

ẢNH HƯỞNG ĐIỀU KIỆN NUÔI CẤY ĐẾN SỰ NHÂN NHANH SINH KHỐI RỄ TÓC SÂM NGỌC LINH TRÊN HỆ THỐNG PLANTIMA®

Hà Thị Loan¹, Dương Hoa Xô¹

TÓM TẮT

Sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha and Grushv) là loại thực vật quý hiếm của Việt Nam, một trong 4 loại sâm quý trên thế giới. Hiện nay, có rất nhiều nghiên cứu ứng dụng trên sâm, trong đó tạo rễ tóc sâm là hướng đi mới có tính chất thương mại cao. Việc tạo rễ tóc sâm Ngọc Linh ở điều kiện *in vitro* chứa nhiều hoạt chất saponin nhóm protopanaxadiol (PPD), protopanaxatriol (PPT), ocotillol (OCT) đã thực hiện thành công tại Trung tâm Công nghệ Sinh học Thành phố Hồ Chí Minh. Bên cạnh đó, sử dụng hệ thống ngập chìm tạm thời plantima® nuôi cấy mô thực vật cho hệ số nhân cao. Chính vì vậy, việc ứng dụng hệ thống này vào việc nuôi cấy rễ tóc được thực hiện, nhằm khảo sát các điều kiện ảnh hưởng đến sự nhân nhanh sinh khối rễ tóc sâm Ngọc Linh để thu được nhiều hoạt chất saponin. Kết quả cho thấy nuôi cấy rễ tóc sâm Ngọc Linh trên plantima trong 2 tháng, mật độ nuôi cấy ban đầu 3 g cho hệ số nhân là 13,2 lần, khoảng cách bơm là 5 giờ/lần và tần suất bơm 3 phút/lần cho hệ số nhân là 13,5; 13,1 lần. Sinh khối rễ tóc nuôi cấy trên hệ thống ngập chìm tạm thời có hệ số nhân cao, ứng dụng để sản xuất thương mại saponin.

Từ khóa: Sâm Ngọc Linh, sinh khối, rễ tóc, saponin, plantima®

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Nhân sinh khối trên môi trường thạch gặp nhiều khó khăn như: Thể tích nuôi cấy nhỏ, toàn bộ mẫu không tiếp xúc hết với môi trường, khả năng nhân mẫu chậm. Vì vậy, Tisserat và Vandercook (1985) báo cáo sự sinh trưởng của phôi cây cà-rốt và cây chà là (*Phoenix dactylifera*) nuôi trong hệ thống ngập chìm tạm thời APCS, thời gian ngập chìm là 5 - 10 phút sau mỗi 2 giờ. So sánh với những cây

nuôi cấy trên môi trường rắn, sự sinh trưởng gấp 1,9 lần trong trường hợp cây cà-rốt, và 4 lần đối với cây chà là trong hệ thống nuôi cấy ngập chìm tạm thời, thêm vào đó chất lượng cũng như số lượng của phôi soma và cây con cà-rốt được nâng lên. Alvard (1993) đã báo cáo: Chối chuối trong môi trường nuôi cấy lỏng đơn giản hay trên giá thể bằng cellulose có sự nhân chối bình thường hay không có gì khác biệt. Các chối trên môi trường bàn rắn có

