ không bổ sung AgNPs.

Đánh giá sự biến động khí ethylene trong bình nuôi cấy cây Dâu tây

Bình nuôi cấy của cây Dâu tây (15 ngày) trên môi trường ra rễ có bổ sung nồng độ AgNPs tối ưu và đối chứng có miếng dán ngăn rò rỉ khí chuyên dụng ở nắp bình được sử dụng để xác định nồng độ khí ethylene. Khí ethylene sau đó được định lượng bằng phương pháp sắc ký khí (Gas chromatography- GC) với đầu dò ion hóa ngọn lửa (GC - Varian CP-3380-Walnut Creek, CA, Hoa Kỳ). Một cột thép không gỉ (3 m × 1,5 mm) chứa đầy chất hấp phụ - Porapack P, có kích thước hạt 80 - 100 Mesh đã được sử dụng. Nhiệt độ phát hiện cột, kim phun và ngọn lửa ion hóa lần lượt là 60°C, 90°C và 90°C. Khí nitơ được sử

dụng làm khí mang (55 mL/phút), sẽ đưa khí cần phân tích đến cột sắc ký (Cristescu *et al.*, 2013).

Khảo sát ảnh hưởng của mật độ nuôi cấy lên khả năng ra rễ của cây Dâu tây

Chồi cây Dâu tây (3 cm) với 4 lá được cấy vào bình nuôi cấy thủy tinh (250 mL) chứa 40 mL môi trường nuôi cấy có bổ sung nồng độ AgNPs tối ưu ở thí nghiệm trên với các mật độ nuôi khác nhau (5, 10 và 15 chồi/bình).

Khảo sát ảnh hưởng của các hệ thống nuôi cấy khác nhau lên sự sinh trưởng của cây Dâu tây

Các chồi Dâu tây (3 cm) với 4 lá được nuôi cấy trong các hệ thống nuôi cấy khác nhau (Bình thủy tinh, hộp nhựa hình vuông và hộp nhựa hình chữ nhật) trên môi trường nuôi cấy có bổ sung AgNPs tối ưu ở thí nghiệm ra rễ.

Khả năng hấp thụ AgNPs của cây Dâu tây trong các hệ thống nuôi cấy

Hàm lượng hấp thụ AgNPs trong môi trường nuôi cấy của các hệ thống nuôi cấy sau 5, 10, 15 ngày nuôi cấy được xác định bằng phương pháp quang phổ hấp thụ OD với bước sóng 480 nm (Bhui *et al.*, 2009) bằng máy quang phổ hấp thụ (Shimadzu, UV-2450, Nhật Bản).

Tỷ lệ AgNPs hấp thụ:

$$\text{Ab-Ag (\%)} = \frac{\text{Ag}_0 - \text{Ag}_T}{\text{Ag}_0} \times 100$$

Trong đó: Ab-Ag là tỷ lệ AgNPs được hấp thụ sau 5; 10 hoặc 15 ngày nuôi cấy (%),

Ag₀ là tổng hàm lượng AgNPs trong môi trường nuôi cấy lúc đầu (mg/L),

Ag_T là tổng hàm lượng AgNPs trong môi trường nuôi cấy ở ngày nuôi cấy thứ 5; 10 hoặc 15 (mg/L).

Khảo sát ảnh hưởng của AgNPs đến khả năng thích nghi, sinh trưởng và phát triển của cây Dâu tây ở giai đoạn vườn ươm

Cây con có nguồn gốc từ các hệ thống bình thủy tinh, hộp nhựa hình vuông và hộp nhựa hình chữ nhật (200 cây/hệ thống) được chuyển vào nhà kính và trồng trên giá thể đất sạch TS1 (Công ty TNHH Hạt giống hoa Việt Nam, TP. Hồ Chí

Minh), pH khoảng 6,5 và phun nước 2 lần/ngày trong tuần đầu sau khi trồng, sau đó tưới 1 lần/ngày vào sáng sớm.

Quan sát hình thái giải phẫu khí khổng

Mẫu lá *in vitro* của cây Dâu tây 15 ngày tuổi có nguồn gốc từ nghiệm thức bổ sung AgNPs tối ưu và đối chứng được thu nhận, tách lớp biểu bì dưới rồi đặt lên lam kính và quan sát dưới kính hiển vi điện tử (Keynce Corporation, Nhật Bản) dưới vật kính $\times 40$ (Russell, 2004).

Điều kiện nuôi cấy

In vitro: Mẫu cấy được nuôi trong điều kiện của phòng nuôi cấy với nhiệt độ $25 \pm 2^\circ\text{C}$, dưới ánh sáng đèn huỳnh quang với cường độ 40 - 45 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, quang chu kỳ 12 giờ/ngày, độ ẩm 55 - 60%.

Ex vitro: Cây con được trồng trong điều kiện của vườn ươm với nhiệt độ $25 \pm 2^\circ\text{C}$ vào ban ngày và $15 \pm 2^\circ\text{C}$ vào ban đêm, độ ẩm trung bình khoảng 75 - 80% và sử dụng ánh sáng tự nhiên có che sáng (40%) bằng lưới đen, pH đất khoảng 6,5.

Xử lý số liệu

Mỗi nghiệm thức lặp lại 3 lần. Số liệu được xử lý và phân tích bằng phần mềm Microsoft Excel® 2010 và SPSS 20.0 theo phép thử Duncan với $p < 0,05$ (Duncan, 1955).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Ảnh hưởng của AgNPs lên khả năng ra rễ *in vitro*

Kết quả ghi nhận được cho thấy AgNPs có tác động lên khả năng ra rễ, sinh trưởng và phát triển của các chồi Dâu tây nuôi cấy *in vitro* (Hình 1, 2). Tỷ lệ ra rễ của chồi Dâu tây đạt 100% ở tất cả nghiệm thức có bổ sung AgNPs và đối chứng (Hình 1). Tuy nhiên, thời gian cảm ứng rễ (4,33 ngày) trên môi trường có bổ sung 0,5 mg/L AgNPs sớm hơn khoảng 4 ngày so với đối chứng (7,67 ngày) (Hình 2D).

Ngoài ra, các chỉ tiêu sinh trưởng như chiều cao cây, khối lượng tươi, khối lượng khô, chiều dài rễ và chỉ số SPAD (Hàm lượng chlorophyll

trong lá được đo bằng máy SPAD-502, Konica Minolta INC., Nhật Bản) của cây Dâu tây tăng tỷ lệ thuận với sự gia tăng của nồng độ AgNPs (0 - 0,5 mg/L) và đạt cao nhất ở nghiệm thức bổ sung 0,5 mg/L AgNPs (5,60 cm; 242,67 mg, 34,67 mg, 6,67 rễ/cây và 39,3 nmol/cm^2 ; tương ứng). Tuy nhiên, khi nồng độ AgNPs vượt quá 0,5 mg/L, kết quả cho thấy cây sinh trưởng chậm lại (Hình 2A, B, C).

