

**BỘ GIÁO DỤC  
VÀ ĐÀO TẠO**

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC  
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM**

**HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ**



**LÊ THỊ DIỄM**

**NGHIÊN CỨU  
ĐA BỘI HOÁ *IN VITRO* CÂY SÂM NGỌC LINH  
(*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.)**

**TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SINH LÝ HỌC THỰC VẬT**

**Mã số: 9 42 01 12**

**Hà Nội - 2023**

Công trình được hoàn thành tại: Học viện Khoa học và Công nghệ - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Người hướng dẫn khoa học:

Người hướng dẫn khoa học 1: GS.TS. Dương Tấn Nhựt, Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên

Người hướng dẫn khoa học 2: TS. Trần Quế, Viện Nghiên cứu Hạt nhân

Phản biện 1: GS.TS. Đỗ Năng Vịnh

Phản biện 2: PGS.TS. Trịnh Ngọc Nam

Phản biện 3: PGS.TS. Nguyễn Du Sanh

Luận án sẽ được bảo vệ trước Hội đồng đánh giá luận án tiến sĩ cấp Học viện, họp tại Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam vào hồi ..... giờ ....., ngày ..... tháng ... năm 2023

Có thể tìm hiểu luận án tại:

- Thư viện Học viện Khoa học và Công nghệ
- Thư viện Quốc gia Việt Nam

## MỞ ĐẦU

Ngày nay, nhu cầu về cây dược liệu ngày càng tăng, phương pháp nhân giống truyền thống thường phụ thuộc vào môi trường, dễ bị ảnh hưởng của nhiều tác động sinh học và phi sinh học bất lợi, cũng như hàm lượng hợp chất thứ cấp thấp khi thu hoạch không đáp ứng đủ nhu cầu về cả số lượng và chất lượng. Trong bối cảnh này, việc phát triển các cá thể đa bội nhân tạo sẽ là một cách tiếp cận tiềm năng nhằm tăng sức sống và hàm lượng hợp chất thứ cấp.

Sâm Ngọc Linh là một loài sâm đặc hữu của Việt Nam, tên khoa học là *Panax vietnamensis* Ha et Grushv. Nhóm chất có tác dụng quyết định đến tác dụng dược lý của loài sâm này là các saponin mà đại diện chính là MR<sub>2</sub>, G-Rb<sub>1</sub> và G-Rg<sub>1</sub>. Hơn nữa, loài sâm này có hàm lượng saponin khung dammaran cao nhất và lượng saponin triterpen nhiều nhất so với các loài khác của chi *Panax* trên thế giới. Tuy nhiên, cây sâm Ngọc Linh có thời gian nuôi trồng kéo dài từ 6 đến 7 năm. Hơn nữa, cây sâm Ngọc Linh lưỡng bội sinh trưởng rất chậm trọng lượng thấp nên không đáp ứng được nhu cầu.

Hiện nay, một trong những chiến lược nhân giống để cải thiện các đặc tính có giá trị của thực vật là gây đột biến đa bội nhân tạo. Gần đây, có nhiều nghiên cứu tạo thể đột biến đa bội trên đối tượng cây dược liệu cho thấy cây dược liệu có toàn bộ bộ nhiễm sắc thể nhân đôi, hàm lượng có dược tính cao hơn mong muốn. Do đó, sự nhân đôi nhiễm sắc thể nhân tạo ở cây dược liệu có thể đem lại những kết quả kinh tế đáng kể. Bằng kỹ thuật tạo đột biến sử dụng kỹ thuật xử lý gây đột biến đa bội bằng tác nhân hóa học là colchicine, oryzalin. Đây là một hướng nghiên cứu mới trên đối tượng cây sâm Ngọc Linh tại Việt Nam, có ý nghĩa trong việc tạo nền tảng cho nghiên cứu đột biến và đột biến thể đa bội trên nhiều đối tượng cây dược liệu quý vốn đang còn khá hạn chế. Bên cạnh đó, nghiên cứu này cũng đặt cơ sở nền móng cho nghiên cứu sinh lý thực vật làm cơ sở cho các nghiên cứu sâu hơn về chọn

giống, lai tạo giống ở cấp độ tế bào và nhân giống vô tính cây đa bội sâm Ngọc Linh tại Việt Nam.

Chính vì vậy, đề tài “**Nghiên cứu đa bội hóa *in vitro* cây sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.)**” được tiến hành với mục đích tạo các thể đa bội cũng như thu được số lượng lớn cây con đa bội với những đặc tính mong muốn như: Sức sống cao, sinh trưởng và phát triển tốt, từ đó góp phần cải thiện và làm phong phú thêm nguồn cây giống dược liệu quý tại Việt Nam.

**Mục tiêu nghiên cứu của luận án:** Xác định được nguồn vật liệu tối ưu cảm ứng phôi soma thông qua kỹ thuật nuôi cấy mô tế bào thực vật. Xác định được tác nhân đa bội và tỉ lệ đa bội hiệu quả. Tạo được cây đa bội sâm Ngọc Linh bằng tác nhân bằng tác nhân hóa học.

**Các nội dung nghiên cứu chính của luận án:** Cảm ứng phôi soma từ các nguồn vật liệu khác nhau của cây đa bội sâm Ngọc Linh. Xác định được tác nhân đa bội, tạo được cây đa bội sâm Ngọc Linh.

**Những đóng góp mới của luận án:** (1) Nghiên cứu đã đánh giá được khả năng phát sinh phôi của sâm Ngọc Linh từ các nguồn mẫu cấy khác nhau, đặc biệt là khả năng phát sinh phôi thứ cấp từ nhiều dạng phôi sơ cấp ban đầu. (2) Đã xây dựng thành công quy trình tạo cây sâm Ngọc Linh tứ bội thông qua phát sinh phôi vô tính dưới tác động của colchicine.

**Cấu trúc của luận án:** Luận án bao gồm 5 phần chính: Phần Mở đầu, Chương 1: *Tổng quan*, Chương 2: *Vật liệu, nội dung và phương pháp nghiên cứu*; Chương 3: *Kết quả và thảo luận* và phần *Kết luận và kiến nghị*.

## CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN

Sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis*) là một loài sâm đặc hữu của Việt Nam, tên khoa học *Panax vietnamensis* Ha et Grushv., họ Nhân Sâm (Araliaceae). Sâm Ngọc Linh có hàm lượng saponin khung dammaran cao

nhất (khoảng 12-15%) và lượng saponin triterpen nhiều nhất so với các loài khác của chi *Panax* trên thế giới. Với những đặc điểm trên, sâm Ngọc Linh không chỉ là loài sâm quý của Việt Nam mà còn là một trong những loại sâm quý trên thế giới. Tuy nhiên, do việc khai thác quá mức nên loài cây này đã được đưa vào trong sách đỏ Việt Nam đang có nguy cơ tuyệt chủng. Do đó, cần thiết ứng dụng những kỹ thuật mới trong sản xuất. Trong đó, nuôi cấy mô là một kỹ thuật tiên tiến có thể ứng dụng nhân giống *in vitro* sâm Ngọc Linh, được cho là phương pháp hiệu quả nhất để bảo tồn và phát triển nguồn gen quý hiếm này.

Hơn 20 năm qua, cây sâm Ngọc Linh đã được nghiên cứu trên nhiều lĩnh vực khác nhau. Các nghiên cứu về nhân giống vô tính, kỹ thuật nuôi cấy lớp mỏng tế bào và các nghiên cứu về phát sinh phôi soma sâm Ngọc Linh cũng đã được thực hiện. Ngoài ra, một số lĩnh vực nghiên cứu khác trên sâm Ngọc Linh như: Nghiên cứu khả năng nảy mầm của hạt nhân tạo từ phôi vô tính sâm Ngọc Linh. Đánh giá sự ổn định di truyền cây sâm Ngọc Linh bằng chỉ thị RAPD; Chuyển gen tạo rễ tơ và khảo sát sinh trưởng của rễ tơ sâm Ngọc Linh; Nghiên cứu tích lũy và sản xuất hợp chất thứ cấp.

Cảm ứng đa bội hóa là một phương pháp tạo giống cây trồng có thể tạo ra các kiểu gen mới với các đặc tính hình thái, sinh lý và sinh hóa được cải thiện thông qua việc tác động đến hệ gen, kiểu hình, sinh lý và cơ quan chuyển hóa của cây. Tăng kích thước tế bào thực vật, mở rộng cơ quan, tăng sinh khối và sản xuất chất chuyển hóa thứ cấp là những kết quả điển hình của phương pháp cảm ứng đa bội nhân tạo. Đối với những loài cây dược liệu, sử dụng phương pháp đa bội hóa có thể thay đổi các thành phần hiện có trong cấu hình hóa học của chúng bằng cách thay đổi sự điều hòa tổng hợp các chất sinh hóa, thêm một số thành phần mới vào cấu trúc hóa học của chúng.

