

So sánh hiệu quả phát sinh phôi vô tính từ các nguồn mẫu *in vitro* của cây sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.)

Lê Thị Diễm^{1,2}, Trương Hoài Phong¹, Hoàng Thanh Tùng¹, Hoàng Đắc Khải¹, Vũ Quốc Luận¹, Đỗ Mạnh Cường¹, Nguyễn Thị Như Mai¹, Trịnh Thị Hương³, Bùi Văn Thế Vinh⁴, Trần Quế⁵, Dương Tấn Nhựt^{*}

¹Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam, 116 Xô Viết Nghệ Tĩnh, phường 7, TP Đà Lạt, tỉnh Lâm Đồng, Việt Nam

²Học viện KH&CN, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam, 8 Hoàng Quốc Việt, phường Nghĩa Đô, quận Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam

³Trường Đại học Công Thương TP Hồ Chí Minh, 140 Lê Trọng Tấn, phường Tây Thạnh, quận Tân Phú, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

⁴Trường Đại học Công nghệ TP Hồ Chí Minh, 475A Điện Biên Phủ, phường 25, quận Bình Thạnh, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

⁵Viện Nghiên cứu Hạt nhân, 1 Nguyễn Tử Lực, phường 8, TP Đà Lạt, tỉnh Lâm Đồng, Việt Nam

Ngày nhận bài 18/2/2022; ngày chuyển phản biện 22/2/2022; ngày nhận phản biện 11/3/2022; ngày chấp nhận đăng 16/3/2022

Tóm tắt:

Nghiên cứu khảo sát khả năng phát sinh phôi vô tính từ nhiều nguồn vật liệu khác nhau của cây sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) được thực hiện nhằm chọn được vật liệu thích hợp cho sự phát sinh phôi trong nuôi cấy *in vitro*. Trong nghiên cứu này, các mẫu *in vitro* từ mảnh lá, cuống lá, rễ và các phôi rời ở dạng hình cầu, hình tim và có lá mầm được khảo sát trên môi trường MS bổ sung riêng lẻ hoặc kết hợp 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid: 0,2, 0,5 và 0,7 mg/l) và TDZ (Thidiazuron: 0,1, 0,3 và 0,5 mg/l). Kết quả cho thấy, tất cả các vật liệu thử nghiệm đều cho phát sinh phôi sau 6 tuần nuôi cấy (100%). Số phôi trung bình trên mẫu mảnh lá (51,00 phôi) trên môi trường tối ưu cao hơn đáng kể so với mẫu cuống lá (29,67 phôi) và mẫu rễ (18,00 phôi). Mẫu phôi hình cầu là nguồn vật liệu thích hợp nhất cho sự phát sinh phôi (68,33 phôi/mẫu) so với các nguồn mẫu cấy khác. Môi trường nuôi cấy có sự kết hợp của 2,4-D và TDZ tăng khả năng tạo phôi thứ cấp ở mẫu phôi hình cầu, kết quả đạt cao nhất tại nồng độ 0,7 mg/l 2,4-D kết hợp với 0,1 mg/l TDZ trong môi trường chứa 0,5 mg/l NAA (1-Naphthaleneacetic acid) (73,33 phôi/mẫu).

Từ khóa: nuôi cấy *in vitro*, phát sinh phôi, phôi thứ cấp, sâm Ngọc Linh.

Chỉ số phân loại: 4.6

1. Đặt vấn đề

Sâm Ngọc Linh là một loài sâm đặc hữu của Việt Nam. Đây là một trong những loài sâm có hàm lượng saponin khung dammaran cao nhất (khoảng 12-15%) và lượng saponin triterpen nhiều nhất so với các loài khác của chi *Panax* trên thế giới [1]. Năm 2011, sâm Ngọc Linh đã thoát nguy cơ tuyệt chủng nhưng độ an toàn còn thấp và mức độ đe dọa vẫn ở bậc E trong *Sách đỏ Việt Nam*. Do vậy, nhân giống sâm Ngọc Linh *in vitro* được cho là phương pháp hiệu quả nhất để bảo tồn và phát triển nguồn gen quý hiếm này.

Ứng dụng công nghệ sinh học trong các chương trình nhân giống cây trồng đòi hỏi các quy trình tái sinh *in vitro* hiệu quả, trong đó có phương pháp phát sinh phôi soma. Việc ứng dụng phương pháp này có thể tạo ra số lượng lớn cây con có chất lượng tốt trong một thời gian ngắn, tỷ lệ sống sót của cây con ngoài vườn ươm cao [2, 3]. Tốc độ nhân giống từ phôi cao hơn nhiều so với nhân giống từ mô phân sinh. Các mô có nguồn gốc từ phôi có khả năng phát sinh phôi cao nhất và khả năng này giảm dần ở lá mầm, cuống lá, lá và rễ [4]. Sự hình thành phôi vô tính có thể thông qua con đường trực tiếp hoặc gián tiếp. Đối với hình thành phôi vô tính trực tiếp, phôi phát triển trực tiếp trên bề mặt của mô cấy. Sự hình thành phôi vô tính gián tiếp có thể thông qua một bước trung gian liên quan đến sự hình thành mô sẹo hoặc nuôi cấy huyền phù tế bào [5, 6].

Phát sinh phôi thứ cấp là quá trình phôi được hình thành từ phôi, khác với phát sinh phôi sơ cấp là quá trình phôi được hình thành từ mẫu cấy thực vật. Quá trình phát sinh phôi soma thứ cấp mang lại nhiều ưu điểm hơn so với quá trình phát sinh phôi soma sơ cấp, đặc biệt là tỷ lệ nhân lên cao và mức độ đồng đều tăng lên. Nuôi cấy *in vitro* bằng phương pháp phát sinh phôi thứ cấp đã được mô tả ở nhiều loài thực vật hạt trần và hạt kín bằng cách sử dụng chất điều hòa sinh trưởng thực vật và các loại carbohydrate khác nhau [7-9].

