

NGHIÊN CỨU ẢNH HƯỞNG CỦA MỘT SỐ CHẤT HỮU CƠ VÀ BẠC NITRAT ($AgNO_3$) LÊN SỰ SINH TRƯỞNG VÀ PHÁT TRIỂN CỦA CÂY SÂM NGỌC LINH (*PANAX VIETNAMENSIS* HA ET GRUSHV.) NUÔI CÂY *IN VITRO*

Nguyễn Việt Cường, Hồ Thanh Tâm, Nguyễn Bá Nam, Hà Thị Mỹ Ngân, Lê Kim Cương, Nguyễn Phúc Huy, Dương Tấn Nhựt

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

TÓM TẮT

Chồi sâm Ngọc Linh cao 2 – 3 cm được nuôi cấy trên môi trường Schenk và Hildebrandt (SH) bổ sung 1 mg/l NAA; 1 g/l than hoạt tính và phối hợp riêng lẻ với tảo spirulina; nước dừa, dịch chiết khoai tây; dịch chiết chuối hoặc $AgNO_3$ ở các nồng độ khác nhau tùy vào các điều kiện thí nghiệm. Các chồi được nuôi cấy dưới điều kiện độ ẩm 50 – 60%, nhiệt độ $25 \pm 2^\circ C$, dưới ánh sáng huỳnh quang, cường độ chiếu sáng khoảng $40 - 45 \mu mol m^{-2} s^{-1}$, thời gian chiếu sáng 16 giờ/ngày. Sau 8 tuần nuôi cấy, kết quả cho thấy chồi sâm Ngọc Linh sinh trưởng và phát triển tốt trên môi trường bổ sung 10 g/l dịch chiết chuối, 5% nước dừa, 2 mg/l $AgNO_3$ hoặc 5 mg/l tảo spirulina. Trong đó, tảo spirulina có ảnh hưởng tốt nhất lên sự sinh trưởng và phát triển của cây sâm Ngọc Linh. Trên môi trường bổ sung 10 g/l dịch chiết khoai tây, chồi sâm sinh trưởng bình thường. Tuy nhiên, khi nồng độ của dịch chiết này trong môi trường tăng lên (50 – 150 g/l) thì cây sâm Ngọc Linh sinh trưởng kém dần và chết.

Từ khóa: bạc nitrat ($AgNO_3$), chất hữu cơ, *Panax vietnamensis* Ha et Grushv., phát triển, sinh trưởng

MỞ ĐẦU

Hiện nay, sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) có thể được nhân giống bằng hạt, đầu mầm thân rễ (Triệu Văn Hùng, 2007) hay sử dụng kỹ thuật nuôi cấy mô tế bào thực vật. Trong đó, kỹ thuật nuôi cấy mô, tế bào thực vật là phương pháp hiệu quả nhất để nhân nhanh sâm Ngọc Linh trong thời gian ngắn mà vẫn đảm bảo chất lượng của cây giống. Nhiều đề tài đã được nghiên cứu và xây dựng được quy trình nhân giống *in vitro* sâm Ngọc Linh. Tuy nhiên, việc nghiên cứu nhằm liên tục cải thiện môi trường và nâng cao chất lượng cây giống luôn là vấn đề được quan tâm trong vi nhân giống ở quy mô lớn. Vì vậy, trong nghiên cứu này một số chất hữu cơ và bạc nitrat đã được bổ sung vào môi trường nuôi cấy nhằm xác định ảnh hưởng của chúng lên sự sinh trưởng và phát triển của sâm Ngọc Linh cũng như tìm ra loại chất bổ sung giúp cải thiện môi trường nhân giống loại dược liệu quý hiếm này.

Các loại chất hữu cơ đã được sử dụng nhiều trong nuôi cấy mô thực vật. Sự sinh trưởng và tái sinh của nhiều loài cây trong điều kiện *in vitro* có thể được cải thiện bằng một lượng nhỏ các chất hữu cơ này. Nhiều chất hữu cơ là nguồn bổ sung amino acid, peptide, acid béo, carbohydrate, vitamin và chất tăng trưởng thực vật không thể thiếu trong nuôi cấy nhiều loài thực vật (Thorpe et al., 2008). Có nhiều loại chất hữu cơ như dịch chiết nấm men (yeast extract), dịch chiết mầm lúa mạch (malt extract), casein hydrolysate, pepton,... Tuy nhiên, trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng bốn loại chất hữu cơ là dịch chiết chuối, dịch chiết khoai tây, nước dừa và tảo spirulina.

