

ẢNH HƯỞNG CỦA NANO BẠC LÊN KHẢ NĂNG KHỬ TRÙNG CÁC LOẠI MẪU CÂY KHÁC NHAU CỦA CÂY ĐỒNG TIỀN (*Gerbera jamesonii*) NUÔI CÂY *IN VITRO*

Vũ Thị Hiền¹, Hoàng Thanh Tùng¹, Hoàng Đức Khải¹, Vũ Quốc Luận¹, Đỗ Mạnh Cường¹, Trần Văn Lịch¹, Bùi Văn Thế Vĩnh², Trịnh Thị Hương^{3,✉}, Dương Tấn Nhựt^{1,✉}

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 – HUTECH

³Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm Thành phố Hồ Chí Minh

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

Ngày nhận bài: 10.11.2020

Ngày nhận đăng: 23.01.2021

TÓM TẮT

Trong nghiên cứu này, ảnh hưởng của nano bạc (AgNPs) lên khả năng khử trùng các loại nguồn mẫu khác nhau (lá non, cuống hoa non và nụ hoa non) của cây Đồng tiền cũng như phát sinh hình thái và sinh trưởng tiếp theo của mẫu cây *in vitro* được nghiên cứu. Các mẫu cây sau khi đã khử trùng sẽ được cắt theo chiều ngang (1 mm) đối với mẫu cuống hoa, hình vuông (1 × 1 cm) đối với mẫu lá, cắt theo chiều dọc (0,5 mm) đối với đế hoa (loại bỏ hoàn toàn cánh hoa) và được nuôi cấy trên môi trường MS; sau đó, các mẫu sống sót được chuyển sang môi trường MS bổ sung 0,02 mg/L TDZ kết hợp với 0,8 mg/L adenin, 10% nước dừa, 30 g/L sucrose và 8 g/L agar trong 15 ngày. Kết quả ghi nhận được cho thấy AgNPs ở nồng độ và thời gian thích hợp có hiệu quả khử trùng mẫu cây nụ hoa (0,02% AgNPs và 20 min), cuống hoa (0,02% AgNPs và 30 min) và lá non (0,05% AgNPs và 20 min) sau 15 ngày nuôi cấy. Ngoài ra, 3 dạng phát sinh hình thái đã được quan sát bao gồm cảm ứng mô sẹo, phát sinh phôi soma và tái sinh chồi của các nguồn mẫu có nguồn gốc khử trùng bằng AgNPs đã được cải thiện so với khử trùng bằng HgCl₂. Bên cạnh đó, môi trường tối ưu cho quá trình nhân nhanh, ra rễ cũng như đánh giá khả năng thích nghi và sinh trưởng tiếp theo cũng được nghiên cứu. Kết quả ghi nhận được cho thấy môi trường MS bổ sung 2 mg/L NAA kết hợp 0,5 mg/L BA và 2 mg/L KIN thích hợp cho nhân nhanh chồi; trong khi đó, môi trường MS bổ sung 2 mg/L NAA cải thiện khả năng ra rễ cũng như nâng cao chất lượng cây con và góp phần nâng cao khả năng sống sót và thích nghi ngoài vườn ươm của cây Đồng tiền nuôi cấy *in vitro*.

Từ khóa: Cây Đồng tiền, nano bạc, khử trùng mẫu cây, vi nhân giống

GIỚI THIỆU

Ngày nay, vi nhân giống được biết đến như một công cụ hữu ích để nhân giống cây với quy mô lớn chỉ trong một thời gian ngắn (Wen *et al.*, 2020). Trên đối tượng cây Đồng tiền, vi nhân giống thường được bắt đầu từ nhiều nguồn mẫu khác nhau như chồi nách (Murashige *et al.*, 1974), cuống lá (Orlikowska *et al.*, 1999), lá (Aswath, Choudhary, 2002), đế hoa (Shabanpour *et al.*, 2011), chồi ngọn (Cardoso, Teixeira, 2012). Tuy nhiên, hiệu quả tái sinh từ các nguồn mẫu cây khác nhau là không như nhau (Cardoso, Teixeira, 2012).

Giai đoạn khử trùng và thiết lập mẫu nuôi cấy được xem là một trong những giai đoạn quan trọng trong vi nhân giống (Constantine, 1986); trong đó, chất khử trùng bề mặt mẫu cây là yếu tố quyết định

chính. Các chất như mercury chloride (HgCl₂), calcium hypochlorite (Ca(ClO)₂), sodium hypochlorite (NaClO₂)... được biết đến như là các chất khử trùng thông dụng trên nhiều đối tượng thực vật khác nhau. Tuy nhiên, các chất này mang tính tẩy rửa và ăn mòn cao, mặc dù tạo ra hiệu quả khử trùng cao nhưng cũng gây ra những ảnh hưởng đáng kể đến mẫu cây và thậm chí gây ra hiện tượng chết mẫu (Ines *et al.*, 2013). Hơn nữa những chất khử trùng thông dụng thường là những hóa chất độc hại và có thể gây ra những ảnh hưởng tiêu cực cho sức khỏe người sử dụng. Do đó, việc nghiên cứu và tìm ra các chất khử trùng mới trong vi nhân giống là mối quan tâm lớn của các nhà vi nhân giống.

Nano bạc (AgNPs) có kích thước dao động từ 1 - 100 nm (Rafsanjani *et al.*, 2012). Với những đặc điểm ưu việt như kích thước nhỏ nên dễ dàng hấp thụ

hay xâm nhập vào tế bào, diện tích bề mặt lớn giúp tăng khả năng tiếp xúc với không gian bên ngoài... Do đó, AgNPs nổi riêng và các hạt nano kim loại nói chung đều mang lại hiệu quả cao khi sử dụng (Shah, Belozerovala, 2008). AgNPs từ lâu đã được báo cáo như một tác nhân kích thích gia tăng sinh trưởng và phát triển của thực vật như ảnh hưởng tới các quá trình sinh lý và sự phát sinh hình thái của mẫu cây theo chiều hướng có lợi (Pilon-Smits *et al.*, 2009), gia tăng hiệu quả nhân chồi, tạo rễ và phát sinh phôi soma (Bais *et al.*, 2000)... Bên cạnh đó, AgNPs còn được biết đến như một tác nhân tiêu diệt khuẩn hiệu quả dựa trên cơ chế tạo ra stress oxy hóa tế bào gây tổn thương cấu trúc tế bào, phá hủy DNA của vi khuẩn từ đó sự ức chế sinh sản và gây chết vi khuẩn một cách hiệu quả (Nabeel, 2011).

