ẢNH HƯỞNG CỦA ĐIỀU KIỆN NUÔI CẤY ĐẾN SINH KHỐI VÀ TÍCH LUỸ SAPONIN CỦA RỄ TÓC SÂM NGỌC LINH TRONG HỆ THỐNG BIOREACTOR 18 LÍT

Quách Ngọc Anh[1,2], Trần Văn Minh[2],
Hà Thị Loan[1*], Trần Nguyễn Lệ Quyên[1]

TÓM TẮT

Sâm Ngọc Linh được công nhận là quốc bảo của Việt Nam. Trong sâm có chứa một hàm lượng lớn saponin, rất hiệu quả trong việc chữa trị những bệnh viêm nhiễm nghiêm trọng và có tác dụng phòng chống ung thư, chống stress, chống oxi hoá. Sâm Ngọc Linh có giá trị lớn về mặt y tế và thương mại, nhưng hiện tại lại đang khan hiếm trong tự nhiên. Chính vì thế các nhà khoa học đã nghiên cứu sản xuất rễ tơ sâm Ngọc Linh, chứa hàm lượng saponin cao phục vụ sản xuất. Nhằm mục tiêu thu được sinh khối rễ tơ sâm Ngọc Linh và hàm lượng saponin cao trên hệ thống bioreactor 18 lít, biểu đồ tăng sinh khối tự nhiên chu kỳ 90 ngày của rễ tóc sâm Ngọc Linh đã được thiết lập, sau đó thiết lập điều kiện thích hợp cho nhân nhanh sinh khối tươi và tích lũy saponin (saponin toàn phần, M-R2, V-R2, G-Rb1). Kết quả nghiên cứu cho thấy nồng độ đường 6%, ánh sáng 200 LUX cho hệ số tăng sinh khối cao nhất đối với rễ tóc sâm Ngọc Linh. Trong điều kiện nuôi cấy không có ánh sáng (tối), mẫu rễ tóc bị ức chế tăng sinh khối, nhưng hàm lượng saponin trong rễ sâm Ngọc Linh cao hơn trong điều kiện chiếu sáng. Khối lượng mẫu nuôi cấy ban đầu 50 -100 g thích hợp để sử dụng làm lượng mẫu ban đầu trong thí nghiệm tăng trưởng và tích lũy saponin.

Từ khoá: Rễ tơ sâm Ngọc Linh, điều kiện ánh sáng, khối lượng ban đầu, nồng độ đường, Bioreactor 18 lít

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Sâm Ngọc Linh là loại thảo dược quý hiếm, đặc hữu ở vùng núi Ngọc Linh thuộc huyện Đăk Tô tỉnh Kon Tum, huyện Nam Trà My tỉnh Quảng Nam. Sâm Ngọc Linh đã trở thành quốc hồn quốc tuý với người dân nơi đây do những đặc tính dược lý và lợi ích kinh tế mà nó đem lại. Trước khi có sự phát hiện và nghiên cứu của các nhà khoa học, người dân tộc Xê Đăng đã sử dụng củ sâm Ngọc Linh như một loại thần dược chữa bách bệnh. Sâm Ngọc Linh được xếp hạng là loại sâm có chứa hàm lượng saponin cao nhất so với các loại sâm khác của Châu Á, nhất là MR2, một loại ocotillol saponin có tính dược lý cao trong y học (Quang-Ung Le *et al.*, 2018). Tuy nhiên, sự bùng nổ về khai thác sâm Ngọc Linh vô tổ chức đã dẫn đến những hệ luỵ về môi trường, và sâm Ngọc Linh đã đứng trước nguy cơ bị tuyệt chủng vào những thập niên cuối thế kỷ 20. Chính phủ đã ra sức kêu gọi người dân nhanh chóng tìm cách bảo tồn và nhân giống sâm Ngọc Linh như bảo tồn di sản văn hoá dân tộc. Các nhà khoa học đã không ngừng nghiên cứu, tạo nguồn, nhân giống và tìm cách di thực sâm Ngọc Linh ra những vùng đất khác.

Nhiều nghiên cứu nhân nhanh sinh khối và tạo nguồn vật liệu rễ sâm Ngọc Linh chuyển gen đã được thực hiện, chẳng hạn như nghiên cứu ảnh hưởng của hàm lượng khoáng đa lượng và bổ sung dinh dưỡng vào giai đoạn sau của quá trình nuôi cấy đến sự sinh trưởng huyền phù tế bào sâm Ngọc Linh (Nguyễn Văn Kết và Trương Thị Lan Anh, 2016); 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 lắc rễ bất định sâm Ngọc Linh (Nguyễn Thị Nhật Linh và *ctv.*, 2017); ảnh hưởng của nồng độ đường, loại bioreactor và thể tích bình nuôi cấy lên sự sinh trưởng của huyền phù tế bào sâm Ngọc Linh (Trần Diệu Thái và *ctv.*, 2019); 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.), (Dương Tấn Nhựt và *ctv.*, 2012). Nhìn chung, những nghiên cứu trên hầu hết đều thành công trên cơ bản lý thuyết, cho ra sinh khối sau cùng gấp 2 - 3 lần nguồn nguyên liệu ban đầu, nhưng chưa áp dụng trên quy mô sản xuất. Năm 2014, nghiên cứu tạo nguồn rễ tóc sâm Ngọc Linh chuyển gen qua trung gian là khuẩn *Agrobacterium rhizogene* ATCC15384 (Hà Thị Loan và *ctv.*, 2014) đã thành công, nuôi cấy rễ tóc

