

Study and forecast of land use changes by Markov chain - CA and GIS in Phu Tho province

Dao Van Khanh, Nguyen Trong Truong Son

Abstract

This study was conducted to apply Markov chain and GIS to predict land use changes in Phu Tho province until 2025. The results were used to build land use change map of the period 2005-2015 for seven land use purposes, including closed forest, medium forest, open forest, shrubs, water surface, residential land, unused land. In addition, the causes of land use changes in this period were also analyzed to predict the land use trend until 2020 and 2025. The predicted results showed that there were a lot of changes in land use types of Phu Tho province in 2025 compared to 2005 such as the area of open forest increased by 13097.43 ha, the area of closed forest and medium forest decreased 8173.15 ha and 5882.38 ha, respectively. The area of shrubs increased by 5382.71 ha, the water surface area decreased by 6378.6 ha. The area of construction land increased sharply 39318.04 ha. Meanwhile, the unused land area decreased to only 37336.04 ha.

Keywords: GIS, land use change, Markov chain

Ngày nhận bài: 20/10/2019

Ngày phản biện: 5/11/2019

Người phản biện: TS. Phạm Anh Hùng

Ngày duyệt đăng: 10/12/2019

NGHIÊN CỨU LƯU GIỮ CÁC MẪU GIỐNG SÂM VIỆT NAM BẰNG CÔNG NGHỆ NUÔI CẤY MÔ TẾ BÀO

Khuất Thị Mai Lương¹, Lê Hà Minh¹, Đinh Văn Phê², Lê Hùng Lĩnh¹

TÓM TẮT

Kỹ thuật nuôi cấy mô tế bào đã và đang được ứng dụng rộng rãi trong việc duy trì, lưu giữ và phát triển các loài cây dược liệu quan trọng. Trong nghiên cứu này, các mẫu giống sâm Ngọc Linh, sâm Lai Châu, sâm Vũ Diệp và tam thất hoang được tiến hành lưu giữ bằng công nghệ nuôi cấy mô tế bào. Kết quả đã hoàn thiện được quá trình lưu giữ bắt đầu từ giai đoạn mô sẹo đến hình thành cây con hoàn chỉnh có khả năng sinh trưởng tốt trong điều kiện *in vitro*. Môi trường MS + 0,5 mg/L 2,4-D thích hợp cho cảm ứng tạo mô sẹo từ mô chồi mầm và MS + 1,0 mg/L 2,4-D thích hợp cho cảm ứng tạo mô sẹo từ mô củ các mẫu sâm nghiên cứu. Tỷ lệ phôi soma tạo thành cao nhất trên môi trường MS + 1,0mg/L 2,4-D + 1mg/L NAA + 0,5mg/L TDZ trên mẫu sâm Ngọc Linh, sâm Lai Châu và sâm Vũ Diệp. Riêng đối với mẫu tam thất hoang nồng độ TDZ giảm xuống 0,3mg/L đạt hiệu quả tạo thành phôi soma cao nhất. Môi trường tối ưu cho sự nảy mầm và phát triển của phôi thành cây con là MS + 0,5 mg/L NAA + 1,0 mg/L BA. Cây con hoàn chỉnh các mẫu sâm lưu giữ được nuôi cấy trên môi trường SH1/2 + 1,0 mg/L NAA + 0,2 mg/L BA + 0,2 g/L than hoạt tính thích hợp cho sự sinh trưởng và ra rễ của cây con với củ micro.

Từ khóa: *in vitro*, nuôi cấy mô, sâm Lai Châu, sâm Ngọc Linh

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hiện nay ở Việt Nam có 4 loài thuộc chi *Panax* mọc tự nhiên và đang là đối tượng bảo tồn, đó là sâm Vũ Diệp (*Panax bipinatifidus*), tam thất hoang (*P. stipuleanatus*) phân bố trên dãy Hoàng Liên Sơn (tỉnh Lào Cai); sâm Puxailaileng hay còn gọi sâm Lào được tìm thấy ở vùng núi cao Phu Xai Lai Leng thuộc dãy Trường Sơn (tỉnh Nghệ An) và loài sâm Việt Nam với tên gọi phổ biến là sâm Ngọc Linh. Sâm Việt Nam (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) hiện có 3 thứ: Sâm Ngọc Linh - *Panax vietnamensis*

Ha et Grushv. var. *vietnamensis*, phân bố ở Kon Tum và Quảng Nam; sâm Lai Châu - *Panax vietnamensis* var. *fuscidiscus*, phân bố ở Lai Châu và sâm Việt Nam mới là *Panax vietnamensis* var. *Langbianensis* phân bố ở núi Lang Biang (Lâm Đồng) (Bộ KH&CN, 2007; Nong Van Duy *et al.*, 2016; Phan Kế Long và *ctv.*, 2014).

