

NGHIÊN CỨU QUÁ TRÌNH TẠO PHÔI VÔ TÍNH TỪ MÔ SẸO TRONG NUÔI CẤY IN VITRO SÂM LAI CHÂU (*Panax vietnamensis* var. *fuscidiscus*)

Lê Hùng Linh¹, Đinh Xuân Tú¹

TÓM TẮT

Trong nghiên cứu này, quy trình cảm ứng tạo phôi vô tính gián tiếp thông qua mô sẹo và tái sinh cây sâm Lai Châu (*Panax vietnamensis* var. *fuscidiscus*), một loài dược liệu quý đang bị tuyệt chủng đã được công bố thành công lần đầu tiên tại Việt Nam. Mô sẹo được tạo thành trên môi trường dinh dưỡng MS (Murashige and Skoog) có bổ sung 0,5 mg/L 2,4-D. Công thức môi trường cho tỷ lệ tạo thành phôi vô tính và số phôi trung bình trên một mẫu cấy cao nhất (tương ứng là 100% và 18,6) là SH (Schenk & Hidebrandt) + 0,5 mg/L NAA (*Naphthalene acetic acid*) + 0,5 mg/L Dropp. Phôi thứ cấp xuất hiện từ phôi ban đầu và được nhân lên trên môi trường SH + 1,0 mg/L NAA + 0,5 mg/L BA. Tiếp theo, công thức môi trường cho cây con phát triển tốt với chồi và rễ củ và tỷ lệ phôi chồi chuyển thành cây con hoàn chỉnh cao nhất là SH + 1 mg/L BA + 0,3 mg/L NAA. Cây con 6 tuần tuổi từ công thức SH + 1,5 mg/L NAA hoặc SH + 0,5 mg/L BA + 1,5 mg/L NAA đã được chuyển thành công sang môi trường đất trong điều kiện nhà kính. Đây được xem là những dẫn liệu quan trọng để tiếp tục các nghiên cứu tiếp theo nhằm phục tráng và bảo tồn giống sâm Lai Châu tại Việt Nam.

Từ khóa: Sâm Lai Châu, mô sẹo, phôi soma, *in vitro*

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Sâm Lai Châu (*Panax vietnamensis* var. *fuscidiscus* K. Komatsu, S. Zhu & S.Q. Cai), là một thứ sâm mới được biết đến ở Việt Nam, thuộc loài sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha & Grushv.). Đây là loại sâm mọc tự nhiên ở độ cao 1400-1900 m, được phát hiện tại địa phận huyện Mường Tè, Sơn Hồ và Tam Đường, tỉnh Lai Châu (Phan Kế Long và *ctv.*, 2014). Trước đó, sâm Lai Châu cũng đã được tìm thấy ở

vùng Jinping, phía Nam tỉnh Vân Nam, Trung Quốc (Zhu *et al.*, 2003). Vai trò của hàng trăm các hoạt chất sinh học (trong đó có saponin) chứa trong sâm đã được biết đến và ứng dụng trong rất nhiều lĩnh vực (Christensen, 2008). Sâm Ngọc Linh được cho là loài sâm tốt nhất thế giới với 52 loại saponin. Theo nghiên cứu của Phan Kế Long và cộng sự (2014), sâm Lai Châu có thể chứa các chất saponin tương tự như sâm Ngọc Linh. Chính vì vậy, sâm Lai Châu đã bị các

¹ Viện Di truyền Nông nghiệp

thương lái sẵn lòng thu mua xuất khẩu sang Trung Quốc từ lâu. Tình trạng khai thác quá mức trong tự nhiên, cộng với môi trường sống bị tác động nghiêm trọng do nạn phá rừng dẫn đến loài này bị đe dọa tuyệt chủng ở mức độ trầm trọng, cần được ưu tiên bảo tồn ở mức cao nhất.

