

NÂNG CAO TẦN SUẤT PHÁT SINH PHÔI VÔ TÍNH CÂY SÂM NGỌC LINH (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) THÔNG QUA KHỬ TRÙNG MẪU CÂY LÁ BẰNG NANO BẠC VÀ BỔ SUNG NANO BẠC TRONG MÔI TRƯỜNG NUÔI CÂY

Đỗ Mạnh Cường^{1,2}, Hoàng Thanh Tùng¹, Hoàng Đắc Khải¹, Vũ Quốc Luận¹, Vũ Thị Hiền¹, Trương Thị Bích Phượng², Dương Tấn Nhựt^{1,✉}

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

²Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế

✉Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: duongtannhut@gmail.com

Ngày nhận bài: 02.12.2019

Ngày nhận đăng: 20.6.2020

TÓM TẮT

Công nghệ phôi vô tính là công nghệ rất có triển vọng cho việc nhân nhanh những cây dược liệu có giá trị. Trong nghiên cứu này, các mẫu lá sâm Ngọc Linh *ex vitro* được khử trùng bằng nano bạc ở nồng độ và thời gian khác nhau để khử các tác nhân gây nhiễm và cảm ứng tạo mô sẹo làm vật liệu cho nuôi cấy phát sinh phôi vô tính. Kết quả mẫu lá được khử nhiễm trong 3 loại chất khử trùng [Nano bạc, HgCl₂ và Ca(ClO₂)] thu được như sau: mẫu lá cho tỷ lệ nhiễm thấp nhất (20,00%) ở nồng độ 0,5 g/L nano bạc trong 15 phút; tỷ lệ hình thành mô sẹo và khối lượng tươi cao nhất (72,22% và 0,77 g) ở nồng độ 0,2 g/L nano bạc trong 20 phút khi nuôi cấy trên môi trường SH có bổ sung 1 mg/L 2,4-D và 0,2 mg/L TDZ. Quá trình phát sinh phôi và hình thành chồi tốt nhất khi các mô sẹo thu được nuôi cấy trên môi trường MS có chứa 1 mg/L 2,4-D; 0,5 mg/L NAA; 0,2 mg/L Kin và bổ sung 1,6 mg/L nano bạc; số lượng phôi hình thành trung bình là 27,33 phôi sau 8 tuần nuôi cấy [hơn gấp 2 lần so với nghiệm thức đối chứng (không có bổ sung nano bạc)]. Các cây hình thành từ chồi trên có chiều cao cây, số rễ, chiều dài rễ, khối lượng tươi, khối lượng khô cao hơn so với đối chứng khi nuôi cấy trên môi trường SH có chứa 1 mg/L NAA và bổ sung 1,2 mg/L nano bạc. Nghiên cứu này cho thấy, hiệu quả sử dụng nano bạc thông qua tiền xử lý và bổ sung vào môi trường nuôi cấy đã đạt hiệu quả cao trong khử trùng, cảm ứng hình thành mô sẹo, nâng cao tần suất phát sinh phôi và tạo cây con hoàn chỉnh của cây sâm Ngọc Linh trong điều kiện nuôi cấy *in vitro* và chuẩn hóa cây con ở giai đoạn vườn ươm.

Từ khóa: mô sẹo, nano bạc, phát sinh phôi, phôi vô tính, sâm Ngọc Linh

MỞ ĐẦU

Sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) thuộc họ Nhân sâm (Araliaceae) là một loài dược liệu quý hiếm và đặc hữu có trong sách đỏ Việt Nam, đang có nguy cơ bị tuyệt chủng cần được bảo tồn (Bộ Khoa học và Công nghệ, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam, 2007). Sâm Ngọc Linh chứa 52 loại saponin, 17 acid amin, 20 chất khoáng vi lượng, 0,1% tinh dầu; nhờ chứa thành phần tự nhiên

quý saponin, loài sâm này có tác dụng dược lý rất quan trọng, giúp tăng cường hệ miễn dịch và ngăn ngừa ung thư. Tại hội nghị quốc tế về sâm, sâm Ngọc Linh được xếp vào nhóm các loài sâm quý trên thế giới cùng với sâm Triều Tiên (*Panax ginseng*), sâm Mỹ (*Panax quinquefolium*) (Phai *et al.*, 2002). Hiện nay, loài sâm này chỉ được trồng tập trung ở vùng núi Ngọc Linh và thời gian từ lúc gieo hạt cho đến khi thu được củ lên đến 5 - 6 năm. Chính vì vậy, sâm Ngọc Linh đã sớm cạn kiệt và đang

đứng trước nguy cơ bị tuyệt chủng do việc khai thác và sử dụng quá mức, ảnh hưởng đến nguồn gen quý. Đứng trước thực trạng đó, kỹ thuật nuôi cấy mô tế bào thực vật đã được áp dụng cho loài cây này: tạo mô sẹo thu sinh khối ban đầu từ mẫu cây lá, cuốn lá, thân và rễ củ (Nguyễn Ngọc Dung, 1995); nhân nhanh số lượng cây sâm Ngọc Linh trong thời gian ngắn mà vẫn đảm bảo chất lượng cây giống (Dương Tấn Nhựt *et al.*, 2010). Trong đó, nhân giống vô tính thông qua con đường phát sinh phôi vô tính đã mang lại nhiều ứng dụng thực tiễn, có tính thương mại cao bởi tạo ra lượng lớn cây con sâm Ngọc Linh trong thời gian ngắn, cây con đồng đều về di truyền và có tỷ lệ sống sót cao ngoài vườn ươm.

Tương tự phôi hữu tính, phôi vô tính gồm có mầm chóp rễ và chồi đỉnh nên có thể nảy mầm thành một cây hoàn chỉnh. Tuy nhiên, sự hình thành phôi vô tính là một quá trình phức tạp, chịu ảnh hưởng của nhiều yếu tố như nguồn mẫu, nhiệt độ, ánh sáng, độ pH... Trong đó, các chất điều hòa sinh trưởng như 2,4-D, NAA, Kinetin... đóng vai trò rất quan trọng (Nhut *et al.*, 2012).

