

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 ĐIỂM

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

LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC

Hà Nội - 2023

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 ĐIỂM

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

LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC

Chuyên ngành: Sinh lý học thực vật

Mã số chuyên ngành: 9 42 01 12

**Xác nhận của Học viện
Khoa học và Công nghệ**

Thầy hướng dẫn 1

Thầy hướng dẫn 2

A handwritten signature in blue ink, appearing to be "D.T.N.", written over a horizontal line.

GS.TS. Dương Tấn Nhựt

A handwritten signature in blue ink, appearing to be "Tran Qu", written in a cursive style.

TS. Trần Quế

Hà Nội - 2023

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của tôi. Các kết quả được trình bày trong luận án là khách quan, trung thực và chưa từng được công bố trong bất kỳ công trình nào khác. Nếu có gì sai sót tôi xin chịu hoàn toàn trách nhiệm.

Hà Nội, ngày tháng năm 2023
Tác giả luận án



Lê Thị Diễm

LỜI CẢM ƠN

Trong suốt quá trình học tập, nghiên cứu và thực hiện luận án tiến sĩ, tôi đã nhận được rất nhiều sự quan tâm, giúp đỡ rất tận tình từ Quý Thầy Cô, các anh chị, gia đình và bạn bè.

Đầu tiên, tôi xin biết ơn sâu sắc nhất đến Thầy GS.TS. Dương Tân Nhựt. Thầy đã tận tình hướng dẫn, định hướng, hết lòng sửa chữa những sai sót trong bài báo và các chuyên đề cũng như luận án. Thầy đã tạo mọi điều kiện thuận lợi nhất để tôi có thể hoàn thành tốt đề tài nghiên cứu của mình.

Tôi xin gửi lời cảm ơn đến Thầy TS. Trần Quế đã giải đáp những thắc mắc và cho những góp ý thiết thực giúp tôi hoàn thành luận án này.

Tôi xin gửi lời cảm ơn đến Ban lãnh đạo Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã tạo điều kiện thuận lợi trong toàn thời gian tôi thực hiện luận án.

Lời cảm ơn chân thành xin được gửi đến Ban lãnh đạo Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên đã tạo mọi điều kiện thuận lợi để tôi thực hiện đề tài luận án.

Tôi xin gửi lời cảm ơn đến các cán bộ phòng Sinh học Phân tử và Chọn tạo giống cây trồng cùng các nghiên cứu sinh và các bạn sinh viên đã hết lòng giúp đỡ, đồng viên tôi hoàn thành luận án.

Cuối cùng, luận án này sẽ không được hoàn thành nếu không có sự cảm thông của gia đình, người thân và bạn bè đã luôn sát cánh đồng viên và chăm sóc gia đình trong thời gian tôi vắng nhà theo đuổi con đường khoa học.

Hà Nội, ngày tháng năm 2023

Tác giả luận án



Lê Thị Diễm

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN	ii
LỜI CẢM ƠN	ii
MỤC LỤC.....	iii
DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT.....	vi
DANH MỤC BẢNG.....	viii
DANH MỤC HÌNH	ix
MỞ ĐẦU	1
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU	4
1.1. Sơ lược về cây sâm Ngọc Linh.....	4
1.1.1. Lịch sử phân loại.....	4
1.1.2. Phân loại	4
1.1.3. Đặc điểm hình thái	4
1.1.4. Sinh thái và phân bố.....	5
1.1.5. Thành phần hóa học	5
1.1.6. Những nghiên cứu trên sâm Ngọc Linh.....	6
1.2. Nuôi cấy <i>in vitro</i>	7
1.2.1. Giới thiệu	7
1.2.2. Cơ sở sinh học.....	8
1.2.3. Yêu cầu căn bản trong nuôi cấy mô thực vật.....	8
1.2.4. Ảnh hưởng của loại mẫu cây trong nuôi cấy <i>in vitro</i>	8
1.3. Phát sinh phôi soma (SE).....	9
1.3.1. Khái niệm.....	9
1.3.2. Vật liệu nuôi cấy trong phát sinh phôi soma	10
1.3.3. Con đường phát sinh phôi soma	11
1.3.4. Đặc tính hình thái của tế bào sinh phôi.....	11
1.3.5. Ảnh hưởng của các chất điều hòa sinh trưởng thực vật đến sự phát sinh phôi soma.....	14
1.4. Sự đa bội hóa ở thực vật	16
1.4.1. Khái niệm đa bội.....	16
1.4.2. Phân loại các dạng đa bội của thể đa bội	16
1.4.3. Cảm ứng đa bội nhân tạo	16
1.4.4. Ứng dụng đa bội trong nhân giống cây dược liệu	19
1.4.5. Ưu điểm của cây đa bội	20
1.4.6. Cải tiến giống cây trồng.....	22
1.4.7. Các tác nhân hóa học chính được sử dụng trong cảm ứng đa bội	26
1.4.8. Cơ chế hình thành thể đa bội	29

1.4.9.	Các yếu tố ảnh hưởng đến cảm ứng đa bội <i>in vitro</i>	30
1.4.10.	Chọn tạo những đột biến sau xử lý đa bội.....	35
1.4.11.	Các thành tựu về nghiên cứu đa bội trên thực vật.....	36
CHƯƠNG 2. VẬT LIỆU, NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....		39
2.1.	Vật liệu	39
2.1.1.	Vật liệu thực vật.....	39
2.1.2.	Thiết bị, dụng cụ và hóa chất.....	39
2.1.3.	Môi trường nuôi cấy	40
2.2.	Nội dung nghiên cứu	40
2.2.1.	Nội dung 1: Tối ưu hoá nguồn vật liệu phát sinh phôi từ cây sâm Ngọc Linh <i>in vitro</i>	42
2.2.2.	Nội dung 2: Xử lý tạo đa bội trên sâm Ngọc Linh bằng colchicine và oryzalin	42
2.2.3.	Nội dung 3: Xác định mức độ đa bội của cây con sâm Ngọc Linh sau xử lý đa bội	43
2.2.4.	Nội dung 4: Khảo sát khả năng sinh trưởng, tái sinh và tính ổn định của cây sâm Ngọc Linh đa bội.	43
2.3.	Phương pháp nghiên cứu	43
2.3.1.	Phương pháp bố trí thí nghiệm	43
2.3.2.	Nội dung 1: Tối ưu hoá nguồn vật liệu phát sinh phôi từ cây sâm Ngọc Linh <i>in vitro</i>	43
2.3.3.	Phương pháp giải phẫu và quan sát giải phẫu hình thái thực vật cây sâm Ngọc Linh	49
2.3.4.	Phương pháp nhuộm NST	49
2.3.5.	Phương pháp quan sát khí khổng.....	50
2.3.6.	Một số công thức tỷ lệ đối với một số chỉ tiêu thu nhận	50
2.3.7.	Điều kiện nuôi cấy	51
2.3.8.	Phương pháp xử lý thống kê	51
2.3.9.	Địa điểm và thời gian thực hiện luận án	51
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN		52
3.1.	Nội dung 1: Tối ưu hoá nguồn vật liệu phát sinh phôi từ cây sâm Ngọc Linh <i>in vitro</i>	52
3.1.1.	Ảnh hưởng của 2,4-D và TDZ lên sự phát sinh phôi từ mảnh lá, cuống lá và rễ của sâm Ngọc Linh	52
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	60
3.1.3.	Ảnh hưởng kết hợp của 2,4-D và TDZ lên sự phát sinh phôi thứ cấp từ mẫu phôi hình cầu của sâm Ngọc Linh	69

3.2. Nội dung 2: Xử lý tạo đa bội trên sâm Ngọc Linh bằng colchicine và oryzalin	73
3.2.1. Tác động của colchicine đến sự phát sinh phôi thứ cấp biến dị	73
3.2.2. Ảnh hưởng của oryzalin lên sự phát sinh phôi thứ cấp biến dị	83
3.2.3. Sự sinh trưởng của cây từ các phôi thứ cấp biến dị phát sinh từ phôi được xử lý colchicine.....	88
3.2.4. Một số đặc điểm hình thái và giải phẫu của cây con biến dị sau khi xử lý đa bội bằng colchicine	93
3.3. Nội dung 3: Xác định mức độ đa bội của cây con sâm Ngọc Linh sau khi xử lý đa bội	98
3.3.1. Xác định mức độ đa bội thông qua phương pháp đếm NST	98
3.3.2. Xác định đặc điểm khí khẩu của cây tứ bội.....	102
3.4. Nội dung 4: Khảo sát khả năng sinh trưởng, tái sinh và tính ổn định của cây sâm Ngọc Linh tứ bội	103
3.4.1. Sự sinh trưởng của cây sâm Ngọc Linh tứ bội	103
3.4.2. Khả năng tái sinh cây sâm Ngọc Linh tứ bội.....	105
3.4.3. Tính ổn định của cây sâm Ngọc Linh tứ bội	107
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....	110
DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ.....	112
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	113

DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT

2,4-D	:	2,4-Dichlorophenoxyacetic acid
AMP	:	Adenosine monophosphate
ATP	:	Adenosine triphosphate
BA	:	Benzyladenine
BAP	:	6-benzylaminopurine
ĐC	:	Đối chứng
HCTC	:	Hợp chất thứ cấp
IAA	:	Indole-3-acetic acid
Kin	:	Kinetin
MS	:	Môi trường Murashige and Skoog
NAA	:	1-Naphthaleneacetic acid
NST	:	Nhiễm sắc thể
PGRs	:	Chất điều hòa sinh trưởng thực vật
RAPD	:	Random Amplified Polymorphic DNA
SE	:	Phôi soma
SSE	:	Phôi thứ cấp
TDZ	:	Thidiazuron
TIBA	:	2,3,5-triiodobenzoic acid
GA	:	Gibberellic acid
ABA	:	Absciscic acid
DNA	:	Deoxyribonucleic acid
RNA	:	Ribonucleic acid
LED	:	Light Emitting Diode
EMS	:	Ethyl methyl sunfonate

TCL	: Thin layer chromatography
APM	: Amiprophos-metyl
SAM	: Shoot apical meristem
RAM	: Root apical meristem
APT	: Adenine phosphoribosyl transferase

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1. Sự thay đổi các đặc tính hình thái và sinh lý của thể đa bội.	24
Bảng 1.2. Sự cảm ứng đa bội ở các cây dược liệu.....	25
Bảng 3.1. Ảnh hưởng của 2,4-D và TDZ lên sự phát sinh phôi từ các nguồn mẫu cây mảnh lá, cuống lá, rễ sâm Ngọc Linh <i>in vitro</i>	52
Bảng 3.2. Ảnh hưởng của 2,4-D và TDZ lên sự phát sinh phôi thứ cấp từ các dạng phôi hình cầu, phôi hình tim, phôi có lá mầm sâm Ngọc Linh.	61
Bảng 3.3. Ảnh hưởng kết hợp của 2,4-D và TDZ lên sự phát sinh phôi thứ cấp từ mẫu phôi hình cầu <i>in vitro</i> sau 6 tuần nuôi cấy.	70
Bảng 3.4. Ảnh hưởng của colchicine đến sự cảm ứng phôi thứ cấp biến dị sau 6 tuần nuôi cấy.	74
Bảng 3.5. Ảnh hưởng của oryzalin lên sự phát sinh phôi thứ cấp sau 6 tuần nuôi cấy.	85
Bảng 3.6. Sự sinh trưởng của cây từ phôi thứ cấp phát sinh từ các phôi đã xử lý colchicine sau 12 tuần nuôi cấy.	89
Bảng 3.7. Khí khổng của lá biến dị sau xử lý colchicine sau 12 tuần sinh trưởng...96	
Bảng 3.8. Ảnh hưởng của nồng độ colchicine đến tỉ lệ cảm ứng đa bội ở các thời gian xử lý khác nhau sau 12 tuần nuôi cấy.	99
Bảng 3.9. Đặc điểm khí khổng trên biểu bì lá của cây tứ bội sau 12 tuần nuôi cấy	102
Bảng 3.10. Sự tái sinh phôi từ mảnh lá, cuống lá, rễ và sự hình thành phôi thứ cấp sau ba lần cấy chuyển phôi của cây sâm Ngọc Linh tứ bội sau 6 tuần nuôi cấy	106
Bảng 3.11. Phôi tứ bội sau lần cấy chuyển thứ 3 sau 24 tuần sinh trưởng.....	107

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1. Sự hình thành phôi của cây <i>Arabidopsis</i> từ tế bào trứng đến phôi ở giai đoạn hình tim.....	13
Hình 1.2. Hiện tượng đa bội trong tự nhiên và nhân tạo giúp tăng cường tổng hợp chất chuyển hóa sơ cấp và thứ cấp.....	17
Hình 1.3. Sự khác nhau về hình thái giữa cây ở thể lưỡng bội và tứ bội.....	21
Hình 1.4. Cơ chế hình thành thể đa bội.....	30
Hình 1.5. Các tác nhân ảnh hưởng đến xử lý đa bội.....	35
Hình 2.1. Các nguồn vật liệu sử dụng làm mẫu cây.....	39
Hình 2.2. Sơ lược các giai đoạn thí nghiệm.....	41
Hình 2.3. Sơ đồ tóm lược các giai đoạn tiến hành thí nghiệm.....	42
Hình 2.4. Sơ đồ mô tả khái quát các bước các bước thực hiện thí nghiệm.....	45
Hình 3.1. Ảnh hưởng của 2,4-D và TDZ lên sự phát sinh SE từ mẫu cây mảnh lá sâm Ngọc Linh sau 6 tuần nuôi cấy.....	53
Hình 3.2. Ảnh hưởng của 2,4-D và TDZ lên sự phát sinh SE từ mẫu cuống lá sâm Ngọc Linh sau 6 tuần nuôi cấy.....	54
Hình 3.3. Ảnh hưởng của 2,4-D và TDZ lên sự phát sinh SE của mẫu cây rễ sâm Ngọc Linh sau 6 tuần nuôi cấy.....	56
Hình 3.4. Ảnh hưởng của nồng độ 2,4-D và TDZ tối ưu lên sự phát sinh phôi từ mẫu rễ, cuống lá và mảnh lá của sâm Ngọc Linh sau 6 tuần nuôi cấy.....	57
Hình 3.5. Sự phát sinh SSE từ phôi hình cầu của sâm Ngọc Linh trên môi trường bổ sung 2,4-D hoặc TDZ nồng độ khác nhau sau 6 tuần nuôi cấy.....	62
Hình 3.6. Sự phát sinh SSE từ phôi hình tim sâm Ngọc Linh trên môi trường bổ sung 2,4-D hoặc TDZ nồng độ khác nhau sau 6 tuần nuôi cấy.....	64
Hình 3.7. Sự phát sinh SSE từ phôi lá mầm sâm Ngọc Linh trên môi trường bổ sung 2,4-D hoặc TDZ nồng độ khác nhau sau 6 tuần nuôi cấy.....	65
Hình 3.8. Ảnh hưởng của nồng độ 2,4-D và TDZ tối ưu lên sự phát sinh SSE từ các dạng phôi hình cầu, phôi hình tim và phôi lá mầm sâm Ngọc Linh sau 6 tuần nuôi cấy.....	67
Hình 3.9. Sự phát sinh phôi từ các mẫu mảnh lá, rễ, cuống lá và sự phát sinh SSE (D) của sâm Ngọc Linh sau 6 tuần nuôi cấy.....	67

Hình 3.10. Sự hình thành SSE trực tiếp trên bề mặt của các dạng phôi của sâm Ngọc Linh	68
Hình 3.11. Sự hình thành SSE gián tiếp từ các dạng phôi sâm Ngọc Linh trên môi trường bổ sung 2,4-D hoặc TDZ.....	69
Hình 3.12. Ảnh hưởng kết hợp của 2,4-D và TDZ lên sự phát sinh SSE từ phôi hình cầu của sâm Ngọc Linh	70
Hình 3.13. Sự hình thành, phát triển của SSE sâm Ngọc Linh.	73
Hình 3.14. Sự sinh trưởng và phát triển tiếp theo của SSE sâm Ngọc Linh sau 3 tuần.	73
Hình 3.15. Sự phát sinh SSE biến dị từ phôi hình cầu của sâm Ngọc Linh dưới tác động của colchicine (0,1; 0,2; 0,3; 0,5; 0,7%) trong 24 giờ xử lý	75
Hình 3.16. Sự phát sinh SSE biến dị từ phôi hình cầu của sâm Ngọc Linh dưới tác động của colchicine (0,1; 0,2; 0,3; 0,5; 0,7%) trong 36 giờ xử lý	76
Hình 3.17. Sự phát sinh SSE biến dị từ phôi hình cầu của sâm Ngọc Linh dưới tác động của colchicine (0,1; 0,2; 0,3; 0,5; 0,7%) trong 48 giờ xử lý	78
Hình 3.18. Sự phát sinh SSE biến dị từ phôi hình cầu của sâm Ngọc Linh dưới tác động của colchicine (0,1; 0,2; 0,3; 0,5; 0,7%) trong 72 giờ xử lý	79
Hình 3.19. Một số dạng SSE biến dị của sâm Ngọc Linh phát sinh từ phôi đã qua xử lý colchicine sau 4 tuần nuôi cấy.	80
Hình 3.20. Ảnh hưởng của oryzalin lên sự phát sinh SSE biến dị từ phôi hình cầu của sâm Ngọc Linh tại các thời gian xử lý khác nhau.....	86
Hình 3.21. Sự sinh trưởng của phôi biến dị sau khi xử lý với colchicine sau 12 tuần nuôi cấy	88
Hình 3.22. Đặc điểm kiểu hình của một số cây con biến dị sau khi xử lý đa bội bằng colchicine 12 tuần nuôi cấy.....	94
Hình 3.23. Một số dạng lá biến dị của cây con có nguồn gốc từ phôi biến dị được xử lý colchicine sau 12 tuần nuôi cấy.	94
Hình 3.24. Hình thái giải phẫu của cuống lá và rễ cây sâm Ngọc Linh có biến dị kiểu hình.....	96
Hình 3.25. Đặc điểm khí khổng ở lá cây sâm Ngọc Linh biến dị kiểu hình sau 12 tuần nuôi cấy từ SSE.	97
Hình 3.26. Cây sâm Ngọc Linh <i>in vitro</i> tứ bội và tạp bội sau 12 tuần nuôi cấy	100

Hình 3.27. Số lượng NST ở các đầu rễ thuộc cây lưỡng bội ($2n = 2x = 24$) và cây tứ bội ($2n = 4x = 48$) ở sâm Ngọc Linh sau 12 tuần nuôi cấy.....	101
Hình 3.28. Đặc điểm khí khổng của các cây lưỡng bội và cây tứ bội ở sâm Ngọc Linh sau 12 tuần nuôi cấy.....	103
Hình 3.29. Đặc điểm hình thái cây lưỡng bội và cây tứ bội của sâm Ngọc Linh sau 32 tuần nuôi cấy.	104
Hình 3.30. Cây sâm Ngọc Linh <i>in vitro</i> cây lưỡng bội và cây tứ bội sau 24 tuần nuôi cấy	104
Hình 3.31. Sự tái sinh phôi của cây sâm Ngọc Linh tứ bội từ các nguồn vật liệu khác nhau	107
Hình 3.32. Cây <i>in vitro</i> , số lượng NST và mật độ lục lạp trong tế bào bảo vệ khí khổng của của cây sâm Ngọc Linh thể lưỡng bội và thể tứ bội sau 24 tuần nuôi cấy.	108

MỞ ĐẦU

Ngày nay, nhu cầu về cây dược liệu ngày càng tăng để phục vụ nhiều lĩnh vực bao gồm sức khỏe và sắc đẹp. Các phương pháp nhân giống truyền thống thường phụ thuộc vào môi trường tự nhiên, dễ bị ảnh hưởng bởi các tác động sinh học và phi sinh học bất lợi, cũng như hàm lượng hợp chất thứ cấp (HCTC) thu hoạch thấp. Trong bối cảnh này, việc phát triển đa bội nhân tạo sẽ là một cách tiếp cận tiềm năng nhằm tăng sức sống cá thể và hàm lượng HCTC. Các thế hệ con lai đa bội thông qua biểu hiện gen đã làm sáng tỏ nguyên nhân của sự chuyển dòng chuyển hóa dẫn đến tích lũy vượt trội các HCTC [1].

Panax vietnamensis Ha et Grushv. là loài sâm đặc hữu của Việt Nam, với tên thường gọi là sâm Ngọc Linh. Cho đến nay, hầu hết các nghiên cứu cho thấy nhiều công dụng hữu ích của sâm Ngọc Linh trong hỗ trợ giảm các hiệu ứng gây stress, chống trầm cảm, kháng tác nhân oxy hóa... Trong đó, nhóm chất saponin với hàm lượng cao và mang tính đặc trưng có giá trị quyết định của loài sâm này là MR₂, G-Rb₁ và G-Rg₁ [2]. Hơn nữa, nhóm saponin có cấu trúc khung dammaran chiếm tỉ lệ cao (12 - 15%), nhóm saponin hiện diện nhiều nhất là nhóm triterpen [3]. Vì vậy, sâm Ngọc Linh đã được công nhận là loài sâm quý nhất của Việt Nam cần được chú trọng nghiên cứu và phát triển.

Tuy nhiên, củ sâm Ngọc Linh muốn đạt đủ chất lượng thường yêu cầu thời gian sinh trưởng kéo dài trên 6 năm. Hơn nữa, cây lưỡng bội sinh trưởng rất chậm trong tự nhiên và có trọng lượng thấp, do vậy sản lượng thu được không đáp ứng đủ nhu cầu ngày càng tăng đối với loài dược liệu quý này.

Chiến lược nhân giống quan trọng để nâng cao các đặc tính có giá trị của cây trồng hiện nay là gây đột biến đa bội nhân tạo. Nhiều nghiên cứu tạo thể đột biến đa bội trên đối tượng cây dược liệu gần đây cho thấy cây dược liệu có toàn bộ bộ nhiễm sắc thể (NST) nhân đôi và hàm lượng các phân tử có dược tính cao [1]. Vì vậy, sự nhân đôi NST nhân tạo ở cây dược liệu có thể đem lại những kết quả kinh tế đáng kể. Kỹ thuật tạo đột biến theo hướng thực nghiệm mà cụ thể là sử dụng kỹ thuật xử lý gây đột biến đa bội bằng các tác nhân hóa học (colchicine, oryzalin) là một hướng nghiên cứu mới trên đối tượng sâm Ngọc Linh tại Việt Nam. Với kỹ thuật này đã mang lại ý nghĩa quan trọng, tạo nền tảng cho nghiên cứu các đối tượng cây dược liệu

quý đang còn khá hạn chế về đột biến và đột biến thể đa bội, đặt cơ sở nền móng cho nghiên cứu sâu hơn về chọn, lai tạo giống và nhân giống 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 cây đa bội với những đặc tính mong muốn như sức sống cao, sinh trưởng và phát triển tốt, góp phần làm phong phú nguồn cây giống chất lượng cao cho thị trường giống cây dược liệu quý tại Việt Nam.

Mục tiêu của đề tài

- Xác định nguồn vật liệu tối ưu trong cảm ứng phôi soma sâm Ngọc Linh dưới tác động của các chất điều hòa sinh trưởng thực vật (PGRs) thông qua kỹ thuật nuôi cấy mô tế bào thực vật.

- Xác định được tác nhân đa bội tương ứng với nồng độ chất tạo đa bội thích hợp để tạo cây đa bội hiệu quả.

- Tạo được cây đa bội bằng tác nhân hóa học từ nguồn vật liệu phôi có nguồn gốc từ cây *in vitro*. Bước đầu đánh giá sự sinh trưởng và phát triển của các cây đa bội trong điều kiện *in vitro*.

Ý nghĩa khoa học của đề tài

Kết quả nghiên cứu của đề tài sẽ cung cấp khái quát các kiến thức về đối tượng trong nghiên cứu đa bội. Các tác nhân thường được ứng dụng để xử lý và các yếu tố liên quan đến hiệu quả gây đột biến đa bội. Đồng thời, chọn nguồn vật liệu phù hợp và các phương pháp xác định độ bội hữu hiệu. Qua đó, từ nghiên cứu này sẽ làm cơ sở đề xuất qui trình xử lý đa bội trên cây sâm Ngọc Linh nói riêng và trên cây dược liệu nói chung.

Ý nghĩa thực tiễn của đề tài

Xác định nguồn vật liệu tốt nhất và phương pháp áp dụng để xử lý gây đột biến đa bội. Chọn lọc các thể đa bội, tái sinh thể đa bội và đề xuất qui trình xử lý và thu nhận các thể đa bội hiệu quả trên cây sâm Ngọc Linh bằng phương pháp *in vitro*. Hơn nữa, nguồn cây sâm Ngọc Linh đa bội thu được từ nghiên cứu này sẽ làm cơ sở để nghiên cứu và đề xuất qui trình nhân giống cây sâm Ngọc Linh đa bội; qua đó góp

phần hiện thực hóa việc trồng và phát triển loài sâm quý này với những đặc tính vượt trội ở quy mô lớn; góp phần lưu giữ nguồn gen quý và khai thác thêm nguồn gen có ưu thế sau khi xử lý đa bội, làm đa dạng và thay thế nguồn giống tự nhiên đang dần cạn kiệt do khai thác quá mức.

Đối tượng và phạm vi nghiên cứu của đề tài

Đối tượng nghiên cứu

Nghiên cứu quá trình đa bội trên cây sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) trong điều kiện *in vitro*.

Phạm vi nghiên cứu

Nghiên cứu tác động của PGRs đến khả năng phát sinh phôi soma (SE) và phôi thứ cấp (SSE) từ nhiều vật liệu khác nhau của cây sâm Ngọc Linh *in vitro* thông qua kỹ thuật nuôi cấy mô tế bào thực vật.

Nghiên cứu ảnh hưởng của các tác nhân đa bội lên khả năng cảm ứng các thể đột biến của phôi thứ cấp sâm Ngọc Linh, bước đầu tạo được cây đột biến đa bội thể tứ bội, đồng thời đánh giá các đặc điểm sinh trưởng và phát triển theo thời gian của cây tứ bội.

Các thí nghiệm *in vitro* được bố trí tại Phòng Sinh học phân tử và Chọn tạo giống cây trồng, Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên, VAST.

Những đóng góp mới của luận án

Nghiên cứu đã đánh giá được khả năng phát sinh phôi thứ cấp (SSE) từ các dạng phôi soma (SE) của sâm Ngọc Linh.

Luận án đã bước đầu thành công trong việc xây dựng một quy trình cơ bản tạo cây tứ bội thông qua quá trình tạo các phôi đột biến bằng các tác nhân gây đột biến đa bội. Đồng thời, nghiên cứu đã bước đầu đánh giá được một số đặc điểm sinh trưởng của cây sâm Ngọc Linh thể tứ bội.

CHƯƠNG 1.

TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. Sơ lược về cây sâm Ngọc Linh

1.1.1. Lịch sử phân loại

Năm 1968, sâm Ngọc Linh được phát hiện tại vùng núi Ngọc Linh. Năm 1985, tại Viện thực vật Kamarov (Liên Xô), tên khoa học của sâm Ngọc Linh được công bố do Hà Thị Dung và Grushvistky đặt tên [3].

1.1.2. Phân loại

Giới: Thực vật (Plantae)

Ngành: Thực vật hạt kín (Magnoliophyta)

Bộ: Hoa tán (Apiales)

Họ: Nhân Sâm (Araliaceae)

Chi: *Panax*

Loài: *Panax vietnamensis* Ha et Grushv.

Tên khác: sâm Ngọc Linh, sâm Việt Nam, sâm Khu 5

1.1.3. Đặc điểm hình thái

Cây sâm Ngọc Linh thuộc nhóm thân thảo, có thân rễ, chiều cao khoảng 40 - 60 cm. Thân rễ không phân nhánh, phân nhiều đốt, mang nhiều rễ nhánh. Ở cuối thân rễ củ thường kém phát triển, có màu vàng nhạt, nhiều rễ con. Ngoài tự nhiên, sâm Ngọc Linh có rễ củ rất phát triển và có nhiều kiểu hình thái khác nhau, phổ biến nhất là 3 kiểu chính: con quay, củ cà rốt, và bó củ.

Quả có hạt dạng hình thận, số ít có hình cầu dẹt chứa 02 hạt. Quả mọng, chín màu đỏ và ở đỉnh quả màu đen. Trọng lượng của quả khoảng 275 mg. Hạt với bề mặt lồi lõm có màu trắng hoặc vàng nhạt, chiều dài khoảng 6 - 8 mm, rộng 5 - 6 mm [3].

Hoa có 05 cánh, 05 nhị màu trắng, đường kính khoảng 3 - 4 mm, màu vàng lục nhạt, có 05 lá đài tạo thành hình chuông, dài khoảng 1 - 1,5 mm. Bao phấn có dạng hình xoan. Bầu nhụy có hai lá noãn nhưng thông thường chỉ một lá noãn phát triển.

Lá kép có dạng chân vịt, phiến lá màu xanh lục với nhiều lông dài khoảng 1 - 2 mm. Gân lá dạng hình lông chim, gân phụ có dạng hình mạng. Mỗi lá kép gồm năm lá chét hình trứng, các mép lá có dạng hình răng cưa, đầu lá có dạng nhọn, đôi khi có mũi nhọn và gốc lá nêm.

1.1.4. Sinh thái và phân bố

1.1.4.1. Đặc điểm sinh thái

Sâm Ngọc Linh thích hợp với điều kiện ẩm độ cao và có bóng râm, thường sinh trưởng chủ yếu ở độ cao từ 1000 - 2000 m so với mặt nước biển, cây thường mọc dưới tán rừng. Sâm Ngọc Linh mọc luôn nơi ẩm ướt, nhiệt độ 15-18°C và lượng mưa trung bình 3000 mm/năm.

Hàng năm, các lá sẽ rụng theo mùa, từ đầu mầm thân rễ chỉ mọc một thân mang lá, do vậy tuổi của sâm có thể căn cứ vào thân rễ để tính.

Mùa hè là mùa sinh trưởng mạnh của Sâm Ngọc Linh, từ tháng 5 - 10 là mùa ra hoa và kết quả. Quả chín rụng xuống mặt đất và hạt nảy mầm vào mùa xuân năm tiếp theo.

1.1.4.2. Đặc điểm phân bố

Cây sâm Ngọc Linh được chính thức công bố năm 1985. Đến nay, chúng phân bố chủ yếu ở vùng núi Ngọc Linh (độ cao trung bình khoảng 2.598 m) thuộc tỉnh Quảng Nam và Kon Tum, Việt Nam. Tuy nhiên, sự phân bố tự nhiên của loài sâm này đã có nhiều thay đổi do việc khai thác quá mức hiện nay.

1.1.5. Thành phần hóa học

1.1.5.1. Hợp chất saponin

Saponin là một nhóm glycosid, nhóm chất này xuất hiện phổ biến trong nhiều loài thực vật, và có nhiều trong sâm Ngọc Linh. Trong đó, saponin dammaran được xem là hoạt chất quyết định cho các tác dụng sinh học của sâm Ngọc Linh. Các dạng saponin chính trong sâm Ngọc Linh bao gồm GRb1, GRd, GRg1, MR2. Phần thân rễ và rễ củ dưới mặt đất có 52 hợp chất saponin, trong đó có 26 saponin có cấu trúc mới. Hơn nữa, phần trên mặt đất của sâm Ngọc Linh cũng giàu saponin, trong đó 19 saponin dammaran đã được thu nhận với 11 saponin đã biết và 8 saponin có cấu trúc mới [3], [4].

1.1.5.2. Hợp chất polyacetylen

Các nghiên cứu cho thấy trong sâm Ngọc Linh có 7 hợp chất thuộc nhóm chất polyacetylen và 5 hợp chất được xác định cấu trúc với panaxynol và heptadeca-1,8(E)-dien-4,6-dien-3,10-diol [3].

1.1.5.3. Các thành phần khác

Acid amin: 18 acid amin (tryptophan, lysine, histidine, arginine, aspartic acid, threonine, serine, glutamic acid, proline, glycine, alanine, cystine, valine, methionine, isoleucine, leucine, tyrosine, phenylalanine) ở phần dưới mặt đất của sâm Ngọc Linh, bao gồm 8 acid amin thiết yếu, trong đó, lysine, tryptophan và arginine được cho là có tác dụng chống lão hóa cao [3].

Ngoài ra, ở sâm Ngọc Linh đã có 20 nguyên tố đa vi lượng được xác định. Trong đó sự hiện diện đa dạng các nguyên tố như Na, K, Mg, Mn, Fe, Zn, Cu, Co, Se có vai trò khác nhau và nhiều tác dụng sinh học nhất định [3].

Sâm Ngọc Linh có vùng phân bố khá hẹp nên số lượng cá thể giảm nhanh, và là một trong 250 loài quý hiếm đang dần biến mất do hoạt động khai thác quá mức. Do đó, sâm Ngọc Linh đã được giới hạn khai thác ngoài tự nhiên và để bảo vệ loài sâm này đã có nhiều chính sách đã được nghiên cứu và áp dụng trong đó đã đưa vào sách đỏ Việt Nam. Hiện nay, nhằm mục tiêu bảo tồn và phát triển cây dược liệu quý, đã có nhiều những nghiên cứu để phát triển và bảo tồn giống sâm Ngọc Linh, chủ yếu tại Quảng Nam, Kon Tum và Đà Lạt. Vì vậy, nhiều kỹ thuật mới đã được ứng dụng trong nghiên cứu, sản xuất, góp phần tăng sản lượng và giá trị, đồng thời xây dựng giá trị thương hiệu và thương mại hóa sâm Ngọc Linh.

1.1.6. Những nghiên cứu trên sâm Ngọc Linh

Trong hơn 20 năm qua, ở Việt Nam cây sâm Ngọc Linh đã được quan tâm nghiên cứu trên nhiều lĩnh vực. Năm 2010, nghiên cứu của Nhựt và cộng sự thông qua các nguồn mẫu mô sẹo, rễ và chồi nuôi cấy *in vitro* đã xác định hàm lượng saponin có trong sinh khối. Đồng thời nghiên cứu này cũng cho thấy các PGRs ảnh hưởng lên quá trình tích lũy hợp chất thứ cấp [5]. Đến năm 2012, tác động của methyl jasmonate đến lượng saponin tích lũy trong mô sẹo sâm Ngọc Linh *in vitro* đã được khảo sát [6]. Năm 2013, nghiên cứu của Ngô Thanh Tài và cộng sự đã chứng minh

ảnh hưởng của ánh sáng LED lên sự hình thành cây từ SE [7]. Một số nghiên cứu khác cũng đã được thực hiện để khảo sát sự ảnh hưởng của PGRs đến sự tích lũy hoạt chất của sâm Ngọc Linh. Năm 2012, nghiên cứu của Dương Tấn Nhựt và cộng sự đã xác định hàm lượng saponin và dư lượng của một PGRs tích lũy trong mô sẹo, chồi và rễ sâm Ngọc Linh nuôi cấy *in vitro* [5]. Ngoài ra Hoàng Xuân Chiến và cộng sự năm 2011 cũng đã thực hiện nghiên cứu một số yếu tố ảnh hưởng lên quá trình tạo củ sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) *in vitro*, đồng thời nghiên cứu này nhóm tác giả cũng đã xác định hàm lượng saponin trong cây [8].

Các nghiên cứu về vi nhân giống đã được tiến hành trong nhiều năm qua nhằm hiện thực hóa hiệu quả nhân giống sâm Ngọc Linh [9], [10]. Nghiên cứu phát sinh hình thái bằng cách sử dụng hệ thống lớp mỏng tế bào [11 - 13] và các nghiên cứu về phát sinh SE của sâm Ngọc Linh [14 - 17] cũng đã được thực hiện. Việc nuôi cấy nhân nhanh rễ thứ cấp cây sâm Ngọc Linh cũng đã được báo cáo trong nhiều nghiên cứu [18 - 22].

Ngoài ra, những nghiên cứu tạo hạt nhân tạo từ mẫu SE và khả năng nảy mầm của hạt nhân tạo cũng đã được thực hiện [23 - 25]; đánh giá sự ổn định di truyền bằng chỉ thị RAPD [26]; chuyển gen tạo rễ tơ và khảo sát sinh trưởng của rễ tơ [27 - 30]; nghiên cứu tích lũy và sản xuất HCTC ở sâm Ngọc Linh [31 - 33]. Tuy nhiên, các báo cáo nghiên cứu về sự đa bội trên sâm Ngọc Linh vẫn chưa được ghi nhận. Vì vậy, đa bội hoá trên sâm Ngọc Linh mở ra một hướng nghiên cứu mới trên đối tượng sâm này.

1.2. Nuôi cấy *in vitro*

1.2.1. Giới thiệu

Nuôi cấy mô thực vật là phương pháp nuôi cấy *in vitro* ở điều kiện vô trùng (sạch virus, vi khuẩn và nấm). Nuôi cấy mô thực vật, hay nuôi cấy *in vitro*, thường được dùng để nghiên cứu các cấu trúc, sinh lý, sinh hóa, di truyền thực vật, tạo dòng tế bào và nhân giống nhanh chóng (vi nhân giống) các loại cây trồng có giá trị kinh tế và dược học [34].

1.2.2. Cơ sở sinh học

Nền tảng của nuôi cấy mô thực vật là khả năng tái sinh được biểu hiện bởi các mô và tế bào thực vật sống. Khi được tách ra từ cây mẹ và nuôi cấy *in vitro*, với các kích thích hóa học và môi trường thích hợp, các tế bào biệt hóa sẽ tiếp tục phân chia và hướng theo các con đường phát triển khác nhau để tạo các tế bào, mô, cơ quan và cây hoàn chỉnh [35]. Khái niệm về mọi tế bào sống bình thường có khả năng tái sinh thành một cơ thể hoàn chỉnh được gọi là tính toàn năng của tế bào, đây được coi là cơ sở quan trọng trong nuôi cấy mô và tế bào thực vật [35], [36].

1.2.3. Yêu cầu căn bản trong nuôi cấy mô thực vật

Chọn lựa mô cấy và tìm môi trường thích hợp là hai yêu cầu quan trọng để nuôi cấy mô thành công. Cô lập mô cấy có tác dụng gián đoạn các tương tác trong cây nguyên vẹn, trong khi môi trường thích hợp giúp mô cấy thể hiện năng lực nội sinh. Do đó, thành phần hóa học của môi trường nuôi cấy và các điều kiện vật lý (khí quyển, kiểu bình nuôi cấy, ánh sáng, nhiệt độ...) cần được kiểm soát [34].

1.2.4. Ảnh hưởng của loại mẫu cấy trong nuôi cấy *in vitro*

Các con đường tái sinh của mẫu cấy là khác nhau. Theo lý thuyết về tính toàn năng của tế bào, tế bào có khả năng phát triển thành cây hoàn chỉnh, tuy nhiên không phải bất kỳ tế bào nào cũng đều có thể biểu hiện tính toàn năng. Các mẫu cấy có tế bào đã biệt hóa cao như lá, thân, rễ hoặc mô hoa. Phôi chưa trưởng thành, mô phân sinh thực vật và tế bào mô phân sinh trong hệ thống bó mạch thì chưa biệt hóa. Các mẫu cấy càng có nhiều tế bào chưa biệt hóa thì càng có khả năng tái sinh tạo thành cây hoàn chỉnh [34].

Các mẫu cấy có các mô phân sinh có tổ chức, ví dụ như chồi bên, chồi hoa chưa trưởng thành, hoặc khúc cắt thân mang chồi bên, có xu hướng được kích thích để phát triển theo chương trình đã có sẵn, giúp nhân nhanh tạo số lượng chồi lớn [35]. Đối với các mẫu cấy không có mô phân sinh như mảnh lá, mảnh cắt cánh hoa, hoặc các đoạn lóng thân thì bước đầu tiên cần thiết cho nuôi cấy thành công là kích thích cho một nhóm nhỏ tế bào tiếp tục hoạt động phân bào. Các tế bào này có mức độ biệt hóa thấp như tế bào nhu mô lá và sự phản biệt hóa có thể cần thiết trước khi đi vào phân chia tế bào [35].

1.3. Phát sinh phôi soma (SE)

1.3.1. Khái niệm

Phát sinh phôi soma là quá trình biến đổi tế bào thực vật vô tính (tế bào soma, tế bào cơ thể, $2n$), tức mọi tế bào khác hơn giao tử, thành phôi theo một quá trình tương tự với sinh phôi hợp tử. Khác với sinh sản vô phôi, một kiểu sinh sản vô tính trong tự nhiên, phát sinh phôi soma xảy ra trong điều kiện *in vitro* [34]. Đây là một phương pháp tái sinh thực vật nhanh nhất. Việc ứng dụng phương pháp này chỉ với thời gian ngắn có thể tạo ra số lượng lớn cây con góp phần nâng cao chất lượng cây giống, đồng thời cải thiện tỷ lệ sống của cây con ở điều kiện vườn ươm [37].

Trong sinh phôi soma, tế bào đầu tiên (tế bào soma giữ vai trò hợp tử) phân chia không cân xứng, sau đó phôi trải qua các giai đoạn hình cầu, tim và cá đuôi ở cây hai lá mầm, hay hình cầu, bao lá mầm và thuần ở cây một lá mầm, tương tự sinh phôi hợp tử. Cây con từ phôi soma có đặc tính di truyền của tế bào soma cha-mẹ. Nếu tế bào soma được chuyển gen, phôi soma và cây tái sinh sẽ là cây chuyển gen [34].

Phát sinh phôi thứ cấp là quá trình phôi được hình thành từ phôi soma sơ cấp được sử dụng làm mẫu cây, khác với phôi sơ cấp được hình thành từ mẫu cây thực vật. Phát sinh phôi thứ cấp mang lại nhiều ưu điểm hơn so với quá trình phát sinh phôi sơ cấp, đặc biệt là tỷ lệ nhân lên và mức độ đồng đều tăng cao. Nuôi cấy phôi thứ cấp đã được mô tả ở ít nhất 80 loài thực vật hạt trần và hạt kín bằng cách sử dụng các PGRs và các loại carbohydrate khác nhau [38], [39]. Gần đây, sự hình thành phôi thứ cấp đã được ghi nhận ở một số cây trồng như Cẩm chướng [40], Rosa lai “Samantha” [39] và *Panax Gingseng* [41] bằng cách sử dụng BA, 2,4-D và một số loại carbohydrate khác nhau.

Phôi thứ cấp được hình thành trực tiếp hoặc/và gián tiếp trên lá mầm, trụ hạ diệp (hypocotyl), trụ thượng diệp (epicotyl) hoặc đầu rễ của phôi sơ cấp. Các hệ thống tái sinh thực vật hiệu quả thông qua phôi thứ cấp đã được ghi nhận ở một số loài thực vật, ví dụ như ở *Cyclamen persicum*, *Hepatica nobilis*, *Pseudotsuga menziesii*, *Akebia trifoliata* và *Olea Europea*. Phôi thứ cấp có thể tăng trưởng và kéo dài khả năng tạo phôi của một số dòng nhất định, nhân số lượng phôi có thể thu được (so với phôi sơ cấp) và phục hồi các hình thái bất thường mà nếu không thì không thể tái tạo cây bình

thường. Con đường phát triển này đặc trưng cho chỉ số nhân giống cao, khả năng lặp lại, độc lập với nguồn mẫu và mức độ đồng nhất cao. Ở nhiều loài, khả năng tạo phôi trong môi trường nuôi cấy *in vitro* suy giảm theo thời gian do quá trình lão hóa và cấy chuyền nhiều lần, phôi thứ cấp là cách để khôi phục tiềm năng phát sinh phôi của các dòng năng suất quan trọng và thường được sử dụng với loài cây lá rộng như một phương pháp quản lý lâu dài [42].

1.3.2. Vật liệu nuôi cấy trong phát sinh phôi soma

Theo lý thuyết, từ một mẫu mô thông qua các kỹ thuật nuôi cấy có thể tạo ra vô số tế bào có khả năng phát sinh phôi. Nhiều nghiên cứu trên các đối tượng khác nhau cho thấy, tốc độ nhân giống từ phôi thường cao hơn mô phân sinh. Hơn nữa, giữa các bộ phận khác nhau của cây tồn tại mức độ phản ứng phát sinh phôi khác nhau. Bên cạnh đó, các mô có nguồn gốc từ phôi có khả năng phát sinh phôi soma cao và giảm dần đối với cuống lá, lá và rễ [43].

Nhiều phần cơ thể thực vật được dùng để tạo phôi soma, và mô cấy thuộc về một trong hai nhóm chính [34]:

- Phôi hợp tử chứa tế bào có sẵn năng lực sinh phôi.
- Mô ít nhiều đã phân hóa chứa tế bào cần được cảm ứng để có khả năng sinh phôi.

Các mô sinh dưỡng chứa các tế bào đã phân hóa, đang thực hiện chức năng trong cơ thể, nên cần được lập trình lại và để vào trạng thái sinh phôi. Thông thường, sự lập trình cần qua giai đoạn cảm ứng tạo mô sẹo với tiềm năng phân chia tế bào nhiều lần liên tiếp [34].

Trong thực tế, không phải mọi mô cấy đều thích hợp để nuôi cấy. Thông thường, việc tạo phôi thường thành công khi mô cấy được cô lập từ phôi hay trụ dưới lá mầm. Ở các loài cỏ, tế bào hợp tử, nụ hoa và lá còn giữ đặc tính mô phân sinh, khi được tách ra khỏi mô trường thành (mô đã phân hóa) để cho tế bào có khả năng sinh phôi [34].

1.3.3. Con đường phát sinh phôi soma

Nền tảng trong phát sinh phôi soma là tính toàn năng của các tế bào [44]. Các tế bào sinh dưỡng (tế bào soma) trải qua các điều kiện cảm ứng để hình thành những tế bào sinh phôi và xảy ra một loạt những biến đổi về sinh hóa, hình thái và dẫn đến hình thành phôi soma [34].

- Phản biệt hóa, tương ứng với xáo trộn hay dừng biểu hiện thông tin phát triển.

- Cảm ứng, để giúp tế bào đạt năng lực sinh phôi, tức khả năng đáp ứng với tín hiệu cảm ứng, như PGRs (thường là 2,4-D), hay điều kiện cảm ứng của môi trường (như lạnh, khô). Phôi hợp tử không cần tín hiệu cảm ứng, vì đã được quy định vào con đường phát triển phôi.

- Tái biệt hóa và quy định để giúp tế bào trở thành tế bào sinh phôi.

Hai bước thu nhận phôi soma gồm [34]:

(1) Tạo tế bào sinh phôi (tạo mô sẹo và/hay dịch treo tế bào), với auxin riêng rẽ hay kết hợp với cytokinin.

(2) Tiến hóa phôi soma (từ mô sẹo, dịch treo tế bào), khi chuyển mô cấy sang môi trường giảm hay loại bỏ auxin.

Có 2 con đường phát sinh phôi soma: Phát sinh trực tiếp và phát sinh gián tiếp [45]:

Phát sinh phôi trực tiếp (direct somatic embryogenesis): Phôi hình thành trực tiếp trên bề mặt của mẫu cấy ban đầu mà không qua giai đoạn trung gian của mô sẹo [46].

Phát sinh phôi gián tiếp (indirect somatic embryogenesis): Phôi hình thành gián tiếp thông qua sự hình thành mô sẹo sinh phôi và thông thường mô sẹo được tăng sinh trước khi được cảm ứng hình thành phôi [45].

1.3.4. Đặc tính hình thái của tế bào sinh phôi

Các tế bào có khả năng phát sinh phôi soma có nhân nằm ở vị trí trung tâm, có những vi ống ở gần nhân và những sợi nhỏ actin [47]. Tế bào mô phân sinh cấp một của thực vật trưởng thành luôn giữ tiềm năng phôi, nghĩa là có thể lập trình để tạo cơ quan (chồi và rễ) như tế bào sinh phôi. Dưới các điều kiện xác định, tế bào từ mô sẹo hay dịch treo tế bào có thể cho sơ khởi cơ quan hay phôi soma [34].

Tế bào có khả năng sinh phôi (trong mô sẹo hay dịch treo tế bào) có hình thái giống tế bào mô phân sinh cấp một (có khả năng sinh mô và cơ quan): kích thước nhỏ, đẳng kính, vách mỏng, cytoplasm đậm đặc, nhân to và tiểu hạch giãn nở. Tế bào mô phân sinh cấp một trong cơ thể thực vật trưởng thành luôn giữ tiềm năng phôi, nghĩa là có khả năng thực hiện chương trình tạo cơ quan (chồi và rễ) như tế bào sinh phôi. Ở các điều kiện xác định, tế bào từ mô sẹo hay dịch treo tế bào có thể cho sơ khởi cơ quan (có khả năng sinh cơ quan) hay phôi soma (có khả năng sinh phôi soma) [34].

Khi phôi sinh dưỡng có nguồn gốc từ một tế bào, sự phân bào đầu tiên là sự phân chia bất đối xứng theo hướng ngang và tạo thành hai tế bào gồm tế bào gốc (basal cell) và tế bào đỉnh (apical cell). Chính tế bào nhỏ này sẽ phân chia để tạo thành những cơ quan của phôi không liên quan đến tế bào gốc. Sự phân chia bất đối xứng này đóng vai trò quan trọng cho con đường phát sinh phôi [48].

Giống với sinh phôi hợp tử, sinh phôi soma từ tế bào sinh phôi trong mô sẹo hay dịch treo tế bào lần lượt qua các bước [34]:

(1) Phân chia lần thứ nhất theo cách không cân xứng

Phôi soma hình thành từ một tế bào ngoại vi (so sánh với hợp tử) của nhóm tế bào có khả năng sinh phôi. Phân chia lần thứ nhất của tế bào sinh phôi xảy ra theo mặt phẳng song song với mặt ngoài của nhóm tế bào, để tạo tế bào ngọn (ở phía ngoài), nguồn gốc của phôi soma; và tế bào đáy (ở phía trong, gần môi trường rắn), nguồn gốc của dây treo. Những tế bào còn lại (của nhóm) hợp với dây treo thành đám tế bào khá to, so với dây treo của phôi hợp tử.

(2) Xuất hiện tiền bì và phôi hình cầu

Phân hóa về cấu trúc và phát sinh mô trong sinh phôi soma bắt đầu ở phôi hình cầu với sự xuất hiện của tiền bì (lớp bao bọc phôi, không kể dây treo). Tiền bì tác động như lực cản đối với các tế bào bên trong, có vai trò điều hòa phân chia và phân hóa tế bào trong phôi soma. Ở cà rốt, tiền bì bất thường làm ngừng phát triển phôi soma.

