

ẢNH HƯỞNG CỦA CÁC ELICITOR SINH HỌC VÀ PHI SINH HỌC ĐẾN SINH KHỐI VÀ HÀM LƯỢNG SAPONIN CỦA RỄ THỨ CẤP TRONG NUÔI CÂY LÔNG LẮC RỄ BẤT ĐỊNH SÂM NGỌC LINH

Nguyễn Thị Nhật Linh^{1,2}, Hoàng Thanh Tùng¹, Nguyễn Hoàng Lộc², Dương Tấn Nhựt^{1,✉}

¹Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên, Viện Hàn Lâm Khoa học và Công Nghệ Việt Nam

²Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế

✉ Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: duongtannhut@gmail.com

Ngày nhận bài: 26.10.2016

Ngày nhận đăng: 20.6.2017

TÓM TẮT

Sâm Ngọc Linh là một loài dược liệu quý hiếm, đặc hữu của Việt Nam và có giá trị kinh tế cao. Các hợp chất saponin đặc trưng của loài sâm này vừa giúp bồi bổ sức khỏe, vừa có tác dụng điều trị bệnh. Trong nghiên cứu này, các elicitor sinh học (dịch chiết nấm men và chitosan) ở nồng độ 50 – 200 mg/l và các elicitor phi sinh học (jasmonic acid, abscisic acid và salicylic acid) ở nồng độ 50 – 200 µl/l được sử dụng để đánh giá khả năng gia tăng các hợp chất saponin và sinh khối của rễ thứ cấp trong nuôi cấy rễ bất định *in vitro*. Các rễ bất định được nuôi cấy trên môi trường MS cải biên (tỷ lệ NH₄⁺/NO₃⁻: 7,19/18,5 mM/mM) bổ sung 7 mg/l IBA, 0,5 mg/l BA và 3% sucrose trên máy lắc Innova 2100 platform shaker với tốc độ 100 vòng/phút. Kết quả sau 56 ngày nuôi cấy cho thấy, hầu hết các elicitor làm giảm đáng kể sinh khối khô rễ thứ cấp so với đối chứng (ngoại trừ bổ sung 50 – 100 mg/l dịch chiết nấm men và 50 µl/l salicylic acid). Tuy nhiên, tất cả các elicitor đều có hiệu quả lên quá trình tích lũy saponin; trong đó, elicitor phi sinh học có hiệu quả gia tăng tích lũy saponin hơn các elicitor sinh học. Jasmonic acid cho kết quả tối ưu nhất so với các elicitor khác về tổng 3 loại saponin ở nồng độ 150 µl/l, Rg1 ở 100 µl/l, Rb1 ở 50 µl/l và MR2 ở 200 µl/l trong việc gia tăng đáng kể các saponin. Tuy nhiên, khi đánh giá hiệu quả tích lũy saponin trên tổng khối lượng rễ thu được cho thấy 150 mg/l YE đem lại hiệu quả tích lũy tốt nhất (0,88 mg).

Từ khóa: elicitor, *in vitro*, rễ thứ cấp, saponin, sâm Ngọc Linh.

GIỚI THIỆU

Sâm Ngọc Linh không chỉ chứa đầy đủ các saponin quý tương tự các loài sâm quý trên thế giới như Rg1, Rb1 mà còn chứa nhiều saponin đặc trưng chỉ có ở loài này, đặc biệt là MR2 với tỷ lệ chiếm rất cao trong tổng saponin toàn phần thu được. Rễ sâm Ngọc Linh từ lâu đã được sử dụng như một dược liệu quý để chữa bá bệnh theo các bài thuốc dân gian ở Việt Nam. Gần đây, rễ sâm ngày càng được sử dụng phổ biến không những để điều trị bệnh mà còn làm các thực phẩm chức năng hay mỹ phẩm (Nguyễn Thượng Dong, 2004). Mặc dù nhu cầu rất cao nhưng nguồn sâm rất hạn hẹp, khó tìm và hầu như đang trên bờ cạn kiệt. Để giải quyết vấn đề này, việc áp dụng nuôi cấy mô thực vật để nhân nhanh sinh khối rễ sâm Ngọc Linh đã được nghiên cứu ở nhiều trung tâm nghiên cứu khác nhau. Trong đó, nuôi cấy rễ đã có những thành công nhất định và cho hiệu quả rõ rệt so với các biện pháp nuôi cấy khác (Trịnh Thị Hương *et*