Hiện nay các loài sâm Việt Nam trong tự nhiên ngày càng khan hiếm do bị khai thác quá mức và đang đứng trước nguy cơ tuyệt chủng. Bên cạnh công việc thu thập nguồn vật liệu ban đầu phục vụ

¹ Viện Di truyền Nông nghiệp, VAAS; ² Viện Khoa học kỹ thuật Nông Lâm nghiệp Tây Nguyên (WASI), VAAS

nghiên cứu, một trong những công việc quan trọng cần triển khai đó là lưu giữ, chủ động nguồn vật liệu cho các nghiên cứu tiếp theo, lâu dài. Nuôi cấy mô thực vật, trong đó nuôi cấy phôi soma là thành công cụ hữu hiệu cho việc lưu giữ dài hạn. Ở Việt Nam, một số kết quả nghiên cứu gần đây đã sử dụng thành công kỹ thuật nhân phôi vô tính thông qua giai đoạn mô sẹo để nhân nhanh sâm Ngọc Linh, sâm Lai Châu và sâm Vũ Diệp (Mai Trường và *ctv.*, 2013; Lê Hùng Linh và *ctv.*, 2017a, 2017b). Trong nghiên cứu này, quá trình lưu giữ *in vitro* các mẫu sâm Ngọc Linh, sâm Lai Châu, sâm Vũ Diệp và tam thất hoang được tiến hành thông qua giai đoạn mô sẹo từ đó tạo phôi vô tính và nảy mầm tạo cây con hoàn chỉnh.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật Liệu nghiên cứu

Mẫu sâm Ngọc Linh (*P. vietnamensis* var. *vietnamensis*) thu thập tại các vườn bảo tồn tại Quảng Nam và Kon Tum; mẫu sâm Lai Châu thu thập tại Lai Châu (*P. vietnamensis* var. *fuscidiscus*); mẫu sâm Vũ Diệp (*Panax bipinatifidus*) và mẫu tam thất hoang (*Panax stipuleanatus*) thu thập tại Lào Cai.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp vô trùng và chuẩn bị mẫu

Mẫu làm vật liệu được rửa sạch sơ bộ dưới vòi nước chảy 10 phút, sau đó được vô trùng lần lượt bằng dung dịch thiophanate methyl 0,7% và streptomycin 0,1% trong 20 phút, dung dịch hypochlorite natri 1,5% trong 10 phút, dung dịch ethylalcohol 70% trong 1 phút. Sau mỗi lần cho qua dung dịch vô trùng, mẫu vật liệu được rửa sạch bằng nước cất vô trùng rồi để ráo nước.

2.2.2. Môi trường dinh dưỡng và điều kiện nuôi cấy

Môi trường dinh dưỡng cơ bản MS và SH được sử dụng có bổ sung thêm 7 g/L agar, 30 g/L sucrose và các chất điều tiết sinh trưởng gồm 2,4-D (2,4 Dichlorophenoxy axit axetic), NAA (Acid acetic naphthalene), TDZ (Thidiazuron), BA (Benzylaminopurine) và GA3 (Gibberellin). Môi trường sử dụng được hấp khử trùng ở 121°C trong 20 phút, pH 5,8. Nhiệt độ phòng nuôi cấy 21 - 23°C, chu kỳ chiếu sáng 12 - 14 giờ/ngày, cường độ chiếu sáng 1800 - 2000 Lux.

2.2.3. Cảm ứng tạo mô sẹo

Các lát cắt mỏng tế bào mô củ được nuôi cấy trên môi trường MS cơ bản với dải nồng độ 2,4-D

khác nhau (0,3; 0,5; 1,0 mg/L). Môi trường MS không có chất điều hòa sinh trưởng được sử dụng làm đối chứng (ĐC) so sánh. Thí nghiệm được thực hiện với 3 lần nhắc lại, mỗi lần tương ứng với 5 bình, mỗi bình 5 miếng mẫu.

2.2.4. Tạo mô sẹo có khả năng sinh phôi

Mô sẹo ban đầu được nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung 2,4-D với nồng độ 0,1 mg/L và 70 g/L đường sucrose trong thời gian 7 - 10 ngày ở điều kiện tối, sau đó chuyển sang điều kiện chiếu sáng 12 giờ/ngày trong 4 tuần. Thí nghiệm được thực hiện với 3 lần nhắc lại, mỗi lần tương ứng với 5 bình, mỗi bình 5 miếng mẫu.

2.2.5. Cảm ứng tạo và nhân phôi vô tính

Mô sẹo có khả năng phát sinh phôi được cấy chuyển sang môi trường MS có hàm lượng đường sucrose 30 g/L và bổ sung đồng thời hoặc riêng rẽ chất điều hòa sinh trưởng 2,4-D (0,5 - 1,0 mg/L), NAA (0,5 - 1,0 mg/L) và TDZ với dải nồng độ khác nhau (0,1; 0,3; 0,5; 1,0 mg/L). Đánh giá khả năng hình thành phôi soma sau 2 - 3 tháng nuôi cấy không chuyển. Thí nghiệm được thực hiện với 3 lần nhắc lại, mỗi lần tương ứng với 5 bình, mỗi bình 5 miếng mẫu.

