

NGHIÊN CỨU TỔNG QUAN NHÂN GIỐNG CÂY SÂM NGỌC LINH (*Panax vietnamensis* Ha et Grush.) TRONG ĐIỀU KIỆN IN VITRO

Lương Thị Hoan¹, Phan Thị Hương Trà¹, Hoàng Thị Như Nụ¹, Lê Việt Dũng¹,
Dương Thị Phúc Hậu¹, Nguyễn Đăng Minh Chánh²

¹Viện Dược liệu

²Viện Cây lương thực và cây thực phẩm

TÓM TẮT

Sâm ngọc linh (*Panax vietnamensis*, Ha et Grushv), thuộc họ Nhân sâm (Araliaceae) là loại cây đặc hữu và quý hiếm ở Việt Nam, có tác dụng chống stress vật lý, tâm lý, trầm cảm, kích thích hệ miễn dịch, chống oxy hóa, lão hóa... Vì vậy phát triển và bảo tồn nguồn gen để cung cấp cho ngành dược đóng vai trò quan trọng trong chiến lược phát triển của quốc gia nói chung và ngành nông nghiệp, y học nói riêng. Mục tiêu của bài báo này để tổng quát lại các kết quả nghiên cứu về nhân giống cây Sâm ngọc linh bằng phương pháp *in vitro* trong ứng dụng công nghệ nuôi cấy mô tế bào tạo nguồn dược liệu quý và có định hướng phát triển dược liệu Sâm ngọc linh trong tương lai. Mặc dù, một vài nghiên cứu về Sâm ngọc linh phát triển từ thập niên 90 như ứng dụng công nghệ sinh học trong nhân giống tạo nguồn dược liệu Sâm ngọc linh thông qua nuôi cấy mô sẹo, phân vô tính, nuôi cấy sinh khối, chồi, lá, rễ và củ... góp phần mang lại thành công đáng kể cho việc phát triển tạo nguồn cây giống, duy trì và bảo tồn loại sâm quý hiếm ở Việt Nam đã được công bố bởi các nhà khoa học trong và ngoài nước. Tuy nhiên, gặp một số khó khăn trong giai đoạn huấn luyện, phát triển cây con ngoài vườn ươm, và hàm lượng saponin của cây nuôi cấy *in vitro* hiệu quả thấp hơn so với sâm tự nhiên. Những kết quả tổng quan này để làm cơ sở cho các nghiên cứu trong tương lai.

Research overview of *Panax vietnamensis* (*Panax vietnamensis* Ha et Grush.) in vitro condition

Panax vietnamensis is a species of the ginseng genus, and is an endemic, valuable and rare plant species in Vietnam. This species is medicinal properties and the effect of anti stress, physics, mentality, depression and stimulating immune system, antioxidant and aging, etc. Therefore, the development and conservation of genetic resources to provide the pharmaceutical industry have played an important roles in the development strategy of Vietnam in general and agriculture, medicine in particular. The objective of this paper was to review the research results of Ngọc Linh ginseng by the application of tissue culture technology to create precious medicinal herbs and to orientate development for Ngọc Linh ginseng in the future. Although some studies on Ngọc Linh ginseng have been developed since the 1990s such as the application of biotechnology in propagation of Ngọc Linh ginseng through the culture of callus, cloned embryos, biomass, shoot, leaf, roots and tubers. The scientists in nation and the world have published and contributed to the significant success for the development of seedling production, maintaining and conservation the valuable and rare ginseng in Vietnam. However, there are some difficulties in the stage of seedlings in the nursery, and the saponin content of *in vitro* cultivated plants is less effective than natural ginseng. This result is the reasons for further research in the future.

Từ khóa: Mô phân sinh, mô sẹo, nhân giống, rễ bất định, Sâm ngọc linh

Keywords: Meristem, callus, indefinite roots, *Panax vietnamensis*, propagation

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Sâm ngọc linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) được biết đến như một loại thảo dược, một loài cây thuốc đặc hữu của Việt Nam và là một nguồn gen quý hiếm có giá trị rất cao được xếp ngang hàng với các loại sâm quý trên thế giới, bởi lẽ trong Sâm ngọc linh có hàm lượng saponin khá cao, đặc biệt là nhóm dammaran với các hợp chất saponoside đại diện chính là MR2, Rb1 và Rg1 (Trần Công Luân, 2003; Nguyễn Thị Liễu *et al.*, 2011). Tuy nhiên, Sâm ngọc linh có thời gian sinh trưởng dài, phạm vi phân bố hẹp và bị khai thác quá mức nên không đủ đáp ứng nhu cầu cung cấp nguyên liệu cho các ngành dược liệu, mỹ phẩm, thực phẩm chức năng...

Ở Việt Nam, bên cạnh đầu tư nhân giống bằng phương pháp truyền thống, đã có nhiều kết quả nghiên cứu về nhân giống, sinh khối bằng phương pháp công nghệ sinh học cũng đã được khuyến cáo. Kết quả nuôi cấy sinh khối rễ bất định cũng được xem như là phương pháp hiệu quả cho việc sản xuất sinh khối vì chúng sinh trưởng nhanh và sản xuất hợp chất ổn định (Asaka *et al.*, 1993). Sâm ngọc linh là loài cây từ lâu đã được đề cập và phát triển tạo nguồn giống với hai hình thức chủ yếu là nhân giống từ hạt và tạo giống từ đầu mầm (thân rễ ngầm). Tuy nhiên, hạt giống chỉ thu được ở cây từ 4 năm tuổi trở lên, nguồn giống bị ảnh hưởng của nhiều yếu tố như thời tiết, động vật ăn (hạt) tỷ lệ nảy mầm bình thường chỉ đạt 50

- 60%, thậm chí có khi chỉ đạt 20 - 30%, do đó giá thành cây cao (Vũ Thị Hiền *et al.*, 2014; Nguyễn Thanh Bình và Nguyễn Ngọc Duy, 1996). Việc sử dụng đầu mầm làm giống gây lãng phí nhiều về nguồn dược liệu. Tác giả Nguyễn Hữu Hồ (2013) đã nghiên cứu xây dựng công nghệ sản xuất sinh khối tế bào và rễ Sâm ngọc linh *in vitro* đưa ra một số kết quả đáng ghi nhận về kỹ thuật nuôi nhân mô phôi góp phần tạo chuỗi giá trị nghiên cứu về Sâm ngọc linh.

Đến nay đã có khá nhiều nghiên cứu về việc sử dụng các phương pháp nhân giống cây Sâm ngọc linh. Vì vậy mục tiêu của bài viết này nhằm tóm tắt lại các kết quả nghiên cứu về nhân giống cây Sâm ngọc linh để bạn đọc có thể tham khảo và có cái nhìn bao quát về cây trồng quý hiếm này.

