

## ẢNH HƯỞNG CỦA MỘT SỐ YẾU TỐ LÊN SỰ TĂNG SINH VÀ TÁI SINH HUYỀN PHỤ TẾ BÀO SÂM NGỌC LINH (*PANAX VIETNAMENSIS* HA ET GRUSHV.)

Lê Kim Cương, Nguyễn Hồng Hoàng, Dương Tấn Nhựt

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

Ngày nhận bài: 27.11.2014

Ngày nhận đăng: 20.6.2015

### TÓM TẮT

Sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) là một loài cây dược liệu lâu năm quý hiếm thuộc họ Araliaceae. Nghiên cứu về đối tượng dược liệu quý này đang là mối quan tâm của các nhà khoa học hiện nay. Trong nghiên cứu này, ảnh hưởng của 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D),  $\alpha$ -naphthaleneacetic acid (NAA), indole-3-butyric acid (IBA), 6-benzylaminopurine (BA), Kinetin (KIN), môi trường khoáng và điều kiện chiếu sáng, pH, nồng độ sucrose, thể tích môi trường lên sự tăng sinh huyền phụ tế bào sâm Ngọc Linh đã được tiến hành khảo sát. Bên cạnh đó, đường cong sinh trưởng của tế bào và ảnh hưởng của một số chất điều hòa sinh trưởng như NAA, BA, IBA lên khả năng tái sinh của huyền phụ tế bào sâm Ngọc Linh cũng được trình bày trong nghiên cứu này. Kết quả sau 28 ngày nuôi cấy cho thấy, tế bào sâm Ngọc Linh tăng trưởng tốt trong môi trường khoáng  $\frac{1}{2}$ MS lỏng có bổ sung 1,5 mg/l NAA, 50 g/l sucrose và pH phù hợp nhất cho tế bào tăng trưởng là 6,3. Thể tích môi trường thích hợp nhất khi nuôi cấy 1,0 g mô sẹo “xốp” sâm Ngọc Linh là 30 ml. Dựa vào đường cong sinh trưởng của huyền phụ tế bào sâm Ngọc Linh cho thấy thời gian cấy chuyên thích hợp nhất để duy trì huyền phụ tế bào sâm Ngọc Linh là vào đầu pha ổn định khoảng ngày nuôi cấy thứ 14 đến ngày thứ 16. Tại thời điểm này, các tế bào sâm Ngọc Linh sinh trưởng mạnh nhất. Phôi vô tính sâm Ngọc Linh được hình thành sau 30 ngày nuôi cấy khi huyền phụ tế bào được cấy chuyển sang môi trường MS có bổ sung 3,0 mg/l NAA cho thấy khả năng tái sinh của huyền phụ tế bào sâm Ngọc Linh là rất cao.

**Từ khóa:** Huyền phụ tế bào, mô sẹo “xốp”, tăng sinh, tái sinh, sâm Ngọc Linh

### MỞ ĐẦU

Sâm Ngọc Linh là một trong những cây dược liệu quý cần được bảo tồn và xếp đầu bảng trong sách Đỏ thực vật Việt Nam. Chính vì hàm lượng dược tính cao, giá trị kinh tế lớn mà sâm Ngọc Linh đã sớm cạn kiệt và đang đứng trước nguy cơ bị tuyệt chủng do việc khai thác quá mức. Do đó, yêu cầu tìm ra những kỹ thuật mới giúp thu được sinh khối sâm nhanh và hiệu quả là điều cấp thiết. Ngày nay, tế bào thực vật được nuôi cấy để phục vụ cho nhiều mục đích khác nhau, như nghiên cứu sự sinh trưởng, phát triển và phân hóa tế bào trong những điều kiện khác nhau, sử dụng trong công tác chọn giống cây trồng như chọn lọc các dòng tế bào mong muốn, nghiên cứu sâu hơn về hoạt động của các loại hormone hay ảnh hưởng của độc chất lên tăng trưởng tế bào hoặc là sản xuất sinh khối tế bào và các hợp chất thứ cấp. Với tiềm năng ứng dụng như trên thì nuôi cấy tế bào hiện đang là một trong những phương pháp thu hút nhiều sự quan tâm (Schenk, Hildebrandt, 1972). Đặc biệt là việc sử dụng tế bào để sản xuất ra các sản

phẩm có giá trị (sản phẩm chuyển hóa sinh học) từ những loài thực vật quý hiếm, trong đó có sâm Ngọc Linh - một loại sâm đặc hữu của nước ta. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã tiến hành khảo sát một số yếu tố lên sự tăng sinh và tái sinh huyền phụ tế bào sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) nhằm tạo nguồn nguyên liệu ban đầu cho việc nhân giống *in vitro* và phục vụ các nghiên cứu chuyên sâu về tế bào trên đối tượng dược liệu quý ở nước ta là sâm Ngọc Linh.

### VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

#### Vật liệu

#### Nguồn mẫu

Mô sẹo “xốp” sâm Ngọc Linh được tạo thành từ mẫu cây cuống lá trên môi trường MS có bổ sung 1,0 mg/l 2,4-D, 1,0 mg/l NAA, 30 g/l sucrose, 8,0 g/l agar có tại Phòng Sinh học Phân tử và Chọn tạo giống cây trồng, Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên (Lê Kim Cương *et al.*, 2012).

**Môi trường nuôi cấy**

Môi trường dinh dưỡng khoáng MS (Murashige, Skoog, 1962), ½MS (môi trường MS có thành phần khoáng đa lượng giảm đi một nửa), SH (Schenk, Hildebrandt, 1972), ½SH (môi trường SH có thành phần khoáng đa lượng giảm đi một nửa) có bổ sung 30 g/l sucrose (ngoại trừ thí nghiệm khảo sát nồng độ sucrose trở về sau), 8 g/l agar (đối với các thí nghiệm tái sinh). Tùy theo thí nghiệm mà các chất điều hòa sinh trưởng khác nhau được sử dụng (2,4-D, NAA, IBA, KIN). Các thí nghiệm được điều chỉnh pH về 5,8 trước khi hấp khử trùng ở 121°C, 1 atm trong 30 phút. Huyền phù tế bào được nuôi cấy trong bình thủy tinh 250 ml chứa 50 ml môi trường lỏng (ngoại trừ thí nghiệm về thể tích nuôi cấy trở về sau), đặt trên máy lắc Innova 2100 platform shaker (100 vòng/phút) (Hermle, Đức).

**Phương pháp****Khảo sát ảnh hưởng của 2,4-D, NAA, IBA, KIN lên sự tăng sinh huyền phù tế bào sâm Ngọc Linh**

Mô sẹo “xốp” có trọng lượng tươi là 1,0 g được nuôi cấy trong môi trường MS lỏng có bổ sung riêng lẻ 2,4-D (0; 0,5; 1,0 và 1,5 mg/l), NAA (0; 0,5; 1,0 và 1,5 mg/l), IBA (0; 1,0; 3,0 và 5,0 mg/l), KIN (0; 0,1; 0,3 và 0,5 mg/l) và 30 g/l sucrose.

**Khảo sát ảnh hưởng của môi trường khoáng và điều kiện chiếu sáng lên sự tăng sinh huyền phù tế bào sâm Ngọc Linh**

Mô sẹo “xốp” (1,0 g trọng lượng tươi) được nuôi cấy trong môi trường MS, ½MS, SH, ½SH lỏng có bổ sung chất điều hòa sinh trưởng với nồng độ tốt nhất ở thí nghiệm trên, 30 g/l sucrose ở điều kiện chiếu sáng 16 giờ/ngày với cường độ 45  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  hoặc tối hoàn toàn.

**Khảo sát ảnh hưởng của pH lên sự tăng sinh huyền phù tế bào sâm Ngọc Linh**

Mô sẹo “xốp” (1,0 g trọng lượng tươi) được nuôi cấy trong môi trường khoáng tốt nhất có bổ sung chất điều hòa sinh trưởng với nồng độ tốt nhất tại điều kiện chiếu sáng thích hợp ở thí nghiệm trước, 30 g/l sucrose và môi trường được điều chỉnh ở các pH khác nhau (4,8; 5,3; 5,8; 6,3 và 6,8).

**Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ sucrose lên sự tăng sinh huyền phù tế bào sâm Ngọc Linh**

Mô sẹo “xốp” (1,0 g trọng lượng tươi) được nuôi cấy trong môi trường lỏng với các điều kiện tối ưu thu được ở các thí nghiệm trên và bổ sung sucrose ở các nồng độ khác nhau (10; 30; 50 và 70 g/l).

**Khảo sát ảnh hưởng của thể tích môi trường lên sự tăng sinh huyền phù tế bào sâm Ngọc Linh**

Mô sẹo “xốp” (1,0 g trọng lượng tươi) được nuôi cấy trong môi trường lỏng với các điều kiện tối ưu thu được ở các thí nghiệm trên với các thể tích môi trường nuôi cấy khác nhau (10; 30; 50; 70 và 90 ml).

**Xác định đường cong sinh trưởng của tế bào đơn sâm Ngọc Linh**

Mô sẹo “xốp” (1,0 g trọng lượng tươi) được nuôi cấy trong môi trường lỏng với các điều kiện tối ưu thu được ở các thí nghiệm trên và được theo dõi 2 ngày/lần để xác định chu kỳ sinh trưởng và phát triển của tế bào.

**Khảo sát ảnh hưởng của NAA, BA, IBA lên khả năng tái sinh của huyền phù tế bào sâm Ngọc Linh**

Huyền phù tế bào thu được ở thí nghiệm trên (10 ml) được cấy trải lên môi trường MS rắn có bổ sung riêng lẻ NAA (1,0; 2,0; 3,0; 4,0 và 5,0 mg/l), IBA (1,0; 3,0; 5,0; 7,0 và 9,0 mg/l), BA (0,5; 1,0; 2,0; 3,0 và 4,0 mg/l), 30 g/l sucrose và 8,0 g/l agar.

**Phương pháp xác định sinh khối****Xác định mật độ tế bào**

Huyền phù tế bào sâm Ngọc Linh được thu nhận và được nhuộm bằng thuốc nhuộm carmine-iodine với tỷ lệ 2:1 (dịch huyền phù tế bào: thuốc nhuộm iodine-carmine). Sau đó, hút 5  $\mu\text{l}$  dịch huyền phù đã nhuộm bằng micropipette trải lên lamelle. Đặt lên lame lõm, quan sát dưới kính hiển vi (Olympus, Nhật Bản) và đếm tế bào dưới vật kính  $\times 10$ .

**Xác định trọng lượng tươi và trọng lượng khô sinh khối**

Tiến hành cân eppendorf, hút 1 ml dịch huyền phù tế bào cho vào eppendorf. Sau đó, dịch huyền phù tế bào này được ly tâm với tốc độ 10000 vòng/phút trong 10 phút. Nhẹ nhàng hút bỏ dịch nổi, giữ lại phần cặn lắng đã được ly tâm. Cân eppendorf có chứa sinh khối tế bào lắng ở đáy để xác định trọng lượng tươi. Trọng lượng tươi sinh khối là độ lệch giữa hai lần cân. Sau đó, tiến hành xác định trọng lượng khô bằng cách sấy eppendorf chứa huyền phù tế bào (đã ly tâm và hút bỏ dịch nổi) trong tủ sấy ở 60°C đến khi trọng lượng không đổi. Trọng lượng khô sinh khối là độ chênh lệch giữa lần cân cuối và lần cân đầu tiên.

**Chỉ tiêu theo dõi và thống kê xử lý số liệu**

Trong nuôi cấy huyền phù tế bào, tiến hành ghi

nhận các chỉ tiêu như mật độ tế bào, trọng lượng tươi, trọng lượng khô của sinh khối huyền phù tế bào sau 7, 14, 21 và 28 ngày nuôi cấy. Chỉ tiêu theo dõi đối với thí nghiệm khảo sát khả năng tái sinh của huyền phù tế bào là: khả năng hình thành mô sẹo, chồi và rễ. Số liệu được xử lý và phân tích bằng phần mềm SPSS 16.0 theo phương pháp Duncan test với  $\alpha = 0,05$  (Duncan, 1995); các biểu đồ được vẽ bằng phần mềm Microsoft Excel.

## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### **Ảnh hưởng của 2,4-D, NAA, KIN, IBA lên sự tăng sinh huyền phù tế bào sâm Ngọc Linh**

#### *Ảnh hưởng của 2,4-D lên sự tăng sinh huyền phù tế bào sâm Ngọc Linh*

Sự hiện diện của các chất điều hòa sinh trưởng thực vật trong môi trường, đặc biệt là auxin, kích thích phân chia tế bào và do đó dẫn đến sự tăng trưởng của huyền phù tế bào. Nhu cầu về nồng độ và loại chất điều hòa sinh trưởng để tạo huyền phù tế bào thay đổi tùy theo từng loại thực vật. 2,4-D là auxin mạnh, có khả năng kích thích sự phân chia của tế bào, sự phân chia này có thể làm cho mô sẹo càng thêm bờ, xốp trong môi trường lỏng lác và dễ dàng hình thành huyền phù tế bào (Nguyễn Đức Lượng, Lê Thị Thủy Tiên, 2006). Kết quả được ghi nhận sau 28 ngày nuôi cấy, mật độ tế bào, trọng lượng sinh khối tươi và khô được thể hiện lần lượt qua biểu đồ 1a, 2a, b. Dưới tác dụng của 2,4-D các tế bào sâm Ngọc Linh phân chia nhanh thể hiện qua độ dốc của biểu đồ, ở các nồng độ 2,4-D khác nhau thì tốc độ phân chia của tế bào cũng khác nhau. Sự phân chia tế bào và sự tăng sinh khối tế bào đạt cao nhất được ghi nhận vào ngày thứ 14 ở nghiệm thức có bổ sung 1,0 mg/l 2,4-D với 22,67 tế bào/5  $\mu$ l, 44,67 mg/l (TLT), 32,67 mg/l (TLK) (Biểu đồ 1a, 2a, b). Ở các nồng độ 2,4-D cao hơn hay thấp hơn 1,0 mg/l thì mật độ tế bào, trọng lượng sinh khối tươi và khô đều cho kết quả thấp hơn. Điều này có thể là do khi bổ sung 2,4-D ở nồng độ cao hay thấp hơn 1,0 mg/l đều gây ức chế sự sinh trưởng của tế bào sâm Ngọc Linh.

#### *Ảnh hưởng của NAA lên sự tăng sinh huyền phù tế bào sâm Ngọc Linh*

Dưới tác dụng của NAA, tương tự như 2,4-D, kết quả thu nhận được sau 28 ngày khi nuôi cấy 1 g mô sẹo “xốp” trong môi trường MS lỏng có bổ sung NAA với các nồng độ khác nhau (0; 0,5; 1,0; 1,5 mg/l) được thể hiện qua biểu đồ 1a; 2c, d, hình 1a. Mật độ tế bào, trọng lượng tươi và khô của tế bào đạt

cao nhất vào ngày 14 ở tất cả các nghiệm thức. Tuy nhiên, khi bổ sung NAA với các nồng độ khác nhau thì sự tăng sinh của tế bào cũng rất khác nhau. Nồng độ NAA càng cao thì tế bào tăng sinh càng nhanh thể hiện qua các chỉ tiêu như mật độ tế bào, trọng lượng tươi và khô của tế bào. Ở nghiệm thức có bổ sung 1,5 mg/l NAA thu được mật độ tế bào (130,17 tế bào/5  $\mu$ l), trọng lượng tươi (49,68 mg/ml) và khô (41 mg/l) cao hơn so với các nghiệm thức còn lại. Kích thước tế bào ở nghiệm thức này cũng lớn hơn.

