

**BỘ GIÁO DỤC  
VÀ ĐÀO TẠO**

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

**HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ**

---



**Trương Thị Lan Anh**

**NGHIÊN CỨU QUÁ TRÌNH  
PHÁT SINH PHÔI SOMA SÂM LANG BIAN  
(*Panax vietnamensis* var. *langbianensis*)**

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

**Mã số: 9 42 01 12**

***Hà Nội - 2024***

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

Người hướng dẫn khoa học:

1. Người hướng dẫn 1: GS.TS. Dương Tấn Nhựt, Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên
2. Người hướng dẫn 2: PGS.TS. Nguyễn Phương Thảo, Trường Đại học Quốc Tế - Đại học Quốc gia TP.HCM

Phản biện 1: PGS.TS. Nguyễn Du Sanh

Phản biện 2: PGS.TS. Nguyễn Vũ Phong

Phản biện 3: PGS.TS. Hoàng Thị Kim Hồng

Luận án được bảo vệ trước Hội đồng đánh giá luận án tiến sĩ cấp Học viện họp tại Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam vào hồi 14 giờ ngày 23 tháng 08 năm 2024

Có thể tìm hiểu luận án tại:

1. Thư viện Học viện Khoa học và Công nghệ
2. Thư viện Quốc gia Việt Nam

## DANH MỤC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. **Truong Thi Lan Anh**, Hoang Thanh Tung, Hoang Dac Khai, Nguyen Thi Nhu Mai, Vu Quoc Luan, Do Manh Cuong, Hoang Thi Nhu Phuong, Le Thi Diem, Nguyen Quang Vinh, Doan Manh Dung, Bui Van The Vinh, Nguyen Phuong Thao, Duong Tan Nhut, Micropropagation of Lang Bian ginseng: an endemic medicinal plant. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2022, 151(3), 565-578. <https://doi.org/10.1007/s11240-022-02372-8>

2. **Truong Thi Lan Anh**, Nguyen Thi Nhu Mai, Hoang Thanh Tung, Hoang Dac Khai, Do Manh Cuong, Vu Quoc Luan, Hoang Thi Nhu Phuong, Nguyen Van Binh, Bui Van The Vinh, Nguyen Thi Thanh Thuy, Nguyen Phuong Thao, Duong Tan Nhut, Effect of spermidine, glutamine, and proline on somatic embryogenesis and silver nanoparticles supplied culture improved rhizome formation of *Panax vietnamensis* var. *langbianensis*. *South African Journal of Botany*, 2023, 163, 226-236. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2023.10.032>.

## MỞ ĐẦU

Chi sâm (*Panax*) là một trong những chi thực vật làm thuốc đông dược quan trọng, nhờ có các loại ginsenoside với nhiều hoạt tính sinh học và giá trị dược dụng cao, có tác dụng làm giảm bớt stress và mệt mỏi, ngăn ngừa lão hóa và tăng cường sinh lực. Hiện nay, Chi sâm có khoảng 20 loài và dưới loài, phân bố ở Đông Á, vùng Himalaya, Đông Nam Á và Bắc Mỹ.

Hiện nay, việc chăm sóc sức khỏe bằng cách sử dụng các dạng thực phẩm có nguồn gốc thảo dược rất được quan tâm. Tuy nhiên, nguồn dược liệu quý này ngoài tự nhiên rất ít, bởi lạm dụng khai thác quá mức dẫn đến bị đe dọa, và rất nhiều trong số đó mất dần khu phân bố, dẫn đến sẽ bị tuyệt chủng trong tương lai không xa. Ngoài ra, việc nhân giống các cây dược liệu ngoài tự nhiên mất rất nhiều thời gian và phụ thuộc vào các điều kiện tự nhiên, do đó không ổn định về mặt số lượng. Vì vậy, cần phải tìm ra một giải pháp về công tác nhân giống nhanh chóng, tạo ra số lượng lớn, và hiệu quả cho những loài dược liệu quý.

Vi nhân giống, trong đó nuôi cấy phôi soma là phương pháp được sử dụng thay thế phương thức nhân giống truyền thống vốn còn nhiều hạn chế vì chúng cung cấp một số lượng cây giống lớn trong thời gian ngắn mà vẫn giữ được những đặc tính tốt từ cây mẹ. Phương pháp này đã thực hiện rất thành công trên một số loài thuộc chi *Panax*, như: *Panax ginseng*, *Panax notoginseng*, *Panax quinquefolius*, *Panax japonicus*, *Panax vietnamensis*. Hiệu quả của quá trình nuôi cấy phôi soma phụ thuộc vào nhiều yếu tố như khử trùng mẫu cấy, loại mẫu, đối tượng thực vật, môi trường và điều kiện nuôi cấy. Ngoài ra, phôi soma sơ cấp tiếp tục được gia tăng sinh khối thông qua các chu kỳ hình thành phôi soma thứ cấp lặp lại, từ đó nâng cao hiệu quả của quá trình vi nhân giống. Bên cạnh đó, cây con được chuyển từ điều kiện *in vitro* ra *ex vitro* có tỷ lệ sống sót rất thấp do chúng có hệ rễ phát triển kém. Một số kết quả đạt được từ nghiên cứu hình thành các thân rễ/củ *in vitro* ở

*P. vietnamensis*, *P. ginseng* và *P. quinquefolius* và *P. ginseng* đã giúp cây thích nghi ở giai đoạn vườn ươm.

Ở Việt Nam, sâm Lang Bian (*Panax vietnamensis* var. *langbianensis*) là một thứ mới được phát hiện và công bố năm 2016, chỉ có phân bố ở vùng núi Langbian thuộc huyện Lạc Dương, tỉnh Lâm Đồng và Hòn Nga (Đam Rông). Sâm Lang Bian có kích thước quần thể nhỏ, số lượng cá thể ít và phân bố rải rác, đa dạng di truyền giảm. Nguyên nhân là do việc khai thác triệt để của người dân bản địa dùng làm thuốc và thương mại hóa. Do đó, việc bảo tồn và phát triển loài thực vật có giá trị và quý hiếm này cần được triển khai. Từ khi được phát hiện cho đến nay, chưa có tài liệu nào ghi nhận về vi nhân giống sâm Lang Bian.

Xuất phát từ những vấn đề trên, đề tài **Nghiên cứu quá trình phát sinh phôi soma sâm Lang Bian (*Panax vietnamensis* var. *langbianensis*)** được thực hiện thông qua việc nghiên cứu các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình phát sinh phôi soma cũng như sinh trưởng tiếp theo, và từ đó góp phần vi nhân giống sâm Lang Bian phục vụ cho công tác gây trồng, bảo tồn và phát triển.

#### **Mục tiêu của đề tài:**

Mục tiêu nghiên cứu của đề tài là xác định được một số yếu tố môi trường thích hợp cho quá trình phát sinh phôi soma sơ cấp và thứ cấp cũng như tạo được thân rễ sâm Lang Bian *in vitro* có tích lũy saponin, với các nội dung cụ thể như sau: (1) Tạo được nguồn mẫu *in vitro* ban đầu làm nguồn vật liệu cho những nghiên cứu phát sinh phôi soma. (2) Phát sinh và nhân nhanh phôi soma sơ cấp từ các mẫu cây lớp mỏng. (3) Phát sinh và nhân nhanh phôi soma thứ cấp từ nguồn phôi soma sơ cấp. (4) Tạo được thân rễ sâm Lang Bian *in vitro* có tích lũy saponin.

**Những đóng góp mới của luận án:** (1) Đề tài đã sử dụng AgNPs khử trùng mẫu thân rễ sâm Lang Bian để tạo nguồn mẫu ban đầu cho nghiên cứu quá trình phát sinh phôi soma sâm Lang Bian *in vitro*. AgNP làm giảm hoặc

loại bỏ nguồn gây nhiễm thân rễ sâm Lang Bian và ảnh hưởng tích cực đến quá trình phát sinh phôi soma của mẫu cây. (2) Đề tài đánh giá được một số yếu tố tác động đến quá trình phát sinh phôi soma sơ cấp sử dụng kỹ thuật TCL. Phôi sơ cấp là nguồn vật liệu sử dụng cho phát sinh phôi thứ cấp nhằm nâng cao hiệu quả của quá trình nhân giống. (3) Đề tài đã tạo được cây con có nguồn gốc từ phôi soma thứ cấp với sự hình thành thân rễ và tích lũy saponin *in vitro*, từ đó, có thể chủ động được nguồn cây giống phục vụ cho công tác bảo tồn và phát triển.

