

TẠO VÀ NHÂN PHÔI SOMA SÂM NGỌC LINH (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) TRONG MÔI TRƯỜNG LỎNG

Mai Trường¹, Trần Thị Ngọc Hà¹, Trần Trọng Tuấn¹, Phan Tường Lộc¹, Đỗ Đăng Giáp¹,
Bùi Đình Thạch¹, Nguyễn Thị Ngọc Hân¹, Phạm Đức Trí¹, Lê Tấn Đức¹,
Nguyễn Đức Minh Hùng¹, Nguyễn Văn Kết², Nguyễn Hữu Hồ^{2,1*}

¹Viện Sinh học nhiệt đới, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam,
²Trường Đại học Đà Lạt

Email*: nguyenhuuho2008@gmail.com

Ngày gửi bài: 07.08.2014

Ngày chấp nhận: 13.10.2014

TÓM TẮT

Bài báo giới thiệu một số kết quả nghiên cứu về tạo và nhân phôi soma sâm Ngọc Linh trong môi trường lỏng. Lá cây *in vivo* (sau khử trùng) được nuôi cấy trên môi trường MS có 1 mg/l 2,4-D + 0,2 mg/l kinetin để tạo mô sẹo. Sau đó, mô sẹo được cấy chuyển sang môi trường MS lỏng (lắc) có 1 mg/l 2,4-D + 0,2 mg/l kinetin + 500 mg/l casein hydrolysate để tạo huyền phù tế bào. Sau 2 tháng, huyền phù tế bào được chuyển sang nuôi cấy trong môi trường B5 lỏng (lắc) có 3 mg/l IBA. Sau nhiều tháng nuôi, rất nhiều phôi soma dạng cầu hình thành và có khả năng nhân ổn định. Mảnh lá mầm (của cây mầm từ phôi) và phôi soma non được nuôi cấy trên môi trường MS có 10% nước dừa (v/v), có hoặc không có 0,2 mg/l IBA để tạo mô sẹo sinh phôi và phôi thứ cấp. Mô sẹo sinh phôi và phôi thứ cấp này cũng đã được dùng để nuôi nhân trong môi trường lỏng có và không có chất điều hòa sinh trưởng ở quy mô bình tam giác và bioreactor. Những kết quả đã tạo cơ sở để nhân giống quy mô lớn và thu hợp chất thứ cấp.

Từ khóa: Nhân phôi soma, sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.), tạo phôi soma.

Studies on Induction and Multiplication of Somatic Embryos of Ngoc Linh Ginseng (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) in Liquid Medium

ABSTRACT

This paper presented results of induction and multiplication of somatic embryos of Ngoc Linh ginseng (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) in liquid media. Leaf explants of *in vivo* plants were cultured on MS agar medium supplemented with 1 mg/l 2,4-D + 0.2 mg/l kinetin for the induction of friable calli. The friable calli were cultured in MS liquid medium supplemented with 1 mg/l 2,4-D + 0.2 mg/l kinetin + 500 mg/l casein hydrolysate for the formation of a cell suspension. This cell suspension was cultured in a B5 liquid medium with 3 mg/l IBA for the formation of a globular somatic embryo suspension. Embryonic cotyledon explants and intact immature somatic embryos from this suspension were cultured on MS agar medium containing 10% (v/v) coconut water with/without 0.2 mg/l IBA for the induction of secondary embryogenic calli and somatic embryos. These embryogenic calli and somatic embryos were also cultured in liquid media with or without plant growth regulators in conical flasks and in bioreactors. The results have laid the foundations for large-scale plant micropropagation and production of secondary metabolites.

Keywords: Ngoc Linh ginseng (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.), somatic embryo induction, somatic embryo multiplication.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hệ thống phôi soma (somatic embryo system) vừa là mục tiêu vừa là vật liệu đối với

các nghiên cứu có đích là phát sinh hình thái, nhân giống, tạo giống và thu hợp chất thứ cấp (Tripathi and Tripathi, 2003; Paek et al., 2005; Hussein et al., 2006; Ozlem et al., 2010; Sun

and Hong, 2012). Trong nghiên cứu liên quan đến hợp chất thứ cấp, phôi soma là vật liệu luôn được quan tâm do nó là hệ thống mang tính biệt hóa, hàm chứa lượng hợp chất thứ cấp thường cao hơn so với hệ thống tế bào phân biệt hóa (de-differentiated). Đối với các cây họ Sâm (Araliaceae), trên thế giới đã có một số kết quả công bố về nuôi nhân mô sẹo sinh phôi (embryogenic) của sâm Triều Tiên (*Panax ginseng* C.A. Meyer) trong môi trường lỏng/thạch không bổ sung/bổ sung chất điều hòa sinh trưởng (Arya et al., 1993; Asaka et al., 1993; Choi et al., 2003; Paek et al., 2005; Kim et al., 2012), của sâm *Panax quinquefolius* (Zhou and Brown, 2006) và của sâm *Panax notoginseng* (You et al., (2012). Riêng sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.), một cây thuốc quý đặc hữu của nước ta, đến nay đã có một số công trình công bố kết quả nghiên cứu tạo phôi soma (Nhut et al., 2012a,b; Ngô Thanh Tài và cs., 2013), nhưng chưa ghi nhận được công bố nào liên quan đến nghiên cứu nuôi nhân phôi soma trong môi trường lỏng, đặc biệt là nuôi nhân trong môi trường không sử dụng chất điều hòa sinh trưởng tổng hợp.

Nội dung bài này trình bày kết quả tạo một số loại mô tiền thể, nuôi nhân sinh khối mô phôi trong môi trường lỏng phục vụ mục đích dài hạn là tạo sinh khối quy mô lớn để có thể dùng trong nhân giống và thu hợp chất thứ cấp.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu

Mẫu lá sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) do Trung tâm Nghiên cứu trồng và chế biến cây thuốc Đà Lạt - Công ty Vimedimex cung cấp.

