

## 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

Nguyễn Hồng Hoàng<sup>1</sup>, Trịnh Thị Hương<sup>1</sup>, Lê Kim Cương<sup>1</sup>, Vũ Thị Hiền<sup>1</sup>, Nguyễn Bá Nam<sup>1</sup>, Nguyễn Phúc Huy<sup>1</sup>, Vũ Quốc Luận<sup>1</sup>, Hà Thị Mỹ Ngân<sup>1</sup>, Phạm Bích Ngọc<sup>2</sup>, Chu Hoàng Hà<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>Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Ngày nhận bài: 14.4.2014

Ngày nhận đăng: 15.6.2014

### TÓM TẮT

Việc sử dụng kỹ thuật nuôi cấy mô tế bào thực vật để sản xuất các hợp chất thứ cấp có giá trị hiện đang gặp một số hạn chế do năng suất thu được thấp và tồn dư các chất điều hòa sinh trưởng, có thể gây ảnh hưởng đến tính an toàn của sản phẩm và sức khỏe người sử dụng. Nuôi cấy sinh khối rễ tơ bằng các kỹ thuật nuôi cấy *in vitro* kết hợp với kỹ thuật chuyển gen có thể khắc phục được vấn đề trên. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm đánh giá ảnh hưởng của thành phần môi trường bao gồm hàm lượng khoáng, hàm lượng đường, giá thể nuôi cấy, pH, nhiệt độ cũng như hàm lượng than hoạt tính lên quá trình sinh trưởng rễ tơ sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) chuyển gen sử dụng vi khuẩn *Agrobacterium rhizogenes* ATCC 15834. Sau 2 tháng nuôi cấy, kết quả cho thấy sử dụng môi trường khoáng SH có bổ sung 8 g/l agar, 50 g/l sucrose và pH của môi trường được điều chỉnh về khoảng 5,8 – 6,1 là thích hợp nhất cho khả năng sinh trưởng của các dòng rễ tơ. Các dòng rễ tơ được nuôi cấy trong điều kiện tối ở 25°C cho số lượng rễ mới hình thành cũng như khối lượng tươi và khối lượng khô cao nhất. Việc bổ sung 1% (w/v) than hoạt tính vào môi trường nuôi cấy cũng góp phần cải thiện khả năng tăng sinh rễ. Bên cạnh đó, nuôi cấy các dòng rễ tơ với hệ thống lồng lắc cũng mang lại hiệu quả nhân nhanh rễ tốt hơn rõ rệt so với nuôi cấy trên môi trường thạch truyền thống. Từ kết quả ban đầu này, một số dòng rễ tơ sâm Ngọc Linh chuyển gen đã được thu nhận dựa trên sự khác biệt về các đặc điểm hình thái góp phần mở ra một hướng mới trong nghiên cứu và sản xuất sinh khối rễ sâm Ngọc Linh, đồng thời giúp từng bước chủ động nguồn vật liệu ban đầu để nhân nhanh trong hệ thống bioreactor nhằm tách chiết hoạt chất saponin.

**Từ khóa:** *Agrobacterium rhizogenes*, chuyển gen, rễ tơ sâm Ngọc Linh, thành phần môi trường

### ĐẶT VẤN ĐỀ

Nghiên cứu tạo giống bằng các phương pháp chuyển gen hiện đã thu được nhiều thành công trên thế giới do công nghệ này cho phép đưa các gen có lợi vào thực vật để tạo những cây trồng có tính trạng mong muốn (Đức *et al.*, 1997). Hiện nay, một số nghiên cứu về chuyển gen đã được triển khai ở nước ta. Tuy nhiên, hầu hết các nghiên cứu đều tập trung vào một số đối tượng cây thực phẩm hoặc cây công nghiệp như: lúa, ngô, cà chua, bắp cải, đu đủ, bông cải (Lê Trần Bình, 2005). Các nghiên cứu và ứng dụng về chuyển gen trên đối tượng cây dược liệu còn hạn chế.

Sâm Ngọc Linh là loài sâm đặc hữu của Việt Nam có tên khoa học là *Panax vietnamensis* Ha et Grushv., được biết đến trên thế giới với tên gọi Vietnamese ginseng. Sâm Ngọc Linh có thành phần ginsenoside,

được chất chính trong nhân sâm, được đánh giá là nhiều nhất so với các loài khác của chi *Panax* trên thế giới (Dong *et al.*, 2007). Hàm lượng ginsenoside tập trung nhiều và chủ yếu trong rễ củ sâm Ngọc Linh do đó hướng nuôi cấy tạo sinh khối rễ đang được quan tâm nghiên cứu. Trong quá trình nuôi cấy tạo sinh khối tế bào thực vật các chất điều hòa sinh trưởng được bổ sung vào môi trường nuôi cấy nhằm làm giảm hoặc mất tính biệt hóa ở các mô tế bào nuôi cấy. Việc làm này dẫn tới sự tồn dư của các chất điều hòa sinh trưởng trong sinh khối tế bào gây ảnh hưởng đến sức khỏe người sử dụng và tính an toàn của sản phẩm. Tuy nhiên, vấn đề này có thể được khắc phục thông qua nuôi cấy sinh khối từ rễ tơ chuyển gen (Kim *et al.*, 2002). Rễ tơ được biết đến là kết quả của quá trình chuyển gen với vi khuẩn *Agrobacterium rhizogenes*, có khả năng sinh tổng hợp các hợp chất thứ cấp tương đương hoặc cao hơn so với cây mẹ (Kim *et al.*, 2002; Srivastava, Srivastava, 2007;

Mishra, Ranjan, 2008). Rễ tơ còn có đặc tính khác là tính ổn định về mặt di truyền, có tốc độ sinh trưởng bằng hoặc nhanh hơn nuôi cấy tế bào (Flores et al., 1999) và không yêu cầu chất kích thích sinh trưởng trong môi trường. Chính vì vậy việc nghiên cứu tạo sinh khối rễ bằng kỹ thuật chuyển gen sẽ góp phần tạo ra nguồn vật liệu ban đầu phục vụ cho công tác nghiên cứu tiếp theo.

