

ỨNG DỤNG HỆ THỐNG NGẬP CHÌM TAM THỜI TRONG NHÂN GIỐNG SÂM NGỌC LINH (*Panax vietnamense* Ha et Grushv.)

Nguyễn Phúc Quân¹, Vũ Đức Thanh¹,

Nguyễn Minh Lý², Đinh Xuân Tú¹

TÓM TẮT

TIS (Temporary Immersion System) là hệ thống nuôi cấy bản ngập chìm giúp tăng hiệu quả nhân phôi, này mầm phôi và kéo dài thời gian của cây sâm Ngọc Linh trong vi nhân giống do khả năng cung cấp hợp lý nhu cầu dinh dưỡng và oxy cho cây, tác dụng của dòng khí và dòng chảy môi trường còn giúp tăng sự thích nghi và phân hóa cho sâ. Điều chỉnh thời gian và tần suất bơm môi trường giúp tăng sinh khối tươi, giảm tỉ lệ thủy tinh. Phôi soma được nhân nhanh trên môi trường 1/2 SH lỏng có chứa 1,0 mg/l NAA + 0,5 mg/l BA + 30 g sucrose. Với chế độ ngâm 3 phút cứ sau mỗi 4 giờ trong TIS. Tỷ lệ này mầm cao nhất của phôi soma là 87,22% trên môi trường 1/2 SH lỏng có bổ sung 5 mg/l GA₃. Nồng độ sucrose cao (40%) kích thích sự phát triển cây *in vitro* có củ bi trong thiết lập ngâm 3 phút tần suất 6 giờ trong TIS. Các cây con có củ nhỏ phát triển thành cây hoàn chỉnh trên môi trường 1/2 SH được bổ sung 1 mg/l NAA + 0,5 mg/l BA + 40% sucrose + 7,5 g/l agar.

Từ khóa: Ngập chìm tam thời, sâm Ngọc Linh, TIS, vi nhân giống.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Ngập chìm tam thời có tác dụng tích cực trên tất cả các giai đoạn của thực vật. Tăng trưởng và phát triển cao hơn so với phương pháp nhân giống thông thường. Cây vô tính và phôi soma có chất lượng tốt hơn. Cây vô tính có tỉ lệ sống và thích nghi cao hơn khi đưa ra vườn ươm. Ngoài việc được sử dụng để nhân giống cây trồng, ngập chìm tam thời còn là một công cụ hữu ích để nghiên cứu quá trình trao đổi chất của cây. Sự phát triển của TIS có liên quan chặt chẽ với việc thương mại hóa các sản phẩm vi nhân giống (Georgiev, 2014).

TIS tỏ ra đặc biệt có hiệu quả với các loài trong họ Araliaceae (Shohael, 2005) nuôi callus có khả năng sinh phôi của *Eleutherococcus sessiliflorus* ngập chìm 4 lần mỗi ngày, mỗi lần 30 phút để phôi này mầm. Tương tự đối với loài *K. septemlobus*, phôi soma ở dạng thủy lôi được này mầm khi ngâm 60 phút, bơm 6 lần một ngày (Kim, 2011). Cũng trên loài *K. septemlobus* trong môi trường quang tự dưỡng (Park, 2011) bơm ngày một lần, mỗi lần 15 phút.

Tại Việt Nam TIS đã được bước đầu ứng dụng trong nghiên cứu nhân giống các loài lan Mokara

vàng chanh (Vương Thị Hồng Loan, 2016), cây lấy gỗ như hồng *Paulownia fortunei* (Nguyễn Đức Minh Hùng, 2015) hay mía (Cao Anh Dương, 2011) cho khả năng nhân chồi hiệu quả hơn so với phương pháp thông thường.

Sâm Ngọc Linh là loài dược liệu quý, có giá trị kinh tế cao, khó nhân giống theo phương pháp truyền thống do tỉ lệ đầu quả và nảy mầm của hạt rất thấp. Đối với phương pháp nhân nhanh bằng công nghệ *in vitro*, hiện nay đang có hai hướng nghiên cứu chính là sản xuất cây giống trên môi trường thạch có cải tiến như vào mẫu bằng lát cắt mỏng, tối ưu điều kiện nuôi cấy trong ánh sáng đèn LED (Dương Tấn Nhứt, 2007; 2010), tối ưu hóa môi trường cho củ (Hoàng Xuân Chiến, 2011). Hướng thứ hai là nhân nhanh sinh khối sâm Ngọc Linh bằng bể bioreactor (Mau Trường, 2014) nhân phôi trong môi trường lỏng. Nhưng phổ biến hơn là nhân sinh khối rễ tóc (Nguyễn Văn Kết, 2012) bằng hệ thống 5 lít, (Nguyễn Thị Nhật Linh, 2017) sử dụng bình 3 L và (Hà Thị Thu Hoà, 2018) dùng bioreactor lên tới 18 lít.

TIS cũng đã được (Hà Thị Loan, 2017) sử dụng để nhân rễ róc sâm Ngọc Linh trong môi trường SH bổ sung 60 g sucrose, pH 5,7-5,8 mật độ nuôi cấy ban đầu là 3 g, khoảng cách bơm 5 giờ/lần, tần suất bơm 3 phút một lần.

¹ Trung tâm Quốc gia Nghiên cứu và Phát triển sâm Ngọc Linh

² Khoa Sinh môi trường, Trường Đại học Sư phạm Đà Nẵng

2. VẬT LIỆU PHƯƠNG PHÁP**2.1. Vật liệu nghiên cứu**

Phôi sấm Ngọc Linh 3 tháng tuổi được lưu giữ tại phòng thí nghiệm Trung tâm Quốc gia Nghiên cứu và Phát triển sấm Ngọc Linh.

Bộ thiết bị TIS PLANTIMA được sản xuất bởi Công ty A-TECH BioScientific (Đài Loan).