Trong nuôi cấy phôi, nồng độ của các chất điều hòa sinh trưởng là rất quan trọng đối với phản ứng sinh trưởng tối ưu của mẫu cấy. Khi nồng độ quá thấp sẽ không kích thích sinh trưởng, ngược lại hàm lượng quá cao có thể gây độc cho mẫu [10]. Các chất điều hòa sinh trưởng thực vật, đặc biệt là auxin, có liên quan chặt chẽ đến quá trình chuyển đổi tế bào sinh dưỡng thành phôi. Bên cạnh việc thúc đẩy sự phân chia tế bào trong mẫu cấy, các auxin có liên quan trực tiếp hoặc gián tiếp đến những thay đổi trong biểu hiện gen, tổng hợp protein và điều chỉnh, tái tổ chức chromatin cần thiết để khởi sự con đường phát sinh phôi [11, 12]. 2,4-D là auxin tổng hợp được nghiên cứu rộng rãi nhất và được ứng dụng trong các hệ thống tạo phôi thực vật khác nhau [10, 12, 13]. Ngoài auxin, các cytokinin cũng sử dụng cho cảm ứng phát sinh phôi ở các loài thực vật hai lá mầm [14]. Một số loại cytokinin được sử dụng nhiều trong môi trường nuôi cấy như

*Tác giả liên hệ: Email: duongtannhut@gmail.com

Comparison of somatic embryogenesis efficiency from *in vitro* explant sources of Ngọc Linh ginseng (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.)

Thi Diem Le^{1,2}, Hoai Phong Truong¹, Thanh Tung Hoang¹,
Dac Khai Hoang¹, Quoc Luan Vu¹, Manh Cuong Do¹,
Thi Nhu Mai Nguyen¹, Thi Huong Trinh³, Van The Vinh Bui⁴,
Que Tran⁵, Tan Nhut Duong^{1*}

¹Tay Nguyen Institute of Scientific Research, VAST,
116 Xo Viet Nghe Tinh, Ward 7, Da Lat City, Lam Dong Province, Vietnam

²Graduate University of Science and Technology, VAST,

18 Hoang Quoc Viet, Nghia Do Ward, Cau Giay District, Hanoi, Vietnam

³Ho Chi Minh City University of Industry and Trade (HUIT),

140 Le Trong Tan, Tay Thanh Ward, Tan Phu District, Ho Chi Minh City, Vietnam

⁴Ho Chi Minh City University of Technology (HUTECH),

475A Dien Bien Phu, Ward 25, Binh Thanh District, Ho Chi Minh City, Vietnam

⁵Dalat Nuclear Research Institute,

1 Nguyen Tu Luc, Ward 8, Da Lat City, Lam Dong Province, Vietnam

Received 18 February 2022; revised 11 March 2022; accepted 16 March 2022

Abstract:

This study on the efficiency of embryogenesis from various explant sources of Ngọc Linh ginseng (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) was conducted to select the appropriate materials and optimise embryogenesis *in vitro*. In this study, *in vitro* explants from leaf fragments, petioles, roots, and embryos (globular, heart-shaped, and cotyledon) were cultured on MS medium supplemented individually or in combination with 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid: 0.2, 0.5, and 0.7 mg/l) and TDZ (Thidiazuron: 0.1, 0.3, and 0.5 mg/l). The results showed that all explants had embryogenesis after 6 weeks of culture (100%). The average number of embryos per leaf fragment (51.00 embryos) on the optimal medium was significantly higher than that of petioles (29.67 embryos) and root samples (18.00 embryos). Interestingly, the globular embryo explant was noted as the most suitable material source for embryogenesis (68.33 embryos/sample). The culture medium with the combination of 2,4-D and TDZ increased the ability to create secondary embryos in globular embryos, the highest result was achieved at the concentration of 0.7 mg/l 2,4-D combined with 0.1 mg/l TDZ in the medium containing 0.5 mg/l NAA - 1-Naphthaleneacetic acid (73.33 embryos/sample).

Keywords: embryogenesis, *in vitro* culture, Ngọc Linh ginseng, secondary embryos.

Classification number: 4.6

6-Benzylaminopurine (BAP), kinetin, zeatin và TDZ cho kết quả tốt tùy thuộc vào loài thực vật [5, 10, 15]. Sự phát sinh phôi vô tính sâm Ngọc Linh đã được báo cáo bởi một số tác giả đối với một số mẫu cây như lá, cuống lá và rễ [16-20]. Tuy nhiên, việc đánh giá được hiệu quả phát sinh phôi trên các nguồn mẫu, đặc biệt là hiệu quả việc phát sinh phôi thứ cấp từ nhiều dạng phôi ban đầu vẫn còn hạn chế và chưa rõ ràng.

Với mục tiêu đánh giá được sự khác biệt của các nguồn mẫu và tìm được nguồn mẫu thích hợp nhất trong phát sinh phôi vô tính sâm Ngọc Linh, nghiên cứu này đã tiến hành khảo sát hiệu quả các nguồn mẫu cây mảnh lá, rễ, cuống lá và các dạng phôi sơ cấp (hình cầu, hình tim, có lá mầm) lên sự phát sinh phôi vô tính sâm Ngọc Linh dưới ảnh hưởng của 2 chất điều hoà sinh trưởng thường được sử dụng trong quá trình phát sinh phôi vô tính là 2,4-D và TDZ.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Nguồn vật liệu sử dụng trong nghiên cứu này là mẫu lá, cuống lá và rễ của cây sâm Ngọc Linh *in vitro* 3 tháng tuổi nuôi cấy trong môi trường MS; các mẫu phôi ở các dạng hình cầu, hình tim và có lá mầm đồng nhất và không có biến dị được tách từ cụm phôi nuôi cấy trên môi trường MS có chứa 1,0 mg/l 2,4-D, 0,5 mg/l (NAA), 0,2 mg/l kinetin, 30 g/l sucrose và 8 g/l agar [17] tại Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên.

2.2. Môi trường và điều kiện nuôi cấy

Các mẫu được nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung 30 g/l sucrose, 8 g/l agar chứa cố định 0,5 mg/l NAA, bổ sung 2,4-D (0,2, 0,5 và 0,7 mg/l) và TDZ (0,1, 0,3 và 0,5 mg/l) riêng lẻ hoặc kết hợp ở các nồng độ khác nhau.

Bình nuôi cấy được sử dụng là bình thủy tinh có thể tích 100 ml chứa 20 ml môi trường MS. Môi trường được điều chỉnh về pH 5,8 và được hấp khử trùng ở 121 °C, 1 atm trong 30 phút. Các thí nghiệm được thực hiện trong điều kiện phòng nuôi có nhiệt độ 22±2°C, độ ẩm 80%, cường độ chiếu sáng 2500±500 lux, thời gian chiếu sáng 12 giờ/ngày.