#### *Ảnh hưởng của IBA lên sự tăng sinh huyền phù tế bào sâm Ngọc Linh*

Sau 28 ngày nuôi cấy, mật độ tế bào, trọng lượng tươi và khô của tế bào được thể hiện qua biểu đồ 1c, 2e, f. Kết quả thu nhận được tương tự như 2,4-D và NAA, IBA cũng có khả năng kích thích phân chia tế bào dẫn đến sự tăng trưởng của huyền phù tế bào. Sự sinh trưởng của tế bào đạt cao nhất vào ngày thứ 14 ở tất cả các nghiệm thức. Ở nghiệm thức có bổ sung 1,0 mg/l IBA tế bào phân chia và tăng sinh tốt nhất thể hiện qua các chỉ tiêu như mật độ tế bào (35,5 tế bào/5  $\mu$ l), trọng lượng tươi (40,33 mg/ml) và khô (26 mg/l) đều đạt cao nhất. Khi bổ sung IBA với nồng độ cao hơn 1,0 mg/l thì tế bào phân chia chậm và tăng sinh ít, điều này có thể là do IBA khi bổ sung với nồng độ cao sẽ ức chế sự sinh trưởng của tế bào.

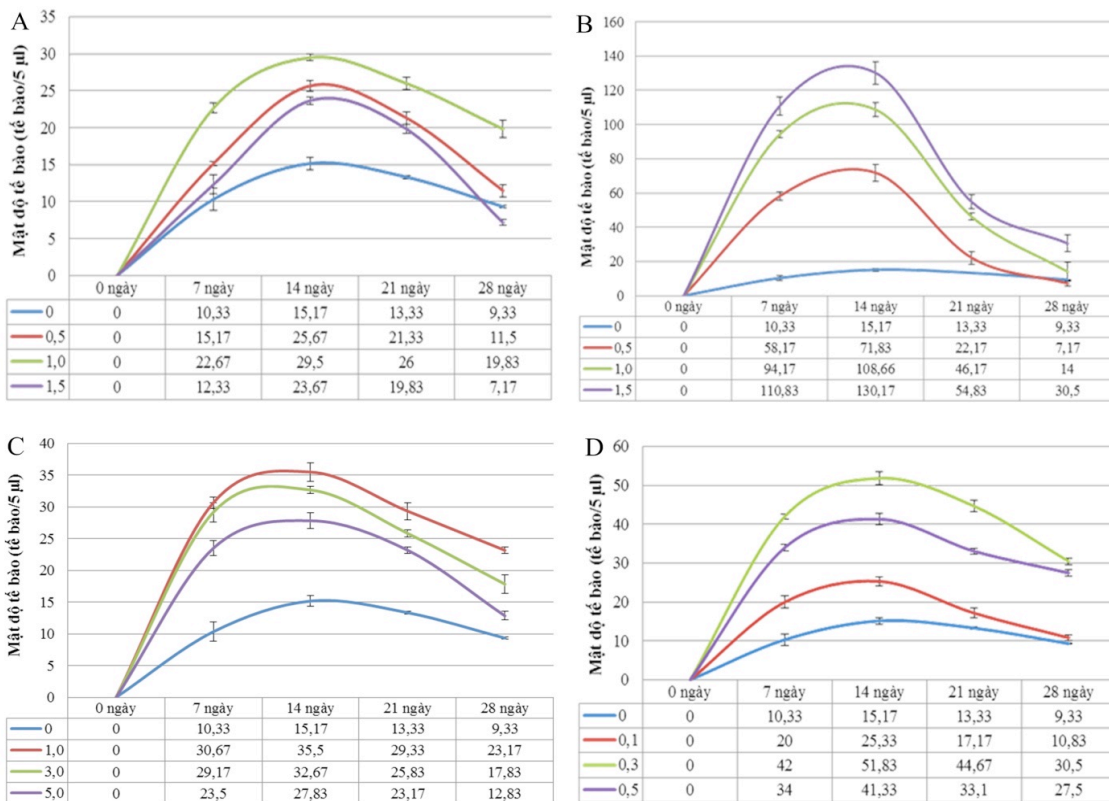
#### *Ảnh hưởng của KIN lên sự tăng sinh huyền phù tế bào sâm Ngọc Linh*

Sau 28 ngày nuôi cấy, kết quả thu nhận được cho thấy sự tăng sinh của huyền phù tế bào tốt nhất vào ngày thứ 14 ở nghiệm thức có bổ sung 0,3 mg/l KIN với mật độ tế bào (51,83 tế bào/5  $\mu$ l), trọng lượng tươi (37,33 mg/ml) và khô (27,83 mg/ml) đạt cao nhất (Biểu đồ 1d, 2g, h). Các tế bào kết thành cụm từ 4 - 6 tế bào. Hình thái các tế bào tương tự nhau giữa các nghiệm thức, tế bào hình cầu, một số tế bào lại có hình bầu dục. Kích thước tế bào giữa các nghiệm thức cũng tương tự nhau.

Yêu cầu dinh dưỡng trong nuôi cấy tế bào đơn là khá phức tạp, do các tế bào bị mất nhiều chất cần thiết cho sự sinh trưởng khi tách rời khỏi quần thể tế bào. Vì thế việc lựa chọn môi trường dinh dưỡng cần thiết và điều kiện nuôi cấy thích hợp là nghiên cứu đầu tiên trong nuôi cấy tế bào đơn (Street *et al.*, 1970). Sự hiện diện của các chất điều hòa sinh trưởng thực vật là một thành phần không thể thiếu cho sự cảm ứng phân chia tế bào, sinh trưởng và phân hóa mô cây (Nguyễn Đức Lượng, Lê Thị Thủy Tiên, 2006). Nghiên cứu của Lian và đồng tác

già (2002) khi khảo sát ảnh hưởng của các chất điều hòa sinh trưởng lên sự tăng sinh huyền phù tế bào sâm Triều Tiên cho thấy auxin (2,4-D, IBA, NAA) có tác động đáng kể đến sự sinh trưởng của tế bào. Tuy nhiên, khi môi trường nuôi cấy có bổ sung cytokinin (BA, KIN) thì tế bào lại chậm phát triển. Khi nghiên cứu sự tăng sinh huyền phù tế bào ở cây *Papaver bracteatum*, Farjaminezhad và đồng tác giả (2013) lại cho thấy sự kết hợp giữa NAA (1,0 mg/l) và BAP (1,0 mg/l) trong môi trường nuôi cấy thì huyền phù tế bào tăng sinh nhanh nhất so với các nghiệm thức bổ sung riêng lẻ auxin (2,4-D, NAA), cytokinin (BAP, KIN) hoặc các nghiệm thức bổ sung kết hợp auxin và cytokinin khác. Bên cạnh

đó, nghiên cứu trên còn chỉ ra rằng, NAA có ảnh hưởng đáng kể đến sự tăng sinh huyền phù tế bào ở cây *Papaver bracteatum*. Trong thí nghiệm về sự tăng sinh huyền phù sâm Ngọc Linh, nhìn chung 2,4-D, NAA, IBA, KIN đều có khả năng kích thích phân chia tế bào. Nồng độ 2,4-D (1,0 mg/l), NAA (1,5 mg/l), IBA (1,0 mg/l) và KIN (0,3 mg/l) là thích hợp cho sự tăng trưởng của huyền phù tế bào sâm Ngọc Linh. Tuy nhiên, mật độ tế bào, trọng lượng tươi và khô của tế bào cao hơn khi bổ sung NAA vào môi trường nuôi cấy. Vì vậy, chúng tôi sử dụng NAA với nồng độ 1,5 mg/l bổ sung vào môi trường nuôi cấy đối với các thí nghiệm tiếp theo.



**Biểu đồ 1.** Ảnh hưởng của các nồng độ 2,4-D (a), NAA (b), IBA (c), KIN (d) khác nhau lên mật độ tế bào sâm Ngọc Linh sau 28 ngày nuôi cấy.