Trong nghiên cứu này, các yếu tố bao gồm hàm lượng khoáng của môi trường nuôi cấy, giá thể nuôi cấy, pH, nhiệt độ, hàm lượng đường, hàm lượng than hoạt tính và điều kiện nuôi cấy được chúng tôi khảo sát để tìm ra điều kiện tối ưu cho quá trình sinh trưởng rễ tơ sâm Ngọc Linh *in vitro* nhằm tạo nguồn nguyên liệu ban đầu phục vụ cho việc nuôi cấy thu nhận sinh khối.

## VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### Vật liệu

Nguồn mẫu được sử dụng trong nghiên cứu này là các cụm rễ tơ sâm Ngọc Linh (khối lượng tươi trung bình 30 mg) được chuyển gen thành công thông qua trung gian là chủng vi khuẩn *Agrobacterium rhizogenes* ATCC 15834 (Ngân et al., 2013) có sẵn tại phòng Sinh học Phân tử và Chọn tạo giống cây trồng – Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên.

### Phương pháp nghiên cứu

*Khảo sát ảnh hưởng của hàm lượng khoáng lên khả năng sinh trưởng của rễ tơ sâm Ngọc Linh chuyển gen*

Các cụm rễ tơ sâm Ngọc Linh chuyển gen được nuôi cấy trên các môi trường là SH (Schenk, Hildebrandt, 1972), ½SH (giảm một nửa hàm lượng các thành phần đa lượng), SH½ (giảm một nửa hàm lượng tất cả các thành phần dinh dưỡng) và SH với hàm lượng vitamin tăng gấp đôi (SH + 2VTM) bổ sung 8 g/l agar, 30 g/l sucrose và pH 5,8.

*Khảo sát ảnh hưởng của giá thể nuôi cấy lên khả năng sinh trưởng của rễ tơ sâm Ngọc Linh chuyển gen*

Các cụm rễ tơ sâm Ngọc Linh chuyển gen được nuôi cấy trên môi trường khoáng tối nhất ở thí nghiệm trên bổ sung 30 g/l sucrose, pH 5,8 và nuôi cấy trên ba loại giá thể khác nhau là agar (8 g/l), gelrite (2 g/l) và bông gòn (kích thước khoảng 4 x 4 cm, khoảng 2 g).

*Khảo sát ảnh hưởng của độ pH của môi trường lên khả năng sinh trưởng của rễ tơ sâm Ngọc Linh chuyển gen*

Các cụm rễ tơ sâm Ngọc Linh chuyển gen được nuôi cấy trên các điều kiện môi trường và giá thể tối nhất thu được từ các thí nghiệm trên, bổ sung 30 g/l sucrose và pH được điều chỉnh đến 4,1; 4,8; 5,1; 5,6; 6,1; 6,8 hoặc 7,1.

*Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy lên khả năng sinh trưởng của rễ tơ sâm Ngọc Linh chuyển gen*

Các cụm rễ tơ sâm Ngọc Linh chuyển gen được nuôi cấy trên các điều kiện môi trường, giá thể, pH tối ưu ở các thí nghiệm trên, bổ sung 30 g/l sucrose được nuôi cấy ở các điều kiện nhiệt độ khác nhau là 22°C, 25°C và 28°C.

*Khảo sát ảnh hưởng của hàm lượng đường lên khả năng sinh trưởng của rễ tơ sâm Ngọc Linh chuyển gen*

Các cụm rễ tơ sâm Ngọc Linh chuyển gen được nuôi cấy trên các điều kiện môi trường tối ưu ở các thí nghiệm trên và có bổ sung hàm lượng sucrose khác nhau (10, 20, 30, 40, 50 và 60 g/l).

*Khảo sát ảnh hưởng của hàm lượng than hoạt tính lên khả năng sinh trưởng của rễ tơ sâm Ngọc Linh chuyển gen*

Các cụm rễ tơ sâm Ngọc Linh chuyển gen được nuôi cấy trên các điều kiện môi trường tối ưu ở các thí nghiệm trên và bổ sung các hàm lượng than hoạt tính khác nhau (0,5; 1; 1,5; 2; 2,5 và 3 g/l).

*Khảo sát ảnh hưởng của điều kiện nuôi cấy lên khả năng sinh trưởng rễ tơ của sâm Ngọc Linh chuyển gen*

Các cụm rễ tơ sâm Ngọc Linh chuyển gen được nuôi cấy trên các điều kiện môi trường tối ưu trong điều kiện rắn (8 g/l agar), bán rắn (4 g/l agar) và lỏng lắc ở 100 vòng/phút trong các chai thủy tinh có thể tích 250 ml.

### Bố trí thí nghiệm và xử lý số liệu

Các mẫu cây được nuôi cấy trong các đĩa petri nhựa đường kính 90 mm, dán kín bằng parafilm (trừ thí nghiệm điều kiện nuôi cấy). Mỗi thí nghiệm được lặp lại 5 lần, mỗi lần cấy 5 mẫu/nghiệm thức. Tất cả môi trường được khử trùng bằng autoclave ở 121°C, 1 atm trong 15 phút. Các thí nghiệm được nuôi cấy trong điều kiện tối, độ ẩm trung bình từ 55 – 60%.

Số liệu được thu nhận sau 8 tuần nuôi cấy, 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

### Ảnh hưởng của hàm lượng khoáng lên khả năng sinh trưởng của rễ tơ sâm Ngọc Linh chuyển gen

Thành phần khoáng có ảnh hưởng rất lớn lên khả năng phát sinh cơ quan trong nuôi cấy *in vitro* cũng như sinh lý của cây ngoài tự nhiên. Mỗi loài cây khác nhau có nhu khoáng khác nhau. Do đó, việc tìm ra môi trường khoáng thích hợp cho việc sinh trưởng của rễ tơ sâm Ngọc Linh là rất quan trọng. Sau 8 tuần nuôi cấy, hiệu quả nhân nhanh rễ tơ trên môi trường SH chứa hàm lượng khoáng khác nhau được trình bày ở Bảng 1.