2.3. Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ 2,4-D và TDZ lên sự phát sinh phôi từ mảnh lá, cuống lá và rễ sâm Ngọc Linh

Mẫu lá được cắt theo hình vuông có kích thước 10×10 mm, cách phiến lá khoảng 1 mm; mẫu cuống lá được cắt ngang, kích thước chiều dài × đường kính khoảng 5×2 mm; khúc cắt rễ có chiều dài khoảng 10 mm và đường kính khoảng 1 mm, được nuôi cấy trong môi trường MS chứa cố định 0,5 mg/l NAA [19] + 30 g/l sucrose, có bổ sung riêng lẻ 2,4-D (0, 0,2, 0,5 và 0,7 mg/l) và TDZ (0, 0,1, 0,3 và 0,5 mg/l). Môi trường MS không bổ sung chất điều hoà sinh trưởng được sử dụng làm đối chứng (ĐC).

2.4. Khảo sát ảnh hưởng của 2,4-D và TDZ lên sự phát sinh phôi từ các dạng phôi hình cầu, hình tim, phôi có lá mầm của sâm Ngọc Linh

Các phôi rời hình cầu, hình tim (khoảng 0,020-0,025 g), phôi có lá mầm (khoảng 0,030 g) của sâm Ngọc Linh có kiểu hình đồng nhất, không có biến dị được tách riêng và nuôi cấy trong môi trường MS + 0,5 mg/l NAA + 30 g/l sucrose, có bổ sung riêng lẻ 2,4-D (0, 0,2, 0,5 và 0,7 mg/l), TDZ (0, 0,1, 0,3 và 0,5 mg/l). Môi trường MS không bổ sung chất điều hoà sinh trưởng được sử dụng làm đối chứng.

2.5. Khảo sát ảnh hưởng kết hợp của 2,4-D và TDZ lên sự phát sinh phôi từ nguồn mẫu có sự tái sinh phôi cao nhất

Nguồn mẫu cho số lượng hình thành phôi cao nhất từ kết quả của thí nghiệm trước được chọn và nuôi cấy trong môi trường MS chứa 0,5 mg/l NAA + 30 g/l sucrose, bổ sung 2,4-D (0,2; 0,5 và 0,7 mg/l) kết hợp với TDZ (0,1, 0,3 và 0,5 mg/l) tại các nồng độ thí nghiệm để khảo sát sự phát sinh phôi vô tính. Môi trường MS không bổ sung chất điều hoà sinh trưởng được sử dụng làm đối chứng.

2.6. Quan sát mô học

Các mẫu cấy phát sinh phôi được thu nhận và quan sát mô học. Mẫu được cắt thành lát mỏng khoảng 10-15 µm theo chiều ngang đi qua phôi, sau đó ngâm trong javen 10% trong 15 phút, rửa sạch mẫu bằng nước cất, tiếp tục ngâm mẫu trong acetic acid 45% trong 15 phút để cố định mẫu, rửa lại bằng nước cất 6 lần, ngâm mẫu đã ráo nước trong phẩm nhuộm carmine red trong 5 phút, rửa lại mẫu bằng nước cất 2 lần, cuối cùng đặt mẫu trong lam, nhỏ 1 giọt nước và đặt lamên kính lại. Quan sát dưới kính hiển vi quang học với vật kính ×10 [21].

2.7. Các chỉ tiêu theo dõi và xử lý số liệu

Tiến hành ghi nhận một số chỉ tiêu tỷ lệ cảm ứng mô sẹo (%), tỷ lệ cảm ứng phôi (%), số phôi/mẫu và trọng lượng tươi cụm phôi (g) sau 6 tuần nuôi cấy. Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần với 10 bình nuôi cấy. Tất cả các số liệu sau khi thu thập ứng với từng chỉ tiêu theo dõi được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel 2010 và phần mềm phân tích thống kê SPSS 16.0 theo phương pháp Duncan với $p < 0,05$ [22].

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Ảnh hưởng của 2,4-D và TDZ lên sự phát sinh hình thái từ mảnh lá, cuống lá và rễ sâm Ngọc Linh

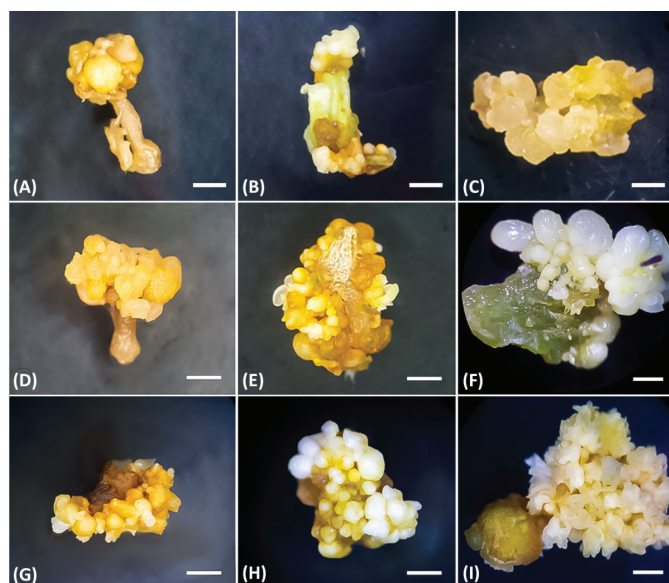
Kết quả thu nhận sau 6 tuần nuôi cấy từ mảnh lá, cuống lá và rễ của sâm Ngọc Linh *in vitro* 3 tháng tuổi cho thấy sự bổ sung các nồng độ khác nhau của 2,4-D hoặc TDZ vào môi trường nuôi cấy có tác dụng cảm ứng tạo mô sẹo; tỷ lệ cảm ứng mô sẹo/mẫu đạt 100% trên tất cả 3 loại mẫu cấy và cao hơn đáng kể so với đối chứng (nhỏ hơn 20%) (bảng 1). Tỷ 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 2,4-D

và TDZ cho thấy vẫn có sự xuất hiện mô sẹo và phôi trên các mẫu, nhưng số lượng thấp hơn đáng kể so với các môi trường có bổ sung 2,4-D hoặc TDZ. Tỷ lệ cảm ứng tạo phôi đạt hiệu quả nhất được ghi nhận đối với mẫu mảnh lá trên môi trường có bổ sung 0,7 mg/l 2,4-D và 0,5 mg/l TDZ (100%). Tương tự, mẫu rễ cũng cho tỷ lệ hình thành phôi cao khi tăng nồng độ 2,4-D và TDZ (88,67 và 93,33%), trong khi mẫu cuống lá cho tỷ lệ phát sinh phôi cao ở nồng độ thấp 0,1 mg/l TDZ (67,67%) (bảng 1). Số phôi trung bình trên mẫu cao nhất ghi nhận ở mẫu mảnh lá (51,00 phôi) trên môi trường bổ sung 0,5 mg/l 2,4-D và cao hơn đáng kể so với số phôi hình thành cao nhất trên mẫu cuống lá (29,67 phôi) và mẫu rễ (18,00 phôi). Phôi có nhiều dạng bao gồm phôi hình cầu, phôi hình tim, phôi có lá thật, có màu từ trắng sáng đến xanh được ghi nhận trên mẫu mảnh lá và mẫu cuống lá, trong khi mẫu rễ ghi nhận chủ yếu là phôi dạng hình cầu và có màu vàng nhạt sau 6 tuần nuôi cấy (bảng 1, hình 1). Đồng thời, trọng lượng tươi của cụm phôi ở các nguồn mẫu được ghi nhận tại nồng độ 0,3-0,5 mg/l TDZ đều cao hơn so với các nghiệm thức khác (bảng 1).

