BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ

TRƯƠNG THỊ LAN ANH

NGHIÊN CỨU QUÁ TRÌNH PHÁT SINH PHÔI SOMA SÂM LANG BIAN (*Panax vietnamensis* var. *langbianensis*)

LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH LÝ HỌC THỰC VẬT

Hà Nội – 2024

BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ

TRƯƠNG THỊ LAN ANH

NGHIÊN CỨU QUÁ TRÌNH PHÁT SINH PHÔI SOMA SÂM LANG BIAN (*Panax vietnamensis* var. *langbianensis*)

LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH LÝ HỌC THỰC VẬT

Mã số: 9.42.01.12

Xác nhận của Học viện Khoa học và Công nghệ

Người hướng dẫn 1

GS.TS. Dương Tấn Nhựt

Người hướng dẫn 2

PGS.TS. Nguyễn Phương Thảo

Hà Nội - 2024

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan luận án "Nghiên cứu quá trình phát sinh phôi soma sâm Lang Bian (*Panax vietnamensis* var. *langbianensis*)" là công trình nghiên cứu của chính mình, được thực hiện dưới sự hướng dẫn khoa học của GS.TS. Dương Tấn Nhựt và PGS.TS. Nguyễn Phương Thảo. Trong luận án, tôi đã sử dụng thông tin tham khảo từ nhiều nguồn khác nhau, và tất cả các thông tin trích dẫn đều được ghi rõ nguồn gốc. Các kết quả nghiên cứu đã được công bố cùng với các tác giả khác đã nhận được sự nhất trí của đồng tác giả trước khi đưa vào luận án. Các số liệu và kết quả được trình bày trong luận án là hoàn toàn trung thực và chưa từng được xuất bản trong bất kỳ công trình nào ngoại trừ các công trình đã được tác giả công bố. Luận án này đã được thực hiện và hoàn thành trong khoảng thời gian tôi làm nghiên cứu sinh tại Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn Lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Hà Nội, ngày tháng năm 2024

Tác giả luận án

(*Ký và ghi rõ tên*)

Trương Thị Lan Anh

LỜI CẢM ƠN

Trong suốt quá trình học tập, nghiên cứu và thực hiện luận án, tôi đã nhận được rất nhiều sự quan tâm giúp đỡ tận tình từ Quý Thầy Cô, gia đình và bạn bè.

Đầu tiên, tôi xin gởi lời cảm ơn trân trọng nhất đến Thầy GS.TS. Dương Tấn Nhựt. Thầy đã tận tình định hướng, hướng dẫn và tạo điều kiện thuận lợi nhất để tôi có thể hoàn thành chương trình học cũng như đề tài nghiên cứu này.

Tôi xin chân thành gửi lời cảm ơn tới Cô PGS.TS. Nguyễn Phương Thảo luôn tận tình giúp đỡ và cho những góp ý quý báu giúp tôi hoàn thành luận án.

Tôi xin chân thành gửi lời cảm ơn tới TS. Hoàng Thanh Tùng luôn tận tình hỗ trợ và đưa ra những góp ý thiết thực giúp tôi hoàn thiện luận án.

Tôi xin gởi lời cảm ơn NCS. Nguyễn Thị Như Mai luôn hỗ trợ tôi trong thời gian khó khăn.

Tôi xin chân thành cảm ơn đến các anh chị và các bạn sinh viên ở Phòng Sinh học Phân tử và Chọn tạo giống cây trồng đã động viên và giúp đỡ tôi trong quá trình học tập và nghiên cứu.

Tôi cũng xin được gửi lời cảm ơn đến Ban lãnh đạo và cán bộ nhân viên của Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên, Trường Đại học Đà Lạt, Khoa Nông lâm đã tạo điều kiện thuận lợi cho tôi trong suốt quá trình học tập và thực hiện luận án.

Cuối cùng, luận án này sẽ không được hoàn thành nếu không có sự cảm thông, động viên của gia đình, người thân và bạn bè, những người luôn ở bên cạnh, giúp đỡ và động viên tôi trong hành trình nghiên cứu khoa học.

Xin gửi lời cảm ơn chân thành nhất!

Hà Nội, ngày tháng năm 2024

Tác giả luận án

(*Ký và ghi rõ tên*)

Trương Thị Lan Anh

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN i
LỜI CẢM ƠN ii
MỤC LỤC iii
DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ VIẾT TẮT viii
DANH MỤC HÌNH ẢNH xii
MỞ ĐẦU 1
Tính cấp thiết của luận án 1
Mục tiêu nghiên cứu 2
Ý nghĩa khoa học 2
Ý nghĩa thực tiễn 2
Đối tượng và phạm vi nghiên cứu của đề tài 3
Đối tượng nghiên cứu 3
Phạm vi nghiên cứu 3
Những đóng góp mới của luận án 3
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU 4
1.1. Tổng quan về chi *Panax* và tình hình nghiên cứu 4
1.1.1. Sơ lược về chi Panax 4
1.1.1.1. Phân loại 4
1.1.1.2. Tình hình nhân giống chi *Panax in vitro* 5
1.1.2. Sâm Ngọc Linh 6
1.1.3. Sâm Lang Bian 9
1.1.3.1. Phân loại 9
1.1.3.2. Đặc điểm thực vật học 10
1.1.3.3. Tình hình khai thác 12
1.1.3.4. Tình hình nhân giống 13
1.2. Nuôi cấy phôi soma 13

1.2.1. Khái niệm 13
1.2.2. Các giai đoạn của quá trình phát sinh phôi soma 14
1.2.3. Sự phát sinh phôi soma thứ cấp 16
1.2.4. Một số yếu tố ảnh hưởng đến sự phát sinh phôi soma 16
1.2.4.1. Loại mẫu cấy 16
1.2.4.2. Dinh dưỡng khoáng 18
1.2.4.3. Chất điều hòa sinh trưởng thực vật 20
1.2.4.4. Một số acid amin và polyamine 24
1.2.4.5. Nước dừa 29
1.2.4.6. Đường 30
1.2.4.7. Stress và sự phát sinh phôi soma 32
1.3. Kỹ thuật nuôi cấy lớp mỏng tế bào (Thin cell layer – TCL) 33
1.3.1. Giới thiệu nuôi cấy lớp mỏng tế bào 33
1.3.2. Đặc điểm của nuôi cấy lớp mỏng tế bào 33
1.3.3. Những nghiên cứu về nuôi cấy lớp mỏng tế bào 36
1.4. Nano bạc trong khử trùng và kích thích sinh trưởng mẫu cấy 37
1.4.1. Hiệu quả của nano bạc trong khử trùng mẫu thực vật 37
1.4.2. Hiệu quả của nano bạc trong sự sinh trưởng và phát triển thực vật 39
CHƯƠNG 2. VẬT LIỆU, NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU 42
2.1. Vật liệu nghiên cứu 42
2.1.1. Vật liệu thực vật 42
2.1.2. Thiết bị, dụng cụ và hóa chất 42
2.2. Nội dung nghiên cứu 43
2.2.1. Nội dung 1: Tạo nguồn mẫu *in vitro* 43
2.2.2. Nội dung 2: Phát sinh phôi soma sơ cấp thông qua nuôi cấy TCL 43
2.2.3. Nội dung 3: Phát sinh phôi soma thứ cấp 43
2.2.4. Nội dung 4: Tạo cây sâm từ phôi soma thứ cấp và xác định hàm lượng saponin tích lũy trong cây sâm Lang Bian *in vitro* 44

2.3. Phương pháp nghiên cứu 44

2.3.1. Cách tiếp cận 44

2.3.2. Phương pháp bố trí thí nghiệm 44

2.3.2.1. Nội dung 1: Tạo nguồn mẫu *in vitro* 44

Thí nghiệm 1: Nghiên cứu ảnh hưởng của AgNPs trong khử trùng bề mặt mẫu thân rễ và sinh trưởng tiếp theo 44

Thí nghiệm 2. Nghiên cứu ảnh hưởng của cytokinin đến sự nhân nhanh chồi *in vitro* 46

2.3.2.2. Nội dung 2: Phát sinh phôi soma sơ cấp thông qua nuôi cấy TCL 46

Thí nghiệm 3: Nghiên cứu ảnh hưởng của auxin đến sự phát sinh phôi soma sơ cấp từ các mẫu L-tTCL hoặc P-lTCL 46

Thí nghiệm 4: Nghiên cứu ảnh hưởng của proline, glutamine hoặc spermidine đến sự phát sinh phôi soma sơ cấp từ các mẫu L-tTCL hoặc P-lTCL 48

2.3.2.3. Nội dung 3: Phát sinh phôi soma thứ cấp 50

Thí nghiệm 5: Nghiên cứu ảnh hưởng của môi trường khoáng đến sự phát sinh phôi soma thứ cấp 50

Thí nghiệm 6: Nghiên cứu ảnh hưởng của hàm lượng đường đến sự phát sinh phôi soma thứ cấp 52

Thí nghiệm 7: Nghiên cứu ảnh hưởng của hàm lượng nước dừa đến sự phát sinh phôi soma thứ cấp 52

2.3.2.4. Nội dung 4: Tạo cây sâm từ phôi soma thứ cấp và xác định hàm lượng saponin tích lũy trong cây sâm Lang Bian *in vitro* 53

Thí nghiệm 8: Tạo cây sâm từ phôi soma thứ cấp và xác định hàm lượng saponin tích lũy trong cây sâm Lang Bian *in vitro* 53

- Xác định hàm lượng một số saponin trong thân rễ và rễ bất định của cây sâm Lang Bian *in vitro* 53

Thí nghiệm 9. Sự sinh trưởng tiếp theo của phôi soma sâm Lang Bian trong môi trường có bổ sung AgNPs 54

2.4. Quan sát hình thái giải phẫu 54

2.5. Điều kiện nuôi cấy 55

2.6. Xử lý số liệu 55
2.7. Địa điểm và thời gian nghiên cứu 55
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN 56
3.1. Nội dung 1: Tạo nguồn mẫu *in vitro* 56
3.1.1. Ảnh hưởng của AgNPs trong khử trùng bề mặt mẫu thân rễ và sinh trưởng tiếp theo 56
3.1.2. Ảnh hưởng của cytokinin đến sự nhân nhanh chồi sâm Lang Bian 60
3.2. Nội dung 2: Phát sinh phôi soma sơ cấp thông qua nuôi cấy TCL 63
3.2.1. Ảnh hưởng của auxin đến sự phát sinh phôi soma sơ cấp từ các mẫu L-tTCL hoặc P-lTCL 63
3.2.1.1. Sự phát sinh phôi soma sơ cấp từ mẫu L-tTCL *in vitro* trong môi trường bổ sung auxin 63
3.2.1.2. Sự phát sinh phôi soma sơ cấp từ mẫu P-lTCL *in vitro* trong môi trường bổ sung auxin 64
3.2.2. Ảnh hưởng của proline, glutamine hoặc spermidine đến sự phát sinh phôi soma sơ cấp từ các mẫu L-tTCL hoặc P-lTCL 70
3.2.2.1. Ảnh hưởng của glutamine, proline hoặc spermidine đến sự phát sinh phôi soma sơ cấp từ mẫu L-tTCL *in vitro* 70
3.2.2.2. Ảnh hưởng của glutamine, proline hoặc spermidine đến sự phát sinh phôi soma sơ cấp từ mẫu P-lTCL *in vitro* 73
3.2.2.3. Ảnh hưởng của glutamine, proline hoặc spermidine đối với hoạt tính của các enzyme chống oxy hóa 79
3.2.2.4. Sự biến động của các hormone nội sinh trong quá trình phát sinh phôi soma 85
3.3. Nội dung 3: Sự phát sinh phôi soma thứ cấp 96
3.3.1. Ảnh hưởng của môi trường khoáng đến sự phát sinh phôi soma thứ cấp 96
3.3.2. Ảnh hưởng của hàm lượng đường đến sự phát sinh phôi soma thứ cấp 99
3.3.3. Ảnh hưởng của hàm lượng nước dừa đến sự phát sinh phôi soma thứ cấp 102

3.4. Nội dung 4: Tạo cây sâm từ phôi soma thứ cấp và xác định hàm lượng saponin tích lũy trong cây sâm Lang Bian *in vitro* 105

3.4.1. Tạo cây sâm từ phôi soma thứ cấp 105

3.4.2. Xác định hàm lượng một số saponin trong thân rễ và rễ bất định của cây sâm Lang Bian *in vitro* 107

3.4.3. Sự sinh trưởng tiếp theo của phôi soma sâm Lang Bian trong môi trường có bổ sung AgNPs 110

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....113

DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ.....115

TÀI LIỆU THAM KHẢO.....116

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ VIẾT TẮT

2,4-D	2,4–Dichlorophenoxyacetic acid acid
2iP	N6–(2-isopentenyl)–adenine
ABA	Abscisic acid
ADC	Arginine decarboxylase
AgNPs	Silver nanoparticles (Các hạt nano bạc)
APX	Ascorbate peroxidase
ATP	Adenosine triphosphate
B5	Môi trường Gamborge B5 (1968)
BA	6-Benzyladenine
BSAA	3-benzo selenenyl acetic acid
BZ	Benzyl adenine & zeatin
$Ca(OCl)_2$	Calcium hypochlorite
CAT	Catalase
CKs	Cytokinins
GA_3	Gibberellic acid A_3
GCF	Hệ số hiệu chỉnh tăng trưởng
G-Rb1	Ginsenoside Rb1
G-Rg1	Ginsenoside Rg1
IAA	Indole–3–acetic acid
IBA	Indole butyric acid
LEA protein	Late embryogenesis abundant protein
LED	Light-emitting diode
lTCL	Longitudinal thin cell layer (Lớp mỏng tế bào cắt dọc)
L-tTCL	Leaf cut transverse thin cell layer (Mẫu lá cắt lớp mỏng tế bào theo chiều ngang)
MEL	Melatonin (N–acetyl–5–methoxytryptamine)
M-Rd	Majonoside–Rd
MS	Môi trường Murashige và Skoog (1962)

mT	Meta–topolin
NAA	Naphthalene acetic acid
PA	Polyamine
PGRs	Plant growth regulators (Các chất điều hòa sinh trưởng thực vật)
P-lTCL	Petiole cut longitudinal thin cell layer (Mẫu cuống lá cắt lớp mỏng tế bào theo chiều dọc)
PSM	Phôi soma
Put	Putrescine
ROS	Reactive oxygen species
R-tTCL	Rhizome cut transverse thin cell layer (Mẫu thân rễ cắt lớp mỏng tế bào theo chiều ngang)
SA	Salicylic acid
SH	Môi trường Schenk và Hildebrandt (1972)
SOD	Superoxide dismutase
Spd	Spermidine
Spm	Spermine
STT	Số thứ tự
TCL	Thin cell layer (Lớp mỏng tế bào)
TDZ	Thidiazuron
TIBA	2,3,5-Triiodobenzoic acid
tTCL	Transverse thin cell layer (Lớp mỏng tế bào cắt ngang)
UHPLC	Ultra high-performance liquid chromatography (Sắc ký lỏng siêu hiệu năng)
UV	Ultraviolet (Tia cực tím)
WPM	Môi trường Woody plant medium
ZEA	Trans-zeatin

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1. Các loài và dưới loài thuộc chi sâm.....4

Bảng 1.2. Lịch sử nuôi cấy sâm *in vitro* 6

Bảng 1.3. Những nghiên cứu về mối quan hệ phát sinh loài, hoạt chất và nuôi cấy sâm Ngọc Linh *in vitro*. 7

Bảng 1.4. Dự kiến diện tích phát triển sâm Việt Nam đến năm 2030 12

Bảng 1.5. Nuôi cấy phôi soma sâm từ các nguồn mẫu cấy khác nhau 18

Bảng 1.6. Vai trò của polyamine trong nuôi cấy *in vitro*.....27

Bảng 1.7. Ảnh hưởng của hàm lượng đường sucrose lên sự phát sinh hình thái của mẫu 31

Bảng 1.8. Sự phát sinh phôi soma ở một số thực vật sử dụng kỹ thuật nuôi cấy lớp mỏng tế bào 36

Bảng 3.1. Ảnh hưởng của AgNPs đến khả năng khử trùng bề mặt và cảm ứng tạo mô sẹo của mẫu thân rễ sâm Lang Bian sau 8 tuần nuôi cấy.....56

Bảng 3.2. Sự nhân nhanh chồi sâm Lang Bian *in vitro* trong môi trường có bổ sung BA hoặc kinetin ở các nồng độ khác nhau sau 12 tuần nuôi cấy.....62

Bảng 3.3. So sánh hiệu quả phát sinh phôi soma sơ cấp và phát sinh hình thái khác từ mẫu L-tTCL trong môi trường có bổ sung auxin sau 12 tuần nuôi cấy.....66

Bảng 3.4. So sánh hiệu quả phát sinh phôi soma sơ cấp và phát sinh hình thái khác từ mẫu P-lTCL trong môi trường có bổ sung auxin sau 12 tuần nuôi cấy.....67

Bảng 3.5. Hệ số hiệu chỉnh tăng trưởng (GCF) của các mẫu L-tTCL và P-lTCL trong môi trường bổ sung auxin sau 12 tuần nuôi cấy 68

Bảng 3.6. So sánh hiệu quả phát sinh phôi soma sơ cấp từ mẫu cấy L-tTCL nuôi cấy trong môi trường có bổ sung glutamine, proline hoặc spermidine sau 12 tuần nuôi cấy 72

Bảng 3.7. So sánh hiệu quả phát sinh phôi soma sơ cấp từ mẫu cấy P-lTCL nuôi cấy trong môi trường có bổ sung glutamine, proline hoặc spermidine sau 12 tuần nuôi cấy 74

Bảng 3.8. Ảnh hưởng của glutamine, proline hoặc spermidine đến hoạt tính SOD, CAT và APX trong mẫu L-tTCL sau 12 tuần nuôi cấy 80

Bảng 3.9. Ảnh hưởng của glutamine, proline hoặc spermidine đến hoạt tính SOD, CAT và APX trong mẫu cấy P-lTCL sau 12 tuần nuôi cấy.....81

Bảng 3.10. Ảnh hưởng của môi trường khoáng đến sự phát sinh phôi soma thứ cấp sau 12 tuần nuôi cấy.....98

Bảng 3.11. Ảnh hưởng của hàm lượng đường đến sự phát sinh phôi soma thứ cấp sau 12 tuần nuôi cấy 100

Bảng 3.12. Ảnh hưởng của hàm lượng nước dừa đến sự phát sinh phôi soma thứ cấp sau 12 tuần nuôi cấy.....103

Bảng 3.13. Sự hình thành thân rễ và rễ bất định của cây con có nguồn gốc từ phôi soma thứ cấp và chồi bất định sau 20 tuần nuôi cấy.....106

Bảng 3.14. Hàm lượng saponin trong thân rễ và rễ bất định sâm Lang Bian 20 tuần tuổi.....107

Bảng 3.15. Sự sinh trưởng tiếp theo của phôi soma thứ cấp sâm Lang Bian trong môi trường có bổ sung nano bạc sau 20 tuần nuôi cấy …… 110

DANH MỤC HÌNH ẢNH

Hình 1.1. Đặc điểm hình thái của sâm Lang Bian 11

Hình 1.2. Mẫu cấy tTCL hoặc lTCL từ mẫu đốt thân. 34

Hình 1.3. Mẫu lá tTCL 35

Hình 2.1. Sơ đồ thí nghiệm nghiên cứu tác động của AgNPs trong khử trùng bề mặt mẫu thân rễ và sinh trưởng tiếp theo 45

Hình 2.2. Sơ đồ thí nghiệm ảnh hưởng của auxin/proline/glutamine hoặc spermidine đến sự phát sinh phôi soma sơ cấp từ các mẫu L-tTCL hoặc P-lTCL 50

Hình 2.3. Sơ đồ thí nghiệm phát sinh phôi soma thứ cấp 51

Hình 2.4. Sơ đồ thí nghiệm tạo cây sâm Lang Bian *in vitro* từ phôi soma thứ cấp và tích lũy saponin 54

Hình 3.1. Ảnh hưởng của AgNPs đến sự tái sinh chồi (A) và số chồi (B) từ mẫu cấy thân rễ sâm Lang Bian sau 12 tuần nuôi cấy.....57

Hình 3.2. Hình thái mô sẹo sau 8 tuần nuôi cấy (A) và chồi *in vitro* sau 12 tuần nuôi cấy (B) hình thành từ mẫu cấy thân rễ sâm Lang Bian sau khi khử trùng bằng AgNPs. 60

Hình 3.3. Hình thái của chồi *in vitro* sâm Lang Bian hình thành trong môi trường SH không bổ sung BA hoặc kinetin (mẫu đối chứng. A), có bổ sung 1,0 mg/L BA (B) hoặc 1,5 mg/L kinetin (C) sau 12 tuần nuôi cấy. 62

Hình 3.4. Quan sát hình thái và giải phẫu trong quá trình phát sinh phôi soma sơ cấp sâm Lang Bian.....64

Hình 3.5. Sự phát sinh phôi soma sơ cấp từ mẫu L-tTCL sâm Lang Bian sau 12 tuần nuôi cấy trên các môi trường khác nhau 73

Hình 3.6. Sự phát sinh phôi soma sơ cấp từ mẫu P-lTCL sâm Lang Bian sau 12 tuần nuôi cấy trên các môi trường khác nhau 75

Hình 3.7. Các giai đoạn phát triển trong quá trình phát sinh phôi soma sơ cấp sâm Lang Bian 75

Hình 3.8. Hệ số hiệu chỉnh tăng trưởng (GCF) của mẫu L-tTCL và P-lTCL nuôi cấy trên môi trường bổ sung glutamine, proline hoặc spermidine sau 12 tuần nuôi cấy 77

Hình 3.9. Sự biến động hàm lượng auxin (IAA) và MEL trong quá trình phát sinh phôi soma sơ cấp sâm Lang Bian. 86

Hình 3.10. Sự biến động hàm lượng cytokinin trong quá trình phát sinh phôi soma sơ cấp sâm Lang Bian.. 86

Hình 3.11. Sự biến động hàm lượng acid gibberellic và acid abscisic trong quá trình phát sinh phôi soma sơ cấp sâm Lang Bian.. 87

Hình 3.12. Sự biến động hàm lượng acid abscisic và acid salycilic trong quá trình phát sinh phôi soma sơ cấp sâm Lang Bian. 88

Hình 3.13. Tỷ lệ hormone nội sinh của mẫu ở các giai đoạn khác nhau của quá trình phát sinh phôi soma sơ cấp sâm Lang Bian 95

Hình 3.14. Sự phát sinh phôi soma thứ cấp sâm Lang Bian.. 99

Hình 3.15. Ảnh hưởng của hàm lượng đường đến sự phát sinh phôi soma thứ cấp ở các giai đoạn khác nhau sau 12 tuần nuôi cấy 102

Hình 3.16. Ảnh hưởng của hàm lượng nước dừa đến sự phát sinh phôi soma thứ cấp ở các giai đoạn khác nhau sau 12 tuần nuôi cấy 104

Hình 3.17. Sắc ký đồ HPLC thể hiện hàm lượng ginsenoside trong rễ bất định (A) và thân rễ (B) sâm Lang Bian *in vitro*.....108

Hình 3.18. Sự hình thành thân rễ của cây con có nguồn gốc từ phôi soma thứ cấp sau 20 tuần nuôi cấy. 109

Hình 3.19. Hình thái cây con có nguồn gốc từ phôi soma nuôi cấy trong môi trường không bổ sung (Đối chứng) hoặc có bổ sung 1,2 mg/L AgNPs sau 20 tuần nuôi cấy. 111

Hình 3.20. Sơ đồ quá trình nuôi cấy phôi soma sâm Lang Bian *in vitro*.....112

MỞ ĐẦU

Tính cấp thiết của luận án

Chi sâm (*Panax*) là một trong những chi thực vật làm thuốc đông dược quan trọng, nhờ có các loại ginsenoside với nhiều hoạt tính sinh học và giá trị dược dụng cao, có tác dụng như làm giảm bớt stress và mệt mỏi, ngăn ngừa lão hóa và tăng cường sinh lực [1]. Hiện nay, Chi sâm có khoảng 20 loài và dưới loài, phân bố ở Đông Á, vùng Himalaya, Đông Nam Á và Bắc Mỹ [1-4].

Hiện nay, việc chăm sóc sức khỏe bằng cách sử dụng các dạng thực phẩm có nguồn gốc thảo dược rất được quan tâm. Tuy nhiên, nguồn dược liệu quý này ngoài tự nhiên rất ít, bởi lạm dụng khai thác quá mức dẫn đến bị đe dọa, và rất nhiều trong số đó mất dần khu phân bố, dẫn đến sẽ bị tuyệt chủng trong tương lai không xa. Ngoài ra, việc nhân giống các cây dược liệu ngoài tự nhiên mất rất nhiều thời gian và phụ thuộc vào các điều kiện tự nhiên, do đó không ổn định về mặt số lượng [5]. Vì vậy, cần phải tìm ra một giải pháp về công tác nhân giống nhanh chóng, tạo ra số lượng lớn, và hiệu quả loại cho những loài dược liệu quý.

Vi nhân giống, trong đó nuôi cấy phôi soma là phương pháp được sử dụng thay thế phương thức nhân giống truyền thống vốn còn nhiều hạn chế vì chúng cung cấp một số lượng cây giống lớn trong thời gian ngắn mà vẫn giữ được những đặc tính tốt từ cây mẹ [6]. Phương pháp này đã thực hiện rất thành công trên một số loài thuộc chi *Panax*, như: *Panax ginseng* [7], *Panax notoginseng* [8], *Panax quinquefolius* [8], *Panax japonicus* [9], *Panax vietnamensis* [10]. Hiệu quả của quá trình nuôi cấy phôi soma phụ thuộc vào nhiều yếu tố như khử trùng mẫu cấy, loại mẫu, đối tượng thực vật, môi trường và điều kiện nuôi mẫu [11]. Ngoài ra, phôi soma sơ cấp tiếp tục được gia tăng sinh khối thông qua các chu kỳ hình thành phôi soma thứ cấp lặp lại, từ đó nâng cao hiệu quả của quá trình vi nhân giống [12, 13]. Bên cạnh đó, cây con được chuyển từ điều kiện *in vitro* ra *ex vitro* có tỷ lệ sống sót rất thấp do chúng có hệ rễ phát triển kém. Một số kết quả đạt được từ nghiên cứu hình thành các thân rễ *in vitro* đã giúp cây thích nghi ở giai đoạn vườn ươm: *P. vietnamensis* [10], *P. ginseng* và *P. quinquefolius* [14] và *P. ginseng* [15].

Ở Việt Nam, sâm Lang Bian (*Panax vietnamensis* var. *langbianensis*) là một thứ mới được phát hiện và công bố năm 2016 [16], chỉ có phân bố ở vùng núi Langbiang thuộc huyện Lạc Dương và Hòn Nga (Đam Rông), tỉnh Lâm Đồng Sâm Lang Bian có kích thước quần thể nhỏ, số lượng cá thể ít và phân bố rải rác, đa dạng di truyền giảm. Nguyên nhân là do việc khai thác triệt để của người dân bản địa dùng

làm thuốc và thương mại hóa [17]. Do đó, việc bảo tồn và phát triển loài thực vật có giá trị và quý hiếm này cần được triển khai. Từ khi được phát hiện cho đến nay, chưa có tài liệu nào ghi nhận về việc thực hiện vi nhân giống sâm Lang Bian. Xuất phát từ những vấn đề trên, đề tài **Nghiên cứu quá trình phát sinh phôi soma sâm Lang Bian (*Panax vietnamensis* var. *langbianensis*)** được thực hiện thông qua việc nghiên cứu các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình phát sinh phôi soma cũng như sinh trưởng tiếp theo, và từ đó góp phần vi nhân giống sâm Lang Bian phục vụ cho công tác gây trồng, bảo tồn và phát triển.

Mục tiêu nghiên cứu

- Tạo được nguồn mẫu *in vitro* ban đầu làm nguồn vật liệu cho những nghiên cứu phát sinh phôi soma.

- Phát sinh và nhân nhanh phôi soma sơ cấp từ các mẫu cấy lớp mỏng.

- Phát sinh và nhân nhanh phôi soma thứ cấp từ nguồn phôi soma sơ cấp.

- Tạo được thân rễ sâm Lang Bian *in vitro* có tích lũy saponin.

Ý nghĩa khoa học

Sâm Lang Bian (*Panax vietnamensis* var. *langbianensis*) là một thứ mới được phát hiện và công bố vào năm 2016 với số lượng nhỏ chỉ khoảng 100 – 200 cá thể, mọc rải rác dưới tán rừng lá rộng thường xanh. Nên việc nghiên cứu để bảo tồn và phát triển sâm Lang Bian là cần thiết, có ý nghĩa khoa học.

Kết quả của luận án đánh giá được ảnh hưởng của một số yếu tố đến quá trình phát sinh phôi soma sơ cấp sâm Lang Bian thông qua kỹ thuật nuôi cấy lớp mỏng TCL, đồng thời, cung cấp thông tin về môi trường dinh dưỡng ảnh hưởng đến quá trình phát sinh và tăng sinh phôi soma thứ cấp, từ đó tạo được cây con hoàn chỉnh có sự hình thành thân rễ *in vitro*. Kết quả của luận án là dẫn liệu tham khảo có giá trị trong nghiên cứu về các loài sâm Việt Nam nói chung và giảng dạy lĩnh vực Sinh lý học thực vật.

Ý nghĩa thực tiễn

Các kết quả của luận án có thể được sử dụng để điều chỉnh quá trình phát sinh phôi soma sơ cấp và thứ cấp một cách có hiệu quả, phục vụ công tác xây dựng quy trình nhân giống Sâm Lang Bian *in vitro* thông qua phát sinh phôi soma, góp phần cung cấp nguồn cây giống đủ lớn phục vụ cho công tác bảo tồn và phát triển đối tượng sâm đặc hữu và quý hiếm này tại Lâm Đồng.

Đối tượng và phạm vi nghiên cứu của đề tài

Đối tượng nghiên cứu

Cây sâm Lang Bian đặc hữu tại Lâm Đồng:

- Thân rễ cây sâm Lang Bian thu thập ngoài tự nhiên để tạo nguồn mẫu ban đầu.

- Các mẫu lá và cuống lá của cây sâm Lang Bian *in vitro* được sử dụng để nghiên cứu sự phát sinh phôi soma sơ cấp nuôi cấy trong điều kiện *in vitro*.

Phạm vi nghiên cứu

Đề tài tập trung nghiên cứu ảnh hưởng của một số yếu tố đến quá trình phát sinh và tăng sinh phôi soma sơ cấp, thứ cấp và tạo cây con hoàn chỉnh với sự hình thành thân rễ sâm Lang Bian trong điều kiện nuôi cấy *in vitro.*

Những đóng góp mới của luận án

Đề tài đã sử dụng AgNPs khử trùng mẫu thân rễ sâm Lang Bian và nhân nhanh chồi sử dụng môi trường bổ sung BA để tạo nguồn mẫu ban đầu cho nghiên cứu quá trình phát sinh phôi soma sâm Lang Bian *in vitro*.

Đề tài đánh giá được một số yếu tố tác động đến quá trình phát sinh phôi soma sơ cấp từ mẫu cấy lớp mỏng lá L-tTCL và cuống lá P-lTCL *in vitro*. Đồng thời, đánh giá được vai trò của một số yếu tố môi trường đến sự phát sinh phôi soma thứ cấp.

Đề tài đã tạo được cây con có nguồn gốc từ phôi soma thứ cấp với sự hình thành thân rễ *in vitro* có tích lũy saponin, từ đó, có thể chủ động được nguồn cây giống phục vụ cho công tác bảo tồn và phát triển.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. Tổng quan về chi *Panax* và tình hình nghiên cứu

1.1.1. Sơ lược về chi Panax

1.1.1.1. Phân loại

Chi sâm *(Panax*) được xếp vào hàng dược liệu có giá trị dược lý và giá trị kinh tế cao. Chi sâm, thuộc họ Araliaceae, phân bố ở một số khu vực trên thế giới từ Đông Á (bao gồm Hàn Quốc, Trung Quốc và Nhật Bản) đến Bắc Mỹ (bao gồm Mỹ, Canada). Hiện nay, chi sâm có khoảng 20 loài và dưới loài, phân bố rộng rãi ở Đông Á, vùng Himalaya, Đông Nam Á và Bắc Mỹ (Bảng 1.1) [1-4], trong đó có 5 loài: *P. ginseng*, *P. japonicus*, *P. notoginseng*, *P. quinquefolius* và *P. vietnamensis* thường được xem như các loại dược thảo quý.

Bảng 1.1. Các loài và dưới loài thuộc chi sâm [1-4]

STT	Tên khoa học	Phân loại	Tên thông thường	Khu vực phân bố
1	*P. assamicus*	Loài	–	Ấn Độ
2	*P. bipinnatifidus*	Loài	Sâm vũ diệp	Ấn Độ, Trung Quốc, Myanmar, Nepal, Thái Lan, Tây Tạng và Tây Himalaya
3	*P. bipinnatifidus* var. *angustifolius*	Thứ	–	Ấn Độ, Trung Quốc, Nepal, Thái Lan, Tây Tạng và Himalaya
4	*P. bipinnatifidus* var. *bipinnatifidus*	Thứ		Trung Quốc, Himalaya, Myanmar, Nepal và Thái Lan
5	*P. ginseng*	Loài	Sâm Hàn Quốc, Nhân sâm	Trung Quốc, Nga, Hàn Quốc
6	*P. japonicus*	Loài	Sâm Nhật	Trung Quốc, Nhật Bản, Nepal, Bhutan, Himalaya, Ấn Độ, Pakistan

7	*P. notoginseng*	Loài	Tam thất	Trung Quốc, Việt Nam
8	*P. pseudoginseng*	Loài	Giả nhân sâm	Nepal, Trung Quốc
9	*P. quinquefolius*	Loài	Sâm Mỹ	Canada, Mỹ, Trung Quốc
10	*P. siamensis*	Loài	–	Thái Lan
11	P. sinensis	Loài	–	Himalaya
12	*P. sokpayensis*	Loài	–	Himalaya
13	*P. stipuleanatus*	Loài	Tam thất hoang	Trung Quốc, Việt Nam
14	*P. trifolius*	Loài	Sâm ba lá	Mỹ, Canada, Đức
15	*P. variabilis*	Loài	–	Ấn Độ, Trung Quốc
16	*P. vietnamensis*	Loài	Sâm Ngọc Linh	Việt Nam
17	*P. vietnamensis* var. *fuscidiscus*	Thứ	Sâm Lai Châu	Việt Nam, Trung Quốc
18	*P. vietnamensis* var. *langbianensis*	Thứ	Sâm Lang Bian	Việt Nam
19	*P. wangianus*	Loài	Sâm lá hẹp	Trung Quốc
20	*P. zingiberensis*	Loài	Sâm gừng	Việt Nam, Trung Quốc, Nepal, Bhutan, Myanmar

Ghi chú: *"– " không được đề cập*

P. ginseng phân bố ở vùng Đông Bắc Á như Hàn Quốc, Trung Quốc, Nga nên thường được gọi là sâm phương Đông (Oriental ginseng); *P. quinquefolius* được tìm thấy chủ yếu ở Bắc Mỹ (Sâm Mỹ); *P. japonicus* và *P. notoginseng* là loài sâm của Nhật Bản và Trung Quốc; *P. vietnamensis* thường gọi là sâm của Việt Nam hay sâm Ngọc Linh. Chúng có chứa hợp chất saponin có tác dụng phòng ngừa nhiều loại bệnh khác nhau như kích hoạt hệ miễn dịch, chống lão hóa, điều chỉnh lượng đường huyết, giảm stress và bảo vệ gan, thận [18].

1.1.1.2. Tình hình nhân giống chi *Panax in vitro*

Sâm có thể được khai thác trong tự nhiên hoặc từ trồng trọt. Tuy nhiên, việc khai thác quá mức đã làm số lượng các loài sâm trong tự nhiên ngày càng giảm. Đồng thời, thời gian canh tác kéo dài dẫn đến cây sâm trồng dễ bị nhiễm bệnh, diện tích đất

canh tác bị hạn chế và chi phí cho công lao động cao đã cản trở người trồng sâm đáp ứng nhu cầu ngày càng gia tăng [19]. Chính vì những lý do này, sâm ngày càng khan hiếm và đắt đỏ hơn. Để khắc phục những vấn đề trên, phương pháp nhân giống *in vitro* đã được nghiên cứu và ứng dụng để tạo ra nguồn cây giống và các hoạt chất sinh học mà không gây tổn hại nguồn sâm trong tự nhiên (Bảng 1.2).

Bảng 1.2. Lịch sử nuôi cấy sâm *in vitro* [4]

Thời gian	Nghiên cứu về chi sâm
1967	Butenko tìm ra phương pháp khử trùng mẫu và nuôi cấy *P. ginseng in vitro*
1967-1968	Butenko và cộng sự nuôi cấy mô *P. japonicas, P. quinquefolius* và *P. pseudoginseng*
1968	Slepyan nuôi cấy mô sẹo từ mẫu rễ sâm
1969	Kitra và Sunggi nghiên cứu được môi trường phù hợp nuôi cấy *P. ginseng*
1971	Lee đã có báo cáo nghiên cứu nuôi cấy *P. ginseng* tại Hàn Quốc lần đầu tiên
1988	Nghiên cứu nuôi cấy mô sâm được tiếp tục thực hiện; từ năm 1988, công ty Nitto Denko đã nuôi cấy huyền phù tế bào với quy mô lớn và bán thực phẩm chức năng có chứa sâm ở Nhật Bản
1990	Choi và cộng sự nuôi cấy phôi soma, thuần hóa và trồng cây con có nguồn gốc từ phôi soma trong nhà kính thành công
2000 đến nay	Nuôi cấy mô sẹo, huyền phù tế bào, phôi soma, rễ bất định, rễ tơ nhằm thu nhận hoạt chất thứ cấp

1.1.2. Sâm Ngọc Linh

Sâm Ngọc Linh (*P. vietnamensis* Ha *et* Grushv.) là loài dược liệu quí hiếm có giá trị rất cao. Chúng có tác dụng như: hỗ trợ hệ thần kinh trung ương, tăng khả năng tập trung và cải thiện trí nhớ, giải độc và bảo vệ chức năng gan, giảm cholesterol máu, kích thích miễn dịch, thúc đẩy quá trình trao đổi chất, giải phóng đường và mỡ trong máu, có tính kháng u và hỗ trợ điều trị ung thư [20].

Từ khi được phát hiện và định danh cho đến nay, các nghiên cứu về sâm Ngọc Linh hướng vào việc xác định quan hệ phát sinh loài, dược chất [21], [22]; nuôi cấy tế bào [23-27] , rễ tơ [28-30], rễ bất định [31-33]và nhân giống *in vitro* [10, 34-36]. Trong nuôi cấy *in vitro*, việc lựa chọn môi trường và điều kiện nuôi cấy thích hợp được tập trung nghiên cứu (Bảng 1.3). Hàm lượng saponin của Sâm Ngọc Linh tập trung ở trong thân rễ, chủ yếu saponin triterpen khung dammaran và chỉ chứa một ít

saponin có genin là acid oleanolic. Thành phần saponin của sâm Ngọc Linh tự nhiên rất giống với nhân sâm, sâm Mỹ và tam thất.

Bảng 1.3. Những nghiên cứu về mối quan hệ phát sinh loài, hoạt chất và nuôi cấy sâm Ngọc Linh *in vitro*.

STT	Những nghiên cứu giá trị dược liệu và nuôi cấy sâm Ngọc Linh *in vitro*	Nguồn
Xác định mối quan hệ phát sinh loài và dược chất		
1	Sâm Việt Nam: Mối quan hệ phát sinh loài, hoạt chất và dược lý	[21]
2	Một số saponin trong sâm Việt Nam	[22]
Nuôi cấy tế bào		
3	Sự gia tăng sinh khối huyền phù tế bào khi bổ sung PGRs và dịch chiết hữu cơ	[23]
4	Nuôi cấy huyền phù tế bào trong bioreactor	[24]
5	Nghiên cứu yếu tố môi trường trong nuôi cấy huyền phù tế bào và tích lũy ginsenoside	[25]
6	Thời gian và số lần cấy chuyền trong nuôi cấy tế bào và sự tích lũy hoạt chất	[26]
7	Ảnh hưởng của yếu tố khoáng đến tích lũy sinh khối và ginsenoside trong nuôi cấy huyền phù tế bào	[27]
Nuôi cấy rễ tơ		
8	Nuôi cấy rễ tơ sâm Ngọc Linh, một phương pháp đầy hứa hẹn để sản xuất ginsenoside dạng ocotillol	[28]
9	Nuôi cấy rễ tơ sử dụng phương pháp chuyển gen bằng vi khuẩn	[29]
10	Hiệu quả tái sinh cây con chuyển gen từ rễ tơ theo con đường phát sinh phôi soma và nâng cao chất lượng cây con (sử dụng môi trường bổ sung nano sắt)	[30]
Nuôi cấy rễ bất định		
11	Phát sinh rễ bất định từ mẫu cấy lá: Tối ưu hóa môi trường và điều kiện nuôi cấy	[31]
12	Hàm lượng đường và mật độ mẫu cấy tác động đến sự sinh trưởng rễ bất định và bước đầu nuôi cấy trong bioreactor	[32]
13	Cải thiện sự tích lũy saponin trong nuôi cấy rễ bất định theo từng giai đoạn nuôi cấy và sử dụng elicitor	[33]
Nhân giống vô tính *in vitro* theo con đường tái sinh chồi và phát sinh phôi soma		

14	Hiệu quả của nano bạc trong nhân giống sâm Ngọc Linh – một cây thuốc quý	[10]
15	Hiệu quả tái sinh và nhân nhanh chồi từ mô sẹo có nguồn gốc từ mẫu lá ex vitro	[34]
16	LED và tiềm năng trong tăng trưởng mô sẹo, phát sinh phôi soma, sinh trưởng cây con và tích lũy saponin	[35]
17	Vi nhân giống sâm Ngọc Linh	[37]
18	Sự phát sinh phôi soma từ một số nguồn mẫu *in vitro* (thân rễ, lá và cuống lá)	[38]
19	Cảm ứng tạo mô sẹo có khả năng sinh phôi và phôi soma	[39]
20	Sự phát sinh phôi soma từ mô sẹo cảm ứng từ mẫu lá TCL	[40]
21	LEDs và tiềm năng trong nuôi cấy phôi soma	[41]
22	Tứ bội hóa phôi soma sâm Ngọc Linh bằng xử lý colchicine	[36]

Sâm Ngọc Linh có 52 hợp chất saponin gồm 26 saponin có cấu trúc tương đồng với các loài sâm khác, ngoài còn có cấu trúc của 26 saponin (25 vina ginsenosid R1-R25 (VG-R1-R25) và 20-O-Me-GRh1). Đặc biệt, saponin dammaran gọi chung là ginsenoside chiếm tới 50/52 saponin được phân lập, đây là những hoạt chất quyết định giá trị của sâm. Mặt khác, sâm Ngọc Linh cũng có một hàm lượng saponin lớn có cấu trúc ocotillol, đặc biệt là majonoside-R2 (hơn 5%), chiếm gần 1/2 lượng saponin toàn phần. Và chính sự có mặt các loại saponin này tạo ra những tác dụng sinh học chuyên biệt cho sâm Ngọc Linh so với các loài sâm khác. Majonosid-R2 có tác dụng chống stress, kích thích hoạt động thần kinh và trí nhớ khi sử dụng ở liều thấp, chống trầm cảm, tăng cường sinh lực, chống oxy hóa, tăng cường sức đề kháng, tác dụng phục hồi máu, tăng cường nội tiết tố sinh dục, điều hòa hoạt động của tim, tác dụng chống tăng cholesterol máu, tác dụng bảo vệ gan khỏi các yếu tố gây độc. Đặc biệt, MR2 trong sâm có tiềm năng trong việc phòng ngừa ung thư [21], làm giảm mức độ hoạt hóa của men gan sGPT và sGOT trong mô hình tổn thương gan của chuột, do đó có thể bảo vệ tế bào gan ở chuột [42].

Môi trường tốt nhất cho sự nhân nhanh mô sẹo là SH bổ sung 1,0 mg/L acid 2,4-Dichlorophenoxyacetic (2,4-D) và 0,2 mg/L Thidiazuron (TDZ); mẫu được nuôi ở nhiệt độ 25 ± 2°C, quang chu kỳ 10 giờ, chiếu sáng bằng đèn huỳnh quang (2500 – 3000 lux) [34]. Các chất hữu cơ và chất điều hòa sinh trưởng thực vật (PGRs) bổ sung đã làm tăng đáng kể sự tích lũy sinh khối của sâm Ngọc Linh và sinh khối được tích lũy lớn nhất ở nghiệm thức môi trường MS chứa 2,0 mg/L kinetin trong thời gian 24 ngày (mẫu được duy trì trong tối, nhiệt độ 25 ± 2°C). Bên cạnh đó, điều kiện chiếu

sáng liên tục có thể cải thiện sinh khối của mẫu [23]. Đặc biệt, trong nuôi cấy sâm Ngọc Linh *in vitro* cho hàm lượng majonoside R_2 (MR_2) tích lũy là cao nhất khi sử dụng đèn LED với tỷ lệ chiếu sáng là 20% đỏ : 80% xanh [35]. Khả năng nhân nhanh sinh khối và tích lũy ginsenosides, đặc biệt là saponin ocotilloltype ở rễ tơ của sâm Ngọc Linh cũng được báo cáo [28]. Ngoài ra, sự sinh trưởng của rễ và hàm lượng một số saponin (MR2, Rb1, và Rg1) cao nhất ở môi trường MS cải tiến [43] bổ sung 7 mg/L acid indole butyric (IBA) và 0,5 mg/L 6-benzyladenine (BA), các mẫu được nuôi cấy lỏng (tốc độ lắc 100 vòng/phút) và duy trì trong tối với nhiệt độ 25 ± 2 °C [31].

Trong nghiên cứu nuôi cấy phôi soma sâm Ngọc Linh phát sinh từ mô sẹo có nguồn gốc từ mẫu cấy tTCL, mẫu tTCL tạo mô sẹo khi nuôi trong môi trường MS có bổ sung 1,0 mg/L 2,4-D và 0,1 mg/L TDZ. Tỷ lệ mẫu phát sinh phôi soma (53,3%) và số phôi soma (35 phôi/mẫu) được tạo thành cao nhất khi nuôi cấy mô sẹo trong môi trường MS bổ sung 1,0 mg/L 2,4-D, 0,5 mg/L acid naphthalene acetic (NAA) và 0,2 mg/L TDZ [40]. Ngoài ra, cây con có nguồn gốc từ phôi soma hình thành thân rễ *in vitro* trong môi trường có bổ sung 1,2 mg/L AgNPs và có tỷ lệ sống sót cao khi chuyển ra trồng trong vườn ươm [10].

1.1.3. Sâm Lang Bian

1.1.3.1. Phân loại

Giới (regnum)	Plantae
Ngành (division)	Magnoliophyta
Lớp (class)	Magnoliopsida
Bộ (ordo)	Apiales
Họ (familia)	Araliaceae
Chi (genus)	*Panax*
Loài (species)	*Panax vietnamensis*
Thứ (variety)	*Panax vietnamensis* var. *langbianensis*

Sâm Lang Bian phân bố ở vùng núi Langbiang và Hòn Nga ở độ cao 1.879 - 1.900 m so với mực nước biển, dưới tán rừng lá rộng thường xanh ít bị tác động, chủ

yếu sườn dốc thoát nước, sương mù nhiều. Hiện nay, sâm Lang Bian mọc rải rác theo từng nhóm nhỏ, số lượng khoảng 100 – 200 cá thể [44].

1.1.3.2. Đặc điểm thực vật học

Sâm Lang Bian thuộc chi *Panax*, họ Araliaceae, ngoài ra, do thân rễ có dạng đốt, nên sâm Lang Bian rất gần với *P. vietnamensis và P. vietnamensis* var. *fuscidiscus*.

Kết hợp nghiên cứu về quan hệ phát sinh chủng loại dựa trên các trình tự DNA bảo tồn với các dữ liệu về so sánh hình thái, cho phép khẳng định sâm Lang Bian là một thứ mới của loài *P. vietnamensis*, và được đặt tên là *Panax vietnamensis* var. *langbianensis*, tên tiếng Việt đề xuất sâm Lang Bian.

Mô tả cây:

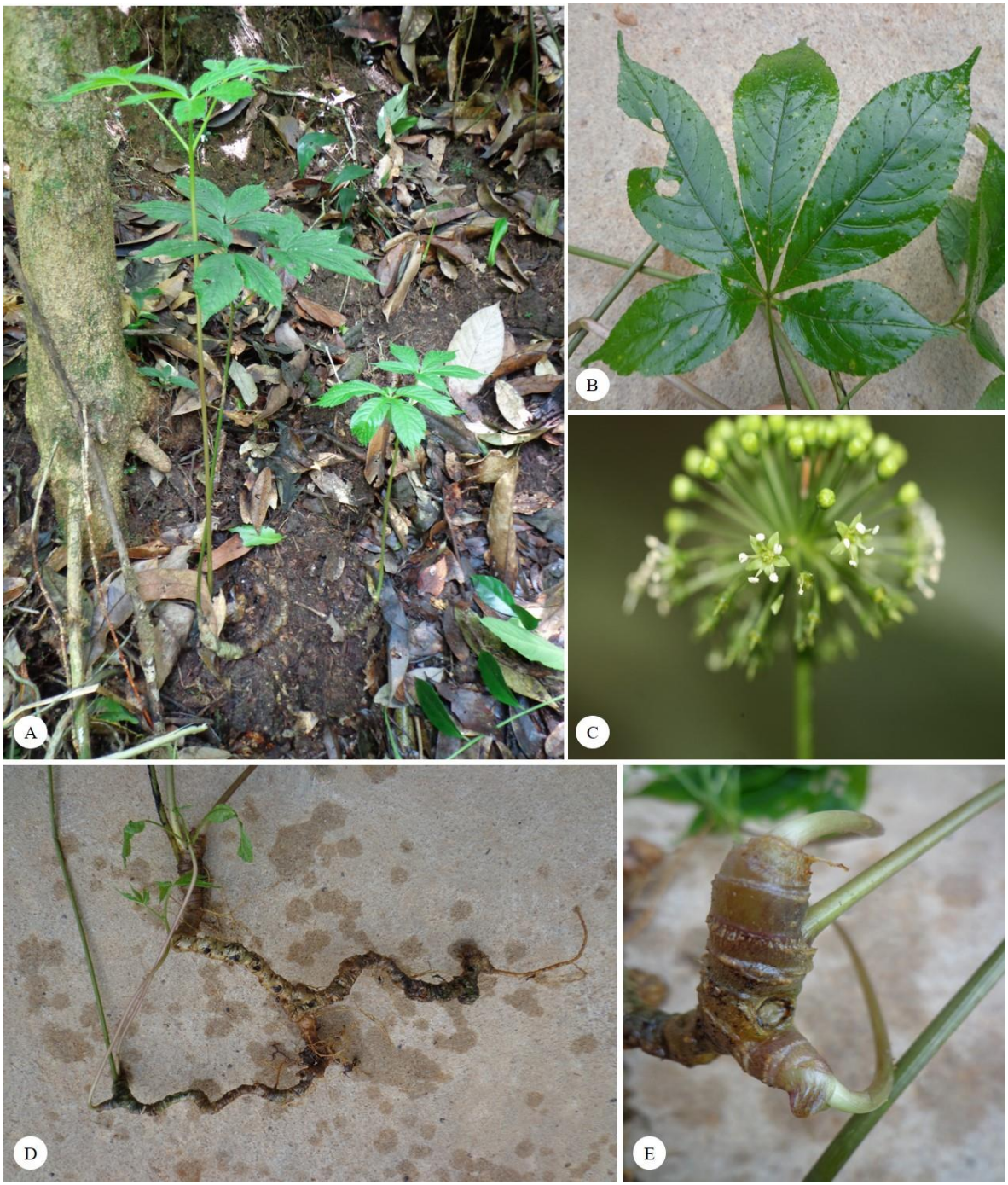
Cây thân thảo, lâu năm, cao 50 – 90 cm. Thân khí sinh thẳng, mảnh, nhẵn với phần lõi xốp, mang các lá kép chân vịt với 3, 4 hoặc hiếm khi 5 lá kép mọc vòng ở đỉnh thân khí sinh, cuống lá kép dài 8 – 13 cm, nhẵn, không có lá kèm hay những phần phụ giống lá kèm (Hình 1.1 A) [16].

Lá kép thường gồm 5 lá chét (hiếm khi đến 7), gồm ba lá chét lớn liền nhau có hình oval hay elip, kích thước 10 – 12 × 4 – 5 cm; hai lá chét còn lại nhỏ hơn cũng có dạng oval-elip với kích thước 4 – 5 × 2 – 3 cm; lá chét mang 5 – 8 gân thứ cấp, phiến dạng màng, có lông ở các gân cả hai mặt lá; gốc lá dạng nêm hay hẹp dần, mép lá chét thường có răng cưa, hiếm khi mang răng cưa đôi; đầu lá chét có dạng mũi nhọn ngắn, dài 8 mm, cuống lá chét dài 8 – 11 mm (Hình 1.1 B).

Cụm hoa dạng tán, khoảng 40 – 80 hoa, cuống cụm hoa dài 10 – 18 cm, có tuyến. Các hoa có đường kính 1,5 – 2 cm, cuống hoa dài 4 – 6 mm, đế hoa có dạng chén, đĩa bầu ban đầu dạng hơi lồi, màu xanh, sau đó chuyển sang dạng lồi hẳn lên và có màu vàng nhạt; đài hoa 5, dạng tam giác, dài 0,45 – 0,55 mm, nhẵn; cánh hoa 5, dạng hình trứng ngược, kích thước 1,4 × 0,75 mm, nhẵn. Bao phấn 5, kích thước 0,7 – 0,8 × 0,3 – 0,4 mm, chỉ nhị dài tương đương hay ngắn hơn cánh hoa; vòi nhị 2 (hiếm khi 1), kích thước 0,6 – 0,8 mm, bầu nhụy dài khoảng 1 mm. Quả có dạng trứng, hơi dẹt, đường kính khoảng 4 – 5 mm, mang 1 (hiếm khi 2) hạt. Hạt chắc, dạng trứng với kích thước 3,5 – 4,5 × 3 – 4 mm (Hình 1.1 C).

Thân rễ dạng đốt, thường bò ngang, đường kính 1 – 2,5 cm, các đốt xếp gần nhau với khoảng cách giữa các đốt từ 2 – 5 cm, mặt bên ngoài có màu nâu vàng. Rễ

củ gắn vào phần dưới của thân rễ, dạng phồng lớn, có hình chóp hay gần như dạng hình nón, kích thước 3 – 5 × 2 – 4 cm (Hình 1.1 D, E).



Hình 1.1. Đặc điểm hình thái của sâm Lang Bian

Thân mang lá chét; B. Lá chét; C. Tán hoa; D, E. Thân rễ

Lê Ngọc Triệu (2017) bước đầu phân tích sơ bộ thành phần saponin ở sâm Lang Bian, kết quả cho thấy Sâm Lang Bian phân bố tại Lâm Đồng có các hoạt chất G-Rb1, G-Re, N-R1, G-Rd, G-Rg1 và M-R2 [45]. Tuy nhiên, tác giả vẫn chưa xác định được hàm lượng cụ thể các hoạt chất này.

1.1.3.3. Tình hình khai thác

Do có giá trị dược liệu quý nên sâm Lang Bian đang bị người dân săn lùng tại vùng rừng các huyện Đam Rông và Vườn Quốc gia Bidoup Núi Bà (Huyện Lạc Dương, Tỉnh Lâm Đồng), dẫn đến xâm hại tài nguyên rừng và đa dạng sinh học, số lượng cá thể ngoài tự nhiên giảm xuống. Do đó mà các chính sách liên quan đến chức năng quản lí nhà nước về đa dạng sinh học và các giải pháp bảo tồn cây sâm Lang Bian đang được quan tâm.

Bảng 1.4. Dự kiến diện tích phát triển sâm Việt Nam đến năm 2030 [46]

TT	Địa phương	Dự kiến diện tích (ha)				Loài sâm phát triển hoặc trồng thử nghiệm
		Tổng	Dưới tán rừng phòng hộ	Dưới tán rừng sản xuất	Trên đất nông nghiệp khác	
1	Quảng Nam	8400	7740	660		Ngọc Linh
2	Kon Tum	8180	4156	4024		Ngọc Linh
3	Lai Châu	3000	2700	287	13	Lai Châu
4	Điện Biên	500	500			Lai Châu Ngọc Linh
5	Lâm Đồng	50	40		10	Lang Bian Ngọc Linh
6	Gia Lai	800		800		Ngọc Linh
7	Lào Cai	8	6	2		Lai Châu
8	Thừa Thiên Huế	32	32			Ngọc Linh
9	Nghệ An	30	15	15		*Puxailaileng* Ngọc Linh
	Tổng	**21.000**	**15.189**	**5.788**	**23**	

Theo quyết định số 611 về việc phê duyệt Chương trình phát triển sâm Việt Nam đến năm 2030, định hướng đến năm 2045 của Thủ tướng Chính phủ [46], tỉnh Lâm Đồng dự kiến đến năm 2030 sẽ phát triển 50 ha trồng sâm, trong đó 40 ha dưới tán rừng phòng hộ và 10 ha trên đất nông nghiệp khác (Bảng 1.4). Trong đó, sâm

Lang Bian là một trong những đối tượng bảo tồn, gây trồng, phát triển quy mô thử nghiệm ở khu vực có điều kiện tự nhiên phù hợp.

Lâm Đồng là một trong các địa phương có tiềm năng, thế mạnh về điều kiện tự nhiên thích hợp cho việc nuôi trồng, phát triển sâm. Do đó, tỉnh Lâm Đồng có nhiệm vụ bảo tồn, gây trồng, phát triển quy mô thử nghiệm ở khu vực có điều kiện tự nhiên phù hợp đối với loài sâm Lang Bian. Trong đó, nhiệm vụ cụ thể xây dựng hệ thống cơ sở dữ liệu về bảo tồn, xây dựng vùng bảo tồn nguyên vị và vườn sưu tập nguồn gen tại một số vùng sinh thái điển hình có phân bố tự nhiên, đề xuất vùng trồng thích hợp, phát triển nguồn gen. Đồng thời, các ngành chức năng và chính quyền địa phương cần thông tin rộng rãi để người dân được biết về giá trị dinh dưỡng cũng như thương mại của sâm Lang Bian để có giải pháp bảo tồn đa dạng sinh học loài sâm Lang Bian và có thể khai thác hợp lý.

1.1.3.4. Tình hình nhân giống

Tính từ khi sâm Lang Bian được phát hiện và công bố đến nay, chỉ có ba công bố liên quan đến định danh sâm Lang Bian [16, 17, 45], các nghiên cứu liên quan đến nhân giống sâm Lang Bian được chưa được thực hiện. Do đó, sẽ khó khăn cho quá trình nhân giống cũng như mở rộng diện tích trồng sâm Lang Bian nhằm đáp ứng mục tiêu bảo tồn và phát triển đối tượng thực vật này. Chính vì lý do đó, nhân giống sâm Lang Bian bằng phương pháp *in vitro* cần được triển khai nghiên cứu, nhằm bước đầu tạo ra nguồn cây giống cung cấp cho nhu cầu bảo tồn và trồng trọt tại địa phương.

1.2. Nuôi cấy phôi soma

1.2.1. Khái niệm

Phôi thực vật bên cạnh phát sinh theo con đường sinh sản hữu tính còn có thể tạo ra một cách tự nhiên hay nhân tạo theo hướng phát sinh phôi soma. Sự phát sinh phôi soma được định nghĩa là một quá trình mà trong đó cấu trúc lưỡng cực giống phôi hữu tính phát triển từ một tế bào sinh dưỡng không có liên kết mạch dẫn với tế bào gốc ban đầu [47].

Phôi soma có nguồn gốc từ các tế bào soma, các tế bào này có vai trò phát sinh phôi tương tự như hợp tử. Sau giai đoạn hình thành các tế bào có khả năng phát sinh phôi và sự biệt hóa tế bào, phôi soma được hình thành. Phôi soma bao gồm chồi đỉnh và mầm chóp rễ, từ đó có thể nảy mầm trực tiếp thành cây con hoàn chỉnh, không cần thiết trải qua giai đoạn tạo chồi và rễ.

Sự phát sinh phôi soma có thể diễn ra theo hai hướng trực tiếp và gián tiếp. Trong đó, phát sinh phôi soma trực tiếp xảy ra không qua giai đoạn tạo mô sẹo, ngược lại, phát sinh phôi soma gián tiếp bắt buộc phải trải qua giai đoạn tạo mô sẹo trước khi phôi soma hình thành và phát triển. Sự khác biệt giữa quá trình phát sinh phôi soma trực tiếp và gián tiếp vẫn chưa được hiểu rõ, tuy nhiên, theo nhiều giả thuyết thì sự phát sinh trực tiếp thường từ các tế bào có nguồn gốc từ phôi hợp tử, ngược lại, sự phát sinh phôi soma gián tiếp lại xảy ra ở các tế bào biệt hóa và đầu tiên sẽ tạo thành các mô sẹo chưa biệt hóa. Trong các mô sẹo được tạo thành bao gồm cả những tế bào có khả năng phát sinh phôi soma và cả những tế bào không có khả năng phát sinh phôi soma và thường được phân biệt dựa vào hình thái và màu sắc của chúng. Tế bào có khả năng phát sinh phôi soma có thể được phân biệt về mặt mô học với các tế bào khác bằng một số đặc điểm như kích thước nhỏ, tế bào chất đặc hơn, nhân lớn nằm ở vị trí trung tâm, tỷ lệ giữa nhân và tế bào chất cao, gần nhân có vi ống và sợi nhỏ actin nổi rõ [48]. Nhân lớn trong tế bào quyết định sự sắp xếp của các vi ống cũng như tạo ra các rRNA, ảnh hưởng đến hướng và vị trí của mặt phẳng phân chia tế bào.

