

SỬ DỤNG KỸ THUẬT NUÔI CẤY LỚP MỎNG TẾ BÀO TRONG NGHIÊN CỨU QUÁ TRÌNH PHÁT SINH HÌNH THÁI CỦA CÂY SÂM NGỌC LINH (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) *IN VITRO*

Vũ Thị Hiền¹, Vũ Quốc Luận¹, Nguyễn Phúc Huy¹, Nguyễn Bá Nam¹,
Nguyễn Thị Kim Loan², Nguyễn Thanh Sang¹, Vũ Thị Thủy¹,
Nguyễn Hồng Hoàng, Thái Xuân Du², Dương Tấn Nhựt^{1*}

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

²*Viện Sinh học Nhiệt đới, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam*

Email*: duongtannhut@gmail.com

Ngày gửi bài: 07.08.2014

Ngày chấp nhận: 04.06.2015

TÓM TẮT

Trong nghiên cứu này, sự phát sinh hình thái từ lớp mỏng tế bào (TCL) mẫu lá, cuống lá và thân rễ sâm Ngọc Linh *in vitro* đã được khảo sát. Mẫu được nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung 30 g/l sucrose, 8 g/l agar, các chất điều hòa sinh trưởng thực vật (NAA, 2,4-D, BA và TDZ riêng lẻ hoặc kết hợp). Sau 10 tuần nuôi cấy, kết quả thu được cho thấy, mẫu lá tTCL_L, mẫu cuống lá ITCL_C, mẫu thân rễ tTCL_R đều cho sự phát sinh phôi, mô sẹo, rễ, trong khi mẫu cuống lá tTCL_C chỉ cho sự phát sinh mô sẹo và rễ. Trong đó, tỷ lệ phát sinh phôi cao nhất (89,6%), tỷ lệ phát sinh mô sẹo cao nhất (91 - 98,8%), tỷ lệ phát sinh rễ cao nhất (98,8%) đã được ghi nhận tương ứng khi mẫu lá tTCL_L được nuôi cấy trên môi trường bổ sung 2,0 mg/l NAA và được đặt dưới điều kiện chiếu sáng 16 h/ngày; lá tTCL_L, cuống lá tTCL_C, ITCL_C, thân rễ tTCL_R được nuôi cấy trên môi trường có bổ sung 2,4-D kết hợp với BA dưới điều kiện chiếu sáng 16 h/ngày, điều kiện tối hoàn toàn; môi trường có bổ sung 1,0 mg/l NAA đặt trong điều kiện tối hoàn toàn. Điều kiện chiếu sáng có tác động đáng kể lên khả năng phát sinh hình thái của mẫu cấy. Việc sử dụng đèn huỳnh quang chiếu sáng 16 h/ngày phù hợp cho khả năng phát sinh phôi của mẫu cấy, những phôi thu được có dạng hình cầu, hình tim, hình thủy lôi và cả dạng lá mầm. Ngược lại, điều kiện tối lại kích thích sự hình thành rễ và mô sẹo tốt hơn. Rễ thu được có màu trắng đục, có phân nhánh, trong khi mô sẹo lại xốp và có màu vàng nhạt.

Từ khóa: Lớp mỏng tế bào, ITCL, phát sinh hình thái, sâm Ngọc Linh, tTCL.

Application of Thin Cell Layer Technique in Studying Morphogenesis of *Panax vietnamensis* Ha et Grushv.

ABSTRACT

In the present study, the morphogenesis of leaf tTCLs, petiole ITCLs and petiole tTCLs, and main root tTCLs of *Panax vietnamensis* Ha et Grushv. was investigated. Explants were cultured on MS media containing 30 g/l sucrose, 8 g/l agar and different concentrations of plant growth regulators including NAA, 2,4-D, BA and TDZ (alone or in combination). After 10 weeks of culture, results indicated that leaf tTCLs, petiole ITCLs and main root tTCLs gave the embryogenesis, callogenesis and root formation whilst petiole tTCLs resulted in callogenesis and root formation but not embryogenesis. The highest embryogenesis rate (89.6%), callogenesis rate (91 - 98.8%) and root formation rate (98.8%) were recorded when leaf tTCLs were cultured on media supplemented with 2.0 mg/l NAA and maintained under a long photoperiod with 16:8-h light-dark cycle (LD 16:8); leaf tTCLs, petiole ITCLs and petiole tTCLs, main root tTCLs were cultured on media with 2,4-D plus BA under a long photoperiod and darkness; and media with 1.0 mg/l NAA under darkness, respectively. Light conditions significantly affected the morphogenesis of all explant types. LD 16:8 was found to be suitable for embryogenesis, and formation of globular, heart- and torpedo-shaped, and cotyledonary embryos were observed. The darkness, on the other hand, showed to be effective for root formation and callogenesis, milk-white roots with few branches and yellowish friable calli were obtained.

Keywords: ITCLs, morphogenesis, *Panax vietnamensis* Ha et Grushv., thin cell layer, tTCLs.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Sâm Ngọc Linh là một loại sâm quý với các hợp chất hóa học đa dạng, được xem là thần dược đối với sức khỏe của con người. Hiện nay trên thị trường, sâm Ngọc Linh ngày càng khan hiếm, được bán với giá thành cao. Trong khi đó, việc khai thác bừa bãi, không có biện pháp quản lý hiệu quả dẫn đến việc sâm Ngọc Linh sớm đứng trước nguy cơ tuyệt chủng và đang nằm trong danh mục 250 loài quý hiếm cần được bảo vệ (Sách đỏ Việt Nam, 1996). Do đó, yêu cầu cấp thiết đặt ra là tìm được kỹ thuật mới giúp thu được số lượng cây con lớn với sức sống cao, rễ và củ phát triển tốt, thích nghi tốt với môi trường bên ngoài, từ đó góp phần cải thiện và tái tạo được lượng cây đã mất đi trong tự nhiên.

