Tạp chí Công nghệ Sinh học **9**(4): 443-453, 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.)

Trịnh Thị Hương, Dương Tấn Nhựt

Viện Sinh học Tây Nguyên

TÓM TẮT

Nghiên cứu này trình bày ảnh hưởng của một số yếu tố như nồng độ sodium alginate trong vỏ bọc, thời gian giữ hạt trong dung dịch $CaCl_2.2H_2O$ 100 mM, nguồn carbohydrate và nồng độ GA_3 bổ sung vào vỏ hạt lên khả năng nảy mầm của hạt nhân tạo có nguồn gốc từ phôi vô tính sâm Ngọc Linh. Sau 3 tháng nuôi cấy, hạt nhân tạo với nồng độ 30 g/l sodium alginate trong vỏ hạt cho tỷ lệ nảy mầm (70,36%) cũng như sự sinh trưởng sau nảy mầm là cao nhất (chiều cao chồi đạt 7 mm, chiều dài rễ đạt 11,18 mm). Thời gian giữ hạt trong dung dịch $CaCl_2.2H_2O$ 100 mM tối ưu nhất là khoảng 22 phút. Bổ sung sucrose (15 g/l) hoặc tinh bột (20 g/l) vào vỏ hạt đều cho tỷ lệ nảy mầm của hạt cao hơn so với khi không bổ sung nguồn carbohydrate vào vỏ hạt. Sau 2 tháng nuôi cấy, hạt nhân tạo có bổ sung 1 mg/l GA_3 trực tiếp vào vỏ bọc cho tỷ lệ nảy mầm, tỷ lệ hình thành chồi và tỷ lệ hình thành rễ cao hơn so với các chỉ tiêu này khi không bổ sung GA_3. Những kết quả này chỉ ra rằng, những tác động trực tiếp vào vỏ hạt nhân tạo có ảnh hưởng đến tỷ lệ nảy mầm cũng như tỷ lệ hình thành chồi và rễ của hạt nhân tạo sâm Ngọc Linh.

Từ khóa: *Hạt nhân tạo, phôi sinh dưỡng, sâm Ngọc Linh, sodium alginate, tỷ lệ nảy mầm*

MỞ ĐẦU

Sâm Ngọc Linh hay sâm Việt Nam là một loài sâm đặc hữu của nước ta đã được thế giới biết đến với tên khoa học là *Panax vietnamensis* Ha et Grushv. So với lịch sử của các loại sâm khác trên thế giới thì sâm Ngọc Linh là loại sâm được biết đến khá muộn. Tuy nhiên, ngay từ khi phát hiện ra chúng vào năm 1973 thông qua đồng bào dân tộc Xê Đăng thì sâm Ngọc Linh đã được nhiều nhà khoa học trong và ngoài nước nghiên cứu về dược tính của nó.

Với tình hình sâm tự nhiên bị khai thác bừa bãi và trữ lượng không đáng kể như hiện nay thì việc nuôi trồng theo phương pháp truyền thống không thể đáp ứng đủ nhu cầu cây giống cần thiết. Do đó, yêu cầu đặt ra là tìm được những kỹ thuật mới giúp việc nhân giống nhanh và hiệu quả nhằm đáp ứng nhu cầu về giống, từ đó tiến tới sản xuất sâm Ngọc Linh thương phẩm với quy mô lớn phục vụ nhu cầu trong nước và tiến tới xuất khẩu. Vì vậy, nuôi cấy *in vitro* có thể là một giải pháp hữu hiệu trong nhân giống hàng loạt. Tuy nhiên, nhân giống thực vật bằng nuôi cấy *in vitro* đòi hỏi thời gian và lao động rất lớn cho sự tái sinh và chuyển cây ra đất. Mặt khác, các khu vực trồng sâm nằm trên núi cao, phương tiện giao thông đi lại khó khăn, nên việc vận chuyển cây giống cũng không thuận lợi. Trước tình hình đó, hạt nhân tạo sâm Ngọc Linh được xem là một giải pháp lý tưởng phục vụ cho công tác nhân giống nhanh và đồng bộ cây sâm Ngọc Linh.

Hạt nhân tạo là một dạng hạt mô phỏng hạt tự nhiên, có phôi sinh dưỡng được bọc trong một lớp sodium alginate có chứa chất dinh dưỡng (nội nhũ nhân tạo). Sau đó, phôi nảy mầm thành cây hoàn chỉnh (Redenbaugh *et al.*, 1987; Saiprasad, 2001).

Trên thế giới, những nỗ lực ban đầu để phát triển hạt nhân tạo đã được thực hiện bởi Walker và Sato (1981) thuộc công ty Monsanto, tiến hành trên cây cỏ Linh lăng (*Medicago sativa* L.) và bởi Lawrence (1981) thuộc tập đoàn Carbide, tiến hành trên cây Cần tây và Rau diếp. Lawrence (1981) tập trung vào sử dụng công nghệ gieo lông cừu như sử dụng polyoxyethylene để tạo các dây hạt từ phôi sinh dưỡng. Drew (1979) đề nghị tạo hạt từ phôi sinh dưỡng Cà rốt sử dụng công nghệ gieo lông nhưng chỉ tạo được 3 cây con từ những phôi Cà rốt nuôi cấy trên môi trường không dưỡng. Kitto và Janick (1985a, b) đã bao bọc những cụm phôi, rễ và mô sẹo của Cà rốt bằng polyoxyethylene. Kết quả cho thấy một vài phôi có khả năng sống sót sau tiến trình tạo vỏ bao. Redenbaugh (1984, 1986, 1988) và Fujii (1987) đã sử dụng vỏ bọc hydrogel như sodium alginate để tổng hợp hạt nhân tạo đơn phôi.

Kể từ khi việc bọc vỏ bao hydrogel cho phôi sinh dưỡng được phát hiện là có thể được dùng làm hạt nhân tạo thì nhiều nghiên cứu đã được thực hiện trên cỏ Linh lăng, Măng tây, Cà rốt, Cần tây, thông

Trầm Hương, Vân sam Norway (Redenbaugh *et al*., 1991; Redenbaugh, 1993), Xixu Ấn Độ (*Dalbergia sissoo*, một loài cây đậu rụng lá) (Chand, Singh, 2004); hoa Cúc kết hợp với sự bảo quản lạnh (Hamagyi *et al*., 2004). Tuy nhiên, ngoại trừ nghiên cứu của Redenbaugh (1991) và Kamada (1988) thì không có một nghiên cứu nào ghi nhận được sự biến đổi phôi thành cây con từ các phôi sinh dưỡng được bọc vỏ bao hydrogel. Theo Redenbaugh và đồng tác giả (1988), nếu phôi sinh dưỡng được xem như là hạt thì việc vận chuyển, đóng gói, bảo quản và trồng sẽ trở nên thuận tiện. Việc sử dụng hạt giống nhân tạo cho một số loài cây trồng nông nghiệp cũng đã được báo cáo (Choi, Jeong, 2002; Kitto, Janick, 1985a; b; Redenbaugh *et al*., 1986). Tuy nhiên, việc gieo hạt nhân tạo ngoài đồng ruộng thực tế vẫn còn gặp nhiều hạn chế do khả năng sống sót ngoài đất còn thấp (Redenbaugh *et al*., 1986; Kamada, 1985).