[1] Trung tâm Công nghệ Sinh học Thành phố Hồ Chí Minh
[2] Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh
* Tác giả liên hệ, e-mail: haloan762001@gmail.com

sâm Ngọc Linh *in vitro* có chứa nhiều thành phần saponin như sâm Ngọc Linh thu hoạch ngoài tự nhiên khoảng 5 tuổi. Sau 3 năm, Trung tâm Công nghệ Sinh học Thành phố Hồ Chí Minh đã tiến hành dự án sàng lọc và nhân nhanh sinh khối rễ tóc sâm Ngọc Linh trên Bioreactor 20 lít trong sản xuất quy mô lớn (Hà Thị Loan và *ctv.*, 2019). Thành công bước đầu nuôi cấy rễ tóc sâm Ngọc Linh trên hệ thống bioreactor đã mở ra con đường mới trong công nghệ sản xuất sinh khối rễ tóc sâm Ngọc Linh trong phòng thí nghiệm. Nối tiếp các nghiên cứu đó, nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ đường, ánh sáng, khối lượng ban đầu lên sự nhân nhanh sinh khối và tích lũy saponin của sâm Ngọc Linh trong bình bioreactor 18 lít đã được đề xuất, đây cũng chính là vấn đề tối ưu hoá cho sản xuất rễ tóc sâm Ngọc Linh chuyển gen trên quy mô lớn.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Rễ tóc sâm Ngọc Linh chuyển gen được tạo ra bằng cách nhiễm khuẩn *Agrobacterium rhizogenes* ATCC 15384 vào cuống lá sâm Ngọc Linh *in vitro* (Hà Thị Loan và *ctv.,* 2014; Loan Ha Thi *et al*., 2016). Các dòng rễ tóc này được sàng lọc, duy trì và tiếp tục nuôi cấy tại Trung tâm Công nghệ Sinh học Thành phố Hồ Chí Minh. Những cụm rễ tóc sâm Ngọc Linh được nuôi cấy 1 tháng trong môi trường bán rắn SH có bổ sung 30 g sucrose. Sau đó, mẫu rễ được nuôi trên hệ thống TIS (hệ thống chìm ngập tạm thời) trong 1,5 tháng, môi trường nuôi cấy SH lỏng chứa 30 g sucrose và được cung cấp khí 4 tiếng mỗi ngày (Hà Thị Loan và Dương Hoa Xô, 2017). Nguồn mẫu rễ tóc nuôi từ TIS được sử dụng để làm vật liệu thí nghiệm.

Bình bioreactor sử dụng trong thí nghiệm là BioPia 18 lít. Môi trường nuôi cấy SH (Schenk and Hilderbrandt, 1972) có bổ sung đường, pH được điều chỉnh từ 5,7 - 5,8.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp bố trí thí nghiệm

Thiết lập biểu đồ tăng sinh khối: Rễ tóc sâm Ngọc Linh từ hộp TIS đã qua sàng lọc (không nhiễm khuẩn, sáng màu, rễ khoẻ), được cân 100 g để cấy chuyển qua bình bioreactor BioPia 18 lít chứa 10 lít môi trường SH lỏng, 6% đường, điều kiện sáng bình thường (200 LUX), tiến hành theo dõi quá trình nuôi và thu mẫu từ 10 - 90 ngày. Thí nghiệm với 9 nghiệm thức được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên, 3 lần lặp lại, mỗi lần lặp 1 bình. Theo dõi và thu mẫu 10 ngày 1 lần.

Thí nghiệm với nồng độ đường: Thí nghiệm 5 nồng độ đường khác nhau (3%, 4%, 5%, 6%, 7%) được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên. Mỗi nồng độ 3 lần lặp lại, mỗi lần 1 bình bioreactor. Khối lượng rễ tóc sâm Ngọc Linh ban đầu là 100 g.

Thí nghiệm với điều kiện sáng tối: Từ kết quả thí nghiệm các nồng độ đường, chọn nồng độ thích hợp sử dụng trong thí nghiệm này. Rễ tóc sâm Ngọc Linh 100 g được cấy chuyển vào bình bioreactor BioPia 18 lít và được nuôi trong điều kiện chiếu sáng 200 LUX và trong điều kiện không có ánh sáng (che tối). Thí nghiệm được tiến hành với 3 lần lặp lại, mỗi lần lặp 1 bình Bioreactor.

Thí nghiệm với sinh khối ban đầu: Thí nghiệm gồm 4 nghiệm thức với các khối lượng rễ tóc sâm Ngọc Linh ban đầu (50 g, 100 g, 150 g và 200 g) từ bình TIS, mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần, mỗi lần lặp 1 bình bioreactor. Nồng độ đường và điều kiện ánh sáng được chọn từ thí nghiệm các nồng độ đường, điều kiện sáng tối.

2.2.2. Điều kiện thí nghiệm

Nhiệt độ phòng nuôi (16 - 20^{o}C), ánh sáng 200 LUX (12 chiếu sáng/12 giờ tối), oxy được cung cấp qua màng lọc 0,1 µm cho rễ tóc sâm Ngọc Linh trong suốt quá trình nuôi cấy.

2.2.3. Các chỉ tiêu theo dõi

Rễ tơ thu được sẽ được rửa qua nước sạch 2 lần và axit citric 1 lần để loại bỏ môi trường nuôi cấy, để ráo nước. Sau khi thu sinh khối tươi, mẫu sẽ được lưu trữ trong tủ –80^{o}C trong 48 giờ, và tiến hành đông khô. Rễ khô được sử dụng để tách chiết saponin.

Khối lượng rễ tươi: rễ thu được được rửa sạch môi trường, để ráo nước và tiến hành cân.

Khối lượng rễ khô: rễ tươi sau khi rửa sạch được xử lí lạnh –80^{o}C sau 48 giờ, tiến hành xử lí khô và cân.

