

NUÔI CÂY DÒNG TẾ BÀO MÔ SỢ CÂY TAM THẤT HOANG (*PANAX STIPULEANATUS* H.T.TSAI ET K.M.FENG) ĐỂ TẠO PHÔI VÔ TÍNH

Nguyễn Thị Ngọc Hương¹, Trần Hùng¹, Trương Thị Đẹp¹

TÓM TẮT

Đặt vấn đề: Tam thất hoang (*Panax stipuleanatus* H.T.Tsai et K.M.Feng), loài cây thuốc quý hiếm với công dụng bồi bổ sức khỏe, chống ung thư đang có nguy cơ bị tuyệt chủng. Vì vậy, việc nuôi cấy dòng tế bào mô sẹo Tam thất hoang có khả năng sinh phôi, hướng tới việc nhân giống bằng phôi vô tính trên quy mô lớn giúp bảo tồn loài cây thuốc này trong tương lai. Mục tiêu là nghiên cứu đặc điểm hình thái, đặc tính sinh lý, sự thay đổi kích thước của tế bào mô sẹo trong quá trình tăng trưởng và phát sinh phôi, từ đó xác định độ tuổi và kích thước các tế bào có thể sinh phôi.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu: Mô sẹo 26 tuần tuổi nuôi cấy trên môi trường 2,4-D 0,5 mg/L liên tục 26 tuần để phân tích các chỉ tiêu hình thái, kích thước và sinh lý của tế bào. Mô sẹo ở thời điểm 0, 4 và 6 tuần sau cấy chuyển được chuyển sang môi trường NAA 0,5 mg/L để khảo sát khả năng tạo phôi.

Kết quả: Mô sẹo 4 tuần sau cấy chuyển có kích thước 17-20 μm , mang đặc tính tế bào sinh phôi, tạo phôi sau 24 tuần trên môi trường NAA 0,5 mg/L.

Kết luận: Mô sẹo đủ 26 tuần tuổi, 4 tuần sau cấy chuyển với các tế bào có kích thước 17-20 μm có khả năng tạo phôi.

Từ khóa: phôi vô tính, mô sẹo

ABSTRACT

CULTURE OF CALLUS CELL LINE FOR SOMATIC EMBRYOGENESIS IN *PANAX STIPULEANATUS* H.T.TSAI ET K.M.FENG

Nguyen Thi Ngoc Huong, Tran Hung, Truong Thi Dep

* Ho Chi Minh City Journal of Medicine * Vol. 25 - No. 6 - 2021: 20 - 28

Background: *Panax stipuleanatus*, a rare medicinal plant with health-promoting and anti-cancer effects, is in danger of extinction. Therefore, culturing the embryonic callus cell line, towards large-scale clonal propagation, helps to preserve this medicinal plant in the future. Objectives are to study on morphological, physiological characteristics and size changes of callus during growth and embryogenesis, thereby determining the age and size of embryogenic callus.

Materials and methods: 26 week-old callus was continuously cultured on the medium with 2,4-D 0.5 mg/L to analyze the morphological characteristics, size and physiological parameters of the cells. Callus at 0, 4 and 6 weeks after the subculture was transferred to the medium with 0.5 mg/L NAA to investigate the embryogenesis.

Results: Callus 4 weeks after subculture was 17-20 μm in size, with embryogenic characteristics, and created embryos after 24 weeks on 0.5 mg/L NAA medium

Conclusions: 26 week-old callus, at 4 weeks after subculture with cells with average size 17-20 μm capable of forming embryos.

Keywords: embryo, callus

¹Khoa Dược, Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh

Tác giả liên lạc: TS. Nguyễn Thị Ngọc Hương

ĐT: 0764599409

Email: ngochuong@ump.edu.vn

ĐẶT VẤN ĐỀ

Tam thất hoang (*Panax stipuleanatus* H.T.Tsai et K.M.Feng) là loài cây thuốc quý hiếm với nhiều công dụng: thân rễ thường được dùng làm thuốc bổ, cầm máu, tăng cường sinh dục, chống stress; lá và nụ hoa dùng làm trà uống có tác dụng kích thích tiêu hóa, an thần⁽¹⁾. Các nghiên cứu gần đây cho thấy cao Tam thất hoang giàu saponin có tác động chống kết tập tiểu cầu, ngăn ngừa hình thành cục máu đông, phòng chống tai biến, xơ vữa động mạch, cao huyết áp^(2,3). Hơn thế nữa, các saponin khung oleanane là thành phần chính trong thân rễ Tam thất hoang quyết định hoạt tính kháng ung thư (ung thư máu và ung thư biểu mô trực tràng)^(4,5). Với những công dụng như trên, trong tự nhiên, Tam thất hoang thường xuyên bị tìm kiếm, khai thác khiến số lượng loài bị suy giảm nghiêm trọng. Theo sách đỏ Việt Nam, Tam thất hoang được xếp vào mức cực kỳ nguy cấp⁽⁶⁾. Tuy nhiên, việc nhân giống cây Tam thất hoang chủ yếu theo phương pháp giâm hom từ đoạn thân rễ với hệ số nhân thấp và phụ thuộc rất nhiều vào số lượng, chất lượng của nguồn vật liệu thân rễ vốn đã rất khan hiếm trong tự nhiên.