2.2.6. Nảy mầm phôi soma và phát triển thành cây con hoàn chỉnh

Phôi soma được nuôi cấy trên môi trường cơ bản MS với nồng độ đường tối ưu theo 8 công thức thí nghiệm gồm: MT1 - ĐC: MS; MT2: MS + 0,5 mg/L GA3; MT3: MS + 1,0 mg/L GA3; MT4: MS + 3,0 mg/L GA3; MT5: MS + 5,0 mg/L GA3; MT6: MS + 1,0 mg/L NAA + 0,5 mg/L BA; MT7: MS + 1,0 mg/L NAA + 1,0 mg/L BA; và MT8: MS + 0,5 mg/L NAA + 1,0 mg/L BA. Thí nghiệm được thực hiện với 3 lần nhắc lại, mỗi lần tương ứng với 5 bình, theo dõi đánh giá sau 6 tuần nuôi cấy.

2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện tại Bộ môn Sinh học phân tử - Viện Di truyền Nông nghiệp từ tháng 01/2017 đến tháng 02/2019.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả cảm ứng tạo mô sẹo

Kết quả cảm ứng tạo mô sẹo từ mô củ sâm Ngọc Linh trên các môi trường dinh dưỡng MT1 (MS + 0,3 mg/L 2,4-D), MT2 (MS + 0,5 mg/L 2,4-D) và MT3 (MS + 1,0 mg/L 2,4-D) diễn ra tương đối

nhanh. Đánh giá sau 5 tuần nuôi cấy, tỷ lệ tạo thành mô sẹo từ mô củ của mẫu sâm Ngọc Linh trên ba môi trường nghiên cứu dao động trong khoảng 62,5 - 87,5% và 80,0 - 100,0% đối với mô chồi mầm (Bảng 1). Điều này cho thấy tế bào ở các mô càng trẻ hóa thì càng dễ cảm ứng tạo thành mô sẹo.

Bảng 1. Ảnh hưởng của chất 2,4-D đến sự tạo thành mô sẹo ở cây sâm Ngọc Linh

Công thức	Môi trường nuôi cấy	TB tỷ lệ tạo thành mô sẹo (%)		Đặc điểm
		Củ	Chồi mầm	
ĐC	MS	0,0	0,0	Không có
MT1	MS + 0,3 mg/L 2,4-D	62,5	90,0	Có màu vàng nhạt, xốp
MT2	MS + 0,5 mg/L 2,4-D	75,0	100,0	
MT3	MS + 1,0 mg/L 2,4-D	87,5	80,0	
LSD _{0,05}		1,03	1,02	-

Kết quả cho thấy, môi trường MS + 0,5 mg/L 2,4-D thích hợp cho cảm ứng tạo mô sẹo từ mô chồi mầm và nồng độ 1,0 mg/L 2,4-D thích hợp cho cảm ứng tạo mô sẹo từ mô củ sâm Ngọc Linh. Tương tự, tỷ lệ tạo thành mô sẹo từ mẫu củ của cây sâm Vũ Diệp trên môi trường có nền dinh dưỡng cơ bản MS có bổ sung 1 mg/L 2,4-D có tỷ lệ tạo mô sẹo đạt 100,0%.

Tỷ lệ tạo thành mô sẹo ở cây tam thất hoang cho tỷ lệ mô sẹo từ 77,8-100% từ mẫu lá và 66,7 - 94,4% từ mẫu củ. Tỷ lệ mô sẹo cao nhất đều trên môi trường MS + 1,0 mg/L 2,4-D (94,4 và 100%). Khi môi trường nuôi cấy giảm nồng độ 2,4-D, Tỷ lệ mô sẹo tạo thành giảm ở cả hai trường hợp mô lá và mô củ.

Thí nghiệm tiến hành trên mẫu mô chồi mầm của cây sâm Lai Châu cho thấy, trên môi trường MS + 0,5 mg/L 2,4-D sau 5 tuần nuôi cấy 100% số mẫu mô chồi sâm Lai Châu phân hóa thành mô sẹo. Điều này chứng tỏ chất 2,4-D ở nồng độ 0,5mg/L thích hợp cho tạo thành mô sẹo từ tế bào mô chồi mầm của các loài sâm Việt nói chung. Nồng độ 2,4-D tăng lên đến 1 mg/L thích hợp khi sử dụng mô lá và mô củ để vào mẫu.

3.2. Kết quả cảm ứng tạo phôi vô tính

Trong nghiên cứu này, để tài tiến hành nuôi cấy mô sẹo ban đầu trên môi trường MS có hàm lượng đường cao (70 g/L) và giảm nồng độ 2,4-D đến 0,1 mg/L. Kết quả sau 7 - 10 ngày nuôi cấy ở trong tối và 4 tuần ở điều kiện chiếu sáng 12 - 14 giờ/ngày thu được mô sẹo có khả năng sinh phôi (Hình 1).



