

ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG SINH TRƯỞNG VÀ TÍCH LŨY SAPONIN CỦA RỄ BẮT ĐỊNH VÀ RỄ TƠ CÂY SÂM NGỌC LINH (*PANAX VIETNAMENSIS* HA *ET* GRUSHV.)

Trịnh Thị Hương¹, Phạm Bích Ngọc², Chu Hoàng Hà², Dương Tấn Nhật¹

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

²Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Ngày nhận bài: 11.4.2016

Ngày nhận đăng: 22.6.2016

TÓM TẮT

Trong nghiên cứu này, rễ bắt định sâm Ngọc Linh (có nguồn gốc từ nuôi cấy mẫu lá *in vitro* trên môi trường thạch có bổ sung 5 mg/l IBA) và rễ tơ chuyên gen (được hình thành bằng cách lây nhiễm mẫu mô sẹo *in vitro* với vi khuẩn *Agrobacterium rhizogenes* chủng ATCC 15834) được sử dụng để đánh giá khả năng sinh trưởng và tích lũy saponin. Kết quả cho thấy, trong thời gian đầu nuôi cấy (2 tháng) tốc độ tăng sinh của rễ tơ sâm Ngọc Linh thấp hơn so với rễ bắt định. Tuy nhiên, ở các khoảng thời gian nuôi cấy tiếp theo, tốc độ tăng sinh của rễ tơ lại cao hơn rễ bắt định. Sau 5 tháng nuôi cấy, tỷ lệ tăng sinh của rễ tơ là 20,87 lần và rễ tơ vẫn còn tiếp tục sinh trưởng; trong khi tỷ lệ tăng sinh của rễ bắt định là 13,52 lần và hầu như đã ngừng tăng sinh từ sau tháng thứ 3. Kết quả phân tích hàm lượng saponin cho thấy, hàm lượng saponin tổng thu được trên toàn bộ chất khô (thu được từ nuôi cấy 10 mg khối lượng tươi sau 5 tháng) của rễ tơ (0,1010 mg) cao hơn rễ bắt định (0,0681 mg). Ngoài ra, rễ tơ sinh trưởng ở môi trường không bổ sung chất điều hoà sinh trưởng thực vật. Vì vậy, rễ tơ là nguồn vật liệu thích hợp cho nuôi cấy sinh khối rễ sâm Ngọc Linh trong các hệ thống bioreactor.

Từ khoá: Rễ bắt định, rễ tơ, salicylic acid, sâm Ngọc Linh, tích lũy saponin

GIỚI THIỆU

Sâm Ngọc Linh là cây dược liệu quý có chứa đầy đủ các tác dụng dược lý của chi nhân sâm. Tuy nhiên, loài cây này chỉ đặc hữu ở vùng sinh thái nhất định, ngoài ra thời gian sinh trưởng của cây chậm, cần tới 6 năm mới có thể bắt đầu thu hoạch và 7 - 10 năm mới thu được củ sâm chất lượng tốt. Trong khi đó, việc khai thác bừa bãi và không có phương pháp quản lý hiệu quả đã dẫn đến nguồn sâm tự nhiên trở nên khan hiếm và được xếp vào danh sách loài có nguy cơ tuyệt chủng. Trong nhiều năm gần đây, nhân giống vô tính và trồng cây sâm Ngọc Linh đã đạt được những thành tựu đáng kể, góp phần bảo tồn nguồn dược liệu quý hiếm này, nhưng vẫn không đủ đáp ứng nhu cầu cung cấp nguyên liệu cho các ngành dược liệu, mỹ phẩm,... Vì vậy, việc ứng dụng công nghệ tế bào thực vật trong nuôi cấy sinh khối sâm Ngọc Linh là rất cần thiết. Trong đó, rễ tơ và rễ bắt định là hai nguồn vật liệu thường được sử dụng trong các hệ thống nuôi cấy lớn như bioreactor để thu nhận sinh khối trong thời gian ngắn.