al., 2012; Dương Tấn Nhựt *et al.*, 2012). Tuy nhiên, khó khăn lớn nhất khi sản xuất rễ *in vitro* là hàm lượng saponin trong nuôi cấy thấp hơn so với ngoài tự nhiên. Để gia tăng các hợp chất saponin trong nuôi cấy thu nhận sinh khối rễ, các elicitor khác nhau đã được nghiên cứu và cho thấy hiệu quả rất lớn trong nuôi cấy nhân sâm ở Hàn Quốc (Yu, 2000). Thuật ngữ elicitor hiện nay đã được sử dụng phổ biến để chỉ các chất có nguồn gốc khác nhau, có thể có bản chất sinh học hay phi sinh học, cũng như các yếu tố cơ học có tác động lên các phản ứng sống của thực vật và kích thích thực vật sản sinh và tích lũy các hợp chất thứ cấp khác nhau (Lambert *et al.*, 2011). Hiện nay, nghiên cứu ứng dụng elicitor để gia tăng các ginsenoside saponin trên nhiều loài sâm khác đã được nhiều tác giả chú ý nghiên cứu đến như sâm Mỹ (Yu, 2000) và sâm Hàn Quốc (Mohammad *et al.*, 2006). Trên đối tượng sâm Ngọc Linh, để gia tăng các hợp chất saponin bằng elicitor trong nuôi cấy thu nhận sinh khối rễ sâm Ngọc Linh thì còn rất

mới và số lượng nghiên cứu còn rất hạn chế. Chính vì thế, chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu “Ảnh hưởng của các elicitor sinh học và phi sinh học đến sinh khối rễ thứ cấp và hàm lượng saponin trong nuôi cấy lỏng lác rễ bất định sâm Ngọc Linh” nhằm đánh giá tác động của loại và nồng độ elicitor lên sinh khối rễ cũng như hàm lượng saponin trong rễ thứ cấp nuôi cấy từ rễ bất định trong điều kiện nuôi cấy lỏng lác.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguồn mẫu

Rễ bất định rễ (50 mg) 60 ngày tuổi, dài 2 cm, được tách ra từ các cụm rễ bất định nuôi cấy từ mẫu cuống lá trên môi trường SH bổ sung 5 mg/l IBA (Trịnh Thị Hương *et al.*, 2012) 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 cải biên bổ sung các elicitor khác nhau. Môi trường được rót vào bình thủy tinh 250 ml, mỗi bình chứa 30 ml môi trường lỏng. Sau đó, được hấp khử trùng ở 121°C, 1 atm trong vòng 20 phút.

Bố trí thí nghiệm

Tăng trưởng rễ thứ cấp từ rễ bất định

Các mẫu rễ bất định sâm Ngọc Linh được nuôi cấy trên môi trường dinh dưỡng khoáng MS cải biên với tỷ lệ $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$: 7,19/18,50 mM/mM (Yu *et al.*, 2001), bổ sung 7 mg/l IBA, 0,5 mg/l BA, 30 g/l sucrose và elicitor sinh học (Chitosan – CHN, Dịch chiết nấm men – YE) ở các nồng độ 0, 50, 100, 150 và 200 mg/l và elicitor phi sinh học (Abscisic acid – ABA, Salicylic acid – SA và Jasmonic acid – JA) ở các nồng độ 0, 50, 100, 150 và 200 $\mu\text{l/l}$ nhằm đánh giá khả năng tăng trưởng của rễ thứ cấp.

Khối lượng tươi và khối lượng khô của rễ (mg) được ghi nhận sau 56 ngày nuôi cấy.

Định lượng saponin trong rễ thứ cấp

Nguồn mẫu

Mẫu rễ thứ cấp (1 g khối lượng khô) thu nhận từ các nghiệm thức bổ sung các loại elicitor khác nhau và đối chứng là không bổ sung elicitor ở thí nghiệm trên.

Chất chuẩn

Chuẩn MR2 được hỗ trợ bởi Trung tâm nghiên cứu Sâm và Dược liệu; 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 (Bùi Thế Vinh, Trần Công Luận, 2011).

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

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

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.

So sánh hiệu quả tích lũy saponin trong rễ thứ cấp

Hiệu quả tích lũy saponin trong rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh tỷ lệ thuận với sự gia tăng sinh khối khô và tổng hàm lượng saponin (MR2 + Rb1 + Rg1), được xác định bằng công thức:

$$ES = DW \times St$$

(*ES*: Hiệu quả tích lũy saponin; *DW*: sinh khối khô của rễ thứ cấp; *St*: tổng hàm lượng saponin (MR2 + Rb1 + Rg1))

Điều kiện nuôi cấy

Các mẫu rễ bất định được nuôi cấy này 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.