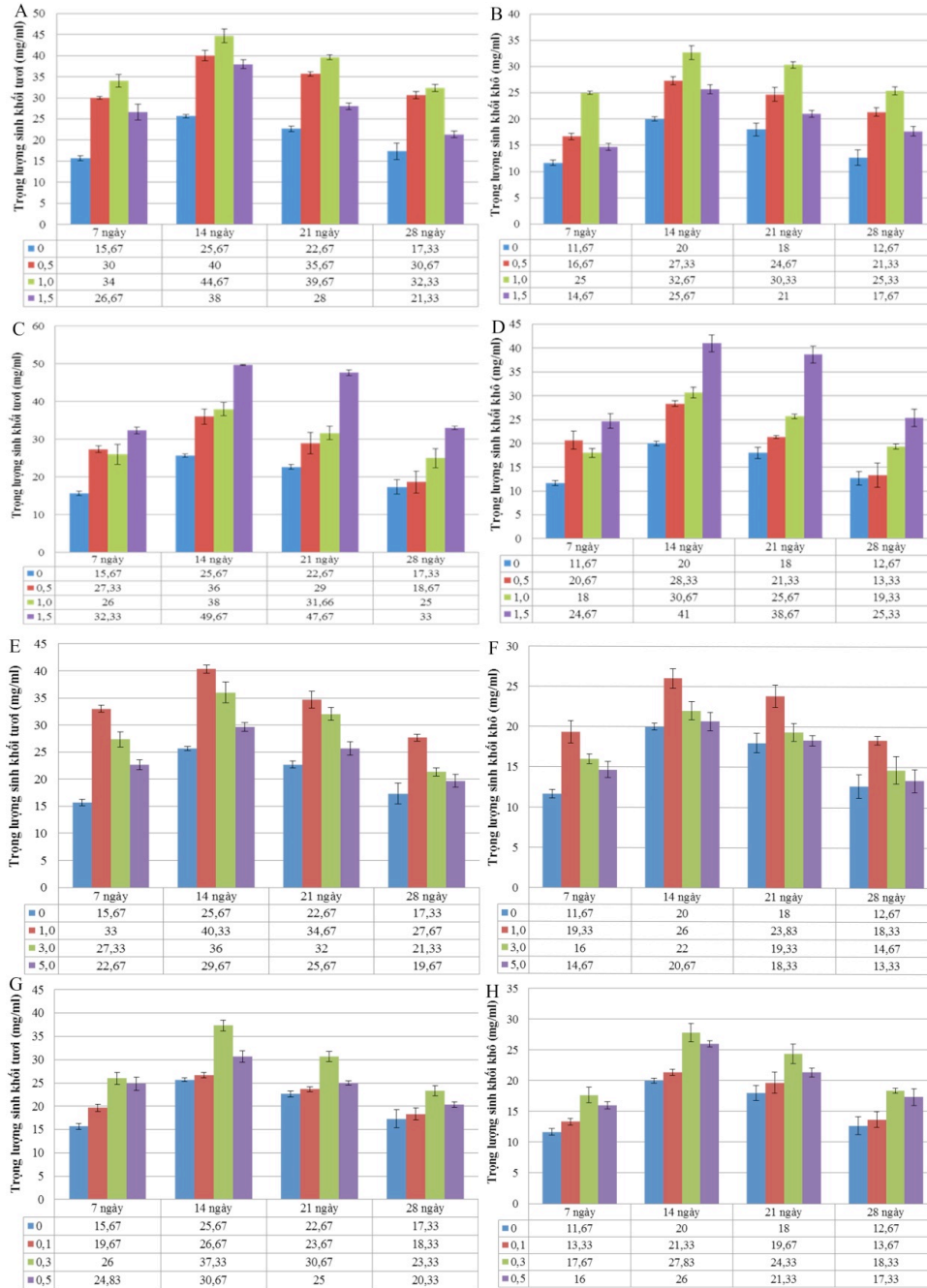
**Ảnh hưởng của môi trường khoáng và điều kiện chiếu sáng lên sự tăng sinh huyền phù tế bào sâm Ngọc Linh**

Kết quả thu nhận được sau 28 ngày nuôi cấy cho thấy môi trường chứa hàm lượng chất khoáng khác nhau có tác động không giống nhau lên sự tăng sinh

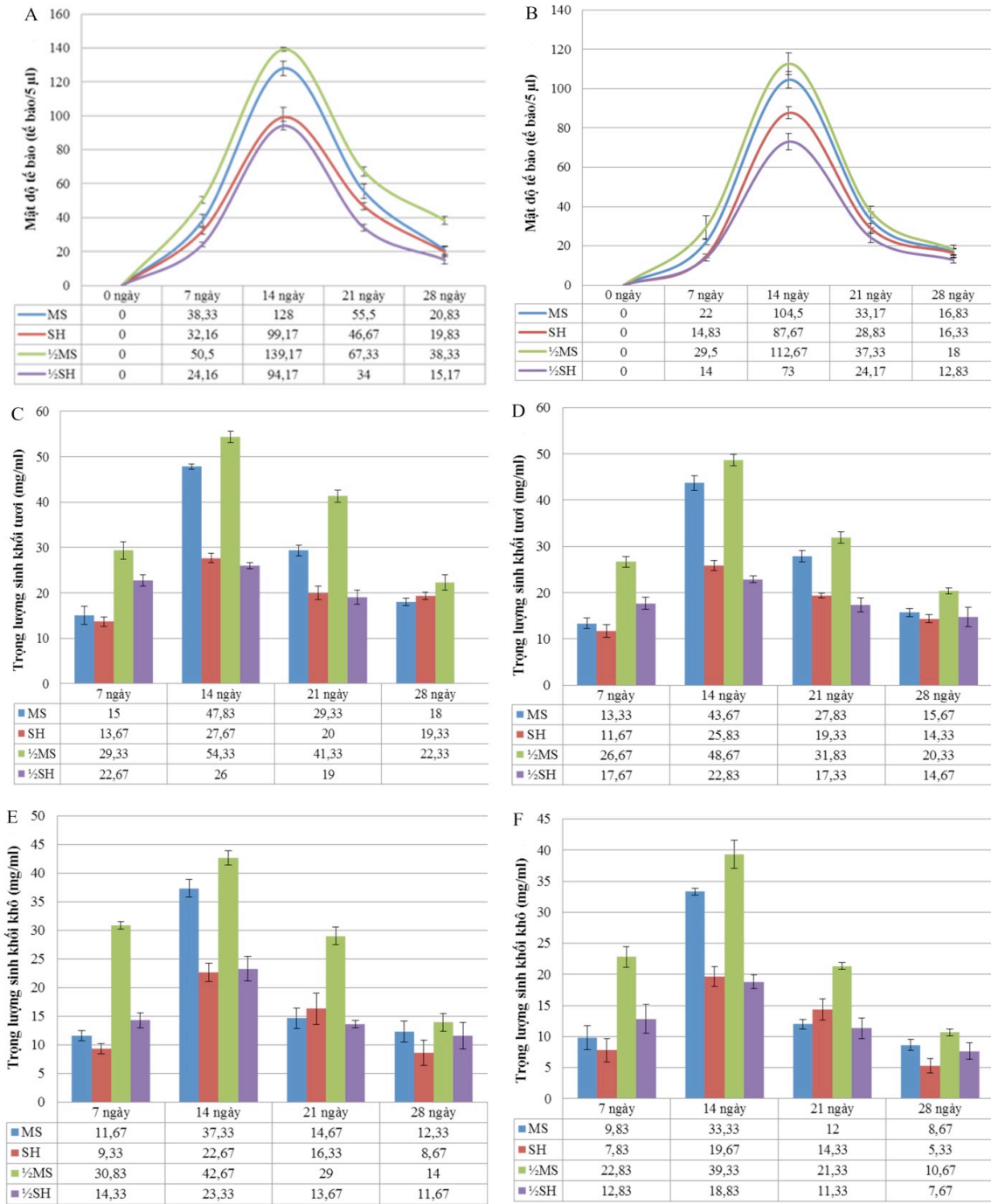
huyền phù tế bào sâm Ngọc Linh. Dựa vào biểu đồ 3 cho thấy mật độ tế bào (139,17 tế bào/5 µl), trọng lượng tươi (54,33 mg/ml) và khô (42,67 mg/ml) đạt cao nhất khi nuôi cấy trong môi trường khoáng ½MS ở điều kiện chiếu sáng 16/8 giờ. Tiếp theo là môi trường MS, ½SH và cuối cùng là SH. Khi sử dụng đèn huỳnh quang với quang kỳ là 16/8 giờ kết hợp với môi trường

khoảng ½MS nhận thấy tế bào sâm Ngọc Linh tăng trưởng tốt hơn so với điều kiện tối hoàn toàn (Biểu đồ 3). Các chỉ tiêu theo dõi như mật độ tế bào, trọng lượng tươi và khô của sinh khối tế bào khi nuôi cấy ở điều

kiện chiếu sáng cho kết quả cao hơn so với khi nuôi cấy trong điều kiện tối hoàn toàn. Có thể kết luận môi trường khoảng ½MS và điều kiện chiếu sáng 16/8 giờ là thích hợp cho tế bào sâm Ngọc Linh tăng trưởng



