

ẢNH HƯỞNG CỦA ÁNH SÁNG ĐƠN SẮC LÊN SỰ SINH TRƯỞNG VÀ KHẢ NĂNG TÍCH LŨY HOẠT CHẤT SAPONIN THÔNG QUA NUÔI CÂY MÔ SẸO VÀ CÂY SÂM NGỌC LINH (*PANAX VIETNAMENSIS* HA ET GRUSHV.) IN VITRO

**Hoàng Văn Cương¹, Nguyễn Bá Nam¹, Trần Công Luận^{2,*}, Bùi Thế Vinh²,
Dương Tấn Nhựt^{1,*}**

¹*Viện Sinh học Tây Nguyên, Viện KHCNVN, TP. Đà Lạt*

²*Trung tâm Sâm và Dược liệu TP. Hồ Chí Minh*

*Email: duongtannhut@gmail.com; congluan53@gmail.com

Đến Tòa soạn: 22/6/2012; Chấp nhận đăng: 21/11/2012

TÓM TẮT

Trong nghiên cứu này, ảnh hưởng của ánh sáng đơn sắc lên sự khởi tạo và tăng sinh của mô sẹo, cũng như sự sinh trưởng, phát triển và khả năng tích lũy hoạt chất saponin trong cây sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) nuôi cấy *in vitro* đã được nghiên cứu. Các mẫu mô sẹo và cây được nuôi cấy dưới 5 loại ánh sáng khác nhau: 100 % ánh sáng xanh, 100 % ánh sáng đỏ, ánh sáng xanh và ánh sáng đỏ kết hợp với tỉ lệ 50 : 50, 30 : 70, 20 : 80; ánh sáng huỳnh quang được sử dụng làm đối chứng. Kết quả cho thấy trọng lượng tươi và trọng lượng khô của mô sẹo thu được là cao nhất (tương ứng 0,274 và 0,030 g) khi các mẫu lá được nuôi cấy dưới ánh sáng ánh sáng xanh và ánh sáng đỏ kết hợp với tỉ lệ 50 : 50. Quá trình tăng sinh mô sẹo hiệu quả nhất khi các mô sẹo được nuôi cấy dưới điều kiện chiếu sáng là ánh sáng xanh và ánh sáng đỏ kết hợp với tỉ lệ 50 : 50, với trọng lượng tươi và trọng lượng khô của mô sẹo là lớn nhất (tương ứng 0,748 và 0,064 g). Ánh sáng xanh và ánh sáng đỏ kết hợp với tỉ lệ 50 : 50 cũng là nguồn sáng thích hợp nhất cho sự sinh trưởng và phát triển của cây sâm Ngọc Linh nuôi cấy *in vitro*. Kết quả phân tích HPLC cho thấy ánh sáng đã tác động khác nhau đến sự tích lũy saponin trong mô sẹo và cây sâm Ngọc Linh nuôi cấy *in vitro*. Các cây được nuôi cấy dưới ánh sáng huỳnh quang cho sự tích lũy saponin là cao nhất (0,2422 % Rb₁ và 0,7081 % MR₂).

Từ khóa: ánh sáng đơn sắc, saponin, sâm Ngọc Linh, sự sinh trưởng và phát triển, sự tích lũy hợp chất.

1. GIỚI THIỆU

Nguồn chiếu sáng được sử dụng thông dụng trong nuôi cấy *in vitro* là ánh sáng huỳnh quang. Các loại đèn halogen kim loại, natri cao áp, dây tóc được sử dụng nhằm làm tăng cường độ ánh sáng. Tuy nhiên, những nguồn sáng này bao gồm các bước sóng không cần thiết cho sự sinh trưởng của cây [9]. Ánh sáng đơn sắc là một nguồn năng lượng đầy hứa hẹn cho các phòng

nuôi cấy mô với khả năng nâng cao quá trình tăng trưởng sinh học nhờ vào kích thước nhỏ, cấu trúc rắn, an toàn, ít tỏa nhiệt, tuổi thọ cao. Ánh sáng đơn sắc bao gồm các bước sóng có lợi cho quá trình quang hợp, từ đó ảnh hưởng đến quá trình phát sinh hình thái và sinh tổng hợp của cây. Hiện nay, ánh sáng đơn sắc được sử dụng trong nhiều nghiên cứu về quang sinh học như sự tổng hợp chlorophyll, quang hợp và phát sinh hình thái hay quá trình tích lũy các hợp chất có hoạt tính sinh học. Ảnh hưởng của ánh sáng đơn sắc lên sự sinh trưởng và phát triển của một số loài cây đã được nghiên cứu, ví dụ như: *Euphorbia milii* [3], *Zantedeschia* [8], Khoai tây [7, 15], Cúc [9], *Lilium* [12], Chuối [19], Dầu tây [20], Lan Ý [21], Nho [23], *Cymbidium* [28] và Lan Hồ Điệp [31]. Những nghiên cứu này đều chỉ ra rằng ánh sáng đơn sắc thích hợp cho sinh trưởng của cây hơn ánh sáng huỳnh quang.

Ảnh hưởng của chất lượng ánh sáng lên sự sinh trưởng và phát triển thực vật đã được nghiên cứu nhiều; tuy nhiên, các nghiên cứu về tác động của ánh sáng đến quá trình tổng hợp các hợp chất thứ cấp có hoạt tính sinh học vẫn còn rất hạn chế. Krewzaler và Hahlbrock [10] đã cho rằng ánh sáng có vai trò kích thích sự tổng hợp flavonoid glycosides trong nuôi cấy tế bào cây *Petroselinum hortense* [10]. Một số nghiên cứu khác cũng đã tìm hiểu ảnh hưởng của ánh sáng lên sự tích lũy các chất trên một số đối tượng như: anthocyanin trong cây *Perilla frutescens* [33], artemisinin từ nuôi cấy rễ tơ cây *Artemisia annua* [13]. Trên đối tượng chi *Panax*, Yu và cộng sự [32] đã nghiên cứu ảnh hưởng của ánh sáng lên sự tổng hợp ginsenoside trong rễ tơ cây Nhân sâm (*Panax ginseng* C. A. Meyer). Tuy nhiên, chưa có nghiên cứu nào được thực hiện trên đối tượng sâm Ngọc Linh.

Sâm Ngọc Linh là một loài sâm đặc hữu của Việt Nam, với tên khoa học là *Panax vietnamensis* Ha et Grushv. Sâm Ngọc Linh không chỉ có các tác dụng dược lý đặc trưng của chi Nhân sâm mà còn có những tác dụng điển hình như chống stress, chống trầm cảm, tác dụng lên sự chống oxy hoá *in vitro* và *in vivo*... Nhóm chất có tác dụng quyết định nhất đến tác dụng dược lý của loài sâm này là các saponin triterpenoic mà đại diện chính là MR₂, Rb₁ và Rg₁ [30]. Sâm Ngọc Linh là một trong những loài sâm có hàm lượng saponin khung dammaran cao nhất (khoảng 12 – 15 %) và lượng saponin nhiều nhất so với các loài khác của chi *Panax* trên thế giới [18]. Với những đặc điểm đó, sâm Ngọc Linh không chỉ là loài sâm quý của Việt Nam mà còn của cả thế giới.

Nguồn sáng thường được sử dụng trong nuôi cấy cây sâm Ngọc Linh *in vitro* là ánh sáng huỳnh quang. Tuy nhiên, chưa có nghiên cứu nào được thực hiện nhằm tìm hiểu ảnh hưởng của ánh sáng đơn sắc lên sinh trưởng, phát triển và sự tích lũy hoạt chất saponin của mô sẹo và cây sâm Ngọc Linh nuôi cấy *in vitro*. Trong nghiên cứu này, bằng việc sử dụng các loại ánh sáng khác nhau, chúng tôi tiến hành tìm hiểu ảnh hưởng lên sự khởi tạo và tăng sinh của mô sẹo, cũng như sự sinh trưởng và phát triển của cây sâm Ngọc Linh *in vitro*; bên cạnh đó, chúng tôi cũng tìm hiểu ảnh hưởng của ánh sáng đơn sắc lên khả năng tích lũy hoạt chất saponin trong mô sẹo và cây sâm Ngọc Linh nuôi cấy *in vitro*. Từ đó, tìm ra ánh sáng phù hợp nhất cho quá trình nhân giống cây sâm Ngọc Linh nuôi cấy *in vitro*.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Nguồn mẫu

Nguồn mẫu sử dụng trong nghiên cứu này là lá (được cắt thành những miếng có kích thước bằng nhau 1 × 1 cm) và chồi (cao khoảng 2 cm) cây sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et

Grushv.) nuôi cấy *in vitro* hiện có tại Phòng Sinh học phân tử và Chọn tạo giống cây trồng, Viện Sinh học Tây Nguyên.