Dụng cụ: thước kẹp điện tử INSIZE (Trung Quốc), cân phân tích phân tích OHAUS PA214 (Mỹ).

Hóa chất: Môi trường SH, GA₃, BA, NAA sản xuất bởi Công ty Duchefa Biochemie (Hà Lan).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Ảnh hưởng của thời gian ngâm đến tỉ lệ nhân của phôi thứ cấp sấm Ngọc Linh

Cấy 2 g phôi sấm Ngọc Linh vào bình TIS chứa 300 ml môi trường 1/2 SH + 1,0 mg/l NAA + 0,5 mg/l BA + 30g sucrose.

Thiết lập chế độ bơm để phôi tiếp xúc với môi trường trong 1, 3, 5 và 10 phút chu kì lặp lại 4 giờ.

2.2.2. Ảnh hưởng của tần suất ngập chìm đến tỉ lệ nhân phôi thứ cấp sấm Ngọc Linh

Cấy 2 g phôi sấm Ngọc Linh vào bình TIS chứa 300 ml môi trường 1/2 SH + 1,0 mg/l NAA + 0,5 mg/l BA + 30g sucrose.

Thiết lập chế độ bơm để phôi tiếp xúc với môi trường trong 3 phút, chu kì lặp lại sau 2, 4, 8, 12 giờ.

Mẫu đối chứng: cấy 0,5 g phôi sấm Ngọc Linh vào bình tam giác 250 ml chứa 100 ml môi trường, lắc ở 100 vòng/phút.

2.2.3. Nghiên cứu ảnh hưởng của GA₃ đến tỉ lệ nảy mầm phôi sấm Ngọc Linh

Cấy 120 phôi sấm Ngọc Linh vào bình TIS chứa 300 ml môi trường 1/2 SH + 1,0 mg/l NAA + 0,5 mg/l BA + X mg/l GA₃ + 30 g sucrose, với giá trị khảo sát X lần lượt là 0, 1, 3, 5, 7.

2.2.4. Nghiên cứu ảnh hưởng của thời gian ngâm đến tỉ lệ nảy mầm và chiều dài chồi sấm Ngọc Linh

Cấy 120 phôi đơn vào bình TIS chứa 300 ml môi trường 1/2 SH + 1,0 mg/l NAA + 0,5 mg/l BA + 5 mg/l GA₃ + 30 g sucrose.

Thiết lập chế độ bơm để phôi tiếp xúc với môi trường trong 1, 3, 5, 10 phút, chu kì lặp lại 4 giờ.

2.2.5. Nghiên cứu ảnh hưởng của tần suất ngập chìm đến tỉ lệ nảy mầm và chiều dài chồi sấm Ngọc Linh

Cấy 120 phôi đơn vào bình TIS chứa 300 ml môi trường 1/2 SH + 1,0 mg/l NAA + 0,5 mg/l BA + 5 mg/l GA₃ + 30 g sucrose.

Thiết lập chế độ bơm để phôi tiếp xúc với môi trường trong 3 phút, chu kì lặp lại sau 2, 4, 8 và 12 giờ.

Mẫu đối chứng: cấy 40 phôi đơn sấm Ngọc Linh vào bình thạch rắn chứa môi trường 1/2 SH + 1 mg/l NAA + 0,5 mg/l BA + 5 mg/l GA₃ + 30 g sucrose + 7,5 g/l agar.

2.2.6. Nghiên cứu tạo cây sấm Ngọc Linh với củi micro (củ bì) trên TIS

Phôi sấm Ngọc Linh sau khi nảy mầm thành chồi được cấy chuyển vào bình TIS chứa môi trường SH + 1,0 mg/l NAA + 0,5 mg/l BA + X% sucrose, với giá trị khảo sát X lần lượt là 2, 3, 4, 5, 6.

Bố trí ngập chìm 3 phút tần suất 6 giờ.

Sau 10 tuần nuôi cấy, đo và cân khối lượng cây thu được.

2.2.7. Nghiên cứu tạo cây hoàn chỉnh gồm lá, thân, củ bì và rễ con trước khi đưa ra vườn ương

Cấy chuyển những cây *in vitro* sấm Ngọc Linh nảy mầm từ phôi soma có đủ lá, củ nhưng đường kính củ nhỏ hơn 0,5 cm và chưa có rễ con hoặc rễ con rất ngắn vào bình thủy tinh chứa môi trường thạch theo các nghiệm thức sau:

CT1: SH + 0,5 mg/l NAA + 1,0 mg/l BA + 4% succrose + 7,5 g/l agar.

CT2: 1/2 SH + 0,5 mg/l NAA + 1,0 mg/l BA + 4% succrose + 7,5 g/l agar.

CT3: 1/3 SH + 0,5 mg/l NAA + 1,0 mg/l BA + 4% succrose + 7,5 g/l agar.

CT4: SH + 1,0 mg/l NAA + 0,5 mg/l BA + 4% succrose + 7,5 g/l agar.

CT5: 1/2 SH + 1,0 mg/l NAA + 0,5 mg/l BA + 4% succrose + 7,5 g/l agar.

CT6: 1/3 SH + 1,0 mg/l NAA + 0,5 mg/l BA + 4% succrose + 7,5 g/l agar.

2.3. Các chỉ tiêu theo dõi và đánh giá

Các thí nghiệm được tiến hành theo dõi và đánh giá sau 8 tuần nuôi cấy, ghi nhận tỉ lệ phôi bị thủy

trình hóa và xác định khối lượng tươi của phôi thu được.

Khối lượng phôi thu được là khối lượng ướt được cân bằng cân phân tích.