Rễ bắt định là những rễ được hình thành từ nhiều vùng khác nhau trên cơ thể thực vật như thân, cành, lá... Sự hình thành rễ bắt định được điều hòa

bởi nhiều yếu tố môi trường và các yếu tố nội sinh (Sorin *et al.*, 2005). Auxin và ethylen được xem là chất kích thích hình thành rễ trong khi cytokinin và gibberellin thì ngược lại (Pop *et al.*, 2011). Ở cây sâm Ngọc Linh, rễ bắt định được cảm ứng hình thành bằng cách nuôi cấy các mẫu cơ quan khác nhau như lá, cuống lá hoặc củ sâm Ngọc Linh trên môi trường có bổ sung IBA (Trịnh Thị Hương *et al.*, 2012). Sau đó, chúng được nhân nhanh bằng cách cấy chuyên liên tục trên môi trường thạch hoặc môi trường lỏng lắc để thu nhận nguồn vật liệu cho nuôi cấy trong các bioreactor. Trong quá trình nhân nhanh, rễ bắt định tiếp tục kéo dài và phân nhánh. Các rễ phân nhánh này gọi là rễ thứ cấp (Trần Hiếu *et al.*, 2014). Trong khi đó, rễ tơ là một hội chứng bệnh lý ở thực vật, được gây ra bởi quá trình lây nhiễm giữa vi khuẩn *Agrobacterium rhizogenes* với mô tế bào thực vật bị tổn thương. Hiện nay, nuôi cấy rễ tơ có nguồn gốc từ vi khuẩn *A. rhizogenes* đã được nghiên cứu rộng rãi để sản xuất *in vitro* các chất chuyển hóa thứ cấp ở thực vật, với hàm lượng chất chuyển hóa thứ cấp thu được tương tự (Caspeta *et al.*, 2005) hoặc cao hơn (Ahn *et al.*, 1996) hàm lượng chất chuyển hóa thứ cấp có mặt trong rễ cây hoang dại hoặc trong cây trồng. Sự ổn định di truyền của rễ tơ đáp ứng được cho sản xuất ổn định các chất

chuyển hóa thứ cấp của chúng. Ngoài ra, rễ tơ còn có ưu điểm là có khả năng phân nhánh mạnh và sinh trưởng trong điều kiện không cần bổ sung chất điều hòa sinh trưởng thực vật. Vì vậy, đây có thể xem như là một nguồn vật liệu đầy hứa hẹn để nuôi cấy sinh khối thu nhận các hợp chất thứ cấp. Tuy nhiên, cho tới nay vẫn chưa có nghiên cứu nào ở sâm Ngọc Linh chỉ ra rằng nên sử dụng rễ tơ hay rễ bất định làm nguồn vật liệu để nuôi cấy thu nhận sinh khối. Vì vậy, nghiên cứu này thực hiện nhằm mục đích so sánh khả năng sinh trưởng và tích lũy hoạt chất saponin giữa rễ bất định và rễ tơ của sâm Ngọc Linh, từ đó lựa chọn nguồn vật liệu thích hợp cho nuôi cấy thu nhận sinh khối rễ ở cây sâm Ngọc Linh.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Nguồn vật liệu thực vật được sử dụng trong nghiên cứu này là rễ bất định (Hình 2A₁) và rễ tơ chuyển gen sâm Ngọc Linh (Hình 2B₁).

Rễ bất định sâm Ngọc Linh được hình thành từ nuôi cấy mẫu lá *in vitro* có kích thước 1 x 1 cm trên môi trường SH (Schenk, Hildebrandt, 1972) + 5 mg/l

IBA + 30 g/l sucrose + 8 g/l agar, pH = 5,8 (Trình Thị Hương *et al.*, 2012).

Rễ tơ chuyển gen (rễ tơ) được hình thành bằng cách lây nhiễm mẫu mô sẹo *in vitro* với vi khuẩn *A. rhizogenes* chủng ATCC 15834. Mật độ vi khuẩn là OD = 0,5; thời gian lây nhiễm là 20 phút và thời gian đồng nuôi cấy là 2 ngày. Sau đó, các mẫu cấy được chuyển qua môi trường chọn lọc có chứa 300 mg/l kháng sinh cefotaxime để chọn lọc được một dòng rễ tơ có khả năng sinh trưởng nhanh và ổn định nhất (Nguyễn Hồng Hoàng *et al.*, 2014).

