

## ẢNH HƯỞNG CỦA MÔI TRƯỜNG KHOÁNG, NGUỒN CARBON VÀ PEPTONE LÊN KHẢ NĂNG PHÁT TRIỂN RỄ THỨ CẤP TỪ RỄ BẮT ĐỊNH SÂM NGỌC LINH *IN VITRO*

Nguyễn Thị Nhật Linh<sup>1,2</sup>, Nguyễn Hoàng Lộc<sup>2</sup>, Dương Tấn Nhựt<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

<sup>2</sup>Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế

\*Email: duongtannhut@gmail.com

Ngày nhận bài: 28/8/2017; ngày hoàn thành phản biện: 9/9/2017; ngày duyệt đăng: 27/10/2017

### TÓM TẮT

Nuôi cấy tăng sinh rễ thứ cấp từ nguồn rễ bắt định sâm Ngọc Linh vô cùng có ý nghĩa cho các ngành công nghiệp y dược vì rễ sâm Ngọc Linh chứa nhiều saponin quý có tác dụng bồi bổ và điều trị bệnh. Để rễ thứ cấp hình thành và phát triển tốt từ nguồn mẫu rễ bắt định, ngoài môi trường MS hay SH, môi trường MSCB (với tỉ lệ  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4:\text{KNO}_3 = 7,19:18,5$  mM:mM) bổ sung 7 mg/l IBA và 0,5 mg/l BA cho kết quả tối ưu nhất. Trong ba nguồn carbon, maltose có hiệu quả tăng sinh rễ thứ cấp thấp nhất, 60 g/l D-glucose có thể thay thế hoàn toàn nguồn sucrose để tạo rễ thứ cấp nhưng do giá thành và hàm lượng sử dụng cao hơn nhiều so với sucrose nên 30 g/l sucrose vẫn là tối ưu nhất cho nuôi cấy tạo rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh. Ngoài ra, việc bổ sung peptone vào môi trường nuôi cấy cũng giúp gia tăng đáng kể sinh khối, và hàm lượng các saponin G-Rb1, G-Rg1 và MR2 cũng tăng lên tương ứng, trong đó sử dụng 200 mg/l peptone là tối ưu nhất.

**Từ khóa:** môi trường khoáng, nguồn carbon, *Panax vietnamensis*, peptone, rễ thứ cấp.

### 1. MỞ ĐẦU

Vietnamese ginseng là cái tên quen thuộc cả thế giới dùng để gọi tên sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.), một loài sâm đặc hữu của Việt Nam, loài có chứa nhiều dược chất nhất so với các loài khác thuộc chi nhân sâm. Sâm Ngọc Linh không chỉ là loài sâm quý hiếm, có giá trị kinh tế cao mà còn là một loài cây lâu năm, khó nuôi trồng và nhân rộng nên để sử dụng các dược chất từ sâm Ngọc Linh vào sản xuất các dược phẩm vẫn còn gặp rất nhiều khó khăn. Cho đến nay, nguồn rễ từ nuôi cấy mô được xem là một giải pháp thay thế tối ưu nhất để sản xuất dược nguồn rễ của loài sâm quý này trong thời gian ngắn và dễ dàng thu nhận nguồn sinh khối lớn. Tuy nhiên, cho dù những nghiên cứu về nuôi cấy rễ sâm Ngọc Linh đã có nhiều bước tiến

*Ảnh hưởng của môi trường khoáng, nguồn carbon và peptone lên khả năng phát triển rễ thứ cấp ...*

quan trọng kể từ các nuôi cấy ban đầu trong việc phát sinh tạo rễ bất định từ các bộ phận khác nhau của cây sâm Ngọc Linh đến những bước tiến xa hơn trong việc nỗ lực tạo nguồn rễ chuyển gen với mong muốn có thể sản xuất nguồn rễ sâm trên quy mô lớn, nhưng hiệu quả sản xuất nguồn rễ sâm hiện nay vẫn còn rất hạn chế.