Gần đây, AgNPs đã được sử dụng rộng rãi như một chất khử trùng mới trong vi nhân giống thực vật mang lại hiệu quả cao như trên cây Hoa hồng (Shokri *et al.*, 2014); cây *African violet* (Dương Tân Nhựt *et al.*, 2018); cây Dâu tây và cây Salem (Đỗ Mạnh Cường *et al.*, 2018a, b)... Từ đó, có thể thấy AgNPs là một chất khử trùng tiềm năng có thể thay thế các chất khử trùng thông dụng trong vi nhân giống. Do đó, nghiên cứu này được thực hiện với mục đích chính nhằm đánh giá hiệu quả khử trùng và cảm ứng mẫu cây của AgNPs trên các loại nguồn mẫu khác nhau (lá non, cuống hoa non và nụ hoa non) của cây Đồng tiền nuôi cấy *in vitro*.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Nguồn mẫu

Mẫu cây lá non, cuống hoa non và nụ hoa non thu nhận từ những cây Đồng tiền 3 tháng tuổi trồng tại vườn ươm của Phòng Sinh học phân tử và Chọn tạo giống cây trồng (Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên) được sử dụng như là vật liệu ban đầu của nghiên cứu.

Dung dịch nano bạc

Dung dịch AgNPs (nồng độ 0,05%) do Viện Công nghệ môi trường (Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam) cung cấp, có kích thước trung bình ≤ 20 nm (Chau *et al.*, 2008).

Môi trường nuôi cấy

Môi trường nuôi cấy MS (Muraghige, Skoog, 1962) bổ sung 8 g/L agar, 30 g/L sucrose và nồng độ các chất điều hòa sinh trưởng thực vật tùy thuộc vào từng giai đoạn nuôi cấy. Môi trường nuôi cấy được

điều chỉnh về pH = 5,8; sau đó được hấp khử trùng ở nhiệt độ 121°C, 1 atm trong thời gian 30 min.

Phương pháp nghiên cứu

Ảnh hưởng của AgNPs lên khả năng khử trùng và cảm ứng phát sinh hình thái của các loại mẫu cây Đồng tiền

Các mẫu thực vật (lá non, cuống hoa non và đế hoa từ nụ hoa non) được thu nhận và rửa dưới vòi nước chảy khoảng 15 min. Sau đó, mẫu được ngâm trong dung dịch xà phòng (0,01%) trong 15 min, rửa lại bằng nước máy 3 lần và rửa mẫu dưới vòi nước chảy ít nhất 30 min. Tiếp theo, các mẫu được đưa vào tủ cấy, khử trùng sơ bộ bằng cồn 70° trong 30 s, rửa lại với nước cất vô trùng 3 lần. Mẫu cây được khử trùng với dung dịch AgNPs với nồng độ 0,02% hoặc 0,05% có bổ sung thêm 2 - 3 giọt Tween-80 trong các khoảng thời gian 5, 10, 15, 20 hoặc 30 min. Nghiệm thức đối chứng (ĐC) là 0,1% HgCl₂ trong thời gian 10 min (Masoud *et al.*, 2012). Các mẫu cây sau khi đã khử trùng sẽ được cấy như sau: mẫu lá được cắt thành hình vuông với kích thước khoảng (1 × 1 cm), mẫu nụ hoa được loại bỏ hoàn toàn cánh hoa để thu nhận đế hoa và cắt theo chiều dọc (0,5 mm). Tất cả mẫu cây được nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung 30 g/L sucrose và 8 g/L agar. Sau 15 ngày nuôi cấy để thu nhận các chỉ tiêu liên quan đến hiệu quả khử trùng mẫu cây. Các mẫu sống sót và không bị nhiễm từ nghiệm thức khử trùng tốt nhất được chuyển sang môi trường MS bổ sung 0,02 mg/L TDZ, 0,8 mg/L adenin, 10% nước dừa, 30 g/L sucrose và 8 g/L agar (Nhut *et al.*, 2007) nhằm đánh giá sự cảm ứng phát sinh hình thái mẫu cây sau thời gian 30 ngày nuôi cấy.

Ảnh hưởng của NAA kết hợp với BA và KIN lên khả năng nhân nhanh chồi cây Đồng tiền nuôi cấy in vitro

Các chồi đơn *in vitro* (1 cm) được tái sinh từ các mẫu có nguồn gốc khử trùng bằng AgNPs được cấy trên môi trường MS bổ sung NAA (0,1; 0,3; 0,7 và 1,0 mg/L) kết hợp 0,5 mg/L BA và 2 mg/L KIN nhằm đánh giá hiệu quả nhân nhanh chồi sau 30 ngày nuôi cấy. ĐC là các chồi nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung 0,5 mg/L IBA, 0,5 mg/L BA và 2 mg/L KIN (Nhut *et al.*, 2007).

Ảnh hưởng của NAA đơn lẻ lên khả năng ra rễ cây Đồng tiền nuôi cấy in vitro

Các chồi đơn *in vitro* (2,5 cm) với 1 cặp lá được cấy vào môi trường MS bổ sung NAA (1,0; 1,5; 2,0

và 3,0 mg/L) nhằm đánh giá hiệu quả ra rễ sau 30 ngày nuôi cấy. ĐC là các chồi nuôi cấy trên môi trường bổ sung 1 mg/L IBA (Nhut *et al.*, 2007).

Đánh giá sự sinh trưởng của cây Đồng tiền có nguồn gốc khử trùng bằng AgNPs trong giai đoạn vườn ươm

Các cây con *in vitro* thu nhận từ thí nghiệm ảnh hưởng của NAA lên khả năng ra rễ và rửa sạch agar, sau đó trồng vào vỉ xốp trên giá thể đất mùn và đặt ở điều kiện vườn ươm, kết quả được ghi nhận sau 30 ngày trồng cây. Thí nghiệm được thực hiện nhằm đánh giá khả năng sống sót của cây Đồng tiền có nguồn gốc khử trùng AgNPs trong điều kiện vườn ươm. ĐC là cây có nguồn gốc khử trùng bằng $HgCl_2$.

Điều kiện thí nghiệm

Điều kiện *in vitro*: Nhiệt độ phòng nuôi $25 \pm 2^\circ C$, độ ẩm 55 - 60%, ánh sáng đèn huỳnh quang có cường độ $40 - 45 \mu mol.m^{-2}.s^{-1}$, quang chu kỳ 16 h sáng và 8 h tối.

Điều kiện ngoài vườn ươm: Cây con được trồng trong vườn ươm với nhiệt độ $18 - 25^\circ C$, độ ẩm trung bình khoảng 70 - 75% với ánh sáng tự nhiên có che sáng 40% bằng lưới đen, pH của giá thể trồng cây khoảng 6,5.

Chỉ tiêu theo dõi

Thí nghiệm khử trùng mẫu cấy: Tỷ lệ mẫu nhiễm (%), tỷ lệ mẫu chết (%) được ghi nhận sau 15 ngày nuôi cấy.

Thí nghiệm phát sinh hình thái: Tỷ lệ tạo phôi (%), chồi (%) và mô sẹo (%) từ các nguồn mẫu khác nhau được ghi nhận sau 30 ngày nuôi cấy.

Thí nghiệm nhân nhanh chồi: Số chồi, chiều cao chồi (cm), chiều cao cây (cm), chiều dài rễ (cm), số lá, chiều rộng lá (cm), khối lượng tươi (mg), khối lượng khô (mg), SPAD ($nmol/cm^2$) (được đo bằng máy SPAD-502 theo mô tả của Markwell *et al.*, 1995) được ghi nhận sau 30 ngày nuôi cấy.