2.2. Phương pháp

2.2.1. Khử trùng mẫu, chuẩn bị mẫu cấy và tạo mô sẹo xộp từ lá cây in vivo

Lá chết của cây sâm 6 tháng tuổi (từ củ) ở vườn ươm 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 - hai giọt/100ml dung dịch) trong 10 phút và dung dịch HgCl₂ 0,1% (w/v) trong 5 phút. Lá đã khử trùng được cắt thành các mảnh kích thước 0,5 x 0,5cm và cấy trên môi trường thạch MS (Murashige and Skoog, 1962) có 1 mg/l 2,4-D; 0,2 mg/l kinetin theo chiều mặt trên của lá hướng lên để tạo mô sẹo. Ghi nhận kết quả thí nghiệm sau khoảng 1,5 tháng nuôi. Sau đó, cấy chuyển mô sẹo trong khoảng 4 tháng (1 lần/tháng) trên cùng môi trường để tạo mô sẹo xộp.

2.2.2. Tạo huyền phù tế bào và huyền phù phôi dạng cầu (phôi sơ cấp)

Để tạo huyền phù tế bào (HPTB), nuôi lác 2g mô sẹo xộp trong bình tam giác (250ml) chứa 50ml môi trường MS có 1 mg/l 2,4-D; 0,2 mg/l kinetin (Duong Tan Nhut et al., 2011, nhưng thay TDZ bằng kinetin) và 500 mg/l casein hydrolysate. Dùng que cấy ép nhẹ mô sẹo vào thành bình tam giác để mô rã và treo vào môi trường thành huyền phù (suspension) tế bào khởi nguyên. Sau 2 tháng nuôi, huyền phù tế bào được chuyển sang nuôi cấy trong môi trường B5 (Gamborg, 1968) lỏng lác có 3 mg/l IBA (Mai Trường và cs., 2013) để tạo và nhân huyền phù phôi cầu (HPPC). Ghi nhận sự hình thành phôi cầu đồng thời loại bỏ dần tế bào/cụm tế bào không sinh phôi theo thời gian từ 2 tháng nuôi cấy trở đi. Phôi dạng cầu có thể phát triển thành phôi trưởng thành và tạo chồi khi được cấy chuyển sang môi trường thạch 1/2MS + 0,5 mg/l BA + 1 mg/l GA₃; môi trường nuôi cấy từ phôi: 1/2MS có bổ sung 0,5 mg/l BA, 1 mg/l IBA và 500 mg/l than hoạt tính (Mai Trường và cs., 2013).

2.2.3. Tạo mô sẹo sinh phôi và phôi từ nuôi cấy lá mầm (cotyledon) và phôi non

Cấy các mảnh lá mầm (dài ≈ 0,8cm) từ cây mầm (phôi có đầy đủ chồi và rễ) và phôi non in vitro (dài ≈ 1cm, có rễ nhưng chưa có lá mầm) trên môi trường thạch MS có 10% nước dừa, có và không có 0,2 mg/l IBA. Theo dõi, ghi nhận sự hình thành mô sẹo sinh phôi và phôi (có hai lá mầm) sau 3 tháng nuôi. Nội dung thực hiện này nhằm mục đích tạo nguồn vật liệu mô sẹo sinh phôi cho nghiên cứu nuôi nhân bằng môi trường lỏng.

2.2.4. Nuôi phôi dạng cầu trong môi trường lỏng tạo sinh khối cụm phôi trưởng thành (có lá mầm và rễ mầm)

Cấy 2 g mô phôi cầu vào bình tam giác 250ml chứa 50ml môi trường SH (Schenk and Hildebrandt, 1972) có NAA (1 và 2 mg/l) và IBA (1 và 2 mg/l). Ghi nhận kết quả sau 2,5 tháng nuôi. Cụm mô phôi có rễ tạo được dùng làm vật liệu nuôi cấy bằng bioreactor.

2.2.5. Nuôi nhân mô sẹo sinh phôi trong bình tam giác và bằng bioreactor:

Cấy nuôi 5g (5% - w/v) mô sẹo sinh phôi vào bình tam giác 250ml chứa 100ml môi trường 1/2SH không có và có 10% nước dừa. Cấy nuôi 50g mô vào bioreactor dạng cầu/trụ (3 và 10 lít) với dung tích (2 lít và 5,5 lít, theo thứ tự) môi trường 1/2SH có 10% nước dừa. Ghi nhận kết quả sau 1 tháng nuôi trong bioreactor bằng cách cân trọng lượng tươi (g).

2.2.6. Nuôi nhân cụm phôi có rễ bằng bioreactor

Cấy 50 g mô cụm phôi trưởng thành vào bioreactor dạng cầu (3 và 5 lít) chứa 2 lít - 2,5% (w/v) và 3,5 lít - 1,5% (w/v), theo thứ tự, môi trường SH có 1 mg/l và 2 mg/l IBA. Ghi nhận kết quả sau 1 tháng nuôi cấy.

2.2.7. Điều kiện nuôi cấy

Để ở điều kiện sáng (10 giờ chiếu sáng/ngày; cường độ ánh sáng \approx 2.000 - 3.000lux tùy trường hợp), nhiệt độ 25 - 28°C đối với nuôi mô sẹo sinh phôi, cụm phôi có rễ, chồi

và cây. Để tối ở nhiệt độ 24°C trong tủ nuôi đối với nuôi tạo và nhân mô sẹo. Nuôi lắc được thực hiện ở tốc độ 110 vòng/phút. Nuôi bioreactor dùng tốc độ thổi khí 0,1vvm.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Tạo huyền phù tế bào và huyền phù phôi dạng cầu

