

NGHIÊN CỨU NUÔI CẤY MÔ SẸO CÓ KHẢ NĂNG SINH PHÔI VÀ MÔ PHÔI SOMA SÂM NGỌC LINH (*PANAX VIETNAMENSIS* HA ET GRUSHV.)

Mai Trường¹, Trần Thị Ngọc Hà¹, Phan Tường Lộc¹, Lê Tấn Đức¹,
Trần Trọng Tuấn¹, Đỗ Đăng Giáp¹, Bùi Đình Thạch¹, Phạm Đức Trí¹,
Nguyễn Đức Minh Hùng¹, Nguyễn Thị Thanh¹, Nguyễn Văn Kết²,
Trần Công Luận³, Nguyễn Hữu Hồ^{1*}

¹Viện Sinh học nhiệt đới, Viện Hàn lâm KH & CN Việt Nam, *nguyenhuuho@itb.ac.vn

²Trường Đại học Đà Lạt

³Trung tâm Sâm và Dược liệu tp. Hồ Chí Minh

TÓM TẮT: Bài báo này trình bày kết quả nghiên cứu về tạo và nuôi nhân mô sẹo có khả năng sinh phôi soma từ mô sẹo lá trong môi trường lỏng; tạo mô phôi soma từ mô sẹo có khả năng sinh phôi, sự phát sinh hình thái chồi/rễ của mô phôi soma trong nuôi cấy và nuôi nhân phôi soma Sâm ngọc linh trong môi trường lỏng. Mục đích của nghiên cứu là tạo kết quả tiền đề cho nghiên cứu nhân sinh khối quy mô lớn hai loại mô có khả năng sản sinh hàm lượng hợp chất thứ cấp cao do chúng đã mang ít nhiều trạng thái biệt hóa. Mảnh lá (0,5 x 0,5 cm) được nuôi cấy trên môi trường tạo mô sẹo MS có 2 mg/l 2,4-D. Mô sẹo được cấy chuyển sang môi trường MS + 1 mg/l 2,4-D + 1 mg/l NAA + 0,2 mg/l kinetin + 10% nước dừa để tạo mô sẹo có khả năng sinh phôi và môi trường MS½ + 0,2 mg/l 2,4-D + 10% nước dừa để tạo mô phôi. Mô sẹo có khả năng sinh phôi tăng nhanh sinh khối qua nuôi cấy trong môi trường lỏng MS + 0,5 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l NAA. Mô phôi có khả năng tăng sinh nhanh trong môi trường lỏng MS½ + 0,2 mg/l NAA + 0,2 mg/l BA. Tùy môi trường nuôi cấy ban đầu và ở các giai đoạn tiếp theo, mô phôi phát triển theo hướng tạo chồi hoặc rễ tạo quần thể chồi hoặc rễ. Các loại mô nói trên hiện đang được nghiên cứu nuôi cấy nhân sinh khối trong bình tam giác dung tích lớn và bioreactor.

Từ khóa: *Panax vietnamensis*, huyền phù tế bào, mô phôi soma, mô sẹo có khả năng sinh phôi.

MỞ ĐẦU

Ngoài hiện tượng phát sinh phôi soma (somatic embryogenesis) trực tiếp (không qua giai đoạn mô sẹo), tạo mô sẹo có khả năng sinh phôi (embryogenic) và điều khiển đến mức có thể sự hình thành, phát triển và trưởng thành phôi soma là hai quá trình gắn liền với nhau trong nghiên cứu nuôi cấy mô thực vật *in vitro*. Kết quả nghiên cứu hai quá trình nói trên, với ưu điểm vốn có của mỗi loại hệ thống mô nuôi cấy, đều góp phần quan trọng trong công tác nhân giống, tạo giống và sản xuất hợp chất thứ cấp [13, 25, 27, 31].

Trong nghiên cứu sự hình thành và sản xuất hợp chất thứ cấp, mô sẹo nói chung và mô sẹo có khả năng sinh phôi nói riêng với hình dạng, kết cấu và đặc tính các tế bào cấu thành đặc trưng, đặc biệt mô sẹo mang sắc tố (xanh lục, tím) luôn được các nhà khoa học quan tâm nghiên cứu, bởi vì loại mô này thường hàm chứa hợp chất thứ cấp cao hơn mô sẹo không có sắc tố do kết quả hiện tượng quang hợp làm thay đổi sâu sắc và

theo hướng tích cực trạng thái sinh lý hóa sinh của vật liệu và tương tự, loại mô nuôi cấy ít nhiều ở trạng thái biệt hóa như chồi, rễ và mô phôi soma cũng thường có hoạt động sinh tổng hợp hợp chất thứ cấp cao hơn loại mô chưa biệt hóa [5, 10, 14, 15, 17, 28].

Đối với Sâm ngọc linh, cây dược liệu quan trọng đặc hữu của Việt Nam, đến nay đã ghi nhận được khá nhiều công trình công bố kết quả nghiên cứu của một số tác giả trong nước về tạo mô sẹo và tái sinh chồi, rễ từ mô sẹo thông qua con đường phát sinh phôi soma và con đường phát sinh chồi, rễ bất định (organogenesis); nuôi tế bào trong môi trường lỏng; tạo và nuôi cấy rễ bất định ở một số quy mô và phương thức nuôi cấy khác nhau nhưng chưa ghi nhận được công bố kết quả nghiên cứu nuôi nhân mô sẹo có khả năng sinh phôi (có ít nhiều sắc tố xanh lục) trong môi trường lỏng, nuôi mô phôi soma trong môi trường thạch và lỏng theo hai hướng phát sinh hình thái chồi và rễ kể cả nuôi nhân sinh khối loại mô quan trọng này.

Vì vậy, nghiên cứu tạo và nuôi nhân hai loại mô vừa đề cập trên là vấn đề cần được quan tâm nghiên cứu nhằm mục đích dài hạn nuôi nhân sinh khối quy mô lớn phục vụ sản xuất hợp chất thứ cấp dùng trong lĩnh vực mỹ phẩm và y dược.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Giống cây

Cây Sâm ngọc linh (*Panax vietnamensis*), được lấy mẫu từ tỉnh Kontum.

Khử trùng mẫu, chuẩn bị mẫu cấy

Lá chét cây sâm 6 tháng tuổi (từ củ) ở vườn ươm trước hết được rửa sạch bằng nước máy trong 10 phút; sau đó được khử trùng lần lượt bằng cồn 70% trong 1 phút, nước Javel thương mại 20% (v/v, có bổ sung Tween 20) trong 10 phút và dung dịch $HgCl_2$ 0,1% (w/v) trong 5 phút. Lá được cắt thành các mảnh kích thước 5×5 mm và cấy vào môi trường tạo mô sẹo.

Môi trường và điều kiện nuôi cấy

Môi trường

Tạo và nuôi nhân mô sẹo

Tạo mô sẹo từ mảnh lá: môi trường MS [19] có 2 mg/l 2,4-D (30 g/l đường saccharose).

Tạo mô sẹo có khả năng sinh phôi (KNSP): MS + 1 mg/l 2,4-D + 1 mg/l NAA + 0,2 mg/l kinetin + 10% nước dừa (30 g/l đường saccharose).

Nuôi nhân mô sẹo có KNSP trong môi trường lỏng: môi trường MS + 0,5 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l NAA (30 g/l đường saccharose).

Tạo huyền phù tế bào

Tạo huyền phù mô tế bào theo hướng không tạo phôi soma từ mô sẹo có KNSP: MS + 2 mg/l 2,4-D (30 g/l đường saccharose).