(3) Phân hóa tiền thượng tầng

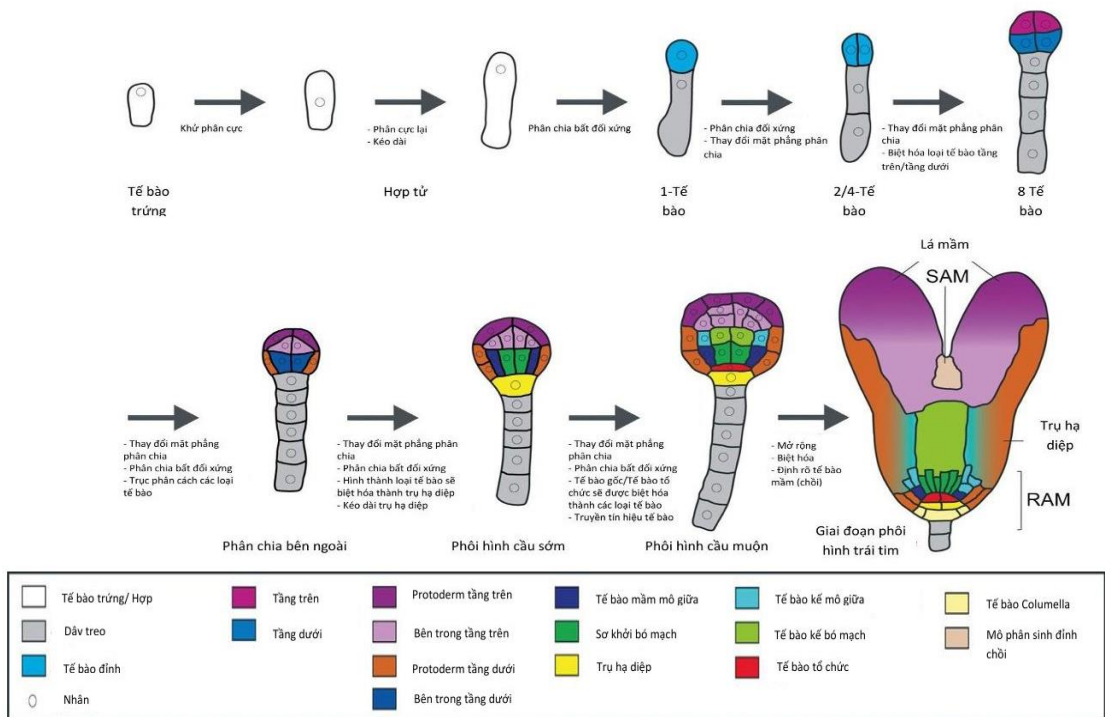
Ngay sau giai đoạn phôi hình cầu, phôi kéo dài đồng thời với sự kéo dài và phân hóa tế bào thành tiền thượng tầng. Tiền thượng tầng gồm các tế bào lớn với không bào, rất khác biệt với tế bào mô nền xung quanh.

(4) Tượng lá mầm

Lá mầm xuất phát từ vùng ngoại vi của phôi, đánh dấu giai đoạn hình tim ở phôi cây hai lá mầm. Số lá mầm có thể thay đổi ở phôi soma, so với phôi hợp tử. Lá mầm quan trọng trong sinh cơ quan phôi, vì điều hòa dòng auxin dẫn tới khuynh độ sinh lý trong phôi. Lá mầm cũng cần cho nảy mầm, như ở hạt trong tự nhiên.

(5) Phân hóa SAM và RAM

SAM bắt đầu ở giai đoạn phôi hình cầu muộn, và xuất hiện rõ ở giai đoạn lá mầm. Ở cà rốt, phôi soma sẽ không tạo được sơ khởi lá nếu SAM chứa tế bào hóa không bào và có nhiều khoảng trống giữa các tế bào. Tạo RAM liên quan tới tế bào yên (tế bào dây treo ở vị trí cao nhất), và cần dây treo hiện diện, vì phôi không tạo được RAM nếu thiếu dây treo.



Hình 1.1. Sự hình thành phôi của cây *Arabidopsis* từ tế bào trứng đến phôi ở giai đoạn hình tim [49].

1.3.5. Ảnh hưởng của các chất điều hòa sinh trưởng thực vật đến sự phát sinh phôi soma

Nồng độ của PGRs có vai trò rất quan trọng trong nuôi cấy tạo phôi. Khi nồng độ thấp, mẫu cấy sẽ không thể cảm ứng sinh phôi, ngược lại nồng độ cao có thể gây độc cho mẫu [37].

1.3.5.1. Auxin

PGRs, đặc biệt là auxin, có liên hệ chặt chẽ đến sự chuyển đổi tế bào sinh dưỡng thành phôi. Việc sử dụng các auxin ngoại sinh giúp điều hòa sự phát triển của phôi soma bằng cách thay đổi hàm lượng auxin nội sinh như IAA. Việc đưa các loại auxin khác nhau vào môi trường nuôi cấy thường được sử dụng để kích hoạt quá trình phân biệt hóa tế bào ở cả cây hạt trần và hạt kín. Bên cạnh việc thúc đẩy sự phân chia tế bào trong mẫu cấy, auxin liên quan trực tiếp hoặc gián tiếp đến những thay đổi trong biểu hiện gen, tổng hợp protein, điều chỉnh và tái tổ chức chromatin cần thiết để bắt đầu con đường phát sinh phôi. 2,4-D là auxin tổng hợp được nghiên cứu rộng rãi nhất và ứng dụng trong các hệ thống tạo phôi thực vật khác nhau. Ở đậu nành, so với 2,4-D, phôi soma do NAA cảm ứng có hình thái giống phôi hợp tử hơn. 2,4-D, nhất là ở nồng độ cao, giúp mô sẹo phát triển nhanh, nhưng thường tạo nhiều phôi soma thứ cấp và phôi tạo cây con không bình thường. Ở cây một lá mầm, xử lý 2,4-D ở nồng độ thấp dần tương ứng số phôi ít dần, nhưng phôi có chất lượng tốt hơn và tỷ lệ nảy mầm cao hơn.

Auxin tự do đạt tới mức cao trước giai đoạn phôi hình cầu, và giảm mạnh khi phôi phát triển tính hữu cực và sinh cơ quan phôi. Auxin liên kết (amid hay ester) cao hơn auxin tự do vài lần, và cũng giảm theo cách tương tự.

Trong giai đoạn tạo tế bào sinh phôi, auxin có vai trò cảm ứng tăng sinh và phân biệt hóa của tế bào, từ đó làm mất tính hữu cực của tế bào. Trong giai đoạn tiến hóa phôi soma, khi mô sẹo được chuyển sang môi trường có ít hay không có auxin, tính hữu cực mới của tế bào xuất hiện nhanh chóng ngay khi tế bào soma vào con đường sinh phôi (giống tế bào hợp tử), giúp phôi qua các biến đổi hình thái đặc trưng. Mẫu được cấy chuyển sang môi trường không bổ sung auxin để thiết lập tính phân cực của tế bào, đây là giai đoạn đầu tiên của quá trình phát triển phôi [34].

1.3.5.2. Cytokinin

Auxin và cytokinin tham gia vào quá trình điều hòa quá trình phân chia và biệt hóa tế bào trong mô thực vật, dẫn đến sự hình thành phôi soma. Cytokinin được cho là có liên quan nhiều hơn đến sự biệt hóa và phát triển hơn nữa của phôi soma [42].

Ngoài auxin, việc sử dụng một số loại cytokinin như BAP, TDZ, kinetin và zeatin cho kết quả tốt. Cytokinin ngoại sinh không làm thay đổi phản ứng của mô cây ở nồng độ thấp, nhưng làm giảm tăng trưởng và cản trở phát triển khi ở nồng độ cao [34].

Phôi sinh dưỡng ở một số loài thực vật hình thành gián tiếp từ những mẫu nuôi cấy trên môi trường có bổ sung cytokinin [50]. Tuy nhiên, vai trò của cytokinin riêng lẻ trong giai đoạn cảm ứng phát sinh phôi rất ít được đề cập, nhưng ở một vài loài thì cần phối hợp giữa auxin và cytokinin. Cytokinin thúc đẩy quá trình cảm ứng hình thành phôi soma từ nuôi cấy mô sẹo ở *Phaseolus* [51], *Trifolium* [52], *Arachis hypogaea* [53], *Dendrobium cv. Chiengmai Pink* [54]. Trong vài trường hợp, sự bổ sung cytokinin giúp cho sự tái sinh của phôi sinh dưỡng như sự hiện diện của BA ở các mẫu cấy cây hoa hồng đã giúp cho phôi sinh dưỡng trưởng thành [55].

1.3.5.3. Gibberellin, ethylene và ABA

Gibberellin (GA) và ethylene đôi khi ảnh hưởng tới sinh phôi soma. GA kích thích nảy mầm, qua đó kích thích tạo mô sẹo từ hạt lúa nảy mầm trên môi trường có auxin, trong khi ethylene liên quan trong hiện tượng ú nước, là “bệnh sinh lý” trong nuôi cấy *in vitro*, làm cho mô trở nên trong suốt và mỏng nước, thường xảy ra trên môi trường lỏng hay nửa-rắn (ít agar), nhất là trong bình nuôi cấy quá kín hơi nước chưa bão hòa [34].

ABA giúp trưởng thành và nảy mầm của phôi soma (đậu nành, hướng dương,...) và tái sinh cây đơn bội từ hạt phấn lúa. Trong vài trường hợp, sự dùng flouridon, một chất cản sinh tổng hợp ABA, cản sinh phôi soma [34].

1.4. Sự đa bội hóa ở thực vật

1.4.1. Khái niệm đa bội

Đa bội, là trạng thái có nhiều hơn 2 bộ NST, từ lâu đã được công nhận là động lực chính của quá trình tiến hóa và hình thành thực vật [56]. Đa bội là hiện tượng số tổ hợp NST đơn bội trong nhân tế bào tăng lên gấp bội. Nếu gọi một tổ hợp đơn bội NST là n thì nhân tế bào soma lưỡng bội là $2n$, tam bội là $3n$, tứ bội là $4n$,... Các thể đa bội tự nhiên đã được xác định trong một loạt các đơn vị phân loại và các ước tính gần đây cho thấy hầu hết thực vật hạt kín đã trải qua các sự kiện đa bội trong lịch sử tiến hóa của chúng [57]. Các lợi thế tiến hóa, thích nghi tiềm năng của thể đa bội bao gồm tăng ưu thế lai, dư thừa gen, độ bền đột biến và tính đa dạng kiểu hình [58], [59].

1.4.2. Phân loại các dạng đa bội của thể đa bội

Thể đa bội được phân làm 2 loại chính là đa bội thể nguyên (euploidy) và đa bội thể lệch (aneuploidy).

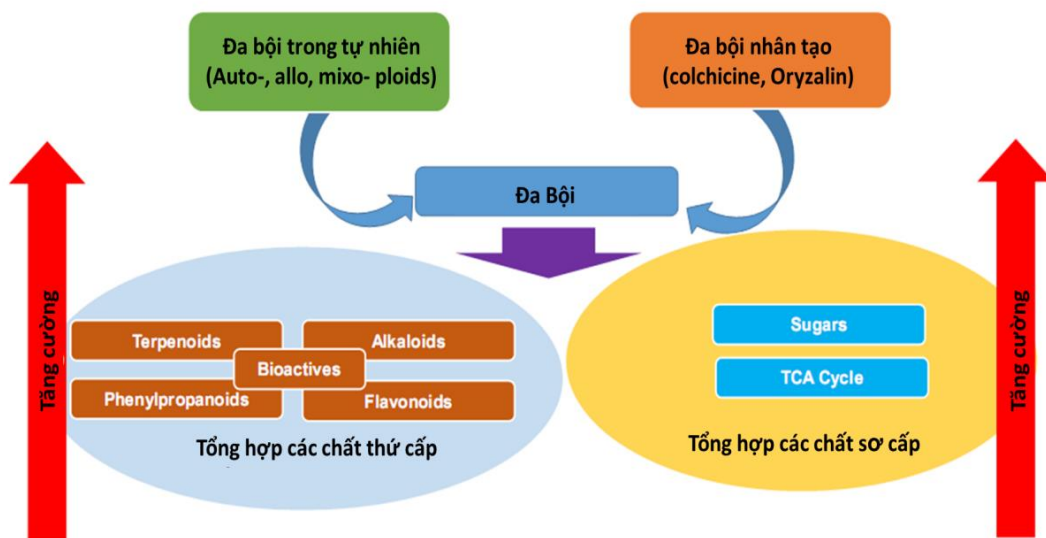
Đa bội thể nguyên: Bộ NST của dạng này chứa một số nguyên lần số tổ hợp NST như $3n$, $4n$, $5n$, $6n$... Trong đa bội thể nguyên, tùy theo con đường phát sinh có thể theo hai kiểu: thể tự đa bội (autopolyploidy), dị đa bội (allopolyploidy).

Đa bội thể lệch bội: có bộ NST thay đổi số lượng cặp NST. Ở bộ NST $2n$ có 1 (hoặc 2) đôi NST nào đó bị mất 1 (hoặc 2) hay thêm vào 1 (hoặc 2) NST. Tùy thuộc vào dạng thay đổi mà ta có các tên gọi khác nhau như thể một ($2n - 1$), thể ba ($2n + 1$), thể không ($2n - 2$), thể bốn ($2n + 2$). Ngoài thể lệch bội đơn (thay đổi NST ở một đôi), còn tồn tại các thể lệch bội kép, đó là trường hợp ở hai đôi NST nào đó đều có sự thay đổi số lượng như thể một kép ($2n - 1 - 1$), thể ba kép ($2n + 1 - 1$),...

1.4.3. Cảm ứng đa bội nhân tạo

Sự cảm ứng đa bội nhân tạo là công cụ hữu hiệu để hỗ trợ tìm hiểu các quá trình tiến hóa, góp phần cải tiến và nhân giống cây trồng. Các thể đa bội thường sở hữu những đặc điểm ưu thế như lá dày và màu sẫm hơn; hoa to, lâu tàn và cánh hoa dày hơn; sức sống mạnh hơn; khả năng chống chịu với stress từ môi trường, sâu bệnh cao hơn; tăng sản xuất các chất chuyển hóa và có thể phục hồi khả năng sinh sản ở các con lai [58], [60], [61]. Hơn nữa, đa bội là một trong những con đường quan trọng

để hình thành các loài mới, gia tăng sự đa dạng sinh học, đặc biệt ở thực vật. Mặc dù, nhiều nghiên cứu tập trung ở đa bội khác loài (allopolyploid), nhưng đa bội cùng loài (autopolyploid) cũng xảy ra phổ biến ở thực vật bậc cao. Khả năng nhiều alen trên một locus có thể dẫn đến sự tương tác alen hoặc ảnh hưởng bởi số lượng alen có thể có sự thay đổi trong điều hòa và biểu hiện gen dẫn đến thay đổi về kiểu hình và biểu hiện gen. Nghiên cứu cơ chế phân tử biểu hiện gen và điều hòa gen trên cây đa bội cùng loài ngoài tự nhiên cũng như đa bội nhân tạo cho thấy cây đa bội thường tăng kích thước cơ quan, vượt qua sự bất thụ, gia tăng hàm lượng các hợp chất tự nhiên cũng như các sản phẩm trao đổi chất, tăng khả năng thích ứng với stress sinh học và phi sinh học (khô, hạn, mặn...) và thích nghi tốt hơn với các môi trường sinh thái [62]. Đa bội trong tự nhiên và nhân tạo đã tác động đến con đường tổng hợp các hợp chất sơ cấp và thứ cấp và từ đó làm thay đổi sự tích lũy các chất liên quan đến con đường này, từ đó làm ảnh hưởng đến các biểu hiện sinh lý và sinh hóa của nhiều đối tượng thực vật [61].



Hình 1.2. Hiện tượng đa bội trong tự nhiên và nhân tạo giúp tăng cường tổng hợp chất chuyển hóa sơ cấp và thứ cấp [61].

Sự thành công của kỹ thuật đa bội ngày nay là do sự phát triển đồng thời với nhiều quy trình nuôi cấy *in vitro* hiệu quả trên nhiều đối tượng cây trồng. Bởi vì các hệ thống nuôi cấy mô thực vật thường khó khăn với nhiều đối tượng thực vật, đặc biệt là cây thân gỗ và chỉ thành công với một số loài hạn chế. Do vậy, việc phát triển

quy trình thường cần được tiến hành đối với từng loài và dòng thực vật để tối ưu hóa các quy trình tái sinh có thể áp dụng cho cảm ứng tạo đa bội *in vitro* [63].

Một số yếu tố quan trọng phải được xem xét để thiết lập quy trình đa bội hóa thành công gồm kiểu gen thực vật và loại mẫu cấy. Bên cạnh đó, loại chất kháng phân bào được sử dụng, thời gian xử lý và nồng độ cũng được xem là các yếu tố chính. Việc nghiên cứu ảnh hưởng của các yếu tố thực vật và chất kháng phân bào rất cần thiết để thiết lập hệ thống nhân giống thông qua quy trình đa bội hóa và cải tiến các giá trị kinh tế của cây trồng [64].

1.4.3.1. Các tác nhân gây đột biến đa bội

Cảm ứng đa bội phụ thuộc vào nhiều yếu tố như: loại chất kháng phân bào, nồng độ và thời gian xử lý với của tác nhân đa bội phù hợp [63].

Tế bào đa bội có thể hình thành phụ thuộc vào nhiều yếu tố vật lý, hoá học khác nhau. Để gây đột biến đa bội, người ta thường dùng tác nhân gây đột biến sau:

Sử dụng phương pháp sốc nhiệt: Nhiệt độ thay đổi đột ngột làm cho sự phân chia của tế bào bị rối loạn.

Gây vết thương cơ giới như ly tâm, khuấy,... : Một tác nhân cơ giới tác động vào tế bào khi đang phân chia làm đứt hoặc không hình thành thoi vô sắc dẫn đến hình thành tế bào đa bội.

Dùng tia phóng xạ ion hóa: Sử dụng tia ronghen, chùm tia neutron và proton gây rối loạn phân bào.

Dùng các chất hóa học gây đột biến: Đây là phương pháp được cho là có hiệu quả cao nhất và được sử dụng nhiều trong việc tạo ra đa bội thể. Các tác nhân hóa học được sử dụng để gây đa bội thể là colchicine, oryzalin, ethyl methyl sunfonate (EMS), acenaphthen. Ngoài ra có thể phối hợp thêm một số acid, kiềm, muối, glyxerin để có hiệu quả tốt nhất.

1.4.3.2. Cơ chế hình thành thể đa bội

Một số rối loạn diễn ra trong quá trình nguyên phân hay giảm phân của tế bào làm cho quá trình phân bào diễn ra không bình thường và hình thành tế bào đa bội. Nguyên nhân là do các NST sau khi nhân đôi nhưng không phân ly về hai cực tế bào

do không hình thành thoi vô sắc hoặc có sự phân ly về cực tế bào nhưng không đồng đều.. Sự rối loạn phân bào xảy ra ở tế bào soma hoặc ở thời kỳ phân chia thứ nhất của hợp tử [65].

Dạng tự đa bội được hình thành do quá trình nội phân (endomitosis) xảy ra trong tế bào sống khi bộ NST nhân đôi nhưng không kèm theo phân bào, do đó số lượng NST được tăng gấp đôi, tức là đa bội hóa và từ đó dẫn tới hình thành các mô đa bội hoặc cơ thể đa bội do sinh sản sinh dưỡng [65].

Dạng dị đa bội được hình thành qua quá trình tạo các giao tử và hợp tử đa bội, nghĩa là sự tạo thành các hợp tử đa bội từ các giao tử của các cơ thể khác nhau (tức là qua hiện tượng lai). Ngoài ra, các dạng đa bội cũng có thể được hình thành từ sự giao phối giữa những cây khác loài, cây có họ hàng xa về mặt di truyền [65].

1.4.4. Ứng dụng đa bội trong nhân giống cây dược liệu

Cảm ứng đa bội hóa là một phương pháp tạo giống cây trồng có thể tạo ra các kiểu gen mới với đặc tính hình thái, đặc điểm 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 [64].

Đối với những loài cây dược liệu, là loài cây có chứa các phân tử chuyên biệt có công dụng làm thuốc chữa bệnh, sử dụng phương pháp đa bội hóa có thể làm biến đổi tỷ lệ 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 thông qua việc biểu hiện các gen im lặng trước đây không được biểu hiện hoặc mất một số các thành phần do ức chế chức năng của gen. Sự cảm ứng đa bội có thể thay đổi kiểu biểu hiện (tăng lên, im lặng và điều hòa tăng/giảm) của các gen được nhân đôi, ảnh hưởng đến hệ thống chuyển hóa - phiên mã (transcriptome–metabolome) và cuối cùng dẫn đến xuất hiện các thể có kiểu hình mới - bao gồm cả kiểu hình mong muốn và không mong muốn trên cây dược liệu. Do đó, hiệu quả của phương pháp cảm ứng đa bội nhân tạo phải được tăng lên để tạo ra một lượng lớn các

thể đa bội cảm ứng với tỷ lệ thấp hơn của các thể tạp bội và sàng lọc kiểu hình mong muốn trong số các thể đa bội cảm ứng có kiểu hình khác nhau [64].

Việc khai thác nguồn gen các loài cây dược liệu vẫn đang còn ở giai đoạn sơ khai. Ở cây đa bội, kích thước hoa, lá, quả và hạt đều tăng. Hoạt động của enzyme và việc sản xuất các chất chuyển hóa thứ cấp có hoạt tính sinh học cũng có thể được tăng cường bằng đa bội hóa. Sự nhân lên của bộ gen và số lượng gen trong thể tự bội có thể giúp tăng năng suất chất chuyển hóa. Cây đa bội có thể có kiểu hình khác hoặc giống với cây bố mẹ lưỡng bội; chúng không bị hạn chế bởi các đặc điểm của tổ tiên lưỡng bội và có thể có mức độ khác nhau về tính chống chịu hạn hán và côn trùng, sản xuất sinh khối, chất lượng và nồng độ của các HCTC [66].

1.4.5. Ưu điểm của cây đa bội

Về hình thái: Cây đa bội thường có kích thước thân to, cao, lá dày; khí khổng lớn; hoa và quả to. Cường độ hô hấp, áp suất thẩm thấu của tế bào cao hơn cây lưỡng bội. Khả năng chống chịu của cây đa bội cao hơn cây lưỡng bội (chống hạn, chống bệnh).

Sinh hoá: Hàm lượng các chất như đường, protein, lipid, vitamin... ở cây đa bội cao hơn so với cây lưỡng bội.

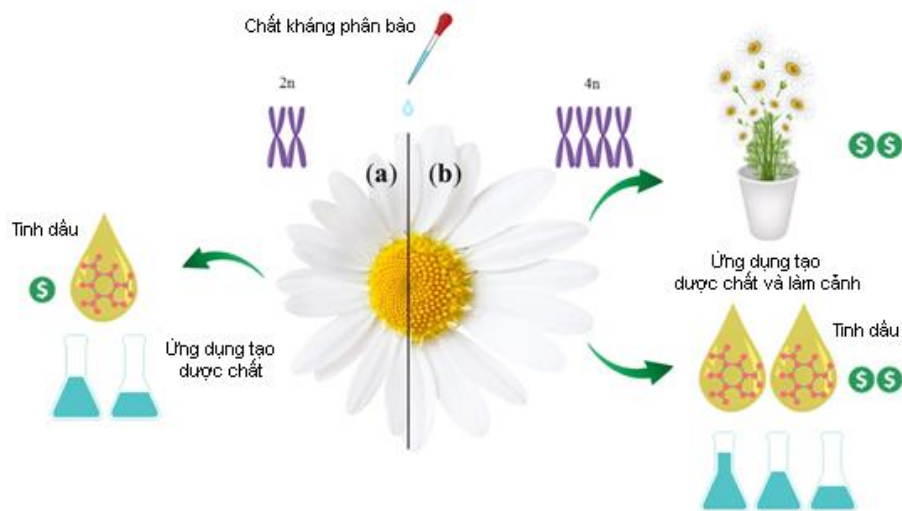
Tính bất dục: Cây đa bội thể cùng nguồn hoặc cây tam bội có tính bất dục đực cao hơn do quá trình phân bào diễn ra không bình thường.

Tính di truyền: Cây đa bội có ưu thế lai duy trì được lâu hơn và khi tự phối ít thoái hoá hơn cây lưỡng bội. Cây đa bội ít phân ly hơn cây lưỡng bội.

Tế bào học: Tế bào đa bội thường lớn hơn tế bào lưỡng bội. Trong tế bào đa bội, kích thước khí khổng lớn hơn, mật độ khí khổng lại nhỏ hơn và lục lạp cũng nhiều hơn so với thể lưỡng bội. Số lượng NST tăng gấp bội và kích thước hạt phấn lớn hơn ở cây lưỡng bội.

Vì các tế bào đa bội có xu hướng sở hữu khả năng tăng trưởng cao hơn, các tế bào này có khả năng hỗ trợ tăng trưởng cơ quan và cân bằng nội môi trong môi trường hợp không xảy ra nguyên phân. Đa bội hóa làm tăng kích thước tế bào và sự sản xuất sinh khối mà không làm phá vỡ cấu trúc tế bào và mô. Ngoài ra còn cải thiện tuổi thọ của tế bào nhờ tính chống chịu với stress [67].

Hầu hết các thể đa bội đã được ghi nhận có biểu hiện trội hơn các cây lưỡng bội cùng họ được gọi là thể “giga” [68]. Tuy nhiên, chất lượng và năng suất của các thể đa bội không phải lúc nào cũng cao hơn so với cây lưỡng bội cùng họ [59]. Hiện tượng “giga” đề cập đến sự gia tăng kích thước của tế bào (dẫn đến kích thước cơ quan lớn hơn) do kết quả của việc nhân đôi NST [1], [59], [69]. Mặc dù, kích thước tế bào thường lớn hơn ở các thể đa bội và sự mở rộng kích thước tế bào là tác dụng phổ biến nhất của quá trình đa bội hóa ở thực vật. Tuy nhiên, kích thước trưởng thành và sinh khối cuối cùng có thể không phải lúc nào cũng tăng ở thực vật [70]. Tỷ lệ giữa diện tích bề mặt và thể tích nhỏ hơn ở tế bào lớn hơn có thể làm giảm tốc độ phát triển của tế bào đa bội. Sự điều hòa kích thước và số lượng tế bào là một chiến lược thích ứng sinh thái ở thực vật. Do đó, việc kích thước tế bào tăng nhưng số lượng tế bào giảm là nguyên nhân một số loài thực vật không xảy ra hiện tượng thay đổi kích thước cơ thể do đa bội hóa [71]. Đôi khi các cây tứ bội không những không to hơn về mặt kích thước mà còn nhỏ hơn cây lưỡng bội [72].



Hình 1.3. Sự khác nhau về hình thái giữa cây ở thể lưỡng bội (a) và tứ bội (b) [64].

Cây đa bội được cho là có sức sống cao và thích nghi rộng, có sức chống chịu cao với điều kiện bất lợi [73]. Đối với cây đa bội, có sự gia tăng hàm lượng đường và các vitamin [74]. Trên cây thuốc lá và đại mạch nghiên cứu gần đây cho thấy thông qua việc xác định hàm lượng tro của cây đa bội cho thấy hàm lượng tro cao do tế bào đa bội có màng dày [75].

Theo Gu và cộng sự (2005), đối với cây thể tứ bội có hoa nở chậm hơn cây lưỡng bội trung bình từ 3 đến 4 ngày trên cùng một cánh đồng [68]. Hơn nữa, nghiên

cứu của Chen và cộng sự (2011) cho thấy trên cây hồng môn (*Anthurium andraeanum*) tứ bội có kích thước của khí khổng lớn hơn nhưng mật độ khí khổng thấp hơn cây lưỡng bội [76].

Sau khi xử lý chồi cây *Ocimum basilicum* với colchicine, Omidbaigi và cộng sự (2010) kết luận rằng hơn 60% lá dày và xanh đậm hơn đối chứng (ĐC) [77]. Dunn và cộng sự (2007) cho rằng kích thước lá, độ dày lá đặc điểm hình thái tốt nhất để phân biệt thể đa bội ở *Buddleja* L. Hơn nữa, kích thước hoa, hạt phấn, đường kính thân, chiều dài lông là những đặc điểm để phân biệt sau khi phát triển ở vườn ươm [78].

Nghiên cứu trên *Cannabis sativa* cho thấy cây con được xử lý đa bội với 0,05% colchicine có biểu hiện lá mầm và trụ hạ diệp dày hơn, có khí khổng lớn hơn và mật độ khí khổng giảm so với cây lưỡng bội [79]. Sự thay đổi về kiểu hình tương tự cũng biểu hiện ở cây chuối Namwa lục bội (*Musa spp.*) [80], *Lilium davidii* var. *unicolor* tứ bội [81] và *Robinia pseudoacacial* tứ bội [82].

Nghiên cứu trên *Populus cathayana* Rehd cho thấy cây tam bội có sự rò rỉ chất điện giải và hàm lượng malondialdehyde (MDA) tương đối thấp hơn, hàm lượng nước tương đối và Proline tự do cao hơn, đồng thời hệ thống quang hợp và chống oxy hóa hiệu quả hơn so với cây lưỡng bội trong điều kiện stress hạn. Kết quả trên chứng tỏ rằng cây đa bội có sự chống chịu tốt hơn trong điều kiện áp lực hạn hán tăng dần [83].

1.4.6. Cải tiến giống cây trồng

Thay đổi di truyền

Sự nhân đôi toàn bộ bộ gen có thể gây ra những thay đổi về mặt di truyền như thay đổi trong biểu hiện gen và chức năng gen ảnh hưởng đáng kể đến sự phát triển và chọn giống cây trồng. Các tác động cụ thể của hiện tượng đa bội có thể rất khác nhau giữa các loài và các yếu tố liên quan đến cảm ứng đa bội [84].

Thay đổi về hình thái

Những thay đổi về hình thái được ghi nhận thường xuyên khi nhiễm sắc thể được nhân đôi sau khi xử lý đa bội trên nhiều đối tượng thực vật. Trong đó, sự gia tăng kích thước khí khổng thường được sử dụng để xác định sự nhân đôi của nhiễm sắc thể [85]. Bên cạnh đó, các đặc điểm như kích thước và độ dày của lá [78], kích

thước và số lượng chùm hoa [86], chiều dài lóng và chiều cao cây [87] đều được báo cáo là bị ảnh hưởng bởi sự nhân đôi của nhiễm sắc thể. Sự gia tăng kích thước và sinh khối cũng được cho là kết quả của sự đa bội hóa. Ví dụ, nhiều loại cỏ được sử dụng làm nguyên liệu cung cấp năng lượng sinh học là loại đa bội [88].

Tạo giống cây trồng không hạt

Cảm ứng đa bội *in vitro* tạo điều kiện để cải tiến và phát triển các giống cây trồng, giống không hạt. Trong đó để phát triển cây không hạt hiệu quả là tạo ra các cây tam bội (cây có ba bộ nhiễm sắc thể) bằng cách lai giữa cây lưỡng bội với cây tứ bội được cảm ứng đa bội nhân tạo [89]. Cách này đã được áp dụng thành công đối với một số loài như *Miscanthus sinensis* [90].

Sự thay đổi các đặc tính hình thái và sinh lý

Bảng 1.1. Sự thay đổi các đặc tính hình thái và sinh lý của thể đa bội [91].

Loại thực vật	Tác nhân đa bội	Vật liệu thực vật	Các đặc tính thay đổi
<i>Lilium regale</i>	Colchicine	Vảy củ	Mật độ khí khổng giảm, kích thước rộng hơn, kích thước lá lớn, cuống dài, chiều dài và chiều rộng lá rộng, chồi thấp hơn
<i>Impatiens walleriana</i> (Hook.)	Oryzalin	Chồi đỉnh	Tăng diện tích lá, độ dày lá, chiều rộng bầu nhụy tăng, tăng chiều dài và kích thước khí khổng, tăng số lượng lục lạp trong tế bào bảo vệ khí khổng giảm, chiều cao cây giảm.
<i>Lilium distichum</i> Nakai and <i>Lilium cernuum</i> Komar	Colchicine	Phôi soma	Lá rộng, tế bào bảo vệ dài, khí khổng và độ mở khí khổng lớn hơn, hàm lượng chlorophyll cao, nhiều lá, tế bào bảo vệ dài hơn.
<i>Catharanthus roseus</i> (L.) G. Don	Colchicine	Lá	Chiều dài, đường kính của khí khổng và số lục lạp trong tế bào bảo vệ khí khổng tăng lên. Tăng đường kính của các nhánh bên. Tăng chiều dài và chiều rộng lá, chiều dài cánh hoa và chiều rộng, và độ bền của hoa cũng tăng, tăng đường kính gốc, trọng lượng tươi và khô của rễ, tăng chiều dài hạt và đường kính hạt.
<i>Anemone sylvestris</i> L.	Oryzalin	Cây	Cây khỏe, sức sống tốt và ra hoa sớm.
<i>Hedychium coro-narium</i>	Colchicine	TCL	Tăng chiều rộng và chiều dài của lá, tăng chiều cao cây, sự phát triển của thân rễ cũng tăng, khí khổng lớn hơn, kích thước hoa và hạt phấn hoa lớn hơn, hoa kéo dài tuổi thọ.
<i>Bletilla striata</i> (Thunb.) Reichb.f	Colchicine	Hạt	Khí khổng lớn với mật độ thấp hơn, phiến lá lớn và cuống lá dày hơn.
<i>Hibiscus moscheutos</i> L. Luna red	Colchicine oryzalin	Hạt nảy mầm	Giảm chiều cao với kích thước nhỏ gọn hơn, tăng tổng thể độ dày của lá, hoa nở lâu, cây tứ bội không tạo phấn hoa, cây tam bội chỉ sản xuất phấn hoa nhưng hạt phấn không thể sống được.
<i>Agastache foeniculum</i>	Colchicine Oryzalin Trifuralin	Mô phân sinh đỉnh	Kích thước và mật độ khí khổng, số lượng lục lạp, hình thái đặc trưng (lá chiều dài và chiều rộng, khoảng cách giữa các đốt thân, diện tích lá, chiều cao cây, trọng lượng tươi và trọng lượng khô đều tăng.

Bảng 1.2. Sự cảm ứng đa bội ở các cây dược liệu [64]

Loại thực vật	Tác nhân đa bội	Vật liệu thực vật	Tỉ lệ đa bội (%)	Các phân tử dược phẩm thay đổi mong muốn /không mong muốn	Thành phần mới được sản xuất / mất đi
Ajowan	Colchicine	Hạt nảy mầm	11,53	Thymol (19.53%)	-/ α -Terpieol
Andrographis (<i>Andrographis paniculata</i>)	Colchicine	Lóng, hạt nảy mầm và hạt	40	Andrographolide (28%)	-/-
Anise (<i>Agastache foeniculum</i> L.)	Colchicine & trifuralin & oryzalin	Mô phân sinh, hạt	16-20	-	-/-
Cannabis (<i>Cannabis sativa</i> L.)	Oryzalin	Chồi bên	100	Cannabidiol (9%)	-/-
<i>Citrus limon</i> (L.)	Colchicine	Hạt	36,36	-	veo, geranial, β -bisabolene/isocartransa - bergamotene
Gardenthyme (<i>Thymus vulgaris</i> L.)	Oryzalin	Đốt thân	7,5	Thymol, carvacrol	-/-
Iranianpoppy (<i>Papaver bracteatum</i>)	Colchicine	Hạt giống 1 tháng tuổi	11,44	Thebaine, noscapine	-/-
Ispaghul (<i>Plantago ovata</i> Forsk.)	Colchicine & trifuralin	Chồi đỉnh	20 \pm 3.3	-	-/-
<i>Lippia alba</i>	Colchicine	Đốt thân		-	-/Citral and Linalool
Eucalyptus (<i>Eucalyptus polybractea</i>)	Colchicine	Chồi bên	-	1,8-cineole/sabinene	-/-
Orchids (<i>Dendrobium Phalaenopsis</i>)	Colchicine & amiprofos-methyl	Protocorm	80	Shihunidine-hircinol	-/-
<i>Plantago psyllium</i>	Colchicine & trifuralin	Chồi đỉnh	23 & 19	Mucilage	-/-

1.4.7. Các tác nhân hóa học chính được sử dụng trong cảm ứng đa bội

1.4.7.1. Colchicine

Colchicine thuộc nhóm chất alkaloid, có chủ yếu ở củ và hạt của loài *Colchicum autumnade* phân bố chủ yếu ở vùng địa Trung Hải. Colchicine có công thức phân tử $C_{22}H_{25}O_6N$ là một trong những chất hoá học được sử dụng rộng rãi để tạo các thể đa bội [92].

- Tính chất và tác dụng của colchicine

Sau khi kết tinh, colchicine có dạng tinh thể màu vàng nhạt, nóng chảy ở $155^{\circ}C$; tan trong rượu, cloroform, nước lạnh, ít tan trong nước nóng, benzen lạnh và hầu như không tan trong ether. Colchicine là hợp chất khá bền vững với nhiệt độ, nhưng dễ bị mất hoạt tính bởi ánh sáng [93]. Colchicine kết tủa với nhiều thuốc thử của alkaloid. Colchicine có khả năng khuếch tán mạnh vào tế bào thực vật, chỉ ở những mô phân chia mạnh khi chịu tác động của colchicine sẽ gây hiện tượng đa bội hóa [94].

- Cơ chế tác động của colchicine

Cuối năm 1930, Blakeslee và Avery đã khám phá ra rằng colchicine ức chế sự hình thành của thoi vô sắc ở kỳ giữa và ngăn chặn một cách hiệu quả quá trình phân bào diễn ra ở kỳ sau [93]. Ở pha này, các NST đã được nhân lên nhưng sự phân bào vẫn chưa diễn ra, sự hình thành của thành tế bào bị hạn chế, kết quả là tế bào đa bội được tạo ra. Các tế bào đa bội lớn hơn tế bào lưỡng bội, các tế bào này phát triển thành những mô dày hơn, kết quả là tạo ra các cơ quan, bộ phận của cây trồng có kích thước lớn hơn. Nó cũng ảnh hưởng tới kích thước và số lượng khí khổng, đường kính hạt phấn và tính trạng hình thái khác biểu hiện theo mức độ đa bội mới.

Đa bội phụ thuộc vào việc phá vỡ chu kỳ tế bào để ngăn chặn sự di chuyển về cực của nhiễm sắc thể trong anaphase. Các chất khác nhau, từ caffein và oxit nito đến thuốc diệt cỏ kháng vi ống đều được chứng minh là có thể cảm ứng đa bội [95]. Tuy nhiên, một số hợp chất kháng vi ống như colchicine và oryzalin sử dụng *in vitro* để cảm ứng đa. Colchicine [N-5,6,7,9-tetrahydro-1,2,3,10-tetra-methoxy-9-oxobenzo (a) heptalen-7-yl] acetamide là chất ức chế phân bào được sử dụng phổ biến nhất và đã được sử dụng để phục hồi đa bội ở nhiều loài. Colchicine được chiết xuất từ củ

của cây *Colchicum autumnale* và được sử dụng rộng rãi như một loại thuốc điều trị bệnh gút và các bệnh viêm nhiễm khác. Là một chất kháng phân bào, colchicine phá vỡ chu kỳ tế bào, bắt đầu từ metaphase, nơi nó làm mất ổn định các vi ống bằng cách liên kết với tiểu đơn vị β -tubulin để tạo thành phức hợp colchicine-tubulin. Do đó, colchicine ngăn chặn quá trình trùng hợp (polymerization) vi ống, mà không ảnh hưởng đến quá trình khử trùng hợp, dẫn đến sự phân hủy vi ống [96]. Trong nhân đôi nhiễm sắc thể *in vitro*, colchicine có ưu điểm là hòa tan trong nước, bền nhiệt, có thể hấp khử trùng và dễ dàng áp dụng cho các mô thực vật. Tuy nhiên, colchicine có ái lực liên kết cao với các vi ống của động vật và có khả năng gây độc cho người [97]. Ngược lại, colchicine có ái lực liên kết tương đối thấp với các vi ống của thực vật, đòi hỏi nó phải được sử dụng ở nồng độ cao để duy trì hiệu quả.

- Thời gian và nồng độ xử lý

Tùy thuộc vào từng loại cây, đặc tính sinh lý và thời gian phân bào mà ta có thể xử lý mẫu cây ở thời gian và nồng độ thích hợp để đạt hiệu quả cao. Nếu thời gian xử lý quá dài thì mẫu sẽ bị chết hoặc không thể sinh trưởng được, còn nếu thời gian quá ngắn thì khả năng tạo đột biến không cao. Nồng độ colchicine xử lý tùy thuộc vào từng loại cây, colchicine được sử dụng dưới dạng dung dịch hay dạng bán rắn được trộn với lanonin hoặc agar.

- Nguyên tắc

Xử lý colchicine ở những vùng mô đang phân chia mạnh, tốt nhất là xử lý hạt đang nảy mầm, chồi, cây con, đỉnh sinh trưởng, nụ hoa, củ...

Hai yếu tố thời gian xử lý và nồng độ colchicine cho các cơ quan, vùng mô phân sinh ở thời kỳ sinh trưởng của từng đối tượng cây trồng khác nhau phải được xác định bằng thực nghiệm. Trong và sau thời gian xử lý cần tạo môi trường tối ưu để cho cây sinh trưởng và phát triển bình thường.

1.4.7.2. Oryzalin

Oryzalin là chất được đăng kí lần đầu tại Mỹ năm 1974, được sử dụng làm thuốc diệt cỏ hàng năm, cỏ lá rộng và cây bụi. Công thức hóa học của oryzalin là $C_{12}H_{18}N_4O_6S$ thuộc nhóm dinitroaniline. Nhiều năm qua, oryzaline được sử dụng để tạo sự đa bội ở cây trồng vì có ảnh hưởng trong ức chế sự phân bào ở thực vật. [98].

Khi oryzalin được xử lý ở nồng độ μM cho kết quả ngang bằng với xử lý colchicine ở nồng độ mM . Ảnh hưởng oryzalin đến quá trình phân bào cũng tương tự colchicine nhưng việc gắn kết với vi ống của colchicine (tubulin) yếu hơn oryzalin [98]. Oryzalin liên kết với vi ống tạo ra phức hợp oryzalin - vi ống làm thoi vô sắc ngừng hoạt động, kết quả là làm ngăn cản sự phân chia tế bào [98].

1.4.7.3. Các tác nhân hóa học khác

Các amide phosphoric là một nhóm thuốc diệt cỏ khác có hoạt tính kháng phân bào, trong đó amiprofos-metyl (APM) đã được sử dụng để nhân đôi NST *in vitro* [99]. APM cho thấy có ái lực cao với α -tubulin trong cây thuốc lá và có thể nhắm mục tiêu vào các vị trí liên kết tương tự như oryzalin [100]. Một ưu điểm của APM là hòa tan được trong nước tăng so với dinitroaniline, do đó sẽ giảm việc sử dụng thêm dung môi. Tương tự, các benzamide, đặc biệt là propyzamide đã cho thấy khả năng nhân đôi NST *in vitro*. Propyzamide cũng nhắm mục tiêu vào các vị trí liên kết tương tự như oryzalin. Cyanoacrylate là một nhóm chất chống phân bào khác có cơ chế tương tự như dinitroaniline. Tương tự như APM và propyzamide, các cyanoacrylat, ethyl (2Z) - 3-amino-2-cyano-4-ethylhex-2-enoate (CA1) và CA2 liên kết với α -tubulin tại các vị trí tương tự như oryzalin. Tuy nhiên, chúng vẫn chưa được sử dụng để cảm ứng tạo đa bội *in vitro* [63].

Nitơ oxide cũng đã được báo cáo là có thể cảm ứng tạo đa bội tuy nhiên cơ chế hoạt động vẫn chưa rõ [63]. Theo Kitamura và cộng sự (2009), nitơ oxide có thể cảm ứng đa bội bằng cách ức chế sự trùng hợp vi ống [101]. Có khả năng là nitơ oxide tương tác với tyrosine để tạo thành nitrotyrosine. Nitrotyrosine có thể thay thế tyrosine trong α -tubulin và ảnh hưởng đến quá trình trùng hợp [63]. Lipka và Müller (2014) nhận thấy rằng nitrotyrosine ở *Arabidopsis thaliana* một mình ức chế quá trình trùng hợp vi ống, nhưng làm giảm độ nhạy cảm với oryzalin do thay đổi vị trí liên kết α -tubulin [102]. Tuy nhiên, nitrotyrosine làm tăng độ nhạy khi nuôi cấy tế bào *Nicotiana tabacum* L. với oryzalin và nitrotyrosine có thể cung cấp thêm chất kháng vi ống [103].

Trái ngược với các chất kháng vi ống, thuốc diệt cỏ carbamate, như protham hoặc chlorprotham, hoạt động để phá vỡ nguyên phân mà không tác động đến quá trình trùng hợp hoặc mất ổn định vi ống. Thay vào đó, carbamate hoạt động để phá

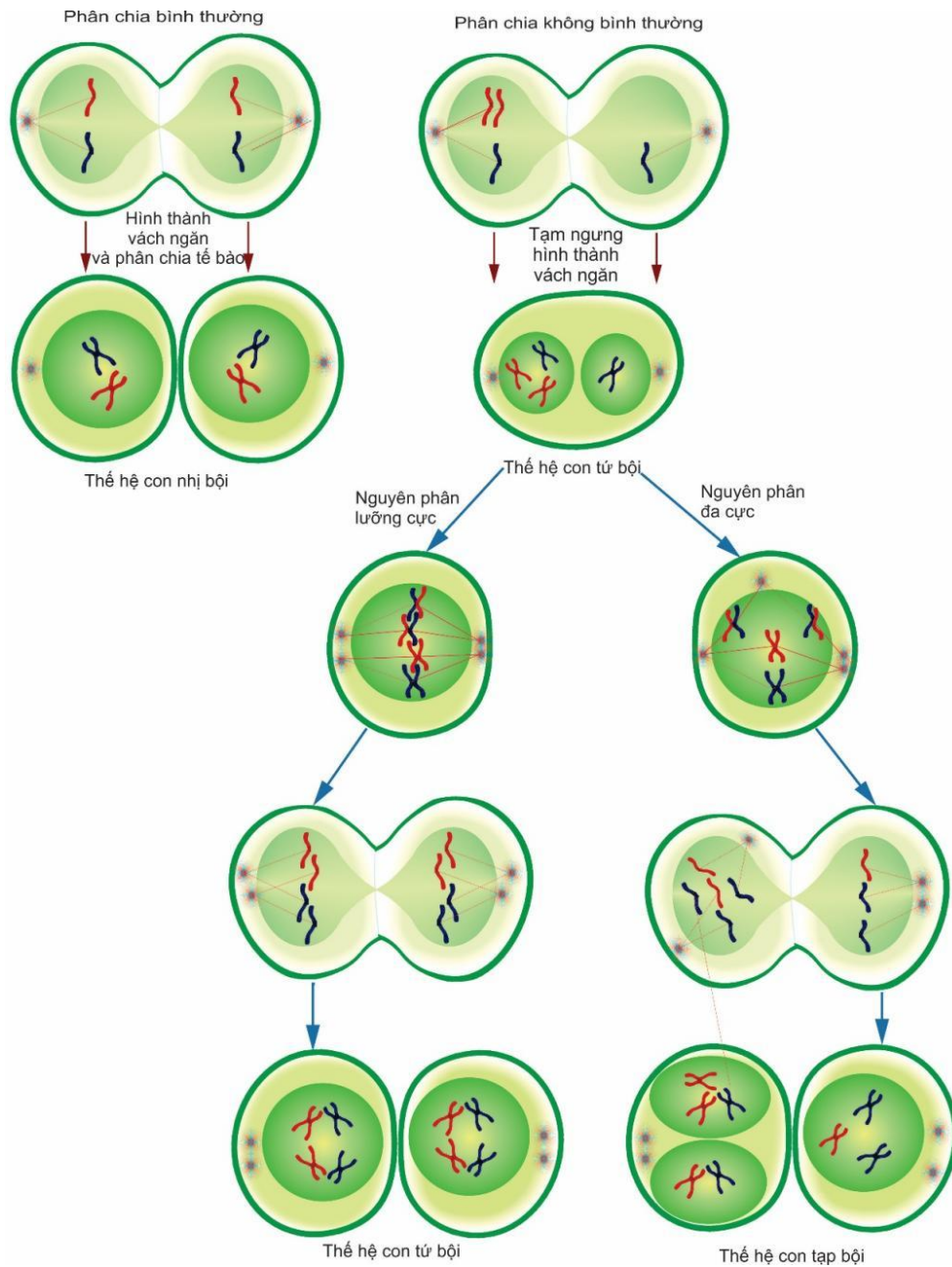
vỡ và phân mảnh các cực trong tế bào, dẫn đến sự di chuyển của NST theo đa cực chứ không phải lưỡng cực. Do đó, không chắc rằng cacbamate sẽ có hiệu quả trong việc phát triển các thể đa bội [63].

Không có báo cáo nào về việc sử dụng chất ức chế proteasome cho các thao tác tạo thể đa bội *in vitro*. Tuy nhiên, các chất ức chế proteasome, như lactacystin và MG132, can thiệp vào các protein điều hòa quan trọng chi phối quá trình chuyển tiếp metaphase, anaphase và cytokinesis. Một hạn chế của chất ức chế proteasome là các phương pháp xử lý không thể đảo ngược hoàn toàn [63].

Một nhóm chất ức chế chu kỳ tế bào khác, gồm hydroxyurea và aphidicolin, hoạt động để bắt giữ chu kỳ tế bào ở đầu pha S. Sau khi loại bỏ chất ức chế, các tế bào tiến qua pha S, G2 và M một cách đồng bộ. Mặc dù các hợp chất này không trực tiếp ảnh hưởng đến thể đa bội, nhưng chúng có thể được xử lý để tạo điều kiện đồng bộ hóa chu kỳ tế bào và tối đa hóa số lượng tế bào bị ảnh hưởng bởi chất kháng vi ống, do đó làm giảm thể tạp bội [63].

1.4.8. Cơ chế hình thành thể đa bội

Phân chia tế bào nguyên nhiễm, giảm nhiễm là cơ chế phân chia chính xác về số lượng NST, đảm bảo cho loài được ổn định về bộ NST qua các thế hệ. Tuy nhiên, trong một số trường hợp sự phân chia bình thường của các tế bào bị phân hủy dẫn tới hình thành các tế bào đa bội. Sự nhân đôi của các NST xảy ra trước phân bào, nhưng các sợi tơ vô sắc bị phân hủy dưới tác động của các yếu tố gây đột biến, làm cho các sợi nhiễm sắc không chạy về hai cực của tế bào. Cuối cùng, lượng vật chất di truyền đã nhân đôi tồn tại ở một bên tế bào, hình thành nên tế bào được đa bội hoá: từ $2n$ trở thành $3n$, $4n$,... (Hình 1.4). Có thể xảy ra trường hợp là các sợi nhiễm sắc được vận động về hai cực của tế bào, song ở giữa tế bào không hình thành vách ngăn để phân đôi hai tế bào con và tế bào trở thành đa bội [104].



Hình 1.4. Cơ chế hình thành thể đa bội.

1.4.9. Các yếu tố ảnh hưởng đến cảm ứng đa bội *in vitro*

1.4.9.1. Loại mẫu cây xử lý đa bội

Mẫu cây thực vật đóng vai trò cốt lõi đối với nghiên cứu đa bội trong điều kiện *in vitro*. Việc sử dụng mẫu cây chứa các mô có khả năng phân chia mạnh là nguồn vật liệu thích hợp nhất cho cảm ứng đa bội *in vitro*, gồm hạt nảy mầm, ngọn chồi, đầu rễ non, đốt thân cây con *in vitro*, chồi bên, chồi đỉnh và phôi [68]. Các mẫu cây khác nhau sẽ có tiềm năng khác nhau đối với cảm ứng đa bội *in vitro* [64]. Cảm ứng đa bội

in vitro phụ thuộc nhiều vào sự sẵn có của các hệ thống tái sinh *in vitro* thành công [64]. Sự tái sinh dựa trên phát sinh SE và cơ quan là các con đường tái sinh chính trong cảm ứng đa bội *in vitro* [64]. Khả năng tạo cây hoàn chỉnh từ một hoặc một vài tế bào có thể cải thiện sự phát triển của cây đa bội đồng nhất và giảm thiểu khả năng xuất hiện dạng hỗn hợp (cytochimeras) [64]. Fu và cộng sự (2019) đã áp dụng các nồng độ colchicine khác nhau trên khúc cắt thân, lá và SE của *Lilium distichum* Nakai và *Lilium cernuum* Komar. Kết quả cho thấy, SE được cảm ứng đa bội tốt hơn so với mẫu cấy lá [68]. Bên cạnh đó, nhiều loại mẫu cấy khác cũng được sử dụng trong cảm ứng đa bội *in vitro* như mô phân sinh đỉnh chồi [105], hạt [106], đốt thân [107], mảnh lá [108] và nuôi cấy huyền phù tạo phôi [109].