Thí nghiệm ra rễ: Chiều cao cây (cm), số rễ, chiều dài rễ (cm), số lá, chiều rộng lá (cm), khối lượng tươi cây (mg), khối lượng khô cây (mg), SPAD ($nmol/cm^2$) được ghi nhận sau 30 ngày nuôi cấy.

Thí nghiệm thuần dưỡng cây con ngoài vườn ươm: Tỷ lệ sống (%), chiều cao cây (cm), số rễ, chiều dài rễ (cm), số lá/cây và SPAD ($nmol/cm^2$) của cây con được ghi nhận sau 30 ngày nuôi trồng ở điều kiện vườn ươm.

Xử lý số liệu

Mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần với 15 bình nuôi cấy, mật độ nuôi cấy 3 mẫu/bình. Tất cả các số liệu sau khi thu thập ứng với từng chỉ tiêu theo dõi được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel 2010 và phần mềm phân tích thống kê SPSS 16.0 theo phương pháp Duncan's test với $p < 0,05$ (Duncan, 1955).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Ảnh hưởng của AgNPs lên khả năng khử trùng mẫu cấy

Kết quả ghi nhận được cho thấy AgNPs có hiệu quả khử trùng các loại mẫu cấy (nụ hoa, cuống hoa và lá non) sau 15 ngày nuôi cấy (Bảng 1).

Đối với mẫu nụ hoa, 0,02% AgNPs trong thời gian 20 min cho hiệu quả khử trùng cao nhất về tỷ lệ mẫu nhiễm (0,00%) và tỷ lệ mẫu chết (23,13%) (Bảng 1, Hình 1a). Bên cạnh đó, 0,05% AgNPs cho hiệu quả loại bỏ vi sinh vật tối ưu (không ghi nhận tỷ lệ nhiễm); tuy nhiên, tất cả mẫu cấy bị hóa nâu hay hoại tử khi thời gian khử trùng lớn hơn 10 min.

Đối với mẫu cuống hoa, 0,02% AgNPs trong 30 min cho hiệu quả khử trùng tốt hơn so với ĐC sử dụng $HgCl_2$ và các nghiệm thức còn lại thể hiện qua chỉ tiêu tỷ lệ mẫu không nhiễm (66,63%) và tỷ lệ mẫu sống (76,68%) (Bảng 1, Hình 1b). Tương tự như mẫu nụ hoa, hiệu quả khử trùng mẫu đã giảm đáng kể với tỷ lệ mẫu chết cao khi sử dụng 0,05% AgNPs để khử trùng ở thời gian 10 min (94,00%), 15 min (99,76%), 20 và 30 min (100,00%).

Trên mẫu cấy lá non, khử trùng 0,05% AgNPs trong 20 min là tối ưu với tỷ lệ mẫu nhiễm thấp hơn đáng kể (38,51%) so sánh với ĐC (56,53%) và các nghiệm thức sử dụng AgNPs còn lại (Bảng 1, Hình 1c). Chỉ tiêu tỷ lệ mẫu chết đã được ghi nhận cho thấy 0,02% và 0,05% AgNPs đều không gây ra hiện tượng chết mẫu với bất kỳ thời gian xử lý nào, trong khi tỷ lệ mẫu chết của ĐC đạt cao nhất (46,42%). Nhìn chung, AgNPs ở nồng độ và thời gian thích hợp có hiệu quả trong khử trùng cả 3 loại mẫu cấy cây Đồng tiền. Masoud và đồng tác giả (2012) đã báo cáo rằng, hiệu quả khử trùng mẫu cấy nụ hoa Đồng tiền tốt nhất khi sử dụng 200 mg/L AgNPs trong 15 min, tuy nhiên, hiệu quả khử trùng không đạt tuyệt đối (91,4% mẫu không nhiễm). Trong nghiên cứu này, AgNPs 200 mg/L ở 15 min cho hiệu quả khử trùng tuyệt đối trên mẫu nụ hoa Đồng tiền. Sự khác biệt về kết quả này có thể do nguồn gốc khác nhau của dung dịch AgNPs được sử dụng trong hai nghiên cứu cũng như có sự khác biệt đáng kể về kích thước hạt AgNPs trong

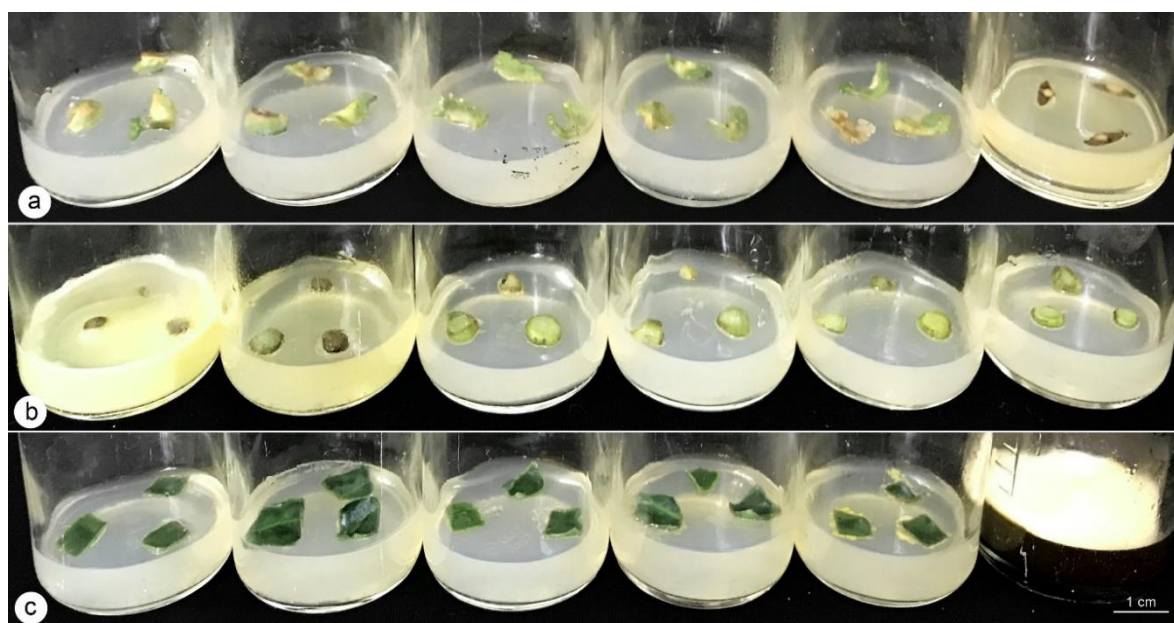
dung dịch. Kết quả của nghiên cứu này tương tự đã được báo cáo trên đối tượng cây *African violet* (Đương Tấn Nhựt *et al.*, 2018), cây chanh dây tím và vàng (Trần Hiếu *et al.*, 2018), cây trà tiên (Bùi Thị Phương *et al.*, 2020)... Hiệu quả khử trùng của AgNPs không chỉ được đánh giá trên hiệu quả loại bỏ nguồn nhiễm vi sinh vật mà còn trên chỉ tiêu tỷ lệ mẫu sống. Trong nghiên cứu

này, AgNPs gây hóa nâu hoặc hoại tử mẫu cây ít hơn hoặc không ghi nhận, khi so sánh với khử trùng mẫu cây bằng HgCl₂ trên cả 3 nguồn mẫu cây Đồng tiền khác nhau (Bảng 1). Do đó, có thể thấy rằng AgNPs là một chất khử trùng mẫu cây mang lại hiệu quả cao và không gây ra những ảnh hưởng xấu đến mẫu cây (Đương Tấn Nhựt *et al.*, 2018).

