

Nghiên cứu khả năng tạo rễ bất định của sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis*, Ha et Grushv.) trong nuôi cấy in vitro

Nguyễn Thị Liễu¹, Nguyễn Trung Thành^{1,*}, Nguyễn Văn Kết²

¹Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, 334 Nguyễn Trãi, Hà Nội, Việt Nam

²Khoa Nông Lâm, Đại học Đà Lạt, 01 Phù Đổng Thiên Vương, Đà Lạt, Việt Nam

Nhận ngày 17 tháng 9 năm 2010

Tóm tắt. Mẫu cây từ củ sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis*, Ha et Grushv.) tươi có kích thước 1cm x 1cm x 0,25cm trên môi trường MS có bổ sung 50g/l sucrose, 8g/l agar, 1mg 2,4D/l đã cho kết quả hình thành mô sẹo và rễ bất định tốt nhất sau 2 tháng nuôi cấy. Những đoạn cắt dài 1cm của những mẫu rễ bất định này sau đó được chuyển sang môi trường Gamborg (B5) được bổ sung 50g/l sucrose, 8 g/l agar, 5mg/l IBA đã cho kết quả hình thành và phát triển rễ bất định cũng như sự tăng sinh khối rất khả quan. Từ kết quả ban đầu này đã mở ra một hướng nghiên cứu mới là tạo sinh khối rễ sâm Ngọc Linh trong thời gian ngắn, số lượng nhiều, chủ động nguồn nguyên liệu để cung cấp cho ngành dược, giảm dần số lượng nhập khẩu, tiết kiệm được nguồn vốn và giảm giá thành sản phẩm.

Keywords: 2,4-D, IBA, NAA, auxin, môi trường nuôi cấy, *Panax*.

1. Đặt vấn đề

Sâm Ngọc Linh có tên khoa học là *Panax vietnamensis* Ha et Grushv, thuộc họ Nhân sâm (Araliaceae). Chữ *Panax* xuất phát từ chữ *Panacea* trong tiếng Hy Lạp, có nghĩa là thuốc trị bá bệnh, thần dược. Tác dụng dược lý của Sâm đã được nhiều nhà khoa học ở Việt Nam cũng như trên thế giới nghiên cứu và chứng minh, như tăng lực, tăng trí nhớ, bảo vệ cơ thể chống stress, tác động lên hệ miễn dịch, tăng sức đề kháng cho cơ thể, giúp chống viêm, ngăn cản sự lão hóa, v.v. [1]. Chính vì vậy mà sâm được xem là vị thuốc quý, đứng đầu các vị thuốc bổ theo thứ tự Sâm, Nhung, Quế, Phụ

trong y học cổ truyền, đã được sử dụng từ rất lâu đời ở các nước trên thế giới cũng như ở Việt Nam [2].

Trong những năm gần đây, việc ứng dụng công nghệ nuôi cấy tế bào thực vật đã rất thành công trong sản xuất các sản phẩm trao đổi chất thứ cấp, bao gồm các nguyên liệu thô trong dược phẩm, các sắc tố và các hợp chất khác. Sản phẩm ginsenosides thu được nhiều kết quả đáng kể thông qua nuôi cấy tế bào thực vật [3]. Tại Hàn Quốc và một số nước khác, Nhân sâm (*Panax ginseng*) đã được nuôi cấy tạo rễ bất định thành công và được ứng dụng sản xuất ở quy mô công nghiệp [4, 5], tạo được sinh khối rất lớn đáp ứng nhu cầu của xã hội, rút ngắn thời gian sản xuất đáng kể, cho hiệu quả kinh tế vô cùng to lớn.

* Tác giả liên hệ. ĐT: 84-4-38582178.
E-mail: thanhtsh@gmail.com

Các nghiên cứu được công bố gần đây về sâm Ngọc Linh cho thấy hàm lượng ginsenoside là thành phần chính có giá trị dược liệu của củ sâm. Các dạng bào chế (viên nang, thuốc bổ...) đều cần được xem xét hàm lượng các ginsenoside, gồm Rgl, Re, Rbl, Rc, Rb2 và Rd. Trong khi đó, nhu cầu sử dụng và chiết xuất từ sâm Ngọc Linh trong những năm qua là rất lớn. Hiện nay, việc ứng dụng công nghệ nuôi cấy tế bào trên một số đối tượng thực vật đã được ứng dụng và bước đầu có kết quả ở Việt Nam.