Kỹ thuật nuôi cấy lớp mỏng tế bào (thin cell layer - TCL) là một kỹ thuật tiên tiến, được ứng dụng thành công trên nhiều loại cây trồng khác nhau bao gồm cây rừng, cây ăn trái, cây hoa, cây cảnh, cây dược liệu (Nhut et al., 2003). Mẫu cấy TCL bao gồm các mẫu cấy có kích thước nhỏ được cắt ra từ các bộ phận khác nhau của cây như thân, lá, rễ, phát hoa, các bộ phận của hoa, lá mầm và phôi. Nếu mẫu cấy được cắt theo chiều dọc được gọi là ITCL (longitudinal TCL), nếu được cắt theo chiều ngang gọi là tTCL (transverse TCL). Các mẫu tTCL và ITCL có đặc điểm chung là mỏng (Tran Thanh Van et al., 2003). Khi cắt mẫu, mô cây bị thương, nhiều enzyme hoặc các polysaccharide sinh ra rất cần cho quá trình cảm ứng sự sinh trưởng và phát triển của cây (Tran Thanh Van and Mutaftschiev, 1990). Lý do cơ bản của việc ứng dụng một vài tế bào trong hệ thống TCL là vì chúng có mối liên hệ mật thiết với các tế bào bị thương và chất dinh dưỡng cùng với các yếu tố khác bên trong môi trường để “kiểm soát” sự phát sinh hình thái. Kỹ thuật TCL là một công cụ hiệu quả trong nuôi cấy mô tế bào thực vật, đặc biệt tạo ra các dạng hình thái, mô cơ quan khác nhau. Trên thế giới hiện nay hầu như chưa có nghiên cứu về kỹ thuật TCL trên đối tượng sâm Ngọc Linh. Ở Việt Nam, việc ứng dụng kỹ thuật này trên đối tượng cây sâm Ngọc Linh còn rất hạn chế. Dương Tấn Nhựt và cs. (2012) đã

dùng kỹ thuật TCL để nghiên cứu sự phát sinh hình thái trên hai nguồn mẫu (rễ và cuống lá dọc ITCL_C). Vũ Thị Hiền và cs. (2014) cũng đã dùng kỹ thuật này nghiên cứu sự phát sinh phôi trực tiếp từ ba nguồn mẫu (mẫu lá (tTCL_L, mẫu cuống lá ITCL_C và mẫu thân rễ tTCL_R). Trong nghiên cứu này, với mục tiêu là hạn chế làm chết cây mẹ nhưng vẫn tạo ra các nguồn vật liệu *in vitro* khác nhau của cây dược liệu quý hiếm này; chúng tôi cũng sử dụng kỹ thuật TCL để nghiên cứu quá trình phát sinh hình thái từ các nguồn mẫu (mẫu lá (tTCL_L; mẫu cuống lá ITCL_C và tTCL_C; mẫu thân rễ tTCL_R) khác nhau nhằm phục vụ cho các nghiên cứu sâu hơn.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu

Nguồn mẫu sử dụng trong nghiên cứu này là các mẫu lá, cuống lá và thân rễ của cây sâm Ngọc Linh *in vitro* 3 tháng tuổi hiện có tại Phòng Sinh học phân tử và Chọn tạo giống cây trồng (Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên).

2.2. Môi trường nuôi cấy

Môi trường cơ bản là môi trường MS (Murashige and Skoog, 1962) có bổ sung 30 g/l sucrose và 8 g/l agar. Tùy từng thí nghiệm mà bổ sung các chất điều hòa sinh trưởng thực vật gồm α -naphthaleneacetic acid (NAA), 2,4-Dichlorophenoxy acetice acid (2,4-D), 6-benzyladenine (BA) và Thidiazuron (TDZ) riêng lẻ hay phối hợp ở các nồng độ khác nhau. Tất cả môi trường được điều chỉnh về pH 5,7 - 5,8 trước khi hấp khử trùng bằng nồi hấp ở 121°C, 1atm trong 30 phút.

Mẫu được nuôi cấy ở điều kiện nhiệt độ 25 $\pm$ 2°C, độ ẩm 55 - 60%, quang kỳ 16h/ngày với cường độ chiếu sáng 25 - 30 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ và trong tối hoàn toàn.

2.3. Quá trình phát sinh hình thái

Những lá có đường kính khoảng 1,5cm được cắt ngang (tTCL_L) với kích thước 1 x 10mm; phần cuống lá được cắt dọc (ITCL_C) với chiều dài 10mm và có độ dày 1mm. Các cuống lá với

đường kính 1mm cũng được cắt ngang (tTCL_C) để có độ dày 1mm. Phần thân rễ có đường kính 5mm được cắt ngang (tTCL_R) với độ dày 1mm của cây sâm Ngọc Linh được nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung các chất điều hòa sinh trưởng 2,4-D; NAA; BA riêng lẻ ở các nồng độ khác nhau (0,1; 0,2; 0,5; 1,0 và 2,0 mg/l) và TDZ ở các nồng độ 0,01; 0,05; 0,1; 0,2; 0,5 và 1,0 mg/l hoặc nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung 1,0 mg/l 2,4-D kết hợp với BA ở các nồng độ khác nhau (0,1; 0,2; 0,5; 1,0 và 2,0 mg/l) hoặc 1 mg/l BA kết hợp với 2,4-D ở các nồng độ khác nhau (0,1; 0,2; 0,5; 1,0 và 2,0 mg/l).