Một sự khác biệt lớn giữa hạt nhân tạo và hạt tự nhiên là sự hiện diện của nội nhũ ở hạt tự nhiên. Ở hạt tự nhiên, một số chất tích lũy trong nội nhũ đóng vai trò quan trọng trong việc cung cấp năng lượng cho sự nảy mầm và sinh trưởng của phôi hợp tử (Bewley, 1997; Cardemil *et al*., 1982). Vỏ alginate đã được sử dụng như một nội nhũ nhân tạo để cung cấp chất dinh dưỡng cần thiết cho sự nảy mầm của các phôi. Tuy nhiên, có ít thông tin về vai trò của việc thêm nguồn carbon cho sự nảy mầm và sinh trưởng sau nảy mầm của hạt nhân tạo, mặc dù việc thêm sucrose vào vỏ bọc (Lulsdorf *et al*., 1993; Ganapathi *et al*., 2001) hoặc môi trường (Ghosh, Sen, 1994; Ara *et al*., 1999) đã được mô tả.

Ở Việt Nam, các nhà nhân giống cũng đang nỗ lực phát triển việc nhân giống nhanh với số lượng lớn sao cho giảm đáng kể chi phí sản xuất. Nguyễn Văn Uyển (1992) đã có những thành công bước đầu trong việc tạo hạt nhân tạo cây Cà phê. Việc tạo hạt nhân tạo từ PLB Địa lan, đốt thân Cúc và PLB Lily cũng đã bước đầu được khảo sát (Nguyễn Thị Thanh Hiền *et al*., 2003). Dương Tấn Nhựt và đồng tác giả (2004) đã tạo thành công hạt nhân tạo từ vảy củ của hoa Lily (*Lilium* spp.). Theo nghiên cứu này, hạt có nồng độ 30 g/l sodium alginate thích hợp cho tái sinh *ex vitro* và hạt có nồng độ 50 g/l sodium alginate thì sinh trưởng tốt trong điều kiện *in vitro*. Theo nghiên cứu của Nhựt và đồng tác giả (2005) trên đối tượng là PLB ba tháng tuổi của cây Địa lan (*Cymbidium* spp.) cho thấy tỷ lệ sống sót của hạt là 35,5% và tỷ lệ tạo chồi là 45,8% khi chuyển hạt trực tiếp sang giá thể dớn không khử trùng sau khi được bọc lớp vỏ chitosan. Cây con tạo ra từ những hạt nhân tạo này đều sống sót sau 6 tháng ngoài nhà kính. Trần Ngọc Thúy Tiên và đồng tác giả (2010) cũng đã nghiên cứu một số điều kiện nảy mầm *in vitro* và *ex vitro* của hạt nhân tạo Địa lan.

Việc sản xuất hạt nhân tạo đã mở ra những triển vọng cho công nghệ sinh học thực vật. Kỹ thuật này là một lĩnh vực đang phát triển nhanh chóng và rất lý thú để nghiên cứu tế bào thực vật cũng như nuôi cấy mô (Datta *et al*., 1999).

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đánh giá ảnh hưởng của một số yếu tố (nồng độ alginate, thời gian giữ hạt trong dung dịch $CaCl_2.2H_2O$ 100 mM, nguồn carbohydrate và GA_3 bổ sung vào vỏ hạt) lên sự nảy mầm của phôi sâm Ngọc Linh được bọc vỏ nhân tạo.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Củ sâm Ngọc Linh *in vitro* được cắt với kích thước 1 x 1 cm và cấy trên môi trường MS (Murashige, Skoog, 1962) có bổ sung 1,0 mg/l 2,4-D, 1,0 mg/l NAA, 30 g/l sucrose và 8 g/l agar (Dương Tấn Nhựt, 2009). Sau 2 tháng nuôi cấy thu được các mẫu mô sẹo trắng trong, hơi mọng nước (Hình 2a). Mô sẹo này được cấy chuyển trên môi trường MS bổ sung 1,0 mg/l 2,4-D, 0,5 mg/l NAA và 0,2 mg/l kinetin để tạo phôi. Phôi này được dùng làm nguồn nguyên liệu trong các thí nghiệm của nghiên cứu này.

Phương pháp

Quy trình tạo hạt nhân tạo

Quy trình tạo hạt nhân tạo được trình bày trên sơ đồ hình 1.

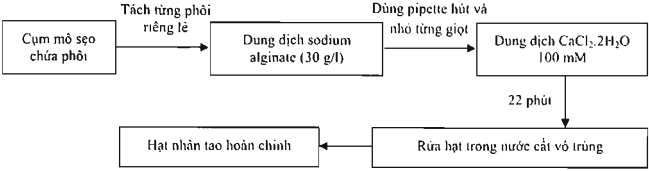
Môi trường nuôi cấy

Môi trường nuôi cấy các hạt nhân tạo là môi trường MS có bổ sung 30 g/l sucrose, 1 g/l than hoạt tính, 8 g/l agar.

Tất cả các môi trường nuôi cấy được điều chỉnh pH = 5,8 và được hấp vô trùng ở 121°C, 1 atm trong vòng 30 phút.

Điều kiện thí nghiệm

Thời gian chiếu sáng: 10 giờ/ngày; cường độ chiếu sáng: 2.500 lux; nhiệt độ phòng sáng 25 ± 2°C; ẩm độ trung bình 75 - 80%.



Hình 1. Quy trình tạo hạt nhân tạo

Bố trí thí nghiệm

Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ alginate lên khả năng nảy mầm của hạt nhân tạo

Các phôi sinh dưỡng sâm Ngọc Linh (Hình 2b) được bọc trong dung dịch sodium alginate ở các nồng độ khác nhau (20, 30, 40, 50 g/l). Sau đó các hạt được nuôi cấy trên môi trường thạch để nảy mầm.

Khảo sát ảnh hưởng của thời gian giữ hạt trong dung dịch $CaCl_2.2H_2O$ 100 mM lên khả năng nảy mầm của hạt nhân tạo

Dùng pipette hút và nhỏ từng giọt dung dịch sodium alginate (nồng độ 30 g/l) dạng gel có chứa phôi sinh dưỡng vào dung dịch $CaCl_2.2H_2O$ 100 mM, để các hạt trong dung dịch này ở các khoảng thời gian khác nhau (7, 15, 22, 30, 38 phút) để tạo vỏ cứng cho hạt. Sau đó, các hạt nhân tạo hoàn chỉnh được nuôi cấy trên môi trường thạch để nảy mầm.

Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ đường bổ sung vào vỏ hạt nhân tạo lên khả năng nảy mầm của hạt nhân tạo

Trong thí nghiệm này, phần vỏ hạt có nồng độ sodium alginate là 30 g/l đồng thời sucrose được bổ sung thêm vào vỏ hạt ở các nồng độ 0, 15, 30, 50, 70, 90 g/l. Sau đó các hạt này được nuôi cấy trên môi trường thạch để nảy mầm.

