

NGHIÊN CỨU MỘT SỐ YẾU TỐ ẢNH HƯỞNG ĐẾN QUÁ TRÌNH PHÁT SINH PHÔI VÔ TÍNH SÂM NGỌC LINH (*PANAX VIETNAMENSIS* HA ET GRUSHV.) IN VITRO

Bùi Văn Thế Vinh¹, Vũ Thị Thủy¹, Thái Thương Hiền¹, Vũ Quốc Luận¹, Nguyễn Bá Nam¹, Nguyễn Phúc Huy¹, Trịnh Thị Hương¹, Vũ Thị Hiền¹, Lê Kim Cương¹, Hồ Thanh Tâm¹, Đỗ Mạnh Cường¹, Nguyễn Việt Cường¹, Đỗ Khắc Thịnh², Dương Tấn Nhựt¹

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

²Viện Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp Miền Nam, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam

Ngày nhận bài: 11.02.2013

Ngày nhận đăng: 20.3.2014

TÓM TẮT

Sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) là một cây thuốc quý của Việt Nam. Trong những năm gần đây, việc nghiên cứu khả năng nhân giống và bảo tồn loài cây dược liệu quý này đang trở thành vấn đề rất cấp thiết. Trong đó, việc nghiên cứu quá trình phát sinh phôi vô tính sâm Ngọc Linh đóng một vai trò hết sức quan trọng. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành khảo sát một số yếu tố ảnh hưởng đến quá trình phát sinh phôi vô tính sâm Ngọc Linh như nguồn mẫu cây, thành phần khoáng trong môi trường nuôi cấy, chất điều hòa sinh trưởng thực vật, spermidine, proline và nguồn carbohydrate. Trong 3 nguồn mẫu ban đầu gồm lá, cuống lá, củ của cây sâm Ngọc Linh *in vitro* 3 tháng tuổi thì mẫu cây lá với kích thước 0,5 x 0,5 cm thích hợp để nuôi cấy tạo phôi trên môi trường MS bổ sung 1,0 mg/l 2,4-D kết hợp với 0,5 mg/l NAA và 0,2 mg/l kinetin. Ảnh hưởng của spermidine và proline lên khả năng kích thích gia tăng tần suất phát sinh phôi cũng được nghiên cứu. Kết quả cho thấy spermidine (0,1 mM) và proline (300 mg/l) có tác dụng gia tăng tần suất phát sinh phôi (tương ứng 93,3% và 86,7%). Nhằm tối ưu hóa môi trường cảm ứng tạo phôi vô tính sâm Ngọc Linh, 3 nguồn carbohydrate khác nhau (sucrose, glucose và fructose) ở các nồng độ 10 - 60 g/l đã được thử nghiệm. Trong đó, sucrose ở nồng độ 50 g/l có hiệu quả trong việc cảm ứng tạo phôi với tỉ lệ đạt 86,7% và số lượng phôi đạt 167 phôi/mẫu. Glucose và fructose tỏ ra không phù hợp để sử dụng làm nguồn carbohydrate bổ sung vào môi trường cảm ứng tạo phôi đối với sâm Ngọc Linh.

Từ khóa: Carbohydrate, *Panax vietnamensis*, phôi vô tính, proline, spermidine

ĐẶT VẤN ĐỀ

Sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) thuộc họ Nhân sâm (Araliaceae), là cây dược liệu có thành phần ginsenoside được đánh giá vào loại nhiều nhất so với các loài khác của chi *Panax* trên thế giới. Qua nghiên cứu các nhà khoa học đã nhận thấy sâm Ngọc Linh không chỉ có các tác dụng dược lý đặc trưng của chi Nhân sâm mà còn có những tác dụng điển hình như chống stress, chống trầm cảm, tác dụng lên sự chống oxy hóa *in vitro* và *in vivo*. .. Nhóm chất có vai trò quyết định nhất đến tác dụng dược lý của loài sâm này là các saponin triterpenoid mà đại diện chính là MR₂, G-Rb₁ và G-Rg₁ (Trần Công Luận, 2003). Sâm Ngọc Linh là một trong những loài sâm có hàm lượng saponin khung dammaran cao nhất (khoảng 12 - 15%) và lượng saponin nhiều nhất so với các loài khác của chi *Panax* trên thế giới (Nguyễn Thượng Dong *et al.*, 2007).

Chính nhờ những giá trị dược lý to lớn như vậy mà nhu cầu đối với sâm Ngọc Linh ngày càng gia tăng. Tuy nhiên, việc trồng đại trà loại cây trồng có giá trị này đang gặp phải rất nhiều khó khăn như giới hạn về phạm vi phân bố, thời gian trồng kéo dài, nhiều sâu bệnh, ... Vì vậy, trong vòng vài năm trở lại đây, nhiều nghiên cứu đã được tiến hành nhằm nhân giống vô tính sâm Ngọc Linh (Nguyễn Ngọc Dung, 1995; Dương Tấn Nhựt *et al.*, 2010). Tuy nhiên, phương pháp nhân giống truyền thống không đáp ứng được nhu cầu về cây giống sâm Ngọc Linh ngày càng tăng trên thị trường do tỉ lệ sống sót của cây con *in vitro* khi chuyển ra vườn ương thấp.

Nhân giống vô tính thông qua con đường phát sinh phôi đã mang lại nhiều ứng dụng thực tiễn và có tính thương mại cao. Việc ứng dụng phương pháp phát sinh phôi vô tính ở cây sâm Ngọc Linh hứa hẹn sẽ mang lại nhiều ưu điểm vì có thể tạo ra một số lượng lớn cây con có chất lượng tốt trong một thời

gian ngắn, tỉ lệ sống sót của cây con ngoài vườn ươm cao do cây con phát triển từ phôi vô tính theo con đường tương tự như phôi hữu tính. Trong nỗ lực nghiên cứu ứng dụng nuôi cấy mô để sản xuất số lượng lớn cây con giống sâm-Ngọc-Linh đồng nhất về mặt di truyền và có khả năng sống sót cao, chúng tôi tiến hành nghiên cứu một số yếu tố ảnh hưởng đến quá trình phát sinh phôi vô tính sâm Ngọc Linh như nguồn mẫu cấy, hàm lượng khoáng, chất điều hòa sinh trưởng thực vật trong môi trường nuôi cấy, nguồn carbohydrate, spermidine và proline.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguồn mẫu *in vitro*

Nguồn mẫu sử dụng trong nghiên cứu này là các cơ quan như lá, cuống lá và củ được cắt ra từ cây sâm Ngọc Linh *in vitro* 3 tháng tuổi có chiều cao khoảng 1,5 cm, trọng lượng tươi khoảng 0,2 g đã ổn định qua 4 đến 5 lần cấy chuyển, hiện có tại Phòng Sinh học Phân tử và Chọn tạo Giống cây trồng, Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên.

Môi trường nuôi cấy

Môi trường MS (Murashige, Skoog, 1962), ½MS (Môi trường MS có thành phần đa lượng giảm một nửa), MS½ (Môi trường MS có thành phần đa lượng và vi lượng giảm một nửa), SH (Schenk, Hidebrandt, 1972), ½SH (Môi trường SH có thành phần đa lượng giảm một nửa) và SH½ (Môi trường SH có thành phần đa lượng và vi lượng giảm một nửa) có bổ sung thêm 30 g/l đường sucrose (ngoại trừ thí nghiệm về các nguồn cacbonhydrat khác nhau), 8 g/l agar, các chất điều hòa sinh trưởng thuộc nhóm auxin (NAA, 2,4-D), cytokinin (kinetin), tùy thuộc vào từng thí nghiệm sẽ bổ sung ở các nồng độ khác nhau. Sau đó điều chỉnh độ pH của môi trường từ 5,7 đến 5,8.