Bảng 1. Ảnh hưởng của nồng độ 2,4-D và TDZ trong môi trường chứa 0,5 mg/l NAA lên sự phát sinh hình thái từ các mẫu mảnh lá, cuống lá và rễ sâm Ngọc Linh *in vitro* sau 6 tuần nuôi cấy.

Nguồn mẫu	Nồng độ 2,4-D (mg/l)	Nồng độ TDZ (mg/l)	Tỷ lệ cảm ứng mô sẹo (%)	Tỷ lệ cảm ứng phôi (%)	Số phôi trung bình (phôi/mẫu)	Trọng lượng tươi cụm phôi (g)	Mô tả
Mảnh lá	ĐC	-	12,00 ^b	16,33 ^c	2,67 ⁱ	0,13 ^s	Phôi có dạng hình cầu, hình tim và phôi có lá thật.
	0,2	-	100,00 ^a	86,67 ^c	21,33 ^f	1,48 ^{ef}	
	0,5	-	100,00 ^a	93,67 ^b	51,00 ^a	1,59 ^{de}	
	0,7	-	100,00 ^a	100,00 ^a	35,67 ^c	1,69 ^{bcd}	
	-	0,1	100,00 ^a	74,67 ^c	16,67 ^{gh}	1,51 ^{ef}	Phôi có màu trắng sáng và có màu xanh
	-	0,3	100,00 ^a	96,33 ^b	48,33 ^b	1,76 ^{bcd}	
Cuống lá	ĐC	-	13,00 ^b	6,33 ^j	2,30 ^j	1,14 ^s	Phôi có dạng hình cầu, hình tim và phôi có lá thật.
	0,2	-	100,00 ^a	15,67 ^a	8,33 ^k	1,67 ^{bcd}	
	0,5	-	100,00 ^a	35,33 ^j	14,67 ^{hi}	1,65 ^{bcd}	
	0,7	-	100,00 ^a	47,33 ^j	25,33 ^e	1,67 ^{bcd}	
	-	0,1	100,00 ^a	67,67 ^b	16,67 ^{gh}	1,51 ^{ef}	Phôi có màu trắng sáng và có màu xanh
	-	0,3	100,00 ^a	62,67 ^b	26,00 ^c	1,64 ^{cd}	
Rễ	ĐC	-	15,00 ^b	18,33 ^k	3,30 ^j	1,15 ^s	
	0,2	-	100,00 ^a	73,33 ^{ef}	12,00 ^{ij}	1,44 ^f	
	0,5	-	100,00 ^a	76,33 ^c	17,67 ^h	1,5 ^{ef}	Phôi chủ yếu hình cầu, phôi có màu vàng nhạt
	0,7	-	100,00 ^a	88,67 ^c	11,33 ^j	1,60 ^{de}	
	-	0,1	100,00 ^a	71,33 ^f	16,33 ^{gh}	1,66 ^{bcd}	
	-	0,3	100,00 ^a	83,00 ^d	18,00 ^b	1,68 ^{bcd}	
	-	0,5	100,00 ^a	93,33 ^b	13,00 ^{ij}	1,71 ^{bcd}	

Các chữ cái khác nhau (a, b...) trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê tại $p < 0,05$ (Duncan's test).



Hình 1. Ảnh hưởng của nồng độ 2,4-D và TDZ tối ưu lên sự phát sinh phôi từ mẫu rễ, cuống lá và mảnh lá sâm Ngọc Linh sau 6 tuần nuôi cấy (thước 1 mm). Mẫu rễ (A), cuống lá (B) và mảnh lá (C) trong môi trường MS không bổ sung chất điều hoà sinh trưởng. Mẫu rễ (D), cuống lá (E) và mảnh lá (F) trong môi trường bổ sung 0,5, 0,7 và 0,5 mg/l 2,4-D, tương ứng. Mẫu rễ (G), cuống lá (H) và mảnh lá (I) trong môi trường bổ sung 0,3, 0,5 và 0,3 mg/l TDZ, tương ứng.

Trong thí nghiệm này, nồng độ 2,4-D và TDZ có ảnh hưởng rõ rệt đến sự hình thành phôi ở các mẫu sâm Ngọc Linh. Một số nghiên cứu cho thấy chất điều hòa sinh trưởng thực đóng một vai trò quan trọng trong quá trình phát sinh phôi [14, 15, 23-25]. Việc sử dụng các auxin ngoại sinh giúp điều hòa sự phát triển của phôi soma bằng cách thay đổi hàm lượng auxin nội sinh và liên quan trực tiếp hoặc gián tiếp đến sự khởi phát hình thành trực phôi và để thiết lập tính đối xứng hai bên trong giai đoạn phát sinh phôi sớm [11, 26]. Trong các nghiên cứu về cảm ứng phát sinh phôi vô tính ở nhiều loài thực vật, auxin, đặc biệt là 2,4-D thường cho hiệu quả phát sinh phôi cao [9, 27]. Ảnh hưởng của auxin lên sự phát sinh phôi được ghi nhận ở một số loài thực vật như *Paspalum scrobilatum* [28], *Picea abies* và *Picea omorika* [29], *Panax Ginseng* [13], *Stewartia* [30], *Camellia oleifera* [31]. Ngoài auxin, các cytokinin cũng sử dụng cho cảm ứng phát sinh phôi ở các loài thực vật hai lá mầm. Một số loại cytokinin như BAP, TDZ, kinetin và zeatin được sử dụng cho kết quả tốt trên nhiều loài thực vật [32-34].