Khảo sát ảnh hưởng của tinh bột bổ sung vào vỏ hạt lên khả năng nảy của hạt nhân tạo

Ở thí nghiệm này, phần vỏ hạt có nồng độ sodium alginate là 30 g/l; đồng thời bổ sung thêm tinh bột vào vỏ hạt ở các nồng độ 0, 5, 10, 20, 30, 40 g/l. Sau đó các hạt này được nuôi cấy trên môi trường thạch để này mầm.

Khảo sát ảnh hưởng của GA_3 bổ sung vào vỏ hạt lên khả năng nảy mầm của hạt nhân tạo

Trong thí nghiệm này, phần vỏ hạt có nồng độ sodium alginate là 30 g/l; đồng thời bổ sung GA_3 vào vỏ hạt với các nồng độ 0, 1, 2, 3, 4 mg/l. Sau đó các hạt này được nuôi cấy trên môi trường thạch để này mầm

Phương pháp thu thập và xử lý thống kê số liệu

Các số liệu thu thập được xử lý bằng phần mềm SPSS 16.0 với phép thử Duncan ở mức P = 0,05 (Duncan, 1995).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Ảnh hưởng của nồng độ sodium alginate lên khả năng nảy mầm hạt nhân tạo

Sau 3 tháng nuôi cấy, hạt nhân tạo từ phôi sinh dưỡng sâm Ngọc Linh có khả năng nảy mầm tương đối cao (trên 50%) ở tất cả các nghiệm thức (Bảng 1). Điều này chỉ ra rằng các phôi sinh dưỡng sâm Ngọc Linh có sức sống mạnh và đây là một trong những điều kiện thuận lợi để làm nguyên liệu cho hạt nhân tạo.

Việc bao bọc vỏ cho hạt này mầm cho thấy sự đáp ứng khác nhau của sự khởi đầu tạo chồi và rễ. Ở hạt nhân tạo từ phôi sinh dưỡng sâm Ngọc Linh, quá trình này mầm chủ yếu khởi đầu bằng việc hình thành rễ (Hình 2c), chỉ một số ít hình thành chồi hoặc phát triển đồng bộ cả chồi và rễ. Sau đó, các hạt này mới dần phát triển thành cây hoàn chỉnh (sau khoảng 2 - 3 tháng nuôi cấy).

Bảng 1. Ảnh hưởng của nồng độ sodium alginate lên khả năng nảy mầm của hạt nhân tạo sau 3 tháng nuôi cấy.

Nồng độ alginate (g/l)	Tỷ lệ nảy mầm (%)	Tỷ lệ hình thành rễ (%)	Tỷ lệ hình thành chồi (%)	Tỷ lệ hình thành cây hoàn chỉnh (%)	Chiều cao trung bình của chồi (mm)	Chiều dài trung bình của rễ (mm)
20	74,07a	59,26a	14,81b	11,11b	7,40a	9,30b
30	**70,36a**	**62,96a**	**25,92a**	**25,92a**	**7,00a**	**11,18a**
40	59,26b	48,15ab	22,22a	18,52ab	5,80a	9,00b
50	74,08a	33,33b	11,11b	11,11b	5,73b	9,37b

Ghi chú: *Các chữ cái a,b,... thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa ở mức tin cậy P = 0,05 trong phép thử Ducan.

Với nồng độ 30 g/l sodium alginate trong vỏ cho thấy hạt nhân tạo từ phôi sinh dưỡng có khả năng nảy mầm và sinh trưởng sau nay mầm tốt hơn so với các nghiệm thức còn lại (Hình 2h$_1$). Kết quả này cũng phù hợp với nhiều nghiên cứu hiện nay trên một số đối tượng như Địa Lan, Lily, Cát Tường, sâm Siberian,... Soneji và đồng tác giả (2002) báo cáo rằng nồng độ 30 g/l sodium alginate có ảnh hưởng tốt nhất tới quá trình hình thành chồi ở loài *Ananas cosmosus*. Năm 2007, Awal và đồng tác giả (2007) cho thấy ở loài *Begonia* x *Heimalis* với lớp vỏ bọc bên ngoài ở nồng độ 30 g/l sodium alginate cho tỷ lệ nảy mầm lên đến 90,48%. Khi tiến hành tạo hạt với nồng độ 30 g/l sodium alginate trong vỏ hạt, chúng tôi nhận thấy các hạt hình thành cứng và có kích thước đồng nhất (Hình 2d). Trong khi đó, ở nồng độ 20 g/l sodium alginate trong vỏ hạt, các hạt hình thành hơi mềm, dễ vỡ, một số bị dị hình (Hình 2e). Mặc dù, tỷ lệ nảy mầm của hạt nhân tạo ở nồng độ 20 g/l sodium alginate không khác biệt nhiều so với sử dụng 30 g/l sodium alginate trong vỏ hạt nhưng sự sinh trưởng sau nảy mầm của hạt nhân tạo bị hạn chế. Lớp vỏ nhân tạo bao bọc bên ngoài phôi sinh dưỡng được xem như một nhũ nhân tạo, nó không chỉ cung cấp chất dinh dưỡng cho phôi nảy mầm mà còn bảo vệ phôi khỏi bất kỳ chấn thương cơ học nào trong suốt quá trình nảy mầm hay xử lý trong bảo quản. Tuy nhiên, độ cứng của lớp vỏ này đã tạo nên một môi trường kỵ khí bên trong vỏ hạt, điều này có thể ức chế quá trình hô hấp của phôi. Độ cứng của lớp vỏ hạt chủ yếu phụ thuộc vào số lượng ion Na^+ trao đổi với ion Ca^+, chính vì vậy mà ở các nồng độ sodium alginate đậm đặc (40, 50 g/l), số lượng ion Na^+ trong dung dịch gel nhiều nên khả năng trao đổi với ion Ca^+ có trong dung dịch $CaCl_2.2H_2O$ cao nên các hạt hình thành cứng hơn, và do vậy ngăn cản sự phát triển đỉnh chồi và gây khó khăn cho quá trình nảy mầm của hạt. Tejavathi và đồng tác giả (2006) cũng đã tiến hành tạo vỏ bao mầm chồi và phôi sinh dưỡng *in vitro* của *Agave vera-cruz* Mill và cũng cho thấy ở nồng độ cao hơn 40 g/l sodium alginate đã ngăn cản sự phát triển của chồi/rễ hoặc cả hai, do đó làm giảm tần suất nảy mầm của hạt.

Khi tiến hành quan sát kỹ hơn sự phát triển của các cây sâm Ngọc Linh thu được từ hạt nhân tạo có nồng độ 30 g/l sodium alginate trong vỏ sau 4 tháng nuôi cấy, chúng tôi nhận thấy cây phát triển mạnh, đã hình thành củ nhỏ (đường kính khoảng 5 mm), nhưng cây cao nhất có chiều cao đạt trên 4 cm (Hình 2i). Một đặc điểm mà chúng tôi quan sát thấy là các cây có nguồn gốc từ hạt nhân tạo có hình dạng điển hình là rễ thường ít hơn so với cây nuôi cấy *in vitro*, củ có dạng hình tròn và phân biệt rõ ràng giữa cực chồi và cực rễ (Hình 2j).

