

# ẢNH HƯỞNG CỦA OLIGOCHITOSAN, DỊCH CHIẾT NẤM MEN VÀ METHYL JASMONATE ĐẾN SỰ TĂNG SINH KHỐI VÀ HÌNH THÀNH HỢP CHẤT SAPONIN Ở RỄ TƠ SÂM NGỌC LINH (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.)

Trần Nguyễn Lệ Quyên<sup>1,2</sup>, Nguyễn Trần Phước Huy<sup>1</sup>, Cao Huệ Trinh<sup>1</sup>, Dương Hoa Xô<sup>1</sup>, Hà Thị Loan<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Trung tâm Công nghệ Sinh học Thành phố Hồ Chí Minh

<sup>2</sup> Trường Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh

## TÓM TẮT

Saponin, thành phần đóng vai trò chính trong tác dụng sinh học của các dược phẩm Sâm. Nghiên cứu này được thực hiện để khảo sát tác động của oligochitosan, yeast extract, sau đó tiến hành so sánh với nghiên cứu trước đây sử dụng methyl jasmonate lên sự tăng sinh khối và tích lũy saponin ở rễ tơ sâm Ngọc Linh. Kết quả cho thấy khối lượng tươi không có sự khác biệt khi xử lý với các hợp chất trên sau 3 và 7 ngày. Khối lượng khô rễ tơ khi xử lý với oligochitosan có sự khác biệt rất có ý nghĩa, khi tăng nồng độ và thời gian xử lý thì khối lượng khô giảm. Kết quả thí nghiệm so sánh giữa oligochitosan, yeast extract, methyl jasmonate cho thấy, oligochitosan 0,5 mL/L xử lý trong 3 ngày và yeast extract 100 mg/L xử lý trong 7 ngày là thích hợp cho sự tăng sinh khối và hàm lượng saponin trong nuôi cấy rễ tơ Sâm Ngọc Linh. Hàm lượng G-Rg1, G-Rb1, G-Rd đạt cao nhất ở nghiệm thức oligochitosan 0,5 mL/L xử lý trong 3 ngày và khác biệt rất có ý nghĩa so với các nghiệm thức khác, hàm lượng MR2 đạt cao nhất ở nghiệm thức yeast extract 100 mg/L xử lý trong 7 ngày (1,7235 mg/g), hàm lượng VR1 + VR2 không có sự khác biệt giữa các nghiệm thức trong thí nghiệm này.

*Từ khóa:* Elicitor, methyl jasmonate, oligochitosan, *Panax vietnamensis*, rễ tơ, saponin, yeast extract.

## MỞ ĐẦU

Sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) là loài dược liệu quý đặc hữu của Việt Nam. Sâm được biết đến với các tác dụng như giúp phục hồi sự suy giảm chức năng, giúp kéo dài sự sống và tăng các tế bào mới, phòng chống ung thư, phòng chống xơ vữa động mạch, bảo vệ tế bào gan (Nguyễn Thượng Dong *et al.*, 2007). Hoạt chất chính quyết định hoạt tính cũng như giá trị của Sâm Ngọc Linh là saponin. Hiện nay nguồn Sâm tự nhiên ngày càng cạn kiệt do tình trạng khai thác quá mức và việc trồng Sâm gặp rất nhiều khó khăn do hệ số nhân giống, tỷ lệ sống thấp, thời gian sinh trưởng dài và đòi hỏi vùng khí hậu đặc thù. Sản xuất hợp chất thứ cấp bằng phương pháp nuôi cấy rễ tơ đã được nghiên cứu và sử dụng trên nhiều đối tượng như *P. ginseng* (Yang và Choi, 2000), *P. quinquefolium* L. (Kochan *et al.*, 2012), *P. vietnamensis* (Hà Thị Loan *et al.*, 2014). Rễ tơ với nhiều ưu điểm như sinh trưởng nhanh trong điều kiện không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng, sản xuất các hợp chất thứ cấp cao, ổn định. Tuy nhiên, vẫn có nhiều loại cây trồng, đặc biệt là những cây sinh trưởng chậm có hàm lượng các hoạt chất thu được trong rễ tơ thấp. Một trong những phương pháp được sử dụng để tăng cường sản xuất hợp chất thứ cấp ở thực vật là sử dụng các elicitor.