Đối với chi *Panax*, phương pháp tạo phôi vô tính đã được nghiên cứu nhiều trên các loài *P. ginseng* [13, 35-37]. Các kết quả trên cho thấy sự phát sinh phôi phụ thuộc vào loại mẫu cây và nồng độ của 2 chất điều hòa sinh trưởng thực vật là 2,4-D và TDZ. Trong thí nghiệm này, dưới ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng, khả năng phát sinh phôi ở mẫu mảnh lá cho hiệu quả tốt hơn các mẫu cuống lá và rễ của cây *in vitro* 3 tháng tuổi. Điều này có thể do tồn tại một gradient phản ứng phát sinh phôi khác biệt giữa các cơ quan trong quá trình phát sinh phôi nhau [4, 38]. V.T. Hien và cs (2014) [18] cũng báo cáo rằng, mảnh lá cho hiệu quả phát sinh phôi trực tiếp cao nhất trên môi trường bổ sung 2

mg/l NAA (29,49 phôi/mẫu) cao hơn các mẫu cuống lá và thân rễ sâm Ngọc Linh. Tương tự, B.V.T. Vinh và cs (2014) [19] cũng báo cáo số phôi hình thành thu được mẫu lá trên môi trường bổ sung 1 mg/l NAA và 1 mg/ 2,4-D cao hơn so với mẫu cuống lá.

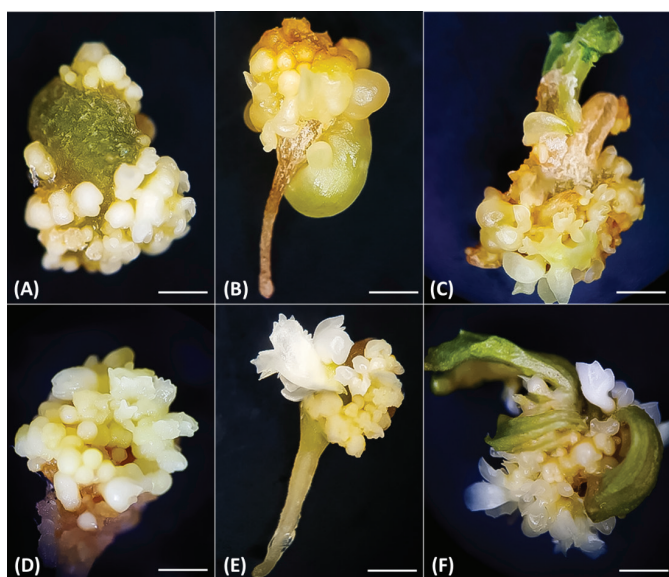
3.2. Ảnh hưởng của 2,4-D và TDZ lên sự phát sinh phôi thứ cấp từ các dạng phôi của sâm Ngọc Linh

Sau 6 tuần nuôi cấy, kết quả cho thấy tất cả các phôi ở cả 3 dạng hình cầu, hình tim và có lá mầm trên tất cả môi trường có bổ sung 2,4-D hoặc TDZ đều có sự hình thành mô sẹo (100%) và phôi (100%) cao hơn đáng kể so với đối chứng. Số phôi trung bình trên mẫu cao nhất được ghi nhận ở mẫu phôi hình cầu trên môi trường bổ sung 0,3 mg/l TDZ (68,33 phôi) (bảng 2, hình 2). Đối với môi trường bổ sung 2,4-D, nồng độ 0,5 mg/l cho số phôi hình thành trên mẫu phôi hình cầu, phôi hình tim và phôi có lá mầm đều tối ưu hơn các nồng độ khác (65,67, 54,33 và 47,33 phôi, tương ứng). Trên môi trường bổ sung TDZ, số phôi hình thành trên mẫu phôi hình tim và phôi có lá mầm tỷ lệ thuận với nồng độ (65,33 và 60,00 phôi). Tuy nhiên, với mẫu phôi hình cầu, số phôi cao nhất ghi nhận ở nồng độ 0,3 mg/l và giảm đáng kể khi tiếp tục tăng nồng độ TDZ (bảng 2). Đồng thời, trọng lượng tươi của cụm phôi ở các mẫu phôi đạt tối ưu tại nồng độ 0,3-0,5 mg/l TDZ (bảng 2) và phôi thứ cấp tạo thành có đầy đủ các dạng bao gồm phôi hình cầu và phôi hình tim và phôi có lá mầm; phôi có màu trắng sáng và màu xanh (hình 2).

Bảng 2. Ảnh hưởng của 2,4-D và TDZ trong môi trường chứa 0,5 mg/l NAA lên sự phát sinh phôi thứ cấp từ các dạng phôi hình cầu, phôi hình tim, phôi có lá mầm của sâm Ngọc Linh sau 6 tuần nuôi cấy *in vitro*.

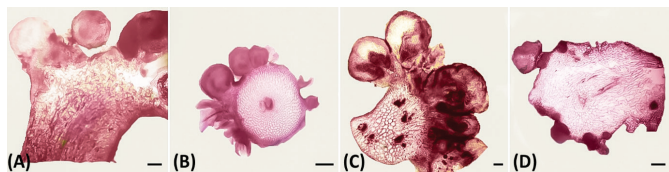
Nguồn mẫu	Nồng độ 2,4-D (mg/l)	Nồng độ TDZ (mg/l)	Tỷ lệ cảm ứng mô sẹo (%)	Tỷ lệ cảm ứng phôi (%)	Số phôi trung bình (phôi/mẫu)	Trọng lượng tươi cụm phôi (g)
Phôi hình cầu	ĐC	-	3,33 ^b	38,33 ^b	4,33 ^a	0,13 ^g
	0,2	-	100,00 ^a	100,00 ^a	32,00 ^{lm}	2,08 ^{ef}
	0,5	-	100,00 ^a	100,00 ^a	65,67 ^b	2,20 ^{de}
	0,7	-	100,00 ^a	100,00 ^a	45,33 ^{efg}	2,27 ^{cd}
	-	0,1	100,00 ^a	100,00 ^a	39,67 ^{hi}	2,11 ^{ef}
	-	0,3	100,00 ^a	100,00 ^a	68,33 ^a	2,26 ^{abc}
	-	0,5	100,00 ^a	100,00 ^a	43,67 ^{fg}	2,46 ^a
Phôi hình tim	ĐC	-	5,33 ^b	29,67 ^c	3,00 ^a	0,13 ^g
	0,2	-	100,00 ^a	100,00 ^a	34,00 ^{kl}	2,40 ^{bcd}
	0,5	-	100,00 ^a	100,00 ^a	54,33 ^d	2,36 ^{bcd}
	0,7	-	100,00 ^a	100,00 ^a	36,67 ^{jk}	2,37 ^{bcd}
	-	0,1	100,00 ^a	100,00 ^a	38,67 ^{ij}	2,34 ^{cde}
	-	0,3	100,00 ^a	100,00 ^a	48,67 ^e	2,36 ^{bcd}
	-	0,5	100,00 ^a	100,00 ^a	65,33 ^b	2,46 ^{abc}
Phôi có lá mầm	ĐC	-	3,67 ^b	16,67 ^d	3,33 ^a	0,15 ^g
	0,2	-	100,00 ^a	100,00 ^a	30,00 ^m	2,17 ^f
	0,5	-	100,00 ^a	100,00 ^a	47,33 ^{ef}	2,30 ^{de}
	0,7	-	100,00 ^a	100,00 ^a	42,33 ^{gh}	2,35 ^{de}
	-	0,1	100,00 ^a	100,00 ^a	35,67 ^{kl}	2,39 ^{bcd}
	-	0,3	100,00 ^a	100,00 ^a	53,00 ^d	2,43 ^{abcd}
	-	0,5	100,00 ^a	100,00 ^a	60,00 ^c	2,47 ^{ab}