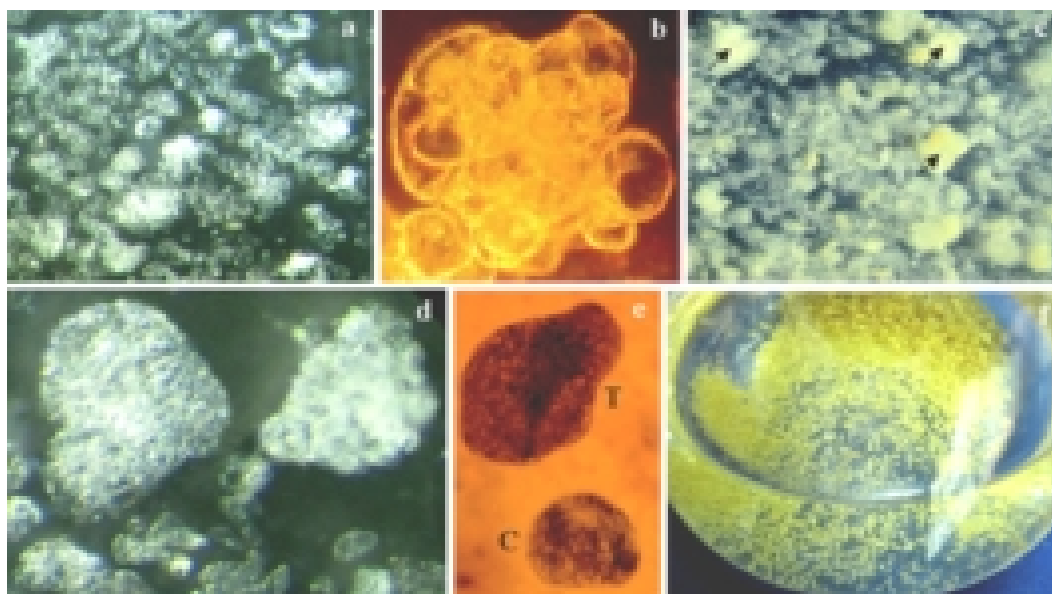
Các mảnh lá (sau khử trùng) được nuôi cấy trên môi trường MS có 1 mg/l 2,4-D; 0,2 mg/l kinetin để tạo mô sẹo. Kết quả nuôi cấy cho thấy mô sẹo hình thành trên khắp bề mặt phiến lá và rìa lá (Hình 1a) sau khoảng 1,5 tháng nuôi. Qua nhiều lần cấy chuyển nhân sinh khối trên cùng môi trường nhận thấy mô sẹo dần hóa xốp (friable), có màu trắng hơi ngà (Hình 1b) và loại mô này được sử dụng để tạo huyền phù tế bào (HPTB). Trạng thái xốp của mô tạo thuận lợi cho sự hình thành HPTB mịn (Hình 1c) chỉ sau khoảng 1 tháng nuôi cấy. Sau đó HPTB được duy trì ổn định qua cấy chuyển 15 - 20 ngày/lần trong cùng môi trường (Hình 1d).

Sự tăng sinh khối của HPTB là do sự phân chia tế bào của quần thể cụm tế bào nuôi cấy (Hình 2a) với hình dạng cụm đa bào đặc trưng (Hình 2b). Để tạo huyền phù phôi soma dạng cầu, sau 2 tháng nuôi cấy trong môi trường như trên, HPTB được chuyển sang nuôi cấy trong môi trường B5 có bổ sung 3 mg/l IBA. Sau khoảng 1,5 tháng nuôi nhận thấy có sự hình thành nhiều cụm đa bào ở đáy bình nuôi (Hình 2c) - tiền đề thuận lợi cho sự hình thành phôi soma sau đó (Hình 2 d,e). Theo thời gian nuôi,



Hình 1. Tạo huyền phù tế bào từ nuôi cấy mô sẹo xốp trong môi trường lỏng lắc

Ghi chú : a. Sự hình thành mô sẹo từ mảnh lá chết nuôi cấy *in vitro*, sau 1,5 tháng; b. Mô sẹo xốp dùng nuôi cấy tạo huyền phù tế bào; c. Huyền phù tế bào sau 1 tháng nuôi cấy; d. Huyền phù tế bào đã được nuôi nhân ổn định (trong bình tam giác 500ml)



Hình 2. Tạo huyền phù phôi dạng cầu từ huyền phù tế bào

Ghi chú : a. Quần thể các cụm tế bào huyền phù sau 1 tháng nuôi cấy; b. Cận cảnh cụm đa bào trong nuôi cấy; c. Sự hình thành bước đầu các cụm đa bào có khả năng sinh phôi (vị trí mũi tên); d. Giai đoạn đầu của sự hình thành phôi; e. Thể phôi soma dạng cầu (C) và dạng tim (T) gần hoàn chỉnh hình thành sau 4 tháng nuôi cấy huyền phù tế bào; f. Quần thể phôi soma chủ yếu dạng cầu hình thành sau 5 tháng nuôi cấy (hình a, c, d: quan sát mẫu dưới kính hiển vi soi nổi, vật kính 4X; hình b,e: quan sát mẫu dưới kính hiển vi soi ngược, vật kính 20X)

sự hình thành cụm mô sinh phôi ngày càng nhiều; quá trình cấy chuyên nhân sinh khối mô sinh phôi đồng thời với việc loại bỏ dần các cụm tế bào không có khả năng sinh phôi. Sự hình

thành huyền phù phôi cầu (HPPC) có thể được hoàn thành sau 4 - 6 tháng nuôi với huyền phù toàn phôi cầu, không còn tế bào chưa biệt hóa (Hình 2f).



Hình 3. Quá trình phát triển của phôi soma từ dạng cầu đến giai đoạn thành cây hoàn chỉnh

Ghi chú : a. Quần thể phôi cầu trong môi trường lỏng; b. Phôi ở các giai đoạn dạng tim, thủy lồi và có cực rễ nuôi cấy trong môi trường lỏng; c. Quần thể phôi trưởng thành với rễ phát triển trong môi trường lỏng; d, e, f. Sự phát triển của phôi trưởng thành tạo cây con hoàn chỉnh; f. Cây phát triển có nguồn gốc từ phôi đơn (thanh ngang 1mm)

Hiện diện trong HPPC còn có dạng phát triển khác của phôi như dạng tim, thủy lồi và dạng có rễ khá phát triển (Hình 3a, b). Hầu hết các phôi của huyền phù đều có khả năng phát triển thành phôi trưởng thành (Hình 3c, d), tạo chồi và thành cây mầm, cây con hoàn chỉnh với đầy đủ rễ thân và lá (Hình 3e, f, g). Kết quả này có thể được sử dụng nhằm mục đích nhân giống.

