

BIẾN ĐỔI HÌNH THÁI TRONG PHÁT SINH PHÔI SOMA THÔNG QUA NUÔI CÂY MÔ SẸO TAM THẮT HOANG (*PANAX STIPULEANATUS* H.T.TSAI ET K.M.FENG)

Nguyễn Thị Ngọc Hương[✉], Trần Hùng, Trương Thị Đệp

Trường Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh

[✉]Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: ngochuongyd82@gmail.com

Ngày nhận bài: 05.8.2017

Ngày nhận đăng: 02.4.2018

TÓM TẮT

Những nghiên cứu gần đây cho thấy nhiều hợp chất saponin trong thân rễ Tam thất hoang (*Panax stipuleanatus* H.T.Tsai et K.M.Feng) có tác dụng giảm căng thẳng, điều hòa khí huyết, tăng cường sinh lực, đặc biệt chống lại một số dòng tế bào ung thư. Tuy nhiên, hiện nay số lượng cá thể Tam thất hoang trong tự nhiên đang bị đe dọa nghiêm trọng bởi nạn khai thác bừa bãi. Đã có nhiều loài cây thuốc có giá trị cao thuộc chi *Panax* được nhân giống bằng cách tạo phôi vô tính từ thân, lá và cuống lá vì mô non dễ đáp ứng cho sự phát sinh phôi hơn. Nhưng cho đến nay, vẫn chưa có nghiên cứu nào về sự phát sinh phôi soma gián tiếp thông qua mô sẹo có nguồn gốc từ thân rễ của Tam thất hoang. Trong nghiên cứu này, khúc cắt thân rễ tạo mô sẹo sau 24 tuần nuôi cấy trên môi trường MS ½ đa lượng có bổ sung lần lượt 2,4-D nồng độ cao (2 mg/l 2,4-D trong 8 tuần đầu và cấy chuyển sang môi trường có bổ sung 0,5 mg/l NAA để thu nhận tế bào có khả năng sinh phôi. Mô sẹo phát triển trên môi trường này trở nên nhão hơn với các cụm tế bào có đặc tính của tế bào sinh phôi: kích thước nhỏ, đẳng kính, nhân to, thấy rõ hạch nhân và tế bào chất đậm đặc. Sự hình thành những cụm gồm các cấu trúc hình cầu, kích thước đồng đều xảy ra tại thời điểm 28 tuần trên môi trường có bổ sung NAA. Các cấu trúc giống phôi này trải qua các giai đoạn phát triển: phôi hình cầu muộn, hình tim và từ điệp trên môi trường có bổ sung 0,5 mg/l BA, 1 mg/l GA₃. Bên cạnh đó, có sự xuất hiện của phôi bất thường chỉ chi tạo rễ, tạo chồi hoặc lá.

Từ khóa: Mô sẹo, *Panax*, phôi soma, Tam thất hoang, thân rễ

MỞ ĐẦU

Tam thất hoang (*Panax stipuleanatus* H.T.Tsai et K.M.Feng) là loài cây thuốc thuộc họ Ngũ gia bì (Araliaceae) chứa các hợp chất chống oxy hóa hỗ trợ điều trị ung thư (Liang *et al.*, 2010; Võ Văn Chi, 2012). Do nhu cầu tiêu thụ loại cây thuốc này tăng nhanh, dẫn đến việc khai thác bừa bãi chúng trong điều kiện tự nhiên, khiến cho số lượng cá thể bị giảm sút nghiêm trọng và đang có nguy cơ bị tuyệt chủng (Nguyễn Tiến Bản, 2009). Hiện nay, Tam thất hoang thường được nhân giống theo cách giâm cành trong vườn ươm bằng vật liệu là thân rễ vì khó thu hạt với số lượng lớn do chỉ ra hoa một lần trong năm và hoa rất khó đậu trái. Do đó, hệ số nhân giống của loài cây này thấp, chưa đáp ứng được về nhu cầu cây giống để sản xuất.

Trong các nghiên cứu nhân giống *in vitro* các cây thuốc họ này, sự phát sinh phôi soma có nhiều ưu điểm phù hợp để tạo được số lượng lớn cây con đồng nhất, mang rễ mầm và chồi mầm với sức sống

tốt và ít nhiễm bệnh. Việc tạo phôi soma *in vitro* đã được thực hiện thành công ở nhiều cây thuốc chi *Panax* như: Nhân sâm (*Panax ginseng* C.A.Meyer), sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.), Tam thất (*Panax notoginseng* (Burk.) F.H.Chen) (Kim *et al.*, 2012; Nhut *et al.*, 2012; Trương *et al.*, 2013; You *et al.*, 2012).