Saponin toàn phần được đánh giá bằng phương pháp cân (g). Bột đông khô rễ tóc sâm Ngọc Linh 4 g được hoà với 40 mL methanol 70% (3 lần) bằng phương pháp siêu âm (45^{o}C, 45 phút) và chiết qua bông gòn. Dịch chiết thu được, lọc qua giấy lọc và định mức 100 mL, cô quay thu được cao chiết.

Cao chiết được hoà với nước cất và chiết tách qua cột SPE C18, rửa giải với MeOH thu dịch. Dịch cô quay đến cắn, đông khô và tiến hành cân xác định khối cao saponin toàn phần.

Hàm lượng saponin chính (VR2, MR2, Rb1) được định lượng bằng cách tách chiết bằng phương pháp sắc ký lỏng (HPLC) sử dụng đầu dò UV-với bước sóng 203, 196 nm và đối chiếu hàm lượng saponin với các chất chuẩn.

2.2.4. Phương pháp xử lý số liệu

Sử dụng Microsoft Excel 2010 và phần mềm SAS 9.1 để xử lý thống kê, trắc nghiệm phân hạng với độ tin cậy P = 0,05.

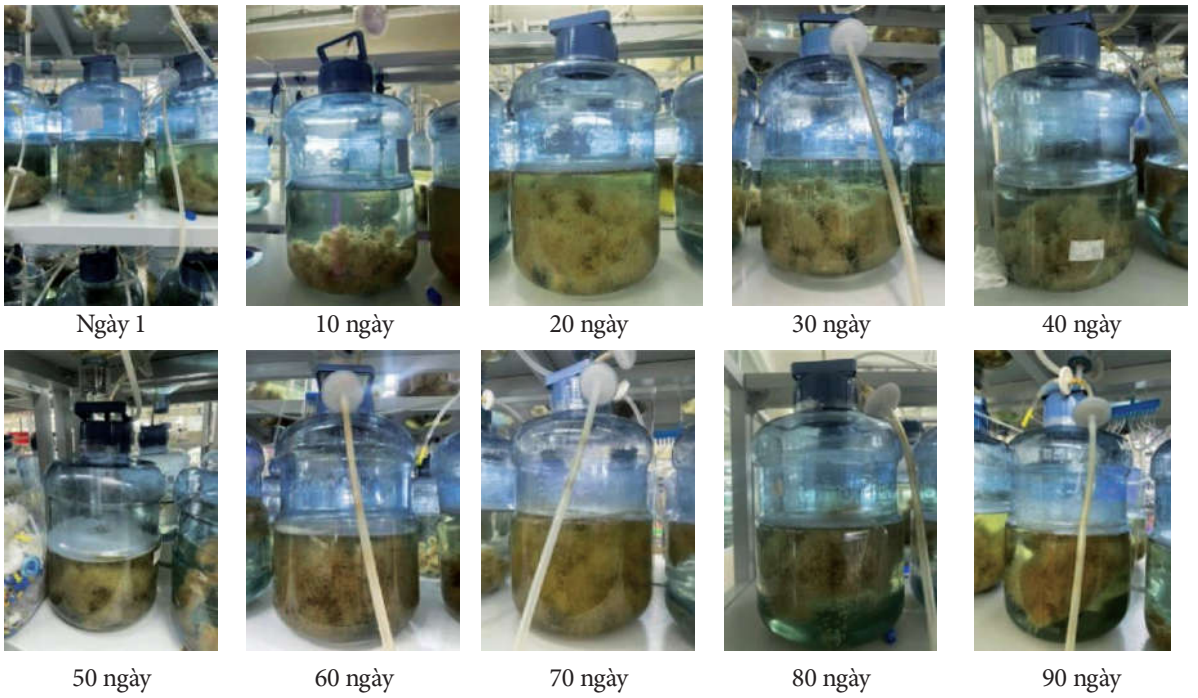
2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện từ tháng 9/2021 đến tháng 9/2022 tại Trung tâm Công nghệ sinh học Thành phố Hồ Chí Minh.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

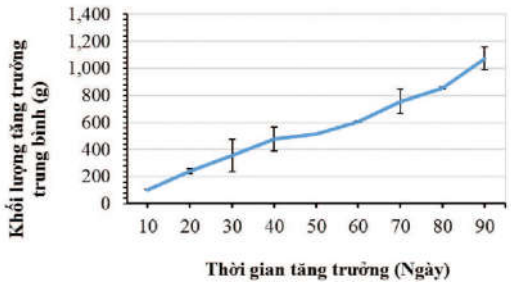
3.1. Thiết lập biểu đồ tăng sinh khối của rễ tóc sâm Ngọc Linh trong bình bioreactor 18 lít

Rễ tóc sâm Ngọc Linh sau khi thu hoạch từ bình bioreactor được rửa sạch và để ráo nước. Tiến hành cân khối lượng tươi và tính trung bình cho mỗi chu kỳ 10 ngày. Biểu đồ tăng sinh khối của rễ tóc sâm Ngọc Linh trong thời gian 90 ngày (Hình 1).



Hình 1. Rễ tóc sâm Ngọc Linh dòng 5 được nuôi cấy trong bình bioreactor Bio Pia 18 lít từ 1 - 90 ngày.