Khi các mẫu lóng, cây con và hạt cây dược liệu *Andrographis paniculata* được xử lý với colchicine, tỷ lệ đa bội thu được từ mẫu hạt đạt được cao nhất (40%) [110]. Đối với *Echinacea purpurea*, các thể đa bội được tái sinh từ cuống lá sau khi xử lý bằng colchicine [111]. Tương tự, sự phát sinh cơ quan từ lá *Populus sp.* được xử lý bằng oryzalin dẫn đến đa bội. Sakhanokho và cộng sự (2009) xử lý mô sẹo tạo phôi của *Hedychium muluense* bằng colchicine hoặc oryzalin để phát triển các thể đa bội đồng nhất [112]. Hơn nữa, hệ thống tái sinh *in vitro* rất cần thiết để phát triển các thể đa bội [63]. Hansen và Andersen (1998) tái sinh đa bội từ vi bào tử của *Triticum aestivum* được xử lý bằng colchicine [113]. Trong một nghiên cứu khác, Yuan và cộng sự (2015) tái sinh đa bội từ rễ *in vitro* được xử lý bằng colchicine của thể đơn bội *Brassica sp.* [114].

Tuy nhiên, các hệ thống tái sinh *in vitro* dựa trên phát sinh cơ quan và SE chỉ mới được phát triển cho một số loài và cách tiếp cận này có thể dẫn đến sự biến dị dòng soma lớn hơn do đột biến và các thay đổi biểu sinh [115]. Đối với nhiều loại cây trồng, hệ thống tái sinh *in vitro* có những thách thức riêng và các mô thay thế có thể cần được xem xét. Do đó, các đốt thân và đỉnh chồi là những mô được sử dụng rộng rãi nhất để nhân đôi NST *in vitro* [63].

Để thu được các thể đa bội đồng nhất bằng cách sử dụng các đoạn nốt và đỉnh chồi, tất cả tế bào ban đầu trong 3 lớp mô phân sinh cần phải chịu tác động của tác nhân kháng phân bào [116], [117]. Nếu tất cả tế bào ban đầu không bị ảnh hưởng, thể đa bội hỗn hợp (mixoploids hoặc cytochimeras) có thể hình thành [63]. Thể đa bội

hỗn hợp đã được quan sát thấy rộng rãi trong quá trình nhân đôi NST *in vitro* của nhiều loài thực vật gồm *Acer platanoides* [118], *Helleborus sp.* [119], *Hypericum sp.* [120], *Lagerstroemia indica* [121], *Rhododendron hybrid* [122], [123], *Rosa rugosa* [124], *Ranunculus asiaticus* [125], *Tulipa gesneriana* [126], *Vitis sp.* [127].

Mô tạp bội (Mixoploid tissue), một mô đơn lẻ gồm các tế bào có số lượng NST khác nhau [128], thường không ổn định, có xu hướng chọn lọc lưỡng bội cao và có thể trở lại trạng thái lưỡng bội ban đầu. Chọn lọc lưỡng bội có thể xảy ra khi các tế bào lưỡng bội (có ít DNA hơn hoặc đa bội thấp) có thể sao chép và phân chia nhanh hơn so với các tế bào đa bội cao hơn ở lân cận [116], [117]. Hussey và Hypher (1978) đã ghi nhận hiện tượng chọn lọc lưỡng bội ở củ cải đường sau khi xử lý với colchicine và quan sát thấy rằng các tế bào đa bội biến mất qua các lần nuôi cấy tiếp theo [129]. Tương tự, Lattier và cộng sự (2013) phát hiện ra rằng đối với *Acer platanoides*, các mô đa bội hỗn hợp trở lại thành lưỡng bội trong khoảng thời gian 6 tháng [118].

Nuôi cấy nội nhũ là một kỹ thuật độc đáo để tạo ra cây tam bội từ cây lưỡng bội. Nội nhũ của *Actinidia kolomikta* (Maxim. & Rupr.) Maxim. được thu hoạch từ 6–10 tuần sau khi ra hoa được sử dụng làm vật liệu cấy ban đầu để kiểm tra ảnh hưởng của các PGRs đối với sự tạo mô sẹo và hình thành cơ quan. Các mô sẹo cứng, chắc, phát triển nhanh được tạo ra trong môi trường MS có bổ sung 2,4-D (0,1 mg/L) kết hợp với kinetin (1,0, 2,0 và 5,0 mg/l), đã phát triển chồi khi được chuyển sang môi trường MS có bổ sung zeatin (1,0, 2,0 và 4,0 mg/L). Phép đo dòng chảy tế bào và phân tích NST đã xác nhận rằng các cây tái sinh là cây tam bội. Nghiên cứu này đã cho thấy nội nhũ của *A. kolomikta* có khả năng tái sinh thực vật và các cây tái sinh có cùng mức độ đa bội như nội nhũ (tam bội). Kết quả này có thể được sử dụng cho thao tác tạo thể đa bội ở các loài khác trong chi *Actinidia* [130].

1.4.9.2. Xử lý với các tác nhân kháng phân bào

Cảm ứng đa bội rất khác nhau giữa các loài, giống cây trồng và phụ thuộc vào tác nhân kháng phân bào, loại mô và điều kiện nuôi cấy. Trong khi chất diệt cỏ dinitroaniline có ái lực cao với các tubulin thực vật và ngày càng được sử dụng nhiều hơn để nhân đôi NST *in vitro*, thì colchicine được sử dụng phổ biến để xử lý gây đột biến đa bội trên nhiều loài [63]. Morejohn và cộng sự (1984) đã chỉ ra rằng hiệu quả gắn kết của colchicine với tubulin thực vật khác nhau đáng kể giữa các loài [98] và

colchicine vẫn là tác nhân kháng phân bào hiệu quả và được sử dụng nhiều nhất đối với các loài như *Populus hopeiensis* [131].

Colchicine là tác nhân kháng phân bào được sử dụng nhiều nhất, bất kể những hạn chế đã được ghi nhận [125] và đã được sử dụng cho nhiều loài khác nhau từ thân thảo như *Echinacea purpurea* [111] đến cây thân gỗ như *Chaenomeles japonica* [132]. Sự thành công của colchicine với vai trò như một chất kháng phân bào là lý do chất này được sử dụng liên tục và thường xuyên trong các nghiên cứu gần đây hơn, như *Bletilla striata* [133], *Petuna axillaris* [134] và *Populus Hopeiensis* [131].

Oryzalin cũng là một tác nhân kháng phân bào được sử dụng thành công để tạo ra các dòng đa bội của cây thân gỗ và bán thân gỗ gồm *Rosa* [135], *Rhododendron* [122], *Chaenomeles* [132], *Hypericum* [120] và *Acer platanoides* [118]. Hơn nữa, oryzalin đã được chứng minh là hiệu quả hơn colchicine trong việc nhân đôi NST *in vitro* đối với *Chaenomeles japonica* [132], *Rhododendron* [123], *Watsonia lepida* [136] và *Ranunculus asiaticus* [125].

Xử lý với các hợp chất kháng phân thay đổi theo nồng độ sử dụng và thời gian tiếp xúc của mẫu là các yếu tố luôn được khảo sát. Trong khi thời gian xử lý thấp không cho hiệu quả và nồng độ cao gây chết mẫu thì sự tương tác giữa thời gian xử lý và nồng độ vẫn chưa được hiểu đầy đủ [63]. Meyer và cộng sự (2009) phát hiện ra rằng nồng độ oryzalin ảnh hưởng đáng kể đến tỷ lệ sống sót và cảm ứng đa bội của mô sẹo ở *Hypericum sp.*; đối với thời gian xử lý thì không gây ảnh hưởng [120]. Tương tự, thời gian xử lý và nồng độ của oryzalin không phải là yếu tố có ý nghĩa trong việc gây ra đa bội ở các cây lai *Rhododendron* [123]. Đối với *Populus hopeiensis*, cả thời gian xử lý và nồng độ colchicine đều là yếu tố có ý nghĩa lớn ảnh hưởng đến đa bội. Đối với *Rosa sp.*, mối quan hệ giữa nồng độ và thời gian xử lý với oryzalin dường như phụ thuộc vào loại mô cấy [124], [135]. Kermani và cộng sự (2003) nhận thấy thời gian giảm đối với oryzalin được yêu cầu khi sử dụng các đốt thân 1 mm so với chồi đỉnh. Tương tự, Allum và cộng sự (2007) nhận thấy kích thước đoạn nốt ảnh hưởng đến thời gian xử lý với oryzalin và để đảm bảo NST nhân đôi thì thời gian xử lý phải kéo dài để tối đa hóa số lượng tế bào trong quá trình nguyên phân và thời gian xử lý với các chất kháng phân bào [124].

Độ hòa tan liên quan đến ái lực liên kết với tubulin là một yếu tố khác cần được chú ý khi lựa chọn một chất kháng phân bào. Ví dụ, colchicine hòa tan cao trong nước ($> 1,5M$) và có thể dễ dàng thêm vào môi trường nuôi cấy tiêu chuẩn, nhưng có ái lực liên kết tương đối thấp với các tubulin thực vật. Ngược lại, dinitroaniline tương đối không hòa tan trong dung dịch nước, với oryzalin đạt đến độ bão hòa ở ($< 7,5 \mu M$) trong nước, nhưng thường liên kết với các tubulin thực vật ở nồng độ dưới 500 nM [137]. Nồng độ hoạt động của oryzalin thường được sử dụng để cảm ứng đa bội thường vượt quá ái lực liên kết và nồng độ hòa tan. Trong khi sự khác biệt giữa các loài về tính đặc hiệu của oryzalin đối với các tubulin có thể giải thích cho một số thay đổi, sự tương tác giữa nồng độ oryzalin ngoại sinh và tubulin nội bào vẫn chưa rõ ràng [138].

Phương pháp phổ biến nhất để ứng dụng chất ức chế kháng phân bào *in vitro* là xử lý trong dung dịch hoặc môi trường lỏng, sau đó phục hồi các mô trên môi trường tái sinh hoặc nhân giống. Tuy nhiên, trong một số trường hợp, việc bổ sung chất kháng phân bào vào môi trường đặc đã thành công để phát triển các thể đa bội. Đối với *Hypericum sp.*, các thể đa bội được phát triển sau khi cho mô sẹo tái sinh xử lý với oryzalin trong môi trường lỏng từ 3 đến 9 ngày [120]. Ngược lại, Dhooghe và cộng sự (2009) đã sử dụng môi trường đặc có chứa oryzalin để tạo ra thể đa bội ở *Ranunculus asiaticus* [125].

Có thể các thành phần môi trường cũng có thể ảnh hưởng đến các chất kháng phân bào gây tác động đến quá trình nhân đôi của NST. Ví dụ, hiệu quả của dinitroaniline liên kết với α -tubulin bị ảnh hưởng đáng kể bởi pH và sucrose [137], [139]. Trong các thử nghiệm liên kết tubulin, Hugdahl và Morejohn (1993) cho thấy ái lực liên kết oryzalin tăng gấp ba lần khi pH tăng từ 6,0 lên 7,0. Hơn nữa, tác giả lưu ý rằng sucrose có thể thay đổi sự tương tác giữa oryzalin và tubulin. Sucrose và pH là hai thành phần quan trọng trong môi trường nuôi cấy mô thực vật và cần được xem xét khi phát triển các quy trình tạo đa bội *in vitro* [139]. Lattier và cộng sự (2013) cho thấy việc bổ sung BA vào môi trường chứa oryzalin làm tăng tỷ lệ chết chồi ở nồng độ oryzalin cao hơn. BA có thể hoạt hóa tăng chu kỳ của tế bào, tạo ra các tế bào chuyển đổi nhanh hơn từ kỳ giữa (metaphase) sang kỳ sau (anaphase) của quá trình nguyên phân, trong giai đoạn này tế bào có thể nhạy cảm với oryzalin. Vì vậy,

việc xác định thành phần môi trường khi phát triển quy trình thao tác tạo đa bội *in vitro* có thể tối đa hóa hiệu quả nhân đôi NST [118].



Hình 1.5. Các tác nhân ảnh hưởng đến xử lý đa bội [64].

1.4.10. Chọn tạo những đột biến sau xử lý đa bội

Phương pháp cảm ứng nhân đôi NST gồm nhiều giai đoạn cảm ứng, tái sinh và kỹ thuật xác nhận để đánh giá tỷ lệ thành công. Sau khi xử lý các tác nhân đa bội, việc chọn tạo cây đa bội mang những đặc tính tốt là khâu quan trọng. Vì những cây đa bội này sẽ được tiếp tục nghiên cứu do đó phải tiến hành kiểm tra, chọn lọc ngay sau khi đột biến. Đầu tiên, chọn những cây đột biến hình thái khác cây bình thường về những đặc điểm mà người ta mong muốn. Sau đó phân tích kiểm tra bằng nhiều phương pháp để phát hiện những đột biến như đếm số NST, đo hàm lượng DNA trong tế bào, ngoài ra để xác định đa bội, một số chỉ tiêu được áp dụng như kích thước hạt phấn, khí khổng, số lượng lục lạp cao hơn dạng lưỡng bội 25 - 30%. Quan sát hình thái hoặc giải phẫu là phương pháp nhanh để đánh giá khả năng thành công của việc đa bội hóa. Hình thái khí khổng (mật độ, số lượng và kích thước của khí khổng), kích thước tế bào bảo vệ và hạt phấn được áp dụng để xác định gián tiếp mức độ đa bội và phân biệt cây đa bội cảm ứng giả định với cây lưỡng bội nguyên vẹn. Mật độ thấp hơn và kích thước khí khổng lớn hơn là những đặc điểm chung của thể đa bội. Hàm lượng lục lạp, chất diệp lục và carotenoid của tế bào bảo vệ là các chỉ số đa bội

đơn giản khác. Đặc điểm hình thái và giải phẫu có thể thay đổi dưới áp lực của môi trường; vì vậy, các chỉ thị quan sát được có thể không chính xác và đáng tin cậy.

Sau khi chọn lọc được các cây đa bội, tiếp tục nhân lên và đưa cây ra ngoài tự nhiên để cây thích ứng. Đây cũng là khâu rất quan trọng, nó giải quyết khả năng ứng dụng vào trong sản xuất, khâu cuối cùng là lai tạo và bảo tồn các đặc tính tốt của cây [64].

1.4.11. Các thành tựu về nghiên cứu đa bội trên thực vật

1.4.11.1. Nghiên cứu ngoài nước

Cảm ứng đa bội được xem là cách nhanh chóng và hiệu quả để tăng cường sản xuất các HCTC trên đối tượng cây dược liệu quan trọng so với cây ban đầu [140]. Đa bội biểu hiện các tính trạng mới rất có giá trị cả trong nông nghiệp và công tác chọn giống. Do đó, đa bội có thể là một công cụ quan trọng để có được giống cây dược liệu mới. Ví dụ, hạt tứ bội *Datura stramonium* L. có hàm lượng alkaloid cao gấp đôi cây lưỡng bội [141], hoặc thể tứ bội *Artemisia annuaproduces* có hàm lượng artemisinin cao gấp sáu lần thể lưỡng bội [142].

Theo Wu (2002), phương pháp xử lý 0,05%, 0,1% colchicine và oryzalin ở nồng độ 0,01%; 0,05%; 0,1% trên mô sẹo tạo ra từ nuôi cấy SE *in vitro* ở cây có mùi tạo ra thể quýt lai cam đường lưỡng bội kép cùng loài [143]. Nguyễn Thị Phương Thảo và cộng sự (2004) đã tạo thành công thể tứ bội trên cây *Alocasia* bằng cách xử lý 0,01%, 0,05% colchicine trên chồi đỉnh cây *Alocasia* lưỡng bội ở các thời gian 24 giờ, 48 giờ, 72 giờ. Xử lý colchicine với nồng độ 0,05% trong 72 giờ, dòng tứ bội cao thu được cao nhất đạt 20%. Đối với mẫu xử lý bằng oryzalin tỷ lệ dòng tứ bội cao nhất ở 0,05% trong 48 giờ [144]. Soriano và cộng sự (2005) đã tiến hành các thí nghiệm nghiên cứu ảnh hưởng của colchicine lên nuôi cấy bao phấn cây lúa mì *Triticum aestivum* L. và kết luận tỷ lệ kiểu hình đơn bội kép tăng gấp đôi ở nồng độ 300 ppm trong 48 giờ [145].

Ngoài ra, các nhà khoa học trên thế giới còn thu được nhiều thành tựu như tạo ra giống cây dưa hấu tam bội hay nho tứ bội cho sản lượng tăng 3 - 4% so với giống ban đầu, chất lượng tốt như hàm lượng đường tăng, không hạt, trái to, thịt quả nhiều và vỏ mỏng. Nimura và cộng sự (2006) đã thành công khi tạo thể lưỡng bội *Dianthus*

Caryophyllus L. và *Dianthus japonicus* bằng colchicine, tác giả sử dụng chồi bất định được lấy từ cây cảm chương *in vitro* và các đoạn mắt ngủ cây cảm chương trong vườn ươm sau đó xử lý với dung dịch colchicine và APT, kết quả có 156 thể lai được tái sinh, trong đó có 9 thể tứ bội, 18 thể đơn bội và 88 thể tạp bội. Thể tứ bội đạt cao nhất (14%) khi xử lý 0,27% colchicine trong 24 giờ [146].

Yang và cộng sự (2006) đã xử lý colchicine trên cây nho *Vitis vinifera* L. nhằm tạo giống nho đa bội. Kết quả có 05/29 cá thể tứ bội hoàn toàn bằng phương pháp đếm NST [147]. Năm 2010, Islam và cộng sự nghiên cứu tạo đơn bội kép ở cây lúa mì bằng xử lý colchicine, kết quả đã làm tăng tỷ lệ này lên đến 81,73% [148].

Nghiên cứu của Kaensaksiri và cộng sự (2011) chỉ ra rằng so với các loài lưỡng bội, các loài đa bội đã được chứng minh là thể hiện hình thái học cao hơn và khả năng đáp ứng với môi trường tốt hơn [149]. Ngoài ra, bộ gen được nhân lên làm tăng cả số lượng và chất lượng của các chất chuyển hóa thứ cấp và dẫn đến biểu hiện gen cao hơn so với các thể lưỡng bội [66].

Gây đột biến đa bội với colchicine lên rễ bất định được nuôi cấy trong thời gian dài cho thấy sự biểu hiện của enzyme sinh tổng hợp ginsenoside tăng lên trong các dòng đột biến đa bội, làm tăng sinh khối và sản xuất ginsenoside ở *Panax ginseng* Mayer [150].

1.4.11.2. Nghiên cứu trong nước

Ở Việt Nam, các nhà khoa học cũng đã nghiên cứu và tạo ra được một số giống cây đa bội có chất lượng tốt, năng suất cao. Năm 2010, Hà Thị Thúy và cộng sự tạo thành công thể tứ bội cây quýt Chum, bưởi và cam Phúc Trạch khi xử lý colchicine trên cành *in vitro* và cũng xử lý thành công trên hạt của cây cam sành và bưởi đỏ [151]. Năm 2012, Nguyễn Thị Ngọc Trâm và cộng sự đã tạo thể tứ bội của *Citrus reticulata* bằng cách sử dụng chất gây đột biến tạo đa bội là colchicine [152]. Trên hành củ *Allium cepa* L., xử lý 1,0% colchicine trong 6 ngày cho số cây sống sót đạt 80% và tỉ lệ cây tứ bội đạt 20% [153]. Dòng cảm chương gấm *Dianthus chinensis* đa bội được tạo thành công bằng phương pháp xử lý 0,1% colchicine trong vòng 24 giờ hoặc 48 giờ; hoặc với 0,01 và 0,05% trong vòng 72 giờ với tỷ lệ đa bội đạt từ 0,87-12,85% [154].

Bùi Văn Thắng và cộng sự (2018) đã thành công tạo ra thể tam bội *Melia azedarach* L. bằng cách nuôi cấy mô nội nhũ (3n) chưa trưởng thành. Các cây con có nguồn gốc từ nội nhũ là 100% thể tam bội được chứng minh bằng phân tích đo tế bào dòng chảy. Việc tạo ra các cây tam bội *M. azedarach* bằng cách tái sinh trực tiếp từ nội nhũ chỉ cần 5 tháng trong khi phương pháp truyền thống tạo ra các cây tam bội thông qua việc lai giữa các cây tứ bội (4n) và lưỡng bội (2n) có thể mất đến 12 năm [155].

Nguyễn Phúc Huy và cộng sự (2019) đã tạo cảm ứng đa bội thành công từ chồi non *in vitro* cây *Paphiopedilum villosum*. Các chồi *Paphiopedilum villosum* cao 1,5 cm xử lý với colchicine ở các thời gian tiếp xúc và nồng độ khác nhau. Tỷ lệ cảm ứng đa bội đạt 19,88% khi xử lý với 50 μ M colchicine trong 6 ngày. Trong số các cây con đa bội thu được, các thể tứ bội đạt 88,24% [156].

CHƯƠNG 2.

VẬT LIỆU, NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

2.1.1. Vật liệu thực vật

Các mẫu cây cuống lá, mảnh lá và rễ của cây sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) *in vitro* ba tháng tuổi (thể lưỡng bội $2n = 24$) nuôi cấy trong môi trường MS tại Viện Nghiên cứu khoa học Tây Nguyên, VAST được sử dụng như nguồn mẫu cây ban đầu.

Các phôi ở dạng hình cầu, dạng hình tim và phôi có lá mầm, không đột biến được tách ra từ cụm phôi được sử dụng như nguồn mẫu để khảo sát sự hình thành phôi thứ cấp. Các loại mẫu cây được sử dụng cho các thí nghiệm được thể hiện trong hình 2.1.

Cây sâm Ngọc Linh *in vitro* ($2n=24$) [157]



Hình 2.1. Các nguồn vật liệu sử dụng làm mẫu cây.

2.1.2. Thiết bị, dụng cụ và hóa chất

2.1.2.1. Thiết bị và dụng cụ

Thiết bị dùng trong thí nghiệm là: Cân kỹ thuật Precisa (Nhật Bản), cân điện tử (200g, sai số 0,0001g) (CP 224S, Sartorius – Đức), nồi hấp, tủ cấy vô trùng Sanyo MOV-112, tủ Sấy Menmert, máy đo pH, kính hiển vi (OLYMPUS, Nhật Bản), bếp ga.

Dụng cụ dùng trong thí nghiệm là: Bình nuôi cấy 250 mL, màng lọc Millipore (0,2 μm), bình tam giác 250 mL, dao cấy, đĩa cấy, pank cấy, dây thun, khẩu trang, nilon và găng tay. Các dụng cụ được hấp khử trùng bằng autoclave ở 121°C, áp suất 1atm, trong 30 phút.

2.1.2.2. Hóa chất

Các đa vi lượng và vitamin xuất xứ từ hãng Duchefa Biochemie, Hà Lan; các chất điều hòa sinh trưởng của hãng Merck KGaA, Darmstadt, Đức gồm 2,4-D, TDZ, NAA, BA. Sử dụng dung dịch NaOH 1N để hòa tan PGRs với nồng độ 1 mg : 1 mL. Dung dịch sau khi được pha và bảo quản ở điều kiện 2 – 8°C.

Dung dịch Colchicine: Colchicine dạng bột (Độ tinh khiết > 95%, Sigma-Aldrich®, Hoa Kỳ) được hòa tan trong một lượng cồn tối thiểu (90%), sau đó dung dịch này được điều chỉnh đến nồng độ mong muốn bằng cách thêm nước vô trùng và lọc qua màng lọc khử trùng (0,22 μm , Sigma-Aldrich®, USA). Dung dịch colchicine được thêm trực tiếp vào môi trường MS lỏng đã hấp tiệt trùng.

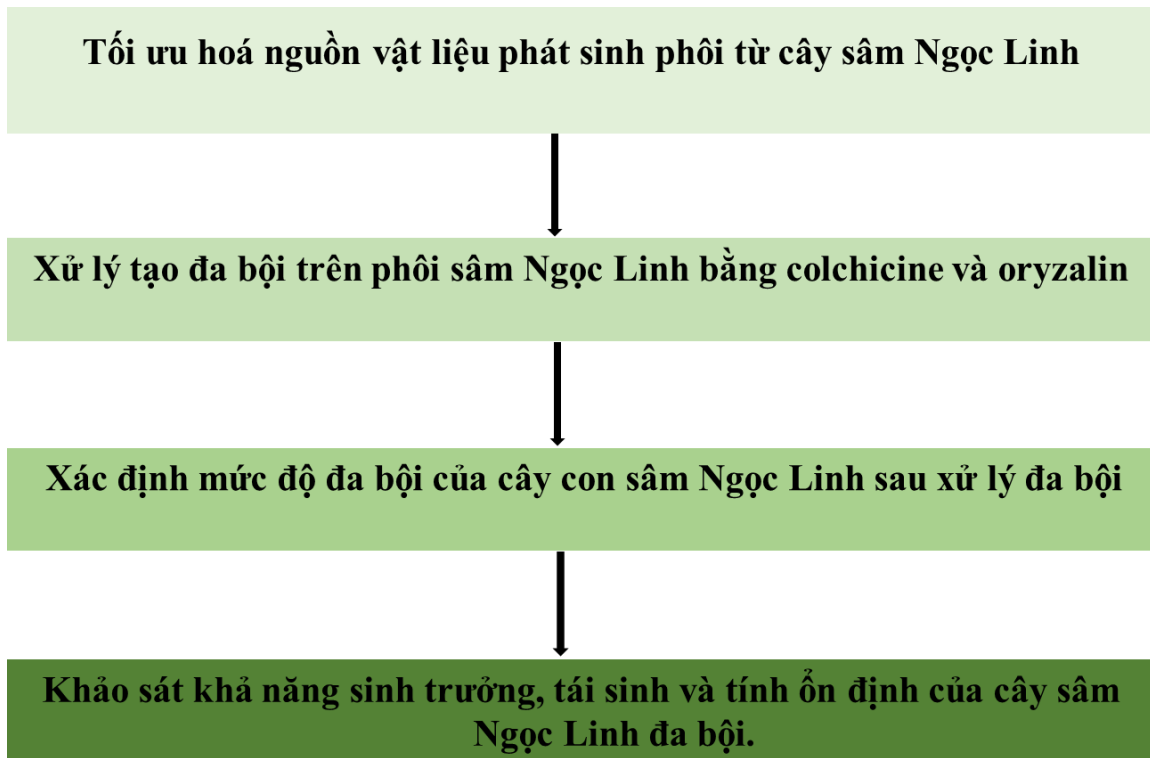
Dung dịch Oryzalin: Oryzalin dạng bột (Độ tinh khiết > 99%, Sigma-Aldrich®, Hoa Kỳ) được điều chỉnh đến nồng độ mong muốn bằng cách thêm nước vô trùng và lọc qua màng lọc khử trùng (0,22 μm , Sigma-Aldrich®, USA). Các dung dịch với nồng độ khác nhau được thêm trực tiếp vào môi trường MS lỏng đã hấp tiệt trùng.

2.1.3. Môi trường nuôi cấy

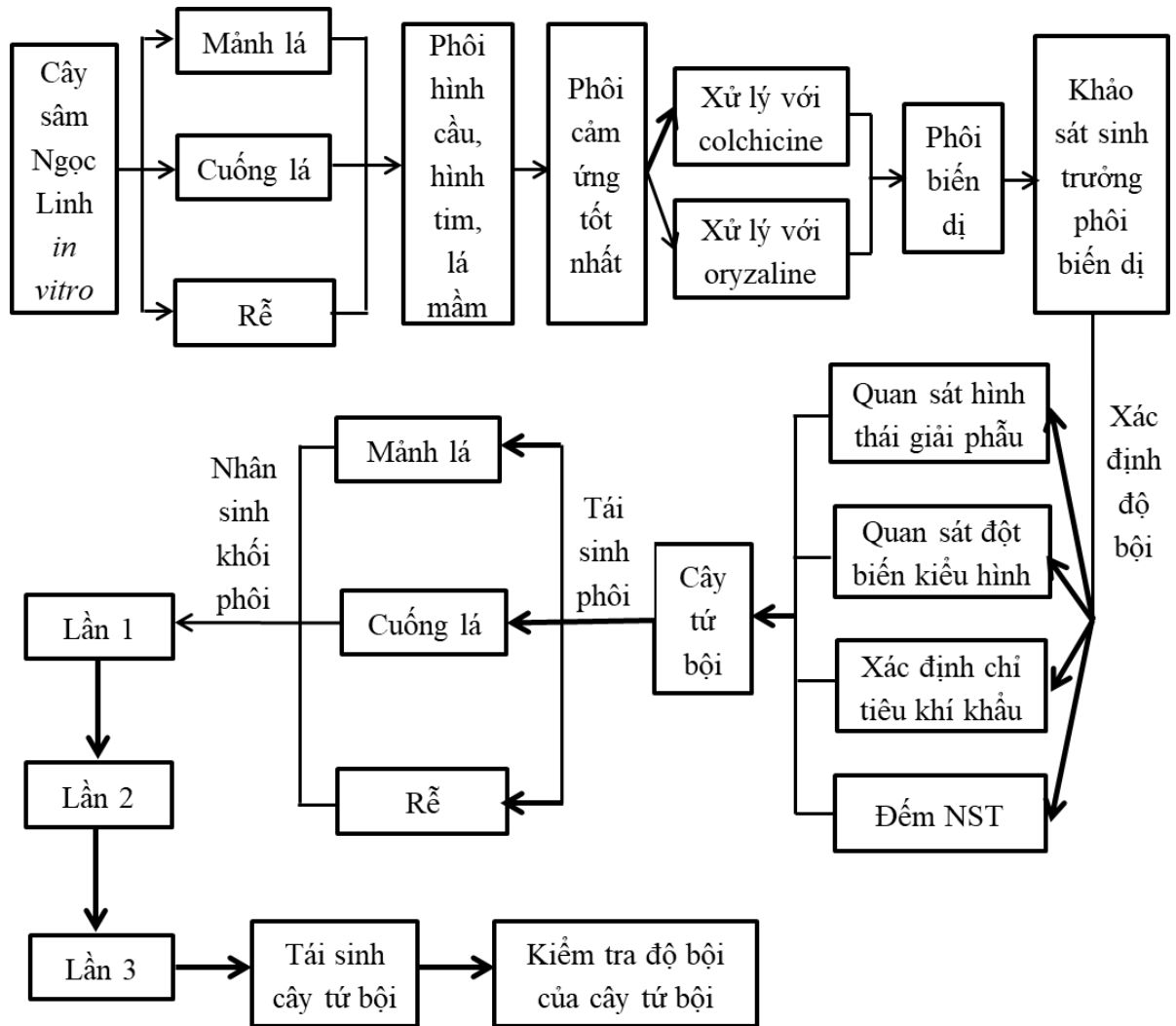
Môi trường nuôi cấy được sử dụng là môi trường Murashige và Skoog (MS) bổ sung 30 g/L sucrose, 8 g/L agar. Tùy vào yêu cầu của thí nghiệm mà PGRs được bổ sung vào môi trường nuôi cấy. Môi trường nuôi cấy được chỉnh về pH 5,8 trước khi hấp khử trùng ở 121°C, áp suất 1 atm trong 30 phút.

2.2. Nội dung nghiên cứu

Nội dung nghiên cứu bao gồm các giai đoạn được mô tả trong hình 2.2 và hình 2.3.



Hình 2.2. Sơ lược các giai đoạn thí nghiệm.



Hình 2.3. Sơ đồ tóm lược các giai đoạn tiến hành thí nghiệm.

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

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

Đánh giá hiệu quả của việc sử dụng riêng lẻ hoặc kết hợp của 2,4-D và TDZ lên sự phát sinh phôi thứ cấp của sâm Ngọc Linh.

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

Nghiên cứu ảnh hưởng của colchicine, oryzalin lên sự phát sinh của phôi thứ cấp biến dị của sâm Ngọc Linh.

2.2.3. Nội dung 3: Xác định mức độ đa bội của cây con sâm Ngọc Linh sau xử lý đa bội

Nghiên cứu sinh trưởng của cây con biến dị sâm Ngọc Linh có nguồn gốc từ phôi thứ cấp biến dị sau khi xử lý với colchicine.

Đánh giá các cây con biến dị thông qua các phương pháp quan sát hình thái, quan sát khí khổng, giải phẫu và quan sát cấu trúc giải phẫu, đếm NST

2.2.4. Nội dung 4: Khảo sát khả năng sinh trưởng, tái sinh và tính ổn định của cây sâm Ngọc Linh đa bội.

Nghiên cứu sự tái sinh phôi từ cuống lá, mảnh lá và rễ của cây sâm Ngọc Linh tứ bội *in vitro* trên môi trường sinh trưởng thích hợp.

Nghiên cứu hình thành phôi thứ cấp từ phôi có nguồn gốc từ cây tứ bội *in vitro* qua 3 lần cấy chuyển trên môi trường sinh trưởng thích hợp.

Nghiên cứu sự sinh trưởng của phôi từ cây sâm Ngọc Linh tứ bội *in vitro*.

Độ ổn định của cây tứ bội được đánh giá bằng các phương pháp quan sát hình thái, soi khí khổng, giải phẫu và quan sát cấu trúc giải phẫu, hình thái cây và các cơ quan của, kiểm tra NST của cây sâm Ngọc Linh tứ bội *in vitro*.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Phương pháp bố trí thí nghiệm

2.3.2. Nội dung 1: Tối ưu hoá nguồn vật liệu phát sinh SE từ cây sâm Ngọc Linh *in vitro*

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

Vật liệu là cuống lá, mảnh lá và rễ của cây sâm Ngọc Linh *in vitro* (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) 12 tuần tuổi.

Môi trường sử dụng trong nghiên cứu là MS bổ sung cố định 0,5 mg/L NAA [15] + 30 g/L sucrose. Theo nghiên cứu của Hiền và cộng sự đây là môi trường thích hợp cho cảm ứng phôi đối với mẫu cây lát mỏng tế bào trên đối tượng sâm Ngọc Linh. Do vậy, trong nghiên cứu này để tối ưu hóa môi trường cảm ứng phôi đối với các

nguồn vật liệu khác nhau, chúng tôi đã sử dụng môi trường MS bổ sung cố định 0,5 mg/L NAA [15] kết hợp với các PGRs khác nhau.

Mảnh lá được cắt thành dạng hình vuông với kích thước 10×10 mm; cuống lá được cắt ngang, kích thước chiều dài × đường kính khoảng 5 × 2 mm; khúc cắt rễ có chiều dài khoảng 10 mm và đường kính khoảng 1 mm, được nuôi cấy trong môi trường MS chứa cố định 0,5 mg/L NAA [15] + 30 g/L sucrose, bổ sung riêng lẻ 2,4-D (0; 0,2; 0,5 và 0,7 mg/L) và TDZ (0; 0,1; 0,3 và 0,5 mg/L). ĐC là môi trường MS không bổ sung 2,4-D và TDZ nhằm xác định loại và nồng độ 2,4-D và TDZ thích hợp cho sự phát sinh SE sâm Ngọc Linh từ ba nguồn vật liệu trên.

Chỉ tiêu theo dõi: Tỷ lệ cảm ứng mô sẹo (%), tỷ lệ cảm ứng phôi (%), số lượng phôi/mẫu, trọng lượng tươi sau 6 tuần nuôi cấy.

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

Thí nghiệm này được tiến hành nhằm so sánh khả năng hình thành SSE từ ba dạng phôi hình cầu, phôi hình tim, phôi có lá mầm sâm Ngọc Linh có nguồn gốc từ vật liệu tốt nhất của thí nghiệm 1. Sau đó, dạng phôi tối ưu cho sự phát sinh SSE được sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

Phôi dạng hình cầu, hình tim và có lá mầm từ cụm phôi sâm Ngọc Linh 6 tuần tuổi có kiểu hình đồng nhất không biến dị được tách riêng từng phôi và được nuôi cấy trong môi trường MS + 0,5 mg/L NAA [15] + 30 g/L sucrose, có bổ sung riêng lẻ 2,4-D (0; 0,2; 0,5; 0,7 mg/L), TDZ (0; 0,1; 0,3; 0,5 mg/L). ĐC là môi trường MS không bổ sung 2,4-D và TDZ.

Chỉ tiêu theo dõi: Tỷ lệ cảm ứng mô sẹo (%), tỷ lệ cảm ứng phôi (%), số lượng phôi/mẫu, trọng lượng tươi sau 6 tuần nuôi cấy.

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

Nguồn vật liệu được sử dụng là mẫu có số lượng hình thành phôi cao nhất trên các môi trường bổ sung 2,4-D, TDZ riêng lẻ của thí nghiệm 2. Mẫu được nuôi cấy

trong môi trường MS + 0,5 mg/L NAA [15] + 30 g/L sucrose, bổ sung 2,4-D tốt nhất của thí nghiệm 2 kết hợp với TDZ (0,1; 0,3; 0,5 mg/L) hoặc ngược lại thay đổi nồng độ 2,4-D (0; 0,2; 0,5; 0,7 mg/L) kết hợp với TDZ nồng độ tốt nhất của thí nghiệm 2. ĐC là môi trường MS không bổ sung 2,4-D và TDZ.

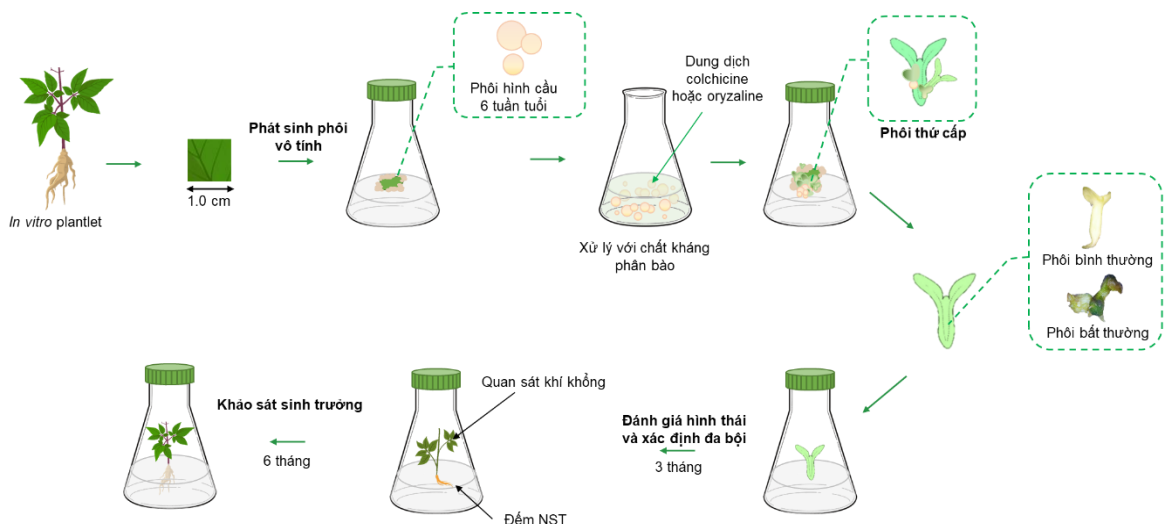
Thí nghiệm này được thực hiện nhằm khảo sát ảnh hưởng kết hợp của 2,4-D và TDZ lên sự phát sinh phôi thứ cấp sâm Ngọc Linh từ nguồn vật liệu tối ưu ở thí nghiệm 2. Loại vật liệu cho khả năng hình thành phôi cao nhất sẽ được sử dụng cho các thí nghiệm sau.

Chỉ tiêu theo dõi: Tỷ lệ cảm ứng mô sẹo (%), tỷ lệ cảm ứng phôi (%), số lượng phôi/mẫu, trọng lượng tươi sau 6 tuần nuôi cấy.

Mỗi nghiệm thức được lặp lại ba lần với 10 bình nuôi cấy, có 3 mẫu/ bình. Bình được sử dụng là bình thủy tinh có thể tích 100 ml chứa 20 ml môi trường. Môi trường được hấp khử trùng ở 121°C, áp suất 1 atm trong 30 phút.

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

Nguồn vật liệu cho khả năng hình thành phôi thứ cấp cao nhất ở thí nghiệm trước là phôi hình cầu, phôi có độ đồng đều cao, đường kính khoảng 1 mm, trọng lượng tươi khoảng 0,020 - 0,022 g. Quy trình xử lý đa bội được thể hiện ở Hình 2.4. ĐC là môi trường MS bổ sung PGRs tốt nhất cho sự tái sinh phôi được xác định từ thí nghiệm trên nhưng không bổ sung colchicine hoặc oryzalin.



Hình 2.4. Sơ đồ mô tả khái quát các bước thực hiện thí nghiệm

Thí nghiệm 4: Khảo sát ảnh hưởng colchicine lên sự phát sinh SSE biến dị của sâm Ngọc Linh

Trong thí nghiệm này, để xác định ảnh hưởng của việc xử lý colchicine đến khả năng sống, tái sinh phôi thứ cấp và sự hình thành phôi thứ cấp biến dị của phôi sâm Ngọc Linh, các phôi sâm Ngọc Linh dạng hình cầu và 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 MS bổ sung 0,5 mg/L NAA + 0,7 mg/L 2,4-D + 0,1 mg/L TDZ để theo dõi sự hình thành các phôi thứ cấp biến dị. Các phôi có hình thái to, hoặc có các bất thường trên cực lá hoặc cực rễ và vượt trội hơn so với các phôi trong cụm sẽ được tách ra, tiến hành ghi nhận các chỉ tiêu và tiếp tục khảo sát sinh trưởng cho giai đoạn tiếp theo. ĐC là phôi hình cầu không xử lý với colchicine được nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung PGRs tốt nhất cho sự tái sinh phôi thứ cấp.

Chỉ tiêu theo dõi: Sau khi xử lý mẫu cấy với tác nhân đa bội theo thời gian 24 giờ, 36 giờ, 48 giờ và 72 giờ và nồng độ khác nhau, tiến hành ghi nhận các chỉ tiêu tỷ lệ sống của mẫu (%), tỷ lệ cảm ứng phôi thứ cấp của mẫu sống (%), số phôi thứ cấp/mẫu, số phôi thứ cấp biến dị/mẫu, tỷ lệ phôi thứ cấp biến dị (%) sau 6 tuần nuôi cấy.

Thí nghiệm 5: Khảo sát ảnh hưởng của oryzalin lên sự phát sinh SSE biến dị của sâm Ngọc Linh

Trong thí nghiệm này, để xác định ảnh hưởng của việc xử lý oryzalin đến khả năng sống, tái sinh phôi thứ cấp và sự hình thành phôi biến dị của phôi sâm Ngọc Linh, các phôi sâm Ngọc Linh dạng hình cầu và 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 MS bổ sung 0,5 mg/L NAA + 0,7 mg/L 2,4-D + 0,1 mg/L TDZ để theo dõi sự hình thành các phôi thứ cấp biến dị. Các phôi có hình thái to, hoặc có các bất thường trên cực lá hoặc cực rễ và vượt trội hơn so với các phôi trong cụm sẽ được tách ra, tiến hành ghi nhận các chỉ tiêu và tiếp tục khảo sát sinh trưởng cho giai đoạn tiếp theo. ĐC là phôi hình cầu không xử lý với oryzalin được nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung PGRs tốt nhất cho sự tái sinh phôi thứ cấp.

Chỉ tiêu theo dõi: Sau khi xử lý mẫu cây với tác nhân đa bội theo các mốc thời gian 24 giờ, 36 giờ, 48 giờ và 72 giờ và nồng độ khác nhau, tiến hành ghi nhận các chỉ tiêu tỷ lệ sống của mẫu (%), tỷ lệ cảm ứng SE của mẫu sống (%), số phôi thứ cấp/mẫu, số phôi thứ cấp biến dị /mẫu, tỷ lệ phôi thứ cấp biến dị (%) sau 6 tuần nuôi cấy.

2.3.2.2. *Nội dung 3: Khảo sát sự sinh trưởng của các thể có biểu hiện biến dị và xác định độ bội cây sâm Ngọc Linh*

Thí nghiệm 6: Khảo sát sự sinh trưởng và xác định mức độ đa bội của cây sâm Ngọc Linh biến dị có nguồn gốc từ các SSE đột biến sau khi xử lý bằng colchicine.

Các phôi thứ cấp biến dị về kiểu hình của cây sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) *in vitro* 6 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, không bổ sung PGRs để tạo cây *in vitro* hoàn chỉnh. Phôi cấy có rễ sau 3 tháng được theo dõi sự sinh trưởng và phát triển của cây sâm Ngọc Linh theo thời gian. ĐC là cây sâm Ngọc Linh 2n bình thường.

Bên cạnh đó, để xác định cây có biểu hiện biến dị là cây tứ bội hoặc cây tạp bội,... các cây có biểu hiện biến dị sau khi đã được xử lý đa bội được đánh giá khả năng đa bội thông qua phương pháp nhuộm NST, soi khí khổng, giải phẫu và quan sát cấu trúc giải phẫu, quan sát sự thay đổi hình thái.

Chỉ tiêu theo dõi: Chiều cao cây (cm), đường kính cuống lá (cm), chiều rộng lá (cm), chiều dài lá (cm), trọng lượng tươi (g) và kiểu hình bất thường.

2.3.2.3. *Nội dung 4: Xác định độ ổn định của cây tứ bội sâm Ngọc Linh thông qua các bước tái sinh*

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

Sau khi xác định mức độ đa bội của cây con sâm Ngọc Linh bằng cách đếm số lượng NST, tiếp tục nuôi cấy các cây được xác định là cây tứ bội trong 24 tuần và ghi nhận các đặc điểm sinh trưởng gồm chiều cao cây con (cm), đường kính cuống lá

(cm), chiều dài cuống lá (cm), chiều rộng lá (cm), chiều dài lá (cm), trọng lượng tươi rễ củ (g) và trọng lượng tươi của cây con (g). ĐC là các cây con lưỡng bội.

Chỉ tiêu theo dõi: Chiều cao cây (cm), đường kính cuống lá (cm), chiều dài cuống lá (cm), chiều rộng lá (cm), chiều dài lá (cm), đường kính rễ củ (cm), trọng lượng tươi (g) của cây tứ bội.

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

Để thực hiện thí nghiệm này, cây đã được xác định là cây tứ bội, 3 loại mẫu cây là mảnh lá, cuống lá và rễ của cây tứ bội được khảo sát sự tái sinh phôi trên môi trường tốt nhất của từng loại mẫu cây đã được xác định từ thí nghiệm trước, bởi vì trong thí nghiệm này khảo sát khả năng tái sinh phôi của từng loại mẫu của cây tứ bội so với mẫu cây nhị bội.

Nguồn vật liệu sử dụng trong thí nghiệm này là mảnh lá, cuống, rễ của cây sâm Ngọc Linh tứ bội 24 tuần tuổi. Mẫu lá có kích thước 10×10 mm được cắt theo hình vuông; cuống lá được cắt ngang, mỗi đoạn cắt có kích thước 5×2 mm; khúc cắt rễ có chiều dài 10 mm và đường kính 2 mm, được nuôi cấy trên môi trường tái sinh phôi thích hợp cho từng loại mẫu cây, cụ thể: đối với mẫu mảnh môi trường MS + 0,5 mg/L NAA + 0,5 mg/L 2,4-D; mẫu cuống lá môi trường MS + 0,5 mg/L NAA + 0,5 mg/L TDZ ; mẫu rễ môi trường MS + 0,5 mg/L NAA + 0,3 mg/L TDZ.

Chỉ tiêu theo dõi: Tỷ lệ cảm ứng SE (%), số SE/mẫu, trọng lượng tươi (g)

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

Nguồn vật liệu sử dụng trong thí nghiệm này là phôi có nguồn gốc từ các nguồn vật liệu ở thí nghiệm 8 được tiến hành nhân sinh khối phôi trên môi trường trên môi trường MS + 0,5 mg/L NAA + 0,7 mg/L 2,4-D + 0,3 mg/L TDZ. Phôi được cấy chuyển 3 lần sau mỗi 4 tuần sinh trưởng, sau lần cấy chuyển thứ 3 các phôi sẽ được trải lên môi trường MS không bổ sung PGRs để tạo cây hoàn chỉnh. Các cây hoàn chỉnh này, sẽ được tiến hành lấy các chỉ tiêu sinh trưởng và kiểm tra độ bội thông qua phương pháp nhuộm NST, soi khí khổng, quan sát sự thay đổi hình thái. Thí nghiệm

này được thực hiện nhằm khảo sát khả năng hình thành SSE của phôi có nguồn gốc từ cây sâm Ngọc Linh tứ bội. Đồng thời nhằm đánh giá độ ổn định của cây sâm Ngọc Linh tứ bội sinh trưởng sau khi phôi được cấy chuyển lần thứ 3.

Chỉ tiêu theo dõi: Trọng lượng tươi của sinh khối phôi, sau đó các cây tứ bội có nguồn gốc từ phôi thứ cấp sau lần cấy chuyển lần thứ 3 sẽ được tiến hành đánh giá đột biến kiểu hình thông qua các chỉ tiêu sinh trưởng, mật độ khí khổng, chiều dài, chiều rộng khí khổng và đếm NST để xác định tỉ lệ cây tứ bội ổn định.

2.3.3. Phương pháp giải phẫu và quan sát giải phẫu hình thái thực vật cây sâm Ngọc Linh

Các mẫu được thu nhận và được cắt thành lát mỏng theo chiều ngang đi qua mẫu kích thước khoảng 10-15 μm , sau đó ngâm 15 phút trong dung dịch javen 10%, sau đó rửa sạch mẫu với nước cất, tiếp theo mẫu được ngâm mẫu 15 phút trong dung dịch acetic acid 45%, rửa lại mẫu bằng nước cất liên tục 6 lần, làm khô và ngâm mẫu trong phẩm nhuộm carmine red trong 5 phút sau đó rửa lại mẫu bằng nước cất 2 lần, cuối cùng đặt mẫu lên lam kính, nhỏ 1 giọt nước và đậy lam kính lại. Quan sát dưới kính hiển vi quang học vật kính $\times 10$.

2.3.4. Phương pháp nhuộm NST

Các SSE biến dị được cấy chuyển sang môi trường MS không bổ sung PGRs. Sau 3 tháng, SSE phát triển thành cây con và ra rễ. Mức độ đa bội được xác định bằng cách đếm các NST ở đầu rễ của cây con sâm Ngọc Linh đột biến.

Để đếm NST, các đầu rễ dài 5 mm của cây con sâm Ngọc Linh biến dị được cho vào ống nghiệm loại 1,5 mL có bổ sung 100 μL dung dịch colchicine 0,1% và ủ trong 30 phút. Sau khi ủ, dung dịch colchicine được loại bỏ và thêm vào ống nghiệm 200 μL natri axetat 0,5%, sau đó ủ mẫu trong 30 phút ở nhiệt độ phòng. Các mẫu được cố định trong dung dịch carnoy trong 4 giờ. Tiếp theo, loại bỏ carnoy và rửa mẫu nhiều lần bằng cồn 70%, nhuộm bằng dung dịch xanh methylen (1%) hoặc đỏ carmine ở nhiệt độ phòng trong 5 phút. Mẫu được tạo bằng cách cắt 1-2 mm đầu rễ và đặt trên lam kính, đậy lam kính lên mẫu và ấn nhẹ [158].