Điều kiện nuôi cấy

Trong phòng thí nghiệm với nhiệt độ $25 \pm 2^\circ\text{C}$, cường độ chiếu sáng khoảng 35 - 40 $\mu\text{mol. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, thời gian chiếu sáng 16 giờ/ngày.

Phương pháp

Khảo sát ảnh hưởng của nguồn mẫu cấy lên khả năng phát sinh phôi vô tính sâm Ngọc Linh

Các mẫu cấy lá (0,5 x 0,5 cm), cuống lá (dài 1,0 cm), củ (0,5 x 0,5 x 0,1 cm) được cắt khỏi cây sâm Ngọc Linh *in vitro* 3 tháng tuổi và nuôi cấy trên môi trường SH bổ sung 1,0 mg/l 2,4-D và 1,0 mg/l NAA.

Sau 8 tuần nuôi cấy, tiến hành ghi nhận các chỉ tiêu tần suất phát sinh phôi, số lượng phôi/mẫu và trọng lượng của mẫu cấy (mg).

Khảo sát ảnh hưởng của thành phần khoáng trong môi trường nuôi cấy lên khả năng phát sinh phôi vô tính sâm Ngọc Linh

Các mẫu cấy lá (0,5 x 0,5 cm) được nuôi cấy trên môi trường MS, ½MS, MS½, SH, ½SH và SH½ có thành phần khoáng đa lượng và vi lượng khác nhau được bổ sung 1,0 mg/l 2,4-D và 1,0 mg/l NAA. Thành phần vitamin của MS được sử dụng cố định trong tất cả các môi trường thí nghiệm. Sau 8 tuần nuôi cấy, tiến hành ghi nhận các chỉ tiêu tỉ lệ hình thành mô sẹo (%), tần suất phát sinh phôi, số lượng phôi/mẫu và trọng lượng của mẫu cấy (mg).

Khảo sát ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng thực vật lên khả năng phát sinh phôi vô tính sâm Ngọc Linh

Mô sẹo được tạo ra từ các thí nghiệm trên được cắt thành những mảnh nhỏ (0,5 x 0,5 cm) và nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung 1,0 mg/l 2,4-D kết hợp với NAA và/hoặc kinetin ở các nồng độ khác nhau (0,1; 0,2; 0,5 và 1,0 mg/l). Sau 12 tuần nuôi cấy, tiến hành ghi nhận các chỉ tiêu tần suất phát sinh phôi, số lượng phôi/mẫu và trọng lượng của mẫu cấy (mg). Môi trường cảm ứng tạo phôi (EM) tối ưu trong thí nghiệm này được sử dụng làm môi trường cơ bản cho các thí nghiệm tiếp theo.

Khảo sát ảnh hưởng spermidine, proline và nguồn carbohydrate lên khả năng gia tăng tần suất phát sinh phôi vô tính sâm Ngọc Linh

Các mẫu mô sẹo sâm Ngọc Linh được cấy vào môi trường cảm ứng tạo phôi (EM) có bổ sung proline (thuộc nhóm acid amine, nồng độ 100, 200, 300 và 400 mg/l) hoặc bổ sung spermidine (thuộc nhóm polyamine, nồng độ 0,01; 0,05; 0,1; 0,2 mM). Các nguồn carbohydrate khác nhau (sucrose, glucose và fructose) cũng được bổ sung vào môi trường cảm ứng tạo phôi (EM) ở các nồng độ khác nhau (10, 20, 30, 40, 50, 60 g/l) để đánh giá khả năng kích thích gia tăng tần suất phát sinh phôi vô tính ở sâm Ngọc Linh. Các chỉ tiêu như tỉ lệ phát sinh phôi (%), số lượng phôi/mẫu được ghi nhận sau 12 tuần nuôi cấy.

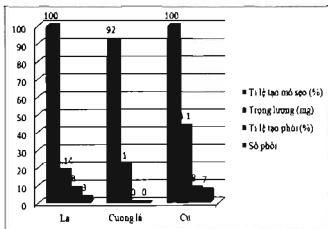
KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Ảnh hưởng của nguồn mẫu cấy lên khả năng phát sinh phôi vô tính sâm Ngọc Linh

Nguồn mẫu và thành phần dinh dưỡng trong môi trường nuôi cấy có vai trò quan trọng trong sự phát sinh hình thái của mẫu cây (Fleming, 2002). Trong thí nghiệm này, các mẫu cây lá, cuống lá và củ được cắt ra từ cây sâm Ngọc Linh *in vitro* 3 tháng tuổi bắt đầu phản ứng hình thành mô sẹo sau 2 tuần nuôi cấy trên môi trường SH bổ sung 1,0 mg/l 2,4-D và 1,0 mg/l NAA. Mô sẹo phát sinh đầu tiên trên mẫu cây củ, có dạng xốp, hình thành xung quanh viên củ. Mô sẹo xốp, trong, mỏng nước cũng được tạo thành từ các mẫu cây lá và cuống lá. Đối với mẫu cây lá, mô sẹo hình thành đầu tiên ở phần mặt cắt tiếp xúc với môi trường sau đó phát triển ở cả 4 phía của mặt cắt. Trong khi đó, đối với mẫu cây cuống lá, mô sẹo chỉ hình thành ở hai đầu, nơi có vết cắt (Hình 9a₁, a₂, a₃).

Sau 8 tuần nuôi cấy, mô sẹo phát sinh mạnh nhất đối với mẫu cây lá và củ (Hình 9a₁, a₃), đạt tỉ

lệ 100% (Hình 1). Trên bề mặt khối mô sẹo xốp bắt đầu xuất hiện những chấm nhỏ màu tím, phần lớn những cấu trúc này sau đó phát triển thành rễ bất định với các dạng hình thái khác nhau (dữ liệu không được trình bày). Bên cạnh đó, có sự xuất hiện của những cấu trúc phôi hình cầu màu trắng trên bề mặt khối mô sẹo có nguồn gốc từ mẫu cây lá và củ với tỉ lệ 8% (Hình 1). Mặc dù số phôi hình thành từ khối mô sẹo có nguồn gốc từ mẫu cây củ (7 phôi/mẫu cây) nhiều hơn so với mẫu cây lá (3 phôi/mẫu cây) nhưng do số lượng mẫu cây lá/cây nhiều hơn rất nhiều so với mẫu cây củ/cây nên tổng số lượng phôi thu nhận được từ mẫu cây lá nhiều hơn so với củ. Do đó, trong các thí nghiệm tiếp theo, chúng tôi sử dụng lá làm nguồn vật liệu ban đầu để nghiên cứu ảnh hưởng của các yếu tố khác lên quá trình phát sinh phôi vô tính ở cây sâm Ngọc Linh.