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

## CHƯƠNG 1 TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

Nội dung phần tổng quan tài liệu bao gồm: (1) Tổng quan về chi *Panax* và *Panax vietnamensis* var *langbianensis*; (2) Sự phát sinh phôi soma sơ cấp và thứ cấp; (3) Kỹ thuật lớp tế bào mỏng (TCL); (4) Vai trò của nano bạc trong khử trùng và phát sinh hình thái.

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

### 2.1. Vật liệu nghiên cứu

Trong nội dung 1, mẫu thân rễ của cây sâm Lang Bian được thu thập từ vùng núi Lang Bian (Lâm Đồng, Việt Nam) được sử dụng làm nguồn vật liệu ban đầu. Trong nội dung 2, các mẫu lá, cuống lá của cây sâm Lang Bian *in vitro* 12 tuần tuổi được sử dụng để bố trí các thí nghiệm phát sinh hình thái, tạo phôi soma sơ cấp. Trong nội dung 3, các phôi soma dạng hình thủy lôi được sử dụng để bố trí các thí nghiệm phát sinh phôi soma thứ cấp. Trong nội dung 4, các phôi soma dạng lá mầm được sử dụng bố trí các thí nghiệm tạo cây hoàn chỉnh *in vitro*. Các mẫu cây trong từng thí nghiệm được mô tả cụ thể trong phần phương pháp nghiên cứu.

## 2.2. Nội dung nghiên cứu

**Nội dung 1:** Tạo nguồn mẫu *in vitro*.

**Nội dung 2:** Phát sinh phôi soma sơ cấp thông qua nuôi cấy TCL

**Nội dung 3:** Phát sinh phôi soma thứ cấp

**Nội dung 4:** Tạo cây sâm từ phôi soma thứ cấp và xác định hàm lượng saponin tích lũy trong cây sâm Lang Bian *in vitro*

## 2.3. Phương pháp nghiên cứu

### 2.3.1. Phương pháp bố trí thí nghiệm

#### 2.3.1.1. Nội dung 1: Tạo nguồn mẫu *in vitro*

• **Thí nghiệm 1:** Nghiên cứu ảnh hưởng của AgNPs trong khử trùng bề mặt mẫu thân rễ và sinh trưởng tiếp theo

Mẫu thân rễ được xử lý sơ bộ và khử trùng bằng AgNPs ở các nồng độ (0,075; 0,100; 0,125; 0,150 và 0,200%) trong 30 phút. Tiếp theo đó, mẫu cấy được cắt thành những mẫu kích thước 0,5 cm × 0,5 cm; độ dày 0,1 cm và cấy trên môi trường MS bổ sung 1 mg/L 2,4-D; 0,2 mg/L TDZ, 30 g/L sucrose, 8,0 g/L agar. Những cụm mô sẹo 8 tuần tuổi có nguồn gốc từ mẫu thân rễ khử trùng bề mặt với AgNPs cắt thành những mẫu kích thước 0,5 cm × 0,5 cm và cấy chuyển sang môi trường SH bổ sung 2,0 mg/L BA, 50 g/L sucrose để nghiên cứu sự hình thành chồi bất định

• **Thí nghiệm 2:** Nghiên cứu ảnh hưởng của cytokinin đến sự nhân nhanh chồi *in vitro*

Các chồi sâm Lang Bian *in vitro* (1 cm) được cấy trong môi trường SH có bổ sung BA (0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 mg/L) hoặc kinetin (0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 mg/L) để nghiên cứu sự nhân nhanh chồi.

#### 2.3.1.2. Nội dung 2: Phát sinh phôi soma thông qua nuôi cấy TCL

• **Thí nghiệm 3:** Nghiên cứu ảnh hưởng của auxin đến sự phát sinh phôi soma sơ cấp từ các mẫu L-tTCL hoặc P-ITCL

Mẫu L-tTCL hoặc P-ITCL được thu nhận từ chồi sâm Lang bian *in vitro* 12 tuần tuổi có nguồn gốc từ mẫu thân rễ. Mỗi chồi sâm Lang Bian gồm

có 5 mẫu lá (5 mm x 10 mm: rộng x dài) và 1 cuống lá (1 mm x 30 mm: dày x dài). Mỗi mẫu lá (L) được cắt lớp mỏng theo chiều ngang thành 10 mẫu L-tTCL (kích thước: 1 mm x 5 mm). Mẫu cuống lá được cắt thành 3 mẫu (kích thước 1 mm x 10 mm). Sau đó, mỗi mẫu cuống lá (P) được cắt lớp mỏng theo chiều dọc (P-ITCL) thành 2 mẫu (kích thước P-ITCL: 0,5 mm x 10 mm).

Các mẫu L-tTCL hoặc P-ITCL được cấy trong môi trường MS bổ sung 30 g/L sucrose và 8,0 g/L agar và 2,4-D (0,5; 1,0; 1,5; 2,0 mg/L) hoặc NAA hoặc IBA (1,0; 3,0; 5,0; 7,0; 9,0 mg/L) để nghiên cứu sự phát sinh phôi soma sơ cấp.

• **Thí nghiệm 4:** Nghiên cứu ảnh hưởng của proline, glutamine hoặc spermidine đến sự phát sinh phôi soma sơ cấp từ các mẫu L-tTCL và P-ITCL

Các mẫu L-tTCL hoặc P-ITCL được cấy tương tự thí nghiệm 3, sau đó, cấy trên môi trường MS bổ sung chất điều hòa sinh trưởng thực vật ở nồng độ thích hợp nhất ghi nhận được từ thí nghiệm 3 kết hợp với proline (100; 200; 300; 400 mg/L) hoặc glutamine (146; 438; 730; 1022 mg/L) hoặc spermidine (1,5; 7,5; 15 và 30 mg/L) để nghiên cứu sự phát sinh phôi soma sơ cấp.

### 2.3.1.3. Nội dung 3: Phát sinh phôi soma thứ cấp

• **Thí nghiệm 5:** Nghiên cứu ảnh hưởng của môi trường khoáng đến sự phát sinh phôi soma thứ cấp

Các phôi soma ở dạng thủy lôi (1,5 mm) được nuôi cấy trên các môi trường khoáng SH; MS; ½ MS; WPM và Gamborg B5 bổ sung 1,0 mg/L 2,4-D, 30 g/L sucrose và 8,0 g/L agar để nghiên cứu sự phát sinh phôi soma thứ cấp.

• **Thí nghiệm 6:** Nghiên cứu ảnh hưởng của hàm lượng đường đến sự phát sinh phôi soma thứ cấp

Các phôi soma ở dạng thủy lôi (1,5 mm) được nuôi cấy trên các môi trường khoáng tốt nhất thu được từ thí nghiệm 5 có bổ sung bổ sung 1,0 mg/L



2,4-D, 8,0 g/L agar và đường sucrose ở các hàm lượng (0; 10; 20; 30; 40; 50 g/L).

• **Thí nghiệm 7:** Nghiên cứu ảnh hưởng của hàm lượng nước dừa đến sự phát sinh phôi soma thứ cấp

Các phôi soma ở dạng thủy lôi (1,5 mm) được nuôi cấy trên các môi trường khoáng tốt nhất thu được từ thí nghiệm 5, đường sucrose ở hàm lượng tốt nhất thu được từ thí nghiệm 6, bổ sung 1,0 mg/L 2,4-D, 8,0 g/L agar, và hàm lượng nước dừa (0; 5; 10; 15; 20; 30 %).

*2.3.1.4. Nội dung 4: Tạo cây sâm từ phôi soma thứ cấp và xác định hàm lượng saponin tích lũy trong cây sâm Lang Bian in vitro*

• **Thí nghiệm 8:** Tạo cây sâm từ phôi soma thứ cấp và xác định hàm lượng saponin tích lũy trong cây sâm Lang Bian *in vitro*

Phôi soma thứ cấp ở giai đoạn có lá mầm (1,5 mm) và chồi bất định (1,5 cm) được nuôi trong môi trường SH bổ sung 0,5 mg/L BA, 0,5 mg/L NAA, 30 g/L sucrose, 1,0 g/L than hoạt tính và 8,0 g/L agar để nghiên cứu sự sinh trưởng và tạo thân rễ/rễ bất định.