Elicitor là một hợp chất cơ bản mà khi đưa vào hệ thống tế bào sống với nồng độ nhỏ thì khởi động lại hoặc cải thiện sự sinh tổng hợp các hợp chất thứ cấp trong tế bào. Sự kích kháng thực vật là quá trình cảm ứng hoặc tăng cường sinh tổng hợp các chất chuyển hóa thứ cấp do sự bổ sung theo hàm lượng elicitor. Trên cơ sở bản chất tự nhiên, elicitor được phân thành 2 nhóm là phi sinh học và sinh học. Việc thực vật bị xử lý bằng chất kích kháng hoặc bị tấn công bằng mầm bệnh gây ra một loạt phản ứng phòng vệ, bao gồm sự tích lũy các hợp chất thứ cấp để bảo vệ ở các trong cây tự nhiên cũng như trong nuôi cấy. Các thông số như thành phần và nồng độ elicitor, thời gian kích ứng, tuổi nuôi cấy, dòng tế bào,... và đặc điểm tế bào phù hợp có thể tăng cường khả năng tích lũy các sản phẩm thứ cấp (Namdeo, 2017). Trong nghiên cứu này sử dụng oligochitosan và yeast extract so sánh với methyl jasmonate về tác động kích thích tăng trưởng sinh khối và sinh tổng hợp saponin.

## NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Nguyên liệu

Rễ tơ Sâm Ngọc Linh dòng số 5 của Trung tâm Công nghệ sinh học TP. Hồ Chí Minh được tạo ra nhờ chuyển gen từ vi khuẩn *Agrobacterium rhizogenes* (chủng ATCC 15834) dạng hoang dại (Hà Thị Loan *et al.*, 2014). Rễ tơ được nuôi cấy trên môi trường khoáng SH bổ sung saccharose 30 g/L, agar 8,5 g/L, thời gian nuôi cấy 40 ngày. Rễ tơ sau đó sẽ được cắt thành từng đoạn 1 - 1,5 cm để tiến hành thí nghiệm.

Các chất bổ sung được sử dụng trong nghiên cứu này là oligochitosan (sản phẩm của Trung tâm Công nghệ sinh học Thành phố Hồ Chí Minh) được chế tạo bằng phương pháp tách phân đoạn, khối lượng phân tử khoảng

3.000 Da; yeast extract với tổng hàm lượng nitrogen  $\geq 10\%$ , trong đó hàm lượng  $\text{NH}_4\text{NO}_3 \geq 5\%$ , độ ẩm  $\leq 6\%$ ; methyl jasmonate độ tinh khiết 95%.

### Phương pháp thí nghiệm

Rễ tơ sau 55 ngày nuôi cấy, tiến hành xử lý riêng lẻ với từng chất bổ sung ở các nồng độ khác nhau oligochitosan (0; 0,5; 1; 1,5; 2 mL/L), yeast extract (0, 50, 100, 250, 500, 1.000, 2.000 mg/L) và thu hoạch sau thời gian 3 và 7 ngày. Các thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên 2 yếu tố với 3 lần lặp lại/nghiệm thức. Sau đó chọn các nghiệm thức có hiệu quả cho sinh khối và tích lũy saponin ở từng thí nghiệm. Tiến hành thí nghiệm so sánh với kết quả nghiên cứu trước đây của nhóm chúng tôi là sử dụng methyl jasmonate 200  $\mu\text{mol/L}$  với thời gian xử lý 5 ngày. Thí nghiệm 1 yếu tố gồm 4 nghiệm thức được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên với 4 lần lặp lại. Khối lượng mẫu cây là 1,0 g trên bình tam giác thể tích 250 mL có chứa 100 mL dung dịch môi trường khoảng SH bổ sung saccharose 60 g/L.

**Điều kiện nuôi cấy:** Tất cả mẫu được nuôi cấy trong điều kiện tối hoàn toàn, nhiệt độ phòng  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ , độ ẩm phòng  $57 \pm 5\%$ , phương pháp nuôi cấy lỏng lắc với tốc độ 100 vòng/phút.

**Phương pháp xử lý mẫu:** Rễ tơ sau thời gian nuôi cấy được lấy ra khỏi môi trường, rửa 2 lần với nước sạch. Sau khi ghi nhận khối lượng tươi, rễ tơ sẽ được đông khô để xác định khối lượng khô và phân tích saponin tổng, hàm lượng saponin thành phần.