Tuy nhiên, các báo cáo nghiên cứu về sự đa bội trên sâm Ngọc Linh vẫn chưa được ghi nhận. Vì vậy, nghiên cứu đa bội hoá trên sâm Ngọc Linh mở ra một hướng nghiên cứu mới trên đối tượng này.

## **CHƯƠNG 2. VẬT LIỆU, NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

### **2.1. Vật liệu**

Nguồn vật liệu sử dụng là mẫu lá, cuống lá và rễ của cây sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) *in vitro* ba tháng tuổi (thể lưỡng bội  $2n = 24$ ). Các mẫu phôi ở các dạng hình cầu, hình tim và có lá mầm đồng nhất được tách từ cụm phôi. Thí nghiệm được tại Viện Nghiên cứu khoa học Tây Nguyên.

### **2.2. Nội dung và phương pháp nghiên cứu**

#### **2.2.1. Nội dung 1: Tối ưu hoá nguồn vật liệu phát sinh phôi soma từ cây sâm Ngọc Linh *in vitro***

Nghiên cứu ảnh hưởng của các nguồn mẫu cây khác: mảnh lá, cuống lá, rễ của cây *in vitro* và mẫu cây phôi ở các dạng hình cầu, hình tim, có lá mầm lên sự phát sinh phôi vô tính sâm Ngọc Linh.

**Thí nghiệm 1:** Khảo sát ảnh hưởng của 2,4-D và TDZ lên sự phát sinh phôi từ mảnh lá, cuống lá và rễ sâm Ngọc Linh

Mẫu lá, cuống lá, rễ được nuôi cấy trong môi trường MS chứa cố định 0,5 mg/L NAA + 30 g/L sucrose, bổ sung 2,4-D, TDZ đối chứng là môi trường MS không bổ sung 2,4-D và TDZ.

**Thí nghiệm 2:** Khảo sát ảnh hưởng của 2,4-D và TDZ lên sự phát sinh phôi thứ cấp từ phôi hình cầu, hình tim, phôi có lá mầm.

Phôi hình cầu, hình tim và có lá mầm từ cụm phôi được tách riêng từng phôi rời và nuôi cấy trong môi trường MS + 0,5 mg/L NAA + 30 g/L sucrose, có bổ sung riêng lẻ 2,4-D, TDZ, đối chứng là môi trường MS không bổ sung 2,4-D và TDZ.

**Thí nghiệm 3:** Khảo sát ảnh hưởng kết hợp của 2,4-D và TDZ lên sự phát sinh phôi từ nguồn mẫu có sự tái sinh phôi cao nhất trên môi trường bổ sung 2,4-D, TDZ riêng lẻ của sâm Ngọc Linh.

Mẫu cho số lượng hình thành phôi cao từ thí nghiệm 1, 2 được nuôi cấy trong MS + 0,5 mg/L NAA + 30 g/L sucrose, bổ sung 2,4-D kết hợp với TDZ.

### **2.2.2. Nội dung 2: Xử lý nguồn vật liệu tối ưu của sâm Ngọc Linh với các tác nhân đa bội colchicine và oryzalin**

Phôi sâm Ngọc Linh dạng hình cầu, đồng đều được xử lý trong môi trường MS lỏng có bổ sung colchicine (0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,5 và 0,7%), thay đổi theo thời gian (24, 36, 48 và 72 giờ). Sau đó, các phôi đã xử lý được chuyển sang môi trường phát sinh phôi đã khảo sát ở các thí nghiệm trước để theo dõi các biến dị. Các phôi không xử lý với colchicine được sử dụng làm đối chứng.

### **Thí nghiệm 5: Khảo sát ảnh hưởng của oryzalin lên sự phát sinh phôi thứ cấp của sâm Ngọc Linh**

Phôi sâm Ngọc Linh dạng hình cầu, đồng đều được xử lý trong môi trường MS lỏng có bổ sung oryzalin (0; 0,01; 0,02; 0,03; 0,05 và 0,07%), thay đổi theo thời gian (24, 36, 48 và 72 giờ). Sau đó, các phôi đã xử lý được chuyển sang môi trường phát sinh phôi đã khảo sát ở các thí nghiệm trước để theo dõi các biến dị.

### **2.2.3. Nội dung 3: Khảo sát sự sinh trưởng của các thể có biểu hiện biến dị và xác định độ bội**

**Thí nghiệm 6:** Khảo sát sự sinh trưởng và xác định mức độ đa bội của cây sâm Ngọc Linh từ các phôi thứ cấp phát sinh từ phôi đã xử lý tác nhân gây đột biến đa bội bằng colchicine.

Các phôi thứ cấp biến dị kiểu hình của cây sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) *in vitro* 8 tuần tuổi sau khi xử lý colchicine ở

giai đoạn trên được tách ra và nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung 8 g/L agar, 30 g/L đường sucrose. Sau 12 tuần, cây được theo dõi sự sinh trưởng, phát triển của cây theo thời gian.

**Thí nghiệm 7:** Khảo sát sự sinh trưởng của cây tứ bội trong điều kiện nuôi cấy *in vitro*

Sau khi xác định mức độ đa bội của cây con bằng cách đếm số lượng nhiễm sắc thể, các cây được xác định là thể tứ bội được tiếp tục nuôi cấy trong 32 tuần và ghi nhận các đặc điểm sinh trưởng, các cây con lưỡng bội được sử dụng làm đối chứng.

#### **2.2.4. Nội dung 4: Xác định độ ổn định của cây tứ bội thông qua các bước tái sinh**

**Thí nghiệm 8:** Nghiên cứu sự tái sinh phôi từ các bộ phận của cây tứ bội sâm Ngọc Linh trên môi trường sinh trưởng thích hợp

Nguồn vật liệu sử dụng trong thí nghiệm này là lá, cuống, thân rễ của cây sâm Ngọc Linh có đột biến tứ bội 32 tuần tuổi được nuôi cấy tái sinh phôi trên môi trường tái sinh phôi tối ưu của từng nguồn vật liệu. Đánh giá độ ổn định của cây tứ bội thông qua các phương pháp nhuộm NST, soi khí khổng, quan sát hình thái cây và các cơ quan của cây tứ bội, giải phẫu và quan sát cấu trúc giải phẫu.

**Thí nghiệm 9:** Khảo sát sự hình thành phôi thứ cấp từ phôi có nguồn gốc từ cây tứ bội qua 3 lần cấy chuyển trên môi trường sinh trưởng thích hợp

Phôi tái sinh có nguồn gốc từ các nguồn vật liệu ở thí nghiệm 8 được tiến hành nhân sinh khối. Các phôi được cấy chuyển 3 lần sau 30 ngày sinh trưởng, sau đó các phôi sẽ được trải lên môi trường MS để hình thành cây hoàn chỉnh. Các cây này sẽ được tiến hành đánh giá các biến dị về kiểu hình, mật độ khí khổng, chiều dài, chiều rộng khí khổng và đếm NST để xác định tỉ lệ cây tứ bội ổn định.

#### **2.2.5. Xác định các đột biến thông qua các phương pháp**



Phương pháp giải phẫu và quan sát giải phẫu hình thái thực vật, phương pháp nhuộm NST, phương pháp quan sát khí khổng

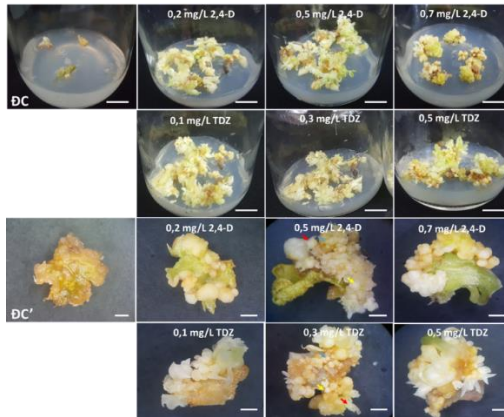
### 2.2.6. Phương pháp xử lý thống kê

Thí nghiệm bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 3 lần lặp lại. Số liệu được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel 2019, so sánh ANOVA 1 yếu tố với phép thử Duncan ( $p < 0,05$ ) (Duncan 1955) trên phần mềm SPSS 16.0.

## CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

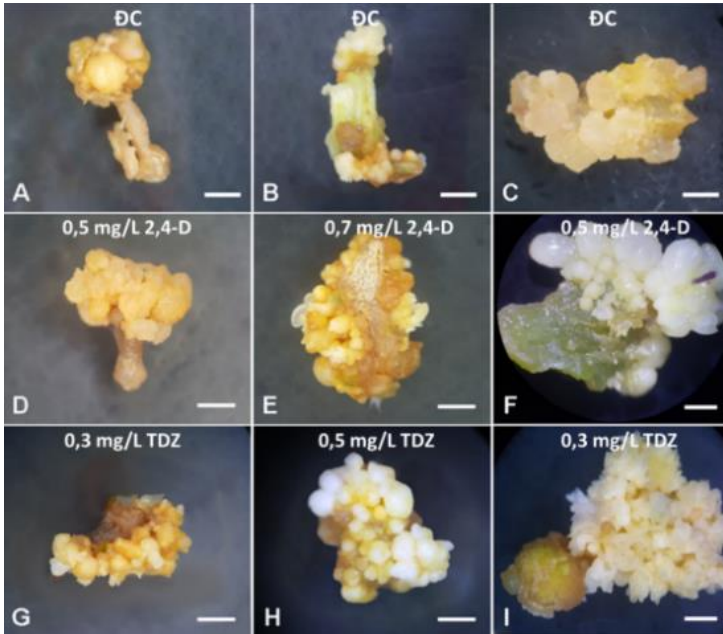
### 3.1. Nội dung 1: Tối ưu hoá nguồn vật liệu phát sinh phôi soma từ cây sâm Ngọc Linh *in vitro*

#### 3.1.1. Ảnh hưởng của 2,4-D và TDZ lên sự phát sinh hình thái từ mảnh lá, cuống lá và rễ sâm Ngọc Linh



**Hình 3.1.** Ảnh hưởng của 2,4-D và TDZ lên sự phát sinh phôi vô tính từ mẫu mảnh lá sâm Ngọc Linh sau 6 tuần nuôi cấy (thước 1 cm).

Số phôi trung bình không tỉ lệ thuận với nồng độ xử lý, số phôi cao nhất là môi trường bổ sung 0,5 mg/L 2,4-D tương ứng là 51 phôi nhưng sau đó giảm xuống 35,67 phôi khi tăng nồng độ 0,7 mg/L 2,4-D (Hình 3.1). Môi trường bổ sung TDZ, số phôi trung bình có sự khác nhau giữa các nghiệm thức, cao nhất trên môi trường bổ sung 0,3 mg/L TDZ tương ứng 48,33 phôi (Hình 3.1).

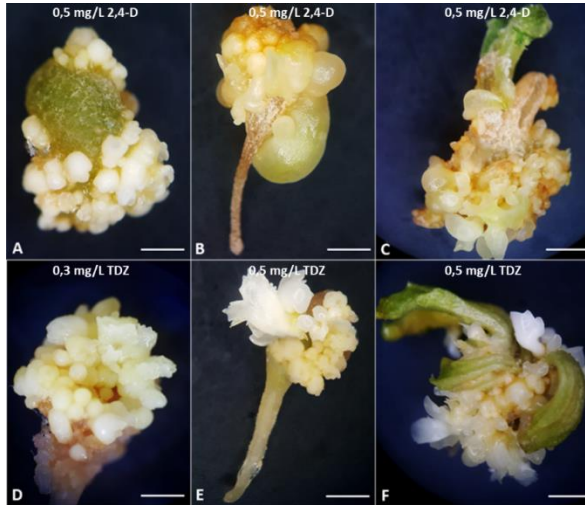


**Hình 3.4.** Ảnh hưởng của nồng độ 2,4-D và TDZ tối ưu lên sự phát sinh phôi từ mẫu rễ (**A, D, G**), cuống lá (**B, E, H**) và mảnh lá (**C, F, I**) của sâm Ngọc Linh sau 6 tuần nuôi cấy (thước 1 mm).

Số phôi trung bình trên mẫu cao nhất ghi nhận ở mẫu mảnh lá (51,00 phôi) trên môi trường bổ sung 0,5 mg/L 2,4-D, trên mẫu cuống lá (25,33 phôi) và mẫu rễ (17,67 phôi) (Hình 3.4).

### **3.1.2. Ảnh hưởng của 2,4-D và TDZ lên sự phát sinh phôi thứ cấp từ các dạng phôi của sâm Ngọc Linh**

Phát sinh phôi thứ cấp là quá trình phôi được hình thành từ phôi, mang lại những ưu điểm hơn so với phát sinh phôi sơ cấp như mức độ đồng đều cao và không phụ thuộc vào nguồn mẫu ban đầu. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành khảo sát sự hình thành phôi thứ cấp từ cả 3 dạng phôi, hình cầu, hình tim và phôi có lá mầm.



**Hình 3.8.** Ảnh hưởng của nồng độ 2,4-D và TDZ tối ưu lên sự phát sinh phôi thứ cấp từ các dạng phôi hình cầu (A, D), phôi hình tim (B, E) và phôi có lá mầm (C, F) sâm Ngọc Linh sau 6 tuần nuôi cấy (thước 1 mm).

Vậy, sau 6 tuần nuôi cấy, kết quả cho thấy, số phôi trung bình trên mẫu cao nhất được ghi nhận ở mẫu phôi hình cầu trên môi trường bổ sung 0,3 mg/L TDZ (68,33 phôi). Đối với môi trường bổ sung 2,4-D, nồng độ 0,5 mg/L cho số phôi hình thành trên mẫu phôi hình cầu, phôi hình tim và phôi có lá mầm đều tối ưu hơn các nồng độ khác 65,67 phôi, tương ứng (Hình 3.8).

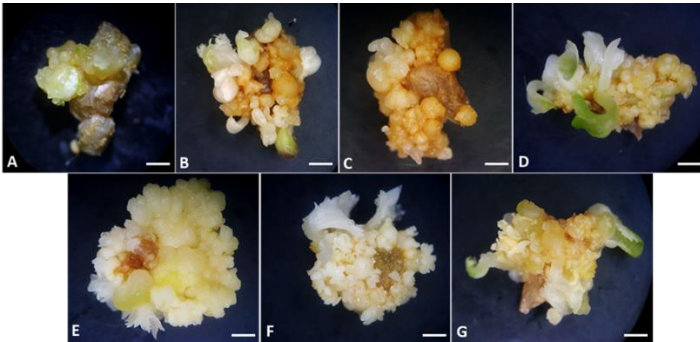
### **3.1.3. Ảnh hưởng của việc bổ sung kết hợp của 2,4-D và TDZ lên sự phát sinh phôi thứ cấp từ mẫu phôi hình cầu của sâm Ngọc Linh**

Mẫu phôi hình cầu được tiếp tục khảo sát sự phát sinh phôi dưới ảnh hưởng của sự kết hợp 2,4-D và TDZ. Kết quả cho thấy sự kết hợp 2,4-D và TDZ ở nồng độ thích hợp cho khả năng phát sinh phôi thứ cấp cao. Số lượng phôi hình thành cao nhất (73,33 phôi/mẫu) trên môi trường có bổ sung 0,7 mg/L 2,4-D và 0,1 mg/L TDZ (Bảng 3.3, Hình 3.12) và cao hơn so với bổ sung riêng lẻ 0,3 mg/L TDZ (67,00 phôi/mẫu). Trọng lượng tươi cụm phôi cao nhất ở nồng độ 0,7 mg/L 2,4-D và 0,1 mg/L TDZ (2,73 g) (Bảng 3.3).

**Bảng 3.3.** Ảnh hưởng kết hợp của 2,4-D và TDZ lên sự phát sinh SSE từ mẫu phôi hình cầu *in vitro* sau 6 tuần nuôi cấy.

Nồng độ 2,4-D (mg/L)	Nồng độ TDZ (mg/L)	Tỉ lệ cảm ứng mô sẹo (%)	Tỉ lệ cảm ứng phôi (%)	Số phôi trung bình (phôi/mẫu)	Trọng lượng tươi cụm phôi (g)	Mô tả
0	0	3,50 <sup>b*</sup>	39,67 <sup>b</sup>	4,67 <sup>e</sup>	0,32 <sup>e</sup>	
0	0,3	100,00 <sup>a</sup>	100,00 <sup>a</sup>	67,00 <sup>c</sup>	2,35 <sup>c</sup>	Hình thành nhiều dạng phôi
0,2	0,3	100,00 <sup>a</sup>	100,00 <sup>a</sup>	51,33 <sup>d</sup>	2,05 <sup>d</sup>	bao gồm phôi hình cầu, hình
0,5	0,3	100,00 <sup>a</sup>	100,00 <sup>a</sup>	55,67 <sup>d</sup>	2,62 <sup>bc</sup>	tim, phôi có lá
0,7	0,3	100,00 <sup>a</sup>	100,00 <sup>a</sup>	69,00 <sup>b</sup>	2,57 <sup>bc</sup>	mầm; phôi có
<b>0,7</b>	<b>0,1</b>	<b>100,00<sup>a</sup></b>	<b>100,00<sup>a</sup></b>	<b>73,33<sup>a</sup></b>	<b>2,73<sup>a</sup></b>	màu trắng sáng
0,7	0,5	100,00 <sup>a</sup>	100,00 <sup>a</sup>	69,33 <sup>b</sup>	2,62 <sup>bc</sup>	và màu xanh
0,7	0,7	100,00 <sup>a</sup>	100,00 <sup>a</sup>	59,67 <sup>cd</sup>	2,65 <sup>b</sup>	

\*Các chữ cái khác nhau (a, b,...) trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê tại  $p < 0,05$  (Phép thử Duncan).