Giống như các dịch chiết tự nhiên khác, dịch chiết chuối có chứa nhiều hợp chất tạo ra những hiệu quả đặc biệt của nó như cytokinin. Dịch chiết chuối thường được thêm vào môi trường nuôi cấy lan và được cho là có vai trò đẩy mạnh sự sinh trưởng (Thorpe et al., 2008). Bên cạnh đó, dịch chiết khoai tây cũng là chất hữu cơ thường được sử dụng. Nhiều nghiên cứu cho thấy dịch chiết khoai tây được bổ sung riêng lẻ hoặc kết hợp với các thành phần của môi trường nuôi cấy thông thường tạo nên một môi trường hữu ích cho việc nuôi cấy bào phần lúa mì, một số loại ngũ cốc và lan (*Phalaenopsis*, *Doritaenopsis*) (Molnár et al., 2011). Nước dừa là dịch nội nhũ không màu của trái dừa non (*Cocos nucifera*) chứa nhiều loại acid amin, acid hữu cơ, acid nucleic, một vài loại vitamin, đường, đường rượu, hóc-môn thực vật (auxin và cytokinin), khoáng chất và các hợp chất không xác định khác. Khi được thêm vào môi trường chứa auxin, nước dừa có thể giúp tế bào thực vật phân chia và tăng trưởng nhanh chóng. Nước dừa cũng thường được sử dụng trong nuôi cấy mô các loài lan (Molnár et al., 2011). Ngoài ra, vi tảo chlorella là một chất hữu cơ được sử dụng trong nuôi cấy mô thực vật. Một số nghiên cứu cho thấy hợp chất của tảo (ví tảo, vi khuẩn lam, ngoại bào và nội bào) có thể tăng cường hoặc thay thế tác động của các PGRs tổng hợp trong nuôi cấy mô ở các loài thực vật bậc cao (Molnár et al., 2011). Tảo spirulina (*Arthrospira platensis*) cũng có đặc tính như vậy và là nguồn nitơ và vitamin thay thế rất hiệu quả giúp nâng cao chất lượng cây giống và giảm chi phí cho quá trình vi nhân giống trên các đối tượng *Musa Paradisiaca* William cv. sik, *Gardenia jasminoides* Ellis và *Mentha piperita* (George và Ravishankar, 1996).

Bên cạnh việc bổ sung các chất hữu cơ vào môi trường nuôi cấy, việc kiểm soát nồng độ ethylene trong bình nuôi cấy cũng là vấn đề cần quan tâm. Nhiều nghiên cứu đã cho thấy ethylene tích lũy nhiều trong bình nuôi cấy gây ức chế sự hình thành mô sẹo, ngăn cản sự hình thành chồi, ức chế sự tạo rễ và gây ra hiện tượng vàng lá, rụng lá ảnh hưởng đến sự sinh trưởng và phát triển của thực vật. Sử dụng bạc nitrat ($AgNO_3$) để giảm lượng ethylene tích lũy là biện pháp đã được áp dụng nhiều và thành công nhất (Kumar et al., 2009). Tuy nhiên, $AgNO_3$ vẫn chưa được áp dụng trên đối tượng cây sâm Ngọc Linh. Vì vậy, trong nghiên cứu này, $AgNO_3$ đã được bổ sung vào môi trường nuôi cấy nhằm nghiên cứu ảnh hưởng của nó lên sự sinh trưởng và phát triển của sâm Ngọc Linh *in vitro*.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguồn mẫu

Nguồn mẫu ban đầu là chồi sâm Ngọc Linh *in vitro* cao khoảng 2 – 3 cm đã ổn định qua nhiều lần cấy chuyển hiện có tại phòng Sinh học Phân tử và Chọn tạo giống cây trồng thuộc Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên.

Điều kiện nuôi cấy

Các thí nghiệm được thực hiện dưới điều kiện phòng nuôi có độ ẩm 50 – 60%, nhiệt độ 25 ± 2°C, dưới ánh sáng đèn huỳnh quang, cường độ chiếu sáng khoảng 45 μmol m⁻².s⁻¹, thời gian chiếu sáng 16 giờ/ngày.

Môi trường nuôi cấy

Môi trường SH (Schenck và Hildebrandt, 1972) bổ sung 1,0 mg/l NAA và 1,0 mg/l than hoạt tính được sử dụng cho tất cả các thí nghiệm trong nghiên cứu này. Tùy từng thí nghiệm mà tảo spirulina, nước dừa, dịch chiết khoai tây, dịch chiết chuối và AgNO₃ được bổ sung vào môi trường với các nồng độ khác nhau. Tảo spirulina sử dụng trong nghiên cứu là sản phẩm của công ty Earthrise Nutritional LLC (Hoa Kỳ), có dạng bột. Bột tảo được hòa tan vào nước thành dung dịch có nồng độ 1 mg/ml. Khi sử dụng, tùy từng thí nghiệm thử mà hũ lượng dung dịch cho phù hợp. Sau đó, tất cả các môi trường được điều chỉnh pH về 5,7 – 5,8 và hấp khử trùng ở 121°C, 1 atm trong 30 phút trước khi nuôi cấy.