2.2. Môi trường và điều kiện nuôi cấy

Môi trường được sử dụng trong thí nghiệm khởi tạo và tăng sinh mô sẹo là môi trường SH [26] có bổ sung 0,2 mg/l TDZ (thidiazuron), 1,0 mg/l 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid), 30 g/l sucrose, 9 g/l agar. Môi trường sử dụng trong thí nghiệm tạo cây hoàn chỉnh là môi trường SH có bổ sung 1 mg/l BA (6-benzyladenine), 0,5 mg/l NAA (1-naphthaleneacetic acid), 30 g/l sucrose, 9 g/l agar, 1 mg/l than hoạt tính. Tất cả môi trường được điều chỉnh về pH 5,7 – 5,8 trước khi đi hấp khử trùng bằng autoclave ở 121 °C, 1 atm trong 30 phút.

Các mẫu cấy được nuôi cấy trong bình thủy tinh loại 250 ml với 40 ml môi trường trong mỗi bình. Các bình nuôi cấy sẽ được cấy 3 mẫu. Mỗi nghiệm thức được cấy với 30 bình.

Điều kiện nuôi cấy: các mẫu được nuôi cấy dưới ánh sáng huỳnh quang với thời gian chiếu sáng 16 giờ/ngày, cường độ chiếu sáng 2.000 lux, nhiệt độ 25 ± 2 °C, độ ẩm trung bình khoảng 55 – 60 %; các mẫu được nuôi cấy dưới ánh sáng đơn sắc với thời gian chiếu sáng 16 giờ/ngày, cường độ chiếu sáng 2.000 lux, nhiệt độ 25 ± 2 °C, độ ẩm trung bình khoảng 55 – 60 %.

Các thí nghiệm về ánh sáng được thiết lập thành 6 loại như sau:

FL: ánh sáng huỳnh quang (đối chứng);

B: 100 % ánh sáng ánh sáng xanh;

B:R = 50 : 50 : 50 % ánh sáng ánh sáng xanh và 50 % ánh sáng ánh sáng đỏ;

B:R = 30:70: 30 % ánh sáng ánh sáng xanh và 70 % ánh sáng ánh sáng đỏ;

B:R = 20 : 80 : 20 % ánh sáng ánh sáng xanh và 80 % ánh sáng ánh sáng đỏ;

R: 100 % ánh sáng ánh sáng đỏ.

Các ánh sáng xanh và đỏ được phát ra từ các diod phát quang (LED).

2.3. Bố trí thí nghiệm

2.3.1. Ảnh hưởng của ánh sáng đơn sắc lên sự khởi tạo mô sẹo từ mô lá cây sâm Ngọc Linh nuôi cấy *in vitro*

Các mẫu lá sâm Ngọc Linh *in vitro* có kích thước 1 × 1 cm được nuôi cấy lên môi trường SH có bổ sung 1,0 mg/l 2,4-D, 0,2 mg/l TDZ, 30 g/l sucrose, 9 g/l agar. Sau đó các bình nuôi cấy được nuôi cấy dưới 6 điều kiện chiếu sáng khác nhau trong 8 tuần (hình 3a). Mục đích của thí nghiệm là tìm ra loại ánh sáng thích hợp cho quá trình khởi tạo mô sẹo từ mẫu lá sâm Ngọc Linh nuôi cấy *in vitro*.

2.3.2. Ảnh hưởng của ánh sáng đơn sắc lên sự tăng sinh mô sẹo sâm Ngọc Linh nuôi cấy *in vitro*

Các mô sẹo thu được ở thí nghiệm 1 được cắt thành những miếng có kích thước 0,5 × 0,5 cm và cấy lên môi trường SH có bổ sung 1,0 mg/l 2,4-D, 0,2 mg/l TDZ, 30 g/l sucrose, 9 g/l agar. Các bình nuôi cấy sau đó được đặt dưới 6 điều kiện chiếu sáng khác nhau trong 6 tuần (hình 3a). Mục đích của thí nghiệm là tìm ra loại ánh sáng thích hợp cho quá trình tăng sinh mô sẹo sâm Ngọc Linh nuôi cấy *in vitro*.

2.3.3. Ảnh hưởng của ánh sáng đơn sắc lên sự sinh trưởng và phát triển của cây sâm Ngọc Linh nuôi cấy in vitro

Các chồi cây sâm Ngọc Linh cao khoảng 2 cm nuôi cấy *in vitro* được cấy lên môi trường SH có bổ sung 1,0 mg/l BA, 0,5 mg/l NAA, 30 g/l sucrose, 9 g/l agar, 1 mg/l than hoạt tính. Các bình nuôi cấy sau đó được đặt dưới 6 điều kiện chiếu sáng khác nhau trong 8 tuần (hình 3a). Mục đích của thí nghiệm là tìm ra loại ánh sáng phù hợp cho sự sinh trưởng và phát triển của cây sâm Ngọc Linh nuôi cấy *in vitro*.

2.3.4. Chỉ tiêu theo dõi

Mô sẹo: khối lượng tươi, khối lượng khô của mô sẹo sau 6 tuần (tăng sinh mô sẹo) và 8 tuần (khởi tạo mô sẹo) nuôi cấy.

Cây: khối lượng tươi, khối lượng khô, chiều cao cây, số rễ, chiều dài rễ, diện tích lá của cây sau 8 tuần nuôi cấy.

2.4. Định tính và định lượng saponin trong mô sẹo và cây sâm Ngọc Linh nuôi cấy in vitro

2.4.1. Định tính saponin bằng sắc kí lớp mỏng

Chuẩn bị mẫu

Chiết siêu âm 1 g mẫu mô sẹo (hoặc cây) đã sấy khô với methanol (20 ml/lần, mỗi lần 10 phút, 9 lần), lọc và cô dịch lọc đến cạn. Hòa cồn với 10 ml nước và 20 ml diethylether, lắc đều, loại dịch diethylether. Dịch nước được tiếp tục lắc với n-butanol bão hòa nước, đem cô cách thủy dịch n-butanol đến cạn, hòa cồn trong methanol làm mẫu thử.

Chuẩn bị bản mỏng silica gel và dung môi

Cắt tấm silica gel với kích thước phù hợp, cách mép dưới 1 cm kẻ một đường thẳng, phía dưới đường thẳng ghi tên các chất cần sắc kí, ở sát mép trên ghi tên dung môi, bản mỏng silica gel F₂₅₄.

Hai hệ dung môi được sử dụng để chạy sắc kí bản mỏng là: cloroform : methanol : nước (65 : 35 : 10) và n-butanol:acid acetic:nước (7 : 1 : 2).

Tiến hành

Châm đồng loạt mẫu thử (các nghiệm thức) cùng đối chiếu với mẫu sâm chuẩn, MR₂, Rb₁, Rg₁ lên bản silica gel. Triển khai trong bình sắc kí đến khi dung môi chạy trên tấm silica gel cách đỉnh trên 1 cm lấy ra để khô. Phun thuốc thử H₂SO₄ 10 % trong cồn và sấy khô. Quan sát các vết hiện màu các vết của mẫu thử so với vết của các chất chuẩn.

2.4.2. Định lượng saponin bằng HPLC

Chuẩn bị mẫu tương tự như sắc kí lớp mỏng.

Cồn n-butanol hòa với 10 ml methanol, trích 2 ml cô cách thủy đến cạn. Hòa cồn với nước và acetonitrile (1 : 2), lọc qua màng lọc 0,45 µm, dịch lọc bơm vào máy HPLC với điều kiện

chung như sau: thể tích tiêm mẫu: 20 µl, tốc độ dòng: 0,5 ml/phút, cột RP C18 Supelco (250 mm – 4,6 mm – 5 µm), nhiệt độ cột: 25 °C, detector: PDA ở bước sóng 190, 196 và 203 nm.