Tất cả các nghiệm thức trên được nuôi cấy dưới điều kiện chiếu sáng 16h/ngày, trong điều kiện tối hoàn toàn.

2.4. Bố trí thí nghiệm và xử lý số liệu

Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 3 lần lặp lại (20 bình/nghiệm thức và 3 mẫu/bình).

Số liệu thu được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel 2013 và phần mềm SPSS 16.0 với Duncan's test ở mức $\alpha = 0,05$ (Duncan, 1995).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả

3.1.1. Ảnh hưởng của các chất điều hòa sinh trưởng thực vật riêng lẻ và điều kiện chiếu sáng lên sự phát sinh hình thái của các loại mẫu cấy

Sự phát sinh hình thái từ mẫu lá tTCL_L: Sau 10 tuần nuôi cấy, kết quả thu được ở bảng 1 cho thấy, mẫu lá tTCL_L khi được nuôi cấy trên môi trường có bổ sung 2,4-D, NAA ở nồng độ 1 - 2 mg/l dưới điều kiện sáng cho sự phát sinh cả phôi, mô sẹo và rễ. Tỷ lệ tạo phôi cao nhất (89,6%) được ghi nhận khi mẫu lá tTCL_L được nuôi cấy trên môi trường có bổ sung 2 mg/l NAA kết quả hình thành phôi này cũng tương đồng với kết quả mà chúng tôi đã nghiên cứu được ở bài báo trước (Vũ Thị Hiền và cs., 2014). Phôi hình thành có dạng hình cầu, hình tim, hình thủy lôi và cả phôi lá mầm (Hình 1a). Mô sẹo

hình thành có dạng xốp, cứng, màu trắng trong và màu vàng nhạt được quan sát thấy trên môi trường có bổ sung NAA hoặc 2,4-D. Rễ phát sinh từ mẫu trên cả môi trường có bổ sung 2,4-D và NAA đều có màu trắng trong, mảnh và phân nhánh. Trong khi mẫu nuôi cấy trên môi trường không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng thực vật (CĐHSTTV) hoặc bổ sung TDZ hay BA không cho bất kì dạng phát sinh hình thái nào.

Mẫu lá tTCL_L khi được nuôi cấy trong điều kiện tối hoàn toàn phát sinh cả phôi, mô sẹo và rễ trên môi trường có bổ sung 2,4-D ở nồng độ từ 0,5 - 2 mg/l (Bảng 1, Hình 1d, g). Khi bổ sung 2,4-D nồng độ thấp từ 0,1 - 0,2 mg/l thì chỉ phát sinh phôi hoặc phát sinh thêm mô sẹo. Mẫu được cấy trên môi trường có bổ sung 2 mg/l NAA chỉ cho phát sinh mô sẹo với tỷ lệ thấp (13,3%). Không có sự phát sinh phôi và rễ ở các mẫu cấy được nuôi trên môi trường có bổ sung NAA ở cùng nồng độ 2 mg/l NAA. Mẫu được nuôi cấy trên môi trường có NAA ở nồng độ thấp (0,1 - 1 mg/l) hoặc môi trường có bổ sung TDZ, BA hoặc không bổ sung CĐHSTTV trong điều kiện tối không cho bất kì dạng phát sinh hình thái nào.

Sự phát sinh hình thái từ mẫu cuống lá tTCL_C: Cuống lá tTCL_C không phát sinh phôi khi nuôi cấy trên môi trường với các CĐHSTTV được khảo sát dưới cả điều kiện sáng và tối hoàn toàn. Cuống lá tTCL_C phát sinh mô sẹo khi được nuôi cấy trên môi trường có bổ sung 1 - 2 mg/l 2,4-D hoặc NAA dưới điều kiện sáng. Mô sẹo hình thành trên các môi trường có 2,4-D hoặc NAA ở cả điều kiện tối và sáng, mô sẹo cứng và có màu vàng nhạt. Nhưng cũng ở điều kiện sáng và tối hoàn toàn thì lại không cho sự phát sinh phôi và rễ. Mẫu được nuôi cấy trên môi trường có BA, TDZ hoặc không bổ sung CĐHSTTV không cảm ứng phát sinh các dạng hình thái. Mẫu cuống lá tTCL_C khi được nuôi cấy trên môi trường có bổ sung 2,4-D hoặc NAA ở nồng độ cao dưới điều kiện tối hoàn toàn cho khả năng phát sinh hình thái tương tự như dưới điều kiện sáng. Sự phát sinh rễ được quan sát thấy ở các mẫu được nuôi cấy trên môi trường có bổ sung 0,5 - 2 mg/l NAA.

Sự phát sinh hình thái từ cuống lá ITCL: Sự phát sinh phôi, mô sẹo và rễ quan sát được ở các mẫu cấy được nuôi trên môi trường có 0,2 - 2 mg/l 2,4-D hoặc 2 mg/l NAA dưới điều kiện sáng (Bảng 1, Hình 1c, f, h), mô sẹo hình thành cứng, màu trắng đục. Các dạng hình thái này cũng được ghi nhận trên môi trường có bổ sung 0,5 - 1 mg/l 2,4-D dưới điều kiện tối hoàn toàn. Mô sẹo tạo thành có màu vàng nhạt. Mẫu được nuôi cấy trên môi trường có bổ sung 1 mg/l NAA cho sự phát sinh phôi và mô sẹo mà không có sự hình thành rễ dưới điều kiện sáng. Phôi thu được cũng có dạng hình cầu, hình tim, hình thủy lôi

và cả phôi lá mầm. Môi trường có bổ sung 0,1 mg/l 2,4-D dưới điều kiện sáng và 0,1 - 0,2 mg/l 2,4-D, 0,5 mg/l NAA dưới điều kiện tối hoàn toàn thì cho sự hình thành rễ hoặc sự phát sinh mô sẹo (Bảng 1). Rễ phát sinh từ mẫu trên cả môi trường có bổ sung 2,4-D và NAA đều có màu trắng trong, mảnh và phân nhánh.

