

SO SÁNH HÌNH THÁI VÀ CẤU TRÚC GIẢI PHẪU CỦA RỄ TƠ CHUYỂN GEN VÀ RỄ BẤT ĐỊNH Ở CÂY SÂM NGỌC LINH (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.)

Trịnh Thị Hương^{1,2}, Nguyễn Thị Nhật Linh¹, Hoàng Thanh Tùng¹, Vũ Thị Hiền¹, Vũ Quốc Luận¹, Đỗ Mạnh Cường¹, Trần Trọng Tuấn³, Phạm Bích Ngọc⁴, Chu Hoàng Hà⁴, Nguyễn Quang Đức Tiên⁵, Nguyễn Hoàng Lộc⁵, Dương Tấn Nhựt^{1,✉}

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

²Đại học Công nghiệp thực phẩm Thành phố Hồ Chí Minh

³Viện Sinh học nhiệt đới, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

⁴Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

⁵Trường Đại học khoa học, Đại học Huế

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

Ngày nhận bài: 13.11.2018

Ngày nhận đăng: 25.6.2019

TÓM TẮT

Trong nghiên cứu này, hình thái bên ngoài, cấu trúc giải phẫu và sự sinh trưởng của rễ tơ chuyển gen và rễ bất định cây sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) được so sánh. Rễ bất định được hình thành bằng cách nuôi cấy bốn loại mẫu khác nhau (lá, cuống lá, củ và mô sẹo) trên môi trường SH có bổ sung 5 mg/L IBA. Rễ tơ chuyển gen sâm Ngọc Linh được hình thành bằng cách lây nhiễm mẫu mô sẹo với vi khuẩn *Agrobacterium rhizogenes* chủng ATCC15834. Kết quả thu được cho thấy, có sự khác nhau rõ ràng về mặt hình thái, cấu trúc giải phẫu, con đường hình thành rễ thứ cấp và môi trường nuôi cấy giữa rễ tơ chuyển gen và rễ bất định sâm Ngọc Linh. Rễ tơ sinh trưởng nhanh, phân nhánh mạnh trên môi trường không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng thực vật. Sự hình thành rễ thứ cấp ở rễ tơ theo hai con đường: (1) Rễ thứ cấp hình thành bắt đầu từ hệ mạch của rễ chính; (2) Rễ thứ cấp hình thành độc lập với hệ mạch của rễ chính sau đó kéo dài và nối liền hai hệ mạch với nhau. Ngược lại, rễ bất định chỉ sinh trưởng trên môi trường có bổ sung auxin ngoại sinh và khả năng phân nhánh tạo rễ bên thấp. Quá trình hình thành rễ thứ cấp ở rễ bất định được khởi đầu từ các bó mạch của rễ bất định và tại một vị trí trên rễ bất định chỉ hình thành một rễ thứ cấp duy nhất. Những kết quả đạt được của nghiên cứu này sẽ là cơ sở để phân biệt được hai loại rễ này.

Từ khóa: *Agrobacterium rhizogenes*, hình thái giải phẫu, sâm Ngọc Linh, rễ bất định, rễ thứ cấp, rễ tơ

MỞ ĐẦU

Sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) thuộc chi Nhân sâm, là một cây dược liệu quý của nước ta. Do thời gian sinh trưởng của loài cây này rất chậm, thêm vào đó là tình trạng khai thác quá mức dẫn đến nguồn cung cấp loài cây dược liệu này còn rất khan hiếm. Ở sâm Ngọc Linh, hàm lượng saponin tập trung chủ yếu trong rễ củ sâm Ngọc Linh, do đó, hướng nuôi cấy tạo sinh khối rễ đang được quan tâm nghiên cứu. Trong đó, rễ tơ và rễ bất định là hai nguồn vật liệu thường được sử dụng trong các hệ thống nuôi cấy lớn như bioreactor để thu nhận sinh khối trong thời gian ngắn.

Rễ bất định là những rễ được hình thành từ

những vùng khác nhau trên cơ thể thực vật như thân, cành, lá,... Sự hình thành rễ bất định được điều hòa bởi yếu tố môi trường và các yếu tố nội sinh (Sorin *et al.*, 2005). Một số nghiên cứu nuôi cấy rễ tơ và rễ bất định ở sâm Ngọc Linh đã được thực hiện (Dương Tấn Nhựt *et al.*, 2010; 2012; Trịnh Thị Hương *et al.*, 2012; Hồ Thanh Tâm *et al.*, 2013; Nguyễn Hồng Hoàng *et al.*, 2014). Con đường cảm ứng hình thành hai loại rễ này là khác nhau. Sự hình thành rễ tơ do các gen *rol* quy định, trong khi đó, rễ bất định được hình thành do sự cảm ứng của auxin ngoại sinh (Trịnh Thị Hương *et al.*, 2016). Chính vì vậy, rễ tơ và rễ bất định có những đặc điểm và tính chất khác nhau. Tuy nhiên, hiện nay chưa có nghiên cứu nào chỉ rõ những đặc điểm giống và khác nhau giữa hai loại

rễ. Do đó, nghiên cứu này được thực hiện nhằm so sánh hình thái và cấu trúc giải phẫu của rễ tơ và rễ bất định sâm Ngọc Linh, làm cơ sở phân biệt được hai loại rễ.