II. NUÔI CÂY MÔ PHÂN SINH

Mô phân sinh cấu tạo bởi những tế bào non chưa phân hóa, vách mỏng bằng cellulose, không có dự trữ dinh dưỡng, xếp xít vào nhau, không để hở những khoảng gian bào, các tế bào đó phân chia rất nhanh để tạo thành các mô khác (Hoàng Minh Tấn *et al.*, 2006). Đối với Sâm ngọc linh, việc nuôi cấy mô phân sinh bằng nhiều hình thức khác nhau như mô phân sinh lá, thân rễ và củ. Các loại mô phân sinh này thể hiện trong môi trường nghiên cứu cũng như các công trình nghiên cứu khác nhau và được thể hiện trong bảng 1:

Bảng 1. Tổng hợp công trình nghiên cứu trước đây

Loại mô phân sinh	Môi trường cơ bản	Chất điều hòa sinh trưởng	Kết quả đạt được	Công trình nghiên cứu
Củ	MS	1.0 mg/l 2,4D + 0.2 mg/l TDZ	Cho tỷ lệ tăng sinh khối mô sẹo	Dương Tấn Nhựt <i>et al.</i> , 2010a
	SH	1mg/l BA + 1mg/l NAA + 2g/l than hoạt tính	Số chồi tái sinh mô sẹo cao nhất	
	½ MS	1mg/l BA + 0.5 mg/l NAA + 50 g sucrose + 2g/l than hoạt tính	Tăng trưởng chồi	

Loại mô phân sinh	Môi trường cơ bản	Chất điều hòa sinh trưởng	Kết quả đạt được	Công trình nghiên cứu
Lá và cuống lá	MS ½	1,0 mg/l 2,4D + 0,2 mg/l TDZ	Callus có khả năng tăng sinh nhanh	Dương Tấn Nhựt <i>et al.</i> , 2010b
	MS	1,0 mg/l BA + 0,5 mg/l NAA + 30 g/l sucrose + 1,0 g/l than hoạt tính	Callus tái sinh chồi và chồi tăng trưởng nhanh	
	SH	3,0 mg/l NAA	Callus tái sinh rễ và rễ tăng sinh nhanh	
Chồi cây từ <i>In vitro</i>	SH	1,0 mg/l NAA + 2,0 mg/l BA + 50 g/l sucrose	Tạo củ thành công trong phòng	Hoàng Xuân Chiến <i>et al.</i> , 2011
Củ	MS	1mg/l 2,4D	Hình thành mô sẹo và rễ bất định tốt hình thành sau 2 tháng nuôi cấy	Nguyễn Thị Liễu <i>et al.</i> , 2011.
	B5	5mg/l IBA	Hình thành và phát triển rễ bất định cũng như sự tăng sinh khối rất khả quan	
Rễ	MS	1,0mg/l 2,4D + 0,2mg/l Kin + 0,5 mg/l NAA + 0,1mM + 300mg/l C ₅ H ₉ NO ₂	Tần số cao về sự phát triển phôi đạt (93,3% và 86,7%)	Nhut, D.T. <i>et al.</i> , 2012.
Lá, cuống lá, củ và mô sẹo	SH	5mg/l IAA 5mg/l IBA 3mg/l NAA	Loại mẫu thích hợp là mẫu lá, khả năng tái sinh rễ bất định từ mẫu lá. Kích thích sự phát triển rễ và sự tăng trọng lượng tươi của mẫu lá là IBA và NAA có hiệu quả hơn so với IAA. Tỷ lệ phát sinh rễ ở môi trường có bổ sung IBA và NAA không có sự khác biệt nhau và đều đạt 100%	Trịnh Thị Hương <i>et al.</i> , 2012
Lá	SH	5mg/l IBA	Cho khả năng tái sinh rễ bất định cao nhất từ các mẫu lá ở các chỉ tiêu về tỉ lệ phát sinh rễ (100%), số rễ/mẫu (46,7), chiều dài rễ (2,67 cm), trọng lượng tươi (121,33 mg/mẫu) và trọng lượng khô (12,33 mg/mẫu).	Hồ Thanh Tâm <i>et al.</i> 2013.
Lá	MS	2mg/l NAA	Hiệu quả phát sinh phôi trực tiếp cao nhất (29,49 phôi/mẫu)	Vũ Thị Hiền <i>et al.</i> , 2014

2.1. Vai trò của các loại mô phân sinh

Mô phân sinh là các loại mô gồm những tế bào thường xuyên thực hiện sự phân chia để hình thành nên những tế bào mới những tế bào này sẽ chuyển hóa để tạo nên các loại mô khác nhau (Hoàng Minh Tuấn *et al.*, 2006). Trong nghiên cứu này loại mô phân sinh được sử dụng nuôi cấy bao gồm lá, cuống lá, củ, rễ và mô sẹo (Vũ Thị Hiền *et al.*, 2015; Hồ Thanh Tâm *et al.*, 2013; Nguyễn Thị Liễu *et al.*,

2011; Hoàng Xuân Chiến *et al.*, 2011; Dương Tấn Nhựt *et al.*, 2010). Các loại mô phân sinh này cho kết quả khác nhau vì phụ thuộc vào nguồn mẫu và kích thước mẫu, trong 5 loại mẫu (bảng 1) đã được nghiên cứu ảnh hưởng rõ rệt tới khả năng tái sinh chồi và rễ bất định. Trịnh Thị Hương và đồng tác giả (2012) đã chỉ ra trong bốn loại mẫu (mô phân sinh) được sử dụng như lá, cuống lá, củ và mô sẹo thì mẫu lá có kích thước 1,5 × 1,5cm là thích hợp nhất cho sự tái sinh rễ bất định đã đạt 52,2 rễ/mẫu

với chiều dài 2,5cm sau 8 tuần nuôi cấy, tỷ lệ phát sinh ra rễ là 100%. Điều này có thể tại gân chính của lá là nơi vận chuyển các chất dinh dưỡng và các auxin, do đó hàm lượng auxin nội sinh tại vị trí này cao hơn so với phần thịt lá, bên cạnh đó khả năng hấp thụ và vận chuyển chất dinh dưỡng và auxin ngoại sinh cũng diễn ra nhanh hơn (Trịnh Thị Hương *et al.*, 2012), vì vậy lá có khả năng tái sinh rễ bất định tốt hơn các mẫu khác. Mẫu cấy từ củ có kích thước 1cm × 1cm × 0,25cm trên môi trường MS có bổ sung 1mg/l 2,4D, 50g/l sucrose, 8g/l agar cho kết quả rễ bất định tốt nhất sau 2 tháng nuôi cấy (Nguyễn Thị Liễu *et al.*, 2011). Điều này chứng tỏ rằng kích thước mẫu đã ảnh hưởng tới khả năng tái sinh chồi và rễ bất định. Những mẫu có kích thước quá nhỏ, nguồn dự trữ trong mô ít, khả năng sống sót của mẫu thấp, mẫu dễ khô héo và chết (Dương Tấn Nhựt và Bùi Thế Vinh, 2009). Còn các mẫu có kích thước lớn có nguồn dinh dưỡng dự trữ dồi dào hơn (Nguyễn Đức Lượng và Lê Thị Thùy Tiên, 2002) và chứa nhiều tế bào hơn, hệ thống mạch vận chuyển cũng dày hơn nên khả năng hấp thụ các chất dinh dưỡng tốt hơn các mẫu có kích thước nhỏ (Trịnh Thị Hương *et al.*, 2012). Tuy nhiên, một số nghiên cứu khác cũng khẳng định không phải mẫu có kích thước lớn thì sẽ tái sinh hiệu quả hơn (Grant & Hammati 2000; Trịnh Thị Hương *et al.*, 2012).