Hiện nay, trong các phương pháp nhân giống, việc nhân giống bằng phôi vô tính thông qua mô sẹo đang ngày càng phát triển với những ưu điểm như: từ các cơ quan (rễ, thân, lá...) của cây mẹ ban đầu có thể tạo được dòng mô sẹo có khả năng sinh phôi với sinh khối lớn, dẫn đến hệ số nhân giống cao, cây con đồng nhất về mặt di truyền, sạch bệnh và không phụ thuộc vào thời tiết cũng như mùa vụ. Từ đó, có thể chủ động về nguồn giống, gia tăng năng suất cây trồng. Trong nhiều năm qua, việc tạo phôi vô tính để nhân giống các loài cây thuốc quý hiếm thuộc chi *Panax* như Nhân sâm (*Panax ginseng* C.A.Mey), sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.), Tam thất (*Panax notoginseng* (Burk.) F.H.Chen) đã được các nhà khoa học quan tâm nghiên cứu và đạt nhiều thành tựu. Tuy nhiên, đối với Tam thất hoang, việc nuôi cấy tế bào mô sẹo có khả năng sinh

phôi vẫn còn rất hạn chế. Vì vậy, trong bài báo này, chúng tôi tập trung nghiên cứu về đặc điểm hình thái, đặc tính sinh lý và sự thay đổi kích thước của tế bào mô sẹo Tam thất hoang trong quá trình tăng trưởng và phát sinh phôi vô tính, từ đó xác định độ tuổi, kích thước các tế bào có khả năng sinh phôi hướng tới việc chọn lọc dòng tế bào mô sẹo phục vụ công tác nhân giống bằng phôi vô tính trên quy mô lớn loài cây thuốc quý này trong tương lai.

ĐỐI TƯỢNG-PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Đối tượng nghiên cứu

Mô sẹo Tam thất hoang có nguồn gốc từ khúc cắt thân rễ (do vườn quốc gia Hoàng Liên, tỉnh Lào Cai cung cấp) được nuôi cấy trên môi trường MS⁽⁷⁾ giảm ½ đa lượng (cải tiến dựa theo Nguyễn Thị Ngọc Hương và cộng sự⁽⁸⁾), có bổ sung 0,5 mg/L 2,4-D đặt trong tối ở điều kiện nhiệt độ 22 ± 2 oC và ẩm độ 65%. Trong 32 tuần nuôi cấy, mô sẹo được cấy chuyển 4 lần (lần lượt tại các thời điểm 8, 14, 20 và 26 tuần tính từ khi bắt đầu nuôi cấy khúc cắt thân rễ), mỗi lần cách nhau 6 tuần (theo cách nuôi cấy mô sẹo của Nguyễn Thị Ngọc Hương và cộng sự⁽⁸⁾).

Phương pháp nghiên cứu

Nuôi cấy mô sẹo

Ở lần cấy chuyển thứ 4, các cụm mô sẹo 26 tuần tuổi (cân 450 mg trong điều kiện vô trùng) được chuyển sang môi trường tương tự (MS ½ đa lượng có bổ sung 0,5 mg/L 2,4-D) và nuôi liên tục (không cấy chuyển) trong 26 tuần kế tiếp. Điều kiện nuôi cấy tương tự (che tối, nhiệt độ 22 ± 2 oC và ẩm độ 65%) (Hình 1).

Tại mỗi thời điểm 0, 2, 4, 6, 8, 12 tuần (trong 26 tuần nuôi cấy tiếp theo), 3 mẫu mô sẹo được đo trọng lượng tươi, trọng lượng khô và 3 mẫu mô sẹo tương tự được đo cường độ hô hấp, hàm lượng đường, tinh bột. Riêng trọng lượng tươi, trọng lượng khô của mô sẹo được khảo sát đến 20 tuần.

Cảm ứng tạo phôi từ mô sẹo

Các mẫu mô sẹo 20, 26 và 32 tuần tuổi được đặt trên môi trường cảm ứng tạo phôi: MS ½ đa

lượng có bổ sung 0,5 mg/L NAA. Lúc này các mô sẹo đều ở thời điểm 6 tuần sau lần cấy chuyên trước đó. Riêng mẫu mô sẹo 30 tuần tuổi (ứng với thời điểm 4 tuần sau lần cấy truyền trước) cũng được chuyển sang môi trường tạo phôi tương tự nhưng sớm hơn 2 tuần. Hình thái tế bào mô sẹo và cụm cấu trúc giống phôi được ghi nhận ở 4 nghiệm thức trên sau 24 tuần, đặc biệt đối với các mẫu tạo phôi (Hình 2).

Khảo sát biến đổi hình thái, kích thước của cụm và tế bào trong mô sẹo

Mô sẹo được tách ra 1 mg (cân) ngẫu nhiên, hòa với 1 giọt thuốc nhuộm orcein trên lam trong 1 phút. Sau đó, mẫu được rửa lại bằng nước cất và quan sát dưới kính hiển vi quang học CKX41 (Olympus, Nhật). Ảnh của các thị trường ở độ phóng đại 40 và 100 lần được ghi nhận nhờ camera Leica DFC 450 kết nối với kính hiển vi và xử lý bằng phần mềm đi kèm.