Thu nhận diện tích peak tương ứng, hàm lượng saponin được tính theo công thức sau:

$$HL (\%) = \frac{x \cdot 10 \cdot 100\%}{a \cdot (100\% - p)} \cdot 10^{-6}$$

x: nồng độ mẫu thử thu được dựa vào đường chuẩn (µg/ml); 10: độ pha loãng mẫu; a: khối lượng nguyên liệu (g); p: độ ẩm.

2.5. Xử lí số liệu

Các số liệu thu được trong nghiên cứu này được xử lí bằng phần mềm SPSS 16.0 với phép thử Duncan P = 0,05 [4].

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả

3.1.1. Ảnh hưởng của ánh sáng đơn sắc lên sự khởi tạo mô sẹo từ mô lá cây sâm Ngọc Linh nuôi cấy *in vitro*

Kết quả thu được cho thấy ánh sáng đơn sắc khác nhau đã tác động khác nhau lên sự khởi tạo mô sẹo sâm Ngọc Linh nuôi cấy *in vitro* (bảng 1, hình 3b). Sau 8 tuần nuôi cấy, khối lượng tươi, khối lượng khô của mô sẹo thu được là cao nhất (tương ứng với 0,274 g và 0,030 g) khi được nuôi cấy dưới tỉ lệ ánh sáng xanh và đỏ là 50 : 50. Kết quả cũng cho thấy khi các mẫu lá được nuôi cấy dưới điều kiện chiếu sáng là ánh sáng huỳnh quang thì quá trình khởi tạo mô sẹo bị hạn chế, với khối lượng tươi và khối lượng khô của mô sẹo thu được là thấp nhất (tương ứng với 0,176 g và 0,018 g). Khi các mẫu cây được nuôi cấy dưới ánh sáng xanh, đỏ, ánh sáng xanh và đỏ kết hợp theo tỉ lệ 30 : 70, 20 : 80 đều cho quá trình khởi tạo mô sẹo tốt hơn khi nuôi cấy dưới ánh sáng huỳnh quang, với khối lượng tươi và khối lượng khô cao hơn (bảng 1).

Bảng 1. Ảnh hưởng của ánh sáng đơn sắc lên sự khởi tạo mô sẹo từ mẫu lá sâm Ngọc Linh sau 8 tuần nuôi cấy.

Ánh sáng	Khối lượng tươi (g)	Khối lượng khô (g)
FL	0,176d*	0,018c
B	0,189c	0,020bc
B : R = 50 : 50	0,274a	0,030a
B : R = 30 : 70	0,194c	0,022bc
B : R = 20 : 80	0,196c	0,025b
R	0,224b	0,023bc

Ghi chú: *Những kí tự khác nhau (a, b, c,...) trong cột thể hiện sự sai khác có ý nghĩa với độ tin cậy P = 0,05 trong phép thử Duncan.

Tuy nhiên, khi so sánh giữa các loại ánh sáng này với nhau thì không có sự khác biệt về mặt thống kê (bảng 1). Kết quả của nghiên cứu này cho thấy ánh sáng xanh và ánh sáng đỏ kết hợp với tỉ lệ 50 : 50 là nguồn sáng thích hợp nhất cho quá trình khởi tạo mô sẹo từ mô lá của sâm Ngọc Linh nuôi cấy *in vitro*.

3.1.2. Ảnh hưởng của ánh sáng đơn sắc lên sự tăng sinh mô sẹo sâm Ngọc Linh nuôi cấy *in vitro*

Các mô sẹo khởi tạo được cấy chuyển sang môi trường tăng sinh và được nuôi cấy dưới 6 loại ánh sáng khác nhau. Kết quả sau 6 tuần nuôi cấy cho thấy các loại ánh sáng khác nhau đã có vai trò khác nhau trong việc kích thích sự tăng sinh của mô sẹo sâm Ngọc Linh nuôi cấy *in vitro* (bảng 2, hình 3c). Khối lượng tươi và khối lượng khô của mô sẹo thu được là cao nhất (tương ứng với 0,748 g và 0,064 g) khi được nuôi cấy dưới ánh sáng xanh và đỏ kết hợp với tỉ lệ 50 : 50. Tiếp theo là ánh sáng xanh, ánh sáng đỏ, ánh sáng xanh và đỏ kết hợp với tỉ lệ 30 : 70, 20 : 80; tuy nhiên, khi so sánh khối lượng tươi và khối lượng khô của mô sẹo ở các loại ánh sáng này thì không có sự khác biệt về mặt thống kê (bảng 2). Mô sẹo bị ức chế sự tăng sinh khi được nuôi cấy dưới ánh sáng huỳnh quang, với khối lượng tươi và khối lượng khô của mô sẹo là thấp nhất (tương ứng với 0,473 g và 0,046 g). Như vậy, sự tăng sinh của mô sẹo là tốt nhất khi được nuôi cấy dưới ánh sáng xanh và đỏ kết hợp với tỉ lệ 50 : 50; và là ánh sáng thích hợp nhất cho cả sự khởi tạo và tăng sinh mô sẹo của sâm Ngọc Linh nuôi cấy *in vitro*.

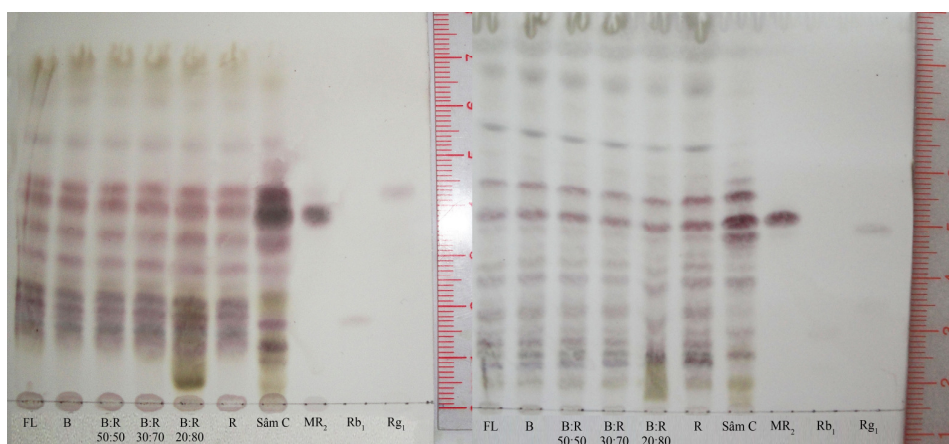
Bảng 2. Ảnh hưởng của ánh sáng đơn sắc lên sự tăng sinh của mô sẹo sâm Ngọc Linh sau 6 tuần nuôi cấy.

Ánh sáng	Khối lượng tươi (g)	Khối lượng khô (g)
FL	0,473c*	0,046c
B	0,522bc	0,050bc
B:R = 50:50	0,748a	0,064a
B:R = 30:70	0,591bc	0,058ab
B:R = 20:80	0,552bc	0,053bc
R	0,608b	0,051bc

Ghi chú: *Những kí tự khác nhau (a, b, c,...) trong cột thể hiện sự sai khác có ý nghĩa với độ tin cậy P = 0,05 trong phép thử Duncan.

3.1.3. Ảnh hưởng của ánh sáng đơn sắc lên sự tích lũy saponin trong mô sẹo sâm Ngọc Linh nuôi cấy *in vitro*

Kết quả bằng sắc kí lớp mỏng cho thấy khi các bản mỏng được chạy trên cả hai loại dung môi khác nhau (cloroform:methanol:nước = 65 : 35 : 10 và n-butanol:acid acetic:nước = 7 : 1 : 2), các mẫu mô sẹo cây sâm Ngọc Linh nuôi cấy *in vitro* ở tất cả các loại ánh sáng đều có sự xuất hiện của 3 vết saponin R_{g1}, R_{b1}, MR₂ (hình 1). Điều này chứng tỏ rằng trong các mẫu mô sẹo sâm Ngọc Linh nuôi cấy *in vitro* có sự hiện diện của R_{g1}, R_{b1}, MR₂. Ngoài ra, ở mẫu mô sẹo sâm Ngọc Linh nuôi cấy *in vitro* còn xuất hiện các vết tương đồng với sâm ngoài tự nhiên (hình 1), điều này chứng tỏ rằng trong mô sẹo sâm Ngọc Linh nuôi cấy *in vitro* còn có mặt của nhiều loại saponin khác tương tự như saponin của cây ngoài tự nhiên.