Tỉ lệ tích lũy chất khô (TLCK – Tỷ số giữa khối lượng khô và khối lượng tươi) phản ánh mức độ tích lũy nước trong cơ thể thực vật và có thể dùng để đánh giá hiện tượng thủy tinh thể trong vi nhân giống thực vật. Tỷ lệ này càng thấp thì mức độ tích lũy nước của thực vật càng cao, chồi bị thủy tinh thể làm giảm chất lượng cũng như tỷ lệ sống sót ở giai đoạn vườn ươm và ngược lại. Trong nghiên cứu này, khi tăng nồng độ AgNPs bổ sung vào môi trường nuôi cấy, TLCK của chồi tăng lên và luôn cao hơn đối chứng (Hình 2B). Kết quả này tương tự với nghiên cứu của Ngan và đồng tác giả (2020), khi bổ sung AgNPs đã ức chế sự hình thành và hoạt động của ethylene cũng như gia tăng TLCK, từ đó làm giảm hiện tượng thủy tinh thể trong vi nhân giống cây Đồng tiền.

Mahmoud và Kosar (2014) đã báo cáo rằng, chồi cây Dâu tây nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung 4 mg/L AgNO_3 (tương đương 2,56 mg/L Ag^+) có tỷ lệ ra rễ đạt 100%, chiều cao cây (5,3 cm) và số rễ/cây (1,5) đạt cao nhất, điều này được giải thích là mặc dù các ion bạc không trực tiếp tham gia vào sự tăng trưởng của thực vật nhưng chúng đã tác động gián tiếp thông qua tác động kim hãm hoạt động ethylene. Tuy nhiên trong nghiên cứu này, nồng độ AgNPs cho quá trình tạo rễ là 0,5 mg/L AgNPs đã cho những kết quả tối ưu (nồng độ AgNPs thấp hơn so với AgNO_3). Như vậy việc sử dụng AgNPs đã có hiệu quả trong việc tạo rễ, sinh trưởng của cây cũng như thời gian cảm ứng rễ sớm hơn.

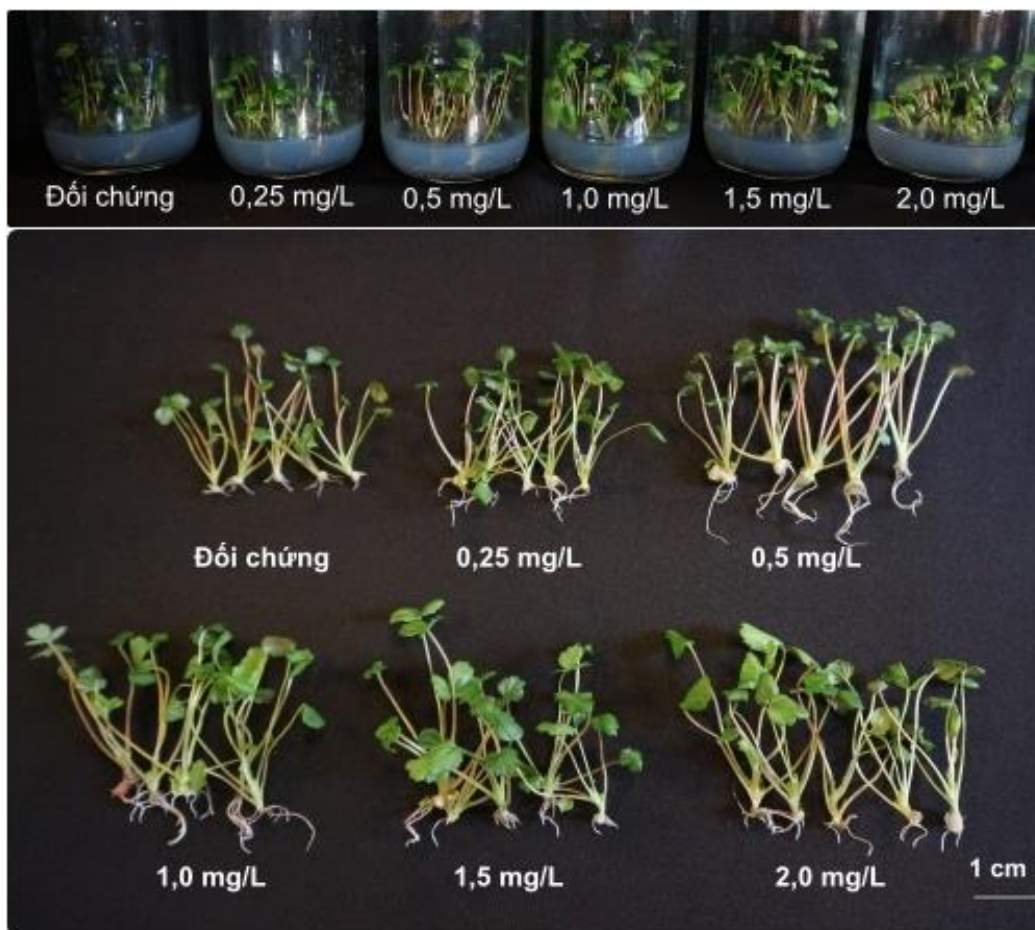
Ở nghiệm thức bổ sung 2,0 mg/L AgNPs, kết quả ghi nhận được cho thấy hình thái rễ (bị hóa nâu) có sự khác biệt so với các nghiệm thức bổ sung nồng độ AgNPs thấp hơn. Có thể nồng độ AgNPs quá cao đã gây nên hiện tượng này, điều

này làm cho khả năng hấp thu chất dinh dưỡng và nước của rễ giảm dẫn đến cây tăng trưởng chậm hơn các nghiệm thức khác (Hình 1). Syu và đồng tác giả (2014) chỉ ra rằng nồng độ AgNPs cao gây ra stress oxy hóa dẫn đến hàm lượng các gốc oxy hoạt hóa trong rễ gia tăng, khi chúng thay thế các tín hiệu ion Ca^{2+} sẽ làm giảm sự cảm ứng của auxin trong các mô rễ.