Chỉ tiêu theo dõi và xử lý số liệu

Các chỉ tiêu theo dõi gồm số lượng rễ (rễ/mẫu), chiều dài rễ (cm), chiều cao cây (cm), trọng lượng tươi của cây (g), trọng lượng khô của cây (g) và hàm lượng chlorophyll (SPAD) của lá. Hàm lượng chlorophyll của lá được đo bằng máy SPAD-502 (Minolta Co., Ltd., Osaka, Nhật Bản).

Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần, mỗi nghiệm thử cây 10 bình, mỗi bình cấy 01 mẫu. Các số liệu được thu nhận sau 8 tuần nuôi cấy. Số liệu được xử lý và phân tích bằng phần mềm SPSS 16.0 theo phép thử Duncan với α = 0,05.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Ảnh hưởng của dịch chiết chuối lên sự sinh trưởng và phát triển *in vitro* của cây sâm Ngọc Linh

Bảng 1 cho thấy các chỉ tiêu đánh giá ảnh hưởng của dịch chiết chuối lên sự sinh trưởng và phát triển *in vitro* của cây sâm Ngọc Linh sau 8 tuần nuôi cấy. Kết quả tốt nhất thuộc về cây trên môi trường bổ sung 10 g/l dịch chiết chuối (Hình 1A). Ở môi trường này, chiều cao cây, trọng lượng tươi và trọng lượng khô của cây không có sự khác biệt với đối chứng (không bổ sung dịch chiết chuối) và môi trường bổ sung 50 g/l dịch chiết chuối. Tuy nhiên, sự khác biệt về số lượng rễ, chiều dài rễ và hàm lượng chlorophyll trong lá của cây so với đối chứng và các môi trường còn lại rất có ý nghĩa về mặt thống kê (Bảng 1). Điều này cho thấy, dịch chiết chuối được bổ sung vào môi trường nuôi cấy đã giúp cây sâm Ngọc Linh không chỉ phát triển về chiều cao và khả năng tích lũy chất khô mà còn thúc đẩy sự phát triển của hệ rễ, một điều kiện cần thiết để giúp cây *in vitro* sinh trưởng tốt. Kết quả tương tự cũng được Kaur và Bhatani (2012) ghi nhận trên đối tượng lan *Cymbidium pendulum* (Roxb.) Sw. Ở loài lan này, bổ sung dịch chiết chuối và môi trường nuôi cấy giúp tăng tỷ lệ hình thành rễ cũng như chiều dài, độ dày và số lông rễ.

Bảng 1. Ảnh hưởng của dịch chiết chuối lên sự sinh trưởng và phát triển *in vitro* của cây sâm Ngọc Linh

Nồng độ dịch chiết chuối (g/l)	Số lượng rễ (rễ/mẫu)	Chiều dài rễ (cm)	Chiều cao cây (cm)	Trọng lượng tươi (g)	Trọng lượng khô (g)	SPAD
0	2,667 ^a	2,217 ^b	4,967 ^a	0,532 ^a	0,100 ^a	18,600 ^a
10	6,667 ^a	3,933 ^a	4,833 ^a	0,708 ^a	0,121 ^a	21,467 ^a
50	4,333 ^a	1,587 ^{bc}	4,733 ^a	0,641 ^a	0,095 ^a	16,667 ^a
100	2,667 ^a	1,396 ^{bc}	3,767 ^a	0,225 ^b	0,041 ^b	9,487 ^b
150	1,000 ^a	0,467 ^c	3,667 ^a	0,215 ^b	0,037 ^b	7,567 ^b

^aCác chữ cái khác nhau (a, b, c ...) trong các cột biểu diễn sự khác nhau có ý nghĩa với α = 0,05 trong Duncan's test.

Khi nồng độ dịch chiết chuối trong môi trường tăng dần từ 10 – 150 g/l, sự sinh trưởng và phát triển của sâm Ngọc Linh *in vitro* cũng giảm dần (Hình 1A). Điều này thể hiện qua sự giảm dần về số lượng rễ, chiều dài rễ, chiều cao cây, trọng lượng tươi và khô của cây cũng như hàm lượng chlorophyll trong lá (Bảng 1). Cụ thể, ở nghiệm thức bổ sung 150 g/l dịch chiết chuối, số lượng rễ giảm hơn 6 lần, chiều cao cây giảm 1,3 lần và hàm lượng chlorophyll giảm gần 3 lần so với nghiệm thức bổ sung 10 g/l dịch chiết chuối. Kết quả này chứng tỏ, ở nồng độ càng cao, dịch chiết chuối ức chế sự sinh trưởng và phát triển *in vitro* của sâm Ngọc Linh. Kaur và Bhatani (2012) cũng nhận thấy hiện tượng tương tự khi tỷ lệ lai sinh của lan *Cymbidium pendulum* (Roxb.) Sw. trên môi trường chứa 75 g/l dịch chiết chuối giảm 3,2 lần. Hiện tượng này có thể được giải thích là do dịch chiết chuối có chứa cytokinin (Thorpe *et al.*, 2008). Chính sự hiện diện của cytokinin trong môi trường đã ức chế sự hình thành rễ. Với nồng độ ngày càng tăng của dịch chiết chuối, sự ức chế này càng thể hiện rõ.