**Hình 3.12.** Ảnh hưởng kết hợp của 2,4-D và TDZ lên sự phát sinh phôi thứ cấp từ phôi hình cầu của sâm Ngọc Linh (thước 1 mm). **A:** đối chứng. **B - D:** môi trường bổ sung 0,2; 0,5 và 0,7 mg/L 2,4-D kết hợp với 0,3 mg/L TDZ. **E - G:** môi trường bổ sung 0,1; 0,5 và 0,7 mg/L TDZ kết hợp với 0,7 mg/L 2,4-D, tương ứng.

### 3.2. Nội dung 2: Xử lý tạo đa bội trên sâm Ngọc Linh bằng colchicine và oryzalin

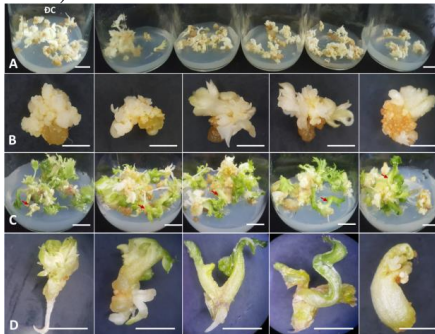
#### 3.2.1. Ảnh hưởng của colchicine lên sự phát sinh phôi thứ cấp

Các phôi sơ cấp hình cầu sâm Ngọc Linh được xử lý với colchicine. Kết quả ghi nhận tại (Bảng 3.2).

**Bảng 3.4.** Ảnh hưởng của colchicine đến sự cảm ứng SSE biến dị sau 4 tuần nuôi cấy.

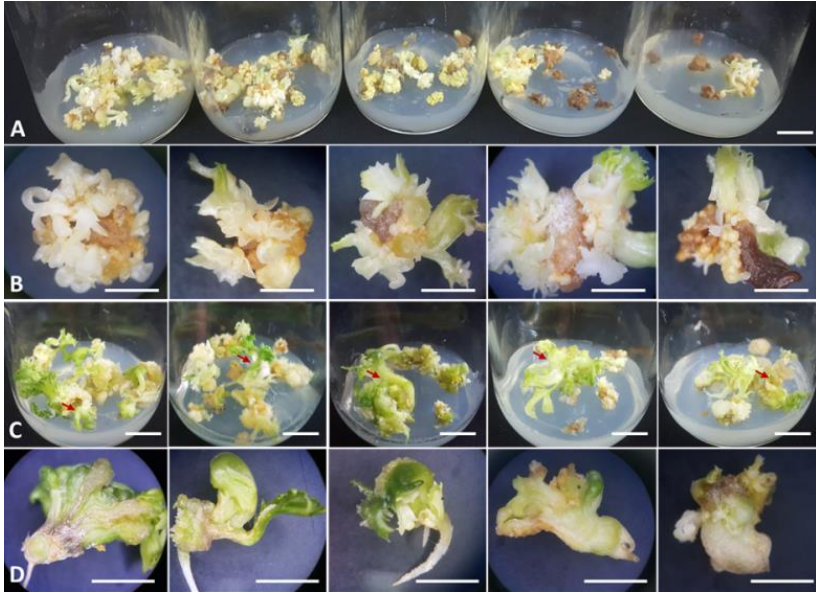
NT	Colchicine (%)	Thời gian xử lý (giờ)	Tỉ lệ sống (%)	Tỉ lệ phôi bất thường (%)	Số phôi thứ cấp (Phôi/mẫu)	
					Bình thường	Biến dị
1	0,0	0	100,00 <sup>a*</sup>	0,00 <sup>j</sup>	27,22 <sup>a</sup>	0,00 <sup>i</sup>
2	0,1	24	92,56 <sup>ab</sup>	4,86 <sup>ij</sup>	23,89 <sup>b</sup>	1,22 <sup>h</sup>
3	0,2		89,00 <sup>bcd</sup>	11,16 <sup>i</sup>	21,22 <sup>bc</sup>	2,67 <sup>g</sup>
4	0,3		86,11 <sup>bcd</sup>	12,50 <sup>ghi</sup>	21,00 <sup>bc</sup>	3,00 <sup>efg</sup>
5	0,5		88,45 <sup>bcd</sup>	23,50 <sup>fghi</sup>	17,89 <sup>cd</sup>	2,82 <sup>fg</sup>
6	0,7		82,11 <sup>cde</sup>	20,32 <sup>efgh</sup>	14,00 <sup>efgh</sup>	3,56 <sup>cd</sup>
7	0,1	36	90,33 <sup>bc</sup>	11,31 <sup>ghi</sup>	12,22 <sup>fgh</sup>	1,56 <sup>h</sup>
8	0,2		83,44 <sup>bcde</sup>	17,20 <sup>fgh</sup>	13,11 <sup>efgh</sup>	2,67 <sup>g</sup>
9	0,3		80,11 <sup>def</sup>	20,23 <sup>efgh</sup>	12,34 <sup>efgh</sup>	3,11 <sup>defg</sup>
10	0,5		75,22 <sup>efg</sup>	19,36 <sup>efgh</sup>	15,89 <sup>defg</sup>	3,78 <sup>bc</sup>
11	0,7		72,33 <sup>fgh</sup>	23,60 <sup>cdef</sup>	10,45 <sup>ghi</sup>	3,22 <sup>def</sup>
12	0,1	48	70,33 <sup>ghi</sup>	16,55 <sup>fgh</sup>	16,00 <sup>def</sup>	3,00 <sup>efg</sup>
13	0,2		57,78 <sup>jk</sup>	29,40 <sup>cde</sup>	10,45 <sup>ghi</sup>	4,22 <sup>b</sup>
14	0,3		62,45 <sup>ij</sup>	21,65 <sup>defg</sup>	12,44 <sup>efgh</sup>	3,44 <sup>cde</sup>
15	0,5		52,00 <sup>kl</sup>	29,52 <sup>cde</sup>	13,56 <sup>efgh</sup>	5,44 <sup>a</sup>
16	0,7		43,22 <sup>l</sup>	33,88 <sup>bc</sup>	8,11 <sup>i</sup>	5,11 <sup>ab</sup>
17	0,1	72	65,00 <sup>hij</sup>	18,93 <sup>efgh</sup>	16,89 <sup>de</sup>	3,89 <sup>bc</sup>
18	0,2		50,45 <sup>kl</sup>	21,99 <sup>defg</sup>	9,89 <sup>hi</sup>	2,78 <sup>fg</sup>
19	0,3		30,44 <sup>m</sup>	31,27 <sup>bcd</sup>	8,11 <sup>i</sup>	3,56 <sup>cd</sup>
20	0,5		32,33 <sup>m</sup>	42,08 <sup>ab</sup>	7,44 <sup>ij</sup>	4,89 <sup>ab</sup>
21	0,7		22,11 <sup>n</sup>	46,49 <sup>a</sup>	5,22 <sup>j</sup>	5,56 <sup>a</sup>

\*Các ký tự khác nhau (a, b, ...) trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở  $p < 0,05$  (Phương pháp Duncan).