Rễ tơ là một bệnh ở thực vật được gây ra bởi quá trình tương tác giữa vi khuẩn *Agrobacterium rhizogenes* và tế bào vật chủ. Hiện nay nghiên cứu nuôi cấy rễ tơ các loài cây được liệu đang là một hướng đầy triển vọng, vì rễ tơ có tính di truyền ổn định, có khả năng sinh trưởng nhanh, phân nhánh mạnh trên môi trường không cần bổ sung chất điều hòa sinh trưởng thực vật. Tuy nhiên, có rất ít các nghiên cứu về hình thái bên ngoài và cấu trúc giải phẫu của rễ tơ. Hơn nữa, kiểu hình của rễ tơ do các gen *rol* quy định (Britton, Escobar, 2008), do đó ở cùng một loài, nhưng có thể thu nhận được nhiều dòng rễ tơ với các hình thái khác nhau.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Vật liệu sử dụng để cảm ứng tạo rễ bất định là 4 loại mẫu khác nhau (mẫu lá, cuống lá, củ và mô sẹo) của cây sâm Ngọc Linh nuôi cấy *in vitro* có nguồn gốc ban đầu từ cây sâm Ngọc Linh 10 năm tuổi trồng tại Vườn Thực nghiệm của Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên.

Các dòng rễ tơ được tạo ra từ nghiên cứu trước đây thông qua lây nhiễm vi khuẩn *A. rhizogenes* chủng ATCC 15834 với mô sẹo nuôi cấy *in vitro*. Mật độ vi khuẩn là $OD_{600} = 0,5$; thời gian lây nhiễm là 20 phút và thời gian đồng nuôi cấy là 2 ngày (Nguyễn Hồng Hoàng *et al.*, 2014).

Vật liệu sử dụng trong thí nghiệm so sánh hình thái và cấu trúc giải phẫu là rễ tơ chuyển gen và rễ bất định sâm Ngọc Linh nuôi cấy *in vitro*.

Phương pháp

Phương pháp nuôi cấy rễ tơ

Các dòng rễ tơ được nuôi cấy trên môi trường SH (Schenk, Hildebrandt, 1972) chứa 30 g/L sucrose, pH = 5,8 và không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng thực vật (Nguyễn Hồng Hoàng *et al.*, 2014).

Phương pháp nuôi cấy rễ bất định

Các nguồn mẫu khác nhau (mẫu lá, cuống lá, củ và mô sẹo) của cây sâm Ngọc Linh nuôi cấy *in vitro* được cắt nhỏ, sau đó nuôi cấy trên môi trường SH có

bổ sung 5 mg/L IBA, 30 g/L sucrose, 8 g/L agar, pH 5,8. Mẫu lá được cắt với kích thước 10×10 mm, cuống lá có đường kính khoảng 2 mm, được cắt theo chiều ngang với chiều dài 10 mm; mẫu củ có đường kính khoảng 8 – 10 mm được cắt theo lớp cắt ngang với độ dày khoảng 2 mm; mô sẹo được cắt với kích thước 10×5 mm (Trịnh Thị Hương *et al.*, 2012).

Phương pháp quan sát và giải phẫu hình thái rễ sâm Ngọc Linh

Hình thái bên ngoài của rễ bất định và rễ tơ được quan sát bằng mắt thường và dưới kính hiển vi soi nổi trong 24 tuần nuôi cấy trên môi trường nhân nhanh.

Cấu trúc giải phẫu của rễ được quan sát bằng cách cắt lát mỏng dọc và ngang rễ, tiến hành nhuộm với thuốc nhuộm 2 màu đỏ carmine và xanh iode như sau: Mẫu sau khi cắt được ngâm trong Javel 10% khoảng 15 phút. Tiếp đó, mẫu được rửa sạch bằng nước cất vô trùng và ngâm khoảng 15 phút trong dung dịch acetic acid 45% để cố định mẫu. Sau đó, mẫu được lấy ra khỏi dung dịch acetic acid và rửa sạch bằng nước cất cho đến khi mất mùi acid và ngâm vào thuốc nhuộm 5 phút. Cuối cùng, mẫu được rửa lại bằng nước cất vô trùng, rồi đặt lên lamên, đặt lam kính và được quan sát, chụp ảnh dưới kính hiển vi quang học với độ phóng đại 10 và 20 lần (Hồ Thanh Tâm *et al.*, 2013).

Điều kiện thí nghiệm

Tất cả môi trường được hấp khử trùng ở 121°C , 1 atm trong 30 phút.

Các thí nghiệm nuôi cấy rễ được đặt ở nhiệt độ phòng $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, độ ẩm 55 – 60% và nuôi cấy trong điều kiện tối.