Ảnh hưởng của thời gian giữ hạt trong dung dịch $CaCl_2.2H_2O$ 100 mM lên khả năng nảy mầm hạt nhân tạo

Ảnh hưởng của thời gian để hạt trong dung dịch $CaCl_2.2H_2O$ 100 mM, chúng tôi nhận thấy khoảng thời gian để hạt trong dung dịch $CaCl_2.2H_2O$ 100 mM từ 22 - 25 phút cho kết quả tốt nhất và được xem như là khoảng thời gian tối thích, các hạt hình thành có độ cứng, kích thước đồng đều nhau và cho tỷ lệ nảy mầm cao nhất (39,59%). Khi thời gian hạt tiếp xúc trong dung dịch $CaCl_2.2H_2O$ 100 mM ngắn (dưới 15 phút), số lượng ion Na^+ trao đổi với ion Ca^+ ít, do đó các hạt hình thành mềm, dễ vỡ và bị dị hình (Hình 2e). Ngược lại, khi hạt tiếp xúc trong dung dịch $CaCl_2.2H_2O$ 100 mM quá dài (trên 30 phút) các hạt hình thành rất cứng, nên khả năng làm phá vỡ lớp vỏ bên ngoài của phôi sinh dưỡng sâm Ngọc Linh để tiếp tục sinh trưởng bình thường, hình thành rễ, chồi cũng gặp khó khăn (Bảng 2).

Bảng 2. Ảnh hưởng của thời gian để hạt trong dung dịch $CaCl_2.2H_2O$ 100 mM lên khả năng nảy mầm của hạt nhân tạo sau 2 tháng nuôi cấy.

Thời gian để hạt trong dung dịch $CaCl_2.2H_2O$ (phút)	Tỷ lệ nảy mầm (%)	Tỷ lệ hình thành rễ (%)	Tỷ lệ hình thành chồi (%)
7	14,58c*	14,58b	0b
15	20,84b	14,58b	6,25a
22	**39,59a**	**33,33a**	**8,33a**
30	14,58c	14,58b	0b
38	14,58c	14,58b	0b

Ghi chú: *Các chữ cái a,b, . thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa ở mức tin cậy P = 0,05 trong phép thử Ducan

Dựa trên kết quả thu được ở cả hai thí nghiệm, rõ ràng là nồng độ sodium alginate và thời gian để hạt trong dung dịch $CaCl_2.2H_2O$ 100 mM của hạt có ảnh hưởng đến độ cứng và khả năng nảy mầm của hạt. Ở nồng độ sodium alginate thấp và thời gian tiếp xúc với dung dịch $CaCl_2.2H_2O$ 100 mM ngắn sẽ khó hình thành hạt, nên các hạt hình thành dễ vỡ, kích thước không đồng đều, có hình dạng không xác định, và kết quả là làm giảm sự nảy mầm của hạt. Ở nồng độ sodium alginate quá cao và thời gian tiếp xúc với dung dịch $CaCl_2.2H_2O$ 100 mM dài, các hạt hình thành quá cứng, nên ngăn cản sự phá vỡ lớp vỏ bên ngoài để hình thành chồi và rễ, cũng dẫn tới tỷ lệ nảy mầm của hạt giảm.

Từ những kết quả thu được đó, chúng tôi thấy rằng nồng độ 30 g/l sodium alginate trong vỏ hạt với thời gian để hạt trong dung dịch $CaCl_2.2H_2O$ 100 mM 22 phút là tối ưu.

Ảnh hưởng của nồng độ đường bổ sung vào vỏ hạt lên khả năng nảy mầm hạt nhân tạo

Trong các nghiên cứu của Dương Tấn Nhựt và đồng tác giả (2010) trên đối tượng sâm Ngọc Linh cho thấy nồng độ đường bổ sung vào môi trường nuôi cấy tối ưu là 30 g/l sucrose. Ở nhiều loài cây trồng khác nhau, nồng độ này cũng là ngưỡng phù hợp. Do đó, chúng tôi tiến hành các thí nghiệm trên môi trường MS cơ bản có bổ sung 30 g/l sucrose.

Trong nuôi cấy *in vitro*, các thao tác được thực hiện trong điều kiện vô trùng, do đó bổ sung sucrose vào môi trường nuôi cấy ít bị ảnh hưởng bởi các vi sinh vật. Ngược lại, trong điều kiện *ex vitro*, việc thêm nguồn sucrose vào môi trường (hay đất trồng) có thể gây hại cho hạt nhân tạo bởi sự tấn công của các vi sinh vật. Do đó thêm carbohydrate vào vỏ hạt nhân tạo có thể là một giải pháp phù hợp. Chính vì vậy trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành bổ sung sucrose vào vỏ hạt. Kết quả thu được cho thấy rằng nguồn sucrose thêm vào vỏ hạt không làm nâng cao phần trăm nảy mầm của hạt nhân tạo nhưng lại giúp nâng cao khả năng sinh trưởng sau nảy mầm của hạt nhân tạo. Sau 2 tháng nuôi cấy ở môi trường bổ sung 15 g/l sucrose trong vỏ hạt, chúng tôi thu được tỷ lệ hình thành rễ là 23,33% và tỷ lệ hình thành chồi là 13,33%; trong khi ở những hạt không bổ sung sucrose vào vỏ hạt tỷ lệ hình thành rễ là 13,33% và tỷ lệ hình thành chồi là 11,67% (Bảng 3). Điều này chỉ ra rằng nguồn carbohydrate đóng một vai trò quan trọng trong sự sinh trưởng sau nảy mầm của phôi sinh dưỡng. Tuy nhiên, vì trong môi trường nuôi cấy đã có chứa sucrose (30 g/l), do đó hàm lượng đường cần thiết bổ sung vào vỏ hạt không cao. Lượng đường chỉ cần đủ để giúp phôi phát triển và phá vỡ lớp vỏ bọc bên ngoài. Sau khi thoát ra khỏi vỏ hạt, phôi sẽ sử dụng nguồn carbohydrate từ môi trường nuôi cấy. Chính vì vậy, khi thêm sucrose vào vỏ hạt ở nồng độ cao không giúp nâng cao tỷ lệ nảy mầm, mà ngược lại gây ức chế. Ở nồng độ sucrose trên 30 g/l gây ra áp lực thẩm thấu cao có thể kích thích các phôi sinh dưỡng chuyển sang trạng thái ngủ. Điều này dẫn tới kết quả là tỷ lệ nảy mầm và hình thành chồi/rễ giảm khi bổ sung đường ở các nồng độ cao (trên 30 g/l) (Bảng 3). Choi và đồng tác giả (1999) cũng đã quan sát thấy hiện tượng ngủ tương tự sau khi xử lý với nồng độ đường cao ở phôi sinh dưỡng của *Panax ginseng*. Tuy nhiên, ở hầu hết các loài cây, hiện tượng nảy mầm sớm là một vấn đề chính thường gặp phải ở phôi sinh dưỡng, do đó nồng độ đường cao có thể được xem như là một giải pháp để giảm sự nảy mầm sớm của phôi tạm thời. Điều này rất có ý nghĩa trong việc bảo quản hạt nhân tạo, vì nhìn chung các hạt nhân tạo không thể bảo quản được trong một thời gian dài, nguyên nhân là do sự nảy mầm không cần thiết xảy ra thậm chí ngay cả ở nhiệt độ thấp.