Ngoài ra, trong các tế bào này còn hiện diện nhiều hạt tinh bột nhỏ, rất nhiều ti thể, bộ máy Golgi và mạng lưới nội chất. Tinh bột có vai trò quan trọng cung cấp năng lượng cho sự tăng trưởng tế bào trong suốt các giai đoạn hình thành các vùng sinh phôi [49]. Đồng thời, sự hiện diện của nhiều ti thể trong giai đoạn này có vai trò cung cấp năng lượng ATP và các tiền chất cần thiết cho quá trình tổng hợp các protein đặc biệt có liên quan đến sự phân chia đầu tiên không cân xứng của tế bào. Sự hoạt động mạnh mẽ của bộ máy Golgi và mạng lưới nội chất giúp cho sự thành lập phragmoplast – cấu trúc chứa các vi ống ở giữa tế bào đang phân chia để hình thành vách ngang giúp cho sự phân chia tế bào thành hai tế bào con.

1.2.2. Các giai đoạn của quá trình phát sinh phôi soma

Sự tái sinh thực vật thông qua con đường phát sinh phôi soma bao gồm các giai đoạn (1) Sự cảm ứng quá trình phát sinh phôi soma, giai đoạn này cần có sự tác động của chất điều hòa sinh trưởng thực vật (PGRs), chủ yếu là auxin; (2) Sự tăng sinh phôi soma trong môi trường nuôi cấy rắn hoặc lỏng có bổ sung PGRs tương tự giai đoạn 1; (3) Phôi soma ở giai đoạn trước khi trưởng thành trong môi trường không bổ sung PGRs, ức chế sự tăng sinh và phát sinh phôi soma thứ cấp; (4) Giai đoạn phôi soma trưởng thành, phôi soma được nuôi cấy trong môi trường bổ sung ABA; và (5) Sự sinh trưởng và phát triển của cây con có nguồn gốc từ phôi soma trong môi trường không bổ sung PGRs [47].

Ở giai đoạn cảm ứng phát sinh phôi soma, các tế bào được tác động để kết thúc sự biểu hiện gen hiện tại và thay bằng chương trình biểu hiện gen phát sinh phôi soma. Giai đoạn này cần sự hiện diện của auxin với vai trò trung tâm trong điều hòa truyền tín hiệu dẫn đến việc cảm ứng sự phân chia tế bào, tăng trưởng khối mô sẹo không tổ chức hoặc tăng trưởng có cực dẫn đến phát sinh phôi soma. Tế bào bắt đầu phân chia lần đầu tiên theo chiều ngang tạo thành hai tế bào không đều nhau, bao gồm một tế bào ngọn (kích thước nhỏ, nguồn gốc của phôi soma) và một tế bào gốc (kích thước lớn hơn, nguồn gốc của dây treo). Các lần phân chia tiếp theo có thể theo chiều ngang hoặc chiều dọc tùy theo từng đối tượng thực vật tạo thành một chuỗi gồm ba hoặc bốn tầng, tế bào ở mỗi tầng tạo một vùng xác định trong phôi soma. Sau các lần phân chia, các tiền bì (protoderm), sơ khởi và phôi soma ở giai đoạn hình cầu xuất hiện. Giai đoạn phôi hình cầu là khởi đầu của sự phân hóa cấu trúc trong quá trình phát sinh phôi soma, tiền bì đóng vai trò như lớp ngoài của phôi giúp phôi tạo hình dạng thông qua tác động vật lý với các tế bào bên trong, đồng thời điều hòa sự phân chia và biệt hóa tế bào trong phôi [50].

Tiếp sau đó, các vùng mô phân sinh chồi và rễ được hình thành và thường bắt đầu vào cuối giai đoạn phôi hình cầu và cấu trúc này được nhận thấy rõ ràng ở giai đoạn phôi có lá mầm. Các tế bào bên trong phôi kéo dài là dấu hiệu của sự biệt hóa tiền tượng tầng. Sự phân hóa cấu trúc bắt đầu ở giai đoạn phôi hình cầu. Ở giai đoạn phôi hình cầu muộn, ở vị trí cách lớp tế bào biểu bì khoảng vài lớp tế bào có sự hình thành mô phân sinh ngọn chồi từ các tế bào nhân to, tế bào chất đậm đặc. Mô phân sinh ngọn rễ xảy ra sau sự hình thành mô phân sinh ngọn chồi. Ban đầu, hai mô phân sinh ngọn chồi và mô phân sinh ngọn rễ nằm gần nhau. Sau đó, do sự kéo dài và phân hóa các tế bào làm cho chúng cách xa nhau. Các biến đổi về mặt hình thái tiếp theo dẫn đến sự hình thành phôi soma hình tim, hình thủy lôi và sự xuất hiện của lá mầm và rễ mầm. Các lá mầm có nguồn gốc từ các tế bào vùng ngoại biên của phôi tạo nên phôi hình tim. Lá mầm có vai trò quan trọng trong sự điều hòa dòng auxin và thúc đẩy quá trình nảy mầm.

Trong suốt giai đoạn trưởng thành, phôi soma trải qua các biến đổi hình thái và sinh hóa, các phôi soma ở giai đoạn này tăng cường tích lũy sản phẩm dự trữ, chuẩn bị cho giai đoạn phát triển tạo thành cây hoàn chỉnh và thông thường các phôi soma phát triển thành các cây nhỏ khi được cấy trên môi trường không có chất điều hòa sinh trưởng [34].

1.2.3. Sự phát sinh phôi soma thứ cấp

Phôi soma được tạo ra trực tiếp hoặc gián tiếp trên các mẫu cấy được gọi là phát sinh phôi soma sơ cấp, trong khi sự hình thành phôi soma trên phôi soma sơ cấp được gọi là phát sinh phôi soma thứ cấp. Phôi soma sơ cấp không chuyển đổi thành cây con hoàn chỉnh mà thay vào đó tạo ra nhiều phôi soma thứ cấp. Trong giai đoạn này, auxin cần thiết cho sự tăng sinh các cụm tiền phôi nhưng lại có tác dụng ức chế chúng phát triển thành phôi soma. Các phôi soma vẫn tiếp tục tăng sinh, tạo thành cụm tiền phôi, thường thì môi trường tương tự như môi trường phát sinh phôi soma được sử dụng để duy trì và tăng sinh. Phôi soma ở những giai đoạn phát triển khác nhau ảnh hưởng đến khả năng phát sinh phôi soma thứ cấp từ nguồn phôi soma sơ cấp ban đầu. Ở thực vật hạt trần, chỉ những tế bào ở trạng thái tiền phôi hay trước giai đoạn hình cầu mới có khả năng phát sinh phôi soma thứ cấp. Ngược lại, hầu hết thực vật hạt kín, các mẫu cấy ở giai đoạn sinh trưởng khác nhau đều có khả năng phát sinh phôi soma thứ cấp. Kim và cộng sự (2012) trong nghiên cứu nuôi cấy phôi soma *P. ginseng,* với mục tiêu nhân nhanh sinh khối cho rằng phôi soma sơ cấp phát sinh từ các mẫu cắt lá mầm của phôi hợp tử là nguồn vật liệu phù hợp để kích thích hình thành phôi soma thứ cấp. Tỷ lệ phôi soma sơ cấp hình thành trong môi trường không có và có bổ sung PGRs chỉ đạt lần lượt là 32,5% và 45%. Tuy nhiên, sự hình thành phôi soma thứ cấp từ nguồn mẫu phôi soma sơ cấp đạt được tỷ lệ cao hơn (88%) khi cấy trên môi trường có 2,4-D và Kinetin. Phôi soma thứ cấp hầu hết xuất hiện ở một số vùng như là trụ dưới lá mầm và phần cực rễ [12].

1.2.4. Một số yếu tố ảnh hưởng đến sự phát sinh phôi soma

Sự phát sinh phôi soma ở các loài sâm đã được nghiên cứu, trong đó, các nguồn mẫu cấy, môi trường dinh dưỡng, PGRs và các biện pháp xử lý để nâng cao chất lượng phôi soma (xử lý kim loại nặng, UV, sử dụng chất kháng sinh, gây stress thẩm thấu, làm khô, xử lý nóng và lạnh cũng như các biện pháp xử lý vật lý và hóa học được tập trung nghiên cứu [51]. Butenko và cộng sự (1968) đã có những kết quả nghiên cứu đầu tiên trong việc cảm ứng phát sinh phôi soma và cơ quan của *P. ginseng* để tạo cây hoàn chỉnh [52]

1.2.4.1. Loại mẫu cấy

Hầu hết các mô thực vật, như: thân, lá, cuống lá, rễ, chồi hoa, phôi non… của cây *ex vitro* và *in vitro* đều có khả năng phát sinh phôi soma. Tuy nhiên, hiệu quả cảm ứng tạo phôi soma tùy vào từng thực vật, từng loại mô và các giai đoạn phát triển khác nhau do sự khác biệt về hàm lượng các chất nội sinh.

Khả năng phát sinh phôi soma tạo ra cây mới từ các tế bào sinh dưỡng phụ thuộc rất nhiều vào thuộc tính toàn năng của tế bào. Sự phát sinh phôi soma được cảm ứng từ các mẫu cấy khác nhau như rễ tự nhiên[7]; rễ bất định [7]; lá [49]; túi phấn[53], và phôi hữu tính hay cây con nảy mầm từ hạt [14] (Bảng 1.5).

Trong nuôi cấy *in vitro*, trạng thái sinh lý của mẫu gây ra sự đáp ứng hình thái khác biệt. Các mô có chứa hàm lượng hormone nội sinh và đường khác nhau, hàm lượng này thay đổi ở lá, cuống lá và rễ và có sự khác biệt giữa phần đỉnh và phần gốc của lá mầm và trụ trên lá mầm. Hàm lượng hormone cũng thay đổi trong quá trình hình thành các cơ quan. Sự tương tác và cân bằng giữa hàm lượng hormone có thể được điều chỉnh bởi các yếu tố tác động khác nhau trong quá trình phát triển của thực vật. Do đó, các mô, cơ quan thực vật được sử dụng làm nguồn mẫu ban đầu sẽ tác động trực tiếp đến khả năng tái sinh [48]. Các nghiên cứu về hàm lượng hormone trong mẫu rễ, cuống lá và lá của cây *Populus* spp. cho thấy, có sự tích lũy của zeatin, acid indole-3-acetic và acid abscisic, những chất này, có thể đóng vai trò trung gian trong quá trình hình thành cơ quan [54]. Đồng thời, các tế bào gần bề mặt vết cắt dễ dàng chịu tác động của stress từ môi trường và chính sự stress này gây ra sự phản biệt hóa và phát sinh phôi soma [55].

Prakash và Gurumurthi (2009) báo cáo độ tuổi khác nhau (10, 15, 25, 30 ngày tuổi) tác động lên sự cảm ứng mô sẹo cũng như phát sinh phôi soma trực tiếp từ phôi hợp tử và lá mầm của những cây con *Eucalyptus camaldulensis in vitro*. Kết quả mô sẹo được hình thành với tỷ lệ cao nhất từ mẫu cấy lá mầm của cây con 10 ngày tuổi. Tuy nhiên, mô sẹo từ phôi hợp tử cảm ứng phát sinh phôi soma tốt nhất. Đồng thời, phát sinh phôi soma trực tiếp từ trụ dưới lá mầm không trải qua giai đoạn hình thành mô sẹo [56]. Những mẫu lá *in vitro* không những là nguồn vật liệu sẵn có mà còn có hiệu quả trong quá trình phát sinh phôi. Các tế bào thịt lá có tiềm năng phản biệt hóa và đi theo nhiều con đường phát sinh hình thái khác nhau khi được nuôi cấy trong môi trường phù hợp. Hơn thế nữa, sự tái sinh cây từ mẫu cấy lá cho sự biến dị di truyền thấp [57].

Phôi soma được ghi nhận phát sinh trực tiếp từ mẫu lá TCL hiệu quả hơn so với cuống lá và thân rễ TCL khi được nuôi trong môi trường MS bổ sung 2,0 mg/L NAA ở sâm Ngọc Linh [58]. Kết quả tương tự cũng được công bố trong nghiên cứu sự phát sinh phôi soma từ mẫu cấy lá và rễ trên đối tượng *Scaevola sericea*. Theo Liang và cộng sự (2020), mẫu cấy lá cho sự hình thành phôi soma cao hơn so với mẫu rễ, số lượng phôi soma thu được là 17,3 phôi/mẫu sau 30 ngày nuôi cấy, trong khi mẫu cấy từ rễ chỉ tạo được 7,6 phôi/mẫu [59].

Bảng 1.5. Nuôi cấy phôi soma sâm từ các nguồn mẫu cấy khác nhau

Loài	Nguồn mẫu	Môi trường nuôi cấy	Nguồn
P. ginseng C.A. Mayer	Rễ sâm tự nhiên	MS + 2,4-D + kinetin + sucrose	[7]
	Rễ bất định	MS + 2,4-D + kinetin	[7]
	Túi phấn	MS + 2,4-D	[53]
	Phôi hợp tử	MS	[60] [61]
	Lá mầm	MS/SH + 2,4-D + BA + lactalbumin hydrolysate	[62]
	Lá	MS + NAA + 2,4-D	[63]
	Mô sẹo	MS + 2,4-D	[64]
P. quinquefolius	Lá mầm	MS + 2,4-D và NAA	[65]
	Phôi hợp tử	MS (Khoáng), B5(Vitamin) + GA_3 + BA	[66]
	Rễ chuyển gen	MS + 2,4-D và NAA	[67]
P. pseudoginseng	Thân rễ	MS + 2,4-D + BAP	[68]
P. japonicus	Phôi hợp tử	MS + 2,4-D Xử lý bằng mannitol	[9]
P. notoginseng	Chồi hoa non	MS + 2,4-D	[69]
P. vietnamensis	Lá *in vivo*	MS/B5 + 2,4-D + kinetin + casein và IBA	[39]
	Mẫu lá tTCL-L *in vitro*	MS + NAA	[58]
P. ginseng x *P. quinquefolius*	Cuống lá cây con nảy mầm từ hạt lai	MS + 2,4-D	[14]

B5: Gamborge B5 (1968); MS: Murashige & Skoog (1962); SH: Schenk & Hildebrandt; BA: 6-benzyl adenine; 2iP: 2-isopentenyladenine; BSAA: 3-benzo selenenyl acetic acid; BZ: 3-benzo selenenyl acetic acid; tTCL-L: *Transverse thin cell layer*

Nhìn chung, tùy theo loại mẫu nuôi cấy, độ tuổi và tình trạng sinh lý của mẫu, có sự khác biệt về phản ứng của các mô thực vật về việc phát sinh phôi soma. Vì vậy, việc xác định nguồn mẫu là rất quan trọng, nâng cao hiệu quả cảm ứng để hình thành phôi soma là cần thiết.

1.2.4.2. Dinh dưỡng khoáng

Trong nuôi cấy phôi soma, tần suất hình thành phôi và khả năng trưởng thành của phôi cũng phụ thuộc vào hàm lượng khoáng. Do đó, nhiều nghiên cứu đã tiến

hành điều chỉnh hàm lượng các chất khoáng phù hợp nhằm đáp ứng việc cảm ứng hình thành và phát triển phôi soma.

Hiện nay, trong nuôi cấy *in vitro* có rất nhiều loại môi trường khác nhau được sử dụng. Thành phần cũng như tỷ lệ các chất khoáng trong các loại môi trường nuôi cấy có sự khác biệt. Chẳng hạn, hàm lượng nitơ dạng amonium (NH_4^+) trong môi trường MS (370 mg/L) cao hơn khoảng 10 lần so với môi trường SH (37 mg/L).

Môi trường MS thường được sử dụng phổ biến nhất trong nuôi cấy, vì phần lớn các cây trồng đều đáp ứng tốt với môi trường này. Đây là môi trường có hàm lượng muối cao (hàm lượng N và một số vi lượng đặc biệt là B và Mn) so với nhiều công thức môi trường khác. Kim và cộng sự (2012) nuôi cấy phôi soma của *P. ginseng* báo cáo rằng, chỉ có khoảng 20 phôi/mẫu được hình thành trong môi trường có hàm lượng amonium và nitrat giảm đi một nửa; ngược lại, tỷ lệ mẫu hình thành phôi soma thứ cấp tăng lên đến 80%, số lượng phôi soma tạo thành là 50 phôi/mẫu trong môi trường MS. Như vậy, hàm lượng ammonium cao sẽ kích thích sự phát sinh phôi soma *P. ginseng* [12].

Tuy nhiên, môi trường MS không phải phù hợp cho sự sinh trưởng của mẫu cấy đối với tất cả các đối tượng thực vật, khi hàm lượng dinh dưỡng khoáng quá cao có thể gây ức chế sự phân chia của tế bào, mô thực vật nuôi cấy. Nguyên nhân có thể là do các ion ở nồng độ cao có thể gây độc cho các tế bào, mô, cơ quan. Đối với *P. ginseng* và *P. quinquefolius*, môi trường SH lại phù hợp hơn cho sự tăng trưởng của phôi soma [70]. Kết quả tương tự cũng được ghi nhận đối với *P. ginseng*, Lee và cộng sự (2021) báo cáo các cây con có nguồn gốc từ phôi hợp tử có thể hình thành rễ củ và phát triển tốt sau vài tháng nuôi cấy trong môi trường 1/3 SH bổ sung 2% sucrose. Hầu hết các cây con đều có khả năng sống sót sau khi chuyển ra vườn ươm [15].

Ngoài việc lựa chọn môi trường khoáng phù hợp, thì việc điều chỉnh hàm lượng các chất khoáng trong môi trường nuôi cấy cũng đóng vai trò quan trọng trong việc tăng cường hiệu quả quá trình nuôi cấy. Liu và Zhong (1998) nghiên cứu tác động của hàm lượng phosphate đến sự tăng trưởng của tế bào *P. ginseng* và *P. quinquefolium* cho rằng, hàm lượng phosphate thấp (dưới 1,04 mM) kìm hãm sự tăng trưởng của tế bào, trong trường hợp ngược lại, khi gia tăng hàm lượng phosphate (1,04 – 4,17 mM) dẫn đến kích thích tế bào tăng trưởng [71].

Từ các kết quả nghiên cứu nuôi cấy phôi soma *P. ginseng* thu nhận được, Kim và cộng sự (2012) đã đề xuất quy trình nhân nhanh cây giống theo con đường phát sinh phôi soma sơ cấp và thứ cấp, những phôi soma phát triển thành những cây con

hoàn thiện đầy đủ chồi và rễ. Đồng thời, tỷ lệ phát sinh phôi soma cao nhất được báo cáo trong môi trường có tỷ lệ NH_4^+: NO_3^- là 21:39. Trong các loại môi trường được thử nghiệm, MS, B5 và SH, mẫu lá mầm cho tỷ lệ phát sinh phôi soma cao nhất trong môi trường MS. Phôi soma thứ cấp được phát sinh trực tiếp từ phôi soma sơ cấp trong môi trường MS không bổ sung PGRs và vẫn hình thành cây con bình thường. Cây con này có rễ phát triển tốt trong môi trường 1/3 MS cải tiến bổ sung 2% đến 3% đường. Tiếp theo, cây con sinh trưởng tốt khi được chuyển qua môi trường SH bổ sung 0,5% than hoạt tính [12].

Như vậy, dẫn từ các kết quả nghiên cứu trên cho thấy, môi trường khoáng có vai trò quyết định trong việc kích thích cảm ứng và phát triển phôi soma. Tùy theo loại thực vật mà lựa chọn và điều chỉnh môi trường khoáng phù hợp nhằm gia tăng hiệu suất nuôi cấy phôi soma.

1.2.4.3. Chất điều hòa sinh trưởng thực vật

Tùy theo từng thực vật cụ thể, ngoài hàm lượng khoáng, chất điều hòa sinh trưởng (sử dụng độc lập hoặc kết hợp) cũng ảnh hưởng đáng kể đến sự phát sinh hình thái của mẫu. Đây là một trong những yếu tố có vai trò quyết định đến tỷ lệ và dạng phát sinh hình thái của mô. Trong số đó, auxin được biết đến với vai trò là một chất cảm ứng gây ra stress oxy hóa và những phản ứng stress liên quan đến quá trình phát sinh phôi soma. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra vai trò của auxin trong việc khởi động chương trình phát sinh phôi soma, quá trình methyl hóa DNA được diễn ra, trong khi đó, chương trình biểu hiện gen của tế bào bị kết thúc hoặc làm thay đổi.

Vai trò tác động của auxin thể hiện ở cả hai giai đoạn, cảm ứng phát sinh phôi soma và hình thành phôi soma. Trước tiên, auxin có tác dụng duy trì tính lưỡng cực của tế bào và làm cho tế bào có thể tách khỏi sự tác động của các tế bào bên ngoài nhờ việc cắt đứt các cầu sinh chất – cầu nối giữa các tế bào với nhau hoặc làm cho quá trình tương tác giữa các tế bào bị gián đoạn. Kết quả là kết thúc chương trình biểu hiện gen sẵn có và chương trình hình thành phôi soma được thiết lập. Song song với quá trình đó, do các tế bào này không còn bị ảnh hưởng bởi các tế bào lân cận nên chúng có thể tách rời khỏi khối mô sẹo [72].

Bên cạnh đó, auxin còn ảnh hưởng đến khả năng hình thành phôi soma thông qua việc tác động đến chương trình của genome, dẫn đến sự phản biệt hóa và phân chia tế bào. Ngoài ra, auxin cũng có tác động lên thụ thể màng, hoạt hóa hoạt động của bơm proton nằm trên màng tế bào, làm tăng acid vách tế bào. Từ đó, tạo điều kiện

cho enzyme hoạt động, dẫn đến vách tế bào trở nên lỏng lẻo, tăng khả năng hấp thu nước và gia tăng kích thước [72].

Các nghiên cứu về ảnh hưởng của PGRs đến khả năng hình thành phôi soma trên các loài sâm khác nhau đã được công bố. Các loại auxin như 2,4-D, NAA có tác dụng gia tăng sự phát sinh phôi soma của các loài *P. quinquefolius, P. japonicus, P. vietnamensis* var. *fuscidicus* [9, 73, 74]. Tuy nhiên, nhu cầu về loại và nồng độ auxin thay đổi tùy theo từng đối tượng và loại mẫu cấy khác nhau. Đối với *P. vietnamensis*, mẫu thân rễ tTCL-R hình thành phôi soma cao trong môi trường có bổ sung 2 mg/L 2,4-D. Tuy nhiên, đối với mẫu lá tTCL-L, tỷ lệ mẫu hình thành mô sẹo cũng như số lượng phôi soma nhiều hơn trong môi trường bổ sung 2 mg/L NAA [58].

Ngoài ra, khi nghiên cứu nuôi cấy phôi soma và tạo cây con sâm lai *P. ginseng* và *P. quinquefolius*, Kim và cộng sự (2019) cho rằng, cuống lá là loại mẫu cấy phù hợp để tạo mô sẹo. Giữa các loại auxin thì 2 mg/L 2,4-D cảm ứng tạo mô sẹo và phát sinh phôi soma tốt nhất. Trong môi trường SH bổ sung 5 mg/L GA_3, phôi soma nảy mầm nhanh chóng; và khi cấy chuyển sang môi trường ½ SH tạo thành cây con hoàn chỉnh với cả chồi và rễ [14]. Từ các kết quả nghiên cứu cho thấy, tùy thuộc loại và nồng độ auxin sử dụng có tác động khác biệt đến tần suất phát sinh phôi soma và số lượng phôi soma phát sinh trên mẫu cấy.

Tuy nhiên, auxin tồn tại ở nồng độ cao lại ngăn cản sự trưởng thành phôi soma. Auxin tác động lên sự phân chia tế bào, nên số lượng tế bào tăng nhanh và liên kết chặt chẽ với nhau trong khối mô sẹo. Do đó, vách thứ cấp dày lên và đồng thời sự tăng trưởng của tế bào bị ức chế. Kết quả làm cho khối mô sẹo chặt thêm và các tế bào khó tách cụm. Đồng thời, nhiều mRNA và protein khác cũng được kích thích tổng hợp dẫn đến cản trở việc hoàn thiện chương trình phát triển phôi soma. Trong nghiên cứu phát sinh phôi soma trên đối tượng tam thất hoang (*P. stipuleanatus*), trước tiên môi trường bổ sung 2,4-D ở nồng độ cao được sử dụng để kích thích sự phân chia tế bào. Sau đó, chuyển các mẫu đã phân chia sang môi trường có nồng độ 2,4-D thấp hơn hoặc NAA để giảm sự phân chia và tăng sự kéo dài tế bào. Kết quả tạo được một lượng mô sẹo lớn, dạng xốp và dễ tách rời bao gồm nhiều tế bào đẳng kính. Các nghiên cứu cũng chỉ ra rằng, các tế bào có xu hướng phân chia không theo quy luật khi được nuôi trong môi trường bổ sung 2,4-D; trong môi trường có NAA thì các tế bào lại có xu hướng phân chia cân xứng, tạo thành cụm gồm các tế bào nhân to, tế bào chất đậm đặc, giống như một hợp tử [75].

Cytokinin là một phytohormone thiết yếu đóng vai trò quan trọng trong sự sinh trưởng và phát triển của thực vật, tham gia vào quá trình phân chia, biệt hóa và phát

sinh hình thái tế bào. Cytokinin giúp cho tế bào gia tăng kích thước thông qua việc làm giảm pH thành tế bào. Trong quá trình phân chia tế bào, cytokinin ảnh hưởng đến hai giai đoạn phân chia nhân và phân chia tế bào chất. Chính nhờ sự có mặt của cytokinin dẫn đến sự phân chia vách tế bào, trong khi auxin chỉ kích thích nhân đôi nhiễm sắc thể nhưng không có sự phân vách tế bào. Một số nghiên cứu trên đối tượng Arabidopsis chứng minh vai trò của cytokinin trong hoạt động của mô phân sinh chồi.

Meta – topolin (mT) là dẫn xuất của BA tự nhiên được phát hiện gần đây. mT đã được chứng minh là có hiệu quả và được sử dụng trong nghiên cứu quá trình nảy mầm, tăng sinh chồi của các đối tượng thực vật khác nhau, chẳng hạn như *Citrus sinensis* Poncirus trifoliata [76] và *Prunus* spp. [77]. Ngoài ra, mT được chứng minh là di chuyển nhanh hơn trong các mô thực vật so với BA, chúng không tích lũy tập trung tại một một vị trí nhất định trong mô thực vật, làm giảm sự hình thành mô sẹo cũng như tình trạng thủy tinh thể của mẫu cấy [78]. Tương tự như auxin, cytokinin (CK) cũng có vai trò quan trọng trong quá trình phát sinh phôi soma. Trong nghiên cứu phát sinh phôi soma ở thu hải đường (Begonia) cho thấy hàm lượng CK và tỷ lệ CK/ABA cao có thể làm tăng số lượng phôi soma tạo thành [79].

Gibberellin (GA) là một loại phytohormone chính điều chỉnh sự sinh trưởng và phát triển của thực vật từ khi hạt nảy mầm đến khi cây ra hoa, kết quả, đậu hạt. Trong mô thực vật, GA tồn tại ở hai dạng tự do là dạng có hoạt tính sinh lý và dạng liên kết – dạng dự trữ và vận chuyển (GA liên kết với đường đơn nhờ các liên kết đồng hóa trị tạo thành GA glucoside). GA gây nên sự gia tăng kích thước tế bào trước khi cảm ứng sự phân chia tế bào. Tốc độ gia tăng kích thước tế bào có thể chịu ảnh hưởng của độ giãn vách và hấp thu nước vào tế bào theo cơ chế thẩm thấu. Như vậy cả GA và auxin cùng tác động đến sự gia tăng kích thước tế bào thông qua sự biến đổi các tính chất của vách tế bào [80]. Tuy nhiên, tác động của GA đến sự gia tăng kích thước tế bào có thể phụ thuộc vào sự acid hóa vách tế bào đã được auxin cảm ứng. Đồng thời, GA tác động đến sự sinh trưởng của tế bào khác biệt với auxin. Zan (2019) báo cáo rằng enzyme xyloglucan endotransglycosylase (XET) liên quan với sự dãn vách được GA khởi động. Chức năng của XET có thể là làm dễ dàng cho sự xâm nhập của expanin trong vách tế bào (expansin là các protein gây nên sự kéo dãn vách trong các điều kiện acid bằng cách làm suy yếu các liên kết hydro giữa các polysaccharide vách), cả expanin và XET có thể cần cho sự giãn tế bào được GA kích thích [81]. Khác với auxin làm giãn vách tế bào thông qua việc làm acid hóa vách tế bào, gibberellin giúp cho sự giãn vách thông qua việc kích thích hấp thu Ca^{2+} vào tế bào dẫn đến giảm nồng độ Ca^{2+} trong vách tế bào. Đồng thời, GA3 có tác động tích

cực trong việc phá vỡ trạng thái ngủ và kích thích phôi soma nảy mầm [82]. Trong các dòng có khả năng phát sinh phôi của *M. sativa* và *M. truncatula*, GA nội sinh đóng vai trò kích thích sự phát sinh phôi soma [83].

Acid abscisic (ABA) là một chất ức chế sinh trưởng và phát triển của thực vật, điều chỉnh sự trưởng thành của phôi và trạng thái ngủ của hạt, đồng thời ức chế sự nảy mầm, phân chia và kéo dài tế bào. Ngoài ra, ABA cũng có tác dụng tích cực đến sự phát sinh phôi soma. Liang (2022) phát hiện ra rằng hàm lượng ABA cao có lợi cho sự phát sinh phôi soma ở thông Hàn Quốc [84]. Kępczyńska (2021) báo cáo, GA có liên quan đến khả năng phát sinh phôi soma từ các mẫu cấy lá *Medicago truncatula* [85].

Như vậy, PGRs có tác động đến cả hai giai đoạn cảm ứng phát sinh phôi soma và phát triển phôi soma. Ngoài ra, tùy theo các loài thực vật, thì khả năng đáp ứng với từng loại và nồng độ của các PGRs khác nhau.

1.2.4.4. Sự biến động hàm lượng hormone nội sinh trong quá trình phát sinh phôi soma

Hormone nội sinh đóng vai trò then chốt trong quá trình phát sinh và phát triển phôi soma. Do đó, mối quan hệ giữa sự thay đổi hàm lượng hormone nội sinh và quá trình phát sinh phôi soma cũng đã được báo cáo trong nhiều nghiên cứu [86].

Liu và cộng sự (2019) đã chỉ ra rằng auxin (IAA) rất cần thiết cho việc phát sinh và phát triển phôi soma, đồng thời việc gia tăng hàm lượng IAA tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình phát sinh phôi soma [87].Trong nghiên cứu nuôi cấy phôi soma *Medicago sativa*, Pasternak và cộng sự (2002) cho thấy rằng hàm lượng IAA nội sinh tăng lên cao nhất trong giai đoạn từ 4-5 ngày đầu tiên của quá trình phát sinh phôi soma trực tiếp từ các tế bào trần tách từ các mẫu lá. Trong đó, sự gia tăng hàm lượng IAA có tương quan với sự phân chia và biệt hóa tế bào, từ đó thúc đẩy sự phát sinh phôi [88]. Bên cạnh đó, hàm lượng IAA thay đổi ở các giai đoạn khác nhau (mẫu ban đầu, mẫu ở giai đoạn cảm ứng và các giai đoạn phát triển phôi soma) trong suốt quá trình phát sinh phôi soma gián tiếp từ mẫu cuống lá *M. sativa* cv. Rangelander cũng được ghi nhận [89]. Trong đó, hàm lượng IAA rất thấp được quan sát thấy ở giai đoạn mô sẹo và huyền phù tế bào, sau đó, tăng lên và ổn định ở giai đoạn phôi hình cầu đến đầu giai đoạn phôi có lá mầm. Hàm lượng này giảm ở giai đoạn phôi có lá mầm và phôi trưởng thành. Ngoài ra, Kępczyńska và Orłowska (2021) cũng chỉ ra rằng mẫu lá ban đầu của hai kiểu gen *M. truncatula* Jemalong: M9-10a (phát sinh phôi) và M9 (không phát sinh phôi) có hàm lượng IAA tương đồng. Tuy nhiên, sau

21 ngày nuôi cấy, hàm lượng IAA trong mô sẹo của M9-10a tăng lên gấp 6 lần so với M9. Sự khác biệt quan sát được có liên quan đến quá trình dị hóa IAA trong 21 ngày của giai đoạn cảm ứng. Hàm lượng 2-oxinoindole-3-acetic acid (oxIAA) cao nhất được tìm thấy ở mô sẹo không có khả năng phát sinh phôi. Quá trình dị hóa IAA được coi là con đường chính dẫn đến bất hoạt IAA [85].

Trong nuôi cấy phôi *Ormosia henryi* Prain, hàm lượng Auxin, CKs, GA và ABA khác nhau đáng kể ở các giai đoạn phát sinh phôi soma. Ở giai đoạn đầu của quá trình phát sinh phôi soma, ngoại trừ hàm lượng auxin cao, các hormone còn lại có hàm lượng thấp. Tuy nhiên, xu hướng ngược lai được ghi nhận ở giai đoạn phôi có lá mầm. Những phát hiện này chỉ ra rằng hàm lượng Auxin tương đối cao và hàm lượng CKs, GA và ABA thấp có lợi cho sự cảm ứng tạo mô sẹo có khả năng phát sinh phôi. Hàm lượng Auxin cao là tiền đề cho sự phát sinh phôi soma và thiết lập tính hữu cực. Trong khi đó, hàm lượng CKs cao quy định sự biệt hóa của phôi soma, GA và ABA với hàm lượng cao đã thúc đẩy sự trưởng thành và nảy mầm của phôi soma ở giai đoạn sau [90]. Tuy nhiên, trong nuôi cấy *Lycium barbarum*, hàm lượng ABA nội sinh tăng lên đáng kể trong các tế bào có khả năng phát sinh phôi. Từ đó cho thấy rằng ABA có liên quan đến việc khởi đầu sự phát sinh phôi soma [91]. Hơn nữa, hàm lượng ABA trong mô sẹo có khả năng phát sinh phôi của *Cucumis melo* cao hơn so với mô sẹo không có khả năng phát sinh phôi [92].

Như vậy, hàm lượng hormone nội sinh thay đổi tùy theo từng giai đoạn của quá trình phát sinh phôi soma cũng như đối tượng thực vật. Do đó, việc xác định nồng độ cũng như tỷ lệ các hormone nội sinh có thể cung cấp thông tin để từ đó đánh giá vai trò của từng hormone nội sinh trong việc điều hòa quá trình phát sinh phôi soma ở thực vật.

1.2.4.4. Một số acid amin và polyamine

Acid amin

Acid amin có ảnh hưởng rất lớn trong việc kích thích hình thành phôi soma ở nhiều loài thực vật, thông qua việc cung cấp năng lượng cho tế bào và mô thực vật. Nguồn hữu cơ (dạng khử) sau khi được hấp thu vào trong tế bào sẽ được chuyển hóa rất nhanh, từ đó, kích thích sự tăng trưởng của tế bào.

Một số acid amin (proline, glutamine) cũng được bổ sung vào môi trường nuôi cấy để nghiên cứu tác động của chúng trong sự hình thành phôi soma. Proline giúp làm gia tăng hàm lượng protein trong các tế bào có khả năng phát sinh phôi soma. Sự hiện diện của proline trong môi trường làm giảm thế nước của môi trường nuôi cấy,

gia tăng hàm lượng các chất tích lũy trong tế bào, do đó thúc đẩy quá trình phát sinh phôi soma [93].

Có nhiều nghiên cứu đã chỉ ra khi bổ sung glutamine hoặc proline ảnh hưởng đến việc gia tăng cảm ứng tạo phôi soma trên nhiều loài thực vật. Đỗ Đăng Giáp và cộng sự (2013) cho rằng một số acid amin và spemindine ảnh hưởng lên sự phát sinh phôi soma cây cọc rào (*Jatropha curcas*), trong đó proline (750 mg/L) và glutamine (150 mg/L) giúp nâng cao hiệu quả hình thành phôi soma từ mô sẹo [94].

Proline ở nồng độ tối ưu giúp cải thiện khả năng phát sinh phôi soma của mẫu cấy ở một số thực vật, như: sâm Ngọc Linh [95], dâu tây [96], *Quercus ilex* L. [97]. Đối với sâm Ngọc Linh, nồng độ proline 300 mg/L ảnh hưởng tốt nhất về tần số phát sinh phôi soma và số lượng phôi soma (86,7% và 167 phôi/mẫu). Đối với dâu tây, sự phát sinh phôi soma tốt nhất khi mô sẹo có nguồn gốc từ lá và đốt thân được nuôi trong môi trường MS có bổ sung 1,0 mg/L 2,4-D, 0,5 mg/L BAP và 500 mg/L proline.

Glutamine cũng có vai trò tích cực đối với việc cảm ứng phát sinh phôi soma, điều này đã được chứng minh ở nhiều đối tượng thực vật. Glutamine là một trong những loại acid amin sẵn có và là nguồn cung cấp năng lượng hiệu quả cho hoạt động phân chia tế bào. Do đó, glutamine thúc đẩy sự sinh trưởng đối với các tế bào cần năng lượng và tổng hợp một lượng lớn acid nucleic và protein. Ageel và Elmeer (2011) cho rằng, loài *Phoenix dactylifera* L. nuôi cấy trong môi trường bổ sung nitơ hữu cơ, đặc biệt là glutamine ở nồng độ cao, đã cải thiện sự hình thành và tăng trưởng mô sẹo cũng như cảm ứng phát sinh phôi soma [98]. Theo EI-Shiaty và cộng sự (2004), glutamine ở nồng độ 900 mg/L là tối ưu cho sự hình thành phôi soma ở cây cọ [99]. Tuy nhiên, đối với đậu Thổ Nhĩ Kỳ, thì nồng độ glutamine chỉ giảm xuống còn 40 mg/L [100]. Đối với cây cọc rào, nồng độ glutamine 150 mg/L giúp gia tăng sự phát sinh phôi soma từ mô sẹo [94]. El-Dawayati và cộng sự (2018) cho rằng việc bổ sung 300 mg/L glutamine giúp tăng cường đáng kể sự hình thành phôi soma cây chà là Sewi (*Phoenix dactylifera*) [101]. Tương tự, mô sẹo của lúa Navara (*Oryza sativa* ssp.) thu được trong môi trường có bổ sung glutamine cao nhất là 40%, ở nồng độ 500 mg/L [102].

Polyamine

Polyamine hiện diện trong tất cả các tế bào thực vật. Putrescine (Put), spermidine (Spd) và spermine (Spm) là các loại polyamine phổ biến nhất trong thực vật bậc cao. Polyamine được tổng hợp từ các amino acid thông qua các phản ứng decarboxyl hóa. Các amino acid cơ bản như arginine và ornithine là nguyên liệu để

tổng hợp của bộ khung carbon giúp hình thành putrescine, dưới sự xúc tác của enzyme ODC (ornithine decarboxylase) và ADC (arginine decarboxylase). Ngược lại, methionine kết hợp với nhóm polyamine để tổng hợp spermidine và từ spermidine tạo thành spermine. Hoạt động của ADC và ODC tùy thuộc vào sinh lý và điều kiện sinh trưởng và phát triển của thực vật. ADC có vai trò như là enzyme giúp cho sự kéo dãn tế bào, tham gia vào quá trình trao đổi chất thứ cấp và đáp ứng với những điều kiện không thuận lợi của môi trường, trong khi đó ODC giúp cho quá trình phân chia tế bào. Polyamine có thể tồn tại ở dạng tự do hay liên kết với coumaroyl, ferulic, acid hydrocinnamic…[103]

Bên cạnh đó, polyamine được xem là một nhóm chất điều hòa sinh trưởng mới liên quan đến sự gia tăng sinh khối và quá trình biệt hóa tế bào, bao gồm cả quá trình phát sinh phôi soma. Bổ sung polyamine ngoại sinh ở các nồng độ khác nhau có hiệu quả tích cực trong việc cải thiện sự phát sinh hình thái vì polyamine ngoại sinh không những kích thích sự phân chia tế bào mà còn gia tăng khả năng tái sinh của tế bào thực vật [104].

Paschalidis và Angelakis (2005) chỉ ra mối quan hệ tích cực giữa quá trình tổng hợp polyamine và thúc đẩy quá trình phân chia tế bào trong lá non cây thuốc lá. Hơn nữa, polyamine thúc đẩy sự phân chia tế bào mô phân sinh, sự phân chia tế bào ở vùng này tăng lên nhanh chóng trong suốt quá trình hình thành phôi soma. Hàm lượng polyamine giảm ở giai đoạn sau của quá trình phát sinh phôi soma. Như vậy, hàm lượng polyamine thay đổi trong suốt giai đoạn phát sinh phôi soma và hàm lượng polyamine nội sinh ở giai đoạn sớm của quá trình phát sinh phôi soma cao hơn so với những tế bào không có khả năng phát sinh phôi soma và phôi soma ở giai đoạn thành thục [105].

Polyamine cũng có vai trò tích cực trong việc kích thích sự cảm ứng hình thành phôi soma và đã được chứng minh qua rất nhiều nghiên cứu trên các đối tượng khác nhau (Bảng 1.7). Các nghiên cứu chỉ ra, có sự liên quan chặt chẽ giữa sự phát sinh phôi soma và việc gia tăng hàm lượng polyamine trong tế bào ở nuôi cấy phôi soma, ức chế quá trình sinh tổng hợp polyamine dẫn đến hiện tượng ức chế sự phát sinh phôi soma.

Kevers và cộng sự (2000) khi nghiên cứu phát sinh phôi soma từ mô sẹo có nguồn gốc từ mẫu cấy rễ *P. ginseng* kết hợp polyamine hay bổ sung một số tiền chất như arginine và ornithine trong môi trường cảm ứng hay tăng sinh phôi soma có tác dụng làm gia tăng số lượng phôi soma tạo thành lên gấp 4 lần. Việc ức chế cả quá trình sinh tổng hợp hay phân giải polyamine dẫn đến việc làm giảm số lượng phôi

soma tạo thành [106]. Qua đó, cho thấy vai trò của polyamine trong quá trình phát sinh phôi soma.

Kết quả tương tự cũng được Monteiro và cộng sự (2002) công bố trong nghiên cứu sự phát sinh phôi soma của *P. ginseng* từ nguồn mẫu là những tế bào có khả năng phát sinh phôi soma nuôi cấy trong môi trường lỏng 1/2 MS có bổ sung auxin tổng hợp BSAA. Việc bổ sung spermidine vào trong môi trường nuôi cấy có hiệu quả trong việc gia tăng số lượng phôi soma phát sinh. Trong trường hợp này, hàm lượng polyamine tổng số của phôi soma cao hơn so với đối chứng không bổ sung spermidine [107].

Tỷ lệ mẫu phát sinh phôi soma được cải thiện khi bổ sung spermidine vào môi trường nuôi cấy *Saccharum* spp. ở nồng độ 15 mg/L [108]; *O. sativa* L. ở nồng độ 150 mg/L [109]; sâm Ngọc Linh ở nồng độ 15 mg/L [95]; *Cunninghamia lanceolate* ở nồng độ 1,5 – 3,0 mg/L [87]. Hơn nữa, polyamine cũng giúp duy trì sự sinh trưởng và phát triển của *Pinus sylvestris* L., đặc biệt là trong điều kiện bất lợi hoặc stress [110].

Bảng 1.6. Vai trò của polyamine trong nuôi cấy *in vitro*

Mục đích nghiên cứu	**Đối tượng thực vật**	**Polyamine**	**Loại, nồng độ tối ưu**	**Đáp ứng của mẫu**	**Nguồn**
Cảm ứng tạo mô sẹo	*Cocos nucifera*	Put và Spm	20 mg/L Spm	Mô sẹo có khả năng sinh phôi	[111]
	Hancorina speciosa	Spd và Spm	-	Không tác động đến sự tăng sinh mô sẹo	[112]
Nhân nhanh chồi	*Bacopa monnieri*	Put, Spd và Spm	150 mg/L Spd	Chồi sinh trưởng tốt	[113]
	Citrullus lanatus	Put, Spd và Spm	100 mg/L Spd	Số lượng và chiều dài chồi gia tăng	[114]
	Withania somnifera	Put, Spd, Spm	200 mg/L Spd	Cảm ứng nhân nhanh chồi 46,4 chồi/đốt	[115]

	Oryza sativa	Spd	150 mg/L	Tăng hiệu quả phát sinh phôi soma ở 3 giống ASD16, ADT43 và IR64	[109]
	Cunninghamia lanceolate	Spd	22 – 44 mg/L	Tăng hiệu quả phát sinh phôi soma do ảnh hưởng đến hàm lượng phytohormone nội sinh	[87]
Phát sinh phôi soma	*Saccharum* spp	Put, Spd và Spm	200 mg/L Spd	96,3% mẫu có khả năng phát sinh phôi soma	[108]
	Eleusine coracana	Spd	218 mg/L Spd	Số lượng mẫu tạo mô sẹo có khả năng sinh phôi cao nhất	[116]
	Jatropha curcas	Spd	0,3 mg/L	Tăng sự hình thành phôi soma từ mô sẹo	[94]
	P. ginseng	Put, Spd và Spm	150 mg/L Spd	Phát sinh phôi soma cao gấp 4 lần	[106]
	P. vietnamensis	Spd	15 mg/L	Tỷ lệ phát sinh phôi soma 93,3%; 353 phôi/mẫu	[95]
Tạo rễ	*C. lanatus*	Put, Spd và Spm	100 mg/L Put	Số lượng và chiều dài rễ tăng	[114]
	Glycine max	Put, Spd và Spm	5,5 mg/L Put	Hiệu quả hình thành rễ tốt nhất	[117]

Như vậy, acid amin và polyamine có tác dụng tích cực đến các quá trình phát sinh hình thái ở thực vật nói chung và quá trình phát sinh phôi soma nói riêng. Trong đó, mỗi đối tượng thực vật lại đáp ứng với loại và nồng độ acid amin và polyamine

khác nhau cần thiết thúc đẩy quá trình phát sinh phôi soma. Do đó, việc nghiên cứu tìm ra loại và nồng độ polyamine để gia tăng hiệu quả của quá trình phát sinh phôi soma cho từng đối tượng thực vật cụ thể là cần thiết.

1.2.4.5. Nước dừa

Vai trò của nước dừa trong việc kích thích phát sinh phôi soma đã được khẳng định ở các báo cáo trên nhiều thực vật khác nhau. Những chất có hiệu quả tăng cường khả năng phát sinh phôi soma và sinh trưởng của mẫu trong nước dừa bao gồm PGRs (auxin, cytokinin, gibberellin, acid abscisic, khoáng chất (magnesium, phosphate), vitamin, đường chiếm khoảng 2,5% (w/v), lipid, amino acid, acid hữu cơ và enzyme [118]. Nitrogen trong nước dừa được sử dụng để tổng hợp amino acid và phytohormone cần thiết cho sự sinh trưởng của thực vật. Thêm vào đó, nước dừa còn có vai trò thay thế những hợp chất hữu cơ cần thiết cho sự sinh trưởng của mẫu cấy nhưng lại có giá thành cao như là zeatin [119]. Các tác giả cho rằng kết hợp giữa nước dừa và BAP hoàn toàn có thể thay thế zeatin và một số hợp chất hữu cơ trong quá trình nuôi cấy phôi soma oliu "Galega vulgar".

Đối với *P. vietnamensis*, nước dừa được sử dụng nhằm gia tăng hiệu quả phát sinh phôi soma thứ cấp từ lá mầm. Các lá mầm cảm ứng tạo mô sẹo và phát sinh phôi soma dưới tác dụng của nước dừa (10%) kết hợp với IBA (0,2 mg/L). Kết quả nghiên cứu cho thấy, sau khoảng 15 ngày nuôi cấy, lá mầm gia tăng kích thước, sau đó, hình thành nhiều cụm mô nhỏ và nhiều phôi soma đơn trên bề mặt mẫu. Bên cạnh đó, ở gốc lá mầm còn tạo mô seo có khả năng sinh phôi. Như vậy, các auxin tự nhiên trong nước dừa kết hợp với IBA ngoại sinh tác động đến sự tạo mô sẹo và phát sinh phôi soma [39].

Khierallah và cộng sự (2013) khi nghiên cứu vai trò của nước dừa đến khả năng phát sinh phôi soma cây chà là (*Phoenix dactylifera*) cho rằng, nước dừa có tác động tích cực đến khả năng phát sinh phôi soma của mẫu cấy với hàm lượng nước dừa tốt nhất ở 20% (v/v), số lượng phôi soma đạt được là 65 phôi/mẫu. Bên cạnh đó, sự nảy mầm của phôi soma tạo thành cây con hoàn chỉnh cũng được cải thiện khi bổ sung nước dừa vào môi trường nuôi cấy, tỷ lệ nảy mầm là 76% khi bổ sung 10% (v/v) nước dừa so với 45% trong môi trường đối chứng [120]. Tác dụng tích cực của nước dừa là do auxin và cytokinin có trong nước dừa kích thích sự phân chia tế bào, sinh trưởng cũng như phát sinh hình thái của mẫu.

Souza và cộng sự (2013) nghiên cứu ảnh hưởng của nước dừa đến nuôi cấy phôi hợp tử của 19 giống oliu khác nhau cho rằng nước dừa có tác động tích cực đến sự

sinh trưởng của phôi, tuy nhiên với mỗi giống lại đáp ứng với một hàm lượng nước dừa bổ sung khác nhau, hàm lượng thích hợp nhất cho giống "Santa Catalina" là 2,5%, trong khi với giống "Cerignola" là 10% [121].

Bertero và cộng sự (2020) khi nghiên cứu sự phát sinh phôi soma trực tiếp cũng như tái sinh cây con từ nguồn mẫu cấy lá của *Minthostachys verticillate* báo cáo nước dừa ở nồng độ 2,5% đã cải thiện đáng kể số lượng phôi soma trên mỗi mẫu, 100% mẫu lá phát sinh phôi soma, trong khi ở nồng độ nước dừa cao hơn (5%) chỉ có 43,1% mẫu phát sinh phôi soma [122].

Như vậy, nước dừa có vai trò tích cực trong quá trình phát sinh và phát triển của phôi soma nuôi cấy *in vitro*. Tuy nhiên, tùy theo từng đối tượng thực vật mà có nhu cầu khác nhau về hàm lượng sử dụng. Hơn nữa, sử dụng nước dừa trong nuôi cấy phôi soma có thể làm giảm chi phí của quá trình sản xuất do giá thành của chúng rẻ và chúng có thể thay thế một số hợp chất hữu cơ có giá thành cao cần thiết cho sự tăng trưởng của mẫu.

1.2.4.6. Đường

Đường được biết đến là nguồn cacbon chủ yếu được sử dụng phổ biến trong môi trường nuôi cấy mô với vai trò cung cấp năng lượng cho hoạt động sống của tế bào. Vì vậy, việc sử dụng đường để cung cấp năng lượng và tham gia vào cấu trúc của tế bào và thành tế bào là điều rất cần thiết. Đối với các đối tượng thực vật, cũng như từng loại mẫu cấy khác nhau thì loại đường và hàm lượng sử dụng có tác động không giống nhau đến khả năng phát sinh hình thái và tích lũy các chất thứ cấp (Bảng 1.8). Ngoài ra, đường vẫn được sử dụng ngay cả trong trường hợp nuôi cấy các mẫu ở dạng chồi có khả năng tự quang hợp. Các dạng đường đơn fructose và glucose tạo ra qua quá trình thủy phân sucrose khi hấp ở nhiệt độ cao giúp mẫu cấy dễ dàng hấp thụ.

Đường trong môi trường nuôi cấy không những có tác dụng kích thích sự sinh trưởng của mẫu cấy mà còn có vai trò quan trọng trong sự gia tăng tổng hợp các hợp chất thứ cấp, nguyên nhân là do sự gia tăng hàm lượng đường có thể dẫn đến thay đổi áp suất thẩm thấu từ đó cảm ứng tổng hợp nên các hoạt chất thứ cấp. Park và cộng sự (2006) báo cáo rằng khi bổ sung đường vào môi trường nuôi cấy tế bào *Eschscholtzia californica* hàm lượng alkaloid được tổng hợp gia tăng đáng kể [125].

Zhang và Zhong (1997) báo cáo rằng, hàm lượng đường phù hợp nhất trong nuôi cấy huyền phù tế bào *P. notoginseng* từ 30 đến 50 g/L. Đồng thời, việc giữ ổn định hoặc bổ sung thêm hàm lượng đường sucrose hay các loại đường khác vào trong

môi trường nuôi cấy giúp sự sinh trưởng và tích lũy các chất thứ cấp cao hơn so với việc bổ sung hàm lượng đường quá cao ở thời điểm nuôi cấy ban đầu [126]. Tương tự, trong công bố của Ali và cộng sự (2016), các nguồn carbohydrate (sucrose, maltose, fructose và glucose), nồng độ sucrose (10, 30, 50, 70 và 90 g/L) và thời điểm bổ sung (ngày thứ 12, 18 và 24) trong quá trình nuôi cấy ảnh hưởng đến sự tích lũy sinh khối và các chất chuyển hóa thứ cấp chống oxy hóa của huyền phù tế bào *Artemisia absinthium*. Kết quả tốt nhất thu được ở nghiệm thức 50 đến 70 g/L sucrose cung cấp ở thời điểm ban đầu. Sau khi bổ sung thêm 3% đường sucrose cho các mẫu nuôi vào ngày 24 cho thấy sinh khối, tổng hàm lượng phenolic và flavonoid cao hơn so với các mẫu nuôi cấy đối chứng. Đồng thời, hoạt tính enzyme chống oxy hóa cao nhất ở các mẫu trong môi trường cung cấp maltose [127]. Ngoài ra, Faisal và cộng sự (2021) trong nuôi cấy phôi soma *Brassica juncea* L. báo cáo, trong số các nguồn carbon cung cấp được thử nghiệm thì fructose, glucose và sucrose đều có tác động đến sự phát sinh phôi soma. Trong đó đường sucrose ở hàm lượng 30g/l cho hiệu quả phát sinh phôi soma là cao nhất [128]. Đối với *P. vietnamensis*, khi bổ sung 50 g/L đường sucrose thì kích thích hình thành phôi soma hiệu quả hơn so với glucose và fructose, với tỷ lệ phát sinh phôi soma và số phôi cao nhất (tương ứng 86,7% và 167 phôi) [95].

Bảng 1.7. Ảnh hưởng của hàm lượng đường sucrose lên sự phát sinh hình thái của mẫu

Phát sinh hình thái	***Panax* sp.**	**Mẫu cấy**	**Hàm lượng sucrose (%)**	**PGRs**	**Nguồn**
Phát sinh phôi soma	*P. ginseng*	Lá	3	1,7 mg/L NAA + 2 mg/L 2,4-D	[63]
	P. pseudoginseng	Thân rễ	3	2,5 mg/L 2,4-D + 2,5 mg/L BAP	[68]
Tạo mô sẹo	*P. ginseng*	Bao phấn	9	1 mg/L 2,4-D	[123]
		Rễ	3	2 mg/L 2,4-D + 0,5 mg/L kinetin	[124]
Tạo chồi	*P. ginseng*	Lá	3	4 mg/L BAP	[34]
		Bao phấn	9	10 mg/L GA_3	[123]

Hàm lượng carbon được cung cấp tác động đến cả hai giai đoạn phát sinh và trưởng thành phôi soma, thể hiện qua việc thay đổi tỷ lệ phôi hình cầu, hình tim, thủy lôi, có lá mầm. Trên đối tượng *P. ginseng*, việc giảm hàm lượng đường và nitrate ảnh hưởng tích cực đến sự trưởng thành của phôi soma cũng như tạo cây con hoàn chỉnh. Hàm lượng đường 30 g/L mặc dù kích thích sự tăng sinh nhưng lại ức chế sự trưởng thành của phôi soma và khi giảm hàm lượng đường xuống 20 g/L thì sự trưởng thành phôi soma được cải thiện, phôi chuyển từ giai đoạn hình cầu sang những giai đoạn tiếp theo [12].

Như vậy, nguồn carbon cung cấp có vai trò rất lớn trong sự phát sinh phôi soma và mỗi đối tượng thực vật cần nguồn cung cấp carbon cũng như hàm lượng khác nhau. Do vậy, việc nghiên cứu nguồn cung cấp carbon và hàm lượng sử dụng cho mỗi đối tượng thực vật là điều cần thiết nhằm gia tăng hiệu suất của quá trình nuôi cấy.

1.2.4.7. Stress và sự phát sinh phôi soma

Quá trình phát sinh phôi soma bao gồm sự phân chia tế bào, sự biệt hóa và những thay đổi sinh lý bên trong tế bào. Các yếu tố bên ngoài ảnh hưởng lớn đến quá trình phát sinh phôi soma, chẳng hạn như tổn thương mẫu (stress vết thương), khử trùng bề mặt (stress oxy hóa) và môi trường nuôi cấy (thiếu nước/stress thẩm thấu). Hơn nữa, tín hiệu stress rất quan trọng trong quá trình biệt hóa tế bào do stress gây ra sự sản sinh các loại oxy phản ứng (ROS). Người ta đã chứng minh rằng có mối quan hệ giữa việc tăng cường sản xuất ROS và cải thiện khả năng phát sinh phôi soma ở nhiều đối tượng thực vật. Tuy nhiên, mức độ ROS vừa phải có thể cảm ứng các tế bào soma thay đổi hình thái và biệt hóa. Ngược lại, hàm lượng ROS quá mức sẽ phá vỡ tính thấm của màng và cũng như các đại phân tử sinh học như lipid, protein và acid nucleic, dẫn đến mất tính toàn năng của tế bào và thậm chí làm chết tế bào [129]. Để hạn chế ảnh hưởng của ROS, thực vật có cơ chế kiểm soát hàm lượng ROS bằng cách sinh tổng hợp các enzyme chống oxy hóa catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) và ascorbate peroxidase (APX). Những enzyme này đóng một vai trò thiết yếu trong quá trình phát sinh phôi soma, một phần do khả năng loại bỏ ROS được tạo ra bởi các điều kiện stress bên ngoài tác động đến thực vật [130].

Polyamine (PA) là một hợp chất hữu cơ, có trọng lượng phân tử thấp, đóng vai trò quan trọng trong việc điều chỉnh quá trình trao đổi chất cơ bản của thực vật. Chúng điều chỉnh các chức năng của tế bào, bao gồm tín hiệu phân tử, phân chia và biệt hóa tế bào, tính toàn năng, quá trình sinh trưởng và phát triển, bảo vệ khỏi tổn hại do oxy hóa và phản ứng với stress môi trường [131]. Nhiều nghiên cứu đã chứng minh rằng

PA có thể tham gia vào các tương tác hiệp đồng hoặc đối kháng với các loại hormone thực vật khác nhau, cho thấy có mối liên hệ giữa hormone và PA [132]. Ngoài ra, polyamine bảo vệ tế bào khỏi sự phá hủy của các nhóm oxy phản ứng và các gốc tự do bằng cách duy trì độ trương và thẩm thấu của tế bào, loại bỏ các loại oxy hoạt hóa, bảo vệ DNA và màng tế bào khỏi bị hư hại, đồng thời giảm tổng hợp H_2O_2 và superoxide trong điều kiện stress [133]. Do đó, polyamine được thêm vào môi trường nuôi cấy sẽ thúc đẩy quá trình phát sinh phôi soma bằng cách điều chỉnh hàm lượng oxy hoạt hóa và hormone nội sinh. Nhiều nghiên cứu cho rằng việc bổ sung loại và nồng độ acid amin và polyamine phù hợp có tác dụng gia tăng hiệu quả phát sinh phôi soma.

1.3. Kỹ thuật nuôi cấy lớp mỏng tế bào (Thin cell layer – TCL)

1.3.1. Giới thiệu nuôi cấy lớp mỏng tế bào

Mẫu cấy có vai trò quan trọng đối với hiệu quả của quá trình nuôi cấy mô, tế bào và cơ quan thực vật. Trong đó, kiểu gen, nguồn gốc mẫu, tuổi sinh lý, kích thước cũng như hình dạng của mẫu ảnh hưởng đến sự phát sinh hình thái [134]. Ý tưởng về nuôi cấy TCL được Trần Thanh Vân đề xuất vào năm 1973 trong nghiên cứu *Nicotiana tabacum* [135]. Tác giả đã cho rằng, sự tái sinh và tái lập trình của cơ quan hoặc phôi soma *in vitro* có thể thực hiện được nếu tách được một số lớp tế bào đã biệt hóa khỏi cơ quan hoặc mô ban đầu. Nuôi cấy TCL là một kỹ thuật có nhiều ưu điểm nhằm mục tiêu phát sinh các dạng mô, cơ quan khác nhau.