Mẫu được quan sát dưới kính hiển vi (OLYMPUS, Nhật Bản) để xác định số lượng NST. Mỗi nghiệm thức được lặp lại ba lần với 9 mẫu. Việc quan sát được thực hiện ít nhất mười pha nguyên phân riêng biệt.

2.3.5. Phương pháp quan sát khí khổng

Các lá của cây sâm Ngọc Linh biến dị và cây lưỡng bội được thu nhận và quan sát hình thái khí khổng để đánh giá sự khác biệt hình thái bằng kính hiển vi quang học, lớp biểu bì của những lá được bóc tách và quan sát gián tiếp thông qua phủ lanoline. Biểu bì dưới của lá cây sâm Ngọc Linh biến dị và lưỡng bội được phủ một lớp lanoline trong suốt và để khô, sau đó tách lớp mẫu lanoline ra và đặt trên lam kính trác vi (thước kính trác vi có chiều dài 1000 μm , chia thành 100 vạch, kích thước mỗi vạch là 10 μm), phủ lamen lên mẫu và quan sát dưới kính hiển vi (OLYMPUS, Nhật Bản) ở độ phóng đại 10x và 40x.

Việc xác định độ chênh lệch kích thước khí khổng dựa trên cơ sở xác định kích thước khí khổng tương ứng với số vạch trên kính trác vi của 30 khí khổng ngẫu nhiên. Mười khu vực lá ($1 \times 1 \text{ mm}$) được lấy mẫu ngẫu nhiên của mỗi lá được đếm để đánh giá mật độ khí khổng. Để quan sát lục lạp trong khí khổng của các lá của cây đột biến, lớp biểu bì dưới của các lá đã chọn được tách vào lúc 9 giờ sáng và quan sát bằng kính hiển vi.

Ghi nhận các chỉ tiêu về khí khổng gồm mật độ khí khổng/ mm^2 , chiều dài khí khổng (μm), chiều rộng khí khổng (μm) và mật độ lục lạp trong tế bào bảo vệ khí khổng.

2.3.6. Một số công thức tỷ lệ đối với một số chỉ tiêu thu nhận

$$\text{Tỷ lệ sống của mẫu (\%)} = \frac{\text{Số mẫu sống}}{\Sigma \text{Tổng số mẫu}} \times 100$$

$$\text{Tỷ lệ cảm ứng mô sẹo (\%)} = \frac{\text{Số mẫu có hình thành mô sẹo}}{\Sigma \text{Tổng số mẫu sống}} \times 100$$

$$\text{Tỷ lệ cảm ứng SE (\%)} = \frac{\text{Số mẫu có hình thành SSE}}{\Sigma \text{Tổng số mẫu sống}} \times 100$$

$$\text{Tỷ lệ mẫu phát sinh phôi (\%)} = \frac{\Sigma \text{số mẫu phát sinh phôi}}{\Sigma \text{số mẫu theo dõi}} \times 100$$

$$\text{Tỷ lệ SSE biến dị} = \frac{\text{Số SSE biến dị (/mẫu)}}{\Sigma \text{Tổng số SSE (/mẫu)}} \times 100$$

$$Tỷ\ lệ\ cảm\ ứng\ SE\ biến\ dị(\%) = \frac{Số\ mẫu\ hình\ thành\ SSE\ biến\ dị}{\Sigma Tổng\ số\ mẫu\ sống} \times 100$$

2.3.7. Điều kiện nuôi cấy

Các bình nuôi cấy được đặt trong phòng kín có nhiệt độ $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, độ ẩm 55 - 60%. Ánh sáng được cung cấp từ đèn huỳnh quang có kích thước 1,2 m (FL-40W/T10), điện áp 220V, công suất 40W, cường độ 40 - 45 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, bước sóng 320 - 800 nm. Phòng nuôi cấy được chiếu sáng 16 giờ/ngày. Đối với mẫu mô sẹo và mẫu mô sẹo phát sinh phôi, các bình nuôi cấy được che tối hoàn toàn trong 2 tuần và sau đó chuyển ra điều kiện chiếu sáng 12 giờ/ngày.

2.3.8. Phương pháp xử lý thống kê

Thí nghiệm được 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.

2.3.9. Địa điểm và thời gian thực hiện luận án

Luận án được thực hiện tại Phòng Sinh học phân tử và Chọn tạo giống cây trồng, Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên – Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Thời gian thực hiện luận án từ 12/2018 đến 12/2022.

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

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

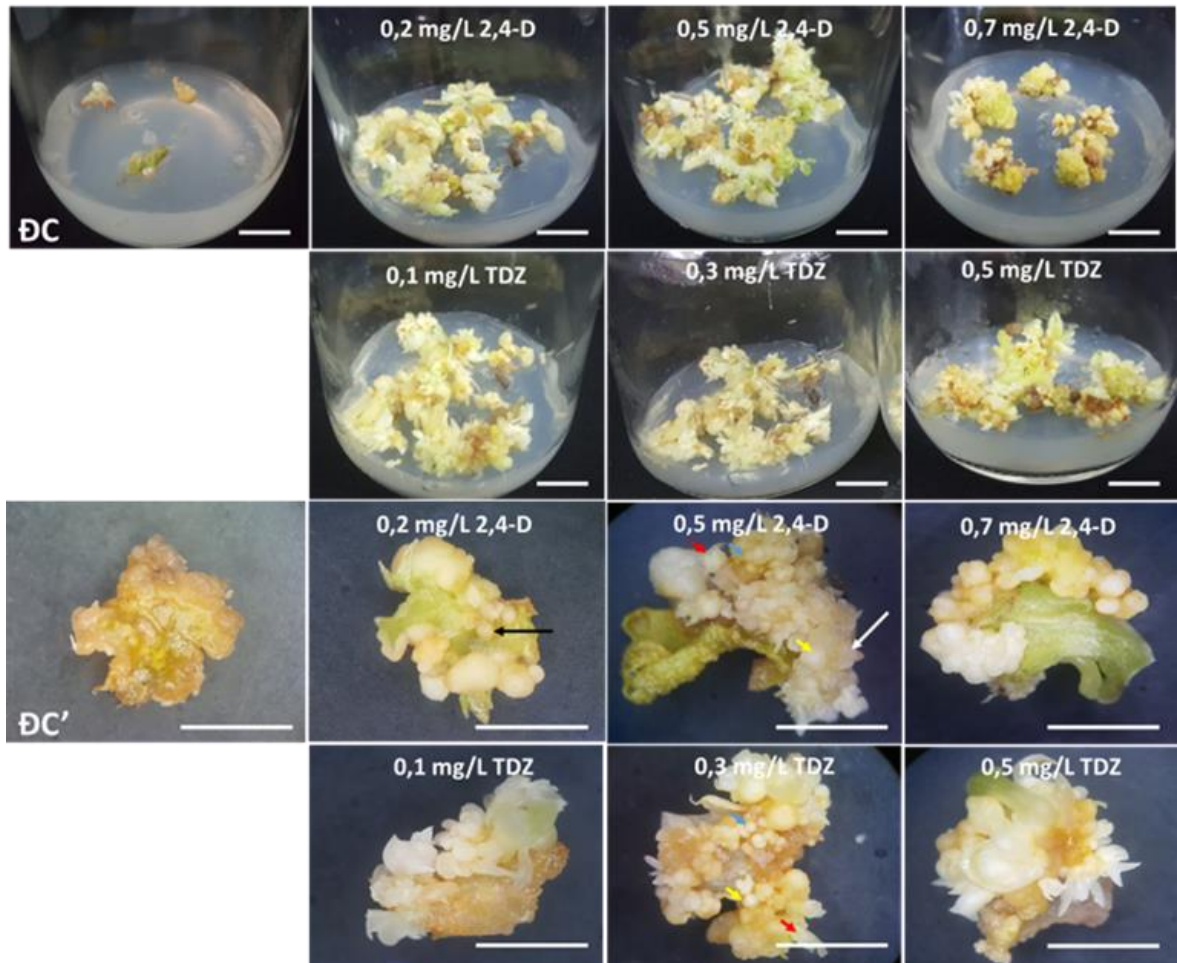
3.1.1. Ảnh hưởng của 2,4-D và TDZ lên sự phát sinh phôi từ mảnh lá, cuống lá và rễ của sâm Ngọc Linh

Kết quả ghi nhận cho thấy việc bổ sung 2,4-D hoặc TDZ ở các nồng độ khác nhau ảnh hưởng đến quá trình cảm ứng phôi soma của mẫu từ mảnh lá sau 6 tuần nuôi cấy (Bảng 3.1).

Bảng 3.1. Ảnh hưởng của 2,4-D và TDZ lên sự phát sinh SE từ các nguồn mẫu cây mảnh lá, cuống lá, rễ sâm Ngọc Linh *in vitro*.

Mẫu cây	Nồng độ 2,4-D (mg/L)	Nồng độ TDZ (mg/L)	Tỷ lệ cảm ứng mô sẹo (%)	Tỷ lệ cảm ứng SE (%)	Số phôi trung bình (phôi/mẫu)	Trọng lượng tươi cụm phôi (g)	Mô tả
Mảnh lá	0,0	0,0	12,00 ^b	16,33 ^k	2,67 ^l	0,13 ^g	Phôi hình cầu, hình tim và có lá mầm. Phôi có màu trắng sáng và màu xanh
	0,2	0,0	100,00 ^a	86,67 ^c	21,33 ^f	1,48 ^{ef}	
	0,5	0,0	100,00 ^a	93,67 ^b	51,00 ^a	1,59 ^{de}	
	0,7	0,0	100,00 ^a	100,00 ^a	35,67 ^c	1,69 ^{bcd}	
	0,0	0,1	100,00 ^a	74,67 ^e	16,67 ^{gh}	1,51 ^{ef}	
	0,0	0,3	100,00 ^a	96,33 ^b	48,33 ^b	1,76 ^{abc}	
	0,0	0,5	100,00 ^a	100,00 ^a	36,67 ^c	1,86 ^a	
Cuống lá	-	0,0	13,00 ^b	6,33 ^m	2,33 ^l	1,14 ^g	Phôi đa phần hình cầu, hình tim, phôi lá mầm. Phôi có màu trắng sáng và màu xanh
	0,2	0,0	100,00 ^a	15,67 ^{kl}	8,33 ^k	1,67 ^{bcd}	
	0,5	0,0	100,00 ^a	35,33 ^j	14,67 ^{hi}	1,65 ^{bcd}	
	0,7	0,0	100,00 ^a	47,33 ⁱ	25,33 ^e	1,67 ^{bcd}	
	0,0	0,1	100,00 ^a	67,67 ^g	16,67 ^{gh}	1,51 ^{ef}	
	0,0	0,3	100,00 ^a	62,67 ^h	26,00 ^e	1,64 ^{cd}	
	0,0	0,5	100,00 ^a	14,67 ^k	29,67 ^d	1,77 ^{ab}	
Rễ	0,0	0,0	15,00 ^b	18,33 ^j	3,33 ^l	1,15 ^g	Phôi chủ yếu hình cầu, phôi có màu vàng nhạt
	0,2	0,0	100,00 ^a	73,33 ^{ef}	12,00 ^{ij}	1,44 ^f	
	0,5	0,0	100,00 ^a	76,33 ^e	17,67 ^g	1,50 ^{ef}	
	0,7	0,0	100,00 ^a	88,67 ^c	11,33 ^j	1,60 ^{de}	
	0,0	0,1	100,00 ^a	71,33 ^f	16,33 ^{gh}	1,66 ^{bcd}	
	0,0	0,3	100,00 ^a	83,00 ^d	18,00 ^g	1,68 ^{bcd}	
	0,0	0,5	100,00 ^a	93,33 ^b	13,00 ^{ij}	1,71 ^{bcd}	

*Các ký tự (a, b, ...) khác nhau đặt cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở $p < 0,05$ (trong phép thử Duncan). (-) Không bổ sung.

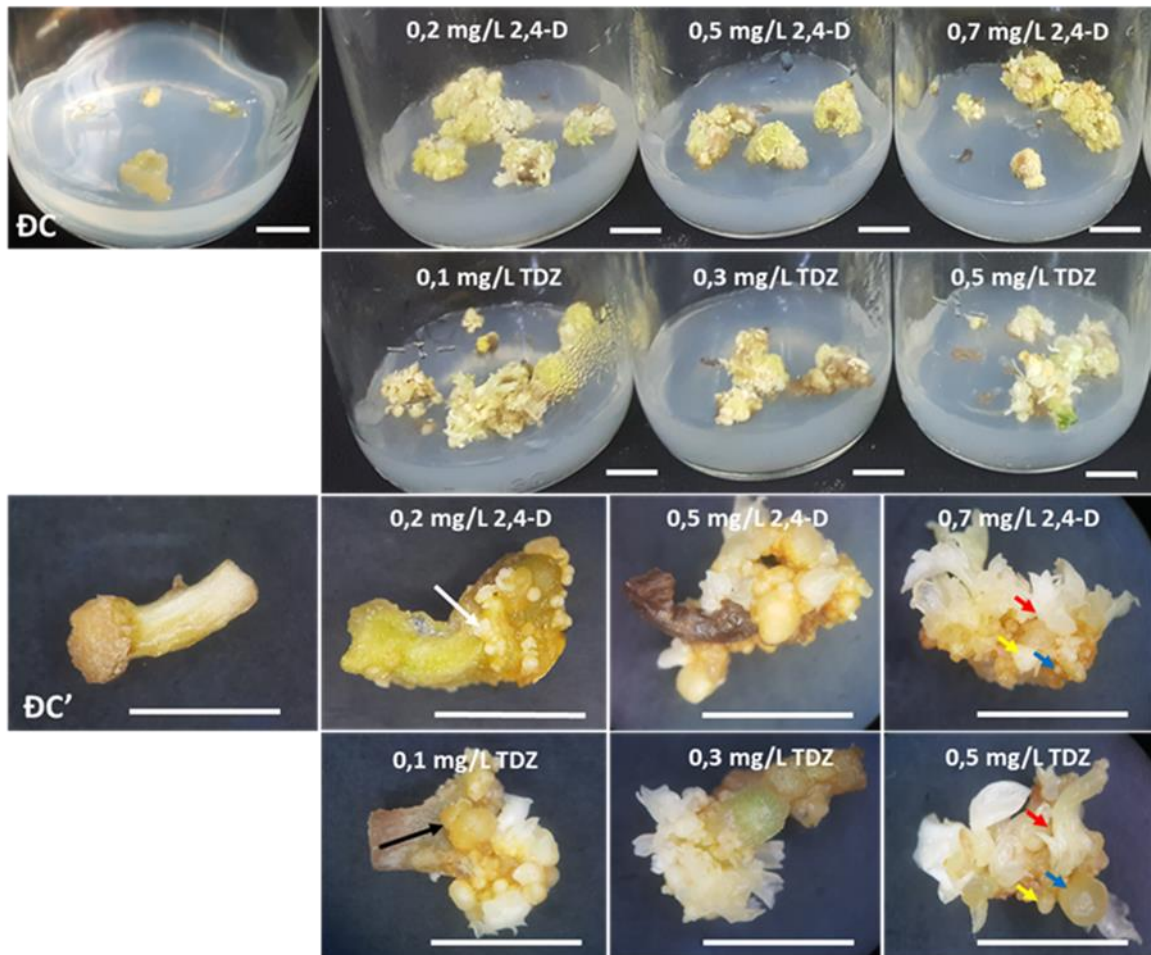


Hình 3.1. Ảnh hưởng của 2,4-D và TDZ lên sự phát sinh SE từ mẫu cấy mảnh lá sâm Ngọc Linh sau 6 tuần nuôi cấy (thước 1 cm). Mũi tên màu đen chỉ sự phát sinh phôi trực tiếp, mũi tên màu trắng chỉ phát sinh phôi gián tiếp. Các mũi tên màu xanh chỉ vị trí của phôi hình cầu, màu vàng chỉ phôi hình tim và màu đỏ chỉ phôi có lá mầm.

Sự cảm ứng mô sẹo đạt 100% trên hầu hết các nghiệm thức. Trong khi đó, tỉ lệ cảm ứng phôi trực tiếp (mũi tên màu đen) hoặc gián tiếp qua mô sẹo (mũi tên màu trắng) (Hình 3.1) là khác nhau tại các nồng độ xử lý với PGRs khác nhau. Cụ thể, môi trường bổ sung 2,4-D, tỉ lệ cảm ứng phôi cũng như trọng lượng tươi của cụm phôi gia tăng tỉ lệ thuận với nồng độ và đạt cao nhất 100% tại 0,7 mg/L 2,4-D, tương ứng với trọng lượng tươi của cụm phôi là 1,69g, cao nhất trong các nghiệm thức thí nghiệm (Bảng 3.1, Hình 3.1). Tuy nhiên, số phôi trung bình không tỉ lệ thuận với nồng độ, cao nhất là 51 phôi tại môi trường 0,5 mg/L 2,4-D nhưng sau đó giảm xuống 35,67 phôi tại nồng độ 0,7 mg/L 2,4-D (Bảng 3.1, Hình 3.1). Phôi hình thành có các

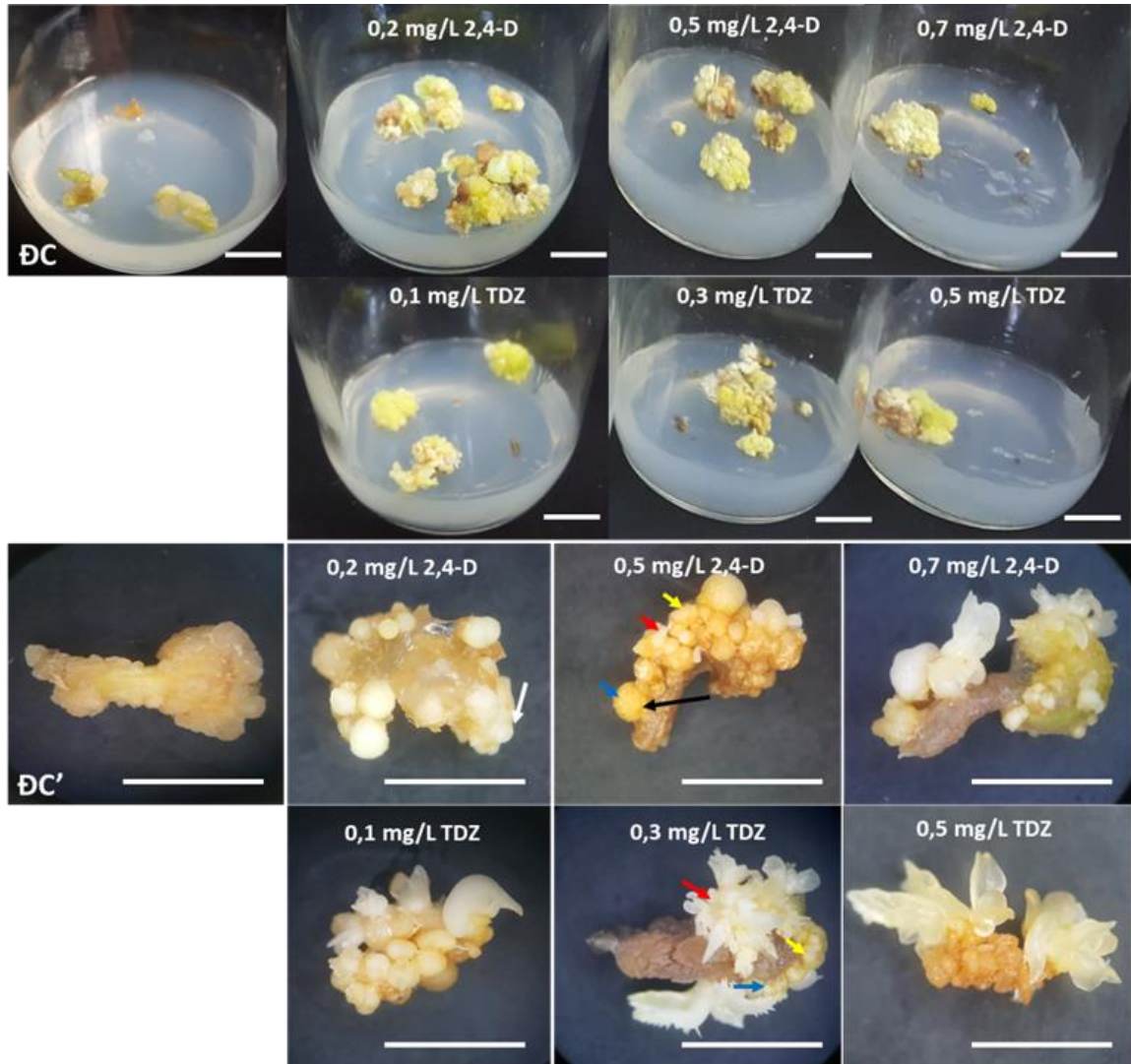
dạng hình cầu (mũi tên màu xanh), hình tim (mũi tên màu vàng) và phôi có lá mầm (mũi tên màu đỏ) (Hình 3.1).

Với môi trường bổ sung TDZ, tỷ lệ cảm ứng phôi có khuynh hướng gia tăng, từ 93,33% và trọng lượng tươi tương ứng của cụm phôi 1,76g tại nồng độ 0,3 mg/L TDZ tăng lên 100% và 1,86g tại 0,5 mg/L TDZ (Bảng 3.1). Tuy nhiên, số phôi trung bình giữa các nghiệm thức có sự khác biệt. Nghiệm thức bổ sung 0,3 mg/L TDZ có số phôi trung bình tương ứng 48,33 phôi và trọng lượng tươi cụm phôi 1,76g cao nhất khi xử lý mẫu mảnh lá với TDZ. Sau đó, số phôi trung bình giảm còn 36,67 phôi trong khi trọng lượng tươi của cụm phôi đạt 1,86g tại nồng độ 0,5 mg/L TDZ cao nhất trong các nghiệm thức với nguồn vật liệu là mảnh lá (Bảng 3.1, Hình 3.1).



Hình 3.2. Ảnh hưởng của 2,4-D và TDZ lên sự phát sinh SE từ mẫu cuống lá sâm Ngọc Linh sau 6 tuần nuôi cấy (thước 1 cm). Mũi tên màu đen chỉ sự phát sinh phôi trực tiếp, mũi tên màu trắng chỉ phát sinh phôi gián tiếp. Các mũi tên màu xanh chỉ vị trí của phôi hình cầu, màu vàng chỉ phôi hình tim và màu đỏ chỉ phôi có lá mầm.

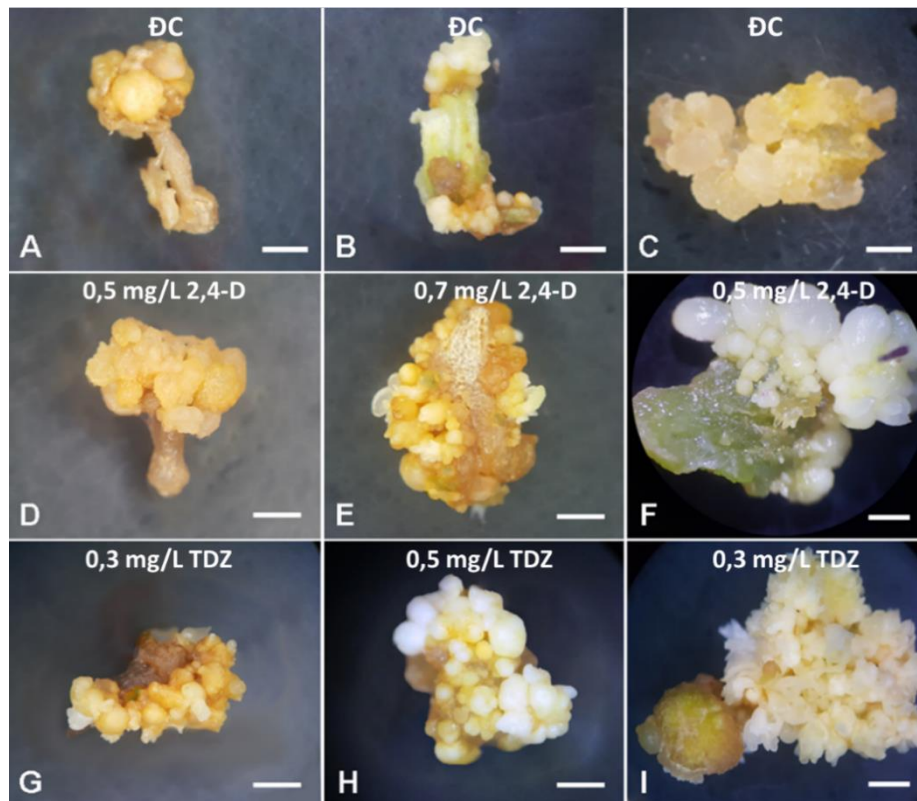
Với mẫu cuống lá, sự phát sinh phôi cũng diễn ra theo con đường trực tiếp (mũi tên màu đen) và gián tiếp (mũi tên màu trắng) (Hình 3.2), nghiên cứu cũng cho thấy 100% mẫu cảm ứng mô sẹo ở hầu hết các nghiệm thức (Bảng 3.1). Đồng thời, tỉ lệ hình thành phôi tăng theo nồng độ, cao nhất tại 0,7 mg/L 2,4-D (Bảng 3.1, Hình 3.2). Ngược lại, khi xử lý với TDZ tỉ lệ hình thành phôi có khuynh hướng giảm dần khi tăng nồng độ và giảm thấp nhất tại TDZ 0,5 mg/L tương ứng là 14,67% (Bảng 3.1). Hơn nữa, khi so sánh với mẫu mảnh lá, tỉ lệ hình thành phôi của mẫu mảnh lá cao hơn so với mẫu cuống lá tại hầu hết các nghiệm thức. Bên cạnh đó, môi trường bổ sung 2,4-D cho thấy trọng lượng tươi của cụm phôi hầu như không có sự khác biệt lớn giữa các nồng độ, nhưng khi xử lý với TDZ thì trọng lượng tươi có sự khác biệt và đạt cao nhất tại 0,5 mg/L TDZ (Bảng 3.1, Hình 3.2). Khi tăng nồng độ cả với 2,4-D và TDZ thì số phôi hình thành tăng dần, cụ thể khi bổ sung 2,4-D số phôi hình thành cao nhất tại 0,7 mg/L 2,4-D, tương ứng là 25,33 phôi/mẫu, trong khi đó với cùng nồng độ này thì mẫu mảnh lá có số phôi cao hơn tương ứng là 35,6 phôi/mẫu, phôi đồng đều và có màu trắng sáng. Tương tự như vậy, số phôi của mẫu cây cũng tăng khi nồng độ TDZ tăng và đạt cao nhất tại 0,5 mg/L tương ứng là 29,67 phôi/mẫu nhưng thấp hơn mẫu cây mảnh lá với cùng nồng độ (Bảng 3.1, Hình 3.2). Các giai đoạn phôi bao gồm dạng hình cầu (mũi tên màu xanh), hình tim (mũi tên vàng) và phôi có lá mầm (mũi tên màu đỏ) đều hiện diện trên mẫu (Hình 3.2).



Hình 3.3. Ảnh hưởng của 2,4-D và TDZ lên sự phát sinh SE của mẫu cây rễ sâm Ngọc Linh sau 6 tuần nuôi cấy (thước 1cm). Mũi tên màu đen chỉ sự phát sinh phôi trực tiếp, mũi tên màu trắng chỉ phát sinh phôi gián tiếp. Các mũi tên màu xanh chỉ vị trí của phôi hình cầu, màu vàng chỉ phôi hình tim và màu đỏ chỉ phôi có lá mầm.

Với mẫu rễ, phôi phát sinh cả trực tiếp (mũi tên màu đen) và gián tiếp (mũi tên màu trắng) (Hình 3.3) môi trường bổ sung 2,4-D (0,2; 0,5; 0,7) mg/L hoặc TDZ (0,1; 0,3; 0,5) mg/L, tỉ lệ cảm ứng mô sẹo là 100% (Bảng 3.1, Hình 3.3). Hơn nữa, tỉ lệ cảm ứng SE của mẫu rễ cao hơn mẫu cuống lá nhưng thấp hơn mẫu mảnh lá (Bảng 3.1). So sánh trọng lượng tươi của cụm phôi giữa các mẫu rễ trên môi trường bổ sung 2,4-D hoặc TDZ kết quả cho thấy trọng lượng tươi trên môi trường bổ sung TDZ cao hơn và cao nhất tại nồng độ 0,5 mg/L TDZ tương ứng là 1,71g (Bảng 3.1, Hình 3.3). Cũng như 2 nguồn vật liệu mảnh lá và cuống lá, kết quả ghi nhận số phôi trung bình trên môi trường bổ sung 2,4-D có xu hướng tăng dần khi tăng nồng độ và cao

nhất tại 0,5 mg/L 2,4-D tương ứng là 17,67 phôi nhưng lại giảm tại 0,7 mg/L 2,4-D tương ứng là 11,33 phôi (Bảng 3.1, Hình 3.3). Tương tự như vậy, sự gia tăng nồng độ TDZ, ban đầu số phôi trung bình của mẫu có khuynh hướng tăng và tại môi trường bổ sung 0,3 mg/L TDZ có số phôi trung bình cao nhất nhưng sau đó giảm xuống 13 phôi tại 0,5 mg/L TDZ. Hơn nữa, khi so sánh số phôi trung bình của 3 nguồn vật liệu là mảnh lá, khúc cắt cuống lá và khúc cắt rễ thì số phôi hình thành trên mẫu rễ là thấp nhất (Bảng 3.1, Hình 3.3).



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 cm).

Tóm lại, từ 3 nguồn vật liệu mảnh lá, cuống lá và rễ, chúng tôi tìm ra môi trường thích hợp cho sự cảm ứng hình thành phôi tương ứng với từng nguồn vật liệu. Đối với mẫu mảnh lá, sự hình thành phôi tốt nhất tương ứng với môi trường bổ sung 0,5 mg/L 2,4-D hoặc 0,3 mg/L TDZ. Đối với mẫu cuống lá, môi trường bổ sung 0,7 mg/L 2,4-D hoặc 0,5 mg/L TDZ phù hợp cho sự hình thành phôi. Đối với sự phát sinh phôi ở mẫu rễ, bổ sung 0,5 mg/L 2,4-D hoặc 0,3 mg/L TDZ là môi trường thích hợp (Bảng 3.1, Hình 3.4).

Ngoài ra, trong 3 nguồn vật liệu trên mẫu mảnh lá có số phôi hình thành/ mẫu là cao nhất tương ứng là 51,00 phôi và cao hơn hẳn so với 2 nguồn vật liệu còn lại.

Chọn mô cấy và môi trường thích hợp là hai yêu cầu quan trọng trong quá trình cảm ứng mô thực vật [34]. Do vậy, chọn mô thích hợp cho cảm ứng tạo phôi và môi trường thích hợp cũng đã được thực hiện trong nghiên cứu này. Trong 3 nguồn mẫu cấy là mảnh lá, cuống lá, rễ thì mảnh lá cho cảm ứng tạo phôi tốt nhất so với hai nguồn mẫu còn lại (Bảng 3.1; Hình 3.4).

Nền tảng của quá trình nuôi cấy mô thực vật là khả năng tái sinh được biểu hiện bởi các mô và tế bào thực vật sống. Khi được tách ra từ cây mẹ và được nuôi cấy *in vitro*, với PGRs và môi trường thích hợp, các tế bào đã biệt hóa trước đó sẽ tiếp tục phân chia và có thể hướng theo con đường phát triển để tạo ra các tế bào, mô, cơ quan và cây hoàn chỉnh [35]. Trong nghiên cứu này, 2,4-D và TDZ có ảnh hưởng rõ rệt đến sự hình thành phôi của mẫu sâm Ngọc Linh giúp cảm ứng sự hình thành phôi trên hầu hết các loại mẫu cấy (Bảng 3.1; Hình 3.1; 3.2; 3.3; 3.4). Một số nghiên cứu cho thấy PGRs đóng vai trò quan trọng trong quá trình phát sinh phôi [159], [160]. Hơn nữa, mọi tế bào sống bình thường khả năng tái sinh cơ thể toàn vẹn được gọi là tính toàn năng của tế bào, đây được coi là cơ sở quan trọng trong nuôi cấy mô thực vật [35-36, 161-162]. Trong đó, auxin ngoại sinh giúp điều hòa sự phát triển của SE bằng cách thay đổi hàm lượng auxin nội sinh và liên quan trực tiếp hoặc gián tiếp đến sự cảm ứng hình thành trục phôi nhằm thiết lập tính đối xứng của giai đoạn phát sinh phôi sớm [163], [164], [34]. Ở nhiều loài thực vật cảm ứng sự phát sinh SE thì vai trò của auxin, đặc biệt là 2,4-D thường cho hiệu quả phát sinh phôi cao [165], [166]. Vai trò của auxin lên sự phát sinh phôi được ghi nhận ở một số loài thực vật như *Paspalum scrobiculatum* [167], *Picea abies* và *Picea omorika* [168], *Panax Gingseng* [169], *Stewartia* [170], *Camellia oleifera* [171]. Hơn nữa, các nghiên cứu cũng cho thấy ngoài auxin, cytokinin cũng được sử dụng cho cảm ứng phát sinh phôi ở các loài thực vật hai lá mầm. Một số loại cytokinin như BAP, TDZ, kinetin và zeatin được sử dụng cho kết quả tốt cho sự phát sinh phôi trên nhiều loài thực vật [51-54].

Đối với các mẫu cấy không có mô phân sinh, bước cần thiết đầu tiên cho nuôi cấy thành công là kích thích cho một nhóm nhỏ tế bào tiếp tục hoạt động phân bào. Các tế bào này có mức biệt hóa thấp như các tế bào nhu mô lá, và sự khử biệt hóa có

thể cần thiết trước khi đi vào phân chia tế bào [35]. Do vậy việc bổ sung các PGRs khác nhau đã góp phần cảm ứng cho quá trình phân biệt hóa của các mô này mà cụ thể là cảm ứng sự hình thành mô sẹo và từ đó làm cơ sở cho hình thành phôi theo con đường gián tiếp bằng cách, nhóm nhỏ các tế bào mới phân chia, bình thường ở bề mặt mẫu cấy, có thể tiếp tục phân chia để tạo ra một sinh khối tế bào chưa biệt hóa. Các nhóm nhỏ tế bào đang phân chia sẽ phát triển nhanh một lớp biểu bì bao phủ và giảm kích thước khi phân chia thường xuyên, tạo ra một cơ quan gọi là meristemoid. Sự phân chia liên tục sau quá trình phát sinh cơ quan này sẽ tạo mô phân sinh hình vòm điển hình, trong trường hợp của chồi, sơ khởi lá. Mô phân sinh chồi đang phát triển có thể được tạo ra để tạo ra cây con *in vitro*, hoàn thành con đường phát triển cần thiết cho vi nhân giống. Quá trình phát sinh cơ quan cần trải qua quá trình phân chia và biệt hóa tế bào [35]. Trong nghiên cứu này, đối với nguồn mẫu cấy không có mô phân sinh như mảnh lá, cuống lá, rễ thì sự phát sinh phôi cũng diễn ra theo con đường trực tiếp và gián tiếp dưới tác động của PGRs cụ thể là 2,4-D và TDZ (Bảng 3.1; Hình 3.1; 3.2; 3.3).

Con đường phát triển do hoạt động của meristemoid tạo ra các thể có lớp biểu bì, đang biệt hóa với mô phân sinh ở cả hai cực. Sau đó, một trong số chúng sẽ phát triển thành mô phân sinh chồi và phần đối cực của nó thành mô phân sinh rễ để tạo ra phôi soma. Sự phát triển tiếp theo của những cây mầm như vậy sẽ gần giống với phôi hợp tử (gọi là sự phát sinh phôi soma) và cây con hoàn chỉnh có thể được phát triển từ những phôi soma như vậy [35].

Cảm ứng SE của chi *Panax* cũng đã được nghiên cứu trên loài *P. ginseng* [169], [172], [173]. Các kết quả trên cho thấy sự phát sinh phôi phụ thuộc vào loại mẫu cấy và nồng độ của hai PGRs là 2,4-D và TDZ. Trong thí nghiệm này, PGRs có ảnh hưởng lên khả năng phát sinh phôi ở mẫu mảnh lá cho hiệu quả tốt hơn các mẫu cuống lá và mẫu rễ của cây *in vitro*. Điều này có thể do tồn tại một khuynh độ (gradient) cảm ứng phát sinh phôi khác biệt giữa các cơ quan trong quá trình phát sinh phôi khác nhau [43], [174]. Hien và cộng sự (2014) cũng báo cáo rằng phôi được phát sinh trực tiếp từ mẫu mảnh lá cao nhất trên môi trường bổ sung 2 mg/L NAA (29,49 phôi/mẫu) cao hơn các mẫu như: cuống lá và thân rễ sâm Ngọc Linh [175]. Tương tự, nghiên cứu của Vinh và cộng sự (2014) cũng cho thấy số phôi thu được từ

mẫu lá của môi trường chứa 1 mg/L NAA và 1 mg/L 2,4-D cao hơn so với mẫu cuống lá [16].

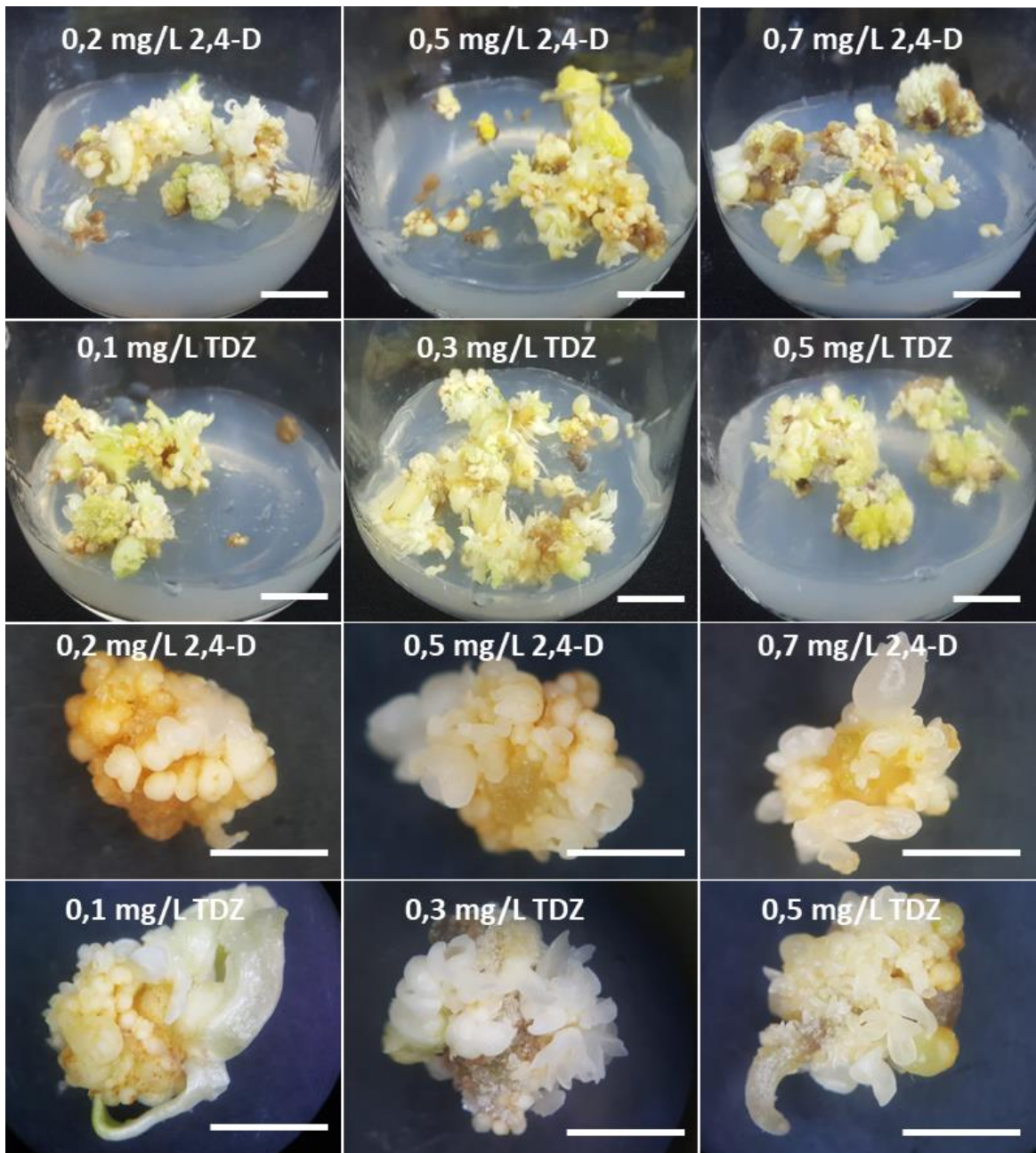
3.1.2. Ảnh hưởng của 2,4-D và TDZ lên sự phát sinh phôi thứ cấp từ các dạng phôi của sâm Ngọc Linh

Phát sinh phôi thứ cấp là quá trình phôi được hình thành từ phôi, khác với cách thức hình thành phôi sơ cấp. Phôi sơ cấp được hình thành từ đa dạng các loại mẫu cây thực vật. Ngoài ra, sự phát sinh phôi thứ cấp mang lại những ưu điểm hơn so với quá trình phát sinh phôi sơ cấp, đặc biệt là tỷ lệ nhân sinh khối phôi cao và mức độ đồng đều của phôi tăng, quá trình này không phụ thuộc vào nguồn mẫu ban đầu. Do vậy, nghiên cứu này nhằm khảo sát sự hình thành phôi thứ cấp từ cả 3 dạng phôi như: phôi hình cầu, hình tim và phôi có lá mầm. Kết quả ghi nhận thể hiện trong bảng 3.2.

Bảng 3.2. Ảnh hưởng của 2,4-D và TDZ lên sự phát sinh phôi thứ cấp từ các dạng phôi hình cầu, phôi hình tim, phôi có lá mầm sâm Ngọc Linh.

Mẫu cây	Nồng độ 2,4-D (mg/L)	Nồng độ TDZ (mg/L)	Tỷ lệ cảm ứng mô sẹo (%)	Tỷ lệ cảm ứng SE (%)	Số phôi trung bình (phôi/mẫu)	Trọng lượng tươi cụm phôi (g)	Mô tả
Phôi hình cầu	ĐC	0,0	3,33 ^b	38,67 ^b	4,33 ^l	0,13 ^g	
	0,2	0,0	100,00 ^a	100,00 ^a	32,00 ^{jk}	2,08 ^{ef}	Phôi thứ cấp
	0,5	0,0	100,00 ^a	100,00 ^a	45,33 ^{de}	2,20 ^{de}	hình thành
	0,7	0,0	100,00 ^a	100,00 ^a	65,67 ^a	2,27 ^{bcd}	theo 2 kiểu
	0,0	0,1	100,00 ^a	100,00 ^a	39,67 ^{fg}	2,11 ^{ef}	trực tiếp,
	0,0	0,3	100,00 ^a	100,00 ^a	68,33 ^a	2,26 ^{abc}	gián tiếp
	0,0	0,5	100,00 ^a	100,00 ^a	43,67 ^e	2,46 ^a	
Phôi hình tim	ĐC	0,0	5,33 ^b	25,33 ^c	3,00 ^l	0,13 ^g	
	0,2	0,0	100,00 ^a	100,00 ^a	34,00 ^{ij}	2,40 ^{bcd}	Phôi thứ cấp
	0,5	0,0	100,00 ^a	100,00 ^a	54,33 ^c	2,36 ^{cde}	hình thành
	0,7	0,0	100,00 ^a	100,00 ^a	36,67 ^{ghi}	2,37 ^{cde}	trực tiếp và
	0,0	0,1	100,00 ^a	100,00 ^a	38,67 ^{gh}	2,34 ^{cde}	gián tiếp
	0,0	0,3	100,00 ^a	100,00 ^a	48,67 ^d	2,36 ^{cde}	
	0,0	0,5	100,00 ^a	100,00 ^a	65,33 ^a	2,46 ^{abc}	
Phôi có lá mầm	ĐC	0,0	3,67 ^b	13,67 ^d	3,33 ^l	0,15 ^g	
	0,2	0,0	100,00 ^a	100,00 ^a	30,00 ^k	2,17 ^f	Phôi thứ cấp
	0,5	0,0	100,00 ^a	100,00 ^a	47,33 ^d	2,30 ^{de}	hình thành
	0,7	0,0	100,00 ^a	100,00 ^a	42,33 ^{ef}	2,35 ^{de}	trực tiếp,
	0,0	0,1	100,00 ^a	100,00 ^a	35,67 ^{hi}	2,39 ^{cde}	gián tiếp
	0,0	0,3	100,00 ^a	100,00 ^a	53,00 ^c	2,43 ^{bcd}	
	0,0	0,5	100,00 ^a	100,00 ^a	60,00 ^b	2,47 ^{ab}	

*Các ký tự (a, b, ...) khác nhau đặt cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở $p < 0,05$ (trong phép thử Duncan). (-) Không bổ sung.

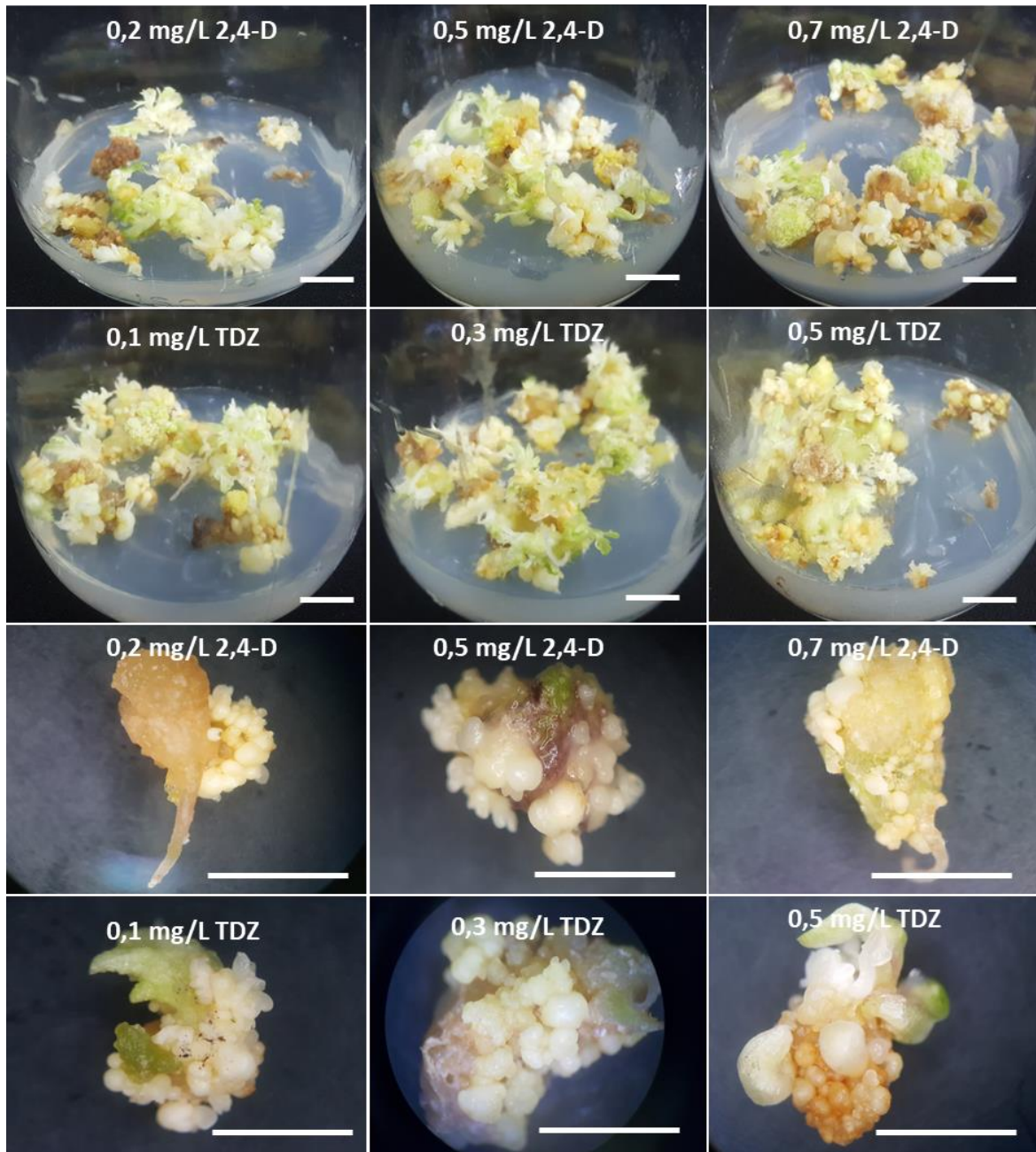


Hình 3.5. Sự phát sinh SSE từ phôi hình cầu của sâm Ngọc Linh trên môi trường bổ sung 2,4-D hoặc TDZ nồng độ khác nhau sau 6 tuần nuôi cấy (thước 1 cm).

