

TĂNG CƯỜNG KHẢ NĂNG HÌNH THÀNH VÀ PHÁT TRIỂN RỄ THỨ CẤP TỪ RỄ BẮT ĐỊNH SÂM NGỌC LINH (*PANAX VIETNAMENSIS*) NUÔI CÂY *IN VITRO*

Nguyễn Thị Nhật Linh^{1,2}, Hoàng Thanh Tùng^{1,2}, Nguyễn Hoàng Lộc², Dương Tấn Nhật¹

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

Ngày nhận bài: 19.5.2015

Ngày nhận đăng: 30.6.2015

TÓM TẮT

Sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) là một cây dược liệu quý hiện nay của Việt Nam và thế giới. Trong đó, bộ phận rễ sâm được cho là nơi tích lũy nhiều dược chất phục vụ các ngành sản xuất dược mỹ phẩm. Sâm Ngọc Linh còn có rất nhiều công dụng khác như bồi bổ sức khỏe, tăng cường sinh lực, điều hòa huyết áp,... Trước tình trạng ngày càng cạn kiệt nguồn sâm tự nhiên, phương pháp nuôi cấy mô đã được ứng dụng để nhân nhanh loài sâm này, đặc biệt là nuôi cấy thu nhận sinh khối rễ có thể sản xuất trực tiếp được các sản phẩm hay nguyên liệu đầu vào cho các ngành hóa dược phẩm trong thời gian rất ngắn. Nghiên cứu này đi sâu vào cải thiện quá trình hình thành và phát triển rễ thứ cấp của từng rễ bắt định đơn lẻ. Mỗi rễ bắt định, được tách từ mẫu cuống lá, sau đó, cắt bỏ phần chóp rễ với kích thước 2 cm là nguồn mẫu thích hợp nhất để tạo rễ thứ cấp (94.33%). Sau 48 ngày nuôi cấy, rễ thứ cấp tăng sinh và đạt tối ưu khi cấy trên môi trường MS bổ sung 7,0 mg/l IBA kết hợp với 0,5 mg/l BA với đa số các chỉ tiêu thu được cao gần gấp đôi so với B5 và khối lượng khô của rễ thứ cấp cao hơn môi trường SH. Các tỷ lệ $NH_4^+ : NO_3^-$ trên môi trường MS có ảnh hưởng đáng kể lên sự hình thành rễ, tại tỷ lệ 7,2:18,5 mM:mM là tốt nhất cho rễ thứ cấp tăng sinh và phát triển. Ngoài ra, khối lượng khô của rễ thứ cấp có thể gia tăng đáng kể sau 56 ngày nuôi cấy ở điều kiện 80% tối. Kết quả thu được đã cải thiện đáng kể nguồn rễ phục vụ cho các nuôi cấy lớn trong các hệ thống bioreactor.

Từ khóa: môi trường MS, *Panax vietnamensis*, rễ bắt định, rễ thứ cấp, $NH_4^+ : NO_3^-$

MỞ ĐẦU

Sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) là một nguồn dược liệu quý hiện nay của Việt Nam và thế giới. Kể từ lần đầu tiên được biết đến và nghiên cứu vào năm 1973 đến nay, loài sâm này đã được các nhà nghiên cứu xác định là có chứa hơn 54 hợp chất saponin, hơn hẳn một số loài sâm nổi tiếng hiện nay trên thế giới, trong đó MR2 chiếm khoảng 50% hàm lượng saponin tổng, là dược chất chính của sâm này giúp giảm stress, chống ung thư và kháng khuẩn (Luan et al., 2001). Ngoài ra, sâm Ngọc Linh còn có rất nhiều công dụng khác như bồi bổ sức khỏe, tăng cường sinh lực, điều hòa huyết áp, chống oxy hóa, hoạt lực tốt với một số loại thuốc kháng sinh,... Trước tình trạng ngày càng cạn kiệt nguồn nguyên liệu tự nhiên, phương pháp nuôi cấy mô đã được ứng dụng để nhân nhanh loài sâm này, đặc biệt là phương pháp nuôi cấy thu nhận sinh khối rễ có thể sản xuất trực tiếp được các sản phẩm hay nguyên liệu đầu vào cho các ngành hóa dược phẩm trong thời gian rất ngắn, như trong nuôi cấy rễ bắt định sâm Ngọc Linh chỉ mất khoảng 2 tháng trong

khi trồng cây giống mất ít nhất 4-5 năm mới thu hoạch được (Trần Hiếu et al., 2014). Các rễ bắt định được phát sinh từ trục thân hay những cơ quan tự nhiên khác nhau (Geneve et al., 1988) Khi tiếp tục nuôi cấy các rễ này sẽ phát sinh tạo rễ thứ cấp (RTC).

Rễ thứ cấp (thường được gọi là rễ bên) là các rễ hình thành từ các mô sâu bên trong rễ ở các vùng ngoại vi của trụ bì trưởng thành ở những khoảng cách khác nhau so với các mô phân sinh đỉnh của rễ (Lavenus et al., 2013). Theo Yun-soo và đồng tác giả (2003), các rễ thứ cấp sâm *Panax ginseng* C.A. Meyer hình thành từ các rễ bắt định 8 tuần tuổi chỉ mất khoảng 2 tuần nuôi cấy. Từ nghiên cứu đầu tiên về nuôi cấy tạo rễ bắt định sâm Ngọc Linh phát sinh rễ thứ cấp trong bioreactor của Dương Tấn Nhật và đồng tác giả (2009), các nghiên cứu tạo rễ thứ cấp từ các mẫu rễ bắt định vẫn còn rất hạn chế và cần được hoàn thiện hơn nên chúng tôi đã tập trung vào vấn đề cải thiện sự hình thành và tăng sinh của rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh *in vitro* để tạo nguồn nguyên liệu ban đầu cho các nuôi cấy lớn như trong hệ thống bioreactor.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguồn mẫu

Mẫu rễ bất định (RBD) 30 ngày tuổi, dài 1-2 cm, được tách ra từ các cụm rễ bất định nuôi cấy trên môi trường SH (Schenk, Hildebrandt, 1972) bổ sung 5 mg/l IBA (Hồ Thanh Tâm *et al.*, 2013).

Khảo sát sự hình thành rễ thứ cấp từ các nguồn rễ bất định khác nhau

Các rễ bất định (dài 1-2 cm) có nguồn gốc từ mẫu lá, cuống lá hay củ, được tách ra, giữ nguyên hay cắt bỏ chóp rễ, tiếp đó được cấy lên môi trường SH bổ sung 5 mg/l IBA, 30 g/l sucrose và 8 g/l agar, pH=5,8 nhằm đánh giá khả năng hình thành rễ thứ cấp (RTC) của từng nguồn mẫu với các kích thước khác nhau (1 hoặc 2 cm). Các chỉ tiêu thu được sau 48 ngày nuôi cấy gồm tỷ lệ tạo RTC (%), ngày khởi tạo RTC, số RTC/RBD, chiều dài RTC (cm) và khối lượng tươi (mg).