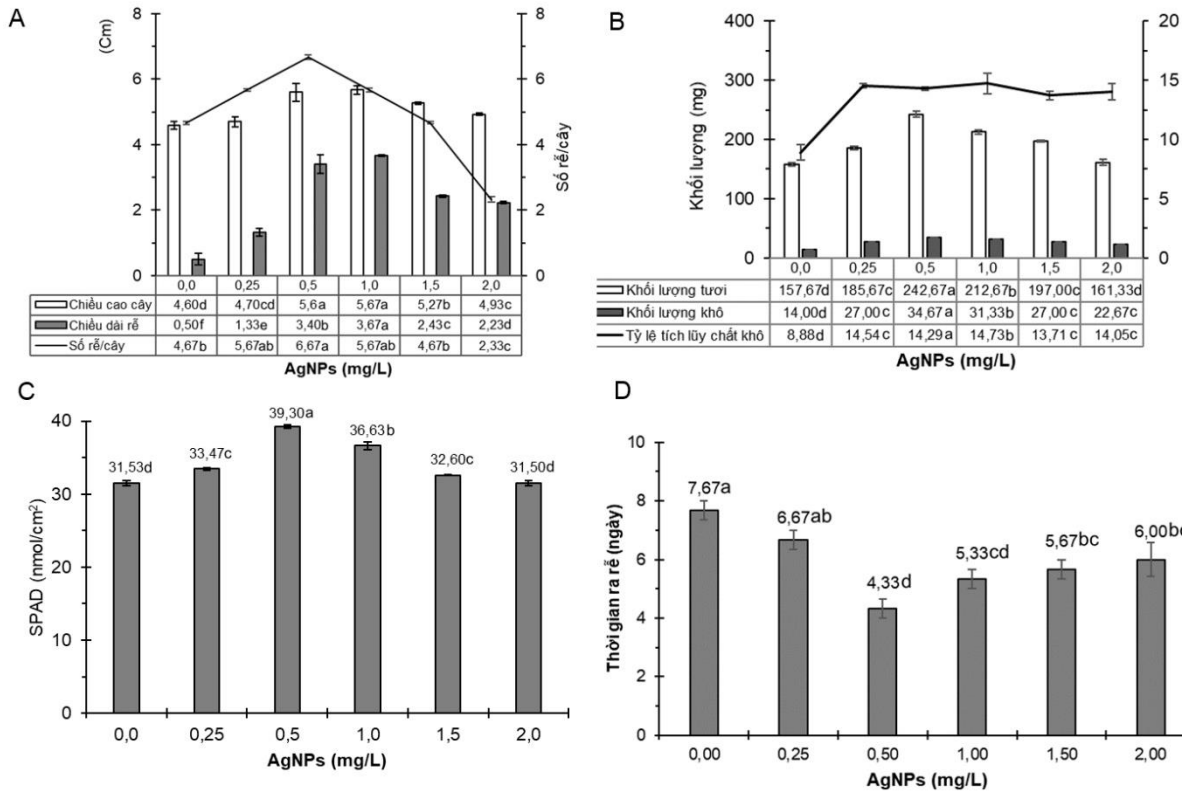
Khi quan sát lớp biểu bì ở mặt dưới của lá dưới kính hiển vi, kết quả cho thấy lá cây Dầu tày ở nghiệm thức đối chứng có khí khổng hình cầu, độ mở khí khổng, một số khí khổng bị biến dạng (Hình 3A); trong khi khí khổng của lá ở nghiệm thức bổ sung 0,5 mg/L AgNPs có hình elip, độ mở hẹp hơn (Hình 3B), khi tiếp tục tăng nồng độ AgNPs cho thấy khí khổng bị

biến dạng nhiều, độ mở khí khổng quá mức được ghi nhận.

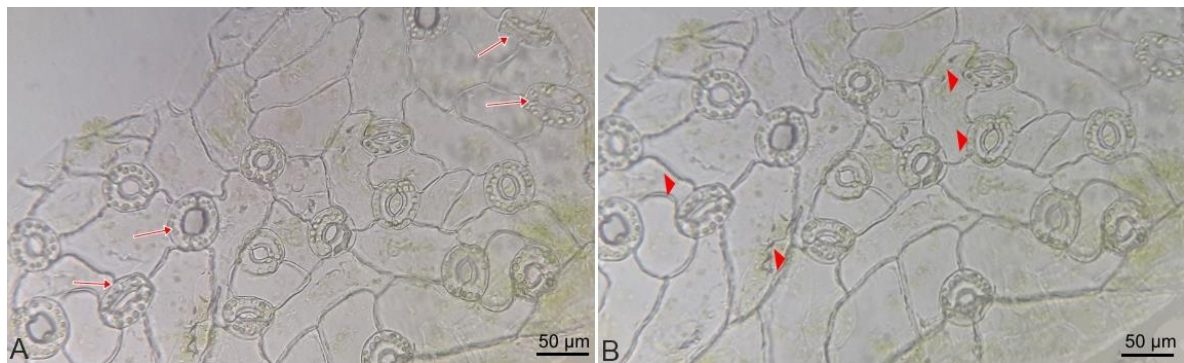
Desikan và đồng tác giả (2006) cho rằng, ethylene là một trong những tác nhân gây ảnh hưởng đến độ mở khí khổng và có thể được kiểm soát bởi các chất đối kháng như 1-Methylcyclopropene (1-MCP) và ion bạc, đối với các cây *in vitro* thì khí khổng có dạng hình cầu được xem là bất thường; ngược lại, khí khổng có hình elip được xem là bình thường. Độ ẩm tương đối và hàm lượng ethylene tích lũy trong bình nuôi cấy cao có thể gây ra sự phát triển bất thường của khí khổng, số lượng khí khổng nhiều hơn, khí khổng có dạng hình cầu, độ mở khí khổng rộng, khí khổng chứa ít lục lạp, đây cũng chính là những triệu chứng của hiện tượng thủy tinh thể.



Hình 1. Ảnh hưởng của các nồng độ AgNPs khác nhau lên khả năng ra rễ *in vitro* cây Dầu tày sau 15 ngày nuôi cấy.



Hình 2. Ảnh hưởng của nồng độ AgNPs khác nhau lên quá trình ra rế của cây Dâu tây sau 15 ngày nuôi cấy. **A:** Ảnh hưởng của AgNPs với các nồng độ khác nhau (0; 0,25, 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 mg/L) lên chiều cao cây, chiều dài rế, số rế/cây; **B:** Khối lượng tươi, khối lượng khô và tỉ lệ tích lũy chất khô của cây Dâu tây nuôi cấy *in vitro*; **C:** Ảnh hưởng của AgNPs với các nồng độ khác nhau lên chỉ số SPAD; **D:** Ảnh hưởng của AgNPs lên thời gian cảm ứng ra rế cây Dâu tây *in vitro*.