Vì vậy, nghiên cứu này được thực hiện để góp phần tạo được nguồn vật liệu ổn định, đồng nhất với số lượng lớn phục vụ cho các nghiên cứu sinh lý học, giải phẫu học. Từ đó, hỗ trợ cho các công tác bảo tồn giống và tiếp tục khai thác các hợp chất có được tính ở loài này mà không ảnh hưởng đến số lượng các thể trong tự nhiên.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Thân rễ cây Tam thất hoang (*Panax stipuleanatus*

H.T.Tsai et K.M.Feng) có đường kính 1-1,5 cm được thu hái tại huyện Sa Pa, tỉnh Lào Cai và được định danh tại Bộ môn Thực vật - Khoa Dược, Trường Đại học Y dược Thành phố Hồ Chí Minh.

Phương pháp

Cảm ứng tạo mô sẹo

Khúc cắt thân rễ (10 × 7 mm) được khử trùng với 0,1% HgCl₂ (10 phút) và lần lượt được cấy trên môi trường MS (Murashige, Skoog, 1962) ½ (giảm một nửa khoáng đa lượng) có bổ sung 2 mg/l 2,4-D trong 8 tuần đầu và cấy chuyển sang môi trường 1 mg/l 2,4-D trong 16 tuần tiếp theo (cấy chuyển mỗi 6 tuần) dưới điều kiện tối hoàn toàn (Chang *et al.*, 1980), Jiménez, V. M., 2001). Cấu trúc giải phẫu của mẫu cấy và hình thái tế bào mô sẹo được ghi nhận theo thời gian nuôi cấy.

Cảm ứng tạo phôi soma

Mẫu mô sẹo (24 tuần tuổi) có nguồn gốc từ nuôi cấy khúc cắt thân rễ của thí nghiệm trên được cấy chuyển sang môi trường MS ½ có bổ sung 0,5 mg/l NAA (theo nồng độ NAA của nghiên cứu trước trên sự phát sinh rễ từ mô sẹo, Nguyễn Thị Ngọc Hương *et al.*, 2016) trong 8 tuần. Sau đó, mô sẹo được tách khỏi mô mẹ, được cấy chuyển sang môi trường mới (cũng bổ sung 0,5 mg/l NAA) và nuôi liên tục trong 20 tuần dưới điều kiện tối hoàn toàn. Hình thái tế bào mô sẹo và cụm cấu trúc giống phôi được ghi nhận theo thời gian nuôi cấy.

Cụm cấu trúc giống phôi được chuyển sang môi trường MS ½ đa lượng có bổ sung 0,5 mg/l BA, 1 mg/l GA₃ (Chang *et al.*, 1980). Các mẫu được đặt trong điều kiện ánh sáng. Hình thái và cấu trúc giải phẫu của phôi ở các giai đoạn phát triển được ghi nhận.

Quan sát cấu trúc giải phẫu

Các lát cắt dọc qua thân rễ và phôi được thực hiện bằng dao lam với bề dày 200 – 300 μm. Các vi phẫu được nhuộm bằng phương pháp nhuộm kép của Bộ môn Thực vật - Khoa Dược. Quy trình nhuộm: Ngâm vi phẫu vào nước Javel đến khi trắng. Sau đó, rửa sạch và tiếp tục ngâm vi phẫu trong dung dịch acid acetic 10% trong 10 phút. Nhuộm vi phẫu với thuốc nhuộm son phenol-iod trong 15 phút. Rửa sạch mẫu bằng nước cất.

Mẫu mô sẹo được trải trên lam kính trong 1 giọt thuốc nhuộm acetocarmine (5 phút) trước khi quan sát. Các tiêu bản được quan sát bằng kính hiển vi quang học (Olympus CKX41, Nhật), chụp ảnh với

camera (Leica DFC450, Đức) gắn trực tiếp trên kính và phân tích kích thước bằng phần mềm (Leica Application Suite phiên bản 4.0). Mô sẹo ở các giai đoạn được lấy mẫu ngẫu nhiên 5 lần lặp lại. Mỗi mẫu được trải lên lam kính và chụp ảnh của 4 thị trường ở vật kính x40. Sau đó, 10 tế bào được chọn ngẫu nhiên để đo kích thước bằng phần mềm.

