

NGHIÊN CỨU HÌNH THÁI GIẢI PHẪU VÀ CẤU TRÚC PHÔI TRONG QUÁ TRÌNH PHÁT SINH PHÔI VÔ TÍNH SÂM NGỌC LINH (*Panax vietnamensis* HA ET GRUSHV.)

Bùi Văn Thế Vinh¹, Vũ Thị Thủy³, Thái Thương Hiền³, Đỗ Khắc Thịnh², Dương Tấn Nhựt^{3*}

¹Trường Đại học Công nghệ TP.HCM

²Viện Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp Miền Nam, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam

³Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Email*: duongtannhut@gmail.com

Ngày gửi bài: 25.07.2014

Ngày chấp nhận: 25.09.2014

TÓM TẮT

Phát sinh phôi vô tính là tiến trình từ một tế bào hay một nhóm tế bào sinh dưỡng có thể phát triển thành phôi hoặc cây con hoàn chỉnh. So với các phương pháp nhân giống vô tính khác, con đường nhân giống thông qua quá trình phát sinh phôi vô tính có thể mang lại nhiều ứng dụng cụ thể, như khả năng loại trừ virus, cung cấp nguồn vật liệu cho các nghiên cứu chuyển gene, tái sinh cây con hoàn chỉnh từ một tế bào hay phát triển công nghệ hạt nhân tạo. Mục đích của nghiên cứu này là thiết lập một hệ thống nuôi cấy *in vitro* để cảm ứng quá trình phát sinh phôi vô tính ở sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.), một loại dược liệu quý của Việt Nam. Những mẫu cấy lá có kích thước 0,5 x 0,5cm được nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung 1,0 mg/l 2,4-D và 1,0 mg/l NAA để cảm ứng tạo thành mô sẹo. Các mẫu mô sẹo này được cắt thành mảnh nhỏ có đường kính 0,5 cm và nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung 1,0 mg/l 2,4-D kết hợp với NAA và/hoặc kinetin ở các nồng độ khác nhau (0,1; 0,2; 0,5 và 1,0 mg/l) để cảm ứng quá trình phát sinh phôi vô tính. Sau 8 tuần nuôi cấy, các cấu trúc hình cầu bắt đầu được ghi nhận. Tần suất phát sinh phôi đạt được cao nhất trên môi trường MS có bổ sung 1,0 mg/l 2,4-D, 0,2 mg/l kinetin và 0,5 mg/l NAA. Sau 12 tuần nuôi cấy, tất cả các giai đoạn phát triển của phôi vô tính, bao gồm phôi hình cầu, hình tim, hình thủy lôi và phôi giai đoạn lá mầm đều được phát hiện trong các cụm phôi. Các quan sát hình thái giải phẫu và phân tích dưới kính hiển vi điện tử quét cho thấy rằng phôi có cấu trúc lưỡng cực với cực chồi và cực rễ phát triển rõ ràng.

Từ khóa: Hình thái giải phẫu, kính hiển vi điện tử quét, phôi vô tính, *Panax vietnamensis*

Morpho-histological Study of Somatic Embryogenesis in Ngoc Linh Ginseng (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.)

ABSTRACT

Somatic embryogenesis is a process where a plant or embryo is derived from a single somatic cell or group of somatic cells. When compared to other methods of vegetative propagation, somatic embryogenesis has more applications, such as clonal propagation of genetically uniform plant material, elimination of viruses, provision of source tissue for genetic transformation, generation of whole plants from single cells and development of synthetic seed technology. The aim of this study was to establish an *in vitro* system for the induction of somatic embryo in Ngoc Linh ginseng (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) – a precious and economic medical herb of Vietnam. Leaf explants of 0.5 x 0.5 cm in size were cultured on Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with 1.0 mg.l⁻¹ 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and 1.0 mg.l⁻¹ naphthaleneacetic acid (NAA) for callus induction. Callus explants were cultured on MS medium supplemented with various concentrations of 2,4-D, kinetin and NAA to establish embryogenic culture. After 8 weeks of culture, globular structures were obtained. The highest efficiency of somatic embryo production was achieved on MS medium supplemented with 1.0 mg.l⁻¹ 2,4-D, 0.2 mg.l⁻¹ kinetin and 0.5 mg.l⁻¹ NAA. After 12 weeks of culture, all stages of somatic embryogenesis, including globular, heart-, torpedo- and cotyledonary-shaped embryos were observed in embryogenic clusters. Histological observation and scanning electron microscopy (SEM) analysis revealed that the embryos had bipolar structure.

Keywords: *Panax vietnamensis*, histology, scanning electron microscopy, somatic embryos.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Sâm Ngọc Linh là một loài sâm đặc hữu của Việt Nam với tên khoa học là *Panax vietnamensis* Ha et Grushv., thuộc họ Nhân sâm (Araliaceae). Đây là cây dược liệu có thành phần ginsenoside được đánh giá vào loại nhiều nhất so với các loài khác của chi *Panax* trên thế giới. Qua nghiên cứu, các nhà khoa học đã nhận thấy sâm Ngọc Linh không chỉ có các tác dụng dược lý đặc trưng của chi Nhân sâm mà còn có những tác dụng điển hình như chống stress, chống trầm cảm, tác dụng lên sự chống oxy hóa *in vitro* và *in vivo*,... Nhóm chất có vai trò quyết định nhất đến tác dụng dược lý của loài sâm này là các saponin triterpenoid mà đại diện chính là MR₂, G-Rb₁ và G-Rg₁ (Trần Công Luận, 2003). Sâm Ngọc Linh là một trong những loài sâm có hàm lượng saponin khung dammaran cao nhất (khoảng 12 - 15%) và lượng saponin nhiều nhất so với các loài khác của chi *Panax* trên thế giới (Nguyễn Thượng Dong và cs., 2007).