Ngoài ra các mô phân sinh (lá, cuống lá, củ, mô sẹo...) có thể phát triển thích hợp phụ thuộc vào môi trường, chất phụ gia, chất điều hòa sinh trưởng trong từng giai đoạn khác nhau. Ví dụ trong cùng mẫu lá và cuống lá nuôi cấy trong môi trường 1/2 MS 1,0 bổ sung mg/l 2,4D + 0,2 mg/l TDZ cho kết quả mô sẹo có khả năng tăng sinh nhanh, nhưng trong môi trường MS bổ sung 1,0 mg/l BA + 0,5 mg/l

NAA + 30 g/l sucrose + 1,0 g/l than hoạt tính cho kết quả mô sẹo tái sinh chồi và chồi tăng trưởng nhanh (Dương Tấn Nhựt *et al.*, 2010b). Vẫn từ các mẫu lá này cấy trong môi trường SH bổ sung 3,0 mg/l NAA kết quả chỉ ra mô sẹo tái sinh rễ và tăng sinh rễ (Dương Tấn Nhựt *et al.*, 2010b), khi cấy trong môi trường này bổ sung 5mg/l IBA cho khả năng tái sinh rễ bất định cao nhất (Hồ Thanh Tâm *et al.*, 2013). Đối với mô phân sinh củ nuôi cấy trong môi trường B5 bổ sung 5mg/l IBA (Bảng 1) kết quả cho thấy hình thành và phát triển rễ bất định cũng như sự tăng sinh khối rất khả quan (Nguyễn Thị Liễu *et al.*, 2011). Kết quả này chứng tỏ rằng tùy thuộc vào nguồn gốc các loại mẫu, phân chia, hình thành và phát triển các tế bào mới khác nhau phụ thuộc vào môi trường và chất điều hòa sinh trưởng tạo nên sự hình thành mô sẹo, chồi rễ khác nhau, tuy nhiên tuổi sinh lý của mô cấy cũng cần quan tâm do ảnh hưởng của nó liên quan đến sự phát sinh hình thái ở thực vật nuôi cấy như sự tạo mô sẹo, tạo chồi hay rễ bất định.

2.2. Vai trò của môi trường cơ bản

Môi trường cơ bản bao gồm các thành phần khoáng vi lượng và đa lượng, vitamin, các amino acid, nguồn các carbon là một trong những yếu tố quan trọng nhất trong sự tăng trưởng và phát triển hình thái của tế bào và mô thực vật thay đổi tùy theo loài và bộ phận nuôi cấy (Ngô Xuân Bình, 2009). Đối với cùng một mẫu cấy nhưng tùy theo mục đích thí nghiệm thành phần môi trường cũng thay đổi theo giai đoạn phân hóa của mẫu cấy. Trong nuôi cấy *in vitro* các khoáng chất có ý nghĩa rất quan trọng đến sự sinh trưởng và tích lũy các hợp chất thứ cấp (Dương Tấn Nhựt *et al.*, 2010a). Vì vậy môi trường khoáng thích hợp là điều kiện thuận lợi cho sự tăng sinh khối callus của Sâm ngọc linh (Bảng 2).

Bảng 2. Ảnh hưởng của hàm lượng khoáng đến sự tăng sinh khối của callus và chồi Sâm ngọc Linh

Môi trường	Tỷ lệ tăng sinh khối callus	Tỷ lệ tăng sinh khối của chồi
MS	3,16	5,14
MS ½ ^a	3,96	4,10
½ MS ^b	3,46	4,59

a - Môi trường MS có thành phần đa lượng giảm một nửa

b - Môi trường MS có thành phần đa lượng và vi lượng giảm một nửa

Nguồn: Dương Tấn Nhựt *et al.*, 2010.

Kết quả bảng 2 cho thấy trong 3 môi trường callus phát triển chậm nhất ở môi trường MS, có lẽ trong môi trường này nồng độ các chất khoáng đa lượng cao hơn nên không thích hợp cho sự tăng sinh khối callus. Môi trường MS 1/2 có tỷ lệ chất khoáng phù hợp với phát triển của callus hơn. Ngược lại, đối với nguyên tố khoáng đặc biệt là nguyên tố đa lượng có vai trò quan trọng trong quá trình sinh trưởng, phát triển của chồi. Kết quả nghiên cứu của Dương Tấn Nhựt (2010a) cho thấy trong môi trường MS đầy đủ, tỷ lệ tăng sinh khối của chồi lớn hơn so với môi trường 1/2MS và MS1/2. Điều đó chứng tỏ rằng môi trường MS là môi trường có hàm lượng khoáng thích hợp cho tăng trưởng của chồi.

Nghiên cứu ảnh hưởng của hàm lượng khoáng đến quá trình phát triển của cây nuôi cấy *in vitro* cho thấy rằng môi trường MS có chứa 1,25mm photphate, trong một số trường hợp khi tăng nồng độ photphat lên 1,86mm có lợi cho tăng trưởng của mẫu cấy (Jones & Murashige, 1974) hoặc với hàm lượng 3,71mM (Thorpe & Murashige 1970) để cảm ứng chồi từ mô sẹo hoặc tăng tốc độ nhân chồi trong môi trường nuôi cấy chồi. Môi trường nuôi cấy chồi *Psidium guajava* thiếu Ca thì chồi sẽ bị thối ngọn, hiện tượng này cũng xảy ra đối với chồi *Sequoiadendron giganteum* (Dương Tấn Nhựt *et al.*, 2010a).

Nhìn chung các nhà khoa học sử dụng môi trường cơ bản nuôi cấy rất khác nhau, việc lựa chọn môi trường nuôi cấy với thành phần hóa học đặc trưng phụ thuộc vào một số yếu tố: (1) đối tượng cây trồng hoặc mô nuôi cấy khác nhau có nhu cầu khác nhau về thành phần môi trường; (2) phương thức nuôi cấy hoặc mục đích nghiên cứu khác nhau (nuôi cấy tạo mô sẹo phôi hoá hoặc phôi vô tính, nuôi cấy tế bào trần hoặc dịch lỏng tế bào, vi nhân giống); (3) trạng thái môi trường khác nhau (đặc, lỏng và bán lỏng...).

Vì vậy trong môi trường cơ bản các khoáng chất đóng vai trò rất quan trọng đối với cây trồng. Ví dụ, Mg là một phần của phân tử diệp lục, Ca là thành phần của màng tế bào, N là thành phần quan trọng của amino axit, vitamin, protein và các axit nucleic (Ngô Xuân Bình, 2009). Tương tự, Fe, Zn và Mo cũng là thành phần của một số enzyme (Dương Tấn Nhựt *et al.* 2010b; Hoàng Xuân Chiên *et al.*, 2011). Các môi trường khác nhau có hàm lượng và thành phần chất khoáng khác nhau, ví dụ thành phần và nồng độ khoáng của môi trường White hoặc Knop khá nghèo nàn, nhưng lại rất giàu ở môi trường MS và B5, muối.