Tuy nhiên, phương pháp nhân giống truyền thống bằng hạt gặp nhiều khó khăn do sâm Lai Châu là cây lâu năm, thời gian để cây mọc từ hạt đến lúc ra hoa đậu quả phải mất 4 - 5 năm, số lượng hạt thu được trên một cây không ổn định, trung bình 20 - 40 hạt, thời gian ngủ nghỉ của hạt kéo dài 6 - 18 tháng, tỷ lệ hạt nảy mầm ngoài tự nhiên thấp. Nuôi cấy mô in vitro tạo phôi vô tính là một công cụ hữu hiệu cho việc nhân nhanh cây được liệu. Phương pháp này cho phép sản xuất số lượng cây giống lớn trong thời gian ngắn với chất lượng đồng đều và sạch bệnh. Kỹ thuật nhân phôi vô tính đã được sử dụng thành công ở một số loài sâm Mỹ (*P. quinquefolius*), Sâm Hàn Quốc (*P. ginseng*), Sâm Ngọc Linh (*P. vietnamensis* Ha et Grushv), Sâm thất bắc (*P. notoginseng*) (Zhang *et al.*, 2014; You *et al.*, 2012). Phôi vô tính hay còn gọi là phôi soma có thể được tạo ra trực tiếp từ phôi hữu tính, lá mầm, trụ dưới lá mầm, cây con hoặc được tạo ra gián tiếp thông qua mô sẹo. Hiện nay, ở Việt Nam chưa có công trình nào công bố về nghiên cứu tạo phôi vô tính ở cây sâm Lai Châu phục vụ công tác bảo tồn loài sâm này. Vì vậy bài báo này trình bày kết quả nghiên cứu quá trình tạo phôi vô tính thông qua mô sẹo của cây sâm Lai Châu.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Củ sâm Lai Châu (*P. vietnamensis* var. *fuscidiscus*) được thu thập từ tự nhiên tại bản U Ma, xã Thu Lũm huyện Mường Tè, tỉnh Lai Châu.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Cảm ứng tạo mô sẹo: Để cảm ứng tạo mô sẹo từ lát cắt mỏng tế bào mô củ, sử dụng môi trường MS có bổ sung 0,5 mg/L 2,4-D, 30 g/L đường sucrose, và 7 g/L agar. Thí nghiệm tạo mô sẹo ban đầu được nuôi cấy trong 5 tuần.

Tạo mô sẹo có khả năng sinh phôi: Để tạo mô sẹo có khả năng phát sinh phôi, tiến hành nuôi cấy mô sẹo ban đầu trên môi trường MS có bổ sung 0,05

mg/L 2,4-D và 70 g/L đường sucrose trong thời gian 7-10 ngày ở điều kiện tối, sau đó chuyển sang điều kiện chiếu sáng 4 tuần.

Cảm ứng tạo phôi vô tính: Mô sẹo có khả năng phát sinh phôi được cấy chuyển sang môi trường SH có hàm lượng đường sucrose giảm (30 g/L) và bổ sung đồng thời chất điều hòa sinh trưởng 2,4-D (0,5 mg/L) và Dropp (xuất xứ Nga) với dải nồng độ khác nhau (0,1; 0,3; 0,5; 1,0 mg/L). Đánh giá khả năng hình thành phôi soma sau 2 - 3 tháng nuôi cấy không chuyển.

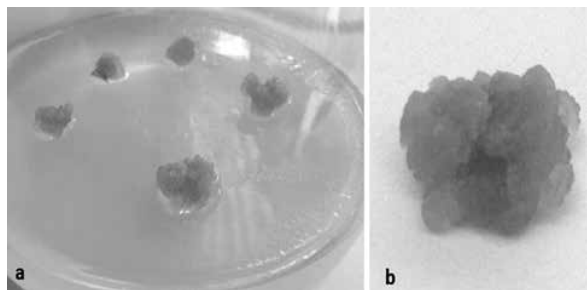
Sự phát triển của phôi chồi và cây con tái sinh: Phôi chồi được cấy chuyển trên môi trường SH có bổ sung đồng thời chất điều hòa sinh trưởng NAA (0,3 mg/L) và BA (0,5; 1,0; 1,5 mg/L). Đánh giá khả năng phát triển của cây con và tỷ lệ phôi chồi chuyển thành cây con hoàn chỉnh.

