

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*)

LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH LÝ HỌC THỰC VẬT

Hà Nội – 2024

BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ

TRƯỜNG THỊ LAN ANH

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

LUẬN ÁN TIÊN SĨ SINH LÝ HỌC THỰC VẬT

Mã số: 9.42.01.12

Xác nhận của Học viện
Khoa học và Công nghệ

Người hướng dẫn 1

Người hướng dẫn 2



GS.TS. Dương Tấn Nhựt

PGS.TS. Nguyễn Phương Thảo

Nguyễn Thị Trung

Hà Nội - 2024

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan luận án “Nghiên cứu quá trình phát sinh phôi soma sâm Lang Bian (*Panax vietnamensis* var. *langbianensis*)” là công trình nghiên cứu của chính mình, được thực hiện dưới sự hướng dẫn khoa học của GS.TS. Dương Tấn Nhật và PGS.TS. Nguyễn Phương Thảo. Trong luận án, tôi đã sử dụng thông tin tham khảo từ nhiều nguồn khác nhau, và tất cả các thông tin trích dẫn đều được ghi rõ nguồn gốc. Các kết quả nghiên cứu đã được công bố cùng với các tác giả khác đã nhận được sự nhất trí của đồng tác giả trước khi đưa vào luận án. Các số liệu và kết quả được trình bày trong luận án là hoàn toàn trung thực và chưa từng được xuất bản trong bất kỳ công trình nào ngoại trừ các công trình đã được tác giả công bố. Luận án này đã được thực hiện và hoàn thành trong khoảng thời gian tôi làm nghiên cứu sinh tại Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn Lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Hà Nội, ngày 28 tháng 08 năm 2024

Tác giả luận án



Trương Thị Lan Anh

LỜI CẢM ƠN

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

Đầu tiên, tôi xin gửi lời cảm ơn trân trọng nhất đến Thầy GS.TS. Dương Tấn Nhựt. Thầy đã tận tình định hướng, hướng dẫn và tạo điều kiện thuận lợi nhất để tôi có thể hoàn thành chương trình học cũng như đề tài nghiên cứu này.

Tôi xin chân thành gửi lời cảm ơn tới Cô PGS.TS. Nguyễn Phương Thảo luôn tận tình giúp đỡ và cho những góp ý quý báu giúp tôi hoàn thành luận án.

Tôi xin chân thành gửi lời cảm ơn tới TS. Hoàng Thanh Tùng luôn tận tình hỗ trợ và đưa ra những góp ý thiết thực giúp tôi hoàn thiện luận án.

Tôi xin gửi lời cảm ơn NCS. Nguyễn Thị Như Mai luôn hỗ trợ tôi trong thời gian khó khăn.

Tôi xin chân thành cảm ơn đến các anh chị và các bạn sinh viên ở Phòng Sinh học Phân tử và Chọn tạo giống cây trồng đã động viên và giúp đỡ tôi trong quá trình học tập và nghiên cứu.

Tôi xin được gửi lời cảm ơn đến Ban lãnh đạo và cán bộ nhân viên của Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên, Trường Đại học Đà Lạt, Khoa Nông lâm đã tạo điều kiện thuận lợi cho tôi trong suốt quá trình học tập và thực hiện luận án.

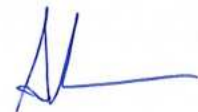
Tôi xin gửi lời cảm ơn sự hỗ trợ từ các đề tài VAST [NCXS01.03/2224], NAFOSTED-[106.01-2020.10] và Quỹ VINIF- [VINIF.2022.TS094].

Cuối cùng, luận án này sẽ không được hoàn thành nếu không có sự cảm thông, động viên của gia đình, người thân và bạn bè, những người luôn ở bên cạnh, giúp đỡ và động viên tôi trong hành trình nghiên cứu khoa học.

Xin gửi lời cảm ơn chân thành nhất!

Hà Nội, ngày 28 tháng 08 năm 2024

Tác giả luận án



Trương Thị Lan Anh

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN	i
LỜI CẢM ƠN	ii
MỤC LỤC.....	iii
DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ VIẾT TẮT.....	vii
DANH MỤC BẢNG.....	ix
DANH MỤC HÌNH ẢNH	xi
MỞ ĐẦU.....	1
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU	4
1.1. Tổng quan về chi <i>Panax</i> và tình hình nghiên cứu.....	4
1.1.1. Sơ lược về chi <i>Panax</i>	4
1.1.2. Tình hình nghiên cứu sâm Việt Nam	6
1.1.3. Sâm Lang Bian	11
1.1.3.1. Phân loại	11
1.1.3.2. Đặc điểm thực vật học	12
1.1.3.3. Tình hình khai thác	14
1.1.3.4. Tình hình nhân giống.....	15
1.2. Nuôi cấy phôi soma.....	15
1.2.1. Khái niệm	15
1.2.2. Các giai đoạn của quá trình phát sinh phôi soma	16
1.2.3. Sự phát sinh phôi soma thứ cấp.....	19
1.2.4. Một số yếu tố ảnh hưởng đến sự phát sinh phôi soma	20
1.2.4.1. Loại mẫu cây	20
1.2.4.2. Dinh dưỡng khoáng	22
1.2.4.3. Chất điều hòa sinh trưởng thực vật	24
1.2.4.4. Một số acid amin và polyamine.....	28
1.2.4.5. Nước dừa	34

1.2.4.6. Đường	35
1.2.4.7. Stress và sự phát sinh phôi soma.....	37
1.3. Kỹ thuật nuôi cấy lớp mỏng tế bào (Thin cell layer – TCL).....	39
1.3.1. Giới thiệu nuôi cấy lớp mỏng tế bào	39
1.3.2. Đặc điểm của nuôi cấy lớp mỏng tế bào	40
1.3.3. Những nghiên cứu về nuôi cấy lớp mỏng tế bào.....	42
1.4. AgNPs trong khử trùng và kích thích sinh trưởng mẫu cấy.....	43
1.4.1. Hiệu quả của AgNPs trong khử trùng mẫu thực vật	43
1.4.2. Hiệu quả của AgNPs trong sự sinh trưởng và phát triển thực vật.....	46
CHƯƠNG 2. VẬT LIỆU, NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	49
2.1. Vật liệu nghiên cứu	49
2.1.1. Vật liệu thực vật	49
2.1.2. Thiết bị, dụng cụ và hóa chất.....	49
2.2. Nội dung nghiên cứu	50
2.2.1. Nội dung 1: Tạo nguồn mẫu <i>in vitro</i>	50
2.2.2. Nội dung 2: Phát sinh phôi soma sơ cấp thông qua nuôi cấy TCL	50
2.2.3. Nội dung 3: Phát sinh phôi soma thứ cấp.....	50
2.2.4. Nội dung 4: Tạo cây sâm từ phôi soma thứ cấp và xác định hàm lượng saponin tích lũy trong cây sâm Lang Bian <i>in vitro</i>	50
2.3. Phương pháp nghiên cứu.....	51
2.3.1. Phương pháp bố trí thí nghiệm.....	51
2.3.1.1. Nội dung 1: Tạo nguồn mẫu <i>in vitro</i>	51
Thí nghiệm 1: Nghiên cứu ảnh hưởng của AgNPs trong khử trùng bề mặt mẫu thân rễ và sinh trưởng tiếp theo	51
Thí nghiệm 2. Nghiên cứu ảnh hưởng của BA hoặc kinetin đến sự nhân nhanh chồi <i>in vitro</i>	52
2.3.1.2. Nội dung 2: Phát sinh phôi soma sơ cấp thông qua nuôi cấy TCL	53
Thí nghiệm 3: Nghiên cứu ảnh hưởng của 2,4-D, NAA hoặc IBA đến sự phát sinh phôi soma sơ cấp từ các mẫu L-tTCL hoặc P-ITCL.....	53

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 hoặc P-ITCL	55
2.3.1.3. Nội dung 3: Phát sinh phôi soma thứ cấp.....	57
Thí nghiệm 5: Nghiên cứu ảnh hưởng của môi trường khoáng đến sự phát sinh phôi soma thứ cấp.....	57
Thí nghiệm 6: Nghiên cứu ảnh hưởng của hàm lượng đường đến sự phát sinh phôi soma thứ cấp.....	58
Thí nghiệm 7: Nghiên cứu ảnh hưởng của hàm lượng nước dừa đến sự phát sinh phôi soma thứ cấp.....	59
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 <i>in vitro</i>	59
Thí nghiệm 8: Tạo cây sâm từ phôi soma thứ cấp và xác định hàm lượng saponin tích lũy trong cây sâm Lang Bian <i>in vitro</i>	59
Thí nghiệm 9. Sự sinh trưởng tiếp theo của phôi soma sâm Lang Bian trong môi trường có bổ sung AgNPs	61
2.4. Quan sát hình thái giải phẫu	61
2.5. Điều kiện nuôi cấy.....	62
2.6. Xử lý số liệu	62
2.7. Địa điểm và thời gian nghiên cứu	62
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	63
3.1. Nội dung 1: Tạo nguồn mẫu <i>in vitro</i>	63
3.1.1. Ảnh hưởng của AgNPs trong khử trùng bề mặt mẫu thân rễ và sinh trưởng tiếp theo	63
3.1.2. Ảnh hưởng của BA hoặc kinetin đến sự nhân nhanh chồi sâm Lang Bian	67
3.2. Nội dung 2: Phát sinh phôi soma sơ cấp thông qua nuôi cấy TCL.....	70
3.2.1. Ảnh hưởng của 2,4-D, NAA hoặc IBA đến sự phát sinh phôi soma sơ cấp từ các mẫu L-tTCL hoặc P-ITCL	70
3.2.1.1. Sự phát sinh phôi soma sơ cấp từ mẫu L-tTCL <i>in vitro</i> trong môi trường bổ sung 2,4-D, NAA hoặc IBA	70

3.2.1.2. Sự phát sinh phôi soma sơ cấp từ mẫu P-ITCL <i>in vitro</i> trong môi trường bổ sung 2,4-D, NAA hoặc IBA	71
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.....	77
3.2.2.1. Ảnh hưởng của glutamine, proline hoặc spermidine đến sự phát sinh phôi soma sơ cấp từ mẫu L-tTCL <i>in vitro</i>	77
3.2.2.2. Ảnh hưởng của glutamine, proline hoặc spermidine đến sự phát sinh phôi soma sơ cấp từ mẫu P-ITCL <i>in vitro</i>	80
3.2.2.3. Ảnh hưởng của glutamine, proline hoặc spermidine đối với hoạt tính của các enzyme chống oxy hóa	87
3.2.2.4. Sự biến động của các hormone nội sinh trong quá trình phát sinh phôi soma.....	92
3.3. Nội dung 3: Sự phát sinh phôi soma thứ cấp	106
3.3.1. Ảnh hưởng của môi trường khoáng đến sự phát sinh phôi soma thứ cấp	106
3.3.2. Ảnh hưởng của hàm lượng đường đến sự phát sinh phôi soma thứ cấp	109
3.3.3. Ảnh hưởng của hàm lượng nước dừa đến sự phát sinh phôi soma thứ cấp	112
3.4. Nội dung 4: Tạo cây sâm từ phôi soma thứ cấp và xác định hàm lượng saponin tích lũy trong cây sâm Lang Bian <i>in vitro</i>	115
3.4.1. Tạo cây sâm từ phôi soma thứ cấp	115
3.4.2. Xác định hàm lượng một số saponin trong thân rễ và rễ bất định của cây sâm Lang Bian <i>in vitro</i>	117
3.4.3. Sự sinh trưởng tiếp theo của phôi soma sâm Lang Bian trong môi trường có bổ sung AgNPs	120
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....	126
DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ.....	128
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	129

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ VIẾT TẮT

2,4-D	2,4-Dichlorophenoxyacetic acid acid
2iP	N ⁶ -(2-isopentenyl)-adenine
ABA	Abscisic acid
ADC	Arginine decarboxylase
AgNPs	Silver nanoparticles (Các hạt nano bạc)
APX	Ascorbate peroxidase
ATP	Adenosine triphosphate
B5	Môi trường Gamborg B5 (1968)
BA	6-Benzyladenine
BSAA	3-benzo selenenyl acetic acid
BZ	Benzyl adenine & zeatin
Ca(OCl) ₂	Calcium hypochlorite
CAT	Catalase
CKs	Cytokinins
GA ₃	Gibberellic acid A ₃
GCF	Hệ số hiệu chỉnh tăng trưởng
G-Rb1	Ginsenoside Rb1
G-Rg1	Ginsenoside Rg1
IAA	Indole-3-acetic acid
IBA	Indole butyric acid
LEA protein	Late embryogenesis abundant protein
LED	Light-emitting diode
ITCL	Longitudinal thin cell layer (Lớp mỏng tế bào cắt dọc)
L-tTCL	Leaf cut transverse thin cell layer (Mẫu lá cắt lớp mỏng tế bào theo chiều ngang)
MEL	Melatonin (N-acetyl-5-methoxytryptamine)

M-Rd	Majonoside–Rd
MS	Môi trường Murashige và Skoog (1962)
mT	Meta–topolin
NAA	Naphthalene acetic acid
PA	Polyamine
PGRs	Plant growth regulators (Các chất điều hòa sinh trưởng thực vật)
P-ITCL	Petiole cut longitudinal thin cell layer (Mẫu cuống lá cắt lớp mỏng tế bào theo chiều dọc)
PSM	Phôi soma
Put	Putrescine
ROS	Reactive oxygen species
R-tTCL	Rhizome cut transverse thin cell layer (Mẫu thân rễ cắt lớp mỏng tế bào theo chiều ngang)
SA	Salicylic acid
SH	Môi trường Schenk và Hildebrandt (1972)
SOD	Superoxide dismutase
Spd	Spermidine
Spm	Spermine
STT	Số thứ tự
TCL	Thin cell layer (Lớp mỏng tế bào)
TDZ	Thidiazuron
TIBA	2,3,5-Triiodobenzoic acid
tTCL	Transverse thin cell layer (Lớp mỏng tế bào cắt ngang)
UHPLC	Ultra high-performance liquid chromatography (Sắc ký lỏng siêu hiệu năng)
UV	Ultraviolet (Tia cực tím)
WPM	Môi trường Woody plant medium
ZEA	Trans-zeatin

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1. Các loài và dưới loài thuộc chi sâm.....	4
Bảng 1.2. Lịch sử nuôi cấy sâm <i>in vitro</i>	6
Bảng 1.3. Những nghiên cứu về mối quan hệ phát sinh loài, hoạt chất và nuôi cấy sâm Ngọc Linh <i>in vitro</i>	7
Bảng 1.4. Dự kiến diện tích phát triển sâm Việt Nam đến năm 2030	14
Bảng 1.5. Nuôi cấy phôi soma sâm từ các nguồn mẫu cấy khác nhau	21
Bảng 1.6. Vai trò của polyamine trong nuôi cấy <i>in vitro</i>	31
Bảng 1.7. Ảnh hưởng của hàm lượng đường sucrose lên sự phát sinh hình thái của mẫu	36
Bảng 1.8. Sự phát sinh phôi soma ở một số thực vật sử dụng kỹ thuật nuôi cấy lớp mỏng tế bào	43
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.....	63
Bảng 3.2. Sự nhân nhanh chồi sâm Lang Bian <i>in vitro</i> trong môi trường có bổ sung BA hoặc kinetin ở các nồng độ khác nhau sau 12 tuần nuôi cấy.....	69
Bảng 3.3. So sánh hiệu quả phát sinh phôi soma sơ cấp và phát sinh hình thái khác từ mẫu L-tTCL trong môi trường có bổ sung 2,4-D, NAA hoặc IBA sau 12 tuần nuôi cấy	73
Bảng 3.4. So sánh hiệu quả phát sinh phôi soma sơ cấp và phát sinh hình thái khác từ mẫu P-ITCL trong môi trường có bổ sung 2,4-D, NAA hoặc IBA sau 12 tuần nuôi cấy	74
Bảng 3.5. Hệ số hiệu chỉnh tăng trưởng (GCF) của các mẫu L-tTCL và P-ITCL trong môi trường bổ sung 2,4-D, NAA hoặc IBA sau 12 tuần nuôi cấy.....	75
Bảng 3.6. So sánh hiệu quả phát sinh phôi soma sơ cấp từ mẫu L-tTCL nuôi cấy trong môi trường có bổ sung glutamine, proline hoặc spermidine sau 12 tuần nuôi cấy...	79
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...	81
Bảng 3.8. Ảnh hưởng của glutamine, proline hoặc spermidine đến hoạt tính SOD, CAT và APX trong mẫu L-tTCL sau 12 tuần nuôi cấy	88

Bảng 3.9. Ảnh hưởng của glutamine, proline hoặc spermidine đến hoạt tính SOD, CAT và APX trong mẫu P-ITCL sau 12 tuần nuôi cấy	88
Bảng 3.10. Ảnh hưởng của môi trường khoáng đến sự phát sinh phôi soma thứ cấp sau 12 tuần nuôi cấy	108
Bảng 3.11. Ảnh hưởng của hàm lượng đường sucrose đến sự phát sinh phôi soma thứ cấp sau 12 tuần nuôi cấy	110
Bảng 3.12. Ảnh hưởng của hàm lượng nước dừa đến sự phát sinh phôi soma thứ cấp sau 12 tuần nuôi cấy	113
Bảng 3.13. Sự hình thành thân rễ và rễ bất định của cây con có nguồn gốc từ phôi soma thứ cấp và chồi bất định sau 20 tuần nuôi cấy	117
Bảng 3.14. Hàm lượng saponin trong thân rễ và rễ bất định sâm Lang Bian 20 tuần tuổi.....	118

DANH MỤC HÌNH ẢNH

Hình 1.1. Đặc điểm hình thái của sâm Lang Bian	13
Hình 1.2. Sự phát sinh phôi của cây Arabidopsis	18
Hình 1.3. Sự vận chuyển auxin trong quá trình phát sinh phôi Arabidopsis	19
Hình 1.4. Sơ đồ tổng hợp polyamine ở thực vật	30
Hình 1.5. Phản ứng của tế bào chống lại các loại oxy hoạt hóa dưới các điều kiện stress khác nhau.....	39
Hình 1.6. Mẫu tTCL hoặc ITCL từ mẫu đốt thân.	41
Hình 1.7. Mẫu lá tTCL.....	42
Hình 2.1. Sơ đồ thí nghiệm nghiên cứu tác động của AgNPs trong khử trùng bề mặt mẫu thân rễ và sinh trưởng tiếp theo.....	51
Hình 2.2. Sơ đồ thí nghiệm ảnh hưởng của auxin/proline/glutamine hoặc spermidine đến sự phát sinh phôi soma sơ cấp từ các mẫu L-tTCL hoặc P-ITCL	55
Hình 2.3. Sơ đồ thí nghiệm phát sinh phôi soma thứ cấp	58
Hình 2.4. Sơ đồ thí nghiệm tạo cây sâm Lang Bian <i>in vitro</i> từ phôi soma thứ cấp và xác định hàm lượng saponin tích lũy	61
Hình 3.1. Ảnh hưởng của AgNPs đến sự tái sinh chồi (A) và số chồi (B) từ mẫu cây thân rễ sâm Lang Bian sau 12 tuần nuôi cấy.....	64
Hình 3.2. Hình thái mô sẹo sau 8 tuần nuôi cấy (A) và chồi <i>in vitro</i> sau 12 tuần nuôi cấy (B) hình thành từ mẫu cây thân rễ sâm Lang Bian sau khi khử trùng bằng AgNPs.	67
Hình 3.3. Hình thái của chồi <i>in vitro</i> sâm Lang Bian hình thành trong môi trường SH không bổ sung BA hoặc kinetin (mẫu đối chứng. A), có bổ sung 1,0 mg/L BA (B) hoặc 1,5 mg/L kinetin (C) sau 12 tuần nuôi cấy.	69
Hình 3.4. Quan sát hình thái và giải phẫu trong quá trình phát sinh phôi soma sơ cấp sâm Lang Bian.....	71
Hình 3.5. Sự phát sinh phôi soma sơ cấp từ mẫu L-tTCL sâm Lang Bian sau 12 tuần nuôi cấy trên các môi trường khác nhau	80
Hình 3.6. Sự phát sinh phôi soma sơ cấp từ mẫu P-ITCL sâm Lang Bian sau 12 tuần nuôi cấy trên các môi trường khác nhau	82

Hình 3.7. Các giai đoạn phát triển trong quá trình phát sinh phôi soma sơ cấp sâm Lang Bian	82
Hình 3.8. Hệ số hiệu chỉnh tăng trưởng (GCF) của mẫu L-tTCL và P-ITCL nuôi cấy trên môi trường bổ sung glutamine, proline hoặc spermidine sau 12 tuần nuôi cấy 84	
Hình 3.9. Sự biến động hàm lượng auxin (IAA) và MEL trong quá trình phát sinh phôi soma sơ cấp sâm Lang Bian.....	93
Hình 3.10. Sự biến động hàm lượng cytokinin trong quá trình phát sinh phôi soma sơ cấp sâm Lang Bian.	94
Hình 3.11. Sự biến động hàm lượng acid gibberellic và acid abscisic trong quá trình phát sinh phôi soma sơ cấp sâm Lang Bian.	95
Hình 3.12. Sự biến động hàm lượng acid salicylic trong quá trình phát sinh phôi soma sơ cấp sâm Lang Bian..	96
Hình 3.13. Tỷ lệ IAA và MEL/CKs và ABA/GA ₃ của mẫu ở các giai đoạn khác nhau của quá trình phát sinh phôi soma sơ cấp sâm Lang Bian	103
Hình 3.14. Tỷ lệ ABA/CKs và ABA/MEL của mẫu ở các giai đoạn khác nhau của quá trình phát sinh phôi soma sơ cấp sâm Lang Bian.....	104
Hình 3.15. Tỷ lệ IAA và MEL/ABA và IAA và MEL/GA ₃ của mẫu ở các giai đoạn khác nhau của quá trình phát sinh phôi soma sơ cấp sâm Lang Bian.....	105
Hình 3.16. Sự phát sinh phôi soma sâm Lang Bian.....	109
Hình 3.17. Ảnh hưởng của hàm lượng đường sucrose đến sự phát sinh phôi soma thứ cấp ở các giai đoạn khác nhau sau 12 tuần nuôi cấy.....	112
Hình 3.18. Ảnh hưởng của hàm lượng nước dừa đến sự phát sinh phôi soma thứ cấp ở các giai đoạn khác nhau sau 12 tuần nuôi cấy	114
Hình 3.19. Sự hình thành thân rễ của cây con có nguồn gốc từ phôi soma thứ cấp sau 20 tuần nuôi cấy.	116
Hình 3.20. Sắc ký đồ HPLC thể hiện hàm lượng ginsenoside trong rễ bất định (A) và thân rễ (B) sâm Lang Bian <i>in vitro</i>	119
Hình 3.21. Hình thái cây con có nguồn gốc từ phôi soma nuôi cấy trong môi trường không bổ sung (Đối chứng) hoặc có bổ sung 1,2 mg/L AgNPs sau 20 tuần nuôi cấy.	121
Hình 3.22. Sơ đồ quá trình nuôi cấy phôi soma sâm Lang Bian <i>in vitro</i>	125

MỞ ĐẦU

Tính cấp thiết của luận án

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 như làm giảm bớt stress và mệt mỏi, ngăn ngừa lão hóa và tăng cường sinh lực [1]. Hiện nay, Chi sâm có khoảng 20 loài và dưới loài, phân bố ở Đông Á, vùng Himalaya, Đông Nam Á và Bắc Mỹ [1-4].

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 [5]. Vì vậy, cần phải tìm ra một giải pháp về công tác nhân giống nhanh chóng, tạo ra số lượng lớn, và hiệu quả loại 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 [6]. Phương pháp này đã thực hiện rất thành công trên một số loài thuộc chi *Panax*, như: *Panax ginseng* [7], *Panax notoginseng* [8], *Panax quinquefolius* [8], *Panax japonicus* [9], *Panax vietnamensis* [10]. 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 [11]. 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 [12, 13]. Bên cạnh những ưu điểm, phương pháp vi nhân giống còn có nhược điểm là 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 *in vitro* đã giúp cây thích nghi ở giai đoạn vườn ươm: *P. vietnamensis* [10], *P. ginseng* và *P. quinquefolius* [14] và *P. ginseng* [15].

Ở Việt Nam, sâm Lang Bian (*Panax vietnamensis* var. *langbianensis*) là một thứ mới được phát hiện và công bố năm 2016 [16], chỉ có phân bố ở vùng núi Langbiang thuộc huyện Lạc Dương và Hòn Nga (Đam Rông), tỉnh Lâm Đồng 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 [17]. 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 việc thực hiện 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 nghiên cứu

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:

- Tạo được nguồn mẫu *in vitro* ban đầu làm nguồn vật liệu cho những nghiên cứu phát sinh phôi soma.
- Phát sinh và nhân nhanh phôi soma sơ cấp từ các mẫu cây lớp mỏng.
- Phát sinh và nhân nhanh phôi soma thứ cấp từ nguồn phôi soma sơ cấp.
- Tạo được thân rễ sâm Lang Bian *in vitro* có tích lũy saponin.

Ý nghĩa khoa học

Sâm Lang Bian (*Panax vietnamensis* var. *langbianensis*) là một thứ mới được phát hiện và công bố vào năm 2016 với số lượng nhỏ chỉ khoảng 100 – 200 cá thể, mọc rải rác dưới tán rừng lá rộng thường xanh. Nên việc nghiên cứu để bảo tồn và phát triển sâm Lang Bian là cần thiết, có ý nghĩa khoa học.

Kết quả của luận án đánh giá được ảnh hưởng của một số yếu tố đến quá trình phát sinh phôi soma sơ cấp sâm Lang Bian thông qua kỹ thuật nuôi cấy lớp mỏng TCL, đồng thời, cung cấp thông tin về môi trường dinh dưỡng ảnh hưởng đến quá trình phát sinh và tăng sinh phôi soma thứ cấp, từ đó tạo được cây con hoàn chỉnh có sự hình thành thân rễ *in vitro*. Kết quả của luận án là dẫn liệu tham khảo có giá trị trong nghiên cứu về các loài sâm Việt Nam nói chung và giảng dạy lĩnh vực Sinh lý học thực vật.

Ý nghĩa thực tiễn

Các kết quả của luận án có thể được sử dụng để điều chỉnh quá trình phát sinh phôi soma sơ cấp và thứ cấp một cách có hiệu quả, phục vụ công tác xây dựng quy

trình nhân giống sâm Lang Bian *in vitro* thông qua phát sinh phôi soma, góp phần cung cấp nguồn cây giống đủ lớn phục vụ cho công tác bảo tồn và phát triển đối tượng sâm đặc hữu và quý hiếm này tại Lâm Đồng.

Đối tượng và phạm vi nghiên cứu của đề tài

Đối tượng nghiên cứu

Cây sâm Lang Bian đặc hữu tại Lâm Đồng:

- Thân rễ cây sâm Lang Bian thu thập ngoài tự nhiên để tạo nguồn mẫu ban đầu.

- Các mẫu lá và cuống lá của cây sâm Lang Bian *in vitro* được sử dụng để nghiên cứu sự phát sinh phôi soma sơ cấp nuôi cấy trong điều kiện *in vitro*.

Phạm vi nghiên cứu

Đề tài tập trung nghiên cứu ảnh hưởng của một số yếu tố đến quá trình phát sinh và tăng sinh phôi soma sơ cấp, thứ cấp và tạo cây con hoàn chỉnh với sự hình thành thân rễ sâm Lang Bian trong điều kiện nuôi cấy *in vitro*.

Những đóng góp mới của luận án

Đề tài đã sử dụng nano bạc (AgNPs) khử trùng mẫu thân rễ sâm Lang Bian và nhân nhanh chồi trong môi trường bổ sung BA để tạo nguồn mẫu ban đầu cho nghiên cứu quá trình phát sinh phôi soma sâm Lang Bian *in vitro*.

Đề tài đánh giá được một số yếu tố tác động đến quá trình phát sinh phôi soma sơ cấp từ mẫu cây lớp mỏng lá L-tTCL và cuống lá P-ITCL *in vitro*. Đồng thời, đánh giá được vai trò của một số yếu tố môi trường đến sự phát sinh phôi soma thứ cấp.

Đề tài đã tạo được cây con có nguồn gốc từ phôi soma thứ cấp với sự hình thành thân rễ *in vitro* có tích lũy saponin, từ đó, có thể chủ động được nguồn cây giống phục vụ cho công tác bảo tồn và phát triển.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. Tổng quan về chi *Panax* và tình hình nghiên cứu

1.1.1. Sơ lược về chi *Panax*

1.1.1.1. Phân loại

Chi sâm (*Panax*) được xếp vào hàng dược liệu có giá trị dược lý và giá trị kinh tế cao. Chi sâm, thuộc họ Araliaceae, phân bố ở một số khu vực trên thế giới từ Đông Á (bao gồm Hàn Quốc, Trung Quốc và Nhật Bản) đến Bắc Mỹ (bao gồm Mỹ, Canada). Hiện nay, chi sâm có khoảng 20 loài và dưới loài, phân bố rộng rãi ở Đông Á, vùng Himalaya, Đông Nam Á và Bắc Mỹ (Bảng 1.1) [1-4], trong đó có 5 loài: *P. ginseng*, *P. japonicus*, *P. notoginseng*, *P. quinquefolius* và *P. vietnamensis* thường được xem như các loại dược thảo quý.

Bảng 1.1. Các loài và dưới loài thuộc chi sâm [1-4]

STT	Tên khoa học	Phân loại	Tên thông thường	Khu vực phân bố
1	<i>P. assamicus</i>	Loài	–	Ấn Độ
2	<i>P. bipinnatifidus</i>	Loài	Sâm vũ diệp	Ấn Độ, Trung Quốc, Myanmar, Nepal, Thái Lan, Tây Tạng và Tây Himalaya
3	<i>P. bipinnatifidus</i> var. <i>angustifolius</i>	Thứ	–	Ấn Độ, Trung Quốc, Nepal, Thái Lan, Tây Tạng và Himalaya
4	<i>P. bipinnatifidus</i> var. <i>bipinnatifidus</i>	Thứ		Trung Quốc, Himalaya, Myanmar, Nepal và Thái Lan
5	<i>P. ginseng</i>	Loài	Sâm Hàn Quốc, Nhân sâm	Trung Quốc, Nga, Hàn Quốc
6	<i>P. japonicus</i>	Loài	Sâm Nhật	Trung Quốc, Nhật Bản, Nepal, Bhutan, Himalaya, Ấn Độ, Pakistan

7	<i>P. notoginseng</i>	Loài	Tam Thất	Trung Quốc, Việt Nam
8	<i>P. pseudoginseng</i>	Loài	Giả nhân sâm	Nepal, Trung Quốc
9	<i>P. quinquefolius</i>	Loài	Sâm Mỹ	Canada, Mỹ, Trung Quốc
10	<i>P. siamensis</i>	Loài	–	Thái Lan
11	<i>P. sinensis</i>	Loài	–	Himalaya
12	<i>P. sokpayensis</i>	Loài	–	Himalaya
13	<i>P. stipuleanatus</i>	Loài	Tam Thất hoang	Trung Quốc, Việt Nam
14	<i>P. trifolius</i>	Loài	Sâm ba lá	Mỹ, Canada, Đức
15	<i>P. variabilis</i>	Loài	–	Ấn Độ, Trung Quốc
16	<i>P. vietnamensis</i>	Loài	Sâm Ngọc Linh	Việt Nam
17	<i>P. vietnamensis</i> var. <i>fuscidiscus</i>	Thứ	Sâm Lai Châu	Việt Nam, Trung Quốc
18	<i>P. vietnamensis</i> var. <i>langbianensis</i>	Thứ	Sâm Lang Bian	Việt Nam
19	<i>P. wangianus</i>	Loài	Sâm lá hẹp	Trung Quốc
20	<i>P. zingiberensis</i>	Loài	Sâm gừng	Việt Nam, Trung Quốc, Nepal, Bhutan, Myanmar

Ghi chú: “– “ không được đề cập

P. ginseng phân bố ở vùng Đông Bắc Á như Hàn Quốc, Trung Quốc, Nga nên thường được gọi là sâm phương Đông (Oriental ginseng); *P. quinquefolius* được tìm thấy chủ yếu ở Bắc Mỹ (Sâm Mỹ); *P. japonicus* và *P. notoginseng* là loài sâm của Nhật Bản và Trung Quốc; *P. vietnamensis* thường gọi là sâm của Việt Nam hay sâm Ngọc Linh. Chúng có chứa hợp chất saponin có tác dụng phòng ngừa nhiều loại bệnh khác nhau như kích hoạt hệ miễn dịch, chống lão hóa, điều chỉnh lượng đường huyết, giảm stress và bảo vệ gan, thận [18].

1.1.1.2. Tình hình nhân giống chi *Panax in vitro*

Sâm có thể được khai thác trong tự nhiên hoặc từ trồng trọt. Tuy nhiên, việc khai thác quá mức đã làm số lượng các loài sâm trong tự nhiên ngày càng giảm. Đồng thời, thời gian canh tác kéo dài dẫn đến cây sâm trồng dễ bị nhiễm bệnh, diện tích đất

canh tác bị hạn chế và chi phí cho công lao động cao đã cản trở người trồng sâm đáp ứng nhu cầu ngày càng gia tăng [19]. Chính vì những lý do này, sâm ngày càng khan hiếm và đắt đỏ hơn. Để khắc phục những vấn đề trên, phương pháp nhân giống *in vitro* đã được nghiên cứu và ứng dụng để tạo ra nguồn cây giống và các hoạt chất sinh học mà không gây tổn hại nguồn sâm trong tự nhiên (Bảng 1.2).

Bảng 1.2. Lịch sử nuôi cấy sâm *in vitro* [4]

Thời gian	Nghiên cứu về chi sâm
1967	Butenko tìm ra phương pháp khử trùng mẫu và nuôi cấy <i>P. ginseng in vitro</i>
1967-1968	Butenko và cộng sự nuôi cấy mô <i>P. japonica</i> , <i>P. quinquefolius</i> và <i>P. pseudoginseng</i>
1968	Slepyan nuôi cấy mô sẹo từ mẫu rễ sâm
1969	Kitra và Sunggi nghiên cứu được môi trường phù hợp nuôi cấy <i>P. ginseng</i>
1971	Lee đã có báo cáo nghiên cứu nuôi cấy <i>P. ginseng</i> tại Hàn Quốc lần đầu tiên
1988	Nghiên cứu nuôi cấy mô sâm được tiếp tục thực hiện; từ năm 1988, công ty Nitto Denko đã nuôi cấy huyền phù tế bào với quy mô lớn và bán thực phẩm chức năng có chứa sâm ở Nhật Bản
1990	Choi và cộng sự nuôi cấy phôi soma, thuần hóa và trồng cây con có nguồn gốc từ phôi soma trong nhà kính thành công
2000 đến nay	Nuôi cấy mô sẹo, huyền phù tế bào, phôi soma, rễ bất định, rễ to nhằm thu nhận hoạt chất thứ cấp

1.1.2. Tình hình nghiên cứu sâm Việt Nam

1.1.2.1. Sâm Ngọc Linh

Sâm Ngọc Linh (*P. vietnamensis* Ha et Grushv.) là loài dược liệu quý hiếm có giá trị rất cao. Chúng có tác dụng như: hỗ trợ hệ thần kinh trung ương, tăng khả năng tập trung và cải thiện trí nhớ, giải độc và bảo vệ chức năng gan, giảm cholesterol máu,

kích thích miễn dịch, thúc đẩy quá trình trao đổi chất, giải phóng đường và mỡ trong máu, có tính kháng u và hỗ trợ điều trị ung thư [20].

Từ khi được phát hiện và định danh cho đến nay, các nghiên cứu về sâm Ngọc Linh hướng vào việc xác định quan hệ phát sinh loài, dược chất [21], [22]; nuôi cấy tế bào [23-27], rễ tơ [28-30], rễ bất định [31-33] và nhân giống *in vitro* [10, 34-36]. Trong nuôi cấy *in vitro*, việc lựa chọn môi trường và điều kiện nuôi cấy thích hợp được tập trung nghiên cứu (Bảng 1.3). Hàm lượng saponin của sâm Ngọc Linh tập trung ở trong thân rễ, chủ yếu saponin triterpen khung dammaran và chỉ chứa một ít saponin có genin là acid oleanolic. Thành phần saponin của sâm Ngọc Linh tự nhiên rất giống với nhân sâm, sâm Mỹ và Tam Thất.

Bảng 1.3. Những nghiên cứu về mối quan hệ phát sinh loài, hoạt chất và nuôi cấy sâm Ngọc Linh *in vitro*.

STT	Những nghiên cứu giá trị dược liệu và nuôi cấy sâm Ngọc Linh <i>in vitro</i>	Nguồn
Xác định mối quan hệ phát sinh loài và dược chất		
1	Sâm Việt Nam: Mối quan hệ phát sinh loài, hoạt chất và dược lý	[21]
2	Một số saponin trong sâm Việt Nam	[22]
Nuôi cấy tế bào		
3	Sự gia tăng sinh khối huyền phù tế bào khi bổ sung PGRs và dịch chiết hữu cơ	[23]
4	Nuôi cấy huyền phù tế bào trong bioreactor	[24]
5	Nghiên cứu yếu tố môi trường trong nuôi cấy huyền phù tế bào và tích lũy ginsenoside	[25]
6	Thời gian và số lần cấy chuyển trong nuôi cấy tế bào và sự tích lũy hoạt chất	[26]
7	Ảnh hưởng của yếu tố khoáng đến tích lũy sinh khối và ginsenoside trong nuôi cấy huyền phù tế bào	[27]
Nuôi cấy rễ tơ		
8	Nuôi cấy rễ tơ sâm Ngọc Linh, một phương pháp đầy hứa hẹn để sản xuất ginsenoside dạng ocotillol	[28]
9	Nuôi cấy rễ tơ sử dụng phương pháp chuyển gen bằng vi khuẩn	[29]
10	Hiệu quả tái sinh cây con chuyển gen từ rễ tơ theo con đường phát sinh phôi soma và nâng cao chất lượng cây con (sử dụng môi trường bổ sung nano sắt)	[30]

Nuôi cấy rễ bất định		
11	Phát sinh rễ bất định từ mẫu cây lá: Tối ưu hóa môi trường và điều kiện nuôi cấy	[31]
12	Hàm lượng đường và mật độ mẫu cây tác động đến sự sinh trưởng rễ bất định và bước đầu nuôi cấy trong bioreactor	[32]
13	Cải thiện sự tích lũy saponin trong nuôi cấy rễ bất định theo từng giai đoạn nuôi cấy và sử dụng elicitor	[33]
Nhân giống vô tính <i>in vitro</i> theo con đường tái sinh chồi và phát sinh phôi soma		
14	Hiệu quả của AgNPs trong nhân giống sâm Ngọc Linh – một cây thuốc quý	[10]
15	Hiệu quả tái sinh và nhân nhanh chồi từ mô sẹo có nguồn gốc từ mẫu lá <i>ex vitro</i>	[34]
16	LED và tiềm năng trong tăng trưởng mô sẹo, phát sinh phôi soma, sinh trưởng cây con và tích lũy saponin	[35]
17	Vi nhân giống sâm Ngọc Linh	[37]
18	Sự phát sinh phôi soma từ một số nguồn mẫu <i>in vitro</i> (thân rễ, lá và cuống lá)	[38]
19	Cảm ứng tạo mô sẹo có khả năng sinh phôi và phôi soma	[39]
20	Sự phát sinh phôi soma từ mô sẹo cảm ứng từ mẫu lá TCL	[40]
21	LEDs và tiềm năng trong nuôi cấy phôi soma	[41]
22	Tứ bội hóa phôi soma sâm Ngọc Linh bằng xử lý colchicine	[36]

Sâm Ngọc Linh có 52 hợp chất saponin gồm 26 saponin có cấu trúc tương đồng với các loài sâm khác, ngoài ra còn có cấu trúc của 26 saponin (25 vina ginsenoside R1-R25 (VG-R1-R25) và 20-O-Me-GRh1). Đặc biệt, saponin dammaran gọi chung là ginsenoside chiếm tới 50/52 saponin được phân lập, đây là những hoạt chất quyết định giá trị của sâm. Mặt khác, sâm Ngọc Linh cũng có một hàm lượng saponin lớn có cấu trúc ocotillol, đặc biệt là majonoside-R2 (hơn 5%), chiếm gần 1/2 lượng saponin toàn phần. Và chính sự có mặt các loại saponin này tạo ra những tác dụng sinh học chuyên biệt cho sâm Ngọc Linh so với các loài sâm khác. Majonoside-R2 có tác dụng chống stress, kích thích hoạt động thần kinh và trí nhớ khi sử dụng ở liều thấp, chống trầm cảm, tăng cường sinh lực, chống oxy hóa, tăng cường sức đề kháng, tác dụng phục hồi máu, tăng cường nội tiết tố sinh dục, điều hòa hoạt động của tim, tác dụng chống tăng cholesterol máu, tác dụng bảo vệ gan khỏi các yếu tố gây độc. Đặc biệt, MR2 trong sâm có tiềm năng trong việc phòng ngừa ung thư [21],

làm giảm mức độ hoạt hóa của men gan sGPT và sGOT trong mô hình tổn thương gan của chuột, do đó có thể bảo vệ tế bào gan ở chuột.

Môi trường tốt nhất cho sự nhân nhanh mô sẹo là SH bổ sung 1,0 mg/L acid 2,4-Dichlorophenoxyacetic (2,4-D) và 0,2 mg/L Thidiazuron (TDZ); mẫu được nuôi ở nhiệt độ $25 \pm 2^\circ\text{C}$, quang chu kỳ 10 giờ, chiếu sáng bằng đèn huỳnh quang (2500 – 3000 lux) [34]. Các chất hữu cơ và chất điều hòa sinh trưởng thực vật (PGRs) bổ sung đã làm tăng đáng kể sự tích lũy sinh khối của sâm Ngọc Linh và sinh khối được tích lũy lớn nhất ở nghiệm thức môi trường MS bổ sung 2,0 mg/L kinetin trong thời gian 24 ngày (mẫu được duy trì trong tối, nhiệt độ $25 \pm 2^\circ\text{C}$). Bên cạnh đó, điều kiện chiếu sáng liên tục có thể cải thiện sinh khối của mẫu [23]. Đặc biệt, trong nuôi cấy sâm Ngọc Linh *in vitro* cho hàm lượng majonoside R_2 (MR_2) tích lũy là cao nhất khi sử dụng đèn LED với tỷ lệ chiếu sáng là 20% đỏ : 80% xanh [35]. Khả năng nhân nhanh sinh khối và tích lũy ginsenoside, đặc biệt là saponin ocotilloltype ở rễ tơ của sâm Ngọc Linh cũng được báo cáo [28]. Ngoài ra, sự sinh trưởng của rễ và hàm lượng một số saponin (MR_2 , Rb1, và Rg1) cao nhất ở môi trường MS cải tiến [42] bổ sung 7 mg/L acid indole butyric (IBA) và 0,5 mg/L 6-benzyladenine (BA), các mẫu được nuôi cấy lỏng (tốc độ lắc 100 vòng/phút) và duy trì trong tối với nhiệt độ $25 \pm 2^\circ\text{C}$ [31].