Bố trí thí nghiệm và xử lý số liệu

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

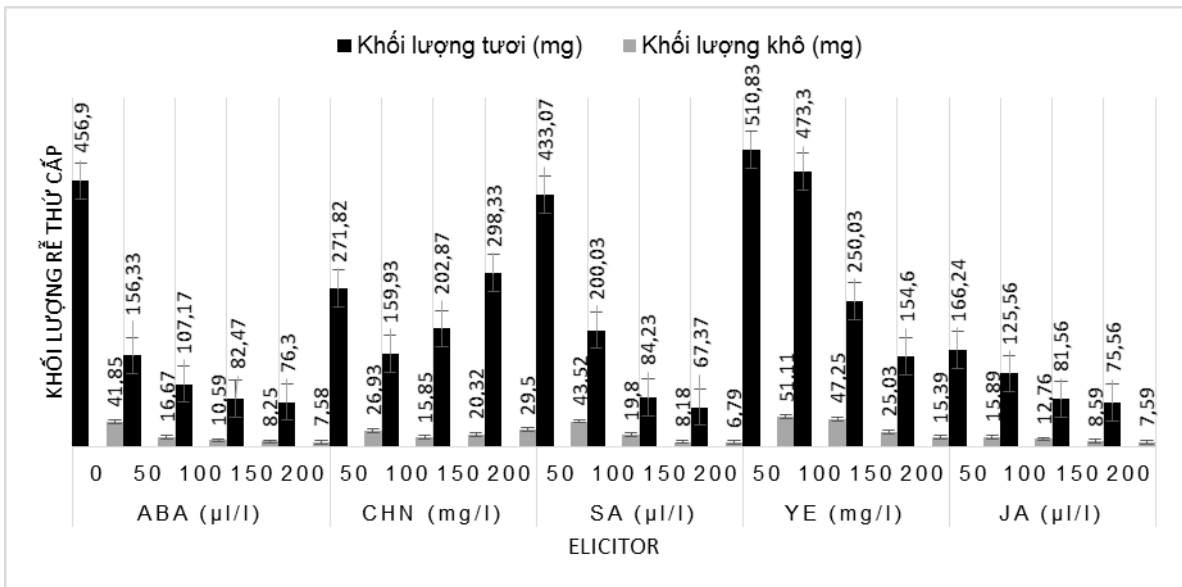
KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Tăng trưởng rễ thứ cấp từ rễ bất định

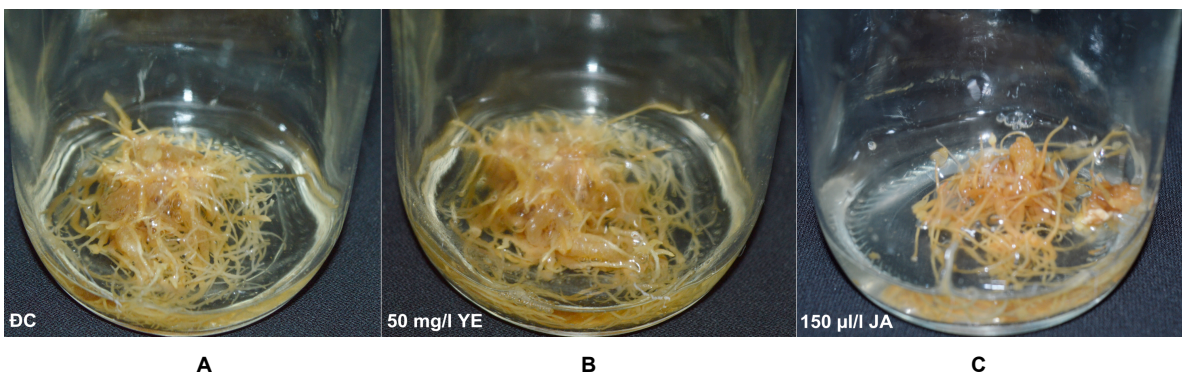
Sinh khối rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh sau 56 ngày nuôi cấy trong môi trường MS cải biên có bổ sung các elicitor sinh học và phi sinh học có sự khác biệt đáng kể giữa các nghiệm thức khác nhau (Hình 1). Đối với môi trường nuôi cấy bổ sung elicitor sinh học (YE và CHN), khi tăng nồng độ elicitor thì sự tăng trưởng của rễ thứ cấp cũng có sự khác biệt ở từng loại và nồng độ elicitor khác nhau. Khi tăng nồng độ YE trong môi trường từ 0