Quan sát cho thấy sau 10 ngày, sinh khối rễ tóc sâm Ngọc Linh tăng không đáng kể, những rễ tóc bắt đầu gom thành hình cầu từ những mảnh ban đầu. Từ 10 - 40 ngày, những cụm rễ tóc bắt đầu phân nhánh, tăng sinh khối. Sau 40 ngày, cụm rễ tóc ban đầu tăng gần 6 lần sinh khối ban đầu. Ở giai đoạn 40 - 60 ngày, sinh khối rễ tóc sâm Ngọc Linh tăng chậm, các quả cầu sâm đan xen và kết lại với nhau thành 1 cụm lớn. Từ 60 - 90 ngày, cụm rễ tóc tiếp tục dài ra và chiếm phần lớn thể tích môi trường nuôi cấy. Mẫu rễ tóc sâm Ngọc Linh được thu hoạch sau 90 ngày có chiều dài gấp 10 lần mẫu sâm ban đầu (1 - 1,5 cm). Các quả cầu sâm kết thành một khối lớn, có màu vàng, các sợi rễ tóc to hơn ban đầu và liên kết chặt chẽ với nhau.



Hình 2. Biểu đồ tăng sinh khối tự nhiên của rễ tóc sâm Ngọc Linh trong bình bioreactor BioPia 18 lít sau 90 ngày nuôi cấy

Theo biểu đồ tăng sinh khối tự nhiên của rễ tóc sâm Ngọc Linh (Hình 2), khả năng tăng trưởng của sâm là gấp 12 lần so với khối lượng ban đầu. Nhìn chung, tốc độ tăng trưởng của rễ tóc sâm Ngọc Linh tăng lên theo cấp số nhân sau mỗi giai đoạn 10 ngày nuôi cấy. Tuy nhiên, ở một số giai đoạn, hệ số nhân cao hơn so với các giai đoạn khác. Cụ thể, giai đoạn bắt đầu tăng trưởng nhanh trong 40 ngày đầu tiên, khối lượng tươi của sâm tăng đều (1,03 - 4,72 lần). Từ 40 - 60 ngày, tốc độ tăng trưởng có phần chậm lại, được xem như giai đoạn tĩnh tiến, hệ số tăng trưởng của sâm thấp hơn giai đoạn đầu (4,75 - 5,97 lần). Giai đoạn tăng trưởng mạnh nhất rơi vào 30 ngày cuối (60 - 90 ngày), khối lượng tươi của sâm tăng trưởng từ 5,97 - 10,67 lần cấp số nhân, cụ thể là khối lượng mẫu tăng 8,5 - 10,67 lần trong giai đoạn 80 đến 90 ngày. Tuy nhiên, sau 90 ngày, khối lượng tươi gần như ngừng tăng sinh, môi trường nuôi cấy có hiện tượng chuyển sang màu vàng đậm. Từ kết quả thí nghiệm cho thấy, chu kỳ sinh trưởng của rễ tóc sâm Ngọc Linh dòng 5 trên bình bioreactor BioPia 18 lít nuôi trong 10 lít môi trường SH trong 90 ngày là thời gian thích hợp để thu hoạch sinh khối.

So sánh với hệ thống Plantima bán chìm ngập (Temporary Immersion System-TIS), rễ tóc sâm Ngọc Linh mật độ nuôi cấy ban đầu 3 g cho hệ số nhân cao nhất là 13,5 lần sau 2 tháng (Hà Thị Loan và Dương Hoa Xô, 2017). Hệ thống Plantima mật độ 3 g với tốc độ bơm thích hợp cho ra sinh khối cao nhất, nhưng vẫn chưa đáp ứng được nhu cầu tiêu thụ của thị trường. Do đó, rễ tóc sâm Ngọc Linh từ hệ thống Plantima được sử dụng làm vật liệu cho hệ thống bioreactor 18 lít.

3.2. Ảnh hưởng nồng độ đường sucrose đến sinh khối và tích lũy saponin của rễ tóc sâm Ngọc Linh

Rễ tóc sâm Ngọc Linh được nuôi cấy trong bình bioreactor BioPia 18 lít chứa 10 lít môi trường SH, bổ sung đường sucrose từ 3 - 7%. Kết quả thí nghiệm cho thấy, tỷ lệ đường càng cao thì mẫu rễ và môi trường nuôi cấy có màu vàng càng đậm. Môi trường có bổ sung sucrose từ 3 - 4% có màu vàng nhạt, môi trường có bổ sung sucrose 5 - 6% có màu vàng đậm hơn, và môi trường có bổ sung sucrose 7% có màu trà. Có thể nói nồng độ đường càng cao dẫn đến sự trao đổi chất diễn ra càng nhiều. Đường sucrose cung cấp nguồn carbon cho rễ tóc sâm Ngọc Linh sinh trưởng, đồng thời tích luỹ saponin. Tuy nhiên, nồng độ đường lý tưởng để rễ tóc sâm Ngọc Linh tận dụng triệt để nhất cho sinh trưởng và tích luỹ saponin là 6% (Bảng 1).

Bảng 1. Ảnh hưởng của đường sucrose đến sinh khối và saponin tổng của rễ tóc sâm Ngọc Linh sau 90 ngày nuôi cấy

Nồng độ đường (%)	Khối lượng mẫu ban đầu (g)	Khối lượng rễ tươi (g)	% saponin
Sucrose 3	100	596,67[b]	1,38[b]
Sucrose 4	100	656,67[b]	1,63[b]
Sucrose 5	100	1113,33[a]	1,71[b]
Sucrose 6	100	1160,00[a]	4,53[a]
Sucrose 7	100	530,00[b]	1,97[b]
CV (%)		*9,89*	*4,95*

Ghi chú: Các chữ cái khác nhau trên cùng một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa ở mức 0,05 trong Duncan test.