Tạo huyền phù mô tế bào theo hướng tạo phôi soma từ mô sẹo có KNSP: môi trường B5 [11] + 3 mg/l NAA (30 g/l đường saccharose).

Tạo và nuôi mô phôi soma

Khái niệm 'mô phôi soma' sử dụng trong bài này được định nghĩa là mô phôi từ giai đoạn phôi dạng cầu đến giai đoạn có lá mầm.

Tạo mô phôi từ mô sẹo/mô sẹo có KNSP: MS $\frac{1}{2}$ (1/2 khoáng đa lượng và vi lượng) + 0,2 mg/l 2,4-D + 10% nước dừa (30 g/l đường saccharose).

Tạo phôi/cụm phôi có lá mầm phát triển trên môi trường thạch: môi trường White [32] (50 g/l đường saccharose).

Nuôi mô phôi trong môi trường lỏng theo hướng tạo chồi: MS $\frac{1}{2}$ + 2 mg/l NAA + 0,1 mg/l BA (20 g/l đường saccharose).

Tạo phôi trưởng thành, tạo chồi từ phôi: MS $\frac{1}{2}$ + 0,5 mg/l BA + 1 mg/l GA $_3$ (20 g/l đường saccharose).

Nuôi chồi và cây con có nguồn gốc từ phôi: MS $\frac{1}{2}$ + 0,5 mg/l BA (20 g/l đường saccharose). Nuôi mô phôi trong môi trường lỏng theo hướng tạo rễ: MS $\frac{1}{2}$ + 2 mg/l NAA (20 g/l đường saccharose).

Nuôi nhân rễ có nguồn gốc từ mô phôi qua nuôi cấy trong môi trường lỏng: B5 + 3 mg/l NAA (50 g/l đường saccharose).

Tạo và nuôi rễ từ cụm phôi trên môi trường thạch: B5 + 5 mg/l IBA (50 g/l đường saccharose).

Nuôi nhân mô phôi trong môi trường lỏng: MS $\frac{1}{2}$ + 0,2 mg/l NAA + 0,2 mg/l BA (20 g/l đường saccharose).

Môi trường có pH 5,8; bổ sung hoặc không bổ sung agar (9 g/l) tùy thí nghiệm.

Điều kiện nuôi cấy

Để tối ở nhiệt độ 25-28°C đối với nuôi cấy mô sẹo chưa sinh phôi, huyền phù tế bào và nuôi cấy tạo rễ; để tối hoặc ngoài sáng (10 giờ chiếu sáng/ngày; cường độ ánh sáng \approx 3.000 lux) tùy thí nghiệm đối với nuôi cấy mô phôi (trình bày cụ thể dưới đây); điều kiện sáng và nhiệt độ như trên đối với nuôi cấy mô sẹo sinh phôi, chồi, cây. Nuôi mô lác ở điều kiện sáng hoặc tối (tùy trường hợp như trên), tốc độ lác 110 vòng/phút.

Quan sát hình thái mô tế bào

Quan sát cụm tế bào, phôi soma nuôi cấy trong môi trường lỏng/thạch bằng kính hiển vi soi ngược Olympus (Nhật Bản), kính hiển vi soi nổi Leica (Đức) ở vật kính 10X và 20X.

Nhuộm mô phôi bằng thuốc nhuộm carmine iodine: ngâm mô trong thuốc nhuộm carmine iodine trong 15 phút, rửa bằng nước cất; đặt mô lên phiến kính lớn (lame) và quan sát mô dưới kính hiển vi soi ngược sau khi ép nhẹ mô bằng phiến kính nhỏ (lamelle).

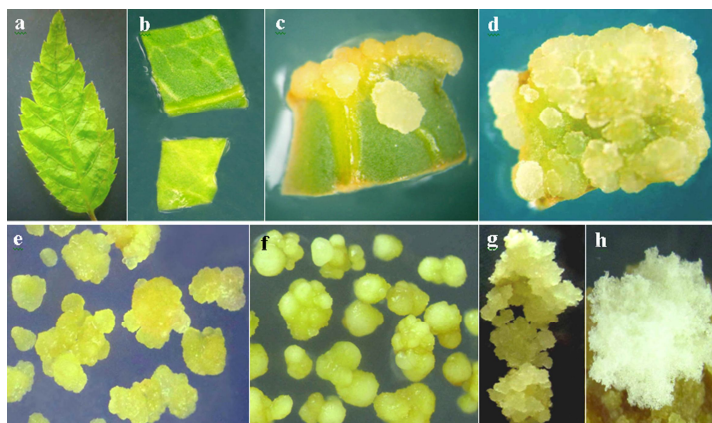
KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Tạo và nuôi nhân mô sẹo

Sau khử trùng, lá chết (hình 1a) được cắt thành các mảnh (hình 1b) và nuôi cấy trên môi trường tạo mô sẹo MS có 2 mg/l 2,4-D. Theo cách khử trùng lá như đã nêu, nhận thấy tỷ lệ mẫu nhiễm không đáng kể. Sau khoảng 1 tháng nuôi, nhận thấy mô sẹo hình thành ở mép cắt (vị trí gần cuống lá), có cụm mô hình thành trên bề mặt phiến lá (hình 1c). Mô sẹo hình thành gần như trên toàn bộ bề mặt phiến lá sau khoảng 2,5 tháng nuôi (hình 1d). Trong nước, mô lá sâm đã được một số tác giả sử dụng như vật liệu ban đầu để nghiên cứu tạo mô sẹo với kết quả tốt [7, 8, 9]; có nghiên cứu dùng mô củ [20, 21, 30], mô cuống lá [9], mô rễ chính (main root) của cây

cây mô [23, 24] để tạo nguồn vật liệu mô sẹo. Theo chúng tôi, lá là loại vật liệu có khả năng đáp ứng thuận lợi với điều kiện khử trùng và nuôi cấy tạo mô sẹo và kết quả thí nghiệm này phù hợp với kết quả nghiên cứu tạo mô sẹo dùng vật liệu lá của các tác giả đã nêu. Mô sẹo sau đó được cắt thành các mảnh nhỏ và cấy chuyển sang môi trường mới để tiếp tục nghiên cứu.

Khi được nuôi cấy trên môi trường MS có nồng độ 2,4-D giảm (1 mg/l 2,4-D) và có bổ sung 1 mg/l NAA, 0,2 mg/l kinetin, 10% nước dừa và để mô ở điều kiện sáng, mô sẹo lá chuyển sang trạng thái cứng (compact) hơn, có sự hình thành diệp lục tố do để ở điều kiện sáng, có khả năng sinh phôi (hình 1e) và sau đó có khả năng bước vào giai đoạn hình thành phôi soma dạng cầu (global) (hình 1f). Nếu tiếp tục cấy chuyển mô sẹo sang môi trường chỉ có 2,4-D (2 mg/l) trong thời gian dài nhận thấy kết cấu mô sẹo xốp dần, ghi nhận có trường hợp màu hơi vàng (hình 1g) và đôi khi có sự hình thành cụm mô với kết cấu toi xốp, trắng (hình 1h).



Hình 1. Sự hình thành mô sẹo từ lá và các loại mô sẹo lá qua nuôi cấy.

a. Lá chết cây giai đoạn vườn ươm; b. Mảnh lá dùng nuôi cấy; c, d. Sự hình thành mô sẹo lá sau khoảng 1 tháng và 2 tháng nuôi cấy; e. Mô sẹo có khả năng sinh phôi sau 1,5 tháng nuôi cấy mô sẹo có nguồn gốc mảnh lá; f. Mô sẹo ở giai đoạn ban đầu hình thành phôi soma; g. Cụm mô sẹo xốp; h. Cụm mô sẹo rất xốp.