Chính nhờ những giá trị dược lý to lớn như vậy mà nhu cầu đối với sâm Ngọc Linh ngày càng gia tăng. Tuy nhiên, việc trồng đại trà loại cây trồng có giá trị này đang gặp phải rất nhiều khó khăn như giới hạn về phạm vi phân bố, thời gian trồng kéo dài, nhiều sâu bệnh,... Vì vậy, thời gian gần đây, nhiều nghiên cứu đã được tiến hành nhằm nhân giống vô tính sâm Ngọc Linh (Nguyễn Ngọc Dung, 1995; Dương Tấn Nhựt và cs., 2010). Tuy nhiên, phương pháp nhân giống truyền thống không đáp ứng được nhu cầu về cây giống do tỉ lệ sống sót của cây con *in vitro* khi chuyển ra vườn ươm thấp.

Nhân giống vô tính thông qua con đường phát sinh phôi vô tính là hướng nghiên cứu có thể mang lại nhiều ứng dụng thực tiễn và có tính thương mại cao. Quá trình phát sinh phôi vô tính có thể được cảm ứng *in vitro* ở nhiều loài thực vật và đang trở thành mối quan tâm của nhiều nhà khoa học nhờ những ứng dụng tiềm năng trong các nghiên cứu phát triển phôi, nhân giống vô tính và chuyển gene. Thông thường, quá trình nuôi cấy tạo phôi được khởi phát bằng cách đưa mẫu cấy vào môi trường có chứa auxin sau đó chuyển mẫu cấy sang môi trường mới

không chứa auxin hoặc chứa auxin ở nồng độ thấp để thúc đẩy quá trình phát triển phôi. Phôi vô tính có những đặc tính hình thái tương tự như phôi hợp tử. Tuy nhiên, những bất thường về hình thái của phôi vô tính cũng thường được ghi nhận. Chất lượng hình thái phôi vô tính có ảnh hưởng đến khả năng phát triển thành cây con hoàn chỉnh. Những phôi có định hướng lưỡng cực rõ ràng, có lá mầm đầy đủ và có trục phôi phát triển hoàn chỉnh dễ dàng phát triển thành cây con hơn so với những phôi bất thường (Lazzeri et al., 1987; Hartweck et al., 1988; Cruz et al., 1990; Wetzstein and Baker, 1993; Rodriguez and Wetzstein, 1994).

Việc ứng dụng phương pháp phát sinh phôi vô tính ở cây sâm Ngọc Linh hứa hẹn sẽ mang lại nhiều ưu điểm vì có thể tạo ra một số lượng lớn cây con có chất lượng tốt trong một thời gian ngắn, tỉ lệ sống sót của cây con ngoài vườn ươm cao do cây con phát triển từ phôi vô tính theo con đường tương tự như phôi hữu tính. Tuy nhiên, vấn đề đáng lo ngại nhất đối với bất kỳ một nghiên cứu phát sinh phôi vô tính nào là phải hạn chế được những dạng phôi bất thường gây ảnh hưởng đến sự nảy mầm và phát triển thành cây con. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tập trung phân tích về những thay đổi hình thái giải phẫu và cấu trúc phôi trong giai đoạn đầu của quá trình phát sinh phôi vô tính ở sâm Ngọc Linh để đánh giá ảnh hưởng của chúng đến khả năng nảy mầm phát triển thành cây con hoàn chỉnh.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Nguồn mẫu *in vitro*

Các mẫu mô sẹo đường kính 0,5cm có nguồn gốc từ nuôi cấy mảnh lá của cây sâm Ngọc Linh *in vitro* trên môi trường MS bổ sung 1,0 mg/l 2,4-D và 1,0 mg/l NAA, hiện có tại Phòng sinh học phân tử và Chọn tạo giống cây trồng (Viện nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên) được sử dụng làm nguồn mẫu cấy cho các thí nghiệm.

2.2. Môi trường nuôi cấy

Môi trường MS (Murashige and Skoog, 1962) có bổ sung thêm 30 g/l đường sucrose, 8

g/l agar, các chất điều hòa sinh trưởng thuộc nhóm auxin (NAA, 2,4-D), cytokinin (kinetin) tùy thuộc vào từng thí nghiệm sẽ bổ sung ở các nồng độ khác nhau. Sau đó điều chỉnh độ pH của môi trường từ 5,7 - 5,8.

2.3. Điều kiện nuôi cấy

Mẫu được nuôi cấy trong phòng thí nghiệm với nhiệt độ $25 \pm 2^\circ\text{C}$, cường độ chiếu sáng khoảng 2.500 – 3.000lux, thời gian chiếu sáng 16 h/ngày.

2.4. Phương pháp nghiên cứu

2.4.1. Quan sát hình thái giải phẫu bằng kính hiển vi huỳnh quang

Vào ngày thứ 7 của quá trình nuôi cấy (khi bắt đầu có sự thay đổi về hình thái của mẫu cấy) và ngày thứ 21 (khi bắt đầu có sự hình thành các cấu trúc phôi), mô cấy được cắt thành các lát thiết vật mỏng. Thiết vật được xử lý với Javel 5% trong 15 phút để loại bỏ nội dung tế bào sau đó xử lý tiếp tục với acid acetic 3% trong 5 phút để loại bỏ Javel trước khi tiến hành nhuộm kép với phẩm nhuộm acetocarmine và iodine để quan sát hình thái giải phẫu của mẫu cấy hoặc nhuộm với phẩm nhuộm acetocarmine và Evan's blue để phân biệt các tế bào có khả năng phát sinh phôi trong khối mô sẹo hoặc nhuộm bằng Lugol (IKI) để quan sát sự tích lũy hạt tinh bột trong tế bào trước khi quan sát dưới kính hiển vi quang học.

