

ĐẠI HỌC HUẾ
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC

ĐỖ MẠNH CƯỜNG

**NGHIÊN CỨU TÁC ĐỘNG CỦA NANO BẠC VÀ
NANO SẮT LÊN CHẤT LƯỢNG CÂY GIỐNG *IN VITRO*
Ở MỘT SỐ CÂY TRỒNG CÓ GIÁ TRỊ KINH TẾ**

Ngành: Công nghệ Sinh học

Mã số: 9420201

LUẬN ÁN TIẾN SĨ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Thừa Thiên Huế - 2021

Công trình được hoàn thành tại:

Phòng Sinh học phân tử và Chọn tạo giống cây trồng,
Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên

Người hướng dẫn khoa học:

1. GS.TS. Dương Tấn Nhựt
2. PGS.TS. Trương Thị Bích Phượng

Phản biện 1:.....

Phản biện 2:

Phản biện 3:.....

Luận án được bảo vệ trước Hội đồng chấm luận án cấp Đại học Huế họp tại.....
..... vào hồi.....giờ..... ngày.....tháng.....năm.....

Có thể tìm hiểu luận án tại:

1.

2.

3.

MỞ ĐẦU

Lý do chọn đề tài

Công nghệ sinh học thực vật - đặc biệt là phương pháp nuôi cấy tế bào, mô và cơ quan thực vật trên môi trường dinh dưỡng được kiểm soát - đã khắc phục được những khó khăn của phương pháp nhân giống truyền thống. Tuy nhiên, bên cạnh những ưu điểm mang lại thì phương pháp này vẫn còn tồn tại một số hạn chế như quá trình khử trùng bề mặt mẫu cây bị nhiễm vi sinh vật ảnh hưởng đến hiệu quả tái sinh, hiệu quả của các quá trình phát sinh hình thái không cao, sự tích lũy khí ethylene ảnh hưởng đến hiệu quả nhân giống, chất lượng cây giống và tỷ lệ sống sót khi thuần hoá ở vườn ươm thấp, giá thành cây giống cao. Do đó việc ứng dụng các nguồn vật liệu mới trong khử trùng cũng như cải tiến môi trường nhằm nâng cao chất lượng cây giống vẫn luôn là một trong những mục tiêu của vi nhân giống thương mại.

Chúng ta đang sống trong thời đại mà công nghệ nano được ứng dụng trong nhiều lĩnh vực như vật lý, hoá học, điện tử, môi trường, năng lượng, vật liệu, sinh học. Chính vì vậy, để hiểu rõ vai trò và tiềm năng của nano trong việc khử trùng, bổ sung như một chất điều hoà sinh trưởng và thay thế dinh dưỡng khoáng nhằm cải thiện các nhược điểm trong hệ thống vi nhân giống, nâng cao chất lượng cây giống nuôi cấy mô, chúng tôi tiến hành thực hiện đề tài “Nghiên cứu tác động của nano bạc và nano sắt lên chất lượng cây giống *in vitro* ở một số cây trồng có giá trị kinh tế”. Trong nghiên cứu này, các cây trồng được sử dụng làm đối tượng nghiên cứu là salem (*Limonium sinuatum*), dâu tây (*Fragaria × ananassa*) và sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.).

Mục tiêu đề tài

Đề tài được thực hiện nhằm đánh giá tác động của các hạt nano bạc (AgNPs) - được sử dụng khử trùng bề mặt mẫu lá và bổ sung vào môi trường nuôi cấy, các hạt nano sắt (FeNPs) - được sử dụng thay thế sắt-Ethylenediamine Tetra Acetate (Fe-EDTA) trong quá trình vi nhân giống lên chất lượng cây giống trên một số loại cây trồng có giá trị kinh tế (salem, dâu tây và sâm Ngọc Linh).

Đối tượng và phạm vi nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu

AgNPs (sử dụng làm chất khử trùng và bổ sung vào môi trường nuôi cấy), FeNPs (thay thế Fe-EDTA trong môi trường nuôi cấy) với các nồng độ khác nhau được sử dụng để nghiên cứu khả năng khử trùng, sự sinh trưởng, phát triển và nâng cao chất lượng cây giống cây salem, dâu tây và sâm Ngọc Linh nuôi cấy *in vitro*.

Phạm vi nghiên cứu

Nghiên cứu ảnh hưởng của AgNPs lên các giai đoạn khử trùng bề mặt, phát sinh hình thái trong vi nhân giống cây salem, dâu tây và sâm Ngọc Linh.

Nghiên cứu ảnh hưởng của AgNPs và FeNPs lên giai đoạn tạo cây hoàn chỉnh trên ba đối tượng cây trồng (salem, dâu tây, sâm Ngọc Linh) nuôi cấy *in vitro*.

Ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài nghiên cứu

Ý nghĩa khoa học của đề tài

Kết quả nghiên cứu của luận án sẽ cung cấp các dẫn liệu khoa học mới có giá trị về vai trò của nano kim loại đến quá trình khử trùng bề mặt, sinh trưởng, phát triển, sự biến động khí ethylene và nâng cao chất lượng cây giống trong vi nhân giống cây hoa cảnh, cây ăn trái và cây dược liệu.

Ý nghĩa thực tiễn của đề tài

Kết quả nghiên cứu của luận án có nhiều tiềm năng ứng dụng trong sản xuất cây giống thương mại.

Những đóng góp mới của luận án

Đây là công trình đầu tiên tại Việt Nam nghiên cứu ứng dụng nano kim loại (AgNPs, FeNPs) trong vi nhân giống cây salem, dâu tây, sâm Ngọc Linh.

Đề tài đã đánh giá được vai trò của AgNPs trong ức chế khí ethylene nhằm nâng cao chất lượng cây giống cây salem, dâu tây, sâm Ngọc Linh nuôi cấy *in vitro*.

Bổ sung nano kim loại vào môi trường nuôi cấy trong giai đoạn vi nhân giống đã giúp gia tăng khả năng thích nghi cũng như tỷ lệ sống của cây salem, dâu tây và sâm Ngọc Linh ở giai đoạn vườn ươm.

Xây dựng được quy trình nhân giống của ba loại cây hoa cảnh có giá trị kinh tế cao là cây salem, dâu tây và sâm Ngọc Linh dưới ảnh hưởng của nano kim loại.

Kết cấu của luận án

Luận án gồm 125 trang (kể cả tài liệu tham khảo) chia thành các phần: Phần mở đầu 4 trang; Chương 1: Tổng quan tài liệu 29 trang; Chương 2: Vật liệu, nội dung và phương pháp nghiên cứu 12 trang; Chương 3: Kết quả và bàn luận 52 trang; Phần kết luận và đề nghị 3 trang; Các công trình đã công bố liên quan đến luận án 1 trang; Phần tài liệu tham khảo 24 trang với 180 tài liệu tham khảo bằng tiếng Việt, tiếng Anh. Luận án có 20 bảng, 20 hình và 6 biểu đồ.

Chương 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU

Luận án đã tham khảo và tổng kết về 10 vấn đề chính với các nội dung liên quan đến: (1) Vi nhân giống; (2) Các quá trình trong vi nhân giống; (3) Hạn chế trong vi nhân giống; (4) Nano kim loại; (5) Ứng dụng của nano kim loại; (6) Nano bạc và nano sắt trong vi nhân giống thực vật; (7) Tính an toàn sinh học của các nano kim loại; (8) Sơ lược về cây salem; (9) Sơ lược về cây dâu tây; (10) Sơ lược về cây sâm Ngọc Linh.

Chương 2: VẬT LIỆU, NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

2.1.1. Vật liệu thực vật

Lá non của cây salem (*Limonium sinuatum*) và dâu tây (*Fragaria × ananassa*) 3 tháng tuổi, sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) 3 năm tuổi

2.1.2. dung dịch nano

AgNPs có kích thước 20 – 25 nm, FeNPs có kích thước 20 – 60 nm

2.1.3 Thiết bị, dụng cụ, hoá chất

Thiết bị và dụng cụ: Cân điện tử, máy cất nước, máy đo pH, nồi hấp vô trùng, tủ cấy vô trùng, máy đo hàm lượng diệp lục SPAD-502 (Minolta Co., Ltd., Osaka, Nhật Bản), tủ sấy Sanyo MOV-112, tủ sấy Memmert, cân kỹ thuật Precisa (Nhật Bản), đèn UV hai bước sóng 254 nm và 365 nm, ấm kế (JR-900A, Trung Quốc), máy lắc Hermle (Đức), kính hiển vi soi nổi C-BD230 và CH30RF200, kính hiển vi điện tử huỳnh quang, kính hiển vi điện tử quét FE SEM S4800, máy quang phổ hấp phụ AAS-6650, máy sắc ký khí GC-CP 3380, đèn cồn, dao cắt, đĩa cắt, panh cắt, kéo, bình nuôi cấy, dây thun, nylon, găng tay,...

Hoá chất: Agar, gelrite (Việt Xô, Cty Phan Trần, Hồ chí Minh); sucrose (Biên Hoà, Đồng Nai); các hoá chất được sử dụng trong môi trường MS hoặc SH, chất điều hoà sinh trưởng thực vật (Merck, Sigma, Duchefa).

2.2. Nội dung nghiên cứu

2.2.1. Nghiên cứu ảnh hưởng của AgNPs lên khử trùng bề mặt và cảm ứng mầm cây

2.2.2. Nghiên cứu ảnh hưởng của AgNPs lên sự phát sinh hình thái các loại mầm trong nuôi cấy *in vitro*

2.2.3. Nghiên cứu ảnh hưởng của AgNPs và FeNPs lên quá trình tạo cây con hoàn chỉnh từ chồi trong nuôi cấy *in vitro*

2.2.4. Nghiên cứu khả năng sinh trưởng tiếp theo của cây con *in vitro* nuôi cấy trên môi trường bổ sung AgNPs và thay thế Fe-EDTA bằng FeNPs tối ưu ở giai đoạn *ex vitro*

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Phương pháp bố trí thí nghiệm

2.3.1.1. Thí nghiệm 1: Nghiên cứu ảnh hưởng AgNPs lên khử trùng bề mặt và cảm ứng mầm cây

Thí nghiệm 1.1: Khảo sát ảnh hưởng AgNPs lên khử trùng bề mặt và cảm ứng mầm lá cây salem

Thí nghiệm 1.2: Khảo sát ảnh hưởng AgNPs lên khử trùng bề mặt và cảm ứng mầm lá cây dâu tây

Thí nghiệm 1.3: Khảo sát ảnh hưởng AgNPs lên khử trùng bề mặt và cảm ứng mầm lá sâm Ngọc Linh

2.3.1.2. Thí nghiệm 2: Nghiên cứu ảnh hưởng của AgNPs lên sự phát sinh hình thái các loại mầm trong nuôi cấy *in vitro*

*Thí nghiệm 2.1: Khảo sát ảnh hưởng của AgNPs lên sự hình thành huyền phù tế bào từ mô sẹo cây salem nuôi cấy *in vitro**

Thí nghiệm 2.2: Khảo sát ảnh hưởng của AgNPs lên sự tái sinh chồi từ huyền phù tế bào cây salem nuôi cấy in vitro

Thí nghiệm 2.3: Khảo sát ảnh hưởng của AgNPs lên quá trình phát sinh và tăng sinh phôi vô tính từ mô sẹo cây sâm Ngọc Linh nuôi cấy in vitro

2.3.1.3. Thí nghiệm 3: Nghiên cứu ảnh hưởng của AgNPs và FeNPs lên quá trình tạo cây con hoàn chỉnh từ chồi nuôi cấy in vitro

Thí nghiệm 3.1. Khảo sát ảnh hưởng của AgNPs và FeNPs lên quá trình tạo cây con hoàn chỉnh từ chồi cây salem nuôi cấy in vitro

Thí nghiệm 3.2: Khảo sát ảnh hưởng của AgNPs và FeNPs lên quá trình tạo cây con hoàn chỉnh từ chồi cây dâu tây nuôi cấy in vitro

Thí nghiệm 3.3: Khảo sát ảnh hưởng của AgNPs và FeNPs lên quá trình tạo cây con hoàn chỉnh từ chồi cây sâm Ngọc Linh nuôi cấy in vitro

2.3.1.4. Thí nghiệm 4: Theo dõi khả năng thích nghi, sinh trưởng, phát triển và tích lũy hoạt chất của cây con in vitro nuôi cấy trên môi trường bổ sung AgNPs và thay thế Fe-EDTA bằng FeNPs tối ưu ở giai đoạn ex vitro

Thí nghiệm 4.1: Theo dõi khả năng thích nghi, sinh trưởng và phát triển cây salem in vitro nuôi cấy trên môi trường bổ sung AgNPs và thay thế Fe-EDTA bằng FeNPs tối ưu ở giai đoạn ex vitro

Thí nghiệm 4.2: Theo dõi khả năng thích nghi, sinh trưởng và phát triển cây dâu tây in vitro nuôi cấy trên môi trường bổ sung AgNPs và thay thế Fe-EDTA bằng FeNPs tối ưu ở giai đoạn ex vitro

Thí nghiệm 4.3: Theo dõi khả năng thích nghi, sinh trưởng, phát triển và tích lũy hoạt chất của cây sâm Ngọc Linh in vitro nuôi cấy trên môi trường bổ sung AgNPs và thay thế Fe-EDTA bằng FeNPs tối ưu ở giai đoạn ex vitro

- 2.3.2. *Phương pháp theo dõi các chỉ tiêu*
- 2.3.3. *Phương pháp quan sát bề mặt mô sẹo*
- 2.3.4. *Phương pháp giải phẫu thực vật*
- 2.3.5. *Phương pháp quan sát và đếm số lượng tế bào*
- 2.3.6. *Phương pháp xác định hàm lượng khí ethylene*
- 2.3.7. *Phương pháp xác định hàm lượng AgNPs hấp thụ*
- 2.3.8. *Phương pháp phân tích định lượng saponin (G-Rg1, M-R2, G-Rb1)*
- 2.4. Điều kiện nuôi cấy
- 2.5. Địa điểm và thời gian tiến hành thí nghiệm
- 2.6. Phương pháp xử lý thông kê

Chương 3: KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Nghiên cứu Ảnh hưởng của AgNPs lên khử trùng bề mặt và cảm ứng mẫu cấy

3.1.1. Ảnh hưởng của AgNPs lên khử trùng bề mặt và cảm ứng mẫu lá cây salem

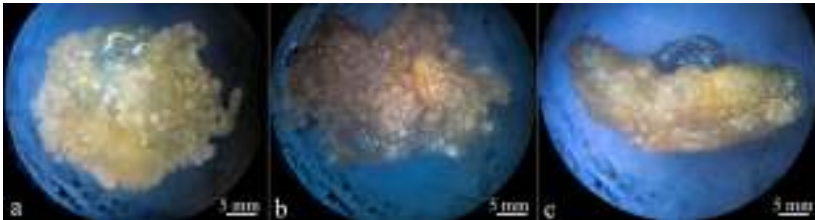
Sau 4 tuần nuôi cấy, kết quả ghi nhận được cho thấy rằng các mẫu lá được khử trùng bằng 0,2 g/L AgNPs trong 20 phút và 0,5 g/L trong 15 phút cho tỷ lệ nhiễm, tỷ lệ cảm ứng mô sẹo và khối lượng tươi tối ưu hơn các nghiệm thức khác (Bảng 3.1 và Hình 3.1).