Các cụm mô sẹo có KNSP được dùng nuôi cấy trong môi trường lỏng MS bổ sung 0,5 mg/l 2,4-D và 0,5 mg/l NAA để nhân sinh khối. Kết quả bước đầu cho thấy mô tăng sinh khối tươi, gấp khoảng 3 lần sau 2 tháng nuôi cấy lắc trong bình tam giác 250 ml chứa 50 ml môi trường

(cấy 2 g mô sẹo/bình) và hiện mô đang được nhân sinh khối trong bình tam giác 500 ml chứa 200 ml môi trường.

Trên thế giới mô sẹo có KNSP của sâm *Panax ginseng* đã được quan tâm sử dụng nuôi

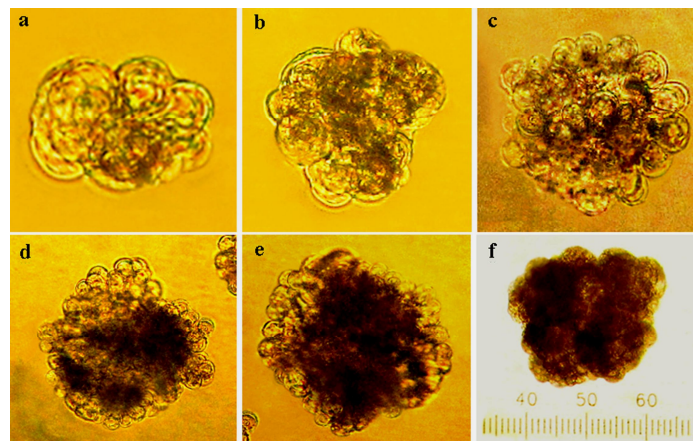
lông trong nghiên cứu hiện tượng phát sinh phôi soma, nhân phôi soma hướng mục đích nhân giống [2, 16, 34] cũng như nghiên cứu nhân sinh khối quy mô lớn loại mô này dùng chiết xuất hợp chất thứ cấp [3, 27].

Tạo huyền phù tế bào

Vật liệu sử dụng để nuôi cấy tạo huyền phù tế bào là mô sẹo có KNSP, kích thước các cụm mô nuôi cấy khoảng 0,5 cm, khối lượng mô nuôi cấy khoảng 3 g/50 ml môi trường trong bình tam giác 250 ml. Sự hình thành huyền phù mô tế bào tăng sinh không theo hướng tạo phôi hoặc theo hướng tạo phôi tùy thuộc vào môi trường nuôi cấy. Trong nước, chưa ghi nhận được công trình công bố đề cập sử dụng mô sẹo có KNSP trong nghiên cứu tạo huyền phù tế bào. Các tác giả Nguyễn Trung Thành và nkk. (2007) [22]; Lê Kim Cương và nkk. (2012) [18] đã sử dụng mô sẹo “xốp” trong nghiên cứu tạo huyền phù tế bào do mô sẹo “xốp” khá dễ bị phân mảnh thành các cụm tế bào nhỏ dưới tác động cơ học (nghiền ép nhẹ, lắc) so với mô có

kết cấu “chặt”. Trong nghiên cứu này, mô sẹo có KNSP được sử dụng có kết cấu không quá “chặt” - khác với kết cấu “chặt” của mô đã bước vào giai đoạn hình thành phôi (hình 1f) nên chúng có thể tăng sinh tạo nhiều cụm tế bào nhỏ trong quá trình nuôi lắc.

Khi nuôi mô sẹo có KNSP dùng môi trường MS bổ sung 2 mg/l 2,4-D; mô tăng sinh, tế bào phân chia theo hướng không tạo phôi. Trong quá trình thay môi trường mới cho mô (15 ngày/lần), các cụm mô có kích thước to, chuyển sang nâu được loại bỏ và sau khoảng 3-4 tháng nuôi quần thể mô nhận được bao gồm các cụm tế bào có kích thước trung bình (2-3 mm) và nhỏ ($\approx 0,5-1$ mm). Sự hình thành các cụm tế bào nói trên do tế bào mô sẹo phân chia, tăng sinh tạo các cụm tế bào mới với kết cấu gồm các tế bào đẳng kính (isodiametric) rất đặc trưng (hình 2). Huyền phù cụm tế bào mịn dần theo thời gian nuôi cấy. Loại huyền phù này có thể được duy trì dài hạn, tăng sinh khối nhưng mất dần khả năng tái sinh thành phôi.



Hình 2. Sự tăng sinh của tế bào nuôi cấy trong môi trường lỏng theo hướng không tạo phôi soma (quan sát dưới kính hiển vi soi ngược).

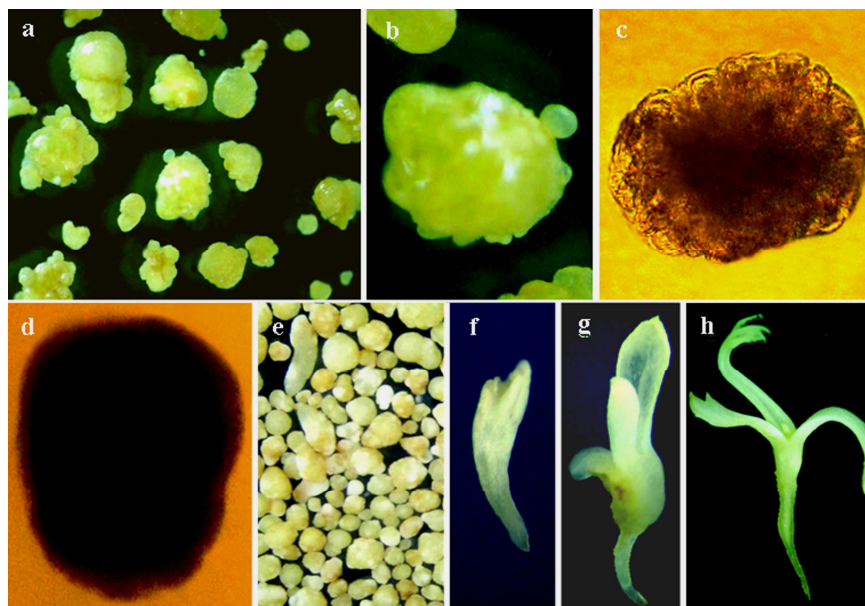
a, b, c. Sự tăng sinh theo thời gian tạo cụm đa bào với kết cấu tế bào dạng cầu, đẳng kính đặc trưng;
d, e, f. Sự hình thành theo thời gian cụm đa bào to vào cuối giai đoạn nuôi cấy (hình a, b, c: quan sát mẫu dùng vật kính 20X; quan sát các mẫu còn lại dùng vật kính 10X).

Ngược lại, khi dùng môi trường B5 bổ sung 3 mg/l NAA, nhận thấy có hiện tượng hình thành phôi cầu trên bề mặt cụm mô sẹo (hình 3a, b); sau đó các phôi này rơi vào môi trường (hình 3c, d). Nuôi lắc liên tục trong khoảng 4-5

tháng, nhận thấy có khá nhiều phôi tròn treo trong môi trường; nuôi lắc càng lâu quần thể phôi nhận được càng nhiều và càng nhỏ; tuy nhiên, huyền phù phôi tăng sinh tương đối chậm. Phần lớn phôi có kích thước rất nhỏ (≤ 1

mm) và có các hình thái khác nhau như phôi/cụm phôi dạng cầu, phôi dạng tim (heart shape) và dạng thủy lôi (torpedo) (hình 3e). Các phôi này có thể phát triển thành phôi trưởng thành với đầy đủ hai cực (pole) chồi, rễ mầm và

phát triển thành cây con hoàn chỉnh khi được cấy chuyển sang môi trường lần lượt là $MS\frac{1}{2} + 0,5 \text{ mg/l BA} + 1 \text{ mg/l GA}_3$ và $MS\frac{1}{2} + 0,5 \text{ mg/l BA}$ (hình 3f, g, h).