• **Thí nghiệm 9:** Sự sinh trưởng tiếp theo của phôi soma sâm Lang Bian trong môi trường có AgNPs

Phôi soma thứ cấp ở dạng cây mầm (1,5 cm) được nuôi cấy trong môi trường SH có bổ sung 0,5 mg/L BA, 0,5 mg/L NAA, 30 g/L sucrose, 1,0 g/L than hoạt tính 8,0 g/L agar và 1,2 mg/L AgNPs để nghiên cứu khả năng tăng trưởng và tạo thân rễ. Môi trường tương tự nhưng không bổ sung AgNPs được sử dụng làm đối chứng.

## **2.4. Quan sát hình thái giải phẫu**

Các mẫu phôi soma ở các giai đoạn phát triển khác nhau được cắt, nhuộm màu và quan sát trên kính hiển vi quang học theo phương pháp của Peterson (2008).

## **2.5. Xác định các chỉ tiêu theo dõi**

*2.5.1. Xác định các chỉ tiêu phát sinh hình thái và tăng trưởng*

### **2.5.2. Xác định hoạt tính enzyme chống oxy hóa bằng phương pháp quang phổ tử ngoại khả kiến (UV-vis)**

Hoạt tính enzyme chống oxy hóa (SOD, CAT và APX) được xác định sau 12 tuần nuôi cấy.

### **2.5.3. Định lượng hormone nội sinh bằng sắc ký lỏng siêu hiệu năng**

Hàm lượng các hormone (ZEA, kinetin, 2iP, mT, IAA, GA<sub>3</sub>, ABA, SA và MEL) của mẫu lá, cuống lá, mầm lá, cuống lá trong giai đoạn cảm ứng, mô sẹo có khả năng phát sinh phôi soma, phôi soma hình cầu, phôi soma có lá mầm được xác định bằng phương pháp UHPLC-UV.

### **2.5.4. Xác định hàm lượng một số saponin trong thân rễ và rễ bất định của cây sâm Lang Bian in vitro**

Rễ bất định và thân rễ của cây con 20 tuần tuổi được sử dụng để xác định hàm lượng saponin.

## **2.6. Điều kiện nuôi cấy**

Tất cả các thí nghiệm được bố trí ngẫu nhiên với 5 lần lặp lại, 30 mẫu cho mỗi nghiệm thức. Các mẫu L-tTCL, P-ITCL, phôi soma được đặt trong điều kiện tối hoàn toàn, độ ẩm 55 – 60 %. Các mẫu chồi được đặt trong phòng nuôi với nhiệt độ phòng  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , độ ẩm 55 – 60 %, quang chu kỳ 16 giờ/ngày, cường độ ánh sáng  $40 - 45 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ .

## **2.7. Xử lý số liệu**

Sử dụng phần mềm Excel 2010 để phân tích và tổng hợp các số liệu thô thu thập được từ các thí nghiệm. Sử dụng phần mềm phân tích thống kê SPSS 16.0 để xử lý các số liệu thu được, thực hiện phân tích ANOVA một yếu tố và áp dụng kiểm định Duncan (Duncan's Multiple Range Test) với  $p < 0,05$ . Ngoại trừ thí nghiệm 8 và thí nghiệm 9 áp dụng kiểm định T-test.

## CHƯƠNG 3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1. Nội dung 1: Nghiên cứu tạo nguồn mẫu ban đầu

#### 3.1.1. Ảnh hưởng của AgNPs trong khử trùng bề mặt mẫu thân rễ và sinh trưởng tiếp theo

Kết quả ghi nhận cho thấy rằng AgNPs có hiệu quả trong việc khử trùng bề mặt mẫu cây và kích thích sự hình thành mô sẹo sau thời gian 8 tuần nuôi cấy. Khi nồng độ AgNPs tăng từ 0,075% lên đến 0,200%, tỷ lệ mẫu nhiễm giảm từ 76,00% xuống còn 25,33%, trong khi tỷ lệ mẫu bị hoại tử tăng từ 1,33% lên 58,67% sau 2 tuần nuôi cấy. Sau 8 tuần nuôi cấy, các mẫu được xử lý bề mặt bằng AgNPs đều thể hiện sự cảm ứng mô sẹo, và tỷ lệ cảm ứng mô sẹo đạt cao nhất là 49,33% đối với mẫu cây được xử lý bề mặt với 0,150% AgNPs (Bảng 3.1).

**Bảng 3.1.** Ảnh hưởng của AgNPs đến khả năng khử trùng bề mặt và cảm ứng tạo mô sẹo của mẫu thân rễ sâm Lang Bian sau 8 tuần nuôi cấy

Nồng độ AgNPs (%)	Tỷ lệ mẫu nhiễm (%) sau 2 tuần nuôi cấy	Tỷ lệ mẫu hoại tử (%) sau 2 tuần nuôi cấy	Tỷ lệ mẫu sống sót và cảm ứng tạo mô sẹo (%) sau 8 tuần nuôi cấy
0,075	76,00 ± 7,61 <sup>a</sup>	1,34 ± 1,23 <sup>c</sup>	22,66 ± 8,96 <sup>c</sup>
0,100	62,67 ± 8,96 <sup>b</sup>	2,68 ± 1,64 <sup>c</sup>	34,68 ± 8,69 <sup>b</sup>
0,125	54,67 ± 3,00 <sup>b</sup>	6,68 ± 4,70 <sup>c</sup>	38,66 ± 5,60 <sup>b</sup>
0,150	36,00 ± 5,95 <sup>c</sup>	14,68 ± 8,69 <sup>b</sup>	49,34 ± 7,59 <sup>a</sup>
0,200	25,33 ± 5,57 <sup>d</sup>	58,68 ± 7,30 <sup>a</sup>	16,00 ± 3,70 <sup>c</sup>

Ghi chú: Các chữ cái khác nhau (a, b, ...) trên cùng một cột chỉ sự sai khác có ý nghĩa thống kê của các giá trị trung bình với  $p < 0,05$  (Duncan's test)

Mô sẹo có nguồn gốc từ thân rễ được khử trùng trong 0,150% AgNP cho tỷ lệ tái sinh chồi cao hơn khoảng 4 lần so với 0,200% AgNP thể hiện

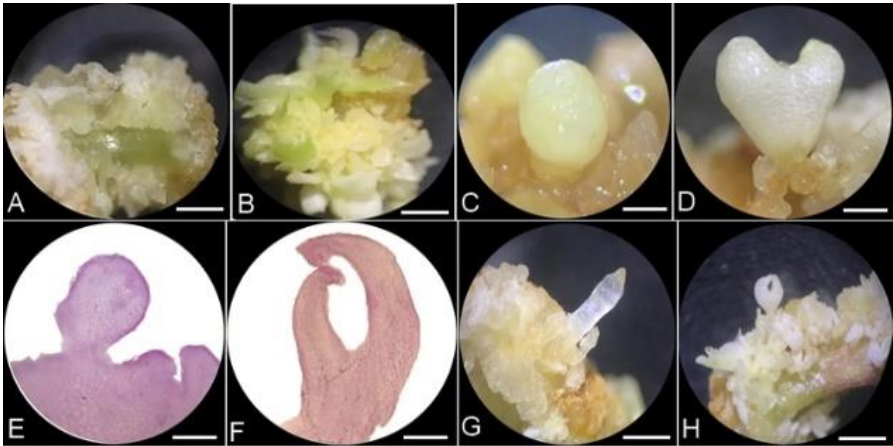
qua tỷ lệ mẫu tái sinh chồi (45,33% so với 12,00%) và số chồi (5,20 chồi so với 1,20 chồi tương ứng) sau 12 tuần nuôi cấy. Như vậy, 0,150 % AgNPs không những cho hiệu quả khử trùng mẫu cao mà còn có tác dụng kích thích mẫu cấy tái sinh chồi bất định.

### **3.1.2. Ảnh hưởng của cytokinin đến khả năng nhân nhanh chồi sâm Lang Bian**

Kết quả nghiên cứu cho thấy BA và kinetin có tác động rõ rệt đến sự nhân nhanh chồi sâm Lang Bian. Trong môi trường đối chứng không ghi nhận được sự xuất hiện của các chồi mới. BA ở nồng độ 1,0 mg/L kích thích sự nhân nhanh chồi sâm Lang Bian tốt nhất, chồi sinh trưởng tốt, xanh khỏe.

