

ẢNH HƯỞNG CỦA IBA, NAA VÀ IAA LÊN KHẢ NĂNG HÌNH THÀNH VÀ TÍCH LŨY SAPONIN CỦA RỄ BẮT ĐỊNH SÂM NGỌC LINH (*PANAX VIETNAMENSIS* HA ET GRUSHV.) NUÔI CÂY *IN VITRO*

Hồ Thanh Tâm¹, Trịnh Thị Hương¹, Hà Thị Mỹ Ngân¹, Hoàng Xuân Chiến¹, Nguyễn Bá Nam¹, Nguyễn Phúc Huy¹, Vũ Thị Hiền¹, Vũ Quốc Luận¹, Lê Kim Cương¹, Bùi Thế Vinh², Trần Công Luận², Phạm Bích Ngọc², Chu Hoàng Hà³, Dương Tân Nhựt³

¹Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Trung tâm Sâm và Dược liệu Thành phố Hồ Chí Minh, Viện Dược liệu

³Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

TÓM TẮT

Trong nghiên cứu này, ba loại auxin là IBA, NAA và IAA được sử dụng nhằm đánh giá ảnh hưởng của chúng đến khả năng hình thành và tích lũy saponin của rễ bắt định sâm Ngọc Linh nuôi cấy *in vitro*. Kết quả thu được cho thấy, trên môi trường SH có bổ sung 5 mg/l IBA cho khả năng tái sinh rễ bắt định cao nhất từ các mẫu lá ở các chi tiêu về tỉ lệ phát sinh rễ (100%), số rễ/mẫu (46,7), chiều dài rễ (2,67 cm), trọng lượng tươi (121,33 mg/mẫu) và trọng lượng khô (12,33 mg/mẫu). Qua kết quả định tính bằng sắc ký lớp mỏng và định lượng bằng HPLC, dựa trên sự đối chiếu với 3 chất chuẩn có được và so sánh với sâm Ngọc Linh tự nhiên; kết quả thực nghiệm cho thấy rễ bắt định hình thành từ ba loại auxin đều có sự hiện diện của MR₂, Rb₁ và Rg₁ với hàm lượng khác nhau. Sau 8 tuần nuôi cấy, hàm lượng Rg₁ trong rễ bắt định đạt cao nhất ở môi trường SH có bổ sung 5 mg/l IAA (0,0663%), Rb₁ đạt cao nhất trong môi trường có bổ sung 3 mg/l NAA (0,1314%). Tuy nhiên, hàm lượng MR₂, một hợp chất saponin chính yếu quyết định tính đặc trưng của sâm Ngọc Linh đạt cao nhất ở môi trường bổ sung 5 mg/l IBA (0,2655%). Kết quả cho thấy rễ bắt định hình thành từ các loại auxin khác nhau thì hàm lượng saponin của chúng cũng khác nhau. Đây cũng là nghiên cứu đầu tiên chi tra mối liên hệ giữa các auxin lên khả năng tích lũy saponin ở rễ bắt định sâm Ngọc Linh.

Từ khóa: IBA, IBA, NAA, rễ bắt định, saponin, sâm Ngọc Linh, tái sinh

INTRODUCTION

Sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) được biết đến như một loại thảo dược, một loài cây thuốc đặc hữu của Việt Nam và là một nguồn gen quý hiếm có giá trị rất cao được xếp ngang hàng với các loại sâm quý trên thế giới, bởi lẽ trong sâm Ngọc Linh có hàm lượng saponin khá cao, đặc biệt là nhóm dammaran với các hợp chất saponoside đại diện chính là MR₂, Rb₁ và Rg₁ (Trần Công Luận, 2003). Tuy nhiên, sâm Ngọc Linh có thời gian sinh trưởng dài, phạm vi phân bố hẹp và bị khai thác quá mức nên không đủ đáp ứng nhu cầu cung cấp nguyên liệu cho các ngành dược liệu, mỹ phẩm, thực phẩm chức năng... Vì vậy, vấn đề đặt ra là áp dụng phương pháp nuôi cấy sinh khối tế bào thực vật nhằm tạo nguồn nguyên liệu ổn định đáp ứng nhu cầu thị trường. Nuôi cấy sinh khối rễ bắt định được xem như là phương pháp hiệu quả cho việc sản xuất sinh khối vì chúng sinh trưởng nhanh và sản xuất hợp chất ổn định (Asaka et al., 1993).