Hình 3. Sự hình thành huyền phù phôi soma từ nuôi cấy mô sẹo có khả năng sinh phôi trong môi trường lỏng

a. Các cụm mô sẹo có khả năng sinh phôi sau 1 tháng nuôi cấy trong môi trường lỏng; b. Cận cảnh cụm mô nuôi tạo phôi dạng cầu; c, d. Cận cảnh phôi soma dạng cầu ở giai đoạn sắp hoàn chỉnh và hoàn chỉnh (quan sát dưới kính hiển vi soi ngược); e. Quần thể phôi soma với một số dạng hình thái khác nhau; f, g, h. Quá trình phát triển tạo phôi soma trưởng thành và cây con từ phôi soma huyền phù.

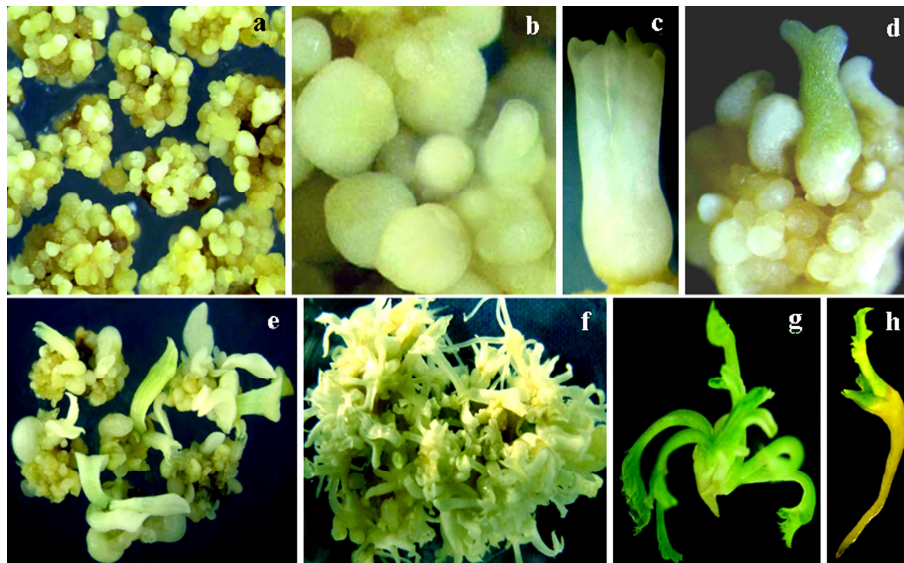
Tạo và nuôi mô phôi soma

Để tạo mô phôi soma, mô sẹo/mô sẹo có khả năng sinh phôi được nuôi cấy trên môi trường $MS\frac{1}{2} + 0,2 \text{ mg/l 2,4-D} + 10\%$ nước dừa. Thời gian hình thành phôi soma nhanh hay chậm, từ 2 đến 3 tháng tùy thuộc loại mô sẹo sử dụng. Sau thời gian nuôi nhận thấy mô phôi soma, thường ở dạng khối tròn, hình thành trên khắp bề mặt mô sẹo (hình 4a); cũng có một số phôi ở trạng thái phân hóa cao hơn với phác thể lá mầm, thân phôi có hình dạng đặc trưng hơn (hình 4b, c, d). Nhìn chung, các thể phôi cầu, đã đi vào trạng thái biệt hóa có bề mặt trơn láng, khác với các khối mô sẹo thường gặp trong nhiều trường hợp cũng ở dạng cầu nhưng có bề mặt “sần sùi”. Khi được cấy chuyển sang môi trường White, các phôi cầu dần hình thành lá

mầm đặc trưng (hình 4e, f) và có thể phát triển tiếp tục thành cây con khi được nuôi cấy, theo thứ tự, trên môi trường $MS\frac{1}{2} + 0,5 \text{ mg/l BA} + 1 \text{ mg/l GA}_3$ và $MS\frac{1}{2} + 0,5 \text{ mg/l BA}$ (hình 4g, h).

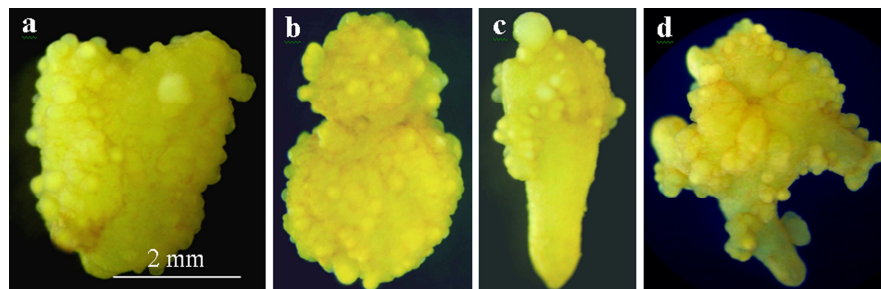
Nuôi nhân mô phôi soma trong môi trường lỏng $MS\frac{1}{2} + 0,2 \text{ mg/l NAA} + 0,2 \text{ mg/l BA}$ đã được thực hiện nhằm tạo tiền đề cho nghiên cứu nuôi nhân sinh khối quy mô lớn để thu hoạt chất. Kết quả bước đầu cho thấy, mô phôi tăng nhanh sinh khối, có thể duy trì nuôi cấy trong thời gian dài hạn. Mô phôi tăng sinh, theo chúng tôi, trên cơ sở trong môi trường nuôi cấy nêu trên có sự hình thành các cụm mô phôi tròn nhỏ (“nốt phôi”) trên khắp bề mặt phôi cầu đơn và phôi cầu đôi (hình 5a, b), trên khắp phần thân và thậm chí trên rễ của phôi đơn và phôi đôi mang rễ (hình 5c, d). Hiện tượng đáp ứng

sinh phôi soma qua nuôi cấy mô trong môi trường lỏng ở loài *Panax ginseng* (Araliaceae) đã được ghi nhận trước đây bởi Kevers et al. (2000) [16].



Hình 4. Quá trình phát triển phôi soma tạo từ mô sẹo lá

a. Quần thể phôi cầu hình thành từ mô sẹo lá. b. Cận cảnh phôi soma dạng cầu và phôi với phác thể lá mầm; c, d. Phôi với lá mầm phát triển; e, f. Sự tăng sinh cụm phôi soma với lá mầm đặc trưng (nuôi trong tối); g, h. Cụm phôi và phôi đơn phát triển với rễ mầm đặc trưng và lá thật (nuôi ở điều kiện sáng).



Hình 5. Sự hình thành các “nốt phôi” mới từ phôi soma nuôi trong môi trường lỏng

a, b. Cận cảnh các “nốt phôi” mới hình thành trên bề mặt phôi cầu đơn và phôi cầu đôi nuôi trong môi trường lỏng; c, d. Cận cảnh các “nốt phôi” mới hình thành trên bề mặt phôi đơn và phôi đôi mang rễ nuôi trong môi trường lỏng.