3.2. Tạo mô sẹo sinh phôi và phôi thứ cấp từ nuôi cấy lá mầm và phôi non

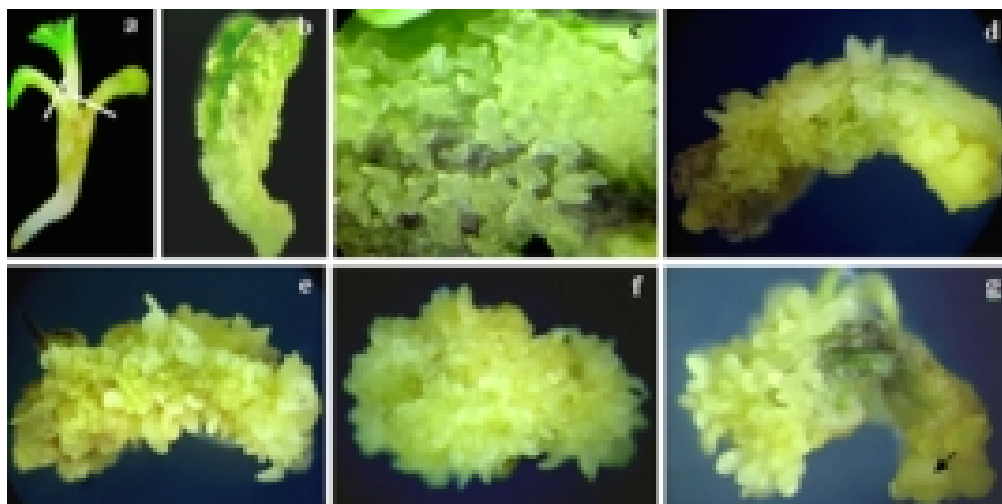
Các lá mầm, cắt ra từ cây mầm *in vitro* (Hình 4a) được nuôi cấy trên môi trường MS có 10% nước dừa và môi trường MS có 10% nước dừa và 0,2 mg/l IBA nhằm tạo mô sẹo sinh phôi và phôi; kết quả nuôi cấy ược trình bày ở bảng 1. Sau khoảng 1/2 tháng nuôi nhận thấy lá mầm phát triển to ra (đến cuối giai đoạn nuôi

có thể đạt kích thước 1,5 - 2cm), trên bề mặt hình thành nhiều cụm mô nhỏ (Hình 4b) và rất nhiều các phôi đơn - sau đó tạo cụm phôi sau khoảng 3 tháng nuôi trên môi trường không có IBA (Hình 4c, d, e, f). Trên môi trường có IBA, ghi nhận ngoài sự tạo phôi còn có hiện tượng hình thành mô sẹo sinh phôi (MSSP) chủ yếu ở gốc lá mầm (Hình 4g), theo chúng tôi, kết quả này là do ngoài tác động của auxin tự nhiên có trong nước dừa (Yong et al., 2009) còn có tác động của IBA bổ sung và việc sử dụng nước dừa trong nuôi cấy (Nguyễn Việt Cường và cs., 2013). Nhìn chung, số lượng phôi hình thành/mẫu trên môi trường không có IBA nhiều hơn trên môi trường có IBA. Bởi vì, trên môi trường không có IBA, ở lá mầm cũng có sự hình thành mô sẹo và chúng nhanh chóng chuyển sang trạng thái phôi sau đó.

Bảng 1. Kết quả tạo mô sẹo sinh phôi và phôi từ nuôi cấy lá mầm, sau 3 tháng

Môi trường nuôi cấy	Nước dừa (ml/l)	IBA (mg/l)	Phần trăm mẫu tạo phôi (%)	Số phôi TB/mẫu cấy	Sự hình thành mô sẹo
MS	100	0	100	206,67 ± 9,71	++
	100	0,2	100	113,00 ± 10,54	+
T-Test			ns	**	

($P < 0,01$)



Hình 4. Tạo mô sẹo sinh phôi và phôi từ lá mầm nuôi cấy *in vitro*

Ghi chú : a. Cắt thu lá mầm từ cây mầm làm vật liệu nuôi cấy (nơi thanh chéo là vị trí cắt); b. Lá mầm sau 15 ngày nuôi cấy; c. Sự hình thành phôi đơn và cụm phôi trên bề mặt lá mầm (quan sát dưới kính hiển vi soi nổi dùng vật kính 4X); d, e, f. Sự phát triển theo thời gian tạo quần thể lớn phôi có lá mầm trên môi trường không có IBA; g. Sự hình thành đồng thời mô sẹo sinh phôi (vị trí mũi tên) và phôi có lá mầm ở mẫu nuôi cấy trên môi trường có IBA

Bảng 2. Kết quả tạo phôi từ nuôi cấy phôi non, sau 3 tháng

Môi trường nuôi cấy	Nước dừa (ml/l)	IBA (mg/l)	Phần trăm mẫu tạo phôi (%)	Số phôi TB/mẫu cấy
MS	100	0,2	100	61,33 ± 7,09
	100	0	100	114,67 ± 6,43
T-test			ns	*

(0,01 < P = 0,02 < 0,05)

Đối với thể nuôi cấy là phôi non (Hình 5a), kết quả tạo phôi được trình bày ở bảng 2. Tương tự trường hợp trên, số phôi hình thành/mẫu cũng nhiều hơn trên môi trường chỉ có nước dừa và không có IBA. Trên môi trường có nước dừa và 0,2 mg/l IBA, sau giai đoạn thân phôi non phù ra, cũng ghi nhận được sự hình thành MSSP và các 'nốt' mô nhỏ dạng cầu (Hình 5b); MSSP với phôi cầu nhỏ (Hình 5c) ở vị trí đầu phôi sau 1,5 tháng nuôi cấy. Phôi cũng có thể hình thành ở cả vị trí đầu phôi và thân phôi (Hình 5d), ở đầu phôi và rễ phôi (Hình 5e); phôi hình thành ở dạng đơn và dạng cụm nhỏ. Trên môi trường không có 0,2 mg/l IBA, sự đáp ứng với nuôi cấy có khuynh hướng tạo thành cụm phôi to (Hình 5f) sau nhiều tháng nuôi cấy.