Rễ bắt định là những rễ hình thành từ trực thân hay những cơ quan tự nhiên khác nhau. Về cơ bản, rễ bắt định có nguồn gốc nội sinh, dưới tác động của auxin đã gây ra sự phân biệt hóa của tế bào như mô nằm quanh hệ thống mạch. Trong quá trình phân biệt hóa, tế bào từ vùng tủy đến vùng vỏ phục hồi lại khả năng phân chia tế bào. Tuy nhiên chỉ có một số tế bào nhất định như tế bào nhu mô libe thuộc mô phân sinh mới có khả năng biệt hóa thành sơ khởi rễ. Nuôi cấy sinh khối rễ bắt định sâm Ngọc Linh *in vitro* chịu ảnh hưởng nhiều bởi tác động của auxin. Auxin nội sinh do thực vật tổng hợp tồn tại ở dạng tự do và dạng liên kết. Auxin dạng liên kết là auxin tự do liên kết với một acid amin (acid aspartic, acid glutamic) hay carbohydrate. Dạng liên kết này không có auxin nhưng dễ dàng phóng thích auxin theo con đường enzyme. IBA, NAA và IAA là những hợp chất auxin thường được sử dụng để kích thích sự phát sinh rễ. Tuy nhiên, sự đáp ứng với loại auxin của các loại cây khác nhau thì hoàn toàn không giống nhau, do đó tìm được loại auxin thích hợp cho sự tái sinh rễ bắt định là công việc cần thiết.

Những nghiên cứu ở nước ta về sâm Ngọc Linh hiện nay phần lớn là về nhân giống vô tính, phân tích hàm lượng saponin và tác dụng dược lý của nó. Trong những năm gần đây đã có những nghiên cứu về sự hình thành rễ bắt định ở sâm Ngọc Linh. Dương Tân Nhựt và đồng tác giả (2006) đã nghiên cứu môi trường nhân nhanh sinh khối callus, chồi, rễ bắt định và bước đầu định tính saponin trong sinh khối sâm Ngọc Linh nuôi cấy *in vitro*. Dương Tân Nhựt và đồng tác giả (2009) đã nghiên cứu sự hình thành rễ bắt định, rễ thứ cấp và phân tích hàm lượng saponin sâm Ngọc Linh. Trịnh Thị Hương và đồng tác giả (2012) đã nghiên cứu ảnh hưởng của các yếu tố nguồn mẫu, kích thước mẫu cây và auxin lên sự tái sinh rễ bắt định sâm Ngọc Linh... Tuy nhiên, chưa có nghiên cứu nào về mối liên hệ giữa các loại auxin đến sự hình thành rễ bắt định và tích lũy saponin ở rễ bắt định sâm Ngọc Linh. Trong nghiên cứu này chúng tôi khảo sát ảnh hưởng của các loại auxin khác nhau lên khả năng hình thành rễ bắt định cũng như mối quan hệ giữa chúng đến quá trình tích lũy saponin ở rễ bắt định sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) nuôi cấy *in vitro*.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguồn mẫu

Nguồn mẫu thực vật được sử dụng trong nghiên cứu này là mẫu lá (được cắt thành những mẫu có kích thước 1 x 1 cm) của cây sâm Ngọc Linh nuôi cấy *in vitro* đã ổn định qua nhiều lần cấy chuyển.

Môi trường và điều kiện nuôi cấy

Môi trường được sử dụng trong thí nghiệm là môi trường SH (Schenk, Hildebrandt, 1972) có bổ sung 30 g/l sucrose, 8 g/l agar và nồng độ IBA, NAA, IAA riêng lẻ tùy vào thí nghiệm. Tất cả môi trường được điều chỉnh về pH 5,8 trước khi hấp khử trùng bằng autoclave ở 121°C, 1 atm trong 30 phút. Các mẫu cây được nuôi cấy trong bình thủy tinh loại 250 ml với 30 ml môi trường trong mỗi bình. Mỗi bình nuôi cấy sẽ được cấy 3 mẫu. Mỗi nghiệm thức được cấy với 30 bình.