Theo nghiên cứu của Sivakumar và cộng sự (2005), khi tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy rễ sâm *Panax ginseng*, điều quan trọng nhất quyết định đến sự phát triển, tăng sinh khối và tích lũy ginsenoside, cũng như đến các giai đoạn phát triển rễ bên loài sâm này là các yếu tố khoáng, nguồn carbon và các elicitor [7]. Nguồn dinh dưỡng đóng vai trò như một nguồn năng lượng và tín hiệu hóa học điều hòa quá trình phát triển và biệt hóa hình thành rễ trong nuôi cấy rễ bất định *Panax ginseng* [14]. Khả năng rễ phản ứng lại với môi trường giàu dinh dưỡng còn thể hiện bản chất của các dòng gen được chuyển vào so với loài tự nhiên thông qua biểu hiện biệt hóa các mô cấy khác nhau [7]. Hơn nữa, tối ưu hóa các yếu tố dinh dưỡng khoáng hay nguồn carbon không những giúp rễ phát triển mà còn tạo điều kiện cho rễ có đủ nguồn năng lượng để tích lũy các saponin quý trong rễ [7]. Trong nuôi cấy rễ bất định sâm Ngọc Linh, ngoài vai trò to lớn của các chất điều hòa sinh trưởng thì nguồn mẫu, môi trường khoáng, nguồn carbon, pH và elicitor là một trong những yếu tố quyết định đến sự thành công của các nuôi cấy tạo rễ bất định. Từ nghiên cứu đầu tiên về nuôi cấy rễ bất định năm 2009, Dương Tấn Nhựt và cộng sự đã nuôi cấy rễ bất định sâm Ngọc Linh thành công trên môi trường SH với 30 g/l sucrose ở pH=5,8 [4]. Tuy nhiên, Nguyễn Thị Liễu và cộng sự (2011) khi khảo sát ba loại môi trường SH, MS và B5 thì cho kết quả nuôi cấy rễ bất định *Panax vietnamensis* phát triển tối ưu trên môi trường MS [12]. Trong khi đó, một số nghiên cứu gần đây sử dụng môi trường SH với 50 g/l sucrose ở pH=5,3 là thích hợp nhất để rễ bất định hình thành và phát triển [4][9]. Do nguồn khoáng dinh dưỡng và nguồn carbon là những yếu tố không thể thiếu cho các nuôi cấy rễ nên cần phải đánh giá và khảo sát chính xác môi trường nuôi cấy thích hợp, cũng như các nguồn đường khác nhau lên sự phát triển rễ thứ cấp từ nuôi cấy rễ bất định. Ngoài ra, peptone, một elicitor sinh học mới có khả năng gia tăng hàm lượng saponin trong sâm *Panax ginseng* C. A. Meyer [11]. Do vậy, chúng tôi đã tiến hành khảo sát ảnh hưởng của peptone, loại và lượng các môi trường khoáng và các nguồn carbon khác nhau đến sự phát triển rễ thứ cấp trong nuôi cấy rễ bất định sâm Ngọc Linh.

## **2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

### **2.1. Vật liệu nghiên cứu**

#### *Nguồn mẫu*

Rễ bất định sâm Ngọc Linh (nặng khoảng 50 mg, dài khoảng 2 cm) được tách ra từ các cụm rễ bất định nuôi cấy sau 60 ngày tuổi từ mẫu cuống lá trên môi trường SH

bổ sung 5 mg/l IBA tại Phòng Sinh học Phân tử và Chọn tạo Giống cây trồng (Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên).

### **Môi trường nuôi cấy**

Môi trường dinh dưỡng khoáng MS [15], SH [13], MSCB [10] bổ sung 7 mg/l IBA, 0,5 mg/l BA. Môi trường được rót vào bình thủy tinh 250 ml, mỗi bình chứa 30 ml môi trường lỏng. Sau đó, được điều chỉnh pH đến 5,8 trước khi hấp khử trùng ở 121°C, 1 atm trong vòng 20 phút.

### **Điều kiện nuôi cấy**

Các mẫu rễ bất định được nuôi cấy trong vòng 56 ngày dưới điều kiện tối hoàn toàn, ở nhiệt độ  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , độ ẩm trung bình 50 – 60% trên máy lắc Innova 2100 plantform shaker (Hermle, Đức) với tốc độ 100 vòng/phút.

## **2.2. Phương pháp nghiên cứu**

### **Khảo sát ảnh hưởng của môi trường khoáng lên sự phát triển rễ thứ cấp từ rễ bất định sâm Ngọc Linh**

Các cụm rễ bất định sau khi tách ra khỏi mẫu cuống lá ban đầu với chiều dài khoảng  $2 \pm 0,5$  cm được cấy lên 3 loại môi trường khác nhau MS,  $\frac{1}{2}$  MS (giảm 1/2 đa lượng),  $\frac{3}{4}$  MS (giảm 3/4 đa lượng), SH,  $\frac{1}{2}$  SH (giảm 1/2 đa lượng),  $\frac{3}{4}$  SH (giảm 3/4 đa lượng) và MS cải biên (với tỉ lệ  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4:\text{KNO}_3=7,19:18,5$  mM:mM) có bổ sung 7 mg/l IBA, 0,5 mg/l BA và 30 g/l sucrose.

### **Khảo sát ảnh hưởng các nguồn carbon lên sự phát triển rễ thứ cấp từ rễ bất định sâm Ngọc Linh**

Các cụm rễ bất định sau khi cắt ra khỏi mẫu cuống lá ban đầu với chiều dài khoảng  $2 \pm 0,5$  cm được cấy lên môi trường MSCB (MS cải biên) bổ sung 7 mg/l IBA và 0,5 mg/l BA, và khảo sát với 0, 10, 30, 50, 60 g/l sucrose, D-glucose, hay maltose.

### **Khảo sát ảnh hưởng của peptone lên sự phát triển rễ thứ cấp từ rễ bất định sâm Ngọc Linh**

Các cụm rễ bất định sau khi cắt ra khỏi mẫu cuống lá ban đầu với chiều dài khoảng  $2 \pm 0,5$  cm được cấy lên môi trường MSCB bổ sung 7 mg/l IBA và 0,5 mg/l BA, và khảo sát với 0, 50, 100, 150, 200 mg/l peptone (đóng vai trò như một elicitor để gây kích kháng sinh tổng hợp saponin) nhằm tìm ra nồng độ thích hợp cho quá trình phát triển và tích lũy saponin trong nuôi cấy tạo rễ thứ cấp từ rễ bất định sâm Ngọc Linh.