Như vậy, 10 g/l là nồng độ dịch chiết chuối tốt nhất giúp tăng cường sự sinh trưởng và phát triển của sâm Ngọc Linh.

Ảnh hưởng của dịch chiết khoai tây lên sự sinh trưởng và phát triển *in vitro* của cây sâm Ngọc Linh

Các chỉ tiêu đánh giá ảnh hưởng của dịch chiết khoai tây lên sự sinh trưởng và phát triển *in vitro* của cây sâm Ngọc Linh được trình bày trong Bảng 2. Sau 8 tuần nuôi cấy, sâm Ngọc Linh trên môi trường bổ sung 10 mg/l dịch chiết khoai tây sinh trưởng bình thường như cây nuôi cấy trên môi trường không bổ sung dịch chiết khoai tây. Điều này được chứng tỏ qua sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê giữa số lượng rễ, chiều dài rễ, chiều cao cây, trọng lượng tươi và khô của cây cũng như hàm lượng chlorophyll trong lá của cây thuộc hai môi trường này ở Bảng 2.

Bảng 2. Ảnh hưởng của dịch chiết khoai tây lên sự sinh trưởng và phát triển *in vitro* của cây sâm Ngọc Linh

Nồng độ dịch chiết khoai tây (g/l)	Số lượng rễ (rễ/mẫu)	Chiều dài rễ (cm)	Chiều cao cây (cm)	Trọng lượng tươi (g)	Trọng lượng khô (g)	SPAD
0	3,667 ^a	2,317 ^a	4,967 ^a	0,532 ^a	0,121 ^a	18,600 ^a
10	3,333 ^a	2,030 ^a	4,833 ^a	0,563 ^a	0,102 ^a	19,667 ^a
50	1,667 ^a	0,835 ^b	2,933 ^b	0,342 ^b	0,038 ^b	5,800 ^b

100	0,867 ^{ab}	0,502 ^{bc}	2,733 ^d	0,335 ^b	0,037 ^a	0,000 ^c
150	0,000 ^c	0,000 ^c	0,000 ^c	0,000 ^c	0,002 ^c	0,000 ^c

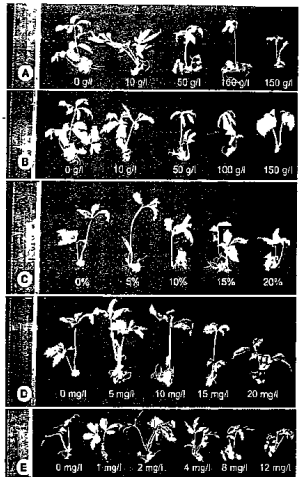
*Các chữ cái khác nhau (a, b, c, ...) trong các cột biểu diễn sự khác nhau có ý nghĩa với $\alpha = 0,05$ trong Duncan's test

Cùng với sự tăng dần của nồng độ dịch chiết khoai tây trong môi trường nuôi cấy từ 10 – 150 g/l, sự sinh trưởng của sâm Ngọc Linh cũng giảm dần và chết. Hiện tượng này biểu hiện qua sự vàng và héo úa của lá ở cây trên môi trường bổ sung 50 g/l dịch chiết khoai tây, sự vàng úa của chồi ở cây trên môi trường bổ sung 100 g/l dịch chiết khoai tây và sự chết của cây trên môi trường bổ sung 150 g/l dịch chiết khoai tây (Hình 1B) xảy ra từ tuần thứ 4 của quá trình nuôi cấy. Sự khác biệt giữa các chỉ tiêu ở bảng 2 của các môi trường trên cũng cho chúng ta thêm cơ sở để kết luận rằng dịch chiết khoai tây ở nồng độ cao (>10 g/l) ức chế sự sinh trưởng và phát triển *in vitro* của sâm Ngọc Linh. Hiện tượng này cũng xảy ra trong nghiên cứu của Murdad và đồng tác giả (2010) trên loài lan *Phalaenopsis gigantea* và được giải thích là do tình bột khoai tây bị thủy phân trong quá trình hấp khử trùng kết hợp với đường sucrose (30 g/l) làm tăng áp suất thẩm thấu của môi trường, từ đó làm tăng tích lũy carbohydrate, ảnh hưởng đến sự hình thành cơ quan và cản trở sự quang hợp của cây.

Tóm lại, việc bổ sung dịch chiết khoai tây không có ý nghĩa cho sự sinh trưởng và phát triển của sâm Ngọc Linh nuôi cấy *in vitro*.