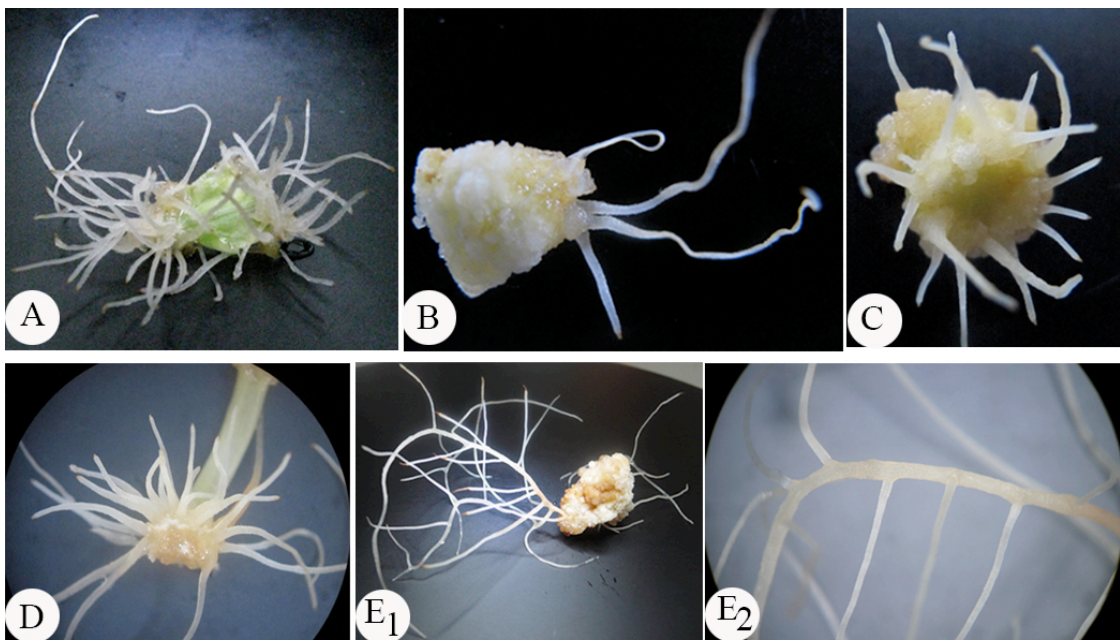
KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Hình thái bên ngoài và khả năng sinh trưởng của rễ bất định và rễ tơ sâm Ngọc Linh

Rễ bất định được cảm ứng hình thành thông qua hai con đường: (1) Trực tiếp từ nuôi cấy các nguồn mẫu mô khác nhau; (2) Gián tiếp thông qua nuôi cấy mô sẹo. Trong nghiên cứu này, sự cảm ứng hình thành rễ bất định sâm Ngọc Linh từ nuôi cấy các loại mô khác nhau (lá, cuống lá, củ và mô sẹo) đều có một điểm chung là các mẫu mô luôn hình thành khối mô sẹo tại vị trí vết cắt hoặc bị thương, sau đó tại khối mô sẹo này mới hình thành sơ khởi rễ và cảm ứng hình thành rễ bất định trên

môi trường SH có bổ sung 5 mg/L IBA (Hình 1A-D). Như vậy, ở sâm Ngọc Linh, rễ bất định chỉ hình thành theo con đường gián tiếp, đó là thông qua phát sinh mô sẹo. Quan sát hình thái bên ngoài cho thấy, rễ bất định sâm Ngọc Linh có màu trắng trong, mảnh và có chiều dài trung bình khoảng 1 – 2 cm (sau 10 tuần nuôi cấy), mọc đâm thẳng ra từ vị trí lát cắt mô như hai đầu mặt cắt của lá, củ, cuống lá (Hình 1A-D). Các mẫu mô (lá, cuống lá và củ) cảm ứng hình thành mô sẹo tại vị trí lát cắt sau khoảng 7 – 10 ngày nuôi cấy. Tiếp theo là sự hình thành rễ bất định sau khoảng 3 – 4 tuần nuôi cấy. Ở các khoảng thời gian nuôi cấy tiếp theo (5 – 12

tuần), các rễ bất định tiếp tục được cảm ứng hình thành và kéo dài. Sau khoảng 15 tuần, rễ bất định bắt đầu hóa nâu và chết đi sau đó, nếu không được cấy chuyển sang môi trường mới. Trong suốt quá trình phát triển này của rễ bất định, hoàn toàn không có sự phân nhánh để hình thành rễ thứ cấp (Hình 1A-D). Chỉ khi rễ bất định được cấy chuyển sang môi trường mới, lúc đó mới có sự phân nhánh của rễ bất định để hình thành nên các rễ thứ cấp. Tuy nhiên, mật độ phân nhánh của rễ cũng không cao và tại một vị trí trên rễ bất định chỉ phân chia duy nhất một nhánh để hình thành một rễ thứ cấp (Hình 1E).



Hình 1. Hình thái của rễ bất định sâm Ngọc Linh sau 10 tuần nuôi cấy. A: Rễ bất định sâm Ngọc Linh phát sinh từ mẫu lá; B: Rễ bất định phát sinh từ mẫu mô sẹo; C: Rễ bất định phát sinh từ mẫu củ; D: Rễ bất định phát sinh từ mẫu cuống lá; E_{1,2}: Sự hình thành rễ thứ cấp từ rễ bất định.

Đối với rễ tơ, do kết quả chuyển gen ở nghiên cứu trước đây của nhóm chúng tôi thu nhận được nhiều dòng khác nhau (Nguyễn Hồng Hoàng *et al.*, 2014), nên hình thái bên ngoài của rễ tơ cũng đa dạng hơn so với rễ bất định. Có dòng thì kéo dài mạnh nên chiều dài có thể đạt trung bình 3 – 4 cm, trong khi một số dòng khác thì chiều dài lại chỉ ở mức khoảng 1 – 2 cm hoặc thậm chí chỉ từ 0,5 – 1 cm (sau 10 tuần nuôi cấy). Nhưng nhìn chung, các dòng rễ tơ có một điểm chung là khả năng phân nhánh rất mạnh. Điều này hoàn toàn ngược lại với rễ bất định là rễ chỉ mọc thẳng ra từ vết cắt hoặc tại vị trí bị thương của mô nuôi cấy và không phân nhánh