Điều kiện nuôi cấy: Môi trường nuôi cấy được hấp khử trùng 20 phút ở 121°C, 1atm. Nhiệt độ phòng nuôi cấy 25 - 27°C. Thời gian chiếu sáng 12 - 14 giờ/ngày.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Cảm ứng tạo mô sẹo từ lát cắt mỏng tế bào mô củ

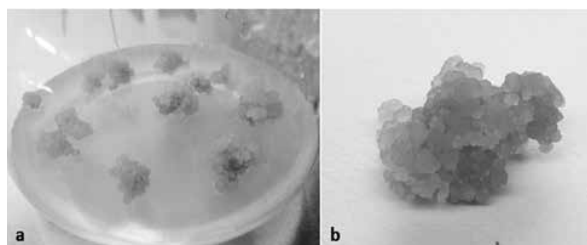
Trong nuôi cấy in vitro thực vật, sự hình thành mô sẹo là một quá trình sinh học phức tạp, dưới tác động của các chất điều hòa sinh trưởng auxin hoặc cytokinin, các tế bào tại vị trí mô bị tổn thương phân chia hỗn độn không ngừng tạo thành khối tế bào phân biệt hóa. Quá trình này không chỉ phụ thuộc vào thành phần và nồng độ chất kích thích mà còn phụ thuộc nhiều vào kiểu gen và trạng thái tế bào ở vị trí lấy mẫu. Tế bào nào càng trẻ hóa thì càng dễ bị tác động, kích thích, quá trình tạo mô sẹo diễn ra nhanh và hiệu quả cao hơn so với tế bào già hóa. Trong nghiên cứu tạo mô sẹo ban đầu, lát cắt mỏng tế bào mô đỉnh sinh trưởng được nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung 0,5 mg/L 2,4-D. Quá trình tạo mô sẹo diễn ra tương đối nhanh, sau 3 tuần nuôi cấy các miếng mẫu cấy bắt đầu phồng lên tạo thành khối tế bào xốp, có màu vàng nhạt. Khối tế bào này lớn rất nhanh, ở viền xuất hiện lớp tế bào mềm màu trắng ở tuần nuôi cấy thứ năm (Hình 1). Điều này chứng tỏ chất 2,4-D ở nồng độ 0,5 mg/L thích hợp cho tạo thành mô sẹo từ tế bào mô đỉnh sinh trưởng ở cây sâm Lai Châu.



Hình 1. Mô sẹo sâm Lai Châu trên môi trường MS + 0,5 mg/L 2,4-D

3.2. Tạo mô sẹo có khả năng sinh phôi

Trong nghiên cứu này, mô sẹo ban đầu được nuôi cấy trên môi trường MS có hàm lượng đường cao (70g/L) và giảm nồng độ 2,4-D mười lần nhằm tạo mô sẹo có khả năng sinh phôi. Mô sẹo có khả năng sinh phôi thu được sau 7 - 10 ngày nuôi cấy ở trong tối và 4 tuần ở điều kiện chiếu sáng 12 - 14 giờ/ngày. Mô sẹo có khả năng sinh phôi là khối mô gồm nhiều tế bào nhỏ, có cùng đường kính, có hoạt động biến dưỡng rất mạnh mẽ và cường độ tổng hợp axit ribonucleic cao (Hình 2).