Cụm phôi có thể phát triển tạo lá mầm hoàn chỉnh và tạo chồi sau giai đoạn chuyển sang nuôi cấy trên môi trường 1/2MS có bổ sung 0,5 mg/l IBA và 1 mg/l GA₃ (hình 5g).

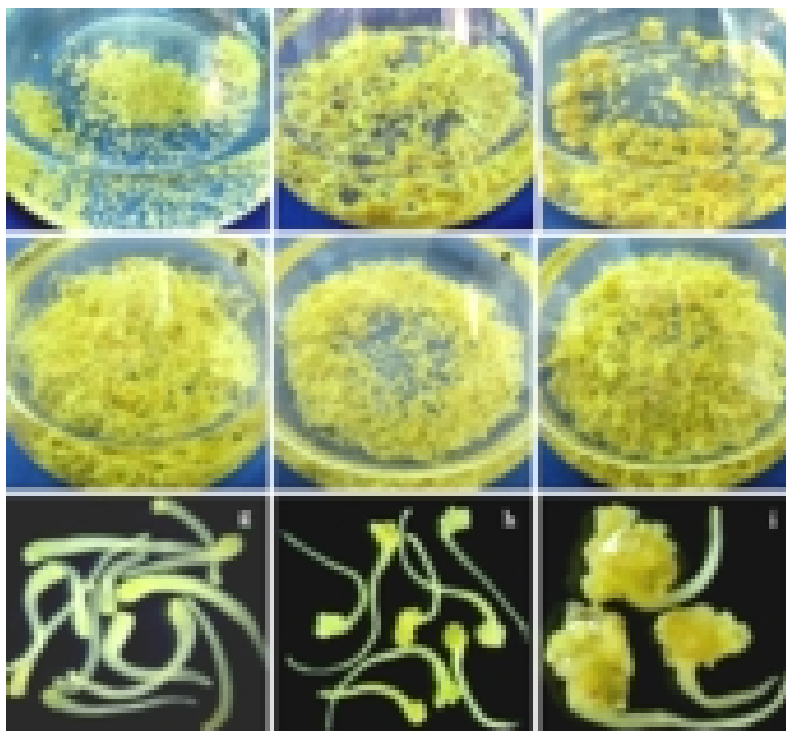
3.3. Nuôi phôi dạng cầu trong môi trường lỏng tạo sinh khối cụm mô phôi có rễ

Huyền phù phôi cầu sau giai đoạn nhân sinh khối (Hình 6a) được sử dụng để tạo và nhân cụm phôi ở giai đoạn biệt hóa phát triển hơn - có rễ. Trong môi trường SH có 1 mg/l NAA, phôi có rễ hình thành nhiều, rễ phôi trắng hơi phù; đầu phôi tăng sinh khối tạo cụm mô phôi - kích thước ≈ 0,5mm (Hình 6b); trong môi trường có 2 mg/l NAA, phôi có rễ ít hình thành, cụm mô ở đầu phôi có kích thước rất to - gần 1cm



Hình 5. Tạo mô sẹo sinh phôi và phôi từ phôi non nuôi cấy *in vitro*

Ghi chú : a. Phôi non dùng nuôi cấy; b. Sự hình thành MSSP và các 'nốt' mô tròn nhỏ sau 1,5 tháng nuôi cấy trên môi trường có IBA; c. Sự hình thành MSSP và phôi ở vị trí đầu phôi; d. Sự hình thành phôi ở vị trí đầu phôi và thân phôi; e. Sự hình thành phôi ở vị trí đầu phôi và rễ phôi; f. Một cụm phôi soma điển hình hình thành qua nuôi cấy trên môi trường không có IBA, sau 3 tháng; g. Cụm phôi với lá mầm và chồi phát triển ở giai đoạn nuôi cấy tiếp theo



Hình 6. Tạo cụm mô phôi có rễ trong môi trường lỏng lác

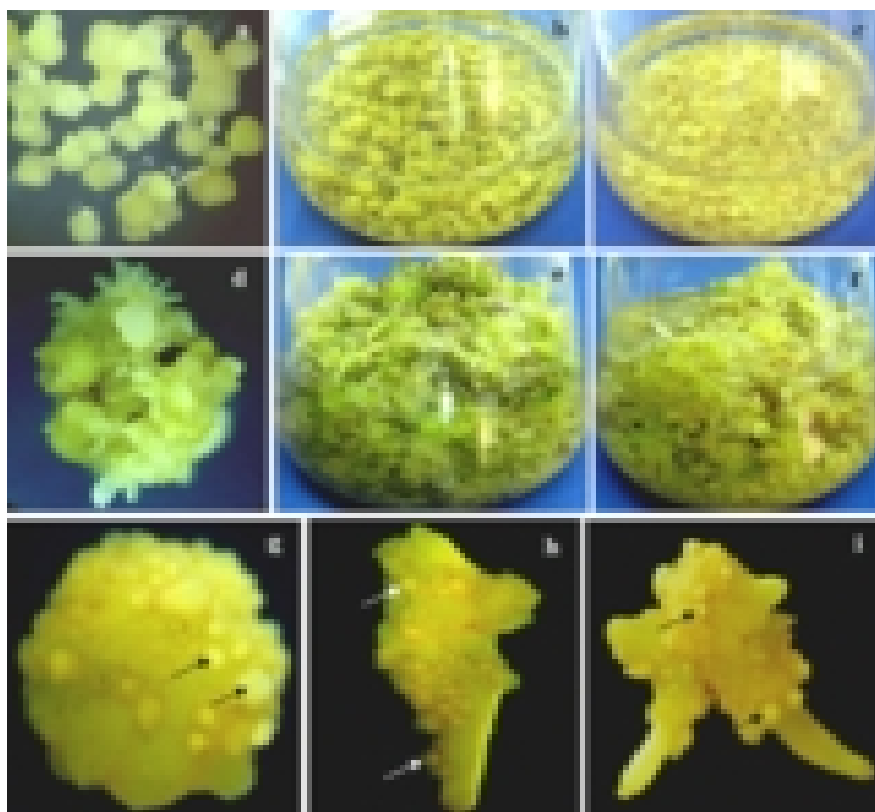
Ghi chú : a. Vật liệu phôi dạng cầu dùng làm thí nghiệm; b, c. Sự tăng sinh khối của phôi cầu trong môi trường có 1 mg/l NAA và 2 mg/l NAA, theo thứ tự; d, e, f. Sự tăng sinh khối của phôi cầu trong môi trường không có chất điều hòa sinh trưởng (đối chứng), 1mg/l IBA và 2 mg/l IBA, theo thứ tự; g,h,i. Hình phóng đại của các phôi lần lượt trong môi trường không có IBA, 1mg/l IBA và 2 mg/l IBA (quan sát dưới kính hiển vi soi nổi dùng vật kính 4X)