### Xác định saponin tổng số bằng phương pháp cân

Cân chính xác 4 g bột khô rễ tơ Sâm Ngọc Linh. Sau đó bổ sung 40 mL MeOH 70% (x 3 lần) vào với tỷ lệ 1:10 (w/v). Ngâm mẫu và kết hợp chiết siêu âm ở  $45^\circ\text{C}$  trong thời gian 40 phút. Thu tất cả dịch chiết, lọc qua giấy lọc và định mức đến 100 mL, cô quay thu được cao chiết. Cao chiết sẽ được hòa với nước cất, tinh chế bằng cột SPE C18, rửa giải với MeOH thu dịch. Cô quay dịch đến cạn, đông khô, thu được cao saponin, cân xác định khối cao saponin toàn phần (phương pháp phát triển bởi Bộ môn Dược liệu, Khoa Dược, Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh).

Định lượng saponin trong rễ tơ Sâm Ngọc Linh bằng phương pháp sắc ký lỏng cao áp (HPLC) sử dụng đầu dò UV-Vis bước sóng 203, 196 nm. Các chuẩn sử dụng trong nghiên cứu là G-Rb1, MR2, VR2, VR1, G-Rb1, G-Rd được cung cấp bởi Trung tâm Sâm và dược liệu.

### Phương pháp xử lý số liệu

Các kết quả thí nghiệm sau khi thu thập sẽ được xử lý số liệu bằng phần mềm Excel 2017 và xử lý thống kê bằng phần mềm SAS 9.1.

## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### Ảnh hưởng của nồng độ và thời gian xử lý oligochitosan đến sinh khối và hàm lượng saponin trong rễ tơ Sâm Ngọc Linh *in vitro*

Các kết quả về sự nhân nhanh sinh khối và hàm lượng saponin tổng số rễ tơ Sâm Ngọc Linh sau khi được xử lý với oligochitosan được trình bày trong bảng 1.

**Bảng 1. Khối lượng tươi, khối lượng khô và hàm lượng saponin tổng số của rễ tơ Sâm Ngọc Linh khi xử lý với oligochitosan**

Chỉ tiêu theo dõi	Oligochitosan (ml/l) (A)	Thời gian xử lý (ngày) (B)		Trung bình oligochitosan
		3	7	
Khối lượng tươi	0	19,82	21,44	20,63
	0,5	21,05	20,29	21,17
	1	20,20	22,06	21,13
	1,5	20,69	22,36	21,53
	2	19,55	21,47	20,51
	Trung bình thời gian xử lý	20,30	21,72	
CV(%) = 6,56; F(A) <sup>ns</sup> ; F(B) <sup>ns</sup> ; F(AB) <sup>ns</sup>				
Khối lượng khô	0	2,20 <sup>bc</sup>	2,10 <sup>c</sup>	2,15
	0,5	2,49 <sup>a</sup>	1,98 <sup>c</sup>	2,22
	1	2,44 <sup>a</sup>	1,71 <sup>d</sup>	2,24
	1,5	2,33 <sup>ab</sup>	1,65 <sup>d</sup>	2,17
	2	2,17 <sup>bc</sup>	1,52 <sup>d</sup>	2,19
	Trung bình thời gian xử lý	2,20 <sup>a</sup>	2,10 <sup>ab</sup>	
CV(%) = 3,44; F(A) <sup>ns</sup> ; F(B) <sup>*</sup> ; F(AB) <sup>**</sup>				
Hàm lượng saponin tổng số	0	2,87	2,54	2,71
	0,5	3,64	2,51	3,08
	1	2,64	3,07	2,86
	1,5	3,08	3,54	3,31
	2	2,39	3,25	2,82
	Trung bình thời gian xử lý	2,92	2,91	

Trong cùng nhóm trung bình các con số đi liền với cùng ký tự khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê, ns: khác biệt không có ý nghĩa, \*: khác biệt có ý nghĩa ở mức  $P \leq 0,05$ , \*\*: khác biệt có ý nghĩa ở mức  $P \leq 0,01$ .

Theo số liệu bảng 1, khối lượng tươi rễ tơ Sâm Ngọc Linh ở các nghiệm thức không có sự khác biệt về mật độ thống kê sau 3 và 7 ngày xử lý oligochitosan. Rễ tơ thu được đều có màu vàng sáng. Oligochitosan chưa ảnh hưởng tới khối lượng tươi trong thời gian xử lý 3 và 7 ngày, tuy nhiên khối lượng khô lại có sự khác biệt giữa các nghiệm thức. Thời gian xử lý 3 ngày cho khối lượng khô cao hơn 7 ngày. Oligochitosan nồng độ 0,5 - 1,5 mL/L với thời gian xử lý 3 ngày cho khối lượng khô cao hơn các nghiệm thức còn lại. Nguyên nhân có thể do xử lý ở thời gian dài và nồng độ oligochitosan cao làm tăng áp suất thẩm thấu, tế bào bị trương nước.