¹ Trung tâm Công nghệ Sinh học thành phố Hồ Chí Minh

sự ngập một phần và trong môi trường lỏng có sục khí có hệ số nhân chồi từ 2,2 - 3,1. Đặc biệt hệ số nhân chồi cao nhất (>5) thu được trên mẫu nuôi cấy trong điều kiện nuôi cấy ngập chìm tạm thời. Theo nhóm tác giả, kết quả trên thu được khi sử dụng hệ thống RITA với thời gian ngập là 20 phút cứ mỗi 2 giờ. Tương tự như vậy, Escalona (1998) đã sử dụng hệ thống trên để nuôi cấy đỉnh sinh trưởng cây Dứa *Ananas comosus*, kết quả cũng cho thấy hệ số nhân đã được gia tăng khoảng 300% so với nuôi cấy lỏng và 400% so với nuôi cấy trên môi trường rắn. Có gần 5.000 cây Dứa thu được từ một hệ thống. Trên đối tượng cây mía *Saccharum* spp. Lorenzo (1998) đã chứng minh rằng hệ thống nuôi cấy ngập chìm dạng bình đôi đã đẩy hệ số nhân (23,9 chồi trong 30 ngày) gấp 6 lần so với quy trình thông thường (3,96 chồi trong 30 ngày; Jimenez, 1995). Trong đó, Trung tâm Công nghệ Sinh học TP. Hồ Chí Minh đã ứng dụng hệ thống ngập chìm tạm thời trong nhân nhanh lan Hồ điệp, Mokara, Renanthera. Kết quả trên lan Hồ điệp: Tần suất ngập chìm 5 phút trong chu kỳ 2 giờ, nhân nhanh PLBs trên thống nuôi cấy ngập chìm tạm thời gấp 2,77 lần so với nhân trên môi trường thạch và gấp 1,2 lần so với nuôi cấy lỏng lắc, tần suất ngập 3 phút trong chu kỳ 6 giờ hệ thống này cho tỉ lệ nhân chồi gấp 3,7 lần so với nuôi cấy trên môi trường thạch, trong giai đoạn phát triển cây con, sử dụng 30 chồi nuôi trong bình Plantima® có thể tích môi trường 250 ml và tần suất ngập là 3 phút trong chu kỳ 6 giờ cho thấy thời gian tạo cây con để có thể đưa ra vườn ươm trên hệ thống này là 8 tuần so với 10 tuần trên môi trường thạch. Ngoài ra, tỉ lệ sống của cây con từ hệ thống TIS sau 1 tháng ở giai đoạn vườn ươm là 95%, trong khi tỉ lệ sống của các cây trên môi trường thạch là 79%, tính tất cả các giai đoạn từ nhân PLB đến ra cây con trên hệ thống ngập chìm tạm thời cho hệ số nhân giống gấp 10,3 lần so với nuôi cấy trên môi trường thạch, tạo cây con sớm hơn 2 tuần và tỉ lệ sống cao hơn (Cung Hoàng Phi Phụng và ctv., 2007). Theo Nguyễn Phúc Trường

(2010) số lượng chồi kiếng lá Lan Ý Mỹ tạo ra trong hệ thống TIS cao hơn xấp xỉ 4 lần so với trên môi trường thạch, chồi tăng trưởng mạnh và khỏe hơn trên môi trường thạch.

Vì vậy, dựa vào các kết quả thí nghiệm, ứng dụng hệ thống ngập chìm để nuôi cấy rễ tóc sâm Ngọc Linh được thực hiện, nhằm tạo được sinh khối lớn từ các dòng rễ tóc chuyển gen thành công với khối lượng rễ rất ít. Rễ tóc chuyển gen được tạo ra từ việc lây nhiễm *Agrobacterium rhizogenes* chủng (15834) trên cây sâm Ngọc Linh (*Panax Vietnamensis* Ha et Grushv.) *in vitro*, các rễ tóc này đã được chọn lọc và đánh giá hoạt chất saponin (Hà Thị Loan, 2009).

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

2.1.1. Nguồn mẫu *in vitro*

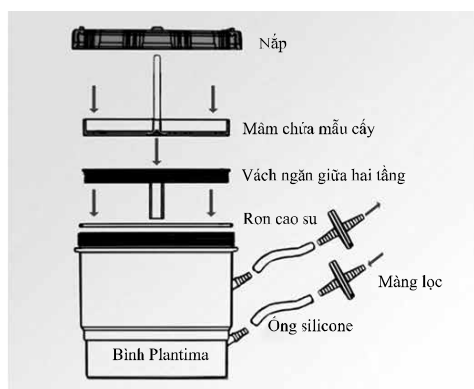
Nguồn mẫu *in vitro* thí nghiệm là rễ tóc chuyển gene sâm Ngọc Linh thông qua vi khuẩn *Agrobacterium rhizogenes*. Rễ tóc này đã được tạo ra tại Trung tâm Công nghệ Sinh học TP. Hồ Chí Minh.

2.1.2. Môi trường nuôi cấy *in vitro*

Môi trường nuôi cấy là môi trường cơ bản thường sử dụng trong các nghiên cứu cây sâm trên thế giới. Môi trường SH (Schenk và Hildebrandt, 1972) có bổ sung 60 g/l sucrose, đặc biệt không sử dụng agar và các chất điều hòa sinh trưởng, môi trường thường được điều chỉnh pH từ 5,7 đến 5,8.