Số liệu ở bảng 1 cho thấy khối lượng trung bình của rễ tóc sâm Ngọc Linh dòng 5 thu hoạch được trong môi trường có bổ sung nồng độ đường từ 5 - 6% cho ra sinh khối cao và không có sự khác biệt về mặt thống kê. Nồng độ đường 3 - 6%, sinh khối rễ tóc sâm Ngọc Linh gia tăng dần, nhưng đến nồng độ đường 7% thì sinh khối tăng trưởng chậm lại và thấp hơn ở nồng độ 3%. Điều này cho thấy nồng độ đường quá cao dẫn đến mất cân bằng trong quy trình chuyển hoá năng lượng của rễ tóc sâm Ngọc Linh, ức chế quá trình tăng sinh khối. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Nguyen Van Ket và cộng tác viên (2012) về nồng độ đường ảnh hưởng đến mô sẹo và sự phát triển của rễ tóc sâm Ngọc Linh trong bình bioreactor 5 lít, và nghiên cứu của tác giả Trần Diệu Thái và cộng tác viên (2019) về ảnh hưởng của nồng độ đường lên sự sinh trưởng của huyền phù tế bào sâm Ngọc Linh trong môi trường MS lỏng lắc. Như vậy, có thể kết luận nồng độ đường 6% là lý tưởng cho sự tăng sinh khối lên rễ tóc sâm Ngọc Linh nuôi cấy trên hệ thống Bioreactor 18 lít.

Hàm lượng saponin toàn phần của rễ tóc sâm Ngọc Linh ở môi trường bổ sung sucrose 7% chỉ thấp hơn so với môi trường có sucrose 6%, nhưng cao hơn so với môi trường có nồng độ đường 3 - 5%. Do đó, nồng độ đường 6% là thích hợp nhất cho quy trình tích luỹ saponin toàn phần của rễ tóc sâm Ngọc Linh.

Phân tích HPLC hàm lượng các saponin chính Rb1, MR2, VR1 cho thấy ba saponin chính đều có mặt trong rễ tóc sâm Ngọc Linh dòng 5, ngoại trừ MR2 không xuất hiện ở rễ nuôi cấy trong môi

trường có bổ sung 5% sucrose. Nguyên nhân do yếu tố nội sinh, sự chuyển hóa các chất trong quá trình tổng hợp saponin, một lượng carbon nhất định được chọn để chuyển hoá sang một loại saponin này, nhưng không chuyển hoá sang loại saponin khác, hoặc đã chuyển hoá, nhưng lại dùng sản phẩm chất này để chuyển hoá sang một loại saponin khác. Như vậy, nồng độ đường 6% là tối ưu cả về sinh trưởng và tích luỹ saponin toàn phần của rễ tóc sâm Ngọc Linh.

Tuy nhiên, lượng saponin Rb1, MR2, VR1 của rễ tóc sâm Ngọc Linh trong môi trường có bổ sung 6% sucrose không xếp hạng cao nhất. Hàm lượng VR1 và Rb1 được xếp cao nhất ở sâm Ngọc Linh trong môi trường có bổ sung 3% sucrose và khối lượng MR2 cao nhất trong môi trường có bổ sung sucrose 7%.

Bảng 2. Ảnh hưởng của đường sucrose đến hàm lượng saponin Rb1, MR2, VR1 trong rễ tóc sâm Ngọc Linh sau 90 ngày nuôi cấy

Nồng độ đường (%)	saponin (%)	Rb1 (mg)	MR2 (mg)	VR1 (mg)
Sucrose 3	1,38^{b}	0,020105^{a}	1,010404^{b}	3,290765^{a}
Sucrose 4	1,63^{b}	0,011129^{d}	0,391350^{d}	1,698658^{c}
Sucrose 5	1,71^{b}	0,011529^{c}	0,000000^{e}	1,732918^{d}
Sucrose 6	4,53^{a}	0,011699^{c}	0,471721^{c}	2,362732^{b}
Sucrose 7	1,97^{b}	0,016823^{b}	3,395261^{a}	1,883894^{c}
CV (%)	*4,95*	*0,66*	*0,047*	*0,0086*

3.3. Ảnh hưởng của điều kiện chiếu sáng đến sinh khối và tích lũy saponin

Rễ tóc sâm Ngọc Linh nuôi trong 2 điều kiện sáng, tối 90 ngày được rửa sạch, cân lấy khối lượng tươi, lưu trữ –80°C trong 48 giờ, xử lý đông khô và tiến hành tách chiết saponin tổng bằng phương pháp cân và phân tích saponin thành phần (Rb1, MR2, VR1) bằng phương pháp HPLC. Kết quả được trình bày trong bảng 3.

Bảng 3. Ảnh hưởng của điều kiện chiếu sáng đến sinh khối, tích lũy saponin toàn phần và các saponin Rb1, MR2, VR1 của rễ tóc sâm Ngọc Linh sau 90 ngày nuôi cấy

Điều kiện ánh sáng	M_i (g)	M_f (g)	Saponin %	Rb1 (mg)	MR2 (mg)	VR1 (mg)
Sáng (200 lux)	100	895^{a}	2,63^{ns}	0,0117^{b}	0,5220^{ns}	1,5505^{b}
Tối (vải tối màu)	100	576,67^{b}	3,05	0,0225^{a}	0,5216	2,4728^{a}
CV (%)		*10,66*	*18,145*	*4,317*	*1,372*	*0,351*

Ghi chú: Các chữ cái khác nhau trên cùng một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa ở mức 0,05 trong LSD test, ns không có sự khác biệt về mặt thống kê

Kết quả cho thấy sinh khối của rễ tóc sâm Ngọc Linh ở điều kiện sáng 200 lux cao hơn so với điều kiện tối. Lượng saponin toàn phần và saponin thành phần của rễ tóc sâm Ngọc Linh trong môi trường tối lại cao hơn so với điều kiện sáng. Các phân tử carbon dễ dàng liên kết với nhau hơn để tổng hợp các saponin trong chu kỳ tối. Có thể kết luận điều kiện sáng lý tưởng hơn cho rễ tóc sâm Ngọc Linh tăng sinh khối, nhưng điều kiện tối lại thích hợp hơn cho quy trình tổng hợp và tích luỹ saponin.