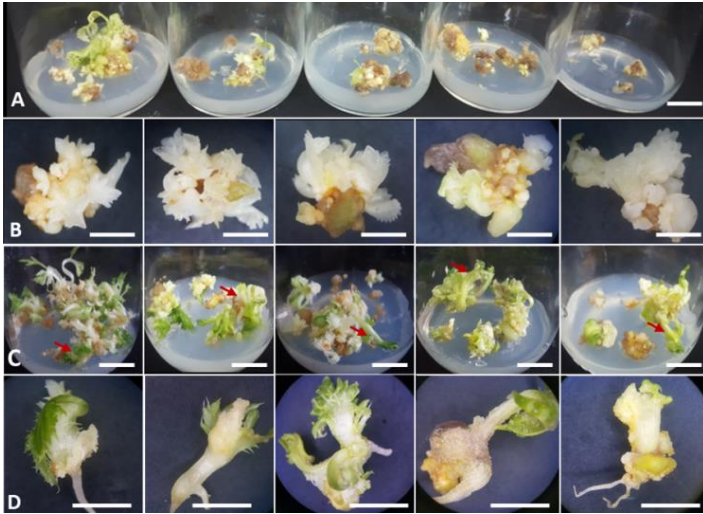
**Hình 3.15.** Sự phát sinh phôi thứ cấp biến dị từ phôi hình cầu của sâm Ngọc Linh dưới tác động của các nồng độ colchicine (0,1; 0,2; 0,3; 0,5; 0,7%) trong 24 giờ xử lý (tuông ứng từ trái sang phải). **A** và **B**: phôi thứ cấp hình thành sau 4 tuần nuôi cấy. **C** và **D**: Phôi thứ cấp hình thành sau 2 tháng nuôi cấy.

Xử lý 24 giờ, tỷ lệ sống của mẫu giảm từ 100% còn 82,11%. Ngược lại, tỉ lệ hình thành phôi đột biến là 4,86% tại nồng độ colchicine 0,1% và tăng lên 20,32% tại nồng độ colchicine 0,7% (Bảng 3.4, Hình 3.15).



**Hình 3.17.** Sự phát sinh phôi thứ cấp biến dị từ phôi hình cầu của sâm Ngọc Linh dưới tác động của các nồng độ colchicine (0,1; 0,2; 0,3; 0,5; 0,7%) trong 48 giờ xử lý (*tương ứng từ trái sang phải*). **B:** phôi thứ cấp hình thành sau 4 tuần nuôi cấy. **C và D:** Phôi thứ cấp hình thành sau 8 tuần nuôi cấy.

Xử lý lên 48 giờ, tỷ lệ mẫu sống giảm chỉ còn 43,22% tại nồng độ colchicine 0,7% (Bảng 3.4, Hình 3.18A, B). số phôi thứ cấp trung bình cũng giảm rất đáng kể so với các mốc thời gian xử lý ngắn hơn. Tại mốc thời gian này, số phôi thứ cấp có biểu hiện biến dị tăng khá cao và đạt cao nhất tại nghiệm thức xử lý 0,5% colchicine (5,44 phôi/mẫu cây) tương ứng tỷ lệ là 29,52 % (Bảng 3.4, Hình 3.17).



**Hình 3.18.** Sự phát sinh phôi thứ cấp bất thường từ phôi hình cầu của sâm Ngọc Linh dưới tác động của các nồng độ colchicine (0,1; 0,2; 0,3; 0,5; 0,7%) trong 72 giờ xử lý (*tương ứng từ trái sang phải*). **A** và **B**: phôi thứ cấp hình thành sau 1 tháng nuôi cấy. **C** và **D**: Phôi thứ cấp hình thành sau 2 tháng nuôi cấy.

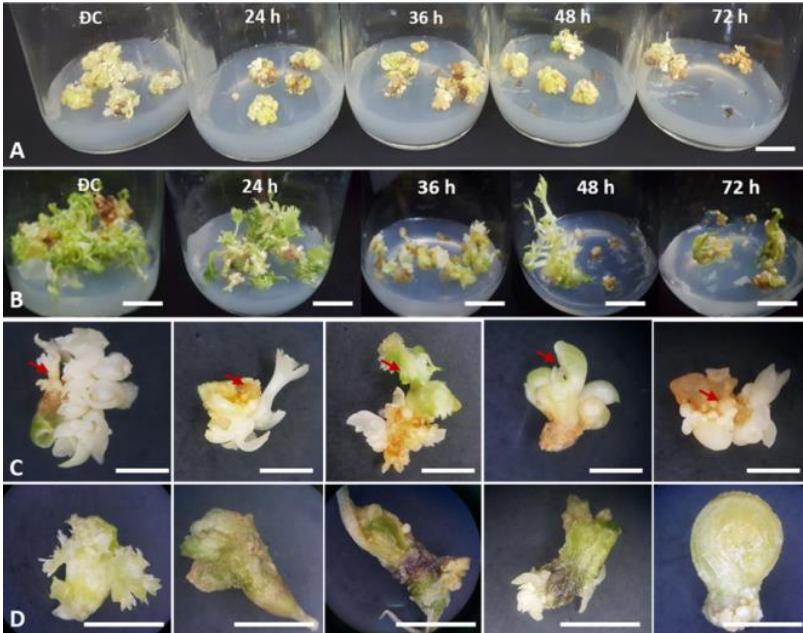
Tại mốc thời gian 72 giờ, tỷ lệ sống của các mẫu giảm và chỉ còn 22,11% tại nghiệm thức xử lý colchicine 0,7% (Bảng 3.4). Tuy nhiên, số phôi biến dị và tỷ lệ phôi biến dị của mẫu có sự gia tăng rất rõ rệt. Tỷ lệ phôi biến dị cao nhất là 46,49% tại colchicine 0,7%, số phôi biến dị tương ứng 5,56 phôi/mẫu (Hình 3.18).

### 3.2.2. Ảnh hưởng của oryzalin lên sự phát sinh phôi thứ cấp

Tỷ lệ sống thấp nhất được ghi nhận tại nồng độ oryzalin cao nhất 0,07% tại các mốc thời gian 24 giờ, 36 giờ, 48 giờ và 72 giờ (46,7; 40,0; 33,3 và 13,3%, tương ứng) (Bảng 3.5).

Tại mốc thời gian 24 giờ, nồng độ oryzalin thấp 0,01% số phôi thứ cấp tương đối cao (17,7 phôi/mẫu) nhưng tỷ lệ phôi thứ cấp đột biến thấp nhất (7,9%) và thấp hơn đáng kể ở nồng độ 0,07% (31,5%). Tại mốc 36 giờ, tỷ lệ phôi biến dị tăng khi tăng nồng độ oryzalin (15,7 - 31,6%). Nghiệm thức

0,07% oryzalin trong 48 giờ cho tỷ lệ phôi biến dị cao (38,3%). Xử lý với nồng độ 0,03 - 0,07% oryzalin trong 72 giờ cho số phôi thứ cấp thấp nhất (7,7 - 8,0 phôi/mẫu) và cho tỷ lệ phôi biến dị cao nhất (42,6 - 45,8%) (Bảng 3.5, Hình 3.20).



**Hình 3.20.** Ảnh hưởng của oryzalin lên sự phát sinh phôi thứ cấp biến dị từ phôi hình cầu của sâm Ngọc Linh tại các thời gian xử lý khác nhau (đối chứng, 24 giờ, 36 giờ, 48 giờ, 72 giờ, tương ứng từ trái sang phải). **A và C:** phôi thứ cấp hình thành sau 4 tuần nuôi cấy. **B và D:** Phôi thứ cấp hình thành sau 8 tuần nuôi cấy.

### 3.2.3 Sự sinh trưởng của cây từ các phôi thứ cấp phát sinh từ phôi được xử lý colchicine

Các phôi thứ cấp có biểu hiện biến dị (phát sinh từ các phôi đã xử lý colchicine) được chuyển sang môi trường MS chứa 8 g/L agar, 30 g/L sucrose. Sau 12 tuần nuôi cấy, sự sinh trưởng, phát triển của cây được ghi nhận và thể hiện trong bảng 3.6.



### 3.2.4. Một số đặc điểm hình thái và giải phẫu của cây con sau khi xử lý đa bội bằng colchicine

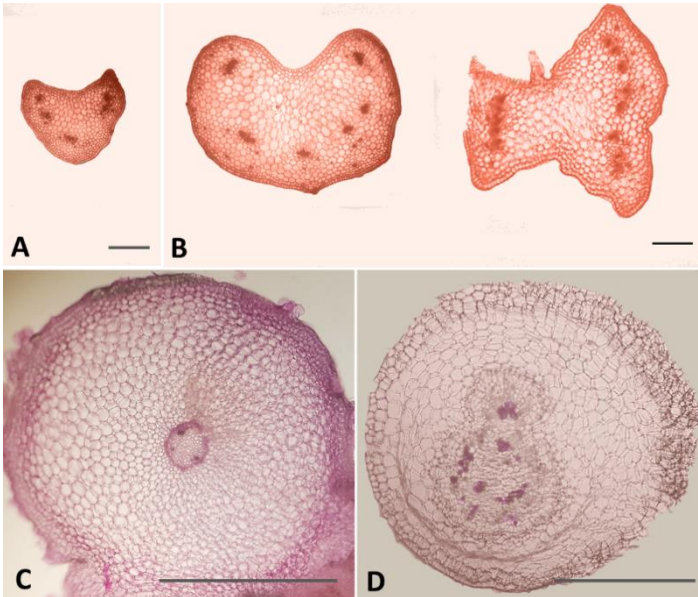
Các cây con bắt nguồn từ các phôi sau khi xử lý đa bội được quan sát và ghi nhận sự thay đổi về thay đổi về mặt hình thái (hình 3.22; 3.23), cấu trúc (Hình 3.24), đặc điểm khí khổng và đếm số lượng NST (Hình 3.25).