Bố trí thí nghiệm

Đánh giá sự sinh trưởng của rễ tơ và rễ bất định

Rễ bất định được nhân nhanh trên môi trường SH + 5 mg/l IBA + 30 g/l sucrose + 8 g/l agar, pH = 5,8 (Trình Thị Hương *et al.*, 2012). Rễ tơ được nhân nhanh trên môi trường SH + 50 g/l sucrose + 8 g/l agar, pH = 5,8 (Nguyễn Hồng Hoàng *et al.*, 2014).

Các mẫu rễ được nuôi cấy trong chai thủy tinh thể tích 250 ml. Mỗi chai cấy 3 mẫu, mỗi mẫu có khối lượng khoảng 10 mg. Chỉ tiêu theo dõi là tốc độ tăng sinh của một mẫu cấy thu được sau các khoảng thời gian nuôi cấy khác nhau.

$$\text{Tốc độ tăng sinh (lần)} = \frac{\text{Khối lượng tươi mẫu cấy thu được (mg)}}{\text{Khối lượng tươi mẫu cấy ban đầu (mg)}}$$

Đánh giá khả năng tích lũy saponin của rễ tơ và rễ bất định

Rễ tơ và rễ bất định sau 5 tháng nuôi cấy ở thí nghiệm trên được thu nhận và sấy khô đến khối lượng không đổi. Sau đó, tiến hành định tính và định lượng hàm lượng các saponin chính có trong 1 g chất khô và hàm lượng saponin tổng số trên toàn bộ chất khô thu được từ nuôi cấy 10 mg khối lượng tươi của mẫu rễ ban đầu.

Các mẫu rễ được nuôi cấy trong chai thủy tinh thể tích 250 ml. Mỗi chai cấy 3 mẫu, mỗi mẫu có khối lượng khoảng 10 mg. Chỉ tiêu theo dõi là tỷ lệ % các saponin chính (MR₂, Rb₁, Rg₁) thu được; tỷ lệ % saponin tổng/1 g chất khô và hàm lượng saponin tổng số thu được trên toàn bộ chất khô thu được từ nuôi cấy 10 mg khối lượng tươi mẫu rễ ban đầu.

$$\text{Tỷ lệ \% saponin tổng} = \text{Tỷ lệ \% MR}_2 + \text{Rb}_1 + \text{Rg}_1 \quad (\text{A})$$

$$\text{Hàm lượng saponin tổng số (mg)} = \frac{\text{Khối lượng khô của rễ thu được (mg)} \times \text{A}}{100}$$

Xác định hàm lượng saponin

Hàm lượng saponin trong rễ được định tính và định lượng bằng kỹ thuật sắc ký lớp mỏng và sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) theo phương pháp của Bùi Văn Thế Vinh & Trần Công Luận (2011).

Điều kiện thí nghiệm

Tất cả môi trường được hấp khử trùng bằng autoclave ở 121°C, 1 atm trong 30 phút.

Các thí nghiệm nuôi cấy rễ được đặt ở nhiệt độ

phòng $22 \pm 2^\circ\text{C}$, độ ẩm 55 - 60% và nuôi cấy trong điều kiện tối.

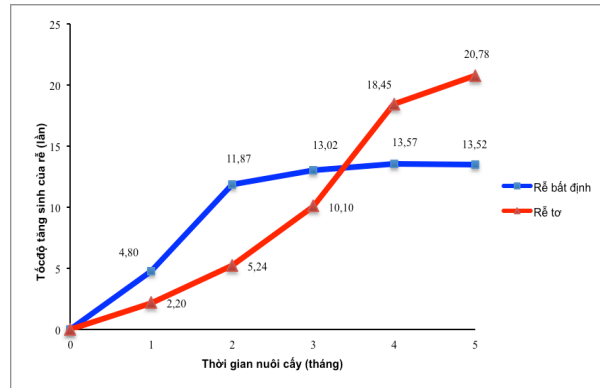
Phương pháp xử lý thống kê

Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Số liệu được xử lý và phân tích bằng phần mềm SPSS 16.0 theo phép thử Duncan (Duncan, 1995) với $\alpha = 0,05$.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

So sánh khả năng sinh trưởng của rễ tơ và rễ bất định

Sau 5 tháng nuôi cấy, chúng tôi ghi nhận được sự khác biệt về khả năng nhân nhanh của rễ tơ và rễ bất định (Hình 1).