Trong những năm gần đây, các ion bạc ở dạng muối bạc nitrate, bạc thiosulphate được ứng dụng nhiều trong nuôi cấy mô tế bào thực vật nhờ đặc tính kháng nấm, kháng khuẩn, không gây ảnh hưởng đến sức khỏe của con người (Abdi *et al.*, 2012). Mặt khác, các ion bạc còn đóng vai trò quan trọng trong sự phát triển của mô sẹo, tái tạo và phát sinh phôi soma, tái sinh chồi trong nuôi cấy *in vitro* (Bais *et al.*, 2000). Tuy nhiên, các ion bạc luôn đi kèm với các cation tồn tại ở dạng muối (AgNO_3 , Ag_2SO_4) điều này ảnh hưởng đến hiệu quả khử trùng và hấp thu của ion bạc.

Để khắc phục tình trạng trên, dung dịch nano bạc gồm các ion có kích thước từ 1 đến 20 nm và với kích thước cực kỳ nhỏ này, các hạt nano có diện tích bề mặt lớn làm tăng khả năng tiếp xúc và sự bám dính trên bề mặt tế bào. Do đó, hiệu quả tác động cao (Sondi, Salopek-Sondi, 2004; Shah, Belozerovala, 2008).

Vì vậy, chúng tôi thực hiện nghiên cứu này, nhằm khảo sát và đánh giá khả năng tiền xử lý bằng nano bạc trong giai đoạn khử trùng mẫu cây và ảnh hưởng của nồng độ nano bạc lên quá trình tạo mô sẹo, tần suất phát sinh phôi soma, hình thành rễ, củ và tạo cây con hoàn chỉnh của cây sâm Ngọc Linh trong điều kiện *in vitro*.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguồn mẫu

Lá non của cây sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv) khoảng 3 năm tuổi sinh trưởng và phát triển tốt, không bị sâu bệnh hiện có tại vườn ươm của Công ty S.U.N (Công ty sản xuất giống Sâm Ngọc Linh) được chọn làm nguồn mẫu ban đầu.

Vật liệu nano

Dung dịch nano bạc do Viện Công nghệ Môi trường cung cấp với các hạt nano bạc có kích thước trung bình ≤ 20 nm được thiết lập theo tỷ lệ: $\text{AgNO}_3 = 700 - 1000$ ppm, β -chitosan = 250 - 300 ppm, $\text{NaBH}_4 = 200$ ppm, tỷ lệ mol $\text{NaBH}_4/\text{AgNO}_3 = 1/4$, tốc độ nhỏ giọt $\text{NaBH}_4 = 10 - 12$ giọt/phút (Chau *et al.*, 2008).

Môi trường nuôi cấy

Môi trường nuôi cấy là môi trường MS (Muraghige, Skoog, 1962), SH (Schenk, Hidebrandt, 1972) có bổ sung chất điều hòa sinh trưởng tùy theo từng giai đoạn phát triển của mẫu cây. Tất cả các môi trường nuôi cấy được điều chỉnh về pH = 5,8; trước khi rót bình thủy tinh 250 ml chứa 40 ml môi trường. Sau đó, toàn bộ môi trường được hấp khử trùng ở nhiệt độ 121°C, áp suất 1 atm trong thời gian 20 phút.

Khử trùng mẫu lá và tạo mô sẹo

Lá non của cây sâm Ngọc Linh được rửa sạch dưới vòi nước máy sau đó ngâm với cồn 70% trong 30 giây, rửa lại với nước cất vô trùng 3 lần và khử trùng bằng dung dịch nano bạc với các nồng độ khác nhau (0,05; 0,1; 0,2; 0,5 g/L), trong các khoảng thời gian thay đổi (5, 10, 15, 20, 30 phút). Nghiệm thức đối chứng sử dụng chất khử trùng calcium hypochlorite ($\text{Ca}(\text{ClO})_2$)

60 g/L trong thời gian 10 phút và dung dịch mercury chloride (HgCl_2) 1 g/L trong thời gian 5 phút (Ngô Xuân Bình, 2010). Những mẫu lá này sau khi khử trùng được cắt thành hình tròn có đường kính 1 cm bằng dụng cụ cắt (Đương Tấn Nhựt, 2012), sau đó được cấy trên môi trường SH có bổ sung 1 mg/L 2,4-D; 0,2 mg/L TDZ; 30 g/L sucrose và 8,5 g/L agar (Nhựt *et al.*, 2010). Mỗi nghiệm thức tiến hành trên 30 bình, mỗi bình cấy 1 mẫu. Thí nghiệm này nhằm theo dõi: tỷ lệ nhiễm (%), tỷ lệ tái sinh (%), khối lượng tươi (g), hình thái mẫu cấy để nghiên cứu vai trò của nano bạc trong khử trùng và cảm ứng tạo mô sẹo sau 6 tuần nuôi cấy.

Phát sinh phôi soma

Để nghiên cứu quá trình phát sinh phôi soma, các mô sẹo (1,5 x 1,5 cm, có khối lượng khoảng 0,5 g) từ nghiệm thức tốt nhất trên được cấy vào môi trường MS có chứa 1 mg/L 2,4-D; 0,5 mg/L NAA; 0,2 mg/L Kin, 30 g/L sucrose và 8,5 g/L agar (Nhut *et al.*, 2012) và nano bạc được bổ sung với các tỷ lệ khác nhau (0; 0,4; 0,8; 1,2; 1,6; 2 mg/L). Mỗi nghiệm thức tiến hành trên 30 bình, mỗi bình cấy 1 mẫu. Các chỉ tiêu theo dõi: tỷ lệ phát sinh phôi (%), số chồi/bình được xác định nhằm khảo sát ảnh hưởng của nano bạc ở những nồng độ khác nhau lên quá trình phát sinh phôi sau 8 tuần nuôi cấy.

Tạo cây con hoàn chỉnh

Chồi thu nhận từ nghiệm thức tốt nhất ở thí nghiệm trên được cấy vào môi trường SH chứa 1 mg/L NAA; 30 g/L sucrose và 8,5 g/L agar (Nhut *et al.*, 2011) và nano bạc được bổ sung với các tỷ lệ khác nhau (0; 0,8; 1,2; 1,6; 2 mg/L). Mỗi nghiệm thức tiến hành trên 30 bình, mỗi bình cấy 1 mẫu. Các chỉ tiêu theo dõi: chiều cao cây (cm), số rễ, chiều dài rễ (cm), khối lượng tươi (g), khối lượng khô (g) được xác định nhằm khảo sát ảnh hưởng của nano bạc đến quá trình tạo cây con hoàn chỉnh sau 12 tuần nuôi cấy.