Các mẫu được nuôi cấy trong điều kiện tối hoàn toàn, nhiệt độ 25 ± 2°C, độ ẩm trung bình từ 55-60%.

Phương pháp nghiên cứu

Ảnh hưởng của các loại auxin lên khả năng tái sinh rễ bất định sâm Ngọc Linh

Trong nghiên cứu trước, nồng độ tối ưu của từng auxin cho sự hình thành rễ bất định ở sâm Ngọc Linh đã được xác định (Trình Thị Hương et al., 2012). Trong nghiên cứu này, các mẫu lá được cắt thành những mẫu có kích thước 1 × 1 cm được cấy vào môi trường SH có bổ sung 30 g/l sucrose, 8 g/l agar và bổ sung riêng lẻ 5 mg/l IBA, 3 mg/l NAA và 5 mg/l IAA. Các chỉ tiêu theo dõi như tỉ lệ phát sinh rễ, số lượng rễ, chiều dài rễ, trong lượng tươi, trong lượng khô được thu nhận sau 8 tuần nuôi cấy.

Giải phẫu hình thái cấu trúc rễ bất định sâm Ngọc Linh hình thành từ các auxin khác nhau

Hình thái rễ được quan sát bằng cách cắt mỏng dọc theo chiều dài của rễ và tiến hành nhuộm với thuốc nhuộm 2 màu Iodine-carmin (Merk KgaA-Germany) như sau: mẫu sau khi giải phẫu được ngâm trong Javel 10% khoảng 15 phút. Tiếp đó, mẫu được rửa sạch bằng nước cất vô trùng và ngâm khoảng 15 phút trong dung dịch acid acetic 45% để cố định mẫu. Sau đó, lấy mẫu ra và rửa sạch bằng nước cất cho đến khi mất mùi acid và ngâm vào thuốc nhuộm 5 phút. Cuối cùng, rửa lại mẫu bằng nước cất vô trùng, đặt mẫu lên lamên, đặt lam kính và tiến hành quan sát, chụp ảnh dưới kính hiển vi quang học với độ phóng đại ×10.

Xác định hàm lượng saponin trong rễ bất định sâm Ngọc Linh hình thành từ các auxin khác nhau

Định tính saponin bằng sắc kí lớp mỏng

Chuẩn bị mẫu

Chiết siêu âm 5 g mẫu rễ đã sấy khô với methanol (20 ml/lần, mỗi lần 10 phút, 9 lần), lọc và cô dịch lọc đến cạn. Hòa cần với 10 ml nước cất và 20 ml diethylether, lắc đều, loại dịch diethylether. Dịch nước được tiếp tục lắc với n-butanol bão hòa nước, đem cô cách thủy dịch n-butanol đến cạn, hòa cần trong methanol làm mẫu thử.

Chuẩn bị bản mỏng silica gel và dung môi

Cắt tấm silica gel với kích thước phù hợp, cách mép dưới 1 cm kẻ một đường thẳng, phía dưới đường thẳng ghi tên các chất cần sắc ký, ở sát mép trên ghi tên dung môi, bản mỏng silica gel F₂₅₄.

Hai hệ dung môi được sử dụng để chạy sắc kí bản mỏng là: chloroform:methanol:nước (65:35:10) và n-butanol:acid acetic:nước (4:1:5).

Tiến hành

Châm đồng loạt mẫu thử (các nghiệm thức cùng đối chiếu với mẫu sâm chuẩn, MR₂, Rb₁, Rg₁) lên bản mỏng silica gel. Triển khai trong bình sắc khí đến khi dung môi chạy trên tấm silica gel cách đỉnh trên 1 cm lấy ra để khô. Phun thuốc thử H₂SO₄ 10% trong cồn và sấy khô. Quan sát các vết hiện màu các vết của mẫu thử so với vết của các chất chuẩn.

Xác định hàm lượng saponin bằng HPLC

Chuẩn bị mẫu tương tự như sắc kí lớp mỏng. Cần n-butanol hòa với 10 ml methanol, ly trích 2 ml cô cách thủy đến cạn. Hòa cần với nước và acetonitrile (1:2), lọc qua màng lọc 0,45 μm, dịch lọc bơm vào máy HPLC với điều kiện chung như sau: thể tích tiêm mẫu: 20 μl, tốc độ dòng: 0,5 ml/phút, cột RP C18 Supelco (250 mm × 4,6 mm - 5 μm), nhiệt độ cột: 25°C, detector: PDA ở bước sóng 203 nm.