Hình 2. Mô sẹo có khả năng sinh phôi

3.3. Cảm ứng tạo phôi vô tính

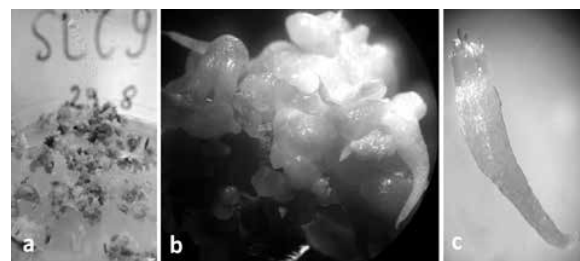
Ảnh hưởng của sự kết hợp chất điều hòa sinh trưởng Dropp với 2,4-D (0,5 mg/L) hoặc NAA (0,5 mg/L) đến quá trình cảm ứng tạo phôi vô tính được tiến hành đánh giá. Kết quả cho thấy sự khác biệt giữa hai nguồn auxin sử dụng thể hiện rõ rệt sau 8-12 tuần nuôi cấy. Sử dụng riêng rẽ 2,4-D (0,5mg/L) hoặc kết hợp với Dropp đều không cho kết quả tạo thành phôi vô tính mà chỉ thấy sự phát triển mạnh của mô sẹo, đặc biệt trên môi trường MS + 0,5 mg/L 2,4-D + 0,3 mg/L Dropp. Kết quả này trái ngược với một số nghiên cứu ở các loài khác thuộc chi sâm *Panax*. You *et al.* (2012) và Zhang *et al.* (2014) đã chỉ ra rằng, chất 2,4-D ở nồng độ 0,5 mg/L rất thích hợp trong cảm ứng tạo phôi ở cây sâm *Panax notoginseng* và sâm Hàn Quốc (You *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2014). Điều này cho thấy sự khác biệt về loài cũng là một nguyên nhân dẫn đến khả năng cảm ứng tạo phôi vô tính khác nhau.

Mặt khác, khi sử dụng kết hợp auxin NAA (0,5 mg/L) với Dropp (0,1-1,0 mg/L) trong môi trường nuôi cấy cho thấy phôi cấu được hình thành trên bề mặt của mô sẹo ở tất cả các công thức nghiên cứu (Hình 3a). Tuy nhiên, tỷ lệ phôi vô tính được tạo thành phụ thuộc vào nồng độ của Dropp (Bảng 1).

Bảng 1. Ảnh hưởng của 2,4-D, NAA và Dropp đến sự tạo thành phôi vô tính

Auxin	Cytokinin	Dropp, mg/L	Tỷ lệ phôi vô tính được tạo thành, %	TB số phôi vô tính/mô sẹo
2,4-D, mg/L	0,5	0,1	0	0
		0,3	0	0
		0,5	0	0
		1,0	0	0
NAA, mg/L	0,5	0,1	57,1	7,5
		0,3	77,8	12,9
		0,5	100	18,6
		1,0	42,9	10,7

Phân tích kết trình bày ở bảng 1 cho thấy môi trường SH có bổ sung 0,5 mg/L NAA và 0,5 mg/L Dropp cho tỷ lệ tạo thành phôi vô tính đạt 100% và trung bình số lượng phôi đếm được trên một mẫu mô sẹo là 18,6. Khi nồng độ của Dropp trong môi trường lớn hơn (hoặc nhỏ hơn) 0,5 mg/L thì tỷ lệ tạo thành phôi cũng như số lượng phôi hình thành trên mô sẹo đều giảm. Phần lớn các phôi cấu ban đầu tạo thành phôi thứ cấp, và trải qua giai đoạn phát triển phôi thủy lôi và phôi mang lá mầm (phôi chồi) trên môi trường SH có bổ sung 1,0mg/L NAA và 0,5mg/L BA sau 6 tuần nuôi cấy (Hình 3b, 3c).



Hình 3. Quá trình tạo thành phôi vô tính từ mô sẹo có khả năng sinh phôi

3.4. Sự phát triển của phôi tạo thành cây con hoàn chỉnh

Trên môi trường cảm ứng, phôi soma phát triển rất chậm hoặc ngừng sinh trưởng, hoặc bắt đầu quá trình hình thành phôi thứ cấp. Tất cả điều đó dẫn tới kích thước phôi nhỏ, phôi trưởng thành không thể

