

ĐẠI HỌC HUẾ
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC

NGUYỄN THỊ NHẬT LINH

**NGHIÊN CỨU NUÔI CÂY RỄ THỨ CẤP SÂM
NGỌC LINH (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) VÀ
KHẢO SÁT ẢNH HƯỞNG CỦA MỘT SỐ
ELICITOR LÊN SỰ TÍCH LŨY SAPONIN**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ NGÀNH SINH LÝ HỌC THỰC VẬT

HUẾ - Năm 2017

ĐẠI HỌC HUẾ
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC

NGUYỄN THỊ NHẬT LINH

**NGHIÊN CỨU NUÔI CÂY RỄ THỨ CẤP SÂM
NGỌC LINH (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) VÀ
KHẢO SÁT ẢNH HƯỞNG CỦA MỘT SỐ
ELICITOR LÊN SỰ TÍCH LŨY SAPONIN**

Chuyên ngành: Sinh lý học thực vật
Mã số: 62.42.01.12

Người hướng dẫn khoa học:
1. GS. TS. Dương Tấn Nhựt
2. GS. TS. Nguyễn Hoàng Lộc

HUẾ - Năm 2017

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan luận án: **“Nghiên cứu nuôi cấy rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) và khảo sát ảnh hưởng của một số elicitor lên sự tích lũy saponin”** là công trình nghiên cứu của tôi được trợ giúp của các cộng sự dưới hướng dẫn của GS.TS. Dương Tấn Nhật và GS.TS. Nguyễn Hoàng Lộc. Luận án được hỗ trợ kinh phí và điều kiện trang thiết bị từ các đề tài của phòng Sinh học Phân tử và Chọn tạo giống cây trồng thuộc Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên, cùng với sự hỗ trợ của Trung tâm Sâm và Dược liệu Thành phố Hồ Chí Minh và Trường Đại học Khoa học – Đại học Huế. Các số liệu trong luận án này cũng là một phần kết quả của các đề tài đã và đang thực hiện tại Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên. Tôi xin cam đoan những kết quả và số liệu trong luận án này hoàn toàn trung thực và chưa được công bố dưới bất kỳ hình thức nào. Tôi xin hoàn toàn chịu trách nhiệm trước Nhà trường về lời cam đoan này.

Đà Lạt, ngày 07 tháng 09 năm 2017

Tác giả

Nguyễn Thị Nhật Linh

LỜI CẢM ƠN

Trong biển kiến thức bao la, tôi đã thực sự tìm được con thuyền lớn để theo đuổi đam mê nghiên cứu khoa học. Với vai trò đầu tàu, Thầy, GS.TS. Dương Tấn Nhựt đã chèo lái, hướng dẫn và giúp đỡ biết bao nhiêu thế hệ sinh viên tiến đến với ước mơ và gặt hái thành công trong cuộc sống và trên con đường nghiên cứu khoa học phục vụ cho sự phát triển của nước nhà. Cảm ơn Thầy luôn tận tình hướng dẫn, truyền đạt nhiều kinh nghiệm quý báu, cũng như không ngừng giúp đỡ để tôi hoàn thành được luận án này.

Để hoàn thành luận án này, tôi xin trân trọng gửi lời cảm ơn sâu sắc đến Thầy GS.TS. Nguyễn Hoàng Lộc đã gợi ý và chỉ dẫn những hướng mới cho nghiên cứu, cũng như đã luôn nhắc nhở để tôi hoàn thành tốt chương trình học và luận án.

Tôi xin gửi lời cảm ơn đến tất cả quý Thầy, Cô Khoa Sinh học và phòng Đào tạo Sau Đại học, Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế đã tạo điều kiện và giúp đỡ tôi trong những năm học vừa qua.

Xin gửi lời cảm ơn đến Ban lãnh đạo và các cô chú, anh chị tại Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên và Trung tâm Sâm và Dược liệu thành phố Hồ Chí Minh đã cho tôi cơ hội thực hiện nghiên cứu tại đây. Đặc biệt, tôi xin cảm ơn các anh, chị Phòng Sinh học Phân tử và Chọn tạo Giống Cây trồng đã trực tiếp hướng dẫn tôi trong thời gian qua. Tôi xin cảm ơn anh Nam, anh Luận, anh Huy, chị Hiền, chị Phượng, Tùng và Chiến đã tận tình giúp đỡ tôi như những người thân trong gia đình.

Thời gian gấp tuy ngắn ngủi nhưng các bạn sinh viên, học viên thực tập tại Viện Nghiên cứu khoa học Tây Nguyên và Trường Đại học Khoa học – Đại học Huế đã cho tôi ấn tượng rất sâu sắc bởi lòng nhiệt tình với công việc của các bạn và đã tạo cho tôi nhiều niềm phấn khởi để thực hiện tốt luận án. Tôi xin cảm ơn sự giúp đỡ của các bạn trong thời gian qua.

Để có thể hoàn thành tốt luận án này, tôi cũng xin gửi lời cảm ơn đến anh Thức, anh Hiếu, Kim Cương, Văn Cương và Tâm luôn sát cánh bên tôi và không ngừng hỗ trợ và giúp đỡ tôi mặc cho những khó khăn và cách trở.

Dù có khó khăn hay thất bại và đôi lúc nản lòng, gia đình cũng luôn là điểm tựa vững chắc giúp con vượt qua những khó khăn và thử thách trong cuộc đời. Con xin cảm ơn Bố, Mẹ, những người Thầy đầu tiên, đã dìu dắt con vào đời, và cho dù khó nhọc đến đâu nhưng vẫn luôn luôn tạo cho con những điều kiện tốt nhất để không thua kém với bạn bè cùng trang lứa. Con xin cảm ơn cả nhà đã luôn luôn ủng hộ, động viên và đỡ đần cho con!

Đà Lạt, ngày 09 tháng 07 năm 2017

Tác giả

Nguyễn Thị Nhật Linh

MỤC LỤC

	Trang
LỜI CAM ĐOAN	i
LỜI CẢM ƠN	ii
MỤC LỤC	iii
DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT	x
DANH MỤC BẢNG	xi
DANH MỤC HÌNH ẢNH, BIỂU ĐỒ	xiii
ĐẶT VẤN ĐỀ	1
CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU	4
1. GIỚI THIỆU VỀ SÂM NGỌC LINH	4
1.1. Nguồn gốc và lịch sử phát triển	4
1.2. Đặc điểm hình thái và sinh trưởng	5
1.3. Đặc điểm phân bố	6
1.4. Đặc điểm đa dạng di truyền	7
1.5. Tác dụng dược lý	7
2. SƠ LƯỢC VỀ CÁC HỢP CHẤT SAPONIN	9
2.1. Cấu trúc của các saponin có trong sâm Ngọc Linh	9
2.2. Các tính chất hóa lý của các saponin trong sâm Ngọc Linh	10
2.3. Vai trò của saponin trong cây	11
2.4. Con đường tổng hợp các triterpene saponin	11
3. NUÔI CÂY <i>IN VITRO</i> SINH KHỐI RỄ BẤT ĐỊNH VÀ RỄ THỨ CẤP	13
3.1. Khái niệm về rễ bất định	13
3.2. Khái niệm về rễ thứ cấp	13
3.3. Một số yếu tố ảnh hưởng đến nuôi cấy rễ thứ cấp và rễ bất định	14
3.3.1. Loại mẫu cấy	14
3.3.2. Vị trí phát sinh	15
3.3.3. Vai trò điều hòa của auxin	17
3.3.4. Tương tác giữa auxin và cytokinin	19
3.3.5. Nhiệt độ	20
3.3.6. Ánh sáng	20
3.3.7. Giá thể nuôi cấy	20

3.3.8. Các hệ thống nuôi cấy.....	21
3.4. Một số nghiên cứu nuôi cấy thu nhận sinh khối rễ các loài sâm	22
3.4.1. Một số nghiên cứu trên thế giới	22
3.4.2. Một số nghiên cứu trong nước về rễ bất định sâm Ngọc Linh	24
4. ELICITOR VÀ SỰ KÍCH KHÁNG TRONG NUÔI CẤY <i>IN VITRO</i>	25
4.1. Khái niệm.....	25
4.2. Phân loại.....	25
4.3. Cơ chế tác động của các elicitor	27
1.1. Cách xử lý và tác động của elicitor	31
4.4.1. <i>Nồng độ elicitor</i>	31
4.4.2. <i>Thời gian tiếp xúc với elicitor</i>	31
4.4.3. <i>Thời kỳ nuôi cấy</i>	31
4.4.4. <i>Thành phần dinh dưỡng</i>	32
1.2. Một số elicitor phổ biến trong nuôi cấy nhân sâm	32
4.5.1. <i>Chitosan</i>	32
4.5.2. <i>Dịch chiết nấm men</i>	33
4.5.3. <i>Elicitor có nguồn gốc từ chất điều hòa sinh trưởng thực vật</i>	33
1.3. Ứng dụng elicitor trong nuôi các loài nhân sâm <i>in vitro</i>	35
CHƯƠNG 2: VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	39
1. VẬT LIỆU NGHIÊN CỨU	39
1.1. Nguồn mẫu	39
1.2. Thiết bị, dụng cụ và hóa chất	39
1.3. Địa điểm và thời gian thực hiện luận án	40
2. PHƯƠNG PHÁP BỐ TRÍ THÍ NGHIỆM	40
2.1. Tối ưu cách chọn mẫu và môi trường nuôi cấy rễ thứ cấp từ nuôi cấy rễ bất định sâm Ngọc Linh <i>in vitro</i>	40
2.1.1. <i>Khảo sát ảnh hưởng của cách cắt mẫu rễ bất định lên sự hình thành và tăng trưởng của rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh từ nuôi cấy rễ bất định in vitro</i> ..	40
2.1.2. <i>Khảo sát ảnh hưởng của auxin lên sự hình thành và tăng trưởng của rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh từ nuôi cấy rễ bất định in vitro</i>	41

2.1.3. Khảo sát ảnh hưởng của việc kết hợp giữa auxin và cytokinin lên sự hình thành và tăng trưởng của rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh từ rễ bất định <i>in vitro</i> ..	42
2.1.4. Khảo sát ảnh hưởng của môi trường khoáng lên sự hình thành và tăng trưởng của rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh từ nuôi cấy rễ bất định <i>in vitro</i>	42
2.1.5. Khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ NH_4^+/NO_3^- trong môi trường MS lên sự hình thành và tăng trưởng của rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh từ rễ bất định <i>in vitro</i>	42
2.1.6. Khảo sát ảnh hưởng của các loại đường carbohydrate lên sự hình thành và tăng trưởng của rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh từ nuôi cấy rễ bất định <i>in vitro</i>	43
2.1.7. Khảo sát ảnh hưởng của giá thể nuôi cấy lên sự hình thành và tăng trưởng của rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh từ nuôi cấy rễ bất định <i>in vitro</i>	43
2.2. Tối ưu điều kiện nuôi cấy rễ bất định sâm Ngọc Linh để tăng cường sự hình thành rễ thứ cấp và tích lũy saponin trong nuôi cấy <i>in vitro</i>	44
2.2.1. Khảo sát ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy lên sự tăng sinh và tích lũy saponin của rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh từ nuôi cấy rễ bất định <i>in vitro</i>	44
2.2.2. Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy lên sự tăng sinh và tích lũy saponin của rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh từ nuôi cấy rễ bất định <i>in vitro</i>	44
2.2.3. Khảo sát ảnh hưởng của pH lên sự tăng sinh và tích lũy saponin của rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh từ nuôi cấy rễ bất định <i>in vitro</i>	44
2.2.4. Khảo sát ảnh hưởng của giai đoạn nuôi cấy tối và sáng lên sự tăng trưởng của rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh từ nuôi cấy rễ bất định <i>in vitro</i>	45
2.2.5. Khảo sát ảnh hưởng của thể tích nuôi cấy lên sự tăng trưởng của rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh từ nuôi cấy rễ bất định <i>in vitro</i>	45
2.2.6. Khảo sát ảnh hưởng của hệ thống nuôi cấy lên sự tăng sinh và tích lũy saponin của rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh từ nuôi cấy rễ bất định <i>in vitro</i>	46
2.3. Tối ưu khả năng tích lũy saponin của rễ thứ cấp hình thành từ rễ bất định sâm Ngọc Linh nhờ tác động của các elicitor	48
2.3.1. Khảo sát ảnh hưởng của chitosan lên sự tăng sinh và tích lũy saponin của rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh từ nuôi cấy rễ bất định <i>in vitro</i>	48

2.3.2. Khảo sát ảnh hưởng của dịch chiết nấm men lên sự tăng sinh và tích lũy saponin của rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh từ nuôi cấy rễ bất định <i>in vitro</i>	48
2.3.3. Khảo sát ảnh hưởng của abscisic acid lên sự tăng sinh và tích lũy saponin của rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh từ nuôi cấy rễ bất định <i>in vitro</i>	49
2.3.4. Khảo sát ảnh hưởng của salicylic acid lên sự tăng sinh và tích lũy saponin của rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh từ nuôi cấy rễ bất định <i>in vitro</i>	49
2.3.5. Khảo sát ảnh hưởng của jasmonic acid lên sự tăng sinh và tích lũy saponin của rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh từ nuôi cấy rễ bất định <i>in vitro</i>	50
2.3.6. Khảo sát ảnh hưởng kết hợp của elicitor ngoại sinh và elicitor nội sinh lên sự tăng sinh và tích lũy saponin của rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh <i>in vitro</i> ..	50
2.3.7. Khảo sát ảnh hưởng của thời gian xử lý elicitor lên sự tăng sinh và tích lũy saponin của rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh từ nuôi cấy rễ bất định <i>in vitro</i> ...	51
2.4. Phương pháp xác định chỉ số tăng trưởng, tỷ lệ chất khô, tỷ lệ hình thành và tăng sinh của mẫu cấy.....	52
2.5. Môi trường nuôi cấy.....	52
2.6. Điều kiện nuôi cấy	52
3. PHƯƠNG PHÁP SINH HÓA ĐỊNH TÍNH VÀ ĐỊNH LƯỢNG SAPONIN	52
3.1. Phương pháp định tính bằng sắc ký lớp mỏng.....	52
3.2. Phương pháp định lượng bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao.....	53
3.3. Phương pháp xác định năng suất tổng hợp saponin.....	55
4. PHƯƠNG PHÁP QUAN SÁT TẾ BÀO HỌC	55
5. PHƯƠNG PHÁP THỐNG KÊ VÀ XỬ LÝ SỐ LIỆU	55
CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU	56
1. TỐI ƯU NUÔI CẤY RỄ THỨ CẤP SÂM NGỌC LINH TỪ NHỮNG MẪU RỄ BẤT ĐỊNH <i>IN VITRO</i>.....	56
1.1. Tối ưu cách chọn mẫu và môi trường nuôi cấy rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh	56
1.1.1. Ảnh hưởng của cách cắt mẫu rễ bất định lên sự hình thành và tăng trưởng của rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh từ nuôi cấy rễ bất định <i>in vitro</i>	56
1.1.2. Ảnh hưởng của auxin lên sự hình thành và tăng trưởng của rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh từ nuôi cấy rễ bất định <i>in vitro</i>	59

1.1.3. Ảnh hưởng của việc kết hợp auxin với cytokinin lên sự hình thành và tăng trưởng của rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh từ nuôi cấy rễ bất định <i>in vitro</i>	62
1.1.4. Ảnh hưởng của môi trường khoáng lên sự hình thành và tăng trưởng của rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh từ nuôi cấy rễ bất định <i>in vitro</i>	65
1.1.5. Ảnh hưởng của tỷ lệ NH_4^+/NO_3^- trong môi trường MS lên sự hình thành và tăng trưởng của rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh từ nuôi cấy rễ bất định <i>in vitro</i>	66
1.1.6. Ảnh hưởng các loại đường carbohydrate lên sự hình thành và tăng trưởng của rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh từ nuôi cấy rễ bất định <i>in vitro</i>	68
1.1.7. Ảnh hưởng của giá thể nuôi cấy lên sự hình thành và tăng trưởng của rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh từ nuôi cấy rễ bất định <i>in vitro</i>	70
1.2. Tối ưu điều kiện nuôi cấy rễ thứ cấp từ rễ bất định sâm Ngọc Linh <i>in vitro</i>	71
1.2.1. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy lên sự tăng trưởng của rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh từ nuôi cấy rễ bất định <i>in vitro</i>	71
1.2.2. Ảnh hưởng của nhiệt độ lên sự tăng trưởng của rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh từ nuôi cấy rễ bất định <i>in vitro</i>	72
1.2.3. Ảnh hưởng của pH môi trường lên sự tăng trưởng của rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh từ nuôi cấy rễ bất định <i>in vitro</i>	73
1.2.4. Ảnh hưởng của giai đoạn nuôi cấy tối và sáng lên sự tăng trưởng của rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh từ nuôi cấy rễ bất định <i>in vitro</i>	75
1.2.5. Ảnh hưởng của thể tích môi trường nuôi cấy lên sự tăng trưởng của rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh từ nuôi cấy rễ bất định <i>in vitro</i>	76
1.2.6. Ảnh hưởng của hệ thống nuôi cấy lên sự hình thành và tăng trưởng của rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh từ nuôi cấy rễ bất định <i>in vitro</i>	78
2. TĂNG CƯỜNG TÍCH LŨY SAPONIN CỦA RỄ THỨ CẤP SÂM NGỌC LINH NUÔI CẤY TỪ RỄ BẤT ĐỊNH <i>IN VITRO</i>	80
2.1. Ảnh hưởng của một số điều kiện nuôi cấy lên sự tích lũy saponin của rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh từ nuôi cấy rễ bất định <i>in vitro</i>	80
2.1.1. Ảnh hưởng của các giai đoạn nuôi cấy lên sự tích lũy saponin của rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh nuôi cấy từ rễ bất định <i>in vitro</i>	80

2.1.2. Ảnh hưởng của nhiệt độ lên sự tích lũy saponin của rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh nuôi cấy từ rễ bất định <i>in vitro</i>	81
2.1.3. Ảnh hưởng của pH lên sự tích lũy saponin của rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh nuôi cấy từ rễ bất định <i>in vitro</i>	82
2.1.4. Ảnh hưởng của hệ thống nuôi cấy lên sự tích lũy saponin của rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh nuôi cấy từ rễ bất định <i>in vitro</i>	83
2.2. Ảnh hưởng của một số elicitor lên sự tăng sinh và tích lũy saponin của rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh nuôi cấy từ rễ bất định <i>in vitro</i>	85
2.2.1. Ảnh hưởng của chitosan lên sự tăng sinh và tích lũy saponin của rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh nuôi cấy từ rễ bất định <i>in vitro</i>	85
2.2.2. Ảnh hưởng của dịch chiết nấm men lên sự tăng sinh và tích lũy saponin của rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh nuôi cấy từ rễ bất định <i>in vitro</i>	86
2.2.3. Ảnh hưởng của abscisic acid lên sự tăng sinh và tích lũy saponin của rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh nuôi cấy từ rễ bất định <i>in vitro</i>	88
2.2.4. Ảnh hưởng của salicylic acid lên sự tăng sinh và tích lũy saponin của rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh nuôi cấy từ rễ bất định <i>in vitro</i>	89
2.2.5. Ảnh hưởng của jasmonic acid lên sự tăng sinh và tích lũy saponin của rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh nuôi cấy từ rễ bất định <i>in vitro</i>	91
2.2.6. So sánh tác động của các elicitor đơn lẻ lên sự tổng hợp saponin của rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh nuôi cấy từ rễ bất định <i>in vitro</i>	92
2.2.7. Ảnh hưởng của việc kết hợp đồng thời salicylic acid và dịch chiết nấm men lên sự tăng sinh và tích lũy saponin của rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh <i>in vitro</i>	95
2.2.8. Ảnh hưởng của thời gian bổ sung dịch chiết nấm men lên sự tăng sinh và tích lũy saponin của rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh <i>in vitro</i>	98
CHƯƠNG 4: BÀN LUẬN	101
1. TỐI ƯU HÓA NUÔI CẤY TẠO RỄ THỨ CẤP TỪ RỄ BẤT ĐỊNH <i>IN VITRO</i> SÂM NGỌC LINH	101
1.1. Ảnh hưởng của cách chọn mẫu rễ bất định <i>in vitro</i> để tạo rễ thứ cấp	101
1.2. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy	102

1.3. Ảnh hưởng của các chất điều hòa sinh trưởng thực vật.....	103
1.4. Ảnh hưởng của môi trường khoáng	105
1.5. Ảnh hưởng của việc thay đổi tỷ lệ $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ trong môi trường MS	106
1.6. Ảnh hưởng của ánh sáng.....	107
1.7. Ảnh hưởng của nhiệt độ.....	108
1.8. Ảnh hưởng của pH	109
1.9. Ảnh hưởng của giá thể nuôi cấy	110
1.10. Ảnh hưởng của loại đường carbohydrate.....	110
1.11. Ảnh hưởng của thể tích môi trường nuôi cấy	112
1.12. Ảnh hưởng của hệ thống nuôi cấy	113
2. ẢNH HƯỞNG CỦA ELICITOR LÊN KHẢ NĂNG TÍCH LŨY SAPONIN TRONG NUÔI CẤY TẠO RỄ THỨ CẤP <i>IN VITRO</i>.....	115
2.1. Ảnh hưởng riêng lẻ của các elicitor lên khả năng tích lũy saponin trong nuôi cấy tạo rễ thứ cấp <i>in vitro</i>	115
2.1.1. Ảnh hưởng của chitosan.....	116
2.1.2. Ảnh hưởng của dịch chiết nấm men.....	118
2.1.3. Ảnh hưởng của abscisic acid	120
2.1.4. Ảnh hưởng của salicylic acid.....	121
2.1.5. Ảnh hưởng của jasmonic acid.....	122
2.2. Ảnh hưởng kết hợp giữa các elicitor.....	125
2.3. Ảnh hưởng của thời gian bổ sung dịch chiết nấm men lên sự tăng sinh và tích lũy saponin của rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh <i>in vitro</i>	126
2.4. So sánh hiệu quả tác động của các elicitor lên năng suất tích lũy saponin của rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh <i>in vitro</i>	127
KẾT LUẬN	129
KIẾN NGHỊ.....	130
DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH KHOA HỌC LIÊN QUAN ĐÃ CÔNG BỐ.....	132
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	133
PHỤ LỤC.....	148

DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT

½MS	: Môi trường MS với thành phần giảm ½ khoáng đa lượng
½SH	: Môi trường SH với thành phần giảm ½ khoáng đa lượng
2,4-D	: 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid
ABA	: Abscisic acid
BA	: 6-benzyladenine
CDHST	: Chất điều hòa sinh trưởng thực vật
CHN	: Chitosan
HEJ	: 2-hydroxyethyl jasmonate
HPLC	: High performance liquid chromatography (sắc ký lỏng hiệu năng cao)
IAA	: Indole-3-acetic acid
IBA	: Indole-3-butyric acid
JA	: Jasmonic acid
Kin	: Kinetin
KLK	: Khối lượng khô
KLT	: Khối lượng tươi
MAPK	: Mitogen-activated protein kinase
MeJA	: Methyl jasmonate acid
MR2	: Majonoside-R2
MS	: Môi trường Murashige và Skoog – 1962
MSCB	: Môi trường MS cải biên
NAA	: α -Naphthaleneacetic acid
NPA	: Naphthylphthalamic acid
NS	: Năng suất tích lũy 3 saponin MR2, Rg1 và Rb1
Rb1	: Ginsenoside-Rb1
RBD	: Rễ bất định
Rg1	: Ginsenoside-Rg1
RTC	: Rễ thứ cấp
SA	: Salicylic acid
SE	: Standard error (sai số chuẩn)
SH	: Môi trường Schenk và Hildebrandt - 1972
SS	: Squalene synthase
TBTB	: Tế bào nền trụ bì
TDZ	: Thidiazuron
TLC	: Thin layer chromatography (sắc ký lớp mỏng)
YE	: Yeast extract (dịch chiết nấm men)

DANH MỤC BẢNG

	Trang
Bảng 1.1. Phân loại elicitor trong sản xuất các hợp chất thứ cấp.....	26
Bảng 1.2. Một số nghiên cứu về các elicitor trong nuôi cấy chi nhân sâm.....	38
Bảng 3.1. Ảnh hưởng của cách cắt mẫu rễ bất định lên khả năng hình thành và tăng trưởng rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh <i>in vitro</i>	56
Bảng 3.2. Ảnh hưởng của auxin lên khả năng hình thành và tăng trưởng rễ thứ cấp từ rễ bất định sâm Ngọc Linh <i>in vitro</i>	60
Bảng 3.3. Ảnh hưởng của IBA kết hợp với cytokinin lên sự hình thành và tăng trưởng rễ thứ cấp từ rễ bất định sâm Ngọc Linh <i>in vitro</i>	62
Bảng 3.4. Ảnh hưởng của các môi trường khác nhau lên sự hình thành và phát triển rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh từ rễ bất định <i>in vitro</i>	65
Bảng 3.5. Ảnh hưởng của tỷ lệ $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ lên sự hình thành và tăng trưởng rễ thứ cấp của rễ bất định sâm Ngọc Linh <i>in vitro</i>	66
Bảng 3.6. Ảnh hưởng loại đường carbohydrate lên sự hình thành và tăng trưởng rễ thứ cấp từ rễ bất định sâm Ngọc Linh <i>in vitro</i>	68
Bảng 3.7. Ảnh hưởng của giá thể nuôi cấy lên khả năng hình thành và tăng trưởng rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh <i>in vitro</i>	70
Bảng 3.8. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến khả năng tăng trưởng của rễ thứ cấp từ rễ bất định sâm Ngọc Linh <i>in vitro</i>	72
Bảng 3.9. Ảnh hưởng của pH đến khả năng hình thành và tăng trưởng rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh <i>in vitro</i>	74
Bảng 3.10. Ảnh hưởng của các điều kiện chiếu sáng lên sự hình thành và tăng trưởng RTC sâm Ngọc Linh <i>in vitro</i>	75
Bảng 3.11. Ảnh hưởng của thể tích môi trường nuôi cấy lên khả năng hình thành và tăng trưởng RTC sâm Ngọc Linh <i>in vitro</i>	76
Bảng 3.12. Ảnh hưởng của hệ thống nuôi cấy đến sự hình thành và tăng trưởng rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh <i>in vitro</i>	78
Bảng 3.13. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến khả năng tích lũy saponin từ rễ thứ cấp của nuôi cấy rễ bất định sâm Ngọc Linh <i>in vitro</i>	80

Bảng 3.14. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến khả năng tích lũy saponin của rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh nuôi cấy từ rễ bất định <i>in vitro</i>	82
Bảng 3.15. Ảnh hưởng của pH đến khả năng tích lũy saponin ở rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh nuôi cấy từ rễ bất định <i>in vitro</i>	82
Bảng 3.16. Ảnh hưởng của hệ thống nuôi cấy đến khả năng tích lũy saponin của rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh từ nuôi cấy rễ bất định <i>in vitro</i>	83
Bảng 3.17. Ảnh hưởng của chitosan lên sự tăng sinh và tích lũy saponin của rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh từ mẫu rễ bất định <i>in vitro</i>	85
Bảng 3.18. Ảnh hưởng của dịch chiết nấm men lên sự tăng sinh và tích lũy saponin của rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh từ mẫu rễ bất định <i>in vitro</i>	87
Bảng 3.19. Ảnh hưởng của abscisic acid lên sự tăng sinh và tích lũy saponin của rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh từ mẫu rễ bất định <i>in vitro</i>	88
Bảng 3.20. Ảnh hưởng của salicylic acid lên sự tăng sinh và tích lũy saponin của rễ thứ cấp từ mẫu rễ bất định sâm Ngọc Linh <i>in vitro</i>	89
Bảng 3.21. Ảnh hưởng của jasmonic acid lên sự tăng sinh và tích lũy saponin của rễ thứ cấp từ mẫu rễ bất định sâm Ngọc Linh <i>in vitro</i>	91
Bảng 3.22. Ảnh hưởng của việc kết hợp giữa acid salicylic và dịch chiết nấm men lên khả năng phát triển của rễ thứ cấp từ nguồn rễ bất định sâm Ngọc Linh.....	95
Bảng 3.23. Ảnh hưởng của thời gian bổ sung dịch chiết nấm men lên khả năng phát triển của rễ thứ cấp từ nguồn rễ bất định sâm Ngọc Linh.....	98

DANH MỤC HÌNH ẢNH, BIỂU ĐỒ

	Trang
Hình 1.1. Cây sâm Ngọc Linh sinh trưởng và phát triển từ nguồn cây giống <i>in vitro</i> của Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên.....	5
Hình 1.1. Con đường isoprenoid trong sinh tổng hợp triterpenoid saponin.....	12
Hình 1.2. Sơ đồ minh họa mạng lưới truyền tín hiệu elicitor	30
Hình 2.1. Sơ đồ cách cắt mẫu cây từ các RBD có nguồn gốc khác nhau.	41
Hình 2.2. Hệ thống Bioreactor tự tạo 3 L và hệ thống Bioreactor hình cầu 3 L.....	47
Hình 2.3. Thao tác trên hệ thống Bioreactor	47
Hình 3.1. Rễ thứ cấp hình thành và tăng trưởng từ rễ bất định tái sinh từ các loại mẫu tái sinh khác nhau của sâm Ngọc Linh.....	57
Hình 3.2. Các giai đoạn phát sinh rễ thứ cấp từ rễ bất định sâm Ngọc Linh <i>in vitro</i>	58
Hình 3.3. Ảnh hưởng của auxin lên sự hình thành và tăng trưởng rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh của rễ bất định <i>in vitro</i> tái sinh từ cuống lá.	61
Hình 3.4. Lớp cắt ngang và cắt dọc của rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh ở môi trường không bổ sung cytokinin và có bổ sung 0,5 mg/L BA.....	63
Hình 3.5. Ảnh hưởng 7 mg/L IBA kết hợp với các cytokinin lên sự hình thành và tăng trưởng RTC sâm Ngọc Linh <i>in vitro</i>	64
Hình 3.6. Ảnh hưởng của các loại môi trường SH, MS, B5 lên phát triển rễ thứ cấp của mẫu rễ bất định từ cuống lá sâm Ngọc Linh.	66
Hình 3.7. Ảnh hưởng của tỷ lệ $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ lên sự hình thành và tăng trưởng rễ thứ cấp từ nuôi cấy rễ bất định sâm Ngọc Linh <i>in vitro</i>	67
Hình 3.8. Ảnh hưởng của các loại đường carbohydrate lên sự hình thành và tăng trưởng rễ thứ cấp từ rễ bất định sâm Ngọc Linh <i>in vitro</i>	69
Hình 3.9. Ảnh hưởng của giá thể nuôi cấy khác nhau lên sự hình thành và tăng trưởng rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh <i>in vitro</i>	71
Hình 3.10. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến khả năng hình thành và tăng trưởng rễ thứ cấp từ rễ bất định sâm Ngọc Linh <i>in vitro</i>	71
Hình 3.11. Rễ thứ cấp hình thành và tăng trưởng từ rễ bất định sâm Ngọc Linh <i>in vitro</i> dưới các điều kiện nhiệt độ khác nhau.....	73

Hình 3.12. Khả năng hình thành và tăng trưởng rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh từ nuôi cấy rễ bất định <i>in vitro</i> dưới điều kiện pH khác nhau.	74
Hình 3.13. 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 <i>in vitro</i>	76
Hình 3.14. Ảnh hưởng của các thể tích môi trường nuôi cấy khác nhau lên khả năng hình thành và tăng trưởng rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh từ nuôi cấy rễ bất định <i>in vitro</i>	77
Hình 3.15. Rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh trong các hệ thống nuôi cấy khác nhau.	79
Hình 3.16. Kết quả định tính saponin của rễ thứ cấp theo thời gian nuôi cấy.	81
Hình 3.17. Định tính saponin (MR2, Rg1, Rb1) của mẫu rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh <i>in vitro</i> ở nhiệt độ 22°C, 25°C và 28°C.	81
Hình 3.18. Định tính saponin ở mẫu rễ sâm Ngọc Linh <i>in vitro</i> ở các pH khác nhau.	83
Hình 3.19. Định lượng và định tính saponin của rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh <i>in vitro</i> trong các hệ thống nuôi cấy khác nhau.	85
Hình 3.20. Peak Rg1, MR2, Rb1 trên sắc ký đồ của mẫu rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh dưới tác động của dịch chiết nấm men.	87
Hình 3.21. Peak Rg1, MR2, Rb1 trên sắc ký đồ của mẫu rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh dưới tác động của ABA.	89
Hình 3.22. Peak Rg1, MR2, Rb1 trên sắc ký đồ của mẫu rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh dưới tác động của SA.	90
Hình 3.23. Ảnh hưởng đơn lẻ của các elicitor lên sự tăng sinh của rễ thứ cấp từ mẫu rễ bất định sâm Ngọc Linh.	94
Hình 3.24. Ảnh hưởng của thời gian bổ sung dịch chiết nấm men lên sự tăng sinh và tích lũy saponin ở rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh <i>in vitro</i>	100
Biểu đồ 3.1. So sánh giữa môi trường cải biên với các môi trường nuôi cấy khác.	67
Biểu đồ 3.2. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến khả năng hình thành và tăng trưởng rễ thứ cấp từ nuôi cấy rễ bất định sâm Ngọc Linh <i>in vitro</i>	71
Biểu đồ 3.3. Ảnh hưởng của elicitor lên năng suất tổng hợp cả ba saponin trong rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh sau 56 ngày nuôi cấy.	92

- Biểu đồ 3.4.** So sánh ảnh hưởng của elicitor lên sự tổng hợp cả ba saponin trong rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh sau 56 ngày nuôi cấy.....93
- Biểu đồ 3.5.** Tác động đồng thời dịch chiết nấm men và salicylic acid lên khả năng tích lũy các saponin trong nuôi cấy tạo rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh.....96
- Biểu đồ 3.6.** So sánh tác động kết hợp của dịch chiết nấm men và salicylic acid lên sự tích lũy các saponin trong nuôi cấy tạo rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh.....97
- Biểu đồ 3.7.** Năng xuất tổng hợp saponin ở các thời điểm xử lý với dịch chiết nấm men trong nuôi cấy rễ bất định sâm Ngọc Linh *in vitro*.....99

ĐẶT VẤN ĐỀ

Vietnamese ginseng, một cái tên quen thuộc được thế giới dùng để gọi tên một loài sâm đặc hữu của Việt Nam, sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.). Kể từ khi được phát hiện năm 1973 tại núi Ngọc Linh thuộc huyện Đắc Tô tỉnh Kon Tum, loài sâm này đã được nghiên cứu và cho thấy có chứa nhiều dược chất hơn so với các loài khác cùng thuộc chi nhân sâm [7]. Ngoài 26 hợp chất saponin tương tự sâm Mỹ và sâm Triều Tiên, trong sâm Ngọc Linh còn phát hiện được hơn 20 loại saponin khác như majonoside R1-2, vinaginsenoside R1-11 và các saponin khác thuộc nhóm glycoside [119]. Những saponin quý này có tác dụng bồi bổ sức khỏe, tăng cường sinh lực, điều hòa huyết áp, chống oxy hóa, phong chống ung thư, chống lão hóa, kích thích hệ miễn dịch, điều trị các bệnh sốt rét, trầm cảm, gan, thận và tiểu đường,... [119]. Loài sâm quý và có giá trị kinh tế cao này tuy thuộc danh mục sách đỏ cần được bảo tồn, nhưng bị khai thác quá mức ngoài tự nhiên. Hơn nữa, việc sử dụng các hợp chất từ sâm Ngọc Linh vào sản xuất dược phẩm vẫn còn gặp rất nhiều khó khăn vì sâm Ngọc Linh khó nuôi trồng và nhân rộng, để thu hoạch được phải cần ít nhất 6-7 năm.

Đến nay, nuôi cấy rễ được xem là một giải pháp thay thế đầy tiềm năng để thu nhận hoạt chất thứ cấp từ loài sâm quý hiếm này, do khả năng sản xuất ổn định được một lượng lớn sinh khối sạch trong thời gian ngắn. Phổ biến nhất là nuôi cấy rễ bất định (RBĐ) phát sinh từ trục thân hay những mô và cơ quan khác nhau của thực vật [9][116]. Khi cấy chuyen các rễ này sang môi trường có hàm lượng auxin cao, các rễ thứ cấp (RTC) hình thành, tuy nhiên, khả năng này còn phụ thuộc vào từng điều kiện nuôi cấy và thành phần môi trường [9][10][16][130].

Trong nuôi cấy rễ sâm *in vitro*, việc gây kích kháng hay bổ sung các elicitor giúp tăng đáng kể khả năng tích lũy các hợp chất thứ cấp trong quá trình nhân nhanh sinh khối rễ [138]. Nuôi cấy rễ sâm Ngọc Linh *in vitro*, dù môi trường giàu dinh dưỡng giúp rễ phát triển nhanh, nhưng hàm lượng saponin phân tích được rất thấp. Hơn nữa, quá trình tích lũy một số chất không diễn ra do thiếu một số yếu tố kích kháng, dẫn đến hàm lượng saponin nội sinh thấp hơn so với rễ thu ngoài tự

nhiên, ví dụ như lượng saponin thu được ở nuôi cấy rễ *P. ginseng* chỉ bằng 1/3 so với trồng ngoài tự nhiên [130]. Kể từ khi các stress do sự thay đổi về ánh sáng, nhiệt độ hay tác động từ các tác nhân gây hại cây trồng được phát hiện làm kích thích tích lũy các hợp chất thứ cấp thông qua con đường truyền tín hiệu của các elicitor. Từ đó, các elicitor này được nhận diện bởi các thụ thể nằm ở màng tế bào và tạo ra các tín hiệu thứ cấp như jasmonic acid (JA), salicylic acid (SA), abscisic acid (ABA),... lần lượt kích hoạt biểu hiện các gen phòng vệ, đồng thời sinh tổng hợp các hợp chất thứ cấp [134]. Từ đó, những elicitor đã được ứng dụng rộng rãi vào nuôi cấy để gia tăng hoạt chất saponin trong nuôi cấy nhiều loài nhân sâm [40]. Ví dụ: như trong nuôi cấy RBD *P. ginseng*, chỉ với 0,2 mM methyl jasmonate (MeJA) đã gia tăng lượng ginsenoside lên gấp 4 lần [40].

Với lợi ích to lớn của các elicitor trong việc tăng cường khả năng tích lũy các hợp chất saponin trong nuôi cấy *in vitro*, việc nghiên cứu ảnh hưởng của elicitor vào nuôi cấy RTC sâm Ngọc Linh là rất cần thiết. Tuy nhiên, các nghiên cứu sử dụng các elicitor trên đối tượng sâm Ngọc Linh còn rất hạn chế, đặc biệt trên nuôi cấy tạo RTC từ nguồn RBD *in vitro* là chưa có. Ứng dụng elicitor trên đối tượng sâm Ngọc Linh chỉ được áp dụng trong nuôi cấy tạo mô sẹo bằng MeJA và gần đây nhất là trên nuôi cấy rễ chuyển gen [13][10]. Tuy nhiên, các nghiên cứu này mới nghiên cứu chủ yếu 3 elicitor tín hiệu (ABA, MeJA và SA), chưa khảo sát được thời gian xử lý elicitor thích hợp, cũng như tác động kết hợp giữa các elicitor, hay vai trò điều hòa của các gen và các enzyme liên quan đến con đường sinh tổng hợp saponin. Do vậy, kết quả kích kháng bằng elicitor trong nuôi cấy sâm Ngọc Linh vẫn chưa thực sự hiệu quả. Chính vì thế, “ **Nghiên cứu nuôi cấy rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) và khảo sát ảnh hưởng của một số elicitor lên sự tích lũy saponin**” đã được thực hiện nhằm tối ưu hóa các yếu tố quyết định đến quá trình hình thành và tăng trưởng RTC trong nuôi cấy *in vitro* RBD sâm Ngọc Linh. Từ đó, nguồn RTC tốt nhất để đánh giá tác động của các elicitor khác nhau lên khả năng tăng cường hàm lượng các saponin.

Mục tiêu của luận án

Xác định được điều kiện nuôi cấy và môi trường thích hợp để RBD của sâm Ngọc Linh phát triển và hình thành nhiều RTC, từ đó, có được nguồn sinh khối lớn và ổn định để nhân nhanh sinh khối rễ sâm Ngọc Linh trong hệ thống nuôi cấy có dung tích lớn như Bioreactor.

Xác định được các loại, nồng độ của các elicitor khác nhau lên quá trình sản xuất ba saponin (MR2, Rg1 và Rb1) quan trọng có trong RTC sâm Ngọc Linh *in vitro* thông qua 5 loại elicitor (SA, JA, ABA, CHN và YE) hiện có tại phòng thí nghiệm. Sau đó, tiến hành kết hợp các elicitor có nguồn gốc khác nhau để nâng cao hiệu quả sản xuất saponin, đồng thời tìm được thời điểm thích hợp để bổ sung các elicitor này vào nuôi cấy RTC sâm Ngọc Linh từ RBD *in vitro*.

Công bố được nghiên cứu này trên những tạp chí khoa học để giúp nghiên cứu được ứng dụng vào thực tiễn.

Ý nghĩa khoa học

Nghiên cứu này cung cấp các dẫn liệu khoa học mới có giá trị về các nghiên cứu phát sinh hình thái rễ, nhân nhanh sinh khối và tăng cường tích lũy các hợp chất saponin trong các nuôi cấy RTC từ RBD sâm Ngọc Linh và các loài cùng chi nhân sâm hay các cây tương tự.

Thiết lập được những phương pháp nghiên cứu hình thái rễ *in vitro*, mô tế bào học và phân tích định lượng và định tính hàm lượng saponin có trong mẫu cây. Đồng thời luận án cũng là tài liệu tham khảo hữu ích cho việc nghiên cứu và giảng dạy về lĩnh vực chuyển hóa thứ cấp, sinh lý thực vật và nuôi cấy mô tế bào thực vật.

Ý nghĩa thực tiễn

Luận án thiết lập được môi trường nuôi cấy, điều kiện nuôi cấy và hệ thống nuôi cấy tối ưu cho RBD sâm Ngọc Linh tăng sinh và tạo nhiều RTC trong thời gian ngắn nhất. Đồng thời, nâng cao được chất lượng rễ thông qua việc sử dụng các elicitor để tăng hàm lượng các saponin nội sinh (MR2, Rg1 và Rb1). Kết quả này có thể ứng dụng vào sản xuất sâm Ngọc Linh trên quy mô lớn nhằm giải quyết vấn đề khan hiếm nguồn nguyên liệu.

CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1. GIỚI THIỆU VỀ SÂM NGỌC LINH

1.1. Nguồn gốc và lịch sử phát triển

Sâm Ngọc Linh là một loài sâm đặc hữu của Việt Nam, chỉ sống trên vùng núi cao thuộc hai tỉnh Kon Tum và Quảng Nam. Hiện nay, sâm Ngọc Linh được cả thế giới biết đến bởi những đặc tính và thành phần vượt trội so với một số loài sâm nổi tiếng khác như sâm Triều Tiên (*P. ginseng* C.A. Meyer), sâm Mỹ (*P. quinqueflum*), sâm tam thất (*P. pseudo-ginseng* (Burk). RH. Chen),... [89]

Sâm Ngọc Linh là một “phương thuốc giầu” của người dân tộc Xê Đăng sống dưới chân núi Ngọc Linh chỉ mật truyền dùng để chữa trị cho dân làng tránh khỏi bệnh tật nơi rừng sâu, núi hiểm; nhưng đến những năm kháng chiến chống Pháp, bí mật về cây “thuốc giầu” bắt đầu được hé lộ. Khi bí mật này được mọi người biết tới, cây sâm quý này đã bị khai thác ồ ạt và dẫn đến nguy cơ gần như là tuyệt chủng [12][13]. Năm 1973, đoàn điều tra dược liệu Ban Dân Y khu 5 do dược sỹ Đào Kim Long và Nguyễn Châu Giang hướng dẫn đã phát hiện được một loài nhân sâm hiếm mọc thành quần thể ở độ cao 1800 m tại vùng Đắc Lây, huyện Đắc Tô, tỉnh Kon Tum và đặt tên là “sâm Đốt trúc” với tên khoa học sơ bộ xác định là *P. articulatus* L., họ nhân sâm (Araliaceae) [7]. Năm 1985, trên cơ sở tiêu bản mẫu chuẩn (Typus) và các số liệu thực vật học của Trung tâm sâm Việt Nam cung cấp, Hà Thị Dung và Grushvisky (1985) đã xác định và chính thức công bố tên khoa học cây sâm Đốt trúc là *Panax vietnamensis* Ha et Grushv., được công bố tại Viện Thực vật Kamarov (Liên Xô cũ) [8]. Ngoài ra, loài sâm này còn được gọi là sâm Ngọc Linh, sâm Khu năm (K5), thuốc giầu Xê Đăng hay sâm Việt Nam và có tên quốc tế là Vietnamese ginseng [13]. Đây là một loài sâm mới của thế giới thuộc chi *Panax* L. với những đặc điểm riêng biệt về hoa, quả và hạt [8].

Năm 1974, qua báo cáo của dược sỹ Nguyễn Thới Nhâm về kết quả phân tích sơ bộ thành phần hóa học cây sâm K5 so với cây sâm Triều Tiên và sâm Tam thất. Khu ủy khu 5 đã cho bảo vệ chặt chẽ vùng sâm này và cũng từ đây sâm K5 được sử dụng để chữa bệnh cho các thương bệnh binh, cán bộ và nhân dân [8][13].

1.2. Đặc điểm hình thái và sinh trưởng



Hình 1.1. Cây sâm Ngọc Linh sinh trưởng và phát triển từ nguồn cây giống *in vitro* của Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên [13].

Sâm Ngọc Linh trưởng thành có dạng thân khí sinh thẳng đứng, màu lục hoặc hơi tím, nhỏ với đường kính thân khoảng 4-8 cm, thường tàn lụi hàng năm. Phần thân rễ có đường kính 1-2 cm, mọc bò ngang như củ hoàng tinh trên hoặc dưới mặt đất khoảng 1-3 cm, mang nhiều rễ nhánh và củ (Hình 1.1). Các thân mang lá và tương ứng với mỗi thân mang lá là một đốt dài khoảng 0,5-0,7 cm. Cây chỉ có một lá duy nhất suốt năm thứ 1 đến năm thứ 3 và chỉ từ năm thứ 4 trở đi mới mọc thêm 2 đến 3 lá. Trên đỉnh của thân mang lá kép hình chân vịt mọc vòng với 3-5 nhánh lá. Cuống lá kép, dài khoảng 6-12 mm, mang 5 lá chét, lá chét ở chính giữa lớn hơn cả với độ dài 12-15 cm, rộng 3-4 cm. Lá chét có phiến hình

bầu dục, mép khía răng cưa, chóp nhọn, lá có lông ở cả hai mặt. Cây 4-5 năm tuổi có hoa hình tán đơn mọc dưới các lá thẳng với thân, cuống tán hoa dài 10-20 cm có thể kèm 1-4 tán phụ hay một hoa riêng lẻ ở phía dưới tán chính. Mỗi tán có 60-100 hoa, cuống hoa ngắn 1-1,5 cm, lá đài, cánh hoa màu vàng nhạt, nhị, bầu 1 ô với 1 vòi nhụy (Hình 1.1). Quả mọc tập trung ở trung tâm của tán lá, dài độ 0,8-1 cm và rộng khoảng 0,5-0,6 cm, sau hai tháng bắt đầu chuyển từ màu xanh đến xanh thẫm, vàng lục, khi chín ngả sang màu đỏ cam với một chấm đen không đều ở đỉnh quả (Hình 1.1). Mỗi quả chứa một hạt, một số quả chứa 2 hạt và số quả trên cây bình quân khoảng 10 đến 30 quả [8].

Bộ phận dùng làm thuốc chủ yếu là thân rễ, củ, ngoài ra có thể dùng lá và rễ con. Vào đầu tháng 1 hàng năm, sâm xuất hiện chồi mới sau mùa ngủ đông, thân khí sinh lớn dần lên thành cây trưởng thành có 1 tán hoa [89]. Từ tháng 4 đến tháng 6, cây nở hoa và kết quả. Tháng 7 quả bắt đầu chín và kéo dài đến tháng 9. Cuối tháng 10, phần thân khí sinh tàn lụi dần, lá rụng, để lại một vết sẹo ở đầu củ và cây bắt đầu giai đoạn ngủ đông đến hết tháng 12. Dựa vào số lượng vết sẹo trên đầu củ, người ta có thể nhận biết độ tuổi của cây. Sau 3 năm đầu, cây mới rụng lá và để lại vết sẹo đầu tiên [89]. Khi thu hoạch, nên thu nhận các củ từ 3 tuổi trở lên, tốt nhất là trên 5 tuổi. Mùa đông cũng là mùa thu hoạch tốt nhất phần thân rễ của sâm [8].

1.3. Đặc điểm phân bố

Đến nay, vùng núi Ngọc Linh thuộc hai tỉnh Quảng Nam và Kon Tum ở miền trung của Việt Nam, tại 14°15' vĩ độ Bắc, là nơi duy nhất được phát hiện có sâm Ngọc Linh. Đây cũng là giới hạn xa nhất về phía Nam của bản đồ phân bố chi nhân sâm trên thế giới [13]. Sâm Ngọc Linh có phân bố tự nhiên ở các huyện Tu Mơ Rông, huyện Đăk Glei (tỉnh Kon Tum), Huyện Nam Trà My, huyện Phước Sơn (tỉnh Quảng Nam), trên vùng núi Ngọc Linh. Ngọc Linh là dãy núi cao thứ hai ở Việt Nam, có tọa độ địa lý từ 107°5'-108°7' kinh tuyến Đông và từ 15°0'-15°1' vĩ tuyến Bắc, đỉnh cao nhất là Ngọc Linh cao 2598 m. Những điểm vốn trước đây có sâm Ngọc Linh mọc tự nhiên từ độ cao khoảng 1500-2200 m, chủ yếu tập trung ở 1800-2000 m, thuộc địa bàn của hai huyện Đăk Tô (Kon Tum) và Nam Trà My (Quảng Nam) [13]; nhưng giới hạn cũng như phân bố của loài sâm này ở núi Ngọc

Linh đã có nhiều thay đổi. Loài này đã trở nên cực hiếm ngoài tự nhiên, do tình trạng khai thác kiệt quệ trong nhiều năm cộng với việc đốt nương làm rẫy nên diện tích rừng tự nhiên bị thu hẹp [13]. Hiện tại, sâm Ngọc Linh đã được đưa vào danh mục sách đỏ của Liên minh Bảo tồn Thiên nhiên Quốc tế (IUCN) năm 2003 và danh sách các loài hạn chế khai thác và sử dụng vì mục đích thương mại (nghị định 32/2006/NĐ-CP ngày 31/03/2006 về quản lý thực vật rừng, động vật rừng nguy cấp quý hiếm), theo sách đỏ Việt Nam (2007), sâm Ngọc Linh được xếp vào hạng EN A1a, c, d, B1 + 2b, c, e [3]. Đến nay, sâm Ngọc Linh chỉ còn tập trung tại 2 điểm bảo tồn là Chốt Sâm (xã Măng Ri, huyện Tu Mơ Rông, tỉnh Kon Tum) và Trạm Dược liệu Trà Linh (xã Trà Linh, huyện Nam Trà My, tỉnh Quảng Nam) với tổng diện tích trồng khoảng 10 hecta [2][8].

1.4. Đặc điểm đa dạng di truyền

Ở Sâm Ngọc Linh, trình tự vùng ITS-rDNA đích mới được xác định có chiều dài khoảng gần 600 bp (đã được đăng ký trên Genbank với mã hiệu JF772113) [19][20]. Kết quả đối chiếu trình tự nucleotide vùng gen của nghiên cứu này cho thấy biến dị giữa *P. vietnamensis* và các loài thuộc chi được so sánh khá cao, chỉ số đa dạng di truyền dựa trên trình tự nucleotide tương đồng đến 0,0436 bp. So với các loài thuộc chi nhân sâm có trình tự tương đồng nhất trên Genbank, *P. vietnamensis* có ít nhất 14 nucleotide sai khác so với *P. ginseng* và nhiều nhất là 25 nucleotide (*P. stipuleanatus*) và đặc trưng bởi 6 nucleotide (autapomorphies) [12]. Từ nghiên cứu cây phát sinh các loài sâm cho thấy, loài *P. vietnamensis* có tổ tiên chung và quan hệ khá gần gũi với một số loài trong chi nhân sâm như *P. notoginseng*, *P. sinensis*, *P. sipinatifidus*, *P. japonicus*, sâm Lào (*Panax* sp.), sâm Lai Châu [19]. Cây phát sinh cũng chỉ ra một số loài khác trong chi nhân sâm có sự khác biệt di truyền lớn với *P. vietnamensis* như *P. Trifolius* và *P. stipuleanatus* [20].

1.5. Tác dụng dược lý

Sâm Ngọc Linh là một cây thuốc quý dùng để chữa nhiều chứng bệnh và tăng cường sức khỏe: cầm máu, chữa lành vết thương, làm thuốc bổ, trị sốt rét, đau bụng, chống trầm cảm, kích thích hệ miễn dịch, chống lão hóa, phòng chống ung thư, bảo vệ tế bào gan, tăng thị lực, sức đề kháng, nâng cao huyết áp ở người bị huyết áp

thấp,... Những tác dụng dược lý đang được quan tâm trong bối cảnh xã hội công nghiệp ngày nay như: chống stress (antistress), chống lão hóa (antioxidant), phòng chống ung thư (antitumor) đã được chứng minh có ở sâm Ngọc Linh, mở ra một triển vọng áp dụng thực tiễn trên lâm sàng rất khả quan [4].

Ngoài ba tác dụng chính của họ nhân sâm là bồi bổ cơ thể để gia tăng chuyển hóa các chất; tăng lực giúp chống nhược sức và tăng sức đề kháng không đặc hiệu của cơ thể nên tăng khả năng sinh thích nghi (adaptogen và antistress) [13]. Sâm Ngọc Linh còn có tác dụng tăng cường hoạt động não bộ và sinh dục, phòng chống phóng xạ, kháng viêm, giảm đau, hiệp lực với thuốc hạ huyết áp, đường huyết và hạ cholesterol (khi dùng bột mô sẹo). Sâm Ngọc Linh còn có tác dụng kháng khuẩn (đặc biệt trên các chủng thuộc chi *Streptococcus* gây viêm họng), bảo vệ tế bào gan và gia tăng hàm lượng cytochrome-P450 trong vi thể gan. Củ sâm Ngọc Linh liều 100 mg/kg làm tăng sức chịu đựng của chuột đối với nhiệt độ cao (37-42°C) hay nhiệt độ thấp (-5°C) nên kéo dài thời gian sống thêm của chuột. Khi thí nghiệm *in vitro* dùng dịch nổi của mô não, gan và phân đoạn vi thể gan của chuột nhắt trắng cho thấy, liều 0,05-0,5 mg/kg củ sâm giúp chống oxy hóa, ức chế sự hình thành malonyl dialdehyde (sản phẩm của quá trình oxy hóa lipid màng sinh học). Thí nghiệm *in vitro* và *in vivo* ở chuột nhắt trắng uống liều 500 mg/kg bột chiết sâm còn cho thấy, sâm Ngọc Linh làm tăng chỉ số thực bào. Các saponin toàn phần của củ sâm còn kích thích miễn dịch không đặc hiệu, chống oxy hóa và bảo vệ gan, phục hồi số lượng hồng cầu [4]. Hơn nữa, Konoshima và cs (1999) đã chứng minh MR2 của sâm này còn có tác động kích hoạt tác dụng chống ung thư *in vitro* và *in vivo* [82]. Điều này cho thấy, khả năng ứng dụng thực tiễn rất cao của sâm Ngọc Linh.

Những nghiên cứu hợp tác về dược lý với Viện Nghiên cứu Y học Đông phương, Trường Đại học Y Dược Toyama và Trường Đại học Hiroshima (Nhật bản), cùng các khảo sát đánh giá của Viện nghiên cứu sức khỏe người có tuổi (Hà Nội), viện Quân Y 175 (Tp. HCM) và viện Điều Dưỡng Tp. HCM, và các kinh nghiệm sử dụng dân gian của sâm Ngọc Linh (thu thập ý kiến người sử dụng ở vùng Liên khu 5, những người tình nguyện thử chế phẩm sâm Ngọc Linh,...) đã khẳng định những tác dụng dược lý này của sâm Ngọc Linh [3].

2. SƠ LƯỢC VỀ CÁC HỢP CHẤT SAPONIN

2.1. Cấu trúc của các saponin có trong sâm Ngọc Linh

Saponin hay saponoside là một hợp chất glycoside tự nhiên có hoạt tính bề mặt. Đây là một nhóm đa dạng của terpenoid được đặc trưng bởi các cấu trúc khác nhau. Saponin được cấu tạo từ một aglycon steroid hoặc triterpenoid với một hoặc nhiều chuỗi đường [27]. Những nghiên cứu phân lập thành phần hóa học mới nhất được công bố cho thấy, các hợp chất saponin của sâm Ngọc Linh tổng cộng có hơn 60 loại khác nhau, mà nhóm chất quan trọng nhất của loài sâm này là các saponin triterpenoid với các đại diện chính là MR2, Rb1 và Rg1 nằm trong nhóm dammaran, nhất là MR2 chiếm gần 50% hàm lượng saponin toàn phần [13][119].

Saponin triterpenoid có cấu trúc phần genin chứa 30 carbon, cấu tạo bởi 6 đơn vị hemiterpene. Các saponin này được chia thành hai loại: saponin triterpenoid pentacyclic có cấu trúc 5 vòng và saponin triterpenoid tetracyclic có 4 vòng. Saponin triterpenoid pentacyclic gồm nhóm olean, ursan, lupan và hopan [119]. Nhóm olean chứa phần lớn các saponin triterpenoid trong tự nhiên, phần aglycol thường là β -amyrin, ít gặp hơn nhóm acid oleanoid. Nhóm lupan có vòng E là vòng 5 cạnh, thường có nối đôi ở vị trí 20-29. Nhóm hopan gần giống lupan chỉ khác methyl ở C18 có hướng α . Saponin triterpenoid tetracyclic gồm 3 nhóm chính là dammaran, lanosan và cucurbitan. Nhóm dammaran có phần aglycol có 4 vòng: A, B, C có 6 cạnh, D có 5 cạnh và một mạch nhánh 8 carbon. Nhóm lanosan khác với nhóm dammaran do có nhóm methyl gắn vào C13 thay vì C18. Nhóm cucurbitan có nhóm methyl gắn ở vị trí C10 thay vì C9 và có hướng β [25] [119].

Từ phần dưới mặt đất (thân rễ và rễ củ) của sâm Ngọc Linh hoang dại đã phân lập và xác định được cấu trúc protopanaxatriol oxyd II và 52 hợp chất saponin bao gồm 26 saponin đã biết với tổng số hàm lượng chiếm khoảng 10,82% tổng hàm lượng các chất có trong rễ và 26 saponin có cấu trúc mới được đặt tên là viginoside V-R1 đến -R25 và 20-O-Me-G-Rh1 [129]. Các saponin dammaran quyết định tác dụng sinh học của sâm Triều Tiên cũng chiếm một tỷ lệ rất cao về hàm lượng và số lượng trong sâm Ngọc Linh (50/52 saponin phân lập được). Trong đó, các saponin dẫn xuất của 20(S)-protopanaxadiol gồm 22 hợp chất với đại diện

chính là ginsenoside-Rb1, -Rb3, -Rd. Các saponin dẫn xuất của protopanaxatriol gồm 17 hợp chất với các đại diện chính là ginsenoside-Re, -Rg1, notoginsenoside-R1 [129]. Các saponin có cấu trúc ocotillol gồm 11 hợp chất với các đại diện chính là majoside-R1 và -R2 [7]. Các hợp chất saponin mới của sâm Ngọc Linh có một số đặc điểm đáng chú ý. V-R1 và V-R2 là saponin ocotillol có nhóm acetyl trên chuỗi đường ở C-6. V-R3 là chất duy nhất thiếu nhóm -OH tại vị trí C-12 trong tất cả các saponin được phân lập từ loài này [119]. V-R4 là một saponin dẫn xuất của 20(S)-protopanaxatriol có mang một trong hai chuỗi đường ở C-3, trong khi các saponin này được tìm thấy trước đây chỉ mang các chuỗi đường ở C-6 và C-20, hoặc C-6 và C-12. V-R5 và -R6 là hai saponin có chứa cầu nối α -glycoside hiếm gặp trong tự nhiên. V-R7 là G-Rd xylosyl hoá. V-R8 có một mạch có liên kết đôi có hướng tại -OH ở C-25. Cấu trúc này có điểm tương đồng với majonoside-F4, có 3-O- và 20-O-di β -d-glucoside trên cùng một nhóm aglycone. V-R9 cũng có liên kết đôi có hướng tại C-36 và có cấu trúc tương đồng với majonoside-F1. Các saponin V-R10, -R12, -R13, -R14, -R15, -R16, -R17, -R19, -R20, -R21 có cấu trúc aglycone mới [119][129]. V-R13 là một glycoside đầu tiên phát hiện trong một loài sâm có aglycone là dammarenediol. Chất này có thể là một chất trung gian trong quá trình sinh tổng hợp của 20(S)-protopanaxadiol và 20(S)-protopanaxatriol [7][40].

Từ phần trên mặt đất (thân và lá) phân lập được 19 saponin, bao gồm 11 saponin đã biết và 8 saponin có cấu trúc mới được đặt tên là vinaginsenoside-L1-L8 [119]. Khác với phần dưới mặt đất, các saponin dẫn xuất của 20(S)-protopanaxadiol chiếm tỷ lệ rất cao trong thành phần saponin từ phần trên mặt đất với đại diện chính là notoginsenoside-Fc, G-RB3, N-Fe và V-L2. Các saponin 20(S)-protopanaxatriol gồm có P-RS1, G-Re và G-Rg1 với tỷ lệ thấp. Ngoài ra, sâm Ngọc Linh còn có các saponin có cấu trúc ocotillol với đại diện chính là V-R1 chiếm tỷ lệ thấp [7][40].

2.2. Các tính chất hóa lý của các saponin trong sâm Ngọc Linh

Theo Đỗ Hữu Bích (2003), saponin trong sâm Ngọc Linh đa số có vị đắng [2]. Về mặt hóa lý, các saponin có tính chất là dễ tan trong nước, cồn; ít tan trong acetone, ether, hexan và lắ sễ tạo bọt bền, cho nên saponin còn có khả năng phá vỡ hồng cầu một cách dễ dàng khi đi vào máu.

Về mặt hóa học, saponin có khả năng tạo phức với cholesterol: những saponin triterpenoid tạo phức kém hơn loại steroid, trong đó digitonin kết hợp với cholesterol gần như hoàn toàn. Ngoài ra, những hợp chất này có khả năng tạo các phản ứng màu, khi hòa tan các saponin với sulphuric acid đậm đặc, màu sẽ thay đổi từ vàng, đỏ, xanh lá hay tím, với vanillin 1% trong HCl hơi nóng (phản ứng Rosenthaler) chuyển thành màu tím, phản ứng với antimoin trichloride trong dung dịch chloroform thì phát huỳnh quang xanh hoặc vàng [2].

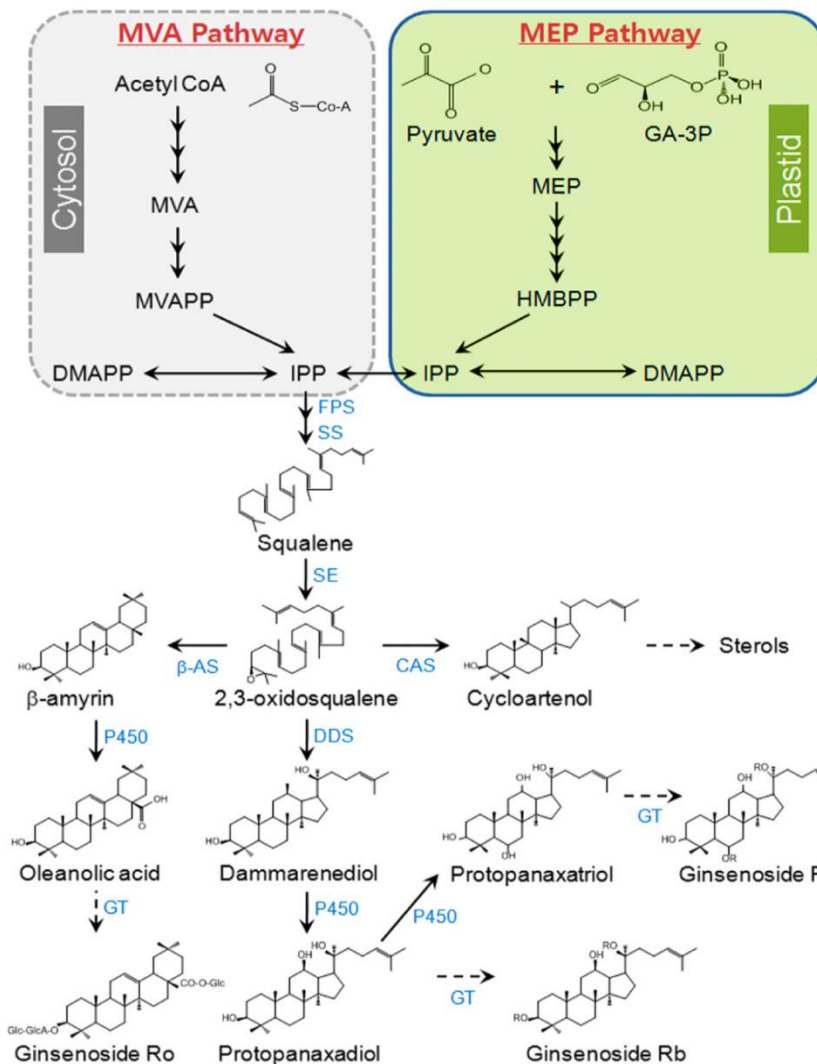
2.3. Vai trò của saponin trong cây

Các ginsenoside saponin chủ yếu tập trung ở ngoài tầng phát sinh của rễ và nhiều nhất ở phần vỏ chu bì (periderm) và vỏ nhu mô (cortex) bên ngoài phloem [84]. Các saponin này có tính kháng khuẩn, diệt virus, hoặc chống lại côn trùng [51]. Theo quan điểm này, có thể nói saponin là một trong những thành phần của cơ chế bảo vệ thực vật và xếp vào nhóm phytoalexin thuộc một nhóm lớn của các phân tử có chức năng bảo vệ, được gọi là phytoprotectant [95]. Phytoalexin không có sẵn trong cây khỏe mạnh, mà cây chỉ tổng hợp các saponin này khi bị thương hoặc khi phải chống lại các cuộc tấn công của sâu hại, các mầm bệnh từ các vi sinh vật hoặc khi bị stress từ môi trường xung quanh. Việc tổng hợp các saponin chỉ giới hạn trong các mô bị xâm chiếm và xung quanh vùng tế bào bị thương hay nhiễm bệnh như một phần của cơ chế bảo vệ thực vật [51]. Do vậy, dù các phytotoxic này có thể làm giảm khả năng phát triển của cây, nhưng chúng cần cho một hệ thống canh tác bền vững [95].

2.4. Con đường tổng hợp các triterpene saponin

Sinh tổng hợp saponin là một quá trình phức tạp qua hai con đường trung gian là con đường mevalonate (MAV) và methyl-D-erythritol 4-phosphate (MEP), cả hai đều dẫn đến sự hình thành isopentenyl diphosphate (IPP) và đồng phân dimethylallyl diphosphate (DMAPP), đó là những tiền chất để hình thành tất cả các terpene (Hình 1.1) [50]. Tích hợp nhóm gen mở đầu đến kết thúc của IPP và DMAPP giúp hình thành các geranyl diphosphate (GPP) và trong bước này tạo ra sản phẩm trung gian là GPP synthase (GPS). Dưới xúc tác của FPP synthase (FPS), một đơn vị IPP được gắn vào GPP tạo FPP. Sau đó, squalene synthase (SS) sẽ xúc

tác cho phản ứng ngưng tụ hai đơn vị FPP tổng hợp nên squalene, đó là tiền thân cho cả steroid và triterpene saponin (Hình 1.1) [94]. Sau đó, thông qua phản ứng oxy hóa, squalene epoxidase (SE) chuyển hóa squalene thành 2,3-oxidosqualene, điểm khởi đầu thường thấy để tạo vòng trong sinh tổng hợp triterpene saponin [94]. Việc tạo vòng của 2,3-oxidosqualene phụ thuộc vào β -amyrin, α -amyrin và dammarenediol dưới xúc tác của oxidosqualene cyclases (OSCs) [109]. Hơn 40 cyclases đã được nhân lên trong tế bào thực vật bậc cao. Trong đó, một số đã xác định được cấu trúc và chức năng như β -amyrin synthase, α -amyrin synthase và dammarenediol-II synthase [90]. Bộ khung triterpenoid sau đó trải qua những thay đổi khác nhau, chẳng hạn như quá trình oxy hóa, chuyển hóa và glycosyl hóa, cũng như qua các trung gian xúc tác bởi các enzyme khác nhau. Tuy nhiên, có rất nhiều các enzyme tham gia vào các bước sau sinh tổng hợp saponin vẫn chưa biết tới [88].



Hình 1.1. Con đường isoprenoid trong sinh tổng hợp triterpenoid saponin.

MVA mevalonate, MVAPP mevalonate-5-diphosphate, DMAPP dimethylallyl diphosphate, IPP isopentenyl diphosphate, MEP methylerythritol phosphate, HMBPP (E)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyldiphosphate, FPS farnesyl diphosphate-synthase, SS squalene synthase, SE squalene epoxidase, DDS dammarenediol synthase, β -AS β -amyrin synthase, CAS cycloartenol synthase, P450 cytochrome P450, GT glucosyltransferase [94].

3. NUÔI CÂY *IN VITRO* SINH KHỎI RỄ BẤT ĐỊNH VÀ RỄ THỨ CẤP

Saponin triterpenoid có cấu trúc phức tạp nên tổng hợp hóa học không có khả năng cạnh tranh kinh tế khi sản xuất trên quy mô lớn. Do đó, nguồn saponin từ sâm Ngọc Linh chủ yếu được chiết xuất từ cây trồng ngoài tự nhiên nhưng phải đối mặt với rất nhiều khó khăn.

Khi so sánh hiệu quả sản xuất các saponin chính trong nuôi cấy tạo các phần khác nhau của cây sâm Ngọc Linh cũng thấy hàm lượng saponin trong nuôi cấy mô sẹo là thấp nhất (1,04 mg/g MR2; 0,08 mg/g Rg1; 0,06 mg/g Rb1), RBD cao hơn (3,79 mg/g MR2; 0,48 mg/g Rg1; 0,30 mg/g Rb1). Dựa trên phân tích TLC đã kết luận rằng, thành phần ginsenoside trong *in vitro* giống với ngoài tự nhiên [53][81].

3.1. Khái niệm về rễ bất định

Rễ bất định (RBD) là những rễ phát sinh từ trục thân hay những cơ quan tự nhiên khác nhau. Về cơ bản, RBD có nguồn gốc nội sinh, do sự phân biệt hóa của tế bào nhu mô nằm xung quanh hệ thống mô mạch dưới tác động của auxin. Trong quá trình phân biệt hóa, tế bào từ vùng tủy đến vùng vỏ hồi phục 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 [32].

Các tế bào phân chia khác thuộc nhóm tế bào phân chia ngang không tham gia vào sự biệt hóa sơ khởi tạo rễ. Hơn nữa, sự phân chia tế bào cũng xuất hiện ở những mẫu cấy không phải là rễ khi xử lý với auxin. Vì vậy, sự phân chia tế bào ở vùng nhu mô không hoàn toàn có khả năng tạo sơ khởi RBD; chỉ có sự phân chia của tế bào ở những vị trí xác định và chuyên biệt mới dẫn đến hình thành mầm rễ [32].

3.2. Khái niệm về rễ thứ cấp

Rễ thứ cấp (RTC) hay còn gọi là rễ bên, rễ phụ, là một trong những phần quan trọng không thể thiếu của hệ thống rễ. Các sơ khởi RTC được hình thành từ các vùng ngoại vi của trụ bì trưởng thành ở những khoảng cách khác nhau từ các mô phân sinh đỉnh của rễ [86]. Nguồn gốc của RTC là từ các mô sâu bên trong rễ chứ không phải từ bề mặt bên ngoài. Sự hình thành rễ bắt đầu từ sự phân chia song song từ trụ bì tạo ra một lớp tế bào đôi. Ngay sau đó, các sơ khởi rễ bắt đầu biệt hóa tế bào, bằng chứng là biểu hiện gen khác biệt trong các lớp tế bào bên trong và các lớp

tế bào bên ngoài [55].

Sơ khởi RTC phát triển thông qua một chương trình phân chia tế bào rất đặc trưng để tạo ra một cấu trúc giống hệt khuôn mẫu của rễ chính. Sau khi mầm RTC được hình thành, nó sẽ trở thành một rễ trưởng thành thông qua một quá trình gồm hai giai đoạn [55]. Đầu tiên, các tế bào quanh trụ bì gia tăng kích thước hình thành các mầm rễ nổi lên xuyên qua các mô tế bào bao phủ [86]. Sự gia tăng kích thước tế bào đặc biệt rõ ràng trong các tế bào gần mầm rễ, trong khi số lượng tế bào vẫn không có thay đổi lớn. Thứ hai, các RTC mới bắt đầu mọc dài ra và tại đầu rễ số lượng tế bào tăng mạnh. Đây là đặc trưng của sự kéo dài rễ trưởng thành thông qua việc phân chia tế bào trong các mô phân sinh đỉnh rễ nên RTC có nguồn gốc nội sinh. Tùy thuộc vào thứ tự các rễ mọc ra, mà sau đó gọi là RTC bậc 1, RTC bậc 2, RTC bậc 3,... [32]. Thông thường, RTC của thực vật hạt trần và thực vật hạt kín hình thành từ trụ bì của rễ chính hoặc trên RBD. Về mặt lý thuyết, tất cả các tế bào trụ bì có khả năng cảm ứng hình thành RTC, nhưng dưới điều kiện bình thường chỉ có các tế bào trụ bì gần cực xylem hoặc cực phloem nhất và tùy thuộc vào các loài thực vật khác nhau mới thực hiện chức năng này. Trái lại, ở một số cây, rễ phát sinh từ nội bì như các cây thuộc ngành dương xỉ [32].

3.3. Một số yếu tố ảnh hưởng đến nuôi cấy rễ thứ cấp và rễ bất định

3.3.1. Loại mẫu cấy

Để tạo RBD, lá non hoặc các chồi non cho khả năng hình thành RBD hiệu quả hơn các loại mẫu khác. Điều này có thể là do lá non là nơi sản xuất auxin và chồi là nơi tích trữ auxin. Vị trí cắt của lá được sử dụng làm mẫu cấy cũng có tác động lên số lượng rễ được hình thành [86]. Các đoạn thân có chồi bên hoặc chồi ngọn hoặc lá trên đọt cắt thường kích thích sự hình thành RBD mạnh hơn [86]. Sự chuyển vị của các carbohydrate từ lá góp phần vào sự tạo rễ [32]. Khi đưa mẫu từ bên ngoài vào nuôi cấy *in vitro*, qua vài lần cấy chuyển mẫu cấy sẽ được trẻ hóa thông qua tác động của các cytokinin [32]. Tuy nhiên, dòng thực vật được trẻ hóa không thể tiếp xúc với BA quá lâu, vì khi đó cytokinin sẽ mất khả năng kích thích phát sinh cơ quan, gây ra hiện tượng thủy tinh thể. Chính vì thế, tình trạng trẻ hóa của mẫu *in vitro* được duy trì nhờ sự xen kẽ giữa các lần cấy chuyển sang môi

trường có và không có BA [106].