Hình 1. Ảnh hưởng của nguồn mẫu cây lên khả năng phát sinh phôi vô tính sâm Ngọc Linh

Ảnh hưởng của thành phần khoáng trong môi trường nuôi cấy lên khả năng phát sinh phôi vô tính sâm Ngọc Linh

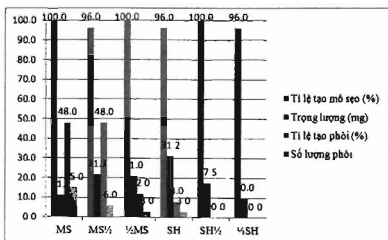
Trong một số nghiên cứu về sâm, môi trường MS thường được sử dụng để nuôi cấy khởi tạo mô sẹo (Huang *et al.*, 2010), phát sinh cơ quan (Bonfill *et al.*, 2003) hay tái sinh cây hoàn chỉnh (Xiang *et al.*, 2007; Dương Tấn Nhật *et al.*, 2010). Trong khi đó, môi trường SH lại tỏ ra hiệu quả để nuôi cấy rễ bất định và tạo củ *in vitro* (Hoàng Xuân Chiến *et al.*, 2011). Sự hấp thu các nguyên tố khoáng từ môi trường nuôi cấy trong quá trình cảm ứng và suốt giai đoạn đầu phát sinh phôi vô tính đã được chứng minh (Dussert *et al.*, 1995; Fischella *et al.*, 2000). Do đó, trong thí nghiệm này, chúng tôi sử dụng 2 môi trường khoáng cơ bản là MS và SH, đồng thời sử

dung 4 môi trường cải biến là ½MS, MS½, ½SH và SH½ có thành phần khoáng đa lượng và vi lượng khác nhau. Trong tất cả các môi trường thí nghiệm, chúng tôi cố định thành phần vitamin của MS, đồng thời bổ sung thêm 1,0 mg/l NAA và 1,0 mg/l 2,4-D.

Sau 8 tuần nuôi cấy, kết quả cho thấy hầu hết các môi trường đều cảm ứng sự hình thành mô sẹo với tỉ lệ cao. Môi trường MS và MS½ cho tỉ lệ tạo phôi cao hơn các môi trường còn lại (48%), tuy nhiên số lượng phôi vô tính hình thành nhiều nhất ở mẫu lá được nuôi cấy trên môi trường có thành phần khoáng đa lượng của MS (15 phôi/mẫu cây). Trên môi trường SH½ và ½SH, các mẫu cây đều phát triển thành mô sẹo mềm, kết cấu xốp và dễ vỡ vụn mà không có sự hiện diện của cấu trúc giống phôi nào (Hình 2).

Sự kết hợp các thành phần khoáng đa lượng cảm ứng sự phát sinh phôi vô tính hiệu quả nhất đối với sâm Ngọc Linh là môi trường MS. Kết quả này có thể do hàm lượng nitơ trong môi trường cao, ít nhất là gấp hai lần so với những môi trường khác; một nguyên nhân khác có thể là do sự cân bằng giữa nitrat và ammonium trong môi trường nuôi cấy. Môi trường MS có chứa 60 mM nitơ trong đó hàm lượng NO_3^- chiếm 39,4 mM và hàm lượng NH_4^+ chiếm 20,6 mM trong khi tất cả các môi trường khác, hàm lượng nitơ không vượt quá 30 mM. Kết quả tương tự cũng đã được báo cáo bởi Kim và đồng tác giả (2006) khi tiến hành nghiên cứu phát sinh phôi trực tiếp từ mẫu cây lá mầm cây Nhân sâm. Sự hình thành cấu trúc giống phôi đạt được trên môi trường MS lớn hơn so với trên môi trường SH hay B5 với tỉ lệ $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$ tối ưu là 21:39 (Kim *et al.*, 2006). Khi nitơ hiện diện ở nồng độ cao, bình thành nên nhiều NH_3 , tổng hợp nên các amino acid là những hợp chất rất cần cho sự tăng trưởng của các cơ quan sinh dưỡng (Marschner, 1983; Nguyễn Du Sanh, 1998).

Bên cạnh hàm lượng nitơ tổng, có thể nhận thấy rằng sự khác biệt về khả năng hình thành mô sẹo phát sinh phôi còn chịu ảnh hưởng bởi hàm lượng ion K^+ và Ca^{2+} . Ion K^+ liên quan đến bơm proton và trong sự vận chuyển gián tiếp các chất hòa tan (Briskin, Hanson, 1992) có thể là yếu tố giới hạn sự phát sinh phôi vô tính. Vì vậy, trong nuôi cấy huyền phù Cà rốt, hàm lượng potassium thấp trong môi trường nuôi cấy làm hạn chế sự hình thành phôi vô tính mà không ảnh hưởng đến sự tăng trưởng tế bào trong khi hàm lượng potassium cao làm tăng mạnh số lượng phôi (Brown *et al.*, 1976). Sự phát sinh phôi vô tính cũng có thể chịu ảnh hưởng bởi calcium. Ca^{2+} hoạt động như là một tín hiệu thứ cấp trong con đường truyền tín hiệu kích thích ngoại bào bằng cách gắn với calmodulin hay các protein gắn calcium khác để kiểm soát nhiều đáp ứng sinh lý tế bào (Bush, 1995). Ở Cà rốt, sự phân cực hình thái của các cụm tế bào sinh phôi kết hợp với Ca^{2+} nội bào tự do (Timmers, Schel, 1991). Hơn nữa, sự gia tăng hàm lượng CaCl_2 trong môi trường cảm ứng hình thành số lượng phôi nhiều hơn (Silva, Ricardo, 1992).



Hình 2. Ảnh hưởng của thành phần khoáng trong môi trường nuôi cấy lên khả năng phát sinh phôi vô tính sâm Ngọc Linh

Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng thực vật lên khả năng phát sinh phôi vô tính sâm Ngọc Linh

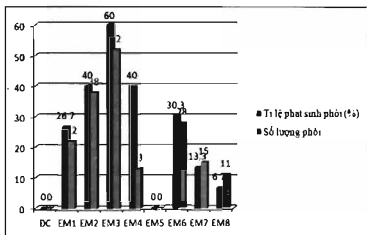
Các mẫu mô sẹo có nguồn gốc từ lá sâm Ngọc Linh *in vitro* được cắt thành từng mảnh có kích thước $0,5 \times 0,5$ cm và cấy vào môi trường MS có bổ sung 1,0 mg/l 2,4-D kết hợp với NAA hoặc kinetin ở các nồng độ 0,1; 0,2; 0,5 và 1,0 mg/l (Hình 9b₁). Sau 12 tuần nuôi cấy, kết quả cho thấy tỉ lệ mẫu tạo phôi và số lượng phôi bình thành trên mẫu khác nhau ở các nghiệm thức thí nghiệm. Đối với nghiệm thức đối chứng (không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng), không xuất hiện phôi trên các mẫu mô sẹo,

các mẫu mô sẹo dần hóa nâu và chết. Các nghiệm thức còn lại bổ sung 2,4-D kết hợp với NAA hoặc kinetin ở các nồng độ khác nhau cho thấy có sự xuất hiện các cấu trúc phôi hình cầu. Sự kết hợp giữa NAA và 2,4-D cho thấy khả năng cảm ứng tạo phôi tốt hơn thông qua các chỉ tiêu tỉ lệ phát sinh phôi và số lượng phôi/mẫu (Hình 3).