Bảng 3. Ảnh hưởng của nồng độ đường bổ sung vào vỏ hạt lên khả năng nảy mầm của hạt nhân tạo sau 2 tháng nuôi cấy.

Nồng độ đường (g/l)	Tỷ lệ nảy mầm (%)	Tỷ lệ hình thành rễ (%)	Tỷ lệ hình thành chồi (%)
0	33,33a*	13,33b	11,67ab
15	36,67a	23,33a	13,33a
30	23,33b	10,00b	13,33a
50	40,00a	26,67a	10,00ab
70	23,33b	16,67b	6,67b
90	16,67b	10,00b	6,67b

Ghi chú: *Các chữ cái a,b,... thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa ở mức tin cậy P = 0,05 trong phép thử Ducan.

Ảnh hưởng của tinh bột bổ sung vào vỏ hạt lên khả năng nảy mầm hạt nhân tạo

Như đã trình bày ở trên, bổ sung sucrose vào môi trường nuôi cấy hạt nhân tạo, đặc biệt là khi tiến hành trong điều kiện nuôi cấy *ex vitro* không phải là giải pháp đạt hiệu quả cao do sự xâm nhập của vi sinh vật, do đó bổ sung sucrose vào vỏ hạt có thể hạn chế được nhược điểm đó. Tuy nhiên, sucrose lại ở dạng hòa tan trong nước, nên khi bổ sung sucrose vào vỏ hạt, nó vẫn có thể bị hòa tan vào môi trường nuôi cấy (trong điều kiện *in vitro*) hoặc vào đất trồng (trong điều kiện *ex vitro*). Ở *Ceddrela odorata* L., sucrose trong vỏ hạt có thể khuếch tán vào trong đất, do vậy khi tần số nảy mầm của hạt đạt tỷ lệ cao thì lượng dinh dưỡng còn lại không đủ để cung cấp cho sự phát triển tiếp theo của hạt (Maruyama *et al.*, 1997). Ngược lại, tinh bột trong hạt không bị khuếch tán vào môi trường nuôi cấy do nó không ở dạng hòa tan. Điều này chỉ ra rằng, tinh bột trong vỏ hạt có thể sử dụng như một nguồn carbon có hiệu quả thay thế được cho sucrose.

Để làm rõ tác động của tinh bột tới khả năng nảy mầm của hạt, trong thí nghiệm này chúng tôi tiến hành bổ sung tinh bột vào vỏ hạt ở các nồng độ khác nhau. Sau 2 tháng nuôi cấy, ở tất cả các nghiệm thức hạt nảy mầm đều hình thành rễ, và chưa có bất kỳ hạt nào hình thành chồi. Vì tỷ lệ nảy mầm của hạt được tính là tỷ lệ hạt nảy chồi hoặc ra rễ hoặc hình thành cả chồi và rễ, do đó tỷ lệ hình thành rễ trong thí nghiệm này cũng chính là tỷ lệ nảy mầm của hạt. Ở nồng độ 20 g/l tinh bột trong vỏ hạt cho tỷ lệ nảy mầm cao nhất (66,67%), sau đó giảm dần khi nồng độ tinh bột trong vỏ hạt tăng lên trên 30 g/l, đạt tỷ lệ nảy mầm thấp nhất là nghiệm thức đối chứng không bổ sung tinh bột vào vỏ hạt (23,33%) (Bảng 4). Điều này chứng tỏ rằng bổ sung tinh bột vào vỏ hạt giúp nâng cao tỷ lệ nảy mầm của hạt nhân tạo. Khi so sánh với thí nghiệm bổ sung 15 g/l sucrose vào vỏ hạt ở trên, mặc dù bổ sung tinh bột vào vỏ hạt chưa thấy có sự hình thành chồi, nhưng rõ ràng là tỷ lệ nảy mầm của hạt khi bổ sung tinh bột (20 g/l) vào vỏ hạt cao hơn so với bổ sung sucrose (15 g/l) vào vỏ hạt, đồng thời các rễ tạo thành ở những hạt có bổ sung 20 g/l tinh bột vào vỏ hạt phát triển khỏe mạnh hơn (Hình 2f) so với khi bổ sung 15 g/l sucrose vào vỏ hạt (Hình 2g).

Tuy nhiên, khi bổ sung tinh bột vào vỏ hạt ở nồng độ quá cao, tỷ lệ nảy mầm của hạt lại giảm. Đồng thời quá trình tiến hành tạo hạt nhân tạo cũng rất khó khăn do dung dịch gel chứa nhiều tinh bột sẽ trở nên đậm đặc nên khi dùng pipette hút và nhỏ từng giọt vào dung dịch $CaCl_2.2H_2O$ 100 mM bị gặp khó khăn, vì vậy các hạt hình thành bị dị hình. Chúng tôi cũng đã tiến hành tạo hạt với nồng độ tinh bột bổ sung vào vỏ hạt là 50 g/l nhưng do dung dịch gel quá đặc nên không thể tạo được các hạt nhân tạo.

Như vậy, tinh bột bổ sung vào vỏ hạt đã được phối sử dụng như là một nguồn carbon bổ sung và cần cho các hoạt động của mình. Cheter (1968) cũng đã chỉ ra rằng hàm lượng tinh bột giảm trong quá trình nuôi cấy là do phôi sinh dưỡng hấp thu và lượng tinh bột này được sử dụng như một nguồn cung cấp năng lượng cho quá trình nảy mầm. Ông đã tiến hành nhuộm màu các vỏ bọc với iốt. Kết quả là hàm lượng tinh bột trong vỏ hạt nhân tạo giảm đi rõ rệt trong suốt quá trình nảy mầm của hạt. Sau 30 ngày nuôi cấy, hàm lượng tinh bột trong trong vỏ hạt nhân tạo có chứa phôi sinh dưỡng chỉ còn lại 48%, trong khi đó ở vỏ hạt nhân tạo không chứa phôi sinh dưỡng thì không có sự giảm sút hàm lượng tinh bột trong suốt quá trình nuôi cấy.