Hình 1. Tốc độ sinh trưởng của rễ tơ và rễ bất định sau các khoảng thời gian nuôi cấy khác nhau.

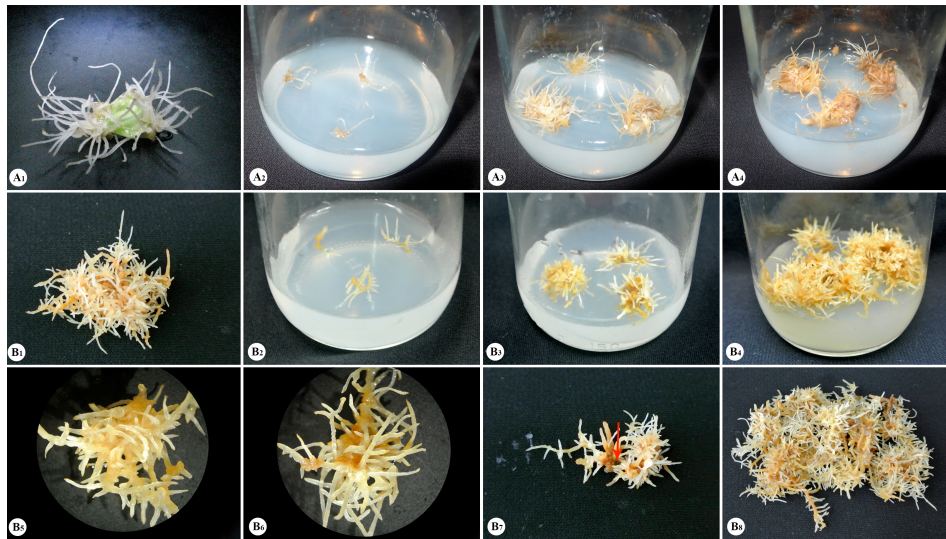
Rễ bất định sinh trưởng nhanh ở giai đoạn đầu nuôi cấy. Sau hai tháng nuôi cấy tốc độ tăng sinh đạt được là 11,87 lần. Từ tháng thứ ba đến tháng thứ tư, tốc độ tăng sinh của rễ bất định chậm, và sau đó nữa thì không nhận thấy có sự sinh trưởng tiếp tục của rễ bất định (Hình 1). Quan sát về mặt hình thái cho thấy, sau 1 - 2 tháng nuôi cấy, rễ bất định có màu vàng nhạt, rễ kéo dài và phân nhánh nhiều tạo thành các rễ thứ cấp có màu trắng (Hình 2A₃). Sau 3 - 4 tháng nuôi cấy, rễ bất định tiếp tục kéo dài và phân nhánh, tuy nhiên với tốc độ chậm hơn giai đoạn đầu; đồng thời rễ nuôi cấy có màu vàng đậm, ở phần gốc đã có hiện tượng chuyển sang màu nâu nhạt, điều này cho thấy đã bắt đầu có sự suy giảm về khả năng sinh trưởng của rễ. Từ sau tháng thứ tư trở đi, hầu như rễ bất định nuôi cấy không kéo dài và phân nhánh; rễ có màu vàng đậm và hóa nâu nhiều (Hình 2A₄). Như vậy, trong nuôi cấy nhân nhanh rễ bất định thì rễ sinh trưởng khá nhanh ở giai đoạn đầu và sau đó thì chậm dần cho đến khi ngừng sinh trưởng và chết đi nếu không được cấy chuyển sang môi trường mới. Điều này có thể được giải thích là do ở giai đoạn đầu nuôi cấy (1 - 2 tháng), trong môi trường nuôi cấy vẫn còn auxin, nên rễ sinh trưởng nhanh do đó tốc độ tăng sinh đạt được cao và rễ phân nhánh tạo rễ thứ cấp nhiều. Các thời gian nuôi cấy tiếp theo, do rễ đã sử dụng hết lượng auxin ngoại sinh trong môi trường nuôi cấy, thêm vào đó là nồng độ dinh dưỡng cũng giảm