Trong các nghiên cứu về cảm ứng phát sinh phôi vô tính ở nhiều loài thực vật thì auxin, đặc biệt là 2,4-D thường được sử dụng nhiều nhất (Umehara, Kamada, 2005). Điều này được chứng minh bởi những thí nghiệm ở Cà rốt (Borkird *et al.*, 1986), *F. sellowiana* (Cruz *et al.*, 1990),

Populus spp. (Michler, 1995), Cacao (Canhoto *et al.*, 1999), *Paspalum scrobilatum* (Avci, Can, 2006). Nồng độ auxin trong môi trường tạo phôi được sử dụng khác nhau và thay đổi tùy theo từng loài cũng như từng loại kiểu gen của thực vật. Do đó, chúng tôi đã sử dụng 1,0 mg/l 2,4-D cho tất cả các thí nghiệm (đây là nồng độ thích hợp trên đối tượng sâm Ngọc Linh đã được nghiên cứu trước đây). Tuy nhiên, nếu chỉ bổ sung 2,4-D riêng rẽ mà không có sự hỗ trợ của các chất điều hòa sinh trưởng khác thuộc nhóm auxin hay cytokinin thì không thu nhận được mô sẹo có khả năng phát sinh phôi. Trong thí nghiệm

này, chúng tôi kết hợp 2,4-D với một auxin khác là NAA, đây là chất có khả năng cảm ứng phát sinh phôi vô tính ở một số loài. NAA đã được chứng minh là rất hiệu quả trong việc tạo phôi vô tính ở cây Đậu tương và cây Cà rốt khi sử dụng với nồng độ 1,0 mg/l (Borkird *et al.*, 1986). Trong khi đó ở thí nghiệm của chúng tôi, tỉ lệ phát sinh phôi cao nhất (đạt 60%) khi sử dụng 0,5 mg/l NAA kết hợp với 1,0 mg/l 2,4-D với số phôi trung bình khoảng 52 phôi/mẫu cấy (Hình 3). Kết quả này phù hợp với nghiên cứu phát sinh phôi ở *Momordica charantia* L. (Ananya *et al.*, 2009), *Panax ginseng* (Shohana *et al.*, 2009).

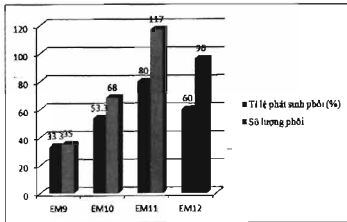


Hình 3. Ảnh hưởng của 2,4-D kết hợp với NAA hoặc kinetin lên khả năng phát sinh phôi vô tính sâm Ngọc Linh DC đối chứng (không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng thực vật); EM1, EM2, EM3, EM4: 2,4-D (1,0 mg/l) kết hợp với NAA (0,1; 0,2; 0,5 và 1,0 mg/l); EM5, EM6, EM7, EM8 2,4-D (1,0 mg/l) kết hợp với kinetin (0,1; 0,2; 0,5 và 1,0 mg/l).

Cytokinin có tác dụng kích thích sự hình thành phôi vô tính từ nuôi cấy mô sẹo không có khả năng phát sinh phôi được báo cáo trên các loài cây đậu như *Phaseolus* (Malik, Saxena, 1992), *Trifolium* (Maheshwaran, Williams, 1986), cây Đậu phụng (Gill, Saxena, 1992). Các loại cytokinin như kinetin được chứng minh là có tác dụng tốt trong nuôi cấy ban đầu để hình thành phôi vô tính ở một số loài thân gỗ (Dunstan *et al.*, 1995). Tuy nhiên, nồng độ của kinetin được sử dụng cũng khác nhau tùy theo loài thực vật. Kết quả được chỉ ra trong thí nghiệm này cho thấy sự kết hợp giữa 2,4-D và kinetin không đạt hiệu quả cảm ứng phát sinh phôi tốt như sự kết hợp giữa 2,4-D và NAA. Ở nghiệm thức EM5 không thấy có dấu hiệu phát sinh phôi, chỉ là khối mô sẹo rắn chắc, màu vàng kem, một số vị trí có màu tím. Ở nghiệm thức EM6 bắt đầu có sự xuất hiện phôi, tuy không nhiều nhưng phôi hình thành có màu trắng sáng, tương đối đồng nhất và phôi lớn hơn so với ở các nghiệm thức kết hợp giữa 2,4-D và NAA. Chính vì vậy, chúng tôi tiến

hành kết hợp hai chất điều hòa này vào thí nghiệm tiếp theo để đánh giá khả năng cảm ứng phát sinh phôi trên đối tượng sâm Ngọc Linh

Khi kết hợp 1,0 mg/l 2,4-D với 0,2 mg/l kinetin và NAA ở các nồng độ khác nhau cho thấy kết quả thu được tương đối tốt và đồng đều ở tất cả các nghiệm thức. Cụ thể ở nghiệm thức EM9, tỉ lệ mẫu tạo phôi là 33,3%, nghiệm thức EM10 là 53,3%, nghiệm thức EM11 đạt cao nhất là 80%, đến nghiệm thức EM12 giảm xuống còn 60% (Hình 4). Số phôi tạo thành trên mẫu cũng tương đối cao so với thí nghiệm chỉ kết hợp 2,4-D với NAA hoặc kinetin và đạt cao nhất ở nghiệm thức EM11 (117 phôi/mẫu). Phôi có các dạng hình cầu, hình tim, hình thủy lôi, hình hạt lá mầm (Hình 9c₁, c₂, c₃, c₄). Phôi màu vàng sáng, to và tương đối đồng đều, không có phôi nào bất thường, một số mẫu có sự hình thành chồi.



Hình 4. Ảnh hưởng của 2,4-D kết hợp với NAA và kinetin lên khả năng phát sinh phôi vô tính mầm Ngọc Linh. EM9, EM10, EM11, EM12: 2,4-D (1,0 mg/l) kết hợp với kinetin (0,2 mg/l) và NAA (0,1, 0,2; 0,5 và 1,0 mg/l)

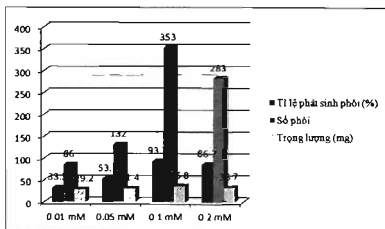
Trong nuôi cấy mô tế bào thực vật, sự phát sinh hình thái bị ảnh hưởng bởi các thành phần khác nhau trong môi trường nuôi cấy, đặc biệt là nồng độ các chất điều hòa sinh trưởng thực vật nên việc đánh giá ảnh hưởng của chúng lên sự tái sinh cây là rất quan trọng. Sự phát sinh phôi vô tính từ nuôi cấy mô sẹo trong môi trường có chứa cytokinin kết hợp với auxin được báo cáo ở các loài Ngũ cốc (Bhaskaran, Smith, 1990), các loài thuộc chi *Trifolium* bao gồm có Ba lá đỏ, *T. pratense* L., và gần đây báo cáo của Haliloglu (2006) đã cho thấy khả năng phát sinh phôi vô tính từ nuôi cấy mẫu lá Khoai mì trong môi trường có sự kết hợp của auxin và cytokinin. Như vậy, sự kết hợp 2,4-D hay NAA với một loại cytokinin được cho là rất cần thiết để kích thích phát sinh phôi vô tính ở một số thực vật. Mặc dù phần lớn sự phát sinh phôi vô tính được kích thích bởi việc sử dụng auxin và cytokinin riêng lẻ hoặc kết hợp trong môi trường nhưng không phải sự kết hợp nào của cytokinin và auxin đều dẫn đến sự hình thành phôi vô tính. Trong thí nghiệm này, chúng tôi sử dụng 2,4-D và NAA kết hợp với kinetin cho hiệu quả tỉ lệ phát sinh phôi rất cao và cao nhất ở nghiệm thức EM11. Kết quả này phù hợp với báo cáo trên loài *Pinus taeda* (Vanildo et al., 2004) và trên cây Bông vải (Hamidou et al., 2005).