Từ kết quả thu được ở cả hai thí nghiệm (bổ sung đường và bổ sung tinh bột vào vỏ hạt) cho thấy rằng nguồn carbohydrate đóng một vai trò quan trọng trong quá trình nảy mầm của hạt nhân tạo. Thêm sucrose hoặc tinh bột vào vỏ hạt có thể

tạo ra một nội nhũ nhân tạo, cung cấp năng lượng cho sự nảy mầm của hạt cũng như sự sinh trưởng sau khi nảy mầm. Tùy vào mục đích nuôi cấy mà lựa chọn phương pháp bổ sung sucrose hay bổ sung tinh bột vào vỏ hạt cho phù hợp. Khi tiến hành gieo hạt trong môi trường *in vitro* thì nên bổ sung sucrose vào vỏ hạt vì giúp hình thành chồi sớm. Ngược lại, nếu tiến hành gieo hạt trong môi trường *ex vitro* thì bổ sung tinh bột vào vỏ hạt lại là giải pháp tối ưu.

Bảng 4. Ảnh hưởng của tinh bột bổ sung vào vỏ hạt lên khả năng nảy của hạt nhân tạo sau 2 tháng nuôi cấy.

Hàm lượng tinh bột (g/l)	Tỷ lệ nảy mầm (%)	Tỷ lệ hình thành rễ (%)	Tỷ lệ hình thành chồi (%)
0	23,33c*	23,33c	0
5	46,67abc	46,67abc	0
10	30,00bc	30,00bc	0
20	**66,67a**	**66,67a**	**0**
30	53,34ab	53,34ab	0
40	26,67bc	26,67bc	0

Ghi chú: *Các chữ cái a,b, . thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa ở mức tin cậy P = 0,05 trong phép thử Ducan

Ảnh hưởng của GA_3 bổ sung vào vỏ hạt lên khả năng nảy mầm hạt nhân tạo

Choi và Jeong (2002) đã báo cáo rằng những phôi Siberian ginseng được bao bọc vỏ hạt nhân tạo sau khi tiến xử lý với nồng độ đường cao để cảm ứng trạng thái ngủ cho quá trình bảo quản hạt đã nảy mầm nhanh chóng và phát triển thành cây con sau khi chúng được chuyển qua môi trường có bổ sung 2 mg/l GA_3. Nhiều nghiên cứu khác cũng đã tiến hành nghiên cứu ảnh hưởng của GA_3 bổ sung vào môi trường nuôi cấy tới khả năng nảy mầm của hạt nhân tạo trên nhiều đối tượng, kết quả thu được đều cho thấy GA_3 có ảnh hưởng tích cực tới quá trình nảy mầm của hạt. Từ đó một vấn đề được đặt ra là chúng ta cũng có thể tiến hành bổ sung GA_3 trực tiếp vào bên trong vỏ hạt nhân tạo, vì như vậy phôi sinh dưỡng sẽ được cung cấp GA_3 một cách trực tiếp và có thể điều này sẽ thúc đẩy quá trình nảy mầm của hạt diễn ra nhanh hơn.

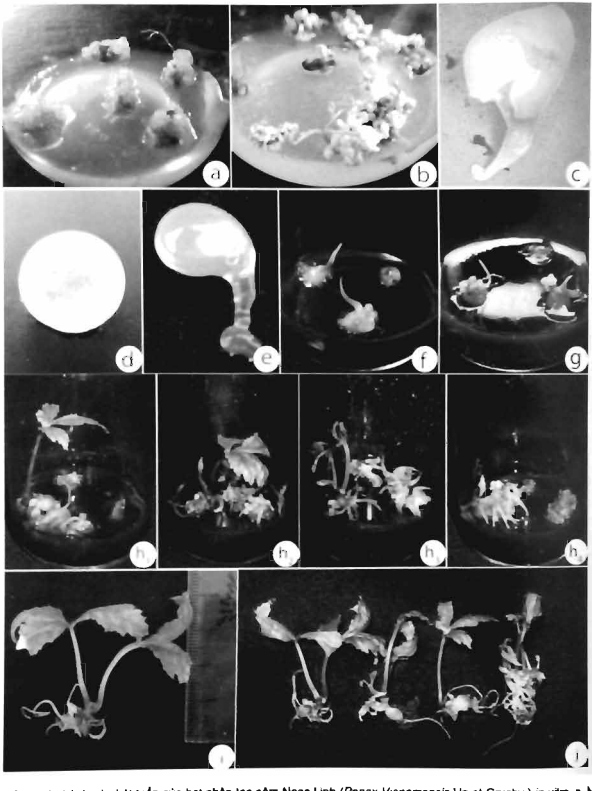
Kết quả chúng tôi thu được ở nồng độ GA_3 trong vỏ hạt là 1 mg/l cho tỷ lệ nảy mầm, tỷ lệ hình thành rễ, tỷ lệ hình thành chồi cao hơn so với khi không bổ sung GA_3 vào vỏ hạt nhân tạo. Tuy nhiên, bổ sung GA_3 vào vỏ hạt ở nồng độ cao (trên 2 mg/l) lại làm giảm tỷ lệ nảy mầm cũng như tỷ lệ hình thành rễ và chồi (Bảng 5). Bản thân phôi sinh dưỡng đã có chứa GA_3 nội sinh, tuy nhiên ở giai đoạn đầu hàm lượng của nó còn thấp, do đó khi bổ sung GA_3 bên ngoài vào (1 mg/l) sẽ giúp hình thành nhanh các enzyme thủy phân, từ đó thúc đẩy nhanh quá trình phân hủy các polymer thành monomer để tạo nguyên liệu cho quá trình nảy mầm. Ngược lại, nếu bổ sung GA_3 bên ngoài vào với nồng độ quá cao (trên 2 mg/l) sẽ gây ra áp suất thẩm thấu, gây ức chế quá trình nảy mầm. Như vậy, bổ sung 1 mg/l GA_3 vào vỏ hạt nhân tạo sâm Ngọc Linh là tốt nhất.

Kết quả thu được trong thí nghiệm này một lần nữa khẳng định về vai trò tích cực của GA_3 trong quá trình nảy mầm của hạt, không chỉ ở hạt hữu tính mà cả ở hạt nhân tạo.

Bảng 5. Ảnh hưởng của GA_3 bổ sung vào vỏ hạt lên khả năng nảy mầm của hạt nhân tạo sau 2 tháng nuôi cấy.

Nồng độ GA_3 (mg/l)	Tỷ lệ nảy mầm (%)	Tỷ lệ hình thành rễ (%)	Tỷ lệ hình thành chồi (%)
0	33,33a*	33,33ab	0,00a
1	**37,33a**	**40,00a**	**3,33a**
2	6,67b	6,67c	0,00a
3	16,67ab	16,67bc	0,00a
4	13,33ab	13,33bc	0,00a

Ghi chú: *Các chữ cái a,b, .. thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa ở mức tin cậy P = 0,05 trong phép thử Ducan.