Điều kiện nuôi cấy

Điều kiện *in vitro*, các thí nghiệm được tiến hành trong điều kiện nhiệt độ phòng $25 \pm 2^\circ\text{C}$,

chu kỳ chiếu sáng 16 giờ/ngày, cường độ 40 - 45 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ dưới ánh sáng đèn huỳnh quang, độ ẩm trung bình 55 - 60%.

Xử lý số liệu

Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Tất cả các số liệu sau khi thu thập ứng với từng chỉ tiêu theo dõi được xử lý bằng phần mềm MicroSoft Excel[®] 2017 và phần mềm phân tích thống kê SPSS 16.0 theo phương pháp Duncan's test với $\alpha = 0,05$ (Duncan, 1955).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Khử trùng mẫu lá và tạo mô sẹo

Sau 6 tuần nuôi cấy, kết quả ghi nhận cho thấy khả năng khử trùng mẫu cấy của nano bạc ở các nồng độ và thời gian xử lý khác nhau có sự khác biệt so với các chất khử trùng thông dụng (HgCl_2 và $\text{Ca}(\text{ClO})_2$) (Bảng 1 và Hình 1).

Theo quan sát, tất cả các mẫu lá nghiệm thức khử trùng bằng nano bạc nồng độ thấp và thời gian ngắn kết quả ghi nhận nhiễm nấm 100% (Bảng 1); các nghiệm thức còn lại số lượng nhiễm dao động từ 20 - 70% phụ thuộc vào nồng độ và thời gian khử trùng. Trong đó, tỷ lệ nhiễm nghiệm thức đối chứng HgCl_2 , $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ (36,66%; 48,88% lần lượt) cao hơn rất nhiều so với nghiệm thức khử trùng nano bạc (nồng độ 0,2 g/L trong 20 phút (26,66%) và 0,5 g/L trong 15 phút (20,00%)). Khi đó, tỷ lệ nhiễm của nghiệm thức khử trùng bằng nano bạc nồng độ 0,5 g/L trong 15 phút là thấp nhất. Điều này cho thấy, tác dụng diệt khuẩn của nano bạc hiệu quả theo nhiều cơ chế khác nhau (Chaloupka *et al.*, 2010); cả hai yếu tố nồng độ và thời gian là những yếu tố then chốt quan trọng trong khử trùng mẫu cấy. Ngoài ra, trong thí nghiệm này cũng quan sát thấy hiện tượng mẫu bị nhiễm khuẩn về sau ở nồng độ (0,2 g/L và 0,5 g/L) ở thời gian 30 phút; điều này có thể thấy, nếu nồng độ khử trùng đạt hiệu quả cao nhưng ở thời gian dài thì mẫu cấy dễ phát sinh khuẩn.

Mặt khác, khi quan sát tỷ lệ hình thành mô sẹo của thí nghiệm này cho thấy nghiệm thức

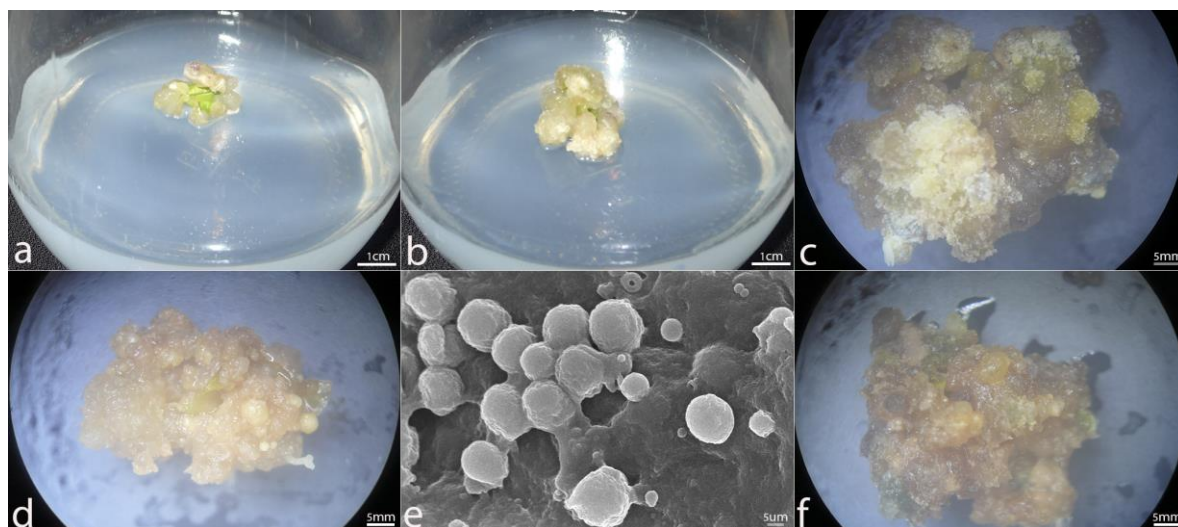
khử trùng nano bạc nồng độ 0,2 g/L trong 20 phút là tốt nhất (72,22%) cao hơn nghiệm thức 0,5 g/L trong 15 phút (66,67%) và cả hai nghiệm thức này đều cao hơn rất nhiều so với nghiệm thức đối chứng HgCl₂, Ca(ClO)₂ (46,66%, 56,66% lần lượt). Mặc dù, tỷ lệ nhiễm của nghiệm thức 0,2 g/L trong 20 phút (26,66%)

cao hơn so với nghiệm thức 0,5 g/L trong 15 phút (20,00%); nhưng tỷ lệ hình thành mô sẹo mới là yếu tố quyết định trong nghiên cứu này. Từ điều này có thể thấy, nồng độ là yếu tố quyết định đến hiệu quả khử trùng; thời gian là yếu tố chi phối tỷ lệ hình thành mô sẹo trong khử trùng mẫu cấy.

Bảng 1. Khả năng khử trùng mẫu cấy của nano bạc và các chất khử trùng thông dụng sau 6 tuần nuôi cấy.