Sự phát sinh hình thái từ thân rễ tTCL_R: Sự phát sinh 3 dạng hình thái (phôi, mô sẹo và rễ) được ghi nhận khi mẫu được nuôi cấy trên môi trường có bổ sung 1 - 2 mg/l NAA dưới điều kiện sáng hoặc môi trường có bổ sung 0,2 - 0,5 mg/l 2,4-D dưới điều kiện tối

Bảng 1. Sự phát sinh hình thái của các loại mẫu cấy trên môi trường có bổ sung các chất điều hòa sinh trưởng thực vật riêng lẻ

Điều kiện chiếu sáng	CĐHSTTV	Nồng độ (mg/l)	Tỷ lệ phát sinh hình thái (%)							
			Lá tTCL		Cuống lá tTCL		Cuống lá ITCL		Thân rễ tTC	
			Mô sẹo	Rễ	Mô sẹo	Rễ	Mô sẹo	Rễ	Mô sẹo	Rễ
Sáng	ĐC	0	0,0 ^t	0,0 ^r	0,0 ^t	0,0 ^r	0,0 ^t	0,0 ^r	0,0 ^t	0,0 ^r
	2,4-D	0,1	0,0 ^t	0,0 ^r	0,0 ^t	0,0 ^r	0,0 ^t	10,6 ^f	75,5 ^{ijk}	0,0 ^r
	2,4-D	0,2	0,0 ^t	0,0 ^r	0,0 ^t	0,0 ^r	24,4 ^{pr}	25,6 ^p	87,7 ^{c-g}	0,0 ^r
	2,4-D	0,5	44,4 ^m	0,0 ^r	0,0 ^t	0,0 ^r	89,9 ^{a-f}	79,9 ^{cde}	89,9 ^{a-f}	0,0 ^r
	2,4-D	1,0	97,7 ^a	42,1 ^{klm}	16,6 ^{rs}	0,0 ^r	97,7 ^a	85,5 ^{bcd}	97,7 ^a	0,0 ^r
	2,4-D	2,0	76,6 ^{ijk}	9,9 ^r	63,3 ^l	0,0 ^r	98,8 ^a	71 ^{efg}	88,8 ^{b-g}	0,0 ^r
	NAA	0,1	0,0 ^t	0,0 ^r	0,0 ^t	0,0 ^r	0,0 ^t	0,0 ^r	0,0 ^t	0,0 ^r
	NAA	0,2	0,0 ^t	0,0 ^r	0,0 ^t	0,0 ^r	0,0 ^t	0,0 ^r	0,0 ^t	0,0 ^r
	NAA	0,5	0,0 ^t	0,0 ^r	0,0 ^t	0,0 ^r	0,0 ^t	0,0 ^r	0,0 ^t	0,0 ^r
	NAA	1,0	74,4 ^{jk}	26,6 ^p	86,6 ^{d-g}	0,0 ^r	84,4 ^{e-h}	0,0 ^r	44,4 ^m	74,4 ^{def}
	NAA	2,0	97,7 ^a	63,3 ^{fgh}	76,6 ^{ijk}	0,0 ^r	96,6 ^{abc}	37,7 ^{m-n}	67,7 ^{kl}	83,3 ^{b-e}
Tối	ĐC	0	0,0 ^t	0,0 ^r	0,0 ^t	0,0 ^r	0,0 ^t	0,0 ^r	0,0 ^t	0,0 ^r
	2,4-D	0,1	0,0 ^t	0,0 ^r	0,0 ^t	0,0 ^r	46,6 ^m	11,06 ^r	41,1 ^{mn}	0,0 ^r
	2,4-D	0,2	39,9 ^{mn}	0,0 ^r	0,0 ^t	0,0 ^r	67,7 ^{kl}	35,5 ^{m-p}	61 ^l	24,4 ^p
	2,4-D	0,5	96,6 ^{abc}	73,3 ^{d-g}	83,3 ^{e-i}	0,0 ^r	84,4 ^{e-h}	41,1 ^{k-n}	91 ^{a-e}	27,7 ^p
	2,4-D	1,0	98,8 ^a	79,9 ^{cde}	63,3 ^l	0,0 ^r	94,4 ^{a-d}	46,6 ^{ijkl}	95,5 ^{a-d}	44,4 ^{kl}
	2,4-D	2,0	97,7 ^a	57,7 ^{hij}	33,3 ^{no}	0,0 ^r	0,0 ^t	0,0 ^r	31 ^{no}	0,0 ^r
	NAA	0,1	0,0 ^t	0,0 ^r	0,0 ^t	0,0 ^r	0,0 ^t	0,0 ^r	0,0 ^t	0,0 ^r
	NAA	0,2	0,0 ^t	0,0 ^r	0,0 ^t	0,0 ^r	0,0 ^t	0,0 ^r	0,0 ^t	28,2 ^{op}
	NAA	0,5	0,0 ^t	0,0 ^r	0,0 ^t	31,3 ^{nop}	0,0 ^t	31,1 ^{nop}	24,4 ^{pr}	48,8 ^l
	NAA	1,0	0,0 ^t	0,0 ^r	0,0 ^t	75,5 ^{def}	45,5 ^m	61,1 ^{ghi}	0,0 ^t	52,2 ^{h-k}
	NAA	2,0	13,3 ^s	0,0 ^r	46,6 ^m	89,9 ^{abc}	81 ^{f-i}	94,4 ^{ab}	0,0 ^t	98,8 ^a