Trong nghiên cứu nuôi cấy phôi soma sâm Ngọc Linh phát sinh từ mô sẹo có nguồn gốc từ mẫu cây tTCL, mẫu tTCL tạo mô sẹo khi nuôi trong môi trường MS có bổ sung 1,0 mg/L 2,4-D và 0,1 mg/L TDZ. Tỷ lệ mẫu phát sinh phôi soma (53,3%) và số phôi soma (35 phôi/mẫu) được tạo thành cao nhất khi nuôi cấy mô sẹo trong môi trường MS bổ sung 1,0 mg/L 2,4-D, 0,5 mg/L acid naphthalene acetic (NAA) và 0,2 mg/L TDZ [40]. Ngoài ra, cây con có nguồn gốc từ phôi soma hình thành thân rễ *in vitro* trong môi trường có bổ sung 1,2 mg/L AgNPs và có tỷ lệ sống sót cao khi chuyển ra trồng trong vườn ươm [10].

1.1.2.2. Sâm Lai Châu

Sâm Lai Châu (*P. Vietnamensis* var. *fuscidiscus* K. Komatsu, S. Zhu & S.Q. Cai) được biết đến là một thứ của sâm Ngọc Linh, chúng còn được gọi là Tam thất hoang Mường Tè, Tam Thất đen... Sâm Lai Châu phân bố chủ yếu ở độ cao 1.400 – 2.200 m thuộc một số khu vực như Sìn Hồ, Mường Tè (Lai Châu). Sâm Lai Châu có tác dụng tăng cường sức khỏe, tăng khả năng thích ứng, kích thích miễn dịch, kháng u và chống oxy hóa [43].

Hiện nay, các công bố về sâm Lai Châu tập trung chủ yếu nghiên cứu đặc điểm sinh vật học, sinh thái học, kỹ thuật nhân giống, chăm sóc cây sâm Lai Châu trong điều kiện vườn ươm và tự nhiên, hướng đến bảo tồn và phát triển loài sâm quý hiếm này. Anh và cộng sự (2018) xử lý hạt sâm Lai Châu với GA₃ ở nồng độ 700 mg/L trong thời 24 giờ cho tỷ lệ nảy mầm đạt 70% sau 75-90 ngày xử lý [44]. Năm 2024, Khôi và cộng sự đã xây dựng bản đồ tiềm năng phát triển sâm Lai Châu dựa trên đánh giá các yếu tố như nhiệt độ, độ cao, độ dốc, độ ẩm ảnh hưởng đến sự phát triển cây sâm Lai Châu [45].

Bên cạnh đó, một số nghiên cứu nuôi cấy mô *in vitro* trên đối tượng sâm Lai Châu cũng được thực hiện. Tú và cộng sự (2016) nghiên cứu ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng thực vật, nguồn mẫu cấy, vị trí mẫu cấy đến khả năng cảm ứng tạo mô sẹo từ mô củ cây sâm Lai Châu sử dụng phương pháp nuôi cấy lớp mỏng tế bào. Kết quả nghiên cứu cho thấy, mô cấy từ phần đỉnh sinh trưởng cho tỷ lệ cảm ứng tạo mô sẹo cao nhất khi được nuôi trong môi trường MS có bổ sung 0,5mg/L 2,4-D hoặc MS bổ sung 0,3mg/L 2,4-D và 0,3mg/L NAA [46]. Tiếp đó, Lĩnh và Tú (2017) thành công phát sinh phôi từ mô sẹo nuôi cấy trong môi trường SH bổ sung 0,5 mg/L NAA và 0,5 mg/L Dropp. Đồng thời, cây con có nguồn gốc từ phôi được tái sinh và chuyển thành công sang môi trường đất trong điều kiện nhà kính [47].

1.1.2.3. Sâm Vũ Diệp

Sâm Vũ Diệp (*Panax bipinnatifidus* Seem.) là một trong những loại dược liệu quý hiếm chứa các hoạt chất có giá trị như β -sitosterol, acid oleanolic, daucosterol, stipuleanosid R2 [48, 49]. Một số công dụng chính của sâm Vũ Diệp được ghi nhận như cầm máu, giảm stress, cải thiện trí nhớ, giảm đường huyết, tăng cường quá trình trao đổi chất và ngăn ngừa sự phát triển của tế bào ung thư. Sâm Vũ Diệp là loài cây thân thảo, sống lâu năm, thường phân bố ở điều kiện khí hậu ẩm ướt, dưới tán rừng xanh, ở độ cao trung bình từ 1600 đến 2300 m so với mực nước biển. Tại Việt Nam, sâm Vũ Diệp chủ yếu được tìm thấy ở các vùng Lai Châu, Sa Pa và Lào Cai [50].

Do sự khai thác quá mức trong tự nhiên, cùng với khả năng nhân giống bằng hạt kém và thời gian nuôi trồng kéo dài (từ 5 đến 7 năm). Do đó, số lượng sâm Vũ Diệp ngoài tự nhiên rất ít, không đủ cung cấp cho nhu cầu bảo tồn và phát triển, cũng như cung cấp nguyên liệu cho ngành dược liệu. Trong thời gian gần đây, có một số ít nghiên cứu về nuôi cấy phôi *in vitro* cây sâm Vũ Diệp được thực hiện. Lĩnh và Tú (2017) nghiên cứu ảnh hưởng của các chất điều hòa sinh trưởng thực vật đến khả năng hình thành và tăng sinh mô sẹo, cũng như khả năng phát sinh phôi của cây sâm Vũ Diệp. Môi trường thích hợp cho cảm ứng tạo mô sẹo là MS bổ sung 1 mg/L 2,4-

D riêng lẻ hoặc kết hợp với 1 mg/L NAA. Đồng thời, tần số phát sinh và số lượng phôi soma cao nhất được ghi nhận ở môi trường MS bổ sung 1 mg/L 2,4-D, 1 mg/l NAA và 0,5 mg/l TDZ. Khi được chuyển sang môi trường SH có bổ sung 1,0 mg/L GA₃, tỉ lệ nảy mầm của phôi đạt 80,3%. Phôi nảy mầm thành cây con trên môi trường SH có bổ sung 1,0 mg/L BA và 0,5 mg/L NAA [50].

1.1.2.4. Tam Thất hoang

Tam Thất Hoang (*Panax stipuleanatus* H.T.Tsai et K.M.Feng) là một trong những loài cây thuốc quý thuộc chi *Panax*. Các saponin thuộc nhóm olean chiết suất từ rễ và thân rễ có công dụng bồi bổ sức khỏe, kích hãm hoạt động một số dòng tế bào ung thư. Vì vậy, đây cũng một trong những đối tượng dược liệu quý bị săn lùng và khai thác bừa bãi, dẫn đến số lượng cá thể ngoài tự nhiên rất ít.

Hiện nay, Tam Thất Hoang đang được trồng ở các tỉnh Tây Bắc, Việt Nam. Tuy nhiên, phải mất khoảng 5 – 7 năm mới có thể thu hoạch. Một số nghiên cứu nuôi cấy phôi soma thông qua nuôi cấy mô sẹo Tam Thất Hoang được công bố. Hương và cộng sự (2018) nuôi cấy khúc cắt thân rễ trong môi trường có bổ sung 2,4-D ở nồng độ cao (2 mg/L) trong thời gian 8 tuần đầu và sau đó cấy chuyển sang môi trường có nồng độ 2,4-D thấp hơn (1 mg/L) trong thời gian 16 tuần tiếp theo. Tiếp theo, mô sẹo được cấy chuyển sang môi trường có bổ sung 0,5 mg/l NAA để thu nhận các tế bào có khả năng sinh phôi. Sau đó, phôi phát triển qua các giai đoạn khác nhau trong môi trường có bổ sung 0,5 mg/L BA và 1 mg/L GA₃ [51]. Ngoài ra, nuôi cấy rễ bất định với mục đích thu nhập saponin cũng được thực hiện. Mô sẹo hình thành trên bề mặt thân rễ được nuôi cấy trong môi trường có bổ sung 0,5 mg/L 2,4-D, 30 g/L đường sucrose, 6 g/L agar và nuôi trong điều kiện tối. Sau đó, rễ có tích lũy acid oleanolic được hình thành từ mô sẹo nuôi cấy trong môi trường có bổ sung 0,5 mg/L NAA [52].

1.1.3. Sâm Lang Bian

1.1.3.1. Phân loại

Giới (regnum)	Plantae
Ngành (division)	Magnoliophyta
Lớp (class)	Magnoliopsida
Bộ (ordo)	Apiales
Họ (familia)	Araliaceae
Chi (genus)	<i>Panax</i>

Loài (species)	<i>Panax vietnamensis</i>
Thứ (variety)	<i>Panax vietnamensis</i> var. <i>langbianensis</i>

Sâm Lang Bian phân bố ở vùng núi Langbiang và Hòn Nga ở độ cao 1.879 - 1.900 m so với mực nước biển, dưới tán rừng lá rộng thường xanh ít bị tác động, chủ yếu sườn dốc thoát nước, sương mù nhiều. Hiện nay, sâm Lang Bian mọc rải rác theo từng nhóm nhỏ, số lượng khoảng 100 – 200 cá thể [53].

1.1.3.2. Đặc điểm thực vật học

Sâm Lang Bian thuộc chi *Panax*, họ Araliaceae, ngoài ra, do thân rễ có dạng đốt, nên sâm Lang Bian rất gần với *P. vietnamensis* và *P. vietnamensis* var. *fuscidiscus*.

Kết hợp nghiên cứu về quan hệ phát sinh chủng loại dựa trên các trình tự DNA bảo tồn với các dữ liệu về so sánh hình thái, cho phép khẳng định sâm Lang Bian là một thứ mới của loài *P. vietnamensis*, và được đặt tên là *Panax vietnamensis* var. *langbianensis*, tên tiếng Việt đề xuất là sâm Lang Bian.

Mô tả cây:

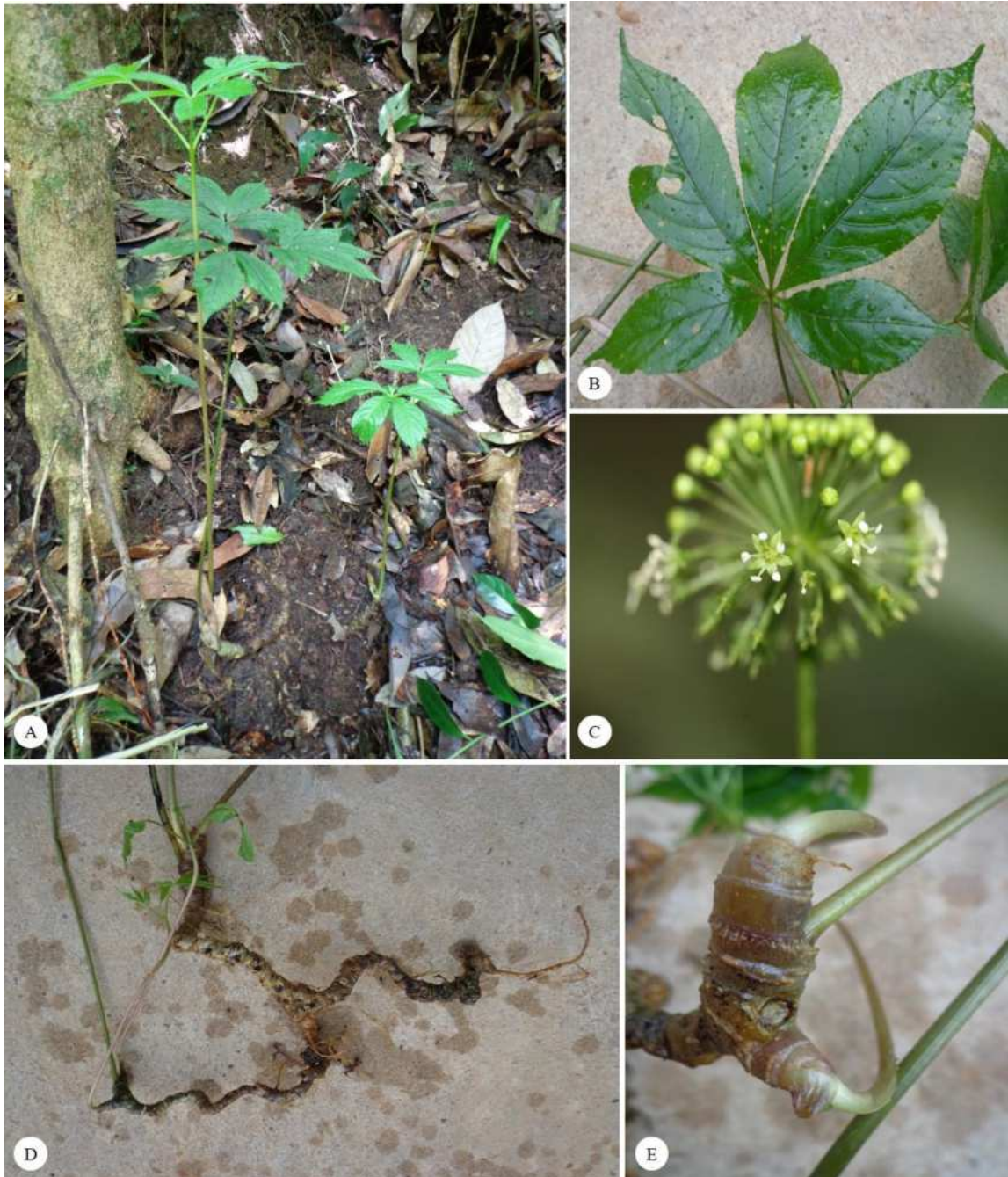
Cây thân thảo, lâu năm, cao 50 – 90 cm. Thân khí sinh thẳng, mảnh, nhẵn với phần lõi xốp, mang các lá kép chân vịt với 3, 4 hoặc hiếm khi 5 lá kép mọc vòng ở đỉnh thân khí sinh, cuống lá kép dài 8 – 13 cm, nhẵn, không có lá kèm hay những phần phụ giống lá kèm (Hình 1.1 A).

Lá kép thường gồm 5 lá chét (hiếm khi đến 7), gồm ba lá chét lớn liền nhau có hình oval hay elip, kích thước 10 – 12 × 4 – 5 cm; hai lá chét còn lại nhỏ hơn cũng có dạng oval-elip với kích thước 4 – 5 × 2 – 3 cm; lá chét mang 5 – 8 gân thứ cấp, phiến dạng màng, có lông ở các gân cả hai mặt lá; gốc lá dạng nêm hay hẹp dần, mép lá chét thường có răng cưa, hiếm khi mang răng cưa đôi; đầu lá chét có dạng mũi nhọn ngắn, dài 8 mm, cuống lá chét dài 8 – 11 mm (Hình 1.1 B).

Cụm hoa dạng tán, khoảng 40 – 80 hoa, cuống cụm hoa dài 10 – 18 cm, có tuyến. Các hoa có đường kính 1,5 – 2 cm, cuống hoa dài 4 – 6 mm, đế hoa có dạng chén, đĩa bầu ban đầu dạng hơi lồi, màu xanh, sau đó chuyển sang dạng lồi hẳn lên và có màu vàng nhạt; đài hoa 5, dạng tam giác, dài 0,45 – 0,55 mm, nhẵn; cánh hoa 5, dạng hình trứng ngược, kích thước 1,4 × 0,75 mm, nhẵn. Bao phấn 5, kích thước 0,7 – 0,8 × 0,3 – 0,4 mm, chỉ nhị dài tương đương hay ngắn hơn cánh hoa; vòi nhị 2 (hiếm khi 1), kích thước 0,6 – 0,8 mm, bầu nhụy dài khoảng 1 mm. Quả có dạng

trứng, hơi dẹt, đường kính khoảng 4 – 5 mm, mang 1 (hiếm khi 2) hạt. Hạt chắc, dạng trứng với kích thước 3,5 – 4,5 × 3 – 4 mm (Hình 1.1 C).

Thân rễ dạng đốt, thường bò ngang, đường kính 1 – 2,5 cm, các đốt xếp gần nhau với khoảng cách giữa các đốt từ 2 – 5 cm, mặt bên ngoài có màu nâu vàng. Rễ củ gắn vào phần dưới của thân rễ, dạng phồng lớn, có hình chóp hay gần như dạng hình nón, kích thước 3 – 5 × 2 – 4 cm (Hình 1.1 D, E).



Hình 1.1. Đặc điểm hình thái của sâm Lang Bian
Thân mang lá chét; B. Lá chét; C. Tán hoa; D, E. Thân rễ

Lê Ngọc Triệu (2017) bước đầu phân tích sơ bộ thành phần saponin ở sâm Lang Bian, kết quả cho thấy sâm Lang Bian phân bố tại Lâm Đồng có các hoạt chất G-Rb1, G-Re, N-R1, G-Rd, G-Rg1 và M-R2 [54]. Tuy nhiên, tác giả vẫn chưa xác định được hàm lượng cụ thể các hoạt chất này.

1.1.3.3. Tình hình khai thác

Do có giá trị dược liệu quý nên sâm Lang Bian đang bị người dân săn lùng tại vùng rừng các huyện Đam Rông và Vườn Quốc gia Bidoup Núi Bà (Huyện Lạc Dương, Tỉnh Lâm Đồng), dẫn đến xâm hại tài nguyên rừng và đa dạng sinh học, số lượng cá thể ngoài tự nhiên giảm xuống. Do đó mà các chính sách liên quan đến chức năng quản lý nhà nước về đa dạng sinh học và các giải pháp bảo tồn cây sâm Lang Bian đang được quan tâm.

Bảng 1.4. Dự kiến diện tích phát triển sâm Việt Nam đến năm 2030 [55]

TT	Địa phương	Dự kiến diện tích (ha)				Loài sâm phát triển hoặc trồng thử nghiệm
		Tổng	Dưới tán rừng phòng hộ	Dưới tán rừng sản xuất	Trên đất nông nghiệp khác	
1	Quảng Nam	8400	7740	660		Ngọc Linh
2	Kon Tum	8180	4156	4024		Ngọc Linh
3	Lai Châu	3000	2700	287	13	Lai Châu
4	Điện Biên	500	500			Lai Châu Ngọc Linh
5	Lâm Đồng	50	40		10	Lang Bian Ngọc Linh
6	Gia Lai	800		800		Ngọc Linh
7	Lào Cai	8	6	2		Lai Châu
8	Thừa Thiên Huế	32	32			Ngọc Linh
9	Nghệ An	30	15	15		<i>Puxailaileng</i> Ngọc Linh
Tổng		21.000	15.189	5.788	23	

Theo quyết định số 611 về việc phê duyệt Chương trình phát triển sâm Việt Nam đến năm 2030, định hướng đến năm 2045 của Thủ tướng Chính phủ [55], tỉnh Lâm Đồng dự kiến đến năm 2030 sẽ phát triển 50 ha trồng sâm, trong đó 40 ha dưới tán rừng phòng hộ và 10 ha trên đất nông nghiệp khác (Bảng 1.4). Trong đó, sâm Lang Bian là một trong những đối tượng bảo tồn, gây trồng, phát triển quy mô thử nghiệm ở khu vực có điều kiện tự nhiên phù hợp.

Lâm Đồng là một trong các địa phương có tiềm năng, thế mạnh về điều kiện tự nhiên thích hợp cho việc nuôi trồng, phát triển sâm. Do đó, tỉnh Lâm Đồng có nhiệm vụ bảo tồn, gây trồng, phát triển quy mô thử nghiệm ở khu vực có điều kiện tự nhiên phù hợp đối với loài sâm Lang Bian. Trong đó, nhiệm vụ cụ thể xây dựng hệ thống cơ sở dữ liệu về bảo tồn, xây dựng vùng bảo tồn nguyên vị và vườn sưu tập nguồn gen tại một số vùng sinh thái điển hình có phân bố tự nhiên, đề xuất vùng trồng thích hợp, phát triển nguồn gen. Đồng thời, các ngành chức năng và chính quyền địa phương cần thông tin rộng rãi để người dân được biết về giá trị dinh dưỡng cũng như thương mại của sâm Lang Bian để có giải pháp bảo tồn đa dạng sinh học loài sâm Lang Bian và có thể khai thác hợp lý.

1.1.3.4. Tình hình nhân giống

Tính từ khi sâm Lang Bian được phát hiện và công bố đến nay, chỉ có ba công bố liên quan đến định danh sâm Lang Bian [16, 17, 54], các nghiên cứu liên quan đến nhân giống sâm Lang Bian được chưa được thực hiện. Do đó, sẽ khó khăn cho quá trình nhân giống cũng như mở rộng diện tích trồng sâm Lang Bian nhằm đáp ứng mục tiêu bảo tồn và phát triển đối tượng thực vật này. Chính vì lý do đó, nhân giống sâm Lang Bian bằng phương pháp *in vitro* cần được triển khai nghiên cứu, nhằm bước đầu tạo ra nguồn cây giống cung cấp cho nhu cầu bảo tồn và trồng trọt tại địa phương.

1.2. Nuôi cấy phôi soma

1.2.1. Khái niệm

Phôi thực vật bên cạnh phát sinh theo con đường sinh sản hữu tính còn có thể tạo ra một cách tự nhiên hay nhân tạo theo hướng phát sinh phôi soma. Sự phát sinh phôi soma được định nghĩa là một quá trình mà trong đó cấu trúc lưỡng cực giống phôi hữu tính phát triển từ một tế bào sinh dưỡng không có liên kết mạch dẫn với tế bào gốc ban đầu [56].

Phôi soma có nguồn gốc từ các tế bào soma, các tế bào này có vai trò phát sinh phôi tương tự như hợp tử. Sau giai đoạn hình thành các tế bào có khả năng phát sinh phôi và sự biệt hóa tế bào, phôi soma được hình thành. Phôi soma bao gồm chồi đỉnh

và mầm chóp rễ, từ đó có thể nảy mầm trực tiếp thành cây con hoàn chỉnh, không cần thiết trải qua giai đoạn tạo chồi và rễ.

Sự phát sinh phôi soma có thể diễn ra theo hai hướng trực tiếp và gián tiếp. Trong đó, phát sinh phôi soma trực tiếp xảy ra không qua giai đoạn tạo mô sẹo, ngược lại, phát sinh phôi soma gián tiếp bắt buộc phải trải qua giai đoạn tạo mô sẹo trước khi phôi soma hình thành và phát triển. Sự khác biệt giữa quá trình phát sinh phôi soma trực tiếp và gián tiếp vẫn chưa được hiểu rõ, tuy nhiên, theo nhiều giả thuyết thì sự phát sinh trực tiếp thường từ các tế bào có nguồn gốc từ phôi hợp tử, ngược lại, sự phát sinh phôi soma gián tiếp lại xảy ra ở các tế bào biệt hóa và đầu tiên sẽ tạo thành các mô sẹo chưa biệt hóa. Trong các mô sẹo được tạo thành bao gồm cả những tế bào có khả năng phát sinh phôi soma và cả những tế bào không có khả năng phát sinh phôi soma và thường được phân biệt dựa vào hình thái và màu sắc của chúng. Tế bào có khả năng phát sinh phôi soma có thể được phân biệt về mặt mô học với các tế bào khác bằng một số đặc điểm như kích thước nhỏ, tế bào chất đặc hơn, nhân lớn nằm ở vị trí trung tâm, tỷ lệ giữa nhân và tế bào chất cao, gần nhân có vi ống và sợi nhỏ actin nổi rõ [57]. Nhân lớn trong tế bào quyết định sự sắp xếp của các vi ống cũng như tạo ra các rRNA, ảnh hưởng đến hướng và vị trí của mặt phẳng phân chia tế bào.

Ngoài ra, trong các tế bào này còn hiện diện nhiều hạt tinh bột nhỏ, rất nhiều ti thể, bộ máy Golgi và mạng lưới nội chất. Tinh bột có vai trò quan trọng cung cấp năng lượng cho sự tăng trưởng tế bào trong suốt các giai đoạn hình thành các vùng sinh phôi [58]. Đồng thời, sự hiện diện của nhiều ti thể trong giai đoạn này có vai trò cung cấp năng lượng ATP (Adenosine triphosphate) và các tiền chất cần thiết cho quá trình tổng hợp các protein đặc biệt có liên quan đến sự phân chia đầu tiên không cân xứng của tế bào. Sự hoạt động mạnh mẽ của bộ máy Golgi và mạng lưới nội chất giúp cho sự thành lập phragmoplast – cấu trúc chứa các vi ống ở giữa tế bào đang phân chia để hình thành vách ngang giúp cho sự phân chia tế bào thành hai tế bào con.

1.2.2. Các giai đoạn của quá trình phát sinh phôi soma

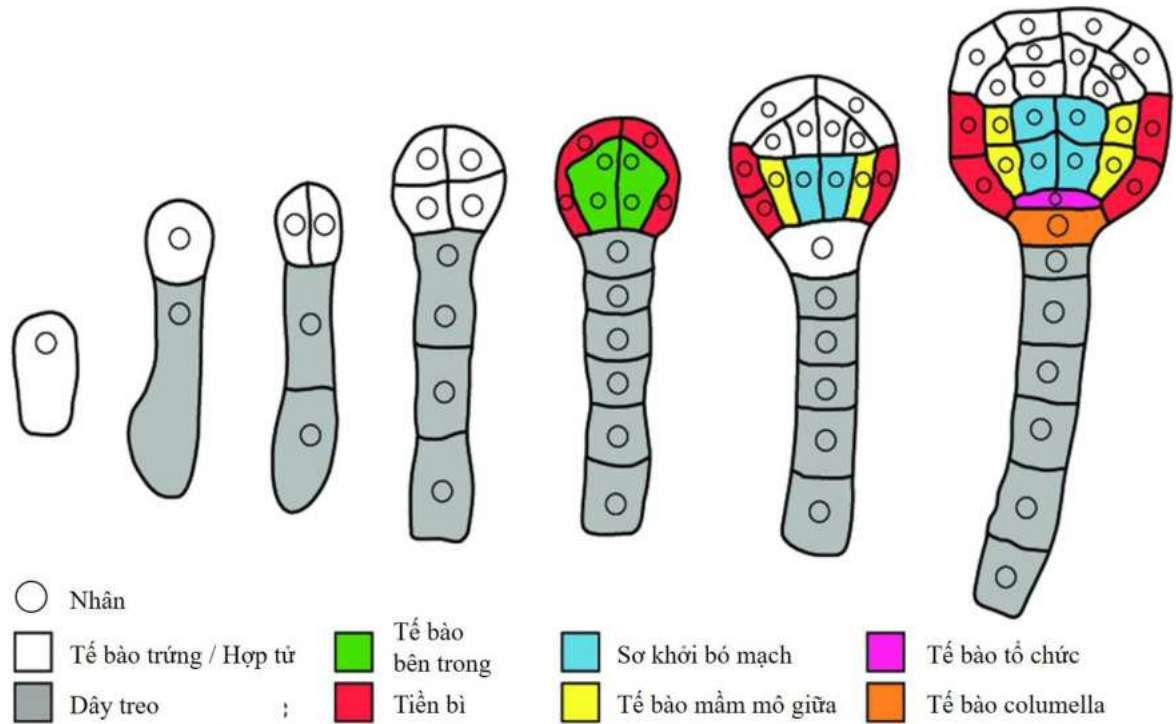
Sự tái sinh thực vật thông qua con đường phát sinh phôi soma bao gồm các giai đoạn (1) Sự cảm ứng quá trình phát sinh phôi soma, giai đoạn này cần có sự tác động của chất điều hòa sinh trưởng thực vật (PGRs), chủ yếu là auxin; (2) Sự tăng sinh phôi soma trong môi trường nuôi cấy rắn hoặc lỏng có bổ sung PGRs tương tự giai đoạn 1; (3) Phôi soma ở giai đoạn trước khi trưởng thành trong môi trường không bổ sung PGRs, ức chế sự tăng sinh và phát sinh phôi soma thứ cấp; (4) Giai đoạn phôi

soma trưởng thành, phôi soma được nuôi cấy trong môi trường bổ sung acid abscisic (ABA); và (5) Sự sinh trưởng và phát triển của cây con có nguồn gốc từ phôi soma trong môi trường không bổ sung PGRs [56].

Tế bào bắt đầu phân chia lần đầu tiên theo chiều ngang tạo thành hai tế bào không đều nhau, bao gồm một tế bào ngọn (kích thước nhỏ, nguồn gốc của phôi soma) và một tế bào gốc (kích thước lớn hơn, nguồn gốc của dây treo). Các lần phân chia tiếp theo có thể theo chiều ngang hoặc chiều dọc tùy theo từng đối tượng thực vật tạo thành một chuỗi gồm ba hoặc bốn tầng, tế bào ở mỗi tầng tạo một vùng xác định trong phôi soma. Sau các lần phân chia, các tiền bì (protoderm), sơ khởi và phôi soma ở giai đoạn hình cầu xuất hiện (Hình 1.2). Giai đoạn phôi hình cầu là khởi đầu của sự phân hóa cấu trúc trong quá trình phát sinh phôi soma, tiền bì đóng vai trò như lớp ngoài của phôi giúp phôi tạo hình dạng thông qua tác động vật lý với các tế bào bên trong, đồng thời điều hòa sự phân chia và biệt hóa tế bào trong phôi [59].

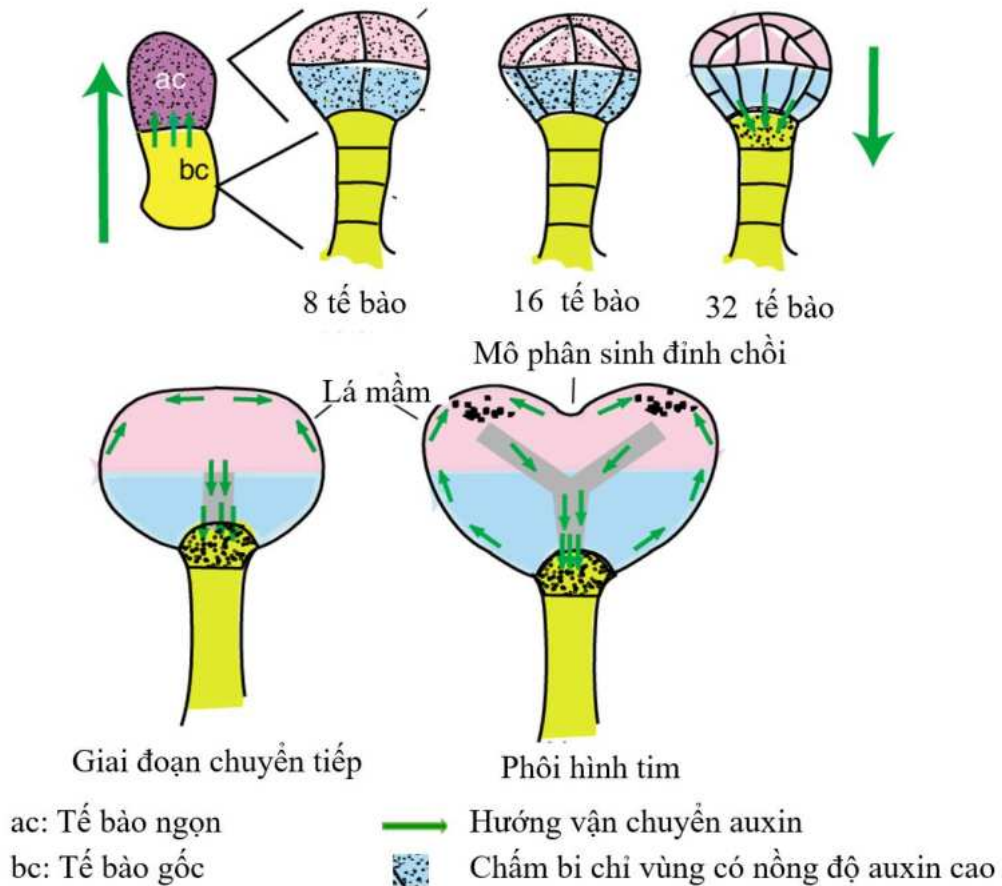
Tiếp sau đó, các vùng mô phân sinh chồi và rễ được hình thành và thường bắt đầu vào cuối giai đoạn phôi hình cầu và cấu trúc này được nhận thấy rõ ràng ở giai đoạn phôi có lá mầm. Các tế bào bên trong phôi kéo dài là dấu hiệu của sự biệt hóa tiền tượng tầng. Sự phân hóa cấu trúc bắt đầu ở giai đoạn phôi hình cầu. Ở giai đoạn phôi hình cầu muộn, ở vị trí cách lớp tế bào biểu bì khoảng vài lớp tế bào có sự hình thành mô phân sinh ngọn chồi từ các tế bào nhân to, tế bào chất đậm đặc. Sự hình thành mô phân sinh ngọn rễ xảy ra sau sự hình thành mô phân sinh ngọn chồi. Ban đầu, hai mô phân sinh ngọn chồi và mô phân sinh ngọn rễ nằm gần nhau. Sau đó, do sự kéo dài và phân hóa các tế bào làm cho chúng cách xa nhau. Các biến đổi về mặt hình thái tiếp theo dẫn đến sự hình thành phôi soma hình tim, hình thủy lôi và sự xuất hiện của lá mầm và rễ mầm. Các lá mầm có nguồn gốc từ các tế bào vùng ngoài biên của phôi tạo nên phôi hình tim. Lá mầm có vai trò quan trọng trong sự điều hòa dòng auxin và thúc đẩy quá trình nảy mầm.

Trong suốt giai đoạn trưởng thành, phôi soma trải qua các biến đổi hình thái và sinh hóa, các phôi soma ở giai đoạn này tăng cường tích lũy sản phẩm dự trữ, chuẩn bị cho giai đoạn phát triển tạo thành cây hoàn chỉnh và thông thường các phôi soma phát triển thành các cây nhỏ khi được cấy trên môi trường không có chất điều hòa sinh trưởng [34].



Hình 1.2. Sự phát sinh phôi của cây Arabidopsis [60]

Ở giai đoạn cảm ứng phát sinh phôi soma, các tế bào được tác động để kết thúc sự biểu hiện gen hiện tại và thay bằng chương trình biểu hiện gen phát sinh phôi soma. Giai đoạn này cần sự hiện diện của auxin với vai trò trung tâm trong điều hòa truyền tín hiệu dẫn đến việc cảm ứng sự phân chia tế bào, tăng trưởng khối mô sẹo không tổ chức hoặc tăng trưởng có cực dẫn đến phát sinh phôi soma. Sự vận chuyển và phân bố không đồng đều của auxin cần thiết để cảm ứng quá trình phát sinh phôi cũng như góp phần xác định vị trí của các cấu trúc phôi như mô phân sinh đỉnh chồi, mô phân sinh rễ, lá mầm, mạch dẫn... Trong giai đoạn đầu của quá trình phát sinh phôi, auxin di chuyển hướng ngọn nhờ các protein vận chuyển. Sự vận chuyển auxin theo chiều hướng này được tiếp tục ở các giai đoạn 8 và 16 tế bào. Trong phôi hình cầu ở giai đoạn 32 tế bào, sự vận chuyển auxin thay đổi hướng (mũi tên) và auxin tích tụ nhiều trong tế bào yên (tế bào dây treo ở vị trí gần phôi nhất). Tế bào này tạo ra một phần của mô phân sinh rễ. Ở giai đoạn chuyển tiếp giữa giai đoạn hình cầu và giai đoạn hình tim, auxin có xu hướng vận chuyển đến vùng trung tâm của các tế bào hình thành lá mầm. Phôi ở giai đoạn hình tim có sự xuất hiện của lá mầm, mô phân sinh đỉnh chồi và sơ khởi bó mạch (Hình 1.3).



Hình 1.3. Sự vận chuyển auxin trong quá trình phát sinh phôi Arabidopsis [61].

1.2.3. Sự phát sinh phôi soma thứ cấp

Phôi soma được tạo ra trực tiếp hoặc gián tiếp trên các mẫu cây được gọi là phát sinh phôi soma sơ cấp, trong khi sự hình thành phôi soma trên phôi soma sơ cấp được gọi là phát sinh phôi soma thứ cấp. Phôi soma sơ cấp không chuyển đổi thành cây con hoàn chỉnh mà thay vào đó tạo ra nhiều phôi soma thứ cấp. Trong giai đoạn này, auxin cần thiết cho sự tăng sinh các cụm tiền phôi nhưng lại có tác dụng ức chế chúng phát triển thành phôi soma. Các phôi soma vẫn tiếp tục tăng sinh, tạo thành cụm tiền phôi, thường thì môi trường tương tự như môi trường phát sinh phôi soma được sử dụng để duy trì và tăng sinh. Phôi soma ở những giai đoạn phát triển khác nhau ảnh hưởng đến khả năng phát sinh phôi soma thứ cấp từ nguồn phôi soma sơ cấp ban đầu. Ở thực vật hạt trần, chỉ những tế bào ở trạng thái tiền phôi hay trước giai đoạn hình cầu mới có khả năng phát sinh phôi soma thứ cấp. Ngược lại, hầu hết thực vật hạt kín, các mẫu cây ở giai đoạn sinh trưởng khác nhau đều có khả năng phát sinh phôi soma thứ cấp. Kim và cộng sự (2012) trong nghiên cứu nuôi cấy phôi soma *P. ginseng*, với mục tiêu nhân nhanh sinh khối cho rằng phôi soma sơ cấp phát sinh từ các mẫu cắt lá mầm của phôi hợp tử là nguồn vật liệu phù hợp để kích thích hình

thành phôi soma thứ cấp. Tỷ lệ phôi soma sơ cấp hình thành trong môi trường không có và có bổ sung PGRs chỉ đạt lần lượt là 32,5% và 45%. Tuy nhiên, sự hình thành phôi soma thứ cấp từ nguồn mẫu phôi soma sơ cấp đạt được tỷ lệ cao hơn (88%) khi cấy trên môi trường có 2,4-D và Kinetin. Phôi soma thứ cấp hầu hết xuất hiện ở một số vùng như là trụ dưới lá mầm và phần cực rễ [12].

1.2.4. Một số yếu tố ảnh hưởng đến sự phát sinh phôi soma

Sự phát sinh phôi soma ở các loài sâm đã được nghiên cứu, trong đó, các nguồn mẫu cấy, môi trường dinh dưỡng, PGRs và các biện pháp xử lý để nâng cao chất lượng phôi soma (xử lý kim loại nặng, UV, sử dụng chất kháng sinh, gây stress thâm thấu, làm khô, xử lý nóng và lạnh cũng như các biện pháp xử lý vật lý và hóa học được tập trung nghiên cứu. Butenko và cộng sự (1968) đã có những kết quả nghiên cứu đầu tiên trong việc cảm ứng phát sinh phôi soma và cơ quan của *P. ginseng* để tạo cây hoàn chỉnh [62]

1.2.4.1. Loại mẫu cấy

Hầu hết các mô thực vật, như: thân, lá, cuống lá, rễ, chồi hoa, phôi non... của cây *ex vitro* và *in vitro* đều có khả năng phát sinh phôi soma. Tuy nhiên, hiệu quả cảm ứng tạo phôi soma tùy vào từng thực vật, từng loại mô và các giai đoạn phát triển khác nhau do sự khác biệt về hàm lượng các chất nội sinh.

Khả năng phát sinh phôi soma tạo ra cây mới từ các tế bào sinh dưỡng phụ thuộc rất nhiều vào thuộc tính toàn năng của tế bào. Sự phát sinh phôi soma được cảm ứng từ các mẫu cấy khác nhau như rễ tự nhiên [7]; rễ bất định [7]; lá [58]; túi phấn [63], và phôi hữu tính hay cây con nảy mầm từ hạt [14] (Bảng 1.5).

Trong nuôi cấy *in vitro*, trạng thái sinh lý của mẫu gây ra sự đáp ứng hình thái khác biệt. Các mô có chứa hàm lượng hormone nội sinh và đường khác nhau, hàm lượng này thay đổi ở lá, cuống lá và rễ và có sự khác biệt giữa phần đỉnh và phần gốc của lá mầm và trụ trên lá mầm. Hàm lượng hormone cũng thay đổi trong quá trình hình thành các cơ quan. Sự tương tác và cân bằng giữa hàm lượng hormone có thể được điều chỉnh bởi các yếu tố tác động khác nhau trong quá trình phát triển của thực vật. Do đó, các mô, cơ quan thực vật được sử dụng làm nguồn mẫu ban đầu sẽ tác động trực tiếp đến khả năng tái sinh. Các nghiên cứu về hàm lượng hormone trong mẫu rễ, cuống lá và lá của cây *Populus spp.* cho thấy, có sự tích lũy của zeatin, acid indole-3-acetic và acid abscisic, những chất này, có thể đóng vai trò trung gian trong quá trình hình thành cơ quan [64]. Đồng thời, các tế bào gần bề mặt vết cắt dễ dàng

chịu tác động của stress từ môi trường và chính sự stress này gây ra sự phản biệt hóa và phát sinh phôi soma.

Bảng 1.5. Nuôi cấy phôi soma sâm từ các nguồn mẫu cây khác nhau

Loài	Nguồn mẫu	Môi trường nuôi cấy	Nguồn
<i>P. ginseng</i> C.A. Mayer	Rễ sâm tự nhiên	MS + 2,4-D + kinetin + sucrose	[7]
	Rễ bất định	MS + 2,4-D + kinetin	[7]
	Túi phấn	MS + 2,4-D	[63]
	Phôi hợp tử	MS	[65] [66]
	Lá mầm	MS/SH + 2,4-D + BA + lactalbumin hydrolysate	[67]
	Lá	MS + NAA + 2,4-D	[68]
<i>P. quinquefolius</i>	Lá mầm	MS + 2,4-D và NAA	[69]
	Rễ chuyên gen	MS + 2,4-D và NAA	[70]
<i>P. pseudoginseng</i>	Thân rễ	MS + 2,4-D + BAP	[71]
<i>P. japonicus</i>	Phôi hợp tử	MS + 2,4-D Xử lý bằng mannitol	[9]
<i>P. notoginseng</i>	Rễ bất định	MS + 2,4-D	[13]
<i>P. vietnamensis</i>	Lá <i>in vivo</i>	MS/B5 + 2,4-D + kinetin + casein và IBA	[39]
	Mẫu lá tTCL-L <i>in vitro</i>	MS + NAA	[72]
<i>P. ginseng</i> x <i>P. quinquefolius</i>	Cuống lá cây con nảy mầm từ hạt lai	MS + 2,4-D	[14]

B5: Gamborg B5 (1968); MS: Murashige & Skoog (1962); SH: Schenk & Hildebrandt; BA: 6-benzyl adenine; 2iP: 2-isopentenyladenine; BSAA: 3-benzo selenenyl acetic acid; BZ: 3-benzo selenenyl acetic acid; tTCL-L: Transverse thin cell layer

Prakash và Gurumurthi (2009) báo cáo độ tuổi khác nhau (10, 15, 25, 30 ngày tuổi) tác động lên sự cảm ứng mô sẹo cũng như phát sinh phôi soma trực tiếp từ phôi hợp tử và lá mầm của những cây con *Eucalyptus camaldulensis in vitro*. Kết quả ghi nhận được cho thấy, mô sẹo được hình thành với tỷ lệ cao nhất từ mẫu cây lá mầm của cây con 10 ngày tuổi. Tuy nhiên, mô sẹo từ phôi hợp tử cảm ứng phát sinh phôi soma tốt nhất. Đồng thời, phát sinh phôi soma trực tiếp từ trụ dưới lá mầm không trải qua giai đoạn hình thành mô sẹo [73]. Những mẫu lá *in vitro* không những là nguồn vật liệu sẵn có mà còn có hiệu quả trong quá trình phát sinh phôi. Các tế bào thịt lá có tiềm năng phản biệt hóa và đi theo nhiều con đường phát sinh hình thái khác nhau khi được nuôi cấy trong môi trường phù hợp. Hơn thế nữa, sự tái sinh cây từ mẫu cây lá cho sự biến dị di truyền thấp [74].