Ảnh hưởng của spermidine lên khả năng gia tăng tần suất phát sinh phôi vô tính mầm Ngọc Linh

Polyamine thực chất là một dạng của acid amin và nó được xem như là một chất điều hòa sinh trưởng. Do đó, chúng tôi đã đưa spermidine là một loại polyamine vào thí nghiệm với mục đích khảo sát khả năng phát sinh phôi từ mô sẹo. Kết quả thí nghiệm cho thấy khi bổ sung spermidine với nồng độ thấp vào môi trường, mô sẹo được cảm ứng rất

nhANH sau 4 tuần nuôi cấy. Trên bề mặt mô sẹo đã thấy xuất hiện lấm tấm những phôi hình cầu nhỏ và số lượng phôi tăng dần lên. Sau 12 tuần nuôi cấy, số lượng phôi xuất hiện nhiều trên bề mặt, có đủ các hình dạng như phôi hình cầu, hình tim, hình thùy lõm, hình hai lá mầm,... Phôi có màu trắng sáng, không thấy xuất hiện phôi biến dị. Khi tăng dần nồng độ spermidine thì các chỉ tiêu được ghi nhận cũng tăng và ở nghiệm thức bổ sung spermidine với nồng độ 0,1 mM cho hiệu quả cao nhất về tỉ lệ phát sinh phôi (93,3%) và số lượng phôi hình thành trên mẫu (353 phôi) (Hình 5, Hình b₂, b₃, b₄). Tiếp tục tăng nồng độ spermidine lên 0,2 mM thì tỉ lệ mẫu hình thành phôi và số phôi hình thành trên mẫu giảm xuống. Kết quả này tương tự với ghi nhận của Kevers và đồng tác giả (2000) trên đối tượng *Panax ginseng*. Nhưng trên cây *Momordica charantia* L. thì nồng độ thích hợp là 0,001 mM (Ananya et al., 2009).

Polyamine đóng vai trò quan trọng trong sự biệt hóa tế bào để hình thành phôi (Rajam, 1997). Tuy nhiên, cơ chế chính xác của nó thì chưa được hiểu một cách rõ ràng và đến bây giờ vẫn còn được tiếp tục nghiên cứu. Ở nồng độ cao, polyamine có tác dụng giúp cho tế bào lớn lên và phân chia. Trong giai đoạn cảm ứng phôi, polyamine sẽ giúp cho tế bào vùng mô phân sinh phân chia nhanh chóng và giúp cho phôi được hình thành. Nồng độ polyamine giảm có thể gia tăng các tế bào mô sẹo nhưng sẽ làm giảm sự bình thành phôi. Do đó, việc sử dụng polyamine kết hợp thêm với các chất điều hòa sinh trưởng khác trong môi trường nuôi cấy mang lại hiệu quả và có ý nghĩa trong giai đoạn phát sinh phôi cũng như các giai đoạn hình thành cây hoàn chỉnh ở thực vật (Kevers et al., 2000).



Hình 5. Ảnh hưởng của spermidine lên khả năng gia tăng tần suất phát sinh phôi vô tính sâm Ngọc Linh

Spermidine là một polyamine mang tính đặc hiệu được dùng cho sự phát sinh phôi vô tính từ mô tế bào Cà rốt (Feirer *et al.*, 1985) và trong suốt các giai đoạn cảm ứng của mảnh cây củ Đinh lăng (Cvikrová *et al.*, 1999). Monteiro và đồng tác giả (2002) cũng đã khẳng định được vai trò của polyamine, đặc biệt là spermidine trong sự phát sinh phôi vô tính *Panax ginseng*. Những nghiên cứu trên mô sẹo có khả năng phát sinh phôi của *Panax ginseng* khi sử dụng spermidine cho hiệu quả tương đối tốt (Kevers *et al.*, 2000). Việc sử dụng polyamine kết hợp với nhóm auxin hay cytokinin giúp cho mô sẹo có khả năng phát sinh phôi và nâng cao tần suất tạo phôi. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã ghi nhận được vai trò của spermidine trong việc nâng cao tần suất phát sinh phôi vô tính ở cây sâm Ngọc Linh khi sử dụng ở nồng độ 0,1 mM kết hợp với 1,0 mg/l 2,4-D, 0,5 mg/l NAA và 0,2 mg/l kinetin.

Ảnh hưởng của proline lên khả năng gia tăng tần suất phát sinh phôi vô tính sâm Ngọc Linh

Việc bổ sung các acid amin ngoại sinh vào môi trường nuôi cấy được báo cáo là có tác dụng thúc đẩy sự phát sinh phôi vô tính ở một số loài thực vật (Wang *et al.*, 2002). Amino acid là một nguồn nitơ hữu cơ (dạng khử) được chuyển hóa rất nhanh trong tế bào thực vật, kích thích tế bào sinh trưởng và phát triển nhanh hơn (Grimes, Hodges, 1990). Vì vậy việc bổ sung amino acid vào môi trường nuôi cấy cung cấp cho tế bào và mô một nguồn nitơ hữu cơ phù hợp ở một mức độ nhất định. Ở các loài thực vật khác nhau thì nhu cầu về các chất bổ sung như amino acid và thành phần của các chất điều hòa sinh trưởng cũng khác nhau.

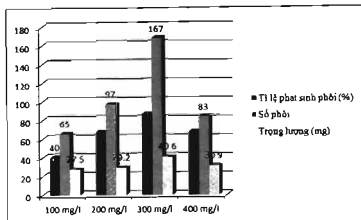
Kết quả thí nghiệm cho thấy việc bổ sung proline có ảnh hưởng tương đối tốt lên số lượng phôi vô tính được hình thành sau 12 tuần nuôi cấy, phôi được tạo thành tương đối đồng nhất. Khi tăng dần nồng độ proline từ 100 mg/l lên 300 mg/l thì tỉ lệ mẫu tạo phôi, số phôi hình thành trên mẫu và trọng lượng của mẫu cũng tăng dần. Ở nghiệm thức bổ sung 300 mg/l proline vào môi trường nuôi cấy, tỉ lệ mẫu tạo phôi cao nhất đạt 86,7%, số phôi hình thành trên mẫu khoảng 167 phôi, trọng lượng tươi của mẫu là 40,55 mg. Khi tăng nồng độ proline lên 400 mg/l thì các chỉ tiêu giảm xuống rõ rệt, tỉ lệ mẫu tạo phôi chỉ còn 66,7%, số phôi hình thành trên mẫu khoảng 83 phôi, trọng lượng tươi của mẫu là 30,90 g (Hình 6). Khi nồng độ proline quá cao sẽ có tác dụng ức chế sự hình thành phôi vô tính từ các mẫu mô sẹo. Trong thí nghiệm này, môi trường MS bổ sung 1,0 mg/l 2,4-D, 0,2 mg/l kinetin, 0,5 mg/l NAA và 300 mg/l proline là nồng độ tối ưu ảnh hưởng đến khả năng cảm ứng phát sinh phôi vô tính và nâng cao tần suất phát sinh phôi vô tính thông qua nuôi cấy mô sẹo sâm Ngọc Linh.