Trong nuôi cấy RTC, hầu hết các nghiên cứu thực hiện với rễ cây hoàn chỉnh nhằm đánh giá ảnh hưởng của các yếu tố môi trường đến sự định hướng của rễ, sự hấp thu chất dinh dưỡng, sinh lý của rễ, ảnh hưởng của rễ đến cây trồng và đưa vào ứng dụng ngoài đồng [55]. Tuy RTC được ghi nhận chủ yếu trong các nghiên cứu ở rễ cây hoàn chỉnh nhưng một số nghiên cứu khác còn sử dụng RBD nhân nhanh RTC để nghiên cứu thu nhận sinh khối và sản xuất các hợp chất thứ cấp. Trong một rễ hoàn chỉnh, mỗi phần khác nhau của rễ đều có vai trò khác nhau, trong đó, phần phát sinh RTC chỉ diễn ra tại vùng kéo dài ở miền sinh trưởng của rễ [86].

3.3.2. Vị trí phát sinh

Rễ bất định chủ yếu có nguồn gốc từ những vị trí tế bào xung quanh mô mạch, mô tủy hay ở nhu mô, vài trường hợp có nguồn gốc là ngoại sinh, từ tế bào biểu bì. Cách hình thành và vị trí hình thành sơ khởi rễ ở nhiều loài cây khác nhau cũng không giống nhau. Ở cây thuộc họ liễu và cây thân gỗ, sơ khởi rễ chủ yếu khởi đầu ở vùng tượng tầng phát sinh gỗ (*Acer pseudoplatanus*), nhu mô của mạch ray (*Populus simonii*), khoảng không bào của lá và chồi (*Lonicera japonica*, *Malus* spp.) [55][89]. Sơ khởi rễ cũng có thể bắt đầu từ các cụm tế bào nhu mô libe của trụ dưới lá mầm cây hướng dương (*Helianthus annuus*) hoặc từ tượng tầng bó mạch ở đốt thứ sáu bên dưới đỉnh ngọn của cây khoai lang (*Ipomoea batatas*) [89].

Đối với cây hạt trần, sự hình thành rễ thường gặp nhiều khó khăn vì thân thường không có sẵn các tiền sơ khởi rễ [86]. Vì vậy, RBD của cây hạt trần thường gọi là rễ do vết thương cảm ứng. Sơ khởi của những rễ hình thành từ vết thương có nguồn gốc từ các tế bào ở mặt trong của vỏ (*Cercis canadensis*), tế bào nhu mô libe và vùng phát sinh gỗ ở cây táo (*Malus domestica*), khoảng không bào ở lá và chồi *Malus pumila*, trụ bì *Abies procera* và từ mô sẹo *Abies firma*. Đối với cây thân thảo, sơ khởi RBD hình thành từ các mô: trụ bì của thân ở cây cà chua, bắp; nhu mô ở mạch ray giữa trụ bì và tượng tầng phát sinh gỗ (*Lonicera japonica*); cụm nhu mô (*Azukiangularis*); bó tượng tầng phát sinh gỗ và nội bì (*Portulaca oleracea*); bó tượng tầng phát sinh gỗ, nội bì và libe (*Begonia*) [89].

Vị trí phát sinh RTC liên quan tới cấu trúc xylem ở trung trụ. Ở cây

Arabidopsis thaliana, trung trụ gồm hai vòng và các RTC phát sinh từ các tế bào nền trụ bì (TBTB) nằm ở các ngăn gần kề với các cực của trung trụ [55]. Do vậy, các rễ sơ cấp cây *A. thaliana* tạo thành hai cột hay hai dãy ở vị trí 180°. Không phải tất cả các tế bào trụ bì nằm đúng vị trí giải phẫu này đều hình thành các mầm RTC mà chỉ có một số trực tiếp khởi đầu chu trình phát triển RTC [86]. Điều này có thể do các tế bào trụ bì cố định được nhận dạng ở giai đoạn sớm hơn đảm nhận nhiệm vụ này và kéo theo sau đó là chu trình phát triển đã định trước. Tuy nhiên, khi sử dụng các auxin ngoại sinh, tách bỏ đầu chóp rễ hay bổ sung thêm các khoáng chất cũng làm gia tăng khả năng khởi tạo RTC lên rất nhiều lần. Hơn nữa, không phải tất cả các tế bào trụ bì nằm đúng vị trí đặc biệt ở các cực mô gỗ sơ cấp mới có khả năng kích thích hình thành RTC khi vắng mặt các yếu tố quyết định ban đầu [55].

Nhiều quan điểm cho rằng, tất cả quá trình khởi tạo RTC gồm cả quá trình phân biệt hóa các tế bào trụ bì nằm trong một chu trình tế bào. Dựa trên đánh giá về độ dài của chu trình tế bào và tốc độ phát triển của rễ chính cho thấy rằng, một số RTC phát triển từ các tế bào trụ bì đã được lên chương trình trước thông qua chu trình tế bào liên tục từ lúc bắt đầu ở mô phân sinh đỉnh. Gần đây, các dữ liệu đã được nghiên cứu sâu hơn để chứng minh cho giả thuyết này. Đa số các nghiên cứu cho thấy các tế bào trụ bì cực xylem tiếp tục chu trình biệt hóa và không bị gián đoạn sau khi đã tách bỏ mô phân sinh đỉnh rễ [55]. Do đó, hầu hết trụ bì vẫn ở pha G1, và chỉ có các tế bào trụ bì ở cực xylem được lập trình từ pha G1 lên G2. Các kết quả này hợp thành một luận cứ hỗ trợ cho luận điểm về quá trình hình thành mô phân sinh đơn bào ở vùng đỉnh còn non của rễ nằm trên vùng kéo dài. Ngược lại, các RTC phát triển từ các vùng trưởng thành của rễ sơ cấp hầu hết chắc chắn cần phân biệt hóa và được chuyển hóa từ các tế bào trụ bì được thiết lập trước đó trong chu trình tế bào [55].

Ở cây *A. thaliana*, hiện tượng phát sinh hình thái đầu tiên liên quan đến việc khởi tạo RTC diễn ra khi hai TBTB nằm ở cùng một cột gần như đồng thời phân chia bất đối xứng và theo chiều ngang. Quá trình này tạo ra hai dẫn xuất trụ bì ngắn nằm từ đầu này sang đầu kia trên cùng một cột được bao bọc ở phía trên và phía dưới bởi hai dẫn xuất trụ bì dài hơn. Tiêu chuẩn phát sinh hình thái này cho phép

nhận dạng chính xác vị trí khởi tạo RTC. Tiếp theo đó, các TBTB trải qua các quá trình phân chia theo kiểu bất đối xứng, theo chiều nghiêng, vòng cung, lồi lên và xiên qua làm gia tăng các nhóm dẫn xuất chứa các mầm RTC. Hình thành mô phân sinh là một quá trình gồm hai giai đoạn: giai đoạn đầu, các tế bào phân chia rất nhanh và khá đồng đều để tạo thành mầm rễ; giai đoạn tiếp theo là sự hình thành các mô phân sinh mới bên trong mầm rễ [55].

3.3.3. *Vai trò điều hòa của auxin*

Hầu hết các nuôi cấy mô sẹo, RBD và dịch huyền phù tế bào đều sử dụng các auxin ngoại sinh. Tuy nhiên, auxin có thể có một tác động tiêu cực đến quá trình sinh tổng hợp các chất chuyển hóa thứ cấp [15][18].

Mặc dù chưa được chứng minh, vai trò của auxin trong sự hình thành RBD được thừa nhận một cách hiển nhiên. Trên thực tế, đây là chất duy nhất gia tăng sự hình thành rễ một cách đáng kể khi sử dụng với nồng độ và thời gian thích hợp. 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 amino acid (aspartic acid, glutamic acid) hay glucidic acid. Dạng liên kết này không có hoạt tính auxin nhưng dễ dàng phóng thích auxin nhờ xúc tác của các enzyme. Đây là dạng dự trữ (không bị phá hủy bởi IAA-oxidase) và vận chuyển của auxin [38]. Auxin liên kết là một cơ chế khử độc hay điều hòa hàm lượng auxin tự do [55].

IAA, IBA và NAA là những hợp chất auxin thường được sử dụng để kích thích sự phát sinh rễ [118]. Để auxin đạt hiệu quả cao nhất, nồng độ sử dụng phải cao cho giai đoạn đầu tiên để khởi động sự phân chia tế bào. Nếu hàm lượng auxin ban đầu quá thấp, sự kích thích tạo rễ sẽ không có hiệu quả đôi khi còn kìm hãm quá trình hình thành rễ. Có ý kiến cho rằng, nên cung cấp một lượng auxin nhất định theo chu kỳ trong suốt quá trình nuôi cấy tạo rễ [32].

Trong quá trình hình thành RTC, đa số các nhà nghiên cứu đều đồng ý rằng auxin là tín hiệu mở khóa cho sự khởi tạo và phát triển của RTC, cũng đã có rất nhiều bằng chứng làm sáng tỏ vai trò của auxin trong quá trình hình thành RTC [118]. Con đường dẫn truyền auxin đóng vai trò quan trọng trong việc điều hòa dòng phytohormone giữa nguồn IAA và các mô bên trong, điều này tác động lên sự

phát triển RTC. Các đột biến làm gián đoạn con đường vận chuyển auxin ở cây *A. thaliana* cũng làm thay đổi cấu trúc của RTC như đột biến gen *tir3* gây giảm các cực vận chuyển auxin dẫn tới giảm số lượng RTC [111]. Tại cấu trúc rễ đột biến thiếu mô phân sinh chồi đã làm mất đi tính hướng ngọn trong quá trình phát triển do những sai sót trong việc hình thành nhu mô lá dẫn tới thiếu hụt IAA cần cho việc tạo RTC [38]. Các đột biến *alf4* gây sai sót trong việc khởi tạo RTC ở cây non, còn đột biến *alf3* có quá trình khởi tạo RTC xảy ra bình thường với việc tạo ra protein ALF3 cần để sinh tổng hợp indole (tiền chất của IAA) [38]. Kiểu hình tương phản của các đột biến *alf3* và *alf4* cho thấy rằng IAA cần cho hàng loạt các giai đoạn phát triển của RTC. Khi nghiên cứu các đột biến trong cấu trúc rễ bị biến đổi gen, AUX1 được cho là chất mang trong dòng vận chuyển auxin nhờ tác dụng ngăn chặn sự vận chuyển phytohormone giữa nguồn IAA vào mô bên trong và dẫn tới làm giảm 50% số RTC. Nguyên nhân cho việc giảm số lượng RTC của dòng *aux1* không liên quan đến tín hiệu khởi tạo RTC của auxin nhưng làm giảm tỷ lệ khởi tạo RTC [55]. Điều này có thể do quá trình khởi tạo RTC còn chịu tác động của lượng nitric oxide (NO) tạo ra trong quá trình vận chuyển auxin [32].

Vận chuyển auxin phân cực cho phép các tế bào rễ đáp ứng lại với các kích thích của môi trường. IAA vận chuyển từ các lá đang phát triển đến hệ thống rễ thông qua các bơm có chu kỳ sống ngắn trong rễ, điều này đóng vai trò rất quan trọng khi khởi tạo RTC sơ cấp trong giai đoạn đầu của quá trình phát triển cây con [55]. Giai đoạn hình thành RTC sơ cấp thường bị ức chế khi cắt đi mô phân sinh đỉnh hay do việc sử dụng tiền chất naphthylphthalamic acid (NPA) dùng để nhận diện các bơm IAA trong rễ nên gây ức chế sinh tổng hợp auxin, nhưng NPA ở liều cực thấp lại có tác dụng khởi tạo RTC sơ cấp [55]. Dựa vào đây, mô hình hình thành RTC của cây con được chia thành hai giai đoạn: pha khởi tạo RTC dựa vào nguồn IAA ở chóp rễ và pha khởi tạo RTC dựa vào việc vận chuyển auxin từ lá [55].

IAA đi vào các tế bào thông qua các kênh hấp thụ auxin được mã hóa trên gen *aux1*. Gần đây, nhiều bằng chứng cho thấy rằng AUX1 thực hiện chức năng vận chuyển auxin theo hai hướng trong đầu rễ, vận chuyển hướng lên ngọn và hướng xuống rễ trong libe nguyên sinh và các tế bào đầu rễ tương ứng [55]. Auxin không

được vận chuyển theo mô dẫn truyền mà đi xuống từ tế bào này sang tế bào khác, sự di chuyển một chiều và có lẽ do sự vận chuyển tích cực và đòi hỏi năng lượng. Ở thân, auxin di chuyển từ đỉnh ngọn thân xuống phần gốc, trong khi ở rễ, sự di chuyển hướng từ ngọn rễ đến thân [55]. Con đường vận chuyển auxin ở các tế bào thực vật diễn ra thông qua các phức mang vận chuyển ra ngoài nhạy cảm với các chất ức chế sinh tổng hợp auxin như NPA (một số hợp chất được biết tới là có ít nhất hai chuỗi polypeptide). Polypeptide đầu tiên của các chất mang này là chất vận chuyển gắn trên màng tế bào được mã hóa bởi nhóm gen tổng hợp protein PIN [55]. Các protein PIN định vị bất đối xứng trên màng plasma đóng vai trò kiểm soát sự phân cực của việc vận chuyển auxin. Rất nhiều trình tự của nhóm gen tổng hợp protein PIN trong cây *A. thaliana* có chứa nhiều chất mang auxin với các biểu hiện riêng biệt. Polypeptide thứ hai của phức hợp chất mang auxin ra ngoài biểu hiện hoạt động như một tiểu đơn vị điều hòa và điểm gắn kết với các chất ức chế dòng auxin *in vitro*. Các protein gắn kết với NPA dường như là một polypeptide riêng biệt từ protein PIN vì chúng có liên kết với màng tế bào ngoại vi và nằm ở tế bào chất. Các protein gắn kết với NPA cũng là các hợp chất điều hòa nội sinh như flavonoid. P-glycoprotein ABCB19/PGP19 là thành viên của các gen kháng thuốc được xác định có ba thành phần tích cực lên chất mang auxin ra ngoài. Điều này thể hiện mối tương tác giữa PIN1 và ABCB19/PGP19 trong màng plasma làm tăng tỷ lệ và độ đặc hiệu của dòng chảy auxin và sự tương tác này làm giảm chu kỳ năng lượng của PIN1 và có chức năng ổn định PIN1 trong màng plasma.

3.3.4. Tương tác giữa auxin và cytokinin

Quá trình hình thành RTC rất phức tạp phụ thuộc vào nhiều vấn đề như các yếu tố tự nhiên được điều hòa bởi các phytohormone khởi tạo RTC nhưng chưa được biết rõ. Tuy nhiên, áp dụng các thành tựu của công nghệ di truyền phân tử ở cây mô hình *A. thaliana* đã làm tăng khả năng tìm ra các yếu tố mới và chủ chốt trong con đường khởi tạo RTC [32]. Đến nay, các con đường truyền tín hiệu bởi phytohormone trở nên rõ ràng và thể hiện vai trò thiết yếu trong việc khởi tạo và hình thành mầm RTC và nhiều nghiên cứu cho rằng việc kiểm soát hình thành RTC sẽ dễ dàng hơn nếu phân tích mối tương tác giữa các phytohormone hơn là tập trung

vào tác động của một phytohormone riêng biệt của auxin [55].

Nồng độ auxin và cytokinin dọc theo rễ chính được cho là điều hòa việc khởi động, hình thành mô phân sinh và phát sinh các mầm RTC. Ví dụ, trong các rễ đậu được tách bỏ hoạt động trụ bì phụ thuộc vào tỷ lệ auxin/cytokinin ngoại sinh, các kết quả cho thấy riêng auxin giúp tăng cường khởi tạo RTC, còn cytokinin có nhiệm vụ hình thành một loạt dây trụ bì và kết hợp với các phytohormone sắp xếp thượng tầng chức năng [32]. Gần đây, auxin được cho là yếu tố gián tiếp điều hòa âm rất nhanh dòng cytokinin bằng cách ngăn chặn quá trình sinh tổng hợp thông qua con đường độc lập với isopentenyladenosine-5'-monophosphate. Ngược lại, khi gia tăng quá mức cytokinin làm toàn bộ dòng auxin ở thực vật di chuyển chậm hơn [55].

3.3.5. Nhiệt độ

Nhiệt độ cao kích thích sự biến dưỡng của tế bào, thích hợp cho sự khởi tạo sơ khởi rễ. Người ta cho rằng, nếu nuôi cấy ra rễ trong điều kiện sáng thì nhiệt độ kích thích ra rễ là 30-35°C, còn nếu nuôi trong điều kiện tối thì nhiệt độ khoảng 20-25°C là thích hợp [55].

3.3.6. Ánh sáng

Ánh sáng thường được cho là tác nhân ức chế sự hình thành rễ, đặc biệt là ở giai đoạn hình thành sơ khởi rễ. Điều kiện tối có lợi cho giai đoạn đầu của quá trình ra rễ. Chu kỳ tối thích hợp là 3-10 ngày tùy thuộc vào loài thực vật khác nhau [55]. Chất lượng ánh sáng có thể ảnh hưởng lên sự ra rễ, ánh sáng trắng kích thích sự ra rễ dưới thông qua vai trò của các phytochrome. Trong đó, với các ánh sáng đơn sắc, ánh sáng đỏ thích hợp cho sự ra rễ, trong khi ánh sáng đỏ xa lại có tác động ức chế sự hình thành RTC [55]. Ánh sáng xanh không ảnh hưởng đến số lượng rễ tạo thành nhưng làm gia tăng sự kéo dài rễ. Nguyên nhân là do ánh sáng xanh thúc đẩy sự phân hủy IAA nhờ tăng cường tổng hợp các phenylalanin và một số phenol mạch đơn [55].

3.3.7. Giá thể nuôi cấy

Có thể nói sự tăng trưởng của rễ chịu ảnh hưởng bởi cấu trúc và thành phần của giá thể nuôi cấy. Agar là một dẫn xuất của rong biển, là một hợp chất polysaccharide cao phân tử. Agar được sử dụng như một nhân tố làm đông trong

hầu hết môi trường dinh dưỡng [55]. Vì agar liên kết với nước và hấp thu các hợp chất từ môi trường nên người ta nghĩ rằng, agar hạn chế sự hấp thu các chất điều hòa tăng trưởng. Agar có thể có những ảnh hưởng về vật lý như hạn chế sự kéo dài rễ, và rễ trở nên dày hơn nhờ sự trương phồng, tỏa tròn của tế bào. Ở cây *Radiata pine*, cây con kéo dài rễ trong môi trường agar: rễ khô héo và hóa đen khi chuyển ra đất [32]. Khi nuôi cấy trên môi trường thạch, RTC có khuynh hướng phát triển hướng lên bề mặt thạch để hấp thu không khí ở bên trên [106].

Gelrite là các polymer sinh học tinh chiết từ nuôi cấy vi khuẩn *Sphingomonas elodea* Gelrite hay Phytigel là các tạo ra gel cứng ở nồng độ thấp hơn nhiều so với agar hoặc agarose. Chúng cũng gần như trong suốt giúp dễ dàng quan sát hơn, ví dụ như để xác định ô nhiễm ở giai đoạn đầu. Tuy nhiên, những loại gel này có xu hướng bị lỏng sau một thời gian dài do sự thay đổi độ pH hoặc sự cạn kiệt các muối cần thiết cho các liên kết. Khả năng mẫu tiếp xúc với môi trường này tối ưu hơn so với agar, nên thông thường mẫu sẽ phát sinh hình thái như tạo mô sẹo xốp tốt hơn [6]. Tuy nhiên, một số nghiên cứu lại cho thấy hiệu quả tiêu cực của chúng lên sự phát triển của mẫu cấy [10].

Để có độ thoáng khí cao trong nuôi cấy một số nghiên cứu đã sử dụng giá thể bông gòn, có nguồn gốc từ bông cây *Gossypium herbaceum*, trở về mặt hóa học. Tuy nhiên, chưa có nhiều nghiên cứu về hiệu quả của bông gòn trong nuôi cấy mô. Theo nghiên cứu của Trịnh Thị Hương (2017), bông gòn cũng có thể sử dụng để nuôi cấy rễ chuyển gen sâm Ngọc Linh, nhưng hiệu quả không cao bằng agar [10].

3.3.8. Các hệ thống nuôi cấy

Các hệ thống lắc theo quỹ đạo bao gồm các bình tam giác đặt trên một máy lắc tạo ra các chuyển động tròn. Bằng cách điều chỉnh các kẹp bên trên, người ta có thể sử dụng chúng để lắc các bình nuôi cấy có thể tích từ 50-2000 mL. Các máy lắc quỹ đạo thường có tốc độ thay đổi trong khoảng 30-150 vòng/phút. Nhìn chung, tốc độ lắc trên 200 vòng/phút là không phù hợp cho nuôi cấy thực vật. Nhịp của máy lắc nên được điều chỉnh ở khoảng 1,9 và 3,8 cm theo quỹ đạo chuyển động. Tốc độ lắc tối ưu (dựa vào tốc độ tăng trưởng, tổng lượng tế bào và khả năng phân tách tế bào tốt nhất) tùy thuộc vào từng trường hợp nuôi cấy, môi trường nuôi cấy, bình

nuôi cấy và lượng thể tích nuôi cấy tương quan với kích thước và hình dạng bình [6]. Nuôi cấy các rễ bất định thường sử dụng 20-25 mL môi trường trong bình thể tích 100 mL hoặc 70 mL môi trường trong bình thể tích 250 mL [38][56].

Các hệ thống nuôi cấy khuấy hoặc sục khí được sử dụng để nuôi cấy rễ lớn (thể tích 5-10 L) [56]. Trong những hệ thống này, tế bào được duy trì và phân bố trong suốt quá trình nuôi cấy, sự trao đổi khí được thúc đẩy nhờ sự thoáng khí do áp lực và sự thoáng khí bên trong do môi trường bị khuấy động nhờ từ tính. Hệ thống nuôi cấy khuấy có thể dễ dàng gắn kết với các thiết bị điều khiển sự tăng trưởng tế bào và thay đổi môi trường nuôi cấy, kết nối với nguồn cung cấp môi trường và nguồn cung cấp khí để thay đổi điều kiện nuôi cấy [66]. Các hệ thống này có thể được phát triển thành hệ thống nuôi cấy liên tục trong đó nhiệt độ của môi trường nuôi cấy có thể điều khiển được nhờ cuộn dây đốt nóng [38].

Các hệ thống nuôi cấy tế bào và rễ của *P. ginseng* đã được thiết kế để so sánh, đánh giá khả năng phát triển và sản xuất saponin trên quy mô lớn [84]. Tổng hàm lượng saponin cụ thể là ginsenoside có nhiều khác biệt trong từng nuôi cấy và trong từng hệ thống thử nghiệm. Trong nuôi cấy rễ, tính chất và thành phần các hợp chất ginsenoside đặc biệt tương tự như trong củ sâm thu ngoài tự nhiên. Tuy nhiên, tổng hàm lượng saponin chỉ chiếm 1,8% KKK từ bình tam giác lớn và 1,5% trong Bioreactor sinh học, thấp hơn so với tổng hàm lượng saponin trong củ *P. ginseng* ngoài tự nhiên (3,3% KKK). Tuy nhiên, năng suất thu nhận saponin trong nuôi cấy tế bào *P. ginseng* rất cao, đặc biệt nuôi cấy huyền phù tế bào trong Bioreactor lên đến 4,3%, trong khi nuôi cấy mô sẹo chỉ đạt 1,3% [126][131]. Trong trường hợp nuôi cấy huyền phù tế bào đã phát hiện được một loạt các saponin riêng lẻ khác, trong đó có chứa các ginsenoside Rb1 và Rg1 với hàm lượng sản xuất ra rất cao. Do đó, hệ thống này sẽ phù hợp hơn cho việc sản xuất các hợp chất riêng lẻ. Ngoài ra, do tình trạng biệt hóa khác nhau ở các tế bào thực vật nên gặp khó khăn khi thu nhận các hợp chất mong muốn [55].

3.4. Một số nghiên cứu nuôi cấy thu nhận sinh khối rễ các loài sâm

3.4.1. Một số nghiên cứu trên thế giới

Việc nuôi cấy RBD một số loài sâm phương Đông để sản xuất saponin cũng

đã có những thành công nhất định. Nuôi cấy RBD hay rễ tơ *P. ginseng* được chú trọng nhiều nhất trong các phương pháp nuôi cấy mô và cơ quan, do các nuôi cấy này thu nhận sinh khối hiệu quả và nhiều nhất trong thời gian rất ngắn. Hơn nữa, các ginsenoside quý từ *P. ginseng* cũng chủ yếu tập trung và tích trữ trong rễ *P. ginseng* cho nên lượng saponin thu được cũng cao hơn hẳn các nuôi cấy khác. So với nuôi cấy rễ tơ chuyên gen hay rễ trồng, nuôi cấy RBD cũng có nhiều ưu điểm hơn vì việc quản lý quy trình nuôi cấy rõ ràng, đơn giản hơn và các nuôi cấy cũng ổn định và an toàn hơn [79].

Kể từ năm 1998, hệ thống Bioreactor có cánh khuấy đã được nghiên cứu nhằm thu nhận sinh khối từ nuôi cấy rễ [104]. Kết quả cho thấy, nuôi cấy rễ được xem như là hiệu quả nhất cho việc sản xuất sinh khối bởi vì chúng sinh trưởng nhanh và sản xuất hợp chất ổn định. Từ đó đến nay, hệ thống nuôi cấy này đã được nghiên cứu và ứng dụng rộng rãi vào nuôi cấy RBD với số lượng lớn phục vụ cho mục đích thương mại [130]. Hệ thống Bioreactor đặc biệt rất hiệu quả trong nuôi cấy trên quy mô lớn RBD *P. ginseng* [55].

Đối với các loài sâm, khả năng tích lũy các hợp chất saponin có ý nghĩa rất lớn trong các ngành sản xuất dược phẩm. Do vậy, Hahn và cs (2003) cũng đã xác định các loại và nồng độ auxin tối ưu lên sự hình thành cơ quan và sản xuất saponin từ nuôi cấy RBD *P. ginseng* C.A. Meyer [56]. Rễ và chồi phát triển trong môi trường có chứa 2,4-D, NAA và đặc biệt là IBA có sự gia tăng hàm lượng các ginsenoside nhóm Rb hơn là nhóm Rg [56]. Palazon và cs (2003) đã tiến hành bước đầu sản xuất ginsenoside từ nuôi cấy rễ tơ *P. ginseng* trong Bioreactor cải tiến [105]. Ngoài ra, hệ thống Bioreactor hình cầu thể tích từ 500-1000 L cũng được sử dụng trong nghiên cứu này để sản xuất ginsenoside. Hệ thống nuôi cấy Bioreactor đã đạt đến thể tích 10000 L tại Hàn Quốc [56][104][116]. Nghiên cứu ảnh hưởng của việc bổ sung oxygen lên sự phát triển tế bào và sản xuất saponin trong nuôi cấy Bioreactor của *P. ginseng* cho thấy bổ sung oxygen cho nuôi cấy *P. ginseng* trong hệ thống Bioreactor là cần thiết cho sự phát triển của tế bào và tích lũy saponin. Ngoài ra, nuôi cấy RBD còn phụ thuộc vào CO₂ vì CO₂ tác động lên enzyme chống oxy hóa và giúp sản xuất ginsenoside ở nuôi cấy lỏng rễ *P. ginseng* [128]. Theo kết quả

quan sát được, nồng độ enzyme chống oxy hóa gia tăng có thể ảnh hưởng đến phản ứng chống lại sự tổn hại tế bào bởi CO₂. Như vậy, sự gia tăng nồng độ CO₂ có thể ảnh hưởng không tốt cho tích lũy ginsenoside; tuy nhiên, nó làm giảm stress và giúp rễ phát triển. Nuôi cấy RBD còn chịu tác động của các điều kiện nuôi cấy: pH, đường, nitrogen, phosphate, nhưng đây không phải là các tác nhân ảnh hưởng đến sự phát triển của rễ, mà còn chịu ảnh hưởng đáng kể đến hàm lượng saponin [40][104][116][118]. Ví dụ, hàm lượng saponin cao nhất thu được khi nuôi cấy RBD cây *P. ginseng* ở pH 5,8 [133].

Nghiên cứu thu nhận sinh khối rõ ràng không chỉ dừng lại ở quy mô phòng thí nghiệm mà đã được công nghiệp hóa bằng nuôi cấy Bioreactor [130]. Tình hình nghiên cứu về tái sinh và đặc biệt là thu nhận sinh khối thông qua nuôi cấy *in vitro* đã có một bước tiến rất dài, nguồn sinh khối thu được đã góp phần làm giảm việc khan hiếm nguyên liệu cho các ngành dược phẩm và mỹ phẩm [123].

3.4.2. Một số nghiên cứu trong nước về rễ bất định sâm Ngọc Linh

Ở Việt Nam đã có một số tác giả nghiên cứu về RBD sâm Ngọc Linh, tuy nhiên, chưa có nghiên cứu nào về RTC và những nghiên cứu về nuôi cấy rễ loài sâm này còn rất hạn chế.

Dương Tấn Nhựt và cs (2009) đã bước đầu thành công trong việc nhân nhanh RBD của sâm Ngọc Linh (*P. vietnamensis* Ha et Grushv.) và các khảo sát về một số yếu tố ảnh hưởng tới sinh khối cây sâm Ngọc Linh nuôi cấy *in vitro* và bước đầu phân tích hàm lượng saponin cũng đã được thực hiện [98]. Dương Tấn Nhựt và cs (2012) cũng đã xây dựng được một hệ thống nuôi cấy phù hợp để tái sinh RBD cây sâm Ngọc Linh [16].

Gần đây, hàng loạt các nghiên cứu trong nước cũng đã tập trung vào tối ưu hóa các yếu tố môi trường dinh dưỡng, các điều kiện nuôi cấy và giá thể nhằm tăng sinh khối RBD sâm Ngọc Linh. Hồ Thanh Tâm và cs (2013) đã xác định được trong các loại auxin, IBA ở nồng độ 5 mg/L là phù hợp để RBD hình thành từ mẫu lá với lượng saponin cao hơn so với sử dụng các auxin khác [18]. Ngoài ra, một số nghiên cứu khác cũng cho rằng môi trường phù hợp cho nuôi cấy rễ sâm Ngọc Linh là môi trường SH hay MS chứa 5 mg/L IBA [14][11].

4. ELICITOR VÀ SỰ KÍCH KHÁNG TRONG NUÔI CẤY *IN VITRO*

Để tăng hiệu quả sản xuất saponin, gần đây mối tương quan giữa sản xuất saponin và biểu hiện của enzyme quan trọng trong sinh tổng hợp saponin đã được nghiên cứu trên các chi *P. ginseng* thông qua tác động của các elicitor [13].

4.1. Khái niệm

Elicitor (elicitor thực vật) có thể được định nghĩa là một chất làm các thay đổi sinh lý trong thực vật. Khi đưa vào hệ thống tế bào sống của thực vật, các tế bào thực vật phản ứng với các tác nhân gây stress này bằng cách hoạt hóa một loạt các cơ chế tương tự như phản ứng phòng vệ của thực vật với các tác nhân gây bệnh hay kích thích của môi trường, ảnh hưởng đến quá trình trao đổi chất của thực vật và tăng cường tổng hợp các hợp chất thứ cấp [101].

Lần đầu tiên, các elicitor sinh học được mô tả vào đầu những năm 1970; kể từ đó, hàng loạt các công bố đã chứng minh các hợp chất có nguồn gốc từ các tác nhân gây bệnh gây ra các phản ứng phòng vệ hoặc cảm ứng chống chịu ở thực vật và gây tích lũy một số hợp chất sinh học ở cây trồng hay trong các nuôi cấy mô tế bào thực vật [101]. Việc ứng dụng các elicitor riêng lẻ hay kết hợp ở các thời điểm sinh trưởng của thực vật như một công cụ để tăng cường hàm lượng các hợp chất thứ cấp, nhưng đây không phải là thuốc bảo vệ thực vật hay phân bón dùng để kích thích sự phát triển của cây trồng.

Sự kích kháng là gây đáp ứng phòng vệ bằng một lượng nhỏ các elicitor để tăng cường quá trình sinh tổng hợp các chất chuyển hóa thứ cấp [95].

4.2. Phân loại

Elicitor có thể được phân loại dựa trên cơ sở bản chất tự nhiên có elicitor phi sinh học, elicitor sinh học (Bảng 1.1) [95][101][137][101]. Elicitor sinh học (chitosan, alginate, cellulose,...) thường bắt nguồn từ các vi sinh vật (nấm, vi khuẩn, virus) hay các tác nhân lây nhiễm từ động vật như các polysaccharide, polyamine, glycoprotein và acid béo. Các elicitor từ thành tế bào vi sinh vật (cell-wall elicitor) thường là các thành phần hoạt hóa ở mức độ phân tử [32]. Các elicitor sinh học (galacturonide hay hepta- β -glucoside) được giải phóng ra khi thực vật bị tấn công thông qua hoạt động của các enzyme chống lại các tác nhân gây bệnh [32][95].

Bảng 1.1. Phân loại elicitor trong sản xuất các hợp chất thứ cấp [95][101].

A. Theo bản chất elicitor	
Elicitor sinh học	Elicitor phi sinh học
<ul style="list-style-type: none"> - Được giải phóng trực tiếp từ động vật, vi sinh vật và được nhận diện bởi tế bào thực vật như các enzyme, các mảnh thành tế bào, protein động vật, các lipopolysaccharide; các poly-saccharide: pectin và cellulose (thành tế bào); chitosan, chitin, các glucan (vi sinh vật), alginate, arabic gum, guar gum, dịch chiết nấm men; các oligo-saccharide: galacturonide, guluronate, mannan, mannu-ronate. - Được tạo thành bởi hoạt động của vi sinh vật trên thành tế bào thực vật như các cellulase, pectolyase. - Được tạo thành từ hoạt động của các enzyme thực vật trên thành tế bào vi khuẩn như các protein: cryptogein, glycolprotein, oligandrin, các hydrolysat, lactoferrin. - Các hợp chất: nội sinh và tạo thành trong tự nhiên như các CDHST nội sinh; được hình thành hoặc tiết ra bởi tế bào thực vật khi đáp ứng kích thích khác nhau như các pathogen toxin như coronatine, các chiết xuất hữu cơ. 	<p>Tác dụng của các tác nhân vật lý hoặc hóa học tự nhiên theo đường nội sinh tạo thành các elicitor sinh học</p> <ul style="list-style-type: none"> - Vật lý: tia UV, protein biến tính (Rnase), gây đông và rã đông, các thành phần không thiết yếu của môi trường (agarose, thiếc,...), sự thay đổi áp suất, độ ẩm, các thành phần khí như CO₂, ozone, bị gây vết thương, stress muối, nhiệt độ hay do khô hạn. - Hóa chất có ái lực cao với DNA và có hoạt tính phá vỡ màng tế bào như thuốc diệt nấm (maneb, butylamin, benomyl), thuốc diệt cỏ (acifluorfen), acetic acid, benzothiadiazole, silicon, kim loại nặng, các prohexadione điều hòa sinh học, ethanol, ethane, các muối vô cơ: HgCl₂, CuSO₄, CaCl₂ và VSO₄,... các ion kim loại: Co²⁺, Fe²⁺, Al³⁺, Ag²⁺, Ag⁺, Mn²⁺, Zn²⁺, Cu²⁺, Pb²⁺ và Cd²⁺.
B. Theo nguồn gốc elicitor	
Các elicitor ngoại sinh	Các elicitor nội sinh
<ul style="list-style-type: none"> - Hình thành từ bên ngoài tế bào, bao gồm phản ứng trực tiếp hoặc qua các chất nội sinh trung gian - Polysaccharide: glucomanose, glucan, chitosan,... - Peptide và chuỗi các ion dương: monilicolin, poly-L-lysine, polyamine, glycoprotein,... - Enzyme: polygalacturonase, endopolygalacturonase acid lyase, cellulase,... - Acid béo: acid arachidonic, acid eicosapentanoic,... 	<ul style="list-style-type: none"> - Được tạo thành qua các phản ứng thứ cấp, cảm ứng bằng một tín hiệu sinh học như JA hay SA hoặc phi sinh học trong tế bào như dodeca-β-1,4-D-galacturonide, hepta-β-glucoside, alginate oligomer,... - Các CDHST: JA, MeJA, SA, ethylene, cytokinin, auxin, GA₃,...

Các hormone thực vật như salicylic acid (SA), jasmonate hay jasmonic acid (JA),... được tổng hợp hóa học hoặc chiết xuất từ thực vật được xếp vào nhóm elicitor sinh học có thể tách riêng thành nhóm các elicitor dẫn truyền tín hiệu (signal elicitor). SA, JA, methyl jasmonate (MeJA) và abscisic acid (ABA) là các elicitor phổ biến gây cảm ứng biểu hiện gen ở thực vật thông qua các con đường chuyển hóa sinh học khác nhau, và được định nghĩa là các hormone bởi các phản ứng của tế bào ở các nồng độ rất thấp, cho nên tùy mục đích mà các elicitor này được ứng dụng theo các cách khác nhau. Ví dụ: có thể sử dụng 0,01 hay 0,1 mM MeJA ở dạng khí trong phòng nuôi kín hay dạng lỏng trong dung dịch thủy canh để tăng cường các hợp chất ginsenoside trong nuôi cấy *P. notoginseng* [60].

Elicitor phi sinh học được sản sinh bởi các tác nhân gây stress từ môi trường. Các tác nhân này có thể có bản chất từ hóa học như các muối vô cơ, các ion kim loại,... có khả năng phá vỡ tính toàn vẹn của tế bào và các tác nhân vật lý (tia UV, vết thương, nhiệt độ,...) như đặt cây súp lơ hay củ cải 3 ngày tuổi dưới điều kiện chiếu sáng với cường độ cao $700 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ hay để ở 4°C trong 1 ngày làm hàm lượng tổng phenolic tăng lên [101].

Ngoài phân loại theo bản chất, có thể phân loại elicitor theo nguồn gốc phát sinh ra gồm elicitor nội sinh và ngoại sinh (Bảng 1.1). Các elicitor cũng được phân loại dựa vào mối tương tác với cây chủ như các “elicitor phổ cập”, các carbohydrate, protein thành tế bào, oligosaccharide gây ra các cơ chế cảm ứng phòng vệ không đặc hiệu trong nuôi cấy và “các elicitor chuyên biệt” từ nấm, vi khuẩn hay bắt nguồn từ thực vật chỉ đặc hiệu với một cây chủ, tương ứng với gen gây đề kháng chỉ có ở cây chủ đó để chống lại tác nhân này [95].

4.3. Cơ chế tác động của các elicitor

Các elicitor có nguồn gốc khác nhau, có khả năng gây nên các đáp ứng về mặt hình thái, sinh lý và tích lũy phytoalexin (chất được sinh ra ở thực vật khi chịu tác động của các tác nhân gây bệnh). Việc thực hiện gây kích kháng các cây *P. ginseng* bởi các elicitor gây ra một loạt các phản ứng phòng vệ giúp bảo vệ cây, đồng thời làm tăng sự tích lũy các hợp chất saponin trong nuôi cấy *in vitro* [137]. Mặc dù đã có những nghiên cứu sâu về cơ chế ảnh hưởng của elicitor lên sự sản xuất hợp chất

thứ cấp ở thực vật; tuy nhiên, cơ chế tác động của các elicitor này vẫn chưa được hiểu đầy đủ. Có nhiều giả thuyết đã được đưa ra để giải thích tác động của elicitor thông qua mạng lưới truyền tín hiệu phức tạp (Hình 1.2) như cơ chế truyền tín hiệu Ca^{2+} , các yếu tố ảnh hưởng đến sự nguyên vẹn của màng tế bào, con đường ức chế/hoạt hóa nội bào hay thay đổi áp suất thẩm thấu [27][95].

Khi G-protein tham gia vào đáp ứng phòng vệ ở thực vật nhờ sự bắt cặp với các thụ thể để gián tiếp truyền tín hiệu elicitor đến các effector, như các kênh ion và các phospholipase, sau đó truyền tín hiệu đến các phản ứng xuôi dòng để sản sinh các hợp chất biến dưỡng thứ cấp. Sự kiềm hóa môi trường (hay apoplast) là một trong những đáp ứng từ rất sớm xảy ra khi nuôi cấy tế bào thực vật khi được xử lý với các elicitor. Sự acid hóa tế bào chất tương ứng được quan sát cùng với sự kiềm hóa môi trường. Sự acid hóa tế bào chất đóng vai trò như là một bước thiết yếu trong con đường truyền tín hiệu, dẫn đến sự sản sinh chất oxy hóa và sinh tổng hợp các hợp chất biến dưỡng thứ cấp [95].

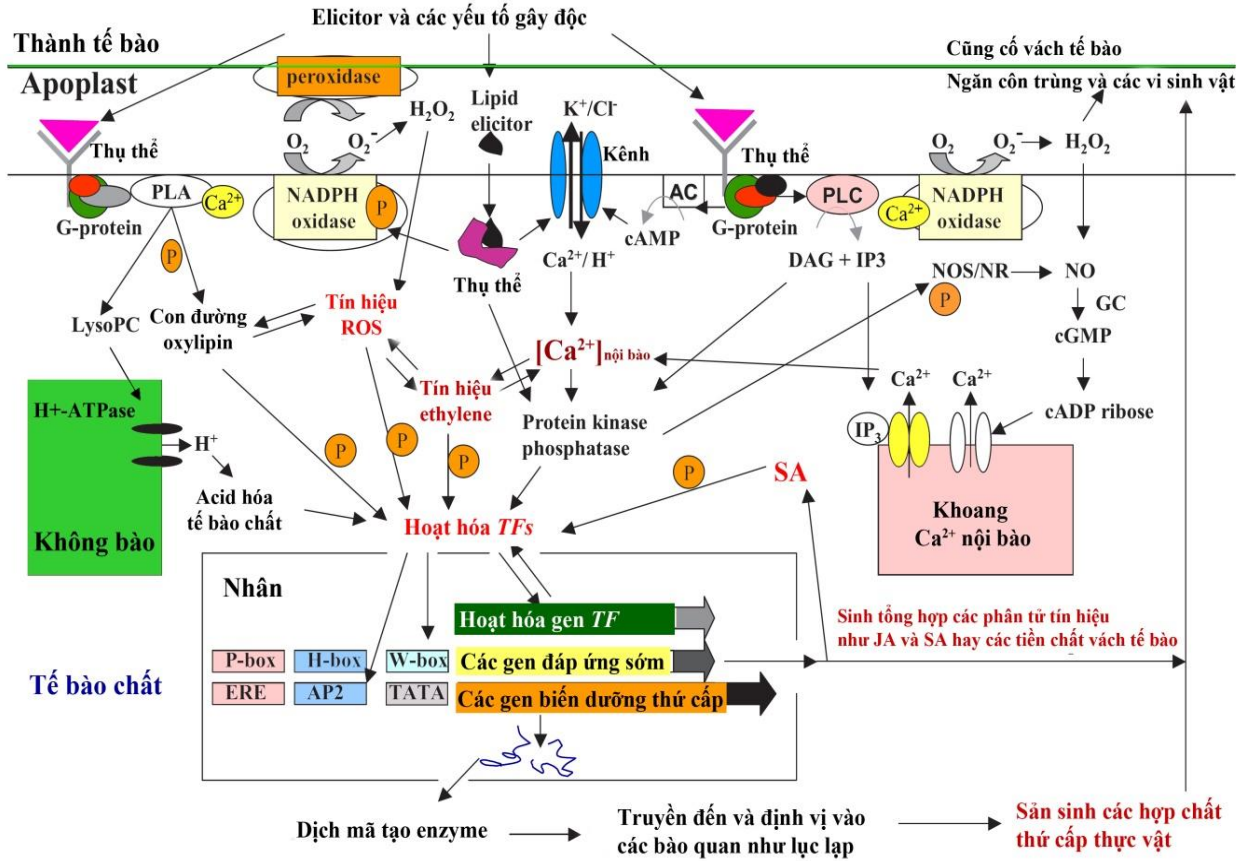
Dòng ion được cảm ứng bởi elicitor là một đáp ứng tức thời của tế bào thực vật, xảy ra chỉ trong vòng 5 phút sau khi xử lý. Dòng ion như sự trao đổi K^+/H^+ , dòng Cl^- đi ra và dòng Ca^{2+} đi vào như là những đáp ứng sớm nhất của tế bào thực vật đối với những tác nhân không độc hay các elicitor. Trong số những dòng ion này, dòng ion Ca^{2+} đi vào hoạt động như là một đáp ứng quan trọng nhất vì Ca^{2+} là một tín hiệu thứ cấp đối với rất nhiều sự thay đổi sinh lý và tiến trình tế bào khác nhau. Có thể nói, dòng Ca^{2+} được cảm ứng bởi elicitor là một trong những đáp ứng sớm nhất và hoạt động như một thông tin tín hiệu kiểm soát hầu hết mọi phản ứng xuôi dòng. Vì vậy, dòng Ca^{2+} được cảm ứng bởi elicitor đóng một vai trò quan trọng đối với sự tích lũy các hợp chất biến dưỡng thứ cấp ở thực vật. Một số giả thiết cho rằng có sự liên kết giữa elicitor với các thụ thể trên màng plasma để kích hoạt quá trình sản xuất hợp chất thứ cấp. Ca^{2+} gắn vào màng nguyên sinh chất từ môi trường bên ngoài tế bào và nguồn Ca^{2+} bên trong tế bào. Một số tác giả nhấn mạnh đến sự thay đổi nhanh quá trình phosphoryl hóa protein và kích hoạt protein kinase chính là cơ chế tác động của các elicitor [137]. Trong khi đó, nhiều tác giả khác nhận thấy có sự tích lũy mitogen-activated protein kinase (MAPK) và kích

hoạt G-protein trong quá trình kích thích tổng hợp các saponin ở *P. ginseng*. Hu và cs (2004) cho thấy, các hoạt động gây ra bởi chitosan (CHN) lên MAPK cần cho việc tổng hợp saponin. EGTA và LaCl₃ đã ức chế hoạt động MAPK 39 kD và 42 kD. Những kết quả này còn chỉ ra rằng, sự gia tăng Ca²⁺ nội bào do CHN gây ra là cần thiết cho sự tổng hợp saponin bao gồm tăng hoạt tính của NADPH oxidase và sản sinh H₂O₂ gây ức chế phản ứng oxy hóa. Ngoài ra, elicitor còn bất hoạt H⁺-ATPase, làm giảm sự phân cực của màng, tăng pH bên ngoài màng [61]. Việc sản xuất các ROS (reactive oxygen species) như anion superoxide và H₂O₂ tạo ra hiệu ứng kháng khuẩn trực tiếp cũng như góp phần tạo ra các dẫn xuất của acid béo có hoạt tính sinh học [127]. Tương tự, ROS tham gia vào quá trình liên kết với protein giàu proline gắn trên thành tế bào sau đó hoạt động như một tín hiệu thứ cấp và kích hoạt dịch mã các gen phòng vệ.

Sự suy giảm phosphoinositide được cảm ứng bởi elicitor xảy ra ở nhiều loài thực vật khác nhau. Một trong những con đường vòng phosphatidylinositol quan trọng là sự thủy phân phosphatidyl inositol 4,5-diphosphate nhờ phospholipase C. Enzyme này có thể được hoạt hóa nhờ Ca²⁺ từ khoang dự trữ calcium nội bào như mạng lưới nội chất, thể golgi hay không bào ở thực vật. Vì vậy, con đường truyền tín hiệu IP₃-Ca²⁺ được cho là đóng vai trò trung gian trong sự sản sinh phytoalexin được cảm ứng bởi elicitor. Sự gia tăng hoạt tính PLC hay IP₃ trong tế bào chất của tế bào thực vật đáp ứng lại với việc xử lý elicitor là cần thiết đối với sự tích lũy một số hợp chất biến dưỡng thứ cấp có khả năng phòng vệ. Một nhóm thông tin tín hiệu thứ cấp khác, các nucleotide vòng như cAMP hay cGMP, cũng đóng vai trò quan trọng trong sự tích lũy các hợp chất biến dưỡng thứ cấp ở một số tế bào thực vật đáp ứng với elicitor. Nhiều bằng chứng sinh lý, sinh hóa và di truyền đã cho rằng cAMP hay cGMP đóng một vai trò quan trọng trong việc điều hòa các kênh cation trên màng plasma của tế bào thực vật đáp ứng lại với elicitor hay các tác nhân gây stress khác và những kênh cation cổng nucleotide vòng này đóng vai trò rất quan trọng trong đáp ứng phòng vệ ở thực vật [43].

Theo các giả thuyết khác, sự tích lũy các protein liên quan đến việc bảo vệ tế bào khỏi tác nhân gây bệnh như chitinase và glucanase, endopolygalacturonase giúp

giải phóng các tín hiệu pectic oligomer (elicitor nội sinh), glycoprotein giàu hydroxyproline và chất ức chế protease [61]. Kích hoạt sự phiên mã của các gen phòng vệ cũng đã được công bố trên các đối tượng là *P. ginseng* [68][78][81].



Hình 1.2. Sơ đồ minh họa mạng lưới truyền tín hiệu elicitor [137].

Ngoài ra, ethylene và nitric oxide (NO) cũng đóng vai trò như một trong những tín hiệu đáp ứng miễn dịch trong phản ứng phòng vệ của thực vật. Rõ ràng, con đường truyền tín hiệu ethylene cần thiết cho phản ứng phòng vệ của thực vật chống lại stress nhưng chỉ có rất ít trường hợp tích lũy các hợp chất biến dưỡng thứ cấp ở thực vật chịu ảnh hưởng bởi ethylene. Nồng độ ethylene trong nuôi cấy phải có một giá trị tới hạn để hoạt động bởi ethylene ở nồng độ cao có thể ức chế quá trình sinh tổng hợp các hợp chất biến dưỡng thứ cấp; trong khi ở nồng độ thấp, ethylene thúc đẩy sự sản sinh các hợp chất biến dưỡng thứ cấp được cảm ứng bởi elicitor. Nitric oxide (NO) được biết đến là một hợp chất tín hiệu ở thực vật. NO hoạt động như một tín hiệu cho sự tăng trưởng, phát triển và phòng vệ của thực vật. Nghiên cứu quá trình phiên mã cho thấy, NO cảm ứng các gen phòng vệ và các gen

thành phần truyền tín hiệu liên quan đến các tác nhân gây bệnh và stress, điều này đã chỉ ra rằng con đường truyền tín hiệu NO có liên quan đến quá trình sản sinh các hợp chất biến dưỡng thứ cấp [68].

1.1. Cách xử lý và tác động của elicitor

Tăng cường sản xuất hợp chất thứ cấp từ nuôi cấy mô tế bào thực vật thông qua vai trò của các elicitor đã mở ra một hướng nghiên cứu mới trong công nghiệp dược phẩm [120]. Các tham số như thành phần và nồng độ elicitor, thời gian xử lý, tuổi nuôi cấy, dòng tế bào, phytohormone, thành phần dinh dưỡng và đặc điểm thành tế bào phù hợp có thể tăng khả năng tích lũy các sản phẩm thứ cấp [95].

4.4.1. Nồng độ elicitor

Nồng độ elicitor đóng vai trò rất quan trọng trong quá trình kích thích sinh tổng hợp các hợp chất thứ cấp. Sự tích lũy ajmalicine cao hơn trong nuôi cấy cây dừa cạn được xử lý bằng dịch chiết *Trichoderma viride*, *Aspergillus niger* và *Fusarium moniliforme* với các nồng độ khác nhau. Sự tích lũy ajmalicine trong các tế bào được xử lý nồng độ elicitor cao (5%) cao hơn so với xử lý ở nồng độ thấp (0,5%). Tuy nhiên, nồng độ elicitor cao hơn 10% ảnh hưởng bất lợi lên sự tích lũy ajmalicine. Nồng độ elicitor cao gây ra hiện tượng đáp ứng quá ngưỡng, dẫn đến chết tế bào [95]. Ngoài ra, khi bổ sung JA, YE và CHN ở các nồng độ khác nhau sẽ có tác động khác nhau lên khả năng tích lũy azadirachtin trong nuôi cấy tế bào *Azadirachtin indica*; JA và YE ở nồng độ cao (100 mg/L) giúp tích lũy hợp chất này tối ưu hơn ở nồng độ thấp, nhưng CHN ở nồng độ thấp (50 mg/L) lại cho năng suất tích lũy cao hơn khi tăng nồng độ lên, trong đó YE cho kết quả tốt nhất [1].

4.4.2. Thời gian tiếp xúc với elicitor

Sản xuất ajmalicine tăng khoảng 3 lần khi tế bào dừa cạn được xử lý với dịch chiết của *T. viride* trong 48 giờ, và tăng 2 lần khi xử lý với dịch chiết của *A. niger* và *F. moniliforme*. Tuy nhiên, thời gian tiếp xúc cao hơn 96 giờ làm giảm ajmalicine tích lũy [95]. Ngoài ra, thời gian tiếp xúc khác nhau cũng tác động lên khả năng tích lũy các saponin ở nhân sâm [13][58][67][76].

4.4.3. Thời kỳ nuôi cấy

Thời điểm cấy chuyển là một yếu tố quan trọng trong sản xuất các hợp chất có

hoạt tính sinh học nhờ tác động của các elicitor. Kết quả sản xuất ajmalicine từ tế bào dừa cạn cho thấy ajmalicine cao nhất (166 μg , dw) được tích lũy trong tế bào 20 ngày tuổi được xử lý với dịch chiết của *T. viride* [95].

4.4.4. Thành phần dinh dưỡng

Thành phần môi trường cũng đóng một vai trò quan trọng để tăng cường sinh tổng hợp các hợp chất thứ cấp khi xử lý với elicitor. Sự tích lũy ajmalicine trong môi trường Zenk tăng nhiều hơn so với môi trường MS [95]. Ngoài ra, ảnh hưởng của elicitor cũng còn phụ thuộc vào đặc tính của chúng, dòng tế bào, dòng vi sinh vật sử dụng làm elicitor, sự có mặt của các CĐHST, thành phần dinh dưỡng và các điều kiện nuôi cấy,... [95].

1.2. Một số elicitor phổ biến trong nuôi cấy nhân sâm

4.5.1. Chitosan

Chitosan (CHN) là một elicitor ngoại sinh hay một elicitor sinh học có nguồn gốc từ thành tế bào của động vật giáp xác, thuộc dạng deacetyl hóa của chitin [138]. Chitin là một polysaccharide bao gồm đồng trùng hợp *N*-acetyl-D-glucosamine và các tiểu phần D-glucosamine liên kết với nhau nhờ cầu nối β -1,4 glycosidic. Chitin hiện diện ở rất nhiều loài như trong vỏ của các loài giáp xác, trong lớp vỏ cutin của côn trùng và trong vách tế bào của nấm và một vài loài tảo [22]. CHN là một polymer sinh học có rất nhiều ứng dụng trong các lĩnh vực xử lý nước thải, công nghiệp giấy và bột giấy, trong các loại dược phẩm và đồ trang sức, trong công nghệ sinh học, thực phẩm, thức ăn gia súc và các loại màng sinh học [32]. Trong những nghiên cứu gần đây, một ảnh hưởng tích cực của CHN đã được ghi nhận trên sự phát triển của rễ, chồi và lá của nhiều loài thực vật như cây hoa đồng tiền và nhiều cây trồng khác [22]. Ngoài ra, CHN còn được biết đến như một elicitor sinh học với khả năng gây ra các phản ứng oxy hóa khử và phòng vệ ở thực vật và giúp kích thích khả năng sinh tổng hợp một số hợp chất thứ cấp [85]. Ví dụ, CHN giúp hoạt hóa các mitogen-activated protein kinase (MAPK) như squalene synthase, ginseng squalene epoxidase (của các gen *gss* và *gse*), hay β -Amyrin synthase (β -AS), từ đó làm tăng khả năng sinh tổng hợp ra các saponin [61].

4.5.2. Dịch chiết nấm men

Dịch chiết nấm men (Yeast extract - YE) cũng là một elicitor ngoại sinh có nguồn gốc sinh khối tế bào nấm men *Saccharomyces cerevisiae*, trong đó YE chứa hàng loạt thành phần có thể kích thích phản ứng phòng vệ thực vật và dẫn đến sự gia tăng các hợp chất thứ cấp như chitin, N-acetylglucosamine oligomers, β -glucan, glycopeptides và ergosterol [138]. Trong tự nhiên, có rất nhiều vi sinh vật có ích cho sự phát triển và tích lũy các hợp chất saponin quý trong rễ, do vậy các vi sinh vật này là rất cần thiết cho cây [125].

Các hợp chất phenol có thể tương tác với protein giàu proline của YE để tạo ra chất kết dính, có khả năng tương tác với protein đã dẫn tới tầm quan trọng của chúng trong ngành công nghiệp thực phẩm, dược phẩm và nông nghiệp [57]. Ứng dụng YE ngày càng trở nên rộng rãi bởi những đặc tính có lợi của YE như làm tăng sản lượng và năng suất sản phẩm của cây đậu nành. Hơn nữa, YE còn có ích cho thực vật tăng trưởng và sinh sản thông qua việc cải thiện sự hình thành hoa và một số cây trồng do hàm lượng auxin và cytokinin cao và tăng cường tích lũy carbohydrate [57]. Xử lý lá với YE còn làm tăng tỷ lệ đạm và thành phần carbohydrate trong cây. YE có tác dụng kích thích đối với sự phân chia và gia tăng tế bào, tổng hợp protein, nucleic acid và sự hình thành chlorophyll [32]. YE còn có chứa chất bảo vệ, tức là đường, protein, amino acid, cũng như một số vitamin cải thiện sự tăng trưởng, ra hoa và kết quả của một số cây trồng bằng cách nuôi cấy lá với chiết xuất từ nấm [57]. Hơn nữa, nhiều nghiên cứu cho thấy YE cũng có tác dụng như cytokinin giúp kích thích khả năng nảy chồi cây đậu.

Vai trò của YE tuy chưa được ứng dụng rộng rãi trong nuôi cấy sâm Ngọc Linh, nhưng đã có rất nhiều nghiên cứu cho thấy hiệu quả tăng cường sản xuất các hợp chất thứ cấp trong nuôi cấy thực vật [57][112]. Khi bổ sung 250 và 500 mg/L YE đã làm tăng đáng kể lượng noradrenaline trong nuôi cấy rễ tơ *Portulaca oleracea* L. [107].

4.5.3. Elicitor có nguồn gốc từ chất điều hòa sinh trưởng thực vật

Salicylic acid

Salicylic acid (SA) là một elicitor nội sinh hay elicitor sinh học có nguồn gốc

là các hormone nội sinh, được biết nhiều nhất với vai trò là một chất cảm ứng truyền tín hiệu đến trong hệ thống kháng tạp nhiễm ở thực vật [138]. SA nhanh chóng được tích lũy ở vị trí bị xâm nhiễm trong suốt quá trình tấn công của tác nhân gây bệnh và nó lan sang những phần khác của cây để cảm ứng đáp ứng phòng vệ trên diện rộng [110]. Đồng thời, SA cảm ứng sự biểu hiện gen liên quan đến sinh tổng hợp và sản sinh một số hợp chất biến dưỡng thứ cấp ở thực vật [134].

Jasmonic acid

Jasmonic acid (JA) là một elicitor nội sinh trong nhóm elicitor sinh học có nguồn gốc là các chất điều hòa sinh trưởng thực vật (CDSTTV) có tiềm năng thương mại cao, có tác động truyền tín hiệu kích thích mạnh phản ứng phòng vệ, làm ức chế sinh trưởng và phát triển thực vật [137][138]. JA được xem là "hormone" bởi vì chúng gây ra những phản ứng của tế bào ở nồng độ thấp. Hàm lượng JA trong thực vật thông thường khoảng 0,01-3 ng/g trọng lượng tươi (FW) [137]. JA được tổng hợp qua con đường octadecanoid, bắt đầu từ acid linolenic và kết thúc ở (+)-7-epi-JA (các thể tiếp hợp và đồng phân của chúng) [137]. Từ lâu, JA đã được xem như là những hợp chất chuyển đổi các tín hiệu elicitor để sản sinh các hợp chất biến dưỡng thứ cấp. Jasmonic acid (JA) và nhiều dẫn xuất khác như MeJA, HEJ,... là các tín hiệu JA ngoại sinh được sử dụng phổ biến trong lĩnh vực nuôi cấy mô tế bào và cơ quan thực vật gây kích thích sinh tổng hợp các hợp chất thứ cấp, hình thành cơ quan dự trữ, cảm ứng hệ thống bảo vệ chống lại các stress sinh học (động vật ăn cỏ và các mầm bệnh) và phi sinh học (hạn hán và ozons), ức chế sự tăng trưởng trong các mô như rễ cây và chồi non [137].

Ngoài ra, JA có thể tương tác với hormone khác đặc biệt là ethylene làm ảnh hưởng đến sự tăng trưởng và phát triển của thực vật [137]. Các JA chủ yếu được hình thành nhờ quá trình oxy hóa các acid béo chưa bão hòa như linoleic acid, hoạt động cộng hợp với lipase, lipoxygenase hay nhóm cytochrome P450 (CYP74) như allene oxide synthase (AOS) và hydroperoxide lyase (HPL). Hầu hết ở các loài thực vật cảm ứng tích lũy các hợp chất biến dưỡng đều nhờ con đường truyền tín hiệu JA như terpenoid, flavonoid, alkaloid và phenylpropanoid. Vì vậy, con đường truyền tín hiệu JA đóng vai trò như một tín hiệu không thể thiếu trong quá trình sinh tổng

hợp nhiều hợp chất thứ cấp ở thực vật [137]. Khi xử lý JA trong nuôi cấy *P. ginseng*, nhiều nghiên cứu đã xác định được quá trình sinh tổng hợp các saponin phụ thuộc vào tín hiệu JA gần như hoàn chỉnh trong hoạt hóa quá trình trao đổi chất và các chất trung gian trong con đường sinh tổng hợp saponin [40]. Nhiều nghiên cứu cũng cho thấy, tín hiệu oxylinin JA liên quan đến con đường sinh tổng hợp các cyclonpenenone thông qua con đường octadecanoide hay con đường không qua hệ thống enzyme [137].

Abscisic acid

Abscisic acid (ABA) là một elicitor nội sinh hay elicitor sinh học có nguồn gốc là các hormone nội sinh [138]. ABA hoạt động như một phân tử tín hiệu quan trọng để điều hòa sự biểu hiện các gen phòng vệ. ABA cũng đóng vai trò điều hòa quá trình sinh tổng hợp các hợp chất biến dưỡng thứ cấp trong nuôi cấy tế bào một số loài thực vật. ABA cũng có thể là một tín hiệu để tích lũy các hợp chất biến dưỡng thứ cấp ở thực vật được cảm ứng bởi stress thâm thấu. Đôi khi ABA lại làm giảm sự tích lũy một số chất biến dưỡng thứ cấp [137].

Ngoài ra, còn rất nhiều elicitor ngoại sinh khác như ánh sáng, nhiệt độ, pH,... và elicitor nội sinh khác chiết xuất từ tế bào thực vật có thể tác động lên quá trình tích lũy các hợp chất thứ cấp hay các saponin trong các loài sâm [50][95].

1.3. Ứng dụng elicitor trong nuôi các loài nhân sâm *in vitro*

Tăng cường tổng hợp saponin triterpene được nghiên cứu chủ yếu bằng cách bổ sung các elicitor vào nuôi cấy *P. ginseng*, *P. notoginseng*, *P. quinquefolium* và *P. vietnamensis* (Bảng 1.2). MeJA ở nồng độ 0,2 mM làm tăng sản xuất các ginsenoside gấp 4 lần trong RBD *P. ginseng* [50] và 1,8-3,1 lần trong nuôi cấy huyền phù tế bào *P. ginseng* [60] so với đối chứng. Trong phản ứng với 0,2 mM SA, saponin tăng gấp 3 lần trong nuôi cấy RBD *P. ginseng* và HEJ tăng sản lượng ginsenoside gấp 2-4,4 lần trong nuôi cấy huyền phù tế bào [40]. Hơn nữa, khi nghiên cứu các elicitor sinh học cũng có hiệu quả mạnh lên khả năng tích lũy các hợp chất thứ cấp [32]. Ngoài ra, một số elicitor sinh học khác cũng được ứng dụng rộng rãi trong nuôi cấy *P. ginseng in vitro* như CHN cũng làm tăng khả năng tích lũy triterpene trong *P. ginseng* [61][62]. Hao và cs (2013) xác định trong 38 chủng

nấm phân lập được từ rễ *P. Ginseng*, *Fusarium* sp. có tiềm năng lớn trong việc gia tăng hàm lượng saponin [125].

Nói chung, sử dụng những elicitor khác nhau để tăng cường sản xuất saponin trong nuôi cấy bằng Bioreactor ít có hiệu quả so với các nuôi cấy ở quy mô nhỏ, nhưng sinh khối thu được lại cao hơn. Wang và cs (2005) đã nghiên cứu sự khác biệt trong sản xuất ginsenoside trong nuôi cấy tế bào sâm Tam thất trong bình tam giác và Bioreactor [122]. Trong bình tam giác, có sự gia tăng mạnh trong tổng hàm lượng ginsenoside từ ngày 8 đến ngày 15 sau khi cảm ứng tới mức tối đa vào ngày 15 gấp 2,6 lần so với đối chứng. Ngược lại, các tế bào trưởng thành trong Bioreactor đã cho thấy một sự gia tăng chậm trong sản xuất saponin, đạt tối ưu vào ngày 15 tăng gấp 1,8 lần so với đối chứng. Tuy nhiên, tương tự sau 5 ngày bổ sung MeJA ngay từ đầu nuôi cấy và kết hợp với nồng độ sucrose thích hợp cho không những có hiệu quả khi nuôi cấy trong Bioreactor mà còn giúp tăng cường sản xuất các saponin lên gấp 4 lần [122]. Năm 2005, các nghiên cứu cũng đã cho thấy, hàm lượng saponin trong sâm Triều Tiên (*P. ginseng*) cũng có thể gia tăng nhờ bổ sung các elicitor vào môi trường lỏng khi nuôi cấy RBD hay tăng lượng bilobalide và các ginkgolide trong nuôi cấy tế bào cây *Ginkgo biloba*, cũng như xác định con đường truyền tín hiệu của các elicitor lên khả năng tạo ra các sản phẩm thứ cấp [71]. Năm 2006, Jeong và cs đã nghiên cứu ảnh hưởng của oxygen, carbon dioxide và ethylene lên sự tăng trưởng và quá trình sản xuất thành phần dược chất trên quá trình nuôi cấy RBD sâm Triều Tiên bằng Bioreactor [67].

Thành phần môi trường hay các elicitor cũng tác động đến việc cảm ứng và phát triển rễ tóc, cũng như sản xuất các dược chất từ một số cây dược liệu. Ali và cs (2008) đã cho thấy, ảnh hưởng của carbon dioxide lên enzyme chống oxy hóa trong sản xuất ginsenoside ở rễ sâm Triều Tiên khi nuôi cấy lỏng [27]. Kim và cs (2005) khi tiến hành nghiên cứu tăng khả năng sản xuất saponin từ RBD của sâm Triều Tiên, môi trường lẫn điều kiện nuôi cấy đều ảnh hưởng đến hàm lượng saponin [76].

Xử lý với MeJA hoặc SA thường làm giảm tăng trưởng các mẫu cấy. Đối với nuôi cấy rễ *P. ginseng*, sinh khối rễ sụt giảm nghiêm trọng khi xử lý hơn 9 ngày với 0,2 mM MeJA hoặc SA [96]. Ngoài ra, nhiều nuôi cấy các loài nhân sâm *in vitro* có

thể bổ sung thêm các phytohormone kết hợp với các elicitor để tăng tích lũy saponin. Yun-Soo và cs (2003, 2009) đã chứng minh, việc bổ sung 0,025 mg/L thidiazuron có thể ngăn chặn những tác động tiêu cực của MeJA lên tăng trưởng toàn bộ cây và tăng sản lượng saponin cao hơn với việc chỉ dùng MeJA [134][76]. Tuy nhiên, mức tăng này trong cây chủ yếu do tăng sinh khối hơn là kích thích trao đổi chất thứ cấp, bởi vì, chỉ khảo sát tăng trưởng rễ khi thêm MeJA [134].

Trong một số trường hợp, xử lý elicitor trong nuôi cấy *in vitro* không chỉ làm tăng sản xuất saponin mà còn làm thay đổi thành phần hóa học của các tiền chất và sản phẩm cuối cùng của chu trình. Ví dụ, trong nuôi cấy quy mô lớn tế bào sâm Tam thất với 200 mM MeJA hoặc HEJ [122], Xiang-Yang và cs (2003) đã xác định được một số tác động của enzyme NADPH oxidase, H_2O_2 và các elicitor lên khả năng trao đổi chất của màng tế bào trong việc sinh tổng hợp saponin [127]. Squalene synthase và SE giúp mức phiên mã tăng gấp 6 lần sau 24 giờ xử lý với 200 mM HEJ. Tổng số ginsenoside tăng từ 12 giờ đến 10 ngày sau khi bổ sung HEJ hoặc MeJA. Khi bổ sung các chất ức chế jasmonate DIECA (NA-diethylthio-carbamate), jasmonic acid giảm đi và hàm lượng ginsenoside cũng giảm theo. DIECA cũng ức chế sinh tổng hợp HEJ cần cho việc tạo SS (squalene synthase) và squalene epoxidase (SE) liên quan đến con đường truyền tín hiệu jasmonate trong tổng hợp saponin [50]. Trong nuôi cấy tế bào sâm Tam thất, khi tăng hoạt động enzyme UGRdGT (glucosyl transferase) sẽ tăng xúc tác chuyển hóa Rd1 thành Rb1 (một trong hai saponin chính của *P. ginseng*) [122]. Nhưng ginsenoside- α -arabinofuranase xúc tác thủy phân ginsenoside-Rc thành Rd vẫn chưa được phát hiện. Con đường sinh tổng hợp từ Rd để tạo Rb1 hiện diện trong các dòng tế bào và MeJA là tác nhân kích hoạt quá trình này thông qua hoạt động UGRdGT [37]. Các kết quả khác cũng cho thấy, xử lý với MeJA hoặc HEJ làm hoạt động gen UGRdGT gia tăng cùng với hàm lượng ginsenoside Rb1 [50]. Ngoài những elicitor phổ biến trên, Kim và cs (2009) cho thấy, tia γ cũng là một elicitor không những thúc đẩy sinh tổng hợp saponin mà còn làm tăng sinh khối, hiệu quả chiếu xạ cho tỷ lệ phát sinh RBD cao nhất đến 75% ở mức chiếu xạ 30 Gy, các dòng đột biến có sinh khối gấp 100 lần so với đối chứng và có sự gia tăng cả 7 loại saponin trong nuôi cấy [75].

Cho đến nay, các nghiên cứu ứng dụng elicitor vào nuôi cấy *in vitro* sâm Ngọc Linh nhằm nâng cao hàm lượng các chuyên hóa thứ cấp còn rất hạn chế. Dương Tấn Nhựt và cs (2012) đã bước đầu nghiên cứu đánh giá tác động của elicitor, JA lên việc tích lũy saponin của mô sẹo và RBD của cây sâm Ngọc Linh đã cho thấy hiệu quả của các elicitor trong việc tăng cường khả năng sản sinh các sản phẩm thứ cấp trên loài sâm này [13][15]. Trịnh Thị Hương (2017) cũng đã cho thấy, một số elicitor có bản chất là CDHST như MeJA, SA và ABA đã giúp tăng cường được các hợp chất saponin trong nuôi cấy rễ tơ sâm Ngọc Linh [10].

Bảng 1.2. Một số nghiên cứu về các elicitor trong nuôi cấy chi nhân sâm [50].

Loài	Hệ thống nuôi cấy	Xử lý Elicitor			Lượng saponin tăng	Tài liệu tham khảo
		Loại	Nồng độ (mM)	Ngày		
<i>P. ginseng</i>	RBD/ Bioreactor	MeJA	0,2	7	4,0×	[28]
		SA	0,2	7	3,0×	[28]
	RBD	IBA	0,025	10	16×	[140]
<i>P. notoginseng</i>	Tế bào	MeJA	0,2	4	3,0×	[60]
		HEJ	0,2	4	2,0×	[60]
	Tế bào/ Bioreactor	MeJA	0,2	4	2,6×	[140]
	Tế bào/ bình tam giác	MeJA	0,2	15	2,6×	[122]
	Tế bào/ Bioreactor	MeJA	0,2	15	1,8×	[122]
	Tế bào	MeJA	0,2	14	3,1×	[96]
		HEJ	0,2	14	4,4×	[96]
<i>P. vietnamensis</i>	RCG	ABA	0,004	60	5×	[10]
	Mô sẹo	MeJA	0,07	14	10×	[13]
<i>P. quinquefolium</i>	Lá/RTC	Nhiệt	30°C	90	2,0×	[53]

MeJA: Methyl jasmonate, HEJ: 2-hydroxyethyl jasmonate, YE: dịch chiết nấm men, RBD: rễ bất định, RCG: rễ chuyển gen, ABA: abscisic acid, SA: Salicylic acid.

CHƯƠNG 2: VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. VẬT LIỆU NGHIÊN CỨU

1.1. Nguồn mẫu

Mẫu rễ bất định (RBD) 30 ngày tuổi được tách ra từ các cụm RBD nuôi cấy trên môi trường SH bổ sung 5 mg/L IBA [18] hiện có tại Phòng Sinh học Phân tử và Chọn tạo Giống cây trồng, Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên.

1.2. Thiết bị, dụng cụ và hóa chất

Thiết bị và dụng cụ

Thiết bị dùng trong nuôi cấy rễ thứ cấp (RTC) sâm Ngọc Linh: cân điện tử, bếp ga, máy cất nước, máy đo pH, nồi hấp, tủ cấy vô trùng, máy bơm khí, hệ thống lọc khí.

Hệ thống Bioreactor gồm 2 dạng Bioreactor tự tạo (bình tam giác 3L Merck, Đức) và Bioreactor hình cầu 3L (Hàn Quốc) (Hình 2.2); được thiết kế với hệ thống bơm khí của máy nén khí TW-OF550-9L (Wing, Việt Nam) với van điều áp R72G-2GK-RMN đưa tốc độ dòng chảy về 0,05 vvm; luồng khí đi qua hệ thống lọc tự thiết kế (bình làm mát, bình làm khô không khí, bình chứa không khí) và đi qua màng lọc Millipore (kích thước lỗ 0,2 μm , đường kính 4 cm) vào Bioreactor qua Sparger một lỗ khí tạo ra các bọt khí có đường kính dưới 0,5 μm (Bioreactor hình cầu); Sparger nhiều lỗ tạo các bọt khí có đường kính dưới 0,5-1 μm (Bioreactor bình tam giác) [38]. Luồng khí đi ra cũng được lọc qua màng Millipore.

Dụng cụ dùng nuôi cấy: dao cấy, đĩa cấy, pank cấy, bình nuôi cấy 250 mL, bình tam giác 250 mL và 3 L, màng lọc Millipore (kích thước lỗ 0,2 μm , đường kính 4 cm và 2 cm). Dụng cụ khử trùng ở 121°C, 1 atm trong 20 phút.