Chất khử trùng	Nồng độ (g/L)	Thời gian khử trùng (phút)	Tỷ lệ nhiễm (%)	Tỷ lệ hình thành mô sẹo (%)	Khối lượng tươi (g)	Hình thái mẫu
Nano bạc	0,05	5	100,00 ^{e*}	-	-	Mẫu nhiễm nấm
		10	100,00 ^e	-	-	
		15	100,00 ^e	-	-	
		20	100,00 ^e	-	-	
		30	68,88 ^d	24,44 ^f	0,44 ^e	
	0,1	5	100,00 ^e	-	-	Mẫu nhiễm nấm
		10	100,00 ^e	-	-	Màu trắng ngà
		15	63,33 ^{cd}	30,00 ^{df}	0,54 ^{cd}	
		20	60,00 ^{cd}	33,33 ^{df}	0,66 ^b	
		30	70,00 ^d	23,33 ^f	0,51 ^d	
	0,2	5	100,00 ^e	-	-	
		10	58,89 ^{cd}	34,44 ^{df}	0,57 ^{cd}	Màu trắng ngà
		15	36,67 ^{ab}	56,66 ^{abc}	0,53 ^d	
		20	26,66^a	72,22^a	0,77^a	
		30	100,00 ^e	-	-	
	0,5	5	52,22 ^{bcd}	41,11 ^{cde}	0,67 ^b	
		10	47,77 ^{bc}	45,55 ^{cd}	0,57 ^{cd}	
		15	20,00 ^a	66,67 ^{ab}	0,58 ^{cd}	
		20	35,55 ^{ab}	57,77 ^{abc}	0,61 ^{bc}	
		30	100,00 ^e	-	-	Mẫu nhiễm khuẩn
HgCl ₂	1	5	48,88 ^{bc}	46,66 ^{bcd}	0,41 ^e	Mô sẹo hoá nâu
Ca(ClO) ₂	60	10	36,67 ^{ab}	56,66 ^{abc}	0,44 ^e	Mô sẹo hoá nâu

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



Hình 1. Sự hình thành mô sẹo từ lá. **a, b,** Mô sẹo sau 1 tuần và 3 tuần nuôi cấy; **c,** Mô sẹo xốp dần sau 4 tuần nuôi cấy; **d,** Mô sẹo trắng ngà sau 6 tuần nuôi cấy; **e,** Các mô phôi hình cầu (Ảnh chụp hiển vi điện tử: SEM); **f,** Mô sẹo chết dần sau 6 tuần nuôi cấy.

Bên cạnh đó, sự phát triển của mô sẹo là quan trọng nhất trong thí nghiệm này. Sau 1 tuần nuôi cấy, nghiệm thức khử trùng nano bạc đã thấy mô sẹo hình thành xung quanh mép cắt của lá (Hình 1a) sau đó lan dần đến toàn bộ bề mặt lá (Hình 1b); nghiệm thức khử trùng bằng HgCl_2 và $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ sự tái sinh mô sẹo diễn ra chậm hơn (tuần thứ 3). Điều này có thể giải thích, chất điều hoà sinh trưởng là yếu tố cảm ứng; nano bạc là nhân tố kích thích, điều khiển quá trình tạo mô sẹo. Sau 4 tuần nuôi cấy, ở nghiệm thức khử trùng nano bạc các mô sẹo xốp dần, có sự hình thành diệp lục tố, sinh phôi và đôi khi có hình thành cụm mô với kết cấu toi xốp trắng (Hình 1c). Sau 6 tuần nuôi cấy, kết quả so sánh khối lượng tươi cho thấy, tất cả các nghiệm thức khử trùng bằng nano bạc đều có khối lượng tối thiểu bằng và/hoặc đa số cao hơn (0,44 - 0,77 g) so với nghiệm thức đối chứng HgCl_2 , $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ (0,41 g; 0,44 g tương ứng); cao nhất vẫn ở nghiệm thức 0,2 g/L trong 20 phút (0,77 g). Mô sẹo ở nghiệm thức khử trùng bằng nano bạc đều có màu trắng ngà (Hình 1d) và có khả năng phát sinh phôi (Hình 1e); đặc biệt, mô sẹo đạt chuẩn nhất ở nghiệm thức khử trùng nồng độ 0,2 g/L trong 20 phút có khả năng sinh phôi với hiệu suất cao nhất; nghiệm thức khử trùng bằng HgCl_2 và $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ mô sẹo hoá nâu

và chết dần (Hình 1f) nếu không được cấy chuyển từ sớm. Như vậy, hiệu quả của nano bạc là khá rõ ràng trong thí nghiệm này; các chất khử trùng thông dụng (HgCl_2 và $\text{Ca}(\text{ClO})_2$) có sự tái sinh mô sẹo chậm hơn so với nano bạc và chu kỳ phát triển mô sẹo ngắn, khả năng biệt hoá tạo mô sẹo không cao, không rõ ràng như nano bạc; mặc dù, tất cả các nghiệm thức trong thí nghiệm đều hình thành mô sẹo và có cấu trúc cơ bản giống nhau. Thực vậy, tất cả những thay đổi về chất, nồng độ và thời gian các ion kim loại dùng khử trùng mẫu cây đều có thể dẫn đến hình thành những tín hiệu ion kim loại khác nhau ảnh hưởng đến tế bào (Dean *et al.*, 2012); cộng với cấu trúc hạt đạt kích thước tới hạn của nano bạc sẽ cho phép một lượng lớn nguyên tử có thể tương tác tiếp xúc bề mặt, dễ dàng xâm nhập, tác động sâu bên trong tế bào làm tăng đáng kể hiệu quả khử trùng, tạo ra sự khác biệt trong tốc độ cảm ứng và phát triển của mẫu cấy so với những vật liệu thô (Navarro *et al.*, 2008; Shah, Belozero, 2008; Nasser *et al.*, 2013).

Phát sinh phôi soma

Sau tuần thứ 4 nuôi cấy trên môi trường, các mô phôi soma dạng cầu (Hình 2b) đầu tiên được quan sát ở các nghiệm thức bổ sung nano bạc; nghiệm thức đối chứng các mô phôi này bắt đầu

xuất hiện ở tuần thứ 7 (không đáng kể). Điều này cho thấy, nano bạc còn có vai trò kích thích hình sự thành mô phôi.

