**ẢNH HƯỞNG CỦA HÀM LƯỢNG KHOÁNG ĐA LƯỢNG
VÀ BỔ SUNG DINH DƯỠNG VÀO GIAI ĐOẠN SAU CỦA QUÁ TRÌNH
NUÔI CÂY ĐẾN SỰ SINH TRƯỞNG HUYỀN PHÙ TẾ BÀO SÂM NGỌC LINH
(*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) IN VITRO**

Nguyễn Văn Kết^a, Trương Thị Lan Anh^{a*}

^aKhoa Nông Lâm, Trường Đại học Đà Lạt, Lâm Đồng, Việt Nam

Lịch sử bài báo

Nhận ngày 15 tháng 08 năm 2016 | Chính sửa ngày 15 tháng 09 năm 2016

Chấp nhận đăng ngày 20 tháng 09 năm 2016

Tóm tắt

Hàm lượng khoáng đa lượng khác nhau có ảnh hưởng đến sự sinh trưởng của mô sẹo Sâm Ngọc Linh. Mô sẹo sinh trưởng tốt nhất trong môi trường có hàm lượng KNO_3 và $CaCl_2$ từ 0,5 đến 1 lần so với hàm lượng trong môi trường cơ bản MS; trong khi đó hàm lượng NH_4NO_3 và $MgSO_4$ tương đương với hàm lượng trong môi trường MS cho sự sinh trưởng của mẫu cấy là tốt nhất. Các chất dinh dưỡng trong môi trường được mẫu cấy hấp thụ để phục vụ cho sự sinh trưởng của mình. Sau một thời gian nuôi cấy, hàm lượng các chất dinh dưỡng trong môi trường nuôi cấy không còn đủ cho sự sinh trưởng của mẫu cấy. Vì vậy, việc bổ sung môi trường là một cách thức để bổ sung thêm nguồn dinh dưỡng giúp cho sự sinh trưởng của mẫu cấy. Khi bổ sung thêm dinh dưỡng vào tuần thứ 3 của quá trình nuôi cấy thì sự sinh trưởng của mẫu cấy tăng lên nhiều và cao hơn so với trường hợp không bổ sung môi trường. Môi trường bổ sung thích hợp nhất cho sự sinh trưởng huyền phù tế bào Sâm Ngọc Linh là 1/4 MS.

Từ khóa: Bioreactor; Bổ sung dinh dưỡng; Khoáng đa lượng; Sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.).

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Ngoài việc gây trồng và phát triển các loài cây quý hiếm, có giá trị cao trong điều kiện tự nhiên thì phương pháp nuôi cấy mô, tế bào trong điều kiện *in vitro* để thu nhận các sản phẩm thứ cấp đồng nhất, vô trùng cũng đang được ứng dụng (Yu, Gao, Son & Paek, 2000a; Zhang, Zhong & Yu, 1996). Vì mô, tế bào thực vật nuôi cấy ít chịu những tác động bất lợi của điều kiện môi trường, do đó tốc độ tăng trưởng của tế bào, mô thực vật cao hơn so với cây trồng trong điều kiện tự nhiên. Phương pháp này đã được thực hiện thành công trên nhiều đối tượng, đặc biệt là một số loài sâm có giá trị như *Panax ginseng* (Yu, 2000a; Yu, Hahn & Paek, 2000b; Thanh, 2005), *Panax notoginseng* (Zhang, Zhong & Yu, 1995).

* Tác giả liên hệ: Email: anhttl@dlu.edu.vn

Khoáng đa lượng là một trong những yếu tố chính ảnh hưởng đến sự sinh trưởng của mô, tế bào thực vật nuôi cấy *in vitro*. Tùy theo các đối tượng nuôi cấy mà hàm lượng các chất khoáng này cũng khác nhau. Do đó việc điều chỉnh môi trường nuôi cấy là một trong những phương pháp để làm gia tăng hiệu quả của quá trình nuôi cấy mô, tế bào thực vật. Vinterhalter và Vinterhalter (1992) cho rằng chất khoáng ảnh hưởng đến sự hình thành rễ bên của loài *Dracaena fragrans* trong nuôi cấy *in vitro*, và khi giảm hàm lượng các chất khoáng đa lượng sẽ kích thích sự hình thành rễ bất định. Ở trên các đối tượng *Panax*, khi bổ sung NO_3^- thúc đẩy cho sự sinh trưởng của tế bào của *Panax ginseng* cao hơn so với NH_4^+ (Furuya, Yoshikawa, Orihara & Oda, 1984); Hàm lượng phosphate trong môi trường nuôi cấy ảnh hưởng đến sự sinh trưởng của tế bào *Panax ginseng* và *Panax quinquefolium* (Liu & Zhong, 1998).