(Hình 6c). Các cụm mô này có khả năng tăng sinh khối nhanh; trọng lượng tươi mô ở hai môi trường trên đạt 11,2g và 12,8g theo thứ tự sau 2,5 tháng nuôi. Trong môi trường có 1 mg/l và 2 mg/l IBA, rễ phôi mảnh hơn, ở đầu phôi cũng có hiện tượng tạo cụm mô nhưng có kích thước nhỏ hơn so với ở môi trường có NAA (Hình 6e, f, h, i); trọng lượng tươi mô ở hai môi trường trên đạt 12,4g và 15,3g theo thứ tự sau 2,5 tháng nuôi. Ở nghiệm thức không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng (ĐHST), rễ phôi dài, đầu phôi không có/biểu hiện ít hiện tượng tạo cụm mô (Hình 6d, g), sinh khối mô tươi đạt khoảng 13g. Các cụm mô phôi có rễ tạo được trong môi trường có IBA được dùng làm vật liệu nuôi cấy bằng bioreactor ở giai đoạn tiếp theo.

3.4. Nuôi nhân mô sẹo sinh phôi trong bình tam giác và bằng bioreactor

Các cụm MSSP (Hình 7a) hình thành từ nuôi cấy lá mầm và phôi non được dùng để nuôi

nhân trong môi trường lỏng 1/2SH không có/có 10% nước dừa (không dùng chất ĐHST tổng hợp) chứa trong bình tam giác. Kết quả bước đầu cho thấy MSSP có thể tăng sinh khá tốt trong môi trường có và không có nước dừa; cũng ghi nhận được phôi có rễ hình thành trong quá trình nuôi cấy. Tuy nhiên cần nuôi với mật độ cao (10g mô/100ml môi trường trong bình tam giác 250ml) ở trường hợp môi trường không bổ sung nước dừa; ngược lại, mô phát triển kém khi nuôi với mật độ thấp (5g/100ml). Ở trường hợp có nước dừa, mô chuyển sang màu vàng và tăng sinh khối nhanh (Hình 7c) so với mô nuôi trong môi trường không có nước dừa - mô có màu hơi xanh lục (Hình 7b). Trọng lượng tươi mô ở môi trường có nước dừa đạt 29,7g sau 2 tháng nuôi. Theo chúng tôi, nước dừa với thành phần dinh dưỡng và chất ĐHST tự nhiên (Yong et al., 2009) đã tạo kích thích cho mô tăng sinh khối. Về mặt mô học, cơ sở của sự tăng sinh khối ở cả hai trường hợp trên là do có sự hình thành các



Hình 7. Nuôi lỏng lác nhân mô sẹo sinh phôi trong bình tam giác

Ghi chú : a. Mô sẹo sinh phôi dùng nuôi cấy; b. Mô sẹo sinh phôi nuôi cấy trong môi trường 1/2SH, sau 2 tháng; c. Mô sẹo sinh phôi nuôi cấy trong môi trường 1/2SH có 10% nước dừa, sau 2 tháng; d. Mô phôi giai đoạn có lá mầm dùng nuôi cấy; e. Mô phôi giai đoạn tạo lá mầm nuôi cấy trong môi trường 1/2SH, sau 2 tháng; f. Mô phôi giai đoạn tạo lá mầm nuôi cấy trong môi trường 1/2SH có 10% nước dừa, sau 2 tháng; g, h, i. Cận cảnh sự hình thành các ‘nốt’ mô nhỏ trên bề mặt cụm mô sẹo sinh phôi và phôi có rễ trong quá trình nuôi cấy lỏng (vị trí mũi tên)



Hình 8. Nuôi nhân mô sẹo sinh phôi bằng bioreactor 3 lít và 10 lít chứa môi trường 1/2SH có 10% nước dừa

Ghi chú: a. Nuôi nhân mô sẹo sinh phôi bằng bioreactor dạng cầu 3 lít, sau 1 tháng nuôi cấy; b. Nuôi nhân mô sẹo sinh phôi bằng bioreactor dạng cầu 10 lít, sau 1 tháng nuôi cấy (vị trí mũi tên chỉ mức khởi điểm lượng sinh khối mô ở ngày nuôi cấy đầu tiên)