Kết quả cho thấy, ngoài chỉ tiêu về chiều dài rễ không có sự khác biệt đáng kể giữa các nghiệm thức, các cụm rễ tơ sâm Ngọc Linh chuyển gen nuôi cấy

trên môi trường khoáng SH đều cho khả năng phát sinh rễ tốt nhất với số lượng rễ (9,00 rễ/mẫu), cũng như các chỉ tiêu khối lượng tươi (77,30 mg), khối lượng khô (8,80 mg) cao hơn so với các môi trường với hàm lượng khoáng khác. Vitamin có vai trò xúc tác các quá trình trao đổi chất diễn ra trong tế bào (Bùi Trang Việt, 2002). Tuy nhiên, trong nghiệm cứu này, vitamin được bổ sung vào với hàm lượng gấp đôi giúp cho mẫu mô sẹo phát triển to khỏe nhưng số lượng rễ hình thành không nhiều. Trong một số nghiệm cứu về sâm, nghiệm cứu của Lee và đồng tác giả (2009) cho thấy môi trường SH tỏ ra rất hiệu quả để nuôi cấy rễ bất định cây nhân sâm trong hệ thống bioreactor. Mallol và đồng tác giả (2001) cũng sử dụng môi trường khoáng SH trong nghiệm cứu của mình trên đối tượng rễ *Panax ginseng* chuyển gen.

Kết quả thu được từ thí nghiệm này cho thấy môi trường khoáng SH là môi trường thích hợp nhất cho sự phát sinh rễ tơ sâm Ngọc Linh chuyển gen và được sử dụng cho những thí nghiệm tiếp theo.

**Bảng 1.** Ảnh hưởng của hàm lượng khoáng khác nhau lên khả năng sinh trưởng của rễ tơ sâm Ngọc Linh chuyển gen

Môi trường khoáng	Khối lượng tươi (mg)	Khối lượng khô (mg)	Số lượng rễ (rễ/mẫu)	Chiều dài rễ (cm)
SH½	54,00b*	6,10c	5,00b	2,00a
½SH	50,70b	5,60d	5,00b	2,50a
SH	77,30a	8,80a	9,00a	2,80a
SH + 2 VTM	71,70ab	8,10b	5,33b	2,50a

\*Các chữ cái khác nhau (a, b, c, ...) trong các cột biểu diễn sự khác nhau có ý nghĩa với  $\alpha = 0,05$  trong phép thử Duncan

### Ảnh hưởng của giá thể nuôi cấy lên khả năng sinh trưởng của rễ tơ sâm Ngọc Linh chuyển gen

Trong nuôi cấy mô tế bào thực vật, bên cạnh các yếu tố như thành phần môi trường, nồng độ các chất dinh dưỡng, ... thì giá thể cũng đóng một vai trò hết sức quan trọng trong quá trình sinh trưởng và phát triển của mẫu cấy. Trong thí nghiệm này, chúng tôi tiến hành đánh giá hiệu quả của giá thể agar, gelrite và bông gòn lên khả năng tái sinh rễ tơ sâm Ngọc Linh chuyển gen nhằm tìm ra loại giá thể thích hợp nhất.

Trên môi trường nuôi cấy sử dụng ba loại giá thể, rễ tơ hình thành trên giá thể agar có số rễ cao gấp 1,70 lần, chiều dài rễ cao gấp 1,45 lần so với giá thể gelrite và cao gấp 2,43 lần và 1,61 lần so với giá thể bông gòn (Bảng 2). Giá thể agar có chứa một số chất vô cơ như Ca, Mg, K, Na... là các yếu tố cần thiết cho sự tăng sinh rễ (Lương, Tiến, 2006). Bên cạnh đó, agar hiện đang được

sử dụng nhiều trong nuôi cấy mô thực vật như một chất tạo đông có cấu trúc xốp, thông thoáng khí lại tiết kiệm được chi phí. Trong thí nghiệm này, rễ tơ hình thành trên giá thể agar và gelrite trắng, dài và đồng đều; rễ tơ hình thành trên giá thể bông gòn ngắn và có màu vàng (Hình 1). Giá thể bông gòn tuy dẫn truyền chất dinh dưỡng tốt nhưng lại không thích hợp cho rễ tơ tăng sinh. Về chỉ tiêu khối lượng tươi thì không có sự khác biệt đáng kể trên hai loại giá thể agar và gelrite, tuy nhiên khối lượng khô của các cụm rễ tơ nuôi cấy trên giá thể agar thể hiện tốt hơn trên giá thể gelrite. Kết quả này cũng tương tự với nghiệm cứu của Hồ Thanh Tâm và đồng tác giả (2013) khi khảo sát giá thể thích hợp cho quá trình tăng sinh rễ bất định sâm Ngọc Linh.

Như vậy, có thể thấy rằng giá thể agar thích hợp nhất cho sự sinh trưởng rễ tơ sâm Ngọc Linh chuyển gen, giá thể này được chúng tôi sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

**Bảng 2.** Ảnh hưởng của giá thể nuôi cấy lên khả năng sinh trưởng của rễ tơ sâm Ngọc Linh chuyển gen

Giá thể	Khối lượng tươi (mg)	Khối lượng khô (mg)	Số lượng rễ (rễ/mẫu)	Chiều dài rễ (cm)
Agar	80,00a*	9,10a	8,00a	2,93a
Gelrite	73,30a	8,00b	4,67b	2,07b
Bông gòn	57,30b	5,40c	3,33b	1,80b

\*Các chữ cái khác nhau (a, b, c...) trong các cột biểu diễn sự khác nhau có ý nghĩa với  $\alpha = 0,05$  trong phép thử Duncan

**Hình 1.** Rễ tơ chuyển gen sinh trưởng và phát triển trên các giá thể khác nhau (từ trái sang phải: agar, gelrite, bông gòn)

### Ảnh hưởng của pH khác nhau lên khả năng sinh trưởng của rễ tơ sâm Ngọc Linh chuyển gen

Việc điều chỉnh pH chính xác trong môi trường nuôi cấy là cần thiết. Mặc dù vậy, trong một số nghiên cứu trên các đối tượng khác nhau thì pH tối ưu cho sự phát triển của các mẫu cây không nằm trong khoảng nhất định. Nghiên cứu của Lê Kim Cương và đồng tác giả (2012) báo cáo về pH tối ưu cho sự phát triển của huyền phù sâm Ngọc Linh là 6,3. Một số ít nghiên cứu về rễ chuyển gen như nghiên cứu của Ho và Shanks (1992) cho thấy sự phát triển của rễ tơ của loài *Catharanthus roseus* ở pH 6,5 là tối ưu nhất.