Tỉ lệ phôi bị thủy tinh được tính theo công thức:

$$TL \text{ phôi thủy tinh} = \frac{\text{Khối lượng phôi thủy tinh}}{\text{Tổng khối lượng phôi}} \times 100 (\%)$$

Tỉ lệ này mầm phôi được tính theo công thức:

$$TL \text{ phôi này mầm} = \frac{\text{Số phôi này mầm}}{\text{Tổng số phôi}} \times 100 (\%)$$

Tỉ lệ tăng sinh khối được tính theo công thức:

$$TL \text{ tăng KL} = \frac{\text{Khối lượng phôi ban đầu}}{\text{Khối lượng phôi thu được}} \times 100 (\%)$$

Chiều dài chồi được đo bằng thước kẹp trên mỗi nghiệm thức sau 10 tuần nuôi cấy và lấy trung bình mỗi nghiệm thức.

Chiều cao cây: đo bằng thước kẹp từ đầu chồi đến cuống lá.

Khối lượng cây được cân bằng cân phân tích.

Xử lý số liệu bằng phần mềm Statgraphics Centurion 18 ở $\alpha = 0,05$; vẽ đồ thị bằng Microsoft Excel Office 365.

Thí nghiệm được tiến hành từ 6/2018 – 9/2018 tại Trung tâm Quốc gia Nghiên cứu và Phát triển sâm Ngọc Linh, đặt tại Khu công nghiệp 24/4, khối 9, thị trấn Đak Tô, huyện Đak Tô, tỉnh Kon Tum.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của thời gian ngâm đến thời gian nhân phôi

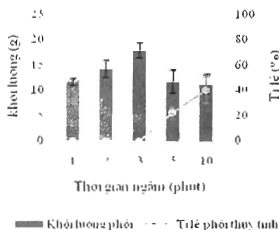
Thời gian ngâm là thời gian mà phôi tiếp xúc với môi trường dinh dưỡng, được coi là yếu tố quan trọng nhất trong việc điều chỉnh cấu trúc của cụm phôi chồi và tỉ lệ cây bị thủy tinh hóa. Thời gian ngâm ngắn nhưng tần suất ngâm dày sẽ kích thích sinh phôi soma và ngăn quá trình hình thành phôi thủy tinh (Georgiev, 2014) thời gian ngâm của đa số các loài thường nhỏ hơn 15 phút tuy nhiên đối với các cây họ Sâm như *E. sessiliflorus* và *K. septemlobus* thì thời gian ngâm lại kéo dài hơn 15 phút. (Shoahel, 2005; Kim, 2011).

Sau 2 tuần nuôi cấy phôi bắt đầu se lại và hình thành các phôi con xung quanh phôi mẹ ban đầu, từng bước hình thành cụm phôi 0,2-0,3 cm dưới tác

động của sự luân chuyển môi trường các cụm phôi bắt đầu tách rời hình thành phôi đơn sau 3 tuần.

Trên môi trường tối ưu cho sự nhân phôi ở thời gian ngâm 3 phút phôi có khả năng tăng sinh khối cao nhất đạt $17,64 \pm 1,46$ g từ 2 g vật liệu ban đầu, với thời gian ngâm thấp hơn 3 phút phôi sinh trưởng chậm hơn, tuy nhiên khi tăng thời gian ngâm lên 5 đến 10 phút thì phôi bắt đầu gặp hiện tượng thủy tinh hóa lên tới $22,22 \pm 5,09\%$, tỉ lệ nhân phôi cũng giảm mạnh.

Điều này chứng tỏ thời gian ngâm có một vai trò nhất định trong việc quyết định tỉ lệ thủy tinh hóa trong nuôi cấy ngập chìm tạm thời, khi tiếp xúc quá lâu với môi trường dinh dưỡng lỏng, phôi gặp stress dẫn đến hiện tượng thủy tinh hóa.



Hình 1. Ảnh hưởng của thời gian ngâm đến khối lượng phôi sâm Ngọc Linh thu được và tỉ lệ phôi thủy tinh

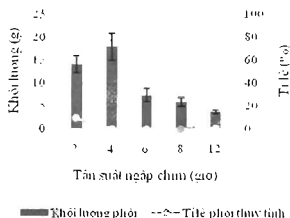
3.2. Ảnh hưởng của tần suất ngập chìm đến tỉ lệ nhân phôi

Chu kì bơm là yếu tố quan trọng nhất ảnh hưởng đến sự sinh trưởng và phát triển của phôi, tần suất bơm quá dày có thể làm cây bị ức chế nhưng nếu tần suất quá thưa sẽ làm cây bị thiếu hụt dinh dưỡng.

Sau 2 tuần nuôi cấy phôi đã bắt đầu kéo dài và sau 4 tuần có thể quan sát được sự phát sinh chồi. Đối với mẫu thí nghiệm ở tần suất 8 và 12 giờ nhận thấy hiện tượng thiếu dinh dưỡng của cây thông qua các dấu hiệu: vàng lá và kích thước chồi ngắn.

Ở môi trường và thời gian ngâm tối ưu, khi thay đổi tần suất ngâm kéo 2 giờ đến 12 giờ, nhận thấy chu kì ngập chìm lặp lại nhanh ở nghiệm thức 2 giờ, có 8,66% phôi có hiện tượng thủy tinh do tiếp xúc liên tục với môi trường lỏng, ở các nghiệm thức con lại khi tần suất thấp hơn, không còn bắt gặp hiện tượng

phôi thủy tinh. Tuy nhiên khi chu kỳ ngập chìm dài phôi bị thiếu dinh dưỡng dẫn tới tỉ lệ nhân phôi giảm thể hiện ở khối lượng phôi thu được sau 4 tuần nuôi cấy. Khối lượng phôi cao nhất thu được đạt $17,83 \pm 2,99$ g ở chu kỳ 4 giờ bơm một lần, thấp nhất ở chu kỳ 12 giờ bơm một lần, chỉ thu được $3,60 \pm 0,41$ g phôi.