Thu nhận diện tích peak tương ứng, hàm lượng saponin được tính theo công thức sau:

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

x: nồng độ mẫu thử thu được đưa vào đường chuẩn (μg/ml); 10: độ pha loãng mẫu, a, khối lượng nguyên liệu (g); p: độ ẩm.

Xử lý số liệu

Các số liệu thu được trong nghiên cứu được xử lý bằng phần mềm SPSS 16.0 theo phép thử Duncan với α = 0,05.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Ảnh hưởng của các loại auxin lên khả năng tái sinh rễ bất định sâm Ngọc Linh

Auxin là một yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến phát sinh cơ quan, hình thành rễ, đặc biệt là cảm ứng hình thành rễ bất định, vì nó kiểm soát sự kéo dài và phân chia tế bào. Auxin được biết đến không chỉ để cảm ứng rễ (Nemeth, 1986), chúng cũng có hiệu quả lên sự cải thiện trọng lượng tươi của rễ. Các nghiên cứu trước đây đã nhận thấy rằng phản ứng của thực vật với các auxin khác nhau thường không giống nhau, chính vì vậy, tìm được loại auxin thích hợp cho sự tái sinh rễ bất định là công việc cần thiết. Ở thí nghiệm này, 3 loại auxin là IBA, NAA và IAA được khảo sát để tìm ra loại

auxin thích hợp nhất cho khả năng tái sinh rễ sẫm Ngọc Linh, ba loại auxin này cũng thường được sử dụng trong nghiên cứu cảm ứng tạo rễ (George, Sherrington, 1984).

Chúng tôi tiến hành thí nghiệm để so sánh ảnh hưởng của ba loại auxin lên khả năng hình thành rễ bất định sẫm Ngọc Linh. Kết quả sau 8 tuần nuôi cấy cho thấy các môi trường nuôi cấy có bổ sung IBA và NAA cho kết quả hình thành rễ bất định tốt hơn IAA. Điều này có thể là do IBA, NAA là các auxin được tổng hợp nhân tạo nên không bị tác động bởi enzyme IAA oxidase, vì thế IBA và NAA bền hơn so với IAA. Kết quả cho thấy, tỉ lệ phát sinh rễ, số lượng rễ, chiều dài rễ, trọng lượng tươi, trọng lượng khô đạt cao nhất khi nuôi cấy trên môi trường có bổ sung IBA (lần lượt là 100%, 47,6 rễ/mẫu, 2,67 cm, 121,33 mg và 12,33 mg); trên môi trường có bổ sung IAA cho hiệu quả tái sinh rễ bất định thấp hơn IBA nhiều lần (Bảng 1). Kết quả này cũng tương tự với nghiên cứu của George và Sherrington (1984), Trịnh Thị Hương và đồng tác giả (2012). Chúng tôi IBA là chất kích thích tạo rễ thích hợp nhất cho nuôi cấy tạo rễ bất định ở sẫm Ngọc Linh (Hình 1a, a₁, b, b₁, c, c₁). IBA cũng đã được chứng minh là auxin hiệu quả nhất cho sự hình thành rễ trên nhiều đối tượng khác thuộc chi Nhân sâm (Son et al., 1999).

Bảng 1. Ảnh hưởng của các loại auxin lên khả năng tái sinh rễ bất định sẫm Ngọc Linh

Loại auxin	Tỉ lệ phát sinh rễ (%)	Số lượng rễ (rễ/mẫu)	Chiều dài rễ (cm)	Trọng lượng tươi (mg)	Trọng lượng khô (mg)
IBA	100	46,7 ^a	2,67 ^a	121,33 ^a	12,33 ^a
NAA	100	30,3 ^b	1,97 ^b	108,00 ^b	10,33 ^b
IAA	77,8	7,7 ^c	1,43 ^c	29,00 ^c	3,33 ^c

^aCác chữ cái khác nhau (a, b, c,...) trong cùng một cột thể hiện sự khác nhau có ý nghĩa với $\alpha = 0,05$ trong phép thử Duncan.