Giá trị pH của môi trường được đo dựa vào nồng độ ion  $H^+$  trong môi trường; pH ảnh hưởng đến khả năng hòa tan của các ion trong môi trường khoáng,

khả năng đồng tụ agar và sự tăng trưởng của tế bào (Skirvin *et al.*, 1986). Giá trị pH của môi trường nuôi cấy thay đổi ảnh hưởng đến sự hấp thụ dinh dưỡng của tế bào nuôi cấy, ảnh hưởng trực tiếp đến sự sinh trưởng của tế bào (Thạch *et al.*, 2009). Trong nghiên cứu này, kết quả thu nhận sau 8 tuần nuôi cấy với pH của môi trường khác nhau từ 4,1 đến 7,1 cho thấy rễ phát sinh kém trong môi trường acid cao (pH được điều chỉnh trong khoảng từ 4,1 đến 4,8) (Bảng 3). Khi tăng pH từ 5,1 đến 6,1 các chỉ tiêu về số lượng rễ, chiều dài rễ, khối lượng tươi và khối lượng khô tăng và đạt cao nhất ở nghiệm thức nuôi cấy trong khoảng pH từ 5,8 đến 6,1. Khi pH môi trường tăng cao hơn 6,1 thì các chỉ tiêu theo dõi này giảm xuống. Điều đó có thể là do pH môi trường quá thấp hoặc quá cao sẽ làm giảm khả năng hấp thụ chất dinh dưỡng của tế bào từ môi trường, tế bào tăng trưởng chậm.

**Bảng 3.** Ảnh hưởng của pH khác nhau lên khả năng sinh trưởng của rễ tơ sâm Ngọc Linh chuyển gen

Độ pH	Khối lượng tươi (mg)	Khối lượng khô (mg)	Số lượng rễ (rễ/mẫu)	Chiều dài rễ (cm)
4,1	44,00cd*	5,20a	3,33c	1,13c
4,8	48,30cd	5,50d	4,67bc	1,17c
5,1	62,30bc	6,80c	5,33bc	2,20ab
5,8	79,30ab	8,20b	7,33ab	2,90a
6,1	87,30a	9,40a	8,67a	2,80a
6,8	50,70cd	5,10e	4,00bc	1,70bc
7,1	38,70d	4,30f	4,00bc	1,30c

\*Các chữ cái khác nhau (a, b, c...) trong các cột biểu diễn sự khác nhau có ý nghĩa với  $\alpha = 0,05$  trong phép thử Duncan

Do đó, pH được điều chỉnh trong khoảng từ 5,8 đến 6,1 là phù hợp nhất cho quá trình sinh trưởng và phát triển của rễ tơ sâm Ngọc Linh và được sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

### Ảnh hưởng của nhiệt độ lên khả năng sinh trưởng của rễ tơ sâm Ngọc Linh chuyển gen

Kết quả nghiên cứu cho thấy nhiệt độ phòng nuôi cũng ảnh hưởng đến khả năng sinh trưởng của rễ sâm Ngọc Linh (Bảng 4). Nhìn chung, khi nhiệt độ phòng nuôi càng cao thì sự sinh trưởng của rễ sâm Ngọc Linh lại càng giảm thể hiện qua

các chỉ tiêu như tỉ lệ phát sinh rễ, số lượng rễ/mẫu, chiều dài rễ và khối lượng tươi của mẫu. Dưới các điều kiện nhiệt độ nuôi cấy khác nhau, các mẫu cấy đều có khả năng phát sinh rễ cao. Tuy nhiên, khi mẫu được nuôi cấy ở điều kiện nhiệt độ là 28°C thì số lượng rễ hình thành thấp nhất so với ở nhiệt độ 22°C và 25°C. Ở 25°C, mẫu cấy phát sinh rễ tốt nhất với 11,33 rễ/mẫu, chiều dài rễ trung bình là 3,33 cm và khối lượng tươi đạt 102,30 mg (Bảng 4). Nhiệt độ thích hợp nhất cho sự sinh trưởng của rễ tơ sâm Ngọc Linh chuyển gen sau 4 tuần nuôi cấy là 25°C (Hình 2).

Bảng 4. Ảnh hưởng của nhiệt độ lên khả năng sinh trưởng của rễ tơ sâm Ngọc Linh chuyển gen

Nhiệt độ	Khối lượng tươi (mg)	Khối lượng khô (mg)	Số lượng rễ (rễ/mẫu)	Chiều dài rễ (cm)
22°C	74,30b*	8,10c	6,87b	1,87b
25°C	102,30a	12,70a	11,33a	3,33a
28°C	81,00b	8,70b	6,00b	2,33b

\*Các chữ cái khác nhau (a, b, c...) trong các cột biểu diễn sự khác nhau có ý nghĩa với  $\alpha = 0,05$  trong phép thử Duncan



Hình 2. Rễ tơ chuyển gen phát sinh khi nuôi cấy ở các nhiệt độ khác nhau (từ trái sang phải: 22°C, 25°C, 28°C)