Điều kiện nuôi cấy

Tất cả các mẫu *in vitro* được nuôi cấy trên cây trên môi trường MS (Murashige, Skoog, 1962) ½ (giảm một nửa khoáng đa lượng) có bổ sung chất điều hòa tăng trưởng thực vật, ở nhiệt độ 22 ± 2 °C, độ ẩm 80%, dưới điều kiện che tối hoàn toàn (đối với mẫu mô sẹo và mẫu mô sẹo phát sinh phôi) hoặc chiếu sáng 2500 ± 500 lux (đèn huỳnh quang compact, đối với mẫu phôi) 12 giờ sáng/ngày.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Ảnh hưởng của 2,4-D lên sự hình thành mô sẹo từ thân rễ Tam thất hoang

Trong nghiên cứu này, mô sẹo cũng được hình thành từ sự phân chia mạnh ở vùng nhu mô vỏ và vùng tương tầng libe-mộc của thân rễ (Hình 1C). Điều này tương tự nghiên cứu trước đây của chúng tôi về sự tạo mô sẹo từ thân rễ Tam thất hoang (Nguyễn Thị Ngọc Hương *et al.*, 2016). Với mục đích tạo mô sẹo có sự phân phân hóa mạnh để rút ngắn thời gian tạo mô sẹo có khả năng sinh phôi cũng như tăng tỷ lệ tạo phôi soma, các công bố trước đây sử dụng 2,4-D nồng độ cao để xử lý mẫu cây (Kitamiya *et al.*, 2000). Vì vậy, trong thí nghiệm tạo mô sẹo ở thân rễ, chúng tôi đã tăng nồng độ 2,4-D lên gấp 4 lần (ở 2 mg/l) so với nghiên cứu trước (ở 0,5 mg/l) (Nguyễn Thị Ngọc Hương *et al.*, 2016). Ở thời điểm 8 tuần, hình thái giải phẫu dọc khúc cắt thân rễ cho thấy các tế bào nhu mô dọc theo trục mẫu cấy phân chia mạnh. Sự phân chia nhanh hơn sự kéo dài tế bào nên mô sẹo chứa các tế bào dài nhưng bị cắt ngang nhiều lần (phân chia tiếp tuyến) thành những chuỗi nhiều tế bào nối nhau và đẩy lên trên. Điều này chứng tỏ hai vai trò sinh lý của 2,4-D ngoại sinh: một là gây ra tác động trên chương trình của genome dẫn đến sự phân phân hóa và phân chia tế bào; hai là tác động trên thụ thể màng hoạt hóa bơm proton tăng acid vách giúp hoạt động của enzyme làm lỏng vách, dẫn đến tế bào thu nước và tăng kích thước (Williams, Maheswaran, 1986). Do đó, tại chỗ hở mặt trên của khúc cắt, khối tế bào trên thoát ra ngoài tạo thành mô sẹo chặt gồm các chuỗi tế bào đa giác nhỏ (Hình 1A, B và C).

Các tế bào nhỏ do phân chia nhanh trong 8 tuần nên chúng xếp chặt chẽ trong mô sẹo và bị ức chế tăng trưởng khi vách thứ cấp càng lúc càng dày lên. Việc này làm mô sẹo ngày một chặt, cứng dẫn đến các tế bào ngoài cùng khó tách khỏi cụm. Để giảm sự phân chia mạnh và tăng sự kéo dài tế bào, các mẫu cấy được chuyển sang môi trường có bổ sung 1 mg/l 2,4-D trong 16 tuần sau đó. Tại thời điểm này, mô sẹo đã hình thành những khối lớn, xốp, dễ tách rời (Hình 1D). Tế bào mô sẹo có kích thước to hơn chứng tỏ việc giảm nồng độ 2,4-D giúp tăng tốc độ kéo dài và tăng rộng của tế bào hơn so với tốc độ phân chia. Kết quả quá trình này tạo ra các cụm mang những tế bào đẳng kính trong mô sẹo, nhưng chia ra làm 2 nhóm: Nhóm có các tế bào kích thước nhỏ $30,19 \pm 0,31 \mu\text{m}$ với tế bào chất đậm đặc (các cụm màu sậm với phẩm nhuộm acetocarmine); và nhóm có các tế bào kích thước lớn $75,49 \pm 1,70 \mu\text{m}$ hình trứng, đẳng kính, tế bào chất được thay bằng không bào lớn, tách dần ra khỏi cụm (Hình 1E). Các tế bào trong 2 loại cụm này đều trong trạng thái phân chia chậm hơn giai đoạn trong 2 mg/l 2,4-D (Hình 1F và G). Điều này cho thấy các tế bào trong cụm với tác động của 1 mg/l 2,4-D trải qua một chu kỳ phân chia – tăng rộng lặp lại. Đầu tiên, các tế bào có kích thước lớn (khoảng $75 \mu\text{m}$) phân chia vài lần để tạo ra các tế bào nhỏ hơn với kích thước khoảng $30 \mu\text{m}$. Sau đó, chúng nhanh chóng tăng kích thước đến giới hạn $75,49 \pm 1,70 \mu\text{m}$ rồi mới tiếp tục phân chia. Do đó, mô sẹo xốp và giữ nước nhiều hơn (Hình 1D).