Giải phẫu hình thái cấu trúc rễ bất định sẫm Ngọc Linh hình thành từ các auxin khác nhau

Sau khi khảo sát ảnh hưởng của các auxin lên sự hình thành rễ bất định, chúng tôi tiến hành giải phẫu rễ để quan sát sự hình thành rễ và so sánh sự khác biệt về hình thái rễ được hình thành dưới tác động của các auxin khác nhau

Quan sát hình thái bên ngoài cũng như cấu trúc giải phẫu cho thấy, các loại auxin khác nhau đều kích thích quá trình hình thành rễ bất định từ mẫu cây lá sẫm Ngọc Linh. Trong ba loại auxin (IAA, IBA, NAA) được sử dụng trong thí nghiệm, thì IBA cho hiệu quả phát sinh rễ bất định hiệu quả hơn so với hai loại auxin còn lại: rễ nhiều, mọc dài và đồng đều (Hình 1a₁, b₁, c₁). Ngoài ra, phát sinh rễ thứ cấp từ rễ bất định cũng được quan sát trong nghiệm thức này (Hình 1e₁, e₂). Dựa vào cấu trúc giải phẫu có thể thấy, sự phát sinh rễ bất định từ mẫu lá cây sẫm Ngọc Linh cũng tương tự như các loài thực vật khác đều chia thành hai loại: Phát sinh rễ trực tiếp và phát sinh gián tiếp thông qua mô sẹo. Đối với phát sinh rễ trực tiếp, mầm rễ khởi tạo gắn liền với mẫu cây, mầm rễ có thể xuất phát từ các loại mô khác nhau như: phloem, mạch dẫn, vỏ hay các tế bào mô mềm khác như nhu mô (Syros et al., 2004). Qua hình giải phẫu của mẫu cây lá sẫm Ngọc Linh ở ba loại auxin (Hình 1a₂, b₂, c₂) và phát sinh rễ thứ cấp từ rễ bất định (Hình 1e₁, e₂) cho thấy, sự phát sinh rễ trực tiếp đều xảy ra từ mạch dẫn của lá hay của rễ (tại vùng bất màu đậm), tác động của các auxin với đích đến là các mô phát sinh ở lớp trung tầng của mạch dẫn, sự phân chia tế bào ở vị trí này, sẽ làm phá vỡ lớp phloem và hình thành nên mầm rễ. Các giai đoạn tiếp theo của quá trình này chỉ là sự kéo dài của rễ để hình thành mô phân sinh hoạt động mạnh ngay chóp rễ (Hình 1f). Đối với quá trình tái sinh gián tiếp, thường xảy ra ở các mô bị tổn thương, quá trình tạo callus với mục đích hàn vết thương và thường xảy ra ở lớp xylem của bộ mạch dẫn. Sự tác động của các auxin ngoại sinh bổ sung vào môi trường nuôi cấy sẽ kích thích quá trình phát sinh rễ từ callus này (Davies et al., 1982). Quá trình phát sinh rễ gián tiếp thông qua mô sẹo từ mẫu cây lá sẫm Ngọc Linh cũng được ghi nhận (Hình 1d) trong nghiệm cứu này. Các loại auxin khác nhau (IBA, NAA, IAA) chỉ khác nhau về khả năng kích thích phát sinh nhiều hay ít hoặc quá trình kéo dài rễ bất định.

Xác định hàm lượng saponin trong rễ bất định sẫm Ngọc Linh hình thành từ các auxin khác nhau

Định tính saponin bằng sắc kí lớp mỏng

Dựa vào vị trí và màu sắc các vết trên bảng mỏng thu được chúng tôi xác định R_f của các vết chất. Kết quả bảng sắc ký lớp mỏng cho thấy khi các bản mỏng được chạy trên cả hai loại dung môi khác nhau (chloroform:methanol:nước = 65:35:10 và n-butanol:acid acetic:nước = 4:1:5), các mẫu rễ bất định sẫm Ngọc Linh nuôi cấy *in vitro* ở các môi trường có bổ sung IBA, NAA, IAA đều có sự xuất hiện của cả 3 vết màu hồng tím tương ứng với 3 vết saponin R_{g1}, R_{b1}, MR₂ (Hình 1g₁, g₂, g₃). Điều này chứng tỏ rằng trong các mẫu rễ bất định sẫm Ngọc Linh nuôi cấy *in vitro* có sự hiện diện của R_g, R_b, MR₂. Ngoài ra, ở mẫu rễ sẫm Ngọc Linh nuôi cấy *in vitro* còn xuất hiện các vết tương đồng với sẫm ngoài tự nhiên (Hình 1g₁, g₂, g₃), điều này chứng tỏ rằng trong rễ sẫm Ngọc Linh nuôi cấy *in vitro* còn có mặt của nhiều loại saponin khác tương tự như saponin của cây ngoài tự nhiên. Như vậy, kết quả định tính cho thấy cả IBA, NAA và IAA đều có chứa saponin. Để xác định được hàm lượng của chúng chúng tôi tiến hành định lượng bằng HPLC.