Bảng 3.1. Ảnh hưởng của AgNPs lên khử trùng bề mặt và cảm ứng mẫu lá cây salem sau 4 tuần nuôi cấy

Chất khử trùng	Nồng độ (g/L)	Thời gian (phút)	Tỷ lệ nhiễm (%)	Tỷ lệ tái sinh mô sẹo (%)	Khối lượng tươi (g)
AgNPs	0,05	5	100,00 ^{a*}	-	-
		10	100,00 ^a	-	-
		15	72,22 ^b	27,77 ^c	0,52 ^e
		20	71,11 ^b	28,88 ^e	0,53 ^{de}
		30	73,33 ^b	26,66 ^c	0,54 ^{cd}

		5	100,00 ^a	-	-
		10	70,00 ^b	30,00 ^c	0,53 ^{de}
	0,1	15	68,89 ^b	31,11 ^e	0,54 ^{cd}
		20	46,66 ^c	53,33 ^d	0,64 ^b
		30	71,11 ^b	28,88 ^e	0,55 ^e
		5	71,11 ^b	28,89 ^e	0,54 ^{cd}
		10	45,55 ^c	54,44 ^d	0,64 ^b
	0,2	15	36,66 ^{de}	63,33 ^{bc}	0,73 ^a
		20	26,66 ^f	73,33 ^a	0,74 ^a
		30	70,00 ^b	30,00 ^e	0,53 ^{de}
		5	71,11 ^b	28,89 ^e	0,52 ^e
		10	44,44 ^{cd}	55,55 ^{cd}	0,65 ^b
	0,5	15	26,66 ^f	73,33 ^a	0,73 ^a
		20	35,55 ^e	64,44 ^b	0,73 ^a
		30	68,89 ^b	31,11 ^e	0,53 ^{de}
HgCl ₂	1	5	43,33 ^{cde}	56,66 ^{bcd}	0,64 ^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 $\alpha = 0,05$ trong phép thử Duncan, ký hiệu (-) thể hiện những nghiệm thức không có mẫu thành công.



Hình 3.1. Sự cảm ứng khác nhau giữa các mẫu lá salem được khử trùng bằng AgNPs so với HgCl₂ sau 4 tuần nuôi cấy

a: mẫu lá được khử trùng bằng 0,2 g/L AgNPs trong 20 phút; **b:** mẫu lá được khử trùng bằng 0,2 g/L AgNPs trong 30 phút **c:** mẫu lá được khử trùng bằng 1 g/L HgCl₂ trong 5 phút; sau 4 tuần nuôi cấy.

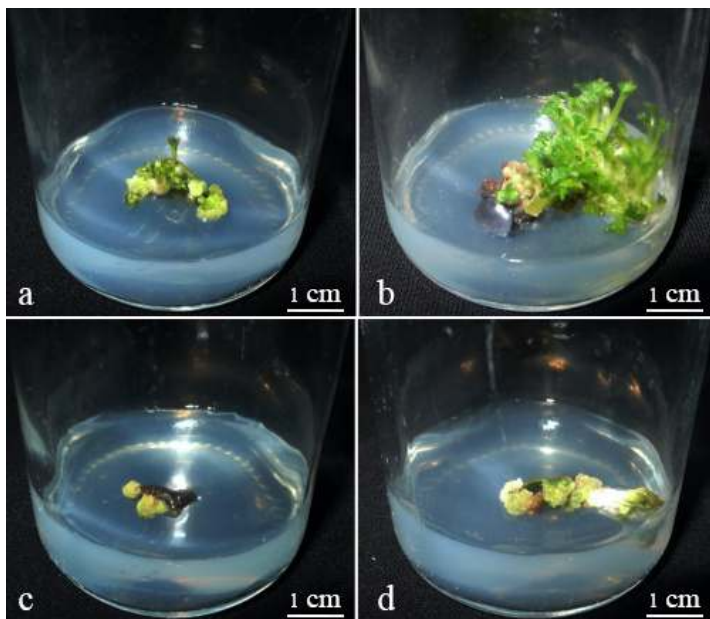
3.1.2. Ảnh hưởng của AgNPs lên khử trùng bề mặt và cảm ứng mầm lá dâu tây

Sau 6 tuần nuôi cây, các mẫu lá được khử trùng bằng 0,2; 0,5 g/L AgNPs trong 20 phút cho tỷ lệ nhiễm thấp hơn so với các nghiệm thức còn lại; nhưng tỷ lệ tái sinh chồi và số chồi tương đương so với 5 g/L HgCl₂ trong 5 phút. Đặc biệt, khối lượng tươi của chồi đạt cao nhất ở 0,2 g/L AgNPs trong 20 phút (Bảng 3.2 và Hình 3.2).

Bảng 3.2. Ảnh hưởng của AgNPs lên khử trùng bề mặt và cảm ứng mầm lá cây dâu tây sau 6 tuần nuôi cây

Chất khử trùng	Nồng độ (g/L)	Thời gian (phút)	Tỷ lệ nhiễm (%)	Tỷ lệ tái sinh chồi (%)	Số chồi/mẫu	Chồi cao > 1,5 cm
AgNPs	0,05	5	100,00 ^{a*}	-	-	-
		10	100,00 ^a	-	-	-
		15	100,00 ^a	-	-	-
		20	100,00 ^a	-	-	-
		30	100,00 ^a	-	-	-
	0,1	5	100,00 ^a	-	-	-
		10	73,33 ^b	22,22 ^d	10,00 ^c	0,00 ^c
		15	63,33 ^{bc}	30,00 ^{cd}	12,33 ^{bc}	0,00 ^c
		20	60,00 ^{bc}	33,33 ^{bcd}	11,33 ^{bc}	0,00 ^c
		30	100,00 ^a	-	-	-
	0,2	5	100,00 ^a	-	-	-
		10	60,00 ^{bc}	34,44 ^{bcd}	10,66 ^c	0,00 ^c
		15	37,78 ^{de}	56,66 ^{abc}	15,66 ^{abc}	4,00 ^b
		20	28,89 ^{ef}	64,44 ^a	21,00 ^a	6,66 ^a
		30	100,00 ^a	-	-	-
	0,5	5	100,00 ^a	-	-	-
		10	48,88 ^{cd}	45,55 ^{abcd}	13,00 ^{bc}	0,00 ^c
		15	36,66 ^{de}	61,11 ^{ab}	13,33 ^{abc}	4,00 ^b
		20	22,22 ^f	57,78 ^{abc}	19,00 ^{ab}	4,66 ^b
		30	100,00 ^a	-	-	-
HgCl ₂	1	5	49,99 ^{cd}	46,66 ^{abcd}	16,33 ^{abc}	0,00 ^c

Ghi chú: *Những chữ cái khác nhau (a,b,c...) trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa ở mức $\alpha = 0,05$ trong phép thử Duncan, ký hiệu (-) thể hiện những nghiệm thức không có mẫu thành công.



Hình 3.2. Sự cảm ứng khác nhau giữa các mẫu lá cây dâu tây được khử trùng bằng AgNPs so với HgCl₂ sau 3 và 6 tuần nuôi cấy

a, b: mô sẹo và chồi ở nghiệm thức khử trùng bằng 0,2 g/L AgNPs trong 20 phút sau 3 và 6 tuần nuôi cấy; **c, d:** mô sẹo và chồi ở nghiệm thức khử trùng bằng HgCl₂ sau 3 và 6 tuần nuôi cấy.

3.1.3. Ảnh hưởng của AgNPs lên khử trùng và cảm ứng mẫu lá sâm Ngọc Linh

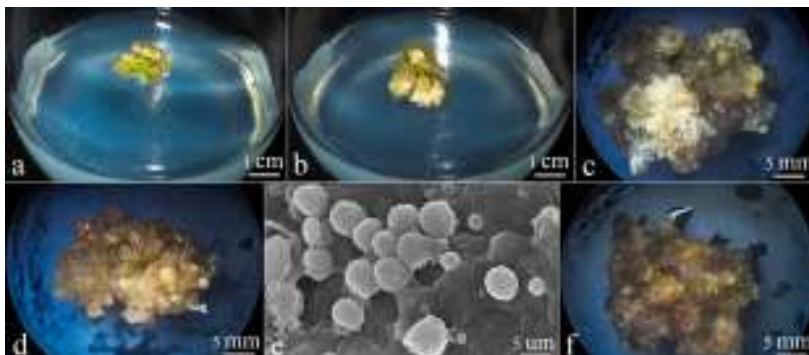
Sau 6 tuần nuôi cấy, các mẫu lá được khử trùng bằng 0,2 g/L AgNPs trong 20 phút; 0,5 g/L AgNPs trong 15 phút cho tỷ lệ nhiễm thấp hơn so với các nghiệm thức khác nhưng tỷ lệ cảm ứng mô sẹo tương đương so với 5 g/L HgCl₂ trong 5 phút. Đặc biệt, khối lượng

tươi mô sẹo đạt cao nhất ở 0,2 g/L AgNPs trong 20 phút (Bảng 3.3 và Hình 3.3).

Bảng 3.3. Ảnh hưởng của AgNPs lên khử trùng bề mặt và cảm ứng mầm lá cây sâm Ngọc Linh sau 6 tuần nuôi cấy

Chất khử trùng	Nồng độ (g/L)	Thời gian (phút)	Tỷ lệ nhiễm (%)	Tỷ lệ hình thành mô sẹo (%)	Khối lượng tươi (g)
AgNPs	0,05	5	100,00 ^{a*}	-	-
		10	100,00 ^a	-	-
		15	100,00 ^a	-	-
		20	100,00 ^a	-	-
		30	68,88 ^b	24,44 ^d	0,44 ^{fg}
	0,1	5	100,00 ^a	-	-
		10	100,00 ^a	-	-
		15	63,33 ^{bc}	30,00 ^{cd}	0,54 ^{de}
		20	60,00 ^{bc}	33,33 ^{cd}	0,66 ^{bc}
		30	70,00 ^b	23,33 ^d	0,51 ^{ef}
	0,2	5	100,00 ^a	-	-
		10	58,89 ^{bc}	34,44 ^{cd}	0,57 ^{cde}
		15	36,67 ^{de}	56,66 ^{abc}	0,53 ^{de}
		20	26,66 ^e	72,22 ^a	0,77 ^a
		30	100,00 ^a	-	-
	0,5	5	52,22 ^{bcd}	41,11 ^{bcd}	0,67 ^b
		10	47,77 ^{cd}	45,55 ^{abcd}	0,57 ^{cde}
		15	20,00 ^e	66,67 ^{ab}	0,58 ^{bcde}
		20	35,55 ^{de}	57,77 ^{abc}	0,61 ^{bcd}
		30	100,00 ^a	-	-
HgCl ₂	1	5	48,88 ^{cd}	46,66 ^{abcd}	0,41 ^g

*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, ký hiệu (-) thể hiện những nghiệm thức không có mầm thành công.*



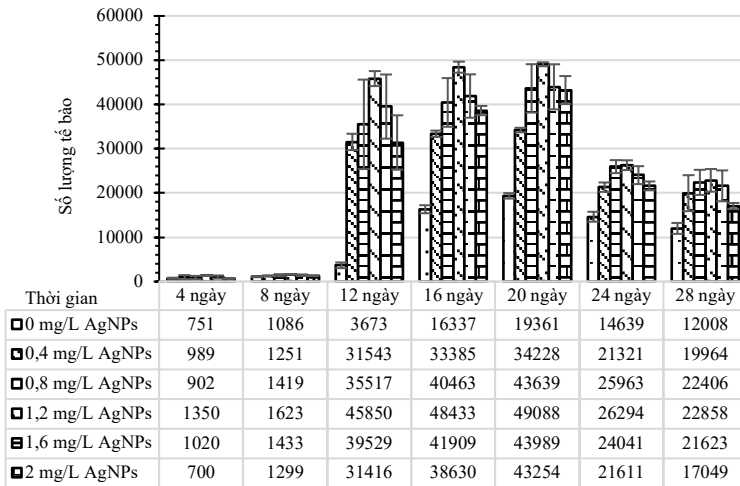
Hình 3.3. Sự cảm ứng khác nhau giữa các mẫu lá sâm Ngọc Linh được khử trùng bằng AgNPs so với HgCl₂ sau 1, 2, 4 và 6 tuần nuôi cấy

a, b, c, d: mô sẹo ở nghiệm thức khử trùng bằng 0,2 g/L AgNPs trong 20 phút sau 1, 2, 4 và 6 tuần nuôi cấy; **e:** Các mô phôi hình cầu (quan sát dưới kính hiển vi điện tử: SEM) ở nghiệm thức khử trùng bằng 0,2 g/L AgNPs trong 20 phút sau 6 tuần nuôi cấy; **f:** mô sẹo ở nghiệm thức khử trùng bằng HgCl₂ sau 6 tuần nuôi cấy.