### **Định lượng saponin trong sinh khối rễ thu được từ nuôi cấy tạo rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh**

#### **Nguồn mẫu**

*Ảnh hưởng của môi trường khoáng, nguồn carbon và peptone lên khả năng phát triển rễ thứ cấp ...*

Mẫu rễ thứ cấp (1 g khối lượng khô) thu nhận từ các nghiệm thức bổ sung thêm peptone với các nồng độ khác nhau và đối chứng là không bổ sung peptone.

#### *Chất chuẩn*

Chuẩn MR2 đã được hỗ trợ bởi Trung tâm nghiên cứu Sâm và Dược liệu thành phố Hồ Chí Minh [1]; chuẩn ginsenoside Rb1 (G-Rb1) và ginsenoside-Rg1 (G-Rg1) được mua từ Wako Pure Chemical Industries, Ltd, Nhật Bản.

Định lượng saponin (MR2, Rb1 và Rg1) bằng phương pháp HPLC [1].

Hàm lượng (%) của ginsenoside được tính theo công thức:

$$HL (\%) = \frac{x \cdot 10 \cdot 100\%}{a \cdot (100\% - p)} \cdot 10^{-6}$$

*x*: nồng độ mẫu thử thu được dựa vào đường chuẩn ( $\mu\text{g/ml}$ ); *10*: độ pha loãng mẫu; *a*: khối lượng nguyên liệu (g); *p*: độ ẩm

Hàm lượng saponin toàn phần, MR2, Rg1, Rb1 trong sinh khối rễ thứ cấp được ghi nhận.

#### *Chỉ tiêu theo dõi*

Sau 56 ngày nuôi cấy tạo rễ thứ cấp từ nguồn mẫu rễ bất định sâm Ngọc Linh, các chỉ tiêu về khả năng phát triển của rễ được thu nhận gồm: khối lượng tươi (mg), khối lượng khô (mg), chiều dài rễ (cm), số rễ/mẫu rễ bất định, % hàm lượng các saponin (G-Rb1, G-Rg1 và MR2).

#### *Xử lý số liệu*

Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần và được xử lý bằng phần mềm SPSS 20.0 theo phép thử Duncan với  $P = 0,05$  [3].

### **3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

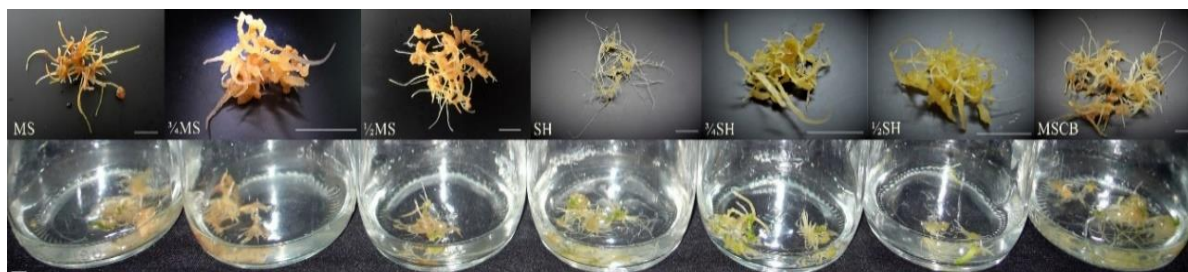
#### **3.1. Ảnh hưởng môi trường khoáng lên sự phát triển rễ thứ cấp từ rễ bất định sâm Ngọc Linh**

*Bảng 1. Ảnh hưởng môi trường khoáng lên sự phát triển rễ thứ cấp từ rễ bất định sâm Ngọc Linh*

Môi trường	Khối lượng tươi (mg)	Khối lượng khô (mg)	Số rễ	Chiều dài rễ (cm)
1/2 MS	193,00 <sup>e*</sup>	16,94 <sup>c</sup>	14,80 <sup>c</sup>	3,02 <sup>c</sup>
1/2 SH	296,40 <sup>b</sup>	24,16 <sup>b</sup>	14,40 <sup>c</sup>	2,70 <sup>c</sup>
3/4 MS	233,60 <sup>d</sup>	24,04 <sup>b</sup>	20,80 <sup>a</sup>	0,80 <sup>e</sup>
3/4 SH	157,00 <sup>f</sup>	13,80 <sup>c</sup>	9,20 <sup>d</sup>	1,52 <sup>d</sup>

MS	287,96 <sup>bc</sup>	26,35 <sup>b</sup>	17,80 <sup>b</sup>	4,10 <sup>b</sup>
MSCB	320,08 <sup>a</sup>	32,56 <sup>a</sup>	22,00 <sup>a</sup>	5,78 <sup>a</sup>
SH	275,00 <sup>c</sup>	22,60 <sup>b</sup>	16,80 <sup>b</sup>	5,24 <sup>a</sup>

**Ghi chú:** \*Các chữ cái a, b, c... thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa với  $p=0,05$  trong phép thử Duncan.



**Hình 1.** Ảnh hưởng của môi trường khoáng lên sự phát triển rễ thứ cấp từ rễ bất định sâm Ngọc Linh.

Thanh bar dài 1 cm.