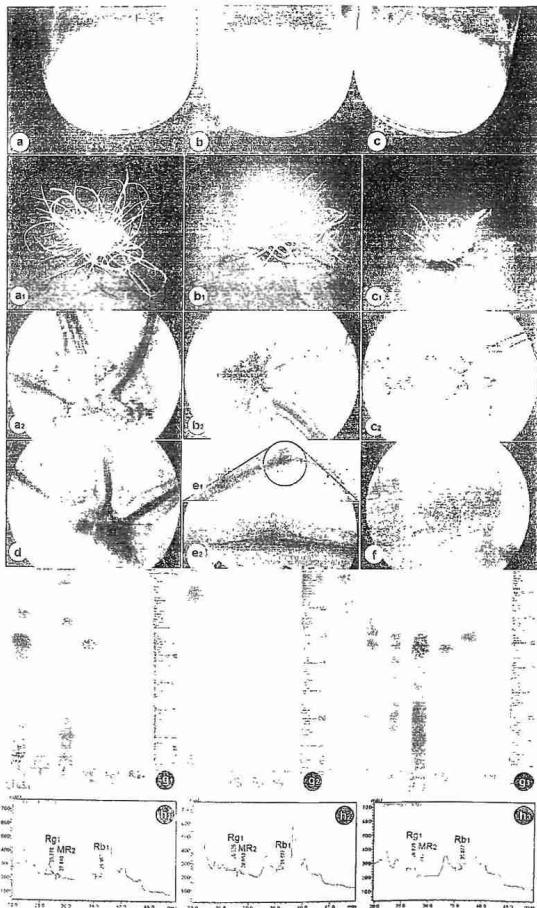
Xác định hàm lượng saponin bằng HPLC

Bảng 2. Hàm lượng saponin trong rễ bất định sẫm Ngọc Linh hình thành từ các auxin khác nhau

Loại auxin	Hàm lượng saponin		
	R _{g1} (%)	R _{b1} (%)	MR ₂ (%)
IBA	0,0644	0,0681	0,2655
NAA	0,0615	0,1314	0,2545
IAA	0,0663	0,1034	0,2540

Khi phân tích ở bước sóng 203 nm chúng tôi nhận thấy sau khoảng 27 phút xuất hiện đỉnh của R_{g1}, 28 phút xuất hiện đỉnh của MR₂ và 36 phút xuất hiện đỉnh của R_{b1} (Hình 1h₁, h₂, h₃). Đồng thời chúng tôi cũng xác định được giới hạn định

lượng và giới hạn phát hiện của chúng. Như vậy, qua kết quả định tính bằng sắc ký lớp mỏng và định lượng bằng HPLC, dựa trên sự đối chiếu với ba chất chuẩn có được và so sánh với sâm Ngọc Linh ngoài tự nhiên, có thể thấy các sinh khối đều có sự hiện diện của MR₂, Rg₁ và Rb₁, tuy nhiên với tỉ lệ và hàm lượng có sự khác biệt (Bảng 2).