2.1.3. Thiết bị nuôi cấy

Trong nghiên cứu này, nhóm sử dụng hệ thống ngập chìm tạm thời Plantima® (Temporary immersion system- TIS) nuôi cấy rễ tóc sâm Ngọc Linh. Một hệ thống ngập chìm tạm thời chứa 40 hộp plantima do công ty A-Tech Bioscientific của Đài Loan cung cấp, mỗi hộp Plantima chứa khoảng 250 ml môi trường SH.



Hình 1. Thành phần hộp Plantima và hệ thống TIS

2.1.4. Điều kiện nuôi cấy

Phòng nuôi rễ tóc sâm Ngọc Linh có hệ thống TIS ngập chìm tạm thời hoạt động. Nhiệt độ của phòng là $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, không cần chiếu sáng, độ ẩm trung bình từ 75 - 80%.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Khảo sát mật độ ban đầu của rễ tóc sâm Ngọc Linh trong nuôi cấy ngập chìm tạm thời

Rễ tóc sâm Ngọc Linh được tạo ra bởi Hà Thị Loan (2014), thí nghiệm được bố trí ngẫu nhiên, 3 lần lặp lại. Mỗi hộp plantima chứa 1 g; 3 g; 5 g; 7 g mẫu rễ tóc. Các hộp plantima gắn vào hệ thống bơm điều khiển, cài đặt khoảng cách bơm là 5 giờ/lần, mỗi lần bơm 3 phút.

2.2.2. Khảo sát tần suất bơm của hệ thống TIS trong nuôi cấy rễ tóc sâm Ngọc Linh

Rễ tóc sâm Ngọc Linh được lấy trọng lượng tươi là 3 g cho vào mỗi hộp plantima®, gắn vào hệ thống điều chỉnh tần suất bơm là 4; 5; 6 giờ/lần, mỗi lần bơm ngập 3 phút. Các thí nghiệm được bố trí ngẫu nhiên, lặp lại 3 lần.

2.2.3. Khảo sát lưu lượng bơm của hệ thống TIS trong nuôi cấy rễ tóc sâm Ngọc Linh

Mỗi hộp plantima chứa 3 g mẫu rễ tóc, gắn vào hệ thống bơm điều chỉnh lưu lượng bơm là 2; 3; 4 phút/lần, mỗi nghiệm thức có khoảng cách bơm 5 giờ/lần. Các thí nghiệm được bố trí ngẫu nhiên, lặp lại 3 lần.

2.2.4. Chỉ tiêu theo dõi

Các thí nghiệm đều lấy trọng lượng tươi của rễ tóc sâm Ngọc Linh sau khi nuôi cấy 2 tháng trên hệ thống ngập chìm tạm thời.

2.2.5. Xử lý số liệu

Số liệu được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel và phần mềm thống kê SPSS 16.0.

2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện từ tháng 10/2015 - 2/2017 tại khu nuôi cấy mô của Trung tâm Công nghệ Sinh học Thành phố Hồ Chí Minh.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Khảo sát mật độ nuôi cấy rễ tóc sâm Ngọc Linh trên hệ thống TIS

Hệ thống nuôi cấy ngập chìm tạm thời thường sử dụng trong vi nhân giống cho hệ số nhân cao hơn. Trong đó, mật độ mẫu ban đầu cho vào nuôi cấy ảnh hưởng rất nhiều đến khối lượng, hệ số nhân

của mẫu (Etienne, 2002). Theo bảng 1, số lượng gam mẫu rễ tóc ban đầu khác nhau cho khối lượng rễ tóc sau 2 tháng khác nhau, hệ số nhân nhau. Với mật độ ban đầu của rễ tóc 3 và 5 g cho khối lượng rễ cao nhất sau khi nuôi hai tháng. Mặc dù, mật độ 7 g ban đầu nhiều hơn nhưng kết quả nuôi cấy lại thấp hơn, kết quả cho thấy mật độ nuôi cấy ban đầu càng cao chưa chắc cho khối lượng sau 2 tháng càng cao. Tuy nhiên, giữa mật độ 3 g và 5 g ban đầu lại cho hệ số nhân rất khác biệt nhau về mặt thống kê học, ở 3 g cho hệ số nhân là 13,289 lần cao hơn. Trong khi đó, nuôi cấy rễ tóc nhân sâm Hàn Quốc trong bình bioreactor 20-Lit có hệ số nhân là 11,67 lần sau hai tháng nuôi cấy (Choi, 2000).