Bảng 1. Ảnh hưởng của AgNPs lên khả năng khử trùng mẫu cây nụ hoa, cuống hoa và lá non cây Đồng tiền sau 15 ngày nuôi cấy.

Chất khử trùng	Nồng độ (%)	Thời gian khử trùng (min)	Tỷ lệ mẫu nhiễm (%)			Tỷ lệ mẫu chết (%)		
			Nụ hoa	Cuống hoa	Lá non	Nụ hoa	Cuống hoa	Lá non
AgNPs	0,02	5	76,93 ^a	79,67 ^a	100,00 ^a	23,13 ^c	0,00 ^e	0,00 ^b
		10	64,31 ^b	79,68 ^a	100,00 ^a	38,72 ^b	0,00 ^e	0,00 ^b
		15	12,57 ^d	74,51 ^a	82,10 ^b	38,57 ^b	0,00 ^e	0,00 ^b
		20	0,00^e	61,62 ^{ab}	76,33 ^{bc}	23,13^c	0,00 ^e	0,00 ^b
		30	0,00 ^e	33,37^c	64,67 ^{cd}	34,85 ^b	23,32^d	0,00 ^b
	0,05	5	0,00 ^e	0,00 ^d	77,00 ^{bc}	35,51 ^b	46,37 ^c	0,00 ^b
		10	0,00 ^e	0,00 ^d	59,00 ^d	57,92 ^b	94,00 ^{ab}	0,00 ^b
		15	0,00 ^e	0,00 ^d	61,67 ^{cd}	100,00 ^a	99,76 ^a	0,00 ^b
		20	0,00 ^e	0,00 ^d	38,51^e	100,00 ^a	100,00 ^a	0,00^b
		30	0,00 ^e	0,00 ^d	28,35 ^e	100,00 ^a	100,00 ^a	0,00 ^b
ĐC	0,1	10	53,92 ^c	51,29 ^b	56,53 ^d	57,00 ^b	87,67 ^b	46,42 ^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 p < 0,05 trong phép thử Duncan.



Hình 1. Ảnh hưởng của thời gian xử lý bằng AgNPs lên khả năng khử trùng các loại mẫu cây Đồng tiền (ĐC – AgNPs: 5 min - 10 min - 15 min - 20 min - 25 min - 30 min, từ trái sang phải) sau 15 ngày nuôi cấy. **a:** Nguồn mẫu đế hoa được khử trùng bằng 0,02% AgNPs, **b:** Nguồn mẫu cuống hoa được khử trùng bằng 0,02% AgNPs, **c:** Nguồn mẫu lá được khử trùng bằng 0,05% AgNPs.

Ảnh hưởng của AgNPs lên khả năng cảm ứng mẫu cấy

Kết quả về sự đáp ứng và cảm ứng mẫu cấy trong giai đoạn tiếp theo đã được quan sát và ghi nhận trong Bảng 2 và Hình 2. Có 3 dạng phát sinh hình thái đã được quan sát bao gồm cảm ứng tạo mô sẹo, phát sinh phôi soma và phát sinh chồi trực tiếp trên bề mặt mẫu cấy (Hình 2). Tuy nhiên, sự phát sinh hình thái có sự khác biệt giữa các loại mẫu cấy và nguồn gốc khử trùng mẫu cấy.

Sự cảm ứng hình thành mô sẹo đã được ghi nhận từ tất cả các loại mẫu cấy, tuy nhiên, tỷ lệ tạo sẹo của các mẫu cuống hoa (90,67%) và lá non (87,33%) có nguồn gốc khử trùng bởi HgCl₂ thấp hơn so với mẫu cuống hoa và lá non có nguồn gốc khử trùng bằng AgNPs (Bảng 2, Hình 2h). Quan sát hình thái cho thấy, mô sẹo hình thành từ các mẫu có nguồn gốc khử trùng AgNPs có dạng xốp, màu xanh lục trong khi ĐC có dạng xốp, màu xanh nhạt (Hình 2a, e).

Bảng 2. Sự phát sinh hình thái của các mẫu cấy cây Đồng tiền có nguồn gốc khử trùng bằng AgNPs và ĐC sau 30 ngày nuôi cấy.

Nguồn gốc	Loại mẫu	Tỷ lệ tạo mô sẹo (%)	Tỷ lệ tạo phôi (%)	Tỷ lệ tạo chồi (%)	Hình thái mẫu cấy
AgNPs	Đế hoa	100 ^a	0 ^d	57,68 ^a	Mô sẹo xốp có màu xanh lục
	Cuống hoa	100 ^a	100 ^a	0 ^e	Phôi có màu trắng sữa đến xanh
	Lá non	100 ^a	87,37 ^b	0 ^e	Phôi có màu trắng sữa đến xanh
ĐC	Đế hoa	100 ^a	0 ^d	8,52 ^b	Mô sẹo xốp có màu xanh nhạt
	Cuống hoa	90,67 ^b	58,27 ^c	0 ^e	Mô sẹo xốp có màu xanh nhạt, phôi có màu trắng sữa đến xanh
	Lá non	87,33 ^{bc}	79,03 ^{bc}	0 ^e	Phôi có màu trắng sữa đến xanh

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

Kết quả ghi nhận về sự phát sinh phôi soma cho thấy, tỷ lệ tạo phôi bị ảnh hưởng bởi hai yếu tố là loại mẫu cấy và nguồn gốc chất khử trùng. Sự phát sinh phôi được ghi nhận trên 2 nguồn mẫu cuống hoa (Hình 2b) và lá non (Hình 2c, g) được khử trùng bằng AgNPs (100%, 87,37%; tương ứng) đều cao hơn so với mẫu khử trùng bằng HgCl₂ (58,27%, 79,03%; tương ứng), trong khi mẫu đế hoa không tái sinh phôi (Bảng 2). Bên cạnh đó, hình thái của các phôi có nguồn gốc khử trùng AgNPs có màu trắng sữa đến xanh tương tự như ĐC cũng đã được quan sát (Hình 2d).