**Biểu đồ 2.** Ảnh hưởng của các nồng độ 2,4-D (a, b), NAA (c, d), IBA (e, f), KIN (g, h) khác nhau lên trọng lượng tươi (a, c, e, g) và trọng lượng khô (b, d, f, h) của sinh khối tế bào sâm Ngọc Linh sau 28 ngày nuôi cấy.

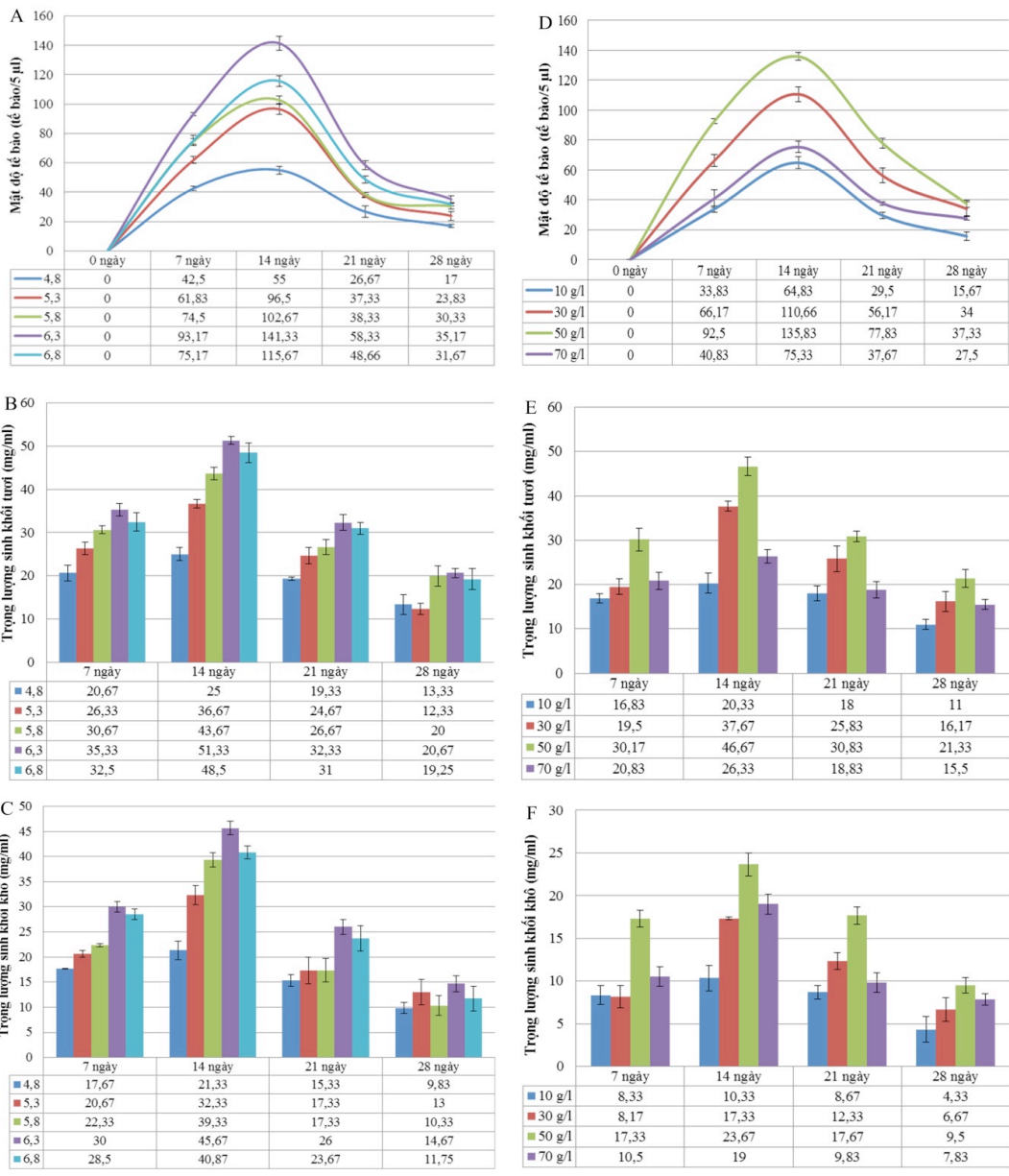


**Biểu đồ 3.** Ảnh hưởng của môi trường khoáng và điều kiện chiếu sáng lên mật độ tế bào (a, b), trọng lượng tươi (c, d), trọng lượng khô (e, f) sâm Ngọc Linh sau 28 ngày nuôi cấy. a, c, e. Điều kiện chiếu sáng 16/8 giờ; b, d, f. Điều kiện tối hoàn toàn.

**Ảnh hưởng của pH lên sự tăng sinh huyền phù tế bào sâm Ngọc Linh**

Trong thí nghiệm này, kết quả thu nhận được sau 28 ngày nuôi cấy được thể hiện qua biểu đồ 4a, b, c. Khi điều chỉnh pH của môi trường về các giá trị khác nhau thì sự tăng sinh của tế bào cũng như sự tăng sinh khối tươi và khô của các nghiệm thức là khác nhau. Khi tăng pH của môi trường từ 4,3

đến 6,3 thì mật độ tế bào, trọng lượng sinh khối tươi và khô cũng tăng dần. Khi pH môi trường cao hơn 6,3 thì các chỉ tiêu theo dõi này giảm xuống. Điều đó có thể là do pH môi trường quá thấp hoặc quá cao sẽ làm giảm khả năng hấp thụ chất dinh dưỡng của tế bào từ môi trường, tế bào tăng sinh chậm. Trong thí nghiệm này, pH môi trường thích hợp nhất cho nuôi cấy lỏng lác của tế bào sâm Ngọc Linh là 6,3.