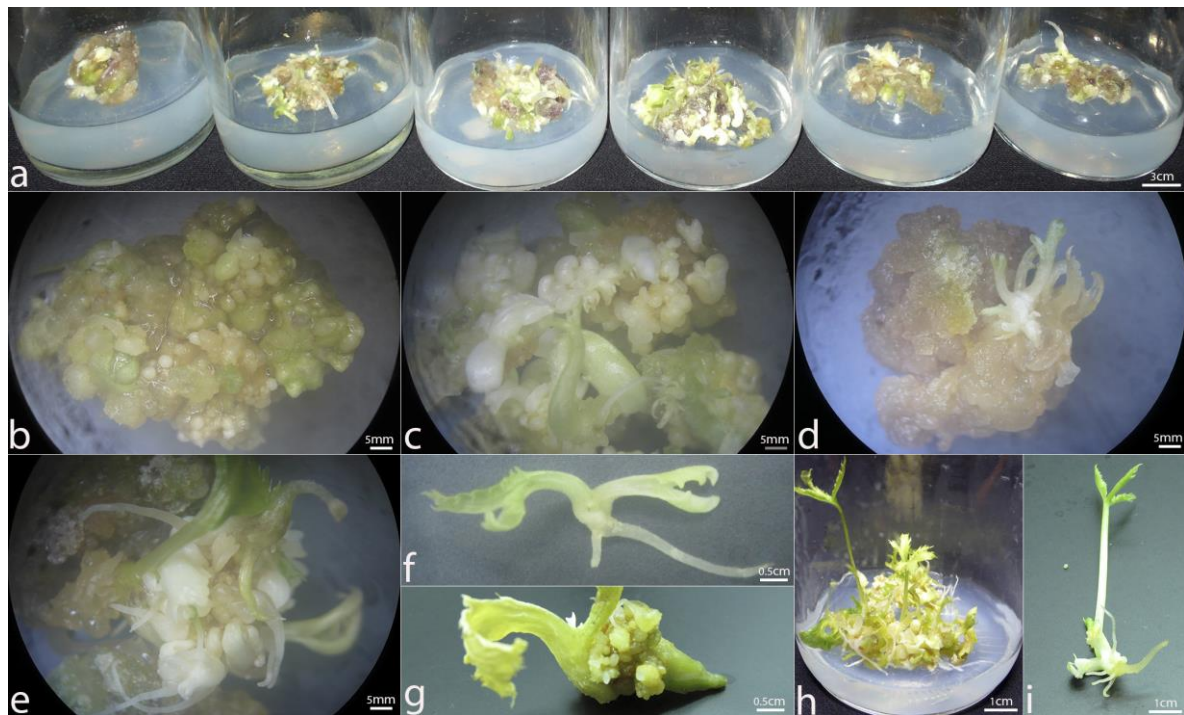
Sau 8 tuần nuôi cấy, kết quả ghi nhận tỷ lệ mẫu tạo phôi và số lượng phôi hình thành trên mẫu khác nhau ở các nghiệm thức thí nghiệm (Bảng 2). Nghiệm thức có bổ sung 1,2 mg/L

nano bạc cho tỷ lệ mẫu tạo phôi cao nhất đạt 82,22%; trong khi đó tỷ lệ này ở nồng độ 1,6 mg/L chỉ đạt 76,66%, nhưng số phôi/mẫu đạt cao nhất (27,33 phôi) (Hình 2a). Đặc biệt, khi so sánh với đối chứng (12,66 phôi), thì tỷ lệ phôi/mẫu ở nghiệm thức bổ sung 1,6 mg/L nano bạc cao hơn đáng kể, gấp 2,15 lần.

Bảng 2. Khả năng kích thích phát sinh phôi soma của nano bạc sau 8 tuần nuôi cấy.

Nồng độ (mg/L)	0,0	0,4	0,8	1,2	1,6	2,0
Tỷ lệ tạo phôi (%)	31,11 ^c	36,66 ^{bc}	56,66 ^{abc}	82,22 ^a	76,66^a	61,11 ^{ab}
Số phôi/ bình	12,66 ^c	16,33 ^{bc}	20,33 ^{abc}	21,33 ^{ab}	27,33^a	15,33 ^{bc}

Ghi chú: *Những chữ cái khác nhau (a,b,c,...) trong cùng một hàng thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa ở mức $\alpha = 0,05$ trong phép thử Duncan.



Hình 2. Sự kích thích phát sinh phôi soma. **a**, Phôi soma ở các nồng độ nano bạc khác nhau (0; 0,4; 0,8; 1,2; 1,6; 2 mg/L, từ trái qua phải) sau 8 tuần nuôi cấy; **b**, Mô phôi soma ở nano bạc nồng độ 1,6 mg/L sau 4 tuần nuôi cấy; **c, e**, Phôi soma ở nano bạc nồng độ 1,6 mg/L sau 8 tuần nuôi cấy; **d**, Phôi soma ở nghiệm thức đối chứng sau 8 tuần nuôi cấy; **f**, Phôi có hình thái 2 lá mầm đặc trưng; **g**, Hình thành các phôi thứ cấp; **h, i**, Hình thành chồi sau 6 tuần nuôi cấy.

Bên cạnh đó, các hình thái phôi khác nhau cũng được ghi nhận; ở nồng độ thấp của nano bạc (0,4 mg/L) và đối chứng chủ yếu kích thích sự hình thành mô sẹo (Hình 1d); ở nồng độ cao của nano bạc (2,0 mg/L) mô sẹo bị ức chế khả năng tái sinh, mất dần khả năng tạo phôi và chai sần, không có khả năng phát triển (Hình 2a). Ở nghiệm thức bổ sung 1,6 mg/L nano bạc cho tỷ lệ tạo phôi tốt nhất; có dạng phôi hình cầu, hình tim là chủ yếu. Nhìn chung, các thể phôi đã đi vào trạng thái biệt hóa có bề mặt trơn láng, dần hình thành phát thể hai lá mầm đặc trưng (Hình 2c) và phát triển thành phôi trưởng thành với đầy đủ 2 cực chồi có màu xanh và rễ mầm (Hình 2e, f). Các phôi trưởng thành này bị ngăn cách với môi trường bởi lớp mô sẹo bên dưới, khi được cấy chuyên qua môi trường tương tự các phôi này tiếp tục phát triển thành chồi con hoàn chỉnh sau 6 tuần nuôi tiếp theo (Hình 2h, i).