2.4.2. Quan sát cấu trúc phôi bằng kính hiển vi điện tử quét

Các khối phôi được tách ra khỏi mẫu cấy ban đầu và ngâm trong dung dịch paraformaldehyde 4% ở nhiệt độ 4°C để qua đêm. Mẫu được rửa lại 3 lần trong đệm sodium phosphate 25mM (pH = 7) trước khi tiến hành khử nước bằng cách ngâm trong ethanol lần lượt qua các nồng độ: 10% (30 phút), 30% (30 phút), 50% (30 phút), 65% (30 phút), 75% (30 phút), 90% (30 phút), 95% (30 phút), ethanol tuyệt đối (30 phút, 3 lần), ethanol tuyệt đối để qua đêm ở 4°C (18 - 24h). Mẫu được xử lý khô tới hạn qua carbon dioxide trước khi gắn lên đế aluminum

và phủ lên một lớp palladium 60nm. Ảnh hiển vi được ghi nhận bằng kính hiển vi điện tử quét tại Phòng hiển vi điện tử, Viện vệ sinh dịch tễ Trung ương.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của 2,4-D kết hợp với NAA và kinetin lên khả năng phát sinh phôi vô tính sâm Ngọc Linh

Các mẫu mô sẹo có nguồn gốc từ lá sâm Ngọc Linh *in vitro* được cắt thành từng mảnh có đường kính 0,5cm và cấy vào môi trường MS có bổ sung 1,0 mg/l 2,4-D kết hợp với NAA hoặc kinetin ở các nồng độ 0,1; 0,2; 0,5 và 1,0 mg/l. Sau 12 tuần nuôi cấy, kết quả cho thấy tỉ lệ mẫu tạo phôi và số lượng phôi hình thành trên mẫu khác nhau ở các nghiệm thức thí nghiệm. Đối với nghiệm thức đối chứng (không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng), không xuất hiện phôi trên các mẫu mô sẹo, các mẫu mô sẹo dần hóa nâu và chết. Các nghiệm thức còn lại bổ sung 2,4-D kết hợp với NAA hoặc kinetin ở các nồng độ khác nhau cho thấy có sự xuất hiện các cấu trúc phôi hình cầu. Sự kết hợp giữa NAA và 2,4-D cho thấy khả năng cảm ứng tạo phôi tốt hơn thông qua các chỉ tiêu tỉ lệ phát sinh phôi và số lượng phôi/mẫu (Bảng 1).

Trong các nghiên cứu về cảm ứng phát sinh phôi vô tính ở nhiều loài thực vật thì auxin, đặc biệt là 2,4-D thường được sử dụng nhiều nhất (Umehara and Kamada, 2005). Điều này được chứng minh bởi những thí nghiệm ở cà rốt (Borkird et al., 1986), *F. sellowiana* (Cruz et al., 1990), *Populus* spp. (Michler, 1995), ca cao (Canhoto et al., 1999), *Paspalum scrobilatum* (Avcı and Can, 2006). Nồng độ auxin trong môi trường tạo phôi được sử dụng khác nhau và thay đổi tùy theo từng loài cũng như từng loại kiểu gen của thực vật. Do đó, chúng tôi đã sử dụng 1,0 mg/l 2,4-D cho tất cả các thí nghiệm (đây là nồng độ thích hợp trên đối tượng sâm Ngọc Linh đã được nghiên cứu trước đây). Tuy nhiên, nếu chỉ bổ sung 2,4-D riêng rẽ mà không có sự hỗ trợ của các chất điều hòa sinh trưởng khác thuộc nhóm auxin hay cytokinin thì không thu

Bảng 1. Ảnh hưởng của 2,4-D kết hợp với NAA hoặc kinetin lên khả năng phát sinh phôi vô tính sâm Ngọc Linh

Nồng độ (mg/l)			Tỉ lệ phát sinh phôi (%)	Số lượng phôi
2,4-D	NAA	Kinetin		
-	-	-	-	-
1,0	0,1	-	26,7 ^c	22 ^{cd}
1,0	0,2	-	40,0 ^b	38 ^b
1,0	0,5	-	60,0 ^a	52 ^a
1,0	1,0	-	40,0 ^b	13 ^d
1,0	-	0,1	-	-
1,0	-	0,2	30,3 ^{bc}	28 ^c
1,0	-	0,5	13,3 ^d	15 ^d
1,0	-	1,0	6,7 ^d	11 ^d

Chú thích: Trong cùng 1 cột những chữ cái khác nhau (a, b, c,...) thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa ở mức $\alpha = 0,05$ trong phép thử DMRT

nhận được mô sẹo có khả năng phát sinh phôi. Trong thí nghiệm này, chúng tôi kết hợp 2,4-D với một auxin khác là NAA, đây là chất có khả năng cảm ứng phát sinh phôi vô tính ở một số loài. NAA đã được chứng minh là rất hiệu quả trong việc tạo phôi vô tính ở cây đậu tương và cây cà rốt khi sử dụng với nồng độ 1,0 mg/l (Borkird và cộng sự, 1986). Trong khi đó ở thí nghiệm của chúng tôi, tỉ lệ phát sinh phôi cao nhất (đạt 60%) khi sử dụng 0,5 mg/l NAA kết hợp với 1,0 mg/l 2,4-D với số phôi trung bình khoảng 52 phôi/mẫu cấy (Bảng 1). Kết quả này phù hợp với nghiên cứu phát sinh phôi ở *Momordica charantia* L. (Ananya và cộng sự, 2009), *Panax ginseng* (Shohana et al., 2009).