Hình 1. Mô sẹo có khả năng sinh phôi sâm Ngọc Linh

3.3. Kết quả nghiên cứu tạo phôi vô tính

Theo dõi và đánh giá thí nghiệm nhận thấy, quá trình hình thành phôi vô tính ở sâm Ngọc Linh, sâm Lai Châu và sâm Vũ Diệp được bắt đầu từ tuần thứ 8 - 12 tùy thuộc vào môi trường nuôi cấy. Môi trường có bổ sung riêng rẽ 2,4-D (0,5 mg/L), NAA (0,5 mg/L) hoặc TDZ (0,1 - 1,0 mg/L) kết hợp với 0,5 mg/L 2,4-D đều không có khả năng cảm ứng tạo thành phôi vô tính mà chỉ thấy sự phát triển mạnh của mô sẹo, đặc biệt trên môi trường MS+0,5 mg/L 2,4-D + 0,3 mg/L TDZ. Theo kết quả nghiên cứu của Duong Tan Nhut và cộng tác viên (2012), môi trường có bổ sung 2 mg/L NAA thích hợp cho việc tạo phôi soma sâm Ngọc Linh sau 8 tuần nuôi cấy ở trong tối. Một nghiên cứu khác của Mai Trường và cộng tác viên (2013) cho thấy sâm Ngọc Linh cũng tạo phôi soma (mô phôi) trong môi trường MS bổ sung 1,0 mg/L 2,4-D, 1 mg/L NAA, 0,2 mg/L Kinetin và 10% nước dừa. Bên cạnh đó, Zhang và cộng tác viên (2014) đã chỉ ra rằng, chất 2,4-D ở nồng độ 0,5 mg/L rất thích hợp trong cảm ứng tạo phôi ở cây sâm *Panax notoginseng* và sâm Hàn Quốc *Panax ginseng*. Điều này cho thấy sự khác biệt về loài cũng là một nguyên nhân dẫn đến khả năng cảm ứng tạo phôi vô tính khác nhau.

Kết quả ở bảng 2 cho thấy, phôi vô tính được hình thành ở các môi trường có bổ sung đồng thời 0,5 mg/L NAA và TDZ; hoặc 1,0 mg/L 2,4-D và 1,0 mg/L NAA; hoặc 1,0 mg/L 2,4-D, 1,0 mg/L NAA và TDZ. Tuy nhiên, thời gian và tỷ lệ phôi vô tính được tạo thành lại khác biệt giữa các môi trường nuôi cấy. Đối với môi trường nuôi cấy chỉ bổ sung 1 mg/L 2,4-D và 1,0 mg/L NAA thì quá trình phát sinh phôi diễn ra tương đối chậm (12 tuần) với tỷ lệ phôi vô tính được tạo thành đạt 35% và số lượng phôi trung bình trên một mẫu cấy đạt 12,2 phôi. Trong khi đó, ở môi trường có bổ sung TDZ quá trình phát sinh phôi diễn ra sớm hơn (8 tuần) và tỷ lệ tạo thành phôi cũng như số lượng phôi trên một mẫu cấy đều cao hơn. Môi trường được bổ sung đồng thời 1,0 mg/L 2,4-D; 1,0 mg/L NAA và 0,5 mg/L TDZ có tỷ lệ phát sinh phôi cao nhất, đạt 95,0%.

Bảng 2. Ảnh hưởng của 2,4-D, NAA và TDZ đến sự tạo thành phôi vô tính từ mô sẹo có khả năng sinh phôi sâm Ngọc Linh

Cytokinin Auxin	TDZ, mg/L	Tỷ lệ phôi vô tính được tạo thành (%)	TB số phôi vô tính/mô sẹo
0,5 mg/L NAA	0	0	0
	0,1	45,0	12,6
	0,3	80,0	18,5
	0,5	50,0	16,3
	1,0	20,0	12,1
1,0 mg/L 2,4-D + 1,0 mg/L NAA	0	35,0	12,2
	0,1	55,0	13,6
	0,3	85,0	17,5
	0,5	95,0	20,1
	1,0	45,0	10,7
<i>LSD</i> _{0,05}		1,88	0,46

Kết quả cảm ứng tạo phôi vô tính từ mô sẹo tam thất hoang cho thấy sự ảnh hưởng tích cực của chất TDZ tới tỷ lệ cảm ứng tạo thành phôi và số lượng phôi/mẫu (Hình 2). Tuy nhiên, khi nồng độ TDZ bổ sung vào môi trường lớn hơn 0,3 mg/L thì tỷ lệ này bắt đầu giảm. Môi trường tốt nhất để cảm ứng tạo phôi vô tính từ mô sẹo tam thất hoang là MS + 1,0 mg/L 2,4-D + 1,0 mg/L NAA + 0,3 mg/L TDZ. Kết quả này khác với kết quả khi nghiên cứu trên mẫu sâm Ngọc Linh, sâm Vũ Diệp và sâm Lai Châu (môi trường tối ưu là 1,0 mg/L 2,4-D + 1,0 mg/L NAA + 0,5 mg/L TDZ). Điều này càng khẳng định rõ, đối với các loài khác nhau môi trường cảm ứng tạo phôi vô tính được sử dụng là khác nhau. Sau khi hình thành, phôi vô tính sơ cấp phát triển thành phôi thứ cấp và được nhân với số lượng lớn trên môi trường MS có bổ sung 1 mg/L NAA và 0,5 mg/L BA.