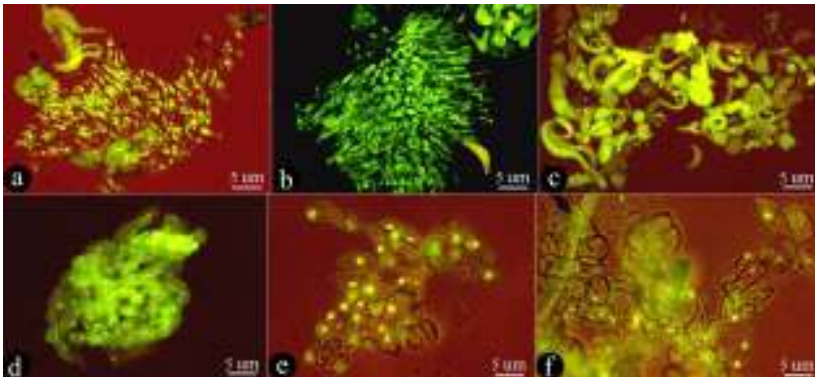
3.2. Nghiên cứu ảnh hưởng của AgNPs lên sự phát sinh hình thái các loại mẫu trong nuôi cấy *in vitro*

3.2.1. Ảnh hưởng của AgNPs lên sự gia tăng số lượng tế bào từ mô sẹo cây salem nuôi cấy *in vitro*

Sau 8 ngày nuôi cấy, các tế bào đã trải qua giai đoạn thích nghi (tế bào sinh trưởng chậm). Giai đoạn tăng trưởng của tế bào kéo dài từ ngày nuôi cấy thứ 8 đến ngày thứ 12 ở tất cả các nồng độ AgNPs và ngày thứ 16 ở đối chứng. Giai đoạn ổn định ở các nồng độ AgNPs được bắt đầu từ ngày thứ 12, ở đối chứng là ngày thứ 16 cùng kéo dài đến ngày thứ 20. Sau đó, số lượng 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 (Biểu đồ 3.1 và Hình 3.4).



Biểu đồ 3.1. Ảnh hưởng của AgNPs lên sự gia tăng số lượng tế bào từ mô sẹo cây salem sau 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28 ngày nuôi cấy



Hình 3.4. Huyền phù tế bào từ mô sẹo cây salem trong môi trường nuôi cấy lỏng lác

a, b, c: huyền phù tế bào trong môi trường không bổ sung AgNPs ở các giai đoạn thích nghi (ngày thứ 8), tăng trưởng (ngày thứ 16), suy vong (ngày thứ 24); **d, e, f:** huyền phù tế bào trong môi trường bổ sung

AgNPs nồng độ 1,2 mg/L ở các giai đoạn thích nghi (ngày thứ 8), tăng trưởng (ngày thứ 16), suy vong (ngày thứ 24).

3.2.2. Ảnh hưởng của AgNPs lên sự tái sinh chồi từ huyền phù tế bào cây salem nuôi cấy *in vitro*

Sau 4 tuần nuôi cấy, kết quả ghi nhận cho tỷ lệ mẫu tái sinh, chiều cao chồi, số chồi lớn hơn 1,5 cm, khối lượng tươi ở nghiệm thức 1,6 mg/L AgNPs đạt cao hơn so với các nghiệm thức còn lại. Số chồi trên bình đạt cao nhất ở 0,8 mg/L AgNPs nhưng các chồi này dính liền với nhau và không thể tách rời (Bảng 3.4 và Hình 3.5)

Bảng 3.4. Ảnh hưởng của AgNPs lên sự tái sinh, sinh trưởng và phát triển chồi từ huyền phù tế bào cây salem sau 4 tuần nuôi cấy

AgNPs (mg/L)	Tỷ lệ mẫu tái sinh (%)	Số chồi/bình	Chiều cao chồi (cm)	Số chồi > 1,5 cm/bình	Khối lượng tươi (g)
0,0	40,00 ^{b*}	2,33 ^c	0,90 ^b	0,00 ^d	0,21 ^c
0,4	45,55 ^{ab}	3,00 ^{bc}	1,06 ^b	1,33 ^c	0,31 ^{bc}
0,8	47,77 ^{ab}	6,66 ^a	1,20 ^b	2,00 ^{bc}	0,42 ^b
1,2	59,99 ^{ab}	4,00 ^{bc}	1,33 ^{ab}	2,33 ^b	0,42 ^b
1,6	67,77 ^a	4,66 ^b	1,83 ^a	3,66 ^a	0,65 ^a
2,0	66,66 ^a	3,66 ^{bc}	1,26 ^{ab}	2,33 ^b	0,32 ^{bc}

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 3.5. Sự tái sinh, sinh trưởng và phát triển chồi từ huyền phù tế bào cây salem ở đối chứng và các nồng độ AgNPs khác nhau sau 4 tuần nuôi cấy

a, b, c, d, e, f: chồi cây salem từ môi trường bổ sung các nồng độ AgNPs khác nhau (0,0; 0,4; 0,8; 1,2; 1,6; 2,0; từ trái qua phải) sau 4 tuần nuôi cấy.

3.2.3. Ảnh hưởng của AgNPs lên quá trình phát sinh và tăng sinh phôi từ mô sẹo sâm Ngọc Linh nuôi cấy *in vitro*

Sau 14 tuần nuôi cấy, kết quả ghi nhận cho thấy số phôi/bình, cây con có nguồn gốc từ phôi, cây con lớn hơn 3 cm/bình, khối lượng tươi và khối lượng khô cây con đạt cao nhất ở nghiệm thức bổ sung 1,6 mg/L AgNPs (Bảng 3.5 và Hình 3.6, 3.7).

Bảng 3.5. Ảnh hưởng của AgNPs lên khả năng nhân nhanh phôi và tái sinh chồi từ phôi vô tính cây sâm Ngọc Linh sau 6 tuần nuôi cấy

AgNPs (mg/L)	Số phôi/ bình	Cây con có nguồn gốc từ phôi		Khối lượng tươi cây con (g)	Khối lượng khô cây con (mg)
		Tổng	Cây con > 3 cm/bình		
0,0	40,33 ^{c*}	4,33 ^d	2,66 ^c	0,28 ^c	28,66 ^d
0,4	49,33 ^c	9,33 ^b	4,00 ^{bc}	0,35 ^{bc}	43,33 ^{bcd}
0,8	83,66 ^b	9,66 ^b	5,00 ^{ab}	0,63 ^a	56,33 ^{bc}
1,2	98,33 ^b	10,66 ^b	5,33 ^{ab}	0,56 ^{ab}	62,00 ^b
1,6	140,00 ^a	14,66 ^a	5,66 ^a	0,48 ^{abc}	86,00 ^a
2,0	40,66 ^c	6,66 ^c	0,00 ^d	0,31 ^{bc}	41,00 ^{cd}

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 3.6. Ảnh hưởng của AgNPs lên quá trình sinh và tăng sinh phôi soma sâm Ngọc Linh sau 14 tuần nuôi cấy

a. và **b.** Phôi soma được chụp bằng kính hiển vi huỳnh quang và phôi hình cầu trên bề mặt mô sẹo được lấy bằng kính hiển vi điện tử quét (SEM trên môi trường chứa 1,6 mg/L AgNPs sau 6 tuần nuôi cấy, **c.** Phôi soma lấy bằng kính hiển vi huỳnh quang trên môi trường chứa 1,6 mg/L AgNPs sau 8 tuần nuôi cấy, **d.** Phôi soma và cây con trên môi trường chứa 1,6 mg/L AgNPs sau 14 tuần nuôi cấy.

Hình 3.7. Hình thái phôi vô tính cây sâm Ngọc Linh ở đối chứng và 1,6 mg/L AgNPs

a: phôi vô tính từ môi trường không bổ sung AgNPs (đối chứng) sau 8 tuần nuôi cấy; **b, c, d:** phôi vô tính từ môi trường bổ sung 1,6 mg/L AgNPs sau 8 tuần nuôi cấy.

3.3. Nghiên cứu ảnh hưởng của AgNPs và FeNPs lên quá trình tạo cây con hoàn chỉnh từ chồi nuôi cấy in vitro

3.3.1. Ảnh hưởng của AgNPs và FeNPs lên quá trình tạo cây con hoàn chỉnh từ chồi cây salem nuôi cấy in vitro

Sau 4 tuần nuôi cấy, kết quả ghi nhận cho thấy các cây con ở nghiệm thức bổ sung 0,4 mg/L AgNPs cho chiều cao cây, chiều rộng lá, chiều dài rễ, khối lượng tươi, khối lượng khô, Chlorophyll là tối ưu so với các nghiệm thức còn lại. Ở nghiệm thức thay thế Fe-EDTA bằng 2,8 mg/L FeNPS cho các chỉ tiêu theo dõi thấp hơn so với 0,4 mg/L AgNPs và tương đồng so với đối chứng (Bảng 3.6).

Bảng 3.6. Ảnh hưởng của AgNPs và FeNPs lên quá trình tạo cây con hoàn chỉnh từ chồi cây salem sau 4 tuần nuôi cấy

Nano (mg/L)		Tỷ lệ ra rễ (%)	Chiều cao cây (cm)	Chiều rộng lá (cm)	Chiều dài rễ (cm)	Khối lượng tươi (g)	Khối lượng khô (mg)	Chlorophyll (nmol/cm ²)
AgNPs	FeNPs							

0,0	0,0	100,00 ^a	6,36 ^b	0,56 ^b	0,66 ^b	1,74 ^b	94,87 ^b	22,36 ^b
0,4	-	100,00 ^a	8,43 ^a	0,56 ^b	0,96 ^a	2,36 ^a	108,17 ^a	26,90 ^a
0,8	-	100,00 ^a	6,56 ^b	0,93 ^a	1,03 ^a	1,24 ^c	80,58 ^c	21,40 ^{bc}
1,2	-	100,00 ^a	5,33 ^{de}	1,03 ^a	0,56 ^{bcd}	1,02 ^{cde}	76,22 ^c	18,86 ^{bcd}
1,6	-	100,00 ^a	5,16 ^e	1,16 ^a	0,40 ^{cd}	0,86 ^{de}	75,51 ^c	18,20 ^{cd}
2,0	-	100,00 ^a	5,10 ^e	1,20 ^a	0,50 ^{bcd}	0,81 ^e	63,58 ^d	16,50 ^{cd}
-	0,7	100,00 ^a	5,00 ^e	0,36 ^b	0,43 ^{bcd}	1,28 ^c	75,95 ^c	18,90 ^{bcd}
-	1,4	100,00 ^a	5,36 ^{cde}	0,36 ^b	0,53 ^{bcd}	1,30 ^c	76,70 ^c	19,49 ^{bcd}
-	2,8	100,00 ^a	6,20 ^{bc}	0,56 ^b	0,63 ^{bc}	1,77 ^b	95,91 ^b	21,23 ^{bc}
-	5,6	100,00 ^a	6,10 ^{bcd}	0,53 ^b	0,43 ^{bcd}	1,20 ^{cd}	80,77 ^c	20,76 ^{bc}
-	8,4	100,00 ^a	5,40 ^{cde}	0,53 ^b	0,40 ^{cd}	1,31 ^c	79,77 ^c	19,77 ^{bcd}
-	11,2	100,00 ^a	5,36 ^{cde}	0,50 ^b	0,36 ^d	1,31 ^c	79,17 ^c	19,13 ^{bcd}

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.

3.3.2. Ảnh hưởng của AgNPs và FeNPs lên quá trình tạo cây con hoàn chỉnh từ chồi cây dâu tây nuôi cấy in vitro

Sau 4 tuần nuôi cấy, kết quả ghi nhận các cây con ở nghiệm thức bổ sung 0,5 mg/L AgNPs và thay thế Fe-EDTA bằng 1,4 mg/L FeNPs cho tỷ lệ ra rễ, chiều cao cây, số rễ, chiều dài rễ, khối lượng tươi, khối lượng khô, chlorophyll là tối ưu so với các nghiệm thức còn lại (Bảng 3.7).

Bảng 3.7. Ảnh hưởng của AgNPs và FeNPs lên quá trình tạo cây con hoàn chỉnh từ chồi dâu tây sau 4 tuần nuôi cấy

Nano (mg/L)		Tỷ lệ ra rễ (%)	Chiều cao cây (cm)	Số rễ	Chiều dài rễ (cm)	Khối lượng tươi (g)	Khối lượng khô (mg)	Chlorophyll (nmol/cm ²)
AgNPs	FeNPs							
0,0	0,0	71,11 ^{bc*}	3,96 ^b	2,66 ^{bcd}	3,10 ^{ab}	0,30 ^{bcd}	40,10 ^d	27,40 ^c
0,5	-	78,89 ^{ab}	4,63 ^b	5,00 ^{ab}	1,60 ^{bc}	0,46 ^b	80,61 ^{ab}	34,49 ^{ab}
1,0	-	65,55 ^{bcd}	6,75 ^a	4,00 ^{abc}	5,13 ^a	0,71 ^a	65,19 ^c	30,31 ^{bc}
1,5	-	58,89 ^{cd}	4,72 ^{ab}	4,33 ^{abc}	4,46 ^a	0,44 ^b	73,35 ^{bc}	29,98 ^{bc}
2,0	-	52,22 ^d	3,49 ^b	6,33 ^a	0,96 ^c	0,26 ^{cd}	38,98 ^{de}	28,44 ^{bc}
-	0,7	56,67 ^{cd}	5,56 ^{ab}	2,00 ^{cd}	3,60 ^{ab}	0,32 ^{bcd}	72,68 ^{bc}	25,32 ^{cd}
-	1,4	88,89 ^a	6,76 ^a	4,00 ^{abc}	4,46 ^a	0,75 ^a	84,19 ^a	38,31 ^a
-	2,8	61,11 ^{cd}	5,36 ^{ab}	2,66 ^{bcd}	3,16 ^{ab}	0,37 ^{bc}	76,61 ^{ab}	29,16 ^{bc}
-	5,6	51,11 ^d	4,10 ^b	2,33 ^{cd}	1,96 ^{bc}	0,19 ^d	37,98 ^{de}	24,11 ^{cd}
-	11,2	32,22 ^e	3,60 ^b	0,66 ^d	1,93 ^{bc}	0,18 ^d	30,13 ^c	20,57 ^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 $\alpha = 0,05$ trong phép thử Duncan.