Khảo sát ảnh hưởng của auxin lên sự hình thành rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh

Các mẫu RBD hình thành từ cuống lá, được cắt bỏ phần chóp rễ và cấy lên môi trường SH có bổ sung các loại auxin riêng lẻ (NAA, IBA, IAA) ở các nồng độ khác nhau (0; 3; 5; 7; 9 mg/l) chứa 30 g/l sucrose và 8 g/l agar, pH=5,8. Sau 48 ngày ghi nhận các chỉ tiêu: tỷ lệ tạo RTC (%), số RTC/RBD, chiều dài RTC (cm), khối lượng tươi và khô của mẫu (mg).

Khảo sát ảnh hưởng của auxin kết hợp với cytokinin lên sự hình thành rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh

Các mẫu RBD hình thành từ cuống lá, được cắt bỏ phần chóp rễ và cấy lên môi trường SH có bổ sung loại và nồng độ auxin khảo sát được ở trên kết hợp với các cytokinin khác nhau ở các nồng độ: 0,0; 0,1; 0,5; 1,0; 2,0 mg/l Kin hay BA và 0,0; 0,01; 0,05; 0,1; 0,2 mg/l TDZ và bổ sung 30 g/l sucrose và 8 g/l agar, pH=5,8. Số liệu được ghi nhận sau 48 ngày nuôi cấy gồm tỷ lệ tạo RTC (%), số RTC/RBD, chiều dài RTC (cm), khối lượng tươi và khô của mẫu (mg).

Khảo sát ảnh hưởng của các loại môi trường nuôi cấy khác nhau lên sự hình thành rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh

Các mẫu rễ bất định cắt bỏ chóp rễ và tách ra khỏi khối mô ban đầu được cấy lên 3 loại môi trường khác nhau MS (Murashige, Skoog, 1962), SH, và B5 (Gamborg *et al.*, 1968) có 30 g/l sucrose và 8 g/l agar và bổ sung auxin kết hợp cytokinin ở nồng độ

tối ưu nhất khảo sát được từ các thí nghiệm trên, pH=5,8. Sau 48 ngày nuôi cấy, các chỉ tiêu về tỷ lệ tạo RTC (%), ngày khởi tạo RTC, số RTC/RBD, chiều dài RTC (cm), khối lượng tươi và khô của mẫu (mg) được ghi nhận.

Khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ $NH_4^+ : NO_3^-$ lên sự hình thành rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh

Môi trường MS được cải tiến bằng cách thay đổi tỷ lệ $NH_4^+ : NO_3^-$ thông qua thay đổi các tỷ lệ $NH_4H_2PO_4 : KNO_3$ (0,0:18,50; 7,19:18,50; 14,38:18,50; 21,57:18,50; 14,38:0,00; 14,38:18,80; 14,38:28,20; 14,38:28,2 mM/mM), bổ sung auxin kết hợp cytokinin ở nồng độ tối ưu nhất khảo sát được từ các thí nghiệm trên, 30 g/l sucrose và 8 g/l agar, pH=5,8. Số liệu được ghi nhận sau 48 ngày nuôi cấy gồm tỷ lệ tạo RTC (%), số RTC/RBD, chiều dài RTC (cm), khối lượng tươi của RTC (mg), khối lượng khô của RTC (mg).

Khảo sát điều kiện chiếu sáng lên khả năng tăng sinh của rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh

Các mẫu rễ bất định cắt bỏ chóp rễ được cấy lên môi trường tối ưu khảo sát được từ các thí nghiệm trên. Sau đó, những mẫu này được đặt trong các điều kiện chiếu sáng khác nhau: 100% tối (trong tối hoàn toàn); 80% tối : 20% sáng (42 ngày tối hoàn toàn và 14 ngày sáng); 50% tối : 50% sáng (28 ngày tối và 28 ngày sáng) và 100% sáng để đánh giá tác động của các giai đoạn chiếu sáng lên khả năng tăng sinh của RTC. Số liệu được ghi nhận sau 56 ngày (sau 48 ngày nuôi cấy, khả năng tăng sinh của RTC hình thành dưới điều kiện chiếu sáng khác nhau chưa có khác biệt lớn về hình thái, đến ngày thứ 56 thì các RTC này tăng sinh mạnh và tạo thêm nhiều mới; vì vậy, chúng tôi tiến hành ghi nhận số liệu ở ngày 56) nuôi cấy gồm tỷ lệ tạo RTC (%), số RTC/RBD, chiều dài RTC (cm), khối lượng tươi của RTC (mg) và khối lượng khô của RTC (mg).

Điều kiện thí nghiệm

Các thí nghiệm được tiến hành ở nhiệt độ $25 \pm 2^\circ C$, độ ẩm trung bình 55-60%, mẫu đặt trong tối hoàn toàn hay sáng tùy mục đích thí nghiệm, các thí nghiệm ngoài sáng có cường độ chiếu sáng khoảng $40-45 \mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ với chu kỳ chiếu sáng 16 giờ/ngày.

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

Ảnh hưởng của nguồn mẫu lên khả năng hình thành rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh

Trong nghiên cứu này, việc ức chế phát triển rễ chính được thực hiện bằng cách loại bỏ chóp rễ đã mang hiệu quả lớn trong việc tạo RTC, tỷ lệ tạo RTC của RBD bỏ chóp rễ (75-83% ở RBD từ củ; 79-94,33% ở RBD từ cuống; 82,33-93,33% ở RBD từ lá) cao hơn hẳn khi không bỏ chóp rễ (48,33-60% ở RBD từ củ; 46-53,67% ở RBD từ cuống; 31,67-46,67% ở RBD từ lá), và số RTC của RBD này từ mẫu cuống (10-13,67 RTC) và củ (8,33-13,33 RTC)

nhiều gần gấp đôi so với mẫu nguyên không bỏ chóp rễ từ mẫu cuống (1,33-3 RTC) và củ (0,67-4,03 RTC) (Hình 1, Bảng 1).

Điều này có thể giải thích do quá trình phát triển của hệ thống rễ là một quá trình phát sinh hình thái tại vị trí mà các cơ quan thứ cấp mới được hình thành thông qua việc huy động định kỳ các tế bào trụ bì để chuyển thành những tiền tế bào của các rễ thứ cấp mới (Gregory, 2009) mà các tế bào trụ bì chủ yếu nằm ở miền sinh trưởng cách chóp rễ một đoạn. Hơn nữa, sự kéo dài của rễ sơ cấp thường bị ức chế để tăng cường sự phát triển rễ bên (Chun-Lin *et al.*, 2010).

Bảng 1. Ảnh hưởng của nguồn mẫu lên khả năng hình thành rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh.