Hình 2. Phôi vô tính tam thất hoang tạo từ mô sẹo có khả năng sinh phôi

3.4. Giai đoạn tối ưu hóa môi trường dinh dưỡng phát sinh hình thái củ micro, rễ và lá các mẫu giống sâm trong quá trình lưu giữ *in vitro*

Để tối ưu sự phát triển của phôi thành cây con hoàn chỉnh, thí nghiệm tiến hành nghiên cứu ảnh hưởng của chất GA3, NAA, và BA đến khả năng nảy mầm của phôi thành cây con *in vitro* với củ micro (củ mini). Đánh giá tỷ lệ nảy mầm và phát triển của phôi thành cây con sau 6 tuần nuôi cấy, kết quả thu được được trình bày ở bảng 3.

Phân tích kết quả ở bảng 3 cho thấy, tất cả môi trường nuôi cấy có bổ sung chất điều tiết sinh trưởng GA3, NAA và BA đều cho tỷ lệ phôi nảy mầm cao hơn so với MT1-ĐC (không có chất điều tiết sinh trưởng). Tuy nhiên, đặc điểm phát triển của các cây con *in vitro* ở các môi trường này lại tùy thuộc vào loại và nồng độ chất điều tiết sinh trưởng sử dụng.

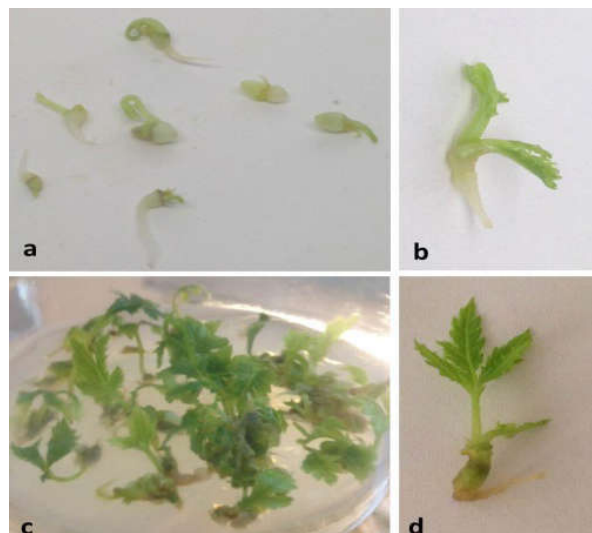
Từ bảng 3 có thể thấy rằng, tất cả công thức chứa GA3 (MT2, MT3, MT4, và MT5) đều cho phôi nảy

mầm thành cây con với thân lá phát triển mạnh nhưng lại không có củ micro. Điều đó chứng tỏ, đối với cây sâm Ngọc Linh chất điều tiết sinh trưởng GA3 khi sử dụng đơn lẻ trong môi trường nuôi cấy chỉ có tác dụng kích thích sự nảy mầm của phôi vô tính. Kết quả này tương tự với kết quả nghiên cứu của Zhang và cộng tác viên (2014) trên đối tượng sâm Hàn Quốc. Bên cạnh đó, ở các công thức thí nghiệm còn lại (MT6, MT7 và MT8) đều có phôi nảy mầm thành cây con sinh trưởng phát triển tốt với củ micro được tạo thành (hình 3), đặc biệt ở MT8 (MS + 1,0 mg/L BA và 0,5 mg/L NAA) có tỷ lệ phôi nảy mầm chuyển thành cây con với củ micro cao nhất đạt 89% . Đây là đặc điểm rất quan trọng quyết định sự phát triển của củ ở giai đoạn tiếp theo cũng như tỷ lệ sống sót của cây *in vitro* ở giai đoạn vườn ươm. Như vậy, trong trường hợp này chất điều tiết sinh trưởng BA và NAA ở nồng độ nhất định có tác dụng không chỉ kích thích sự nảy mầm của phôi mà còn giúp cây con phát triển tạo củ micro.