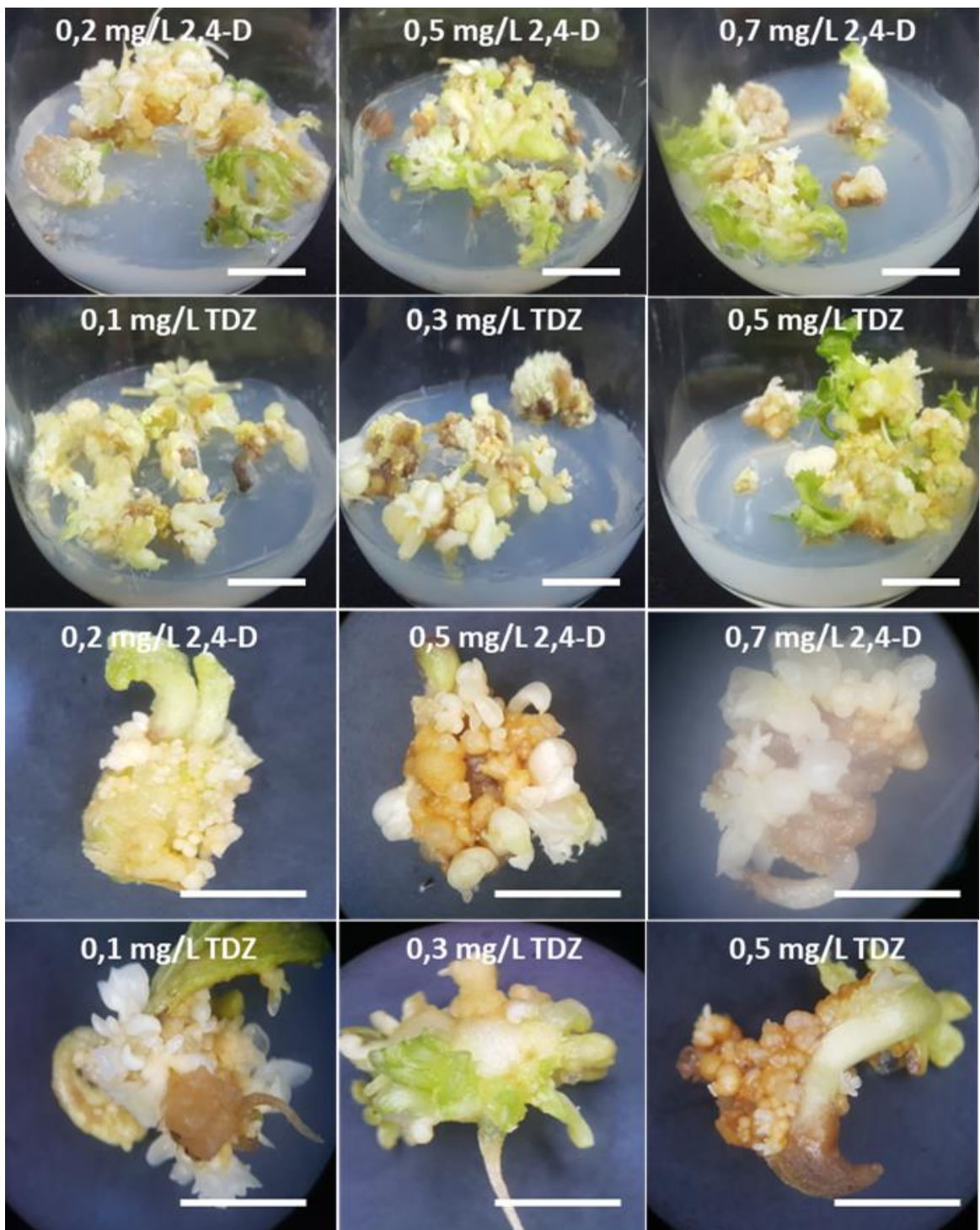
Đối với nguồn vật liệu phôi hình cầu, môi trường bổ sung riêng lẻ 2,4-D hoặc TDZ có 100% mẫu hình thành mô sẹo và các mô sẹo này có khả năng biệt hóa phôi với tỉ lệ 100% (Bảng 3.2, Hình 3.5). Ngoài ra, sự hình thành phôi thứ cấp có thể diễn ra trực tiếp hoặc gián tiếp (Hình 3.5, Hình 3.6). Tuy nhiên, đối với chỉ tiêu số phôi thứ cấp trung bình có sự khác biệt tùy vào loại và nồng độ của PGRs được sử dụng. Cụ thể, số phôi thứ cấp tăng dần và đạt cao nhất tại môi trường bổ sung 0,7 mg/L 2,4-D tương ứng trọng lượng tươi của mẫu là 2,27 g (Bảng 3.2, Hình 3.5). Tương tự, môi trường bổ sung TDZ có số phôi thứ cấp đạt cao nhất tại 0,3 mg/L TDZ tương ứng là

68,33 phôi và là nghiệm thức cho số phôi thứ cấp hình thành cao hơn các nghiệm thức còn lại trên môi trường bổ sung riêng lẻ 2,4-D hoặc TDZ (Bảng 3.2, Hình 3.5). Ngoài ra, với TDZ riêng lẻ nhận thấy xung quanh mẫu phôi xuất hiện các phôi thứ cấp mới, là những nốt màu trắng mọc xung quanh các phôi ban đầu và sau đó chuyển dần sang màu xanh, dần dần hình thành một cụm phôi (Hình 3.5).

Đối với nguồn vật liệu phôi hình tim, nghiên cứu cho thấy: Nghiệm thức bổ sung riêng lẻ 2,4-D hoặc TDZ cũng cho hiệu quả cảm ứng mô sẹo và phôi thứ cấp trên hầu hết các nồng độ khảo sát đều đạt 100% (Bảng 3.2, Hình 3.6). Khi so sánh số phôi trung bình của mẫu, có sự khác biệt theo từng loại và nồng độ của môi trường bổ sung 2,4-D hoặc TDZ, môi trường bổ sung 2,4-D có số SSE cao nhất tại 0,5 mg/L 2,4-D tương ứng 54,33 phôi và trọng lượng tươi cụm phôi là 2,36 g (Bảng 3.2, Hình 3.6). Cũng xu hướng đó, môi trường bổ sung TDZ giúp đẩy quá trình hình thành SSE, trong đó số phôi trung bình tăng dần theo sự gia tăng của nồng độ TDZ, tại 0,5 mg/L TDZ tương ứng là 65,33 phôi và là nghiệm thức cho số phôi thứ cấp cao, trọng lượng tươi của cụm phôi cũng đạt cao nhất là 2,46 g. Vậy, nghiệm thức tốt nhất cho sự cảm ứng phôi thứ cấp của mẫu phôi hình tim là xử lý 0,5 mg/L TDZ mặc dù có thấp hơn so với nguồn vật liệu là phôi hình cầu.



Hình 3.6. Sự phát sinh SSE từ phôi hình tim sâm Ngọc Linh trên môi trường bổ sung 2,4-D hoặc TDZ nồng độ khác nhau sau 6 tuần nuôi cấy (thước 1 cm).

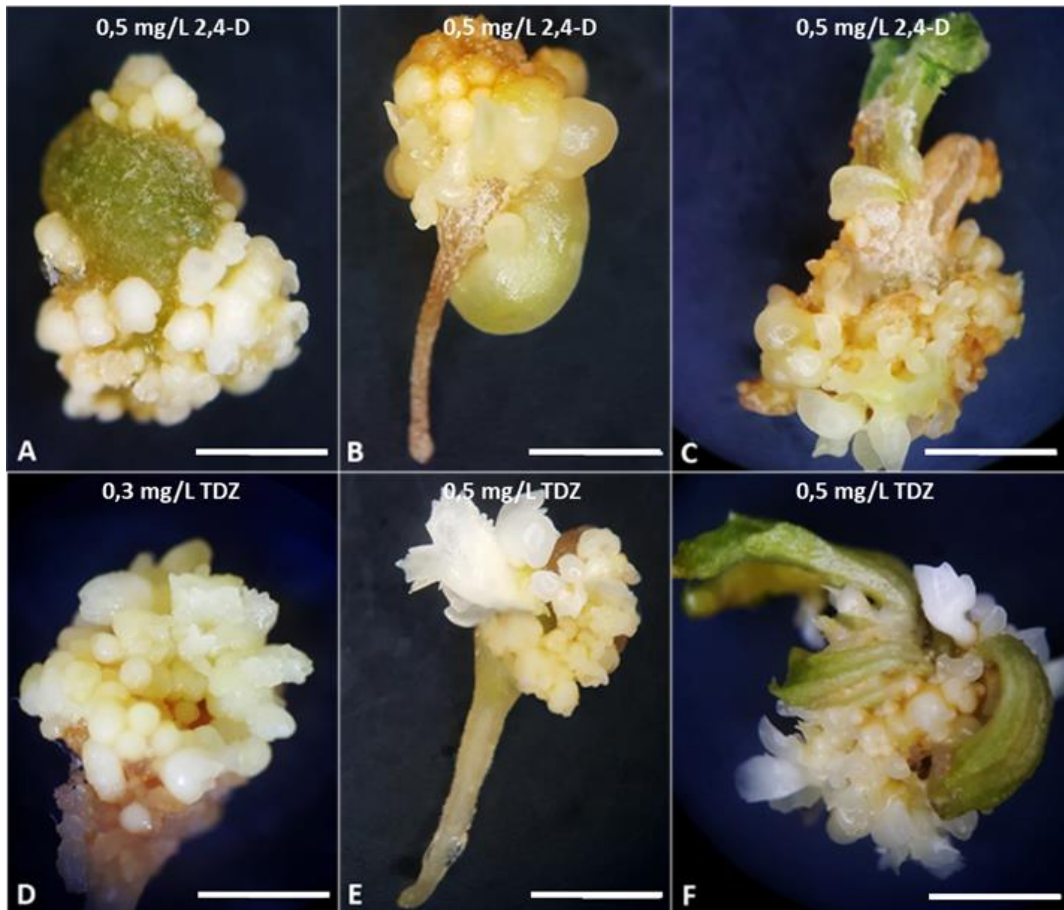


Hình 3.7. Sự phát sinh SSE từ phôi lá mầm sâm Ngọc Linh trên môi trường bổ sung 2,4-D hoặc TDZ nồng độ khác nhau sau 6 tuần nuôi cấy (thước 1 cm).

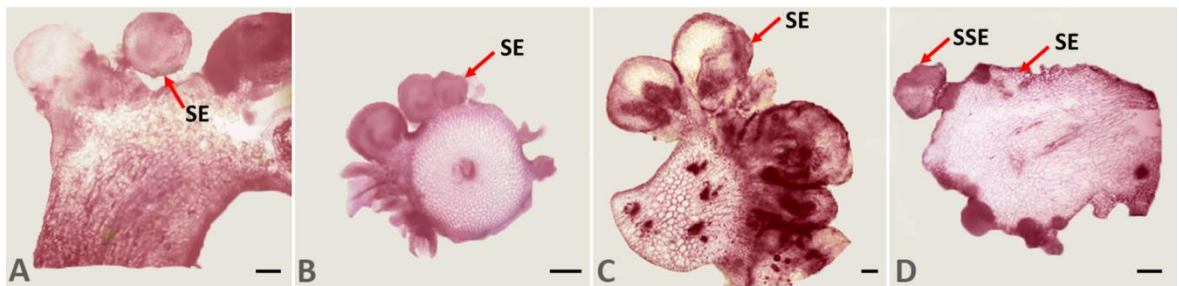
Sự biệt hóa hay độ trưởng thành của phôi có ảnh hưởng đáng kể đến sự cảm ứng phôi thứ cấp, với nguồn vật liệu phôi có lá mầm cũng tương tự như hai nguồn vật liệu phôi cầu và phôi hình tim, sự hiện diện của 2,4-D hoặc TDZ trong môi trường

nuôi cấy cho hiệu quả cảm ứng mô sẹo và phôi trên hầu hết các nồng độ khảo sát và đạt 100% (Bảng 3.2, Hình 3.7). Đối với phôi lá mầm, xử lý với 2,4-D hoặc TDZ cũng có hiệu quả cảm ứng phôi thứ cấp, tại 0,5 mg/L 2,4-D số phôi thứ cấp tương ứng 47,33 phôi, trọng lượng tươi cụm phôi là 2,30 g hoặc 60 phôi với môi trường có chứa 0,5 mg/L TDZ, trọng lượng tươi cụm phôi là 2,47g (Bảng 3.2, Hình 3.7). Tuy nhiên số phôi thứ cấp hình thành hầu như thấp hơn khi so sánh với hai nguồn vật liệu phôi cầu và phôi hình tim.

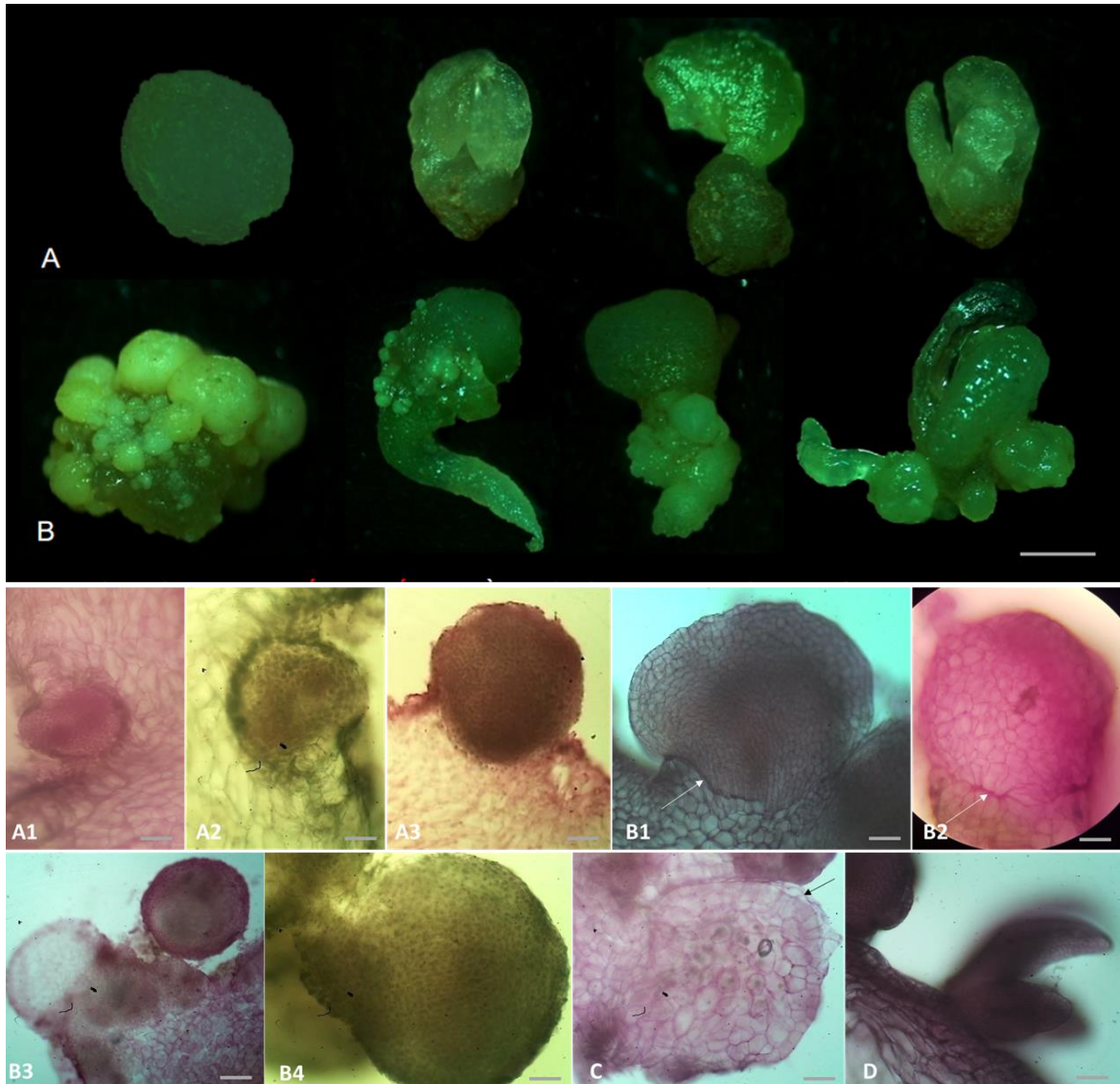
Tóm lại, kết quả thu được từ thí nghiệm trên, bổ sung 2,4-D, TDZ riêng lẻ cho thấy tất cả mẫu thí nghiệm đều có khả năng phát sinh phôi thứ cấp. Sự hình thành phôi thứ cấp có thể trực tiếp hoặc gián tiếp (Hình 3.10, hình 3.11). Trong ba dạng phôi, phôi hình cầu bổ sung 0,7 mg/L 2,4-D số phôi trung bình cao nhất 65,67 phôi, phôi hình tim và phôi có lá mầm, bổ sung 0,5 mg/L 2,4-D cho số phôi thứ cấp hình thành cao nhất tương ứng là 54,33 và 47,33 phôi (Bảng 3.2, Hình 3.8B). Với môi trường bổ sung 0,5 mg/L TDZ số phôi thứ cấp hình thành cao nhất ở 2 dạng phôi hình tim và phôi lá mầm tương ứng lần lượt 65,33 và 60,00 phôi (Bảng 3.2, Hình 3.8D); bổ sung 0,3 mg/L TDZ tốt nhất cho sự hình thành phôi thứ cấp của phôi hình cầu và cũng là nghiệm thức tốt nhất trong cả 3 nguồn vật liệu (68,33 phôi) (Bảng 3.2, Hình 3.5B)



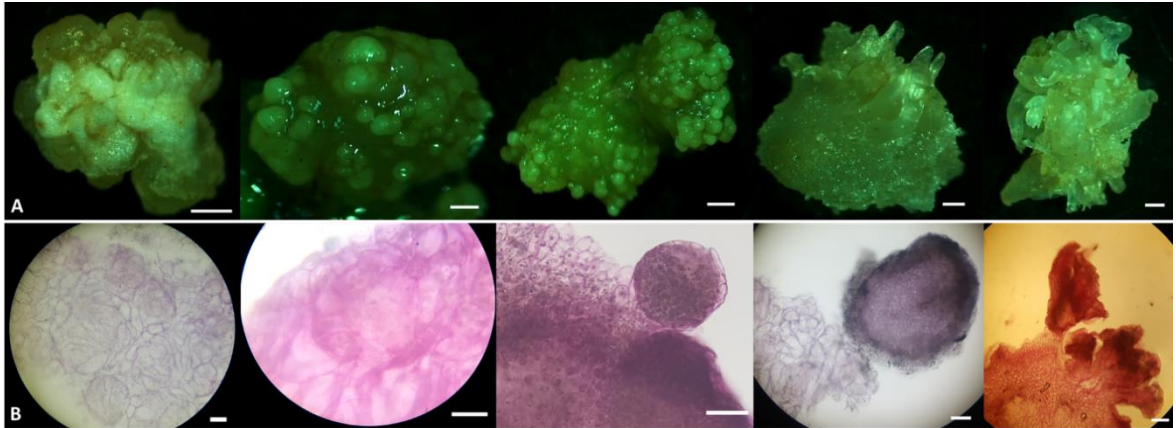
Hình 3.8. Ảnh hưởng của nồng độ 2,4-D và TDZ tối ưu lên sự phát sinh SSE từ các dạng phôi hình cầu (A, D), phôi hình tim (B, E) và phôi lá mầm (C, F) sâm Ngọc Linh sau 6 tuần nuôi cấy (thước 1 cm).



Hình 3.9. Sự phát sinh phôi từ các mẫu mảnh lá (A), rễ (B), cuống lá (C) và sự phát sinh SSE (D) của sâm Ngọc Linh sau 6 tuần nuôi cấy (thước 0,1 mm).



Hình 3.10. Sự hình thành SSE trực tiếp trên bề mặt của các dạng phôi của sâm Ngọc Linh. **A:** Các dạng phôi sâm Ngọc Linh; **B:** SSE trực tiếp trên bề mặt của các dạng phôi của sâm Ngọc Linh môi trường bổ 2,4-D hoặc TDZ. Hình thái giải phẫu các giai đoạn hình thành SSE. **A1 - A3:** Giai đoạn sơ khởi của phôi (phôi dạng cầu sớm). **B1 - B4:** Giai đoạn hình thành tầng tách rời (phôi dạng cầu muộn). **C:** phôi trưởng thành (hình thành lớp biểu bì) (phôi hình tim). **D:** phôi có lá mầm. (A, B: thước 1 mm; A1 - D: thước 100 μ m).



Hình 3.11. Sự hình thành SSE gián tiếp từ các dạng phôi sâm Ngọc Linh trên môi trường bổ sung 2,4-D hoặc TDZ (thước 1 mm). **A:** Sự hình thành SSE gián tiếp. **B:** Hình thái giải phẫu sự hình thành SSE gián tiếp (thước 100 μm).

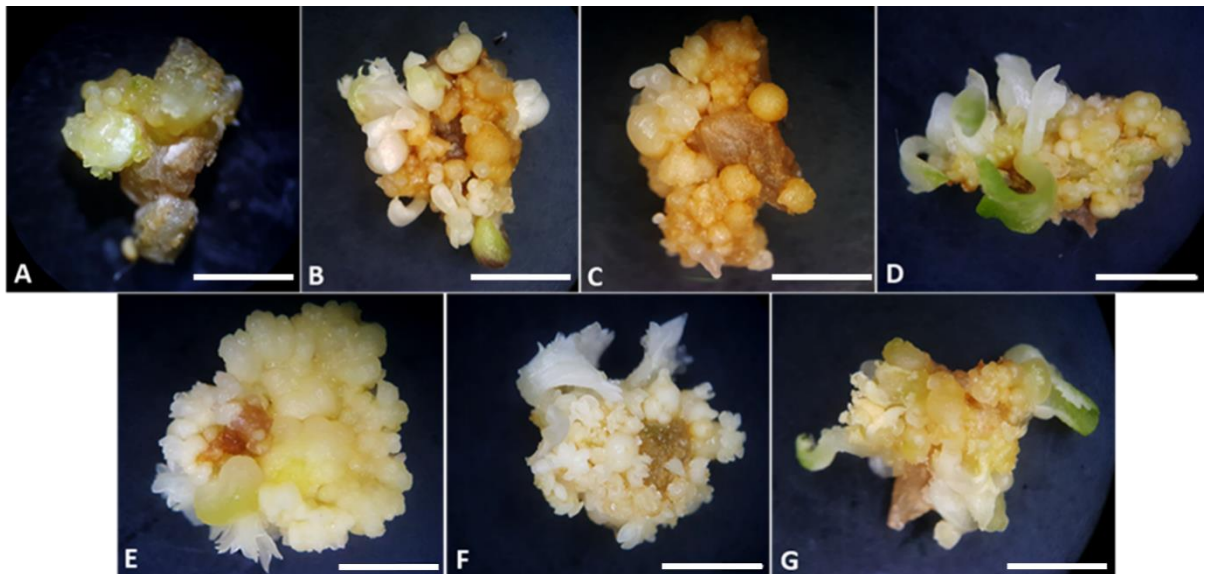
3.1.3. Ảnh hưởng kết hợp của 2,4-D và TDZ lên sự phát sinh SSE từ mẫu phôi hình cầu của sâm Ngọc Linh

Loại mẫu cấy phát sinh phôi hiệu quả nhất được khảo sát là mẫu phôi hình cầu trong môi trường có bổ sung 0,3 mg/L TDZ. Nhằm nâng cao hiệu quả phát sinh phôi, mẫu phôi cầu được tiếp tục khảo sát sự phát sinh phôi dưới ảnh hưởng 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 hiệu quả hơn so với sử dụng riêng lẻ. Số lượng phôi cảm ứng cao nhất (73,33 phôi/mẫu) trên môi trường bổ sung 0,7 mg/L 2,4-D và 0,1 mg/L TDZ (Bảng 3.3, Hình 3.12) cao hơn so với bổ sung riêng lẻ 0,3 mg/L TDZ (68,33 phôi/mẫu). Trọng lượng tươi cụm phôi cũng đạt cao nhất ở nồng độ 0,7 mg/L 2,4-D kết hợp 0,1 mg/L TDZ (2,73 g) (Bảng 3.3). Thêm vào đó, sự phát triển bình thường của phôi thứ cấp phát sinh từ nguồn phôi hình cầu cũng được ghi nhận trên môi trường kết hợp TDZ và 2,4-D (Hình 3.12).

Bảng 3.3. Ảnh hưởng kết hợp của 2,4-D và TDZ lên sự phát sinh phôi thứ cấp 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 SE (%)	Số phôi trung bình (phôi/mẫu)	Trọng lượng tươi cụm phôi (g)	Mô tả
0,0	0,0	3,33 ^b	39,67 ^b	4,67 ^e	0,32 ^e	
0,0	0,3	100,00 ^a	100,00 ^a	67,00 ^c	2,35 ^c	Hình thành nhiều dạng
0,2	0,3	100,00 ^a	100,00 ^a	51,33 ^d	2,05 ^d	phôi bao gồm
0,5	0,3	100,00 ^a	100,00 ^a	55,67 ^d	2,62 ^{bc}	phôi hình cầu, hình tim,
0,7	0,3	100,00 ^a	100,00 ^a	69,00 ^{ab}	2,57 ^{bc}	phôi có lá mầm; phôi có
0,7	0,1	100,00 ^a	100,00 ^a	73,33 ^a	2,73 ^a	màu trắng
0,7	0,5	100,00 ^a	100,00 ^a	69,33 ^{ab}	2,62 ^{bc}	sáng và màu
0,7	0,7	100,00 ^a	100,00 ^a	59,67 ^{cd}	2,65 ^b	xanh

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



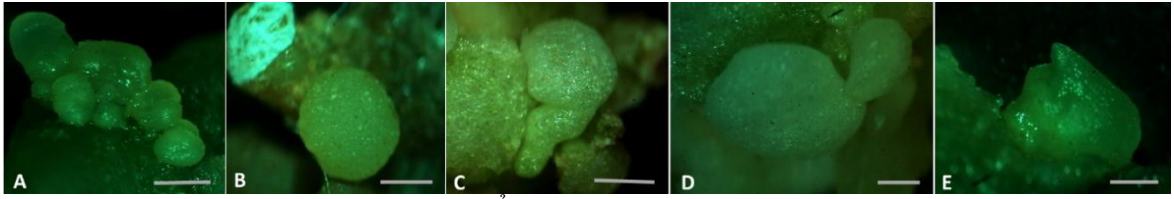
Hình 3.12. Ảnh hưởng kết hợp của 2,4-D và TDZ lên sự phát sinh SSE từ phôi hình cầu của sâm Ngọc Linh (thước 1 cm). **A:** ĐC. **B - D:** môi trường bổ sung 0,2; 0,5 và 0,7 mg/L 2,4-D kết hợp với 0,3 mg/L TDZ. **E - G:** môi trường bổ sung 0,1; 0,5 và 0,7 mg/L TDZ kết hợp với 0,7 mg/L 2,4-D, tương ứng.

Sự phát sinh phôi có thể được cảm ứng từ nhiều nguồn vật liệu khác nhau. Phôi soma thứ cấp được hình thành trực tiếp hoặc/và gián tiếp trên lá mầm, trụ hạ diệp (hypocotyl), trụ thượng diệp (epicotyl) hoặc đầu rễ của phôi soma sơ cấp. Các hệ thống tái sinh thực vật hiệu quả thông qua phôi soma thứ cấp đã được ghi nhận ở một số loài thực vật, ví dụ như ở *Cyclamen persicum*, *Hepatica nobilis*, *Pseudotsuga menziesii*, *Akebia trifoliata* và *Olea Europea* [42]. Trong nghiên cứu này phôi có thể được cảm ứng từ các dạng phôi như: phôi hình cầu, phôi hình tim và phôi có lá mầm. Sự phát sinh phôi từ nguồn vật liệu ban đầu là phôi đây là con đường hình thành phôi thứ cấp. Hơn nữa, phát sinh phôi thứ cấp mang lại nhiều ưu điểm hơn so với quá trình phát sinh phôi sơ cấp, đặc biệt là hệ số nhân và mức độ đồng đều của phôi cao. Nuôi cấy phôi thứ cấp đã được mô tả ở ít nhất 80 loài thực vật hạt trần và hạt kín bằng cách sử dụng các PGRs và các loại carbohydrate khác nhau [39]. Gần đây, sự hình thành phôi thứ cấp đã được ghi nhận ở một số cây trồng như Cẩm chướng [40], Rosa lai “Samantha” [39] và *Panax Gingseng* [41] bằng cách sử dụng BA, 2,4-D và một số loại carbohydrate khác nhau. Với nghiên cứu này, sự hình thành phôi thứ cấp tương ứng với 3 dạng phôi hình cầu hình tim, phôi có lá mầm đều cao hơn so với các nguồn vật liệu còn lại (Bảng 3.2; Hình 3.8)

Ngoài ra, trong nghiên cứu này PGRs có vai trò quan trọng trong việc cảm ứng sự hình thành phôi thứ cấp, với việc sử dụng 2,4-D, TDZ riêng lẻ và phối hợp có vai trò cảm ứng sự hình thành phôi thứ cấp hiệu quả (Bảng 3.2; Hình 3.5; 3.6; 3.7; 3.8). Bởi vì, PGRs vật đóng vai trò như là những dấu hiệu trung gian để dẫn đến sự tái lập lại chương trình biểu hiện gen. Kết quả là một loạt những biến đổi trong tế bào như: sinh tổng hợp RNA và DNA, pH nội bào thay đổi, gia tăng sự hấp thu oxy, tăng hoạt tính của enzyme đặc biệt là kinase, nhân di chuyển đến gần vách tế bào, bộ xương tế bào thay đổi [44] từ đó dẫn đến cảm ứng phát sinh phôi sinh dưỡng bao gồm sự kết thúc sự biểu hiện của những gen hiện hành và thay thế bằng chương trình biểu hiện của những gen sinh phôi từ tế bào sinh dưỡng để hình thành phôi mới và phát triển thành một cây hoàn chỉnh. Tuy nhiên, tùy vào loại và nồng độ PGRs mà hiệu quả cảm ứng sự hình thành phôi thứ cấp khác nhau, cụ thể trong nghiên cứu này sự hình thành phôi thứ cấp tốt nhất là môi trường bổ sung kết hợp 2,4-D và TDZ (Bảng 3.3; Hình 3.12).

Hơn nữa, bằng cách sử dụng tỷ lệ thích hợp của auxin, cytokinin riêng lẻ hay kết hợp trong môi trường nuôi cấy giúp cảm ứng quá trình phát sinh phôi soma. Ngoài ra, kiểu phát sinh hình thái trong nuôi cấy mô và tế bào thực vật, được xác định do sự cân bằng bởi auxin và cytokinin. Vì vậy, sự hình thành phôi soma của nhiều loài thực vật được cảm ứng trong môi trường có cả auxin và cytokinin [176], [177]. Sự hiện diện đồng thời của 2,4-D với các PGRs khác trong phát sinh phôi đã được báo cáo ở nhiều loài cây thân gỗ [178-180]. Trong nghiên cứu này, môi trường có sự hiện diện đồng thời của 2,4-D và TDZ cho sự phát sinh phôi tốt nhất đối với mẫu phôi hình cầu cây sâm Ngọc Linh. Kết quả của nghiên cứu này phù hợp với các nghiên cứu về sự phát sinh phôi *in vitro*. Hơn nữa, so với việc nhân giống từ các nguồn vật liệu khác mà cụ thể là nhân giống từ mô phân sinh thì tốc độ nhân giống từ phôi cao hơn khá nhiều. Ngoài ra, mô có nguồn gốc từ phôi cho khả năng phát sinh phôi cao, nhưng khả năng này giảm dần ở trụ lá mầm, cuống lá, lá và rễ [43].

Ngoài ra, trong nghiên cứu này, sự phát sinh phôi có thể diễn ra trực tiếp hoặc gián tiếp (Hình 3.10, 3.11). Phát sinh phôi trực tiếp (direct somatic embryogenesis): phôi sinh dưỡng được hình thành trực tiếp trên bề mặt của mẫu cây ban đầu không qua giai đoạn trung gian của mô sẹo [46]. Trong trường hợp này vẫn có sự hình thành của mô sẹo trên bề mặt của mẫu cây nhưng sự tăng sinh khối của mô sẹo không đáng kể và mô sẹo xuất hiện trước sự hình thành phôi. Hiện tượng này cũng được ghi nhận trong nghiên cứu này trên đối tượng Sâm Ngọc Linh (Hình 3.10). Bên cạnh đó, sự phát sinh phôi gián tiếp cũng đã được ghi nhận (Hình 3.11). Sự phát sinh phôi gián tiếp (indirect somatic embryogenesis): sự phát sinh phôi sinh dưỡng thực hiện gián tiếp thông qua mô sẹo và mô sẹo được cảm ứng hình thành phôi [45]. Sự phát sinh phôi soma gián tiếp thông qua quá trình nuôi cấy mô sẹo được nghiên cứu trên các loài ngũ cốc, các loài thuộc chi *Trifolium*, khoai mì thành công với môi trường bổ sung kết hợp cytokinin và auxin [176-181].



Hình 3.13. Sự hình thành, phát triển của SSE sâm Ngọc Linh. **A:** SSE hình thành trên bề mặt của phôi. **B:** sự trưởng thành của SSE. **C - E:** tương ứng hình cầu, hình tim và lá mầm (thước 1 mm).



Hình 3.14. Sự sinh trưởng và phát triển tiếp theo của SSE sâm Ngọc Linh sau 3 tuần (**A**), 8 tuần (**B**), 12 tuần (**C**) và 16 tuần (**D**) nuôi cấy (thước 0,5 cm).

Các phôi hình thành trên các môi trường bổ sung TDZ và 2,4-D khác nhau trải qua đầy đủ các giai đoạn phát triển của phôi (Hình 3.13). Các phôi được tiếp tục khảo sát sự sinh trưởng bằng cách nuôi cấy trên môi trường MS không bổ sung PGRs. Kết quả cho thấy, các phôi sinh trưởng phát triển tốt và tạo được cây con hoàn chỉnh (Hình 3.14).

Trong sinh phôi soma, tế bào đầu tiên (tế bào soma giữ vai trò hợp tử) phân chia không cân xứng, sau đó phôi qua các giai đoạn hình cầu, tim và cá đuôi ở cây hai lá mầm, tương tự sinh phôi hợp tử. Cây con từ phôi soma có đặc tính di truyền của tế bào soma cha mẹ [34].

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

3.2.1. Tác động của colchicine đến sự phát sinh phôi thứ cấp biến dị

Các phôi hình cầu sâm Ngọc Linh được xử lý với colchicine ở các nồng độ, thời gian khác nhau. Kết quả cho thấy, việc xử lý với colchicine ảnh hưởng đáng kể

đến số lượng mẫu sống sót, số phôi thứ cấp, số phôi thứ cấp biến dị, tỉ lệ phôi thứ cấp biến dị (Bảng 3.4).

Bảng 3.4. Ảnh hưởng của colchicine đến sự cảm ứng SSE biến dị sau 6 tuần nuôi cấy.

Nghiem thức	Colchicine (%)	Thời gian xử lý (giờ)	Tỉ lệ sống (%)	Tỉ lệ phôi biến dị (%)	Số SSE (Phôi/mẫu)	
					Bình thường	Biến dị
1	0,0	0	100,00 ^{a*}	0,00 ^j	27,22 ^a	0,00 ^j
2	0,1	24	92,56 ^{ab}	4,86 ^{ij}	23,89 ^b	1,33 ⁱ
3	0,2		89,00 ^{bcd}	11,16 ⁱ	21,22 ^{bc}	2,67 ^h
4	0,3		86,11 ^{cd}	12,50 ^{ghi}	21,00 ^{bc}	3,00 ^{fgh}
5	0,5		88,45 ^{bcd}	23,50 ^{cdef}	17,89 ^{cd}	2,87 ^h
6	0,7		82,11 ^{cde}	20,38 ^{efgh}	14,00 ^{efgh}	3,56 ^{cdef}
7	0,1	36	90,33 ^{bc}	11,31 ^{ghi}	12,22 ^{fgh}	1,56 ⁱ
8	0,2		83,44 ^{bcde}	17,21 ^{fgh}	13,11 ^{efgh}	2,67 ^h
9	0,3		80,11 ^{def}	20,23 ^{efgh}	12,34 ^{efgh}	3,11 ^{efgh}
10	0,5		75,22 ^{efg}	19,36 ^{efgh}	15,89 ^{defg}	3,78 ^{cde}
11	0,7		72,33 ^{fgh}	23,60 ^{cdef}	10,45 ^{ghi}	3,22 ^{efgh}
12	0,1	48	70,33 ^{ghi}	16,55 ^{fgh}	16,00 ^{def}	3,00 ^{fgh}
13	0,2		57,78 ^{jk}	29,52 ^{cde}	10,45 ^{ghi}	4,22 ^c
14	0,3		62,45 ^{ij}	21,65 ^{defg}	12,44 ^{efgh}	3,44 ^{defg}
15	0,5		52,00 ^{kl}	29,52 ^{cde}	13,56 ^{efgh}	5,44 ^{ab}
16	0,7		43,22 ^l	33,88 ^{bc}	8,11 ⁱ	5,11 ^{ab}
17	0,1	72	65,00 ^{hij}	18,93 ^{efgh}	16,89 ^{de}	3,89 ^{cd}
18	0,2		50,45 ^{kl}	21,99 ^{defg}	9,89 ^{hi}	2,78 ^{gh}
19	0,3		30,44 ^m	31,27 ^{bcd}	8,11 ⁱ	3,56 ^{cdef}
20	0,5		32,33 ^m	42,08 ^{ab}	7,44 ^{ij}	4,89 ^b
21	0,7		22,11 ⁿ	46,49 ^a	5,22 ^j	5,57 ^a

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

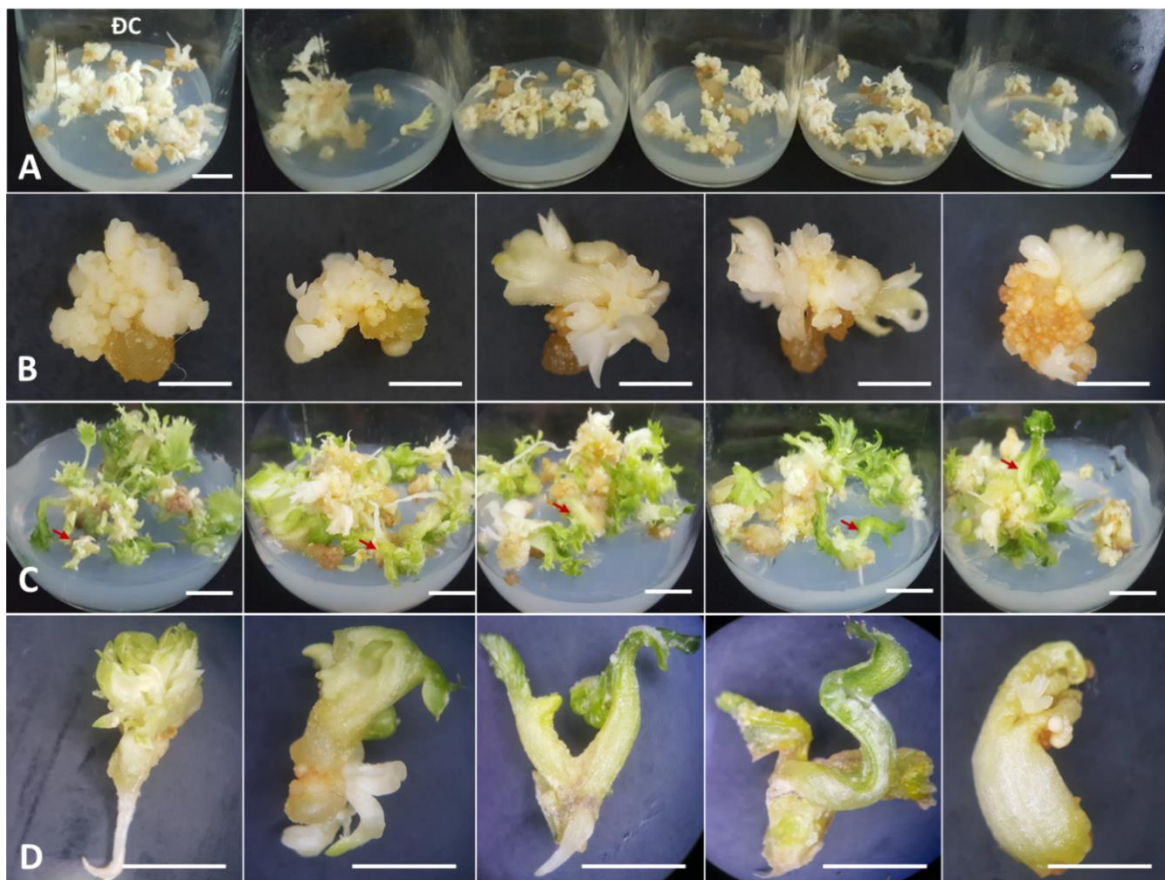
Tại mốc thời gian 24 giờ:

Xử lý với colchicine trong 24 giờ, kết quả cho thấy tỷ lệ sống của mẫu giảm khi tăng dần nồng độ từ 0,1% đến 0,7%, tỷ lệ sống của mẫu giảm từ 100% xuống còn 82,11%. Tương tự, khi tăng nồng độ colchicine dẫn đến số phôi thứ cấp giảm, tại

nồng độ colchicine 0,1% số phôi thứ cấp là 23,89 phôi/mẫu, khác biệt với ĐC và khuynh hướng giảm số phôi thứ cấp vẫn tiếp tục diễn ra khi tăng nồng độ colchicine và chỉ còn trung bình 14 phôi/mẫu tại colchicine 0,7% (Bảng 3.4, Hình 3.15A, B).

Ngược lại, khi xét đến vai trò của tác nhân đa bội cảm ứng hình thành phôi biến dị, kết quả nghiên cứu cho thấy xử lý với tác nhân đa bội nồng độ cao dẫn đến số phôi biến dị/mẫu tăng, tỷ lệ phôi biến dị cũng tăng tương ứng và cao nhất tại 0,7% colchicine với số phôi biến dị là 3,56 phôi/mẫu. Đồng thời, tỉ lệ hình thành phôi biến dị của mẫu cũng tăng từ 4,86% tại colchicine 0,1% lên 20,32% tại nồng độ colchicine 0,7% (Bảng 3.4, Hình 3.15A, B).

Các phôi biến dị (mũi tên màu đỏ, hình 3.15C) có hình thái đa dạng, phôi có sự thay đổi số lá mầm, có từ 1, 2, 3 lá mầm và hình thái các lá mầm khá đa dạng, hoặc phôi có cực rễ phình to hơn so với phôi bình thường, v.v. Các phôi biến dị này tương ứng với từng nồng độ colchicine được tách ra và khảo sát sự sinh trưởng ở các giai đoạn tiếp theo (Hình 3.15D).

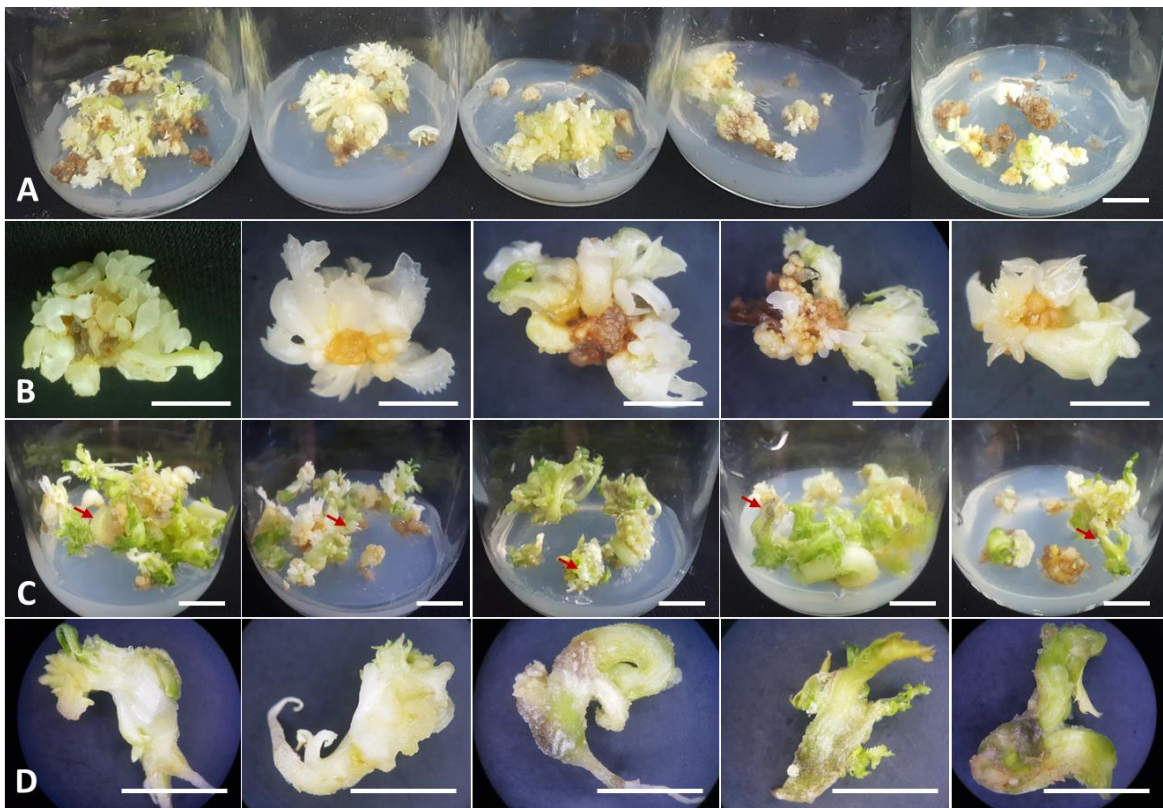


Hình 3.15. Sự phát sinh SSE biến dị từ phôi hình cầu của sâm Ngọc Linh dưới tác động của colchicine (0,1; 0,2; 0,3; 0,5; 0,7%) trong 24 giờ xử lý (tương ứng từ trái

sang phải). **A** và **B**: SSE hình thành sau 4 tuần nuôi cấy. **C** và **D**: SSE hình thành sau 8 tuần nuôi cấy (thước 1 cm). Các mũi tên chỉ vị trí của SSE biến dị.

Tại mốc thời gian 36 giờ:

Tiếp theo chúng tôi tăng thời gian xử lý mẫu với colchicine. Tại mốc thời gian 36 giờ, tỷ lệ sống của mẫu giảm khi tăng nồng độ xử lý, từ 90,33% tại colchicine 0,1% xuống 72,33% tại nồng độ colchicine 0,7% (Bảng 3.4). Tương tự, tỉ lệ hình thành phôi thứ cấp của mẫu cũng chịu ảnh hưởng đáng kể, số phôi thứ cấp giảm khi gia tăng nồng độ xử lý và giảm nhiều hơn so với các nghiệm thức xử lý colchicine trong 24 giờ. Số phôi thứ cấp trung bình thấp nhất là 10,45 phôi tại colchicine 0,7%, thấp hơn so với cùng nồng độ xử lý tại mốc thời gian 24 giờ. Ngược lại, số phôi thứ cấp có biểu hiện biến dị và tỉ lệ phôi biến dị tăng khi tăng nồng độ colchicine, cao nhất là 3,78 phôi biến dị tương ứng với tỷ lệ là 19,36 % tại nồng độ colchicine 0,5% (Bảng 3.4, Hình 3.16 A, B).

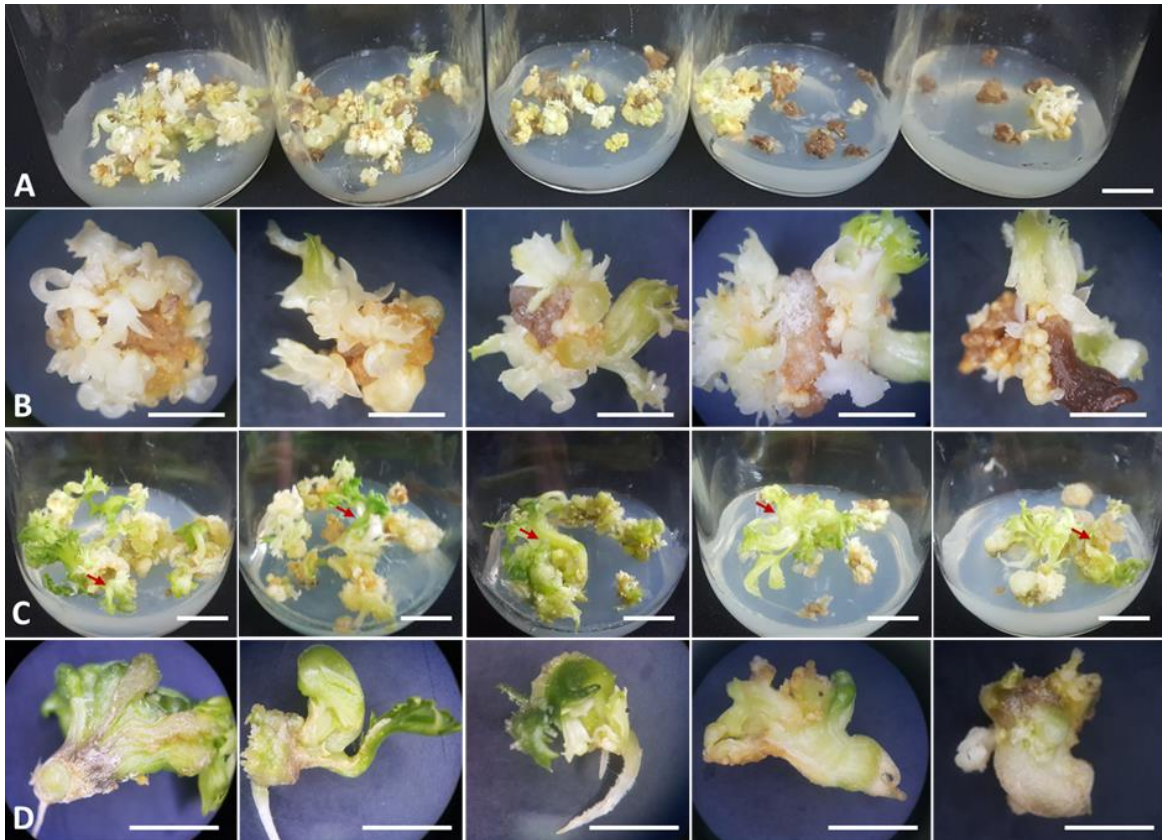


Hình 3.16. Sự phát sinh SSE biến dị từ phôi hình cầu của sâm Ngọc Linh dưới tác động của colchicine (0,1; 0,2; 0,3; 0,5; 0,7%) trong 36 giờ xử lý (*tương ứng từ trái sang phải*). **A** và **B**: SSE hình thành sau 4 tuần nuôi cấy. **C** và **D**: SSE hình thành sau 8 tuần nuôi cấy (thước 1cm). Các mũi tên chỉ vị trí của SSE biến dị.

Mặc dù số phôi biến dị không cao vượt trội so với nghiệm thức tốt nhất của ngưỡng xử lý 24 giờ nhưng xét về hình thái phôi biến dị khá đặc trưng. Các phôi biến dị có hình thái đa dạng và biểu hiện biến dị của phôi càng nhiều khi xử lý mẫu với nồng độ càng cao, số lá mầm của phôi biến dị có sự thay đổi, phôi đa số có 1 lá mầm và hình thái các lá mầm cũng có sự đa dạng, lá mầm dày và tạo thành phiến to. Ngoài ra, phôi có kích thước lớn và cực rễ phình to hơn so với phôi bình thường, các phôi biến dị này (mũi tên màu đỏ, hình 3.16C, D) tương ứng với từng nồng độ xử lý với colchicine được tách ra và khảo sát sinh trưởng ở các giai đoạn tiếp theo (Hình 3.15D).

Tại mốc thời gian 48 giờ:

Khi tăng thời gian xử lý từ 36 giờ lên 48 giờ tỉ lệ mẫu sống giảm khá đáng kể chỉ còn 43,22% tại colchicine 0,7% (Bảng 3.4, Hình 3.17A, B). Tương tự, số phôi/mẫu cũng chịu tác động của nồng độ và thời gian tiếp xúc của mẫu cây với colchicine, số phôi thứ cấp trung bình giảm so với các mốc thời gian xử lý với tác nhân đa bội ngắn hơn. Cụ thể, với nghiệm thức xử lý 0,1% colchicine tương ứng số phôi thứ cấp là 16,0 phôi/mẫu và số phôi thứ cấp thấp nhất khi xử lý với 0,7% colchicine số SSE chỉ 8,11 phôi/mẫu (Bảng 3.4, Hình 3.17A, B). Ngược lại, số phôi thứ cấp biến dị, tỉ lệ phôi biến dị của mẫu tăng khi tăng cả thời gian xử lý và nồng độ colchicine tăng. Tại mốc thời gian này, số phôi thứ cấp biến dị tăng khá cao và đạt cao nhất tại 0,5% colchicine (5,44 phôi/mẫu) tương ứng tỷ lệ là 29,52 % (Bảng 3.4, Hình 3.17B).