Hơn thế nữa, do sự giảm nồng độ 2,4-D ngoại sinh, tế bào có xu hướng tăng rộng do tăng kích thước không bào nên tỷ lệ nhân rất nhỏ so với tế bào. Các tế bào này đã chấm dứt phân phân hóa và tiếp tục phân hóa thành các tế bào nhu mô với nhân có kích thước trung bình $8,06 \pm 0,08 \mu\text{m}$ (Hình 1F và G).

Ảnh hưởng của NAA lên sự tạo tế bào có khả năng sinh phôi từ mô sẹo thân rễ Tam thất hoang

Auxin còn có vai trò quan trọng trong việc duy trì tính hữu cực bên trong tế bào sinh phôi. Chính điều này cũng giúp những tế bào sinh phôi tách khỏi sự ảnh hưởng của các mô xung quanh (Williams, Maheswaran, 1986). Ở Nhân sâm (*Panax ginseng* C.A. Meyer) để tái sinh phôi từ rễ, cần có sự tác động 2 bước với việc dùng 2 loại auxin ngoại sinh. Thứ nhất, 2,4-D được dùng để hình thành mô sẹo từ rễ. Thứ hai, NAA được dùng để kích thích sự tạo mô sẹo có khả năng sinh phôi (Choi *et al.*, 1982).

Tại thời điểm 8 tuần sau khi được cấy chuyển qua môi trường 0,5 mg/l NAA, mô sẹo phát sinh từ môi trường có 2,4-D trở nên trắng, nhão hơn và rất