## **3.2. Nội dung 2: Phát sinh phôi soma sơ cấp thông qua nuôi cấy TCL**

### **3.2.1. Ảnh hưởng của auxin đến sự phát sinh phôi soma sơ cấp từ các mẫu L-tTCL hoặc P-ITCL**



**Hình 3.4.** Quan sát hình thái và giải phẫu trong quá trình phát sinh phôi soma sơ cấp sâm Lang Bian. A. Mô sẹo có khả năng sinh phôi. B. Sự phát sinh phôi soma từ mẫu cấy L-tTCL sau 12 tuần nuôi cấy. C. Phôi soma ở giai đoạn hình cầu. D. Phôi soma ở giai đoạn hình tim. E. Lát cắt dọc của phôi soma hình cầu phát sinh từ mô sẹo có khả năng phát sinh phôi. F. Lát cắt dọc của phôi soma có lá mầm. G. Sự hình thành rễ bất định. H. Sự phát sinh phôi soma sơ cấp từ mẫu cấy P-ITCL sau 12 tuần nuôi cấy (Thước đo: 3 mm – A; B; H; Thước đo: 1mm – C; D; E; F; G)

**Bảng 3.3.** So sánh hiệu quả phát sinh phôi soma sơ cấp từ mẫu L-tTCL trong môi trường có bổ sung auxin sau 12 tuần nuôi cấy

Auxin	Nồng độ (mg/L)	Mẫu phát sinh phôi soma (%)	Số phôi soma	GCF <sub>L-tTCL</sub>
<b>Đôi chứng</b>	0	-	-	-
<b>2,4-D</b>	0,5	19,99 ± 7,46 <sup>f</sup>	28,20 ± 1,79 <sup>e</sup>	5,63 ± 2,09 <sup>f</sup>
	1,0	56,66 ± 9,13 <sup>bc</sup>	35,20 ± 2,39 <sup>c</sup>	19,90 ± 3,06 <sup>c</sup>
	1,5	63,33 ± 7,45 <sup>b</sup>	40,40 ± 2,79 <sup>a</sup>	25,70 ± 4,25 <sup>b</sup>
	2,0	26,66 ± 9,13 <sup>ef</sup>	6,40 ± 1,14 <sup>i</sup>	1,70 ± 0,67 <sup>g</sup>
<b>NAA</b>	1,0	16,66 ± 0,00 <sup>f</sup>	13,40 ± 2,88 <sup>h</sup>	2,23 ± 0,48 <sup>g</sup>
	3,0	33,33 ± 0,00 <sup>de</sup>	30,80 ± 2,86 <sup>d</sup>	10,27 ± 0,95 <sup>e</sup>
	5,0	80,00 ± 7,46 <sup>a</sup>	32,80 ± 1,92 <sup>cd</sup>	26,33 ± 3,66 <sup>b</sup>
	7,0	86,66 ± 7,46 <sup>a</sup>	37,80 ± 1,30 <sup>b</sup>	32,73 ± 2,59 <sup>a</sup>
	9,0	-	-	-
<b>IBA</b>	1,0	-	-	-
	3,0	13,33 ± 7,45 <sup>f</sup>	21,80 ± 3,27 <sup>g</sup>	2,80 ± 1,63 <sup>g</sup>
	5,0	30,00 ± 7,46 <sup>de</sup>	25,40 ± 1,82 <sup>f</sup>	7,63 ± 2,03 <sup>ef</sup>
	7,0	53,33 ± 7,45 <sup>c</sup>	31,00 ± 2,00 <sup>d</sup>	16,60 ± 3,13 <sup>d</sup>
	9,0	36,53 ± 7,53 <sup>d</sup>	26,80 ± 1,79 <sup>ef</sup>	9,80 ± 2,15 <sup>e</sup>

Ghi chú: Các chữ cái khác nhau (a, b, ...) trên cùng một cột chỉ sự sai khác có ý nghĩa thống kê của các giá trị trung bình với  $p < 0,05$  (Duncan's test)

Tỷ lệ mẫu phát sinh phôi soma (100%), số lượng phôi soma (51,80 phôi/mẫu) và GCF của mẫu P-ITCL (51,80) ở nghiệm thức bổ sung 1 mg/L 2,4-D cao hơn đáng kể so với nghiệm thức đối chứng và các nghiệm thức khác (Bảng 3.4).

**Bảng 3.4.** So sánh hiệu quả phát sinh phôi soma sơ cấp từ mẫu P-ITCL trong môi trường có bổ sung auxin sau 12 tuần nuôi cấy

Auxin	Nồng độ (mg/L)	Mẫu phát sinh phôi soma (%)	Số phôi soma	GCF P-ITCL
<b>Đối chứng</b>	0	16,70 ± 0,00 <sup>h</sup>	2,00 ± 0,71 <sup>h</sup>	0,33 ± 0,12 <sup>f</sup>
<b>2,4-D</b>	0,5	29,98 ± 7,42 <sup>gh</sup>	2,80 ± 0,84 <sup>h</sup>	0,83 ± 0,33 <sup>f</sup>
	1,0	100,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	51,80 ± 6,38 <sup>a</sup>	51,80 ± 6,38 <sup>a</sup>
	1,5	70,02 ± 7,42 <sup>cd</sup>	33,00 ± 2,00 <sup>d</sup>	23,16 ± 3,53 <sup>c</sup>
	2,0	53,34 ± 7,47 <sup>e</sup>	33,40 ± 5,46 <sup>d</sup>	17,87 ± 4,07 <sup>d</sup>
<b>NAA</b>	1,0	20,02 ± 7,42 <sup>gh</sup>	16,00 ± 2,65 <sup>g</sup>	3,30 ± 1,73 <sup>f</sup>
	3,0	63,33 ± 7,45 <sup>e</sup>	21,00 ± 2,35 <sup>f</sup>	13,33 ± 2,40 <sup>e</sup>
	5,0	89,98 ± 9,15 <sup>b</sup>	33,00 ± 1,58 <sup>d</sup>	29,80 ± 4,35 <sup>b</sup>
	7,0	60,02 ± 9,15 <sup>de</sup>	43,00 ± 3,74 <sup>b</sup>	25,57 ± 2,35 <sup>bc</sup>
	9,0	23,34 ± 9,09 <sup>gh</sup>	5,20 ± 1,79 <sup>h</sup>	1,20 ± 0,66 <sup>f</sup>
<b>IBA</b>	1,0	43,32 ± 9,15 <sup>f</sup>	21,40 ± 2,51 <sup>f</sup>	9,40 ± 2,80 <sup>e</sup>
	3,0	79,98 ± 7,42 <sup>c</sup>	28,40 ± 3,85 <sup>e</sup>	22,77 ± 4,12 <sup>c</sup>
	5,0	76,66 ± 9,09 <sup>c</sup>	38,00 ± 3,67 <sup>c</sup>	28,96 ± 2,86 <sup>b</sup>
	7,0	70,20 ± 7,42 <sup>cd</sup>	40,40 ± 3,21 <sup>bc</sup>	28,23 ± 3,16 <sup>b</sup>
	9,0	36,64 ± 7,47 <sup>fg</sup>	29,80 ± 1,52 <sup>de</sup>	10,93 ± 2,29 <sup>e</sup>

Ghi chú: Các chữ cái khác nhau (a, b, ...) trên cùng một cột chỉ sự sai khác có ý nghĩa thống kê của các giá trị trung bình với  $p < 0,05$  (Duncan's test)

Ngoài ra, auxin còn ảnh hưởng đến hệ số hiệu chỉnh tăng trưởng của hai loại mẫu cây lá (L-tTCL) và cuống lá (P-ITCL), đạt giá trị cao nhất trong môi trường có bổ sung 7 mg/L NAA (1636,62). Tổng hệ số hiệu chỉnh tăng trưởng thu được từ một chồi sâm Lang Bian, bao gồm L-tTCL (th nghiệm thức

bổ sung 7 mg/L NAA) và P-ITCL (thí nghiệm thức bổ sung 1 mg/L 2,4-D), đạt được cao nhất 1947,42 sau 12 tuần nuôi cấy

### **3.2.2. Ảnh hưởng của proline, glutamine hoặc spermidine đến sự phát sinh phôi soma sơ cấp từ các mẫu L-tTCL hoặc P-ITCL**

#### **3.2.2.1. Ảnh hưởng của glutamine, proline hoặc spermidine đến sự phát sinh phôi soma sơ cấp từ mẫu L-tTCL in vitro**

Ảnh hưởng của glutamine, proline và spermidine đối với sự phát sinh phôi soma sơ cấp từ các mẫu L-tTCL sau 12 tuần nuôi cấy được ghi nhận trong Bảng 3.6 và Hình 3.5.