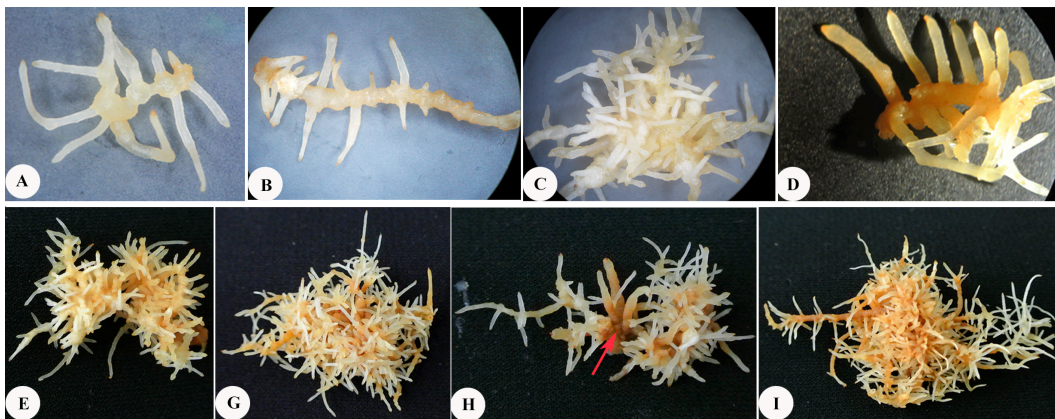
cho tới khi được cấy chuyển sang môi trường mới; tuy nhiên đối với rễ tơ, ngay từ khi rễ chính mới hình thành từ khối mô thực vật thì đã bắt đầu có sự phân nhánh nhanh và mạnh để hình thành rễ thứ cấp (Hình 2). Một điểm khác biệt rất rõ ràng so với rễ bất định là mật độ phân nhánh hình thành rễ thứ cấp của rễ tơ rất dày đặc, tại một vị trí trên rễ chính có thể hình thành nhiều hơn 1 rễ thứ cấp và có hiện tượng phát sinh rễ thứ cấp đối xứng nhau theo nhiều hướng khác nhau trên trục rễ chính (Hình 2D), điều này cho thấy rễ tơ có tính hướng động bất thường, không theo một hướng nhất định nào. Kim và Soh (1996) đã chỉ ra rằng, rễ tơ hiếm khi đáp ứng với những tác động của

trọng lực. Phelep và đồng tác giả (1991) cũng báo cáo rằng, một số khác biệt phát sinh từ hội chứng rễ tơ điển hình là sự tăng trưởng nhanh chóng trong môi trường không có phytohormone, tính hướng động bất thường và phân nhánh bên. Ngoài ra, rễ chính thường có đường kính lớn hơn so với các rễ thứ cấp, và tại vị trí hình thành thành rễ thứ cấp, rễ chính thường phồng lên (Hình 2A, B). Đây có thể là do đặc tính gây bệnh khối u của nhóm vi khuẩn *Agrobacterium*.

So với rễ bất định, rễ tơ tăng sinh chậm hơn ở thời gian đầu, nhưng lại nhanh hơn ở giai đoạn sau và thời gian sinh trưởng của rễ tơ cũng kéo dài hơn. Thời gian sinh trưởng của rễ bất định chỉ kéo dài khoảng 4 tháng nuôi cấy nếu không được cấy chuyển sang môi trường mới; trong khi đó, ở thời điểm sau hơn 6 tháng nuôi cấy rễ tơ trên môi trường thạch, chỉ có sự hóa nâu ở phần gốc rễ chính, còn các rễ bên vẫn tiếp tục sinh trưởng, phân nhánh hình thành các rễ thứ cấp mới (Hình 2H, mũi tên chỉ vị trí gốc rễ hóa nâu).

Trong quá trình thí nghiệm, các rễ bất định cũng được cấy chuyển sang môi trường SH có bổ sung 30 g/L sucrose, pH = 5,8 nhưng không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng thực vật để quan sát khả năng sinh trưởng của rễ bất định trên môi trường không bổ sung auxin ngoại sinh. Kết quả cho thấy, rễ bất định sinh trưởng rất chậm và không có bất kỳ sự phân nhánh nào ở môi trường nuôi cấy này, nhanh chóng hóa nâu rồi chết sau khoảng 4 tuần nuôi cấy. Trong khi đó, rễ tơ sinh trưởng nhanh và liên tục trong suốt quá trình nuôi cấy từ lúc cảm ứng hình thành cho tới

giai đoạn nhân nhanh, không cần bổ sung auxin ngoại sinh vào môi trường nuôi cấy. Nguyên nhân này có thể là do bản chất về nguồn gốc của hai loại rễ là khác nhau. Ở rễ tơ có chứa các gen mã hóa sinh tổng hợp auxin và các gen *rol* (Britton, Escobar, 2008), trong đó, gen *rolB* đóng một vai trò quan trọng trong việc cảm ứng hình thành rễ (Cardarelli *et al.*, 1987) và gen *rolC* giữ vai trò giúp rễ tơ sinh trưởng và sự hình thành các rễ mới (Schmülling *et al.*, 1988); trong khi ở rễ bất định thì hoàn toàn không có khả năng này. Sự phát sinh cơ quan ở thực vật được kiểm soát bởi tỷ lệ auxin và cytokinin (Skoog, Miller, 1957). Vì vậy, trong môi trường cảm ứng và nhân nhanh rễ bất định cần bổ sung auxin ngoại sinh (5 mg/L IBA), trong khi, môi trường nuôi cấy rễ tơ không cần bổ sung chất điều hòa sinh trưởng, đây cũng có thể chính là nguyên nhân giải thích vì sao ở giai đoạn đầu nuôi cấy của quá trình nhân nhanh, rễ tơ tăng sinh chậm hơn so với rễ bất định vì cần thời gian để tự cảm ứng sinh tổng hợp auxin và kích hoạt các gen liên quan đến sự hình thành rễ; ở các giai đoạn nuôi cấy tiếp theo thì rễ tơ sinh trưởng nhanh, trong khi tốc độ sinh trưởng của rễ bất định giảm dần cho tới khi ngừng sinh trưởng ở các khoảng thời gian nuôi cấy sau đó, do đã sử dụng hết nguồn auxin ngoại sinh. Như vậy, ngoài dựa vào hình thái bên ngoài để phân biệt hai loại rễ (rễ bất định và rễ tơ), thì dựa môi trường nuôi cấy cũng là một phương pháp để nhận biết được hai loại rễ này, bằng cách nuôi cấy hai loại rễ trên môi trường thạch không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng thực vật, khi đó chỉ rễ tơ mới có khả năng tiếp tục sinh trưởng.