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

hoàn toàn (Bảng 1, Hình 1b, e). Mẫu thân rễ tTCL_R được nhận thấy là phù hợp nhất cho sự phát sinh rễ (98,8%) khi nuôi cấy trên môi trường có bổ sung NAA ở nồng độ 2 mg/l dưới điều kiện tối hoàn toàn. Rễ có màu trắng trong, mảnh và phân nhánh. Môi trường có bổ sung BA, TDZ hoặc không bổ sung CĐHSTTV cũng không phù hợp cho sự phát sinh các dạng hình thái ở mẫu thân rễ tTCL (Bảng 1).

3.1.2. Ảnh hưởng của 2,4-D kết hợp với BA và điều kiện chiếu sáng lên sự phát sinh hình thái của các loại mẫu cấy

Sau 10 tuần nuôi cấy, môi trường có bổ sung 2,4-D và BA là phù hợp với sự phát sinh mô sẹo dưới cả điều kiện sáng và tối hoàn toàn. Khả năng phát sinh mô sẹo tốt nhất ở (1) mẫu lá

tTCL_L trên môi trường có bổ sung 1 mg/l 2,4-D kết hợp với 0,1 - 1 mg/l BA dưới điều kiện sáng, 1 mg/l 2,4-D kết hợp với 0,1 - 2 mg/l BA dưới điều kiện tối; (2) cuống lá tTCL_C trên môi trường có 1 mg/l 2,4-D kết hợp với 0,1 - 1 mg/l BA dưới điều kiện sáng; 1 mg/l 2,4-D kết hợp với 0,1 - 2 mg/l BA, 1 mg/l BA kết hợp với 0,2 - 2 mg/l 2,4-D dưới điều kiện tối hoàn toàn; (3) cuống lá ITCL_C được cắt với chiều dài 10mm sau đó chỉ làm đôi có độ dày 1mm được nuôi cấy trên môi trường có bổ sung 1 mg/l 2,4-D kết hợp với 0,1 - 2 mg/l BA dưới cả điều kiện sáng và tối hoàn toàn. Còn ở nồng độ 1 mg/l BA kết hợp với 0,1 - 2 mg/l 2,4-D trong điều kiện sáng thì không có sự hình thành mô sẹo. Kết quả nghiên cứu thu được hoàn toàn ngược lại so với kết quả nghiên cứu của Dương Tấn Nhựt và cs. (2012).

Bảng 2. Sự phát sinh hình thái của các loại mẫu cấy trên môi trường có bổ sung 2,4-D kết hợp với BA

Điều kiện chiếu sáng	CĐHSTTV (mg/l)		Tỷ lệ phát sinh hình thái (%)				
	2,4-D	BA	Lá tTCL	Cuống lá tTCL	Cuống lá ITCL		Thân rễ tTCL
			Mô sẹo	Mô sẹo	Phôi	Mô sẹo	Mô sẹo
Sáng	0	0	0,0 ^f	0,0 ^f	0,0 ^f	0,0 ^f	0,0 ^f
	1,0	0,1	98,8 ^a	97,7 ^{ab}	24,4 ^d	98,8 ^a	97,7 ^{ab}
	1,0	0,2	98,8 ^a	98,8 ^a	48,8 ^b	97,7 ^{ab}	98,8 ^a
	1,0	0,5	97,7 ^{ab}	98,8 ^a	31,0 ^c	95,5 ^{ab}	98,8 ^a
	1,0	1,0	97,7 ^{ab}	97,7 ^{ab}	0,0 ^f	97,7 ^{ab}	98,8 ^a
	1,0	2	89,9 ^{bc}	74,4 ^e	0,0 ^f	91,0 ^{abc}	91,0 ^{abc}
	0,1	1,0	0,0 ^f	0,0 ^f	0,0 ^f	0,0 ^f	0,0 ^f
	0,2	1,0	0,0 ^f	0,0 ^f	0,0 ^f	0,0 ^f	0,0 ^f
	0,5	1,0	0,0 ^f	0,0 ^f	0,0 ^f	0,0 ^f	79,9 ^{de}
	2	1,0	0,0 ^f	0,0 ^f	0,0 ^f	0,0 ^f	85,5 ^{cd}
Tối	0	0	0,0 ^g	0,0 ^g	0,0 ^f	0,0 ^g	0,0 ^g
	1,0	0,1	97,7 ^a	97,7 ^a	0,0 ^f	98,8 ^a	94,4 ^{ab}
	1,0	0,2	98,8 ^a	98,8 ^a	21 ^e	98,8 ^a	98,8 ^a
	1,0	0,5	97,7 ^a	97,7 ^a	0,0 ^f	97,7 ^a	97,7 ^a
	1,0	1,0	98,8 ^a	97,7 ^a	0,0 ^f	98,8 ^a	98,8 ^a
	1,0	2	97,7 ^a	98,8 ^a	0,0 ^f	95,5 ^{ab}	97,7 ^a
	0,1	1,0	0,0 ^g	0,0 ^g	0,0 ^f	0,0 ^g	0,0 ^g
	0,2	1,0	44,4 ^e	96,6 ^a	0,0 ^f	34,4 ^e	47,7 ^d
	0,5	1,0	68,8 ^d	97,7 ^a	0,0 ^f	72,2 ^d	94,4 ^{ab}
	2	1,0	31,1 ^f	96,6 ^a	0,0 ^f	35,5 ^f	88,8 ^b