Kết quả cho thấy việc bổ sung 146 mg/L glutamine hiệu quả cho sự phát sinh phôi soma cao hơn so với thí nghiệm thức đối chứng và các thí nghiệm thức khác. Tuy nhiên, glutamine ở nồng độ cao hơn (730 và 1022 mg/L) làm giảm dần hiệu quả phát sinh phôi soma. Bên cạnh đó, ở thí nghiệm thức đối chứng ghi nhận chủ yếu mô sẹo và phôi soma hình cầu; trong khi đó, phôi soma hình thủy lôi, là nguồn nguyên liệu thiết yếu cho các nghiên cứu về phát sinh phôi soma thứ cấp, được hình thành trên môi trường bổ sung glutamine. Trong các thí nghiệm thức bổ sung proline, sự phát sinh phôi soma từ các mẫu L-tTCL không có sự cải thiện đáng kể.

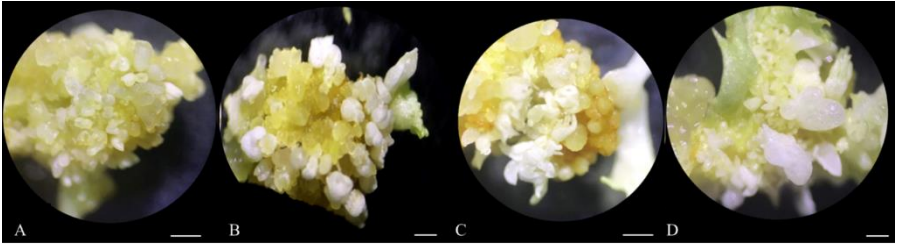
Bên cạnh đó, spermidine ở nồng độ thấp (1,5 - 7,5 mg/L) có tác dụng tích cực đối với sự phát sinh phôi soma từ mẫu L-tTCL, trong khi nồng độ cao lại ức chế hình thành phôi soma (Bảng 3.6). Sự phát sinh phôi soma tốt nhất ở thí nghiệm thức 1,5 mg/L spermidine (93,32% và 54,20 phôi/mẫu), phôi soma chủ yếu ở giai đoạn thủy lôi và lá mầm (Hình 3.5). Hệ số hiệu chỉnh tăng trưởng cũng cho kết quả tương tự, GCF cao nhất thu được ở thí nghiệm thức bổ sung 1,5 mg/L spermidine.

**Bảng 3.6.** So sánh hiệu quả phát sinh phôi soma sơ cấp từ mẫu cây L-tTCL nuôi cấy trong môi trường có bổ sung glutamine, proline hoặc spermidine sau 12 tuần nuôi cấy

Nghiệm thức	Nồng độ (mg/L)	Tỷ lệ mẫu phát sinh phôi soma (%)	Số phôi soma (Phôi/ mẫu)	Hình thái phôi soma
Đối chứng	0	76,68 ± 14,88 <sup>b</sup>	33,40 ± 4,67 <sup>c</sup>	Hình cầu
Glutamine	146	83,34 ± 16,65 <sup>ab</sup>	52,20 ± 5,26 <sup>a</sup>	Hình cầu, tim và thủy lồi
	438	83,32 ± 11,77 <sup>ab</sup>	22,60 ± 4,67 <sup>d</sup>	
	730	60,02 ± 9,15 <sup>c</sup>	12,60 ± 2,07 <sup>ef</sup>	
	1022	56,68 ± 9,15 <sup>cd</sup>	10,40 ± 2,07 <sup>ef</sup>	
	100	53,34 ± 7,47 <sup>cd</sup>	21,00 ± 4,06 <sup>d</sup>	
Proline	200	29,98 ± 7,42 <sup>e</sup>	14,60 ± 3,65 <sup>e</sup>	-
	300	0,00 ± 0,00 <sup>f</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>g</sup>	
	400	0,00 ± 0,00 <sup>f</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>g</sup>	
	1,5	93,32 ± 9,15 <sup>a</sup>	54,20 ± 4,44 <sup>a</sup>	
Spermidine	7,5	80,00 ± 13,92 <sup>ab</sup>	38,60 ± 3,43 <sup>b</sup>	Hình cầu, tim, thủy lồi và cây mầm
	15	60,02 ± 9,15 <sup>c</sup>	8,60 ± 1,14 <sup>f</sup>	
	30	43,32 ± 14,94 <sup>de</sup>	3,40 ± 0,89 <sup>g</sup>	

Ghi chú: Các chữ cái khác nhau (a, b, ...) trên cùng một cột chỉ sự sai khác có ý nghĩa thống kê của các giá trị trung bình với  $p < 0,05$  (Duncan's test)

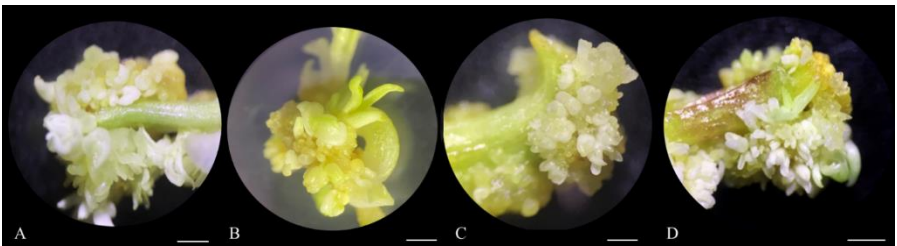




**Hình 3.5.** Phôi soma sơ cấp phát sinh từ mẫu L-tTCL sâm Lang Bian sau 12 tuần nuôi cấy (Thước đo: 1 mm). A. Đối chứng; B. 146 mg/L glutamine; C. 100 mg/L proline; D. 1,5 mg/L spermidine

### 3.2.2.2. Ảnh hưởng của glutamine, proline hoặc spermidine đến sự phát sinh phôi soma sơ cấp từ mẫu P-ITCL *in vitro*

Đối với các mẫu P-ITCL, việc bổ sung glutamine và proline không có hiệu quả tích cực trong sự phát sinh phôi soma sơ cấp. Tỷ lệ mẫu phát sinh phôi soma (96,66%) cũng như số lượng phôi soma hình thành (68,80 phôi/mẫu) cao nhất được ghi nhận khi mẫu P-ITCL được cấy trên môi trường bổ sung 1,5 mg/L spermidine (Bảng 3.7, Hình 3.6). Tương tự mẫu L-tTCL, P-ITCL cho khả năng tạo phôi soma thấp nhất khi tăng nồng độ spermidine bổ sung lên đến 30 mg/L. Bên cạnh đó, hệ số hiệu chỉnh tăng trưởng cũng cho kết quả tương tự, GCF cao nhất thu được ở nghiệm thức bổ sung 1,5 mg/L spermidine.



**Hình 3.6.** Phôi soma sơ cấp phát sinh từ mẫu P-ITCL sâm Lang Bian sau 12 tuần nuôi cấy (Thước đo: 1 mm) A. Đối chứng; B. 146 mg/L glutamine; C. 100 mg/L proline; D. 1,5 mg/L spermidine

**Bảng 3.7.** So sánh hiệu quả phát sinh phôi soma sơ cấp từ mẫu P-ITCL nuôi cấy trong môi trường có bổ sung glutamine, proline hoặc spermidine sau 12 tuần nuôi cấy

<b>Nghiệm thức</b>	<b>Nồng độ (mg/L)</b>	<b>Tỷ lệ mẫu phát sinh phôi soma (%)</b>	<b>Số phôi soma (Phôi/mẫu)</b>	<b>Hình thái phôi soma</b>
Đối chứng	0	93,32 ± 9,15 <sup>a</sup>	54,20 ± 4,27 <sup>b</sup>	Hình cầu
Glutamine	146	73,34 ± 9,09 <sup>c</sup>	35,00 ± 5,48 <sup>d</sup>	Hình cầu, tim, thủy lồi
	438	63,36 ± 7,47 <sup>cd</sup>	34,60 ± 4,22 <sup>d</sup>	
	730	53,34 ± 7,47 <sup>de</sup>	23,00 ± 8,37 <sup>e</sup>	Hình cầu
	1022	43,32 ± 9,15 <sup>e</sup>	18,20 ± 5,07 <sup>ef</sup>	
Proline	100	79,98 ± 7,42 <sup>b</sup>	42,00 ± 8,60 <sup>c</sup>	Hình cầu, tim
	200	73,34 ± 9,09 <sup>c</sup>	29,80 ± 6,14 <sup>d</sup>	Hình cầu
	300	60,02 ± 9,15 <sup>d</sup>	19,60 ± 3,78 <sup>ef</sup>	
	400	56,68 ± 9,15 <sup>d</sup>	13,40 ± 4,22 <sup>f</sup>	
Spermidine	1,5	96,66 ± 7,47 <sup>a</sup>	68,80 ± 2,95 <sup>a</sup>	Hình cầu, tim, thủy lồi và cây mầm
	7,5	93,32 ± 9,15 <sup>a</sup>	60,40 ± 5,13 <sup>b</sup>	
	15	79,98 ± 7,42 <sup>b</sup>	46,40 ± 2,97 <sup>c</sup>	
	30	76,66 ± 9,09 <sup>b</sup>	15,20 ± 3,11 <sup>f</sup>	