Sự tái sinh chồi đã được ghi nhận duy nhất trên nguồn mẫu đế hoa (Hình 2f, i); tuy nhiên, tỷ lệ tái sinh chồi của các mẫu đế hoa có nguồn gốc khử trùng bằng AgNPs (57,68%) cao gấp khoảng 6,7 lần so với ĐC (8,52%) (Bảng 2). Nghiên cứu của Dương Tấn Nhựt và đồng tác giả (2018) cũng đã chỉ ra rằng các mẫu cấy cây *African violet* có nguồn gốc khử trùng bằng AgNPs cho mẫu cấy cảm ứng nhanh chóng và tạo ra hệ số nhân chồi (88 chồi) cao hơn 2,33 lần và 2,11 lần so với mẫu được khử trùng bằng HgCl₂ và Ca(ClO)₂ (37,67 chồi và 41,67 chồi; tương ứng). AgNPs đã được chứng minh là một nhân tố tham gia vào nhiều phản ứng sinh lý, sinh hóa và trao đổi chất khác nhau ở thực vật (Ngan *et al.*, 2020). Trước đó, AgNPs được

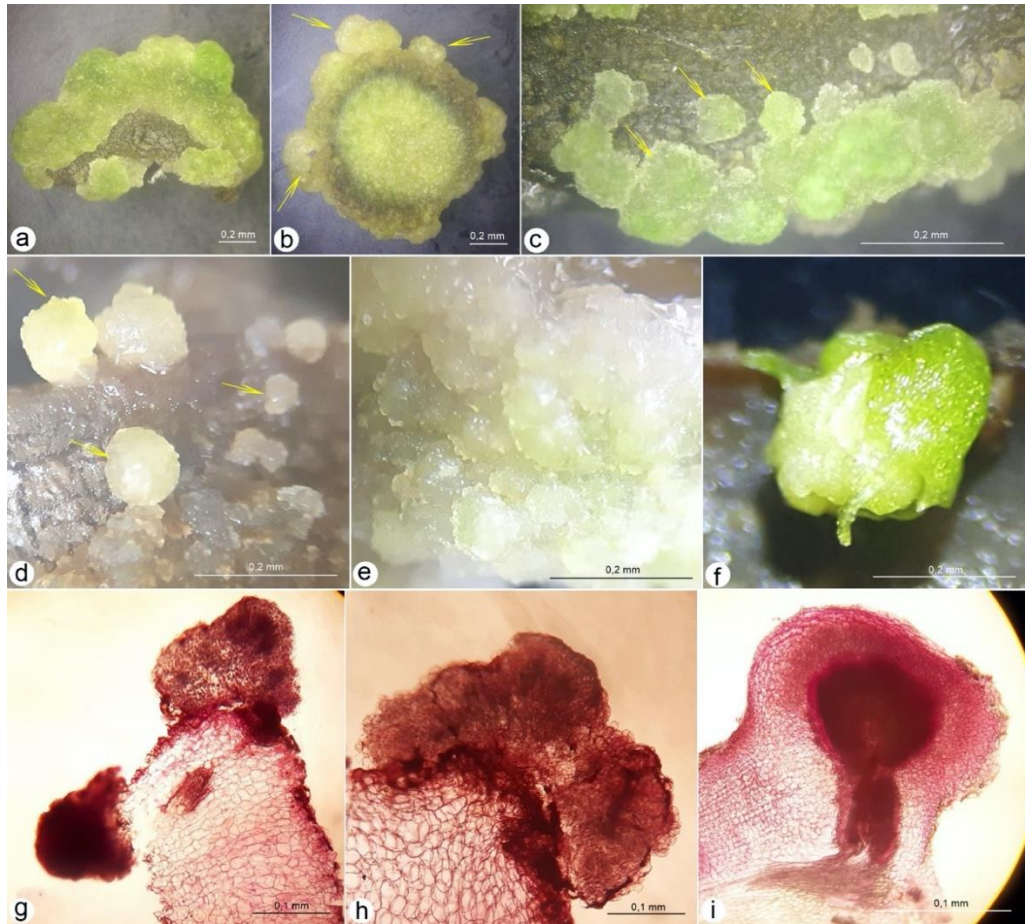
xác định có ảnh hưởng đáng kể lên sự sinh trưởng và phát triển của thực vật tùy thuộc vào nồng độ được sử dụng (Sharma *et al.*, 2008). Trong nghiên cứu này, hiệu quả khử trùng mẫu cấy đã được cải thiện đáng kể khi sử dụng AgNPs như một chất khử trùng, bên cạnh đó, AgNPs cũng cho thấy những tác động tích cực lên hiệu quả tái sinh các mẫu cấy trong giai đoạn tiếp theo. Trong đó, 0,02% AgNPs có hiệu quả khử trùng mẫu nụ hoa Đồng tiền trong 30 min giúp gia tăng hiệu quả khử trùng mẫu cấy và nâng cao khả năng phát sinh phôi soma từ mẫu cấy đế hoa. Các phôi thu nhận được từ nghiệm thức này được thu nhận và sử dụng làm vật liệu cho thí nghiệm nhân nhanh tiếp theo.

Ảnh hưởng của NAA kết hợp với BA và KIN lên khả năng nhân nhanh chồi cây Đồng tiền nuôi cấy *in vitro*

Sau 30 ngày nuôi cấy, ảnh hưởng của các nồng độ NAA lên khả năng nhân nhanh chồi cây Đồng tiền đã được ghi nhận (Bảng 3 và Hình 3). Kết quả ghi nhận được cho thấy, hiệu quả nhân chồi cao nhất thu được từ 2 nghiệm thức bổ sung 0,3 mg/L và 0,7 mg/L NAA (18,33 chồi, 19,67 chồi; tương ứng) (Bảng 3). Các chồi thu được từ nghiệm thức 0,3 mg/L có kích thước tương đối đồng đều, lá xanh to và xanh đậm hơn so với các nghiệm thức còn lại (Hình 3a). Bên cạnh đó, các chỉ tiêu

về sinh trưởng như chiều cao chồi (4,10 cm), số lá (22 lá), chiều rộng lá (1,00 cm), SPAD (33,80 nmol/cm²) và

khối lượng tươi chồi (325,00 mg) đều cao hơn đáng kể so với ĐC và các nghiệm thức còn lại (Bảng 3).