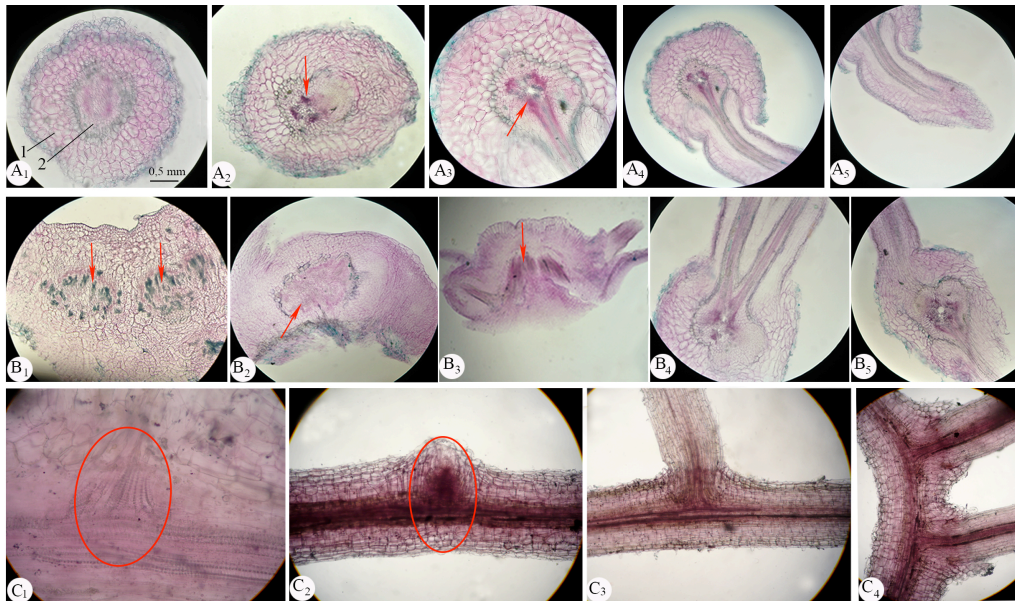


Hình 2. Hình thái của rễ tơ chuyển gen sâm Ngọc Linh sau 24 tuần nuôi cấy. A-D: Hình thái rễ tơ dưới kính hiển vi soi nổi; E-I: Các cụm rễ tơ. Mũi tên màu đỏ chỉ vị trí phần gốc rễ bị hoá nâu.

Cấu trúc giải phẫu của rễ bất định và rễ tơ sâm Ngọc Linh

Kết quả giải phẫu hình thái từ lớp cắt ngang của rễ bất định và rễ tơ cho thấy, rễ bất định và rễ tơ đều có cấu trúc tương tự với cấu trúc của rễ thông thường, gồm hai vùng chính là vùng vỏ nằm bên ngoài và vùng trung trụ nằm ở trung tâm (Hình 3A). Sutter và Luza (1993) báo cáo rằng giải phẫu sự phát triển của rễ tơ giống với rễ không chuyển gen, những rễ mà được xử lý với auxin ngoại sinh. Tương tự, Alpizar và đồng tác giả (2008) cũng chỉ ra rằng, đa số các dòng rễ tơ (86%) của cây cà phê (*Coffea arabica*) có biểu hiện kiểu hình không khác biệt so với rễ không chuyển gen. Nghiên cứu của Park và Facchini (2000) cũng cho thấy, các rễ tạo ra bởi sự lây nhiễm *A. rhizogenes* có cấu trúc tương tự như rễ của loài hoang dại, chỉ một số trường hợp ngoại lệ đáng chú ý. Ví dụ, giải phẫu của loài *Eschscholzia californica* Cham. và *Papaver somniferum* L. có khác nhau về sự sắp xếp và cấu trúc các tế bào rễ tơ chuyển gen và rễ của loài hoang dại. Cụ thể, các tế bào biểu bì của rễ biến đổi gen có cấu trúc lỏng lẻo và dẫn tới mọc nhiều rễ bên. Ngược lại, các tế bào biểu bì của rễ cây hoang dại có cấu trúc chặt chẽ hơn