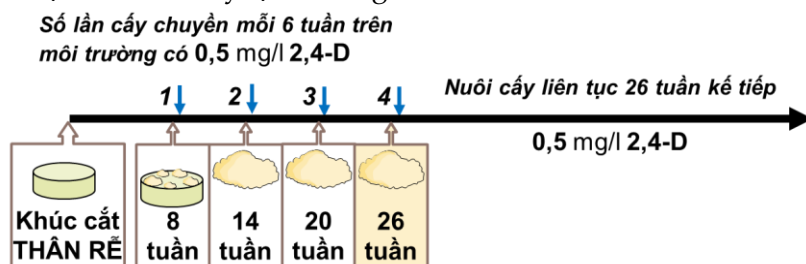
Lamen dày mẫu quan sát được chia thành 25 ô vuông bằng nhau, 5 thị trường được quan sát nằm trong 4 ô ở 4 góc và 1 ô ở trung tâm. Đường kính trung bình của cụm tế bào và tỷ lệ của từng

loại cụm theo kích thước (trên tổng số cụm) được ghi nhận từ 5 thị trường ở độ phóng đại 40 lần. Đường kính trung bình của các tế bào (đơn và trong cụm) và tỷ lệ từng loại tế bào theo kích thước (trên tổng số tế bào) được ghi nhận từ 100 tế bào ở những vị trí khác nhau của 5 thị trường có độ phóng đại 100 lần. Tất cả các ghi nhận trên ở các thời điểm khác nhau trong quá trình nuôi cấy mô sẹo được lặp lại 3 lần từ các mẫu mô sẹo của 3 ống nghiệm khác nhau.

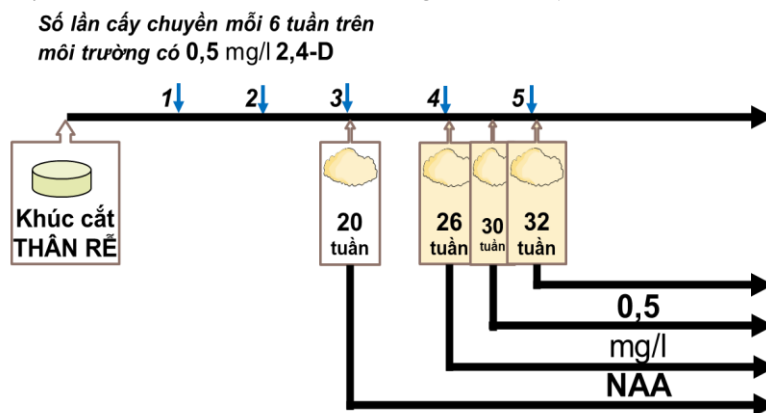
Đường kính trung bình của tế bào và cụm tế bào được tính từ hai đường kính lớn nhất vuông góc với nhau (the maximal perpendicular diameters⁽⁹⁾) và được gọi chung là kích thước tế bào (hoặc cụm).

Đo sự thay đổi trọng lượng tươi và khô

Mô sẹo ban đầu (450 mg) và các mô sẹo ở những thời điểm khác nhau sau khi cấy chuyên được cân vô trùng để ghi nhận trọng lượng tươi. Sau đó các mẫu này được sấy khô ở 80°C trong 72 giờ (đến khi trọng lượng không thay đổi) để ghi nhận trọng lượng khô.



Hình 1. Nuôi cấy mô sẹo từ thân rễ Tam thất hoang (*Panax stipuleanatus* H.T.Tsai et K.M.Feng)



Hình 2. Thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng tuổi mô sẹo trên khả năng tạo phôi ở Tam thất hoang (*Panax stipuleanatus* H.T.Tsai et K.M.Feng)

Đo hàm lượng đường và tinh bột

Đường tổng số của mô sẹo (1g) được trích với dung môi ethanol, dịch trích được phản ứng màu với dung dịch phenol 5% và acid H₂SO₄ đậm đặc (với tỷ lệ 1:1:5 theo thể tích) và đo mật độ quang bằng quang phổ kế ở bước sóng 490 nm. Hàm lượng đường tổng số được tính dựa vào đường chuẩn sucrose ở các nồng độ 10 - 70 µg/ml⁽¹⁰⁾.

Hàm lượng tinh bột của mô sẹo (1g) được xác định dựa vào hàm lượng glucose có được sau khi thủy phân tinh bột với acid HCl 5%. Đường glucose được định lượng thông qua phản ứng với thuốc thử DNS (dinitrosalicylic acid) và đo mật độ quang ở bước sóng 530 nm. Hàm lượng đường glucose của mẫu được tính dựa vào đường chuẩn glucose ở các nồng độ 50 - 250 µg/ml⁽¹¹⁾.

Đo cường độ hô hấp

Sự trao đổi khí của mẫu được đo bằng điện cực oxygen của máy LeafLab 2 với buồng đo pha khí LD2 (Hansatech, Anh). Cường độ hô hấp của mẫu được tính dựa trên lượng oxygen giảm trong buồng đo, ứng với sự hấp thu oxygen của mẫu (µmol O₂/g trọng lượng tươi/giờ).

Xử lý số liệu

Số liệu ghi nhận từ các thí nghiệm được xử lý bằng phần mềm Microsoft Office Excel 2010 và thống kê bằng phần mềm SPSS 11.5 cho Windows. Sự phân hạng, chia nhóm theo công thức Duncan, khác biệt có ý nghĩa ở mức $p \leq 0,05$ được biểu hiện bằng các mẫu tự khác nhau kèm theo sau số trung bình.

KẾT QUẢ

Sự thay đổi hình thái, kích thước của tế bào mô sẹo trên môi trường có bổ sung 2,4-D.

Ban đầu, 450 mg mô sẹo 26 tuần tuổi, ngay trước lần cấy chuyển thứ 4 có màu vàng nhạt khi mới được tách ra (Hình 3A) và tăng nhanh kích thước trên môi trường mới trong 4 tuần đầu (Hình 3C). Đến 4 tuần kế tiếp (tuần thứ 8), mô sẹo tiếp tục tăng kích thước và màu vàng

sậm dần. Lúc này, mô sẹo đã tăng sinh và lấp đầy bề mặt môi trường (Hình 3E). Ở tuần thứ 12 trở đi, mô sẹo có màu nâu và kém tăng trưởng (Hình 3G).