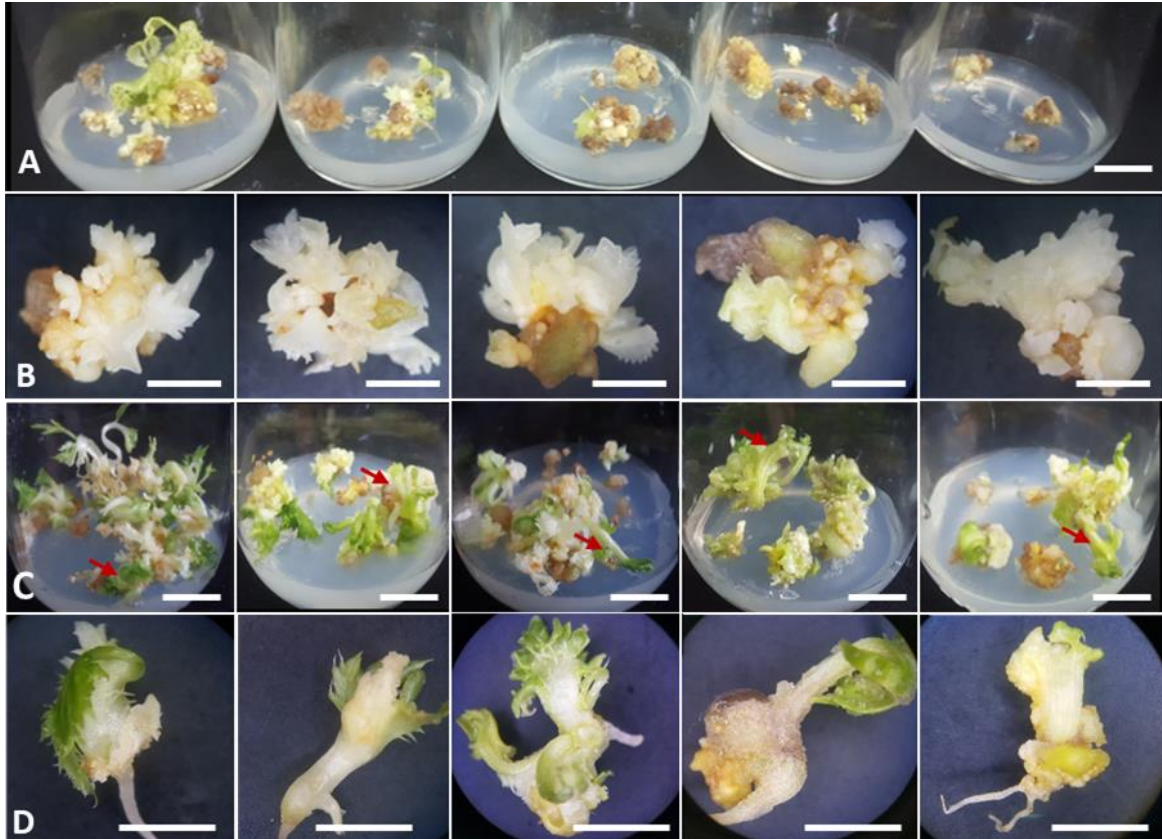
Hình 3.17. Sự phát sinh SSE biến dị từ phôi hình cầu của sâm Ngọc Linh dưới tác động của colchicine (0,1; 0,2; 0,3; 0,5; 0,7%) trong 48 giờ xử lý (*tương ứng từ trái sang phải*). **A và B:** SSE hình thành sau 4 tuần nuôi cấy. **C và D:** SSE hình thành sau 8 tuần nuôi cấy (thước 1 cm). Các mũi tên chỉ vị trí của SSE biến dị.

Các phôi biến dị có hình thái khá đa dạng (mũi tên màu đỏ, hình 3.17C, D), phôi có số lá mầm thay đổi, phôi xuất hiện dạng 1, 2, 3 lá mầm hoặc lá mầm chia thành rất nhiều thùy hoặc lá mầm không phân thùy, hình thái các lá mầm cũng có sự đa dạng, phôi có kích thước lớn, chắc, hoặc phôi có cực rễ phình to hơn so với bình thường, v.v. Các phôi biến dị này tương ứng với từng nồng độ xử lý với colchicine được tách ra và sự sinh trưởng được tiếp tục khảo sát ở các giai đoạn tiếp theo (Hình 3.17D).

Tại mốc thời gian 72 giờ:

Tại mốc thời gian 72 giờ, rõ ràng rằng thời gian xử lý của mẫu càng dài với colchicine, số lượng mẫu sống giảm và chỉ còn 22,11% tại nghiệm thức colchicine 0,7% (Bảng 3.4). Ở 4 ngưỡng thời gian và nồng độ xử lý với colchicine, nghiên cứu cho thấy, không những tỷ lệ sống mà sự hình thành phôi thứ cấp của mẫu giảm rất đáng kể. Tuy nhiên, số phôi biến dị và tỷ lệ phôi biến dị gia tăng rõ rệt. Tỷ lệ phôi

biến dị cao nhất 46,49% tại colchicine 0,7%, số phôi biến dị tương ứng cao nhất 5,56 phôi/mẫu (Bảng 3.4, Hình 3.18A, B).



Hình 3.18. Sự phát sinh SSE biến dị từ phôi hình cầu của sâm Ngọc Linh dưới tác động của 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**: SSE hình thành sau 4 tuần nuôi cấy. **C** và **D**: SSE hình thành sau 8 tuần nuôi cấy. Các mũi tên chỉ vị trí của SSE biến dị.

Các phôi biến dị có hình thái khá đặc trưng và biểu hiện biến dị của phôi càng nhiều khi mẫu được xử lý với tác nhân đa bội tăng cả thời gian tiếp xúc lẫn nồng độ colchicine. Phôi biến dị có số lá mầm nhiều hơn hoặc phôi có 1 lá mầm, hình thái cũng có sự đa dạng, các lá mầm bất thường, lá mầm dày không phân thùy hoặc tạo thành phiến to (Hình 3.18 D). Ngoài ra, phôi có kích thước to và có cực rễ phình to so với bình thường. Các phôi có biểu hiện biến dị (mũi tên màu đỏ, hình 3.18C, D) tương ứng với từng nồng độ xử lý với colchicine được tạo ra và khảo sát các giai đoạn tiếp theo của sự sinh trưởng của các phôi biến dị (Hình 3.19 D).



Hình 3.19. Một số dạng SSE biến dị của sâm Ngọc Linh phát sinh từ phôi đã qua xử lý colchicine sau 4 tuần nuôi cấy (thước 1 mm).

Tóm lại, xử lý mẫu với tác nhân đa bội colchicine, trong nghiên cứu này cho thấy phụ thuộc khá lớn vào thời gian và nồng độ, có ảnh hưởng đến tỉ lệ sống của mẫu cấy, số lượng phôi thứ cấp, số phôi thứ cấp biến dị. Xử lý colchicine để gây biến dị đa bội với nồng độ cao và thời gian tiếp xúc của mẫu càng lâu đã làm giảm đáng kể đến tỉ lệ sống, số lượng phôi thứ cấp của mẫu. Chẳng hạn, ở nồng độ 0,7% colchicine trong 72 giờ, số lượng phôi thứ cấp bình thường được hình thành đã giảm 5 lần so với nghiệm thức ĐC. Một xu hướng ngược lại đã được quan sát đối với số lượng phôi thứ cấp biến dị. Nồng độ 0,5 - 0,7% colchicine trong 48 giờ và 72 giờ cho số lượng phôi biến dị cao (4,89 - 5,56 phôi/mẫu), các phôi biến dị có nhiều dạng khác nhau được thu nhận và tiếp tục khảo sát sự sinh trưởng trong các thí nghiệm tiếp theo (Hình 3.19).

Sự đa bội hóa của thực vật thường xảy ra trong tự nhiên nhưng chậm tuy nhiên giúp đẩy nhanh sự tiến hóa và sự hình thành loài mới. Do vậy, quá trình này có thể được tạo ra trong khoảng thời gian ngắn hơn bằng cách sử dụng colchicine cản trở quá trình nguyên phân của tế bào và từ đó hình thành các thể đa bội [91]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi cũng đã sử dụng colchicine như là một tác nhân gây đa bội trên đối tượng sâm Ngọc Linh ở các mức nồng độ và thời gian xử lý khác nhau đã cho kết quả cảm ứng phôi thứ cấp có biểu hiện biến dị (Bảng 3.4, Hình 3.15; 3.16; 3.17; 3.18). Colchicine đã được biết đến là một chất kháng phân bào, ngăn chặn quá

trình trùng hợp (polymerization) vi ống, mà không ảnh hưởng đến quá trình khử trùng hợp, dẫn đến sự phân hủy vi ống [96]. Vì vậy khi sử dụng colchicine trong nghiên cứu này đã làm ảnh hưởng đến quá trình phân bào bình thường của chu trình tế bào từ đó hình thành nên các tế bào bất thường, làm cơ sở cho sự hình thành các thể phôi thứ cấp biến dị.

Hơn nữa, đa bội *in vitro* phụ thuộc nhiều vào nguồn vật liệu và sự sẵn có của các hệ thống tái sinh *in vitro*. Sự tái sinh thông qua hình thành phôi soma hoặc hình thành chồi rất được mong muốn đối với các phương pháp xử lý cảm ứng đa bội. Khả năng tái sinh toàn bộ cây từ một hoặc chỉ một vài tế bào có thể cải thiện sự phát triển của các cây đa bội đồng nhất và giảm thiểu khả năng xuất hiện các tế bào phân bào (cytochimeras). Các hệ thống tái sinh tạo cơ quan hoặc tạo phôi đã được sử dụng để nhân đôi nhiễm sắc thể cho một số loài [63]. Dựa trên cơ sở này, đối với đối tượng sâm Ngọc Linh trong nghiên cứu này chúng tôi sử dụng phôi hình cầu làm nguồn vật liệu để xử lý với tác nhân đa bội colchicine.

Tương tự, nghiên cứu gần đây của Linlan (2019) đã sử dụng hệ thống cảm ứng đa bội bằng phôi soma của *Lilium distichum* Nakai and *Lilium cernuum* Komar, nghiên cứu này, phôi soma được nuôi cấy trên MS bổ sung 0,41 $\mu\text{mol L}^{-1}$ picloram và 1,07 $\mu\text{mol L}^{-1}$ NAA [57]. Theo Touchell và cộng sự., 2020 các hệ thống phát sinh phôi soma và phát sinh cơ quan là các con đường tái sinh chính trong cảm ứng đa bội hóa *in vitro* [63]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng hệ thống tái sinh phôi thứ cấp sau khi phôi sơ cấp được cảm ứng với các tác nhân đa bội và có sự hình thành phôi thứ cấp có biểu hiện biến dị tại các nồng độ xử lý colchicine và mốc thời gian xử lý khác nhau (Bảng 3.4, Hình 3.15; 3.16; 3.17; 3.18). Hơn nữa, colchicine được biết đến là chất chống phân bào và có thể làm tăng các rối loạn sinh lý khi được sử dụng ở nồng độ cao để xử lý gây đột biến đa bội ở nhiều đối tượng thực vật [182]. Bởi vì, colchicine có ái lực liên kết tương đối thấp với các vi ống của thực vật, đòi hỏi nó phải được sử dụng ở nồng độ cao để duy trì hiệu quả.) [97]. Tuy nhiên, nồng độ colchicine cao kết hợp với thời gian xử lý dài cũng làm giảm đáng kể tỷ lệ sống của mẫu [68] [124], [183-185].

Demtsu (2013) đã sử dụng kỹ thuật đa bội bằng cách xử lý colchicine trên SE để sản xuất chuối 'Namwa' và nghiên cứu đã cho thấy, tỷ lệ chết của mẫu tăng lên khi nồng độ colchicine cao thời gian tiếp xúc với chất gây đa bội càng tăng [80]. Kết quả

tương tự cũng được quan sát khi nghiên cứu tạo cây tứ bội *Ligustrum sinense* Lour [186]. Trong nghiên cứu này, nồng độ cao và thời gian xử lý colchicine ảnh hưởng đáng kể đến tỷ lệ sống của phôi và đồng thời tạo ra các phôi thứ cấp có các đặc điểm kiểu hình khác với những phôi không được xử lý bằng colchicine.

Sự xuất hiện của các biến dị có lẽ dưới tác động của colchicine dẫn tới sự nhân lên của NST trong nhân tế bào nhưng không có sự phân chia nhân đã tạo ra các tế bào có đột biến đa bội. Theo Germana (2011) sự hình thành vách không hoàn chỉnh giữa nhân sinh dưỡng và nhân sinh sản của tiểu bào tử là nguồn gốc ban đầu để tạo cây đa bội. Trong nghiên cứu này chúng tôi ghi nhận rằng, tại các mốc thời gian xử lý và thay đổi nồng độ chất xử lý đa bội dẫn đến tạo các thể có đột biến đa bội là khác nhau. Có một mối tương quan ngược giữa nồng độ chất gây đột biến đa bội và thời gian xử lý. Điều này tương tự với *Populus hopeiensis*, yếu tố có ảnh hưởng đến kết quả đa bội chính là nồng độ và thời gian tiếp xúc với tác nhân gây đột biến để tạo các thể đột biến đa bội [63].

Ngoài ra, nồng độ colchicine và thời gian xử lý khác nhau ảnh hưởng đến đáng kể đến khả năng hình thành phôi thứ cấp có biểu hiện biến dị. Nghiên cứu của Xu et al. 2018 cho rằng có một tác động tương tác đáng kể giữa các loài thực vật (kiểu gen thực vật) và nồng độ chất kháng phân bào [187]. Chất chống phân bào là yếu tố quan trọng thứ hai (sau yếu tố kiểu gen thực vật) trong các thí nghiệm gây đột biến đa bội nhân tạo. Có một số thông số ảnh hưởng, bao gồm loại, nồng độ hiệu quả tối thiểu, thời gian tiếp xúc và phương pháp áp dụng cần được xem xét [64].

Do vậy, nồng độ và thời gian tiếp xúc với các hợp chất kháng phân bào là những yếu tố luôn được khảo sát. Trong khi mức độ tiếp xúc thấp không có hiệu quả và mức độ cao gây chết mẫu, sự tương tác giữa thời gian tiếp xúc của mẫu và nồng độ vẫn chưa được hiểu đầy đủ [63]. Trong nghiên cứu này, đối với các phương pháp xử lý đa bội, sự tương tác giữa nồng độ và thời gian xử lý vẫn chưa được làm sáng tỏ, với mức độ tiếp xúc thấp với tác nhân đa bội không cho hiệu quả và mức độ cao gây ra chết mẫu [68]. Vì vậy, việc tìm ra nồng độ hữu hiệu tối thiểu để gây đột biến đa bội là rất cần thiết. Hiệu quả gây đột biến cao có thể đạt được bằng cách sử dụng chất gây đột biến đa bội với nồng độ cao và mẫu được tiếp xúc trong thời dài [182]. Allum và cộng sự (2007) đề xuất rằng để đảm bảo sự nhân đôi NST, thời gian xử lý

phải đủ dài để tối đa hóa số lượng tế bào trong quá trình nguyên phân và xử lý với các hợp chất kháng phân bào [124]. Xu và cộng sự (2018) cho rằng có sự tương tác đáng kể giữa nồng độ chất kháng phân bào và kiểu gen thực vật [187]. Do đó, phản ứng khác nhau đối với nồng độ và thời gian của các đối tượng nghiên cứu với colchicine có thể bị ảnh hưởng bởi kiểu gen của từng loại cây. Ví dụ, tỷ lệ cảm ứng tứ bội ở *Trachyspermum ammi* L. tối ưu ở 0,05% colchicine trong 24 giờ [183]; tỷ lệ cây tứ bội ở *Gerbera jamesonii* tối ưu ở 0,2% colchicine trong 2 giờ [185]. Trong nghiên cứu của chúng tôi, nồng độ và thời gian xử lý colchicine khác nhau có ảnh hưởng đáng kể đến hiệu quả tạo ra các thể đa bội. Nồng độ colchicine cao và thời gian xử lý dài cho thấy tỷ lệ đa bội hóa cao (trên 30% tại 0,5% - 0,7% colchicine trong 48 - 72 giờ). Kết quả này tương tự đối với nhiều loài thực vật, trong đó kết quả đa bội chịu ảnh hưởng đáng kể bởi nồng độ cao và thời gian tiếp xúc dài với colchicine [63, 188].

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

Khi xử lý với tác nhân đa bội oryzalin, có khuynh hướng giảm dần của tỉ lệ sống của mẫu theo sự gia tăng của nồng độ và thời gian xử lý. Sau 4 tuần nuôi cấy, tỷ lệ sống của phôi sâm Ngọc linh có sự thay đổi đáng kể. Hơn nữa, nồng độ và thời gian cũng như sự tương tác giữa 2 nhân tố này ảnh hưởng đến tỷ lệ sống của phôi. Oryzalin là một chất gây đa bội nhưng ít độc đối với mô tế bào thực vật hơn colchicine, do đó với nồng độ thấp oryzalin hầu như không ảnh hưởng lên mẫu cấy. Tuy nhiên, trong thí nghiệm này oryzalin có ảnh hưởng đáng kể đến tỷ lệ sống của mẫu ngay cả ở nồng độ thấp và thời gian xử lý ngắn. Số mẫu 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).

Oryzalin có ảnh hưởng đến sự cảm ứng phôi thứ cấp biến dị. Khi tăng nồng độ oryzalin, số phôi thứ cấp có xu hướng giảm nhưng làm tăng số phôi thứ cấp biến dị và tỷ lệ phôi biến dị của mẫu (Bảng 3.5, Hình 3.20). Tại mốc thời gian 24 giờ, xử lý với nồng độ oryzalin thấp 0,01% số phôi thứ cấp tương đối cao (17,7 phôi/mẫu) nhưng cho tỷ lệ phôi thứ cấp biến dị thấp nhất (7,9%) và thấp hơn đáng kể ở nồng độ 0,07% (31,5%). Tại mốc 36 giờ, đối với nghiệm thức ĐC có số phôi thứ cấp cao nhất (24,0 phôi/mẫu) khác biệt khá đáng kể so với nghiệm thức bổ sung oryzalin làm giảm

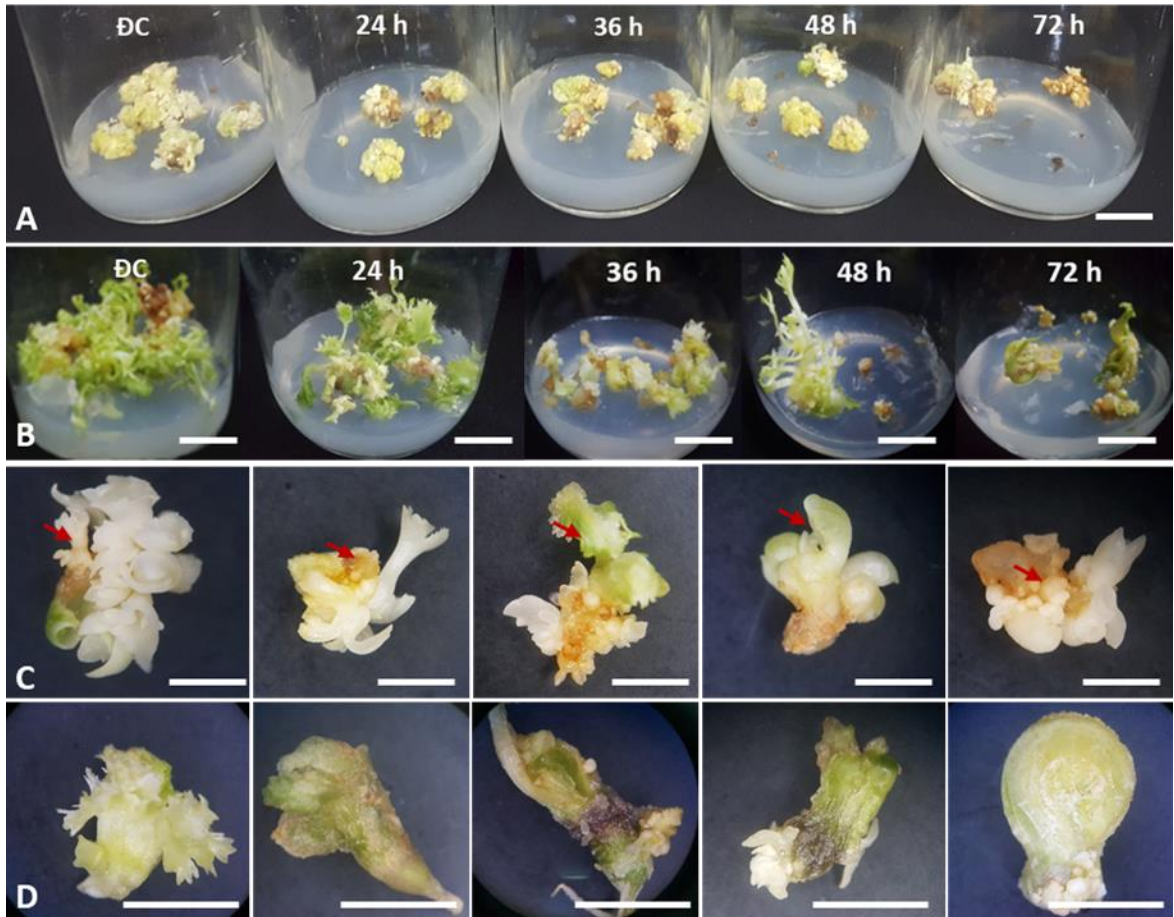
số phôi thứ cấp rất đáng kể chỉ khoảng (14,7 - 12,0 phôi/mẫu). Ngược lại, tỷ lệ phôi biến dị tăng khi tăng nồng độ oryzalin (15,7 - 31,6%).

Nghiệm thức với nồng độ 0,07% oryzalin trong 48 giờ có số phôi thứ cấp giảm chỉ 8,3 phôi/mẫu thấp hơn đáng kể so với ĐC (25,3 phôi/mẫu) nhưng cho tỷ lệ phôi biến dị cao (38,3%). Đối với mốc 72 giờ, nồng độ oryzalin có ảnh hưởng đến sự gia tăng số phôi biến dị trên kiểu hình. 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).

Bảng 3.5. Ảnh hưởng của oryzalin lên sự phát sinh phôi thứ cấp sau 6 tuần nuôi cấy.

Nghiệm thức	Oryzalin (%)	Thời gian xử lý (giờ)	Tỷ lệ sống của mẫu (%)	Số phôi thứ cấp (phôi/mẫu)	Số phôi thứ cấp biến dị (phôi/mẫu)	Tỷ lệ phôi thứ cấp biến dị (%)
1	0,00	0	100,00 ^a	24,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^h
2	0,01	24	80,00 ^b	17,67 ^b	1,33 ^b	7,96 ^{gh}
3	0,02		66,67 ^{bcd}	14,67 ^{bc}	2,33 ^{ab}	16,03 ^{fg}
4	0,03		46,67 ^{efg}	14,33 ^{bcd}	2,33 ^{ab}	16,74 ^{fg}
5	0,05		46,67 ^{efg}	13,00 ^{cde}	3,00 ^a	23,68 ^{def}
6	0,07		46,67 ^{efg}	11,00 ^{def}	3,33 ^a	31,48 ^{cde}
7	0,01		36	73,33 ^{bc}	14,67 ^{bc}	2,33 ^{ab}
8	0,02	53,33 ^{def}		14,00 ^{cde}	3,00 ^a	21,66 ^{efg}
9	0,03	46,67 ^{efg}		13,67 ^{cde}	3,67 ^a	28,79 ^{def}
10	0,05	46,67 ^{efg}		13,67 ^{cde}	3,33 ^a	25,10 ^{def}
11	0,07	40,00 ^{fgh}		12,00 ^{def}	3,67 ^a	31,59 ^{cde}
12	0,01	48		60,00 ^{cde}	17,67 ^b	3,00 ^a
13	0,02		53,33 ^{def}	15,00 ^{bc}	3,33 ^a	22,77 ^{def}
14	0,03		60,00 ^{cde}	10,00 ^{def}	3,00 ^a	31,30 ^{cde}
15	0,05		53,33 ^{def}	9,67 ^{ef}	3,33 ^a	35,95 ^{bcd}
16	0,07		33,33 ^{fghi}	8,33 ^f	3,00 ^a	38,26 ^{abc}
17	0,01		72	40,00 ^{fgh}	11,33 ^{def}	2,67 ^a
18	0,02	26,67 ^{ghi}		8,00 ^f	2,67 ^a	33,13 ^{bcd}
19	0,03	20,00 ^{hi}		7,67 ^f	3,33 ^a	42,59 ^{ab}
20	0,05	13,33 ⁱ		7,67 ^f	3,33 ^a	43,49 ^a
21	0,07	13,33 ⁱ		8,00 ^f	3,67 ^a	45,67 ^a

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



Hình 3.20. Ảnh hưởng của oryzalin lên sự phát sinh SSE biến dị từ phôi hình cầu của sâm Ngọc Linh tại các thời gian xử lý khác nhau (ĐC, 24 giờ, 36 giờ, 48 giờ, 72 giờ, tương ứng từ trái sang phải). **A** và **C**: SSE hình thành sau 4 tuần nuôi cấy. **B** và **D**: SSE hình thành sau 8 tuần nuôi cấy (thước 1 cm). Các mũi tên chỉ vị trí của phôi biến dị.

Sự phân bào bị tác động khi xử lý với oryzalin cũng tương tự như colchicine, tuy nhiên, cách thức tác động của hai chất này có khác nhau do hoạt động gắn kết của colchicine với vi ống (tubulin) yếu hơn so với oryzalin. Sử dụng oryzalin để gây đột biến đa bội trên nhiều đối tượng cây trồng được thực hiện với nồng độ micromol (μM) cho kết quả tương đương với những cây trồng được xử lý bằng colchicine ở nồng độ milimol (mM) [189]. Sử dụng oryzalin đã gây đột biến đa bội thành công để tạo ra các dòng đa bội của cây thân gỗ và bán thân gỗ bao gồm *Rosa* [135], *Rhododendron* [122], *Chaenomeles* [132], *Hypericum* [120] và *Acer platanoides* [118]. Hơn nữa, oryzalin đã được chứng minh là hiệu quả hơn colchicine trong việc nhân đôi NST *in vitro* đối với *Chaenomeles japonica* [132], *Rhododendron* [123], *Watsonia lepida* [136], và *Ranunculus asiaticus* [125].

Trong nghiên cứu của chúng tôi, phôi sâm Ngọc Linh được xử lý với tác nhân kháng phân bào là oryzalin ở các nồng độ khác nhau (0,01%, 0,02%, 0,03%, 0,05%, 0,07%) tại các mốc thời gian khác nhau (24 giờ, 36 giờ, 48 giờ, 72 giờ). Kết quả sau 4 tuần nuôi cấy cho thấy tỷ lệ sống của phôi sâm Ngọc Linh có sự thay đổi và có khuynh hướng giảm dần theo sự gia tăng của nồng độ xử lý oryzalin và giảm theo sự tăng thời gian xử lý với tác nhân kháng phân bào. Kết quả này tương tự với kết quả của các nghiên cứu trước đây trên *Hypericum sp.* [120], chuối *Musa acuminata* [190], *Rosa euphytica* [99], *Rosa rugosa* [124].

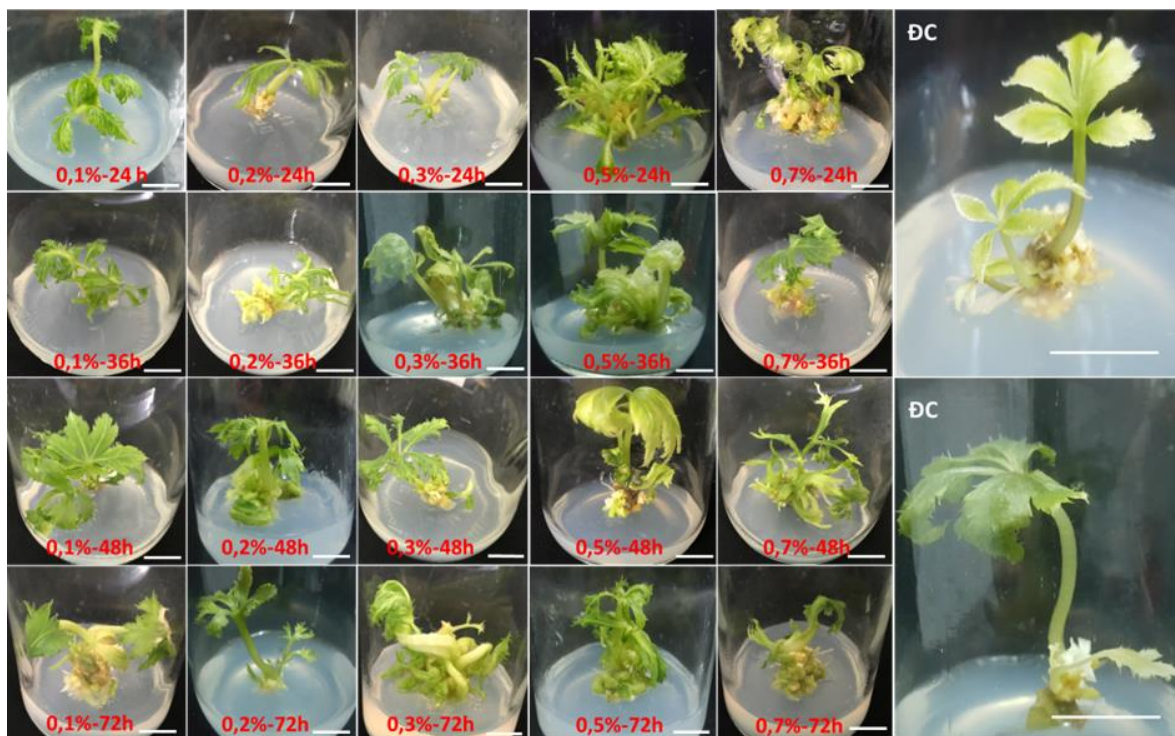
Oryzalin gây độc cho tế bào, làm giảm tỷ lệ sống của mẫu do có khả năng gắn kết chặt với vi ống (tubulin) tạo thành thể phức hợp oryzalin - vi ống (tubulin). Phức hợp oryzalin - vi ống đã làm thoi vô sắc ngừng hoạt động vì vậy ngăn cản sự phân chia của tế bào [98]. Ngoài ra, tỷ lệ sống của phôi soma sâm Ngọc Linh cũng có thể liên quan đến tác dụng gây độc của chất kháng phân bào thông qua ảnh hưởng của các chất này đến nội cân bằng auxin và cytokinin bên trong mẫu cấy [191], dẫn đến làm tăng sự nhạy cảm của tế bào thực vật với oryzalin. Bên cạnh đó, PGRs có trong môi trường nuôi cấy cũng có thể tương tác với các chất kháng phân bào. Lattier và cộng sự (2013) đã cho thấy rằng cytokinin có thể hoạt hóa tăng chu kỳ của tế bào, tạo ra các tế bào chuyển đổi nhanh hơn từ kỳ giữa (metaphase) sang kỳ sau (anaphase) của quá trình nguyên phân, trong giai đoạn này tế bào có thể nhạy cảm với oryzalin [118].

Trong các nghiên cứu đa bội, nồng độ và thời gian xử lý với các hợp chất kháng phân bào là những yếu tố luôn được khảo sát, trong khi xử lý với nồng độ thấp không có hiệu quả thì ở nồng độ cao sẽ gây chết mẫu [63]. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi ghi nhận rằng khi tăng nồng độ oryzalin, số phôi thứ cấp có xu hướng giảm nhưng làm tăng số phôi đột biến và tỷ lệ phôi thứ cấp đột biến xuất hiện của mẫu. Kết quả này cũng phù hợp với kết quả nghiên cứu của Allum và cộng sự (2007), cho rằng để đảm bảo NST nhân đôi, thời gian xử lý phải đủ lâu để tối đa hóa số lượng tế bào trong quá trình nguyên phân và xử lý với các hợp chất kháng phân bào. Mặc dù sự gia tăng nồng độ của chất kháng phân bào có thể làm tăng đáng kể tỷ lệ chết của mẫu cấy nhưng lại tăng khả năng nhân đôi hàm lượng DNA, dẫn đến tăng khả năng tạo thể đa bội [124].

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

Trong nghiên cứu này, bằng việc sử dụng tác nhân đa bội chung tôi đã thu nhận các phôi có biểu hiện biến dị về mặt hình thái. Tuy nhiên, sẽ có ý nghĩa hơn nếu các phôi này sinh trưởng tiếp theo để tạo thành cây hoàn chỉnh và từ các cây hoàn chỉnh này sẽ được sử dụng để xác định độ bội cho những thí nghiệm tiếp theo. Chính vì vậy, chúng tôi tiếp tục khảo sát sự sinh trưởng của các phôi biến dị với các chỉ tiêu theo dõi được trình bày trong bảng 3.6.

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, không bổ sung PGRs. Sự sinh trưởng, phát triển của cây được ghi nhận sau 12 tuần tháng và thể hiện trong bảng 3.6.



Hình 3.21. Sự sinh trưởng của phôi biến dị sau khi xử lý với colchicine sau 12 tuần nuôi cấy (thước 1 cm).

Từ số liệu bảng 3.6 cho thấy, các cây biến dị sau xử lý colchicine có sự sinh trưởng, phát triển tốt. Trong đó, quan sát kiểu hình của cây biến dị nhận thấy cây có sự sinh trưởng nhanh, được đánh giá dựa trên các chỉ tiêu về chiều cao, số lá và đường kính rễ. Sự xuất hiện các biến dị trên cây cả thân và lá khi xử lý colchicine nồng độ cao và thời gian xử lý dài (Hình 3.21). Trong các dạng cây biến dị, số lá, chiều cao

cây, trọng lượng tươi có sự khác biệt so với ĐC, hình thái lá to và dày hơn, lá có màu xanh đậm, đường kính thân và lá to hơn cây đối chứng. Đồng thời, sau 12 tuần nuôi cấy, cây biến dị có một số đặc điểm của lá cho thấy sự khác biệt rõ nhất được thể hiện ở sự tăng lên hoặc giảm số lượng phiến lá, độ dày tăng, bất thường về hình dạng và số răng cưa ở phiến lá; khác biệt ở độ sâu của thùy lá; hình dạng và kích thước cuống lá so với ĐC (Hình 3.21).

Bảng 3.6. Sự sinh trưởng của cây từ phôi thứ cấp phát sinh từ các phôi đã xử lý colchicine sau 12 tuần nuôi cấy.

Nghiệm thức	Colchicine (%)	Thời gian xử lý (giờ)	Chiều cao cây (cm)	Đường kính cuống lá (cm)	Chiều rộng lá (cm)	Chiều dài lá (cm)	Trọng lượng tươi (g)
1	0,0	0	2,10 ^k	0,43 ⁱ	1,11 ^{fg}	4,07 ^d	0,15 ^j
2	0,1		3,22 ^{ij}	0,52 ^{ghi}	1,3 ^{def}	4,07 ^d	0,31 ⁱ
3	0,2		2,80 ^{jk}	0,50 ^{hi}	1,16 ^{efg}	5,17 ^b	0,39 ^{hi}
4	0,3	24	3,15 ^{ij}	0,67 ^{efg}	1,32 ^{de}	3,38 ^e	0,45 ^{fgh}
5	0,5		3,77 ^{hi}	0,63 ^{fgh}	1,58 ^{bc}	4,25 ^{cd}	0,58 ^{de}
6	0,7		5,39 ^{def}	0,62 ^{fgh}	1,52 ^{bc} _d	3,57 ^e	0,82 ^{ab}
7	0,1		4,55 ^{gh}	0,58 ^{fgh}	1,68 ^b	3,30 ^e	0,45 ^{fgh}
8	0,2		5,18 ^{efg}	0,59 ^{fgh}	2,14 ^a	4,47 ^c	0,70 ^{bcd}
9	0,3	36	4,45 ^{gh}	0,68 ^{def}	1,56 ^{bc}	4,25 ^{cd}	0,54 ^{efg}
10	0,5		6,29 ^{bc}	0,70 ^{cde}	1,68 ^b	4,32 ^{cd}	0,60 ^{cde}
11	0,7		6,16 ^{bcd}	0,77 ^{bcd}	2,13 ^a	3,35 ^e	0,57 ^{def}
12	0,1		5,65 ^{cde}	0,62 ^{fgh}	1,48 ^{bc} _d	3,31 ^e	0,53 ^{efg}
13	0,2		5,65 ^{cde}	0,63 ^{fgh}	1,62 ^{bc}	3,41 ^e	0,56 ^{def}
14	0,3	48	7,29 ^a	0,68 ^{def}	1,43 ^{cd}	4,47 ^c	0,61 ^{cde}
15	0,5		6,61 ^{ab}	0,87 ^a	1,60 ^{bc}	4,62 ^c	0,74 ^{ab}
16	0,7		5,37 ^{def}	0,52 ^{ghi}	1,07 ^g	5,38 ^{ab}	0,44 ^{gh}

17	0,1		6,04 ^{bcd}	0,91 ^a	1,23 ^{efg}	2,62 ^f	0,61 ^{cde}
18	0,2		5,80 ^{bcde}	0,79 ^{ab}	1,45 ^{cd}	3,24 ^e	0,76 ^{ab}
19	0,3	72	5,60 ^{cde}	0,78 ^{abc}	1,59 ^{bc}	4,38 ^{cd}	0,67 ^{bcd}
20	0,5		4,58 ^{fg}	0,64 ^{fgh}	2,16 ^a	5,28 ^{ab}	0,56 ^{def}
21	0,7		5,18 ^{efg}	0,88 ^a	2,25 ^a	5,55 ^{ab}	0,40 ^{hi}

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

Tại mốc thời gian xử lý 24 giờ: Sự sinh trưởng của cây có sự khác biệt so với cây đối chứng. Tuy nhiên cây biến dị tại nồng độ xử lý colchicine 0,7%, chiều cao cây (5,39 cm) và trọng lượng tươi (0,82 g) có sự vượt trội so với các nghiệm thức còn lại và khác biệt so với đối chứng. Bên cạnh đó, đường kính cuống lá (0,62 cm), chiều rộng lá (1,52 cm) cũng tương đối cao so với các nghiệm thức còn lại (Bảng 3.6, Hình 3.21).

Tại các mốc thời gian xử lý 36 giờ, chiều cao cây, đường kính cuống có sự khác biệt đáng kể, được ghi nhận tại nồng độ colchicine từ 0,5% hoặc 0,7% (từ 5,39 cm đến 6,29 cm). Tuy nhiên, các chỉ chiều rộng lá (1,52 cm), chiều dài lá không có sự khác biệt lớn giữa các nghiệm thức ngoại trừ chỉ tiêu đường kính cuống lá (0,62 cm) (Bảng 3.6, Hình 3.21).

Tại ngưỡng xử lý 48 giờ, tương ứng với nồng độ 0,3% - 0,5% colchicine cho thấy chiều cao cây tốt nhất (7,29 cm và 6,61 cm) và cao hơn đáng kể so với ĐC (2,75 cm). Đường kính cuống lá đều có kích thước lớn hơn đáng kể so với ĐC (Bảng 3.6, Hình 3.21).

Kích thước cuống lá lớn nhất được ghi nhận tại nồng độ 0,1% colchicine trong 72 giờ (0,91 cm), đồng thời xử lý 0,5% colchicine trong 48 giờ và 0,7% colchicine trong 72 giờ cũng cho kích thước cuống lá lớn (0,87 cm và 0,88 cm). Bên cạnh đó, chiều rộng lá và chiều dài lá cao nhất cũng được ghi nhận tại nồng độ 0,7% colchicine trong 72 giờ (2,25 cm và 5,55 cm) (Bảng 3.6, Hình 3.21).

Sau khi xử lý colchicine, các cây bất thường có sự sinh trưởng tốt, cả chiều cao, số lá và trọng lượng tươi đều vượt trội so với đối chứng. Những dấu hiệu trên có thể là dấu hiệu của các thể đa bội. Nghiên cứu của Oates và cộng sự (2012) cho thấy các đặc điểm như kích thước và độ dày của lá, chiều dài lông và chiều cao cây đều bị ảnh hưởng bởi sự nhân đôi của nhiễm sắc thể [86].

Thật vậy, các nghiên cứu gần đây cũng cho rằng, tác động của sự nhân đôi toàn bộ bộ gen có thể gây ra những thay đổi di truyền đáng kể trong biểu hiện gen, chức năng gen và những ảnh hưởng đáng kể đối với sự phát triển, chọn giống cây trồng. Các tác động cụ thể của hiện tượng đa bội có thể rất khác nhau giữa các loài và các yếu tố ảnh hưởng đến cảm ứng đa bội [192]. Sự tăng trưởng vượt trội của thể đa bội có liên quan đến sự gia tăng kích thước và sinh khối. Các phôi sau đột biến đa bội có sự tăng trưởng vượt trội về các chỉ tiêu sinh trưởng có thể là do sự nhân lên

của bộ NST làm thay đổi hàng loạt các biểu hiện về sinh lý và sinh hóa dẫn đến những thay đổi về mặt biểu sinh và những thay đổi này là do sự thay đổi lớn trong biểu hiện gen. Thật vậy, những nghiên cứu gần đây đã dần làm sáng tỏ khía cạnh này cụ thể là vì đa bội có ảnh hưởng đáng kể đến sự biểu hiện gen (tăng, im lặng và điều hòa lên/xuống) của các gen được nhân đôi. Sự thay đổi sâu rộng trong bộ gen tạo ra nhiều kiểu biểu hiện mới, tương tác điều hòa, những thay đổi di truyền và biểu sinh là kết quả của việc hợp nhất và nhân đôi hai bộ gen [193].

Tương tự, khi xử lý ở các mốc thời gian càng tăng và nồng độ cochicine cao, chiều cao của cây giảm nhưng số lá, đường kính thân đều lớn hơn so với ĐC. Sự khác biệt về các chỉ tiêu sinh trưởng của cây đột biến so với ĐC có thể là do trên cây đột biến sau quá trình đột biến đa bội có sự gia tăng về kích thước của tế bào, dẫn đến sự gia tăng về kích thước của cơ quan. Hơn nữa, sự thay đổi sâu rộng trong bộ gen tạo ra nhiều kiểu biểu hiện mới, tương tác điều hòa, và những thay đổi di truyền và biểu sinh là kết quả của việc hợp nhất và nhân đôi hai bộ gen [70]. Do vậy, trong nghiên cứu này sự thay đổi trong các đặc điểm sinh trưởng có thể là do sự thay đổi về số lượng NST, từ đó dẫn đến thay đổi hàm lượng gen và kết quả là những thay đổi trong biểu hiện gen dẫn đến sự đa dạng trong kiểu hình. Thật vậy, ảnh hưởng phổ biến và được biết đến nhiều nhất của quá trình đa bội hóa ở thực vật là tăng kích thước tế bào [193]. Khối lượng tế bào tứ bội tăng gấp đôi so với tổ tiên lưỡng bội và tăng diện tích bề mặt tế bào lên khoảng 1,5 lần [194]. Do sự gia tăng kích thước tế bào, thể đa bội khác với thể lưỡng bội ban đầu về các đặc điểm hình thái và giải phẫu, ví dụ: tăng kích thước của các cơ quan và cấu trúc (lá, hoa và quả to ra) [193]. Sự khác biệt về kiểu hình có liên quan đến hai vấn đề vốn có của quá trình đa bội góp phần vào các tác động nhất quán nhất của “kiểu hình đa bội”, là: sự gia tăng hàm lượng DNA và sự gia tăng số lượng gen [193]. Các tế bào có nhiều NST hơn, do đó có nhiều DNA, sẽ tăng kích thước để duy trì mối quan hệ không đổi giữa thể tích tế bào và nhân. Từ đó, những gia tăng này có thể được quan sát ở kích thước của các cơ quan và thậm chí của toàn bộ cây [193].

Hơn nữa, thời gian và nồng độ chất xử lý khác nhau cũng cho thấy có sự xuất hiện các dạng biến dị khác nhau, theo Touchell và cộng sự (2020) cho rằng, các loài thực vật khác nhau có phản ứng khác nhau đối với nồng độ sử dụng của một loại chất kháng phân bào [63], cụ thể: Trong cảm ứng tạo đa bội *in vitro* của cây dược liệu

ajowan (*Trachyspermum ammi* L.), cảm ứng tứ bội hóa cao nhất bằng cách sử dụng 0,05% colchicine trong 24 giờ [183]; trong khi đó, tỷ lệ cây tứ bội *in vitro* nhân đôi nhiễm sắc thể *in vitro* cao nhất ở cúc châu Phi (*Gerbera jamesonii*), đạt được bằng cách sử dụng 0,2% colchicine trong 2 giờ [185]. Tương tự, với kết quả nghiên cứu này sự đa dạng kiểu hình của các cây biến dị cũng đã được ghi nhận và có sự khác nhau theo từng mốc thời gian và nồng độ xử lý (Bảng 3.6; Hình 3.21).

Sự khác biệt về các chỉ tiêu sinh trưởng của cây biến dị so với đối chứng có thể là do cây biến dị sau quá trình đột biến đa bội có sự gia tăng về kích thước của tế bào, dẫn đến sự gia tăng về kích thước của cơ quan cũng như toàn bộ cơ thể, thật vậy, ảnh hưởng phổ biến và được biết đến nhiều nhất của quá trình đa bội hóa ở thực vật là tăng kích thước tế bào [70]. Khối lượng tế bào tứ bội tăng gấp đôi so với tổ tiên lưỡng bội và tăng diện tích bề mặt tế bào lên khoảng 1,5 lần [193]. Do sự gia tăng kích thước tế bào, thể đa bội khác với thể lưỡng bội ban đầu về các đặc điểm hình thái và giải phẫu, ví dụ: tăng kích thước của các cơ quan và cấu trúc (lá, hoa và quả to ra). Sự khác biệt về kiểu hình có liên quan đến hai vấn đề vốn có của quá trình đa bội hóa góp phần vào các tác động nhất quán nhất của “kiểu hình đa bội”, là: sự gia tăng hàm lượng DNA và sự gia tăng số lượng gen. Các tế bào có nhiều nhiễm sắc thể hơn, và do đó có nhiều DNA, sẽ tăng kích thước để duy trì mối quan hệ không đổi giữa thể tích tế bào và nhân. Do đó, những gia tăng này có thể được quan sát ở kích thước của cơ quan/ các cơ quan và thậm chí của toàn bộ cây [70].

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

Các cây có nguồn gốc từ phôi thứ cấp sau khi xử lý đa bội có biểu hiện biến dị được ghi nhận các chỉ tiêu sinh trưởng, đánh giá sự thay đổi về hình thái, cấu trúc, đặc điểm khí khổng và đếm số lượng NST.



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



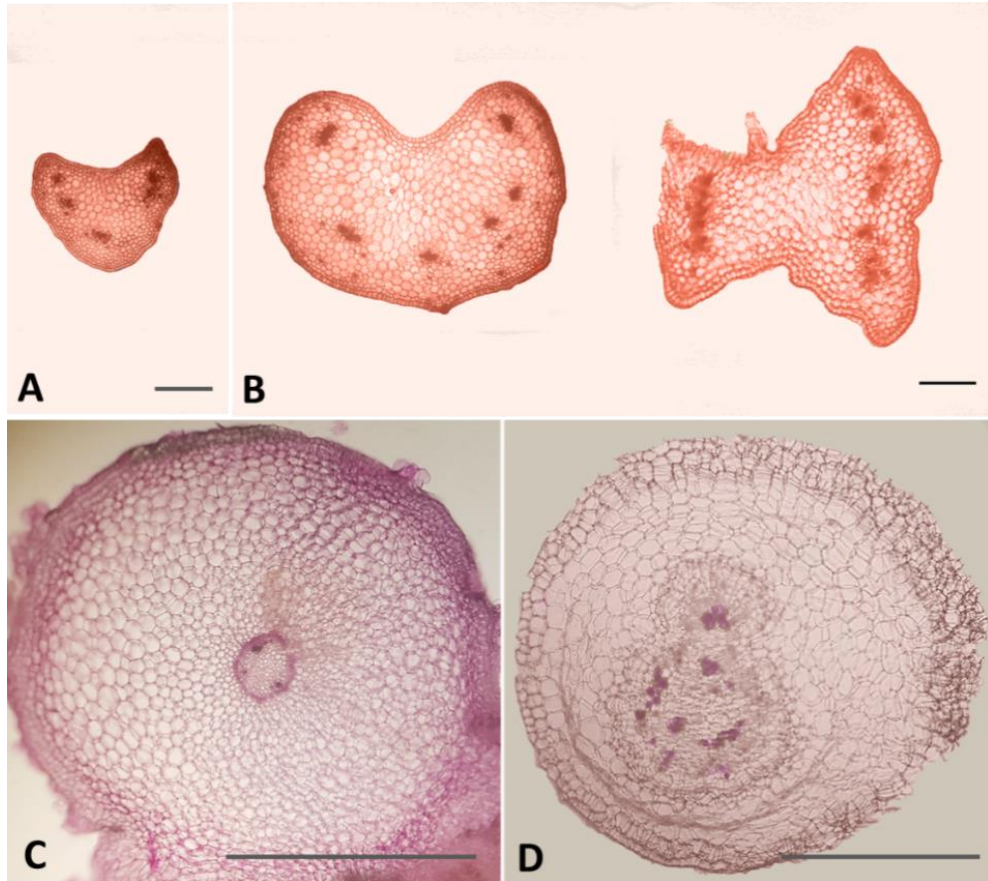
Hình 3.23. Một số dạng lá biến dị của cây con có nguồn gốc từ phôi biến dị được xử lý colchicine sau 12 tuần nuôi cây (thước 1 cm).

Đặc điểm dễ nhận biết khi quan sát cây biến dị do sự thay đổi hình thái lá (Hình 3.22, Hình 3.23). Sau 3 tháng nuôi cây, đặc điểm của lá có sự khác biệt rõ rệt so với ĐC. Sự khác biệt rõ nhất thể hiện ở sự tăng lên hoặc giảm số lượng phiến lá, độ dày phiến lá tăng, hình dạng lá bất thường cũng như số răng cưa ở phiến lá; khác biệt ở độ sâu của thùy lá; kích thước cuống lá tăng so với ĐC (Hình 3.22, Hình 3.23).

Cây có biểu hiện biến dị về mặt hình thái như cây có kích thước lớn vượt trội so với ĐC về chiều cao, chiều dài, chiều rộng cuống lá, ... như mô tả mô tả trong hình 3.22, hình 3.23. Chúng tôi tiến hành giải phẫu cuống lá, rễ của cây có biểu hiện biến dị hình thái (Hình 3.22), hình thái giải phẫu cho thấy có sự khác biệt rõ ràng về số bó mạch trong cấu trúc của cuống lá cây biến dị so với cuống lá cây ĐC (Hình 3.24). Cụ thể cuống lá cây biến dị có nhiều hơn 6 mạch dẫn nằm tách biệt và phân bố khá đồng đều trong khi cuống không xử lý có 5 mạch nằm gần nhau và phân bố không đều. Điều này cho thấy rõ ràng cây biến dị đa bội có sự khác biệt không chỉ về mặt hình thái mà còn về mặt cấu trúc so với cây không biến dị. Có lẽ, đột biến đa bội dẫn đến sự thay đổi kích thước của tế bào, do vậy dẫn đến thay đổi sự tổ chức của cấu trúc các cơ quan trong đó có sự thay đổi trong sắp xếp các hệ thống mạch dẫn cả về số lượng và vị trí các mạch dẫn. Điều này cho thấy cây biến dị đa bội có sự khác biệt không chỉ về mặt hình thái mà còn về mặt cấu trúc so với cây không biến dị.