3.3.3. Ảnh hưởng của AgNPs và FeNPs lên quá trình tạo cây con hoàn chỉnh từ chồi cây sâm Ngọc Linh nuôi cấy in vitro

Sau 12 tuần nuôi cấy, kết quả ghi nhận cho thấy các cây con ở nghiệm thức bổ sung 1,2 mg/L AgNPs cho chiều cao cây, số rễ, đường kính củ, chiều dài củ, khối lượng tươi, chlorophyll là tối ưu so với các nghiệm thức còn lại. Ở nghiệm thức thay thế Fe-EDTA bằng 5,6 mg/L FeNPs cho các chỉ tiêu theo dõi cao hơn so với các nghiệm thức khác (Bảng 3.8).

Bảng 3.8. Ảnh hưởng của AgNPs và FeNPs lên quá trình tạo cây con hoàn chỉnh từ chồi cây sâm Ngọc Linh sau 12 tuần nuôi cấy

Nano (mg/L)		Tỷ lệ ra rễ (%)	Chiều cao cây (cm)	Số rễ	Đường kính củ (cm)	Chiều dài củ (cm)	Khối lượng tươi (g)	Chlorophyll (nmol/cm ²)
AgNPs	FeNPs							
0,0	0,0	100,00 ^{a*}	3,93 ^{bc}	2,66 ^{df}	0,43 ^e	1,53 ^c	0,86 ^{bc}	18,90 ^{bed}
0,4	-	100,00 ^a	4,33 ^{bc}	4,33 ^{ede}	0,70 ^{bc}	1,46 ^c	1,19 ^{abc}	19,70 ^{bed}
0,8	-	100,00 ^a	5,31 ^b	6,33 ^b	0,86 ^b	2,03 ^b	1,31 ^{ab}	21,10 ^{bc}
1,2	-	100,00 ^a	6,75 ^a	8,66 ^a	1,16 ^a	2,43 ^a	1,56 ^a	26,56 ^a
1,6	-	100,00 ^a	3,89 ^{bc}	4,66 ^{bed}	0,73 ^{bc}	2,40 ^a	1,25 ^{abc}	18,80 ^{bed}
2,0	-	100,00 ^a	3,39 ^c	6,00 ^{bc}	0,66 ^{bcd}	2,53 ^c	0,89 ^{bc}	16,93 ^{cde}
-	0,7	100,00 ^a	5,16 ^{ab}	4,33 ^{ede}	0,46 ^{de}	1,60 ^c	0,76 ^c	14,13 ^e
-	1,4	100,00 ^a	5,33 ^{ab}	5,33 ^{bcd}	0,53 ^{cde}	1,63 ^c	1,11 ^{abc}	15,90 ^{de}
-	2,8	100,00 ^a	6,56 ^a	3,66 ^{def}	0,60 ^{cde}	1,66 ^c	1,20 ^{abc}	17,03 ^{cde}
-	5,6	100,00 ^a	4,26 ^{bc}	5,00 ^{bcd}	0,86 ^b	1,93 ^b	1,32 ^{ab}	21,76 ^b
-	11,2	100,00 ^a	2,93 ^c	2,33 ^f	0,53 ^{cde}	1,66 ^c	0,73 ^c	9,60 ^f

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.*

3.4. Khả năng sinh trưởng tiếp theo của cây con in vitro nuôi cấy trên môi trường bổ sung AgNPs và thay thế Fe-EDTA bằng FeNPs tối ưu ở giai đoạn ex vitro

3.4.1. Khả năng sinh trưởng tiếp theo của cây sâm Ngọc Linh in vitro nuôi cấy trên môi trường bổ sung AgNPs và thay thế Fe-EDTA bằng FeNPs tối ưu ở giai đoạn ex vitro

Sau 4 và 12 tuần nuôi trồng kết quả cho thấy các cây con có nguồn gốc từ môi trường bổ sung 0,4 mg/L AgNPs trong giai đoạn tạo cây

hoàn chỉnh cho tỷ lệ sống sót, số lá, chiều cao cây, diện tích lá, khối lượng tươi cây, hàm lượng chlorophyll, số cành, chiều cao hoa, số lượng đé trên cành, số lượng hoa trên đé, khối lượng tươi của hoa đạt tối ưu so với các nghiệm thức khác (Bảng 3.9, 3.10, Hình 3.11).

Bảng 3.9. Khả năng thích nghi và sinh trưởng của cây salem trong vỉ xốp sau 4 tuần nuôi trồng

Nano (mg/L)		Tỷ lệ sống (%)	Số lá	Chiều cao cây (cm)	Diện tích lá (cm ²)	Khối lượng tươi (g)	Chlorophyll (nmol/cm ²)
AgNPs	FeNPs						
0,0	0,0	71,33 ^b	3,66 ^c	6,96 ^b	4,03 ^b	2,50 ^b	25,76 ^b
0,4	-	89,00 ^a	10,00 ^a	9,83 ^a	14,75 ^a	4,23 ^a	35,26 ^a
-	2,8	72,00 ^b	5,66 ^b	7,10 ^b	8,26 ^b	2,73 ^b	28,46 ^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 $\alpha = 0,05$ trong phép thử Duncan.*

Bảng 3.10. Khả năng sinh trưởng và phát triển của cây salem trong chậu nhựa sau 12 tuần nuôi trồng

Nano (mg/L)		Số lượng cành	Chiều cao hoa (cm)	Số lượng đé/cành	Số lượng hoa/δέ	Khối lượng tươi hoa (g)
AgNPs	FeNPs					
0,0	0,0	10,66 ^c	46,00 ^c	66,00 ^b	2,33 ^b	28,93 ^c
0,4	-	16,66 ^a	85,00 ^a	88,66 ^a	4,33 ^a	61,53 ^a
-	2,8	14,33 ^b	62,00 ^b	71,33 ^b	2,66 ^b	35,26 ^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 $\alpha = 0,05$ trong phép thử Duncan.*

3.4.2. Khả năng sinh trưởng tiếp theo của cây dâu tây in vitro nuôi cấy trên môi trường bổ sung AgNPs và thay thế Fe-EDTA bằng FeNPs tối ưu ở giai đoạn ex vitro

Sau 4 và 12 tuần nuôi trồng kết quả cho thấy các cây con có nguồn gốc từ môi trường thay thế Fe-EDTA bằng 1,4 mg/L FeNPs trong giai đoạn tạo cây hoàn chỉnh cho tỷ lệ sống, số lá, chiều cao cây, diện tích

lá, khối lượng tươi cây, hàm lượng chlorophyll, tỷ lệ đậu trái, số lượng ngô F1, F2 đạt tối ưu so với các nghiệm thức khác (Bảng 3.11, 3.12, Hình 3.12).

Bảng 3.11. Khả năng thích nghi và sinh trưởng của cây đậu tây trong vĩ xôp sau 4 tuần nuôi trồng

Nano (mg/L)		Tỷ lệ sống (%)	Số lá	Chiều cao cây (cm)	Diện tích lá (cm ²)	Khối lượng tươi (g)	Chlorophyll (nmol/cm ²)
AgNPs	FeNPs						
0,0	0,0	69,33 ^b	6,00 ^b	6,66 ^b	1,94 ^b	5,46 ^b	33,53 ^b
0,5	-	72,33 ^b	6,33 ^b	7,33 ^b	2,06 ^b	5,83 ^b	35,03 ^b
-	1,4	86,00 ^a	8,66 ^a	11,33 ^a	3,24 ^a	8,86 ^a	39,90 ^a

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

Bảng 3.12. Khả năng sinh trưởng và phát triển của cây đậu tây trong chậu nhựa sau 12 tuần nuôi trồng

Nano (mg/L)		Chiều cao cây (cm)	Tỷ lệ đậu trái (%)	Số lượng ngô F1	Số lượng ngô F2	Diện tích lá (cm ²)	Khối lượng tươi (g)
AgNPs	FeNPs						
0,0	0,0	10,30 ^b	50,00 ^b	2,00 ^b	0,00 ^b	7,33 ^b	21,80 ^b
0,5	-	11,40 ^b	76,66 ^a	3,00 ^b	0,00 ^b	8,22 ^b	22,83 ^b
-	1,4	15,01 ^a	81,76 ^a	6,00 ^a	3,00 ^a	14,00 ^a	39,86 ^a

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

3.4.3. Khả năng sinh trưởng tiếp theo của cây sâm Ngọc Linh in vitro nuôi cấy trên môi trường bổ sung AgNPs và thay thế Fe-EDTA bằng FeNPs tối ưu ở giai đoạn ex vitro

Sau 6; 12; 24 tháng nuôi trồng kết quả cho thấy các cây con có nguồn gốc từ môi trường bổ sung 1,2 mg/L AgNPs trong giai đoạn tạo cây hoàn chỉnh cho tỷ lệ sống, số lá, chiều cao cây, diện tích lá, khối lượng tươi cây, hàm lượng Chlorophyll, khối lượng tươi củ, hàm lượng saponin (G-Rg1, M-R2, G-Rb1) trong củ đạt tối ưu so với các nghiệm thức khác (Bảng 3.13 3.14, Biểu đồ 3.5, 3.6, Hình 3.13).

Bảng 3.13. Khả năng thích nghi và sinh trưởng cây sâm Ngọc Linh trong vĩ xốp sau 6 tháng nuôi trồng

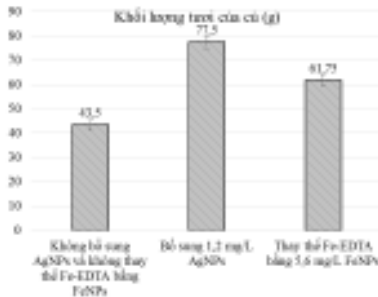
Nano (mg/L)		Tỷ lệ sống (%)	Số lá	Chiều cao cây (cm)	Diện tích lá (cm ²)	Khối lượng tươi (g)	Chlorophyll (nmol/cm ²)
AgNPs	FeNPs						
0,0	0,0	44,44 ^{c*}	1,00 ^c	1,16 ^c	0,30 ^b	1,03 ^c	16,73 ^b
1,2	-	93,65 ^a	3,33 ^a	4,66 ^a	3,70 ^a	3,86 ^a	23,95 ^a
-	5,6	63,49 ^b	2,00 ^b	3,30 ^b	1,94 ^b	2,10 ^b	19,65 ^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 $\alpha = 0,05$ trong phép thử Duncan.*

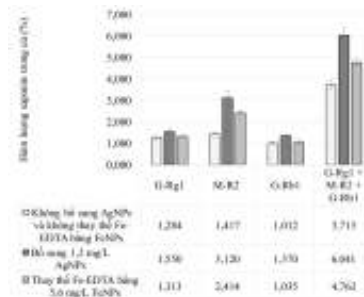
Bảng 3.14. Khả năng sinh trưởng và phát triển của cây sâm Ngọc Linh trong rỗ nhựa sau 12 tháng nuôi trồng

Nano (mg/L)		Số lá	Chiều cao cây (cm)	Diện tích lá (cm ²)	Khối lượng tươi (g)	Chlorophyll (nmol/cm ²)
AgNPs	FeNPs					
0,0	0,0	1,66 ^{b*}	1,63 ^c	0,52 ^c	1,43 ^c	19,73 ^b
1,2	-	4,33 ^a	6,73 ^a	6,02 ^a	5,20 ^a	24,95 ^a
-	5,6	2,33 ^b	3,90 ^b	2,68 ^b	2,66 ^b	20,98 ^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 $\alpha = 0,05$ trong phép thử Duncan.*



Biểu đồ 3.5. Khối lượng tươi của củ sâm Ngọc Linh sau 2 năm trồng trong điều kiện nhà kính



Biểu đồ 3.6. Hàm lượng saponin của củ sâm Ngọc Linh sau 2 năm trồng trong điều kiện nhà kính



Hình 3.8. Sự thích nghi, sinh trưởng và phát triển của cây salem sau 4 tuần và 12 tuần nuôi trồng



Hình 3.9. Sự thích nghi, sinh trưởng và phát triển của cây dâu tây sau 4 tuần và 12 tuần nuôi trồng



Hình 3.10. Sự thích nghi, sinh trưởng và phát triển của cây salem sau 6 tháng và 12 tháng nuôi trồng



Hình 11. Sự sinh trưởng, phát triển của cây sâm Ngọc Linh sau 24 tháng nuôi trồng trong điều kiện nhà kính

a: cây có nguồn gốc từ môi trường không bổ sung AgNPs và không thay thế Fe-EDTA bằng FeNPs; **b:** cây có nguồn gốc từ môi trường

bổ sung 1,2 mg/L AgNPs; c: cây có nguồn gốc từ môi trường thay thế Fe-NPs bằng 5,6 mg/L FeNPs.

KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

Kết luận

Kết quả nghiên cứu đã cho thấy tác động tích cực của nano kim loại (AgNPs, FeNPs) lên quá trình khử trùng, sinh trưởng, phát triển và nâng cao chất lượng cây giống salem, dâu tây và sâm Ngọc Linh nuôi cấy *in vitro*.

0,2 g/L AgNPs trong 20 phút và 0,5 g/L AgNPs trong 15 phút trên mẫu lá cây salem; 0,2 AgNPs trong 20 phút trên mẫu lá cây dâu tây; 0,2 g/L AgNPs trong 20 phút trên mẫu lá sâm Ngọc Linh cho hiệu quả khử trùng bề mặt cũng như cảm ứng mẫu cấy cao.

1,2 mg/L AgNPs cho hiệu quả hình thành huyền phù tế bào salem cao nhất ở ngày nuôi cấy thứ 20 và từ ngày 16 – 20 là thời gian thích hợp nhất cho việc cấy chuyển huyền phù tế bào. 1,6 mg/L AgNPs cho hiệu quả tái sinh chồi salem đạt tối ưu nhất sau 4 tuần nuôi cấy. 1,6 mg/L AgNPs cho hiệu quả tái sinh và tăng sinh phôi sâm Ngọc Linh cao nhất sau 14 tuần nuôi cấy.

0,4 mg/L AgNPs trên cây salem; 0,5 mg/L AgNPs và 1,4 mg/L FeNPs trên cây dâu tây; 1,2 mg/L AgNPs trên cây sâm Ngọc Linh có hiệu quả cao lên quá trình tạo cây con hoàn chỉnh trong nuôi cấy *in vitro*. 0,4 mg/L AgNPs trên cây salem; 0,5 mg/L AgNPs trên cây dâu tây; 1,2 mg/L AgNPs trên cây sâm Ngọc Linh cho hàm lượng AgNPs hấp thu tích hợp và khí ethylene tích lũy trong bình nuôi cấy thấp nhất có ảnh hưởng tích lên sự sinh trưởng và phát triển của các cây con nuôi cấy *in vitro*.

Cây con salem, dâu tây và sâm Ngọc Linh có nguồn gốc từ môi trường nuôi cấy tương ứng có bổ sung 0,4 mg/L AgNPs, được thay thế 1,4 mg/L FeNPs và có bổ sung 1,2 mg/L AgNPs cho khả năng thích nghi, sinh trưởng và phát triển tiếp theo tối ưu ở giai đoạn *ex vitro*.

Kiến nghị

1. Tiếp tục nghiên cứu các nano kim loại khác nhau lên sinh trưởng, phát triển và nâng cao chất lượng cây giống của nhiều loại cây trồng nhằm tìm ra các chất điều hoà sinh trưởng mới hay một nguồn vật liệu mới để thay thế dinh dưỡng khoáng trong môi trường nuôi cấy *in vitro*.

2. Phân tích sự hấp thu, vận chuyển, tích lũy, chuyển hoá của các nano kim loại trong quá trình nuôi cấy *in vitro* và tác động của chúng lên các kim loại khác và hệ enzyme của thực vật.

3. Triển khai ứng dụng các nano kim loại trong vi nhân giống và canh tác giống cây trồng ở quy mô thương mại.

CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. **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 (2018), Vai trò của nano bạc trong nâng cao tần xuất hình thành tế bào đơn cây hoa salem (*Limonium sinuatum* (L.) Mill), *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 16(3), tr. 481-490
2. **Đỗ Mạnh Cường**, Trương Thị Bích Phượng, Dương Tấn Nhựt (2018), Ảnh hưởng của nano bạc lên khả năng cảm ứng mô sẹo và tái sinh chồi từ mẫu lá dâu tây (*Fragaria × ananassa*) nuôi cấy *in vitro*, *Tạp chí Khoa học Đại học Huế: Khoa học Tự nhiên*, 127(1C), tr. 61-70.
3. **Đỗ Mạnh Cường**, Hoàng Thanh Tùng, Hoàng Đắc Khải, Vũ Quốc Luận, Vũ Thị Hiền, Trương Thị Bích Phượng, Dương Tấn Nhựt (2020), Nâng cao tần xuất phát sinh phôi vô tính sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) thông qua khử trùng mẫu lá bằng nano bạc và bổ sung nano bạc trong môi trường nuôi cấy, *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 18(3), tr. 517-527.
4. **Đỗ Mạnh Cường**, Hà Thị Mỹ Ngân, Hoàng Thanh Tùng, Vũ Quốc Luận, Vũ Thị Hiền, Trương Thị Bích Phượng, Dương Tấn Nhựt (2020), Nghiên cứu ảnh hưởng của nano sắt lên sự hình thành rễ và tạo cây hoàn chỉnh của cây dâu tây (*Fragaria × ananassa*) và sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) nuôi cấy *in vitro*, *Tạp chí Khoa học Công nghệ, Đại học Khoa học Huế*, 17(2), tr. 93-105.
5. **Do Manh Cuong**, Phan Cong Du, Hoang Thanh Tung, Ha Thi My Ngan, Vu Quoc Luan, Truong Hoai Phong, Hoang Dac Khai, Truong Thi Bich Phuong, Duong Tan Nhut (2021), Silver nanoparticles as an effective stimulant in micropropagation of *Panax vietnamensis*—a valuable medicinal plant, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 146, pp. 577-588.

**HUE UNIVERSITY
UNIVERSITY OF SCIENCES**

DO MANH CUONG

**EFFECTS OF SILVER NANOPARTICLES AND
IRON NANOPARTICLES ON *IN VITRO* PLANTLET QUALITY
OF SOME ECONOMICALLY VALUABLE CROPS**

Major: Biotechnology

No.: 9.42.02.01

SUMMARY OF THE PH.D. THESIS IN BIOTECHNOLOGY

Thua Thien Hue - 2021

The research is completed at:

Molecular and Plant Breeding Department,
Tay Nguyen Institute for Scientific Research

Supervisors:

1. Prof. Duong Tan Nhut
2. Assoc. Prof. Truong Thi Bich Phuong

Reviewer 1:

Reviewer 2:

Reviewer 3:

The thesis will be presented at the Hue University's Doctoral thesis defense Committee Meeting at ... date ... month ... year 2021

The thesis can be found at:

1. National Library of Vietnam
2. Information Center and Library of University of Sciences, Hue University

INTRODUCTION

The necessity of the project

Plant biotechnology - especially the method of culturing plant cells, tissues and organs on controlled nutrient media - has overcome the disadvantages of traditional propagation methods. However, besides the advantages, this method still has some limitations such as the sterilization of the surface of the cultured samples contaminated with microorganisms affecting the regeneration efficiency; the efficiency of the morphogenesis processes is not high; the accumulation of ethylene gas affects the propagation efficiency; seedling quality and survival rate when domesticated in the nursery are low; the cost of seedlings is high. Therefore, the application of new materials in sterilization as well as environmental improvement to enhance seedling quality has always been one of the goals of commercial micropropagation. We are living in an era where nanotechnology is applied in many fields such as physics, chemistry, electronics, environment, energy, materials, biology. Therefore, in order to understand the role and potential of nano in sterilization, supplementation (as a growth regulator) and replacement of mineral nutrition in order to minimize the weaknesses in the micropropagation system, improve the quality of tissue culture seedlings, we carried out the project "Study of the effects of nano silver and nano iron on in vitro seedling quality of some economically valuable plants". In this study, the plants used as research subjects were *Limonium sinuatum*, *Fragaria × ananassa* and *Panax vietnamensis*.

The goal of the project

The study was carried out to evaluate the impact of silver nanoparticles (AgNPs) - used to disinfect the surface of leaf samples and added to the culture medium, iron nanoparticles (FeNPs) - used to replace Iron substitution Ethylenediamine Tetra Acetate (Fe-EDTA) during micropropagation on seedling quality on some economically valuable crops (*Limonium sinuatum*, *Fragaria* × *ananassa* and *Panax vietnamensis*).

Subject and research scope

Subject

AgNPs (used as disinfectant and added to the culture medium), FeNPs (replaced Fe-EDTA in the culture medium) with different concentrations were used to study the sterilization ability, the growth, development and quality improvement of seedlings of *Limonium sinuatum*, *Fragaria* × *ananassa* and *Panax vietnamensis* cultured *in vitro*.

Research scope

Study the effect of AgNPs on the stages of surface sterilization and morphogenesis in micropropagation of *Limonium sinuatum*, *Fragaria* × *ananassa* and *Panax vietnamensis* Ha et Grushv.).

Study the effects of AgNPs and FeNPs on the stage of complete plant growth on three plant species (*Limonium sinuatum*, *Fragaria* × *ananassa* and *Panax vietnamensis*) cultured *in vitro*.

Scientific and practical significance of the study

Scientific significance

The research results of this thesis will provide valuable new scientific data about the role of metal nanoparticles in surface sterilization, growth, development, ethylene gas fluctuations and

seedlings quality improvement in micropropagation of ornamental flowers, fruit trees and medicinal plants.

Practical significance

The research results of the thesis have many potential applications in commercial seeding production.

The new findings of the thesis

This is the first work in Vietnam to study the application of metal nanoparticles (AgNPs, FeNPs) in micropropagation of *Limonium sinuatum*, *Fragaria × ananassa* and *Panax vietnamensis*.

The study evaluated the role of AgNPs in inhibiting ethylene gas in order to improve the quality of seedlings of *Limonium sinuatum*, *Fragaria × ananassa* and *Panax vietnamensis* Ha et Grushv. *in vitro*.

Adding metal nanoparticles to the culture medium during the micropropagation stage helped to increase the adaptability as well as the survival rate of *Limonium sinuatum*, *Fragaria × ananassa* and *Panax vietnamensis* Ha et Grushv. at the nursery stage.

The propagation process of three ornamental plants with high economic value, namely *Limonium sinuatum*, *Fragaria × ananassa* and *Panax vietnamensis* was formed under the influence of metal nanoparticles.

The overall structure of the thesis

The thesis consists of 125 pages, divided into sections: Foreword, 4 pages; Chapter 1: Literature review, 29 pages; Chapter 2: Materials, Contents and Methods, 12 pages; Chapter 3: Results and Discussion, 52 pages; Conclusions and Recommendations, 3 pages; List of publications related to the thesis, 1 page; Reference, 24 pages with 171 reference documents in Vietnamese, English and from the internet. The thesis includes 20 tables, 26 figures.

Chapter 1: LITERATURE REVIEW

The thesis has consulted and summarized 10 main issues related to: (1) Micropropagation; (2) Processes in micropropagation; (3) Restrictions in micropropagation; (4) Nano metal; (5) Application of metal nanoparticles; (6) Nano silver and nano iron in plant micropropagation; (7) Biosafety of metal nanoparticles; (8) Summary of the *Limonium sinuatum* ; (9) Summary of the *Fragaria × ananassa*; (10) Summary of the *Panax vietnamensis*.

Chapter 2: MATERIALS, CONTENTS, AND METHODS

2.1. Materials

2.1.1. Plant material

Young leaves of *Limonium sinuatum* and *Fragaria × ananassa* 3 months old; *Panax vietnamensis* 3 years old

2.1.2. Nano solution

AgNPs have a size of 20-25 nm, FeNPs have a size of 20-60 nm

2.1.3 Equipment, tools, chemicals

Equipment, tools: Electronic balance, water distiller, pH meter, aseptic autoclave, aseptic incubator, chlorophyll meter SPAD-502 (Minolta Co., Ltd., Osaka, Japan), drying cabinet Sanyo MOV- 112, drying cabinet Memmert, precise technical balance (Japan), UV lamp with two wavelengths 254 nm and 365 nm, hygrometer (JR-900A, China), Hermle shaker (Germany), stereo microscope C -BD230 and CH30RF200, fluorescence electron microscope, scanning electron microscope FE SEM S4800, adsorption spectrometer AAS-6650, gas chromatograph GC-CP 3380, alcohol lamp, inoculation knife, inoculation plate, culture pins, scissors, culture flasks, elastic bands, nylon, gloves,...

Chemicals: Agar, gelrite (Viet Xo, Phan Tran Company, Ho Chi Minh); sucrose (Bien Hoa, Dong Nai); chemicals used in cultures of MS or SH, plant growth regulators (Merck, Sigma, Duchefa).

2.2. Research contents

2.2.1. Research on the effect of AgNPs on surface sterilization and induction of explants

2.2.2. Research on the effect of AgNPs on the morphogenesis of various explants in in vitro culture

2.2.3. Research on the effect of AgNPs and FeNPs on the formation of complete plantlets from shoots in in vitro culture

2.2.4. Subsequent growth of plantlets in vitro cultured on media with optimal AgNPs and FeNPs at ex vitro stage

2.3. Research methods

2.3.1. Experimental design

2.3.1.1. Experiment 1: Research on the effect of AgNPs on surface sterilization and induction of explants

Experiment 1.1: Effect of AgNPs on surface sterilization and induction of Limonium sinuatum leaf explants

Experiment 1.2: Effect of AgNPs on surface sterilization and induction of Fragaria × ananassa leaf explants

Experiment 1.3: Effect of AgNPs on surface sterilization and induction of Panax vietnamensis leaf explants

2.3.1.2. Experiment 2: Research on the effect of AgNPs on the morphogenesis of various explants in in vitro culture

Experiment 2.1: Effect of AgNPs on the increase in the number of cells from Limonium sinuatum callus cultured in vitro

Experiment 2.2: Effect of AgNPs on shoot regeneration from cell suspensions Limonium sinuatum cultured in vitro

Experiment 2.3: Effect of AgNPs on embryogenesis and proliferation from Panax vietnamensis callus cultured in vitro

2.3.1.3. Experiment 3: Research on the effect of AgNPs and FeNPs on the formation of complete plantlets from shoots in *in vitro* culture

Experiment 3.1. Effects of AgNPs and FeNPs on complete plantlets from Limonium sinuatum shoots in vitro

Experiment 3.2: Effects of AgNPs and FeNPs on complete plantlets from Fragaria × ananassa shoots in vitro

Experiment 3.3: Effects of AgNPs and FeNPs on complete plantlets from Panax vietnamensis shoots in vitro

2.3.1.4. Experiment 4: Subsequent growth of plantlets *in vitro* cultured on media with optimal AgNPs and FeNPs at *ex vitro* stage

Experiment 4.1: Subsequent growth of Limonium sinuatum in vitro cultured on media with optimal AgNPs and FeNPs at ex vitro stage

Experiment 4.2: Subsequent growth of Fragaria × ananassa in vitro cultured on media with optimal AgNPs and FeNPs at ex vitro stage

Experiment 4.3: Subsequent growth of Panax vietnamensis in vitro cultured on media with optimal AgNPs and FeNPs at ex vitro stage

2.3.2. Plant cell, tissue and organ culture

2.3.3. The scanning electron microscopy

2.3.4. Histological

2.3.5. Cell observing and counting

2.3.6. Gas chromatography

2.3.7. Atomic absorption spectrometry

2.3.8. High performance liquid chromatography (HPLC)

2.4. Culture conditions

2.5. Location and time

2.6. Statistical analysis

Chapter 3: RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Effect of AgNPs on surface sterilization and induction of explants

3.1.1. Effect of AgNPs on surface sterilization and induction of *Limonium sinuatum* leaf explants

After 4 weeks of culture, the results showed that the leaf explants disinfected with 0.2 g/L AgNPs for 20 mins and 0.5 g/L for 15 mins showed better contamination rate, callus induction rate and fresh weight were better than those of other treatments (Table 3.1 and Figure 3.1).