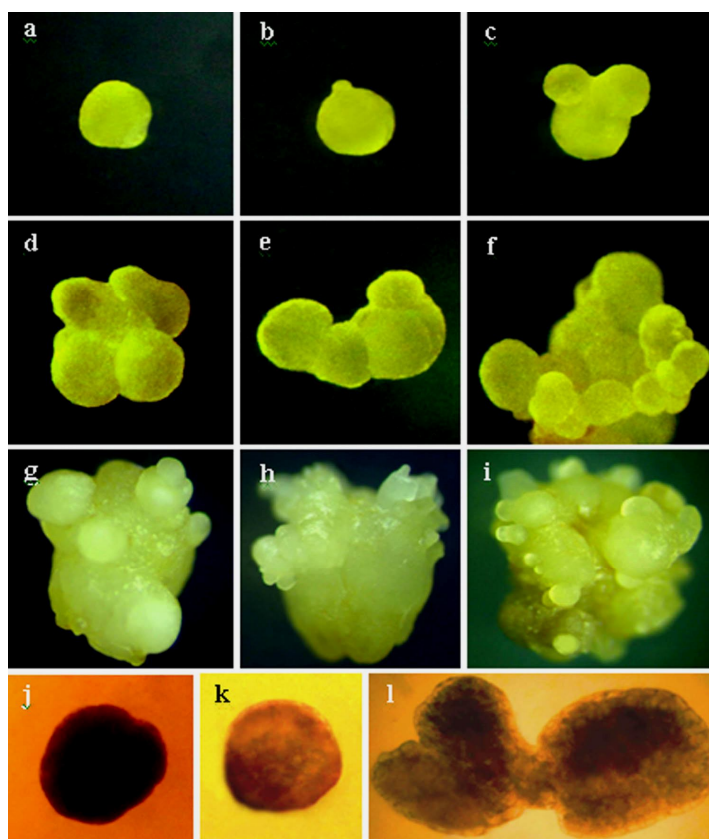
Sự tăng sinh mô phôi nuôi cấy trong môi trường thạch và lỏng, theo chúng tôi, là do hiện tượng sinh phôi thứ cấp nói chung (secondary somatic embryogenesis) bao gồm phôi thứ cấp cấp 1 (secondary), cấp 2 (tertiary) từ phôi sơ cấp (primary embryo) liên tục xảy ra trong quá trình nuôi dẫn đến sự hình thành cụm đa phôi (poly/multi-embryos); phôi thứ cấp có thể ở dạng cầu, hay mang phác thể lá mầm. Quá trình

hình thành phôi thứ cấp từ phôi đơn, qua quan sát ghi nhận dùng kính hiển vi soi nổi và soi ngược, được trình bày ở hình 6. Kiểm tra hình thái, qua sử dụng thuốc nhuộm carmine iodine, cho thấy phôi đơn và phôi thứ cấp phát sinh có lớp biểu mô (epidermis) rất đặc trưng (hình 6 k, l). Theo chúng tôi, sự hình thành trực tiếp các phôi thứ cấp từ mô nuôi cấy ban đầu ở nghiên cứu này tương tự kết quả của các tác giả Nhut et

al. (2012a) [23] trên sâm Ngọc Linh, của Ahn et al. (1996) [1] trên sâm Triều tiên và của You et al. (2007) [33] trên sâm *Panax japonicus*.

Nghiên cứu nhân giống qua khai thác hiện tượng phát sinh và nhân sinh khối phôi soma thứ cấp phục vụ cho các mục đích khác nhau đã được

ghi nhận ở một số loài thuộc họ Nhân sâm (Araliaceae) như nhân sâm (*Panax ginseng*) [2, 4, 27]; sâm siberi (*Eleutherococcus senticosus*) [6, 35], sâm bắc mỹ (*Polyscias filicifolia*) [29], *Panax notoginseng* [34] và *Panax quinquefolius* [36].



Hình 6. Quá trình hình thành phôi soma thứ cấp qua nuôi cấy

a. Phôi đơn dạng cầu (sơ cấp); b. Sự hình thành bước đầu phôi thứ cấp; c, d, e, f. Sự hình thành nhiều phôi thứ cấp tạo cụm phôi dạng cầu; g. Sự hình thành đồng thời nhiều phôi thứ cấp (cấp 1) dạng cầu từ phôi sơ cấp; h. Sự hình thành phôi thứ cấp dạng cầu (cấp 1) và dạng có lá mầm từ phôi sơ cấp; i. Sự hình thành phôi thứ cấp (cấp 2) dạng cầu từ phôi thứ cấp cấp 1; j. Phôi đơn dạng cầu quan sát dưới kính hiển vi ngược; k, l. Hình thái phôi dạng cầu sơ cấp và phôi thứ cấp với lớp biểu mô đặc trưng ghi nhận được qua xử lý thuốc nhuộm carmine iodine (hình j, k: Quan sát mẫu dùng vật kính 10X; hình l: Quan sát mẫu dùng vật kính 20X).

Ngoài nghiên cứu tìm hiểu khả năng nhân sinh khối, mô phôi soma cũng đã được nghiên cứu về khả năng phát sinh hình thái chồi và rễ trong nuôi cấy lỏng.

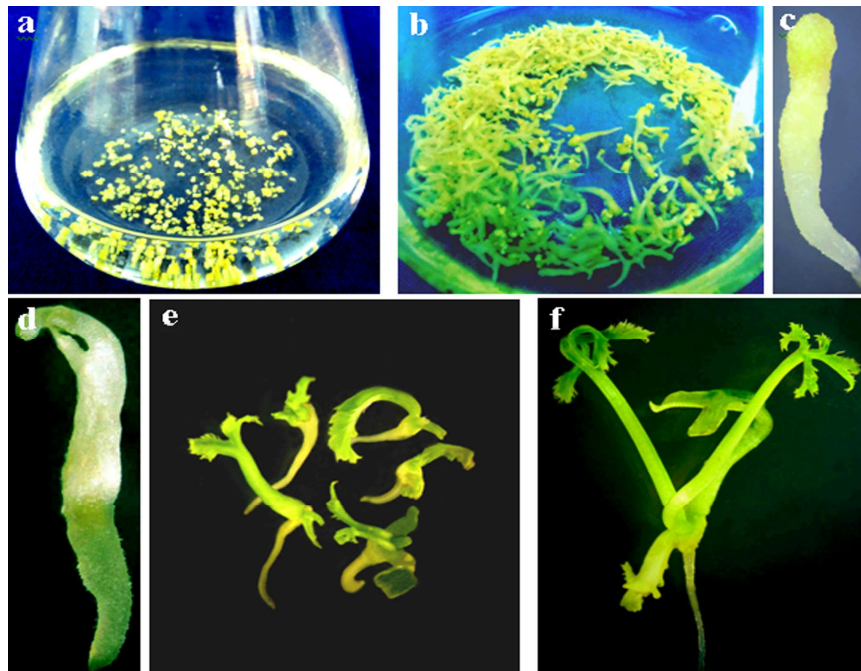
Theo hướng tạo chồi, mô phôi ở dạng đơn hoặc cụm đa phôi (2-3 phôi) (khoảng 200 mg) được nuôi cấy trong môi trường MS $\frac{1}{2}$ bổ sung 2

mg/l NAA và 0,1 mg/l BA (chứa 20-30 ml/bình tam giác 100 ml). Sau khoảng 20-30 ngày nuôi cấy, nhận thấy một số cụm tạo rễ và sau 2 tháng nuôi, rễ hình thành ở hầu hết các phôi đơn (hình 7b); các cụm đa phôi có khuynh hướng tăng sinh tạo phôi cầu treo vào môi trường và từ đó các phôi cầu này bắt đầu quá trình tạo rễ. Quan

sát dưới kính hiển vi, phôi đơn mang rễ điển hình, cực chồi hình thành nhưng phát triển chưa rõ nét, có màu xanh lá nhạt (hình 7c). Các phôi (có rễ) này có thể phát triển thành phôi trưởng thành, tạo chồi và thành cây con khi được cấy chuyển lần lượt sang các môi trường $MS\frac{1}{2} + 0,5$ mg/l BA + 1 mg/l GA_3 và $MS\frac{1}{2} + 0,5$ mg/l BA (hình 7d, e, f). Kết quả này tạo điều kiện cho

nghiên cứu nhân giống tạo cây có rễ trụ (tap root) ở quy mô lớn, tương tự như cây phát triển từ phôi hợp tử.