Hình 3. Khí khổng của lá cây Dâu tây ở nghiệm thức đối chứng (A) và bổ sung 0,5 mg/L AgNPs (B).

Sự biến động khí ethylene trong bình nuôi cấy cây Dâu tây

Sự tích lũy khí ethylene (0,06 ppm) trong

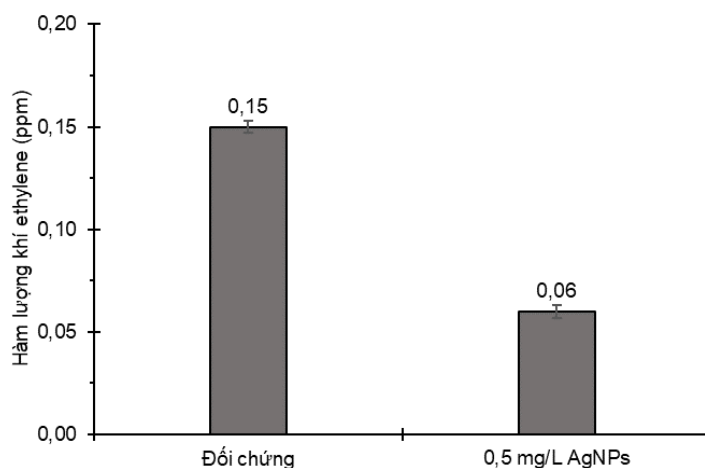
bình nuôi cấy bổ sung 0,5 mg/L AgNPs thấp hơn khoảng 2,5 lần so với nghiệm thức đối chứng (0,15 ppm) (Hình 4). Bên cạnh đó, cây Dâu tây ở môi trường có bổ sung 0,5 mg/L AgNPs cũng thể

hiện sự sinh trưởng và phát triển vượt trội so với các nghiệm thức còn lại và đối chứng (Hình 2). Kết quả này tương tự với nghiên cứu của Ngan và đồng tác giả (2020) trên đối tượng cây hoa Hồng, việc bổ sung nano bạc ở nồng độ thích hợp vào môi trường nuôi cấy đã làm giảm sự tích lũy khí ethylene trong bình nuôi cấy.

Như vậy, kết quả nghiên cứu này cho thấy, vai trò của AgNPs trong việc ức chế sự hình thành và hoạt động của khí ethylene. AgNPs có khả năng ức chế hoạt động của khí ethylene bằng cách ngăn chặn sự liên kết của ethylene với các thụ thể trong tế bào thực vật; ngăn chặn sự hình

thành và hoạt động của khí ethylene. Một số nghiên cứu trước đây đã cho thấy rằng sự tích lũy khí ethylene trong bình nuôi cấy đã giảm đáng kể khi sử dụng khi sử dụng AgNO_3 , Ag_2SO_4 trong vi nhân giống cây Anh đào (Sarropoulou, Maloupa, 2017), cây Bông (Kumar *et al.*, 2016).

Kết quả này tương tự nghiên cứu của Qin và đồng tác giả (2005), khi bổ sung 0,5 - 1,0 mg/L AgNO_3 vào môi trường ra rễ cây Dâu tây thì đã làm giảm hàm lượng ethylene trong bình nuôi cấy, tuy nhiên khi tiếp tục tăng nồng độ AgNO_3 đã làm gia tăng nồng độ ethylene tích lũy trong bình nuôi cấy.



Hình 4. Sự biến động khí ethylene trong bình nuôi cấy cây Dâu tây sau 15 ngày nuôi cấy.

Ảnh hưởng mật độ nuôi cấy lên khả năng ra rễ của cây Dâu tây

Nghiên cứu nói về mối tương quan giữa mật độ của mẫu cấy, thể tích môi trường nuôi cấy cũng như sự cạnh tranh giữa các mẫu cấy trong môi trường còn rất hạn chế. Mustafa và đồng tác giả (2011) nhận thấy rằng, khi tăng mật độ (hay giảm khoảng cách) của mẫu cấy trụ dưới lá mầm cây Lanh thì sẽ gia tăng số cây và chiều cao cây. Ngoài ra, mật độ mẫu cấy cũng ảnh hưởng tới sự sinh trưởng và khả năng ra rễ của cây Cúc trong hệ thống vi thủy canh (Hoàng Thanh Tùng, 2018).

Kết quả của nghiên cứu này cho thấy, sau 15 ngày nuôi cấy, các chỉ tiêu sinh trưởng ở mật độ 10 cây/bình không có sự khác biệt đáng kể so

với nghiệm thức 5 cây/bình, cây sinh trưởng, phát triển tốt (Bảng 1). Tuy nhiên khi tiếp tục tăng mật độ thành 15 cây/bình thì sinh trưởng của cây có xu hướng giảm dần (trừ chỉ tiêu chiều cao cây) (Bảng 1 và Hình 5). Điều này có thể là với điều kiện mật độ cao, các cây cạnh tranh nhau về dinh dưỡng, nguồn sáng đã làm giảm sinh trưởng của cây.

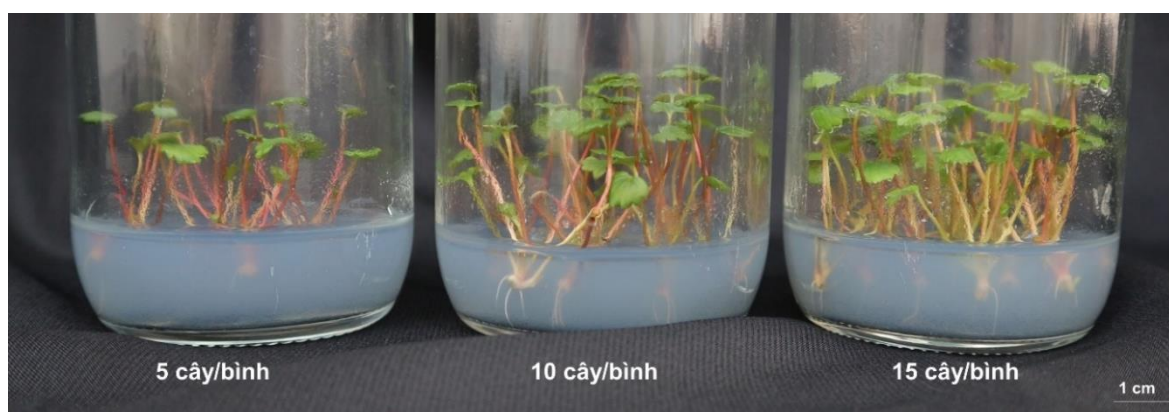
Ảnh hưởng của các hệ thống nuôi cấy khác nhau lên sự sinh trưởng của cây Dâu tây

Sau 15 ngày nuôi cấy, kết quả ghi nhận cho thấy, các chỉ tiêu sinh trưởng trong các hệ thống lớn (BS1 và BS2) không có sự khác biệt đáng kể so với nghiệm thức đối chứng (BS0) (Bảng 2 và Hình 6).