Cytokinin có tác dụng kích thích sự hình thành phôi vô tính từ nuôi cấy mô sẹo không có

khả năng phát sinh phôi được báo cáo trên các loài cây đậu như *Phaseolus* (Malik và Saxena, 1992), *Trifolium* (Maheshwaran and Williams, 1986), cây đậu phộng (Gill and Saxena 1992). Các loại cytokinin như kinetin được chứng minh là có tác dụng tốt trong nuôi cấy ban đầu để hình thành phôi vô tính ở một số loài thân gỗ (Dunstan et al., 1995). Tuy nhiên, nồng độ của kinetin được sử dụng cũng khác nhau tùy theo loài thực vật. Kết quả được chỉ ra trong thí nghiệm này cho thấy sự kết hợp giữa 2,4-D và kinetin không đạt hiệu quả cảm ứng phát sinh phôi tốt như sự kết hợp giữa 2,4-D và NAA. Ở nghiệm thức môi trường bổ sung kinetin ở nồng độ thấp (0,1 mg/l) kết hợp với 1,0 mg/l 2,4-D không thấy có dấu hiệu phát sinh phôi, chỉ là khối mô sẹo rắn chắc, màu vàng kem, một số vị

Bảng 2. Ảnh hưởng của 2,4-D kết hợp với NAA và kinetin lên khả năng phát sinh phôi vô tính sâm Ngọc Linh

Nồng độ (mg/l)			Tỉ lệ phát sinh phôi (%)	Số lượng phôi
2,4-D	NAA	kinetin		
1,0	0,1	0,2	33,3 ^c	35 ^d
1,0	0,2	0,2	53,3 ^{bc}	68 ^c
1,0	0,5	0,2	80,0 ^a	117 ^a
1,0	1,0	0,2	60,0 ^b	96 ^b

Chú thích: Trong cùng 1 cột những chữ cái khác nhau (a, b, c,...) thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa ở mức $\alpha = 0,05$ trong phép thử DMRT

trí có màu tím. Ở môi trường có sự kết hợp 1,0 mg/l 2,4-D với kinetin ở nồng độ cao hơn (từ 0,2 mg/l) bắt đầu có sự xuất hiện phôi, tuy không nhiều nhưng phôi hình thành có màu trắng sáng, tương đối đồng nhất và phôi lớn hơn so với ở các nghiệm thức kết hợp giữa 2,4-D và NAA. Chính vì vậy, chúng tôi tiến hành kết hợp hai chất điều hòa này vào thí nghiệm tiếp theo để đánh giá khả năng cảm ứng phát sinh phôi trên đối tượng sâm Ngọc Linh.

Khi kết hợp 1,0 mg/l 2,4-D với 0,2 mg/l kinetin và NAA ở các nồng độ khác nhau cho thấy kết quả thu được tương đối tốt và đồng đều ở tất cả các nghiệm thức. Cụ thể khi kết hợp với NAA ở nồng độ 0,5 mg/l đạt tỉ lệ phát sinh phôi và số phôi tạo thành cao nhất (tương ứng 80% và 117 phôi/mẫu). Phôi có các dạng hình cầu, hình tim, hình thủy lôi, hình hai lá mầm (Hình 1i₁₋₄). Phôi màu vàng sáng, to và tương đối đồng đều, một số phôi có cấu trúc bất thường (Hình 1j₁), một số mẫu có sự hình thành chồi.

