

## Nhân nhanh rễ bất định Nhân sâm *Panax ginseng* C.A. Meyer: ảnh hưởng của một số nhân tố lý hóa lên sự tăng trưởng sinh khối và sản phẩm trao đổi chất ginsenosides

Nguyễn Trung Thành<sup>1,\*</sup>, Paek Kee Yoeup<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQGHN, 334 Nguyễn Trãi, Hà Nội, Việt Nam

<sup>2</sup>Bộ môn Cây ăn quả, Trường Đại học Quốc gia Chungbuk, 361-763 Cheongju, Hàn Quốc

Nhận ngày 29 tháng 10 năm 2008

**Tóm tắt.** Rễ bất định Nhân sâm được nuôi cấy trên môi trường cơ bản MS, kết quả thu được 2-4D là thích hợp cho sự hình thành và phát triển của mô sẹo, còn IBA là thích hợp cho sự hình thành và tăng trưởng của rễ bất định. Số rễ bất định được hình thành trên môi trường được bổ sung IBA nhiều hơn rất nhiều so với NAA. Nồng độ đường sucrose ban đầu đã ảnh hưởng đến sự tăng trưởng sinh khối tế bào và sản phẩm saponin, kết quả thu được nồng độ 50 g/L cho thấy là tối ưu nhất cho sự sinh trưởng của rễ bất định với trọng lượng khô (TLK) là  $1.62 \pm 0.19$  g. Ngược lại đối với sản phẩm trao đổi chất ginsenoside hầu như thay đổi không có ý nghĩa khi tăng nồng độ đường từ 10 g/L đến 90 g/L. Thành phần ginsenoside tổng số đã tăng khi bổ sung nồng độ axit jasmonic, giá trị đạt cao nhất (59.7 mg/g.TLK) ở nồng độ 10 mg/L axit jasmonic, và cao hơn 5.2 lần so với đối chứng (11.42 mg/g.TLK). Cả 2 nhóm ginsenosides Rb (Protopanaxadiol) và Rg (Protopanaxatriol) đạt cao nhất ở nồng độ 10 mg/L, nhưng thành phần của nhóm Rb tăng nhanh có ý nghĩa hơn nhóm Rg. Như vậy toàn bộ năng suất của ginsenosides cao nhất là 255 mg/L giành được ở nồng độ 2 mg/L axit jasmonic.

**Từ khóa:** Auxin, ginsenoside, đường sucrose, axit jasmonic, *Panax ginseng*.

### 1. Đặt vấn đề

Nhân sâm (*Panax ginseng* C.A. Meyer) thuộc họ Araliaceae, từ xa xưa đã được coi là một trong số những cây thuốc có tác dụng đồng hóa các sản phẩm trong tế bào, thích nghi di truyền, kháng sinh, điều hòa lượng đường huyết, thần kinh và chống ung thư, v.v. Thành phần chính ginsenoside đã được ghi nhận như là hợp chất có hoạt tính quan trọng nhất trong rễ sâm. Mặt khác Nhân sâm cũng có các thành

phần khác nhau như các chất chống oxy hóa, peptides, polysaccharides, axit béo, rượu, và vitamin [1].

Nhu cầu về sử dụng Nhân sâm và chiết xuất các hoạt chất của chúng đã tăng nhanh theo thời gian. Nhưng để thu hoạch được rễ sâm trồng trên đồng ruộng thì phải mất từ 4-6 năm và nhân công lao động cũng đã làm cho giá thành tăng lên rất cao [2]. Ngoài ra việc điều khiển các loại dịch bệnh, sự kháng các loại thuốc trừ sâu cũng là một vấn đề nghiêm trọng [3]. Trong những năm gần đây, việc ứng dụng công nghệ nuôi cấy tế bào thực vật đã rất thành công trong

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

sản xuất các sản phẩm trao đổi chất thứ cấp, bao gồm các nguyên liệu thô trong dược phẩm, các sắc tố và các hóa chất khác [4]. Sản phẩm ginsenosides cũng đã thu được thông qua nuôi cấy tế bào [5-7].

Các nhân tố lý hóa được coi như các chất xúc tác để kích thích hoặc kìm hãm sự tăng trưởng sinh khối và tích lũy sản phẩm trao đổi chất thứ cấp trong tế bào thực vật. Điều này đã nhận được nhiều sự chú ý và đã có được các thành quả rất khả quan [2]. Axít jasmonic đã được khẳng định như là chất xúc tác hiệu quả để kích thích sự trao đổi chất thứ cấp trong nuôi cấy tế bào thực vật [8].