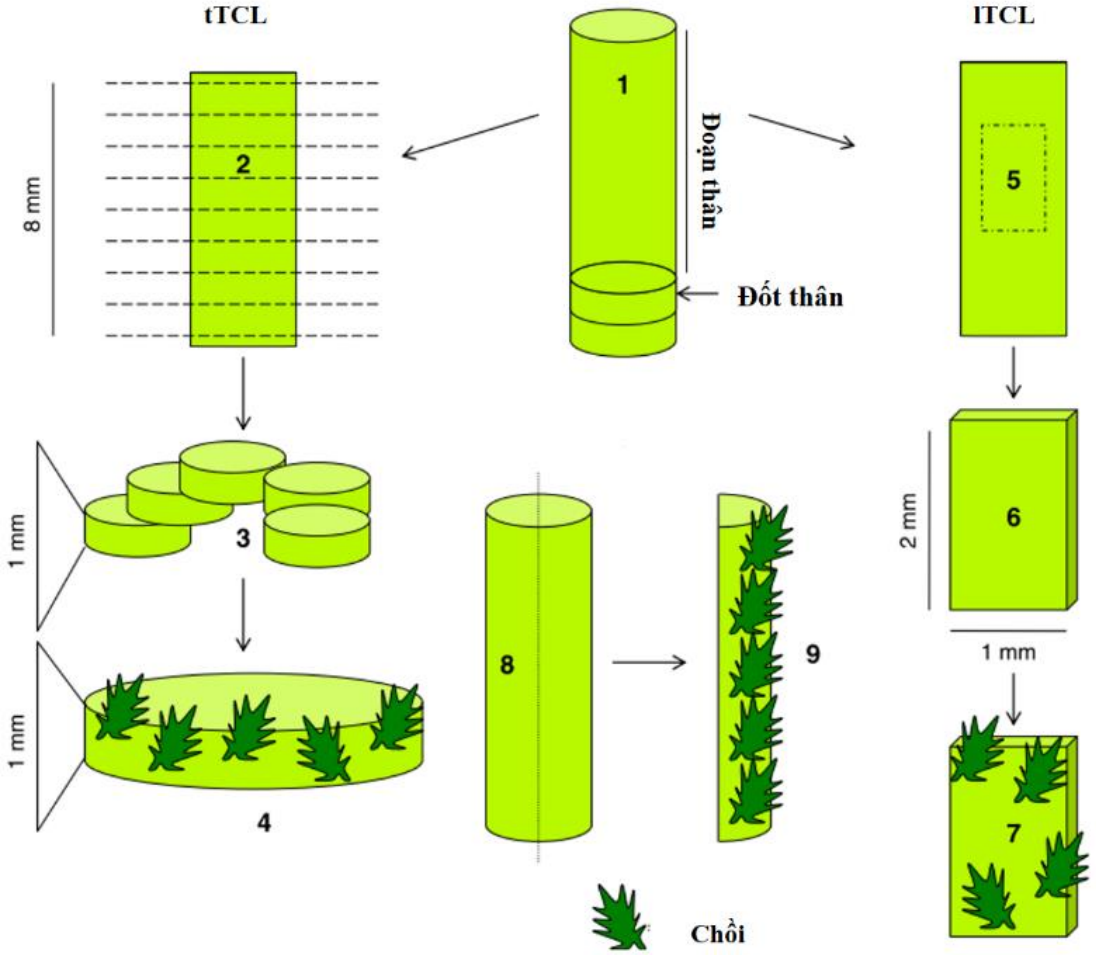
1.3.2. Đặc điểm của nuôi cấy lớp mỏng tế bào

Các mẫu TCL có đặc điểm rất mỏng [136], được cắt từ các nguồn mẫu cấy như: thân, lá, gân lá chính, thân rễ, cuống lá, lá mầm, protocorm [137-143]. Các mẫu TCL bao gồm một vài lớp tế bào nên hàm lượng hormone nội sinh của mẫu thấp, khả năng hấp thu dưỡng chất tốt hơn [144]. Ngoài ra, diện tích vết thương ở mẫu cấy TCL lớn hơn nhiều so với các mẫu cấy thông thường nên đáp ứng tốt hơn với điều kiện stress. Do đó, chúng phản ứng nhanh với môi trường dinh dưỡng, phát sinh phôi soma và cơ quan tốt hơn.

Mặc dù hệ số nhân giống thực tế của mẫu TCL thấp hơn so với mẫu cấy thông thường, tuy nhiên, khi xét về hệ số điều chỉnh tăng trưởng (GCF) (được tính dựa trên "Tỷ lệ mẫu phát sinh phôi soma", "Số lượng phôi soma hình thành/mẫu" và "Hệ số mẫu") cho thấy hiệu quả nhân giống của mẫu TCL cao hơn so với mẫu thông thường và đã được báo cáo ở nhiều thực vật (địa lan lai, hoa cúc và táo…) [145-147].

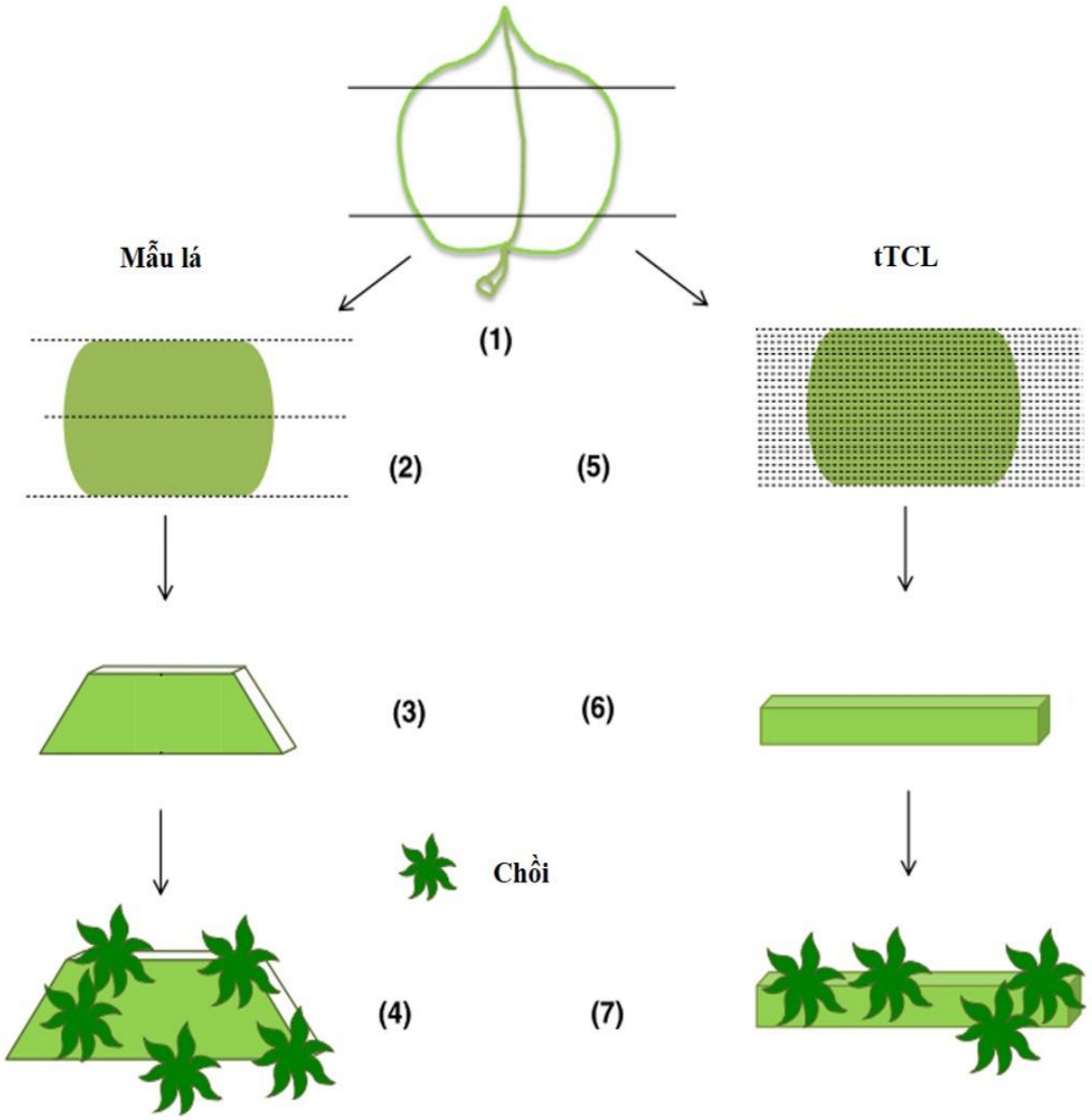
Những cây con có nguồn gốc từ mẫu TCL có đặc điểm di truyền thường ổn định [142]. Kỹ thuật TCL gây ít tổn thương cho cây mẹ, nguồn mẫu dồi dào và có hệ số nhân cao, đặc biệt là khi đánh giá số lượng cơ quan tái sinh trên mỗi mẫu cấy [138]. Qua đó, hiệu quả vi nhân giống được cải thiện. Đặc biệt, kỹ thuật TCL thường được sử dụng phổ biến trong nuôi cấy một số thực vật quý hiếm, hạn chế về số lượng mẫu.

Bên cạnh đó, kỹ thuật này tạo điều kiện thuận lợi cho việc xác định các gen biệt hóa trong tế bào đích[148]. Các mẫu TCL được sử dụng trong nghiên cứu quan sát cấu trúc và phát sinh hình thái cũng như nguồn gốc của cơ quan phát sinh thuận lợi hơn so với các mẫu thông thường. Do đó, kỹ thuật TCL là một trong những kỹ thuật vi nhân giống hứa hẹn tạo ra nguồn cây giống đảm bảo về mặt số lượng và chất lượng.



Hình 1.2. Mẫu cấy tTCL hoặc lTCL từ mẫu đốt thân [147]. (1, 2 và 3) Mẫu được cắt lớp mỏng theo chiều ngang tTCL; (5, 6 và 8) Mẫu được cắt lớp mỏng theo chiều dọc lTCL; (4, 7, 9) Sự hình thành chồi trên bề mặt mẫu.

Dựa vào phương thức cắt mẫu mà chia thành hai hai loại mẫu TCL bao gồm lớp mỏng được cắt theo chiều ngang (tTCL - transverse TCL) và lớp mỏng được cắt theo chiều dọc (lTCL - longitudinal TCL) (Hình 1.2 và 1.3). Mẫu cấy lTCL bao gồm một loại mô, chẳng hạn như lớp tế bào biểu bì. Mẫu lTCL thường dùng trong nghiên cứu các cơ chế như biệt hóa tế bào và sự hình thành cơ quan từ lớp tế bào đã được xác định rõ ràng. Trong khi đó, mẫu tTCL chứa một số lượng tế bào của các loại mô khác nhau (biểu bì, vỏ, tế bào bao quanh bó mạch và tế bào nhu mô). Mẫu tTCL được sử dụng để cải thiện hiệu quả tái sinh cơ quan hoặc sự phát sinh phôi soma.



Hình 1.3. Mẫu lá tTCL [147]. (1) Mẫu lá ban đầu; (2, 3, 5 và 6) Mẫu lá được cắt lớp mỏng theo chiều ngang; (4 và 7) Chồi tạo thành từ các tế bào biểu bì và tế bào nhu mô.

1.3.3. Những nghiên cứu về nuôi cấy lớp mỏng tế bào

Kỹ thuật TCL được thực hiện và công bố đầu tiên trên cây mô hình *N. tabacum* [135]. Sau đó, kỹ thuật này tiếp tục được thực hiện và ứng dụng trong vi nhân giống hơn 100 đối tượng thực vật trong thời gian 50 năm. Đồng thời, kỹ thuật này cũng dùng trong nghiên cứu về quá trình phát sinh phôi soma trên nhiều thực vật, chẳng hạn như: cây lâm nghiệp, cây hoa, cây dược liệu, cây ăn trái (Bảng 1.6).

Do kích thước của mẫu cấy rất nhỏ (độ dày 100 μm đến 1–2 mm) nên sự tương tác giữa các tế bào và môi trường nuôi cấy tốt hơn. Do đó, hiệu quả trong quá trình phát sinh phôi soma cao hơn so với mẫu cấy thông thường. Hơn nữa, kỹ thuật này còn giúp gia tăng hiệu suất phát sinh phôi soma và giảm thời gian tăng sinh của mẫu cấy, đây là chìa khóa cho sự biệt hóa của tế bào và mô thực vật.

Bảng 1.8. Sự phát sinh phôi soma ở một số thực vật sử dụng kỹ thuật nuôi cấy lớp mỏng tế bào

Thực vật	Loại mẫu cấy	Kiểu TCL	Kích thước mẫu	Nguồn
Actinidia chinensis	Gân lá chính	tTCL, lTCL	0,5 – 1,0 mm	[138]
Bactris gasipaes	Chồi	tTCL	0,3 mm	[149]
Brasilidium forbesii	Protocorm	tTCL, lTCL	1,0 mm	[150]
Citrus spp.	Nhụy và vòi nhụy	tTCL	0,4 – 0,5 mm	[151]
Guadua chacoensis	Chồi	tTCL	0,5 – 1,0 mm	[152]
Jatropha curcas	Cuống lá	tTCL	0,8 – 1,0 mm	[153]
Panax vietnamensis	Lá Cuống lá thân rễ	tTCL lTCL tTCL	1 x 10 mm 1 x 5 mm 1 mm	[40, 58, 139]
Phalaenopsis amabilis	Mầm ngủ phát hoa Lá	tTCL lTCL	0,5 mm	[154]
Pinus patula	Chồi ngọn	tTCL	0,5 – 1,0 mm	[155]
	Phôi non	tTCL, lTCL	0,3 – 0,5 mm	[143]

1.4. Nano bạc trong khử trùng và kích thích sinh trưởng mẫu cấy

1.4.1. Hiệu quả của nano bạc trong khử trùng mẫu thực vật

Trong nuôi cấy mô thực vật, sự xâm nhiễm vi sinh vật có thể do nhiều loại côn trùng nhỏ khác nhau, vi sinh vật (nấm sợi, nấm men, vi khuẩn), virus và viroid. Nhiễm vi sinh vật trước hoặc sau giai đoạn cảm ứng của mẫu cấy đều ảnh hưởng nghiêm trọng cho toàn bộ quá trình nuôi cấy.

Khử trùng bằng nhiệt độ cao thường được sử dụng thường xuyên ở các phòng thí nghiệm để tiệt trùng môi trường và các dụng cụ nuôi cấy. Tuy nhiên, các vật liệu thực vật không thể khử trùng bằng nhiệt vì chúng dễ bị tổn thương. Do đó, để có nguồn mẫu sạch, cung cấp cho quá trình nuôi cấy cần phải tìm ra một phương pháp khử trùng thích hợp.

Một bước khởi đầu quan trọng của nuôi cấy *in vitro* là khử trùng bề mặt của mẫu cấy. Các mẫu thường được thu thập trong tự nhiên hoặc từ các vườn ươm, bản thân chúng có thể bị nhiễm các vi sinh vật khác nhau. Đồng thời, các vi sinh vật phát triển mạnh hơn so với mẫu cấy thực vật trong môi trường nuôi cấy. Do đó, sau khi thu thập, mẫu thực vật được khử trùng bề mặt bằng một số hóa chất khác nhau như ethanol, nước brom (BW), hydrogen peroxide (H_2O_2), thủy ngân clorua ($HgCl_2$), natri hypocloride (NaOCl), canxi hypocloride ($Ca(OCl)_2$), thuốc diệt nấm, kháng sinh… [156].

Tuy nhiên, những chất khử trùng truyền thống thường có tính chất tẩy rửa cao, tác động đến thành tế bào của vi sinh vật theo cơ chế ăn mòn vách. Do đó, sẽ ảnh hưởng tiêu cực đến sự sống sót cũng như tái sinh của mẫu cấy hoặc thậm chí dẫn đến hoại tử các mẫu thực vật nên có hiệu quả khử trùng thấp [157]. Bên cạnh đó, hầu hết các chất khử trùng thông dụng hiện nay đều có tác động tiêu cực đối với sức khỏe con người [158].

Vì vậy, các nhà khoa học luôn tìm kiếm các phương pháp và chất khử trùng mới. Trong số đó, các ion bạc như nitrate bạc ($AgNO_3$), thiosulphate bạc ($Ag(S_2O_3)_2$) được nghiên cứu và áp dụng rộng rãi trong quá trình khử trùng và nuôi cấy mẫu thực vật. Chúng có những ưu điểm an toàn cho sức khỏe người sử dụng và đồng thời có hiệu quả cao trong việc kháng nấm, kháng khuẩn. Mặt khác, các ion bạc còn có vai trò tích cực trong sự phát triển của mẫu nuôi cấy *in vitro* như mô sẹo, chồi, phôi soma, rễ…. Tuy nhiên, cũng cần lưu ý rằng các ion bạc thường đi kèm với các anion tồn tại ở dạng muối. Do đó, khả năng chuyển hóa, hấp thu ion bạc, hiệu quả khử trùng, phát sinh hình thái và sinh trưởng của mẫu bị ảnh hưởng [159].

Để khắc phục những vấn đề của các ion bạc dạng muối, thời gian gần đây, AgNPs được sử dụng thay cho các chất khử trùng truyền thống. AgNPs không những làm giảm sự gây nhiễm mà còn kích thích mẫu cấy phát sinh hình thái. AgNPs bao gồm các ion có kích thước nhỏ (1 - 20 nm), diện tích tiếp xúc bề mặt lớn. Do đó, chúng dễ dàng tiếp cận và bám lên bề mặt tế bào, từ đó gia tăng hiệu quả khử trùng cũng như tác động sinh trưởng. Việc sử dụng AgNPs đã loại bỏ được sự gây nhiễm vi sinh vật của mẫu cấy. Đồng thời, các hạt nano cũng thể hiện những tác động tích cực đến sự cảm ứng hình thành mô sẹo, phôi soma, huyền phù tế bào và cơ quan v.v. Các hạt nano ở nồng độ tối ưu có tác dụng làm giảm hoặc loại bỏ nguồn nhiễm mà không gây hại đến sức sống của mẫu [160].

Khả năng diệt khuẩn của AgNPs là kết quả của quá trình biến đổi và giải phóng liên tục các nguyên tử kim loại bạc trên bề mặt hạt AgNPs thành các ion bạc tự do và các ion tự do này sau đó tác dụng và tiêu diệt vi khuẩn. Các đặc tính kháng khuẩn của bạc là ngăn cản quá trình sao chép DNA của tế bào vi khuẩn. Đặc tính này dựa trên sự tương tác tĩnh điện giữa ion bạc mang điện tích dương và bề mặt tế bào vi khuẩn mang điện tích âm. Đồng thời, chúng vô hiệu hóa nhóm thiol trong enzyme vận chuyển oxy hoặc trên sự tương tác của ion bạc với DNA dẫn đến sự dime hóa pyridin. Ngoài ra, bạc còn có tác động trực tiếp lên màng bảo vệ của tế bào vi khuẩn thông qua việc tương tác với các nhóm peptidoglican làm ức chế khả năng vận chuyển oxy từ bên ngoài vào bên trong tế bào vi khuẩn, kết quả làm ức chế hoạt động hô hấp của vi khuẩn. Ngược lại, AgNPs hầu như không tác động đến sức khỏe người sử dụng ngay cả khi tiếp xúc với các ion bạc. Có thể là do tế bào ở động vật có hai lớp lipoprotein giàu liên kết đôi bền vững có khả năng cho điện tử [161]. Như vậy, AgNPs có khả năng diệt khuẩn theo những phương pháp như phá hủy chức năng hô hấp, phá hủy chức năng của thành tế bào vi khuẩn. Đồng thời, AgNPs lên kết với DNA của tế bào vi sinh vật và ức chế chức năng sao chép của vi sinh vật, kìm hãm không cho chúng phát triển triển mạnh.

Hiệu quả khử trùng chịu ảnh hưởng bởi nhiều yếu tố, như: kích thước, tuổi, loại mẫu, các điều kiện trồng trọt, trạng thái sinh lý của cây mẹ, thời gian và nhiệt độ tiếp xúc, loại chất khử trùng và nồng độ sử dụng. Với các mô mềm, chất khử trùng ở nồng độ cao có thể loại bỏ các vi sinh vật gây nhiễm nhưng đồng thời cũng gây chết mẫu. Nhiều nghiên cứu cho rằng, việc xử lý mẫu với các chất khử trùng ở nồng độ cao và thời gian xử lý dài sẽ cho tỷ lệ mẫu nhiễm thấp. Tuy nhiên, chúng có thể tạo ra những ảnh hưởng bất lợi đối với khả năng sống sót và tái sinh của mẫu xử lý [162].

Do đó, hiệu quả khử trùng mẫu phụ thuộc chất sử dụng, nồng độ và thời gian khử trùng.

Ảnh hưởng tích cực hoặc tiêu cực của việc sử dụng AgNPs trong quá trình khử trùng đối với sự tái sinh và sinh trưởng của mẫu cấy phụ thuộc đặc biệt vào nhiều yếu tố như thành phần, hàm lượng, kích thước, tính chất hóa học và vật lý của hạt nano, cũng như đặc điểm cụ thể của từng loại thực vật. Vì vậy, các nghiên cứu đã được tiến hành để đánh giá hiệu quả khử trùng và ảnh hưởng của AgNPs đến sinh trưởng của cây *in vitro* và *ex vitro*.

Tung và cộng sự (2021) đã chỉ ra, AgNPs ảnh hưởng đáng kể đến khả năng khử trùng mẫu lá dâu tây. Mẫu được xử lý trong 20 phút với 500 mg/L AgNPs cho tỷ lệ mẫu nhiễm chỉ còn 22,22%. Khi giảm nồng độ AgNPs xuống 200 mg/L, thời gian tương tự, thì tỷ lệ mẫu tạo chồi, số chồi/mẫu và số chồi cao trên 1,5 cm đạt giá trị cao nhất (lần lượt 64,44 %, 21 chồi và 6,66 chồi). Như vậy, khi xử lý ở nồng độ 200 mg/L AgNPs, với thời gian 20 phút, không những hiệu quả khử trùng cao mà còn cải thiện sự tái sinh, sinh trưởng và phát triển của mẫu [163]. Các tác giả cũng đã chỉ ra, dưới tác động của những thay đổi về loại, nồng độ và thời gian xử lý khi khử trùng mẫu bằng các ion kim loại có thể hình thành những tín hiệu ion kim loại khác nhau, ảnh hưởng đến mức độ tái sinh, tăng trưởng của mô, tế bào thực vật. Kết quả cũng tương tự, khi nghiên cứu trên đối tượng *Capsicum frutescens* Mill., nguyên nhân là các mô phản ứng mạnh dẫn đến làm tăng kích thước chiều dài của chồi và cũng như số lượng chồi tối đa khi có tác động của AgNPs [164]. Đỗ Mạnh Cường và cộng sự (2020), khi thực hiện khử trùng các mẫu lá sâm Ngọc Linh *ex vitro* chỉ ra rằng, 500 mg/L AgNPs với thời gian xử lý 15 phút cho tỷ lệ nhiễm chỉ còn 20,00% so với 1000 mg/L $HgCl_2$ và 60000 mg/L $Ca(OCl)_{2)}$. Trong khi đó, nghiệm thức 200 mg/L AgNPs, 20 phút cho tỷ lệ mẫu cảm ứng mô sẹo và khối lượng tươi tốt nhất (72,22% và 0,77 g) [165].

Nhìn chung, tùy theo từng đối tượng, loại mẫu sử dụng mà hiệu quả về khả năng khử trùng của AgNPs thay đổi theo. Do đó, việc nghiên cứu và tìm được nồng độ, thời gian hiệu quả của việc khử trùng bằng AgNPs cho từng đối tượng thực vật là cần thiết.

1.4.2. Hiệu quả của nano bạc trong sự sinh trưởng và phát triển thực vật

Gần đây, có nhiều nghiên cứu đã chỉ ra được vai trò của AgNPs trong nuôi cấy mô, tế bào thực vật *in vitro*. Bên cạnh vai trò khử trùng, AgNPs còn được biết đến với vai trò gia tăng kích thước mô, tế bào thực vật, đồng thời cũng cải thiện quá trình

tích lũy các hoạt chất thứ cấp [166]. AgNPs khi được hấp thu vào trong tế bào, sẽ kích thích tổng hợp ROS, từ đó cảm ứng đến các con đường truyền tín hiệu cho tế bào, giúp cải thiện sự sinh trưởng và phát triển của thực vật [167]. Hiệu quả kích thích tăng trưởng mô, tế bào thực vật của AgNPs đã đươc chứng minh ở nhiều đối tượng thực vật như *P. vietnamesis* [10]; *Stevia rebaudiana* Bert. [168]; *Gaillardia pulchella* Foug cv. 'Torch Yellow' [169].

Một số nghiên cứu chỉ ra rằng các hạt nano tác động đến sự cảm ứng mô sẹo, tạo rễ và chồi. Khi bổ sung AgNPs vào trong môi trường MS nuôi cấy đốt thân *Tecomella undulata*, cho thấy có sự gia tăng đáng kể tỷ lệ mẫu cảm ứng phát sinh mô sẹo, chồi, số lượng chồi, tỷ lệ chồi và chiều dài chồi [170]. Kết quả tương tự cũng được công bố liên quan đến dâu tây. Đỗ Mạnh Cường và cộng sự (2018) bổ sung AgNPs trực tiếp vào môi trường nuôi cấy mẫu lá *ex vitro* làm tăng khả năng cảm ứng mô sẹo và tái sinh chồi. Kết quả cho thấy, AgNPs có tác động tích cực trong tất cả các giai đoạn sinh trưởng của mẫu bao gồm tạo mô sẹo, tái sinh chồi và phát triển thành cây con [171].

Ngoài ra, AgNPs cũng có vai trò kìm hãm sự già hóa và tăng tỷ lệ sống sót của mẫu thông qua việc điều hòa biểu hiện của gen *TuACS* - gen tổng hợp ACC (tiền chất cuối trong con đường tổng hợp ethylene). Đồng thời, các hạt nano cũng tác động đến sự cảm ứng mô sẹo, nhân nhanh chồi, phát sinh phôi soma và hình thành rễ bằng cách thay đổi hoạt động của các enzyme chống oxy hóa, biểu hiện của gen và cản trở quá trình tổng hợp ethylene. AgNPs cũng giúp hạn chế quá trình sinh tổng hợp khí ethylene bằng cách ức chế enzyme l-aminocyclo-propane carboxylic acid (enzyme ACC) hoạt động. Điều này giúp kiểm soát hiện tượng thủy tinh thể trong nhân giống cẩm chướng, đồng tiền và hoa hồng [172].

Một số nghiên cứu cũng được tiến hành để đánh giá khả năng gây độc đối với thực vật khi sử dụng các nano kim loại, đặc biệt khi sử dụng ở nồng độ cao. Các hạt nano được có thể tạo ra các tác động trái ngược về khả năng phát sinh cơ quan, sinh trưởng chồi, nảy mầm của hạt, sống sót của mẫu cấy và sinh trưởng của cây con [173, 174].

Từ các kết quả công bố trên cho thấy, các nghiên cứu cần được tiến hành nhằm tìm ra nồng độ nano phù hợp cho từng đối tượng thực vật, cải thiện sự sinh trưởng mà không gây hại cho thực vật cũng như môi trường.

Nhận xét chung:

Qua tìm hiểu các công trình nghiên cứu trên thế giới cũng như trong nước về các vấn đề liên quan có thể rút ra một số nhận xét sau:

Đã có các nghiên cứu về cảm ứng phát sinh phôi soma cũng như nhân nhanh phôi soma trong các môi trường, điều kiện và phương thức nuôi cấy khác nhau; Khử trùng mẫu cấy là bước cần thiết khởi đầu quá trình nuôi cấy mô, việc xác định được loại và nồng độ chất khử trùng là quan trọng nhằm thu được tỷ lệ mẫu không nhiễm nhưng vẫn còn khả năng tái sinh. Ngoài ra, tùy từng đối tượng thực vật, yêu cầu các yếu tố cảm ứng phát sinh hình thái, đặc biệt là quá trình hình thành phôi soma và điều chỉnh các yếu tố đó nhằm kích thích sự phát sinh phôi soma là khác nhau. Do đó, cần có những nghiên cứu cụ thể về việc tìm ra nồng độ chất khử trùng tốt nhất tạo nguồn mẫu ban đầu trong điều kiện *in vitro*; Loại cũng như nồng độ các chất kích thích cảm ứng phát sinh phôi soma; Phát sinh và nhân nhanh phôi soma thứ cấp với mục tiêu gia tăng hệ số nhân; Tái sinh cây hoàn chỉnh có nguồn gốc từ phôi soma cho từng đối tượng thực vật.

Đối với sâm Lang Bian, đây là một đối tượng mới, chưa có những nghiên cứu về sự phát sinh, tăng sinh và phát triển phôi soma được thực hiện. Chính vì lý do đó, nghiên cứu quá trình phát sinh phôi soma sâm Lang Bian (*Panax vietnamensis* var. *langbianensis)* nhằm hiểu rõ và kiểm soát một cách hiệu quả quá trình nuôi cấy phôi soma, góp phần tạo ra nguồn giống phục vụ cho công tác bảo tồn cần được thực hiện.

CHƯƠNG 2. VẬT LIỆU, NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

2.1.1. Vật liệu thực vật

Mẫu thân rễ (đường kính 1,5 cm) của cây sâm Lang Bian 10 năm tuổi được thu thập từ vùng núi Langbiang (Lâm Đồng, Việt Nam) với chiều dài thân rễ khoảng 9 cm, không sâu bệnh được sử dụng làm nguồn vật liệu ban đầu cho nghiên cứu.

Các mẫu cấy lá, cuống lá của cây sâm Lang Bian *in vitro* 12 tuần tuổi hiện có tại Khoa Nông lâm, Trường Đại học Đà Lạt được sử dụng làm nguồn mẫu cho các thí nghiệm phát sinh phôi soma sơ cấp.

Các phôi soma dạng hình thủy lôi được tách ra từ cụm phôi soma được sử dụng làm nguồn mẫu cho các thí nghiệm phát sinh phôi soma thứ cấp.

Các phôi soma dạng lá mầm được tách ra từ các cụm phôi soma được sử dụng làm nguồn mẫu cho các thí nghiệm tạo cây hoàn chỉnh *in vitro*.

Phần thân rễ và rễ bất định tương ứng của cây con có nguồn gốc từ phôi soma thứ cấp và chồi bất định *in vitro* được sử dụng làm nguồn mẫu phân tích hàm lượng saponin tích lũy.

2.1.2. Thiết bị, dụng cụ và hóa chất

2.1.2.1. Thiết bị, dụng cụ

Các thiết bị và dụng cụ được sử dụng trong nghiên cứu bao gồm: Cân kỹ thuật (1500 g, sai số 0,01g, TE1502S Sartorius – Đức), cân phân tích (200 g, sai số 0,0001 g, CP 224S Sartorius – Đức), nồi hấp khử trùng (Hirayama HV- 100 – Nhật Bản), tủ cấy vô trùng, tủ sấy (256 L, 300°C, UF260 Memmert – Đức, máy đo pH (Hanna-HI-2550 – Mỹ), kính hiển vi truyền suốt (CX23, Olympus – Nhật Bản), kính lúp soi nổi (SZX7, Olympus – Nhật Bản).

Các dụng cụ được sử dụng: Bình nuôi cấy 250 mL, bình tam giác 250 mL, đĩa petri, dao cấy, kẹp cấy. Các dụng cụ trước khi sử dụng được hấp khử trùng trong autoclave ở nhiệt độ 121^0C, áp suất 1atm trong thời gian 30 phút.

2.1.2.2. Hóa chất

Các chất khoáng đa lượng, vi lượng, vitamin và sucrose được mua từ hãng Duchefa Biochemie, Hà Lan; các PGRs dùng trong thí nghiệm bao gồm 2,4-D, NAA, IBA, BA, Kinetin được cung cấp từ hãng Merck KGaA, Darmstadt, Đức.

Spermidine dạng dung dịch (Độ tinh khiết > 95%, Sigma-Aldrich, Hoa Kỳ) được điều chỉnh đến nồng độ mong muốn bằng nước cất vô trùng và bổ sung vào môi trường nuôi cấy đã được hấp tiệt trùng qua màng lọc khử trùng (0,45 µm, Sigma-Aldrich, USA).

Proline, glutamin dạng bột (Độ tinh khiết > 99%, Sigma-Aldrich, Hoa Kỳ) được điều chỉnh đến nồng độ mong muốn bằng nước cất vô trùng và bổ sung vào môi trường nuôi cấy trước khi hấp tiệt trùng.

Dung dịch nano bạc (AgNPs) có nồng độ 500 mg/L được cung cấp bởi Viện Công nghệ Môi trường, VAST [175].

2.2. Nội dung nghiên cứu

2.2.1. Nội dung 1: Tạo nguồn mẫu in vitro

Nghiên cứu ảnh hưởng của AgNPs trong khử trùng bề mặt mẫu thân rễ và sinh trưởng tiếp theo.

Nghiên cứu ảnh hưởng của cytokinin đến sự nhân nhanh chồi sâm Lang Bian *in vitro.*

2.2.2. Nội dung 2: Phát sinh phôi soma sơ cấp thông qua nuôi cấy TCL

Nghiên cứu ảnh hưởng của auxin đến sự phát sinh phôi soma sơ cấp *in vitro* từ các mẫu cấy lớp mỏng L-tTCL và P-lTCL

Nghiên cứu ảnh hưởng của proline, glutamine hoặc spermidine đến sự phát sinh phôi soma sơ cấp từ các mẫu cấy lớp mỏng L-tTCL và P-lTCL

Nghiên cứu sự biến động hàm lượng hormone nội sinh trong quá trình phát sinh phôi soma sơ cấp từ các mẫu cấy lớp mỏng L-tTCL và P-lTCL

2.2.3. Nội dung 3: Phát sinh phôi soma thứ cấp

Nghiên cứu ảnh hưởng của môi trường khoáng đến sự phát sinh phôi soma thứ cấp

Nghiên cứu ảnh hưởng của hàm lượng đường đến sự phát sinh phôi soma thứ cấp

Nghiên cứu ảnh hưởng của hàm lượng nước dừa đến sự phát sinh phôi soma thứ cấp

2.2.4. Nội dung 4: Tạo cây sâm từ phôi soma thứ cấp và xác định hàm lượng saponin tích lũy trong cây sâm Lang Bian in vitro

Nghiên cứu tạo cây sâm từ phôi soma thứ cấp và xác định hàm lượng saponin tích lũy trong cây sâm Lang Bian *in vitro*

Nghiên cứu sự sinh trưởng tiếp theo của phôi soma sâm Lang Bian trong môi trường có AgNPs

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Cách tiếp cận

- Kế thừa có chọn lọc các kết quả nghiên cứu trong nước và ngoài nước về các yếu tố khử trùng mẫu cấy, dinh dưỡng cũng như điều kiện nuôi cấy ảnh hưởng đến khả năng phát sinh hình thái, sự hình thành và sinh trưởng của phôi soma *in vitro*, nhằm xây dựng các thí nghiệm về yếu tố khử trùng, dinh dưỡng và điều kiện nuôi cấy… ảnh hưởng đến sự cảm ứng và tăng sinh phôi soma.

- Cập nhật các thông tin trong và ngoài nước về phương pháp cảm ứng và nuôi cấy phôi soma của một số cây dược liệu với mục đích đưa ra các giải pháp kỹ thuật để giải quyết các vấn đề được đặt ra trong thực tiễn.

2.3.2. Phương pháp bố trí thí nghiệm

2.3.2.1. Nội dung 1: Tạo nguồn mẫu in vitro

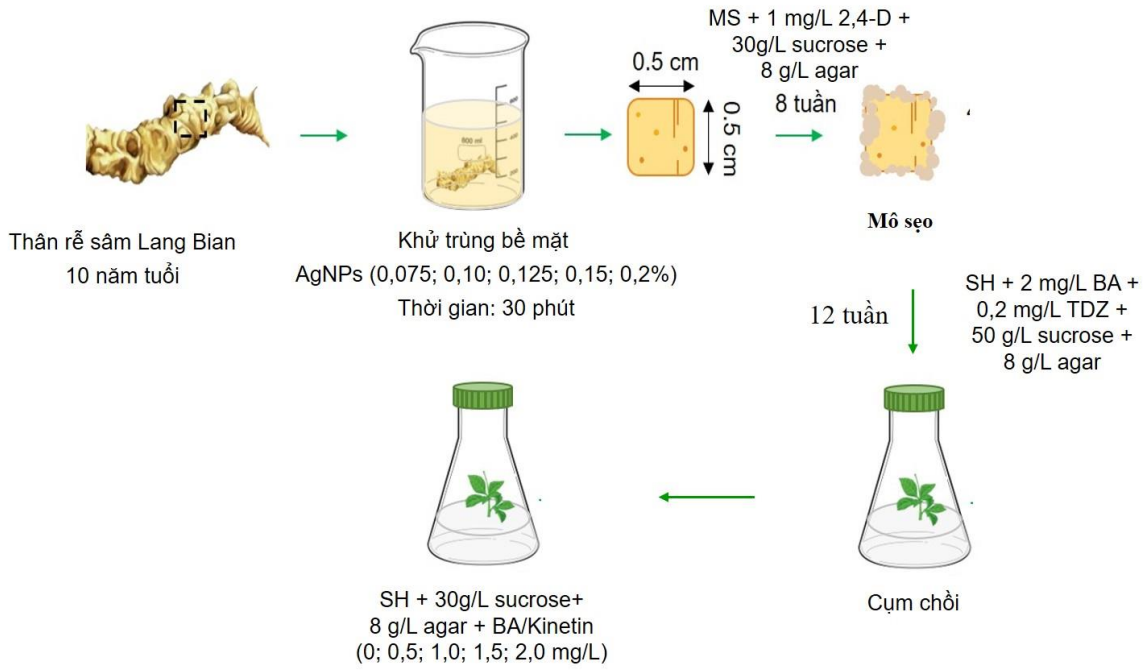
Thí nghiệm 1: Nghiên cứu ảnh hưởng của AgNPs trong khử trùng bề mặt mẫu thân rễ và sinh trưởng tiếp theo

Vật liệu là mẫu thân rễ (đường kính 1,5 cm) của cây sâm Lang Bian 10 năm tuổi được thu thập từ vùng núi Lang Biang (Lâm Đồng, Việt Nam) với chiều dài thân rễ khoảng 9 cm, không sâu bệnh được sử dụng làm nguồn vật liệu ban đầu cho nghiên cứu.

Mẫu thân rễ được rửa dưới vòi nước chảy 15 phút; rửa tiếp 3 lần bằng nước cất vô trùng, lắc đều mẫu trong ethanol 70% trong 10 phút; sau đó, rửa sạch bằng nước cất vô trùng 3 lần và đưa vào tủ cấy. Mẫu thân rễ sau khi khử trùng sơ bộ được khử trùng bằng AgNPs ở các nồng độ (0,075; 0,10; 0,125; 0,15 và 0,20%) có thêm 1 - 2 giọt Tween-80 trong 30 phút. Sau đó, mẫu được rửa bằng nước cất vô trùng 3 - 4 lần, những phần đã bị tổn thương do chất khử trùng được loại bỏ.

Tiếp theo đó, mẫu cấy được cắt thành những mẫu nhỏ kích thước khoảng 0,5 cm × 0,5 cm; độ dày 0,1 cm và cấy trên môi trường MS bổ sung 1,0 mg/L 2,4-D; 0,2 mg/L thidiazuron (TDZ), 30 g/L sucrose, 8,0 g/L agar [34].

Những cụm mô sẹo 8 tuần tuổi có nguồn gốc từ mẫu thân rễ khử trùng bề mặt với AgNPs cắt thành những mẫu nhỏ có kích thước 0,5 cm × 0,5 cm và cấy chuyển sang môi trường SH bổ sung 2,0 mg/L BA, 50 g/L sucrose, 8,0 g/L agar [34] để hình thành chồi bất định (Hình 2.1).



Hình 2.1. Sơ đồ thí nghiệm nghiên cứu tác động của AgNPs trong khử trùng bề mặt mẫu thân rễ và sinh trưởng tiếp theo

Chỉ tiêu theo dõi: Tỷ lệ mẫu nhiễm, tỷ lệ mẫu bị hoại tử, tỷ lệ mẫu sống sót và cảm ứng mô sẹo được ghi nhận sau 2 và 8 tuần nuôi cấy, trong khi đó, tỷ lệ mẫu tạo chồi và số chồi hình thành, hình thái mô sẹo và chồi phát sinh được ghi nhận sau 12 tuần nuôi cấy.

-Tỷ lệ mẫu nhiễm:

$$\text{Tỷ lệ nhiễm (\%)} = \frac{\text{Số mẫu nhiễm}}{\text{Tổng số mẫu}} \times 100$$

-Tỷ lệ mẫu hoại tử:

$$\text{Tỷ lệ mẫu hoại tử (\%)} = \frac{\text{Số mẫu không nhiễm, hoại tử}}{\text{Tổng số mẫu}} \times 100$$

-Tỷ lệ mẫu sống sót, tạo mô sẹo:

$$\text{Tỷ lệ mẫu sống sót, tạo mô sẹo (\%)} = \frac{\text{Số mẫu sống sót, tạo mô sẹo}}{\text{Tổng số mẫu}} \times 100$$

-Tỷ lệ mẫu tạo chồi:

$$\text{Tỷ lệ mẫu tạo chồi (\%)} = \frac{\text{Số mẫu tạo chồi}}{\text{Tổng số mẫu}} \times 100$$

- *Số lượng chồi* (chồi/mẫu): Quan sát và đếm số chồi trên mẫu cấy.

Thí nghiệm 2. Nghiên cứu ảnh hưởng của cytokinin đến sự nhân nhanh chồi *in vitro*

Cách tiến hành:

Các chồi sâm Lang Bian *in vitro* (kích thước khoảng 1 cm) được cấy trong môi trường SH có bổ sung BA (0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 mg/L) hoặc kinetin (0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 mg/L). pH của môi trường nuôi cấy được điều chỉnh 5,7 - 5,8. Tiếp theo, môi trường được rót vào bình thủy tinh có thể tích 250 ml, mỗi bình thủy tinh chứa 30 mL môi trường và được hấp khử trùng ở nhiệt độ 121^0C, 1 atm trong 30 phút (Hình 2.1).

Chỉ tiêu theo dõi bao gồm số chồi (Chồi/mẫu), chiều cao chồi (cm), khối lượng tươi (mg) của mẫu cấy được ghi nhận sau 12 tuần nuôi cấy.

- *Số lượng chồi* (chồi/mẫu): Quan sát và đếm số chồi trên mẫu cấy.

- *Chiều cao chồi (cm)*: Đo chiều cao của chồi bằng thước có vạch chia mm.

- *Khối lượng tươi của chồi (mg)*: Mẫu chồi sau khi được xác định số chồi và chiều cao chồi thì xác định khối lượng tươi bằng cân phân tích với độ chia nhỏ nhất 0,0001 g.

2.3.2.2. Nội dung 2: Phát sinh phôi soma sơ cấp thông qua nuôi cấy TCL

Thí nghiệm 3: Nghiên cứu ảnh hưởng của auxin đến sự phát sinh phôi soma sơ cấp từ các mẫu L-tTCL hoặc P-lTCL

Chuẩn bị mẫu cấy lớp mỏng L-tTCL hoặc P-lTCL

+ Mẫu L-tTCL: Mẫu lá được thu nhận từ chồi sâm Lang bian *in vitro* 12 tuần tuổi có nguồn gốc từ mẫu thân rễ. Mỗi chồi sâm Lang Bian gồm có 5 mẫu lá (5 mm × 10 mm: rộng × dài) Mẫu lá (L) được cắt lớp mỏng theo chiều ngang thành 10 mẫu L-tTCL (kích thước: 1 mm × 5 mm) (Hình 2.2).

+ Mẫu P-lTCL: Mẫu cuống lá được thu nhận từ chồi sâm Lang bian *in vitro* 12 tuần tuổi có nguồn gốc từ mẫu thân rễ. Mỗi chồi sâm Lang Bian có một cuống lá (1 mm × 30 mm: dày × dài). Mẫu cuống lá được cắt thành 3 mẫu (kích thước 1 mm

× 10 mm); sau đó, mỗi mẫu cuống lá (P) được cắt lớp mỏng theo chiều dọc (P-lTCL) thành 2 mẫu (kích thước P-lTCL: 0,5 mm × 10 mm) (Hình 2.2).

Các mẫu L-tTCL hoặc P-lTCL được cấy trong môi trường MS bổ sung 30 g/L sucrose và 8,0 g/L agar và 2,4-D (0,5; 1,0; 1,5; 2,0 mg/L) hoặc NAA hoặc IBA (1,0; 3,0; 5,0; 7,0; 9,0 mg/L). Đối chứng là môi trường MS không bổ sung auxin. Các mẫu L-tTCL hoặc P-lTCL được đặt trên bề mặt của môi trường sao cho mặt cắt tiếp xúc với môi trường.

Chỉ tiêu theo dõi bao gồm tỷ lệ mẫu phát sinh phôi soma sơ cấp (%) và số phôi soma tạo thành (phôi/mẫu), hệ số hiệu chỉnh tăng trưởng (GCF), tỷ lệ mẫu cảm ứng mô sẹo (%), tỷ lệ mẫu tạo rễ bất định (%) và số rễ bất định (rễ/mẫu) được thu nhận tùy theo dạng phát sinh hình thái từ mẫu L-tTCL hoặc P-lTCL sau 12 tuần nuôi cấy.

- *Tỷ lệ mẫu tạo phôi soma*:

$$\text{Tỷ lệ mẫu tạo phôi soma (\%)} = \frac{\text{Số mẫu tạo phôi soma}}{\text{Tổng số mẫu}} \times 100$$

- *Số phôi soma trên mẫu (Phôi/mẫu)*: Đếm số lượng phôi soma hình thành trên từng mẫu cấy dưới kính lúp soi nổi

- *Hệ số hiệu chỉnh tăng trưởng (GCF) của mẫu cấy lá (L-tTCL) và cuống lá (P-lTCL) và chồi*

+ Hệ số hiệu chỉnh tăng trưởng (GCF) của mẫu cấy L-tTCL hoặc P-lTCL được xác định dựa trên "Tỷ lệ mẫu phát sinh phôi soma", "Số lượng phôi soma hình thành trên mỗi mẫu" và "Hệ số mẫu" theo công thức của Teixeira da Silva và Dobránszki [147]:

$$\boldsymbol{GCF_{L\text{-}tTCL/\ P\text{-}lTCL}} = N_{L/P} \times (R\%_{L\text{-}tTCL/P\text{-}lTCL} \times SEN_{L\text{-}tTCL/P\text{-}lTCL})/100$$

Trong đó:

R% $_{L\text{-}tTCL/P\text{-}lTCL}$: Tỷ lệ mẫu phát sinh phôi soma sơ cấp của mẫu cấy L-tTCL hoặc P-lTCL;

SEN $_{L\text{-}tTCL/P\text{-}lTCL}$**:** Số lượng phôi soma hình thành từ mẫu cấy L-tTCL hoặc P-lTCL;

N: Hệ số mẫu L-tTCL hoặc P-lTCL.

+ Hệ số hiệu chỉnh tăng trưởng của mẫu cấy chồi ($GCF_{chồi}$) bao gồm mẫu L-tTCL và P-lTCL được xác định dựa trên tổng hệ số hiệu chỉnh tăng trưởng của mẫu GCF $_{L\text{-}tTCL}$ và GCF $_{P\text{-}lTCL}$.

Trong đó, tổng số mẫu TCL trên mỗi chồi được tính theo công thức:

$T_{mẫu} = N_{lá} \times N_{L-tTCL} + N_{cuống\ lá} \times N_{P-1TCL}$

$= 5 \times 10 + 1 \times 6 = 56$

$T_{mẫu}$ là tổng số mẫu trên mỗi chồi; $N_{lá}$: Số lượng lá trên mỗi chồi; N_{L-tTCL}: số lượng mẫu L-TCL; $N_{cuống\ lá}$: số lượng mẫu cuống lá trên mỗi chồi; N_{P-lTCL}: Số lượng mẫu P-lTCL.

- *Tỷ lệ mẫu tạo rễ bất định*:

$$\text{Tỷ lệ mẫu tạo rễ bất định (\%)} = \frac{\text{Số mẫu tạo rễ}}{\text{Tổng số mẫu}} \times 100$$

- *Số rễ bất định (Rễ/mẫu)*: Đếm số lượng rễ hình thành trên từng mẫu cấy

***Thí nghiệm 4**:* Nghiên cứu ảnh hưởng của proline, glutamine hoặc spermidine đến sự phát sinh phôi soma sơ cấp từ các mẫu L-tTCL hoặc P-lTCL

Các mẫu L-tTCL hoặc P-lTCL được cắt tương tự thí nghiệm 3. Sau đó, các mẫu L-tTCL hoặc P-lTCL được nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung auxin ở nồng độ thích hợp nhất ghi nhận được từ thí nghiệm 3 kết hợp với proline (100; 200; 300; 400 mg/L) hoặc glutamine (146; 438; 730; 1022 mg/L) hoặc spermidine (1,5; 7,5; 15 và 30 mg/L) (Hình 2.2), pH của môi trường nuôi cấy được điều chỉnh trong khoảng 5,7 đến 5,8. Sau đó, các mẫu được duy trì ở nhiệt độ 22 ± 2°C trong tối với độ ẩm trung bình 55 - 60%.

Chỉ tiêu theo dõi bao gồm tỷ lệ mẫu phát sinh phôi soma sơ cấp (%) và số phôi soma tạo thành (phôi/mẫu), hệ số hiệu chỉnh tăng trưởng (GCF) được thu nhận tương tự thí nghiệm 3, hoạt tính enzyme chống oxy hóa (SOD, CAT và APX) được thu nhận sau 12 tuần nuôi cấy; hàm lượng hormone nội sinh (ZEA, kinetin, 2iP, mT, IAA, GA_3, ABA, SA và MEL) được thu nhận ở các giai đoạn khác nhau của quá trình phát sinh và phát triển phôi soma (Mẫu lá L-tTCL, mẫu cuống lá P-lTCL, mẫu lá L-tTCL trong giai đoạn cảm ứng, mẫu cuống lá P-lTCL trong giai đoạn cảm ứng, mô sẹo có khả năng phát sinh phôi soma, phôi soma hình cầu, phôi soma có lá mầm), cụ thể như sau:

- *Xác định hoạt tính enzyme chống oxy hóa bằng phương pháp quang phổ tử ngoại khả kiến (UV-vis)*

Để chiết xuất các enzyme (SOD, CAT và APX), 0,3 g phôi soma được làm lạnh trong nitơ lỏng và nghiền thành bột, tiếp đó được đồng nhất bằng tán xạ siêu âm trong 2 mL dung dịch đệm 0,1 M phosphat (pH 7,4) và 0,1 mM EDTA. Sau đó, chúng

được ly tâm lạnh ở tốc độ tốc độ 15.000 vòng/phút trong 20 phút ở 4ºC. Để đo hoạt tính của các enzyme chống oxy hóa, các dịch nổi được thu thập và giữ lạnh.

Quy trình được mô tả bởi Marklund và Marklund (1974) được sử dụng để đánh giá hoạt tính của SOD [176]. Pyrogallol được tạo ra trong môi trường kiềm thông qua quá trình oxy hóa với sự có mặt của oxy không khí, sản phẩm tạo thành có bước sóng hấp thụ cực đại là 320 nm. SOD trong mẫu xúc tác sự phân hủy các gốc peroxide (-O-O-), ngăn chặn quá trình tự oxy hóa của pyrogallol. Hoạt tính superoxide dismutase trong mẫu được thể hiện bằng tỷ lệ ức chế. Sự thay đổi độ hấp thụ ở bước sóng 320 nm được sử dụng để tính toán đơn vị hoạt tính của enzyme (U), tương đương với sự ức chế 50% quá trình tự oxy hóa của pyrogallol. Hoạt tính enzyme được tính theo công thức: Đơn vị enzyme (U/g prot) = (% bị ức chế/50) tỷ lệ pha loãng.

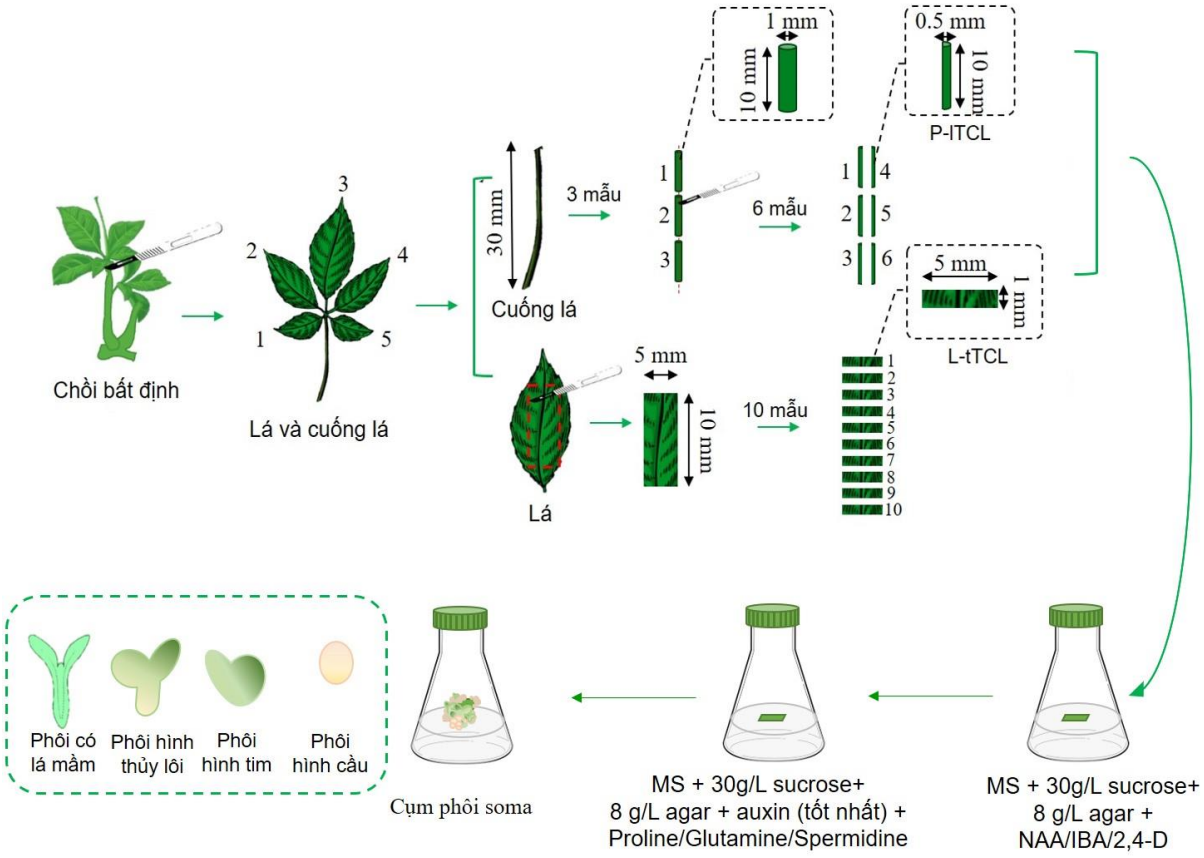
Hoạt tính CAT của mẫu thử nghiệm được đánh giá bằng cách cho phản ứng trong 2 phút với 100 µL H_2O_2 ở nồng độ 65 mM trước khi H_2O_2 dư được trộn với 100 µL amoni molybdat [$(NH_4)_6Mo_7O_{24}$], tạo ra phức màu vàng nhạt ổn định nhất hấp thụ ở bước sóng 405 nm. Một đơn vị catalase hoạt tính (U/g prot) tương đương với 1 mol H_2O_2 thủy phân trong 1 phút [177].

Độ hấp thụ ascorbate cực đại (ở bước sóng 290 nm) trong thời gian 3 phút với sự có mặt của 0,5 mM H_2O_2 được sử dụng để tính toán đơn vị hoạt độ APX (U). Giá trị hấp thụ 2,8 mM/cm được sử dụng để tính toán trực tiếp lượng ascorbate bị oxy hóa. Khi thử nghiệm, một đơn vị hoạt tính enzyme (U/g prot) cần thiết để oxy hóa 1 µm ascorbate trong 1 phút [178].

- Định lượng hàm lượng hormone nội sinh bằng sắc ký lỏng siêu hiệu năng (Ultra high performance liquid chromatography - UHPLC-UV)

Dung dịch Bieleski - $CHCl_3$:MeOH:HCOOH:H_2O (25:60:5:10, v/v/v/v) được dùng để nghiền các mẫu lá tươi, cuống lá và phôi soma (mẫu cảm ứng, mô sẹo có khả năng phát sinh phôi soma, phôi soma dạng hình cầu và phôi soma dạng lá mầm) được hình thành khi cấy mẫu trong môi trường có bổ sung 1,5 mg/L Spd với tỷ lệ 0,1 g mẫu trên 1 mL dung dịch. Sau khi được chiết xuất lại trong 4 mL methanol 80% trong 1 giờ ở 4°C, phần cặn được ly tâm một lần nữa. Dịch nổi được đưa vào cột Sep-Pak C18 sau khi được điều chỉnh với 1 mL methanol ở nồng độ 100% và 80% (Pha từ methanol 100% với nước cất). 500 µL methanol ở nồng độ 80% được sử dụng để rửa cột. Dung môi được loại bỏ khỏi dịch chiết nguyên chất bằng cách làm khô trong máy hút chân không ở 50°C, và sau đó được hoàn nguyên trong 1 - 2 mL nước có độ pH là 2 (được điều chỉnh bằng acid formic). Sau đó, dung dịch được bơm vào hệ thống

UHPLC qua màng lọc 0,45 µm. Các hormone AUX (IAA), MEL, CKs (KIN, 2iP, và ZEA), mT, GA (GA_3), ABA, SA được phân tách bằng hệ thống Thermo-Ultimate 3000 UHPLC (Thermo Science, USA) sử dụng cột BDS Hypersil C18 (có đường kính 25 mm × 4,6 mm) kích thước hạt 0,5 mm và được kết nối với đầu dò UV điều chỉnh ở bước sóng 280 nm. Cụ thể, acetonitrile (A) và nước Milli-Q được acid hóa bằng acid formic 0,5% được sử dụng làm hệ dung môi nhị phân. Việc phân tách được thực hiện bằng cách sử dụng các gradient phân đoạn từ 0 - 10 phút A từ 100% đến 75%, 11 - 17 phút A từ 75% đến 50% và cuối cùng là 18 - 25 phút A từ 50% đến 75% với tốc độ dòng chảy là 0,7 mL/phút. Nồng độ hormone được xác định dựa trên các đường chuẩn [79]. Các chất chuẩn tương ứng được mua từ Sigma-Aldrich, Hoa Kỳ.



Hình 2.2. Sơ đồ thí nghiệm ảnh hưởng của auxin/proline/glutamine hoặc spermidine đến sự phát sinh phôi soma sơ cấp từ các mẫu L-tTCL hoặc P-lTCL

2.3.2.*3. Nội dung 3: Phát sinh phôi soma thứ cấp*

Thí nghiệm 5: Nghiên cứu ảnh hưởng của môi trường khoáng đến sự phát sinh phôi soma thứ cấp

Các cụm phôi được chuyển vào đĩa petri vô trùng có dán thước chia vạch đến mm

bên dưới và đặt dưới kính lúp soi nổi. Các phôi dạng thủy lôi được quan sát, tách dưới kính lúp soi nổi, sau đó được cấy chuyển sang môi trường thí nghiệm. Các thao tác được thực hiện trong tủ cấy vô trùng.

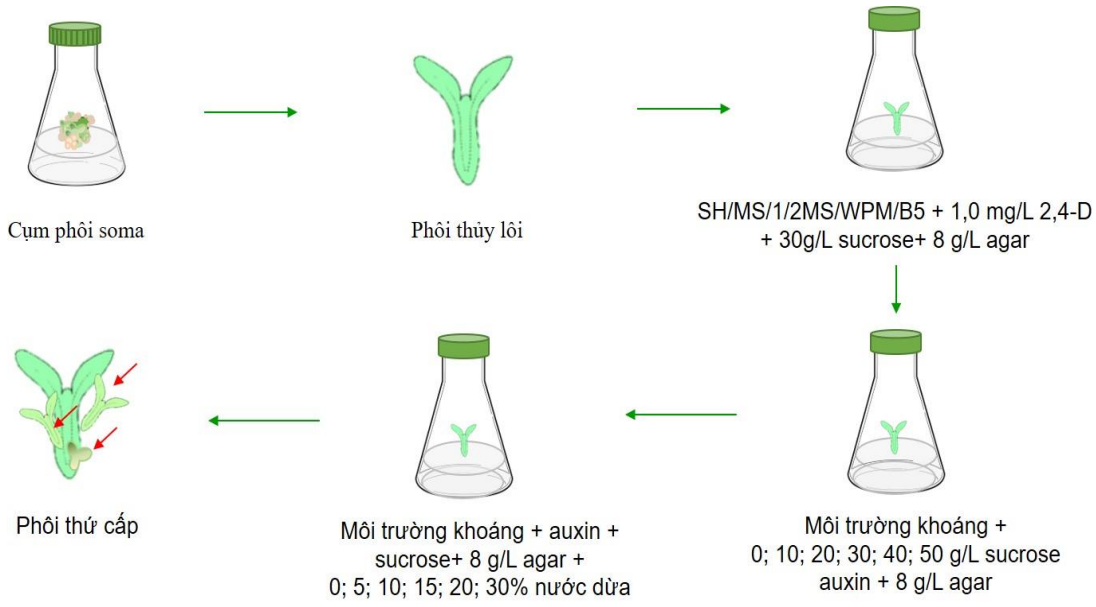
Các phôi soma ở dạng thủy lôi (chiều cao khoảng 1,5 mm) được thu nhận và nuôi cấy trên các môi trường khoáng khác nhau SH [179]; MS; ½ MS (Hàm lượng khoáng đa lượng giảm đi một nửa); WPM [180] và Gamborg B5 [181] bổ sung 1,0 mg/L 2,4-D, 30 g/L sucrose và 8,0 g/L agar (Hình 2.3).

Chỉ tiêu theo dõi bao gồm: Số phôi soma thứ cấp tạo thành (phôi/mẫu), khối lượng tươi (mg), khối lượng khô (mg) được ghi nhận sau 12 tuần nuôi cấy.

- *Số phôi soma thứ cấp trên mẫu (Phôi/mẫu)*: Đếm số lượng phôi soma hình thành trên từng mẫu cấy dưới kính lúp soi nổi

- *Khối lượng tươi của phôi soma (mg)*: Mẫu cụm phôi soma sau khi được xác định số phôi soma hình thành thì được sử dụng để xác định khối lượng tươi bằng cân phân tích với độ chia nhỏ nhất 0,0001 g.

- *Khối lượng khô của phôi soma (mg)*: Mẫu cụm phôi soma sau khi xác định khối lượng tươi được sấy ở nhiệt độ 70^0C đến khối lượng không đổi, xác định khối lượng khô bằng cân phân tích với độ chia nhỏ nhất 0,0001 g.



Hình 2.3. Sơ đồ thí nghiệm phát sinh phôi soma thứ cấp

Thí nghiệm 6: Nghiên cứu ảnh hưởng của hàm lượng đường đến sự phát sinh phôi soma thứ cấp

Các phôi soma ở dạng thủy lôi (chiều cao khoảng 1,5 mm) được thu nhận tương tự phương pháp ở thí nghiệm 5. Sau đó, phôi được nuôi cấy trên các môi trường khoáng tốt nhất thu được từ thí nghiệm 5 có bổ sung bổ sung 1,0 mg/L 2,4-D, 8,0 g/L agar và đường sucrose ở các hàm lượng khác nhau (0; 10; 20; 30; 40; 50 g/L) (Hình 2.3).