Bảng 3.1. Effect of AgNPs on surface sterilization and induction of *Limonium sinuatum* leaf explants after 4 weeks of culture

Disinfection agent	Concentration (g/L)	Exposure time (min)	Contamination rate (%)	Callus induction rate (%)	Dry weight (g)
AgNPs	0.05	5	100.00 ^{a*}	-	-
		10	100.00 ^a	-	-
		15	72.22 ^b	27.77 ^c	0.52 ^e
		20	71.11 ^b	28.88 ^e	0.53 ^{de}
		30	73.33 ^b	26.66 ^e	0.54 ^{cd}
	0.1	5	100.00 ^a	-	-
		10	70.00 ^b	30.00 ^e	0.53 ^{de}
		15	68.89 ^b	31.11 ^e	0.54 ^{cd}
		20	46.66 ^c	53.33 ^d	0.64 ^b
		30	71.11 ^b	28.88 ^e	0.55 ^e
	0.2	5	71.11 ^b	28.89 ^e	0.54 ^{cd}
		10	45.55 ^c	54.44 ^d	0.64 ^b
		15	36.66 ^{de}	63.33 ^{bc}	0.73 ^a
		20	26.66 ^f	73.33 ^a	0.74 ^a
		30	70.00 ^b	30.00 ^e	0.53 ^{de}
0.5	5	71.11 ^b	28.89 ^e	0.52 ^e	

		10	44.44 ^{cd}	55.55 ^{cd}	0.65 ^b
		15	26.66 ^f	73.33 ^a	0.73 ^a
		20	35.55 ^e	64.44 ^b	0.73 ^a
		30	68.89 ^b	31.11 ^e	0.53 ^{de}
HgCl ₂	1	5	43.33 ^{cde}	56.66 ^{bcd}	0.64 ^b

Note: * Different letters in the same column indicate significantly different means using Duncan's test ($p < 0.05$). The mark (-) indicates unsuccessful experiments.



Fig. 3.1. Induction of *Limonium sinuatum* leaf explants sterilized with AgNPs compared with HgCl₂ after 4 weeks of culture

a: explants were disinfected with 0.2 g/L AgNPs for 20 mins; **b:** explants were disinfected with 0.2 g/L AgNPs for 30 minutes; **c:** explants were disinfected with 1 g/L HgCl₂ for 5 minutes after 4 weeks of culture.

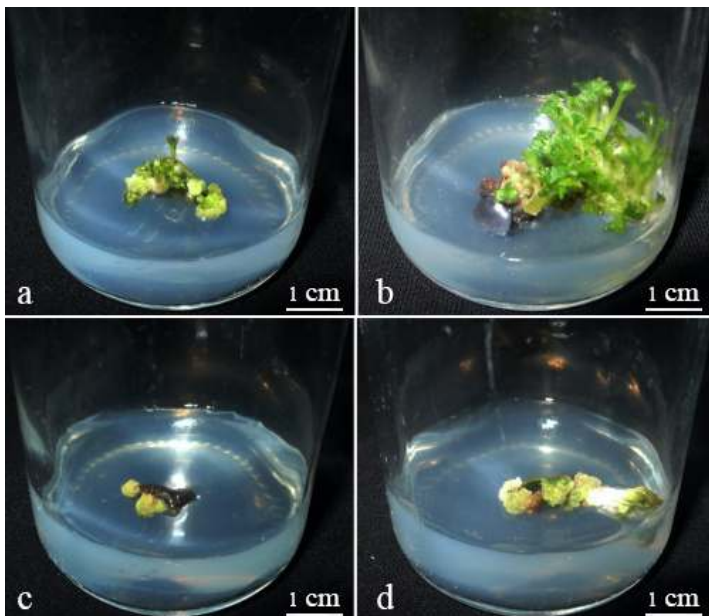
3.1.2. Effect of AgNPs on surface sterilization and induction of *Fragaria × ananassa* leaf explants

After 6 weeks of culture, the leaf explants were sterilized with 0.2; 0.5 g/L AgNPs for 20 mins showed a lower contamination rate than the other treatments; but shoot regeneration rate and number of shoots were similar to 5 g/L HgCl₂ for 5 mins. In particular, number of shoot > 1,5 cm in height was highest at 0.2 g/L AgNPs in 20 mins (Table 3.2 and Figure 3.2).

Bảng 3.2. Effect of AgNPs on surface sterilization and induction of *Fragaria × ananassa* leaf explants after 6 weeks of culture

Disinfection agent	Concentration (g/L)	Exposure time (min)	Contamination rate (%)	Shoot regeneration rate (%)	No. of shoot	No. of shoot > 1,5 cm in height
AgNPs	0.05	5	100.00 ^{a*}	-	-	-
		10	100.00 ^a	-	-	-
		15	100.00 ^a	-	-	-
		20	100.00 ^a	-	-	-
		30	100.00 ^a	-	-	-
	0.1	5	100.00 ^a	-	-	-
		10	73.33 ^b	22.22 ^d	10.00 ^c	0.00 ^c
		15	63.33 ^{bc}	30.00 ^{cd}	12.33 ^{bc}	0.00 ^c
		20	60.00 ^{bc}	33.33 ^{bcd}	11.33 ^{bc}	0.00 ^c
		30	100.00 ^a	-	-	-
	0.2	5	100.00 ^a	-	-	-
		10	60.00 ^{bc}	34.44 ^{bcd}	10.66 ^c	0.00 ^c
		15	37.78 ^{de}	56.66 ^{abc}	15.66 ^{abc}	4.00 ^b
		20	28.89 ^{ef}	64.44 ^a	21.00 ^a	6.66 ^a
		30	100.00 ^a	-	-	-
	0.5	5	100.00 ^a	-	-	-
		10	48.88 ^{cd}	45.55 ^{abcd}	13.00 ^{bc}	0.00 ^c
		15	36.66 ^{de}	61.11 ^{ab}	13.33 ^{abc}	4.00 ^b
		20	22.22 ^f	57.78 ^{abc}	19.00 ^{ab}	4.66 ^b
		30	100.00 ^a	-	-	-
HgCl ₂	1	5	49.99 ^{cd}	46.66 ^{abcd}	16.33 ^{abc}	0.00 ^c

Note: * Different letters in the same column indicate significantly different means using Duncan's test ($p < 0.05$). The mark (-) indicates unsuccessful experiments.



Hình 3.2. Induction of *Fragaria* × *ananassa* leaf explants sterilized with AgNPs compared with HgCl₂ after 3 and 6 weeks of culture

a, b: callus and shoots were disinfected with 0.2 g/L AgNPs for 20 minutes after 3 and 6 weeks of culture; **c, d:** callus and shoots in HgCl₂ sterilization after 3 and 6 weeks of culture.

3.1.3. Effect of AgNPs on surface sterilization and induction of *Panax vietnamensis* leaf explants

After 6 weeks of culture, the leaf explants were sterilized with 0.2 g/L AgNPs for 20 mins; 0.5 g/L AgNPs for 15 mins showed a lower contamination rate than other treatments but the same callus induction rate as the ones sterilized with 5g HgCl₂ for 5 mins. In particular, callus fresh weight was highest at 0.2 g/L AgNPs in 20 mins (Table 3.3 and Figure 3.3).

Table 3.3. Effect of AgNPs on surface sterilization and induction of *Panax vietnamensis* leaf explants after 6 weeks of culture

Disinfection agent	Concentration (g/L)	Exposure time (min)	Contamination rate (%)	Callus induction rate (%)	Dry weight (g)
AgNPs	0.05	5	100.00 ^{a*}	-	-
		10	100.00 ^a	-	-
		15	100.00 ^a	-	-
		20	100.00 ^a	-	-
		30	68.88 ^b	24.44 ^d	0.44 ^{fg}
	0.1	5	100.00 ^a	-	-
		10	100.00 ^a	-	-
		15	63.33 ^{bc}	30.00 ^{cd}	0.54 ^{de}
		20	60.00 ^{bc}	33.33 ^{cd}	0.66 ^{bc}
		30	70.00 ^b	23.33 ^d	0.51 ^{ef}
	0.2	5	100.00 ^a	-	-
		10	58.89 ^{bc}	34.44 ^{cd}	0.57 ^{cde}
		15	36.67 ^{de}	56.66 ^{abc}	0.53 ^{de}
		20	26.66 ^e	72.22 ^a	0.77 ^a
		30	100.00 ^a	-	-
	0.5	5	52.22 ^{bcd}	41.11 ^{bcd}	0.67 ^b
		10	47.77 ^{cd}	45.55 ^{abcd}	0.57 ^{cde}
		15	20.00 ^e	66.67 ^{ab}	0.58 ^{bcd} _e
		20	35.55 ^{de}	57.77 ^{abc}	0.61 ^{bcd}
		30	100.00 ^a	-	-
HgCl ₂	1	5	48.88 ^{cd}	46.66 ^{abcd}	0.41 ^g

Note: * Different letters in the same column indicate significantly different means using Duncan's test ($p < 0.05$). The mark (-) indicates unsuccessful experiments.

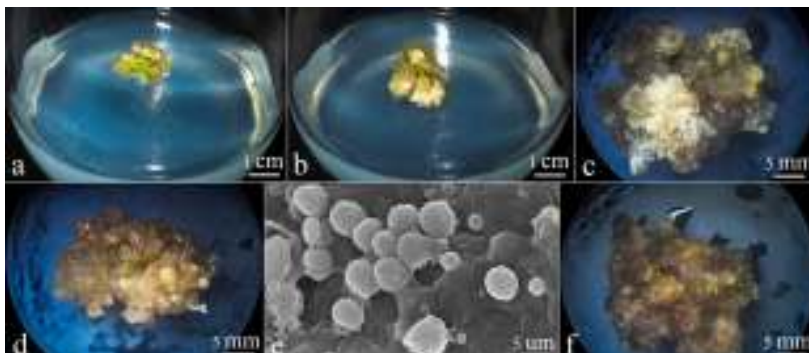


Fig. 3.3. Induction of *Fragaria × ananassa* leaf explants sterilized with AgNPs compared with HgCl₂ after 1, 2, 4 and 6 weeks of culture **a, b, c, d:** callus in the treatment was disinfected with 0.2 g/L AgNPs for 20 mins after 1, 2, 4 and 6 weeks of culture; **e:** globular somatic embryos (observed under electron microscope: SEM) in the treatment treated with 0.2 g/L AgNPs sterilization for 20 mins after 6 weeks of culture; **f:** callus in HgCl₂ sterilization after 6 weeks of culture.

3.2. Effect of AgNPs on the morphogenesis of various explants in *in vitro* culture

3.2.1. Effect of AgNPs on the increase in the number of cells from *Limonium sinuatum* callus cultured *in vitro*

After 8 days of culture, the cells went through the acclimatization phase (slow growth of cells). The cell growth phase lasted from day 8th of culture to day 12th at all AgNPs concentrations and day 16th in the control. The stabilization period at AgNPs concentrations was started from day 12th, in the control day 16th and continued until day 20th. Then, the number of cells decreased rapidly till day 24th and slowly decreased till day 28th, which indicates that the cells entered a stage of death (FIG. 3.1 and Figure 3.4).