Hình 2. Ảnh hưởng của tần suất ngập chìm đến sự phát triển của phôi và tỉ lệ phôi thủy tinh

Bảng 1. So sánh tỷ lệ nhân phôi trên TIS so với nuôi lỏng lác

	KL phôi ban đầu (g)	KL phôi thu được sau 8 tuần (g)	Tỉ lệ nhân phôi (%)
TIS (tối ưu)	1,5	$17,64 \pm 1,46$	$11,22 \pm 0,4^a$
Lỏng lác	0,5	$4,12 \pm 0,16$	$8,25 \pm 0,31^b$

(Trong cùng một cột những giá trị có cùng chữ cái theo sau thì không khác nhau về giá trị thống kê ở $p < 0,05$).

Qua thí nghiệm thu được thời gian tuần suất tối ưu để nhân phôi là 3 phút ngâm với chu kỳ 4 giờ.

Do không thể bố trí thí nghiệm lỏng lác đối chứng ở cùng thể tích 300 ml với TIS, đã sử dụng các bình tam giác chứa 100 ml môi trường cùng loại và so sánh trên tỉ lệ nhân phôi thông qua sự tăng khối lượng phôi sau thời gian nuôi cấy.

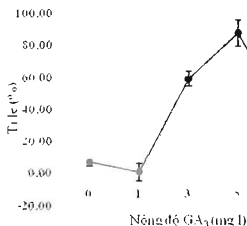
Nhận thấy tỉ lệ nhân phôi trên TIS hiệu quả hơn 26,5% so với hệ thống lỏng lác thông thường. Đáng chú ý là trong quá trình nuôi cấy lỏng lác đã nhận thấy quá trình tăng nhanh sinh khối (sản lượng phôi) chỉ diễn ra từ tuần thứ 3 đến tuần thứ 5, sau đó dừng lại, màu phôi chuyển dần từ màu sáng sang màu vàng nâu ở tuần thứ 8.

Chu kỳ luân chuyển môi trường trên TIS để phôi sâm Ngọc Linh này mầm tương đồng với E.

sessiliflorus, tuy nhiên thời gian ngâm của sâm Ngọc Linh 3 phút ngắn hơn nhiều lần so với các loài trong họ sâm Araceae như E. sessiliflorus 15 phút hoặc K. septemlobus 30 phút. Chứng tỏ sâm Ngọc Linh có nhu cầu hấp thụ dinh dưỡng khác biệt so với các loài khác trong cùng họ nhưng lại tương đồng với đa số các loài phổ biến đã biết do thời gian ngâm < 15 phút của Shohael (2005), Kim (2011).

3.3. Nghiên cứu ảnh hưởng của GA₃ đến tỉ lệ nảy mầm phôi của sâm Ngọc Linh trên TIS

Trong phương pháp nuôi cấy mô tế bào thực vật bằng các hệ thống bioreactor, việc sử dụng GA₃ là một phương thức phổ biến nhằm điều khiển các phôi nảy mầm đồng nhất nhằm tạo nguyên liệu để sản xuất cây giống số lượng lớn, nhanh chóng và đồng đều. Có hai phương thức sử dụng GA₃ chính là bổ sung trực tiếp vào môi trường nuôi cấy hoặc xử lý phôi bằng GA₃ trước khi đưa vào bioreactor. Trong thí nghiệm này đã bổ sung trực tiếp GA₃ vào môi trường nuôi cấy với các nồng độ khảo sát khác nhau nhằm rút ngắn thời gian sản xuất, giảm số lần cấy chuyển hạn chế rủi ro do nhiễm khuẩn và thoái hóa. Theo dõi và đánh giá thí nghiệm sau 4 tuần nuôi cấy thu được số liệu trình bày trong bảng 1.



Hình 3. Ảnh hưởng của nồng độ GA₃ đến tỉ lệ nảy mầm của phôi vô tính sâm Ngọc Linh

Quan sát và đánh giá thí nghiệm sau 4 tuần cho thấy: ở môi trường không có GA₃ quá trình nhân phôi diễn ra mạnh, phôi từ cấp tiếp tục được hình thành từ phôi gốc ban đầu, khả năng nảy mầm phôi thành chồi rất thấp, tỉ lệ phôi này mầm chỉ đạt 6,11%. Tỉ lệ nảy mầm của phôi có sự tăng lên rõ rệt khi nồng độ GA₃ trong môi trường nuôi cấy tăng từ 1 đến 5 mg/l. Tỉ lệ này mầm phôi cao nhất đạt 87,22% ở môi trường

chứa 5mg/l GA₃. Tuy nhiên khi tăng nồng độ GA₃ lớn hơn 5 mg/l thì khả năng này giảm bị ức chế và giảm mạnh chỉ còn 33,06%. Điều này là tương đồng với báo cáo của Shohael, (2005) trên phôi *E. sessiliflorus* và Kim, (2011) với phôi soma *K. septemlobus*.

3.4. Nghiên cứu ảnh hưởng của thời gian ngập đến tỉ lệ nảy mầm phôi và kéo dài chồi sẫm Ngọc Linh trên TIS

Sau khi khảo sát xác định được nồng độ GA₃ tối ưu cho phôi này mầm sau 4 tuần nuôi cấy, tiến hành thí nghiệm nghiên cứu ảnh hưởng của thời gian ngập đến tỉ lệ nảy mầm của phôi và kéo dài chồi. Theo dõi đánh giá thí nghiệm sau 10 tuần thu được số liệu trình bày ở hình 4.