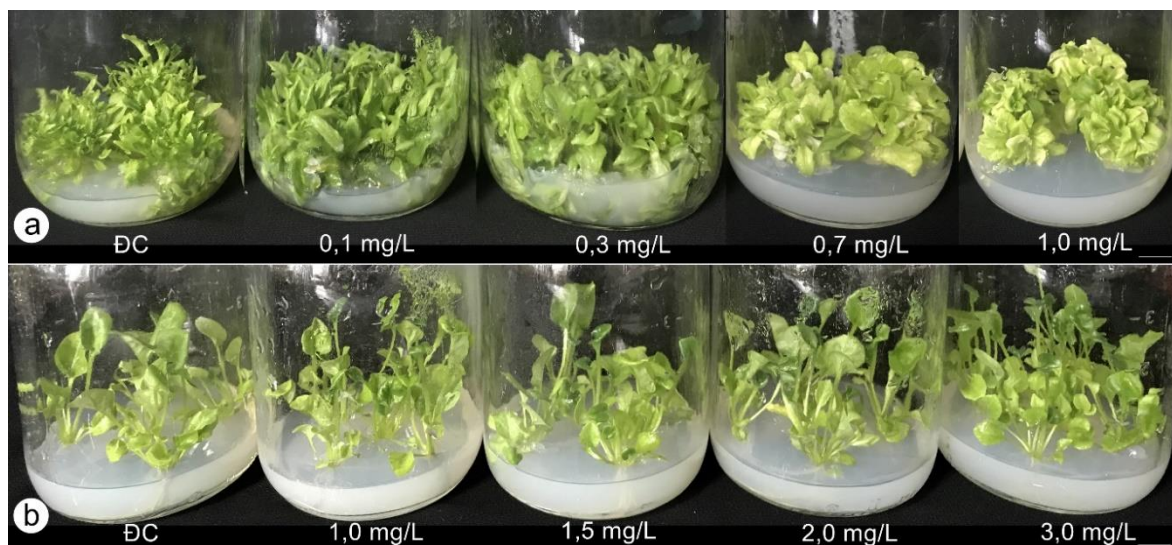


Hình 2. Sự phát sinh hình thái từ nguồn mẫu cuống hoa, đế hoa, lá cây Đồng tiền được khử trùng bằng AgNPs sau 30 ngày nuôi cấy. **a:** Sự cảm ứng mô sẹo từ mẫu đế hoa; **b:** Sự phát sinh phôi soma (mũi tên) từ mẫu cuống hoa; **c:** Sự phát sinh phôi soma từ mẫu lá, **d:** Phôi soma hình cầu; **e:** Mô sẹo; **f:** Chồi phát sinh trực tiếp trên mẫu đế hoa. Quan sát mô học từ các mẫu cấy khác nhau; **g:** Phôi từ mẫu lá; **h:** Mô sẹo từ mẫu đế hoa; **i:** Chồi từ mẫu đế hoa.

Bảng 3. Ảnh hưởng của NAA kết hợp BA và KIN lên hiệu quả nhân nhanh chồi cây Đồng tiền sau 30 ngày nuôi cấy.

Nồng độ NAA (mg/L)	Số chồi/mẫu	Chiều cao chồi (cm)	Số lá	Chiều rộng lá (cm)	SPAD (nmol/cm ²)	Khối lượng tươi chồi (mg)	Khối lượng khô chồi (mg)
ĐC	15,00 ^{bc*}	2,40 ^c	17,00 ^{cd}	0,43 ^c	30,93 ^a	211,67 ^{bc}	13,00 ^b
0,1	12,67 ^{cd}	3,00 ^b	16,67 ^d	0,80 ^b	31,83 ^a	264,33 ^{ab}	12,87 ^c
0,3	18,33 ^{ab}	4,10 ^a	22,00 ^a	1,00 ^a	33,80 ^a	325,00 ^a	12,90 ^b
0,7	19,67 ^a	2,70 ^{bc}	20,33 ^b	0,96 ^{ab}	19,40 ^b	190,00 ^{bc}	13,30 ^a
1	10,67 ^c	2,20 ^c	18,33 ^c	0,93 ^{ab}	17,63 ^b	161,33 ^c	12,67 ^d

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



Hình 3. Hiệu quả nhân nhanh chồi và ra rễ *in vitro* cây Đồng tiền trên môi trường có bổ sung chất điều hòa sinh trưởng thực vật sau 30 ngày nuôi cấy. **a:** NAA kết hợp BA và KIN lên hiệu quả nhân nhanh chồi; **b:** NAA đơn lẻ lên hiệu quả ra rễ. *Thước đo: 1 cm.*

Việc nghiên cứu thay thế hoặc bổ sung thêm chất điều hòa sinh trưởng nhằm tối ưu môi trường nuôi cấy từ lâu đã được thực hiện thành công trên nhiều đối tượng như bổ sung thêm NAA vào môi trường giúp gia tăng hiệu quả nhân chồi cây *Huernia hystrix* (Amoo, van Staden, 2013); thay thế 2,4-D bằng BA trong môi trường giúp cải thiện chất lượng chồi cây nhỏ (Khan *et al.*, 2015)... Trên đối tượng cây Đồng tiền, Hà Thị Mỹ Ngân và đồng tác giả (2019) đã báo cáo rằng môi trường MS bổ sung 0,7 mg/L BA, 0,7 mg/L KIN, 0,5 mg/L IBA và 0,2 mg/L AgNPs cho hiệu quả nhân chồi đạt 8,33 chồi, trong khi số chồi thu được trong nghiên cứu này đã tăng lên 18,33 chồi khi sử dụng NAA thay cho IBA trong vai trò kết hợp với BA và KIN. Do đó, các chồi thu được từ nghiệm thức môi trường bổ sung 0,3 mg/L NAA kết hợp 0,5 mg/L BA và 2 mg/L KIN được thu nhận và sử dụng cho thí nghiệm tạo cây hoàn chỉnh tiếp theo.

Ảnh hưởng của NAA đơn lẻ lên khả năng ra rễ cây Đồng tiền nuôi cấy *in vitro*

Sau 30 ngày nuôi cấy, tất cả các chồi nuôi cấy trên môi trường bổ sung NAA hoặc không bổ sung NAA (ĐC) đều ra rễ (100%), tuy nhiên, số rễ hình thành cao nhất ở nghiệm thức bổ sung 2 mg/L NAA (7,67 rễ) (Bảng 4). Ngoài ra, các chỉ tiêu sinh trưởng của cây như chiều cao cây (4,43 cm), chiều dài rễ (1,80 cm), số lá (7 lá), chiều rộng lá (1,06

cm), SPAD (34,66 nmol/cm²), khối lượng tươi cây (236,70 mg), khối lượng khô cây (36,30 mg) ở nghiệm thức bổ sung 2 mg/L NAA đều cao hơn đáng kể so với ĐC (Bảng 4).

Ra rễ *in vitro* hay tạo cây hoàn chỉnh được xem là giai đoạn quan trọng bậc nhất trong vi nhân giống (Ngan *et al.*, 2020), giai đoạn này ảnh hưởng trực tiếp đến khả năng sống sót và thích nghi khi chuyển cây sang giai đoạn vườn ươm. Trong nghiên cứu này, việc bổ sung 2 mg/L NAA vào môi trường nuôi cấy không chỉ kích thích khả năng ra rễ cao hơn so với ĐC sử dụng 0,5 mg/L IBA (Nhut *et al.*, 2007) mà còn gia tăng đáng kể chất lượng cây con, từ đó nâng cao khả năng sống sót của cây khi chuyển ra thuần dưỡng trong điều kiện vườn ươm.