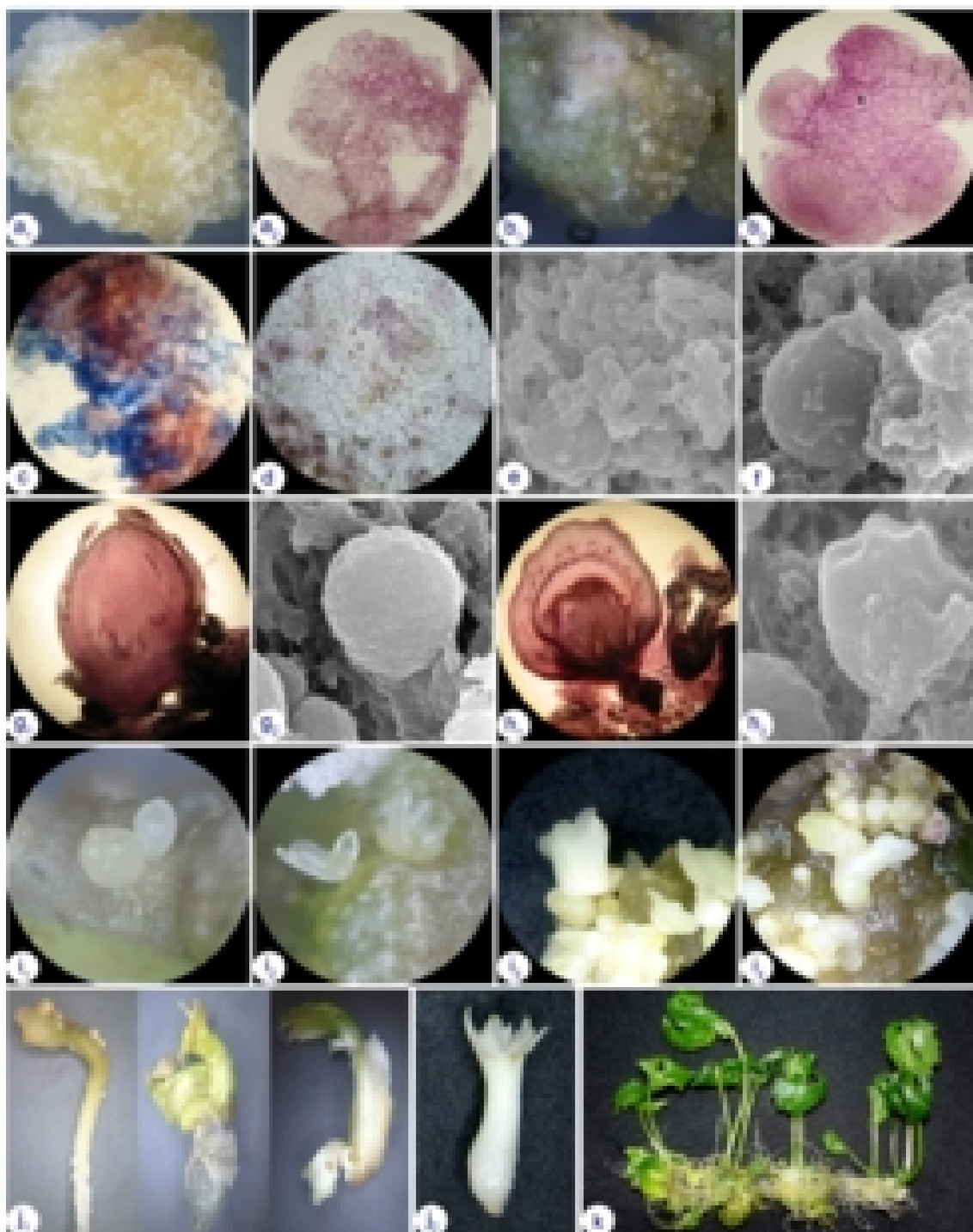
Trong nuôi cấy mô tế bào thực vật, sự phát sinh hình thái bị ảnh hưởng bởi các thành phần khác nhau trong môi trường nuôi cấy, đặc biệt là nồng độ các chất điều hòa sinh trưởng thực vật nên việc đánh giá ảnh hưởng của chúng lên sự tái sinh cây là rất quan trọng. Sự phát sinh phôi vô tính từ nuôi cấy mô sẹo trong môi trường có chứa cytokinin kết hợp với auxin được báo cáo ở các loài ngũ cốc (Bhaskaran and Smith, 1990), các loài thuộc chi *Trifolium* bao gồm cỏ ba lá đỏ, *T. pratense* L., và gần đây báo cáo của Haliloglu (2006) đã cho thấy, khả năng phát sinh phôi vô tính từ nuôi cấy mẫu lá khoai mì trong môi trường có sự kết hợp của auxin và cytokinin. Như vậy, sự kết hợp 2,4-D hay NAA với một loại cytokinin được cho là rất cần thiết để kích thích phát sinh phôi vô tính ở một số thực vật. Mặc dù phần lớn sự phát sinh phôi vô tính được kích thích bởi việc sử dụng auxin và cytokinin riêng lẻ hoặc kết hợp trong môi trường nhưng không phải sự kết hợp nào của cytokinin và auxin đều dẫn đến sự hình thành phôi vô tính. Trong thí nghiệm này, chúng tôi sử dụng 2,4-D và NAA kết hợp với kinetin cho hiệu quả

tỉ lệ phát sinh phôi rất cao và cao nhất ở nghiệm thức môi trường bổ sung 1,0 mg/l 2,4-D kết hợp với 0,5 mg/l NAA và 0,2 mg/l kinetin. Kết quả này phù hợp với báo cáo trên loài *Pinus taeda* (Vanildo et al., 2004) và trên cây bông vải (Hamidou et al., 2005).

3.2. Sự thay đổi hình thái và cấu trúc trong quá trình phát sinh phôi vô tính sâm Ngọc Linh

Phát sinh phôi vô tính là quá trình tái sinh *in vitro* trong đó những cấu trúc lưỡng cực được hình thành từ những tế bào sinh dưỡng mà không có sự kết nối hệ thống mạch dẫn với mô mẹ ban đầu. Vì vậy, điều quan trọng là phải xác định những giai đoạn trong tiến trình này thông qua các đặc tính về hình thái và cấu trúc mô học. Trong nghiên cứu này, những thay đổi hình thái được ghi nhận bằng cách quan sát những lát cắt mô học của phôi vô tính ở tất cả các giai đoạn chuyên biệt dưới kính hiển vi huỳnh quang và kính hiển vi điện tử quét.

Những thay đổi hình thái đầu tiên của mẫu cấy được ghi nhận sau 7 ngày nuôi cấy trên tất cả các môi trường thí nghiệm với sự thay đổi về hình dạng và kích thước của một số tế bào mô sẹo trong mẫu cấy (Hình 1a₁). Các tế bào mô sẹo có kích thước lớn, có nhiều hình dạng khác nhau được sắp xếp lỏng lẻo và phân chia theo nhiều hướng khác nhau (Hình 1a₂). Mô sẹo được nuôi cấy trong môi trường bổ sung 2,4-D kết hợp với NAA có hoạt động phân chia tế bào mạnh hơn so với mô cấy được cảm ứng bởi 2,4-D kết hợp với kinetin thể hiện qua kích thước khối mô sẹo (dữ liệu không được trình bày). Trên bề mặt khối mô sẹo có sự xuất hiện của các cấu trúc hình cầu (Hình 1b₁). Các cấu trúc này có màu vàng đậm hơn so với khối tế bào mô sẹo xung quanh. Một cụm mô sẹo có mang các cấu trúc hình cầu giống phôi này được gọi là khối tiền phôi - proembryogenic mass (PEM) theo cách gọi của Halperin (1970). Những khối tiền phôi này thường định vị ở vùng ngoại vi của khối mô sẹo và thường nằm rải rác cùng với các tế bào mô sẹo có không bào lớn (Hình 1b₂, 1f).