Nghiên cứu gần đây của Corneillie và cộng sự (2019) trên *Arabidopsis thaliana*, cho thấy đa bội cũng làm thay đổi thành tế bào và thành phần đường trong tế bào. Những thay đổi này ảnh hưởng đến cấu trúc liên quan đến sản xuất/dự trữ tinh dầu, độc lập với kích thước của chúng [195].

Soltis và Burleigh (2009) xác định rằng những thay đổi bao gồm chức năng phụ, chức năng gen mới, thay đổi biểu sinh và thay đổi biểu hiện gen, bên cạnh tác động đến tỷ lệ trao đổi CO_2 , mức độ hormone, tỷ lệ quang hợp và cân bằng nước [57].



Hình 3.24. Hình thái giải phẫu của cuống lá và rễ cây sâm Ngọc Linh có biến dị kiểu hình. Mẫu cuống lá ở cây ĐC (A) và cây biến dị kiểu hình (B) (thước 1 mm).

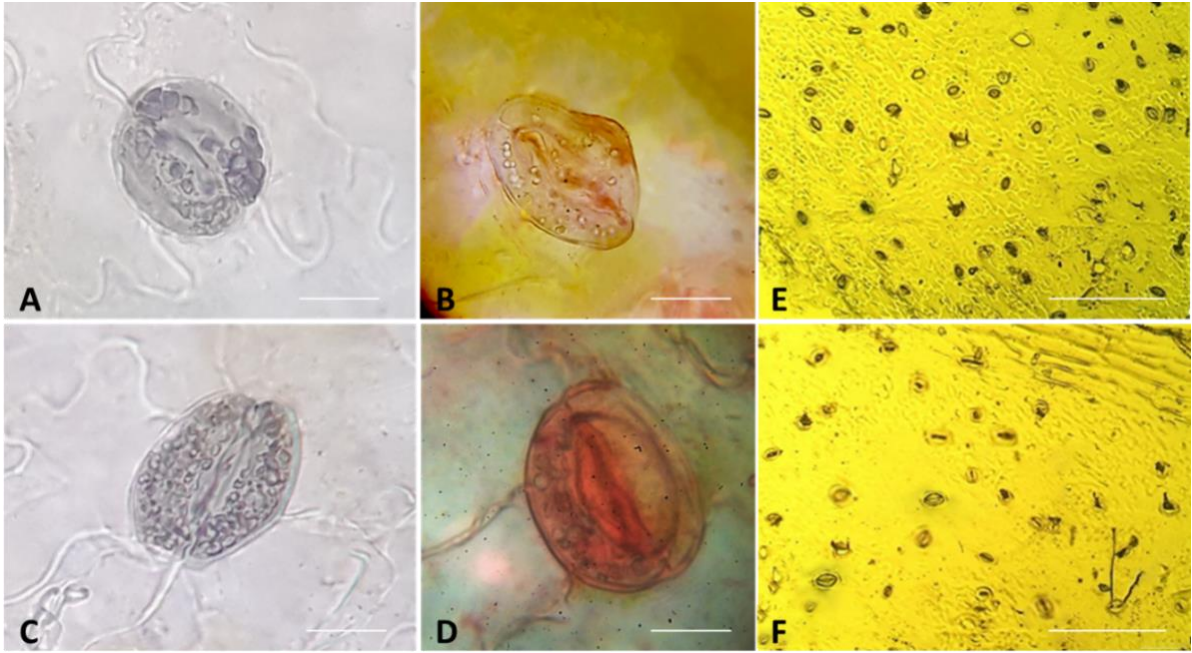
Mẫu rễ ở cây ĐC (C) và cây biến dị kiểu hình (D) (thước 0,2 mm).

Bảng 3.7. Khí khổng của lá biến dị sau xử lý colchicine sau 12 tuần sinh trưởng

Cây	Mật độ khí khổng (Số kk/mm^2)	Chiều dài khí khổng (μm)	Chiều rộng khí khổng (μm)
ĐC	125,7	57,33	42,33
Biến dị	119,7*	78,00*	55,33*

* Biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê thông qua *t-test*.

Chúng tôi tiến hành đánh giá cây biến dị đa bội thông qua các chỉ tiêu hình thái, kích thước khí khổng như: Mật độ khí khổng/ mm^2 , mật độ lục lạp trong tế bào bảo vệ khí khổng/ mm^2 , 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 cây từ SSE. Mật độ lục lạp trong tế bào bảo vệ khí khổng, hình dạng khí khổng cây ĐC (**A, B**) và cây biến dị kiểu hình (**C, D**) (thước 20 μm); Mật độ khí khổng cây ĐC (**E**) và cây biến dị kiểu hình (**F**) (thước 0,1 mm).

Kết quả quan sát cho thấy, cây biến dị có mật độ khí khổng thưa hơn ($119,7 \text{ kk/mm}^2$) so với ĐC ($125,7 \text{ kk/mm}^2$), kích thước khí khổng dài hơn ($70,8 \mu\text{m}$) so với ĐC ($57,33 \mu\text{m}$). Bên cạnh đó, mật độ lục lạp trong tế bào bảo vệ khí khổng dày đặc hơn so với cây ĐC (Bảng 3.7, Hình 3.25).

Theo tác giả Ahmadi và Ebrahimzadeh (2020), ngoài các phương pháp đếm NST thì các chỉ tiêu của khí khổng như: mật độ khí khổng, số lượng và kích thước của khí khổng, kích thước tế bào bảo vệ khí khổng, được sử dụng làm chỉ tiêu gián tiếp để xác định mức độ đa bội từ đó có thể phân biệt cây được cảm ứng đa bội với cây lưỡng bội [196].

Phương pháp dựa trên một số đặc điểm khí khổng có thể sử dụng để xác định thể đa bội [197 - 199]. Tăng kích thước khí khổng thường được sử dụng để xác định sự nhân đôi của NST [132], [85]. Khí khổng của các thể được cảm ứng đa bội cũng có kích thước lớn hơn và được sử dụng như một trong những đặc điểm chính biểu thị sự thay đổi mức độ đa bội ở các loài, vì việc xác định kích thước của chúng rất đơn giản và không cần thiết bị phức tạp [1].

Trong nghiên cứu này, thông qua quan sát hình thái cho thấy mật độ khí khổng của các dạng biến dị thấp hơn cây ĐC, kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của Sabzehzari và cộng sự (2019) khi mật độ thấp hơn và kích thước khí khổng lớn hơn là những đặc điểm chung của thể đa bội. Mật độ lục lạp, chất diệp lục của các tế bào bảo vệ cũng là chỉ số đa bội đơn giản được ứng dụng để xác định độ bội [182]. Tuy nhiên, các đặc điểm hình thái và giải phẫu có thể bị thay đổi dưới áp lực yếu tố môi trường; do đó, các quan sát có thể không chính xác và đáng tin cậy [132].

Ngoài ra, thông qua quan sát kết quả cho thấy có sự khác biệt khá rõ về mật độ lục lạp trong tế bào bảo vệ khí khổng của lá cây đột biến và lá cây ĐC. Số lượng lục lạp ở tế bào bảo vệ khí khổng lá cây đột biến cao hơn so với lá cây ĐC (Hình 3.25A, C). Theo Supena và cộng sự (2006) có sự tương quan thuận ở mức từ 80-100% giữa lượng lục lạp trong tế bào khí khổng và mức độ bội thể [200]. Trong đó, số lượng lục lạp trong tế bào khí khổng của cây tứ bội gần gấp đôi so với cây lưỡng bội. Do vậy, có nhiều khả năng một số trong các cây đột biến trong nghiên cứu này là cây tứ bội. Tuy nhiên, để có thể kết luận chính xác, cần có thêm các kết quả khảo sát về NST.

3.3. Nội dung 3: Xác định mức độ đa bội của cây con sâm Ngọc Linh sau khi xử lý đa bội

3.3.1. Xác định mức độ đa bội thông qua phương pháp đếm NST

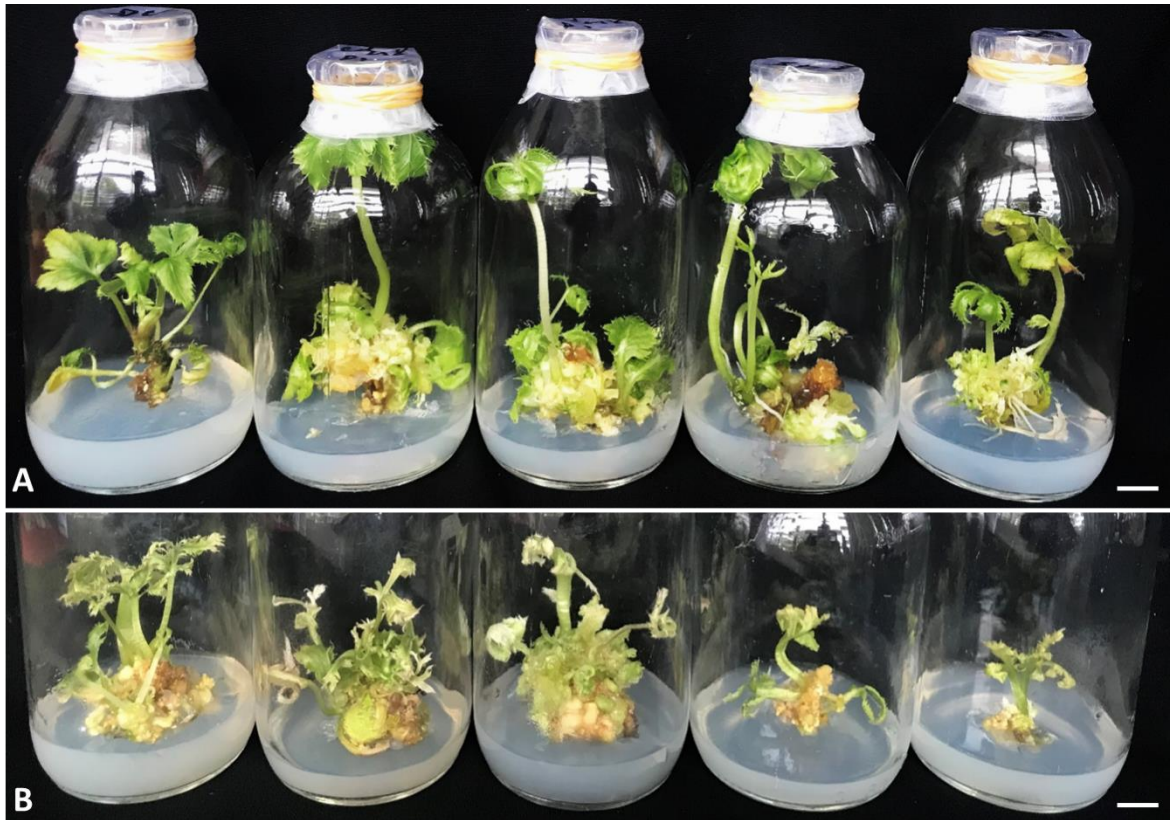
Đếm số lượng NST là phương pháp xác định mức độ đa bội đáng tin cậy và rõ ràng nhất. Với nghiên cứu này, số lượng NST trong các đầu rễ của cây con biến dị được đếm để xác định các đột biến đa bội. Kết quả ghi nhận cho thấy các thể tứ bội và thể tạp bội đã hình thành dưới tác động của colchicine; tuy 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 24 giờ, cây tứ bội bắt đầu được ghi nhận ở nồng độ 0,2% colchicine hoặc cao hơn. Đồng thời, đột biến tứ bội tăng dần khi tăng nồng độ xử lý. Ở nồng độ colchicine cao 0,5 - 0,7%, cây đột biến dạng tạp bội bắt đầu được ghi nhận với tỷ lệ thấp (dưới 10%). Ở 36 giờ, xử lý 0,1 - 0,7% colchicine đều cho tỷ lệ đột biến tứ bội lớn hơn 10%, tỉ lệ đột biến tứ bội cao nhất được ghi nhận tại 0,7% (22,22%) (Bảng 3.8; Hình 3.26).

Bảng 3.8. Ảnh hưởng của nồng độ colchicine đến tỉ lệ cảm ứng đa bội ở các thời gian xử lý khác nhau sau 12 tuần nuôi cấy.

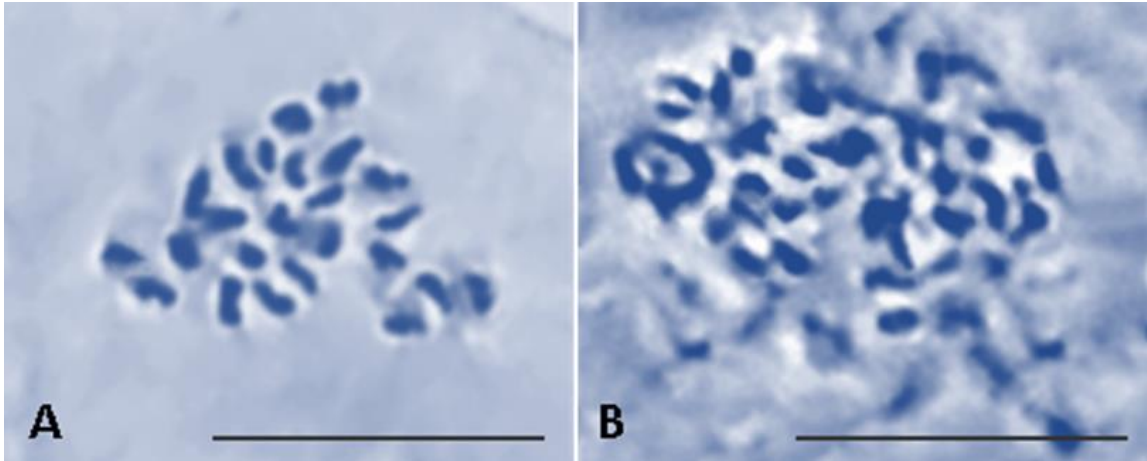
Nghiệm thức	Colchicine (%)	Thời gian xử lý (giờ)	Tỉ lệ cảm ứng đa bội (%)	
			Cây tứ bội	Cây tạp bội
1	0,0	0	0,00 ^{e*}	0,00 ^g
2	0,1		0,00 ^e	0,00 ^g
3	0,2		11,11 ^{bcd}	0,00 ^g
4	0,3	24	14,81 ^{abc}	0,00 ^g
5	0,5		18,52 ^{abc}	3,70 ^{fg}
6	0,7		18,52 ^{abc}	7,41 ^{ef}
7	0,1		14,81 ^{abc}	7,41 ^{ef}
8	0,2		18,52 ^{abc}	11,11 ^{efg}
9	0,3	36	18,52 ^{abc}	14,81 ^{def}
10	0,5		18,52 ^{abc}	22,22 ^{cde}
11	0,7		22,22 ^{ab}	25,92 ^{cd}
12	0,1		18,52 ^{abc}	11,11 ^{efg}
13	0,2		22,22 ^{ab}	14,81 ^{def}
14	0,3	48	22,22 ^{ab}	22,22 ^{cde}
15	0,5		25,92 ^a	25,92 ^{cd}
16	0,7		18,52 ^{abc}	29,63 ^c
17	0,1		11,11 ^{bcd}	22,22 ^{cde}
18	0,2		7,41 ^{cde}	25,92 ^{cd}
19	0,3	72	3,70 ^{de}	40,74 ^b
20	0,5		3,70 ^{de}	48,14 ^{ab}
21	0,7		3,70 ^{de}	55,55 ^a

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



Hình 3.26. Cây sâm Ngọc Linh *in vitro* tứ bội (A) và tạp bội (B) sau 12 tuần nuôi cây (thước 1cm).

Xử lý colchicine 0,2% - 0,5% trong 48 giờ cho hiệu quả cảm ứng cây tứ bội cao (22,22% - 25,93%), tuy nhiên khi tăng nồng độ lên 0,7%, tỷ lệ cây tứ bội giảm đáng kể (18,52%). Ở thời điểm 72 giờ, tỷ lệ cây tứ bội giảm mạnh khi nồng độ colchicine tăng từ 0,1% - 0,7% (từ 11,11% xuống 3,70%), ngược lại tỷ lệ cây tạp bội tăng mạnh, cao nhất từ 0,5% - 0,7% colchicine (48,15% và 55,56%). Nhìn chung, tỷ lệ cây tạp bội được hình thành có xu hướng tăng khi tăng thời gian xử lý và nồng độ colchicine, trong khi thể tứ bội bắt đầu giảm hoặc không tăng ở nồng độ 0,7% colchicine; trừ nghiệm thức 72 giờ tỷ lệ tứ bội thấp nhất và giảm dần khi tăng nồng độ colchicine từ 0,1% - 0,7% (Bảng 3.8).



Hình 3.27. Số lượng NST ở các đầu rễ thuộc cây lưỡng bội ($2n = 2x = 24$) (A) và cây tứ bội ($2n = 4x = 48$) (B) ở sâm Ngọc Linh sau 12 tuần nuôi cấy (Thước 5 μm).

Sự cảm ứng đa bội cũng phụ thuộc đáng kể vào loại mẫu cấy được sử dụng để cảm ứng đa bội [63]. Các mẫu cấy trong xử lý đa bội thường là hạt nảy mầm, ngọn rễ non, chồi bất định, đốt thân, phiến lá và các mô có khả năng phân chia tế bào mạnh [201], [68], [131]. Sự nhân đôi NST đã được ghi nhận ở nhiều loài thực vật thông qua phát sinh phôi và phát sinh cơ quan [69]; tuy nhiên, sự tái sinh thông qua hình thành SE trong quá trình cảm ứng đa bội được mong đợi để cải thiện sự phát triển đồng nhất của cây con [202]. Eeckhaut và cộng sự (2004) đã báo cáo sự cảm ứng của cây tứ bội *Spathiphyllum wallisii* thông qua sử dụng SSE hiệu quả hơn so với sử dụng phôi sơ cấp [203]. Tùy thuộc vào kiểu gen thực vật mà thời gian và nồng độ xử lý colchicine khác nhau [63]. Chẳng hạn, *Trachyspermum ammi* L. cảm ứng tứ bội hóa cao nhất tại 0,05% colchicine trong 24 giờ [183]; trong khi đó, tỷ lệ cây tứ bội *in vitro* ở *Gerbera jamesonii* đạt cao nhất tại 0,2% colchicine trong 2 giờ [185]. Các thể đa bội của *L. distichum* và *L. cernuum* được hình thành thành công từ SE và vảy tại các nồng độ colchicine (0,01%, 0,05% và 0,1%) khi mẫu được xử lý với thời gian (24, 48 và 72 giờ). Tỷ lệ cảm ứng đa bội đạt lần lượt là 57,14% và 46,15% khi xử lý 0,05% colchicine trên đối tượng *L. distichum* trong 48 giờ. Đối với *L. cernuum* tỷ lệ tứ bội tốt nhất của *Lilium distichum* và *Lilium cernuum* lần lượt là 28,57% và 23,08% trong 24 giờ xử lý [68]. Trong khi đối với cây cùng họ là *Lilium davidii* var. *unicolor*, cảm ứng tứ bội cao nhất tương ứng tỷ lệ (33,33%) là kết quả của việc xử lý 0,025% colchicine trong 24 giờ [81].

Trong nghiên cứu hiện tại, sâm Ngọc Linh tứ bội ($2n = 4x=48$) được tạo thành công từ SSE phát sinh từ phôi được xử lý bằng colchicine với tỉ lệ cảm ứng cao (25,92%). Thể tứ bội hình thành từ SE cũng được ghi nhận trên *Musa* sp. [80], *Elaeis quineensis* [204], *Lilium distichum* Nakai và *Lilium cernuum* Komar [68]. Đồng thời, các thể tạp bội thường xuất hiện trong quá trình đa bội [201], [205], [206] cũng được ghi nhận trong quá trình xử lý đa bội với mẫu phôi sâm Ngọc Linh với tỷ lệ cao (Bảng 3.8). Tuy nhiên, các thể tạp bội được xem là không ổn định do sự không đồng bộ trong chu kỳ tế bào giữa hai loại tế bào [111]. Vì vậy, các thể tạp bội ở sâm Ngọc Linh cần được tiếp tục nghiên cứu thêm để đánh giá mức độ ổn định (Hình 3.27B).

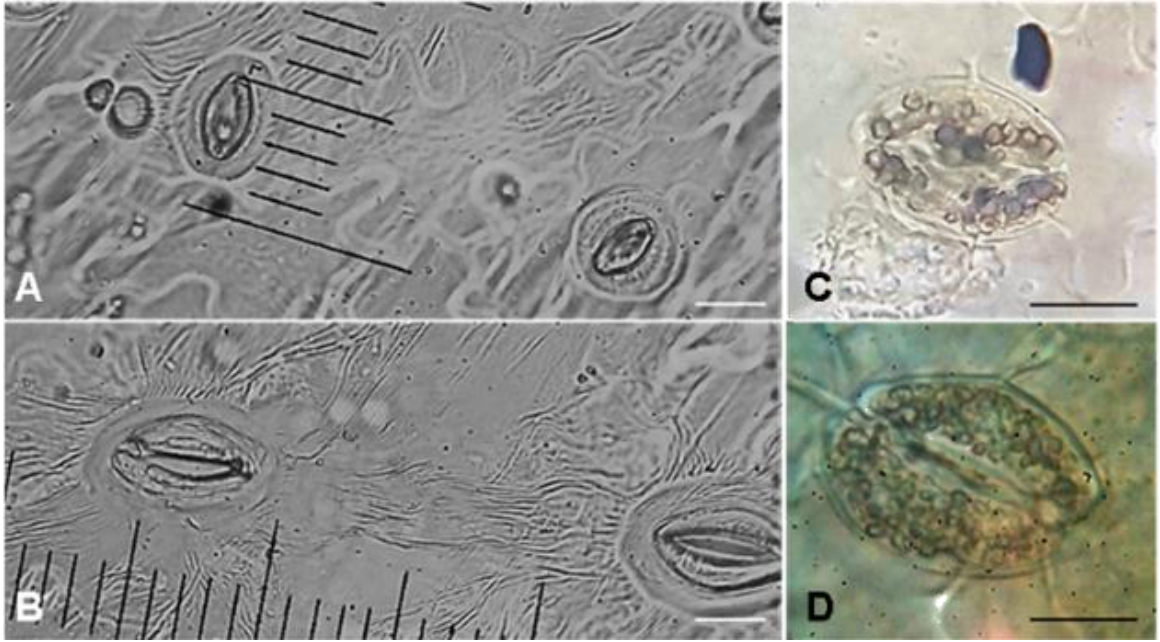
3.3.2. Xác định đặc điểm khí khổng của cây tứ bội

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, các lá của cây tứ bội và cây lưỡng bội được thu nhận và quan sát đặc điểm của khí khổng dưới kính hiển vi quang học. Kết quả quan sát cho thấy khí khổng của cây tứ bội có hình trứng, nằm rải rác và có kích thước lớn hơn ĐC. Chiều dài và chiều rộng của khí khổng ở lá tứ bội (75,46 μm và 52,63 μm) lớn hơn đáng kể so với ĐC (57,10 μm và 42,03 μm) (Bảng 3.9, Hình 3.28A, B). Tuy nhiên, mật độ khí khổng của cây tứ bội (110,20 khí khổng/ mm^2) thấp hơn ĐC (122,67 khí khổng/ mm^2) (Bảng 3.9). Ngoài ra, sự khác biệt đáng kể mật độ lục lạp trong tế bào bảo vệ khí khổng của cây tứ bội và lưỡng bội cũng được quan sát. Mật độ lục lạp trong tế bào bảo vệ khí khổng của lá tứ bội cao hơn ĐC (Hình 3.28C, D).

Bảng 3.9. Đặc điểm khí khổng trên biểu bì lá của cây tứ bội sau 12 tuần nuôi cấy

Cây	Mẫu độ khí khổng (mm^2)	Chiều dài khí khổng (μm)	Chiều rộng khí khổng (μm)	Tỉ lệ khí khổng	
				Chiều dài	Chiều rộng
Lưỡng bội	122,67	57,10	42,03	1	1
Tứ bội	110,20*	75,46*	52,63*	1,32	1,24

*Biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê thông qua t-test. Tỉ lệ giữa chiều dài (hoặc chiều rộng) khí khổng của cây tứ bội và cây lưỡng bội.

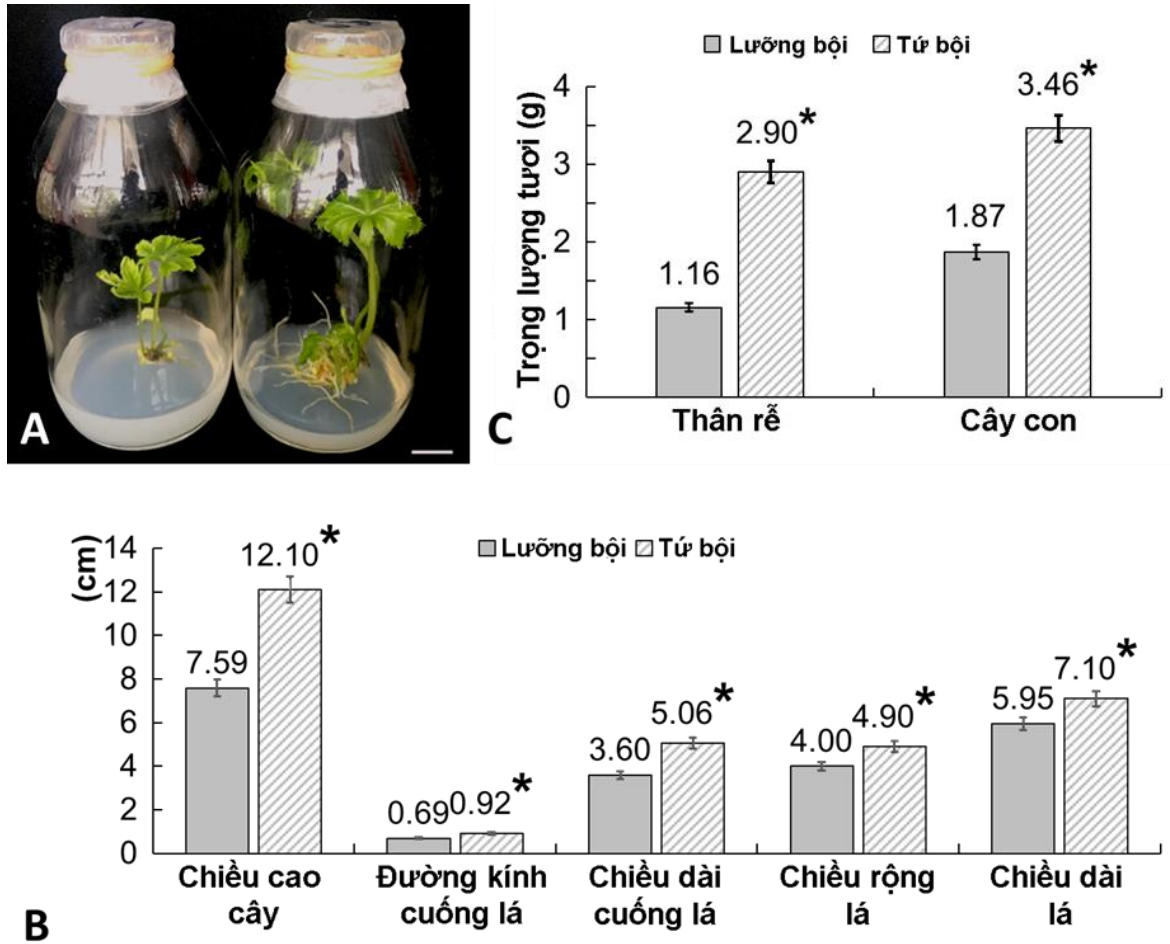


Hình 3.28. Đặc điểm khí khổng của các cây lưỡng bội và cây tứ bội ở sâm Ngọc Linh sau 12 tuần nuôi cấy. Hình dạng và kích thước của khí khổng ở cây lưỡng bội (A) và cây tứ bội (B). Mật độ lục lạp trên tế bào bảo vệ khí khổng của cây lưỡng bội (C) và cây tứ bội (D) (thước 20 μm).

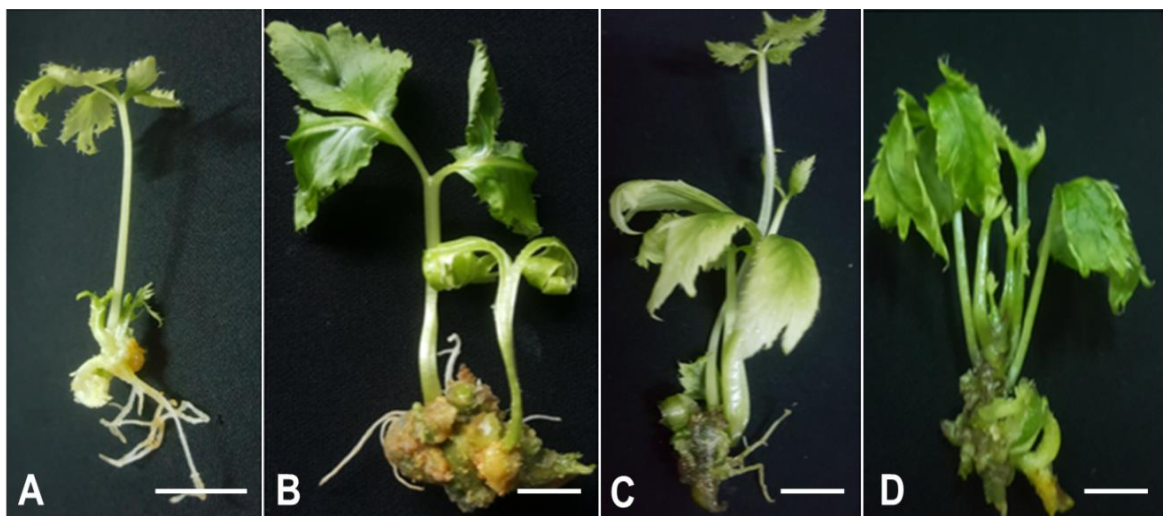
3.4. Nội dung 4: Khảo sát khả năng sinh trưởng, tái sinh và tính ổn định của cây sâm Ngọc Linh tứ bội

3.4.1. Sự sinh trưởng của cây sâm Ngọc Linh tứ bội

Các cây con tứ bội được tiếp tục khảo sát sự sinh trưởng và phát triển trong điều kiện *in vitro*. Kết quả cho thấy cây con tứ bội có những thay đổi đáng kể đặc điểm hình thái so với cây lưỡng bội sau 24 tuần tuổi. Các cây tứ bội có chiều cao vượt trội, cao nhất 12,10 cm và cao hơn đáng kể so với cây con lưỡng bội (7,59 cm) (Hình 3.29B). Lá cây tứ bội phát triển tốt, có sự gia tăng đường kính cuống lá, chiều dài cuống lá, chiều dài lá, chiều rộng lá so với lá cây lưỡng bội. Ngoài ra, cây tứ bội có khối lượng tươi thân rễ và cây con lớn hơn đáng kể (tương ứng là 40,00% và 54,01%) so với cây lưỡng bội (Hình 3.29 và 3.30).



Hình 3.29. Đặc điểm hình thái cây lưỡng bội và cây tứ bội của sâm Ngọc Linh sau 24 tuần nuôi cấy. **A:** cây con 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* cây lưỡng bội (**A**) và cây tứ bội (**B - D**) sau 24 tuần nuôi cấy (thước 1cm).

Thực vật sau khi được xử lý đa bội có sinh trưởng vượt trội, có thể do sự nhân lên của NST đã làm thay đổi hàng loạt các biểu hiện sinh hoá, sinh lý dẫn đến các biến đổi biểu sinh. Tế bào có nhiều NST hơn kéo theo sự tăng kích thước tế bào để duy trì mối quan hệ không đổi giữa thể tích và nhân tế bào [70]. Do đó, những thay đổi hình thái ở thực vật thường dễ được nhận biết sau khi gây đột biến đa bội. Hầu hết các thể đa bội (tự nhiên hoặc tổng hợp) biểu hiện kiểu hình khác với các thể lưỡng bội ban đầu. Chẳng hạn, hầu hết các thể tứ bội của cây *Spathiphyllum wallisii* có thể được phân biệt bằng mắt thường thông qua hình dạng và độ dày của lá [203]. Các đặc điểm như kích thước cơ quan lớn hơn (lá, hoa, v.v.), sinh khối cao hơn và các biến thể khác cho phép các thể đa bội tồn tại và phát triển [205], [83], [79], [188].

Trong nghiên cứu này, các cây tứ bội của sâm Ngọc Linh đều cho thấy các chỉ tiêu về chiều cao cây con, kích thước lá và khối lượng tươi của cây cao hơn đáng kể so với cây ĐC lưỡng bội sau 6 tháng nuôi cấy. Sự tăng kích thước cơ quan cũng đã được ghi nhận trên một số loài thực vật sau quá trình đa bội, chẳng hạn sự tăng kích thước lá ở cây tứ bội *Robinia pseudoacacia* L. [82] và *Populus hopeiensis* [131], sự tăng sinh khối ở cây tứ bội *Digitalis lanata* [207].

3.4.2. Khả năng tái sinh cây sâm Ngọc Linh tứ bội

Các mẫu cây khác nhau từ cây sâm Ngọc Linh tứ bội được tái sinh phôi trên môi trường thích hợp sau 6 tuần nuôi cấy, đối chứng là cây lưỡng bội. Đối với mẫu mảnh lá: MS bổ sung 0,5 mg/L NAA + 0,5 mg/L 2,4-D; mẫu cuống lá: MS bổ sung 0,5 mg/L NAA và 0,5 mg/L TDZ; mẫu rễ: MS bổ sung 0,5 mg/L NAA và 0,3 mg/L TDZ.

Kết quả nghiên cứu cho thấy các mẫu cây từ cây tứ bội đều có sự tái sinh cao với tỉ lệ là 100% (Bảng 3.10). Đối với mẫu mảnh lá, số phôi trung bình trung bình (42 phôi/mẫu) không khác biệt so với mảnh lá cây ĐC lưỡng bội (41,7 phôi/mẫu). Tương tự, với mẫu cây 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). Vậy các mẫu cây khác nhau của cây tứ bội có sự tái sinh phôi tốt trên môi trường tốt nhất tương ứng của từng loại mẫu cây

Bảng 3.10. Sự tái sinh phôi từ mảnh lá, cuống lá, rễ và sự hình thành phôi thứ cấp sau ba lần cấy chuyên phôi của cây sâm Ngọc Linh tứ bội sau 6 tuần nuôi cấy

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

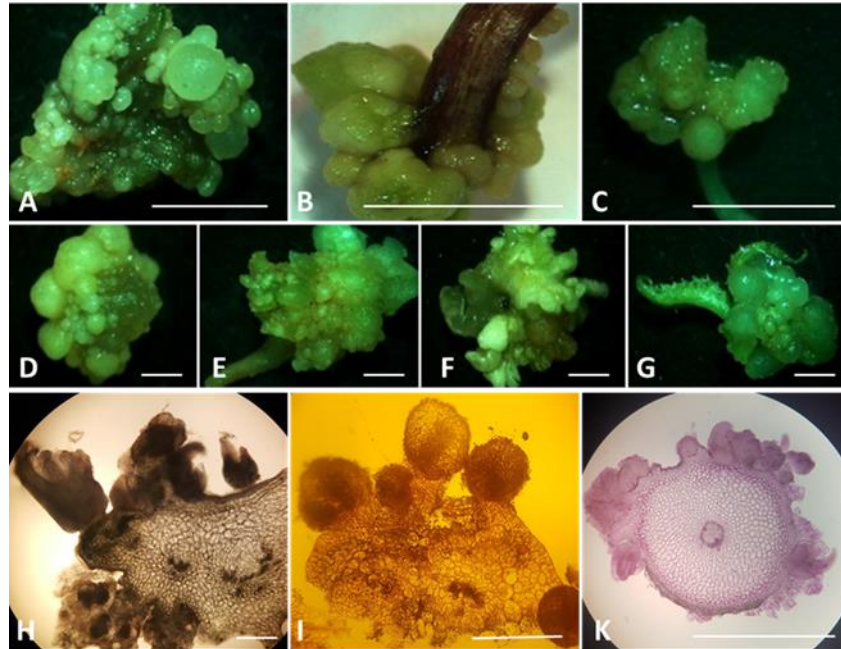
*Các ký tự (a, b, ...) khác nhau đặt cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở $p < 0,05$ (trong phép thử Duncan).

Phôi của cây tứ bội được nuôi cấy trên môi trường môi trường MS bổ sung 0,5 mg/L NAA + 0,7 mg/L 2,4-D + 0,1 mg/L TDZ là môi trường tốt nhất cho sự hình thành phôi thứ cấp (Hình 3.31). Sau 3 lần cấy chuyên chúng tôi ghi nhận trọng lượng tươi của phôi sau mỗi lần cấy chuyên, cụ thể như sau, lần cấy chuyên 1 trọng lượng tươi của phôi tương ứng như sau: của mảnh lá (2,99 g), cuống (2,04 g), rễ (1,25 g); cấy chuyên lần 2 trọng lượng tươi tương ứng: lá (2,82 g), cuống (2,21 g), rễ (1,25 g); cấy chuyên lần 3 trọng lượng tươi tương ứng: lá (2,72 g), cuống (2,14 g), rễ (1,37 g) (Bảng 3.10, Hình 3.31). Vậy, sau 3 lần cấy chuyên, phôi vẫn duy trì sự hình thành phôi thứ cấp tốt và chưa có biểu hiện giảm. Do đó, có thể thấy rằng sự hình thành phôi thứ cấp từ phôi cây tứ bội có sự sinh trưởng khá mạnh và ổn định nhất định.

Phôi soma thứ cấp có thể tăng trưởng và duy trì khả năng tạo phôi qua một số lần cấy chuyên nhất định để thu được số lượng phôi lớn [42]. Trong nghiên cứu này, thông qua con đường tạo phôi thứ cấp các phôi có nguồn gốc từ cây tứ bội có sự sinh trưởng tốt. Hơn nữa, con đường phát sinh phôi này là đặc trưng cho hệ số nhân giống cao, khả năng lặp lại, độc lập với nguồn mẫu ban đầu với mức độ đồng nhất cao [42].

Ngoài ra, ở nhiều loài, khả năng tạo phôi trong môi trường nuôi cấy *in vitro* suy giảm theo thời gian do quá trình lão hóa và cấy chuyên nhiều lần. Tạo phôi thứ cấp là cách để khôi phục tiềm năng phát sinh phôi của các đối tượng cây trồng tiềm năng và là phương pháp quan trọng để duy trì giống lâu dài [42]. Tương tự, với nghiên cứu này, việc cấy chuyên phôi 3 lần thông qua con đường tạo phôi thứ cấp, chúng tôi

cũng đã ghi nhận tiềm năng tạo phôi vẫn được duy trì, phôi có nguồn gốc từ mảnh lá, cuống lá và rễ của cây tứ bội đều có khả năng tạo phôi thứ cấp tốt và chưa có dấu hiệu sụt giảm đến lần cây chuyên thứ 3 (Bảng 3.10).



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 mảnh lá, cuống lá, rễ (Thước 1 cm). **D, E, F, G:** Sự tái sinh SSE từ các dạng phôi của cây tứ bội (Thước 1 mm). **H, I, K:** Hình thái giải phẫu sự phát sinh SE từ các mẫu cây cuống lá, mảnh lá và rễ của cây sâm Ngọc Linh tứ bội. (Thước 1 mm).

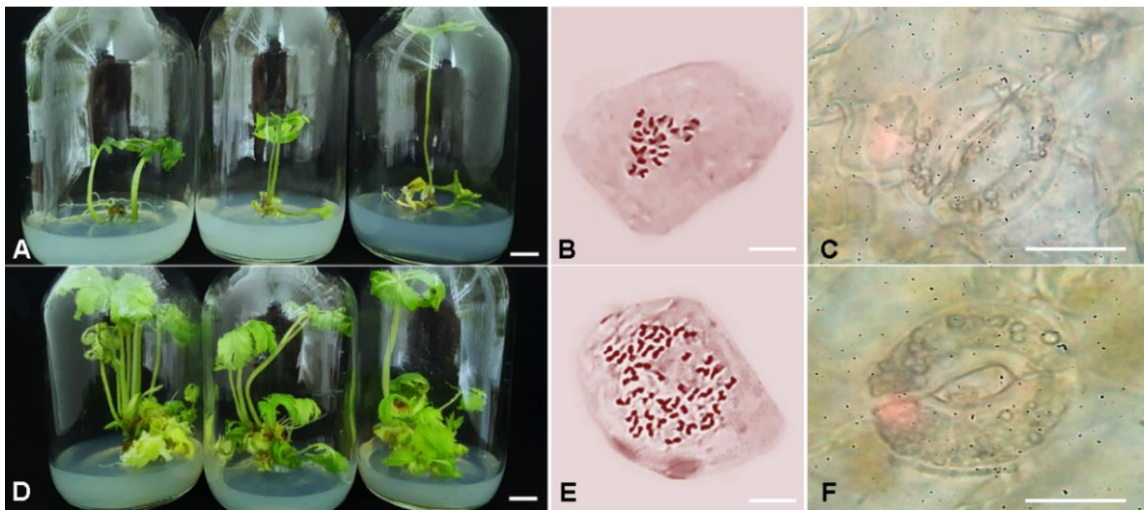
3.4.3. Tính ổn định của cây sâm Ngọc Linh tứ bội

Bảng 3.11. Sự sinh trưởng của phôi tứ bội sau lần cây chuyên thứ 3 sau 24 tuần nuôi cấy

Mẫu	Chiều cao cây (cm)	Đường kính cuống lá (cm)	Chiều dài cuống lá (cm)	Chiều rộng lá (cm)	Chiều dài lá (cm)	Đường kính thân rễ (cm)	Trọng lượng tươi (g)
ĐC	7,32 ^{b*}	0,63 ^b	3,15 ^b	3,10 ^b	5,80 ^b	0,46 ^b	1,21 ^b
Cây tứ bội	11,10 ^a	0,92 ^a	5,06 ^a	4,90 ^a	7,10 ^a	0,85 ^a	4,91 ^a

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

Kết quả cho thấy, các cây đa bội cho thấy có sự sinh trưởng tốt và khác biệt rõ rệt so với đối chứng sau 6 tháng nuôi cấy (Bảng 3.11, Hình 3.32). Cây tứ bội có chiều cao vượt trội (11,10 cm) so với đối chứng (7,32 cm). Bên cạnh đó, đường kính cuống lá (0,92 cm), chiều dài cuống lá (5,06 cm), chiều rộng lá (4,90 cm) cũng có kích thước lớn hơn so với cây đối chứng nhị bội tương ứng là đường kính cuống lá (0,63 cm), chiều dài cuống lá (3,15 cm), chiều rộng lá (3,10 cm). Khi xét đến sự tích lũy sinh khối cũng có sự khác biệt giữa cây tứ bội và cây đối chứng nhị bội cụ thể, đường kính rễ củ (0,85 cm), trọng lượng tươi (4,91g) của cây tứ bội cao hơn đáng kể so với cây đối chứng nhị bội tương ứng là đường kính rễ củ (0,46 cm), trọng lượng tươi (1,21g) (Bảng 3.11, Hình 3.32). Như vậy, từ kết quả này, chúng tôi nhận thấy rằng phôi tứ bội có nguồn gốc từ các cơ quan khác nhau của cây tứ bội trải qua 3 lần cấy chuyển để nhân sinh khối thông qua con đường hình thành phôi thứ cấp vẫn giữ được ngừng đặc tính về mặt hình thái của cây tứ bội biểu hiện qua các chỉ tiêu sinh trưởng vượt trội so với cây nhị bội.



Hình 3.32. Cây *in vitro*, số lượng NST và mật độ lục lạp trong tế bào bảo vệ khí khổng của của cây sâm Ngọc Linh thể lưỡng bội (A, B, C) và thể tứ bội (D, E, F) sau 24 tuần nuôi cấy. (A, D: thước 1 cm; B, E: thước 5 μ m; C, F: thước 20 μ m).

Việc phân biệt các cây tứ bội với cây lưỡng bội có thể được tiến hành trực tiếp và gián tiếp. Bên cạnh các chỉ số về hình thái, quan sát đặc điểm khí khổng, mật độ lục lạp trong tế bào bảo vệ khí khổng, đếm nhiễm sắc thể là phương pháp gián tiếp để xác định mức độ ổn định của cá thể đa bội. Do vậy, tiến hành quan sát đặc điểm khí khổng của cây tứ bội cho thấy, khí khổng ở cây tứ bội có kích thước lớn hơn cây

đối chứng nhị bội, ngoài ra mật độ lục lạp của tế bào bảo vệ khí khổng của cây tứ bội dày đặc hơn cây đối chứng (Hình 3.32C, F). Hơn nữa, trong thí nghiệm này, quan sát NST dưới kính hiển vi tế bào rễ của cây tứ bội sâm Ngọc Linh sau lần cấy chuyền thứ 3 cho thấy có cùng bộ NST so với cây tứ bội đã được xác định trước đó, bộ nhiễm sắc thể gấp đôi bộ lưỡng bội (Hình 3.32 B, E). Điều này minh chứng, cây tứ bội tái sinh từ các cơ quan khác nhau của cây tứ bội thu được sau lần cấy chuyền thứ 3 đã giữ được tính ổn định bộ NST của cây tứ bội ($2n=4x=48$).

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

Kết luận

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

Trong ba nguồn vật liệu cuống lá, mảnh lá và rễ; sự phát sinh phôi tốt nhất được ghi nhận đối với mẫu cây mảnh lá trên môi trường MS bổ sung 0,5 mg/L NAA và 0,5 mg/L 2,4-D.

Đối với vật liệu từ ba dạng phôi: phôi hình cầu, phôi hình tim và phôi có lá mầm cho hiệu quả phát sinh phôi thứ cấp cao nhất là phôi hình cầu được nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung 0,5 mg/L NAA + 0,7 mg/L 2,4-D + 0,1 mg/L TDZ.

Nội dung 2: Xử lý đa bội trên mẫu phôi hình cầu

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 dài kết hợp với nồng độ cao thì khả năng cho số lượng phôi biến dị càng lớn. Số phôi biến dị hình thành cao nhất khi xử lý colchicine với nồng độ 0,5% - 0,7% trong 48 giờ và 0,7% trong 72 giờ.

Xử lý với oryzalin cho tỉ lệ mẫu sống thấp và các phôi thứ cấp hình thành các kiểu biến dị khác biệt với phôi đối chứng, xử lý đa bội với oryzaline không hiệu quả bằng xử lý với colchicine.

Nội dung 3: Xác định mức độ đa bội của cây con sâm Ngọc Linh

Đối với xử lý colchicine, việc tăng thời gian xử lý và nồng độ colchicine làm giảm tỷ lệ sống của mẫu cấy và số lượng phôi thứ cấp nhưng làm tăng tỷ lệ hình thành phôi thứ cấp biến dị. Kết quả xác định mức độ đa bội cho thấy nồng độ colchicine ở 0,5% trong 48 giờ cho tỷ lệ tứ bội cao (25,92%).

Kết quả cũng cho thấy cây tứ bội ($4n = 4x = 48$) có kích thước khí khổng lớn, mật độ khí khổng thấp, mật độ lục lạp trong tế bào bảo vệ khí khổng dày, sinh trưởng tốt hơn so với cây lưỡng bội ($2n = 24$).

Nội dung 4: Đánh giá sự phát sinh hình thái và ổn định di truyền của cây tứ bội

Cây sâm Ngọc Linh tứ bội có sự sinh trưởng cao hơn đáng kể so với cây lưỡng bội sau 24 tuần sinh trưởng.

Các cơ quan của cây tứ bội bao gồm mảnh lá, cuống lá, rễ có sự tái sinh phôi tốt trên môi trường phát sinh phôi thích hợp.

Phôi có nguồn gốc từ cây tứ bội có sự tái sinh ổn định qua ba lần cấy chuyển đồng thời các cây sinh trưởng từ phôi tứ bội vẫn mang tính chất đặt trung của cây tứ bội.

Kiến nghị

Nghiên cứu này được thực hiện trong phạm vi và giới hạn nhất định. Do vậy, một số nội dung cần được nghiên cứu cần được nghiên cứu và làm rõ:

Tiếp tục tiến hành xử lý tạo đa bội với các nồng độ 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.

Tiếp tục thực hiện các nghiên cứu đánh giá sự ổn định của các thể tứ bội qua các đời cây con.

DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ

1. **Le Thi Diem**, Truong Hoai Phong, Hoang Thanh Tung, Hoang Dac Khai, Truong Thi Lan Anh, Nguyen Thi Nhu Mai, Do Manh Cuong, Vu Quoc Luan, Tran Que, Hoang Thi Nhu Phuong, Bui Van The Vinh, Duong Tan Nhut. *Tetraploid induction through somatic embryogenesis in Panax vietnamensis Ha et Grushv. by colchicine treatment*. Scientia horticulturae, **2022**, 303, 111254.

2. **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)

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Salma, U., S. Kundu, N. Mandal, *Artificial polyploidy in medicinal plants: advancement in the last two decades and impending prospects*, Journal of crop science and biotechnology, 2017, 20, 1, 9-19.
2. 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, 62-75.
3. Nguyễn Thượng Dong, *Sâm Việt Nam và một số cây thuốc họ nhân sâm 2007*.
4. Konoshima, T., M. Takasaki, E. Ichiishi, T. Murakami, H. Tokuda, H. Nishino, N.M. Duc, R. Kasai, K. Yamasaki, *Cancer chemopreventive activity of majonoside-R2 from Vietnamese ginseng, Panax vietnamensis*, Cancer letters, 1999, 147, 1-2, 11-16.
5. Dương Tấn Nhựt, Bùi Thế Vinh, Phan Quốc Tâm, Nguyễn Cửu Thành Nhân, Hoàng Xuân Chiến, Lê Nữ Minh Thùy, Vũ Thị Hiền, Vũ Quốc Luận, Trần Công Luận, Đoàn Trọng Đức, *Xác định hàm lượng saponin và dư lượng một số chất điều hòa sinh trưởng trong callus, chồi và rễ sâm Ngọc Linh nuôi cấy in vitro*, Tạp chí Công nghệ Sinh học, 2010, 8, 2, 189-202.
6. Dương Tấn Nhựt, Nguyễn Bá Phong, Lê Nữ Minh Thùy, Hoàng Văn Cương, Hoàng Xuân Chiến, Bùi Thế Vinh, Trần Công Luận, *Bước đầu đánh giá ảnh hưởng của methyl jasmonic acid lên khả năng tích lũy saponin trong mô sẹo sâm Ngọc Linh (Panax vietnamensis Ha et Grushv.)*, Tạp chí Công nghệ Sinh học, 2012, 10, 867-875.
7. Ngô Thanh Tài, Hồ Thanh Tâm, Hà Thị Mỹ Ngân, Dương Tấn Nhựt, *Nghiên cứu tác động của ánh sáng đèn LED lên khả năng tăng sinh mô sẹo và sự hình thành cây hoàn chỉnh từ phôi vô tính cây sâm Ngọc Linh*, Báo cáo khoa học Hội nghị Khoa học công nghệ sinh học toàn quốc, Nhà xuất bản Khoa học Tự nhiên và Công nghệ, 2013, 1038-1042.
8. Hoàng Xuân Chiến, Ngô Thanh Tài, Trần Xuân Tình, Lâm Bích Thảo, Trần Công Luận, Dương Tấn Nhựt, *Nghiên cứu một số yếu tố tạo củ sâm Ngọc Linh (Panax vietnamensis Ha et Grushv.) in vitro và xác định hàm lượng saponin trong cây tạo từ củ trồng thử nghiệm ở núi Ngọc Linh*, Tạp chí Công nghệ Sinh học, 2011, 9, 3, 325-339.