Chỉ tiêu theo dõi bao gồm: Số phôi soma thứ cấp tạo thành (phôi/mẫu), khối lượng tươi (mg), khối lượng khô (mg) tương tự thí nghiệm 5, tỷ lệ phôi ở các giai đoạn phát triển khác nhau (%) được ghi nhận sau 12 tuần nuôi cấy.

- *Tỷ lệ phôi soma hình cầu*:

$$\text{Tỷ lệ phôi soma hình cầu (\%)} = \frac{\text{Số phôi soma hình cầu}}{\text{Tổng số phôi soma ở các giai đoạn khác nhau}} \times 100$$

- *Tỷ lệ phôi soma hình tim*:

$$\text{Tỷ lệ phôi soma hình tim (\%)} = \frac{\text{Số phôi soma hình tim}}{\text{Tổng số phôi soma ở các giai đoạn khác nhau}} \times 100$$

- *Tỷ lệ phôi soma hình thủy lôi*:

$$\text{Tỷ lệ phôi soma hình thủy lôi (\%)} = \frac{\text{Số phôi soma hình thủy lôi}}{\text{Tổng số phôi soma ở các giai đoạn khác nhau}} \times 100$$

- *Tỷ lệ phôi soma có lá mầm*:

$$\text{Tỷ lệ phôi soma có lá mầm (\%)} = \frac{\text{Số phôi soma có lá mầm}}{\text{Tổng số phôi soma ở các giai đoạn khác nhau}} \times 100$$

Thí nghiệm 7: Nghiên cứu ảnh hưởng của hàm lượng nước dừa đến sự phát sinh phôi soma thứ cấp

Các phôi soma ở dạng thủy lôi (chiều cao khoảng 1,5 mm) được thu nhận được thu nhận tương tự phương pháp ở thí nghiệm 5 và nuôi cấy trên các môi trường khoáng tốt nhất thu được từ thí nghiệm 5, đường sucrose ở hàm lượng tốt nhất thu được từ thí nghiệm 6, bổ sung 1,0 mg/L 2,4-D, 8,0 g/L agar, và hàm lượng nước dừa khác nhau (0; 5; 10; 15; 20; 30 %) (Hình 2.3). Nước dừa sử dụng cho thí nghiệm được thu từ trái dừa non khoảng 7-8 tháng tuổi, giống dừa xiêm (*Cocos nucifera*).

Chỉ tiêu theo dõi bao gồm: Số phôi soma thứ cấp tạo thành (phôi/mẫu), khối lượng tươi (mg), khối lượng khô (mg), tỷ lệ phôi ở các giai đoạn phát triển khác nhau (%) được ghi nhận sau 12 tuần nuôi cấy tương tự thí nghiệm 6.

2.3.2.4. Nội dung 4: Tạo cây sâm từ phôi soma thứ cấp và xác định hàm lượng saponin tích lũy trong cây sâm Lang Bian in vitro

Thí nghiệm 8: Tạo cây sâm từ phôi soma thứ cấp và xác định hàm lượng saponin tích lũy trong cây sâm Lang Bian *in vitro*

Các cụm phôi được chuyển vào đĩa petri vô trùng có dán thước chia vạch đến mm bên dưới và đặt dưới kính lúp soi nổi. Phôi soma thứ cấp ở giai đoạn có lá mầm (chiều cao 1,5 mm) được quan sát, tách dưới kính lúp soi nổi, sau đó được cấy chuyển sang môi trường thí nghiệm. Các chồi bất định (chiều cao 1,5 cm) được nuôi trong môi trường SH bổ sung 0,5 mg/L BA, 0,5 mg/L NAA, 30 g/L sucrose, 1,0 g/L than hoạt tính và 8,0 g/L agar [10, 37] để nghiên cứu sự sinh trưởng và tạo thân rễ/rễ bất định. Các chỉ tiêu sinh trưởng được ghi nhận sau 20 tuần nuôi cấy (Hình 2.4).

Chỉ tiêu theo dõi bao gồm: Tỷ lệ mẫu tạo thân rễ (%), đường kính thân rễ (cm), chiều dài thân rễ (cm), tỷ lệ mẫu tạo rễ bất định (%), số rễ bất định (rễ/mẫu), chiều dài rễ bất định (cm), hàm lượng saponin (Rd1, Rd, Rb1) trong thân rễ và rễ bất định của cây sâm Lang Bian *in vitro* sau 20 tuần nuôi cấy.

- *Tỷ lệ mẫu tạo thân rễ*:

$$\text{Tỷ lệ mẫu tạo thân rễ (\%)} = \frac{\text{Số mẫu tạo thân rễ}}{\text{Tổng số mẫu}} \times 100$$

- *Đường kính thân rễ (cm)*: Đường kính củ được đo ở phần giữa thân rễ bằng thước chia vạch mm

- *Chiều dài thân rễ (cm)*: Chiều dài thân rễ được đo bằng thước chia vạch mm

- *Tỷ lệ mẫu tạo rễ bất định*:

$$\text{Tỷ lệ mẫu tạo rễ bất định (\%)} = \frac{\text{Số mẫu tạo rễ}}{\text{Tổng số mẫu}} \times 100$$

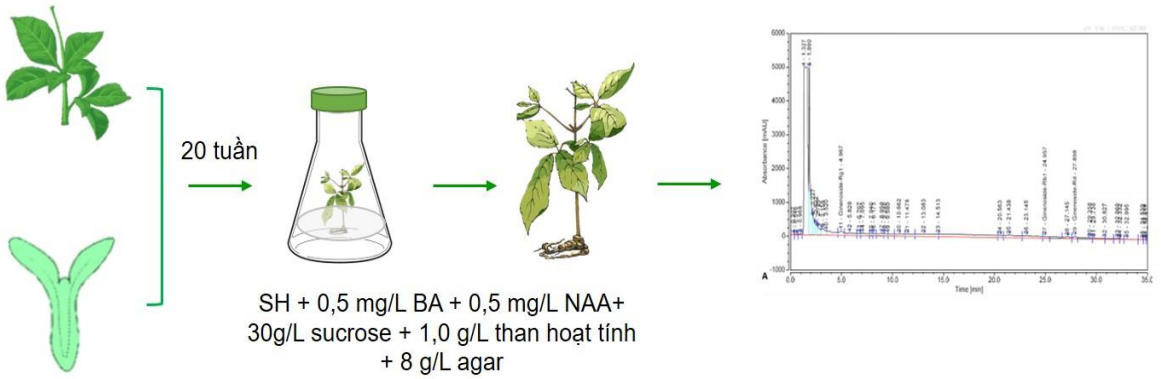
- *Số rễ bất định (Rễ/mẫu)*: Đếm số lượng rễ hình thành trên từng mẫu cấy

- *Chiều dài rễ bất định (cm)*: Chiều dài rễ được đo bằng thước chia vạch mm

- *Xác định hàm lượng một số saponin trong thân rễ và rễ bất định của cây sâm Lang Bian in vitro*

Rễ bất định và thân rễ (1g) của cây con 20 tuần tuổi được sấy khô và nghiền thành bột. Cân 0,5 g bột và chiết siêu âm với metanol (10 mL metanol × 6 lần). Sau đó, dung dịch được làm bay hơi để thu cắn. Hòa tan cắn với 20 mL nước cất và phân đoạn với Ethyl ether và N-butanol. N-butanol được cô đặc để thu được cắn. Hòa tan cắn bằng hỗn hợp acetonitril và nước (2 : 1, v/v). Dung dịch được lọc qua màng 0,45

µm, sau đó định mức chính xác 5 mL. Dịch lọc được bơm vào hệ thống HPLC để định lượng saponin theo phương pháp đường chuẩn. Thông số của máy HPLC : cột Supelco RP C18 (250 × 4,6 mm; I.D. 5 mm), sử dụng đầu dò SPD-M20A-PDA (Shimadzu), thể tích bơm 20 µL; tốc độ dòng chảy 0,5 mL/phút. Nhiệt độ cột được giữ ở 25 ℃ [182].



Hình 2.4. Sơ đồ thí nghiệm tạo cây sâm Lang Bian *in vitro* từ phôi soma thứ cấp và tích lũy saponin

Thí nghiệm 9. Sự sinh trưởng tiếp theo của phôi soma sâm Lang Bian trong môi trường có bổ sung AgNPs

Phôi soma thứ cấp ở dạng có lá mầm (chiều cao 1,5 cm) được nuôi cấy trong môi trường SH có bổ sung 0,5 mg/L BA, 0,5 mg/L NAA, 30 g/L sucrose, 1,0 g/L than hoạt tính 9,0 g/L agar [10, 37] và 1,2 mg/L AgNPs để nghiên cứu khả năng tăng trưởng và tạo thân rễ. Môi trường tương tự nhưng không bổ sung AgNPs được sử dụng làm đối chứng. Sự sinh trưởng và tạo thân rễ của cây con được ghi nhận sau 20 tuần nuôi cấy.

Chỉ tiêu theo dõi bao gồm: Tỷ lệ mẫu tạo thân rễ (%), đường kính thân rễ (cm), chiều dài thân rễ (cm).

2.4. Quan sát hình thái giải phẫu

Các mẫu phôi soma ở các giai đoạn phát triển khác nhau, được cắt, nhuộm màu và quan sát trên kính hiển vi điện tử truyền suốt theo phương pháp của Peterson năm 2008 [183]. phôi soma được cắt thành từng lát mỏng (30 - 40 µm), ngâm trong dung dịch Javen 10% trong 15 phút và rửa sạch mẫu bằng nước cất. Tiếp theo, mẫu được ngâm trong acid acetic 10% trong 10 phút và rửa sạch bằng nước cất 3 lần. Sau đó, nhuộm mẫu bằng dung dịch thuốc nhuộm gồm 2 màu đỏ carmine và xanh iodine trong 5 phút; rửa lại mẫu bằng nước cất cho đến khi hết màu thuốc nhuộm. Cuối cùng,

đặt mẫu lên lam kính nhỏ thêm 1 giọt nước hoặc glyxerin và đậy bằng lame. Quan sát, chụp hình và ghi nhận hình ảnh dưới kính hiển vi điện tử truyền suốt.

2.5. Điều kiện nuôi cấy

Tất cả các thí nghiệm được bố trí ngẫu nhiên với 5 lần lặp lại, 30 mẫu cho mỗi nghiệm thức.

Đối với các mẫu cấy L-tTCL, P-lTCL, phôi soma: Mẫu được đặt trong phòng nuôi cấy với độ ẩm 55 – 60 % và trong điều kiện tối hoàn toàn.

Đối với các mẫu cấy chồi: Mẫu được đặt trong phòng nuôi với nhiệt độ phòng 25 ± 2^0C, độ ẩm 55 – 60 %, chiếu sáng bằng đèn huỳnh quang (40W) kích thước 1,2 m, điện áp 220 V, quang chu kỳ 16 giờ/ngày, cường độ ánh sáng 40 – 45 µmol.m^{-2}.s^{-1}.

2.6. Xử lý số liệu

- Sử dụng phần mềm Excel 2010 để phân tích và tổng hợp các số liệu thô thu thập được từ các thí nghiệm.

- Sử dụng phần mềm phân tích thống kê SPSS 16.0 để xử lý các số liệu thu được, thực hiện so sánh ANOVA 1 yếu tố theo phương pháp Duncan test với $p < 0,05$ [184].

2.7. Địa điểm và thời gian nghiên cứu

- Các thí nghiệm khử trùng mẫu, phát sinh phôi soma sơ cấp, phát sinh phôi soma thứ cấp và tạo cây sâm Lang Bian *in vitro* được thực hiện tại Phòng Sinh học phân tử và chọn tạo giống cây trồng, Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên và Phòng Công nghệ Sinh học Thực vật, Khoa Nông lâm, Trường Đại học Đà Lạt.

- Xác định hoạt tính enzyme chống oxy hóa bằng phương pháp quang phổ tử ngoại khả kiến (UV-vis) được thực hiện tại Trung tâm Khoa học Công nghệ Dược Sài Gòn.

- Định lượng một số saponin trong thân rễ và rễ bất định của cây sâm Lang Bian *in vitro* và định lượng hormone nội sinh bằng UHPLC-UV được thực hiện tại Viện Công nghệ sinh học và Môi trường, Trường Đại học Tây Nguyên.

- Thời gian thực hiện luận án: Từ tháng 10/2019 đến 10/2023.

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Nội dung 1: Tạo nguồn mẫu *in vitro*

3.1.1. Ảnh hưởng của AgNPs trong khử trùng bề mặt mẫu thân rễ và sinh trưởng tiếp theo

Kết quả ghi nhận cho thấy rằng AgNPs có hiệu quả trong việc khử trùng bề mặt mẫu cấy và kích thích sự hình thành mô sẹo sau thời gian 8 tuần nuôi cấy (Bảng 3.1). Khi nồng độ AgNPs tăng từ 0,075% lên đến 0,200%, tỷ lệ mẫu nhiễm giảm từ 76,00% xuống còn 25,33%, trong khi tỷ lệ mẫu bị hoại tử tăng từ 1,34% lên 58,68% sau 2 tuần nuôi cấy. Sau 8 tuần nuôi cấy, các mẫu được xử lý bề mặt bằng AgNPs đều thể hiện sự cảm ứng mô sẹo, và tỷ lệ cảm ứng mô sẹo đạt cao nhất là 49,34% đối với mẫu cấy được xử lý bề mặt với 0,150% AgNPs (Bảng 3.1).

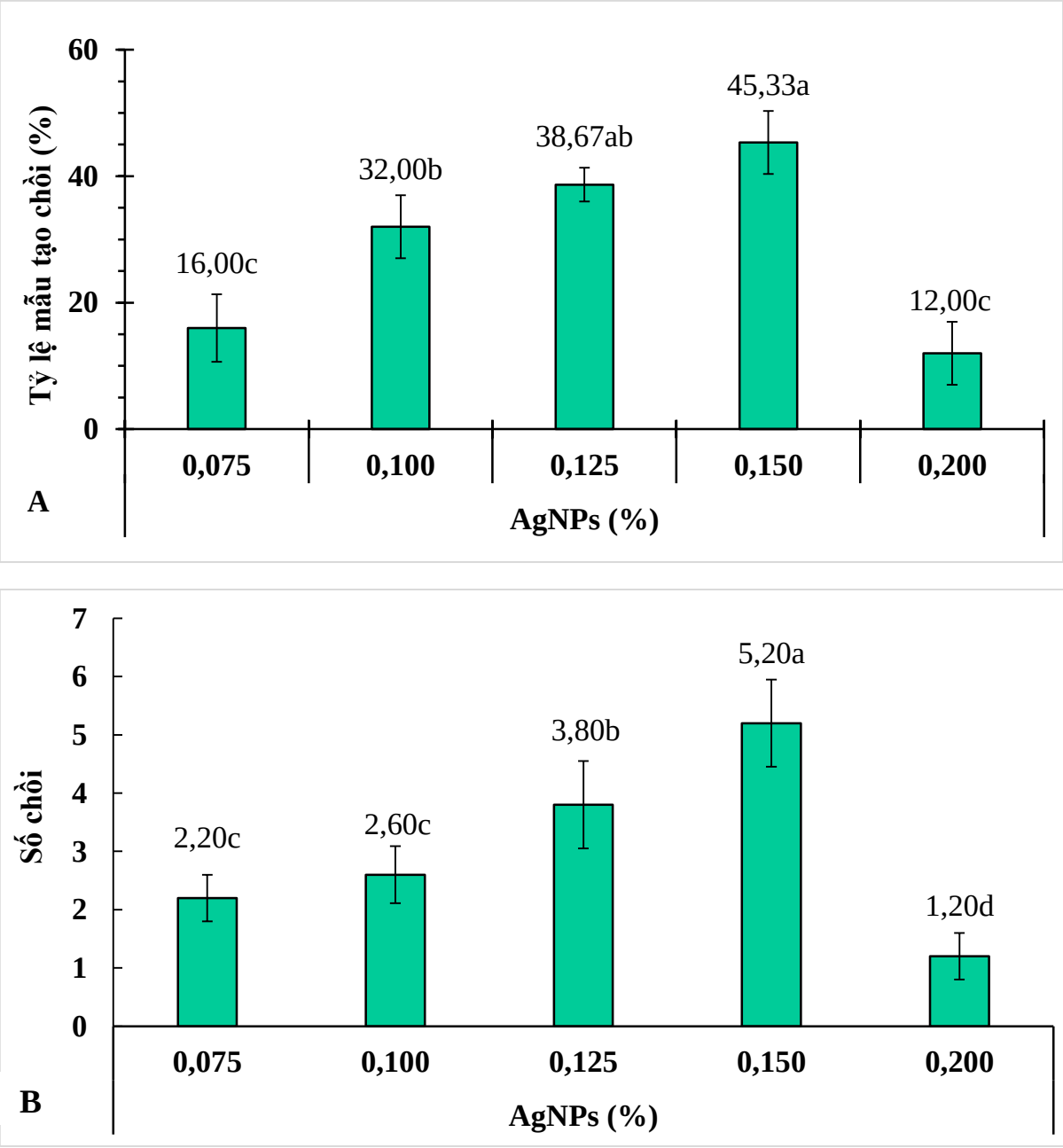
Bảng 3.1. Ảnh hưởng của AgNPs đến khả năng khử trùng bề mặt và cảm ứng tạo mô sẹo của mẫu thân rễ sâm Lang Bian sau 8 tuần nuôi cấy

Nồng độ AgNPs (%)	Tỷ lệ mẫu nhiễm (%) sau 2 tuần nuôi cấy	Tỷ lệ mẫu hoại tử (%) sau 2 tuần nuôi cấy	Tỷ lệ mẫu sống sót và cảm ứng tạo mô sẹo (%) sau 8 tuần nuôi cấy
0,075	$76,00 \pm 7,61^{a}$	$1,34 \pm 1,23^{c}$	$22,66 \pm 8,96^{c}$
0,100	$62,67 \pm 8,96^{b}$	$2,68 \pm 1,64^{c}$	$34,68 \pm 8,69^{b}$
0,125	$54,67 \pm 3,00^{b}$	$6,68 \pm 4,70^{c}$	$38,66 \pm 5,60^{b}$
0,150	$36,00 \pm 5,95^{c}$	$14,68 \pm 8.69^{b}$	$49,34 \pm 7,59^{a}$
0,200	$25,33 \pm 5,57^{d}$	$58,68 \pm 7,30^{a}$	$16,00 \pm 3,70^{c}$

Ghi chú: *Các chữ cái khác nhau (a, b, ...) trên cùng một cột chỉ sự sai khác có ý nghĩa thống kê của các giá trị trung bình với $p < 0,05$ (Duncan's test). Giá trị thể hiện trong bảng là giá trị trung bình ± SD (độ lệch chuẩn).*

Những cụm mô sẹo có nguồn gốc từ mẫu thân rễ khử trùng bề mặt với AgNPs cấy chuyển sang môi trường SH có bổ sung 2 mg/L BA đều cho hình thành chồi bất định sau 12 tuần nuôi cấy (Hình 3.1). Trong đó, nồng độ AgNPs và khả năng tái sinh

chồi của mẫu cấy có mối tương quan thuận với nhau. Tuy nhiên, khả năng tái sinh chồi và số lượng chồi hình thành có xu hướng giảm rõ rệt khi tăng nồng độ AgNP lên mức cao (0,200%). Mô sẹo có nguồn gốc từ thân rễ được khử trùng trong 0,150% AgNP cho tỷ lệ tái sinh chồi cao hơn khoảng 4 lần so với 0,200% AgNP thể hiện qua tỷ lệ mẫu tái sinh chồi (45,33% so với 12,00%) và số chồi (5,20 chồi so với 1,20 chồi tương ứng) sau 12 tuần nuôi cấy (Hình 3.1 A và B). Như vậy, 0,150 % AgNPs không những cho hiệu quả khử trùng mẫu cao mà còn có tác dụng kích thích mẫu cấy tái sinh chồi bất định.



Hình 3.1. Ảnh hưởng của AgNPs đến sự tái sinh chồi (A) và số chồi (B) từ mẫu cấy thân rễ sâm Lang Bian sau 12 tuần nuôi cấy

Các chất khử trùng thông thường như sodium hypochlorite, calcium hypochlorite và mercury chloride thường được sử dụng trong giai đoạn khử trùng các loại mẫu cấy khác nhau như chồi ngủ, lá, đốt thân, …; tuy nhiên, chúng thường gây độc, làm tổn thương và làm giảm hiệu quả tái sinh của mẫu cấy [185]. Mặt khác, tác dụng kháng khuẩn của AgNPs đã được biết đến trong nhiều năm, đặc biệt là trong lĩnh vực y tế[186]. Trong lĩnh vực sinh học - nông nghiệp nói chung và nuôi cấy mô, tế bào và cơ quan thực vật nói riêng, AgNPs thường được bổ sung vào môi trường nuôi cấy với mục tiêu kích thích mẫu cấy sinh trưởng, phát triển, khắc phục được một số hiện tượng bất thường và tích lũy hoạt chất thứ cấp [187].

Gần đây, AgNPs được sử dụng như là tác nhân khử trùng môi trường nuôi cấy *in vitro* [188], khử trùng mẫu cấy rong bắp sú [189], cây cúc [188], cây dâu tây [163] hay bổ sung vào môi trường nuôi cấy *in vitro* nhằm gia tăng khả năng sinh trưởng trên cây cúc, cây dâu tây, cây hồng môn, sâm Ngọc Linh [10, 137, 163], hạn chế vi sinh vật trong hệ thống vi thủy canh [190]. Ngoài ra, nghiên cứu của Tung và cộng sự (2021) cũng đã chỉ ra rằng AgNPs có hiệu quả trong kích thích tạo chồi thu hải đường trong giai đoạn khử trùng và cảm ứng mẫu cấy [191]. Kết quả của nghiên cứu này cho thấy AgNPs có hiệu quả trong khử trùng bề mặt mẫu cấy thân rễ của sâm Lang Bian và có thể được sử dụng thay thế chất khử trùng thông thường.

Như vậy, AgNPs có hiệu quả rất lớn trong khử trùng mẫu cấy, cung cấp nguồn vật liệu ban đầu cho những nghiên cứu tiếp theo. Khi các AgNPs được giải phóng chúng sẽ ức chế quá trình vận chuyển các ion Na^+ và Ca^{2+} qua màng tế bào ngăn cản quá trình trao đổi chất, phá vỡ màng tế bào, oxi hóa nguyên sinh chất của tế bào vi khuẩn. Đồng thời, AgNPs làm gia tăng số lượng các gốc tự do dẫn đến giảm hoạt tính của các hợp chất chứa oxi hoạt động và làm rối loạn các quá trình oxy hóa cũng như phosphoryl hóa trong tế bào vi khuẩn. Cuối cùng, vô hiệu hóa enzyme có chứa các nhóm -SH và –COOH, từ đó, phá vỡ cân bằng áp suất thẩm thấu hoặc tạo phức với acid nucleic dẫn đến làm thay đổi cấu trúc DNA của tế bào vi sinh vật, tác động trực tiếp trên cấu trúc DNA. Do đó, khi xử lý AgNPs ở nồng độ thích hợp có tác dụng tiêu diệt các nguồn vi sinh vật gây nhiễm, tạo được nguồn mẫu sạch. Kết quả nghiên cứu cũng cho thấy, AgNPs có vai trò tích cực trong khử trùng mẫu cấy thân rễ sâm Lang Bian thể hiện qua tỷ lệ mẫu nhiễm thấp và tỷ lệ mẫu sạch, còn khả năng tái sinh cao.

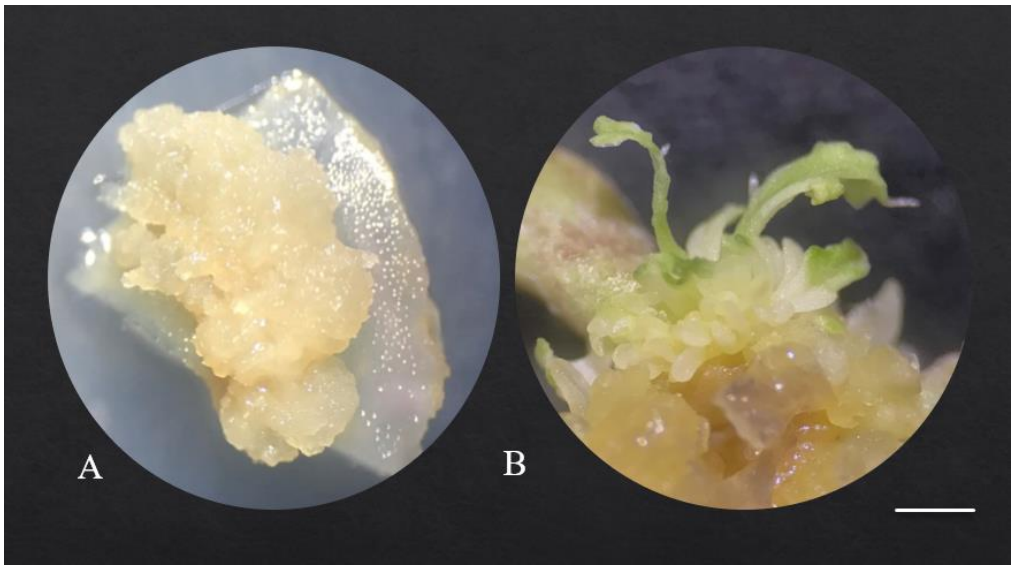
Tuy nhiên, nồng độ AgNPs thích hợp để khử trùng mẫu cấy thay đổi tùy thuộc vào từng loại mẫu cũng như thực vật nuôi cấy. Khi xử lý mẫu ở nồng độ thấp cho tỷ lệ mẫu nhiễm cao hơn so với các nghiệm thức có nồng độ cao. Ngược lại, khi xử lý mẫu trong dung dịch AgNPs có nồng độ cao, mặc dù tỷ lệ mẫu nhiễm giảm nhưng lại

ảnh hưởng tới sức sống của mẫu. Mẫu thân rễ sâm Lang Bian xử lý khử trùng ở nồng độ 0,150% cho tỷ lệ mẫu sạch, vẫn còn khả năng tái sinh đạt 49,33%. Trong trường hợp tiếp tục gia tăng nồng độ lên đến 0,200% có hiện tượng mẫu bị chết, không có khả năng tái sinh hình thành mô sẹo, dẫn đến tỷ mẫu tái sinh thấp so với AgNPs ở các nồng độ thấp hơn. Kết quả tương tự cũng được công bố trên nhiều đối tượng thực vật khác nhau. Dương Tấn Nhựt và cộng sự (2018) cho rằng AgNPs có hiệu quả tích cực trong việc khử trùng mẫu cấy hoa African violet và có thể thay thế các chất khử trùng thông thường. Nồng độ AgNPs và thời gian có hiệu quả tốt nhất để khử trùng mẫu cấy là 0,05% trong 15 phút. Ngoài ra, AgNPs kích thích mẫu cấy cảm ứng nhanh, phát sinh hình thái, và không gây ra bất kỳ tác động tiêu cực nào đến sức sống của mẫu cấy [192]. Đồng Huy Giới và cộng sự (2019) cho rằng nồng độ AgNPs thích hợp nhất để khử trùng phát hoa lan Hồ điệp vàng là 0,125% cho tỷ lệ mẫu sống, sạch bệnh là 72,12% [193]. Kết quả tương tự cũng được công bố bởi Bùi Thị Thanh Phương và cộng sự (2020) trong khử trùng mẫu thân rễ cây Trầu tiên, các tác giả cho rằng sau 6 tuần nuôi cấy, mẫu được khử trùng bằng AgNPs ở nồng độ 0,150% trong 40 phút cho tỷ lệ mẫu sống và tỷ lệ mẫu sống sạch bệnh đạt cao nhất (tương ứng là 70,32 và 65,34%). Tuy nhiên, khi gia tăng nồng độ AgNPs để khử trùng mẫu cấy, mặc dù tỷ lệ mẫu nhiễm giảm xuống đáng kể nhưng khả năng tái sinh của mẫu bị ảnh hưởng rất nhiều [194]. Trong khử trùng mẫu cấy lan hồ điệp vàng bằng dung dịch AgNPs, Đồng Huy Giới và Bùi Thị Thu Hương cho rằng AgNPs ở nồng độ 0,150% cho tỷ lệ mẫu sống và mẫu sống sạch thấp nhất (tương ứng là 61,11% và 60,13%) [193]. Kết quả tương tự cũng được công bố trong khử trùng mẫu cấy Trầu tiên, AgNPs ở nồng độ 0,200 mg/L cũng cho hiệu quả khử trùng mẫu cấy thấp với tỷ lệ mẫu sống và tỷ lệ mẫu sống, không nhiễm vi sinh vật đạt được lần lượt là 64,19% và 54,31% [194]. Như vậy, AgNPs ở nồng độ quá cao đã ảnh hưởng tới khả năng tái sinh của mẫu nuôi cấy. Nguyên nhân có thể là do các hạt nano bạc có kích thước nhỏ cho nên chúng dễ dàng tiếp xúc và xâm nhập vào bên trong tế bào tác động tích cực đến sự tăng trưởng của mẫu cấy. Tuy nhiên, khi nồng độ nano bạc trong tế bào quá cao dẫn đến phenol bị trùng hợp dưới xúc tác của enzyme peroxidase (Backor, 2009); ngoài ra, chúng còn ảnh hưởng đến hoạt động phân bào, ổn định DNA, biến đổi protein và DNA ở thực vật [195].

Bên cạnh tác động khử trùng, AgNPs còn có hiệu quả tác động kích thích mẫu cấy cảm ứng nhanh và phát sinh hình thái. Khi có sự tác động của AgNPs, gene mã hóa cho sự tổng hợp auxin trong tế bào thực vật sẽ được kích thích làm gia tăng hàm lượng auxin nội sinh bên trong mẫu [196]. Trong khi đó, auxin là một trong những

yếu tố quan trọng trong sự cảm ứng tạo mô sẹo cũng như phát sinh hình thái của mẫu cấy.

Kết quả nghiên cứu cho thấy, sau 8 tuần nuôi cấy, các mẫu thân rễ sâm Lang Bian sống sót sau giai đoạn khử trùng có sự cảm ứng hình thành mô sẹo trên bề mặt mẫu cấy. Mô sẹo có màu vàng nhạt hình thành chủ yếu trên bề mặt mẫu và ở những vị trí vết cắt. Sau đó, trên khối mô sẹo xuất hiện các sơ khởi chồi và chồi hình thành từ mô sẹo (Bảng 3.1, Hình 3.1 và 3.2). Kết quả tương tự cũng được công bố trong nghiên cứu của Dương Tấn Nhựt và cộng sự (2018), khi nghiên cứu tác động AgNPs trên đối tượng African violet, các mẫu cấy ở nghiệm thức sử dụng AgNPs có sự hình thành rễ tơ, chồi cao và rõ ràng hơn so với các nghiệm thức còn lại [192].



Hình 3.2. Hình thái mô sẹo sau 8 tuần nuôi cấy (A) và chồi *in vitro* sau 12 tuần nuôi cấy (B) hình thành từ mẫu cấy thân rễ sâm Lang Bian sau khi khử trùng bằng AgNPs. Thước đo: 1 mm.

Tóm lại, nghiên cứu đã chứng minh được hiệu quả của AgNPs đối với khử trùng cũng như kích thích mẫu cấy cảm ứng hình thành mô sẹo và phát sinh chồi bất định. Nồng độ AgNPs thích hợp nhất cho khử trùng và tái sinh mẫu cấy là 0,150%.

3.1.2. Ảnh hưởng của cytokinin đến sự nhân nhanh chồi sâm Lang Bian

Các chồi tạo thành được chuyển sang môi trường MS có bổ sung BA hoặc kinetin ở các nồng độ khác nhau (0; 0,5; 1,0; 1,5; 2 mg/L) để nhân nhanh và tạo nguồn vật liệu cho các thí nghiệm tiếp theo. Kết quả nghiên cứu cho thấy BA và kinetin có tác động rõ rệt đến sự tăng trưởng của chồi sâm Lang Bian (Bảng 3.2). Trong trường hợp không bổ sung cytokinin vào trong môi trường nuôi cấy, sự tăng trưởng của chồi bị ức chế, không ghi nhận được sự xuất hiện của các chồi mới. Mẫu chồi ban đầu chỉ

tạo được khối mô sẹo nhỏ nhưng không có khả năng sinh trưởng, khối mô sẹo bị nâu hóa (Hình 3.3A). So với môi trường đối chứng, thì BA được bổ sung trong môi trường nuôi cấy có hiệu quả kích thích tạo chồi. Sự nhân nhanh chồi được nuôi cấy trong môi trường bổ sung BA ở nồng độ 0,5 mg/L có sự khác biệt rõ rệt so với môi trường đối chứng không có bổ sung BA, số lượng chồi mới tạo thành, chiều cao chồi trung bình và khối lượng tươi tương ứng là 7,20 chồi, 2,74 cm và 96,86 mg (Bảng 3.2). Kết quả này cho thấy, khi có sự hiện diện của BA đã kích thích sự hình thành chồi, khả năng tạo chồi của mẫu cấy tăng lên rõ rệt. Nồng độ BA tăng lên 1,0 mg/L kích thích sự nhân nhanh chồi sâm Lang Bian tốt nhất, cụ thể số lượng chồi mới tạo thành, chiều cao chồi trung bình và khối lượng tươi đạt được lần lượt là 12,60 chồi/mẫu, 5,88 cm và 478,88 mg, chồi sinh trưởng tốt, xanh khỏe (Bảng 3.2, Hình 3.3B). Tuy nhiên, khi tăng nồng độ BA cao hơn 1,0 mg/L thì khả năng nhân nhanh chồi có khuynh hướng giảm đi, BA ở nồng độ 2,0 mg/L cho kết quả thấp nhất về khả năng nhân nhanh chồi, số lượng chồi được tạo thành chỉ đạt được 1,40 chồi/mẫu, chồi nhỏ, ngắn, chồi thường tập trung thành những nốt nhỏ dưới gốc. Kết quả thí nghiệm cho thấy rằng khi BA ở nồng độ cao hơn không chỉ làm giảm số lượng chồi hình thành mà còn làm chậm sự tăng trưởng của các chồi.

Như vậy, BA có ảnh hưởng tích cực đến sự sinh trưởng và khả năng nhân nhanh chồi sâm Lang Bian. Từ kết quả thí nghiệm cho thấy, môi trường nuôi cấy có bổ sung BA ở nồng độ 1,0 mg/L thích hợp nhất cho sự sinh trưởng và nhân nhanh chồi sâm Lang Bian thể hiện qua các chỉ tiêu về số lượng, chiều cao chồi trung bình và khối lượng tươi. Kết quả này cũng tương tự với kết quả nghiên cứu của Thân Thị Minh Phương (2011) khi khảo sát ảnh hưởng của một số PGRs và chất hữu cơ trong nhân giống sâm Ngọc Linh *in vitro*, môi trường MS có bổ sung 1,0 mg/L BA là tốt nhất cho sự tái sinh chồi sâm Ngọc Linh *in vitro* sau 60 ngày nuôi cấy [197].

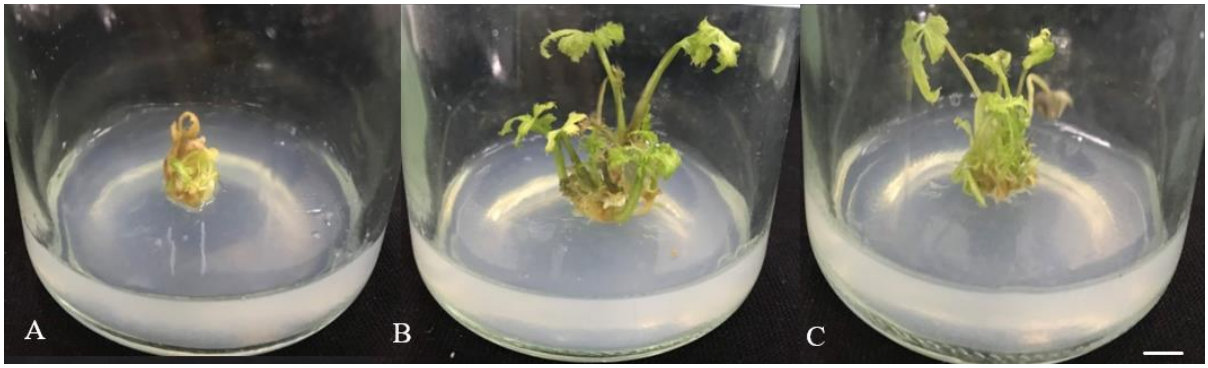
Từ kết quả ở Bảng 3.2 cho thấy, kinetin có ảnh hưởng đến khả năng nhân nhanh chồi của sâm Lang Bian. Mẫu được nuôi trong môi trường có bổ sung kinetin ở nồng độ 0,5 mg/L cho số lượng chồi, chiều cao chồi trung bình và khối lượng tươi tương ứng là 2,0 chồi, 2,32 cm và 55,78 mg, các chồi có hình dạng và kích thước nhỏ. Tuy nhiên, khi tăng nồng độ 1,0 mg/L Kinetin thì khả năng nhân nhanh và sinh trưởng của chồi sâm Lang Bian cũng tăng theo tỷ lệ thuận với gia tăng nồng độ thể hiện qua số lượng, chiều cao chồi trung bình và khối lượng tươi của chồi (5,20 chồi; 3,68 cm; 132,90 mg). Ở nồng độ 1,5 mg/L Kinetin thì khả năng nhân nhanh và sinh trưởng của chồi đạt giá trị cao nhất với số lượng chồi tạo thành đạt được 7,00 chồi, chiều cao chồi trung bình là 4,70 cm và khối lượng tươi 204,80 mg. Khi tiếp tục gia tăng nồng

độ Kinetin thì khả năng nhân nhanh chồi có khuynh hướng giảm xuống. Số chồi, chiều cao và khối lượng tươi chỉ còn 1,80 chồi, 1,26 cm và 62,06 mg ở nồng độ 2 mg/L.

Bảng 3.2. Sự nhân nhanh chồi sâm Lang Bian *in vitro* trong môi trường có bổ sung BA hoặc kinetin ở các nồng độ khác nhau sau 12 tuần nuôi cấy

Cytokinin	Nồng độ (mg/L)	Số chồi (Chồi/mẫu)	Chiều cao chồi trung bình (cm)	Khối lượng tươi (mg/mẫu)
Đối chứng	0	$0,00 \pm 0,00^{e}$	$0,00 \pm 0,00^{g}$	$0,00 \pm 0,00^{f}$
BA	0,5	$7,20 \pm 1,10^{b}$	$2,74 \pm 0,70^{d}$	$96,86 \pm 9,39^{d}$
	1,0	$12,60 \pm 2,70^{a}$	$5,88 \pm 0,92^{a}$	$478,88 \pm 27,02^{a}$
	1,5	$5,00 \pm 1,87^{c}$	$2,76 \pm 0,43^{d}$	$127,62 \pm 18,62^{c}$
	2,0	$1,40 \pm 0,55^{de}$	$1,68 \pm 0,38^{ef}$	$55,32 \pm 8,54^{e}$
Kinetin	0,5	$2,00 \pm 0,71^{d}$	$2,32 \pm 0,48^{de}$	$55,78 \pm 8,87^{e}$
	1,0	$5,20 \pm 0,84^{c}$	$3,68 \pm 0,98^{c}$	$132,90 \pm 13,76^{c}$
	1,5	$7,00 \pm 1,22^{b}$	$4,70 \pm 1,04^{b}$	$204,80 \pm 6,54^{b}$
	2,0	$1,80 \pm 0,55^{d}$	$1,26 \pm 0,50^{f}$	$62,06 \pm 13,57^{e}$

Ghi chú: *Các chữ cái khác nhau (a, b, ...) trên cùng một cột chỉ sự sai khác có ý nghĩa thống kê của các giá trị trung bình với p < 0,05 (Duncan's test). Giá trị thể hiện trong bảng là giá trị trung bình ± SD (độ lệch chuẩn).*



Hình 3.3. Hình thái của chồi *in vitro* sâm Lang Bian hình thành trong môi trường SH không bổ sung BA hoặc kinetin (mẫu đối chứng. A), có bổ sung 1,0 mg/L BA (B) hoặc 1,5 mg/L kinetin (C) sau 12 tuần nuôi cấy. Thước đo: 1 mm

Tóm lại, BA và kinetin đều có tác dụng kích thích sự sinh trưởng và nhân nhanh chồi sâm Lang Bian ở các nồng độ khác nhau. Kết quả thu được cũng cho thấy rằng, chồi sâm Lang Bian *in vitro* rất nhạy cảm với loại và nồng độ chất điều hòa sinh trưởng. Trong hai loại cytokinin được bổ sung vào môi trường nuôi cấy thì BA ở nồng độ 1,0 mg/L cho hiệu quả nhân nhanh chồi cao hơn.

3.2. Nội dung 2: Phát sinh phôi soma sơ cấp thông qua nuôi cấy TCL

3.2.1. Ảnh hưởng của auxin đến sự phát sinh phôi soma sơ cấp từ các mẫu L-tTCL hoặc P-lTCL

3.2.1.1. Sự phát sinh phôi soma sơ cấp từ mẫu L-tTCL in vitro trong môi trường bổ sung auxin

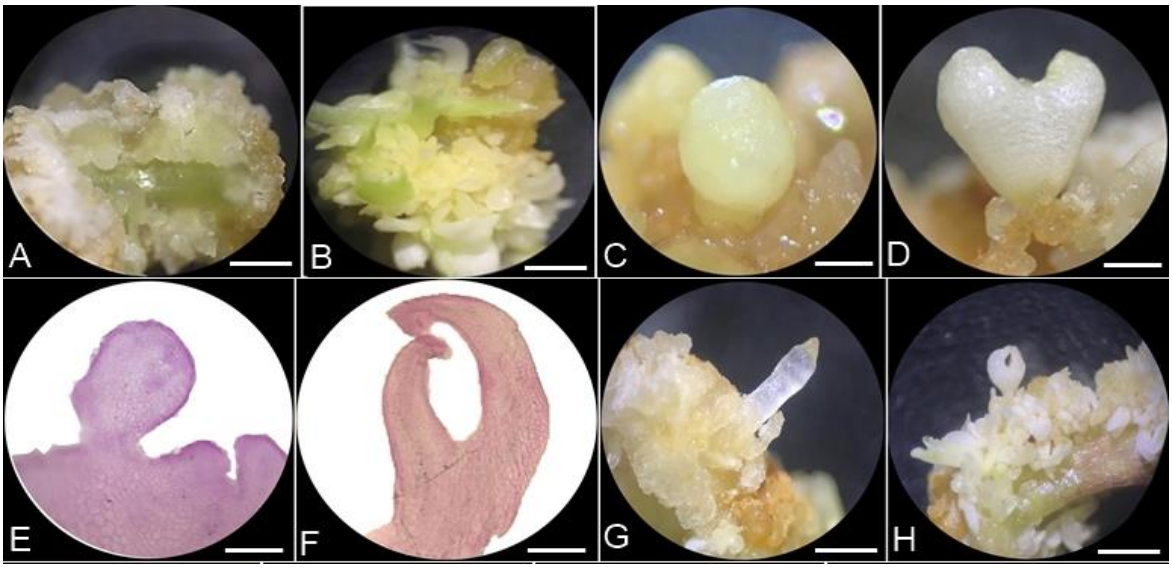
Sự phát sinh hình thái từ mẫu L-tTCL sâm Lang Bian nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung auxin (2,4-D, NAA và IBA), bao gồm (1) phát sinh phôi soma, (2) hình thành mô sẹo và (3) tái sinh rễ bất định thu được sau 12 tuần nuôi cấy (Bảng 3.3, Hình 3.4). Tất cả các mẫu L-tTCL được nuôi cấy trong môi trường bổ sung auxin đều phát sinh phôi soma, ngoại trừ mẫu được nuôi cấy trong môi trường bổ sung 9,0 mg/L NAA và 1,0 mg/L IBA sau 12 tuần nuôi cấy. Phôi soma được hình thành tại vị trí các vết cắt xung quanh mẫu L-tTCL; sau đó, phủ toàn bộ bề mặt mẫu cấy L-tTCL. Các giai đoạn phát triển khác nhau của phôi soma bao gồm hình cầu, hình tim, hình thủy lôi và có lá mầm sau 12 tuần nuôi cấy (Bảng 3.3, Hình 3.4A–F). Tỷ lệ mẫu phát sinh phôi soma sơ cấp cao nhất (80,00% và 86,66%) ghi nhận ở nghiệm thức bổ sung 5,0 – 7,0 mg/L NAA, trong khi số phôi soma cao nhất (40,40 phôi) đạt được ở nghiệm thức bổ sung 1,5 mg/L 2,4-D. Tuy nhiên, hệ số hiệu chỉnh tăng trưởng (GCF) cao nhất của mẫu cấy L-tTCL thu được ở nghiệm thức bổ sung 7,0 mg/L NAA (32,73) (Bảng 3.3).

Ngoài ra, sự hình thành mô sẹo và sự tái sinh rễ bất định đã được ghi nhận từ các mẫu cấy L-tTCL được nuôi cấy trong môi trường bổ sung auxin. Tỷ lệ mẫu cảm ứng mô sẹo đạt được 100% ở nghiệm thức bổ sung 1,5 mg/L 2,4-D hoặc 5,0 – 7,0 mg/L NAA (Bảng 3.3). Mô sẹo có màu vàng nhạt và tăng trưởng mạnh; ban đầu, mô sẹo hình thành ở vị trí xung quanh vết cắt mẫu L-tTCL, sau đó, mô sẹo tăng nhanh sinh khối và phủ đều trên toàn bộ bề mặt mẫu L-tTCL (Hình 3.4 A). Ngoài ra, mẫu L-tTCL nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung 3,0 – 5,0 mg/L NAA cho tỷ lệ mẫu L-tTCL cảm ứng rễ bất định đạt từ 23,33 – 63,33 % và số rễ từ 1,40 – 4,60 rễ; các rễ hình thành mảnh, dài, có màu trắng nhạt (Hình 3.4 G). Bên cạnh đó, mẫu L-tTCL

nuôi cấy trên môi trường không bổ sung auxin không ghi nhận loại phát sinh hình thái nào; mẫu chuyển dần qua màu nâu sậm và chết.

3.2.1.2. Sự phát sinh phôi soma sơ cấp từ mẫu P-lTCL in vitro trong môi trường bổ sung auxin

Tương tự như mẫu L-tTCL, mẫu P-lTCL nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung auxin (2,4-D, NAA và IBA) cũng ghi nhận 3 kiểu phát sinh hình thái bao gồm phát sinh phôi soma, cảm ứng mô sẹo và hình thành rễ bất định sau 12 tuần nuôi cấy (Bảng 3.4; Hình 3.4 H).



Hình 3.4. Quan sát hình thái và giải phẫu trong quá trình phát sinh phôi soma sơ cấp sâm Lang Bian. A. Mô sẹo có khả năng sinh phôi. B. Sự phát sinh phôi soma sơ cấp từ mẫu cấy L-tTCL sau 12 tuần nuôi cấy. C. Phôi soma ở giai đoạn hình cầu. D. Phôi soma ở giai đoạn hình tim. E. Lát cắt dọc của phôi soma hình cầu phát sinh từ mô sẹo có khả năng phát sinh phôi soma. F. Lát cắt dọc của phôi soma có lá mầm. G. Sự hình thành rễ bất định. H. Sự phát sinh phôi soma sơ cấp từ mẫu cấy P-lTCL sau 12 tuần nuôi cấy. Thước đo: 3 mm – A; B; H; Thước đo: 1mm – C; D; E; F; G

Tỷ lệ mẫu phát sinh phôi soma sơ cấp (100%), số lượng phôi soma (51,80 phôi/mẫu) và GCF của mẫu P-lTCL (51,80) ở nghiệm thức bổ sung 1,0 mg/L 2,4-D cao hơn đáng kể so với nghiệm thức đối chứng và các nghiệm thức khác (Bảng 3.4). Ngoài ra, 100% mô sẹo cảm ứng được thu nhận từ các mẫu nuôi cấy trong môi trường bổ sung 2,4-D, 3,0 – 7,0 mg/L NAA, hoặc 7,0 mg/L IBA. Trong khi đó, tỷ lệ mẫu hình thành rễ bất định (93,33%) và số lượng rễ (5,40 rễ/mẫu) cao nhất ở nghiệm thức bổ sung 5,0 mg/L NAA, các rễ hình thành dài, mảnh, có màu trắng nhạt và sinh trưởng mạnh.

Ngoài ra, auxin còn ảnh hưởng đến hệ số hiệu chỉnh tăng trưởng của hai loại mẫu L-tTCL và P-lTCL (Bảng 3.5). Đối với mẫu cấy L-tTCL, chúng tôi không ghi nhận được bất kỳ sự phát sinh phôi soma sơ cấp ở tất cả các mẫu cấy trong nghiệm thức đối chứng. Ngược lại, mẫu được cấy trong môi trường có bổ sung auxin, hệ số hiệu chỉnh tăng trưởng của mẫu gia tăng và đạt giá trị cao nhất trong môi trường có bổ sung 7,0 mg/L NAA (1636,62). Đồng thời, hệ số này cũng cao hơn đáng kể so với giá trị GCF cao nhất của mẫu được nuôi cấy trong môi trường bổ sung 2,4-D (1284,89) và IBA (829,98).

Tuy nhiên, nồng độ auxin cao làm giảm đáng kể GCF của mẫu cấy. Xu hướng tương tự đã được quan sát thấy đối với mẫu P-lTCL; GCF của P-lTCL là cao nhất (310,80) ở nghiệm thức bổ sung 1,0 mg/L 2,4-D và giảm dần khi gia tăng nồng độ 2,4-D lên đến 2,0 mg/L (107,20). GCF cao nhất của mẫu P-lTCL được nuôi cấy trong môi trường bổ sung NAA (178,80) và IBA (173,79) thấp hơn đáng kể so với GCF cao nhất của mẫu cấy được xử lý với 2,4-D.

Loại mẫu và PGRs là những yếu tố ảnh hưởng rất lớn đến sự phát sinh phôi soma. Những nghiên cứu trước đây ở các loài thuộc chi *Panax* cho rằng các nguồn mẫu như rễ tơ, thân rễ, lá, cuống lá, trụ trên lá mầm, mô sẹo có thể được sử dụng làm nguồn mẫu cấy cho sự phát sinh phôi soma [10, 14, 67, 139]. Trong nghiên cứu này, mẫu L-tTCL và cuống lá của cây con *in vitro* sâm Lang Bian đều cho hiệu quả phát sinh phôi soma sơ cấp cao. Đây là những nguồn mẫu sẵn có, cho phép tái sinh cây con mới có tính ổn định cao về mặt di truyền [198].

Hiệu quả của kỹ thuật nuôi cấy TCL thông qua phát sinh phôi soma cũng đã được chứng minh trên một số đối tượng thực vật khác nhau. Các kết quả nghiên cứu cho thấy, loại mẫu cấy và phương pháp cắt ảnh hưởng đến khả năng tái sinh mẫu. rong nuôi cấy TCL *Pinus patula* Schl. Et Cham, mẫu cắt dọc lTCL từ phôi soma chưa trưởng thành cho hiệu quả phát sinh phôi soma tốt hơn so với mẫu cắt ngang tTCL [143]. Kết quả tương tự cũng được ghi nhận trên cây chanh dây, mẫu cấy thân lTCL cho hiệu quả tái sinh chồi cao hơn so với mẫu cấy tTCL [199]. Trong khi đó, Hanh và cộng sự (2022) cho rằng mẫu gân lá chính (½ mv-tTCL) và cuống lá (1/2 p-tTCL) cây *A. chinensis* Planch được cắt theo chiều ngang cho hiệu quả phát sinh phôi soma là cao nhất sau 8 tuần nuôi cấy [138]. Đối với sâm Lang Bian, hệ số hiệu chỉnh tăng trưởng GCF của mẫu P-lTCL (51,80) cao hơn so với mẫu L-tTCL (32,73) (Bảng 3.3 và 3.4). Tuy nhiên, tổng GCF của toàn bộ lá (5 lá, 1636,62) cao hơn so với cuống lá (310,98) (Bảng 3.5).

Bảng 3.3. So sánh hiệu quả phát sinh phôi soma sơ cấp và phát sinh hình thái khác từ mẫu L-tTCL trong môi trường có bổ sung auxin sau 12 tuần nuôi cấy

Auxin	Nồng độ (mg/L)	Mẫu phát sinh phôi soma sơ cấp (%)	Số phôi soma	GCF $_{L\text{-}tTCL}$	Mô sẹo (%)	Rễ bất định (%)	Số rễ
Đối chứng	0	-	-	-	-	-	-
2,4-D	0,5	$19,99 \pm 7,46^{f}$	$28,20 \pm 1,79^{e}$	$5,63 \pm 2,09^{f}$	$86,66 \pm 7,46^{b}$	-	-
	1,0	$56,66 \pm 9,13^{bc}$	$35,20 \pm 2,39^{c}$	$19,90 \pm 3,06^{c}$	$93,33 \pm 9,13^{ab}$	-	-
	1,5	$63,33 \pm 7,45^{b}$	$40,40 \pm 2,79^{a}$	$25,70 \pm 4,25^{b}$	$100,00 \pm 0,00^{a}$	$30,00 \pm 7.46^{b}$	$1,20 \pm 0,45^{b}$
	2,0	$26,66 \pm 9,13^{ef}$	$6,40 \pm 1,14^{i}$	$1,70 \pm 0,67^{g}$	$90,00 \pm 9,13^{ab}$	-	-
NAA	1,0	$16,66 \pm 0,00^{f}$	$13,40 \pm 2,88^{h}$	$2,23 \pm 0,48^{g}$	$63,33 \pm 7,45^{c}$	-	-
	3,0	$33,33 \pm 0,00^{de}$	$30,80 \pm 2,86^{d}$	$10,27 \pm 0,95^{e}$	$76,66 \pm 14,91^{c}$	$23,33 \pm 9,13^{c}$	$4,60 \pm 1,14^{a}$
	5,0	$80,00 \pm 7,46^{a}$	$32,80 \pm 1,92^{cd}$	$26,33 \pm 3,66^{b}$	$100,00 \pm 0,00^{a}$	$63,33 \pm 13,94^{a}$	$1,40 \pm 0,55^{b}$
	7,0	$86,66 \pm 7,46^{a}$	$37,80 \pm 1,30^{b}$	$32,73 \pm 2,59^{a}$	$100,00 \pm 0,00^{a}$	-	-
	9,0	-	-	-	$23,33 \pm 9,13^{f}$	-	-
IBA	1,0	-	-	-	-	-	-
	3,0	$13,33 \pm 7,45^{f}$	$21,80 \pm 3,27^{g}$	$2,80 \pm 1,63^{g}$	$20,00 \pm 7,45^{f}$	-	-
	5,0	$30,00 \pm 7,46^{de}$	$25,40 \pm 1,82^{f}$	$7,63 \pm 2,03^{ef}$	$40,00 \pm 9,13^{e}$	-	-
	7,0	$53,33 \pm 7,45^{c}$	$31,00 \pm 2,00^{d}$	$16,60 \pm 3,13^{d}$	$53,33 \pm 13,94^{d}$	-	-
	9,0	$36,53 \pm 7,53^{d}$	$26,80 \pm 1,79^{ef}$	$9,80 \pm 2,15^{e}$	$40,00 \pm 9,13^{e}$	$19,99 \pm 7,45^{c}$	$1,00 \pm 0,00^{b}$

Ghi chú: *Dấu "-" thể hiện không ghi nhận sự phát sinh phôi soma, cảm ứng tạo mô sẹo và hình thành rễ bất định của mẫu L-tTCL. Các chữ cái khác nhau (a, b, ...) trên cùng một cột chỉ sự sai khác có ý nghĩa thống kê của các giá trị trung bình với p < 0,05 (Duncan's test). Giá trị thể hiện trong bảng là giá trị trung bình ± SD (độ lệch chuẩn).*

Bảng 3.4. So sánh hiệu quả phát sinh phôi soma sơ cấp và phát sinh hình thái khác từ mẫu P-lTCL trong môi trường có bổ sung auxin sau 12 tuần nuôi cấy

Auxin	Nồng độ (mg/L)	Mẫu phát sinh phôi soma sơ cấp (%)	Số phôi soma	GCF P-ITCL	Mô sẹo (%)	Rễ bất định (%)	Số rễ
Đối chứng	0	16,70 ± 0,00^{h}	2,00 ± 0,71^{h}	0,33 ± 0.12^{f}	-	-	-
2,4-D	0,5	29,98 ± 7,42^{gh}	2,80 ± 0,84^{h}	0,83 ± 0,33^{f}	100,00 ± 0,00^{a}	-	-
	1,0	100,00 ± 0,00^{a}	51,80 ± 6,38^{a}	51,80 ± 6,38^{a}	100,00 ± 0,00 ^{a}	46,66 ± 7,46^{d}	1,00 ± 0,00 ^{e}
	1,5	70,02 ± 7,42^{cd}	33,00 ± 2,00^{d}	23,16 ± 3,53^{c}	100,00 ± 0,00^{a}	-	-
	2,0	53,34 ± 7,47^{e}	33,40 ± 5,46^{d}	17,87 ± 4,07^{d}	100,00 ± 0,00^{a}	-	-
NAA	1,0	20,02 ± 7,42^{gh}	16,00 ± 2,65^{g}	3,30 ± 1,73^{f}	86,64 ± 7,47 ^{b}	93,33 ± 9,13^{a}	1,20 ± 0,45^{e}
	3,0	63,33 ± 7,45^{e}	21,00 ± 2,35^{f}	13,33 ± 2,40^{e}	100,00 ± 0,00 ^{a}	100,00 ± 0,00^{a}	1,80 ± 0,45^{d}
	5,0	89,98 ± 9,15^{b}	33,00 ± 1,58^{d}	29,80 ± 4,35^{b}	100,00 ± 0,00^{a}	93,33 ± 9,13^{a}	5,40 ± 0,55^{a}
	7,0	60,02 ± 9,15^{de}	43,00 ± 3,74^{b}	25,57 ± 2,35^{bc}	100,00 ± 0,00^{a}	44,40 ± 6,80^{d}	2,60 ± 0,55^{c}
	9,0	23,34 ± 9,09^{gh}	5,20 ± 1,79^{h}	1,20 ± 0,66^{f}	43,32 ± 9,15^{e}	33,33 ± 0,00^{e}	1,80 ± 0,45^{d}
IBA	1,0	43,32 ± 9,15^{f}	21,40 ± 2,51^{f}	9,40 ± 2,80^{e}	23,34 ± 9,09^{f}	-	-
	3,0	79,98 ± 7,42^{c}	28,40 ± 3,85^{e}	22,77 ± 4,12^{c}	66,70 ± 0,00^{d}	36,66 ± 7,46^{e}	2,00 ± 0,00^{d}
	5,0	76,66 ± 9,09^{c}	38,00 ± 3,67^{c}	28,96 ± 2,86^{b}	79,98 ± 7,42^{c}	40,00 ± 9,13^{de}	2,00 ± 0,00^{d}
	7,0	70,20 ± 7,42^{cd}	40,40 ± 3,21^{bc}	28,23 ± 3,16^{b}	100,00 ± 0,00^{a}	83,33 ± 0,00^{b}	3,40 ± 0,55^{b}
	9,0	36,64 ± 7,47^{fg}	29,80 ± 1,52^{de}	10,93 ± 2,29^{e}	63,36 ± 7,47^{d}	76,66 ± 9,13^{c}	1,80 ± 0,45^{d}

Ghi chú: *Dấu "-" thể hiện không ghi nhận sự cảm ứng tạo mô sẹo và hình thành rễ bất định của mẫu P-lTCL. Các chữ cái khác nhau trên cùng một cột chỉ sự sai khác có ý nghĩa thống kê của các giá trị trung bình với p< 0,05 (Duncan's test). Giá trị thể hiện trong bảng là giá trị trung bình ± SD (độ lệch chuẩn).*

Bảng 3.5. Hệ số hiệu chỉnh tăng trưởng (GCF) của các mẫu L-tTCL và P-lTCL trong môi trường bổ sung auxin sau 12 tuần nuôi cấy

Auxin	**Nồng độ (mg/L)**	**$GCF_{L\text{-}tTCL}$ (Toàn bộ lá)**	**$GCF_{P\text{-}lTCL}$ (Toàn bộ cuống lá)**	**$GCF_{l\text{-}tTCL + P\text{-}lTCL}$ (Chồi)**
Đối chứng	0	-	$2,00 \pm 0,71^{f}$	$2,00 \pm 0,71^{h}$
2,4-D	0,5	$281,58 \pm 104,50^{f}$	$5,00 \pm 2,00^{f}$	$286,58 \pm 103,30^{f}$
	1,0	$994,95 \pm 152,87^{c}$	$310,80 \pm 38,28^{a}$	$1305,75 \pm 173,04^{c}$
	1,5	$1284,89 \pm 212,43^{b}$	$138,98 \pm 21,16^{c}$	$1423,87 \pm 215,30^{bc}$
	2,0	$84,99 \pm 33,55^{g}$	$107,20 \pm 24,43^{d}$	$192,18 \pm 25,01^{fg}$
NAA	1,0	$111,62 \pm 24,00^{g}$	$19,79 \pm 10,38^{f}$	$131,42 \pm 31,52^{fgh}$
	3,0	$513,28 \pm 47,72^{e}$	$79,99 \pm 14,42^{e}$	$593,28 \pm 52,46^{e}$
	5,0	$1316,60 \pm 183,07^{b}$	$178,80 \pm 26,08^{b}$	$1495,40 \pm 199.79^{b}$
	7,0	$1636,62 \pm 129,74^{a}$	$153,39 \pm 14,13^{bc}$	$1790,01 \pm 136,78^{a}$
	9,0	-	$7,20 \pm 3,96^{f}$	$7,20 \pm 3,96^{h}$
IBA	1,0	-	$56,40 \pm 16,77^{e}$	$56,40 \pm 16,77^{gh}$
	3,0	$139,94 \pm 81,49^{g}$	$136,59 \pm 24,70^{c}$	$276,54 \pm 93,47^{f}$
	5,0	$381,62 \pm 102,46^{ef}$	$173,79 \pm 17,18^{b}$	$555,41 \pm 111,46^{e}$
	7,0	$829,98 \pm 156,48^{d}$	$169,39 \pm 18,97^{b}$	$999,36 \pm 172,89^{d}$
	9,0	$489,85 \pm 107,58^{e}$	$65,60 \pm 13,74^{e}$	$555,44 \pm 108,11^{e}$

Ghi chú: *Dấu "-" thể hiện không ghi nhận sự phát sinh phôi soma của mẫu L-tTCL. Các chữ cái khác nhau (a, b, ...) trên cùng một cột chỉ sự sai khác có ý nghĩa thống kê của các giá trị trung bình với p < 0,05 (Duncan's test). Giá trị thể hiện trong bảng là giá trị trung bình ± SD (độ lệch chuẩn).*

Các mẫu cấy TCL có nguồn gốc từ hai nguồn mẫu lá và cuống lá của cùng một chồi sâm Lang Bian *in vitro* đều có thể được sử dụng trong nuôi cấy phát sinh phôi soma. Xét trên toàn bộ chồi thì hệ số hiệu chỉnh tăng trưởng GCF của chồi đạt được giá trị cao nhất khi các mẫu đươc cấy trong môi trường có bổ sung 7 mg/L NAA (1790,01) (Bảng 3.5). Tuy nhiên, mỗi loại mẫu cấy yêu cầu loại và nồng độ auxin khác nhau (7mg/L NAA cho mẫu cấy L-tTCL và 1 mg/L 2,4–D cho mẫu cấy P-lTCL). Do đó, việc lựa chọn môi trường thích hợp nhất cho từng loại mẫu sẽ giúp nâng cao được hiệu quả phát sinh phôi soma. Tổng hệ số hiệu chỉnh tăng trưởng thu được từ một chồi sâm Lang Bian, bao gồm L-tTCL (1636,62 ở nghiệm thức bổ sung 7,0 mg/L NAA) và P-lTCL (310,80 ở nghiệm thức bổ sung 1,0 mg/L 2,4-D), đạt được cao nhất 1947,42 sau 12 tuần nuôi cấy.