Phôi soma được ghi nhận phát sinh trực tiếp từ mẫu lá TCL hiệu quả hơn so với cuống lá và thân rễ TCL khi được nuôi trong môi trường MS bổ sung 2,0 mg/L NAA ở sâm Ngọc Linh [72]. Kết quả tương tự cũng được công bố trong nghiên cứu sự phát sinh phôi soma từ mẫu cây lá và rễ trên đối tượng *Scaevola sericea*. Theo Liang và cộng sự (2020), mẫu cây lá cho sự hình thành phôi soma cao hơn so với mẫu rễ, số lượng phôi soma thu được là 17,3 phôi/mẫu sau 30 ngày nuôi cấy, trong khi mẫu cây từ rễ chỉ tạo được 7,6 phôi/mẫu [75].

Nhìn chung, tùy theo loại mẫu nuôi cấy, độ tuổi và tình trạng sinh lý của mẫu, có sự khác biệt về phản ứng của các mô thực vật về việc phát sinh phôi soma. Vì vậy, việc xác định nguồn mẫu là rất quan trọng nhằm mục tiêu nâng cao hiệu quả cảm ứng và phát sinh phôi soma.

1.2.4.2. Dinh dưỡng khoáng

Trong nuôi cấy phôi soma, tần suất hình thành phôi và khả năng trưởng thành của phôi cũng phụ thuộc vào hàm lượng khoáng. Do đó, nhiều nghiên cứu đã tiến hành điều chỉnh hàm lượng các chất khoáng phù hợp cho sự cảm ứng hình thành và phát triển phôi soma.

Hiện nay, trong nuôi cấy *in vitro* có rất nhiều loại môi trường khác nhau được sử dụng. Thành phần cũng như tỷ lệ các chất khoáng trong các loại môi trường nuôi cấy có sự khác biệt. Chẳng hạn, hàm lượng nitơ dạng amonium (NH_4^+) trong môi trường MS (370 mg/L) cao hơn khoảng 10 lần so với môi trường SH (37 mg/L).

Môi trường MS thường được sử dụng phổ biến nhất trong nuôi cấy, vì phần lớn các cây trồng đều đáp ứng tốt với môi trường này. Đây là môi trường có hàm lượng muối cao (hàm lượng N và một số vi lượng đặc biệt là B và Mn) so với nhiều

công thức môi trường khác. Kim và cộng sự (2012) nuôi cấy phôi soma của *P. ginseng* báo cáo rằng, chỉ có khoảng 20 phôi/mẫu được hình thành trong môi trường có hàm lượng amonium và nitrat giảm đi một nửa; ngược lại, tỷ lệ mẫu hình thành phôi soma thứ cấp tăng lên đến 80%, số lượng phôi soma tạo thành là 50 phôi/mẫu trong môi trường MS. Như vậy, hàm lượng ammonium cao sẽ kích thích sự phát sinh phôi soma *P. ginseng* [12].

Tuy nhiên, môi trường MS không phải phù hợp cho sự sinh trưởng của mẫu cấy đối với tất cả các đối tượng thực vật, khi hàm lượng dinh dưỡng khoáng quá cao có thể gây ức chế sự phân chia của tế bào, mô thực vật nuôi cấy. Nguyên nhân có thể là do các ion ở nồng độ cao có thể gây độc cho các tế bào, mô, cơ quan. Đối với *P. ginseng* và *P. quinquefolius*, môi trường SH lại phù hợp hơn cho sự tăng trưởng của phôi soma [76]. Kết quả tương tự cũng được ghi nhận đối với *P. ginseng*, Lee và cộng sự (2021) báo cáo các cây con có nguồn gốc từ phôi hợp tử có thể hình thành rễ củ và phát triển tốt sau vài tháng nuôi cấy trong môi trường 1/3 SH bổ sung 2% sucrose. Hầu hết các cây con đều có khả năng sống sót sau khi chuyển ra vườn ươm [15].

Ngoài việc lựa chọn môi trường khoáng phù hợp, thì việc điều chỉnh hàm lượng các chất khoáng trong môi trường nuôi cấy cũng đóng vai trò quan trọng trong việc tăng cường hiệu quả quá trình nuôi cấy. Liu và Zhong (1998) nghiên cứu tác động của hàm lượng phosphate đến sự tăng trưởng của tế bào *P. ginseng* và *P. quinquefolium* cho rằng, hàm lượng phosphate thấp (dưới 1,04 mM) kìm hãm sự tăng trưởng của tế bào, trong trường hợp ngược lại, khi gia tăng hàm lượng phosphate (1,04 – 4,17 mM) dẫn đến kích thích tế bào tăng trưởng [77].

Từ các kết quả nghiên cứu nuôi cấy phôi soma *P. ginseng* thu nhận được, Kim và cộng sự (2012) đã đề xuất quy trình nhân nhanh cây giống theo con đường phát sinh phôi soma sơ cấp và thứ cấp, những phôi soma phát triển thành những cây con hoàn thiện đầy đủ chồi và rễ. Đồng thời, tỷ lệ phát sinh phôi soma cao nhất được báo cáo trong môi trường có tỷ lệ $\text{NH}_4^+ : \text{NO}_3^-$ là 21:39. Trong các loại môi trường được thử nghiệm, MS, B5 và SH, mẫu lá mầm cho tỷ lệ phát sinh phôi soma cao nhất trong môi trường MS. Phôi soma thứ cấp được phát sinh trực tiếp từ phôi soma sơ cấp trong môi trường MS không bổ sung PGRs và vẫn hình thành cây con bình thường. Các cây con này có rễ phát triển tốt trong môi trường 1/3 MS cải tiến bổ sung 2% đến 3% đường. Tiếp theo, cây con sinh trưởng tốt khi được chuyển qua môi trường SH bổ sung 0,5% than hoạt tính [12].

Như vậy, dẫn từ các kết quả nghiên cứu trên cho thấy, môi trường khoáng có vai trò quyết định trong việc kích thích cảm ứng và phát triển phôi soma. Tùy theo

loại thực vật cần lựa chọn và điều chỉnh môi trường khoáng phù hợp nhằm gia tăng hiệu suất nuôi cấy phôi soma.

1.2.4.3. Chất điều hòa sinh trưởng thực vật

Tùy theo từng thực vật cụ thể, ngoài hàm lượng khoáng, chất điều hòa sinh trưởng (sử dụng độc lập hoặc kết hợp) cũng ảnh hưởng đáng kể đến sự phát sinh hình thái của mẫu. Đây là một trong những yếu tố có vai trò quyết định đến tỷ lệ và dạng phát sinh hình thái của mô. Trong số đó, auxin được biết đến với vai trò là một chất cảm ứng gây ra stress oxy hóa và những phản ứng stress liên quan đến quá trình phát sinh phôi soma. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra vai trò của auxin trong việc khởi động chương trình phát sinh phôi soma, quá trình methyl hóa DNA được diễn ra, trong khi đó, chương trình biểu hiện gen của tế bào bị kết thúc hoặc làm thay đổi.

Vai trò tác động của auxin thể hiện ở cả hai giai đoạn, cảm ứng phát sinh phôi soma và hình thành phôi soma. Trước tiên, auxin có tác dụng duy trì tính lưỡng cực của tế bào và làm cho tế bào có thể tách khỏi sự tác động của các tế bào bên ngoài nhờ việc cắt đứt các cầu sinh chất – cầu nối giữa các tế bào với nhau hoặc làm cho quá trình tương tác giữa các tế bào bị gián đoạn. Kết quả là kết thúc chương trình biểu hiện gen sẵn có và chương trình hình thành phôi soma được thiết lập. Song song với quá trình đó, do các tế bào này không còn bị ảnh hưởng bởi các tế bào lân cận nên chúng có thể tách rời khỏi khối mô sẹo [78].

Bên cạnh đó, auxin còn ảnh hưởng đến khả năng hình thành phôi soma thông qua việc tác động đến chương trình của genome, dẫn đến sự phân biệt hóa và phân chia tế bào. Ngoài ra, auxin cũng có tác động lên thụ thể màng, hoạt hóa hoạt động của bơm proton nằm trên màng tế bào, làm tăng acid vách tế bào. Từ đó, tạo điều kiện cho enzyme hoạt động, dẫn đến vách tế bào trở nên lỏng lẻo, tăng khả năng hấp thu nước và gia tăng kích thước [79].

Các nghiên cứu về ảnh hưởng của PGRs đến khả năng hình thành phôi soma trên các loài sâm khác nhau đã được công bố. Các loại auxin như 2,4-D, NAA có tác dụng gia tăng sự phát sinh phôi soma của các loài *P. japonicus*, *P. vietnamensis* var. *fuscidicus* [9, 47]. Tuy nhiên, nhu cầu về loại và nồng độ auxin thay đổi tùy theo từng đối tượng và loại mẫu cây khác nhau. Đối với *P. vietnamensis*, mẫu thân rễ tTCL-R hình thành phôi soma với hiệu quả cao trong môi trường có bổ sung 2 mg/L 2,4-D. Tuy nhiên, đối với mẫu lá tTCL-L, tỷ lệ mẫu hình thành mô sẹo cũng như số lượng phôi soma nhiều hơn trong môi trường bổ sung 2 mg/L NAA [72].

Ngoài ra, khi nghiên cứu nuôi cấy phôi soma và tạo cây con sâm lai *P. ginseng* và *P. quinquefolius*, Kim và cộng sự (2019) cho rằng, cuống lá là loại mẫu cây phù hợp để tạo mô sẹo. Giữa các loại auxin thì 2 mg/L 2,4-D cảm ứng tạo mô sẹo và phát sinh phôi soma tốt nhất. Trong môi trường SH bổ sung 5 mg/L GA₃, phôi soma nảy mầm nhanh chóng; và khi cây chuyển sang môi trường ½ SH tạo thành cây con hoàn chỉnh với cả chồi và rễ [14]. Từ các kết quả nghiên cứu cho thấy, tùy thuộc loại và nồng độ auxin sử dụng có tác động khác biệt đến tần suất phát sinh phôi soma và số lượng phôi soma phát sinh trên mẫu cây.

Tuy nhiên, auxin tồn tại ở nồng độ cao lại ngăn cản sự trưởng thành phôi soma. Auxin tác động lên sự phân chia tế bào, nên số lượng tế bào tăng nhanh và liên kết chặt chẽ với nhau trong khối mô sẹo. Do đó, vách thứ cấp dày lên và sự tăng trưởng của tế bào bị ức chế. Kết quả làm cho khối mô sẹo chặt thêm và các tế bào khó tách cụm. Đồng thời, nhiều mRNA và protein khác cũng được kích thích tổng hợp dẫn đến cản trở việc hoàn thiện chương trình phát triển phôi soma. Trong nghiên cứu phát sinh phôi soma trên đối tượng Tam Thất hoang (*P. stipuleanatus*), trước tiên môi trường bổ sung 2,4-D ở nồng độ cao được sử dụng để kích thích sự phân chia tế bào. Sau đó, chuyển các mẫu đã phân chia sang môi trường có nồng độ 2,4-D thấp hơn hoặc NAA để giảm sự phân chia và tăng sự kéo dài tế bào. Kết quả tạo được một lượng mô sẹo lớn, dạng xốp và dễ tách rời bao gồm nhiều tế bào đẳng kính. Các nghiên cứu cũng chỉ ra rằng, các tế bào có xu hướng phân chia không theo quy luật khi được nuôi trong môi trường bổ sung 2,4-D; trong môi trường có NAA thì các tế bào lại có xu hướng phân chia cân xứng, tạo thành cụm gồm các tế bào nhân to, tế bào chất đậm đặc, giống như một hợp tử [51].

Cytokinin là một phytohormone thiết yếu đóng vai trò quan trọng trong sự sinh trưởng và phát triển của thực vật, tham gia vào quá trình phân chia, biệt hóa và phát sinh hình thái tế bào. Cytokinin giúp cho tế bào gia tăng kích thước thông qua việc làm giảm pH thành tế bào. Trong quá trình phân chia tế bào, cytokinin ảnh hưởng đến hai giai đoạn phân chia nhân và phân chia tế bào chất. Chính nhờ sự có mặt của cytokinin dẫn đến sự phân chia vách tế bào, trong khi auxin chỉ kích thích nhân đôi nhiễm sắc thể nhưng không có sự phân vách tế bào. Một số nghiên cứu trên đối tượng *Arabidopsis thaliana* đã chứng minh được vai trò của cytokinin trong hoạt động của mô phân sinh chồi.

Meta – topolin (mT) là dẫn xuất của BA tự nhiên được phát hiện gần đây. mT đã được chứng minh là có hiệu quả và được sử dụng trong nghiên cứu quá trình nảy mầm, tăng sinh chồi của các đối tượng thực vật khác nhau, chẳng hạn như *Citrus*

sinensis × *Poncirus trifoliata* [80] và *Prunus* spp. [81]. Ngoài ra, mT được chứng minh là di chuyển nhanh hơn trong các mô thực vật so với BA, chúng không tích lũy tập trung tại một vị trí nhất định trong mô thực vật và có vai trò làm giảm sự hình thành mô sẹo cũng như tình trạng thủy tinh thể của mẫu cây [82]. Tương tự như auxin, cytokinin cũng có vai trò quan trọng trong quá trình phát sinh phôi soma. Trong nghiên cứu phát sinh phôi soma ở thu hải đường (*Begonia*), Khai và cộng sự (2021) cho thấy hàm lượng CK và tỷ lệ CK/ABA cao có thể làm tăng số lượng phôi soma tạo thành [83].

Gibberellin (GA) là một loại phytohormone chính điều chỉnh sự sinh trưởng và phát triển của thực vật từ khi hạt nảy mầm đến khi cây ra hoa, kết quả, đậu hạt. Trong mô thực vật, GA tồn tại ở hai dạng tự do là dạng có hoạt tính sinh lý và dạng liên kết – dạng dự trữ và vận chuyển (GA liên kết với đường đơn nhờ các liên kết đồng hóa trị tạo thành GA glucoside). GA gây nên sự gia tăng kích thước tế bào trước khi cảm ứng sự phân chia tế bào. Tốc độ gia tăng kích thước tế bào có thể chịu ảnh hưởng của độ giãn vách và hấp thu nước vào tế bào theo cơ chế thẩm thấu. Như vậy cả GA và auxin cùng tác động đến sự gia tăng kích thước tế bào thông qua sự biến đổi các tính chất của vách tế bào. Tuy nhiên, tác động của GA đến sự gia tăng kích thước tế bào có thể phụ thuộc vào sự acid hóa vách tế bào đã được auxin cảm ứng. Đồng thời, GA tác động đến sự sinh trưởng của tế bào khác biệt với auxin. Zan (2019) báo cáo rằng enzyme xyloglucan endotransglycosylase (XET) liên quan với sự dẫn vách được GA khởi động. Chức năng của XET có thể giúp cho sự xâm nhập của expansin trong vách tế bào dễ dàng hơn (expansin là các protein gây nên sự kéo dẫn vách trong các điều kiện acid bằng cách làm suy yếu các liên kết hydro giữa các polysaccharide vách), cả expansin và XET cần cho sự giãn tế bào được GA kích thích [84]. Khác với auxin làm giãn vách tế bào thông qua việc làm acid hóa vách tế bào, gibberellin giúp cho sự giãn vách thông qua việc kích thích hấp thu Ca^{2+} vào tế bào dẫn đến giảm nồng độ Ca^{2+} trong vách tế bào. Đồng thời, GA_3 có tác động tích cực trong việc phá vỡ trạng thái ngủ và kích thích phôi soma nảy mầm [85]. Trong các dòng có khả năng phát sinh phôi của *M. sativa* và *M. truncatula*, GA nội sinh đóng vai trò kích thích sự phát sinh phôi soma [86].

ABA là một chất ức chế sinh trưởng và phát triển của thực vật, điều chỉnh sự trưởng thành của phôi và trạng thái ngủ của hạt, đồng thời ức chế sự nảy mầm, phân chia và kéo dài tế bào. Ngoài ra, ABA cũng có tác dụng tích cực đến sự phát sinh phôi soma. Kępczyńska và Orłowska (2021) báo cáo, ABA có liên quan đến khả năng phát sinh phôi soma từ các mẫu cây lá *Medicago truncatula* [87]. Liang và cộng sự

(2022) phát hiện ra rằng hàm lượng ABA cao có lợi cho sự phát sinh phôi soma ở thông Hàn Quốc [88].

1.2.4.4. Sự biến động hàm lượng hormone nội sinh trong quá trình phát sinh phôi soma

Hormone nội sinh đóng vai trò then chốt trong quá trình phát sinh và phát triển phôi soma. Do đó, mối quan hệ giữa sự thay đổi hàm lượng hormone nội sinh và quá trình phát sinh phôi soma cũng đã được báo cáo trong nhiều nghiên cứu. Liu và cộng sự (2019) đã chỉ ra rằng auxin (IAA) rất cần thiết cho việc phát sinh và phát triển phôi soma, đồng thời việc gia tăng hàm lượng IAA tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình phát sinh phôi soma. Trong nghiên cứu nuôi cấy phôi soma *Medicago sativa*, Pasternak và cộng sự (2002) cho thấy rằng hàm lượng IAA nội sinh tăng lên cao nhất trong giai đoạn từ 4-5 ngày đầu tiên của quá trình phát sinh phôi soma trực tiếp từ các tế bào trần tách từ các mẫu lá. Trong đó, sự gia tăng hàm lượng IAA có tương quan với sự phân chia và biệt hóa tế bào, từ đó thúc đẩy sự phát sinh phôi [89]. Bên cạnh đó, hàm lượng IAA thay đổi ở các giai đoạn khác nhau (mẫu ban đầu, mẫu ở giai đoạn cảm ứng và các giai đoạn phát triển phôi soma) trong suốt quá trình phát sinh phôi soma gián tiếp từ mẫu cuống lá *M. sativa* cv. Rangelander cũng được ghi nhận [90]. Trong đó, hàm lượng IAA rất thấp được quan sát thấy ở giai đoạn mô sẹo và huyền phù tế bào, sau đó, tăng lên và ổn định ở giai đoạn phôi hình cầu đến đầu giai đoạn phôi có lá mầm. Hàm lượng này giảm ở giai đoạn phôi có lá mầm và phôi trưởng thành. Ngoài ra, Kępczyńska và Orłowska (2021) cũng chỉ ra rằng mẫu lá ban đầu của hai kiểu gen *M. truncatula* Jemalong: M9-10a (phát sinh phôi) và M9 (không phát sinh phôi) có hàm lượng IAA tương đồng. Tuy nhiên, sau 21 ngày nuôi cấy, hàm lượng IAA trong mô sẹo của M9-10a tăng lên gấp 6 lần so với M9. Sự khác biệt quan sát được có liên quan đến quá trình dị hóa IAA trong 21 ngày của giai đoạn cảm ứng. Hàm lượng 2-oxindole-3-acetic acid (oxIAA) cao nhất được tìm thấy ở mô sẹo không có khả năng phát sinh phôi. Quá trình dị hóa IAA được coi là con đường chính dẫn đến bất hoạt IAA [87].

Trong nuôi cấy phôi *Ormosia henryi* Prain, hàm lượng Auxin, CKs, GA và ABA khác nhau đáng kể ở các giai đoạn phát sinh phôi soma. Ở giai đoạn đầu của quá trình phát sinh phôi soma, ngoại trừ hàm lượng auxin cao, các hormone còn lại có hàm lượng thấp. Tuy nhiên, xu hướng ngược lại được ghi nhận ở giai đoạn phôi có lá mầm. Những phát hiện này chỉ ra rằng hàm lượng auxin tương đối cao và hàm lượng CKs, GA và ABA thấp có lợi cho sự cảm ứng tạo mô sẹo có khả năng phát sinh phôi. Hàm lượng auxin cao là tiền đề cho sự phát sinh phôi soma và thiết lập tính

hữu cực. Trong khi đó, hàm lượng CKs cao quy định sự biệt hóa của phôi soma, GA và ABA với hàm lượng cao đã thúc đẩy sự trưởng thành và nảy mầm của phôi soma ở giai đoạn sau [91]. Tuy nhiên, trong nuôi cấy *Cucumis melo*, hàm lượng ABA trong mô sẹo có khả năng phát sinh phôi của *Cucumis melo* cao hơn so với mô sẹo không có khả năng phát sinh phôi. Từ đó cho thấy rằng ABA có liên quan đến việc khởi đầu sự phát sinh phôi soma.

Như vậy, hàm lượng hormone nội sinh thay đổi tùy theo từng giai đoạn của quá trình phát sinh phôi soma cũng như đối tượng thực vật. Do đó, việc xác định nồng độ cũng như tỷ lệ các hormone nội sinh có thể cung cấp thông tin để từ đó đánh giá vai trò của từng hormone nội sinh trong việc điều hòa quá trình phát sinh phôi soma ở thực vật.

1.2.4.4. Một số acid amin và polyamine

Acid amin

Acid amin có ảnh hưởng rất lớn trong việc kích thích hình thành phôi soma ở nhiều loài thực vật, thông qua việc cung cấp năng lượng cho tế bào và mô thực vật. Nguồn hữu cơ (dạng khử) sau khi được hấp thu vào trong tế bào sẽ được chuyển hóa rất nhanh, từ đó, kích thích sự tăng trưởng của tế bào.

Một số acid amin (proline, glutamine) cũng được bổ sung vào môi trường nuôi cấy để nghiên cứu tác động của chúng trong sự hình thành phôi soma. Proline giúp làm gia tăng hàm lượng protein trong các tế bào có khả năng phát sinh phôi soma. Sự hiện diện của proline trong môi trường làm giảm thế nước của môi trường nuôi cấy, gia tăng hàm lượng các chất tích lũy trong tế bào, do đó thúc đẩy quá trình phát sinh phôi soma.

Có nhiều nghiên cứu đã chỉ ra khi bổ sung glutamine hoặc proline ảnh hưởng đến việc gia tăng cảm ứng tạo phôi soma trên nhiều loài thực vật. Đỗ Đăng Giáp và cộng sự (2013) cho rằng một số acid amin và spermidine ảnh hưởng lên sự phát sinh phôi soma cây cọc rào (*Jatropha curcas*), trong đó proline (750 mg/L) và glutamine (150 mg/L) giúp nâng cao hiệu quả hình thành phôi soma từ mô sẹo [92].

Proline ở nồng độ tối ưu giúp cải thiện khả năng phát sinh phôi soma của mẫu cấy ở một số thực vật, như: sâm Ngọc Linh [93], dâu tây [94]. Đối với sâm Ngọc Linh, proline ở nồng độ 300 mg/L cho tần số phát sinh phôi soma và số lượng phôi soma (86,7% và 167 phôi/mẫu) tốt nhất. Đối với dâu tây, sự phát sinh phôi soma tốt nhất khi mô sẹo có nguồn gốc từ lá và đốt thân được nuôi trong môi trường MS có bổ sung 1,0 mg/L 2,4-D, 0,5 mg/L BAP và 500 mg/L proline.

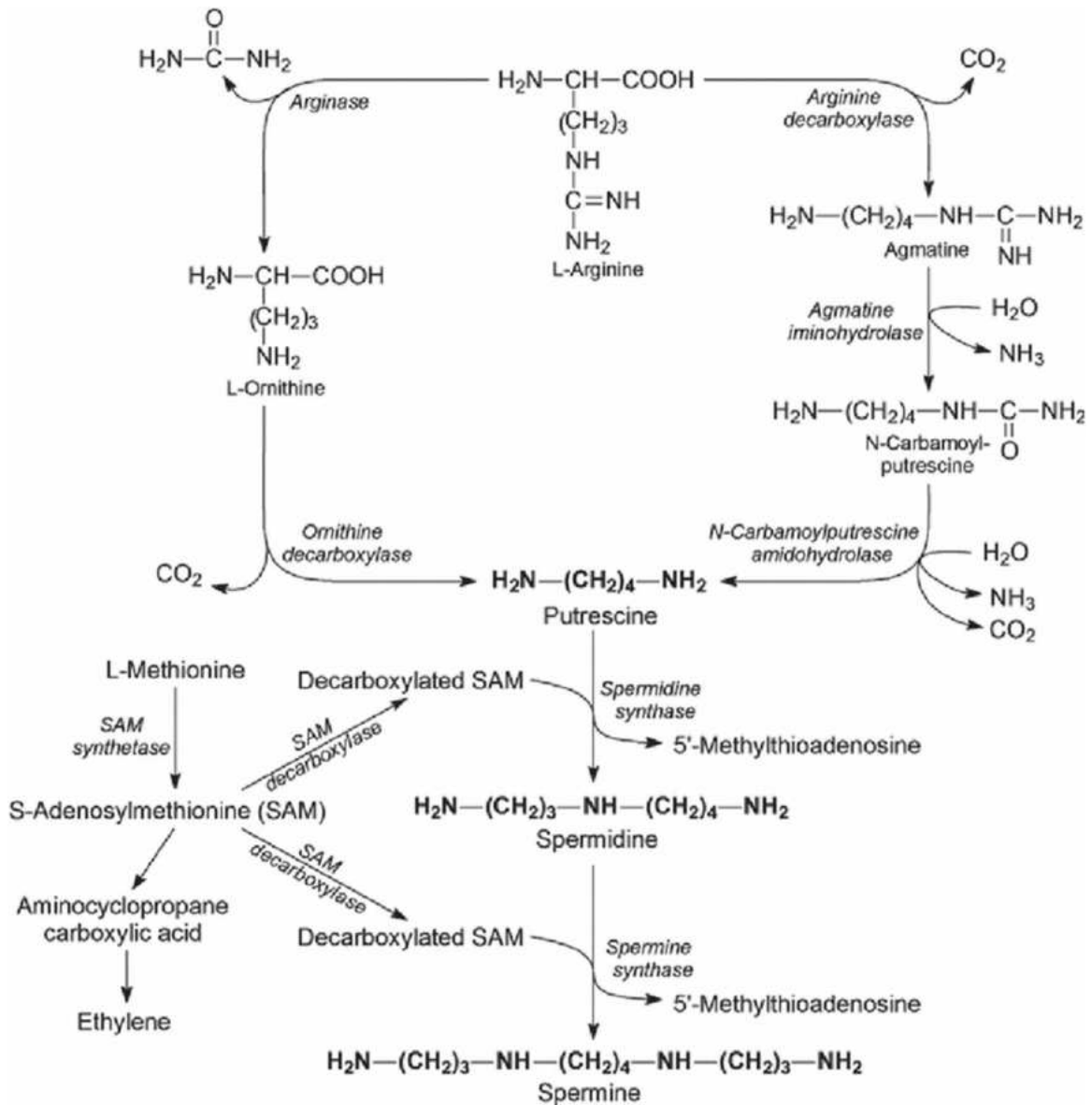
Glutamine cũng có vai trò tích cực đối với việc cảm ứng phát sinh phôi soma, điều này đã được chứng minh ở nhiều đối tượng thực vật. Glutamine là một trong những loại acid amin sẵn có và là nguồn cung cấp năng lượng hiệu quả cho hoạt động phân chia tế bào. Do đó, glutamine thúc đẩy sự sinh trưởng đối với các tế bào cần năng lượng và tổng hợp một lượng lớn acid nucleic và protein. Ageel và Elmeer (2011) cho rằng, *Phoenix dactylifera* L. nuôi cấy trong môi trường bổ sung nitơ hữu cơ, đặc biệt là glutamine ở nồng độ cao, đã cải thiện sự hình thành và tăng trưởng mô sẹo cũng như cảm ứng phát sinh phôi soma [95]. Theo El-Shiaty và cộng sự (2004), glutamine ở nồng độ 900 mg/L là tối ưu cho sự hình thành phôi soma ở cây cọ [96]. Tuy nhiên, đối với đậu Thổ Nhĩ Kỳ, thì nồng độ glutamine chỉ giảm xuống còn 40 mg/L [97]. Đối với cây cọ rào, nồng độ glutamine 150 mg/L giúp gia tăng sự phát sinh phôi soma từ mô sẹo [92]. El-Dawayati và cộng sự (2018) cho rằng việc bổ sung 300 mg/L glutamine giúp tăng cường đáng kể sự hình thành phôi soma cây chà là Sewi (*Phoenix dactylifera*) [98]. Tương tự, tỷ lệ mẫu hình thành mô sẹo của lúa Navara (*Oryza sativa* ssp.) thu được cao nhất (40%) trong môi trường có bổ sung glutamine ở nồng độ 500 mg/L [99].

Polyamine

Polyamine hiện diện trong tất cả các tế bào thực vật. Putrescine (Put), spermidine (Spd) và spermine (Spm) là các loại polyamine phổ biến nhất trong thực vật bậc cao. Polyamine được tổng hợp từ các amino acid thông qua các phản ứng decarboxyl hóa. Các amino acid cơ bản như arginine và ornithine là nguyên liệu để tổng hợp bộ khung carbon giúp hình thành putrescine, dưới sự xúc tác của enzyme ODC (ornithine decarboxylase) và ADC (arginine decarboxylase). Ngược lại, methionine kết hợp với nhóm polyamine để tổng hợp spermidine và từ spermidine tạo thành spermine. Hoạt động của ADC và ODC tùy thuộc vào tình trạng sinh lý và điều kiện sinh trưởng và phát triển của thực vật. ADC có vai trò như là enzyme giúp cho sự kéo dài tế bào, tham gia vào quá trình trao đổi chất thứ cấp và đáp ứng với những điều kiện không thuận lợi của môi trường, trong khi đó ODC cần cho quá trình phân chia tế bào. Polyamine có thể tồn tại ở dạng tự do hay liên kết với coumaroyl, ferulic, acid hydrocinnamic... (Hình 1.4)

Put, Spd và Spm có liên quan đến các quá trình xảy ra bên trong tế bào như các quá trình phân chia tế bào, tăng sinh tế bào, trao đổi chất thứ cấp, ổn định của màng tế bào, hình thành rễ, sự già hóa, sự chết của tế bào, cấu trúc nhiễm sắc thể, tổng hợp ribosome, tổng hợp protein và tương tác protein – DNA. Polyamine mang điện tích dương, tạo được một lực hút tĩnh điện với DNA, RNA, protein và

phospholipid. Do đó, Polyamine đóng một vai trò quan trọng trong việc đảm bảo tính linh hoạt của màng, truyền tín hiệu, kích thích quá trình tổng hợp RNA, tái cấu trúc sợi nhiễm sắc... Ngoài ra, chúng cũng tham gia vào quá trình biểu hiện gen và tổng hợp protein.



Hình 1.4. Sơ đồ tổng hợp polyamine ở thực vật [100]

Chức năng cơ bản của polyamine trong quá trình sinh trưởng và phát triển của thực vật, đáp ứng lại với các điều kiện stress có thể là do sự tương tác của các polyamine với các phân tử tín hiệu như oxid nitric, γ -aminobutyric acid, proline và phytohormone. Polyamine có vai trò hỗ trợ quá trình quang hợp và gia tăng sự tăng trưởng thực vật thông qua việc gia tăng hoạt động của rubisco. Ngoài ra, polyamine làm gia tăng phản ứng quang phosphoryl hóa dẫn đến tăng cường tổng hợp ATP. Polyamine liên quan đến tần số phân bào, kích thích nhiều phản ứng liên quan đến

sinh tổng hợp DNA, ARN và protein. Do bản chất đa cation, polyamine có ái lực cao đối với các anion, chẳng hạn như DNA, ARN, phospholipid và các protein cũng như các nhóm anion trong màng và vách tế bào.

Bên cạnh đó, polyamine được xem là một nhóm chất điều hòa sinh trưởng mới liên quan đến sự gia tăng sinh khối và quá trình biệt hóa tế bào, bao gồm cả quá trình phát sinh phôi soma (Bảng 1.6). Bổ sung polyamine ngoại sinh ở các nồng độ khác nhau có hiệu quả tích cực trong việc cải thiện sự phát sinh hình thái vì polyamine ngoại sinh không những kích thích sự phân chia tế bào mà còn gia tăng khả năng tái sinh của tế bào thực vật [101].

Polyamine cũng có vai trò tích cực trong việc kích thích sự cảm ứng hình thành phôi soma và đã được chứng minh qua rất nhiều nghiên cứu trên các đối tượng khác nhau (Bảng 1.6). Các nghiên cứu chỉ ra, có sự liên quan chặt chẽ giữa sự phát sinh phôi soma và việc gia tăng hàm lượng polyamine trong tế bào ở nuôi cấy phôi soma, ức chế quá trình sinh tổng hợp polyamine dẫn đến hiện tượng ức chế sự phát sinh phôi soma.

Bảng 1.6. Vai trò của polyamine trong nuôi cấy *in vitro*

Mục đích nghiên cứu	Đối tượng thực vật	Polyamine	Loại, nồng độ tối ưu	Đáp ứng của mẫu	Nguồn
Cảm ứng tạo mô sẹo	<i>Cocos nucifera</i>	Put và Spm	20 mg/L Spm	Mô sẹo có khả năng sinh phôi	[102]
	<i>Hancorina speciosa</i>	Spd và Spm	-	Không tác động đến sự tăng sinh mô sẹo	[103]
Nhân nhanh chồi	<i>Bacopa monnieri</i>	Put, Spd và Spm	150 mg/L Spd	Chồi sinh trưởng tốt	[104]
	<i>Citrullus lanatus</i>	Put, Spd và Spm	100 mg/L Spd	Số lượng và chiều dài chồi gia tăng	[105]
	<i>Cunninghamia lanceolata</i>	Spd	22 – 44 mg/L	Tăng hiệu quả phát sinh phôi	[106]

Phát sinh phôi soma				soma do ảnh hưởng đến hàm lượng phytohormone nội sinh	
	<i>Jatropha curcas</i>	Spd	0,3 mg/L	Tăng sự hình thành phôi soma từ mô sẹo	[92]
	<i>P. vietnamensis</i>	Spd	15 mg/L	Tỷ lệ phát sinh phôi soma 93,3%; 353 phôi/mẫu	[93]
	<i>P. ginseng</i>	Put, Spd và Spm	150 mg/L Spd	Phát sinh phôi soma cao gấp 4 lần	[107]
	<i>Saccharum spp</i>	Put, Spd và Spm	200 mg/L Spd	96,3% mẫu có khả năng phát sinh phôi soma	[108]
	<i>Oryza sativa</i>	Spd	150 mg/L	Tăng hiệu quả phát sinh phôi soma ở 3 giống ASD16, ADT43 và IR64	[109]
Tạo rễ	<i>C. lanatus</i>	Put, Spd và Spm	100 mg/L Put	Số lượng và chiều dài rễ tăng	[105]
	<i>Glycine max</i>	Put, Spd và Spm	5,5 mg/L Put	Hiệu quả hình thành rễ tốt nhất	[110]

Sự cảm ứng hình thành và phát triển phôi được đánh dấu bằng những thay đổi về hàm lượng polyamine. Trong giai đoạn đầu, ở các tế bào tiền phôi, hàm lượng put cao hơn so với spd và spm nhưng spd lại chiếm ưu thế trong quá trình phát triển phôi. Tỷ lệ này được coi là một dấu hiệu sinh hóa của giai đoạn phát triển và nó cũng tương ứng với sự phân chia và kéo dài tế bào. Put có vai trò thúc đẩy chu kỳ tế bào và phân chia nguyên phân. Hơn nữa, Put có thể điều chỉnh sự biểu hiện của peroxidase và các

protein liên quan, thúc đẩy sự tổng hợp Spd và giảm stress oxy hóa được tạo ra do oxy hoạt hóa (ROS) trong giai đoạn đầu hình thành phôi.

Kevers và cộng sự (2000) khi nghiên cứu phát sinh phôi soma từ mô sẹo có nguồn gốc từ mẫu cây rễ *P. ginseng* kết hợp polyamine hay bổ sung một số tiền chất như arginine và ornithine trong môi trường cảm ứng hay tăng sinh phôi soma có tác dụng làm gia tăng số lượng phôi soma tạo thành lên gấp 4 lần. Việc ức chế cả quá trình sinh tổng hợp hay phân giải polyamine dẫn đến việc làm giảm số lượng phôi soma tạo thành [107]. Qua đó, cho thấy vai trò quan trọng của polyamine trong quá trình phát sinh phôi soma.

Kết quả tương tự cũng được Monteiro và cộng sự (2002) công bố trong nghiên cứu sự phát sinh phôi soma của *P. ginseng* từ nguồn mẫu là những tế bào có khả năng phát sinh phôi soma nuôi cấy trong môi trường lỏng 1/2 MS có bổ sung auxin tổng hợp BSAA. Việc bổ sung spermidine vào trong môi trường nuôi cấy có hiệu quả trong việc gia tăng số lượng phôi soma phát sinh. Trong trường hợp này, hàm lượng polyamine tổng số của phôi soma cao hơn so với đối chứng không bổ sung spermidine [111].

Paschalidis và Angelakis (2005) chỉ ra mối quan hệ tích cực giữa sự tổng hợp polyamine và phân chia tế bào trong lá non cây thuốc lá. Đồng thời, hàm lượng polyamine thay đổi trong suốt giai đoạn phát sinh phôi soma. Trong giai đoạn đầu của quá trình phát sinh phôi soma, hàm lượng polyamine tăng lên nhanh chóng, thúc đẩy sự phân chia tế bào. Tuy nhiên, hàm lượng polyamine giảm dần ở giai đoạn sau của quá trình phát sinh phôi soma. Ngoài ra, hàm lượng polyamine nội sinh ở các tế bào có khả năng phát sinh phôi soma cao hơn so với những tế bào không có khả năng phát sinh phôi soma [112].

Tỷ lệ mẫu phát sinh phôi soma được cải thiện khi bổ sung spermidine vào môi trường nuôi cấy *Saccharum* spp. ở nồng độ 15 mg/L [108]; *O. sativa* L. ở nồng độ 150 mg/L [109]; sâm Ngọc Linh ở nồng độ 15 mg/L [93]; *Cunninghamia lanceolate* ở nồng độ 1,5 – 3,0 mg/L [106]. Hơn nữa, polyamine cũng giúp duy trì sự sinh trưởng và phát triển của *Pinus sylvestris* L., đặc biệt là trong điều kiện bất lợi hoặc stress [100].

Như vậy, acid amin và polyamine có tác dụng tích cực đến các quá trình phát sinh hình thái ở thực vật nói chung và quá trình phát sinh phôi soma nói riêng. Trong đó, mỗi đối tượng thực vật lại đáp ứng với loại và nồng độ acid amin và polyamine khác nhau cần thiết thúc đẩy quá trình phát sinh phôi soma. Do đó, việc nghiên cứu

tìm ra loại và nồng độ polyamine để gia tăng hiệu quả của quá trình phát sinh phôi soma cho từng đối tượng thực vật cụ thể là cần thiết.

1.2.4.5. Nước dừa

Vai trò của nước dừa trong việc kích thích phát sinh phôi soma đã được khẳng định trong nhiều nghiên cứu trên các đối tượng thực vật khác nhau. Những chất có hiệu quả tăng cường khả năng phát sinh phôi soma và sinh trưởng của mẫu trong nước dừa đã được ghi nhận bao gồm PGRs (auxin, cytokinin, gibberellin, acid abscisic, khoáng chất (magnesium, phosphate), vitamin, đường chiếm khoảng 2,5% (w/v), lipid, amino acid, acid hữu cơ và enzyme. Nitrogen trong nước dừa được sử dụng để tổng hợp amino acid và phytohormone cần thiết cho sự sinh trưởng của thực vật. Thêm vào đó, nước dừa còn có vai trò thay thế những hợp chất hữu cơ cần thiết cho sự sinh trưởng của mẫu cấy nhưng lại có giá thành cao như là zeatin. Sự kết hợp giữa nước dừa và BAP hoàn toàn có thể thay thế zeatin và một số hợp chất hữu cơ trong quá trình nuôi cấy phôi soma oliu "*Galega vulgar*" [113].

Đối với *P. vietnamensis*, nước dừa được sử dụng nhằm gia tăng hiệu quả phát sinh phôi soma thứ cấp từ mẫu cấy lá mầm. Các lá mầm được nuôi trong môi trường bổ sung 10% nước dừa kết hợp với 0,2 mg/L IBA cảm ứng tạo mô sẹo và phát sinh phôi soma. Sau khoảng 15 ngày nuôi cấy, lá mầm gia tăng kích thước, sau đó, hình thành nhiều cụm mô nhỏ và nhiều phôi soma đơn trên bề mặt mầm. Bên cạnh đó, ở góc lá mầm còn tạo mô sẹo có khả năng sinh phôi. Như vậy, các auxin tự nhiên trong nước dừa kết hợp với IBA ngoại sinh tác động đến sự tạo mô sẹo và phát sinh phôi soma [39].

Khierallah và cộng sự (2013) khi nghiên cứu vai trò của nước dừa đến khả năng phát sinh phôi soma cây chà là (*Phoenix dactylifera*) cho rằng, nước dừa có tác động tích cực đến khả năng phát sinh phôi soma của mẫu cấy với hàm lượng nước dừa tốt nhất ghi nhận được là 20% (v/v), số lượng phôi soma đạt được 65 phôi/mẫu. Bên cạnh đó, sự nảy mầm của phôi soma tạo thành cây con hoàn chỉnh cũng được cải thiện khi bổ sung nước dừa vào môi trường nuôi cấy, tỷ lệ nảy mầm là 76% khi bổ sung 10% (v/v) nước dừa so với 45% trong môi trường đối chứng [114]. Tác dụng tích cực của nước dừa là do auxin và cytokinin có trong nước dừa kích thích sự phân chia tế bào, sinh trưởng cũng như phát sinh hình thái của mẫu.