Proline riêng lẻ hay kết hợp với các amino acid khác có tác dụng kích thích phát sinh phôi ở các loài thực vật khác nhau như trong trường hợp cây Đậu nành và Đậu xanh (Shetty, McKersie, 1993). Proline được xem như là nguồn nitơ khử quan trọng được chuyển hóa và hấp thụ rất nhanh trong tế bào thực vật, ngoài ra proline được xem như là một nguồn năng lượng sẵn có cho tế bào. Bên cạnh đó, proline còn có chức năng quan trọng khác như là bảo vệ các enzyme chống lại sự suy thoái, điều khiển nồng độ acid trong cytosol. Nồng độ của proline có tác dụng như là một chất đệm bên trong tế bào chất, chống lại sự gia tăng nồng độ các ion trong

không bão, có chức năng như một chất điều khiển cấu trúc của nước, làm tăng tính tan của protein và các phân tử sinh học khác dưới điều kiện thể nước giảm (Schobert, 1977).

Trong thí nghiệm này, chúng tôi nhận thấy việc sử dụng proline không tác dụng mạnh đến hiệu quả phát sinh phôi với tần suất cao như spermidine. Trong 4 nồng độ được thử nghiệm thì ở nghiệm thức bổ sung

300 mg/l proline có ảnh hưởng đáng kể nhất đến tỉ lệ phát sinh phôi và số lượng phôi tạo thành. Kết quả này khác với ghi nhận của Manosh và đồng tác giả (2007) trên đối tượng Đậu tằm (nồng độ tối ưu là 500 mg/l), trên đối tượng cây Đậu phụng (nồng độ thích hợp là 100 mg/l), Victoria và đồng tác giả (1984) trên đối tượng cây Cà rốt (nồng độ thích hợp là 100 mg/l). Điều này cho thấy ở mỗi loài thực vật khác nhau thì proline có tác dụng ở các nồng độ khác nhau.



Hình 6. Ảnh hưởng của proline lên khả năng gia tăng tăng tần suất phát sinh phôi vô tính sấm Ngọc Linh

Ảnh hưởng của nguồn carbohydrate lên khả năng gia tăng tần suất phát sinh phôi vô tính sấm Ngọc Linh

Tế bào, mô hay cơ quan nuôi cấy thực vật thông thường đòi hỏi cung cấp một lượng carbohydrate để thỏa mãn nhu cầu về năng lượng cần thiết. Trong nuôi cấy mô, carbohydrate hoạt động như là những tác nhân thâm thấu và hỗ trợ cho sự phát triển tế bào. Nguồn carbon chủ yếu được bổ sung trong môi trường nuôi cấy là đường, các tế bào thực vật sẽ sử dụng nguồn đường này để tạo nên bộ khung carbon phục vụ cho việc tăng trưởng cũng như phát sinh cơ quan. Đường cũng là một yếu tố quyết định khả năng khởi phát các cơ quan của mô cấy.

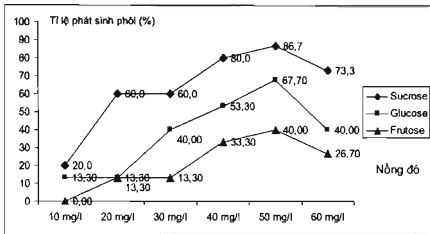
Thành phần carbohydrate trong môi trường nuôi cấy đã được chứng minh là có tác động đến sự phát sinh phôi vô tính ở nhiều loài thực vật (Lou, Kako, 1995). Kết quả trong thí nghiệm này cho thấy cả 3 loại đường sử dụng đều có khả năng cảm ứng phát sinh phôi. Tuy nhiên, tỉ lệ phát sinh phôi khi sử dụng đường sucrose là cao nhất, đạt đến 86,7%, trong khi đó đường glucose chỉ đạt 66,7%, đường fructose cho kết quả thấp nhất, chỉ đạt 40% (Hình 7). Riêng chỉ tiêu số phôi tạo thành trên mẫu, đường sucrose cũng cho kết quả cao nhất (đạt 167 phôi/mẫu), đường glucose chỉ đạt 75 phôi/mẫu, đường fructose thấp

nhất (đạt 35 phôi/mẫu) (Hình 8). Tỉ lệ phát sinh phôi, số phôi tạo thành trên mẫu đều tăng dần cùng với sự gia tăng nồng độ đường và đạt kết quả cao nhất là ở nồng độ 50 g/l, sau đó giảm dần khi tiếp tục tăng nồng độ.

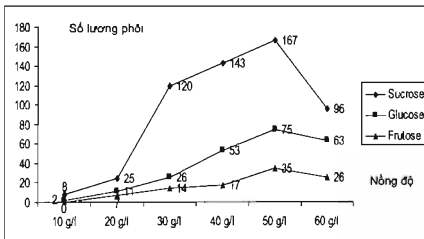
Trong nghiên cứu này, sự gia tăng nồng độ đường thúc đẩy sự gia tăng các cụm tiền phôi và phôi vô tính, điều này giống với những nghiên cứu đã được báo cáo trên nhiều đối tượng khác (Luo *et al.*, 1996). Mô sẹo hay các cơ quan nuôi cấy của thực vật đòi hỏi phải có sự hợp nhất của nguồn carbon trong môi trường nuôi cấy và sucrose được sử dụng như là nguồn carbon chính trong nuôi cấy mô (Fuentes *et al.*, 2000). Mặc dù sucrose được dùng như là nguồn carbon chính trong quá trình phát sinh phôi vô tính nhưng có một vài nghiên cứu đã chứng minh được sự cần thiết có một nồng độ carbohydrate cao, nó không chỉ đóng vai trò là nguồn dinh dưỡng mà còn thể hiện tính chất là điều hòa thâm thấu. Do đó, nồng độ đường cao không những có vai trò trong sự phát sinh phôi vô tính mà còn có thể tác động đến sự thâm thấu tế bào. Nồng độ đường sucrose cao tác động đến khả năng thâm thấu của tế bào trong quá trình phát sinh phôi vô tính cũng được đề cập bởi một vài nhóm nghiên cứu (May, Trigiano, 1991). Do đó, vai trò của đường sucrose trong nghiên cứu này làm sáng tỏ hai chức năng của

carbohydratic, đó là chức năng dinh dưỡng và chức năng điều hòa thẩm thấu. Kết quả này cũng phù hợp

với một số kết quả được thực hiện trên cây *Asparagus officinalis* L. (Kanji, Yuji, 2000).