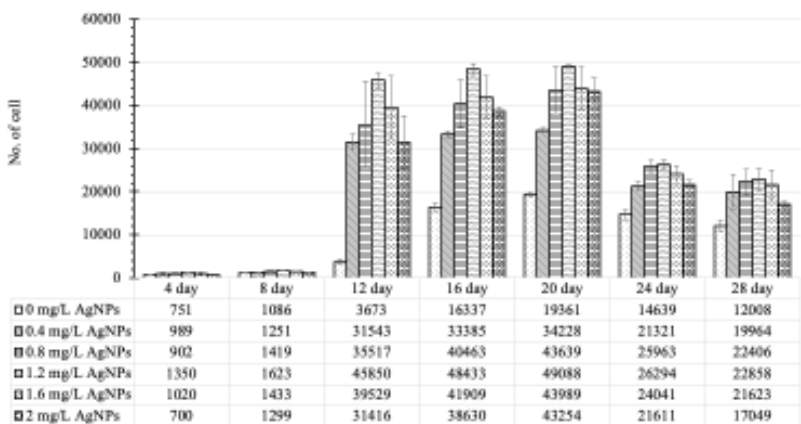


FIG. 3.1. Effect of AgNPs on the increase in the number of cells from *Limonium sinuatum* callus after day 4th, 8th, 12th, 16th, 20th, 24th, 28th of culture

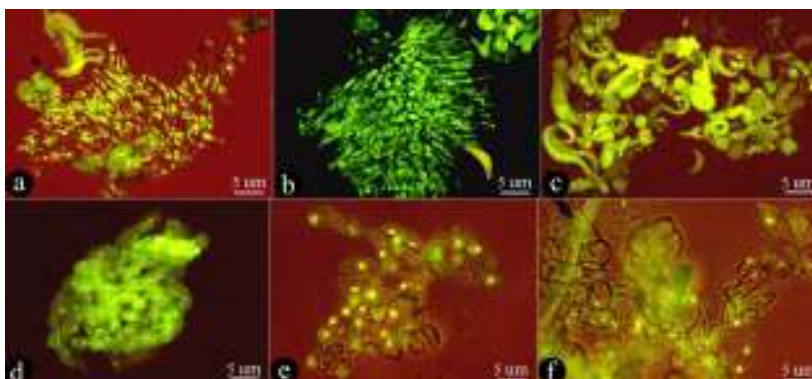


Fig. 3.4. Cell suspensions from *Limonium sinuatum* callus in shaking liquid culture medium

a, b, c: cell suspension in medium without AgNPs at the stages of adaptation (day 8th), growth (day 16th), death (day 24th); **d, e, f:** cell suspension in medium supplemented with AgNPs at a concentration of 1.2 mg/L at the stages of adaptation (day 8th), growth (day 16th), death (day 24th).

3.2.2. Effect of AgNPs on shoot regeneration from cell suspensions *Limonium sinuatum* cultured in vitro

After 4 weeks of culture, the results showed that shoot regeneration rate, shoot height, number of shoots > 1.5 cm, fresh weight in 1.6 mg/L AgNPs treatment were higher than other treatments. The number of shoots was highest at 0.8 mg/L AgNPs, but these shoots were attached to each other and could not be separated (Table 3.4 and Figure 3.5).

Table 3.4. Effect of AgNPs on shoot regeneration, growth and development from *Limonium sinuatum* cell suspension after 4 weeks of culture

AgNPs (mg/L)	Shoot regeneration rate (%)	No. of shoots	Plantlet height (cm)	No. of shoots > 1,5 cm	Fresh weight (g)
0.0	40.00 ^{b*}	2.33 ^c	0.90 ^b	0.00 ^d	0.21 ^c
0.4	45.55 ^{ab}	3.00 ^{bc}	1.06 ^b	1.33 ^c	0.31 ^{bc}
0.8	47.77 ^{ab}	6.66 ^a	1.20 ^b	2.00 ^{bc}	0.42 ^b
1.2	59.99 ^{ab}	4.00 ^{bc}	1.33 ^{ab}	2.33 ^b	0.42 ^b
1.6	67.77 ^a	4.66 ^b	1.83 ^a	3.66 ^a	0.65 ^a
2.0	66.66 ^a	3.66 ^{bc}	1.26 ^{ab}	2.33 ^b	0.32 ^{bc}

Note: * Different letters in the same column indicate significantly different means using Duncan's test ($p < 0.05$).



Fig. 3.5. Shoot regeneration, growth and development from *Limonium sinuatum* cell suspension in control and different concentrations of AgNPs after 4 weeks of culture

a, b, c, d, e, f: *Limonium sinuatum* shoots from medium supplemented with different concentrations of AgNPs (0.0; 0.4; 0.8; 1.2; 1.6; 2.0; left to right) after 4 weeks of culture.

3.2.3. Effect of AgNPs on embryogenesis and proliferation from *Panax vietnamensis* callus cultured in vitro

After 14 weeks of culture, the results showed that the number of somatic embryos, embryo-derived plantlets, embryo-derived plantlets >3 cm, plantlet fresh weight and dry weight were highest in the treatment supplemented with 1.6 mg/L AgNPs (Table 3.5 and Figures 3.6, 3.7).

Table 3.5. Effects of AgNPs on embryo multiplication and shoot regeneration from *Panax vietnamensis* somatic embryos after 6 weeks of culture

AgNPs (mg/L)	No. of somatic embryos	Embryo-derived plantlets		Plantlet fresh weight (g)	Plantlet dry weight (mg)
		Total	Embryo-derived plantlets >3 cm		
0.0	40.33 ^{c*}	4.33 ^d	2.66 ^c	0.28 ^c	28.66 ^d
0.4	49.33 ^c	9.33 ^b	4.00 ^{bc}	0.35 ^{bc}	43.33 ^{bcd}
0.8	83.66 ^b	9.66 ^b	5.00 ^{ab}	0.63 ^a	56.33 ^{bc}
1.2	98.33 ^b	10.66 ^b	5.33 ^{ab}	0.56 ^{ab}	62.00 ^b
1.6	140.00 ^a	14.66 ^a	5.66 ^a	0.48 ^{abc}	86.00 ^a
2.0	40.66 ^c	6.66 ^c	0.00 ^d	0.31 ^{bc}	41.00 ^{cd}

Note: * Different letters in the same column indicate significantly different means using Duncan's test ($p < 0.05$).



Fig. 3.6. Effects of AgNPs on the embryogenesis and proliferation of *Panax vietnamensis* after 14 weeks of cultures

Embryogenic calli image after 6 weeks of culture taken by fluorescence microscope (a) and scanning electron microscope (SEM) (b). Somatic embryo images taken by fluorescence microscope on the medium containing after 8 weeks of culture (c). Somatic embryo-derived plantlets after 14 weeks of culture (d)



Fig. 3.7. The morphological and structural of somatic embryo

Somatic embryos derived from medium without AgNPs (control) after 8 weeks of culture (a); somatic embryos derived from medium supplemented with 1.6 mg/L AgNPs after 8 weeks of culture (b, c, d).

3.3. Effects of AgNPs and FeNPs on formation of complete plantlets from shoots *in vitro*

3.3.1. Effects of AgNPs and FeNPs on formation of complete plantlets from *Limonium sinuatum* shoots *in vitro*

After 4 weeks of culture, the plantlets in the treatment supplemented with 0.4 mg/L AgNPs showed optimal results in terms

of plantlet height, leaf width, root length, fresh weight, dry weight, chlorophyll content compared with other treatments. In the treatment with 2.8 mg/L FeNPS, the parameters were lower than 0.4 mg/L AgNPs and similar to the control (Table 3.6).

Table 3.6. Effect of AgNPs and FeNPs on formation of complete plantlets from *Limonium sinuatum* shoots after 4 weeks of culture

Nano (mg/L)		Rooting rate (%)	Plantlet height (cm)	Leaf width (cm)	Root length (cm)	Fresh weight tuoi (g)	Dry weight (mg)	Chlorophyll (nmol/cm ²)
AgNPs	FeNPs							
0.0	0.0	100.00 ^{a*}	6.36 ^b	0.56 ^b	0.66 ^b	1.74 ^b	94.87 ^b	22.36 ^b
0.4	-	100.00 ^a	8.43 ^a	0.56 ^b	0.96 ^a	2.36 ^a	108.17 ^a	26.90 ^a
0.8	-	100.00 ^a	6.56 ^b	0.93 ^a	1.03 ^a	1.24 ^c	80.58 ^c	21.40 ^{bc}
1.2	-	100.00 ^a	5.33 ^{de}	1.03 ^a	0.56 ^{bcd}	1.02 ^{cde}	76.22 ^c	18.86 ^{bcd}
1.6	-	100.00 ^a	5.16 ^c	1.16 ^a	0.40 ^{cd}	0.86 ^{de}	75.51 ^c	18.20 ^{cd}
2.0	-	100.00 ^a	5.10 ^e	1.20 ^a	0.50 ^{bcd}	0.81 ^e	63.58 ^d	16.50 ^d
-	0.7	100.00 ^a	5.00 ^e	0.36 ^b	0.43 ^{bcd}	1.28 ^c	75.95 ^c	18.90 ^{bcd}
-	1.4	100.00 ^a	5.36 ^{cde}	0.36 ^b	0.53 ^{bcd}	1.30 ^c	76.70 ^c	19.49 ^{bcd}
-	2.8	100.00 ^a	6.20 ^{bc}	0.56 ^b	0.63 ^{bc}	1.77 ^b	95.91 ^b	21.23 ^{bc}
-	5.6	100.00 ^a	6.10 ^{bcd}	0.53 ^b	0.43 ^{bcd}	1.20 ^{cd}	80.77 ^c	20.76 ^{bc}
-	8.4	100.00 ^a	5.40 ^{cde}	0.53 ^b	0.40 ^{cd}	1.31 ^c	79.77 ^c	19.77 ^{bcd}
-	11.2	100.00 ^a	5.36 ^{cde}	0.50 ^b	0.36 ^d	1.31 ^c	79.17 ^c	19.13 ^{bcd}

Note: * Different letters in the same column indicate significantly different means using Duncan's test ($p < 0.05$).

3.3.2. Effects of AgNPs and FeNPs on formation of complete plantlets from *Fragaria × ananassa* shoots in vitro

After 4 weeks of culture, the results recorded in the treatment with 0.5 mg/L AgNPs and 1.4 mg/L FeNPs showed that rooting rate, plant height, number of roots, root length, and fresh weight, dry weight and chlorophyll content were optimal compared with the other treatments (Table 3.7).

Table 3.7. Effect of AgNPs and FeNPs on formation of complete plantlets from *Fragaria × ananassa* shoots after 4 weeks of culture

Nano (mg/L)		Rooting rate (%)	Plantlet height (cm)	No. of roots	Root length (cm)	Fresh weight (g)	Dry weight (mg)	Chlorophyll (nmol/cm ²)
AgNPs	FeNPs							
0.0	0.0	71.11 ^{bc*}	3.96 ^b	2.66 ^{bcd}	3.10 ^{ab}	0.30 ^{bcd}	40.10 ^d	27.40 ^c
0.5	-	78.89 ^{ab}	4.63 ^b	5.00 ^{ab}	1.60 ^{bc}	0.46 ^b	80.61 ^{ab}	34.49 ^{ab}
1.0	-	65.55 ^{bcd}	6.75 ^a	4.00 ^{abc}	5.13 ^a	0.71 ^a	65.19 ^c	30.31 ^{bc}
1.5	-	58.89 ^{cd}	4.72 ^{ab}	4.33 ^{abc}	4.46 ^a	0.44 ^b	73.35 ^{bc}	29.98 ^{bc}

2.0	-	52.22 ^d	3.49 ^b	6.33 ^a	0.96 ^c	0.26 ^{cd}	38.98 ^{de}	28.44 ^{bc}
-	0.7	56.67 ^{cd}	5.56 ^{ab}	2.00 ^{cd}	3.60 ^{ab}	0.32 ^{bcd}	72.68 ^{bc}	25.32 ^{cd}
-	1.4	88.89 ^a	6.76 ^a	4.00 ^{abc}	4.46 ^a	0.75 ^a	84.19 ^a	38.31 ^a
-	2.8	61.11 ^{cd}	5.36 ^{ab}	2.66 ^{bcd}	3.16 ^{ab}	0.37 ^{bc}	76.61 ^{ab}	29.16 ^{bc}
-	5.6	51.11 ^d	4.10 ^b	2.33 ^{cd}	1.96 ^{bc}	0.19 ^d	37.98 ^{de}	24.11 ^{cd}
-	11.2	32.22 ^e	3.60 ^b	0.66 ^d	1.93 ^{bc}	0.18 ^d	30.13 ^e	20.57 ^d

Note: * Different letters in the same column indicate significantly different means using Duncan's test ($p < 0.05$).

3.3.3. Effects of AgNPs and FeNPs on formation of complete plantlets from *Panax vietnamensis* shoots in vitro

After 12 weeks of culture, the plantlets in the treatment supplemented with 1.2 mg/L AgNPs showed optimal results in terms of plant height, number of roots, rhizome diameter, rhizome length, fresh weight and chlorophyll content compared with other treatments. The treatment with 5.6 mg/L FeNPs showed higher parameters than other treatments (Table 3.8).

Table 3.8. Effect of AgNPs and FeNPs on formation of complete plantlets from *Panax vietnamensis* shoots after 12 weeks of culture

Nano (mg/L)		Rooting rate (%)	Plantlet height (cm)	No. of roots	Rhizome diameter (cm)	Rhizome length (cm)	Fresh weight (g)	Chlorophyll (nmol/cm ²)
AgNPs	FeNPs							
0.0	0.0	100.00 ^a	3.93 ^{bc}	2.66 ^{df}	0.43 ^e	1.53 ^c	0.86 ^{bc}	18.90 ^{bcd}
0.4	-	100.00 ^a	4.33 ^{bc}	4.33 ^{cde}	0.70 ^{bc}	1.46 ^c	1.19 ^{abc}	19.70 ^{bcd}
0.8	-	100.00 ^a	5.31 ^b	6.33 ^b	0.86 ^b	2.03 ^b	1.31 ^{ab}	21.10 ^{bc}
1.2	-	100.00 ^a	6.75 ^a	8.66 ^a	1.16 ^a	2.43 ^a	1.56 ^a	26.56 ^a
1.6	-	100.00 ^a	3.89 ^{bc}	4.66 ^{bcd}	0.73 ^{bc}	2.40 ^a	1.25 ^{abc}	18.80 ^{bcd}
2.0	-	100.00 ^a	3.39 ^c	6.00 ^{bc}	0.66 ^{bcd}	2.53 ^c	0.89 ^{bc}	16.93 ^{cde}
-	0.7	100.00 ^a	5.16 ^{ab}	4.33 ^{cde}	0.46 ^{de}	1.60 ^c	0.76 ^c	14.13 ^e
-	1.4	100.00 ^a	5.33 ^{ab}	5.33 ^{bcd}	0.53 ^{cde}	1.63 ^c	1.11 ^{abc}	15.90 ^{de}
-	2.8	100.00 ^a	6.56 ^a	3.66 ^{def}	0.60 ^{cde}	1.66 ^c	1.20 ^{abc}	17.03 ^{cde}
-	5.6	100.00 ^a	4.26 ^{bc}	5.00 ^{bcd}	0.86 ^b	1.93 ^b	1.32 ^{ab}	21.76 ^b
-	11.2	100.00 ^a	2.93 ^c	2.33 ^f	0.53 ^{cde}	1.66 ^c	0.73 ^c	9.60 ^f

Note: * Different letters in the same column indicate significantly different means using Duncan's test ($p < 0.05$).