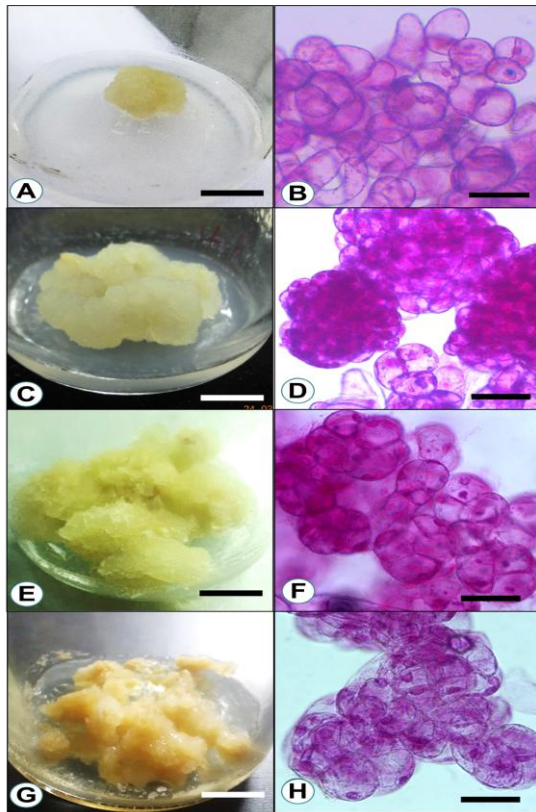
Mẫu mô sẹo ở thời điểm 6 tuần sau lần cấy chuyển trước có cấu tạo từ những cụm mô sẹo có kích thước trung bình 127 µm (Hình 4). Các tế bào bên trong cụm có hình cầu hoặc hình que với kích thước trung bình 37 µm (Hình 4). Các tế bào này liên kết với nhau khá lỏng lẻo bên trong các cụm (Hình 3B). Khi làm mới môi trường mô sẹo tăng trưởng 4 tuần trên môi trường mới lại được cấu tạo từ những cụm có kích thước (86 µm) nhỏ hơn ban đầu và rời rạc nhau. Các tế bào bên trong mới phân chia, vách chung dính nhau chặt chẽ, đẳng kính, hình cầu, kích thước rất nhỏ (17-20 µm) (Hình 4). Bên cạnh đó, các tế bào trong mỗi cụm có số lượng nhiều hơn. Đặc biệt, các cụm cũng có dạng hình cầu và kích thước tương đối đồng đều nhau (Hình 3D).

Ở tuần thứ 8, các tế bào này có kích thước tăng trở lại ở mức 48 µm và kích thước cụm tăng ở mức 142 µm (Hình 3F, Hình 4). Từ tuần thứ 8 trở đi, kích thước tế bào mô sẹo được giữ nguyên (Hình 3H).

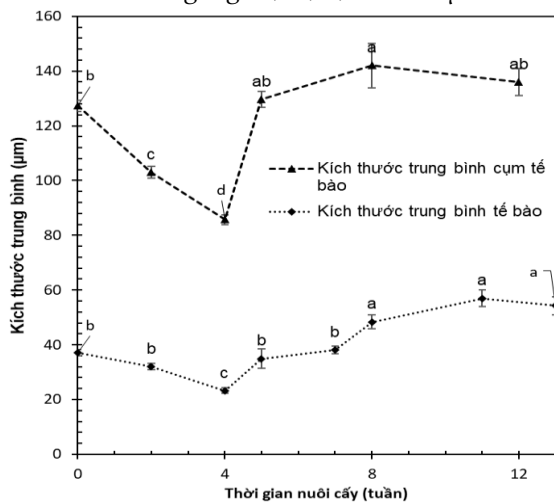
Như vậy, kích thước tế bào và cụm tế bào mô sẹo (được nuôi trên môi trường MS ½ đa lượng có bổ sung 2,4-D) giảm đi trong 4 tuần đầu, tăng trở lại vào 4 tuần kế tiếp và duy trì không đổi kể từ tuần thứ 8 (Hình 4).

Ứng với sự gia tăng kích thước của mô sẹo trong 4 tuần đầu là sự gia tăng trọng lượng tươi.

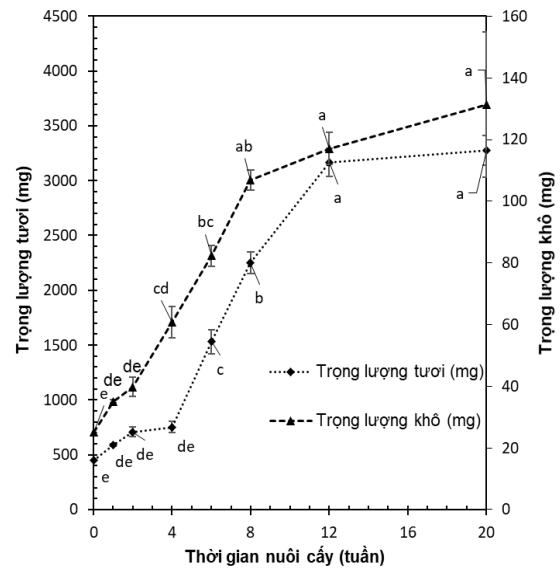
Tuy nhiên, trong giai đoạn này, trọng lượng khô không tăng. Nhưng trong 4 tuần kế tiếp, trọng lượng khô tăng mạnh dẫn tới sự tăng cao của trọng lượng tươi (Hình 5). Điều này kèm theo sự sậm màu của mô sẹo và sự tăng kích thước của các tế bào mới phân chia (Hình 3E và Hình 3F). Sự gia tăng trọng lượng tươi tiếp tục duy trì từ tuần 8 đến tuần 12 trong khi trọng lượng khô đã dừng tăng từ tuần thứ 8. Sau tuần thứ 12, mô sẹo ngừng gia tăng trọng lượng và dần chuyển sang màu nâu (Hình 3G và Hình 5).