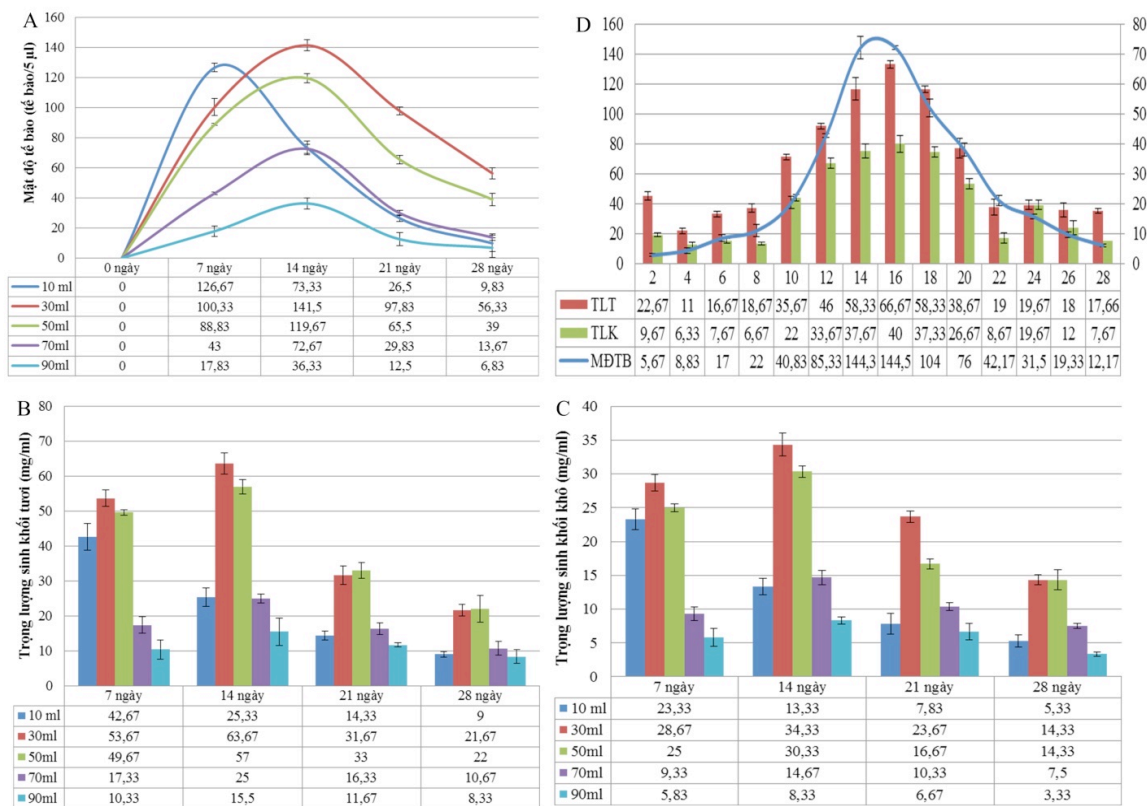


**Biểu đồ 4.** Ảnh hưởng của pH (a, b, c) và nồng độ sucrose (d, e, f) lên mật độ tế bào (a, d), trọng lượng tươi (b, e), trọng lượng khô (c, f) sinh khối tế bào sâm Ngọc Linh sau 28 ngày nuôi cấy.

**Ảnh hưởng của nồng độ sucrose lên sự tăng sinh huyền phù tế bào sâm Ngọc Linh**

Bởi vì huyền phù tế bào được hình thành từ mô sẹo “xốp” có chứa các tế bào đơn và cụm tế bào nhỏ riêng lẻ trong môi trường lỏng lác, cho nên khả năng sinh tổng hợp của các tế bào đơn và các cụm tế bào này có thể yếu hơn về mặt cơ học, dễ chết và vỡ so với các tế bào trong mô sẹo. Do đó, các tế bào sẽ phân chia nhanh và tăng trưởng tốt hơn khi được nuôi cấy trong một môi trường giàu năng lượng (nguồn carbon). Sự phân chia và tách rời các tế bào diễn ra trong quá trình nuôi cấy lỏng lác mô

seo “xốp” sâm Ngọc Linh rất cần nguồn carbon để tổng hợp các vật liệu mới cho vách tế bào và tích lũy tinh bột. Kết quả thu nhận sau 28 ngày nuôi cấy cho thấy huyền phù tế bào hình thành tốt nhất trong môi trường có bổ sung 50 g/l sucrose và thấp nhất trên môi trường có bổ sung 10 g/l sucrose (Biểu đồ 4d, e, f). Nồng độ sucrose thấp không đủ để cung cấp nguồn carbon cho sự phân chia và tăng trưởng của tế bào. Ngược lại, khi nồng độ sucrose quá cao lại gây stress thẩm thấu bất lợi cho sự tăng trưởng của tế bào sâm Ngọc Linh. Do vậy, nồng độ đường thích hợp cho sự tăng trưởng tế bào sâm Ngọc Linh là 50 g/l.



**Biểu đồ 5.** Ảnh hưởng của thể tích môi trường (a, b, c) lên mật độ tế bào (a), trọng lượng tươi (b), trọng lượng khô (c) sinh khối tế bào sâm Ngọc Linh sau 28 ngày nuôi cấy; d. Sự sinh trưởng và phát triển của sinh khối tế bào sâm Ngọc Linh sau các khoảng thời gian nuôi cấy khác nhau; MDTB: mật độ tế bào (tế bào/5 µl); TLT: trọng lượng tươi sinh khối (mg/ml); TLK: trọng lượng khô sinh khối (mg/ml).

**Ảnh hưởng của thể tích môi trường lên sự tăng sinh tế bào sâm Ngọc Linh**

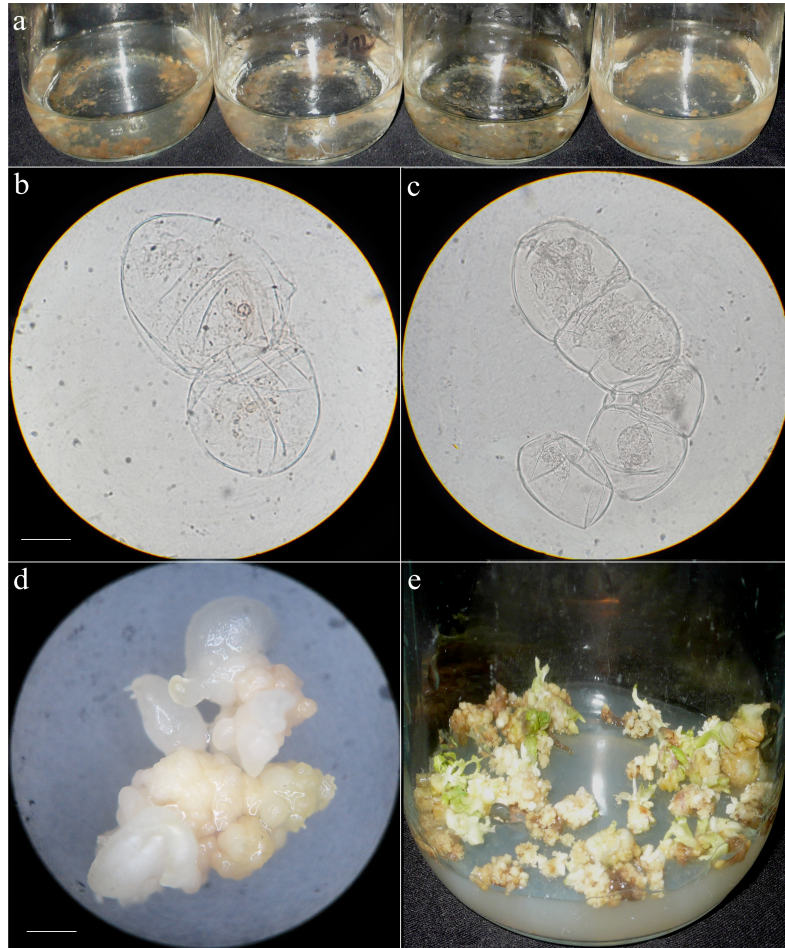
Huyền phù tế bào sâm Ngọc Linh khi được nuôi cấy ở các thể tích môi trường khác nhau thì các tế bào tăng sinh không giống nhau sau 28 ngày nuôi cấy (Biểu đồ 5a, b, c). Sự tăng trưởng của huyền phù

tế bào đạt cao nhất vào ngày thứ 14 khi nuôi cấy ở các thể tích môi trường là 30, 50, 70 và 90 ml. Ở nghiệm thức thể tích môi trường nuôi cấy là 10 ml có sự khác biệt, các tế bào sinh trưởng nhanh vào 7 ngày đầu, nhưng sau đó lại sinh trưởng chậm và chết đi nhanh chóng. Điều này có thể là do thể tích môi trường ít không đủ cung cấp chất dinh dưỡng cho các



tế bào phân chia và duy trì hoạt động sống của tế bào. Chính vì vậy mà, sự tăng trưởng của tế bào ở nghiệm thức chứa 10 ml môi trường nuôi cấy diễn ra nhanh và cũng suy vong nhanh chóng. Thể tích môi

trường tối ưu cho tế bào sâm Ngọc Linh tăng trưởng là 30 ml với mật độ tế bào (141,5 tế bào/5  $\mu$ l), trọng lượng sinh khối tươi (63,67 mg/ml) và khô (34,33 mg/ml) đạt cao nhất.