**Hình 3.22.** Đặc điểm kiểu hình của một số cây con sau khi xử lý đa bội bằng colchicine sau 12 tuần nuôi cấy (thước 2 cm).



**Hình 3.23.** Một số dạng lá biến dị của cây con bắt nguồn từ phôi được xử lý colchicine sau 12 tuần nuôi cấy (thước 1 cm)



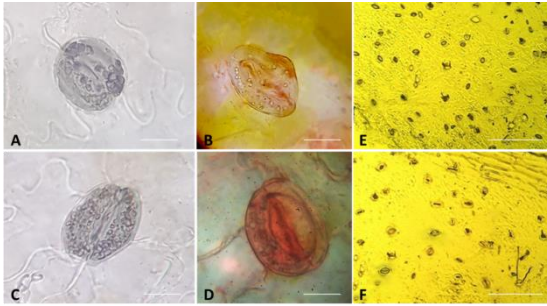
**Hình 3.24.** Hình thái giải phẫu của cuống lá và rễ cây sâm Ngọc Linh có kiểu hình biến dị. Mẫu cuống lá ở cây đối chứng (A) và cây biến dị kiểu hình (B) (thước 1 mm). Mẫu rễ ở cây đối chứng (C) và cây biến dị kiểu hình (D) (thước 0,2 mm).

**Bảng 3.7.** Khí khổng của các dạng biến dị sau xử lý colchicine, sau 12 tuần sinh trưởng

Cây	Mật độ khí khổng (Số $kk/mm^2$ )	Mật độ lục lạp (Số lục lạp/khí khổng)	Chiều dài khí khổng ( $\mu m$ )	Chiều rộng khí khổng ( $\mu m$ )
Đối chứng	125,7 <sup>a*</sup>	27,3 <sup>b</sup>	57,33 <sup>b</sup>	42,33 <sup>b</sup>
Biến dị	119,7 <sup>bc</sup>	29,5 <sup>ab</sup>	78,00 <sup>a</sup>	55,33 <sup>a</sup>

\*Các ký tự khác nhau (a, b,...) trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở  $p < 0,05$  (phép thử Duncan).

Chúng tôi tiến hành đánh giá khả năng đa bội của các dạng này dựa vào các chỉ tiêu về hình thái, kích thước và độ bội của cây bằng cách xác định các chỉ tiêu về khí khổng như: Mật độ khí khổng/cm<sup>2</sup>, mật độ lục lạp khí khổng/cm<sup>2</sup>, chiều dài khí khổng, chiều rộng khí khổng (Bảng 3.7, Hình 3.25).



**Hình 3.25.** Đặc điểm khí khổng ở lá cây sâm Ngọc Linh biến dị kiểu hình sau 12 tuần nuôi cấy từ phôi thứ cấp. Hình dạng khí khổng cây đối chứng (A, B) và cây biến dị kiểu hình (C, D) (thước 0,05 mm); Mật độ khí khổng cây đối chứng (E) và cây đa bội (F) (thước 0,1 mm).

Quan sát hình thái của nghiên cứu này cho thấy mật độ khí khổng của các dạng biến dị có thấp hơn cây đối chứng. Ngoài ra, quan sát trên kính hiển vi cho thấy có sự khác biệt khá rõ về số lượng lục lạp trong tế bào khí khổng lá cây biến dị và lá cây đối chứng. Số lượng lục lạp trong tế bào khí khổng lá cây biến dị cao hơn so với lá cây đối chứng (Hình 3.25). Trong đó, số lượng lục lạp trong tế bào khí khổng của cây tứ bội gần gấp đôi so với cây nhị bội.

### **3.3. Nội dung 3: Xác định mức độ đa bội của cây con sâm Ngọc Linh bắt nguồn từ phôi sơ cấp được xử lý với colchicine**

Đếm số lượng NST là phương pháp xác định mức độ đa bội đáng tin cậy và rõ ràng nhất. Trong nghiên cứu này, số lượng NST trong các đầu rễ của cây con có nguồn gốc từ phôi thứ cấp được đếm để xác định các thể đa bội (Hình 3.27). Kết quả cho thấy các thể tứ bội và thể hỗn bội đã hình thành dưới tác động của colchicine; tuy nhiên, tỷ lệ cảm ứng đa bội của cây con phụ thuộc đáng kể vào nồng độ và thời gian xử lý (Bảng 3.8).

Ở thời gian xử lý trong 24 giờ, các thể tứ bội bắt đầu được ghi nhận ở nồng độ xử lý 0,2% colchicine hoặc cao hơn. Đồng thời, cảm ứng tứ bội tăng dần khi tăng nồng độ xử lý. Ở nồng độ colchicine cao 0,5 - 0,7%, các thể hỗn bội được ghi nhận với tỷ lệ thấp (dưới 10%). Ở 36 giờ xử lý, xử lý 0,1 - 0,7%

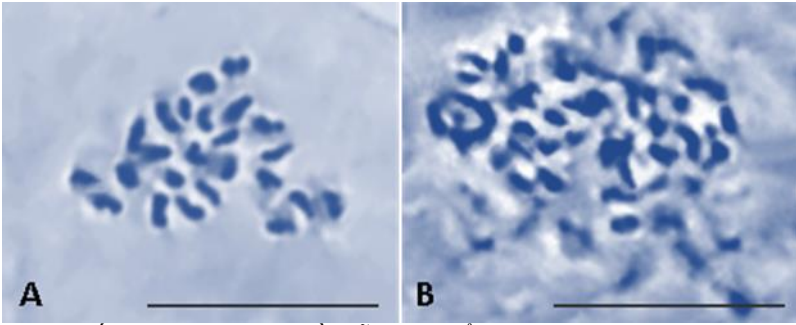
colchicine đều cho tỷ lệ tứ bội lớn hơn 10%, tỉ lệ tứ bội cao nhất được ghi nhận tại nồng độ 0,7% (22,22%). Bên cạnh đó, tỉ lệ cây hỗn bội tăng dần khi tăng nồng độ xử lý, tỉ lệ cây hỗn bội cao nhất được ghi nhận.

**Bảng 3.8.** Ảnh hưởng của nồng độ colchicine đến tỉ cảm ứng đa bội của sâm Ngọc Linh ở các thời gian xử lý khác nhau khác nhau.

Nghiem thức	Colchicine (%)	Thời gian xử lý (giờ)	Tỉ lệ cảm ứng đa bội (%)	
			Tứ bội	Tạp bội
1	0,0	0	0,00 <sup>f*</sup>	0,00 <sup>g</sup>
2	0,1		0,00 <sup>f</sup>	0,00 <sup>g</sup>
3	0,2		11,11 <sup>de</sup>	0,00 <sup>g</sup>
4	0,3	24	14,81 <sup>cd</sup>	0,00 <sup>g</sup>
5	0,5		18,52 <sup>bc</sup>	3,70 <sup>fg</sup>
6	0,7		18,52 <sup>bc</sup>	7,41 <sup>ef</sup>
7	0,1		14,81 <sup>cd</sup>	7,41 <sup>ef</sup>
8	0,2		18,52 <sup>bc</sup>	11,11 <sup>ef</sup>
9	0,3	36	18,52 <sup>bc</sup>	14,81 <sup>de</sup>
10	0,5		18,52 <sup>bc</sup>	22,22 <sup>cd</sup>
11	0,7		22,22 <sup>ab</sup>	25,92 <sup>c</sup>
12	0,1		18,52 <sup>bc</sup>	11,11 <sup>ef</sup>
13	0,2		22,22 <sup>ab</sup>	14,81 <sup>de</sup>
14	0,3	48	22,22 <sup>ab</sup>	22,22 <sup>cd</sup>
15	0,5		25,92 <sup>a</sup>	25,92 <sup>c</sup>
16	0,7		18,52 <sup>bc</sup>	29,63 <sup>c</sup>
17	0,1		11,11 <sup>de</sup>	22,22 <sup>cd</sup>
18	0,2		7,41 <sup>def</sup>	25,92 <sup>c</sup>
19	0,3	72	3,70 <sup>ef</sup>	40,74 <sup>b</sup>
20	0,5		3,70 <sup>ef</sup>	48,14 <sup>ab</sup>
21	0,7		3,70 <sup>ef</sup>	55,55 <sup>a</sup>

\*Các ký tự khác nhau (a, b,...) trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở  $p < 0,05$  (Phép thử Duncan).