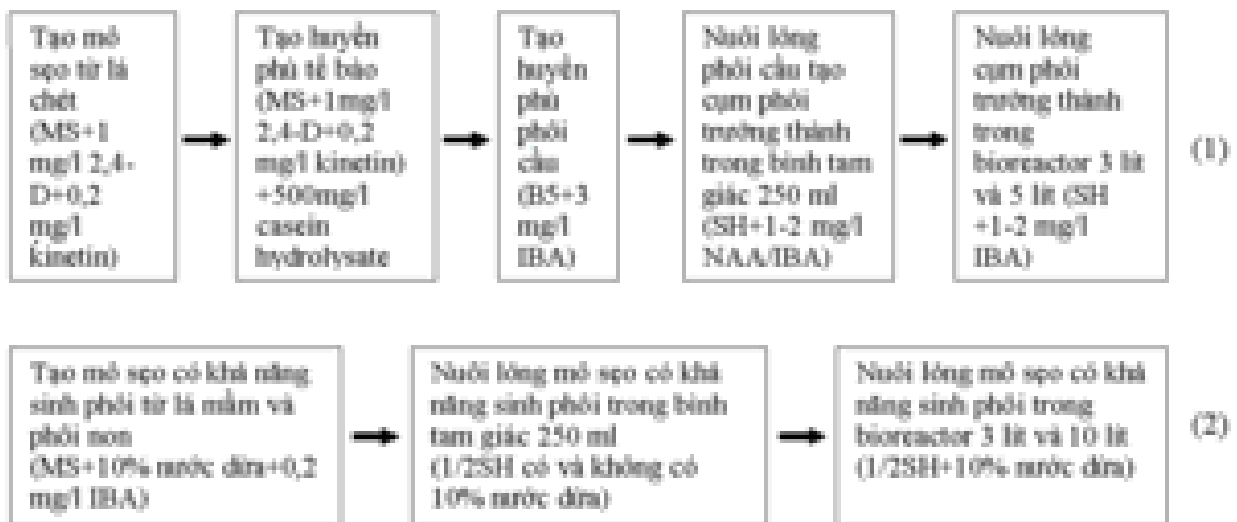
‘nốt’ mô tròn nhỏ - tương tự tiên phiêu trên khắp bề mặt cụm MSSP (Hình 6g) và phiêu đơn/kép (Hình 7h, i). Nếu dùng cụm mô phiêu giai đoạn có lá mầm (Hình 7d), mô tăng sinh nhanh, tạo nhiều rễ phiêu; mô có màu xanh hơn ở trường hợp không có nước dừa (Hình 7e) so với môi trường có nước dừa (Hình 7f); trọng lượng tươi mô ở hai môi trường không có và có nước dừa lần lượt là 40,3g và 44,5g sau 2 tháng nuôi. Ở cây họ Sâm, nghiên cứu nuôi nhân mô phiêu soma sâm Triều Tiên không dùng chất ĐHST đã được thực hiện thành công qua sử dụng môi trường khoáng đơn giản 1/3MS (Choi et al., 2003; Kim et al., 2012). Tuy nhiên, trong nước và quốc tế chưa ghi nhận công bố nào về kết quả nghiên cứu nuôi nhân mô phiêu soma sâm Ngọc Linh không dùng chất ĐHST tổng hợp ở các quy mô khác nhau. Việc nuôi cấy có kết quả loại mô này, đặc biệt nuôi bằng hệ thống bioreactor, không dùng chất ĐHST mở ra triển vọng tạo được ‘sản phẩm sạch’ dư lượng MSSP từ nuôi cấy trong môi trường có nước dừa được dùng để nuôi nhân sinh khối trong cùng môi trường bằng bioreactor thể tích 3 lít và 10 lít (Hình 8a, b). Kết quả cho thấy mô tăng sinh khối rất nhanh chỉ sau một thời gian

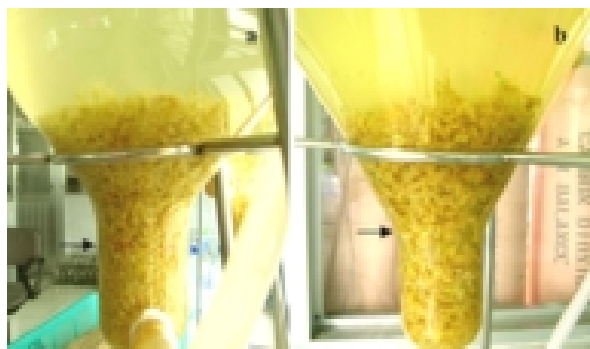
ngắn nuôi cấy. Với trọng lượng mô tươi cấy ban đầu là 50g, mô tăng sinh khối trong bioreactor 3 lít và 10 lít - đạt lần lượt gần 150g (gấp ≈ 3 lần) và 252g (gấp ≈ 5 lần) sau 1 tháng nuôi.

3.5. Nuôi nhân cụm phiêu có rễ bằng bioreactor

Như đã trình bày, cụm phiêu có rễ từ nuôi cấy phiêu dạng cầu trong môi trường có 1 mg/l và 2 mg/l IBA (Hình 6h, i) được sử dụng trong nuôi cấy bằng bioreactor 3 lít và 5 lít trong môi trường tương ứng (Hình 9a, b). Kết quả bước đầu cho thấy, trong môi trường SH có 1 mg/l và 2 mg/l IBA, mô tăng sinh khối rất nhanh và có kết cấu hình thái tương tự như được nuôi trong bình tham giác. Kết quả bước đầu cho thấy trong môi trường có 2 mg/l IBA với lượng mô cấy ban đầu 50g, sinh khối mô tăng gần 7 lần sau 2 tháng nuôi cấy (≈ 350 g). Kết quả này tạo tiền đề cho việc triển khai nuôi nhân với quy mô lớn hơn. Kiểm tra hợp chất thứ cấp saponin đang được thực hiện.

Dưới đây là sơ đồ tóm tắt hai mảng nội dung nghiên cứu đã trình bày ở trên.





Hình 9. Nuôi nhân cụm phôi có rễ bằng bioreactor 3 lít và 5 lít

Ghi chú : a. Nuôi nhân cụm phôi có rễ bằng bioreactor dạng trụ 3 lít, sau 1 tháng nuôi cấy trong môi trường SH có 1 mg/l IBA; b. Nuôi nhân cụm phôi có rễ bằng bioreactor dạng cầu 5 lít, sau 1 tháng nuôi cấy trong môi trường có 2 mg/l IBA (vị trí mũi tên chỉ mức khối điểm lượng sinh khối mô ở ngày nuôi cấy đầu tiên).