### Ảnh hưởng của hàm lượng đường lên khả năng sinh trưởng của rễ tơ sâm Ngọc Linh chuyển gen

Đường là một trong những nhân tố quan trọng trong nuôi cấy mô thực vật. Tùy vào mỗi giai đoạn phát triển khác nhau của thực vật mà đường được bổ sung nhiều hay ít. Rễ là cơ quan đặc biệt ở thực vật hầu như không có diệp lục tố, vì vậy nhu cầu sử dụng đường thường cao hơn các cơ quan khác. Mặt khác, nồng độ đường trong môi trường còn ảnh hưởng đến áp suất thẩm thấu và khả năng hút các chất dinh dưỡng và nước ở thực vật. Nồng độ đường sucrose trong môi trường thay đổi có ảnh hưởng đáng kể đến quá trình tăng sinh rễ (Bùi Trang Việt, 2002). Trong thí nghiệm này, chúng tôi sử dụng môi trường SH có bổ sung sucrose với nồng độ 10 đến 60 g/l và kết quả thu được cho thấy

sự khác biệt ở khối lượng, chiều dài rễ cũng như số lượng rễ hình thành (Bảng 5, Hình 3).

Ở nghiệm thức đối chứng (không bổ sung đường) và nghiệm thức bổ sung đường với nồng độ thấp (10 g/l) cho thấy mẫu cấy có sự phát sinh rễ tơ thấp. Khi gia tăng nồng độ đường trong môi trường từ 20 đến 50 g/l đường, sự hình thành rễ tơ gia tăng đáng kể và sinh khối rễ đạt cao nhất với khối lượng tươi (96,33 mg), khối lượng khô (10,50 mg), số rễ (9,00 rễ/mẫu) và chiều dài rễ (3,30 cm) khi các cụm rễ tơ được nuôi cấy trong môi trường bổ sung 50 g/l sucrose. Theo Khuri và Moorby (1995), nguồn carbon tốt nhất và phổ biến nhất trong nuôi cấy *in vitro* là sucrose ở nồng độ khoảng 2 – 5%, chủ yếu tập trung ở rễ và được hấp thu nhanh. Việc bổ sung đường sucrose vào môi trường nuôi cấy có ảnh

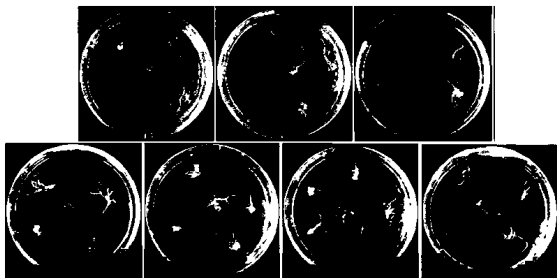
hướng đến sự hình thành và sinh trưởng của rễ được ghi nhận ở các nghiên cứu trên các đối tượng khác nhau như *Panax ginseng* (Inomata *et al.*, 1993), *Datura stramonium* (Holmes *et al.*, 1997), *Lithospermum erythrorhizon* (Sim, Chang, 1997). Trong thí nghiệm này, môi trường bổ sung 40 g/l và 50 g/l sucrose đều thích hợp cho nuôi cấy các mẫu rễ, tuy nhiên, chỉ tiêu khối lượng khô ở nghiệm thức bổ sung 50 g/l sucrose thể hiện tốt hơn so với nghiệm thức bổ sung 40 g/l sucrose. Đây là một chỉ tiêu khá quan trọng trong sản xuất sinh khối rễ sâm

(Kochan *et al.*, 2014). Gần đây, Kochan và đồng tác giả (2014) cũng đã báo cáo về tốc độ tăng trưởng cũng như khối lượng tươi và khô của rễ *Panax quinquefolium* đạt cao nhất ở môi trường bổ sung 50 g/l sucrose. Tuy nhiên, khi nồng độ đường tăng cao, khả năng phát sinh rễ ở mẫu cấy lại suy giảm, điều này phù hợp với những kết quả thu được trong nghiên cứu của Hahn và đồng tác giả (2003) trên rễ của sâm Triều Tiên (*Panax ginseng* C.A. Meyer) và nghiên cứu của Kochan và đồng tác giả (2014) trên rễ của sâm Mỹ (*Panax quinquefolium*).

**Bảng 5.** Ảnh hưởng của hàm lượng đường lên khả năng sinh trưởng của rễ tơ sâm Ngọc Linh chuyển gen

Sucrose (g)	Khối lượng tươi (mg)	Khối lượng khô (mg)	Số lượng rễ (rễ/mẫu)	Chiều dài rễ (cm)
0	33,33d*	4,00g	2,00b	1,67c
10	41,70d	4,60f	2,67b	2,20bc
20	66,00c	7,10e	7,67a	2,47b
30	81,33ab	8,20c	8,33a	2,67ab
40	86,33a	9,30b	8,00a	2,67ab
50	96,33a	10,50a	9,00a	3,30a
60	70,30bc	7,60d	7,67a	2,33bc

\*Các chữ cái khác nhau (a, b, c...) trong các cột biểu diễn sự khác nhau có ý nghĩa với  $\alpha = 0,05$  trong phép thử Duncan



**Hình 3.** Rễ tơ chuyển gen phát sinh trên môi trường bổ sung các hàm lượng đường khác nhau (từ trái sang phải, từ trên xuống dưới 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 g/l)

### Ảnh hưởng của hàm lượng than hoạt tính lên khả năng sinh trưởng của rễ tơ sâm Ngọc Linh chuyển gen

Kết quả nuôi cấy rễ tơ chuyển gen trên môi trường chứa các hàm lượng than hoạt tính khác nhau được thể hiện ở Bảng 6. Sau 8 tuần nuôi cấy, so với

nghiệm thức đối chứng không chứa than hoạt tính, nghiệm thức chứa hàm lượng than hoạt tính trong khoảng 0,5 đến 1,5 g/l cho hiệu quả cao trong quá trình phát sinh rễ chuyển gen. Các chỉ tiêu cao nhất về khối lượng tươi (117,70 mg), khối lượng khô (13,50 mg) số rễ (10,33 rễ/mẫu) và chiều dài rễ (3,66 cm) thu được ở nghiệm thức bổ sung 1 g/l than hoạt tính.