Kết quả phân tích saponin tổng số cho thấy oligochitosan có ảnh hưởng tới hàm lượng saponin ở rễ tơ Sâm Ngọc Linh. Nghiệm thức oligochitosan 0,5 mL/L với thời gian xử lý 3 ngày cho hàm lượng saponin tổng cao nhất 3,64%. Ở thời gian xử lý 7 ngày, hàm lượng saponin tổng có xu hướng tăng khi nồng độ oligochitosan tăng từ 0,5 - 1,5 mL/L, sau đó giảm. Sivanandhan và đồng tác giả (2012) đã nghiên cứu và xác định được rằng bổ sung chitosan ở nồng độ 100 mg/L với thời gian xử lý 4h làm tăng đáng kể hàm lượng các withanolides, cao nhất gấp 17 lần so với đối chứng ở rễ thứ cấp Sâm *Withania somnifera* (L.) Dunal.

**Ảnh hưởng của nồng độ và thời gian xử lý yeast extract (YE) đến sinh khối và hàm lượng saponin trong rễ tơ Sâm Ngọc Linh *in vitro***

Các elicitor thu được từ vi sinh vật đang nhận được sự chú ý do tác dụng kích thích của chúng đối với sự tổng hợp các hợp chất thứ cấp trong nuôi cấy tế bào. Trước đây dịch chiết nấm men được sử dụng chủ yếu là chất dinh dưỡng kích thích tăng trưởng như trong nuôi cấy đỉnh sinh trưởng và mô sẹo. Vai trò của YE tuy chưa được nghiên cứu nhiều trong nuôi cấy Sâm Ngọc Linh, nhưng đã cho thấy hiệu quả tăng cường sản xuất các hợp chất thứ cấp trong nuôi cấy thực vật. Khi bổ sung YE 250 và 500 mg/L đã làm tăng đáng kể lượng noradrenaline trong nuôi cấy rễ tơ *Portulaca oleracea* L. (Pirian *et al.*, 2013).

**Bảng 2. Khối lượng tươi, khối lượng khô và hàm lượng saponin tổng số của rễ tơ Sâm Ngọc Linh khi xử lý với YE**

Chỉ tiêu theo dõi	Nồng độ YE (mg/L) (A)	Thời gian xử lý (ngày) (B)		Trung bình nồng độ YE
		3	7	
Khối lượng tươi	0	19,82	21,44	20,63
	50	21,25	20,90	21,08
	100	19,39	22,23	20,81
	250	20,47	22,70	21,59
	500	20,15	21,36	20,76
	1000	19,21	20,54	19,87
	2000	17,97	21,76	19,87
	Trung bình thời gian xử lý	19,75 <sup>B</sup>	21,56 <sup>A</sup>	
CV(%) = 7,57; F(A) <sup>ns</sup> ; F(B) <sup>**</sup> ; F(AB) <sup>ns</sup>				
Khối lượng khô	0	2,20	2,10	2,15
	50	2,23	2,18	2,21
	100	2,27	2,27	2,27
	250	2,34	2,27	2,30
	500	2,34	2,17	2,26
	1000	2,25	2,16	2,21
	2000	2,22	2,27	2,25
	Trung bình thời gian xử lý	2,27	2,20	
CV(%) = 4,76; F(A) <sup>ns</sup> ; F(B) <sup>ns</sup> ; F(AB) <sup>ns</sup>				
Hàm lượng saponin tổng số	0	2,87	2,54	2,71
	50	3,08	2,98	3,03
	100	2,44	3,29	2,87
	250	2,57	2,43	2,50
	500	2,02	2,97	2,50
	1000	2,18	2,45	2,32
	2000	2,71	2,94	2,83
	Trung bình thời gian xử lý	2,55	2,80	

*Trong cùng nhóm trung bình các con số đi liền với cùng ký tự khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê, ns: khác biệt không có ý nghĩa, \*\*: khác biệt có ý nghĩa ở mức P ≤ 0,01.*