4. KẾT LUẬN

Ứng dụng phương pháp nuôi cấy mô tế bào thực vật *in vitro* trên đối tượng sâm Ngọc Linh, từ vật liệu ban đầu là mô sẹo lá cây *in vivo*, nghiên cứu đã thành công trong tạo và nuôi nhân huyền phù phôi soma dạng cầu dùng môi trường B5 có 3 mg/l IBA từ nuôi cấy tế bào trong môi trường lỏng; nuôi nhân sinh khối mô sẹo sinh phôi không dùng chất điều hòa sinh trưởng trong bình tam giác và bioreactor dùng môi trường 1/2SH có và không có 10% nước dừa. Nuôi nhân sinh khối cụm mô phôi có rễ bằng bioreactor cũng được thực hiện có kết quả dùng môi trường SH có bổ sung 1-2 mg/l IBA. Kết quả nuôi cấy thành công các loại hệ thống mô nói trên tạo tiền đề cho việc nhân giống sâm thông qua phôi soma và 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 thành phố Hồ Chí Minh đã tài trợ cho các nội dung riêng ở nghiên cứu này. Xin cảm ơn TS. Vương Chí Hùng - Trung tâm Nghiên cứu trồng và chế biến cây thuốc Đà Lạt đã cung cấp mẫu lá làm thí nghiệm. Công trình 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

- Nguyễn Việt Cường, Hồ Thanh Tâm, Nguyễn Bá Nam, Hà Thị Mỹ Ngân, Lê Kim Cương, Nguyễn Phúc Huy, Dương Tấn Nhựt (2013). Nghiên cứu ảnh hưởng của một số chất hữu cơ và bạc nitrate (AgNO_3) lên sự sinh trưởng và phát triển của cây sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) nuôi cấy *in vitro*. Báo cáo khoa học Hội nghị Khoa học công nghệ sinh học toàn quốc 2013. Nhà xuất bản Khoa học Tự nhiên và Công nghệ, tr. 727-731.
- Ngô Thanh Tài, Nguyễn Bá Nam, Hồ Thanh Tâm, Hà Thị Mỹ Ngân, Dương Tấn Nhựt (2013). Nghiên cứu tác động của ánh sáng đèn LED lên khả năng tăng sinh mô sẹo và sự hình thành cây hoàn chỉnh từ phôi vô tính cây sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.). Báo cáo khoa học Hội nghị Khoa học công nghệ sinh học toàn quốc 2013. Nhà xuất bản Khoa học Tự nhiên và Công nghệ, tr. 1038-1042.
- Mai Trường, Trần Thị Ngọc Hà, Phan Tường Lộc, Lê Tấn Đức, Trần Trọng Tuấn, Đỗ Đăng Giáp, Bùi Đình Thạch, Phạm Đức Trí, Nguyễn Đức Minh Hùng, Nguyễn Thị Thanh, Nguyễn Văn Kết, Trần Công Luận, Nguyễn Hữu Hồ (2013). Nghiên cứu nuôi cấy mô sẹo có khả năng sinh phôi và mô phôi soma sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.). Tạp chí Sinh học, 35(3se): 145-157.
- Arya S., Arya I.D., Eriksson T. (1993). Rapid multiplication of adventitious somatic embryos of *Panax ginseng*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 34: 157-162.
- 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.
- Choi Y.E., Jeong J.H., Shin C.K. (2003). Hormone-independent embryogenic callus production from ginseng cotyledons using high concentrations of NH_4NO_3 and progress towards bioreactor production. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 72: 229-235.
- 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. African Journal of Biotechnology, 10(84): 19499-19504.
- 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.

- Hussein S., Ibrahim R., Kiong A.L.P. (2006). Somatic embryogenesis: an alternative method for *in vitro* micropropagation. Iranian Journal of Biotechnology, 4(3): 156-161.
- Kim Y.J., Lee O.R., Kim K.T., and Deok-Chun Yang D.C. (2012). High frequency of plant regeneration through cyclic secondary somatic embryogenesis in *Panax ginseng*. J. Ginseng Res., 36(4): 442-448.
- Murashige T. and Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. Physiol. Plant, 15: 473-497.
- Nhut D.T., Vinh B.V.T., Hien T.T., Huy N.P., Nam N.B. and Chien H.X. (2012a). 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.). African Journal of Biotechnology, 11(5): 1084-1091.
- Nhut D. T., Nga L.T.M., Chien H.X. and Huy N.P. (2012b). Morphogenesis of *in vitro* main root transverse thin cell layers of Vietnamese ginseng (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.). African Journal of Biotechnology, 11(23): 6274-6289.
- Ozlem Y.C., Gurel A., Fazilet V.S. (2010). Large scale cultivation of plant cell and tissue culture in bioreactors. (Transworld Research Network, Kerala, India), p. 1- 54.
- Paek K.Y., Chakrabarty D., Hahn E.J. (2005). Application of bioreactor systems for large scale production of horticultural and medicinal plants. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 81: 287-300.
- Schenck R.U. and Hildebrandt A.C. (1972). Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell culture. Can. J. Bot., 50: 199-204.
- Sun Y.L., and Hong S.K. (2012). Recent advances of *in vitro* embryogenesis of monocotyledon and dicotyledon. Embryogenesis, Ken-Ichi Sato (Ed.), ISBN: 978-953-51-0466-7, p. 269-296. InTech Publisher, Available from: <http://www.intechopen.com/books/embryogenesis/recent-advances-of-in-vitro-embryogenesis-ofmonocotyledon-and-dicotyledon>.
- Tripathi L. and Tripathi J.N. (2003). Role of biotechnology in medicinal plants. Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 2(2): 243-253.
- Yong J.W.H., Ge L., Ng Y.F., Tan S.N. (2009). The chemical composition and biological properties of coconut (*Cocos nucifera* L.) water. Molecules, 14: 5144-5164.
- 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, Tissue and Organ Culture, 108: 333-338.
- Zhou S. and Brown D.C.W. (2006). High efficiency plant production of North American ginseng via somatic embryogenesis from cotyledon explants. Plant Cell Reports, 25: 166-173.