Xử lý colchicine 0,2% - 0,5% trong 48 giờ cho hiệu quả cảm ứng cây tứ bội tối ưu (22,22% - 25,93%). Ở thời điểm 72 giờ, tỷ lệ cây tứ bội giảm mạnh khi tăng nồng độ colchicin từ 0,1% - 0,7% (từ 11,11% xuống 3,70%), ngược lại tỷ lệ cây hỗn bội hình thành tăng mạnh, cao nhất ở nồng độ từ 0,5% - 0,7% (48,15% và 55,56%).



**Hình 3.27.** Số lượng NST ở các đầu rễ thuộc thể lưỡng bội ( $2n = 24$ ) (A) và tứ bội ( $2n = 48$ ) (B) ở sâm Ngọc Linh sau 32 tuần nuôi cấy (Thước 5  $\mu\text{m}$ ).

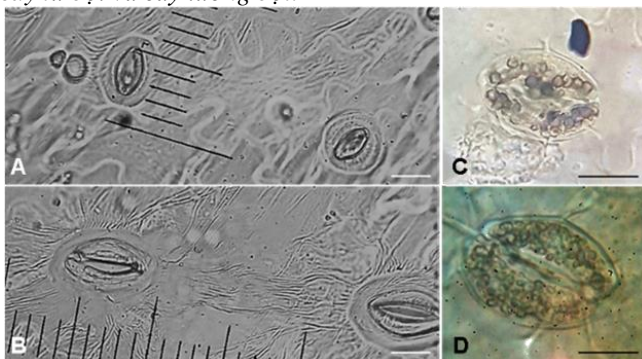
Trong nghiên cứu này, sâm Ngọc Linh tứ bội ( $2n = 48$ ) được tạo thành công từ phôi thứ cấp phát sinh từ phôi được xử lý bằng colchicine với tỉ lệ cảm ứng cao (25,92%). Đồng thời, các thể tạp bội cũng được ghi nhận trong quá trình xử lý đa bội với mẫu phôi sâm Ngọc Linh với tỷ lệ cao (Bảng 3.8).

Mặt khác, sự thay đổi đặc điểm của khí khổng được coi là một trong những dấu hiệu thường gặp ở thể đa bội. Theo kết quả xác định độ bội phía trên, các lá của cây tứ bội và cây lưỡng bội được thu nhận và quan sát đặc điểm của các khí khổng bằng kính hiển vi quang học. Kết quả cho thấy khí khổng ở lá của các thể tứ bội có hình trứng, nằm rải rác và có kích thước lớn hơn đối chứng. Chiều dài và chiều rộng của khí khổng ở lá tứ bội (75,46  $\mu\text{m}$  và 52,63  $\mu\text{m}$ ) lớn hơn đáng kể so với đối chứng (57,10  $\mu\text{m}$  và 42,03  $\mu\text{m}$ ) (Bảng 3.9, Hình 3.28A, B). Tuy nhiên, mật độ khí khổng của thể tứ bội (110,20 khí khổng/ $\text{mm}^2$ ) thấp hơn đối chứng (122,67 khí khổng/ $\text{mm}^2$ ) (Bảng 3.9). Ngoài ra, quan sát bằng kính hiển vi cho thấy sự khác biệt đáng kể về số lượng lục lạp trong khí khổng của lá tứ bội và lưỡng bội. Số lượng lục lạp trong khí khổng của lá tứ bội có mật độ cao hơn đối chứng (Hình 3.28 C, D).

**Bảng 3.9.** Đặc điểm khí khổng trên biểu bì lá của cây sâm Ngọc Linh tứ bội sau 3 tháng nuôi cây

Cây	Mẫu độ khí khổng ( $mm^2$ )	Chiều dài khí khổng ( $\mu m$ )	Chiều rộng khí khổng ( $\mu m$ )	Tỉ lệ khí khổng <sup>z</sup>	
				Chiều dài	Chiều rộng
Lưỡng bội	122,67 <sup>a*</sup>	57,10 <sup>b</sup>	42,03 <sup>b</sup>	1	1
Tứ bội	110,20 <sup>b</sup>	75,46 <sup>a</sup>	52,63 <sup>a</sup>	1,32	1,24

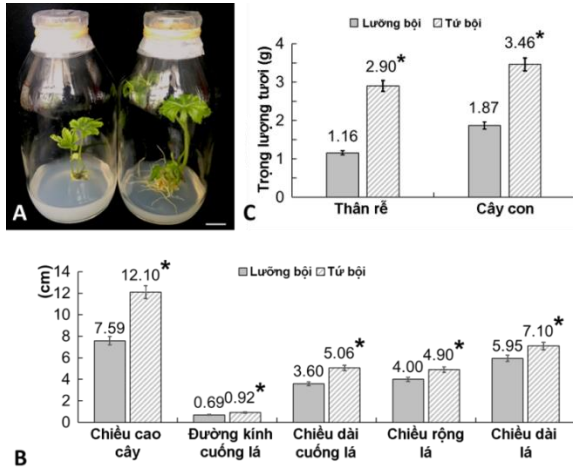
\*Các ký tự khác nhau (a, b, ...) trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở  $p < 0,05$  (Phép thử Duncan). <sup>Z</sup>Tỉ lệ giữa chiều dài (hoặc chiều rộng) khí khổng của cây tứ bội và cây lưỡng bội.



**Hình 3.28.** So sánh đặc điểm khí khổng của các thể lưỡng bội và tứ bội ở sâm Ngọc Linh sau 12 tuần nuôi cây. Hình dạng và kích thước của khí khổng ở thể lưỡng bội (A) và tứ bội (B). Mật độ lục lạp trên tế bào bảo vệ khí khổng của thể lưỡng bội (C) và tứ bội (D) (thước 20  $\mu m$ ).

### 3.4. Nội dung 4: Khảo sát sự sinh trưởng, khả năng tái sinh và tính ổn định của cây sâm Ngọc Linh tứ bội

Các cây tứ bội có những thay đổi đáng kể về một số đặc điểm hình thái so với cây con lưỡng bội sau 32 tuần nuôi cấy, chiều cao cây con cao nhất (12,10 cm), cao hơn đáng kể so với cây con lưỡng bội (7,59 cm). Lá cây con tứ bội phát triển tốt về đường kính cuống lá, chiều dài cuống lá, chiều rộng lá, chiều dài lá. Ngoài ra, khối lượng tươi thân rễ và khối lượng tươi cây con lớn hơn đáng kể (tương ứng là 40,00% và 54,01%) so với các thể lưỡng bội (Hình 3.29 và 3.30).



**Hình 3.29.** So sánh một số đặc điểm hình thái giữa thể lưỡng bội và thể tứ bội của sâm Ngọc Linh sau 32 tuần nuôi cấy. **A:** cây con trong ống nghiệm lưỡng bội (trái) và tứ bội (phải) (thước 1 cm). **B** và **C:** thống kê một số đặc điểm sinh trưởng của cây con lưỡng bội và tứ bội (\* $p < 0,05$ ).



**Hình 3.30.** Cây sâm Ngọc Linh *in vitro* thể lưỡng bội (**A**) và thể tứ bội (**B - D**) sau 32 tuần nuôi cấy (thước 1cm).

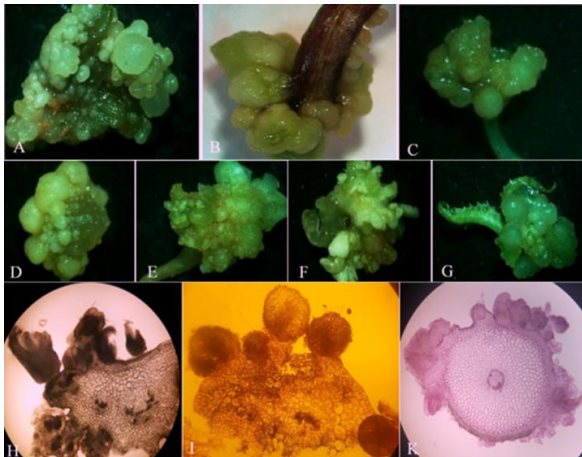
Các mẫu cây cấy tứ bội cho kết quả tái sinh tốt trên môi trường thích hợp. Mẫu mảnh lá, số phôi trung bình trung bình (42 phôi/mẫu) không khác biệt so với mảnh lá cây đối chứng lưỡng bội (41,7 phôi/mẫu). Tương tự, mẫu cấy là cuống lá, rễ cũng có số phôi hình thành cao, tương ứng là 35 phôi/mẫu đối với mẫu cuống lá và 25,3 phôi/mẫu đối với mẫu rễ (Bảng 3.10, Hình 3.31).