dần theo thời gian nuôi cấy, nên rễ không tiếp tục sinh trưởng và chết dần nếu không được cấy chuyển qua môi trường mới. Ngoài ra, cũng có thể giả thiết rằng, chu trình sinh trưởng của rễ bất định ngắn, do đó cần phải được cấy chuyển thường xuyên. Như vậy, dựa vào tốc độ tăng sinh của rễ bất định ở hình 1, sự sinh trưởng của rễ bất định sâm Ngọc Linh có thể chia thành 3 giai đoạn như sau: (1) trong 1 tháng đầu tiên mẫu thích nghi với môi trường nuôi cấy; (2) sau đó có sự tăng sinh nhanh chóng của rễ từ tháng 1 - 2 và (3) tốc độ sinh trưởng của rễ giảm dần cho tới khi ngừng hẳn và chết đi. Kết quả thu được ở nghiên cứu này cũng phù hợp với nghiên cứu của Trần Hiếu *et al.*, (2014) khi đánh giá khả năng tăng sinh của rễ bất định và rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh trong một số hệ thống nuôi cấy khác nhau.

Đối với quá trình nuôi cấy nhân nhanh rễ tơ, kết quả thu được cho thấy, rễ tơ cảm ứng sinh trưởng chậm ở giai đoạn đầu nuôi cấy và sinh trưởng nhanh ở giai đoạn sau 3 tháng nuôi cấy. Sau 2 tháng nuôi cấy, tốc độ tăng sinh của rễ tơ chỉ đạt 5,24 lần, trong khi rễ bất định đạt được 11,87 lần ở cùng thời điểm. Sau 3 tháng nuôi cấy, tốc độ tăng sinh của rễ tơ đạt được là 10,1 lần, gần bằng với tốc độ tăng sinh của rễ bất định ở thời điểm 2 tháng nuôi cấy. Ở các khoảng thời gian nuôi cấy sau đó,

rễ tơ tiếp tục sinh trưởng với tốc độ nhanh hơn, trong đó rễ tơ phát triển nhanh nhất ở giai đoạn 4 tháng nuôi cấy (tốc độ tăng sinh đạt 18,45 lần); sau 5 tháng nuôi cấy tốc độ tăng sinh đạt lên đến 20,78 lần (Hình 1). Quan sát về mặt hình thái rễ tơ cho thấy, rễ tơ kéo dài và phân nhánh mạnh ở khoảng thời gian từ 2 - 4 tháng nuôi cấy, rễ có màu vàng nhạt, các rễ nhánh mới hình thành thì có màu trắng (Hình 2B₃, B₅, B₆). Ở các khoảng thời gian nuôi cấy

tiếp theo, rễ tiếp tục phân nhánh và kéo dài, tuy nhiên ở phần gốc rễ cũng bắt đầu chuyển sang màu vàng đậm và bắt đầu có sự hóa nâu (Hình 2B₄, B₇). Như vậy, sự sinh trưởng của rễ tơ có thể chia thành các giai đoạn: (1) trong 2 tháng đầu rễ thích nghi với môi trường; (2) sau đó có sự sinh trưởng nhanh chóng của rễ từ tháng thứ 2 đến tháng thứ 4; (3) rễ tiếp tục sinh trưởng nhưng với tốc độ chậm hơn ở các tháng nuôi cấy tiếp theo.