dẫn đến sự mở rộng lông hút. Cả rễ của cây hoang dại và rễ chuyển gen đều có một trung trụ trung tâm được bao quanh bởi các tế bào vỏ. Peres và đồng tác giả (2001) quan sát thấy rằng các tế bào vỏ (cortical cells) và những bó mạch tăng lên nhiều trong rễ chuyển gen của cây cà chua (*Lycopersicon* spp.) và các tế bào vỏ có cấu trúc lỏng lẻo, điều này chứng tỏ rễ tơ của các loài khác nhau có thể có hình thái giải phẫu khác nhau. Ở sâm Ngọc Linh, quá trình cảm ứng rễ bất định được khởi đầu là sự hình thành các bó mạch tại khối mô sẹo (Hình 3B₁), tiếp theo là hình thành sơ khởi rễ (Hình 3B_{2,3}, mũi tên chỉ vị trí hình thành sơ khởi rễ), sau đó là sự hình thành và kéo dài của rễ bất định (Hình 3B_{4,5}). Quan sát quá trình hình thành rễ thứ cấp từ rễ bất định cho thấy, vị trí khởi đầu của sự hình thành rễ thứ cấp là các bó mạch của rễ bất định, sau đó phát triển ra lớp vỏ và phá vỡ lớp biểu bì bên ngoài để hình thành nên rễ thứ cấp (Hình 3C). Chính vì vậy, hệ mạch dẫn của rễ thứ cấp nối liền với hệ mạch dẫn của rễ bất định và tại một vị trí trên rễ bất định chỉ hình thành một rễ thứ cấp duy nhất (Hình 3C_{3,4}).



Hình 3. Cấu trúc giải phẫu của rễ bất định sâm Ngọc Linh. A_{1,2}: Lớp cắt ngang của rễ bất định gồm 2 vùng: vùng vỏ (1) và vùng trụ (2); A₃₋₅: Lớp cắt dọc của rễ bất định; B₁₋₃: Sự hình thành sơ khởi rễ; B_{4,5}: Sự hình thành và kéo dài của rễ, Mũi tên chỉ vị trí hình thành sơ khởi rễ; C₁₋₄) Sự hình thành rễ thứ cấp từ rễ bất định, Hình elip chỉ vị trí phát sinh rễ thứ cấp.

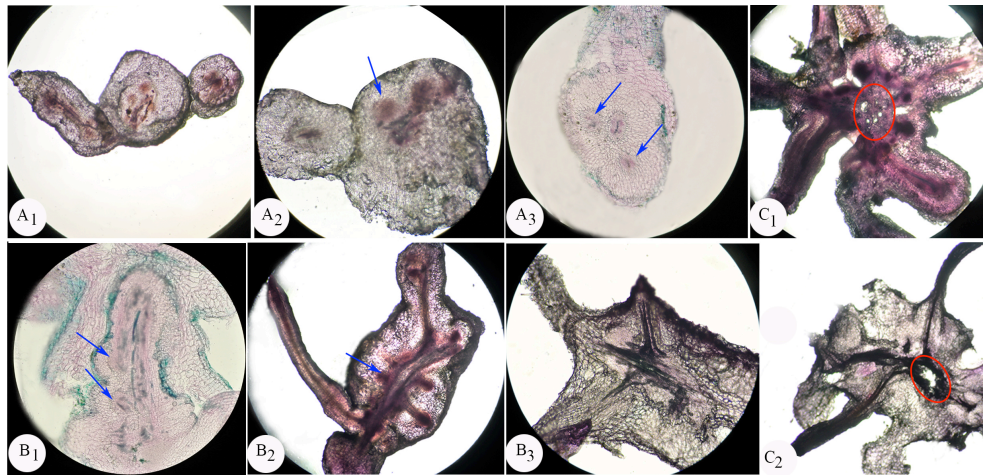
Ở rễ tơ, do mật độ phân nhánh hình thành rễ thứ cấp dày đặc nên quan sát hình thái giải phẫu cho thấy xuất hiện sự hình thành nhiều sơ khởi rễ (Hình 4B₁). Quan sát lớp cắt dọc cho thấy, tại một vị trí trên rễ

chính có sự hình thành sơ khởi rễ thứ cấp đối xứng nhau (Hình 4B_{2,3}). Bởi vì các rễ bên phát sinh đối diện với các cực protoxylem, nên số rễ bên là biểu hiện của số cực protoxylem trong rễ chính. Điều này

cho thấy, ở sâm Ngọc Linh, số lượng cực protoxylem của rễ tơ nhiều hơn so với rễ bất định.

Quan sát sự hình thành sơ khởi rễ thứ cấp ở rễ tơ cho thấy, vị trí hình thành sơ khởi rễ thứ cấp có thể ở vùng vỏ (Hình 4A₁₋₃, vị trí mũi tên) hoặc ở vùng trụ của rễ chính (Hình 4B_{1,2}, vị trí mũi tên). Như vậy, trong quá trình hình thành rễ thứ cấp ở rễ tơ, nhận thấy có hai trường hợp: (1) Hệ mạch của rễ thứ cấp độc lập với hệ mạch của rễ chính (Hình 4A) và (2) Hệ mạch của rễ thứ cấp nối liền với hệ mạch của rễ chính (Hình 4B). Do đó, có thể giả thuyết rằng có hai con đường hình thành rễ thứ cấp ở rễ tơ: (1) Rễ thứ cấp hình thành bắt đầu từ hệ mạch của rễ chính tương tự như rễ bất định; (2) Rễ thứ cấp hình thành