Các chữ cái khác nhau (a, b...) trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê tại p<0,05 (Duncan's test).

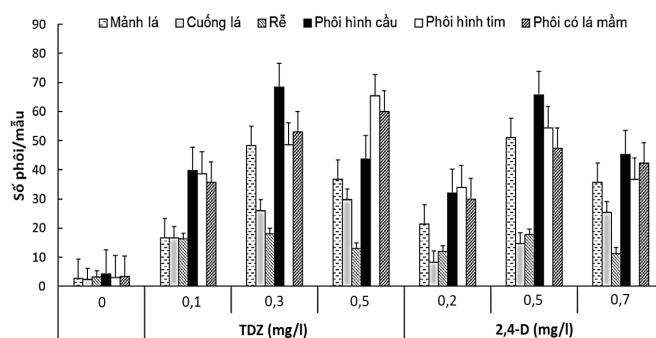


Hình 2. Ảnh hưởng của nồng độ 2,4-D và TDZ tới sự phát sinh phôi từ các dạng phôi hình cầu, phôi hình tim và phôi có lá mầm sâm Ngọc Linh sau 6 tuần nuôi cấy (thước 1 mm). Phôi hình cầu (A), hình tim (B) và có lá mầm (C) trong môi trường bổ sung 0,5 mg/l 2,4-D. Phôi hình cầu (D), hình tim (E) và có lá mầm (F) trong môi trường bổ sung 0,3, 0,5 và 0,5 mg/l TDZ, tương ứng.

Nhìn chung, kết quả thu được từ thí nghiệm trên các môi trường bổ sung 2,4-D, TDZ riêng lẻ cho thấy tất cả các nguồn mẫu thí nghiệm đều có khả năng phát sinh phôi và các phôi chủ yếu được hình thành trực tiếp trên bề mặt của mẫu cây (hình 3). Trong đó, mẫu phôi dạng hình cầu cho số lượng phôi hình thành tối ưu ở nồng độ 0,3 mg/l TDZ và cao hơn các loại mẫu cây mảnh lá, cuống lá, rễ của cây *in vitro* 3 tháng tuổi được sử dụng trong hai thí nghiệm trước đó và các dạng phôi khác. Số phôi hình thành ở các mẫu mảnh lá, rễ và phôi hình cầu có xu hướng giảm khi tăng nồng độ TDZ và 2,4-D lên nồng độ cao nhất, trong khi các mẫu cuống lá ghi nhận xu hướng tăng. Số phôi hình thành ở các mẫu phôi hình tim và phôi có lá mầm có xu hướng tăng khi tăng nồng độ TDZ, nhưng có xu hướng giảm khi tăng nồng độ 2,4-D quá cao (hình 4). Kết quả này phù hợp với các nghiên cứu về sự phát sinh phôi *in vitro* cho thấy tốc độ nhân giống từ phôi cao hơn nhiều so với nhân giống từ mô phân sinh. Các mô có nguồn gốc từ phôi có khả năng phát sinh phôi cao nhất và khả năng này giảm dần ở trụ lá mầm, cuống lá, lá và rễ [4].



Hình 3. Sự phát sinh phôi từ các mẫu mảnh lá, rễ, cuống lá và phôi của sâm Ngọc Linh sau 6 tuần nuôi cấy. (A) Mảnh lá; (B) Rễ; (C) Cuống lá; (D) Phôi vô tính (thước 0,1 mm).



Hình 4. Ảnh hưởng của nồng độ TDZ và 2,4-D lên số phôi thứ cấp hình thành từ các nguồn mẫu cây khác nhau sau 6 tuần nuôi cấy ($p < 0,05$).

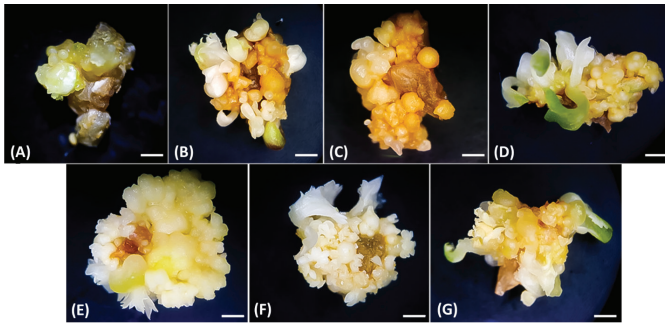
3.3. Ảnh hưởng của việc bổ sung kết hợp của 2,4-D và TDZ lên sự phát sinh phôi thứ cấp từ mẫu phôi hình cầu của sâm Ngọc Linh

Loại vật liệu cho khả năng phát sinh phôi hiệu quả nhất được khảo sát ở các thí nghiệm trên là phôi hình cầu. Để nâng cao hiệu quả phát sinh phôi, mẫu phôi hình cầu được tiếp tục khảo sát sự phát sinh phôi dưới ảnh hưởng của sự kết hợp 2,4-D và TDZ. Sau 6 tuần nuôi cấy, kết quả cho thấy sự kết hợp 2,4-D và TDZ ở nồng độ thích hợp cho khả năng phát sinh phôi thứ cấp đạt hiệu quả cao. Số lượng phôi hình thành cao nhất (73,33 phôi/mẫu) thu được trên môi trường có bổ sung 0,7 mg/l 2,4-D và 0,1 mg/l TDZ (bảng 3, hình 5) và cao hơn so với bổ sung riêng lẻ 0,3 mg/l TDZ (67,00 phôi/mẫu). Trọng lượng tươi cụm phôi cũng đạt cao nhất ở nồng độ 0,7 mg/l 2,4-D và 0,1 mg/l TDZ (2,73 g) (bảng 3). Bên cạnh đó, sự phát triển bình thường của phôi thứ cấp phát sinh từ phôi hình cầu ở nghiệm thức bổ sung kết hợp TDZ và 2,4-D được ghi nhận trên môi trường MS tại các mốc thời gian khác nhau (hình 6).