Souza và cộng sự (2013) nghiên cứu ảnh hưởng của nước dừa đến nuôi cấy phôi hợp tử của 19 giống oliu khác nhau cho rằng nước dừa có tác động tích cực đến sự sinh trưởng của phôi, tuy nhiên với mỗi giống lại đáp ứng với một hàm lượng nước

dừa bở sung khác nhau, hàm lượng thích hợp nhất cho giống “Santa Catalina” là 2,5%, trong khi với giống “Cerignola” là 10% [115].

Bertero và cộng sự (2020) khi nghiên cứu sự phát sinh phôi soma trực tiếp cũng như tái sinh cây con từ nguồn mẫu cây lá của *Minthostachys verticillate* báo cáo nước dừa ở nồng độ 2,5% đã cải thiện đáng kể số lượng phôi soma trên mỗi mẫu, 100% mẫu lá phát sinh phôi soma, trong khi ở nồng độ nước dừa cao hơn (5%) chỉ có 43,1% mẫu phát sinh phôi soma [116].

Như vậy, nước dừa có vai trò tích cực trong quá trình phát sinh và phát triển của phôi soma nuôi cấy *in vitro*. Tuy nhiên, tùy theo từng đối tượng thực vật mà có nhu cầu khác nhau về hàm lượng sử dụng. Hơn nữa, sử dụng nước dừa trong nuôi cấy phôi soma có thể làm giảm chi phí của quá trình sản xuất do giá thành của chúng rẻ và chúng có thể thay thế một số hợp chất hữu cơ có giá thành cao cần thiết cho sự tăng trưởng của mẫu.

1.2.4.6. Đường

Đường được biết đến là nguồn cacbon chủ yếu được sử dụng phổ biến trong môi trường nuôi cấy mô với vai trò cung cấp năng lượng cho hoạt động sống của tế bào. Vì vậy, việc sử dụng đường để cung cấp năng lượng và tham gia vào cấu trúc của tế bào và thành tế bào là điều rất cần thiết. Đối với các đối tượng thực vật, cũng như từng loại mẫu cây khác nhau thì loại đường và hàm lượng sử dụng có tác động không giống nhau đến khả năng phát sinh hình thái và tích lũy các chất thứ cấp (Bảng 1.7). Ngoài ra, đường vẫn được sử dụng ngay cả trong trường hợp nuôi cấy các mẫu ở dạng chồi có khả năng tự quang hợp. Các dạng đường đơn fructose và glucose tạo ra qua quá trình thủy phân sucrose khi hấp ở nhiệt độ cao giúp mẫu cây dễ dàng hấp thụ.

Đường trong môi trường nuôi cấy không những có tác dụng kích thích sự sinh trưởng của mẫu cây mà còn có vai trò quan trọng trong sự gia tăng tổng hợp các hợp chất thứ cấp, nguyên nhân là do sự gia tăng hàm lượng đường có thể dẫn đến thay đổi áp suất thẩm thấu từ đó cảm ứng tổng hợp nên các hoạt chất thứ cấp. Park và cộng sự (2006) báo cáo rằng khi bổ sung đường vào môi trường nuôi cấy tế bào *Eschscholtzia californica* hàm lượng alkaloid được tổng hợp gia tăng đáng kể [117].

Bảng 1.7. Ảnh hưởng của hàm lượng đường sucrose lên sự phát sinh hình thái của mẫu

Phát sinh hình thái	<i>Panax sp.</i>	Mẫu cây	Hàm lượng sucrose (%)	PGRs	Nguồn
Phát sinh phôi soma	<i>P. ginseng</i>	Lá	3	1,7 mg/L NAA + 2 mg/L 2,4-D	[68]
				<i>P. pseudoginseng</i>	Thân rễ
Tạo mô sẹo	<i>P. ginseng</i>	Bao phấn	9	1 mg/L 2,4-D	[118]
		Rễ	3	2 mg/L 2,4-D + 0,5 mg/L kinetin	[119]
Tạo chồi	<i>P. ginseng</i>	Lá	3	4 mg/L BAP	[34]
		Bao phấn	9	10 mg/L GA ₃	[118]

Kim và cộng sự (2010) báo cáo rằng, các mẫu cây lá mầm *P. ginseng* được nuôi cấy trong môi trường bổ sung hàm lượng đường khác nhau, từ 30 đến 70 g/L, cho thấy đường ở hàm lượng cao giúp gia tăng hiệu quả phát sinh phôi soma. Đồng thời, tiền xử lý mẫu lá mầm với đường sucrose ở nồng độ 1 M trong 24 giờ cũng giúp gia tăng đáng kể hiệu quả phát sinh phôi soma [120]. Tương tự, trong công bố của Ali và cộng sự (2016), các nguồn carbohydrate (sucrose, maltose, fructose và glucose), hàm lượng đường sucrose (10, 30, 50, 70 và 90 g/L) và thời điểm bổ sung (ngày thứ 12, 18 và 24) trong quá trình nuôi cấy huyền phù tế bào *Artemisia absinthium* ảnh hưởng đến sự tích lũy sinh khối và các chất chuyển hóa thứ cấp. Sinh khối cao nhất thu được ở nghiệm thức bổ sung 50 đến 70 g/L sucrose ở thời điểm ban đầu của quá trình nuôi cấy. Đồng thời, bổ sung thêm 3% đường sucrose vào ngày thứ 24 cho thấy sinh khối, tổng hàm lượng phenolic và flavonoid cao hơn so với nghiệm thức đối chứng. Trong khi đó, hoạt tính enzyme chống oxy hóa lại cao nhất ở các mẫu

nuôi trong môi trường bổ sung maltose [121]. Ngoài ra, Faisal và cộng sự (2021) trong nuôi cấy phôi soma *Brassica juncea* L. báo cáo, trong số các nguồn carbon cung cấp được thử nghiệm thì fructose, glucose và sucrose đều có tác động tích cực đến sự phát sinh phôi soma. Trong đó đường sucrose ở hàm lượng 30g/L cho hiệu quả phát sinh phôi soma là cao nhất [122]. Đối với *P. vietnamensis*, khi bổ sung 50 g/L đường sucrose thì kích thích hình thành phôi soma hiệu quả hơn so với glucose và fructose, với tỷ lệ phát sinh phôi soma và số phôi cao nhất (tương ứng 86,7% và 167 phôi) [93].

Hàm lượng carbon được cung cấp tác động đến cả hai giai đoạn phát sinh và trưởng thành phôi soma, thể hiện qua việc thay đổi tỷ lệ phôi hình cầu, hình tim, thủy lôi, có lá mầm. Trên đối tượng *P. ginseng*, việc giảm hàm lượng đường và nitrate ảnh hưởng tích cực đến sự trưởng thành của phôi soma cũng như tạo cây con hoàn chỉnh. Hàm lượng đường 30 g/L mặc dù kích thích sự tăng sinh nhưng lại ức chế sự trưởng thành của phôi soma và khi giảm hàm lượng đường xuống 20 g/L thì sự trưởng thành phôi soma được cải thiện, phôi chuyển từ giai đoạn hình cầu sang những giai đoạn tiếp theo [12].

Như vậy, nguồn carbon cung cấp có vai trò rất lớn trong sự phát sinh phôi soma và mỗi đối tượng thực vật cần nguồn cung cấp carbon cũng như hàm lượng khác nhau. Do vậy, việc nghiên cứu nguồn cung cấp carbon và hàm lượng sử dụng cho mỗi đối tượng thực vật là điều cần thiết nhằm gia tăng hiệu suất của quá trình nuôi cấy.

1.2.4.7. Stress và sự phát sinh phôi soma

Quá trình phát sinh phôi soma bao gồm sự phân chia tế bào, sự biệt hóa và những thay đổi sinh lý bên trong tế bào. Các yếu tố bên ngoài ảnh hưởng lớn đến quá trình phát sinh phôi soma, chẳng hạn như tổn thương mẫu (stress vết thương), khử trùng bề mặt (stress oxy hóa) và môi trường nuôi cấy (thiếu nước/stress thẩm thấu). Hơn nữa, tín hiệu stress rất quan trọng trong quá trình biệt hóa tế bào do stress gây ra sự sản sinh các loại oxy hoạt hóa (ROS).

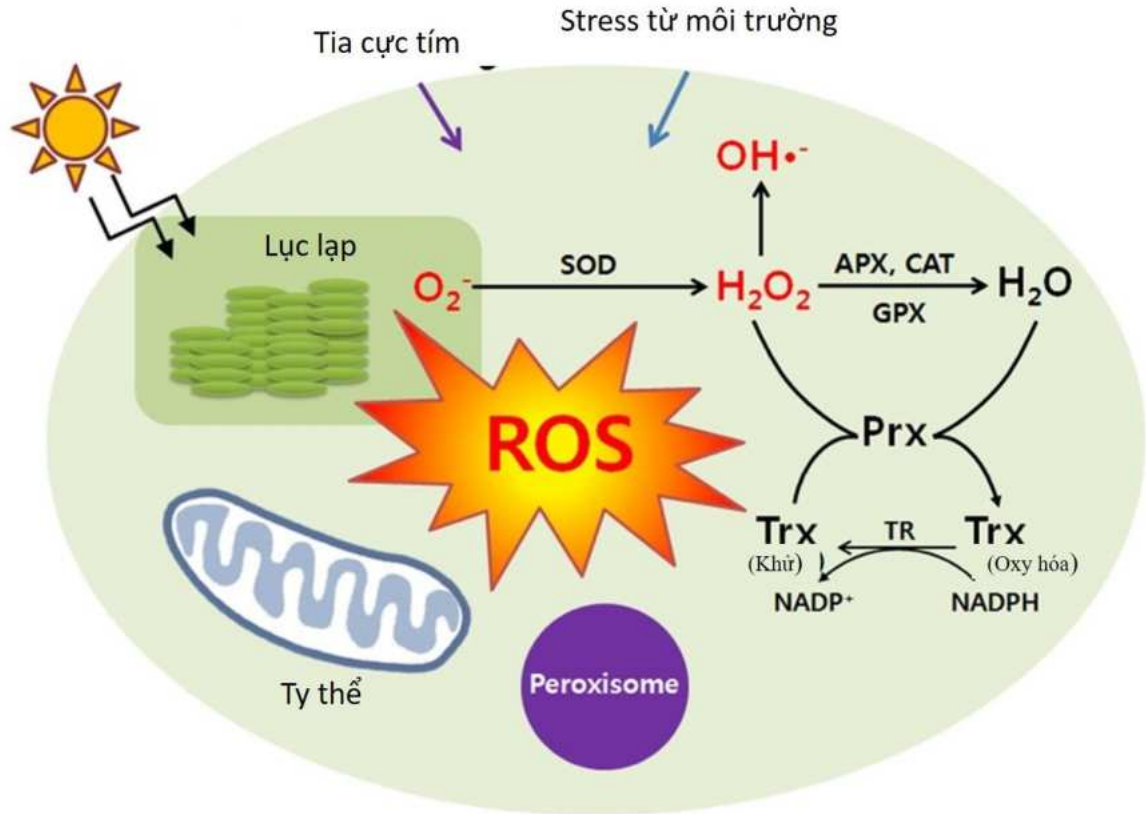
Các dạng ROS bao gồm những loại oxy có khả năng phản ứng mạnh nhưng chỉ tồn tại trong thời gian ngắn, có thể chuyển hóa lẫn nhau, và được tạo ra trong quá trình kích hoạt điện tử hoặc oxy hóa dưới tác động của các điều kiện môi trường bất lợi. Trong cơ thể thực vật, phần lớn oxy được sử dụng làm chất nhận điện tử cuối cùng trong quá trình hô hấp hoặc trong các phản ứng oxy hóa khác, nhưng khoảng 2 - 5% oxy còn lại có thể chuyển thành dạng oxy hoạt hóa, với khả năng phản ứng rất

cao và có thể gây hại cho các thành phần của tế bào. Một số dạng ROS đã được ghi nhận bao gồm gốc anion superoxide ($O_2^{\bullet-}$), peroxide hydrogen (H_2O_2), gốc hydroxyl tự do ($\bullet OH$), và oxy singlet (oxy đơn 1O_2).

Nhiều nghiên cứu chứng minh rằng có mối quan hệ giữa việc tăng cường sản xuất ROS và cải thiện khả năng phát sinh phôi soma ở nhiều đối tượng thực vật. Tuy nhiên, mức độ ROS vừa phải có thể cảm ứng các tế bào soma thay đổi hình thái và biệt hóa. Ngược lại, hàm lượng ROS quá mức sẽ phá vỡ tính thấm của màng và cũng như các đại phân tử sinh học như lipid, protein và acid nucleic, dẫn đến mất tính toàn năng của tế bào và thậm chí làm chết tế bào [123]. Để hạn chế ảnh hưởng của ROS, thực vật có cơ chế kiểm soát hàm lượng ROS bằng cách sinh tổng hợp các enzyme chống oxy hóa như catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) và ascorbate peroxidase (APX), cũng như các chất chống oxy hóa không phải enzyme như ascorbate, glutathiol dạng khử (GSH), α – tocopherol (vitamin E), carotenoid, proline, glycine betain, polyamine. Các chất chống oxy hóa này bảo vệ tế bào thông qua việc loại bỏ các ROS, tương tác với các gốc hữu cơ để làm gián đoạn chuỗi oxy hóa, chuyển đổi peroxide tạo ra các sản phẩm bền như rượu, aldehyde, giảm nồng độ oxy tự do... Chẳng hạn như ROS sơ cấp là anion superoxide ($O_2^{\bullet-}$) có thể được hình thành bằng cách khử một electron của phân tử oxy. Anion superoxide ($O_2^{\bullet-}$) sẽ bị phân hủy bởi superoxide dismutase (SOD) thành hydro peroxide (H_2O_2), sau đó tiếp tục được khử bởi catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX), glutathione peroxidase (GPX) và peroxiredoxin (Prx). Từ đó, làm giảm tác hại của ROS đối với thực vật (Hình 1.5). Ngoài ra, những chất chống oxy hóa này đóng một vai trò thiết yếu trong quá trình phát sinh phôi soma, một phần do khả năng loại bỏ ROS được tạo ra bởi các điều kiện stress bên ngoài tác động đến thực vật [124].

Polyamine (PA) là một hợp chất hữu cơ, có trọng lượng phân tử thấp, đóng vai trò quan trọng trong việc điều chỉnh quá trình trao đổi chất cơ bản của thực vật. Chúng điều chỉnh các chức năng của tế bào, bao gồm tín hiệu phân tử, phân chia và biệt hóa tế bào, tính toàn năng, quá trình sinh trưởng và phát triển, bảo vệ khỏi tổn hại do oxy hóa và phản ứng với stress môi trường [125]. Nhiều nghiên cứu đã chứng minh rằng PA có thể tham gia vào các tương tác hiệp đồng hoặc đối kháng với các loại hormone thực vật khác nhau, từ đó cho thấy có mối liên hệ giữa hormone và PA [126]. Ngoài ra, polyamine bảo vệ tế bào khỏi sự phá hủy của các nhóm oxy hoạt hóa và các gốc tự do bằng cách duy trì độ trương và thẩm thấu của tế bào, loại bỏ các loại oxy hoạt hóa, bảo vệ DNA và màng tế bào khỏi bị hư hại, đồng thời giảm tổng hợp H_2O_2 và superoxide trong điều kiện stress [127]. Do đó, polyamine được bổ sung vào môi

trường nuôi cấy sẽ thúc đẩy quá trình phát sinh phôi soma bằng cách điều chỉnh hàm lượng ROS và hormone nội sinh. Như vậy, việc bổ sung loại và nồng độ acid amin và polyamine phù hợp có tác dụng gia tăng hiệu quả phát sinh phôi soma.



Hình 1.5. Phản ứng của tế bào chống lại các loại oxy hoạt hóa dưới các điều kiện stress khác nhau [128]

1.3. Kỹ thuật nuôi cấy lớp mỏng tế bào (Thin cell layer – TCL)

1.3.1. Giới thiệu nuôi cấy lớp mỏng tế bào

Mẫu cấy có vai trò quan trọng quyết định hiệu quả của quá trình nuôi cấy mô, tế bào và cơ quan thực vật. Trong đó, kiểu gen, nguồn gốc mẫu, tuổi sinh lý, kích thước cũng như hình dạng của mẫu ảnh hưởng đến sự phát sinh hình thái [129]. Ý tưởng về nuôi cấy TCL được Trần Thanh Vân đề xuất vào năm 1973 trong nghiên cứu *Nicotiana tabacum* [130]. Tác giả đã cho rằng, sự tái sinh và tái lập trình của cơ quan hoặc phôi soma *in vitro* có thể thực hiện được nếu tách được một số lớp tế bào đã biệt hóa khỏi cơ quan hoặc mô ban đầu. Nuôi cấy TCL là một kỹ thuật có nhiều ưu điểm nhằm mục tiêu phát sinh các dạng mô, cơ quan khác nhau.

1.3.2. Đặc điểm của nuôi cấy lớp mỏng tế bào

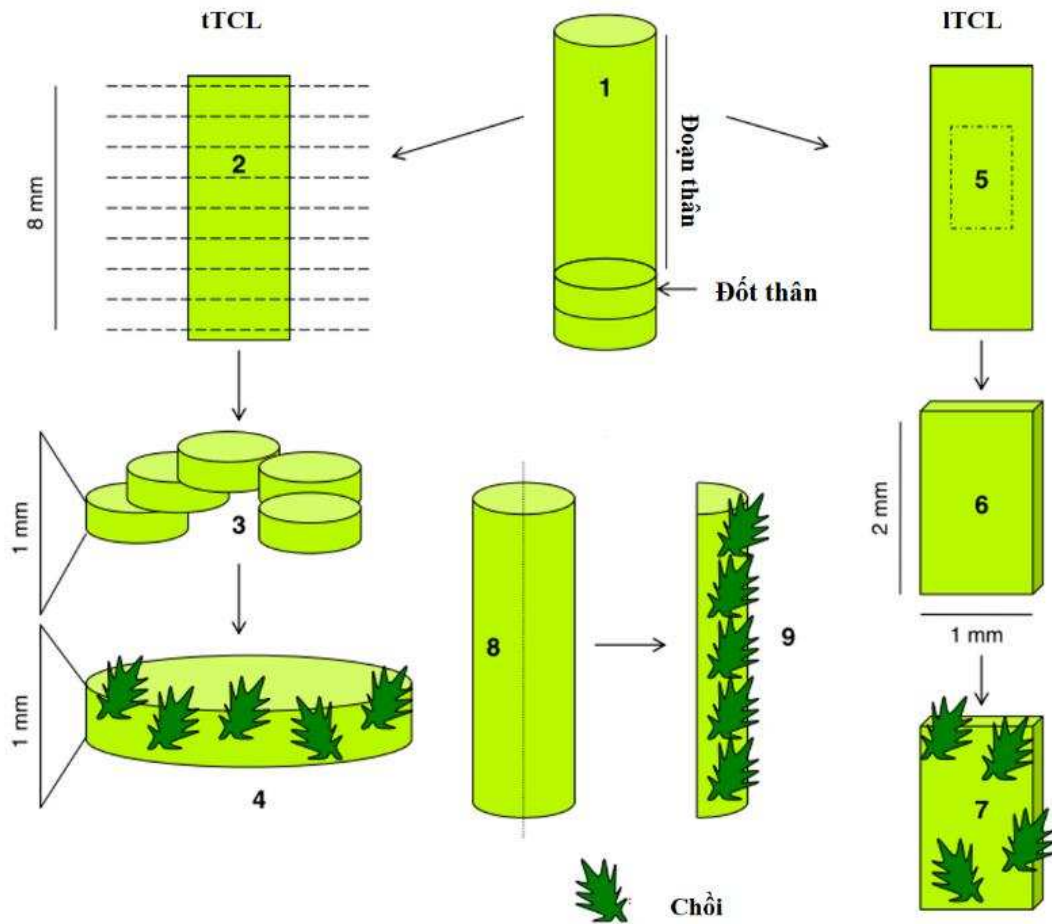
Các mẫu TCL có đặc điểm rất mỏng, được cắt từ các nguồn mẫu cây như: thân, lá, gân lá chính, thân rễ, cuống lá, lá mầm, protocorm [131-137]. Các mẫu TCL bao gồm một vài lớp tế bào nên hàm lượng hormone nội sinh của mẫu thấp, khả năng hấp thu dưỡng chất tốt hơn [138]. Ngoài ra, diện tích vết thương ở mẫu cây TCL lớn hơn nhiều so với các mẫu cây thông thường nên đáp ứng tốt hơn với điều kiện stress. Do đó, chúng phản ứng nhanh với môi trường dinh dưỡng, phát sinh phôi soma và cơ quan tốt hơn.

Mặc dù hệ số nhân giống thực tế của mẫu TCL thấp hơn so với mẫu cây thông thường, tuy nhiên, khi xét về hệ số điều chỉnh tăng trưởng (GCF) (được tính dựa trên “Tỷ lệ mẫu phát sinh phôi soma”, “Số lượng phôi soma hình thành/mẫu” và “Hệ số mẫu”) cho thấy hiệu quả nhân giống của mẫu TCL cao hơn so với mẫu thông thường và đã được báo cáo ở nhiều thực vật (địa lan lai, hoa cúc và táo...) [139-141].

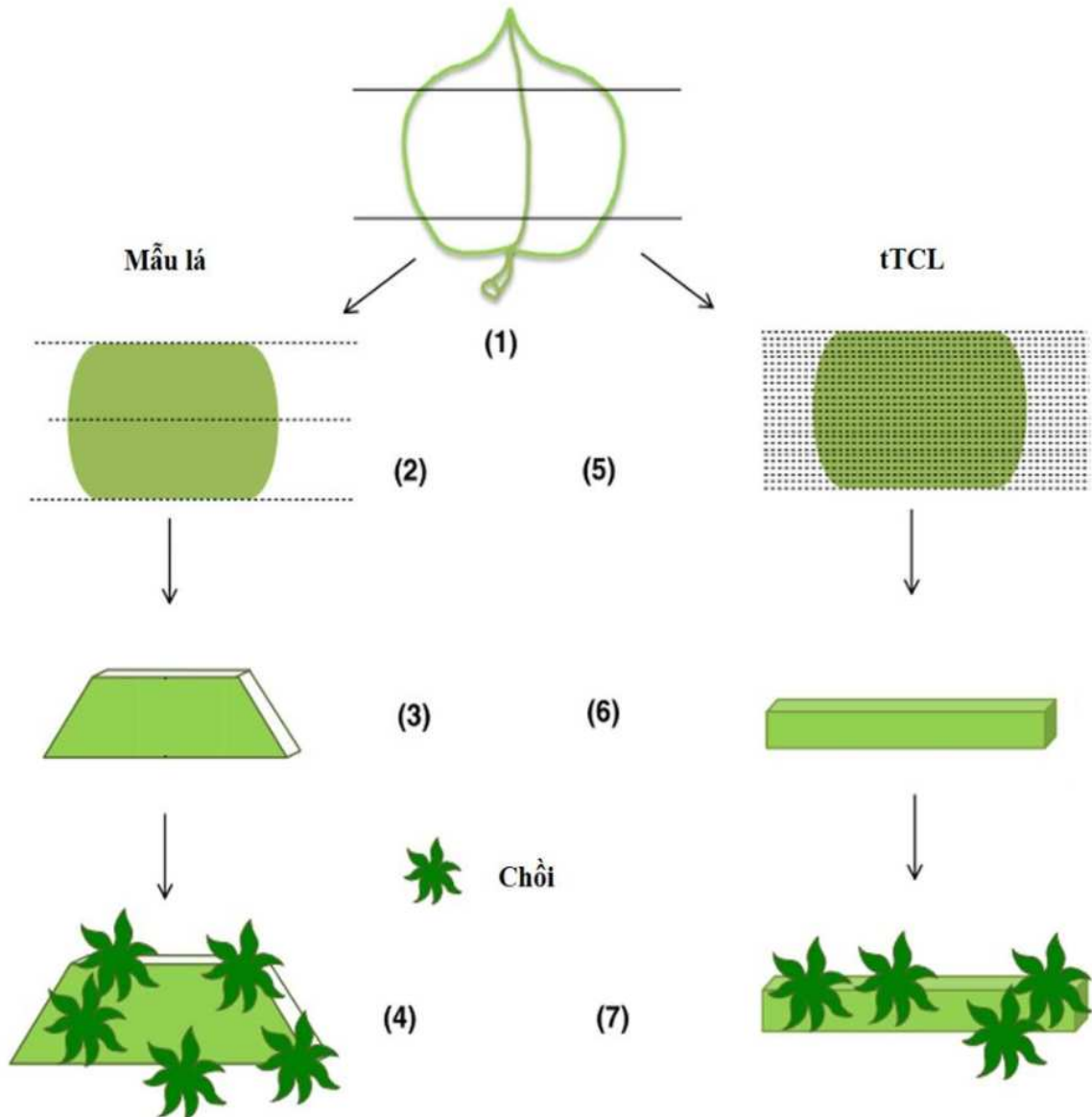
Những cây con có nguồn gốc từ mẫu TCL có đặc điểm di truyền thường ổn định [136]. Kỹ thuật TCL gây ít tổn thương cho cây mẹ, nguồn mẫu dồi dào và có hệ số nhân cao, đặc biệt là khi đánh giá số lượng cơ quan tái sinh trên mỗi mẫu cây [132]. Qua đó, hiệu quả vi nhân giống được cải thiện. Đặc biệt, kỹ thuật TCL thường được sử dụng phổ biến trong nuôi cấy một số thực vật quý hiếm, hạn chế về số lượng mẫu.

Bên cạnh đó, kỹ thuật này tạo điều kiện thuận lợi cho việc xác định các gen biệt hóa trong tế bào đích. Các mẫu TCL được sử dụng trong nghiên cứu quan sát cấu trúc và phát sinh hình thái cũng như nguồn gốc của cơ quan phát sinh thuận lợi hơn so với các mẫu thông thường. Do đó, kỹ thuật TCL là một trong những kỹ thuật vi nhân giống hứa hẹn tạo ra nguồn cây giống đảm bảo về mặt số lượng và chất lượng.

Dựa vào phương thức cắt mẫu mà chia thành hai loại mẫu TCL bao gồm mẫu cây lớp mỏng được cắt theo chiều ngang (tTCL - transverse TCL) và mẫu cây lớp mỏng được cắt theo chiều dọc (lTCL - longitudinal TCL) (Hình 1.6 và Hình 1.7). Mẫu cây lTCL bao gồm một loại mô, chẳng hạn như lớp tế bào biểu bì. Mẫu lTCL thường dùng trong nghiên cứu các cơ chế như biệt hóa tế bào và sự hình thành cơ quan từ lớp tế bào đã được xác định rõ ràng. Trong khi đó, mẫu tTCL chứa một số lượng tế bào của các loại mô khác nhau (biểu bì, vỏ, tế bào bao quanh bó mạch và tế bào nhu mô). Mẫu tTCL được sử dụng để cải thiện hiệu quả tái sinh cơ quan hoặc sự phát sinh phôi soma.



Hình 1.6. Mẫu tTCL hoặc ITCL từ mẫu đốt thân [141]. (1, 2 và 3) Mẫu được cắt lớp mỏng theo chiều ngang tTCL; (5, 6 và 8) Mẫu được cắt lớp mỏng theo chiều dọc ITCL; (4, 7, 9) Sự hình thành chồi trên bề mặt mẫu.



Hình 1.7. Mẫu lá tTCL [141]. (1) Mẫu lá ban đầu; (2, 3, 5 và 6) Mẫu lá được cắt lớp mỏng theo chiều ngang; (4 và 7) Chồi tạo thành từ các tế bào biểu bì và tế bào nhu mô.

1.3.3. Những nghiên cứu về nuôi cấy lớp mỏng tế bào

Kỹ thuật TCL được thực hiện và công bố đầu tiên trên cây mô hình *N. tabacum* [130]. Sau đó, kỹ thuật này tiếp tục được thực hiện và ứng dụng trong vi nhân giống hơn 100 đối tượng thực vật trong thời gian 50 năm. Đồng thời, kỹ thuật này cũng dùng trong nghiên cứu về quá trình phát sinh phôi soma trên nhiều thực vật, chẳng hạn như: cây lâm nghiệp, cây hoa, cây dược liệu, cây ăn trái (Bảng 1.8).

Do kích thước của mẫu cấy rất nhỏ (độ dày 100 μm đến 1–2 mm) nên sự tương tác giữa các tế bào và môi trường nuôi cấy tốt hơn. Do đó, hiệu quả trong quá trình

phát sinh phôi soma cao hơn so với mẫu cây thông thường. Hơn nữa, kỹ thuật này còn giúp gia tăng hiệu suất phát sinh phôi soma và giảm thời gian tăng sinh của mẫu cây, đây là chìa khóa cho sự biệt hóa của tế bào và mô thực vật.

Bảng 1.8. Sự phát sinh phôi soma ở một số thực vật sử dụng kỹ thuật nuôi cấy lớp mỏng tế bào

Thực vật	Loại mẫu cây	Kiểu TCL	Kích thước mẫu	Nguồn
<i>Panax vietnamensis</i>	Lá	tTCL	1 x 10 mm	[40, 72, 133]
	Cuống lá	ITCL	1 x 5 mm	
	thân rễ	tTCL	1 mm	
<i>Actinidia chinensis</i>	Gân lá chính	tTCL, ITCL	0,5 – 1,0 mm	[132]
<i>Pinus patula</i>	Phôi non	tTCL, ITCL	0,3 – 0,5 mm	[137]
<i>Brasilidium forbesii</i>	Protocorm	tTCL, ITCL	1,0 mm	[142]
<i>Guadua chacoensis</i>	Chồi	tTCL	0,5 – 1,0 mm	[143]
<i>Jatropha curcas</i>	Cuống lá	tTCL	0,8 – 1,0 mm	[144]
<i>Phalaenopsis amabilis</i>	Mầm ngủ phát hoa	tTCL	0,5 mm	[145]
	Lá	ITCL		

1.4. AgNPs trong khử trùng và kích thích sinh trưởng mẫu cây

1.4.1. Hiệu quả của AgNPs trong khử trùng mẫu thực vật

Trong nuôi cấy mô thực vật, sự xâm nhiễm vi sinh vật có thể do nhiều loại côn trùng nhỏ khác nhau, vi sinh vật (nấm sợi, nấm men, vi khuẩn), virus và viroid. Nhiễm vi sinh vật trước hoặc sau giai đoạn cảm ứng của mẫu cây đều ảnh hưởng nghiêm trọng cho toàn bộ quá trình nuôi cấy.

Khử trùng bằng nhiệt độ cao thường được sử dụng thường xuyên ở các phòng thí nghiệm để tiệt trùng môi trường và các dụng cụ nuôi cấy. Tuy nhiên, các vật liệu

thực vật không thể khử trùng bằng nhiệt vì chúng dễ bị tổn thương. Do đó, để có nguồn mẫu sạch, cung cấp cho quá trình nuôi cấy cần phải tìm ra một phương pháp khử trùng thích hợp.

Một bước khởi đầu quan trọng của nuôi cấy *in vitro* là khử trùng bề mặt của mẫu cấy. Các mẫu thường được thu thập trong tự nhiên hoặc từ các vườn ươm, bản thân chúng có thể bị nhiễm các vi sinh vật khác nhau. Đồng thời, các vi sinh vật phát triển mạnh hơn so với mẫu cấy thực vật trong môi trường nuôi cấy. Do đó, sau khi thu thập, mẫu thực vật được khử trùng bề mặt bằng một số hóa chất khác nhau như ethanol, nước brom (BW), hydrogen peroxide (H_2O_2), thủy ngân clorua ($HgCl_2$), natri hypochloride ($NaOCl$), canxi hypochloride ($Ca(OCl)_2$), thuốc diệt nấm, kháng sinh... [146].

Tuy nhiên, những chất khử trùng truyền thống thường có tính chất tẩy rửa cao, tác động đến thành tế bào của vi sinh vật theo cơ chế ăn mòn vách. Do đó, sẽ ảnh hưởng tiêu cực đến sự sống sót cũng như tái sinh của mẫu cấy hoặc thậm chí dẫn đến hoại tử các mẫu thực vật nên có hiệu quả khử trùng thấp [147]. Bên cạnh đó, hầu hết các chất khử trùng thông dụng hiện nay đều có tác động tiêu cực đối với sức khỏe con người [148].

Vì vậy, các nhà khoa học luôn tìm kiếm các phương pháp và chất khử trùng mới. Trong số đó, các ion bạc như nitrate bạc ($AgNO_3$), thiosulphate bạc ($Ag(S_2O_3)_2$) được nghiên cứu và áp dụng rộng rãi trong quá trình khử trùng và nuôi cấy mẫu thực vật. Chúng có những ưu điểm an toàn cho sức khỏe người sử dụng và đồng thời có hiệu quả cao trong việc kháng nấm, kháng khuẩn. Mặt khác, các ion bạc còn có vai trò tích cực trong sự phát triển của mẫu nuôi cấy *in vitro* như mô sẹo, chồi, phôi soma, rễ... Tuy nhiên, cũng cần lưu ý rằng các ion bạc thường đi kèm với các anion tồn tại ở dạng muối. Do đó, khả năng chuyển hóa, hấp thu ion bạc, hiệu quả khử trùng, phát sinh hình thái và sinh trưởng của mẫu bị ảnh hưởng [149].

Để khắc phục những vấn đề của các ion bạc dạng muối, thời gian gần đây, AgNPs được sử dụng thay cho các chất khử trùng truyền thống. AgNPs không những làm giảm sự gây nhiễm mà còn kích thích mẫu cấy phát sinh hình thái. AgNPs bao gồm các ion có kích thước nhỏ (1 - 20 nm), diện tích tiếp xúc bề mặt lớn. Do đó, chúng dễ dàng tiếp cận và bám lên bề mặt tế bào, từ đó gia tăng hiệu quả khử trùng cũng như tác động sinh trưởng. Việc sử dụng AgNPs đã loại bỏ được sự gây nhiễm vi sinh vật của mẫu cấy. Đồng thời, các hạt nano cũng thể hiện những tác động tích cực đến sự cảm ứng hình thành mô sẹo, phôi soma, huyền phù tế bào và cơ quan v.v.

Các hạt nano ở nồng độ tối ưu có tác dụng làm giảm hoặc loại bỏ nguồn nhiễm mà không gây hại đến sức sống của mẫu [150].

Khả năng diệt khuẩn của AgNPs là kết quả của quá trình biến đổi và giải phóng liên tục các nguyên tử kim loại bạc trên bề mặt hạt AgNPs thành các ion bạc tự do và các ion tự do này sau đó tác dụng và tiêu diệt vi khuẩn. Các đặc tính kháng khuẩn của bạc là ngăn cản quá trình sao chép DNA của tế bào vi khuẩn. Đặc tính này dựa trên sự tương tác tĩnh điện giữa ion bạc mang điện tích dương và bề mặt tế bào vi khuẩn mang điện tích âm. Đồng thời, chúng vô hiệu hóa nhóm thiol trong enzyme vận chuyển oxy hoặc trên sự tương tác của ion bạc với DNA dẫn đến sự dime hóa pyridin. Ngoài ra, bạc còn có tác động trực tiếp lên màng bảo vệ của tế bào vi khuẩn thông qua việc tương tác với các nhóm peptidoglycan làm ức chế khả năng vận chuyển oxy từ bên ngoài vào bên trong tế bào vi khuẩn, kết quả làm ức chế hoạt động hô hấp của vi khuẩn. Ngược lại, AgNPs hầu như không tác động đến sức khỏe người sử dụng ngay cả khi tiếp xúc với các ion bạc. Có thể là do tế bào ở động vật có hai lớp lipoprotein giàu liên kết đôi bền vững có khả năng cho điện tử. Như vậy, AgNPs có khả năng diệt khuẩn theo những phương pháp như phá hủy chức năng hô hấp, phá hủy chức năng của thành tế bào vi khuẩn. Đồng thời, AgNPs liên kết với DNA của tế bào vi sinh vật và ức chế chức năng sao chép của vi sinh vật, kìm hãm không cho chúng phát triển triển mạnh.

Hiệu quả khử trùng chịu ảnh hưởng bởi nhiều yếu tố, như: kích thước, tuổi, loại mẫu, các điều kiện trồng trọt, trạng thái sinh lý của cây mẹ, thời gian và nhiệt độ tiếp xúc, loại chất khử trùng và nồng độ sử dụng. Với các mô mềm, chất khử trùng ở nồng độ cao có thể loại bỏ các vi sinh vật gây nhiễm nhưng đồng thời cũng gây chết mẫu. Nhiều nghiên cứu cho rằng, việc xử lý mẫu với các chất khử trùng ở nồng độ cao và thời gian xử lý dài sẽ cho tỷ lệ mẫu nhiễm thấp. Tuy nhiên, chúng có thể tạo ra những ảnh hưởng bất lợi đối với khả năng sống sót và tái sinh của mẫu xử lý [151]. Do đó, hiệu quả khử trùng mẫu phụ thuộc chất sử dụng, nồng độ và thời gian khử trùng.

Ảnh hưởng tích cực hoặc tiêu cực của việc sử dụng AgNPs trong quá trình khử trùng đối với sự tái sinh và sinh trưởng của mẫu cấy phụ thuộc đặc biệt vào nhiều yếu tố như thành phần, hàm lượng, kích thước, tính chất hóa học và vật lý của hạt nano, cũng như đặc điểm cụ thể của từng loại thực vật. Vì vậy, các nghiên cứu đã được tiến hành để đánh giá hiệu quả khử trùng và ảnh hưởng của AgNPs đến sinh trưởng của cây *in vitro* và *ex vitro*.

Tung và cộng sự (2021) đã chỉ ra, AgNPs ảnh hưởng đáng kể đến khả năng khử trùng mẫu lá dâu tây. Mẫu được xử lý trong 20 phút với 500 mg/L AgNPs cho tỷ lệ mẫu nhiễm chỉ còn 22,22%. Khi giảm nồng độ AgNPs xuống 200 mg/L, thời gian tương tự, thì tỷ lệ mẫu tạo chồi, số chồi/mẫu và số chồi cao trên 1,5 cm đạt giá trị cao nhất (lần lượt 64,44 %, 21 chồi và 6,66 chồi). Như vậy, khi xử lý ở nồng độ 200 mg/L AgNPs, với thời gian 20 phút, không những hiệu quả khử trùng cao mà còn cải thiện sự tái sinh, sinh trưởng và phát triển của mẫu [152]. Các tác giả cũng đã chỉ ra, dưới tác động của những thay đổi về loại, nồng độ và thời gian xử lý khi khử trùng mẫu bằng các ion kim loại có thể hình thành những tín hiệu ion kim loại khác nhau, ảnh hưởng đến mức độ tái sinh, tăng trưởng của mô, tế bào thực vật. Kết quả tương tự cũng được ghi nhận trong nghiên cứu trên đối tượng *Capsicum frutescens* Mill., dưới tác động của AgNPs kích thước của chồi và số lượng chồi hình thành gia tăng đáng kể [153]. Đỗ Mạnh Cường và cộng sự (2020), khi thực hiện khử trùng các mẫu lá sâm Ngọc Linh *ex vitro* chỉ ra rằng, 500 mg/L AgNPs với thời gian xử lý 15 phút cho tỷ lệ nhiễm chỉ còn 20,00% so với 1000 mg/L HgCl₂ và 60000 mg/L Ca(OCl)₂. Trong khi đó, nghiệm thức 200 mg/L AgNPs, 20 phút cho tỷ lệ mẫu cảm ứng mô sẹo và khối lượng tươi tốt nhất (72,22% và 0,77 g) [154].

Nhìn chung, tùy theo từng đối tượng, loại mẫu sử dụng mà hiệu quả khử trùng của AgNPs thay đổi. Do đó, việc nghiên cứu và tìm được nồng độ AgNPs, thời gian khử trùng tối ưu cho từng đối tượng thực vật và loại mẫu cấy là cần thiết với mục tiêu giảm tỷ lệ mẫu nhiễm, gia tăng tỷ lệ mẫu sống sót và còn khả năng tái sinh.

1.4.2. Hiệu quả của AgNPs trong sự sinh trưởng và phát triển thực vật

Gần đây, có nhiều nghiên cứu đã chỉ ra được vai trò của AgNPs trong nuôi cấy mô, tế bào thực vật *in vitro*. Bên cạnh vai trò khử trùng, AgNPs còn được biết đến với vai trò kích thích sinh trưởng mô, tế bào thực vật, đồng thời cũng cải thiện quá trình tích lũy các hoạt chất thứ cấp [155]. AgNPs khi được hấp thu vào trong tế bào, sẽ kích thích tổng hợp ROS, từ đó cảm ứng đến các con đường truyền tín hiệu cho tế bào, giúp cải thiện sự sinh trưởng và phát triển của thực vật [156]. Hiệu quả kích thích tăng trưởng mô, tế bào thực vật của AgNPs đã được chứng minh ở nhiều đối tượng thực vật như *P. vietnamesis* [10]; *Stevia rebaudiana* Bert. [157]; *Gaillardia pulchella* Foug cv. 'Torch Yellow' [158].

Một số nghiên cứu chỉ ra rằng các hạt nano tác động đến sự cảm ứng mô sẹo, tạo rễ và chồi. Khi bổ sung AgNPs vào trong môi trường MS nuôi cấy đọt thân *Tecomella undulata*, cho thấy có sự gia tăng đáng kể tỷ lệ mẫu cảm ứng phát sinh mô sẹo, chồi, số lượng chồi, tỷ lệ chồi và chiều dài chồi [159]. Kết quả tương tự cũng

được công bố trên đối tượng dâu tây. Đỗ Mạnh Cường và cộng sự (2018) bổ sung AgNPs trực tiếp vào môi trường nuôi cấy mẫu lá *ex vitro* làm tăng khả năng cảm ứng mô sẹo và tái sinh chồi. Kết quả cho thấy, AgNPs có tác động tích cực trong tất cả các giai đoạn sinh trưởng của mẫu bao gồm tạo mô sẹo, tái sinh chồi và phát triển thành cây con [160].

Ngoài ra, AgNPs cũng có vai trò kìm hãm sự già hóa và tăng tỷ lệ sống sót của mẫu thông qua việc điều hòa biểu hiện của gen *TuACS* - gen tổng hợp ACC (tiền chất cuối trong con đường tổng hợp ethylene). Đồng thời, các hạt nano cũng tác động đến sự cảm ứng mô sẹo, nhân nhanh chồi, phát sinh phôi soma và hình thành rễ bằng cách thay đổi hoạt động của các enzyme chống oxy hóa, biểu hiện của gen và cản trở quá trình tổng hợp ethylene. AgNPs cũng giúp hạn chế quá trình sinh tổng hợp khí ethylene bằng cách ức chế enzyme l-aminocyclo-propane carboxylic acid (enzyme ACC) hoạt động. Điều này giúp kiểm soát hiện tượng thủy tinh thể trong nhân giống cảm chương, đồng tiền và hoa hồng [161].