Trong bài báo này chúng tôi giới thiệu kết quả nghiên cứu bước đầu về khả năng tạo mô sẹo, sự hình thành và phát triển của rễ bất định sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis*, Ha et Grushv.) trong nuôi cấy in vitro.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Vật liệu là những củ sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) 3-4 năm tuổi lấy từ vùng núi Lang Biang, Lâm Đồng do Trạm Dược liệu Lâm Đồng cung cấp (Hình 1A).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Củ sâm Ngọc Linh 3-4 năm tuổi tươi sau khi thu mẫu về, được rửa sạch bằng nước lã từ 3-5 phút, sau đó khử trùng bằng cồn 70% trong 2 phút, cuối cùng khử trùng bằng nước Javen ở các nồng độ khác nhau, và rửa lại bằng nước lã vô trùng 3 lần. Mẫu sau khi khử trùng được cắt thành những khối có kích thước 1cm x 1cm x 0,25cm, sau đó cấy vào các bình thủy tinh 100ml có chứa sẵn 20ml môi trường, đặt trong điều kiện tối hoàn toàn ở nhiệt độ 23 ± 2 °C. Tất cả mọi thao tác được tiến hành trong tủ cấy vô trùng.

Sau 2 tháng những rễ bất định hình thành trên khối mô sẹo được cắt thành các mẫu có kích thước 1cm và cấy chuyển sang các môi trường nghiên cứu. Môi trường sử dụng trong các thí nghiệm là môi trường MS (Murashige và Skoog, 1962), SH và Gamborg (B5). Đây là những môi trường được sử dụng phổ biến nhất cho nhiều đối tượng khác nhau.

Môi trường và các dụng cụ nuôi cấy được vô trùng trong autoclave ở 121°C, 1atm trong 30 phút. Mỗi nghiệm thức sử dụng 10 bình, mỗi bình cấy 6 mẫu. Số liệu được đo đếm sau 30 và 60 ngày nuôi cấy trên tất cả 10 bình cho mỗi nghiệm thức. Các kết quả thí nghiệm được xử lý thống kê bằng phần mềm MSTAT-C.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Khảo sát ảnh hưởng của 2,4-D lên sự hình thành mô sẹo và rễ bất định của mẫu cấy

Mặc dù có hàng trăm công thức môi trường nuôi cấy khác nhau dùng để nuôi cấy các loài thực vật khác nhau nhưng công thức pha môi trường MS được sử dụng nhiều nhất, thường chỉ thay đổi các thành phần khoáng đa lượng. Trong đề tài này, chúng tôi nghiên cứu thí nghiệm thăm bước đầu khả năng tạo mô sẹo và phát triển của rễ bất định sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis*, Ha et Grushv.) trên môi trường MS có bổ sung 2,4-D ở các nồng độ khác nhau.

Sau 7 ngày nuôi cấy, các mẫu cấy trên môi trường có nồng độ 2,4-D cao hơn 1mg/l bắt đầu có sự hình thành mô sẹo (callus). Các mẫu nuôi cấy trên môi trường bổ sung 1mg/l 2,4-D hình thành sẹo sau 10 ngày nuôi cấy, còn các mẫu nuôi cấy trên môi trường không có 2,4-D lại không có sự hình thành sẹo. Điều đó chứng tỏ sự có mặt của 2,4-D là cần thiết cho sự hình thành mô sẹo (Hình 1B-C). Các mô sẹo hình thành trên môi trường có bổ sung 1mg/l 2,4-D