Hình 1. Sắc ký lớp mỏng được chạy trên hai hệ dung môi khác nhau (chloroform : methanol : nước = 65 : 35 : 10) (trái) và n-butanol:acid acetic:nước = 7 : 1 : 2 (phải)) của các mẫu mô sẹo sâm Ngọc Linh được nuôi cấy dưới các loại ánh sáng khác nhau.

Kết quả chạy HPLC cho thấy ánh sáng đã ảnh hưởng đến quá trình tích lũy hoạt chất saponin trong mô sẹo sâm Ngọc Linh nuôi cấy *in vitro*. Hàm lượng saponin Rg_1 là cao nhất (0,3015 %) khi các cây được nuôi cấy dưới ánh sáng xanh và đỏ kết hợp với tỉ lệ 50 : 50 và thấp nhất (0,1273 %) ở các cây nuôi cấy dưới ánh sáng xanh và đỏ kết hợp với tỉ lệ 30 : 70. Hàm lượng saponin Rb_1 là cao nhất (0,2281 %) khi các cây được nuôi cấy dưới ánh sáng huỳnh quang và thấp nhất ở các cây nuôi cấy dưới ánh sáng xanh và đỏ kết hợp với tỉ lệ 30 : 70 và 20 : 80. Kết quả cũng cho thấy ánh sáng xanh và đỏ kết hợp với tỉ lệ 30 : 70 cho hàm lượng Rg_1 và Rb_1 trong mô sẹo là thấp nhất; tuy nhiên, hàm lượng MR_2 thu được (0,5773 %) lại cao hơn rất nhiều so với các loại ánh sáng khác. Hàm lượng MR_2 thấp nhất (0,1564 %) được thu nhận ở ánh sáng xanh và đỏ kết hợp với tỉ lệ 50 : 50 (bảng 3).

Bảng 3. Ảnh hưởng của ánh sáng đơn sắc lên tích lũy saponin trong mô sẹo sâm Ngọc Linh nuôi cấy *in vitro*.

Ánh sáng	Rg_1 (%)	Rb_1 (%)	MR_2 (%)
FL	0,1968e	0,2281a	0,2933e
B	0,2543c	0,1722d	0,3184c
B : R = 50 : 50	0,3015a	0,1855b	0,1564f
B:R = 30 : 70	0,1273f	0,1685e	0,5773a
B:R = 20 : 80	0,2106d	0,1679e	0,3162d
R	0,2675b	0,1789c	0,3712b

Ghi chú: *Những kí tự khác nhau (a, b, c,...) trong cột thể hiện sự sai khác có ý nghĩa với độ tin cậy $P = 0,05$ trong phép thử Duncan.

3.1.4. Ảnh hưởng của ánh sáng đơn sắc lên sự sinh trưởng và phát triển của cây sâm Ngọc Linh nuôi cấy *in vitro*

Các chồi sâm Ngọc Linh *in vitro* có kích thước khoảng 2 cm được nuôi cấy trên môi trường tạo cây hoàn chỉnh dưới 6 loại ánh sáng khác nhau. Kết quả sau 8 tuần cho thấy các loại ánh sáng khác nhau cũng ảnh hưởng khác nhau lên sự sinh trưởng và phát triển của cây sâm Ngọc Linh nuôi cấy *in vitro* (bảng 4, hình 3d). Các chỉ tiêu về khối lượng tươi, khối lượng khô, chiều cao cây và diện tích lá thu được là cao nhất ở các cây được nuôi cấy dưới điều kiện ánh sáng xanh và đỏ kết hợp với tỉ lệ 50:50; tuy nhiên, khi so sánh số lượng rễ và chiều dài rễ của các cây được nuôi cấy dưới các loại ánh sáng khác nhau thì chưa có sự khác biệt về mặt thống kê (bảng 4). Chiều cao của cây cũng như diện tích lá của cây hầu như bị ức chế khi nuôi cấy dưới điều kiện chiếu sáng là ánh sáng xanh (bảng 4). Dựa vào kết quả này có thể nhận thấy ánh sáng xanh và đỏ kết hợp với tỉ lệ 50 : 50 là nguồn sáng thích hợp cho sự sinh trưởng và phát triển của sâm Ngọc Linh *in vitro*, và có thể được sử dụng như nguồn sáng phù hợp cho các hệ thống nuôi cấy sâm Ngọc Linh *in vitro*.

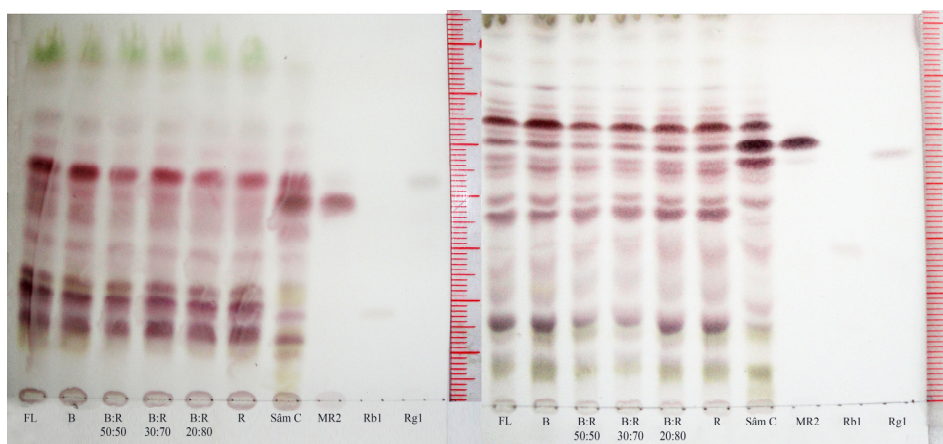
Bảng 4. Ảnh hưởng của ánh sáng đơn sắc lên sự sinh trưởng và phát triển của cây sâm Ngọc Linh sau 8 tuần nuôi cấy.

Ánh sáng	Khối lượng tươi (g)	Khối lượng khô (g)	Chiều cao cây (cm)	Số rễ	Chiều dài rễ (cm)	Diện tích lá (cm ²)
FL	0,179b*	0,032ab	4,2a	3,7a	0,5a	0,81b
B	0,185b	0,032ab	3,0c	1,3a	0,4a	0,79b
B:R = 50:50	0,361a	0,061a	4,4a	1,7a	0,5a	2,33a
B:R = 30:70	0,147b	0,030c	3,3bc	1,7a	0,6a	0,67b
B:R = 20:80	0,177b	0,038ab	4,0ab	3,7a	0,4a	1,22b
R	0,185b	0,030c	4,3a	3,0a	0,6a	1,51ab

Ghi chú: *Những kí tự khác nhau (a, b, c,...) trong cột thể hiện sự sai khác có ý nghĩa với độ tin cậy P = 0,05 trong phép thử Duncan.

3.1.5. Ảnh hưởng của ánh sáng đơn sắc lên sự tích lũy saponin trong cây sâm Ngọc Linh nuôi cấy *in vitro*

Kết quả bằng sắc kí lớp mỏng cho thấy khi các bản mỏng được chạy trên cả hai loại dung môi khác nhau (cloroform : methanol : nước = 65 : 35 : 10 và n-butanol : acid acetic : nước = 7 : 1 : 2), các mẫu cây sâm Ngọc Linh nuôi cấy *in vitro* ở tất cả các loại ánh sáng đều có sự xuất hiện của 3 vết saponin R_{g1}, R_{b1}, MR₂ (hình 2). Điều này chứng tỏ rằng trong các cây sâm Ngọc Linh nuôi cấy *in vitro* có sự hiện diện của R_{g1}, R_{b1}, MR₂. Ngoài ra, ở mẫu sâm Ngọc Linh nuôi cấy *in vitro* còn xuất hiện các vết tương đồng với sâm ngoài tự nhiên (hình 2), điều này chứng tỏ rằng trong cây sâm Ngọc Linh nuôi cấy *in vitro* còn có mặt của nhiều loại saponin khác tương tự như saponin của cây ngoài tự nhiên.