Trong bài báo này chúng tôi muốn giới thiệu một số kết quả nghiên cứu về sự ảnh hưởng của một số nhân tố lý hóa lên sự tăng trưởng sinh khối và sản phẩm trao đổi chất của ginsenosides trong rễ bất định Nhân sâm.

## 2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

### 2.1. Sự hình thành và tăng trưởng của mô sẹo

Rễ Nhân sâm tươi 6 năm tuổi đã được khử trùng và phân lập theo mô tả (Thành, 2005); mô sẹo đã được nuôi cấy trong bóng tối ở nhiệt độ  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ , sau 4 tuần nuôi mô sẹo đã được hình thành trên môi trường rắn MS, bổ sung 1mg/L 2-4D (2-4 Dichlorophenoxyacetic acid) và 0.1 mg/L kinetin.

### 2.2. Nuôi cấy rễ bất định

Rễ bất định đã hình thành từ mô sẹo sau 4 tuần nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung thêm 2mg/L IBA (indole 3-butyric axit), 0.1 mg/L kinetin. Sau đó, rễ bất định được chuyển sang nuôi cấy trong bình tam giác với dung tích 300 ml có chứa 100 ml môi trường lỏng MS. Các bình tam đặt trên máy lắc với tốc độ 100 vòng/phút. Quá trình nuôi cấy tiếp theo được tiến hành trong bioreactor với dung tích 5L, có chứa 4L môi trường. Sơ đồ nuôi cấy trong bioreactor đã được mô tả [9].

### 2.3. Chiết xuất và xác định hàm lượng ginsenosides

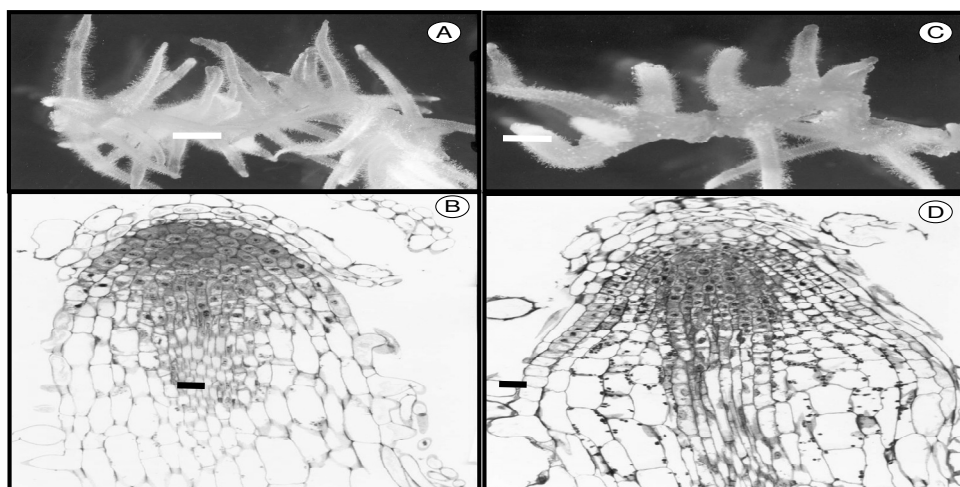
Rễ sâm đã thu hoạch, rửa sạch và sấy khô ở nhiệt độ  $60^\circ\text{C}$  trong 7 giờ. Quá trình chiết xuất, xác định hàm lượng ginsenosides có trong rễ sâm đã tiến hành theo mô tả [9,10].

Các thí nghiệm đều đã tiến hành cùng điều kiện như nhau và có 3 lần lặp lại.