Theo quan sát, nghiệm thức bổ sung nano bạc và đặc biệt nghiệm thức bổ sung nano bạc nồng độ 1,6 mg/L có sự hình thành các cụm mô phôi tròn nhỏ (“nốt phôi”) trên khắp bề mặt phôi cầu đơn và phôi cầu đôi, trên khắp phần thân và thậm chí trên rễ của phôi đơn và phôi đôi (Hình 2g). Sự tăng sinh mô phôi là do hiện tượng sinh phôi thứ cấp nói chung bao gồm phôi thứ cấp cấp 1, cấp 2 từ phôi sơ cấp liên tục xảy ra trong quá trình nuôi dẫn đến sự hình thành cụm đa phôi; phôi thứ cấp có thể ở dạng cầu, hay mang phác thể lá mầm. Kết quả trên có thể cho thấy, nano bạc đã được chuyển hoá và sử dụng để hỗ trợ cho quá trình kích thích, phát triển phôi soma (Larue *et al.*, 2014), nano bạc có thể dễ dàng thâm nhập vào lớp biểu bì gốc, khí khổng hoặc nội mạc tế bào (Sondi, Salopek, 2004; Kim *et al.*, 2007; Navarro *et al.*, 2008). Vậy, các nano bạc đóng một vai trò thiết yếu trong quá trình hô hấp, tăng trưởng, sao chép gen, nhân đôi tế bào, phát triển phôi soma (Dean *et al.*, 2012).

Về lý thuyết, mỗi tế bào thực vật sống đều có khả năng phát sinh phôi soma. Quá trình phát sinh phôi soma Ngọc Linh cũng đã được nghiên cứu; ảnh hưởng của nguồn mẫu, thành phần khoáng, chất điều hoà sinh trưởng, spermidine, proline và nguồn carbohydrate lên khả năng

phát sinh phôi soma sâm Ngọc Linh (Bùi Văn Thế Vinh *et al.*, 2014); Nguyễn Việt Cường và đồng tác giả (2013) đã báo cáo ảnh hưởng của AgNO₃ lên sự sinh trưởng và phát triển *in vitro* của cây sâm Ngọc Linh. Bên cạnh đó, AgNO₃ cũng đã được nghiên cứu trong quá trình tạo phôi soma trên nhiều đối tượng khác nhau như là Buffalograss (Fei *et al.*, 2000), *Coffea* sp. (Fuentes *et al.*, 2000; Giridhar *et al.*, 2004), Carrot (Nissen, 1994), White spruce (Kong, Yeung, 1994), *Triticum durum* (Fernandez *et al.*, 1999) và *Zea mays* (Vain Hort, Flament, 1989; Vain Hort *et al.*, 1989; Songstad *et al.*, 1991). Trong nghiên cứu này, lần đầu tiên nano bạc được sử dụng trong nghiên cứu quá trình phát sinh phôi soma sâm Ngọc Linh, nghiệm thức bổ sung nano bạc nồng độ 1,6 mg/L là tốt nhất cho quá trình phát sinh phôi soma.

Tạo cây con hoàn chỉnh

Các nồng độ nano bạc khác nhau sẽ ảnh hưởng khác nhau lên sự sinh trưởng và phát triển của chồi sâm Ngọc Linh nuôi cấy *in vitro*. Kết quả thu được sau 12 tuần nuôi cấy chồi sâm được chi ra ở Bảng 3.

Sau 4 tuần nuôi cấy cho thấy rễ hình thành hầu hết ở tất cả các nghiệm thức bổ sung nano bạc (Hình 3), nghiệm thức đối chứng ghi nhận sự hình thành rễ ở tuần thứ 6. Số liệu sau 12 tuần cho thấy, các chỉ tiêu theo dõi như chiều cao cây, số rễ, khối lượng tươi, khối lượng khô của nghiệm thức bổ sung nano bạc nồng độ 1,2 mg/L (6,75 cm; 8,66 rễ; 1,56 g; 1,19 g lần lượt) cao hơn đáng kể so với đối chứng (3,98 cm; 2,33 rễ; 0,84 g; 0,46 g lần lượt) và các nghiệm thức bổ sung nano bạc còn lại (Bảng 3). Đối với chỉ tiêu chiều dài rễ ở nghiệm thức bổ sung nano bạc nồng độ 0,8 mg/L (5,13 cm) tỏ ra vượt trội hơn các nghiệm thức còn lại; nhưng các rễ này phát triển không đồng đều, có hiện tượng mọng nước ở thân, lá, và có hiện tượng đa thân. Ở nghiệm thức bổ sung nano bạc nồng độ 1,6 mg/L xuất hiện các mô phôi tròn, nhỏ ở gốc cây. Ở nghiệm thức bổ sung nano bạc nồng độ 2,0 mg/L các cây bị khản, già hoá; mặt dù, vẫn có rễ, thân, lá đầy đủ. Ở nghiệm thức đối chứng, cây phát triển chậm và

yếu; khối lượng tươi, khối lượng khô (0,84 g; 0,46 g lần lượt) xấp xỉ bằng ½ so với nghiệm thức bổ sung nano bạc nồng độ 1,2 g/L (1,56 g; 1,19 g lần lượt).

Bảng 3. Khả năng hình thành rễ và tạo cây con hoàn chỉnh của nano bạc sau 12 tuần nuôi cấy.

Nồng độ (mg/L)	Chiều cao cây (cm)	Số rễ	Chiều dài rễ (cm)	Khối lượng tươi (g)	Khối lượng khô (g)
0,0	3,98 ^{bc*}	2,33 ^c	1,83 ^c	0,84 ^b	0,46 ^b
0,8	5,31 ^{ab}	6,33 ^b	5,13 ^a	1,31 ^{ab}	0,86 ^{ab}
1,2	6,75^a	8,66^a	3,83^b	1,56^a	1,19^a
1,6	3,89 ^{bc}	4,66 ^b	1,80 ^b	1,25 ^{ab}	0,80 ^{ab}
2,0	3,39 ^c	6,00 ^b	2,76 ^{bc}	0,89 ^b	0,54 ^b

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



Hình 3. Khả năng hình thành rễ và tạo cây con hoàn chỉnh của các nồng độ nano bạc khác nhau (0; 0,8; 1,2; 1,6; 2 mg/L, từ trái qua phải) sau 12 tuần nuôi cấy.