Hình 2. Sắc kí lớp mỏng được chạy trên hai hệ dung môi khác nhau (cloroform : methanol : nước = 65 : 35 : 10) (trái) và n-butanol : acid acetic : nước = 7 : 1 : 2 (phải)) của các mẫu cây sâm Ngọc Linh được nuôi cấy dưới các loại ánh sáng khác nhau.

Kết quả chạy HPLC cho thấy ánh sáng đã ảnh hưởng đến quá trình tích lũy hoạt chất saponin trong cây sâm Ngọc Linh nuôi cấy *in vitro*. Hàm lượng saponin Rg₁ là cao nhất khi các cây được nuôi cấy dưới ánh sáng xanh và đỏ kết hợp với tỉ lệ 20 : 80 (với 2,2749 %), và thấp nhất ở các cây nuôi cấy dưới ánh sáng xanh (với 0,1540 %). Tuy nhiên, hàm lượng saponin Rb₁, MR₂ cao nhất lại thu được ở các cây nuôi cấy dưới ánh sáng huỳnh quang (tương ứng 0,1709 và 0,4080 %) (bảng 5). Đặc biệt, hàm lượng MR₂ ở các cây nuôi cấy dưới huỳnh quang cao hơn rất nhiều so với các loại ánh sáng khác.

Bảng 5. Ảnh hưởng của ánh sáng đơn sắc lên tích lũy saponin trong cây sâm Ngọc Linh nuôi cấy *in vitro*.

Ánh sáng	Rg ₁ (%)	Rb ₁ (%)	MR ₂ (%)
FL	0,2368c	0,2422a	0,7081a
B	0,1540f	0,1709b	0,4080b
B:R = 50:50	0,1635e	0,1647d	0,1273f
B:R = 30:70	0,2481d	0,1373e	0,1582d
B:R = 20:80	0,2749a	0,1672c	0,1316e
R	0,2693b	0,1017f	0,2257c

Ghi chú: *Những kí tự khác nhau (a, b, c,...) trong cột thể hiện sự sai khác có ý nghĩa với độ tin cậy P = 0,05 trong phép thử Duncan.

3.2. Thảo luận

Ánh sáng điều khiển sự sinh trưởng và phát triển của thực vật thông qua hai con đường: quang hợp và quang phát sinh hình thái. Ở các mô nuôi cấy, có ba yếu tố ánh sáng tác động đến sự sinh trưởng của phát sinh hình thái đó là bước sóng, cường độ và thời gian chiếu sáng. Đã có nhiều nghiên cứu chỉ ra rằng ánh sáng có tác động đáng kể đến sự sinh trưởng, phát sinh hình thái và sự hình thành của các enzyme đặc hiệu cho quá trình hình thành các hợp chất thứ cấp

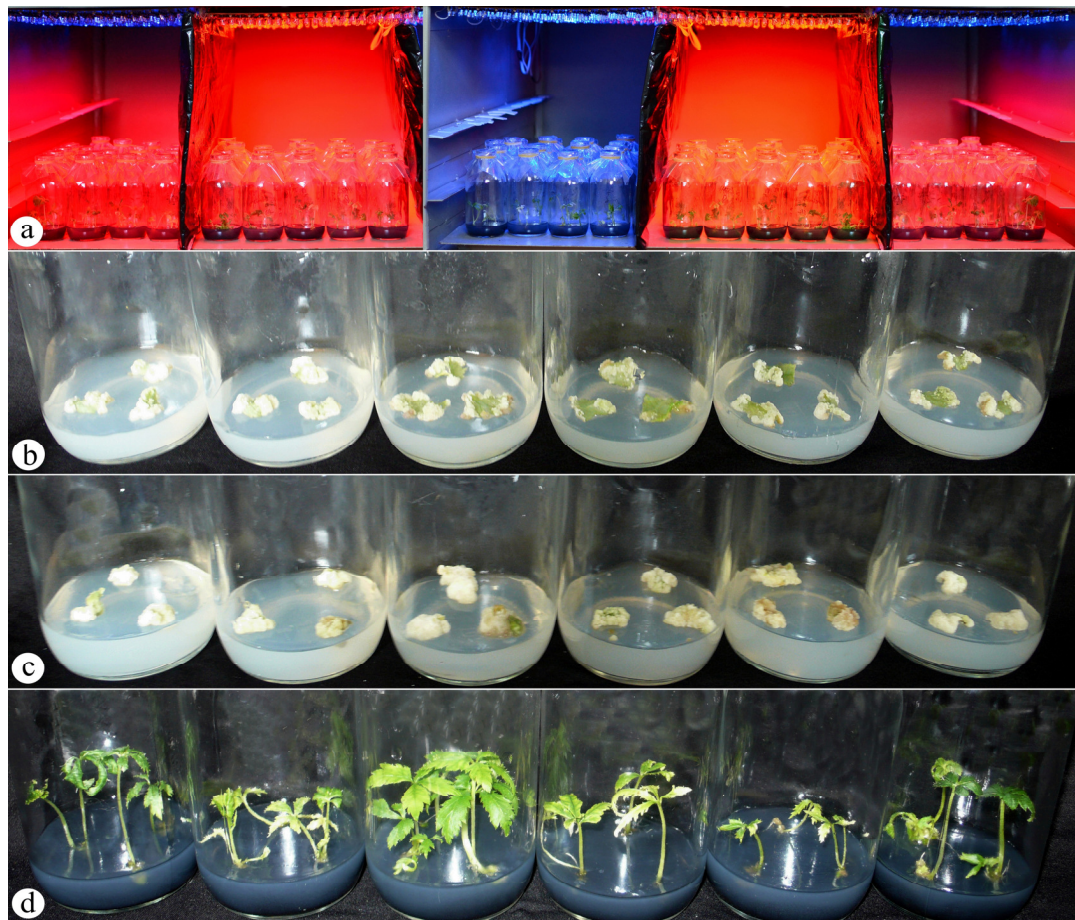
flavonoid glycosides [5]. Tuy nhiên, sự hiểu biết về tác động của ánh sáng lên sự khởi tạo và tăng sinh mô sẹo, đặc biệt là trên đối tượng sâm Ngọc Linh thì vẫn chưa được nghiên cứu.

Kết quả thu được cho thấy ánh sáng có vai trò khác nhau trong quá trình khởi tạo và tăng sinh mô sẹo sâm Ngọc Linh nuôi cấy *in vitro*. Ánh sáng đơn sắc đã tác động đến quá trình khởi tạo và tăng sinh mô sẹo tốt hơn ánh sáng huỳnh quang. Ánh sáng xanh và đỏ kết hợp với tỉ lệ 50:50 cho sự khởi tạo của mô sẹo từ mẫu lá và quá trình tăng sinh mô sẹo sâm Ngọc Linh là tốt nhất, với khối lượng tươi và khối lượng khô của mô sẹo thu được là cao nhất (bảng 1, 2; hình 3b, c). Trong khi đó, sự khởi tạo và tăng sinh mô sẹo bị hạn chế khi nuôi cấy dưới ánh sáng huỳnh quang, với kết quả về khối lượng tươi và khối lượng khô mô sẹo thu được là thấp nhất (bảng 1, 2; hình 3b, c). Kết quả này cũng cho thấy vai trò của ánh sáng đơn sắc và sự kết hợp giữa ánh sáng xanh và đỏ lên sự khởi tạo và tăng sinh mô sẹo sâm Ngọc Linh nuôi cấy *in vitro*.