Theo kết quả bảng 1, khi nuôi cấy rễ bất định trong điều kiện lỏng lác, các môi trường MS cải biên, MS,  $\frac{1}{2}$  SH, SH đều cho có khả năng thúc đẩy rễ phát triển và kéo dài rễ thứ cấp nhiều hơn. Trên môi trường MS và  $\frac{3}{4}$  MS, rễ thứ cấp vàng đi, đặc biệt phần rễ bất định chuyển sang nâu đậm hơn so với môi trường SH và chiều dài rễ (4,1 cm) cũng ngắn hơn ở trên môi trường SH, MS cải biên (trên 5 cm) (Hình 1, Bảng 1). Việc giảm khoáng đa lượng của MS, SH không tạo điều kiện thuận lợi cho rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh phát triển, điều này có thể do khi giảm khoáng đa lượng thì lượng K và P giảm kéo theo rễ kém phát triển hơn vì nhiều nghiên cứu cho thấy hàm lượng K và P trong nuôi cấy rễ nhân sâm thường khá cao và thông thường môi trường MS là thích hợp nhất để rễ bất định phát triển [10][11][14].

Kết quả thu được cho thấy mẫu rễ thứ cấp phát triển tốt nhất ở nghiệm thức sử dụng môi trường MS cải biên (thay 20,61 mM  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  của MS bằng 7,12 mM  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  và 18,79 mM  $\text{KNO}_3$  của MS xuống 18,5 mM, tương ứng làm thay đổi tỉ lệ  $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$  của môi trường MS từ 1:7 thành 1:9 ở môi trường MSCB), dẫn đến tỉ lệ  $\text{NO}_3^-$  trong môi trường tăng lên nhưng hàm lượng khoáng vẫn không quá cao so với môi trường MS. Ngoài ra, rễ phát triển trên môi trường MSCB cũng tươi hơn và không vàng như trên môi trường MS, sinh khối cũng đạt tối ưu với khối lượng tươi (320,08 mg), khối lượng khô (32,56 mg) và số rễ (22 rễ/mẫu rễ bất định) và chiều dài rễ (5,78 cm) (Hình 1, Bảng 1). Yu và cộng sự (2000) cho kết quả tương tự trong nuôi cấy sâm *Panax ginseng* C. A. Meyer, số lượng rễ thứ cấp cũng tăng lên và phát triển rất tốt khi tỉ lệ  $\text{NO}_3^-$  tăng lên [11]. Trong đó, giảm hàm lượng khoáng đa lượng xuống  $\frac{3}{4}$  MS thì số rễ tăng lên rõ rệt so với các nghiệm thức khác. So với môi trường SH, tỉ lệ  $\text{NO}_3^-$  là 1/32 cao hơn môi trường MS cải biên rất nhiều, tuy nhiên do bản chất môi trường MSCB là môi trường MS có một số vi lượng như Mn, Zn cao hơn môi trường SH và có thể chính điều này làm rễ tăng khối lượng cao hơn [15]. Rễ trên môi trường MS,  $\frac{1}{2}$  MS và  $\frac{3}{4}$  MS

Ảnh hưởng của môi trường khoáng, nguồn carbon và peptone lên khả năng phát triển rễ thứ cấp ...

kém phát triển và mau hóa vàng hơn ở môi trường SH, 1/2 SH, 3/4 SH điều này có thể do lượng Cu<sup>2+</sup> trên môi trường này thấp hơn mà Cu<sup>2+</sup> là một yếu tố không thể thiếu trong tất cả các giai đoạn phát triển của rễ [6].