Bảng 3. Ảnh hưởng của GA3, NAA và BA đến sự nảy mầm của phôi thành cây con *in vitro* với củ micro sâm Ngọc Linh

Công thức	Môi trường nuôi cấy	Tỷ lệ phôi nảy mầm thành cây con <i>in vitro</i> sau 6 tuần nuôi cấy (%)	Đặc điểm của cây con <i>in vitro</i>
MT1-ĐC	SH	26,5	Cây phát triển chậm, không có củ micro
MT2	MS + 0,5 mg/L GA3	31,0	Cây phát triển thân lá, không tạo củ micro
MT3	MS + 1,0 mg/L GA3	38,5	Cây phát triển thân lá, không tạo củ micro
MT4	MS + 3,0 mg/L GA3	51,5	Cây phát triển thân lá, không tạo củ micro
MT5	MS + 5,0 mg/L GA3	88,0	Cây phát triển thân lá, không tạo củ micro
MT6	MS + 1,0 mg/L NAA + 0,5 mg/L BA	60,5	Cây phát triển với củ micro
MT7	MS + 1,0 mg/L NAA + 1,0 mg/L BA	45,5	Cây phát triển với củ micro
MT8	MS + 0,5 mg/L NAA + 1,0 mg/L BA	89,0	Cây phát triển tốt với củ micro
LSD _{0,05}		0,39	-

Đánh giá tỷ lệ nảy mầm và phát triển của phôi thành cây con sau 6 tuần nuôi cấy trên hai đối tượng sâm Vũ Diệp, tam thất hoang và sâm Lai Châu, kết quả thu được tương tự như trên sâm Ngọc Linh. Kết quả nghiên cứu khẳng định, sự kết hợp giữa BA và NAA theo tỷ lệ 1 mg/L : 0,5 mg/L đạt hiệu quả cao nhất cho sự nảy mầm phôi và hình thành củ micro. Cụ thể, môi trường MS + 1,0 mg/L BA và 0,5 mg/L NAA tỷ lệ phôi nảy mầm chuyển thành cây con với củ micro cao nhất đạt 88,5% ở sâm Vũ Diệp, 89,5% ở tam thất hoang và 90% ở sâm Lai Châu (Hình 3).



Hình 3. Sự phát nảy mầm của phôi thành cây con với củ micro cây sâm Lai Châu

Tóm lại, môi trường tối ưu cho sự nảy mầm của phôi vô tính phát triển thành cây con *in vitro* có củ micro ở cả 4 mẫu sâm nghiên cứu là MS + 0,5 mg/L NAA + 1,0 mg/L BA. Cây con hoàn chỉnh các mẫu sâm lưu giữ được nuôi cấy trên môi trường SH1/2 + 1,0 mg/L NAA + 0,2 mg/L BA + 0,2 g/L than hoạt tính thích hợp cho sự sinh trưởng và ra rễ của cây con với củ micro (Hình 4).



Hình 4. Cây sâm Ngọc Linh *in vitro* hoàn chỉnh với rễ, củ micro, thân lá trên môi trường dinh dưỡng tối ưu

IV. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

Quá trình lưu giữ các mẫu giống sâm Việt Nam nghiên cứu đã được hoàn thiện bằng công nghệ nuôi cấy mô tế bào thực vật. Môi trường MS + 0,5 mg/L 2,4-D thích hợp cho cảm ứng tạo mô sẹo từ mô chồi mầm và MS + 1,0 mg/L 2,4-D thích hợp cho cảm ứng tạo mô sẹo từ mô củ các mẫu sâm Việt. Tỷ lệ phôi soma tạo thành cao nhất trên môi trường MS + 1,0 mg/L 2,4-D + 1 mg/L NAA + 0,5 mg/L TDZ trên mẫu sâm Ngọc Linh, sâm Lai Châu và sâm Vũ Diệp.

Riêng đối với mẫu tam thất hoang môi trường MS + 1,0 mg/L 2,4-D + 1 mg/L NAA + 0,3 mg/L đạt hiệu quả tạo thành phôi soma cao nhất. Môi trường tối ưu cho sự nảy mầm và phát triển của phôi thành cây con là MS + 0,5 mg/L NAA + 1,0 mg/L BA. Cây con hoàn chỉnh các mẫu sâm lưu giữ được nuôi cấy trên môi trường SH1/2 + 1,0 mg/L NAA + 0,2 mg/L BA + 0,2 g/L than hoạt tính thích hợp cho sự sinh trưởng và ra rễ của cây con với củ micro. Các mẫu giống sâm nghiên cứu được lưu giữ ở dạng phôi vô tính và cây con hoàn chỉnh từ đó chủ động nguồn vật liệu cho các nghiên cứu tiếp theo trong tương lai.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bộ Khoa học và Công nghệ, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam.** 2007. *Sách đỏ Việt Nam - Phần II - Thực vật*. Nxb Khoa học tự nhiên và Công nghệ. Hà Nội, trang 85-89.
- Lê Hùng Linh, Đinh Xuân Tú,** 2017a. Nghiên cứu quá trình phát sinh phôi soma từ mô củ cây sâm Vũ Diệp (*Panax bipinatifidus* Seem.). *Tạp chí Khoa học Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam*, số 2(75), trang 72-76.
- Lê Hùng Linh, Đinh Xuân Tú,** 2017b. 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 Nông nghiệp Việt Nam*, số 2(75), trang 76-80.