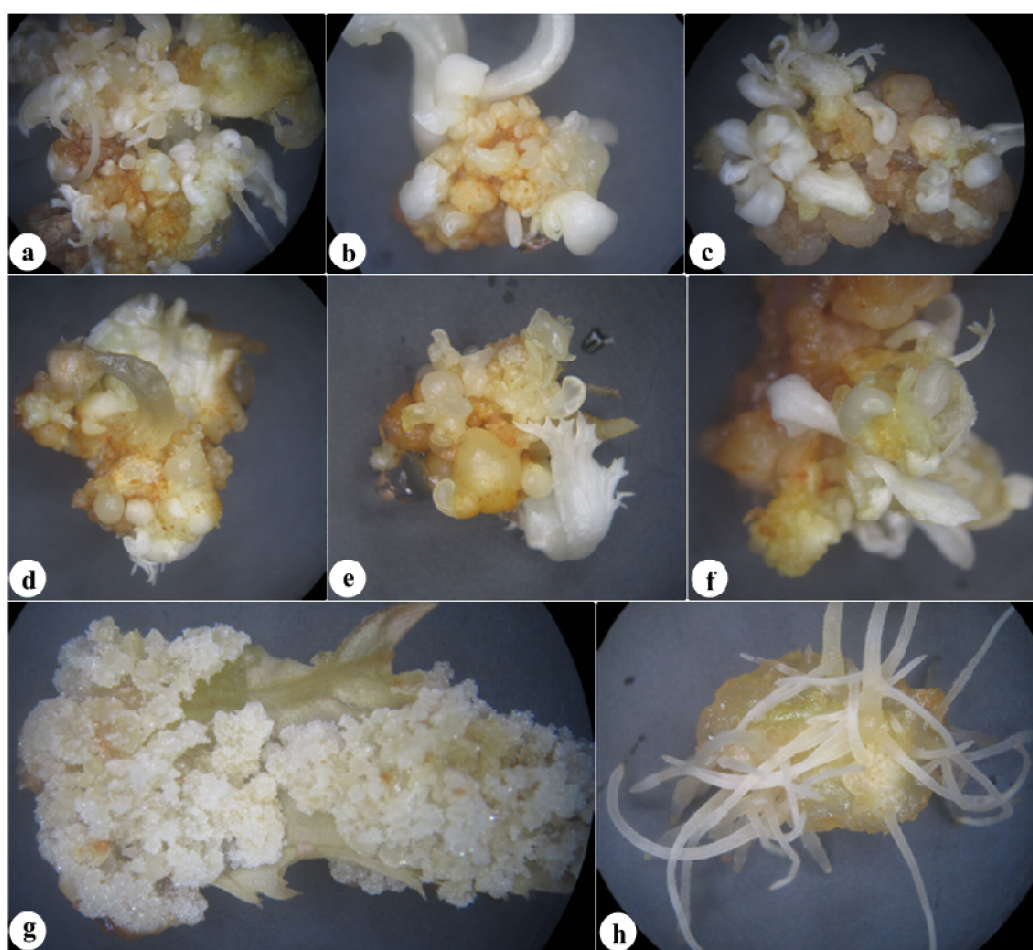
Ghi chú: Những chữ cái a, b, c,... trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt với mức ý nghĩa với $\alpha = 0,05$ trong phép thử Duncan.

Như vậy, có thể kết luận rằng, mẫu cuống lá ITCL_C được cắt với chiều dài 10mm sau đó chế làm đôi có độ dày 1mm không cho phản ứng tạo mô sẹo, trong khi nghiên cứu của Dương Tấn Nhựt và cs. (2012) nguồn mẫu cuống lá ITCL_C được để nguyên không chế. Những nghiên cứu trước đây cho thấy, cách cắt mẫu cũng ảnh hưởng đến sự phát sinh hình thái của mẫu cấy (Perez et al., 2010; Fernanda et al., 2006); và (4) thân rễ tTCL_R nuôi cấy trên môi trường có sự kết hợp 1 mg/l 2,4-D và 0,1 - 2 mg/l BA dưới cả điều kiện sáng và tối hoàn toàn và 1 mg/l BA

kết hợp 0,5 - 2 mg/l 2,4-D dưới điều kiện tối hoàn toàn (Bảng 2).

Kết quả thu được từ bảng 2 cũng cho thấy có sự phát sinh phôi từ mẫu cuống lá ITCL_C nuôi cấy trên môi trường có sự kết hợp 1 mg/l 2,4-D với 0,1 - 0,5 mg/l BA dưới điều kiện sáng và 1 mg/l 2,4-D kết hợp với 0,2 mg/l BA dưới điều kiện tối hoàn toàn.

Dưới các điều kiện chiếu sáng được khảo sát, môi trường có sự kết hợp 2,4-D và BA không thích hợp cho sự phát sinh rễ từ các loại mẫu cấy.