3.4. Subsequent growth of plantlets *in vitro* cultured on media with optimal AgNPs and FeNPs at *ex vitro* stage

3.4.1. Subsequent growth of *Limonium sinuatum* *in vitro* cultured on media with optimal AgNPs and FeNPs at *ex vitro* stage

After 4 and 12 weeks of culture, the plantlets derived from the medium supplemented with 0.4 mg/L AgNPs in the complete plantlet generation stage showed optimal results in terms of survival rate, number of leaves, plantlet height, leaf area, fresh weight, chlorophyll content, number of branches, flower branch height, number of slips/branch, number of flowers/slips, and fresh weight of flowers branches compared with other treatments (Tables 3.9, 3.10, Fig. 3.11).

Table 3.9. Acclimatization and growth of *Limonium sinuatum* in sursery styrofoam after 4 weeks of cultivation

Nano (mg/L)		Survival rate (%)	No. of leaves	Plantlet height (cm)	Leaf area (cm ²)	Fresh weight (g)	Chlorophyll (nmol/cm ²)
AgNPs	FeNPs						
0.0	0.0	71.33 ^b	3.66 ^c	6.96 ^b	4.03 ^b	2.50 ^b	25.76 ^b
0.4	-	89.00 ^a	10.00 ^a	9.83 ^a	14.75 ^a	4.23 ^a	35.26 ^a
-	2.8	72.00 ^b	5.66 ^b	7.10 ^b	8.26 ^b	2.73 ^b	28.46 ^b

Note: * Different letters in the same column indicate significantly different means using Duncan's test ($p < 0.05$).

Table 3.10. Growth and development of *Limonium sinuatum* in plastic pots after 12 weeks of cultivation

Nano (mg/L)		No. of branches	Flower branch height (cm)	No. of slips/branches	No. of flowers/slips	Fresh weight of flower branches (g)
AgNPs	FeNPs					
0.0	0.0	10.66 ^c	46.00 ^c	66.00 ^b	2.33 ^b	28.93 ^c
0.4	-	16.66 ^a	85.00 ^a	88.66 ^a	4.33 ^a	61.53 ^a
-	2.8	14.33 ^b	62.00 ^b	71.33 ^b	2.66 ^b	35.26 ^b

Note: * Different letters in the same column indicate significantly different means using Duncan's test ($p < 0.05$).

3.4.2. Subsequent growth of *Fragaria* × *ananassa* in vitro cultured on media with optimal AgNPs and FeNPs at ex vitro stage

After 4 and 12 weeks of culture, the seedlings derived from the medium replaced Fe-EDTA with 1.4 mg/L FeNPs in the complete plantlet generation stage showed optimal results in terms of survival rate, number of leaves, plantlet height, leaf area, fresh weight, chlorophyll content, fruit setting rate, number of runner F1 and F2 compared with other treatments (Table 3.11, 3.12, Figure 3.12)

Table 3.11. Acclimatization and growth of *Fragaria* × *ananassa* in sursery styrofoam after 4 weeks of cultivation

Nano (mg/L)		Survival rate (%)	No. of leaves	Plantlet height (cm)	Leaf area (cm ²)	Fresh weight (g)	Chlorophyll (nmol/cm ²)
AgNPs	FeNPs						
0.0	0.0	69.33 ^b	6.00 ^b	6.66 ^b	1.94 ^b	5.46 ^b	33.53 ^b
0.5	-	72.33 ^b	6.33 ^b	7.33 ^b	2.06 ^b	5.83 ^b	35.03 ^b
-	1.4	86.00 ^a	8.66 ^a	11.33 ^a	3.24 ^a	8.86 ^a	39.90 ^a

Note: * Different letters in the same column indicate significantly different means using Duncan's test ($p < 0.05$).

Table 3.12. Growth and development of *Fragaria* × *ananassa* in plastic pots after 12 weeks of cultivation

Nano (mg/L)		Plantlet height (cm)	Fruit setting rate (%)	No. of Runner F1	No. of Runner F2	Leaf area (cm ²)	Fresh weight (g)
AgNPs	FeNPs						
0.0	0.0	10.30 ^b	50.00 ^b	2.00 ^b	0.00 ^b	7.33 ^b	21.80 ^b
0.5	-	11.40 ^b	76.66 ^a	3.00 ^b	0.00 ^b	8.22 ^b	22.83 ^b
-	1.4	15.01 ^a	81.76 ^a	6.00 ^a	3.00 ^a	14.00 ^a	39.86 ^a

Note: * Different letters in the same column indicate significantly different means using Duncan's test ($p < 0.05$).

3.4.3. Subsequent growth of *Panax vietnamensis* in vitro cultured on media with optimal AgNPs and FeNPs at ex vitro stage

After 6, 12, 24 months of cultivation, the plantlets derived from culture medium supplemented with 1.2 mg/L AgNPs in the complete plantlet generation stage showed optimal results in terms of survival rate, number of leaves, plant height, leaf area, fresh weight, chlorophyll content, fresh weight, saponin content (G-Rg1, M-R2, G-Rb1) in the rhizome compared with other treatments (Table 3.13, 3.14; FIG. 3.5, 3.6).

Table 3.13. Acclimatization and growth of *Panax vietnamensis* in sursery styrofoam after 6 months of cultivation

Nano (mg/L)		Survival rate (%)	No. of leaves	Plantlet height (cm)	Leaf area (cm ²)	Fresh weight (g)	Chlorophyll (nmol/cm ²)
AgNPs	FeNPs						
0.0	0.0	44.44 ^{c*}	1.00 ^c	1.16 ^c	0.30 ^b	1.03 ^c	16.73 ^b
1.2	-	93.65 ^a	3.33 ^a	4.66 ^a	3.70 ^a	3.86 ^a	23.95 ^a
-	5.6	63.49 ^b	2.00 ^b	3.30 ^b	1.94 ^b	2.10 ^b	19.65 ^b

Note: * Different letters in the same column indicate significantly different means using Duncan's test ($p < 0.05$).

Table 3.14. Growth and development of *Panax vietnamensis* in plastic basket after 12 months of cultivation

Nano (mg/L)		No. of leaves	Plantlet height (cm)	Leaf area (cm ²)	Fresh weight (g)	Chlorophyll (nmol/cm ²)
AgNPs	FeNPs					
0.0	0.0	1.66 ^{b*}	1.63 ^c	0.52 ^c	1.43 ^c	19.73 ^b
1.2	-	4.33 ^a	6.73 ^a	6.02 ^a	5.20 ^a	24.95 ^a
-	5.6	2.33 ^b	3.90 ^b	2.68 ^b	2.66 ^b	20.98 ^b

Note: * Different letters in the same column indicate significantly different means using Duncan's test ($p < 0.05$).

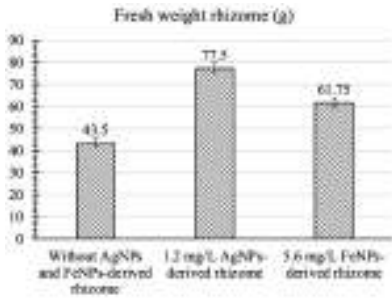


FIG. 3.5. Fresh weight of *Panax vietnamensis* rhizome after 2 years of growing under greenhouse conditions

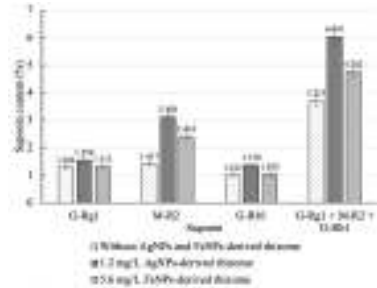


FIG. 3.6. Saponin content of *Panax vietnamensis* rhizome after 2 years of growing under greenhouse conditions



Fig. 3.8. The acclimatization and growth of *Limonium sinuatum* plantlets after 4 and 12 weeks of cultivation



Fig. 3.9. The acclimatization and growth of *Fragaria ananassa* plantlets after 4 and 12 weeks of cultivation



Fig. 3.10. The acclimatization and growth of *Panax vietnamensis* plantlets after 6 and 12 months of cultivation



Fig. 3.14. Growth and development of *Panax vietnamensis* after 24 months of cultivation in greenhouse conditions

a: without AgNPs and FeNPs-derived plantlet; **b:** 1.2 mg/L AgNPs-derived plantlet; **c:** 5.6 mg/L FeNPs-derived plantlet

CONCLUSIONS AND RECOMMENDATIONS

CONCLUSIONS

Research results have shown the positive effects of metal nanoparticles (AgNPs, FeNPs) on the sterilization process, growth, development and quality improvement of *Limonium sinuatum*, *Fragaria × ananassa* and *Panax vietnamensis* plantlets cultured *in vitro*.

Treating with 0.2 g/L AgNPs for 20 mins and 0.5 g/L AgNPs for 15 mins on *Limonium sinuatum* leaf samples; 0.2 AgNPs for 20 mins on *Fragaria × ananassa* leaf samples; 0.2 g/L AgNPs for 20 mins on *Panax vietnamensis* leaf samples showed high surface sterilization as well as explant induction.

1.2 mg/L AgNPs showed the highest efficiency of *Limonium sinuatum* cell suspension formation on the 20th day of culture, and from the 16th day to the 20th day was the most suitable time for cell suspension inoculation. 1.6 mg/L AgNPs gave the best shoots regeneration efficiency of *Limonium sinuatum* after 4 weeks of culture. 1.6 mg/L AgNPs showed the highest efficiency in

regeneration and proliferation of *Panax vietnamensis* embryos after 14 weeks of culture.

Using 0.4 mg/L AgNPs on *Limonium sinuatum*; 0.5 mg/L AgNPs and 1.4 mg/L FeNPs on *Fragaria × ananassa*; 1.2 mg/L AgNPs on *Panax vietnamensis* showed highly effective on the production of complete seedlings in in vitro culture. 0.4 mg/L AgNPs on *Limonium sinuatum*; 0.5 mg/L AgNPs on *Fragaria × ananassa*; 1.2 mg/L AgNPs on *Panax vietnamensis* gave the lowest concentration of absorbed AgNPs and the lowest accumulated ethylene gas in the culture vessel, which had a positive effect on the growth and development of *in vitro* plantlets.

The plantlets of *Limonium sinuatum*, *Fragaria × ananassa*, *Panax vietnamensis* derived from the respective culture media supplemented with 0.4 mg/L AgNPs, replaced with 1.4 mg/L FeNPs and supplemented with 1.2 mg/L FeNPs. L AgNPs showed optimal adaptability, growth and subsequent development at *ex vitro* stage.

RECOMMENDATIONS

1. Continuing to study different metal nanoparticles on growth, development and improvement of seedling quality of many crops in order to find new growth regulators or a new source of materials to replace mineral nutrients in in vitro culture.
2. Analyzing the absorption, transport, accumulation and metabolism of metal nanoparticles during in vitro culture and their effects on other metals and plant enzymes.
3. Deploying the application of metal nanoparticles in micropropagation and cultivation of plant varieties on a commercial scale.

PUBLICATIONS RELATED TO THE THESIS

1. **Do Manh Cuong**, Le Thanh Long, Hoang Thanh Tung, Vu Quoc Luan, Vu Thi Hien, Nguyen Thi Nhat Linh, Truong Thi Bich Phuong, Duong Tan Nhut (2018), The role of nanosilver in improving frequency of single cell formation of *Limonium sinuatum* (L.) MILL, *Vietnam Journal of Biotechnology*, 16(3), pp. 481-490
2. **Do Manh Cuong**, Truong Thi Bich Phuong, Duong Tan Nhut (2018), Effect of nanosilver on callus induction and shoot regeneration ability from leaf explants of strawberry (*Fragaria x ananassa*) cultured *in vitro*, *Hue University Journal of Science: Natural Science*, 127(1C), pp. 61-70.
3. **Do Manh Cuong**, Hoang Thanh Tung, Hoang Dac Khai, Vu Quoc Luan, Vu Thi Hien, Truong Thi Bich Phuong, Duong Tan Nhut (2020), Increasing the somatic embryogenesis frequency of *Panax vietnamensis* Ha et Grushv. by disinfection of leaf explant using nano silver and the addition of nano silver in culture medium, *Vietnam Journal of Biotechnology*, 18(3), pp. 517-527.
4. **Do Manh Cuong**, Ha Thi My Ngan, Hoang Thanh Tung, Vu Quoc Luan, Vu Thi Hien, Truong Thi Bich Phuong, Duong Tan Nhut (2020), Effects of nano iron on root and plantlet formation of strawberry (*Fragaria x ananassa*), Ngoc Linh ginseng (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) cultured *in vitro*, *Journal of Science and Technology, Hue University of Sciences*, 17(2), pp. 93-105.
5. **Do Manh Cuong**, Phan Cong Du, Hoang Thanh Tung, Ha Thi My Ngan, Vu Quoc Luan, Truong Hoai Phong, Hoang Dac Khai, Truong Thi Bich Phuong, Duong Tan Nhut (2021), Silver nanoparticles as an effective stimulant in micropropagation of *Panax vietnamensis*—a valuable medicinal plant, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 146, pp. 577-588.