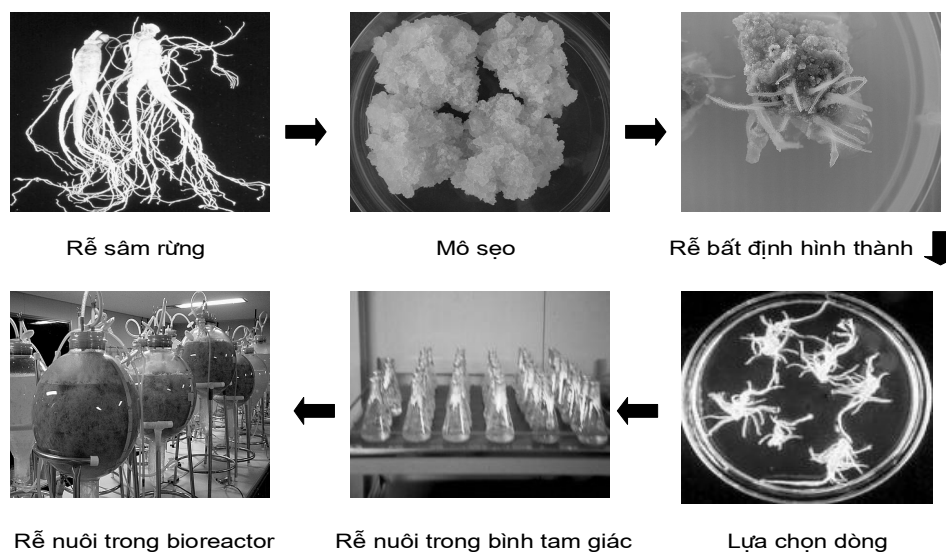
## 3. Kết quả và biện luận

### 3.1. Sự hình thành mô sẹo và tăng trưởng của rễ bất định

Các mẫu rễ sâm đã được cấy trên môi trường MS với bổ sung 1.0 mg/L 2-4D, 0.1 mg/L kinetin, và 3% đường để tạo ra mô sẹo. Mô sẹo đã được hình thành sau 4 tuần nuôi cấy. Rễ bất định đã được hình thành từ mô sẹo trên môi trường rắn được bổ sung 2.0 mg/L IBA, 0.1 mg/L kinetin, và 3% đường. Có 4 giai đoạn chính để hình thành rễ bất định: a) sự hình thành các vị trí mô phân sinh, b) sự phân các tế bào non, c) sự phân chia các tế bào già để hình thành nên các cơ quan và các mô phân sinh rễ, d) sự phát triển của rễ từ mô phân sinh (Hình 1). Rễ tiếp tục được cấy chuyển trong bình tam giác 300 ml, có chứa 100 ml môi trường lỏng MS. Trong nuôi cấy rễ bất định của *P. notoginseng*, [11] cũng nhận được kết quả tương tự với auxin 2-4D ở nồng độ 2.0 mg/L là tối ưu cho sự hình thành mô sẹo và IBA dùng cho hình thành, tăng trưởng của rễ bất định. Furuya và cộng sự (1983) đã tìm thấy rằng 2-4D là cần thiết cho sự sinh trưởng của *P. ginseng*, nhưng nồng độ của 2-4D cao (0.5 mg/L hoặc cao hơn) có thể gây ức chế sự sinh trưởng. Trong thí nghiệm này chúng tôi đã kết luận rằng 2-4D là thích hợp cho sự hình thành và phát triển của mô sẹo, còn IBA là thích hợp cho sự hình thành và tăng trưởng của rễ bất định. Số rễ non được hình thành trên môi trường được bổ sung IBA nhiều hơn rất nhiều so với NAA (Hình 1). Quá trình hình thành mô sẹo và nuôi cấy rễ bất định được tóm tắt trong (Hình 2).



Hình 1. Số rễ bất định hình thành trên môi trường nuôi cấy MS được bổ auxin.  
(A:IBA, B:đỉnh rễ non; C:NAA, D:đỉnh rễ non).



Hình 2. Sơ đồ của quá trình hình thành mô sẹo và nuôi cấy rễ bất định.

### 3.2. Ảnh hưởng của nồng độ đường lên sự tăng trưởng sinh khối và sản phẩm ginsenosides

Trên môi trường MS được bổ sung 5 mg/L IBA, kết quả nhận được trong (Bảng 1) với sinh khối tăng có ý nghĩa khi tăng nồng độ đường từ 10 g/L đến 50 g/L, và tiếp tục tăng nồng độ

đường lên 70 g/L đến 90 g/L sinh khối giảm dần. Như vậy, nồng độ 50 g/L cho thấy là tối ưu nhất cho sự sinh trưởng của rễ bất định với trọng lượng khô (TLK) là  $1.62 \pm 0.19$  g. Ngược lại đối với sản phẩm trao đổi chất ginsenoside hầu như thay đổi không có ý nghĩa khi tăng nồng độ đường từ 10 g/L đến 90 g/L.