Đối với Sâm ngọc linh, môi trường các nghiên cứu sử dụng chủ yếu là môi trường MS và SH. Hai loại môi trường cơ bản này

phát triển các mô phân sinh tùy vào mục đích thí nghiệm, đối tượng nuôi cấy trong nghiên cứu về các loài Sâm, đặc biệt môi trường SH (Schenk và Hildebrandt, 1972) lại tỏ ra rất hiệu quả để nuôi cấy rễ bất định cây Nhân sâm trong hệ thống bioreactor (Park *et al.*, 2000). Một số nghiên cứu khác lại chỉ ra việc sử dụng môi trường SH loại bỏ NH_4NO_3 ra khỏi môi trường cũng làm tăng hiệu quả tái sinh chồi Sâm ngọc linh (Dương Tấn Nhựt *et al.*, 2010b) và làm tăng tỷ lệ tạo rễ bất định và số lượng rễ trên mẫu cây của cây (Han *et al.*, 2006). Trong hai loại môi trường MS và SH, các chỉ số về số lượng chồi/mẫu, trọng

lượng tươi của chồi ((Dương Tấn Nhựt *et al.*, 2010b) và tỷ lệ tạo củ (Hoàng Xuân Chiến *et al.*, 2011) trên môi trường SH là vượt trội so với môi trường MS do hàm lượng các vitamin trong môi trường SH cao hơn rất nhiều so với môi trường MS, đặc biệt là trong môi trường SH không có mặt NH_4NO_3 , hàm lượng nitơ trong môi trường bị suy giảm cũng đã tác động đến khả năng tái sinh chồi và tạo củ thông qua việc làm giảm hay ngưng trệ sinh sản sinh dưỡng và giúp cho quá trình tích lũy chất dự trữ hình thành chồi và củ Sâm ngọc linh (Dương Tấn Nhựt *et al.*, 2010 a, b; Hoàng Xuân Chiến *et al.*, 2011) (Bảng 3).

Bảng 3. Ảnh hưởng của các môi trường khoáng đến khả năng hình thành củ Sâm ngọc linh

Môi trường	Tỷ lệ tạo củ (%)	Hình thái củ
MS	43,33	Củ nhỏ, chồi nhỏ, có nhiều rễ tơ
½ MS ^a	65,72	Củ rất nhỏ, có nhiều chồi, không thấy rễ xuất hiện
SH	90	Củ to, chắc, ít chồi, chồi to, rễ ít
½ SH ^b	61,50	Củ to, ít rễ

a - Môi trường MS có thành phần đa lượng giảm một nửa

b - Môi trường SH có thành phần đa lượng giảm một nửa

Nguồn: Hoàng Xuân Chiến *et al.*, 2011.

Kết quả này cũng khẳng định rằng thành phần khoáng đa lượng và vi lượng trong môi trường nuôi cấy có ý nghĩa quan trọng đến sự tăng sinh của mô sẹo, tỷ lệ tăng sinh khối của chồi, khả năng tái sinh chồi, tạo củ của Sâm ngọc linh. Trong đó, nitrogen là nhân tố khá quan trọng và đã được chứng minh bằng nghiên cứu trên đối tượng sâm (Dương Tấn Nhựt *et al.*, 2012). Trong thí nghiệm môi trường MS và ½ MS có nồng độ ion NH_4^+ và NO_3^- quá cao, ngược lại môi trường 1/2 SH lại có nồng độ ion NH_4^+ và NO_3^- quá thấp, chính vì vậy các môi trường này không phù hợp. Trong môi trường B5, nồng độ hai ion này không chênh lệch nhiều so với môi trường SH, nhưng tỷ lệ $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ cao hơn

so với môi trường SH nên đã không phù hợp cho sự tăng sinh của mô sẹo Sâm ngọc linh (Dương Tấn Nhựt *et al.*, 2012). Như vậy môi trường phù hợp cho việc tăng sinh mô sẹo, rễ bất định, chồi và củ Sâm ngọc linh là môi trường SH (Dương Tấn Nhựt *et al.*, 2010a, b; Hoàng Xuân Chiến *et al.*, 2011; Dương Tấn Nhựt *et al.*, 2012a,b).

2.3. Vai trò của chất điều hòa sinh trưởng

Bên cạnh các khoáng chất, các chất phụ gia cung cấp dinh dưỡng cho nuôi cấy *in vitro*, việc bổ sung một hoặc nhiều chất điều hòa sinh trưởng như auxin, cytokinin và gibberellin là rất cần thiết để kích thích sự sinh trưởng, phát triển và phân hóa cơ quan, cung cấp sức sống tốt cho mô và các tổ chức.

Auxin là nhóm chất điều hòa sinh trưởng thực vật được sử dụng thường xuyên trong nuôi cấy mô tế bào thực vật bao gồm các chất IAA, IBA, NAA và 2,4 - D (Hoàng Minh Tấn *et al.*, 2006). Auxin đóng vai trò rất quan trọng, đặc biệt là kích thích sự phân chia và tăng rộng của các tế bào vùng thượng tầng, tạo không gian tích trữ chất dự trữ, ngoài ra auxin còn giúp cho tế bào tập trung chất dinh dưỡng, thu hút chất dinh dưỡng và gia tăng áp suất thẩm thấu trong tế bào (Hoàng Xuân Chiến *et al.*, 2011; Dương Tấn Nhựt *et al.*, 2010a; Hoàng Minh Tấn *et al.*, 2006). Sự đáp ứng với loại và hàm lượng auxin của các loại cây khác nhau thì không hoàn toàn giống nhau do đó tìm được loại auxin và nồng độ thích hợp là công việc cần thiết.

Cytokinin là hormone liên quan chủ yếu đến sự phân chia tế bào, sự thay đổi ưu thế ngọn, và phân hóa chồi trong nuôi cấy mô. Các cytokinin được sử dụng thường xuyên BA, kinentin, zeatin (Hoàng Minh Tấn *et al.*, 2006). Vai trò của cytokinin rất quan trọng trong sự hình thành và phát triển ở các loài thực vật như kích thích phát sinh chồi trong nuôi cấy mô, tạo và nhân callus, tạo các chồi bất định (Ngô Xuân Bình, 2009; Hoàng Minh Tấn *et al.*, 2006).

Việc kết hợp hai chất điều hòa sinh trưởng auxin và cytokinin theo một tỷ lệ thích hợp sẽ kích thích các quá trình phát sinh hình thái khác nhau, nên các chất điều hòa sinh trưởng thực vật đóng một vai trò rất quan trọng trong sự hình thành các cơ quan, và đặc biệt nhận thấy có sự ảnh hưởng qua lại giữa auxin và cytokinin trong quá trình tạo củ gừng ở nồng độ đường cao (Young Zheng *et al.*, 2008). Việc kết hợp giữa NAA và BA ở nồng độ đường thấp cho sự hình thành củ nghệ (Raghu, 1997). Sự kết hợp giữa auxin và cytokinin cũng cảm ứng sự hình thành và phát triển của cấu trúc lưu

giữ như củ và rễ củ, thể hiện ở một số loài cây trồng khoai tây và khoai mỡ (Jasik & Mantell 2000; Jasik & Klerk 2006; Kim *et al.*, 2005).