Thiết bị dùng trong phân tích HPLC: Máy HPLC của Shimadzu với hệ thống bơm LC-20A-D, Degasser DGU-20A5, đầu dò DDA SPD-MZOA và cột SapeIco C18; Máy siêu âm Ultrasonic LC 60H, tủ cấy Sanyo MOV-112, tủ Sấy Menmert, cân kỹ thuật Precisa (Nhật Bản), đèn UV hai bước sóng 254 nm, 365 nm, Viber Luormat (Pháp), bể cách thủy Menmert WB. 14, bản mỏng tráng sẵn

Silica gel 60F254 (Mérck), máy soxhlet, bình sắc ký.

Hóa chất

Các elicitor: jasmonic acid-JA (95%), salicylic acid-SA (99%), abscisic acid-ABA (98%), dịch chiết nấm men (yeast extract-YE) của hãng Duchefa Biochemie, Hà Lan. YE là hỗn hợp các amino acid, peptide, vitamin tan trong nước và carbohydrate. CHN (chitosan) từ vỏ tôm của hãng Merck KGaA, Darmstadt, Đức. CHN chứa 75% deacetylated, 10 mg/L acetic acid 1M.

Chất chuẩn: G-Rg1 (độ tinh sạch > 98%), G-Rb1 (độ tinh sạch > 98%), MR2 (độ tinh sạch > 90%) có tại Trung tâm Sâm và Dược liệu Tp. Hồ Chí Minh.

Thành phần đa lượng, vi lượng và các vitamin của hãng Duchefa Biochemie, Hà Lan; các chất điều hòa sinh trưởng (IBA, NAA, 2,4-D, KIN, TDZ, BA,...) của hãng Merck KGaA, Darmstadt, Đức.

Dung môi phân tích HPLC

Methanol, diethyl ether, n- butanol, acid acetic, acid sulfuric, ethanol.

n-butanol:acid acetic:nước (7:1:2)

Chloroform:methanol:nước (65:35:10)

1.3. Địa điểm và thời gian thực hiện luận án

Luận án được thực hiện tại Phòng Sinh học phân tử và Chọn tạo giống cây trồng, Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên – Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Cùng hợp tác thực hiện luận án tại Trung tâm Sâm và Dược liệu Thành phố Hồ Chí Minh và Trường Đại học Khoa học – Đại học Huế.

Thời gian thực hiện luận án từ 11/2014 đến 12/2017.

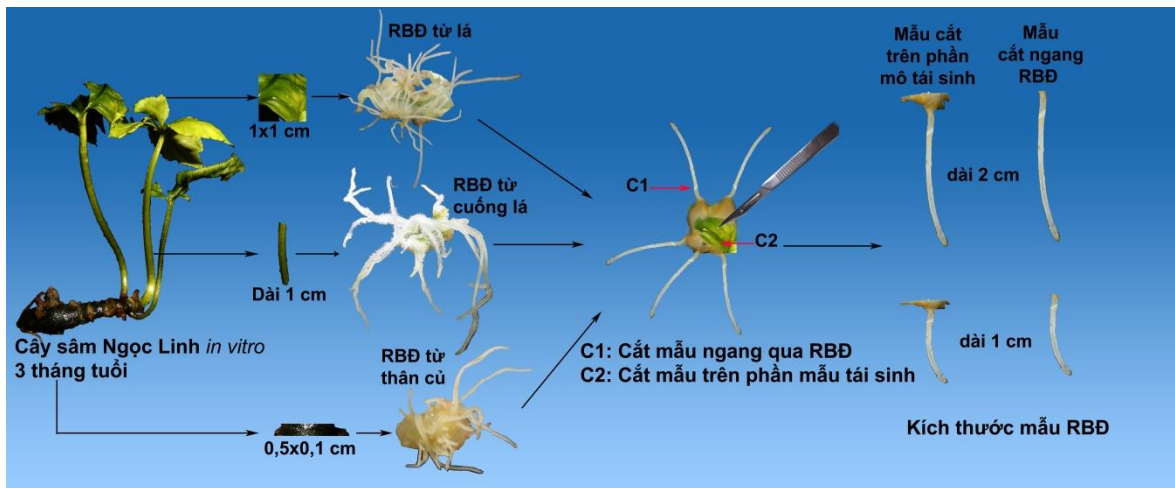
2. PHƯƠNG PHÁP BỐ TRÍ THÍ NGHIỆM

2.1. Tối ưu cách chọn mẫu và môi trường nuôi cấy rễ thứ cấp từ nuôi cấy rễ bất định sâm Ngọc Linh *in vitro*

2.1.1. Khảo sát ảnh hưởng của cách cắt mẫu rễ bất định lên sự hình thành và tăng trưởng của rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh từ nuôi cấy rễ bất định *in vitro*

Các RBD sâm Ngọc Linh dài 2,5 cm có nguồn gốc tái sinh ban đầu từ 3 loại mẫu khác nhau [lá (1×1 cm), cuống lá (dài 1 cm) và thân củ (đường kính khoảng

0,5 cm, độ dày 0,1 cm)] được khảo sát và đánh giá khả năng hình thành và tăng trưởng RTC sau 56 ngày nuôi cấy trong tối. Ngoài ra, thích thước và vị trí cắt mẫu được khảo sát với 2 cách cắt mẫu ở 2 kích thước RBD dài 1 cm và 2 cm. Cách cắt thứ 1, mẫu được cắt ngang qua RBD và loại bỏ hoàn toàn phần mô tái sinh (lá, cuống lá hay củ) với chiều dài mẫu cấy được tính từ vị trí cắt đến chóp rễ; cách cắt thứ 2, mẫu RBD cắt trên phần mô tái sinh, nhưng không loại bỏ hoàn toàn phần mô này, chỉ cắt bỏ phần mô không tái sinh RBD và chiều dài mẫu cấy được tính từ vị trí phát sinh RBD đến chóp rễ (Hình 2.1). Môi trường nuôi cấy được duy trì tiếp trên môi trường tái sinh RBD lúc ban đầu chứa 5 mg/L IBA và 30 g/L sucrose của Hồ Thanh Tâm và cs (2012) [18].



Hình 2.1. Sơ đồ cách cắt mẫu cây từ các RBD có nguồn gốc khác nhau.

Các chỉ tiêu theo dõi như khối lượng tươi (KLT), chiều dài RTC (cm), số RTC/RBD, tỷ lệ hình thành RTC/RBD (%) được thu nhận sau 48 ngày nuôi cấy. KLT được xác định sau khi sấy khô ở 55-60°C cho đến khi khối lượng không đổi.

2.1.2. Khảo sát ảnh hưởng của auxin lên sự hình thành và tăng trưởng của rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh từ nuôi cấy rễ bất định in vitro

Kế thừa kết quả từ thí nghiệm về cách chọn mẫu cấy và thời gian nuôi cấy, các mẫu RBD đơn lẻ (dài khoảng 2 cm) được tái sinh từ cuống lá được tách ra và cấy lên môi trường SH có 30 g/L sucrose và 8 g/L agar, được bổ sung các loại auxin riêng lẻ khác nhau (NAA, IBA và IAA) ở các nồng độ từ 0; 3; 5; 7 mg/L. Nuôi cấy được duy trì dưới điều kiện tối hoàn toàn trong 56 ngày nuôi cấy để đánh giá tác động của các auxin lên sự hình thành và tăng trưởng RTC sâm Ngọc Linh. Các chỉ

tiêu về KLT - khối lượng tươi và KLK - khối lượng khô (mg), chiều dài trung bình của RTC (cm), số rễ (RTC/RBD), tỷ lệ tạo RTC (%) được thu sau 56 ngày nuôi cấy.

2.1.3. Khảo sát ảnh hưởng của việc kết hợp giữa auxin và cytokinin lên sự hình thành và tăng trưởng của rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh từ rễ bất định in vitro

Áp dụng môi trường, điều kiện nuôi cấy và kết quả tốt nhất của thí nghiệm về auxin ở trên, các mẫu RBD đơn lẻ (dài khoảng 2 cm) với loại RBD tái sinh từ cuống lá được cấy lên môi trường SH có bổ sung 7 mg/L IBA và kết hợp với các cytokinin ở các nồng độ khác nhau của Kin, BA (0,0; 0,1; 0,5; 1,0; 2,0 mg/L) và TDZ (0,0; 0,01; 0,05; 0,1; 0,2 mg/L) để cải thiện chất lượng RTC sâm Ngọc Linh từ nuôi cấy RBD. Nuôi cấy được duy trì dưới điều kiện tối hoàn toàn và sau 56 ngày nuôi cấy, các chỉ tiêu KLT (mg), KLK (mg), chiều dài trung bình của RTC (cm), số rễ (RTC/RBD), tỷ lệ tạo RTC (%) được xác định.

2.1.4. Khảo sát ảnh hưởng của môi trường khoáng lên sự hình thành và tăng trưởng của rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh từ nuôi cấy rễ bất định in vitro

Áp dụng môi trường, điều kiện nuôi cấy và kết quả tốt nhất của thí nghiệm về auxin kết hợp với cytokinin ở trên, các mẫu RBD đơn lẻ (2 cm) được tái sinh từ cuống lá được tách ra và cấy lên 3 loại môi trường khác nhau MS, SH, và B5 có bổ sung 30 g/L sucrose và 8 g/L agar và auxin kết hợp với cytokinin ở nồng độ thích hợp. RBD nuôi dưới điều kiện tối hoàn toàn trong 56 ngày nuôi cấy với các chỉ tiêu theo dõi là KLT (mg), KLK (mg), chiều dài trung bình của RTC (cm), số rễ (RTC/RBD), tỷ lệ tạo RTC (%).

2.1.5. Khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ NH_4^+/NO_3^- trong môi trường MS lên sự hình thành và tăng trưởng của rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh từ rễ bất định in vitro

Kế thừa từ nghiệm thức tốt nhất về loại mẫu cấy, môi trường, điều kiện nuôi cấy (thời gian nuôi cấy, pH, nhiệt độ), về auxin kết hợp với cytokinin, các mẫu RBD đơn lẻ (dài khoảng 2 cm) được tái sinh từ cuống lá được tách ra và cấy vào môi trường MS được cải biên bằng cách thay đổi tỷ lệ NH_4^+/NO_3^- . Các muối đa lượng (KNO_3 , NH_4NO_3) trong môi trường MS được thay bằng hai muối $NH_4H_2PO_4:KNO_3$ với khối lượng là 0,0:1870,4; 827,1:1870,4; 1654,1:1870,4; 2481,2:1870,4; 1654,1:0,00; 1654,1:1900,7; và 1654,1:2851,0 mg:mg [130], tương

ứng tỷ lệ $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ là 0/2, 1/2, 1/1, 3/2, 2/0, 2/2 và 2/3. Tỷ lệ K^+ và PO_4^- thấp hơn trong môi trường MS được điều chỉnh về môi trường MS bằng KOH hay H_2PO_4 . Các thành phần môi trường khác của môi trường MS không đổi và chỉnh pH về 5,3, nhiệt độ ở 22°C. Ngoài ra, kết quả tối ưu của thí nghiệm này cũng được so sánh với các môi trường MS, SH, và các môi trường cải biên khác ($\frac{1}{2}\text{MS}$, $\frac{3}{4}\text{MS}$, $\frac{1}{2}\text{SH}$, $\frac{3}{4}\text{SH}$). Các chỉ tiêu về KLT (mg), KLK (mg), chiều dài trung bình của RTC (cm), số rễ (RTC/RBĐ), tỷ lệ tạo RTC (%) được thu sau 56 ngày nuôi cấy.

2.1.6. Khảo sát ảnh hưởng của các loại đường carbohydrate lên sự hình thành và tăng trưởng của rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh từ nuôi cấy rễ bất định *in vitro*

Áp dụng môi trường, điều kiện nuôi cấy và kết quả tốt nhất của thí nghiệm về auxin kết hợp với cytokinin ở trên, các mẫu RBĐ đơn lẻ (2 cm) được tái sinh từ cuống lá được tách ra và cấy lên môi trường MS cải tiến tốt nhất từ thí nghiệm trên bổ sung 8 g/L agar và auxin kết hợp với cytokinin ở nồng độ thích hợp khảo sát được. Sau đó tiến hành đánh giá và cải tiến các loại đường carbohydrate (sucrose, maltose và D-glucose) ở các nồng độ khác nhau lần lượt là 10, 30, 40, 50 và 60 g/L. Các nghiệm thức này được nuôi cấy trong các bình 250 mL chứa 30 mL môi trường lỏng, lắc với tốc độ 100 vòng/phút, và được đặt trong điều kiện 80% tối ở giai đoạn đầu nuôi cấy. Các chỉ tiêu về KLT (mg), KLK (mg), chiều dài trung bình của RTC (cm), số rễ (RTC/RBĐ), tỷ lệ tạo RTC (%) được ghi nhận sau 56 ngày nuôi cấy.

2.1.7. Khảo sát ảnh hưởng của giá thể nuôi cấy lên sự hình thành và tăng trưởng của rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh từ nuôi cấy rễ bất định *in vitro*

Áp dụng môi trường, điều kiện nuôi cấy và kết quả tốt nhất của thí nghiệm về auxin kết hợp với cytokinin ở trên, các cụm RBĐ được tái sinh từ cuống lá, với chiều dài 2 cm được tách ra và nuôi cấy trên môi trường tối ưu từ thí nghiệm trên với 7 mg/L IBA, 0,5 mg/L BA và 30 g/L sucrose và sử dụng ba loại giá thể khác nhau là agar (8 g/L), gelrite (2 g/L) và bông gòn (kích thước khoảng 4x4 cm, khoảng 2 g). Các chỉ tiêu về KLT (mg), KLK (mg), chiều dài trung bình của RTC (cm), số rễ (RTC/RBĐ), tỷ lệ tạo RTC (%) được thu sau 56 ngày nuôi cấy để xác định giá thể phù hợp cho RTC hình thành.

2.2. Tối ưu điều kiện nuôi cấy rễ bất định sâm Ngọc Linh để tăng cường sự hình thành rễ thứ cấp và tích lũy saponin trong nuôi cấy *in vitro*

2.2.1. Khảo sát ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy lên sự tăng sinh và tích lũy saponin của rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh từ nuôi cấy rễ bất định *in vitro*

Thời gian nuôi cấy quyết định rất lớn đến lượng sinh khối tối đa thu được, do đó, khảo sát về thời gian nuôi cấy được tiến hành đầu tiên để xác định thời gian nuôi cấy tối đa cho RBD sâm Ngọc Linh hình thành RTC và tăng trưởng. Các mẫu RBD tái sinh từ lá (chiều dài 2 cm, khối lượng tươi 25 mg) được cấy trên môi trường SH chứa 5 mg/L IBA và được thiết kế theo các thời gian khác nhau lần lượt là 14, 28, 42, 56 70 và 84 ngày nuôi cấy dưới điều kiện tối hoàn toàn. Trong thí nghiệm này, các chỉ tiêu về KLT và KLK của RBD (mg), số RTC/RBD, các chỉ tiêu về thu nhận saponin gồm: năng suất tổng hợp cả ba loại saponin (mg/L), hàm lượng % các saponin (Rb1, Rg1, và MR2), % tổng 3 saponin được xác định sau 56 ngày nuôi cấy và theo từng giai đoạn nuôi cấy.

2.2.2. Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy lên sự tăng sinh và tích lũy saponin của rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh từ nuôi cấy rễ bất định *in vitro*

Sau khi xác định được thời gian nuôi cấy phù hợp, và dựa vào khoảng nhiệt độ thích hợp cho đa số các cây trồng phát triển và tăng trưởng RTC là từ 20-27°C [114][140], cùng điều kiện thích hợp nhất để rễ *P. ginseng* phát triển trong tối là 23±2°C [116]; cũng như nhiệt độ duy trì ở đa số các phòng nuôi cấy 25°C, thí nghiệm nhiệt độ nuôi cấy thích hợp cho RTC sâm Ngọc Linh được thiết kế từ 22°C, 25°C đến 28°C. Các mẫu RBD tái sinh từ lá sâm Ngọc Linh được nuôi cấy trên môi trường SH có 5 mg/L IBA, được đặt trong tủ tối hoàn toàn và điều chỉnh đến nhiệt độ không đổi. Sau 56 ngày nuôi cấy, các chỉ tiêu sinh trưởng tỷ lệ tạo RTC và KLT và KLK của mẫu cấy (mg), số RTC/RBD, chiều dài trung bình của RTC (cm), hàm lượng % các saponin (Rb1, Rg1, và MR2), % tổng 3 saponin và năng suất tổng hợp cả ba loại saponin (mg/L) được xác định bằng TCL và HPLC.

2.2.3. Khảo sát ảnh hưởng của pH lên sự tăng sinh và tích lũy saponin của rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh từ nuôi cấy rễ bất định *in vitro*

Kế thừa kết quả tốt nhất về thời gian nuôi cấy và nhiệt độ, các mẫu RBD tái

sinh từ lá (chiều dài 2 cm, khối lượng khoảng 25 mg) được cấy trên môi trường SH có chứa 8 g/L agar, 30 g/L sucrose và bổ sung 5 mg/L IBA. Trước khi hấp khử trùng, môi trường được điều chỉnh pH về 4,3; 4,8; 5,3; 5,8 và 6,3 trước khi nuôi cấy. Sau 56 ngày nuôi cấy, các chỉ tiêu sinh trưởng tỷ lệ tạo RTC và KLT và KLK của mẫu cấy (mg), số RTC/RBĐ, chiều dài trung bình của RTC (cm), hàm lượng % các saponin (Rb1, Rg1 và MR2), % tổng 3 saponin và năng suất tổng hợp cả ba loại saponin (mg/L) được xác định bằng TCL và HPLC.

2.2.4. Khảo sát ảnh hưởng của giai đoạn nuôi cấy tối và sáng lên sự tăng trưởng của rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh từ nuôi cấy rễ bất định in vitro

Kế thừa kết quả tốt nhất từ tất cả các thí nghiệm trên (mẫu RBĐ, môi trường cải biên, pH, nhiệt độ, thời gian nuôi cấy), các cụm mẫu RBĐ tái sinh từ cuống lá (chiều dài mỗi rễ khoảng 2 cm, khối lượng khoảng 25 mg) được cấy lên môi trường tối ưu từ các thí nghiệm trên để khảo sát các điều kiện chiếu sáng khác nhau lên sự hình thành và tăng trưởng RTC sâm Ngọc Linh *in vitro*. Thí nghiệm được bố trí như sau: 100% tối (các nuôi cấy được đặt trong tối hoàn toàn suốt cả quá trình nuôi cấy 56 ngày); 80% tối (42 ngày đầu nuôi cấy để trong tối và 14 ngày còn lại để ngoài sáng); 50% tối (28 ngày đầu đặt trong tối, còn lại 28 ngày sau đặt ngoài sáng); và 100% sáng (các nuôi cấy duy trì hoàn toàn ngoài sáng). Giai đoạn sáng có chu kỳ là 16 giờ/ngày dưới ánh sáng đèn huỳnh quang có cường độ chiếu sáng khoảng 40-45 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, giai đoạn tối là hoàn toàn để trong tối và không chiếu sáng. Các chỉ tiêu sinh trưởng tỷ lệ tạo RTC và KLT và KLK của mẫu cấy (mg), số RTC/RBĐ và chiều dài trung bình của RTC được thu sau 56 ngày nuôi cấy.

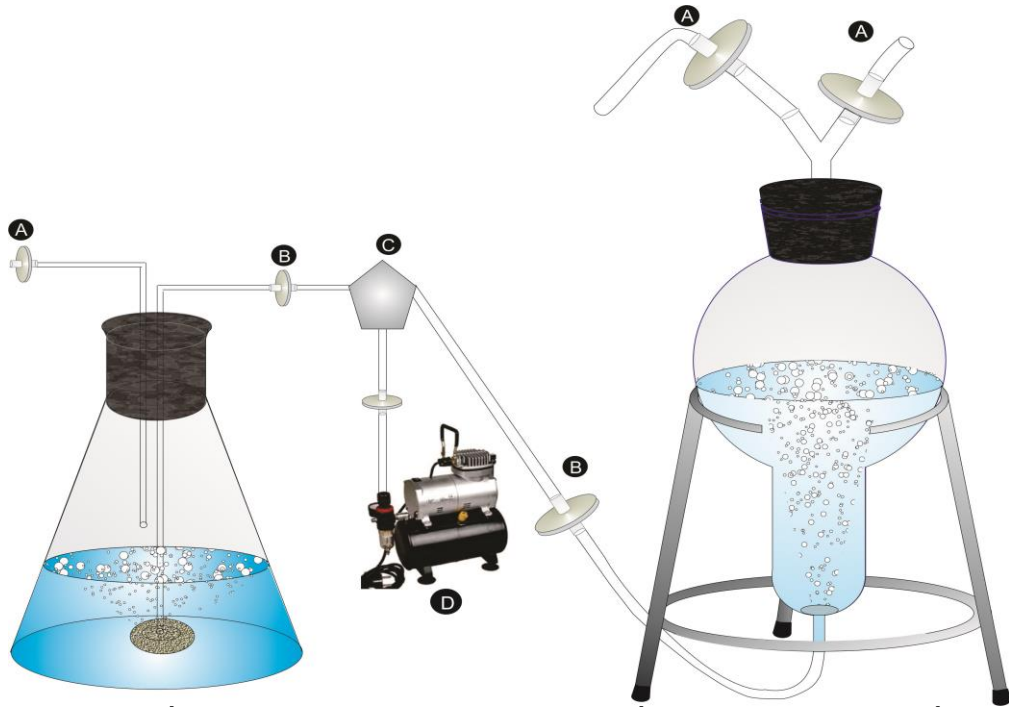
2.2.5. Khảo sát ảnh hưởng của thể tích nuôi cấy lên sự tăng trưởng của rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh từ nuôi cấy rễ bất định in vitro

Theo nhiều nghiên cứu, môi trường thoáng khí rất tốt cho sự ra rễ, đặc biệt trong nuôi cấy lỏng lác, chất lượng và chiều dài rễ tốt hơn khi nuôi cấy trên môi trường rắn hay lỏng tĩnh [18][9][38]. Do vậy, nuôi cấy ở điều kiện lỏng lác được tiến hành nhằm khảo sát ảnh hưởng của thể tích môi trường lên khả năng hình thành và tăng trưởng RTC từ nuôi cấy RBĐ sâm Ngọc Linh *in vitro* để làm tiền đề cho nuôi cấy lỏng trong các hệ thống lớn. Kế thừa kết quả tốt nhất từ tất cả các thí

nghiệm trên (mẫu RBD, môi trường cải biên, pH, nhiệt độ, thời gian nuôi cấy), các cụm RBD tái sinh từ mẫu lá (mỗi rễ dài khoảng 2 cm, nặng 25 mg) được nuôi cấy trong môi trường lỏng lắc ở 100 vòng/phút và thể tích môi trường thay đổi ở 10 mL, 30 mL, 50 mL, 70 mL và 90 mL (các chai thủy tinh có thể tích 250 mL), và nuôi cấy trong 56 ngày. Sau đó, các chỉ tiêu sinh trưởng tỷ lệ tạo RTC và KLT và KLK của mẫu cấy (mg), số RTC/RBD, chiều dài trung bình của RTC, hàm lượng các ginsenoside-Rb1, Rg1, và MR2 được ghi nhận.

2.2.6. Khảo sát ảnh hưởng của hệ thống nuôi cấy lên sự tăng sinh và tích lũy saponin của rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh từ nuôi cấy rễ bất định in vitro

Kế thừa kết quả tốt nhất từ tất cả các thí nghiệm trên (mẫu RBD, môi trường cải biên, các điều kiện nuôi cấy khác nhau và thể tích môi trường), các cụm RBD với chiều dài khoảng 2 cm, khối lượng khoảng 25 mg được cấy vào bình tam giác 250 mL chứa 30 mL môi trường tối ưu khảo sát được từ các thí nghiệm trên; và sau khoảng 15 ngày, khi mẫu đã thích nghi với môi trường lỏng, 8 g RBD thu được từ các bình này được cấy chuyển vào 3 hệ thống nuôi cấy khác nhau chứa 1,5 L môi trường. Hệ thống nuôi cấy gồm có Bioreactor hình cầu 3 L, bình tam giác 3 L kết hợp lắc với tốc độ 100 vòng/phút và bình tam giác 3 L có kết hợp với sục khí (Bioreactor tự tạo) (Hình 2.2, Hình 2.3). Việc sục khí được thực hiện thông qua các sparger và một máy bơm khí từ ngoài vào trong với van điều áp R72G-2GK-RMN đưa tốc độ dòng chảy về 0,05 vvm. Bioreactor hình cầu có một sparger ở vị trí tại dưới cùng của Bioreactor, được sử dụng để tạo ra các bọt khí có đường kính dưới 0,5 μm . Sparger ở Bioreactor tự tạo có rất nhiều lỗ khí, nên tạo nhiều bọt khí với đường kính dưới 0,5-1 μm (bioreactor tự tạo); [38]. Các dòng không khí đi ra và đi vào các Bioreactor được lọc thông qua các hệ thống lọc khí và màng Millipore kích thước lỗ 0,2 μm . Các hệ thống nuôi cấy này được duy trì ở pH 5,3, nhiệt độ 22°C trong 56 ngày. Các chỉ tiêu về KLT (mg), KLK (mg) của RTC, chiều dài trung bình của RTC (cm), số rễ (RTC/RBD), tỷ lệ tạo RTC (%), hàm lượng các ginsenoside-Rb1, Rg1, và MR2, % tổng 3 saponin và năng suất tổng hợp cả ba loại saponin (mg/L) được xác định sau 56 ngày nuôi cấy.



Hình 2.2. Hệ thống Bioreactor tự tạo 3 L và hệ thống Bioreactor hình cầu 3 L.
A. Đường dẫn khí ra qua màng lọc Millipore, **B.** Đường dẫn khí vào qua màng lọc Millipore, **C.** Hệ thống lọc không khí, **D.** Máy bơm không khí vào.



Hình 2.3. Thao tác trên hệ thống Bioreactor [16].
A. Lắp ráp các bộ phận và bọc nylon chịu nhiệt và hấp khử trùng; **B.** Đổ môi trường; **C.** Cấy mẫu; **D.** Dán kín miệng bình; **E.** Nối hệ thống vào máy bơm khí.

2.3. Tối ưu khả năng tích lũy saponin của rễ thứ cấp hình thành từ rễ bất định sâm Ngọc Linh nhờ tác động của các elicitor

Kế thừa kết quả tốt nhất từ tất cả các thí nghiệm trên về mẫu RBD, CĐHST, môi trường cải biên, điều kiện nuôi cấy, các thí nghiệm về tác động của các elicitor đã được tiến hành.

2.3.1. Khảo sát ảnh hưởng của chitosan lên sự tăng sinh và tích lũy saponin của rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh từ nuôi cấy rễ bất định *in vitro*

Theo Hu và cs (2002), chitosan (CHN) bổ sung vào môi trường nuôi cấy có thể giúp tăng cường tích lũy saponin trong nuôi cấy tế bào *P. ginseng* [62], cho nên, nghiên cứu này cũng đã khảo sát ảnh hưởng của CHN vào nuôi cấy tạo RTC sâm Ngọc Linh. Các cụm RBD 30 ngày tuổi và dài khoảng 2 cm được sử dụng để khảo sát ảnh hưởng của CHN lên sự tăng trưởng và tích lũy các hợp chất saponin (MR2, Rg1, và Rb1). Nồng độ CHN bổ sung vào môi trường nuôi cấy: 0, 50, 100, 150, và 200 mg/L. CHN được bổ sung vào môi trường nuôi cấy trước khi hấp khử trùng.

Các nuôi cấy được tiến hành dưới điều kiện nuôi cấy lỏng lác với tốc độ 100 vòng/phút trong bình 250 mL chứa khoảng 30 mL môi trường tối ưu từ các thí nghiệm trên với tỷ lệ $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ là 1/2, được bổ sung 7 mg/L IBA, 0,5 mg/L BA và 30 g/L đường sucrose. Các kết quả về các chỉ tiêu tăng trưởng về KLT và KLK (mg), năng suất tổng hợp cả ba loại saponin MR2, Rg1 và Rb1 (mg/L) trong sinh khối thu được, hàm lượng % hay $\mu\text{g/L}$ của từng saponin trên 1 g sinh khối RTC khô được thu nhận sau 56 ngày nuôi cấy.

2.3.2. Khảo sát ảnh hưởng của dịch chiết nấm men lên sự tăng sinh và tích lũy saponin của rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh từ nuôi cấy rễ bất định *in vitro*

Gần đây, dịch chiết nấm men (Yeast extract-YE) được xem như một elicitor có hiệu quả lớn trong việc tích lũy các hợp chất thứ cấp. Để đánh giá hiệu quả của YE trong tích lũy saponin, các cụm RBD 30 ngày tuổi và dài khoảng 2 cm được sử dụng để khảo sát ở các nồng độ từ 0, 50, 100, 150, và 200 mg/L trong nuôi cấy tạo RTC sâm Ngọc Linh. YE được bổ sung vào môi trường nuôi cấy trước khi hấp khử trùng. Các nuôi cấy được tiến hành dưới điều kiện nuôi cấy lỏng lác với tốc độ 100 vòng/phút trong bình 250 mL chứa khoảng 30 mL môi trường tối ưu từ các thí

nghiệm trên với tỷ lệ $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ là 1/2, được bổ sung 7 mg/L IBA, 0,5 mg/L BA và 30 g/L đường sucrose. Các kết quả về các chỉ tiêu tăng trưởng về KLT và KLK (mg), năng suất tổng hợp cả ba loại saponin MR2, Rg1 và Rb1 (mg/L) trong sinh khối thu được, hàm lượng % hay $\mu\text{g/L}$ của từng saponin trên 1 g sinh khối RTC khô được thu nhận sau 56 ngày nuôi cấy.

2.3.3. Khảo sát ảnh hưởng của abscisic acid lên sự tăng sinh và tích lũy saponin của rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh từ nuôi cấy rễ bất định *in vitro*

Abscisic acid (ABA) là một CĐHST, giúp điều hòa quá trình lão hóa ở thực vật. Tuy nhiên, trong các phản ứng phòng vệ thực vật và trên con đường sinh tổng hợp các hợp chất thứ cấp, hàm lượng ABA nội sinh thường tăng lên. Khi nghiên cứu cơ chế của quá trình này, Zhao và cs (2005) cũng đã khẳng định khả năng tăng cường hợp chất thứ cấp của ABA trên nhiều loài thực vật [137]. Vì vậy, nghiên cứu này đã tiến hành đánh giá tác động của ABA (0, 50, 100, 150 và 200 $\mu\text{g/L}$) với vai trò như là một elicitor trong việc tăng tích lũy saponin ở nuôi cấy tạo RTC sâm Ngọc Linh từ RBD *in vitro* 30 ngày tuổi và dài khoảng 2 cm. ABA được bổ sung vào môi trường nuôi cấy sau khi đã hấp khử trùng bằng cách lọc qua màng lọc vô khuẩn có kích thước lỗ là 20 μm .

Các nuôi cấy được tiến hành dưới điều kiện nuôi cấy lỏng lắc với tốc độ 100 vòng/phút trong bình 250 mL chứa 30 mL môi trường tối ưu từ các thí nghiệm trên với tỷ lệ $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ là 1/2, được bổ sung 7 mg/L IBA, 0,5 mg/L BA và 30 g/L đường sucrose. Các kết quả về các chỉ tiêu tăng trưởng về KLT và KLK (mg), năng suất tổng hợp cả ba loại saponin MR2, Rg1 và Rb1 (mg/L) trong sinh khối thu được, hàm lượng % hay $\mu\text{g/L}$ của từng saponin trên 1 g sinh khối RTC khô được thu nhận sau 56 ngày nuôi cấy.

2.3.4. Khảo sát ảnh hưởng của salicylic acid lên sự tăng sinh và tích lũy saponin của rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh từ nuôi cấy rễ bất định *in vitro*

Salicylic acid (SA) cũng là một CĐHST, nhưng được sử dụng phổ biến với vai trò là một elicitor hơn. Nghiên cứu này đã khảo sát SA bổ sung vào môi trường nuôi cấy: 0, 50, 100, 150 và 200 $\mu\text{g/L}$ nhằm gia tăng hàm lượng saponin trong nuôi cấy RTC sâm Ngọc Linh *in vitro*. SA được bổ sung vào môi trường nuôi cấy sau

khi đã hấp khử trùng bằng cách lọc qua màng lọc vô khuẩn (kích thước lỗ là 20 μm).

Các RBD 30 ngày tuổi và dài 2 cm được nuôi cấy dưới điều kiện lỏng lắc với tốc độ 100 vòng/phút trong bình 250 mL chứa 30 mL môi trường tối ưu từ các thí nghiệm trên với tỷ lệ $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ là 1/2, được bổ sung 7 mg/L IBA, 0,5 mg/L BA và 30 g/L đường sucrose. Các kết quả về các chỉ tiêu tăng trưởng về KLT và KLK (mg), năng suất tổng hợp cả ba loại saponin MR2, Rg1 và Rb1 (mg/L) trong sinh khối thu được, hàm lượng % hay $\mu\text{g/L}$ của từng saponin trên 1 g sinh khối RTC khô được thu nhận sau 56 ngày nuôi cấy.

2.3.5. Khảo sát ảnh hưởng của jasmonic acid lên sự tăng sinh và tích lũy saponin của rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh từ nuôi cấy rễ bất định in vitro

Jasmonic acid (JA) ngoài là một CDHST, còn là một elicitor có hiệu quả cao trong việc tăng cường tích lũy saponin ở các loài sâm. Cho nên, các cụm RBD 30 ngày tuổi và dài khoảng 2 cm được sử dụng để khảo sát ảnh hưởng của JA lên sự tăng trưởng và tích lũy các hợp chất saponin ở 0, 50, 100, 150, và 200 $\mu\text{g/L}$. JA được bổ sung vào môi trường nuôi cấy sau khi đã hấp khử trùng bằng cách lọc qua màng lọc vô khuẩn có kích thước lỗ là 20 μm .

Các nuôi cấy được tiến hành dưới điều kiện lỏng lắc với tốc độ 100 vòng/phút trong bình 250 mL chứa khoảng 30 mL môi trường tối ưu từ các thí nghiệm trên với tỷ lệ $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ là 1/2, được bổ sung 7 mg/L IBA, 0,5 mg/L BA và 30 g/L đường sucrose. Các kết quả về các chỉ tiêu tăng trưởng về KLT và KLK (mg), năng suất tổng hợp cả ba loại saponin MR2, Rg1 và Rb1 (mg/L) trong sinh khối thu được, hàm lượng % hay $\mu\text{g/L}$ của từng saponin trên 1 g sinh khối RTC khô được thu nhận sau 56 ngày nuôi cấy.

2.3.6. Khảo sát ảnh hưởng kết hợp của elicitor ngoại sinh và elicitor nội sinh lên sự tăng sinh và tích lũy saponin của rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh in vitro

YE là một elicitor ngoại sinh từ thành tế bào vi sinh vật, trong khi SA là một elicitor nội sinh có bản chất là hormone thực vật, mỗi elicitor này sẽ có tác động khác nhau lên quá trình tăng trưởng và tích lũy saponin của nuôi cấy RBD sâm Ngọc Linh. Chính vì thế, việc kết hợp SA (0, 25, 50, 100 và 150 $\mu\text{g/L}$) với YE (0, 25, 50, 100 và 150 mg/L) được thực hiện để khảo sát hiệu quả kết hợp lên sự gia

tăng hoạt chất saponin trong nuôi cấy tạo RTC từ RBD sâm Ngọc Linh nuôi cấy *in vitro*. SA được bổ sung vào môi trường nuôi cấy sau khi đã hấp khử trùng bằng cách lọc qua màng lọc vô khuẩn có kích thước lỗ là 20 μm ; và YE thêm vào trước lúc khử trùng môi trường.

Các cụm RBD 30 ngày tuổi và dài khoảng 2 cm được sử dụng trong thí nghiệm này được tiến hành dưới điều kiện nuôi cấy lỏng lắc với tốc độ 100 vòng/phút trong bình 250 mL chứa khoảng 30 mL môi trường tối ưu từ các thí nghiệm trên với tỷ lệ $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ là 1/2, được bổ sung 7 mg/L IBA, 0,5 mg/L BA và 30 g/L đường sucrose. Các kết quả về các chỉ tiêu tăng trưởng về KLT và KLK (mg), năng suất tổng hợp cả ba loại saponin MR2, Rg1 và Rb1 (mg/L) trong sinh khối thu được, hàm lượng % hay $\mu\text{g/L}$ của từng saponin trên 1 g sinh khối RTC khô được thu nhận sau 56 ngày nuôi cấy.

2.3.7. Khảo sát ảnh hưởng của thời gian xử lý elicitor lên sự tăng sinh và tích lũy saponin của rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh từ nuôi cấy rễ bất định in vitro

Kế thừa kết quả của thí nghiệm trên, kết quả tốt nhất (150 mg/L YE) được tiến hành khảo sát ảnh hưởng của thời gian bổ sung elicitor này lên khả năng tăng trưởng và tích lũy các hợp chất saponin của RTC sâm Ngọc Linh với thời gian khảo sát được bố trí như sau: các elicitor được bổ sung vào môi trường trước khi nuôi cấy (ký hiệu là 0), vào ngày thứ 10, 20, 30 và 40 khi nuôi cấy. YE được pha sẵn và hấp khử trùng trước mỗi thời điểm bổ sung.

Các cụm RBD 30 ngày tuổi và dài khoảng 2 cm được sử dụng trong thí nghiệm này được tiến hành dưới điều kiện nuôi cấy lỏng lắc với tốc độ 100 vòng/phút trong bình 250 mL chứa khoảng 30 mL môi trường tối ưu từ các thí nghiệm trên với tỷ lệ $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ là 1/2, được bổ sung 7 mg/L IBA, 0,5 mg/L BA và 30 g/L đường sucrose. Các kết quả về các chỉ tiêu tăng trưởng về KLT và KLK (mg), năng suất tổng hợp cả ba loại saponin MR2, Rg1 và Rb1 (mg/L) trong sinh khối thu được, hàm lượng % hay $\mu\text{g/L}$ của từng saponin trên 1 g sinh khối RTC khô được thu nhận sau 56 ngày nuôi cấy.

2.4. Phương pháp xác định chỉ số tăng trưởng, tỷ lệ chất khô, tỷ lệ hình thành và tăng sinh của mẫu cấy

Chỉ số tăng trưởng = [Khối lượng khô thu được (mg) – Khối lượng khô ban đầu (mg)]/Khối lượng khô ban đầu (mg)

Tỷ lệ chất khô (%) = (Khối lượng khô/Khối lượng tươi)×100

Tỷ lệ tạo RTC (%) = (Tổng số mẫu tạo RTC/Tổng số mẫu nuôi cấy)×100

Tỷ lệ tăng sinh (lần) = Khối lượng tươi thu được/Khối lượng tươi ban đầu

2.5. Môi trường nuôi cấy

Môi trường dinh dưỡng khoáng MS [93], SH [113] và B5 [52] có bổ sung 30 g/L đường sucrose, 8 g/L agar, pH = 5,8 và thay đổi tùy vào từng thí nghiệm.

Chất điều hòa sinh trưởng thực vật (CĐHST) bao gồm: IBA, NAA, IAA, 2,4-D, Kin, BA,... được bổ sung vào môi trường với nồng độ thích hợp trước khi điều chỉnh pH về 5,8 (trừ thí nghiệm khảo sát pH). Các elicitor, đường, muối khoáng và pH cho các thí nghiệm có thể thay đổi tùy theo từng thí nghiệm.

Môi trường được rót vào bình thủy tinh 250 mL, mỗi bình chứa 30 mL môi trường; trừ thí nghiệm về thể tích môi trường và hệ thống nuôi cấy. Sau đó, được hấp khử trùng ở 121°C, 1 atm trong 20 phút.

2.6. Điều kiện nuôi cấy

Các thí nghiệm được tiến hành ở nhiệt độ 25±2°C (trừ thí nghiệm khảo sát nhiệt độ nuôi cấy), độ ẩm trung bình 50-60%, tất cả các thí nghiệm đều đặt trong điều kiện tối hoàn toàn (trừ thí nghiệm khảo sát về thời gian chiếu sáng), các thí nghiệm ngoài sáng được để dưới ánh sáng đèn huỳnh quang có cường độ chiếu sáng khoảng 40-45 μmol.m⁻².s⁻¹ với chu kỳ chiếu sáng 16 giờ/ngày.

Các mẫu RBD được nuôi cấy trên môi trường lỏng trong vòng 56 ngày dưới điều kiện tối hoàn toàn được đặt ở nhiệt độ 25±2°C, độ ẩm trung bình 50-60% trên máy lắc Innova 2100 plantform shaker (Hermle, Đức) với tốc độ 100 vòng/phút.

3. PHƯƠNG PHÁP SINH HÓA ĐỊNH TÍNH VÀ ĐỊNH LƯỢNG SAPONIN

3.1. Phương pháp định tính bằng sắc ký lớp mỏng

Phương pháp sắc ký lớp mỏng (TLC) là kỹ thuật dùng dung dịch mẫu thử chấm trên bản mỏng hấp phụ (thường là silica gel) để xác định sự hiện diện của các

chất phù hợp với một dung môi lôi kéo. Dung dịch pha động này di chuyển dọc theo bản mỏng sẽ làm di chuyển các cấu tử của mẫu thử theo một vận tốc khác nhau, tạo thành một sắc đồ có nhiều vết Rf khác nhau [21].

Rf của một chất A là tỷ số giữa đoạn đường di chuyển của chất A (I_A) và đoạn đường di chuyển của dung môi (I_0) tính từ vạch xuất phát của mẫu thử:

$$Rf_A = I_A/I_0$$

Trị số Rf luôn luôn < 1,00 và chỉ lấy đúng 2 số lẻ.

Các bước thực hiện định tính saponin trong mẫu cần phân tích [21]:

Chuẩn bị mẫu

Chiết siêu âm 5 g mẫu với MeOH (30 mL/lần, mỗi lần 15 phút, 5 lần), lọc và cô dịch lọc đến cạn. Hòa cạn với 30 mL nước và 30 mL diethylether, lắc đều, loại bỏ dịch diethylether. Dịch nước được tiếp tục lắc với n-BuOH bão hòa nước, đem cô cách thủy dịch n-BuOH đến cạn, hòa cạn trong MeOH làm mẫu thử.

Chuẩn bị bản mỏng silica gel

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.

Chuẩn bị dung môi

Chloroform:methanol:nước (65:35:10, lớp dưới);

n-butanol:acetic acid:nước (7:1:2, lớp trên).

Tiến hành

Chấm đồng loạt mẫu thử (các nghiệm thức) cùng đối chiếu với chuẩn MR2, G-Rb1, G-Rg1 lên bản silica gel.

Cho bản mỏng đã chấm mẫu thử vào bình sắc ký 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 và xác định giá trị Rf của các vết chất so với vết của các chất chuẩn.

3.2. Phương pháp định lượng bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao

Phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) là kỹ thuật sắc ký tách hỗn

hợp trên cột được nhồi đầy bằng các hạt có kích thước $\leq 10 \mu\text{m}$. Do vậy, phải dùng một bơm có áp suất cao khoảng 300 atm để đẩy pha động qua cột với tốc độ dòng khoảng vài mL/phút và cho phép phân giải nhanh một lượng mẫu nhỏ cỡ 20 μg [21]. Về mặt kỹ thuật, việc định lượng các chất bằng HPLC có thể dựa vào sự so sánh chiều cao của đỉnh hay so sánh diện tích đỉnh của chất cần xác định với một hay nhiều mẫu chuẩn [21].

Có nhiều phương pháp định lượng, nhưng thí nghiệm này dùng chất chuẩn để so sánh trực tiếp chiều cao hoặc diện tích đỉnh của mẫu thử với chiều cao hoặc diện tích đỉnh của một dung dịch chất chuẩn tương ứng có nồng độ đã biết. Phương pháp này được áp dụng phổ biến trong HPLC để định lượng các chất. Ưu điểm của phương pháp này là chính xác, chỉ cần lưu ý đến sự phân tách của hợp chất cần xác định nên tiến hành định lượng khá đơn giản. Nhược điểm của phương pháp này là sai số có thể xảy ra khi nạp mẫu sẽ ảnh hưởng trực tiếp đến kết quả định lượng [21].

Các bước thực hiện định lượng saponin (MR2, Rb1 và Rg1) bằng HPLC:

Dựng đường chuẩn định lượng saponin (chuẩn MR2, Rg1, và Rb1):

Cân chất chuẩn: 3,6 mg MR2; 0,97 mg G-Rg1; 1,2 mg G-Rb1 pha trong bình định mức 10 mL với acetonitrile và nước (tỷ lệ 7:3) để có được dung dịch mẹ, từ dung dịch mẹ pha dải mẫu.

Nạp các mẫu chuẩn ở nồng độ khác nhau vào máy HPLC, ghi nhận diện tích đỉnh tương ứng với mỗi nồng độ, dựng đường chuẩn ($y = ax + b$) biểu diễn mối tương quan tuyến tính giữa diện tích đỉnh và nồng độ.

Áp dụng quy trình định lượng saponin (MR2, Rg1, và Rb1) trên củ sâm tự nhiên cho mẫu RTC sâm Ngọc Linh như sau:

Chuẩn bị mẫu tương tự như sắc ký lớp mỏng.

Cẩn n-butanol hòa với 10 mL methanol, trích 2 mL cô cách thủy đến cạn. Hòa cẩn với nước và acetonitrile (1:2), lọc qua màng lọc 0,45 μm , dịch lọc bơm vào máy HPLC với điều kiện thể tích mẫu 20 μL , tốc độ dòng 0,5 mL/phút, cột RP C8 Supelco (250 mm, 4,6 mm, 5 μm), nhiệt độ cột 25°C, detector là PDA ở bước sóng 190, 196 và 203 nm.

3.3. Phương pháp xác định năng suất tổng hợp saponin

Năng suất tích lũy saponin trong RTC sâm Ngọc Linh tỷ lệ thuận với sự gia tăng sinh khối khô và tổng hàm lượng saponin (MR2 + Rb1 + Rg1), được xác định bằng công thức [135]:

$$NS \text{ (mg/L)} = (KLK \times ST) / V$$

NS: Năng suất tích lũy saponin (mg/L)

KLK: Tổng khối lượng khô (mg)

ST: Tổng 3 saponin (MR2 + Rb1 + Rg1) trong 1 g mẫu phân tích (mg)

V: Thể tích môi trường nuôi cấy (L), V = 30 mL môi trường/bình/1000 mL.

4. PHƯƠNG PHÁP QUAN SÁT TẾ BÀO HỌC

Hình thái rễ được quan sát bằng cách cắt mỏng rễ theo chiều dọc (song song với trục thân của rễ) và chiều ngang (vuông góc với trục thân của rễ) và tiến hành nhuộm kép với thuốc nhuộm 2 màu như sau: mẫu sau khi giải phẫu được ngâm trong Javel 10% đến khi mẫu trắng, nhưng tối đa không quá 30 phút. Tiếp đó, mẫu được rửa sạch bằng nước cất 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 vi phẫu trong xanh methylene 1 phút. Rửa sạch bằng nước cất và ngâm vào thuốc nhuộm iodine-carmin (Merk KgaA-Germany) trong 5 phút. Cuối cùng, rửa lại bằng nước cất và bảo quản vi phẫu trong nước cất hoặc glycerine [106].

Quan sát mẫu trên lame kính được đặt bằng lamelle và chụp ảnh với máy ảnh kỹ thuật số Sony DSC-W570 dưới kính hiển vi quang học Olympus CH30 ở vật kính $\times 10$. Màu nhuộm vách tế bào thay đổi theo bản chất của vách: vách tế bào bằng cellulose (tế bào biểu bì, mô mềm, mô dày và libe) có màu hồng hay màu hồng tím, vách tế bào tâm suberin hay suberoid (bần, mô cứng, gỗ) có màu xanh.

5. PHƯƠNG PHÁP THỐNG KÊ VÀ XỬ LÝ SỐ LIỆU

Mỗi thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên và được lặp lại 3 lần với mỗi lần 10 bình (số lượng mẫu trong bình tùy thuộc từng thí nghiệm). Sau đó, các kết quả trung bình của 3 lần lặp lại được xác định và xử lý bằng ANOVA một yếu tố của phép thử Duncan với $p \leq 0,05$ bằng phần mềm SPSS 20.0 [49]. Các biểu đồ vẽ bằng phần mềm Excel 2010 cũng thể hiện $\pm SE$ và phân hạng của Duncan [49].

CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

1. TỐI ƯU NUÔI CÂY RỄ THỨ CẤP SÂM NGỌC LINH TỪ NHỮNG MẪU RỄ BẤT ĐỊNH *IN VITRO*

1.1. Tối ưu cách chọn mẫu và môi trường nuôi cấy rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh

1.1.1. Ảnh hưởng của cách cắt mẫu rễ bất định lên sự hình thành và tăng trưởng của rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh từ nuôi cấy rễ bất định *in vitro*

Bảng 3.1. Ảnh hưởng của cách cắt mẫu rễ bất định lên khả năng hình thành và tăng trưởng rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh *in vitro*

Mẫu RBD	TM	KT (cm)	Tỷ lệ tạo RTC (%)	Số RTC	Chiều dài RTC (cm)	KLT (mg)
Từ Lá	C1	1	31,67 ^{e*}	0,33 ^h	0,37 ^f	29,33 ^g
		2	46,67 ^d	2,00 ^{efg}	0,83 ^f	39,67 ^f
	C2	1	82,33 ^b	2,33 ^{ef}	2,00 ^e	65,00 ^c
		2	93,33^a	7,33 ^c	3,33 ^{bc}	73,00 ^b
Từ cuống lá	C1	1	46,00 ^d	1,33 ^{fgh}	1,67 ^e	30,33 ^g
		2	53,67 ^{cd}	10,00 ^b	5,23 ^a	49,67 ^e
	C2	1	79,00 ^b	3,00 ^e	3,13 ^{cd}	57,67 ^d
		2	94,33^a	13,67^a	5,60^a	78,00^a
Từ thân củ	C1	1	48,33 ^d	0,67 ^{gh}	0,67 ^f	42,33 ^f
		2	60,00 ^c	6,00 ^d	4,03 ^b	51,00 ^e
	C2	1	75,00 ^b	8,33 ^c	2,33 ^{de}	56,33 ^d
		2	83,33 ^b	13,33 ^a	5,00 ^a	71,33 ^b

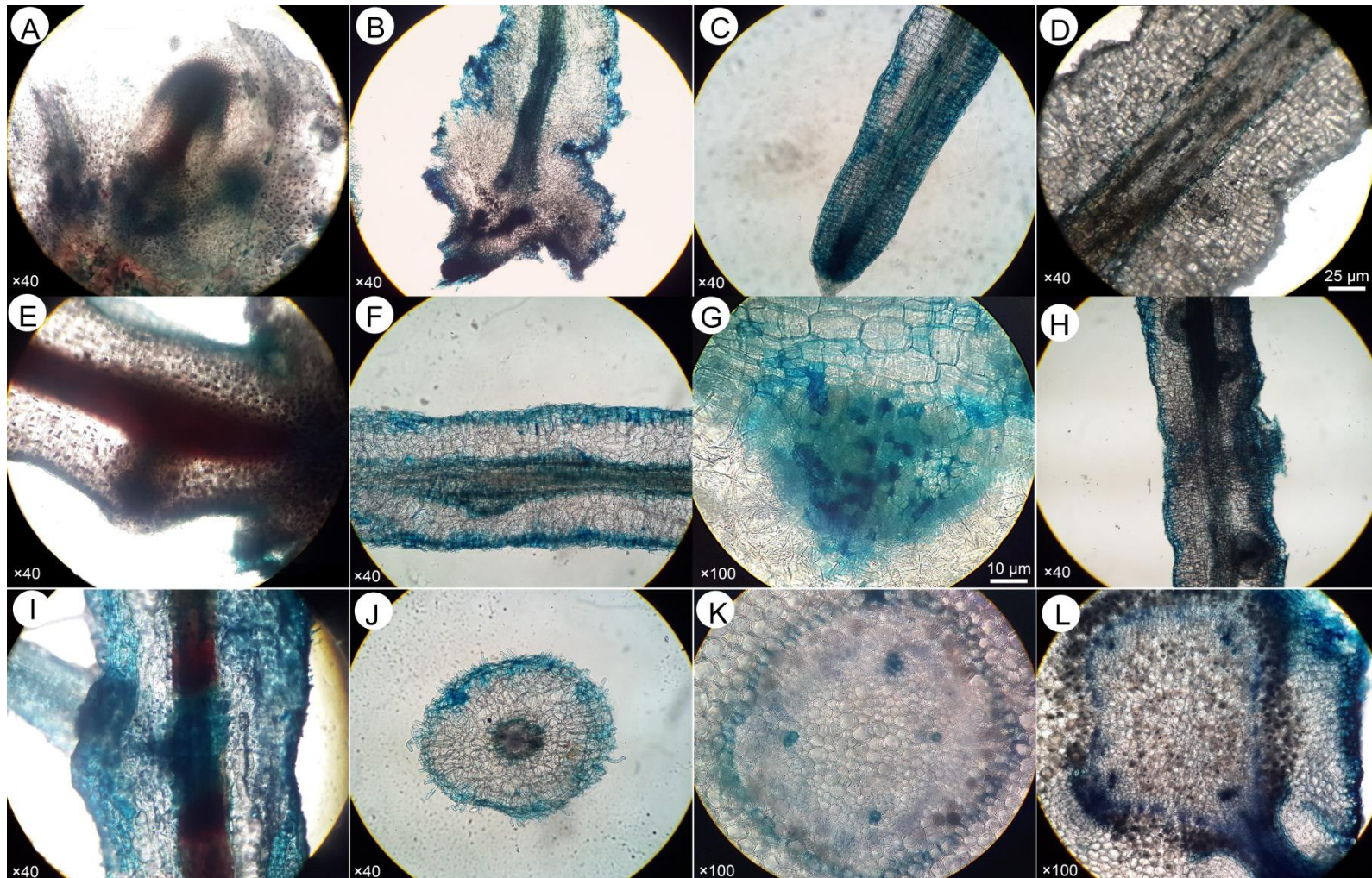
*Các chữ cái khác nhau trong một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa với $p \leq 0,05$ trong phép thử Duncan. KLT: Khối lượng tươi, TM: Cách cắt mẫu, C1: mẫu được cắt ngang RBD để bỏ phần mẫu tái sinh, C2: mẫu cắt trên phần mẫu tái sinh, KT: Chiều dài mẫu cắt.

Sự phát triển của RBD sâm Ngọc Linh sau khi cây chuyển sang môi trường khác vẫn phụ thuộc vào thành phần dinh dưỡng và lượng hormone có trong phần mô (lá, cuống lá và thân củ) đã tái sinh nên phần RBD này. Điều này làm ảnh hưởng lên khả năng hình thành và tăng trưởng RTC của các RBD được tái sinh từ các loại mô khác nhau. Do vậy, để xác định tác động này lên sự hình thành các RTC của RBD, các mẫu RBD từ 3 loại mô tái sinh lá, cuống lá và thân củ được cắt theo 2 cách khác nhau (C1 là cắt bỏ toàn bộ khối mô tái sinh ban đầu, C2 vẫn giữ lại phần mô tái sinh này), ngoài ra, 2 kích thước (1 và 2 cm) cũng được khảo sát. Kết quả

nuôi cấy sau 48 ngày nuôi cấy được ghi nhận ở Bảng 3.1, Hình 3.1 và Hình 3.2 cho thấy, các RBD tái sinh từ mẫu cuống lá hình thành RTC tốt hơn các RBD tái sinh từ phiến lá và thân củ. Bên cạnh đó, các mẫu RBD này cắt theo cách C2 cho kết quả tăng trưởng tốt hơn C1 (Bảng 3.1, Hình 3.1). Ở mẫu RBD tái sinh từ cuống lá, khi phần mô tái sinh không còn, số lượng RTC (1,33 RTC/mẫu) và chiều dài RTC (1,67 cm), KLT (30 mg) thấp hơn đáng kể so với các mẫu khác (Bảng 3.1, Hình 3.1). So sánh giữa các mẫu RBD 1 cm, tỷ lệ tạo rễ tốt nhất thu được ở mẫu rễ tái sinh từ phiến lá, nhưng các chỉ tiêu khác vẫn không bằng RBD tái sinh từ cuống lá. Giữa 2 kích thước 1 cm và 2 cm, kích thước 2 cm cho kết quả tốt nhất ở tất cả các loại RBD (Bảng 3.1). Quan sát mô tế bào tại vùng tăng trưởng của RBD 2 cm, ngoài những RTC đã đâm ra khỏi lớp vỏ ngoài của RBD, còn dễ dàng tìm thấy rất nhiều mầm RTC đang phát triển, trong khi ở mẫu RBD dài 1 cm có rất ít mầm RTC (Hình 3.2). Do đó, RBD 2 cm tái sinh từ cuống lá cho kết quả tốt nhất về sự hình thành và tăng sinh RTC sâm Ngọc Linh, với KLT (78 mg), chiều dài RTC (5,6 cm), số RTC/RBD (16,67 RTC) và tỷ lệ tạo RTC (94,33%) đều đạt cao nhất. Ngoài ra, sự hình thành RTC theo các cách cắt mẫu khác nhau cũng tỷ lệ thuận với kích thước RBD vì RBD càng dài số RTC càng tăng.



Hình 3.1. Rễ thứ cấp hình thành và tăng trưởng từ rễ bất định tái sinh từ các loại mẫu tái sinh khác nhau của sâm Ngọc Linh.
A. RBD tái sinh từ cuống lá, **B.** RBD tái sinh từ thân củ, **C.** RBD tái sinh từ lá. **1.** RBD 1 cm không có mô tái sinh, **2.** RBD 2 cm không có mô tái sinh, **3.** RBD 1 cm còn phần mô tái sinh, **4.** RBD 2 cm còn phần mô tái sinh.



Hình 3.2. Các giai đoạn phát sinh rễ thứ cấp từ rễ bất định sâm Ngọc Linh *in vitro*.

A. Mẫu RBD tái sinh từ nhu mô cuống lá, **B.** Mẫu cắt RBD có chứa phần mô tái sinh, **C.** Phần chóp RTC từ RBD 1 cm, **D.** Mầm RTC của RBD 1 cm không có mô tái sinh, **E.** Mầm RTC từ RBD 1 cm có mô tái sinh, **F, G, H.** Các mầm RTC từ vùng tăng trưởng RBD 2 cm có mô tái sinh, **I.** RTC trưởng thành tăng trưởng, **J, K.** Lớp cắt ngang của RTC, **L.** Lớp cắt ngang của RBD tại vị trí tạo RTC.

Quan sát hình thái giải phẫu của các RBD sâm Ngọc Linh có nguồn gốc khác nhau cho thấy, RTC hình thành từ RBD 2 cm tái sinh từ mẫu cuống lá có cấu trúc tương tự rễ chính (Hình 3.2). Theo lớp giải phẫu cắt dọc, các RTC này có đầy đủ các vùng tăng trưởng, vùng lông hút, chóp rễ và mũ bảo vệ rễ; theo lớp cắt ngang cho thấy, RTC này được tổ chức thành một khối hình trụ đồng tâm với một lớp ngoại bì (epidermis) màu xanh, đến lớp nhu mô vỏ (cortex) dày màu hồng, lớp nội bì (endodermis) màu xanh, giữa là trung trụ (pericycle) và các mạch dẫn trung tâm với các cực xylem nằm xen kẽ với 4 bó mạch phloem có libe màu hồng và gỗ màu xanh, chính giữa là nhu mô tủy màu hồng (Hình 3.2J,K). Các RTC được hình thành ở trụ bì tại vị trí của bó mạch dẫn trung tâm của RBD (Hình 3.2L). Ngoài ra, RBD này cũng trải qua đầy đủ các giai đoạn hình thành RTC như ở các rễ của các cây hoàn chỉnh. Quá trình phát triển RTC ở sâm Ngọc Linh là một quá trình phát sinh hình thái thông qua quá trình phân biệt hóa và biệt hóa tế bào tại vị trí các tế bào xylem của nền trụ bì ở vùng tăng trưởng để chuyển thành những tiền tế bào tạo ra các sơ khởi RTC và mầm RTC, sau đó các RTC này kéo dài và trưởng thành, rồi tiếp tục quá trình hình thành các RTC khác (Hình 3.2). Quan sát tại phần mô cuống lá tái sinh RBD cho thấy, các RBD vẫn dính liền với phần mô tái sinh, nên quá trình dẫn truyền các tín hiệu, phytohormone và chất dinh dưỡng từ mô tái sinh (phần thân xuống) vẫn diễn ra và kích thích hình thành RTC tốt hơn; nếu không để lại phần mô này sẽ làm giảm rõ rệt khả năng hình thành và phát triển RTC (Bảng 3.1, Hình 3.2).

Tóm lại, RTC sâm Ngọc Linh hình thành từ trụ bì và tại vị trí có các mạch dẫn, trong đó, nguồn RBD *in vitro* tái sinh từ cuống lá, có kích thước 2 cm, không tách bỏ phần cuống lá là tốt nhất cho RTC sâm Ngọc Linh hình thành và tăng trưởng.

1.1.2. Ảnh hưởng của auxin lên sự hình thành và tăng trưởng của rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh từ nuôi cấy rễ bất định in vitro

Kế thừa kết quả từ thí nghiệm về cách chọn mẫu cây và thời gian nuôi cấy, việc bổ sung các loại và nồng độ của auxin khác nhau đã được khảo sát để tăng hiệu quả thúc đẩy sự hình thành RTC sâm Ngọc Linh từ RBD *in vitro*. Kết quả thu được ở Bảng 3.2 sau 56 ngày nuôi cấy cho thấy, trên môi trường không bổ sung auxin, RTC không hình thành; nhưng khi có mặt auxin sự hình thành RTC tăng lên rõ rệt.

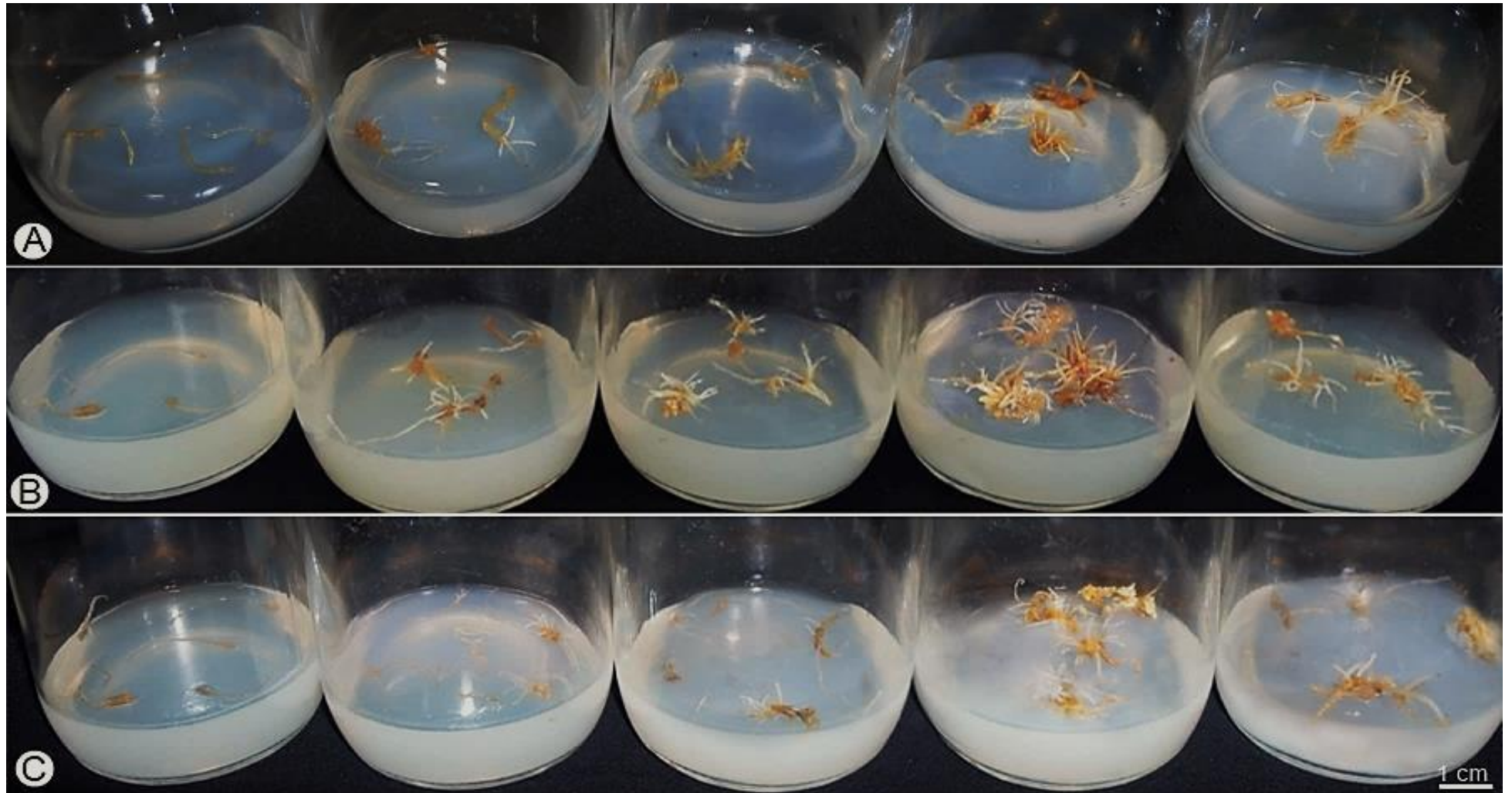
Bảng 3.2. Ảnh hưởng của auxin lên khả năng hình thành và tăng trưởng rễ thứ cấp từ rễ bất định sâm Ngọc Linh *in vitro*

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

*Các chữ cái khác nhau trong một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa với $p \leq 0,05$ trong phép thử Duncan. KLT: Khối lượng tươi, KLK: Khối lượng khô.

Sau 40 ngày nuôi cấy, quan sát hình thái giải phẫu của RBD ở nghiệm thức bổ sung 7 mg/L IBA cho thấy, các mầm RTC đã bắt đầu hình thành ở phần rễ nằm gần mẫu cuống lá; Tiếp đó, sau 56 ngày, ngoài các RTC đã hình thành trước đó, còn rất nhiều mầm rễ mới xuất hiện ở phần rễ cách chóp rễ khoảng 0,2 cm (Hình 3.2).

Ở giai đoạn đầu của sự hình thành RTC ở các nghiệm thức bổ sung IAA và NAA, khả năng cảm ứng tạo rễ không tốt bằng IBA, với tỷ lệ tạo RTC rất thấp (Bảng 3.2). Sau 56 ngày nuôi cấy, các nghiệm thức bổ sung 7 mg/L NAA, IAA và 5-7 mg/L IBA quan sát không có khác biệt về mặt hình thái và khả năng tăng trưởng đều đạt tối ưu với RBD hơi vàng và hình thành nhiều RTC có màu trắng tươi, dài và rất mảnh (Hình 3.3). Tuy nhiên, theo kết quả xử lý thống kê, 7 mg/L IBA cho khả năng hình thành và phát triển RTC tốt nhất với 17 RTC/RBD, còn chiều dài, KLT và KLK cao gấp khoảng 2 lần nghiệm thức tốt nhất của IAA (9 mg/L) và khoảng 1,5 lần so với nghiệm thức tốt nhất của NAA (5 mg/L) (Bảng 3.2, Hình 3.3). Hơn nữa, khi nồng độ NAA tăng quá 5 mg/L, các RBD bắt đầu hình thành mô sẹo, trong khi, IBA không có hiện tượng này.



Hình 3.3. Ảnh hưởng của auxin lên sự hình thành và tăng trưởng rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh của rễ bất định *in vitro* tái sinh từ cuống lá.
A. IAA ở nồng độ 0, 3, 5 và 7 mg/L; B. IBA ở nồng độ 0, 3, 5 và 7 mg/L; C. NAA ở nồng độ 0, 3, 5 và 7 mg/L (từ trái sang phải)

Như vậy, trong các loại và dãy nồng độ auxin đã khảo sát, IBA ở nồng độ 7 mg/L là thích hợp nhất cho RTC hình thành và tăng trưởng. Nồng độ này sẽ được sử dụng cho tất cả thí nghiệm sau để cải tiến môi trường nuôi cấy RTC sâm Ngọc Linh từ RBD *in vitro*, cũng như để tăng cường tích lũy saponin.

1.1.3. Ảnh hưởng của việc kết hợp auxin với cytokinin lên sự hình thành và tăng trưởng của rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh từ nuôi cấy rễ bất định *in vitro*

Sau khi xác định loại mẫu và nồng độ auxin tối ưu, dựa vào các kết quả tốt nhất ở trên, để tiếp tục cải thiện khả năng tăng trưởng RTC, cytokinin được bổ sung vào môi trường SH có 7 mg/L IBA với các nồng độ thấp từ 0,01-2 mg/L. Các kết quả thu sau 56 ngày nuôi cấy thể hiện ở Bảng 3.3.

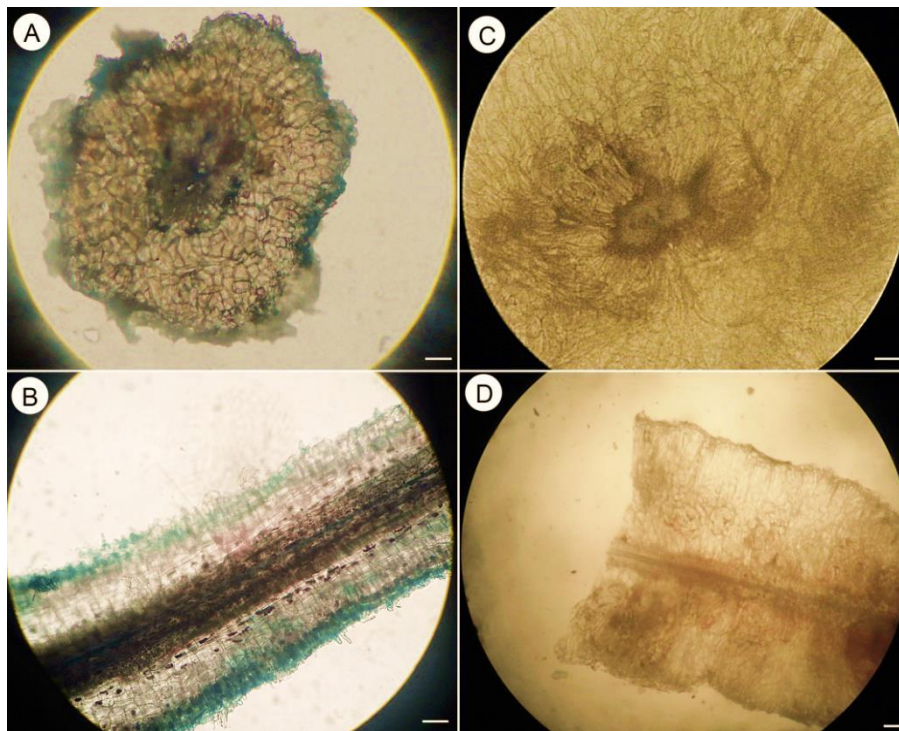
Bảng 3.3. Ảnh hưởng của IBA kết hợp với cytokinin lên sự hình thành và tăng trưởng rễ thứ cấp từ rễ bất định sâm Ngọc Linh *in vitro*

IBA (mg/L)	Cytokinin (mg/L)	Tỷ lệ tạo RTC	Số RTC	Chiều dài RTC (cm)	KLT (mg)	KLK (mg)	
7,0	Kin	0	94,53 ^{a*}	13,75 ^a	5,25 ^a	155,00 ^{de}	14,25 ^{de}
		0,1	81,53 ^b	5,75 ^c	0,95 ^{de}	85,50 ^g	6,50 ^{hi}
		0,5	68,75 ^{cd}	4,00 ^{de}	0,75 ^{ef}	121,00 ^f	13,75 ^{def}
		1,0	47,50 ^f	2,75 ^{ef}	0,45 ^{fgh}	229,00 ^b	17,00 ^{bc}
		2,0	25,00 ^g	1,50 ^{fg}	0,20 ^{gh}	70,25 ^g	5,98 ^{hi}
	BA	0,1	85,00 ^{ab}	10,25 ^b	1,95 ^b	125,25 ^f	7,75 ^h
		0,5	92,50^a	12,50^a	2,23^b	260,25^a	21,50^a
		1,0	77,50 ^{bc}	4,75 ^{cd}	1,25 ^{cd}	132,25 ^{ef}	12,25 ^{efg}
		2,0	56,25 ^{ef}	1,75 ^{fg}	0,70 ^{ef}	164,25 ^{cd}	11,78 ^{fg}
	TDZ	0,01	82,75 ^{ab}	4,00 ^{de}	1,50 ^c	117,50 ^f	10,23 ^g
		0,05	65,00 ^{de}	2,75 ^{ef}	0,85 ^{def}	233,00 ^{ab}	15,25 ^{cd}
		0,1	30,00 ^g	1,50 ^{fg}	0,65 ^{efg}	187,25 ^c	18,50 ^b
		0,2	10,00 ^h	0,75 ^g	0,13 ^h	60,00 ^g	5,00 ⁱ

*Các chữ cái khác nhau trong một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa với $p \leq 0,05$ trong phép thử Duncan.

Các kết quả và hình ảnh thu được cho thấy, RTC sâm Ngọc Linh hình thành và tăng trưởng trên môi trường MS có sự kết hợp 7 mg/L IBA với cytokinin làm tăng sự phân chia và kéo dài tế bào theo chiều ngang, đặc biệt ở phần nhu mô vỏ của RBD, nên vỏ RBD dày lên và làm đường kính rễ to lên và khối lượng của rễ cũng tăng lên, nhưng đồng thời cũng ức chế quá trình tạo RTC với tỷ lệ tạo rễ và chiều dài rễ giảm xuống khi tăng nồng độ cytokinin lên cao (Bảng 3.3, Hình 3.4,

Hình 3.5). Theo quan sát trong các nghiệm thức kết hợp với cytokinin, 7 mg/L IBA kết hợp với 0,5 mg/L Kin hoặc 0,05 mg/L TDZ cho kết quả tốt nhất về hình thái RTC sâm Ngọc Linh nuôi cấy từ RBD *in vitro* sau 40 ngày nuôi cấy. RTC hình thành trên môi trường có 2 cytokinin này, có màu trắng tươi và giàu sức sống. Tuy nhiên theo kết quả thu được sau 56 ngày nuôi cấy, RTC kéo dài và tạo RTC tốt hơn khi không có cytokinin với tỷ lệ tạo RTC đạt 94,53%, số RTC/RBD trên 13,75 và chiều dài đạt tốt nhất với 5,25 cm. Mặc dù vậy, nghiệm thức bổ sung 7 mg/L IBA kết hợp với 0,5 mg/L BA cho kết quả về các chỉ số này không khác biệt về mặt thống kê với 92,50% RBD hình thành RTC, có 12,5 RTC/RBD; hơn nữa, KLT và KLK của rễ đạt cao nhất (tương ứng là 260,25 mg và 21,5 mg (Bảng 3.3).



Hình 3.4. Lớp cắt ngang và cắt dọc của rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh ở môi trường không bổ sung cytokinin và có bổ sung 0,5 mg/L BA.

A. Lớp cắt ngang của RTC không có BA; **B.** Lớp cắt dọc của RTC không có BA;
C. Lớp cắt ngang của RTC có BA; **D.** Lớp cắt dọc của RTC có BA.