Kỹ thuật nuôi cấy và kết quả đạt được ở nội dung nghiên cứu này tương tự như kết quả công bố nuôi cấy nhân giống sâm *Panax notoginseng* quy mô bioreactor dùng mô phôi của You et al. (2012) [34].

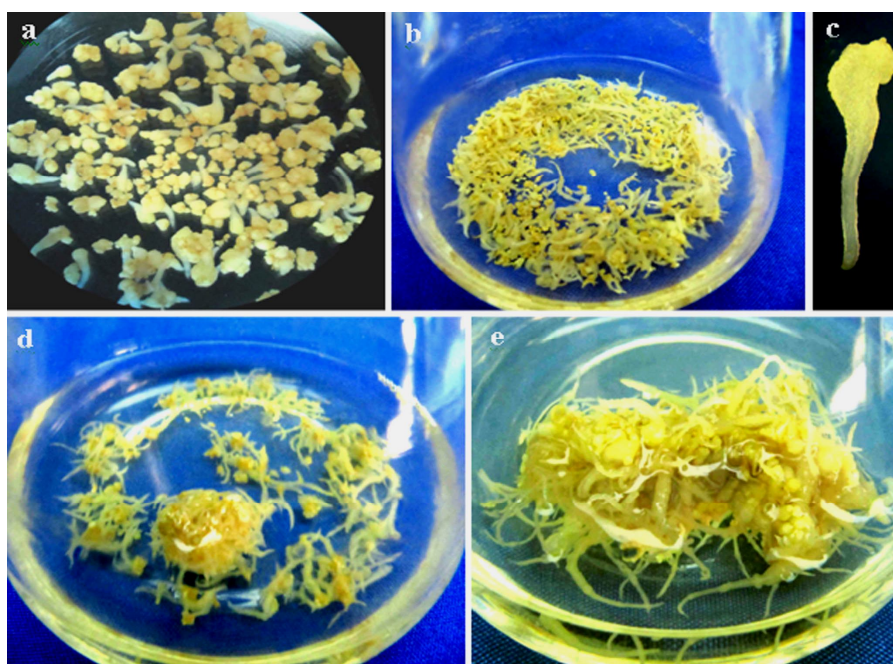


Hình 7. Nuôi mô phôi dạng cầu trong môi trường lỏng theo hướng tạo phôi soma hoàn chỉnh và cây con

a. Mô phôi cầu sau 15 ngày nuôi cấy; b. Quần thể phôi với cực rễ phát triển sau 2 tháng nuôi cấy; c. Cận cảnh phôi đơn hình thành trong môi trường lỏng với cực rễ phát triển và cực chồi phát triển chưa hoàn chỉnh; d. Cận cảnh phôi đơn phát triển cực chồi qua nuôi cấy trên môi trường thạch; e, f. Quá trình phôi phát triển tạo lá thật thành cây con trên môi trường thạch.

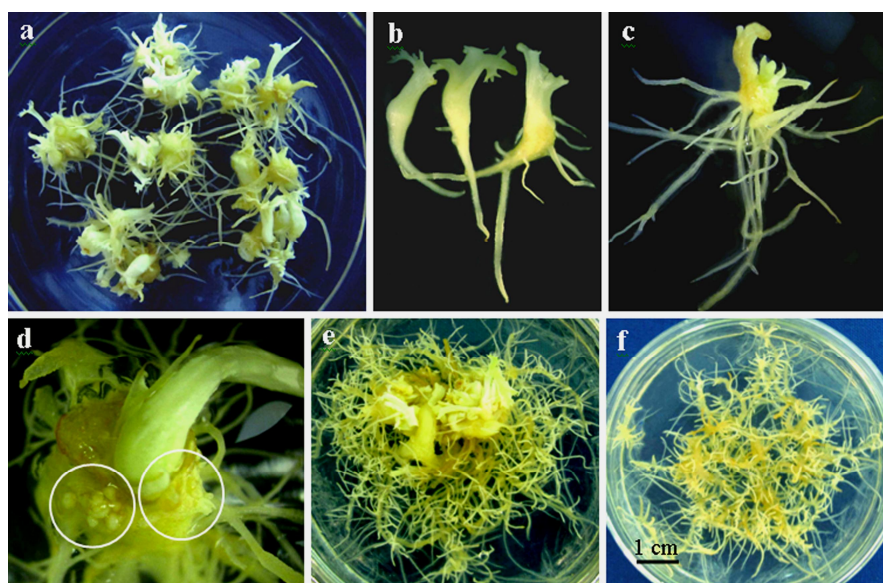
Theo hướng tạo rễ, tương tự trường hợp tạo chồi nêu trên, mô phôi được nuôi cấy trong môi trường lỏng $MS\frac{1}{2} + 2$ mg/l NAA. Mô phôi bước vào giai đoạn tạo rễ sau khoảng 30 ngày (hình 8a) và rễ hình thành ở hầu hết các phôi sau khoảng 60 ngày nuôi cấy (hình 8b). Quan sát dưới kính hiển vi phôi có rễ phát triển dài nhưng cực chồi chưa phát triển và không có màu xanh lá (hình 8c); theo chúng tôi, do môi trường chỉ có NAA và không chứa BA như ở trường hợp nuôi tạo chồi. Tiếp tục nuôi cấy, rễ phôi tăng sinh dài hơn và do điều kiện nuôi lác

nên đã ghi nhận được hiện tượng rễ bị rối (tangled), tương tự trường hợp nuôi rễ sâm *Panax ginseng* của Paek (2002) [26] tạo “búi rễ” dạng cầu (hình 8d). Các “búi rễ” dạng cầu này tăng sinh khá nhanh do điều kiện môi trường tốt hơn khi được chuyển sang nuôi cấy trong môi trường B5 + 3 mg/l NAA (50 g/l đường) (hình 8e). Kết quả thí nghiệm này tương tự kết quả nghiên cứu tạo sinh khối rễ sâm *Panax ginseng* từ phôi cầu giai đoạn sớm (early globular staged embryo) của Gu (2003) [12].



Hình 8. Nuôi mô phôi dạng cầu trong môi trường lỏng theo hướng tạo và nhân rễ

a. Mô phôi bước đầu tạo rễ trong môi trường lỏng sau 30 ngày nuôi; b. Quần thể phôi với cực rễ phát triển sau 2 tháng nuôi cấy; c. Cận cảnh phôi đơn với cực rễ hình thành trong môi trường lỏng; d. Rễ sau 3 tháng nuôi cấy với sự hình thành “búi rễ”; e. “Búi rễ” tăng sinh khối sau 2 tháng nuôi cấy riêng.



Hình 9. Tạo và nhân rễ từ cụm phôi soma

a. Cụm phôi tạo rễ trên môi trường B5 bổ sung 5 mg/l IBA; b, c. Cận cảnh phôi đơn (từ cụm phôi) tạo rễ với các mức độ khác nhau trên môi trường; d. Mô mới hình thành ở gốc mô phôi mẹ (vị trí khoanh tròn) tạo điều kiện nhân sinh khối thể phôi tạo rễ; e. Cụm phôi tiếp tục tạo rễ trên môi trường B5 bổ sung 5 mg/l IBA sau 3 tháng nuôi; f. Rễ (không có mô phôi mẹ) tiếp tục phát triển trên môi trường B5 như trên, sau 3 tháng nuôi.