Tuy nhiên, yêu cầu đối với những chất này thay đổi tùy theo loài thực vật, loại mô, hàm lượng chất điều hòa sinh trưởng nội sinh của chúng. Ở Sâm ngọc linh, để tăng cường sự sinh trưởng của mẫu thì môi trường nuôi cấy phải được bổ sung thêm các vitamin, axit amin, các loại dịch chiết và các chất điều hòa sinh trưởng thực vật. Đặc biệt tỷ lệ auxin/cytokinin đóng một vai trò quan trọng trong tái sinh chồi, sự phát sinh hình thái trong hệ thống nuôi cấy. Việc cân bằng auxin/cytokinin được khảo sát trên sự tạo củ của Sâm ngọc linh *in vitro* thông qua cân bằng của NAA (1 mg/l) và BA (2mg/l), mức cân bằng của auxin và cytokinin này cho tỷ lệ hình thành củ và hình thái củ tốt nhất (Hoàng Xuân Chiến *et al.*, 2011). Với mức cân bằng 1 mg/l BA và 1 mg/l NAA cho tái sinh chồi tốt nhất, 6,3 chồi/mẫu. Trong khi 1 mg/l BA và 0,5 mg/l NAA thích hợp cho sự tăng trưởng của chồi mô sẹo của Sâm ngọc linh (Dương Tấn Nhựt *et al.*, 2009; 2010). Vì vậy, NAA và BA kết hợp với nhau ở một nồng độ thích hợp tạo nên một sự cân bằng giữa auxin và cytokinin trong mô cấy và quyết định tạo chồi, tạo rễ hay hình thành củ.

Ngoài ra, các nghiên cứu trên các đối tượng thuộc chi *Panax* cho thấy giai đoạn khởi tạo mô sẹo thường có sự kết hợp giữa cytokinin và auxin. Theo Dương Tấn Nhựt và đồng tác giả (2009) thì quá trình khởi tạo mô sẹo ở auxin phù hợp nhất là 2,4 - D với nồng độ 1,0 mg/l. Nhưng khi sử dụng kết hợp auxin và cytokinin với mục đích nhân nhanh mô sẹo thì auxin sử dụng là 2,4 - D (1,0 mg/l) và cytokinin là TDZ (0,2 mg/l) cho tỷ lệ tăng sinh khối mô sẹo tốt nhất, trọng lượng tươi trung bình 520mg, tăng

3,25 lần so với mẫu mô sẹo ban đầu (Đương Tấn Nhựt *et al.*, 2010b). Điều này chứng tỏ rằng kết hợp auxin và cytokinin ảnh hưởng đến mô nuôi cấy của Sâm ngọc linh. Bên cạnh đó auxin cũng ảnh hưởng rất lớn đến việc hình thành rễ bất định của Sâm ngọc linh (bảng 4).

Bảng 4. Ảnh hưởng của auxin lên khả năng tái sinh rễ bất định được nuôi cấy từ mẫu lá của Sâm ngọc linh

Chất auxin	Nồng độ (mg/l)	Tỷ lệ phát sinh rễ	Số rễ/mẫu	Chiều dài rễ (cm)
IAA ^a	5	80,02	7,8	1,46
IBA ^b	5	100,0	48,4	2,7
NAA ^c	3	100,0	31,0	2,06

* Các chữ cái a, b, c là nồng độ tối ưu nhất của từng loại auxin ứng với loại mẫu lá cho tái sinh rễ bất định cao nhất của Sâm Ngọc linh.

Nguồn: Trịnh Thị Hương *et al.*, (2012).

Sau khi xác định được nồng độ tối ưu của từng loại auxin cho sự tái sinh rễ bất định (5mg/l IAA, 5mg/l IBA và 3 mg/l NAA), tỷ lệ phát sinh rễ, số rễ trên mẫu và chiều dài rễ của IBA và NAA là có hiệu quả hơn so với IAA, Trịnh Thị Hương và đồng tác giả (2012) khẳng định trong ba loại auxin sử dụng thì IBA (5mg/l) cho hiệu quả tái sinh rễ bất định cao nhất. Kết quả này cũng khẳng định auxin thường được sử dụng để kích thích ra rễ là IAA, IBA và NAA, trong đó IBA là có tác động hiệu quả nhất, điều này tương tự với nghiên cứu của George và Sherington (1984) (Trịnh Thị Hương *et al.*, 2012).

Vì vậy, chất điều hòa sinh trưởng bao gồm auxin, cytokinin có vai trò quan trọng và ảnh hưởng rất lớn đến sự hình thành và phát triển mô nuôi cấy tạo mô sẹo, tái sinh chồi, tạo rễ, và tái sinh rễ bất định và hình thành củ Sâm ngọc linh. Đặc biệt là xác định hàm lượng

auxin và cytokinin phù hợp để đạt hiệu quả cao nhất.

2.4. Vai trò chiếu sáng

Nguồn ánh sáng được sử dụng thông dụng trong nuôi cấy *invitro* là ánh sáng huỳnh quang. Ánh sáng điều khiển sự sinh trưởng và phát triển của thực vật thông qua hai con đường quang hợp và phát sinh hình thái. Ở các mô nuôi cấy, có ba yếu tố ánh sáng tác động đến sinh trưởng của phát sinh hình thái đó là bước sóng, cường độ và thời gian chiếu sáng. Một số nghiên cứu chỉ ra ánh sáng có tác động đáng kể đến sự sinh trưởng, phát sinh hình thái và sự hình thành của các enzyme đặc hiệu cho quá trình hình thành các hợp chất thứ cấp flavonoid glycosides (George *et al.*, 2008).

Đối với Sâm ngọc linh nuôi cấy *in vitro*, ánh sáng có vai trò khác nhau trong quá trình hình thành mô sẹo, nhân nhanh mô sẹo, kéo dài thân và chồi, rễ và việc tích lũy hoạt chất sponin. Nghiên cứu của Hoàng Văn Cương và đồng tác giả (2012) chỉ ra rằng ánh sáng xanh và đỏ kết hợp với tỷ lệ 50:50 thích hợp cho sự khởi tạo và nhân nhanh mô sẹo cây Sâm ngọc linh, ánh sáng xanh và đỏ kết hợp với tỉ lệ 50:50 có thể được sử dụng trong giai đoạn đầu cho quá trình sinh trưởng của cây Sâm ngọc linh, trong khi đó ánh sáng huỳnh quang được sử dụng trong giai đoạn sau nhằm gia tăng sự tích lũy saponin (0,2422% Rb₁ và 0,7981% MR₂). Vì vậy, ánh sáng đóng một vai trò quan trọng đến quá trình quang hợp cũng như quá trình tổng hợp các chất trong cây, điều kiện chiếu sáng khác nhau cho thấy ánh sáng có vai trò trong quá trình tổng hợp các sắc tố như ánh sáng xanh tạo nên màu xanh của cây (Hoàng Văn Cương *et al.*, 2012), trong khi ánh sáng LED xanh dưới điều kiện 100% chiếu sáng lại ức chế quá trình tạo rễ cây Sâm ngọc linh nuôi cấy *in vitro* hoàn toàn không ra rễ (Đương Tấn