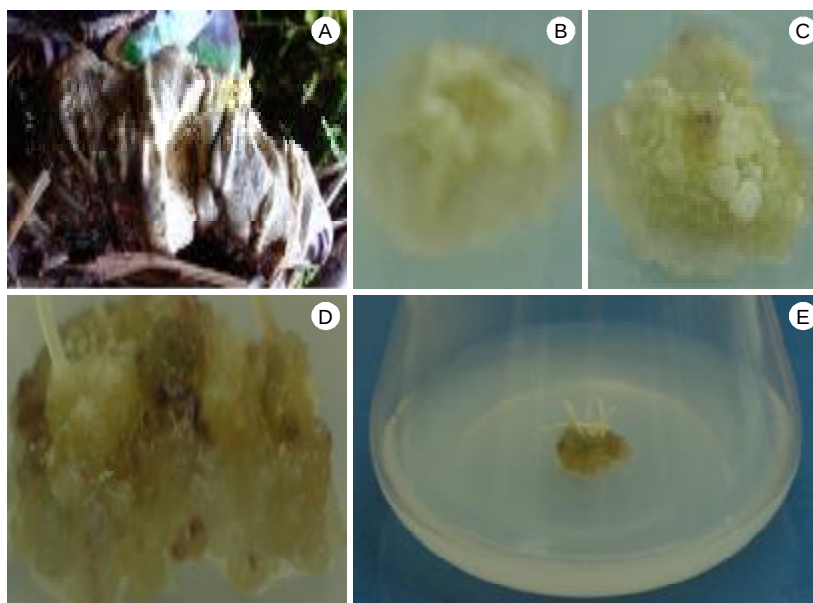
sinh trưởng mạnh, khối sẹo lớn lên rất nhanh, có màu trắng, mềm, xốp, sau 2 tháng nuôi cấy có sự xuất hiện rễ bất định. Trong khi đó các mẫu nuôi cấy trên các môi trường có nồng độ 2,4-D càng cao thì sự sinh trưởng của khối sẹo càng giảm, không xuất hiện rễ bất định và sẹo già đi nhanh chóng, đặc biệt các mẫu nuôi cấy trên môi trường có bổ sung 3 mg/l 2,4-D chỉ sau 25 ngày nuôi cấy đã chuyển sang màu vàng; các khối sẹo cũng cứng, ít xốp hơn. Các mô sẹo hình thành trên môi trường 0,5 mg/l 2,4-D giai đoạn từ 40-60 ngày sau nuôi cấy, tăng kích thước rất chậm và cũng không xuất hiện rễ bất định. Kết quả nghiên cứu sự ảnh hưởng của auxin 2,4-D lên sự hình thành mô sẹo của *Panax ginseng* đã thu được kết quả tương tự [6, 7].

Như vậy, nồng độ 2,4-D không chỉ có tác dụng gây phân biệt hóa các tế bào trong mẫu cấy, tạo khối mô sẹo, sẵn sàng cho sự tái biệt hóa phát sinh hình thái về sau mà nó còn có ảnh hưởng rất rõ rệt đến sự sinh trưởng của khối mô

sẹo. Điều đó có thể được giải thích là do sự hiện diện của 2,4-D trong môi trường làm tăng hàm lượng các DNA, RNA, đặc biệt là mRNA trong mẫu cấy, do đó làm gia tăng quá trình sinh tổng hợp các protein, dẫn đến sự gia tăng sinh khối của mẫu cấy. Nồng độ 2,4-D tăng làm tăng quá trình sinh tổng hợp protein. Nhưng khi hàm lượng 2,4-D quá cao, nó sẽ làm gia tăng các RNA, và dạng tích lũy là rRNA [8], do đó mẫu cấy trở nên sinh trưởng chậm hẳn đi, khối mô sẹo trở nên chai cứng và nhanh già.

Nồng độ 2,4-D trong môi trường nuôi cấy thấp sẽ làm thời gian cảm ứng tạo sẹo kéo dài, khối mô sẹo tăng trưởng chậm. Khi nồng độ 2,4-D vượt quá mức 1mg/l giúp rút ngắn thời gian cảm ứng tạo sẹo của mẫu cấy nhưng gây ức chế quá trình sinh trưởng của khối mô sẹo, tạo khối mô sẹo cứng, nhanh già.

Môi trường thích hợp cho sự hình thành sẹo và rễ bất định ở mẫu cấy củ sâm Ngọc Linh là môi trường MS có bổ sung 1mg/l 2,4-D, 50g/l sucrose, 8g/l agar.



Hình 1. Quá trình hình thành mô sẹo và rễ bất định của sâm Ngọc Linh (*P. vietnamensis*) sau 2 tháng nuôi cấy. (A. củ sâm Ngọc Linh tươi dùng trong thí nghiệm; B. mẫu đối chứng; C. mô sẹo hình thành ở nồng độ 1 mg/L 2,4D; D. mầm rễ bất định bắt đầu hình thành; E. rễ bất định hình thành và phát triển).

3.2. Khảo sát ảnh hưởng của NAA lên sự hình thành rễ bất định in vitro của sâm Ngọc Linh trên các môi trường MS, SH và Gamborg (B5)

Bảng 1. Ảnh hưởng của NAA lên sự hình thành rễ bất định in vitro của sâm Ngọc Linh trên các môi trường MS, SH và (B5)

Nồng độ NAA (mg/l)	Số lượng rễ hình thành sau 30 ngày nuôi cấy(rễ/mẫu)		
	Môi trường MS	Môi trường SH	Môi trường B5
0	0,0e*	0,0f	0,0f
1	3,1d	6,9e	7,3e
3	4,9c	8,5d	8,5d
5	7,6b	15,9a	10,9b
7	8,6a	10,1b	16,5a
9	7,7b	9,5c	10,7c
LSD at P = 0,01	0,1730	0,1771	0,1557