Như vậy, việc kết hợp IBA và cytokinin vẫn kích thích RTC hình thành, còn giúp thiết lập thượng tầng chức năng, làm tăng đường kính RTC so với nghiệm thức không có cytokinin, đặc biệt khi bổ sung BA, thành tế bào trở nên dày hơn (Hình 3.4). Tóm lại, việc kết hợp 7 mg/L IBA với 0,5 mg/L BA là hiệu quả nhất để RTC sâm Ngọc Linh hình thành và tăng trưởng từ nguồn RBD *in vitro*.



Hình 3.5. Ảnh hưởng 7 mg/L IBA kết hợp với các cytokinin lên sự hình thành và tăng trưởng RTC sâm Ngọc Linh *in vitro*.
A. Kin từ 0; 0,1; 0,5; 1 và 2 mg/L; **B.** BA từ 0; 0,1; 0,5; 1 và 2 mg/L; **C.** TDZ từ 0; 0,01; 0,05; 0,1 và 0,2 mg/L (từ trái sang phải).

1.1.4. Ảnh hưởng của môi trường khoáng lên sự hình thành và tăng trưởng của rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh từ nuôi cấy rễ bất định *in vitro*

Bảng 3.4. Ảnh hưởng của các môi trường khác nhau lên sự hình thành và phát triển rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh từ rễ bất định *in vitro*

Môi trường	Tỷ lệ tạo RTC (%)	Số RTC	Chiều dài RTC (cm)	KLT (mg)	KLK (mg)	Đặc điểm rễ
SH	78,70 ^{b*}	16,50 ^b	3,63 ^b	206,75 ^c	20,75 ^b	RTC màu trắng trong và mảnh, rễ chính màu trắng trong và mảnh
MS	92,50 ^a	18,26 ^a	4,50 ^a	346,25 ^a	31,25 ^a	RTC mập, màu trắng đục và rễ chính màu vàng, dày
B5	82,50 ^{ab}	14,00 ^c	1,35 ^c	312,25 ^b	21,75 ^b	RTC màu vàng và mảnh, rễ chính hóa nâu, phòng dày lên

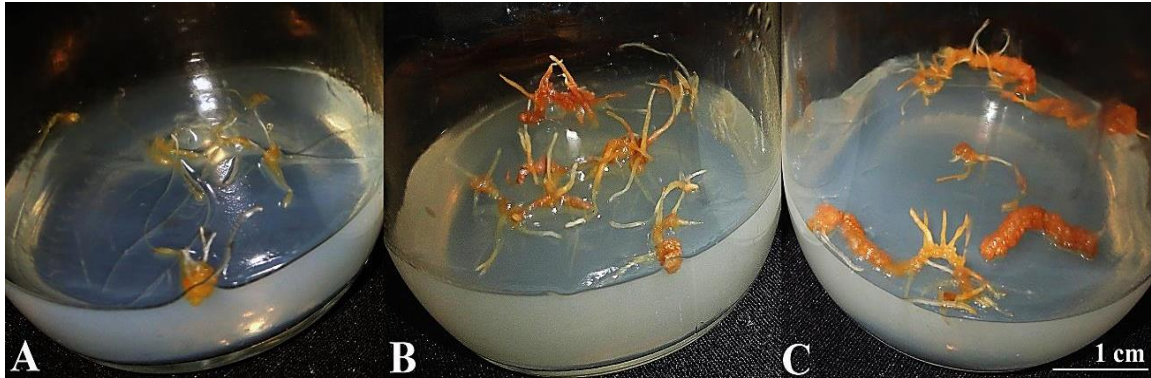
*Các chữ cái khác nhau trong một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa với $p \leq 0,05$ trong Duncan's test. KLT: Khối lượng tươi, KLK: Khối lượng khô, RTC: Rễ thứ cấp.

Áp dụng môi trường, điều kiện nuôi cấy và kết quả tốt nhất của thí nghiệm về auxin kết hợp với cytokinin ở trên, các mẫu RBD được nuôi cấy trong các môi trường SH, MS và B5 bổ sung 7 mg/L IBA và 0,5 mg/L BA có những khác biệt nhất định trong quá trình phát sinh RTC sau 56 ngày nuôi cấy trên (Bảng 3.4).

Theo kết quả thu được cho thấy, RTC hình thành trên môi trường MS tốt hơn và nhanh hơn trên môi trường B5 và SH, với tất cả các chỉ tiêu thu được đều đạt cao nhất, trung bình có 18,26 RTC/RBD, chiều dài 4,5 cm và nặng 346,25 mg (Bảng 3.4). Tuy nhiên, theo quan sát, mặc dù trên môi trường SH đa số hình thái rễ thuận dài, đều, rất mảnh, không có hiện tượng bất thường, màu sắc rất tươi và có sức sống tốt hơn môi trường MS và B5, nhưng sinh khối RTC thấp hơn MS (Hình 3.6).

Ngoài ra, trên môi trường MS, RBD ít hóa vàng hơn trên môi trường B5, sinh khối cao và đường kính rễ to hơn trên môi trường SH; nhưng RTC không kéo dài và màu sắc không tươi như trên môi trường SH (Hình 3.6). Đối với môi trường B5, RTC bị hóa nâu, gây biến dạng và phòng dày lên, dễ lâu bị hoại tử và chết dần, khác hẳn với trên môi trường SH và MS. Hơn nữa, hầu hết các chỉ tiêu thu được số rễ (14 RTC/RBD), chiều dài rễ (1,35 cm), KLK (21,75 mg) trên môi trường B5 đều thấp nhất, dù tỷ lệ tạo RTC cao hơn MS, nhưng không khác biệt về thống kê (Bảng 3.4).

Như vậy, RTC hình thành và tăng sinh khối tốt nhất trên môi trường MS; tuy nhiên, ở môi trường SH, hình thái và sự phát triển RTC và RBD tốt hơn môi trường MS. Vì thế, môi trường MS cần được cải tiến hơn để hạn chế sự hóa vàng của mẫu, mà vẫn duy trì được sự gia tăng sinh khối.



Hình 3.6. Ảnh hưởng của các loại môi trường SH, MS, B5 lên phát triển rễ thứ cấp của mẫu rễ bất định từ cuống lá sâm Ngọc Linh.

A. Môi trường MS, **B.** Môi trường SH, **C.** Môi trường B5

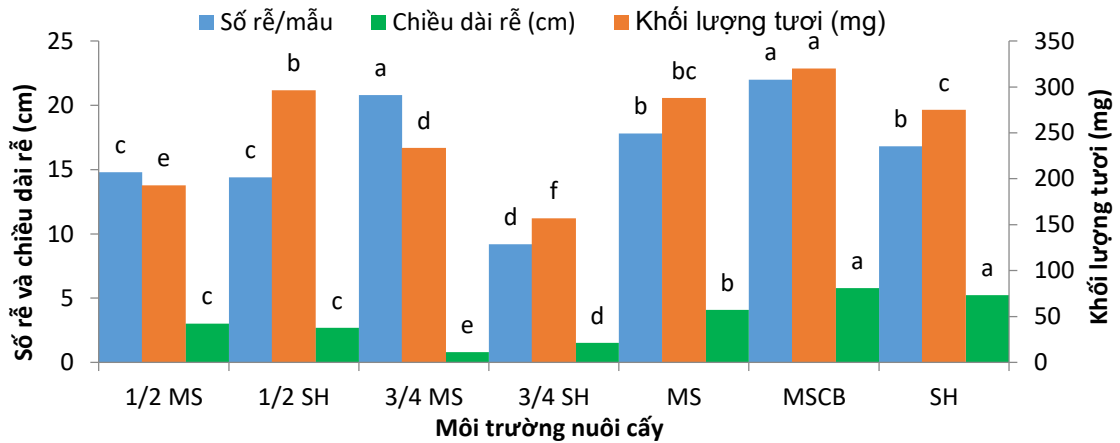
1.1.5. Ảnh hưởng của tỷ lệ $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ trong môi trường MS lên sự hình thành và tăng trưởng của rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh từ nuôi cấy rễ bất định *in vitro*

Từ môi trường thí nghiệm trên, việc cải tiến môi trường MS đã được thực hiện bằng cách thay đổi tỷ lệ $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ trong môi trường này. Kết quả thu nhận sau 56 ngày nuôi cấy cho thấy, các môi trường MS cải biên (MSCB) có tỷ lệ $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ giảm xuống giúp RTC sâm Ngọc Linh phát triển tốt hơn; trong đó, RTC phát triển và tăng sinh tốt nhất ở tỷ lệ $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ là 1/2 (Bảng 3.5).

Bảng 3.5. Ảnh hưởng của tỷ lệ $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ lên sự hình thành và tăng trưởng rễ thứ cấp của rễ bất định sâm Ngọc Linh *in vitro*

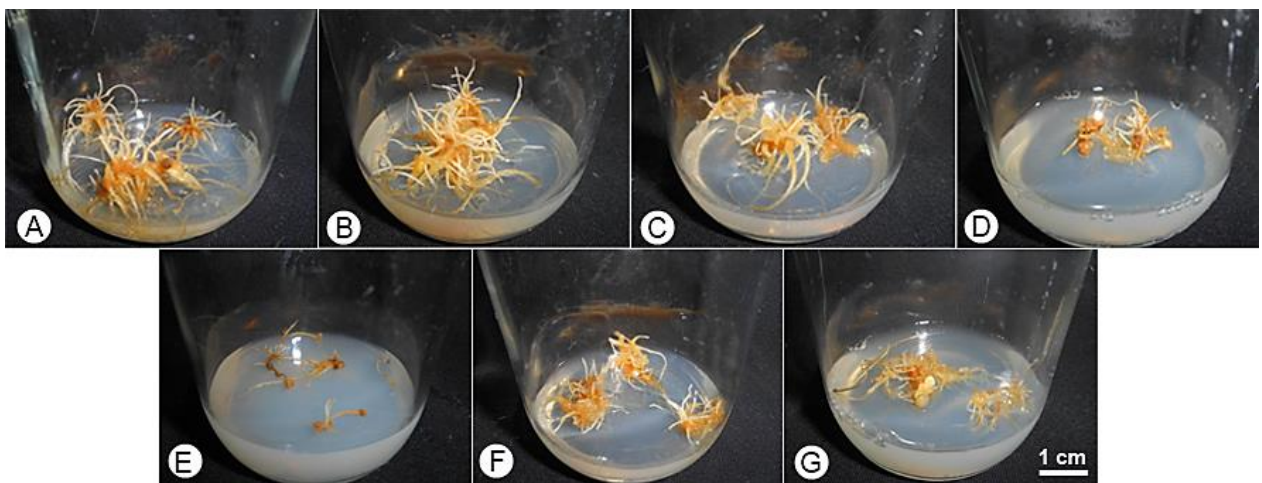
$\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$	Số RTC	Chiều dài RTC (cm)	KLT (mg)	KLK (mg)
0/2	15,22 ^{c*}	4,33 ^{bc}	323,67 ^b	24,33 ^b
1/2	19,33^a	6,57^a	396,00^a	26,67^a
1/1	16,83 ^b	3,50 ^{cd}	281,00 ^b	22,83 ^c
3/2	13,00 ^d	2,67 ^d	219,67 ^c	21,50 ^d
2/0	4,00 ^f	2,87 ^d	63,33 ^d	5,67 ^f
2/2	15,67 ^{bc}	2,60 ^d	316,67 ^b	24,67 ^b
2/3	11,00 ^e	4,67 ^b	99,67 ^d	9,27 ^e

*Các chữ cái khác nhau trong một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa với $p \leq 0,05$ trong phép thử Duncan. KLT: Khối lượng tươi, KLK: Khối lượng khô.



Biểu đồ 3.1. So sánh giữa môi trường cải biên với các môi trường nuôi cấy khác. Các chữ cái khác nhau (a, b, c...) trên mỗi cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa với $p \leq 0,05$ trong phép thử Duncan.

Từ Biểu đồ 3.1 còn cho thấy, so với môi trường MS, SH và các môi trường cải biên khác, môi trường MSCB có tỷ lệ $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ (1/2) cho kết quả tốt nhất, các chỉ tiêu sinh trưởng thu được đạt cao nhất. Môi trường MS có tỷ lệ $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ khoảng 2/2 khi thay đổi còn 1/2 rõ ràng đã cải tiến đáng kể sự tăng trưởng của RTC của sâm Ngọc Linh. Môi trường SH có tỷ lệ $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ khoảng 1/2; như vậy, tỷ lệ $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ của môi trường MSCB mới này xấp xỉ bằng với tỷ lệ $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ của môi trường SH và cao hơn môi trường B5 (tỷ lệ $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ 1/4). Theo kết quả quan sát cho thấy, hình thái phát triển của RTC trên môi trường MSCB có tỷ lệ $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ (1/2) cũng phát triển tốt như trên môi trường SH, điều này có thể do tỷ lệ này phù hợp cho RTC sâm Ngọc Linh phát triển (Hình 3.6, Hình 3.7).



Hình 3.7. Ảnh hưởng của tỷ lệ $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ lên sự hình thành và tăng trưởng rễ thứ cấp từ nuôi cấy rễ bất định sâm Ngọc Linh *in vitro*.

Tỷ lệ $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ được sắp xếp lần lượt như sau: A. 0/2; B. 1/2; C. 1/1; D. 3/2; E. 2/0; F. ĐC; G. 2/3.

Như vậy, môi trường MS với tỷ lệ $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ (1/2) là tối ưu cho sự hình thành và tăng trưởng của RTC sâm Ngọc Linh từ nuôi cấy RBD *in vitro*. Vì thế, môi trường này được sử dụng để khảo sát giá thể và các loại đường trong nuôi cấy, cũng như thí nghiệm về các giai đoạn chiếu sáng, thể tích môi trường và hệ thống nuôi cấy, về các elicitor.

1.1.6. Ảnh hưởng các loại đường carbohydrate lên sự hình thành và tăng trưởng của rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh từ nuôi cấy rễ bất định *in vitro*

Từ các kết quả tốt nhất về cách chọn mẫu, CDHST, môi trường nuôi cấy và điều kiện nuôi cấy, để cải thiện chất lượng RTC sâm Ngọc Linh nuôi cấy từ RBD *in vitro*, các loại và nồng độ đường carbohydrate cũng được khảo sát. Kết quả thu được sau 56 ngày nuôi cấy thể hiện tại Bảng 3.6.

Bảng 3.6. Ảnh hưởng loại đường carbohydrate lên sự hình thành và tăng trưởng rễ thứ cấp từ rễ bất định sâm Ngọc Linh *in vitro*

Loại đường (g/L)	KLT (mg)	KLK (mg)	Tỷ lệ chất khô (%)	Đặc điểm rễ	
0	51,67 ^{e*}	3,33 ^{hi}	6,42 ^d	trong, nhũn, không phát triển	
D-Glucose	10	160,33 ^d	15,00 ^{gh}	9,82 ^{bc}	trắng, dài, phân nhánh ít
	30	206,67 ^d	18,33 ^g	8,89 ^{bcd}	trắng, rất dài, phân nhánh ít
	40	379,33 ^c	41,57 ^e	10,96 ^{ab}	trắng, rất dài, mập, ít nhánh
	50	577,67 ^b	51,93 ^{bcd}	8,99 ^{bcd}	trắng, rất dài, mập, nhiều nhánh
	60	523,00 ^b	67,40 ^a	13,03 ^a	trắng, rất dài, mập, nhiều nhánh
Sucrose	10	374,33 ^c	29,33 ^f	8,85 ^{bcd}	trắng đục, tròn đều, mập, ít nhánh
	30	641,33 ^a	55,33 ^{bc}	8,64 ^{bcd}	dài, trắng đục, mập, nhiều nhánh
	40	572,33 ^b	56,00 ^b	9,79 ^{ab}	dài, trắng đục, mập, nhiều nhánh
	50	533,33 ^b	47,83 ^{cde}	9,16 ^{bcd}	dài, trắng đục, mập, nhiều nhánh
	60	526,67 ^b	46,33 ^{de}	7,80 ^{cd}	dài, hơi vàng, mập, nhiều nhánh
Maltose	10	91,67 ^e	9,00 ^{hi}	8,22 ^{bcd}	vàng, ít phân nhánh và kéo dài
	30	182,67 ^d	15,33 ^{gh}	9,54 ^{bc}	vàng, ít phân nhánh
	40	181,67 ^d	17,33 ^f	9,76 ^{bc}	vàng, ít phân nhánh
	50	102,73 ^e	7,67 ^{hi}	7,37 ^{cd}	vàng, mọng nước, ít phân nhánh
	60	62,53 ^e	4,33 ^{hi}	6,94 ^{cd}	vàng, không phân nhánh

*Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa với $p \leq 0,05$ trong phép thử Duncan.

Theo kết quả này cho thấy, trong ba loại đường carbohydrate bổ sung vào môi trường nuôi cấy, maltose không có hiệu quả cho sự hình thành và tăng trưởng RTC từ mẫu RBD *in vitro*, KLT và KLK thu được đều rất thấp, nhiều rễ bị vàng và mọng nước, càng tăng hàm lượng maltose thì tỷ lệ chất khô càng giảm, điều này cho thấy

rễ không hấp thu và chuyển hóa maltose nhiều trong quá trình hình thành và tăng trưởng RTC. Để rễ hấp thu chất dinh dưỡng và nước tốt thì D-glucose và sucrose có hiệu quả hơn, rễ có màu sắc trắng tươi, hầu hết các nghiệm thức có D-glucose RTC đều khá dài (Bảng 3.6, Hình 3.8).

Nghiệm thức tối ưu là 60 g/L D-glucose với KLK lên đến 67,4 mg, tỷ lệ chất khô cũng đạt cao nhất 13,03%. Tuy nhiên, sucrose cũng có nhiều ưu điểm hơn D-glucose, nồng độ sucrose cần thiết cho RTC tăng sinh về cả KLT, KLK và tỷ lệ chất khô chỉ cần 30 g/L và tối ưu là 30 g/L với KLT (641,33 mg) cao nhất và KLK (55,33 mg) cũng khá cao so với các nghiệm thức khác (Bảng 3.6). Trong khi đó, D-glucose sử dụng trên 50 g/L, khả năng tăng sinh mới có khác biệt đáng kể (Bảng 3.6, Hình 3.8). Mặc dù KLK và tỷ lệ chất khô đạt cao nhất khi sử dụng 60 g/L D-glucose, nhưng KLT thấp hơn khi sử dụng 30 g/L sucrose; và kết quả về KLK và tỷ lệ chất khô không có cách biệt quá lớn. Hơn nữa, RTC sâm Ngọc Linh nuôi cấy trên môi trường sử dụng đường sucrose có màu tươi và ít vàng hơn trên môi trường sử dụng D-glucose và maltose (Hình 3.8). Xét về mặt kinh tế, đường sucrose được sản xuất đại trà và có giá thành rẻ hơn; chính vì thế, rõ ràng 30 g/L sucrose là tốt nhất không những cho rễ phát triển mà còn cho việc đầu tư nuôi cấy trên quy mô lớn.

Như vậy, 30 g/L sucrose là tối ưu cho RTC sâm Ngọc Linh *in vitro* hình thành và tăng trưởng, và mang lại nhiều lợi ích nhất về kinh tế và khả năng ứng dụng rộng rãi. Vì vậy, 30 g/L sucrose được sử dụng trong tất cả các thí nghiệm khác.



Hình 3.8. Ảnh hưởng của các loại đường carbohydrate lên sự hình thành và tăng trưởng rễ thứ cấp từ rễ bất định sâm Ngọc Linh *in vitro*.

A. 60 g/L D-Glucose, **B.** 30 g/L Sucrose, **C.** 30 g/L Maltose.

1.1.7. Ảnh hưởng của giá thể nuôi cấy lên sự hình thành và tăng trưởng của rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh từ nuôi cấy rễ bất định *in vitro*

Trong nuôi cấy mô tế bào thực vật, bên cạnh các yếu tố như thành phần môi trường, nồng độ các chất dinh dưỡng, hàm lượng đường, ánh sáng,... thì giá thể cũng đóng một vai trò hết sức quan trọng trong quá trình sinh trưởng và phát triển của mẫu cấy. Do vậy, từ các kết quả tốt nhất về cách chọn mẫu, CDHST, môi trường nuôi cấy và điều kiện nuôi cấy, hiệu quả nuôi cấy của các giá thể agar, gelrite và bông gòn được đã khảo sát cho sự tăng trưởng RTC sâm Ngọc Linh.

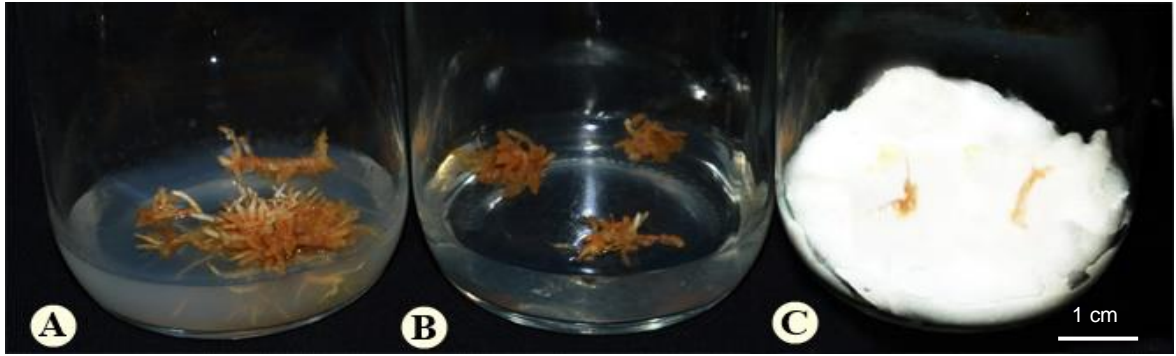
Bảng 3.7. Ảnh hưởng của giá thể nuôi cấy lên khả năng hình thành và tăng trưởng rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh *in vitro*

Giá thể	Tỷ lệ tạo RTC (%)	Số lượng rễ (rễ/mẫu)	Chiều dài rễ (cm)	KLT (mg)	KLK (mg)
Agar	100,00 ^a	48,45 ^{a*}	2,70 ^a	121,40 ^a	12,47 ^a
Gelrite	100,00 ^a	13,83 ^b	0,94 ^b	121,03 ^a	13,23 ^a
Bông gòn	93,34 ^b	8,80 ^c	0,68 ^b	77,20 ^b	8,27 ^b

*Các chữ cái khác nhau trong một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa với $p \leq 0,05$ trong phép thử Duncan. KLT: Khối lượng tươi, KLK: Khối lượng khô.

Kết quả sau 56 ngày nuôi cấy cho thấy, giá thể agar là thích hợp nhất cho sự hình thành và tăng trưởng RTC sâm Ngọc Linh *in vitro*, với các chỉ tiêu tỷ lệ tạo RTC (100%), số RTC/RBĐ (48 RTC), chiều dài RTC (2,7 cm), KLT (121,4 mg) và KLK (13,23 mg) đạt cao nhất (Bảng 3.7, Hình 3.9). Trên ba loại giá thể, agar và gelrite không có sự khác biệt về tỷ lệ phát sinh rễ (100%), còn giá thể bông gòn thấp hơn (93%). Tuy nhiên, RTC phát triển trên giá thể agar là tốt nhất vì so với giá thể gelrite, số RTC/RBĐ cao gấp 3,5 lần và chiều dài rễ gấp 2,87 lần; so với giá thể bông gòn, số RTC/RBĐ cao gấp 2,87 lần, chiều dài rễ gấp 3,97 lần, KLT gấp 1,6 lần và KLK gấp 1,5 lần (Bảng 3.7). Trên giá thể agar, RTC hình thành nhiều có màu trắng và đồng đều về kích thước; trên giá thể gelrite, RTC hình thành có màu trắng, mập và ngắn; còn trên giá thể bông gòn, RTC hình thành thường mảnh và có màu vàng và tỷ lệ tạo RTC và số RTC rất ít (Hình 3.9). Vì vậy, bông gòn không thích hợp cho quá trình hình thành và tăng trưởng RTC sâm Ngọc Linh (Bảng 3.7).

Tóm lại, giá thể agar thích hợp nhất cho sự tăng trưởng RTC sâm Ngọc Linh từ RBĐ *in vitro*. Vì thế, nó được sử dụng cho tất cả thí nghiệm dùng môi trường rắn.



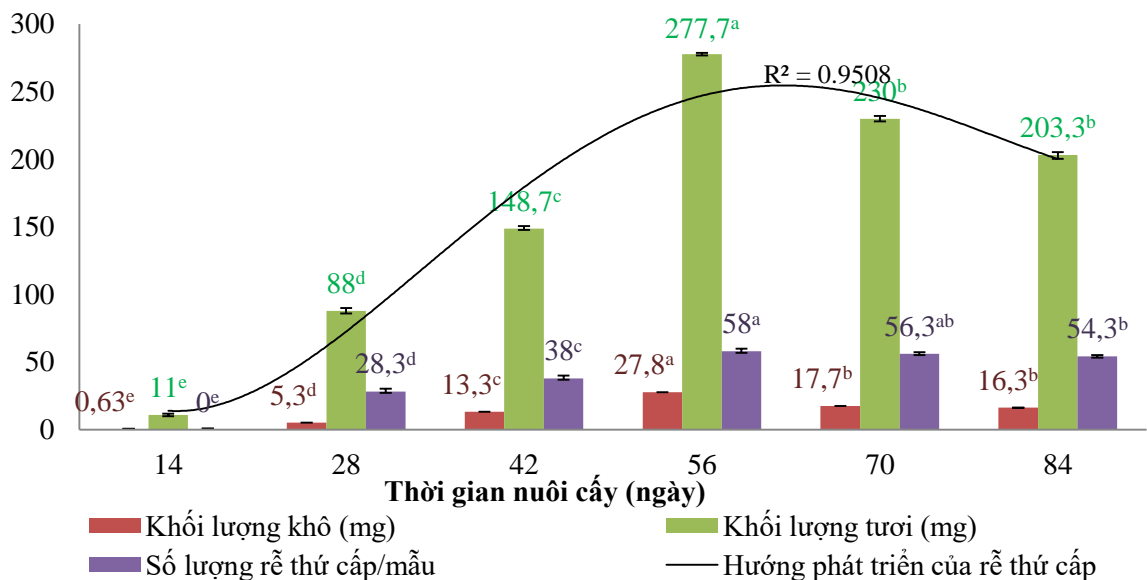
Hình 3.9. Ảnh hưởng của giá thể nuôi cấy khác nhau lên sự hình thành và tăng trưởng rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh *in vitro*.

a. Agar; b. Gelrite; c. Bông gòn.

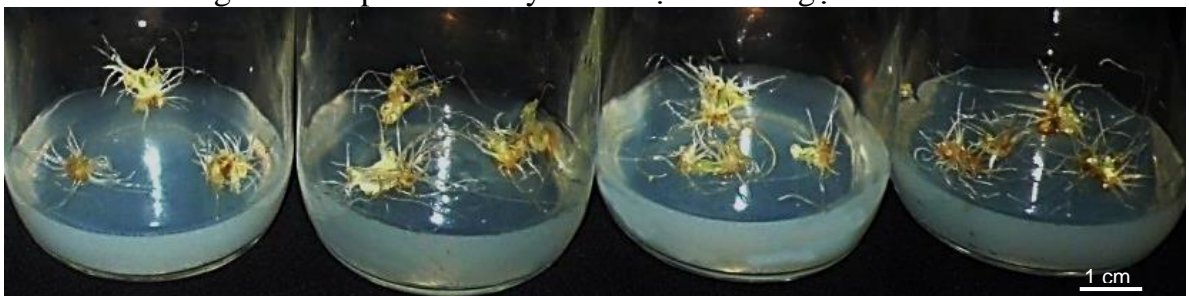
1.2. Tối ưu điều kiện nuôi cấy rễ thứ cấp từ rễ bất định sâm Ngọc Linh *in vitro*

1.2.1. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy lên sự tăng trưởng của rễ thứ cấp sâm

Ngọc Linh từ nuôi cấy rễ bất định *in vitro*



Biểu đồ 3.2. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến khả năng hình thành và tăng trưởng rễ thứ cấp từ nuôi cấy rễ bất định sâm Ngọc Linh *in vitro*.



Hình 3.10. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến khả năng hình thành và tăng trưởng rễ thứ cấp từ rễ bất định sâm Ngọc Linh *in vitro*.

Thời gian sau 42, 56, 70 và 84 ngày nuôi cấy (thứ tự từ trái qua phải).

Trước khi nuôi cấy được tối ưu, để có thể dự trù tối đa sự phát triển của RTC,

sâm Ngọc Linh từ RBD *in vitro*, các khảo sát về thời gian nuôi cấy đã được thực hiện. Sau 14 ngày nuôi cấy, các kết quả cho thấy, RBD chưa có sự cảm ứng hình thành RTC (Biểu đồ 3.2). Sau 28 đến 42 ngày nuôi cấy, các tế bào bắt đầu phân chia và cảm ứng nhanh để hình thành RTC (Biểu đồ 3.2, Hình 3.10). Đặc biệt, vào ngày thứ 56, số lượng rễ, KLT và KLK tăng mạnh và gấp đôi ngày thứ 42 (Biểu đồ 3.2). Tuy nhiên, khi kéo dài thời gian nuôi cấy lên 70-84 ngày thì không nhận thấy có sự thay đổi đáng kể về số lượng rễ; ngoài ra, KLT và KLK lại giảm.

Dựa vào kết quả ở Biểu đồ 3.2, cho thấy sự sinh trưởng của RTC sâm Ngọc Linh có thể chia thành 3 giai đoạn: (1) trong 14 ngày đầu tiên mẫu thích nghi với môi trường nuôi cấy; (2) sau đó, sự phân chia nhanh chóng của tế bào để cảm ứng hình thành RTC diễn ra từ ngày thứ 14 đến 56 và (3) tốc độ phân chia của tế bào giảm ở các giai đoạn phát triển tiếp theo sau 56 ngày nuôi cấy.

Như vậy, các nuôi cấy tạo RTC từ RBD sâm Ngọc Linh *in vitro* tăng trưởng và tạo sinh khối lớn nhất sau 56 ngày nuôi cấy, nên thời gian này là thích hợp để duy trì cho các thí nghiệm tiếp theo.

1.2.2. Ảnh hưởng của nhiệt độ lên sự tăng trưởng của rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh từ nuôi cấy rễ bất định *in vitro*

Bảng 3.8. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến khả năng tăng trưởng của rễ thứ cấp từ rễ bất định sâm Ngọc Linh *in vitro*

Nhiệt độ (°C)	Tỷ lệ tạo RTC (%)	Số RTC (rễ/mẫu)	Chiều dài rễ (cm)	KLT (mg)	KLK (mg)
22	100 ^{a*}	41,67 ^a	1,00 ^a	127,33 ^a	8,33 ^a
25	100 ^a	23,67 ^b	0,73 ^b	102,00 ^b	6,67 ^b
28	100 ^a	18,00 ^c	0,50 ^c	62,00 ^c	4,33 ^c

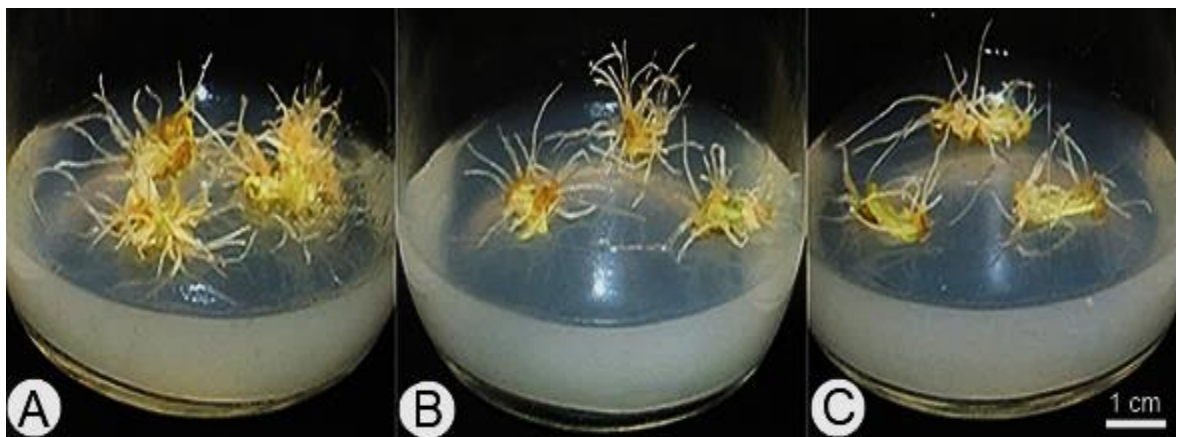
*Các chữ cái khác nhau trong một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa với $p \leq 0,05$ trong phép thử Duncan. KLT: Khối lượng tươi, KLK: Khối lượng khô.

Sau khi xác định được thời gian nuôi cấy tốt nhất cho RTC sâm Ngọc Linh tăng trưởng từ RBD *in vitro*, thí nghiệm về nhiệt độ được tiến hành; dựa vào các kết quả của Schneider (2005) cho thấy, khoảng nhiệt độ thích hợp nhất cho đa số các cây trồng phát triển và tăng trưởng RTC là từ 20-27°C [114]; và dựa theo nghiên cứu của Sivakumar và cs (2005) về nuôi cấy rễ *P. ginseng* cho thấy, 23±2°C là nhiệt độ tốt nhất để rễ phát triển [116]. Chính vì thế, nhiệt độ nuôi cấy RTC của sâm

Ngọc Linh từ RBD *in vitro* đã được khảo sát ở khoảng nhiệt độ từ 22 đến 28°C. Các kết quả sau 56 ngày nuôi cấy cho thấy, nhiệt độ nuôi cấy ảnh hưởng rõ rệt đến sự hình thành và tăng trưởng RTC sâm Ngọc Linh (Bảng 3.8, Hình 3.11).

Khi càng tăng nhiệt độ phòng nuôi cấy, sự hình thành và tăng trưởng RTC càng giảm, thể hiện qua các chỉ tiêu về số lượng rễ, chiều dài rễ, KLT và KLK của mẫu; tuy nhiên, tỷ lệ hình thành rễ đều đạt 100% (Bảng 3.8). Ở điều kiện nhiệt độ phòng nuôi 22°C, RTC phát triển tốt nhất với 41,67 rễ/mẫu, chiều dài rễ trung bình 1,00 cm, KLT và KLK lần lượt là 127,33 mg và 8,33 mg. Rễ bất định phát triển kém nhất ở 28°C với 18,00 rễ/mẫu, chiều dài rễ trung bình, KLT và KLK lần lượt là 0,50 cm; 62,00 và 4,33 mg.

Như vậy, trong thí nghiệm này, nhiệt độ phòng nuôi 22°C là thích hợp cho sự hình thành và tăng trưởng RTC sâm Ngọc Linh sau 56 ngày nuôi cấy; cho nên nhiệt độ nuôi cấy ở 22°C được sử dụng cho tất cả các thí nghiệm sau.



Hình 3.11. Rễ thứ cấp hình thành và tăng trưởng từ rễ bất định sâm Ngọc Linh *in vitro* dưới các điều kiện nhiệt độ khác nhau.

A. 22°C; B. 25°C; C. 28°C.

1.2.3. Ảnh hưởng của pH môi trường lên sự tăng trưởng của rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh từ nuôi cấy rễ bất định in vitro

pH môi trường là một trong những yếu tố quan trọng cho quá trình hấp thu các chất dinh dưỡng và vận chuyển các chất qua màng tế bào; vì thế, sau khi tối ưu các điều kiện nuôi cấy về thời gian nuôi cấy và nhiệt độ, thí nghiệm khảo sát về pH đã được tiến hành với dãy nồng độ pH từ acid đến kiềm (4,3-6,3) lên sự hình thành và tăng trưởng của RTC sâm Ngọc Linh từ nuôi cấy RBD *in vitro*.

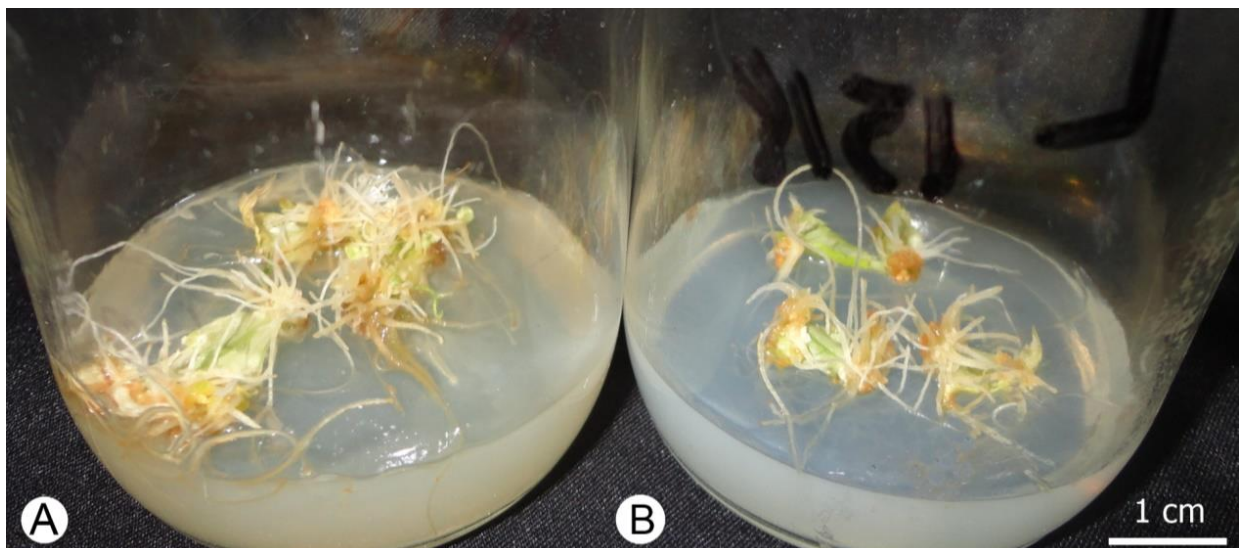
Bảng 3.9. Ảnh hưởng của pH đến khả năng hình thành và tăng trưởng rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh *in vitro*

pH	Tỷ lệ tạo RTC (%)	Số RTC	Chiều dài RTC (cm)	KLT (mg)	KLK (mg)
4,3	100 ^{a*}	18,67 ^c	0,80 ^c	91,67 ^{bc}	9,67 ^c
4,8	100 ^a	36,67 ^b	1,07 ^b	169,67 ^b	16,33 ^b
5,3	100^a	56,00^a	1,37^a	210,67^a	20,67^a
5,8	100 ^a	30,00 ^{bc}	1,00 ^{bc}	116,33 ^b	11,33 ^c
6,3	100 ^a	21,33 ^c	1,00 ^{bc}	77,33 ^c	8,00 ^c

*Các chữ cái khác nhau trong một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa với $p \leq 0,05$ trong phép thử Duncan. KLT: Khối lượng tươi, KLK: Khối lượng khô.

Sau 56 ngày nuôi cấy, kết quả thu được cho thấy, khi pH ban đầu của môi trường chính từ 4,3 đến 6,3, tất cả các mẫu đều cho tỷ lệ hình thành rễ đạt 100%. Tuy nhiên khi tăng pH môi trường từ 4,3 đến 5,3, số lượng rễ, chiều dài rễ, KLT và KLK tăng dần và đạt cao nhất khi pH = 5,3. Khi pH môi trường cao hơn 5,3, sự hình thành và tăng trưởng RTC giảm đáng kể (Bảng 3.9, Hình 3.12).

Chính vì thế, pH = 5,3 là tối ưu và thích hợp để duy trì sự hình thành và tăng trưởng của RTC sâm Ngọc Linh từ RBD *in vitro*. Do vậy, pH này được duy trì trong tất cả các thí nghiệm sau về môi trường nuôi cấy và CDHST.



Hình 3.12. Khả năng hình thành và tăng trưởng rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh từ nuôi cấy rễ bất định *in vitro* dưới điều kiện pH khác nhau.

A. pH 5,3; **B.** pH 5,8.

1.2.4. Ảnh hưởng của giai đoạn nuôi cấy tối và sáng lên sự tăng trưởng của rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh từ nuôi cấy rễ bất định *in vitro*

Kế thừa kết quả tốt nhất từ tất cả các thí nghiệm trên (mẫu RBD, môi trường cải biên, pH, nhiệt độ và thời gian nuôi cấy), thí nghiệm về các giai đoạn nuôi cấy tối và sáng được tiến hành.

Bảng 3.10. Ảnh hưởng của các điều kiện chiếu sáng lên sự hình thành và tăng trưởng RTC sâm Ngọc Linh *in vitro*

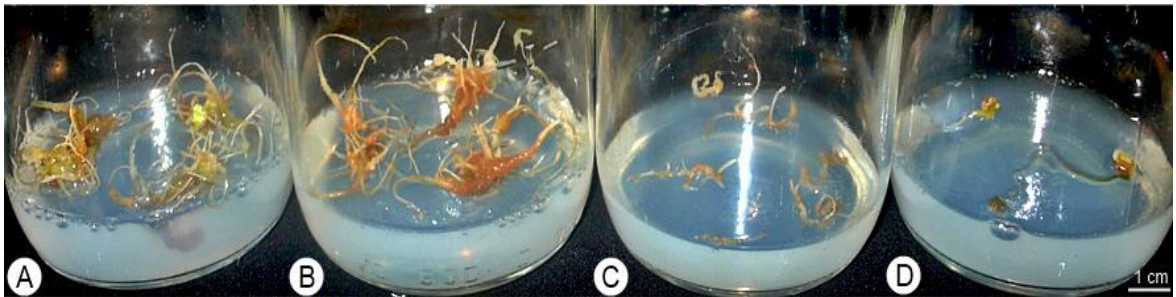
Thời điểm chiếu sáng	Tỷ lệ tạo RTC (%)	Số RTC	Chiều dài RTC (cm)	KLT (mg)	KLK (mg)
100% Tối	94,00 ^{a*}	18,67 ^a	5,66 ^a	365,33 ^a	26,67 ^b
80% Tối	94,67^a	19,00^a	5,00^a	369,00^a	34,33^a
50% Tối	64,67 ^b	8,67 ^b	2,83 ^b	188,67 ^b	13,67 ^c
100% Sáng	12,33 ^c	1,00 ^c	0,83 ^c	24,67 ^c	1,67 ^d

*Các chữ cái khác nhau trong một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa với $p \leq 0,05$ trong phép thử Duncan. 80% tối ở thời gian đầu nuôi cấy; 100% tối là thời gian nuôi cấy hoàn toàn trong tối; 50% tối là nửa thời gian đầu nuôi cấy trong tối hoàn toàn; 100% sáng là nuôi cấy ngoài sáng với chu kỳ chiếu sáng 16 giờ/ngày.

Các kết quả sau 56 ngày nuôi cấy ở Bảng 3.10 cho thấy, khi RBD sâm Ngọc Linh được nuôi cấy hoàn toàn ngoài sáng (100% sáng), quá trình hình thành RTC bị ức chế, số mẫu RBD tạo RTC chỉ có 12,33%, và RBD hầu như không tăng sinh khối với KLT bằng với KLT trước khi nuôi cấy khoảng 25 mg. Ở điều kiện 50% tối ở giai đoạn đầu nuôi cấy (28 ngày đầu) và nửa thời gian còn lại ngoài sáng, các chỉ tiêu thu được đạt cao hơn; tuy nhiên, thời gian để trong tối vẫn chưa đủ cho RTC sâm Ngọc Linh hình thành và phát triển từ RBD *in vitro* (Bảng 3.10). Do vậy, khi kéo dài thời gian nuôi cấy tối lên đến 45 ngày đầu (80% tối) và toàn bộ thời gian nuôi cấy tối (100% tối), khả năng phát triển của RTC được cải thiện rõ rệt, với tỷ lệ tạo RTC, số RTC/RBD, chiều dài RTC và KLT đều đạt cao nhất (Bảng 3.10). Giữa hai điều kiện 100% tối và 80% tối, RTC sâm Ngọc Linh tăng sinh tốt nhất ở nghiệm thức 80% tối, KLK (34,33 mg) thu được cao hơn (Bảng 3.10). Ngoài ra, ở điều kiện 80% tối này, RTC sâm Ngọc Linh không những tăng trưởng tốt hơn 100% tối; mà còn tích lũy các chất khô cao hơn với KLK cao gấp 1,6 lần so với điều kiện tối hoàn toàn (Bảng 3.10, Hình 3.13). Bên cạnh đó, hình thái của các rễ sâm Ngọc Linh tại

nghiệm thức này tốt hơn các nghiệm thức khác, các rễ chính trong nghiệm thức này to, mập và dài hơn so với các nghiệm thức khác, mặc dù có một số rễ bị chuyển sang màu xanh nhạt (Hình 3.13).

Như vậy, ánh sáng có thể ức chế quá trình tạo RTC sâm Ngọc Linh, khi các mẫu RBD được đặt ở ngoài sáng suốt cả giai đoạn nuôi cấy, nhưng ở điều kiện nuôi cấy 80% thời gian đầu đặt trong tối lại thích hợp cho RTC sâm Ngọc Linh hình thành và tăng trưởng từ các mẫu RBD tái sinh từ mẫu cuống lá.



Hình 3.13. 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 *in vitro*.

A. 80% thời gian đầu trong tối; **B.** 100% thời gian nuôi cấy trong tối; **C.** 50% thời gian đầu nuôi cấy trong tối và 50% thời gian còn lại ngoài sáng; **D.** 100% thời gian nuôi cấy ngoài sáng với chu kỳ 16 giờ/ngày.

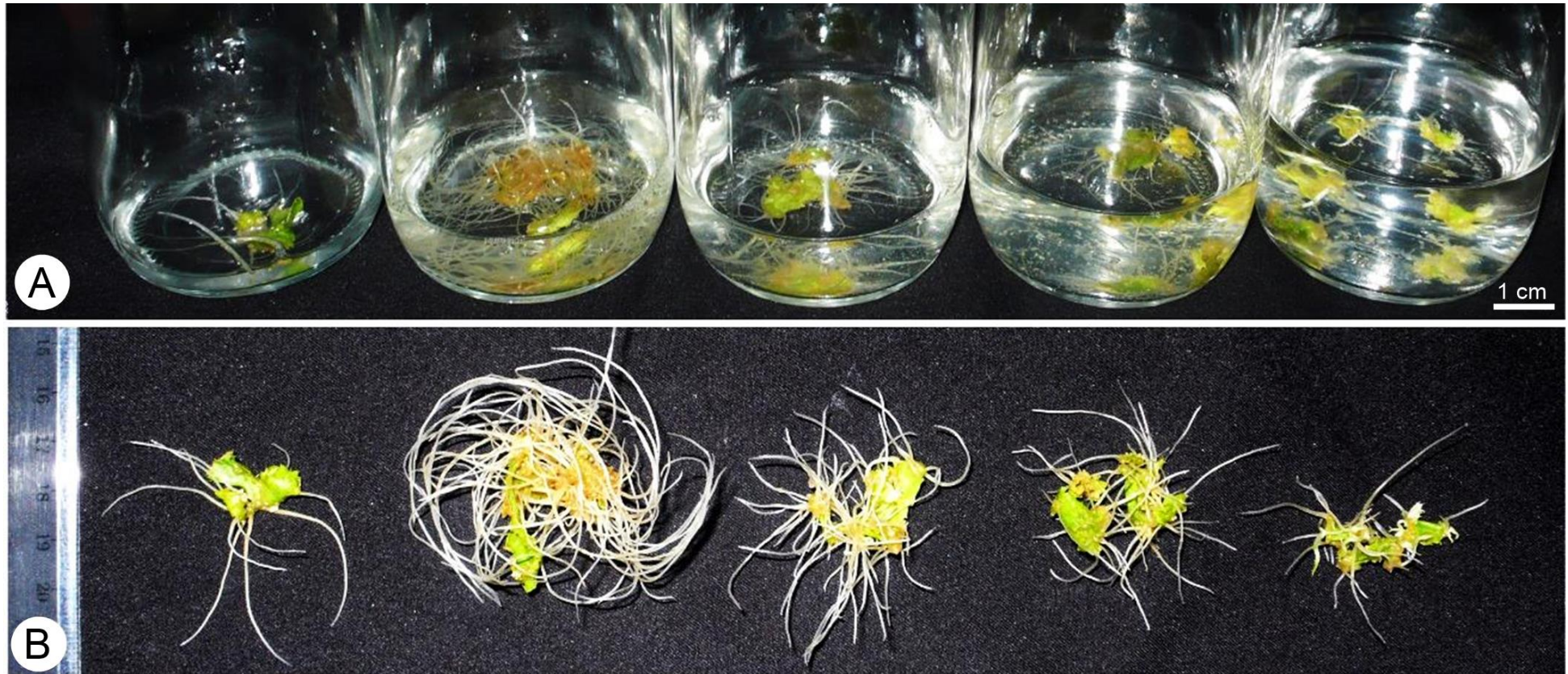
1.2.5. Ảnh hưởng của thể tích môi trường nuôi cấy lên sự tăng trưởng của rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh từ nuôi cấy rễ bất định *in vitro*

Bảng 3.11. Ảnh hưởng của thể tích môi trường nuôi cấy lên khả năng hình thành và tăng trưởng RTC sâm Ngọc Linh *in vitro*

Thể tích (mL)	Tỷ lệ tạo rễ (%)	Số lượng rễ (rễ/mẫu)	Chiều dài rễ (cm)	KLT (mg)	KLK (mg)
10	93,34 ^b	8,2 ^{d*}	2,12 ^b	117,20 ^c	12,80 ^c
30	100 ^a	70,60 ^a	3,18 ^a	455,60 ^a	45,60 ^a
50	100 ^a	38,80 ^b	2,84 ^a	176,40 ^b	18,20 ^b
70	100 ^a	14,40 ^c	2,38 ^b	134,00 ^c	13,40 ^c
90	93,34 ^b	12,60 ^c	1,32 ^c	114,00 ^c	12,00 ^c

*Các chữ cái khác nhau trong một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa với $p \leq 0,05$ trong phép thử Duncan. KLT: Khối lượng tươi, KLK: Khối lượng khô.

Kế thừa các kết quả trên, các thí nghiệm về thể tích môi trường đã được thực hiện dựa trên các kết quả này, nhằm bước đầu tìm ra thể tích môi trường lỏng phù hợp để nhân nhanh RTC sâm Ngọc Linh từ RBD *in vitro* trên quy mô lớn.



Hình 3.14. Ảnh hưởng của các thể tích môi trường nuôi cấy khác nhau lên khả năng hình thành và tăng trưởng rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh từ nuôi cấy rễ bất định *in vitro*.

A, B. Các thể tích môi trường từ 10, 30, 50, 70 đến 90 mL (từ trái sang phải).

Khi khảo sát thể tích nuôi cấy từ 10-90 mL, các kết quả cho thấy khả năng hình thành và tăng trưởng RTC sâm Ngọc Linh từ RBD *in vitro* có khác biệt ở các thể tích môi trường nuôi cấy khác nhau; bởi vì thể tích môi trường nuôi cấy liên quan đến lượng chất dinh dưỡng và lượng khí trên bề mặt cung cấp đủ cho cả quá trình tăng trưởng RBD (Bảng 3.11, Hình 3.12). Hiệu quả phát triển RBD đạt cao nhất ở nghiệm thức có 30 mL thể tích môi trường, với các chỉ tiêu về số lượng rễ, chiều dài rễ, KLT và KLK đạt cao nhất (lần lượt là 70,6 rễ/mẫu; 3,18 cm; 455,6 mg và 45,6 mg) (Bảng 3.11, Hình 3.12).

Như vậy, thể tích môi trường tối ưu cho 25 mg RBD sâm Ngọc Linh hình thành và tăng trưởng RTC là 30 mL môi trường trong bình 250 mL; tương ứng, 8 g RBD trên 1,5 L môi trường nuôi cấy.

1.2.6. Ảnh hưởng của hệ thống nuôi cấy lên sự hình thành và tăng trưởng của rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh từ nuôi cấy rễ bất định *in vitro*

Dựa vào kết quả tối ưu về điều kiện nuôi cấy như thời gian, pH, nhiệt độ, thể tích môi trường nuôi cấy, để rễ dễ dàng hấp thu chất dinh dưỡng và trao đổi khí, các hệ thống nuôi cấy với các hình dạng và hệ thống điều khí khác nhau đã được khảo sát. Các kết quả thu được sau 56 ngày nuôi cấy thể hiện ở Bảng 3.12 và Hình 3.15

Bảng 3.12. Ảnh hưởng của hệ thống nuôi cấy đến sự hình thành và tăng trưởng rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh *in vitro*

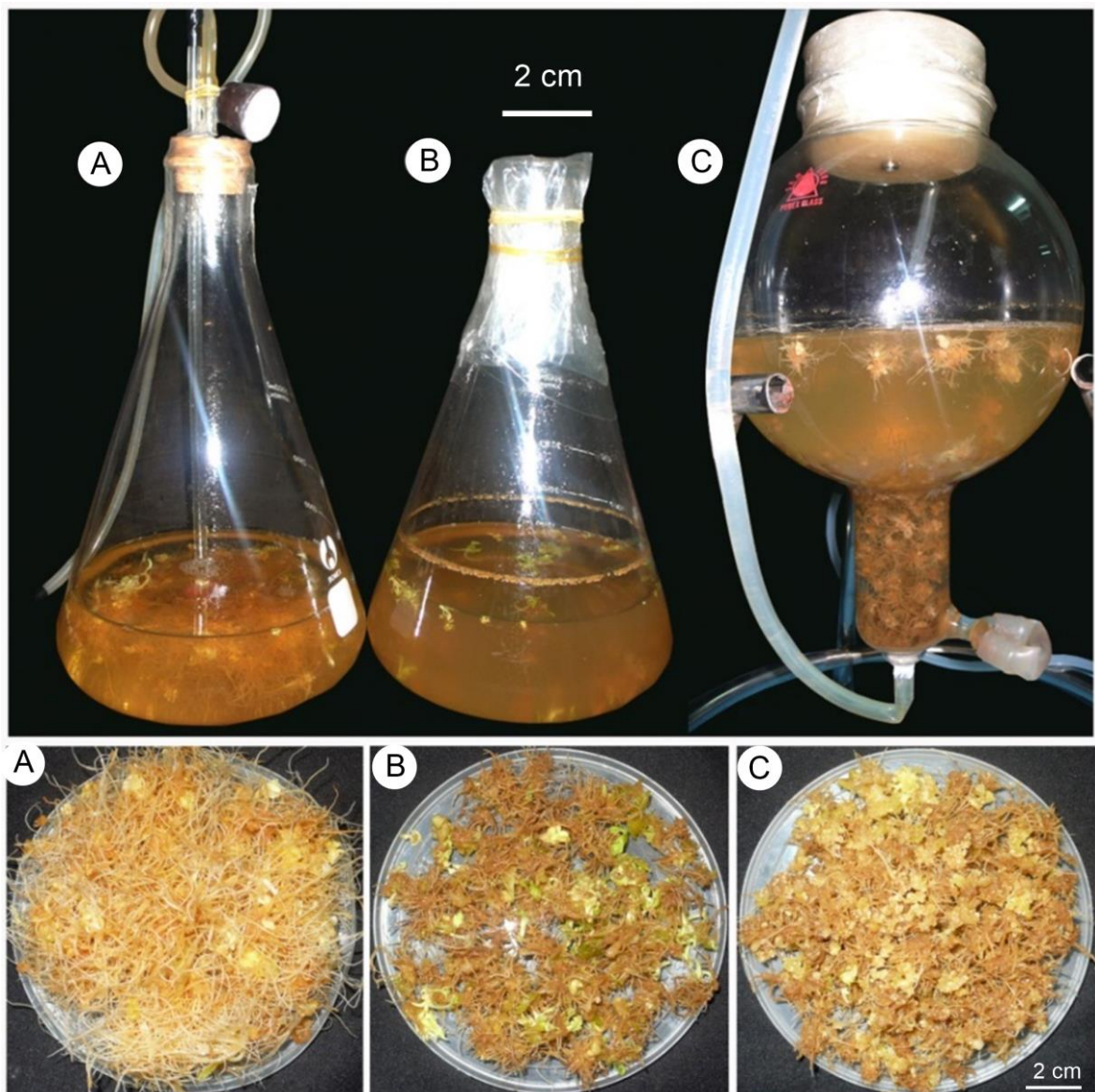
Hệ thống nuôi cấy 3 L	KLT (g)	KLK (g)	Tỷ lệ tăng sinh (lần)	Tỷ lệ chất khô (%)
Bioreactor tự tạo	72,82 ^{a*}	6,74 ^a	9,71 ^a	9,25 ^a
Bình tam giác kết hợp lắc	30,54 ^c	2,65 ^c	4,07 ^c	8,68 ^b
Bioreactor hình cầu	51,30 ^b	4,63 ^b	6,84 ^b	9,03 ^{ab}

*Các chữ cái khác nhau trong một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa với $p \leq 0,05$ trong phép thử Duncan. KLT: Khối lượng tươi, KLK: Khối lượng khô.

Kết quả sau 56 ngày nuôi cấy 8 g RBD trong 1,5 L môi trường nuôi cấy ở các hệ thống khác nhau cho thấy, cả 3 hệ thống nuôi cấy đều cho sự tăng sinh và tích lũy saponin ở RTC (Bảng 3.12, Hình 3.15). Hệ thống nuôi cấy Bioreactor tự tạo cho kết quả tốt nhất về KLT (72,82 g), KLK (6,74 g) và tỷ lệ tăng sinh (9,71 lần). Trong khi đó, rễ được nuôi cấy trong bình tam giác kết hợp lắc lại cho kết quả kém hơn về

KLT (30,54 g), KLK (2,65 g) và tỷ lệ tăng sinh (4,07 lần) (Bảng 3.12). Cùng điều kiện nuôi cấy lỏng, những mẫu rễ nuôi cấy trong hệ thống bình tam giác kết hợp lắc không có khả năng gia tăng sinh khối mạnh như hệ thống Bioreactor hình cầu và Bioreactor tự tạo (Bảng 3.12, Hình 3.15).

Tóm lại, hệ thống Bioreactor tự tạo đã cho hiệu quả tăng trưởng tốt nhất, bởi lượng bọt khí tạo ra từ dưới đáy nhiều hơn Bioreactor hình cầu, cho nên không những tạo lực đẩy cho RBD sâm Ngọc Linh di chuyển liên tục lên trên bề mặt mà còn giúp cung cấp lượng khí cần thiết cho RTC hình thành và phát triển.



Hình 3.15. Rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh trong các hệ thống nuôi cấy khác nhau. **A.** Bioreactor tự tạo từ bình tam giác 3L có sục khí dưới đáy, **B.** Hệ thống bình tam giác 3L kết hợp lắc ở 100 vòng/phút, **C.** Bioreactor hình cầu có sục khí dưới đáy.

2. TĂNG CƯỜNG TÍCH LŨY SAPONIN CỦA RỄ THỨ CẤP SÂM NGỌC LINH NUÔI CÂY TỪ RỄ BẤT ĐỊNH *IN VITRO*

2.1. Ảnh hưởng của một số điều kiện nuôi cấy lên sự tích lũy saponin của rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh từ nuôi cấy rễ bất định *in vitro*

2.1.1. Ảnh hưởng của các giai đoạn nuôi cấy lên sự tích lũy saponin của rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh nuôi cấy từ rễ bất định *in vitro*

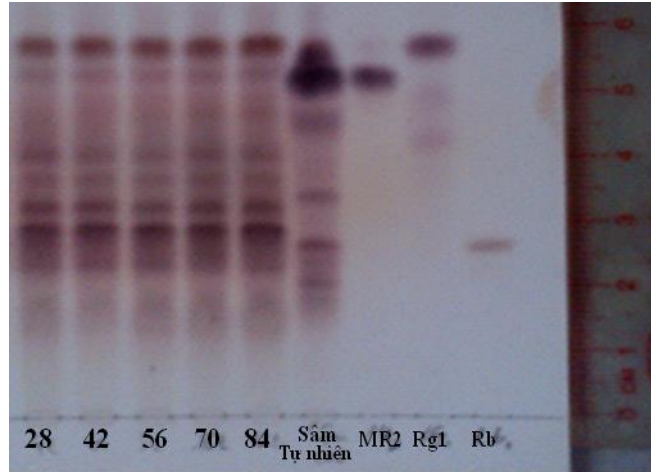
Bảng 3.13. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến khả năng tích lũy saponin từ rễ thứ cấp của nuôi cấy rễ bất định sâm Ngọc Linh *in vitro*

Thời gian (ngày)	Hàm lượng saponin (%)*				NS (mg/L)
	Rg1	Rb1	MR2	Tổng (Rg1+ Rb1+ MR2)	
14	0,00 ^d	0,00 ^d	0,00 ^d	0,00 ^d	0,00 ^e
28	0,05 ^c	0,02 ^b	0,74 ^d	0,81 ^c	0,14 ^d
42	0,06 ^b	0,03 ^a	1,05 ^c	1,14 ^c	0,51 ^c
56	0,05^c	0,01^c	2,41^b	2,47^b	2,29^a
70	0,06 ^b	0,02 ^b	3,13 ^a	3,21 ^a	1,89 ^b
84	0,08 ^a	0,02 ^b	3,26 ^a	3,36 ^a	1,83 ^b

*Trung bình 3 lần chạy mẫu tính trên 1 g chất khô; NS: năng suất tổng hợp cả 3 saponin trên toàn bộ sinh khối khô thu được.

Sau khi đánh giá sự tăng trưởng và tăng sinh khối của RTC ở các giai đoạn tăng trưởng khác nhau, các phân tích TLC và HPLC được tiến hành để xác định hàm lượng saponin ở mỗi giai đoạn tăng trưởng của RTC sâm Ngọc Linh từ nuôi cấy RBD *in vitro*. Kết quả cho thấy có sự hiện diện của cả ba loại saponin (MR2, Rg1 và Rb1) ở tất cả các nghiệm thức với sự thay đổi hàm lượng saponin khác nhau trong từng giai đoạn (Bảng 3.13, Hình 3.16). Tổng hàm lượng saponin và đặc biệt hàm lượng MR2 tăng dần khi kéo dài thời gian nuôi cấy lên. Kết quả thí nghiệm cho thấy, khi thời gian kéo dài quá 56 ngày, khả năng phát triển rễ kém dần; nhưng khả năng tích lũy saponin tăng lên. Tuy nhiên, dựa vào tổng sinh khối khô thu được và tổng 3 loại saponin, năng suất thu cả 3 saponin đạt cao nhất khi duy trì nuôi cấy chỉ tới ngày thứ 56 với năng suất tăng gấp 3 lần so với 42 ngày nuôi cấy và gấp 1,2 lần khi kéo dài thời gian lên 70 và 84 ngày nuôi cấy.

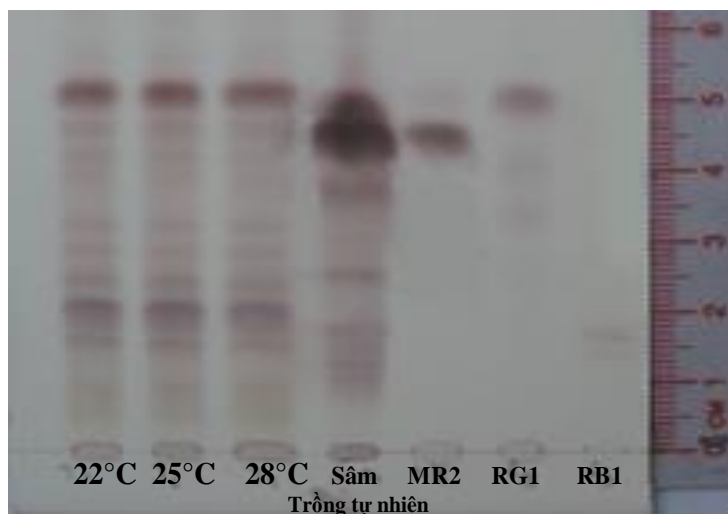
Chính vì thế, thời gian nuôi cấy tốt nhất để thu sinh khối RTC sâm Ngọc Linh từ RBD *in vitro* có hàm lượng cả ba saponin cao nhất là sau 56 ngày nuôi cấy.



Hình 3.16. Kết quả định tính saponin của rễ thứ cấp theo thời gian nuôi cấy. Thời gian sau **28, 42, 56, 70** và **84** ngày nuôi cấy.

2.1.2. Ảnh hưởng của nhiệt độ lên sự tích lũy saponin của rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh nuôi cấy từ rễ bất định *in vitro*

Sau 56 ngày nuôi cấy, 1 g sinh khối khô của RTC sâm Ngọc Linh được dùng để định tính và định lượng ba saponin (MR2, Rg1 và Rb1) bằng phương pháp TLC và HPLC, kết quả cho thấy đều có sự hiện diện 3 loại saponin Rg1, Rb1 và MR2; nhưng có sự khác biệt về hàm lượng của từng saponin (Bảng 3.14, Hình 3.17). Khi nhiệt độ tăng càng cao, sự tích lũy saponin càng giảm, thể hiện qua hàm lượng Rg1, Rb1, MR2 và tổng hàm lượng saponin (Bảng 3.14). Kết quả còn cho thấy, nhiệt độ 22°C cho hàm lượng Rg1, Rb1, MR2, tổng 3 saponin và năng suất thu nhận 3 saponin là cao nhất (tương ứng 0,06‰; 0,7‰; 0,64‰; 1,40‰ và 0,40 mg/L);



Hình 3.17. Định tính saponin (MR2, Rg1, Rb1) của mẫu rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh *in vitro* ở nhiệt độ 22°C, 25°C và 28°C.

Bảng 3.14. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến khả năng tích lũy saponin của rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh nuôi cấy từ rễ bất định *in vitro*

Nhiệt độ (°C)	Hàm lượng saponin (%)*				NS (mg)
	Rg1	Rb1	MR2	Tổng 3 saponin	
22	0,06 ^c	0,76 ^a	0,64 ^a	1,40 ^a	0,40 ^a
25	0,07 ^b	0,73 ^b	0,35 ^b	1,12 ^b	0,23 ^b
28	0,07 ^b	0,62 ^c	0,39 ^b	1,08 ^c	0,17 ^c

*Trung bình 3 lần chạy mẫu tính trên 1 g chất khô; NS: Năng suất tổng hợp cả ba saponin trên toàn bộ sinh khối khô thu được.

2.1.3. Ảnh hưởng của pH lên sự tích lũy saponin của rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh nuôi cấy từ rễ bất định *in vitro*

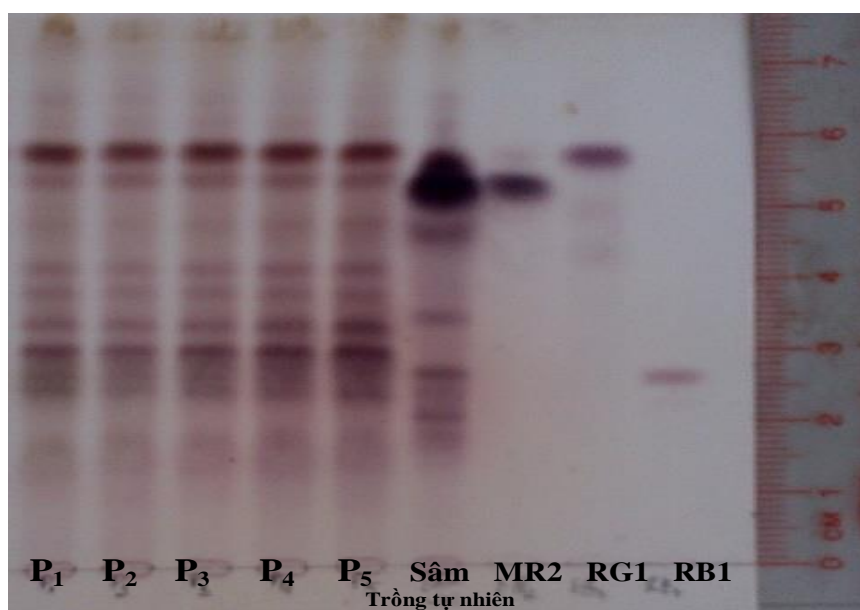
Bảng 3.15. Ảnh hưởng của pH đến khả năng tích lũy saponin ở rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh nuôi cấy từ rễ bất định *in vitro*

pH	Hàm lượng saponin (%)*				NS (mg)
	Rg1	Rb1	MR2	Tổng 3 saponin	
4,3	0,03 ^c	0,01 ^b	1,25 ^c	1,29 ^c	0,42 ^c
4,8	0,03 ^c	0,01 ^b	1,45 ^c	1,49 ^c	0,81 ^b
5,3	0,04 ^b	0,02 ^{ab}	1,62 ^b	1,68 ^b	1,16 ^a
5,8	0,04 ^b	0,02 ^a	2,45 ^a	2,51 ^a	0,95 ^{ab}
6,3	0,06 ^a	0,02 ^b	1,61 ^b	1,67 ^b	0,45 ^c

*Trung bình 3 lần chạy mẫu tính trên 1 g chất khô; NS: Năng suất tổng hợp cả ba saponin trên toàn bộ sinh khối khô thu được.

Sau khi đánh giá sự tăng trưởng và tăng sinh khối của RTC ở pH được điều chỉnh ngay ban đầu từ 4,3-6, kết quả về sự thay đổi hàm lượng các saponin ở mỗi pH sau 56 ngày nuôi cấy được xác định. Tuy kết quả cho thấy RTC ở pH = 5,3 có KLIK (20,67 mg) cao nhất với sự tăng trưởng RTC cũng tốt nhất; nhưng tổng hàm lượng saponin thu được (1,68%) lại thấp hơn so với RTC ở pH = 5,8 (KLIK 11,33 mg và tổng hàm lượng 3 saponin là 2,51%). Vì vậy, khi tính năng suất thu nhận saponin cho thấy năng suất tổng hợp 3 saponin trong toàn bộ KLIK của RTC thu được ở pH = 5,3 (1,16 mg/L) là cao hơn so với RTC thu được ở pH = 5,8 (0,95 mg/L). Vì vậy, trong thí nghiệm này pH = 5,3 không những thích hợp nhất cho sự tăng sinh khối mà còn cả cho sự thu nhận tổng 3 loại saponin từ RTC sâm Ngọc Linh nuôi cấy *in vitro*.

Như vậy, để RTC vừa tăng sinh, vừa sản xuất nhiều saponin, các nuôi cấy tạo RTC từ các cụm RBD sâm Ngọc Linh *in vitro* nên nuôi cấy ở pH = 5,3.



Hình 3.18. Định tính saponin ở mẫu rễ sâm Ngọc Linh *in vitro* ở các pH khác nhau. P₁. 4,3; P₂. 4,8; P₃. 5,3; P₄. 5,8; P₅. 6,3.

2.1.4. Ảnh hưởng của hệ thống nuôi cấy lên sự tích lũy saponin của rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh nuôi cấy từ rễ bất định *in vitro*

Bảng 3.16. Ảnh hưởng của hệ thống nuôi cấy đến khả năng tích lũy saponin của rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh từ nuôi cấy rễ bất định *in vitro*

Hệ thống nuôi cấy 3 L	Hàm lượng saponin (%) [*]				NS (mg)
	Rg1	Rb1	MR2	Tổng 3 saponin	
Bioreactor tự tạo	0,12 ^c	1,03 ^c	3,00 ^b	4,15 ^b	0,93 ^b
Bình tam giác kết hợp lắc	0,35 ^a	1,90 ^a	1,15 ^c	3,40 ^b	0,30 ^c
Bioreactor hình cầu	0,25^{ab}	1,41^{ab}	6,86^a	8,52^a	1,31^a

^{*}Trung bình 3 lần chạy mẫu tính trên 1 g chất khô; NS: năng suất tổng hợp cả ba saponin trên toàn bộ sinh khối khô thu được.

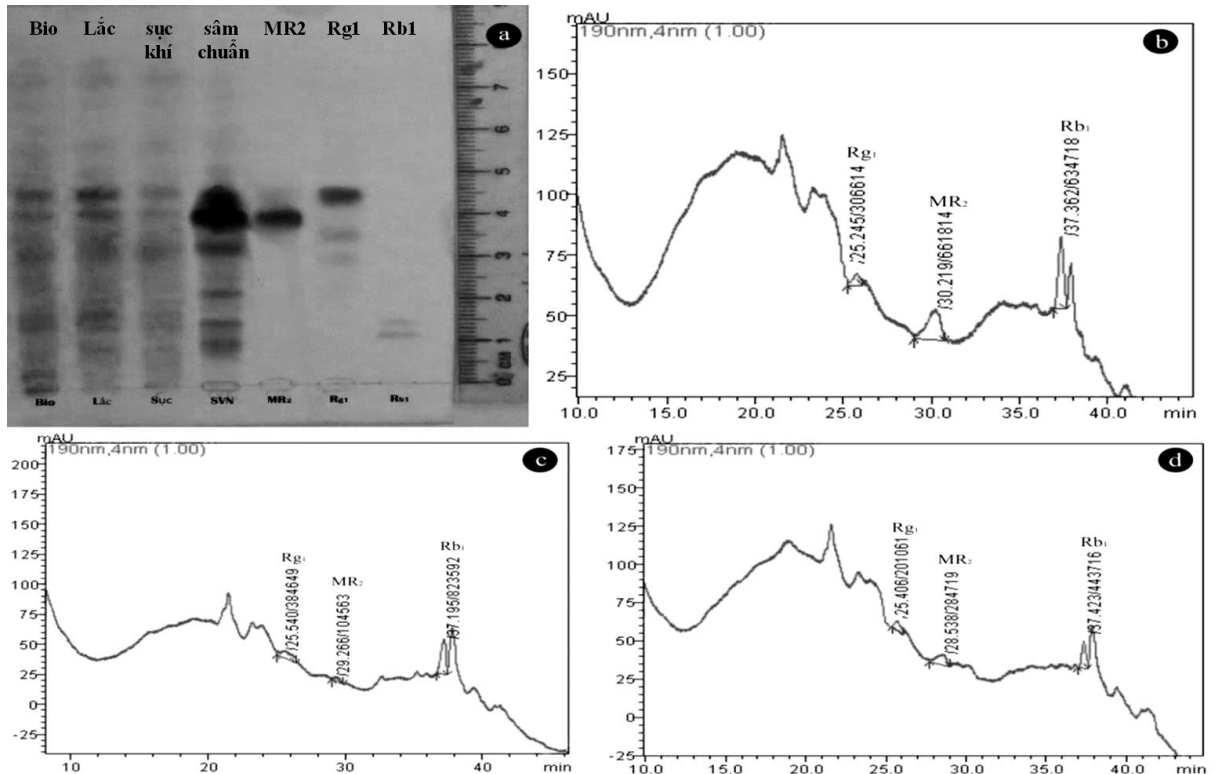
Từ những kết quả tối ưu về tăng trưởng RTC của hệ thống nuôi cấy, hàm lượng saponin trên từng hệ thống cũng được khảo sát. Kết quả định tính bằng TLC thu được trong thí nghiệm này cho thấy, các mẫu rễ sâm Ngọc Linh nuôi cấy trong các hệ thống khác nhau đều có sự xuất hiện của cả 3 vết màu hồng tím tương ứng với 3 vết saponin trên bảng sắc ký (Hình 3.19). Điều này chứng tỏ rằng, trong các mẫu rễ sâm Ngọc Linh trong các hệ thống nuôi cấy đều có sự hiện diện của MR2,

Rb1 và Rg1. Ngoài ra, trên sắc ký đồ còn xuất hiện nhiều vệt khác tương ứng với mẫu saponin toàn phần của sâm Ngọc Linh ngoài tự nhiên (Hình 3.19). Như vậy, trong rễ sâm Ngọc Linh được nuôi cấy trong các hệ thống còn có chứa nhiều loại saponin khác tương tự với sâm Ngọc Linh ngoài tự nhiên.