Sâm Ngọc Linh thuộc loài cây lâu năm có củ và thân giả, sự hình thành cây hoàn chỉnh là rất quan trọng. Ảnh hưởng của AgNO_3 đến sự hình thành cây hoàn chỉnh trong ống nghiệm đã được nghiên cứu trên cây *Decalepis hamiltonii* (Bais *et al.*, 2000a; Reddy *et al.*, 2001); *Vanilla planifolia* (Giridhar *et al.*, 2001) các cây con *in vitro* thu được trên môi trường bổ sung 0,4 mg/L AgNO_3 có tỷ lệ sống sót 100% khi chuyển ra vườn ươm. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng nano bạc nồng độ (0,0 - 2,0 mg/L); nhận thấy nano bạc nồng độ 1,2 mg/L thích hợp nhất cho quá trình tạo cây *in vitro* hoàn chỉnh chuẩn bị cho giai đoạn thuần hoá ngoài vườn ươm.

KẾT LUẬN

Việc sử dụng nano bạc nồng độ 0,2 g/L trong 20 phút có thể thay thế các chất khử trùng thông dụng (HgCl_2 , Ca(ClO)_2) trong vi nhân giống cây sâm Ngọc Linh. Bên cạnh đó,

nano bạc còn có tác dụng kích thích mầm cây cảm ứng nhanh, tác động đến sự phát sinh hình thái và hoàn toàn không gây ra bất kỳ tác động tiêu cực nào đến mầm cây. Ngoài ra, nano bạc nồng độ 1,6 mg/L thích hợp cho sự phát sinh phôi soma với tần suất cao và 1,2 mg/L nano bạc là thích hợp cho việc tạo cây hoàn chỉnh.

Lời cảm ơn: Để hoàn thành nghiên cứu này, nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn sự tài trợ kinh phí của đề tài “Nghiên cứu tác động của nano kim loại lên khả năng tái sinh, sinh trưởng, phát triển và tích lũy hoạt chất trong quá trình nhân giống một số cây trồng có giá trị cao ở Việt Nam” thuộc hợp phần: “Nghiên cứu cơ chế tác động và đánh giá an toàn sinh học của các chế phẩm nano được nghiên cứu trong dự án”, mã số: VAST.TĐ.NANO.04/15-18.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Arab MM, Yadollahi A, Hosseini-Mazinani M, Bagheri S (2014) Effects of antimicrobial activity of silvernanoparticles on *in vitro* establishment of G x N15 (hybrid of almond x peach) rootstock. *J Gen Eng Biotech* 12: 103-110.

Bais HP, Sudha G, Suresh B, Ravishankar GA (2000) Silver nitrate influences *in vitro* root formation in *Decalepis hamiltonii* Wight, Arn. *Current Sci* 79(6): 894-898.

Bais HP, Sudha G, Suresh B, Ravishankar GA (2000a) AgNO₃ influences *in vitro* root formation in *Decalepis hamiltonii* Wight, Arn. *Current Sci* 79: 894-898.

Bộ Khoa học và Công nghệ, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam (2007) *Sách Đỏ Việt Nam*, phần II: Thực vật. Nhà xuất bản Khoa học tự nhiên và Công nghệ, Hà Nội, 516.

Bùi Văn Thế Vinh, Vũ Thị Thuý, Thái Thương Hiền, Đỗ Khắc Thịnh, Dương Tấn Nhựt (2014) Nghiên cứu hình thái giải phẫu và cấu trúc phôi trong quá trình phát sinh phôi vô tính sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.). *Tạp chí Khoa học và Phát triển* 12(7): 1140-1148.

Chaloupka K, Malam Y, Seifalian AM (2010) Nanosilver as a new generation of nanoparticle in biomedical applications. *Trends Biotech* 28(11): 580-588.

Chau HN, Bang LA, Buu NQ, Dung TTN, Ha HT, Quang DV (2008) Some results in manufacturing of nano silver and investigation of its application for disinfection. *Adv Nat Sci* 9: 241-248.

Dean KM, Qin Y, Palmer AE (2012) Visualizing metal ions in cells: an overview of analytical techniques, approaches, and probes. *Biochim Biophys Acta* 1823(9): 1406-1415.

Dương Tấn Nhựt (2012) *Thiết kế dụng cụ lấy mẫu trong nghiên cứu tái sinh và nhân giống vô tính cây dâu tây*, Công nghệ Sinh học Thực vật, Nhà xuất bản Nông nghiệp, Hà Nội, 48-59.

Dương Tấn Nhựt, Lâm Thị Mỹ Hằng, Bùi Thế Vinh, Phan Quốc Tâm, Nguyễn Bá Nam, Nguyễn Cửu Thành Nhân, Hoàng Xuân Chiến, Lê Nữ Minh Thùy, Vũ Thị Hiền, Nguyễn Văn Bình, Vũ Quốc Luận, Trần Công Luận, Đoàn Trọng Đức (2010) xác định hàm lượng saponin và dư lượng một số chất điều hòa sinh trưởng trong callus, chồi và rễ sâm Ngọc Linh

nuôi cấy *in vitro*. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 8(2): 189-202.

Fei S, Read PE, Riordan TP (2000). Improvement of embryogenic callus induction and shoot regeneration of buffalo grass by AgNO₃. *Plant Cell Tiss Org Cult* 60(3): 197-203.

Fernandez S, Michaux-Ferrière N, Coumans M (1999) The embryogenic response of immature embryo cultures of durum wheat (*Triticum durum*): histology and improvement by AgNO₃. *Plant Grow Reg* 28(3): 147-155.

Fuentes SRL, Calheiros MBP, Manetti- Filho J, Vieira LGE (2000) The effects of silver nitrate and different carbohydrate sources on somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. *Plant Cell Tiss Org Cult* 60(1): 5-13.

Giridhar P, Indu EP, Vinod K, Chandrashekar A, Ra Vishankar GA (2004) Direct somatic embryogenesis from *Coffea arabica* L and *Coffea canephora* P ex Fr. under the influence of ethylene action inhibitor-silver nitrate. *Acta Physiol Plant* 26(3): 299-305.

Giridhar P, Obul Reddy B, RaVishankar GA (2001) Silver nitrate influences *in vitro* shoot multiplication and root formation in *Vanilla planifolia* Andr. *Current Sci* 81(9): 1166-1170.