Bảng 1. Ảnh hưởng của mật độ nuôi cấy đến hệ số nhân rễ tóc sâm Ngọc Linh

Khối lượng ban đầu	Khối lượng sau 2 tháng	Hệ số nhân
1 g	7,1800 c	7,1800 b
3 g	39,567 a	13,289 a
5 g	36,9150 a	7,3830 b
7 g	23,1167 b	3,2216 c
CV(%)	22,1	17,67

Ghi chú: Những chữ cái khác nhau (a,b,c) trong các cột biểu diễn sự khác biệt có ý nghĩa với $\alpha=0,05$ trong Duncan's test.

3.2. Khảo sát tần suất bơm của hệ thống TIS trong nuôi cấy rễ tóc sâm Ngọc Linh

Theo Alvard (1993), tần suất bơm của hệ thống TIS ảnh hưởng nhiều đến khả năng nhân giống của cây chuối, nếu khoảng cách bơm ngắn có thể làm mẫu bị hóa nâu hoặc thủy tinh thể, còn khoảng cách bơm dài làm mẫu ít tiếp xúc với môi trường làm mẫu chết hoặc chậm phát triển. Vì vậy, khoảng cách giữa hai lần bơm cũng ảnh hưởng đến sinh khối rễ tóc sâm Ngọc Linh. Kết quả thí nghiệm như bảng 2.

Bảng 2. Tần suất bơm ảnh hưởng đến nuôi cấy rễ tóc sâm Ngọc Linh

Khoảng cách thời gian bơm	Khối lượng sau 2 tháng	Hệ số nhân
4h	12,3200 b	4,1067 b
5h	40,4930 a	13,4977 a
6h	39,458 a	13,1527 a
CV(%)	10,2	9,8

Ghi chú: Những chữ cái khác nhau (a,b) trong các cột biểu diễn sự khác biệt có ý nghĩa với $\alpha=0,05$ trong LSD 0.05.

Sau 2 tháng nuôi cấy, khối lượng rễ tóc sâm Ngọc Linh với khoảng cách bơm 5 giờ và 6 giờ là khác biệt về mặt thống kê học so với 4 giờ bơm. Tuy nhiên, khối lượng sinh khối ở nghiệm thức 5 giờ có khối lượng cao hơn ($40.4930 > 39.458$). Bên cạnh đó, hệ số nhân ở nghiệm thức 5 giờ và 6 giờ không khác biệt về mặt thống kê học nhưng nghiệm thức 5 giờ vẫn cho hệ số nhân cao hơn.

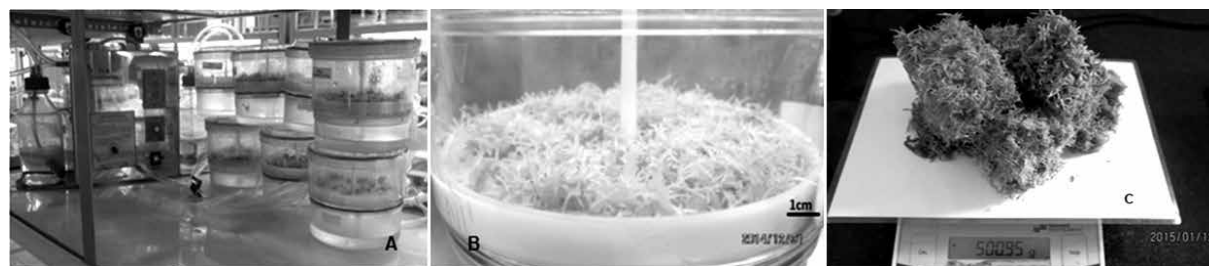
3.3. Khảo sát lưu lượng bơm của hệ thống TIS trong nuôi cấy rễ tóc sâm Ngọc Linh