Một số nghiên cứu cũng được tiến hành để đánh giá khả năng gây độc đối với thực vật khi sử dụng các nano kim loại, đặc biệt khi sử dụng ở nồng độ cao. Các hạt nano được có thể tạo ra các tác động trái ngược về khả năng phát sinh cơ quan, sinh trưởng chồi, nảy mầm của hạt, sống sót của mẫu cây và sinh trưởng của cây con [162].

Từ các kết quả công bố trên cho thấy, các nghiên cứu cần được tiến hành nhằm tìm ra nồng độ nano phù hợp cho từng đối tượng thực vật, cải thiện sự sinh trưởng mà không gây hại cho thực vật cũng như môi trường.

Nhận xét chung:

Qua tìm hiểu các công trình nghiên cứu trên thế giới cũng như trong nước về các vấn đề liên quan có thể rút ra một số nhận xét sau:

Đã có các nghiên cứu về cảm ứng phát sinh phôi soma cũng như nhân nhanh phôi soma trong các môi trường, điều kiện và phương thức nuôi cấy khác nhau; Khử trùng mẫu cấy là bước cần thiết khởi đầu quá trình nuôi cấy mô, việc xác định được loại và nồng độ chất khử trùng là quan trọng nhằm thu được mẫu không nhiễm nhưng vẫn còn khả năng tái sinh. Ngoài ra, tùy từng đối tượng thực vật, yêu cầu các yếu tố cảm ứng phát sinh hình thái, đặc biệt là quá trình phát sinh phôi soma là khác nhau. Do đó, cần có những nghiên cứu cụ thể về việc tìm ra nồng độ chất khử trùng tốt nhất tạo nguồn mẫu ban đầu trong điều kiện *in vitro*; Loại cũng như nồng độ các chất kích thích cảm ứng phát sinh phôi soma; Phát sinh và nhân nhanh phôi soma thứ cấp với

mục tiêu gia tăng hệ số nhân; Tái sinh cây hoàn chỉnh có nguồn gốc từ phôi soma cho từng đối tượng thực vật.

Đối với sâm Lang Bian, đây là một đối tượng mới, chưa có những nghiên cứu về sự phát sinh, tăng sinh và phát triển phôi soma được thực hiện. Chính vì lý do đó, nghiên cứu quá trình phát sinh phôi soma sâm Lang Bian (*Panax vietnamensis* var. *langbianensis*) nhằm hiểu rõ và kiểm soát một cách hiệu quả quá trình nuôi cấy phôi soma, góp phần tạo ra nguồn giống phục vụ cho công tác bảo tồn cần được thực hiện.

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

2.1. Vật liệu nghiên cứu

2.1.1. Vật liệu thực vật

Mẫu thân rễ (đường kính 1,5 cm) của cây sâm Lang Bian 10 năm tuổi được thu thập từ vùng núi Langbiang (Lâm Đồng, Việt Nam) với chiều dài thân rễ khoảng 9 cm, không sâu bệnh được sử dụng làm nguồn vật liệu nghiên cứu.

2.1.2. Thiết bị, dụng cụ và hóa chất

2.1.2.1. Thiết bị, dụng cụ

Các thiết bị và dụng cụ được sử dụng trong nghiên cứu bao gồm: Cân kỹ thuật (1500 g, sai số 0,01g, TE1502S Sartorius – Đức), cân phân tích (200 g, sai số 0,0001 g, CP 224S Sartorius – Đức), nồi hấp khử trùng (Hirayama HV- 100 – Nhật Bản), tủ cấy vô trùng, tủ sấy (256 L, 300°C, UF260 Memmert – Đức, máy đo pH (Hanna-HI-2550 – Mỹ), kính hiển vi truyền suốt (CX23, Olympus – Nhật Bản), kính lúp soi nổi (SZX7, Olympus – Nhật Bản), máy sắc ký lỏng siêu hiệu năng Ultimate 3000 UHPLC-UV (Thermo Science, Mỹ), máy HPLC với các thông số bao gồm cột Supelco RP C18 (250 × 4,6 mm; I.D. 5 mm), sử dụng đầu dò SPD-M20A-PDA (Shimadzu).

Các dụng cụ được sử dụng: Bình nuôi cấy 250 mL, bình tam giác 250 mL, đĩa petri, dao cắt, kẹp cắt. Các dụng cụ trước khi sử dụng được hấp khử trùng trong autoclave ở nhiệt độ 121°C, áp suất 1atm trong thời gian 30 phút.

2.1.2.2. Hóa chất

Các chất khoáng đa lượng, vi lượng, vitamin và sucrose được mua từ hãng Duchefa Biochemie, Hà Lan; các PGRs dùng trong thí nghiệm bao gồm 2,4-D, NAA, IBA, BA, Kinetin, TDZ được cung cấp từ hãng Merck KGaA, Darmstadt, Đức.

Glutamine dạng bột (Độ tinh khiết > 99%, Sigma-Aldrich, Hoa Kỳ), spermidine dạng dung dịch (Độ tinh khiết > 95%, Sigma-Aldrich, Hoa Kỳ) được điều chỉnh đến nồng độ mong muốn bằng nước cất vô trùng và bổ sung vào môi trường nuôi cấy đã được hấp tiệt trùng qua màng lọc khử trùng (0,45 µm, Sigma-Aldrich, USA).

Proline dạng bột (Độ tinh khiết > 99%, Sigma-Aldrich, Hoa Kỳ) được điều chỉnh đến nồng độ mong muốn bằng nước cất vô trùng và bổ sung vào môi trường nuôi cấy trước khi hấp tiệt trùng.

Dung dịch AgNPs được cung cấp bởi Viện Công nghệ Môi trường, VAST với tiêu chuẩn như sau: kích thước trung bình của các hạt nano ≤ 20 nm được làm theo tỷ lệ: 700 - 1000 ppm AgNO₃, 250 - 300 ppm β - chitosan, 200 ppm NaBH₄, tỷ lệ mol NaBH₄/AgNO₃ = 1/4, tốc độ nhỏ giọt NaBH₄ từ 10 - 12 giọt/phút [163].

2.2. Nội dung nghiên cứu

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

Nghiên cứu ảnh hưởng của AgNPs trong khử trùng bề mặt mẫu thân rễ và sinh trưởng tiếp theo.

Nghiên cứu ảnh hưởng của BA hoặc kinetin đến sự nhân nhanh chồi sâm Lang Bian *in vitro*.

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

Nghiên cứu ảnh hưởng của 2,4-D, NAA hoặc IBA đến sự phát sinh phôi soma sơ cấp *in vitro* từ các mẫu cây lớp mỏng L-tTCL và P-ITCL

Nghiên cứu ảnh hưởng của proline, glutamine hoặc spermidine đến sự phát sinh phôi soma sơ cấp từ các mẫu cây lớp mỏng L-tTCL và P-ITCL

Nghiên cứu sự biến động hàm lượng hormone nội sinh trong quá trình phát sinh phôi soma sơ cấp từ các mẫu cây lớp mỏng L-tTCL và P-ITCL

2.2.3. Nội dung 3: Phát sinh phôi soma thứ cấp

Nghiên cứu ảnh hưởng của môi trường khoáng đến sự phát sinh phôi soma thứ cấp

Nghiên cứu ảnh hưởng của hàm lượng đường đến sự phát sinh phôi soma thứ cấp

Nghiên cứu ảnh hưởng của hàm lượng nước dừa đến sự phát sinh phôi soma thứ cấp

2.2.4. 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*

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

Nghiên cứu sự sinh trưởng tiếp theo của phôi soma sâm Lang Bian trong môi trường có AgNPs

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Phương pháp bố trí thí nghiệm

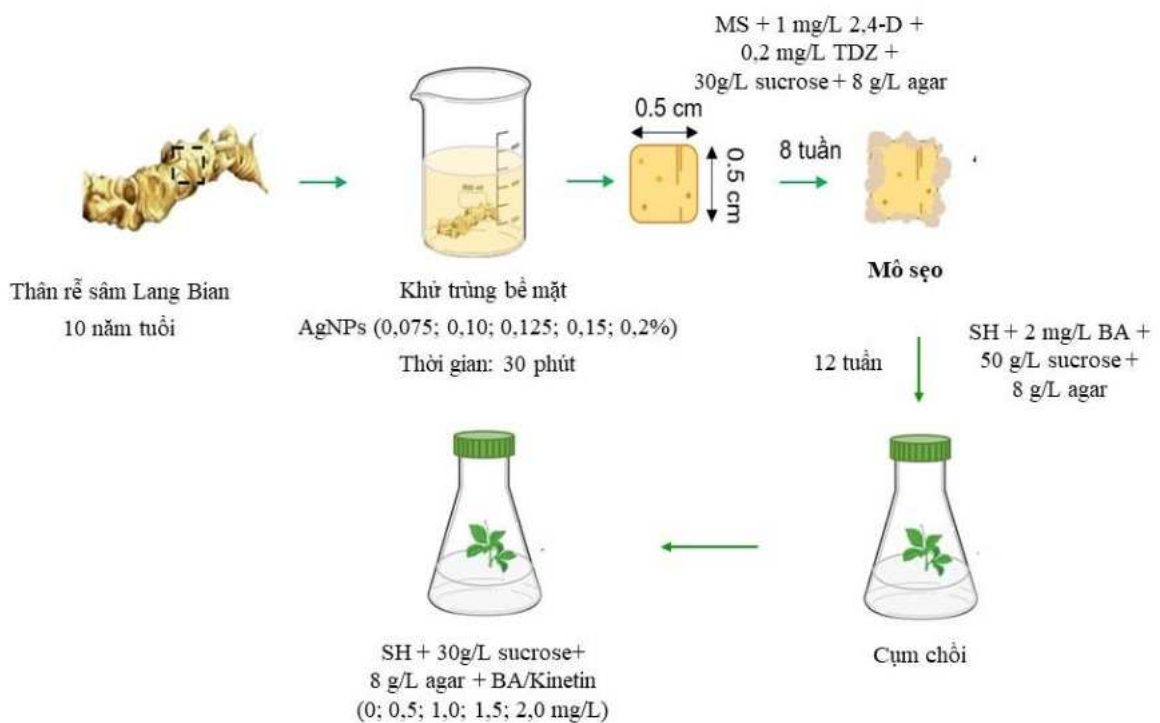
2.3.1.1. Nội dung 1: Tạo nguồn mẫu in vitro

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

Vật liệu là mẫu thân rễ (đường kính 1,5 cm) của cây sâm Lang Bian 10 năm tuổi được thu thập từ vùng núi Langbiang (Lâm Đồng, Việt Nam) với chiều dài thân rễ khoảng 9 cm, không biểu hiện sâu bệnh được sử dụng làm nguồn vật liệu ban đầu cho nghiên cứu.

Mẫu thân rễ được rửa dưới vòi nước chảy 15 phút; rửa tiếp 3 lần bằng nước cất vô trùng. Sau đó, mẫu thân rễ được khử trùng bằng AgNPs ở các nồng độ (0,075; 0,10; 0,125; 0,15 và 0,20%) có thêm 1 - 2 giọt Tween-80 trong 30 phút. Sau đó, mẫu được rửa bằng nước cất vô trùng 3 - 4 lần, những phần đã bị tổn thương do chất khử trùng được loại bỏ.

Tiếp theo đó, mẫu cây được cắt thành những mẫu nhỏ kích thước khoảng 0,5 cm × 0,5 cm; độ dày 0,1 cm và cấy trên môi trường MS bổ sung 1,0 mg/L 2,4-D; 0,2 mg/L TDZ, 30 g/L sucrose, 8,0 g/L agar [34].



Hình 2.1. Sơ đồ thí nghiệm nghiên cứu tác động của AgNPs trong khử trùng bề mặt mẫu thân rễ và sinh trưởng tiếp theo

Những cụm mô sẹo 8 tuần tuổi có nguồn gốc từ mẫu thân rễ khử trùng bề mặt với AgNPs cắt thành những mẫu nhỏ có 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, 8,0 g/L agar [34] để hình thành chồi bất định (Hình 2.1).

Chỉ tiêu theo dõi: Tỷ lệ mẫu nhiễm, tỷ lệ mẫu bị hoại tử, tỷ lệ mẫu sống sót và cảm ứng mô sẹo được ghi nhận sau 2 và 8 tuần nuôi cấy, trong khi đó, tỷ lệ mẫu tạo chồi và số chồi hình thành, hình thái mô sẹo và chồi phát sinh được ghi nhận sau 12 tuần nuôi cấy.

-*Tỷ lệ mẫu nhiễm:*

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

-*Tỷ lệ mẫu hoại tử:*

$$\text{Tỷ lệ mẫu hoại tử (\%)} = \frac{\text{Số mẫu không nhiễm, hoại tử}}{\text{Tổng số mẫu}} \times 100$$

-*Tỷ lệ mẫu sống sót, tạo mô sẹo:*

$$\text{Tỷ lệ mẫu sống sót, tạo mô sẹo (\%)} = \frac{\text{Số mẫu sống sót, tạo mô sẹo}}{\text{Tổng số mẫu}} \times 100$$

-*Tỷ lệ mẫu tạo chồi:*

$$\text{Tỷ lệ mẫu tạo chồi (\%)} = \frac{\text{Số mẫu tạo chồi}}{\text{Tổng số mẫu}} \times 100$$

- *Số lượng chồi (chồi/mẫu):* Quan sát và đếm số chồi trên mẫu cấy.

Thí nghiệm 2. Nghiên cứu ảnh hưởng của BA hoặc kinetin đến sự nhân nhanh chồi *in vitro*

Các chồi sâm Lang Bian *in vitro* (kích thước khoảng 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), 30 g/L sucrose, 8,0 g/L agar. pH của môi trường nuôi cấy được điều chỉnh 5,7 - 5,8. Môi trường được đựng trong bình thủy tinh có thể tích 250 ml, mỗi bình thủy tinh chứa 30 mL môi trường và được hấp khử trùng ở nhiệt độ 121⁰C, 1 atm trong 30 phút (Hình 2.1).

Chỉ tiêu theo dõi bao gồm số chồi (chồi/mẫu), chiều cao chồi (cm), khối lượng tươi (mg) của mẫu cấy được ghi nhận sau 12 tuần nuôi cấy.

- *Số lượng chồi (chồi/mẫu):* Quan sát và đếm số chồi trên mẫu cấy.

- *Chiều cao chồi (cm):* Đo chiều cao của chồi bằng thước có vạch chia mm.

- *Khối lượng tươi của chồi (mg)*: Mẫu chồi sau khi được xác định số chồi và chiều cao chồi thì xác định khối lượng tươi bằng cân phân tích với độ chia nhỏ nhất 0,0001 g.

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

Thí nghiệm 3: Nghiên cứu ảnh hưởng của 2,4-D, NAA hoặc IBA đến sự phát sinh phôi soma sơ cấp từ các mẫu L-tTCL hoặc P-ITCL

Các mẫu cây lá, cuống lá của cây sâm Lang Bian *in vitro* 12 tuần tuổi nuôi cấy trong môi trường MS có bổ sung 30 g/L sucrose, 8,0 g/L agar và BA hoặc kinetin (kết quả tốt nhất thu được từ thí nghiệm 2) sử dụng làm nguồn mẫu cho các thí nghiệm phát sinh phôi soma sơ cấp.

Chuẩn bị mẫu cây lớp mỏng L-tTCL hoặc P-ITCL

+ Mẫu L-tTCL: Mẫu lá 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 × 10 mm: rộng × dài) Mẫu lá (L) được cắt lớp mỏng theo chiều ngang thành 10 mẫu L-tTCL (kích thước: 1 mm × 5 mm) (Hình 2.2).

+ Mẫu P-ITCL: Mẫu cuống lá 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 có một cuống lá (1 mm × 30 mm: dày × dài). Mẫu cuống lá được cắt thành 3 mẫu (kích thước 1 mm × 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 × 10 mm) (Hình 2.2).

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). Đối chứng là môi trường MS không bổ sung auxin. Các mẫu L-tTCL hoặc P-ITCL được đặt trên bề mặt của môi trường sao cho mặt cắt tiếp xúc với môi trường.

Chỉ tiêu theo dõi bao gồm tỷ lệ mẫu phát sinh phôi soma sơ cấp (%) và số phôi soma tạo thành (phôi/mẫu), hệ số hiệu chỉnh tăng trưởng (GCF), tỷ lệ mẫu cảm ứng mô sẹo (%), tỷ lệ mẫu tạo rễ bất định (%) và số rễ bất định (rễ/mẫu) được thu nhận tùy theo dạng phát sinh hình thái từ mẫu L-tTCL hoặc P-ITCL sau 12 tuần nuôi cấy.

- *Tỷ lệ mẫu tạo phôi soma:*

$$\text{Tỷ lệ mẫu tạo phôi soma (\%)} = \frac{\text{Số mẫu tạo phôi soma}}{\text{Tổng số mẫu}} \times 100$$

- *Số phôi soma trên mẫu (phôi/mẫu)*: Đếm số lượng phôi soma hình thành trên từng mẫu cây dưới kính lúp soi nổi

- *Hệ số hiệu chỉnh tăng trưởng (GCF) của mẫu cây lá (L-tTCL) và cuống lá (P-ITCL) và chồi*

+ Hệ số hiệu chỉnh tăng trưởng (GCF) của mẫu cây L-tTCL hoặc P-ITCL được xác định dựa trên “Tỷ lệ mẫu phát sinh phôi soma”, “Số lượng phôi soma hình thành trên mỗi mẫu” và “Hệ số mẫu” theo công thức của Teixeira da Silva và Dobránszki [141]:

$$GCF_{L-tTCL/P-ITCL} = N_{L/P} \times (R\%_{L-tTCL/P-ITCL} \times SEN_{L-tTCL/P-ITCL})/100$$

Trong đó:

R%_{L-tTCL/P-ITCL}: Tỷ lệ mẫu phát sinh phôi soma sơ cấp của mẫu cây L-tTCL hoặc P-ITCL;

SEN_{L-tTCL/P-ITCL}: Số lượng phôi soma hình thành từ mẫu cây L-tTCL hoặc P-ITCL;

N: Hệ số mẫu L-tTCL (N_{L-tTCL}) là 10 tương ứng với số lượng mẫu L-tTCL thu được từ một mẫu lá hoặc P-ITCL (N_{P-ITCL}) là 6 tương ứng với số lượng mẫu P-ITCL thu được từ một mẫu cuống lá.

+ Hệ số hiệu chỉnh tăng trưởng của mẫu cây chồi ($GCF_{chồi}$) bao gồm mẫu L-tTCL và P-ITCL được xác định dựa trên tổng hệ số hiệu chỉnh tăng trưởng của mẫu GCF_{L-tTCL} và GCF_{P-ITCL} .

Trong đó, tổng số mẫu TCL trên mỗi chồi được tính theo công thức:

$$\begin{aligned} T_{mẫu} &= N_{lá} \times N_{L-tTCL} + N_{cuống lá} \times N_{P-ITCL} \\ &= 5 \times 10 + 1 \times 6 = 56 \end{aligned}$$

$T_{mẫu}$ là tổng số mẫu trên mỗi chồi; $N_{lá}$: Số lượng lá trên mỗi chồi; N_{L-tTCL} : số lượng mẫu L-TCL; $N_{cuống lá}$: số lượng mẫu cuống lá trên mỗi chồi; N_{P-ITCL} : Số lượng mẫu P-ITCL.

- *Tỷ lệ mẫu tạo rễ bất định*:

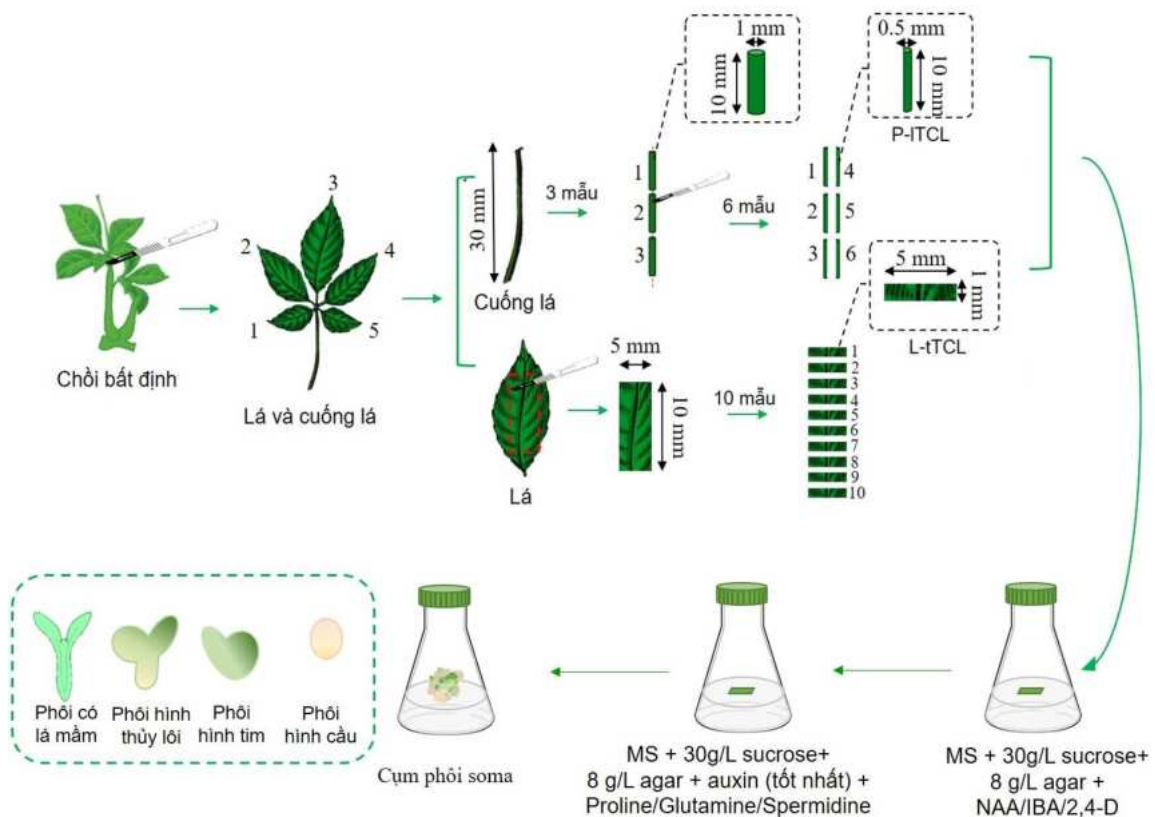
$$\text{Tỷ lệ mẫu tạo rễ bất định (\%)} = \frac{\text{Số mẫu tạo rễ}}{\text{Tổng số mẫu}} \times 100$$

- *Số rễ bất định (rễ/mẫu)*: Đếm số lượng rễ hình thành trên từng mẫu cây

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 hoặc P-ITCL

Các mẫu L-tTCL hoặc P-ITCL được cắt tương tự thí nghiệm 3. Sau đó, các mẫu L-tTCL hoặc P-ITCL được nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung auxin 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), 30 g/L sucrose, 8,0 g/L agar (Hình 2.2), pH của môi trường nuôi cấy được điều chỉnh trong khoảng 5,7 đến 5,8. Sau đó, các mẫu được duy trì ở nhiệt độ $22 \pm 2^\circ\text{C}$ trong tối với độ ẩm trung bình 55 - 60%.

Chỉ tiêu theo dõi bao gồm tỷ lệ mẫu phát sinh phôi soma sơ cấp (%) và số phôi soma tạo thành (phôi/mẫu), hệ số hiệu chỉnh tăng trưởng (GCF) được thu nhận tương tự thí nghiệm 3, hoạt tính enzyme chống oxy hóa (SOD, CAT và APX) được thu nhận sau 12 tuần nuôi cấy; hàm lượng hormone nội sinh (ZEA, kinetin, 2iP, mT, IAA, GA₃, ABA, SA và MEL) được thu nhận ở các giai đoạn khác nhau của quá trình phát sinh và phát triển phôi soma (Mẫu lá L-tTCL, mẫu cuống lá P-ITCL, mẫu lá L-tTCL trong giai đoạn cảm ứng, mẫu cuống lá P-ITCL trong giai đoạn cảm ứng, mô sẹo có khả năng phát sinh phôi soma, phôi soma hình cầu, phôi soma có lá mầm).



Hình 2.2. Sơ đồ thí nghiệm ảnh hưởng của auxin/proline/glutamine hoặc spermidine đến sự phát sinh phôi soma sơ cấp từ các mẫu L-tTCL hoặc P-ITCL

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

Để chiết xuất các enzyme (SOD, CAT và APX), 0,3 g phôi soma được làm lạnh trong nitơ lỏng và nghiền thành bột, tiếp đó được đồng nhất bằng tán xạ siêu âm trong 2 mL dung dịch đệm 0,1 M phosphate (pH 7,4) và 0,1 mM EDTA. Sau đó, chúng được ly tâm lạnh ở tốc độ 15.000 vòng/phút trong 20 phút ở 4°C. Để đo hoạt tính của các enzyme chống oxy hóa, các dịch nổi được thu thập và giữ lạnh.

Quy trình sử dụng để đánh giá hoạt tính của SOD cụ thể như sau: Pyrogallol được tạo ra trong môi trường kiềm thông qua quá trình oxy hóa với sự có mặt của oxy không khí, sản phẩm tạo thành có bước sóng hấp thụ cực đại là 320 nm. SOD trong mẫu xúc tác sự phân hủy các gốc peroxide (-O-O-), ngăn chặn quá trình tự oxy hóa của pyrogallol. Hoạt tính superoxide dismutase trong mẫu được thể hiện bằng tỷ lệ ức chế. Sự thay đổi độ hấp thụ ở bước sóng 320 nm được sử dụng để tính toán đơn vị hoạt tính của enzyme (U), tương đương với sự ức chế 50% quá trình tự oxy hóa của pyrogallol. Hoạt tính enzyme được tính theo công thức: Đơn vị enzyme (U/g protein) = (% bị ức chế/50) tỷ lệ pha loãng.

Hoạt tính CAT của mẫu thử nghiệm được đánh giá bằng cách cho phản ứng trong 2 phút với 100 μ L H₂O₂ ở nồng độ 65 mM trước khi H₂O₂ dư được trộn với 100 μ L amoni molybdat [(NH₄)₆Mo₇O₂₄], tạo ra phức màu vàng nhạt ổn định nhất hấp thụ ở bước sóng 405 nm. Một đơn vị catalase hoạt tính (U/g protein) tương đương với 1 mol H₂O₂ thủy phân trong 1 phút.

Độ hấp thụ ascorbate cực đại (ở bước sóng 290 nm) trong thời gian 3 phút với sự có mặt của 0,5 mM H₂O₂ được sử dụng để tính toán đơn vị hoạt độ APX (U). Giá trị hấp thụ 2,8 mM/cm được sử dụng để tính toán trực tiếp lượng ascorbate bị oxy hóa. Khi thử nghiệm, một đơn vị hoạt tính enzyme (U/g protein) cần thiết để oxy hóa 1 μ m ascorbate trong 1 phút.

- *Định lượng hormone nội sinh bằng sắc ký lỏng siêu hiệu năng (Ultra high performance liquid chromatography - UHPLC-UV)*

Dung dịch Bielecki - CHCl₃:MeOH:HCOOH:H₂O (25:60:5:10, v/v/v/v) được dùng để nghiền các mẫu lá tươi, cuống lá và phôi soma (mẫu cảm ứng, mô sẹo có khả năng phát sinh phôi soma, phôi soma dạng hình cầu và phôi soma dạng lá mầm) được hình thành khi cấy mẫu trong môi trường MS có bổ sung 1 mg/L 2,4-D, 1,5 mg/L Spd, 30 g/L sucrose, 8,0 g/L agar với tỷ lệ 0,1 g mẫu trên 1 mL dung dịch. Sau khi được chiết xuất lại trong 4 mL methanol 80% trong 1 giờ ở 4°C, phần cặn được ly

tâm một lần nữa. Dịch nổi được đưa vào cột Sep-Pak C18 sau khi được điều chỉnh với 1 mL methanol ở nồng độ 100% và 80% (Pha từ methanol 100% với nước cất). 500 μ L methanol ở nồng độ 80% được sử dụng để rửa cột. Dung môi được loại bỏ khỏi dịch chiết nguyên chất bằng cách làm khô trong máy hút chân không ở 50°C, và sau đó được hoàn nguyên trong 1 - 2 mL nước có độ pH là 2 (được điều chỉnh bằng acid formic). Sau đó, dung dịch được bơm vào hệ thống UHPLC qua màng lọc 0,45 μ m. Các hormone AUX (IAA), MEL, CKs (KIN, 2iP, và ZEA), mT, GA (GA₃), ABA, SA được phân tách bằng hệ thống Thermo-Ultimate 3000 UHPLC (Thermo Science, USA) sử dụng cột BDS Hypersil C18 (có đường kính 25 mm \times 4,6 mm) kích thước hạt 0,5 mm và được kết nối với đầu dò UV điều chỉnh ở bước sóng 280 nm. Cụ thể, acetonitrile (A) và nước Milli-Q được acid hóa bằng acid formic 0,5% được sử dụng làm hệ dung môi nhị phân. Việc phân tách được thực hiện bằng cách sử dụng các gradient phân đoạn từ 0 - 10 phút A từ 100% đến 75%, 11 - 17 phút A từ 75% đến 50% và cuối cùng là 18 - 25 phút A từ 50% đến 75% với tốc độ dòng chảy là 0,7 mL/phút. Nồng độ hormone được xác định dựa trên các đường chuẩn, các đường chuẩn được xây dựng dựa trên tỷ lệ giữa diện tích peak sắc ký của mỗi phân tích dung dịch chuẩn với diện tích của chất chuẩn nội tương ứng [83]. Các chất chuẩn tương ứng được mua từ Sigma-Aldrich, Hoa Kỳ. Hàm lượng AUX (IAA), MEL, CKs (KIN, 2iP và ZEA), mT, GA₃, ABA, SA (μ g/g khối lượng tươi); tỷ lệ IAA và MEL/CKs, ABA/GA₃, ABA/CKs, ABA/MEL, IAA và MEL/ABA và IAA và MEL/GA₃ được ghi nhận.

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

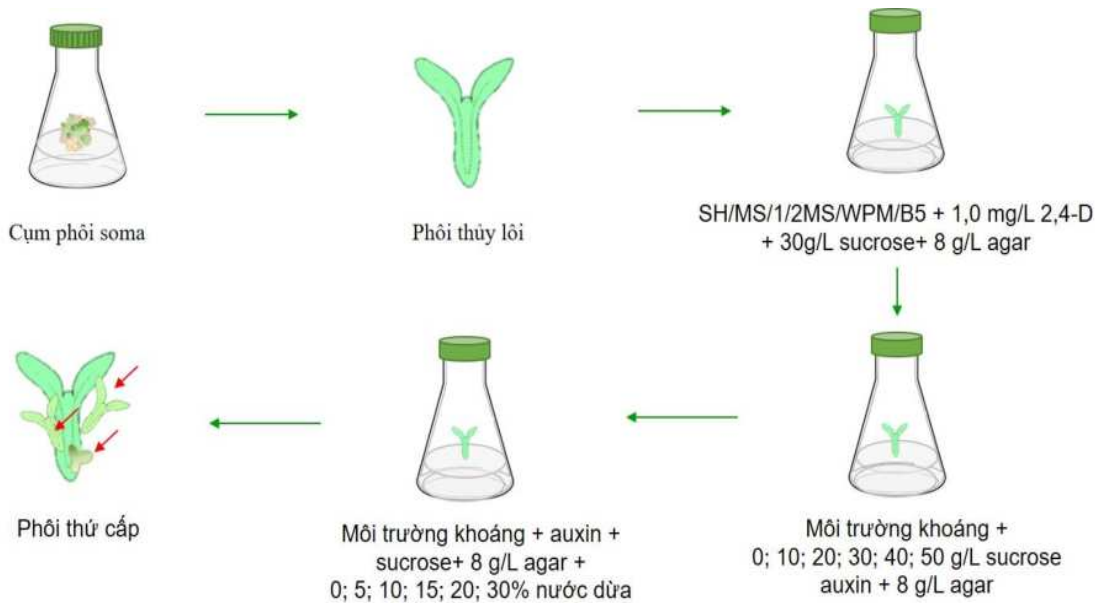
Thí nghiệm 5: Nghiên cứu ảnh hưởng của môi trường khoáng đến sự phát sinh phôi soma thứ cấp

Các phôi soma dạng hình thủy lôi được tách ra từ cụm phôi soma nuôi cấy trong môi trường trường MS bổ sung 30 g/L sucrose và 8,0 g/L agar, 2,4-D hoặc NAA hoặc IBA (kết quả tốt nhất thu được từ thí nghiệm 3) và proline hoặc glutamine hoặc spermidine (kết quả tốt nhất thu được từ thí nghiệm 4) sử dụng làm nguồn mẫu cho các thí nghiệm phát sinh phôi soma thứ cấp.

Các cụm phôi được chuyển vào đĩa petri vô trùng có dán thước chia vạch đến mm bên dưới và đặt dưới kính lúp soi nổi. Các phôi dạng thủy lôi được quan sát, tách dưới kính lúp soi nổi, sau đó được cấy chuyển sang môi trường thí nghiệm. Các thao tác được thực hiện trong tủ cấy vô trùng.

Các phôi soma ở dạng thủy lôi (chiều cao khoảng 1,5 mm) được thu nhận và nuôi cấy trên các môi trường khoáng khác nhau SH [164]; MS; ½ MS (Hàm lượng

khoảng đa lượng giảm đi một nửa); WPM [165] và Gamborg B5 [166] bổ sung 1,0 mg/L 2,4-D, 30 g/L sucrose và 8,0 g/L agar (Hình 2.3).



Hình 2.3. Sơ đồ thí nghiệm phát sinh phôi soma thứ cấp

Chỉ tiêu theo dõi bao gồm: Số phôi soma thứ cấp tạo thành (phôi/mẫu), khối lượng tươi (mg), khối lượng khô (mg) được ghi nhận sau 12 tuần nuôi cấy.

- *Số phôi soma thứ cấp trên mẫu (Phôi/mẫu)*: Đếm số lượng phôi soma hình thành trên từng mẫu cây dưới kính lúp soi nổi

- *Khối lượng tươi của phôi soma (mg)*: Mẫu cụm phôi soma sau khi được xác định số phôi soma hình thành thì được sử dụng để xác định khối lượng tươi bằng cân phân tích với độ chia nhỏ nhất 0,0001 g.

- *Khối lượng khô của phôi soma (mg)*: Mẫu cụm phôi soma sau khi xác định khối lượng tươi được sấy ở nhiệt độ 70°C đến khối lượng không đổi, xác định khối lượng khô bằng cân phân tích với độ chia nhỏ nhất 0,0001 g.

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 lồi (chiều cao khoảng 1,5 mm) được thu nhận tương tự phương pháp ở thí nghiệm 5. Sau đó, phôi 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 khác nhau (0; 10; 20; 30; 40; 50 g/L) (Hình 2.3).

Chỉ tiêu theo dõi bao gồm: Số phôi soma thứ cấp tạo thành (phôi/mẫu), khối lượng tươi (mg), khối lượng khô (mg) tương tự thí nghiệm 5, tỷ lệ phôi ở các giai đoạn phát triển khác nhau (%) được ghi nhận sau 12 tuần nuôi cấy.

- Tỷ lệ phôi soma hình cầu:

$$\text{Tỷ lệ phôi soma hình cầu (\%)} = \frac{\text{Số phôi soma hình cầu}}{\text{Tổng số phôi soma ở các giai đoạn khác nhau}} \times 100$$

- Tỷ lệ phôi soma hình tim:

$$\text{Tỷ lệ phôi soma hình tim (\%)} = \frac{\text{Số phôi soma hình tim}}{\text{Tổng số phôi soma ở các giai đoạn khác nhau}} \times 100$$

- Tỷ lệ phôi soma hình thủy lồi:

$$\text{Tỷ lệ phôi soma hình thủy lồi (\%)} = \frac{\text{Số phôi soma hình thủy lồi}}{\text{Tổng số phôi soma ở các giai đoạn khác nhau}} \times 100$$

- Tỷ lệ phôi soma có lá mầm:

$$\text{Tỷ lệ phôi soma có lá mầm (\%)} = \frac{\text{Số phôi soma có lá mầm}}{\text{Tổng số phôi soma ở các giai đoạn khác nhau}} \times 100$$

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 lồi (chiều cao khoảng 1,5 mm) được thu nhận được thu nhận tương tự phương pháp ở thí nghiệm 5 và 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 khác nhau (0; 5; 10; 15; 20; 30 %) (Hình 2.3). Nước dừa sử dụng cho thí nghiệm được thu từ trái dừa non khoảng 7-8 tháng tuổi, giống dừa xiêm (*Cocos nucifera*).

Chỉ tiêu theo dõi bao gồm: Số phôi soma thứ cấp tạo thành (phôi/mẫu), khối lượng tươi (mg), khối lượng khô (mg), tỷ lệ phôi ở các giai đoạn phát triển khác nhau (%) được ghi nhận sau 12 tuần nuôi cấy tương tự thí nghiệm 6.

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*

Các phôi soma dạng lá mầm được tách ra từ các cụm phôi soma nuôi cấy trong môi trường khoáng, bổ sung hàm lượng đường, hàm lượng nước dừa thích hợp nhất từ thí nghiệm 5, 6 và 7 và 1,0 mg/L 2,4-D, 8,0 g/L agar sử dụng làm nguồn mẫu cho các thí nghiệm tạo cây hoàn chỉnh *in vitro*.

Các cụm phôi được chuyển vào đĩa petri vô trùng có dán thước chia vạch đến mm bên dưới và đặt dưới kính lúp soi nổi. Phôi soma thứ cấp ở giai đoạn có lá mầm (chiều cao 1,5 mm) được quan sát, tách dưới kính lúp soi nổi, sau đó được cấy chuyển sang môi trường thí nghiệm. Các chồi bất định (chiều cao 1,5 cm) được quan sát và tách từ các cụm chồi. Sau đó, các phôi soma và chồi được nuôi cấy 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 [10, 37] để nghiên cứu sự sinh trưởng và tạo thân rễ/rễ bất định. Các chỉ tiêu sinh trưởng được ghi nhận sau 20 tuần nuôi cấy (Hình 2.4).

Chỉ tiêu theo dõi bao gồm: Tỷ lệ mẫu tạo thân rễ (%), đường kính thân rễ (cm), chiều dài thân rễ (cm), tỷ lệ mẫu tạo rễ bất định (%), số rễ bất định (rễ/mẫu), chiều dài rễ bất định (cm), hàm lượng saponin (Rd1, Rd, Rb1) trong thân rễ và rễ bất định của cây sâm Lang Bian *in vitro* sau 20 tuần nuôi cấy.

- Tỷ lệ mẫu tạo thân rễ:

$$\text{Tỷ lệ mẫu tạo thân rễ (\%)} = \frac{\text{Số mẫu tạo thân rễ}}{\text{Tổng số mẫu}} \times 100$$

- Đường kính thân rễ (cm): Đường kính củ được đo ở phần giữa thân rễ bằng thước chia vạch mm

- Chiều dài thân rễ (cm): Chiều dài thân rễ được đo bằng thước chia vạch mm

- Tỷ lệ mẫu tạo rễ bất định:

$$\text{Tỷ lệ mẫu tạo rễ bất định (\%)} = \frac{\text{Số mẫu tạo rễ}}{\text{Tổng số mẫu}} \times 100$$

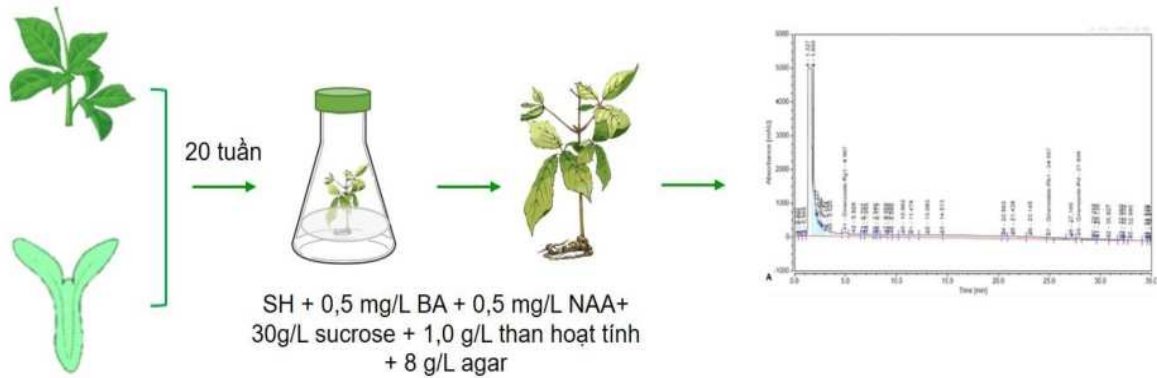
- Số rễ bất định (rễ/mẫu): Đếm số lượng rễ hình thành trên từng mẫu cấy

- Chiều dài rễ bất định (cm): Chiều dài rễ được đo bằng thước chia vạch mm

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

Phân thân rễ và rễ bất định tương ứng của cây con có nguồn gốc từ phôi soma thứ cấp và chồi bất định *in vitro* 20 tuần tuổi được sử dụng làm nguồn mẫu phân tích hàm lượng saponin tích lũy. Rễ bất định và thân rễ (1g) được sấy khô và nghiền thành bột. Cân 0,5 g bột và chiết siêu âm với methanol (10 mL methanol × 6 lần). Sau đó, dung dịch được làm bay hơi để thu cặn. Hòa tan cặn với 20 mL nước cất và phân đoạn với Ethyl ether và N-butanol. N-butanol được cô đặc để thu được cặn. Hòa tan cặn bằng hỗn hợp acetonitril và nước (2 : 1, v/v). Dung dịch được lọc qua màng 0,45 μm, sau đó định mức chính xác 5 mL. Dịch lọc được bơm vào hệ thống HPLC để

định lượng saponin theo phương pháp đường chuẩn. Thông số của máy HPLC: cột Supelco RP C18 (250 × 4,6 mm; I.D. 5 mm), sử dụng đầu dò SPD-M20A-PDA (Shimadzu), thể tích bơm 20 μ L; tốc độ dòng chảy 0,5 mL/phút. Nhiệt độ cột được giữ ở 25 °C [167].



Hình 2.4. Sơ đồ thí nghiệm tạo cây sâm Lang Bian *in vitro* từ phôi soma thứ cấp và xác định hàm lượng saponin tích lũy

Thí nghiệm 9. Sự sinh trưởng tiếp theo của phôi soma sâm Lang Bian trong môi trường có bổ sung AgNPs

Phôi soma thứ cấp ở dạng có lá mầm (chiều cao 1,5 cm) được thu nhận tương tự phương pháp ở thí nghiệm 8 và 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 [10, 37] 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. Sự sinh trưởng và tạo thân rễ của cây con được ghi nhận sau 20 tuần nuôi cấy.