Hình 1. Sự thay đổi hình thái và cấu trúc trong quá trình phát sinh phôi vô tính sâm Ngọc Linh

Ghi chú: a₁. Mẫu cấy mô sẹo sau 7 ngày nuôi cấy quan sát dưới kính hiển vi soi nổi; a₂. Ảnh hiển vi các tế bào mô sẹo sau 7 ngày nuôi cấy quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang; b₁. Các khối tiền phôi xuất hiện trên bề mặt mô sẹo sau 21 ngày nuôi cấy quan sát dưới kính hiển vi soi nổi; b₂. Ảnh hiển vi các tế bào trong khối tiền phôi sau 21 ngày nuôi cấy quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang; c. Ảnh hiển vi các tế bào được nhuộm bằng acetocarmine (bắt màu đỏ) và Evan's blue (bắt màu xanh) quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang; d. Ảnh hiển vi các tế bào chứa hạt tinh bột bắt màu xanh tím khi nhuộm với thuốc nhuộm IKI quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang; e. Ảnh hiển vi mẫu cấy mô sẹo sau 7 ngày nuôi cấy quan sát dưới kính hiển vi điện tử quét; f. Ảnh hiển vi mẫu cấy mô sẹo sau 21 ngày nuôi cấy xuất hiện các khối tiền phôi xen kẽ giữa các tế bào mô sẹo quan

sát dưới kính hiển vi điện tử quét; g_1 . Ảnh hiển vi cấu trúc phôi hình cầu với tầng nguyên bì bao bọc bên ngoài quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang; g_2 . Ảnh hiển vi phôi hình cầu quan sát dưới kính hiển vi điện tử quét; h_1 . Ảnh hiển vi phôi hình tim sớm với sự xuất hiện của hệ thống mạch dẫn quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang; h_2 . Ảnh hiển vi phôi hình tim sớm quan sát dưới kính hiển vi điện tử quét; i_1, i_2, i_3, i_4 . Phôi ở các giai đoạn hình cầu, hình tim, hình thủy lôi và lá mầm quan sát dưới kính hiển vi soi nổi; j_1 . Một số phôi có hình thái bất thường (không có lá mầm, lá mầm hình loa kèn, lá mầm hình cổ áo); j_2 . Phôi vô tính có cấu trúc bình thường tương tự như phôi hữu tính; k . Cây con có nguồn gốc từ phôi vô tính.

Rất khó để phân biệt các tế bào có khả năng phát sinh phôi và các tế bào không phát sinh phôi trong khối tiền phôi. Một phương pháp nhuộm kép đã được phát triển để phân biệt hai loại tế bào này (Gupta and Holmstrom, 2005). Phương pháp này được gọi là phương pháp nhuộm kép vì có 2 phẩm nhuộm acetocarmine và Evan's blue được sử dụng để nhuộm tế bào. Các tế bào có khả năng phát sinh phôi có nhân lớn và tế bào chất đậm đặc nhuộm màu đỏ sáng mạnh với acetocarmine. Các thành phần trong tế bào chất cũng có ái lực với acetocarmine và bắt màu đỏ sáng. Acetocarmine thường được sử dụng để phát hiện glycoprotein, chromatin và DNA trong nghiên cứu hóa học tế bào (Sharma and Sharma, 1980). Các tế bào dây treo có nguồn gốc từ tế bào phôi có nhân nhỏ hơn, phản ứng với thuốc nhuộm Evan's blue để phân biệt khối tế bào sinh phôi. Sự ngăn chặn phẩm nhuộm Evan's blue xác định những tế bào có khả năng phát sinh phôi. Ngược lại, những tế bào không có khả năng phát sinh phôi có không bào lớn với hạch nhân nhỏ cho phép phẩm nhuộm Evan's blue xâm nhập vào bên trong (Gahan, 1984). Các tế bào nằm trong khối mô sẹo không sinh phôi có hạch nhân rất nhỏ nên những vật liệu bên trong tế bào được nhuộm đỏ bởi acetocarmine rất khó được phát hiện trong khi toàn bộ tế bào bắt màu xanh của phẩm nhuộm Evan's blue (Hình 1c).

Các tế bào trong các cụm tiền phôi có kích thước nhỏ với hạch nhân lớn và tế bào chất đậm đặc. Trong 7 - 14 ngày tiếp theo, những tế bào này trải qua quá trình phân chia tạo thành phôi vô tính ở giai đoạn sớm. Phôi hình cầu gồm các tế bào nhỏ giàu tế bào chất được bao quanh bởi một lớp tế bào nguyên bì (Hình 1 $g_1, 1g_2$). Các tế bào gắn kết chặt với rất ít khoảng trống giữa các tế bào. Quiroz-Figueroa et al., (2006) đã cho rằng sự phát triển của tầng nguyên bì là một trong những đặc tính đáng chú ý của quá trình

phát triển phôi vô tính. Phôi vô tính phát triển lớn dần nhờ hoạt động phân chia tế bào diễn ra liên tục dẫn đến sự hình thành phôi hình tim sớm (Hình 1 $h_1, 1h_2$). Sự kéo dài trục phôi trong giai đoạn hình tim muộn cho thấy phôi có cấu trúc lưỡng cực. Sự tăng trưởng về chiều cao của các mầm lá mầm bao xung quanh trục phôi tạo ra phôi hình thủy lôi.

Các hạt tinh bột xuất hiện trong suốt quá trình hình thành vùng sinh phôi và quá trình phát triển sau đó của phôi vô tính được xác định bằng cách nhuộm với IKI (Hình 1d). Tinh bột được xem là nguồn năng lượng chính cho quá trình tăng sinh và tăng trưởng tế bào. Tinh bột nhanh chóng được sử dụng trong suốt giai đoạn hình thành các vùng sinh phôi và sau đó mất dần ở giai đoạn phôi hình cầu và phôi hình tim. Tuy nhiên, có sự tích lũy tinh bột được ghi nhận trở lại ở phôi vào các giai đoạn sau, đặc biệt là ở vùng lá mầm. Mô hình tích lũy và sử dụng tinh bột này đã được báo cáo trước đây trong những hệ thống phát sinh cơ quan và sinh phôi (Von Arnold, 1987; Hartweck et al., 1988; Barciela and Vieitez, 1993).