### 3.2. Ảnh hưởng các nguồn carbon lên sự phát triển rễ thứ cấp từ rễ bất định sâm Ngọc Linh.

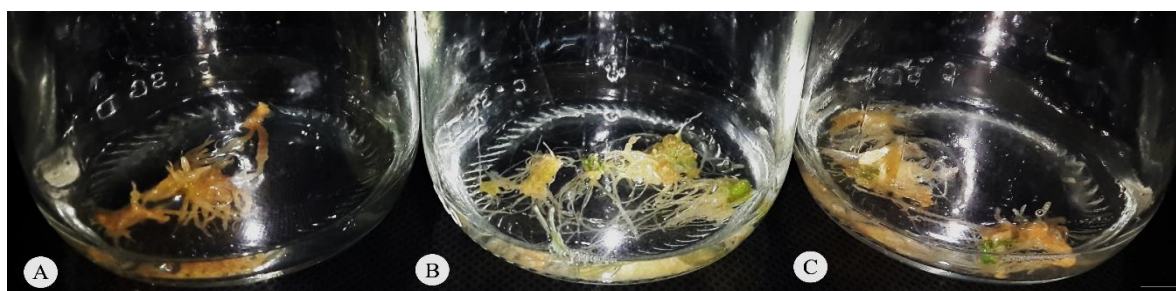
Kết quả thu được tại Bảng 2 cho thấy, trong ba nguồn carbon bổ sung vào môi trường nuôi cấy thì maltose không có hiệu quả cho sự phát triển rễ thứ cấp từ mẫu rễ bất định *in vitro*, khối lượng tươi và khối lượng khô thu được đều rất thấp, nhiều rễ bị vàng trong và mọng nước, càng tăng hàm lượng maltose thì tỉ lệ chất khô cũng càng giảm theo, điều này cho thấy rễ không hấp thu và chuyển hóa maltose nhiều trong quá trình hình thành và tăng trưởng rễ thứ cấp. Để rễ hấp thu chất dinh dưỡng và nước tốt thì D-glucose và sucrose tỏ ra hiệu quả hơn, rễ có màu sắc trắng tươi, hầu hết các nghiệm thức có D-glucose rễ thứ cấp đều khá dài (Bảng 2, Hình 2). Nghiệm thức tối ưu nhất là 60 g/l D-glucose với khối lượng khô lên đến 67,4 mg, tỉ lệ chất khô cũng đạt cao nhất 13,03%. Ngoài D-glucose thì sucrose cũng có nhiều ưu điểm hơn, nồng độ sucrose cần thiết cho rễ thứ cấp tăng sinh về cả khối lượng tươi, khối lượng khô và tỉ lệ chất khô chỉ từ 30-60 g/l và tối ưu nhất là 30 g/l với khối lượng tươi (641,33 mg) cao nhất và khối lượng khô (55,33 mg) cũng khá cao so với các nghiệm thức khác (Bảng 2). Trong khi đó, D-glucose sử dụng trên 50 g/l thì khả năng tăng sinh mới có khác biệt đáng kể (Bảng 2, Hình 2). Mặc dù khối lượng khô và tỉ lệ chất khô đạt tối ưu nhất khi sử dụng 60 g/l D-glucose, nhưng chỉ ở 30 g/l sucrose khối lượng tươi đạt cao nhất và khối lượng khô hay tỉ lệ chất khô cũng đạt khá cao, rễ cũng có màu tươi và ít vàng hơn. Hơn nữa, trong nhiều nghiên cứu đều sử dụng 30 g/l sucrose để nuôi cấy rễ bất định sâm Ngọc Linh *in vitro* [4][5][9][12]. Xét về mặt kinh tế, sucrose phổ biến và có giá thành rẻ hơn chính vì thế rõ ràng 30 g/l sucrose là tốt nhất không những cho rễ phát triển mà còn cho việc đầu tư nuôi cấy trên quy mô lớn. Ngoài ra, theo nghiên cứu của Yu (2000) cho thấy trong ba loại đường trên, sucrose tốt nhất cho rễ thứ cấp nhân sâm phát triển, đặc biệt hiệu quả tích lũy saponin cao gần gấp đôi D-glucose ở nồng độ 30 g/l [10]. Theo nghiên cứu của Kim và cộng sự (2005) cũng cho thấy 30 g/l sucrose không những tối ưu cho rễ nhân sâm *Panax ginseng* phát triển và còn giúp tích lũy được hàm lượng saponin đạt cao nhất với khối lượng rễ thu được từ bioreactor 3 lít là 2,5 g và tổng saponin chiếm 0,25% [8].

**Bảng 2.** Ảnh hưởng nguồn carbon lên sự phát triển rễ thứ cấp từ rễ bất định sâm Ngọc Linh

Nguồn carbon	Nồng độ (g/l)	Khối lượng tươi (mg)	Khối lượng khô (mg)	Tỉ lệ chất khô (%)	Đặc điểm rễ
	0	51,67 <sup>e*</sup>	3,33 <sup>hi</sup>	6,42 <sup>d</sup>	trong, nhũn, không phát triển

<b>D-Glucose</b>	10	160,33 <sup>d</sup>	15,00 <sup>gh</sup>	9,82 <sup>bc</sup>	trắng, dài, phân nhánh ít
	30	206,67 <sup>d</sup>	18,33 <sup>g</sup>	8,89 <sup>bcd</sup>	trắng, rất dài, phân nhánh ít
	40	379,33 <sup>c</sup>	41,57 <sup>e</sup>	10,96 <sup>ab</sup>	trắng, rất dài, mập, ít nhánh
	50	577,67 <sup>b</sup>	51,93 <sup>bcd</sup>	8,99 <sup>bcd</sup>	trắng, rất dài, mập, nhiều nhánh
	60	523,00 <sup>b</sup>	67,40 <sup>a</sup>	13,03 <sup>a</sup>	trắng, rất dài, mập, nhiều nhánh
<b>Sucrose</b>	10	374,33 <sup>c</sup>	29,33 <sup>f</sup>	8,85 <sup>bcd</sup>	trắng đục, tròn đều, mập, ít nhánh
	30	641,33 <sup>a</sup>	55,33 <sup>bc</sup>	8,64 <sup>bcd</sup>	dài, trắng đục, mập, nhiều nhánh
	40	572,33 <sup>b</sup>	56,00 <sup>b</sup>	9,79 <sup>ab</sup>	dài, trắng đục, mập, nhiều nhánh
	50	533,33 <sup>b</sup>	47,83 <sup>cde</sup>	9,16 <sup>bcd</sup>	dài, trắng đục, mập, nhiều nhánh
	60	526,67 <sup>b</sup>	46,33 <sup>de</sup>	7,80 <sup>cd</sup>	dài, hơi vàng, mập, nhiều nhánh
<b>Maltose</b>	10	91,67 <sup>e</sup>	9,00 <sup>hi</sup>	8,22 <sup>bcd</sup>	vàng, ít phân nhánh và kéo dài
	30	182,67 <sup>d</sup>	15,33 <sup>gh</sup>	9,54 <sup>bc</sup>	vàng, ít phân nhánh
	40	181,67 <sup>d</sup>	17,33 <sup>f</sup>	9,76 <sup>bc</sup>	vàng, ít phân nhánh
	50	102,73 <sup>e</sup>	7,67 <sup>hi</sup>	7,37 <sup>cd</sup>	vàng, mỏng nước, ít phân nhánh
	60	62,53 <sup>e</sup>	4,33 <sup>hi</sup>	6,94 <sup>cd</sup>	vàng, không phân nhánh

Ghi chú: \*Các chữ cái a, b, c... thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa với  $p=0,05$  trong phép thử Duncan



Hình 2. Ảnh hưởng của các nguồn carbon lên sự phát triển rễ thứ cấp từ rễ bất định sâm Ngọc Linh.