Có sự khác biệt rất có ý nghĩa về thời gian xử lý, xử lý 7 ngày cho khối lượng tươi cao hơn 3 ngày. Khi tăng thời gian xử lý YE từ 3 lên 7 ngày, khối lượng tươi tăng. Các nghiệm thức với các nồng độ khác nhau trong cùng thời gian xử lý không có sự khác biệt về khối lượng tươi. Thời gian xử lý có ảnh hưởng tới sinh khối rễ tơ, tuy nhiên trong các nồng độ không có sự khác biệt. Rễ tơ thu được ở các nghiệm thức của thí nghiệm đều có màu vàng nhạt, rễ chắc. Khối lượng khô, kết quả thí nghiệm cho thấy ở các nồng độ khác nhau, thời gian xử lý khác nhau cho khối khô không có sự khác biệt về mật độ thống kê. Như vậy, có thể thấy YE chưa ảnh hưởng đến sự sinh trưởng trong khoảng thời gian 3 - 7 ngày về sinh khối, màu sắc của rễ tơ.

Hàm lượng saponin tổng ở các nghiệm thức 7 ngày xử lý nhìn chung cao hơn so với các nghiệm thức 3 ngày xử lý. Nghiệm thức YE 100 mg/L, xử lý trong 7 ngày cho hàm lượng saponin tổng cao nhất 3,29%, gấp 1,3 lần so với đối chứng. Theo nghiên cứu của Lu và đồng tác giả (2001), việc bổ sung cao nấm men làm gia tăng hàm lượng saponin ở mức cao nhất gấp 20 lần so với đối chứng ở *Panax ginseng*.

**Khảo sát ảnh hưởng của oligochitosan, YE, methyl jasmonate (MeJa) đến hàm lượng saponin trong rễ tơ Sâm Ngọc Linh**

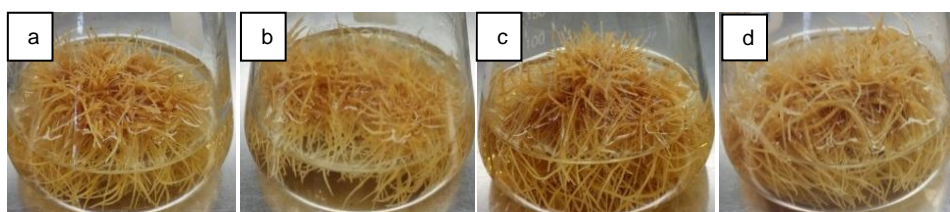
Từ kết quả của các thí nghiệm trên, chọn được các nghiệm thức cho hàm lượng saponin tổng số cao là oligochitosan 0,5 mL/L xử lý trong 3 ngày, YE 100 mg/L xử lý trong 7 ngày. Kết hợp kế thừa từ kết quả nghiên cứu trước đây của nhóm chúng tôi (MeJa 200 µmol/L xử lý trong 5 ngày), tiến hành so sánh sự ảnh hưởng của các elicitor khác nhau lên sự nhân nhanh sinh khối và hàm lượng saponin trong rễ tơ Sâm Ngọc Linh.

**Bảng 3. Ảnh hưởng của oligochitosan, YE, methyl jasmonate lên sự nhân nhanh sinh khối rễ tơ Sâm Ngọc Linh**

Nghiệm thức	Thời gian xử lý (ngày)	Nồng độ elicitor	Khối lượng tươi (g)	Khối lượng khô (g)	Màu sắc rễ
ĐC	0	0	23,02	1,94c	Vàng nhạt
O13	3	Oligochitosan 0,5 mL/L	22,64	2,47a	Vàng nhạt
MeJa200	5	MeJa 200 µmol/L	22,65	2,12bc	Vàng nhạt
Y27	7	YE 100 mg/L	25,23	2,32ab	Vàng nhạt
CV			6,73 <sup>ns</sup>	9,26*	

Những chữ cái khác nhau (a, b, c, ...) trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa ở mức  $p \leq 0,05$  trong phép thử LSD.