Hình 1. Ảnh hưởng của các loại auxin lên khả năng hình thành và tích lũy saponin ở rễ bất định sâm Ngọc Linh. Rễ bất định hình thành trên môi trường có bổ sung IBA (a, a₁), NAA (b, b₁) và IAA (c, c₁); Giải phẫu hình thái rễ bất định hình thành từ môi trường

có bổ sung IBA (a_2), NAA (b_2), IAA (c_2); (d) Rễ bất định hình thành trực tiếp từ mô mạch (2, 3) và gián tiếp qua sự hình thành mô sẹo xốp (1). Sự hình thành rễ thứ cấp từ rễ bất định (e_1, e_2); Chóp rễ bất định (f); Định tính saponin (MR_1, Rg_1, Rb_1) trong rễ bất định hình thành từ (1) IBA, (2) NAA và (3) IAA trên hệ dung môi chloroform:metanol nước tỷ lệ 65:35:10 (g_1, g_2) và hệ dung môi n-butanol:acetic acid: nước tỷ lệ 4:1:5 (g_3); Sắc ký độ saponin toàn phần của rễ bất định sâm Ngọc Linh hình thành từ IBA (h_1), NAA (h_2) và IAA (h_3)

Kết quả cho thấy ở rễ bất định sâm Ngọc Linh có hàm lượng ginsenoside MR_2 khá cao chiếm hơn 50% saponin của sâm. Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của Trần Công Luận (2003). Kết quả phân tích sau 8 tuần nuôi cấy cây cho thấy, hàm lượng Rg_1 trong rễ bất định đạt cao nhất ở môi trường SH có bổ sung IAA (0,0663%). Rb_1 đạt cao nhất trong môi trường có bổ sung NAA (0,1314%). Tuy nhiên, hàm lượng MR_2 , một hợp chất saponin chính yếu quyết định tính đặc trưng của sâm Ngọc Linh đạt cao nhất ở môi trường bổ sung IBA (0,2655%). Điều này cho thấy mối quan hệ giữa các auxin lên quá trình tích lũy saponin ở rễ bất định sâm Ngọc Linh, mỗi loại auxin đều có những tác động khác nhau lên sự tích lũy saponin ở sâm Ngọc Linh. Kết quả cho thấy rễ bất định hình thành có cấu trúc và hàm lượng saponin khác nhau. Đây cũng là nghiên cứu đầu tiên chỉ ra mối liên hệ giữa các auxin lên sự tích lũy hàm lượng saponin ở rễ bất định sâm Ngọc Linh. Với những kết quả này chúng ta có thể sử dụng IBA để kích thích quá trình tái sinh rễ bất định *in vitro* nhằm thu sinh khối rễ có chứa saponin phục vụ cho nhu cầu thị trường.

KẾT LUẬN

Trong các loại auxin được sử dụng thì IBA (5 mg/l) là có hiệu quả nhất đến sự phát sinh rễ bất định sâm Ngọc Linh. Kết quả giải phẫu cho thấy IBA, NAA, IAA chỉ khác nhau về khả năng kích thích phát sinh nhiều hay ít hoặc quá trình kéo dài rễ bất định. Các auxin khác nhau thì tác động không giống nhau lên quá trình tích lũy saponin trong rễ bất định sâm Ngọc Linh. Hàm lượng Rg_1 đạt cao nhất trong môi trường có bổ sung IAA (5 mg/l), hàm lượng Rb_1 đạt cao nhất trong môi trường có bổ sung NAA (3 mg/l) và hàm lượng MR_2 , saponin quan trọng của sâm Ngọc Linh đạt cao nhất trong môi trường có bổ sung IBA (5 mg/l). Như vậy, IBA là auxin thích hợp nhất cho sự hình thành và tích lũy saponin của rễ bất định sâm Ngọc Linh.

Lời cảm ơn

Nhóm tác giả xin cảm ơn đề tài cấp Nhà nước "Nghiên cứu chuyển gen tạo rễ tổ 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