Nguồn tạo RBD	Dạng mẫu tách	Kích thước (cm)	Tỷ lệ tạo RTC (%)	Ngày khởi tạo RTC	Số RTC	Chiều dài RTC (cm)	Khối lượng tươi (mg)
Lá	Không bỏ chóp rễ	1	31,67e*	47,00a	0,33h	0,37f	29,33g
		2	46,67d	45,33a	2,00efg	0,83f	39,67f
	Bỏ phần chóp rễ	1	82,33b	46,00a	2,33ef	2,00e	65,00c
		2	93,33a	40,00cd	7,33c	3,33bc	73,00b
Cuống	Không bỏ chóp rễ	1	46,00d	45,67a	1,33fgh	1,67e	30,33g
		2	53,67cd	41,33c	3,00e	5,23a	49,67e
	Bỏ phần chóp rễ	1	79,00b	37,00fg	10,00b	3,13cd	57,67d
		2	94,33a	35,67g	13,67a	5,60a	78,00a
Củ	Không bỏ chóp rễ	1	48,33d	46,00a	0,67gh	0,67f	42,33f
		2	60,00c	43,00b	6,00d	4,03b	51,00e
	Bỏ phần chóp rễ	1	75,00b	39,33de	8,33c	2,33de	56,33d
		2	83,33b	38,33ef	13,33a	5,00a	71,33b

Ghi chú: *Các chữ cái a, b, c thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa ở mức tin cậy p < 0,05 trong phép thử Duncan.

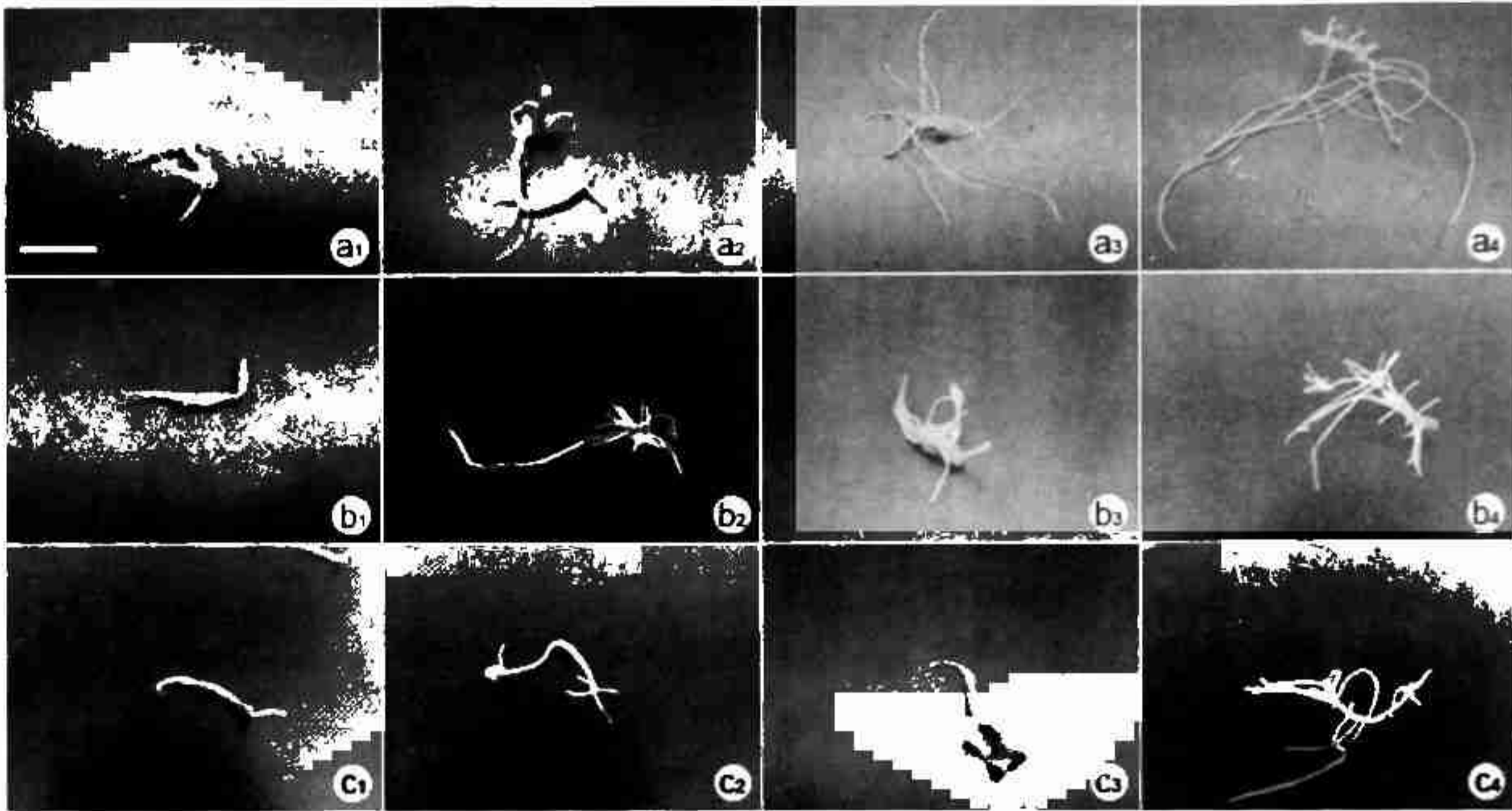
Kích thước và nguồn mẫu ban đầu tạo RBD cũng ảnh hưởng đến khả năng tạo RTC, khi chúng tôi khảo sát mẫu ở hai loại kích thước (1 cm và 2 cm) của 3 loại RBD từ mẫu lá, cuống lá và củ thì mẫu rễ kích thước 2 cm cho hiệu quả phát sinh RTC cao, tỷ lệ tạo RTC của RBD cùng trên nguồn mẫu cuống lá đã bỏ chóp rễ với kích thước 2 cm (94,33%) cao hơn hẳn mẫu có kích thước 1 cm (79%), tương tự ở các mẫu RBD từ lá không bỏ hay bỏ chóp rễ thì kích thước cũng có ảnh hưởng đến sự phát sinh RTC còn ở RBD đã bỏ chóp rễ từ mẫu củ thì không có khác biệt nhiều (Hình 1, Bảng 1). Hơn nữa, chiều dài RTC hình thành từ RBD dài 2 cm trên cùng nguồn mẫu cuống lá (5,23-5,6 cm) cũng có chiều dài lớn hơn mẫu RBD dài 1 cm (1,67-3,13 cm). Theo kết quả từ bảng 1 còn cho thấy số rễ phụ thuộc rất lớn vào kích thước ban đầu của RBD như ở mẫu RBD từ củ chưa bỏ chóp rễ ở kích

thước 1 cm chỉ có 0,67 RTC còn ở kích thước 2 cm lên tới 6 RTC (Hình 1, Bảng 1). Kết quả thí nghiệm cũng cho thấy rằng, các rễ thứ cấp sau ngày khởi tạo sẽ hình thành rễ mới và tăng sinh rất nhanh, điển hình như mẫu lá bỏ phần chóp rễ, sau khi khởi tạo 2 ngày thì các rễ mới hình thành được khoảng 2 cm (tương đương với 1 cm/ngày).