Phan Kế Long, Trần Thị Việt Thanh, Nguyễn Thiên Tạo, Phan Kế Lộc, Nguyễn Tư Lệnh, Nguyễn Tiến Lâm, Đặng Xuân Minh, 2014. Đặc điểm hình thái và phân tử của *Panax* sp. (Araliaceae) thu ở núi Phu Xai Lai Leng, tỉnh Nghệ An, Việt Nam. *Tạp chí Sinh học* 36(4): 494-499.

Mai Trường, Trần Thị Ngọc Hà, Trần Trọng Tuấn, Phan Trường Lộc, Đỗ Đăng Giáp, Bùi Đình Thạch, Nguyễn Thị Ngọc Hân, Phạm Đức Trí, Lê Tấn Đức, Nguyễn Đức Minh Hùng, Nguyễn Văn Kết, Nguyễn Hữu Hồ, 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), trang 1085-1095.

Nhut D.T., Nga L.T.M., 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), 6274-6289.

Nong Van Duy, Le Ngoc Trieu, Nguyen Duy Chinh, Van Tien Tran, 2016. A new variety of *Panax* (Araliaceae) from Lam Vien Plateau, Vietnam and its molecular evidence. *Phytotaxa* 277(1), 47-58.

Zhang J.Y., Sun H.J., Song I.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. *J Ginseng Res* 38, 220-225.

Maintenance of Vietnamese ginseng samples by plant cell culture technology

Khuat Thi Mai Luong, Le Ha Minh, Dinh Van Phe, Le Hung Linh

Abstract

Tissue culture techniques have been widely used in the maintenance and development of important medicinal plants. At the present, Vietnamese wild ginsengs are at risk from over exploitation, which needs to be conserved. In this study, Ngọc Linh ginseng, Lai Chau ginseng, *Panax bipinatifidus* and *Panax stipuleanatus* samples were maintained by cell culture technology. The maintaining process was completed from callus stage to plant regeneration with good growth ability during *in vitro*. The medium MS + 0.5 mg/L 2,4-D was suitable for callus induction from rhizome and MS + 1 mg/L 2,4-D was suitable for callus induction from root of Vietnamese ginseng. The highest frequency of somatic embryo was generated on MS + 1 mg/L 2,4-D + 1 mg/L NAA + 0.5 mg/L TDZ from Ngọc Linh ginseng, Lai Chau ginseng, *Panax bipinatifidus*. The highest frequency of somatic embryo from *Panax stipuleanatus* was generated on medium MS + 1 mg/L 2,4-D + 1 mg/L NAA + with 0.3 mg/L TDZ. The optimal medium for germination embryos into plantlet was MS + 0.5 mg/L NAA + 1 mg/L BA. The medium SH1/2 + 1 mg/L NAA + 0.2 mg/L BA + 0.2 g/L with active charcoal was suitable for the *in vitro* growth of plantlets.

Keywords: *in vitro*, Lai Chau ginseng, Ngọc Linh ginseng, tissue culture

Ngày nhận bài: 12/9/2019
Ngày phản biện: 26/9/2019

Người phản biện: TS. Trần Danh Sứ
Ngày duyệt đăng: 14/10/2019

SÀNG LỌC VÀ NHÂN NHANH SINH KHỐI RỄ TÓC SÂM NGỌC LINH TRÊN BIOREACTOR 20 LÍT TRONG SẢN XUẤT QUY MÔ LỚN

Hà Thị Loan¹, Lâm Vỹ Nguyên¹,
Trần Nguyễn Lệ Quyên¹, Huỳnh Hữu Đức¹, Dương Hoa Xô¹

TÓM TẮT

Sâm Ngọc Linh là một loài thực vật đặc hữu, quý hiếm của Việt Nam, đồng thời là một trong những loài sâm có hàm lượng saponin nhiều nhất so với các loài khác của chi *Panax*. Nhằm mục tiêu khai thác một cách có hiệu quả một số dược chất có giá trị cao trong sâm Ngọc Linh thông qua nuôi sinh khối rễ tóc, 10 dòng rễ tóc Sâm Ngọc Linh có triển vọng được tiến hành đánh giá; sau đó thiết lập điều kiện nhân sinh khối thích hợp cho dòng được chọn lọc trên bioreactor 20 lít. Kết quả đánh giá, phân tích các dòng rễ tóc sâm Ngọc Linh sau 90 ngày nuôi cấy cho thấy tất cả các dòng đều có tăng sinh khối và có khả năng tích lũy saponin. Trong đó, các dòng 0, 2, 4, 6, 8, A đạt sinh khối 11,4 - 12,6 g/bình cao hơn các dòng còn lại; các dòng 0, 4, 5, 8, 33 tích lũy saponin cao đạt 3,2 - 3,7 mg/g. Từ các kết quả trên, dòng rễ tóc số 8 được chọn lọc tiến hành phân tích các saponin thành phần đạt tương tự sâm Ngọc Linh ngoài tự nhiên như Rg1 0,73 mg/g, MR2 0,032 mg/g, VR17,320 mg/g, Rb1 0,034 mg/g, Rd 0,002 mg/g. Kết quả đánh giá các thông số về thể tích môi trường nuôi cấy và thời gian bổ sung môi trường vào bioreactor 20 lít cho thấy thể tích môi trường 10 lít thích hợp để nuôi cấy rễ tóc sâm Ngọc Linh. Ngoài ra, việc sử dụng thể tích môi trường ban đầu là 6 lít và sau khi nuôi cấy 20 ngày bổ sung thêm 4 lít môi trường giúp cải thiện cả sinh khối (hệ số nhân 12,5 lần) và hàm lượng saponin tổng số bằng 12,27%.