Trương tự như các nghiên cứu trước đây cũng cho thấy bổ sung than hoạt tính vào môi trường nuôi cấy giúp tăng cường phát sinh cơ quan (Kee-Yoeup, Eun-Joo, 2000), gia tăng đáng kể sự hình thành và phát triển rễ ở một số cây thân thảo cũng như thân gỗ (Dumas *et al.*, 1995; Pan *et al.*, 1998). Ngoài ra, trong nghiên cứu của Pan và Staden (1998) ghi nhận than hoạt tính có lợi cho sự tăng trưởng *in vitro* nhưng cũng có thể tác dụng ngược lại. Trong đó, các tác dụng có lợi của than hoạt tính là do các đặc tính sẵn có của nó như màu đen sẽ làm môi trường "tối" nên tạo điều kiện nuôi cấy tương tự như trong đất giúp rễ dễ dàng phát triển và hấp thụ được các chất dinh dưỡng trong môi trường nuôi cấy. Than hoạt tính gồm một cấu trúc mạng lưới các lỗ xơ rỗng với vùng chuyên biệt lớn từ 600 đến 2000 m<sup>2</sup>g<sup>-1</sup> và các lỗ này phân bố từ 10 đến 500 µm cho nên có tính hấp thụ rất lớn, hấp thụ được các độc tố kim hàm sự

phát triển của cây như các phenolic và các oxidase của chất này hay dịch rỉ nâu do môi trường hay mẫu sinh ra. Tuy nhiên, Pan và Staden (1998) cho rằng than hoạt tính có tác động hấp thụ không chọn lọc nên có thể sẽ tạo ra các tác động không tốt lên mẫu nuôi cấy do chúng hấp thụ cả các chất dinh dưỡng và vitamin thiết yếu cho mẫu cấy như thiamine, nicotinic acid, pyridoxine, folic acid, các chất điều hòa sinh trưởng, kiềm, sắt, kẽm và điều này sẽ tiếp tục cho đến khi có sự cân bằng giữa các phân tử bị hấp thụ và không bị hấp thụ. Hơn nữa, khả năng hấp thụ của than hoạt tính tùy thuộc vào nhiều nhân tố như mật độ, độ tinh sạch và pH của môi trường. Ở nghiên cứu này khi bổ sung than hoạt tính ở nồng độ vượt quá 1,5 g/l làm giảm khả năng hình thành và phát sinh của rễ tơ sâm Ngọc Linh, các chỉ tiêu về khối lượng và cũng như số rễ và chiều dài rễ tơ đều giảm (Bảng 6).

**Bảng 6.** Ảnh hưởng của hàm lượng than hoạt tính lên khả năng sinh trưởng của rễ tơ sâm Ngọc Linh chuyển gen

Hàm lượng than hoạt tính (g)	Khối lượng tươi (g)	Khối lượng khô (g)	Số lượng rễ (rễ/mẫu)	Chiều dài rễ (cm)
0	77,33bc*	8,40bc	7,33bc	2,70ab
0,5	82,70bc	8,70b	8,33ab	2,80ab
1,0	117,70a	13,50a	10,33a	3,63a
1,5	85,70b	8,20c	6,00cd	2,93ab
2,0	65,00bc	7,10d	3,67d	2,50b
2,5	61,77bc	5,90e	2,00d	2,67bc
3,0	50,70c	5,20f	2,00d	1,37c

\*Các chữ cái khác nhau (a, b, c,...) trong các cột biểu diễn sự khác nhau có ý nghĩa với  $\alpha = 0,05$  trong phép thử Duncan

**Ảnh hưởng của điều kiện nuôi cấy lên khả năng sinh trưởng rễ tơ sâm Ngọc Linh chuyển gen**

Sau 8 tuần nuôi cấy, hiệu quả sinh trưởng rễ tơ chuyển gen trên ba điều kiện môi trường được trình bày ở Bảng 7 và Hình 4.

Trong thí nghiệm này, các chỉ tiêu có sự khác biệt đáng kể giữa ba điều kiện nuôi cấy. Cụ thể, môi trường lỏng lác cho các chỉ tiêu cao nhất về cả số lượng rễ (25,00 rễ/mẫu), chiều dài rễ (4,37 cm), khối lượng tươi (140,00 mg) và khối lượng khô (13,60 mg). Tiếp theo, sự hình thành rễ tơ giảm dần trên môi trường bán rắn và môi trường rắn. Đáng chú ý, số rễ hình thành trên môi trường lỏng lác cao gấp

3,57 lần môi trường rắn. Rễ tơ hình thành trên môi trường lỏng lác tơ hơn, dài hơn và đồng đều hơn so với các điều kiện môi trường còn lại (Hình 4).

Cụm rễ tơ chuyển gen nuôi cấy trong điều kiện lỏng lác có sự tiếp xúc tích đủ giữa sinh trình hô hấp và môi trường dinh dưỡng nên tốc độ sinh trưởng và phát triển tăng nhanh. Bên cạnh đó, trong điều kiện lỏng lác, môi trường chuyển động đều, lượng oxy hòa tan nhiều hơn, tác động tích cực đến quá trình hô hấp và trao đổi khí giữa mẫu cấy và môi trường (Tâm *et al.*, 2013) Thí nghiệm này cũng cho kết quả tương tự với nghiên cứu của Trương Tấn Nhựt (2011) trên đối tượng cây hoa Thu hải đường (*Begonia tuberosus*) bằng hệ thống air-lift. Gần đây, nghiên cứu của

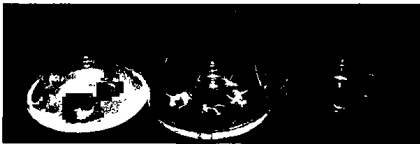
Hồ Thanh Tâm và đồng tác giả (2013) cũng cho thấy sự phát sinh rễ bất định trong môi trường lỏng lác cho hiệu quả cao nhất sau 8 tuần nuôi cấy, sinh khối rễ bất định khi nuôi cấy lỏng lác tăng 45,56 lần so với ban đầu, cao gấp 3 lần so với nuôi cấy bán rắn và cao gấp 4 lần so với nuôi cấy rắn.