Ngoài ra, các nguồn mẫu ban đầu tạo RBD cũng có ảnh hưởng nhất định lên khả năng hình thành và phát triển của RTC, mẫu RBD từ cuống lá ở kích thước 2 cm phát sinh RTC tốt hơn RBD từ mẫu lá và củ với tỷ lệ tạo RTC của RBD từ cuống lá có cùng kích thước (2 cm) và dạng mẫu tách (bỏ chóp rễ) (94,33%) cao hơn đáng kể so với từ củ (83,33%), ngày khởi tạo RTC ngắn hơn 3 ngày so với mẫu củ, 5 ngày so với mẫu lá; số RTC (13,67 RTC) và chiều dài RTC (5,6 cm) lớn

hơn so với mẫu RBD từ lá (7,33 RTC, 3,33 cm) nhưng gần bằng với mẫu RBD từ củ (13,33 RTC, 5 cm); khối lượng tươi (78 mg) cũng cao hơn mẫu RBD từ lá (73 mg), củ (71,33 mg) (Hình 1, Bảng 1).

Chính vì thế, RBD không có chóp rễ với kích thước 2 cm có nguồn gốc ban đầu từ mẫu cuống lá là tốt nhất và được chọn làm nguồn mẫu cho các nghiên cứu tiếp theo.



Hình 1. Ảnh hưởng của nguồn rễ bất định lên khả năng tạo rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh *in vitro*. a. Cuống lá; b. Củ; c. Lá: 1. RBD dài 1 cm; 2. RBD dài 2 cm, 3. RBD bỏ chóp rễ dài 1 cm, 4. RBD bỏ chóp rễ dài 2 cm. Thanh bar dài 1 cm.

Ảnh hưởng của auxin đến sự hình thành rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh

Khi nghiên cứu tác động của các auxin ngoại

sinh lên khả năng hình thành rễ thứ cấp của các mẫu rễ bất định sâm Ngọc Linh, hầu hết các mẫu khởi tạo rễ bắt đầu sau khoảng 35-40 ngày, đến ngày thứ 48, các kết quả thu được ghi nhận ở bảng 2.

Bảng 2. Ảnh hưởng của auxin lên sự hình thành rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh.

Auxin (mg/l)	Tỷ lệ tạo RTC (%)	Số RTC	Chiều dài RTC (cm)	Khối lượng tươi (mg)	Khối lượng khô (mg)	
NAA	0	0,00f*	0,00j	0,00f	23,33h	1,33i
	3	60,00e	7,67g	0,83e	40,2g	2,70h
	5	78,33c	13,67d	1,83d	47,67f	4,00fg
	7	59,33e	15,67b	3,13c	62,67d	5,70d
	9	63,33de	7,33g	4,67b	65,00d	5,00de
IBA	3	78,33c	9,00f	1,77d	54,67e	5,67d
	5	93,67ab	16,00b	5,17b	115,33c	11,00b
	7	96,33ab	17,67a	6,00a	158,33a	15,27a
	9	98,67a	14,67c	4,60b	140,33b	11,63b
IAA	3	66,67d	5,33i	1,03e	32,00g	1,33i
	5	90,00b	6,33h	1,83d	48,33f	3,17gh
	7	91,67b	12,33e	3,33c	56,33e	4,67ef
	9	90,00b	12,67e	3,56c	66,67d	6,83c

Ghi chú: *Các chữ cái a, b, c thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa ở mức tin cậy $p < 0,05$ trong phép thử Duncan.

Trong nghiên cứu này, trên môi trường không có auxin sau 48 ngày hoàn toàn không tạo RTC, như vậy, hàm lượng auxin nội sinh của các rễ bất định đơn lẻ đã tách bỏ chóp rễ có thể rất thấp không đủ để khởi phát RTC. Nhìn chung, trong các loại và nồng độ auxin, 7 mg/l IBA tạo nhiều rễ bất định nhất khoảng 17 RTC/RBD; với chiều dài đạt 6 cm, khối lượng tươi là 158 mg, khối lượng khô 15,27 mg/l gấp đôi IAA và gần 1,5 lần NAA ở cùng nồng độ, mặt khác, NAA cảm ứng tạo rễ kém nhất với có tỷ lệ tạo RTC thấp dưới 78% (Bảng 2).

Các auxin đóng vai trò chính trong điều hòa quá trình hình thành và kéo dài rễ thứ cấp. Auxin tăng cường các hoạt động sớm nhất trong quá trình phát sinh rễ bên như tạo môi kích thích, chuyên hóa các tiền tế bào và khởi tạo rễ cũng như các giai đoạn tạo mầm rễ

và nảy rễ sau đó (Agnieszka, 2012). Trong các loại auxin, IBA cho kết quả tốt nhất lên sự hình thành và phát triển RTC sâm Ngọc Linh, điều này cũng được khẳng định bởi nhiều nghiên cứu khác (Trần Hiếu *et al.*, 2014; Jae *et al.*, 2009; Yun-Soo *et al.*, 2005).

Ảnh hưởng của auxin kết hợp với cytokinin lên sự hình thành rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh

Kết quả trên cho thấy RTC sâm Ngọc Linh từ mẫu RBD của cuống lá hình thành và phát triển phát triển trên môi trường SH có 7 mg/l IBA là tốt nhất, vì vậy nồng độ này được sử dụng để kết hợp với các cytokinin ở nồng độ thấp hơn để đánh giá hiệu quả bổ sung thêm cytokinin trong nuôi cấy tạo RTC. Sau 48 ngày, chúng tôi thu được một số kết quả được thể hiện ở bảng 3.

Bảng 3. Ảnh hưởng của auxin kết hợp với cytokinin lên sự hình thành rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh.

Cytokinin	Nồng độ (mg/l)	Tỷ lệ tạo RTC (%)	Số RTC	Chiều dài RTC (cm)	Khối lượng tươi (mg)	Khối lượng khô (mg)	Đặc điểm rễ
Kin	0,00	94,5a*	13,75a	4,38a	87,75f	4,75h	Màu trắng trong, mảnh
	0,10	81,50b	5,75c	0,95cd	85,50f	6,5gh	Vàng nhạt và mập
	0,50	68,75cd	4,00de	0,73cd	121,00e	13,75de	Vàng tươi và mập
	1,00	47,50f	2,75ef	0,43cd	229,00b	17,00bc	Vàng tươi và mập
	2,00	25,00g	1,50fg	0,20d	70,25f	5,98gh	Nâu và sưng phồng
BA	0,00	94,5a	13,75a	4,38a	87,75f	4,75h	Màu trắng trong, mảnh
	0,10	85,00ab	10,25b	3,50a	125,25e	7,75g	Trắng ngà và mập
	0,50	92,50a	12,50a	4,00a	260,25a	21,50a	Trắng ngà và mập
	1,00	77,50bc	4,75cd	1,50bc	132,25e	12,25ef	Trắng ngà và mập
	2,00	56,25ef	1,75fg	0,70cd	164,25d	11,78ef	Trắng ngà và mập
TDZ	0,00	94,5a	13,75a	4,38a	87,75f	4,75h	Màu trắng trong, mảnh
	0,01	82,75b	4,00de	2,25b	117,50f	10,23f	Vàng và mập
	0,05	65,00de	2,75ef	2,18b	233,00ab	15,25cd	Vàng và mập
	0,10	30,00g	1,50fg	0,65cd	196,25c	18,50b	Vàng và mập, hơi trương nước
	0,20	10,00h	0,750g	0,13d	60,00f	5,00h	Nâu và phồng lên

Ghi chú: *Các chữ cái a, b, c thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa ở mức tin cậy p < 0,05 trong phép thử Duncan.