Từ khóa: Bioreactor, Sâm Ngọc Linh, saponins, nuôi cấy rễ tóc

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Sâm Ngọc Linh còn được gọi là sâm Việt Nam, sâm Khu 5 hay là cây Thuốc Giấu, có tên khoa học là *Panax vietnamensis* Ha et Grushv., mọc tập trung ở chân núi Ngọc Linh cao 2.578 m (thuộc địa phận hai tỉnh Quảng Nam và Kon Tum), do đó mà loài sâm này được đặt tên là sâm Ngọc Linh. Sâm Ngọc Linh trở thành loài quý hiếm bởi nó chứa một số hoạt chất có giá trị về mặt dược học. Sâm Ngọc Linh là một trong những loài sâm có hàm lượng saponin nhiều nhất so với các loài khác của chi *Panax* trên thế giới và có lượng saponin khung dammaran cao nhất (khoảng 12 - 15% tổng lượng saponin). Ở sâm Ngọc Linh, lượng saponin ocotillol vượt trội so với những loại sâm cùng chi *Panax* như majonoside-R2, thuộc nhóm saponin có cấu trúc mạch nhánh ocotillol tạo nên hoạt tính đặc hữu của nhân sâm Việt Nam. Theo kết quả nghiên cứu của Nguyễn Minh Đức và cộng tác viên (1993), Võ Duy Huấn (2001), Trần Lê Quan và cộng tác viên (2001), Nguyễn Thượng Dong và cộng tác viên (2007), trong thân rễ của sâm Ngọc Linh chứa hơn 52 hoạt chất saponin (ginsenoside), trong đó có 26 hợp chất có cấu trúc hoá học đã biết và 26 saponin có cấu trúc mới không có trong các loại nhân sâm khác được đặt tên là vina-ginsenoside-R1-R24. Sâm Ngọc Linh đặc biệt chứa chất majonoside-R2, đây là saponin nhóm ocotillol chiếm hơn nửa tổng số hàm lượng saponin của sâm Ngọc Linh và là nhóm chất có tác dụng quyết định đến chất lượng loài sâm Việt (Nguyễn Minh Đức và *ctv.*, 1993;

Trần Lê Quan và *ctv.*, 2001). Cũng theo nhóm tác giả này, thân củ sâm có chứa các hợp chất polyacetylen, trong đó 7 hợp chất polyacetylen được phân lập ở phân đoạn ít phân cực và 5 hợp chất đã được xác định cấu trúc. Ngoài ra, trong sâm Ngọc Linh còn chứa 17 thành phần acid béo, 18 acid amin, 20 nguyên tố vi lượng và các hợp chất sterol cụ thể là β -sitosterol và daucosterin (β -sitosteryl-3- α - β -D-glucopyranosid) (Đỗ Huy Bích và *ctv.*, 2004). Trong củ và rễ sâm còn chứa các hợp chất glucid như đường tự do, đường toàn phần, tinh dầu, vitamin C (Nguyễn Thượng Dong và *ctv.*, 2007).

Hiện nay trên thế giới đã có nhiều nghiên cứu ứng dụng hệ thống nuôi cấy bioreactor trong sản xuất sinh khối rễ tóc trên đối tượng là sâm Triều tiên (Dewir *et al.*, 2010; Mallol *et al.*, 2001; Jung *et al.*, 2006; Jeong *et al.*, 2002). Trong các nghiên cứu này, các dòng rễ tóc được tạo ra và sàng lọc nhằm tìm ra các dòng tối ưu, sau đó được tiến hành nuôi cấy trên các hệ thống bioreactor khác nhau nhằm mục tiêu thu được sinh khối cao nhất. Ở Việt Nam, một số nghiên cứu về chuyển gen tạo rễ tóc sâm hay nuôi cấy rễ tóc (Nguyễn Thị Liễu và *ctv.*, 2011) đã được thực hiện và bước đầu đã thực hiện việc nhân sinh khối (Trịnh Thị Hương và *ctv.*, 2016). Tuy nhiên, hiện nay trong nước chưa có nghiên cứu thực hiện một quy trình hoàn thiện từ việc sàng lọc và đánh giá các dòng rễ tóc đến việc nuôi cấy nhân sinh khối rễ tóc theo từng giai đoạn và tiến tới sản xuất trên bioreactor thể tích lớn (20 lít) nhằm mục tiêu sản

¹ Trung tâm Công nghệ Sinh học TP. Hồ Chí Minh