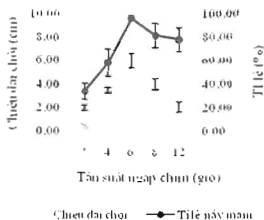


Hình 4. Ảnh hưởng của thời gian ngâm đến tỉ lệ nảy mầm của phôi và chiều dài chồi

Phân tích kết quả ở hình 4 cho thấy, tỉ lệ nảy mầm phôi tăng từ 46,67% lên đến 91,11±8,39% khi thời gian ngập tăng từ 1 đến 3 phút. Tuy nhiên, khi thời gian ngập lớn hơn 3 phút (5-10 phút) thì tỉ lệ nảy mầm của phôi lại có xu hướng giảm mạnh xuống còn 40%. Điều đo chứng tỏ, ở nồng độ xác định 5,0 mg/l GA₃, khi ngâm phôi trong khoảng thời gian 1-3 phút, chu kỳ bom 4 tiếng/lần thì GA₃ có tác dụng kích thích tăng khả năng nảy mầm của phôi.

Đánh giá chỉ số chiều dài chồi sau 10 tuần nuôi cấy cho thấy GA₃ cũng có ảnh hưởng tương tự như ở đánh giá chỉ tiêu nảy mầm của phôi. Kết quả ở hình 4 chỉ ra rằng, khi thời gian ngập 3 phút thì khả năng kéo dài chồi của phôi nảy mầm là rõ rệt và mạnh nhất với chiều dài chồi trung bình đạt 4,53±0,44 cm. Khi thời gian ngâm trong 1-2 phút hoặc 5-10 phút thì chiều dài chồi không có sự khác biệt nhau về mặt thống kê. Chiều dài chồi có giá trị nhỏ nhất (1,01 cm) khi thời gian ngập là 10 phút. Như vậy, GA₃ không chỉ ức chế khả năng nảy mầm mà còn hạn chế sự kéo dài chồi khi thời gian ngâm lớn hơn 3 phút.

3.5. Ảnh hưởng của tần suất ngập chìm đến khả năng nảy mầm phôi và kéo dài chồi sẫm Ngọc Linh



Hình 5. Ảnh hưởng của tần suất bơm môi trường đến tỉ lệ nảy mầm và chiều dài chồi

Bảng 2. Ảnh hưởng của tần suất ngập chìm đến khả năng nảy mầm phôi và kéo dài chồi sẫm Ngọc Linh

	Tỉ lệ nảy mầm (%)	Chiều dài chồi (cm)
TIS (tối ưu)	95,56±1,92 ^a	5,98±0,61 ^a
Thạch rần	82,12±10,2 ^b	4,62±0,56 ^a
Lông	16,67±2,7 ^c	1,37±0,4 ^c

(Trong cùng một cột những giá trị có cùng chữ cái theo sau thì không khác nhau về giá trị thống kê ở $p < 0,05$).

Với thời gian ngâm tối ưu cho phôi này mầm là 3 phút trên môi trường 1/2 SH + 1 mg/l NAA + 0,5 mg/l BA + 5 mg/l GA₃ + 30 g sucrose. Ở chu kì từ 2 đến 12 giờ nhận thấy càng kéo dài tần suất ngập chìm thì tỉ lệ phôi, chồi bị thủy tinh hóa giảm, ở chu kì 6 tiếng phôi có tỉ lệ nảy mầm cao nhất đạt 95,56±1,92%, đồng thời ở tần suất này cũng thu được chồi ở có chiều dài lớn nhất đạt 5,98±0,61 cm. Thời gian tần suất tối ưu để phôi nảy mầm là 3 phút ngâm ở chu kì 6 giờ.

Trong thí nghiệm so sánh tỉ lệ nảy mầm trên các môi trường khác nhau, nhận thấy TIS có tỉ lệ nảy mầm và chiều dài chồi lớn nhất, sau đó là môi trường thạch rần thông thường. Ở môi trường thạch, bên cạnh quá trình nảy mầm thì phôi mới vẫn tiếp tục nhân lên, gây tổn thương để phân loại phôi chồi khi cấy chuyển. Môi trường lông chúng tôi không hiệu quả cho quá trình nảy chồi, khi chỉ có 16,67±2,7% phôi nảy mầm, chồi ngắn thường bị tổn thương trong quá trình lúc.

Trong TIS, mô nuôi cấy lần lượt được tiếp xúc với môi trường dinh dưỡng và không khí sạch theo chu kỳ tuần hoàn, điều này ngăn các stress do ngâm lâu ngày trong dung dịch, không sử dụng cánh quạt như bioreactor nên cũng giảm được tổn thương mẫu.

3.6. Nghiên cứu tạo cây sâm Ngọc Linh với củ micro (củ bi) trên TIS

Nồng độ sucrose có vai trò rất lớn đến sự mầm, kéo dài chồi vào tạo củ của các loài trong họ

Sâm. Choi, (2002) nhận thấy đối với sâm *Syberya E. sessiliflorus* khi hàm lượng đường trong môi trường vượt quá 6% tỉ lệ nảy mầm giảm, khi sucrose vượt trên 9% thì phôi không thể nảy mầm dù đã có lá mầm. Kim, (2016) đã nghiên cứu ảnh hưởng của các yếu tố tới sự hình thành củ sâm *P. ginseng* trên TIS trong đó môi trường 1/2 HS 50% sucrose cây có khối lượng củ lớn nhất nhưng có số chồi ít hơn.

Bảng 3. Ảnh hưởng của nồng độ đường đến quá trình chuyển hóa từ chồi thành cây

Công thức	Môi trường	TIS		Thạch rắn	
		Khối lượng cây (g)	Chiều cao cây (cm)	Khối lượng cây (g)	Chiều cao cây (cm)
CT1	SH + 2% sucrose	0.57±0,04 ^a	4.43±0,39 ^a	0.64±0,09 ^a	5.0±0.8 ^a
CT2	SH + 3% sucrose	0.80±0,09 ^b	6.17±0.65 ^b	0.85±0,06 ^a	5.9±1,1 ^a
CT3	SH + 4% sucrose	1.59±0,06 ^c	7.40±0,19 ^c	1.37±0,18 ^b	6.8±0,3 ^b
CT4	SH + 5% sucrose	1,14±0,16 ^d	6,22±0,57 ^b	1,22±0,11 ^b	6,3±0,3 ^{ab}
CT5	SH + 6% sucrose	1,33±0,14 ^c	5,86±0,75 ^d	1,19±0,16 ^b	5,6±0,5 ^a

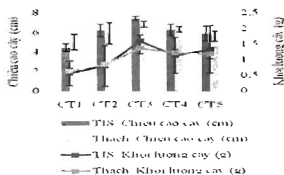
(Trong cùng một cột những giá trị có cùng chữ cái theo sau thì không khác nhau về giá trị thống kê ở $p < 0,05$).