Từ bảng 3, chúng tôi thấy rằng khi bổ sung các cytokinin vào thì làm giảm đáng kể tỷ lệ tạo rễ, số rễ và chiều dài rễ, đặc biệt ở nghiệm thức có TDZ và Kin. Bên cạnh đó, do hiệu ứng của cytokinin làm tăng sự phân hóa và giãn dài tế bào theo chiều dọc, làm các rễ củ phình to lên và tăng khả năng dự trữ (Nguyễn Du Sanh, 1998) nên có lẽ vì vậy RTC và RBD không chỉ gia tăng kích thước theo chiều ngang mà khối lượng khô của chúng cũng có sự gia tăng

đáng kể trong tất cả các nghiệm thức có cyokinin (Bảng 3). Việc gia tăng khối lượng của các mẫu rễ bất định nhờ kết hợp giữa auxin với cytokinin cho quá trình nuôi cấy rễ cũng đã được ghi nhận trong nghiên cứu của Xi-Hua và đồng tác giả (2010). Mặt khác, hình thái RBD hay RTC trên môi trường có cyokinin cũng có sự khác biệt rõ ràng hơn từ mẫu rễ màu trắng trong và rất mảnh ở nghiệm thức đối chứng (chỉ có IBA) thì các nghiệm thức có cytokinin

lại có màu trắng ngà hay vàng tươi, vàng và một số mẫu thì bị phồng rộp lên và hóa nâu dần từ ngoài vào trong.

Trong tất cả nghiệm thức thì các nghiệm thức bổ sung BA ít ảnh hưởng đến sự hình thành và kéo dài RTC nhất, trong đó ở nghiệm thức kết hợp với 0,5 mg/l BA được xem là tối ưu nhất vì màu rễ chỉ chuyển sang trắng ngà; khối lượng tươi và khối lượng khô của RTC (260,25 mg, 21,5 mg; tương ứng) lại đạt cao nhất; và tỷ lệ tạo RTC (92,5%), số lượng RTC (12,5 RTC) và chiều dài RTC (4 cm) cao hơn hẳn các nghiệm thức bổ sung TDZ và Kin và tương đương với đối chứng (chỉ có 7 mg/l IBA). Thêm vào đó, khi kết hợp auxin với cytokinin ở nồng độ thấp cũng có thể giúp tăng cường sự hình thành và tăng sinh rễ *de novo* (Tatiana, 2011). Chính vì thế, việc tìm ra tỷ lệ auxin/cytokinin thích hợp cho

RTC hình thành và tăng sinh là rất cần thiết, chúng có thể tạo sự khác biệt rất lớn trong tạo RTC *in vitro* vì kết hợp cả hai chất điều hòa sinh trưởng thực vật này giúp thiết lập tầng thượng chức năng của rễ để rễ tiếp tục phát triển và tạo RTC (Gregory, 2009).

Chính vì thế, chúng tôi đã chọn môi trường có bổ sung 7 mg/l IBA kết hợp với 0,5 mg/l BA để tiến hành các nghiên cứu kế tiếp.

Ảnh hưởng của các loại môi trường nuôi cấy khác nhau lên sự hình thành rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh

Trong nghiên cứu này, các mẫu RBD đơn này sau 48 ngày nuôi cấy trên các môi trường SH, MS, B5 có bổ sung 7 mg/l IBA và 0,5 mg/l BA có những đặc điểm khác biệt nhất định trong quá trình hình thành và tăng sinh RTC được mô tả trên bảng 4.

Bảng 4. Ảnh hưởng của các môi trường khác nhau lên sự hình thành và phát triển rễ thứ cấp của rễ bất định sâm Ngọc Linh.

Môi trường	Tỷ lệ tạo RTC (%)	Ngày khởi tạo rễ	Số RTC	Chiều dài RTC (cm)	Khối lượng tươi (mg)	Khối lượng khô (mg)	Đặc điểm rễ
SH	78,70b*	30,25b	16,50b	3,63b	206,75c	20,75b	RTC màu trắng ngà trong, rất dài và hơi mảnh, rễ chính màu trắng ngà trong và hơi mảnh
MS	92,50a	34,25a	18,26a	4,50a	346,25a	31,25a	RTC màu trắng đục, dài và rất mập, rễ chính hơi ngà vàng và dày
B5	82,50ab	30,75b	14,00c	1,35c	312,25b	21,75b	RTC màu vàng nâu, rất ngắn và hơi mập, rễ chính hóa nâu phồng dày lên

Ghi chú: *Các chữ cái a, b, c thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa ở mức tin cậy $p < 0,05$ trong phép thử Duncan.

Khả năng hình thành RTC của các mẫu RBD đơn đã loại bỏ chóp rễ phụ thuộc chủ yếu vào tỷ lệ các chất điều hòa sinh trưởng. Ngoài ra, loại môi trường nuôi cấy cũng có ảnh hưởng lên quá trình phát triển của mẫu RBD. Theo nghiên cứu về RBD sâm Ngọc Linh của Nguyễn Thị Liễu và đồng tác giả (2010) cho thấy RBD tạo nhiều rễ nhất trên môi trường B5 chỉ có 0,5 mg/l IBA và không bổ sung cytokinin. Trong nghiên cứu này, đa số RTC phát triển tốt trên môi trường MS với các chỉ tiêu khác cao hơn đáng kể nhưng ngày khởi tạo rễ chậm hơn khoảng 3-4 ngày (Hình 2, Bảng 4). RTC phát triển tốt trên cả môi trường SH và MS với các đặc điểm rễ không bị vàng và hóa nâu hay phồng dày lên như ở môi trường B5, hơn nữa, hầu hết chỉ tiêu thu được trên môi trường B5 rất thấp với số rễ, chiều dài rễ, khối lượng khô chỉ gần một nửa so với MS (Hình 2, Bảng 4). Theo nghiên cứu của Aye và

đồng tác giả (2012), khả năng phát triển và tăng sinh của RBD cây hoàng kỳ (*Astragalus membranaceus*) cũng đạt khối lượng cao nhất khi nuôi cấy trên môi trường MS.