Kim JS, Kuk E, Yu KN, Kim J, Park SJ, Lee HJ, Kim SH, Park YK, Park YH, Hwany CY, Kim YK, Lee SY, Jeong DH, Cho MH (2007) Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine* 3: 95-101.

Kong L, Yeung EC (1994) Effects of ethylene and ethylene inhibitors on white spruce somatic embryo maturation. *Plant Sci* 104(1): 71-80.

Larue C, Castillo-Michel H, Sobanska S, Cécillon L, Bureau S, Barthès V (2014) Foliar exposure of the crop *Lactuca sativa* to silver nanoparticles: evidence for internalization and changes in Ag speciation. *J Hazard Mater* 264: 98-106.

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-497.

Nasser M, Sepideh ZV, Sajjad K (2013) Plant *in vitro* culture goes nano: nanosilver-mediated decontamination of *ex vitro* explants. *J Nanomed Nanotechnol* 4(2): 161-164.

Navarro EAB, Behra R, Hartman NB, Filser J, Miao AJ, Quiagg A, Santschi PH, Sigg L (2008)

- Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nano particles to algae, plants, and fungi. *Ecotoxicology* 17: 372-386.
- Ngô Xuân Bình (2010) *Điều kiện và môi trường nuôi cấy mô tế bào thực vật*, Nuôi cấy mô tế bào thực vật - Cơ sở lý luận và ứng dụng, Nhà xuất bản Khoa học - Kỹ Thuật, Hà Nội. 26-48.
- Nguyễn Ngọc Dung (1995) *Nhân giống sâm Ngọc Linh (Panax vietnamensis Ha et Grushv.) bằng con đường sinh học*. Nhà xuất bản Nông nghiệp: 43-100.
- 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 nitrat (AgNO₃) lên sự sinh trưởng và phát triển của cây sâm ngọc linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) nuôi cấy *in vitro*. Hội nghị khoa học công nghệ sinh học toàn quốc: 727-731.
- Nhut DT, Huy NP, Chien HX, Luan TC, Vinh BV, Thao LB (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. *Inter J Appl Biol Pharm Tech* 3(3): 178 – 190.
- Nhut DT, Huy NP, Luan VQ, Binh NV, Nam NB, Thuy LNM, Ha DTN, Chien HX, Huong TT, Cuong HV (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.
- Nhut DT, Vinh BVT, Hien TT, Huy NP, Nam NB, Chien HX (2012) 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 Biotech* 11(5): 1084-1091.
- Nissen P (1994) Stimulation of somatic embryogenesis in carrot by ethylene: Effects of modulators of ethylene biosynthesis and action. *Physiol Plant* 92(3): 397-403.
- Phai DN, Chinh NN, Duc NM, Cam TTV, Trung LT, Cang NM (2002) Cultivation and development of Vietnamese ginseng and preliminary results of the study on cultivated Vietnamese ginseng. *Tạp chí Y học Thành Phố Hồ Chí Minh* 6(1): 12-18.
- Reddy BO, Giridhar P, Ra Vishankar GA (2001) *In vitro* rooting of *Decalepis hamiltonii* Wight and Arn., an endangered shrub by auxins and root-promoting agents. *Current Sci* 81(11): 1479- 1481.
- Schenk RU, Hildebrandt AC (1972) Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Can J Bot* 50: 199- 204.
- Shah V, Belozeroval I (2008) Influence of metal nanoparticles on the soil microbial community and germination of lettuce seeds. *Water Air Soil Pollut* 197: 143-148.
- Sondi I, Salopek-Sondi B (2004) Silver nano particles as antimicrobial agent: Case study on *E. coli* as a model for gram-negative bacteria. *J Colloid Interface Sci* 275: 177-182.
- Songstad DD, Armstrong CL, Petersen WL (1991) Silver nitrate increase type II callus production from immature embryos of maize inbred B73 and its derivatives. *Plant Cell Rep* 9(12): 699-702.
- Vain Hort YP, Flament P (1989) Role of ethylene in embryogenic callus initiation and regeneration in *Zea mays* L. *J Plant Physiol* 135(5): 537-540.
- Vain Hort YP, Yean H, Flament P (1989) Enhancement of production and regeneration of embryogenic type II callus in *Zea mays* L by AgNO₃. *Plant Cell Tiss Org Cult* 18(2): 143-142.

INCREASING THE SOMATIC EMBRYOGENESIS FREQUENCY OF *Panax vietnamensis* Ha et Grushv. BY DISINFECTION OF LEAF EXPLANT USING NANO SILVER AND THE ADDITION OF NANO SILVER IN CULTURE MEDIUM

**Do Manh Cuong^{1,2}, Hoang Thanh Tung¹, Hoang Dac Khai¹, Vu Quoc Luan¹, Vu Thi Hien¹,
Truong Thi Bich Phuong², Duong Tan Nhut¹**

¹Tay Nguyen Institute for Scientific Research, Vietnam Academy of Science and Technology

²Hue University of Sciences, Hue University

SUMMARY

Somatic embryo is a developmental method for mass multiplication of valuable medicinal plants. In this study, leaf explants of Ngoc Linh ginseng were disinfected with nano silver at different concentrations and exposure times to eliminate infectious agents and induce embryogenic callus for the production of somatic embryos. The results show that the lowest contamination rate (20.00%) was observed when leaf explants were treated with 0.5 g/L nano silver for 15 minutes while the highest embryogenic callus induction rate (72.22%) and fresh weight (0.77 g) was determined at 0.2 g/L nano silver for 20 minutes. High frequency of somatic embryogenesis formation and germination were occurred on MS medium supplemented 1.0 mg/L 2,4-D; 0.5 mg/L NAA; 0.2 mg/L Kin and 1.6 mg/L nanosilver. After 8 weeks of culture, the number somatic embryos derived from nano silver treated-leaves was increased 2 times than non-treated explants. Addition of 1.0 mg/L NAA and 1.2 mg/L nano silver was showed the highest shoot and root length, root number, fresh and dry weight of plantlets. This research showed that pre-treatment and supplement of nano silver in culture medium is potentially useful for improving embryogenesis frequency, and plantlet formation of Ngoc Linh ginseng cultured *in vitro*.

Keywords: callus, embryogenesis, nanosilver, Ngoc Linh ginseng, somatic embryo