– 50 mg/l, kết quả ghi nhận cho thấy có sự gia tăng về khối lượng tươi cũng như khối lượng khô của rễ thứ cấp (510,83 mg và 51,11 mg; tương ứng) (Hình 2), nồng độ YE tăng lên đến 100 mg/l thì có sự giảm về khối lượng tươi (473,43 mg) và khối lượng khô (45,25 mg) nhưng vẫn cao hơn so với đối chứng là không bổ sung elicitor (456,9 mg và 41,85 mg; tương ứng) (Hình 1). Tăng nồng độ YE trong môi trường vượt quá 100 mg/l thì sự tăng trưởng về sinh khối rễ thứ cấp tỷ lệ nghịch với gia tăng của nồng độ YE (Hình 1). Bên cạnh đó, các mẫu rễ bất định trong môi trường có bổ sung YE vẫn giữ được màu vàng tươi như nghiệm thức không bổ sung elicitor và không bị hóa nâu như mẫu rễ trong các môi trường bổ sung các loại elicitor khác (Hình 2).

Sinh khối của rễ thứ cấp cũng có sự khác biệt khi bổ sung các nồng độ khác nhau của CHN, khi tăng nồng độ từ 0 – 100 mg/l thì sinh khối tươi và khô của rễ thứ cấp giảm nhưng khi tăng nồng độ lên 150 – 200 mg/l thì sinh khối rễ lại tăng. Tuy nhiên, sự gia tăng này là không đáng kể và vẫn còn thấp hơn nhiều so với đối chứng (Hình 1). Trong khi đó, môi trường bổ sung các loại elicitor phi sinh học (ABA, SA và JA), sinh khối của rễ thứ cấp giảm rõ rệt và tỷ lệ nghịch với sự gia tăng của nồng độ của các loại elicitor phi sinh học (Hình 1). Trong 3 loại elicitor phi sinh học, 50 µl/l SA có hiệu quả đến gia tăng sinh khối rễ (khối lượng tươi 433,07 mg giảm so với đối chứng nhưng khối lượng khô của rễ 43,52 mg lại cao hơn đối chứng).



Hình 1. Ảnh hưởng của các Elicitor lên sinh khối rễ thứ cấp từ nuôi cấy rễ bất định sau năm sáu ngày nuôi cấy.



Hình 2. Rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh sau 56 ngày nuôi cấy. A. ĐC: không có elicitor; B. YE: Dịch chiết nấm men; C. JA: Jasmonic acid.

Khả năng tích lũy saponin trong rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh

Sau 56 ngày nuôi cấy, khả năng tích lũy saponin của rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh nuôi cấy trong môi trường bổ sung các loại elicitor khác nhau cho thấy sự khác biệt giữa các nghiệm thức (Bảng 1).

Khi tăng nồng độ YE từ 0 – 150 mg/l trong môi trường nuôi cấy, hàm lượng các loại saponin Rg1, Rb1, MR2 và tổng của 3 loại saponin đều cao hơn so với đối chứng và cao nhất ở nồng độ 150 mg/l (2,48%, 0,24%, 0,79% và 3,51%; tương ứng). Ở nồng độ cao hơn (200 mg/l) thì sự tích lũy saponin lại giảm so với nồng độ 150 mg/l (Bảng 1). YE là một elicitor sinh học và hiệu quả của nó đã được ghi nhận trên nhiều đối tượng khác nhau. Trong nuôi cấy rễ cây *Portulaca oleracea*, Pirian và Piri (2013) chỉ ra rằng lượng YE tốt nhất để thu nhận chất noradrenaline là 250 và 500 mg/l. Theo nghiên cứu của Loc và Giang (2012), hiệu quả YE để gia tăng

gia hàm lượng asiaticoside (thuộc nhóm triterpenoide saponin) cao hơn sử dụng 2-hydroxybenzoic acid và nồng độ tốt nhất là 4 g/l bổ sung sau 10 ngày nuôi cấy tế bào rau má.

Trong nuôi cấy rễ bất định nhân sâm, Rahimi và đồng tác giả (2014) cũng thấy YE có tác dụng làm gia tăng đáng kể hàm lượng các ginsenoside saponin ở nồng độ 3 g/l. Tại nồng độ này đã kích thích sản xuất bacchotricuneatin C, guaiazulene, isochiapin B và p-benzoquinone sesquiterpenoid; từ đó giúp biểu hiện các gen IPPI và FPS có vai trò quan trọng trong quá trình trao đổi chất sinh tổng hợp các triterpenoide saponin. Trong nghiên cứu này, trong dãy nồng độ từ 50 – 200 mg/l, nồng độ YE thích hợp nhất cho rễ thứ cấp có thể phát triển và đạt đa số các hàm lượng saponin cao nhất là tại nồng độ 150 mg/l. Điều này cho thấy YE cũng là một trong những nhân tố có ảnh hưởng đến con đường sinh tổng hợp các hợp chất saponin trong nuôi cấy sâm Ngọc Linh.