Kết quả bảng 3 chứng tỏ rằng, thời gian mỗi lần bơm cũng ảnh hưởng đến sinh khối rễ, hệ số nhân mẫu. Thời gian ngập thấp cũng là mẫu tiếp xúc môi trường rất ít, không cung cấp đủ dinh dưỡng để rễ phát triển, ngược lại thời gian tiếp xúc nhiều quá, mẫu ngập nhiều trong dinh dưỡng cũng làm sinh khối tăng trưởng chậm. Ở đây, nghiệm thức ngập 3 phút cho khối lượng rễ sau hai tháng cao nhất, vượt trội so với thời gian bơm 2 phút, 4 phút. Đồng thời, hệ số nhân cũng khác biệt rất có ý nghĩa về mặt thống kê học (13,12 lần).

Bảng 3. Lưu lượng bơm ảnh hưởng đến nuôi cấy rễ tóc sâm Ngọc Linh

Khoảng cách thời gian bơm	Khối lượng sau 2 tháng	Hệ số nhân
2 p	23,2900 b	7,7633 b
3 p	44,6833 a	14,8944 a
4 p	18,3333 b	6,1111 b
CV(%)	13,3	13,34

Ghi chú: Những chữ cái khác nhau (a,b) trong các cột biểu diễn sự khác biệt có ý nghĩa với $\alpha=0,05$ trong LSD 0.05.



Hình 2. Rễ tóc sâm Ngọc Linh nhân trên hệ thống ngập chìm tạm thời

A. Hệ thống TIS nuôi cấy sinh khối rễ tóc. B. Sinh khối rễ tóc trong một hộp Plantima sau 2 tháng nuôi cấy. C. Khối lượng sâm Ngọc Linh nuôi cấy

LỜI CẢM ƠN

Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn các đồng nghiệp làm việc tại phòng Thực nghiệm Cây trồng, Trung tâm Công nghệ Sinh học thành phố Hồ Chí Minh đã tạo mọi điều kiện để thực hiện nghiên cứu này. Xin gửi lời tri ân đến Hội đồng Khoa học của

IV. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

4.1 Kết luận

Đề tài đã thiết lập được điều kiện tối ưu để nhân rễ tóc sâm Ngọc Linh trên hệ thống ngập chìm tạm thời (TIS). Mật độ nuôi cấy tối ưu là 3 gam trên một hộp plantima, tần suất bơm là 5 giờ/lần, thời gian ngập mẫu rễ là 3 phút. Với điều kiện này, hệ số nhân của sinh khối rễ tóc sâm Ngọc Linh sau 2 tháng cao nhất là 13 lần.

Qua các thí nghiệm này, khối lượng mẫu rễ cho vào một hộp TIS nuôi cấy rất ít, (khoảng 3 g), nhưng sau 2 tháng đạt trên 40 g/ hộp plantima*. Với khối lượng mẫu đạt được này, một hệ thống TIS vận hành bao gồm 40 hộp phantima*, sau 2 tháng thì hệ thống cho ra từ 1.200 - 1.400 g, nguồn vật liệu này rất lớn để cung cấp cho sản xuất sinh khối rễ tóc sâm Ngọc Linh.

4.2. Kiến nghị

Để tài nên khảo sát thêm các điều kiện hàm lượng oxy cung cấp cho mẫu, độ khuếch tán không khí trong hộp plantima, cường độ ánh sáng cũng như thành phần môi trường nuôi cấy... để đạt sinh khối rễ tóc sâm Ngọc Linh nhiều nhất.

Ngoài ra, sinh khối trên hệ thống TIS nên sử dụng làm nguồn nguyên liệu nuôi cấy cho hệ thống bioreactor thể tích lớn (20L, 50L, 100L) để thu được sinh khối nhiều hơn.