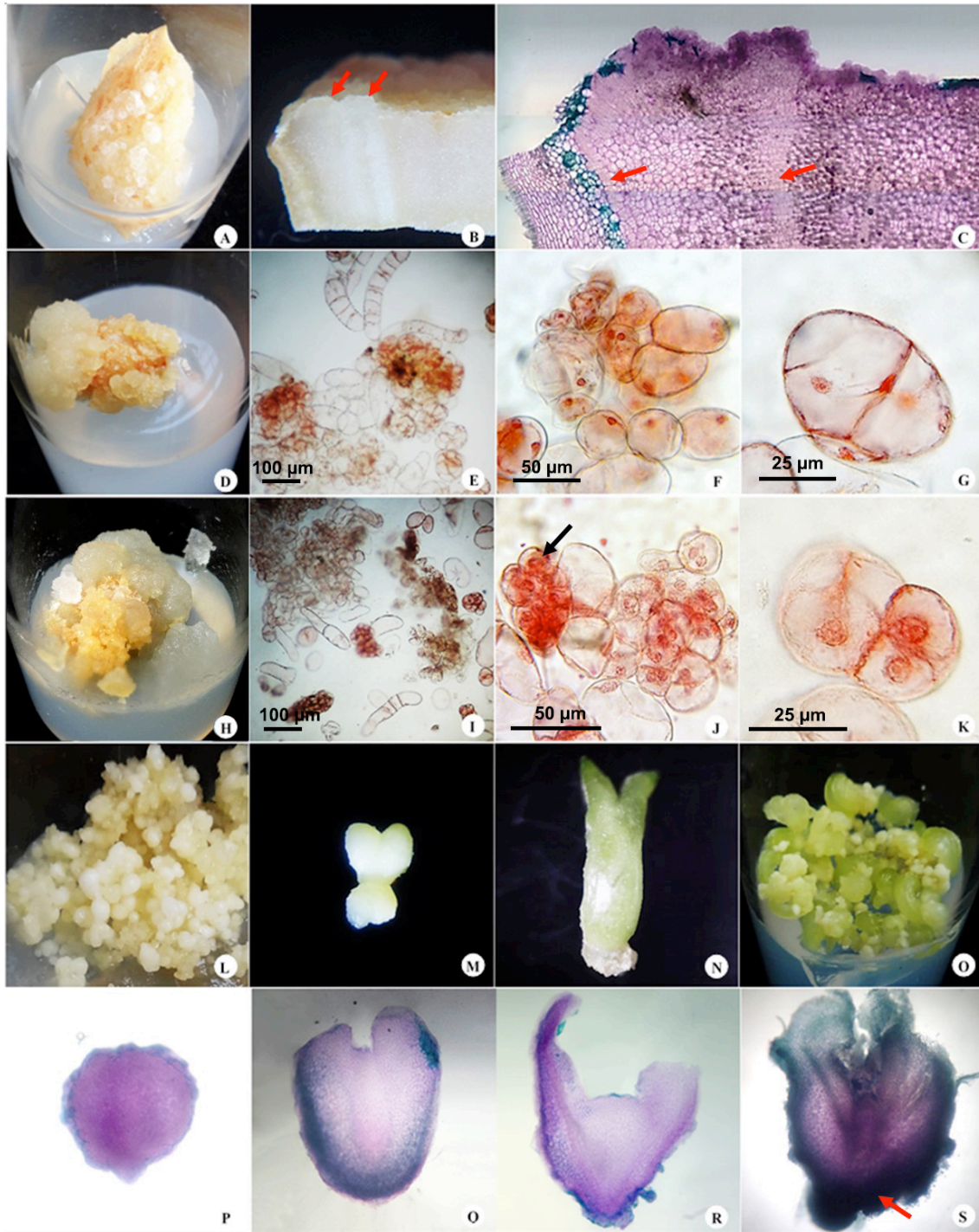
dễ tách rời (Hình 1H).

Trong khối mô sẹo, có sự hiện diện của các tế bào đơn có kích thước $75,49 \pm 1,70 \mu\text{m}$ được tách rời từ các tế bào ngoài cùng của các cụm lớn. Bên cạnh đó, một số cụm tế bào có xu hướng co nguyên sinh và chết đi (Hình 1I). Thông thường, với sự hiện diện của auxin, quá trình methyl hóa DNA xảy ra và gây ra sự kết thúc hoặc làm thay đổi chương trình biểu hiện gen của tế bào. Quan trọng hơn, các tế bào này cần phải tách khỏi sự kiểm soát của các tế bào xung quanh và cần được phóng thích khỏi cụm mô sẹo. Các tế bào đã được cảm ứng trong cụm có thể tách khỏi các tế bào xung quanh bằng cách cắt đứt cầu sinh chất hoặc do sự chết của những mô xung quanh, làm gián đoạn tương tác tế bào-tế bào. Từ đó, kết thúc chương trình biểu hiện gen đã có sẵn và thiết lập chương trình phát sinh phôi (Bonnelle *et al.*, 1990).

Ở mô sẹo từ thân rễ Tam thất hoang, sau 8 tuần trên môi trường có bổ sung NAA, đặc biệt có sự xuất hiện các cụm tế bào có kích thước khoảng $40 \mu\text{m}$, kích thước tương tự với đa số các tế bào của mô sẹo trên môi trường 2,4-D. Các cụm này được cấu thành bởi các tế bào có kích thước rất nhỏ ($20,45 \pm 0,14 \mu\text{m}$) tương tự kích thước của các tế bào mô phân sinh thực vật (Hình 1I). Điều này cho thấy chính các tế bào có kích thước $30,19 \pm 0,31 \mu\text{m}$ từ môi trường 2,4-D khi được chuyển sang môi trường có bổ sung NAA, đã phân chia để tạo các cụm chứa các tế bào có kích thước nhỏ khoảng $20 \mu\text{m}$. Các tế bào trong cụm nhỏ theo đúng quy luật cũng sẽ tiếp tục tăng trưởng cho tới khi đạt kích thước tối đa. Nhờ đó, các tế bào sẽ dễ tách khỏi cụm và tạo điều kiện cho sự biểu hiện gen của từng tế bào đơn. Tuy nhiên, một số tế bào trong cụm vẫn giữ nguyên ở kích thước khoảng $20 \mu\text{m}$.