Thích nghi và sinh trưởng ngoài vườn ươm

Sau 30 ngày trồng và thuần dưỡng trong điều kiện vườn ươm, kết quả ghi nhận được cho thấy, các cây con có nguồn gốc khử trùng bằng AgNPs và ĐC đều cho tỷ lệ sống sót cao (95%, 80,76%; tương ứng) và không có sự khác biệt đáng kể về mặt thống kê giữa chúng. Tuy nhiên, cây có nguồn gốc khử trùng AgNPs có chiều cao cây (7,63 cm), số lá (10,66 lá), số rễ/cây (14 rễ), chiều dài rễ (8,16 cm) và SPAD (32,80 nmol/cm²) đều cao hơn đáng kể so với cây ở nghiệm thức ĐC (Bảng 5, Hình 4).

Bảng 4. Ảnh hưởng của NAA đơn lẻ lên khả năng ra rễ của cây Đồng tiền sau 30 ngày nuôi cấy.

Nồng độ NAA (mg/L)	Chiều cao cây (cm)	Tỷ lệ ra rễ (%)	Số rễ	Chiều dài rễ (cm)	Số lá	Chiều rộng lá (cm)	SPAD (nmol/cm ²)	Khối lượng tươi cây (mg)	Khối lượng khô cây (mg)
ĐC	3,50 ^b	100,00 ^a	2,66 ^d	1,23 ^b	5,66 ^{ab}	0,96 ^b	28,63 ^b	178,67 ^c	27,33 ^c
1,0	4,03 ^{ab}	100,00 ^a	3,66 ^c	1,66 ^a	5,00 ^b	0,86 ^a	31,93 ^{ab}	198,00 ^b	30,43 ^{bc}
1,5	4,00 ^{ab}	100,00 ^a	5,33 ^b	1,66 ^a	5,66 ^{ab}	1,13 ^a	31,13 ^{ab}	207,67 ^b	31,88 ^b
2,0	4,43 ^a	100,00 ^a	7,67 ^a	1,80 ^a	7,00 ^a	1,06 ^a	34,66 ^a	236,70 ^a	36,30 ^a
3,0	3,93 ^{ab}	100,00 ^a	4,00 ^{bc}	1,46 ^a	5,33 ^b	0,90 ^a	29,56 ^{ab}	206,63 ^b	31,62 ^b

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

Bảng 5. Sự sinh trưởng của cây con Đồng tiền có nguồn gốc khử trùng AgNPs và ĐC sau 30 ngày thuần dưỡng ở vườn ươm.

Chất khử trùng	Tỷ lệ sống sót (%)	Chiều cao cây (cm)	Số lá/cây	Chiều rộng lá (cm)	Số rễ/cây	Chiều dài rễ (cm)	SPAD (nmol/cm ²)
AgNPs	95,00±2,33*	7,63±1,00	10,66±2,33	2,13±0,13	14,00±3,33	8,16±1,67	32,80±4,00
ĐC	80,76±3,67	5,67±1,33	7,66±2,33	2,16±0,08	8,66±4,20	4,13±1,50	25,53±3,67

Ghi chú: *Giá trị trung bình ± SE



Hình 4. Cây con Đồng tiền *in vitro* có nguồn gốc khử trùng bằng AgNPs (phải) và ĐC (trái). **a:** Cây con *in vitro* chuẩn bị đưa ra trồng trong vườn ươm; **b:** Sinh trưởng của cây con sau 30 ngày thuần dưỡng trong vườn ươm.

Dương Tấn Nhựt và đồng tác giả (2018) đã báo cáo rằng cây *African violet* có nguồn gốc nuôi cấy *in vitro* được khử trùng bằng AgNPs có khả năng thích nghi và sinh trưởng tốt tương tự như cây được khử trùng bằng các chất khử trùng truyền thống ($HgCl_2$ và $Ca(ClO)_2$). Trong nghiên cứu này, cây Đồng tiền có nguồn gốc khử trùng AgNPs cho sinh trưởng tốt hơn trong giai đoạn thuần dưỡng cho thấy những tác động tích cực và mạnh mẽ của chất khử trùng lên hiệu quả nhân giống vô tính cây Đồng tiền.

KẾT LUẬN

Kết quả của nghiên cứu đã cho thấy hiệu quả khử trùng của AgNPs phụ thuộc vào nồng độ AgNPs sử dụng, thời gian xử lý mẫu và loại mẫu khử trùng. Hiệu quả khử trùng đạt cao nhất khi sử dụng 0,02% AgNPs trong thời gian 20 min cho mẫu nụ hoa và trong 30 min cho mẫu cuống hoa Đồng tiền; trong khi đó, mẫu lá non là 0,05% AgNPs trong 20 min sau 15 ngày nuôi cấy. Bên cạnh đó, cảm ứng tạo mô sẹo, phát sinh phôi soma và tái sinh chồi trực tiếp của các nguồn mẫu có nguồn gốc khử trùng bằng AgNPs tối ưu hơn so với khử trùng bằng $HgCl_2$ cũng được ghi nhận trong nghiên cứu này. Ngoài ra, môi trường MS bổ sung 2 mg/L NAA kết hợp 0,5 mg/L BA và 2 mg/L KIN thích hợp cho nhân nhanh chồi và môi trường MS bổ sung 2 mg/L NAA thích hợp cho sự ra rễ cũng như nâng cao chất lượng cây con và gia tăng khả năng sống sót và thích nghi ngoài vườn ươm của cây Đồng tiền nuôi cấy *in vitro*.

Lời cảm ơn: Để hoàn thành nghiên cứu này, nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn sự tài trợ kinh phí của Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên và Quỹ Phát triển Khoa học và Công nghệ Quốc gia (NAFOSTED) trong đề tài mã số 106.01-2019.301.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Amoo SO, Van Staden J (2013) Influence of plant growth regulators on shoot proliferation and secondary metabolite production in micropropagated *Huernia hystrix*. *Plant Cell Tiss Org Cult* 112(2): 249-256.

Aswath C, Choudhary ML (2002) Rapid plant regeneration from *Gerbera jamesonii* Bolus callus cultures. *Acta Bot Croatica* 61: 125-134.

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.

Phuong BT, Phương LN, Kim TĐT, Bảo TT, Minh MPXB

(2020) Ảnh hưởng của nano bạc đến khả năng nhân giống *in vitro* cây trà tiên (*Asarum glabrum* Merr.). *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam* 62(6).

Cardoso JC, da Silva JAT (2012) Micropropagation of *Gerbera* using chlorine dioxide (ClO_2) to sterilize the culture medium. *In Vitro Cell Dev Bio - Plant* 48(3): 362-368.

Chau NH, Bang L, Buu N, Dung T, Ha H, Quang D (2008) Some results in manufacturing of nanosilver and investigation of its application for disinfection. *Adv Nat Appl Sci* 9(2): 241-248.

Đỗ Mạnh Cường, Lê Thành Long, Hoàng Thanh Tùng, Vũ Quốc Luận, Vũ Thị Hiền, Nguyễn Thị Nhật Linh, Trương Thị Bích Phượng, Dương Tấn Nhựt (2018a) Vai trò của nano bạc trong khử trùng, cảm ứng mẫu cây ban đầu và nâng cao tần suất hình thành tế bào đơn cây hoa salem (*Limonium sinuatum* (L.) Mill). *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 16(3): 481-490.