Hình 7. Ảnh hưởng của nguồn carbohydrate lên tỉ lệ phát sinh phôi vô tính sâm Ngọc Linh (%)



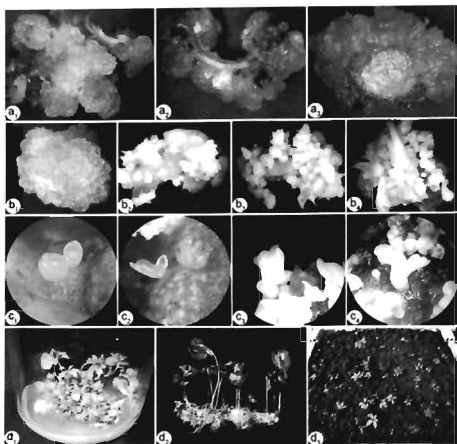
Hình 8. Ảnh hưởng của nguồn carbohydrate lên số lượng phôi vô tính sâm Ngọc Linh hình thành

KẾT LUẬN

Môi trường thích hợp nhất để cảm ứng tạo phôi vô tính từ mẫu cây lá cây sâm Ngọc Linh *in vitro* là môi trường MS có bổ sung 1,0 mg/l 2,4-D kết hợp với 0,5 mg/l NAA và 0,2 mg/l kinetin trong điều kiện chiếu sáng 16 giờ/ngày. Việc bổ sung spermidine (nồng độ 0,1 mM) thuộc nhóm polyamine hay proline (nồng độ 300 mg/l) thuộc nhóm acid amine có tác dụng kích thích gia tăng tần suất phát sinh phôi cũng như số lượng phôi vô tính hình thành. Việc sử dụng các nguồn carbohydrate khác nhau như sucrose, glucose hay fructose đều có khả năng cảm ứng sự phát sinh phôi vô tính ở sâm

Ngọc Linh, tuy nhiên, đường sucrose ở nồng độ 50 g/l cho hiệu quả cảm ứng sự hình thành và phát triển phôi tốt nhất. Cây con có nguồn gốc từ phôi vô tính khi được chuyển ra vườn ương đạt tỉ lệ sống sót cao (Hình 9d₁, d₂, d₃).

Lời cảm ơn: Các tác giả xin chân thành cảm ơn đề tài: Ứng dụng hệ thống chiếu sáng đơn sắc (LED) trong nghiên cứu nhân nhanh cây sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) với số lượng lớn phục vụ nhu cầu nhân giống của tỉnh Quảng Nam (Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam) đã hỗ trợ kinh phí cho đề tài nghiên cứu này.



Hình 9. Quá trình phát sinh phôi vô tính sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv) a₁, a₂, a₃ Mô sẹo được hình thành từ mẫu cây lá, cuống lá và củ của cây sâm Ngọc Linh *in vitro* sau 8 tuần nuôi cấy, b₁, b₂, b₃, b₄: Phôi vô tính được hình thành từ mô sẹo ở các thời điểm 0, 4, 8 và 12 tuần nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung 1,0 mg/l 2,4-D, 0,5 mg/l NAA, 0,2 mg/l kinetin và 0,1 mM spermidine, c₁, c₂, c₃, c₄ Phôi vô tính sâm Ngọc Linh ở các giai đoạn hình cầu, hình trụ, hình thùy lồi và là mầm, d₁, d₂, d₃ cây con sâm Ngọc Linh có nguồn gốc từ phôi vô tính trong ống nghiệm, chuẩn bị đưa ra vườn ươm và sau 3 tháng trong thử nghiệm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Ananya P, Kalyan M, Sarnistha SR (2009) Effect of polyamines on *in vitro* somatic embryogenesis in *Momordica charantia* L. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 97: 303-311.

Avcı S, Can E (2006) Efficient somatic embryogenesis from immature inflorescences of *Dallisgrass* (*Paspalum dilatatum* Poir). *Propag Ornament Plants*, 6: 134-139.

Bhaskaran S, Smith RH (1990) Regeneration in cereal tissue cultures. *Crop Sci*, 30: 1328-1337.

Bunfil M, Cusido RM, Palazon J, Canut E, Pinol MT, Morales C (2003) Relationship between peroxidase activity and organogenesis in *Panax ginseng* calluses. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 73: 37-41.

Barkird C, Choi JH, Sung ZR (1986) Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on the expression of embryogenic program of carrot. *Plant Physiol*, 81: 1143-1145.

Briskin D, Hanson JB (1992) How does the plant plasma membrane HC-ATPase pump protons. *J Exp Bot*, 43: 269-289

Brown S, Wetherell DF, Dougall DK (1976) The potassium requirement for growth and embryogenesis in wild carrot suspension cultures. *Physiol Plant*, 37: 73-79

Bush DS (1995) Calcium regulation in plant cells and its role in signalling. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 46: 95-122.

Canhoto JM, Lopes ML, Cruz GS (1999) Somatic embryogenesis and plant regeneration in myrtle (*Myrtaceae*). *Plant Cell Tiss Org Cult*, 57: 13-21

Cruz GS, Canhoto JM, Abreu MA (1990) Somatic embryogenesis and plant regeneration from zygotic embryos of *Feijoa sellowiana* Berg. *Plant Sci*, 66: 263-270

Cvikrová M, Binarová P, Cenklová V, Eder J, Machácková I (1999) Reinitiation of cell division and polyamine and monoamine levels in alfalfa explants during somatic embryogenesis. *Physiol Plant*, 105: 330-337.

Dunstan DI, Tautorus TE, Thorpe TA (1995) Somatic embryogenesis in woody plants. In: Thorpe TA (ed) *In vitro* embryogenesis in plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 471-540

Dussert S, Verdeil JL, Buffard-Morel J (1995) Specific nutrient uptake during initiation of somatic embryogenesis in coconut calluses. *Plant Sci*, 111: 229-236.

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.

Feirer RP, Wann SR, Einspahr DW (1985). The effects of spermidine synthesis inhibitors on *in vitro* plant development. *Plant Growth Regul*, 3: 319-327.

Fischella M, Silvi E, Morini S (2000) Regeneration of somatic embryos and roots from quince leaves cultured on media with different macroelement composition. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 63: 101-107.

Fleming JA (2002) The mechanism of leaf morphogenesis. *Planta*, 216: 17-22.

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

Grimes HD, Hodges TK (1990) The inorganic $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ ratio influences plant regeneration and auxin sensitivity in primary callus derived from immature embryos of indica rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Physiol*, 136: 362-367

Gill R, Saxena PK (1992) Direct somatic embryogenesis and regeneration of plant from seedling explant of peanut (*Arachis hypogae* L.). *Can J Bot*, 70: 1186-1192.

Halioglu K (2006) Efficient regeneration system from wheat leaf base segments. *Biol Plant*, 50(3): 326-330.

Hamidou SF, Peggy O, Lloyd M, Peng WC (2005) Putrescine enhances somatic embryogenesis and plant regeneration in upland cotton. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 81: 91-95.

Hoàng Xuân Chiến, Ngô Thanh Tài, Nguyễn Bá Trục, Trần Xuân Tinh, Lâm Bích Thảo, Trần Công Luận, Dương Tấn Nhựt (2011) Nghiên cứu một số yếu tố tạo củ sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) *in vitro* và xác định hàm lượng saponin trong cây tạo từ củ trồng thử nghiệm ở núi Ngọc Linh. *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 9(3): 325-339.

Huang T, Gao WY, Wang J, Cao Y, Zhao YX, Huang LQ, Liu CX (2010) Selection and optimization of a high-producing tissue culture of *Panax ginseng* C. A. Meyer. *Acta Physiol Plant*, 32: 765-772.

Kanji M, Yuji S (2000) Effects of sugar concentration and strength of basal medium on conversion of somatic embryos in *Asparagus officinalis* L. *Sci Hort*, 84(1-2): 15-26.

Kevers C, Le Gal N, Monteiro M, Dommes J, Gaspar T (2000) Somatic embryogenesis of *Panax ginseng* in liquid

cultures: a role for polyamines and their metabolic pathways. *Plant Growth Regul*, 31: 209-214.

Kim OT, Kim TS, In DS, Bang KH, Kim YC, Choi YE, Cha SW, Seong NS (2006) Optimization of direct somatic embryogenesis from mature zygotic embryos of *Panax ginseng* C. A. Meyer. *J Plant Biol*, 49(5): 348-352.