Bảng 3. Ảnh hưởng kết hợp của 2,4-D và TDZ trong môi trường chứa 0,5 mg/l NAA lên sự phát sinh phôi thứ cấp từ mẫu phôi hình cầu của sâm Ngọc Linh *in vitro* sau 6 tuần nuôi cấy.

Nồng độ 2,4-D (mg/l)	Nồng độ TDZ (mg/l)	Tỷ lệ cảm ứng mô sẹo (%)	Tỷ lệ cảm ứng phôi (%)	Số phôi trung bình (phôi/mẫu)	Trọng lượng tươi cụm phôi (g)	Mô tả
0	0	3,50 ^b	39,67 ^b	4,67 ^c	0,32 ^c	
0	0,3	100,00 ^a	100,00 ^a	67,00 ^c	2,35 ^c	
0,2	0,3	100,00 ^a	100,00 ^a	51,33 ^d	2,05 ^d	Hình thành nhiều dạng phôi,
0,5	0,3	100,00 ^a	100,00 ^a	55,67 ^d	2,62 ^{bc}	bao gồm phôi hình cầu, hình
0,7	0,3	100,00 ^a	100,00 ^a	69,00 ^b	2,57 ^{bc}	tim, phôi có lá
0,7	0,1	100,00 ^a	100,00 ^a	73,33 ^a	2,73 ^a	thật; phôi có màu
0,7	0,5	100,00 ^a	100,00 ^a	69,33 ^b	2,62 ^{bc}	trắng sáng và
0,7	0,7	100,00 ^a	100,00 ^a	59,67 ^{cd}	2,65 ^b	màu xanh

Các chữ cái khác nhau (a, b...) trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê tại $p < 0,05$ (Duncan's test).



Hình 5. Ảnh hưởng kết hợp của 2,4-D và TDZ lên sự phát sinh phôi thứ cấp từ phôi hình cầu của sâm Ngọc Linh sau 6 tuần nuôi cấy (thước 1 mm). (A) Đối chứng; (B-D) Môi trường bổ sung 0,2, 0,5 và 0,7 mg/l 2,4-D kết hợp với 0,3 mg/l TDZ, tương ứng; (E-G) Môi trường bổ sung 0,1, 0,5 và 0,7 mg/l TDZ kết hợp với 0,7 mg/l 2,4-D, tương ứng.



Hình 6. Sự sinh trưởng và phát triển tiếp theo của phôi thứ cấp sâm Ngọc Linh trên môi trường MS sau 3 tuần (A), 8 tuần (B), 12 tuần (C) và 16 tuần (D) nuôi cấy (thước 0,5 cm).

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 [39], các loài thuộc chi *Trifolium* bao gồm cỏ ba lá đỏ (*T. pratense* L.) và khoai mì [40]. 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 nuôi cấy mô thực vật, kiểu phát sinh hình thái được xác định bởi sự cân bằng giữa hormone auxin và cytokinin trong môi trường. Do đó, đối với nhiều loài thực vật, quá trình hình thành phôi vô tính được cảm ứng trong môi trường có chứa auxin và cytokinin [8, 12]. Sự kết hợp của 2,4-D và các chất điều hòa sinh trưởng thực vật khác trong phát sinh phôi đã được báo cáo ở nhiều loài cây thân gỗ [38, 41-44]. Trong thí nghiệm này, sự kết hợp giữa 2,4-D và TDZ cho sự phát sinh phôi tối ưu đối với mẫu phôi hình cầu cây sâm Ngọc Linh.

4. Kết luận

Sau 6 tuần nuôi cấy, nguồn vật liệu từ phôi vô tính cho hiệu quả phát sinh phôi cao hơn các nguồn vật liệu đã biệt hóa từ mảnh lá, cuống lá và rễ của cây *in vitro* 3 tháng tuổi. Số lượng phôi phát sinh cao nhất (73,33 phôi/mẫu) ghi nhận ở mẫu phôi hình cầu được nuôi cấy trên môi trường MS có chứa 0,5 mg/l NAA và bổ sung kết hợp 0,7 mg/l 2,4-D với 0,1 mg/l TDZ. Kết quả của nghiên cứu này góp phần nâng cao hiệu quả vi nhân