Bảng 1. Ảnh hưởng của elicitor lên khả năng tích lũy saponin của rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh sau 56 ngày nuôi cấy.

Elicitor	Nồng độ	Rg1 (%)	Rb1 (%)	MR2 (%)	Rg1+ Rb1+ MR2 (%)**
ĐC	0	0,34 [*]	0,14 ^p	0,40 ⁿ	0,88
	50	0,50 ^{jl}	0,25 ^{ki}	0,72 ^j	1,47
	100	0,53 ⁱ	0,20 ⁿ	0,68 ^k	1,41
	150	2,48 ^b	0,24 ^{lk}	0,79 ⁱ	3,51
	200	0,55 ⁱ	0,26 ^j	0,86 ^h	1,67
CHN (mg/l)	50	0,26 ^m	0,47 ^d	0,16 ^p	0,89
	100	1,63 ^e	0,14 ^p	0,25 ^o	2,02
	150	0,68 ^h	0,33 ^h	0,43 ^m	1,44
	200	0,37 ⁱ	0,23 ^{mi}	0,42 ^{mn}	1,02
ABA (µl/l)	50	0,70 ^h	0,20 ⁿ	1,06 ^f	1,96
	100	1,23 ^g	0,20 ⁿ	0,97 ^g	2,40
	150	1,50 ^f	0,22 ^m	1,65 ^d	3,37
	200	0,73 ^h	0,28 ⁱ	1,63 ^d	2,64
SA (µl/l)	50	0,68 ^h	0,25 ^{ki}	0,87 ^h	1,80
	100	0,45 ^{ki}	0,38 ^f	0,60 ^l	1,43
	150	0,50 ^{jl}	0,18 ^o	0,58 ^l	1,26
	200	0,44 ^k	0,36 ^g	0,40 ⁿ	1,20
JA (µl/l)	50	2,23 ^c	0,85 ^a	1,86 ^c	4,94
	100	3,22 ^a	0,72 ^b	1,30 ^e	5,24
	150	2,52 ^b	0,58 ^c	2,46 ^b	5,56
	200	1,98 ^d	0,40 ^e	2,83 ^a	5,21

Ghi chú: *Các chữ cái a, b, c... trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa với P = 0,05 trong phép thử Duncan; ** : Tổng giá trị trung bình của 3 loại saponin Rg1, Rb1 và MR2.

Nồng độ 100 mg/l CHN cho khả năng tích lũy saponin cao hơn so với các nồng độ CHN khác về Rg1 (1,63%) và tổng 3 loại saponin (2,02%) (Bảng 1). Kết quả của nghiên cứu này cũng phù hợp với nghiên cứu Hu và đồng tác giả (2004) trên nhân sâm cho thấy nồng độ xử lý tối ưu nhất là khoảng 100 mg/l CHN cho tế bào duy trì sự phát triển và tích lũy ginsenoside và thời gian bổ sung là khoảng $\frac{2}{3}$ thời gian nuôi cấy, tại nồng độ này hoạt động của β -Amyrin synthase được tăng cường, đây là một trong những enzyme quan trọng để mở khóa cho quá trình sinh tổng hợp các triterpenoide saponin.

Theo kết quả trên, các elicitor phi sinh làm giảm mạnh sinh khối rễ thứ cấp nhưng tạo ra khác biệt lớn trong việc gia tăng tích lũy từng loại saponin ở các nồng độ elicitor khác nhau (Bảng 1). Nghiệm thức bổ sung ABA, ở cùng nồng độ 150 μ l/l là tốt nhất để tích lũy MR2 (1,65%), Rg1 (1,5%) và tổng 3 loại saponin (3,37%) nhưng để tích lũy Rg1 cần tăng nồng độ lên 200 μ l/l (0,28%). Điều này cũng tương đồng với nhiều nghiên cứu về các elicitor phi sinh học khác trên thế giới như nghiên cứu của Hu và đồng tác giả (2004) hay Rahimi và đồng tác giả (2014).

Ngoài ra, để tổng hợp các hợp chất triterpenoid saponin, theo Suzuki và đồng tác giả (2002) cho thấy ABA đã kích thích con đường tổng hợp saponin do β -amyrin synthase làm tăng phiên mã lên 2,5 lần khi xử lý dịch huyền phù tế bào *Medicago truncatula* trong 1 giờ. Trong thí nghiệm này, chúng tôi nhận thấy mặc dù ABA hoàn toàn không thích hợp cho rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh phát triển và tăng sinh nhưng có kích thích gia tăng sự tích lũy hàm lượng saponin. Kết quả định lượng saponin cho thấy ở tất cả các nghiệm thức đều hiện diện cả ba loại ginsenoside Rg1, MR₂, Rb1 và tổng 3 loại saponin thu được ở các nghiệm thức có bổ sung ABA vào môi trường nuôi cấy đều cao hơn so với nghiệm thức đối chứng. So với YE và CHN thì ABA có hiệu quả gia tăng hàm lượng MR2 tốt hơn, còn hai ginsenoside Rg1 và Rb1 không khác biệt lớn (Bảng 1).