Hình 2. Sự sinh trưởng của rễ tơ và rễ bất định sâm Ngọc Linh. A: rễ bất định; B: rễ tơ có nguồn gốc mô sẹo lây nhiễm vi khuẩn *A. rhizogenes*; A₁, B₁: nguồn vật liệu ban đầu; A₂, B₂: mẫu cây lúc 0 tháng; A₃, B₃: mẫu cây sau 2 tháng; A₄, B₄: mẫu cây sau 5 tháng; B₅: hình thái rễ tơ sau 2 tháng; B₆: hình thái rễ tơ sau 4 tháng; B₇: hình thái rễ tơ sau 5 tháng, mũi tên màu đỏ chỉ vị trí gốc rễ chuyển sang màu nâu; B₈: rễ tơ dùng làm vật liệu để nuôi cấy trong hệ thống bioreactor.

Như vậy, ở thời gian đầu của quá trình nhân nhanh rễ, tốc độ tăng sinh của rễ tơ chậm hơn so với rễ bất định; nhưng ở giai đoạn sau thì tốc độ tăng sinh rễ tơ nhanh hơn so với rễ bất định và thời gian sinh trưởng của rễ tơ kéo dài hơn so với rễ bất định. Nguyên nhân có thể là do bản chất về nguồn gốc của hai loại rễ là khác nhau. Ở rễ tơ có chứa các gen mã hóa sinh tổng hợp auxin và các gen *rol* (Britton, Escobar, 2008), trong khi ở rễ bất định thì hoàn toàn không có chức năng này. Vì vậy trong quá trình nhân nhanh, rễ bất định được nuôi cấy trên môi trường có bổ sung auxin ngoại sinh (5 mg/l IBA). Cũng chính vì được cung cấp auxin ngoại sinh, nên thời gian để rễ bất định thích nghi với môi trường nuôi cấy nhanh, thời gian sinh trưởng cũng nhanh và ngắn. Trong khi đó, rễ tơ là rễ có chứa gen tự tổng hợp auxin và có khả năng sinh trưởng và phân nhánh trên môi trường không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng, nên trong quá trình nhân nhanh, rễ tơ được nuôi cấy trên môi

trường không bổ sung auxin ngoại sinh, đây cũng có thể chính là nguyên nhân giải thích vì sao ở giai đoạn đầu nuôi cấy của quá trình nhân nhanh, rễ tơ tăng sinh chậm hơn so với rễ bất định vì cần thời gian để tự cảm ứng sinh tổng hợp auxin và kích hoạt các gen liên quan đến sự hình thành rễ; ở các giai đoạn nuôi cấy tiếp theo thì rễ tơ sinh trưởng nhanh, trong khi tốc độ sinh trưởng của rễ bất định giảm dần cho tới khi ngừng sinh trưởng ở các khoảng thời gian nuôi cấy sau đó do đã sử dụng hết nguồn auxin ngoại sinh.

Khả năng tích lũy saponin của rễ tơ và rễ bất định

Kết quả phân tích hàm lượng ba loại saponin chính (MR₂, Rb₁, Rg₁)/1 g rễ khô bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao cho thấy, khả năng tích lũy saponin của rễ tơ và rễ bất định được thu nhận vào thời điểm sau 5 tháng nuôi cấy gần như là tương đương nhau (hàm lượng saponin tổng/1 g chất khô của rễ tơ khoảng 0,4859%, rễ bất định khoảng

0,5034%). Tuy nhiên, tỷ lệ về hàm lượng saponin từng thành phần lại có sự khác biệt nhau giữa hai loại rễ. Sự khác biệt nhau này sẽ dẫn đến sự khác nhau về hoạt tính dược lý của hai loại rễ. Hàm lượng ginsenoside MR₂ (ginsenoside chính quyết định hoạt tính dược lý chủ yếu của sâm Ngọc Linh) ở rễ tơ thu được cao nhất và cao hơn so với rễ bất định 3,03 lần. Trong khi đó, ở rễ bất định hàm lượng của hai loại ginsenoside còn lại (Rb₁ và Rg₁) lại cao hơn so với rễ tơ, trong đó đạt cao nhất là Rb₁.