Chỉ tiêu theo dõi bao gồm: Tỷ lệ mẫu tạo thân rễ (%), đường kính thân rễ (cm), chiều dài thân rễ (cm) được ghi nhận tương tự thí nghiệm 8.

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 năm 2008 [168]. Phôi soma được cắt thành từng lát mỏng, ngâm trong dung dịch Javen 10% trong 15 phút và rửa sạch mẫu bằng nước cất. Tiếp theo, mẫu được ngâm trong acid acetic 10% trong 10 phút và rửa sạch bằng nước cất 3 lần. Sau đó, nhuộm mẫu bằng dung dịch thuốc nhuộm gồm 2 màu đỏ carmine và xanh iodine trong 5 phút; rửa lại mẫu bằng nước cất cho đến khi hết màu thuốc nhuộm. Cuối cùng, đặt mẫu lên lam kính nhỏ thêm 1 giọt nước hoặc glycerin và đậy bằng lame. Quan sát, chụp hình và ghi nhận hình ảnh dưới kính hiển vi quang học Olympus CH30 (Nhật Bản).

2.5. Điều kiện nuôi cấy

Các thí nghiệm khử trùng mẫu, phát sinh phôi soma sơ cấp, phát sinh phôi soma thứ cấp và tạo cây sâm Lang Bian *in vitro* được bố trí ngẫu nhiên với 5 lần lặp lại, 30 mẫu cho mỗi nghiệm thức.

Xác định hoạt tính enzyme chống oxy hóa bằng phương pháp quang phổ tử ngoại khả kiến (UV-vis), định lượng một số saponin trong thân rễ và rễ bất định của cây sâm Lang Bian *in vitro* và định lượng hàm lượng hormone nội sinh bằng UHPLC-UV được thực hiện 3 lần lặp lại.

Đối với các mẫu cây L-tTCL, P-ITCL, phôi soma: Mẫu được đặt trong phòng nuôi cấy với độ ẩm 55 – 60 % và trong điều kiện tối hoàn toàn.

Đối với các mẫu cây chồi: Mẫu được đặt trong phòng nuôi với nhiệt độ phòng $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, độ ẩm 55 – 60 %, chiếu sáng bằng đèn huỳnh quang (40W) kích thước 1,2 m, điện áp 220 V, quang chu kỳ 16 giờ/ngày, cường độ ánh sáng $40 - 45 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

2.6. 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.

2.7. Địa điểm và thời gian nghiên cứu

- Các thí nghiệm khử trùng mẫu, phát sinh phôi soma sơ cấp, phát sinh phôi soma thứ cấp và tạo cây sâm Lang Bian *in vitro* được thực hiện tại Phòng Sinh học phân tử và chọn tạo giống cây trồng, Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên và Phòng Công nghệ Sinh học Thực vật, Khoa Nông lâm, Trường Đại học Đà Lạt.

- Xác định hoạt tính enzyme chống oxy hóa bằng phương pháp quang phổ tử ngoại khả kiến (UV-vis): mẫu được gửi phân tích tại Trung tâm Khoa học Công nghệ Dược Sài Gòn.

- Định lượng một số saponin trong thân rễ và rễ bất định của cây sâm Lang Bian *in vitro* và định lượng hàm lượng hormone nội sinh bằng UHPLC-UV: mẫu được gửi phân tích tại Viện Công nghệ sinh học và Môi trường, Trường Đại học Tây Nguyên.

- Thời gian thực hiện luận án: Từ tháng 10/2019 đến 10/2023.

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

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

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 (Bảng 3.1). 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 1,34% lên 58,68% sau 2 tuần nuôi cấy. Sau 8 tuần nuôi cấy, các mẫu được xử lý bề mặt bằng AgNPs và nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung 1,0 mg/L 2,4-D; 0,2 mg/L thidiazuron (TDZ), 30 g/L sucrose, 8,0 g/L agar đều thể hiện sự cảm ứng mô sẹo, và tỷ lệ cảm ứng mô sẹo đạt cao nhất là 49,34% đối với mẫu cây được xử lý bề mặt với 0,150% AgNPs (Bảng 3.1).

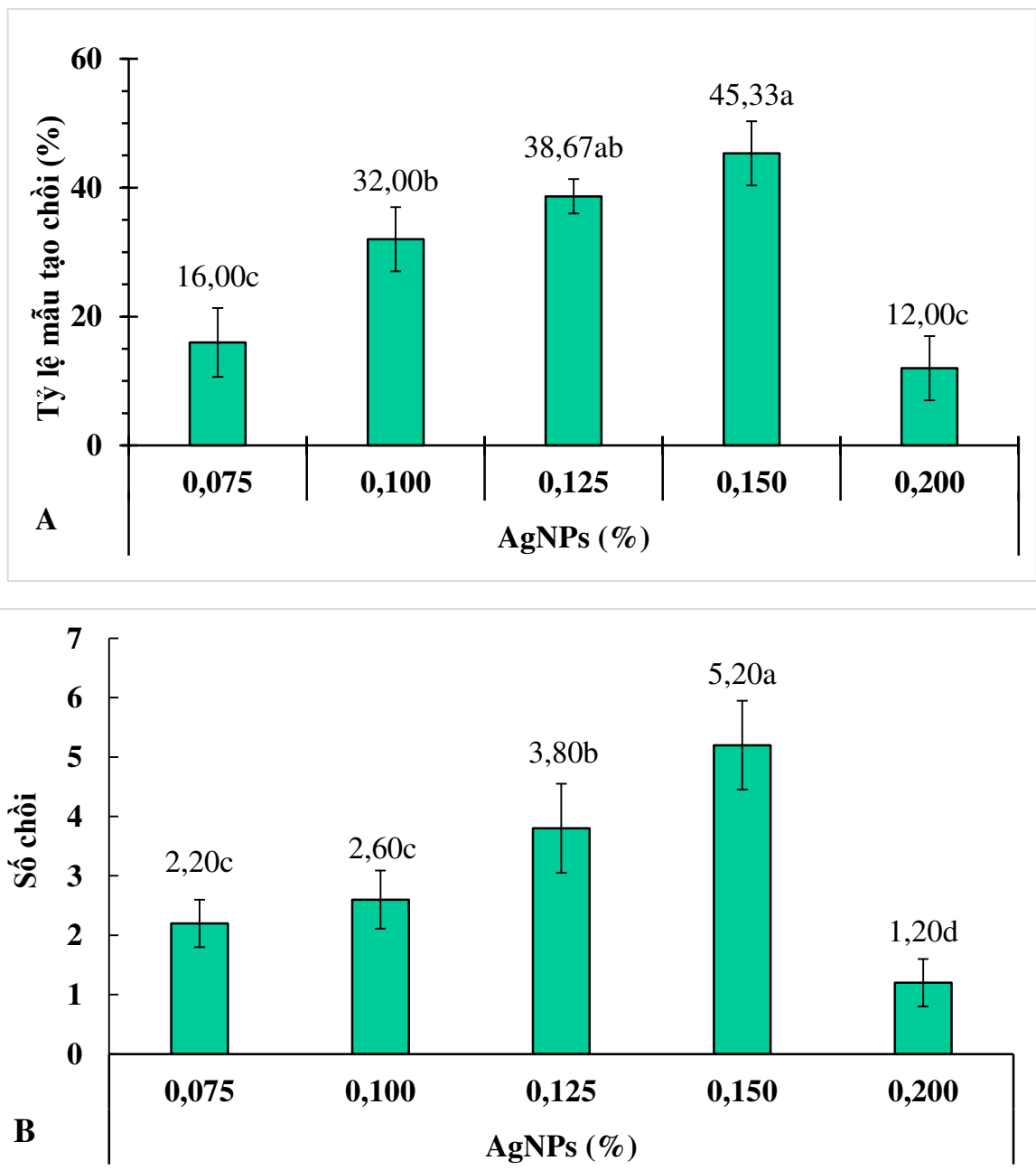
Bảng 3.1. Ảnh hưởng của AgNPs đến khả năng khử trùng bề mặt và cảm ứng tạo mô sẹo của mẫu thân rễ sâm Lang Bian sau 8 tuần nuôi cấy

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 ^a	1,34 ± 1,23 ^c	22,66 ± 8,96 ^c
0,100	62,67 ± 8,96 ^b	2,68 ± 1,64 ^c	34,68 ± 8,69 ^b
0,125	54,67 ± 3,00 ^b	6,68 ± 4,70 ^c	38,66 ± 5,60 ^b
0,150	36,00 ± 5,95 ^c	14,68 ± 8,69 ^b	49,34 ± 7,59 ^a
0,200	25,33 ± 5,57 ^d	58,68 ± 7,30 ^a	16,00 ± 3,70 ^c

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). Giá trị thể hiện trong bảng là giá trị trung bình ± SD (độ lệch chuẩn).

Những cụm mô sẹo có nguồn gốc từ mẫu thân rễ khử trùng bề mặt với AgNPs cấy chuyển sang môi trường SH có bổ sung 2 mg/L BA, 30 g/L sucrose, 8,0 g/L agar đều cho hình thành chồi bất định sau 12 tuần nuôi cấy (Hình 3.1). Trong đó, nồng độ

AgNPs và khả năng tái sinh chồi của mẫu cây có mối tương quan thuận với nhau. Tuy nhiên, khả năng tái sinh chồi và số lượng chồi hình thành có xu hướng giảm rõ rệt khi tăng nồng độ AgNPs lên mức cao (0,200%). Mô sẹo có nguồn gốc từ thân rễ được khử trùng trong 0,150% AgNPs cho tỷ lệ tái sinh chồi cao hơn khoảng 4 lần so với 0,200% AgNPs 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 (Hình 3.1 A và B). Như vậy, 0,150 % AgNPs không những cho hiệu quả khử trùng mẫu cao mà còn có tác dụng kích thích mẫu cây tái sinh chồi bất định.



Hình 3.1. Ảnh hưởng của AgNPs đến sự tái sinh chồi (A) và số chồi (B) từ mẫu cây thân rễ sâm Lang Bian sau 12 tuần nuôi cấy

Các chất khử trùng thông thường như sodium hypochlorite, calcium hypochlorite và mercury chloride thường được sử dụng trong giai đoạn khử trùng các loại mẫu cấy khác nhau như chồi ngủ, lá, đốt thân, ...; tuy nhiên, chúng thường gây độc, làm tổn thương và làm giảm hiệu quả tái sinh của mẫu cấy [169]. Mặt khác, tác dụng kháng khuẩn của AgNPs đã được biết đến trong nhiều năm, đặc biệt là trong lĩnh vực y tế. Trong lĩnh vực sinh học - nông nghiệp nói chung và nuôi cấy mô, tế bào và cơ quan thực vật nói riêng, AgNPs thường được bổ sung vào môi trường nuôi cấy với mục tiêu kích thích mẫu cấy sinh trưởng, phát triển, khắc phục được một số hiện tượng bất thường và tích lũy hoạt chất thứ cấp [170].

Gần đây, AgNPs được sử dụng như là tác nhân khử trùng môi trường nuôi cấy *in vitro* [171], khử trùng mẫu cấy cây cúc [171], cây dâu tây [152] hay bổ sung vào môi trường nuôi cấy *in vitro* nhằm gia tăng khả năng sinh trưởng trên cây cúc, cây dâu tây, cây hồng môn, sâm Ngọc Linh [10, 131, 152]. Ngoài ra, nghiên cứu của Tung và cộng sự (2021) cũng đã chỉ ra rằng AgNPs có hiệu quả trong kích thích tạo chồi thu hải đường trong giai đoạn khử trùng và cảm ứng mẫu cấy [172]. Kết quả của nghiên cứu này cho thấy AgNPs có hiệu quả trong khử trùng bề mặt mẫu cấy thân rễ của sâm Lang Bian và có thể được sử dụng thay thế chất khử trùng thông thường.

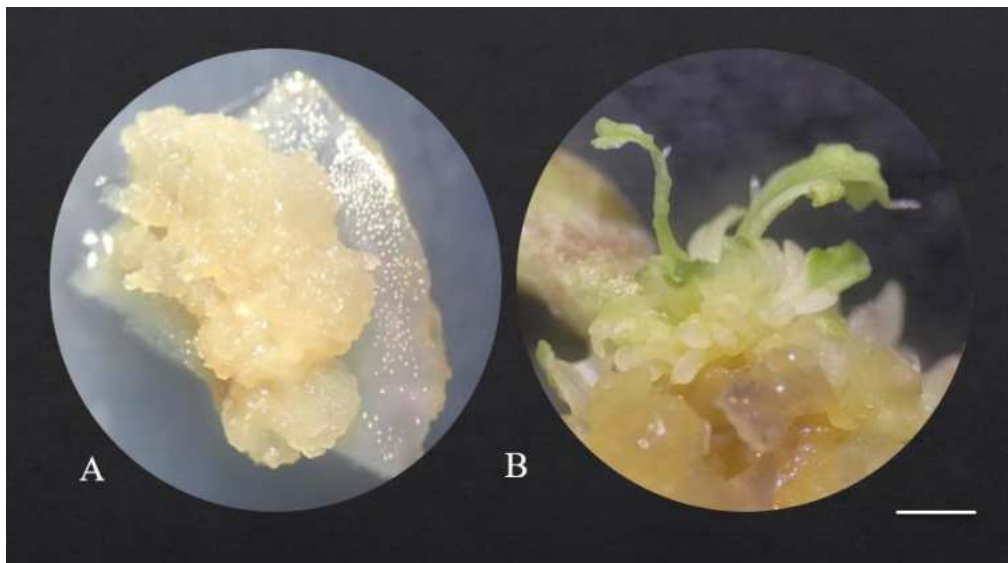
Như vậy, AgNPs có hiệu quả rất lớn trong khử trùng mẫu cấy, cung cấp nguồn vật liệu ban đầu cho những nghiên cứu tiếp theo. Khi các AgNPs được giải phóng chúng sẽ ức chế quá trình vận chuyển các ion Na^+ và Ca^{2+} qua màng tế bào ngăn cản quá trình trao đổi chất, phá vỡ màng tế bào, oxy hóa nguyên sinh chất của tế bào vi khuẩn. Đồng thời, AgNPs làm gia tăng số lượng các gốc tự do dẫn đến giảm hoạt tính của các hợp chất chứa oxy hoạt động và làm rối loạn các quá trình oxy hóa cũng như phosphoryl hóa trong tế bào vi khuẩn. Cuối cùng, vô hiệu hóa enzyme có chứa các nhóm -SH và -COOH, từ đó, phá vỡ cân bằng áp suất thẩm thấu hoặc tạo phức với acid nucleic dẫn đến làm thay đổi cấu trúc DNA của tế bào vi sinh vật, tác động trực tiếp trên cấu trúc DNA. Do đó, khi xử lý AgNPs ở nồng độ thích hợp có tác dụng tiêu diệt các nguồn vi sinh vật gây nhiễm, tạo được nguồn mẫu sạch. Kết quả nghiên cứu cũng cho thấy, AgNPs có vai trò tích cực trong khử trùng mẫu cấy thân rễ sâm Lang Bian thể hiện qua tỷ lệ mẫu nhiễm thấp và tỷ lệ mẫu sạch, còn khả năng tái sinh cao.

Tuy nhiên, nồng độ AgNPs thích hợp để khử trùng mẫu cấy thay đổi tùy thuộc vào từng loại mẫu cũng như thực vật nuôi cấy. Khi xử lý mẫu ở nồng độ thấp cho tỷ lệ mẫu nhiễm cao hơn so với các nghiệm thức có nồng độ cao. Ngược lại, khi xử lý mẫu trong dung dịch AgNPs có nồng độ cao, mặc dù tỷ lệ mẫu nhiễm giảm nhưng lại ảnh hưởng tới sức sống của mẫu. Mẫu thân rễ sâm Lang Bian xử lý khử trùng ở nồng

độ 0,150% cho tỷ lệ mẫu sạch, vẫn còn khả năng tái sinh đạt 49,33%. Trong trường hợp tiếp tục gia tăng nồng độ lên đến 0,200% có hiện tượng mẫu bị chết, không có khả năng tái sinh hình thành mô sẹo, dẫn đến tỷ mẫu tái sinh thấp so với AgNPs ở các nồng độ thấp hơn. Kết quả tương tự cũng được công bố trên nhiều đối tượng thực vật khác nhau. Dương Tấn Nhựt và cộng sự (2018) cho rằng AgNPs có hiệu quả tích cực trong việc khử trùng mẫu cấy hoa African violet và có thể thay thế các chất khử trùng thông thường. Nồng độ AgNPs và thời gian có hiệu quả tốt nhất để khử trùng mẫu cấy là 0,05% trong 15 phút. Ngoài ra, AgNPs kích thích mẫu cấy cảm ứng nhanh, phát sinh hình thái, và không gây ra bất kỳ tác động tiêu cực nào đến sức sống của mẫu cấy [173]. Đồng Huy Giới và cộng sự (2019) cho rằng nồng độ AgNPs thích hợp nhất để khử trùng phát hoa lan Hồ điệp vàng là 0,125% cho tỷ lệ mẫu sống, sạch bệnh là 72,12% [174]. Kết quả tương tự cũng được công bố bởi Bùi Thị Thanh Phương và cộng sự (2020) trong khử trùng mẫu thân rễ cây Trầu tiên, các tác giả cho rằng sau 6 tuần nuôi cấy, mẫu được khử trùng bằng AgNPs ở nồng độ 0,150% trong 40 phút cho tỷ lệ mẫu sống và tỷ lệ mẫu sống sạch bệnh đạt cao nhất (tương ứng là 70,32 và 65,34%). Tuy nhiên, khi gia tăng nồng độ AgNPs để khử trùng mẫu cấy, mặc dù tỷ lệ mẫu nhiễm giảm xuống đáng kể nhưng khả năng tái sinh của mẫu bị ảnh hưởng rất nhiều [175]. Trong khử trùng mẫu cấy lan hồ điệp vàng bằng dung dịch AgNPs, Đồng Huy Giới và Bùi Thị Thu Hương cho rằng AgNPs ở nồng độ 0,150% cho tỷ lệ mẫu sống và mẫu sống sạch thấp nhất (tương ứng là 61,11% và 60,13%) [174]. Kết quả tương tự cũng được công bố trong khử trùng mẫu cấy Trầu tiên, AgNPs ở nồng độ 0,200 mg/L cũng cho hiệu quả khử trùng mẫu cấy thấp với tỷ lệ mẫu sống và tỷ lệ mẫu sống, không nhiễm vi sinh vật đạt được lần lượt là 64,19% và 54,31% [175]. Như vậy, AgNPs ở nồng độ quá cao đã ảnh hưởng tới khả năng tái sinh của mẫu nuôi cấy. Nguyên nhân có thể là do các hạt AgNPs có kích thước nhỏ cho nên chúng dễ dàng tiếp xúc và xâm nhập vào bên trong tế bào tác động tích cực đến sự tăng trưởng của mẫu cấy. Tuy nhiên, khi nồng độ AgNPs trong tế bào quá cao dẫn đến phenol bị trùng hợp dưới xúc tác của enzyme peroxidase; ngoài ra, chúng còn ảnh hưởng đến hoạt động phân bào, ổn định DNA, biến đổi protein và DNA ở thực vật [176].

Bên cạnh tác động khử trùng, AgNPs còn có hiệu quả tác động kích thích mẫu cấy cảm ứng nhanh và phát sinh hình thái. Khi có sự tác động của AgNPs, gene mã hóa cho sự tổng hợp auxin trong tế bào thực vật sẽ được kích thích làm gia tăng hàm lượng auxin nội sinh bên trong mẫu [177]. Trong khi đó, auxin là một trong những yếu tố quan trọng trong sự cảm ứng tạo mô sẹo cũng như phát sinh hình thái của mẫu cấy.

Kết quả nghiên cứu cho thấy, sau 8 tuần nuôi cấy, các mẫu thân rễ sâm Lang Bian sống sót sau giai đoạn khử trùng có sự cảm ứng hình thành mô sẹo trên bề mặt mẫu cấy. Mô sẹo có màu vàng nhạt hình thành chủ yếu trên bề mặt mẫu và ở những vị trí vết cắt. Sau đó, trên khối mô sẹo xuất hiện các sơ khởi chồi và chồi hình thành từ mô sẹo (Bảng 3.1, Hình 3.1 và 3.2). Kết quả tương tự cũng được công bố trong nghiên cứu của Dương Tấn Nhựt và cộng sự (2018), khi nghiên cứu tác động AgNPs trên đối tượng African violet, các mẫu cấy ở nghiệm thức sử dụng AgNPs có sự hình thành rễ tơ, chồi cao và rõ ràng hơn so với các nghiệm thức còn lại [173].



Hình 3.2. Hình thái mô sẹo sau 8 tuần nuôi cấy (A) và chồi *in vitro* sau 12 tuần nuôi cấy (B) hình thành từ mẫu cấy thân rễ sâm Lang Bian sau khi khử trùng bằng AgNPs. Thước đo: 1 mm.

Tóm lại, nghiên cứu đã chứng minh được hiệu quả của AgNPs đối với khử trùng cũng như kích thích mẫu cấy cảm ứng hình thành mô sẹo và phát sinh chồi bất định. Nồng độ AgNPs thích hợp nhất cho khử trùng và tái sinh mẫu cấy là 0,150%.

3.1.2. Ảnh hưởng của BA hoặc kinetin đến sự nhân nhanh chồi sâm Lang Bian

Các chồi tạo thành được chuyển sang môi trường MS có bổ sung 30 g/L sucrose, 8,0 g/L agar và BA hoặc kinetin ở các nồng độ khác nhau (0; 0,5; 1,0; 1,5; 2 mg/L) để nhân nhanh và tạo nguồn vật liệu cho các thí nghiệm tiếp theo. Kết quả nghiên cứu cho thấy BA và kinetin có tác động rõ rệt đến sự tăng trưởng của chồi sâm Lang Bian (Bảng 3.2). Trong trường hợp không bổ sung BA hoặc kinetin vào trong môi trường nuôi cấy, sự tăng trưởng của chồi bị ức chế, không ghi nhận được sự xuất hiện của các chồi mới. Mẫu chồi ban đầu chỉ tạo được khối mô sẹo nhỏ nhưng không có khả năng sinh trưởng, khối mô sẹo bị nâu hóa (Hình 3.3A). So với môi trường đối chứng, thì BA được bổ sung trong môi trường nuôi cấy có hiệu quả kích

thích tạo chồi. Sự nhân nhanh chồi được nuôi cấy trong môi trường bổ sung BA ở nồng độ 0,5 mg/L có sự khác biệt rõ rệt so với môi trường đối chứng không có bổ sung BA, số lượng chồi mới tạo thành, chiều cao chồi trung bình và khối lượng tươi tương ứng là 7,20 chồi, 2,74 cm và 96,86 mg (Bảng 3.2). Kết quả này cho thấy, khi có sự hiện diện của BA đã kích thích sự hình thành chồi, khả năng tạo chồi của mẫu cấy tăng lên rõ rệt. Nồng độ BA tăng lên 1,0 mg/L kích thích sự nhân nhanh chồi sâm Lang Bian tốt nhất, cụ thể số lượng chồi mới tạo thành, chiều cao chồi trung bình và khối lượng tươi đạt được lần lượt là 12,60 chồi/mẫu, 5,88 cm và 478,88 mg, chồi sinh trưởng tốt, xanh khỏe (Bảng 3.2, Hình 3.3B). Tuy nhiên, khi tăng nồng độ BA cao hơn 1,0 mg/L thì khả năng nhân nhanh chồi có khuynh hướng giảm đi, BA ở nồng độ 2,0 mg/L cho kết quả thấp nhất về khả năng nhân nhanh chồi, số lượng chồi được tạo thành chỉ đạt được 1,40 chồi/mẫu, chồi nhỏ, ngắn, chồi thường tập trung thành những nốt nhỏ dưới gốc. Kết quả thí nghiệm cho thấy rằng khi BA ở nồng độ cao hơn không chỉ làm giảm số lượng chồi hình thành mà còn làm chậm sự tăng trưởng của các chồi.

Như vậy, BA có ảnh hưởng tích cực đến sự sinh trưởng và khả năng nhân nhanh chồi sâm Lang Bian. Từ kết quả thí nghiệm cho thấy, môi trường nuôi cấy có bổ sung BA ở nồng độ 1,0 mg/L thích hợp nhất cho sự sinh trưởng và nhân nhanh chồi sâm Lang Bian thể hiện qua các chỉ tiêu về số lượng, chiều cao chồi trung bình và khối lượng tươi. Kết quả này cũng tương tự với kết quả nghiên cứu của Thân Thị Minh Phương (2011) khi khảo sát ảnh hưởng của một số PGRs và chất hữu cơ trong nhân giống sâm Ngọc Linh *in vitro*, môi trường MS có bổ sung 1,0 mg/L BA là tốt nhất cho sự tái sinh chồi sâm Ngọc Linh *in vitro* sau 60 ngày nuôi cấy [178].

Từ kết quả ở Bảng 3.2 cho thấy, kinetin có ảnh hưởng đến khả năng nhân nhanh chồi của sâm Lang Bian. Mẫu được nuôi trong môi trường có bổ sung kinetin ở nồng độ 0,5 mg/L cho số lượng chồi, chiều cao chồi trung bình và khối lượng tươi tương ứng là 2,0 chồi, 2,32 cm và 55,78 mg, các chồi có kích thước nhỏ. Tuy nhiên, khi tăng nồng độ 1,0 mg/L Kinetin thì sự nhân nhanh và sinh trưởng của chồi sâm Lang Bian cũng tăng theo tỷ lệ thuận với gia tăng nồng độ thể hiện qua số lượng, chiều cao chồi trung bình và khối lượng tươi của chồi (5,20 chồi; 3,68 cm; 132,90 mg). Ở nồng độ 1,5 mg/L Kinetin thì sự nhân nhanh và sinh trưởng của chồi đạt giá trị cao nhất với số lượng chồi tạo thành đạt được 7,00 chồi, chiều cao chồi trung bình là 4,70 cm và khối lượng tươi 204,80 mg. Khi tiếp tục gia tăng nồng độ Kinetin thì khả năng nhân nhanh chồi có khuynh hướng giảm xuống. Số chồi, chiều cao và khối lượng tươi chỉ còn 1,80 chồi, 1,26 cm và 62,06 mg ở nồng độ 2 mg/L.

Bảng 3.2. Sự nhân nhanh chồi sâm Lang Bian *in vitro* trong môi trường có bổ sung BA hoặc kinetin ở các nồng độ khác nhau sau 12 tuần nuôi cấy

Cytokinin	Nồng độ (mg/L)	Số chồi (Chồi/mẫu)	Chiều cao chồi trung bình (cm)	Khối lượng tươi (mg/mẫu)
Đối chứng	0	0,00 ± 0,00 ^e	0,00 ± 0,00 ^g	0,00 ± 0,00 ^f
BA	0,5	7,20 ± 1,10 ^b	2,74 ± 0,70 ^d	96,86 ± 9,39 ^d
	1,0	12,60 ± 2,70 ^a	5,88 ± 0,92 ^a	478,88 ± 27,02 ^a
	1,5	5,00 ± 1,87 ^c	2,76 ± 0,43 ^d	127,62 ± 18,62 ^c
	2,0	1,40 ± 0,55 ^{de}	1,68 ± 0,38 ^{ef}	55,32 ± 8,54 ^e
Kinetin	0,5	2,00 ± 0,71 ^d	2,32 ± 0,48 ^{de}	55,78 ± 8,87 ^e
	1,0	5,20 ± 0,84 ^c	3,68 ± 0,98 ^c	132,90 ± 13,76 ^c
	1,5	7,00 ± 1,22 ^b	4,70 ± 1,04 ^b	204,80 ± 6,54 ^b
	2,0	1,80 ± 0,55 ^d	1,26 ± 0,50 ^f	62,06 ± 13,57 ^e

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). Giá trị thể hiện trong bảng là giá trị trung bình ± SD (độ lệch chuẩn).



Hình 3.3. Hình thái của chồi *in vitro* sâm Lang Bian hình thành trong môi trường SH không bổ sung BA hoặc kinetin (mẫu đối chứng. A), có bổ sung 1,0 mg/L BA (B) hoặc 1,5 mg/L kinetin (C) sau 12 tuần nuôi cấy. Thước đo: 1 mm

Tóm lại, BA và kinetin đều có tác dụng kích thích sự sinh trưởng và nhân nhanh chồi sâm Lang Bian ở các nồng độ khác nhau. Kết quả thu được cũng cho thấy

rằng, chồi sâm Lang Bian *in vitro* rất nhạy cảm với loại và nồng độ chất điều hòa sinh trưởng. Trong hai loại cytokinin được bổ sung vào môi trường nuôi cấy thì BA ở nồng độ 1,0 mg/L cho hiệu quả nhân nhanh chồi cao hơn.

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

3.2.1. Ảnh hưởng của 2,4-D, NAA hoặc IBA đến sự phát sinh phôi soma sơ cấp từ các mẫu L-tTCL hoặc P-tTCL

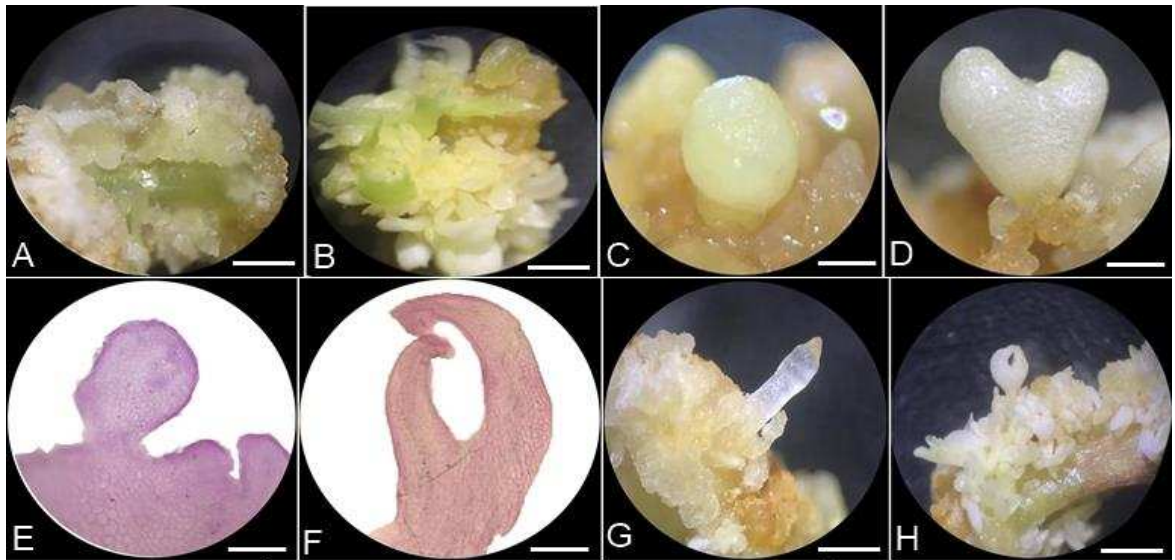
3.2.1.1. Sự phát sinh phôi soma sơ cấp từ mẫu L-tTCL *in vitro* trong môi trường bổ sung 2,4-D, NAA hoặc IBA

Sự phát sinh hình thái từ mẫu L-tTCL sâm Lang Bian nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung 30 g/L sucrose, 8,0 g/L agar và auxin (2,4-D, NAA và IBA), bao gồm (1) phát sinh phôi soma, (2) hình thành mô sẹo và (3) tái sinh rễ bất định thu được sau 12 tuần nuôi cấy (Bảng 3.3, Hình 3.4). Tất cả các mẫu L-tTCL được nuôi cấy trong môi trường bổ sung 2,4-D, NAA hoặc IBA đều phát sinh phôi soma, ngoại trừ mẫu được nuôi cấy trong môi trường bổ sung 9,0 mg/L NAA và 1,0 mg/L IBA sau 12 tuần nuôi cấy. Phôi soma được hình thành tại vị trí các vết cắt xung quanh mẫu L-tTCL; sau đó, phủ toàn bộ bề mặt mẫu cấy L-tTCL. Các giai đoạn phát triển khác nhau của phôi soma bao gồm hình cầu, hình tim, hình thủy lôi và có lá mầm sau 12 tuần nuôi cấy (Bảng 3.3, Hình 3.4A–F). Tỷ lệ mẫu phát sinh phôi soma sơ cấp cao nhất (80,00% và 86,66%) ghi nhận ở nghiệm thức bổ sung 5,0 – 7,0 mg/L NAA, trong khi số phôi soma cao nhất (40,40 phôi) đạt được ở nghiệm thức bổ sung 1,5 mg/L 2,4-D. Tuy nhiên, hệ số hiệu chỉnh tăng trưởng (GCF) cao nhất của mẫu cấy L-tTCL thu được ở nghiệm thức bổ sung 7,0 mg/L NAA (32,73) (Bảng 3.3).

Ngoài ra, sự hình thành mô sẹo và sự tái sinh rễ bất định đã được ghi nhận từ các mẫu cấy L-tTCL được nuôi cấy trong môi trường bổ sung auxin. Tỷ lệ mẫu cảm ứng mô sẹo đạt được 100% ở nghiệm thức bổ sung 1,5 mg/L 2,4-D hoặc 5,0 – 7,0 mg/L NAA (Bảng 3.3). Mô sẹo có màu vàng nhạt và tăng trưởng mạnh; ban đầu, mô sẹo hình thành ở vị trí xung quanh vết cắt mẫu L-tTCL, sau đó, mô sẹo tăng nhanh sinh khối và phủ đều trên toàn bộ bề mặt mẫu L-tTCL (Hình 3.4 A). Ngoài ra, mẫu L-tTCL nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung 3,0 – 5,0 mg/L NAA cho tỷ lệ mẫu L-tTCL cảm ứng rễ bất định đạt từ 23,33 – 63,33 % và số rễ từ 1,40 – 4,60 rễ; các rễ hình thành mảnh, dài, có màu trắng nhạt (Hình 3.4 G). Bên cạnh đó, mẫu L-tTCL nuôi cấy trên môi trường không bổ sung 2,4-D, NAA hoặc IBA không ghi nhận loại phát sinh hình thái nào; mẫu chuyển dần qua màu nâu sậm và chết.

3.2.1.2. Sự phát sinh phôi soma sơ cấp từ mẫu P-ITCL in vitro trong môi trường bổ sung 2,4-D, NAA hoặc IBA

Tương tự như mẫu L-tTCL, mẫu P-ITCL nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung 30 g/L sucrose, 8,0 g/L agar và auxin (2,4-D, NAA hoặc IBA) cũng ghi nhận 3 kiểu phát sinh hình thái bao gồm phát sinh phôi soma, cảm ứng mô sẹo và hình thành rễ bất định sau 12 tuần nuôi cấy (Bảng 3.4; Hình 3.4 H).



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 sơ cấp từ mẫu cây 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 soma. 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 cây P-ITCL sau 12 tuần nuôi cấy. Thước đo: 3 mm – A; B; H; Thước đo: 1mm – C; D; E; F; G

Tỷ lệ mẫu phát sinh phôi soma sơ cấp (100%), số lượng phôi soma (51,80 phôi/mẫu) và GCF của mẫu P-ITCL (51,80) ở nghiệm thức bổ sung 1,0 mg/L 2,4-D cao hơn đáng kể so với nghiệm thức đối chứng và các nghiệm thức khác (Bảng 3.4). Ngoài ra, 100% mô sẹo cảm ứng được thu nhận từ các mẫu nuôi cấy trong môi trường bổ sung 2,4-D, 3,0 – 7,0 mg/L NAA, hoặc 7,0 mg/L IBA. Trong khi đó, tỷ lệ mẫu hình thành rễ bất định (93,33%) và số lượng rễ (5,40 rễ/mẫu) cao nhất ở nghiệm thức bổ sung 5,0 mg/L NAA, các rễ hình thành dài, mảnh, có màu trắng nhạt và sinh trưởng mạnh.

Ngoài ra, 2,4-D, NAA hoặc IBA còn ảnh hưởng đến hệ số hiệu chỉnh tăng trưởng của hai loại mẫu L-tTCL và P-ITCL (Bảng 3.5). Đối với mẫu cây L-tTCL,

chúng tôi không ghi nhận được bất kỳ sự phát sinh phôi soma sơ cấp ở tất cả các mẫu cây trong nghiệm thức đối chứng. Ngược lại, mẫu được cấy trong môi trường có bổ sung 2,4-D, NAA hoặc IBA, hệ số hiệu chỉnh tăng trưởng của mẫu gia tăng và đạt giá trị cao nhất trong môi trường có bổ sung 7,0 mg/L NAA (1636,62). Đồng thời, hệ số này cũng cao hơn đáng kể so với giá trị GCF cao nhất của mẫu được nuôi cấy trong môi trường bổ sung 2,4-D (1284,89) và IBA (829,98).

Tuy nhiên, nồng độ 2,4-D, NAA hoặc IBA cao làm giảm đáng kể GCF của mẫu cấy. Xu hướng tương tự đã được quan sát thấy đối với mẫu P-ITCL; GCF của P-ITCL là cao nhất (310,80) ở nghiệm thức bổ sung 1,0 mg/L 2,4-D và giảm dần khi gia tăng nồng độ 2,4-D lên đến 2,0 mg/L (107,20). GCF cao nhất của mẫu P-ITCL được nuôi cấy trong môi trường bổ sung NAA (178,80) và IBA (173,79) thấp hơn đáng kể so với GCF cao nhất của mẫu cấy được xử lý với 2,4-D.

Loại mẫu và PGRs là những yếu tố ảnh hưởng rất lớn đến sự phát sinh phôi soma. Những nghiên cứu trước đây ở các loài thuộc chi *Panax* cho rằng các nguồn mẫu như rễ tơ, thân rễ, lá, cuống lá, trụ trên lá mầm, mô sẹo có thể được sử dụng làm nguồn mẫu cấy cho sự phát sinh phôi soma [10, 14, 70, 133]. Trong nghiên cứu này, mẫu L-tTCL và cuống lá của cây con *in vitro* sâm Lang Bian đều cho hiệu quả phát sinh phôi soma sơ cấp cao. Đây là những nguồn mẫu sẵn có, cho phép tái sinh cây con mới có tính ổn định cao về mặt di truyền [179].

Hiệu quả của kỹ thuật nuôi cấy TCL thông qua phát sinh phôi soma cũng đã được chứng minh trên một số đối tượng thực vật khác nhau. Các kết quả nghiên cứu cho thấy, loại mẫu cấy và phương pháp cắt ảnh hưởng đến khả năng tái sinh mẫu. rong nuôi cấy TCL *Pinus patula* Schl. Et Cham, mẫu cắt dọc ITCL từ phôi soma chưa trưởng thành cho hiệu quả phát sinh phôi soma tốt hơn so với mẫu cắt ngang tTCL [137]. Kết quả tương tự cũng được ghi nhận trên cây chanh dây, mẫu cấy thân ITCL cho hiệu quả tái sinh chồi cao hơn so với mẫu cấy tTCL [180]. Trong khi đó, Hanh và cộng sự (2022) cho rằng mẫu gân lá chính ($1/2$ mv-tTCL) và cuống lá ($1/2$ p-tTCL) cây *A. chinensis* Planch được cắt theo chiều ngang cho hiệu quả phát sinh phôi soma là cao nhất sau 8 tuần nuôi cấy [132]. Đối với sâm Lang Bian, hệ số hiệu chỉnh tăng trưởng GCF của mẫu P-ITCL (51,80) cao hơn so với mẫu L-tTCL (32,73) (Bảng 3.3 và 3.4). Tuy nhiên, tổng GCF của toàn bộ lá (5 lá, 1636,62) cao hơn so với cuống lá (310,98) (Bảng 3.5).

Bảng 3.3. So sánh hiệu quả phát sinh phôi soma sơ cấp và phát sinh hình thái khác từ mẫu L-tTCL trong môi trường có bổ sung 2,4-D, NAA hoặc IBA sau 12 tuần nuôi cấy

Auxin	Nồng độ (mg/L)	Tỷ lệ mẫu phát sinh phôi soma sơ cấp (%)	Số phôi soma	GCF _{L-tTCL}	Tỷ lệ mẫu tạo mô sẹo (%)	Tỷ lệ mẫu tạo rễ bất định (%)	Số rễ
Đối chứng	0	-	-	-	-	-	-
2,4-D	0,5	19,99 ± 7,46 ^f	28,20 ± 1,79 ^e	5,63 ± 2,09 ^f	86,66 ± 7,46 ^b	-	-
	1,0	56,66 ± 9,13 ^{bc}	35,20 ± 2,39 ^c	19,90 ± 3,06 ^c	93,33 ± 9,13 ^{ab}	-	-
	1,5	63,33 ± 7,45 ^b	40,40 ± 2,79 ^a	25,70 ± 4,25 ^b	100,00 ± 0,00 ^a	30,00 ± 7,46 ^b	1,20 ± 0,45 ^b
	2,0	26,66 ± 9,13 ^{ef}	6,40 ± 1,14 ⁱ	1,70 ± 0,67 ^g	90,00 ± 9,13 ^{ab}	-	-
NAA	1,0	16,66 ± 0,00 ^f	13,40 ± 2,88 ^h	2,23 ± 0,48 ^g	63,33 ± 7,45 ^c	-	-
	3,0	33,33 ± 0,00 ^{de}	30,80 ± 2,86 ^d	10,27 ± 0,95 ^e	76,66 ± 14,91 ^c	23,33 ± 9,13 ^c	4,60 ± 1,14 ^a
	5,0	80,00 ± 7,46 ^a	32,80 ± 1,92 ^{cd}	26,33 ± 3,66 ^b	100,00 ± 0,00 ^a	63,33 ± 13,94 ^a	1,40 ± 0,55 ^b
	7,0	86,66 ± 7,46 ^a	37,80 ± 1,30 ^b	32,73 ± 2,59 ^a	100,00 ± 0,00 ^a	-	-
	9,0	-	-	-	23,33 ± 9,13 ^f	-	-
IBA	1,0	-	-	-	-	-	-
	3,0	13,33 ± 7,45 ^f	21,80 ± 3,27 ^g	2,80 ± 1,63 ^g	20,00 ± 7,45 ^f	-	-
	5,0	30,00 ± 7,46 ^{de}	25,40 ± 1,82 ^f	7,63 ± 2,03 ^{ef}	40,00 ± 9,13 ^e	-	-
	7,0	53,33 ± 7,45 ^c	31,00 ± 2,00 ^d	16,60 ± 3,13 ^d	53,33 ± 13,94 ^d	-	-
	9,0	36,53 ± 7,53 ^d	26,80 ± 1,79 ^{ef}	9,80 ± 2,15 ^e	40,00 ± 9,13 ^e	19,99 ± 7,45 ^c	1,00 ± 0,00 ^b

Ghi chú: Đối chứng là môi trường MS bổ sung 30 g/L đường sucrose, 8,0 g/L agar và không bổ sung 2,4-D, NAA hoặc IBA. Dấu “-” thể hiện không ghi nhận sự phát sinh phôi soma, cảm ứng tạo mô sẹo và hình thành rễ bất định của mẫu L-tTCL. 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). Giá trị thể hiện trong bảng là giá trị trung bình ± SD (độ lệch chuẩn).