Bảng 1. Ảnh hưởng của nồng độ đường lên sự sinh trưởng của rễ bất định Nhân sâm được nuôi cấy trong bình tam giác

| Nồng độ đường (g/L) | TL khô (g/100ml) | Tỷ số tăng trưởng | Sản phẩm ginsenoside (mg/g TLK) |             |              |
|---------------------|------------------|-------------------|---------------------------------|-------------|--------------|
|                     |                  |                   | Rb                              | Rg          | Tổng số      |
| 10                  | 1.13 ± 0.84      | 3.52              | 3.05 ± 0.12                     | 6.98 ± 0.08 | 10.03 ± 0.31 |
| 20                  | 1.31 ± 0.21      | 4.05              | 2.95 ± 0.23                     | 7.05 ± 0.13 | 10.11 ± 0.24 |
| 30                  | 1.23 ± 0.15      | 3.82              | 3.11 ± 0.15                     | 7.89 ± 0.21 | 11.16 ± 0.11 |
| 50                  | 1.62 ± 0.19      | 5.07              | 3.87 ± 0.11                     | 7.43 ± 0.15 | 11.42 ± 0.13 |
| 70                  | 1.52 ± 0.11      | 4.79              | 3.05 ± 0.20                     | 8.22 ± 0.17 | 11.27 ± 0.25 |
| 90                  | 1.34 ± 0.13      | 4.61              | 3.35 ± 0.09                     | 7.54 ± 0.10 | 10.89 ± 0.17 |

Đường là nguồn các bon quan trọng đối với quá trình nuôi cấy mô và tế bào thực vật. Nó đã được chứng minh rằng nồng độ đường ban đầu có thể ảnh hưởng đến các thông số khác nhau trong quá trình nuôi cấy tế bào thực vật, như tỷ số tăng trưởng, năng suất của sự trao đổi chất thứ cấp. Ví dụ, trong nuôi cấy tế bào lông của *Perilla frutescens*, nồng độ đường cao hơn 45 g/L là thích hợp cho sản phẩm anthocyanin [4]. Akalezi và cộng sự [7] cũng đã báo cáo về nồng độ đường ban đầu đã ảnh hưởng đến sự tăng trưởng sinh khối tế bào và sản phẩm saponin ở *P. ginseng*. Họ đã nhận được sự tăng trưởng sinh khối lớn nhất ở nồng độ đường là 30 g/L và sự tích lũy sản phẩm trao đổi chất lớn nhất ở nồng độ đường 60 g/L.

Kết quả thí nghiệm của chúng tôi đã khẳng định rằng nồng độ đường ban đầu có vai trò quan trọng đến sự sinh trưởng của rễ bất định Nhân sâm, và nồng độ đường 50 g/L là tối ưu cho sự tăng trưởng sinh khối.

### 3.3. Ảnh hưởng của axit jasmonic lên sự tăng trưởng sinh khối và sản phẩm ginsenosides

Sự tăng dần nồng độ axit jasmonic đã cho kết quả sự tích lũy thành phần ginsenosides cao nhưng lại ức chế rất mạnh đến sự tăng trưởng của sinh khối. Kết quả thí nghiệm cho thấy ở (Bảng 2) ảnh hưởng của nồng độ axit jasmonic lên sự tăng trưởng của rễ bất định và sản phẩm ginsenosides. Trọng lượng khô và tỷ số tăng trưởng của sinh khối giảm khi tăng dần nồng độ axit jasmonic.

Mặt khác, thành phần ginsenosides tăng có ý nghĩa khi tăng nồng độ axit jasmonic. Toàn bộ thành phần ginsenoside đã tăng với sự tăng nồng độ axit jasmonic, giá trị đạt cao nhất (59.7 mg/g.TLK) ở nồng độ 10 mg/L axit jasmonic, và cao hơn 5.2 lần so với đối chứng (11.42 mg/g.TLK). Cả 2 nhóm ginsenosides Rb (Protopanaxadiol) và Rg (Protopanaxatriol) đạt cao nhất ở nồng độ 10 mg/L, nhưng thành phần của nhóm Rb tăng nhanh có ý nghĩa hơn nhóm Rg. Như vậy toàn bộ năng suất của ginsenosides cao nhất là 255 mg/L giành được ở nồng độ 2 mg/L axit jasmonic (Bảng 2).