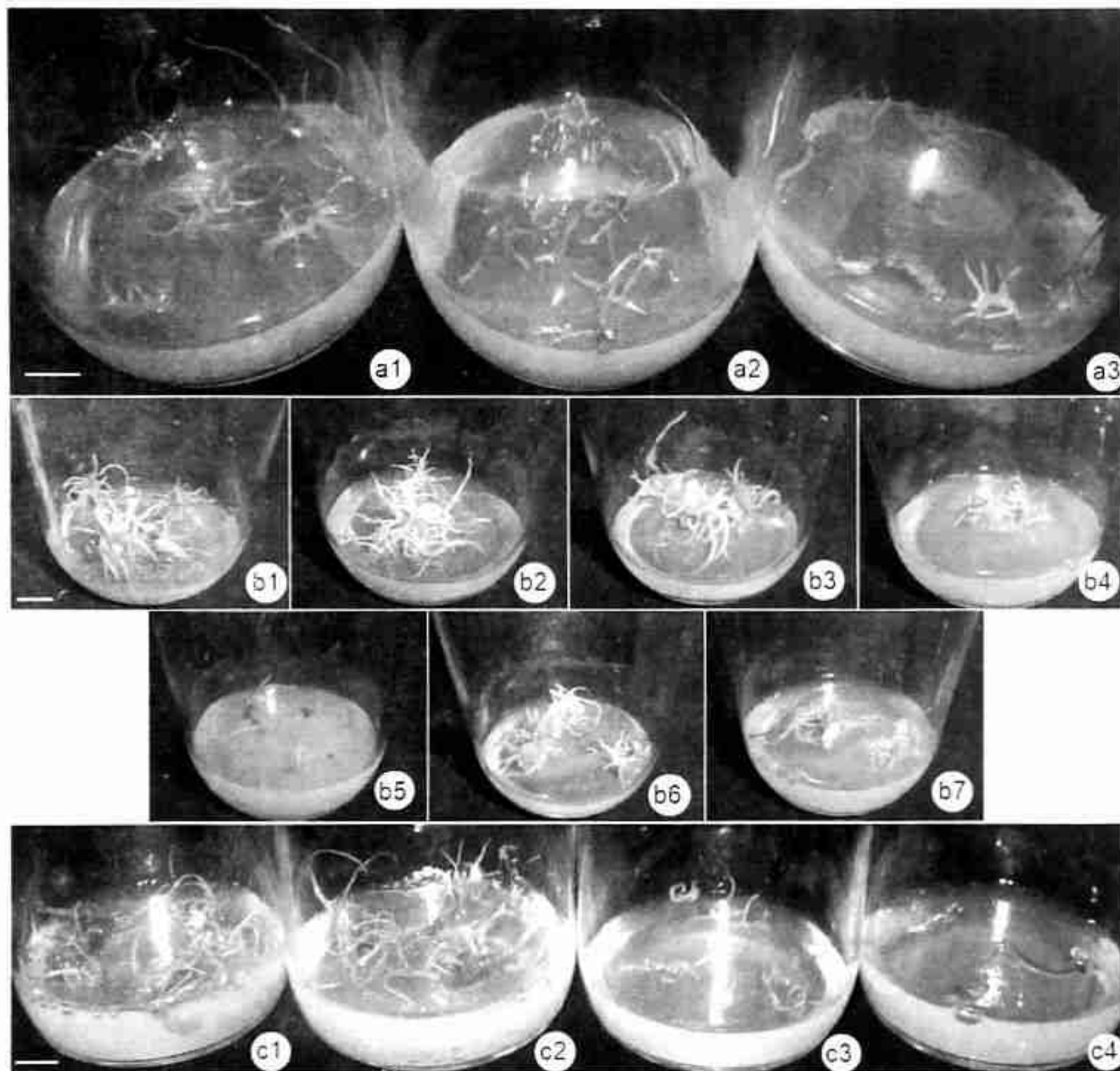
Ảnh hưởng của tỷ lệ $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$ lên sự hình thành rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh

Trong nghiên cứu này, môi trường MS chứa 7 mg/l IBA và 0,5 mg/l BA khi thay đổi tỷ lệ $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$ thông qua tỷ lệ $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4:\text{KNO}_3$ đã tạo sự khác biệt đáng kể cho quá trình phát sinh RTC của mẫu RBD, các chỉ tiêu thu được đạt tối ưu ở các nghiệm thức có tỷ lệ $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$ thấp và hình thái rễ cũng to hơn đáng kể, trong đó RTC hình thành và tăng sinh tốt nhất ở tỷ lệ 7,19:18,50 mM:mM với khối lượng tươi và khô của RTC cao gấp 6,3 lần nghiệm thức chỉ có NH_4^+ , cao hơn đáng kể so với

môi trường MS với tỷ lệ $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$ là 14,38:18,8 mM:mM (Hình 2, Bảng 5).

Trong nghiên cứu này, khi thay đổi tỷ lệ $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$ trong môi trường MS thì số rễ thứ cấp mới hình thành cũng cao hơn; ở tỷ lệ 7,19:18,50 mM:mM số rễ thứ cấp (19,33 rễ) cao hơn các nghiệm thức còn lại và cao hơn trên môi trường MS không thay đổi về nguồn nitrogen (18,26 rễ - Bảng 4). Số rễ tạo ra nhiều hơn; vì vậy, các rễ mới hình

thành hấp thu các chất dinh dưỡng từ rễ cũ; điều này giải thích tại sao khối lượng khô của rễ ở tỷ lệ 7,19:18,50 mM:mM lại thấp hơn thí nghiệm trên. Khi phân tích thành phần saponin trong các rễ này (số liệu chúng tôi chưa công bố), kết quả cho thấy rằng ở các nghiệm thức có số rễ thứ cấp và khối lượng của rễ thứ cấp mới hình thành cao hơn thì hàm lượng saponin cao hơn. Điều này chứng tỏ số rễ thứ cấp mới hình thành có ý nghĩa rất quan trọng.



Hình 2. Ảnh hưởng của môi trường và điều kiện chiếu sáng lên khả năng tạo rễ thứ cấp của mẫu rễ bất định từ cuống lá. a. Ảnh hưởng của các loại môi trường SH, MS, B5 lên sự hình thành rễ thứ cấp của mẫu rễ bất định từ cuống lá sâm Ngọc Linh. 1. Môi trường SH, 2. Môi trường MS, 3. Môi trường B5 b. Ảnh hưởng của tỷ lệ $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$ lên sự hình thành rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh. 1. 0,00:18,50 $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$ (mM:mM); 2. 7,19:18,50 $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$ (mM:mM); 3. 14,38:18,50 $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$ (mM:mM); 4. 21,57:18,50 $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$ (mM:mM), 5. 14,38 0,00 $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$ (mM:mM), 6. 14,38:18,8 $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$ (mM:mM), 7. 14,38:28,2 $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$ (mM:mM) c. Ảnh hưởng của điều kiện chiếu sáng lên khả năng tạo rễ thứ cấp của mẫu rễ bất định từ cuống lá sâm Ngọc Linh: 1. 80% tối, 2. 100% tối, 3. 50% tối; 4. 100% sáng

Môi trường MS đặc trưng bởi nồng độ cao nitrogen thông qua các dạng ammonium nitrate (NH_4^+) và potassium nitrate (NO_3^-). Điều này được báo cáo là làm ức chế quá trình hình thành rễ củ như ở cây *Discorea alata* L. (Mantell, Hugo,

1989). Theo kết quả ghi nhận trong nghiên cứu này, hình thái RBD phát triển trên môi trường MS hóa vàng sau một thời gian nuôi cấy khi môi trường có auxin và cytokinin. Theo nhiều nghiên cứu khác cũng cho thấy lượng NO_3^- cao rất tốt cho

quá trình phát triển và tích lũy các hợp chất thứ cấp của RBD ở các loài nhân sâm (Liu, Zhong, 1997; Kee-Won *et al.*, 2001; Zhong, Wang, 1998). Song song với điều này, các nghiên cứu khác cũng chỉ ra rằng sự thiếu hụt NO_3^- trong môi trường nuôi cấy có ảnh hưởng bất lợi lên quá trình phát triển kiểu hình (Jean, Cappadocia, 1991). Rễ và lá *Zingiber officinale* Rosc. phát triển kém hơn khi môi trường có NH_4NO_3 nhưng lá dài hơn và rễ tăng sinh tốt hơn khi nitrogen ở dưới dạng KNO_3 , không có NH_4^+ (Cecilia, 2010).