Khi phân tích ở bước sóng 190 nm, kết quả quan sát được sau khoảng 25 phút xuất hiện đỉnh Rg1, 28-30 phút xuất hiện đỉnh MR2 và 37 phút xuất hiện đỉnh Rb1 (Hình 3.19). Kết quả định lượng bằng phương pháp HPLC cũng cho thấy, RTC sâm Ngọc Linh nuôi cấy trong các hệ thống khác nhau cho hàm lượng saponin khác nhau và đạt cao nhất ở hệ thống Bioreactor hình cầu (Bảng 3.12). Hệ thống Bioreactor hình cầu cho kết quả cao đáng kể về Rg1 (0,25%), Rb1 (1,41%), và năng suất thu nhận 3 saponin (1,31 mg/L) đạt cao nhất, đặc biệt tổng hàm lượng 3 saponin phân tích (8,52%), hàm lượng MR2 (6,86%) cao vượt trội, gấp trên 2 lần các nghiệm thức khác. Trong khi đó, hệ thống bình tam giác kết hợp lắc lại cho kết quả về tổng hàm lượng các saponin được phân tích (3,40%) và hàm lượng MR2 (1,15%) là thấp nhất nhưng hàm lượng Rg1 (0,35%) và Rb1 (1,90%) lại là cao nhất (Hình 3.15). Điều này lại một lần nữa khẳng định vai trò của việc sục khí trong các hệ thống Bioreactor.

Kết quả thu được trong Bảng 3.12, Hình 3.19 và Hình 3.15 cho thấy, hệ thống Bioreactor tự tạo cho tỷ lệ tăng sinh (9,71 lần) và KLK (6,74 g) cao hơn; nhưng tổng hàm lượng các saponin thu được (4,15%) lại thấp hơn so với hệ thống Bioreactor hình cầu (tỷ lệ tăng sinh rễ là 6,84 lần, KLK là 4,63 g và tổng hàm lượng các saponin là 8,52%). Tuy nhiên, năng suất tổng hợp 3 saponin trong toàn bộ sinh khối khô thu được từ hệ thống Bioreactor hình cầu (1,31 mg/L) là cao hơn so với Bioreactor tự tạo (0,93 mg/L) và hệ thống bình tam giác kết hợp lắc (0,30 mg/L).

Vì vậy, trong thí nghiệm này hệ thống Bioreactor hình cầu là phù hợp nhất cho việc thu nhận cả 3 saponin của RTC sâm Ngọc Linh *in vitro*.



Hình 3.19. Định lượng và định tính saponin của rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh *in vitro* trong các hệ thống nuôi cấy khác nhau.

a. Định tính saponin (MR2, Rg1, Rb1); **b, c, d.** Định lượng saponin của RTC sâm Ngọc Linh trong Bioreactor hình cầu, bình tam giác kết hợp lắc và Bioreactor tự tạo.

2.2. Ảnh hưởng của một số elicitor lên sự tăng sinh và tích lũy saponin của rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh nuôi cấy từ rễ bất định *in vitro*

2.2.1. Ảnh hưởng của chitosan lên sự tăng sinh và tích lũy saponin của rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh nuôi cấy từ rễ bất định *in vitro*

Bảng 3.17. Ảnh hưởng của chitosan lên sự tăng sinh và tích lũy saponin của rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh từ mẫu rễ bất định *in vitro*

CHN (mg/L)	KLT (mg)	KLK (mg)	Hàm lượng (% trên 1 g RTC khô)			
			Rg1	Rb1	MR2	Tổng 3 saponin
0	456,90 ^{a*}	41,85 ^a	0,339 ^d	0,144 ^d	0,395 ^c	0,88 ^d
50	271,82 ^c	26,93 ^c	0,260 ^e	0,466^a	0,164 ^e	0,89 ^d
100	159,93 ^e	15,85 ^e	1,632^a	0,142^d	0,251^d	2,03^a
150	202,87 ^d	20,32 ^d	0,676 ^b	0,328 ^b	0,433^a	1,43 ^b
200	298,33 ^b	29,50 ^b	0,368 ^c	0,231 ^c	0,415 ^b	1,02 ^c

*Các chữ cái khác nhau trong một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa với $p \leq 0,05$ trong phép thử Duncan. KLT: Khối lượng tươi, KLK: Khối lượng khô.

Trong thí nghiệm này, sinh khối rễ sâm Ngọc Linh sau 56 ngày nuôi cấy dưới tác động của CHN làm giảm đáng kể KLT và KLK; nhưng hàm lượng các hợp chất saponin cũng được cải thiện đáng kể với tất cả kết quả thể hiện tại Bảng 3.17 và Hình 3.23. Sinh khối rễ ở tất cả nghiệm thức bổ sung CHN giảm hơn một nửa so với mẫu đối chứng, trong khi tổng saponin lại tăng gấp 2 lần tại nghiệm thức bổ sung 100 mg/L CHN. Trong 3 loại saponin, hàm lượng Rg1 tăng cao nhất là 1,632% trên 1 g mẫu phân tích ở nghiệm thức bổ sung 100 mg/L và giảm đều xuống còn 0,368% tại nghiệm thức bổ sung 200 mg/L; hàm lượng Rb1 thu được cao nhất là 0,466% tại nghiệm thức chứa 50 mg/L và giảm đột ngột tại nồng độ 100 mg/L còn 0,142%, sau đó tăng dần lên ở các nồng độ tiếp theo; hàm lượng MR2 lại giảm khi bổ sung 50 mg/L và tăng dần lên đến mức cao nhất là 0,433% ở nồng độ 150 mg/L và giảm chậm xuống còn 0,415% ở nghiệm thức 200 mg/L (Bảng 3.17). Ngoài ra theo quan sát, một số mẫu RTC khi bổ sung từ 150 mg/L CHN thì mẫu ngoài tạo thêm các RTC, còn phát sinh rất nhiều phôi tại vị trí cắt nên KLT và KLK tăng lên, nhưng RTC rất ít và hàm lượng tổng ba loại saponin cũng giảm đi.

Tóm lại, nghiệm thức bổ sung 100 mg/L CHN là tối ưu trong tất cả nghiệm thức với tổng ba loại saponin và Rg1 trong 1 g mẫu phân tích đạt cao nhất, hơn nữa khi đánh giá năng suất thu nhận saponin trong toàn bộ sinh khối thu được sau 56 ngày nuôi cấy, rõ ràng nghiệm thức này cho năng suất tích lũy saponin đạt cao nhất trong tất cả các nồng độ CHN (Biểu đồ 3.3).

2.2.2. Ảnh hưởng của dịch chiết nấm men lên sự tăng sinh và tích lũy saponin của rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh nuôi cấy từ rễ bất định in vitro

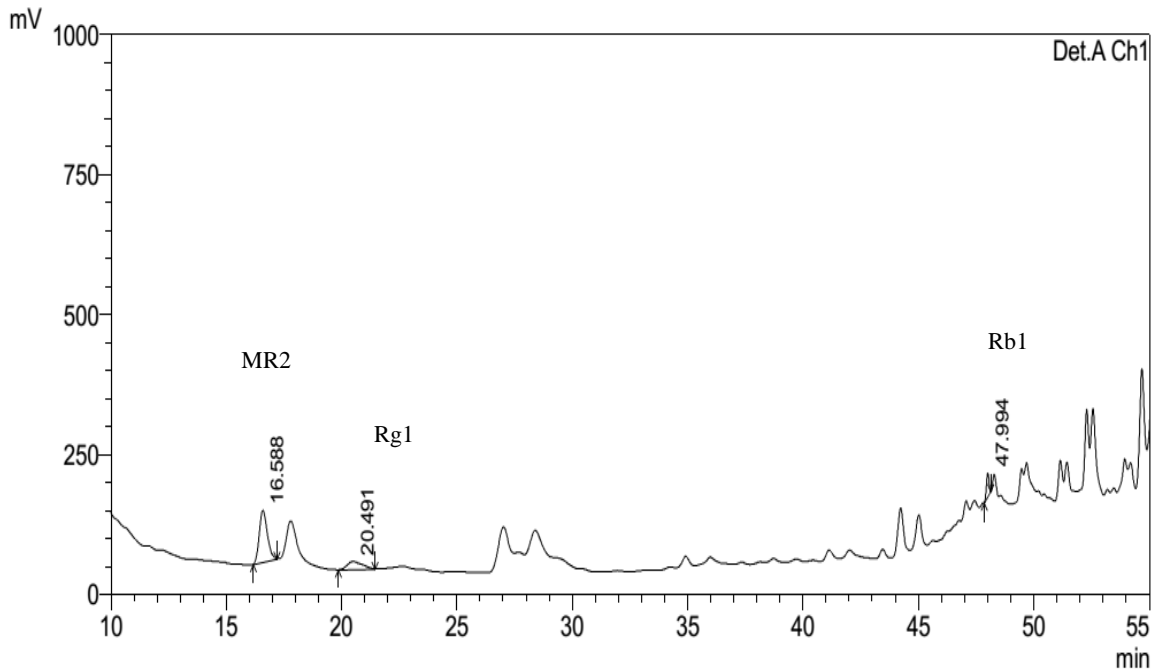
Kết quả xử lý bằng dịch chiết nấm men (YE) được thể hiện tại Bảng 3.18 và Hình 3.23B.

Theo kết quả thu được cho thấy, xử lý bằng YE trong nuôi cấy RBD với liều thấp (50 mg) làm tăng khả năng tăng sinh RTC của sâm Ngọc Linh từ 456,9 lên 510,83 mg và đồng thời cũng làm tăng các hợp chất saponin, đặc biệt là RTC và RBD đều có màu vàng tươi và không bị hóa nâu hay bị trương nước như các elicitor khác (Bảng 3.18, Hình 3.23B).

Bảng 3.18. Ảnh hưởng của dịch chiết nấm men lên sự tăng sinh và tích lũy saponin của rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh từ mẫu rễ bất định *in vitro*

YE (mg/L)	KLT (mg)	KLK (mg)	Hàm lượng (% trên 1 g RTC khô)			
			Rg1	Rb1	MR2	Tổng 3 saponin
0	456,90 ^{c*}	41,85 ^c	0,339 ^c	0,144 ^c	0,395 ^d	0,88 ^d
50	510,83^a	51,25^a	0,502 ^b	0,251 ^a	0,679 ^c	1,48 ^b
100	473,30 ^b	47,25 ^b	0,534 ^b	0,200 ^b	0,743 ^b	1,42 ^b
150	250,03^d	25,03^d	2,482^a	0,244^a	0,786^b	3,51^a
200	154,60 ^e	15,39 ^e	0,544 ^b	0,256 ^a	0,842^a	1,67 ^c

*Các chữ cái khác nhau trong một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa với $p \leq 0,05$ trong phép thử Duncan. KLT: Khối lượng tươi, KLK: Khối lượng khô.



Hình 3.20. Peak Rg1, MR2, Rb1 trên sắc ký đồ của mẫu rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh dưới tác động của dịch chiết nấm men.

Định lượng saponin ở nghiệm thức 150 mg/L YE trên xuống dưới.

Đối với mỗi saponin, Rg1, Rb1 tăng mạnh khi bổ sung 150 mg/L YE (Hình 3.20), đạt 2,482% và 0,244% tương ứng; MR2 có sự gia tăng rõ rệt từ nồng độ 50-200 mg/L và đạt tối ưu 0,842% khi bổ sung 200 mg/L YE. Nhìn tổng thể, 150 mg/L YE tối ưu vì hầu hết các saponin đều tăng đáng kể, nhất là tổng ba loại saponin thu được cao nhất tại nghiệm thức này. So với CHN, YE giúp tăng lượng Rg1 và MR2 cao hơn (Bảng 3.18).

2.2.3. Ảnh hưởng của abscisic acid lên sự tăng sinh và tích lũy saponin của rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh nuôi cấy từ rễ bất định *in vitro*

Từ kết quả thu được tại Bảng 3.19, Hình 3.23, Hình 3.21 cho thấy abscisic acid (ABA) làm giảm mạnh khả năng phát triển của rễ, KLT và KLK giảm 1/4 so với mẫu đối chứng. Ngoài ra, lượng RTC hình thành cũng thấp hơn và màu sắc RTC dần chuyển sang màu nâu; nồng độ càng cao, các biểu hiện này càng rõ rệt. Tuy nhiên, hàm lượng saponin của Rg1, MR2 và ba tổng saponin cao hơn các thí nghiệm trên, Rg1 tăng mạnh ngay từ nghiệm thức bổ sung 50 µg/L ABA và tăng dần đến điểm cao nhất là 1,506%; MR2 cũng tăng ngay từ nghiệm thức chứa 50 µg/L ABA và đạt tối ưu ở cả hai nồng độ 150 và 200 µg/L và hàm lượng saponin tổng số khi bổ sung ABA cũng khác biệt rõ ràng so với khi bổ sung YE và CHN. Riêng hàm lượng Rb1 gia tăng dần từ nồng độ 50 µg/L đến 200 µg/L ABA, nhưng không khác biệt nhiều so với YE và CHN.

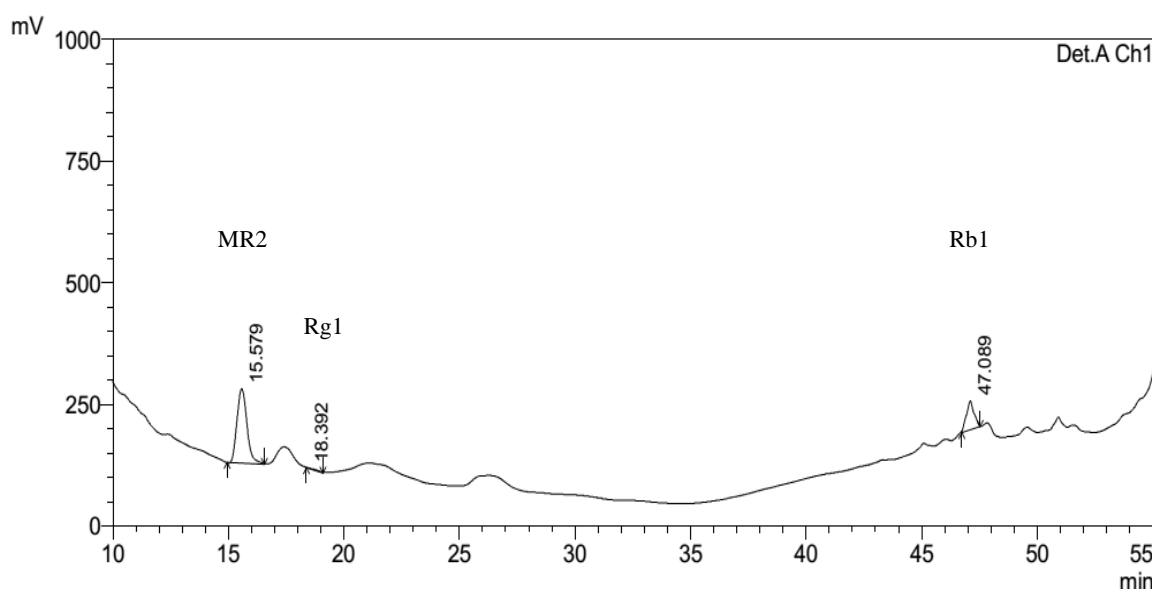
Bảng 3.19. Ảnh hưởng của abscisic acid lên sự tăng sinh và tích lũy saponin của rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh từ mẫu rễ bất định *in vitro*

ABA (µg/L)	KLT (mg)	KLK (mg)	Hàm lượng (% trên 1 g RTC khô)			
			Rg1	Rb1	MR2	Tổng 3 saponin
0	456,9 ^{a*}	41,85 ^a	0,339 ^d	0,144 ^d	0,395 ^d	0,88 ^e
50	156,33 ^b	16,67 ^b	0,703 ^c	0,198 ^c	1,058 ^b	1,96 ^d
100	107,17 ^c	10,59 ^c	1,234 ^b	0,204 ^c	0,973 ^c	2,41 ^c
150	82,47 ^d	8,25 ^d	1,506 ^a	0,219 ^b	1,651 ^a	3,37 ^a
200	76,30 ^d	7,58 ^d	0,731 ^c	0,277 ^a	1,637 ^a	2,65 ^b

*Các chữ cái a, b, c, ... thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa với $p \leq 0,05$ trong phép thử Duncan. KLT: Khối lượng tươi, KLK: Khối lượng khô, RTC: Rễ thứ cấp.

ABA cũng góp phần điều hòa trung gian trong quá trình sinh tổng hợp các hợp chất biến dưỡng thứ cấp trong nuôi cấy mô tế bào một số loài thực vật. Trong thí nghiệm này, ABA ức chế mạnh sự sinh trưởng của rễ sâm Ngọc Linh, nhưng có hiệu quả rõ rệt lên sự gia tăng các saponin, trên 1 g mẫu phân tích HPLC, sự gia tăng sự tích lũy hàm lượng saponin mạnh hơn YE và CHN. Kết quả định tính và định lượng saponin cho thấy ở tất cả các nghiệm thức đều có sự hiện diện các saponin rõ rệt và tăng mạnh cả ba loại saponin Rg1, MR2 và Rb1 (Bảng 3.19, Hình

3.21). Hàm lượng saponin tổng thu được ở các nghiệm thức có bổ sung ABA vào môi trường nuôi cấy đều cao hơn so với nghiệm thức đối chứng, và hàm lượng saponin đạt cao nhất ở nồng độ 200 mg/L ABA; nhưng hiệu quả thực sự thu được so với tổng khối lượng thu được thấp hơn cả mẫu đối chứng vì sinh khối giảm mạnh (Biểu đồ 3.3).



Hình 3.21. Peak Rg1, MR2, Rb1 trên sắc ký đồ của mẫu rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh dưới tác động của ABA.

Định lượng saponin ở nghiệm thức 150 $\mu\text{g/L}$ ABA.

2.2.4. Ảnh hưởng của salicylic acid lên sự tăng sinh và tích lũy saponin của rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh nuôi cấy từ rễ bất định *in vitro*

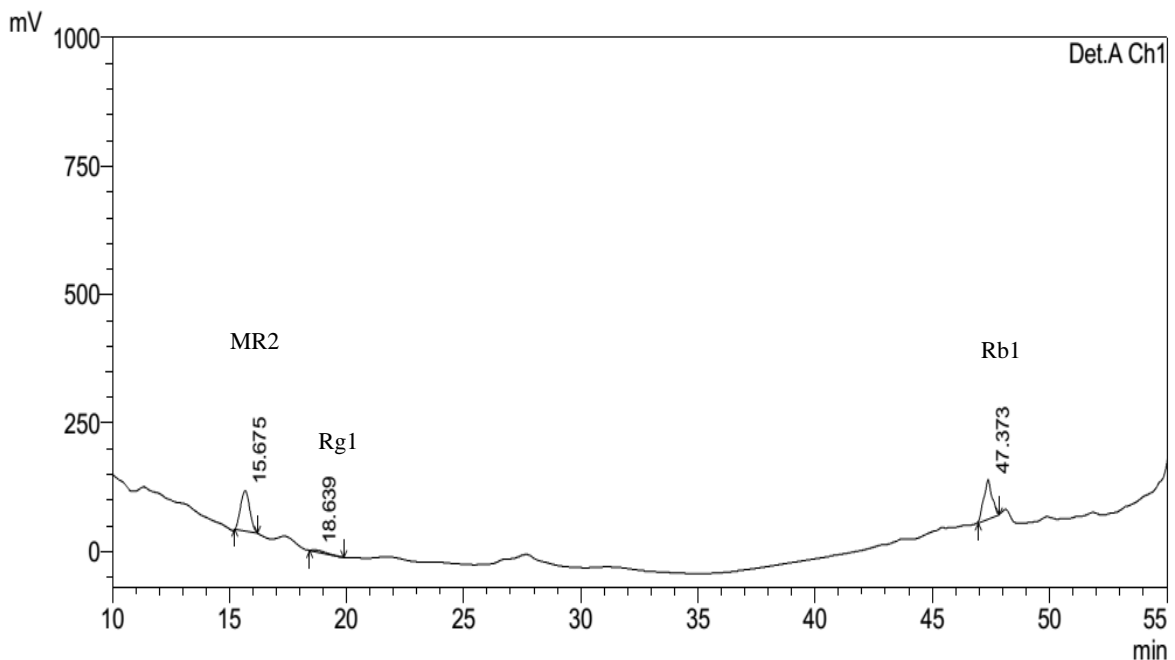
Bảng 3.20. Ảnh hưởng của salicylic acid lên sự tăng sinh và tích lũy saponin của rễ thứ cấp từ mẫu rễ bất định sâm Ngọc Linh *in vitro*

SA ($\mu\text{g/L}$)	KLT (mg)	KLK (mg)	Hàm lượng (% trên 1 g RTC khô)			
			Rg1	Rb1	MR2	Tổng 3 saponin
0	456,9 ^{a*}	41,85 ^a	0,339 ^d	0,144 ^d	0,395 ^c	0,88 ^d
50	433,07 ^b	43,52 ^a	0,675 ^a	0,248 ^b	0,867 ^a	1,79 ^a
100	200,03 ^c	19,8 ^b	0,455 ^c	0,385 ^a	0,599 ^b	1,44 ^b
150	84,23 ^d	8,18 ^c	0,503 ^b	0,176 ^c	0,576 ^b	1,25 ^c
200	67,37 ^d	6,79 ^c	0,439 ^c	0,356 ^b	0,398 ^c	1,19 ^c

*Các chữ cái khác nhau trong một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa với $p \leq 0,05$ trong phép thử Duncan. KLT: Khối lượng tươi, KLK: Khối lượng khô.

Từ Bảng 3.17 đến Bảng 3.20 cho thấy salicylic acid (SA) tương tự các elicitor khác đều làm giảm khả năng phát triển của rễ; bắt đầu từ nồng độ 150 $\mu\text{g/L}$ là gây ức chế sinh trưởng mạnh lên sự hình thành và tăng trưởng RTC, nhưng tác động này của SA không mạnh bằng ABA, màu sắc của rễ ít biến đổi (Hình 3.23). Kết quả phân tích sắc ký lớp mỏng và HPLC trong nghiên cứu này cũng cho thấy có sự hiện diện của cả ba loại ginsenoside ở tất cả các nghiệm thức bổ sung SA. Lượng MR2 quyết định tác dụng dược lý chính của sâm Ngọc Linh, thu được ở các nghiệm thức có bổ sung SA đều cao hơn so với nghiệm thức khác, và đạt cao nhất là ở nghiệm thức có bổ sung 50 $\mu\text{g/L}$ SA (Bảng 3.20, Hình 3.22).

Khả năng kích thích tích lũy hợp chất thứ cấp của SA từ 1 g mẫu khô đem phân tích cao hơn CHN. Mặc dù tổng 3 loại saponin (1,79%), và Rg1 (0,675%) đạt cao nhất ở nồng độ 50 $\mu\text{g/L}$ SA, nhưng lượng Rb1 đạt tối ưu ở 100 $\mu\text{g/L}$ SA (0,385%). Khi đánh giá năng suất sản xuất tổng saponin trong toàn bộ sinh khối thu được sau 56 ngày, nồng độ 50 $\mu\text{g/L}$ SA tối ưu cho RTC tích lũy saponin với năng suất đạt 0,78 mg mà lượng Rg1 và MR2 cũng cao hơn các nồng độ SA khác (Biểu đồ 3.3).



Hình 3.22. Peak Rg1, MR2, Rb1 trên sắc ký đồ của mẫu rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh dưới tác động của SA.

Định lượng saponin ở nghiệm thức 50 $\mu\text{g/L}$ SA.

2.2.5. Ảnh hưởng của jasmonic acid lên sự tăng sinh và tích lũy saponin của rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh nuôi cấy từ rễ bất định *in vitro*

Bảng 3.21. Ảnh hưởng của jasmonic acid lên sự tăng sinh và tích lũy saponin của rễ thứ cấp từ mẫu rễ bất định sâm Ngọc Linh *in vitro*

JA ($\mu\text{g/L}$)	KLT (mg)	KLK (mg)	Hàm lượng (% trên 1 g RTC khô)			
			Rg1	Rb1	MR2	Tổng saponin
0	456,90^{a*}	41,85^a	0,339 ^e	0,144 ^e	0,395 ^e	0,88 ^d
50	166,24 ^b	15,89 ^b	2,227 ^c	0,849^a	1,855 ^c	4,93 ^c
100	125,56 ^c	12,76 ^c	3,219^a	0,718 ^b	1,302 ^d	5,24 ^b
150	81,56^d	8,59^d	2,524^b	0,582^c	2,464^b	5,57^a
200	75,56 ^d	7,59 ^d	1,975 ^d	0,401 ^d	2,826^a	5,21 ^b

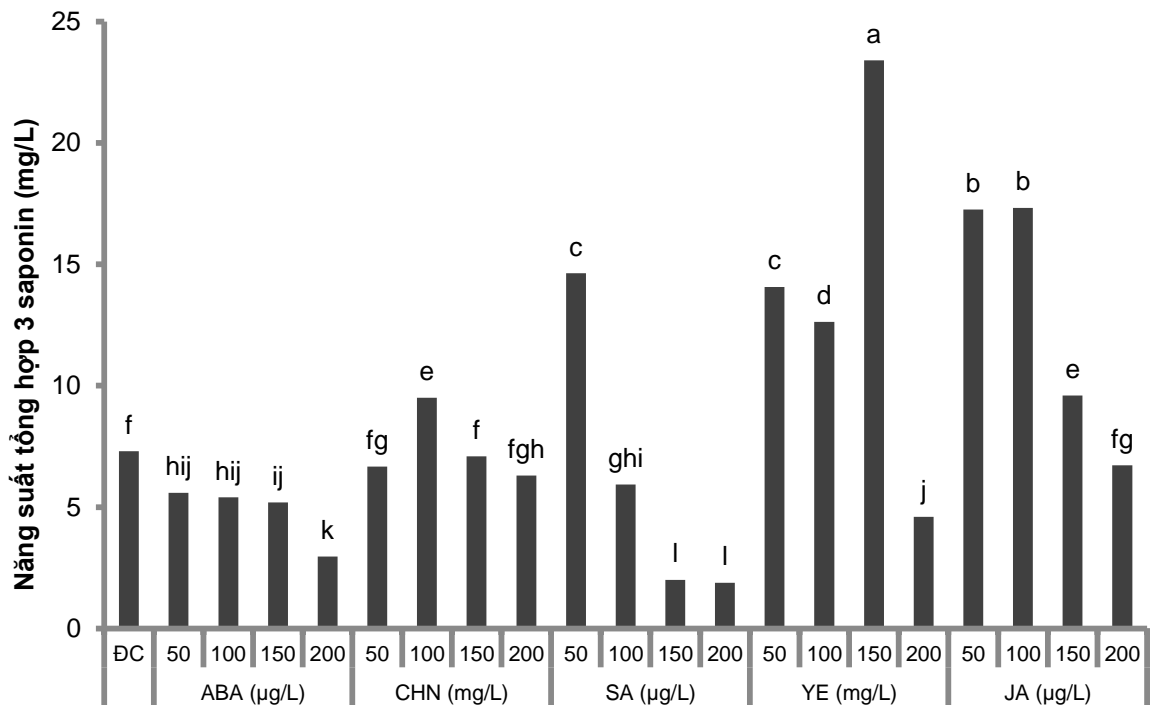
*Các chữ cái khác nhau trong một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa với $p \leq 0,05$ trong phép thử Duncan. KLT: Khối lượng tươi, KLK: Khối lượng khô.

Các kết quả ảnh hưởng của jasmonic acid (JA) thể hiện ở Bảng 3.21, và Hình 3.23. Tất cả các elicitor trên đều giúp tăng lượng saponin, nhưng từ 1 g mẫu đem phân tích, năng suất tích lũy saponin tốt nhất là JA với các peak thể hiện cao và rộng rõ rệt, phần trăm các saponin cũng cao đáng kể so với CHN, YE, ABA và SA (Bảng 3.17-Bảng 3.21, Hình 3.23). Tác động ức chế khả năng tăng trưởng rễ trong các nghiệm thức bổ sung JA cũng mạnh nhất, rễ hóa nâu đậm ở tất cả mẫu rễ nuôi cấy, nhưng lượng saponin trong 1 g mẫu đem phân tích rất cao (Bảng 3.21, Hình 3.23). Trong từng saponin, Rg1 tăng cao ở tất cả các nồng độ và đạt tối ưu ở nồng độ là 100 $\mu\text{g/L}$ JA và lượng Rb1 đạt cao nhất là 0,849% tại nồng độ 50 $\mu\text{g/L}$ JA, còn MR2 tăng cao tại tất cả các nghiệm thức và cao nhất là 2,826% ở nồng độ 200 $\mu\text{g/L}$ JA. Tổng số saponin cao nhất ghi nhận tại nồng độ 150 $\mu\text{g/L}$ JA. Như vậy, RTC tích lũy saponin cao nhất tại nồng độ 150 $\mu\text{g/L}$ JA, nhưng khối lượng RTC tại nồng độ 150 $\mu\text{g/L}$ JA lại rất thấp giảm xuống 5 lần so với đối chứng nên năng suất thu nhận saponin tối ưu chỉ khi sử dụng 50 $\mu\text{g/L}$ JA (Biểu đồ 3.3, Bảng 3.21).

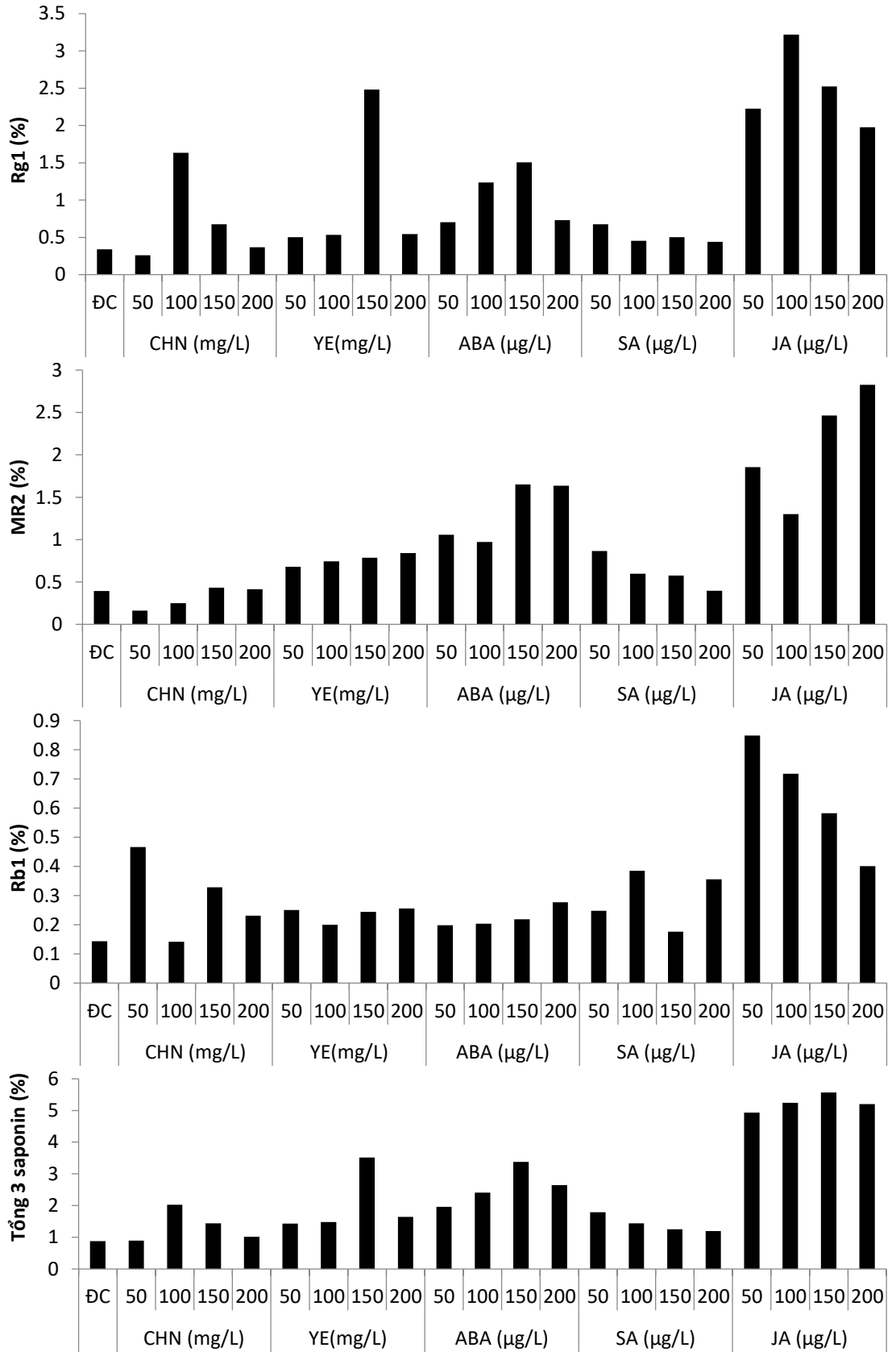
Ngoài ra, do RTC bị ức chế sinh trưởng mạnh nên tổng saponin thực thu trên toàn bộ sinh khối khô thấp hơn các nghiệm thức sử dụng SA, YE và CHN.

2.2.6. So sánh tác động của các elicitor đơn lẻ lên sự tổng hợp saponin của rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh nuôi cấy từ rễ bất định *in vitro*

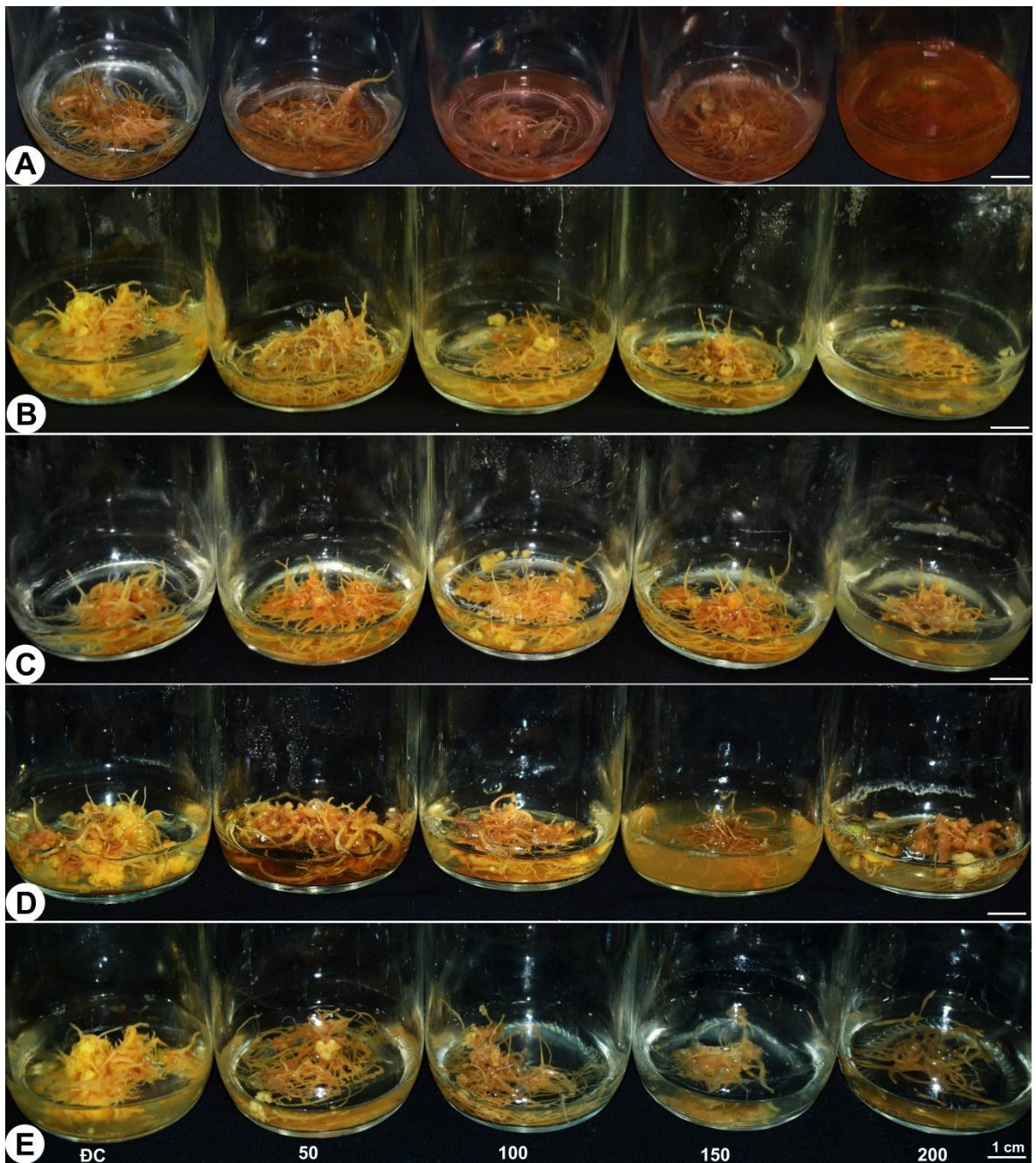
Sinh khối của RTC cũng như hàm lượng saponin có sự khác biệt giữa các nghiệm thức và không tăng tỷ lệ thuận theo sự biến thiên của nồng độ (Biểu đồ 3.3). Kết quả so sánh giữa các elicitor cho thấy, hàm lượng Rb1 đạt cao nhất ở 50 $\mu\text{g/L}$ JA, Rg1 ở 100 $\mu\text{g/L}$ JA, MR2 ở 200 $\mu\text{g/L}$ JA và tổng ba saponin này đạt cao nhất ở 150 $\mu\text{g/L}$ JA. Để xác định năng suất tích lũy saponin tối ưu từ các nuôi cấy tạo RTC nên dựa trên mối tương quan giữa sinh khối và khả năng tích lũy của từng nồng độ elicitor. Kết quả cho thấy, việc bổ sung 150 mg/L YE cho năng suất tích lũy saponin ở RTC sâm Ngọc Linh đạt cao nhất (23,41 mg/L), cho dù xét trên 1 g mẫu đem phân tích thì tổng lượng saponin tại nghiệm thức này thấp hơn nghiệm thức bổ sung 150 $\mu\text{g/L}$ JA, nhưng rõ ràng tổng sinh khối khô lớn nhất đã đem lại hiệu quả lớn nhất cho việc thu nhận tổng 3 saponin này. Ngoài ra, 50 $\mu\text{g/L}$ của SA và JA thì năng suất tích lũy cũng tương đối cao; trong khi đó, bổ sung 150-200 $\mu\text{g/L}$ SA cho năng suất tích lũy thấp nhất so với các nồng độ elicitor khác (Biểu đồ 3.3).



Biểu đồ 3.3. Ảnh hưởng của elicitor lên năng suất tổng hợp cả ba saponin trong rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh sau 56 ngày nuôi cấy.



Biểu đồ 3.4. So sánh ảnh hưởng của elicitor lên sự tổng hợp cả ba saponin trong rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh sau 56 ngày nuôi cấy.



Hình 3.23. Ảnh hưởng đơn lẻ của các elicitor lên sự tăng sinh của rễ thứ cấp từ mẫu rễ bất định sâm Ngọc Linh.

A. CHN từ 0, 50, 100, 150 và 200 mg/L; **B.** YE từ 0, 50, 100, 150 và 200 mg/L; **C.** SA từ 0, 50, 100, 150 và 200 µg/L; **D.** ABA từ 0, 50, 100, 150 và 200 µg/L; **E.** JA từ 0, 50, 100, 150 và 200 µg/L. Các nghiệm thức xếp từ trái sang phải.

2.2.7. Ảnh hưởng của việc kết hợp đồng thời salicylic acid và dịch chiết nấm men lên sự tăng sinh và tích lũy saponin của rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh in vitro

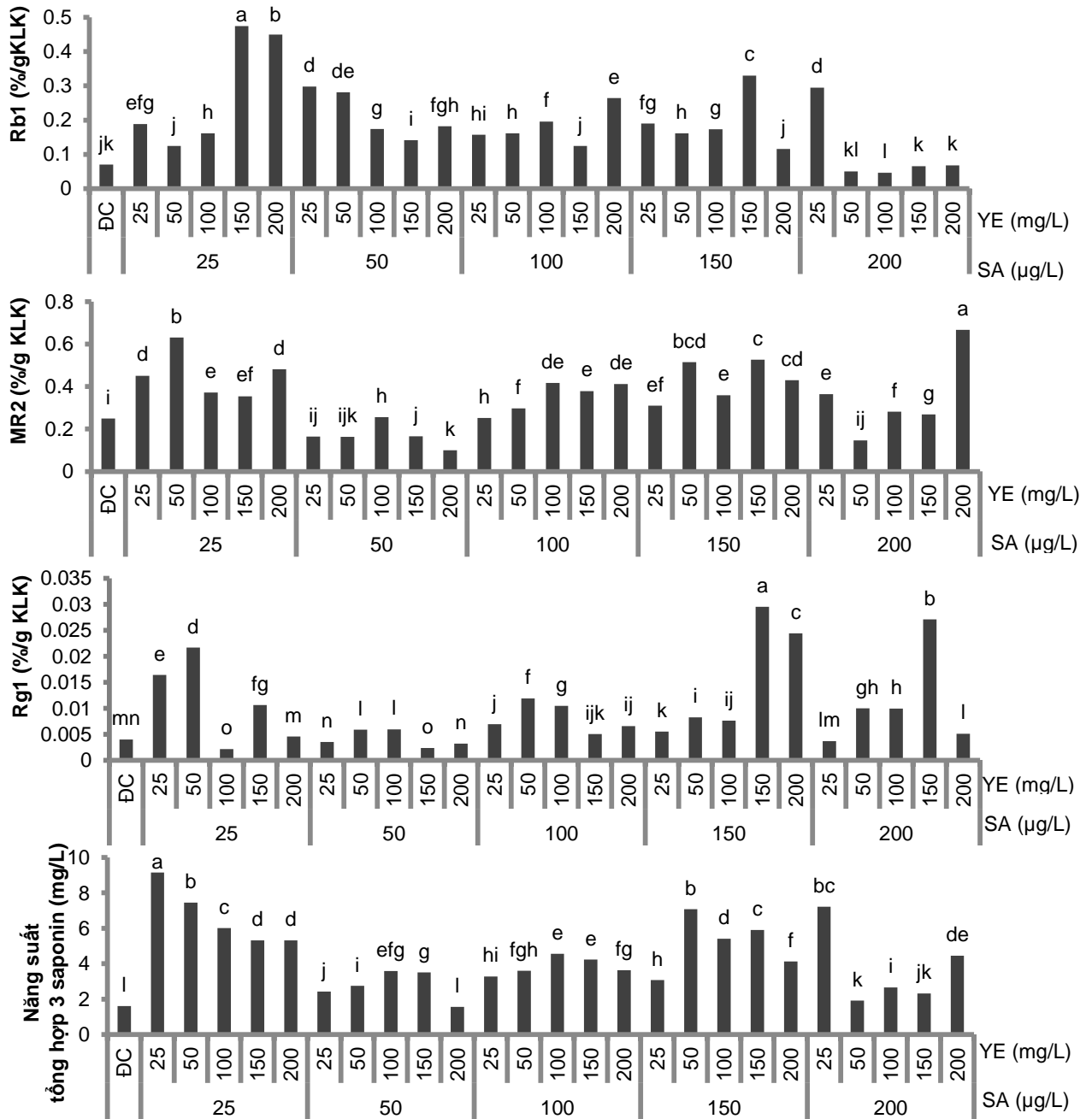
Bảng 3.22. Ảnh hưởng của việc kết hợp giữa acid salicylic và dịch chiết nấm men lên khả năng phát triển của rễ thứ cấp từ nguồn rễ bất định sâm Ngọc Linh

SA µg/L	YE (mg/L)	KLT (mg/L)	KLK (mg/L)	Chỉ số tăng trưởng	% tỷ lệ chất khô
0	0	453,47 ^a	41,85 ^a	17,14 ^a	9,23 ^{bcde}
25	25	440,00^a	33,67^b	16,60^a	7,69^{def}
	50	342,20 ^c	28,8d ^e	12,69 ^c	8,42 ^{bcde}
	100	281,5 ^{de}	21,75 ^h	10,26 ^{de}	7,73 ^{cdef}
	150	219,00 ^{ghi}	19,00 ^{ij}	7,76 ^{ghi}	8,68 ^{bcde}
	200	205,00 ^{hijk}	17,06 ^{km}	7,20 ^{hijk}	8,32 ^{bcd e}
50	25	182,22 ^{ijk}	15,67 ^{mn}	6,29 ^{ijk}	8,61 ^{bcde}
	50	217,11 ^{ghij}	18,33 ^{ijk}	7,68 ^{ghij}	9,78 ^b
	100	255,00 ^{efg}	24,67 ^f	9,20 ^{efg}	9,68 ^{bc}
	150	267,00 ^{ef}	34,00 ^b	9,68 ^{ef}	12,73^a
	200	174,25 ^k	16,38 ^{mn}	5,97 ^k	9,40 ^{bcd}
100	25	266,33 ^{ef}	23,67 ^{fg}	9,65 ^{ef}	8,89 ^{bcde}
	50	240,67 ^{fgh}	23,00 ^{gh}	8,63 ^{fgh}	9,57 ^{bcd}
	100	283,00 ^{de}	22,00 ^h	10,32 ^{de}	7,77 ^{cdef}
	150	320,00 ^{cd}	25,00 ^f	11,80 ^{cd}	7,82 ^{cdef}
	200	198,33 ^{ijk}	16,00 ^{mn}	6,93 ^{ijk}	8,07 ^{cdef}
150	25	288,67 ^{de}	18,33 ^{ijk}	10,55 ^{de}	6,35 ^f
	50	383,67 ^b	31,00 ^c	14,35 ^b	8,08 ^{cdef}
	100	404,33 ^b	30,11 ^{cd}	15,17 ^b	7,44 ^{ef}
	150	255,00 ^{efg}	20,00 ⁱ	9,20 ^{efg}	7,86 ^{cdef}
	200	178,70 ^k	15,00 ⁿ	6,15 ^{jk}	8,39 ^{bcde}
200	25	379,33 ^b	32,67 ^b	14,17 ^b	8,61 ^{bcde}
	50	311,33 ^{cd}	28,00 ^e	11,45 ^{cd}	8,99 ^{bcde}
	100	290,33 ^{de}	23,67 ^{fg}	10,61 ^{de}	8,15 ^{cdef}
	150	211,67 ^{hijk}	19,33 ^{ij}	7,47 ^{hijk}	9,13 ^{bcde}
	200	192,25 ^{ijk}	18,06 ^{jk}	6,69 ^{ijk}	9,39 ^{b^{cde}}

*Các chữ cái khác nhau trong một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa với $p \leq 0,05$ trong phép thử Duncan. KLT: Khối lượng tươi, KLK: Khối lượng khô, RTC: Rễ thứ cấp.

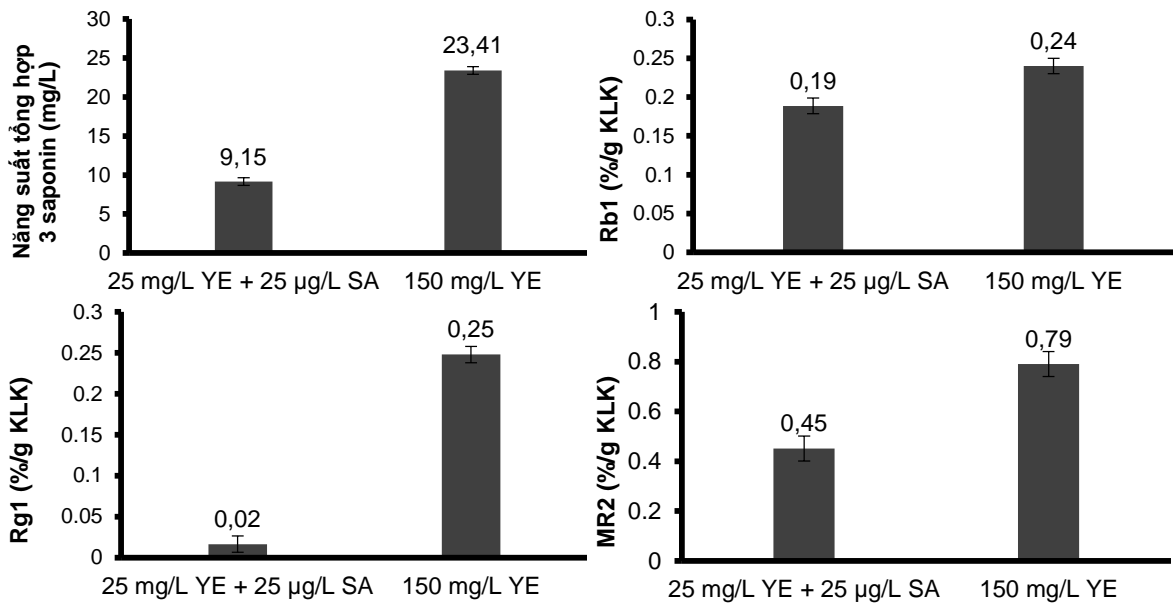
YE là một elicitor ngoại sinh từ thành tế bào vi sinh vật, trong khi SA là một elicitor nội sinh có bản chất là hormone thực vật, mỗi elicitor này sẽ có tác động khác nhau lên quá trình tăng trưởng và tích lũy saponin của nuôi cấy RBD sâm Ngọc Linh. Theo kết quả nghiên cứu trước, YE tốt nhất cho sự tăng sinh khối và có năng suất thu cả 3 saponin đạt rất cao; SA ức chế hình thành và tăng trưởng RTC ít

hơn các elicitor nội sinh khác; hơn nữa, hàm lượng MR2, Rb1 thu được cao hơn YE. Chính vì thế, việc kết hợp SA (0, 25, 50, 100 và 150 µg/L) với YE (0, 25, 50, 100 và 150 mg/L) được thực hiện. Kết quả đánh giá khả năng kết hợp của 2 elicitor có bản chất khác nhau (YE và SA) lên khả năng phát triển và tích lũy các hợp chất saponin của RTC từ nuôi cấy RBD sâm Ngọc Linh trong 56 ngày nuôi cấy được thể hiện ở Bảng 3.21, Biểu đồ 3.5 và Hình 3.21.



Biểu đồ 3.5. Tác động đồng thời dịch chiết nấm men và salicylic acid lên khả năng tích lũy các saponin trong nuôi cấy tạo rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh.

Theo kết quả thu được ở Bảng 3.18, Bảng 3.20 và Biểu đồ 3.5 cho thấy, nghiệm thức kết hợp 25 µg/L SA với 150 mg/L YE cho phần trăm hàm lượng Rb1 trên 1 g mẫu phân tích đạt tốt nhất (0,47%), nhất là hàm lượng Rb1 này cao hơn cả các nghiệm thức tốt nhất khi xử lý đơn lẻ YE (0,24% ở 150 mg/L YE) hay SA (0,38% ở 100 mg/L SA). Hàm lượng MR2 (0,67%) đạt cao nhất tại nghiệm thức 200 mg/L YE kết hợp với 200 µg/L SA, nhưng thấp hơn khi xử lý đơn lẻ YE (0,84% ở 200 mg/L YE) và SA (0,87% ở 50 mg/L SA). Hàm lượng Rg1 (0,03%) đạt cao nhất 150 mg/L YE với 150 µg/L SA, và thấp hơn khi xử lý đơn lẻ YE (2,48% ở 150 mg/L YE) và SA (0,68% ở 50 mg/L SA). Trong đó, khả năng kết hợp đạt tối ưu khi xử lý mẫu đồng thời với 25 mg/L YE và 25 µg/L SA, vì chỉ số tăng trưởng và KLK thu gần tương đương với đối chứng không bổ sung elicitor, nên năng suất thu nhận tổng cả ba saponin (9,15 mg/L) đạt cao nhất trên toàn bộ sinh khối khô thu được. Ngoài ra, khi quan sát thấy rễ phát triển có màu tươi và phát triển khá mạnh, không có bất kỳ hiện tượng bất thường nào.



Biểu đồ 3.6. So sánh tác động kết hợp của dịch chiết nấm men và salicylic acid lên sự tích lũy các saponin trong nuôi cấy tạo rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh.

Tuy nhiên, tại nghiệm thức tốt nhất khi kết hợp đồng thời 2 elicitor, khả năng tích lũy ba saponin không cao bằng việc chỉ xử lý đơn lẻ với 150 mg/L YE (Biểu đồ 3.6). Như vậy, việc kết hợp đồng thời cũng làm tăng đáng kể lượng saponin, nhưng không hiệu quả bằng việc chỉ sử dụng đơn lẻ 150 mg/L YE.

2.2.8. Ảnh hưởng của thời gian bổ sung dịch chiết nấm men lên sự tăng sinh và tích lũy saponin của rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh *in vitro*

Bảng 3.23. Ảnh hưởng của thời gian bổ sung dịch chiết nấm men lên khả năng phát triển của rễ thứ cấp từ nguồn rễ bất định sâm Ngọc Linh

Thời gian (ngày)	KLT (mg)	KLK (mg)	Hàm lượng (% trên 1 g RTC khô)				Nồng độ ($\mu\text{g/mL}$) suy ra từ đường chuẩn			
			Rb1	MR2	Rg1	Tổng	Rb1	MR2	Rg1	Tổng
0	254,40 ^c	24,40 ^c	0,0237 ^d	0,7858^a	0,2405^a	1,050^a	236,6 ^e	785,81 ^b	24,05^a	1046,46 ^b
10	208,25 ^c	20,00 ^c	0,1793 ^c	0,4836 ^b	0,0042 ^e	0,667 ^b	327,26 ^c	882,70^a	22,16 ^b	1232,13^a
20	373,40 ^b	33,20 ^b	0,3112^a	0,2366 ^d	0,0097 ^c	0,558 ^b	567,50^a	431,48 ^d	17,70 ^b	1016,68 ^b
30	374,75 ^b	29,50 ^c	0,2210 ^b	0,1020 ^e	0,0051 ^d	0,328 ^d	405,03 ^b	186,96 ^e	9,37 ^d	601,36 ^d
40	656,50^a	64,00^a	0,1655 ^c	0,2763 ^c	0,0122 ^b	0,454 ^c	301,32 ^d	502,80 ^c	7,62 ^e	811,73 ^c

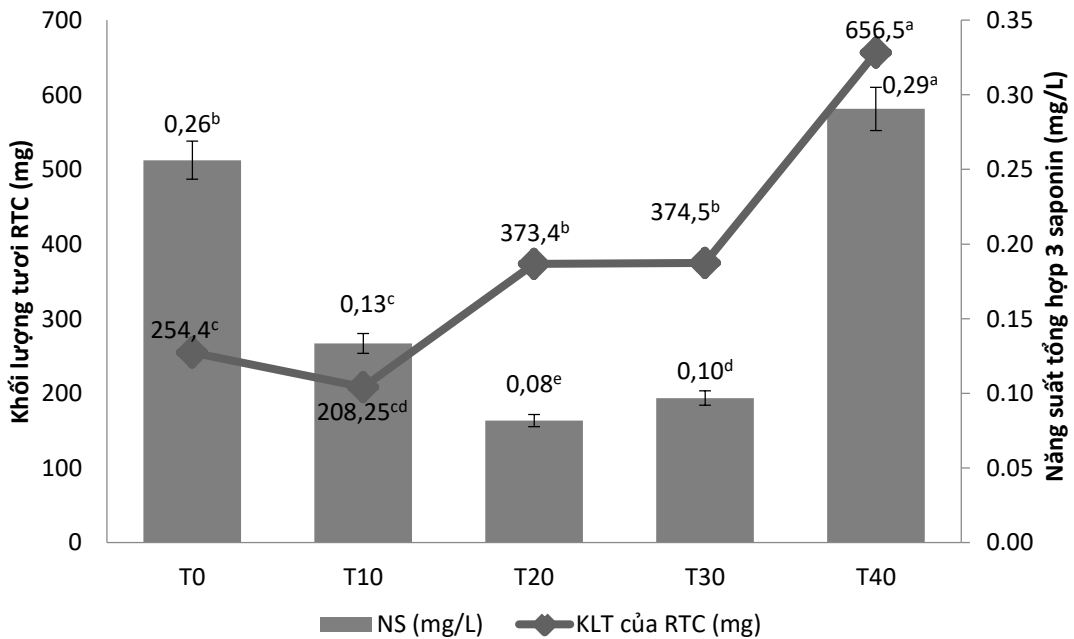
*Các chữ cái khác nhau trong một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa với $p \leq 0,05$ trong phép thử Duncan. KLT: Khối lượng tươi, KLK: Khối lượng khô.

Từ nồng độ elicitor tối ưu (150 mg/L YE), việc khảo sát thời gian bổ sung các elicitor này tại các thời điểm khác nhau (như đầu giai đoạn nuôi cấy và tại ngày thứ 10, 20, 30 và 40 của nuôi cấy) được thực hiện và kết quả thu được thể hiện ở Bảng 3.23, Hình 3.24 và Biểu đồ 3.7. Sau 56 ngày nuôi cấy, các kết quả cho thấy, tất cả mẫu RTC sâm Ngọc Linh nuôi cấy từ RBD *in vitro* đem phân tích đều có chứa cả ba loại saponin MR2, Rb1 và Rg1.

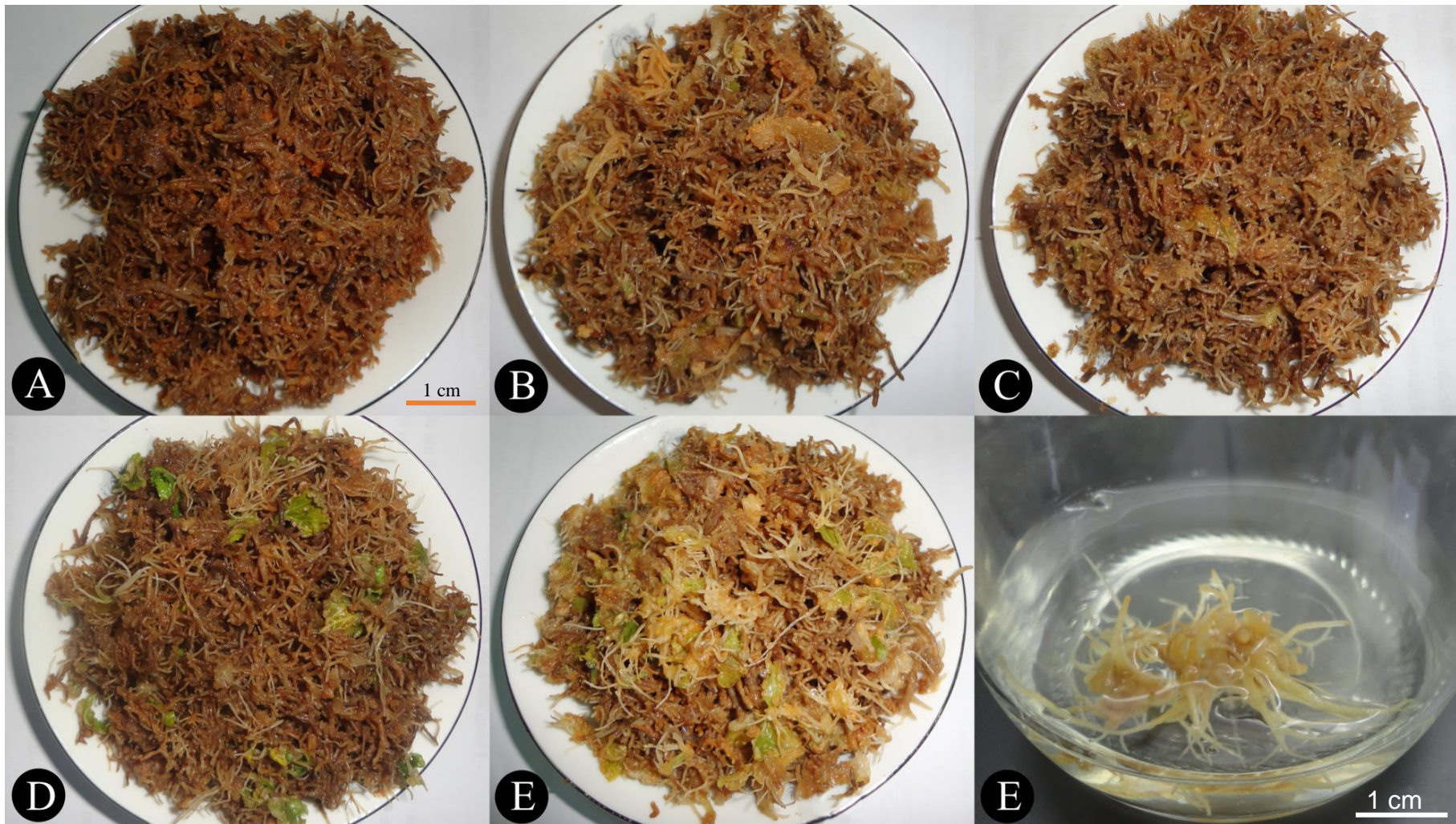
Các kết quả còn cho thấy, thời gian xử lý elicitor tỷ lệ nghịch với sự gia tăng sinh khối của RTC sâm Ngọc Linh, thời gian xử lý càng ngắn, RTC hình thành và phát triển càng tốt (Bảng 3.23). Do năng suất thu nhận ba saponin MR2, Rb1 và Rg1 tăng theo sự gia tăng KLT, nên khi lượng sinh khối thu nhận càng cao, hàm lượng cả ba saponin thụ nhận được càng cao; vì thế, kết quả cho thấy, năng suất ba saponin thu được đạt cao nhất ở nghiệm thức có thời gian xử lý ngắn nhất tại ngày thứ 40 của nuôi cấy (16 ngày trước khi thu hoạch) (Biểu đồ 3.7). Trong 1 g mẫu phân tích cho thấy, khi xử lý elicitor tại ngày thứ 10, 20, 30 của nuôi cấy, phần trăm hàm lượng MR2, Rg1 và tổng ba saponin giảm rõ rệt so với việc xử lý ngay từ đầu nuôi cấy, nhưng phần trăm hàm lượng Rb1 tăng dần lên và đạt cao nhất khi xử lý ở ngày thứ 20 (36 ngày trước khi thu hoạch). Dựa vào nồng độ $\mu\text{g/mL}$ suy ra từ

đường chuẩn, hàm lượng Rb1 (567,5 $\mu\text{g/mL}$) cũng đạt cao nhất khi xử lý ở ngày thứ 20; hàm lượng MR2 (882,7 $\mu\text{g/mL}$) và tổng ba saponin (1232,13 $\mu\text{g/mL}$) đạt cao nhất khi xử lý trong 46 ngày nuôi cấy trước khi thu hoạch (tại ngày thứ 10 của nuôi cấy); còn hàm lượng Rb1 (24,05 $\mu\text{g/mL}$) vẫn cao nhất khi xử lý ngay từ đầu nuôi cấy (trong suốt 56 ngày nuôi cấy) (Bảng 3.23).

Tóm lại, trong tất cả chỉ thu nhận về khả năng tích lũy saponin trong nuôi cấy RTC sâm Ngọc Linh từ RBD *in vitro*, năng suất tổng ba saponin thu nhận được là quan trọng nhất, do chỉ tiêu này được tính dựa theo hàm lượng tổng ba saponin trên tổng KLK thu được. Vì thế, để đạt được hiệu quả thu nhận saponin cao nhất, thời gian xử lý tốt nhất là trong 16 ngày trước khi thu hoạch sinh khối rễ trong nuôi cấy, tức là xử lý tại ngày thứ 40 của nuôi cấy.



Biểu đồ 3.7. Năng suất tổng hợp saponin ở các thời điểm xử lý với dịch chiết nấm men trong nuôi cấy rễ bất định sâm Ngọc Linh *in vitro*.



Hình 3.24. Ảnh hưởng của thời gian bổ sung dịch chiết nấm men lên sự tăng sinh và tích lũy saponin ở rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh *in vitro*.
A. Xử lý tại thời điểm T0 (ngay từ đầu nuôi cấy), **B.** Xử lý sau 10 ngày nuôi cấy (T10), **C.** Xử lý sau 20 ngày nuôi cấy (T20), **D.** Xử lý sau 30 ngày nuôi cấy (T30), **E.** Xử lý sau 40 ngày nuôi cấy (T40).

CHƯƠNG 4: BÀN LUẬN

1. TỐI ƯU HÓA NUÔI CÂY TẠO RỄ THỨ CẤP TỪ RỄ BẮT ĐỊNH *IN VITRO* SÂM NGỌC LINH

1.1. Ảnh hưởng của cách chọn mẫu rễ bắt định *in vitro* để tạo rễ thứ cấp

Các mô phân sinh sơ cấp, nằm tại đỉnh chồi hay chóp rễ, có vai trò quan trọng trong việc tạo chồi và RTC. Các vùng tế bào gốc của mô phân sinh chồi đỉnh và rễ có hai chức năng chính: tự đổi mới nhờ kết hợp với các tín hiệu duy trì và bảo vệ các mô phân sinh, và phát triển các tế bào cần thiết cho việc tái sinh cơ quan thông qua các hoạt động phân chia, kéo dài và biệt hóa [44]. Theo quan sát hình thái giải phẫu trong nghiên cứu này, từ vùng phát sinh RTC sâm Ngọc Linh của RBD *in vitro* dài 2 cm tái sinh từ cuống lá cho đến vùng tế bào gốc của mô phân sinh rễ được bảo vệ bởi các mũ rễ nằm ngoài chóp rễ. Các tế bào rễ này được tổ chức thành một khối hình trụ đồng tâm với một lớp ngoại bì (epidermis), tiếp đó là lớp nhu mô vỏ (cortex), lớp nội bì (endodermis), trung trụ (pericycle) và các mạch dẫn trung tâm với 2 cực xylem và phloem. Hơn nữa, các mẫu RBD này cũng có các vùng tầng trưởng. Điều này cho thấy, mẫu RBD *in vitro* đã trưởng thành và có đầy đủ chức năng như một rễ chính của cây sâm Ngọc Linh và có thể tạo thành các RTC.

Nguồn gốc hình thành RBD thực sự rất đa dạng, phức tạp và vẫn chưa biết được biết một cách rõ ràng bởi có rất nhiều yếu tố tác động lên quá trình này. Trong khi, quá trình hình thành RTC đã được nghiên cứu từ rất lâu, và các RTC được xác định là phát sinh từ phần trụ bì của miền sinh trưởng của rễ, nhưng không phải ở bất kỳ vị trí nào của trụ bì đều hình thành RTC, đặc biệt các nghiên cứu về sự hình thành RTC từ nguồn RBD còn rất hạn chế. Trong nghiên cứu này, các RBD tái sinh từ mẫu phiến lá nhiều hơn cuống lá [18], nhưng theo nghiên cứu này, các mẫu RBD tách ra từ phân mô tái sinh của cuống lá và thân củ phát triển nhanh hơn và hình thành nhiều RTC hơn các mẫu RBD tái sinh từ mẫu phiến lá. Theo các kết quả nghiên cứu về sự tái sinh RBD, RBD từ thân, lá và từ các phần mô không phải là trụ bì của rễ như thân củ có một số điểm khác nhau, tùy thuộc vào việc phát sinh RBD trực tiếp từ thân hay gián tiếp thông qua việc phát sinh mô sẹo. Trong đó, hầu hết

các mẫu phiến lá đều hình thành RBD gián tiếp qua mô sẹo, còn mẫu thân hay cuống lá thường phát sinh RBD trực tiếp ở lần phân chia đầu tiên từ tầng libe gỗ hay không bào [42]. Ngoài ra, RBD được biệt hóa từ cuống lá có chứa nhiều tín hiệu dẫn truyền IAA từ phần gốc thân, nên khởi động quá trình hình thành RTC nhanh hơn, bởi vì các RBD từ cuống lá chủ yếu hình thành từ các tế bào mạch dẫn phloem hay xylem [32]. Quá trình phát triển của hệ thống RTC chỉ được khởi động khi chu trình tế bào chuyển sang giai đoạn biệt hóa liên tục khi nhận tín hiệu từ mô phân sinh đỉnh từ phần phiến lá hay cuống lá truyền tới để huy động định kỳ các tế bào trụ bì chuyển thành những tiền tế bào để tạo RTC nằm ở miền sinh trưởng của rễ. Từ đó, quá trình này tạo ra các sơ khởi RTC và giúp hình thành nên các RTC mới [41]. Theo quan sát hình thái của RBD sâm Ngọc Linh, quá trình hình thành RTC sẽ không bị gián đoạn khi phần chóp rễ hay mô tái sinh bị tách bỏ sau khi các mô phân sinh đã hoạt hóa; vì một số RBD khi bỏ chóp rễ hay phần mô tái sinh vẫn hình thành RTC, nhưng số RTC và tỷ lệ tạo RTC ít hơn các RBD hoàn chỉnh. Điều này cho thấy, sự hình thành RTC bị ức chế khi tách bỏ phần mô tái sinh (phiến lá, thân củ và cuống); do quá trình hình thành RTC còn phụ thuộc vào dòng vận chuyển auxin từ phần ngọn trên mặt đất xuống phần rễ và cytokinin từ phần chóp rễ lên. Nhiều nghiên cứu cũng cho thấy khi cắt bỏ phần ngọn cây sẽ ảnh hưởng đến việc hình thành RTC [55]. Chính vì thế, kết quả trong luận án này cũng cho thấy, các RBD *in vitro* tái sinh trực tiếp từ mẫu cuống lá với chiều dài trên 2 cm không những có cấu trúc giống rễ chính của cây tự nhiên (gồm các miền sinh trưởng, miền lông hút, chóp rễ, đầu bao rễ, các bó mạch xylem và phloem, trụ bì và nội bì,...); mà quá trình hình thành và tăng trưởng của RTC đều trải qua đầy đủ các giai đoạn phát sinh RTC như ở rễ của một cây hoàn chỉnh.

1.2. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy

Thời gian nuôi cấy ở loài thực vật hoàn toàn khác nhau do đặc điểm một số cây trồng có chu kỳ sống ngắn thì thời gian nuôi cấy ngắn hơn, nhưng đối với các cây lâu năm như sâm Ngọc Linh, có thời gian nuôi trồng kéo dài hơn các loại cây thân thảo khác. Đối với *P. ginseng*, sự sinh trưởng của rễ tơ cũng được chia thành 3 giai đoạn: tốc độ sinh trưởng bắt đầu sau 14 ngày, sau đó chuyển sang pha cân bằng

sau 28 ngày và sinh trưởng chậm ở các giai đoạn tiếp theo và ngừng tăng sinh sau 74 ngày nuôi cấy. Nên cần phải cấy chuyển sau 14 ngày/lần để duy trì sự sinh trưởng nhanh chóng của rễ tơ [139]. Theo kết quả nghiên cứu của luận án, thời gian nuôi cấy tối ưu cho RTC sâm Ngọc Linh phát triển là 56 ngày, và có thể chia thành 3 giai đoạn phát triển: giai đoạn tăng sinh (giai đoạn phát triển mạnh nhất bắt đầu từ ngày thứ 14 đến 56, giai đoạn ổn định từ sau 56 ngày đến ngày thứ 70 và giai đoạn suy thoái bắt đầu biểu hiện sau ngày thứ 70 và trở về sau. Cho nên, kết quả này tương đồng với kết quả nghiên cứu trong nuôi cấy rễ của loài *P. ginseng* [139]. Ngoài ra, Dương Tấn Nhứt (2016) cho rằng để phơi hay rễ sâm Ngọc Linh tiếp tục phát triển RTC, sau thời gian tái sinh phải tiến hành cấy truyền, tốt nhất là tìm ra môi trường và điều kiện phù hợp cho mẫu tiếp tục tăng trưởng [13]. Trong đó, khi nhân giống cây sâm Ngọc Linh, để làm mới môi trường nuôi cấy cần phải cấy chuyển định kỳ vật liệu sau 48-60 ngày nuôi cấy [13]. Trong suốt thời gian nuôi cấy, sự sinh trưởng và tăng sinh của tế bào diễn ra liên tục nên chất dinh dưỡng trong môi trường nuôi cấy cạn kiệt dần; hơn nữa, thể tích môi trường dinh dưỡng trong bình nuôi cấy lại có giới hạn bởi kích cỡ của bình nuôi cấy [55][105]. Theo nghiên cứu của Hồ Thanh Tâm và cs (2013), tại tất cả các thí nghiệm, thời gian nuôi cấy tái sinh RBD sâm Ngọc Linh đều được duy trì dưới 60 ngày nuôi cấy [18]. Điều này tương đồng với kết quả của luận án, khi thời gian nuôi cấy kéo dài vượt qua 56 ngày, khả năng hình thành các RTC sâm Ngọc Linh và sự tăng sinh khối của RBD chậm lại và giảm mạnh sau 70 ngày nuôi cấy.

1.3. Ảnh hưởng của các chất điều hòa sinh trưởng thực vật

Để rễ phát triển có thể bổ sung thêm các gibberellin acid (GA3) hay 6-benzylaminopurine (BA) [23]. Bởi vì nuôi cấy RBD *P. ginseng* thường trải qua hai giai đoạn phát triển: Giai đoạn đầu, các auxin đóng vai trò chính trong điều hòa quá trình hình thành và kéo dài rễ và phát sinh RTC, tiếp đó rễ mẹ tăng kích thước theo chiều ngang khi cytokinin di chuyển lên ngọn [23][32]. Auxin tăng cường các hoạt động ban đầu của quá trình phát sinh RTC bao gồm tạo môi kích thích, chuyên hóa các tiền tế bào và khởi tạo rễ cũng như các giai đoạn hình thành mầm rễ và tạo RTC [23]. IAA, IBA và NAA là những hợp chất auxin thường được sử dụng để kích thích

sự phát sinh rễ. Để auxin đạt hiệu quả cao nhất, nồng độ sử dụng cho giai đoạn đầu nuôi cấy phải cao để khởi động được sự phân chia tế bào. Nếu hàm lượng auxin ban đầu quá thấp, sự kích thích tạo rễ sẽ không có hiệu quả đôi khi còn kìm hãm quá trình hình thành rễ. Có ý kiến cho rằng, nên cung cấp một lượng auxin thích hợp theo định kỳ trong chu trình nuôi cấy tạo rễ [32]. Theo kết quả này, 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 [66][133]. Xi-Hua và cs (2010) cũng đã chứng minh hiệu quả của IBA so với các auxin khác lên khả năng hình thành RTC trên môi trường MS và rễ thích ứng tốt hơn khi cấy chuyển sang điều kiện nuôi cấy khác khi ban đầu cấy trên môi trường có IBA [128]. Ngoài ra, theo nghiên cứu này cũng cho thấy, nồng độ auxin cao thường làm tăng khả năng tích lũy các hợp chất thứ cấp trong nuôi cấy rễ như gây tích lũy hàm lượng phenol và flavonoid. Khi tái sinh RBD từ phiến lá sâm Ngọc Linh, Hồ Thanh Tâm và cs (2013) cũng cho thấy IBA so với IAA và NAA không những giúp phiến lá tái sinh RBD tốt hơn mà còn làm tăng đáng kể hàm lượng ba loại saponin MR2, Rg1 và Rb1 cao hơn, đặc biệt Rb1 thu được cao hơn Rg1 [18]. Nghiên cứu của Kim và cs (2005) cũng cho thấy IBA là một auxin có hiệu quả nhất trong việc hình thành RTC cũng như giúp tăng cường khả năng tích lũy các hợp chất ginsenoside thuộc nhóm saponin [133]. Hahn và cs (2003) đã nghiên cứu hiệu quả của auxin lên sự hình thành cơ quan và sản xuất saponin từ nuôi cấy RBD *P. ginseng* C.A. Meyer [56]. Rễ và chồi của loài sâm này phát triển trong môi trường có chứa 2,4-D, NAA cũng không hiệu quả bằng việc sử dụng IBA, và IBA cũng cho sự gia tăng nhóm Rb cao hơn nhóm Rg [56].