Ngoài ra, việc cung cấp thêm dinh dưỡng cùng với thời gian bổ sung phù hợp sẽ kích thích sự sinh trưởng của mẫu cấy. Khi bổ sung thêm nguồn dinh dưỡng vào môi trường nuôi cấy đã giúp cải thiện sự sinh trưởng của rễ *Panax ginseng* (Yu, Gao, Hahn, & Paek, 2001). Wu, Murthy, Hahn và Paek (2007) thành công trong việc thúc đẩy sự sinh trưởng rễ *Echinacea purpurea* cũng như hàm lượng acid caffeic được tổng hợp khi bổ sung 0,5MS vào tuần thứ 2 của quá trình nuôi cấy.

Sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) là loài đặc hữu của Việt Nam, phân bố ở các vùng núi cao (1200-2100 m) thuộc Nam Trung Bộ và Tây Nguyên như Ngọc Linh (Đắc Tô) Trà Mi, núi Ngọc Lum Heo và Ngọc Am (Quảng Nam). Đây là loài có giá trị dược liệu rất cao. Trong tự nhiên, Sâm cần thời gian tối thiểu 4 - 7 năm mới có thể thu hoạch được và phải được trồng trong những điều kiện đặc biệt, ít chịu tác động trực tiếp của ánh sáng mặt trời (Đỗ & ctg., 2003).

Việc nghiên cứu, tìm ra môi trường nuôi cấy tối ưu cho sự sinh trưởng của huyền phù tế bào làm cơ sở để nhân sinh khối với quy mô lớn, nhằm đáp ứng cho nhu cầu sử dụng trong lĩnh vực dược phẩm và thực phẩm là cần thiết. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tìm hiểu ảnh hưởng của hàm lượng khoáng đa lượng và việc bổ sung dinh dưỡng vào giai đoạn sau của quá trình nuôi cấy đến sự sinh trưởng của huyền phù tế bào Sâm Ngọc Linh.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu

Mô sẹo được tạo ra từ củ Sâm Ngọc Linh tự nhiên được sử dụng làm mẫu cấy để nghiên cứu ảnh hưởng của hàm lượng khoáng đa lượng;

Mô sẹo được sử dụng làm mẫu cấy để tạo huyền phù tế bào Sâm Ngọc Linh trong môi trường lỏng, lắ khi bổ sung dinh dưỡng ở giai đoạn sau của quá trình nuôi cấy.

2.2. Điều kiện nuôi cấy

Mẫu được nuôi trong tối, ở nhiệt độ phòng $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$; đối với thí nghiệm bổ sung dinh dưỡng, mẫu cấy được lắc liên tục với tốc độ lắc là 100 vòng/phút.

2.3. Phương pháp

2.3.1. Tạo và nhân nhanh mô sẹo

Môi trường cảm ứng tạo và nhân nhanh mô sẹo Sâm Ngọc Linh là MS (Murashige & Skoog, 1962) có bổ sung 7 mg/l NAA, 30 g đường và 8% agar.

Sau khi thu được mô sẹo Sâm Ngọc Linh, chúng được chuyển sang nuôi cấy lỏng lắc. Môi trường nuôi cấy huyền phù tế bào được sử dụng trong thí nghiệm tương tự môi trường nhân nhanh mô sẹo (không thêm agar).

2.3.2. Ảnh hưởng của hàm lượng khoáng đa lượng đến sự sinh trưởng mô sẹo Sâm Ngọc Linh

Mô sẹo Sâm Ngọc Linh được cấy trong môi trường MS có hàm lượng khoáng đa lượng (KNO_3 , NH_4NO_3 , CaCl_2 , MgSO_4) khác nhau theo các tỷ lệ (0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 lần) so với hàm lượng của chúng trong môi trường cơ bản (đvcb). Khối lượng tươi và khối lượng khô được thu thập sau 40 ngày nuôi cấy.