Thí nghiệm cho thấy trên môi trường SH ở nồng độ đường tăng dần từ 2-4% thì có ảnh hưởng tích cực đến sự sinh trưởng của cây thể hiện qua sự tăng chiều cao và khối lượng cây, ở 4% sucrose sinh trưởng tốt nhất cây có khối lượng trung bình 1,59 g cao 7,40 cm. Tuy nhiên khi tăng nồng độ đường 5-6% nhận thấy cây *in vitro* có dấu hiệu bị mất nước thể hiện qua hiện tượng lá bị héo, chuyển màu trắng. Như vậy, môi trường SH +1 mg/l NAA + 0,5 mg/l BA có bổ sung 4% đường sucrose là thích hợp nhất cho sự sinh trưởng phát triển thành cây từ chồi của sâm Ngọc Linh.

Một đặc điểm làm tăng hiệu suất của TIS so với nuôi cấy thông thường chính là do mẫu mô thực vật được tiếp xúc với không khí: sự tiếp xúc này là nhờ vào bơm khí nén, qua màng lọc.

Sự tiếp xúc trực tiếp của mô thực vật với môi trường khí làm đơn giản hóa việc vận chuyển oxy từ không khí vào trong tế bào nuôi cấy, trái ngược với môi trường lỏng, nơi mà vận chuyển oxy giữa các bề mặt phải đối mặt với sức cản khi đi qua bề mặt của các môi trường khác nhau (lỏng-lỏng và lỏng-rắn). Cải thiện vận chuyển oxy góp phần vào trao đổi khí tốt hơn, không làm ức chế quá trình hô hấp, giảm sự xuất hiện của rối loạn sinh lý như ngạt. Làm tăng quá

trình nhân nhanh, phân hóa và phát sinh của mô tế bào (Georgiev, 2014).



Hình 6. Ảnh hưởng của nồng độ sucrose đến khả năng hình thành cây và tạo củ micro



Hình 7. Phôi vô tính sâm Ngọc Linh nảy mầm thành chồi. A. Phôi sâm Ngọc Linh. B. Phôi sâm Ngọc Linh nảy mầm thành chồi trên TIS

Chu kì ngập chìm còn làm cải thiện chất lượng vật liệu gốc như tăng tốc độ sinh trưởng, giảm biến dị, tăng khả năng biệt hóa thành mô cơ quan, ngăn đột biến soma làm giảm tỉ lệ nhân, giảm hiện tượng thủy tinh hóa. Cây giống vô tính sản xuất từ TIS còn có tỉ lệ sống, tốc độ sinh trưởng ngoài vườn ươm cao hơn so với cây nuôi cấy mô thông thường. Bên cạnh đó TIS còn đem lại hiệu quả kinh tế lớn do giảm công lao động, giảm diện tích phòng, kệ nuôi cấy, giảm số lượng bình nuôi cấy, tăng năng suất sinh học (Etienne, 2002; Hvoslef-Eide, 2005; Georgiev, 2014).

Tuy nhiên qua thực tế sản xuất cũng đã nhận thấy những hạn chế của công nghệ sản xuất cây con *in vitro* bằng TIS.

Qua thí nghiệm đối chứng giữa cây trên môi trường thạch và cây từ môi trường thạch nhận thấy cây con từ môi trường thạch tuy có khối lượng và chiều cao cao hơn nhưng lá và rễ phát triển tốt, cây không bị tổn thương. Vì vậy để xuất sử dụng TIS trong vai trò nhân nhanh và nảy mầm phôi là hiệu quả nhất, các bước tiếp theo trong quy trình vẫn sử dụng phương thức nhân trên môi trường thạch rắn.

3.7. Nghiên cứu tạo cây *in vitro* sâm ngọc linh hoàn chỉnh gồm lá, thân, củ và rễ con

Yêu cầu quan trọng đối với cây *in vitro* là phát triển nhanh, thích nghi tốt và đặc biệt là phải phát triển độc lập ko dính liền với phôi soma, vì vậy cần chọn môi trường phù hợp sao cho cây có thể phát triển tốt đồng thời không làm xuất hiện phôi soma.

Bảng 4. Ảnh hưởng của môi trường và các chất điều hòa sinh trưởng lên khả năng hình thành các bộ phận lá, thân, củ và rễ con sâm Ngọc Linh

Nghiệm thức	Môi trường	Số rễ/cây	Chiều cao cây (cm)	Đặc điểm sinh trưởng	
CT1	0,5 mg/l NAA + 1,0 mg/l BA	SH + 4% sucrose	1,84±0,26 ^a	6,63±0,36 ^a	Nhanh, yếu, sinh phôi soma ở góc
CT2		1/2SH + 4% sucrose	3,30±0,54 ^{abc}	6,58±1,10 ^a	Nhanh, khỏe, sinh phôi soma ở góc
CT3		1/3SH + 4% sucrose	3,57±0,27 ^a	5,67±0,78 ^b	Chậm, yếu, sinh phôi soma ở góc
CT4	1,0 mg/l NAA + 0,5 mg/l BA	SH + 4% sucrose	3,81±0,27 ^{abc}	6,48±1,08 ^a	Nhanh, khỏe, không sinh phôi soma ở góc
CT5		1/2SH + 4% sucrose	5,58±1,30 ^c	6,91±0,93 ^a	Nhanh, khỏe, không sinh phôi soma ở góc
CT6		1/3SH + 4% sucrose	4,56±0,83 ^{bc}	5,32±0,91 ^b	Chậm, yếu, không sinh phôi soma ở góc

(Những giá trị có cùng chữ cái theo sau trong cùng một cột thì không khác nhau về thống kê ở p<0,05).