Sự đa dạng của các cấu trúc phôi khác nhau cũng được ghi nhận trong quá trình phát sinh phôi vô tính sâm Ngọc Linh trong các môi trường thí nghiệm. Một số phôi có chồi và mầm lá tương tự như phôi hợp tử (Hình 1 j_2). Trong khi đó các thể phôi bất thường khác xuất hiện trong suốt giai đoạn sớm của quá trình hình thành các mầm lá cũng như quá trình phát triển của lá mầm như các dạng phôi không có lá mầm, lá mầm hình quạt (Hình 1 j_1). Canhoto and Cruz (1996) đã ghi nhận một lượng lớn phôi bất thường ở cây *Feijoa sellowiana* liên quan đến nguồn gốc đa tế bào của phôi. Halperin and Wetherell (1964) đã ghi nhận rằng hàm lượng 2,4-D cao có thể gây ra những bất thường hay ức chế sự phát triển của mô phân sinh ngọn.

Sự vận chuyển hữu cực của auxin là yếu tố quyết định điều khiển sự khởi phát hình thành trục phôi và để thiết lập tính đối xứng hai bên trong giai đoạn phát sinh phôi sớm (Fry and Wangermann, 1976; Schiavone and Cooke, 1987; Liu et al., 1993). Hàm lượng auxin ngoại sinh cao trong môi trường nuôi cấy hay hiện diện trong mô cấy qua quá trình hấp thụ có thể làm ảnh hưởng đến sự sinh tổng hợp và mức độ phân bố của auxin trong phôi. Liu et al., (1993) đề nghị rằng vị trí sinh tổng hợp auxin là mầm chồi hay những vùng xung quanh và sự vận chuyển hữu cực của auxin dẫn đến sự hình thành lá mầm bình thường. Ngược lại, sự ức chế quá trình vận chuyển hữu cực sẽ gây ra sự khuếch tán ngẫu nhiên của auxin ra các tế bào xung quanh và hình thành nên các lá mầm giống dạng cổ áo (Hình 1j₁).

4. KẾT LUẬN

Phôi vô tính có nhiều đặc tính tốt trong công tác nhân giống các cây trồng quan trọng. Nhân giống bằng con đường phát sinh phôi cho thấy có nhiều thuận lợi hơn so với con đường phát sinh cơ quan. Bên cạnh đó, nghiên cứu về quá trình phát sinh phôi vô tính còn cung cấp những khía cạnh quan trọng về mặt sinh lý học, phôi học thực vật. Phôi vô tính hình thành và phát triển lớn dần nhờ hoạt động phân chia diễn ra liên tục của các tế bào sinh phôi nằm trong các khối tiền phôi. Kết quả nghiên cứu cho thấy môi trường có bổ sung 1,0 mg/l 2,4-D, 0,2 mg/l kinetin và 0,5 mg/l NAA thích hợp để cảm ứng sự hình thành phôi vô tính sâm Ngọc Linh từ mô sẹo có nguồn gốc từ lá. Tất cả các giai đoạn phát triển của phôi (hình cầu, hình tim, hình thủy lôi, lá mầm) đều được phát hiện trong các cụm phôi. Bên cạnh đó cũng có một số phôi có hình thái bất thường như phôi không có lá mầm, lá mầm hình loa kèn hay lá mầm hình cổ áo. Nghiên cứu mô học cho thấy rằng phôi có cấu trúc lưỡng cực. Phôi trưởng thành có cực rõ phát triển đầy đủ và cực chồi với các lá mầm phát triển tốt.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Ananya P., Kalyan M. and Sarmistha S.R. (2009). Effect of polyamines on *in vitro* somatic embryogenesis in *Momordica charantia* L. Plant Cell Tiss. Org. Cult., 97: 303-311.
- Von Arnold S. (1987). Effect of sucrose on starch accumulation in an adventitious bud formation on embryos of *Picea abies*. Ann. Bot., 59: 15-22.
- Avci S. and Can E. (2006). Efficient somatic embryogenesis from immature inflorescences of Dallisgrass (*Paspalum dilatatum* Poir). Propag. Orn. Plants, 6: 134-139.
- Barciela J. and Vieitez A.M. (1993). Anatomical sequence and morphometric analysis during somatic embryogenesis on cultured cotyledon explants of *Camellia japonica* L. Ann. Bot., 71: 395-404.
- Bhaskaran S. and Smith R.H. (1990). Regeneration in cereal tissue cultures. Crop Sci., 30: 1328-1337.
- Borkird C., Choi J.H. and Sung Z.R. (1986). Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on the expression of embryogenic program of carrot. Plant Physiol., 81: 1143-1145.
- Canhoto J.M. and Cruz G.S. (1996). Histodifferentiation of somatic embryos in cotyledons of pineapple guava (*Feijoa sellowiana* Berg). Protoplasma, 191: 34-45.
- Canhoto J.M., Lopes M.L. and Crus G.S. (1999). Somatic embryogenesis and plant regeneration in myrtle (*Myrtaceae*). Plant Cell Tiss. Org. Cult., 57: 13-21.
- Cruz G.S., Canhoto J.M. and Abreu M.A. (1990). Somatic embryogenesis and plant regeneration from zygotic embryos of *Feijoa sellowiana* Berg. Plant Sci., 66: 263-270.
- Dunstan D.I., Tautoris T.E. and Thorpe T.A. (1995). Somatic embryogenesis in woody plants. In: *In vitro* embryogenesis in plants, Thorpe T.A. (ed). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 471-540.
- Dương Tấn Nhựt, Hoàng Xuân Chiến, Nguyễn Bá Trục, Nguyễn Bá Nam, Trần Xuân Tinh, Vũ Quốc Luận, Nguyễn Văn Bình, Vũ Thị Hiền, Trịnh Thị Hương, Nguyễn Cửu Thành Nhân, Lê Nữ Minh Thùy, Lý Thị Mỹ Nga, Thái Thương Hiền và Nguyễn Thành Hải (2010). Nhân giống vô tính cây sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.). Tạp chí Công nghệ Sinh học, 8 (3B): 1211-1219.
- Fry S.C. and Wangermann E. (1976). Polar transport of auxin through embryos. New Phyt., 77: 313-317.