Lou H, Kako S (1995) Role of high sugar concentrations in inducing somatic embryogenesis from cucumber cotyledons. *Sci Hort*, 64: 11-20.

Luo H, Obara-Okeyo P, Tamaki M, Kako S (1996) Influence of sucrose concentration on *in vitro* morphogenesis in cultured cucumber cotyledon explant. *J Am Soc Hort Sci*, 71: 497-502.

Maheshwaran G, Williams EG (1986) Somatic embryogenesis factors influencing coordinate behavior of cells as an embryogenic group. *Ann Bot*, 57: 442-462.

Malik KA, Saxena PK (1992) Regeneration in *Phaseolus vulgaris* L.: High frequency induction of direct shoot formation in intact seedlings by N6-benzylaminopurine and thidiazuron. *Planta*, 186: 384-389

Manosh KB, Rafiul I, Monzur H (2007) Somatic embryogenesis in strawberry (*Fragaria* sp) through callus culture. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 90: 49-54.

Marschner H (1983) General introduction to the mineral nutrition of plant. In inorganic plant nutrition. *Encyclopedia of plant physiology Springer Verlag, Berlin*, 15: 5-60.

May RA, Trigiano RN (1991) Somatic embryogenesis and plant regulation from leaves of *Dendrothema grandiflora*. *J Am Soc Hort Sci*, 116: 366-371

Michler CH (1995) Somatic embryogenesis in *Populus* spp. In Jain SM, Gupta PK, Newton RJ (eds), Somatic embryogenesis in Woody Plants. *Kluwer Academic Publishers, Dordrecht*, 89-97.

Monteiro M, Kevers C, Dommes J, Gaspar T (2002) A specific role for spermidine in the initiation phase of somatic embryogenesis in *Panax ginseng* CA Meyer. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 68: 225-232.

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Plant Physiol* 15: 473-479.

Nguyễn Du Sanh (1998) Sự tăng trưởng của củ sâm (*Panicum Repens* L.) trong thiên nhiên. *Luận án Tiến sĩ Sinh học* Đại học Khoa học Tự nhiên Thành phố Hồ Chí Minh.

Nguyễn Ngọc Dung (1995) Nhân giống sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) bằng con đường sinh học. NXB Nông nghiệp. 43-100

Nguyễn Thương Đông, Trần Công Luận, Nguyễn Thị Thu Hương (2007) Sâm Việt Nam và một số cây thuốc họ Nhân sâm. NXB Khoa học và Kỹ thuật 109-110.

Rajam MV (1997). Polyamines. In: Prasad MNV (ed). *Plant ecophysiology*. John Wiley & Sons, New York, 343-374.

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.

Schobert B (1977) Is there an osmotic regulatory mechanism in algae and higher plants? *J Theor Biol*, 68: 17-26.

Shetty K, McKersie BD (1993) Proline, thioproline and potassium mediated stimulation of somatic embryogenesis in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Sci*, 88: 185-193.

Shohana P, Yeon-Yu K, Rama KP, Yu-Jin K, Neha GW, Deok-Yung K (2009) Identification and characterization of spermidine synthase gene from *Panax ginseng*. *Mol Biol Rep*, 37: 923-932.

Silva P, Ricardo CPP (1992) Beta-fructosidases and *in vitro* dedifferentiation-redifferentiation of carrot cells. *Phytochem*, 31: 1507-1511.

Timmers ACJ, Schel JIN (1991) Localization of cytosolic Ca²⁺ during carrot somatic embryogenesis using confocal scanning laser microscopy. In: Karsenn CM, van Loon LC, Vreugdenhil D (eds) Progress in plant growth regulation. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 347-353.

Trần Công Luận (2003) Kết quả nghiên cứu về hóa học sâm Việt Nam. *Hội thảo bảo tồn và phát triển sâm Ngọc Linh tại tỉnh Quảng Nam*: 62-75.

Umehara M, Kamada H (2005) Development of the embryo proper and the suspensor during plant embryogenesis. *Plant Biotechnol*, 22: 253-260.

Vanildo S, Eny SF, Walter H, Migue PG (2004) Effect of plant growth regulators on the cellular growth and levels of intracellular protein, starch and polyamines in embryogenic suspension of *Pinus taeda*. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 76: 53-60.

Victoria NR, Maria AC, Mauro N, Gualtiero L (1984) Stimulation of carrot somatic embryogenesis by proline and serine. *Plant Cell Rep*, 3: 210-214.

Wang Y, Ruenmele B, Chandlee J, Sullivan M, Knapp J, Kausch A (2002) Embryogenic callus induction and plant regeneration media for bent grasses and annual bluegrass. *In Vitro Biol*, 38: 460-467.

Xiang LY, Jung YH, Yong EC (2007) Plant regeneration via direct somatic embryogenesis in *Panax japonicus*. *Plant Biotechnol Rep*, 1: 5-9.

FACTORS EFFECTING SOMATIC EMBRYOGENESIS OF NGOC LINH GINSENG (*PANAX VIETNAMENSIS* HA ET GRUSHV.)

Bui Van The Vinh¹, Vu Thi Thuy¹, Thai Thuong Hien¹, Vu Quoc Luan¹, Nguyen Ba Nam¹, Nguyen Phuc Huy¹, Trinh Thi Huong¹, Vu Thi Hien¹, Le Kim Cuong¹, Ho Thanh Tam¹, Do Manh Cuong¹, Nguyen Viet Cuong¹, Do Khắc Thịnh², Duong Tan Nhut^{1*}

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

²Institute of Agricultural Science for Southern Vietnam, Vietnam Academy of Agricultural Sciences

SUMMARY

Ngoc Linh ginseng (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) is a precious and economic medical herbal of Vietnam. In recent years, with micro-propagation and conservation of this herb tendency, plant regeneration is a necessary problem, in this, research about somatic embryogenesis play an important role. Therefore, this study was conducted for estimating affection of explant sources, mineral component of culture media, type, plant growth regulators, spermidine (polyamine groups), proline (amino acid groups) and carbohydrate sources on somatic embryogenesis of Ngoc Linh ginseng. With three explant sources such as leaf, petiole and main root, leaf explants having 0.5 x 0.5 cm size were cultured on Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with 1.0 mg.l⁻¹ 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), 0.2 mg.l⁻¹ kinetin and 0.5 mg.l⁻¹ naphthaleneacetic acid (NAA) to establish embryogenic culture. The effects of exogenous spermidine and proline on enhancement of somatic embryogenesis were investigated. The results showed that spermidine (0.1 mM) and proline (300 mg.l⁻¹) resulted in a high frequency of somatic embryogenesis (93.3% and 86.7%, respectively). To further optimize a culture medium for induction of embryo formation of *P. vietnamensis*, three carbohydrate sources (sucrose, glucose and fructose) from 10 to 60 g.l⁻¹ were tested. Among them, glucose and fructose were not suitable for somatic embryogenesis in this species while sucrose at 50 g.l⁻¹ produced the highest embryogenic frequency (86.7%) and number of embryos per responding explant (167). This study confirmed the importance of spermidine, proline and osmotic potential provided by sucrose in enhancement of somatic embryogenesis.

Keywords: carbohydrate, *Panax vietnamensis*, proline, somatic embryos, spermidine

* Author for correspondence: Tel: +84-63-3831056; Fax: +84-63-3831028; E-mail: duongtannhut@gmail.com