2.3.3. Ảnh hưởng của việc bổ sung môi trường đến sự sinh trưởng của huyền phù tế bào Sâm Ngọc Linh

Huyền phù tế bào với mật độ 60g/l được cấy trong bình tam giác 100 ml có chứa 20 ml môi trường MS bổ sung 7 mg/l NAA, 30 g/l đường. Sau 2, 3 và 4 tuần nuôi cấy, chúng tôi tiến hành bổ sung thêm 20 ml môi trường MS theo tỷ lệ (1/4; 1/2; 3/4; 1) vào trong bình nuôi cấy. Khối lượng tươi và khối lượng khô được thu thập sau 40 ngày nuôi cấy.

Kết quả phân tích được xử lý thống kê bằng phần mềm MSTATC với mức sai số có ý nghĩa là 0,01.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả

3.1.1. Ảnh hưởng của hàm lượng các chất khoáng đa lượng đến sự sinh trưởng của mô sẹo Sâm Ngọc Linh *in vitro*

Kết quả thí nghiệm cho thấy, hàm lượng chất khoáng đa lượng có ảnh hưởng rất lớn đến sự sinh trưởng của mô sẹo Sâm Ngọc Linh nuôi cấy *in vitro*. Hàm lượng KNO_3 và CaCl_2 thích hợp nhất cho sự sinh trưởng của mô sẹo là từ 0,5 đến 1 lần so với đvcb. Trong khi đó, NH_4NO_3 và MgSO_4 với hàm lượng tương đương với đvcb là thích hợp nhất cho sự sinh trưởng của mẫu cấy (Bảng 1).

Bảng 1. Ảnh hưởng của hàm lượng KNO_3 , NH_4NO_3 , CaCl_2 , MgSO_4 lên sự sinh trưởng của mô sẹo Sâm Ngọc Linh sau 40 ngày nuôi cấy

	Hàm lượng các chất khoáng đa lượng	Khối lượng tươi (mg/mẫu)	Khối lượng khô (mg/mẫu)
KNO_3	0,0	573,2 b	17,3 c
	0,5	1186,1 a	25,6 b
	1,0	1219,2 a	32,6 a
	1,5	201,2 c	5,8 de
	2,0	200,9 c	9,9 d
CV%		6,1	3,4
LSD _{0,01}		106,2	1,6
NH_4NO_3	0,0	354,8 d	10,1 c
	0,5	946,6 b	15,2 b
	1,0	1641,1 a	21,7 a
	1,5	1060,1 b	21,2 a
	2,0	794,4 c	16,0 b

Bảng 1. Ảnh hưởng của hàm lượng KNO₃, NH₄NO₃, CaCl₂, MgSO₄ lên sự sinh trưởng của mô sẹo Sâm Ngọc Linh sau 40 ngày nuôi cấy (tiếp theo)

Hàm lượng các chất khoáng đa lượng		Khối lượng tươi (mg/mẫu)	Khối lượng khô (mg/mẫu)
CV%		5,3	9,1
LSD _{0,01}		131,0	4,0
	0,5	640,3 bc	20,7 b
	1,0	1102,0 a	30,9 a
	1,5	469,6 c	17,5 b
	2,0	464,5 c	13,3 c
CV%		10,9	7,7
LSD _{0,01}		194,7	3,8
CaCl ₂	0,0	708,6 b	9,4 c
	0,5	1105,1 a	17,4 b
	1,0	1143,6 a	24,2 a
	1,5	747,9 b	9,3 c
	2,0	659,4 b	10,7 c
CV%	8,1	5,2	6,95
LSD _{0,01}	2,1	117,1	2,6

Ghi chú: Trong cùng một cột các giá trị trung bình ở mỗi hàm lượng khoáng có chữ cái khác nhau thì khác nhau có ý nghĩa thống kê qua phép thử Duncan ($p < 0,01$)

3.1.2. Ảnh hưởng của việc bổ sung môi trường ở giai đoạn sau của quá trình nuôi cấy đến sự sinh trưởng của huyền phù tế bào Sâm Ngọc Linh

Nguồn dinh dưỡng được bổ sung thêm vào giai đoạn sau của quá trình nuôi cấy có tác dụng kích thích đến sự sinh trưởng của mẫu cấy. Thời gian và hàm lượng dinh dưỡng được bổ sung có tác dụng kích thích sự sinh trưởng của mẫu cấy là khác nhau. Thời gian bổ sung thêm dinh dưỡng vào tuần 3 với hàm lượng dinh dưỡng 1/4 MS là thích hợp nhất cho sự sinh trưởng của mẫu cấy (Bảng 2).