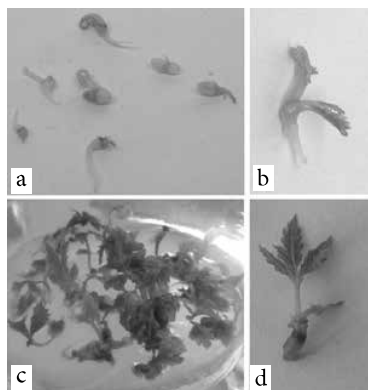
này mầm hoàn toàn thành cây con có đầy đủ chồi và rễ củ. Để tối ưu sự phát triển của phôi thành cây con hoàn chỉnh, phôi chồi được nuôi cấy trong môi trường SH có bổ sung đồng thời NAA (0,3 mg/L) và

BA (0,5; 1,0; 1,5 mg/L) (Hình 4). Sự phát triển của phôi chồi thành cây con sau 6 tuần nuôi cấy được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. Ảnh hưởng của NAA và BA đến sự phát triển của phôi chồi

Công thức nghiên cứu	NAA, mg/L	BA, mg/L	Tỷ lệ phôi chồi chuyển thành cây con, %	Đặc điểm của cây con
CT1	0,3	0,5	67,5	Cây con phát triển chậm, có nhiều phôi thứ cấp hình thành từ gốc
CT2		1,0	92,5	Cây con phát triển tốt với chồi và rễ củ
CT3		1,5	90,0	Cây con cao, yếu, rễ củ kém phát triển

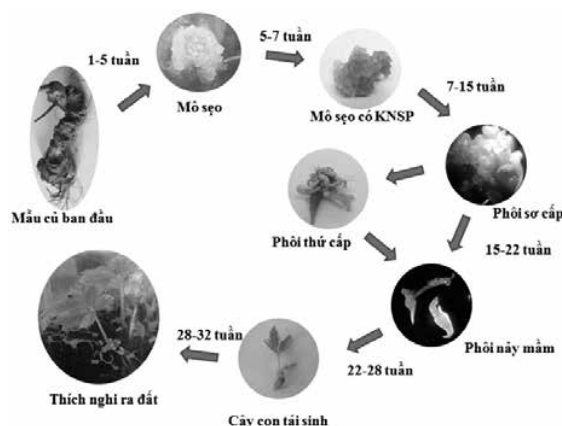
Phân tích kết quả ở bảng 2 cho thấy môi trường nuôi cấy có bổ sung 1,0 mg/L BA và 0,3 mg/L NAA cho cây con phát triển tốt với chồi và rễ củ (Hình 4c, 4d), tỷ lệ phôi chồi chuyển thành cây con đạt cao nhất 92,5%. Hai công thức nghiên cứu còn lại (CT1 và CT3) cho cây phát triển yếu hơn, tỷ lệ phôi chồi chuyển thành cây con thấp, đặc biệt ở môi trường CT1, chủ yếu là sự phát triển của phôi thứ cấp. Đây có thể là nguyên nhân làm chậm sự phát triển của cây con. Các nghiên cứu trước đó cũng chỉ ra rằng, ở nồng độ thích hợp BA có tác dụng tạo củ *in vitro* ở một số loài khác (Cousins and Adelberg, 2008) và BA có thể được chuyển hóa để dàng hơn các chất điều hòa sinh trưởng được tổng hợp bởi mô thực vật và có khả năng kích thích sản xuất hooc môn tự nhiên zeatin trong mô.



Hình 4. Sự phát triển của phôi chồi thành cây con

Để nhận được cây con khỏe chuẩn bị cho việc thích ứng với môi trường đất, tiến hành cấy chuyển cây con với chồi và rễ củ (Hình 4) sang môi trường SH1/2 có bổ sung riêng rẽ hoặc kết hợp 1,5 mg/L NAA với 0,5 mg/L BA.

Quy trình tạo phôi vô tính gián tiếp thông qua mô sẹo ở cây sâm Lai Châu được trình bày ở hình 5 và lần đầu tiên được nghiên cứu thành công tại Việt Nam.