Từ kết quả bảng số liệu 3 và các thí nghiệm trước cho thấy việc xử lý với các chất bổ sung trong nghiên cứu này không ảnh hưởng tới khối lượng tươi trong thời gian xử lý 3, 5, 7 ngày. Về chỉ tiêu khối lượng khô, có sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê giữa các nghiệm thức. Các nghiệm thức bổ sung oligochitosan và YE cho khối lượng khô cao hơn và có sự khác biệt về thống kê. Marsik và đồng tác giả (2014) đã nghiên cứu ảnh hưởng của một số hợp chất (YE, nước dừa, casein hydrolyzate, CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, jasmonic acid...) trong nuôi cấy rễ bất định *Panax ginseng*, kết quả chỉ ra rằng xử lý với YE và jasmonic acid cho khối lượng tươi thấp hơn nhiều so với đối chứng, tuy nhiên hàm lượng saponin toàn phần của nghiệm thức xử lý jasmonic acid lại cao hơn nhiều so với đối chứng (elicitor được bổ sung và ngày thứ 21, thu hoạch vào ngày thứ 28 sau cấy). Yu và đồng tác giả (2000) khi nghiên cứu ảnh hưởng của acid jasmonic (JA), dạng ban đầu của MeJa, lên sự tăng trưởng của rễ tơ của *P. ginseng* C.A. Meyer cũng nhận thấy sự tăng nồng độ JA đã ức chế mạnh sự phát triển của rễ tơ. Tuy nhiên ở thí nghiệm này, YE và MeJa không ảnh hưởng tới khối lượng tươi so với đối chứng. Các rễ tơ thu được đều có màu vàng nhạt, rễ chắc.



**Hình 1. Rễ tơ Sâm Ngọc Linh sau khi xử lý với các nhóm chất khác nhau**  
 a: Đối chứng (không xử lý elicitor); b: O13 (Oligochitosan 0,5 ml/l, 3 ngày);  
 c: MeJa200 (MeJa 200 µmol, 5 ngày); d: Y27 (YE 100 mg/L, 7 ngày)

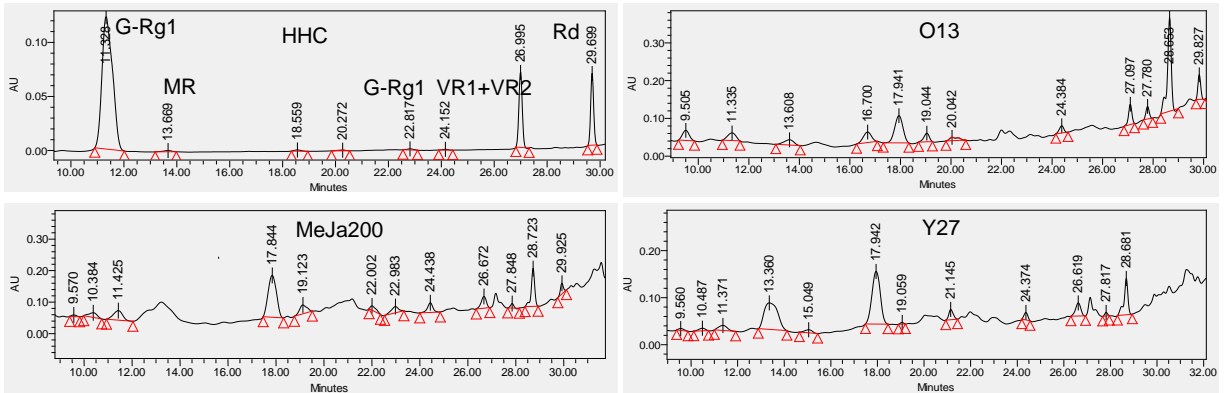
**Bảng 4. Kết quả phân tích saponin trong rễ tơ Sâm Ngọc Linh sau khi xử lý oligochitosan, YE, MeJa**

Nghiệm thức	Hàm lượng saponin tổng (%)	Hàm lượng saponin thành phần (mg/g)					Hàm lượng tổng 5 saponin chính (mg/g)
		G-Rg1	G-Rb1	G-Rd	MR2	VR1 + VR2	
ĐC	2,30	0,0436 (0,019) <sup>c</sup>	0,0205 (0,009) <sup>c</sup>	0,0632 (0,027) <sup>b</sup>	1,4993 (0,395) <sup>ab</sup>	2,6418 (0,561)	4,2684
O13	2,60	0,1980 (0,078) <sup>a</sup>	0,0865 (0,036) <sup>a</sup>	0,1550 (0,063) <sup>a</sup>	0,8198 (0,250) <sup>bc</sup>	4,1634 (0,698)	5,4227
MeJa	2,54	0,1241 (0,051) <sup>b</sup>	0,0134 (0,006) <sup>c</sup>	0,0306 (0,013) <sup>c</sup>	0,6855 (0,226) <sup>c</sup>	4,0946 (0,705)	4,9482
Y27	2,22	0,0502 (0,021) <sup>c</sup>	0,0610 (0,026) <sup>b</sup>	0,0287 (0,012) <sup>c</sup>	1,7235 (0,432) <sup>a</sup>	4,1256 (0,701)	5,9890
CV	7,5 <sup>ns</sup>	19,36**	18,90**	18,32**	22,38*	15,15	