Hình 3. Hình thái mô sẹo và cụm tế bào trên môi trường MS ½ đa lượng có bổ sung 0,5 mg/L 2,4-D ở thời điểm 0 đến 12 tuần sau khi cấy chuyển. A và B, ngay sau khi cấy chuyển; C và D, sau 4 tuần, với sự tăng sinh và có màu vàng nhạt; E và F, sau 8 tuần; G và H, sau 12 tuần; Thanh ngang (A, C, E, G) = 1 cm; Thanh ngang (B, D, F, H) = 50 μm



Hình 4. Kích thước trung bình của tế bào và cụm tế bào của mô sẹo 26 tuần tuổi trên môi trường MS ½ đa lượng có bổ sung 0,5 mg/L 2,4-D trong 12 tuần nuôi cấy liên tục kế tiếp



Hình 5. Trọng lượng tươi và trọng lượng khô của mô sẹo 26 tuần tuổi trên môi trường MS ½ đa lượng có bổ sung 0,5 mg/L 2,4-D trong 20 tuần nuôi cấy liên tục kế tiếp

Sự thay đổi về sinh lý, sinh hóa mô sẹo

Trên môi trường MS ½ đa lượng có bổ sung 2,4-D 0,5 mg/L, hàm lượng đường tổng số trong mô sẹo gia tăng từ tuần thứ 2 đến tuần thứ 4 và giảm dần sau đó. Ngược lại, hàm lượng tinh bột giảm ở tuần thứ 4 và tăng lại ở tuần thứ 7 trước khi giảm đi sau đó. Từ tuần thứ 8 trở đi, đường và tinh bột đều giảm mạnh (Hình 6).

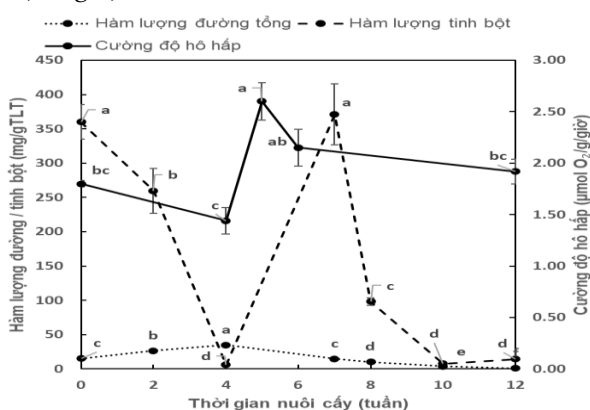
Cường độ hô hấp của mô sẹo trên môi trường MS ½ đa lượng có bổ sung 0,5 mg/L 2,4-D không thay đổi trong 4 tuần đầu. Đến tuần thứ 5 cường độ hô hấp gia tăng mạnh và giảm dần ngay sau đó (Hình 6).

Ảnh hưởng của chu kỳ tăng trưởng trên khả năng tạo phôi của mô sẹo

Mô sẹo 20 tuần, khi được chuyển sang môi trường MS ½ đa lượng có bổ sung 0,5 mg/L NAA, trải qua 26 tuần kế tiếp không hình thành cơ quan. Trong khi đó, mô sẹo 26 tuần tuổi trở đi bắt đầu có khả năng phát sinh cơ quan với tỷ lệ khá thấp. Do đó, mô sẹo 26 tuần ở thời điểm 0, 4 và 6 tuần trong chu kỳ tăng trưởng, ứng với mô sẹo có độ tuổi 26, 30 và 32 tuần có thể cảm ứng

tạo các nốt phát sinh hình thái có cấu trúc đẳng kính (Bảng 1).

Trong đó, mô sẹo ở thời điểm 4 tuần, ứng với thời điểm kích thước tế bào mô sẹo giảm thấp nhất (17-20 μm), có thể tạo được các cấu trúc giống phôi (embryo-like structures) và tạo chồi sau 24 tuần nuôi cấy. Tương tự, mô sẹo ở thời điểm 6 tuần, ứng với lúc tế bào mô sẹo tăng kích thước, cũng phát sinh cơ quan nhưng lại là rễ (Bảng 1).



Hình 6. Hàm lượng đường, tinh bột và cường độ hô hấp của mô sẹo 26 tuần tuổi trên môi trường $\text{MS } \frac{1}{2}$ đa lượng có bổ sung 0,5 mg/L 2,4-D trong 12 tuần nuôi cấy liên tục kế tiếp