A. 30 g/l Maltose; B. 30 g/l Sucrose. C. 60 g/l D-Glucose. Thanh bar dài 1 cm.

### 3.3. Ảnh hưởng của peptone lên sự phát triển và tích lũy saponin của rễ thứ cấp từ nuôi cấy rễ bất định sâm Ngọc Linh

Theo kết quả bảng 3, hệ số tăng sinh của rễ thứ cấp tỉ lệ thuận với nồng độ peptone thêm vào môi trường nuôi cấy, trong đó, rễ đạt tối ưu ở nồng độ 200 mg/l, tại

*Ảnh hưởng của môi trường khoáng, nguồn carbon và peptone lên khả năng phát triển rễ thứ cấp ...*

nồng độ này cả khối lượng tươi và khối lượng khô đều tăng lên và đạt tối ưu (Bảng 3, Hình 3). Theo nhiều nghiên cứu cũng cho thấy peptone thúc đẩy khả năng phát triển của rễ [6][8][11]. Ngoài khả năng tăng sinh rễ thứ cấp, peptone còn có khả năng tăng cường các hợp chất thứ cấp trong nuôi cấy, càng tăng nồng độ peptone thì hàm lượng saponin cũng tăng theo và đạt tối ưu ở nồng độ 200 mg/l peptone với cả ba loại saponin (G-Rb1, G-Rg1 và MR2) đều đạt tối ưu nhất sau 56 ngày nuôi cấy (Bảng 3). Theo nghiên cứu của Yu và cộng sự (2000), khi nuôi cấy rễ nhân sâm *Panax ginseng* C. A. Meyer cũng cho thấy ngoài khả năng tăng cường rễ phát triển, peptone còn giúp gia tăng hàm lượng các saponin trong nhân sâm ở nồng độ 300 mg/l. Tại nồng độ này, hiệu quả tích lũy đạt tối đa so với các elicitor sinh học khác được khảo sát nhưng khả năng kích kháng của peptone thì thấp hơn jasmonic acid ở nồng độ 5 mg/l. Ngoài ra, khi so sánh hiệu quả các nuôi cấy mô sẹo, huyền phù tế bào, nuôi cấy rễ của các loài nhân sâm thương mại hiện có như *Panax notoginseng*, *Panax ginseng* C. A. Meyer và *Panax vietnamensis*, nghiên cứu cũng ghi nhận rằng việc bổ sung 2 g/l peptone vào cuối giai đoạn nuôi cấy trong nuôi cấy một số loài nhân sâm giúp gia tăng tích lũy các hàm lượng saponin lên đáng kể, đặc biệt ở nuôi cấy tế bào *Panax ginseng* (3,31 mg/g), ở tế bào *Panax vietnamensis* (3,07 mg/g), tế bào *Panax notoginseng* (2,35 mg/g) [2]. Điều này chứng tỏ peptone hoàn toàn có khả năng kích thích sinh tổng hợp các saponin trong nhân sâm, không những vậy hiệu quả sinh trưởng cũng tăng lên rõ rệt.

Tóm lại, khác với các elicitor khác như methyl jasmonate, salicylic acid và dịch chiết nấm men thường gây giảm sinh khối rễ bất định [7][10][11][14], peptone lại giúp tăng mạnh khả năng phát triển rễ thứ cấp từ nuôi cấy rễ bất định sâm Ngọc Linh, và đồng thời cũng làm tăng hàm lượng saponin trong rễ thứ cấp lên đáng kể trong tất cả các nghiệm thức và đạt tối ưu ở nghiệm thức bổ sung 200 mg/l peptone.

**Bảng 3.** Ảnh hưởng của nguồn carbon lên sự phát triển rễ thứ cấp từ rễ bất định sâm Ngọc Linh

Peptone (mg/l)	Khối lượng tươi (mg)	Khối lượng khô (mg)	G-Rg1 (%)	G-Rb1 (%)	MR2 (%)
0	295,33 <sup>b*</sup>	24,33 <sup>c</sup>	0,10309 <sup>e</sup>	0,18727 <sup>e</sup>	0,09888 <sup>e</sup>
50	311,67 <sup>b</sup>	24,00 <sup>c</sup>	1,12005 <sup>d</sup>	0,75829 <sup>d</sup>	0,14632 <sup>d</sup>
100	350,33 <sup>b</sup>	34,33 <sup>b</sup>	1,42903 <sup>c</sup>	0,78012 <sup>c</sup>	0,17976 <sup>c</sup>
150	435,33 <sup>b</sup>	41,00 <sup>ab</sup>	1,5234 <sup>b</sup>	1,14326 <sup>b</sup>	0,19889 <sup>b</sup>
200	471,00 <sup>a</sup>	49,33 <sup>a</sup>	2,95840 <sup>a</sup>	3,20143 <sup>a</sup>	0,184397 <sup>a</sup>

**Ghi chú:** \*Các chữ cái a, b, c... thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa với  $p=0,05$  trong phép thử Duncan.