Như vậy, sự hình thành rễ tơ sâm Ngọc Linh chuyên gen trong điều kiện môi trường lỏng lác cho kết quả tốt nhất trên tất cả các chỉ tiêu, phù hợp cho việc sinh trưởng sinh khối rễ tạo nguồn vật liệu ban đầu cho nuôi cấy rễ sâm Ngọc Linh trong hệ thống bioreactor ở quy mô thương mại.

**Bảng 7.** Ảnh hưởng của các điều kiện môi trường nuôi cấy lên khả năng sinh trưởng rễ tơ sâm Ngọc Linh chuyên gen

Điều kiện nuôi cấy	Khối lượng tươi (mg)	Khối lượng khô (mg)	Số lượng rễ (rễ/mẫu)	Chiều dài rễ (cm)
Rắn	79,00b*	9,00c	7,00b	2,40b
Bán rắn	92,33b	11,10b	4,00b	2,57b
Lỏng lác	140,00a	13,60a	25,00a	4,37a

\*Các chữ cái khác nhau (a, b, c...) trong các cột biểu diễn sự khác nhau có ý nghĩa với  $\alpha = 0,05$  trong phép thử Duncan



**Hình 4.** Rễ tơ sâm Ngọc Linh chuyên gen phát sinh trên các điều kiện nuôi cấy (từ trái sang phải: rắn, bán rắn, lỏng lác)

## KẾT LUẬN

Sự phát sinh cũng như sinh trưởng và phát triển của rễ tơ sâm Ngọc Linh chuyên gen tốt nhất khi nuôi cấy trong điều kiện tối ở nhiệt độ 25°C trên môi trường khoảng SH bổ sung 8 g/l agar, 50 g/l sucrose, 1 g/l than hoạt tính và pH môi trường được điều chỉnh đến khoảng từ 5,8 đến 6,1.

Nuôi cấy rễ tơ sâm Ngọc Linh chuyên gen trong điều kiện lỏng lác cho hiệu quả vượt trội so với nuôi cấy trên môi trường thạch truyền thống, sinh khối rễ thu được khá cao với lượng rễ nhiều. Đây là tiền đề cho nuôi cấy thu nhận sinh khối rễ tơ sâm Ngọc Linh trong các hệ thống bioreactor với quy mô thương mại, nhằm mục tiêu chủ động tạo nguồn nguyên liệu rễ sạch, hạn chế những dư lượng do chất điều hòa sinh trưởng gây ra, góp phần đem lại những sản phẩm an toàn và tốt cho sức khỏe của người sử dụng.

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

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Lê Trần Bình (2005) Nghiên cứu áp dụng công nghệ gen để tạo cây chuyên gen nâng cao sức chống chịu đối với sâu bệnh và ngoại cảnh bất lợi. *Báo cáo Tổng kết Khoa học Kỹ thuật đề tài KC.04.13*: 9-15.
- Lê Kim Cương, Hoàng Xuân Chiến, Nguyễn Bá Nam, Trịnh Thị Hương, Dương Tấn Nhựt (2012) Ảnh hưởng của một số yếu tố lên khả năng tăng sinh mô sẹo "xốp" và bước đầu nuôi cấy huyền phù tế bào sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.). *Tạp chí Sinh học* 34(3): 265-276.
- Lê Tấn Đức, Nguyễn Hữu Hồ, Nguyễn Văn Uyên (1997) Cấu trúc vector plasmid mang gen kháng sâu và ứng dụng trong tạo cây trồng chuyển gen thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*. *Báo cáo hội nghị khoa học về công nghệ*. 345-350
- Dong NT, Luan TC, Huang NTT (2007) Ngọc Linh ginseng and some medicinal plants belong to Ginseng family. *Sci Tech Publ Hou*: 109-110.
- Dumas E, Monteuis O (1995) *In vitro* rooting of micropropagated shoots from Juvenile and mature *Pinus pinaster* explants - influence of activated charcoal. *Plant Cell Tiss Org Cult* 40: 231-235.