Những chữ cái khác nhau (a, b, c, ...) trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê. ns: khác biệt không có ý nghĩa, \*: khác biệt có ý nghĩa ở mức  $P \leq 0,05$ , \*\*: khác biệt có ý nghĩa ở mức  $P \leq 0,01$ . Số liệu trên là số liệu chuyển đổi  $yi = \log(xi+1)$   
 Đối chứng: không xử lý; O13: Oligochitosan 0,5 mL/L, 3 ngày; MeJa: MeJa 200 µmol/L, 5 ngày; Y27: YE 100 mg/L, 7 ngày.

Trong Sâm Ngọc Linh, saponin là thành phần quan trọng nhất và quyết định tính chất của Sâm. Trong nghiên cứu này chỉ phân tích các saponin chính đại diện cho các nhóm khác nhau: G-Rb1, G-Rd đại diện cho Protopanaxadiol; G-Rg1 đại diện cho Protopanaxatriol; MR2, VR1, VR2 đại diện cho Ocotillol. Kết quả bảng 5 (bảng 4) cho thấy, tất cả các nghiệm thức thí nghiệm đều có sự xuất hiện của các saponin chính. Về hàm lượng saponin tổng số, không có sự khác biệt về mặt thống kê. Nghiệm thức O13 (Oligochitosan 0,5 mL/L, 3 ngày) cho hàm lượng saponin tổng số cao nhất 2,60%, tiếp đến là nghiệm thức MeJa200 (MeJa 200 µmol, 5 ngày) 2,54%.

Hàm lượng tổng 5 saponin chính cao nhất ở nghiệm thức Y27 (YE 100 mg/L, 7 ngày) 5,989 mg/g rễ tơ khô. Nghiệm thức Y27 có hàm lượng saponin tổng số thấp hơn nghiệm thức O13, tuy nhiên hàm lượng tổng 5 saponin chính lại cao hơn. Vì trong thí nghiệm này chỉ đánh giá hàm lượng 5 saponin trong tổng số 52 saponin đã được tìm thấy trong Sâm Ngọc Linh. Hàm lượng G-Rg1, G-Rb1, G-Rd đạt cao nhất ở nghiệm thức O13 và khác biệt rất có ý nghĩa so với các nghiệm thức khác. Hàm lượng MR2 đạt cao nhất ở nghiệm thức Y27 (1,7235 mg/g). Hàm lượng VR1 + VR2 không có sự khác biệt giữa các nghiệm thức trong thí nghiệm này. Quan sát sắc ký đồ của các nghiệm thức thí nghiệm đều xuất hiện peak ở các vị trí của các saponin chính so với hỗn hợp chuẩn.



Hình 2. Sắc ký đồ rễ tơ Sâm Ngọc Linh khi xử lý với oligochitosan, YE, MeJa

Dựa trên kết quả sinh khối thu được và phân tích hàm lượng saponin tổng cũng như năm saponin thành phần, nghiệm thức O13 (oligochitosan 0,5 ml/L xử lý trong 3 ngày) và Y27 (YE 100 mg/L xử lý trong 7 ngày) cho kết quả tốt nhất.

## KẾT LUẬN

Khối lượng tươi của rễ tơ không ảnh hưởng khi xử lý với oligochitosan (trong 3 và 7 ngày), yeast extract (trong 3 và 7 ngày), methyl jasmonate (trong 5 ngày). Khối lượng khô giảm dần khi tăng nồng độ và thời gian xử lý với oligochitosan. Oligochitosan nồng độ 0,5 ml/L xử lý trong 3 ngày và YE nồng độ 100 mg/L xử lý trong 7 ngày cho kết quả tốt nhất cho sự nhân nhanh sinh khối và tích lũy saponin ở rễ tơ Sâm Ngọc Linh trong thí nghiệm so sánh giữa các elicitor oligochitosan, yeast extract, methyl jasmonate.