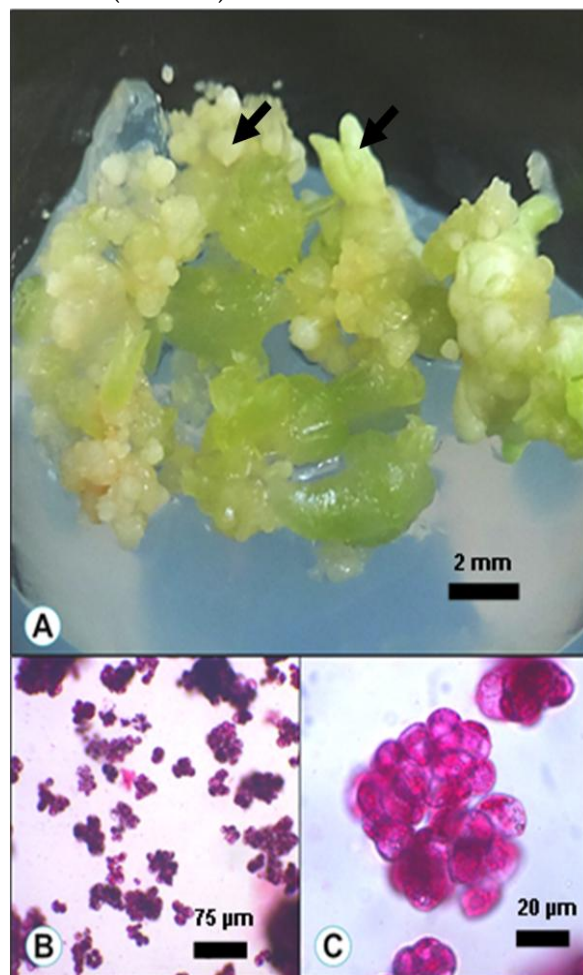
Lúc này, các cụm mô sẹo chưa hình thành phôi của mẫu cấy này được cấu thành từ những tế bào dạng hình cầu hoặc trứng, đẳng kính, với kích thước trung bình khoảng 17 – 20 μm (Hình 7C). Tế bào chất của các tế bào này đậm đặc, chõ tiếp xúc giữa 2 vách của tế bào lân cận ít, nên chúng khá rời rạc, khiến các cụm do

Bảng 1. Ảnh hưởng của tuổi mô sẹo đến thời gian tạo rễ, tỷ lệ hình thành nốt, và rễ của mô sẹo từ thân rễ Tam thất hoang trên môi trường $\text{MS } \frac{1}{2}$ đa lượng có bổ sung 0,5 mg/L NAA

Tuổi mô sẹo trên môi trường 0,5 mg/L 2,4-D (tuần)	Thời gian nuôi cấy trên môi trường 0,5 mg/L 2,4-D của lần cấy chuyển trước (tuần)	Thời gian tạo cơ quan trên môi trường 0,5 mg/L NAA (tuần)	Tổng thời gian nuôi cấy từ mẫu ban đầu cho tới khi hình thành cơ quan (tuần)	Tỷ lệ tạo các nốt (%)	Tỷ lệ tạo rễ (%)	Tỷ lệ tạo chồi/phôi (%)
20	6	–	–	–	–	–
26	6	26	52	26,67 \pm 6,67	13,33 \pm 6,67	–
30	4	24	54	13,33 \pm 6,67	–	13,33 \pm 6,67
32	6	22	54	20,00 \pm 11,55	10,00 \pm 10,00	–

Các số trung bình trong mỗi cột với các chữ cái khác nhau kèm theo thì khác biệt ở mức xác suất $p=0,05$; “–”, Không ghi nhận được sự tạo nốt và rễ

chúng tạo thành cũng có kích thước nhỏ hơn, dễ tách rời (Hình 7B).



Hình 7. Hình thái mô sẹo tạo phôi (A, với các phôi, dấu mũi tên) và cụm tế bào có khả năng sinh phôi (B, C) trên môi trường $\text{MS } \frac{1}{2}$ đa lượng có bổ sung 0,5 mg/L NAA ở thời điểm 24 tuần

BÀN LUẬN

Sự tăng trưởng của mô sẹo

Mô sẹo là một nhóm tế bào chưa biệt hóa có nguồn gốc từ sự khử phân hóa một mô thực vật dưới tác động của vết thương hay auxin mạnh⁽¹²⁾. Trong các loại auxin, 2,4-D ở nồng độ thấp đặc biệt kích thích sự phân chia và khử phân hóa của tế bào dẫn đến hình thành mô sẹo⁽¹³⁾. Tương tự như vậy, đối với Tam thất hoang, 2,4-D ở nồng độ 0,5 mg/L gây ra sự phân phân hóa mạnh ở vùng mô mềm vỏ cấp 2 và tượng tầng libe – mộc dẫn đến hình thành mô sẹo và duy trì sự tăng sinh mô sẹo trong 26 tuần tiếp theo⁽⁸⁾. Nghiên cứu trước đây ở cây Trà xanh (*Camellia sinensis* L.) cho thấy hàm lượng 2,4-D trong môi trường nuôi cấy giảm đi theo thời gian, chủ yếu do mẫu cấy hấp thu trong 6 tuần đầu và cũng là thời gian hình thành mô sẹo. Sau thời điểm này, tổng hàm lượng 2,4-D trong mẫu và môi trường sẽ bắt đầu giảm mạnh, chỉ còn 50% ở tuần thứ 10⁽¹⁴⁾. Trong nghiên cứu của chúng tôi, nồng độ 2,4-D 0,5 mg/L được sử dụng và mẫu cấy là mô sẹo 26 tuần tuổi tại thời điểm 6 tuần sau lần cấy chuyển thứ 3, do đó mô sẹo Tam thất hoang luôn trong thời gian hấp thu 2,4-D và có đáp ứng tốt nhất. Mô sẹo 6 tuần tuổi này gồm các tế bào có kích thước trung bình 37 μm và khá rời rạc với tế bào chất loãng, chứa tinh bột. Mô sẹo này có màu vàng, khá nhão và dễ tách rời (Hình 3B). Đây là đặc tính của nhóm mô sẹo không đáp ứng với sự biệt hóa phôi hay cơ quan^(15,16).