Bảng 2. Ảnh hưởng của nồng độ axit jasmonic lên sự sinh trưởng của rễ bất định Nhân sâm được nuôi cấy trong bioreactor

| Nồng độ axit jasmonic | Trọng lượng khô | Tỷ số tăng trưởng | Sản phẩm ginsenoside (mg/g TLK) |           |            | Tỷ số Rb/Rg | Sản phẩm ginsenoside (mg/L) |
|-----------------------|-----------------|-------------------|---------------------------------|-----------|------------|-------------|-----------------------------|
|                       |                 |                   | Rb                              | Rg        | Tổng số    |             |                             |
| 0                     | 1.47 ± 0.07     | 4.03              | 7.4 ± 0.7                       | 3.7 ± 0.3 | 11.4 ± 0.5 | 1.8 ± 0.4   | 166 ± 6                     |
| 1                     | 1.04 ± 0.05     | 2.81              | 13.2 ± 0.5                      | 2.7 ± 0.1 | 16.1 ± 0.4 | 4.7 ± 0.2   | 163 ± 5                     |
| 2                     | 0.85 ± 0.02     | 2.42              | 24.2 ± 0.8                      | 4.5 ± 0.3 | 28.5 ± 1.1 | 5.5 ± 0.1   | 255 ± 8                     |
| 5                     | 0.61 ± 0.06     | 1.61              | 34.5 ± 0.9                      | 4.2 ± 0.2 | 38.8 ± 1.3 | 8.3 ± 0.6   | 229 ± 6                     |
| 10                    | 0.43 ± 0.01     | 1.14              | 54.4 ± 0.9                      | 5.6 ± 0.1 | 59.7 ± 0.8 | 9.7 ± 0.4   | 245 ± 5                     |

Axit jasmonic và các đồng phân của chúng đã được coi là có tham gia vào con đường

truyền tín hiệu và kích thích các enzym xúc tác trong phản ứng sinh hóa để hình thành nên các

hợp chất bảo vệ có trọng lượng phân tử thấp ở thực vật như polyphenol, alkaloids, quinones, terpenoids, và polypeptides [12,13] (Mizukami và cộng sự, 1993; William và cộng sự, 1996). Trong nuôi cấy tế bào *Lithospermum*, jasmonate đã gây ra sự tăng theo chu kỳ hoạt động của enzym mà có liên quan đến quá trình sinh tổng hợp Shikonin như p-hydroxybenzoate geranyltransferase [14] (Urbanek và cộng sự, 1996). Ginsenosides thuộc triterpenoide saponin chúng có nguồn gốc từ acetyl-CoA thông qua 15 bước của quá trình trao đổi chất. Trong số ginsenoside Rb1, Rb2, Rc, Rd thuộc nhóm Rb, và Re, Rg1, Rf thuộc nhóm Rg.

Cho đến nay, các enzym liên quan đến sự sinh tổng hợp của Rb, Rg ginsenoside vẫn chưa được xác định. Trong thí nghiệm của chúng tôi, axit jasmonic đã kích thích đặc biệt đến sự tích lũy của Rb hơn Rg. Kết quả này đã gợi ý rằng axit jasmonic có thể gây kích thích hoạt động của enzym cho quá trình tổng hợp Rb ginsenosides.