Ảnh hưởng của nước dừa lên sự sinh trưởng và phát triển *in vitro* của cây sâm Ngọc Linh

Sau 8 tuần nuôi cấy, sâm Ngọc Linh sinh trưởng và phát triển tốt nhất trên môi trường bổ sung 5% nước dừa. Kết quả này được thể hiện qua các chỉ tiêu theo dõi được trình bày trong bảng 3. Cây sâm trên môi trường bổ sung 5% nước dừa có số lượng rễ (8,333 rễ/mẫu), chiều dài rễ (2,555 cm), chiều cao cây (6,100 cm), trọng lượng tươi (0,854 g) và trọng lượng khô (0,116 g) đạt cao nhất và khác biệt với đối chứng (không chứa nước dừa) cũng như các nghiệm thức còn lại. Kết quả này là do nước dừa có chứa nhiều thành phần như acid amin, acid hữu cơ, acid nucleic, vitamin, đường, đường rượu, khoáng chất và đặc biệt là nhiều loại hormone thực vật (auxin và cytokinin) (Molnár et al., 2011). Chính sự kết hợp của các chất hữu cơ và hormone thực vật đã tăng cường sự phát triển của tế bào và mô nuôi cấy từ đó giúp sâm Ngọc Linh sinh trưởng tốt trong điều kiện *in vitro*. Đây cũng là giải thích của Baque và đồng tác giả (2001) trong nghiên cứu trên giống lan *Calanthe* lai khi nhận thấy nước dừa ở nồng độ 50 ml/l (5%) tăng cường sự sinh trưởng ở cây con ở loài lan này.



Hình 1. Ảnh hưởng của dịch chiết chuối (A), dịch chiết khoai tây (B), nước dừa (C), tảo spirulina (D) và bạc nitrat (E) lên sự sinh trưởng và phát triển của cây sâm Ngọc Linh *in vitro*.

Bảng 3. Ảnh hưởng của nước dừa lên sự sinh trưởng và phát triển *in vitro* của cây sâm Ngọc Linh

Tỷ lệ nước dừa (%)	Số lượng rễ (rễ/mẫu)	Chiều dài rễ (cm)	Chiều cao cây (cm)	Trọng lượng tươi (g)	Trọng lượng khô (g)	SPAD
0	2,667 ^a	1,333 ^a	4,500 ^c	0,403 ^f	0,057 ^e	32,567 ^a
5	6,333 ^a	2,555 ^a	6,100 ^a	0,854 ^a	0,116 ^a	24,100 ^b
10	3,333 ^b	1,466 ^b	4,100 ^b	0,555 ^d	0,081 ^d	16,700 ^c
15	2,333 ^b	1,387 ^b	3,600 ^b	0,552 ^d	0,059 ^e	8,500 ^d
20	1,667 ^b	1,133 ^b	3,267 ^b	0,398 ^e	0,048 ^e	8,400 ^d

*Các chữ cái khác nhau (a, b, c, ...) trong các cột biểu diễn sự khác nhau có ý nghĩa với $\alpha = 0,05$ trong Duncan's test.

Tương tự như môi trường bổ sung dịch chiết chuối, tỷ lệ nước dừa trong môi trường tăng dần (5 – 20%) làm giảm sự sinh trưởng và phát triển của sâm Ngọc Linh. Bảng 3 cho thấy sự giảm trên tất cả các chỉ tiêu của cây trên môi trường bổ sung 20% nước dừa so với cây trên môi trường bổ sung 5% nước dừa. Trong đó, số lượng rễ giảm gần 4 lần, chiều dài rễ và chiều cao cây giảm gần 2 lần, trọng lượng tươi và khô giảm hơn 2 lần, hàm lượng chlorophyll giảm 3 lần. Hình thái cây ở các môi trường trên cũng bị ảnh hưởng, lá bị vàng hơn 1/2 lá, cây nhỏ và yếu (Hình 1C). Điều này cho thấy, cây sâm Ngọc Linh trên môi trường bổ sung nước dừa với nồng độ lớn hơn 5% bị ức chế sinh trưởng. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Baque và đồng tác giả (2001), trong đó nước dừa ở nồng độ 100 ml/l (10%) làm giảm sự sinh trưởng, ảnh hưởng đến các đặc điểm hình thái cũng như tạo ra các cây dị dạng ở loài lan *Calanthe* lai.

Các kết quả trên đưa đến kết luận, cây sâm Ngọc Linh sinh trưởng và phát triển *in vitro* tốt nhất trên môi trường bổ sung 5% nước dừa.