Bảng 1. Ảnh hưởng mật độ nuôi cấy lên khả năng ra rễ của cây Dâu tây sau 15 ngày nuôi cấy.

| Mật độ (cây/bình) | Chiều cao cây (cm) | Khối lượng tươi (mg) | Khối lượng khô (mg) | Số rễ/cây | Chiều dài rễ (cm) | SPAD (nmol/cm ²) |
|-------------------|--------------------|----------------------|---------------------|-----------|-------------------|------------------------------|
| 5 | 5,69b* | 222,83a | 33,63a | 6,40a | 3,33a | 36,5a |
| 10 | 5,98ab | 221,17ab | 33,17ab | 6,50a | 3,43a | 34,4b |
| 15 | 6,06a | 214,97b | 30,18b | 5,60b | 2,85 b | 30,03c |

Ghi chú: *Những chữ cái (a, b, c,...) trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa với $p < 0,05$ trong phép thử Duncan.

**Hình 5.** Ảnh hưởng mật độ nuôi cấy (5, 10, 15 chồi/bình) lên khả năng ra rễ của cây Dâu tây sau 15 ngày nuôi cấy.**Bảng 2.** Sự sinh trưởng của cây Dâu tây trong các hệ thống nuôi cấy khác nhau sau 15 ngày nuôi cấy.

| Hệ thống nuôi cấy | Chiều cao cây (cm) | Khối lượng tươi (mg) | Khối lượng khô (mg) | Số rễ/cây | Chiều dài rễ (cm) | SPAD (nmol/cm ²) |
|-------------------|--------------------|----------------------|---------------------|-----------|-------------------|------------------------------|
| BS0 | 5,33a* | 242,67a | 34,33a | 5,67a | 4,33a | 38,17a |
| BS1 | 5,67a | 240,67b | 33,67a | 6,33a | 3,67ab | 36,40b |
| BS2 | 5,36a | 241,33ab | 34,67a | 6,67a | 3,33b | 37,27ab |

Ghi chú: *Những chữ cái (a, b, c,...) trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa với $p < 0,05$ trong phép thử Duncan.

Hệ thống nuôi cấy hộp nhựa hình vuông (BS1) có thể sản xuất 100 cây giống; trong khi đó, hệ thống hộp nhựa hình chữ nhật (BS2) có thể sản xuất 200 cây giống giúp gia tăng hiệu quả sản xuất so với bình thủy tinh (250 mL) chứa 10 cây/bình. Kết quả của nghiên cứu này cho thấy, 2 hệ thống nuôi cấy BS1 và BS2 có tiềm năng trong sản xuất cây giống ở quy mô thương mại. Nghiên cứu của Tung và đồng tác giả (2018) cũng đã chứng minh rằng, các hệ thống nuôi cấy hộp nhựa hình chữ nhật có thể sản xuất 300 và 600 cây giống Cúc trong hệ thống vi thủy canh

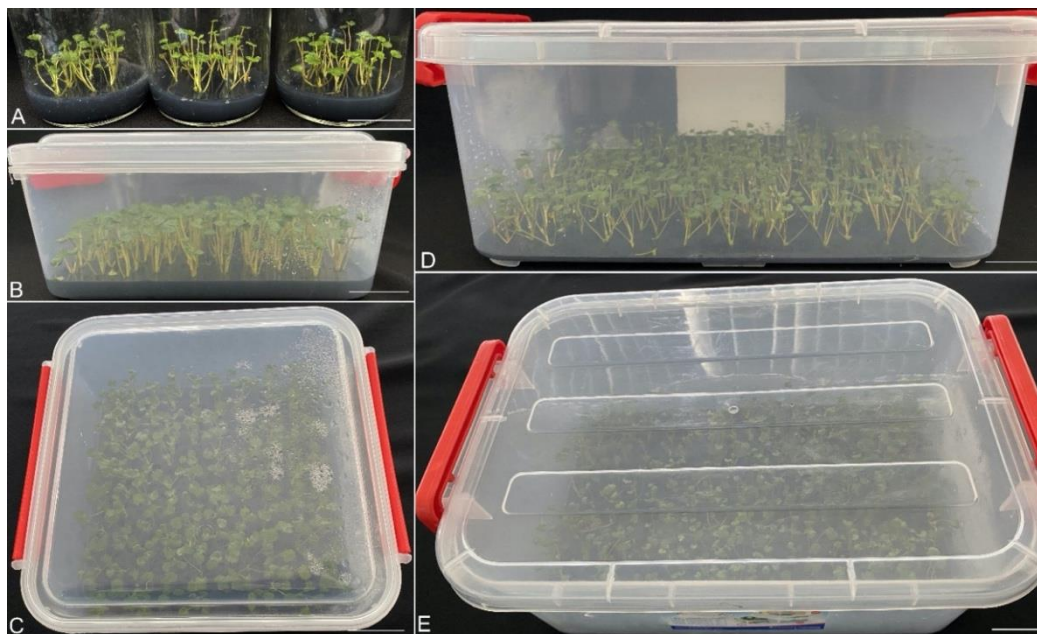
cũng như chất lượng không có sự khác biệt khi so sánh với hệ thống bình nuôi cấy thủy tinh. Điều này cho thấy các hộp nhựa có kích thước lớn hoàn toàn có thể thay thế hệ thống bình nuôi cấy thủy tinh trong sản xuất cây giống với số lượng lớn.