3.4. Ảnh hưởng của lượng mẫu cấy ban đầu đến sự nhân nhanh sinh khối và tích lũy saponin

Khối lượng ban đầu khác nhau được nuôi cấy trong bình bioreactor BioPia 18 lít cho ra khối lượng sau cùng khác nhau. Khối lượng tươi sau cùng của rễ tóc sâm Ngọc Linh được nuôi cấy từ 150 g khối lượng ban đầu cho ra khối lượng sau cùng cao nhất, 50 g khối lượng ban đầu cho ra khối lượng sau cùng thấp nhất. Hai nghiệm thức với khối lượng ban đầu 100 g và 200 g cho ra khối lượng cuối cùng gần như nhau. Tuy nhiên, cần đánh giá theo tỷ lệ tăng sinh của từng nghiệm thức (cột 2, Bảng 4), khối lượng ban đầu càng thấp dẫn đến tỷ lệ tăng sinh càng cao. Kết luận này phù hợp với nghiên cứu của Nguyen Van Ket và cộng tác viên (2012) về nuôi cấy tế bào huyền phù sâm Ngọc Linh, theo đó, tác giả cho rằng 2% là mật độ lý tưởng cho huyền phù tế bào sinh trưởng trong bình bioreactor 5 lít. Đối với rễ tóc nuôi cấy trong bình bioreactor BioPia 18 lít có thể

tích môi trường nuôi là 10 lít, 50 -100 g khối lượng ban đầu được xem là tối ưu cho tỷ lệ tăng sinh khối lẫn khả năng tích luỹ saponin.

Saponin toàn phần ở nghiệm thức khối lượng ban đầu 50 g và 100 g gần như nhau và cao hơn so với các nghiệm thức khác. Hàm lượng saponin thành phần (Rb1, MR2, VR1) cao nhất ở nghiệm thức 100 g cho MR2 và VR1 cao nhất. Nghiệm thức 50 g và 100 g cho ra hàm lượng saponin toàn phần cao gần như nhau, nhưng saponin chính (Rb1, MR2, VR1) cao nhất ở nghiệm thức 100 g. Điều này có thể giải thích rằng do có sự hình thành của các saponin khác ngoài những saponin chính đã được khảo sát.

Bảng 4. Khối lượng tươi trung bình và hàm lượng saponin toàn phần và saponin chính (Rb1, MR2, VR1) của rễ tóc sâm Ngọc Linh với các sinh khối ban đầu khác nhau trong 90 ngày

M_i	M_f (g)	M_f/M_i	saponin (%)	Rb1 (mg)	MR2 (mg)	VR1 (mg)
50	673,33[c]	13,47[a]	4,54[a]	0,001523[d]	3,233915[b]	0,427115[d]
100	1073,33[b]	10,73[b]	4,53[a]	0,005200[c]	3,411454[a]	4,293509[a]
150	1298,33[a]	8,65[c]	2,21[b]	0,028442[b]	2,586780[c]	1,985361[c]
200	921,67[b]	4,61[d]	2,26[b]	0,034500[a]	2,267500[d]	2,176600[b]
CV (%)	*8,53*	*9,07*	*11,708*	*3,602*	*0,112*	*0,071*

Ghi chú: các chữ cái khác nhau trên cùng một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa ở mức 0,05 trong LSD test; M_i: khối lượng ban đầu (g); M_f: khối lượng tươi sau cùng (g). M_f/M_i: tỷ lệ tăng sinh.

IV. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

4.1. Kết luận

Khảo sát động thái tăng trưởng của rễ tơ sâm Ngọc Linh (dòng 5) trên bioreactor 18 lít cho thấy tốc độ tăng trưởng của rễ tơ sâm Ngọc linh là 12 lần so với khối lượng ban đầu và rễ tơ tăng trưởng mạnh nhất giai đoạn 80 - 90 ngày, sau 90 ngày hầu như dừng tăng sinh. Sử dụng 50 - 100 g mẫu rễ tơ ban đầu nuôi cấy trên hệ thống bioreactor 18 lít có chứa 10 lít môi trường SH, bổ sung đường sucrose 6% có tỷ lệ tăng sinh khối và tích lũy saponin cao. Rễ tơ nuôi trong điều kiện chiếu sáng 200 Lux thích hợp cho sự gia tăng sinh khối (895 g). Điều kiện tối hoàn toàn ức chế tăng sinh khối của rễ tóc sâm Ngọc Linh (576,67 g), nhưng không ức chế saponin toàn phần và thành phần (3,05%).

4.2. Đề nghị

Khảo sát ảnh hưởng của chu kỳ sáng, tối đến năng suất và hàm lượng saponin trong quá trình nuôi cấy; các nguyên tố ảnh hưởng đến khả năng tăng sinh khối và tích lũy hàm lượng saponin của rễ tóc sâm Ngọc Linh và yếu tố tác động của môi trường đến các chuỗi gen hình thành ginsenoside chính (VR1, Rb1, MR2, Rd, ...) phản ánh chính xác hơn về sinh học và cơ chế hình thành các saponin chính từ rễ tóc sâm Ngọc Linh.