Hình 5. Quy trình nhân giống vô tính in vitro cây sâm Lai Châu

IV. KẾT LUẬN

Mô sẹo được tạo ra trên môi trường MS có bổ sung 0,5 mg/L 2,4-D. Mô sẹo được cảm ứng phát sinh phôi trên môi trường MS + 0,5 mg/L 2,4-D + 0,3 mg/L Dropp với tỷ lệ cao. Phôi soma phát triển bình thường tạo thành cây con hoàn chỉnh trên môi trường SH có bổ sung đồng thời 0,5 mg/L NAA và 1,5 mg/L BA.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Phan Kế Long, Vũ Đình Duy, Nguyễn Giang Sơn, Nguyễn Thị Phương Trang, Lê Mai Linh, Phan Kế Lộc, 2014. Nghiên cứu đặc điểm di truyền của các mẫu Sâm thu ở Lai Châu trên cơ sở phân tích trình tự vùng gen matK và ITS-rDNA. *Tạp chí Công nghệ sinh học* 12(2): 327-337.
- Christensen, L.P., 2008. Ginsenosides, chemistry, biosynthesis, analysis, and potential health effects. *Adv Food Nutr Res* 55:1-99.
- Cousins, M.M and Adelberg, J.W., 2008. Short-term and long-term time course studies of turmeric (*Curcuma longa* L.) microrhizome development in vitro. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 93(3): 283-293.

- Phan Kế Long, Lê Thanh Sơn, Phan Kế Lộc, Vũ Đình Duy, Phạm Văn Thế**, 2013. Lai Chau ginseng *Panax vietnamensis* var. *fuscidiscus* K. Komatsu, S. Zhu & S.Q. Cai I. morphology, ecology, distribution and conservation status. *Hội thảo VAST-KAST lần thứ II về đa dạng sinh học và các hợp chất*, 65-73.
- 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 Organ Cult*, 108(2): 333-338.
- Zhang, J.Y., Sun, H.J., Song, I.J., Bae, T.W., Kang, H.G., Ko, S.M., Kwon, Y., Kim, I.W., Lee, J., Park, S.Y., Lim, P.O.**, 2014. Plant regeneration of Korean wild ginseng (*Panax ginseng* Meyer) mutant lines induced by -irradiation (^{60}Co) of adventitious roots. *J Ginseng Res*, 38(3): 220-225.
- Zhu, S., Fushimi, H., Cai, S., Komatsu, K.**, 2003. Phylogenetic relationship in the Genus *Panax*: inferred from Chloroplast trnK gene and nuclear 18S rRNA gene sequences. *Planta Med*, 69(7): 647-653.

Study on somatic embryogenesis from *in vitro* callus of Lai Chau ginseng (*Panax vietnamensis* var. *fuscidiscus*)

Le Hung Linh, Dinh Xuan Tu

Abstract

A protocol for induction of indirect somatic embryogenesis via callus and subsequent plant regeneration for the medicinally important and endangered plant *Panax vietnamensis* var. *fuscidiscus* has been developed for the first time in Vietnam. Calli were formed on MS medium supplemented with 0.5 mg/L 2,4-D. The highest rate of somatic embryogenesis (100%) and average number of somatic embryos (SEs) per explant (18.6 %) were obtained on MS medium supplemented with 0.5 mg/L NAA and 0.5 mg/L Dropp. Secondary somatic embryos (SSEs) appeared on the primary Ses were multiplied in SH medium with 1.0 mg/L NAA and 0.5 mg/L BA. Highest percentage of seedling to plantlet conversion was observed in the medium supplemented with 1.0 mg/L BA and 0.3 mg/L NAA. Healthy plantlets were characterized by well developed rhizome with roots and shoot showing vigorous growth. The plantlets were successfully acclimated under shaded greenhouse conditions after 6 months of transfer to medium SH + 1.5 mg/L NAA or SH + 0.5mg/L BA + 1.5 mg/L NAA.

Key words: Laichau ginseng, *Panax vietnamensis* var. *fuscidiscus*, callus, somatic embryo, *in vitro*

Ngày nhận bài: 14/02/2017

Người phản biện: TS. Trần Danh Sửu

Ngày phản biện: 18/02/2017

Ngày duyệt đăng: 20/02/2017