Bảng 2. Ảnh hưởng của việc bổ sung dinh dưỡng đến sự sinh trưởng của huyền phù tế bào Sâm Ngọc Linh sau 40 ngày nuôi cấy

Thời gian bổ sung dinh dưỡng	Hàm lượng khoáng bổ sung (MS)	Khối lượng tươi (mg/bình)	Khối lượng khô (mg/bình)
Đối chứng		3873 b	108,1 bc
Tuần 2	1/4	4381 a	115,8 b
	1/2	3742 bc	96,3 de
	3/4	2656 f	67,4 fg
	1	2937 e	62,1 g
	1/4	4207 a	131,8 a
Tuần 3	1/2	4189 a	100,7 cd
	3/4	3322 d	87,4 e
	1	2375 g	71,3 fg

Bảng 2. Ảnh hưởng của việc bổ sung dinh dưỡng đến sự sinh trưởng của huyền phù tế bào Sâm Ngọc Linh sau 40 ngày nuôi cấy (tiếp theo)

Thời gian bổ sung dinh dưỡng	Hàm lượng khoáng bổ sung (MS)	Khối lượng tươi (mg/bình)	Khối lượng khô (mg/bình)
Tuần 4	1/4	3544 cd	93,8 de
	1/2	2986 e	73,6 f
	3/4	2279 g	63,7 fg
	1	2176 g	60,9 g
CV %		3,72	5,28
LSD _{0,01}		275,5	10,45

Ghi chú: Trong cùng một cột các giá trị trung bình có chữ cái khác nhau thì khác nhau có ý nghĩa thống kê qua phép thử Duncan ($p < 0,01$)

3.2. Thảo luận

3.2.1. Ảnh hưởng của hàm lượng khoáng đa lượng khác nhau đến sự sinh trưởng của mô sẹo Sâm Ngọc Linh *in vitro*

Trong nuôi cấy mô, tế bào thực vật, hàm lượng chất khoáng, đặc biệt là các chất khoáng đa lượng có ảnh hưởng rất lớn đến sự sinh trưởng cũng như khả năng tổng hợp các sản phẩm thứ cấp. Bằng cách điều chỉnh hàm lượng khoáng thích hợp trong môi trường nuôi cấy, người ta có thể tối ưu hóa được quá trình nuôi cấy mô, tế bào thực vật thu nhận sản phẩm thứ cấp. Trong đó, các chất khoáng đa lượng như KNO_3 , NH_4NO_3 , $MgSO_4$ và $CaCl_2$ là những chất đóng vai trò quan trọng trong việc thúc đẩy sự sinh trưởng của mẫu cấy.

Kết quả thí nghiệm cho thấy KNO_3 ở hàm lượng từ 0,5 đến 1 lần so với đvcb là thích hợp cho sự sinh trưởng của mô sẹo Sâm Ngọc Linh, với giá trị khối lượng tươi thu được lần lượt là 1186,1 mg và 1219,2 mg. Trong trường hợp không có sự hiện diện của KNO_3 thì sự sinh trưởng của mô sẹo Sâm bị kìm hãm, khối lượng tươi và khối lượng khô chỉ đạt 573,2 mg và 17,3 mg. Nguyên nhân có thể là do khi thiếu hụt K^+ trong môi trường nuôi cấy mô thực vật sẽ dẫn tới tình trạng thừa nước và làm giảm tốc độ hấp thu phosphate. Kết quả này cũng tương tự với nghiên cứu của Thanh (2005) khi nuôi cấy huyền phù tế bào *Panax ginseng*. Theo tác giả, KNO_3 có ảnh hưởng rất lớn đến sự sinh trưởng của huyền phù tế bào và khả năng tổng hợp saponin. Do đó, khi thay đổi hàm lượng KNO_3 thì sự sinh trưởng của huyền phù tế bào Sâm và hàm lượng saponin được