Hình 3. Ảnh hưởng của peptone lên sự phát triển rễ thứ cấp từ rễ bất định sâm Ngọc Linh.

#### 4. KẾT LUẬN

Sau 56 ngày, khả năng hình thành và phát triển rễ thứ cấp từ nuôi cấy rễ bất định sâm Ngọc Linh được cải thiện rõ ràng khi thay đổi các yếu tố khoáng dinh dưỡng, nguồn carbon và peptone. Kết quả thu được cho thấy rằng môi trường tăng sinh rễ thứ cấp tốt nhất là môi trường MSCB (có tỉ lệ  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4:\text{KNO}_3 = 7,19:18,5$  mM:mM) chứa 30 g/l sucrose hoặc 60 g/l D-glucose và bổ sung thêm 200 mg/l peptone. Việc bổ sung 200 mg/l peptone ngoài việc thúc đẩy khả năng phát triển peptone còn đóng vai trò như một elicitor giúp kích thích khả năng sản sinh ra các hợp chất saponin trong sinh khối rễ thứ cấp.

#### LỜI CẢM ƠN

Nhóm tác giả xin cảm ơn đề tài cấp Nhà nước: “Nghiên cứu chuyển gen tạo rễ tóc sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) làm vật liệu nuôi cấy bioreactor” đã hỗ trợ kinh phí cho chúng tôi thực hiện nghiên cứu này.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Bùi Thế Vinh, Trần Công Luận (2011). Xây dựng phương pháp định lượng G-Rb1, G-Rg1 và MR2 trong sâm Việt Nam bằng kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao, *Tạp chí Dược liệu*, 16(1+2), tr. 44-50.
- [2]. C. Kevers, P. Jacques, T. Gaspar, P. Thonart, J. Dommès (2004). Comparative titration of ginsenosides by different techniques in commercial ginseng products and callus cultures, *Journal of Chromatographic Science*, 42(10), pp. 1-5.
- [3]. D. B. Duncan (1995). Multiple range and multiple F tests, *Biometrics*, 11(1), pp. 1-42.
- [4]. Dương Tấn Nhật, Phan Quốc Tâm, Vũ Quốc Luận, Nguyễn Văn Bình, Đặng Thị Ngọc Hà, Hoàng Xuân Chiến, Nguyễn Cửu Thành Nhân, Nguyễn Bá Nam, Nguyễn Bá Trực, Lê Nữ Minh Thùy, Phan Lê Hà Nguyễn, Vũ Thị Hiền, Lâm Thị Mỹ Hằng, Nguyễn Thị Thúy Hằng, Nguyễn Thành Hải (2009). Nghiên cứu sự hình thành rễ bất định và rễ thứ cấp của sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.), *Kỷ yếu Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc các tỉnh phía Nam*, NXB. Khoa học và Kỹ thuật, tr. 252-258.

Ảnh hưởng của môi trường khoáng, nguồn carbon và peptone lên khả năng phát triển rễ thứ cấp ...

- [5]. Dương Tấn Nhật, Trần Hiếu, Nguyễn Thị Nhật Linh, Hoàng Thanh Tùng, Nguyễn Bá Nam, Nguyễn Phúc Huy, Vũ Quốc Luận, Vũ Thị Hiền (2015). Tối ưu hóa quá trình nhân nhanh và tích lũy saponin của rễ bất định sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) trong các hệ thống nuôi cấy, *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 13(3), tr. 853-864.
- [6]. G. R. Lambert (2009). *Mechanical induction of lateral root initiation*, The Graduate School, The Huck Institutes of the Life Sciences, The Pennsylvania State University.
- [7]. G. Sivakumar, K. W. Yu, E. J. Hahn, K. Y. Paek (2005). Optimization of organic nutrients for ginseng hairy roots production in large-scale bioreactors, *Current Science*, 89(4), pp. 641-649.
- [8]. H. J. Kim, E. J. Chang, H. I. Oh (2005). Saponin production in submerged adventitious root culture of *Panax ginseng* as affected by culture conditions and elicitors, *Pacific Journal Molecular Biology and Biotechnology*, 13(2), pp. 87-91.
- [9]. Hồ Thanh Tâm, Nguyễn Bá Nam, Hoàng Xuân Chiến, Lê Kim Cương, Ngô Thanh Tài, Nguyễn Việt Cường, Nguyễn Phúc Huy, Trịnh Thị Hương, Trần Hiếu, Nguyễn Thị Nhật Linh, Dương Tấn Nhật (2015). Tối ưu hóa một số yếu tố môi trường và điều kiện nuôi cấy đến quá trình tái sinh rễ bất định từ lá sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.), *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 13(3), tr. 865-873.
- [10]. K. W. Yu (2000). *Production of the Useful Metabolites through Bioreactor Culture of Korean Ginseng (Panax ginseng C. A. Meyer)*, Doctor Thesis, Chungbuk National University, Korea.
- [11]. K. W. Yu, W. Y. Gao, S. H. Son, K.Y. Paek (2000). Improvement of ginsenoside production by jasmonic acid and some other elicitors in hairy root culture of ginseng (*Panax ginseng* C. A. Meyer), *In vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 36(5), pp. 424-428.
- [12]. 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, tr. 30-36.
- [13]. R. U. Schenk, A. C. Hidebrandt (1972). Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures, *Canadian Journal of Botany*, 50(1), pp. 199-204.
- [14]. S. M. Choi, S. H. Son, S. R. Yun, O. W. Kwon, J. H. Seon, K. Y. Paek (2000). Pilot-scale culture of adventitious roots of ginseng in a bioreactor system, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 62(3), pp. 187-193.
- [15]. T. Murashige, F. Skoog (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, *Plant Physiology*, 15(3), pp. 473-497.