Vi nhân giống thông qua con đường phát sinh phôi soma sử dụng kỹ thuật TCL có hiệu quả cao hơn so với các kỹ thuật nuôi cấy khác, đặc biệt là thời gian phát sinh phôi soma và hiệu quả tái sinh mẫu. Ở *P. ginseng*, mẫu TCL (0,2 mm) cắt từ lá mầm, lá, cuống lá và rễ phát sinh phôi soma sau 9 tuần nuôi cấy [200]. Kết quả tương tự cũng được quan sát thấy ở *P. vietnamensis*; mẫu lá TCL (kích thước 10 mm × 10 mm) cho hiệu quả phát sinh phôi soma trực tiếp cao sau 10 tuần so với 12 tuần ở mẫu lá [38, 49]. Đối với quá trình phát sinh phôi soma gián tiếp, mẫu lá tTCL cảm ứng tạo mô sẹo và tiếp sau đó là phát sinh phôi soma (16 tuần) nhanh hơn ở mẫu lá (18 tuần) [40]. Do đó, vi nhân giống thông qua con đường phát sinh phôi soma sử dụng kỹ thuật nuôi cấy TCL hiệu quả hơn so với nuôi cấy các mô thực vật khác. Hầu hết các tế bào đều tiếp xúc với chất dinh dưỡng và chất điều hòa sinh trưởng trong môi trường. Ngoài ra, mặc dù tỷ lệ mẫu phát sinh phôi soma và số lượng phôi soma trên mỗi mẫu TCL có thể thấp hơn so với các mô thực vật khác, tuy nhiên, hiệu quả tái sinh của mẫu TCL cao hơn. Vì thế, có thể áp dụng kỹ thuật nuôi cấy TCL trong vi nhân giống các loài thuộc chi *Panax*.

Ngoài ra, 2,4-D và NAA thường hay được sử dụng để cảm ứng phát sinh phôi soma ở nhiều loài thuộc chi *Panax* bao gồm *P. quinquefolium* [67], *P. ginseng* [7], *P. vietnamensis* [10] với nồng độ sử dụng phù hợp từ 0,5 – 1,0 mg/L. Auxin được sử dụng ở nồng độ cao gây ức chế sự phát sinh phôi soma cũng như phát triển tiếp theo của phôi soma [201]. Tuy nhiên, ở *P. ginseng* [202] và *P. ginseng* x *P. quinquefolius* [14], 2,0 mg/L 2,4-D là nồng độ tối ưu cho sự phát sinh phôi soma từ các mẫu cấy. Trong nghiên cứu này, 1,0 mg/L 2,4-D kích thích sự phát sinh phôi soma từ mẫu cấy P-lTCL hiệu quả hơn so với các nghiệm thức khác; trong khi đó, NAA ở nồng độ cao (7,0 mg/L) cho hiệu quả phát sinh phôi soma sơ cấp tốt nhất ở mẫu cấy L-tTCL.

Một số nghiên cứu đã chỉ ra rằng việc kết hợp auxin và cytokinin mang lại hiệu quả phát sinh phôi soma cao hơn so với việc sử dụng auxin riêng lẻ trên cây *P. vietnamenis* [10]. Tuy nhiên, đối với sâm Lang Bian, việc kết hợp giữa auxin và cytokinin cho hiệu quả phát sinh phôi soma không cao hơn so với những nghiệm thức sử dụng auxin đơn lẻ (số liệu không công bố). Những kết quả này chứng tỏ rằng sự đáp ứng của mẫu với quá trình phát sinh phôi soma có sự khác biệt phụ thuộc vào đối tượng thực vật, loại mẫu, loại và nồng độ auxin sử dụng. Đồng thời, mẫu lá L-tTCL và cuống lá P-lTCL đều là nguồn vật liệu phù hợp sử dụng cho quá trình vi nhân giống *in vitro* theo con đường phát sinh phôi soma.

Bên cạnh sự phát sinh phôi soma, sự phát sinh mô sẹo và rễ bất định cũng được ghi nhận trên hai loại mẫu L-tTCL và P-lTCL . Tương tự như các nghiên cứu trên các loài thuộc chi *Panax* như *P. ginseng, Panax pseudoginseng, P.quinquefolius, P. vietnamensis* [8, 139, 203], 2,4-D cho hiệu quả cảm ứng mô sẹo cao hơn so với NAA và IBA với nồng độ thích hợp. Bên cạnh đó, 5 mg/L NAA cho hiệu quả cảm ứng hình thành rễ là tốt nhất ở cả hai nguồn mẫu L-tTCL và P-lTCL. Điều này có sự khác biệt so với các loài thuộc chi *Panax* khác, IBA thường được sử dụng hiệu quả để cảm ứng và nhân nhanh rễ với nồng độ nằm trong khoảng từ 2 – 7 mg/L [204]. Mô sẹo và rễ bất định cũng là những nguồn vật liệu thích hợp có thể sử dụng cho những nghiên cứu tiếp theo như nuôi cấy sinh khối, tế bào đơn, rễ nhằm thu nhận sản phẩm thứ cấp có hoạt tính sinh học trong những nghiên cứu tiếp theo.

Tóm lại, auxin có ảnh hưởng đến sự phát sinh phôi soma sơ cấp từ các nguồn mẫu cấy L-tTCL và P-lTCL. Đối với mẫu L-tTCL, sự phát sinh phôi tốt nhất ghi nhận được trong môi trường có bổ sung 7 mg/L NAA. Đối với mẫu P-lTCL, môi trường bổ sung 1 mg/L 2,4–D phù hợp cho sự phát sinh phôi soma. Các phôi soma được thu nhận từ mẫu L-tTCL và P-lTCL có thể được sử dụng làm nguồn nguyên liệu tăng sinh phôi soma thứ cấp. Bên cạnh đó, sự phát sinh mô sẹo và rễ bất định cũng được ghi nhận ở cả hai loại mẫu L-tTCL và P-lTCL. Đây cũng là nguồn nguyên liệu phù hợp sử dụng trong nghiên cứu nuôi cấy sinh khối thu nhận hoạt chất.

3.2.2. Ảnh hưởng của proline, glutamine hoặc spermidine đến sự phát sinh phôi soma sơ cấp từ các mẫu L-tTCL hoặc P-lTCL

3.2.2.1. Ảnh hưởng của glutamine, proline hoặc spermidine đến sự phát sinh phôi soma sơ cấp từ mẫu L-tTCL in vitro

Acid amin và spermidine làm gia tăng hiệu quả của quá trình phát sinh và phát triển phôi soma đã được ghi nhận ở nhiều đối tượng thực vật. Vì vậy, trong thí nghiệm

tiếp theo này, chúng tôi tập trung vào nghiên cứu ảnh hưởng của glutamine, proline hoặc spermidine trong việc nâng cao hiệu quả phát sinh phôi soma sơ cấp sâm Lang Bian.

Các mẫu L-tTCL sâm Lang Bian được nuôi cấy trong môi trường MS có bổ sung 7 mg/L NAA và glutamine hoặc proline hoặc spermidine ở các nồng độ khác nhau. Ảnh hưởng của glutamine, proline hoặc spermidine đối với sự phát sinh phôi soma sơ cấp từ các mẫu L-tTCL sau 12 tuần nuôi cấy được ghi nhận trong Bảng 3.6. Kết quả cho thấy việc bổ sung 146 mg/L glutamine hiệu quả cho sự phát sinh phôi soma sơ cấp thể hiện ở cả tỷ lệ mẫu phát sinh phôi soma sơ cấp và số lượng phôi soma (83,34% và 52,20 phôi/mẫu) cao hơn so với nghiệm thức đối chứng (76,68% và 33,40 phôi/mẫu) và các nghiệm thức khác. Tuy nhiên, glutamine ở nồng độ cao hơn (730 và 1022 mg/L) làm giảm dần hiệu quả phát sinh phôi soma. Bên cạnh đó, ở nghiệm thức đối chứng ghi nhận chủ yếu mô sẹo và phôi soma hình cầu; trong khi đó, phôi soma hình thủy lôi, là nguồn nguyên liệu thiết yếu cho các nghiên cứu về phát sinh phôi soma thứ cấp, được hình thành trên môi trường bổ sung glutamine (Hình 3.5 B).

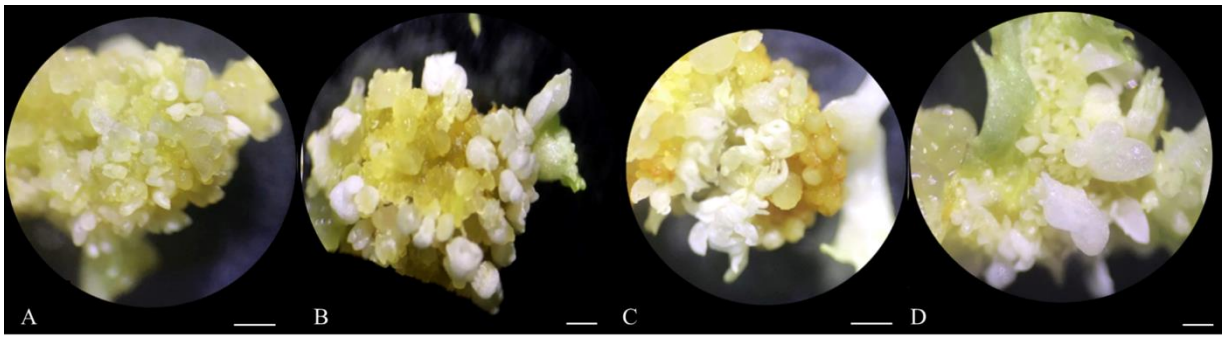
Trong các nghiệm thức bổ sung proline, sự phát sinh phôi soma sơ cấp từ các mẫu L-tTCL không có sự cải thiện đáng kể; tỷ lệ mẫu phát sinh phôi soma sơ cấp cũng như số lượng phôi soma cao nhất chỉ đạt 53,34% và 21,00 phôi/mẫu ở nồng độ proline 100 mg/L, thấp hơn so với đối chứng (tương ứng là 76,68% và 33,40 phôi/mẫu). Proline ở nồng độ 300 mg/L và 400 mg/L không cho thấy sự cảm ứng phát sinh phôi soma sơ cấp (Bảng 3.6). Tuy nhiên, việc bổ sung proline ở mức 100 – 200 mg/L đã cảm ứng hình thành phôi soma thủy lôi (Hình 3.5 C); trong khi đó ở nghiệm thức đối chứng chỉ quan sát thấy mô sẹo có khả năng phát sinh phôi soma sơ cấp và phôi soma dạng hình cầu (Bảng 3.6).

Sau 12 tuần nuôi cấy trên môi trường bổ sung spermidine, kết quả cho thấy spermidine ở nồng độ thấp (1,5 – 7,5 mg/L) có tác dụng tích cực đối với sự phát sinh phôi soma sơ cấp từ mẫu cấy L-tTCL, trong khi sử dụng ở nồng độ cao, chúng lại có tác dụng ức chế hình thành phôi soma (Bảng 3.6). Hơn nữa, phôi soma được quan sát thấy ở các dạng hình cầu, tim, hình thủy lôi và lá mầm trong tất cả các nghiệm thức bổ sung spermidine (Hình 3.5 D) với kết quả cao nhất ở nghiệm thức bổ sung 1,5 mg/L spermidine, tỷ lệ mẫu phát sinh phôi soma sơ cấp và số phôi soma lần lượt là 93,32% và 54,20 phôi/mẫu, phôi soma chủ yếu ở giai đoạn thủy lôi và lá mầm (Hình 3.5D). Hệ số tái sinh phôi soma cũng cho kết quả tương tự, GCF cao nhất thu được ở nghiệm thức bổ sung 1,5 mg/L spermidine (Hình 3.8).

Bảng 3.6. So sánh hiệu quả phát sinh phôi soma sơ cấp từ mẫu cấy L-tTCL nuôi cấy trong môi trường có bổ sung glutamine, proline hoặc spermidine sau 12 tuần nuôi cấy

Nghiệm thức	**Nồng độ (mg/L)**	**Tỷ lệ mẫu phát sinh phôi soma sơ cấp (%)**	**Số phôi soma (Phôi/ mẫu)**	**Hình thái phôi soma**
Đối chứng	0	76,68 ± 14,88^{b}	33,40 ± 4,67^{c}	Hình cầu
Glutamine	146	83,34 ± 16,65^{ab}	52,20 ± 5,26^{a}	Hình cầu, tim và thủy lôi
	438	83,32 ± 11,77^{ab}	22,60 ± 4,67^{d}	
	730	60,02 ± 9,15^{c}	12,60 ± 2,07^{ef}	
	1022	56,68 ± 9,15^{cd}	10,40 ± 2,07^{ef}	
Proline	100	53,34 ± 7,47^{cd}	21,00 ± 4,06^{d}	
	200	29,98 ± 7,42^{e}	14,60 ± 3,65^{e}	
	300	0,00 ± 0,00^{f}	0,00 ± 0,00^{g}	-
	400	0,00 ± 0,00^{f}	0,00 ± 0,00^{g}	-
Spermidine	1,5	93,32 ± 9,15^{a}	54,20 ± 4,44^{a}	Hình cầu, tim, thủy lôi và lá mầm
	7,5	80,00 ± 13,92^{ab}	38,60 ± 3,43^{b}	
	15	60,02 ± 9,15^{c}	8,60 ± 1,14^{f}	
	30	43,32 ± 14,94^{de}	3,40 ± 0,89^{g}	

Ghi chú: *Dấu "-" thể hiện không ghi nhận sự phát sinh phôi soma của mẫu L-tTCL. Các chữ cái khác nhau (a, b,…) trên cùng một cột chỉ sự sai khác có ý nghĩa thống kê của các giá trị trung bình với p < 0,05 (Duncan's test). Giá trị thể hiện trong bảng là giá trị trung bình ± SD (độ lệch chuẩn).*



Hình 3.5. Sự phát sinh phôi soma sơ cấp từ mẫu L-tTCL sâm Lang Bian sau 12 tuần nuôi cấy trên các môi trường khác nhau (Thước đo: 1 mm). A. Đối chứng; B. 146 mg/L glutamine; C. 100 mg/L proline; D. 1,5 mg/L spermidine

3.2.2.2. Ảnh hưởng của glutamine, proline hoặc spermidine đến sự phát sinh phôi soma sơ cấp từ mẫu P-lTCL in vitro

Các mẫu cấy P-lTCL được nuôi cấy trong môi trường MS có bổ sung 1 mg/L 2,4-D và glutamin hoặc proline hoặc spermidine ở các nồng độ khác nhau nhằm mục tiêu đánh giá ảnh hưởng của chúng đến khả năng phát sinh phôi. Từ đó, xác định được loại và hàm lượng chất bổ sung phù hợp để nâng cao hiệu quả phát sinh phôi. Đối với các mẫu P-lTCL, việc bổ sung glutamine và proline không có hiệu quả tích cực trong sự phát sinh phôi soma, dẫn đến số phôi soma hình thành trên mỗi mẫu cấy thấp hơn so với đối chứng. Cụ thể, khi nồng độ glutamine tăng lên 1022 mg/L, tỷ lệ mẫu phát sinh phôi soma sơ cấp và số lượng phôi soma lần lượt chỉ là 43,32% và 18,20 phôi/mẫu (Bảng 3.7 và Hình 3.6 B). Mặc dù tỷ lệ mẫu phát sinh phôi soma sơ cấp và số phôi soma hình thành cao nhất tương ứng là 79,98% và 42,00 phôi soma/mẫu khi mẫu được cấy trong môi trường bổ sung 100 mg/L proline, tuy nhiên, các chỉ tiêu này vẫn thấp hơn so với đối chứng (tương ứng là 93,32% và 54,20 phôi/mẫu). Thêm vào đó, các mẫu P-lTCL hình thành chủ yếu phôi soma dạng hình cầu, hình tim và hình thủy lôi trên môi trường bổ sung từ 146 đến 438 g/L glutamine (Hình 3.6 B). Trong trường hợp tiếp tục gia tăng hàm lượng glutamine lên đến 730 – 1022 mg/L chỉ ghi nhận phôi soma ở dạng hình cầu. Đối với nghiệm thức bổ sung proline, phôi soma chủ yếu dạng hình cầu và hình tim (Hình 3.6 C) được hình thành trong môi trường có bổ sung 100 mg/L proline; trong khi đó ở nghiệm thức đối chứng và các nghiệm thức bổ sung proline với nồng độ từ 200 – 400 mg/L chỉ quan sát thấy mô sẹo có khả năng phát sinh phôi soma sơ cấp và phôi soma dạng hình cầu. Nhìn chung, nồng độ proline càng cao thì hiệu quả phát sinh phôi soma sơ cấp thu được càng thấp (Bảng 3.7 và Hình 3.6 C).

Bảng 3.7. So sánh hiệu quả phát sinh phôi soma sơ cấp từ mẫu cấy P-lTCL nuôi cấy trong môi trường có bổ sung glutamine, proline hoặc spermidine sau 12 tuần nuôi cấy

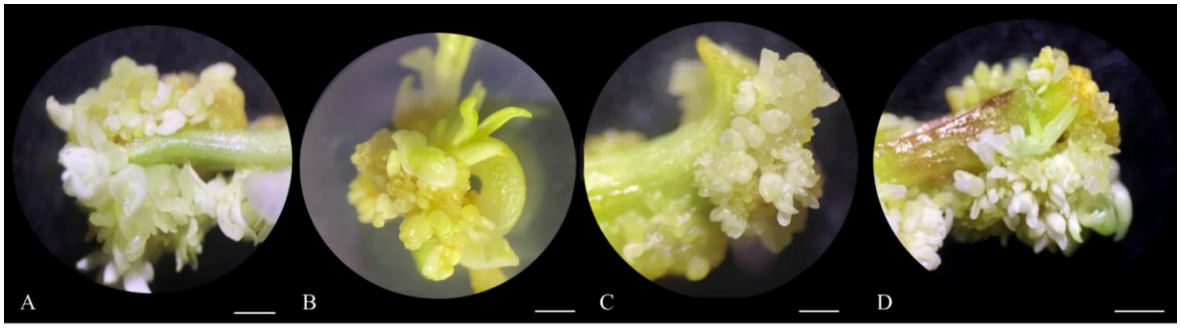
Nghiệm thức	Nồng độ (mg/L)	Tỷ lệ mẫu phát sinh phôi soma sơ cấp (%)	Số phôi soma (Phôi/mẫu)	Hình thái phôi soma
Đối chứng	0	93,32 ± 9,15^{a}	54,20 ± 4,27^{b}	Hình cầu
Glutamine	146	73,34 ± 9,09^{c}	35,00 ± 5,48^{d}	Hình cầu, tim, thủy lôi
	438	63,36 ± 7,47^{cd}	34,60 ± 4,22^{d}	
	730	53,34 ± 7,47^{de}	23,00 ± 8,37^{e}	Hình cầu
	1022	43,32 ± 9,15^{e}	18,20 ± 5,07^{ef}	
Proline	100	79,98 ± 7,42^{b}	42,00 ± 8,60^{c}	Hình cầu, tim
	200	73,34 ± 9,09^{c}	29,80 ± 6,14^{d}	Hình cầu
	300	60,02 ± 9,15^{d}	19,60 ± 3,78^{ef}	
	400	56,68 ± 9,15^{d}	13,40 ± 4,22^{f}	
Spermidine	1,5	96,66 ± 7,47^{a}	68,80 ± 2,95^{a}	Hình cầu, tim, thủy lôi và có lá mầm
	7,5	93,32 ± 9,15^{a}	60,40 ± 5,13^{b}	
	15	79,98 ± 7,42^{b}	46,40 ± 2,97^{c}	
	30	76,66 ± 9,09^{b}	15,20 ± 3,11^{f}	

Ghi chú: *Các chữ cái khác nhau (a, b, …) trên cùng một cột chỉ sự sai khác có ý nghĩa thống kê của các giá trị trung bình với p < 0,05 (Duncan's test). Giá trị thể hiện trong bảng là giá trị trung bình ± SD (độ lệch chuẩn).*

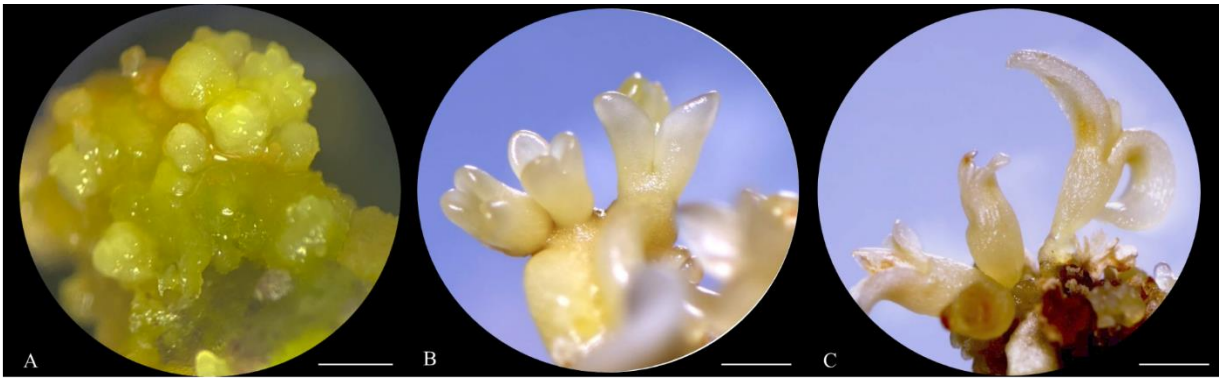
Phôi soma được quan sát thấy ở các dạng hình cầu, hình tim, hình thủy lôi và lá mầm trong tất cả các nghiệm thức bổ sung spermidine, trong đó, phôi soma chủ yếu ở hai giai đoạn hình thủy lôi và có lá mầm (Hình 3.6 D). Tỷ lệ mẫu phát sinh phôi soma sơ cấp (96,66%) cũng như số lượng phôi soma hình thành (68,80 phôi/mẫu) cao nhất được ghi nhận khi mẫu P-lTCL được cấy trên môi trường bổ sung 1,5 mg/L

spermidine, khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức khác (Bảng 3.7 Hình 3.6 D). Tương tự mẫu L-tTCL, P-lTCL cho khả năng tạo phôi soma thấp nhất khi tăng nồng độ spermidine bổ sung lên đến 30 mg/L (76,66% và 15,20 phôi/mẫu). Bên cạnh đó, hệ số hiệu chỉnh tăng trưởng cũng cho kết quả tương tự (Hình 3.8).

Glutamine là một trong những acid amin thường được sử dụng làm nguồn năng lượng cho tế bào, đặc biệt là các tế bào đang phân chia với tốc độ cao trong nuôi cấy *in vitro*. Glutamine rất cần thiết trong quá trình cảm ứng phát sinh phôi soma sơ cấp và trưởng thành phôi soma vì nó cung cấp nguồn nitơ cho quá trình tổng hợp protein và acid nucleic. Hơn nữa, glutamine được sử dụng làm nguyên liệu để tổng hợp các amino acid khác và hoạt động như một chất chuyển hóa vận chuyển nitơ. Hơn nữa, glutamine đóng một vai trò quan trọng trong sự tăng trưởng, phát triển, thích nghi và đáp ứng với stress của môi trường [205].



Hình 3.6. Sự phát sinh phôi soma sơ cấp từ mẫu P-lTCL sâm Lang Bian sau 12 tuần nuôi cấy trên các môi trường khác nhau (Thước đo: 1 mm) A. Đối chứng; B. 146 mg/L glutamine; C. 100 mg/L proline; D. 1,5 mg/L spermidine



Hình 3.7. Các giai đoạn phát triển trong quá trình phát sinh phôi soma sơ cấp sâm Lang Bian (Thước đo: 1 mm) A. Phôi soma hình cầu; B. Phôi soma hình thủy lôi; C. Phôi soma có lá mầm

Hiệu quả của glutamine trong việc cải thiện sự cảm ứng phát sinh và trưởng thành của phôi soma cũng đã được chứng minh ở nhiều đối tượng thực vật. Theo Rai

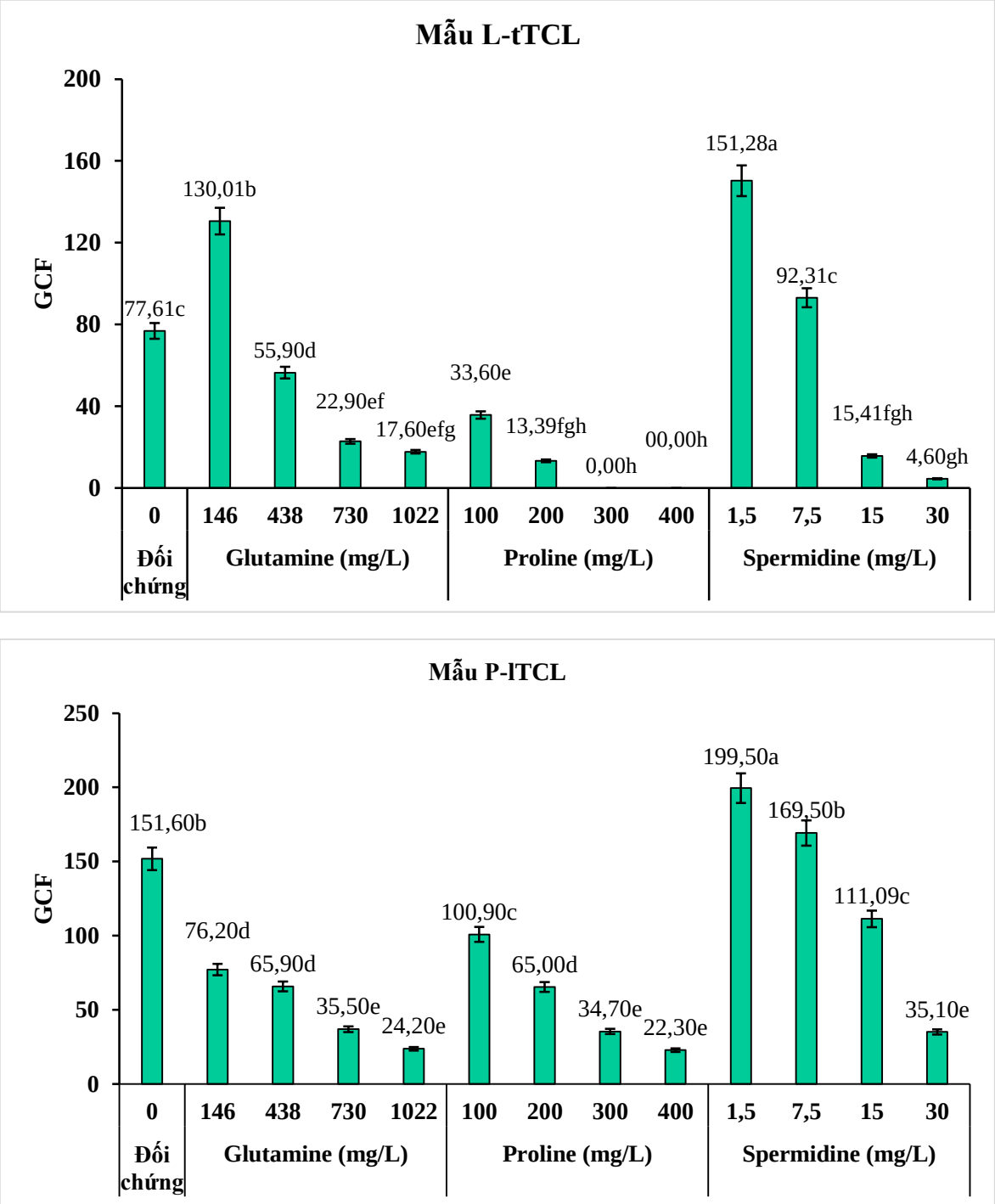
và cộng sự (2009), bổ sung 100 mg/L glutamine làm gia tăng tỷ lệ trưởng thành của phôi soma *Psidium guajava* [206]. Ngoài ra, glutamine cũng đã được chứng minh là có ảnh hưởng tích cực đến sự phát sinh phôi soma *Musa* spp., *Quercus suber* L. [207]. Ở sự phát sinh phôi soma *Musa* spp., Grand Naine và Rasthali, Nandhakumar và cộng sự (2018) cho rằng glutamine (400 mg/L) đã tăng cường đáng kể sự phát sinh phôi soma sơ cấp (lần lượt là 1680 và 1850 phôi) và thứ cấp (tương ứng là 3597 và 3270 phôi) so với các nghiệm thức bổ sung acid amin khác và cao hơn so với môi trường bổ sung proline [208].

Rahmouni (2020) đã nghiên cứu ảnh hưởng của 19 loại acid amin khác nhau đến sự hình thành phôi soma thứ cấp ở *Quercus suber* L., tùy thuộc vào nồng độ và loại acid amin cho hiệu quả tạo phôi soma khác nhau. Glutamine ở nồng độ 500 mg/L cho hiệu quả phát sinh phôi soma tốt nhất và kích thích hình thành phôi soma thứ cấp; tỷ lệ phát sinh phôi soma thứ cấp là 79,97% và 11,5 phôi/mẫu được hình thành từ phôi soma sơ cấp [207]. Ngoài việc tăng hiệu quả phát sinh và trưởng thành phôi soma, việc bổ sung glutamine (500 mg/L) vào môi trường nuôi cấy còn giúp giảm tỷ lệ phôi soma bất thường [207]. Tương tự, Rathore và cộng sự (2012) cho rằng việc bổ sung glutamine (2192 mg/L) vào môi trường nuôi cấy đã kích thích sự trưởng thành của phôi soma *Acacia senegal* và giảm tỷ lệ phôi soma bất thường [209]. Tuy nhiên, tùy theo loài thực vật nghiên cứu mà nhu cầu về glutamine sẽ khác nhau.

Mặt khác, việc bổ sung acid amin vào môi trường nuôi cấy có thể thúc đẩy hoặc ức chế sự phát sinh và tái sinh của cây con từ phôi soma, tùy thuộc vào loại và nồng độ sử dụng cho từng loài thực vật. Pintos và cộng sự (2010) đã nghiên cứu ảnh hưởng của các acid amin (aspargine, arginine và glutamine) đối với sự phát sinh phôi soma *Quercus suber*. Các tác giả nhận thấy, mặc dù sự kết hợp của 3 acid amin này kích thích sự phát sinh phôi soma nhưng hiệu quả không khác biệt so với đối chứng [210]. Tương tự, glutamine làm giảm số lượng phôi soma và tỷ lệ hình thành phôi soma thứ cấp của *Quercus ilex* [97]. Kết quả của chúng tôi cũng cho thấy rằng việc tăng nồng độ glutamine lên 730 − 1022 mg/L đã ức chế sự phát sinh phôi soma của các mẫu L-tTCL và P-lTCL sâm Lang Bian.

Như vậy, glutamine đóng một vai trò quan trọng trong sự phát sinh phôi soma của nhiều đối tượng thực vật. Chúng được sử dụng như một nguồn nitơ bổ sung cho sự phát triển của mẫu cấy. Trong một số trường hợp, nhờ tác dụng kích thích tăng trưởng, glutamine cũng được sử dụng làm nguồn cung cấp nitơ duy nhất trong môi trường nuôi cấy. Tuy nhiên, nhu cầu về hàm lượng glutamine phụ thuộc vào giống

cây trồng. Trong nghiên cứu này, glutamine không có tác động tích cực đến sự phát sinh phôi soma sơ cấp sâm Lang Bian.



Hình 3.8. Hệ số hiệu chỉnh tăng trưởng (GCF) của mẫu L-tTCL và P-lTCL nuôi cấy trên môi trường bổ sung glutamine, proline hoặc spermidine sau 12 tuần nuôi cấy

Proline là một trong những nguồn nitơ khử thiết yếu được chuyển hóa và hấp thụ rất nhanh trong tế bào; nó không gây độc mà thúc đẩy sự tăng trưởng tế bào trong quá trình nuôi cấy [211]. Tăng cường tổng hợp proline có tác dụng cải thiện hoạt

động của con đường pentose phosphate oxy hóa. Qua đó, gia tăng sự phân chia và biệt hóa tế bào. Đồng thời, việc kích hoạt con đường pentose phosphate liên kết với proline đóng một vai trò tích cực trong quá trình phát sinh phôi soma thông qua việc tăng cường sinh tổng hợp cytokinin, auxin và phenolic nội sinh cần thiết cho quá trình phát sinh phôi soma [212].

Proline được bổ sung riêng lẻ hoặc kết hợp với các amino acid khác trong môi trường nuôi cấy với nồng độ thích hợp có tác dụng thúc đẩy sự tăng trưởng của tế bào và sự phát sinh phôi soma. Proline còn có chức năng bảo vệ enzyme khỏi sự phân hủy, kiểm soát nồng độ acid trong bào tương [213]. Ngoài ra, proline còn có vai trò tích cực trong việc tăng hàm lượng protein trong tế bào có khả năng phát sinh phôi soma. Sự hiện diện của proline trong môi trường làm giảm thế nước của môi trường nuôi cấy, làm tăng nồng độ các chất tích lũy trong tế bào, và do đó thúc đẩy sự phát sinh phôi soma [214]. Kết quả nghiên cứu cho thấy, tác động của proline đến quá trình phát sinh phôi soma khác nhau đối với từng loài thực vật. Đối với sâm Lang Bian, hiệu quả của proline trong sự phát sinh phôi soma sơ cấp không cao ở các mẫu P-lTCL thể hiện qua tỷ lệ mẫu phát sinh phôi soma sơ cấp và số lượng phôi soma hình thành trên mỗi mẫu cấy. Trong khi đó, ở các mẫu cấy L-tTCL, mặc dù tỷ lệ mẫu phát sinh phôi soma sơ cấp và số phôi soma không cao nhưng chất lượng phôi vượt trội so với đối chứng khi bổ sung 100 – 200 mg/L proline vào môi trường nuôi cấy.

Tác dụng của proline đối với sự phát sinh phôi soma đã được nghiên cứu trên nhiều đối tượng thực vật như sâm Ngọc Linh [95], tulip [215]. Gerdakaneh và cộng sự (2011) đã báo cáo rằng proline ở nồng độ 100 mg/L có tác dụng đáng kể hơn glutamine trong việc phát sinh và phát triển phôi soma ở dâu tây. Nghiên cứu cho rằng tác dụng tích cực của proline đối với quá trình phát sinh phôi soma có thể là do acid amin này tham gia vào một số con đường truyền tín hiệu trong tế bào [216]. Tương tự, trong vi nhân giống hoa tulip, Podwyszyńska và Marasek-Ciolakowska (2020) đã báo cáo sự tăng sinh mô sẹo và phát sinh phôi soma tốt nhất khi các mẫu cấy được nuôi cấy trên môi trường bổ sung 0,01 mg/L 2,4-D đơn lẻ hoặc kết hợp với TDZ hoặc BA, và 100 mg/L proline có thể thu được trung bình từ 30 đến 55 phôi/100 mg mô sẹo [215]. Tuy nhiên, đối với một số loài thực vật khác thì cần nồng độ proline cao hơn cho sự phát sinh phôi soma, chẳng hạn proline ở nồng độ 300 mg/L phù hợp với sâm Ngọc Linh [95] và 500 mg/L phù hợp phát sinh phôi soma dâu tây [96]. Tuy nhiên, với sâm Lang Bian, sự có mặt của proline trong môi trường nuôi cấy ảnh hưởng tiêu cực đến sự phát sinh phôi soma.

Polyamine đóng một vai trò quan trọng trong quá trình phân chia tế bào, biệt hóa, ổn định màng tế bào và sao chép DNA. Polyamine đã được báo cáo là có liên quan đến các quá trình phát triển của thực vật như tăng trưởng, lão hóa và phản ứng với stress. Hơn nữa, polyamine còn kích thích quá trình tổng hợp và/hoặc kích hoạt các hormone nội sinh và tổng hợp protein. Mặt khác, tác động của polyamine đối với sự phát triển của thực vật được điều hòa thông qua quá trình điều hòa biểu hiện gen, thay đổi cấu trúc, tính linh động của màng tế bào, phiên mã và dịch mã. Cation amine của polyamine có thể liên kết với các anion trong nhóm phosphate của DNA hoặc RNA và nhóm carboxyl của protein trên màng tế bào, do đó đảm bảo tính linh hoạt của màng [217].

Vai trò của polyamine trong quá trình phát sinh phôi soma ở các loại thực vật khác nhau đã được nghiên cứu. Nghiên cứu của Nhựt và cộng sự (2012) cho thấy việc bổ sung 15 mg/L spermidine vào môi trường nuôi cấy làm tăng tỷ lệ mẫu phát sinh phôi soma cũng như số lượng phôi soma hình thành trên mỗi mẫu cấy ở sâm Ngọc Linh [95]. Takeda và cộng sự (2002) đã báo cáo rằng việc bổ sung polyamine ngoại sinh vào môi trường nuôi cấy tế bào, mô thực vật có thể thúc đẩy quá trình tạo phôi soma bằng cách thay đổi hàm lượng hormone nội sinh và việc bổ sung chất ức chế tổng hợp polyamine dẫn đến trì hoãn hoặc ức chế quá trình tạo phôi soma [218]. Ngoài ra, Kadioglu và cộng sự (2002) cho rằng có thể giảm nồng độ ethylene không mong muốn và tăng sự phát triển của mô thực vật bằng cách bổ sung polyamine ngoại sinh [219].

Trong nghiên cứu sự phát sinh phôi soma của *Agave angustifolia*, Elbl và cộng sự (2015) cho rằng, sự phát sinh phôi soma hình cầu của *A. angustifolia* được đánh dấu bằng sự gia tăng tốc độ phân chia và biệt hóa tế bào, sự biểu hiện của các gen liên quan đến sinh tổng hợp carbohydrate và stress oxy hóa. Sau đó, quá trình phát triển phôi soma từ dạng hình cầu sang cây con xảy ra một loạt các biến đổi sinh lý và sinh hóa trong tế bào. Trong quá trình hình thành và phát triển phôi soma, hàm lượng của một số polyamine nội sinh thay đổi tùy theo giai đoạn của quá trình phát sinh phôi soma [220]. Kết quả nghiên cứu thu được cho thấy, spermidine có tác động tích cực đến sự phát sinh phôi soma sơ cấp ở cả hai loại mẫu cấy L-tTCL và P-lTCL sâm Lang Bian *in vitro* ở nồng độ tối ưu 1,5 mg/L.

3.2.2.3. Ảnh hưởng của glutamine, proline hoặc spermidine đối với hoạt tính của các enzyme chống oxy hóa

Kết quả nghiên cứu cho thấy glutamine, proline hoặc spermidine khi được sử dụng ở nồng độ thích hợp đều có tác dụng kích thích sự phát sinh phôi soma từ các

nguồn mẫu L-tTCL hoặc P-lTCL. Theo một số nghiên cứu đã được công bố, proline, glutamine và polyamine có vai trò bảo vệ thực vật đáp ứng lại với các tác nhân gây stress khác nhau. Để hiểu rõ được tác động bảo vệ của chúng đối với thực vật, cụ thể là sự phát sinh phôi soma từ các nguồn mẫu cấy khác nhau, chúng tôi sử dụng các nghiệm thức cho hiệu quả phát sinh phôi soma tốt nhất đối với cả hai nguồn mẫu L-tTCL hoặc P-lTCL (tương ứng 146 mg/L glutamine, 100 mg/L proline và 1,5 mg/L spermidine) để nghiên cứu so sánh ảnh hưởng của chúng đối với hoạt tính của các enzyme chống oxy hóa so và sự khác biệt so với đối chứng.

Hoạt tính SOD, CAT và APX của phôi soma sâm Lang Bian thu được từ các mẫu L-tTCL và P-lTCL sau 12 tuần nuôi cấy được ghi nhận trong Bảng 3.8 và 3.9. Đối với mẫu L-tTCL, hoạt tính của các enzyme chống oxy hóa, bao gồm SOD, CAT và APX, trong nghiệm thức nuôi cấy phôi soma trên môi trường bổ sung 1,5 mg/L spermidine cao hơn đáng kể so với nghiệm thức bổ sung 100 mg/L proline và 146 mg/L glutamine. Hoạt tính của SOD và CAT trong nghiệm thức bổ sung 146 mg/L glutamine (186,89 U/g, 1145,52 U/g) và 100 mg/L proline (136,46 U/g; 930,22 U/g), thấp hơn nhiều so với nghiệm thức đối chứng (238,26 U/g), 1490,09 U/g); tuy nhiên, kết quả ngược lại đã được ghi nhận đối với hoạt tính APX, glutamine và proline cho hoạt tính APX cao hơn (Bảng 3.8).

Bảng 3.8. Ảnh hưởng của glutamine, proline hoặc spermidine đến hoạt tính SOD, CAT và APX trong mẫu L-tTCL sau 12 tuần nuôi cấy

Nghiệm thức	SOD (U/g)	CAT (U/g)	APX (U/g)
Đối chứng	$238,26 \pm 3,68^{b}$	$1490,09 \pm 7,35^{b}$	$0,26 \pm 0,05^{d}$
146 mg/L Glutamine	$186,89 \pm 1,47^{c}$	$1145,52 \pm 3,41^{c}$	$2,65 \pm 0,04^{b}$
100 mg/L Proline	$136,46 \pm 1,27^{d}$	$930,22 \pm 1,28^{d}$	$1,78 \pm 0,04^{c}$
1,5 mg/L Spermidine	$355,10 \pm 10,87^{a}$	$2047,87 \pm 13,76^{a}$	$3,18 \pm 0,15^{a}$

Ghi chú: *Các chữ cái khác nhau (a, b, ...) trên cùng một cột chỉ sự sai khác có ý nghĩa thống kê của các giá trị trung bình với $p < 0,05$ (Duncan's test). Giá trị thể hiện trong bảng là giá trị trung bình ± SD (độ lệch chuẩn).*

Trong các mẫu P-lTCL, việc bổ sung 1,5 mg/L spermidine cũng cho các giá trị SOD, CAT và APX cao nhất so với tất cả các nghiệm thức còn lại. Tuy nhiên, trong loại mẫu cấy này, việc bổ sung proline có thể tăng cường hoạt tính của SOD và APX.

Các dạng oxi hoạt hóa (reactive oxygen species – ROS), một sản phẩm của quá trình trao đổi chất, bao gồm các gốc tự do và một số phân tử có chứa nguyên tử oxi trong cấu trúc. Các ROS nội sinh được chuyển hóa từ các gốc tự do anion superoxide. Gốc tự do anion superoxide được hình thành chủ yếu thông qua hệ enzyme NADPH oxidases (NOXs), xanthine oxidase (XO) và chuỗi truyền điện tử ty thể. Do chúng có chứa electron tự do nên chúng có khả năng tham gia phản ứng rất mạnh. Sinh tổng hợp ROS thường gắn liền với một số phản ứng quan trọng của thực vật như dẫn truyền tín hiệu tế bào, cân bằng nội môi, kích hoạt sự biểu hiện gen và protein có chức năng bảo vệ và phát sinh hình thái thực vật. Một số nghiên cứu trên các đối tượng thực vật như *Oldenlandia umbellate* [221] và *Cyathea Delgadii* [222] báo cáo rằng ROS có vai trò quan trọng ở giai đoạn đầu của quá trình phát sinh phôi soma và được đặc trưng bởi việc cảm ứng các gen liên quan đến stress. Tuy nhiên, ROS nếu được tổng hợp và tích lũy ở nồng độ cao cũng có tác động gây độc đối với tế bào, thậm chí gây chết tế bào [223].

Bảng 3.9. Ảnh hưởng của glutamine, proline hoặc spermidine đến hoạt tính SOD, CAT và APX trong mẫu cấy P-lTCL sau 12 tuần nuôi cấy

Nghiệm thức	SOD (U/g)	CAT (U/g)	APX (U/g)
Đối chứng	$120,56 \pm 1,31^{d}$	$1004,57 \pm 2,95^{c}$	$0,37 \pm 0,02^{d}$
146 mg/L Glutamine	$181,60 \pm 2,73^{b}$	$1183,11 \pm 7,39^{b}$	$2,50 \pm 0,05^{b}$
100 mg/L Proline	$151,81 \pm 1,09^{c}$	$689,20 \pm 6,68^{d}$	$1,64 \pm 0,06^{c}$
1,5 mg/L Spermidine	$208,19 \pm 2,16^{a}$	$1794,30 \pm 16,20^{a}$	$2,87 \pm 0,03^{a}$

Ghi chú: *Các chữ cái khác nhau (a, b, ...) trên cùng một cột chỉ sự sai khác có ý nghĩa thống kê của các giá trị trung bình với $p < 0,05$ (Duncan's test). Giá trị thể hiện trong bảng là giá trị trung bình ± SD (độ lệch chuẩn).*

Thực vật là những sinh vật nhạy cảm, thường xuyên phải đối mặt với nhiều stress phi sinh học và sinh học như nhiễm độc kim loại nặng, hạn hán, nhiễm mặn và nhiệt độ (thấp và cao) trong suốt chu trình sống. Sự cân bằng giữa sản xuất và loại bỏ các oxy hoạt hóa (ROS) bị xáo trộn dưới những tác động stress này. Stress oxy hóa làm tổn thương các phân tử sinh học (DNA, lipid và protein), làm rối loạn tính thấm của màng tế bào, cuối cùng dẫn đến chết tế bào. Để tồn tại dưới điều kiện stress oxy hóa, thực vật đã thích nghi thông qua nhiều phương thức khác nhau, bao gồm tích lũy các chất chuyển hóa có vai trò bảo vệ. Các chất chống oxi hóa bao gồm các phân tử

ổn định, có tác dụng làm giảm hoặc mất khả năng gây hại của ROS đến tế bào thực vật bằng cách nhận hoặc nhường electron cho các gốc tự do và trung hòa chúng. Các tổn thương oxy hóa có thể được hạn chế thông qua hai cách trực tiếp hoặc gián tiếp. Theo phương thức trực tiếp, các chất chống oxi hóa phản ứng với các ROS, chẳng hạn như tạo phức làm mất khả năng xúc tác của các kim loại chuyển điện tử. Do đó, làm giảm sự hình thành số lương gốc oxy hoạt hóa. Theo phương thức gián tiếp, ức chế hoạt động tạo ra ROS (NAD(P)H oxidase và xanthine oxidase) hoặc tăng cường biểu hiện các enzyme chống oxi hóa như superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) và ascorbate peroxidase (APX) [223]. Các enzyme này vừa có vai trò duy trì sự sinh tổng hợp ROS giúp thực vật tồn tại trong những điều kiện môi trường bất lợi, vừa có tác dụng kiểm soát và giảm thiểu tác động gây độc của ROS đối với hoạt động sống của tế bào. Trong đó, (1) SOD là enzyme chuyển hóa các gốc tự do superoxide thành H_2O_2 và O_2. Chúng thường hoạt động trong tế bào chất, lục lạp, ty thể và peroxisome. Trong trường hợp hàm lượng các gốc tự do superoxide thấp thì hoạt độ của SOD cũng giảm nhanh; (2) CAT có chức năng phân giải H_2O_2 thành H_2O và O_2. CAT thường hoạt động trong peroxisome, glyoxysome, ty thể; (3) APX xúc tác phân giải H_2O_2 thành H_2O và O_2 sử dụng ascorbate làm chất cho điện tử. Enzyme này có trong tế bào chất, màng thylakoid của lục lạp, màng peroxisome và ty thể. Vai trò chính của APX là loại bỏ H_2O_2 khi vắng mặt CAT [224]. Một số nhóm chất chuyển hóa bao gồm proline, glutamine và polyamine, từ lâu đã được cho là có vai trò bảo vệ dưới tác động dưới các điều kiện stress khác nhau, bao gồm cả stress oxy hóa, bằng cách duy trì các chức năng và cấu trúc của tế bào đáp ứng với stress oxy hóa.

Hầu hết thực vật sử dụng nitơ vô cơ bao gồm nitrate và amonium làm nguồn nitơ chính. Nitrate hấp thu từ môi trường bên ngoài bị khử thành nitrite nhờ nitrate reductase. Nitrite rất độc đối với tế bào thực vật nên chúng nhanh chóng bị khử thành amonium dưới xúc tác nitrite reductase. Amonium có nguồn gốc từ nitrat hoặc được hấp thụ trực tiếp từ môi trường bên ngoài được đồng hóa thành glutamine và glutamate thông qua chu trình glutamine synthetase (GS)/glutamineoxoglutarate aminotransferase (GOGAT) [225]. Ngoài ra, thực vật cũng có thể hấp thụ trực tiếp các acid amin, cụ thể là glutamine để hỗ trợ sự sinh trưởng và phát triển của chúng. Glutamine được hấp thu vào tế bào thực vật thông qua các chất vận chuyển acid amin và đóng vai trò như là nguồn nitơ quan trọng cho sự tăng trưởng và phát triển của thực vật. Glutamine có vai trò quan trọng trong quá trình sinh tổng hợp protein và nucleotide, là nguồn cung cấp amino chính để tổng hợp acid amin và các hợp chất chứa nitơ khác trong thực vật. Bên cạnh vai trò trong dinh dưỡng và trao đổi chất,

glutamine còn có chức năng như một phân tử truyền tín hiệu liên quan đến điều hòa trao đổi chất [226].

Ngoài ra, glutamine còn ảnh hưởng đến sự biểu hiện của một số gen quan trọng liên quan đến phản ứng stress. Tác động của glutamine lên biểu hiện gen có thể xảy ra do tác động trực tiếp của glutamine hoặc thông qua các sản phẩm chuyển hóa glutamine. Khi hàm lượng glutamine nội sinh bên trong tế bào gia tăng sẽ ảnh hưởng đến trạng thái oxy hóa khử của tế bào, từ đó gây ra sự biểu hiện của các gen phản ứng với stress. Hơn nữa, glutamine có thể khuếch đại tín hiệu và tương tác với các con đường truyền tín hiệu khác để điều chỉnh sự phát triển của thực vật và phản ứng với stress [227]. Ngoài ra, glutamine có thể liên quan đến việc giảm tác hại của ROS thông qua con đường tổng hợp proline [228]. Như vậy, glutamine có thể đóng vai trò là chất dinh dưỡng để hỗ trợ sự tăng trưởng và phát triển của thực vật, chúng cũng là tác nhân gây stress để tạo ra phản ứng phòng vệ ở thực vật.

Proline có vai trò quan trọng giúp thực vật chống chịu với những điều kiện bất lợi của môi trường thông qua điều chỉnh áp suất thẩm thấu, chống oxy hóa, cung cấp năng lượng và đóng vai trò như một phân tử tín hiệu. Tác động chống oxy hóa của proline thể hiện qua việc bảo vệ protein và màng tế bào khỏi sự tổn thương bằng cách làm bất hoạt các nhóm hydroxyl và các chất phản ứng mạnh khác trong ti thể và lục lạp được tạo ra trong những điều kiện stress. Proline kết hợp với gốc hydroxyl tự do để hình thành các gốc tự do ổn định hơn. Chẳng hạn như proline tương tác với gốc hydroxyl tự do và bị oxy hóa đến 5-hydroxyl proline hoặc semialdehyde glutamate hay theo nhánh rẽ tới glutamate góp phần loại bỏ được gốc oxy hoạt hóa này [229]. Bên cạnh đó, proline dễ dàng tạo phức vận chuyển với oxy singlet, qua đó làm giảm năng lượng hoạt động của nó. Do đó, proline có tác dụng bảo vệ cho các hợp chất amin trong lục lạp. Ngoài ra, proline còn giúp duy trì trạng thái cân bằng NADPH/$NADP^+$ giúp ổn định trạng thái oxy hóa khử và ngăn ngừa sự tổn thương bộ máy quang hợp. Trong giai đoạn stress, proline đóng vai trò như là nguồn cung cấp năng lượng và đương lượng khử, ngăn ngừa sự mất hoạt tính của các đại phân tử, góp phần bảo vệ toàn ven cấu trúc màng. Trong giai đoạn phục hồi sau stress, proline có vai trò như nguồn bổ sung năng lượng, nguồn nitơ hữu cơ và các hợp chất khử tham gia vào quá trình sửa chữa.

Do đó, việc bổ sung proline vào trong môi trường nuôi cấy giúp thực vật đáp ứng lại với các điều kiện bất lợi của môi trường. Tuy nhiên, hoạt tính của các enzyme chống oxy hóa không chỉ phụ thuộc vào mức độ stress mà còn phụ thuộc vào từng đối tượng thực vật và hàm lượng proline bổ sung [230]. Sự gia tăng hoạt động APX

đã được quan sát thấy ở mía khi sử dụng proline ở nồng độ 2300 mg/L proline [231]. Ngược lại, Kibria et al. (2016) cho thấy rằng sử dụng 2875 và 5750 mg/L proline ngoại sinh làm giảm hoạt động APX ở Triticum aestivum [232].

Trong nghiên cứu phát sinh phôi sâm Lang Bian, đối với mẫu cấy L-tTCL, hoạt tính SOD và CAT trong nghiệm thức bổ sung proline thấp hơn so với đối chứng có thể là do khả năng bất hoạt các nhóm hydroxyl và các chất phản ứng mạnh khác của proline để hình thành các gốc tự do ổn định hơn. Trong khi đó, SOD thường được tăng cường tổng hợp khi hàm lượng các gốc tự do superoxide cao. Tiếp theo đó, ảnh hưởng tới sự tổng hợp CAT với vai trò phân giải H_2O_2 thành H_2O và O_2 (sản phẩm của quá trình chuyển hóa các gốc tự do superoxide thành H_2O_2 và O_2 dưới xúc tác của enzyme SOD). Đối với mẫu P-lTCL, proline tăng cường hoạt tính SOD so với đối chứng giúp chuyển hóa hiệu quả hơn superoxide thành H_2O_2, trước khi tiếp tục phân giải thành H_2O_2 và O_2 dưới xúc tác của APX.

Polyamine điều hòa hoạt tính enzyme oxy hóa ROS để cân bằng nội môi thông qua vai trò (trực tiếp hoặc gián tiếp) điều chỉnh hệ thống enzyme chống oxy hóa hoặc ngăn chặn sản xuất enzyme chống oxy hóa ROS. Thực vật tổng hợp các chất chuyển hóa và các phân tử như polyamine và H_2O_2 để đáp ứng lại stress oxy hóa. Ngoài ra, polyamine còn có tác dụng giảm stress oxy hóa. Thực vật phản ứng với stress oxy hóa thông qua các con đường chống oxy hóa enzyme và phi enzyme [233]. Vì vậy, việc bổ sung polyamine vào môi trường nuôi cấy giúp mẫu cấy tổng hợp nhiều enzyme chống oxy hóa hơn, từ đó giúp mẫu cấy hạn chế các tác động bất lợi do stress oxy hóa gây ra. Hơn nữa, một nghiên cứu gần đây của Zhong và cộng sự (2020) cho thấy sự tích lũy polyamine đóng một vai trò quan trọng ở cây cà chua sinh trưởng trong điều kiện stress mặn. Họ phát hiện ra rằng sự tích lũy polyamine giúp giảm thiểu thiệt hại do stress oxy hóa gây ra cho tế bào thực vật thông qua liên kết chéo giữa polyamine và các enzyme chống oxy hóa; Nghiên cứu cũng chứng minh rằng việc bổ sung spermidine vào trong môi trường nuôi cấy cây cà chua làm tăng biểu hiện của các enzyme chống oxy hóa như SOD, CAT và APX, cải thiện sự tăng trưởng và năng suất của cây trồng dưới điều kiện stress mặn [234]. Trong nghiên cứu này, việc bổ sung 1,5 mg/L spermidine vào môi trường nuôi cấy đã giúp phôi soma sâm Lang Bian tổng hợp được nhiều enzyme chống oxy hóa hơn so với nghiệm thức đối chứng và các nghiệm thức khác. Từ đó, sự hình thành phôi soma và chất lượng phôi soma ở nghiệm thức này cũng vượt trội hơn.

3.2.2.4. Sự biến động của các hormone nội sinh trong quá trình phát sinh phôi soma

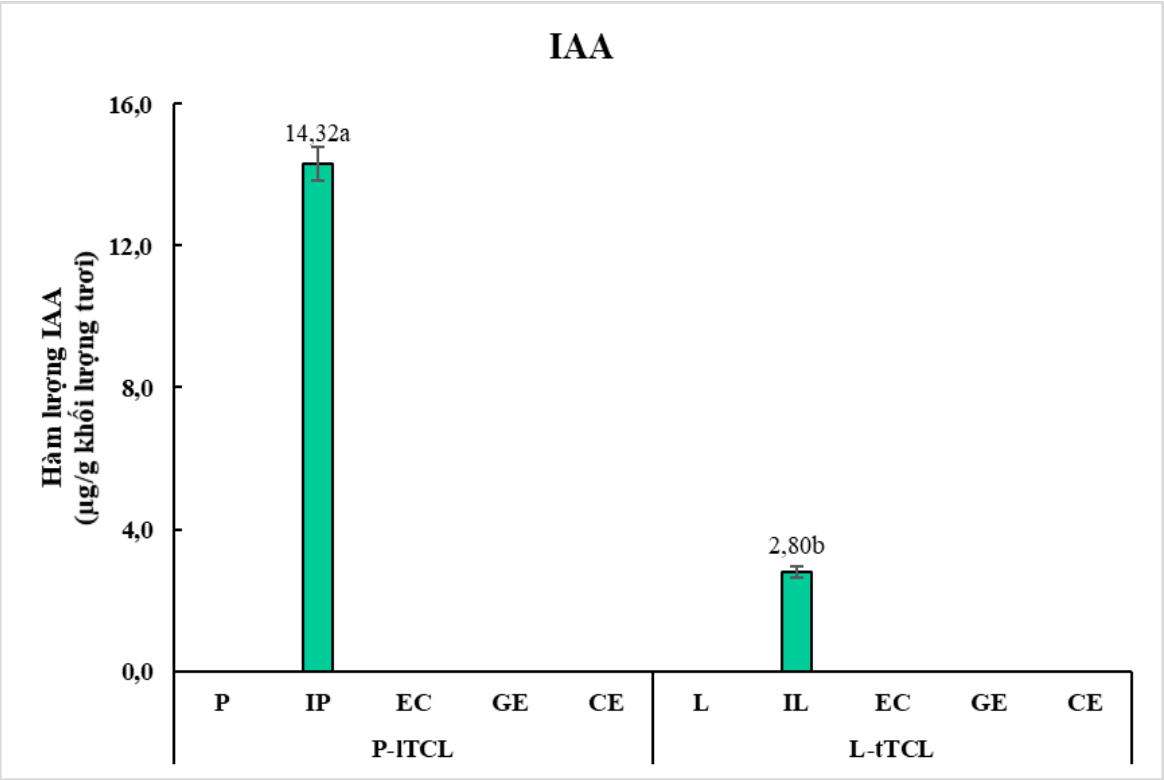
Sự phát sinh phôi soma chịu sự tác động của cả các nhóm chất kích thích sinh trưởng (auxin, cytokinin và gibberellin), và nhóm chất ức chế sinh trưởng (ABA, SA). Bất kỳ sự thay đổi về hàm lượng của các chất kích thích hay ức chế sinh trưởng đều tác động đến sự cảm ứng, phát sinh và phát triển phôi soma. Do đó, nghiên cứu về sự thay đổi hàm lượng hormone nội sinh và tỷ lệ giữa các nhóm hormone nội sinh trong các mô thực vật là cần thiết nhằm tạo điều kiện tối ưu hóa cho sự phát sinh phôi soma.