Điều kiện chiếu sáng

Ánh sáng làm ức chế quá trình tạo rễ thứ cấp của mẫu rễ bất định vì thế khi ở ngoài sáng hoàn toàn RBD hầu như không hình thành rễ thứ cấp tỷ lệ tạo RTC chỉ đạt 12,33%. Ở điều kiện 50% tối, tỷ lệ tạo RTC có cao hơn điều kiện sáng hoàn toàn nhưng thấp hơn hẳn điều kiện tối hoàn toàn (100% tối) và

80% tối, ngoài ra, các chỉ tiêu khác cũng có sự khác biệt rõ rệt (Hình 2, Bảng 6).

Trong điều kiện 80% tối hầu như RTC phát sinh và tăng trưởng giống với ở điều kiện 100% tối; chỉ có khối lượng khô của mẫu (34,33 mg) có sự gia tăng vượt bậc, cao gấp 1,6 lần với điều kiện tối hoàn toàn (Hình 2, Bảng 6). Điều này có thể do dưới tác động của ánh sáng auxin bị phân hủy đồng thời tế bào bị hóa mộc (Nguyễn Du Sanh, 1998) và có thể do rễ chủ yếu làm chức năng dự trữ các chất nên làm gia tăng khối lượng khô của RTC. Khối lượng tươi của mẫu ở điều kiện tối hoàn toàn và 80% tối là không có sự khác biệt, điều này có thể là do các tế bào của rễ ở điều kiện tối hoàn toàn hấp thu nước từ môi trường nhiều hơn còn các tế bào rễ ở điều kiện 80% tối bị hóa gỗ nên hấp thu nước ít hơn. Vì vậy, khi đánh giá khả năng dự trữ thì khối lượng khô sẽ có ý nghĩa hơn khối lượng tươi.

Bảng 5. Ảnh hưởng của tỷ lệ $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ lên sự hình thành rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh.

$\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ (mM:mM)	Số RTC	Chiều dài RTC (cm)	Khối lượng tươi (mg)	Khối lượng khô (mg)
0,00:18,50	15,22c*	4,33bc	323,67b	24,33b
7,19:18,50	19,33a	6,57a	396,00a	26,67a
14,38 18,50	16,83b	3,5cd	281,00b	22,83c
21,57-18,50	13,00d	2,67d	219,67c	21,5d
14,38-0,00	4,00f	2,87d	63,33d	5,67f
14,38-18,8	15,67bc	2,60d	316,67b	24,67b
14,38:28,2	11,00e	4,67b	99,67d	9,27e

Ghi chú: *Các chữ cái a, b, c thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa ở mức tin cậy $p < 0,05$ trong phép thử Duncan

Bảng 6. Ảnh hưởng của các điều kiện chiếu sáng lên khả năng hình thành rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh.

Điều kiện chiếu sáng	Tỷ lệ tạo RTC (%)	Số RTC	Chiều dài RTC (cm)	Khối lượng tươi (mg)	Khối lượng khô (mg)
100%Tối	94,00a	18,67a	5,66a	365,33a	26,67b
20% Sáng	94,67a	19,00a	5,00a	369,00a	34,33a
50% Sáng	64,67b	8,67b	2,83b	188,67b	13,67c
100% Sáng	12,33c	1,00c	0,83c	24,67c	1,67d

Ghi chú: *Các chữ cái a, b, c thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa ở mức tin cậy $p < 0,05$ trong phép thử Duncan.

KẾT LUẬN

Từ những kết quả đạt được, chúng tôi cho rằng nguồn mẫu thích hợp cho nuôi cấy tạo RTC là sử dụng các đoạn rễ bất định tách từ mẫu cuống lá đã bó chóp rễ và có kích thước khoảng 2 cm; môi trường tối ưu cho mẫu RBD này tiếp tục phát triển và tạo RTC là môi trường MS cải biên với tỷ lệ $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ là 7,19:18,50 (mM:mM) bổ sung 7 mg/l IBA và 0,5 mg/l BA; và điều kiện nuôi cấy tốt nhất là 80% tối trong 56 ngày nuôi cấy.

Lời cảm ơn: Nhóm tác giả xin cảm ơn đề tài Bộ Nông nghiệp: "Nghiên cứu rễ thứ cấp 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

Agnieszka B, Katerina P, Peter M, Jérôme D, Candela C, Bruno M, Wim G, Petr T, Eva B (2012) Spatiotemporal regulation of lateral root organogenesis in *Arabidopsis* by cytokinin. *Plant Cell* 24: 3967-3981.

Aye AT, Mai NTT, Xiaohua L, Yeji K, Yeon BK, Uddin MR, Young SK, Hanhong B, Haeng HK, Mi YL, Sang U (2012) Production of astragaloside and flavones from adventitious root cultures of *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus*. *Plant Omics J* 5(5): 466-470.

Mantell SH, Hugo SA (1989) Effects of photoperiod, mineral medium strength, inorganic ammonium, sucrose and cytokinin on roots, shoot and microtuber development in shoot cultures of *Discorea alata* L. and *D. bulbifera* L. yams. *Plant Cell Tiss Org Cult* 16: 23-37.

Cecilia CV (2010) Influence of media strength and sources of nitrogen on micropropagation of ginger, *Zingiber officinale* Rosc. *E-Inter Scie Res J* 2(2): 2094-1749.

Chun-Lin S, Hyo-Bee P, Jong SL, Sangryeol R, Choong-Min R (2010) Inhibition of primary roots and stimulation of lateral root development in *Arabidopsis thaliana* by the *Rhizobacterium Serratia marcescens* 90-166 is through both auxin-dependent and independent signaling pathways. *Mol Cells* 29: 251-258.