tổng hợp cũng thay đổi đáng kể. Nhưng khi hàm lượng K^+ trong môi trường quá cao cũng sẽ kìm hãm sự sinh trưởng của mẫu cây, nguyên nhân là do K^+ có hoạt động đối kháng với Ca^{2+} và Mg^{2+} (Iranbakhsh, Oshagi & Ebadi, 2007). Chính vì vậy mà sự sinh trưởng của huyền phù tế bào bị kìm hãm trong môi trường có hàm lượng KNO_3 gấp 1,5 đến 2 lần so với môi trường cơ bản.

Trong nuôi cấy mô, tế bào thực vật để thu nhận các sản phẩm thứ cấp, ở giai đoạn đầu tiên, các chất khoáng trong môi trường nuôi cấy đều được sử dụng cho quá trình chuyển hóa giúp cho sinh trưởng và tăng sinh khối của mẫu cây. Ở giai đoạn này, người ta thường bổ sung các chất giúp cho sự tăng sinh khối của mẫu cây, chẳng hạn như tăng hàm lượng N bổ sung vào trong môi trường nuôi cấy (Iranbakhsh, 2007). NH_4NO_3 là nguồn cung cấp N trong môi trường nuôi cấy mô, tế bào thực vật, vì N là nguyên tố cần thiết cho sự sinh trưởng của mẫu cây. Kết quả thí nghiệm cho thấy, trong nghiệm thức không bổ sung NH_4NO_3 thì sự sinh trưởng của mô sẹo bị kìm hãm, khối lượng tươi và khối lượng khô thu được sau 40 ngày nuôi cấy chỉ đạt 354,8 mg và 10,1 mg. Khi bổ sung NH_4NO_3 vào trong môi trường nuôi cấy mô sẹo sâu ở hàm lượng tương đương với đvcb giúp cho sự sinh trưởng của mô sẹo đạt kết quả cao nhất. Kết quả thể hiện qua giá trị khối lượng tươi và khô lần lượt là 1641,1 và 21,7 mg. Trong trường hợp hàm lượng NH_4NO_3 trong môi trường nuôi cấy quá cao thì sự sinh trưởng của mẫu cây bị kìm hãm. Như vậy, hàm lượng NH_4NO_3 được bổ sung thích hợp nhất cho sự sinh trưởng của mô sẹo Sâm Ngọc Linh là tương đương so với hàm lượng của nó trong môi trường cơ bản.

$MgSO_4$ là nguồn cung cấp Mg^{2+} duy nhất trong môi trường dinh dưỡng. Mg^{2+} là một ion linh động, có thể khuếch tán vào trong tế bào như K^+ , vì vậy nó cũng có vai trò như một cation và có thể trung hòa các anion và các acid hữu cơ (Nguyễn & Lê, 2002). Ngoài ra nó còn tham gia tích cực vào quá trình phân bào nhờ có ảnh hưởng đến sự tổng hợp các acid nucleic. Bên cạnh đó, Mg^{2+} tham gia vào thành phần chất nguyên sinh trong các cơ quan tử riêng biệt của tế bào và trong dịch tế bào, đồng thời Mg^{2+} hoạt hóa một số lớn các enzyme tham gia vào quá trình hô hấp và biến đổi năng lượng. Kết quả thí nghiệm cho thấy trong môi trường không bổ sung $MgSO_4$ thì sự sinh trưởng của mẫu cây là thấp nhất, khối lượng tươi và khối lượng khô của mẫu cây đạt 782,6 mg và

11,7 mg, và sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức khác. Tốc độ sinh trưởng của mẫu cây gia tăng cùng với sự gia tăng hàm lượng MgSO_4 trong môi trường nuôi cấy từ 0 đến 1,0 và chúng đạt giá trị cao nhất khi hàm lượng MgSO_4 là tương đương so với đvcb. Khối lượng tươi và khối lượng khô thu được lần lượt là 1102,0 mg và 30,9 mg. Khi tiếp tục gia tăng hàm lượng MgSO_4 thì sự sinh trưởng của mẫu cây bị kìm hãm, khối lượng tươi và khối lượng khô và chỉ còn 464,5 mg và 13,3 mg ở hàm lượng gấp 2 lần so với đvcb.