Hình 1. Sự phát sinh hình thái từ các nguồn mẫu khác nhau của cây sâm Ngọc Linh

Ghi chú: a. Mẫu lá tTCL_L tạo phôi trên môi trường có bổ sung 2 mg/l NAA nuôi ở điều kiện chiếu sáng; b. Mẫu thân rễ tTCL_R tạo phôi trên môi trường có bổ sung 0,2 mg/l NAA nuôi ở điều kiện chiếu sáng; c. Mẫu cuống lá ITCL_C tạo phôi trên môi trường có bổ sung 2 mg/l NAA nuôi ở điều kiện chiếu sáng; d. Mẫu lá tTCL_L tạo phôi trên môi trường có bổ sung 1 mg/l 2,4-D nuôi ở điều kiện tối; e. Mẫu thân rễ tTCL_R tạo phôi trên môi trường có bổ sung 0,2 mg/l 2,4-D nuôi ở điều kiện tối; f. Mẫu cuống lá ITCL_C tạo phôi trên môi trường có bổ sung 1 mg/l 2,4-D nuôi ở điều kiện chiếu sáng; g. Mẫu lá tTCL_L tạo mô sẹo trên môi trường có bổ sung 1 mg/l 2,4-D nuôi ở điều kiện tối; h. Mẫu cuống lá ITCL_C hình thành rễ trên môi trường có bổ sung 2 mg/l NAA nuôi ở điều kiện chiếu sáng.

Mô sẹo thu được ở các mẫu cấy được đặt dưới điều kiện sáng có cả dạng xộp, cứng với lượng mô sẹo nhiều, trong khi mẫu được đặt dưới điều kiện tối cho mô sẹo cứng và có màu vàng nhạt. Đặc điểm hình thái của rễ phát sinh trên môi trường kết hợp 2,4-D và BA có sự khác biệt rõ rệt với rễ thu được trên môi trường có bổ sung 2,4-D hoặc NAA (riêng lẻ). Rễ thu được trên các môi trường có sự kết hợp 2 loại chất điều hòa sinh trưởng thực vật này ngắn, không phân nhánh, có màu trắng trong, số lượng rất ít.

3.2. Thảo luận

Trong các nghiên cứu áp dụng kỹ thuật TCL, cuống lá *Panax ginseng* C.A. Meyer đã được nghiên cứu cảm ứng mô sẹo thành công bởi Jhang et al. (1974). Năm 1992, Jiu đã thành công trong việc tạo mô sẹo, phôi, chồi và cây con có nguồn gốc từ củ sâm. Các tTCL của thân, lá, rễ hoặc phôi cũng được sử dụng để nghiên cứu phát sinh phôi vô tính và tái sinh chồi ở nhiều loài khác nhau (Ahn et al., 1996; Gendy et al., 1996). Củ sâm được nghiên cứu cảm ứng mô sẹo đầu tiên bởi Butenko et al. (1968). Jhang et al. (1974) tiếp tục nghiên cứu khả năng cảm ứng mô sẹo từ củ *Panax ginseng* và phát sinh hình thái từ mô sẹo này; tuy nhiên, vẫn còn hạn chế khi biệt hóa cấu trúc từ mô sẹo phát triển thành rễ, phôi và cây con.

Trên đối tượng sâm Ngọc Linh, nghiên cứu của Trung tâm Sâm từ năm 1984 đã khảo sát ảnh hưởng của sự hình thành và tăng trưởng mô sẹo từ các bộ phận khác nhau của loài sâm này. Nghiên cứu cho thấy, mẫu lá có gân chính hình thành mô sẹo trong 3 - 4 tuần với tỷ lệ 100%, rễ hình thành trong 1 - 2 tuần với tỷ lệ 96,76%, còn thân phát sinh trong 4 tuần với tỷ lệ 100% và chỉ có 20% hạt hình thành mô sẹo trong vòng 12 tuần (Nguyễn Thượng Dong và cs., 2007).

Kết quả ghi nhận từ các thí nghiệm trên cho thấy sự phát sinh phôi vô tính, mô sẹo, rễ trên hầu hết các bộ phận của cây sâm *in vitro*. Trong đó, mẫu lá (tTCL) cho tỷ lệ phát sinh phôi vô tính trực tiếp cao hơn so với lớp mỏng thân rễ và cuống lá. Kết quả này ngược lại với kết quả của Ahn et al. (1996) trên đối tượng *Panax ginseng*.

Trong nghiên cứu này, khi so sánh các nghiệm thức có tạo rễ bất định trong cả hai điều kiện tối hoàn toàn và sáng, tỷ lệ hình thành rễ bất định trong điều kiện tối hoàn toàn cao hơn hẳn so với điều kiện chiếu sáng. Qua đó, thấy được, ánh sáng có ảnh hưởng rất lớn đến sự tạo rễ của đoạn cắt và góp phần quan trọng vào sự tạo rễ của đoạn cắt, chỉ cần cường độ ánh sáng thấp sẽ kích thích cho quá trình tạo rễ (Nhut et al., 2003).

Trong các nghiên cứu trên đối tượng thuộc chi Nhân sâm, nhiều tác giả sử dụng điều kiện tối để cảm ứng và nhân mô sẹo từ các cơ quan như rễ, lá, cuống lá, trụ dưới lá mầm... (Arya et al., 1991; Gao et al., 2005). Tuy nhiên, khi kết hợp giữa điều kiện chiếu sáng 16h/ngày với môi trường 1,0 mg/l 2,4-D và 0,01 mg/l Kinetin để cảm ứng tạo mô sẹo trên lá, cuống lá, cuống hoa và rễ của cây sâm Triều Tiên *in vitro*, Lim et al. (1997) nhận thấy lá và cuống lá phát sinh mô sẹo với tỷ lệ cao (98% và 100%), ngoài ra mô sẹo hình thành có khả năng biệt hóa tạo rễ về sau. Từ đó cho thấy, auxin và nồng độ auxin có vai trò rất lớn trong nghiên cứu tạo phôi vô tính, mô sẹo và tạo rễ ở các loài thuộc chi *Panax*.