Ghi chú: Các chữ cái khác nhau (a, b, ...) trên cùng một cột chỉ sự sai khác có ý nghĩa thống kê của các giá trị trung bình với  $p < 0,05$  (Duncan's test)

### 3.2.2.3. Ảnh hưởng của glutamine, proline hoặc spermidine đối với hoạt tính các enzyme chống oxy hóa

Đối với mẫu L-tTCL, hoạt tính của các enzyme chống oxy hóa (SOD, CAT và APX) trong nghiệm thức 1,5 mg/L spermidine cao hơn đáng kể so với nghiệm thức 146 mg/L glutamine và 100 mg/L proline. Hoạt tính của SOD và CAT trong nghiệm thức bổ sung 146 mg/L glutamine (186,89 U/g, 1145,52 U/g) và 100 mg/L proline (136,46 U/g; 930,22 U/g), thấp hơn nhiều so với nghiệm thức đối chứng (238,26 U/g), 1490,09 U/g); tuy nhiên, kết quả ngược lại đã được ghi nhận đối với hoạt tính APX, proline và glutamine cho hoạt tính APX cao hơn (Bảng 3.8).

**Bảng 3.8.** Ảnh hưởng của glutamine, proline hoặc spermidine đến hoạt tính SOD, CAT và APX trong mẫu L-tTCL sâm Lang Bian sau 12 tuần nuôi cấy

Nghiệm thức	SOD (U/g)	CAT (U/g)	APX (U/g)
Đối chứng	238,26 ± 3,68 <sup>b</sup>	1490,09 ± 7,35 <sup>b</sup>	0,26 ± 0,05 <sup>d</sup>
146 mg/L Glutamine	186,89 ± 1,47 <sup>c</sup>	1145,52 ± 3,41 <sup>c</sup>	2,65 ± 0,04 <sup>b</sup>
100 mg/L Proline	136,46 ± 1,27 <sup>d</sup>	930,22 ± 1,28 <sup>d</sup>	1,78 ± 0,04 <sup>c</sup>
1,5 mg/L Spermidine	355,10 ± 10,87 <sup>a</sup>	2047,87 ± 13,76 <sup>a</sup>	3,18 ± 0,15 <sup>a</sup>

Ghi chú: Các chữ cái khác nhau (a, b, ...) trên cùng một cột chỉ sự sai khác có ý nghĩa thống kê của các giá trị trung bình với  $p < 0,05$  (Duncan's test)

Trong các mẫu P-ITCL, việc bổ sung 1,5 mg/L spermidine cũng cho các giá trị SOD, CAT và APX cao nhất so với tất cả các nghiệm thức còn lại. Tuy nhiên, việc bổ sung proline hoặc glutamine có thể tăng cường hoạt tính của SOD và APX so với nghiệm thức đối chứng (Bảng 3.9).

**Bảng 3.9.** Ảnh hưởng của glutamine, proline hoặc spermidine đến hoạt tính SOD, CAT và APX trong mẫu P-ITCL sâm Lang Bian sau 12 tuần nuôi cấy

Nghiệm thức	SOD (U/g)	CAT (U/g)	APX (U/g)
Đôi chứng	120,56 ± 1,31 <sup>d</sup>	1004,57 ± 2,95 <sup>c</sup>	0,37 ± 0,02 <sup>d</sup>
146 mg/L Glutamine	181,60 ± 2,73 <sup>b</sup>	1183,11 ± 7,39 <sup>b</sup>	2,50 ± 0,05 <sup>b</sup>
100 mg/L Proline	151,81 ± 1,09 <sup>c</sup>	689,20 ± 6,68 <sup>d</sup>	1,64 ± 0,06 <sup>c</sup>
1,5 mg/L Spermidine	208,19 ± 2,16 <sup>a</sup>	1794,30 ± 16,20 <sup>a</sup>	2,87 ± 0,03 <sup>a</sup>

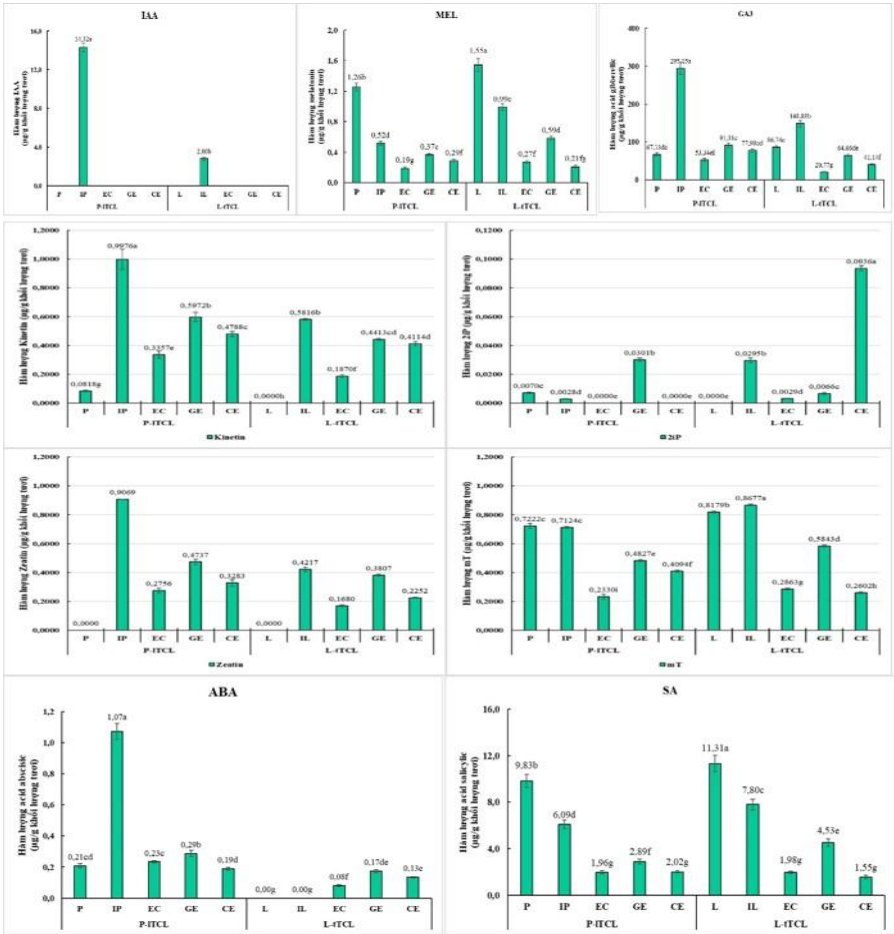
Ghi chú: Các chữ cái khác nhau (a, b, ...) trên cùng một cột chỉ sự sai khác có ý nghĩa thống kê của các giá trị trung bình với  $p < 0,05$  (Duncan's test)