Khi được cấy chuyển để làm mới lượng 2,4-D trong môi trường nuôi cấy, mô sẹo này đáp ứng bằng cách tăng sự phân chia tế bào trong 4 tuần đầu tiên, thể hiện thông qua sự giảm kích thước tế bào (Hình 4) và tăng nhẹ sinh khối (Hình 5). Tế bào đã trải qua giai đoạn tăng trưởng chậm, với trọng lượng tươi và khô chỉ tăng gấp đôi. Sự phân chia tế bào làm kích thước các tế bào trong cụm giảm và các tế bào đã tách khỏi cụm cũng có kích thước rất nhỏ (17-20 μm). Đặc biệt, các tế bào này có tế bào chất đậm đặc, nhân khá to thể hiện trạng thái

tế bào có khả năng tạo phôi. Các tế bào mô sẹo có đường kính từ 15-20 μm có khả năng sinh phôi cũng được ghi nhận trong nuôi cấy cây Cà phê (*Coffea arabica* L.)⁽¹⁷⁾. Trong các nghiên cứu trước đây, bên trong các tế bào tương tự như vậy có sự tổng hợp mạnh mẽ của RNA và tăng cường hoạt động trao đổi chất đáp ứng cho quá trình sinh phôi. Trạng thái này cũng được ghi nhận trong các mô sẹo có khả năng sinh phôi trong các nghiên cứu trước đây ở cây Cà phê (*Coffea arabica* L.) và cây Ngái bún (*Boesenbergia rotunda* L.)^(15,16,18).

Trong quá trình tăng trưởng của tế bào, carbohydrate rất quan trọng vì cung cấp nguồn carbon và điều hòa áp suất thẩm trong quá trình cảm ứng, tăng sinh và phát triển tế bào phôi⁽¹⁹⁾. Ở mô sẹo Tam thất hoang, trong giai đoạn phân chia tế bào sau 4 tuần đổi mới môi trường, hàm lượng tinh bột trong mô sẹo 4 tuần tuổi giảm và hàm lượng đường tăng lên. Điều này cho thấy sự phân chia tế bào đã sử dụng năng lượng trực tiếp từ nguồn dự trữ carbon trong tế bào. Sau thời điểm này, tuần thứ 7 sự tăng mạnh tinh bột như ban đầu được ghi nhận. Vậy từ tuần 4 đến tuần 7 tế bào tăng tích lũy tinh bột. Các tế bào không đáp ứng với sự sinh phôi sẽ phát triển không bào to, bắt đầu tích lũy tinh bột và phân đoạn dần tế bào⁽¹⁵⁾. Tuy nhiên, mô sẹo có khả năng sinh phôi thường gia tăng sự sinh tổng hợp các hợp chất sơ cấp gồm amino acid và tinh bột nhưng vẫn giữ kích thước nhỏ, tế bào chất đậm đặc và nhân to⁽¹⁶⁾. Điều này cho thấy ở thời điểm 4 tuần, mô sẹo Tam thất hoang có hình thái gần với nhóm tế bào có khả năng sinh phôi, nhưng sang đến tuần thứ 6 thì hình thái tế bào thay đổi nhanh theo hướng gia tăng kích thước tế bào.

Thời gian tăng trưởng của mô sẹo và khả năng phát sinh phôi

Mô sẹo tăng trưởng trong môi trường 2,4-D sau 3 chu kỳ cấy chuyển được làm mới mỗi 6 tuần. Điều này giúp duy trì sự tăng sinh của các tế bào để tạo dòng mô sẹo có khả năng đáp ứng với môi trường tạo phôi. Tuy nhiên, mô sẹo 20 tuần tuổi ở thời điểm 6 tuần sau lần cấy

chuyên thứ 2 không phát sinh cơ quan hay phôi trên môi trường có 0,5 mg/L NAA. Nhưng 6 tuần sau đó, khi mô sẹo trải qua lần cấy chuyên thứ 3 và đủ 26 tuần tuổi lại có thể đáp ứng tạo các nốt phát sinh hình thái trên môi trường có bổ sung 0,5 mg/L NAA. Từ thời điểm này trở đi, mô sẹo có thể đáp ứng tạo các nốt phát sinh hình thái. Điều này cho thấy thời gian tiếp xúc với 2,4-D cần kéo dài hơn 26 tuần để mô sẹo có sự phân phân hóa đủ để đáp ứng sự phát sinh cơ quan hoặc phôi.

Trong một chu kỳ cấy chuyên đổi mới môi trường trong 6 tuần, mô sẹo ở thời điểm 4 tuần ứng với hình thái nhân to, tế bào chất đậm đặc (Hình 1D), kích thước đẳng kính 20 μm (Hình 4), có khả năng sinh phôi sau 24 tuần nuôi cấy trên môi trường có bổ sung 0,5 mg/L NAA (Bảng 1). Mô sẹo này có hàm lượng đường tổng số tăng mạnh và giảm tinh bột chứng tỏ sự thủy giải mạnh cung cấp năng lượng cho các quá trình phân bào. Ngay sau thời điểm này, lúc 5 tuần, mô sẹo tăng mạnh hô hấp và kèm theo sự tích trữ tinh bột thay vì tăng tạo đường (Hình 6). Mô sẹo ở thời điểm 6 tuần không còn khả năng tạo phôi mà chỉ có thể tạo rễ (Bảng 1).