Ảnh hưởng của tảo spirulina lên sự sinh trưởng và phát triển *in vitro* của cây sâm Ngọc Linh

Tảo spirulina (*Arthrospira platensis*) có chứa hàm lượng lớn các acid amin, carbohydrate, vitamin, khoáng chất, acid béo đặc biệt là γ -Linolenic Acid cũng như các hoạt chất sinh học khác (Vonshak, 2002). Chính vì điều này mà spirulina không chỉ được sử dụng làm thực phẩm bổ sung cho người, động vật mà còn được sử dụng trong nhiều nghiên cứu nhằm cải thiện môi trường nuôi cấy mô tế bào thực vật. Một trong các nghiên cứu đó là nghiên cứu của George và Ravissanker (1996) trên các đối tượng *Musa Paradisiaca* William cv. silk, *Gardenia jasminoides* Ellis và *Menithc piperita* với kết quả thu được cho thấy spirulina là nguồn nitơ và vitamin thay thế rất hiệu quả giúp nâng cao chất lượng cây giống và giảm chi phí cho quá trình vì nhân giống ở các loài cây này. Trong thí nghiệm này, ảnh hưởng của spirulina đối với sự sinh trưởng và phát triển của cây sâm Ngọc Linh *in vitro* cũng được nghiên cứu. Sau 8 tuần nuôi cấy, kết quả cho thấy sâm Ngọc Linh sinh trưởng và phát triển tốt nhất trên môi trường bổ sung 5 mg/l tảo spirulina. Điều này được thể hiện trên Bảng 4 với các chỉ tiêu về số lượng rễ, chiều dài rễ, chiều cao cây, trọng lượng tươi và khô của cây cũng như hàm lượng chlorophyll trong lá đều đạt mức cao nhất. Các chỉ tiêu này có sự khác biệt với đối chứng (không bổ sung spirulina) và các nghiệm thức còn lại. Ngoài ra, cây sâm Ngọc Linh thuộc nghiệm thức này to, khỏe và không có hiện tượng bất thường về hình thái (Hình 1D). Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của George và Ravissanker (1996) đã nêu ở trên.

Bảng 4. Ảnh hưởng của tảo spirulina lên sự sinh trưởng và phát triển *in vitro* của cây sâm Ngọc Linh

Nồng độ tảo Spirulina (mg/l)	Số lượng rễ (rễ/mẫu)	Chiều dài rễ (cm)	Chiều cao cây (cm)	Trọng lượng tươi (g)	Trọng lượng khô (g)	SPAD
0	3,000 ^a	1,383 ^b	5,367 ^a	0,453 ^b	0,057 ^b	32,587 ^a
5	6,667 ^a	1,779 ^a	6,533 ^a	1,088 ^a	0,152 ^a	33,300 ^a
10	4,333 ^b	1,393 ^b	5,400 ^b	0,704 ^b	0,073 ^b	36,533 ^a
15	3,333 ^b	1,213 ^b	4,667 ^{bc}	0,455 ^b	0,062 ^b	25,767 ^a
20	3,333 ^b	1,225 ^b	4,167 ^c	0,403 ^b	0,050 ^b	24,700 ^b

*Các chữ cái khác nhau (a, b, c...) trong các cột biểu diễn sự khác nhau có ý nghĩa với $\alpha = 0,05$ trong Duncan's test.

Sự sinh trưởng và phát triển của sâm Ngọc Linh giảm khi nồng độ spirulina trong môi trường nuôi cấy tăng từ 5 – 20 mg/l. Điều này có thể nhận thấy qua sự sụt giảm của tất cả các chỉ tiêu của cây được nuôi cấy trên các môi trường bổ sung 10, 15 và 20 mg/l spirulina so với cây trên môi trường bổ sung 5% spirulina (Bảng 4). Sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê của các chỉ tiêu ở cây trên các môi trường bổ sung từ 10 – 20 g/l tảo spirulina cho thấy tảo spirulina ở nồng độ này không ức chế mà chỉ làm giảm sự sinh trưởng và phát triển của cây. Cây vẫn có sinh trưởng bình thường và không có biến dị về hình thái (Hình 1D) nhưng sự phát triển của rễ, sự tích lũy chất khô và khả năng quang hợp đều giảm.

Như vậy, bổ sung tảo spirulina ở nồng độ 5 mg/l giúp tăng cường khả năng sinh trưởng và phát triển của sâm Ngọc Linh *in vitro*.

Ảnh hưởng của bạc nitrat (AgNO₃) lên sự sinh trưởng và phát triển *in vitro* của cây sâm Ngọc Linh

Sau 8 tuần nuôi cấy, kết quả cho thấy, cây sâm Ngọc Linh nuôi cấy trên môi trường có và không có bổ sung AgNO₃ đều ra rễ. Tuy nhiên, xét về số lượng và chiều dài rễ trung bình, nghiệm thức bổ sung 2 mg/l AgNO₃ là nghiệm thức tốt nhất với số lượng rễ trung bình đạt 7,667 rễ/mẫu và chiều dài rễ trung bình là 2,138 cm (Bảng 5). Các giá trị này cao hơn so với các giá trị ở nghiệm thức không bổ sung AgNO₃ 7 – 8 lần. Điều này cho thấy AgNO₃ bổ sung vào môi trường nuôi cấy đã ức chế hoạt động của ethylene qua đó thúc đẩy sự hình thành và phát triển của rễ sâm Ngọc Linh. Kết quả tương tự cũng được Ma và đồng tác giả (1996) ghi nhận trên đối tượng tảo Royal Gata (*Malus domestica* Borkh.) với môi trường bổ sung từ 0,5 đến 1,7 mg/l AgNO₃ kích thích tạo rễ sớm, tăng số lượng và chiều dài rễ, và được tác giả giải thích là do ion Ag⁺ giảm khả năng bám vào ethylene của các thụ quan.