Khả năng hấp thụ AgNPs của cây Dâu tây trên các hệ thống nuôi cấy

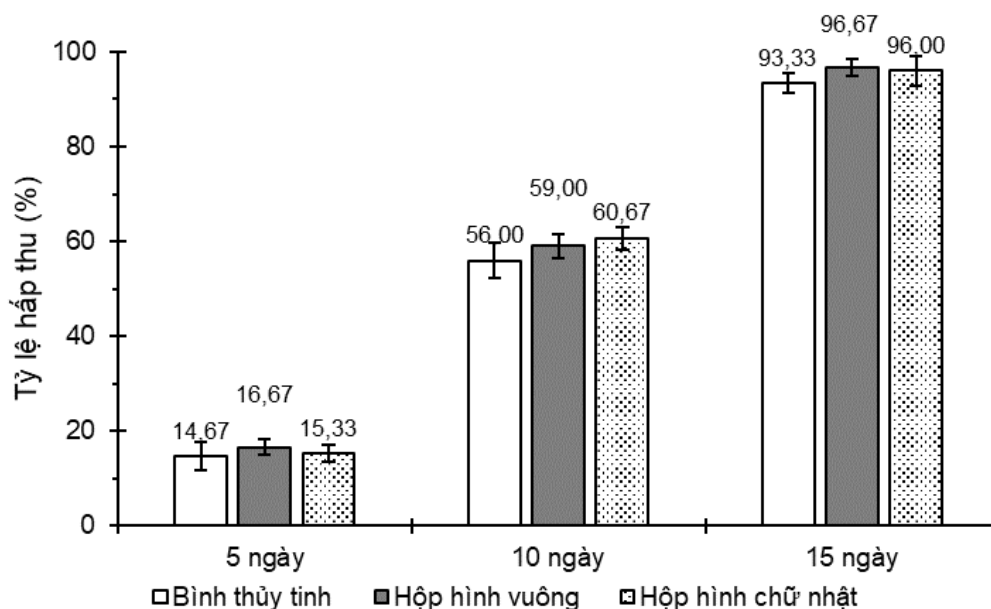
Tỷ lệ hấp thụ AgNPs của cây Dâu tây ở các hệ thống nuôi cấy khác nhau sau 5, 10, 15 ngày nuôi cấy được ghi nhận bởi phương pháp quang

phổ hấp thụ OD với bước sóng 480 nm. Tỷ lệ hấp thụ AgNPs chỉ đạt 14,67 - 16,67% sau 5 ngày nuôi cấy và tăng lên 56,00 - 60,67% sau 10 ngày nuôi cấy. Sau 15 ngày nuôi cấy, tỷ lệ

hấp thụ đã tăng lên 93,33 - 96,67% (Hình 7). Khả năng hấp thụ AgNPs từ ngày thứ 5 trở đi có sự gia tăng nhanh hơn so với 5 ngày đầu sau nuôi cấy.



Hình 6. Ảnh hưởng của các hệ thống nuôi cấy khác nhau lên sự ra rễ của cây Đậu tây. (Thước đo: 5 cm). **A:** Hệ thống bình thủy tinh chứa 40 mL môi trường (BS0); **B, C:** Hệ thống hộp nhựa hình vuông chứa 250 mL môi trường (BS1); **D, E:** Hệ thống hộp nhựa hình chữ nhật chứa 500 mL môi trường (BS2).



Hình 7. Tỷ lệ hấp thụ AgNPs của cây Đậu tây ở các hệ thống nuôi cấy khác nhau sau 5, 10, 15 ngày nuôi cấy.

Thích nghi, sinh trưởng và phát triển của cây Dâu tây ở giai đoạn vườn ươm

Sau 30 ngày chuyển sang điều kiện vườn ươm, tất cả các cây Dâu tây có nguồn gốc trong 3 hệ thống nuôi cấy (BS0, BS1 và BS2) cho khả năng thích nghi ở điều kiện vườn ươm thể hiện qua tỷ lệ sống sót (100%) và các chỉ tiêu sinh trưởng không có sự khác biệt đáng kể (Bảng 3).

Tất cả cây Dâu tây trong các hệ thống nuôi cấy khác nhau đều hình thành thân bò sau khoảng 30 ngày nuôi trồng ở điều kiện vườn ươm (Bảng 4). Sau 60 ngày nuôi trồng, không có sự khác biệt về sự hình thành cây ngó (7,26 - 7,76 ngó/cây) cũng như sự sinh trưởng của ngó (Bảng 4 và Hình 8). Kết quả cho thấy rằng, các cây Dâu tây có nguồn gốc từ các hệ thống nuôi cấy khác nhau cho sự sinh trưởng không có sự khác biệt.

Bảng 3. Sự sinh trưởng của cây Dâu tây trong các hệ thống nuôi cấy khác nhau sau 30 ngày nuôi trồng ở giai đoạn vườn ươm.

| Hệ thống nuôi cấy | Tỷ lệ sống sót (%) | Chiều cao cây (cm) | Khối lượng tươi (g) | Số rễ/cây | Chiều dài rễ (cm) | SPAD (nmol/cm ²) |
|-------------------|--------------------|--------------------|---------------------|-----------|-------------------|------------------------------|
| BS0 | 100a | 10,93ab | 3,67a | 8,33ab | 10,33b | 40,13ab |
| BS1 | 100a | 11,67a | 3,63a | 8,67a | 10,67ab | 42,77a |
| BS2 | 100a | 10,09b | 3,70a | 8,33ab | 12,33a | 41,27ab |

Ghi chú: *Những chữ cái (a, b, c,...) trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa với $p < 0,05$ trong phép thử Duncan.

Bảng 4. Sự sinh trưởng của cây Dâu tây trong các hệ thống nuôi cấy khác nhau sau 60 ngày nuôi trồng ở giai đoạn vườn ươm.

| Hệ thống nuôi cấy | Thời gian hình thành thân bò (ngày) | Số thân bò/cây | Số ngó/thân bò | Tổng số ngó** | Chiều cao ngó (cm) | Số lá/ngó | Khối lượng tươi ngó (g) |
|-------------------|-------------------------------------|----------------|----------------|---------------|--------------------|-----------|-------------------------|
| BS0 | 29,33ab* | 3,33a | 2,33a | 7,76a | 7,35a | 3,33a | 3,58a |
| BS1 | 30,00a | 3,67a | 2,33a | 7,34ab | 7,18ab | 3,33a | 3,44ab |
| BS2 | 30,67a | 3,63a | 2,00a | 7,26ab | 7,09ab | 3,00a | 3,50a |

Ghi chú: *Những chữ cái (a, b, c,...) trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa với $p < 0,05$ trong phép thử Duncan. **Tổng số ngó = số thân bò/cây × số ngó/thân bò.



Hình 8. Sinh trưởng, phát triển của cây Dâu tây trên các hệ thống khác nhau sau 60 ngày trồng ở vườn ươm. **A:** Cây có nguồn gốc từ hệ thống BS0 ; **B:** Cây có nguồn gốc từ hệ thống BS1; **C:** Cây có nguồn gốc từ hệ thống BS2.