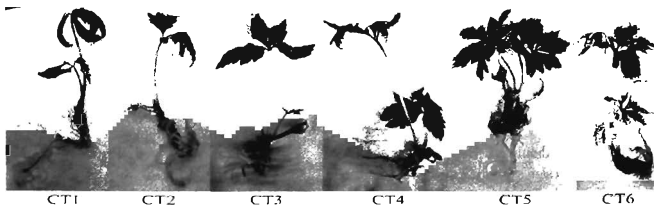
Khi sử dụng chất điều hòa sinh trưởng 1,0 mg/l NAA + 0,2 mg/l BA trong môi trường 1/2 SH và 1/3 SH nhận thấy sau 4 tuần cây bắt đầu phát triển rễ con, sớm hơn 1 tuần so với môi trường cùng loại nhưng dùng 0,5 mg/l NAA + 1,0 mg/l BA. Ngoài ra cây cho ra nhiều rễ và có chiều dài lớn hơn, chúng tỏ tỉ lệ auxin/cytokinin là yếu tố quyết định đến quá trình phát triển các bộ phận của cây.

Sau 10 tuần bắt đầu quan sát được sự hình thành chồi mầm trên các cây ở mẫu 1/2 SH + 1,0 mg/l + NAA + 0,5 mg/l BA+ 4% sucrose, lá cây bắt đầu chuyển sang màu xanh đậm, cây cứng cáp.

Thí nghiệm cho thấy khi hàm lượng dinh dưỡng trong môi trường giảm thì số rễ của cây tăng, chúng

tỏ môi trường nghèo dinh dưỡng kích thích tăng sinh rễ để đáp ứng nhu cầu dinh dưỡng cho cây. Tuy nhiên khi nồng độ dinh dưỡng giảm thì quá trình sinh trưởng của cây bị chậm thể hiện qua chiều cao cây giảm chỉ còn 5,32 – 5,67 cm ở nghiệm thức môi trường 1/3 SH. Nồng độ dinh dưỡng là một yếu tố ảnh hưởng đến chiều cao và số rễ *in vitro*.

Bên cạnh đó môi trường hoàn thiên các bộ phận của cây trước khi đưa ra vườn ươm cần phải hạn chế quá trình phát sinh phôi, vì phôi sẽ cạnh tranh dinh dưỡng với cây và làm ức chế sự phát triển các cơ quan của cây *in vitro*, trong các nghiệm thức chỉ có môi trường 1/2 SH + 1,0 mg/l NAA + 0,5 mg/l BA+ 4% sucrose là phù hợp nhất cho quá trình tạo cây *in vitro* hoàn chỉnh.



Hình 8. Cây in vitro ở các nghiệm thức môi trường

4. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

Đối với phôi sâm Ngọc Linh được nuôi cấy trên TIS nhận thấy với chu kì bơm 4 giờ mỗi lần ngâm 3 phút trên môi trường 1/2 SH + 1,0 mg/l NAA + 0,5 mg/l BA + 30 g sucrose là tối ưu cho quá trình nhân phôi soma. Quá trình này mầm của chồi diễn ra ở tần suất bơm dài hơn là 6 giờ sử dụng môi trường 1/2 SH + 1 mg/l NAA + 0,5 mg/l BA + 5 mg/l GA₃ + 30 g sucrose. Phôi có tỉ lệ nảy mầm cao, chồi khỏe, không ghi nhận phôi, chồi có dấu hiệu thủy tinh hóa. TIS có ưu điểm trong quá trình nhân nhanh và nảy mầm phôi nhưng không phù hợp để phát triển cây và chồi.

Ở quá trình tạo củ: tại môi trường 1/2 SH + 1,0 mg/l NAA + 0,5 mg/l BA + 4% sucrose + 7,5 g agar cho kết quả tốt nhất. Cây con thu được đạt trạng thái sinh trưởng và phát triển mạnh nhất, các chỉ số về đặc điểm nông sinh học đều đạt yêu cầu (rễ củ cứng cáp, đậm màu, lá màu xanh đậm). Đặc biệt, không xuất hiện các phôi soma trên môi trường nuôi cấy, cung cấp một dữ liệu quan trọng cho các nghiệm thức tối ưu môi trường nhân cây sau này. Tuy nhiên vẫn còn một số điểm yếu của TIS PLANTIMA cần được tiếp tục nghiên cứu cải tiến.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được thực hiện với sự tài trợ từ đề tài "Nghiên cứu hoàn thiện quy trình nhân giống in vitro sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) bằng công nghệ bioreactor", thuộc nhiệm vụ khoa học và công nghệ, Bộ Khoa học và Công nghệ.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Trương Thị Lan Anh và Nguyễn Văn Kết (2012). Ảnh hưởng của nồng độ đường và mật độ mẫu cấy đến sự sinh trưởng của rễ sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) trong nuôi cấy lỏng và bước đầu nuôi cấy trong bioreactor. Khoa học Kỹ thuật Nông Lâm nghiệp. 2, tr. 5.

2. Vũ Tuấn Anh và Chử Văn Mến (2015). Nghiên cứu ảnh hưởng của một số yếu tố đến chất lượng sinh khối Sâm Ngọc Linh trên hệ thống Bioreactor 100 L. Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam (2B), tr. 55.