Đỗ Mạnh Cường, Trương Thị Bích Phượng, Dương Tấn Nhựt (2018b) Ảnh hưởng của nano bạc lên khả năng cảm ứng mô sẹo và tái sinh chồi từ mẫu cây lá cây dâu tây (*Fragaria x ananassa*) nuôi cấy *in vitro*. *Tạp chí Khoa học Đại học Huế* 127(1C): 61-70.

Duncan DB (1955) Multiple range and multiple F tests. *Biometrics* 11(1): 1-42.

Dương Tấn Nhựt, Dương Bảo Trinh, Đỗ Mạnh Cường, Hoàng Thanh Tùng, Nguyễn Phúc Huy, Vũ Thị Hiền, Vũ Quốc Luận, Lê Thị Thu Hiền, Nguyễn Hoài Châu (2018) Khảo sát nano bạc làm chất khử trùng mẫu mới trong nhân giống vô tính cây *African violet* (*Saintpaulia ionantha* H. Wendl.). *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 16(1): 87-97.

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 tỷ lệ sống của cây con hoa đồng tiền (*Gerbera jamesonii*) nuôi cấy *in vitro* trong môi trường bổ sung nano bạc. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 17(1): 115-124.

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.

Khan N, Ahmed M, Hafiz I, Abbasi N, Ejaz S, Anjum M (2015) Optimizing the concentrations of plant growth regulators for *in vitro* shoot cultures, callus induction and shoot regeneration from calluses of grapes. *Oeno One* 49(1): 37-45.

Masoud F, Abdolreza B, Ahmad S (2012) Disinfecting effects of nano silver fluids in *Gerbera* (*Gerbera jamesonii*) capitulum tissue culture. *J Biol Environ* 6(17): 121-127.

- Murashige T, Serpa M, Jones TB (1974) Clonal multiplication of *Gerbera jamesonii* through tissue culture. *Hort Sci* 9: 175-180.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiol* 1(3): 473-497.
- Nabeel KA (2011) Using silver nano-particles to increase efficiency of sterile solution for *in vitro* techniques. *Iraqi J Canc Med Genet* 4(1): 48-51.
- 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.
- Nhut DT, An TTT, Huong NTD, Don NT, Hai NT, Thien NQ, Vu NH (2007) Effect of genotype, explant size, position, and culture medium on shoot generation of *Gerbera jamesonii* by receptacle transverse thin cell layer culture. *Sci Hortic* 111(2): 146-151.
- Orlikowska T, Nowak E, Marasek A, Kucharska D (1999) Effects of growth regulators and incubation period on *in vitro* regeneration of adventitious shoots from gerbera petioles. *Plant Cell Tiss Org Cult* 59(2): 95-102.
- Pilon-Smits EAH, Quinn CF, Tapken W, Malagoli M, Schiavon M (2009) Physiological functions of beneficial elements. *Curr Opin Plant Biol* 12: 267-274.
- Rafsanjani MSO, Alvani A, Samim M, Hejazi MA, Abdin MZ (2012) Application of novel nanotechnology strategies in plant biotransformation: A contemporary Overview. *Recent Pat Biotech* 6:69-79.
- Shabanpour KAA, Sharifi A, Bagheri A, Moshtaghi N (2011) Effect of genotypes and culture medium on shoot regeneration and proliferation of *Gerbera jamesonii*. *Afr J Biotech* 10(57): 12211-12217.
- Shah V, Belozerovala I (2008) Influence of metal nanoparticles on the soil microbial community and germination of lettuce seeds. *Water Air Soil Poll* 197: 143-148.
- Shokri S, Babaei A, Ahmadian M, Hessami S, Arab MM (2014) The effects of different concentrations of nano silver on elimination of bacterial contaminations and phenolic exudation of Rose (*Rosa hybrida* L.) *in vitro* culture. *Inter J Farm Allied Sci* 3(1): 50-54.
- Trần Hiếu, Hoàng Thanh Tùng, Cao Đăng Nguyên, Dương Tấn Nhựt (2018) Tạo nguồn mẫu *in vitro* cho giống chanh dây tím (*Passiflora edulis* Sims.) và vàng (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*). *Tạp chí Khoa học Đại học Huế: Khoa học Tự nhiên* 127(1C): 71-84.
- Wen SS, Chen L, Tian RN (2020) Micropropagation of tree peony (*Paeonia* sect. *Moutan*): A review. *Plant Cell Tiss Org Cult* 141(1): 1-14.
- Markwell J, Osterman JC, Mitchell JL (1995) Calibration of the Minolta SPAD-502 leaf chlorophyll meter. *Photosynthesis Res* 46(3): 467-472.

EFFECT OF SILVER NANOPARTICLES ON STERILIZATION OF DIFFERENT EXPLANT SOURCES OF *Gerbera jamesonii* CULTURED *IN VITRO*

Vũ Thị Hiền¹, Hoàng Thanh Tùng¹, Hoàng Đức Khai¹, Vũ Quốc Luận¹, Đỗ Mạnh Cường¹, Trần Văn Lịch¹, Bùi Văn Thế Vinh², Trinh Thị Hương³, Dương Tấn Nhựt¹

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

²HUTECH University

³HCMC University of Food Industry

SUMMARY

In this study, silver nanoparticles effects on the sterilization of different sources of explants (young leaves, young flower stalks and young flower buds) of *Gerbera* as well as on the *in vitro* morphogenesis and their growth were investigated. The explants were sterilized and cut transversally (1 mm) with the flower stalk, square (0.5 × 0.5 cm) for the leaf sample, longitudinally (0.5 mm) for the flowers (removed the petals) and cultured on MS medium; then, the explants (contamination-free or no browning/necrosis) were transferred into MS medium supplemented with 0.02 mg/L TDZ plus 0.8 mg/L adenine, 10% coconut water, 30 g/L sucrose and 8 g/L agar in 15 days. The results showed that AgNPs at the appropriate concentration and duration treatment was effective in explant sterilization of flower bud (0.02% AgNPs and 20 min), flower stalks (0.02% AgNPs and 30 min) and young leaves (0.05% AgNPs and 20 min) after 15 days of culture. In addition, 3 types of morphogenesis including callus induction, somatic embryogenesis and direct shoot regeneration of explants derived from sterilization by AgNPs were improved as compared to that of HgCl₂. In addition, research on the optimal medium for shoot multiplication, rooting as well as evaluation of acclimatization and the growth at the greenhouse were also studied.

Results showed that MS medium supplemented with 2 mg/L NAA combined with 0.5 mg/L BA and 2 mg/L KIN is suitable for shoot multiplication; meanwhile, MS medium supplemented with 2 mg/L NAA improved rooting ability as well as quality of plantlets and to improving survival rate and acclimatization of *Gerbera* cultured *in vitro*.

Keywords: *Gerbera*, silver nanoparticles, explant sterilization, micro-propagation.