### Tài liệu tham khảo

- [1] H.S. Lee, S.W. Kim, K.W. Lee, T. Eriksson, J.R. Liu, Agrobacterium mediated transformation of ginseng (*P. ginseng*) and mitotic stability of the inserted beta-glucuronidase gene in regenerates from isolated protoplasts, *Plant Cell Rep.* 14 (1995) 545.
- [2] F. Bourgaud, A. Gravot, S. Milesi, Gontier, Production of plant secondary metabolites: a historical perspective, *Plant Science* 161(2001) 839.
- [3] Y.H. Yu, S.H. Ohh, 1995, Problems and present status of research on ginseng diseases in Korea. pp. 120-130. In: W.G. Bailey, C. Whitehead, J.T.A. Proctor, J.T. Kyle (eds.), Proc Int Ginseng Conf Vancouver 1994, Canada.
- [4] J.J. Zhong, Production of ginseng saponin and polysaccharide by cell cultures of *P. ginseng* and *P. notoginseng*. Effects of plant growth regulators, *Appl. Biochem. and Biotechnol.*, 75 (1998) 261.
- [5] T. Furuya, 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.
- [6] S. Liu, J.J. Zhong, Phosphate effect on production of ginseng saponin and polysaccharide by cell suspension cultures of *P. ginseng* and *P. quinquefolium*. *Process Biochem.* 33 (1998) 69.
- [7] C.O. Akalezi, S. Liu, Q.S. Li, J.T. Yu, J.J. Zhong, Combined effects of initial sucrose concentration and inoculum size on cell growth and ginseng saponin production by suspension cultures of *P. ginseng*. *Process Biochem.* 34 (1998) 639.
- [8] K.W. Yu, W.Y. Gao, S.H. Son, K.Y. Paek, Improvement of ginsenoside production by jasmonic acid and some other elicitors in hairy root culture of ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer). *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant*, 36 (2000) 424.
- [9] N.T. Thanh, Factors affecting cell growth and ginsenoside production in *P. ginseng* C. A. Meyer. Ph.D. thesis, Chungbuk National University, South Korea, 2005.
- [10] N.T. Thanh, H.N. Murthy, K.W. Yu, E.J. Hahn, K.Y. Paek, Methyl jasmonate elicitation enhanced synthesis of ginsenoside by cell suspension cultures of *P. ginseng* in 5-l balloon type bubble bioreactors, *Appl. Microb. Biotechnol.* 67 (2005) 197.
- [11] S.H. Son, S.M. Choi, S.J. Hyung, S.R. Yun, M.S. Choi, E.M. Shin, Y.P. Hong, Induction and culture of mountain ginseng adventitious roots and AFLP analysis for identifying mountain ginseng, *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 4 (1999) 119.
- [12] H. Mizukami, Y. Tabira, B.E. Ellis, Methyl jasmonate induced rosmarinic acid biosynthesis in *Lithospermum erythrorhizon* cell suspension cultures, *Plant Cell Rep.* 12 (1993) 706.
- [13] S. William, G. John, J. Hendel, Reserved-phase high performance liquid chromatographic determination of ginsenosides of *P. quinquefolium*. *J. Chromatog.* 775 (1996.) 11.
- [14] H. Urbanek, K. Bergier, M. Saniewski, J. Patykowski, Effects of jasmonic acid and exogenous polysaccharides on production of alkannin pigments in suspension cultures of *Alkanna tinctoria*. *Plant Cell Rep.* 15(1996) 637.

## Adventitious root cultures of *Panax ginseng* C.V. Meyer: factors affecting adventitious root growth and ginsenosides production

Nguyen Trung Thanh<sup>1</sup>, Paek Kee Yoeup<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Faculty of Biology, College of Science, VNU, 334 Nguyen Trai, Hanoi, Vietnam*

<sup>2</sup>*Department of Horticulture, Chungbuk National University, 361-763 Cheongju, South Korea*

The adventitious root of *Panax ginseng* C. A. Meyer is regarded as an efficient alternative to cell culture for biomass production due to its fast growth and stable metabolite production. To determine optimal culture conditions for the bioreactor culture roots, experiments have been conducted on physical and chemical factors such as plant growth regulator, sucrose concentration, and elicitor. Elicitation is a key step to increase ginsenoside accumulation in the adventitious root. In this paper, we discussed several factors affecting the root propagation and ginsenoside accumulation: 1) among auxins, we have concluded that 2,4-D was suitable for induction and growth of the callus, while IBA is favorable for induction and proliferation of the adventitious root in ginseng culture; 2) on the sucrose concentrations such as 10, 20, 30, 50, 70, and 90 g/L, root dry weight increased the most at 50 g/L, showing maximum dry weight and growth rate. However the root growth started to decrease from the sucrose concentration above 70 g/L. The effect of sucrose concentration on ginsenoside production was not as significant as in the case of biomass increase; c) in bioreactor culture, ginsenoside content increased significantly by the addition of 10 mg/L jasmonic acid. However, the root growth was strongly inhibited by increasing jasmonic acid concentration. The highest ginsenoside yield was obtained at 2.0 mg/L jasmonic acid.

**Keywords:** Auxin, ginsenoside, sucrose, jasmonic acid, *Panax ginseng*.