CaCl_2 là nguồn cung cấp Ca^{2+} trong môi trường nuôi cấy mô, tế bào. Mặc dù Ca^{2+} chỉ tồn tại một lượng rất nhỏ trong thực vật nhưng nó lại đóng vai trò quan trọng trong sự sinh trưởng của chúng. Kết quả thí nghiệm cho thấy sự sinh trưởng của mẫu cây là thấp nhất khi trong môi trường nuôi cấy không có sự hiện diện của CaCl_2 . Kết quả về khối lượng tươi và khối lượng khô thu được lần lượt là 708,6mg và 9,4mg, và sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với những nghiệm thức khác. Nguyên nhân có thể là do khi thiếu Ca^{2+} màng tế bào bị hóa nhầy. Đồng thời, khi giảm thấp hàm lượng Ca^{2+} trong dung dịch dinh dưỡng, quá trình lignin hóa của mô sẽ tăng lên. Sự sinh trưởng của mẫu cây tăng lên cùng với sự gia tăng hàm lượng CaCl_2 và đạt giá trị cao nhất ở hàm lượng CaCl_2 từ 0,5 đến 1 so với đvcb, khối lượng tươi thu được lần lượt là 1105,1mg và 1143,6mg. Khi tiếp tục gia tăng hàm lượng CaCl_2 thì tốc độ sinh trưởng của mẫu cây lại giảm dần. Kết quả này tương tự đối với *Panax ginseng*, khi không có sự hiện diện của CaCl_2 trong môi trường nuôi cấy thì sự sinh trưởng của huyền phù tế bào thấp, trong trường hợp gia tăng hàm lượng CaCl_2 thì sự sinh trưởng của mẫu cây cũng tăng theo (Thanh, 2005).

3.2.2. Ảnh hưởng của việc bổ sung dinh dưỡng ở giai đoạn sau của quá trình nuôi cấy đến sự sinh trưởng của huyền phù tế bào Sâm Ngọc Linh

Bổ sung dinh dưỡng thường được sử dụng trong nuôi cấy mô, tế bào thực vật để làm gia tăng sinh khối cũng như tổng hợp các sản phẩm thứ cấp (Neto, Melanson, Sakata & DiCosmo, 1993; Zhang, 1996; Wang, Yu & Zhong, 1999). Panda, Mishra và Bisaria (1992); Srinivasan và Ryu (1993); và Jeong, Murthy, Hahn và Paek (2008) cho rằng việc bổ sung các chất khoáng đa lượng (đặc biệt là C và N) ảnh hưởng tích cực đến sự gia tăng sinh khối và tổng hợp các sản phẩm thứ cấp trong nuôi cấy tế bào của

Holarrhena antidyenterica, *Lithospermum erythrorhizon* và *Panax ginseng*. Kết quả tương tự trong nuôi cấy *Echinacea purpurea*, việc bổ sung thêm môi trường cho thấy kích thích sự sinh trưởng của rễ bất định và tổng hợp các dẫn xuất của acid caffeic (Wu, 2007). Trong nuôi cấy tế bào *Panax notoginseng*, carbon và nitơ được bổ sung vào trong môi trường nuôi cấy làm gia tăng sự sinh trưởng cũng như tích lũy saponin và polysaccharides (Zhang, 1996). Khi bổ sung đường hoặc kết hợp đường với casein hydrolysate và các chất khoáng của môi trường MS vào giai đoạn ổn định của quá trình nuôi cấy cho thấy sự sinh trưởng của tế bào cao hơn khoảng 50-60% so với đối chứng.