Nhật *et al.*, 2010a). Ánh sáng cũng làm ức chế quá trình tạo rễ thứ cấp của mẫu rễ bất định vì thế ở ngoài ánh sáng hoàn toàn rễ bất định hầu như không hình thành rễ thứ cấp tỷ lệ tạo rễ thứ cấp chỉ đạt 12,33%, ở điều kiện 50% tối, tỷ lệ tạo rễ thứ cấp cao hơn điều kiện sáng hoàn toàn nhưng thấp hơn hẳn điều kiện tối hoàn toàn (100%) và 80% tối, ngoài ra các chỉ tiêu khác như chiều dài rễ, khối lượng tươi, khô (Nguyễn Thị Nhật Linh *et al.*, 2015).

Tùy theo từng loại mẫu cây, ánh sáng cần hoặc không cần trong suốt thời gian tạo thành mô sẹo như mẫu cây cuống lá được nuôi cấy trong điều kiện chiếu sáng 16 giờ/ngày là thích hợp cho quá trình cảm ứng và tăng sinh mô sẹo “xốp” Sâm ngọc linh (Lê Kim Cương *et al.*, 2012). Dưới ánh sáng huỳnh quang, cường độ chiếu sáng khoảng $40 - 45 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$, thời gian chiếu sáng 16 giờ/ngày các chồi trong ống nghiệm sinh trưởng và phát triển tốt nhất (trong 8 tuần nuôi cấy) (Nguyễn Việt Cường *et al.*, 2013; Nguyễn Bảo Triệu *et al.*, 2013), tỷ lệ phối hợp 30% ánh sáng LED xanh kết hợp với 70% ánh sáng LED đỏ giúp cho chồi Sâm ngọc linh sinh trưởng và phát triển tốt nhất, ở tỷ lệ 90% ánh sáng xanh kết hợp với 10% ánh sáng LED xanh thì chiều cao cây đạt cao nhất (Đương Tấn Nhật *et al.*, 2010). Vì vậy điều kiện chiếu sáng khác nhau sẽ ảnh hưởng khác nhau lên sự sinh trưởng và phát triển của chồi, mô sẹo Sâm ngọc linh.

2.5. Vai trò quá trình huấn luyện cây *in vitro*

Quá trình huấn luyện cây con vườn ươm là giai đoạn quan trọng trong quy trình nuôi cấy *in vitro*, từ việc huấn luyện cây con trong phòng thí nghiệm đến chuẩn bị vườn ươm, chuẩn bị giá thể huấn luyện cây mô. Việc tiến hành đánh giá và thu thập các chỉ tiêu như tỷ lệ sống sót của cây, tỷ lệ nảy chồi của cây, độ dài trung bình của rễ, chiều cao trung bình của chồi, tỷ lệ cây có hai chồi trở lên, kết quả

nghiên cứu của Đương Tấn Nhật và đồng tác giả (2010b) cho thấy sau 6 tháng tại khu vực vườn ươm thiết lập vùng núi cao tỷ lệ sống 87% trong đó 73% cây có hai chồi trên một củ, nhiều cây đạt 4 - 5 chồi trên một củ, chiều dài trung bình của rễ lên tới 10cm. Tuy nhiên việc vận chuyển khó khăn, việc chăm sóc và phòng ngừa sâu bệnh không thực hiện được tốt sau một thời gian trồng thực địa cây sâm con có biểu hiện héo rũ, ngã ngực chết hàng loạt, tỷ lệ sống sót chỉ còn 30 - 40% (Nông thôn mới Quảng Nam, 2014), nguyên nhân là do xuất hiện một số chủng loại nấm gây bệnh lở cổ rễ.

Hầu như tất cả các nghiên cứu khác mới tập trung chủ yếu trong phòng thí nghiệm, quy trình huấn luyện bên ngoài vườn ươm chưa được quan tâm ở các nghiên cứu. Quá trình chăm sóc, thời gian cây được huấn luyện để thích hợp với điều kiện bên ngoài, chế độ tưới nước, độ tàn che và xử lý nấm bệnh trước khi cây được đưa vào bầu, cây con chăm sóc vườn ươm chưa một nghiên cứu nào đưa ra. Vì vậy đây là định hướng cần nghiên cứu trong tương lai.

III. ĐỊNH HƯỚNG NGHIÊN CỨU TIẾP THEO

Sâm ngọc linh là loại sâm đặc hữu của Việt Nam, chứa nhiều hoạt chất hóa học hữu ích và mang đến những tác dụng thực tiễn thần kỳ đối với sức khỏe của con người. Đây là loài cây quý hiếm, nên nhân giống tốt và có chất lượng phục vụ cho công tác bảo tồn và phát triển loài cây này là công việc quan trọng. Mặc dù, ứng dụng công nghệ nuôi cấy mô tế bào của loài Sâm ngọc linh không còn mới mẻ, chúng đã được nghiên cứu và phát triển từ những năm 90 bằng việc nuôi cấy từ lá, cuống lá, củ, thân rễ, tạo mô sẹo, rễ bất định, tạo củ và hạt nhân tạo nhằm mục tiêu tạo nguồn cây giống sâm sạch bệnh, chủ động nguồn nguyên liệu để cung cấp cho ngành dược, tiết kiệm giá thành

sản phẩm, tạo ra giống đồng đều và có hàm lượng saponin giống như sâm tự nhiên.

Tuy nhiên cho đến nay, nuôi cấy sinh khối cây Sâm ngọc linh vẫn đang được tập trung nghiên cứu nhằm nâng cao năng suất và giảm thiểu những ảnh hưởng tồn dư hóa chất, mang đến tính an toàn cho sản phẩm, nhưng vẫn còn nhiều hạn chế như:

- Điều kiện cây con đưa ra ngoài vườn ươm đối với cây nuôi cấy mô chết hàng loạt, nguyên nhân này có thể do chế độ chăm sóc như tưới nước, phòng trừ sâu bệnh hại trên đất, điều kiện nhiệt độ vườn ươm. Các vấn đề này là điều đáng cần quan tâm và đang phải đối mặt và là một thách thức lớn đối với nhà khoa học và các nhà quản lý để tìm ra hướng nghiên cứu mới trong tương lai nhằm đảm bảo sản xuất dược liệu cũng như bảo đảm nguồn cây giống chất lượng tốt.

- Xử lý nấm bệnh đối với cây con khi đưa ra ngoài môi trường tự nhiên chưa hiệu quả, sau thời gian cây con từ phòng thí nghiệm ra bầu khoảng 18 - 20 ngày cây chết hàng loạt do nấm bệnh (Báo Nông thôn mới Quảng Nam, 2014). Vấn đề này cần được nghiên cứu tìm hiểu về đối tượng nấm bệnh cổ rễ đối với Sâm ngọc linh.