Trong các loại elicitor phi sinh học, SA cho khả năng tích lũy saponin là thấp nhất và JA cho hiệu quả cao nhất về tổng 3 loại saponin (5,56%) ở nồng độ 150 μ l/l JA và gấp hơn 6 lần so với đối chứng (0,88%). Ở các nồng độ JA khác khả năng tích lũy saponin tổng cũng rất cao từ 4,94 – 5,24%. Bên cạnh đó, Rg1 (3,22%) ở nồng độ 100 μ l/l JA cao nhất so với các nghiệm thức bổ sung elicitor sinh học cũng như phi sinh học khác và gấp 9,5 lần so với đối chứng (0,34%). Rb1 (0,85%) cao nhất khi môi

trường nuôi cấy bổ sung 50 μ l/l JA và MR2 (2,83%) cao nhất khi bổ sung 200 μ l/l JA (Bảng 1). Trong nghiên cứu của Rahimi và đồng tác giả (2014), khi xử lý các rễ bất định nhân sâm với 200 mg/l SA trong 24 giờ giúp làm tăng đáng kể khả năng biểu hiện các gen mã hóa lipooxygenase (LOX) tổng hợp jamic acid nội sinh là dẫn xuất quan trọng để tổng hợp các saponin. Tuy nhiên để rễ phát triển được nhưng vẫn chứa đầy đủ 3 loại saponin chính của sâm Ngọc Linh thì chỉ cần sử dụng SA với nồng độ rất thấp khoảng 50 μ l/l là tương đối tốt cho rễ phát triển và sẽ hiệu quả kinh tế nhất định. Kết quả trong nghiên cứu này cũng tương tự với nghiên cứu trên; tuy nhiên, hàm lượng saponin vẫn thấp hơn so với việc bổ sung JA. Điều này có thể được giải thích là do trong con đường sinh tổng hợp ginsenoside, JA có khả năng cảm ứng các enzyme quan trọng cho quá trình tích lũy ginsenoside (Wang *et al.*, 2006). Khi nghiên cứu trên đối tượng *P. notoginseng*, Hu và Zhong (2007) xử lý 2-hydroxyethyl jasmonate (HEJ), kết quả cho thấy hoạt tính của protopanaxdiol 6-hydroxylase (P6H) và UDPG-ginsenoside Rd glucosyltransferase (UGRdGT) tăng lên dẫn đến hàm lượng ginsenoside Rb1, Rg1 cũng như tỉ lệ Rb/Rg tăng. Ngoài ra, JA có thể cảm ứng lipooxygenase và dẫn đến sự tổng hợp JA nội sinh, kết quả làm tăng khả năng tích lũy ginsenoside trong tế bào (Hu, Zhong, 2007).

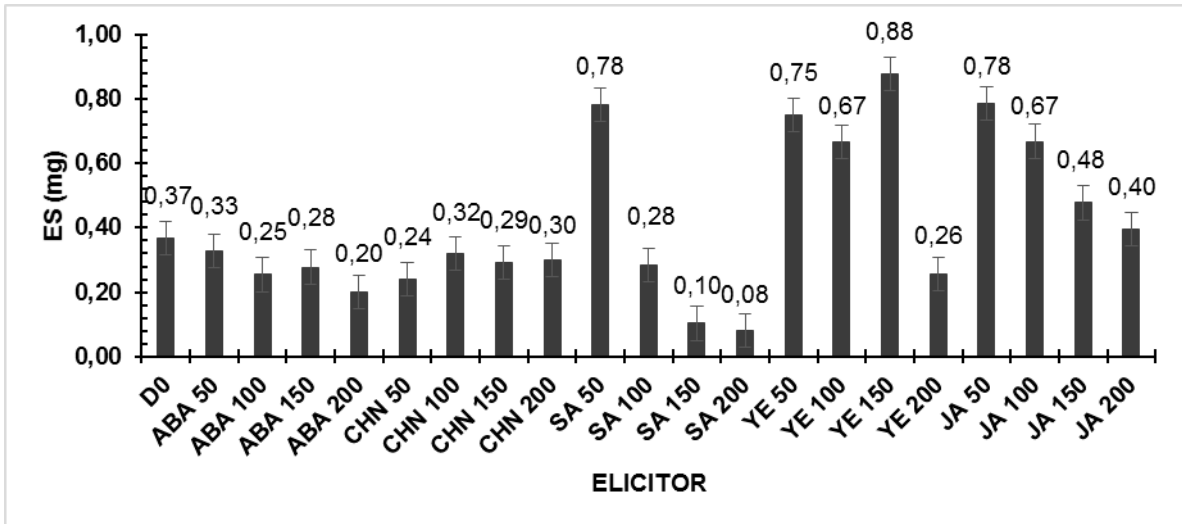
Tóm lại, khi bổ sung elicitor vào môi trường nuôi cấy cho thấy hầu hết các elicitor đều làm giảm khả năng phát triển của rễ ở các mức độ khác nhau (ngoại trừ nồng độ 50 – 100 mg/l YE và 50 μ l/l SA). Khả năng tích lũy saponin cũng có sự khác biệt khi bổ sung các loại elicitor khác nhau vào môi trường nuôi cấy và đạt cao nhất khi bổ sung JA. Tùy thuộc vào mục đích thu nhận từng loại saponin mà chọn nồng độ JA cho phù hợp (Rg1 là 100 μ l/l, Rb1 50 μ l/l, MR2 là 200 μ l/l và cả 3 saponin là 150 μ l/l).