KẾT LUẬN

Trong bốn nguồn mẫu được sử dụng: lá tTCL_L, cuống lá tTCL_C và lTCL_C và thân rễ tTCL_R được nuôi cấy đều cảm ứng phát sinh hình thái, mẫu lá tTCL_L cho khả năng phát sinh phôi trực tiếp cao nhất 89,6%. Tỷ lệ phát sinh mô sẹo cao nhất (91 - 98,8%) và tỷ lệ phát sinh rễ cao nhất (98,8%) được nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung 2,0 mg/l NAA dưới điều kiện chiếu sáng. Mẫu lá tTCL_L, cuống lá tTCL_C và lTCL_C, và thân rễ tTCL_R được nuôi cấy trên môi trường có bổ sung 2,4-D kết hợp với BA dưới cả điều kiện sáng và tối hoàn toàn; và môi trường có bổ sung 1,0 mg/l NAA đặt trong điều kiện tối hoàn toàn cho khả năng phát sinh mô sẹo cao nhất.

LỜI CẢM ƠN

Các tác giả xin chân thành cảm ơn Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã hỗ trợ kinh phí cho đề tài này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Nguyễn Thượng Dong, Trần Công Luận và Nguyễn Thị Thu Hương (2007). Sâm Việt Nam và một số cây thuốc họ nhân sâm. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật.
- Sách đỏ Việt Nam (1996). Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật.
- Ahn I.O., Le B.V., Gendy C., Tran Thanh Van K. (1996). Direct somatic embryogenesis through thin cell layer culture in *Panax ginseng*. Plant Cell Tiss. Org. Cult., 45: 237-243.
- Arya S., Liu J.R. and Eriksson T. (1991). Plant regeneration from protoplast of *Panax ginseng* C. A. Meyer through somatic embryogenesis. Plant Cell Rep., 10: 277-281.
- Bukento R.G., Brushwitzky I.V. and Slepian L.I. (1968). Organogenesis and somatic embryogenesis in the tissue of *Panax ginseng* C.A. Meyer. Bot. Zh., 7: 906-913.
- Ducan D.B. (1995). Multiple range and multiple F test. Biometrics, 11: 1-42.
- Duong Tan Nhut, Nguyen Phuc Huy, Hoang Xuan Chien, Tran Cong Luan, Bui The Vinh, Lam Bich Thao (2012). *In vitro* culture of petiole longitudinal thin cell layer explants of Vietnamese ginseng (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) and preliminary analysis of saponin content. International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology, 3: 178-190
- Fernanda Vidigal Duarte Souza, Begoña Garcia-Sogo, Antonio da Silva Souza, Amparo Pérez San-Juán and Vicente Moreno (2006). Morphogenetic Response of Cotyledon and Leaf Explants of Melon (*Cucumis melo* L.) cv. Amarillo Oro. Brazilian Archives of Biology and Technology, (1): 21-27.
- Gao X., Zhu C., Jia W., Gao W., Qiu M., Zhang Y. and Xiao P. (2005). Induction and characterization of adventitious roots directly from the explants of *Panax notoginseng*. Biotechnol. Lett., 27: 1771-1775.
- Gendy C., Sene M., Bui VL., Vidal J. and Tran Thanh Van K. (1996). Somatic Embryogenesis and plant regeneration in *Sorghum bicolor* (L.) Moench. Plant Cell Rep., 15: 900-904.
- Jhang J.J., Staba E.J. and Kim J.Y. (1974). American and Korean ginseng tissue culture: Growth, chemical analysis and plantlet production. *In Vitro*, 9(4): 253-259.
- J. Perez, N. Albany, J. Vilchez, S. Leon de Sierralta y M. Molina (2010). Effect of culture media on the *in vitro* multiplication of Aloe barbadensis Mill. Rev. Fac. Agron. (LUZ), 27: 447-459.
- Jiu S.Y. (1992). Plant generation from adventitious root-derived calli of ginseng (*Panax ginseng* C. A. Meyer). J. Agr. Assoc. China (NS), p. 41-48.
- Lim H.T. and Lee H.S. (1997). Regeneration of *Panax ginseng* C. A. Meyer by organogenesis DNA analysis of regenerants. Plant Cell Tiss. Org. Cult., 49: 179-187.
- Murashige T. and Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Plant Physiol., 15: 472-497.
- Nhut D.T., Le B.V., Tran Thanh Van K. and Thorpe T. (2003). Thin Cell Layer Culture System. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands.
- Tran Thanh Van K. (2003). Thin cell layer concept. In: Thin Cell Layer Culture System: regeneration and transformation applications, Nhut D.T., Le B.V., Tran Thanh Van K. and Thorpe T. (Eds). Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, p. 1-11.
- Tran Thanh Van K. and Mutaftschiev S. (1990). Signals influencing cell elongation, cell enlargement, cell division and morphogenesis. In: Progress in plant cellular and molecular biology, Nijkam H.J.J., Van Der Plas L.H.W. and Aartij J. (Eds.). Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, p. 514-519.
- Vũ Thị Hiền, Vũ Quốc Luận, Nguyễn Phúc Huy, Nguyễn Bá Nam, Bùi Văn Thế Vinh, Thái Xuân Du, Dương Tấn Nhựt (2014). Phát sinh phôi trực tiếp từ lá, cuống lá và thân rễ cây sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.). Tạp chí Sinh học, 36 (1se): 277-282.