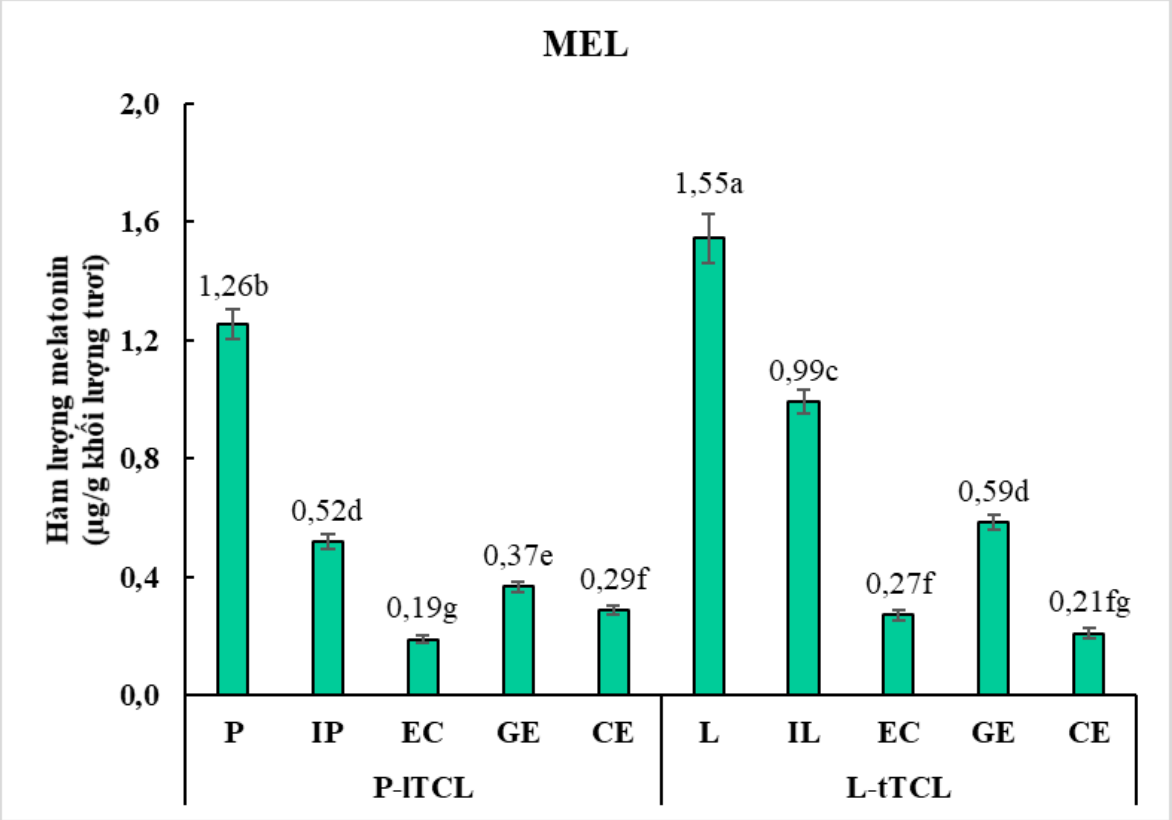
Sự khác biệt rõ rệt về hàm lượng hormone nội sinh đã được quan sát thấy ở các giai đoạn khác nhau của quá trình phát sinh phôi soma sơ cấp sâm Lang Bian. Nồng độ CK nội sinh (ZEA, 2iP, kinetin, mT), IAA và GA_3 cao nhất trong giai đoạn cảm ứng phát sinh phôi soma sơ cấp ở cả hai loại mẫu cấy L-tTCL và P-lTCL (Hình 3.9, Hình 3.10 và Hình 3.11). Trong khi đó, các hormone nội sinh còn lại (MEL, ABA và SA) không biểu hiện xu hướng biến động rõ ràng (Hình 3.9, Hình 3.11 và Hình 3.12). Ngoài ra, IAA chỉ được phát hiện ở giai đoạn cảm ứng phát sinh phôi soma sơ cấp trong cả hai mẫu cấy (Hình 3.9). Những kết quả này cho thấy, sự biến động của các hormone nội sinh trong từng giai đoạn của quá trình phát sinh phôi soma. Đồng thời, sự hiện diện và hàm lượng của các hormone nội sinh này cũng khác nhau giữa mẫu L-tTCL và P-lTCL. Tuy nhiên, sự biến động hàm lượng hormone nội sinh trong từng giai đoạn của quá trình phát sinh phôi soma sơ cấp từ các mẫu L-tTCL và P-lTCL sâm Lang Bian nhìn chung tương tự nhau (ngoại trừ GA_3) (Hình 3.9, Hình 3.10, Hình 3.11 và Hình 3.12).

Quá trình phát sinh phôi soma bao gồm sự kết hợp của các tín hiệu nội sinh và tái lập trình gen. Việc sử dụng các auxin ngoại sinh, sử dụng đơn lẻ hay kết hợp với các chất điều hòa sinh trưởng thực vật khác cảm ứng sự biểu hiện của các gen khác nhau, gây ra sự thay đổi chương trình biểu hiện gen của các tế bào soma và điều chỉnh sự phát triển của các tế bào ở các giai đoạn khác nhau trong quá trình phát triển phôi soma [235]. Các gen này mã hóa cho protein hoạt động trong chu kỳ tế bào, sinh tổng hợp chất điều hòa sinh trưởng thực vật, chủ yếu là auxin, cũng như các protein liên quan đến con đường truyền tín hiệu.

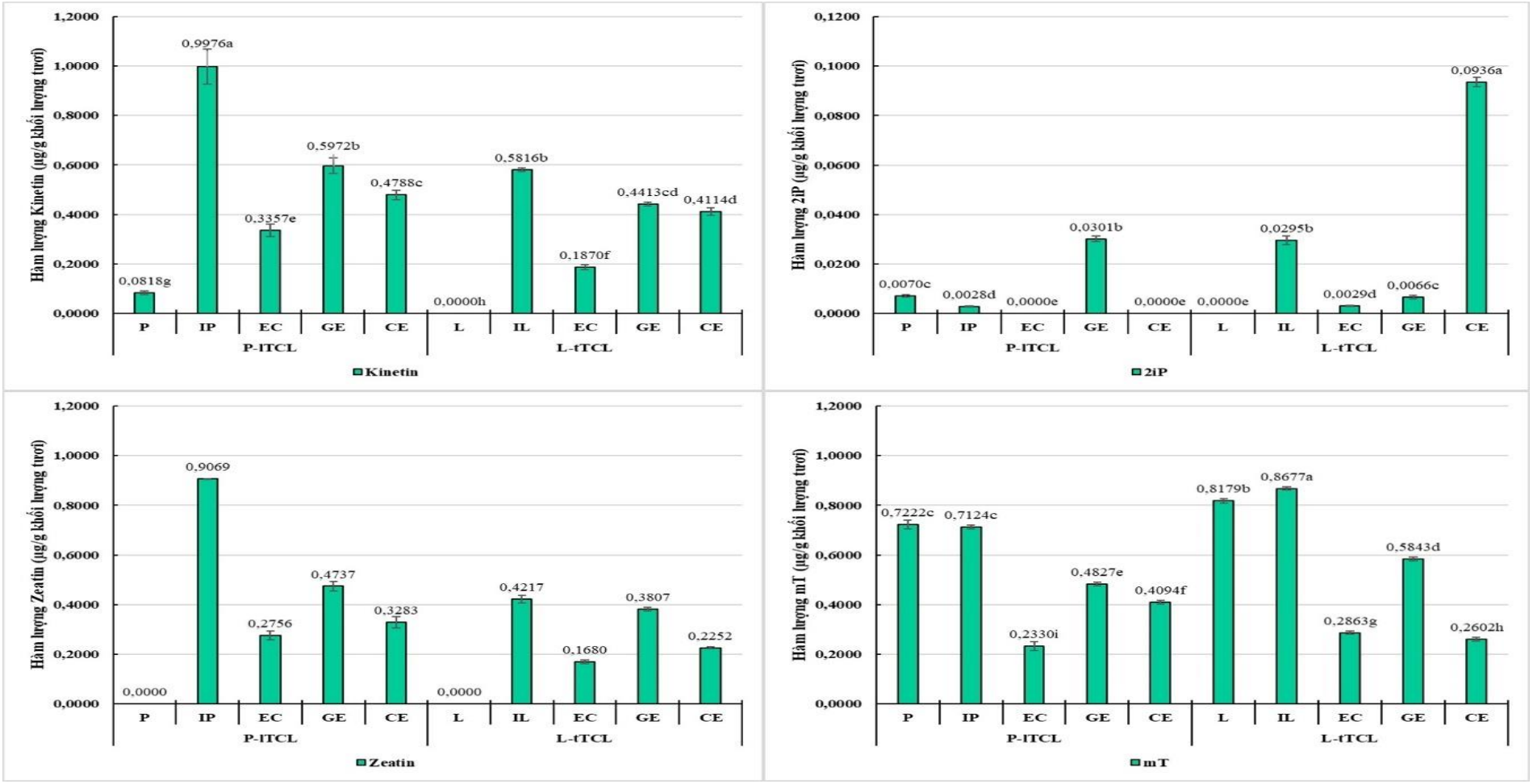
Vai trò của auxin và melatonin

Trong số các chất điều hòa sinh trưởng thực vật, auxin có vai trò quan trọng nhất cho sự phân chia và biệt hóa tế bào liên quan đến sự phát sinh và phát triển phôi soma [236].

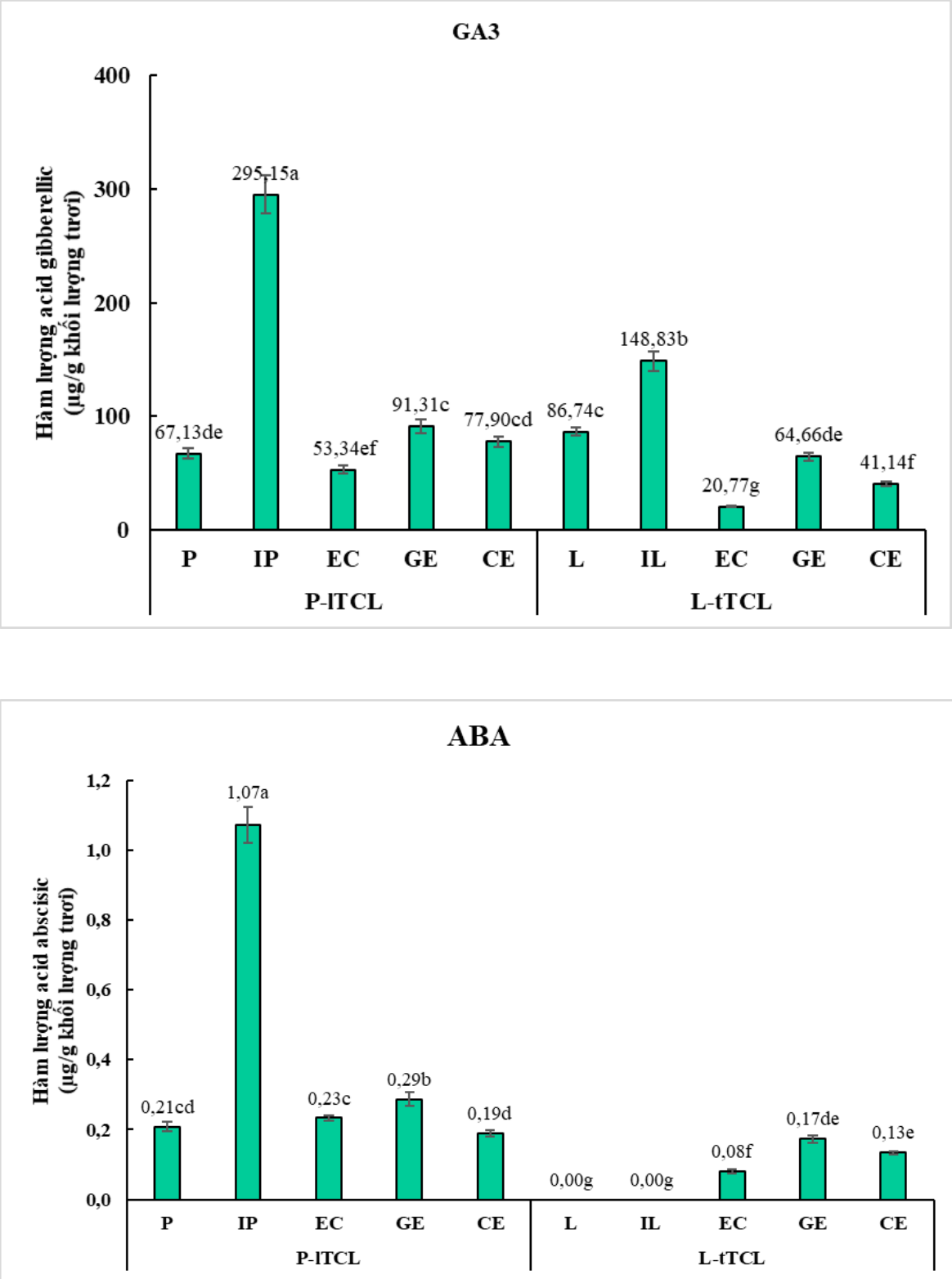




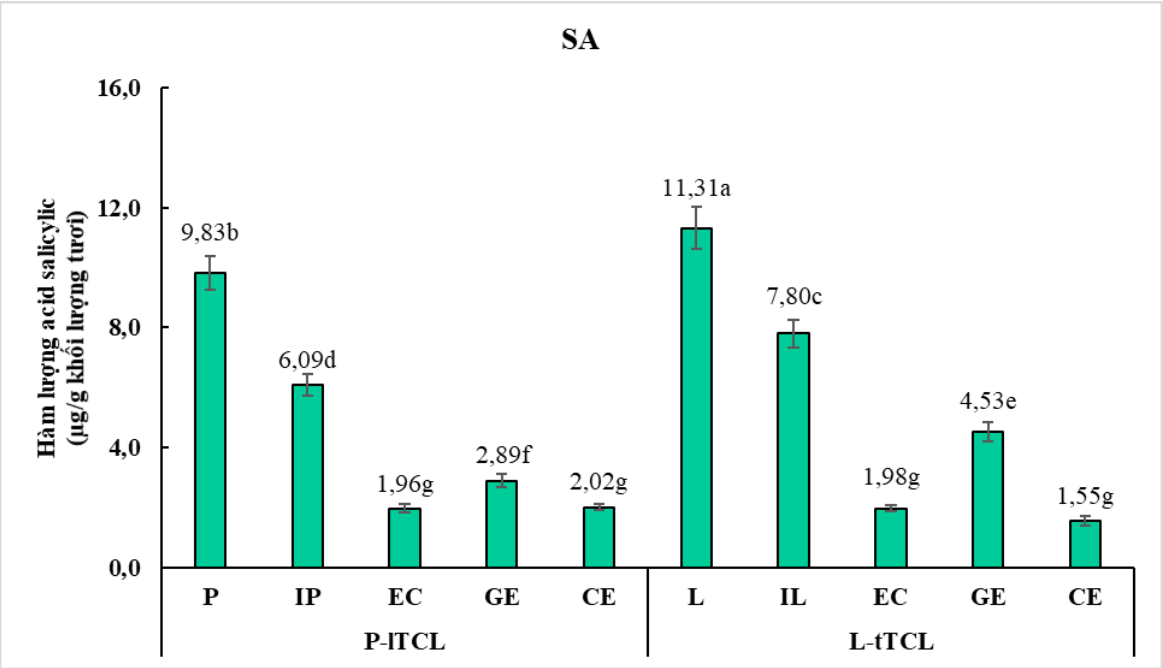
Hình 3.9. Sự biến động hàm lượng auxin (IAA) và MEL trong quá trình phát sinh phôi soma sơ cấp sâm Lang Bian. L – Mẫu lá; P – Mẫu cuống lá; IP – Mẫu cuống lá trong giai đoạn cảm ứng; IL – Mẫu lá trong giai đoạn cảm ứng; EC – Mô sẹo có khả năng phát sinh phôi soma; GE – phôi soma hình cầu; CE – phôi soma có lá mầm



Hình 3.10. Sự biến động hàm lượng cytokinin trong quá trình phát sinh phôi soma sơ cấp sâm Lang Bian. L – Mẫu lá; P – Mẫu cuống lá; IP – Mẫu cuống lá trong giai đoạn cảm ứng; IL – Mẫu lá trong giai đoạn cảm ứng; EC – Mô sẹo có khả năng phát sinh phôi soma; GE – phôi soma hình cầu; CE – phôi soma có lá mầm.



Hình 3.11. Sự biến động hàm lượng acid gibberellic và acid abscisic trong quá trình phát sinh phôi soma sơ cấp sâm Lang Bian. L – Mẫu lá; P – Mẫu cuống lá; IP – Mẫu cuống lá trong giai đoạn cảm ứng; IL – Mẫu lá trong giai đoạn cảm ứng; EC – Mô sẹo có khả năng phát sinh phôi soma; GE – phôi soma hình cầu; CE – phôi soma có lá mầm.



Hình 3.12. Sự biến động hàm lượng acid salycilic trong quá trình phát sinh phôi soma sơ cấp sâm Lang Bian. L – Mẫu lá; P – Mẫu cuống lá; IP – Mẫu cuống lá trong giai đoạn cảm ứng; IL – Mẫu lá trong giai đoạn cảm ứng; EC – Mô sẹo có khả năng phát sinh phôi soma; GE – phôi soma hình cầu; CE – phôi soma có lá mầm.

Trong giai đoạn cảm ứng phát sinh phôi có sự gia tăng hàm lượng IAA nội sinh thông qua sự tăng cường biểu hiện của các gen mã hóa cho enzyme tryptophan aminotransferase và enzyme flavin monooxygenase. Đây là hai enzyme tham gia vào quá trình sinh tổng hợp IAA. Sự tích lũy IAA có tương quan với việc kích hoạt chu trình phân chia trong các tế bào có khả năng phát sinh phôi. IAA có tác dụng kích thích sự tăng trưởng của tế bào theo hai cách: (1) kích thích quá trình acid hóa thành tế bào, dẫn đến tăng kích thước tế bào; và (2) cảm ứng sự phiên mã của các mRNA mã hóa các protein liên quan đến sự tăng trưởng của tế bào [237].

Ngoài ra, sự phân bố không đều của auxin phải được thiết lập để bắt đầu quá trình phát sinh phôi. Trong giai đoạn đầu của quá trình phát sinh phôi, auxin di chuyển hướng ngọn nhờ protein PIN7 (protein vận chuyển auxin). Từ đó, góp phần xác định vị trí của mô phân sinh ngọn chồi và các tế bào hình thành tiền mạch. Sự vận chuyển auxin theo chiều hướng này vẫn tiếp tục cho đến giai đoạn 32 tế bào của quá trình phát sinh phôi. Đây là điều kiện cần thiết cho hình thành của mô phân sinh đỉnh chồi. Ngoài ra, auxin được vận chuyển và phân bố ở hai bên phôi quyết định vị trí của lá mầm sau này. Đồng thời, protein PIN1 điều chỉnh sự di chuyển của auxin hướng gốc cần thiết cho sự hình thành mô phân sinh đỉnh rễ. Một số nghiên cứu báo cáo rằng, xử lý các chất ngăn cản sự di chuyển hữu cực của auxin, chẳng hạn như TIBA sẽ ức

chế khả năng phát sinh phôi của tế bào. Như vậy, hàm lượng auxin tăng mạnh ở giai đoạn cảm ứng giúp xác định vị trí cũng như phát triển sau đó của các cơ quan phôi. Sau đó, hàm lượng auxin giảm mạnh ở những giai đoạn tiếp theo của quá trình phát triển phôi. Hàm lượng IAA giảm xuống có thể là do chúng đã bị thoái biến trong tế bào thông qua việc hình thành các dạng liên kết (chủ yếu với amino acid và đường) hoặc bị phân hủy. Một số IAA ở dạng liên kết có thể được xem là dạng dự trữ có thể bị thủy phân để tạo thành IAA tự do đáp ứng cho nhu cầu trao đổi chất của tế bào. Ayil-Gutiérrez và cộng sự (2013) đề xuất rằng sự cân bằng giữa IAA tự do và dạng liên kết là cần thiết cho sự cho sự phát sinh phôi *Cofea canephora* [238]. Kết quả nghiên cứu ở sâm Lang Bian cũng cho thấy, chỉ phát hiện IAA với hàm lượng đạt được giá trị cao nhất trong giai đoạn cảm ứng phát sinh phôi soma sơ cấp ở cả hai loại mẫu cấy L-tTCL và P-lTCL cần thiết cho sự phát sinh phôi sâm Lang Bian.

Melatonin (MEL) tác động đến các chức năng sinh lý khác nhau của thực vật bao gồm hấp thụ ion, vận chuyển chất dinh dưỡng, trao đổi khí, đóng mở khí khổng và chống oxy hóa. Bên cạnh đó, MEL kích hoạt hệ thống chống oxy hóa ở thực vật, bao gồm chu trình ascorbate-glutathione, superoxide dismutase (SOD) và catalase (CAT) dẫn đến loại bỏ các gốc oxy hoạt động (ROS), tăng cường phân tử tín hiệu chống stress [239]. Ngoài ra, sự tương tác giữa MEL-ROS giúp duy trì các mô thực vật tồn tại trong điều kiện stress và điều hòa các mạng lưới truyền tín hiệu nhanh và phức tạp trong thực vật. Zhao và cộng sự (2011) báo cáo rằng MEL tăng khả năng phục hồi của mô sẹo sau thời gian bảo quản lạnh, đồng thời, hoạt tính của các enzyme chống oxy hóa catalase và peroxidase gia tăng trong các khối mô sẹo được xử lý với 0,1 μM MEL [240].

Ngoài ra, MEL kích thích sự hình thành mô sẹo *in vitro* thông qua tác động đến sự phân chia tế bào; kích thích sự phát sinh phôi khi được bổ sung vào môi trường nuôi cấy thay thế IAA [241]. Trong nghiên cứu nuôi cấy phôi soma *Coffea canephora,* MEL được bổ sung vào trong môi trường nuôi cấy có tác dụng cải thiện tỷ lệ mẫu cảm ứng tạo mô sẹo và phát sinh phôi soma [242]. Kết quả tương tự cũng báo cáo trong nuôi cấy phôi *Medicago sativa L.* [243]. Đối với sâm Lang Bian, hàm lượng MEL nội sinh bên trong mẫu L-tTCL và P-lTCL ban đầu cao kích thích sự phân chia tế bào và phát sinh phôi soma.

Vai trò của cytokinin và meta – topolin

Trong sự phát sinh phôi soma, cytokinin có vai trò thúc đẩy sự phiên mã, kích thích tổng hợp các protein và enzyme liên quan đến sự phân chia tế bào thông qua việc kích hoạt các protein kinase trong con đường truyền tín hiệu. Sự hiện diện của

cytokinin cùng với một số lượng lớn ti thể sẵn sàng cho sự phân chia tế bào dẫn đến sự hình thành phôi hình cầu. Đồng thời, cytokinin cần thiết cho sự hoạt động của mô phân sinh ngọn. Do đó, trong giai đoạn hình thành mô phân sinh ngọn có sự gia tăng hàm lượng cytokinin. Trong nghiên cứu Arabidopsis, mô phân sinh chồi không thể phát triển bình thường nếu không có sự chuyển đổi cytokinin từ liên kết sang dạng tự do. Nguyên nhân có thể là do hàm lượng cytokinin không đủ cung cấp cho hoạt động của các tế bào vùng mô phân sinh ngọn, dẫn đến giảm sút sự tổng hợp auxin, hàm lượng auxin không đủ cho sự di chuyển hữu cực đến các vị trí hình thành cơ quan phôi. Từ đó, sự trưởng thành của phôi không được tiếp tục do không có sự phát triển của mô phân sinh chồi và rễ. Như vậy, cytokinin cần thiết cho sự phát triển phôi bình thường. Kết quả phân tích hàm lương cytokinin (bao gồm kinetin, 2iP và zeatin) trên đối tượng sâm Lang Bian cũng cho thấy, tất cả các giai đoạn cảm ứng, tạo mô sẹo có khả năng phát sinh phôi, phôi hình cầu và phôi có lá mầm ở cả hai mẫu L-tTCL và P-lTCL đều có sự hiện diện của cytokinin. Mặc dù hàm lượng kinetin, 2iP và zeatin có sự biến động giữa các giai đoạn khác nhau của quá trình phát sinh phôi, tuy nhiên, chúng lại cần thiết cho sự phân chia tế bào cũng như sự phát triển bình thường của phôi soma.

Meta – topolin (mT) là dẫn xuất của BA tự nhiên được phát hiện gần đây. mT đã được chứng minh là có hiệu quả và được sử dụng trong nghiên cứu quá trình phát sinh phôi của các đối tượng thực vật khác nhau. Saharan và cộng sự (2011) đã báo cáo rằng mô sẹo *Balanites aegyptiaca* có nguồn gốc từ rễ phát sinh phôi khi được nuôi trong môi trường MS bán rắn bổ sung 0,5 mg/L mT và 2,5 mg/L 2,4-D. Phôi soma thu được trong môi trường lỏng bổ sung mT có tần suất tái sinh cao (78%) với chồi và rễ phát triển tốt [244]. Tương tự, trong nuôi cấy phôi lúa mạch, Esteves và cộng sự (2014) báo cáo rằng việc thay thế BA bằng mT trong môi trường tái sinh đã cho tỷ lệ nảy mầm của phôi tạo thành cây con tăng gấp 2,9 lần [78]. Saeed và Shahzad (2015) sử dụng mT như một chất bổ sung thuộc nhóm cytokinin trong các giai đoạn khác nhau của quá trình phát sinh phôi soma *Albizia lebbeck* bao gồm cảm ứng, phát sinh và phát triển và nảy mầm của phôi soma. Tỷ lệ phôi và số phôi trưởng thành cao hơn khi mẫu được nuôi cấy trong môi trường bổ sung 1,2 mg/L mT kết hợp với 2,5 NAA và 11 mg/L glutamine [245]. Ngoài ra, trong giai đoạn nảy mầm, Solórzano-Cascaante và cộng sự (2018) báo cáo rằng mT có tác động tích cực đến sự nảy mầm của phôi soma đu đủ Carica [246]. Kết quả phân tích hàm lượng mT trong nuôi cấy phôi soma sâm Lang Bian cũng cho thấy, đối với cả hai mẫu cấy L-tTCL và P-lTCL, mT được phát hiện với hàm lượng lớn ở giai đoạn ban đầu cũng như giai đoạn cảm ứng cần thiết cho sự phát sinh phôi soma. Sau đó, hàm lượng mT giảm ở giai đoạn

tạo mô sẹo có khả năng phát sinh phôi trước khi tăng trở lại ở giai đoạn phôi soma hình cầu với vai trò thúc đẩy sự trưởng thành của phôi.

Vai trò của gibberellin

Trong quá trình tạo phôi hợp tử, GA nội sinh được yêu cầu chủ yếu ở giai đoạn đầu của quá trình phát triển phôi và có thể liên quan đến dây treo. Dây treo của phôi ở giai đoạn hình cầu được phát hiện có chứa một số hormone thực vật như GA, auxin, cytokinin và acid abscisic. Sự tổng hợp GA trong dây treo có vai trò quan trọng cho sự phát triển phôi. Hơn nữa, trong dây treo có các mRNA mã hóa GA_3-oxidase, enzyme sinh tổng hợp gibberellin có hoạt tính sinh học quan trọng. GA_3 và GA_3-oxidase mRNA cũng được tích lũy trong dây treo của các cây họ đậu khác, ví dụ: *Glycine max* và *Cytisus laburnum* [83]

Ngoài ra, trong sự phát sinh phôi soma, GA có tác động đến hướng đặt của các vi ống ở vị trí ngoại vi tế bào, dẫn đến kiểm soát hướng đặt các vi sợi cellulose được tổng hợp trên vách tế bào. GA được bổ sung vào trong môi trường nuôi cấy *M. sativa* cv. Rangelander ở hai giai đoạn khác nhau: trong giai đoạn cảm ứng và biệt hóa đã làm giảm sự tăng sinh mô sẹo và tăng số lượng phôi soma; khả năng phát sinh phôi tăng mạnh khi GA có mặt trong môi trường biệt hóa [247]. Ngoài ra, hàm lượng GA nội sinh (GA_1, GA_3, GA_{20}) cao hơn đáng kể được tìm thấy trong mô sẹo có khả năng phát sinh phôi của ngô, so với hàm lượng GA nội sinh ở mô sẹo không có khả năng phát sinh phôi [248]. Tương tự, trong sự phát sinh phôi soma gián tiếp ở *M. truncatula*, các mẫu lá cảm ứng tạo mô sẹo cảm ứng phát sinh phôi soma chủ yếu đi kèm với quá trình sinh tổng hợp GA_3. Ngoài ra, chất ức chế sinh tổng hợp GA (paclobutrazol) đã ức chế mạnh mẽ sự tăng trưởng của mô sẹo và quá trình phát sinh phôi sau đó [83]. Những kết quả nghiên cứu này chỉ ra rằng GA nội sinh cần thiết cho cả quá trình cảm ứng và quá trình biệt hóa phôi soma. Kết quả phân tích hàm lượng GA_3 trên sâm Lang Bian cũng cho thấy, hàm lượng GA_3 tăng mạnh trong giai đoạn cảm ứng cần thiết cho sự cảm ứng và phát sinh phôi soma.

Vai trò của acid abscisic

Trong toàn bộ quá trình phát sinh phôi soma, ABA được tổng hợp trong tất cả các mô thực vật như cuống lá, lá, mô sẹo, phôi ở các giai đoạn phát triển khác nhau nhưng hàm lượng ABA tương ứng ở các giai đoạn là khác nhau. Sự khác biệt về hàm lượng ABA giữa các mô thực vật cũng như các giai đoạn phát sinh phôi có thể là do ABA được tổng hợp và tồn tại ở hai dạng tự do hoặc liên kết. Một số con đường trao đổi chất mà qua đó ABA có thể được loại bỏ hoặc phân hủy trong mô thực vật như

một biện pháp điều chỉnh hàm lượng ABA. ABA có thể được chuyển hóa bằng quá trình oxy hóa, khử hoặc tạo ra dạng liên kết không có hoạt tính [phổ biến nhất là glucosyl ester (ABA-GE)] được tích lũy trong không bào hoặc apoplast [85].

ABA nội sinh có ý nghĩa quan trọng đối với sự khởi đầu của quá trình phôi ở một số thực vật. Nakagawa và cộng sự (2001) đã báo cáo hàm lượng ABA cao hơn ở các dòng mô sẹo có khả năng sinh phôi ở dưa (*Cucumis melo*) [92]. Thi và Pleschka (2005) đã báo cáo về mối quan hệ tích cực giữa hàm lượng ABA nội sinh trong mẫu cấy cuống lá và quá trình tạo phôi soma của một số loài *Daucus* [249]. Thêm vào đó, sự phát sinh và phát triển phôi soma Arabidopsis thaliana bị ức chế khi bổ sung Fluridone (FL), một chất ức chế sinh tổng hợp ABA, vào trong môi trường nuôi cấy phát sinh phôi soma. Hợp chất này tác động tới phytoene desaturase, tham gia vào quá trình sinh tổng hợp carotenoid – tiền chất để sinh tổng hợp ABA [250]. Ngoài ra, sự tổng hợp và tích lũy ABA là một đặc điểm quan trọng trong việc cải thiện sự phát triển phôi soma của thực vật. ABA được gia tăng tổng hợp trong giai đoạn tích lũy dinh dưỡng dự trữ và tham gia vào quá trình biểu hiện gen liên quan đến tổng hợp các protein dự trữ và protein LEA. Đồng thời, ABA giúp hạn chế sự phá vỡ biểu bì thông qua việc cản phôi tăng trưởng để tiếp tục phát triển bình thường. Ở cây lá kim, ABA thường được bổ sung trong môi trường nuôi cấy để tăng cường sự trưởng thành của phôi soma [251].

Tuy nhiên, ABA lại có tác động ức chế sự phát triển tiếp tục của phôi soma; số lượng phôi hình cầu và hình thủy lôi được tạo ra nhiều hơn so với phôi có lá mầm. Phôi soma chậm phát triển là do ABA ức chế hoạt động ACC oxidase (ACO), từ đó giảm tổng hợp và hoạt động ethylene, kiểm soát các giai đoạn phát sinh phôi soma [252]. Đồng thời, ABA giúp các phôi hình cầu có sự biểu bì hóa rõ hơn và nhanh chóng đạt đến giai đoạn thủy lôi. Tuy nhiên, nếu tiếp tục duy trì ABA ở hàm lượng cao, phôi sẽ không tiếp tục phát triển và nảy mầm thành cây hoàn chỉnh. Trong nghiên cứu nuôi cấy phôi soma Medicago spp cũng cho thấy, hàm lượng ABA tương đối cao trong các mẫu cuống lá ban đầu, sau đó, giảm mạnh trong giai đoạn cảm ứng mô sẹo, nhưng lại tăng đáng kể ở các phôi đang biệt hóa, tiếp theo đó, hàm lượng này lại giảm ở giai đoạn phôi có lá mầm [253]. Kết quả tương tự cũng được ghi nhận khi cấy chuyển mô sẹo *Lycium barbarum* sang môi trường phát sinh phôi, hàm lượng ABA nội sinh tăng lên đáng kể, theo đó hàm lượng cao nhất trùng với giai đoạn tạo tế bào có khả năng phát sinh phôi [91]. Đối với sâm Lang Bian chúng tôi cũng nhận thấy, ABA được phát hiện trong mẫu cấy P-tTCL ban đầu, sau đó, tiếp tục gia tăng mạnh ở giai đoạn cảm ứng. Tuy nhiên, hàm lượng ABA lại giảm ở giai đoạn tạo mô sẹo có

khả năng phát sinh phôi trước khi tăng trở lại ở giai đoạn phôi hình cầu và giảm ở giai đoạn phôi có lá mầm. Kết quả tương tự cũng được ghi nhận đối với mẫu cấy L-tTCL, tuy nhiên, ở giai đoạn đầu không ghi nhận được sự hiện diện của ABA, hàm lượng ABA lại gia tăng ở giai đoạn tạo mô sẹo có khả năng phát sinh phôi và đạt giá trị cao nhất ở giai đoạn phôi hình cầu trước khi giảm ở giai đoạn phôi có lá mầm. Từ các kết quả nghiên cứu cho thấy rằng, ABA có liên quan đến cảm ứng phát sinh phôi soma, đồng thời, tăng cường sự phát triển phôi soma sâm Lang Bian.

Vai trò của acid salicylic

Đối với sự phát sinh phôi soma, SA đóng vai trò là một yếu tố tín hiệu liên quan đến điều hòa hormone và đề kháng của thực vật. Đồng thời, nhiều nghiên cứu đã chứng minh, SA thông qua việc ức chế sinh tổng hợp ethylene, có thể thúc đẩy biểu hiện của các protein liên quan đến sự phát sinh phôi soma [254].

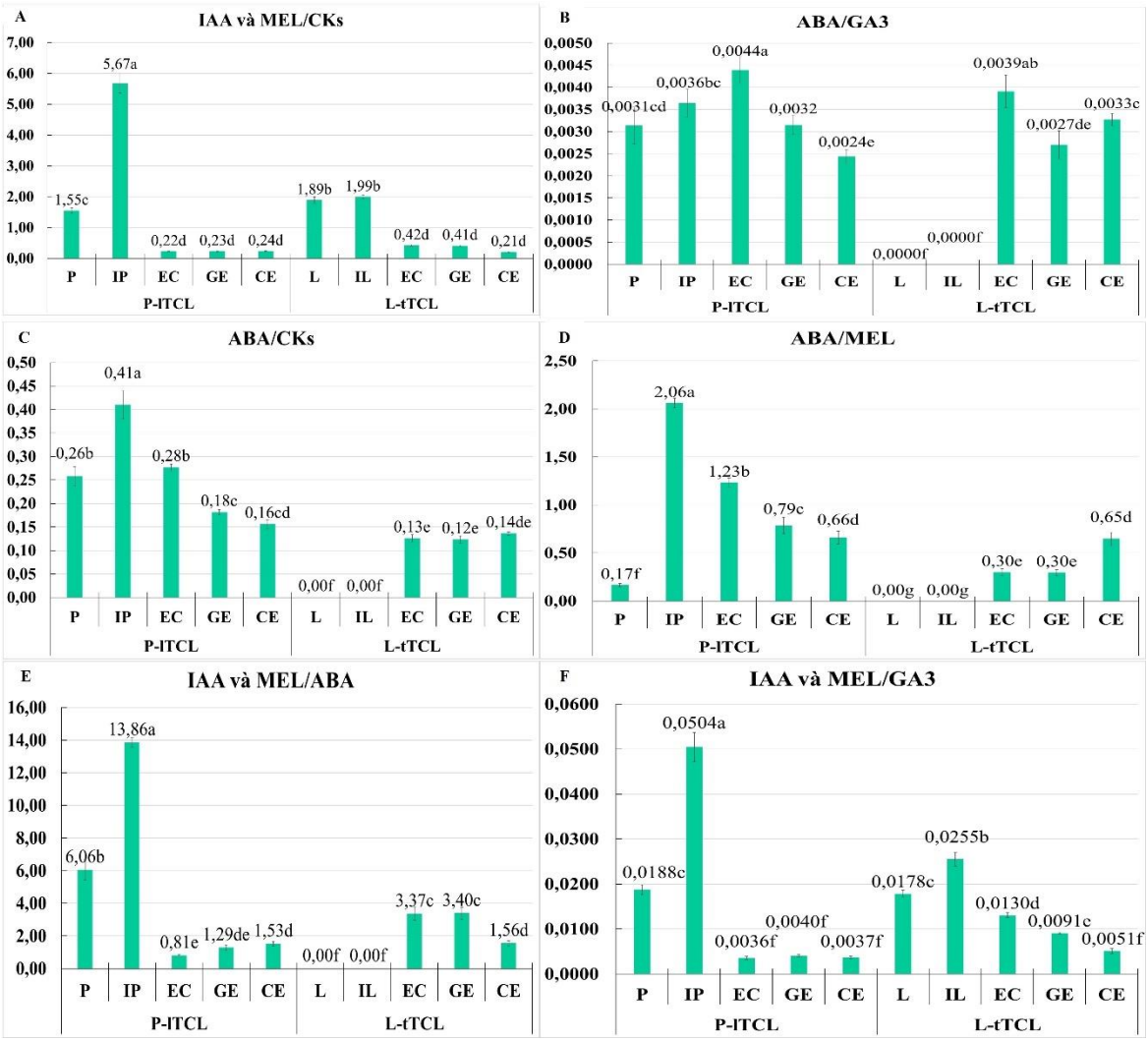
Ngoài ra, SA điều chỉnh quá trình sinh tổng hợp và vận chuyển IAA, do đó tác động đến sự phát sinh hình thái của mẫu cấy. Bên cạnh đó, một số nghiên cứu cho thấy rằng SA gây ra sự gia tăng nồng độ hydrogen peroxide (H_2O_2) trong mô thực vật, từ đó thúc đẩy quá trình phát sinh phôi soma. SA làm tăng nồng độ H_2O_2 nội sinh bằng cách tác động đến các enzyme chuyển hóa H_2O_2 để thay đổi trạng thái oxy hóa khử của tế bào và tạo điều kiện thuận lợi cho việc tạo ra SA* để bắt đầu quá trình peroxide hóa lipid, do đó kích hoạt sự biểu hiện của các protein chitinase và glucanase điều hóa quá trình phát sinh phôi soma [255, 256].

Đã có một số nghiên cứu về tác dụng của SA lên sự phát sinh phôi soma được thực hiện. SA ở nồng độ rất thấp ($1{,}38 \times 10^{-6}$ mg/L) đã cho hiệu quả trong việc hình thành phôi soma từ mô sẹo của *Coffea arabica* [257]. Tương tự, trong nuôi cấy *Astragalus adsurgens*, SA ở nồng độ thấp hơn 27,6 mg/L phù hợp để cảm ứng sự hình thành phôi soma [258]. Tuy nhiên, theo Hao và cộng sự (2006), nồng độ SA rất cao (70 mg/L) lại có tác dụng cải thiện sự hình thành phôi soma từ các phần gốc lá non của yến mạch (*Avena nuda*) [259]. Kết quả phân tích hàm lượng SA ở mẫu sâm Lang Bian cũng cho thấy, hàm lượng SA ở các mẫu cấy L-tTCL và P-lTCL ban đầu cũng như ở giai đoạn cảm ứng cao, đây cũng là một yếu tố góp phần cảm ứng sự phát sinh phôi soma.

Tùy thuộc vào loại mẫu cấy, tỷ lệ hormone nội sinh rất khác nhau trong quá trình phát sinh phôi soma sơ cấp (Hình 3.13). Tỷ lệ IAA và MEL/CK, ở cả hai loại mẫu cấy, đạt cao nhất ở giai đoạn cảm ứng, sau đó giảm mạnh ở giai đoạn hình thành mô sẹo có khả năng phát sinh phôi soma sơ cấp và duy trì ổn định (tăng/giảm nhẹ) ở các giai

đoạn phát sinh phôi soma sơ cấp còn lại (Hình 3.13 A). Trong khi đó, tỷ lệ ABA/GA_3 cao nhất ở giai đoạn hình thành mô sẹo có khả năng phát sinh phôi soma và giảm ở giai đoạn phôi soma hình cầu (Hình 3.13 B). Tuy nhiên, ở giai đoạn phôi soma có lá mầm, tỷ lệ này tiếp tục giảm đối với mẫu P-lTCL nhưng tăng lên đối với mẫu L-tTCL. Ngoài ra, trong giai đoạn cảm ứng, tỷ lệ ABA/GA_3 không được quan sát thấy trong mẫu L-tTCL. Tỷ lệ ABA/CKs, ABA/MEL, IAA và MEL/ABA và IAA và MEL/GA_3 tăng dần từ thời điểm nuôi cấy đến giai đoạn cảm ứng phát sinh phôi soma sơ cấp và giảm dần ở các giai đoạn tiếp theo đối với mẫu P-lTCL. Trong khi đó, tỷ lệ ABA/CKs và ABA/MEL tăng trong giai đoạn hình thành mô sẹo có khả năng phát sinh phôi soma sơ cấp và ổn định hoặc tăng nhẹ (Hình 3.13 C, D), và tỷ lệ IAA và MEL/ABA và IAA và MEL/GA_3 giảm trong các giai đoạn còn lại của quá trình phát sinh phôi soma sơ cấp đối với mẫu L-tTCL (Hình 3.13 E, F).

Sự phát sinh phôi soma vừa là một phương thức quan trọng để tái sinh thực vật vừa là một trong những lĩnh vực thú vị nghiên cứu về hình thái, sinh lý và nguyên tắc di truyền của quá trình cảm ứng và phát triển phôi soma. Để kiểm soát quá trình này, điều quan trọng là phải hiểu cơ chế sinh lý của quá trình cảm ứng phát sinh phôi soma. Bằng cách tạo điều kiện thuận lợi cho sự truyền tín hiệu giúp lập trình lại các biểu hiện gen, các hormone nội sinh được sử dụng làm phân tử tín hiệu cho quá trình phát sinh phôi soma [260]. Tuy nhiên, chưa có nghiên cứu nào về sự biến động của các hormone liên quan đến quá trình phát sinh phôi soma sơ cấp sâm Lang Bian được công bố. Nhiều nghiên cứu cho rằng polyamine ngoại sinh ảnh hưởng đến sự phát sinh phôi soma bằng cách ảnh hưởng đến hàm lượng phytohormone nội sinh. Việc bổ sung polyamine ngoại sinh trong nuôi cấy phôi soma *Araucaria angustifolia* làm tăng hàm lượng IAA và ABA nội sinh, từ đó cho thấy mối quan hệ trực tiếp giữa polyamine và sự tích lũy ABA, cải thiện chất lượng của phôi soma, đặc biệt là trong giai đoạn trưởng thành [101]. Kết quả tương tự cũng được Wang và cộng sự (2020) báo cáo trong nghiên cứu về ảnh hưởng của spermidine ngoại sinh đối với sự phát sinh phôi soma, nồng độ của bốn loại hormone nội sinh (IAA, ABA, GA và ZEA) đều tăng khi các mẫu được nuôi cấy trong môi trường bổ sung spermidine ngoại sinh. Đặc biệt, hàm lượng IAA trong mô sẹo cao nhất và giảm dần theo quá trình phát sinh và trưởng thành phôi soma. Tương tự IAA, hàm lượng GA có xu hướng tăng nhanh và sau đó giảm dần trong quá trình phát sinh phôi soma khi mẫu được nuôi cấy trong môi trường có bổ sung spermidine ngoại sinh [87].



Hình 3.13. Tỷ lệ hormone nội sinh của mẫu ở các giai đoạn khác nhau của quá trình phát sinh phôi soma sơ cấp sâm Lang Bian

Ngược lại, ABA và ZEA có xu hướng tăng ở giai đoạn sau của quá trình phát sinh phôi soma. Do đó, giai đoạn đầu của quá trình phát sinh phôi soma yêu cầu nồng độ IAA và GA cao, ngược lại, ở các giai đoạn sau lại cần gia tăng nồng độ ABA và ZEA [87]. Trong nghiên cứu quá trình phát sinh phôi ở Medicago spp., sự tổng hợp IAA diễn ra mạnh mẽ với hàm lượng IAA ngày càng tăng từ giai đoạn đầu đến cảm ứng phát sinh phôi. Sau đó, hàm lượng IAA giảm dần [253]. Như vậy, có sự tương quan giữa các giai đoạn phát sinh phôi và sự thay đổi hàm lượng các hormone nội sinh. Ở giai đoạn hoạt hóa tế bào, có sự gia tăng hàm lượng IAA và cytokinin trong tế bào. Khi phôi hình thành và trưởng thành, hàm lượng IAA và cytokinin đều giảm (nhằm giảm tỉ lệ auxin/cytokinin) [261]. Hơn nữa, Khai và cộng sự (2021) cũng cho thấy auxin chỉ hiện diện ở giai đoạn cảm ứng quá trình phát sinh phôi soma (ngày nuôi thứ 30), sau đó giảm dần, tạo điều kiện thuận lợi cho phôi soma phát triển; sau 60 - 120 ngày nuôi cấy, các tác giả không ghi nhận được hàm lượng auxin trong mẫu

phôi soma *Begonia* [79]. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng tương tự như kết quả của nghiên cứu trên; sau 12 tuần nuôi cấy, hầu hết các phôi soma đều ở giai đoạn thành thục và ở giai đoạn này không phát hiện được sự hiện diện của auxin nội sinh, cụ thể là IAA. Tỷ lệ ABA/GA_3 liên quan đến khả năng sinh trưởng hay ngủ nghỉ của thực vật, cũng như giai đoạn phát triển của phôi soma [262]. Ở các giai đoạn khác nhau của quá trình phát sinh phôi soma *Ormosia henryi* Prain, tỷ lệ IAA/GAs, IAA/ABA, AUX/ABA và AUX/GAs cao, và tỷ lệ GAs/CKs và ABA/CKs thấp thuận lợi cho việc cảm ứng tạo mô sẹo có khả năng phát sinh phôi soma; tuy nhiên, tỷ lệ IAA/CK và AUX/CK thấp hơn ở phôi soma dạng lá mầm, điều này thuận lợi cho sự trưởng thành và biệt hóa phôi soma. Kết quả này phù hợp với lý thuyết, cần có nồng độ AUX thấp và CK cao là cần thiết cho sự trưởng thành và biệt hóa phôi soma [263].

Như vậy, việc nghiên cứu vai trò của các acid amin và spermidine đối với quá trình phát sinh phôi soma sơ cấp của sâm Lang Bian có ý nghĩa rất lớn trong việc tăng hiệu quả sự phát sinh phôi soma sơ cấp và nâng cao chất lượng phôi soma, từ đó tạo nguồn vật liệu cho sự tăng sinh phôi soma thứ cấp ở giai đoạn tiếp theo trong quá trình vi nhân giống. Ngoài ra, ảnh hưởng của các acid amin và polyamine bổ sung vào môi trường nuôi cấy đến một số chỉ tiêu sinh lý - sinh hóa như các enzyme chống oxy hóa và sự biến động của các hormone nội sinh trong quá trình phát sinh phôi soma sơ cấp sâm Lang Bian cũng được ghi nhận và làm rõ trong nghiên cứu này.

3.3. Nội dung 3: Sự phát sinh phôi soma thứ cấp

3.3.1. Ảnh hưởng của môi trường khoáng đến sự phát sinh phôi soma thứ cấp

Trong nuôi cấy các loài thuộc chi *Panax,* nuôi cấy phôi soma thứ cấp có nhiều ưu điểm hơn so với phôi soma sơ cấp, đặc biệt là tốc độ gia tăng sinh khối và mức độ đồng nhất cao [39]. Từ đó, hứa hẹn tạo ra một số lượng lớn cây con có chất lượng cao trong một thời gian ngắn, giải quyết được nhu cầu nguồn giống cũng như giảm thiểu áp lực khai thác giống trong tự nhiên. Phôi soma sơ cấp được thu nhận từ các nghiên cứu trước sẽ được tiếp tục sử dụng cho quá trình phát sinh và tăng sinh phôi soma thứ cấp nhằm mục tiêu rút ngắn thời gian nhân giống và nâng cao hiệu quả của quá trình vi nhân giống sâm Lang Bian theo con đường phát sinh phôi soma.

Sự hình thành phôi soma thứ cấp, quá trình hình thành phôi soma mới trên bề mặt của phôi soma sơ cấp, giúp nâng cao hiệu quả của quá trình vi nhân giống. Nghiên cứu phát sinh phôi soma thứ cấp đã được ghi nhận ở một số loài thực vật bao gồm *P. quinquefolius* [65], *P. japonicas* [9], *Eleutherococcus senticosus* [264], *P. ginseng* [12], *P. notoginseng* [13], *P. vietnamensis* [39], *Olea europaea* [265]. Trong nghiên

cứu này, kết quả ghi nhận cũng cho thấy sự phát sinh phôi soma thứ cấp từ phôi soma sơ cấp sâm Lang Bian nuôi cấy trên các môi trường khác nhau (SH, MS, ½ MS, WPM và B5) sau 12 tuần nuôi cấy (Bảng 3.10).

Tất cả các phôi soma sơ cấp nuôi cấy trong các môi trường khoáng khác nhau đều cảm ứng phát sinh phôi soma thứ cấp. Sau 8 tuần nuôi cấy, phôi soma thứ cấp được cảm ứng trên bề mặt phôi soma sơ cấp, có dạng hình cầu và phân bố ở vị trí đầu và thân phôi. Sau đó, các phôi soma thứ cấp tăng sinh tạo thành các cụm phôi soma với các giai đoạn phát triển khác nhau sau 12 tuần nuôi cấy (Hình 3.14). Số phôi soma thứ cấp (39,20 phôi/mẫu), khối lượng tươi (1005,34 mg) và khối lượng khô (77,90 mg) cao nhất được ghi nhận khi mẫu phôi soma sơ cấp nuôi cấy trên môi trường ½ MS sau 12 tuần nuôi cấy. Đồng thời, các phôi soma thứ cấp hình thành trong môi trường ½ MS chủ yếu ở dạng có lá mầm. Đây là dạng phôi soma phù hợp để tái sinh cây con hoàn chỉnh từ phôi soma khi chúng được cấy chuyển sang môi trường thích hợp.

Hàm lượng dinh dưỡng khoáng trong môi trường nuôi cấy thiếu hay dư thừa đều có tác động tiêu cực đến sự tăng trưởng tiếp theo của phôi soma [266]. Kết quả nghiên cứu cho thấy môi trường MS cho hiệu quả phát sinh phôi soma thứ cấp cao nhất so với các môi trường SH, WPM và B5 thể hiện các chỉ tiêu theo dõi bao gồm số lượng phôi soma thứ cấp, khối lượng tươi, khối lượng khô (Bảng 3.10). Ngoài ra, sự khác biệt về hàm lượng dinh dưỡng khoáng sẵn có trong môi trường phù hợp cho hoạt động trao đổi chất bên trong tế bào, dẫn đến sự tăng sinh phôi soma thứ cấp [267].

Mặt khác, hàm lượng khoáng trong môi trường MS giảm xuống 1/2 MS (hàm lượng khoáng đa lượng giảm đi một nửa) thì số phôi soma tạo thành tăng lên (từ 30,30 phôi tăng đến 39,20 phôi), khối lượng tươi cũng tăng lên gấp 2 lần (từ 499,15 mg tăng lên 1005,34 mg). Kết quả tương tự cũng được ghi nhận trong nuôi cấy phát sinh phôi soma *Anthurium andraeanum,* giảm hàm lượng NH_4NO_3 trong môi trường MS hoặc giảm hàm lượng khoáng đa lượng trong môi trường MS xuống 1/8 MS có tác dụng kích thích sự phát sinh phôi soma [268]. Như vậy, hiện tượng stress gây ra do thiếu dinh dưỡng trong môi trường có thể cũng là một trong những tác nhân kích thích sự cảm ứng phát sinh phôi soma thứ cấp hiệu quả hơn.

Bảng 3.10. Ảnh hưởng của môi trường khoáng đến sự phát sinh phôi soma thứ cấp sau 12 tuần nuôi cấy

Môi trường	Số lượng phôi soma thứ cấp	Khối lượng tươi (mg)	Khối lượng khô (mg)	Đặc điểm phôi soma thứ cấp
SH	17,70 ± 0,75^{d}	99,90 ± 4,90 ^{d}	18,95 ± 1,09 ^{c}	Phôi soma thứ cấp bao gồm các giai đoạn phát triển hình cầu, tim, thủy lôi và lá mầm. phôi soma thứ cấp chủ yếu ở giai đoạn hình cầu và thủy lôi
MS	30,30 ± 3,83^{b}	499,15 ± 25,87^{b}	54,62 ± 3,48^{b}	Phôi soma thứ cấp bao gồm các giai đoạn phát triển hình cầu, tim, thủy lôi và lá mầm mầm với bề mặt trơn nhẵn và tách biệt khỏi nhau. Các phôi soma chủ yếu ở dạng lá mầm
½ MS	39,20 ± 1,52^{a}	1005,34 ± 89,31^{a}	77,90 ± 9,82^{a}	Phôi soma thứ cấp bao gồm các giai đoạn phát triển hình cầu, tim, thủy lôi và lá mầm với bề mặt trơn nhẵn và tách biệt khỏi nhau. Các phôi soma chủ yếu ở dạng lá mầm
WPM	22,90 ± 2,26^{c}	425,75 ±31,53^{c}	51,04 ± 8,80^{b}	Phôi soma thứ cấp bao gồm các giai đoạn phát triển hình cầu, tim, thủy lôi và lá mầm. Phôi soma thứ cấp chủ yếu ở giai đoạn hình cầu và thủy lôi
B5	22,10 ± 1,78^{c}	101,25 ± 2,27^{d}	17,38 ± 1,29^{c}	Phôi soma thứ cấp bao gồm các giai đoạn phát triển hình cầu, tim, thủy lôi và lá mầm. Phôi soma thứ cấp chủ yếu ở giai đoạn hình cầu

Ghi chú: *Các chữ cái khác nhau (a, b, ...) trên cùng một cột chỉ sự sai khác có ý nghĩa thống kê của các giá trị trung bình với p < 0,05 (Duncan's test). Giá trị thể hiện trong bảng là giá trị trung bình ± SD (độ lệch chuẩn).*

Hình 3.14. Sự phát sinh phôi soma thứ cấp sâm Lang Bian. A. Phôi soma sơ cấp (Thước đo: 1 mm). B. Phôi soma thứ cấp ở giai đoạn hình cầu có nguồn gốc từ phôi soma sơ cấp (Thước đo: 1 mm). C. Sự tăng trưởng của phôi soma thứ cấp (Thước đo: 1 mm). D. Các giai đoạn phát triển của phôi soma thứ cấp (Thước đo: 2 mm).

3.3.2. Ảnh hưởng của hàm lượng đường đến sự phát sinh phôi soma thứ cấp

Kết quả nghiên cứu cho thấy hàm lượng đường sucrose khác nhau (0 ; 10 ; 20 ; 30 ; 40 và 50 g/L) có ảnh hưởng rất lớn đến sự phát sinh phôi soma thứ cấp từ phôi soma sơ cấp sâm Lang Bian sau 12 tuần nuôi cấy (Bảng 3.11). Tỷ lệ mẫu phát sinh phôi soma thứ cấp đạt được 100% sau 12 tuần nuôi cấy trong các nghiệm thức môi trường có bổ sung 20 – 50 g/L đường sucrose; trong khi đó, môi trường không bổ sung đường, tỷ lệ mẫu tạo phôi soma thứ cấp chỉ đạt 43,33%, mẫu chủ yếu hình thành mô sẹo có màu nâu sậm.

Số phôi soma thứ cấp (47,40 phôi/mẫu), khối lượng tươi (1062,29 mg) và khối lượng khô (82,77 mg) cao nhất được ghi nhận khi phôi soma được nuôi cấy trên môi trường có bổ sung 40 g/L đường sau 12 tuần nuôi cấy. Trong môi trường không bổ sung đường vẫn ghi nhận được sự hình thành phôi soma thứ cấp, tuy nhiên, số lượng phôi soma thứ cấp hình thành, khối lượng tươi và khối lượng khô tương ứng chỉ đạt 9,93 phôi/mẫu; 152,25 mg và 9,75 mg).

Ngoài ra, hàm lượng đường được bổ sung vào trong môi trường nuôi cấy ảnh hưởng rất lớn đến sự phát triển tiếp theo của phôi soma thứ cấp. Trong cùng một mẫu có thể quan sát các giai đoạn phát triển phôi soma khác nhau (Hình 3.15). Số lượng phôi soma ở các giai đoạn khác nhau thay đổi tùy thuộc vào hàm lượng đường bổ sung vào môi trường nuôi cấy. Trong môi trường đối chứng không bổ sung đường, phôi soma thứ cấp được hình thành chủ yếu dạng hình cầu, hầu hết phôi soma trong nghiệm thức này đều ở trạng thái chưa trưởng thành và chúng cần được phát triển qua các giai đoạn tiếp theo để tạo cây hoàn chỉnh. Trong khi đó, phôi soma thứ cấp được hình thành trong môi trường có bổ sung 40 g/L đường cho tỷ lệ phôi soma ở các giai đoạn hình thủy lôi và có lá mầm cao hơn (79,48%). Tuy nhiên, trong trường hợp tiếp

tục gia tăng hàm lượng đường thì tỷ lệ phôi soma dạng thủy lôi và dạng có lá mầm giảm xuống. Tỷ lệ phôi soma trưởng thành (giai đoạn thủy lôi và lá mầm) trong môi trường bổ sung 50 g/L sucrose chỉ còn tương ứng 31,56% phôi soma hình thủy lôi và 23,40% phôi soma có lá mầm (Hình 3.14)

Bảng 3.11. Ảnh hưởng của hàm lượng đường đến sự phát sinh phôi soma thứ cấp sau 12 tuần nuôi cấy

Hàm lượng đường (g/L)	Tỷ lệ mẫu phát sinh phôi soma thứ cấp (%)	Số lượng phôi soma thứ cấp	Khối lượng tươi (mg/mẫu)	Khối lượng khô (mg/mẫu)
0	$43,33 \pm 9,13^{c}$	$9,93 \pm 0,95^{f}$	$152,25 \pm 39,39^{e}$	$9,75 \pm 0,62^{e}$
10	$76,67 \pm 9,12^{b}$	$20,10 \pm 1,37^{e}$	$324,12 \pm 67,31^{d}$	$23,43 \pm 3,13^{d}$
20	$100 \pm 0,00^{a}$	$30,78 \pm 1,78^{c}$	$693,55 \pm 107,53^{b}$	$52,54 \pm 3,29^{bc}$
30	$100 \pm 0,00^{a}$	$36,20 \pm 3,17^{b}$	$799,53 \pm 75,85^{b}$	$62,99 \pm 5,46^{b}$
40	$100 \pm 0,00^{a}$	$46,97 \pm 4,04^{a}$	$1062,29 \pm 116,57^{a}$	$82,77 \pm 3,70^{a}$
50	$100 \pm 0,00^{a}$	$25,03 \pm 3,56^{d}$	$493,70 \pm 163,89^{c}$	$50,13 \pm 4,09^{c}$

Ghi chú: *Các chữ cái khác nhau (a, b, ...) trên cùng một cột chỉ sự sai khác có ý nghĩa thống kê của các giá trị trung bình với $p < 0,05$ (Duncan's test). Giá trị thể hiện trong bảng là giá trị trung bình ± SD (độ lệch chuẩn).*

Đường đóng vai trò quan trọng cung cấp năng lượng, xây dựng các đại phân tử sinh học và điều chỉnh thẩm thấu của môi trường nuôi cấy. Các nghiên cứu trước đây cho rằng việc bổ sung đường vào môi trường nuôi cấy gây ra những stress kích hoạt quá trình tạo phôi từ tế bào soma. Do đó, việc thay đổi hàm lượng đường sẽ tác động đến hiệu quả cảm ứng phát sinh phôi soma [269]. Hàm lượng đường phù hợp cho sự phát sinh phôi soma *Picea abies, Pinus radiata* nằm trong khoảng 10 – 30 g/L [270, 271], 17 g/L đối với *Picea omorika* [272].