độc lập với hệ mạch của rễ chính sau đó kéo dài và nối liền hai hệ mạch với nhau. Điều này giải thích nguyên nhân ở rễ tơ có hiện tượng rễ chính hóa nâu và chết đi, nhưng các rễ bên vẫn tiếp tục sinh trưởng và phân nhánh hình thành các rễ thứ cấp mới (Hình 2H). Trong khi đó, ở rễ bất định nếu rễ chính bị hóa nâu và chết thì dẫn tới toàn bộ rễ cũng chết. Ngoài ra, khi giải phẫu hình thái rễ tơ cũng nhận thấy ở hệ mạch của rễ chính xốp, có nhiều lỗ rỗng (Hình 4C, hình elip), trong khi ở rễ bất định thì không có hiện tượng này. Điều này có thể là do tại mỗi vị trí phân nhánh trên rễ chính của rễ tơ thường phồng lên, mà mật độ phân nhánh của rễ tơ rất dày đặc, vì vậy mà hầu như toàn bộ rễ chính đều phồng xốp lên bởi các khối u của các điểm phân nhánh (Hình 2B).



Hình 4. Cấu trúc giải phẫu của rễ tơ sâm Ngọc Linh. A₁₋₃: Lát cắt ngang của rễ tơ cho thấy hệ mạch của rễ thứ cấp độc lập với hệ mạch của rễ chính; B₁₋₃: Lát cắt dọc của rễ tơ cho thấy hệ mạch của rễ thứ cấp nối liền với hệ mạch của rễ chính và có sự phát sinh rễ thứ cấp đối xứng nhau (B_{2,3}); Mũi tên chỉ vị trí phát sinh rễ thứ cấp; C_{1,2}: Cấu trúc rỗng xốp trong hệ mạch chính của rễ tơ. Hình elip chỉ vị trí xuất hiện các cấu trúc rỗng xốp trong hệ mạch chính.

KẾT LUẬN

Rễ tơ và rễ bất định có nhiều điểm tương đồng với nhau, nhưng ở mỗi loại rễ cũng có những điểm đặc trưng riêng, mà dựa vào những đặc trưng đó, có thể phân biệt được 2 loại rễ này với nhau. Rễ tơ phân nhánh nhanh và mạnh trên môi trường không cần bổ sung chất điều hòa sinh trưởng thực vật; ngược lại, rễ bất định phân nhánh ít và không sinh trưởng trên môi trường không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng thực vật. Sự phân nhánh ở rễ tơ theo nhiều hướng khác nhau, tại một vị trí trên rễ chính có thể hình thành nhiều rễ bên đối xứng nhau qua trục của rễ chính, trong khi tại một vị trí trên rễ bất định chỉ hình thành một rễ bên. Ở rễ bất định, hệ mạch của rễ

bên nối liền với hệ mạch của rễ chính; còn ở rễ tơ, hệ mạch của rễ bên có thể nối liền hoặc độc lập với hệ mạch của rễ chính. Ngoài ra, hệ mạch chính của rễ bất định dày đặc, còn hệ mạch của rễ chính ở rễ tơ lỏng lẻo, có cấu trúc rỗng xốp.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ Phát triển khoa học và công nghệ Quốc gia (NAFOSTED) trong đề tài mã số 106.02-2018.49 và Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Alpizar E, Dechamp E, Lapeyre-Montes F, Guilhaumon C, Bertrand B, Jourdan C, Lashermes P, Etienne H (2008) *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots of coffee