**Hình 1.** Ảnh hưởng của NAA (0; 0,5; 1,0 và 1,5 mg/l theo thứ tự từ trái sang phải) lên sự tăng sinh huyền phù tế bào sâm Ngọc Linh (a); hình thái một số tế bào sâm Ngọc Linh được quan sát dưới kính hiển vi quang học ở vật kính  $\times 100$  (b, c); thước đo: 10  $\mu$ m; sự tái sinh phôi của huyền phù tế bào sâm Ngọc Linh sau 30 ngày nuôi cấy (d); sự phát triển thành cây con từ phôi vô tính sâm Ngọc Linh sau 30 ngày nuôi cấy; thước đo: 2 mm.

### Xác định đường cong sinh trưởng của tế bào đơn sâm Ngọc Linh

Các thí nghiệm khảo sát sự tăng trưởng của tế bào sâm Ngọc Linh trong nghiên cứu này được thực hiện bằng phương pháp nuôi cấy không liên tục. Trong phương pháp này, mô sẹo “xốp” sâm Ngọc Linh được nuôi cấy trong hệ thống kín, cả môi trường nuôi cấy và tế bào không được chuyển đổi. Phương pháp này yêu cầu phải cấy chuyển các tế bào sang môi trường mới sau mỗi một chu kỳ. Trong quá

trình phát triển trong môi trường lỏng, các tế bào đơn sâm Ngọc Linh thường phát triển theo đúng chu kỳ sinh trưởng của nhiều tế bào sinh vật (Biểu đồ 5d). Khi bắt đầu nuôi cấy đến ngày thứ 8, các tế bào thực vật trải qua giai đoạn thích nghi. Giai đoạn này, sự sinh trưởng của tế bào khá chậm. Thời gian để các tế bào thích ứng với môi trường nuôi cấy phụ thuộc vào nhiều yếu tố như tuổi mẫu, khối lượng mẫu và các điều kiện nuôi cấy. Ở giai đoạn này, các tế bào có kích thước tương đối nhỏ. Đặc biệt là trong môi trường nuôi cấy xuất hiện các tế bào với nội chất

đậm đặc, hai cực hình thành 2 hình cầu nhỏ, bắt màu thuốc nhuộm rất đậm, các tế bào này chiếm số lượng lớn trong dịch huyền phù (Hình 1b). Tiếp theo là giai đoạn tăng trưởng của tế bào kéo dài từ ngày nuôi cấy thứ 8 đến ngày thứ 12. Ở giai đoạn này, sự phân chia và sự tăng khối lượng tế bào diễn ra với tốc độ lớn nhất, số lượng tế bào tăng lên theo hàm số mũ. Các tế bào kết thành cụm từ 5 - 10 tế bào (Hình 1c). Sự phân tách các cụm tế bào trong huyền phù thay đổi theo thời gian. Khi huyền phù tế bào mới được cấy sang môi trường mới, số lượng tế bào đơn quan sát thấy được rất cao, ít có cụm tế bào. Khi quan sát từ ngày thứ 8 trở đi, số lượng cụm tế bào xuất hiện nhiều hơn. Kết quả này tương tự như nghiên cứu của Henshaw và đồng tác giả (1966) trên chi *Acer*, nhận thấy sự kết cụm các tế bào tăng lên trong suốt giai đoạn phân chia mạnh nhất của tế bào, hệ số gián phân trong các cụm tế bào cao hơn là ở các tế bào đơn. Vào giai đoạn tiếp theo từ ngày nuôi cấy thứ 12 đến ngày thứ 16 các tế bào bước vào giai đoạn ổn định. Ở giai đoạn này, hoạt tính phân bào của tế bào giảm mạnh, số lượng và trọng lượng sinh khối tươi

và khô của tế bào ổn định. Ảnh hưởng của một số yếu tố như sự cạn kiệt dinh dưỡng, sự tăng mật độ tế bào, sự tích lũy các chất độc là nguyên nhân làm giảm tốc độ sinh trưởng của tế bào. Thời gian bắt đầu nuôi cấy huyền phù tế bào cho đến khi đạt giai đoạn ổn định phụ vào các yếu tố như: nồng độ tế bào ban đầu, sự kéo dài của pha thích nghi và tốc độ tăng trưởng của dòng tế bào (Đương Tấn Nhựt, 2009). Sau giai đoạn ổn định thì sự sinh trưởng của các tế bào giảm xuống và dần đến sẽ ngừng sinh trưởng nếu không được cấy chuyển sang môi trường mới.

Do đó, để duy trì huyền phù tế bào sâm Ngọc Linh thì cần phải cấy chuyển vào đầu pha ổn định vì thời điểm này các tế bào tăng trưởng mạnh nhất, tốc độ tăng trưởng tỷ lệ với thời gian. Như vậy, dựa vào đường cong sinh trưởng ở biểu đồ 5d thì thời điểm cấy chuyển tế bào sâm Ngọc Linh là vào khoảng ngày nuôi cấy thứ 14 đến ngày thứ 16. Huyền phù tế bào thu được dùng làm nguyên liệu cho các thí nghiệm tái sinh tiếp theo.

**Bảng 1.** Ảnh hưởng của NAA, BA, IBA lên khả năng tái sinh của huyền phù tế bào sâm Ngọc Linh.

Chất điều hòa sinh trưởng	Nồng độ (mg/l)	Đặc điểm tái sinh
NAA	0	Không có hiện tượng cảm ứng tái sinh
	1,0	Một số ít cảm ứng tái sinh phôi, phôi nhỏ, màu trắng đục, xen kẽ các đốm đen của phần huyền phù bị chết
	2,0	Một số cảm ứng tái sinh phôi, phôi màu trắng đục ngả hơi vàng
	3,0	Phần lớn hình thành phôi, phôi có màu trắng đục, tròn
	4,0	Một số cảm ứng tái sinh phôi, phôi màu trắng đục ngả hơi vàng
	5,0	Phôi tái sinh rất ít, phôi có màu vàng đục
IBA	0	Không có hiện tượng cảm ứng tái sinh
	1,0	Hầu như không cảm ứng tái sinh, huyền phù hóa nâu
	3,0	Một số ít cảm ứng tái sinh phôi, phôi có màu trắng đục
	5,0	Một số ít cảm ứng tái sinh phôi, phôi có màu vàng đục, xuất hiện rễ
	7,0	Cảm ứng tái sinh phôi, phôi có màu hơi tím, xuất hiện rễ
	9,0	Hầu như không cảm ứng tái sinh, huyền phù hóa nâu
BA	0	Không có hiện tượng cảm ứng tái sinh
	0,5	Hầu như không cảm ứng tái sinh, huyền phù hóa nâu
	1,0	Hầu như không cảm ứng tái sinh, huyền phù hóa nâu
	2,0	Hầu như không cảm ứng tái sinh, huyền phù hóa nâu
	3,0	Hầu như không cảm ứng tái sinh, huyền phù hóa nâu
	4,0	Hầu như không cảm ứng tái sinh, huyền phù hóa nâu

### Ảnh hưởng của NAA, BA, IBA lên khả năng tái sinh của huyền phù tế bào sâm Ngọc Linh

Hiện tượng tái sinh chồi được Skoog và Miller (1957) nghiên cứu và cho thấy các tế bào đơn khi hình thành mô sẹo, từ mô sẹo tạo thành chồi, từ chồi tạo rễ và thành cây con hoàn chỉnh đều rất cần đến các chất điều hòa sinh trưởng thực vật. Một số hiện tượng khác được thấy xuất hiện trong nuôi cấy tế bào là hiện tượng phát sinh phôi. Hiện tượng tái sinh cây thông qua sự phát sinh phôi xuất hiện ở nhiều loài thực vật khác nhau khi nuôi cấy mô sẹo và huyền phù tế bào.