Các nghiên cứu trước cũng chỉ ra rằng sự kết hợp giữa ánh sáng xanh và đỏ có tác động đến sự sinh trưởng của một số cây. Ánh sáng đỏ quan trọng cho sự kéo dài thân và chồi, đáp ứng phytochrome và thay đổi cấu trúc giải phẫu của cây [27]. Trong khi đó, ánh sáng xanh lại có vai trò quan trọng trong quá trình tổng hợp chlorophyll, sự mở của khí khổng, tổng hợp các enzyme, sự trưởng thành của lục lạp và quá trình quang hợp [29]. Ánh sáng đỏ cần thiết cho sự sinh trưởng của thực vật, trong khi đó, ánh sáng xanh lại góp phần vào quá trình quang hợp của cây [22].

Kết quả trong nghiên cứu này cho thấy khối lượng tươi, khối lượng khô của cây sâm Ngọc Linh là cao nhất khi được nuôi cấy dưới ánh sáng xanh và đỏ kết hợp với tỉ lệ 50 : 50 (bảng 4). Ánh sáng huỳnh quang kém thích hợp cho sự sinh trưởng của cây sâm Ngọc Linh. Kết quả này cũng tương đồng với các nghiên cứu ở một số loài cây khác như *Lilium* [12], Cúc [9], cây Bông [11]. Các tác giả đều cho rằng sự sinh trưởng thu được là tốt nhất khi các cây được nuôi cấy dưới ánh sáng xanh và đỏ kết hợp với tỉ lệ 1 : 1. Abdullahil Baque và cộng sự [1] đã nghiên cứu ảnh hưởng của chất lượng ánh sáng lên sự sinh trưởng của cây *Calanthe in vitro* và cho thấy rằng sự sinh trưởng là tốt nhất khi được nuôi cấy dưới ánh sáng xanh và đỏ kết hợp, kết quả thấp hơn được thu nhận ở ánh sáng huỳnh quang, ánh sáng xanh và ánh sáng đỏ. Khi nuôi cấy cây *Cymbidium*, sự kết hợp giữa ánh sáng đỏ và xanh đã tăng cường sự sinh trưởng và phát triển bằng sự gia tăng của quá trình quang hợp [28]. Tuy nhiên, tỉ lệ kết hợp giữa hai loại ánh sáng này sẽ thay đổi tùy theo loài khác nhau.

Sau 8 tuần nuôi cấy các cây sâm Ngọc Linh dưới các loại ánh sáng khác nhau, chiều cao cây thu được là cao nhất khi các cây được nuôi cấy dưới ánh sáng xanh và đỏ kết hợp với tỉ lệ 50 : 50, tiếp theo là 100 % ánh sáng đỏ và ánh sáng huỳnh quang; kết quả thấp nhất được thu nhận khi các cây được nuôi cấy dưới ánh sáng xanh (bảng 4, hình 3d). Kết quả trong thí nghiệm cũng tương đồng với nghiên cứu của Appelgren [2] ở cây *Pelargonium*, nghiên cứu của Mortensen và Stromme [17] ở cây Cúc và Khoai tây, kết quả đã cho rằng ánh sáng xanh đã ức chế mạnh sự kéo dài của thân. Mặt khác, nghiên cứu của Puspa và cộng sự [23] lại cho thấy sự kéo dài chồi và chiều dài thân của cây Nho là tốt nhất khi các cây được nuôi cấy dưới ánh sáng đỏ. Tuy nhiên, Heo và cộng sự [6] lại cho rằng chiều cao của cây *Salvia* là cao nhất khi được nuôi cấy dưới ánh sáng xanh và bị ức chế dưới ánh sáng đỏ. Sự khác nhau này có thể là do sự tương tác phối hợp khác nhau của thụ quang nhận ánh sáng xanh và các phytochrome trong việc kích thích hay ức chế sự kéo dài thân. Kim và cộng sự [9] đã cho rằng sự kéo dài thân có thể được kích thích hay ức chế bởi sự tương tác phối hợp giữa thụ quang tiếp nhận ánh sáng xanh, đỏ và các phytochrome cũng tùy thuộc tùy theo loài.



Hình 3. Ảnh hưởng của ánh sáng đơn sắc lên sự khởi tạo và tăng sinh của mô sẹo, sự sinh trưởng và phát triển của cây sâm Ngọc Linh nuôi cấy *in vitro*. **a.** Hệ thống ánh sáng đơn sắc; **b.** Các mô sẹo hình thành từ mẫu lá; **c.** Các mô sẹo được tăng sinh khi nuôi cấy dưới các loại ánh sáng khác nhau; **d.** Các cây sâm Ngọc Linh *in vitro* được nuôi cấy dưới các loại ánh sáng khác nhau (từ trái sang phải tương ứng với ánh sáng huỳnh quang, 100 % ánh sáng xanh, ánh sáng xanh và đỏ kết hợp với tỉ lệ 50 : 50, 30 : 70, 20 : 80 và 100 % ánh sáng đỏ).

Số lượng rễ và chiều dài rễ của các cây sâm Ngọc Linh đã bị hạn chế khi được nuôi cấy dưới ánh sáng xanh. Hầu hết các cây sâm Ngọc Linh khi được nuôi cấy dưới ánh sáng xanh đều không xuất hiện rễ. Tuy nhiên, khi so sánh với các loại ánh sáng khác thì nó không có khác biệt về mặt thống kê (Bảng 4). Moon và cộng sự [16] cũng cho rằng sự ra rễ được kích thích bởi ánh sáng đỏ và ức chế bởi ánh sáng xanh.

Vai trò của sự kết hợp giữa ánh sáng đỏ và ánh sáng xanh cũng đã tác động đến sự mở rộng của lá sâm Ngọc Linh nuôi cấy *in vitro*. Diện tích của lá thu được là cao nhất khi các cây được nuôi cấy dưới tỉ lệ ánh sáng xanh và đỏ là 50:50, tiếp theo là các cây dưới ánh sáng đỏ; tuy nhiên, chúng không khác biệt nhiều về mặt thống kê (bảng 4, hình 3d). Diện tích của lá thu được là thấp nhất khi các cây được nuôi cấy dưới ánh sáng xanh, mặc dù không khác biệt về mặt thống kê so với các cây dưới các loại ánh sáng còn lại (bảng 4). Các nghiên cứu trước cũng cho thấy ánh sáng có tác động đến sự mở rộng của lá [25]. Ở một số loài cây, ánh sáng xanh làm

tăng diện tích lá (như cây *Betula pendula* [24]; trong khi ở một số cây, ánh sáng xanh lại ức chế sự mở rộng của lá (như cây Cúc [17]). Tuy nhiên, trong nghiên cứu này, ánh sáng đỏ và ánh sáng đỏ kết hợp với ánh sáng xanh theo tỉ lệ 50:50 dường như có vai trò trong sự mở rộng của lá, trong khi đó, ánh sáng xanh lại có tác dụng ngược lại.

Quan sát hình thái của các cây nuôi cấy dưới các điều kiện chiếu sáng khác nhau cho thấy ánh sáng cũng có vai trò quan trọng trong quá trình tổng hợp các sắc tố trong cây sâm Ngọc Linh nuôi cấy *in vitro*. Các cây được nuôi cấy dưới ánh sáng xanh sinh trưởng kém hơn dưới ánh sáng đỏ, tuy nhiên lá lại có màu xanh đậm hơn, các cây nuôi cấy dưới ánh sáng đỏ có màu hơi vàng. Các cây được nuôi cấy dưới ánh sáng xanh và đỏ kết hợp có màu xanh nhạt (hình 3d). Tibbitts và cộng sự [29] cho rằng ánh sáng xanh có vai trò kích thích sự tổng hợp các chlorophyll trong cây. Nghiên cứu của Liu và cộng sự [14] cũng cho rằng ánh sáng xanh kích thích sự tổng hợp các sắc tố trong PLB của cây *Oncidium*. Kết quả thu nhận trong nghiên cứu này cho thấy ánh sáng xanh có vai trò kích thích quá trình tổng hợp các sắc tố tạo nên màu xanh của cây, trong khi đó ánh sáng đỏ lại có tác động ngược lại. Vì vậy, trong nuôi cấy *in vitro* việc kết hợp giữa ánh sáng xanh và đỏ vừa có tác động tăng cường sự sinh trưởng vừa có tác động đến quá trình tổng hợp các sắc tố trong cây.