**EFFECT OF MACRONUTRIENT MEDIUM, DIFFERENT CARBOHYDRATE SOURCES, AND PEPTONE ON FORMATION AND DEVELOPMENT OF SECONDARY ROOT IN *PANAX VIETNAMENSIS* ADVENTITIOUS ROOT CULTURE**

**Nguyen Thi Nhat Linh<sup>1,2</sup>, Nguyen Hoang Loc<sup>2</sup>, Duong Tan Nhat<sup>\*</sup>**

<sup>1</sup>Tay Nguyen Institute for Scientific Research, Vietnam Academy of Science and Technology

<sup>2</sup> University of Sciences, Hue University

\*Email: duongtannhut@gmail.com

**ABSTRACT**

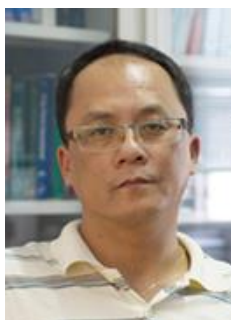
The proliferation of *Panax vietnamensis* secondary root in vitro plays critical roles in the pharmaceutical industry because triterpenoid saponins from *Panax vietnamensis* roots are purified to produce medicine for improving health and treating many diseases. As results, formation and development of the secondary roots could be maintained in MS or SH medium, but the best development was in MS modified with the ratio of  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4:\text{KNO}_3$  (7.19:18.5 mM:mM), supplemented with 7 mg/l IBA and 0.5 mg/l BA. In three-carbohydrate sources, maltose was not good for the development roots. Besides sucrose source in vitro cultures, 60 g/l D-glucose were able to replace it. However, D-glucose concentrations and cost were remarkably higher than sucrose sources, thus, 30 g/l sucrose is the most optimum for the formation and development of the *Panax vietnamensis* secondary roots. In addition, supplementing peptone in culture medium also increase significantly root biomasses and saponin contents (including G-Rb1, G-Rg1, and MR2), especially using 200 mg/l peptone is the best for ginseng root culture.

**Keywords:** carbohydrate sources, macronutrient medium, *Panax vietnamensis*, peptone, secondary root.



**Nguyễn Thị Nhật Linh** sinh ngày 7/9/1985 tại Đà Lạt, Lâm Đồng. Bà tốt nghiệp cử nhân ngành Công nghệ sinh học năm 2005 và thạc sĩ chuyên ngành Sinh học thực nghiệm năm 2012 tại Đại học Đà Lạt, làm nghiên cứu viên tại trung nghiên cứu Rau, hoa và giống khoai tây Đà Lạt năm 2013-2014 và giảng dạy tại Trường Cao đẳng Y tế Lâm Đồng từ năm 2015. Hiện nay, Bà đang là nghiên cứu sinh tại Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên và Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế từ năm 2014.

*Lĩnh vực nghiên cứu:* Nuôi cấy mô tế bào thực vật và Công nghệ sinh học thực vật.



**Nguyễn Hoàng Lộc** sinh ngày 22/11/1962 tại Lâm Đồng. Ông tốt nghiệp cử nhân ngành Sinh học năm 1984. Năm 1992, ông nhận học vị tiến sĩ tại Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Ông nhận chức danh phó giáo sư năm 2003 và giáo sư năm 2013. Từ năm 1984 đến nay, ông công tác tại Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế và hiện đang giữ chức Viện trưởng Viện nghiên cứu Hoạt chất sinh học, Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế.

*Lĩnh vực nghiên cứu:* Biểu hiện các gen mã hóa kháng nguyên tiểu đơn vị ở cây trồng và vi khuẩn, Điều hòa biểu hiện gen trong các chu trình chuyển hóa thứ cấp ở tế bào thực vật, Sản xuất và tinh sạch enzyme tái tổ hợp.



**Dương Tấn Nhựt** sinh ngày 06/04/1967 tại Khánh Hòa. Ông tốt nghiệp cử nhân ngành Sinh học năm 1991 tại Đại học Đà Lạt và thạc sĩ chuyên ngành Công nghệ Sinh học thực vật tại Đại học Kagawa (Nhật Bản) vào năm 1999. Ông nhận học vị tiến sĩ năm 2002 tại Đại học Kagawa (Nhật Bản) và nhận học hàm phó giáo sư năm 2009. Ông hiện đang giữ chức vụ Phó Viện trưởng của Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên (VAST) và là thành viên của các tổ chức Hội cây trồng Nhật Bản, Mỹ...

*Lĩnh vực nghiên cứu:* Công nghệ sinh học thực vật.