Qua kết quả thí nghiệm, khi bổ sung thêm dinh dưỡng vào tuần thứ 2 hoặc 3 của quá trình nuôi cấy thì sự sinh trưởng của mẫu cấy tăng lên nhiều so với trường hợp không bổ sung dinh dưỡng. Khối lượng tươi của mẫu nuôi cấy ở tuần 3 đạt được giá trị cao nhất là 4381mg và 4207mg, và có sự khác biệt ý nghĩa thống kê so với trường hợp không bổ sung môi trường dinh dưỡng. Việc thay đổi hàm lượng dinh dưỡng cho kết quả sinh trưởng của mẫu là khác nhau. Trong số các hàm lượng dinh dưỡng (1/4 ; 1/2 ; 3/4 ; 1) MS thì mẫu cấy sinh trưởng tốt nhất trong môi trường có bổ sung 1/4 MS ở tuần thứ 3 ở cả hai chỉ tiêu khối lượng tươi và khối lượng khô.

Nhìn chung, sự sinh trưởng của huyền phù tế bào Sâm Ngọc Linh thay đổi tùy theo hàm lượng khoáng khác nhau cũng như thời gian bổ sung dinh dưỡng. Các chất dinh dưỡng trong môi trường nuôi cấy được mẫu cấy hấp thụ để giúp cho quá trình sinh trưởng thuận lợi, và ngược lại hàm lượng các chất dinh dưỡng trong môi trường nuôi cấy giảm xuống rất nhiều. Vì vậy, việc bổ sung môi trường vào giai đoạn sau của quá trình nuôi cấy là một cách thức tốt để bổ sung thêm nguồn dinh dưỡng giúp cho sự sinh trưởng của mẫu cấy.

Như vậy, việc bổ sung môi trường để cung cấp thêm nguồn dinh dưỡng cho sự sinh trưởng của mẫu cấy là cần thiết. Với phương pháp nuôi cấy lỏng, chúng ta có thể xác định được thành phần dinh dưỡng trong môi trường nuôi cấy và việc bổ sung thêm các chất dinh dưỡng ở thời điểm thích hợp được thực hiện một cách dễ dàng. Đây là một trong những ưu điểm của nuôi cấy lỏng so với nuôi cấy đặc truyền thống.

4. KẾT LUẬN

Sự sinh trưởng của mô sẹo Sâm Ngọc Linh tốt nhất khi được nuôi cấy trong môi trường có hàm lượng KNO_3 và CaCl_2 từ 0,5 đến 1 so với đvcb và hàm lượng MgSO_4 và NH_4NO_3 tương đương với đvcb.

Việc bổ sung thêm nguồn dinh dưỡng vào trong môi trường nuôi cấy với hàm lượng và thời gian phù hợp có tác dụng thúc đẩy sự sinh trưởng của mẫu cấy. Trong thí nghiệm này, hàm lượng dinh dưỡng 1/4 MS bổ sung vào tuần thứ 3 của quá trình nuôi cấy là thích hợp nhất cho sự sinh trưởng của huyền phù tế bào Sâm Ngọc Linh.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Đỗ, H. B., Đặng, Q. C., Bùi, X. C., Nguyễn, T. D., Đỗ, T. Đ., Phạm, V. H., Vũ, N. L., Phạm, D. M., Phạm, K. M., Đoàn, T. T., Nguyễn, T., & Trần, T. (2003). *Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam* (Tập II). Hà Nội, Việt Nam: NXB Khoa học và Kỹ thuật Hà Nội.
- Furuya T., Yoshikawa T., Orihara Y., & Oda H. (1984). Studies of the culture conditions for *Panax ginseng* cells in jar fermentors. *Journal of Natural Products*, 47(1), 70-75.
- Iranbakhsh, A. R., Oshagi, M. A., & Ebadi, M. (2007). Growth and production optimization of Tropane alkaloid in *Datura stramonium* cell suspension culture. *Pakistan Journal of biological Sciences*, 10(8), 1236-1242.
- Jeong, C. S., Murthy, H. N., Hahn, E. J., & Paek K. Y. (2008). Improved production of ginsenosides in suspension cultures of ginseng by medium replenishment strategy. *Journal of bioscience and bioengineering*, 105(3), 288-291.
- Liu, S., & Zhong, J. J. (1998). Phosphate effect on production of ginseng saponin and polysaccharide by cell suspension cultures of *Panax ginseng* and *Panax notoginseng*. *Process Biochemistry*, 33, 69-74.
- Neto, F. A. G., Melanson, S. J., Sakata, K., & DiCosmo, F. (1993). Improved growth and taxol yield in developing callus of *Taxus cuspidata* by medium composition modification. *Biological Technology*, 11, 731-734.
- Nguyễn, Đ. L., & Lê, T. T. T. (2002). *Công nghệ tế bào*. Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam: NXB Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh.
- Panda, A. K., Mishra, S., & Bisaria, V. S. (1992). Alkaloid production by plant cell suspension cultures of *Holarrhena antidysenterica*: Effect of major nutrients. *Biotechnol Bioeng*, 39, 1043-1051.
- Srinivasan, V., & Ryu, D. D. Y. (1993). Improvement of shikonin productivity in *Lithospermum erythrorhizon* cell cultures by alternating carbon and nitrogen feeding strategy. *Biotechnology and Bioengineering*, 42, 793-799.