(*) Giá trị cách biệt trong cột khi phân tích LSD ở P = 0.01

Đối với sâm Ngọc Linh, thời gian cảm ứng và tạo sẹo của các mô rễ nuôi cấy trên các môi trường tương đối nhanh chỉ khoảng 5-7 ngày kể từ khi nuôi cấy. 100% số mẫu nuôi cấy trên các môi trường thí nghiệm có bổ sung NAA đều có sự đáp ứng tạo sẹo, tuy nhiên sau 30 ngày nuôi cấy số lượng rễ hình thành/mẫu cấy ở các nồng độ bổ sung NAA khác nhau thì khác nhau, hiệu quả cao nhất là trên môi trường B5 có bổ sung 7

mg/l NAA. Số lượng rễ hình thành và phát triển là 16,5 rễ/mẫu cấy (Bảng 1). Trên tất cả các nghiệm thức thí nghiệm không có bổ sung NAA thì không thấy hình thành sẹo và rễ bất định, điều này cho thấy auxin nội sinh có trong mẫu không đủ để cảm ứng cho việc hình thành sẹo và rễ bất định trên đối tượng này, [9] đã thu được kết quả tương khi nuôi cấy rễ bất định của (*Cichorium intybus*).



Hình 2. Sâm Ngọc Linh trên môi trường B5 có bổ sung 7 mg/l NAA sau 30 ngày nuôi cấy.

Vậy NAA có hiệu quả kích thích sự hình thành rễ bất định in vitro khá cao ở sâm Ngọc Linh, trong môi trường Gamborg ở nồng độ 7mg/l.

4.3. Khảo sát ảnh hưởng của IBA lên sự hình thành rễ bất định in vitro của sâm Ngọc Linh trên các môi trường MS, SH, B5

Bảng 2. Ảnh hưởng của IBA lên sự hình thành rễ bất định in vitro của sâm sâm Ngọc Linh trên các môi trường MS, SH, B5

Nồng độ IBA (mg/l)	Số lượng rễ hình thành sau 30 ngày nuôi cấy(rễ/mẫu)		
	Môi trường MS	Môi trường SH	Môi trường B5
0	0,0e*	0,0f	0,0e
1	5,3d	7,6e	8,1d
3	7,2c	9,0d	12,6b
5	12,8a	16,6a	17,2a
7	8,8b	12,7b	10,7c
9	7,3c	11,7c	7,9d
LSD at P = 0.01	0,2068	0,1925	0,2388

(*) Giá trị cách biệt trong cột khi phân tích LSD ở P = 0.01

Những mẫu rễ cây trên môi trường B5 có bổ sung IBA ở các nồng độ khác nhau đều cho kết quả cao hơn so với trên các môi trường khác (MS, SH) có cùng nồng độ IBA tương ứng. Kết quả đạt cao nhất khi mẫu rễ được nuôi cấy trên môi trường Gamborg có bổ sung IBA ở nồng độ 5mg/l đạt 17,2 rễ/mẫu cấy, tuy nhiên trên môi trường SH có bổ sung IBA cùng nồng độ (5mg/l) cũng cho kết quả khả quan đạt 16,6 rễ/mẫu cấy.

Chúng tôi cũng đã tiến hành thí nghiệm kiểm chứng so sánh lại giữa môi trường Gamborg và môi trường SH có bổ sung IBA ở các nồng độ 3, 5, 7, 9 mg/l để xác định chính xác hơn môi trường nào và nồng độ nào của IBA cho hiệu quả tăng sinh khối cao nhất. Kết quả chúng tôi cũng nhận thấy môi trường phù hợp nhất vẫn là môi trường Gamborg và nồng

độ IBA thích hợp nhất vẫn là 5mg/l. Nồng độ IBA càng thấp (dưới 5mg/l) số lượng rễ bất định hình thành càng ít và khi nồng độ IBA trong môi trường tăng lên trên 5 mg/l số lượng rễ hình thành lại có xu hướng giảm đi. Đó là do nồng độ cao của auxin sẽ khiến nó trở thành tác nhân ức chế sự hình thành rễ ở mẫu cấy.

So sánh giữa các môi trường nuôi cấy có IBA và NAA, chúng tôi nhận thấy các môi trường có bổ sung NAA đều cho kết quả (số lượng rễ hình thành) kém hơn so với các môi trường tương ứng có bổ sung IBA ở cùng nồng độ, chứng tỏ IBA là chất kích thích tạo rễ thích hợp hơn cho nuôi cấy tạo rễ bất định ở sâm Ngọc Linh. IBA cũng đã được chứng minh là auxin hiệu quả nhất cho sự hình thành rễ trên nhiều đối tượng khác (*P. ginseng*) [10].