Ánh sáng đóng một vai trò quan trọng đến quá trình quang hợp cũng như quá trình tổng hợp các chất trong cây. Trong nghiên cứu này, vai trò của ánh sáng đến sự sinh trưởng của mô sẹo và cây sâm Ngọc Linh đã được ghi nhận. Tuy nhiên, để biết được vai trò của ánh sáng đến sự tích lũy hoạt chất saponin trong mô sẹo và cây sâm Ngọc Linh nuôi cấy *in vitro* thì những mẫu này được tiến hành phân tích bằng HPLC.

Kết quả thu được cho thấy các mô sẹo và cây được nuôi cấy dưới các ánh sáng khác nhau thì sự tích lũy hợp chất saponin là khác nhau (bảng 3, 5). Mặt khác, ảnh hưởng của ánh sáng đến sự tích lũy saponin trong mô sẹo và trong cây cũng hoàn toàn khác nhau (bảng 3, 5). Sự khác nhau này có thể được giải thích là do các mẫu nuôi cấy khác nhau. Mô sẹo là một khối tế bào phân chia vô tổ chức, không phân hóa, có lẽ chính vì vậy mà các quá trình sinh tổng hợp trong mô sẹo không giống với trong các cây nuôi cấy *in vitro*. Ngoài ra, cây có chứa nhiều sắc tố hơn mẫu mô sẹo, tạo nên màu xanh của cây, trong khi các mô sẹo thu được lại có màu trắng; chính vì vậy mà ánh sáng đã tác động đến các thụ quang tiếp nhận ánh sáng khác nhau cũng như kích thích quá trình sinh tổng hợp của cây khác so với mô sẹo.

Đối với mô sẹo, hàm lượng saponin R_{g1} là cao nhất khi các mô sẹo được nuôi cấy dưới ánh sáng xanh và đỏ kết hợp với tỉ lệ 50:50 và thấp nhất ở các mô sẹo nuôi cấy dưới ánh sáng xanh và đỏ kết hợp với tỉ lệ 30 : 70. Hàm lượng saponin R_{b1} là cao nhất khi các mô sẹo được nuôi cấy dưới ánh sáng huỳnh quang và thấp nhất ở các mô sẹo nuôi cấy dưới ánh sáng xanh và đỏ kết hợp với tỉ lệ 30 : 70 và 20 : 80. Kết quả cũng cho thấy ánh sáng xanh và đỏ kết hợp với tỉ lệ 30:70 cho hàm lượng R_{g1} và R_{b1} trong mô sẹo là thấp nhất; tuy nhiên, hàm lượng MR_2 thu được lại cao hơn rất nhiều so với các loại ánh sáng khác. Hàm lượng MR_2 thấp nhất được thu nhận ở ánh sáng xanh và đỏ kết hợp với tỉ lệ 50 : 50 (bảng 3). Có thể nhận thấy rằng, ở mô sẹo, mỗi loại ánh sáng lại có vai trò khác nhau cho quá trình tổng hợp của từng loại saponin, điều này có thể là do mỗi loại ánh sáng có vai trò khác nhau trong việc kích thích các enzyme tổng hợp của từng saponin khác nhau.

Đối với cây, hàm lượng saponin R_{g1} thu được là cao nhất khi các cây được nuôi cấy dưới ánh sáng xanh và đỏ kết hợp với tỉ lệ 20 : 80 và thấp nhất ở các cây được nuôi cấy dưới ánh sáng xanh. Tuy nhiên, sự tích lũy saponin R_{b1} và MR_2 là cao nhất khi các cây được nuôi cấy dưới ánh sáng huỳnh quang, tiếp theo là ánh sáng xanh; ánh sáng đỏ không có vai trò quan trọng trong việc kích thích sự tích lũy các saponin (bảng 5). Hàm lượng R_{b1} và MR_2 trong các cây nuôi cấy

dưới huỳnh quang cao hơn rất nhiều so với những cây được nuôi cấy dưới các ánh sáng khác. Đặc biệt, hàm lượng MR₂ (một saponin quan trọng, quyết định đến vai trò dược lí của cây sâm Ngọc Linh) cao gấp khoảng 1,5 - 5,5 lần khi được nuôi cấy dưới huỳnh quang so với các ánh sáng khác. Ánh sáng xanh và đỏ kết hợp với tỉ lệ 50 : 50 và 100 % ánh sáng đỏ cho sự sinh trưởng của cây là tốt nhất (bảng 4); tuy nhiên, nó lại ức chế sự tích lũy hoạt chất saponin. Từ đó cho thấy, khi sự sinh trưởng càng nhanh thì quá trình sinh tổng hợp saponin xảy ra càng chậm. Kết quả trong thí nghiệm cũng cho thấy rằng tổng hàm lượng saponin (Rg₁, Rb₁ và MR₂) thu được là cao nhất khi các cây được nuôi cấy dưới ánh sáng huỳnh quang. Kết quả này cũng tương đồng với nghiên cứu của Yu và cộng sự [32] khi nuôi cấy rễ tơ Nhân sâm, cho thấy dưới ánh sáng đỏ và trong tối có sự gia tăng đáng kể của khối lượng tươi rễ tơ và hàm lượng nhóm Rb là cao hơn, tuy nhiên, tổng hàm lượng saponin thu được lại thấp hơn huỳnh quang.

Từ kết quả của nghiên cứu này, có thể thiết lập quy trình tạo cây sâm Ngọc Linh có hàm lượng saponin cao bằng cách thực hiện theo hai bước: giai đoạn đầu, các cây được nuôi cấy dưới ánh sáng xanh và đỏ kết hợp theo tỷ lệ 50 : 50 nhằm tăng cường quá trình sinh trưởng và giai đoạn hai, các cây được chuyển ra ánh sáng huỳnh quang nhằm gia tăng hàm lượng saponin.

4. KẾT LUẬN

Chất lượng của ánh sáng ảnh hưởng đến sự khởi tạo và nhân nhanh mô sẹo cũng như sự sinh trưởng, phát triển và tích lũy hoạt chất saponin trong cây sâm Ngọc Linh nuôi cấy *in vitro*. Kết quả nghiên cứu này cho thấy ánh sáng xanh và đỏ kết hợp với tỉ lệ 50 : 50 thích hợp cho sự khởi tạo và nhân nhanh mô sẹo cây sâm Ngọc Linh nuôi cấy *in vitro*. Ánh sáng xanh và đỏ kết hợp với tỉ lệ 50 : 50 có thể được sử dụng trong giai đoạn đầu cho quá trình sinh trưởng của cây sâm Ngọc Linh nuôi cấy *in vitro*, trong khi đó ánh sáng huỳnh quang được sử dụng trong giai đoạn sau nhằm gia tăng sự tích lũy saponin.

Lời cảm ơn. Các tác giả xin chân thành cảm ơn Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã hỗ trợ kinh phí để thực hiện đề tài nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Abdullahil Baque M., Yun-Kyong S., Elshmari T., Eun-Jung L., and Paek K. Y. - Effect of light quality, sucrose and coconut water concentration on the microporpagation of Calanthe hybrids ('Bukduseong' × 'Hyesung' and 'Chunkwang' × 'Hyesung'), Aust. J. Crop Sci. **5** (10) (2010) 1247-1254.
2. Appelgren M. - Effects of light quality on stem elongation of Pelargonium in vitro, Sci. Hort. **45** (1991) 345-351.
3. Dewir Y. H., Chakrabarty D., Hahn E. J., and Paek K. Y. - Flowering of Euphorbia millii plantlets in vitro as affected by paclobutrazol, light emitting diodes (LEDs) and sucrose, Acta. Hort. **764** (2007) 169-173.
4. Duncan D. B. - Multiple range and multiple F tests, Biometrics **11** (1955) 1-42.
5. George E. F., Hall M. A., and De Klerk G. J. - Plant propagation by tissue culture, Springer, Dordrecht, The Netherlands **1** (2008) 501.