Huyền phù tế bào (10 ml) được cấy chuyển vào môi trường MS rắn có bổ sung các chất điều hòa sinh trưởng NAA (1; 2; 3; 4 và 5 mg/l), IBA (1; 3; 5; 7 và 9 mg/l) và BA (0,5; 1; 2; 3 và 4 mg/l) nhằm khảo sát khả năng tái sinh của tế bào sâm Ngọc Linh. Kết quả thu nhận được sau 30 ngày nuôi cấy được thể hiện qua bảng 1 cho thấy huyền phù tế bào không tái sinh tạo thành mô sẹo mà hình thành phôi khi môi trường có bổ sung NAA; khi môi trường có bổ sung IBA thì huyền phù tế bào hình thành phôi và xuất hiện rễ; còn đối với các nghiệm thức có bổ sung BA thì huyền phù tế bào hóa nâu và chết dần. Nghiên cứu của Fujimura và Komamine (1975) cũng ghi nhận kết quả tương tự. Khi môi trường có bổ sung BA, KIN riêng lẻ hoặc Zeatin kết hợp với auxin (2,4-D, IAA) gây ra sự ức chế hình thành phôi soma từ huyền phù tế bào cà rốt. Trong nuôi cấy huyền phù tế bào, sự phát sinh phôi soma xảy ra ở bề mặt các tế bào kết cụm trong môi trường nuôi cấy. Các phôi này phát triển qua nhiều giai đoạn giống như phôi hợp tử. Phôi soma có thể tái sinh tạo thành cây hoàn chỉnh trên môi trường dinh dưỡng rắn. Việc nuôi cấy tế bào đơn để thu nhận huyền phù tế bào là bước đầu tiên của quá trình tạo phôi trong nuôi cấy *in vitro*.

Các phôi thu được sau 30 ngày nuôi cấy được cấy chuyển sang môi trường phát triển phôi (môi trường MS rắn có bổ sung 0,5 mg/l NAA và 1,0 mg/l BA). Sau 30 ngày nuôi cấy, từ các phôi cấy chuyển hình thành các cụm chồi. Điều này cho thấy tiềm năng tái sinh cây từ huyền phù tế bào sâm Ngọc Linh rất cao (Hình 1d, e).

### KẾT LUẬN

Qua các kết quả bước đầu trong nghiên cứu này cho thấy, đối với quá trình tăng sinh huyền phù tế bào sâm Ngọc Linh thì tế bào sâm Ngọc Linh tăng trưởng tốt trong môi trường khoáng  $\frac{1}{2}$ MS lỏng (với hàm lượng

khoáng đa lượng giảm đi  $\frac{1}{2}$ ) có bổ sung 1,5 mg/l NAA, 50 g/l sucrose và pH = 6,3 là thích hợp nhất cho tế bào sinh trưởng và phát triển trong điều kiện lỏng lác. Thể tích môi trường thích hợp nhất khi nuôi cấy 1,0 g mô sẹo “xốp” sâm Ngọc Linh là 30 ml. Thời gian cấy chuyển thích hợp nhất để duy trì huyền phù tế bào sâm Ngọc Linh là vào khoảng ngày nuôi cấy thứ 14 đến ngày thứ 16. Đối với quá trình tái sinh thì tế bào sâm Ngọc Linh tái sinh tạo phôi trên môi trường MS có bổ sung 3,0 mg/l NAA sau 30 ngày nuôi cấy.

**Lời cảm ơn:** Các tác giả xin chân thành cảm ơn Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn đã hỗ trợ kinh phí cho đề tài nghiên cứu này.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Duncan DB (1995) Multiple range and multiple F test. *Biometrics* 11: 1-42.
- Dương Tân Nhựt (2009) Công nghệ sinh học thực vật - Tập 2. Nxb. Nông nghiệp, Hà Nội, 392.
- Farjaminezhad R, Zare N, Zakaria RA, Farjaminezhad M (2013) Establishment and optimization of cell growth in suspension culture of *Papaver bracteatum*: a biotechnology approach for thebaine production. *Turk J Biol* 37(6): 689-697.
- Fujimura TT, Komamine A (1975) Effects of various growth regulators on the embryogenesis in a carrot cell suspension culture. *Plant Sci Lett* 5: 359-364.
- Henshaw GG, Jha KK, Mehta AR, Shakeshaft DJ, Street HE (1966) Studies on the growth in culture of plant cells. I-Growth patterns in batch propagated suspension cultures. *J Exp Bot* 17: 362-377.
- Lê Kim Cương, Hoàng Xuân Chiến, Nguyễn Bá Nam, Trịnh Thị Hương, Dương Tân Nhựt (2012) Ảnh hưởng của một số yếu tố lên khả năng tăng sinh mô sẹo “xốp” và bước đầu nuôi cấy huyền phù tế bào sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.). *Tạp Chí Sinh Học* 34(3SE): 265-276.
- Lian ML, Chakrabarty D, Paek KY (2002) Effect of plant growth regulators and medium composition on cell growth and saponin production during cell suspension culture of mountain ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer). *J Plant Biol* 45: 201-206.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-497.
- Nguyễn Đức Lượng, Lê Thị Thủy Tiên (2006) Công nghệ tế bào. Nxb. Đại học Quốc gia Tp. Hồ Chí Minh, 375.

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.

Skoog F, Miller CO (1957) Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured *in vitro*. *Sym*

*Soc Exp Bio* 11: 118-231.

Street HE, Wilson SB, King PJ (1970) Studies on the growth in culture of plant cells. XII. A versatile system for the large scale batch and continuous cultures of plant cell suspensions. *J Exp Bot* 21: 177-207.

## EFFECT OF SOME FACTORS ON THE GROWTH AND REGENERATION OF CELL SUSPENSION OF NGOC LINH GINSENG (*PANAX VIETNAMENSIS* HA ET GRUSHV.)

Le Kim Cuong, Nguyen Hong Hoang, Duong Tan Nhut<sup>✉</sup>

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

### SUMMARY

Ngoc Linh ginseng also known as Vietnamese ginseng (*Panax Vietnamensis* Ha et Grushv.) is a perennial medicinal plant. This plant is extremely rare and belongs to the Araliaceae family. Scientists are focusing on studies of Ngoc Linh ginseng nowadays. In this research, the effects of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D),  $\alpha$ -naphthaleneacetic acid (NAA), indole-3-butyric acid (IBA), 6-benzylaminopurine (BA), Kinetin (KIN), mineral salt formulations and cultural conditions, pH, sucrose concentration, medium volume on cell suspension culture of *Panax vietnamensis* Ha et Grushv. were investigated. In addition, growth curves and the effect of several plant grow regulators including  $\alpha$ -naphthaleneacetic acid (NAA), indole-3-butyric acid (IBA), 6-benzylaminopurine (BA) on the regeneration of Ngoc Linh ginseng's cell suspension were also presented in this study. After 28 days in culture, the results showed that the best growth of a cell suspension of Ngoc Linh ginseng were obtained on  $\frac{1}{2}$ MS liquid medium supplemented with 1.5 mg/l NAA, 50 g/l sucrose and the most suitable pH was 6.3. The acceptable medium volume for cell suspension growth was 30 ml. The growth curve of Ngoc Linh ginseng's cell suspension showed that it should be subcultured at the beginning of the stationary phase approximately the 14<sup>th</sup>-16<sup>th</sup> day of culture. Ngoc Linh ginseng's cell suspension exhibited the strongest growth at this time. When Ngoc Linh ginseng's cell suspension was transferred to fresh medium, somatic embryos were formed in MS medium supplemented with 3.0 mg/l NAA after 30 days culture. The results shown that the potential regeneration of cell suspension of Ngoc Linh ginseng is very high.

**Keywords:** Cell suspension, friable callus, growth, Ngoc Linh ginseng, regeneration

---

<sup>✉</sup> Author for correspondence: Tel: +84-63-3831056; Fax: +84-63-3831028; E-mail: [duongtannhut@gmail.com](mailto:duongtannhut@gmail.com)