3. Cao Anh Đường, Trần Đông Hạ, Đỗ Đức Hạnh (2011). Ứng dụng hệ thống nuôi cấy ngập chìm tạm thời (PLANTIMA®) trong vi nhân giống mía ở Việt Nam. Tạp chí Khoa học Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam, số 9 2011: tr105-109.

4. Nguyễn Đức Minh Hùng, Đỗ Thị Tuyền, Trần Văn Minh (2015). Nghiên cứu ảnh hưởng của đèn LED và bioreactor chìm ngập cách quang đến sinh trưởng quang tự dưỡng cây hồng (*Paulownia fortunei*) in vitro. Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn, số 18 năm 2015, tr 57-62.

5. Nguyễn Thị Nhật Linh (2017). Nghiên cứu nuôi cấy rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) và khảo sát ảnh hưởng của một số elicitor lên sự tích lũy saponin. Luận án tiến sĩ, Đại học Khoa học Huế.

6. Vương Thị Hồng Loan, Kha Nữ Tú Uyên, Nguyễn Thị Diệp, Lê Thị Thủy Tiên (2016). Khảo sát khả năng nhân nhanh protocorm like bodies và tái sinh chồi lan mokara vàng chanh trong hệ thống ngập chìm tạm thời Rita®. Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn 2016, số 5 tr.41-49.

7. Hà Thị Loan (2014). Nghiên cứu tạo rễ tóc sâm Ngọc Linh *Panax vietnamensis* bằng phương pháp chuyển gen rol nhờ vi khuẩn *Agrobacterium rhizogenes*. Tạp chí Sinh học. 36(1se), tr. 7.

8. Dương Tấn Nhựt (2007). Công nghệ sinh học thực vật - tập 1. Nhà xuất bản Nông nghiệp, thành phố Hồ Chí Minh.

9. Dương Tấn Nhựt (2010). Nhân giống vô tính cây sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.). Tạp chí Công nghệ Sinh học. 8(3B), tr. 8.

10. Mai Trường (2014). Tạo và nhân nuôi phôi soma sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) trong môi trường lỏng. Tạp chí Khoa học và Phát triển. 12(7), tr. 10.
11. F Afreen (2008). Temporary immersion bioreactor. *Plant Tissue Culture Engineering*, Springer, tr. 187-201.
12. Marc Berthouly và Hervé Etienne (2005). Temporary immersion system: a new concept for use liquid medium in mass propagation. *Liquid culture systems for in vitro plant propagation*, Springer, tr. 165-195.
13. YE Choi và các cộng sự (2002). Production of plantlets of *Eleutherococcus sessiliflorus* via somatic embryogenesis and successful transfer to soil. *Plant cell, tissue and organ culture*. 69(2), tr. 201-204.
14. Hervé Etienne và Marc Berthouly (2002). Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 69(3), tr. 215-231.
15. Anne Kathrine Hvoslef-Eide và Walter Preil (2005). *Liquid culture systems for in vitro plant propagation*, Springer Science & Business Media.
16. Sun Ja Kim, Yaser Hassan Dewir và Heung Kyu Moon (2011). Large-scale plantlets conversion from cotyledonary somatic embryos of *Kalopanax septemlobus* tree using bioreactor culture. *Journal of plant biochemistry and biotechnology* (tr. 241-248).
17. So-Young Park, Heung-Kyu Moon và Yong-Wook Kim (2011). The Photoautotrophic Culture System Promotes Photosynthesis and Growth of Somatic Embryo-derived Plantlets of *Kalopanax septemlobus*. *Journal of Korean Society of Forest Science*. 100(2), tr. 212-217.
18. AM Shohael và các cộng sự (2005). Application of bioreactor system for large-scale production of *Eleutherococcus sessiliflorus* somatic embryos in an air-lift bioreactor and production of eleutherosides. *Journal of biotechnology*. 120(2), tr. 228-236.
19. SJ Snyman, PD Nkwanyana và MP Watt (2011). Alleviation of hyperhydricity of sugarcane plantlets produced in RITA® vessels and genotypic and phenotypic characterization of acclimated plants. *South African journal of botany*. 77(3), tr. 685-692.
20. Vasil Georgiev và các cộng sự (2014). Temporary immersion systems in plant biotechnology¹, *Engineering in life sciences*. 14(6), tr. 607-621.

APPLICATION OF A TEMPORARY IMMERSION SYSTEM FOR MICROPROPAGATION OF VIETNAMESE GINSENG (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.)

Nguyen Phuc Quan, Vu Duc Thanh

Nguyen Minh Ly, Dinh Xuan Tu

Summary

TIS helps increase embryo efficiency, germination and prolonging buds of ginseng in micropropagation due to the ability to reasonably supply nutrient and oxygen demand for plants, the effect of air flow and environmental flow It also helps increase the adaptation and differentiation of Vietnamese ginseng. Adjust the time and frequency of pumping medium to increase fresh biomass, reduce glass plants. For mass production of somatic embryos, embryogenic cell clumps were maintained in 1/2 strength SH liquid medium containing 1.0 mg/l NAA + 0.5 mg/l BA + 30 g sucrose. It is most high yielding protocol with an immersion regime of 3 min every 4 h in TIS. Highest germination rate of somatic embryos is 87.22% on 1/2 strength SH liquid medium supplemented with 5 mg/l GA₃. Elevated concentration of sucrose in the SH liquid medium (40%) stimulated the root thickening of plantlets in TIS (3 min immersion every 6 h). The plantlets with small taproots developed into plants with well-developed taproots on 1/2 strength SH medium supplemented with 1 mg/l NAA + 0.5 mg/l BA + 40% sucrose+7.5 g/l agar.

Keywords: *Micro propagation, Temporary Immersion System, TIS, Vietnamese ginseng.*

Người phản biện: PGS.TS. Nguyễn Văn Đông

Ngày nhận bài: 24/9/2019

Ngày thông qua phản biện: 24/10/2019

Ngày duyệt đăng: 31/10/2019