Ngoài thí nghiệm tìm hiểu khả năng tạo rễ của mô phôi cầu trong môi trường lỏng, cụm phôi (kích thước khoảng 0,5 cm) mang lá mầm hình thành trên môi trường White (hình 4f) cũng đã được sử dụng nuôi cấy trên môi trường thạch nhằm tìm hiểu khả năng tạo rễ. Việc áp dụng môi trường B5 có bổ sung 5 mg/l IBA đã kích thích tạo rễ rất tốt đối với cụm phôi (hình 9a), kết quả này phù hợp với kết quả môi trường khoáng và nồng độ chất điều hòa sinh trưởng nêu trên tạo rễ tốt nhất đối với đoạn cắt rễ bất định của Nguyễn Thị Liễu và nnk. (2011) [20]. Nhận thấy phôi trên môi trường có IBA nồng độ nói trên, phôi đơn cầu thành cụm phôi tạo nhiều rễ bất định và rễ nhánh khác ngoài rễ cọc/trụ điển hình (hình 9b, c). Không chỉ tạo rễ, cụm phôi còn gia tăng sinh khối tạo điều kiện có thể nhân dài hạn loại mô này đáp ứng nhu cầu nguồn vật liệu rễ dùng cho các nghiên cứu tiếp theo. Theo chúng tôi, nguyên nhân gây tăng sinh khối là do phôi có khả năng hình thành các cụm mô phôi/chồi mới từ góc mô phôi mẹ (mother embryo) (hình 9d) trên môi trường có nồng độ auxin (IBA) kết hợp nồng độ đường cao (50 g/l) tương tự kết quả nhân mô phôi (embryoid) *Panax ginseng* dùng môi trường có nồng độ đường cao (100 g/l) của Asaka et al. (1994) [2].

Rễ có mô mẹ hoặc không có mô mẹ khi được nuôi nhân tiếp tục dùng môi trường có nồng độ IBA nói trên đã tiếp tục tăng sinh khối tạo “đệm rễ” trên bề mặt môi trường (hình 9e, f).

KẾT LUẬN

Việc ứng dụng phương pháp nuôi cấy mô thực vật *in vitro* trên đối tượng Sâm ngọc linh, từ vật liệu ban đầu là lá cây *ex vitro*, đã thành công trong nghiên cứu tạo và nuôi nhân mô sẹo có khả năng sinh phôi soma; tạo huyền phù mô/tế bào theo hai hướng không sinh phôi và sinh phôi soma; tạo và nuôi mô phôi soma phát triển theo hai hướng phát sinh hình thái chồi và rễ kể cả nuôi nhân sinh khối loại mô này. Kết quả nuôi cấy thành công các loại mô nói trên tạo tiền đề cho việc nhân giống quy mô lớn phục vụ sản xuất hợp chất thứ cấp.

Lời cảm ơn: Các tác giả xin chân thành cảm ơn Bộ Khoa học và Công nghệ, Sở Khoa học và

Công nghệ Tp. Hồ Chí Minh đã tài trợ cho nghiên cứu này. Đề tài được thực hiện tại Phòng thí nghiệm Trọng điểm phía Nam về công nghệ tế bào thực vật, Viện Sinh học nhiệt đới.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Ahn I. O., Bui Van Le, Gendy C. K., Tran Thanh Van, 1996. Direct somatic embryogenesis through thin cell layer culture in *Panax ginseng*. Plant Cell, Tiss. Org. Cult., 45: 237-243.
2. Arya S., Arya I. D., Eriksson T., 1993. Rapid multiplication of adventitious somatic embryos of *Panax ginseng*. Plant Cell, Tiss. Org. Cult., 34: 157-162.
3. Asaka I., Ii I., Hirotani M., Asada Y., Yoshokawa T., Furuya T., 1994. Mass production of Ginseng (*Panax ginseng*) embryoids on media containing high concentrations of sugar. Planta Med., 60(2):146-148.
4. Asaka I., Li I., Hirotani M., Asada Y., Furuya T., 1993. Production of ginsenoside saponins by culturing ginseng (*Panax ginseng*) embryonic tissue in bioreactors. Biotechnol. Lett., 15: 1259-1264.
5. Betsui F., Tanaka-Nishikawa N., Shimomura K., 2004. Anthocyanin production in adventitious root cultures of *Raphanus sativus* L. cv. Peking Koushin. Plant Biotechnol., 21(5): 387-391.
6. Choi Y. E., Lee K. S., Kim E. Y., Kim Y. S., Han J. Y., Kim H. S., Jeong J. H., Ko S. K., 2002. Mass production of Siberian ginseng plantlets through large-scale tank culture of somatic embryos. Plant Cell Rep., 21(1): 24-28.
7. Dương Tấn Nhựt, Lâm Thị Mỹ Hằng, Bùi Thế Vinh, Phan Quốc Tâm, Nguyễn Bá Nam, Nguyễn Cửu Thành Nhân, Hoàng Xuân Chiến, Lê Nữ Minh Thùy, Vũ Thị Hiền, Nguyễn Văn Bình, Vũ Quốc Luận, Trần Công Luận, Đoàn Trọng Đức, 2010. Xác định hàm lượng saponin và dư lượng một số chất điều hòa sinh trưởng trong callus, chồi và rễ sâm Ngọc Linh nuôi cấy *in vitro*. Tạp chí Công nghệ sinh học, 8(2): 189-202.