Hình 2. Sự hình thành và phát triển của hạt nhân tạo sâm Ngọc Linh (*Panax Vienamensis* Ha et Grushv.) *in vitro*. **a.** Nguồn mô sẹo trắng trong dùng để tạo phôi sinh dưỡng, **b.** Phôi sinh dưỡng sâm Ngọc Linh, **c.** Hạt nhân tạo sâm Ngọc Linh nảy mầm; **d.** Hạt nhân tạo sâm Ngọc Linh với nồng độ sodium alginate trong vỏ hạt là 20 g/l; **f.** Sự nảy mầm của hạt nhân tạo sâm Ngọc Linh có bổ sung 20 g/l linh bột vào vỏ hạt, **g.** Sự nảy mầm của hạt nhân tạo sâm Ngọc Linh có bổ sung 15 g/l sucrose vào vỏ hạt; h_1, h_2, h_3, h_4. Sự phát triển của hạt nhân tạo sâm Ngọc Linh khi bổ sung sodium alginate ở các nồng độ tương ứng là 20, 30, 40, 50 g/l; **i, j.** Cây sâm Ngọc Linh có nguồn gốc từ hạt nhân tạo.

KẾT LUẬN

Từ các kết quả thu được ở trên cho thấy phôi sinh dưỡng sâm Ngọc Linh là đối tượng tốt cho công nghệ hạt nhân tạo. Các hạt có nồng độ sodium alginate trong vỏ 30 g/l và thời gian giữ hạt trong dung dịch $CaCl_2.2H_2O$ 100 mM khoảng 22 phút thu được tỷ lệ này mầm, tỷ lệ hình thành rễ và tỷ lệ hình thành chồi là cao nhất. Nguồn carbohydrate bổ sung vào vỏ hạt giúp nâng cao rõ rệt tỷ lệ này mầm của hạt. Khi bổ sung 15 g/l sucrose vào vỏ hạt cho tỷ lệ này mầm là 36,67%, tỷ lệ hình thành rễ là 23,33% và tỷ lệ hình thành chồi là 13,33%. Bổ sung tinh bột vào vỏ hạt chưa thấy có sự hình thành chồi, các hạt này mầm bằng cách hình thành rễ, tuy nhiên lại cho tỷ lệ này mầm rất cao và đặc biệt là các rễ hình thành khỏe, trong đó cho tỷ lệ này mầm cao nhất là ở nồng độ tinh bột 20 g/l (đạt 66,67% sau 2 tháng nuôi cấy). GA_3 bổ sung vào vỏ hạt cũng giúp nâng cao tỷ lệ này mầm của hạt. Nồng độ GA_3 bổ sung vào vỏ hạt tối ưu nhất là 1 mg/l. Những kết quả này chỉ ra rằng, những tác động vào lớp vỏ của hạt nhân tạo có ảnh hưởng đáng kể đến tỷ lệ này mầm cũng như khả năng sinh trưởng, phát triển sau này mầm của hạt nhân tạo sâm Ngọc Linh.

Lời cảm ơn: *Các tác giả xin chân thành cảm ơn Bộ Khoa học và Công nghệ đã hỗ trợ kinh phí cho đề tài nghiên cứu này.*

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Ara H, Jaiswal U, Jaiswal VS (1999) Germination and plantlet regeneration from encapsulated somatic embryos of mango (*Mangifera indica* L.). *Plant Cell Rep* 19: 166-170.

Awal A, Taha RM, Hasbullah NA (2007) *In vitro* formation of synthetic seed of *Begoniax hiemalis* Fotch. *Int J Environ Sci Tech* 2: 189-192.

Bewley JD (1997) Seed germination and dormancy *Plant Cell* 9: 1055-1066.

Cardemil L, Lozada R, Cort SM (1982) Changes in *Araucaria araucana* (Mol.) Koch seed reserves during germination and early seedling growth. *Can J Bot* 60: 1629-1638.

Chand S, Singh AK (2004) Plant regeneration from encapsulated nodal segments of *Dalbergia sissoo* Roxb., a timber-yielding leguminous tree species. *J Plant Physiol* 161: 237-243.

Chester VE (1968) Heritable glycogen-storage deficiency in yeast and its induction by ultra-violet light. *J Gen Microbiol* 51: 49-56.

Choi YE, Yang DC, Yoon ES, Choi KT (1999) High-efficiency plant production via direct somatic single embryogenesis from preplasmolysed cotyledons of *Panax ginseng* and possible dormancy of somatic embryos. *Plant Cell Rep* 18: 493-499.

Choi YE, Jeong JH (2002) Dormancy induction of somatic embryos of Siberian ginseng by high sucrose concentrations enhances the conservation of hydrated artificial seeds and dehydration resistance. *Plant Cell Rep* 20: 1112-1116.

Datta KB, Kanjilal B, De Sarker D (1999) Artificial seed technology. Development of a protocol in *Geodorum densiflorum* (Lam) Schltr. An endangered orchid. *Curr Sci* 76(8): 1142-1144.

Drew R (1979) The development of carrot (*Daucus carota* L.) embryoids (derived from cell suspension culture) into plantlets on a sugar-free basal medium. *Hortic Rev* 19: 79-84

Duncan DB (1995) Multiple range and multiple F test. *Biometrics* 11: 1-42.

Dương Tấn Nhựt, Trần Ngọc Thúy Tiên, Mai Thị Ngọc Hương, Nguyễn Thị Thanh Hiền, Phan Xuân Huyên, Bùi Văn Lé, Đỗ Năng Vịnh (2004) Một số kết quả nghiên cứu về hạt nhân tạo của hoa Lily (*Lilium* spp.). *Tạp chí công nghệ sinh học* 2(3): 359-370.

Dương Tấn Nhựt, Vũ Quốc Luận, Nguyễn Văn Bình, Phạm Thanh Phong, Bùi Ngọc Huy, Đặng Thị Ngọc Hà, Phan Quốc Tâm, Nguyễn Bá Nam, Vũ Thị Hiền, Bùi Thế Vinh, Lâm Thị Mỹ Hằng, Dương Thị Mộng Ngọc, Lâm Bích Thảo, Trần Công Luận (2009) Một số yếu tố ảnh hưởng tới sinh khối cây sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) nuôi cấy *in vitro* và bước đầu phân tích hàm lượng saponin. *Tạp chí Công nghệ sinh học* 7(3): 365-378.

Dương Tấn Nhựt, Hoàng Xuân Chiến, Nguyễn Bá Trực, Nguyễn Bá Nam, Trần Xuân Tình, Vũ Quốc Luận, Nguyễn Văn Bình, Vũ Thị Hiền, Trịnh Thị Hương, Nguyễn Cửu Thành Nhân, Lê Nữ Minh Thùy, Lý Thị Mỹ Nga, Thái Thương Hiền, Nguyễn Thành Hải (2010) Nhân giống vô tính cây sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.). *Tạp chí Công nghệ sinh học* 8 (3B): 1211-1219.

Fujii J, Slade D, Redenbaugh K, Walker K (1987) Artificial seeds for plant propagation *Trends Biotechnol* 5: 335-339.

Ganapathi TR, Srinivas L, Suprasanna P, Bapat VA (2001) Regeneration of plants from alginate-encapsulated somatic embryo of banana cv. Rasthali (*Musa* spp AAB group). *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 37: 178-181.

Ghosh B, Sen S (1994) Plant regeneration from alginate encapsulated somatic embryos of *Asparagus cooperi*

Baker. *Plant Cell Rep* 13: 381-385.