Hiệu quả tích lũy saponin trong rễ thứ cấp

Sinh khối của rễ thứ cấp cũng như hàm lượng saponin có sự khác biệt giữa các nghiệm thức và không tăng tỷ lệ thuận theo sự biến thiên của nồng độ. Vì vậy, hiệu quả của tích lũy saponin trong rễ thứ cấp được chúng tôi xác định dựa trên mối tương quan giữa sinh khối và khả năng tích lũy của từng nồng độ elicitor (Hình 3).

Kết quả chúng tôi ghi nhận được cho thấy, bổ sung 150 mg/l YE cho hiệu quả tích lũy cao nhất (0,88 mg). Ở nồng độ 50 μ l/l của SA và JA thì hiệu quả tích lũy cũng

trung đối cao (0,78 mg); trong khi đó, bổ sung 150 – nồng độ elicitor khác (0,08 – 0,10 mg) (Hình 3).
200 µl/l SA cho hiệu quả tích lũy thấp nhất so với các



Hình 3. Ảnh hưởng của elicitor lên hiệu quả tích lũy saponin trong rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh sau 56 ngày nuôi cấy.

KẾT LUẬN

Trong nuôi cấy rễ bất định sâm Ngọc Linh sau 56 ngày ở điều kiện lỏng lác, cả 5 elicitor đều có tác dụng gia tăng khả năng tích lũy saponin tuy nhiên chúng có tác dụng ngược lại lên sự phát triển của rễ thứ cấp. Giữa các elicitor, elicitor phi sinh học gây kích thích mạnh nhất đến khả năng phát triển của rễ thứ cấp nhưng tăng mạnh hàm lượng saponin. Tuy nhiên, để mang lại hiệu quả tích lũy saponin thực sự so với khối lượng rễ thu được thì kết quả cho thấy rằng 150 mg/l YE là cho hiệu quả cao nhất.

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

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.

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

Dương Tấn Nhật, Nguyễn Cửu Thành Nhân, Hoàng Xuân Chiến, Nguyễn Phúc Huy, Trần Xuân Ninh, Phạm Huy Hải, Vũ Quốc Luận, Paek Kee-Yoeup (2012) Một số hệ thống nuôi cấy trong nghiên cứu nhân nhanh rễ bất định và rễ thứ cấp cây sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.). *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 10(4A): 887-897.

Hu X, Neill SJ, Fang J, Cai W, Tang Z (2004) Mitogen-activated protein kinases mediate the oxidative burst and saponin synthesis induced by chitosan in cell cultures of *Panax ginseng*. *Sci China C Life Sci* 47(4): 303-312.

Hu FX, Zhong JJ (2007) Role of jasmonic acid in alteration of ginsenoside heterogeneity in elicited cell cultures of *Panax notoginseng*. *J Biosci Bioeng* 104: 513-516.

Lambert E, Faizal A, Geelen D (2011) Modulation of triterpene saponin production: *in vitro* cultures, elicitation, and metabolic engineering. *Appl Biochem Biotechnol* 164: 220-237.

Loc NH, Giang NT (2012) Effects of elicitors on the enhancement of asiaticoside biosynthesis in cell cultures of centella (*Centella asiatica* L. Urban). *Chem Pap* 66 (7): 642-648.