LỜI CẢM ƠN

Vô cùng cảm ơn GS.TS. Trần Văn Minh đã giới thiệu đề tài mang tính thiết thực trong giai đoạn đất nước đang khủng hoảng bệnh dịch. Lời cảm ơn lớn nhất đến tiến sĩ Hà Thị Loan, người đã thành công chuyển gen để phục vụ sản xuất, đồng thời tiếp tục cung ứng cho các nghiên cứu sau này. Lời cảm ơn chân thành đến Trung tâm Công nghệ Sinh học Thành phố Hồ Chí Minh đã hỗ trợ cơ sở vật chất cho đề tài.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Nguyễn Văn Kết, Trương Thị Lan Anh, 2016. Ảnh hưởng của hàm lượng khoáng đa lượng và bổ sung dinh dưỡng vào giai đoạn sau của quá trình nuôi cấy đến sự sinh trưởng huyền phù tế bào sâm Ngọc Linh. *Tạp chí Khoa học Đà Lạt*, 6(4): 419-430.

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 rễ thứ cấp và hàm lượng saponin trong nuôi cấy lỏng lắc rễ bất định sâm Ngọc Linh. *Tạp chí Công nghệ Sinh học,* 15(2): 285-291.

Hà Thị Loan, Dương Hoa Xô, Nguyễn Quốc Bình, Nguyễn Hoàng Quân, Vũ Thị Đào, Nathalie-Jullian, 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 Sinh học*, 36 (1se): 293-300.

Hà Thị Loan, Dương Hoa Xô, 2017. Ảnh hưởng điều kiện nuôi cấy đến sự nhân nhanh sinh khối rễ tóc sâm Ngọc Linh trên hệ thống Plantima. *Tạp chí Khoa học Công Nghệ Nông nghiệp Việt Nam*, 6(79):45-49.

Hà Thị Loan, Lâm Vỹ Nguyên, Trần Nguyễn Lệ Quyên, Huỳnh Hữu Đức, Dương Hoa Xô, 2019. Sàng lọc và nhân nhanh sinh khối rễ tóc sâm Ngọc Linh trên Bioreactor 20 lít trong sản xuất quy mô lớn. *Tạp chí Khoa học Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam*, 11(108): 164-170.

Dương Tấn Nhựt, Nguyễn Cửu Thành Nhân, Hoàng Xuân Chiến, Nguyễn Phúc Huy, Nguyễn Bá Nam, Trần Xuân Ninh, Phạm Phong Hải, Vũ Quốc Luận, Phan Quốc Tâm, Vũ Thị Hiển, Trịnh Thị Hương, Trần Công 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(4A): 887-889.

Trần Diệu Thái, Nguyễn Văn Dự, Đỗ Đăng Giáp, Trịnh Thị Hương và Trần Trọng Tuấn, 2019. Ảnh hưởng của nồng độ đường, loại bioreactor và thể tích bình nuôi cấy lên sự sinh trưởng của huyền phù tế bào sâm Ngọc Linh *(Panax vietnamensis* Ha et. Grushv). *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. Số chuyên đề: Công Nghệ Sinh Học. Available from: sj.ctu.edu.vn.*

Nguyen Van Ket, Truong Thi Lan Anh and Nguyen Hoang Uyen Dung, 2012. Effecting of sucrose concentrations and inoculum density on adventitious root growth in cell suspension culture of *Panax vietnamensis* and intially growth in bioreactor. *Southeast-Asian Journal of Science*, 1(2): 215-222.

Loan Ha Thi, Nathalie Pawlicki-Jullian, Michelle Pillon-Lequart, Michele Boitel-Conti, Hoa Xo Duong & Eric Gontier, 2016. Hairy root cultures of *Panax vietnamensis*, a promising approach for the production of ocotillol -type Ginsenosides. *Plant cell, Tissue and Organ Culture, 126 (1): 93-103.*

Schenk R.H., Hildebrandt A.C., 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Canadian Journal of Botany,* 50: 199-204.

Quang-Ung Le, Horng-Liang Lay, Ming-Chang Wu, Thi Hong-Hanh Nguyen and Duy-Lam Nguyen, 2018. Phytoconstituents and Biological Activities of *Panax vietnamensis* (Vietnamese ginseng): A precious ginseng and call for further research-A Systematic Review. *Natural Product Communications*, 13 (10): 1381-1384.

Effects of culture conditions on biomass growth and saponin accumulation of *Panax vietnamensis* hairy roots in 18-litter bioreactor

Quach Ngoc Anh, Tran Van Minh,
Ha Thị Loan, Tran Nguyen Le Quyen

Abstract

Panax vietnamensis is recognized as the national precious herb of Vietnam. *Panax vietnamensis* contains a large amount of saponins, really effective in curing serious inflammatory diseases, preventing cancer, anti-stresses, anti-oxidation. *Panax vietnamensis* has great medical and commercial values, but is currently scarce in nature. Therefore, scientists have been interested in producing *Panax vietnamensis* in a large scale with a high accumulation of saponin. In order to obtain *Panax vietnamensis* hairy root biomass and high saponin content in an 18-litter bioreactor system, a 90-day cycle of natural biomass growth chart of natural biomass growth of *Panax vietnamensis* hairy root tissues was established, then established suitable conditions for rapid multiplication of fresh biomass and accumulation of saponins (total saponins, M-R2, V-R2, G-Rb1). The results showed that 6% sucrose concentration, 200 lux light condition yielded the highest biomass growth coefficient for *Panax vietnamensis* hairy root tissues. In the culture condition without light (dark), the hair roots were inhibited to increase the biomass, but the saponin content in *Panax vietnamensis* roots was higher than in the light condition. The initial culture mass of 50 -100 g was suitable for the growth and saponin accumulation.