Bảng 3.4. So sánh hiệu quả phát sinh phôi soma sơ cấp và phát sinh hình thái khác từ mẫu P-ITCL trong môi trường có bổ sung 2,4-D, NAA hoặc IBA sau 12 tuần nuôi cấy

Auxin	Nồng độ (mg/L)	Tỷ lệ mẫu phát sinh phôi soma sơ cấp (%)	Số phôi soma	GCF P-ITCL	Tỷ lệ mẫu tạo mô sẹo (%)	Tỷ lệ mẫu tạo rễ bất định (%)	Số rễ
Đối chứng	0	16,70 ± 0,00 ^h	2,00 ± 0,71 ^h	0,33 ± 0,12 ^f	-	-	-
2,4-D	0,5	29,98 ± 7,42 ^{gh}	2,80 ± 0,84 ^h	0,83 ± 0,33 ^f	100,00 ± 0,00 ^a	-	-
	1,0	100,00 ± 0,00 ^a	51,80 ± 6,38 ^a	51,80 ± 6,38 ^a	100,00 ± 0,00 ^a	46,66 ± 7,46 ^d	1,00 ± 0,00 ^e
	1,5	70,02 ± 7,42 ^{cd}	33,00 ± 2,00 ^d	23,16 ± 3,53 ^c	100,00 ± 0,00 ^a	-	-
	2,0	53,34 ± 7,47 ^e	33,40 ± 5,46 ^d	17,87 ± 4,07 ^d	100,00 ± 0,00 ^a	-	-
NAA	1,0	20,02 ± 7,42 ^{gh}	16,00 ± 2,65 ^g	3,30 ± 1,73 ^f	86,64 ± 7,47 ^b	93,33 ± 9,13 ^a	1,20 ± 0,45 ^e
	3,0	63,33 ± 7,45 ^e	21,00 ± 2,35 ^f	13,33 ± 2,40 ^e	100,00 ± 0,00 ^a	100,00 ± 0,00 ^a	1,80 ± 0,45 ^d
	5,0	89,98 ± 9,15 ^b	33,00 ± 1,58 ^d	29,80 ± 4,35 ^b	100,00 ± 0,00 ^a	93,33 ± 9,13 ^a	5,40 ± 0,55 ^a
	7,0	60,02 ± 9,15 ^{de}	43,00 ± 3,74 ^b	25,57 ± 2,35 ^{bc}	100,00 ± 0,00 ^a	44,40 ± 6,80 ^d	2,60 ± 0,55 ^c
	9,0	23,34 ± 9,09 ^{gh}	5,20 ± 1,79 ^h	1,20 ± 0,66 ^f	43,32 ± 9,15 ^c	33,33 ± 0,00 ^e	1,80 ± 0,45 ^d
IBA	1,0	43,32 ± 9,15 ^f	21,40 ± 2,51 ^f	9,40 ± 2,80 ^e	23,34 ± 9,09 ^f	-	-
	3,0	79,98 ± 7,42 ^c	28,40 ± 3,85 ^e	22,77 ± 4,12 ^c	66,70 ± 0,00 ^d	36,66 ± 7,46 ^e	2,00 ± 0,00 ^d
	5,0	76,66 ± 9,09 ^c	38,00 ± 3,67 ^c	28,96 ± 2,86 ^b	79,98 ± 7,42 ^c	40,00 ± 9,13 ^{de}	2,00 ± 0,00 ^d
	7,0	70,20 ± 7,42 ^{cd}	40,40 ± 3,21 ^{bc}	28,23 ± 3,16 ^b	100,00 ± 0,00 ^a	83,33 ± 0,00 ^b	3,40 ± 0,55 ^b
	9,0	36,64 ± 7,47 ^{fg}	29,80 ± 1,52 ^{de}	10,93 ± 2,29 ^e	63,36 ± 7,47 ^d	76,66 ± 9,13 ^c	1,80 ± 0,45 ^d

Ghi chú: Đối chứng là môi trường MS bổ sung 30 g/L đường sucrose, 8,0 g/L agar và không bổ sung 2,4-D, NAA hoặc IBA. Dấu “-” thể hiện không ghi nhận sự cảm ứng tạo mô sẹo và hình thành rễ bất định của mẫu P-ITCL. Các chữ cái khác nhau 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). Giá trị thể hiện trong bảng là giá trị trung bình ± SD (độ lệch chuẩn).

Bảng 3.5. Hệ số hiệu chỉnh tăng trưởng (GCF) của các mẫu L-tTCL và P-ITCL trong môi trường bổ sung 2,4-D, NAA hoặc IBA sau 12 tuần nuôi cấy

Auxin	Nồng độ (mg/L)	GCF _{L-tTCL} (Toàn bộ lá)	GCF _{P-ITCL} (Toàn bộ cuống lá)	GCF _{L-tTCL + P-ITCL} (Chồi)
Đối chứng	0	-	2,00 ± 0,71 ^f	2,00 ± 0,71 ^h
2,4-D	0,5	281,58 ± 104,50 ^f	5,00 ± 2,00 ^f	286,58 ± 103,30 ^f
	1,0	994,95 ± 152,87 ^c	310,80 ± 38,28 ^a	1305,75 ± 173,04 ^c
	1,5	1284,89 ± 212,43 ^b	138,98 ± 21,16 ^c	1423,87 ± 215,30 ^{bc}
	2,0	84,99 ± 33,55 ^g	107,20 ± 24,43 ^d	192,18 ± 25,01 ^{fg}
	1,0	111,62 ± 24,00 ^g	19,79 ± 10,38 ^f	131,42 ± 31,52 ^{gh}
NAA	3,0	513,28 ± 47,72 ^e	79,99 ± 14,42 ^e	593,28 ± 52,46 ^e
	5,0	1316,60 ± 183,07 ^b	178,80 ± 26,08 ^b	1495,40 ± 199,79 ^b
	7,0	1636,62 ± 129,74 ^a	153,39 ± 14,13 ^{bc}	1790,01 ± 136,78 ^a
	9,0	-	7,20 ± 3,96 ^f	7,20 ± 3,96 ^h
IBA	1,0	-	56,40 ± 16,77 ^e	56,40 ± 16,77 ^{gh}
	3,0	139,94 ± 81,49 ^g	136,59 ± 24,70 ^c	276,54 ± 93,47 ^f
	5,0	381,62 ± 102,46 ^{ef}	173,79 ± 17,18 ^b	555,41 ± 111,46 ^e
	7,0	829,98 ± 156,48 ^d	169,39 ± 18,97 ^b	999,36 ± 172,89 ^d
	9,0	489,85 ± 107,58 ^e	65,60 ± 13,74 ^e	555,44 ± 108,11 ^e

Ghi chú: Đối chứng là môi trường MS bổ sung 30 g/L đường sucrose, 8,0 g/L agar và không bổ sung 2,4-D, NAA hoặc IBA. Dấu “-” thể hiện không ghi nhận sự phát sinh phôi soma của mẫu L-tTCL. 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). Giá trị thể hiện trong bảng là giá trị trung bình ± SD (độ lệch chuẩn).

Các mẫu cây TCL có nguồn gốc từ hai nguồn mẫu lá và cuống lá của cùng một chồi sâm Lang Bian *in vitro* đều có thể được sử dụng trong nuôi cấy phát sinh phôi soma. Xét trên toàn bộ chồi thì hệ số hiệu chỉnh tăng trưởng GCF của chồi đạt được giá trị cao nhất khi các mẫu được cấy trong môi trường có bổ sung 7 mg/L NAA (1790,01) (Bảng 3.5). Tuy nhiên, mỗi loại mẫu cây yêu cầu loại và nồng độ auxin khác nhau (7mg/L NAA cho mẫu cây L-tTCL và 1 mg/L 2,4-D cho mẫu cây P-ITCL). Do đó, việc lựa chọn môi trường thích hợp nhất cho từng loại mẫu sẽ giúp nâng cao

được hiệu quả phát sinh phôi soma. Tổng hệ số hiệu chỉnh tăng trưởng thu được từ một chồi sâm Lang Bian, bao gồm L-tTCL (1636,62 ở nghiệm thức bổ sung 7,0 mg/L NAA) và P-ITCL (310,80 ở nghiệm thức bổ sung 1,0 mg/L 2,4-D), đạt được cao nhất 1947,42 sau 12 tuần nuôi cấy.

Vì nhân giống thông qua con đường phát sinh phôi soma sử dụng kỹ thuật TCL có hiệu quả cao hơn so với các kỹ thuật nuôi cấy khác, đặc biệt là thời gian phát sinh phôi soma và hiệu quả tái sinh mẫu. Ở *P. ginseng*, mẫu TCL (0,2 mm) cắt từ lá mầm, lá, cuống lá và rễ phát sinh phôi soma sau 9 tuần nuôi cấy [181]. Kết quả tương tự cũng được quan sát thấy ở *P. vietnamensis*; mẫu lá TCL (kích thước 10 mm × 10 mm) cho hiệu quả phát sinh phôi soma trực tiếp cao sau 10 tuần so với 12 tuần ở mẫu lá [38, 58]. Đối với quá trình phát sinh phôi soma gián tiếp, mẫu lá tTCL cảm ứng tạo mô sẹo và tiếp sau đó là phát sinh phôi soma (16 tuần) nhanh hơn ở mẫu lá (18 tuần) [40]. Do đó, vì nhân giống thông qua con đường phát sinh phôi soma sử dụng kỹ thuật nuôi cấy TCL hiệu quả hơn so với nuôi cấy các mô thực vật khác. Hầu hết các tế bào đều tiếp xúc với chất dinh dưỡng và chất điều hòa sinh trưởng trong môi trường. Ngoài ra, mặc dù tỷ lệ mẫu phát sinh phôi soma và số lượng phôi soma trên mỗi mẫu TCL có thể thấp hơn so với các mô thực vật khác, tuy nhiên, hiệu quả tái sinh của mẫu TCL cao hơn. Vì thế, có thể áp dụng kỹ thuật nuôi cấy TCL trong vi nhân giống các loài thuộc chi *Panax*.

Ngoài ra, 2,4-D và NAA thường hay được sử dụng để cảm ứng phát sinh phôi soma ở nhiều loài thuộc chi *Panax* bao gồm *P. quinquefolium* [70], *P. ginseng* [7], *P. vietnamensis* [10] với nồng độ sử dụng phù hợp từ 0,5 – 1,0 mg/L. Auxin được sử dụng ở nồng độ cao gây ức chế sự phát sinh phôi soma cũng như phát triển tiếp theo của phôi soma. Tuy nhiên, ở *P. ginseng* x *P. quinquefolius* [14], 2,0 mg/L 2,4-D là nồng độ tối ưu cho sự phát sinh phôi soma từ các mẫu cấy. Trong nghiên cứu này, 1,0 mg/L 2,4-D kích thích sự phát sinh phôi soma từ mẫu cấy P-ITCL hiệu quả hơn so với các nghiệm thức khác; trong khi đó, NAA ở nồng độ cao (7,0 mg/L) cho hiệu quả phát sinh phôi soma sơ cấp tốt nhất ở mẫu cấy L-tTCL.

Một số nghiên cứu đã chỉ ra rằng việc kết hợp auxin và cytokinin mang lại hiệu quả phát sinh phôi soma cao hơn so với việc sử dụng auxin riêng lẻ trên cây *P. vietnamensis* [10]. Tuy nhiên, đối với sâm Lang Bian, việc kết hợp giữa auxin và cytokinin cho hiệu quả phát sinh phôi soma không cao hơn so với những nghiệm thức sử dụng auxin đơn lẻ (số liệu không công bố). Những kết quả này chứng tỏ rằng sự đáp ứng của mẫu với quá trình phát sinh phôi soma có sự khác biệt phụ thuộc vào đối tượng thực vật, loại mẫu, loại và nồng độ auxin sử dụng. Đồng thời, mẫu lá L-tTCL

và cuống lá P-ITCL đều là nguồn vật liệu phù hợp sử dụng cho quá trình vi nhân giống *in vitro* theo con đường phát sinh phôi soma.

Bên cạnh sự phát sinh phôi soma, sự phát sinh mô sẹo và rễ bất định cũng được ghi nhận trên hai loại mẫu L-tTCL và P-ITCL. Tương tự như các nghiên cứu trên các loài thuộc chi *Panax* như *P. ginseng*, *Panax pseudoginseng*, *P. quinquefolius*, *P. vietnamensis* [8, 133, 182], 2,4-D cho hiệu quả cảm ứng mô sẹo cao hơn so với NAA và IBA với nồng độ thích hợp. Bên cạnh đó, 5 mg/L NAA cho hiệu quả cảm ứng hình thành rễ là tốt nhất ở cả hai nguồn mẫu L-tTCL và P-ITCL. Điều này có sự khác biệt so với các loài thuộc chi *Panax* khác, IBA thường được sử dụng hiệu quả để cảm ứng và nhân nhanh rễ với nồng độ nằm trong khoảng từ 2 – 7 mg/L [183]. Mô sẹo và rễ bất định cũng là những nguồn vật liệu thích hợp có thể sử dụng cho những nghiên cứu tiếp theo như nuôi cấy sinh khối, tế bào đơn, rễ nhằm thu nhận sản phẩm thứ cấp có hoạt tính sinh học trong những nghiên cứu tiếp theo.

Tóm lại, 2,4-D, NAA hoặc IBA có ảnh hưởng đến sự phát sinh phôi soma sơ cấp tương ứng từ các nguồn mẫu cây L-tTCL hoặc P-ITCL. Đối với mẫu L-tTCL, sự phát sinh phôi tốt nhất ghi nhận được trong môi trường MS có bổ sung 7 mg/L NAA, 30 g/L sucrose và 8,0 g/L agar. Đối với mẫu P-ITCL, môi trường MS bổ sung 1 mg/L 2,4-D, 30 g/L sucrose và 8,0 g/L agar phù hợp cho sự phát sinh phôi soma. Các phôi soma được thu nhận từ mẫu L-tTCL và P-ITCL có thể được sử dụng làm nguồn nguyên liệu tăng sinh phôi soma thứ cấp. Bên cạnh đó, sự phát sinh mô sẹo và rễ bất định cũng được ghi nhận ở cả hai loại mẫu L-tTCL và P-ITCL. Đây cũng là nguồn nguyên liệu phù hợp sử dụng trong nghiên cứu nuôi cấy sinh khối thu nhận hoạt chất.

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*

Acid amin và spermidine làm gia tăng hiệu quả của quá trình phát sinh và phát triển phôi soma đã được ghi nhận ở nhiều đối tượng thực vật. Vì vậy, trong thí nghiệm tiếp theo này, chúng tôi tập trung vào nghiên cứu ảnh hưởng của glutamine, proline hoặc spermidine trong việc nâng cao hiệu quả phát sinh phôi soma sơ cấp sâm Lang Bian.

Các mẫu L-tTCL sâm Lang Bian được nuôi cấy trong môi trường MS có bổ sung 7 mg/L NAA, 30 g/L sucrose, 8,0 g/L agar và glutamine hoặc proline hoặc spermidine ở các nồng độ khác nhau. Ảnh hưởng của glutamine, proline hoặc

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. Kết quả cho thấy việc bổ sung 146 mg/L glutamine hiệu quả cho sự phát sinh phôi soma sơ cấp thể hiện ở cả tỷ lệ mẫu phát sinh phôi soma sơ cấp và số lượng phôi soma (83,34% và 52,20 phôi/mẫu) cao hơn so với nghiệm thức đối chứng (76,68% và 33,40 phôi/mẫu) và các 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 nghiệm thức đối chứng ghi nhận chủ yếu mô sẹo và phôi soma hình cầu; trong khi đó, phôi soma hình thủy lô, 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 (Hình 3.5 B).

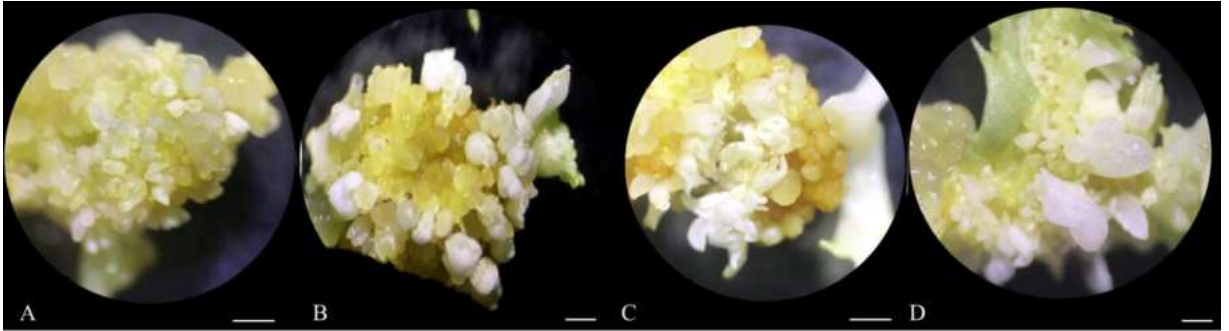
Trong các nghiệm thức bổ sung proline, sự phát sinh phôi soma sơ cấp từ các mẫu L-tTCL không có sự cải thiện đáng kể; tỷ lệ mẫu phát sinh phôi soma sơ cấp cũng như số lượng phôi soma cao nhất chỉ đạt 53,34% và 21,00 phôi/mẫu ở nồng độ proline 100 mg/L, thấp hơn so với đối chứng (tương ứng là 76,68% và 33,40 phôi/mẫu). Proline ở nồng độ 300 mg/L và 400 mg/L không cho thấy sự cảm ứng phát sinh phôi soma sơ cấp (Bảng 3.6). Tuy nhiên, việc bổ sung proline ở mức 100 – 200 mg/L đã cảm ứng hình thành phôi soma thủy lô (Hình 3.5 C); trong khi đó ở nghiệm thức đối chứng chỉ quan sát thấy mô sẹo có khả năng phát sinh phôi soma sơ cấp và phôi soma dạng hình cầu (Bảng 3.6).

Sau 12 tuần nuôi cấy mẫu trên môi trường MS bổ sung 7 mg/L NAA, 30 g/L đường sucrose, 8,0 g/L agar và spermidine ở các nồng độ khác nhau, kết quả cho thấy spermidine ở nồng độ thấp (1,5 – 7,5 mg/L) có tác dụng tích cực đối với sự phát sinh phôi soma sơ cấp từ mẫu cấy L-tTCL, trong khi sử dụng ở nồng độ cao, chúng lại có tác dụng ức chế hình thành phôi soma (Bảng 3.6). Hơn nữa, phôi soma được quan sát thấy ở các dạng hình cầu, tim, hình thủy lô và lá mầm trong tất cả các nghiệm thức bổ sung spermidine (Hình 3.5 D) với kết quả cao nhất ở nghiệm thức bổ sung 1,5 mg/L spermidine, tỷ lệ mẫu phát sinh phôi soma sơ cấp và số phôi soma lần lượt là 93,32% và 54,20 phôi/mẫu, phôi soma chủ yếu ở giai đoạn thủy lô và lá mầm (Hình 3.5D). Hệ số tái sinh phôi soma cũng cho kết quả tương tự, GCF cao nhất thu được ở nghiệm thức bổ sung 1,5 mg/L spermidine (Hình 3.8).

Bảng 3.6. So sánh hiệu quả phát sinh phôi soma sơ cấp từ mẫu 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 sơ cấp (%)	Số phôi soma (Phôi/ mẫu)	Hình thái phôi soma
Đối chứng	0	76,68 ± 14,88 ^b	33,40 ± 4,67 ^c	Hình cầu
Glutamine	146	83,34 ± 16,65 ^{ab}	52,20 ± 5,26 ^a	Hình cầu, tim và thủy lồi
	438	83,32 ± 11,77 ^{ab}	22,60 ± 4,67 ^d	
	730	60,02 ± 9,15 ^c	12,60 ± 2,07 ^{ef}	
	1022	56,68 ± 9,15 ^{cd}	10,40 ± 2,07 ^{ef}	
Proline	100	53,34 ± 7,47 ^{cd}	21,00 ± 4,06 ^d	-
	200	29,98 ± 7,42 ^e	14,60 ± 3,65 ^e	
	300	0,00 ± 0,00 ^f	0,00 ± 0,00 ^g	
	400	0,00 ± 0,00 ^f	0,00 ± 0,00 ^g	
Spermidine	1,5	93,32 ± 9,15 ^a	54,20 ± 4,44 ^a	Hình cầu, tim, thủy lồi và lá mầm
	7,5	80,00 ± 13,92 ^{ab}	38,60 ± 3,43 ^b	
	15	60,02 ± 9,15 ^c	8,60 ± 1,14 ^f	
	30	43,32 ± 14,94 ^{de}	3,40 ± 0,89 ^g	

Ghi chú: *Đối chứng là môi trường MS bổ sung 7 mg/L NAA, 30 g/L đường sucrose, 8 g/L agar, không bổ sung glutamine, proline hoặc spermidine. Dấu “-” thể hiện không ghi nhận sự phát sinh phôi soma của mẫu L-tTCL. 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). Giá trị thể hiện trong bảng là giá trị trung bình ± SD (độ lệch chuẩn).*



Hình 3.5. Sự phát sinh phôi soma sơ cấp từ mẫu L-tTCL sâm Lang Bian sau 12 tuần nuôi cấy trên các môi trường khác nhau (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*

Các mẫu cấy P-ITCL được nuôi cấy trong môi trường MS có bổ sung 1 mg/L 2,4-D, 30 g/L sucrose, 8,0 g/L agar và glutamine hoặc proline hoặc spermidine ở các nồng độ khác nhau nhằm mục tiêu đánh giá ảnh hưởng của chúng đến khả năng phát sinh phôi. Từ đó, xác định được loại và hàm lượng chất bổ sung phù hợp để nâng cao hiệu quả phát sinh phôi. Đối với các mẫu P-ITCL, việc bổ sung glutamine và proline không có hiệu quả tích cực trong sự phát sinh phôi soma, dẫn đến số phôi soma hình thành trên mỗi mẫu cấy thấp hơn so với đối chứng. Cụ thể, khi nồng độ glutamine tăng lên 1022 mg/L, tỷ lệ mẫu phát sinh phôi soma sơ cấp và số lượng phôi soma lần lượt chỉ là 43,32% và 18,20 phôi/mẫu (Bảng 3.7 và Hình 3.6 B). Mặc dù tỷ lệ mẫu phát sinh phôi soma sơ cấp và số phôi soma hình thành cao nhất tương ứng là 79,98% và 42,00 phôi soma/mẫu khi mẫu được cấy trong môi trường bổ sung 100 mg/L proline, tuy nhiên, các chỉ tiêu này vẫn thấp hơn so với đối chứng (tương ứng là 93,32% và 54,20 phôi/mẫu). Thêm vào đó, các mẫu P-ITCL hình thành chủ yếu phôi soma dạng hình cầu, hình tim và hình thủy lôi trên môi trường bổ sung từ 146 đến 438 g/L glutamine (Hình 3.6 B). Trong trường hợp tiếp tục gia tăng hàm lượng glutamine lên đến 730 – 1022 mg/L chỉ ghi nhận phôi soma ở dạng hình cầu. Đối với nghiệm thức bổ sung proline, phôi soma chủ yếu dạng hình cầu và hình tim (Hình 3.6 C) được hình thành trong môi trường có bổ sung 100 mg/L proline; trong khi đó ở nghiệm thức đối chứng và các nghiệm thức bổ sung proline với nồng độ từ 200 – 400 mg/L chỉ quan sát thấy mô sẹo có khả năng phát sinh phôi soma sơ cấp và phôi soma dạng hình cầu. Nhìn chung, nồng độ proline càng cao thì hiệu quả phát sinh phôi soma sơ cấp thu được càng thấp (Bảng 3.7 và Hình 3.6 C).

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

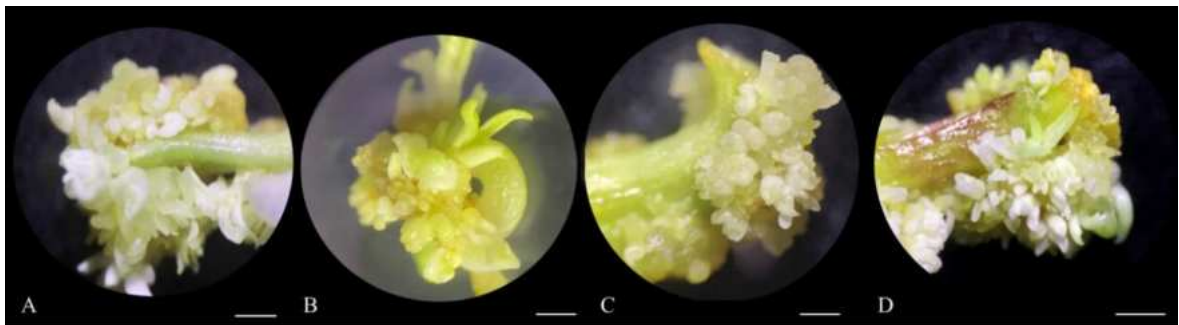
Nghiệm thức	Nồng độ (mg/L)	Tỷ lệ mẫu phát sinh phôi soma sơ cấp (%)	Số phôi soma (Phôi/mẫu)	Hình thái phôi soma
Đối chứng	0	93,32 ± 9,15 ^a	54,20 ± 4,27 ^b	Hình cầu
Glutamine	146	73,34 ± 9,09 ^c	35,00 ± 5,48 ^d	Hình cầu, tim, thủy lồi
	438	63,36 ± 7,47 ^{cd}	34,60 ± 4,22 ^d	
	730	53,34 ± 7,47 ^{de}	23,00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

Ghi chú: Đối chứng là môi trường MS bổ sung 1 mg/L 2,4-D, 30 g/L đường sucrose, 8 g/L agar, không bổ sung glutamine, proline hoặc spermidine. 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). Giá trị thể hiện trong bảng là giá trị trung bình ± SD (độ lệch chuẩn).

Phôi soma được quan sát thấy ở các dạng hình cầu, hình tim, hình thủy lồi và lá mầm trong tất cả các nghiệm thức bổ sung spermidine, trong đó, phôi soma chủ yếu ở hai giai đoạn hình thủy lồi và có lá mầm (Hình 3.6 D). Tỷ lệ mẫu phát sinh phôi

soma sơ cấp (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, khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức khác (Bảng 3.7 Hình 3.6 D). 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 (76,66% và 15,20 phôi/mẫu). Bên cạnh đó, hệ số hiệu chỉnh tăng trưởng cũng cho kết quả tương tự (Hình 3.8).

Glutamine là một trong những acid amin thường được sử dụng làm nguồn năng lượng cho tế bào, đặc biệt là các tế bào đang phân chia với tốc độ cao trong nuôi cấy *in vitro*. Glutamine rất cần thiết trong quá trình cảm ứng phát sinh phôi soma sơ cấp và trưởng thành phôi soma vì nó cung cấp nguồn nitơ cho quá trình tổng hợp protein và acid nucleic. Hơn nữa, glutamine được sử dụng làm nguyên liệu để tổng hợp các amino acid khác và hoạt động như một chất chuyển hóa vận chuyển nitơ. Hơn nữa, glutamine đóng một vai trò quan trọng trong sự tăng trưởng, phát triển, thích nghi và đáp ứng với stress của môi trường [184].



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



Hình 3.7. Các giai đoạn phát triển trong quá trình phát sinh phôi soma sơ cấp sâm Lang Bian (Thước đo: 1 mm) A. Phôi soma hình cầu; B. Phôi soma hình thùy lồi; C. Phôi soma có lá mầm

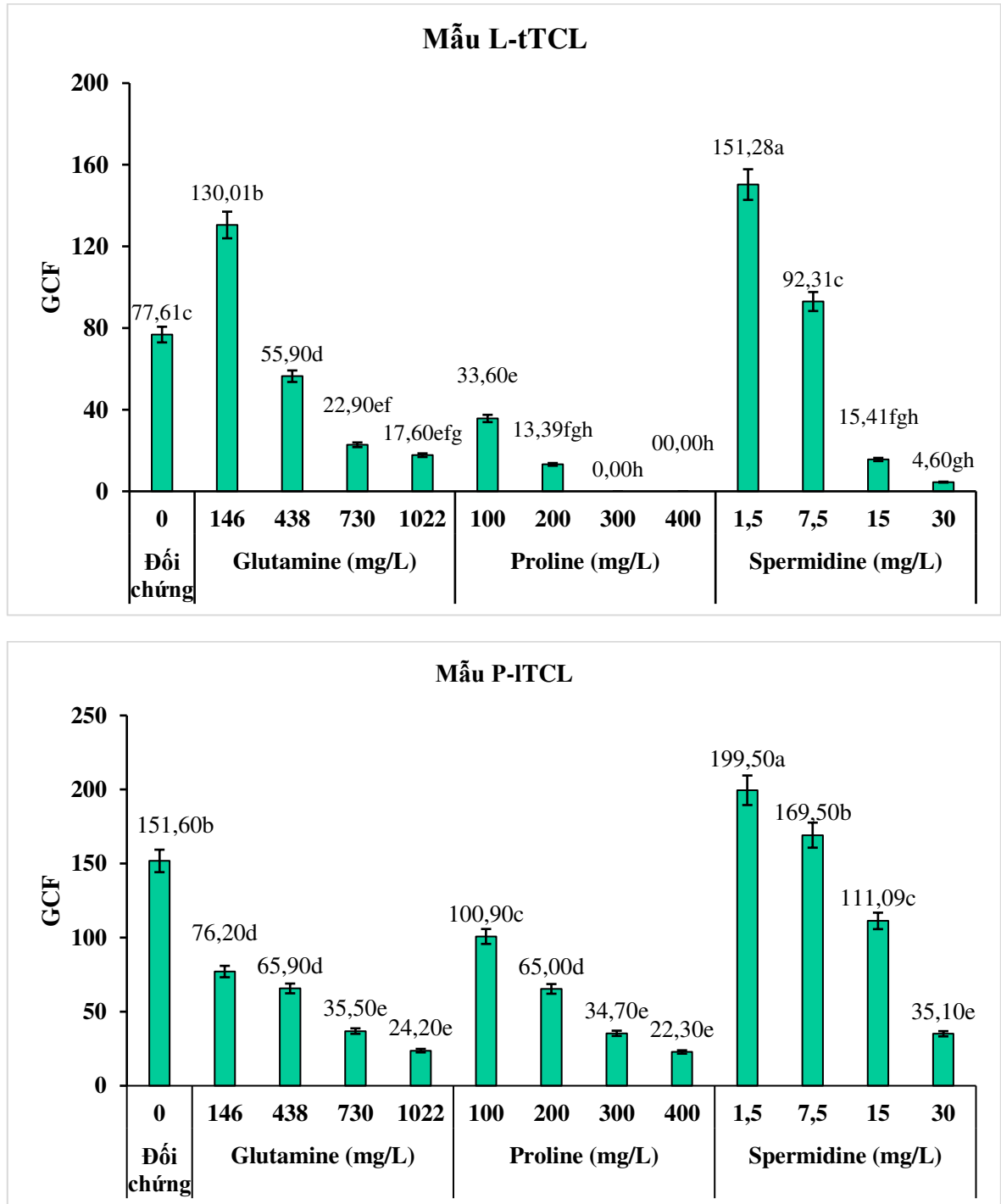
Hiệu quả của glutamine trong việc cải thiện sự cảm ứng phát sinh và trưởng thành của phôi soma cũng đã được chứng minh ở nhiều đối tượng thực vật. Theo Rai và cộng sự (2009), bổ sung 100 mg/L glutamine làm gia tăng tỷ lệ trưởng thành của phôi soma *Psidium guajava* [185]. Ngoài ra, glutamine cũng đã được chứng minh là có ảnh hưởng tích cực đến sự phát sinh phôi soma *Musa* spp., *Quercus suber* L. [186]. Trong nghiên cứu sự phát sinh phôi soma *Musa* spp., Grand Naine và Rasthali, Nandhakumar và cộng sự (2018) cho rằng glutamine (400 mg/L) đã tăng cường đáng kể sự phát sinh phôi soma sơ cấp (lần lượt là 1680 và 1850 phôi) và thứ cấp (tương ứng là 3597 và 3270 phôi) so với các nghiệm thức bổ sung acid amin khác và cao hơn so với môi trường bổ sung proline [187].

Rahmouni (2020) đã nghiên cứu ảnh hưởng của 19 loại acid amin khác nhau đến sự hình thành phôi soma thứ cấp ở *Quercus suber* L., tùy thuộc vào nồng độ và loại acid amin cho hiệu quả tạo phôi soma khác nhau. Glutamine ở nồng độ 500 mg/L cho hiệu quả phát sinh phôi soma tốt nhất và kích thích hình thành phôi soma thứ cấp; tỷ lệ phát sinh phôi soma thứ cấp là 79,97% và 11,5 phôi/mẫu được hình thành từ phôi soma sơ cấp [186]. Ngoài việc tăng hiệu quả phát sinh và trưởng thành phôi soma, việc bổ sung glutamine (500 mg/L) vào môi trường nuôi cấy còn giúp giảm tỷ lệ phôi soma bất thường [186]. Tương tự, Rathore và cộng sự (2012) cho rằng việc bổ sung glutamine (2192 mg/L) vào môi trường nuôi cấy đã kích thích sự trưởng thành của phôi soma *Acacia senegal* và giảm tỷ lệ phôi soma bất thường [188]. Tuy nhiên, tùy theo loài thực vật nghiên cứu mà nhu cầu về glutamine sẽ khác nhau.

Mặt khác, việc bổ sung acid amin vào môi trường nuôi cấy có thể thúc đẩy hoặc ức chế sự phát sinh và tái sinh của cây con từ phôi soma, tùy thuộc vào loại và nồng độ sử dụng cho từng loài thực vật. Pintos và cộng sự (2010) đã nghiên cứu ảnh hưởng của các acid amin (asparagine, arginine và glutamine) đối với sự phát sinh phôi soma *Quercus suber*. Các tác giả nhận thấy, mặc dù sự kết hợp của 3 acid amin này kích thích sự phát sinh phôi soma nhưng hiệu quả không khác biệt so với đối chứng [189]. Tương tự, glutamine làm giảm số lượng phôi soma và tỷ lệ hình thành phôi soma thứ cấp của *Quercus ilex* [190]. Kết quả của chúng tôi cũng cho thấy rằng việc tăng nồng độ glutamine lên 730 – 1022 mg/L đã ức chế sự phát sinh phôi soma của các mẫu L-tTCL và P-ITCL sâm Lang Bian.

Như vậy, glutamine đóng một vai trò quan trọng trong sự phát sinh phôi soma của nhiều đối tượng thực vật. Chúng được sử dụng như một nguồn nitơ bổ sung cho sự phát triển của mẫu cấy. Trong một số trường hợp, nhờ tác dụng kích thích tăng trưởng, glutamine cũng được sử dụng làm nguồn cung cấp nitơ duy nhất trong môi

trường nuôi cấy. Tuy nhiên, nhu cầu về hàm lượng glutamine phụ thuộc vào giống cây trồng. Trong nghiên cứu này, glutamine không có tác động tích cực đến sự phát sinh phôi soma sơ cấp sâu Lang Bian.



Hình 3.8. Hệ số hiệu chỉnh tăng trưởng (GCF) của mẫu L-tTCL và P-ITCL nuôi cấy trên môi trường bổ sung glutamine, proline hoặc spermidine sau 12 tuần nuôi cấy

Proline là một trong những nguồn nitơ khử thiết yếu được chuyển hóa và hấp thụ rất nhanh trong tế bào; nó không gây độc mà thúc đẩy sự tăng trưởng tế bào trong

quá trình nuôi cấy. Tăng cường tổng hợp proline có tác dụng cải thiện hoạt động của con đường pentose phosphate oxy hóa. Qua đó, gia tăng sự phân chia và biệt hóa tế bào. Đồng thời, việc kích hoạt con đường pentose phosphate liên kết với proline đóng một vai trò tích cực trong quá trình phát sinh phôi soma thông qua việc tăng cường sinh tổng hợp cytokinin, auxin và phenolic nội sinh cần thiết cho quá trình phát sinh phôi soma [191].

Proline được bổ sung riêng lẻ hoặc kết hợp với các amino acid khác trong môi trường nuôi cấy với nồng độ thích hợp có tác dụng thúc đẩy sự tăng trưởng của tế bào và sự phát sinh phôi soma. Proline còn có chức năng bảo vệ enzyme khỏi sự phân hủy, kiểm soát nồng độ acid trong bào tương [192]. Ngoài ra, proline còn có vai trò tích cực trong việc tăng hàm lượng protein trong tế bào có khả năng phát sinh phôi soma. Sự hiện diện của proline trong môi trường làm giảm thế nước của môi trường nuôi cấy, làm tăng nồng độ các chất tích lũy trong tế bào, và do đó thúc đẩy sự phát sinh phôi soma. Kết quả nghiên cứu cho thấy, tác động của proline đến quá trình phát sinh phôi soma khác nhau đối với từng loài thực vật. Đối với sâm Lang Bian, hiệu quả của proline trong sự phát sinh phôi soma sơ cấp không cao ở các mẫu P-ITCL thể hiện qua tỷ lệ mẫu phát sinh phôi soma sơ cấp và số lượng phôi soma hình thành trên mỗi mẫu cấy. Trong khi đó, ở các mẫu cấy L-tTCL, mặc dù tỷ lệ mẫu phát sinh phôi soma sơ cấp và số phôi soma không cao nhưng chất lượng phôi vượt trội so với đối chứng khi bổ sung 100 – 200 mg/L proline vào môi trường nuôi cấy.

Tác dụng của proline đối với sự phát sinh phôi soma đã được nghiên cứu trên nhiều đối tượng thực vật như sâm Ngọc Linh [93], tulip [193]. Gerdakaneh và cộng sự (2011) đã báo cáo rằng proline ở nồng độ 100 mg/L có tác dụng đáng kể hơn glutamine trong việc phát sinh và phát triển phôi soma ở dâu tây. Nghiên cứu cho rằng tác dụng tích cực của proline đối với quá trình phát sinh phôi soma có thể là do acid amin này tham gia vào một số con đường truyền tín hiệu trong tế bào [194]. Tương tự, trong vi nhân giống hoa tulip, Podwyszyńska và Marasek-Ciolakowska (2020) đã báo cáo sự tăng sinh mô sẹo và phát sinh phôi soma tốt nhất khi các mẫu cấy được nuôi cấy trên môi trường bổ sung 0,01 mg/L 2,4-D đơn lẻ hoặc kết hợp với TDZ hoặc BA, và 100 mg/L proline có thể thu được trung bình từ 30 đến 55 phôi/100 mg mô sẹo [193]. Tuy nhiên, đối với một số loài thực vật khác thì cần nồng độ proline cao hơn cho sự phát sinh phôi soma, chẳng hạn proline ở nồng độ 300 mg/L phù hợp với sâm Ngọc Linh [93] và 500 mg/L phù hợp phát sinh phôi soma dâu tây [94]. Tuy nhiên, với sâm Lang Bian, sự có mặt của proline trong môi trường nuôi cấy ảnh hưởng tiêu cực đến sự phát sinh phôi soma.

Putrescine (Put), Spermidine (Spd), Spermine (Spm) là những loại polyamine, phổ biến đóng một vai trò quan trọng trong quá trình phân chia tế bào, biệt hóa, ổn định màng tế bào và sao chép DNA. Chúng được báo cáo là có liên quan đến các quá trình phát triển của thực vật như tăng trưởng, lão hóa và phản ứng với stress. Hơn nữa, polyamine còn kích thích quá trình tổng hợp và/hoặc kích hoạt các hormone nội sinh và tổng hợp protein. Mặt khác, tác động của polyamine đối với sự phát triển của thực vật được điều hòa thông qua quá trình điều hòa biểu hiện gen, thay đổi cấu trúc, tính linh động của màng tế bào, phiên mã và dịch mã. Cation amine của polyamine có thể liên kết với các anion trong nhóm phosphate của DNA hoặc RNA và nhóm carboxyl của protein trên màng tế bào, do đó đảm bảo tính linh hoạt của màng [195].

Vai trò của spermidine trong quá trình phát sinh phôi soma ở các loại thực vật khác nhau đã được nghiên cứu. Trong giai đoạn cảm ứng phôi, spermidine sẽ giúp cho tế bào vùng mô phân sinh phân chia nhanh chóng và giúp cho phôi được hình thành. Nghiên cứu của Nhựt và cộng sự (2012) cho thấy việc bổ sung 15 mg/L spermidine vào môi trường nuôi cấy làm tăng tỷ lệ mẫu phát sinh phôi soma cũng như số lượng phôi soma hình thành trên mỗi mẫu cấy ở sâm Ngọc Linh [93]. Takeda và cộng sự (2002) đã báo cáo rằng việc bổ sung spermidine ngoại sinh vào môi trường nuôi cấy tế bào, mô thực vật có thể thúc đẩy quá trình tạo phôi soma bằng cách thay đổi hàm lượng hormone nội sinh và việc bổ sung chất ức chế tổng hợp polyamine dẫn đến trì hoãn hoặc ức chế quá trình tạo phôi soma [196]. Ngoài ra, Kadioglu và cộng sự (2002) cho rằng có thể giảm nồng độ ethylene không mong muốn và tăng sự phát triển của mô thực vật bằng cách bổ sung polyamine ngoại sinh [197].

Trong nghiên cứu sự phát sinh phôi soma của *Agave angustifolia*, Elbl và cộng sự (2015) cho rằng, sự phát sinh phôi soma hình cầu của *A. angustifolia* được đánh dấu bằng sự gia tăng tốc độ phân chia và biệt hóa tế bào, sự biểu hiện của các gen liên quan đến sinh tổng hợp carbohydrate và stress oxy hóa. Sau đó, quá trình phát triển phôi soma từ dạng hình cầu sang cây con xảy ra một loạt các biến đổi sinh lý và sinh hóa trong tế bào. Trong quá trình hình thành và phát triển phôi soma, hàm lượng của spermidine nội sinh thay đổi tùy theo giai đoạn của quá trình phát sinh phôi soma [198]. Kết quả nghiên cứu thu được cho thấy, spermidine có tác động tích cực đến sự phát sinh phôi soma sơ cấp ở cả hai loại mẫu cấy L-tTCL và P-ITCL. Hiệu quả phát sinh phôi soma sơ cấp sâm Lang Bian *in vitro* ở cả hai loại mẫu cấy tốt nhất trong môi trường MS có bổ sung 30 g/L sucrose, 8,0 g/L agar và 1,5 mg/L spermidine.