Vì vậy, điểm khác biệt của mô sẹo này so với mô sẹo trên môi trường bổ sung 2,4-D là sự hiện diện các tế bào nhỏ và chúng giữ yên ở kích thước khoảng $20 \mu\text{m}$ chứ không tiếp tục tăng trưởng. Đây là một hình thái tế bào mới trong mô sẹo, chứng tỏ đã có sự biểu hiện gen mới bên trong các tế bào này. Đặc biệt, khác với chiều hướng phân chia hỗn độn trong môi trường bổ sung 2,4-D, các tế bào trong NAA lại có quy luật phân chia cân xứng để tạo ra cụm 4, 8, 16 tế bào (Hình 1J) với tế bào chất đậm đặc, nhân to, thấy rõ hạch nhân, tương tự như một hợp tử (Hình 1K), điều này rất phù hợp với mô tả trước đây (Yoshida *et al.*, 2014).

Sau 28 tuần nuôi cấy trên môi trường bổ sung NAA, khối mô sẹo trắng lúc này đã đồng loạt chuyển thành những cụm gồm nhiều cấu trúc hình cầu có kích thước bằng nhau, một số có thể tách rời dễ dàng. Đây là các cấu trúc giống phôi (Hình 1L).



Hình 1. Phát sinh phôi soma từ mô sẹo thân rễ Tam thất hoàng. **A – C:** sự hình thành mô sẹo từ khúc cắt thân rễ 8 tuần trên môi trường MS ½ bổ sung 2 mg/l 2,4-D (mũi tên đỏ chỉ vị trí mô sẹo); **D – G:** hình thái tế bào mô sẹo 16 tuần sau khi được chuyển sang môi trường có 1 mg/l 2,4-D; **H – K:** hình thái tế bào mô sẹo 8 tuần sau khi được chuyển sang môi trường có 0,5 mg/l NAA; **L:** các cấu trúc giống phôi hình thành trên mô sẹo sau 28 tuần trên môi trường có 0,5 mg/l NAA; **M – S:** các giai đoạn phôi hình cầu, hình tim và phôi có tử diệp trên môi trường có 0,5 mg/l BA, 1 mg/l GA₃.

Sự phát triển phôi soma Tam thất hoang

Auxin có vai trò quan trọng cả trong cảm ứng sinh phôi lẫn trong sự phát sinh hình thái phôi. Với sự có mặt của auxin, các cấu trúc tiền phôi (PEM, pro embryonic mass) có các biểu hiện gene cần thiết để hoàn tất giai đoạn phôi hình cầu. Nhưng đồng thời chúng cũng tổng hợp nhiều mRNA và protein khác có khả năng cản trở việc hoàn thiện chương trình phát triển phôi. Vì vậy, trong giai đoạn tiếp theo, auxin cần được loại bỏ (Zimmerman, 1993).

Các cấu trúc giống phôi của Tam thất hoang sau khi được trải trên môi trường có bổ sung 0,5 mg/l BA và 1 mg/l GA₃, chúng tiếp tục phát triển các giai đoạn như: hình cầu, hình tim, hình thủy lôi, hình hai lá mầm (Hình 1M, N, O, P, Q, R). Nhiều phôi có cấu trúc bất thường phát triển thành các cấu trúc chỉ có chồi mang lá (Hình 1S).

Vai trò của 2,4-D và NAA trong sự tái sinh cơ quan và phôi ở Tam thất hoang

Ở bài báo trước, việc sử dụng 0,5 mg/l 2,4-D trong giai đoạn tạo mô sẹo dẫn đến giai đoạn phát sinh phôi từ mô sẹo trên môi trường NAA chỉ cho ra cực rễ và được định nghĩa là phôi khuyết cực chồi (Nguyễn Thị Ngọc Hương *et al.*, 2016). Trong nghiên cứu này, nồng độ 2,4-D được tăng lên là 2 mg/l trong 8 tuần và 1 mg/l trong 16 tuần. Điều này giúp cho sự phát sinh phôi hoàn chỉnh trong giai đoạn nuôi cấy mô sẹo trên môi trường có bổ sung NAA nồng độ 0,5 mg/l trong 28 tuần. Tuy nhiên, bên cạnh đó cũng có những phôi bất thường chỉ tạo rễ, tạo chồi hoặc lá.