Hình 3. Rễ bất định hình thành sau 1 tháng nuôi cấy.

Lời cảm ơn

Công trình được sự hỗ trợ của Quỹ phát triển khoa học và công nghệ Quốc gia thuộc Chương trình nghiên cứu cơ bản trong khoa học tự nhiên, mã số đề tài: 106.11.142.09. Nhân dịp này chúng tôi xin chân thành cảm ơn giúp đỡ quý báu đó. Chúng tôi xin bày tỏ sự cảm ơn tới Ban quản lý Trạm Dược liệu Lâm Đồng, tỉnh Lâm Đồng đã hỗ trợ trong việc thu thập mẫu vật.

Tài liệu tham khảo

- [1] Duc N.M., R. Kasai, K. Ohtani, A. Ito, N.T. Nham, K. Yamasaki and O. Tanaka, New saponins from Vietnamese ginseng: Highlights on biogenesis of dammarane triterpenoids. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol. 404, Ed., by G.R. Waller and K. Yamasaki, Plenum Press, New York and London (1996) 129.
- [2] Đỗ Tất Lợi, *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*, Nhà xuất bản Y học, 2006.
- [3] Bourgaud F., A. Gravot, S. Milesi and Gontier, Production of plant secondary metabolites: a historical perspective, *Plant Science* 161 (2001) 839.
- [4] Murthy H.N, E.J. Hahn and K.Y. Paek, Adventitious Roots and Secondary Metabolism, *Chinese J. Biotechnology*, Vol 24, (5), (2008) 711.
- [5] Son S.H., S.M. Choi, S.J. Hyung, S.R. Yun, M.S. Choi, E.M. Shin and Y.P. Hong, Induction and culture of mountain ginseng adventitious roots and AFLP analysis for identifying mountain ginseng, *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, 4 (1999) 119.
- [6] Thanh N.T., L.T. Son and K.Y. Paek, Induction and proliferation of callus of Ngoc Linh ginseng (*P. vietnamensis* Ha et Grushv): Effects of plant growth regulators, *J. of Science*, 23, No.1S (2007) 167.
- [7] Furuya T., T. Yoshikawa, T. Ishii, K. Kaji, Effects of auxins on growth and saponin production in callus cultures of *P. ginseng*, *Planta Med.*, 47 (3), (1983) 183.
- [8] Thomas C Moore, *Biochemistry and Physiology of Plant Hormones*, Springer, 1989.
- [9] Nandagopal S. and B.D. Ranjitha Kumari, Effectiveness of auxin induced in vitro root culture in *Chicory intybus*, *J. Cent. Eur. Agric.*, 8 (1) (2007) 73.
- [10] Son S.H., S.M. Choi, S.J. Hyung, S.R. Yun, M.S. Choi, E.M. Shin and Y.P. Hong, Induction and cultures of mountain ginseng adventitious roots and AFLP analysis for identifying mountain ginseng, *Biotechnol Bioprocess Eng* 4 (1999) 118.

The adventitious root induce of Ngoc Linh ginseng (*Panax vietnamensis*, Ha et Grushv.) in vitro cultures

Nguyen Thi Lieu¹, Nguyen Trung Thanh¹, Nguyen Van Ket²

¹Faculty of Biology, Hanoi University of Science, VNU, 334 Nguyen Trai, Hanoi, Vietnam

²Faculty of Agroforestry, Dalat University, 01 Phu Dong Thien Vuong, Da Lat, Vietnam

Organic nutrients and auxin play a central role during Ngoc Linh ginseng (*P. vietnamensis*) adventitious root culture in vitro. To understand how the nutrient elements and auxin were uptaken during the adventitious root induction, a biotechnological approach to identifying the nutritional physiology of ginseng in a commercial scale was necessary. The effects of the medium types and auxin concentration on the induction and the growth from adventitious roots were investigated. Appropriate conditions allowed for a maximum callus production to be obtained after 2 months of culture in MS medium with supplemented 50g sucrose, 8g agar, 1mg 2-4D/l. Otherwhile, matured explants was subcultured in Gamborg (B5) MS solid medium supplemented with 50g sucrose, 8g agar and 5mg/l IBA, under continuous total dark condition. The induced highest number of rooting from matured explants is very good. The results demonstrated that the key organic nutrients can be regulated to improve the biomass and growth in vitro cultures of *P. vietnamensis* adventitious roots.

Keywords: 2,4-D, IBA, NAA auxin, culture medium, *Panax*.