KẾT LUẬN

Mô sẹo 26 tuần tuổi sau khi cấy chuyên và nuôi cấy thêm 4 tuần trên môi trường có 2,4-D 0,5 mg/L có kích thước 17-20 μm , mang đặc tính tế bào đáp ứng sinh phôi, có thể tạo phôi hoặc cụm chồi sau 24 tuần trên môi trường NAA 0,5 mg/L. Ở thời điểm 6 tuần sau sự cấy chuyên, mô sẹo không thể đáp ứng sinh phôi và chỉ có thể tạo rễ.

Lời cảm ơn

Nhóm tác giả chân thành cảm ơn: Trường Đại học Y Dược TP. Hồ Chí Minh đã cấp kinh phí tài trợ cho đề tài, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên TP. Hồ Chí Minh đã tạo điều kiện để nhóm tác giả triển khai các thí nghiệm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Võ Văn Chi (2012). Từ điển cây thuốc Việt Nam, V2. Nhà Xuất Bản Y Học, Hà Nội.

- Lưu Thị Huyền Trang (2018). Bước đầu đánh giá tác dụng chống oxy hóa và ức chế enzym AchE của Sâm vũ diệp (*Panax bipinnatifidus* Seem.) và Tam thất hoang (*Panax stipuleanatus* HT Tsai et KM Feng) trên thực nghiệm. *Đại Học Quốc Gia Hà Nội*, Hà Nội.
- Thom VT, Quynh DT, Long DD, Huong DTL (2019). Acute and semi-chronic toxicity of *Panax stipuleanatus* H. T. Tsai et KM Feng saponin enriched extracts in animal model. *Asian J Pharmacogn*, 3(2):5-12.
- Liang C, Ding Y, Nguyen HT, et al (2010). Oleanane-type triterpenoids from *Panax stipuleanatus* and their anticancer activities. *Bioorganic Medicinal Chemistry Letters*, 20(23):7110-7115.
- Liang C, Ding Y, Kim JA, Yang SY, Boo HJ, Kang HK, Nguyen MC, Kim YH (2011). Polyacetylenes from *Panax stipuleanatus* and their cytotoxic effects on human cancer cells. *Bull Kor Chem Soc*, 32(9):3513-3516.
- Nguyễn Tiến Bản (2009). Sách đỏ Việt Nam (Phần II: Thực vật). *Nhà Xuất Bản Khoa Học Tự Nhiên và Công Nghệ*, Hà Nội.
- Murashige T, Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15(3):473-497.
- Nguyễn Thị Ngọc Hương, Trần Hùng, Trương Thị Đẹp (2016). Tìm hiểu các biến đổi hình thái trong sự phát sinh rễ Tam thất hoang (*Panax stipuleanatus* H.T.Tsai et K.M.Feng) nuôi cấy *in vitro* và bước đầu định tính oleanolic acid trong rễ tạo thành. *Công Nghệ Sinh Học*, 14(1):49-54.
- Schmitt P, Mandonnet E, Perdreau A (2013). Effects of slice thickness and head rotation when measuring glioma sizes on MRI: in support versus two largest diameters methods. *J Neurooncol*, 112(2):165-172.
- Masuko T, Minami A, Iwasaki N, Majima T, Nishimura SI, Lee YC (2005). Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format. *Analytical Biochemistry*, 339(1):69-72.
- Miller GL (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3):426-428.
- Hussain A, Qarshi IA, Nazir H, Ullah I (2012). Plant tissue culture: current status and opportunities. *Recent Advances in Plant in vitro Culture*, 1-28.
- Borkird C, Choi JH, Sung R (1986). Effect of 2,4-D on the expression of embryogenic program in carrot. *Plant Physiol*, 81:1143-1146.
- Sandal I, Kumar A, Bhattacharya A, Sharma M, Shanker M, Ahuja PS (2005). Gradual depletion of 2,4-D in the culture medium for indirect shoot regeneration from leaf explants of *Camellia sinensis* (L). *Plant Growth Regulation*, 47(2-3):121-127.
- Ribas, AF, Dechamp E, Champion A, et al (2011). Agrobacterium-mediated genetic transformation of *Coffea arabica* (L.) is greatly enhanced by using established embryogenic callus cultures. *BMC Plant Biology*, 11(1):1-15.
- Ng TLM, Karim R, Tan YS, Teh HF, Danial AD, Ho LS, et al (2016). Amino acid and secondary metabolite production in embryogenic and non-embryogenic callus of fingerroot ginger (*Boesenbergia rotunda*). *PLoS ONE*, 11(6):e0156714.
- Quiroz-figueroa F, Fuentes-cerda, CFJ, Rojas-herrera R, Loyolavargas VM (2012). Histological studies on the developmental stages and differentiation of two different somatic embryogenesis systems of *Coffea arabica*. *Plant Cell Reports*, 20(12):1141-1149, 2002.

18. Aslam J, Khan SA, Cheruth AJ, MujibA, Sharma MP, Srivastava PS (2011). Somatic embryogenesis, scanning electron microscopy, histology and biochemical analysis at different developing stages of embryogenesis in six date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars. *Saudi Journal of Biological Sciences*,18(4):369-380.
19. Maadon SN, Rohani ER, Ismail I, Baharum SN, Normah MN (2016). Somatic embryogenesis and metabolic differences between embryogenic and non-embryogenic structures in

mangosteen. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 127(2): 443-459.

Ngày nhận bài báo: 02/07/2021
 Ngày phản biện nhận xét bài báo: 05/10/2021
 Ngày bài báo được đăng: 20/12/2021