Tỷ lệ auxin/cytokinin tạo sự khác biệt rất lớn trong tạo RTC *in vitro*. Kết hợp cả hai CDHST này giúp thiết lập thượng tầng chức năng tốt hơn và khi kết hợp auxin với cytokinin ở nồng độ thấp sẽ giúp tăng cường sự hình thành rễ mới [55]. Theo nghiên cứu của Xi-Hua và cs (2010), khả năng cải thiện sự hình thành và tăng trưởng RTC nhờ kết hợp auxin với cytokinin cũng đã được ghi nhận [128]. Theo kết quả từ nghiên cứu này, 0,1 mg/L Kin không những làm tăng sinh khối rễ mà còn làm tăng hàm lượng flavonoid lên so với đối chứng. Các kết quả nghiên cứu của luận án cũng cho thấy, việc bổ sung 0,5 mg/L Kin hay 0,5 mg/L BA hay 0,05 mg/L

TDZ kết hợp với 7 mg/L IBA đã cải thiện rõ rệt khả năng tăng trưởng của RTC sâm Ngọc Linh hình thành từ RBD *in vitro*; tuy nhiên, khi tỷ lệ về nồng độ auxin/cytokinin tăng lên sự hình thành của rễ giảm đi. Một số nghiên cứu khác cho thấy, trong quá trình nuôi cấy rễ bổ sung cytokinin với liều thấp và duy trì tỷ lệ auxin/cytokinin trên 1 rễ phát triển tốt hơn [26][35][55], thậm chí tỷ lệ này có thể trên 10 như theo môi trường nuôi cấy rễ *P. Ginseng* của Ali và cs (2007) [26]. Kết quả trong luận án này, tỷ lệ IBA/BA cũng cao hơn 10, và RTC sâm Ngọc Linh hình thành và tăng trưởng khá tốt. Hơn nữa, cytokinin phân bố dọc theo các phần rễ chính còn giúp điều hòa quá trình khởi tạo RTC và hình thành các mô thượng tầng chức năng, mô phân sinh trong rễ và giúp nâng đỡ tạo các chồi RTC trong quá trình hình thành RTC. Khi nghiên cứu quá trình phát triển của rễ cây đậu còn cho thấy, cytokinin có vai trò hình thành các dây trụ bì của rễ và kết hợp với các phytohormone khác điều hòa quá trình tăng trưởng của rễ như giúp sắp xếp các thượng tầng chức năng [32][55]. Zhang và cs (1996) còn cho thấy, Kin có thể ức chế sự phát triển tế bào của *P. notoginseng*, nhưng BA thì không và 2 mg/L IAA kết hợp với 0,07 mg/L Kin có thể cho hàm lượng saponin cao nhất [136]. Hơn nữa, một số đột biến lên hoạt động của auxin, như ức chế dòng vận chuyển auxin đã làm giảm đáng kể số lượng RTC, hay tăng hoạt động của các phytohormone như IAA đã giúp rễ trưởng thành hình thành quá mức RTC [48]. Ngoài ra, việc thêm NPA (một chất ức chế vận chuyển cực auxin) hoàn toàn ngăn chặn sự khởi tạo RTC. Ngoài tác động của auxin nội sinh, khả năng thẩm thấu các CĐHST trong môi trường cũng ảnh hưởng lớn đến chiều dài và khối lượng, tốc độ kéo dài của rễ và số RTC hình thành ở nhiều loài cây khác nhau [48].

1.4. Ảnh hưởng của môi trường khoáng

Môi trường khoáng được chú trọng bởi đây là yếu tố quyết định đến cả sự sinh trưởng, phát triển của mẫu cấy, cũng như hình thành các hợp chất thứ cấp trong quá trình nuôi cấy tế bào thực vật [106]. Trong luận án này, khả năng hình thành RTC của các mẫu RBD đơn không những chịu tác động của các CĐHST mà còn chịu tác động rất lớn của môi trường dinh dưỡng lên sự hình thành và tăng trưởng RTC sâm Ngọc Linh *in vitro*. Đa số các nuôi cấy rễ *P. ginseng* đều sử dụng môi trường MS

để tăng sinh khối cũng như các hợp chất ginsenoside vì nhu cầu hàm lượng K và P trong nuôi cấy rễ *P. ginseng* thường khá cao và thông thường môi trường MS giàu khoáng đa lượng nên rất thích hợp để RBD phát triển [46][50][51][75][81][130]. Theo nghiên cứu về RBD sâm Ngọc Linh của Nguyễn Thị Liễu và cs (2010) khi tiến hành tái sinh RBD từ phiến lá cho thấy, RBD có khối lượng cao nhất trên môi trường B5 chỉ có 0,5 mg/L IBA, nhưng màu sắc và hình thái rễ không tốt bằng nuôi cấy trên môi trường MS [11]. Nghiên cứu về việc tái sinh RBD sâm Ngọc Linh từ các loại mẫu khác nhau cho thấy, môi trường SH rất thích hợp cho cây sâm phát triển, cũng như tái sinh RBD [13]. Theo kết quả luận án thu được, mặc dù về mặt hình thái RTC hình thành trên môi trường SH tốt hơn trên môi trường B5 hay MS, nhưng khối lượng rễ và các chỉ tiêu khác thu được lại thấp hơn môi trường MS, chính vì thế rõ ràng môi trường MS hiệu quả hơn trong việc tăng sinh khối RTC. Ngoài ra, trong môi trường MS, khối lượng CaCl_2 (2,99 mM) cao gấp 2 lần môi trường SH (1,36 mM) và B5 (1,02 mM), không những vậy khối lượng $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ của MS (0,1 μM) bằng SH và cao hơn B5 (0,8 μM), mà Ca^{2+} và Cu^{2+} là tín hiệu chính trong chu trình tế bào để kích hoạt các hoạt động phân nhánh của rễ thực vật, hàm lượng hai ion này càng cao rễ phân nhánh càng mạnh [52][55][93][113]. Yu (2000) cũng báo cáo rằng, môi trường MS cho sinh khối rễ sâm Triều Tiên đạt cực đại; hơn nữa, trên nền môi trường MS khả năng sản xuất saponin ginsenoside của loài sâm này cũng hiệu quả nhất. Trong các nghiên cứu khác, việc ứng dụng môi trường vào nuôi cấy rễ các loài sâm khác cũng cho năng suất rất cao [75][76][77][78][79]. Khả năng gia tăng sinh khối của môi trường MS còn thể hiện trong các nuôi cấy rễ các loài thực vật khác như theo nghiên cứu của Aye và cs (2012), khả năng phát triển và tăng sinh của RBD cây Huang-qi (*Astragalus membranaceus*) cũng đạt sinh khối cao nhất khi nuôi cấy trên môi trường MS [31].

1.5. Ảnh hưởng của việc thay đổi tỷ lệ $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ trong môi trường MS

Hàm lượng các khoáng đa lượng như nitrate, potassium, ammonium và phosphate khi tăng lên sẽ làm tăng khả năng phát triển của tế bào, tuy nhiên có một số có tác dụng hạn chế sinh trưởng thực vật và giúp tăng cường các hợp chất thứ cấp [106]. Môi trường MS đặc trưng bởi nồng độ nitrogen cao thông qua các dạng

ion ammonium nitrate (NH_4^+) và potassium nitrate (NO_3^-) của NH_4NO_3 và KNO_3 [36]. Hàm lượng NH_4^+ cao được ghi nhận là làm ức chế quá trình hình thành rễ củ như ở cây *D. alata* [50]. Theo kết quả ghi nhận trong nghiên cứu này, hình thái RTC phát triển trên môi trường MS thường hóa vàng sau một thời gian nuôi cấy khi môi trường có auxin và cytokinin. Nhưng khi tỷ lệ $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ từ tỷ lệ khoảng (1/1) của MS thay đổi còn 1/2, RTC hình thành nhiều và tốt hơn, nhưng tăng tỷ lệ này hoặc loại bỏ NO_3^- rễ bị ức chế tăng trưởng dần. Tác động ức chế sinh trưởng này có thể do lượng NH_4^+ trong môi trường vẫn còn khá cao. Theo Yu (2000), khi nghiên cứu trên cùng dãy nồng độ này cũng cho thấy tỷ lệ $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ (1/2) cũng cho kết quả tốt nhất [130]. Nhiều nghiên cứu khác cho thấy, lượng NO_3^- cao rất tốt cho quá trình phát triển và tích lũy các hợp chất thứ cấp của RTC ở các loài nhân sâm [55][72][130]. 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 ở rễ và cây trồng [55]. Rễ và lá *Zingiber officinale* Rosc. phát triển kém hơn khi môi trường giữ nguyên lượng NH_4NO_3 trong môi trường MS, trái lại lá sẽ dài hơn và rễ tăng sinh tốt hơn khi nitrogen ở dưới dạng KNO_3 , không có NH_4^+ [36]. Zhang và cs (1996) nghiên cứu ảnh hưởng của nguồn nitrogen ảnh hưởng lên khả năng sản sinh saponin và các polysaccharide khi nuôi cấy tế bào *P. notoginseng*. Ngoài ra, theo kết quả khảo sát được, môi trường SH (tỷ lệ $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ là 1/2) cho sự phát triển hình thái RTC tốt hơn MS và B5, tuy lượng sinh khối thấp hơn MS nhưng vì RTC duy trì trên môi trường SH tươi hơn nên nuôi cấy để lâu hơn 56 ngày, RTC vẫn tiếp tục phát triển [136]. Chính vì vậy, nghiên cứu này thay đổi tỷ lệ $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ bằng với tỷ lệ $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ trong môi trường SH cũng cho hiệu quả tương tự và RTC phát triển và thu sinh khối tốt hơn trên MS.

1.6. Ảnh hưởng của ánh sáng

Ánh sáng là yếu tố vật lý không những tác động đến sự phát triển của rễ mà còn tác động đến quá trình trao đổi chất ở thực vật. Ánh sáng kích thích sản xuất các hợp chất thứ cấp như gingerol và zingiberene khi nuôi cấy mô sẹo cây *Z. officinale*. Hơn nữa, sự tương quan đồng thuận giữa cường độ ánh sáng và nồng độ của các chất phenol cũng được Anasori và cs (2008) ghi nhận [30]. Tác động của

ánh sáng lên sự hình thành rễ cũng đã được nghiên cứu rất nhiều. Mặc dù, điều kiện tối cần cho giai đoạn đầu của quá trình ra rễ, thông thường chu kỳ thích hợp để rễ phát triển là từ 3-10 ngày tùy thuộc vào từng loài cây. Đặc biệt, ánh sáng thường tạo tác động tích cực lên khả năng phân nhánh của RTC và tác động này đã được chứng minh và nghiên cứu trên cây *A. thaliana*; ngoài ra, Catherine và cs (2014) cũng ghi nhận các điều kiện ánh sáng cao làm tăng hàm lượng nitrogen nội sinh lên, điều này có ảnh hưởng tích cực đến việc hình thành RTC của cây *Euphorbia pulcherrima* Willd. khi bảo quản và vận chuyển dưới ánh sáng thấp [35]. Từ kết quả luận án có được cho thấy, ánh sáng ở giai đoạn sau của quá trình nuôi cấy (80% giai đoạn đầu trong tối, 20% thời gian còn lại để ngoài sáng) cũng tạo hiệu quả tích cực cho RTC của sâm Ngọc Linh tăng trưởng và tiếp tục phân nhánh. Hơn nữa, theo quan sát đường kính rễ cũng lớn hơn, mặc dù rễ hơi có màu xanh. Điều này có thể giải thích do dưới tác động của ánh sáng auxin bị phân hủy; đồng thời do tế bào bị hóa mộc làm thành tế bào dày lên. Hơn nữa, ánh sáng cũng giúp tăng khả năng tích lũy các hợp chất biến dưỡng thứ cấp khác nhau trong quá trình nuôi cấy nên làm gia tăng KKK [17]. Theo kết quả nghiên cứu của Hoàng Văn Cương và cs (2013) cũng cho thấy, ánh sáng có tác động tích cực lên sự tích lũy các hợp chất saponin Rg1, Rb1 và MR2 ở cây sâm Ngọc Linh [5].

1.7. Ảnh hưởng của nhiệt độ

Nhiệt độ ảnh hưởng rất lớn lên hoạt động trao đổi chất và vòng đời của thực vật, nhiệt độ cao có thể cảm ứng sự già hóa của thực vật nhưng làm tăng hàm lượng các hợp chất thứ cấp ở thực vật, thông thường đối với *P. ginseng* nhiệt độ phát triển phù hợp nhất là 25/20°C (ngày/đêm) [53]. Theo Schneider (2005), khoảng nhiệt độ thích hợp nhất cho đa số các cây trồng phát triển và tăng trưởng RTC là từ 20-27°C [114], ngoài ra theo nghiên cứu của Sivakumar và cs (2005), điều kiện thích hợp nhất để rễ phát triển là nuôi cấy lỏng trong tối ở 23±2°C trên môi trường MS có 30 g/L sucrose [116]. Khi khảo sát các điều kiện nhiệt độ thích hợp cho RTC sâm Ngọc Linh hình thành và tăng trưởng, các kết quả thể hiện là, nhiệt độ thấp (22°C) tối ưu cho RTC tăng sinh khối và tích lũy đầy đủ cả ba loại saponin với hàm lượng cao. Hơn nữa, do sâm Ngọc Linh tự nhiên phát triển ở vùng núi cao, quanh năm

nhệt độ mặt đất thường dưới 23°C nên rễ thường phát triển tốt ở nhiệt độ từ 25°C trở xuống, trong đó rễ sâm Ngọc Linh sau khi chuyển gen được ghi nhận là phát triển tốt ở 25°C [10]. Tác động của nhiệt độ lên sự tích lũy hợp chất thứ cấp cũng được Wu và cs (2007) nghiên cứu lên sự tích lũy của tổng hàm lượng caffeic acid trong RBD của *E. purpurea* nuôi cấy *in vitro*, kết quả hàm lượng chất này cũng đạt tối ưu ở nhiệt độ thấp (20°C) và khi tăng nhiệt độ lên 25°C, 30°C, tổng hàm lượng caffeic acid giảm [124].

1.8. Ảnh hưởng của pH

pH môi trường là một trong những yếu tố quan trọng của môi trường lý hóa trong quá trình phát triển rễ *P. ginseng* trong điều kiện nuôi cấy *in vitro* [130][133]. pH ảnh hưởng đến khả năng hòa tan của các ion trong môi trường khoáng, khả năng đông tụ agar và sự tăng trưởng của tế bào [106]. Sự thay đổi pH cũng làm ion H⁺ xâm nhập tự do vào thành tế bào, tạo ra pH tối ưu cho enzyme hoạt động nói lỏng thành tế bào. Ion H⁺ trong môi trường sẽ xâm nhập vào thành tế bào, hoạt hóa enzyme phân hủy các polysaccharide liên kết giữa các sợi cellulose lỏng lẻo hơn và tạo điều kiện cho thành tế bào giãn dưới tác dụng áp suất thẩm thấu của không bào trung tâm, kích thích phân chia tế bào [106].

Đối với sâm Ngọc Linh, khi nghiên cứu ảnh hưởng của pH lên nuôi cấy huyền phù tế bào sâm Ngọc Linh, pH thích hợp là 6,3 [6]. Theo kết quả nghiên cứu của Trịnh Thị Hương (2017), rễ chuyển gen sâm Ngọc Linh phát triển kém trong môi trường acid cao với pH dưới 4,8; và RTC phát triển tốt khi pH tăng lên 5,8 và không phát triển khi pH tăng cao hơn [10]. Theo kết quả này, pH = 5,3 là thích hợp nhất cho sự tăng sinh cũng như tích lũy saponin của RTC sâm Ngọc Linh nuôi cấy *in vitro*. Điều này xảy ra có thể do khi pH môi trường quá thấp, một số yếu tố trong môi trường nuôi cấy như nhôm và hydro trở nên độc đối với hệ thống rễ nuôi cấy; khi pH môi trường quá cao, và các chất dinh dưỡng như các yếu tố vi lượng có thể chuyển sang dạng liên kết làm giới hạn khả năng hòa tan, chuyển hóa và xâm nhập vào rễ nên rễ không hấp thụ được [116]. Ngoài ra, nhiều nghiên cứu cũng đã khẳng định giá trị pH của môi trường thay đổi vượt quá ngưỡng từ 5,0-6,5 sẽ ảnh hưởng xấu đến sự hấp thụ dinh dưỡng của tế bào nuôi cấy, ảnh hưởng trực tiếp hay gián

tiếp đến sự sinh trưởng của tế bào [55]. Khi nghiên cứu ảnh hưởng của pH lên sự tăng sinh rễ *P. ginseng*, Sivakumar và cs (2005) cũng cho thấy, pH 6,0- 6,5 là tối ưu cho rễ tăng trưởng và tích lũy các hợp chất saponin và pH dưới 4 hoặc trên 7,0 có tác động tiêu cực lên sự tăng sinh của rễ [116].

1.9. Ảnh hưởng của giá thể nuôi cấy

Giá thể nuôi cấy thường là các hợp chất trơ về mặt hóa học và có tác dụng nâng đỡ mẫu cấy trong các môi trường khác nhau. Các giá thể sử dụng trong nuôi cấy mô thực vật rất phong phú, trong đó ở Việt nam sử dụng phổ biến nhất là agar, gelrite và bông gòn. Gelrite là các polymer sinh học tinh chiết từ nuôi cấy vi khuẩn *Sphingomonas elodea*, agar là những hợp chất chiết xuất từ các loại rong biển *Gracilaria tenuistipitata*, bông gòn thường được sản xuất từ cây bông vải *Gossypium herbaceum*. Mỗi giá thể này đều có cấu trúc, độ toi xốp và khả năng dẫn truyền dinh dưỡng khác nhau, trong đó bông gòn có độ trơ về mặt hóa học cao và dễ dẫn truyền dinh dưỡng, nhưng do cấu trúc của các sợi bông xốp và thường tạo bề mặt nuôi cấy không bằng phẳng; vì thế, toàn bộ mẫu cấy thường khó tiếp xúc và hấp thu môi trường dinh dưỡng khi nằm trên các sợi bông gòn. Do vậy, trong nghiên cứu này RTC sâm Ngọc Linh hầu như không phát triển trên giá thể bông gòn, nhưng phát triển tốt trên giá thể gelrite và agar, và đạt hiệu quả tối ưu trên giá thể agar. Theo nghiên cứu của Trịnh Thị Hương (2017) cũng ghi nhận rễ tơ sâm Ngọc Linh phát triển tốt nhất trên giá thể agar, vì agar có chứa một số hợp chất vô cơ như Ca, Mg, K, Na,... có hiệu quả tích cực lên sự tăng sinh của rễ chuyên gen sâm Ngọc Linh [10]. Tuy nhiên, Natalia và cs (2014) khẳng định khi nuôi cấy RBD cây *Platycodon grandiflorum* trong môi trường lỏng lác thì chất lượng rễ và chiều dài rễ tối so với môi trường agar [96]. Hầu như rễ không hình thành lông hút khi nuôi cấy trên môi trường agar [106]. Trái lại, khi được nuôi trong môi trường lỏng lác, rễ phát triển bình thường với đầy đủ lông hút [55].

1.10. Ảnh hưởng của loại đường carbohydrate

Carbohydrate được bổ sung vào môi trường nuôi cấy *in vitro* như một loại đường carbohydrate để duy trì việc cung cấp carbon cho thực vật phát triển, cũng như duy trì khả năng thẩm thấu của tế bào nên giúp tăng khả năng hấp thu dinh

dưỡng của thực vật [117]. Các loại carbohydrate thường được sử dụng là sucrose, fructose, maltose và glucose. Sucrose được sử dụng rộng rãi trong nuôi cấy mô thực vật do đây là một loại đường phổ biến và có hiệu quả tốt nhất cho thực vật tăng trưởng và chi phí tương đối thấp [117]. Ngoài ra, nghiên cứu này cũng nói rằng sucrose còn có khả năng giúp thực vật sản xuất các phytohormone, nhất là tạo cho cây có sức sống cao hơn so với các loại đường khác. Theo kết quả của nghiên cứu này, trong các loại đường carbohydrate ở các nồng độ khác nhau, 30 g/L sucrose là cần thiết nhất cho sự phát triển của cây *Metroxylon sagu* Rottb [117]. Vì nguồn sucrose rõ ràng là một nguồn năng lượng không thể thiếu cho sự phân chia của tế bào và giúp tăng sinh khối trong nuôi cấy *in vitro* [117]. Theo Baskaran và Jayabalan (2005), các loại đường carbohydrate còn kiểm soát sự phát sinh hình thái của thực vật như giúp kéo dài tế bào, tăng độ cứng và giúp cấu thành nên thành tế bào, trong đó sucrose giúp tăng kích thước tế bào và duy trì áp suất thẩm thấu của tế bào, từ đó làm tăng đường kính của thân cây [33]. Al-Khateeb (2001) nhận thấy rằng, khi sử dụng 30 g/L sucrose còn giúp rễ kéo dài hơn với nhiều RTC hơn và nhiều nghiên cứu khác cũng khẳng định điều này [29]. Theo kết quả luận án này, 30 g/L sucrose cũng là tốt nhất cho RTC sâm Ngọc Linh hình thành và tăng trưởng từ RBD *in vitro*.

Tuy nhiên, một số nghiên cứu khác lại cho thấy, các loại đường carbohydrate khác có hiệu quả lên sự phát triển của thực vật hơn. Novero và cs (2010) đã sử dụng sucrose và sorbitol trong nuôi cấy cây cọ *in vitro* và phát hiện ra rằng môi trường tốt nhất cho sự phát triển của mẫu cấy là môi trường MS có sorbitol (22,5 g/L) và không có sucrose (7,5 g/L) [102]. Đường glucose không những giúp tăng cường sự tăng trưởng của rễ mà còn giúp chồi phát triển tốt nhất, nhưng loại đường carbohydrate cao có thể gây độc và ức chế sự phát triển của thực vật.

Ở sâm Ngọc Linh, Nhut và cs (2012) đã chứng minh rằng trong ba loại đường carbohydrate (D-glucose, sucrose và fructose) ở các nồng độ khác nhau, 30 g/L sucrose cho hiệu quả phát sinh phôi tốt nhất, phôi hình thành nhiều rễ và các phôi không có bất thường. Ngoài ra, khi nghiên cứu sự tăng trưởng của rễ chuyển gen của sâm Ngọc Linh trên môi trường không có CDHST, Trịnh Thị Hương (2017) ghi

nhận rằng 50 g/L sucrose là cần thiết cho rễ chuyển gen phát triển. Trong nghiên cứu của luận án này, cả đường sucrose và D-glucose đều có hiệu quả tăng trưởng và hình thành nhiều RTC, nhưng khi sử dụng 30 g/L sucrose cho sự phát triển hình thái rễ tốt hơn và đường sucrose không những dễ kiểm và có giá thành rẻ hơn, mà lượng sử dụng cũng thấp hơn D-glucose; cho nên, rõ ràng hiệu quả của sucrose trong môi trường nuôi cấy RTC sâm Ngọc Linh từ RBD *in vitro* là tốt nhất. Ngoài ra, theo nghiên cứu của Yu (2000) cho thấy sucrose tốt nhất cho RTC *P. ginseng* phát triển, đặc biệt là hiệu quả tích lũy saponin, với hàm lượng các ginsenoside cao gấp đôi khi sử dụng D-glucose ở nồng độ 30 g/L [130]. Theo nghiên cứu của Kim và cs (2005) cũng cho thấy, 30 g/L sucrose không những tối ưu cho rễ *P. ginseng* phát triển, mà còn giúp tích lũy được hàm lượng saponin đạt cao nhất trên sinh khối rễ thu được từ Bioreactor 3 L, với 2,5 g rễ thu được tổng saponin chiếm đến 0,25% [76].

1.11. Ảnh hưởng của thể tích môi trường nuôi cấy

Thể tích môi trường nuôi cấy thay đổi ảnh hưởng đến mật độ mẫu cây trong bình nuôi. Nghiên cứu của Lê Kim Cương và cs (2012) đã cho thấy, giữa các tế bào sâm Ngọc Linh có hiệu ứng tương hỗ, nếu mật độ tế bào khởi đầu quá cao cũng làm giảm mức độ tăng trưởng của mẫu cây, vì điều này gây ra sự cạnh tranh dinh dưỡng và lượng khí oxy, CO₂ hòa tan trong môi trường nuôi cấy. Theo kết quả nghiên cứu trên, thể tích môi trường phù hợp nhất cho mẫu huyền phù tế bào sâm Ngọc Linh phát triển là 30 mL trong bình 250 mL và khi thể tích môi trường lớn hơn 30 mL thì tốc độ phát triển của tế bào giảm dần [6]. Kết quả này tương đồng với các kết quả của luận án, với các RTC sâm Ngọc Linh hình và tăng sinh mạnh khi cho 25 mg mẫu RBD *in vitro* được nuôi cấy với 30 mL môi trường trong bình 250 mL.

Ngoài ra, theo nghiên cứu của Trần Hiếu và cs (2014), khối lượng mẫu cây có tác động lên sự tăng sinh RTC sâm Ngọc Linh trong bình tam giác 3 L với tỷ lệ tăng sinh khối của RTC đạt cao nhất khi lượng mẫu khoảng 7,5-10 g/L, tương ứng khoảng 25 mg trên 30 mL môi trường [9]. Jeong và cs (2002) cũng cho thấy, lượng mẫu khoảng 8 g/L là thích hợp nhất cho các nuôi cấy rễ tơ *P. ginseng* vì lượng oxygen trong nuôi cấy phù hợp cho khả năng hô hấp của mẫu [68]. Choi và cs (2000) đã chứng minh nếu lượng oxygen trong nuôi cấy thấp, chu trình citric không

thể hoạt động nên rẽ bước vào giai đoạn glycolysis và lên men lactic. Sự lên men này hạ thấp pH của tế bào kéo theo sự lên men rượu và làm giảm năng lượng ATP cho các quá trình biến dưỡng cơ bản và vận chuyển của tế bào [39][67]. Khi thiếu oxi, khả năng vận chuyển của H^+ vào không bào bị cản trở, độ cân bằng pH bình thường không được duy trì, H^+ thoát dần ra khỏi không bào và tế bào chất, làm tế bào chất bị acid hóa làm quá trình trao đổi chất của tế bào bị gián đoạn và dẫn đến sự chết tế bào [56][67][69].

1.12. Ảnh hưởng của hệ thống nuôi cấy

Kể từ năm 1960, Nickell và Tulecke đã sử dụng kỹ thuật lên men vi sinh vật lên việc nghiên cứu động học phát triển của huyền phù tế bào thực vật bậc cao, các quá trình chính diễn ra trong nuôi cấy dịch lỏng trên quy mô lớn, cùng với sự cải tiến hệ thống kiểm soát quá trình nuôi cấy [100]. Đến năm 1993, Inomata và cs đã thành công trong việc chuyển gen tạo rễ tơ bằng *Agrobacterium rhizogenes* để sản xuất saponin trong nuôi cấy rễ *P. ginseng* trong Bioreactor có cánh khuấy [65]. Hwang và cs (1996) đã thiết lập một quá trình nuôi cấy hai bước lên việc nuôi cấy và sản xuất ginsenoside bằng rễ tơ, việc sử dụng Bioreactor hình cầu 3 L đã cho thấy điều kiện sáng thích hợp cho việc tổng hợp ginsenoside và điều kiện tối cần cho sự tăng sinh của rễ [63]. Palazon và cs (2003) đã nghiên cứu sản xuất ginsenoside từ nuôi cấy rễ tơ *P. ginseng* trong Bioreactor cải tiến rất hiệu quả so với các nuôi cấy thông thường [105]. Ngoài ra, nghiên cứu của Wang và cs (2012) trên RBD *P. ginseng* C.A. Meyer cho thấy, tỷ lệ tăng sinh của RBD trong Bioreactor 3 L (51,92 lần) và 5 L (49,84 lần) cũng cao hơn trong bình tam giác 0,5 L (14,87 lần) [121]. Năm 2000, Choi và cs, Yu và cs đã thành công trong việc nuôi cấy trên quy mô lớn RBD *P. ginseng* trong hệ thống Bioreactor [38][130]. Các Bioreactor đã phát triển với nhiều hình dạng khác nhau như dạng hình bình tam giác, hình ống, hình cầu, hình bong bóng,... được cho là tạo hiệu quả tốt cho việc nuôi cấy tế bào và mô thực vật. Ngoài ra, các Bioreactor đã được kết nối với hệ thống kiểm soát của máy tính đã tạo ra những thuận lợi có sự khác biệt rõ ràng trong việc sản xuất nuôi cấy thương mại để có thể tự động hóa, tiết kiệm nhân công và giảm chi phí sản xuất [130].

Jeong và cs (2006) đã nghiên cứu ảnh hưởng của oxygen, carbon dioxide và ethylene lên sự tăng trưởng và quá trình sản xuất thành phần dược chất trên quá trình nuôi cấy RBD sâm Triều Tiên bằng Bioreactor [67]. Kết quả thí nghiệm của luận án này cho thấy, sự sục khí có vai trò quan trọng cho sự phát triển của mẫu trong điều kiện nuôi cấy ngập chìm hoàn toàn, do vậy hệ thống Bioreactor hình cầu và hệ thống bình tam giác có sự sục khí giúp RTC sâm Ngọc Linh phát triển rất tốt, đặc biệt ở Bioreactor hình cầu có cấu tạo hình cầu nên dòng khí sục lên phân tán đều trong bình nuôi cấy. Sự sục khí vào môi trường đã cung cấp một lượng O_2 hòa tan vào môi trường nuôi cấy, giúp cho quá trình trao đổi khí giữa tế bào, mô với môi trường xung quanh tốt hơn. Một trong những chức năng chính của Bioreactor là khả năng vận chuyển O_2 từ pha khí sang pha lỏng. Do O_2 chỉ hòa tan một phần trong nước nên để đáp ứng đủ nhu cầu O_2 cho sự sinh trưởng và phát triển tế bào thực vật, một lượng lớn O_2 cần được khuếch tán vào môi trường nuôi cấy [106]. Cho nên để đáp ứng tốt nhất nhu cầu O_2 cho sự phát triển của mô và tế bào thực vật, lượng O_2 hòa tan trong môi trường nuôi cấy luôn luôn phải lớn hơn ngưỡng O_2 hòa tan cực đại mà tế bào, mô hấp thụ. Nếu lượng O_2 hòa tan trong môi trường nhỏ hơn ngưỡng O_2 hòa tan cực đại mà tế bào mô hấp thụ, năng lượng ATP của tế bào sẽ giảm sút và điều này có thể ảnh hưởng tiêu cực đến sự trao đổi chất của tế bào và hình thái [106].

Các RTC sâm Ngọc Linh được nuôi cấy trong hệ thống Bioreactor sự sục khí còn giúp tăng đáng kể lượng saponin trong nuôi cấy so với hệ thống bình tam giác lỏng lắc và sự sục khí. Mặc dù sinh khối thu từ Bioreactor thấp hơn so với bình tam giác sự sục khí nhưng năng suất thu nhận tổng các saponin trên tổng khối lượng cuối cùng thu được cao hơn. Kết quả này cũng tương đồng với nghiên cứu của Kochan và cs (2012), sự phát triển của sinh khối trong bình tam giác tăng gấp đôi trong Bioreactor, ngược lại ginsenoside chỉ đạt 3 mg/g KKK trong bình tam giác và còn trong Bioreactor tăng gấp đôi (6 mg/g KKK) [81]. Theo Zhang và cs (2011), khi nuôi cấy các dòng RBD *P. ginseng*, hàm lượng tổng saponin cũng như từng ginsenoside thu được trong Bioreactor cũng cao hơn trong bình tam giác [135]. Hơn nữa, yêu cầu O_2 của tế bào thực vật là tương đối thấp cho sự tăng trưởng tế bào, nhưng có thể làm tăng đáng kể sự tổng hợp các chất chuyển hóa [106]. Kết quả này

tương tự như nghiên cứu của Kochan và cs (2012) trên rễ tơ của *P. quinquefolium*, tổng hàm lượng các saponin thu được từ hệ thống bình tam giác lỏng lắc (3%) thấp hơn hệ thống Bioreactor nhỏ giọt dinh dưỡng (6%) [81].

2. ẢNH HƯỞNG CỦA ELICITOR LÊN KHẢ NĂNG TÍCH LŨY SAPONIN TRONG NUÔI CÂY TẠO RỄ THỨ CẤP *IN VITRO*

Việc sinh tổng hợp các hợp chất thứ cấp diễn ra theo rất nhiều con đường trao đổi chất khác nhau. Con đường shikimate được tìm thấy ở thực vật và vi sinh vật, nhưng không có ở động vật; con đường này gồm hàng loạt các bước trao đổi chất bắt đầu từ cặp đôi phosphoenolpyruvate và erythrose-4-phosphate tạo ra acid chorismate, tiền chất của các aminino acid như phenylalanine, tyrosine và tryptophan,... sau đó, tổng hợp các phenolic, flavonoid, lignin,... đặc biệt là sinh tổng hợp rất nhiều hợp chất thứ cấp chứa nitrogen [44]. Các hợp chất thứ cấp như panaxynol và panaxydol ở cây sâm *P. ginseng* đã được chứng minh là sinh tổng hợp theo con đường này [80], sâm Ngọc Linh cũng chứa nhiều các hợp chất này. Từ những tiền chất có được, các hợp chất saponin đặc trưng cho sâm Ngọc Linh với các đại diện chính là MR2, và các ginsenoside như Rg1, Rb1,... được sinh tổng hợp thông qua hai con đường là MAV và MEP, cả hai đều hình thành IPP và DMAPP để dưới xúc tác của các enzyme FPS, SS và SE tạo thành 2,3-oxidosqualene là tiền chất để tổng hợp các sterol tạo ra MR2 dưới xúc tác của CAS, và các tiền chất tạo ra các ginsenoside nhờ các enzyme β AS, DDS và các cytochrome P450 [94]. Để kích thích các gen liên quan đến các enzyme này, việc sử dụng các elicitor đã cho thấy sự biểu hiện quá mức của các gen này ở trên các loài sâm nuôi cấy *in vitro* [46][94].

2.1. Ảnh hưởng riêng lẻ của các elicitor lên khả năng tích lũy saponin trong nuôi cấy tạo rễ thứ cấp *in vitro*

Cấu trúc của hệ thống rễ được điều hòa để đối phó với sự thiếu hụt nguồn khoáng và nước do phụ thuộc vào môi trường sinh học (hệ vi sinh vật, động vật và thực vật xung quanh). Sự điều hòa này dựa trên sự điều hòa phát triển các rễ sơ cấp thông qua các hoạt động phân chia và kéo dài, cũng như điều sự phân nhánh các RTC và RBD [44]. Hơn nữa, trong nghiên cứu này cho thấy mối tương tác với môi trường sinh học còn giúp thực vật thích nghi thông qua cơ chế phòng vệ bằng các

phytoalexin như các saponin, một dạng của hợp chất thứ cấp chỉ sinh ra khi cây bị kích thích từ môi trường bên ngoài.

2.1.1. Ảnh hưởng của chitosan

Chitosan (CHN) được biết đến như một elicitor sinh học có hiệu quả lên quá trình trao đổi chất sinh tổng hợp các hợp chất thứ cấp trên nhiều loài thực vật *Cistanche deserticola* làm tăng khả năng sản xuất các glycoside phenylethanoid lên gấp 3,4 lần so với đối chứng không có CHN, ngoài ra khi xử lý CHN ở nồng độ 25 mg/L trong nuôi cấy rễ cây *Stemona sp.* cho khả năng sản xuất *Stemona* alkaloid đạt cao nhất, hơn nữa còn giúp tăng cao việc sản xuất 1', 2'-didehydro-stemofoline lên 2,65 lần và stemofoline lên 2,95 lần so với đối chứng [97]. Hiệu quả của CHN lên sự tăng trưởng của rễ tơ *P. ginseng* cũng đã được khảo sát, kết quả cho thấy CHN ức chế sự tăng trưởng của rễ, nhưng có hiệu quả tích cực lên khả năng sản xuất các alkaloid [61].

Khi sử dụng chitin và CHN vào nuôi cấy để sinh tổng hợp các hợp chất thứ cấp sẽ làm tăng cường phản ứng phòng vệ ở thực vật trong cả cây một lá mầm và hai lá mầm. Những phản ứng này bao gồm quá trình gây bần hóa vách tế bào, thay đổi các dòng ion qua màng tế bào, gây nhiễm độc tế bào, khử cực màng tế bào và gây phosphoryl hóa protein; ngoài ra, còn kích hoạt các enzyme chitinase và glucanase, sinh tổng hợp phytoalexin, tạo ra các loại phản ứng oxy hóa, sinh tổng hợp JA, và gây biểu hiện sớm các đáp ứng miễn dịch đặc trưng, cùng các gen liên quan đến phản ứng phòng vệ. Ngoài ra, CHN đã được báo cáo là gây cảm ứng hình thành callose, chất ức chế proteinase, và sinh tổng hợp phytoalexin ở nhiều loài cây hai lá mầm như ở *P. ginseng*. Phản ứng của thực vật với chitin, CHN, và các oligosaccharides rất khác nhau tùy thuộc vào mức độ acetyl hóa của mỗi loài [22]. Ngoài ra, theo nghiên cứu của Laura và cs (2013), CHN có hiệu quả lên việc sinh tổng hợp H₂O₂ nội sinh ở nồng độ 1000 µg/mL bổ sung sau 1/3 thời gian xử lý lá *Capsicum annuum* L. [85].

Nghiên cứu trên sâm *P. ginseng* cũng cho thấy, nồng độ xử lý tối ưu là khoảng 100 mg/L CHN cho tế bào phát triển và tích lũy saponin với thời gian bổ sung là khoảng 2/3 thời gian nuôi cấy [62]. CHN đặc biệt kích thích hoạt động của kinase

protein 39 kD và 42 kD trong tế bào *P. ginseng*, nhưng PD98059 có thể ức chế con đường tín hiệu protein kinase hoạt hóa phân bào (MAPK) [62]. Việc sử dụng phương pháp gây kết tủa miễn dịch (IP) khi sử dụng kháng thể MAPK hoặc thử nghiệm kinase *in vitro* cũng cho thấy, enzyme protein kinase 39 kD và 42 kD được hoạt hóa bởi CHN thuộc nhóm MAPK. PD98059 có thể ngăn các phiên mã của squalen synthase và các gen của squalene epoxidase (gss và gse) ở *P. ginseng* được tạo bởi CHN, đồng thời dẫn đến tích lũy β -amyrin (β -AS) và sinh tổng hợp saponin. Những kết quả này cho thấy, tác động của CHN liên quan đến MAPK rất cần thiết cho việc tổng hợp saponin. EGTA và LaCl_3 bị ức chế bởi hoạt động MAPK 39 kD và 42 kD. Ruthenium red (RR) có thể chặn hoạt động của protein 39 kD. Tất cả chúng đều ức chế con đường tổng hợp saponin nhờ CHN. Những kết quả này còn chỉ ra rằng, sự gia tăng Ca^{2+} trong tế bào chất là cần thiết cho CHN gây cảm ứng tổng hợp saponin. PD98059 cũng đã ức chế sự bùng phát oxy hóa do CHN gây ra (bao gồm tăng hoạt động của NADPH oxidase và sản sinh H_2O_2), nhưng diphenylen iodon (DPI), dimethylthiourea (DMTU) và 2,5-dihydroxycinnami (DHC) không thể ngăn các hoạt động MAPK do CHN gây ra, như vậy MAPK đã hoạt động ngược dòng của CHN làm bùng phát các phản ứng oxy hóa [62].

Nghiên cứu về CHN trên sâm Ngọc Linh cho thấy, nồng độ 100 mg/L CHN cho khả năng tích lũy saponin cao nhất so với các nồng độ CHN khác về Rg1 (1,63%) và tổng 3 loại saponin (2,02%) (Bảng 1). Kết quả của nghiên cứu này cũng phù hợp với nghiên cứu Hu và cs (2004) trên *P. ginseng*, nồng độ xử lý tối ưu là khoảng 100 mg/L CHN cho tế bào duy trì khả năng phát triển và tích lũy ginsenoside và thời gian bổ sung là khoảng 2/3 thời gian nuôi cấy, tại nồng độ này hoạt động của β -Amyrin synthase được tăng cường, đây là một trong những enzyme quan trọng để mở khóa cho quá trình sinh tổng hợp các triterpenoide saponin. Theo Caiyan và cs (2011), Việc sử dụng 100 mg/L CHN trên lá không gây hại cho sự tăng trưởng của *Artemisia annua* mà còn giúp lượng hydrogen peroxide (H_2O_2) và anion superoxide (O_2^-) lần lượt tăng 1,4 và 3,0 lần so với nhóm đối chứng. Ngoài ra, CHN còn tăng phản ứng oxy hóa (ROS) nên làm tăng tốc chuyển đổi dihydroartemisinic acid thành artemisinin [34][35].

2.1.2. Ảnh hưởng của dịch chiết nấm men

Dịch chiết nấm men (YE) cũng là một elicitor có hiệu quả lên con đường sinh tổng hợp các hợp chất thứ cấp ở thực vật. Xử lý YE trong nuôi cấy cây *Stemona* sp. có hiệu quả tiêu cực lên sự phát triển của rễ; tuy nhiên, một số nghiệm thức như xử lý chỉ với 100 mg/L YE lại có hiệu quả tích cực lên sự tăng trưởng của rễ. Tuy nhiên, khả năng sản xuất các alkaloid tăng ở tất cả các nghiệm thức được xử lý với YE và đạt tối ưu ở nồng độ 50 mg/L [97]. Trong luận án này, khi nuôi cấy RTC sâm Ngọc Linh, YE cũng tăng sinh khối lên so với đối chứng khi bổ sung ở nồng độ thấp (50 mg/L YE), nhưng khi tăng quá 100 mg/L YE sinh khối giảm rõ rệt; nhưng hàm lượng các saponin (Rg1, Rb1 và MR2) tăng lên đáng kể so với đối chứng. Trước đây, YE cũng được sử dụng như các chất dinh dưỡng để tăng sinh khối cho các nuôi cấy tế bào, mô sẹo và rễ [57][107]. YE thường được sử dụng như một elicitor sinh học có nguồn gốc từ thành tế bào vi sinh vật để kích thích và tăng cường sản sinh các chất chuyển hóa thứ cấp. Các báo cáo khác cũng cho thấy, YE làm tăng cường sự phát triển của cây, do hàm lượng amino acid cao [57][59][107]. Tuy nhiên, các loài thực vật khác nhau phản ứng theo những cách khác nhau đối với từng nồng độ YE, trong nuôi cấy sâm Ngọc Linh việc bổ sung nồng độ YE quá cao trên 100 mg/L làm ức chế sự tăng trưởng, trong khi nồng độ thấp hơn có lợi sự phát triển của mẫu cấy. Xử lý lá với YE còn làm tăng tỷ lệ đạm, protein và carbohydrate. YE có tác dụng kích thích đối với sự phân chia và gia tăng kích thước tế bào, tổng hợp protein, nucleic acid và sự hình thành chlorophyll [32]. YE còn có chứa chất bảo vệ, tức là đường, protein, amino acid và cùng một số vitamin cải thiện sự tăng trưởng, ra hoa và kết quả của một số cây trồng bằng cách nuôi cấy lá với chiết xuất từ nấm men [57]. YE được cho là nguồn cytokinin tự nhiên và có tác động kích thích nảy chồi ở cây đậu [57]. Điều quan trọng là, YE còn giúp tăng hoạt động của các gen quan trọng trong quá trình trao đổi chất giúp tăng khả năng sản xuất các hợp chất thứ cấp như saponin, alkaloid, tanshinone [32][40][138]. Các tác giả cũng ghi nhận, YE đóng vai trò như một nguồn nitrogen sinh học giúp kích thích sự sinh trưởng của thực vật, cũng như làm tăng khả năng sản sinh ra các hợp chất thứ cấp đặc biệt là các saponin ở *P. ginseng*.

Trong nuôi cấy RBD *P. ginseng*, Rahimi và cs (2014) đã xác định, YE có tác dụng làm gia tăng đáng kể hàm lượng các ginsenoside saponin ở nồng độ 3 g/L. Tại nồng độ này đã kích thích sản xuất bacchotricuneatin C, guaiazulene, isochiapin B và p-benzoquinone sesquiterpenoid; từ đó, giúp biểu hiện các gen IPP và FPS có vai trò quan trọng trong quá trình trao đổi chất sinh tổng hợp các triterpenoide saponin [108]. Kết quả của luận án ghi nhận trong dãy nồng độ từ 50-200 mg/L, nồng độ YE thích hợp nhất cho RTC tăng sinh khối và tích lũy hợp chất thứ cấp là 150 mg/L với hàm lượng các saponin Rg1, Rb1 và MR2 đạt rất cao, đặc biệt tổng ba saponin (3,513%) và năng suất tích lũy saponin từ tổng sinh khối rễ khô thu được cũng đạt cao nhất tất cả các elicitor được khảo sát. Trong nuôi cấy rễ cây *Portulaca oleracea*, Pirian và Piri (2013) chỉ ra rằng lượng YE tốt nhất để thu nhận chất noradrenaline là 250 và 500 mg/L [107]. Theo nghiên cứu của Loc và Giang (2012), hiệu quả YE để gia tăng hàm lượng asiaticoside (thuộc nhóm triterpenoide saponin) cao hơn khi sử dụng 2-hydroxybenzoic acid và nồng độ tốt nhất là 4 g/L bổ sung sau 10 ngày nuôi cấy tế bào rau má [88].

Hiệu quả của YE cũng đã được ghi nhận nhiều trên các đối tượng khác nhau [57][112]. Trong nuôi cấy rễ cây *Portulaca oleracea*, Pirian và cs (2013) chỉ ra rằng lượng YE tốt nhất để thu nhận noradrenaline ở nồng độ 250 và 500 mg/L [107]. Hasanloo và cs (2009) cho thấy, hiệu quả của YE lên nuôi cấy rễ tơ *Silybum marianum* L. tương quan với thời gian nuôi cấy, và sự tổng hợp đạt tối đa là 0,47 mg/g KLK trong 72 giờ sau khi nuôi cấy (gấp 2 lần so với đối chứng). Hoạt tính lipoxygenase và hàm lượng linoleic acid được kích thích bằng YE; qua đó, con đường JA làm trung gian cho sự tích lũy silymarin. Hàm lượng H₂O₂ tăng 24 giờ sau khi kích thích và không có thay đổi đáng kể giữa 48 và 72 giờ. Ngoài ra, hàm lượng tocopherol (đặc biệt là α - và δ -tocopherol) tăng 72 giờ sau khi xử lý so với các môi trường không được xử lý. Ascorbate có sự thay đổi theo thời gian xử lý và thấp hơn so với đối chứng. Hoạt tính chống oxy hoá được xác định với 1-1 diphenyl-2-picrylhydrazyl tăng lên đáng kể khi được xử lý với YE, đặc biệt là 24 giờ sau khi xử lý, với những thay đổi liên quan đến hàm lượng H₂O₂. Những quan sát này cho thấy, các loại oxy hoạt tính có thể là tín hiệu trung gian dẫn đến con

đường tín hiệu JA giúp sản xuất silymarin [59].

Ngoài ra, bước đầu tiên trong sinh tổng hợp saponin trong cây cũng liên quan đến việc tạo vòng của 2,3-oxidosqualene thành các loại saponin cũng được điều hòa bởi YE thông qua việc điều hòa các enzyme β - amyrin synthase đã được xác định ở *P. ginseng* [83].

2.1.3. Ảnh hưởng của abscisic acid

Abscisic acid (ABA) là một CDHST quan trọng cho sự phát triển của hạt, sự phát triển của rễ và khí khổng của lá. ABA cũng liên quan đến khả năng thích nghi của thực vật với các stress môi trường khác nhau, như nước, hạn hán và áp suất lạnh. Sự ức chế tốc độ tăng trưởng RTC thể hiện rõ ràng ở hai loài đột biến có và không nhạy cảm với ABA (*abi4* và *abi5*). Ngoài ra, ABA cũng đóng một vai trò trung gian kích thích sự kéo dài RTC. Với sự hiện diện của 1 $\mu\text{M/L}$ ABA, sự phát triển của RTC đã bị ức chế ở *A. thaliana*. Điều này xảy ra ngay sau khi sự xuất hiện của mầm RTC từ rễ mẹ và ngay trước khi kích hoạt các mô phân sinh của RTC. Tuy vậy, ABA cũng không phải hoàn toàn gây bất lợi cho sự phát triển của rễ, 10 $\mu\text{M/L}$ ABA dẫn đến khởi tạo và phát sinh nhiều lông hút ở các rễ mới. Kết quả luận án này cho thấy, việc bổ sung ABA vào môi trường nuôi cấy sẽ gây ức chế rất mạnh lên sự phát triển RTC sâm Ngọc Linh, sinh khối giảm hơn một nửa so với đối chứng.

Đối với khả năng điều hòa quá trình sinh tổng hợp các hợp chất thứ cấp, ABA là một elicitor có bản chất là CDHST, nhưng có hiệu quả cao lên quá trình sản xuất nhiều hợp chất thứ cấp ở các loài thực vật khác nhau; và tác dụng này của ABA đã được khẳng định trong nuôi cấy rễ của nhiều loài thực vật *in vitro*. ABA giúp tăng tích lũy một số alkaloid trong các nuôi cấy tế bào *Catharanthus roseus* và cây cỏ rễ máu [137]; hay kích thích sản sinh taxol trong nuôi cấy tế bào *Taxus* spp. [73]; cảm ứng tích lũy hydroxycinnamic, các acid amin và tryptophan ở nuôi cấy *Hordeum vulgare* L. [95]. Nghiên cứu ảnh hưởng của ABA lên sự tích lũy của tanshinone trong nuôi cấy rễ *Salvia miltiorrhiza* sau 7 ngày cho thấy, sự phát triển của rễ tơ *Salvia miltiorrhiza* cũng bị ức chế bởi ABA, nhưng khi sử dụng 20 $\mu\text{M/L}$ ABA thì tác động này không đáng kể, mà hàm lượng tanshinone như tanshinone I, cryptotanshinone, dihydrotanshinon I và tanshinone II A tăng lên đáng kể tương

ứng gấp 5,4; 9,5; 1,5 và 1,8 lần so với nhóm đối chứng sau khi xử lý 210 $\mu\text{M/L}$ ABA [115]. Ngoài ra, ABA cũng kích thích khả năng sản xuất các hợp chất ajmalicin trong nuôi cấy rễ *Rauwolfia verticillata* [37]. Tuy nhiên, ABA đôi khi lại làm giảm sự tích lũy một số biến dưỡng thứ cấp như ức chế sự tích lũy các hợp chất thứ cấp và ức chế sự phát triển RTC ở cây đậu nành [48].

Theo nghiên cứu của Trịnh Thị Hương (2017), ABA cũng không có lợi cho rễ tơ sâm Ngọc Linh phát triển, mà chỉ có hiệu quả cho sự tích lũy saponin, trong đó nghiệm thức sử dụng 1 mg/L ABA là hiệu quả nhất với tổng hàm lượng saponin đạt 22,9% gấp 4 lần đối chứng. Việc bổ sung ABA vào nuôi cấy RTC sâm Ngọc Linh trong luận án này có lượng thấp hơn ở nghiên cứu của Trịnh Thị Hương (2017), nhưng khả năng phát triển của RTC sâm Ngọc Linh vẫn bị ức chế, mặc dù khả năng tích lũy saponin của ABA có hiệu quả rõ rệt hơn. Trong đó, nồng độ 150 $\mu\text{g/L}$ là tốt nhất để tích lũy MR2 với hàm lượng đạt 1,65%, Rg1 đạt 1,5%, Rb1 đạt 0,3% và tổng 3 loại saponin đạt 3,5%. Ngoài ra, hàm lượng Rb1 còn tiếp tục tăng nếu tăng nồng độ ABA lên 200 $\mu\text{g/L}$. Hơn nữa, con đường tổng hợp các hợp chất thứ cấp dưới tác động của ABA được chứng minh là liên quan đến các enzyme trong con đường sinh tổng hợp các triterpenoid saponin [137][138]. ABA kích thích enzyme β -amyrin synthase làm tăng phiên mã lên 2,5 lần dẫn đến tăng hàm lượng các saponin trong nuôi cấy huyền phù tế bào *Medicago truncatula* sau 1 giờ xử lý với ABA [91]. Dù ABA thực sự chứng tỏ được vai trò sinh tổng hợp các saponin nhưng do chúng ức chế khả năng phát triển của rễ quá mạnh nên năng suất sản xuất saponin của ABA thấp hơn các elicitor khác đặc biệt là YE.

2.1.4. Ảnh hưởng của salicylic acid

Salicylic acid (SA) là một elicitor quan trọng trong việc kích hoạt các gen liên quan đến phản ứng phòng vệ và có ảnh hưởng lớn đến khả năng tích lũy các hợp chất thứ cấp ở thực vật, đặc biệt ở các cây dược liệu và các loài nhân sâm quý. SA là tín hiệu gây đáp ứng miễn dịch ở tất cả loài thực vật, nhưng tác động của nó ở mỗi loài cây rất khác nhau, trên từng bộ phận cũng không giống nhau [95][137]. Xử lý với 1,0 mM SA, hàm lượng ginkgolide A, và ginkgolide B sản xuất tăng gấp 3,1 và 6,1 lần tương ứng, so với đối chứng, và SA còn kích thích sự giải phóng các chất

chuyển hóa này vào môi trường nuôi cấy [71]. SA ở nồng độ 6,7 và 10 mM SA gây sản sinh ra H₂O₂ nội sinh trong nuôi cấy *C. annuum* L. dẫn tới hoạt hóa các enzyme catalase (CAT) và phenylalanine amoniac lyase (PAL), cũng như giúp biểu hiện gen của *cat1*, *pal*, và protein liên quan đến các gen pathogenesis (*pr1*) [85].

Trong các loại elicitor đã khảo sát, kết quả luận án cho thấy SA cho khả năng tích lũy saponin tương đối thấp hơn so với YE, ABA và JA trên 1 g mẫu khô RTC sâm Ngọc Linh, nhưng năng suất tích lũy saponin trong toàn bộ sinh khối rễ thu được cao hơn JA, ABA và CHN và chỉ thấp hơn YE. Trong dãy nồng độ được khảo sát từ 50-100 µg/L SA, 50 µg/L SA là tối ưu cho RTC sâm Ngọc Linh phát triển và tích lũy các hợp chất saponin (Rg1 0,675%, Rb1 0,248% và MR2 0,867%), cũng như tổng 3 loại saponin (1,79%) cao hơn so với các nồng độ SA khác, mặc dù RTC bị ức chế tăng trưởng nên sinh khối không cao bằng đối chứng, do tác động kích thích miễn dịch mạnh của SA. Trong nghiên cứu Trịnh Thị Hương (2017), khi bổ sung SA vào đầu giai đoạn nuôi cấy rễ chuyển gen sâm Ngọc Linh cho thấy 20 µg/L SA là tối ưu với tổng saponin đạt 2,7%. Nghiên cứu của Mohammad và cs (2006) trên đối tượng *P. ginseng* C.A. Meyer còn cho thấy, việc bổ sung SA (200 µM) có tác dụng kích thích tăng tích lũy saponin trong nuôi cấy rễ của loài sâm [92]. Hơn nữa, nghiên cứu của Rahimi và cs (2014) cũng xác định khi xử lý các RBD *P. ginseng* với 200 mg/L SA trong 24 giờ giúp làm tăng đáng kể khả năng biểu hiện các gen lipoxygenase (LOX) tổng hợp JA nội sinh là dẫn xuất quan trọng để tổng hợp các saponin ở *P. ginseng* [108]. Trong phản ứng với 0,2 mM SA, saponin tăng gấp 3 lần trong nuôi cấy RBD *P. ginseng* [40]. Ngoài ra, nhiều nghiên cứu cũng cho thấy SA có hiệu quả tích cực lên sinh tổng hợp các saponin ở rễ *P. ginseng* và có hiệu quả tiêu cực lên sự phát triển của rễ [27][50][69][68][104][134].

2.1.5. Ảnh hưởng của jasmonic acid

Vai trò điều hòa tổng hợp các hợp chất thứ cấp của JA đã được nghiên cứu rộng rãi trên nhiều đối tượng thực vật khác nhau. Jasmonic acid (JA) có rất nhiều dẫn xuất khác nhau được sử dụng trong nuôi cấy mô thực vật như JA, MeJA, HEJ... Từ lâu, JA đã được xem như là những hợp chất chuyển đổi các tín hiệu elicitor để sản sinh các hợp chất biến dưỡng thứ cấp. Khi xử lý thực vật với JA,

ngoài vai trò khởi động quá trình lão hóa, JA còn tham gia vào con đường truyền tín hiệu và kích thích các enzyme xúc tác trong các phản ứng hóa sinh, hình thành các hợp chất thứ cấp trong cây như polyphenol, alkaloid, quinone, terpenoid và polypeptide. Vì vậy, con đường truyền tín hiệu JA đóng vai trò như một tín hiệu không thể thiếu trong quá trình sinh tổng hợp nhiều hợp chất thứ cấp ở thực vật [137].

Khi xử lý các nuôi cấy *P. ginseng* với JA đã hoạt hóa con đường sinh tổng hợp nhiều hợp chất saponin khác nhau, đặc biệt là nhóm ginsenoside. Điều này có thể được giải thích là do trong con đường sinh tổng hợp ginsenoside, JA có khả năng cảm ứng các enzyme quan trọng cho quá trình tích lũy ginsenoside [123]. Trong bài tổng quan của Christensen (2009) còn mô tả một dẫn xuất của JA là HEJ giúp làm tăng sản lượng ginsenoside gấp 2-4,4 lần trong nuôi cấy huyền phù tế bào *P. ginseng*, do tác động lên rất nhiều enzyme khác nhau liên quan đến con đường tổng hợp ginsenoside [40]. Khi xử lý với 5 mg/L JA vào ngày thứ 7 trước khi thu hoạch, hàm lượng các saponin trong *P. ginseng* tăng gấp 4 so với đối chứng, chứng tỏ JA thực sự có hiệu quả trong việc tăng cường tích lũy các hợp chất saponin. Khi nghiên cứu trên đối tượng *P. notoginseng*, Hu và Zhong (2007) xử lý 2-hydroxyethyl jasmonate (HEJ), kết quả cho thấy hoạt tính của hai enzyme protopanaxdiol 6-hydroxylase (P6H) và UDPG-ginsenoside Rd glucosyltransferase (UGRdGT) tăng lên dẫn đến hàm lượng ginsenoside-Rb1, Rg1 cũng như tỷ lệ Rb/Rg tăng. Ngoài ra, JA có thể cảm ứng lipoxygenase và dẫn đến sự tổng hợp JA nội sinh, kết quả làm tăng khả năng tích lũy ginsenoside trong tế bào [60].

Từ luận án này cho thấy, trong số các elicitor khảo sát, JA là một elicitor gây ức chế sinh trưởng mạnh nhất. Đối với tất cả các nghiệm thức bổ sung JA, RBD sâm Ngọc Linh đều phát triển kém và chết rất nhiều, rễ gần như hóa nâu toàn bộ. Thế nhưng, JA lại kích thích tăng cường sản xuất saponin mạnh ở nuôi cấy RTC sâm Ngọc Linh hơn so với các elicitor khác, trong 1 g mẫu phân tích ở trong hầu hết các nghiệm thức đều thu được hàm lượng saponin (MR2, Rg1 và Rb1) rất cao so với các elicitor khác. Tuy nhiên, do tổng KLK rễ thu được quá thấp so với các nghiệm thức khác, nên hiệu quả sản xuất saponin của JA thấp đi, với năng suất thu

nhận ba saponin MR2, Rg1 và Rb1 thấp hơn YE. Theo Knispel và cs (2013), các peroxidases tạo liên kết với các ion với thành tế bào thông qua các tiền chất lignin tổng hợp từ con đường shikimate; khi oxy hóa các peroxidases sẽ làm thành tế bào cứng hơn nhờ liên kết chéo của các polysaccharide và glycoprotein, nhưng nếu ức chế enzyme này sẽ làm thành tế bào yếu đi [26]. Trong đó, MeJA và SA đều có khả năng ức chế các enzyme này ở cây sâm *P. ginseng*, đặc biệt là MeJA [26]; vì thế, thành tế bào của RBD sâm Ngọc Linh có thể bị suy yếu dần khi có mặt các chất này, dẫn đến RTC không hình thành và giảm dần sinh khối. Khi Yu và cs (2003) nghiên cứu ảnh hưởng của JA lên sự phát triển của rễ tơ *P. ginseng* thì cũng khẳng định đây là một elicitor ức chế tăng trưởng mạnh nhưng có tác động mạnh nhất lên việc gia tăng hàm lượng các saponin trong nuôi cấy *in vitro*.

Hiệu quả tăng cường tổng hợp các saponin của các dẫn xuất JA như MeJA được Han và cs (2010) xác định là do MeJA có khả năng điều hòa hai gen squalene epoxidase (PgSQE1 và PgSQE2) xúc tác phản ứng đầu tiên trong sinh tổng hợp triterpene saponin và phytosterol trong *P. ginseng*. Trong nghiên cứu này, MeJA làm tăng sự phiên mã mRNA PgSQE1 trong rễ, nhưng lại ngăn chặn sự biểu hiện của PgSQE2. Điều này gây bất hoạt PgSQE1 RNAi trong rễ đã làm tăng được sự kiểm soát của PgSQE2 và PNX (cycloartenol synthase) và kết quả là sự tích lũy phytosterol được tăng cường. Do đó, nghiên cứu này cho thấy, PgSQE1 sẽ điều hòa sinh tổng hợp ginsenoside, chứ không phải của các phytosterol trong *P. ginseng* [58]. Trong luận án này, hiệu quả của JA lên khả năng tích lũy MR2 (một saponin được tổng hợp từ các phytosterol) cũng không cao như tổng hợp các ginsenoside-Rb1 và Rg1, vì lượng MR2 chỉ đạt cao nhất khi sử dụng ở JA ở nồng độ cao nhất trong dãy nồng độ từ 50-200 µg/L. Thêm vào đó, vai trò tăng cường hoạt động của các gen SS quy định sinh tổng hợp triterpene và phytosterol ở *P. ginseng* cũng chịu ảnh hưởng bởi các dẫn xuất JA khác [87]. Trong *P. ginseng*, gen SS là chủ yếu nằm ở chồi, nhưng không khác biệt với phần tích lũy ở các bộ phận khác [87]. Tăng cường biểu hiện gen PgSS1 trong RBD *P. ginseng* chuyên gen cũng đã được xác định là do JA tăng cường điều hòa phiên mã mạch xuôi của các gen thông qua SE, dammarediol synthase, β -amyrin synthase và cycloartenol synthase [87].

Tóm lại, elicitor dẫn truyền tín hiệu (JA) có nguồn gốc từ các hormone nội sinh có hiệu quả lớn lên khả tích lũy saponin, nhưng vì ức chế tăng trưởng mạnh nên năng suất tổng hợp saponin không cao, chính vì vậy, nếu xử lý elicitor trong thời gian ngắn sau khi thu được lượng lớn sinh khối sẽ cho hiệu quả tốt hơn.

2.2. Ảnh hưởng kết hợp giữa các elicitor

Sự kết hợp của MeJA với SA, SA với YE và MeJA với YE làm tăng sự tích lũy taxol trong nuôi cấy *Taxus baccata*, và sản xuất tối đa taxol đã được quan sát bằng cách kết hợp ba elicitor này [74]. Tuy nhiên, tích lũy các chất chuyển hóa thứ cấp không phải lúc nào cũng xảy ra khi kết hợp các elicitor. Ví dụ, mặc dù arachidonic acid, SA, ammonium citrate và MeJA đều gây ra sự tích lũy taxol, hỗn hợp arachidonic acid với SA và ammonium citrate với MeJA không làm tăng khả năng tích lũy hợp chất thứ cấp [132].

Theo Hwa-Young và cs (2008), xử lý đồng thời với MeJA, SA và YE không làm gia tăng sản xuất các alkaloid benzophenanthridine như xử lý đơn lẻ. Tích lũy sinh khối và sản xuất dihydrosanguinarine và sanguinarine gia tăng đồng thời khi xử lý chỉ với YE; bởi vì YE làm tăng tích lũy sanguinarine bằng cách chuyển đổi các dihydrosanguinarine trong quá trình trao đổi chất [64]. Khi sử dụng nồng độ YE cao cũng làm chết các tế bào mầm cảm, vì sanguinarine gây độc cho tế bào [64]. Do đó, sự tích lũy alkaloid của benzophenanthridine cũng có kết quả tương tự khi xử lý với YE, hay xử lý kết hợp YE với MeJA và SA. Để làm sáng tỏ tác dụng đồng thời của các elicitor, Hwa-Young và cs (2008) đã phân tích biểu hiện của 6 enzyme, CYP80B1 được cảm ứng đầu tiên khi xử lý với MeJA, SA hoặc YE, và sau đó giảm đi, trong khi xử lý tuần tự 3 elicitor dẫn đến biểu hiện liên tục các enzyme [64]. Hơn nữa, biểu hiện OMT bằng cách xử lý đồng thời các elicitor kéo dài lâu hơn so với bất kỳ phương pháp xử lý đơn lẻ nào, nhưng mức độ biểu hiện của nó chỉ xảy ra cho đến 24 giờ sau khi xử lý. Xử lý đồng thời rất hiệu quả trên biểu hiện CYP80B1, nhưng không liên tục ảnh hưởng đến sự biểu hiện 4'OMT. Do vậy, cảm ứng mạnh bằng cách xử lý đồng thời có thể ức chế biểu hiện 4'OMT [64].

Kết quả nghiên cứu này cho thấy rằng, việc xử lý tuần tự lần lượt từng elicitor trong suốt quá trình nuôi cấy thì hiệu quả hơn. Từ đó triển vọng mới về phương

pháp xử lý tuần tự bằng cách sử dụng các tín hiệu biểu hiện gen khác nhau có thể làm tăng năng suất tích lũy các chất chuyển hóa thứ cấp trong nuôi cấy tế bào thực vật và phân tích ở cấp độ phân tử có thể chứng minh điều này. Trong nuôi cấy rễ tơ *Salvia miltiorrhiza*, sản xuất các diterpenoid tanshinone đã tăng lên nhờ kết hợp giữa MeJA và YE. Xử lý với MeJA trước sau đó xử lý YE, tổng hàm lượng tanshinone cao hơn khi dùng MeJA hoặc YE cùng liều lượng [138].

Trong luận án này, việc kết hợp đồng thời 25 mg/L YE với 25 µg/L SA chỉ tối ưu cho khả năng tích lũy ginsenoside-Rb1 tăng lên gấp 4 lần so với việc sử dụng YE hay SA đơn lẻ; tuy nhiên, kết hợp lại không có hiệu quả lên sự tích lũy tổng cả ba loại saponin như khi sử dụng YE đơn lẻ ở nồng độ 150 mg/L trong suốt quá trình nuôi cấy. Xử lý riêng rẽ YE vào nuôi cấy tế bào *E. californica* cũng cho kết quả tích lũy các alkaloid cũng cao hơn xử lý đồng thời YE và MeJA [64].

Dựa vào các nghiên cứu trên và kết quả đạt được rõ ràng kết hợp có thể tăng sinh tổng hợp các hợp chất thứ cấp. Tuy nhiên, việc xử lý đồng thời cùng một lúc nhiều elicitor là không khoa học, nên xử lý tuần tự từng elicitor vào từng giai đoạn nuôi cấy của RBD sâm Ngọc Linh có lẽ cho hiệu quả cao hơn các xử lý đơn lẻ.

2.3. Ảnh hưởng của thời gian bổ sung dịch chiết nấm men lên sự tăng sinh và tích lũy saponin của rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh *in vitro*

Khác với các elicitor khác, YE là một elicitor sinh học có nguồn gốc từ nấm men không những có tác dụng tăng cường sinh tổng hợp saponin, mà còn giúp rễ phát triển tốt hơn ở nồng độ thích hợp, nên thông thường YE có thể bổ sung vào đầu giai đoạn nuôi cấy. Tuy nhiên, để đạt hiệu quả tối ưu cho nuôi cấy tạo RTC sâm Ngọc Linh, 150 mg/L YE có thể bổ sung tại ngày thứ 40 của nuôi cấy (16 ngày trước khi thu hoạch) với thời gian xử lý chiếm khoảng 1/3 thời gian nuôi cấy RTC từ RBD *in vitro*. Trong nuôi cấy tế bào *S. melongena*, Nguyễn Hữu Thuận Anh (2016) cho thấy thời gian xử lý bằng YE chỉ cần khoảng 20-24 ngày trước khi thu hoạch, nhưng kết quả tốt nhất lại đầu giai đoạn nuôi cấy tế bào cà gai leo, vì sinh khối vẫn tăng nên sự tích lũy hàm lượng solasodine đạt nhiều nhất. Ngoài ra, đối với *P. expansum* thời gian bổ sung YE trong vòng 8 ngày trước thu hoạch (chiếm 1/3 thời gian nuôi cấy) cũng thu được hàm lượng andrographolia cao nhất [1].

2.4. So sánh hiệu quả tác động của các elicitor lên năng suất tích lũy saponin của rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh *in vitro*

Trong nuôi cấy RTC sâm Ngọc Linh từ RBD *in vitro* này, tất cả các elicitor đã khảo sát đều gây ức chế tăng trưởng và tăng cường sản xuất hợp chất saponin, trừ YE ở nồng độ 50 mg/L. Các elicitor này đều được biết đến là những elicitor liên quan đến con đường tổng hợp các hợp chất thứ cấp ở thực vật, chẳng hạn như thúc đẩy sản sinh các terpene hay taxol [73], hay tích lũy saponin ở *P. ginseng* C.A. Meyer và trên nhiều loài sâm khác [38][39][47][96]. Kết quả định tính saponin từ rễ sâm Ngọc Linh *in vitro* bằng TLC trong luận án này cho thấy, sự hiện diện của cả ba loại saponin Rg1, MR2 và Rb1 ở tất cả các nghiệm thức. Trong đó, khi bổ sung JA, hầu hết các saponin thu được đều cao hơn so với các elicitor khác; tuy nhiên, JA ức chế sinh trưởng mạnh và làm rễ mất sức sống, như JA xử lý ở nồng độ hơn 200 µg/L, hầu hết các RBD đều chết. ABA có tác động ức chế tương tự JA lên sự tăng trưởng RBD sâm Ngọc Linh, bởi đây là một elicitor có tác dụng kích hoạt các phản ứng già hóa ở thực vật [106]. So với YE và CHN, ABA có hiệu quả gia tăng hàm lượng MR2 tốt hơn, còn hai ginsenoside Rg1 và Rb1 không khác biệt lớn. Đặc biệt là nhiều nghiên cứu cũng đã chứng minh, ABA có tác dụng ức chế phát triển RTC rõ rệt [48]. Trái lại, hai elicitor ngoại sinh YE và CHN lại ít gây giảm sinh khối của RTC sâm Ngọc Linh hơn, với YE ở nồng độ thấp vừa cho hiệu quả lên quá trình tích lũy các saponin, mà lại vừa tạo ra lượng sinh khối cao giúp năng suất sản xuất saponin tăng lên và cao hơn các elicitor khác.

Ngoài ra, khi đánh giá hiệu quả của các elicitor có nguồn gốc từ các vi sinh vật so với các elicitor từ hormone thực vật, nhiều nghiên cứu khác cũng cho thấy YE có hiệu quả hơn bởi khả năng kích thích sinh trưởng của YE [138], với 200 µg/L YE đã có hiệu quả tích lũy các isoflavonoid tối ưu ở nuôi cấy tế bào *P. tuberosa* hơn khi bổ sung SA và MeJA [54]. Khi so sánh ảnh hưởng của ba elicitor YE, MeJA và SA trong nuôi cấy huyền phù tế bào *E. californic*, việc sử dụng đơn lẻ YE cũng cho hiệu quả cao hơn [64]. Trái lại, một số nghiên cứu lại cho thấy tác động của elicitor có bản chất là CDHST hiệu quả hơn như 150 µM SA là tốt nhất cho khả năng tích lũy solasodine ở nuôi cấy tế bào cà gai leo so với SA và MeJA [1].

So với các kết quả nghiên cứu tăng cường sản xuất hợp chất saponin khác trên sâm Ngọc Linh, việc sử dụng YE ở nồng độ 150 mg/L cho kết quả tốt nhất so với nghiên cứu các nghiên cứu trước đây với tổng ba saponin đạt 3,5% trong 1 g mẫu RTC khô phân tích, nhưng KLIK còn đến 25,03 mg và năng suất đạt 23,41 mg/L. Theo Trịnh Thị Hương (2017), khi khảo sát các elicitor có bản chất là các CDHST, kết quả tốt nhất đạt được khi sử dụng 1 mg/L ABA vào nuôi cấy rễ chuyển gen sâm Ngọc Linh với tổng saponin đạt 2,29% trong 1 g mẫu rễ chuyển gen, KLIK chỉ đạt 17 mg, cho nên năng suất thu tổng saponin trên tổng sinh khối khô tính được chỉ khoảng 13 mg/L [10]. Kết quả của luận án này gấp 2,26 lần so với nghiên cứu về rễ chuyển gen sâm Ngọc Linh ở trên. So với nghiên cứu nuôi cấy mô sẹo sâm Ngọc Linh, kết quả tốt nhất chỉ đạt khi sử dụng 15 mg/L MeJA với lượng tổng 3 saponin là 0,87% trên 1 g KLIK của mô sẹo và tổng KLIK tại nghiệm thức này là 62 mg, nên năng suất thu nhận saponin tính được là 18 mg/L [13], so với nghiên cứu này thấp hơn 1,6 lần. Năng suất này cho thấy, khi sử dụng YE giúp thúc đẩy RTC tăng sinh ở nồng độ thấp dưới 100 mg, nhưng ở nồng độ cao hơn RTC sẽ tăng sinh kém hơn, ở nồng độ (100-200 mg YE) rễ giảm sinh khối không nhiều như ABA, SA và CHN. Cho nên, nuôi cấy tạo RTC sâm Ngọc Linh bổ sung 150 mg/L YE cho năng suất thu nhận saponin tốt nhất. Điều này cho thấy, trong quá trình phát triển cây sâm Ngọc Linh thường chịu tác động bởi một hệ vi sinh vật trong đất. Từ đó, các vi sinh vật này đã kích thích các con đường sinh tổng hợp các saponin trong loài sâm này.