KẾT LUẬN

Kết quả của nghiên cứu cho thấy bổ sung 0,5 mg/L AgNPs có hiệu quả trong việc cải thiện quá trình ra rễ, gia tăng sinh trưởng của cây cũng như hạn chế sự tích lũy khí ethylene trong bình nuôi cấy. Mật độ nuôi cấy 10 chồi/bình thủy tinh (250 mL) cho khả năng sinh trưởng tốt hơn mật độ 5 và 15 chồi/bình. Hệ thống nuôi cấy hình vuông (100 chồi/hộp) và hệ thống hình chữ nhật (200 chồi/hộp) có tiềm năng ứng dụng trong sản xuất thương mại cây Dâu tây. Ngoài ra, cây Dâu tây có nguồn gốc bổ sung 0,5 mg/L AgNPs trong các hệ thống nuôi cấy khác nhau cho khả năng thích nghi, sinh trưởng và phát triển tương đồng sau 30 và 60 ngày nuôi trồng.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ Phát triển khoa học và công nghệ Quốc gia (NAFOSTED) trong đề tài mã số 106.01-2019.301.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Ali A, Mohammad S, Khan MA, Raja NI, Arif M, Kamil A, Mashwani ZUR (2019) Silver nanoparticles elicited *in vitro* callus cultures for accumulation of biomass and secondary metabolites in *Caralluma tuberculata*. *Artif Cell Nanomed B* 47(1): 715-724.
- Bhui DK, Bar H, Sarkar P, Sahoo GP, Misra A (2009) Synthesis and UV-vis spectroscopic study of silver nanoparticles in aqueous SDS solution. *J Mol Liq* 145(1): 33-37.
- Cristescu SM, Mandon J, Arslanov D, De Pessemier J, Hermans C, Harren FJ (2013) Current methods for detecting ethylene in plants. *Ann Bot* 111(3): 347-360.
- 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-Nanosci* 9(2): 241-248.
- Desikan R, Last K, Harrett-Williams R, Tagliavia C, Harter K, Hooley R, Neill SJ (2006) Ethylene-induced stomatal closure in *Arabidopsis* occurs via AtrbohF-mediated hydrogen peroxide synthesis. *The Plant J* 47(6): 907-916.
- Duncan DB (1955) Multiple range and multiple F tests. *Biometrics* 11(1): 1-42.

Dương Tấn Nhựt (2011) *Công nghệ sinh học thực vật: Nghiên cứu cơ bản và ứng dụng*, Tập 1. NXB. Nông nghiệp TP. Hồ Chí Minh, 531 trang.

Dương Tấn Nhựt, Nguyễn Xuân Tuấn, Nguyễn Thị Thùy Anh, Hồ Việt Long, Hoàng Thanh Tùng, Nguyễn Bá Nam, Nguyễn Phúc Huy, Vũ Quốc Luận, Vũ Thị Hiền, Lê Thị Thu Hiền, Nguyễn Hoài Châu, Ngô Quốc Bửu (2015) Nghiên cứu ảnh hưởng của nano bạc lên sự nhân chồi, sinh trưởng và phát triển của cây hoa Hồng (*Rosa sp.*) *in vitro*. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 13(2): 231-239.

Đông Huy Giới, Bùi Thị Thu Hương (2019) Nghiên cứu sử dụng nano bạc trong nhân giống *in vitro* lan Hồ điệp vàng (*Phalaenopsis sp.*). *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Lâm nghiệp* 1: 19-24.

El-Mahdy MT, Radi AA, Shaaban MM (2019) Impacts of exposure of Banana to silver nanoparticles and silver ions *in vitro*. *Sciences* 9(3): 727-740.

Gaspar T, Kevers C, Crèvecoeur M, Penel C, Foidart JM, Greppin H (1992) Habituation and vitrification of plants cultured *in vitro*: a reciprocal relationship. *Wiss Z Humboldt Univ Berl Math Naturwiss* 41(3): 35-40.

Hà Thị Mỹ Ngân, Trần Đào Hồng Trinh, Đỗ Mạnh Cường, Hoàng Thanh Tùng, Nguyễn Thị Nhật Linh, Vũ Thị Hiền, Phan Lê Hà Nguyễn, Vũ Quốc Luận, Bùi Văn Lê, Dương Tấn Nhựt (2019) Hạn chế hiện tượng thủy tinh thể và gia tăng tỉ lệ sống của cây con hoa Đồng tiền (*Gerbera jamesonii*) nuôi cấy *in vitro* trong môi trường có bổ sung nano bạc. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 17(1): 115-124.

Haddadi F, Aziz MA, Saleh G, Rashid AA, Kamaladini H (2010) Micropropagation of Strawberry cv. Camarosa: prolific shoot regeneration from *in vitro* shoot tips using thidiazuron with N6-benzylamino-purine. *HortSci* 45(3): 453-456.

Hdider C, Desjardins Y (1993) Prevention of shoot vitrification of Strawberry micropropagated shoots proliferated on liquid media by new antivitrifying agents. *Canadian J Plant Sci* 73(1): 231-235.

Hoàng Thanh Tùng (2018) *Hoàn thiện hệ thống nhân giống vi thủy canh cây hoa cúc trắng (Chrysanthemum morifolium)*. Luận án Tiến sĩ Sinh lý học Thực vật, Đại học Khoa học Huế.

Iqbal T, Tehseen A, Anwar M, Masooma S, Bashir A (2020) A short review on role of nanotechnology in daily life. *J Comput Biol* 8(3): 24-33.