Mohammad BA, Kee WY, Eun JH, Kee YP (2006) Methyl jasmonate and salicylic acid elicitation induces ginsenosides accumulation, enzymatic and nonenzymatic antioxidant in suspension culture *Panax ginseng* roots in bioreactors. *Plant Cell Rep* 25(6): 613-620.

Nguyễn Thượng Dong, Trần Công Luận, Nguyễn Thị Thu Hương (2007) *Sâm Việt Nam và một số họ Nhân sâm*. NXB. Khoa học và kỹ thuật.

Pirian K, Piri K (2013) Influence of yeast extract as a biotic elicitor on noradrenaline production in hairy root culture of *Portulaca oleracea* L. *Int J Agron Plant Prod* 4(11): 2960-2964.

Rahimi S, Devi BSR, Khorolragchaa A, Kim YJ, Kim JH, Jung SK, Yang DC (2014) Effect of salicylic acid and yeast extract on the accumulation of jasmonic acid and sesquiterpenoids in *Panax ginseng* adventitious roots. *Russ J Plant Physiol* 61(6): 811-817

Suzuki H, Achnine L, Xu R, Matsuda SPT, Dixon RA A genomics approach to the early stages of triterpene saponin biosynthesis in *Medicago truncatula*. *Plant J* 32: 1033-1048.

Trịnh Thị Hương, Hồ Thanh Tâm, Hà Thị Mỹ Ngân, Ngô Thanh Tài, Nguyễn Phúc Huy, Hoàng Xuân Chiển,

Nguyễn Bá Nam, Vũ Quốc luận, Vũ Thị Hiền, 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*. *Tap chí Công nghệ Sinh học* 10(4A): 877-886.

Wang W, Zhao ZJ, Xu Y, Qian X, Zhong JJ (2006) Efficient induction of ginsenoside biosynthesis and alteration of ginsenoside heterogeneity in cell cultures of *Panax notoginseng* by using chemically synthesized 2-hydroxyethyl jasmonate. *Appl Microbiol Biotechnol* 70: 298-307.

Yu KW (2000) *Production of the Useful Metabolites through Bioreactor Culture of Korean Ginseng (Panax ginseng C. A. Meyer)*, Doctor Thesis, Chungbuk National University, Korea.

Yu KW, Gao WY, Hahn EJ, Paek KY (2001). Effects of macro elements and nitrogen source on adventitious root growth and ginsenoside production in Ginseng (*Panax ginseng* C. A. Meyer). *J Plant Biol* 44(4):179-184.

THE EFFECT OF BIOTIC AND ABIOTIC ELICITORS ON BIOMASS AND SAPONIN PRODUCTION OF SECONDARY ROOT CULTIVATED IN SHAKE FLASKS *PANAX VIETNAMENSIS* ADVENTITIOUS ROOT

Nguyen Thi Nhat Linh^{1,2}, Hoang Thanh Tung¹, Nguyen Hoang Loc², Duong Tan Nhut¹

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

²Hue University of Sciences, Hue University

SUMMARY

Panax vietnamensis Ha et Grushv. is an endemic ginseng of Vietnam which has highly nutraceutical, medicinal and commercial values. Many its special saponins provide resistance to stress, disease and exhaustion. In this study, the biotic elicitors (yeast extract and chitosan) at concentrations from 50 – 200 mg/l and abiotic elicitors (jasmonic acid, abscisic acid and salicylic acid) at concentrations from 50 – 200 µl/l were used to evaluate the possibility of increasing secondary root's biomass and saponin in *Panax vietnamensis* adventitious root cultures. This cultures were maintained on Innova 2100 shaker shaker platform at a speed of 100 rpm, and its modified MS medium (NH₄⁺/NO₃⁻: 7.19/18.5 mM/mM) were supplemented with 7 mg/l IBA, 0.5 mg/l BA and 3% sucrose. Results after 56 days of cultured showed that most elicitors significantly reduced dry biomass of secondary roots as compared to control (exception the addition of 50 – 100 mg/l yeast extract or 50 µl/l salicylic acid). However, all elicitors increased saponin-accumulation, and abiotic elicitor is more effective saponin-accumulation than those biotic elicitors. Jasmonic acid obviously gave the best results; with total amount of 3 saponins at 150 µl/l, Rg1 at 100 µl/l, Rb1 at 50 µl/l and MR2 at 200 µl/l and Rg1 (3.22%), significantly higher than other concentration of elicitor. However, for accumulating saponins and developing secondary root, 150 mg/l YE is the most real effective in all elicitors (0.88 mg).

Keywords: *elicitor, in vitro, Panax vietnamensis, saponin, secondary root*