KẾT LUẬN

Từ những các kết quả đạt được cho thấy:

1. Các RTC sâm Ngọc Linh hình thành từ trụ bì tại vị trí của bó mạch dẫn trung tâm đạt tốt nhất ở mẫu RBD 2 cm tái sinh từ cuống lá và không bỏ phần mô cuống lá này trong khi nuôi cấy tạo RTC.
2. Nhu cầu về dinh dưỡng, các CDHST và đường carbohydrate đảm bảo tốt nhất cho RTC sâm Ngọc Linh tăng trưởng từ RBD *in vitro* là môi trường MS cải biên có tỷ lệ $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ (1/2), bổ sung 7 mg/L IBA, 0,5 mg/L BA và 30 g/L sucrose.
3. Điều kiện nuôi cấy thích hợp nhất cho RTC sâm Ngọc Linh tăng trưởng và tích lũy saponin là nuôi cấy tối đa trong 56 ngày, với 45 ngày đầu trong tối và 11 ngày sau ngoài sáng; ở nhiệt độ 22°C, trong 30 mL môi trường ở bình 250 mL và pH = 5,3. Hệ thống nuôi cấy tốt nhất là Bioreactor tự tạo 3 L chứa 1,5 L môi trường và 8 g RBD.
4. Khi sử dụng đơn lẻ các elicitor, JA và ABA ức chế sinh trưởng mạnh nhất, còn SA, YE và CHN ít ức chế tăng trưởng hơn. Đối với sự tích lũy các saponin, hàm lượng Rb1 đạt cao nhất ở 50 µg/L JA, Rg1 ở 100 µg/L JA, MR2 ở 200 µg/L JA và năng suất tổng hợp cả ba saponin này đạt cao nhất ở 150 mg/L YE.
5. Kết hợp đồng thời YE và SA không hiệu quả bằng chỉ sử dụng 150 mg/L YE.
6. Thời gian thích hợp nhất để bổ sung 150 mg/L YE vào môi trường nuôi cấy là tại ngày thứ 40 ngày (16 ngày trước khi thu hoạch) trong quá trình nuôi cấy rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh từ rễ bắt định *in vitro*.

KIẾN NGHỊ

Trong khuôn khổ giới hạn về kinh phí và thời gian nghiên cứu, nên luận án chỉ thực hiện được một số nội dung như đã trình bày. Do vậy, để nghiên cứu hoàn thiện hơn, tôi đề nghị tiếp tục nghiên cứu một số nội dung sau:

Nghiên cứu về thời gian xử lý JA, ABA hay SA trên sinh khối RBD sâm Ngọc Linh sau khi thu hoạch.

Nghiên cứu thời điểm xử lý tuần tự từng elicitor khác nhau trong nuôi cấy RBD sâm Ngọc Linh thông qua biểu hiện tuần tự của các enzyme xúc tác tổng hợp từng saponin trong con đường triterpenoid.

Nghiên cứu thêm các tác động của các elicitor liên quan đến các gen sinh tổng hợp từng hợp chất saponin cụ thể ở sâm Ngọc Linh để có thể sản xuất được các saponin theo mong muốn.

Ứng dụng nuôi cấy RTC sâm Ngọc Linh vào sản xuất trên quy mô công nghiệp để tạo nguồn nguyên liệu cho các ngành công nghiệp dược phẩm và thực phẩm.

SUMMARY

Ngoc Linh ginseng (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) plays critical roles in pharmaceutical industry, because triterpenoid saponins from its roots are widely used to produce medicine for improving health and treating various types of diseases. This study investigated the effects of culture conditions and elicitors on the growth and saponin accumulation in lateral root of Ngoc Linh ginseng. The results showed that the optimum length of the ginseng adventitious root explants for the lateral roots growth were about 2 cm, which regenerated from the petioles, but were not excised completely the petiole patterns. The optimal medium for developing lateral roots is MS medium modified with $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ (1/2), supplemented with 7 mg/L IBA, 0.5 mg/L BA and 30 g/L sucrose. The most appropriate culture conditions for the formation, growth and accumulation of the ginseng lateral roots from *in vitro* adventitious roots were cultured in 56 days with the first 80% of culture period in dark, at a temperature of 22°C and pH 5.3. In bottle 250 mL, 25 mg adventitious roots developed highest of lateral roots and three-saponin-content (MR2, Rb1 and Rg1) in 30 mL culture medium, respectively using 8 g explants in 1.5 L medium contained in Balloon-type bubble Bioreactor 3 L. Elicitors enhanced significantly the accumulation of MR2, Rb1 and Rg1, but inhibited the lateral roots growth of Ngoc Linh ginseng. In solitary treatment of 50-200 mg/L cell-wall-derived elicitors, 150 mg/L YE and 100 mg/L CHN is optimal for saponin accumulation, and YE is better than CHN. From 50-200 µg/L plant's hormone derived elicitors, 50 µg/L SA, 150 µg/L JA and 150 µg/L ABA is optimal for saponin accumulation. JA and ABA strongly inhibited the lateral root formation and growth; therefore 150 mg/L YE was the best for saponin accumulation among 5 elicitors. In addition, the combination of YE and SA showed effective lower than the solitary elicitor treatment (150 mg/L YE). The elicitation time of 150 mg/L YE treatment at the 40th culture day (16 days before harvest) is the most optimal for saponin accumulation in lateral root culture. The results suggest that the solitary YE elicitor treatment is optimized for increasing MR2, Rb1 and Rg1 content of Ngoc Linh ginseng; Thus, the ginseng saponin production could be scale-up by root culture.

DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH KHOA HỌC LIÊN QUAN ĐÃ CÔNG BỐ

1. **Nguyễn Thị Nhật Linh**, Nguyễn Hoàng Lộc, Dương Tấn Nhựt (2018). Ứng dụng elicitor vào sản xuất saponin trong nuôi cấy *in vitro* các loài thuộc chi nhân sâm. *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 16(1): 1-11.
2. **Nguyen Thi Nhat Linh**, Hoang Thanh Tung, Vu Thi Hien, Vu Quoc Luan, Nguyen Phuc Huy, Nguyen Hoang Loc, Duong Tan Nhut (2017). Effect of metal nanoparticles on the growth of Ngoc Linh ginseng (*Panax vietnamensis*) lateral roots cultured *in vitro*. *Hue University Journal of Science: Natural Science*, 126(1C): 47-55.
3. **Nguyễn Thị Nhật Linh**, Nguyễn Hoàng Lộc, Dương Tấn Nhựt (2017). Ảnh hưởng của môi trường khoáng, nguồn carbon và peptone lên khả năng phát triển rễ thứ cấp từ rễ bất định sâm Ngọc Linh *in vitro*. *Tạp chí trường Đại học Khoa học – Đại học Huế*, 10(1): 155-166.
4. **Nguyễn Thị Nhật Linh**, Hoàng Thanh Tùng, Nguyễn Hoàng Lộc, Dương Tấn Nhựt (2017). Ảnh hưởng của các elicitor sinh học và phi sinh học đến sinh khối và hàm lượng saponin của rễ thứ cấp trong nuôi cấy lỏng lác rễ bất định sâm Ngọc Linh. *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 15(2): 285-291.
5. **Nguyễn Thị Nhật Linh**, Hoàng Thanh Tùng, Nguyễn Hoàng Lộc, Dương Tấn Nhựt (2015). Tăng cường khả năng hình thành và phát triển rễ thứ cấp từ rễ bất định sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis*) nuôi cấy *in vitro*. *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 13(2): 221-230.
6. Dương Tấn Nhựt, Trần Hiếu, **Nguyễn Thị Nhật Linh**, Hoàng Thanh Tùng, Nguyễn Bá Nam, Nguyễn Phúc Huy, Vũ Quốc Luận, Vũ Thị Hiền (2015). Tối ưu hóa quá trình nhân nhanh và tích lũy saponin của rễ bất định sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) trong các hệ thống nuôi cấy. *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 13(3): 853-864.
7. Hồ Thanh Tâm, Nguyễn Bá Nam, Hoàng Xuân Chiến, Lê Kim Cương, Ngô Thanh Tài, Nguyễn Việt Cường, Nguyễn Phúc Huy, Trịnh Thị Hương, Trần Hiếu, **Nguyễn Thị Nhật Linh**, Dương Tấn Nhựt (2015). Tối ưu hóa một số yếu tố môi trường và điều kiện nuôi cấy đến quá trình tái sinh rễ bất định từ lá Sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.). *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 13(3): 865-873.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tài Liệu Tiếng Việt

- [1]. Nguyễn Hữu Thuận Anh (2016), *Nghiên cứu ảnh hưởng của chất kích kháng lên khả năng tích lũy solasodine ở tế bào in vitro của cây cà gai leo (Solanum hainanense Hance)*, Luận án tiến sĩ, Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế.
- [2]. Đỗ Hữu Bích (2003), *Từ điển cây thuốc và động vật làm thuốc Việt Nam II*. NXB Khoa học Kỹ thuật.
- [3]. Bộ khoa học và Công nghệ, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam (2007), *Sách đỏ Việt Nam, Phần II- Thực vật*, NXB. Khoa học tự nhiên và Công nghệ, Hà Nội, tr. 499-502, 530-532.
- [4]. Bộ Y tế (2010), *Hội nghị phát triển dược liệu và sản phẩm thuốc quốc gia*, Bình Dương.
- [5]. Hoàng Văn Cương, Nguyễn Bá Nam, Trần Công Luận, Bùi Thế Vinh, Dương Tấn Nhựt (2012), Ảnh hưởng của ánh sáng đơn sắc lên sự sinh trưởng và khả năng tích lũy hoạt chất saponin thông qua nuôi cấy mô sẹo và cây sâm Ngọc Linh (*Panax Vietnamensis Ha et Grushv.*) *in vitro*, *Tạp chí khoa học và công nghệ*, 50(4), tr. 475-490.
- [6]. 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(3SE), tr. 265-276.
- [7]. Nguyễn Thượng Dong, Trần Công Luận, Nguyễn Thị Thu Hương (2007), *Sâm Việt Nam và một số họ Nhân sâm*, NXB. Khoa học và kỹ thuật.
- [8]. Hà Thị Dung, Grushvitzky IV, Skvortsova NT (1983), “Đặc tính hình thái - giải phẫu lá của *Panax vietnamensis* (Araliaceae)”, *Tạp chí Sinh học*, 7(3), tr. 45-48.
- [9]. 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 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, tr. 241-251.

- [10]. Trịnh Thị Hương (2017), *Nghiên cứu chuyển gen tạo rễ tơ sâm Ngọc Linh (Panax vietnamensis Ha et Grushv.) làm vật liệu cho nuôi cấy sinh khối*, Luận án tiến sĩ sinh học, Viện Công nghệ Sinh học, Hà Nội.
- [11]. 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, tr. 30-36.
- [12]. Phan Kế Long, Vũ Đình Duy, Phan Kế Lộc, Nguyễn Giang Sơn, Nguyễn Thị Phương Trang, Lê Thị Mai Linh Lê Thanh Sơn (2014), Mối quan hệ di truyền của các mẫu sâm thu ở Lai Châu trên cơ sở phân tích trình tự nucleotide vùng MATK và ITS-Rdna, *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 12(2), tr. 327-337.
- [13]. Dương Tấn Nhựt (2016), *Công nghệ sinh học trong nghiên cứu chọn tạo giống sâm Ngọc Linh (Panax vietnamensis Ha et Grushv.)*, NXB. Đại học Quốc gia Hà Nội.
- [14]. Dương Tấn Nhựt, Lâm Thị Mỹ Hằng, Bùi Thế Vinh, Phan Quốc Tâm, Nguyễn Bá Nam, Nguyễn Cửu Thành Nhân, Hoàng Xuân Chiến, Lê Nữ Minh Thùy, Vũ Thị Hiền, Nguyễn Văn Bình, Vũ Quốc Luận, Trần Công Luận, Đoàn Trọng Đức (2010a), Xác định hàm lượng saponin và dư lượng một số chất điều hòa sinh trưởng trong callus, chồi và rễ sâm Ngọc Linh nuôi cấy *in vitro*, *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 8(2), tr. 201-214.
- [15]. Dương Tấn Nhựt, Nguyễn Bá Phong, Lê Nữ Minh Thùy, Hoàng Văn Cương, Hoàng Xuân Chiến, Bùi Thế Vinh, Trần Công Luận (2012), Bước đầu đánh giá ảnh hưởng của methyl jasmonic acid lên khả năng tích lũy saponin trong mô sẹo sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.), *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 10(A), tr. 867-875.
- [16]. Dương Tấn Nhựt, Nguyễn Cửu Thành Nhân, Hoàng Xuân Chiến, Nguyễn Phúc Huy, Trần Xuân Ninh, Phạm Huy Hải, Vũ Quốc Luận, Paek Kee-Yoeup (2012), Một số hệ thống nuôi cấy trong nghiên cứu nhân nhanh rễ bất định và rễ thứ cấp cây sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.), *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 10(A), tr. 887-897.
- [17]. 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.
- [18]. 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*, Hội nghị CNSH toàn quốc 2013, Hà Nội, tr. 1043-1048.

- [19]. Nguyễn Trung Thành, Paek Kee-Yoeup (2008), Nhân nhanh rễ bất định Nhân sâm (*Panax ginseng* C.A. Meyer): ảnh hưởng của một số nhân tố lý hóa lên sự tăng trưởng sinh khối và sản phẩm trao đổi chất ginsenoside, *Tạp chí Khoa học Đại học Quốc gia Hà Nội, Khoa học Tự nhiên và Công nghệ*, 24, tr. 318-323.
- [20]. Nguyễn Thị Phương Trang, Nguyễn Giang Sơn, Lê Thanh Sơn, Phan Kế Long (2014), *Mối quan hệ di truyền của sâm Ngọc Linh (Panax vietnamensis Ha et Grushv., 1985) với các loài trong chi nhân sâm*, Hội nghị khoa học toàn quốc về sinh thái và tài nguyên sinh vật lần thứ 4, tr. 955-959.
- [21]. Bùi Thế Vinh, Trần Công Luận (2011), Xây dựng phương pháp định lượng G-Rb1, G-Rg1 và MR2 trong sâm Việt Nam bằng kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao, *Tạp chí Dược liệu*, 16(1+2), tr. 44-50.

Tài Liệu Tiếng Anh

- [22]. Abdelbasset E.H., Lorne R.A., Ismail E.H., Fouad D. (2010), Review: Chitosan in plant protection, *Marine Drugs*, 8(4), pp. 968-987.
- [23]. 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, *The Plant Cell*, 24(10), pp. 3967-3981.
- [24]. Ahlawat S., Saxena P., Alam P., Wajid S., Abdin M.Z. (2014), Modulation of artemisinin biosynthesis by elicitors, inhibitor, and precursor in hairy root cultures of *Artemisia annua* L., *Journal of Plant Interactions*, 9(1), pp. 811-824.
- [25]. Ahmed S.A., Baig M.M.V. (2014), Biotic elicitor enhanced production of psoralen in suspension cultures of *Psoralea corylifolia* L., *Saudi Journal of Biological Sciences*, 21(5), pp. 499-504.
- [26]. Ali B.M., Hahn E.J., Paek K.Y. (2007), Methyl jasmonate and salicylic acid induced oxidative stress and accumulation of phenolics in panax ginseng bioreactor root suspension cultures, *Molecules*, 12(3), pp. 607-221.

- [27]. Ali M.B., Dewir Y.H., Hahn E.J., Paek K.Y. (2008), Effect of carbon dioxide on antioxidant enzymes and ginsenoside production in root suspension cultures of *Panax ginseng*, *Environmental and Experimental Botany*, 63(1-3), pp. 297-304.
- [28]. Ali M.B., Yu K.W., Hahn E.J., Paek K.Y. (2006), Methyl jasmonate and salicylic acid elicitation induces ginsenosides accumulation, enzymatic and non-enzymatic antioxidant in suspension culture *Panax ginseng* roots in Bioreactors, *Plant Cell Report*, 25(6), pp. 613-620.
- [29]. Al-Khateeb A.A. (2001), Influence of different carbon source on *in vitro* root formation of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cv. Khanezi., *Bioresource Technology*, 99(14), pp. 6550-6555.
- [30]. Anasori P., Asghari G. (2008), Effects of light and differentiation on gingerol and zingiberene production in callus culture of *Zingiber officinale* Rosc., *Research in Pharmaceutical Sciences*, 3(1), pp. 59-63.
- [31]. Aye A.T., Mai N.T.T., Xiaohua L., Yeji K., Yeon B.K., Uddin M.R., Young S.K., Hanhong B., Haeng H.K., Mi Y.L., Sang U. (2012), Production of astragaloside and flavones from adventitious root cultures of *Astragalus membranaceus* var. mongholicus, *Plant Omics Journal*, 5(5), pp. 466-470.
- [32]. Azeez T.H.A., Ibrahim K.M. (2013), Effect of biotic elicitors on secondary metabolite production in cell suspensions of *Hypericum triquetrifolium*, *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca Horticulture*, 70(1), pp. 26-33.
- [33]. Baskaran P., Jayabalan N. (2005), Role of basal medium, carbon source and growth regulator in micropropagation of *Eclipta alba* valuable medicinal herb, *KMITL Science Journal*, 5, pp. 469-682.
- [34]. Caiyan L., Dongming M., Gaobin P., Xiaofang Q., Zhigao D., Hong W., Guofeng L., Hechun Y., Benye L. (2011), Foliar application of chitosan activates artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L., *Industrial Crops and Products*, 33(1), pp. 176-182.
- [35]. Catherine B., Daniel I.P., Irene P. (2014), Adventitious Roots and Lateral Roots: Similarities and Differences, *Annual Review of Plant Biology*, 65, pp. 639-666.

- [36]. Cecilia C.V. (2010), Influence of media strength and sources of nitrogen on micropropagation of ginger, *Zingiber officinale* Rosc., *E-International Scientific Research Journal*, 2(2), pp. 2094-1749.
- [37]. Chang K., Chen M., Zeng L., Lan X., Wang Q., Liao Z. (2014), Abscisic acid enhanced ajmalicine biosynthesis in hairy roots of *Rauvolfia verticillata* by upregulating expression of the MEP pathway genes, *Russian Journal of Plant Physiology*, 61(1), pp. 136-140.
- [38]. Choi S.M., Son S.H., Yun S.R., Kwon O.W., Seon J.H., Paek K.Y. (2000), Pilot-scale culture of adventitious roots of ginseng in a bioreactor system, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 62(3), pp. 187-193.
- [39]. Choi Y.E., Jeong J.H., Shin C.K. (2003), Hormone-independent embryogenic callus production from ginseng cotyledons using high concentrations of NH_4NO_3 and progress towards bioreactor production, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 72(3), pp. 229-235.
- [40]. Christensen L.P. (2009), Ginsenosides: Chemistry, biosynthesis, analysis, and potential health effects, *Advances in Food and Nutrition Research*, 55, 1-99.
- [41]. Chun-Lin S., Hyo-Bee P., Jong S.L., Sangryeo 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, *Molecules and Cells*, 29, pp. 251-258.
- [42]. Cibele T.C., Márcia R.A., Carolina M.R., Joseli S., Felipe S.M., Arthur G.F. (2013), When stress and development go hand in hand: main hormonal controls of adventitious rooting in cuttings, *Frontiers in Plant Sciences*, 4, pp. 133-142.
- [43]. Correa-Aragunde N., Graziano M., Lamattina L. (2004), Nitric oxide plays a central role in determining lateral root development in tomato, *Planta*, 218(6), pp. 900-905.
- [44]. Couzigou J.M., Combier J.P. (2016), Plant microRNAs: key regulators of root architecture and biotic interactions, *The New Phytologist*, 212(1), pp. 22-35.
- [45]. Dang H.X., Chen Y., Liu X.M., Wang Q., Wang L.W., Jia W. (2009), Antidepressant effects of ginseng total saponins in the forced swimming test and chronic mild stress models of depression, *Progress in Neuro Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 33, pp. 1417-1424.

- [46]. Devarenne T.P., Ghosh A., Chappell J. (2002), Enhanced triterpene and phytosterol biosynthesis in *Panax ginseng* overexpressing squalene synthase gene, *Plant Physiology*, 129, pp. 1095-1106.
- [47]. Dong J., Wan G., Liang Z. (2010), Accumulation of salicylic acid-induced phenolic compounds and raised activities of secondary metabolic and antioxidative enzymes in *Salvia miltiorrhiza* cell culture, *Journal Biotechnology*, 148(2-3), pp. 99-104.
- [48]. Dongliang G., Jianhua L., Ling L. (2009), Abscisic acid (ABA) inhibition of lateral root formation involves endogenous ABA biosynthesis in *Arachis hypogaea* L., *Plant Growth Regulation*, 58(2), pp. 173-179.
- [49]. Duncan D.B. (1955), Multiple range and multiple F tests, *Biometrics*, 11, pp. 1-42.
- [50]. Ellen L., Ahmad F., Danny G. (2011), Modulation of triterpene saponin production: *In vitro* culture elicitation, and metabolic engineering, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 164, pp. 220-237
- [51]. Faizal A., Geelen D. (2013), Saponins and their role in biological processes in plants, *Phytochemistry reviews*, 12(4), pp. 877-893.
- [52]. Gamborg O.L., Miller R.A., Ojima K. (1968), Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells, *Experimental Cell Research*, 50(1), pp. 151-158.
- [53]. Gera M., Jochum (2007), Elevated temperatures increase leaf senescence and root secondary metabolite concentrations in the understory herb *Panax quinquefolium* (Araliaceae), *American Journal of Botany*, 94(5), pp. 819-826.
- [54]. Goyal S., Ramawat K.G. (2008), Increased isoflavonoids accumulation in cell suspension cultures of *Pureraria tuberosa* by elicitor, *Indian Journal of Biotechnology*, 7(3), pp. 378-382.
- [55]. Gregory L.R. (2009), *Mechanical induction of lateral root initiation*, The Graduate School, The Huck Institutes of the Life Sciences, The Pennsylvania State University.
- [56]. Hahn E.J., Kim Y.S., Yu K.W., Joeng C.S., Paek K.Y. (2003), Adventitious root cultures of *Panax ginseng* C.A. Meyer and ginsenoside production through large scale bioreactor system, *Journal of Plant Biotechnology*, 5(1), pp. 1-6.
- [57]. Hamza M.A. (2013), Effect of yeast extract (biotic elicitor) and incubation periods on selection of *Lupinus termis* explant *in vitro*, *Journal of Applied Sciences Research*, 9(7), pp. 4186-4192.

- [58]. Han J.Y., In J.G., Kwon Y.S., Choi Y.E. (2010), Regulation of ginsenoside and phytosterol biosynthesis by RNA interferences of squalene epoxidase gene in *Panax ginseng*, *Phytochemistry*, 71, pp. 36-46.
- [59]. Hasanloo T., Sepehrifar R., Rahnama H., Shams M.R. (2009), Evaluation of the yeast-extract signaling pathway leading to silymarin biosynthesis in milk thistle hairy root culture, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25, pp. 1901-1909.
- [60]. Hu F.X., Zhong J.J. (2007), Role of jasmonic acid in alteration of ginsenoside heterogeneity in elicited cell cultures of *Panax notoginseng*, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 104(6), pp. 513-516.
- [61]. Hu S.J.N, Fang J., Cai W., Tang Z. (2004), Mitogen-activated protein kinases mediate the oxidative burst and saponin synthesis induced by chitosan in cell cultures of *P. ginseng*, *Science in China Series C Life Sciences*, 47(4), pp. 303-312.
- [62]. Hu X.Y., Zhang W.Q., Fang J.Y. (2002), Chitosan treatment raises the accumulation of saponin and the transcriptional level of genes encoding the key enzymes of saponin synthesis in cultured *Panax ginseng* cells, *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*, 28(6), pp. 485-490.
- [63]. Hwang B., Yang D.C., Park J.C., Choi K.J., Min K.K. (1996), Mass culture and ginsenoside production of ginseng hairy root by two-step culture process, *Journal of Plant Biology*, 39, pp. 63-69.
- [64]. Hwa-Young C., Seok Y.S., Hong S.R., Sung-Yong H.Y., Carolyn W.T., Lee P., Jong M.P. (2012), Synergistic effects of sequential treatment with methyl jasmonate, salicylic acid and yeast extract on benzophenanthridine alkaloid accumulation and protein expression in *Eschscholtzia californica* suspension cultures, *Journal of Biotechnology*, 135, pp. 117-122.
- [65]. Inomata S., Yokoyama M., Gozu Y., Shimizu T., Yanagi, M. (1993), Growth pattern and ginsenoside production of *Agrobacterium*-transformed *Panax ginseng* root, *Plant Cell Report*, 12, pp. 681-686.
- [66]. Jae G.L., Eun S.S., Eun J.G., Na Y.K., Chang Y.Y. (2009), Factors involved in masspropagation of ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer) using bioreactor system, *Journal of Korean society applied biology chemistry*, 52(5), pp. 466-471.

- [67]. Jeong C.S., Chakrabarty D., Hahn E.J., Lee H.L., Paek K.Y. (2006), Effects of oxygen, carbon dioxide and ethylene on growth and bioactive compound production in bioreactor culture of ginseng adventitious roots, *Biochemical Engineering Journal*, 27, pp. 252-263.
- [68]. Jeong G.T., Park D.H., Ryu H.W., Lee W.T., Park K., Kang C.H., Hwang B., Woo J.C. (2002), Optimum conditions for transformed *Panax ginseng* hairy roots in flask culture, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 98-100, pp. 1129-1139.
- [69]. Jeong G.T., Park D.H., Ryu H.W., Woo J.C., Kim D., Kim S.W. (2005), Production of antioxidant compounds by culture of *Panax ginseng* C.A. Meyer hairy roots, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 121-124, pp. 1147-1157.
- [70]. Jia L., Zhao Y.Q., Liang X.J. (2009), Current evaluation of the millennium phytomedicine ginseng (II): Collected chemical entities, modern pharmacology, and clinical applications emanated from traditional chinese medicine, *Current Medicinal Chemistry*, 16(22), pp. 2924-2942.
- [71]. Kang E.M., Min J.Y., Kim Y.D., Kang Y.M., Park D.J., Jung H.N., Choi M.S. (2005), Effects of methyl jasmonate and salicylic acid on the production of bilobalide and ginkgolides in cell cultures of *Ginkgo biloba*, *In vitro Cell Development Biology Plant*, 42, pp. 44-49.
- [72]. Kee-Won Y., Wen Y.G., Eun-Joo H., Kee-Yoeup P. (2001), Effects of macro elements and nitrogen source on adventitious root growth and ginsenoside production in ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer), *Journal of Plant Biology*, 44(4), pp. 179-184.
- [73]. Ketchum R.E.B., Gibson D.M., Croteau R.B., Shuler M.L. (1999), The kinetics of taxoid accumulation in cell suspension cultures of *Taxus* following elicitation with methyl jasmonate, *Biotechnology and Bioengineering*, 62, pp. 97-105.
- [74]. Khosroushashi A.Y., Valizadeh M., Ghasempour A., Khosrowshahli M., Naghdibadi H., Dadpour M.R., Omidi Y. (2006), Improved Taxol production by combination of inducing factors in suspension cell cultures of *Taxus baccata*, *Cell Biology International*, 30, pp. 262-269.
- [75]. Kim D.S., Kim S.Y., Jeong I.Y., Kim J.B, Lee G.J., Kang S.Y., Kim W. (2009), Improvement of ginsenoside production by *Panax ginseng* adventitious roots induced by γ -irradiation, *Biologia Plantarum*, 53(3), pp. 408-414.

- [76]. Kim H.J., Chang E.J., Oh H.I. (2005), Saponin production in submerged adventitious root culture of *Panax ginseng* as affected by culture conditions and elicitors, *Asia Pacific Journal Molecular Biology Biotechnology*, 13, pp. 87-91.
- [77]. Kim O.T., Kim S.H., Ohyama K., Muranaka T., Choi Y.E., Lee H.Y. (2010), Upregulation of phytosterol and triterpene biosynthesis in *Centella asiatica* hairy roots overexpressed ginseng farnesyl diphosphate synthase, *Plant Cell Reports*, 29, pp. 403-411.
- [78]. Kim Y., Barbara E.W., Pamela J.W. (2002), Invited review: Secondary metabolism of hairy root cultures in bioreactors, *In vitro Cellular & Develop Biology*, 38, pp. 1-10.
- [79]. Kim Y.S., Hahn E.J., Murthy H.N., Paek K.Y. (2004), Adventitious root growth and ginsenoside accumulation in *Panax ginseng* cultures as affected by methyl jasmonate, *Biotechnology Letters*, 26, pp.1619-1622.
- [80]. Knispel N., Ostrozhenkova E., Schramek N., Huber C., Peña-Rodríguez M.L., Bonfill M., Palazón J., Wischmann G., Cusidó M.R., Eisenreich W. (2013), Biosynthesis of panaxynol and panaxydol in *Panax ginseng*, *Molecules*, 18(7), pp.7686-7698.
- [81]. Kochan E., Królicka A., Chmiel A. (2012), Growth and ginsenoside production in *Panax quinquefolium* hairy roots cultivated in flasks and nutrient sprinkle bioreactor, *Acta Physiol Plant*, 34, pp. 1513-1518.
- [82]. Konoshima T., Takasaki M., Ichiishi E., Murakami T., Tokuda H., Nishino H., Duc N.M., Kasai R., Yamasaki K. (1999), Cancer chemopreventive activity of majonoside-R2 from Vietnamese ginseng, *Panax vietnamensis*, *Cancer letters*,147(1-2), pp. 11-16.
- [83]. Kushiro T., Shibuya M., Ebizuka Y. (1998), *Molecular cloning of oxidosqualene cyclase cDNA from Panax ginseng: the isogene that encodes β -amyrin synthase*, Towards Natural Medicine Research in the 21 st Century, 1157, pp. 421-427.
- [84]. Langhansová L., Marsik P., Vanek T. (2005), Production of saponins from *Panax ginseng* suspension and adventitious root cultures, *Biologia Plantarum*, 49, pp. 463-465.
- [85]. Laura M., Flor D.D., Angela M.C., Irineo T., Andrés C., Mario M.G., Rosalía V.O., Ramón G.G. (2013), Oxidative and molecular responses in *Capsicum annuum* L. after hydrogen peroxide, salicylic acid and chitosan foliar applications, *International Journal of Molecular Sciences*, 14, pp. 10178-10196

- [86]. 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 in plant science*, 18(8), pp. 450-458.
- [87]. Lee M.H., Jeong J.H., Seo J.W., Shin C.G., Kim Y.S., In J.G. (2004), Enhanced triterpene and phytosterol biosynthesis in *Panax ginseng* overexpressing squalene synthase gene, *Plant & Cell Physiology*, 45, pp. 976-984.
- [88]. Loc N.H., An N.T.T., Huy N.D. (2015), Effect of salicylic acid on expression level of genes related with isoprenoid pathway in centella (*Centella asiatica* L. Urban), 3 *Biotech*, 6, pp. 86.
- [89]. Lovell P.H., White J. (1986), *Anatomical changes during adventitious root formation*. In: Jackson M.B. (eds.). *New root formation in plants and cuttings*. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 111-140
- [90]. Luan T.C., De P.V., Bich L.K., Nguyen N.T., Huan V.D., Huong N.T.T., Phu D.T. (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, pp. 329-334.
- [91]. Mizutani M., Ohta D. (2010), Enhanced triterpene saponin biosynthesis and root nodulation in transgenic barrel medic (*Medicago truncatula* Gaertn.) expressing a novel β -amyrin synthase (AsOXA1) gene, *Annual Review of Plant Biology*, 61, pp. 291-315.
- [92]. Mohammad B., Ali K.Y., Eun-Joo H., Paek K.Y. (2006), Methyl jasmonate and salicylic acid elicitation induces ginsenosides accumulation, enzymatic and nonenzymatic antioxidant in suspension culture *Panax ginseng* roots in bioreactors. *Plant Cell Report*, 25, pp. 613-620.
- [93]. Murashige T., Skoog F. (1962), A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, *Plant Physiology*, 15, pp. 473-497.
- [94]. Murthy H.N., Georgiev M.I., Kim Y.S., Jeong C.S., Kim S.J., Park S.Y., Paek K.Y. (2014) Ginsenosides: prospective for sustainable biotechnological production. *Applied microbiology and biotechnology*, 98 (14):6243-6254.
- [95]. Namdeo A.G. (2007), Plant Cell Elicitation for Production of Secondary Metabolites: A Review, *Pharmacognosy Reviews*, 1(1), pp. 69-79.

- [96]. Natalia U., Joanna G., Olga O., Wojciech J.S. (2014), The growth and saponin production of *Platycodon grandiflorum* (Jacq.) A. DC. (Chinese bellflower) hairy roots cultures maintained in shake flasks and mist bioreactor, *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 83(3), pp. 229-237.
- [97]. Natthiya C., Srisulak D., Araya J., Sunanta W., Stephen G.P., Pitchaya M., Padchane S., Thanapat S. (2012), Response of stemona alkaloid production in *Stemona* sp. to chitosan and yeast extract elicitors, *Current Research Journal of Biological Sciences*, 4(4), pp. 449-454.
- [98]. Nhut D.T., Luan V.Q., Binh N.V., Phong P.T., Huy B.N., Ha N.D.T., Tam P.Q., Nam N.B., Hien V.T., Vinh B.T., My Hang L.T., Ngoc D.T.M., Thao L.T.B., Luan T.C. (2009), The effects of some factors on *in vitro* biomass production of Vietnamese ginseng (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) and preliminary analysis of saponin content, *Journal of Biotechnology*, 7(3), pp. 357-370.
- [99]. Nhut D.T., Vinh B.V.T., Hien T.T., Huy N.P., Nam N.B., Chien H.X. (2012), Effects of spermidine, proline and carbohydrate sources on somatic embryogenesis from main root transverse thin cell layers of Vietnamese ginseng (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.), *African Journal of Biotechnology*, 11(5), pp. 1084-1091.
- [100]. Nickell L.G., Tulecke W. (1960), Submerged growth of cells of higher plants, *Journal of Biochemical and Microbiological Technology and Engineering*, 2, pp. 287-297.
- [101]. Nieves B., Cristina G.V., Diego A.M. (2014), Elicitation: A tool for enriching the bioactive composition of foods, *Molecules*, 19, pp. 13541-13563.
- [102]. Novero A., Delima A.G., Acaso J., Baltore L.M. (2010), The influence of osmotic concentration of media on the growth of Sago Palm (*Metroxylon sagu* Rottb.) *in vitro*, *Australian Journal of Crop Science*, 4, pp. 453-456.
- [103]. Okrslar V., Plaper I., Kovac M., Erjavec A., Obermajer T., Rebec A. (2007), Saponins in tissue culture of *Primula veris* L, *In vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 43, pp. 644-651.
- [104]. Paek K.Y., Murthy H.N., Hahn E.J., Zhong J.J. (2009), Large scale culture of ginseng adventitious roots for production of ginsenosides, *Biotechnology in China I*, 113, pp. 151-176.

- [105]. Palazon J., Mallol A., Eibl R., Lettenbauer C., Cusido R.H., Pinol M.T. (2003), Growth and ginsenoside production in hairy root cultures of *Panax ginseng* using a novel bioreactor, *Planta Medica Journal*, 69(4), pp. 344-349.
- [106]. Pierik R.L.M. (1987), *In vitro culture of higher plants*. Nijhoff, Dordrecht, The Netherlands, pp. 344.
- [107]. Pirian K., Piri K. (2013), Influence of yeast extract as a biotic elicitor on noradrenaline production in hairy root culture of *Portulaca oleracea* L., *International Journal of Plant Production*, 4(11), pp. 2960-2964.
- [108]. Rahimi S., Devi B.S.R., Khorolragchaa A., Kim Y.J., Kim J.H., Jung S.K., Yang D.C. (2014), Effect of salicylic acid and yeast extract on the accumulation of jasmonic acid and sesquiterpenoids in *Panax ginseng* adventitious roots, *Russian Journal of Plant Physiology*, 61(6), pp. 811-817
- [109]. Rasbery J.M., Shan H., Le-Clair R.J., Norman M., Matsuda S.P.T., Bartel B. (2007), *Arabidopsis thaliana* squalene epoxidase 1 is essential for root and seed development, *The Journal of Biological Chemistry*, 282(23), pp. 17002-17013.
- [110]. Rezaei A., Ghanati F., Dehaghi M.A. (2011), *Stimulation of taxol production by combined salicylic acid elicitation and sonication in Taxus baccata cell culture*. International Conference on Life Science and Technology, Singapore, pp. 193-197.
- [111]. Rishi K.V., Krunal P., Prashant S., Uma K., Somesh S., Ruby, Shakeel A., Dinesh C.A. Hsin-Sheng T., Bashir M.K. (2015), Squalene synthase gene from medicinal herb bacopa monniera: molecular characterization, differential expression, comparative modeling, and docking studies, *Plant Molecular Biology Reporter*, 33(6), pp. 1675-1685.
- [112]. Sanchez M.A., Fernández-Tárago J., Corchete P. (2005), Yeast extract and methyl jasmonate-induced silymarin production in cell cultures of *Silybum marianum* (L.) Gaertn, *Journal of Biotechnology*, 119(1), pp. 60-69.
- [113]. Schenk R.U., Hidebrandt A.C. (1972), Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures, *Canadian Journal of Botany*, 50(1), pp. 199-204.

- [114]. Schneider F. (2005), *Effect of different cultural conditions on micropropagation of rose (Rosa sp. L.) and globe artichoke (Cynara scolymus L.)*, PhD dissertation Technische, Universität München, Germany.
- [115]. Sheng D.F., Zhang Y.L. (2013), Effects of ABA on tanshinones accumulation of *Salvia miltiorrhiza* hairy root, *Journal of Chinese Medicinal Materials*, 36(3), pp. 354-358.
- [116]. Sivakumar G., Yu K.W., Hahn E.J., Paek K.Y. (2005), Optimization of organic nutrients for ginseng hairy roots production in large-scale bioreactors, *Current Science*, 89(4), pp. 641-649.
- [117]. Sumaryono, Wirdhatul M., Diah R. (2012), Effect of carbohydrate source on growth and performance of *in vitro* sago palm (*Metroxylon sagu* Rottb.) plantlets, *HAYATI Journal of Biosciences*, 19(2), pp. 88-92.
- [118]. Tatiana S. (2011), *Organogenesis in vitro under altered auxin signaling conditions*, University of Toronto, pp. 36.
- [119]. Van L.T.H, Gwang J.L., Long V.H.K., Sung W.K., Khoi N.N., Jeong H.P., Duc N.M. (2015), Ginseng saponins in different parts of *Panax vietnamensis*, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 63(11), pp. 950-954.
- [120]. Vijaya S.N., Udayasri P., Aswani K.Y., Ravi B.B., Phani K.Y., Vijay V.M. (2010), Advancements in the production of secondary metabolites, *Journal of Natural Products*, 3, pp. 112-123.
- [121]. Wang J., Gao W., Zuo B., Liu H., Zhang L., Huang L. (2012), Gradually scale-up culture in a bioreactor promotes radical scavenging activity of *Panax ginseng* (C.A. Meyer) adventitious roots on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, *Plant Growth Regulators*, 67(1), pp. 101-105.
- [122]. Wang W., Zhang Z.Y., Zhong J.J. (2005), Enhancement of ginsenoside biosynthesis in high-density cultivation of *Panax notoginseng* cells by various strategies of methyl jasmonate elicitation, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67(6), pp. 752- 758.
- [123]. Wang W., Zhao Z.J., Xu Y., Qian X., Zhong J.J. (2006), Efficient induction of ginsenoside biosynthesis and alteration of ginsenoside heterogeneity in cell cultures of *Panax notoginseng* by using chemically synthesized 2-hydroxyethyl jasmonate, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 70, pp. 298-307.

- [124]. Wu C.H., Murthy H.N., Hahn E.J., Paek K.Y. (2007), Improved production of caftaric acid, chlorogenic acid and cichoric acid in suspension cultures of *Echinacea purpurea* by the manipulation of incubation temperature and photoperiod, *Biochemical Engineering Journal*, 36(3), pp. 301-303.
- [125]. Wu H., Hong-Yan Y., Xiang-Lin Y., Yu-Hua L. (2013), Diversity of endophytic fungi from roots of *Panax ginseng* and their saponin yield capacities, *SpringerPlus*, 2(1), pp. 107-116.
- [126]. Wu J.Y., Zhong J.J. (1999), Production of ginseng and its bioactive components in plant cell culture: Current technological and applied aspects, *Journal of Biotechnology*, 68, pp. 89-99.
- [127]. Xiang-Yang H.U., Neill S.J., Wei-Ming C.A.I., Zhang-Cheng T. (2003), Activation of plasma membrane NADPH oxidase and generation of H₂O₂ mediate the induction of PAL activity and saponin synthesis by endogenous elicitor in suspension-cultured cells of *Panax ginseng*, *Acta Botanica Sinica*, 45(12), pp. 1434-1441.
- [128]. 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, *Bioresource Technology*, 101, pp. 4708-4716.
- [129]. Yamasaki K. (2000), Bioactive saponins in Vietnamese ginseng (*Panax vietnamensis*), *Pharmaceutical Biology*, 38, pp. 16-24.
- [130]. Yu K.W. (2000), *Production of the useful metabolites through bioreactor culture of Korean ginseng (Panax ginseng C.A. Meyer)*, Doctor Thesis, Chungbuk National University, Korea.
- [131]. Yu K.W., Gao W., Hahn E.J., Paek K.Y. (2002), Jasmonic acid improves ginsenoside accumulation in adventitious root culture of *Panax ginseng* C.A. Meyer, *Biochemical Engineering Journal*, 11, pp. 211-215.
- [132]. Yuan Y.J., Wei Z.J., Miao Z.Q., Wu J.C. (2002), Acting paths of elicitors on taxol biosynthesis pathway and their synergistic effect, *Biochemical Engineering Journal*, 10, pp. 77-83.
- [133]. Yun-soo K., Eun-joo H., Edward C.Y., 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 Cellular & Developmental Biology – Plant*, 39, pp. 245-249.

- [134]. Yun-Soo K., Jung-Yeon H., Soon L., Yong-Eui C. (2009), Ginseng metabolic engineering: Regulation of genes related to ginsenoside biosynthesis, *Journal of Medicinal Plants Research*, 3(13), pp. 1270-1276.
- [135]. Zhang J.Y., Bae T.W., Boo K.H., Sun H.J., Song I.J., Pham C.H., Ganesan M., Yang D.H., Kang H.G., Ko S.M., Riu K.Z., Lim P.O., Lee H.Y. (2011), Ginsenoside production and morphological characterization of wild ginseng (*Panax ginseng* Meyer) mutant lines induced by γ -irradiation (^{60}Co) of adventitious roots, *Journal of Ginseng Research*, 35(3), pp. 283-293.
- [136]. Zhang Y.H., Zhong J.J., Yu J.T. (1996), Effect of nitrogen source on cell growth and production of ginseng saponin and polysaccharide in suspension cultures of *Panax notoginseng*, *Biotechnology Progress*, 12, pp. 567-571.
- [137]. Zhao J., Davis L.C., Verpoorte R. (2005), Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites, *Biotechnology Advances*, 23, pp. 283-333.
- [138]. Zhao J.L., Zhou L.G., Wu J.Y. (2010), Effects of biotic and abiotic elicitors on cell growth and tanshinone accumulation in *Salvia miltiorrhiza* cell cultures, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87, pp. 137-144
- [139]. Zhao S.J., Li C.Y., Qian Y.C., Luo X.P., Zhang X., Wang X.S., Kang B.Y. (2004), Induction of hairy roots of *Panax ginseng* and studies on suitable culture condition of ginseng hairy roots, *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*, 20(2): 215-220.
- [140]. Zhong J.J., Zhang Z.Y. (2005), High density cultivation of *Panax notoginseng* cell cultures with methyl jasmonate elicitation in a centrifugal impeller bioreactor, *Engineering in Life Sciences*, 5, pp. 471-474.

PHỤ LỤC

1. Thành phần của môi trường MS (Murashige và Skoog, 1962), SH (Schenk và Hildebrandt, 1972), B5 (Gamborg và cs, 1968).

	MS	SH	B5	MSCB
Đa lượng (mg/L)				
NH ₄ NO ₃	1650	-	-	-
KNO ₃	1900	2500	2500	1870
CaCl ₂ .2H ₂ O	440	200	113,25	440
MgSO ₄ .7H ₂ O	370	400	122,1	370
KH ₂ PO ₄	170	-	-	-
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	-	-	-
NH ₄ H ₂ PO ₄	-	300	-	827
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	-	-	150	-
Vi lượng (mg/L)				
KI	0,83	1,0	3,0	0,83
H ₃ BO ₃	6,2	5,0	-	6,2
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3	-	-	22,3
MnSO ₄ .H ₂ O	-	10	10	-
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6	1,0	2,0	8,6
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25	0,1	0,25	0,25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	0,2	2,5	0,025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	0,1	0,025	0,025
Na ₃ EDTA	37,3	20	37,5	37,3
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8	15	-	27,8
Vitamin (mg/L) và chất hữu cơ (g/L)				
Myo-Inositol	100	1000	100	100
Nicotinic acid	0,5	5,0	0,5	0,5
Pyridoxine HCl	0,5	0,5	1,0	0,5
Thiamine HCl	0,1	5,0	10,0	0,1
Glycine	2,0	-	-	2,0
Sucrose	30	30	30	30
pH	5,8	5,8	5,8	5,8

2. Kết quả phân tích Duncan's test ($p < 0,05$) bằng phần mềm SPSS 20.0

1.1. Ảnh hưởng nguồn rế bất định lên sự hình thành và tăng trưởng RTC sâm Ngọc Linh

Duncan		Số rế thứ cấp							
Nghiem thức	N	Subset for alpha = 0.05							
		1	2	3	4	5	6	7	8
1. L-TM-1	3	.33							
9. -TM-1	3	.67	.667						
5. CL-TM-1	3	1.33	1.33	1.33					
2. L-TM-2	3		2.00	2.00	2.00				
3. KTM-1	3			2.33	2.33				
7. CL-KTM-1	3				3.00				
10. C-TM-2	3					6.00			
4. L-KTM-2	3						7.33		
11. C-KTM-1	3						8.33		
6. CL-TM-2	3							10.33	
12. C-KTM-2	3								13.33
8. CL-KTM-2	3								13.67
Sig.		.142	.053	.142	.142	1.000	.122	1.000	.598

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Khối lượng tươi

Duncan		Số rế thứ cấp						
Nghiem thức	N	Subset for alpha = 0.05						
		1	2	3	4	5	6	7
1. L-TM-1	3	29.3333						
9.0. C-TM-1	3	3p.3333						
7. CL-KTM-1	3		39.6667					
5. CL-TM-1	3		42.3333					
2. L-TM-2	3			49.6667				
11. C-KTM-1	3			51.0000				
10. C-TM-2	3				56.3333			
3. L-KTM-1	3				57.6667			
6. CL-TM-2	3					65.0000		
4. L-KTM-2	3						71.3333	
12. C-KTM-2	3						73.0000	
8. CL-KTM-2	3							78.0000
Sig.		.656	.241	.554	.554	1.000	.460	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Duncan		Chiều dài rế					
Nghiem thức	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
1. L-TM-1	3	.3667					
9. C-TM-1	3	.6667					
2. L-TM-2	3	.8333					
5. CL-TM-1	3		1.6667				
3. L-KTM-1	3		2.0000				
11. C-KTM-1	3		2.3333	2.3333			
7. L-KTM-1	3			3.1333	3.1333		
4. L-KTM-2	3				3.3333	3.3333	
10. C-TM-2	3					4.0333	
12. C-KTM-2	3						5.0000
6. CL-TM-2	3						5.2333
8.000 CL-KTM-2	3						5.6000
Sig.		.278	.125	.055	.619	.091	.166

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Phần trăm ra rế

Duncan		Số rế thứ cấp				
Nghiem thức	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
1. L-TM-1	3	31.6667				
5.000 CL-TM-1	3		46.0000			
2. L-TM-2	3		46.6667			
9. C-TM-1	3		48.3333			
6. CL-TM-2	3			53.6667		
10. C-TM-2	3			60.0000		
11. C-KTM-1	3				75.0000	
7. CL-KTM-1	3				79.0000	
3. L-KTM-1	3				82.3333	
12. C-KTM-2	3				83.3333	
4. L-KTM-2	3					93.3333
8. CL-KTM-2	3					94.3333
Sig.		1.000	.141	.183	.110	.830

Tests of Between-Subjects Effects

Source	Dependent Variable	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
NM * TM	Phần trăm ra rế	840.167 ^a	2	420.083	13.139	.000
	Số rế thứ cấp	67.389 ^b	2	33.694	57.762	.000
NM * KT	Chiều dài rế	8.961 ^c	2	4.480	18.931	.000
	Khối lượng tươi	273.500 ^d	2	136.750	18.508	.000
TM * KT	Phần trăm ra rế	13.500	2	6.750	.211	.811
	Số rế thứ cấp	5.444	1	5.444	9.333	.005
	Chiều dài rế	.218	1	.218	.920	.347
NM * TM * KT	Khối lượng tươi	6.250	1	6.250	.846	.367
	Phần trăm ra rế	.028	1	.028	.001	.977
	Số rế thứ cấp	5.056	2	2.528	4.333	.025
Error	Chiều dài rế	1.621	2	.810	3.424	.049
	Khối lượng tươi	223.167	2	111.583	15.102	.000
	Phần trăm ra rế	64.389	2	32.194	1.007	.380
Error	Số rế thứ cấp	14.000	24	.583		
	Chiều dài rế	5.680	24	.237		
	Khối lượng tươi	177.333	24	7.389		
Total	Phần trăm ra rế	767.333	24	31.972		
	Số rế thứ cấp	1968.000	36			
	Chiều dài rế	409.000	36			
Corrected Total	Khối lượng tươi	112495.000	36			
	Phần trăm ra rế	172703.000	36			
	Số rế thứ cấp	789.222	35			
Total	Chiều dài rế	116.590	35			

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Số rễ

Nghiệm thức	N	Subset for alpha = 0.05						
		1	2	3	4	5	6	7
Duncan ^c	12	.7500						
	4	1.5000	1.5000					
	11	1.5000	1.5000					
	8	1.7500	1.7500					
	3		2.7500	2.7500				
	10		2.7500	2.7500				
	2			4.0000	4.0000			
	9			4.0000	4.0000			
	7				4.7500	4.7500		
	1					5.7500		
	5						10.2500	
	6							13.5000
	0							13.7500
Sig.		.217	.132	.123	.337	.176	1.000	.732

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000.

Khối lượng tươi

Nghiệm thức	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
Duncan ^c	12	60.0000					
	4	70.2500					
	1	85.5000					
	0	87.7500					
	9		117.5000				
	2		121.0000				
	5		125.2500				
	7		132.2500				
	8			164.2500			
	11				196.2500		
	3					229.0000	
	10					233.0000	233.0000
	6						260.2500
Sig.		.089	.365	1.000	1.000	.785	.069

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000.

Khối lượng khô

Nghiệm thức	N	Subset for alpha = 0.05							
		1	2	3	4	5	6	7	8
Duncan ^c	0	4.7500							
	12	5.0000							
	4	5.9750	5.9750						
	1	6.5000	6.5000						
	5		7.7500						
	9			10.2250					
	8			11.7750	11.7750				
	7			12.2500	12.2500				
	2				13.7500	13.7500			
	10					15.2500	15.2500		
	3						17.0000	17.0000	
	11							18.5000	
	6								21.5000
Sig.		.155	.135	.089	.097	.181	.120	.181	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000.

1.4. Ảnh hưởng của môi trường khoáng lên sự hình thành và tăng trưởng của rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh in vitro

Số rễ thứ cấp

Nghiệm thức	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Duncan ^c	2	14.0000		
	0		16.5000	
	1			18.2500
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000.

Chiều dài rễ

Nghiệm thức	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Duncan ^c	2	1.3500		
	0		3.6250	
	1			4.5000
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000.

Khối lượng tươi

Nghiệm thức	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Duncan ^c	0	206.7500		
	2		312.5000	
	1			346.2500
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000.

Khối lượng khô

Nghiệm thức	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
Duncan ^c	0	20.7500	
	2	21.7500	
	1		31.2500
Sig.		.760	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000.

1.5. Ảnh hưởng các loại đường carbohydrate lên sự hình thành và tăng trưởng của rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh in vitro

Số rễ thứ cấp

Nghiệm thức	N	Subset for alpha = 0.05						
		1	2	3	4	5	6	
Duncan ^a	4	3	4.0000					
	6	3		11.0000				
	3	3			13.0000			
	0	3				15.2233		
	5	3				15.6667	15.6667	
	2	3					16.8333	
	1	3						19.3333
Sig.			1.000	1.000	1.000	.527	.110	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Chiều dài rễ

Nghiệm thức	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	
Duncan ^a	5	3	2.6000			
	3	3	2.6667			
	4	3	2.8667			
	2	3	3.5000	3.5000		
	0	3		4.3333	4.3333	
	6	3			4.6667	
	1	3				6.5667
Sig.			.114	.113	.510	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Khối lượng tươi

Nghiệm thức	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	
Duncan ^a	4	3	63.3333			
	6	3	99.6667			
	3	3		219.6667		
	2	3			281.0000	
	5	3			316.6667	
	0	3			323.6667	
	1	3				396.0000
Sig.			.091	1.000	.061	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Khối lượng khô

Nghiệm thức	N	Subset for alpha = 0.05						
		1	2	3	4	5	6	
Duncan ^a	4	3	5.6667					
	6	3		9.2667				
	3	3			21.5000			
	2	3				22.8333		
	0	3					24.3333	
	5	3					24.6667	
	1	3						26.6667
Sig.			1.000	1.000	1.000	1.000	.548	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

1.6. Ảnh hưởng của thời gian chiếu sáng lên sự tăng sinh và tích lũy saponin của rễ thứ cấp nuôi cấy từ rễ bất định sâm Ngọc Linh in vitro

Số rễ thứ cấp

nghiệm thức	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	
Duncan ^a	3	3	1.0000		
	2	3		8.6667	
	0	3			18.6667
	1	3			19.0000
Sig.			1.000	1.000	.545

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Chiều dài rễ

nghiệm thức	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	
Duncan ^a	3	3	.8333		
	2	3		2.8333	
	1	3			5.0000
	0	3			5.6667
Sig.			1.000	1.000	.219

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Khối lượng tươi

nghiệm thức	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	
Duncan ^a	3	3	24.6667		
	2	3		188.6667	
	0	3			365.0000
	1	3			369.0000
Sig.			1.000	1.000	.281

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Khối lượng khô

nghiệm thức	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	
Duncan ^a	3	3	1.6667			
	2	3		13.6667		
	0	3			26.6667	
	1	3				34.3333
Sig.			1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

1.7. Ảnh hưởng loại đường carbohydrate lên sự hình thành và tăng trưởng rễ thứ cấp từ rễ bất định sâm Ngọc Linh in vitro

Trọng lượng tươi

Tỷ lệ chất khô

Duncan

Thử nghiệm	N	Subset for alpha = 0.05					Thử nghiệm	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5			1	2	3	4	
Không đường	3	51.6667					Không đường	3	6.42				
60mg Mantose	3	62.5333					60mg Mantose	3	6.94	6.94			
10mg Mantose	3	91.6667					50mg Mantose	3	7.37	7.37			
50mg Mantose	3	102.733					10mg Sucrose	3	7.80	7.80			
10mg D-Glucose	3		160.3333				30mg Mantose	3	8.22	8.22	8.22		
40mg Mantose	3		181.6667				30mg Sucrose	3	8.64	8.64	8.64		
30mg Mantose	3		182.6667				60mg Sucrose	3	8.85	8.85	8.85		
30mg D-Glucose	3		206.6667				30mg D-Glucose	3	8.89	8.89	8.89		
10mg Sucrose	3			374.3333			50mg D-Glucose	3	8.99	8.99	8.99		
40mg D-Glucose	3			379.3333			50mg Sucrose	3	9.16	9.16	9.16		
60mg D-Glucose	3				523.0000		40mg Mantose	3		9.54	9.54		
60mg Sucrose	3				526.6667		10mg Mantose	3		9.76	9.76		
50mg Sucrose	3				533.3333		40mg Sucrose	3		9.78	9.78		
40mg Sucrose	3				572.3333		10mg D-Glucose	3		9.82	9.82		
50mg D-Glucose	3				577.6667		40mg D-Glucose	3			10.96	10.96	
30mg Sucrose	3					641.33	60mg D-Glucose	3				13.03	13.03
Sig.		.105	.141	.860	.090	1.000	Sig.		.070	.061	.072	.106	.106

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Trọng lượng khô

Duncan

Thử nghiệm	N	Subset for alpha = 0.05								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
.Không đường	3	3.33333								
15.60mg Mantose	3	4.33333								
14.50mg Mantose	3	7.66667	7.66667							
11.10mg Mantose	3	9.00000	9.00000							
1.10mg D-Glucose	3		15.00000	15.00000						
12.30mg Mantose	3		15.33333	15.33333						
13.40mg Mantose	3			17.33333						
2.30mg D-Glucose	3			18.33333						
6.10mg Sucrose	3				29.33333					
3.40mg D-Glucose	3					41.56667				
10.60mg Sucrose	3					46.33333	46.33333			
9.50mg Sucrose	3					47.83333	47.83333	47.83333		
4.50mg D-Glucose	3						51.93333	51.93333	51.93333	
7.30mg Sucrose	3							55.33333	55.33333	
8.40mg Sucrose	3								56.00000	
5.60mg D-Glucose	3									67.40000
Sig.		.155	.056	.402	1.000	.105	.147	.054	.290	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

1.8. Ảnh hưởng của chitosan lên sự tăng sinh và tích lũy saponin của rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh in vitro

M-R2

G-Rb1

Duncan^{a,b}

NT	N	Subset for alpha = 0.05								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
50CHN	3	.16433333								
100CHN	3		.25073333							
Đoi chung	3			.39543333						
200SA	3			.39750000						
200CHN	3			.41450000	.41450000					
150CHN	3				.43280000					
150SA	3					.57646667				
100SA	3					.59930000				
100YE	3						.67870000			
50YE	3							.72430000		
150YE	3								.78683333	
200YE	2									.84215000
50SA	3									.86663333
Sig.		1.000	1.000	.239	.232	.139	1.000	1.000	1.000	.114

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.889.

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

Duncan^{a,b}

NT	N	Subset for alpha = 0.05								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
100CHN	3	.14200000								
Đoi chung	3	.14433333								
150SA	3		.17600000							
100YE	3			.20033333						
200CHN	3				.23066667					
150YE	3				.24400000	.24400000				
50SA	3				.24766667	.24766667				
50YE	3					.25166667				
200YE	2					.25600000				
150CHN	3						.32833333			
200SA	3							.35633333		
100SA	3								.38433333	
50CHN	3									.46566667
Sig.		.779	1.000	1.000	.060	.193	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.889.

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

Trong lượng tươi (mg)

Duncan^{a,b}

NT	N	Subset for alpha = 0.05								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
200SA	3	67.3667								
150SA	3	84.2333								
200YE	2		154.6000							
100CHN	3		159.9333							
100SA	3			200.0333						
150CHN	3			202.8667						
150YE	3				250.0333					
50CHN	3					271.8167				
200CHN	3						298.3333			
50SA	3							433.0667		
Doi chung	3								456.9000	
100YE	3								473.3000	
50YE	3									510.8333
Sig.		.063	.544	.747	1.000	1.000	1.000	1.000	.070	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.889.

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

Trong lượng khô (mg)

Duncan^{a,b}

NT	N	Subset for alpha = 0.05							
		1	2	3	4	5	6	7	8
200SA	3	6.7900							
150SA	3	8.1767							
200YE	2		15.3600						
100CHN	3		15.8467						
100SA	3			19.8000					
150CHN	3			20.3167					
150YE	3				25.0287				
50CHN	3				26.9267				
200CHN	3					29.5000			
Doi chung	3						41.8500		
50SA	3						43.5167		
100YE	3							47.2474	
50YE	3								51.1137
Sig.		.153	.610	.588	.055	1.000	.089	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.889.

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

G-Rg1

Duncan^{a,b}

NT	N	Subset for alpha = 0.05						
		1	2	3	4	5	6	7
50CHN	3	.26000000						
Doi chung	3		.33933333					
200CHN	3		.36833333					
200SA	3			.43866667				
100SA	3			.45533333				
50YE	3			.50200000	.50200000			
150SA	3			.50266667	.50266667			
100YE	3				.53400000			
200YE	2				.54200000			
50SA	3					.67466667		
150CHN	3					.67566667		
100CHN	3						1.63200000	
150YE	3							2.48233333
Sig.		1.000	.395	.091	.286	.976	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.889.

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

1.9. Ảnh hưởng của dịch chiết nấm men lên sự tăng sinh và tích lũy saponin của rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh in vitro

Trong lượng tươi (mg)

Duncan^{a,b}

NT	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
200YE	2	154.6000				
150YE	3		250.0333			
Doi chung	3			456.9000		
100YE	3				473.3000	
50YE	3					510.8333
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.727.

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

Trong lượng khô (mg)

Duncan^{a,b}

NT	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
200YE	2	15.3600				
150YE	3		25.0287			
Doi chung	3			41.8500		
100YE	3				47.2474	
50YE	3					51.1137
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.727.

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

M-R2

Duncan^{a,b}

NT	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
Doi chung	3	.39543333			
100YE	3		.67870000		
50YE	3		.72430000		
150YE	3			.78583333	
200YE	2				.84215000
Sig.		1.000	.068	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.727.

G-Rb1

Duncan^{a,b}

NT	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Doi chung	3	.14433333		
100YE	3		.20033333	
150YE	3			.24400000
50YE	3			.25166667
200YE	2			.25600000
Sig.		1.000	1.000	.235

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.727.

G-Rb1

Duncan^{a,b}

NT	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Doi chung	3	.33933333		
50YE	3		.50200000	
100YE	3		.53400000	
200YE	2		.54200000	
150YE	3			2.48233333
Sig.		1.000	.512	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.727.

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

1.10. Ảnh hưởng của salicylic acid lên sự tăng sinh và tích lũy saponin của rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh in vitro

Trong lượng tươi (mg)

Duncan^a

NT	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
200SA	3	67.3667			
150SA	3	84.2333			
100SA	3		200.0333		
50SA	3			433.0667	
Doi chung	3				456.9000
Sig.		.098	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

G-Rb1

Trong lượng khô (mg)

Duncan^a

NT	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
200SA	3	6.7900		
150SA	3	8.1767		
100SA	3		19.8000	
Doi chung	3			41.8500
50SA	3			43.5167
Sig.		.233	1.000	.158

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

M-R2

Duncan^a

NT	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Doi chung	3	.39543333		
200SA	3	.39750000		
150SA	3		.57646667	
100SA	3		.59930000	
50SA	3			.86663333
Sig.		.861	.076	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

G-Rg1

Duncan^a

NT	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
Doi chung	3	.14433333				
150SA	3		.17600000			
50SA	3			.24766667		
200SA	3				.35633333	
100SA	3					.38433333
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Duncan^a

NT	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
Doi chung	3	.33933333			
200SA	3		.43866667		
100SA	3		.45533333		
150SA	3			.50266667	
50SA	3				.67466667
Sig.		1.000	.130	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

1.11. Ảnh hưởng của abscisic acid lên sự tăng sinh và tích lũy saponin của rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh in vitro

Trong lượng tươi (mg)

Duncan^a

NT	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
200ABA	3	76.3003			
150ABA	3	82.4733			
100ABA	3		107.1667		
50ABA	3			156.3333	
Doi chung	3				456.9000
Sig.		.232	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

G-Rb1

Trong lượng khô (mg)

Duncan^a

NT	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
200ABA	3	7.5843			
150ABA	3	8.2517			
100ABA	3		10.5867		
50ABA	3			16.6667	
Doi chung	3				41.8500
Sig.		.501	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

M-R2

Duncan^a

NT	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
Doi chung	3	.39543333			
100ABA	3		.96993333		
50ABA	3			1.05836667	
200ABA	3				1.63736667
150ABA	3				1.65050000
Sig.		1.000	1.000	1.000	.526

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

G-Rg1

Duncan^a

NT	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
Doi chung	3	.14433333			
50ABA	3		.19766667		
100ABA	3		.20433333		
150ABA	3			.21900000	
200ABA	3				.27666667
Sig.		1.000	.134	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Duncan^a

NT	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
Doi chung	3	.33933333			
50ABA	3		.70300000		
200ABA	3		.73066667		
100ABA	3			1.23433333	
150ABA	3				1.50566667
Sig.		1.000	.289	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

1.12. Ảnh hưởng của jasmonic acid lên sự tăng sinh và tích lũy saponin của rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh in vitro

Trong lượng tươi (mg)

Duncan^a

NT	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
200JA	3	75.5567			
150JA	3		81.5567		
100JA	3			125.5567	
50JA	3				166.2433
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Trong lượng khô (mg)

Duncan^a

NT	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
200JA	3	7.5900			
150JA	3		8.5900		
100JA	3			12.7567	
50JA	3				15.8900
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

G-Rb1

Duncan^a

NT	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
200JA	3	40120600			
150JA	3		58166400		
100JA	3			71825800	
50JA	3				84897300
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

M-R2

Duncan^a

NT	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
100JA	3	1.30160600			
50JA	3		1.85463200		
150JA	3			2.46352200	
200JA	3				2.82644600
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

G-Rg1

Duncan^a

NT	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
200JA	3	1.97508667			
50JA	3		2.22656333		
150JA	3			2.52438667	
100JA	3				3.21942333
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

1.13. Ảnh hưởng của thời điểm bổ sung elicitor lên sự tăng sinh và tích lũy saponin của rễ thực vật sâm Ngọc Linh in vitro

RG1

Duncan^{a,b}

NT	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
10.000	4	7.61500				
30.000	4		9.36846			
20.000	5			17.69618		
40.000	4				22.15712	
.000	5					24.05200
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.348.

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

KLT

Duncan^{a,b}

NT	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
10.000	4	208.25000		
.000	5	254.40000		
20.000	5		373.40000	
40.000	4		374.75000	
30.000	4			656.50000
Sig.		.262	.973	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.348.

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

KLK

Duncan^{a,b}

NT	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
10.000	4	20.00000		
.000	5	24.40000		
40.000	4		29.50000	
20.000	5		33.20000	
30.000	4			64.00000
Sig.		.064	.115	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.348.

Duncan^{a,b}

NT	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
.000	5	236.60000				
40.000	4		301.32488			
10.000	4			327.25559		
30.000	4				405.03386	
20.000	5					567.50321
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.348.

MR2

Duncan^{a,b}

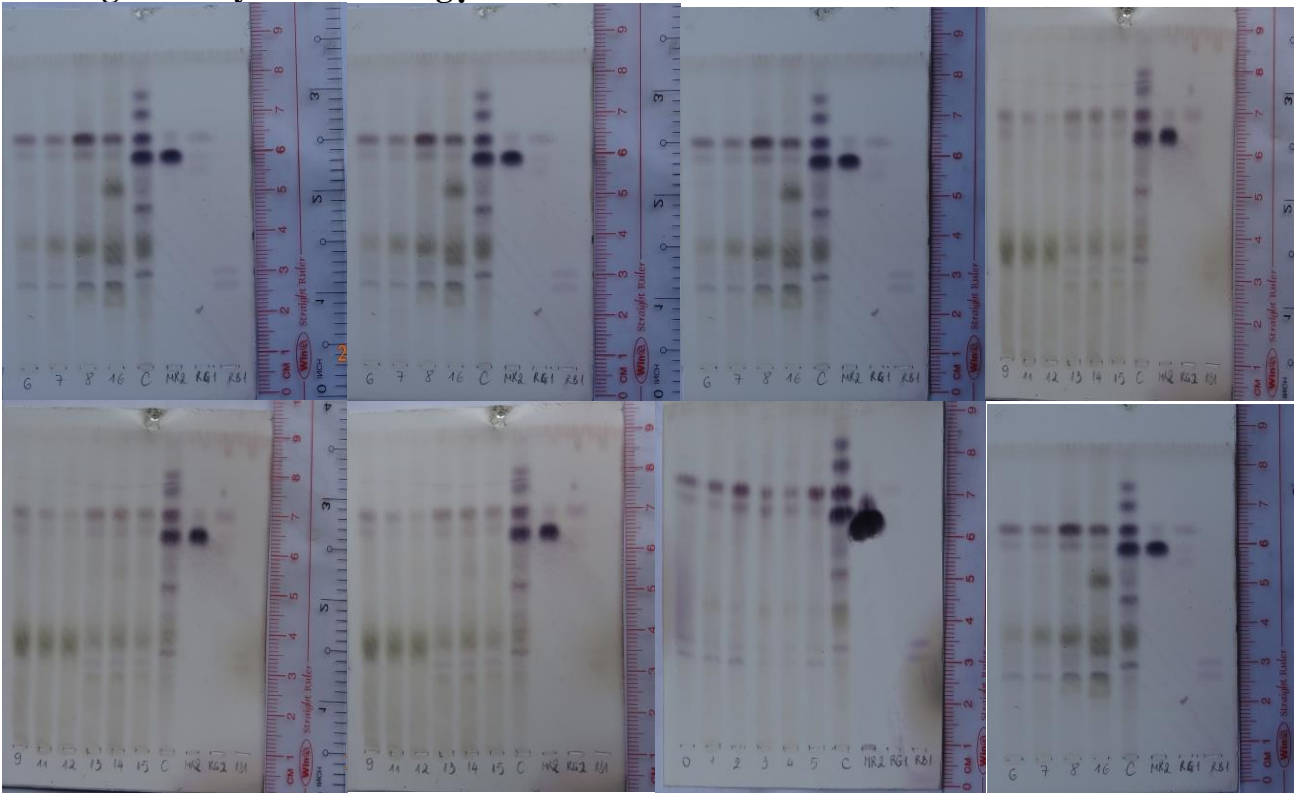
NT	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
30.000	4	186.95790				
20.000	5		431.47597			
40.000	4			502.80045		
.000	5				785.81000	
10.000	4					882.69635
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.348.