Trung tâm Công nghệ Sinh học thành phố Hồ Chí Minh đã có những góp ý, định hướng để nghiên cứu này được thực hiện chính xác nhất. Đồng thời, cũng xin cảm ơn sự giúp đỡ chân thành và rất nhiệt tình của các bạn sinh viên từng tham gia trong nghiên cứu để hoàn thành tốt đề tài này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Hà Thị Loan**, 2009. *Triển khai quy trình nhân nhanh các giống lan Mokara, Renanthera, Phalaenopsis bằng phương pháp ngập chìm tạm thời*. Báo cáo nghiệm thu tại Sở Khoa học và Công nghệ TP. Hồ Chí Minh.
- Hà Thị Loan, Dương Hoa Xô, Nguyễn Quốc Bình, Nguyễn Hoàng Quân, Vũ Thị Đào, Nathalie Pawlicki- Julian, Eric Gontier**, 2014. Nghiên cứu tạo rễ tóc sâm Ngọc Linh *Panax vietnamensis* bằng phương pháp chuyển gen rol nhờ vi khuẩn *Agrobacterium rhizogenes*. *Tạp chí Công nghệ sinh học* 2014, 36(1se): 293-300.
- Cung Hoàng Phi Phượng, Nguyễn Văn Hiếu, Nguyễn Quốc Thiện, Nguyễn Quốc Bình và Dương Hoa Xô**, 2007. Bước đầu ứng dụng hệ thống nuôi cấy ngập chìm tạm thời cho nhân giống lan Hồ Điệp lai - *Phalaenopsis* huybrid. *Hội nghị khoa học công nghệ sinh học thực vật trong nhân giống và chọn tạo giống hoa*. NXB Nông nghiệp, trang 7-16.
- Nguyễn Phúc Trường**, 2010. *Ứng dụng hệ thống nuôi cấy ngập chìm tạm thời trong nhân giống cây kiểng lá*. Báo cáo nghiệm thu tại Trung tâm Công nghệ Sinh học TP. Hồ Chí Minh.
- Alvard D, Cote F, Teisson C.**, 1993. Comparison of methods of liquid medium culture for banana micropropagation. Effects of temporary immersion of explants. *Plant Cell Tiss Org Cult* 32:55-60.
- 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 Org. Cult.* 62: 187-193.
- Escalona M, Lorenzo J.C., Gonzalez B., Daquinta M., Fundora Z., Borrito C.G., Espinosa D., Arias E. and Aspiolea M.E.**, 1998. New system for *in vitro* propagation of pineapple [*Ananas comosus* (L.) Merr]. *Pineapple News*, 5, pp: 5-7.
- Etienne H., Berthouly M.**, 2002. Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 69: 215-231.
- Lorenzo J., González B., Escalona M., Teisson C., Espinosa P. & Borrito C.**, 1998. Sugarcane shoot formation in an improved temporary immersion system. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* 54: 197-200.
- Schenk R. U.; Hildebrandt A. C.**, 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Can. J. Bot.* 50: 199-204.
- Tisserat B., Vandercook C. E.**, 1985. Development of an automated plant culture system. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* 5: 107-117.

Effect of cultural conditions on propagating hairy root biomass of Ngọc Linh ginseng in the Plantima® system

Ha Thi Loan, Duong Hoa Xo

Abstract

Ngọc Linh Ginseng (*Panax vietnamensis* Ha and Grushv) is a rare and precious plant of Viet Nam, one of the four precious ginseng types in the world. Currently, there are many applicable studies on ginseng, among them study on creating hairy root is a new approach for highly commercial production. Creating hairy root from Ngọc Linh ginseng *in vitro* which contains many saponin groups such as protopanaxadiol (PPD), protopanaxatriol (PPT), ocotillol (OCT) have been successfully implemented at the Biotechnology Center of Ho Chi Minh City. Besides, using Plantima® temporary immersion system for culturing plant tissue can give high multiplication coefficient. Therefore, the application of this system to culture hairy root was carried out to investigate the conditions which affected biomass rapid multiplication of Ngọc Linh Ginseng hairy root for obtaining more saponins. The results showed that the multiplication coefficient of Ngọc Linh ginseng roots was recorded at 13.2 times after 2 months of culturing on Plantima with the initial cultural density of 3 grams; The high multiplication coefficient reached 13.5; 13.1 times when timing interval of pumping was 5 hours/times with pumping frequency of 3 minutes/times. Hairy root biomass which cultured on Temporary immersion system has a high multiplier, application for producing commercial saponin.

Key words: Ngọc Linh ginseng, biomass, hairy roots, saponin, plantima®

Ngày nhận bài: 9/6/2017

Người phản biện: TS. Trần Danh Sừu

Ngày phản biện: 13/6/2017

Ngày duyệt đăng: 25/6/2017