- Kumar GP, Sivakumar S, Siva G, Vigneswaran M, Kumar TS, Jayabalan N (2016) Silver nitrate promotes high-frequency multiple shoot regeneration in Cotton (*Gossypium hirsutum* L.) by inhibiting ethylene production and phenolic secretion. *In Vitro Cell Dev-Pl* 52(4): 408-418.
- Mahmoud O, Kosar M (2014) *In vitro* achievement of Strawberry roots formation using AgNO₃. *Am Eurasian J Agric Environ Sci* 14(11): 1281-1286.
- Mir H, Rani R, Ahmad F, Sah AK, Prakash S, Kumar V (2019) Phenolic exudation control and establishment of *in vitro* Strawberry (*Fragaria × ananassa*) cv. Chandler. *Curr J Appl Sci Technol* 33(3): 1-5.
- Mir JI, Ahmed N, Rashid R, Wani SH, Mir H, Sheikh MA (2010) Micropropagation of Strawberry (*Fragaria × ananassa*). *J Crop Improv* 37(2): 153-156.
- Munir M, Iqbal S, Baloch JUD, Khakwani AA (2015) *In vitro* explant sterilization and bud initiation studies of four Strawberry cultivars. *J Appl Hortic* 17(3): 192-198.
- Mustafa Y, Çağlayan S, Cansu T, Emine GE (2011) Effect of *in vitro* competition on shoot regeneration from hypocotyl explants of *Linum usitatissimum*. *Turkish J Bot* 35: 211-218.
- Ngan HTM, Cuong DM, Tung HT, Nghiep ND, Le BV, Nhut DT (2020) The effect of cobalt and silver nanoparticles on overcoming leaf abscission and enhanced growth of Rose (*Rosa hybrida* L. 'Baby Love') plantlets cultured *in vitro*. *Plant Cell Tiss Org Cult* 141: 393-405.
- Nghia LT, Tung HT, Huy NP, Luan VQ, Nhut DT (2017) The effects of silver nanoparticles on growth of *Chrysanthemum morifolium* Ramat. cv." Jimba" in different cultural systems. *Vietnam J Sci Technol* 55(4): 503-514
- Nguyễn Trần Đông Phương, Bùi Thị Thu Hằng (2017) Bước đầu nhân giống cây Dâu tây New Zealand (*Fragaria × ananassa*) từ hạt. *Tạp chí Khoa học Đại học Mở TP. Hồ Chí Minh* 55(4): 32-37.
- Palei S, Das AK, Rout GR (2015) *In vitro* studies of Strawberry-an important fruit crop: A review. *J Plant Sci Res* 31(2): 115-131.
- Palei S, Rout GR, Das AK, Dash DK (2017) Callus induction and indirect regeneration of Strawberry (*Fragaria × ananassa*) Duch. cv. Chandler. *Inter J Cur Microb Appl Sci* 6(11): 1311-1318.
- Pirtarighat S, Ghannadnia M, Baghshahi S (2019) Green synthesis of silver nanoparticles using the plant extract of *Salvia spinosa* grown *in vitro* and their antibacterial activity assessment. *J Nanostructure Chem* 9(1): 1-9.
- Qin Y, Zhang S, Zhang L, Zhu D, Syed A (2005) Response of *in vitro* Strawberry to silver nitrate (AgNO₃). *HortSci* 40(3): 747-751.
- Razzaq A, Ammara R, Jhanzab HM, Mahmood T, Hafeez A, Hussain S (2016) A novel nanomaterial to enhance growth and yield of Wheat. *J Nanosci Nanotechnol* 2(1): 55-58.
- Russell G (2004) Stomatal guard cell measurements using leaf prints. *Soc Cert Sen Adv J* 4: 137-139
- Salachna P, Byczyńska A, Zawadzinska A, Piechocki R, Mizielińska M (2019) Stimulatory effect of silver nanoparticles on the growth and flowering ofotted oriental Lilies. *Agronomy* 9(10): 1-14.
- Sarpoulou V, Maloupa E (2017) Effect of the NO donor "sodium nitroprusside"(SNP), the ethylene inhibitor "cobalt chloride"(CoCl₂) and the antioxidant vitamin E "α-tocopherol" on *in vitro* shoot proliferation of *Sideritis raeseri* Boiss. & Heldr. subsp. raeseri. *Plant Cell Tiss Org Cult* 128(3): 619-629.
- Syu YY, Hung JH, Chen JC, Chuang HW (2014) Impacts of size and shape of silver nanoparticles on Arabidopsis plant growth and gene expression. *J Plant Physiol Biochem* 83: 57-64.
- Timoteo CD, Paiva R, dos Reis MV, Claro PIC, Ferraz LM, Marconcini JM, de Oliveira JE (2019) *In vitro* growth of *Physalis peruviana* L. affected by silver nanoparticles. *3 Biotech* 9(4): 1-9.
- Wafaa AF, Wahdan HM (2017) Influence of substrates on *in vitro* rooting and acclimatization of micropropagated Strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.). *Middle East J Agric Res* 6(3): 682-691.
- Zia M, Yaqoob K, Mannan A, Nisa S, Raza G, Rehman R (2020) Regeneration response of Carnation cultivars in response of silver nanoparticles under *in vitro* conditions. *Vegetos* 33(1): 11-20.

PRODUCTION OF *IN VITRO* STRAWBERRY (*Fragaria × ananassa*) PLANTLETS IN LARGE-SCALE SYSTEM SUPPLEMENTED WITH SILVER NANOPARTICLES

Tran Thi Thuong¹, Hoang Thanh Tung¹, Hoang Dac Khai¹, Vu Thi Hien¹, Vu Quoc Luan¹, Do Manh Cuong¹, Nguyen Ba Nam², Nguyen Hoai Chau³, Bui Van The Vinh⁴, Duong Tan Nhut¹

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

²*University of Da Lat*

³*Institute of Environment Technology, Vietnam Academy of Science and Technology*

⁴*Ho Chi Minh City University of Technology (HUTECH)*

SUMMARY

The growth of strawberry plantlets in the rooting stage on culture medium supplemented with silver nanoparticles (AgNPs) and the ethylene gas accumulation in plantlet culture bottles were investigated. In addition, different culture systems were first used to produce large-scale Strawberry plantlets. The results showed that shoots (3 cm) were cultured on MS medium supplemented with 0.02 mg/L NAA, 1 g/L activated charcoal, 30 g/L sucrose, 8 g/L agar and 0.5 mg/L AgNPs showed about 4 days earlier rooting formation and the plantlet growth such as plantlet height (5.60 cm), fresh weight (242.67 mg), dry weight (34.67 mg), number of roots/plantlet (6.67), root length (3.40 cm), SPAD (39.30 nmol/cm²) were higher than those in the control after 15 days of culture. Besides, the ethylene gas content in the culture bottle (0.06 ppm) in the 0.5 mg/L AgNPs treatment was lower than as compared to that in the control (0.15 ppm) after 15 days of culture. A shoot density (10 shoots) in 250 mL culture bottle with 40 mL of medium gave optimal growth than those in other treatments after 15 days of culture. Square plastic box culture system (length × width × height: 19 cm × 19 cm × 7 cm; 2.5 L in volume) containing 250 mL MS medium added to 0.5 mg/L AgNPs produced 100 vigorous plantlets; meanwhile, rectangular plastic box system (34 cm × 23 cm × 13 cm; 10 L in volume; 10 L in volume) produced 200 vigorous plantlets. Plantlets derived from 0.5 mg/L AgNPs treatment in the plastic box systems exhibited well acclimatization after 30 and 60 days of culture in the greenhouse.

Keywords: *Culture system, ethylene, silver nanoparticles, shoot density, Strawberry.*