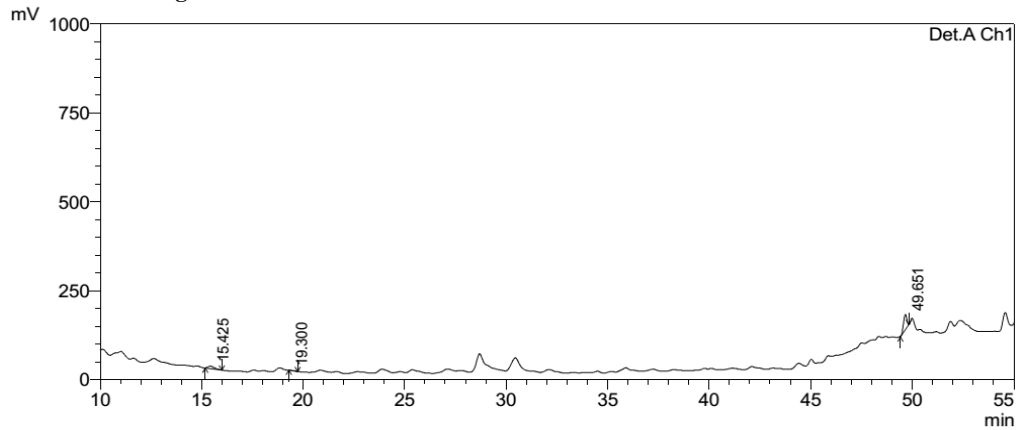
b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

3. Kết quả sắc ký lớp mỏng định tính các saponin dưới tác động đơn lẻ của các elicitor trong nuôi cấy RTC sâm Ngọc Linh

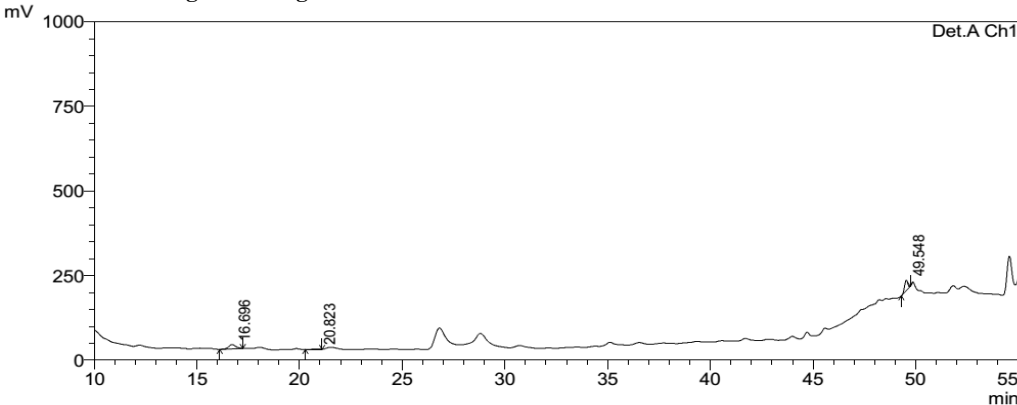


Kết quả phân tích HPLC định lượng các saponin dưới tác động đơn lẻ của các elicitor trong nuôi cấy RTC sâm Ngọc Linh

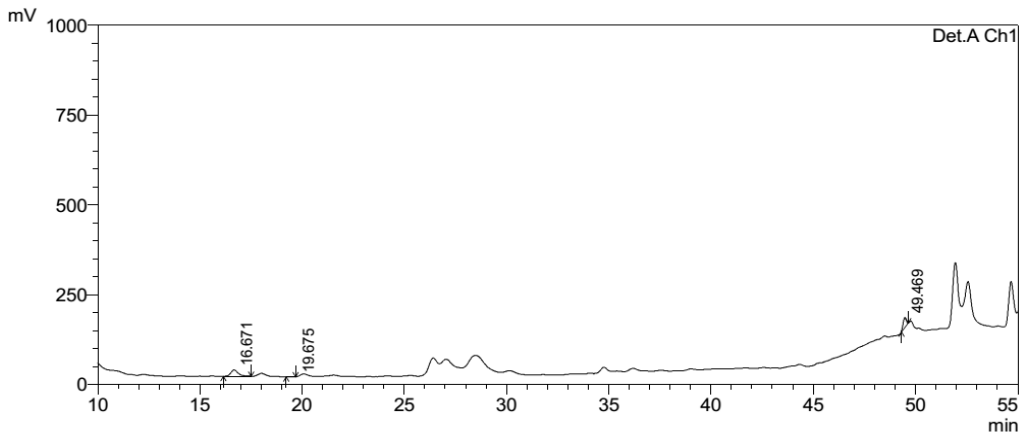
Mẫu 0: Đối chứng



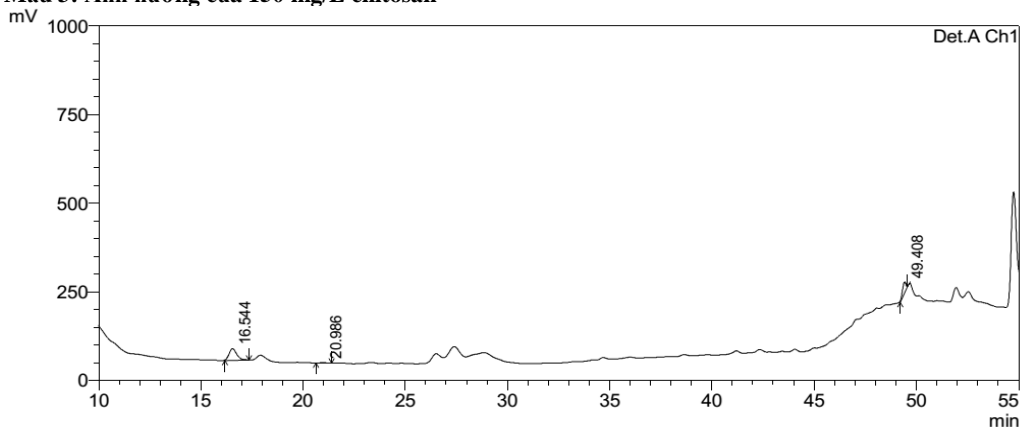
Mẫu 1: Ảnh hưởng của 50 mg/L chitosan



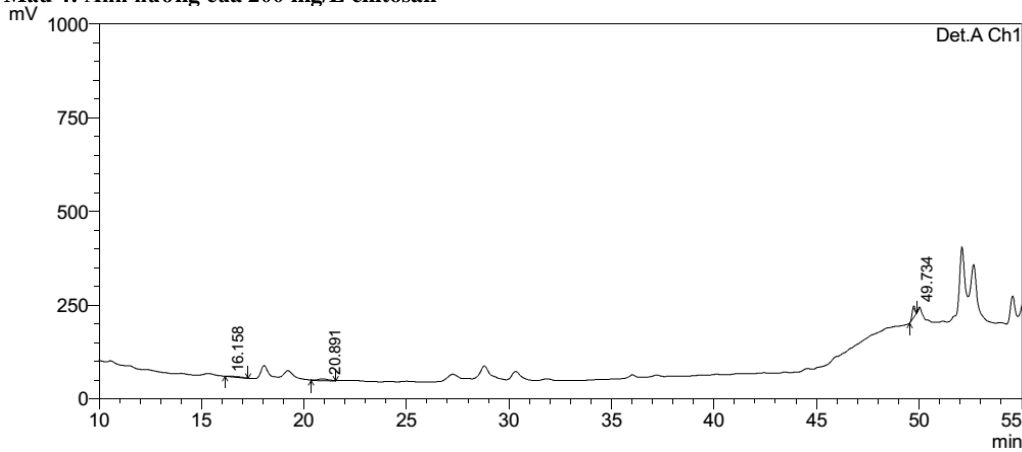
Mẫu 2: Ảnh hưởng của 100 mg/L chitosan



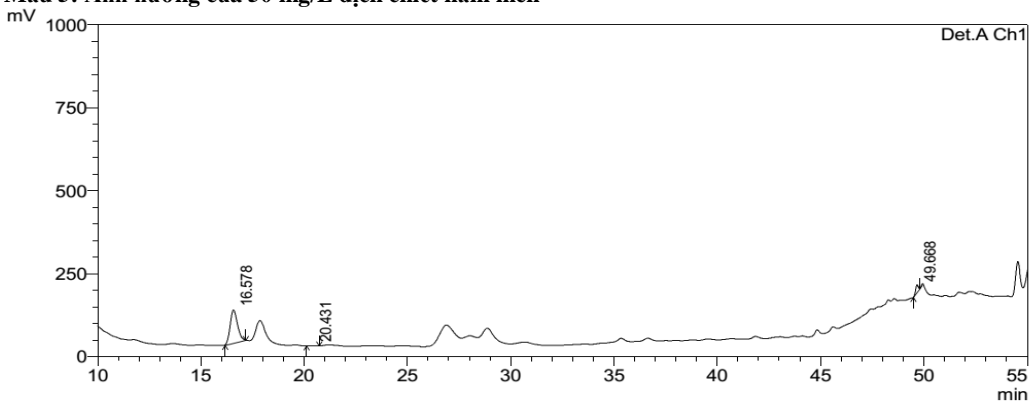
Mẫu 3: Ảnh hưởng của 150 mg/L chitosan



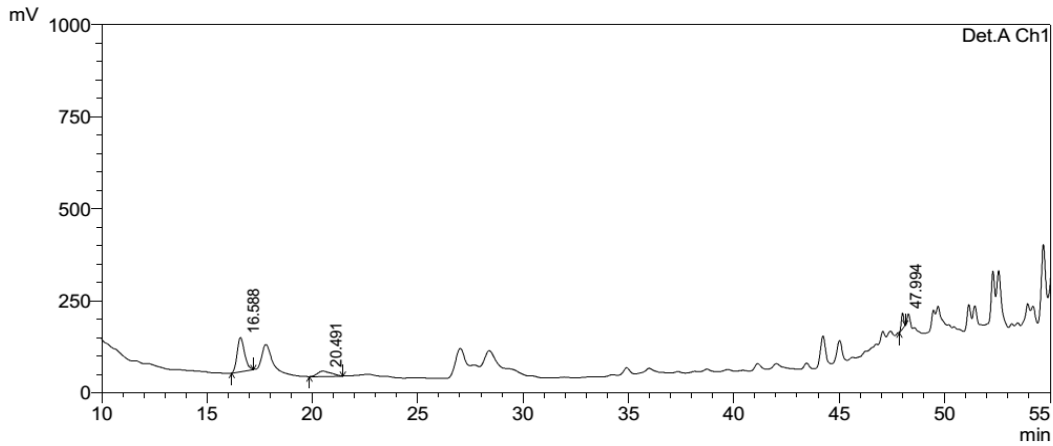
Mẫu 4: Ảnh hưởng của 200 mg/L chitosan



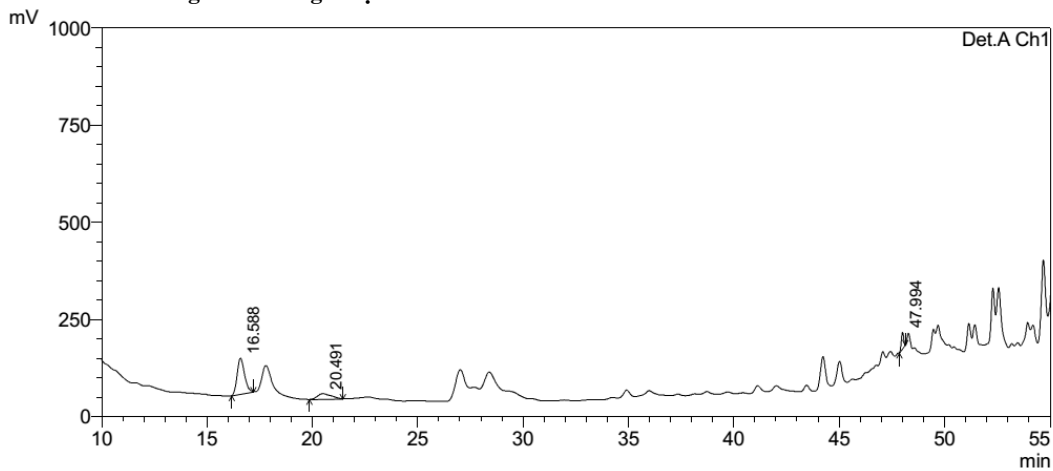
Mẫu 5: Ảnh hưởng của 50 mg/L dịch chiết nấm men



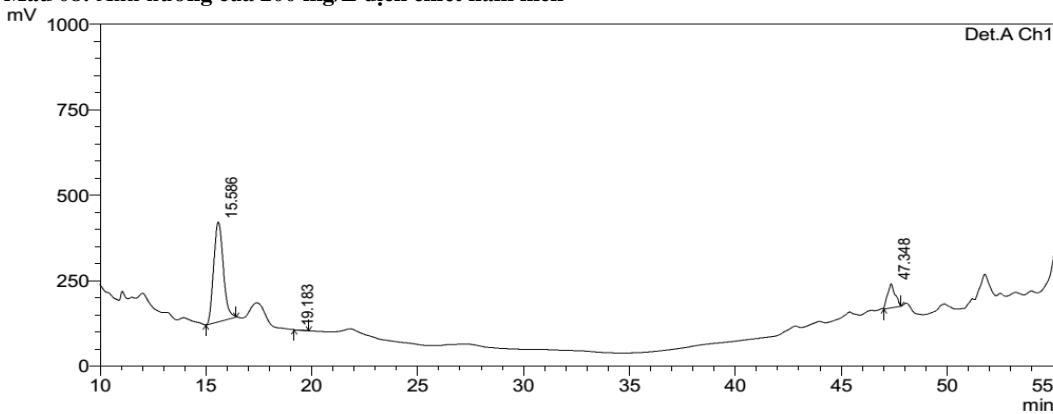
Mẫu 6: Ảnh hưởng của 100 mg/L dịch chiết nấm men



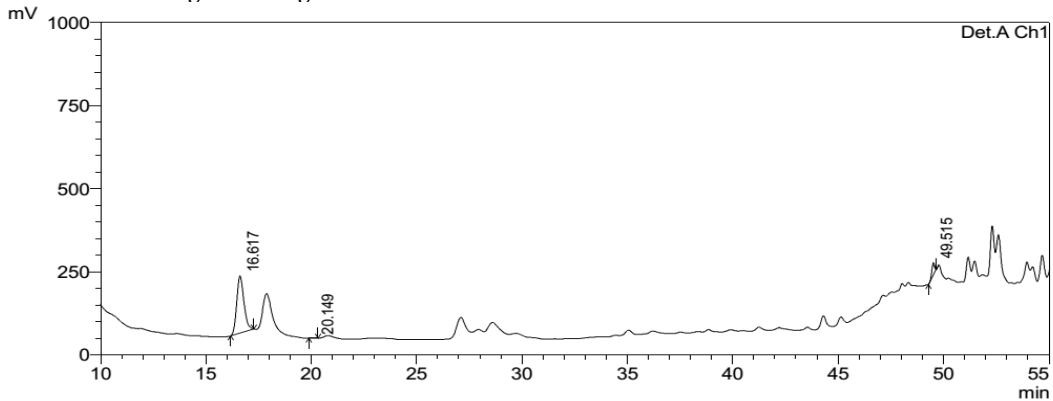
Mẫu 7: Ảnh hưởng của 150 mg/L dịch chiết nấm men



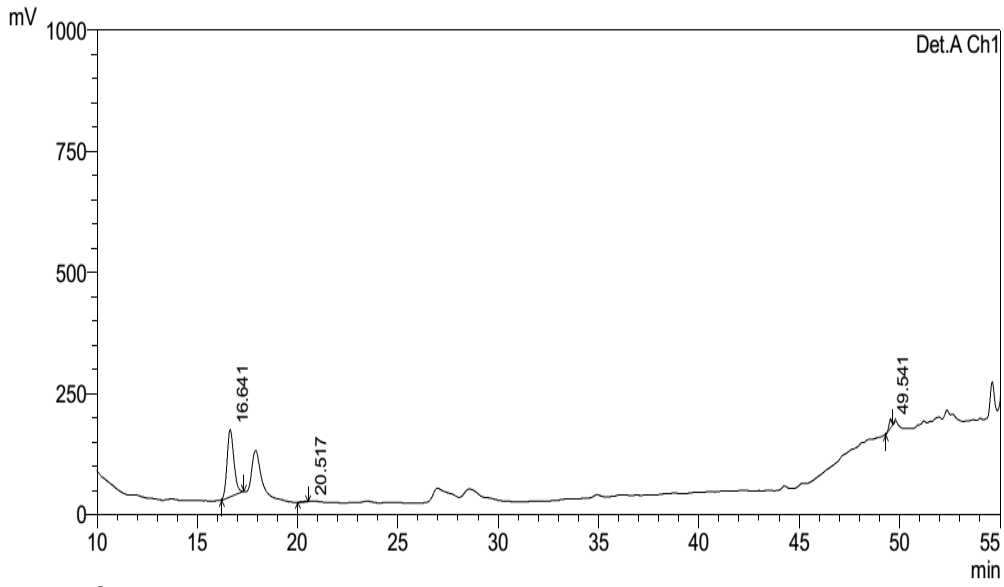
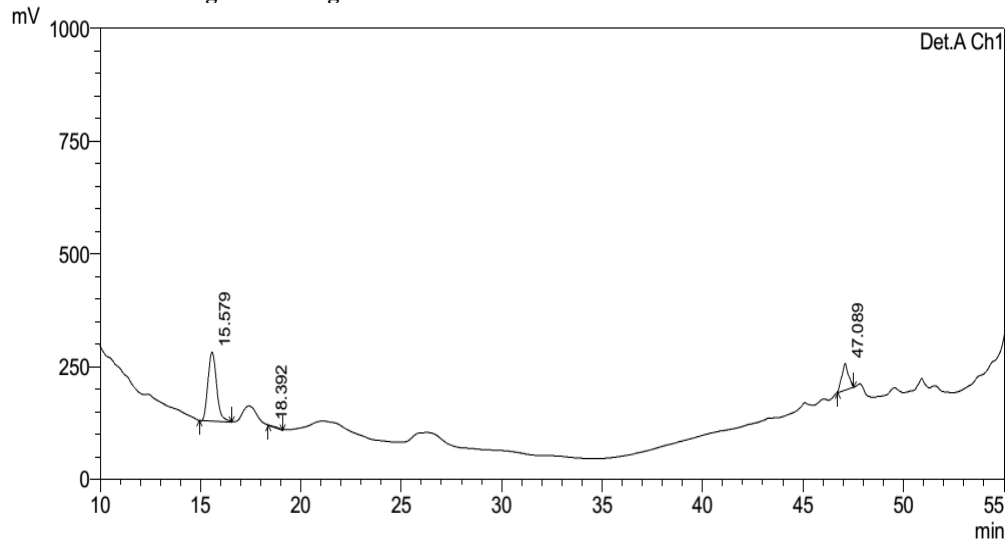
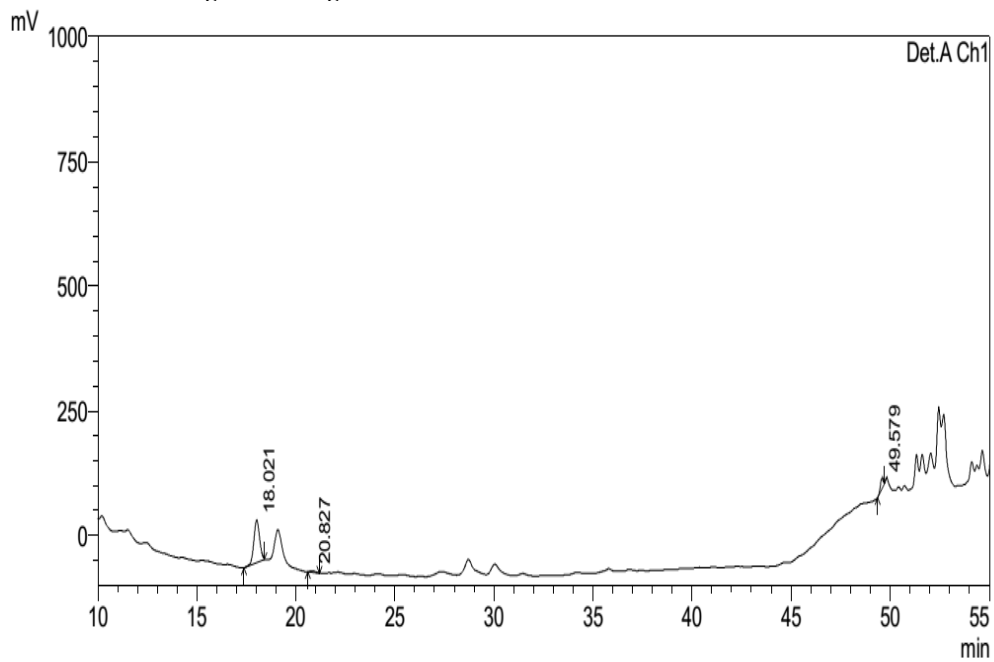
Mẫu 08: Ảnh hưởng của 200 mg/L dịch chiết nấm men

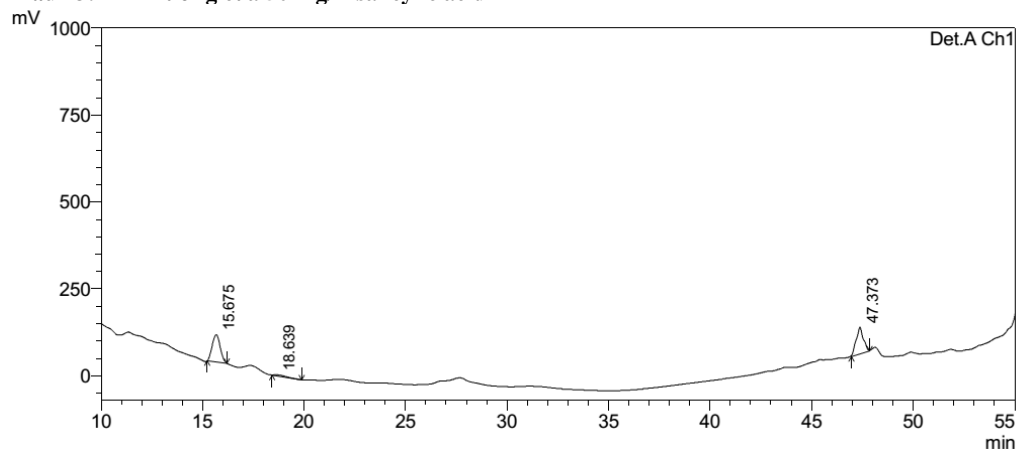
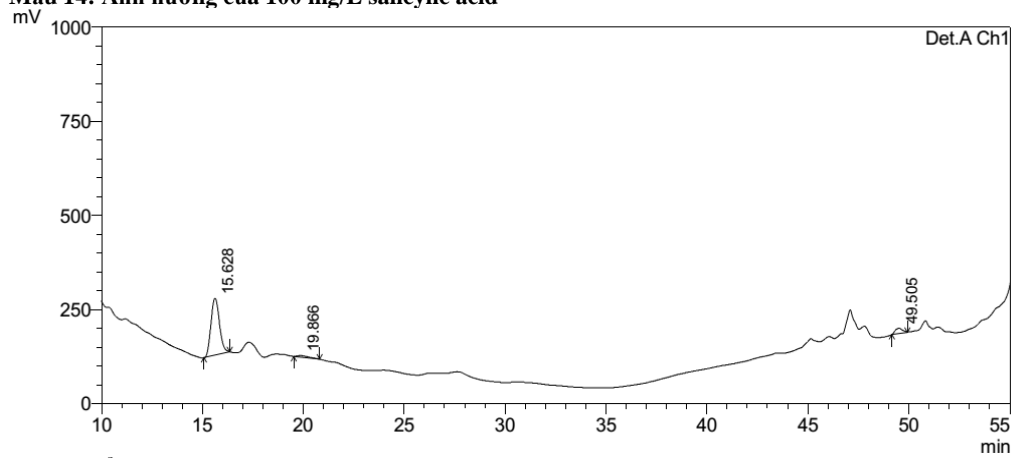
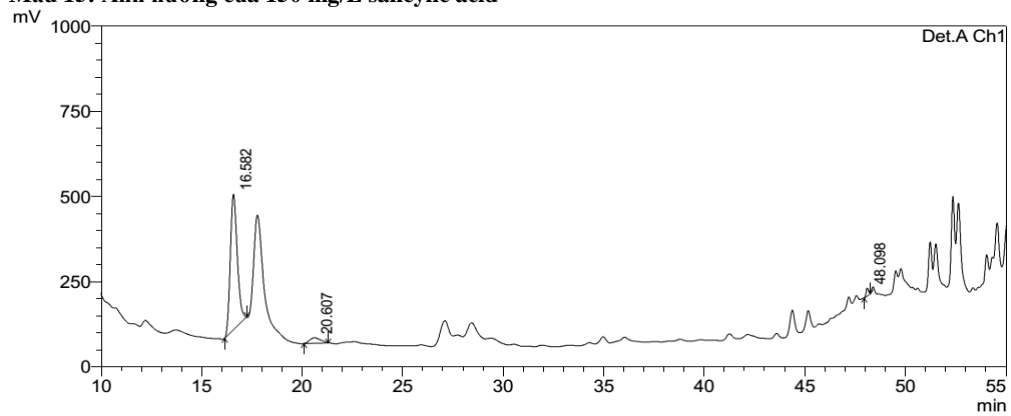
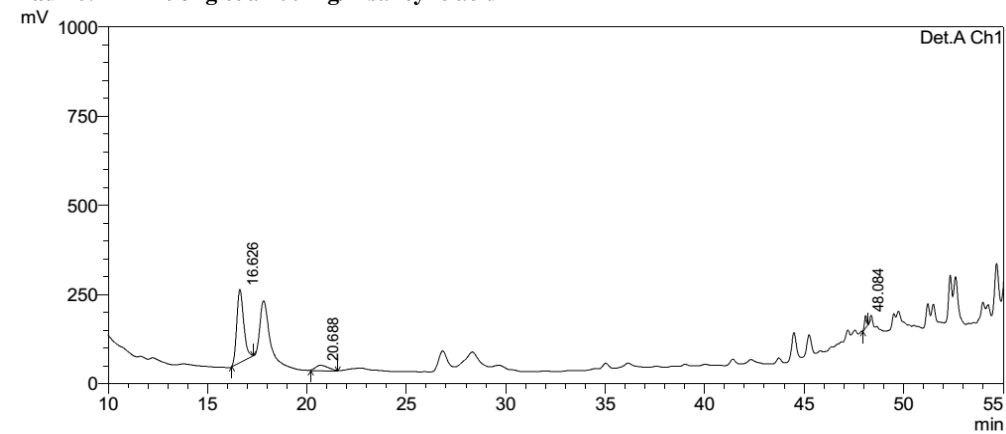


Mẫu 9: Ảnh hưởng của 50 mg/L abscisic acid

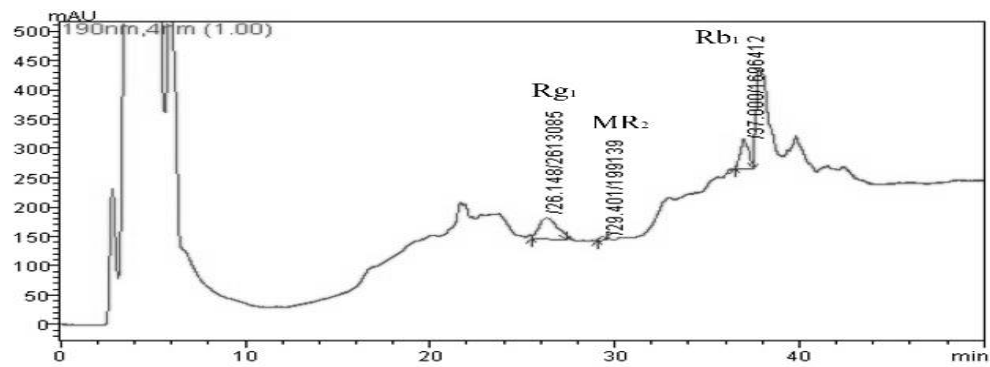


Mẫu 10: Ảnh hưởng của 100 mg/L abscisic acid

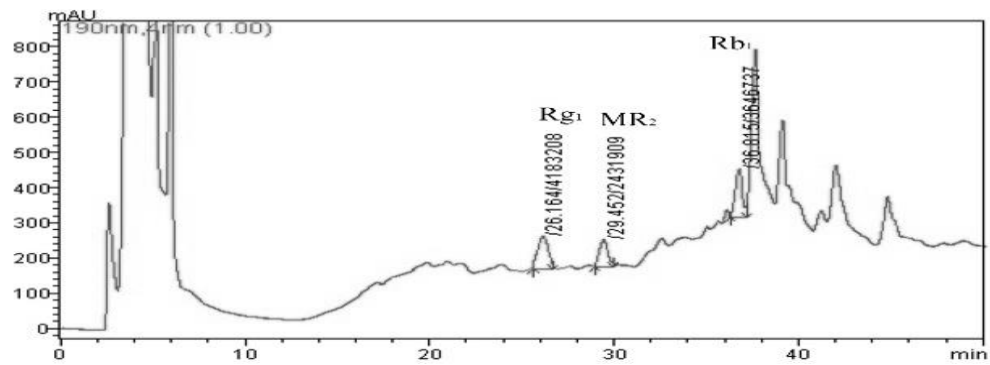
**Mẫu 11: Ảnh hưởng của 150 mg/L abscisic acid****Mẫu 12: Ảnh hưởng của 200 mg/L abscisic acid**

Mẫu 13: Ảnh hưởng của 50 mg/L salicylic acid**Mẫu 14: Ảnh hưởng của 100 mg/L salicylic acid****Mẫu 15: Ảnh hưởng của 150 mg/L salicylic acid****Mẫu 16: Ảnh hưởng của 200 mg/L salicylic acid**

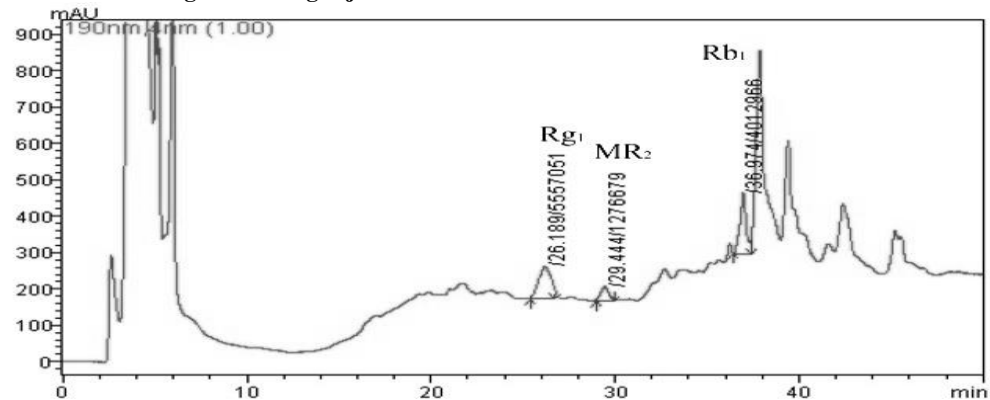
Mẫu 17: Ảnh hưởng của 50 mg/L jasmonic acid



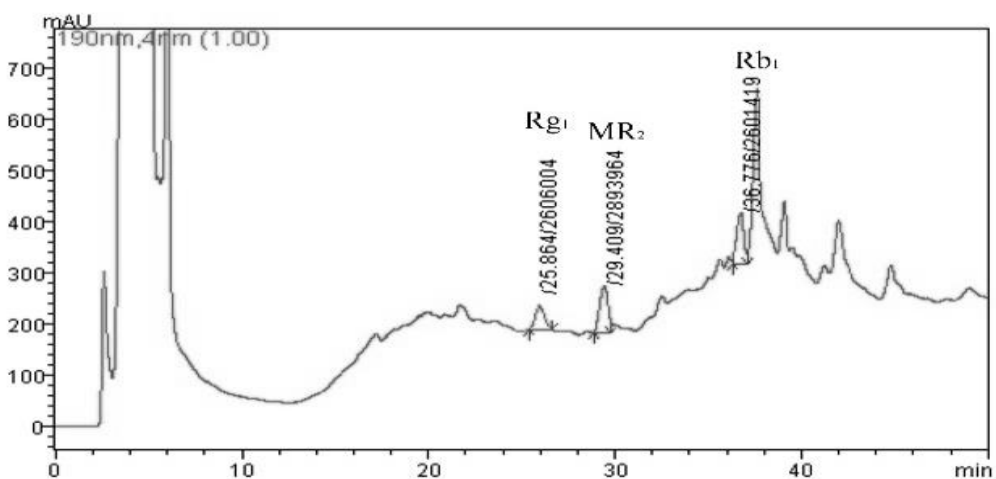
Mẫu 18: Ảnh hưởng của 100 mg/L jasmonic acid



Mẫu 19: Ảnh hưởng của 150 mg/L jasmonic acid

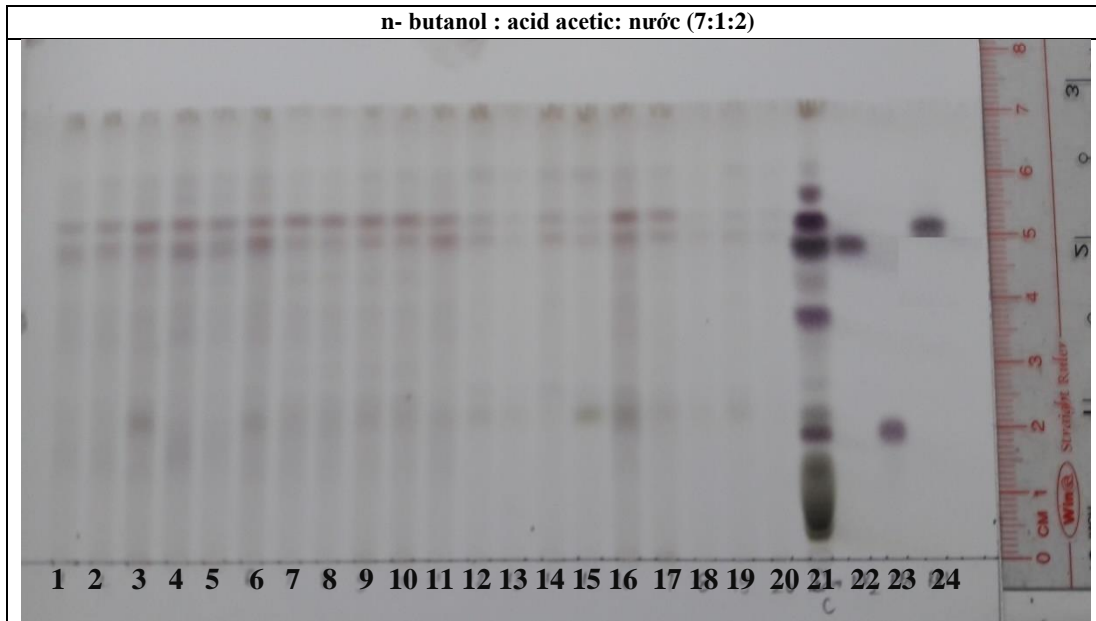


Mẫu 20: Ảnh hưởng của 200 mg/L jasmonic acid



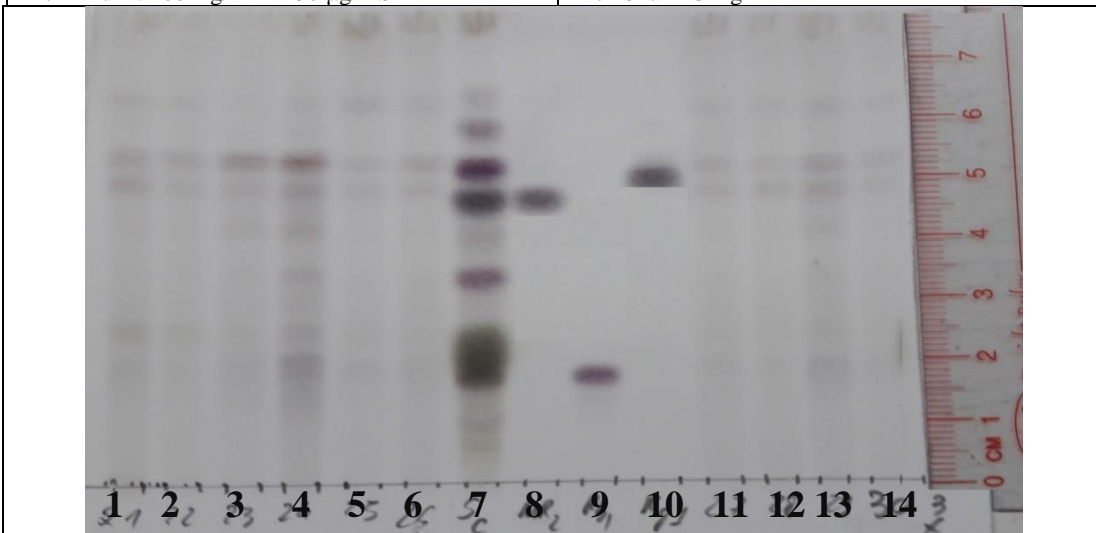
4. Kết quả sắc ký lớp mỏng định tính các saponin dưới tác động kết hợp và thời gian xử lý trong nuôi cấy RTC sâm Ngọc Linh

Sắc ký đồ mẫu khảo sát cho các vết có giá trị R_f và màu sắc tương đồng với vết của các chuẩn M-R2, G-Rb1, G-Rg1.



1. Mẫu 01: 25 mg/L YE+25 µg/L SA
2. Mẫu 02: 25 mg/L YE+50 µg/L SA
3. Mẫu 03: 25 mg/L YE+100 µg/L SA
4. Mẫu 04: 25 mg/L YE+150 µg/L SA
5. Mẫu 05: 25 mg/L YE+200 µg/L SA
6. Mẫu 06: 50 mg/L YE+25 µg/L SA
7. Mẫu 07: 50 mg/L YE+50 µg/L SA
8. Mẫu 08: 50 mg/L YE+100 µg/L SA
9. Mẫu 09: 50 mg/L YE+150 µg/L SA
10. Mẫu 10: 50 mg/L YE+200 µg/L SA
11. Mẫu 11: 100 mg/L YE+25 µg/L SA
12. Mẫu 12: 100 mg/L YE+50 µg/L SA

13. Mẫu 13: 100 mg/L YE+100 µg/L SA
14. Mẫu 14: 100 mg/L YE+150 µg/L SA
15. Mẫu 15: 100 mg/L YE+200 µg/L SA
16. Mẫu 16: 150 mg/L YE+25 µg/L SA
17. Mẫu 17: 150 mg/L YE+50 µg/L SA
18. Mẫu 18: 150 mg/L YE+100 µg/L SA
19. Mẫu 19: 150 mg/L YE+150 µg/L SA
20. Mẫu 20: 150 mg/L YE+200 µg/L SA
21. Sâm chuẩn
22. Chuẩn M-R2
23. Chuẩn G-Rb1
24. Chuẩn G-Rg1



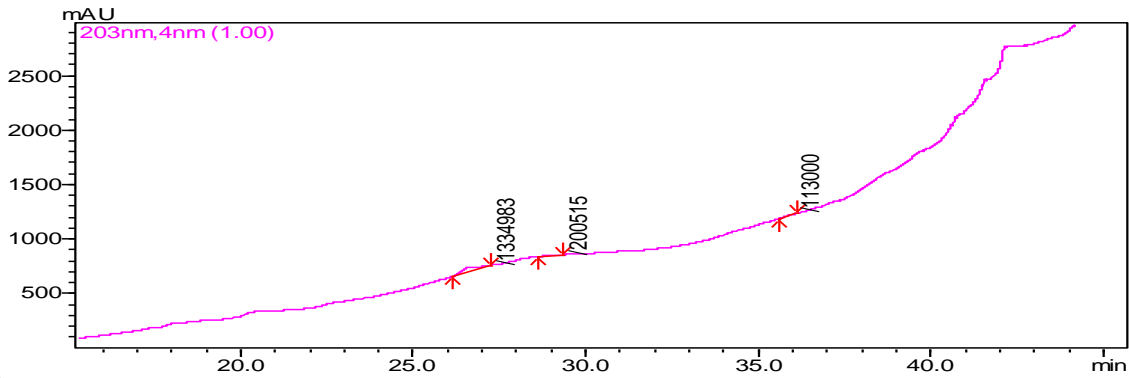
1. Mẫu 21: 200 mg/L YE+25 µg/L SA
2. Mẫu 22: 200 mg/L YE+50 µg/L SA
3. Mẫu 23: 200 mg/L YE+100 µg/L SA
4. Mẫu 24: 200 mg/L YE+150 µg/L SA
5. Mẫu 25: 200 mg/L YE+200 µg/L SA
6. Mẫu 26: Thêm 150 mg/L YE sau 10 ngày nuôi cấy
7. Sâm chuẩn

8. Chuẩn M-R2
9. Chuẩn G-Rb1
10. Chuẩn G-Rg1
11. Mẫu 27: Thêm 150 mg/L YE sau 20 ngày nuôi cấy
12. Mẫu 28: Thêm 150 mg/L YE sau 30 ngày nuôi cấy
13. Mẫu 29: Thêm 150 mg/L YE sau 40 ngày nuôi cấy
14. Mẫu 30: Thêm 150 mg/L YE giai đoạn đầu nuôi cấy

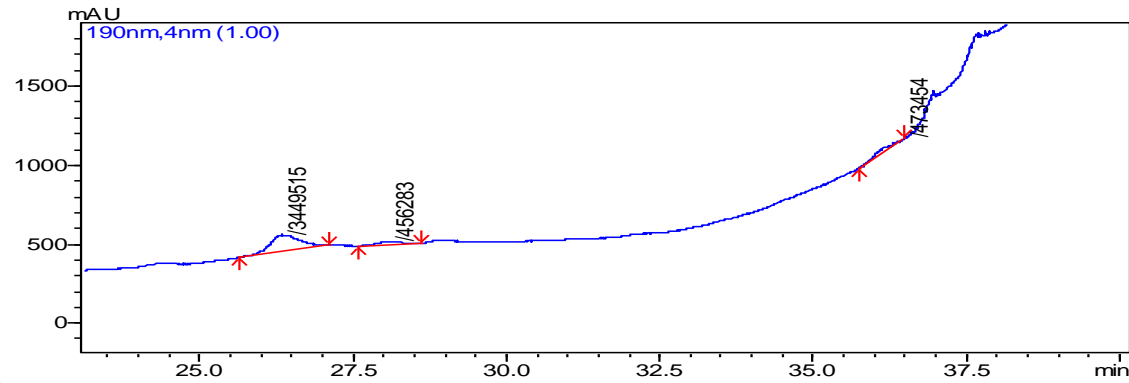
5. Kết quả định lượng các saponin dưới tác động kết hợp và thời gian xử lý trong nuôi cấy RTC sâm Ngọc Linh

SẮC KÝ ĐỒ MẪU SÂM

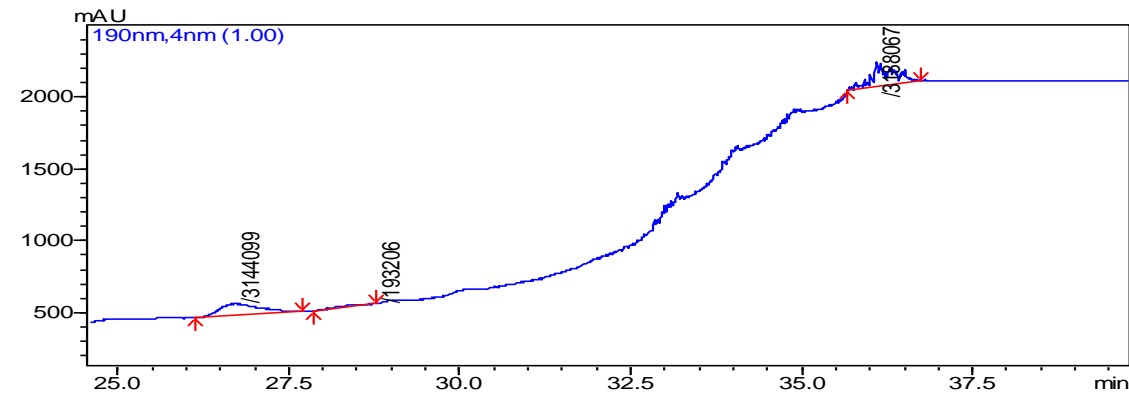
MẪU 1:



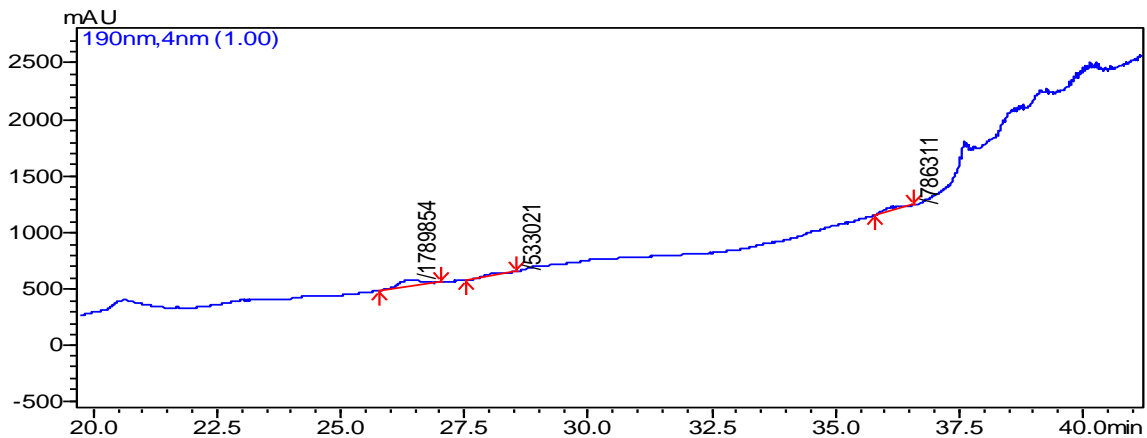
MẪU 2:



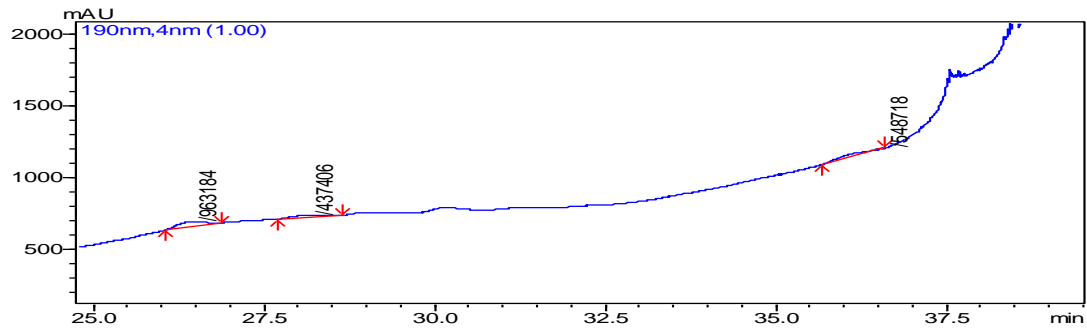
MẪU 3



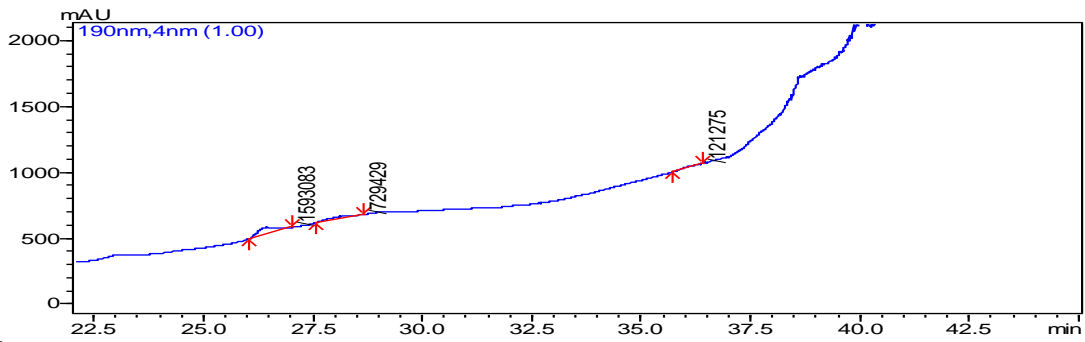
MẪU 4



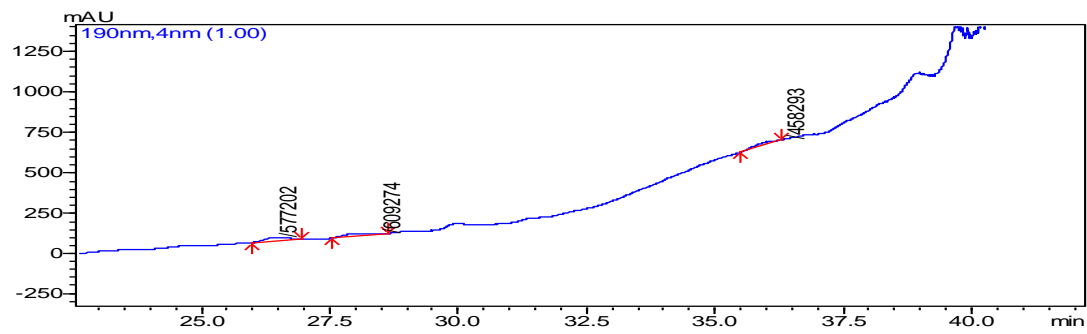
MÄU 5



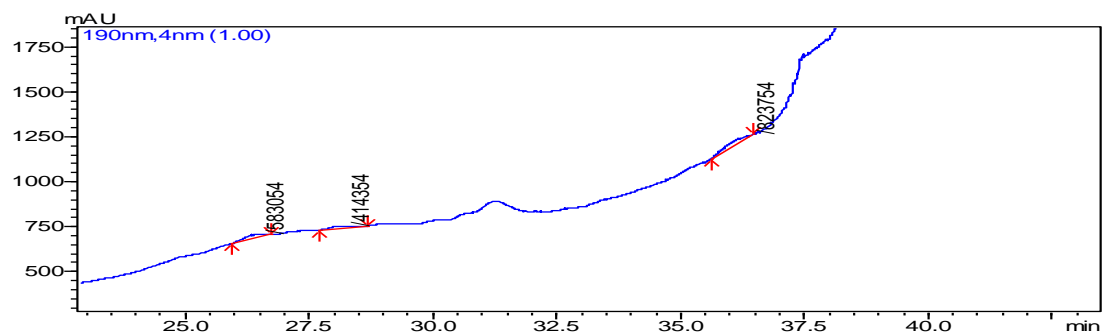
MÄU 6



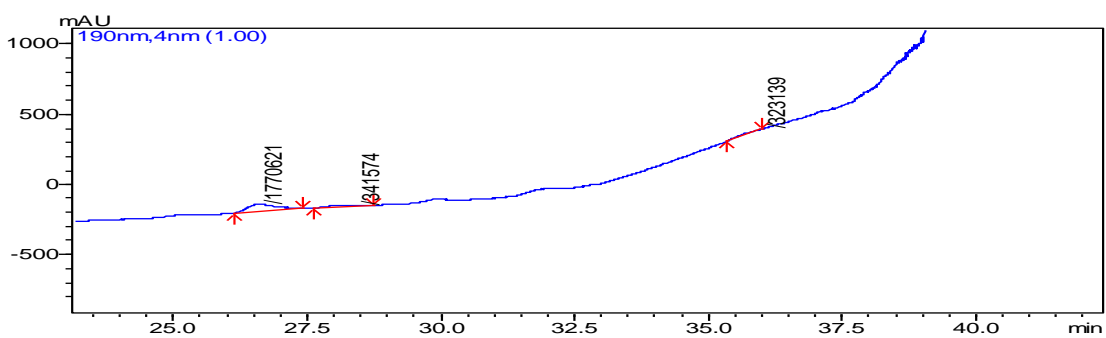
MÄU 7



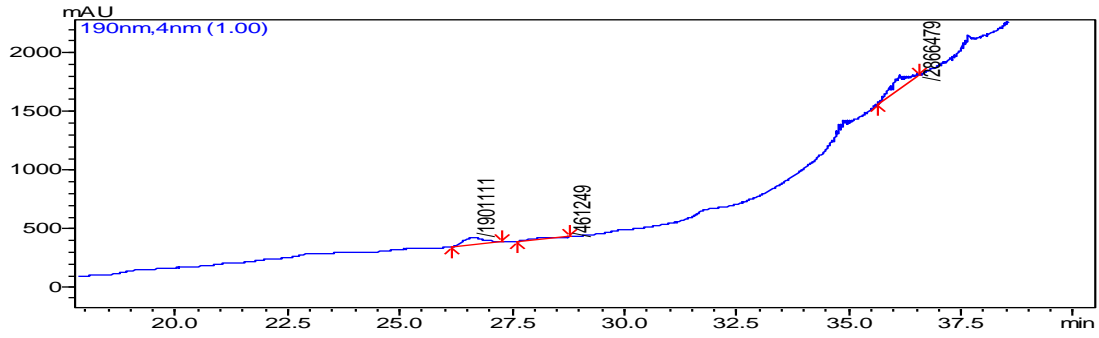
MÄU 8



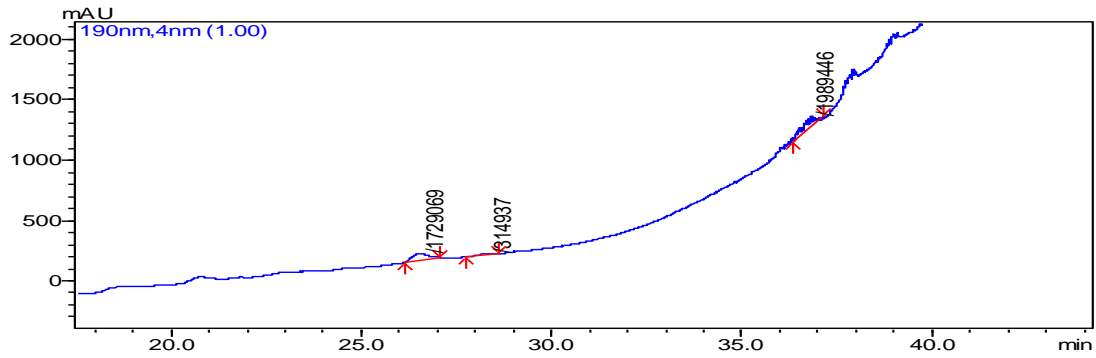
MÄU 9



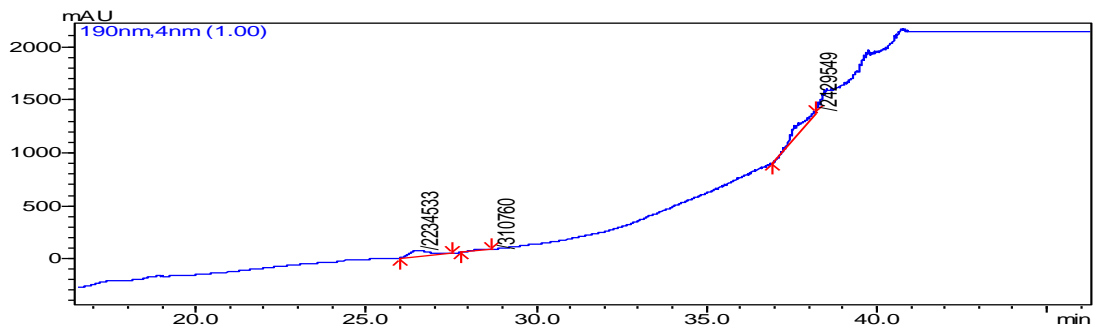
MĀU 10



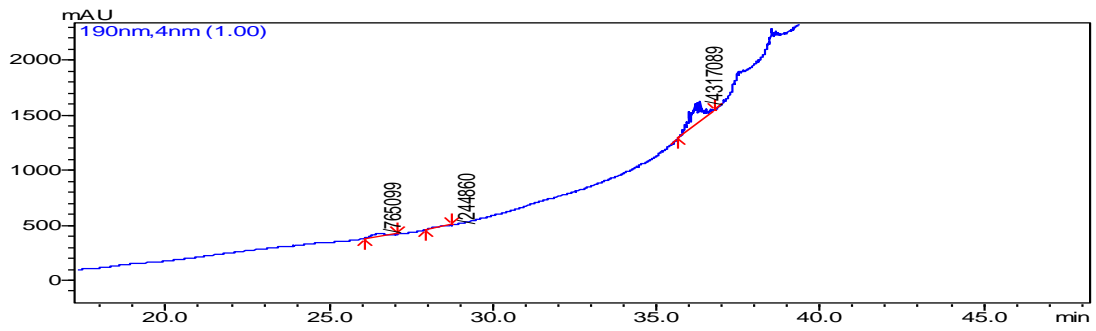
MĀU 11



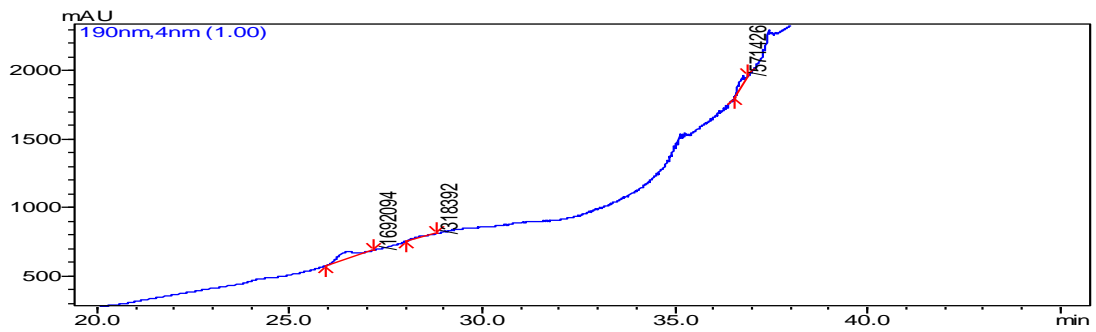
MĀU 12



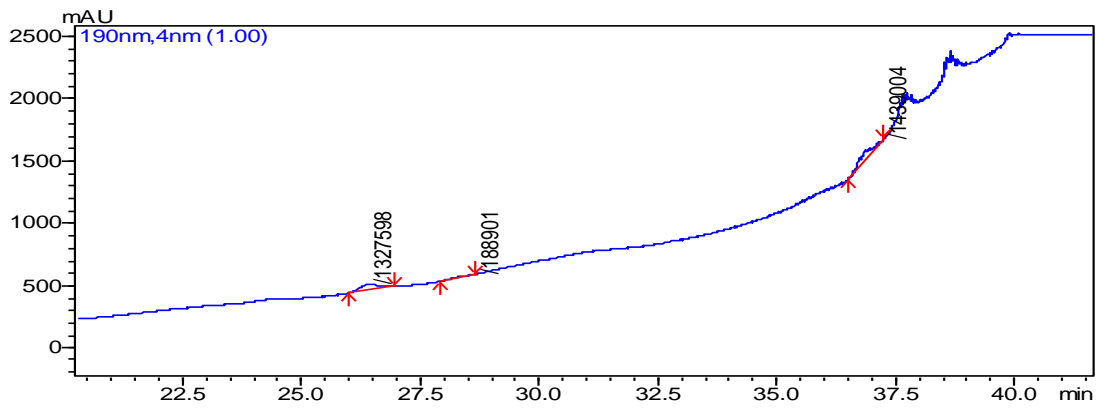
MĀU 13



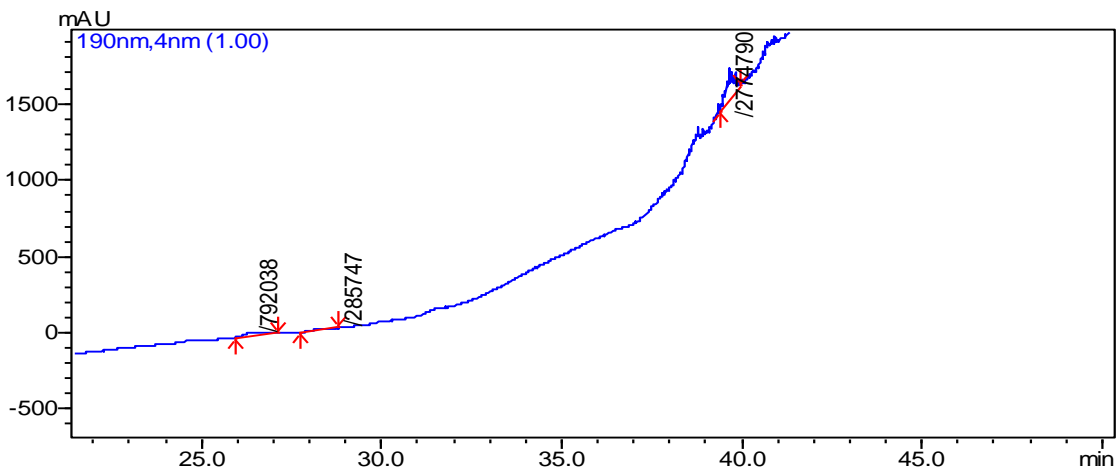
MĀU 14



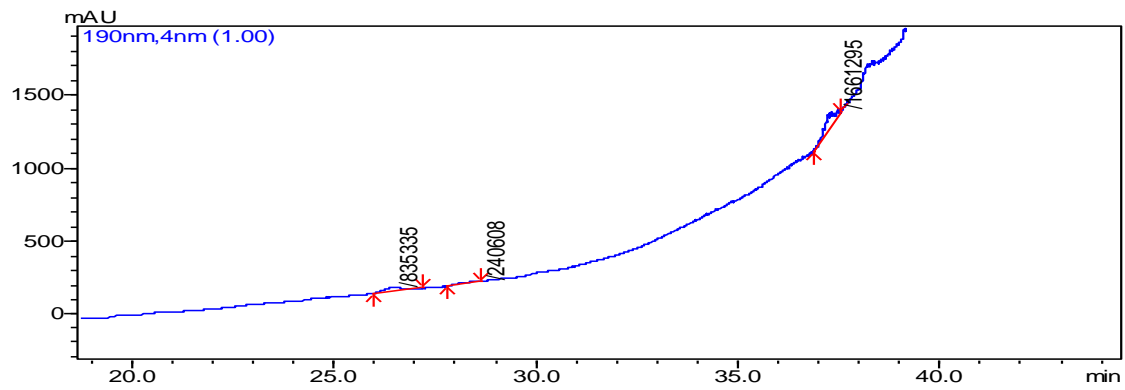
MÃU 15



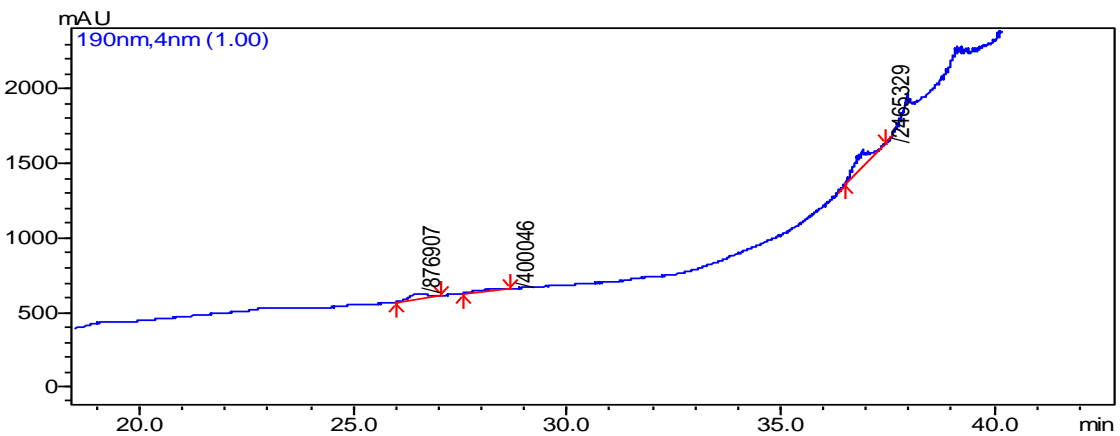
MÃU 16



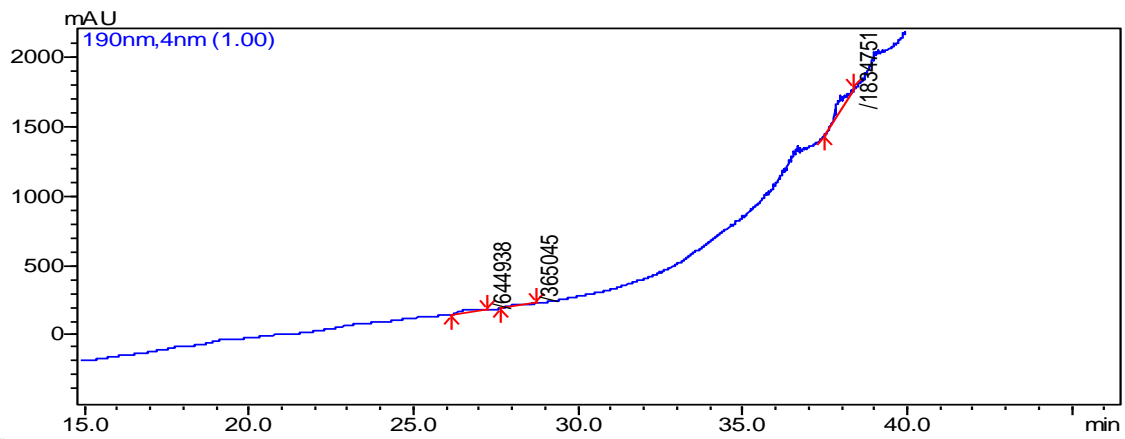
MÃU 17



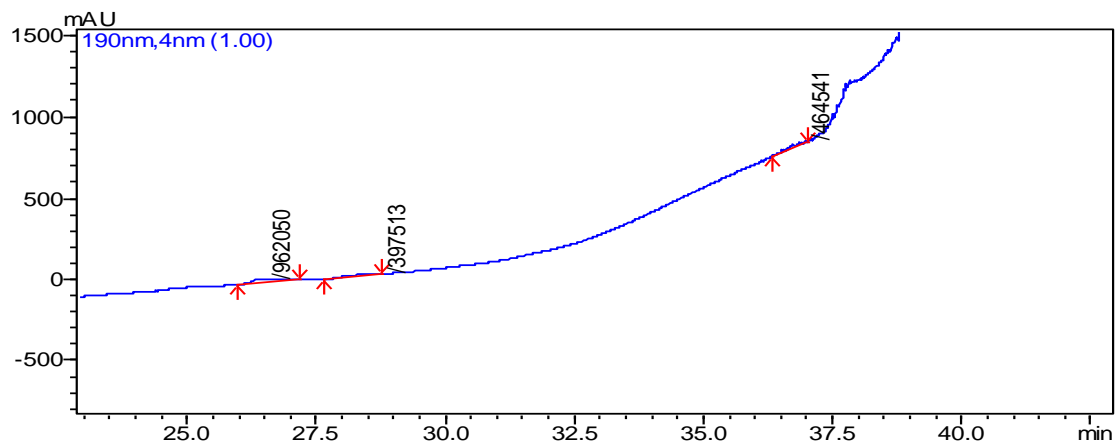
MÃU 18



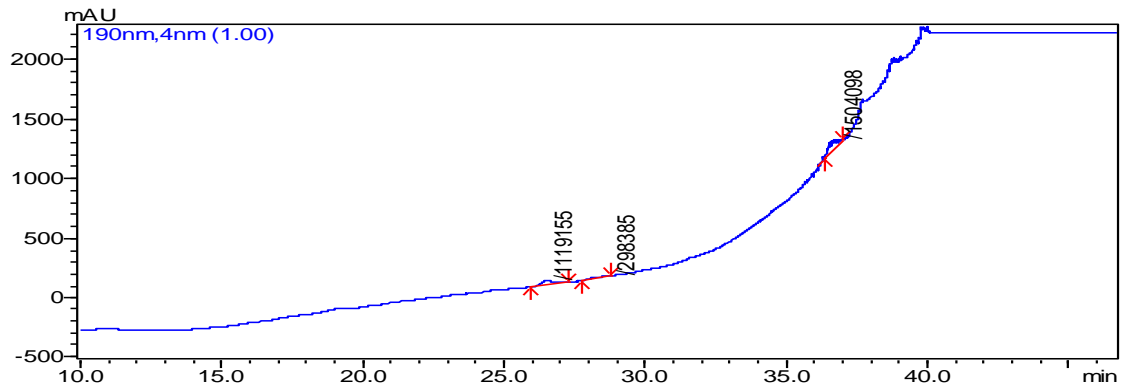
MÄU 19



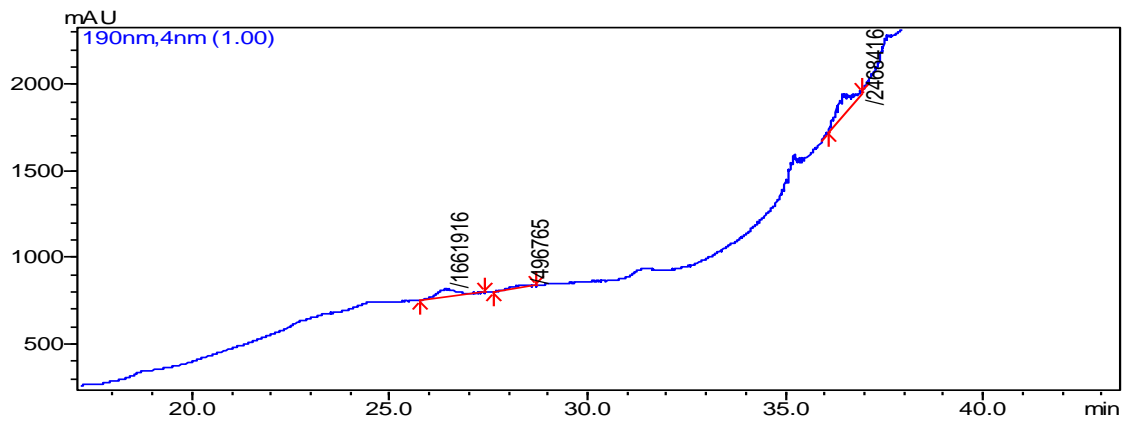
MÄU 20



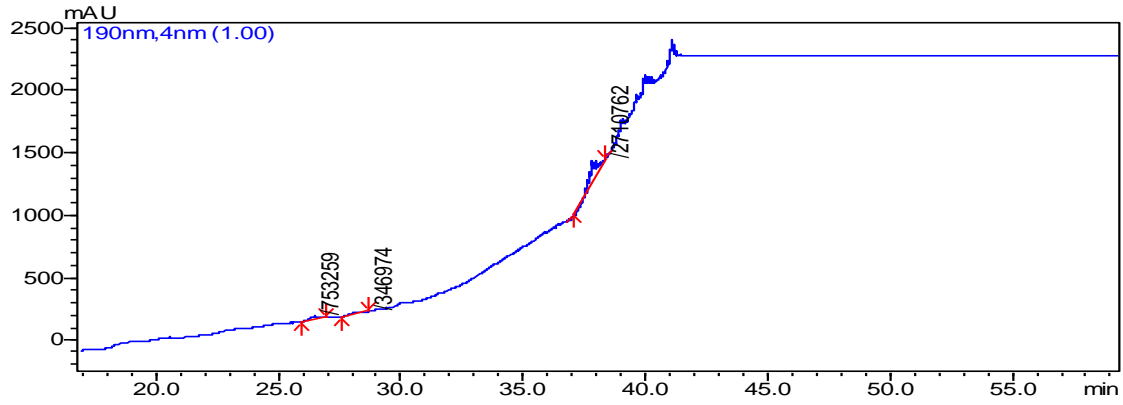
MÄU 21



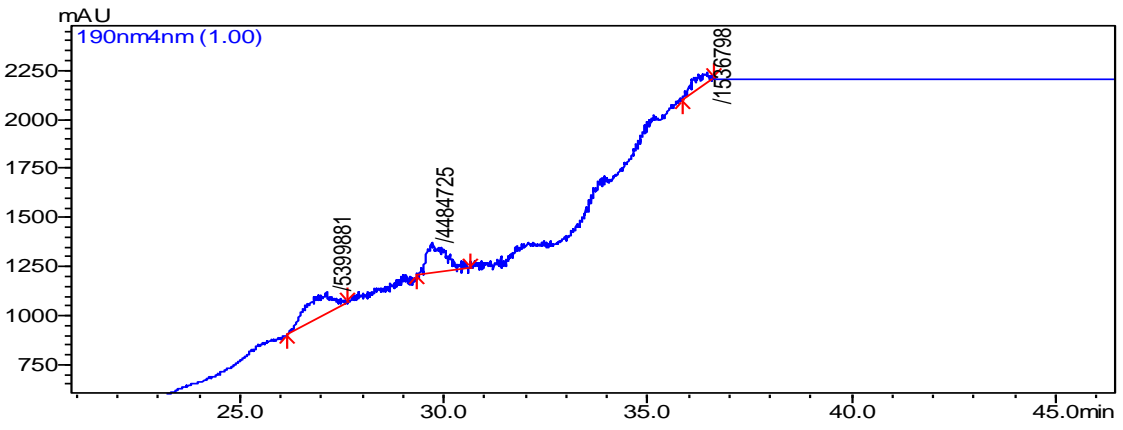
MÄU 22



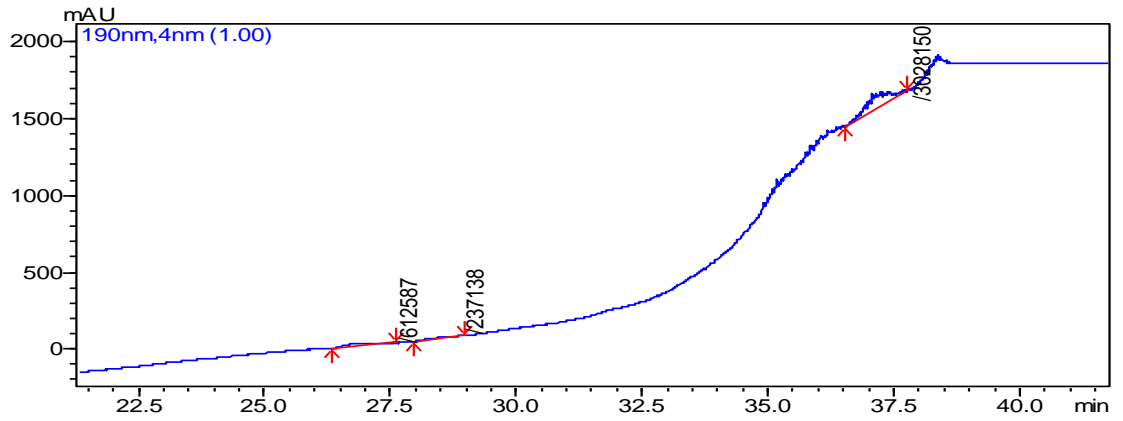
MÄU 23



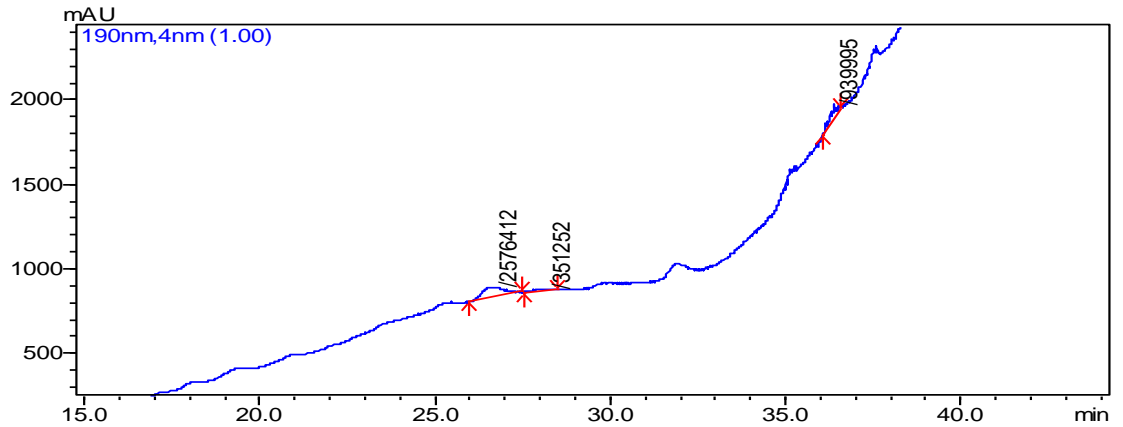
MÄU 24



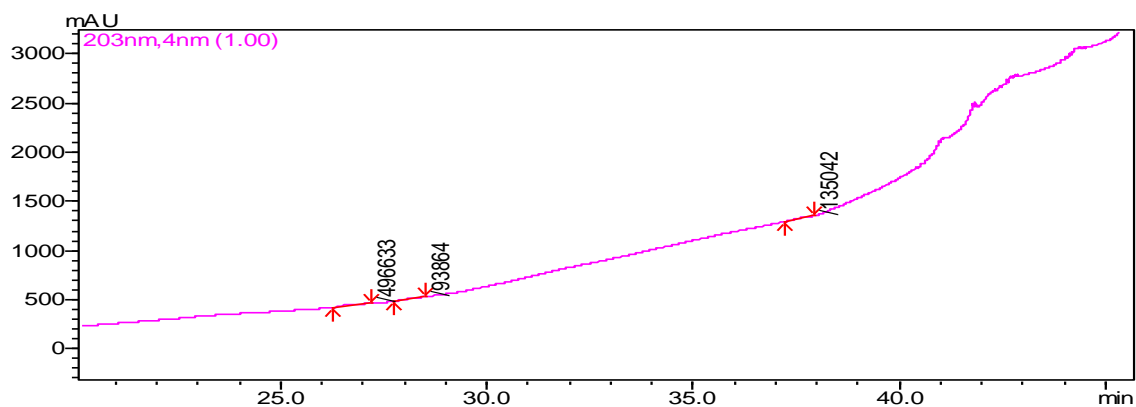
MÄU 25



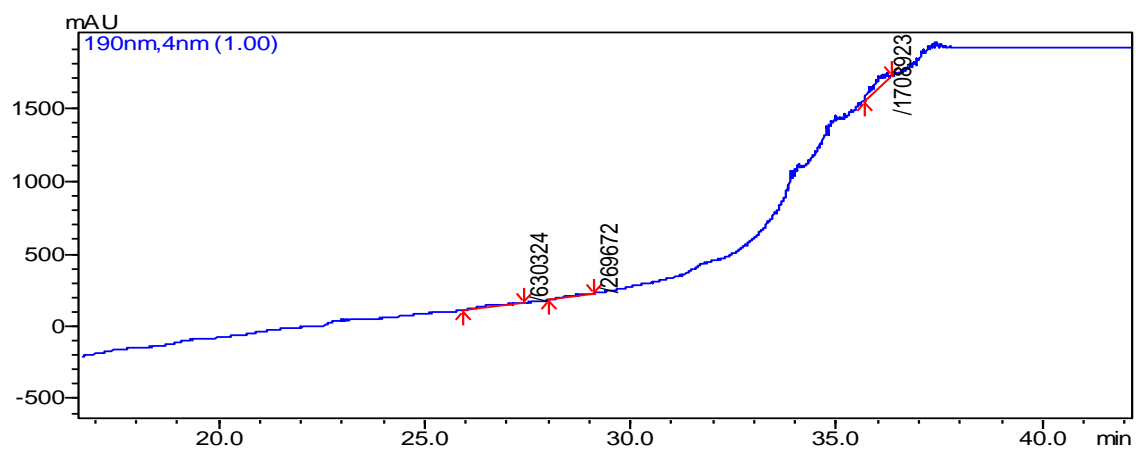
MÄU 26



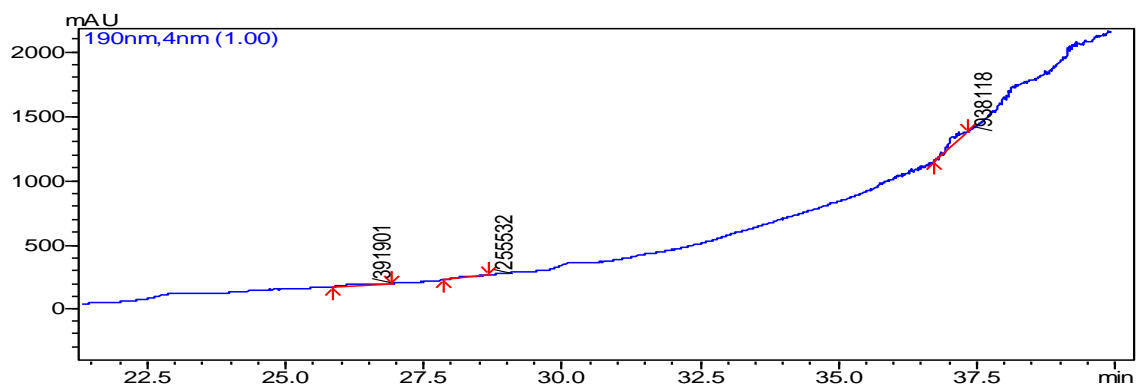
MÄU 27



MÄU 28



MÄU 29



MÄU 30