Nhut và cộng sự (2012) cho rằng đường ở hàm lượng thấp làm giảm khả năng phát sinh phôi soma ở sâm Ngọc Linh. Trong các loại đường được sử dụng thì sucrose có tác dụng phát sinh phôi soma tốt hơn so với glucose và fructose và hàm lượng đường sucrose tối ưu nhất cho sự phát sinh phôi soma là 50 g/L [95]. Một số nghiên

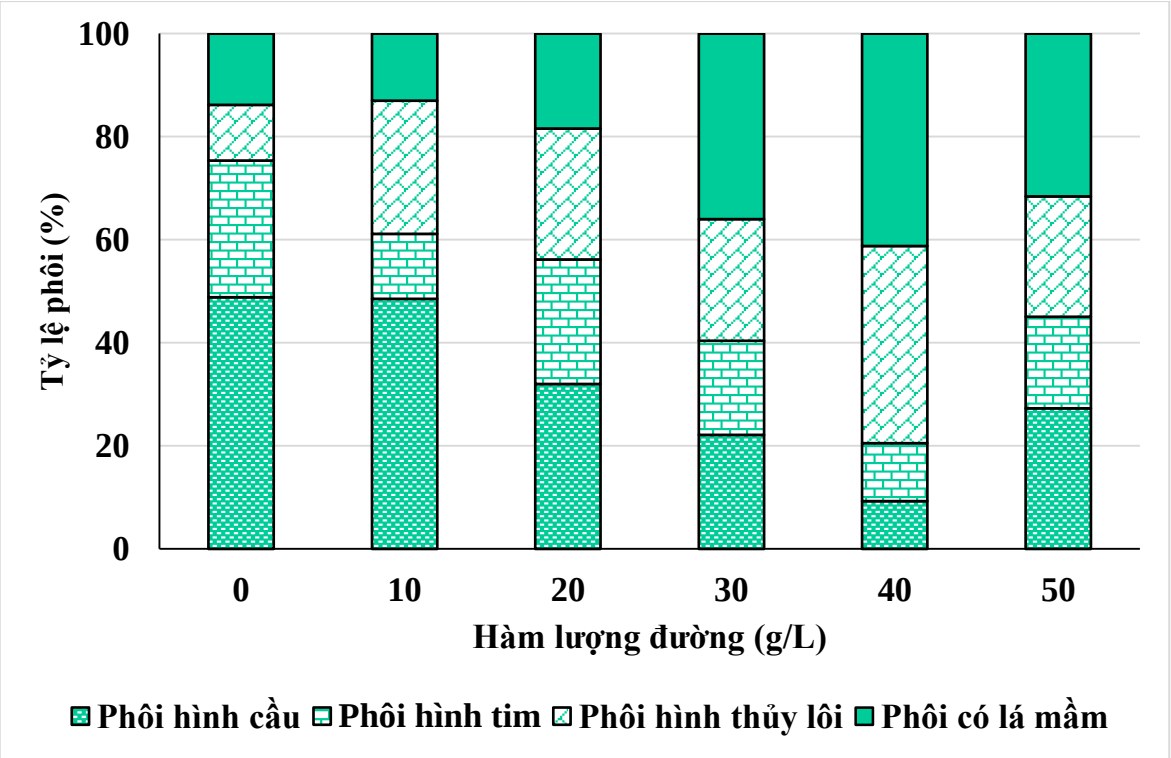
cứu trên đối tượng khác cũng cho rằng sucrose là lựa chọn tốt nhất cho sự phát sinh phôi soma [128]. Theo Blanc và cộng sự (2002), sucrose thủy phân thành hexose và các hợp chất dự trữ nhanh hơn các nguồn carbon khác, điều này có thể thúc đẩy sự tăng sinh tế bào [273].

Tác động tiêu cực của nồng độ đường sucrose quá cao cũng đã được báo cáo ở các loài thực vật khác như *Paeonia sect.* Moutan, *Euonymus alatus* [274, 275]. Ngược lại, ở *P. quinquefolius*, loài có họ hàng gần với *P. Ginseng*, tỷ lệ tạo phôi soma cao nhất ở mức 70 g/L sucrose [65]. Đối với sâm Lang Bian, khả năng phát sinh phôi soma thứ cấp cao nhất thể hiện qua các chỉ tiêu theo dõi như tỷ lệ mẫu phát sinh phôi soma, số phôi soma hình thành cũng như số lượng phôi soma ở giai đoạn thủy lôi và có lá mầm ở hàm lượng đường bổ sung 40 g/L. Vì vậy, nhu cầu về hàm lượng đường tối ưu có thể thay đổi phụ thuộc vào loài.

Song song với vai trò thẩm thấu, đường có thể ảnh hưởng đến sự thành thục phôi soma thông qua tác động đến sự thay đổi hàm lượng ABA nội sinh của mô hoặc tích lũy tinh bột [272]. Sự thành thục của phôi soma là một trong những trở ngại lớn cho quá trình tạo phôi soma ở các loài thực vật khác nhau khi sự phát triển bị dừng lại ở giai đoạn hình cầu [276]. Sự thành thục của phôi soma là điều cần thiết để tái sinh thực vật thành công.

Trong nghiên cứu này, hàm lượng đường sucrose trong môi trường ảnh hưởng đến sự phát triển của phôi soma (Hinh 3.15). Ở nghiệm thức đối chứng và bổ sung đường sucrose ở hàm lượng 10 – 20 g/L, tỷ lệ phôi soma hình cầu chiếm tỷ lệ cao. Tuy nhiên, 30 – 40 g/L sucrose đã thúc đẩy quá trình chuyển phôi soma chưa trưởng thành sang giai đoạn trưởng thành, tỷ lệ phôi soma ở giai đoạn hình thủy lôi và có lá mầm tăng lên. Kim và cộng sự (2012) cho rằng nhiều phôi soma *P. ginseng* đã chuyển từ giai đoạn hình cầu sang giai đoạn lá mầm khi được nuôi cấy trong môi trường có bổ sung 2% sucrose [12]. Những kết quả này cho thấy, việc tăng nồng độ sucrose đã cải thiện sự trưởng thành của phôi soma.

Thông thường ở giai đoạn trưởng thành của phôi soma, nồng độ đường cao hơn là cần thiết để ức chế sự nảy mầm sớm của phôi soma, nhưng nồng độ đường quá cao có thể cản trở sự phát triển của phôi soma. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng cho thấy, việc sử dụng đường ở hàm lượng 50 g/L ảnh hưởng tiêu cực đến sự phát sinh phôi soma thứ cấp và trưởng thành phôi soma (tỷ lệ phôi soma ở giai đoạn hình thủy lôi và có lá mầm thấp hơn). Kết quả tương tự cũng được ghi nhận trên một số đối tượng thực vật như *Picea pungens*, các loài vân sam khác [272].



Hình 3.15. Ảnh hưởng của hàm lượng đường đến sự phát sinh phôi soma thứ cấp ở các giai đoạn khác nhau sau 12 tuần nuôi cấy

3.3.3. Ảnh hưởng của hàm lượng nước dừa đến sự phát sinh phôi soma thứ cấp

Nhiều nghiên cứu đã chứng minh, nước dừa có hiệu quả gia tăng sinh khối mô sẹo có khả năng phát sinh phôi soma cũng như cải thiện sự phát sinh, phát triển phôi soma của mẫu nuôi cấy [120]. Đối với sâm Lang Bian, sau 12 tuần nuôi cấy, tất cả các mẫu được nuôi cấy trong các nghiệm thức đối chứng và bổ sung nước dừa đều phát sinh phôi soma thứ cấp. Tuy nhiên, hàm lượng nước dừa ảnh hưởng rất lớn đến số lượng phôi soma tạo thành cũng như khối lượng tươi, khối lượng khô (Bảng 3.12). Số lượng phôi soma hình thành tăng từ 61,80 phôi/mẫu lên 115,00 phôi/mẫu khi hàm lượng nước dừa bổ sung vào môi trường nuôi cấy tăng từ 5% đến 15% và giảm ở nồng độ từ 20 – 30%. Số lượng phôi soma cao nhất thu được trong môi trường bổ sung 15% nước dừa (115,00 phôi/mẫu) tiếp theo là 10% (77,80 phôi/mẫu), số lượng phôi soma thấp nhất ở các nghiệm thức không bổ sung và bổ sung 30% nước dừa (tương ứng 44,00 và 42,44 phôi/mẫu). Khối lượng tươi và khối lượng khô cao nhất tương ứng là 1954,40 mg và 144,40 mg khi mẫu được nuôi cấy trong môi trường bổ sung 15% nước dừa, tiếp đó là 10 và 20% và thấp nhất là môi trường đối chứng và bổ sung 30% nước dừa.

Phôi soma ở các giai đoạn phát triển khác nhau bao gồm phôi soma hình cầu, tim, thủy lôi và có lá mầm được ghi nhận ở các mẫu được nuôi cấy trong môi trường

đối chứng và bổ sung nước dừa. Tuy nhiên, nước dừa còn ảnh hưởng đến sự phát triển của phôi soma thể hiện qua tỷ lệ phôi soma thu nhận được ở giai đoạn khác nhau. Phôi soma ở giai đoạn có lá mầm chiếm tỷ lệ cao hơn so với giai đoạn hình cầu và tim ở các nghiệm thức bổ sung nước dừa (Hình 3.16).

Bảng 3.12. Ảnh hưởng của hàm lượng nước dừa đến sự phát sinh phôi soma thứ cấp sau 12 tuần nuôi cấy

Hàm lượng nước dừa (%)	Tỷ lệ mẫu phát sinh phôi soma thứ cấp (%)	Số lượng phôi soma thứ cấp	Khối lượng tươi (mg/mẫu)	Khối lượng khô (mg/mẫu)
0	100	$44,00 \pm 2,80^{d}$	$936,00 \pm 89,43^{d}$	$74,63 \pm 1,36^{d}$
5	100	$61,80 \pm 3,66^{c}$	$1119,10 \pm 66,28^{c}$	$94,17 \pm 5,37^{c}$
10	100	$77,80 \pm 6,68^{b}$	$1302,30 \pm 75,37^{b}$	$109,50 \pm 5,51^{b}$
15	100	$115,00 \pm 7,78^{a}$	$1954,40 \pm 67,33^{a}$	$144,40 \pm 4,22^{a}$
20	100	$65,00 \pm 7,31^{c}$	$1201,00 \pm 91,58^{c}$	$107,50 \pm 5,49^{b}$
30	100	$42,44 \pm 1,29^{d}$	$841,40 \pm 63,90^{d}$	$68,00 \pm 3,16^{e}$

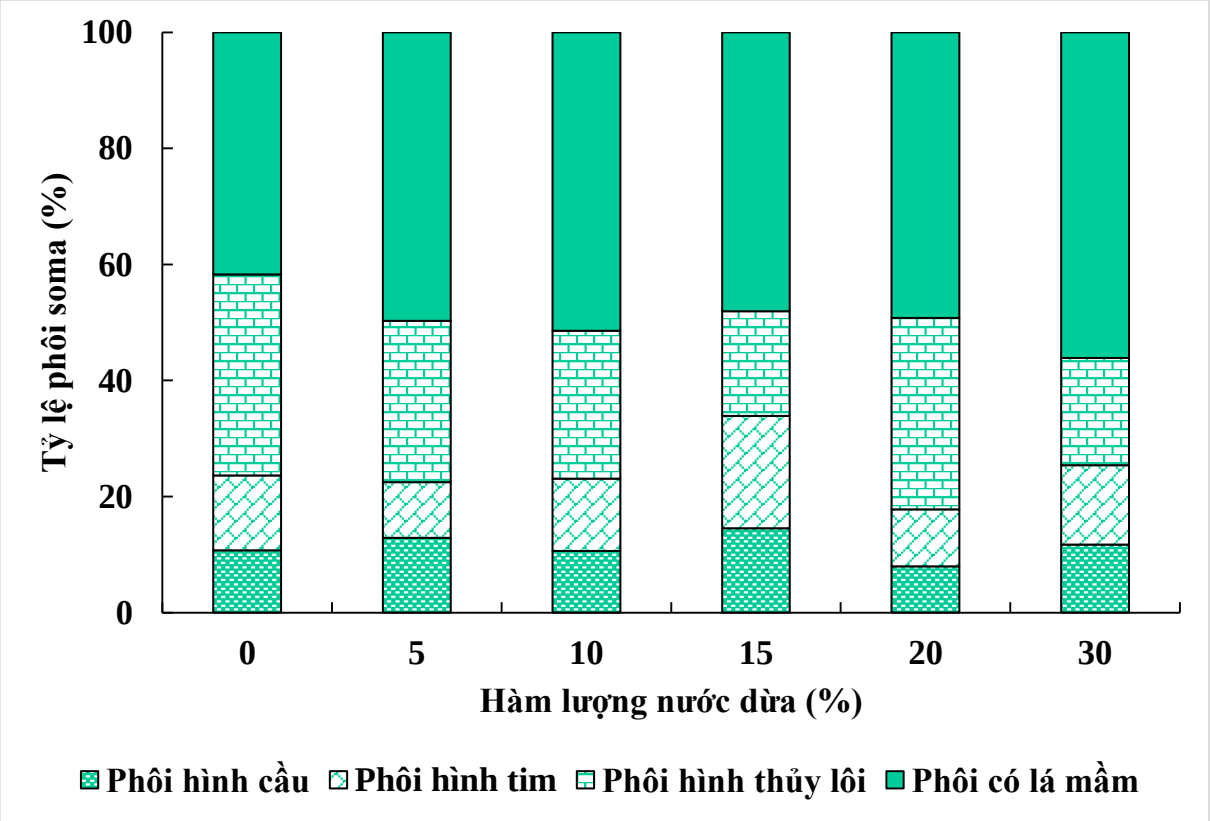
Ghi chú: *Các chữ cái khác nhau (a, b, ...) trên cùng một cột chỉ sự sai khác có ý nghĩa thống kê của các giá trị trung bình với $p < 0,05$ (Duncan's test). Giá trị thể hiện trong bảng là giá trị trung bình ± SD (độ lệch chuẩn).*

Nước dừa chứa một số hợp chất hữu cơ và chất dinh dưỡng khoáng cũng như phytohormone bao gồm auxin, cytokinin, gibberellin và acid abscisic [277]. Farhatullah và cộng sự (2007) cũng đã báo cáo rằng nước dừa có chứa Gibberellin-1 (16,7nM), Gibberellin-3 (37,8 nM) được sử dụng trong môi trường nuôi cấy *in vitro* có hiệu quả trong sự tăng sinh mẫu cấy [278]. Ngoài ra, sự hiện diện của cytokinin trong nước dừa đóng vai trò quan trọng trong sự phân chia tế bào, từ đó giúp cho mẫu cấy tăng trưởng [118].

Bên cạnh đó, thành phần các chất có trong nước dừa, đặc biệt là các hormone tự nhiên có thể tương tác với các hormone nội sinh bên trong mẫu và hormone bổ sung trong môi trường nuôi cấy tác động kích thích sự phân chia tế bào. Các tế bào

này sau đó trải qua một loạt các thay đổi về hình thái và sinh hóa và cuối cùng hình thành phôi soma [279].

Hàm lượng nước dừa tối ưu thay đổi tùy thuộc vào từng đối tượng thực vật khác nhau. Trong nghiên cứu nuôi cấy phôi soma cây cọ dừa (*Phoenix dactylifera* L.), AI-Khayri (2010) cho rằng nước dừa có ảnh hưởng tích cực đến sự phát sinh phôi soma của mẫu cấy. Sự phát sinh phôi soma được cải thiện ngay cả ở hàm lượng nước dừa thấp (5%), khả năng phát sinh phôi soma gia tăng khi hàm lượng nước dừa tăng lên và đạt giá trị cao nhất ở 10 - 15%. Tuy nhiên, hàm lượng nước dừa tăng lên 20% gây ra sự ức chế phát sinh phôi soma. Ngoài ra, thời gian phát sinh phôi soma cũng giảm xuống 30% khi mẫu được cấy trong môi trường bổ sung nước dừa so với đối chứng. Sau 12 tuần nuôi cấy ở nghiệm thức bổ sung 10 và 15 % nước dừa khoảng 90% mẫu phát sinh phôi soma so với 28% trong môi trường đối chứng. Cũng trong nghiên cứu này nước dừa được sử dụng trong giai đoạn nảy mầm có thể ảnh hưởng đến sự phát triển phôi soma và tạo cây hoàn chỉnh [280].



Hình 3.16. Ảnh hưởng của hàm lượng nước dừa đến sự phát sinh phôi soma thứ cấp ở các giai đoạn khác nhau sau 12 tuần nuôi cấy

Kết quả tương tự cũng được ghi nhận trong nuôi cấy *Cymbopogon pendulus*, bổ sung nước dừa vào môi trường có tác dụng cải thiện cảm ứng tạo mô sẹo và phát sinh phôi soma [281]. Trong nuôi cấy *Citrullus lanantus* và *Ananas comosus*, 10%

nước dừa cho hiệu quả phát sinh phôi soma tốt nhất [282]. Sự phát sinh phôi soma từ mô sẹo có nguồn gốc từ mẫu cấy lá *ex vitro* cây Đinh lăng lá xẻ nhỏ (*Polyscias fruticosa* L. Harms) tốt nhất trong môi trường MS có bổ sung 10% nước dừa kết hợp với 0,5 mg/L BA [283]. Tương tự, nước dừa có tác động tích cực đến khả năng phát sinh phôi soma thứ cấp ở sâm Ngọc Linh. Các lá mầm cắt ra từ phôi có lá mầm *in vitro* được nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung 10% nước dừa và kết hợp 0,2 mg/L IBA tạo mô sẹo sinh phôi và phôi soma [39]. Tuy nhiên, đối với cây chà là hàm lượng nước dừa 20% thích hợp cho sự tăng sinh mô sẹo có khả năng phát sinh phôi và hình thành phôi soma [120]. Khối lượng tươi, khối lượng khô và số lượng phôi soma hình cầu cao nhất đạt được lần lượt là 1,95 g, 0,48 g và 65 phôi. Đối với sâm Lang Bian, nước dừa có ảnh hưởng tích cực đến sự phát sinh và trưởng thành phôi soma thứ cấp từ các phôi soma sơ cấp. Sự phát sinh phôi soma thứ cấp đạt hiệu quả cao nhất trong môi trường nuôi cấy có bổ sung 15% nước dừa.

3.4. Nội dung 4: Tạo cây sâm từ phôi soma thứ cấp và xác định hàm lượng saponin tích lũy trong cây sâm Lang Bian *in vitro*

3.4.1. Tạo cây sâm từ phôi soma thứ cấp

Thông thường, tỷ lệ sống sót của cây con chuyển từ ống nghiệm ra vườn ươm rất thấp vì chúng có bộ rễ kém phát triển và dễ bị nhiễm nấm sau khi chuyển ra đất. Do đó, nghiên cứu tạo củ cho cây con *in vitro* có nguồn gốc từ phôi soma trước khi chuyển ra vườn ươm giúp gia tăng tỷ lệ sống sót của cây con là cần thiết.

Kết quả nghiên cứu cho thấy, các cây con hình thành từ phôi soma thứ cấp và chồi bất định sinh trưởng tốt, khỏe mạnh, lá có bản rộng, màu xanh đậm và không có sự bất thường về hình thái sau 20 tuần nuôi cấy. Cây con có nguồn gốc từ chồi hình thành rễ bất định, trong khi đó, cây con có nguồn gốc từ phôi soma thứ cấp hình thành củ và rễ bất định (Bảng 3.13).

Các cây con có nguồn gốc từ phôi soma thứ cấp có sự hình thành củ nhỏ, màu xanh ở phần gốc với tỷ lệ hình thành củ, đường kính củ và chiều dài củ đạt được lần lượt 63,34%, 0,65 cm và 1,27 cm sau 20 tuần nuôi cấy. Đối với cây hình thành từ chồi, sự hình thành mô sẹo được quan sát thấy ở phần gốc chồi, sau đó xuất hiện các rễ bất định màu trắng, mảnh và dài từ khối mô sẹo. Thêm vào đó, không có sự khác biệt về chiều dài rễ ghi nhận giữa hai nguồn mẫu cấy, trong khi đó, số rễ bất định hình thành từ chồi (8,14 rễ/mẫu) nhiều hơn so với cây từ phôi soma thứ cấp (6,92 rễ/mẫu) (Bảng 3.13).

Các củ có vai trò là nguồn cung cấp dinh dưỡng cho cây khi chuyển ra trồng ở ngoài điều kiện tự nhiên [284]. Một số kết quả nghiên cứu hình thành thân rễ/củ *in vitro* cũng đã được ghi nhận ở *P. vietnamensis* [10], *P. ginseng* và *P. quinquefolius* [14], *P. ginseng* [15]. Kim và cộng sự (2019) cho rằng việc tạo củ của cây con lai giữa *P. ginseng* và *P. quinquefolius* cho phép chúng có thể thích ứng tốt hơn khi được chuyển ra ngoài vườn ươm với tỷ lệ sống sót lên đến 80% [14]. Tương tự, tỷ lệ sống sót của cây *P. vietnamensis* đã tạo củ đạt đến 93,65 % sau 1 năm trồng trong nhà kính. Như vậy, sự hình thành củ của cây con sâm Lang Bian là một trong những đặc điểm hứa hẹn giúp cây gia tăng khả năng sống sót khi chuyển ra ngoài vườn ươm trong tương lai.

Bảng 3.13. Sự hình thành thân rễ và rễ bất định của cây con có nguồn gốc từ phôi soma thứ cấp và chồi bất định sau 20 tuần nuôi cấy

Nguồn gốc cây con	Thân rễ			Rễ bất định			Đặc điểm
	Thân rễ (%)	Đường kính thân rễ (cm)	Chiều dài thân rễ (cm)	Rễ bất định (%)	Số lượng rễ	Chiều dài rễ (cm)	
phôi soma thứ cấp	63,34 ± 6,67	0,65 ± 0,10	1,27 ± 0,12	100	6,92 ± 0,97	1,53 ± 0,12	Cây con hình thành củ màu xanh với các rễ bất định dài, mảnh, màu trắng
Chồi bất định	-	-	-	100	8,14 ± 0,84	1,59 ± 0,21	Cây con hình thành rễ bất định màu trắng, dài, mảnh. Mô sẹo hình thành ở gốc chồi, sau đó là sự hình thành rễ bất định từ mô sẹo

Ghi chú: *Dấu "-" thể hiện không ghi nhận sự hình thành thân rễ của chồi bất định. Giá trị thể hiện trong bảng là giá trị trung bình ± SD (độ lệch chuẩn), kiểm định T-test*

3.4.2. Xác định hàm lượng một số saponin trong thân rễ và rễ bất định của cây sâm Lang Bian in vitro

Thân rễ của cây con có nguồn gốc từ phôi soma thứ cấp và rễ bất định của cây con có nguồn gốc từ chồi bất định *in vitro* được sử dụng làm nguồn mẫu để xác định và so sánh hàm lượng một số saponin tích lũy. Kết quả phân tích saponin bằng phương pháp HPLC cho thấy mẫu rễ bất định và thân rễ sâm Lang bian *in vitro* 20 tuần tuổi đều có sự hiện diện của Rg1, Rd và Rb1. Trong đó, hàm lượng Rg1, Rd, Rb1 và saponin tổng số ở thân rễ (703,38; 770,67; 174,81 và 1648,86 µg/g) cao hơn so với rễ bất định (325,79; 171,08; 4,78 và 501,65 µg/g) (Bảng 3.14, Hình 3.17).

Bảng 3.14. Hàm lượng saponin trong thân rễ và rễ bất định sâm Lang Bian 20 tuần tuổi

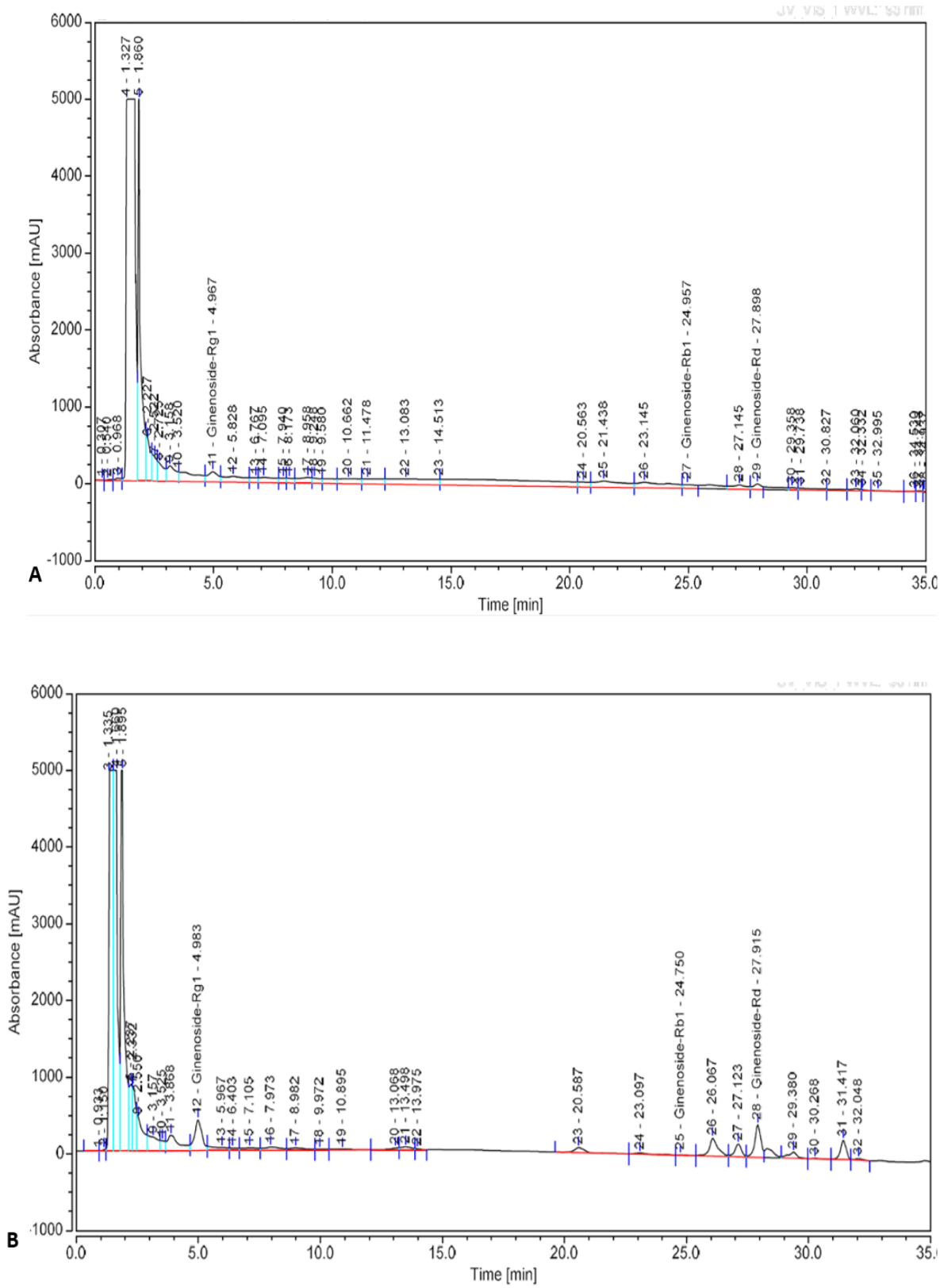
Loại mẫu	Hàm lượng saponin (µg/g)			
	Rg1	**Rd**	**Rb1**	**Rg1+Rd+Rb1**
Thân rễ	703,38 ± 78,34	770,67 ± 57,56	174,81 ± 43,15	1648,86 ± 52,62
Rễ bất định	325,79 ± 65,45	171,08 ± 2,48	4,78 ± 0,14	501,65 ± 50,52

Ghi chú: *Giá trị thể hiện trong bảng là giá trị trung bình ± SD (độ lệch chuẩn), kiểm định T-test.*

Các loài thuộc chi *Panax* đã được sử dụng rộng rãi ở Trung Quốc, Hàn Quốc, Việt Nam và các nơi khác trên thế giới với công dụng bồi bổ sức khỏe, tăng cường miễn dịch, chống stress, hỗ trợ điều trị tiểu đường và một số bệnh nan y [285]. Saponin được xem là thành phần hoạt chất chủ yếu của các loài sâm, trong đó, các saponin triterpene loại dammaran có vai trò quyết định cho giá trị dược liệu của sâm. Ginsenoside-Rb1, -Rb3, và -Rd là các đại diện chính cho nhóm saponin dẫn suất từ 20(S)-proto*Panax*adiol (gồm 22 hợp chất); ginsenoside-Re, -Rg1, và notoginsenoside-R1 đại diện cho nhóm dẫn suất từ proto*Panax*atriol (gồm 17 hợp chất); còn majoside-R1 và -R2 đại diện cho nhóm có cấu trúc occotillol (gồm 11 hợp chất).

Cây sâm có thể chứa nhiều loại saponin khác nhau và các cấu trúc này liên quan chặt chẽ với nhau. Sự đa dạng trong cấu trúc đã tạo nên một loạt các saponin khác nhau đang được khai thác và sử dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực như dược phẩm, thực phẩm và mỹ phẩm. Hiện nay, các nhà khoa học đã xác định được trên 50

loại saponin trong các loài *P. ginseng*, *P. notoginseng*, *P. quinquefolius* và *P. vietnamensis* [286].



Hình 3.17. Sắc ký đồ HPLC thể hiện hàm lượng ginsenoside trong rễ bất định (A) và thân rễ (B) sâm Lang Bian *in vitro*

Một số nghiên cứu về sự khác biệt hàm lượng saponin trong các bộ phận khác nhau của các loài thuộc chi *Panax* cũng đã được báo cáo. Phần dưới và phần trên mặt đất có sự khác biệt về loại và hàm lượng saponin, saponin trong rễ đa dạng hơn so với lá [287]. Đối với sâm Ngọc Linh, phần rễ và thân rễ được coi là bộ phận chính sử dụng cho các mục đích y học, trong khi đó, phần lá và thân chỉ được sử dụng dưới dạng trà thảo mộc. Do đó, hầu hết các nghiên cứu về các thành phần hóa học và tác dụng dược lý đã được tập trung vào phần thân rễ của sâm Ngọc Linh. Năm mươi saponin triterpene loại dammarane bao gồm 26 hợp chất mới đã được báo cáo ở các bộ phận dưới mặt đất [22]. Bên cạnh đó, Le và cộng sự (2015) đã xác định được hàm lượng 17 saponin trong các bộ phận khác nhau của sâm Ngọc Linh. Hàm lượng saponin trong thân rễ, củ và rễ tương ứng là 195, 156 và 139 mg/g, rất cao so với các các loài thuộc chi *Panax* khác [288].

Nhìn chung, qua kết quả phân tích định lượng mẫu thân rễ và rễ bất định sâm Lang Bian cho thấy có sự hiện diện của một số saponin chính bao gồm Rg1, Rd và Rb1 và đây là những loại saponin chính có giá trị dược liệu, có tiềm năng sử dụng trong y học. Trong đó, hàm lượng saponin của thân rễ cao hơn so với rễ bất định. Như vậy, các cây con có nguồn gốc từ phôi soma không những có khả năng hình thành thân rễ hứa hẹn gia tăng tỷ lệ sống sót khi chuyển ra vườn ươm mà còn tích lũy được hàm lượng một số loại saponin cao hơn so với cây con có nguồn gốc từ chồi bất định. Do đó, nuôi cấy phôi soma là một phương pháp đầy hứa hẹn để nhân giống sâm Lang Bian, góp phần giải quyết tình trạng khan hiếm giống hiện nay.

Hình 3.18. Sự hình thành thân rễ của cây con có nguồn gốc từ phôi soma thứ cấp sau 20 tuần nuôi cấy. Thước đo: 1 cm

3.4.3. Sự sinh trưởng tiếp theo của phôi soma sâm Lang Bian trong môi trường có bổ sung AgNPs

Việc sử dụng các hạt nano trong nuôi cấy mô thực vật đã thu hút được sự chú ý đáng kể trong những năm gần đây. Các hạt nano, chủ yếu là AgNPs, đã được báo cáo có tác dụng tăng cường sự tăng trưởng và phát triển của thực vật trong nuôi cấy mô. Nghiên cứu này cho thấy, việc sử dụng AgNPs có tác động tích cực đến sự hình thành và sinh trưởng của thân rễ sâm Lang Bian. Phôi soma ở dạng có lá mầm được cấy chuyển sang môi trường SH có bổ sung 0,5 mg/L BA, 0,5 mg/L NAA, 30 g/L sucrose, 1,0 g/L than hoạt tính, 9,0 g/L agar và 1,2 mg/L AgNPs cho thấy tỷ lệ hình thành thân rễ được cải thiện so với đối chứng (không bổ sung AgNPs) (Bảng 3.15). Ngoài ra, bổ sung AgNPs vào môi trường còn giúp tăng tỷ lệ mẫu hình thành thân rễ và cải thiện chất lượng cây con so với nghiệm thức đối chứng (không bổ sung AgNPs). Cây con trên môi trường nuôi cấy bổ sung 1,2 mg/L AgNPs có màu xanh đậm, cứng cáp và phát triển tốt (Hình 3.19).

Sự hiện diện của AgNPs trong môi trường nuôi cấy đã được chứng minh có khả năng làm gia tăng sự phát sinh hình thái, sinh lý và sinh hóa của các loài thực vật khác nhau. Trong vi nhân giống *T. undulata*, 60 µg/L AgNPs bổ sung trong môi trường nuôi cấy có tác dụng cải thiện chất lượng của cây con [289]. Cho đến nay, chỉ có một báo cáo về ảnh hưởng của AgNPs đến sự hình thành thân rễ sâm Ngọc Linh, Cuong và cộng sự (2021) cho rằng sự sinh trưởng của thân rễ sâm Ngọc Linh được cải thiện rõ rệt khi nuôi cấy trên môi trường có bổ sung 1,2 mg/L AgNPs [10]. Ngoài ra, sự có mặt của AgNPs còn giúp cải thiện các hiện tượng bất thường của sâm Ngọc Linh [10], dâu tây [163], hoa đồng tiền [290].

Bảng 3.15. Sự sinh trưởng tiếp theo của phôi soma thứ cấp sâm Lang Bian trong môi trường có bổ sung nano bạc sau 20 tuần nuôi cấy

Nghiệm thức	Tỷ lệ hình thành thân rễ (%)	Đường kính thân rễ (cm)	Chiều dài thân rễ (cm)
Đối chứng	47,78 ± 1,92	0,42 ± 0,03	1,20 ± 0,02
1,2 mg/L AgNPs	85,56 ± 1,93	1,14 ± 0,03	2,05 ± 0,05

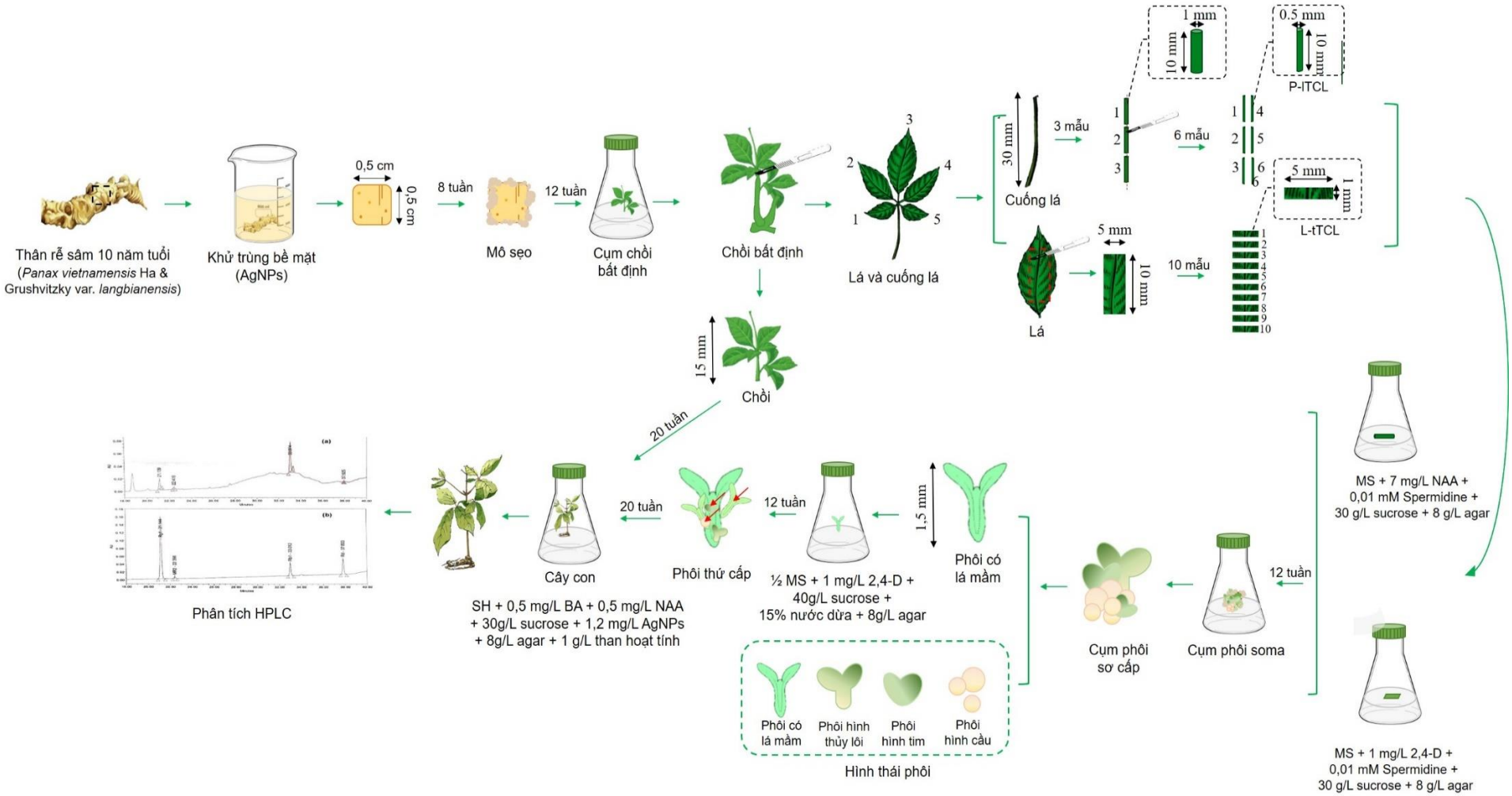
Ghi chú: *Giá trị thể hiện trong bảng là giá trị trung bình ± SD (độ lệch chuẩn), kiểm định T-test.*

Hơn nữa, AgNP đã được báo cáo giúp tăng cường tổng hợp các chất chuyển hóa thứ cấp trong thực vật. Các chất chuyển hóa thứ cấp này có vai trò thiết yếu trong

cơ chế bảo vệ thực vật và sản xuất các chất hóa học thực vật có giá trị, chẳng hạn như flavonoid, alkaloid và các hợp chất phenolic. Cuong và cộng sự (2021) cho thấy việc bổ sung AgNPs vào môi trường nuôi cấy giúp tăng cường đáng kể quá trình tổng hợp các hợp chất thứ cấp trong sâm Ngọc Linh [10].

Nhìn chung, việc sử dụng AgNPs trong nuôi cấy mô thực vật đã được chứng minh là có ảnh hưởng đáng kể đến sự tăng trưởng, phát triển và tổng hợp chất chuyển hóa thứ cấp của thực vật. Tuy nhiên, cần nghiên cứu thêm để hiểu đầy đủ các cơ chế liên quan đến việc tăng cường sự phát triển của thực vật và tổng hợp chất chuyển hóa thứ cấp dưới tác động của AgNPs.

Hình 3.19. Hình thái cây con có nguồn gốc từ phôi soma nuôi cấy trong môi trường không bổ sung (Đối chứng) hoặc có bổ sung 1,2 mg/L AgNPs sau 20 tuần nuôi cấy. Thước đo: 1 cm.



Hình 3.20. Sơ đồ quá trình nuôi cấy phôi soma sâm Lang Bian *in vitro*

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

KẾT LUẬN

Nghiên cứu quá trình phát sinh phôi soma sơ cấp và thứ cấp sâm Lang Bian (*P. vietnamensis* var. *langbianensis*), một trong những cây dược liệu quý đặc hữu tại Lâm Đồng, Việt Nam thu nhận được những kết quả như sau:

1. Tạo nguồn mẫu *in vitro*

AgNPs ở nồng độ 0,15% không những cho hiệu quả tốt trong khử trùng mẫu thân rễ mà còn có tác dụng kích thích mẫu tái sinh chồi bất đinh. Các chồi bất định tiếp tục được nhân nhanh trong môi trường SH có bổ sung 1 mg/L BA. Đây là nguồn mẫu sẵn có, sạch, dễ duy trì thích hợp sử dụng cho nghiên cứu phát sinh phôi soma.

2. Phát sinh hình thái thông qua nuôi cấy TCL

Auxin có tác dụng tích cực đến sự phát sinh phôi soma thứ cấp từ các mẫu TCL với nồng độ thích hợp nhất ghi nhận được lần lượt là 7,0 mg/L NAA (đối với mẫu L-tCL) hoặc 1,0 mg/L 2,4-D (đối với mẫu P-lTCL). Các phôi soma này được sử dụng cho nghiên cứu phát sinh phôi soma thứ cấp ở giai đoạn tiếp theo.

Glutamine, proline, và spermidine đều có ảnh hưởng đến quá trình phát sinh phôi soma thứ cấp sâm Lang Bian. Trong đó, 1,5 mg/L spermidine cho hiệu quả phát sinh phôi soma thứ cấp tốt nhất đối với cả hai loại mẫu L-tTCL và P-lTCL thông qua việc tăng cường tổng hợp các enzym chống oxy hóa (APX, CAT và SOD), do đó làm giảm tác dụng phụ của ROS. Ngoài ra, hàm lượng và tỷ lệ các hormone nội sinh ở các giai đoạn khác nhau luôn được điều chỉnh nhằm tạo điều kiện thuận lợi nhất cho sự phát sinh phôi soma thứ cấp sâm Lang Bian.

3. Phát sinh phôi soma thứ cấp

Phôi soma thứ cấp chủ yếu ở dạng có lá mầm được thu nhận từ nuôi cấy phôi soma sơ cấp dạng thủy lôi trên môi trường 1/2 MS bổ sung 1,0 mg/L 2,4-D, 40 g/L đường sucrose và 15 % nước dừa. Đây là nguồn vật liệu quan trọng sử dụng cho mục đích nhân nhanh sinh khối, nâng cao hiệu quả của quá trình nhân giống.

4. Tạo cây sâm từ phôi soma thứ cấp và xác định hàm lượng saponin tích lũy trong cây sâm Lang Bian *in vitro*

Cây con có nguồn gốc từ phôi soma thứ cấp nuôi cấy trong môi trường có bổ sung 1,2 mg/L AgNPs sinh trưởng khỏe mạnh, lá to, mở rộng, có hình thành thân rễ trong điều kiện *in vitro*, hứa hẹn gia tăng tỷ lệ sống sót khi chuyển cây ra trồng ở

ngoài vườn ươm trong tương lai. Ngoài ra, kết quả phân tích saponin cho thấy mẫu thân rễ sâm Lang Bian *in vitro* 20 tuần tuổi có sự hiện diện của saponin Rg1, Rd và Rb1. Đây là những loại saponin chính có giá trị dược liệu, có tiềm năng sử dụng trong y học.

KIẾN NGHỊ

Nghiên cứu đã xác định được một số yếu tố ảnh hưởng đến quá trình phát sinh phôi soma sâm Lang Bian và tạo được nguồn phôi soma cũng như cây con có nguồn gốc từ phôi soma *in vitro*, Chúng tôi đưa ra một số kiến nghị như sau:

Dựa trên những kết quả nghiên cứu phát sinh phôi soma, tiếp tục nghiên cứu và ứng dụng nhân nhanh phôi soma ở quy mô lớn hơn với mục tiêu đáp ứng được nhu cầu cây giống phục vụ công tác bảo tồn và phát triển.

Tiếp tục nghiên cứu đánh giá khả năng thích nghi và sinh trưởng của cây con có nguồn gốc *in vitro* trong điều kiện vườn ươm.

DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ

1. **Truong Thi Lan Anh**, Hoang Thanh Tung, Hoang Dac Khai, Nguyen Thi Nhu Mai, Vu Quoc Luan, Do Manh Cuong, Hoang Thi Nhu Phuong, Le Thi Diem, Nguyen Quang Vinh, Doan Manh Dung, Bui Van The Vinh, Nguyen Phuong Thao, Duong Tan Nhut, **2022**, Micropropagation of Lang Bian ginseng: an endemic medicinal plant, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 151:565–578. https://doi.org/10.1007/s11240-022-02372-8
2. **Truong Thi Lan Anh**, Nguyen Thi Nhu Mai, Hoang Thanh Tung, Hoang Dac Khai, Do Manh Cuong, Vu Quoc Luan, Hoang Thi Nhu Phuong, Nguyen Van Binh, Bui Van The Vinh, Nguyen Thi Thanh Thuy, Nguyen Phuong Thao, Duong Tan Nhut, **2023**, Effect of spermidine, glutamine, and proline on somatic embryogenesis and silver nanoparticles supplied culture improved rhizome formation of *Panax vietnamensis* var. *langbianensis*, *South African Journal of Botany*, 163: 226-236. https://doi.org/10.1016/j.sajb.2023.10.032

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Zhang, H., Abid, S., Ahn, J.C., Mathiyalagan, R., Kim, Y.J., Yang, D.C., Wang, Y., 2020, Characteristics of *Panax ginseng* Cultivars in Korea and China, *Molecules*, 25, 2635.

2. Liu, L., Xu, F.R., Wang, Y.Z., 2020, Traditional uses, chemical diversity and biological activities of *Panax* L.(Araliaceae): A review, *Journal of Ethnopharmacology*, 263, 112792.

3. Wen, J., Krupnick, G., Esser, H.J., 2023, *Panaxsiamensis* J. Wen, a new species of the ginseng genus (*Panax, Araliaceae*) from northern Thailand, *PhytoKeys*, 234, pp. 51-59.

4. Xu, F., Valappil, A.K., Mathiyalagan, R., Tran, T.N.A., Ramadhania, Z.M., Awais, M., Yang, D.C., 2023, *In vitro* cultivation and ginsenosides accumulation in *Panax ginseng*: A review, *Plants*, 12, 3165.

5. Burkhart, E.P., Nilson, S.E., Pugh, C.V., Zuiderveen, G.H., 2021, Neither Wild nor Cultivated: American Ginseng (*Panax quinquefolius* L.) Seller Surveys Provide Insights into in situ Planting and Husbandry, *Economic Botany*, 75(2), pp. 126-143.

6. Pais, M.S., 2019, Somatic embryogenesis induction in woody species: the future after OMICs data assessment, *Frontiers in Plant Science*, 10, 240.

7. Zhang, J.Y., Sun, H.J., Song, I.J., Bae, T.W., Kang, H.G., Ko, S.M., Kwon, Y.I., Kim, I.W., Lee, J., Park, S.Y., Lim, P.O., Kim, Y.H., Lee, H.Y., 2014, Plant regeneration of Korean wild ginseng (*Panax ginseng* Meyer) mutant lines induced by γ-irradiation ((60)Co) of adventitious roots, *Journal of Ginseng Research*, 38(3), pp. 220-225.

8. Qiang, B., Miao, J., Phillips, N., Wei, K., Gao, Y., 2020, Recent advances in the tissue culture of American ginseng (*Panax quinquefolius*), *Chemistry and Biodiversity*, 17, e2000366.

9. You, X., Han, J., Choi, Y.E., 2007, Plant regeneration via direct somatic embryogenesis in *Panax japonicus, Plant Biotechnology Reports*, 1, pp. 5-9.

10. Cuong, D.M., Du, P.C., Tung, H.T., Ngan, H.T.M., Luan, V.Q., Phong, T.H., Khai, H.D., Phuong, T.T.B., Nhut, D.T., 2021, Silver nanoparticles as an

effective stimulant in micropropagation of *Panax vietnamensis*—a valuable medicinal plant, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 146(3), pp. 577-588.

11. Keshvari, T., Najaphy, A., Kahrizi, D., Zebarjadi, A., 2018, Callus induction and somatic embryogenesis in *Stevia rebaudiana* Bertoni as a medicinal plant, *Cellular and Molecular Biology*, 64(2), pp. 46-49.

12. Kim, Y.J., Lee, O.R., Kim, K.T., Yang, D.C., 2012, High frequency of plant regeneration through cyclic secondary somatic embryogenesis in *Panax ginseng*, *Journal of Ginseng Research*, 36(4), pp. 442 - 448.

13. You, X.L., Tan, X., Dai, J.L., Li, Y.H., Choi, Y.E., 2012, Large-scale somatic embryogenesis and regeneration of *Panax notoginseng*, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 108(2), pp. 333-338.

14. Kim, J.Y., Adhikari, P.B., Ahn, C.H., Kim, D.H., Kim, Y.C., Han, J.Y., Kondeti, S., Choi, Y.E., 2019, High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration of interspecific ginseng hybrid between *Panax ginseng* and *Panax quinquefolius, Journal of Ginseng Research*, 43, pp. 38 - 48.

15. Lee, J.W., Do, G.R., Jo, I.H., Hong, C.E., Bang, K.H., Kim, J.U., Park, Y.D., 2021, Zygotic embryo culture is an efficient way to optimize *in vitro* growth in *Panax ginseng*, *Industrial Crops and Products*, 167, pp. 113497.

16. Duy, N.V., Trieu, L.N., Chinh, N.D., Tran, V.T., 2016, A new variety of *Panax* (Araliaceae) from Lam Vien Plateau, Vietnam and its molecular evidence, *Phytotaxa*, 277(1), pp. 047-058.

17. Trieu, L.N., Duy, N.V., Tien, T.V., 2019, Genetic diversity of Panax vietnamensis var. langbianensis populations in Lam Vien plateau–Vietnam detected by inter simple sequence repeat (ISSR) markers, *Journal of Biotechnology*, 17(4), pp. 651-661.

18. Trương Thị Hồng Hải, Dương Thanh Thủy, Đặng Thanh Long, Hồ Thị Huyền Trân, Nguyễn Mạnh Tuấn, 2018, Đa dạng di truyền dựa trên đặc điểm hình thái của quần thể sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) ở Nam Trà My, Quảng nam, *Tạp chí Khoa học Đại học Huế: Khoa học Tự nhiên*, 127(1C), pp. 203-210.

19. Adil, M., Jeong, B.R., 2018, *In vitro* cultivation of *Panax ginseng* C.A. Meyer, *Industrial Crops and Products*, 122, pp. 239-251.

20. Đỗ Huy Bích, 2003, *Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam*. NXB Khoa học và Kỹ thuật Hà Nội. Tập II, 707 – 717.

21. Nguyen, T.H., Phuong, T.T., 2019, Vietnamese Ginseng (*Panax vietnamensis* Ha and Grushv.): Phylogenetic, Phytochemical, and Pharmacological Profiles, *Pharmacognosy Reviews*, 13(26), pp. 59-62.

22. Yamasaki, K., 2000, Bioactive saponins in Vietnamese ginseng, *Panax vietnamensis, Pharmaceutical biology*, 38(sup1), pp. 16-24.

23. Trong, T.T., Truong, D.H., Nguyen, H.C., Tran, D.T., Thi, H.T.N., Do Dang, G., Huu, H.N., 2017, Biomass accumulation of *Panax vietnamensis* in cell suspension cultures varies with addition of plant growth regulators and organic additives, *Asian Pacific journal of tropical medicine*, 10(9), pp. 907-915.

24. Jacques, P., Kevers, C., Gaspar, T., Dommes, J., Thonart, P., 2007, Conditioning *Panax vietnamensis* cell mass production in bioreactors, *Acta Botanica Gallica*, 154(1), pp. 21-26.

25. Nguyen, T.T., Nguyen, V.K., Paek, K.Y., 2007, Effecting of medium composition on biomass and ginsenoside production in cell suspension culture of *Panax vietnamensis* Ha et Grushv, *VNU Journal of Science: Natural Sciences and Technology*, 23(4), pp. 269-274.

26. Vũ Tuấn Anh, Chử Văn Mến, 2015, Ảnh hưởng của thời gian và số lần cấy chuyển đến sự phát triển và hàm lượng hoạt chất của tế bào sâm Ngọc Linh, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam*, 2(8), pp. 36-38.

27. Nguyen, T.T., Ha, T.A., Paek, K.Y., 2008, Effects of macro elements on biomass and ginsenoside production in cell suspension culture of Ngoc Linh ginseng (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv), *VNU Journal of Science: Natural Sciences and Technology*, 24(3), pp. 248-252.

28. Ha, L.T., Pawlicki-Jullian, N., Pillon-Lequart, M., Boitel-Conti, M., Duong, H.X., Gontier, E., 2016, Hairy root cultures of *Panax vietnamensis*, a promising approach for the production of ocotillol-type ginsenosides, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 126, pp. 93-103.

29. Hà Thị Loan, Dương Hoa Xô, Nguyễn Quốc Bình, Nguyễn Hoàng Quân, Vũ Thị Đào, Pawlicki Julian Nathalie, Gontier Eric, 2014, Nghiên cứu tạo rễ tóc sâm Ngọc Linh *Panax vietnamensis* bằng phương pháp chuyển gen rol nhờ vi

khuẩn *Agrobacterium rhizogenes*, *Tạp chí Công nghệ sinh học*, 36(1se), pp. 293-300.

30. Nhut, D.T., Duc, H.H., Hoang, N.H., Ngan, H.T.M., Diem, L.T., Tung, H.T., Khai, H.D., Mai, N.T.N., Cuong, D.M., Luan, V.Q., 2022, Efficient transgenic plantlet regeneration from hairy roots via somatic embryogenesis and hardening plantlets of *Panax vietnamensis* by iron nanoparticles-supplied culture, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 151(2), pp. 335-345.

31. Hồ Thanh Tâm, Nguyễn Bá Nam, Hoàng Xuân Chiến, Lê Kim Cương, Ngô Thanh Tài, Nguyễn Cường Việt, Nguyễn Phúc Huy, Trịnh Thị Hương, Trần Hiếu, 2015, Tối ưu hóa một số yếu tố môi trường và điều kiện nuôi cấy đến quá trình tái sinh rễ bất định từ lá sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.), *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 13(3), pp. 865-873.

32. Ket, N.V., Anh, T.T.L., Dung, N.H.U., 2012, Effecting of sucrose concentrations and inoculum density on adventitiuos root growth in cell suspension culture of *Panax vietnamensis* and initially growth in a bioreactor, *Southeast Asian Journal of Sciences*, 1(2), pp. 215-222.

33. Linh, N.T.N., Cuong, L.K., Tam, H.T., Tung, H.T., Luan, V.Q., Hien, V.T., Loc, N.H., Nhut, D.T., 2019, Improvement of bioactive saponin accumulation in adventitious root cultures of *Panax vietnamensis* via culture periods and elicitation, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 137(1), pp. 101-113.

34. Nhut, D.T., Huy, N.P., Luan, V.Q., Van Binh, N., Nam, N.B., Thuy, L.N.M., Ha, D.T.N., Chien, H.X., Huong, T.T., Cuong, H., 2011, Shoot regeneration and micropropagation of *Panax vietnamensis* Ha et Grushv. from *ex vitro* leaf-derived callus, *African Journal of Biotechnology*, 10(84), pp. 19499-19504.

35. Nhut, D.T., Huy, N.P., Tai, N.T., Nam, N.B., Luan, V.Q., Hien, V.T., Tung, H.T., Vinh, B.T., Luan, T.C., 2015, Light-emitting diodes and their potential in callus growth, plantlet development and saponin accumulation during somatic embryogenesis of *Panax vietnamensis* Ha et Grushv, *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 29(2), pp. 299-308.

36. Diem, L.T., Phong, T.H., Tung, H.T., Khai, H.D., Anh, T.T.L., Mai, N.T.N., Luan, V.Q., Que, T., Phuong, H.T.N., Vinh, B.V.T., Nhut, D.T., 2022, Tetraploid induction through somatic embryogenesis in *Panax vietnamensis* Ha et Grushv. by colchicine treatment, *Scientia Horticulturae*, 303, 111254.

37. Dương Tấn Nhựt, Hoàng Xuân Chiến, Nguyễn Bá Trực, Nguyễn Bá Nam, Trần Xuân Tình, Vũ Quốc Luận, Nguyễn Văn Bình, Vũ Thị Hiền, Trịnh Thị Hương, Nguyễn Cửu Thành Nhân, 2010, Nhân giống vô tính cây sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.), *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 8, pp. 1211-1219.

38. Hien, V.T., Luan, V.Q., Huy, N.P., Nam, N.B., Du, T.X., Nhut, D.T., 2014, Direct somatic embryogenesis from leaf, petiole and rhizome explant of *Panax vietnamensis* Ha et Grushv, *Academia Journal of Biology*, 36(1se), pp. 277-282.

39. Truong, M., Ha, T.T.N., Loc, P.T., Duc, L.T., Tuan, T.T., Giap, D.D., Thach, B.D., Tri, P.D., Hung, N.D.M., Thanh, N.T., Ket, N.V., Luan, T.C., Ho, N.H., 2013, The study on *in vitro* culture of embryogenic callus and somatic embryo tissue of *Panax vietnamensis* Ha et Grushv., *Vietnam Journal of Biotechnology*, 35(3se), pp. 145-157.

40. Hien, V.T., Huy, N.P., Chien, H.X., Tung, H.T., Nam, N.B., Luan, V.Q., Nhut, D.T., 2016, Somatic embryogenesis from leaf transverse thin cell layer derived-callus of Vietnamese ginseng (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.), *Vietnam Journal of Biotechnology*, 14(1), pp. 63-73.

41. Nhut, D.T., Huy, N.P., Tung, H.T., Luan, V.Q., Nam, N.B., 2017, *Leds and their potential in somatic embryogenesis of Panax vietnamensis Ha et Grushv.*, in *Light Emitting Diodes for Agriculture*. Springer. p. 321-330.

42. Tran, Q.L., Adnyana, I.K., Tezuka, Y., Harimaya, Y., Saiki, I., Kurashige, Y., Tran, Q.K., Kadota, S., 2002, Hepatoprotective effect of majonoside R2, the major saponin from Vietnamese ginseng (*Panax vietnamensis*), *Planta Med*, 68(5), pp. 402-6.

43. Murashige, T., Skoog, F., 1962, A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures, *Physiologia Plantarum*, 15(3), pp. 473-497.

44. Nông Văn Duy, Trần Thái Vinh, Vũ Kim Công, Đặng Thị Thắm, H'Yon Nê Bing, Quách Văn Hợi, 2020, Nghiên cứu đa dạng tài nguyên thực vật ở khu vực Tây Nguyên, *Đa dạng Sinh học và Các chất có Hoạt tính Sinh học. Kỷ yếu Hội nghị Khoa học 45 năm Viện Hàn lâm KHCNVN*, pp. 13-23.

45. Lê Ngọc Triệu, 2017, *Nghiên cứu phân loại và đánh giá đa dạng di truyền quần thể sâm (Panax sp.) phân bố tự nhiên tại Lâm Đồng*. Luận án tiến sĩ nông nghiệp, Viện khoa học Nông nghiệp Việt Nam.

46. Thủ tướng Chính phủ, *Quyết định số 611/QĐ-TTg của Thủ tướng Chính phủ: Phê duyệt Chương trình phát triển Sâm Việt Nam đến năm 2030, định hướng đến năm 2045*. 2023.

47. Méndez-Hernández, H.A., Ledezma-Rodríguez, M., Avilez-Montalvo, R.N., Juárez-Gómez, Y.L., Skeete, A., Avilez-Montalvo, J., De-la-Peña, C., Loyola-Vargas, V.M., 2019, Signaling overview of plant somatic embryogenesis, *Frontiers in Plant Science*, 10, 77.

48. Woo, H.A., Ku, S.S., Jie, E.Y., Kim, H., Kim, H.S., Cho, H.S., Jeong, W.J., Park, S.U., Min, S.R., Kim, S.W., 2021, Efficient plant regeneration from embryogenic cell suspension cultures of *Euonymus alatus*, *Scientific Reports*, 11, 15120.

49. Bùi Văn Thế Vinh, Vũ Thị Thủy, Thái Thương Hiền, Đỗ Khắc Thịnh, Nhựt, D.T., 2014, Nghiên cứu hình thái giải phẫu và cấu trúc phôi trong quá trình phát sinh phôi vô tính sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha *et* Grushv.), *Tạp chí Khoa học và Phát triển* 12(7), pp. 1140-1148.

50. Kurczyńska, E.U., Gaj, M.D., Ujczak, A., Mazur, E., 2007, Histological analysis of direct somatic embryogenesis in Arabidopsis thaliana (L.) Heynh, *Planta*, 226, pp. 619-628.

51. Zavattieri, M.A., Frederico, A.M., Lima, M., Sabino, R., Arnholdt, S.B., 2010, Induction of somatic embryogenesis as an example of stress-related plant reactions, *Electronic Journal of Biotechnology*, 13(1), pp. 12-13.

52. Butenko, R., Brushwitzky, I., Slepyan, L., 1968, Organogenesis and somatic embryogenesis in the tissue culture of *Panax ginseng* CA Meyer, *Bot Zh*, 7, pp. 906-913.

53. Lee, J.W., Bang, K.H., Kim, D.H., Kim, J.U., Kim, Y.C., Jo, I.H., 2023, Embryogenesis and plant regeneration of *Panax ginseng* Meyer via anther culture and ploidy assessment using flow cytometry, *Journal of Plant Biotechnology*, 50(1), pp. 19-26.

54. Horstman, A., Bemer, M., Boutilier, K., 2017, A transcriptional view on somatic embryogenesis, *Regeneration (Oxf)*, 4(4), pp. 201-216.

55. Fehér, A., 2015, Somatic embryogenesis—stress-induced remodeling of plant cell fate, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1849(4), pp. 385-402.

56. Prakash, M.G., Gurumurthi, K., 2009, Effects of type of explant and age, plant growth regulators and medium strength on somatic embryogenesis and plant regeneration in *Eucalyptus camaldulensis*, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 100(1), pp. 13-20.

57. Singh, C., Raj, S.R., Patil, V., Jaiswal, P., Subhash, N., 2013, Plant regeneration from leaf explants of mature sandalwood (Santalum album L.) trees under *in vitro* conditions, *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 49, pp. 216-222.

58. Vũ Thị Hiền, 2018, *Nghiên cứu quá trình tái sinh và nhân giống in vitro cây sâm Ngọc Linh (Panax vietnamensis Ha et Grushv.) bằng kỹ thuật nuôi cấy lớp mỏng tế bào*. Luận án tiến sĩ nông nghiệp, Học viện Khoa học và Công nghệ.

59. Liang, H., Xiong, Y., Guo, B., Yan, H., Jian, S., Ren, H., Zhang, X., Li, Y., Zeng, S., Wu, K., 2020, Shoot organogenesis and somatic embryogenesis from leaf and root explants of *Scaevola sericea*, *Scientific Reports*, 10(1), pp. 1-11.

60. Lee, J.-W., Kim, J.-U., Bang, K.-H., Kwon, N., Kim, Y.-C., Jo, I.-H., Park, Y.-D., 2023, Efficient somatic embryogenesis, regeneration and acclimatization of Panax ginseng Meyer: True-to-type conformity of plantlets as confirmed by ISSR analysis, *Plants*, 12(6), pp. 1270.