- (*Coffea arabica*): Conditions for long-term proliferation, and morphological and molecular characterization. *Ann Bot* 101: 929-940.
- Britton MT, Escobar MA (2008) *The oncogenes of Agrobacterium tumefaciens and Agrobacterium rhizogenes*. In: Tzfira T, Citovsky V, eds. *Agrobacterium: From biology to biotechnology*. Springer, New York, USA: 524-565.
- Cardarelli M, Mariotti D, Pomponi M, Spano L, Capone I, Costantino P (1987) *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA genes capable of inducing hairy root phenotype. *Mol Gen Genet* 209: 475-480.
- Dương Tấn Nhựt, Hoàng Xuân Chiến, Nguyễn Bá Trục, Nguyễn Bá Nam, Trần Xuân Tinh, Vũ Quốc Luận, Nguyễn Văn Bình, Vũ Thị Hiền, Trịnh Thị Hương, Nguyễn Cửu Thành Nhân, Lê Nữ Minh Thùy, Lý Thị Mỹ Nga, Thái Thương Hiền, Nguyễn Thành Hải (2010) Nhân giống vô tính cây sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.). *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 8(3B): 1211-1219.
- Dương Tấn Nhựt, Nguyễn Cửu Thành Nhân, Hoàng Xuân Chiến, Nguyễn Phúc Huy, Nguyễn Bá Nam, Trần Xuân Ninh, Phạm Phong Hải, Vũ Quốc Luận, Phan Quốc Tâm, Vũ Thị Hiền, Trịnh Thị Hương, Trần Công Luận, Paek Kee Yoeup (2012) Một số hệ thống nuôi cấy trong nghiên cứu nhân nhanh rễ bất định và rễ thứ cấp cây sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.). *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 10(4A): 887-897.
- Hồ Thanh Tâm, Trịnh Thị Hương, Hà Thị Mỹ Ngân, Hoàng Xuân Chiến, Nguyễn Bá Nam, Nguyễn Phúc Huy, Vũ Thị Hiền, Vũ Quốc Luận, Lê Kim Cương, Bùi Thế Vinh, Trần Công Luận, Phạm Bích Ngọc, Chu Hoàng Hà, Dương Tấn Nhựt (2013) Ảnh hưởng của IBA, NAA và IAA lên khả năng hình thành và tích lũy saponin của rễ bất định sâm Ngọc Linh nuôi cấy *in vitro*. *Hội nghị Khoa học Công nghệ sinh học toàn quốc*: 1043-1047.
- Kim YS, Soh WY (1996) Amyloplast distribution in hairy roots induced by infection with *Agrobacterium rhizogenes*. *Biol Sci Space* 10(2): 102-104.
- Nguyễn Hồng Hoàng, Trịnh Thị Hương, Lê Kim Cương, Vũ Thị Hiền, Nguyễn Bá Nam, Nguyễn Phúc Huy, Vũ Quốc Luận, Hà Thị Mỹ Ngân, Phạm Bích Ngọc, Chu Hoàng Hà, Dương Tấn Nhựt (2014) Khảo sát một số yếu tố ảnh hưởng đến sự sinh trưởng của rễ tơ sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) chuyển gen. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 12(3): 467-476.
- Park SU, Facchini PJ (2000) *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of *Opium poppy*, *Papaver somniferum* L. and *California poppy*, *Eschscholzia californica* Cham. root cultures. *J Exp Bot* 51(37): 1005-1016.
- Peres L, Morgante P, Vecchi C, Kraus J, Sluys M (2001) Shoot regeneration capacity from roots and transgenic hairy roots of tomato cultivars and wild related species. *Plant Cell Tiss Org Cult* 65: 37-44.
- Phelep M, Petit A, Martin L, Duhoux E, Tempé J (1991) Transformation and regeneration of a nitrogen-fixing tree, *Allocasuarina Verticillata* Lam. *Nat Biotechnol* 9: 461-466.
- 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.
- Schmülling T, Schell J, Spena A (1988) Single genes from *Agrobacterium rhizogenes* influence plant development. *EMBO J* 7: 2621-2629.
- Skoog F, Miller CO (1957) Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. *Symp Soc Exp Biol* 11: 118-231.
- Sorin C, Bussell JD, Camus I, Liung K, Kowalczyk M, Geiss G, MsKhann H, Garcion C, Vaucheret H, Sandberg G, Bellini C (2005) Auxin and light control of adventitious rooting in *Arabidopsis* require agonaute. *Plant Cell* 17: 1343-1359.
- Sutter EG, Luza J (1993) Developmental anatomy of roots induced by *Agrobacterium rhizogenes* in *Malus pumila* 'M. 26' shoot grown *in vitro*. *Int J Plant Sci* 154: 59-67.
- Trịnh Thị Hương, Hồ Thanh Tâm, Hà Thị Mỹ Ngân, Ngô Thanh Tài, Nguyễn Phúc Huy, Hoàng Xuân Chiến, Nguyễn Bá Nam, Vũ Quốc Luận, Vũ Thị Hiền, Nguyễn Thị Thúy Hương, Phạm Bích Ngọc, Chu Hoàng Hà, Dương Tấn Nhựt (2012) Ảnh hưởng của nguồn mẫu, kích thước mẫu và một số loại auxin lên khả năng tái sinh rễ bất định của sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) nuôi cấy *in vitro*. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 10(4A): 877-886.
- Trịnh Thị Hương, Phạm Bích Ngọc, Chu Hoàng Hà, Dương Tấn Nhựt (2016) Đánh giá khả năng sinh trưởng và tích lũy saponin của rễ bất định và rễ tơ cây sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.). *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 14(2): 231-236.

COMPARISON OF MORPHOGENESIS AND ANATOMY BETWEEN HAIRY ROOTS AND ADVENTITIOUS ROOTS OF NGOC LINH GINSENG (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.)

Trinh Thi Huong^{1,2}, Nguyen Thi Nhat Linh¹, Hoang Thanh Tung¹, Vu Thi Hien¹, Vu Quoc Luan¹, Do Manh Cuong¹, Tran Trong Tuan³, Pham Bich Ngoc⁴, Chu Hoang Ha⁴, Nguyen Quang Duc Tien⁵, Nguyen Hoang Loc⁵, Duong Tan Nhut¹

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

²Ho Chi Minh City University of Food Industry

³Institute of Tropical Biology, Vietnam Academy of Science and Technology

⁴Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology

⁵College of Sciences, Hue University

SUMMARY

In this study, morphogenesis and anatomy of adventitious roots and hairy roots of Ngoc Linh ginseng (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) were compared. Adventitious roots were derived from four different samples (leaf, petiole, root and callus) *in vitro* cultured on medium SH supplemented with 5 mg/L IBA. Hairy roots were derived from callus infected with *Agrobacterium rhizogenes* strain ATCC 15834. The results showed that there were significant differences in morphogenesis and anatomy, the pathway of secondary roots formation, culture medium between adventitious roots and hairy roots. The hairy roots strongly grew and branched on the free-plant growth regulator medium. The secondary root of the hairy root was formed in two pathways: (1) The secondary root formation began at the vesicles system of main root; (2) The secondary root formation was independent of the vesicles system of main root; it kept developing in length and connected to the vesicles system of main root. On the other hand, growing adventitious roots only grew on the environment with exogenous auxin supplementation; also their branching ability were low. The secondary root formation of the adventitious root was started at the vesicles of the main roots and there was only one secondary root that was formed at an location of adventitious root. The results that obtained in this study will be the reference to identify two types of root.

Keywords: *Adventitious roots; Agrobacterium rhizogenes; hairy roots, morphogenesis and anatomy, secondary roots, Vietnamese ginseng*