#### 3.2.2.4. Sự biến động của các hormone nội sinh trong quá trình phát sinh phôi soma

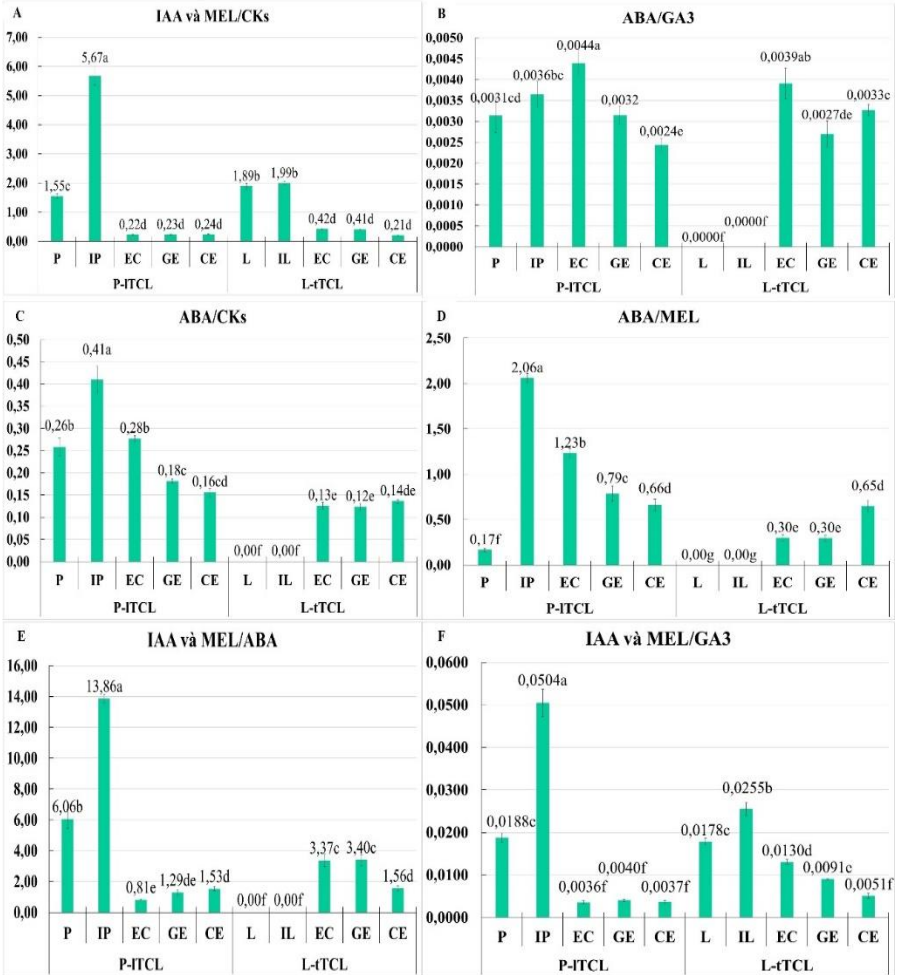
Sự khác biệt rõ rệt về hàm lượng hormone nội sinh đã được quan sát thấy ở các giai đoạn khác nhau của quá trình phát sinh phôi soma ở sâm Lang Bian (Hình 3.9). Nồng độ CK nội sinh (ZEA, 2iP, kinetin, mT), IAA và GA<sub>3</sub> cao nhất trong giai đoạn cảm ứng phát sinh phôi soma ở cả hai loại mẫu L-tTCL và P-ITCL. Trong khi đó, các hormone nội sinh còn lại (MEL, ABA và SA) không biểu hiện xu hướng biến động rõ ràng. Ngoài ra, IAA chỉ được phát hiện ở giai đoạn cảm ứng phát sinh phôi soma trong cả hai mẫu cấy. Đồng thời, sự hiện diện và nồng độ của các hormone nội sinh này cũng khác nhau giữa mẫu L-tTCL và P-ITCL. Tuy nhiên, sự biến động hàm lượng hormone nội sinh trong từng giai đoạn phát sinh phôi soma ở các mẫu L-tTCL và P-ITCL sâm Lang Bian nhìn chung tương tự nhau (ngoại trừ GA<sub>3</sub>).

Tùy thuộc vào loại mẫu cấy, tỷ lệ hormone nội sinh rất khác nhau trong quá trình phát sinh phôi soma (Hình 3.13). Tỷ lệ IAA và MEL/CK, ở cả hai loại mẫu cấy, đạt cao nhất ở giai đoạn cảm ứng, sau đó giảm mạnh ở giai

đoạn hình thành mô sẹo có khả năng phát sinh phôi soma và duy trì ổn định (tăng/giảm nhẹ) ở các giai đoạn phát sinh phôi soma còn lại.



**Hình 3.9.** Sự biến động hàm lượng IAA, melatonin, acid gibberellic, cytokinin, acid abscisic và acid salycilic trong quá trình phát sinh PSM sâm Lang Bian. L – Mẫu lá; P – Mẫu cuống lá; IP – Mẫu cuống lá trong giai đoạn cảm ứng; IL – Mẫu lá trong giai đoạn cảm ứng; EC – Mô sẹo có khả năng phát sinh phôi soma; GE – Phôi soma hình cầu; CE – Phôi soma có lá mầm.



**Hình 3.13.** Tỷ lệ hormone nội sinh của mẫu lá và cuống lá ở các giai đoạn khác nhau của quá trình phát sinh phôi soma sâm Lang Bian

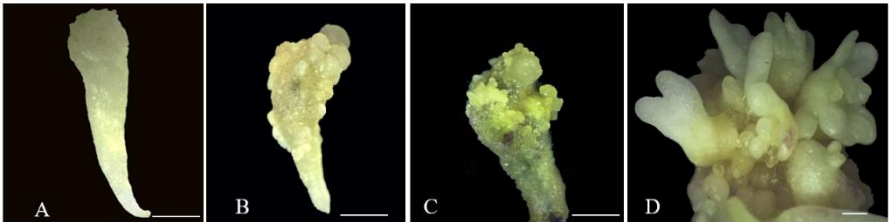
Trong khi đó, tỷ lệ ABA/GA<sub>3</sub> cao nhất ở giai đoạn hình thành mô sẹo có khả năng phát sinh phôi soma và giảm ở giai đoạn phôi soma hình cầu. Tuy nhiên, ở giai đoạn phôi soma có lá mầm, tỷ lệ này tiếp tục giảm đối với mẫu P-ITCL nhưng tăng lên đối với mẫu L-tTCL. Ngoài ra, trong giai đoạn cảm ứng, tỷ lệ ABA/GA<sub>3</sub> không được quan sát thấy trong mẫu L-tTCL.

Tỷ lệ ABA/CKs, ABA/MEL, IAA và MEL/ABA và IAA và MEL/ GA<sub>3</sub> tăng dần từ thời điểm nuôi cấy đến giai đoạn cảm ứng phát sinh phôi soma và giảm dần ở các giai đoạn tiếp theo đối với P-ITCL. Trong khi đó, tỷ lệ ABA/CKs và ABA/MEL tăng trong giai đoạn hình thành mô sẹo có khả năng phát sinh phôi soma, sau đó, ổn định hoặc tăng nhẹ, và tỷ lệ IAA và MEL/ABA và IAA và MEL/ GA<sub>3</sub> giảm trong các giai đoạn còn lại của quá trình phát sinh phôi soma đối với mẫu L-tTCL.

### 3.3. Nội dung 3: Sự phát sinh phôi soma thứ cấp

#### 3.3.1. Ảnh hưởng của hàm lượng khoáng đến sự phát sinh phôi soma thứ cấp

Số phôi soma thứ cấp (39,20 phôi/mẫu), khối lượng tươi (1005,34 mg) và khối lượng khô (77,90 mg) cao nhất và chủ yếu ở dạng có lá mầm được ghi nhận khi mẫu phôi soma sơ cấp nuôi cấy trên môi trường ½ MS sau 12 tuần nuôi cấy (Hình 3.14). Đây là dạng phôi soma phù hợp để tái sinh cây con hoàn chỉnh từ phôi soma khi chúng được cấy chuyển sang môi trường thích hợp.



**Hình 3.14.** Sự phát sinh phôi soma thứ cấp sâm Lang Bian. A. Phôi soma sơ cấp. B. Phôi soma thứ cấp ở giai đoạn hình cầu có nguồn gốc từ phôi soma sơ cấp. C. Sự tăng trưởng của phôi soma thứ cấp. D. Các giai đoạn phát triển của phôi soma thứ cấp. (Thước đo: 1 mm – A, B, C; Thước đo: 2 mm – D)

### **3.3.2. Ảnh hưởng của hàm lượng đường đến sự phát sinh phôi soma thứ cấp**

Số phôi soma thứ cấp/mẫu (47,40 phôi), khối lượng tươi (1062,29 mg) và khối lượng khô (82,77 mg) cao nhất được ghi nhận khi phôi soma được nuôi cấy trên môi trường có bổ sung 40 g/L đường sau 12 tuần nuôi cấy.

Ngoài ra, hàm lượng đường được bổ sung vào trong môi trường nuôi cấy ảnh hưởng rất lớn đến sự phát triển tiếp theo của phôi soma thứ cấp. Ở nghiệm thức đối chứng, phôi soma thứ cấp được hình thành chủ yếu dạng hình cầu và cần được phát triển qua các giai đoạn tiếp theo để tạo cây hoàn chỉnh. Trong khi đó, phôi soma thứ cấp được hình thành trong môi trường có bổ sung 40 g/L đường chủ yếu ở các giai đoạn hình thủy lồi và có lá mầm (79,48%).