- Điều kiện vườn ươm hiện tại ở địa hình có độ cao từ 1000 mét trở lên, có nhiệt độ khoảng 15 - 25°C, dưới tàn che hoặc mật độ che phủ rừng khoảng trên 80% (Báo Nông thôn mới Quảng Nam, 2014; Dương Tấn Nhựt 2010b), xa phòng thí nghiệm dẫn tới việc vận chuyển cây con từ phòng thí nghiệm tới vườn ươm là vấn

đề cần phải xem xét trong quá trình huấn luyện cây ra rễ. Điều này ảnh hưởng không nhỏ tới nghiên cứu và cần đưa ra hướng phù hợp trong chế độ chăm sóc đối với cây con ngoài vườn ươm.

Vì vậy, các nhà khoa học cần phải tiếp tục nghiên cứu để đánh giá cây sâm cấy mô ngoài thực tiễn, so sánh hàm lượng saponin trong sâm cấy mô với sâm được nhân giống hữu tính bằng hạt và đầu mầm. Từ đó có thể xây dựng quy trình sản xuất số lượng lớn cây con giống Sâm ngọc linh chất lượng cao bằng kỹ thuật nuôi cấy mô ở quy mô công nghiệp.

IV. KẾT LUẬN

Nghiên cứu nhân giống *in vitro* đã mang lại thành công sử dụng các mô phân sinh như lá, cuống lá, thân rễ và củ Sâm ngọc linh tạo mô sẹo, hình thành và phát triển chồi, tạo rễ bất định và rễ thứ cấp. Các kết quả, cũng như các bước đi trong phòng thí nghiệm đạt hiệu quả cao, từ đó lựa chọn tìm ra môi trường nuôi cấy cho từng giai đoạn phù hợp đối với mục đích nghiên cứu. Tuy nhiên với giai đoạn tạo rễ và huấn luyện cây nuôi cấy mô ra ngoài vườn ươm đang là vấn đề cấp thiết hiện nay, cần được lựa chọn xem xét cho những nghiên cứu tiếp theo về việc huấn luyện, chăm sóc, tưới tiêu và sâu bệnh hại để phát triển giống hàng loạt cho Sâm ngọc linh trên quy mô sản xuất công nghiệp tạo nguồn dược liệu cho ngành dược trong tương lai.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Asaka I., Li L., Hirotsani M., Asada Y., Furuya T., 1993. Production of ginsenoside saponin by culturing ginseng (*Panax ginseng*) embryonic tissue in bioreactors. *Biotechnol Lett*, 15: 1259 - 1264.
2. Dương Tấn Nhựt, Bùi Văn Vinh, 2009. Ảnh hưởng của các chất điều hòa sinh trưởng thực vật lên sự tái sinh hình thái của mẫu cấy lớp mỏng tế bào cuống chồi hoa Súp lơ (*Brassica oleracea* var. *bitrytis*). *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 7(20): 229 - 233.

3. Dương Tấn Nhựt, Hoàng Xuân Chiến, Nguyễn Bá Trục, Nguyễn Bá Nam, Trần Xuân Tinh, Vũ Quốc Luận, Nguyễn Văn Bình, Vũ Thị Hiền, Trịnh Thị Hương, Nguyễn Cửu Thành Nhân, Lê Nữ Minh Thùy, Lý Thị Mỹ Nga, Thái Thương Hiền, Nguyễn Thành Hải, 2010a. Nhân giống vô tính cây Sâm ngọc linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.). Tạp chí Công nghệ Sinh học, 8(3B), tr. 1211 - 1219.
4. Dương Tấn Nhựt, Lâm Thị Mỹ Hằng, Bùi Thế Vinh, Phan Quốc Tâm, Nguyễn Bá Nam, Nguyễn Cửu Thành Nhân, Hoàng Xuân Chiến, Lê Nữ Minh Thùy, Vũ Thị Hiền, Nguyễn Văn Bình, Vũ Quốc Luận, Trần Công Luận, Đoàn Trọng Đức, 2010b. Xác định hàm lượng saponin và dư lượng một số chất điều hòa sinh trưởng trong callus, chồi và rễ Sâm ngọc linh nuôi cấy *in vitro*. Tạp chí Công nghệ Sinh học, 8(2), tr. 189 - 202.
5. Duong Tan Nhut, Nguyen Phuc Huy, Vu Quoc Luan, Nguyen Van Binh, Nguyen Ba Nam, Le Nu Minh Thuy, Dang Thi Ngoc Ha, Hoang Xuan Chien, Trinh Thi Huong, Hoang Van Cuong, Le Kim Cuong, Vu Thi Hien, 2011. Shoot regeneration and micropropagation of *Panax Vietnamensis* Ha et Grushv. from *ex vitro* derived callus. African journal of Biotachnology Vol 10: 19499 - 19504.
6. Dương Tấn Nhựt, Nguyễn Bá Phong, Lê Nữ Minh Thùy, Hoàng Văn Cương, Hoàng Xuân Chiến, Bùi Thế Vinh, Trần Công Luận, 2012a. Bước đầu đánh giá ảnh hưởng của methyl jasmonate lên khả năng tích lũy saponin trong mô sẹo cây Sâm ngọc linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) nuôi cấy *in vitro*. Tạp chí Công nghệ Sinh học 10(4A): 867 - 875.
7. Dương Tấn Nhựt, Nguyễn Cửu Thành Nhân, Hoàng Xuân Chiến, Nguyễn Phúc Huy, Nguyễn Bá Nam, Trinh Xuân Ninh, Phạm Phong Hải, Vũ Quốc Luận, Phan Quốc Tâm, Vũ Thị Hiền, Trịnh Thị Hương, Trần Công Luận, Pack Kee Yoeup, 2012b. Một số hệ thống nuôi cấy trong nghiên cứu nhân nhanh rễ bất định và rễ thứ cấp cây Sâm ngọc linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.). Tạp chí Công nghệ Sinh học 10(4A): 887 - 897.
8. George E. F., Hall M. A., De Klerk G. J., 2008. Plant propagation by tissue culture. Springer, Dordrecht, The Netherlands 1: 501
9. Han J.Y., Kwon Y. S, Yang D. C., Jung Y. R., Choi Y. E., 2006. Expression and RNA. interference -induced silencing of the damarediol synthase gene in *Paxax gineng*. Plant Cell Physiol 47: 1653 - 1662.
10. Hoàng Văn Cương, Nguyễn Bá Nam, Trần Công Luận, Bùi Thế Vinh, Dương Tuấn Nhựt, 2012. Ảnh hưởng của ánh sáng đơn sắc lên sự sinh trưởng và khả năng tích lũy hoạt chất saponin thông qua nuôi cấy mô sẹo và cây Sâm ngọc linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv) *in vitro*. Tạp chí Khoa học và Công nghệ 50 (4): 475 - 490.
11. Hoàng Xuân Chiến, Ngô Thanh Tài, Nguyễn Bá Trục, Trần Xuân Tinh, Lâm Bích Thảo, Trần Công Luận, Dương Tuấn Nhựt, 2011. Nghiên cứu một số yếu tố tạo củ Sâm ngọc linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) *in vitro* và xác định hàm lượng saponin trong cây tạo từ củ trồng thử nghiệm ở núi Ngọc Linh. Tạp chí Công nghệ sinh học 9(3): 325 - 339.
12. Hoàng Minh Tấn, Nguyễn Quang Thạch, Vũ Quang Sáng, 2006. Giáo trình sinh lý thực vật Trường đại học Nông nghiệp I, Hà Nội.
13. Jasik J, Mantell S. H., 2000. Effects of Jasrmonic acid and ít methlester on in vitro microoctubersation of three food yam (*Disocrea*) species. Plant Cell Rep 19: 863 - 867
14. Jasik J, Klerk G.J., 2006. Efect of methyl jasmonate on morphology and dormancy development in lily bulblets regenerated *in vitro*. J Plant Grow Reg 25: 45 - 51.
15. Jones J. B., Murashige, 1974. Tissue culture propagation of *Aechnlea fasciate* Baker and other bromeliads. *Pro Int Plant prop Scoc* 24: 117 - 126.
16. Kim Y. S., 2005. Production of ginsenosides through bioreactor cultures of adventitious roots in ginseng (*Panax ginseng* C. A. Meyer). Ph.D thesis, Chungbuk National University, Chenogju, South Korea, 1 - 137.
17. Lê Kim Cương, Hoàng Xuân Chiến, Nguyễn Bá Nam, Trịnh Thị Hương, Dương Tấn Nhựt, 2012. Ảnh hưởng của một số yếu tố lên khả năng tăng sinh mô sẹo “xốp” và bước đầu nuôi cấy huyền phù tế bào Sâm ngọc linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.). Tạp chí Sinh học 34(3SE): 265 - 276.
18. Ngô Xuân Bình, 2009. Nuôi cấy tế bào thực vật cơ sở lý luận và ứng dụng. Nhà xuất bản Khoa học kỹ thuật.
19. Nguyễn Đức Lượng, Lê Thị Thủy Tiên, 2002. Công nghệ tế bào. Nhà xuất bản Đại học Quốc gia TP. Hồ Chí Minh.
20. Nguyễn Bảo Triệu, Nguyễn Thanh Tùng, Trương Thị Bích Phượng, 2013. Nuôi cấy *in vitro* Sâm ngọc linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.). Tạp chí Khoa học (Đại học Huế) 79(1): 107 - 115.