**Bảng 3.10.** Sự tái sinh phôi từ các bộ phận của cây tứ bội của Sâm Ngọc Linh trên môi trường sinh trưởng thích hợp

Mẫu	Tỷ lệ cảm ứng phôi(%)	Số phôi (phôi/mẫu)	Trọng lượng tươi (g)		
			Lần 1	Lần 2	Lần 3
ĐC	100	41,7 <sup>a*</sup>	2,02 <sup>b</sup>	2,09 <sup>b</sup>	2,14 <sup>b</sup>
Lá	100	42,0 <sup>a</sup>	2,99 <sup>a</sup>	2,82 <sup>a</sup>	2,72 <sup>a</sup>
Cuống lá	100	35,0 <sup>ab</sup>	2,04 <sup>b</sup>	2,21 <sup>b</sup>	2,14 <sup>b</sup>
Rễ	100	25,3 <sup>b</sup>	1,25 <sup>c</sup>	1,25 <sup>c</sup>	1,37 <sup>c</sup>

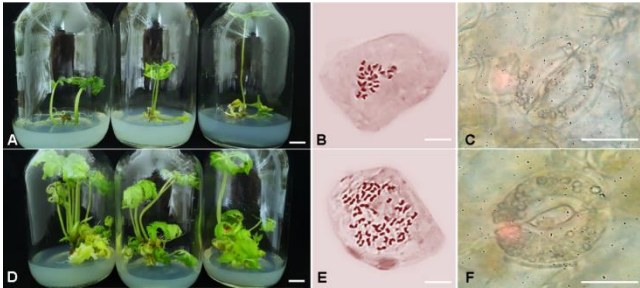
\*Các ký tự khác nhau (a, b,...) trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở  $p < 0,05$  (phép thử Duncan).

Các phôi được tiến hành nhân sinh khối trên môi trường tối ưu cho việc tạo phôi thứ cấp, sau 3 lần cấy chuyển, phôi vẫn có sự hình thành tốt. Do đó, sự hình thành phôi thứ cấp của phôi có nguồn gốc từ phôi của cây tứ bội có sự sinh trưởng khá mạnh và có sự ổn định. Đồng thời, các cây tứ bội phát triển từ các phôi thứ cấp (phôi tái sinh ở lần cấy chuyển thứ 3) trên môi trường MS cho thấy độ ổn định về kiểu hình và độ bội sau 32 tuần nuôi cấy (Hình 3.32).



**Hình 3.31.** Sự tái sinh phôi của cây sâm Ngọc Linh tứ bội từ các nguồn vật liệu khác nhau. **A, B, C:** Phôi phát sinh từ lá, cuống, rễ. **D, E, F, G:** Sự tái sinh phôi thứ cấp từ các dạng phôi của cây tứ bội của Ngọc Linh. **H, I, K:** Hình thái giải phẫu sự phát sinh phôi từ các mẫu cây cuống lá, mảnh lá và rễ của cây sâm Ngọc Linh tứ bội.





**Hình 3.32.** Cây *in vitro*, số lượng NST và khí không của của cây sâm Ngọc Linh thể lưỡng bội (A, B, C) và thể tứ bội (D, E, F) sau 32 tuần nuôi cấy.

## KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

### KẾT LUẬN

**Kết luận 1:** Tối ưu hoá nguồn vật liệu phát sinh phôi soma từ cây sâm Ngọc Linh *in vitro*

Tối ưu hóa nguồn vật liệu cho sự phát sinh phôi soma và sự phát sinh phôi thứ cấp thành công. Trong ba nguồn vật liệu: mảnh lá, cuống lá và rễ, sự phát sinh phôi soma tốt nhất là mẫu mảnh lá trên môi trường MS có 0,5 mg/L NAA và bổ sung 0,5 mg/L 2,4-D. Đối với vật liệu từ phôi soma, hiệu quả phát sinh phôi cao hơn các nguồn vật liệu mảnh lá, cuống lá và rễ của cây *in vitro* 3 tháng tuổi. Trong đó, số lượng phôi phát sinh cao nhất ghi nhận ở mẫu phôi hình cầu được nuôi cấy trên môi trường MS có 0,5 mg/L NAA và bổ sung kết hợp 0,7 mg/L 2,4-D với 0,1 mg/L TDZ.

**Kết luận 2:** Xử lý tạo đa bội trên sâm Ngọc Linh bằng colchicine và oryzalin

Phôi hình cầu cho sự phát sinh phôi biến dị ở tất cả các nồng độ và thời gian thí nghiệm. Thời gian xử lý mẫu càng lâu kết hợp với nồng độ cao thì khả năng cho số lượng phôi biến dị là càng lớn. Số phôi biến dị hình thành cao nhất khi xử lý colchicine với nồng độ 0,5% - 0,7% trong 48 giờ. Hơn nữa, xử lý colchicine nồng độ 0,7% trong 72 giờ tác động sâu sắc nhất đến phôi thứ cấp và các phôi đó hầu như bất thường.

**Kết luận 3:** Xác định mức độ đa bội của cây con sâm Ngọc Linh bắt nguồn từ phôi sơ cấp được xử lý với colchicine.

Xử lý colchicine, tăng nồng độ và thời gian colchicine làm giảm tỷ lệ sống của mẫu và số lượng phôi thứ cấp nhưng làm tăng tỷ lệ hình thành phôi thứ cấp đột biến, nồng độ colchicine ở 0,3% đến 0,5% trong 48 giờ cho tỷ lệ tứ bội cao (22,22 - 25,92%). Kết quả cũng cho thấy thể tứ bội ( $2n = 48$ ) có kích thước khí khổng lớn hơn, mật độ khí khổng thấp hơn, mật độ lục lạp trong khí khổng dày hơn, sinh trưởng tốt hơn so với thể lưỡng bội ( $2n = 24$ ).

**Kết luận 4:** Khảo sát sự sinh trưởng, khả năng tái sinh và tính ổn định của cây sâm Ngọc Linh tứ bội.

Cây sâm Ngọc Linh tứ bội cho các chỉ số sinh trưởng cao hơn đáng kể so với cây tứ bội. Các bộ phận của cây tứ bội được tiếp tục nuôi cấy để khảo sát sự tái sinh phôi trên môi trường phát sinh phôi thích hợp thích hợp. Kết quả cho thấy các mẫu cấy có nguồn gốc từ cây tứ bội tái sinh ổn định và cây sinh trưởng từ phôi vẫn mang tính chất đặt trưng của cây tứ bội thông qua các phương pháp kiểm định.

## **KIẾN NGHỊ**

- Tiếp tục tiến hành xử lý tạo đa bội với các nồng độ và thời gian xử lý colchicine và oryzalin khác nhau hoặc với chất chống phân bào khác để tối ưu hoá tỉ lệ cảm ứng cây đa bội.

- Đánh giá và kiểm tra các đặc điểm kiểu hình và tính ổn định di truyền của các cây tạp bội hình thành.

**DANH MỤC CÁC BÀI BÁO ĐÃ XUẤT BẢN  
LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN**

1. **Lê Thị Diễm**, Trương Hoài Phong, Hoàng Thanh Tùng, Hoàng Đắc Khải, Vũ Quốc Luận, Đỗ Mạnh Cường, Nguyễn Thị Như Mai, Trịnh Thị Hương, Bùi Văn Thế Vinh, Dương Tấn Nhựt, So sánh hiệu quả phát sinh phôi vô tính từ các nguồn mẫu *in vitro* của cây sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.). Tạp chí Khoa học và Công nghệ - Bản B, **2022** (chấp nhận đăng).

2. **Le Thi Diem**, Trương Hoài Phong, Hoàng Thanh Tùng, Hoàng Đắc Khải, Trương Thị Lan Anh, Nguyễn Thị Như Mai, Đỗ Mạnh Cường, Vũ Quốc Luận, Trần Que, Hoàng Thị Như Phương, Bùi Văn Thế Vinh, Dương Tấn Nhựt, Tetraploid induction through somatic embryogenesis in *Panax vietnamensis* Ha et Grushv. by colchicine treatment. Scientia Horticulturae, **2022**, 303, 111254.