### **3.3.3. Ảnh hưởng của hàm lượng nước dừa đến sự phát sinh phôi soma thứ cấp**

Sự phát sinh phôi soma tốt nhất ở nghiệm thức bổ sung 15% nước dừa và giảm ở nghiệm thức trên 20 – 30%. Phôi soma ở giai đoạn hình thủy lồi và có lá mầm chiếm tỷ lệ cao hơn so với giai đoạn hình cầu và tim ở các nghiệm thức bổ sung nước dừa.

## **3.4. Nội dung 4: Tạo cây từ phôi soma thứ cấp và tích lũy saponin ở cây sâm Lang Bian *in vitro***

### **3.4.1. Tạo cây từ phôi soma thứ cấp**

Các cây con hình thành từ phôi soma thứ cấp và chồi bất định sinh trưởng tốt, khỏe mạnh, lá có bản rộng, màu xanh đậm và không có sự bất thường về hình thái sau 20 tuần nuôi cấy. Cây con có nguồn gốc từ chồi hình thành rễ bất định, trong khi đó, cây con có nguồn gốc từ phôi soma thứ cấp hình thành thân củ và rễ bất định (Hình 3.18).





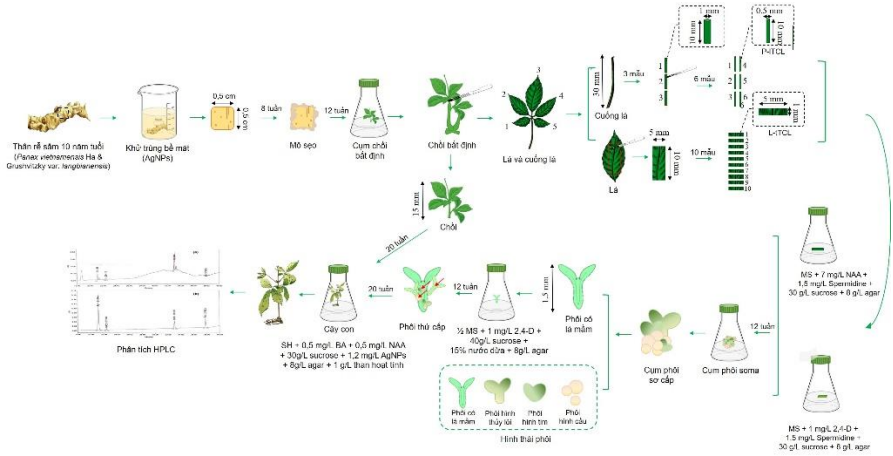
**Hình 3.18.** Sự hình thành thân rễ từ phôi soma thứ cấp sau 20 tuần nuôi cấy (Thước đo: 1 cm).

### **3.4.2. Xác định hàm lượng một số saponin trong thân rễ và rễ bất định của cây sâm Lang Bian *in vitro***

Kết quả phân tích saponin bằng phương pháp HPLC cho thấy mẫu rễ bất định và thân rễ sâm Lang Bian *in vitro* 20 tuần tuổi đều có sự hiện diện của Rg1, Rd và Rb1. Trong đó, hàm lượng Rg1, Rd, Rb1 và saponin tổng số ở thân rễ (703,38; 770,67; 174,81 và 1648,86  $\mu\text{g/g}$ ) cao hơn so với rễ bất định (325,79; 171,08; 4,78 và 501,65  $\mu\text{g/g}$ ).

### **3.4.3. Sự sinh trưởng tiếp theo của phôi soma sâm Lang Bian trong môi trường có bổ sung AgNPs**

Kết quả nghiên cứu cho thấy, AgNPs có tác động tích cực đến sự hình thành và sinh trưởng của thân rễ sâm Lang Bian. Phôi soma ở dạng có lá mầm được cấy chuyển sang môi trường SH có bổ sung 0,5 mg/L BA, 0,5 mg/L NAA, 30 g/L sucrose, 1,0 g/L than hoạt tính, 8 g/L agar và 1,2 mg/L AgNPs cho thấy tỷ lệ hình thành thân rễ được cải thiện so với đối chứng. Cây con có màu xanh đậm, cứng cáp và phát triển tốt.



**Hình 3.20.** Sơ đồ quá trình nuôi cấy mô thực vật sâm Lang Bian *in vitro*

## KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

### 1. Kết luận

#### Tạo nguồn mẫu *in vitro*

Hiệu quả khử trùng mẫu thân rễ tốt nhất trong dung dịch AgNPs ở nồng độ 0,15%. Các chồi bất định phát sinh từ mô sẹo có nguồn gốc từ mẫu thân rễ được nhân nhanh trong môi trường SH có bổ sung 1 mg/L BA, 30 g/L đường sucrose, 8,0 g/L agar.

#### Phát sinh hình thái thông qua nuôi cấy TCL

NAA hoặc 2,4-D có tác dụng tích cực đến sự phát sinh mô sẹo sơ cấp từ các mẫu TCL với nồng độ thích hợp nhất ghi nhận được lần lượt là 7,0 mg/L NAA (đối với mẫu L-tCL) hoặc 1,0 mg/L 2,4-D (đối với mẫu P-ITCL).

Glutamine, proline hoặc spermidine đều có ảnh hưởng đến quá trình phát sinh mô sẹo sơ cấp sâm Lang Bian. Trong đó, 1,5 mg/L spermidine cho hiệu quả phát sinh mô sẹo tốt nhất đối với cả hai loại mẫu L-tCL và P-ITCL thông qua việc tăng cường tổng hợp các enzym chống oxy hóa (APX,

CAT và SOD). Các hormone nội sinh trong từng giai đoạn của quá trình phát sinh phôi soma sơ cấp sâm Lang Bian có sự biến động. Hàm lượng CK nội sinh (ZEA, 2iP, kinetin, mT), IAA và GA<sub>3</sub> cao nhất trong giai đoạn cảm ứng phát sinh phôi soma sơ cấp ở cả hai loại mẫu cây L-tTCL và P-ITCL. IAA chỉ được phát hiện ở giai đoạn cảm ứng phát sinh phôi soma sơ cấp trong cả hai loại mẫu cây. Đồng thời, sự hiện diện và hàm lượng của các hormone nội sinh cũng khác nhau giữa mẫu L-tTCL và P-ITCL.

### ***Phát sinh phôi soma thứ cấp***

Phôi soma thứ cấp chủ yếu ở dạng có lá mầm được thu nhận từ nuôi cấy phôi soma sơ cấp dạng thủy lồi trên môi trường 1/2 MS bổ sung 1,0 mg/L 2,4-D, 40 g/L đường sucrose và 15 % nước dừa.

### ***Tạo cây sâm từ phôi soma thứ cấp và xác định hàm lượng saponin tích lũy trong cây sâm Lang Bian in vitro***

Cây con sâm Lang Bian có nguồn gốc từ phôi soma thứ cấp nuôi cấy trong môi trường SH có bổ sung 0,5 mg/L BA, 0,5 mg/L NAA, 30 g/L sucrose, 1,0 g/L than hoạt tính, 8,0 g/L agar và 1,2 mg/L AgNPs sinh trưởng khỏe mạnh, lá to, mở rộng, có hình thành thân rễ trong điều kiện *in vitro*. Ngoài ra, kết quả phân tích saponin cho thấy mẫu thân rễ sâm Lang Bian *in vitro* 20 tuần tuổi có sự hiện diện của saponin Rg1, Rd và Rb1.

## **2. Kiến nghị**

Nghiên cứu đã đưa ra được một số yếu tố ảnh hưởng đến phát sinh phôi sơ cấp, thứ cấp sâm Lang Bian; tuy nhiên, để làm rõ được tác động này cần phải tiếp tục nghiên cứu chuyên sâu những biến đổi sinh lý và biểu hiện của các gen liên quan.

Tiếp tục nghiên cứu đánh giá khả năng thích nghi và sinh trưởng của cây con có nguồn gốc từ phôi soma *in vitro* trong điều kiện vườn ươm.

Dựa trên những kết quả nghiên cứu phát sinh phôi soma, tiếp tục nghiên cứu và ứng dụng nhân nhanh phôi soma ở quy mô lớn hơn với mục tiêu đáp ứng được nhu cầu cây giống phục vụ công tác bảo tồn và phát triển.