Bảng 5. Ảnh hưởng của AgNO₃ lên sự sinh trưởng và phát triển *in vitro* của cây sâm Ngọc Linh

Nồng độ AgNO ₃ (mg/l)	Số lượng rễ (rễ/mẫu)	Chiều dài rễ (cm)	Chiều cao cây (cm)	Trọng lượng tươi (g)	Trọng lượng khô (g)	SPAD
0	1,667 ^c	0,593 ^{bc}	4,633 ^d	0,369 ^f	0,041 ^f	11,033 ^d
1	3,667 ^b	1,308 ^b	4,833 ^d	0,489 ^d	0,074 ^d	18,767 ^c
2	7,667 ^a	2,138 ^a	5,000 ^b	0,672 ^c	0,104 ^c	24,500 ^b
-4	4,333 ^b	1,396 ^b	3,200 ^e	0,451 ^e	0,057 ^e	18,433 ^b
8	2,000 ^c	0,781 ^c	2,867 ^e	0,427 ^{ef}	0,048 ^e	12,533 ^c
12	1,333 ^c	0,469 ^c	2,267 ^f	0,360 ^f	0,038 ^f	11,367 ^c

*Các chữ cái khác nhau (a, b, c...) trong các cột biểu diễn sự khác nhau có ý nghĩa với $\alpha = 0,05$ trong Duncan's test.

Sự phát triển tốt của bộ rễ cũng góp phần giúp cây sinh trưởng và phát triển tốt hơn, tăng khả năng tích lũy các chất khô và muối khoáng. Điều này được chứng minh qua hai chỉ tiêu về trọng lượng tươi và trọng lượng khô của cây (Bảng 5). Nồng độ AgNO₃ từ 4 mg/l ức chế sự hình thành và tăng trưởng rễ. Điều này dễ nhận thấy qua số liệu về số lượng, chiều dài rễ và chiều cao cây trung bình giảm dần từ nghiệm thức bổ sung 2 mg/l AgNO₃ xuống nghiệm thức bổ sung 12 mg/l AgNO₃ (Bảng 5). Hiện tượng này cũng được Petrova và đồng tác giả (2011) nhận thấy trên cây *Gentiana lutea* khi số lượng rễ và chiều cao chồi giảm trên môi trường bổ sung 3 mg/l AgNO₃. Tuy đây có thể thấy, nồng độ 2 mg/l AgNO₃ là thích hợp nhất cho sự hình thành và tăng trưởng rễ sâm Ngọc Linh *in vitro*.

Với hai chỉ tiêu này, nghiệm thức bổ sung 2 mg/l AgNO₃ đạt cao nhất với trọng lượng tươi và khô trung bình của cây lần lượt là 0,672 g và 0,104 g. Hơn nữa, hàm lượng chlorophyll trong lá của cây ở nghiệm thức này cao hơn các nghiệm thức còn lại (Bảng 4, Hình 1E). Qua đây, có thể khẳng định việc bổ sung AgNO₃ với nồng độ 2 mg/l giúp cây sâm Ngọc Linh sinh trưởng và phát triển tốt hơn so với việc không bổ sung AgNO₃. Nguyễn Thị Kim Yến và đồng tác giả (2012) cũng nhận được kết quả tương tự trên cây hoa đồng tiền (*Gerbera jamesonii*) với nồng độ AgNO₃ bổ sung là 8 mg/l.

KẾT LUẬN

Thành phần và tỷ lệ của các hợp chất trong mỗi loại chất hữu cơ là khác nhau nên sự tác động của chúng lên sự sinh trưởng và phát triển của cây *in vitro* là khác nhau. Nghiên cứu trên cho thấy chất chiết chuỗi ở nồng độ 10 g/l, tảo spirulina ở nồng độ 5 mg/l và nước dừa ở tỷ lệ 5% tăng cường sự sinh trưởng và phát triển *in vitro* của sâm Ngọc Linh. Dịch chiết khoai tây ức chế khả năng sinh trưởng của sâm Ngọc Linh *in vitro*. Riêng AgNO₃ cũng đã thể hiện tốt được vai trò trong việc ức chế ethylene, từ đó tăng khả năng sinh trưởng và phát triển *in vitro* của cây sâm Ngọc Linh ở nồng độ 2 mg/l.