Vi tốc độ tăng sinh của rễ tơ sau 5 tháng nuôi cấy thu được cao hơn rễ bất định nên chúng tôi cũng tính toán hàm lượng saponin tổng số của toàn bộ chất khô thu được. Kết quả cho thấy, sau 5 tháng nuôi cấy, từ 10 mg mẫu rễ nuôi cấy ban đầu sẽ thu nhận được 20,78 g khô rễ tơ và 13,52 g khô rễ bất định tương ứng với hàm lượng saponin tổng số/toàn bộ chất khô của rễ tơ là 0,101 mg và rễ bất định là 0,0681 mg (Bảng 1).

Bảng 1. Khả năng tích lũy các saponin chính của rễ tơ và rễ bất định.

Chỉ tiêu theo dõi	Rễ tơ	Rễ bất định
MR ₂ / 1 mg chất khô (%)	0,4633	0,1530
Rb ₁ / 1 mg chất khô (%)	0,0063	0,3018
Rg ₁ / 1 mg chất khô (%)	0,0163	0,0486
Saponin tổng / 1 mg chất khô (%)	0,4859	0,5034
Tổng khối lượng khô của mẫu (g)	20,780	13,520
Saponin tổng số (mg)	0,1010	0,0681

Như vậy, tỷ lệ % saponin tổng trên 1 g chất khô của hai loại rễ là tương tự nhau, tuy nhiên khi tính toán hàm lượng saponin tổng số thu được trên toàn bộ chất khô, thì hàm lượng saponin tổng số của rễ tơ cao hơn so với rễ bất định. Thêm vào đó, rễ tơ được nuôi cấy trên môi trường không bổ sung chất điều hoà sinh trưởng thực vật, nên không dẫn tới những lo ngại về tồn dư của những chất điều hoà sinh trưởng trong sinh khối rễ thu được, vì vậy đây là nguồn vật liệu thích hợp cho nuôi cấy sinh khối rễ ở các quy mô bioreactor có thể tích lớn.

KẾT LUẬN

Ở giai đoạn đầu của quá trình nuôi cấy (2 tháng đầu), rễ tơ phát triển chậm hơn rễ bất định; nhưng ở các thời gian nuôi cấy tiếp theo rễ tơ lại phát triển nhanh và mạnh hơn nhiều so với rễ bất định. Sau 5 tháng nuôi cấy, tỷ lệ tăng sinh của rễ tơ đạt được là 20,78 lần, rễ bất định là 13,52 lần, và hàm lượng saponin tổng số của toàn bộ chất khô thu được tương ứng ở rễ tơ là 0,101 mg, rễ bất định là 0,0681 mg. Trong đó, hàm lượng ginsenoside chính quyết định hoạt tính dược lý chủ yếu của sâm Ngọc Linh (MR₂) ở rễ tơ thu được cao hơn rễ bất định 3,03 lần. Ngoài ra, rễ tơ sinh trưởng ở môi trường không bổ sung chất điều hoà sinh trưởng thực vật. Vì vậy, rễ tơ là nguồn nguyên liệu thích hợp để nuôi cấy sinh khối rễ sâm ở các hệ thống bioreactor.

Lời cảm ơn: Các tác giả xin chân thành cảm ơn Bộ Nông nghiệp và phát triển nông thôn đã hỗ trợ kinh phí cho đề tài nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Ahn JC, Hwang B, Tada H, Ishimaru K, Sasaki K, Shimomura K (1996) Polyacetylenes in hairy roots of *Platycodon grandiflorum*. *Phytochemistry* 42(1): 69-72.
- 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: 44-50.
- Britton MT and Escobar MA (2008) The oncogenes of *Agrobacterium tumefaciens* and *Agrobacterium rhizogenes*. In: Tzfira T and Citovsky V, (eds). *Agrobacterium: From biology to biotechnology*. New York, Springer: 524-565.
- Caspeta L Nieto I, Zamilpa A, Alvarez L, Quintero R and Villarreal ML (2005) *Solanum chrysotrichum* hairy root cultures: characterization, scale-up and production of five antifungal saponins for human use. *Planta Med* 71(11): 1084-1087.
- Chilton MD, Tepfer DA, Petit A, David C, Casse-Delbart F and Tempé J (1982) *Agrobacterium rhizogenes* inserts T-DNA into the genomes of the host plant root cells. *Nature* 295: 432-434.
- Duncan DB (1995) Multiple range and multiple F tests. *Biometrics* 11: 1-5.