Ở cây cà rốt, 2,4-D nồng độ rất cao (ở 45 mM và 450 mM, tương đương 10 và 100 mg/l) trong thời gian ngắn (2 giờ) có khả năng kích thích sự tạo phôi từ trụ dưới lá mầm thông qua việc mở hai gen *Dchsp-1* và *Dcarg-1* điều hòa quá trình này. 2,4-D ở nồng độ 450 mM kích thích tạo được nhiều phôi hơn so với nồng độ 45 mM (Kitamiya *et al.*, 2000). Trong nghiên cứu này, việc gia tăng nồng độ 2,4-D ở 2 mg/l (thấp hơn xử lý trên) nhưng liên tục trong 8 tuần có lẽ cũng đã giúp kích hoạt các gene điều hòa sự phát sinh hình thái của phôi từ mô sẹo thân rễ Tam thất hoang. Do đó, sau 28 tuần trên môi trường có bổ sung NAA, mô sẹo hình thành rất nhiều cụm tròn nhỏ đáng kính, có cấu trúc giống phôi hình cầu (Hình 1L).

KẾT LUẬN

2,4-D 2 mg/l, 1 mg/l và NAA 0,5 mg/l tuần tự

giúp tế bào mô sẹo từ thân rễ cảm ứng được chương trình tạo phôi. 2,4-D nồng độ 2 mg/l kích thích mạnh sự phân chia tế bào mô sẹo, trong khi, sự hạ thấp nồng độ 2,4-D xuống 1 mg/l ở tuần nuôi cấy thứ 8 giúp mô sẹo tăng trưởng. Mô sẹo này gồm các cụm có các tế bào nhu mô nhỏ kích thước $30,19 \pm 0,31$ μm và tối đa ở kích thước $75,49 \pm 1,70$ μm . NAA nồng độ 0,5 mg/l giúp sự phân chia của các tế bào $30,19 \pm 0,31$ μm này thành các cụm với các tế bào nhỏ hơn (kích thước $20,45 \pm 0,14$ μm) sắp xếp cân xứng và có đặc tính của tế bào sinh phôi. Ở tuần thứ 28, các cụm này tạo thành các cấu trúc giống phôi hình cầu. Các cấu trúc giống phôi này tuần tự trải qua các giai đoạn phát triển phôi: hình cầu, hình tim, từ diệp trên môi trường có 0,5 mg/l BA và 1 mg/l GA₃.

Lời cảm ơn: Các tác giả xin chân thành cảm ơn Bộ môn Sinh lý thực vật, Khoa Sinh học - Công nghệ sinh học, Trường Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh và Bộ môn Thực vật thuộc Khoa Dược Trường Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh đã tạo điều kiện để nghiên cứu được tiến hành thuận lợi tại phòng thí nghiệm của bộ môn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bonnelle C, Lejeune F, Fournier D, Tourte Y (1990) Infrastructural modifications and acquisition of embryogenic properties in cotyledonary cells of leguminous species. *Compt Rend Acad Sci Paris, Sér 3, Sci Vie* 310(13): 657-664.
- Chang WC, Hsing YI (1980) Plant regeneration through somatic embryogenesis in root-derived callus of ginseng (*Panax ginseng* CA Meyer). *TAG Theor Appl Genet* 57(3):133-135.
- Choi KT, Kim MW, Shin HS (1982) Induction of callus and organ in tissue culture of ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer). *Korean J Ginseng Sci* 6:162-167.
- Jiménez VM (2001) Regulation of *in vitro* somatic embryogenesis with emphasis on to the role of endogenous hormones. *Rev Brasil Fisiol Veg* 13(2): 196-223.
- Kim YJ, Lee OR, Kim KT, Yang DC (2012) High frequency of plant regeneration through cyclic secondary somatic embryogenesis in *Panax ginseng*. *Jl Ginseng Res* 36(4): 442-448.
- Kitamiya E, Suzuki S, Sano T, Nagata T (2000) Isolation of two genes that were induced upon the initiation of somatic embryogenesis on carrot hypocotyls by high concentrations of 2,4-D. *Plant Cell Rep* 19(6): 551-557.