21. Nguyễn Hữu Hồ, 2013. Nghiên cứu xây dựng công nghệ sản xuất sinh khối tế bào và rễ Sâm Ngọc linh in vitro. Đề tài độc lập cấp Nhà nước (2012 - 2015).
22. Nguyễn Thị Nhật Linh, Hoàng Thanh Tùng, Nguyễn Hoàng Lộc, Dương Tấn Nhựt, 2015. Tăng cường khả năng hình thành và phát triển rễ thứ cấp từ rễ bất định Sâm ngọc linh (*Panax vietnamensis*) nuôi cấy in vitro. Tạp chí Công nghệ Sinh học 13 (2): 221 - 230.
23. Nguyễn Thị Liễu, Nguyễn Trung Thành, Nguyễn Văn Kết, 2011. Nghiên cứu khả năng tạo rễ bất định của Sâm ngọc linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) trong nuôi cấy in vitro. Tạp chí Khoa học, ĐHQGHN, Khoa học Tự nhiên và Công nghệ 27: 30 - 36.
24. Nguyễn Việt Cường, Hồ Thanh Tâm, Nguyễn Bá Nam, Hà Thị Mỹ Ngân, Lê Kim Cương, Nguyễn Phúc Huy, Dương Tấn Nhựt, 2013. Nghiên cứu ảnh hưởng của một số chất hữu cơ và bạc nitrat ($AgNO_3$) lên sự sinh trưởng và phát triển của cây Sâm ngọc linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) nuôi cấy in vitro. Hội nghị khoa học Công nghệ sinh học toàn quốc 2013.
25. Nhut, D. T., Vinh B. V. T., Hien T. T., Huy N. P., Nam N. B. and 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 Vol. 11(5), pp. 1084 - 1091.
26. Park S. J., Kim S. M. Kim M. H, Kim C. S., Lee C. H., 2000. Development of a prototype continuous flow dryer using infranred ray and headted -air for white ginseng. J Korean Society Agril Machin 25 (2): 115 - 122.
27. Raghu R. V., 1997. Micropropagation of turmeric (*Curcuma longa* L.) by in vitro microrhizomes biotechnonology of spices medicinal and romatic crops. Indian Scociety for spices, Calicut, Keala, India.
28. Thorpe T., Murashige T, 1970. Some histochemical changes underlying shoot initiation in tobacco callus culture. Can J Bot 48: 277 - 285.
29. Trần Công Luận, 2003. Kết quả nghiên cứu về hóa học sâm Việt Nam. Hội thảo bảo tồn và phát triển Sâm ngọc linh tại tỉnh Quảng Nam: 62 - 75.
30. Trịnh Thị Hương, Dương Tuấn Nhựt, 2011. Khả năng nảy mầm trong nuôi cấy của hạt nhân tạo có nguồn gốc từ phôi vô tính cây Sâm ngọc linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.). Tạp chí Công nghệ Sinh học 9(4): 443 - 453.
31. Trịnh Thị Hương, Hồ Thanh Tâm, Hà Thị Mỹ Ngân, Ngô Thanh Tài, Nguyễn Phúc Huy, Hoàng Xuân Chiến, Nguyễn Bá Nam, Vũ Quốc Luận, Vũ Thị Hiền, Nguyễn Thị Thúy Hoàng, Phạm Bích Ngọc, Chu Hoàng Hà, Dương Tấn Nhựt, 2012. Ảnh hưởng của nguồn mẫu, kích thước mẫu và một số loại auxin lên khả năng tái sinh rễ bất định của Sâm ngọc linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) nuôi cấy in vitro. Tạp chí Công nghệ Sinh học 10 (4A). 877 - 886.
32. Vũ Thị Hiền, Vũ Quốc Luận, Nguyễn Phúc Huy, Nguyễn Bá Nam, Bùi Văn Thế Vinh, Thái Xuân Du, Dương Tấn Nhựt, 2014. Phát sinh phôi trực tiếp từ lá, cuống lá và thân rễ cây Sâm ngọc linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.). Tạp chí Sinh học, 36(1se), tr. 277 - 282.
33. Youngquiang Zheng, Yanmel Liu, Mi Ma, Kun Xu, 2008. Increasing in vitro microhizome production of ginger (*Zingerer officinale* Roscoe). Acta Physiol Plant 30: 513 - 519.

Email tác giả chính: hoanlt76@googlemail.com

Ngày nhận bài: 29/08/2017

Ngày phản biện đánh giá và sửa chữa: 30/09/2017

Ngày duyệt đăng: 10/11/2017