giống từ phôi cũng như chọn được nguồn vật liệu thích hợp cho các nghiên cứu có liên quan đến quá trình phát sinh phôi vô tính cây sâm Ngọc Linh.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] N.T. Huong, K. Matsumoto, R. Kasai, et al. (1998), "In vitro antioxidant activity of Vietnamese ginseng saponin and its components", *Biol. Pharm. Bull.*, **21**(9), pp.978-981, DOI: 10.1248/bpb.21.978.
- [2] C. Stasolla, E.C. Yeung (2003), "Recent advances in conifer somatic embryogenesis: Improving somatic embryo quality", *Plant Cell, Tissue Organ Culture*, **74**, pp.15-35, DOI: 10.1023/A:1023345803336.
- [3] G. Raza, M.B. Singh, P.L. Bhalla (2020), "Somatic embryogenesis and plant regeneration from commercial soybean cultivars", *Plants (Basel)*, **9**(1), DOI: 10.3390/plants9010038.
- [4] K.H. Neumann (2000), *Some Studies on Somatic Embryogenesis: A Tool in Plant Biotechnology*, Institute for Plant Nutrition, Justus Liebig University, Germany, 27pp.
- [5] H.F. Sakhanokho, E.M. Babiker, B.J. Smith, et al. (2019), "Highfrequency somatic embryogenesis, nuclear DNA estimation of milkweed species (*Asclepias latifolia*, *A. speciosa*, and *A. subverticillata*), and genome size stability of regenerants", *Plant Cell, Tissue Organ Culture*, **137**(1), pp.149-156, DOI: 10.1007/s11240-019-01559-w.
- [6] P.D. Smitha, K.R. Binoy, S.N. Ashalatha (2020), "Enhanced secondary somatic embryogenesis in suspension culture of four diploid banana cultivars from Kerala", *Int. J. Fruit Sci.*, **20**(2), pp.617-626, DOI: 10.1080/15538362.2020.1753138.
- [7] Y. Bao, G. Liu, X. Shi, et al. (2012), "Primary and repetitive secondary somatic embryogenesis in *Rosa hybrida* 'Samantha'", *Plant Cell, Tissue Organ Culture*, **109**, pp.411-418, DOI: 10.1007/s11240-011-0105-6.
- [8] Y. Guan, S.G. Li, X.F. Fan, et al. (2016), "Application of somatic embryogenesis in woody plants", *Front. Plant Sci.*, **7**, DOI: 10.3389/fpls.2016.00938.
- [9] M.D. Bogdanovic, K.B. Cukovic, A.R. Subotic, et al. (2021), "Secondary somatic embryogenesis in *Centaurea erythraea* Rafn", *Plants*, **10**(2), DOI: 10.3390/plants10020199.
- [10] R.J. Rose, Y. Song (2017), "Somatic embryogenesis", *Encyclopedia of Applied Plant Sciences*, Second Edition, Academic Press, pp.474-479.
- [11] A.M. Wojcik, B. Wojcikowska, M.D. Gaj (2020), "Current perspectives on the auxin-mediated genetic network that controls the induction of somatic embryogenesis in plants", *Int. J. Mol. Sci.*, **21**(4), DOI: 10.3390/ijms21041333.
- [12] J. Yan, P. Peng, G. Duan, et al. (2021), "Multiple analyses of various factors affecting the plantlet regeneration of *Picea mongolica* (H. Q. Wu) W.D. Xu from somatic embryos", *Sci. Rep.*, **11**(1), DOI: 10.1038/s41598-021-83948-w.
- [13] Y. Yang, N. Wang, S. Zhao (2020), "Functional characterization of a WRKY family gene involved in somatic embryogenesis in *Panax ginseng*", *Protoplasma*, **257**(2), pp.449-458, DOI: 10.1007/s00709-019-01455-2.
- [14] H.A.M. Hernandez, M.L. Rodriguez, R.N.A. Montalvo, et al. (2019), "Signaling overview of plant somatic embryogenesis", *Front. Plant Sci.*, **10**, DOI: 10.3389/fpls.2019.00077.

- [15] M.T. Martinez, M.C.S. Jose, A.M. Vieitez, et al. (2017), "Propagation of mature *Quercus ilex* L. (holm oak) trees by somatic embryogenesis", *Plant Cell, Tissue Organ Culture*, **131**, pp.321-333, DOI: 10.1007/s11240-017-1286-4.
- [16] D.T. Nhut, N.P. Huy, H.X. Chien, et al. (2012a), "In vitro culture of petiole longitudinal thin cell layer explants of Vietnamese ginseng (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) and preliminary analysis of saponin content", *Int. J. Appl. Biol. Pharm.*, **3(3)**, pp.178-190.
- [17] D.T. Nhut, B.V.T. Vinh, T.T. Hien, et al. (2012b), "Effects of spermidine, proline and carbohydrate sources on somatic embryogenesis from main root transverse thin cell layers of Vietnamese ginseng (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.)", *Afr. J. Biotechnol.*, **11(5)**, pp.1084-1091, DOI: 10.5897/AJB11.3186.
- [18] V.T. Hien, V.M. Luan, N.P. Huy, et al. (2014), "Direct somatic embryogenesis from leaf, petiole and rhizome explant of *Panax vietnamensis* Ha et Grushv.", *Academia J. Biol.*, **36**, pp.277-282, DOI: 10.15625/0866-7160/v36n1se.4408.
- [19] B.V.T. Vinh, V.T. Thuy, T.T. Hien, et al. (2014), "Factors effecting somatic embryogenesis of Ngoc Linh Ginseng (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.)", *Vietnam J. Sci. Technol.*, **1**, pp.73-84.
- [20] V.T. Hien, N.P. Huy, B.V.T. Vinh, et al. (2016), "Somatic embryogenesis from leaf transverse thin cell layer derived-callus of Vietnamese ginseng (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.)", *Vietnam J. Biotechnol.*, **14**, pp.63-73, DOI: 10.15625/1811-4989/14/1/9294.
- [21] R.L. Peterson, C.A. Peterson, L.H. Melville (2008), *Teaching Plant Anatomy Through Creative Laboratory Exercises*, NRC Press, **104(1)**, 164pp, DOI: 10.1093/aob/mcp112.
- [22] D.B. Duncan (1995), "Multiple range and multiple F tests", *J. Biometrics*, **11(1)**, pp.1-42, DOI: 10.2307/3001478.
- [23] I. Žur, E. Dubas, M. Krzewska, et al. (2015), "Hormonal requirements for effective induction of microspore embryogenesis in triticales ($\times$ *Triticosecale* Wittm.) anther cultures", *Plant Cell Rep.*, **34(1)**, pp.47-62, DOI: 10.1007/s00299014-1686-4.
- [24] T. Isah (2016), "Induction of somatic embryogenesis in woody plants", *Acta Physiol. Plant.*, **38(5)**, DOI: 10.1007/s11738-016-2134-6.
- [25] N. Sabooni, A. Shekafandeh (2017), "Somatic embryogenesis and plant regeneration of blackberry using the thin cell layer technique", *Plant Cell, Tissue Organ Culture*, **130**, pp.313-321, DOI: 10.1007/s11240-017-1225-4.
- [26] C.M. Liu, Z.H. Xu, N. Chua (1993), "Auxin polar transport is essential for the establishment of bilateral symmetry during early plant embryogenesis", *Plant Cell*, **5(6)**, pp.621-630, DOI: 10.1105/tpc.5.6.621.
- [27] M. Umehara, H. Kamada (2005), "Development of the embryo proper and the suspensor during plant embryogenesis", *Plant Biotechnology*, **22(4)**, pp.253-260, DOI: 10.5511/plantbiotechnology.22.253.
- [28] S. Avci, E. Can (2006), "Efficient somatic embryogenesis from immature inflorescences of Dallisgrass (*Paspalum dilatatum* Poir.)", *Prop. Orn. Plants*, **6(3)**, pp.134-139.
- [29] T.H. Przybył, E. Ratajczak, A. Obarska, et al. (2020), "Different roles of auxins in somatic embryogenesis efficiency in two *Picea* species", *Int. J. Mol. Sci.*, **21(9)**, DOI: 10.3390/ijms21093394.
- [30] H.J. Gladfelter, J. Johnston, H.D. Wilde, et al. (2021), "Somatic embryogenesis and cryopreservation of *Stewartia* species", *Plant Cell, Tissue Organ Culture*, **144**, pp.211-221, DOI: 10.1007/s11240-020-01834-1.