Keywords: *Panax vietnamensis* hairy roots, light condition, initial mass, sucrose concentration, 18-litter bioreactor

Ngày nhận bài: 14/9/2022
Ngày phản biện: 09/9/2022
Người phản biện: TS. Nguyễn Thị Kiều Oanh
Ngày duyệt đăng: 28/10/2022

HOÀN THIỆN QUY TRÌNH CÔNG NGHỆ NHÂN GIỐNG LAN KIẾM THANH NGỌC *(Cymbidium sinense)* BẰNG TÁCH CHỒI

Đặng Văn Đông[1*], Chu Thị Ngọc Mỹ[1],
Đặng Tiến Dũng[1], Đặng Thị Phương Anh[1]

TÓM TẮT

Năm 2020 - 2021, Viện Nghiên cứu Rau quả đã nghiên cứu hoàn thiện quy trình công nghệ nhân giống bằng tách chồi cho cây lan kiếm Thanh Ngọc. Kết quả đã xác định được giá thể 1/2 vỏ thông + 1/2 giá thể Klasmann TS2 đạt tỷ lệ sống cao 94,44%. Sử dụng chế phẩm kích thích ra rễ Super root giúp thời gian ra rễ nhanh; 18 ngày sau tách, bộ rễ cây phát triển khỏe đạt 4,8 rễ mới/chậu. Phân bón Plant soud 20-20-20 ở nồng độ 1/1.500 giúp cây sinh trưởng phát triển tốt đạt 4,3 chồi/chậu, kích thước lá lớn đạt 46,3 cm × 3,9 cm. Sử dụng Antracol 70WP hoặc Ridomil gold 68WG để phòng trừ một số bệnh hại phổ biến như thối thân, đốm đen, khô đầu lá. Áp dụng quy trình công nghệ nhân giống mới tại một số địa phương giúp cây sinh trưởng, phát triển tốt, hệ số nhân đạt 3,20 - 3,26 lần, tỷ lệ cây đạt tiêu chuẩn xuất vườn cao > 90%, chất lượng cây giống tốt với 3,7 - 4,0 chồi/chậu, rút ngắn thời gian nhân giống xuống còn 79 - 82 ngày (so với quy trình cũ là 89 - 91 ngày).

Từ khóa: Lan kiếm Thanh Ngọc, giá thể trồng, kích thích ra rễ, phân bón

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Lan kiếm Thanh Ngọc (*Cymbidium sinense*) thuộc chi địa lan là một trong những giống lan kiếm có giá trị cao nhất hiện nay bởi đặc điểm nhiều hoa, kích thước hoa lớn, hoa màu xanh ngọc, ngồng hoa dài và hương thơm dịu.

Từ năm 2013 - 2016, Viện Nghiên cứu Rau quả đã được giao thực hiện nhiệm vụ: "Khai thác phát triển nguồn gen lan kiếm (*Cymbidium sinense*) tại các tỉnh phía Bắc". Nhóm tác giả đã tiến hành thu thập, đánh giá và xây dựng các quy trình kỹ thuật nhân giống cho lan kiếm Thanh Ngọc. Một trong những quy trình nhân giống đang được Viện Nghiên cứu Rau quả áp dụng phổ biến hiện nay và chuyển giao cho nhiều tỉnh thành trong cả nước như: Hà Nội, Sơn La, Bắc Ninh, Hưng Yên, Nam Định, Thái Bình,… Tuy nhiên, trong quá trình sản xuất đã phát hiện một số hạn chế như: giá thể trồng cũ có khả năng thoát nước quá mạnh, giữ phân kém dẫn đến tốn nhiều nhân công trong quá trình chăm sóc; thời gian nhân giống còn dài đặc biệt tỷ lệ nhiễm nấm bệnh còn cao, cho nên ảnh hưởng đến chất lượng cây giống. Xuất phát từ nhu cầu thực tế, để nâng cao hiệu quả sản xuất, tiếp tục đẩy mạnh và phát triển giống lan kiếm Thanh Ngọc ngoài sản xuất thì: "Nghiên cứu hoàn thiện quy trình công nghệ nhân giống lan kiếm Thanh Ngọc bằng phương pháp tách chồi" là cần thiết. Trong khuôn khổ nội dung nghiên cứu của dự án: "Sản xuất thử nghiệm 02 giống hoa lan kiếm Thanh Ngọc và Hoàng Vũ tại một số tỉnh phía Bắc" sẽ giải quyết vấn đề trên.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Vật liệu nghiên cứu: Sử dụng cây mẹ lan kiếm Thanh Ngọc (là cây nuôi cấy *in vitro*, 3 năm tuổi) khỏe mạnh, không bị sâu bệnh hại, ít bị tổn thương cơ giới, có ít nhất 6 - 8 nhánh (chồi) trên 1 chậu. Mỗi chậu con tách 2 chồi.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Hoàn thiện quy trình nhân giống lan kiếm Thanh Ngọc bằng tách chồi

Thí nghiệm 1: Nghiên cứu ảnh hưởng của giá thể trồng. Gồm: CT1: 1/3 vỏ lạc + 1/3 vỏ thông + 1/3 đá sỏi (Đối chứng); CT2: 1/2 vỏ thông +1/2 giá thể Klasmann TS 2; CT3: 1/2 vỏ lạc + 1/2 giá thể Klasmann TS 2; CT4: 1/2 đá sỏi + 1/2 giá thể Klasmann TS 2.

Thí nghiệm 2: Nghiên cứu ảnh hưởng của chế phẩm kích thích ra rễ. Gồm: CT1: Trimix-DT 500G (Đối chứng); CT2: Super root; CT3: Rootone; CT4: Atonix 1.8 SL.

Thí nghiệm 3: Nghiên cứu ảnh hưởng của chủng

[1] Viện Nghiên cứu Rau quả
* Tác giả liên hệ, e-mail: donghoacaycanh03@gmail.com