61. Lee, J.W., Kwon, N., Kim, J.U., Bang, K.-H., Jung, S.M., Lee, S.W., Kim, D.H., Kim, Y.C., Jo, I.H., Park, Y.D., 2023, *In vitro* micropropagation of commercial ginseng cultivars (*Panax ginseng* Meyer) via somatic embryogenesis compared to traditional seed production, *Horticulturae*, 9(4), pp. 435.

62. Tang, L.P., Zhang, X.S., Su, Y.H., 2020, Regulation of cell reprogramming by auxin during somatic embryogenesis, *aBIOTECH*, 1(3), pp. 185-193.

63. Punja, Z.K., Feeney, M., Schluter, C., Tautorus, T., 2004, Multiplication and germination of somatic embryos of American ginseng derived from suspension cultures and biochemical and molecular analyses of plantlets, *In vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 40(3), pp. 329-338.

64. Gorpenchenko, T.Y., Kiselev, K.V., Bulgakov, V.P., Tchernoded, G.K., Bragina, E.A., Khodakovskaya, M.V., Koren, O.G., Batygina, T.B., Zhuravlev, Y.N., 2006, The *Agrobacterium rhizogenes* rolC-gene-induced somatic embryogenesis and shoot organogenesis in *Panax ginseng* transformed calluses, *Planta*, 223(3), pp. 457-67.

65. Zhou, S., Brown, D.C., 2006, High efficiency plant production of North American ginseng via somatic embryogenesis from cotyledon explants, *Plant Cell Reports*, 25(3), pp. 166-173.

66. Hovius, M.H.Y., Proctor, J.T.A., Saxena, P.K., 2007, Effects of date and growth regulators on the culture of immature zygotic embryos of north American ginseng, *Journal of Ginseng Research*, 31(1), pp. 14-22.

67. Zhao, S.J., Wang, J.H., Liang, Y.L., Xu, L.X., 2012, Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from hairy roots transformed by *Agrobacterium rhizogenes* in *Panax quiquefolium* L., *International Journal of Pharmaceutical and Bio-Medical Science*, 6, pp. 97-100.

68. Kharwanlang, L., Das, M.C., Kumaria, S., Tandon, P., 2016, High frequency somatic embryos induction from the rhizome explant of *Panax pseudoginseng* Wall. Using thin cell layer section, *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*, 7, pp. 31-34.

69. Shoyama, Y., Zhu, X.X., Nakai, R., Shiraishi, S., Kohda, H., 1997, Micropropagation of *Panax notoginseng* by somatic embryogenesis and RAPD analysis of regenerated plantlets, *Plant Cell Reports*, 16(7), pp. 450-453.

70. Zhou, S., Brown, D.C., 2007, *A highly efficient protocol for micropropagation of North American ginseng*, in *Biotechnology and Sustainable Agriculture 2006 and Beyond*. Springer. p. 425-428.

71. Liu, S., Zhong, J.J., 1998, Phosphate effect on production of ginseng saponin and polysaccharide by cell suspension cultures of *Panax ginseng* and *Panax notoginseng*, *Process Biochemistry*, 33, pp. 69-74.

72. Williams, E.G., Maheswaran, G., 1986, Somatic Embryogenesis: Factors Influencing Coordinated Behaviour of Cells as an Embryogenic Group, *Annals of Botany*, 57(4), pp. 443-462.

73. Tirajoh, A., Kyung, T., Punja, Z., 1998, Somatic embryogenesis and plantlet regeneration in American ginseng (*Panax quinquefolium* L..), *In vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 34, pp. 203–211.

74. Lê Hùng Lĩnh, Đinh Xuân Tú, 2017, Nghiên cứu quá trình tạo phôi vô tính từ mô sẹo trong nuôi cấy *in vitro* sâm Lai Châu (*Panax vietnamensis* var. *fuscidiscus*). *Tạp chí Khoa học Công nghệ Việt Nam*, 2(75), pp. 76-80.

75. Nguyễn Thị Ngọc Hương, Trần Hùng, Trương Thị Đẹp, 2018, Biến đổi hình thái trong phát sinh phôi soma thông qua nuôi cấy mô sẹo tam thất hoang (*Panax stipuleanatus* H.T.Tsai et K.M.Feng), *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 16(2), pp. 279-284.

76. Chiancone, B., Martorana, L., Gianguzzi, V., Germanà, M.A. *The effects of meta-Topolin and benzyladenine on in vitro organogenesis from epicotyl cuttings of Troyer citrange (Citrus sinensis [L.] Osbeck× Poncirus trifoliata [L.] Raf.)*. in *VI International Symposium on Production and Establishment of Micropropagated Plants 1155*. 2015.

77. Monticelli, S., Gentile, A., Frattarelli, A., Caboni, E. *Effects of the natural cytokinin meta-Topolin on in vitro shoot proliferation and acclimatization of Prunus spp*. in *VI International Symposium on Production and Establishment of Micropropagated Plants 1155*. 2015.

78. Esteves, P., Clermont, I., Marchand, S., Belzile, F., 2014, Improving the efficiency of isolated microspore culture in six-row spring barley: II-exploring novel growth regulators to maximize embryogenesis and reduce albinism, *Plant Cell Reports*, 33(6), pp. 871-879.

79. Khai, H.D., Vinh, N.Q., Dung, D.M., Dai Nghiep, N., Mai, N.T.N., Tung, H.T., Luan, V.Q., Nhut, D.T., 2021, Alterations in endogenous hormone levels and energy metabolism promoted the induction, differentiation and maturation of Begonia somatic embryos under clinorotation, *Plant Science*, 312, 111045.

80. Lincoln, T., Lincoln, T., Eduardo, Z., 2006, *Plant physiology*: Sinaur Associated, Incorporated Publishers.

81. Zan, N.M., 2019, *Phytohormonal effects on the regulation of stem elongation of pea (Pisum sativum) subjected to drying soil*: Lancaster University (United Kingdom).

82. Guo, H., Li, J., Ma, Y., Zhu, Z., Du, L., 2022, Somatic embryogenesis processes and changes in endogenous hormone content of Cinnamomum camphora L.

83. Igielski, R., Kępczyńska, E., 2017, Gene expression and metabolite profiling of gibberellin biosynthesis during induction of somatic embryogenesis in Medicago truncatula Gaertn, *PLoS One*, 12(7), pp. e0182055.

84. Liang, Y., Xu, X., Shen, H., Gao, M., Zhao, Y., Bai, X., 2022, Morphological and endogenous phytohormone changes during long-term embryogenic cultures in Korean pine, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 151(2), pp. 253-264.

85. Kępczyńska, E., Orłowska, A., 2021, Profiles of endogenous ABA, bioactive GAs, IAA and their metabolites in Medicago truncatula Gaertn. non-embryogenic and embryogenic tissues during induction phase in relation to somatic embryo formation, *Planta*, 253, pp. 1-13.

86. Grzyb, M., Kalandyk, A., Mikuła, A., 2017, Effect of TIBA, fluridone and salicylic acid on somatic embryogenesis and endogenous hormone and sugar contents in the tree fern Cyathea delgadii Sternb, *Acta Physiologiae Plantarum*, 40(1), pp. 1.

87. Wang, D., Guo, Y., Long, X., Pan, Y., Yang, D., Li, R., Lu, Y., Chen, Y., Shi, J., Chen, J., 2020, Exogenous spermidine promotes somatic embryogenesis of *Cunninghamia lanceolata* by altering the endogenous phytohormone content, *Phyton*, 89(1), pp. 27.

88. Pasternak, T.P., Prinsen, E., Ayaydin, F., Miskolczi, P., Potters, G., Asard, H., Van Onckelen, H.A., Dudits, D., Fehér, A., 2002, The role of auxin, pH, and stress in the activation of embryogenic cell division in leaf protoplast-derived cells of alfalfa, *Plant physiology*, 129(4), pp. 1807-1819.

89. Ruduś, I., Weiler, E.W., Kępczyńska, E., 2009, Do stress-related phytohormones, abscisic acid and jasmonic acid play a role in the regulation of Medicago sativa L. somatic embryogenesis?, *Plant Growth Regulation*, 59, pp. 159-169.

90. Wu, G., Wei, X., Wang, X., Wei, Y., 2021, Changes in biochemistry and histochemical characteristics during somatic embryogenesis in *Ormosia henryi* Prain, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 144, pp. 505-517.

91. Cui, K., Pei, X., Qin, L., Wang, J., Wang, Y., 1998, Effects of modulation of abscisic acid during somatic embryogenesis in Lycium barbarum L, *Shi yan Sheng wu xue bao*, 31(2), pp. 195-201.

92. Nakagawa, H., Saijyo, T., Yamauchi, N., Shigyo, M., Kako, S., Ito, A., 2001, Effects of sugars and abscisic acid on somatic embryogenesis from melon (Cucumis melo L.) expanded cotyledon, *Scientia Horticulturae*, 90(1-2), pp. 85-92.

93. Santos, M.A., Camara, T., Rodriguez, P., Claparols, I., Torn, J.M., 1996, Influence of exogenous proline on embryogenic and organogenic maize callus subjected to salt stress *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 47, pp. 59-65.

94. Đỗ Đăng Giáp, Nguyễn Thị Kim Loan, Trần Trọng Tuấn, Lê Thanh Tuấn, Huỳnh Lê Thiên Tứ, Thái Xuân Du, Nguyễn Đình Lâm, Dương Tấn Nhựt, 2013, Ảnh hưởng của một số acid amine và spemindine lên sự hình thành phôi vô tính cây cọc rào (*Jatropha curcas* L.), *Tạp chí sinh học*, 35(3), pp. 136-144.

95. Nhut, D.T., Vinh, B.V.T., Hien, T.T., Huy, N.P., Nam, N.B., Chien, H.X., 2012, Effects of spermidine, proline and carbohydrate sources on somatic embryogenesis from main root transverse thin cell layers of Vietnamese ginseng (*Panax vietnamensis* Ha et. Grushv.), *African Journal of Biotechnology* 11(5), pp. 1084-1091.

96. Biswas, M.K., Islam, R., Hossain, M., 2007, Somatic embryogenesis in strawberry (*Fragaria* sp.) through callus culture, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 90, pp. 49-54.

97. Martínez, M., San José, M.C., Vieitez, A., Cernadas, M.J., Ballester, A., Corredoira, E., 2017, Propagation of mature *Quercus ilex* L.(holm oak) trees by somatic embryogenesis, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 131, pp. 321-333.

98. Ageel, S., Elmeer, K., 2011, Effects of casein hydrolysates and glutamine on callus and somatic embryogenesis of date palm (*Phoenix dactylifera* L.), *New York Science Journal*, 4(7), pp. 121-125.

99. El-Shiaty, O.H., El-Sharabasy, S.F., Abd El-Kareim, A.H., 2004, Effect of some amino acids and biotin on callus and proliferation of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) Sewy cultivar, *Arab Journal Biotechnology*, 7, pp. 265-272.

100. Varisai Mohamed, S., Wang, C.S., Thiruvengadam, M., Jayabalan, N., 2004, *In vitro* plant regeneration via somatic embryogenesis through cell suspension cultures of horsegram [*Macrotyloma uniflorum* (Lam.) verdc.], *In vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 40(3), pp. 284-289.

101. El-Dawayati, M.M., Ghazzawy, H.S., Munir, M., 2018, Somatic embryogenesis enhancement of date palm cultivar Sewi using different types of polyamines and glutamine amino acid concentration under *in-vitro* solid and liquid media conditions, *International Journal of Biosciences*, 12(1), pp. 149-159.

102. Solanki, M., Sinha, A., Shukla, L.I., 2019, Optimization of *in vitro* culture media for improvement in yield of Navara ancient Indian medicinal rice, *Biotech*, 9, 270.

103. Kakkar, R., Nagar, P., Ahuja, P., Rai, V., 2000, Polyamines and plant morphogenesis, *Biologia Plantarum*, 43, pp. 1-11.

104. Silveira, V., Balbuena, T.S., Claudete, S.C., Floh, E.I.S., Guerra, M.P., Handro, W., 2004, Biochemical changes during seed development in *Pinus taeda* L, *Plant Growth Regulation*, 44(2), pp. 147-156.

105. Paschalidis, K.A., Roubelakis-Angelakis, K.A., 2005, Spatial and temporal distribution of polyamine levels and polyamine anabolism in different organs/tissues of the tobacco plant. Correlations with age, cell division/expansion, and differentiation, *Plant physiology*, 138(1), pp. 142-152.

106. 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 Regulation*, 31(3), pp. 209-214.

107. Monteiro, M., Kevers, C., Dommes, J., T., G., 2002, A specific role for spermidine in the initiation phase of somatic embryogenesis in *Panax ginseng* CA Meyer, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 68, pp. 225-232.

108. Sathish, D., Theboral, J., Vasudevan, V., Pavan, G., Ajithan, C., Appunu, C., Manickavasagam, M., 2019, Exogenous polyamines enhance somatic embryogenesis and *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation efficiency in sugarcane (*Saccharum* spp. hybrid), *In vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 56(1), pp. 29-40.

109. Sundararajan, S., Sivakumar, H.P., Nayeem, S., Rajendran, V., Subiramani, S., Ramalingam, S., 2020, Influence of exogenous polyamines on somatic embryogenesis and regeneration of fresh and long-term cultures of three elite indica rice cultivars, *Cereal Research Communications*, 49(2), pp. 245-253.

110. Rakesh, B., Sudheer, W., Nagella, P., 2021, Role of polyamines in plant tissue culture: An overview, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 145, pp. 487-506.

111. Rajesh, M., Radha, E., Sajin, K., Anitha, K., 2014, Polyamine-induced somatic embryogenesis and plantlet regeneration *in vitro* from plumular explants of dwarf cultivars of coconut (*Cocos nucifera*), *Indian Journal of Agricultural Sciences*, 84, pp. 527-530.

112. Fraguas, C., Villa, F., Lima, G., 2009, Evaluation of exogenous application of polyamines on callus growth of Mangaba tree (*Hancornia speciosa* Gomes), *Revista Brasileira de Fruticultura*, 31, pp. 1206 - 1210.

113. Dey, A., Hazra, A.K., Nongdam, P., Nandy, S., Tikendra, L., Mukherjee, A., Banerjee, S., Mukherjee, S., Pandey, D.K., 2019, Enhanced bacoside content in polyamine treated *in-vitro* raised *Bacopa monnieri* (L.) Wettst, *South African Journal of Botany*, 123, pp. 259-269.

114. Venkatachalam, V., Subramanyam, K., Elayaraja, D., Karthik, S., Vasudevan, A., Manickavasagam, M., 2017, Assessment of the efficacy of amino acids and polyamines on regeneration of watermelon (*Citrullus lanatus* Thunb.) and analysis of genetic fidelity of regenerated plants by SCoT and RAPD markers, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 130, pp. 1-7.

115. Sivanandhan, G., Mariashibu, T.S., Arun, M., Rajesh, M., Kasthurirengan, S., Selvaraj, N., Ganapathi, A., 2011, The effect of polyamines on the efficiency of multiplication and rooting of *Withania somnifera* (L.) Dunal and content of some withanolides in obtained plants, *Acta Physiologiae Plantarum*, 33, pp. 2279-2288.

116. Satish, L., Rency, A.S., Rathinapriya, P., Ceasar, S.A., Pandian, S., Rameshkumar, R., Rao, T.B., Balachandran, S., Ramesh, M., 2016, Influence of plant growth regulators and spermidine on somatic embryogenesis and plant regeneration in four Indian genotypes of finger millet (*Eleusine coracana* (L.) Gaertn), *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 124, pp. 15-31.

117. Arun, M., Subramanyam, K., Theboral, J., Ganapathi, A., Manickavasagam, M., 2014, Optimized shoot regeneration for Indian soybean: the influence of exogenous polyamines, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 117(2), pp. 305-309.

118. Yong, J.W., Ge, L., Ng, Y.F., Tan, S.N., 2009, The chemical composition and biological properties of coconut (*Cocos nucifera* L.) water, *Molecules*, 14(12), pp. 5144-5164.

119. Peixe, A., Raposo, A., Lourenço, R., Cardoso, H., Macedo, E., 2007, Coconut water and BAP successfully replaced zeatin in olive (*Olea europaea* L.) micropropagation, *Scientia Horticulturae*, 113(1), pp. 1-7.

120. Khierallah, H.S., Hussein, N.H., 2013, The role of coconut water and casein hydrolysate in somatic embryogenesis of date palm and genetic stability detection using RAPD markers *Research in Biotechnology*, 4(3), pp. 20-28.

121. Souza, R.A.V.d., Braga, F.T., Setotaw, T.A., Vieira Neto, J., Azevedo, P.H.d., Azevedo, V.H.d., Cançado, G.M.d.A., 2013, Effect of coconut water on growth of olive embryos cultured *in vitro*, *Ciência Rural*, 43(2), pp. 290-296.

122. Bertero, V.G., Beznec, A., Faccio, P., Auteri, M., Arteaga, M., Bonafede, M., Bossio, E., 2020, High-efficiency direct somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf base explants of "peperina" (*Minthostachys verticillata*), *In vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 56(6), pp. 915-919.

123. Lee, H.Y., Khorolragchaa, A., Sun, M.S., Kim, Y.J., Kim, Y.J., Kwon, W.S., Yang, D.C., 2013, Plant regeneration from anther culture of *Panax ginseng*, *Korean Journal of Plant Resources*, 26(3), pp. 383-388.

124. Huang, T., Gao, W.Y., Wang, J., Cao, Y., Zhao, Y., Huang, L., Liu, C., 2010, Selection and optimization of a high-producing tissue culture of *Panax ginseng* CA Meyer, *Acta Physiologiae Plantarum*, 32(4), pp. 765-772.

125. Park, J.J., Yoon, S.Y.H., Cho, H.Y., Son, S.Y., Rhee, H.S., Park, J.M., 2006, Patterns of protein expression upon adding sugar and elicitor to the cell culture of *Eschscholtzia californica*, *Plant cell, tissue and organ culture*, 86(2), pp. 257-269.

126. Zhang, Y.H., Zhong, J.J., 1997, Hyperproduction of ginseng saponin and polysaccharide by high density cultivation of *Panax notoginseng* cells, *Enzyme and microbial technology*, 21(1), pp. 59-63.

127. Ali, M., Abbasi, B.H., Ahmad, N., Ali, S.S., Ali, S., Ali, G.S., 2016, Sucrose-enhanced biosynthesis of medicinally important antioxidant secondary metabolites in cell suspension cultures of *Artemisia absinthium* L, *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 39(12), pp. 1945-1954.

128. Faisal, M., Abdel-Salam, E.M., Alatar, A.A., Qahtan, A.A., 2021, Induction of somatic embryogenesis in *Brassica juncea* L. and analysis of regenerants using ISSR-PCR and flow cytometer, *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(1), pp. 1147-1153.

129. Orłowska, A., Kępczyńska, E., 2020, Oxidative status in *Medicago truncatula* Gaertn. non-embryogenic and embryogenic tissues with particular reference to somatic embryogenesis, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 140, pp. 35-48.

130. Ighodaro, O., Akinloye, O., 2018, First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid, *Alexandria Journal of Medicine*, 54(4), pp. 287-293.

131. Jangra, A., Chaturvedi, S., Kumar, N., Singh, H., Sharma, V., Thakur, M., Tiwari, S., Chhokar, V., 2023, Polyamines: The Gleam of Next-Generation Plant Growth Regulators for Growth, Development, Stress Mitigation, and Hormonal Crosstalk in Plants—A Systematic Review, *Journal of Plant Growth Regulation*, 42(8), pp. 5167-5191.

132. Tyagi, A., Ali, S., Ramakrishna, G., Singh, A., Park, S., Mahmoudi, H., Bae, H., 2023, Revisiting the Role of Polyamines in Plant Growth and Abiotic Stress Resilience: Mechanisms, Crosstalk, and Future Perspectives, *Journal of Plant Growth Regulation*, 42(8), pp. 5074-5098.

133. Prudente, D.d.O., de Souza, L.B., Paiva, R., 2020, Plant somatic embryogenesis: Modulatory role of oxidative stress, *Proceedings of the National Academy of Sciences India Section B - Biological Sciences*, 90, pp. 483-487.

134. Ibáñez, S., Carneros, E., Testillano, P.S., Pérez-Pérez, J.M., 2020, Advances in plant regeneration: shake, rattle and roll, *Plants*, 9, 897.

135. Van, M.T.T., 1973, Direct flower neoformation from superficial tissue of small explants of *Nicotiana tabacum* L, *Planta*, 115, pp. 87-92.

136. Van, T.T.K., 2003, Thin cell layer concept. In: Nhut, D.T., Le, B.V., Van, T.T.K., Thorpe, T. (Eds.), Thin cell layer culture system Regeneration and transformation applications., *Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands*, , pp. 1-11.

137. Tung, H.T., Suong, P.T., Khai, H.D., Luan, V.Q., Cuong, D.M., Hien, V.T., Nam, N.B., Ngan, H.T.M., Phong, T.H., Nhut, D.T., 2022, Protocorm-like body formation, stem elongation, and enhanced growth of *Anthurium andraeanum* 'Tropical'plantlet on medium containing silver nanoparticles, *In vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 58(1), pp. 70-79.

138. Hanh, N.T.M., Tung, H.T., Khai, H.D., Cuong, D.M., Luan, V.Q., Mai, N.T.N., Anh, T.T.L., Le, B.V., Nhut, D.T., 2022, Efficient somatic embryogenesis and regeneration from leaf main vein and petiole of *Actinidia chinensis* Planch. via thin cell layer culture technology, *Scientia Horticulturae*, 298, 110986.

139. Nhut, D.T., Nga, L., Chien, H.X., Huy, N.P., 2012, Morphogenesis of *in vitro* main root transverse thin cell layers of Vietnamese ginseng (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.), *African Journal of Biotechnology* 11(23), pp. 6274-6289.

140. Sabooni, N., Shekafandeh, A., 2017, Somatic embryogenesis and plant regeneration of blackberry using the thin cell layer technique, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 130(2), pp. 313-321.

141. Lo, K.C., Gansau, J.A., Shih, C.H., Kao, C.Y., 2022, Shoot development through modified transverse thin cell layer (tTCL) culture of *Phalaenopsis* hybrid protocorms, *Horticulturae*, 8, 206.

142. Abdolinejad, R., Shekafandeh, A., Jowkar, A., Gharaghani, A., Alemzadeh, A., 2020, Indirect regeneration of Ficus carica by the TCL technique and genetic fidelity evaluation of the regenerated plants using flow cytometry and ISSR, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 143(1), pp. 131-144.

143. Ramírez-Mosqueda, M.A., Iglesias-Andreu, L.G., Armas-Silva, A.A., Cruz-Gutiérrez, E.J., de la Torre-Sánchez, J.F., Leyva-Ovalle, O.R., Galán-Páez, C.M., 2018, Effect of the thin cell layer technique in the induction of somatic embryos in *Pinus patula* Schl. et Cham, *Journal of Forestry Research*, 30(4), pp. 1535-1539.

144. Tung, H.T., Hieu, T., Phong, T.H., Khai, H.D., Hanh, N.T.M., Van, K., Nhut, D.T., 2022, *The Application of Thin Cell Layer Culture Technique in Plant Regeneration and Micropropagation: Latest Achievements*, in *Plant Tissue Culture: New Techniques and Application in Horticultural Species of Tropical Region*. Springer, Singapore. p. 231-257.

145. Teixeira da Silva, J.A., Dobránszki, J., 2013, Plant Thin Cell Layers: A 40-Year Celebration, *Journal of Plant Growth Regulation*, 32(4), pp. 922-943.

146. Bravo-Ruiz, I.N., González-Arnao, M.T., Castañeda-Castro, O., Pastelín-Solano, M.C., Cruz-Cruz, C.A., 2022, *Use of thin cell layer (TCL) to obtain somatic embryogenesis*, in *Somatic Embryogenesis: Methods and Protocols*. Springer. p. 183-201.

147. Teixeira da Silva, J.A., Dobránszki, J., 2014, Dissecting the concept of the thin cell layer: theoretical basis and practical application of the plant growth correction factor to apple, *Cymbidium* and *Chrysanthemum, Journal of Plant Growth Regulation*, 33(4), pp. 881-895.

148. Nhut, D.T., Teixeira da Silva, J.A., Thorpe, T., Van Le, B., Van, K.T.T., 2003, *Woody plant micropropagation and morphogenesis by thin cell layers*, in *Thin cell layer culture system: regeneration and transformation applications*. Springer. p. 473-493.

149. Campos-Boza, S., Vinas, M., Solorzano-Cascante, P., Holst, A., Steinmacher, D.A., Guerra, M.P., Jimenez, V.M., 2022, Somatic embryogenesis and plant regeneration from transverse thin cell layers of adult peach palm (*Bactris gasipaes*) lateral offshoots, *Frontiers in Plant Science*, 13, 995307.

150. Gomes, L.R.P., Franceschi, C.d.R.B., Ribas, L.L.F., 2015, Micropropagation of *Brasilidium forbesii* (Orchidaceae) through transverse and longitudinal thin cell layer culture, *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, 37(2), pp. 143-149.

151. Fiore, S., De Pasquale, F., Carimi, F., Sajeva, M., 2002, Effect of 2, 4-D and 4-CPPU on somatic embryogenesis from stigma and style transverse thin cell layers of Citrus, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 68, pp. 57-63.

152. Giacomolli Polesi, L., Pacheco de Freitas Fraga, H., Goeten, D., Panato Back, F., de Medeiros Oliveira, E., Steiner, N., Guerra, M.P., 2022, Morphohistological and biochemical features of the *Guadua chacoensis* (Bambusoideae; Poaceae) somatic embryogenesis, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 148(3), pp. 479-499.

153. Cristian, N.M.P., Anne, K.T.H.E., 2021, A novel genotype-independent technique for successful induction of somatic embryogenesis of adult plants of *Jatropha curcas* L. using petiole transverse Thin Cell Layer (TCL), *African Journal of Biotechnology* 20(2), pp. 85-91.

154. Ghahremani, R., Daylami, S.D., Mirmasoumi, M., Askari, N., Vahdati, K., 2021, Refining a protocol for somatic embryogenesis and plant regeneration of *Phalaenopsis amabilis* cv. Jinan from mature tissues, *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 45(3), pp. 356-364.

155. Malabadi, R.B., Van Staden, J., 2005, Somatic embryogenesis from vegetative shoot apices of mature trees of *Pinus patula*, *Tree Physiology*, 25(1), pp. 11-16.

156. Nongalleima, K.H., Dikash Singh, T.H., Amitabha, D., Deb, L., Sunitibala Devi, H., 2014, Optimization of surface sterilization protocol, induction of axillary shoots regeneration in *Zingiber zerumbet* (L.) Sm. as affected by season, *Biological Rhythm Research*, 45(2), pp. 317-324.

157. Duan, Y., Zhang, H., Sun, M., Zhao, F., Xue, T., Xue, J., 2019, Use of chlorine dioxide to sterilize medium for tissue culture of potato, *Scientific Reports*, 9, 10232.

158. World Health Organization. Regional Office for, E., 2000, *Air quality guidelines for Europe: second edition*. WHO Regional Publications, European Series, No. 91, Copenhagen: World Health Organization. Regional Office for Europe.

159. Steinitz, B., Barr, N., Tabib, Y., Vaknin, Y., Bernstein, N., 2010, Control of *in vitro* rooting and plant development in Corymbia maculata by silver nitrate, silver thiosulfate and thiosulfate ion, *Plant Cell Rep*, 29(11), pp. 1315-23.

160. Branislav, R.N., Krystofova, O., Nejdl, L., Adam, V., 2017, Nanoparticles based on essential metals and their phytotoxicity, *Journal of Nanobiotechnology*, 15(1), pp. 1-19.

161. Nguyễn Mạnh Cường, *Nghiên cứu tổng hợp nano bạc bằng phương pháp sinh học định hướng ứng dụng trong kiểm soát vi khuẩn gây nhiễm trùng bệnh viện*, in *Luận văn thạc sĩ sinh học ứng dụng. Trường Đại học Thái Nguyên*. 2019.

162. Hesami, M., Naderi, R., Tohidfar, M., 2019, Modeling and Optimizing *in vitro* Sterilization of Chrysanthemum via Multilayer Perceptron-Non-dominated Sorting Genetic Algorithm-II (MLP-NSGAII), *Frontiers in Plant Science*, 10, 282.

163. Tung, H.T., Thuong, T.T., Cuong, D.M., Luan, V.Q., Hien, V.T., Hieu, T., Nam, N.B., Phuong, H.T.N., Khai, H.D., Nhut, D.T., 2021, Silver nanoparticles improved explant disinfection, *in vitro* growth, runner formation and limited ethylene accumulation during micropropagation of strawberry (*Fragaria× ananassa*), *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 145(2), pp. 393-403.

164. Sharma, A., Kumar, V., Giridhar, P., Ravishankar, G.A., 2008, Induction of *in vitro* flowering in *Capsicum frutescens* under the influence of silver nitrate and cobalt chloride and pollen transformation, *Electronic Journal of Biotechnology*, 11(2), pp. 84-89.

165. Đỗ Mạnh Cường, Hoàng Thanh Tùng, Hoàng Đắc Khải, Vũ Quốc Luận, Vũ ThịHiền, Trương Thị Bích Phượng, Nhựt, D.T., 2020, Nâng cao tần suất phát sinh phôi vô tính cây sâm ngọc linh (*Panax vietnamensis* Ha *et* Grushv.) thông qua khử trùng mẫu cấy lá bằng nano bạc và bổ sung nano bạc trong môi trường nuôi cấy, *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 18(3), pp. 517-527.

166. Abdelkawy, A.M., Alshammari, S.O., Hussein, H.-A.A., Abou El-Enain, I.M.M., Abdelkhalek, E.S., Radwan, A.M., Kenawy, S.K.M., Maaty, D.A.M., Abed, N.N., Sabry, S., Mohsen, A., 2023, Effect of silver nanoparticles on tropane alkaloid production of transgenic hairy root cultures of *Hyoscyamus muticus* L. and their antimicrobial activity, *Scientific Reports*, 13, 10397.

167. Lala, S., 2021, Nanoparticles as elicitors and harvesters of economically important secondary metabolites in higher plants: A review, *IET nanobiotechnology*, 15(1), pp. 28-57.

168. Laha, S., Subrahmanyeswari, T., Verma, S.K., Kamble, S.N., Singh, S., Bhattacharyya, S., Gantait, S., 2023, Biogenic synthesis, characterization and application of silver nanoparticles as biostimulator for growth and rebaudioside-A production in genetically stable stevia (*Stevia rebaudiana* Bert.) under *in vitro* conditions, *Industrial Crops and Products*, 197, 116520.

169. Manokari, M., Raj, M.C., Dey, A., Faisal, M., Alatar, A.A., Joshee, N., Shekhawat, M.S., 2023, Silver nanoparticles improved morphogenesis, biochemical profile and micro-morphology of *Gaillardia pulchella* Foug cv. 'Torch Yellow', *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, pp. 1-13.

170. Aghdaei, M., Salehi, H., Sarmast, M.K., 2012, Effects of silver nanoparticles on *Tecomella undulata* (Roxb.) Seem. micropropagation, *Advances in Horticultural Science*, 26(1), pp. 21-24.

171. Do Manh Cuong, Trương Thị Bích Phượng, Dương Tấn Nhựt, 2018, Ảnh hưởng của nano bạc lên khả năng cảm ứng mô sẹo và tái sinh chồi từ mẫu lá cây dâu tây (*Fragaria x ananassa*) nuôi cấy *in vitro*, *Tạp chí Khoa học Đại học Huế: Khoa học Tựnhiên*, 127(1C), pp. 61-70.

172. Hà Thị Mỹ Ngân, 2021, *Nghiên cứu ảnh hưởng của nano kim loại lên việc khắc phục một số hiện tượng bất thường của cây trồng nuôi cấy in vitro*. Luận án tiến sĩ sinh học, Trường Đại học khoa học tự nhiên.

173. Landa, P., Cyrusova, T., Jerabkova, J., Drabek, O., Vanek, T., Podlipna, R., 2016, Effect of Metal Oxides on Plant Germination: Phytotoxicity of Nanoparticles, Bulk Materials, and Metal Ions, *Water, Air, & Soil Pollution*, 227(12), pp. 448.

174. Tripathi, D.K., Singh, S., Singh, S., Srivastava, P.K., Singh, V.P., Singh, S., Prasad, S.M., Singh, P.K., Dubey, N.K., Pandey, A.C., 2017, Nitric oxide alleviates silver nanoparticles (AgNps)-induced phytotoxicity in Pisum sativum seedlings, *Plant Physiology and Biochemistry*, 110, pp. 167-177.

175. Chau, N.H., Bang, L., Buu, N., Dung, T., Ha, H., Quang, D., 2008, Some results in manufacturing of nanosilver and investigation of its application for disinfection, *Advances in Natural Sciences*, 9(2), pp. 241-248.

176. Marklund, S., Marklund, G., 1974, Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide

dismutase, *European Journal of Molecular Biology and Biochemistry*, 47(3), pp. 469-474.

177. Goth, L., 1991, A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range, *Clinica Chimica Acta*, 196(2-3), pp. 143-151.

178. Nakano, Y., Asada, K., 1981, Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts, *Plant and Cell Physiology*, 22(5), pp. 867-880.

179. Schenk, R.U., Hildebrandt, A.C., 1972, Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures, *Canadian Journal of Botany*, 50(1), pp. 199-204.

180. Lloyd, G., McCown, B., 1980, Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture, *Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, Kalmia latifolia, by use of shoot-tip culture*, 30, pp. 421-427.

181. Gamborg, O.L., Miller, R.A., Ojima, K., 1968, Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells, *Experimental Cell Research*, 50(1), pp. 151-158.

182. Gui, F.J., Yang, X.W., Li, L.Y., Tian, J.M., 2007, Simultaneous enantiomer determination of 20 (R)-and 20 (S)-ginsenoside-Rg2 in rat plasma after intravenous administration using HPLC method, *The Journal of Chromatography B*, 850(1-2), pp. 1-6.

183. Peterson, R.L., Peterson, C.A., Melville, L.H., 2008, *Teaching plant anatomy through creative laboratory exercises*: NRC Research Press.

184. Duncan, D.B., 1955, Multiple range and multiple F tests, *biometrics*, 11(1), pp. 1-42.

185. Lazo-Javalera, M.F., Troncoso-Rojas, R., Tiznado-Hernandez, M.E., Martinez-Tellez, M.A., Vargas-Arispuro, I., Islas-Osuna, M.A., Rivera-Dominguez, M., 2016, Surface disinfection procedure and *in vitro* regeneration of grapevine (*Vitis vinifera* L.) axillary buds, *SpringerPlus*, 5(1), pp. 1-9.

186. Maiti, S., Krishnan, D., Barman, G., Ghosh, S.K., Laha, J.K., 2014, Antimicrobial activities of silver nanoparticles synthesized from *Lycopersicon*

esculentum extract, *Journal of Analytical Science and Technology*, 5(1), pp. 1-7.

187. Ngan, H.T.M., Cuong, D.M., Thanh, T.H., Nghiep, N.D., Nhut, D.T., 2020, The effect of cobalt and silver nanoparticles on overcoming leaf abscission and enhanced growth of rose (*Rosa hybrida* L.'Baby Love') plantlets cultured *in vitro*, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 141(2), pp. 393-405.

188. Tung, H.T., Bao, H.G., Cuong, D.M., Ngan, H.T.M., Hien, V.T., Luan, V.Q., Phuong, H.T.N., Nam, N.B., Trieu, L.N., Truong, N.K., 2021, Silver nanoparticles as the sterilant in large-scale micropropagation of chrysanthemum, *In vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 57(6), pp. 897-906.

189. Mo, V.T., Cuong, L.K., Tung, H.T., Huynh, T.V., Nghia, L.T., Khanh, C.M., Lam, N.N., Nhut, D.T., 2020, Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from the seaweed *Kappaphycus striatus*, *Acta Physiol Plant*, 42(7), pp. 1-11.

190. Tung, H.T., Nam, N.B., Huy, N.P., Luan, V.Q., Hien, V.T., Phuong, T.T.B., Le, D.T., Loc, N.H., Nhut, D.T., 2018, A system for large scale production of chrysanthemum using microponics with the supplement of silver nanoparticles under light-emitting diodes, *Scientia Horticulturae*, 232, pp. 153-161.

191. Tung, H.T., Van, H.T., Bao, H.G., Khai, H.D., Luan, V.Q., Phong, T.H., Nhut, D.T., 2021, Silver nanoparticles enhanced efficiency of explant surface disinfection and somatic embryogenesis in Begonia tuberous via thin cell layer culture, *Vietnam Journal of Biotechnology*, 19(2), pp. 337-347.

192. Dương Tấn Nhựt, Vũ Thị Hiền, Vũ Quốc Luận, Lê Thị Thu Hiền, Nguyễn Hoài Châu, Dương Bảo Trinh, Đỗ Mạnh Cường, Hoàng Thanh Tùng, Nguyễn Phúc Huy, 2018, Khảo sát nano bạc làm chất khử trùng mẫu mới trong nhân giống vô tính cây African violet (*Saintpaulia ionantha* H. Wendl.), *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 16(1), pp. 87-97.

193. Đồng Huy Giới, Bùi Thị Thu Hương, 2019, Nghiên cứu sử dụng nano bạc trong nhân giống *in vitro* lan hồ điệp vàng (*Phalaenopsis* sp.), *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Lâm nghiệp* 1, pp. 19-24.

194. Bùi Thị Thanh Phương, Nguyễn Phương Lan, Đỗ Thị Kim Trang, Trần Bảo Trâm, Phan Xuân Bình Minh, 2020, Ảnh hưởng của nano bạc đến khả năng

nhân giống *in vitro* cây Trầu tiên (*Asarum glabrum* Merr.), *Tạp chí Khoa học Công nghệ Việt Nam*, 62(6), pp. 10-23.

195. Tripathi, D.K., Singh, S., Singh, V.P., Prasad, S.M., Dubey, N.K., Chauhan, D.K., 2017, Silicon nanoparticles more effectively alleviated UV-B stress than silicon in wheat (*Triticum aestivum*) seedlings, *Plant Physiology and Biochemistry*, 110, pp. 70-81.

196. Syu, Y.Y., Hung, J.H., Chen, J.C., Chuang, H.W., 2014, Impacts of size and shape of silver nanoparticles on Arabidopsis plant growth and gene expression, *Plant Physiology and Biochemistry*, 83, pp. 57-64.

197. Thân Thị Minh Phương, 2011, Khảo sát ảnh hưởng của một số chất điều hòa sinh trưởng thực vật và một số chất hữu cơ trong nuôi cấy *in vitro* sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.), *Khóa luận tốt nghiệp. Đại học Nông Lâm thành phố Hồ Chí Minh*.

198. Thu, H.T.M., Naing, A.H., Jeong, H.Y., Kim, C.K., 2020, Regeneration of genetically stable plants from *in vitro* vitrified leaves of different carnation cultivars, *Plants*, 9, 950.

199. Hieu, T., Phong, T.H., Khai, H.D., Mai, N.T.N., Cuong, D.M., Luan, V.Q., Tung, H.T., Nam, N.B., Tan Nhut, D., 2022, Efficient production of vigorous passion fruit rootstock for *in vitro* grafting, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 148(3), pp. 635-648.

200. Ahn, I.O., Van Le, B., Gendy, C., Tran Than Van, K., 1996, Direct somatic embryogenesis through thin cell layer culture in *Panax ginseng*, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 45(3), pp. 237-243.

201. Meijer, E., De Vries, S., Mordhorst, A., 1999, Co-culture with *Daucus carota* somatic embryos reveals high 2, 4-D uptake and release rates of *Arabidopsis thaliana* cultured cells, *Plant Cell Reports*, 18(7), pp. 656-663.

202. Choi, K.T., 1988, *Panax ginseng C. A. Meyer: Micropropagation and the in vitro production of saponins*, in *Medicinal and Aromatic Plants I*, Y.P.S. Bajaj, Editor. Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 484-500.

203. Lei, X., Wang, Q., Yang, H., Qi, Y., Hao, X., Wang, Y., 2021, Vitrification and proteomic analysis of embryogenic callus of *Panax ginseng* CA Meyer, *In vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 57(1), pp. 118-127.

204. Zhao, Y., Guo, W.H., Sun, X.Y., Li, K.H., Liu, K.J., Wang, J., Wang, Y., Tan, X., You, X.L., 2020, A culture system for the stable and high-efficiency proliferation of adventitious roots of *Panax notoginseng* and ginsenoside accumulation, *Industrial Crops and Products*, 157, 112882.

205. Qiu, X.M., Sun, Y.Y., Ye, X.Y., Li, Z.G., 2020, Signaling role of glutamate in plants, *Frontiers in Plant Science*, 10, 1743.

206. Rai, M.K., Jaiswal, V., Jaiswal, U., 2009, Effect of selected amino acids and polyethylene glycol on maturation and germination of somatic embryos of guava (*Psidium guajava* L.), *Scientia Horticulturae*, 121(2), pp. 233-236.

207. Rahmouni, S., El Ansari, Z.N., Badoc, A., Martin, P., El Kbiach, M.L.B., Lamarti, A., 2020, Effect of amino acids on secondary somatic embryogenesis of Moroccan cork oak (*Quercus suber* L.) tree, *American Journal of Plant Sciences*, 11(5), pp. 626-641.

208. Nandhakumar, N., Kumar, K., Sudhakar, D., Soorianathasundaram, K., 2018, Plant regeneration, developmental pattern and genetic fidelity of somatic embryogenesis derived *Musa* spp, *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 16(2), pp. 587-598.

209. Rathore, J.S., Rai, M.K., Shekhawat, N., 2012, Induction of somatic embryogenesis in gum arabic tree [*Acacia senegal* (L.) Willd.], *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 18, pp. 387-392.

210. Pintos, B., Manzanera, J.A., Bueno, M.A., 2010, Oak somatic and gametic embryos maturation is affected by charcoal and specific aminoacids mixture, *Annals of Forest Science*, 67(2), pp. 205. DOI: 10.1051/forest/2009098.

211. Pawar, B., Kale, P., Bahurupe, J., Jadhav, A., Kale, A., Pawar, S., 2015, Proline and glutamine improve *in vitro* callus induction and subsequent shooting in rice, *Rice Science*, 22(6), pp. 283-289.

212. Dijkema, C., de Vries, S.C., Booij, H., Schaafsma, T.J., van Kammen, A., 1988, Substrate Utilization by Suspension Cultures and Somatic Embryos of Daucus carota L. Measured by 13C NMR, *Plant Physiology*, 88(4), pp. 1332-1337.

213. Szabados, L., Savouré, A., 2010, Proline: a multifunctional amino acid, *Trends in Plant Science*, 15(2), pp. 89-97.

214. Ehsani Moghaddam, B., Mesbah, M., Yavari, N., 2000, The effect of in planta TIBA and proline treatment on somatic embryogenesis of sugar beet (*Beta vulgaris* L.), *Euphytica*, 112(2), pp. 151-156.

215. Podwyszyńska, M., Marasek Ciolakowska, A., 2020, Micropropagation of tulip via somatic embryogenesis, *Agronomy*, 10, 1857.

216. Gerdakaneh, M., Mozafari, A.-A., sioseh-mardah, A., Sarabi, B., 2011, Effects of different amino acids on somatic embryogenesis of strawberry (*Fragaria× ananassa* Duch.), *Acta Physiologiae Plantarum*, 33, pp. 1847-1852.

217. Mattoo, A., Fatima, T., Upadhyay, R., Handa, A., 2015, *Polyamines in plants: biosynthesis from arginine, and metabolic, physiological and stress-response roles*, in *Amino acids in higher plants*. CAB International Wallingford UK. p. 177-194.

218. Takeda, T., Hayakawa, F., Oe, K., Matsuoka, H., 2002, Effects of exogenous polyamines on embryogenic carrot cells, *Biochemical Engineering Journal*, 12(1), pp. 21-28.

219. Kadioglu, A., Turgut, R., Palavan-Ünsal, N., Saruhan, N., 2002, Effect of polyamines on leaf rolling during drought stress in *Ctenanthe setosa* (Rosc.) Eichler, *Israel Journal of Plant Sciences*, 50(1), pp. 19-23.

220. Elbl, P., Lira, B.S., Andrade, S.C.S., Jo, L., dos Santos, A.L.W., Coutinho, L.L., Floh, E.I.S., Rossi, M., 2015, Comparative transcriptome analysis of early somatic embryo formation and seed development in Brazilian pine, *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 120, pp. 903-915.

221. Krishnan, S.R.S., Siril, E.A., 2017, Auxin and nutritional stress coupled somatic embryogenesis in Oldenlandia umbellata L, *Physiol Mol Biol Plants*, 23(2), pp. 471-475.

222. Grzyb, M., Mikuła, A., 2019, Explant type and stress treatment determine the uni- and multicellular origin of somatic embryos in the tree fern Cyathea delgadii Sternb, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 136(2), pp. 221-230.

223. Mansoor, S., Ali Wani, O., Lone, J.K., Manhas, S., Kour, N., Alam, P., Ahmad, A., Ahmad, P., 2022, Reactive Oxygen Species in Plants: From Source to Sink, *Antioxidants*, 11(2), pp. 225.

224. Nguyễn Văn Mã, 2015, *Sinh lý chống chịu điều kiện môi trường bất lợi của thực vật*. Nhà xuất bản Đại học Quốc gia Hà Nội.

225. Fortunato, S., Nigro, D., Lasorella, C., Marcotuli, I., Gadaleta, A., de Pinto, M.C., 2023, The Role of Glutamine Synthetase (GS) and Glutamate Synthase (GOGAT) in the Improvement of Nitrogen Use Efficiency in Cereals, *Biomolecules*, 13(12).

226. Forchhammer, K., 2007, Glutamine signalling in bacteria, *Front Biosci*, 12, pp. 358-70.

227. Kan, C.C., Chung, T.Y., Juo, Y.A., Hsieh, M.H., 2015, Glutamine rapidly induces the expression of key transcription factor genes involved in nitrogen and stress responses in rice roots, *BMC Genomics*, 16(1), pp. 731.

228. Ji, Y. *The role of cytosolic glutamine synthetases in abiotic stress and development in Arabidopsis thaliana*. in *Master Thesis. University of Saskatchewan Saskatoon*. 2011.

229. Matysik, J., Alia, A., Bhalu, B., Mohanty, P., 2002, Molecular mechanism of quenching of reactive oxygen species by proline under stress in plants, *Current Science*, 82.

230. Cruz de Carvalho, M.H., 2008, Drought stress and reactive oxygen species: Production, scavenging and signaling, *Plant Signal Behav*, 3(3), pp. 156-65.

231. Medeiros, M., Silva, M., Granja, M., Silva-Junior, G., Camara, T., Willadino, L., 2014, Effect of exogenous proline in two sugarcane genotypes grown *in vitro* under salt stress, *Acta Biológica Colombiana*, 20.

232. Kibria, M., farzana, K., Matin, M., Hoque, M., 2016, Mitigating water stress in wheat (BARI Gom-26) by exogenous application of proline, *Fundamental and Applied Agriculture*, 1, pp. 118-123.

233. Mandal, C., Ghosh, N., Maiti, S., Das, K., Gupta, S., Dey, N., Adak, M., 2013, Antioxidative responses of Salvinia (*Salvinia natans* Linn.) to aluminium stress and it's modulation by polyamine, *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 19, pp. 91-103.

234. Zhong, M., Song, R., Wang, Y., Shu, S., Sun, J., Guo, S., 2020, TGase regulates salt stress tolerance through enhancing bound polyamines-mediated antioxidant enzymes activity in tomato, *Environmental and Experimental Botany*, 179, 104191.

235. Loyola-Vargas, V.M., Ochoa-Alejo, N., 2016, *Somatic Embryogenesis. An Overview*, in *Somatic embryogenesis. An overview in Somatic Embryogenesis: Fundamental Aspects and Applications*, V.M. Loyola-Vargas and N. Ochoa-Alejo, Editors. Springer International Publishing: Cham. p. 1-8.

236. Nic-Can, G.I., Loyola-Vargas, V.M., 2016, *The Role of the Auxins During Somatic Embryogenesis*, in *Somatic Embryogenesis: Fundamental Aspects and Applications*, V.M. Loyola-Vargas and N. Ochoa-Alejo, Editors. Springer International Publishing: Cham. p. 171-182.

237. Richard, C., Lescot, M., Inzé, D., De Veylder, L., 2002, Effect of auxin, cytokinin, and sucrose on cell cycle gene expression in Arabidopsis thaliana cell suspension cultures, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 69, pp. 167-176.

238. Ayil-Gutiérrez, B., Galaz-Ávalos, R.M., Peña-Cabrera, E., Loyola-Vargas, V.M., 2013, Dynamics of the concentration of IAA and some of its conjugates during the induction of somatic embryogenesis in Coffea canephora, *Plant Signaling & Behavior*, 8(11), pp. e26998.

239. Sun, Q., Zhang, N., Wang, J., Cao, Y., Li, X., Zhang, H., Zhang, L., Tan, D.X., Guo, Y.D., 2016, A label-free differential proteomics analysis reveals the effect of melatonin on promoting fruit ripening and anthocyanin accumulation upon postharvest in tomato, *Journal of Pineal Research*, 61(2), pp. 138-153.

240. Zhao, Y., Qi, L.W., Wang, W.M., Saxena, P.K., Liu, C.Z., 2011, Melatonin improves the survival of cryopreserved callus of Rhodiola crenulata, *Journal of Pineal Research*, 50(1), pp. 83-88.

241. Giridhar, A.R.P., Ravishankar, G., 2009, Indoleamines and calcium channels influence morphogenesis in *in vitro* cultures of Mimosa pudica L, *Plant signaling & behavior*, 4(12), pp. 1136-1141.

242. Ramakrishna, A., Giridhar, P., Sankar, K.U., Ravishankar, G.A., 2012, Endogenous profiles of indoleamines: serotonin and melatonin in different tissues of Coffea canephora P ex Fr. as analyzed by HPLC and LC-MS-ESI, *Acta Physiologiae Plantarum*, 34, pp. 393-396.

243. Bezİrganoglu, İ., 2021, Promoting effects of melatonin supplements on the embryogenic callus maintainance in alfalfa (Medicago sativa L.), *Journal of the Institute of Science and Technology*, 11(2), pp. 927-932.

244. Saharan, V., Yadav, R., Yadav, N., Wiesman, Z., 2011, Somatic embryogenesis and plant regeneration of Balanites aegyptiaca Del (L.): an industrial important arid tree, *Journal of Cell and Tissue Research*, 11(1), pp. 2529.

245. Saeed, T., Shahzad, A., 2015, High frequency plant regeneration in Indian Siris via cyclic somatic embryogenesis with biochemical, histological and SEM investigations, *Industrial Crops and Products*, 76, pp. 623-637.

246. Solórzano-Cascante, P., Sánchez-Chiang, N., Jiménez, V.M., 2018, Explant type, culture system, 6-benzyladenine, meta-topolin and encapsulation affect indirect somatic embryogenesis and regeneration in Carica papaya L, *Frontiers in Plant Science*, 9, pp. 419213.

247. Ruduś, I., Kępczyńska, E., Kępczyński, J., 2002, Regulation of Medicago sativa L. somatic embryogenesis by gibberellins, *Plant growth regulation*, 36, pp. 91-95.

248. Jiménez, V.c.M., Bangerth, F., 2001, Hormonal status of maize initial explants and of the embryogenic and non-embryogenic callus cultures derived from them as related to morphogenesis *in vitro*, *Plant science*, 160(2), pp. 247-257.

249. Thi, L.T., Pleschka, E., 2005, Somatic embryogenesis of some Daucus species influenced by ABA.

250. Su, Y.H., Su, Y.X., Liu, Y.G., Zhang, X.S., 2013, Abscisic acid is required for somatic embryo initiation through mediating spatial auxin response in Arabidopsis, *Plant Growth Regulation*, 69, pp. 167-176.

251. Stasolla, C., Yeung, E.C., 2003, Recent advances in conifer somatic embryogenesis: improving somatic embryo quality, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 74, pp. 15-35.

252. Kępczyńska, E., Zielińska, S., 2011, Disturbance of ethylene biosynthesis and perception during somatic embryogenesis in Medicago sativa L. reduces embryos' ability to regenerate, *Acta Physiologiae Plantarum*, 33, pp. 1969-1980.

253. Kępczyńska, E., Kępczyński, J., 2023, Hormonal regulation of somatic embryogenesis in Medicago spp, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 155(3), pp. 613-625.

254. Roustan, J., Latche, A., Fallot, J., 1989, Effect of salicylic acid and acetylsalicylic acid on ethylene production and somatic embryogenesis in carrot (Daucus carota L.) cell suspensions.

255. Rao, M.V., Paliyath, G., Ormrod, D.P., Murr, D.P., Watkins, C.B., 1997, Influence of salicylic acid on H_2O_2 production, oxidative stress, and H_2O_2-metabolizing enzymes (salicylic acid-mediated oxidative damage requires H_2O_2), *Plant Physiology*, 115(1), pp. 137-149.

256. Bezirganoglu, İ., Yazıcılar, B., 2023, Salicylic acid improves somatic embryogenesis system in triticale using mature embryos, *Eurasian Journal of Molecular and Biochemical Sciences*, 2(1), pp. 14-18.

257. Quiroz-Figueroa, F., Méndez-Zeel, M., Larqué-Saavedra, A., Loyola-Vargas, V., 2001, Picomolar concentrations of salicylates induce cellular growth and enhance somatic embryogenesis in Coffea arabica tissue culture, *Plant Cell Reports*, 20, pp. 679-684.

258. Luo, J.P., Jiang, S.T., Pan, L.J., 2001, Enhanced somatic embryogenesis by salicylic acid of *Astragalus adsurgens* Pall.: relationship with H_2O_2 production and H_2O_2-metabolizing enzyme activities, *Plant Science*, 161(1), pp. 125-132.

259. Hao, L., Zhou, L., Xu, X., Cao, J., Xi, T., 2006, The role of salicylic acid and carrot embryogenic callus extracts in somatic embryogenesis of naked oat (Avena nuda), *Plant cell, tissue and organ culture*, 85, pp. 109-113.

260. Elhiti, M., Stasolla, C., Wang, A., 2013, Molecular regulation of plant somatic embryogenesis, *In vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 49, pp. 631-642.

261. Trần Thanh Hương, 2011, *Phân tích các biến đổi hình thái học và sinh lý học trong các quá trình phát sinh cơ quan và phôi thể hệ ở một số giống chuối (Musa sp.)*. Luận án thạc sĩ Sinh lý thực vật, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí MInh.

262. Zheng, Q., Zheng, Y., Perry, S.E., 2013, Decreased GmAGL15 expression and reduced ethylene synthesis may contribute to reduced somatic embryogenesis in a poorly embryogenic cultivar of Glycine max, *Plant Signaling and Behavior*, 8, e25422.

263. Wu, G.Y., Wei, X.L., Wang, X., Wei, Y., 2020, Induction of somatic embryogenesis in different explants from *Ormosia henryi* Prain, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 142(2), pp. 229-240.

264. Chen, G.Z., Jing, L.Y., Li, K.L., Cheng, N.L., De, A.X., Cheng, H., Li, 2011, Research progress in somatic embryogenesis of Siberian ginseng (*Eleutherococcus senticosus* Maxim.), *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(33), pp. 7140-7145.

265. Mazri, M.A., Naciri, R., Belkoura, I., 2020, Maturation and conversion of somatic embryos derived from seeds of olive (*Olea europaea* L.) cv. Dahbia: occurrence of secondary embryogenesis and adventitious bud formation, *Plants*, 9, 1489.

266. Guillou, C., Fillodeau, A., Brulard, E., Breton, D., De Faria Maraschin, S., Verdier, D., Simon, M., Ducos, J.P., 2018, Indirect somatic embryogenesis of *Theobroma cacao* L. in liquid medium and improvement of embryo-to-plantlet conversion rate, *In vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 54(4), pp. 377-391.

267. Fadel, D., Kintzios, S., Economou, A.S., Moschopoulou, G., Constantinidou, H.I.A., 2010, Effect of different strength of medium on organogenesis, phenolic accumulation and antioxidant activity of spearmint (*Mentha spicata* L.), *The Open Horticulture Journal*, 3, pp. 31-35.

268. Wang, G., Xu, C., Yan, S., Xu, B., 2019, An efficient somatic embryo liquid culture system for potential use in large-scale and synchronic production of *Anthurium andraeanum* seedlings, *Frontiers in Plant Science*, 10, 29.

269. Lee, J.W., Kwon, N., Kim, J.U., Bang, K.H., Jung, S.M., Lee, S.W., Kim, D.H., Kim, Y.C., Jo, I.H., Park, Y.D., 2023, *In vitro* micropropagation of commercial ginseng cultivars (*Panax ginseng* meyer) via somatic embryogenesis compared to traditional seed production, *Horticulturae*, 9, 435.

270. Hazubska-Przybyl, T., Bojarczuk, K., 2008, Somatic embryogenesis of selected spruce species [*Picea abies*, *P. omorika*, *P. pungens*' Glauca'and P. breweriana], *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 77(3), pp. 189-199.

271. Montalbán, I., De Diego, N., Moncaleán, P., 2012, Enhancing initiation and proliferation in radiata pine (*Pinus radiata* D. Don) somatic embryogenesis

through seed family screening, zygotic embryo staging and media adjustments, *Acta Physiologiae Plantarum*, 34, pp. 451-460.

272. Hazubska-Przybył, T., Kalemba, E.M., Ratajczak, E., Bojarczuk, K., 2016, Effects of abscisic acid and an osmoticum on the maturation, starch accumulation and germination of *Picea* spp. somatic embryos, *Acta Physiologiae Plantarum*, 38, pp. 1-14.

273. Blanc, G., Lardet, L., Martin, A., Jacob, J.L., Carron, M.P., 2002, Differential carbohydrate metabolism conducts morphogenesis in embryogenic callus of *Hevea brasiliensis* (Mull. Arg.), *Journal of Experimental Botany*, 53(373), pp. 1453-1462.

274. Du, Y., Cheng, F., Zhong, Y., 2020, Induction of direct somatic embryogenesis and shoot organogenesis and histological study in tree peony (*Paeonia sect*. Moutan), *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 141, pp. 557-570.

275. Woo, H.A., Ku, S.S., Jie, E.Y., Kim, H., Kim, H.-S., Cho, H.S., Jeong, W.J., Park, S.U., Min, S.R., Kim, S.W., 2021, Efficient plant regeneration from embryogenic cell suspension cultures of *Euonymus alatus*, *Scientific Reports*, 11(1), pp. 15120.

276. Etienne, H., Bertrand, B., Georget, F., Lartaud, M., Montes, F., Dechamp, E., Verdeil, J.-L., Barry-Etienne, D., 2013, Development of coffee somatic and zygotic embryos to plants differs in the morphological, histochemical and hydration aspects, *Tree Physiology*, 33(6), pp. 640-653.

277. Lukose, R.M., 2013, The chemical composition of tender coconut (*Cocos nucifera* L.) water and coconut meat and their biological effect in human body, *International Journal of Green and Herbal Chemistry*, 2(3), pp. 723-729.

278. Farhatullah, F., Abbas, Z., Abbas, S., 2007, *In vitro* effects of gibberellic acid on morphogenesis of potato explant, *International Journal of Agriculture and Biology* 9, pp. 181-182.

279. Jiménez, V.M., 2001, Regulation of *in vitro* somatic embryogenesis with emphasis on to the role of endogenous hormones, *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 13, pp. 196-223.

280. Al-Khayri, J., 2010, Somatic embryogenesis of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) improved by coconut water, *Biotechnology*, 9(4), pp. 477-484.

281. Bhattacharya, S., Bandopadhyay, T., Ghosh, P., 2010, Somatic embryogenesis in *Cymbopogon pendulus* and evaluation of clonal fidelity of regenerants using ISSR marker, *Scientia Horticulturae*, 123(4), pp. 505-513.

282. Krug, M.G.Z., Stipp, L.C.L., Rodriguez, A.P.M., Mendes, B.M.J., 2005, *In vitro* organogenesis in watermelon cotyledons, *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 40, pp. 861-865.

283. Tô Thị Nhã Trầm, Trương Phi Yến, Tôn Trang Ánh, Hoàng Thanh Tùng, Hà Thị Mỹ Ngân, Dương Tấn Nhựt, 2020, Phát sinh phôi soma cây Đinh lăng lá xẻ nhỏ (*Polyscias fruticosa* L. Harms) thông qua nuôi cấy mẫu lá *ex vitro*, *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 18(3), pp. 497-506.

284. Hoàng Xuân Chiến, Ngô Thanh Tài, Nguyễn Bá Trực, Trần Xuân Tình, 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), pp. 317-331.

285. Faizal, A., Geelen, D., 2013, Saponins and their role in biological processes in plants, *Phytochemistry reviews*, 12, pp. 877-893.

286. Nguyễn Thị Nhật Linh, Nguyễn Hoàng Lộc, Dương Tấn Nhựt, 2018, Ứng dụng elicitor vào sản xuất saponin trong nuôi cấy *in vitro* các loài thuộc chi Nhân sâm, *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 16(2), pp. 211-221.

287. Zhang, K., Wang, X., Ding, L., Li, J., Qu, C.L., Chen, L.G., Jin, H.Y., Zhang, H.Q., 2008, Determination of seven major ginsenosides in different parts of *Panax quinquefolius* L.(American Ginseng) with different ages, *Chemical Research in Chinese Universities*, 24(6), pp. 707-711.

288. Le, T.H., Lee, G.J., Vu, H.K., Kwon, S.W., Nguyen, N.K., Park, J.H., Nguyen, M.D., 2015, Ginseng saponins in different parts of *Panax vietnamensis*, *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 63(11), pp. 950-954.

289. Sarmast, M., Niazi, A., Salehi, H., Abolimoghadam, A., 2015, Silver nanoparticles affect ACS expression in *Tecomella undulata in vitro* culture, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 121, pp. 227-236.

290. Tung, H.T., Nguyen, P.L.H., Van Lich, T., Ngan, H.T.M., Luan, V.Q., Khai, H.D., Mai, N.T.N., Vinh, B.V.T., Nhut, D.T., 2022, Enhanced shoot and plantlet quality of Gerbera (*Gerbera jamesonii* Revolution Yellow) cultivar on

medium containing silver and cobalt nanoparticles, *Scientia Horticulturae*, 306, 111445.