- Duncan DB (1995) Multiple range and multiple F tests *Biometrics* 11: 1-5.
- Flores HE, Vivanco JM, Loyola-Vargas VM (1999) Radicle biochemistry: the biology of root-specific metabolism. *Trends Plant Sci* 4: 220-226.
- Hahn EJ, Kim YS, Yu KW, Joeng CS, Paek KY (2003) Adventitious root cultures of *Panax ginseng* C.A. Meyer and ginsenoside production through large scale bioreactor system. *J Plant Biotechnol* 5(1): 1-5.
- Ho CH, Shanks JV (1992) Effects of initial medium pH on growth and metabolism of *Catharanthus roseus* hairy root cultures - A study with  $^{31}\text{P}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy. *Biotechnol Lett* 14(10): 959-96.
- Holmes P, Si L, Green KD, Ford-Lloyd BV, Thomas NH (1997) Drip tube technology for continuous culture of hairy roots with integrated alkaloid extraction. In Doran PM, ed. *Hairy roots: culture and application*. Harwood Academic Publisher, Amsterdam: 201-208.
- Inomata S, Yokoyama M, Gozu Y, Shimizu T, Yanagi M (1993) Growth pattern and ginsenoside production of *Agrobacterium* transformed *Panax ginseng* roots. *Plant Cell Rep* 12: 681-686.
- Kee-Yoep P, Eun-Joo H (2000) Cytokinins, auxins and activated charcoal affect organogenesis and anatomical characteristics of shoot tip cultures of *Lisianthus* (*Eustoma grandiflorum* Raf Shina). *In Vitro Cell Dev Bio Plant* 36(2): 128-132.
- Khuri S, Moorby J (1995) Investigation into the role of sucrose in potato: Estima microtuber production *in vitro* *Ann Botany* 75: 295-303.
- Kim Y, Wyslouzil BE, Weathers PJ (2002) Secondary metabolism of hairy root cultures in bioreactors. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 38: 1-10.
- Kochan E, Szyman'ska G, Szymczyk P (2014) Effect of sugar concentration on ginsenoside biosynthesis in hairy root cultures of *Panax quinquefolium* cultivated in shake flasks and nutrient sprinkle bioreactor. *Acta Physiol Plant* 35(3): 613-619.
- Lee JG, Seong ES, Goh EJ, Kim NY, Yu CY (2009) Factors involved in mass propagation of ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer) using bioreactor system. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 52(5) 466-471.
- Nguyễn Đức Lượng, Lê Thị Thủy Tiên (2006) *Công nghệ tế bào*. Nxb Đại học Quốc gia Tp Hồ Chí Minh: 357.
- Mallol A, Casadó MR, Palazón J, Bonfill M, Morales C, Piñol MT (2001) Ginsenoside production in different phenotypes of *Panax ginseng* transformed roots. *Phytochemistry* 57(3): 365-371.
- Mishra BN, Ranjan R (2008) Growth of hairy-root cultures in various bioreactors for the production of secondary metabolites. *Biotech Appl Biochem* 49(1): 1-10.
- Dương Tấn Nhựt (2011) *Công nghệ sinh học thực vật, tập 3*. Nxb Nông nghiệp: 175-183
- Hà Thị Mỹ Ngân, Trịnh Thị Hương, Nguyễn Bá Nam, Lê Kim Cương, Nguyễn Phúc Huy, Vũ Thị Hiền, Vũ Quốc Luận, Nguyễn Hồng Hoàng, Ngô Thanh Tài, Nguyễn Đình Khôi, Phạm Bích Ngọc, Chu Hoàng Hà, Dương Tấn Nhựt (2013) Chuyển gen tạo rễ to sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) qua trung gian vi khuẩn *Agrobacterium rhizogenes*. *Tap chí Công nghệ Sinh học* 11(3): 479-486.
- Pan MJ, Staden VJ (1998) The use of charcoal in *in vitro* culture: review. *J Plant Grow Reg* 26: 155-163.
- 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.
- Sim SJ, Chang HN (1997) *Shikonin production by hairy root of Lithospermum erythrorhizon in bioreactors with in situ separation*. In Doran PM, ed. *Hairy roots culture and applications*. Harwood Academic Publishers, Australia: 219-225
- Skirvin RM, Chu MC, Mary L, Heather Y, Thomas F (1986) Stability of tissue culture medium pH as a function of autoclaving, time and cultured plant material. *Plant Cell Rep* 4: 292-294.
- Srivastava S, Srivastava AK (2007) Hairy root culture for mass production of high value secondary metabolites. *Crit Rev Biotech* 27(1): 29-43.
- Hồ Thanh Tâm, Nguyễn Bá Nam, Hoàng Xuân Chiến, Lê Kim Cương, Ngô Thanh Tài, Nguyễn Việt Cường, Nguyễn Phúc Huy, Dương Tấn Nhựt (2013) Tối ưu hóa một số yếu tố môi trường và điều kiện nuôi cấy đến quá trình tái sinh rễ bất định sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.). *Hội nghị Sinh học toàn quốc khu vực miền Nam lần thứ III*.
- Nguyễn Quang Thạch, Nguyễn Thị Lý Anh, Phạm Kim Ngọc, Trần Văn Minh, Nguyễn Thị Phương Thảo (2009) *Cơ sở công nghệ sinh học, tập 3 Công nghệ tế bào*. Nxb Giáo dục: 548.
- Bùi Trang Việt (2002) *Sinh lý thực vật đại cương, phần II Phát triển*. Nxb Đại học Quốc gia Tp HCM: 328-329.

**THE EFFECT OF MEDIUM COMPONENTS ON THE GROWTH OF TRANSGENIC *PANAX VIETNAMENSIS* HAIRY ROOTS**

Nguyen Hong Hoang<sup>1</sup>, Trinh Thi Huong<sup>1</sup>, Le Kim Cuong<sup>1</sup>, Vu Thi Hien<sup>1</sup>, Nguyen Ba Nam<sup>1</sup>, Nguyen Phuc Huy<sup>1</sup>, Vu Quoc Luan<sup>1</sup>, Ha Thi My Ngan<sup>1</sup>, Pham Bich Ngoc<sup>2</sup>, Chu Hoang Ha<sup>2</sup>, Duong Tan Nhut<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology,

**SUMMARY**

Production of valuable secondary metabolites using plant cell, tissue and organ cultures generally hampered by low productivity and residual growth regulators might affect on the safety of products and the health of users. Hairy roots derived from *in vitro* culture in combination with gene transfer techniques could resolve those problems. The aim of this study was to investigate effect of medium components including mineral composition, sugar content, substrate, pH, temperature, and concentration of activated charcoal on growth of *Panax vietnamensis* hairy roots infected with *Agrobacterium rhizogenes* ATCC 15834. After 2 months, the results indicated that SH medium supplemented with 8 g/l agar, 50 g/l sucrose, and pH adjusted to 5.8 – 6.1 was suitable for the growth of hairy root lines. The hairy root lines cultured in the darkness at 25°C resulted in the highest number of roots, root fresh weight and dry weight. Furthermore, adding 1% (w/v) activated charcoal into the culture medium led to a positive effect on root proliferation. In addition, hairy root lines cultured in shake flask system was also significantly better than those cultured on semi-solid medium with agar. In this initial study, some hairy root lines of *Panax vietnamensis* were collected based on different morphological characteristics. These lines would be the good resources for bioreactor culture as well as studies on root biomass of *Panax vietnamensis*.

**Keywords:** *Agrobacterium rhizogenes*, hairy roots, medium components, *Panax vietnamensis*, transformation