8. Duong Tan Nhut, Nguyen Phuc Huy, Vu Quoc Luan, Nguyen Van Binh, Nguyen Ba Nam, Le Nu Minh Thuy, Dang Thi Ngoc Ha, Hoang Xuan Chien, Trinh Thi Huong, Hoang Van Cuong, Le Kim Cuong, Vu Thi Hien, 2011. Shoot regeneration and micropropagation of *Panax vietnamensis* Ha et Grushv. from *ex vitro* leaf-derived callus. Afr. J. Biotechnol., 10(84): 19499-19504.
9. Dương Tấn Nhựt, Vũ Quốc Luận, Nguyễn Văn Bình, Phạm Thanh Phong, Bùi Ngọc Huy, Đặng Thị Ngọc Hà, Phan Quốc Tâm, Nguyễn Bá Nam, Vũ Thị Hiền, Bùi Thế Vinh, Lâm Thị Mỹ Hằng, Dương Thị Mộng Ngọc, Lâm Bích Thảo, Trần Công Luận, 2009. Một số yếu tố ảnh hưởng đến sinh khối của cây sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) nuôi cấy *in vitro* và bước đầu phân tích hàm lượng saponin. Tạp chí Công nghệ sinh học, 7(3): 365-378.
10. Flores H. E., Dai Y. R., Cuello J. L., Maldonado-Mendoza I. E., Loyola-Vargas V. M., 1993. Green roots: Photosynthesis and photoautotrophy in an underground plant organ. Plant Physiol., 101: 363-371.
11. Gamborg O. L., Miller R. A., Ojima K., 1968. Nutrient requirement of suspensions cultures of soybean root cells. Exp. Cell Res., 50(1): 151-158.
12. Gu L. S., 2003. Mass-production method of adventitious root of ginseng from early globular staged embryo. Patent: Neo Bio, Kr. (Publication number: KR 10-2003-0030347 A).
13. Hussein S., Ibrahim R., Kiong A. L. P., 2006. Somatic embryogenesis: an alternative method for *in vitro* micropropagation. Iranian J. Biotechnol., 4(3): 156-161.
14. Jacob A., Malpathak N., 2004. Green hairy root cultures of *Solanum khasianum* Clarke - A new route to *in vitro* solasodine production. Curr. Sci., 87(10): 1442-1447.
15. Jedinak A., Farago J., Ivana Psenakova I., Tibor Maliar T., 2004. Approaches to flavonoid production in plant tissue cultures. Biologia, Bratislava, 59(6): 697-710.
16. Kevers C., Gal N. L., Monteiro M., Dommes J., Gaspar T., 2000. Somatic embryogenesis of *Panax ginseng* in liquid cultures: a role for polyamines and their metabolic pathways. Plant Growth Regul., 31(3): 209-214.
17. Kim Y. S., 2002. Production of ginsenosides through bioreactor cultures of adventitious roots in ginseng (*Panax ginseng* C. A. Meyer). Ph.D thesis, Chungbuk National University, Cheongju, South Korea, 1-137.
18. Lê Kim Trọng, Hoàng Xuân Chiến, Nguyễn Bá Nam, Trịnh Thị Hương, Dương Tấn Nhựt, 2012. Ảnh hưởng của một số yếu tố lên khả năng tăng sinh mô sẹo “xốp” và bước đầu nuôi cấy huyền phù tế bào sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.). Tạp chí Sinh học, 34(3SE): 265-276.
19. Murashige T., Skoog F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. Physiol. Plant., 15: 473-497.
20. Nguyễn Thị Liễu, Nguyễn Trung Thành, Nguyễn Văn Kết, 2011. Nghiên cứu khả năng tạo rễ bất định của sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) trong nuôi cấy *in vitro*. Tạp chí Khoa học Đại học quốc gia Hà Nội, Khoa học Tự nhiên và Công nghệ, 27: 30-36.
21. Nguyễn Trung Thành, Lê Văn Cần, Paek Kee Yoeup, 2007. Nuôi cấy rễ bất định của Sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.). Tuyển tập báo cáo Hội nghị khoa học toàn quốc về Những vấn đề nghiên cứu cơ bản trong khoa học sự sống. Nxb. Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội, 828-831.
22. Nguyễn Trung Thành, Nguyễn Văn Kết, Paek Kee Yoeup, 2007. Ảnh hưởng môi trường nuôi cấy đến sự tăng trưởng sinh khối và sự tích lũy sản phẩm ginsenoside trong nuôi cấy tế bào lông của sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.).

- Tap chí Khoa học ĐHQGHN, Khoa học Tự nhiên và Công nghệ, 23(4): 269-274.
23. Nhut, D. T., Nga, L. T. M., Chien, H. X., Huy, N. P., 2012. Morphogenesis of *in vitro* main root transverse thin cell layers of Vietnamese ginseng (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.). Afr. J. Biotechnol., 11(23): 6274-6289.
 24. Nhut, D. T., Vinh, B. V. T., Hien, T. T., Huy, N. P., Nam, N. B., Chien, H. X., 2012. Effects of spermidine, proline and carbohydrate sources on somatic embryogenesis from main root transverse thin cell layers of Vietnamese ginseng (*Panax vietnamensis* Ha et. Grushv.). Afr. J. Biotechnol., 11(5): 1084-1091.
 25. Ozlem Y. C., Gurel A., Fazilet V. S., 2010. Large scale cultivation of plant cell and tissue culture in bioreactors. Large Scale Cultivation of Plant Cell and Tissue Culture in Bioreactors (Transworld Research Network, Kerala, India): 1-54.
 26. Paek K. Y., 2002. Method for the mass propagation of adventitious roots of ginseng, camphor ginseng and wild ginseng by tissue culture and the improvement of their saponin content. Patent (Pub. No.: US 2002/0142463 A1, Oct., 3, 2002).
 27. Paek K. Y., Chakrabarty D., Hahn E. J., 2005. Application of bioreactor systems for large scale production of horticultural and medicinal plants. Plant Cell, Tiss. Org. Cult., 81: 287-300.
 28. Sauerwein M., Yoshimatsu K., Shimomura K., 1992. Further approaches in the production of secondary metabolites by plant tissue cultures. Plant Tiss. Cult. Lett. 9(1): 1-9.
 29. Sliwinska A., Olszowska O., Furmanowa M., Nosov A., 2008. Rapid multiplication of *Polyscias filicifolia* by secondary somatic embryogenesis. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant*, 44: 69-77.
 30. Trần Thị Liên, Tạ Như Thục Anh, Nguyễn Văn Thuận, 2009. Nghiên cứu nhân giống *in vitro* cây sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis*). Kỹ yếu Hội nghị Công nghệ sinh học toàn quốc, Trường Đại học Thái Nguyên, 233-236.
 31. Tripathi L., Tripathi J. N., 2003. Role of biotechnology in medicinal plants. *Tropical J. Phar. Res.*, 2(2): 243-253.
 32. White P. R., 1963. The cultivation of of animal and plant cells. Ronald Press Co., New York, p. 39.
 33. You X. L., Han J. Y., Choi Y. E., 2007. Plant regeneration via direct somatic embryogenesis in *Panax japonicus*. *Plant Biotechnol. Rep.*, 1: 5-9.
 34. You X. L., Tan X., Dai J. L., Li Y. H., Choi Y. E., 2012. Large-scale somatic embryogenesis and regeneration of *Panax notoginseng* *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 108: 333-338.
 35. Zhou C. G., Yang J. L., Liu L. K., Liang C. N., Xia D. A., Li C. H., 2011. Research progress in somatic embryogenesis of Siberian ginseng (*Eleutherococcus senticosus* Maxim.). *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(33): 7140-7145.
 36. Zhou S., Brown D. C. W., 2006. High efficiency plant production of North American ginseng via somatic embryogenesis from cotyledon explants. *Plant Cell Rep.*, 25: 166-173.

THE STUDY ON *IN VITRO* CULTURE OF EMBRYOGENIC CALLUS AND SOMATIC EMBRYO TISSUE OF *PANAX VIETNAMENSIS* HA ET GRUSHV.

**Mai Truong¹, Tran Thi Ngoc Ha¹, Phan Tuong Loc¹, Le Tan Duc¹,
Tran Trong Tuan¹, Do Dang Giap¹, Bui Dinh Thach¹, Pham Duc Tri¹,
Nguyen Duc Minh Hung¹, Nguyen Thi Thanh¹, Nguyen Van Ket²
Tran Cong Luan³, Nguyen Huu Ho¹**

¹Institute of Tropical Biology, VAST

²Da Lat University

³Ho Chi Minh City Research Center of Ginseng and Medicinal Materials

SUMMARY

This paper presented the results on induction and multiplication of embryogenic calli in liquid medium; on induction of somatic embryo, shoot/root morphogenesis of somatic embryo through culture and on multiplication of somatic embryo tissue in liquid medium.

The aim of this study is to lay out the basis for large scale multiplication of these two kinds of tissues with high capable of secondary metabolite production due to their more or less morphological differentiation status.

Leaf disks (about 0.5 × 0.5 cm) were cultured on the MS medium with 2 mg/l 2,4-D for callus induction. Callus was subcultured on the MS medium with 1 mg/l 2,4-D + 1 mg/l NAA + 0.2 mg/l kinetin + 10% coconut water for induction of somatic embryo tissue.

The embryogenic callus was proliferated in the MS½ liquid medium with 0.5 mg/l 2,4-D + 0.5 mg/l NAA. Depending on the initial medium and the subsequent media, the somatic embryo tissue was cultured for development, via two directions, into population of shoots or roots. The mentioned above tissues are being cultured on shaker in big flask/bioreactor for biomass propagation.

Keywords: *Panax vietnamensis*, cell suspension, embryogenic callus, somatic embryo tissue.

Ngày nhận bài: 30-6-2013