**Lời cảm ơn:** Nghiên cứu này được hỗ trợ một phần về cơ sở vật chất, trang thiết bị và kinh phí của Trung tâm Công nghệ Sinh học Thành phố Hồ Chí Minh.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Hà Thị Loan, Dương Hoa Xô, Nguyễn Quốc Bình, Nguyễn Hoàng Quân, Vũ Thị Đào, Nathalie Pawlicki - 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 Công nghệ sinh học* 36(1): 293-300.
- Kochan E, Wasiela M, Scienkiewicz M (2013). The production of ginsenosides in hairy root cultures of American Ginseng, *Panax quinquefolium* L. and their antimicrobial activity. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 49(1):24-29.
- Luan LQ, Nagasawa N, Tamada M, Nakanishi TM (2006). Enhancement of Plant Growth Activity of Irradiated Chitosan by Molecular Weight Fractionation. *Radioisotopes* 55:21-27.
- Lu M, Wong H, Teng W (2001). Effects of elicitation on the production of saponin in cell culture of *Panax ginseng*. *Plant Cell Rep* 20(7): 674-677.
- Marsik P, Langhansova L, Dvorakova M, Cigler P, Hruby M (2014). Increased Ginsenosides Production by Elicitation of *In vitro* Cultivated *Panax Ginseng* Adventitious Roots. *Med Aromat Plants* 3:147.
- Naik PM, Al-Khayri JM (2016). Biotic and Biotic Elicitors – Role in Secondary Metabolites Production through *In Vitro* Culture of Medicinal Plants. *Abiotic and Biotic Stress in Plants - Recent Advances and Future Perspectives*: 247-277.
- Namdeo AG (2007). Plant cell elicitation for production of secondary metabolites. *Phcog Rev* 1(1): 69-79.
- Nguyễn Thượng Đông, Trần Công Luận và Nguyễn Thị Thu Hương (2007). *Sâm Việt Nam và một số cây thuốc họ nhân sâm*. Nhà xuất bản Khoa học và kỹ thuật, Hà Nội.
- Piriani K, Piri K (2013). Influence of yeast extract as a biotic elicitor on noradrenaline production in hairy root culture of *Portulaca oleracea* L. *Int J Agron Plant Prod* 4(11): 2960-2964.

Sivanandhan G, Arun M, Mayavan S, Rajesh M, Nariashibu TS, Manickavasagam M, Selvaraj N, Ganapathi A (2012). Chitosan enhances withanolides production in adventitious root cultures of *Withania somnifera* (L.) Dunal. *Ind Crop Prod* 37: 124-129.

Yang DC, Choi YE (2000). Production of transgenic plants via *Agrobacterium rhizogenes* - mediated transformation of *Panax ginseng*. *Plant Cell Rep* 19: 491 - 496.

Yu KW, Gao WY, Son SH, Kee YP (2000). Improvement of ginsenoside production by jasmonic acid and some other elicitors in hairy root culture of ginseng (*Panax ginseng* C. A. Meyer). *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 36: 424-428.

## EFFECT OF OLIGOCHITOSAN, YEAST EXTRACT AND METHYL JASMONATE ON *IN VITRO* BIOMASS GROWTH AND SAPONINS SYNTHESIS IN HAIRY ROOT CULTURES OF NGOC LINH GINSENG (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.)

Tran Nguyen Le Quyen<sup>1,2</sup>, Nguyen Tran Phuoc Huy<sup>1</sup>, Cao Hue Trinh<sup>1</sup>, Duong Hoa Xo<sup>1</sup>, Ha Thi Loan<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Biotechnology Center of Ho Chi Minh City

<sup>2</sup> Nong Lam University - Ho Chi Minh City

### SUMMARY

Saponin, the main compound - responsible for the biological effects of ginseng medical products. The study was conducted to investigate the effect of oligochitosan, yeast extract individually, compared with previous studies using methyl jasmonate for biomass production and saponin accumulation in hairy root of *Panax vietnamensis*. The results showed that the adding of above mentioned supplements result no effect on fresh weight after 3 and 7 days, but causes lightly decrease of the dry mass when treated with oligochitosan depending positively on the concentration and duration. The compared results of oligochitosan, yeast extract and methyl jasmonate showed that oligochitosan 0.5 mL/L treated for 3 days and yeast extract 100 mg/L treated for 7 days were suitable to the mass production and saponin accumulation in hairy root of *Panax vietnamensis*. The highest contents of G-Rg1, G-Rb1, G-Rd were observed in oligochitosan 0.5 mL/L treatment for 3 days and significantly different from other treatments, MR2 content was highest when treated with yeast extract 100 mg/L in 7 days (1.7235 mg/g), while the content of VR1 + VR2 was not different between treatments in this experiment.

**Keywords:** Elicitor, hairy roots, methyl jasmonate, oligochitosan, *Panax vietnamensis*, saponin, yeast extract.

---

\* Author for correspondence: Tel: +84-983779598; Email: haloan762001@gmail.com