- Asaka I, Li L, Hirota N, Asada Y, Furuya T (1993) Production of ginsenoside saponin by culturing ginseng (*Panax ginseng*) embryonic tissue in bioreactors. *Biotechnol Lett.* 15: 1259-1264
- Davies FT, Lazarte JE, Joiner JN (1982) Initiation and development of roots in juvenile and mature leaf bud cuttings of *Ficus pumila* L. *Amer J Bot.* 69: 804-811.
- Dương Tấn Nhựt, Vũ Quốc Luận, Nguyễn Văn Bình, Phạm Thanh Phong, Bùi Ngọc Huy, Đặng Thị Ngọc Hà, Phan Quốc Tâm, Nguyễn Bá Nam, Vũ Thị Hiền, Bùi Thế Vinh, Lâm Thị Mỹ Hằng, Dương Thị Mộng Ngọc, Lâm Bích Thảo, Trần Công Luận (2009) Một số yếu tố ảnh hưởng đến sinh khối của cây sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) nuôi cấy *in vitro* và bước đầu phân tích hàm lượng saponin. *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 7 (3): 365-378.
- Dương Tấn Nhựt, Phan Quốc Tâm, Vũ Công 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 Thủy 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.
- George EF, Sherington PD (1984) Plant propagation by tissue culture. *Exegetics Ltd, Eversley, England.* 709.
- Nemeth G (1986) Induction of rooting. Bajaj YPS, eds. *Biotechnology in Agriculture and Forestry, Tree I, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo.* 1: 49-64.
- Như DT, Huy BN, Phong PT, Hai NT, Luan TC (2006) Primary study on multiplication of adventitious roots of *Panax vietnamensis* Ha et Grushv. A valuable material source for saponin isolation. *Biotechnology in Agronomy and Plant Protection* 118-121.
- Schenk RU, Hildebrandt A (1972) Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Can J Bot.* 50: 199-204
- Son SH, Choi SM, Hyung SJ, Yun SR, Choi EM, Hong YP (1999) Induction and cultures of mountain ginseng adventitious roots and AFLP analysis for identifying mountain ginseng. *Biotechnol Bioprocess Eng.* 4: 118.
- Trần Công Luận (2003) Kết quả nghiên cứu về hóa học sâm Việt Nam. *Hội thảo bảo tồn và phát triển sâm Ngọc Linh tại tỉnh Quảng Nam.* 62-75
- Syros T, Yupsams T, Zafinadis H, Economou A (2004) Activity and isoforms of peroxidases, lignin and anatomy, during adventitious rooting in cuttings of *Ebenus cretica* L. *J Plant Physiol.* 161: 69-77
- Trịnh Thị Hương, Hồ Thanh Tâm, Hà Thị Mỹ Ngân, Ngô Thanh Tài, Nguyễn Phúc Huy, Hoàng Xuân Chiến, Nguyễn Bá Nam, Vũ Quốc Luận, Vũ Thị Hiền, Nguyễn Thị Thủy Hương, Phạm Bích Ngọc, Chu Hoàng Hà, 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*. *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 10 (4A): 877-886.

EFFECTS OF IBA, NAA AND IAA ON REGENERATION AND SAPONIN ACCUMULATION ON ADVENTITIOUS ROOT OF PANAX VIETNAMENSIS HA ET GRUSHV.

Ho Thanh Tam¹, Trinh Thi Huong¹, Ha Thi Hiy Ngan¹, Hoang Xuan Chien¹, Nguyen Ba Nam¹, Nguyen Phuc Huy¹, Vu Thi Hien¹, Vu Quoc Luan¹, Le Kim Cuong¹, Bui The Vinh², Tran Cong Luan², Pham Bich Ngoc³, Chu Hoang Ha³, Duong Tan Nhut^{3*}

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

²Research Center of Ginseng and Medicinal Materials Ho Chi Minh city, National Institute of Medicinal Materials

³Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology

SUMMARY

This study was set out to determine impact of different concentrations of IBA, NAA and IAA on *in vitro* adventitious root regeneration and saponin accumulation of Ngọc Linh ginseng (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) The results showed that SH medium containing 5 mg/l IBA produced the best adventitious root regeneration from leaf explants, which gave the root formation rate of 100%, 46.7 roots/explant, average root length of 2.67 cm, average explant fresh weight of 121.33 mg and explant dry weight of 12.33 mg. TLC and HPLC analyses indicated that the highest Rg₁ content (0.0663%) and Rb₁ content (0.1314%) were obtained on medium supplemented with 5 mg/l IAA and 3 mg/l NAA, respectively, after 8 weeks of culture. The most significant finding to emerge from this study was that a considerable high content of MR₂ (0.2655%), the most important saponin, was achieved when explants were cultured on medium with 5 mg/l IBA. The present study is the first report demonstrated the role of auxins in saponin accumulation of *Panax vietnamensis* leaf-derived adventitious root.

Keywords: Adventitious root, IAA, IBA, NAA, *Panax vietnamensis*, regeneration, saponin

*Author for correspondence: Tel.: +84-63-3631056; Fax: +84-63-3831028; E-mail: duongtanhnut@gmail.com