Lời cảm ơn

Nhóm tác giả xin chân thành gửi lời cảm ơn đến quý Phát triển Khoa học và Công nghệ Quốc gia (Nafosted) và Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã hỗ trợ kinh phí cho chúng tôi thực hiện nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Baque A, Shin YK, Eishmarí T, Lee EJ, Paek KY (2011) Effect of light quality, sucrose and coconut water concentration on the micropropagation of *Calanthe hybrids* ('Bukduseong' × 'Hyesung' and 'Chunkwang' × 'Hyesung'). *AJCS*, 5 (10): 1247-1254.
- George J, Ravishankar GA (1996) Development of modified plant tissue culture media using alternate sources of nitrogen and vitamin for micropropagation. *Int J Biol Macromol*, 19 (1): 1-7.
- Kaur S, Bhatnari KK (2012) Organic growth supplement stimulants for *in vitro* multiplication of *Cymbidium pendulum* (Roxb.) Sw. *Hort Sci (Prague)*, 39 (1): 47-52.
- Kumar V, Parvatam G, Ravishankar GA (2009) AgNO₃ – a potential regulator of ethylene activity and plant growth modulator. *Electron J Biotechnol*, 12 (2): 8-9.
- Ma JH, Yao JL, Cohen D, Morns B (1998) Ethylene inhibitors enhance *in vitro* formation from apple shoot cultures. *Plant Cell Rep*, 17: 211-214.
- Molnár Z, Virág E, Ördög V (2011) Natural substances in tissue culture media of higher plants. *Acta Biol Szeged*, 55 (1): 123-127.
- Murdad R, Latip MA, Aziz ZA, Ripin R (2010) Effects of carbon source and potato homogenate on *in vitro* growth and development of Sabah's Endangered orchid: *Phalaenopsis gigantea*. *AsPac J Mol Biol Biotechnol*, 18 (1): 199-202.
- Nguyễn Thị Kim Yến, Nguyễn Phúc Huy, Hoàng Văn Cường, Dương Tấn Nhựt (2012) Ảnh hưởng của bạc nitrate (AgNO₃) lên khả năng sinh trưởng và phát triển của cây hoa đồng tiền (*Gerbera jamesonii*) nuôi cấy *in vitro*. *Tạp Chí Công Nghệ Sinh Học*, 10 (4A): 953-980.
- Petrova M, Zayova E, Vitkova A (2011) Effect of silver nitrate on *in vitro* root formation of *Gentiana lutea*. *ACRomanian Biotech Let*, 16 (6): 53-58.
- Thorpe TA, Stasolla C, Yeung E-C, de Klerk GJ, Roberts A, George EF (2008) The components of plant tissue culture media II: Organic additions, osmotic and pH effects, and support systems. George EF, Hall MA and de Klerk GJ, eds., *Plant propagation by tissue culture*, 3rd edition. *Springer-Verlag, Dordrecht*: 115-173.
- Trịnh Văn Hùng (2007) Lâm sản ngoài gỗ Việt Nam. NXB Bản Đồ: 545-547.
- Vonshak A (2002) The chemicals of *Spirulina*. Zvi Chan, eds., *Spirulina platensis (Arthrospira) – Physiology, cell-biology and biotechnology*. *Taylor and Francis publisher*: 175-204

INFLUENCE OF ORGANIC EXTRACTS AND SILVER NITRATE ON THE GROWTH AND DEVELOPMENT OF PANAX VIETNAMENSIS HA ET GRUSHV. CULTURED IN VITRO

Nguyen Viet Cuong, Ho Thanh Tam, Nguyen Ba Nam, Ha Thi My Ngan, Le Kim Cuong, Nguyen Phuc Huy, Duong Tan Nhut*

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

SUMMARY

- In vitro* *Panax vietnamensis* shoots with 2 – 3 cm in high were cultured on Schenk and Hildebrandt medium supplemented with 1 mg/l NAA; 1 g/l active charcoal, and various levels of spirulina microalgae (0, 5, 10, 15, 20 mg/l); coconut water (0, 5, 10, 15, 20%, v/v); potato extract (0, 10, 50, 100, 150 g/l); banana extract (0, 10, 50, 100, 150 g/l) or AgNO₃ (0, 1, 2, 4, 8, 12 mg/l). All of the cultures were maintained at 50 – 60% humidity, 25 ± 2°C under a 16h/8h (light/dark) photoperiod with light intensity of 40 – 45 μmol m⁻² s⁻¹ provided by cool white fluorescent tubes. After 8 weeks of culture, media with 5 mg/l spirulina microalgae showed to be the best medium for root formation and photosynthesis capacity of *Panax vietnamensis*. Shoots also grew well on media supplemented with 10 g/l banana extract, 5% coconut water or 2 mg/l AgNO₃. On the media supplemented with 10 g/l potato extract, shoots growth were normal. But, an increase in the concentration of potato extract proved ineffective in promoting the growth and development of Ngọc Linh ginseng and induced necrosis.

Keywords: development, growth, organic extracts, *Panax vietnamensis* Ha et Grushv., silver nitrate (AgNO₃)

*Author for correspondence: Tel. +84-63-3631056, Fax: +84-63-3631028, E-mail: duongtannhut@gmail.com