Halmagyi A, Fischer-Kluver G, Mix-Wagner G, Schumacher HM (2004) Cryopreservation of *Chrysanthemum morifolium* (*Dendranthema grandiflora* Ramat.) using different approaches *Plant Cell Rep* 22: 371-375.

Kamada H (1985) Artificial seed. In Tanaka R, ed. *Practical technology on the mass production of clonal plants*. CMC, Tokyo, 48

Kamada H, Kiyosue T, Harada H (1988) New methods for somatic embryo induction and their use for synthetic seed production. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 24: 71A

Kitto S, Janick J (1985a) Production of synthetic seeds by encapsulating asexual embryos of carrot. *J Am Soc Hort Sci* 110: 277-282

Kitto S, Janick J (1985b) Hardening treatments increase survival of synthetically-coated asexual embryos of carrot *J Am Soc Hort Sci* 110: 283-286.

Lawrence RJR (1981) *In vitro* cloning systems. *Environ Exp Bot* 21: 289-300.

Lulsdorf MM, Tautorus TE, Kikcio SI, Bethune TD, Dunstan DI (1993) Germination of encapsulated embryos of interior spruce (*Picea glauca engelmannii* complex) and black spruce (*Picea mariana* Mill.) *Plant Cell Rep* 12: 385-389

Maruyama E, Kinoshita I, Ishii K, Shigenage H, Ohba K, Saito A (1997) Alginate-encapsulated technology for the propagation of the tropical forest trees: *Cedrela odorata* L., *Guazuma crinita* Mart, and *Jacaranda mimosaefolia* D. Don. *Silvae Genet* 46, 17-23

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiol* 15: 473-479.

Nguyễn Thị Thanh Hiền, Mai Thị Ngọc Hương, Trần Ngọc Thùy Tiên, Phan Xuân Huyên, Dương Tấn Nhựt, Đỗ Năng Vịnh (2003) Bước đầu nghiên cứu việc tạo hạt nhân tạo và ứng dụng trong nhân giống vô tính và bảo quản. *Báo cáo Khoa học Hội nghị Công nghệ Sinh học Toàn quốc, Hà Nội:* 935-938.

Nguyễn Văn Uyển (1992) *Những phương pháp Công nghệ Sinh học Thực vật*, tập 2. Nhà xuất bản Nông nghiệp, Hà Nội.

Nhut DT, Tien TNT, Huong MTN, Hien NTT, Huyen PX, Luan VQ, Teixeira da Silva J (2005) Artificial seeds for propagation and preservation of *Cymbidium* spp. *J Pro Orn Plants* 5(2): 67-73.

Redenbaugh K, Nichol J, Kossler M, Paasch B (1984) Encapsulation of somatic embryos for artificial seed production. *In Vitro* 3: 256-257.

Redenbaugh K, Paasch BD, Nichol J, Kossler ME, Viss PR, Walker KA (1986) Somatic seeds: encapsulation of asexual plant embryos. *Biotechnology* 4: 797-801.

Redenbaugh K, Viss P, Slade D, Fujii J (1987) Scale-up: Synseeds. In Green C, Somers D, Hackett W, Biesboer D, Eds. *Plant Tissue and Cell Culture*. Alan R. Liss, Inc: 473-493.

Redenbaugh K, Fujii JA, Slade D (1988) *Encapsulated plant embryos*. In: Mizrahi A, ed. *Biotechnology in Agriculture. Advances in Biotecnological Processes*. Liss, New York 9: 225-248.

Redenbaugh K, Fujii J, Slade D, Viss P, Kossler M (1991) *Artificial seeds - encapsulated somatic embryos*. In Bajaj YPS, ed. *High Technology and Micropropagation I. Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Springer, Heidelberg-Berlin-New York 17: 395-416.

Redenbaugh K (1993) Synthetic seeds of alfalfa; Carrot somatic embryogenesis and its application to synthetic seeds; somatic embryogenesis and synthetic seed technology using carrot as a model system; Celery and lectuce; somatic embryogenesis of Spruce. In Redenbaugh K, ed. *Synseeds-Applications of synthetic seeds to crop improvement*. CRC, Press Inc: 231-255, 257-287, 289-304, 305-327, 427-450.

Saiprasad GVS (2001) Artificial seeds and their applications. *Resonance*: 39-47.

Soneji JR, Rao PS, Mhatre M. (2002) Germination synthetic seeds of pineapple (*Ananas comosus* L. Merr). *Plant Cell Rep* 20: 891-894.

Tejavathi DH, Gayathramma K, Sowmya R (2006) Production of plantlets from encapsulated *in vitro* shoot buds and somatic embryos of *Agave vera-cruz* Mill. *Plant Cell Biotechnol Mol Biol* 7: 183-186.

Trần Ngọc Thùy Tiên, Thái Khiết Vi, Trịnh Thị Hương, Trần Thị Ngọc Lan, Trần Trọng Tuấn, Đoàn Quốc Quỳnh, Vũ Quốc Luận, Nguyễn Thành Hải, Dương Tấn Nhựt (2010) Nghiên cứu một số điều kiện nảy mầm *in vitro* và *ex vitro* của hạt nhân tạo Địa lan (*Cymbidium* spp.). *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 8(3B): 1381-1388.

Walker K, Sato S (1981) Morphogenesis in callus tissue of *Medicago sativa*: The role of ammonium ion in somatic embryogenesis. *Plant Cell Tiss Org Cult* 1: 109-121.

IN VITRO GERMINATION OF SOMATIC EMBRYO-DERIVED ARTIFICIAL SEED OF NGOC LINH GINSENG (*PANAX VIETNAMENSIS* HA ET GRUSHV.)

Trinh Thi Huong, Duong Tan Nhut*

Tay Nguyen Insititute of Biology

SUMMARY

In this study, several factors affected on artificial seed germination derived from somatic embryos of *Panax vietnamensis* such as concentration of sodium alginate in the matrix, duration of seed submergence in the $CaCl_2.2H_2O$ 100 mM solution, carbohydrate source and GA_3 added to the matrix were presented. After 3 months culture, artificial seeds with concentrations 30 g/l sodium alginate in the matrix reached germinative rate (70.36%) and post-germinative growth rate were the highest (average high shoot reached 7 mm, average length root reached 11.18 mm). Optimal time of seed incubated in the $CaCl_2.2H_2O$ 100 mM solution was 22 minutes. 15 g/l sucrose or 20 g/l starch additional to the matrix showed higher germinative than those in the matrix without carbohydrate source. After 2 months culture, 1 mg/l GA_3 supplemented to the matrix reached germinative and shoot/root formation rate were higher than those in the matrix without GA_3. These results indicated that the matrix components directly affect germinative and shoot/root formation rate of artificial seeds of *Panax vietnamensis*.

Keywords: *Artificial seed, germinative rate, Panax vietnamensis, sodium alginate, somatic embryo*

* *Author for correspondence:* Tel: *84-63-3831056;* Fax: *84-63-3831028,* E-mail: *duongtannhut@gmail.com*