9. Dương Tấn Nhựt, Hoàng Xuân Chiến, Nguyễn Bá Trục, Nguyễn Bá Nam, Trần Xuân Tình, Vũ Quốc Luận, Nguyễn Văn Bình, Vũ Thị Hiền, Trịnh Thị Hương, Nguyễn Cửu Thành Nhân, Lê Nữ Minh Thùy, Lý Thị Mỹ Nga, Thái Thương Hiền, N.T. Hải, *Nhân giống vô tính cây sâm Ngọc Linh (Panax vietnamensis Ha et Grushv.)*, Tạp chí Công nghệ Sinh học, 2010, 8, 3B, 1211-1219.
10. Nhut, D.T., N.P. Huy, V.Q. Luan, N. Van Binh, N.B. Nam, L.N.M. Thuy, D.T.N. Ha, H.X. Chien, T.T. Huong, H. Cuong, *Shoot regeneration and micropropagation of Panax vietnamensis Ha et Grushv. from ex vitro leaf-derived callus*, African Journal of Biotechnology, 2011, 10, 84, 19499-19504.
11. D.T. Nhut NPH, H.X.C., T.C. Luan, B.T. Vinh, L.B. Thao, *In vitro culture of petiole longitudinal thin cell layer explants of Vietnamese ginseng (Panax vietnamensis Ha et Grushv.) and preliminary analysis of saponin content*, 2012.
12. Nhut, D., L. Nga, H. Chien, N. Huy, *Morphogenesis of in vitro main root transverse thin cell layers of Vietnamese ginseng (Panax vietnamensis Ha et Grushv.)*, African Journal of Biotechnology, 2012, 11, 23, 6274-6289.
13. Vũ Thị Hiền, Vũ Quốc Luận, Nguyễn Phúc Huy, Nguyễn Bá Nam, Nguyễn Thị Kim Loan, Nguyễn Thanh Sang, Vũ Thị Thủy, Nguyễn Hồng Hoàng, Thái Xuân Du, Dương Tấn Nhựt, *Sử dụng kỹ thuật nuôi cấy lớp mỏng tế bào trong nghiên cứu quá trình phát sinh hình thái của cây sâm Ngọc Linh (Panax Vietnamensis Ha et Grushv.) in vitro*, Tạp chí Khoa học và Phát triển, 2015, 13, 4, 657-664.
14. Nhut, D., B. Vinh, T. Hien, N. Huy, N. Nam, H. Chien, *Effects of spermidine, proline and carbohydrate sources on somatic embryogenesis from main root transverse thin cell layers of Vietnamese ginseng (Panax vietnamensis Ha et Grushv.)*, African Journal of Biotechnology, 2012, 11, 5, 1084-1091.
15. Vũ Thị Hiền, Vũ Quốc Luận, Nguyễn Phúc Huy, Nguyễn Bá Nam, Bùi Văn Thế Vinh, Thái Xuân Du, Dương Tấn Nhựt, *Phát sinh phôi trực tiếp từ lá, cuống lá và thân rễ cây sâm Ngọc Linh (Panax vietnamensis Ha et Grushv.)*, Tạp chí Sinh học, 2014, 36, 1se, 277-282.

16. Vũ Thị Thuý, Thái Thương Hiền, Vũ Quốc Luận, Nguyễn Bá Nam, Nguyễn Phúc Huy, Trịnh Thị Hương, Vũ Thị Hiền, Lê Kim Cương, Hồ Thanh Tâm, Nguyễn Việt Cường, *Nghiên cứu một số yếu tố ảnh hưởng đến quá trình phát sinh phôi vô tính Sâm Ngọc Linh (Panax vietnamensis Ha et Grushv.) in vitro*, 2014.
17. Bùi Văn Thế Vinh, Thái Thương Hiền, Đỗ Khắc Thịnh, Dương Tấn Nhựt, *Nghiên cứu hình thái giải phẫu và cấu trúc phôi trong quá trình phát sinh phôi vô tính sâm Ngọc Linh (Panax vietnamensis Ha et Grushv.)*, Tạp chí Khoa học và Phát triển, 2014, 12, 7, 1140-1148.
18. Trịnh Thị Hương, Hà Thị Mỹ Ngân, Ngô Thanh Tài, Nguyễn Phúc Huy, Hoàng Xuân Chiến, Nguyễn Bá Nam, Vũ Quốc Luận, Vũ Thị Hiền, Nguyễn Thị Thúy Hường, Phạm Bích Ngọc, Chu Hoàng Hà, Dương Tấn Nhựt, *Ảnh hưởng của nguồn mẫu, kích thước mẫu và một số loại auxin lên khả năng tái sinh rễ bất định của sâm Ngọc Linh (Panax Vietnamensis Ha et Grushv.) nuôi cấy in vitro*, Tạp chí Công nghệ Sinh học, 2012, 10, 4A, 877-886.
19. Dương Tấn Nhựt, *Một số hệ thống nuôi cấy trong nghiên cứu nhân nhanh rễ bất định và rễ thứ cấp cây sâm Ngọc Linh (Panax vietnamensis Ha et Grushv.)*, Tạp chí Công nghệ Sinh học, 2012, 10, 4A, 887-897.
20. D.T. Nhut, P.T.T., H.X. Chien, *Effect of some factors on adventitious root induction from in vitro leaf and callus of Vietnamese ginseng (Panax Vietnamensis Ha et Grushv)*, Vietnam Journal of Biotechnology, 2012, 10, 1, 81-86.
21. Trịnh Thị Hương, Hồ Thanh Tâm, Nguyễn Hồng Hoàng, Vũ Thị Hiền, Lê Kim Cương, Nguyễn Bá Nam, Nguyễn Phúc Huy, Vũ Quốc Luận, Bùi Thế Vinh, Trần Đình Phương, Trần Công Luận, Chu Hoàng Hà, Dương Tấn Nhựt, *Ảnh hưởng của một số elicitor lên sự sinh trưởng và tích lũy saponin trong rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh (Panax vietnamensis Ha et Grushv.) nuôi cấy in vitro*, Tạp chí Công nghệ Sinh học, 2014, 12, 3, 477-487.
22. Nguyễn Thị Nhật Linh, Hoàng Thanh Tùng, Nguyễn Hoàng Lộc, Dương Tấn Nhựt, *Tăng cường khả năng hình thành và phát triển rễ thứ cấp từ rễ bất định sâm Ngọc Linh (Panax vietnamensis) nuôi cấy in vitro*, Tạp chí Công nghệ Sinh học, 2015, 13, 2, 221-230.

23. Trịnh Thị Hương, Hoàng Thanh Tùng, Nguyễn Hồng Hoàng, Dương Tấn Nhựt, *Ảnh hưởng của các điều kiện bảo quản tới khả năng nảy mầm của hạt nhân tạo sâm Ngọc Linh (Panax vietnamensis Ha et Grushv.) nuôi cấy in vitro*, Tạp chí Công nghệ Sinh học, 2015, 13, 4A, 1257-1262.
24. Trịnh Thị Hương, Dương Tấn Nhựt, *Khả năng nảy mầm trong nuôi cấy của hạt nhân tạo có nguồn gốc từ phôi vô tính cây sâm Ngọc Linh (Panax vietnamensis Ha et Grushv)*, Tạp chí Công nghệ Sinh học, 2011, 9, 4, 443-453.
25. Huong, T.T., V.Q. Luan, N.P. Huy, N.B. Nam, T.T. Tuan, N.X. Tuan, N.T.T. Anh, D.T. Nhut, *Effects of GA3, NAA and BA supplementation to the matrix or in culture medium on germination of artificial seeds of Panax vietnamensis Ha et Grushv*, Tạp chí Công nghệ Sinh học, 2013, 11, 4, 681-687.
26. Bùi Văn Thế Vinh, Vũ Thị Thủy, Hoàng Thanh Tùng, Vũ Thị Hiền, Trần Xuân Tình, Đỗ Khắc Thịnh, Dương Tấn Nhựt, *Đánh giá sự ổn định di truyền cây sâm ngọc linh (Panax vietnamensis Ha et grushv.) bằng chỉ thị RAPD*, Tạp chí Công nghệ Sinh học, 2015, 13, 1, 63-73.
27. Hà Thị Mỹ Ngân, Nguyễn Bá Nam, Lê Kim Cương, Nguyễn Phúc Huy, Vũ Thị Hiền, Vũ Quốc Luận, Nguyễn Hồng Hoàng, Ngô Thanh Tài, Nguyễn Đình Trọng, Phạm Bích Ngọc, Chu Hoàng Hà, Dương Tấn Nhựt, *Chuyển gen tạo rễ tơ sâm Ngọc Linh (Panax Vietnamensis Ha et Grushv.) qua trung gian vi khuẩn Agrobacterium rhizogenes*, Tạp chí Công nghệ Sinh học, 2013, 11, 3, 479-486.
28. Phạm Bích Ngọc, Nguyễn Khắc Hưng, Nguyễn Thị Thúy Hường, Lâm Đại Nhân, Nguyễn Hữu Cường, Lê Trần Bình, Dương Tấn Nhựt, Chu Hoàng Hà, *Nghiên cứu chuyển gen tạo rễ tơ của cây sâm Ngọc Linh (Panax vietnamensis Ha et Grushv.) thông qua vi khuẩn Agrobacterium rhizogenes*, Tạp chí Công nghệ Sinh học, 2013, 11, 4, 689-695.
29. Nguyễn Hồng Hoàng, Lê Kim Cương, Vũ Thị Hiền, Nguyễn Bá Nam, Nguyễn Phúc Huy, Vũ Quốc Luận, Hà Thị Mỹ Ngân, Phạm Bích Ngọc, Chu Hoàng Hà, Dương Tấn Nhựt, *Khảo sát một số yếu tố ảnh hưởng đến sự sinh trưởng của rễ tơ sâm Ngọc Linh (Panax vietnamensis Ha et Grushv.) chuyển gen*, Tạp chí Công nghệ Sinh học, 2014, 12, 3, 467-476.

30. Dương Tấn Nhựt, Trịnh Thị Hương, Nguyễn Hồng Hoàng, Vũ Thị Hiền, Nguyễn Bá Nam, Nguyễn Phúc Huy, Vũ Quốc Luận, Phạm Bích Ngọc, Chu Hoàng Hà, Trần Thị Thùy An, Trần Đình Phương, Nguyễn Thị Thu Hương, Trần Công Luận, *Đánh giá tác dụng tăng lực của saponin trong rễ tơ chuyển gen sâm Ngọc Linh (Panax vietnamensis Ha et Grushv.)*, Tạp chí Công nghệ Sinh học, 2015, 13, 1, 75-82.
31. D.T. Nhut VQL, N.V.B., P.T. Phong, B.N. Huy, D.T.N. Ha, P.Q. Tam, N.B. Nam, V.T. Hien, B.T. Vinh, L.T.M. Hang, D.T.M. Ngoc, L.B. Thao, T.C. Luan, *The effects of some factors on in vitro biomass production of Vietnamese ginseng (Panax vietnamensis Ha et Grushv.) and preliminary analysis of saponin content*, Vietnam Journal of Biotechnology, 2009, 7, 3, 357-370.
32. Hoàng Văn Cương, Trần Công Luận, Bùi Thế Vinh, Dương Tấn Nhựt, *Ảnh hưởng của ánh sáng đơn sắc lên sự sinh trưởng và khả năng tích lũy hoạt chất saponin thông qua nuôi cấy mô sẹo và cây sâm Ngọc Linh (Panax vietnamensis Ha et Grushv.) in vitro*, Tạp chí Khoa học và Công nghệ, 2012, 50, 4, 475-490.
33. D.T. Nhut, N.T.T., N.B. Nam, V.Q. Luan, V.T. Hien, H.T. Tung, B.T. Vinh, T.C. Luan, *Light-emitting diodes and their potential in callus growth, plantlet development and saponin accumulation during somatic embryogenesis of Panax vietnamensis Ha et Grushv*, Biotechnol Biotechnol Equip, 2015, 29, 2, 299-308.
34. Bùi Trang Việt, *Sinh Lý Thực Vật*, NXB. Đại học Quốc Gia TP HCM, 2016.
35. Grout, B., *General principles of tissue culture*, 2017.
36. Su, Y.H., L.P. Tang, X.Y. Zhao, X.S. Zhang, *Plant cell totipotency: Insights into cellular reprogramming*, Journal of Integrative Plant Biology, 2021, 63, 1, 228-243.
37. Dương Tấn Nhựt, *Công nghệ sinh học thực vật - tập 1*, NXB. Nông nghiệp TP. HCM, 2007.
38. Raemakers, C., E.a. Jacobsen, R. Visser, *Secondary somatic embryogenesis and applications in plant breeding*, Euphytica, 1995, 81, 1, 93-107.

39. Bao, Y., G. Liu, X. Shi, W. Xing, G. Ning, J. Liu, M. Bao, *Primary and repetitive secondary somatic embryogenesis in Rosa hybrida 'Samantha'*, Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 2012, 109, 3, 411-418.
40. Karami, O., A. Deljou, G.K. Kordestani, *Secondary somatic embryogenesis of carnation (Dianthus caryophyllus L.)*, Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2008, 92, 3, 273-280.
41. Kim, Y.-J., O.R. Lee, K.-T. Kim, D.-C. Yang, *High frequency of plant regeneration through cyclic secondary somatic embryogenesis in Panax ginseng*, Journal of ginseng research, 2012, 36, 4, 442.
42. Milica D. Bogdanovi´c, Katarina B. Cukovi´c, Angelina R. Suboti´c, Milan B. Dragi´cevi´c ´, Ana D. Simonovi´c , Biljana K. Filipovi´c, Sladana I. Todorovi´c, *Secondary Somatic Embryogenesis in Centaurium erythraea Rafn*, Plants, 2021, 10, 20.
43. Neumann, K.-H., *Some studies on somatic embryogenesis: A tool in plant biotechnology*, 2000.
44. Suprasanna, P., V. Bapat, *Differential gene expression during somatic embryogenesis*, in *Somatic embryogenesis*. 2005, Springer. p. 305-320.
45. Kassem, M.A., A. Jacquin, *Somatic embryogenesis, rhizogenesis, and morphinan alkaloids production in two species of opium poppy*, Journal of Biomedicine and Biotechnology, 2001, 1, 2, 70-78.
46. Junaid, A., A. Mujib, M. Bhat, A. Ilah, M. Sharma, *Embryogenesis in Catharanthus roseus: Roles of some external factors in proliferation, maturation and germination of embryos*, in *Somatic embryogenesis*. 2006, Springer. p. 259-270.
47. Šamaj, J., F. Baluška, A. Pretová, D. Volkmann, *Auxin deprivation induces a developmental switch in maize somatic embryogenesis involving redistribution of microtubules and actin filaments from endoplasmic to cortical cytoskeletal arrays*, Plant Cell Reports, 2003, 21, 10, 940-945.
48. Mordhorst, A.P., K.J. Voerman, M.V. Hartog, E.A. Meijer, J. van Went, M. Koornneef, S.C. de Vries, *Somatic embryogenesis in Arabidopsis thaliana is facilitated by mutations in genes repressing meristematic cell divisions*, Genetics, 1998, 149, 2, 549-563.

49. Maria Antonietta Germanà, Maurizio Lambardi, *In Vitro Embryogenesis in Higher Plants, Methods in Molecular Biology*, Springer, 2016, 1359.
50. Nhut, D.T., N.S. Tuan, H.M. Ngoc, P.N. Uyen, N.T. Don, N.T. Mai, J.T. Da Silva, *Somatic embryogenesis induction from in vitro leaf cultures of lisianthus (Eustoma grandiflorum (Raf.) Shinn.)*, Propagation of Ornamental Plants, 2006, 6, 3, 121-127.
51. Malik, K.A., P.K. Saxena, *Regeneration in Phaseolus vulgaris L.: High-frequency induction of direct shoot formation in intact seedlings by N6-benzylaminopurine and thidiazuron*, Planta, 1992, 186, 3, 384-389.
52. Williams, E., G. Maheswaran, *Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group*, Annals of botany, 1986, 57, 4, 443-462.
53. Gill, R., P.K. Saxena, *Direct somatic embryogenesis and regeneration of plants from seedling explants of peanut (Arachis hypogaea): promotive role of thidiazuron*, Canadian Journal of Botany, 1992, 70, 6, 1186-1192.
54. Chung, H.-H., J.-T. Chen, W.-C. Chang, *Cytokinins induce direct somatic embryogenesis of Dendrobium chiengmai pink and subsequent plant regeneration*, In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 2005, 41, 6, 765-769.
55. Korban S, *Somatic embryogenesis in Rose: Gene expression and genetic transformation in Somatic Embryogenesis*, Springer, 2005, 247-257.
56. Soltis DE, A.V., Leebens - Mack J, Bell CD, Paterson AH, Zheng C, Sankoff D, de Pamphilis CW, Wall PK, Soltis PS, *Polyploidy and angiosperm diversification*, American journal of botany, 2009, 96, 1, 336-348.
57. Soltis DE, B.J., *Surviving the KT mass extinction: New perspectives of polyploidization in angiosperms*, Proceedings of the National Academy of Sciences, 2009, 106, 14, 5455-5456.
58. Comai L, *The advantages and disadvantages of being polyploid*, Nature reviews genetics, 2005, 6, 11, 836-846.
59. Sattler MC, C.C., Clarindo WR, *The polyploidy and its key role in plant breeding*, Planta, 2016, 243, 2, 281-296.

60. Kehr, *Woody plant polyploidy*, *American Nurseryman*, 1996, 183, 40-48.
61. Banyai, W., R. Sangthong, N. Karaket, P. Inthima, M. Mii, K. Supaibulwatana, *Overproduction of artemisinin in tetraploid Artemisia annua L*, *Plant biotechnology*, 2010, 27, 5, 427-433.
62. Hieu, P.V., *Polyploid gene expression and regulation in polysomic polyploids*, *American Journal of Plant Sciences*, 2019, 10, 8, 1409-1443.
63. Touchell, D.H., I.E. Palmer, T.G. Ranney, *In vitro ploidy manipulation for crop improvement*, *Frontiers in Plant Science*, 2020, 11, 722.
64. Niazian, M., A.M. Nalouisi, *Artificial polyploidy induction for improvement of ornamental and medicinal plants*, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 2020, 142, 3, 447-469.
65. De Storme, N., A. Mason, *Plant speciation through chromosome instability and ploidy change: cellular mechanisms, molecular factors and evolutionary relevance*, *Current Plant Biology*, 2014, 1, 10-33.
66. Madani, H., A. Escrich, B. Hosseini, R. Sanchez-Muñoz, A. Khojasteh, J. Palazon, *Effect of polyploidy induction on natural metabolite production in medicinal plants*, *Biomolecules*, 2021, 11, 6, 899.
67. Orr-Weaver, Terry L, *When bigger is better: the role of polyploidy in organogenesis*, *Trends in Genetics*, 2015, 31, 6, 307-315.
68. Fu, L., Y. Zhu, M. Li, C. Wang, H. Sun, *Autopolyploid induction via somatic embryogenesis in Lilium distichum Nakai and Lilium cernuum Komar*, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 2019, 139, 2, 237-248.
69. Eng, W.-H., W.-S. Ho, *Polyploidization using colchicine in horticultural plants: a review*, *Scientia horticulturae*, 2019, 246, 604-617.
70. Iannicelli, J., J. Guariniello, V.E. Tossi, J.J. Regalado, L. Di Ciaccio, C.M. Van Baren, S.P. Álvarez, A.S. Escandón, *The “polyploid effect” in the breeding of aromatic and medicinal species*, *Scientia Horticulturae*, 2020, 260, 108854.
71. Lavania, U.C., S. Srivastava, S. Lavania, S. Basu, N.K. Misra, Y. Mukai, *Autopolyploidy differentially influences body size in plants, but facilitates enhanced accumulation of secondary metabolites, causing increased cytosine methylation*, *The Plant Journal*, 2012, 71, 4, 539-549.

72. Trần Thượng Tuấn, *Chọn giống và công tác chọn giống cây trồng*, Tủ sách Đại học Cần Thơ, 1992.
73. Bùi Chí Bửu, Nguyễn Thị Lang, *Chọn giống cây trồng phương pháp truyền thống và phân tử*, NXB Nông Nghiệp, 2007.
74. Chu Thị Thơm, Phan Thị Lại, Nguyễn Văn Tố, *Phương pháp chọn giống cây trồng*, NXB Lao động, Hà Nội, 2006.
75. Lê Duy Thành, *Cơ sở di truyền chọn giống thực vật*, NXB Khoa Học và Kỹ Thuật Hà Nội, 2001.
76. Chen, C., X. Hou, H. Zhang, G. Wang, L. Tian, *Induction of Anthurium andraeanum "Arizona" tetraploid by colchicine in vitro*, Euphytica, 2011, 181, 2, 137-145.
77. OMID, B.R., M. Mirzaei, M. Hasani, M.M. SEDIGHI, *Induction and identification of polyploidy in basil (Ocimum basilicum L.) medicinal plant by colchicine treatment*, 2010.
78. Dunn, B.L., J.T. Lindstrom, *Oryzalin-induced chromosome doubling in Buddleja to facilitate interspecific hybridization*, HortScience, 2007, 42, 6, 1326-1328.
79. Kurtz, L.E., M.H. Brand, J.D. Lubell-Brand, *Production of tetraploid and triploid hemp*, HortScience, 2020, 55, 10, 1703-1707.
80. Demtsu, B., T. Taychasinpitak, S. Wongchaochant, B. Manochai, *Induced mutation by colchicine treatment of somatic embryos in 'Namwa' Banana (Mus a sp. ABB)*, International Transaction Journal of Engineering, Management, & Applied Sciences & Technologies, 2013, 4, 4, 311-320.
81. Li, S., Y. Lin, H. Pei, J. Zhang, J. Zhang, J. Luo, *Variations in colchicine-induced autotetraploid plants of Lilium davidii var. unicolor*, Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 2020, 141, 3, 479-488.
82. Li, X., Z. Zhang, Y. Ren, Y. Feng, Q. Guo, L. Dong, Y. Sun, Y. Li, *Induction and early identification of tetraploid black locust by hypocotyl in vitro*, In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 2021, 57, 3, 372-379.
83. Liao, T., Y. Wang, C. Xu, Y. Li, X. Kang, *Adaptive photosynthetic and physiological responses to drought and rewatering in triploid Populus populations*, Photosynthetica, 2018, 56, 2, 578-590.

84. B. Liu, J.V., M. Feldman, *Rapid genomic changes in newly synthesized amphiploids of Triticum and Aegilops. II. Changes in low-copy coding DNA sequences*, Genome, 1998, 41, 535-542.
85. Dhooghe, E., K. Van Laere, T. Eeckhaut, L. Leus, J. Van Huylenbroeck, *Mitotic chromosome doubling of plant tissues in vitro*, Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 2011, 104, 3, 359-373.
86. K.M. Oates, T.G.R., D.H. Touchell, *Influence of induced polyploidy on fertility and morphology of Rudbeckia species and hybrids*, HortScience, 2012, 47, 9, 1217-1221.
87. GE. Liu, M.V., A. Cellamare, L. Chen, Z. Cheng, B. Zhu, EE. Eichler, *Analysis of recent segmental duplications in the bovine genome*, BMC Genomics, 2009, 10, 1, 1-16.
88. Lambertini, C., *Why are tall-statured energy grasses of polyploid species complexes potentially invasive? A review of their genetic variation patterns and evolutionary plasticity*, Biological Invasions, 2019, 21, 10, 3019-3041.
89. TG, R., *Polyploidy: From evolution to new plant development*, In Combined Proceedings International Plant Propagators' Society, 2006, 56, 137-142.
90. Rounsaville TJ, T.D., Ranney TG, *Fertility and reproductive pathways in diploid and triploid Miscanthus sinensis*, HortScience, 2011, 46, 10, 1353-1357.
91. Wee-Hiang Eng, W.-S.H., *Polyploidization using colchicine in horticultural plants: A review* Scientia Horticulturae 2019, 246, 604–617.
92. Trần Duy Quý, *Các phương pháp mới trong chọn giống cây trồng*, NXB Nông nghiệp Hà Nội, 1997.
93. Blakeslee, A.F., A.G. Avery, *Methods of inducing doubling of chromosomes in plants: by treatment with colchicine*, Journal of Heredity, 1937, 28, 12, 393-411.
94. Nguyễn Đức Thành, *Nuôi cấy mô tế bào thực vật – nghiên cứu và ứng dụng*, NXB Nông nghiệp Hà Nội, 2001.
95. N.L. Taylor, M.K.A., K.H. Queenberry, L. Watson, *Doubling the chromosome number of Trifolium species using nitrous oxide*, Crop Science, 1976, 16, 516-518.

96. Y.Y. Leung, L.L.Y.H., V.B. Kroaus, *Colchicine - update on mechanisms of action and therapeutic uses*, Semin Arthritis Rheum, 2015, 45, 341-350.
97. L.C. Morejohn, T.E.B., L.P. Tocchi, D.E. Fosket, *Tubulins from different higher plant species are immunologically nonidentical and bind colchicine differentially*, Proceedings of the National Academy of Sciences, 1984, 81, 5, 1440-1444.
98. Morejohn, L.C., T.E. Bureau, L.P. Tocchi, D.E. Fosket, *Tubulins from different higher plant species are immunologically nonidentical and bind colchicine differentially*, Proceedings of the National Academy of Sciences, 1984, 81, 5, 1440-1444.
99. Khosravi, P., M.J. Kermani, G.A. Nematzadeh, M.R. Bihanta, K. Yokoya, *Role of mitotic inhibitors and genotype on chromosome doubling of Rosa*, Euphytica, 2008, 160, 2, 267-275.
100. Murthy, J.V., H.-H. Kim, V.R. Hanesworth, J.D. Hugdahl, L.C. Morejohn, *Competitive inhibition of high-affinity oryzalin binding to plant tubulin by the phosphoric amide herbicide amiprofos-methyl*, Plant Physiology, 1994, 105, 1, 309-320.
101. Kitamura, S., M. Akutsu, K. Okazaki, *Mechanism of action of nitrous oxide gas applied as a polyploidizing agent during meiosis in lilies*, Sexual plant reproduction, 2009, 22, 1, 9-14.
102. Lipka, E., S. Müller, *Nitrosative stress triggers microtubule reorganization in Arabidopsis thaliana*, Journal of experimental botany, 2014, 65, 15, 4177-4189.
103. Jovanović, A.M., S. Durst, P. Nick, *Plant cell division is specifically affected by nitrotyrosine*, Journal of experimental botany, 2010, 61, 3, 901-909.
104. Nguyễn Quang Thạch, N.T.L.A., Phạm Kim Ngọc, Trần Văn Minh, Nguyễn Thị Phương Thảo, *Công nghệ Sinh học tế bào: Cơ sở công nghệ sinh học*, NXB Giáo Dục Việt Nam, 2009.
105. Zhang, X., J. Gao, *In vitro tetraploid induction from multigenotype protocorms and tetraploid regeneration in Dendrobium officinale*, Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 2020, 141, 2, 289-298.

106. Carbajal, E.M., M.C. Zuleta, L. Swayzer, B.M. Schwartz, M.C. Chavarro, A.C. Ballen - Taborda, S.R. Milla - Lewis, *Development of colchicine - induced tetraploid St. Augustinegrass (Stenotaphrum secundatum) lines*, Plant Breeding, 2019, 138, 6, 958-966.
107. Shmeit, Y.H., E. Fernandez, P. Novy, P. Kloucek, M. Orosz, L. Kokoska, *Autopolyploidy effect on morphological variation and essential oil content in Thymus vulgaris L*, Scientia Horticulturae, 2020, 263, 109095.
108. Zhang, Y.-S., J.-J. Chen, Y.-M. Cao, J.-X. Duan, X.-D. Cai, *Induction of tetraploids in 'Red Flash' caladium using colchicine and oryzalin: morphological, cytological, photosynthetic and chilling tolerance analysis*, Scientia Horticulturae, 2020, 272, 109524.
109. Acanda, Y., Ó. Martínez, M.V. González, M.J. Prado, M. Rey, *Highly efficient in vitro tetraploid plant production via colchicine treatment using embryogenic suspension cultures in grapevine (Vitis vinifera cv. Mencía)*, Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 2015, 123, 3, 547-555.
110. Qi-Qing, L., J. Zhang, L. Ji-Hua, Y. Bo-Yang, *Morphological and chemical studies of artificial Andrographis paniculata polyploids*, Chinese journal of natural medicines, 2018, 16, 2, 81-89.
111. Nilanthi, D., X.-L. Chen, F.-C. Zhao, Y.-S. Yang, H. Wu, *Induction of tetraploids from petiole explants through colchicine treatments in Echinacea purpurea L*, Journal of Biomedicine and Biotechnology, 2009, 2009.
112. Sakhanokho, H.F., K. Rajasekaran, R.Y. Kelley, N. Islam-Faridi, *Induced polyploidy in diploid ornamental ginger (Hedychium muluense RM Smith) using colchicine and oryzalin*, HortScience, 2009, 44, 7, 1809-1814.
113. Hansen, N., S.B. Andersen, *In vitro chromosome doubling with colchicine during microspore culture in wheat (Triticum aestivum L.)*, Euphytica, 1998, 102, 1, 101-108.
114. Yuan, S., Y. Su, Y. Liu, Z. Li, Z. Fang, L. Yang, M. Zhuang, Y. Zhang, H. Lv, P. Sun, *Chromosome doubling of microspore-derived plants from cabbage (Brassica oleracea var. capitata L.) and broccoli (Brassica oleracea var. italica L.)*, Frontiers in plant science, 2015, 6, 1118.

115. Bairu, M.W., W.A. Stirk, K. Dolezal, J. Van Staden, *Optimizing the micropropagation protocol for the endangered Aloe polyphylla: can meta-topolin and its derivatives serve as replacement for benzyladenine and zeatin?*, Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2007, 90, 1, 15-23.
116. Klekowski, E.J., *Plant clonality, mutation, diplontic selection and mutational meltdown*, Biological Journal of the Linnean Society, 2003, 79, 1, 61-67.
117. Dermen, H., *Periclinal cytochimeras and origin of tissues in stem and leaf of peach*, American journal of botany, 1953, 154-168.
118. Lattier, J.D., D.H. Touchell, T.G. Ranney, J.C. Smith, *Micropropagation and Polyploid Induction of Acer platanoides 'Crimson Sentry*, Journal of Environmental Horticulture, 2013, 31, 4, 246-252.
119. Dhooghe, E., W. Grunewald, L. Leus, M.-C. Van Labeke, *In vitro polyploidisation of Helleborus species*, Euphytica, 2009, 165, 1, 89-95.
120. Meyer, E.M., D.H. Touchell, T.G. Ranney, *In vitro shoot regeneration and polyploid induction from leaves of Hypericum species*, HortScience, 2009, 44, 7, 1957-1961.
121. Zhang, Q., F. Luo, L. Liu, F. Guo, *In vitro induction of tetraploids in crape myrtle (Lagerstroemia indica L.)*, Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 2010, 101, 1, 41-47.
122. Hebert, C.J., D.H. Touchell, T.G. Ranney, A.V. LeBude, *In vitro shoot regeneration and polyploid induction of Rhododendron 'Fragrantissimum Improved'*, HortScience, 2010, 45, 5, 801-804.
123. Väinölä, A., *Polyploidization and early screening of Rhododendron hybrids*, Euphytica, 2000, 112, 3, 239-244.
124. Allum, J., D. Bringloe, A. Roberts, *Chromosome doubling in a Rosa rugosa Thunb. hybrid by exposure of in vitro nodes to oryzalin: the effects of node length, oryzalin concentration and exposure time*, Plant cell reports, 2007, 26, 11, 1977-1984.
125. Dhooghe, E., S. Denis, T. Eeckhaut, D. Reheul, M.-C. Van Labeke, *In vitro induction of tetraploids in ornamental Ranunculus*, Euphytica, 2009, 168, 1, 33-40.

126. Chauvin, J., A. Label, M. Kermarrec, *In vitro chromosome-doubling in tulip (Tulipa gesneriana L.)*, The Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 2005, 80, 6, 693-698.
127. Notsuka, K., T. Tsuru, M. Shiraishi, *Induced polyploid grapes via in vitro chromosome doubling*, Journal of the Japanese Society for Horticultural Science, 2000, 69, 5, 543-551.
128. Kunakh, V., V. Adonin, S. Ozheredov, Y.B. Blyum, *Mixoploidy in wild and cultivated species of Cruciferae capable of hybridizing with rapeseed Brassica napus*, Cytology and Genetics, 2008, 42, 3, 204-209.
129. Hussey, G., A. Hopher, *Clonal propagation of sugar beet plants and the formation of polyploids by tissue culture*, Annals of botany, 1978, 42, 178, 477-479.
130. Asakura, I., Y. Hoshino, *Endosperm-derived triploid plant regeneration in diploid Actinidia kolomikta, a cold-hardy kiwifruit relative*, Scientia Horticulturae, 2017, 219, 53-59.
131. Wu, J., Y. Sang, Q. Zhou, P. Zhang, *Colchicine in vitro tetraploid induction of Populus hopeiensis from leaf blades*, Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 2020, 141, 2, 339-349.
132. Stanys, V., A. Weckman, G. Staniene, P. Duchovskis, *In vitro induction of polyploidy in Japanese quince (Chaenomeles japonica)*, Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2006, 84, 3, 263-268.
133. Pan-pan, H., L. Wei-xu, L. Hui-hui, *In vitro induction and identification of autotetraploid of Bletilla striata (Thunb.) Reichb. f. by colchicine treatment*, Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 2018, 132, 3, 425-432.
134. Regalado, J., E. Carmona-Martín, V. Querol, C. Veléz, C. Encina, S. Pitta-Alvarez, *Production of compact petunias through polyploidization*, Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 2017, 129, 1, 61-71.
135. Kermani, M., V. Sarasan, A. Roberts, K. Yokoya, J. Wentworth, V. Sieber, *Oryzalin-induced chromosome doubling in Rosa and its effect on plant morphology and pollen viability*, Theoretical and Applied Genetics, 2003, 107, 7, 1195-1200.

136. Ascough, G.D., J. Van Staden, J.E. Erwin, *Effectiveness of colchicine and oryzalin at inducing polyploidy in Watsonia lepidota* NE Brown, HortScience, 2008, 43, 7, 2248-2251.
137. Morejohn, L., T. Bureau, J. Mole-Bajer, A. Bajer, D. Fosket, *Oryzalin, a dinitroaniline herbicide, binds to plant tubulin and inhibits microtubule polymerization in vitro*, Planta, 1987, 172, 2, 252-264.
138. Ma, C., J. Tran, F. Gu, R. Ochoa, C. Li, D. Sept, K. Werbovetz, N. Morrissette, *Dinitroaniline activity in Toxoplasma gondii expressing wild-type or mutant α -tubulin*, Antimicrobial agents and chemotherapy, 2010, 54, 4, 1453-1460.
139. Hugdahl, J.D., L.C. Morejohn, *Rapid and reversible high-affinity binding of the dinitroaniline herbicide oryzalin to tubulin from Zea mays L*, Plant Physiology, 1993, 102, 3, 725-740.
140. Dhawan, O., U. Lavania, *Enhancing the productivity of secondary metabolites via induced polyploidy: a review*, Euphytica, 1996, 87, 2, 81-89.
141. Berkov, S., S. Philipov, *Alkaloid production in diploid and autotetraploid plants of Datura stramonium*, Pharmaceutical biology, 2002, 40, 8, 617-621.
142. Jesus-Gonzalez, D., P. Weathers, *Tetraploid Artemisia annua hairy roots produce more artemisinin than diploids*, Plant cell reports, 2003, 21, 8, 809-813.
143. Wu, J.-H., P. Mooney, *Autotetraploid tangor plant regeneration from in vitro Citrus somatic embryogenic callus treated with colchicine*, Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2002, 70, 1, 99-104.
144. Thi, P.T.N., Y. Ozaki, H. Okubo, *Colchicine- and oryzalin-induced tetraploids in ornamental Alocasia \times amazonica hort*, Journal of the Japanese Society for Horticultural Science, 2004, 73, 1, 63-65.
145. Soriano, M., L. Cistué, M.P. Vallés, A.M. Castillo, *Effects of colchicine on anther and microspore culture of bread wheat (Triticum aestivum L.)*, Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2007, 91, 3, 225-234.
146. Nimura, M., J. Kato, H. Horaguchi, M. Mii, K. Sakai, T. Katoh, *Induction of fertile amphidiploids by artificial chromosome-doubling in interspecific hybrid between Dianthus caryophyllus L. and D. japonicus Thunb*, Breeding Science, 2006, 56, 3, 303-310.

147. Yang, X., Z. Cao, L. An, Y. Wang, X. Fang, *In vitro tetraploid induction via colchicine treatment from diploid somatic embryos in grapevine (Vitis vinifera L.)*, Euphytica, 2006, 152, 2, 217-224.
148. Islam, S.S., *The Effect of Colchicine Pretreatment on Isolated Microspore Culture of Wheat ('Triticum aestivum' L.)*, Australian Journal of Crop Science, 2010, 4, 9, 660-665.
149. Kaensaksiri, T., P. Soontornchainaksaeng, N. Soonthornchareonnon, S. Prathanturarug, *In vitro induction of polyploidy in Centella asiatica (L.) Urban*, Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 2011, 107, 2, 187-194.
150. Le, K.-C., T.-T. Ho, J.-D. Lee, K.-Y. Paek, S.-Y. Park, *Colchicine mutagenesis from long-term cultured adventitious roots increases biomass and ginsenoside production in wild ginseng (Panax ginseng Mayer)*, Agronomy, 2020, 10, 6, 785.
151. Hà Thị Thuý, *Nghiên cứu tạo giống bưởi, cam, quýt không hạt bằng công nghệ sinh học*, Báo cáo tổng hợp kết quả khoa học công nghệ đề tài cấp Bộ, 2010.
152. Nguyễn Thị Ngọc Trâm, Trần Nhân Dũng, Đỗ Tân Khang, *Đánh giá hiệu quả của Colchicine trong chọn tạo giống quýt hồng Lai Vung tứ bội (Citrus Reticulata Blanco)* Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ, 2012, 174-183.
153. Trần Thị Minh Hằng, Nguyễn Thanh Tuấn, Phan Thị Ngân, *Ảnh hưởng của nồng độ và thời gian xử lý Colchicine đến khả năng tạo đa bội ở hành củ (Allium cepa L., Aggregatum group)*, Tạp chí KH Nông nghiệp Việt Nam, 2016, 14, 3, 360-366.
154. Nguyễn Thị Lý Anh, Hồ Thị Thu Thanh, Lê Hải Hà, Nguyễn Thị Hân, *Tạo dòng Cẩm Chướng gấm (Dianthus chinensis) đa bội bằng xử lý Colchicine in vitro*, Tạp chí Khoa học và Phát triển, 2014, 12, 8, 1322-1330.
155. Bui, V.T., V.V. Nguyen, Q.N. Vu, T.T. Hoang, T.N. Duong, *Triploid plant regeneration from immature endosperms of Melia azedazach*, Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2018, 133, 3, 351-357.
156. Huy, N.P., V.Q. Luan, H.T. Tung, V.T. Hien, H.T.M. Ngan, P.N. Duy, D.T. Nhut, *In vitro polyploid induction of Paphiopedilum villosum using colchicine*, Scientia horticulturae, 2019, 252, 283-290.

157. Kim, K., V.B. Nguyen, J. Dong, Y. Wang, J.Y. Park, S.-C. Lee, T.-J. Yang, *Evolution of the Araliaceae family inferred from complete chloroplast genomes and 45S nrDNAs of 10 Panax-related species*, Scientific reports, 2017, 7, 1, 1-9.
158. Kirov, I., M. Divashuk, K. Van Laere, A. Soloviev, L. Khrustaleva, *An easy "SteamDrop" method for high quality plant chromosome preparation*, Molecular cytogenetics, 2014, 7, 1, 1-10.
159. Sabooni, N., A. Shekafandeh, *Somatic embryogenesis and plant regeneration of blackberry using the thin cell layer technique*, Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 2017, 130, 2, 313-321.
160. Méndez-Hernández, H.A., M. Ledezma-Rodríguez, R.N. Avilez-Montalvo, Y.L. Juárez-Gómez, A. Skeete, J. Avilez-Montalvo, C. De-la-Peña, V.M. Loyola-Vargas, *Signaling overview of plant somatic embryogenesis*, Frontiers in plant science, 2019, 10, 77.
161. Schleiden, M., *Beiträge zur phytogenesis*, Arch. Anat. Physiol. Wiss Med, 1838.
162. Schwann, T., *Mikroskopische Untersuchungen über die Übereinstimmung in der Struktur und dem Wachstum der Thiere und Pflanzen*. Berlin 1839, Ostwalds Klassiker der exakten Wissenschaften. Bd, 1939, 176.
163. Wójcik, A.M., B. Wójcikowska, M.D. Gaj, *Current perspectives on the auxin-mediated genetic network that controls the induction of somatic embryogenesis in plants*, International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21, 4, 1333.
164. Schiavone, F.M., T.J. Cooke, *Unusual patterns of somatic embryogenesis in the domesticated carrot: developmental effects of exogenous auxins and auxin transport inhibitors*, Cell differentiation, 1987, 21, 1, 53-62.
165. Umehara, M., H. Kamada, *Development of the embryo proper and the suspensor during plant embryogenesis*, Plant biotechnology, 2005, 22, 4, 253-260.
166. Bogdanović, M.D., K.B. Čuković, A.R. Subotić, M.B. Dragičević, A.D. Simonović, B.K. Filipović, S.I. Todorović, *Secondary somatic embryogenesis in Centaurium erythraea Rafn*, Plants, 2021, 10, 2, 199.

167. Avci, S.,E. Can, *Efficient somatic embryogenesis from immature inflorescences of Dallisgrass (Paspalum Dilatatum Poir.)*, Prop. Orn. Plants, 2006, 6, 134-139.
168. Hazubska-Przybył, T., E. Ratajczak, A. Obarska,E. Pers-Kamczyc, *Different roles of auxins in somatic embryogenesis efficiency in two Picea species*, International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21, 9, 3394.
169. Yang, Y., N. Wang,S. Zhao, *Functional characterization of a WRKY family gene involved in somatic embryogenesis in Panax ginseng*, Protoplasma, 2020, 257, 2, 449-458.
170. Gladfelter, H.J., J. Johnston, H.D. Wilde,S.A. Merkle, *Somatic embryogenesis and cryopreservation of Stewartia species*, Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 2021, 144, 1, 211-221.
171. Zhang, M., A. Wang, M. Qin, X. Qin, S. Yang, S. Su, Y. Sun,L. Zhang, *Direct and indirect somatic embryogenesis induction in Camellia oleifera Abel*, Frontiers in plant science, 2021, 12, 451.
172. Arya, S., I.D. Arya,T. Eriksson, *Rapid multiplication of adventitious somatic embryos of Panax ginseng*, Plant cell, tissue and organ culture, 1993, 34, 2, 157-162.
173. Choi, Y.-E.,W.-Y. Soh, *Enhanced somatic single embryo formation by plasmolyzing pretreatment from cultured ginseng cotyledons*, Plant Science, 1997, 130, 2, 197-206.
174. Prakash, M.,K. Gurumurthi, *Effects of type of explant and age, plant growth regulators and medium strength on somatic embryogenesis and plant regeneration in Eucalyptus camaldulensis*, Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 2010, 100, 1, 13-20.
175. Hien, V.T., V.Q. Luan, N.P. Huy, N.B. Nam, T.X. Du,D.T. Nhut, *Direct somatic embryogenesis from leaf, petiole and rhizome explant of Panax vietnamensis Ha et Grushv*, Academia Journal of Biology, 2014, 36, 1se, 277-282.
176. Haliloglu, K., *Efficient regeneration system from wheat leaf base segments*, Biologia plantarum, 2006, 50, 3, 326-330.

177. Guan, Y., S.-G. Li, X.-F. Fan, Z.-H. Su, *Application of somatic embryogenesis in woody plants*, Frontiers in Plant Science, 2016, 7, 938.
178. Ahn, C.-H., A.R. Tull, P.M. Montello, S.A. Merkle, *A clonal propagation system for Atlantic white cedar (Chamaecyparis thyoides) via somatic embryogenesis without the use of plant growth regulators*, Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 2017, 130, 1, 91-101.
179. Pullman, G.S., K. Bucalo, *Pine somatic embryogenesis: analyses of seed tissue and medium to improve protocol development*, New Forests, 2014, 45, 3, 353-377.
180. Nunes, S., L. Marum, N. Farinha, V.T. Pereira, T. Almeida, D. Sousa, N. Mano, J. Figueiredo, M.C. Dias, C. Santos, *Somatic embryogenesis of hybrid Pinus elliottii var. elliottii × P. caribaea var. hondurensis and ploidy assessment of somatic plants*, Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 2018, 132, 1, 71-84.
181. Bhaskaran, S., R.H. Smith, *Regeneration in cereal tissue culture: a review*, Crop science, 1990, 30, 6, 1328-1337.
182. Sabzehzari, M., S. Hoveidamanesh, M. Modarresi, V. Mohammadi, *Morphological, anatomical, physiological, and cytological studies in diploid and tetraploid plants of Plantago psyllium*, Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 2019, 139, 1, 131-137.
183. Niazian, M., S.A. Sadat Noori, M. Tohidfar, S.M.M. Mortazavian, *Essential oil yield and agro-morphological traits in some Iranian ecotypes of ajowan (Carum copticum L.)*, Journal of Essential Oil Bearing Plants, 2017, 20, 4, 1151-1156.
184. Aqafarini, A., M. Lotfi, M. Norouzi, G. Karimzadeh, *Induction of tetraploidy in garden cress: morphological and cytological changes*, Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 2019, 137, 3, 627-635.
185. Khalili, S., M. Niazian, M. Arab, M. Norouzi, *In vitro chromosome doubling of African daisy, Gerbera jamesonii Bolus cv. Mini Red*, The Nucleus, 2020, 63, 1, 59-65.

186. Fetouh, M.I., Z. Deng, S.B. Wilson, C.R. Adams, G.W. Knox, *Induction and characterization of tetraploids in chinese privet (Ligustrum sinense Lour.)*, *Scientia Horticulturae*, 2020, 271, 109482.
187. Xu, C., Y. Zhang, Z. Huang, P. Yao, Y. Li, X. Kang, *Impact of the leaf cut callus development stages of Populus on the tetraploid production rate by colchicine treatment*, *Journal of Plant Growth Regulation*, 2018, 37, 2, 635-644.
188. Shariat, A., F. Sefidkon, *Tetraploid induction in savory (Satureja khuzistanica): cytological, morphological, phytochemical and physiological changes*, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 2021, 146, 1, 137-148.
189. Doležel, J., M. Kubaláková, J. Bartoš, J. Macas, *Flow cytogenetics and plant genome mapping*, *Chromosome Research*, 2004, 12, 1, 77-91.
190. Costa, F.H.d.S., M. Pasqual, S.d.O. Silva, H.P.d. Silva Neto, E.P. Amorim, J.A.d. Santos-Serejo, *Polyploidization in banana shoot apex and its morphophysiological effects in vitro*, *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 2011, 46, 8, 805-813.
191. Cid, L.P.B., J. Teixeira, *Cultivo in vitro de plantas*, Brasília: Embrapa informação tecnológica, 2010.
192. Liu, G., Z. Li, M. Bao, *Colchicine-induced chromosome doubling in Platanus acerifolia and its effect on plant morphology*, *Euphytica*, 2007, 157, 1, 145-154.
193. Lavania, U.C., *Polyploidy, body size, and opportunities for genetic enhancement and fixation of heterozygosity in plants*, *The Nucleus*, 2013, 56, 1, 1-6.
194. Kondrashov, F.A., I.B. Rogozin, Y.I. Wolf, E.V. Koonin, *Selection in the evolution of gene duplications*, *Genome biology*, 2002, 3, 2, 1-9.
195. Corneillie, S., N. De Storme, R. Van Acker, J.U. Fangel, M. De Bruyne, R. De Rycke, D. Geelen, W.G. Willats, B. Vanholme, W. Boerjan, *Polyploidy affects plant growth and alters cell wall composition*, *Plant Physiology*, 2019, 179, 1, 74-87.

196. Ahmadi, B.,H. Ebrahimzadeh, *In vitro androgenesis: Spontaneous vs. artificial genome doubling and characterization of regenerants*, Plant cell reports, 2020, 39, 3, 299-316.
197. Riehle, M.M., A.F. Bennett,A.D. Long, *Genetic architecture of thermal adaptation in Escherichia coli*, Proceedings of the National Academy of Sciences, 2001, 98, 2, 525-530.
198. Endo, M., J.-S. Kim,I. Inada, *Production and characteristics of chromosome-doubled plants of small-flowered garden Chrysanthemum, Dendranthema× grandiflorum (Ramat.) Kitam. cv. YS by colchicine treatment of cultured shoot tips*, Journal of the Japanese Society for Horticultural Science, 1997, 65, 4, 825-833.
199. Vichiato, M., D. Castro, M. Vichiato, S. Gonçalves,M. Lima. *Anatomia foliar de Dendrobium nobile Lindl.(Orchidaceae)*. in *Congresso Nacional de Botânica. Anais, Viçosa: UFV*. 2004.
200. Sandegren, L.,D.I. Andersson, *Bacterial gene amplification: implications for the evolution of antibiotic resistance*, Nature Reviews Microbiology, 2009, 7, 8, 578-588.
201. Mondin, M., R.R. Latado,F.d.A.A. Mourão Filho, *In vitro induction and regeneration of tetraploids and mixoploids of two cassava cultivars*, Crop Breeding and Applied Biotechnology, 2018, 18, 176-183.
202. Nhut, D.T., N.P. Huy, N.T. Tai, N.B. Nam, V.Q. Luan, V.T. Hien, H.T. Tung, B.T. Vinh,T.C. Luan, *Light-emitting diodes and their potential in callus growth, plantlet development and saponin accumulation during somatic embryogenesis of Panax vietnamensis Ha et Grushv*, Biotechnology & Biotechnological Equipment, 2015, 29, 2, 299-308.
203. Eeckhaut, T.G., S.P. Werbrouck, L.W. Leus, E.J. Van Bockstaele,P.C. Debergh, *Chemically induced polyploidization in Spathiphyllum wallisii Regel through somatic embryogenesis*, Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2004, 78, 3, 241-246.
204. Te-chato, S.S.S., *Ploidy induction through secondary somatic embryo (SSE) of oil palm by colchicine treatment*, Journal of Agricultural Technology, 2012, 8, 1, 337-352.

205. Wang, X., Z.-M. Cheng, S. Zhi, F. Xu, *Breeding triploid plants: a review*, Czech Journal of Genetics and Plant Breeding, 2016, 52, 2, 41-54.
206. Yan, X., J. Zhang, H. Zhang, *Induction and characterization of tetraploids in poplar*, Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 2021, 146, 1, 185-189.
207. Bhusare, B., C. John, V. Bhatt, T. Nikam, *Colchicine induces tetraploids in in vitro cultures of Digitalis lanata Ehrh.: Enhanced production of biomass and cardiac glycosides*, Industrial Crops and Products, 2021, 174, 114-167.