Nguyễn Hồng Hoàng, Trịnh Thị Hương, Lê Kim Cương, Vũ Thị Hiền, Nguyễn Bá Nam, Nguyễn Phúc Huy, Vũ Quốc Luận, Hà Thị Mỹ Ngân, Phạm Bích Ngọc, Chu Hoàng Hà, Dương Tấn Nhựt (2014) Khảo sát một số yếu tố ảnh hưởng đến sự sinh trưởng của rễ tơ sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) chuyển gen. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 12(3): 467-476.

Pop TI, Pameil D, Bell C (2011) Auxin control in the formation of adventitious roots. *Not Bot Hort Agrobot Cluj* 39: 307-316.

Schenk RU, Hildebrandt AC (1972) Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Can J Bot* 50: 199-204.

Sorin C, Bussell JD, Camus I, Liung K, Kowalczyk M, Geiss G, MsKhann H, Garcion C, Vaucheret H, Sandberg G, Bellini C (2005) Auxin and light control of adventitious rooting in *Arabidopsis* require agonaute. *The Plant Cell* 17: 1343-1359.

Trần Hiếu, Nguyễn Cửu Thành Nhân, Nguyễn Bá Nam, Ngô Thanh Tài, Trương Thị Lan Anh, Bùi Thế Vinh, Trần Đình Phương, Nguyễn Văn Kết, Trần Công Luận, Dương Tấn Nhựt (2014) Sự tăng sinh và tích lũy ginsenoside của rễ bất định và rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) trong một số hệ thống nuôi cấy. *Kỷ yếu hội nghị khoa học lần thứ nhất. Hội Sinh lý Thực vật Việt Nam, NXB. Đại học Nông Nghiệp, Hà Nội: 241-251.*

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 Hương, 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.

ASSESSING THE GROWTH AND SAPONIN ACCUMULATION IN HAIRY AND ADVENTITIOUS ROOTS OF VIETNAMESE GINSENG (*PANAX VIETNAMENSIS* HA ET GRUSHV.)

Trịnh Thị Hương¹, Phạm Bích Ngọc², Chu Hoàng Hà², Dương Tấn Nhựt^{1,✉}

¹Tay Nguyen Institute for Scientific Research, Vietnam Academy of Science and Technology

²Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology

SUMMARY

In this study, adventitious and hairy roots of Vietnamese ginseng were used to assess the ability of growth and saponin accumulation. Adventitious roots were derived from leaf samples *in vitro* (1.0 x 1.0 cm of size) cultured on SH medium supplemented with 5.0 mg.l⁻¹ IBA, 30 g.l⁻¹ sucrose, 8 g.l⁻¹ agar, pH 5.8, and subcultured on the same medium for multiplication. Hairy roots were derived from callus infected with *Agrobacterium rhizogenes* strain ATCC 15834, then these roots were cultured on plant growth regulators-free SH medium supplemented with 50 g.l⁻¹ sucrose, 8 g.l⁻¹ agar, pH 5.8. During the early culture of two months, the results showed that the growth rate of hairy roots was lower than that of adventitious roots. However, in the later period of culture, the growth rate of hairy roots was higher than that of adventitious roots. After 5 months of culture, the growth rate of hairy roots was 20.87 times and they kept growing as well as branching, while the growth rate of adventitious roots was only 13.52 times and they did not grow further after three months of culture. Analytical results showed that the total saponins of total dry matter of hairy roots (0.101 mg) were higher than that of adventitious roots (0.0681 mg). The main ginsenoside of hairy roots (MR₂) was also higher than that of adventitious roots 3.03 fold. In addition, the hairy roots grew on plant growth regulators-free medium while adventitious roots grew on medium supplemented with auxin. Therefore, hairy roots proved to be suitable source material for Vietnamese ginseng root biomass production in the bioreactor systems.

Keywords: *Adventitious roots, hairy roots, salicylic acid, saponin accumulation, Vietnamese ginseng*

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