Dương Tấn Nhựt, Phan Quốc Tâm, Vũ Quốc Luận, Nguyễn Văn Bình, Đặng Thị Ngọc Hà, Hoàng Xuân Chiến, Nguyễn Cửu Thành Nhân, Nguyễn Bá Nam, Nguyễn Bá Trúc, Lê Nữ Minh Thủy, Phan Lê Hà Nguyễn, Vũ Thị Hiền, Lâm Thị Mỹ Hằng, Nguyễn Thị Thúy Hằng, Nguyễn Thành Hải (2009) Nghiên cứu sự hình thành rễ bất định và rễ thứ cấp của sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.). *Kỷ yếu Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc các tỉnh phía Nam*. NXB Khoa học và Kỹ thuật: 252-258.

Gamborg OL, Miller RA, Ojima K (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res*. 50: 151-158.

Geneve RL, Hackett WP, Swanson BT (1988). Adventitious root initiation in debladed petioles from the juvenile and mature phases of English ivy. *J Amer Soc Hort Sci* 113: 630-635.

Gregory LR (2009) Mechanical induction of lateral root initiation, The Huck Institutes of the Life Sciences, The Pennsylvania State University, The United States.

Hồ Thanh Tâm, Trịnh Thị Hương, Hà Thị Mỹ Ngân, Hoàng Xuân Chiến, Nguyễn Bá Nam, Nguyễn Phúc Huy, Vũ Thị Hiền, Vũ Quốc Luận, Lê Kim Cương, Bùi Thế Vinh, Trần Công Luận, Phạm Bích Ngọc, Chu Hoàng Hà, Dương Tấn Nhựt (2013) Ảnh hưởng của IBA, NAA và IAA lên khả năng hình thành và tích lũy saponin của rễ bất định sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) nuôi cấy *in vitro*. *Báo cáo khoa học Hội nghị CNSH toàn quốc 2013*, Hà Nội: 1043-1048

Jae GL, Eun SS, Eun JG, Na YK, Chang YY (2009) Factors involved in masspropagation of ginseng (*Panax ginseng* C. A. Meyer) using bioreactor system. *J Korean Soc Appl Bi* 52(5): 466-471.

Jean M, Cappadocia M (1991) *In vitro* tuberization in *D. alata* L. "Brazo fuerte" and Florida and *D. abyssinica* Hoch. *Plant Cell Tiss Org Cult* 26: 147-152.

Kee-Won Y, Wen YG, Eun-Joo H, Kee-Yoep P (2001) Effects of macro elements and nitrogen source on adventitious root growth and ginsenoside production in ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer). *Plant Biol* 44(4): 179-184.

Lavenus J, Goh T, Roberts I, Guyomarc'h S, Lucas M, De Smet I, Fukaki H, Beeckman T, Bennett M, Laplaze L. (2013) Lateral root development in *Arabidopsis*: fifty shades of auxin. *Trends Plant Sci* 18(8): 458.

Liu S, Zhong JJ (1997) Simultaneous production of ginseng saponin and polysaccharide by suspension cultures of *Panax ginseng*: Nitrogen effects. *Enzyme Microb Technol* 21: 518-524

Luan TC, De PV, Bich LK, Nguyen NT, Huan VD, Huong NTT, Phu DT (2001) Screening for medicinal plants of Araliaceae family which have effects of strengthening and antistress. *Proceeding Pharma Indochina II*, SRV Ministry of Health and Hanoi College of Pharmacy, Vietnam: 329-334.

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiol* 15: 473-497.

Nguyễn Du Sanh (1998) Sự tăng trưởng của củ cỏ ống (*panicum repens* L.) trong thiên nhiên. Luận án Tiến sĩ sinh học, Đại học Khoa học Tự nhiên Thành phố Hồ Chí Minh.

Nguyễn Thị Liễu, Nguyễn Trung Thành, Nguyễn Văn Kết (2011) Nghiên cứu khả năng tạo rễ bất định của sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) trong nuôi cấy *in vitro*. *Tạp chí Khoa học ĐHQGHN, Khoa học Tự nhiên và Công nghệ* 27: 30-36.

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

Tatiana S (2011) Organogenesis *in vitro* under altered auxin signaling conditions. Graduate Department of Cell and system Biology, University of Toronto, Canada.

Trần Hiếu, Nguyễn Cửu Thành Nhân, Nguyễn Bá Nam, Ngô Thanh Tài, Trương Thị Lan Anh, Bùi Thế Vinh, Trần Đình Phương, Nguyễn Văn Kết, Trần Công Luận, Dương Tấn Nhựt (2014) Sự tăng sinh và tích lũy ginsenoside của rễ bất định và rễ thứ cấp sâm ngọc linh (*Panax*

vietnamensis Ha et Grushv.) trong một số hệ thống nuôi cấy khác nhau. *Kỷ yếu hội nghị khoa học lần thứ nhất*. Hội Sinh lý Thực vật Việt Nam, NXB. Đại học Nông Nghiệp, Hà Nội: 241-251.

Xi-Hua C, Debasis C, Eun-Jung L, Kee-Yoeup P (2010) Production of adventitious roots and secondary metabolites by *Hypericum perforatum* L. in a bioreactor. *Bioresour Technol* 101: 4708-4716.

Yun-soo K, Eun-joo H, Edward CY, Kee-yoeup P (2003) Lateral root development and saponin accumulation as affected by IBA or NAA in adventitious root cultures of *Panax ginseng* C.A Meyer *In vitro Cell Dev Biol* 39: 245-249.

Zhong JJ, Wang SJ (1998) Effects of nitrogen source on the production of ginseng saponin and potysaccharide by cell cultures of *Panax quinquefolium*. *Process Biochem* 33: 671-675.

ENHANCING SECONDARY ROOT FORMATION AND DEVELOPMENT FROM *IN VITRO* ADVENTITIOUS ROOT OF NGOC LINH GINSENG (*PANAX VIETNAMENSIS*)

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

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

²Hue University of Sciences, Hue University

SUMMARY

Ngoc Linh ginseng (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) is a valuable medicinal plant in Vietnam and the world. Ngoc Linh ginseng root is believed to be the part accumulating the highest amount of secondary metabolite supplying for drug and cosmetic industries. Ngoc Linh ginseng also has many other uses such as health improvement enhance vitality, regulating blood pressure, etc. Faced with dwindling natural resources ginseng, the micropropagation has already been implemented used for multiplying this ginseng species, especially the root biomass culture could be produced direct product of input materials for the pharmaceutical chemistry in a short time. This study was concentrated on improving the secondary root formation and development from single adventitious roots. Adventitious roots derived from petiole (2 cm in length and removed root tip) are the best explant for secondary root formation (94.33%). After 48 day-culture, these roots proliferated rapidly and produced the best quality in MS medium containing 7.0 mg/l IBA and 0.5 mg/l BA. Most of growth targets were 2 fold higher compared to those in B5 medium and the dry weight were higher than those in SH medium. Among the ratio of NH_4^+ to NO_3^- added into the modified MS medium, the ratio of 7.2 and 18.5 showed to be the most suitable for lateral roots proliferation. Furthermore, secondary root dry weight increased remarkably after 56 days in 80% dark culture condition. Root obtained could be used as material for scale-up root culture in bioreactor.

Keywords: MS medium, *Panax vietnamensis*, adventitious root, secondary root, $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$

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