6. Heo J. W., Lee C. W., Chakrabarty D., and Paek K. Y. - Growth responses of marigold and salvia bedding plants as affected by monochromic or mixture radiation provided by a light emitting diode (LED), *Plant Growth Regul.* **38** (2002) 225-230.
7. Jao R. C., and Fang W. - Effects of frequency and duty ratio on the growth of potato plantlets in vitro using light-emitting diodes, *HortScience* **39** (2004) 375-379.
8. Jao R. C., Lai C. C., Fang W., and Chang S. F. - Effects of red light on the growth of *Zantedeschia* plantlets in vitro and tuber formation using light-emitting diodes, *HortScience* **40** (2005) 436-438.
9. Kim S. J., Hahn E. J., Heo J. W., and Paek K. Y. - Effects of LEDs on net photosynthetic rate, growth and leaf stomata of *Chrysanthemum* plantlets in vitro, *Sci. Hort.* **101** (2004) 143-151.
10. Krewzaler F., and Hahlbrock K. - Flavonoid glycosides from illuminated cell suspension cultures of *Petroselinum hortense*, *Phytochemistry* **12** (1973) 1149-1152.
11. Li H., Xu Z., and Tang C. - Effect of light-emitting diodes on growth and morphogenesis of upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) plantlets in vitro, *Plant Cell. Tiss. Organ Cult.* **103** (2010) 155-163.
12. Lian M. L., Murthy H. N., and Paek K. Y. - Effect of light emitting diodes (LEDs) on the in vitro induction and growth of bulblets of *Lilium oriental* hybrid 'Pesaro', *Sci. Hort.* **94** (2002) 365-370.
13. Liu C. Z., Guo C., Wang Y. C., and Ouynag F. - Effect of light irradiation on hairy root growth and artemisinin biosynthesis of *Artemisia annua* L. process, *Biochemistry* **38** (2002) 581-585.
14. Liu M., Xu Z., and Yang Y. - Effects of different spectral lights on *Oncidium* PLBs induction, proliferation, and plant regeneration, *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* **106** (2011) 1-10.
15. Miyashita Y., Kitaya Y., Kozai T., and Kimura T. - Effects of red and far-red light on the growth and morphology of potato plantlets in vitro: using light emitting diode as a light source for micropropagation, *Acta. Hort.* **393** (1995) 189-194.
16. Moon H. K., Park S. Y., Kim Y. W., and Kim C. S. - Growth of *Tsuru-rindo* (*Tripterospermum japonicum*) cultured in vitro under various sources of light-emitting diodes (LED) irradiation, *J. Plant Biol.* **49** (2006) 174-179.
17. Mortensen L. M., and Stromme E. - Effects of light quality on some greenhouse crops, *Sci. Hort.* **33** (1987) 27-36.
18. Nguyễn Thượng Dong, Trần Công Luận, và Nguyễn Thị Thu Huống - *Sâm Việt Nam và một số cây thuốc họ Nhân sâm*, NXB. Khoa học và Kỹ thuật, 2007, tr. 109-110.
19. Nhut D. T., Hong L. T. A., Watanabe H., Goi M., and Tanaka M. - Efficiency of a novel culture system by using light-emitting diode (LED) on in vitro and subsequent growth of micropropagated banana plantlets, *Acta. Hort.* **616** (2003) 121-127.
20. Nhut D. T., Takamura T., Watanabe H., Okamoto K., and Tanaka M. - Responses of strawberry plantlets cultured in vitro under superbright red and blue light-emitting diodes (LEDs), *Plant Cell Tissue Org. Cult.* **73** (2003) 43-52.

21. Nhut D. T., Takamura T., Watanabe H., Okamoto K., and Tanaka M. - Artificial light source using light-emitting diodes (LEDs) in the efficient micropropagation of *Spathiphyllum* plantlets, *Acta. Hort.* **692** (2005) 137-142.
22. Okamoto K., Yanagi T., and Takita S. - Development of plant growth apparatus using blue and red as artificial light source, *Acta. Hort.* **40** (1996) 111-116.
23. Puspa R. P., Ikuo K., and Ryosuke M. - Effect of red-and blue-light emitting diodes on growth and morphogenesis of grapes, *Plant Cell Tissue Org. Cult.* **92** (2008) 147-153.
24. Saebo A., Krekling T., and Appelgren M. - Light quality affects photosynthesis and leaf anatomy of birch plantlets in vitro, *Plant Cell Tissue Org. Cult.* **41** (1995) 177-185.
25. Salisbury F. B., and Ross C. W. - *Plant physiology*. Wadsworth Publishing Company, Inc. Belmont, 1992.
26. Schenk R. U., and Hildebrandt A. C. - Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures, *Can. J. Bot.* **50** (1972) 199-204.
27. Schuerger A. C., Brown C. S., and Stryjewski E. C. - Anatomical features of pepper plants (*Capsium annuum* L.) grown under red light emitting diodes supplemented with blue or far-red light, *Ann. Bota.* **79** (1997) 273-282.
28. Tanaka M., Takamura T., Watanabe H., Endo M., Yanagi T., and Okamoto K. - In vitro growth of *Cymbidium* plantlets cultured under super bright red and blue light-emitting diodes (LEDs), *J. Hort. Sci. Biotechnol.* **73** (1998) 39-44.
29. Tibbitts T. W., Morgan D. C., and Warrington J. J. - Growth of lettuce, spinach, mustard and wheat plants under four combinations of light-pressure sodium, metal halide and tungsten halogen lamp at equal PPFD, *J. Am. Hort. Sci.* **108** (1983) 622-630.
30. Trần Công Luận - Kết quả nghiên cứu về hóa học sâm Việt Nam. Hội thảo bảo tồn và phát triển sâm Ngọc Linh tại tỉnh Quảng Nam, 2003, tr. 62-75.
31. Wongnok A., Piluek C., Techasilpitak T., and Tantivivat S. - Effects of light emitting diodes on micropropagation of *Phalaenopsis* orchids, *Acta. Hort.* **788** (2008) 149-156.
32. Yu K. W., Murthy H. N., Hahn E. J., and Paek K. Y. - Ginsenoside production by hairy root cultures of *Panax ginseng*: influence of temperature and light quality, *Bio. Eng. J.* **23** (1) (2005) 53-56.
33. Zhong J. J., Seki T., Kinoshita S., and Yoshida T. - Effect of light irradiation on anthocyanin production by suspended culture of *Perilla frutescens*, *Biotechnol. Bioeng.* **38** (1991) 653-658.

ABSTRACT

EFFECT OF LED-LIGHTS ON GROWTH AND SAPONIN ACCUMULATION OF CALLUS AND PLANTLETS OF *PANAX VIETNAMENSIS* HA ET GRUSHV. *IN VITRO*

Hoang Van Cuong¹, Nguyen Ba Nam¹, Tran Cong Luan^{2,*}, Bui The Vinh²,
Duong Tan Nhut^{1,*}

¹Tay Nguyen Institute of Biology, Vietnam Academy of Science and Technology, Da Lat city

²Research Center of Ginseng and Medicinal Material Ho Chi Minh city

*Email: duongtannhut@gmail.com, congluan53@gmail.com

In this study, callus and plantlets were cultured under six different lights: fluorescent lamp light (control), monochromatic blue LED (B), blue and red LED mixtures (B : R = 50 : 50, 30 : 70, 20 : 80) and monochromatic red LED (R) in order to investigate the effects of LED-lights on callus induction and proliferation, plantlet growth and saponin accumulation of *Panax vietnamensis* Ha et Grushv. *in vitro*. Fresh weight, dry weight of callus were greatest (0.274 and 0.030 g, respectively) when leaf explants were cultured under the B:R = 50 : 50 blue and red LED light. Moreover, the B : R = 50 : 50 blue and red LED light enhanced proliferation of callus with highest fresh weight and dry weight (0.748 and 0.064 g, respectively). Fresh weight, dry weight, stem length and leaf area were highest in plantlets cultured under the B:R = 50:50 blue and red LED light. HPLC analysis results showed that different light sources had variable effects on saponin accumulation of callus and plantlets of *Panax vietnamensis in vitro*. The fluorescent light enhanced saponin accumulation of plantlets with highest saponin (0.2422 % Rb₁ and 0.7081 % MR₂) content.

Keywords: accumulation, callus induction and proliferation, growth, light-emitting diodes (LEDs), *Panax vietnamensis* Ha et Grushv., saponin.