- Thanh, N. T. (2005). Factor affecting cell growth and ginsenoside production in *Panax ginseng* C. A. Myer (Thesis for Degree of Doctor of Philosophy). Korea: Chungbuk National University.
- Vinterhalter, D., & Vinterhalter, B. (1992). Effect of inorganic nutrition on the formation of lateral roots in *Dracaena fragrans* Ker-Gawl cultured *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 28, 267-274.
- Wang, H. Q., Yu, J. T., & Zhong, J. J. (1999). Significant improvement of taxane production in suspension cultures of *Taxus chinensis* by sucrose feeding strategy. *Process Biochemistry*, 35, 479-483.
- Wu, C. H., Murthy, H. N., Hahn, E. J., & Paek, K. Y. (2007). Improved production of caffeic acid derivatives in suspension cultures of *Echinacea purpurea* by medium replenishment strategy. *Archives of Pharmacal Research*, 30(8), 945-949.
- Yu, K. W., Gao, W. Y., Hahn, E. J., & Paek, K. Y. (2001). Effects of macro elements and nitrogen source on adventitious root growth and ginsenoside production in ginseng (*Panax ginseng* C. A. Meyer). *The Journal of Plant Biology*, 44, 179-184.
- Yu, K. W., Gao, W. Y., Son, S. H., & Paek, K. Y. (2000a). Improvement of ginsenoside production by jasmonic acid and some other elicitors in hairy root culture of ginseng (*Panax ginseng* C. A. Meyer). *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, 36, 424-428.
- Yu, K. W., Hahn, E. J., & Paek, K. Y. (2000b). Production of adventitious ginseng roots using bioreactors. *Korean Journal of Plant Tissue Culture*, 27, 309-315.
- Zhang, Y. H., Zhong, J. J., & Yu, J. T. (1995). Effect of osmotic pressure on cell growth and production of ginseng saponin and polysaccharide in suspension cultures of *Panax notoginseng*. *Biotechnology Letters*, 17(12), 1347-1350.
- Zhang, Y. H., Zhong, J. J., & Yu, J. T. (1996). Enhancement of ginseng saponin production in suspension cultures of *Panax notoginseng*: Manipulation of medium sucrose. *Journal Biotechnology*, 51, 49-56.

EFFECTS OF MACRO ELEMENTS AND MEDIUM REPLENISHMENT ON CELL SUSPENSION CULTURE OF PANAX GINSENG HA ET GRUSHV. *IN VITRO*

Nguyen Van Ket^a, Truong Thi Lan Anh^{a*}

^a*The Faculty of Agriculture and Forestry, Dalat University, Lamdong, Vietnam*

^{*}*Corresponding author: Email: anhttl@dlu.edu.vn*

Article history

Received: August 15th, 2016 | Received in revised form: September 15th, 2016

Accepted: September 20th, 2016

Abstract

It has been demonstrated that the difference of macro-elements concentrations effect various on callus culture in vitro of Panax vietnamensis. The callus growths were the greatest in the medium supplemented with from 0.5 to 1.0- strength KNO₃ and CaCl₂, and 1.0-strength NH₄H₂PO₄ and MgSO₄. Moreover, the strategy of medium replenishment was helpful for cell suspension growth. And the maximum cell suspension growth was achieved with feeding of the 1/4MS at the end of 3rd.

Keywords: Bioreactor; Macro element; Medium replenishment; *Panax vietnamensis* Ha et Grushv.