- Gahan P.B. (1984). Plant histochemistry and cytochemistry: an introduction. Academic Press, London.
- Gill R. and Saxena P.K. (1992). Direct somatic embryogenesis and regeneration of plant from seedling explant of peanut (*Arachis Hypogae* L.). Can. J. Bot., 70: 1186-1192.
- Gupta P.K. and Holmstrom D. (2005). Double staining technology for distinguishing embryogenic cultures. In: Protocol for somatic embryogenesis in woody plants, Jain S.M. and Gupta P.K. (eds). Springer Publishers, pp. 573-575.
- Haliloglu K. (2006). Efficient regeneration system from wheat leaf base segments. Biol. Plant., 50(3): 326-330.
- Halperin W. (1970). Embryos from somatic plant cells. In: Control mechanism in the expression of cellular phenotypes, Padykula H. A. (ed). Symp. Int. Soc. Cell Biol., 9: 169.
- Halperin W. and Wetherell D.F. (1964). Adventive embryony in tissue cultures of the wild carrot, *Daucus carota*. Am. J. Bot., 51: 274-283.
- Hamidou S.F., Peggy O., Lloyd M. and Peng W.C. (2005). Putrescine enhances somatic embryogenesis and plant regeneration in upland cotton. Plant Cell Tiss. Org. Cult., 81: 91-95.
- Hartweck L.M., Lazzeri P.A., Cui D., Collins G.B. and Williams E.G. (1988). Auxin-orientation effects on somatic embryogenesis from immature soybean cotyledons. In Vitro Cell. Dev. Biol., 24: 821-828.
- Lazzeri P.A., Hildebrand D.F. and Collins G.B. (1987). Soybean somatic embryogenesis: effects of hormones and culture manipulations. Plant Cell Tiss. Org. Cult., 10: 197-208.
- Liu C.M., Xu Z.H. and Chua N.H. (1993). Auxin polar transport is essential for the establishment of bilateral symmetry during early plant embryogenesis. Plant Cell, 5: 621-630.
- Maheshwaran G. and Williams E.G. (1986). Somatic embryogenesis factors influencing coordinate behavior of cells as an embryogenic group. Ann. Bot., 57: 442-462.
- Malik K.A. and Saxena P.K. (1992). Regeneration in *Phaseolus vulgaris* L.: High frequency induction of direct shoot formation in intact seedlings by N6-benzylaminopurine and thidiazuron. Planta, 186: 384-389.
- Michler C.H. (1995). Somatic embryogenesis in *Populus* spp. In: Somatic embryogenesis in Woody Plants, Jain S.M., Gupta P.K. and Newton R.J. (eds). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 89-97.
- Murashige T. and Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant., 15: 473-497.
- Nguyễn Ngọc Dung (1995). Nhân giống sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) bằng con đường sinh học. Nhà xuất bản Nông nghiệp, tr. 43-100.
- Nguyễn Thượng Dong, Trần Công Luận, Nguyễn Thị Thu Hương (2007). Sâm Việt Nam và một số cây thuốc họ Nhân sâm. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, tr. 109-110.
- Quiroz-Figueroa F., Rojas-Herrera R., Galaz-Avalos R.M. and Layola-Vargas M. (2006). Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. Plant Cell Tiss. Org. Cult., 86: 285-301.
- Rodriguez A.P.M. and Wetzstein H.Y. (1994). The effect of auxin type and concentration on pecan (*Carya illinoensis*) somatic embryo morphology and subsequent conversion into plants. Plant Cell Rep., 13: 607-611.
- Schiavone F.M. and Cooke T.J. (1987). Unusual patterns of somatic embryogenesis in domesticated carrot: developmental effects of exogenous auxins and auxin transport inhibitors. Cell Diff., 21: 53-62.
- Sharma A.K. and Sharma A. (1980). Chromosome techniques. Theory and practice, 3rd ed. Butterworths, London.
- Shohana P., Yeon-Yu K., Rama K.P., Yu-Jin K., Neha G.W. and Deok-Yung K. (2009). Identification and characterization of spermidine synthase gene from *Panax ginseng*. Mol. Biol. Rep., 37: 923-932.
- Trần Công Luận (2003). Kết quả nghiên cứu về hóa học sâm Việt Nam. Hội thảo bảo tồn và phát triển sâm Ngọc Linh tại tỉnh Quảng Nam, tr. 62-75.
- Umehara M. and Kamada H. (2005). Development of the embryo proper and the suspensor during plant embryogenesis. Plant Biotechnol., 22: 253-260.
- Vanildo S., Eny S.F., Walter H. and Migue P.G. (2004). Effect of plant growth regulators on the cellular growth and levels of intracellular protein, starch and polyamines in embryogenic suspension of *Pinus taeda*. Plant Cell Tiss. Org. Cult., 76: 53-60.
- Wetzstein H.Y. and Baker C.M. (1993). The relationship between somatic embryo morphology and conversion in peanut (*Arachis hypogaea* L.). Plant Sci., 92: 81-89.