- Liang C, Ding Y, Nguyen HT, Kim JA, Boo HJ, Kang HK, Nguyen MC, Kim YH (2010) Oleanane-type triterpenoids from *Panax stipuleanatus* and their anticancer activities. *Bioor Med Chem Lett* 20(23): 7110-7115.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15(3): 473-497.
- Nguyễn Tiến Bàn (2009) *Sách đỏ Việt Nam* (Phần II Thực Vật). NXB Khoa học tự nhiên và Công nghệ Hà Nội.
- Nguyễn Thị Ngọc Hương, Trần Hùng, Trương Thị Đẹp (2016) Tìm hiểu các biến đổi hình thái trong sự phát sinh rễ Tam thất hoang (*Panax stipuleanatus* H.Tsai et K.M.Feng) nuôi cấy *in vitro* và bước đầu định tính oleanolic acid trong rễ tạo thành. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 14(1): 49-54.
- Nhut DT, Vinh BVT, Hien TT, Huy NP, Nam NB, and 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.). *Afric J Biotechnol* 11(5): 1084-1091.
- Truong M, Ha TTN, Loc PT, Duc LT, Tuan TT, Giap DD, Thach BD, Tri PD, Hung NDM, Thanh NT, Ket NV, Luan TC, Ho NH (2013) The study on *in vitro* culture of embryogenic callus and somatic embryo tissue of *Panax vietnamensis* Ha et Grushv. *Tạp chí Sinh học* 35(3se): 145-157.
- Võ Văn Chi (2012) Từ điển cây thuốc Việt Nam (Tập II (Bộ mới)). NXB Y học.
- Williams EG, Maheswaran G (1986) Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group. *Ann Bot* 57(4): 443-462.
- Yoshida S, de Reuille PB, Lane B, Bassel GW, Prusinkiewicz P, Smith RS, and Weijers D (2014) Genetic control of plant development by overriding a geometric division rule. *Devel cell* 29(1): 75-87.
- You XL, Tan X, Dai JL, Li YH, Choi YE (2012) Large-scale somatic embryogenesis and regeneration of *Panax notoginseng*. *Plant Cell, Tiss Organ Cult* 108(2): 333-338.
- Zimmerman JL (1993) Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. *Plant Cell* 5: 1411.

MORPHOLOGICAL AND HISTOLOGICAL CHANGES DURING SOMATIC EMBRYOGENESIS VIA CALLUS OF *PANAX STIPULEANATUS* H.T.TSAI ET K.M.FENG

Nguyen Thi Ngoc Huong, Tran Hung, Trương Thị Đẹp

University of Medicine and Pharmacy, Ho Chi Minh City

SUMMARY

Recently, saponins in the rhizomes of *Panax stipuleanatus* H.T.Tsai et K.M.Feng were studied for their effects as an anti-stress, enhancer of blood circulation and vitality, especially against human cancer cell lines. However, the number of individuals of *Panax stipuleanatus* H.T.Tsai et K.M.Feng in nature is threatened by the indiscriminate exploitation. High-value medicinal plants (belonging to the genus *Panax*) were propagated by somatic embryogenesis from the stems, leaves and petioles because of easy response to somatic embryogenesis. No report on indirect somatic embryogenesis via callus derived from the rhizomes of *Panax stipuleanatus* H.T.Tsai et K.M.Feng has been previously published. In this study, the callus was induced from rhizome explants on MS medium ½ macro supplemented in 2 stages with 2,4-D at high concentrations (2 mg/l in 8 weeks and then 1 mg/l in 16 weeks). The callus containing clusters of isolated and isodiametric cells were sub-cultured to a medium containing 0.5 mg /l NAA to obtain embryogenic callus. The callus growing on this medium became looser with clusters of embryonic stem cell: small size, isodiametric cell, large nucleus, clear nucleus and dense cytoplasm. The formation of clusters with homogeneous globular structures occurred at 28 weeks on medium supplemented with NAA. These embryo-like structures pass through developmental stages: late globular-shape, heart-shape, and cotyledon on medium MS medium ½ macro supplemented with 0,5 mg/l BA, 1 mg/l GA₃. Besides, there were some abnormal embryos which only develop roots, shoots or just leaves.

Keywords: Callus, *Panax*, rhizomes, *Panax stipuleanatus* H.T.Tsai et K.M.Feng, somatic embryogenesis