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

Kết quả nghiên cứu cho thấy glutamine, proline hoặc spermidine khi được sử dụng ở nồng độ thích hợp đều có tác dụng kích thích sự phát sinh phôi soma từ các nguồn mẫu L-tTCL hoặc P-ITCL. Theo một số nghiên cứu đã được công bố, proline, glutamine và polyamine có vai trò bảo vệ thực vật đáp ứng lại với các tác nhân gây stress khác nhau. Để hiểu rõ được tác động bảo vệ của chúng đối với thực vật, cụ thể là sự phát sinh phôi soma từ các nguồn mẫu cây khác nhau, chúng tôi sử dụng các nghiệm thức cho hiệu quả phát sinh phôi soma tốt nhất đối với cả hai nguồn mẫu L-tTCL hoặc P-ITCL [môi trường MS có bổ sung 7 mg/L NAA (đối với mẫu L-tTCL) hoặc 1 mg/L 2,4-D (đối với mẫu P-ITCL), 30 g/L sucrose, 8,0 g/L agar và tương ứng 146 mg/L glutamine, 100 mg/L proline hoặc 1,5 mg/L spermidine] để nghiên cứu hưởng của chúng đối với hoạt tính của các enzyme chống oxy hóa và sự khác biệt so với đối chứng.

Hoạt tính SOD, CAT và APX của phôi soma sâm Lang Bian thu được từ các mẫu L-tTCL và P-ITCL sau 12 tuần nuôi cấy được ghi nhận trong Bảng 3.8 và 3.9. Đối với mẫu L-tTCL, hoạt tính của các enzyme chống oxy hóa, bao gồm SOD, CAT và APX, trong nghiệm thức nuôi cấy phôi soma trên môi trường bổ sung 1,5 mg/L spermidine cao hơn đáng kể so với nghiệm thức bổ sung 100 mg/L proline và 146 mg/L glutamine. 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, glutamine và proline cho hoạt tính APX cao hơn (Bảng 3.8). Đối với 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, trong loại mẫu cây này, việc bổ sung proline có thể tăng cường hoạt tính của SOD và APX.

Các dạng oxy hoạt hóa (reactive oxygen species – ROS), một sản phẩm của quá trình trao đổi chất, bao gồm các gốc tự do và một số phân tử có chứa nguyên tử oxy trong cấu trúc. Các ROS nội sinh được chuyển hóa từ các gốc tự do anion superoxide. Gốc tự do anion superoxide được hình thành chủ yếu thông qua hệ enzyme NADPH oxidases (NOXs), xanthine oxidase (XO) và chuỗi truyền điện tử ty thể. Do chúng có chứa electron tự do nên chúng có khả năng tham gia phản ứng rất mạnh. Sinh tổng hợp ROS thường gắn liền với một số phản ứng quan trọng của thực vật như dẫn truyền tín hiệu tế bào, cân bằng nội môi, kích hoạt sự biểu hiện gen và

protein có chức năng bảo vệ và phát sinh hình thái thực vật. Một số nghiên cứu trên các đối tượng thực vật như *Oldenlandia umbellata* [199] và *Cyathea Delgadii* [200] báo cáo rằng ROS có vai trò quan trọng ở giai đoạn đầu của quá trình phát sinh phôi soma và được đặc trưng bởi việc cảm ứng các gen liên quan đến stress. Tuy nhiên, ROS nếu được tổng hợp và tích lũy ở nồng độ cao cũng có tác động gây độc đối với tế bào, thậm chí gây chết tế bào.

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

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

Ghi chú: *Đối chứng là môi trường MS bổ sung 7 mg/L NAA, 30 g/L đường sucrose, 8 g/L agar, không bổ sung glutamine, proline hoặc spermidine. 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). Giá trị thể hiện trong bảng là giá trị trung bình ± SD (độ lệch chuẩn).*

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

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

Ghi chú: *Đối chứng là môi trường MS bổ sung 1 mg/L 2,4-D, 30 g/L đường sucrose, 8 g/L agar, không bổ sung glutamine, proline hoặc spermidine. 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). Giá trị thể hiện trong bảng là giá trị trung bình ± SD (độ lệch chuẩn).*

Thực vật là những sinh vật nhạy cảm, thường xuyên phải đối mặt với nhiều stress phi sinh học và sinh học như nhiễm độc kim loại nặng, hạn hán, nhiễm mặn và nhiệt độ (thấp và cao) trong suốt chu trình sống. Sự cân bằng giữa sản xuất và loại bỏ các oxy hoạt hóa (ROS) bị xáo trộn dưới những tác động stress này. Stress oxy hóa làm tổn thương các phân tử sinh học (DNA, lipid và protein), làm rối loạn tính thấm của màng tế bào, cuối cùng dẫn đến chết tế bào. Để tồn tại dưới điều kiện stress oxy hóa, thực vật đã thích nghi thông qua nhiều phương thức khác nhau, bao gồm tích lũy các chất chuyển hóa có vai trò bảo vệ. Các chất chống oxy hóa bao gồm các phân tử ổn định, có tác dụng làm giảm hoặc mất khả năng gây hại của ROS đến tế bào thực vật bằng cách nhận hoặc nhường electron cho các gốc tự do và trung hòa chúng. Các tổn thương oxy hóa có thể được hạn chế thông qua hai cách trực tiếp hoặc gián tiếp. Theo phương thức trực tiếp, các chất chống oxy hóa phản ứng với các ROS, chẳng hạn như tạo phức làm mất khả năng xúc tác của các kim loại chuyển điện tử. Do đó, làm giảm sự hình thành số lượng gốc oxy hoạt hóa. Theo phương thức gián tiếp, ức chế hoạt động tạo ra ROS (NAD(P)H oxidase và xanthine oxidase) hoặc tăng cường biểu hiện các enzyme chống oxy hóa như superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) và ascorbate peroxidase (APX) [201]. Các enzyme này vừa có vai trò duy trì sự sinh tổng hợp ROS giúp thực vật tồn tại trong những điều kiện môi trường bất lợi, vừa có tác dụng kiểm soát và giảm thiểu tác động gây độc của ROS đối với hoạt động sống của tế bào. Trong đó, (1) SOD là enzyme chuyển hóa các gốc tự do superoxide thành H_2O_2 và O_2 . Chúng thường hoạt động trong tế bào chất, lục lạp, ty thể và peroxisome. Trong trường hợp hàm lượng các gốc tự do superoxide thấp thì hoạt độ của SOD cũng giảm nhanh; (2) CAT có chức năng phân giải H_2O_2 thành H_2O và O_2 . CAT thường hoạt động trong peroxisome, glyoxysome, ty thể; (3) APX xúc tác phân giải H_2O_2 thành H_2O và O_2 sử dụng ascorbate làm chất cho điện tử. Enzyme này có trong tế bào chất, màng thylakoid của lục lạp, màng peroxisome và ty thể. Vai trò chính của APX là loại bỏ H_2O_2 khi vắng mặt CAT [202]. Một số nhóm chất chuyển hóa bao gồm proline, glutamine và polyamine, từ lâu đã được cho là có vai trò bảo vệ dưới tác động dưới các điều kiện stress khác nhau, bao gồm cả stress oxy hóa, bằng cách duy trì các chức năng và cấu trúc của tế bào đáp ứng với stress oxy hóa.

Hầu hết thực vật sử dụng nitơ vô cơ bao gồm nitrate và amonium làm nguồn nitơ chính. Nitrate hấp thu từ môi trường bên ngoài bị khử thành nitrite nhờ nitrate reductase. Nitrite rất độc đối với tế bào thực vật nên chúng nhanh chóng bị khử thành amonium dưới xúc tác nitrite reductase. Amonium có nguồn gốc từ nitrat hoặc được hấp thụ trực tiếp từ môi trường bên ngoài được đồng hóa thành glutamine và glutamate thông qua chu trình glutamine synthetase (GS)/glutamine oxoglutarate

aminotransferase (GOGAT) [203]. Ngoài ra, thực vật cũng có thể hấp thụ trực tiếp các acid amin, cụ thể là glutamine để hỗ trợ sự sinh trưởng và phát triển của chúng. Glutamine được hấp thụ vào tế bào thực vật thông qua các chất vận chuyển acid amin và đóng vai trò như là nguồn nitơ quan trọng cho sự tăng trưởng và phát triển của thực vật. Glutamine có vai trò quan trọng trong quá trình sinh tổng hợp protein và nucleotide, là nguồn cung cấp amino chính để tổng hợp acid amin và các hợp chất chứa nitơ khác trong thực vật. Bên cạnh vai trò trong dinh dưỡng và trao đổi chất, glutamine còn có chức năng như một phân tử truyền tín hiệu liên quan đến điều hòa trao đổi chất.

Ngoài ra, glutamine còn ảnh hưởng đến sự biểu hiện của một số gen quan trọng liên quan đến phản ứng stress. Tác động của glutamine lên biểu hiện gen có thể xảy ra do tác động trực tiếp của glutamine hoặc thông qua các sản phẩm chuyển hóa glutamine. Khi hàm lượng glutamine nội sinh bên trong tế bào gia tăng sẽ ảnh hưởng đến trạng thái oxy hóa khử của tế bào, từ đó gây ra sự biểu hiện của các gen phản ứng với stress. Hơn nữa, glutamine có thể khuếch đại tín hiệu và tương tác với các con đường truyền tín hiệu khác để điều chỉnh sự phát triển của thực vật và phản ứng với stress [204]. Ngoài ra, glutamine có thể liên quan đến việc giảm tác hại của ROS thông qua con đường tổng hợp proline [205]. Như vậy, glutamine có thể đóng vai trò là chất dinh dưỡng để hỗ trợ sự tăng trưởng và phát triển của thực vật, chúng cũng là tác nhân gây stress để tạo ra phản ứng phòng vệ ở thực vật.

Proline có vai trò quan trọng giúp thực vật chống chịu với những điều kiện bất lợi của môi trường thông qua điều chỉnh áp suất thẩm thấu, chống oxy hóa, cung cấp năng lượng và đóng vai trò như một phân tử tín hiệu. Tác động chống oxy hóa của proline thể hiện qua việc bảo vệ protein và màng tế bào khỏi sự tổn thương bằng cách làm bất hoạt các nhóm hydroxyl và các chất phản ứng mạnh khác trong ti thể và lục lạp được tạo ra trong những điều kiện stress. Proline kết hợp với gốc hydroxyl tự do để hình thành các gốc tự do ổn định hơn. Chẳng hạn như proline tương tác với gốc hydroxyl tự do và bị oxy hóa đến 5-hydroxyl proline hoặc semialdehyde glutamate hay theo nhánh rẽ tới glutamate góp phần loại bỏ được gốc oxy hoạt hóa này. Bên cạnh đó, proline dễ dàng tạo phức vận chuyển với oxy singlet, qua đó làm giảm năng lượng hoạt động của nó. Do đó, proline có tác dụng bảo vệ cho các hợp chất amin trong lục lạp. Ngoài ra, proline còn giúp duy trì trạng thái cân bằng NADPH/NADP⁺ giúp ổn định trạng thái oxy hóa khử và ngăn ngừa sự tổn thương bộ máy quang hợp. Trong giai đoạn stress, proline đóng vai trò như là nguồn cung cấp năng lượng và đương lượng khử, ngăn ngừa sự mất hoạt tính của các đại phân tử, góp phần bảo vệ

toàn vẹn cấu trúc màng. Trong giai đoạn phục hồi sau stress, proline có vai trò như nguồn bổ sung năng lượng, nguồn nitơ hữu cơ và các hợp chất khử tham gia vào quá trình sửa chữa.

Do đó, việc bổ sung proline vào trong môi trường nuôi cấy giúp thực vật đáp ứng lại với các điều kiện bất lợi của môi trường. Tuy nhiên, hoạt tính của các enzyme chống oxy hóa không chỉ phụ thuộc vào mức độ stress mà còn phụ thuộc vào từng đối tượng thực vật và hàm lượng proline bổ sung. Sự gia tăng hoạt động APX đã được quan sát thấy ở mía khi sử dụng proline ở nồng độ 2300 mg/L proline [206]. Ngược lại, Kibria et al. (2016) cho thấy rằng sử dụng 2875 và 5750 mg/L proline ngoại sinh làm giảm hoạt động APX ở *Triticum aestivum* [207].

Trong nghiên cứu phát sinh phôi sâm Lang Bian, đối với mẫu cây L-tTCL, hoạt tính SOD và CAT trong nghiệm thức bổ sung proline thấp hơn so với đối chứng có thể là do khả năng bất hoạt các nhóm hydroxyl và các chất phản ứng mạnh khác của proline để hình thành các gốc tự do ổn định hơn. Trong khi đó, SOD thường được tăng cường tổng hợp khi hàm lượng các gốc tự do superoxide cao. Tiếp theo đó, ảnh hưởng tới sự tổng hợp CAT với vai trò phân giải H_2O_2 thành H_2O và O_2 (sản phẩm của quá trình chuyển hóa các gốc tự do superoxide thành H_2O_2 và O_2 dưới xúc tác của enzyme SOD). Đối với mẫu P-lTCL, proline tăng cường hoạt tính SOD so với đối chứng giúp chuyển hóa hiệu quả hơn superoxide thành H_2O_2 , trước khi tiếp tục phân giải thành H_2O_2 và O_2 dưới xúc tác của APX.

Polyamine điều hòa hoạt tính enzyme oxy hóa ROS để cân bằng nội môi thông qua vai trò (trực tiếp hoặc gián tiếp) điều chỉnh hệ thống enzyme chống oxy hóa hoặc ngăn chặn sản xuất enzyme chống oxy hóa ROS. Thực vật tổng hợp các chất chuyển hóa và các phân tử như polyamine và H_2O_2 để đáp ứng lại stress oxy hóa. Ngoài ra, polyamine còn có tác dụng giảm stress oxy hóa. Thực vật phản ứng với stress oxy hóa thông qua các con đường chống oxy hóa enzyme và phi enzyme [208]. Vì vậy, việc bổ sung polyamine vào môi trường nuôi cấy giúp mẫu cây tổng hợp nhiều enzyme chống oxy hóa hơn, từ đó giúp mẫu cây hạn chế các tác động bất lợi do stress oxy hóa gây ra. Hơn nữa, một nghiên cứu gần đây của Zhong và cộng sự (2020) cho thấy sự tích lũy polyamine đóng một vai trò quan trọng ở cây cà chua sinh trưởng trong điều kiện stress mặn. Họ phát hiện ra rằng sự tích lũy polyamine giúp giảm thiểu thiệt hại do stress oxy hóa gây ra cho tế bào thực vật thông qua liên kết chéo giữa polyamine và các enzyme chống oxy hóa; Nghiên cứu cũng chứng minh rằng việc bổ sung spermidine vào trong môi trường nuôi cấy cây cà chua làm tăng biểu hiện của các enzyme chống oxy hóa như SOD, CAT và APX, cải thiện sự tăng trưởng

và năng suất của cây trồng dưới điều kiện stress mặn [209]. Trong nghiên cứu này, môi trường nuôi cấy MS có chứa 7 mg/L NAA (đối với mẫu L-tTCL) hoặc 1 mg/L 2,4-D (đối với mẫu P-ITCL), 30g/L sucrose, 8,0 g/L agar được bổ sung thêm 1,5 mg/L spermidine đã giúp phôi soma sâm Lang Bian tổng hợp được nhiều enzyme chống oxy hóa hơn so với nghiệm thức đối chứng và các nghiệm thức khác. Từ đó, sự hình thành phôi soma và chất lượng phôi soma ở nghiệm thức này cũng vượt trội hơn.

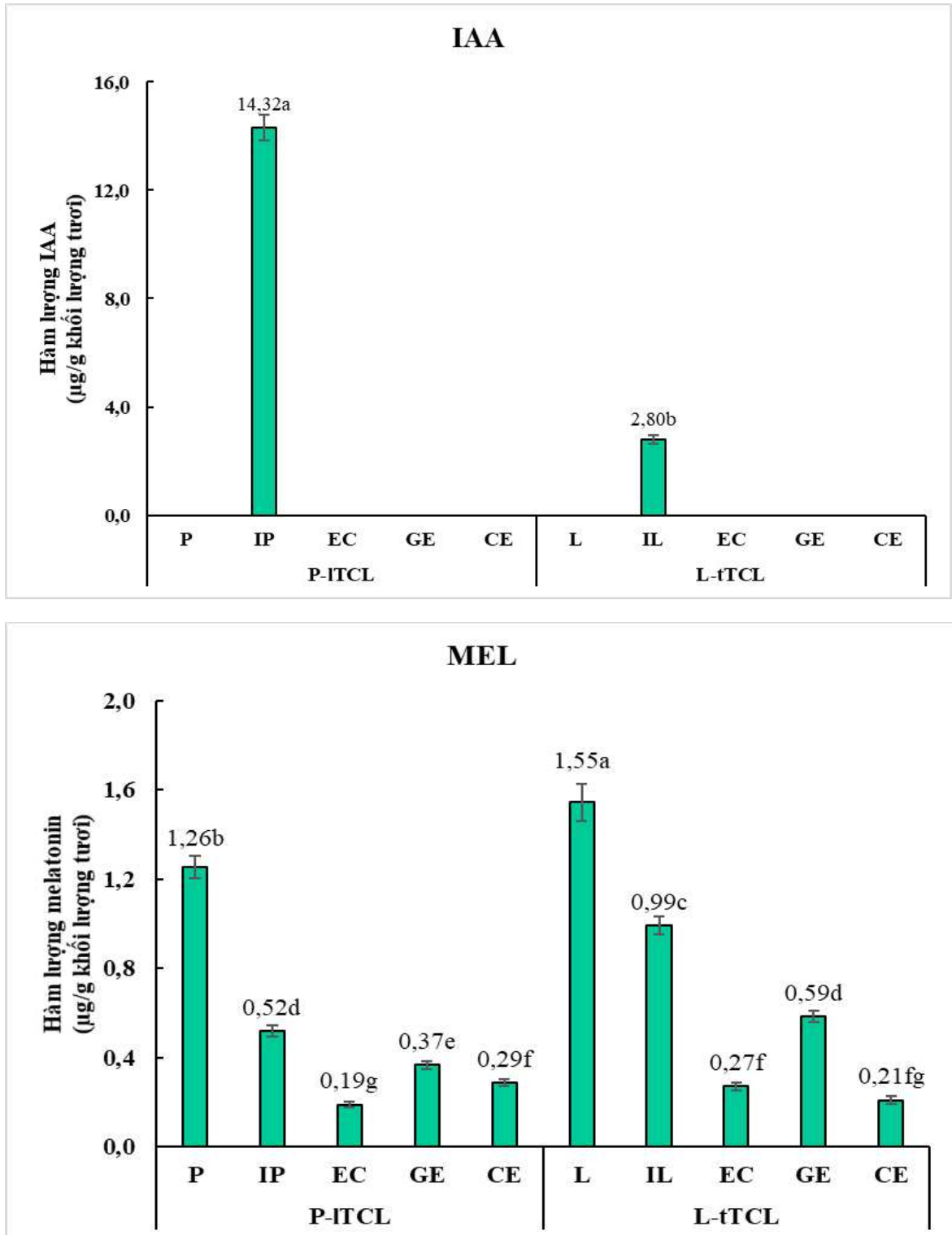
3.2.2.4. Sự biến động của các hormone nội sinh trong quá trình phát sinh phôi soma

Sự phát sinh phôi soma chịu sự tác động của cả các nhóm chất kích thích sinh trưởng (auxin, cytokinin và gibberellin), và nhóm chất ức chế sinh trưởng (ABA, SA). Bất kỳ sự thay đổi về hàm lượng của các chất kích thích hay ức chế sinh trưởng đều tác động đến sự cảm ứng, phát sinh và phát triển phôi soma. Do đó, nghiên cứu về sự thay đổi hàm lượng hormone nội sinh và tỷ lệ giữa các nhóm hormone nội sinh trong các mô thực vật là cần thiết nhằm tạo điều kiện tối ưu hóa cho sự phát sinh phôi soma.

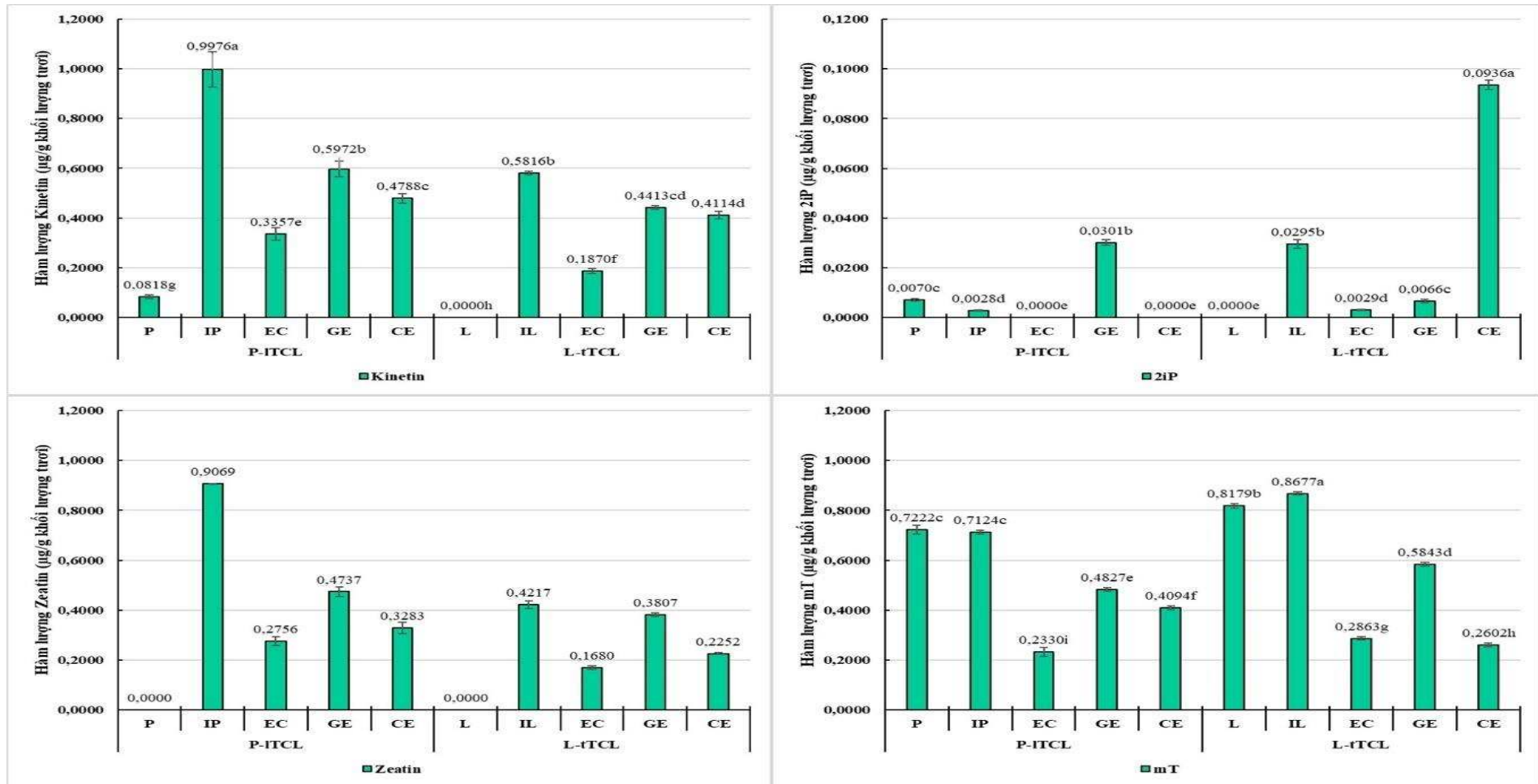
Sự khác biệt rõ rệt về hàm lượng hormone nội sinh đã được quan sát thấy ở các giai đoạn khác nhau của quá trình phát sinh phôi soma sơ cấp sâm Lang Bian. Nồng độ CK nội sinh (ZEA, 2iP, kinetin, mT), IAA và GA₃ cao nhất trong giai đoạn cảm ứng phát sinh phôi soma sơ cấp ở cả hai loại mẫu cây L-tTCL và P-ITCL (Hình 3.9, Hình 3.10 và Hình 3.11). Trong khi đó, các hormone nội sinh còn lại (MEL, ABA và SA) không biểu hiện xu hướng biến động rõ ràng (Hình 3.9, Hình 3.11 và Hình 3.12). Ngoài ra, IAA chỉ được phát hiện ở giai đoạn cảm ứng phát sinh phôi soma sơ cấp trong cả hai mẫu cây (Hình 3.9). Những kết quả này cho thấy, sự biến động của các hormone nội sinh trong từng giai đoạn của quá trình phát sinh phôi soma. Đồng thời, sự hiện diện và hàm lượng 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 của quá trình phát sinh phôi soma sơ cấp từ các mẫu L-tTCL và P-ITCL sâm Lang Bian nhìn chung tương tự nhau (ngoại trừ GA₃) (Hình 3.9, Hình 3.10, Hình 3.11 và Hình 3.12).

Quá trình phát sinh phôi soma bao gồm sự kết hợp của các tín hiệu nội sinh và tái lập trình gen. Việc sử dụng các auxin ngoại sinh, sử dụng đơn lẻ hay kết hợp với các chất điều hòa sinh trưởng thực vật khác cảm ứng sự biểu hiện của các gen khác nhau, gây ra sự thay đổi chương trình biểu hiện gen của các tế bào soma và điều chỉnh sự phát triển của các tế bào ở các giai đoạn khác nhau trong quá trình phát triển phôi soma [210]. Các gen này mã hóa cho protein hoạt động trong chu kỳ tế bào, sinh tổng

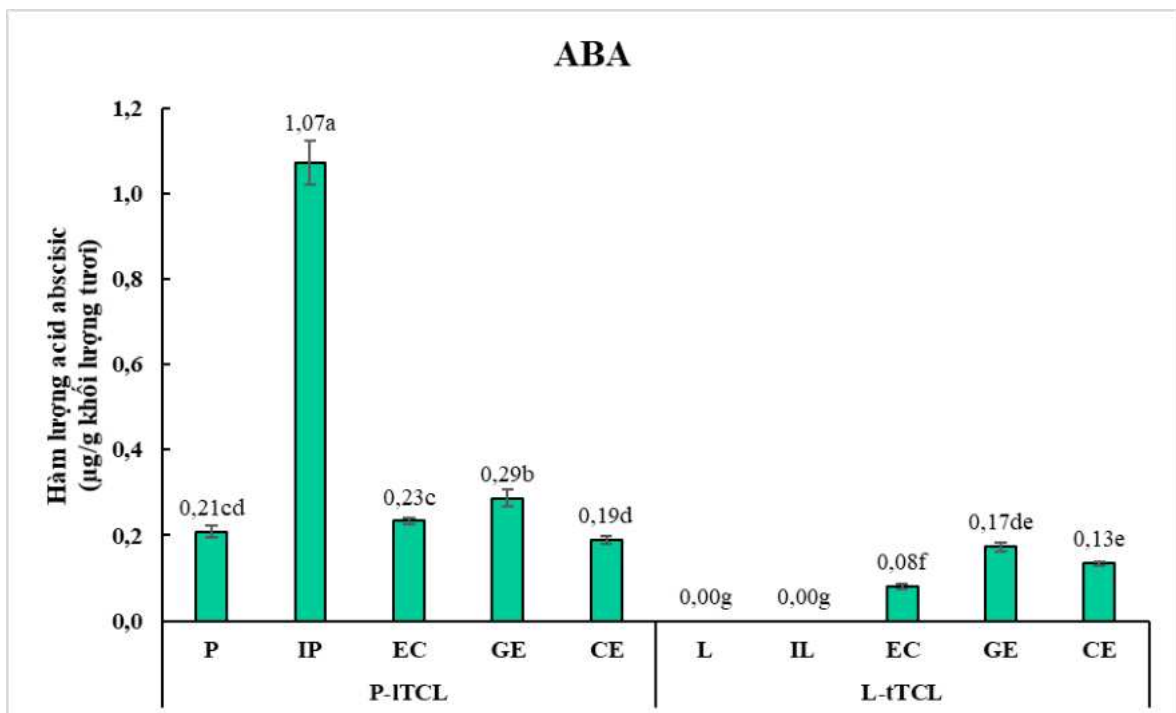
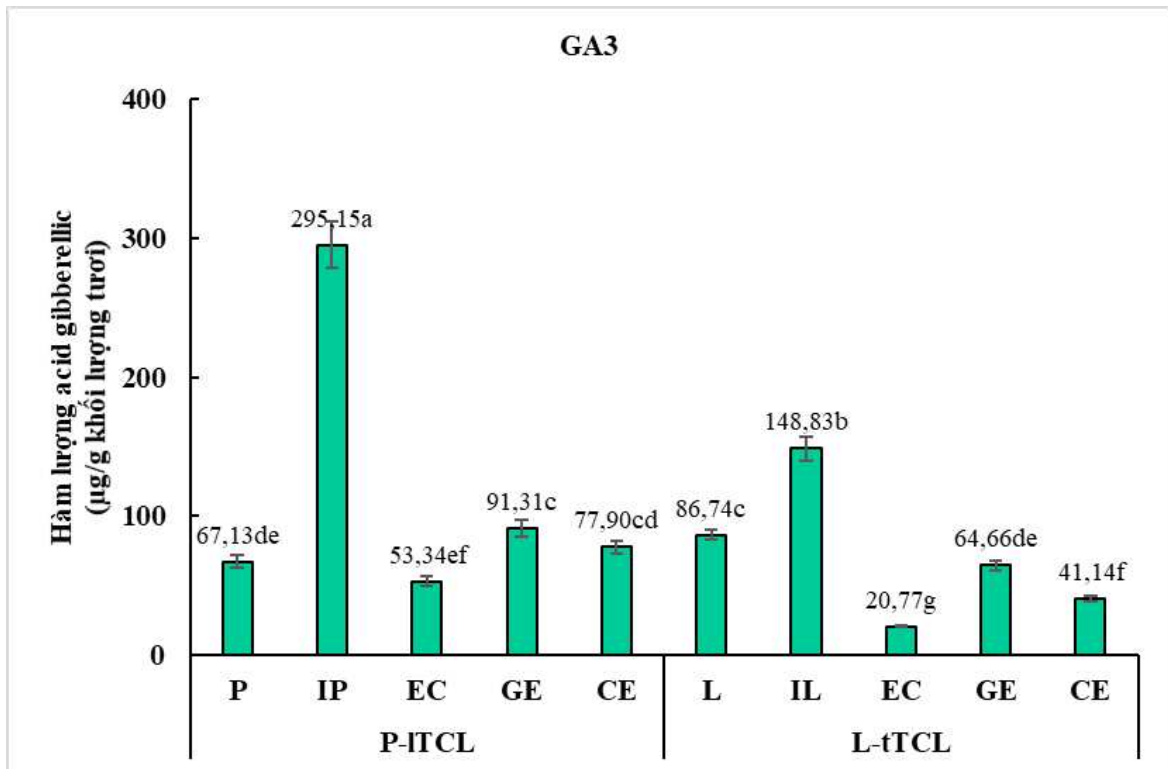
hợp chất điều hòa sinh trưởng thực vật, chủ yếu là auxin, cũng như các protein liên quan đến con đường truyền tín hiệu.



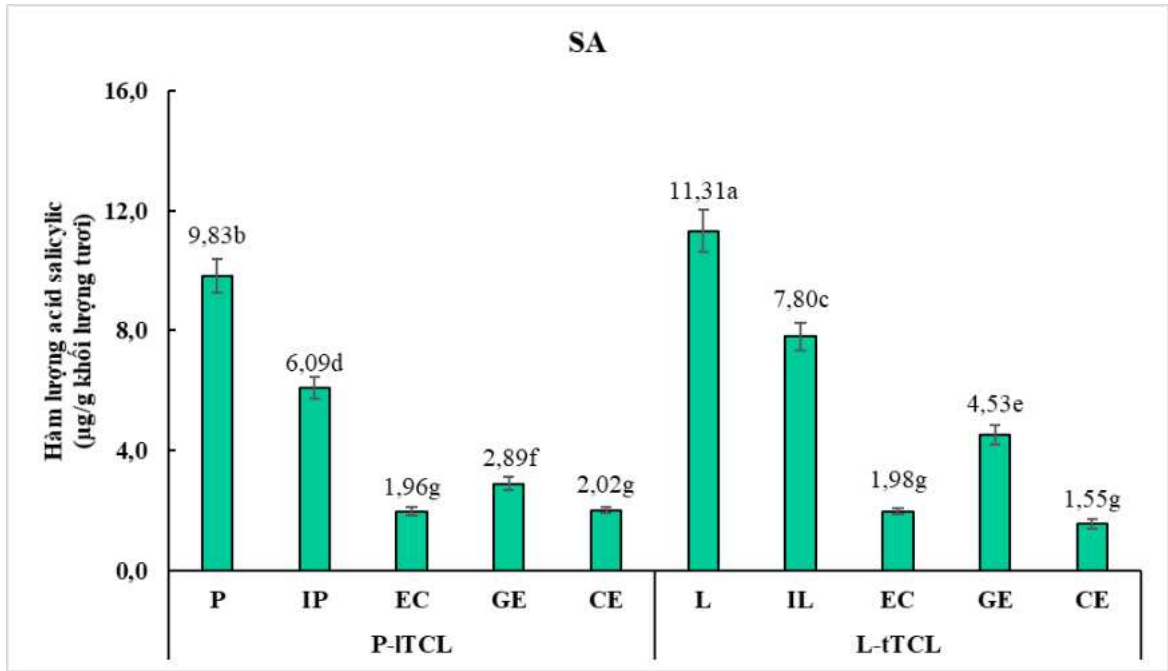
Hình 3.9. Sự biến động hàm lượng auxin (IAA) và MEL trong quá trình phát sinh phôi soma sơ cấp sâp Lang Bian. L – Mẫu lá; P – Mẫu cuống lá; IP – Mẫu cuống lá trong giai đoạn cảm ứng; IL – Mẫu lá trong giai đoạn cảm ứng; EC – Mô sẹo có khả năng phát sinh phôi soma; GE – phôi soma hình cầu; CE – phôi soma có lá mầm



Hình 3.10. Sự biến động hàm lượng cytokinin trong quá trình phát sinh phôi soma sơ cấp 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 3.11. Sự biến động hàm lượng acid gibberellic và acid abscisic trong quá trình phát sinh phôi soma sơ cấp 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 3.12. Sự biến động hàm lượng acid salicylic trong quá trình phát sinh phôi soma sơ cấp 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.

Vai trò của auxin và melatonin

Trong số các chất điều hòa sinh trưởng thực vật, auxin có vai trò quan trọng nhất cho sự phân chia và biệt hóa tế bào liên quan đến sự phát sinh và phát triển phôi soma. Trong giai đoạn cảm ứng phát sinh phôi có sự gia tăng hàm lượng IAA nội sinh thông qua sự tăng cường biểu hiện của các gen mã hóa cho enzyme tryptophan aminotransferase và enzyme flavin monooxygenase. Đây là hai enzyme tham gia vào quá trình sinh tổng hợp IAA. Sự tích lũy IAA có tương quan với việc kích hoạt chu trình phân chia trong các tế bào có khả năng phát sinh phôi. IAA có tác dụng kích thích sự tăng trưởng của tế bào theo hai cách: (1) kích thích quá trình acid hóa thành tế bào, dẫn đến tăng kích thước tế bào; và (2) cảm ứng sự phiên mã của các mRNA mã hóa các protein liên quan đến sự tăng trưởng của tế bào [211].

Ngoài ra, sự phân bố không đều của auxin phải được thiết lập để bắt đầu quá trình phát sinh phôi. Trong giai đoạn đầu của quá trình phát sinh phôi, auxin di chuyển hướng ngọn nhờ protein PIN7 (protein vận chuyển auxin). Từ đó, góp phần xác định vị trí của mô phân sinh ngọn chồi và các tế bào hình thành tiền mạch. Sự vận chuyển auxin theo chiều hướng này vẫn tiếp tục cho đến giai đoạn 32 tế bào của quá trình phát sinh phôi. Đây là điều kiện cần thiết cho hình thành của mô phân sinh đỉnh chồi. Ngoài ra, auxin được vận chuyển và phân bố ở hai bên phôi quyết định vị trí của lá

mầm sau này. Đồng thời, protein PIN1 điều chỉnh sự di chuyển của auxin hướng gốc cần thiết cho sự hình thành mô phân sinh đỉnh rễ. Một số nghiên cứu báo cáo rằng, xử lý các chất ngăn cản sự di chuyển hữu cực của auxin, chẳng hạn như TIBA sẽ ức chế khả năng phát sinh phôi của tế bào. Như vậy, hàm lượng auxin tăng mạnh ở giai đoạn cảm ứng giúp xác định vị trí cũng như phát triển sau đó của các cơ quan phôi. Sau đó, hàm lượng auxin giảm mạnh ở những giai đoạn tiếp theo của quá trình phát triển phôi. Hàm lượng IAA giảm xuống có thể là do chúng đã bị thoái biến trong tế bào thông qua việc hình thành các dạng liên kết (chủ yếu với amino acid và đường) hoặc bị phân hủy. Một số IAA ở dạng liên kết có thể được xem là dạng dự trữ có thể bị thủy phân để tạo thành IAA tự do đáp ứng cho nhu cầu trao đổi chất của tế bào. Ayil-Gutiérrez và cộng sự (2013) đề xuất rằng sự cân bằng giữa IAA tự do và dạng liên kết là cần thiết cho sự cho sự phát sinh phôi *Coffea canephora* [212]. Kết quả nghiên cứu ở sâm Lang Bian cũng cho thấy, chỉ phát hiện IAA với hàm lượng đạt được giá trị cao nhất trong giai đoạn cảm ứng phát sinh phôi soma sơ cấp ở cả hai loại mẫu cấy L-tTCL và P-ITCL cần thiết cho sự phát sinh phôi sâm Lang Bian.

Melatonin (MEL) tác động đến các chức năng sinh lý khác nhau của thực vật bao gồm hấp thụ ion, vận chuyển chất dinh dưỡng, trao đổi khí, đóng mở khí khổng và chống oxy hóa. Bên cạnh đó, MEL kích hoạt hệ thống chống oxy hóa ở thực vật, bao gồm chu trình ascorbate-glutathione, superoxide dismutase (SOD) và catalase (CAT) dẫn đến loại bỏ các gốc oxy hoạt động (ROS), tăng cường phân tử tín hiệu chống stress [213]. Ngoài ra, sự tương tác giữa MEL-ROS giúp duy trì các mô thực vật tồn tại trong điều kiện stress và điều hòa các mạng lưới truyền tín hiệu nhanh và phức tạp trong thực vật. Zhao và cộng sự (2011) báo cáo rằng MEL tăng khả năng phục hồi của mô sẹo sau thời gian bảo quản lạnh, đồng thời, hoạt tính của các enzyme chống oxy hóa catalase và peroxidase gia tăng trong các khối mô sẹo được xử lý với 0,1 μM MEL [214].

Ngoài ra, MEL kích thích sự hình thành mô sẹo *in vitro* thông qua tác động đến sự phân chia tế bào; kích thích sự phát sinh phôi khi được bổ sung vào môi trường nuôi cấy thay thế IAA. Trong nghiên cứu nuôi cấy phôi soma *Coffea canephora*, MEL được bổ sung vào trong môi trường nuôi cấy có tác dụng cải thiện tỷ lệ mẫu cảm ứng tạo mô sẹo và phát sinh phôi soma [215]. Kết quả tương tự cũng báo cáo trong nuôi cấy phôi *Medicago sativa L.* [216]. Đối với sâm Lang Bian, hàm lượng MEL nội sinh bên trong mẫu L-tTCL và P-ITCL ban đầu cao kích thích sự phân chia tế bào và phát sinh phôi soma.

Vai trò của cytokinin và meta – topolin

Trong sự phát sinh phôi soma, cytokinin có vai trò thúc đẩy sự phân chia, kích thích tổng hợp các protein và enzyme liên quan đến sự phân chia tế bào thông qua việc kích hoạt các protein kinase trong con đường truyền tín hiệu. Sự hiện diện của cytokinin cùng với một số lượng lớn ti thể sẵn sàng cho sự phân chia tế bào dẫn đến sự hình thành phôi hình cầu. Đồng thời, cytokinin cần thiết cho sự hoạt động của mô phân sinh ngọn. Do đó, trong giai đoạn hình thành mô phân sinh ngọn có sự gia tăng hàm lượng cytokinin. Trong nghiên cứu *Arabidopsis thaliana*, mô phân sinh chồi không thể phát triển bình thường nếu không có sự chuyển đổi cytokinin từ dạng liên kết sang dạng tự do. Nguyên nhân có thể là do hàm lượng cytokinin không đủ cung cấp cho hoạt động của các tế bào vùng mô phân sinh ngọn, dẫn đến giảm sút sự tổng hợp auxin, hàm lượng auxin không đủ cho sự di chuyển hữu cực đến các vị trí hình thành cơ quan phôi. Từ đó, sự trưởng thành của phôi không được tiếp tục do không có sự phát triển của mô phân sinh chồi và rễ. Như vậy, cytokinin cần thiết cho sự phát triển phôi bình thường. Kết quả phân tích hàm lượng cytokinin (bao gồm kinetin, 2iP và zeatin) trên đối tượng sâm Lang Bian cũng cho thấy, tất cả các giai đoạn cảm ứng, tạo mô sẹo có khả năng phát sinh phôi, phôi hình cầu và phôi có lá mầm ở cả hai mẫu L-tTCL và P-lTCL đều có sự hiện diện của cytokinin. Mặc dù hàm lượng kinetin, 2iP và zeatin có sự biến động giữa các giai đoạn khác nhau của quá trình phát sinh phôi, tuy nhiên, chúng lại cần thiết cho sự phân chia tế bào cũng như sự phát triển bình thường của phôi soma.

Meta – topolin (mT) là dẫn xuất của BA tự nhiên được phát hiện gần đây. mT đã được chứng minh là có hiệu quả và được sử dụng trong nghiên cứu quá trình phát sinh phôi của các đối tượng thực vật khác nhau. Saharan và cộng sự (2011) đã báo cáo rằng mô sẹo *Balanites aegyptiaca* có nguồn gốc từ rễ phát sinh phôi khi được nuôi trong môi trường MS bán rắn bổ sung 0,5 mg/L mT và 2,5 mg/L 2,4-D. Phôi soma thu được trong môi trường lỏng bổ sung mT có tần suất tái sinh cao (78%) với chồi và rễ phát triển tốt [217]. Tương tự, trong nuôi cấy phôi lúa mạch, Esteves và cộng sự (2014) báo cáo rằng việc thay thế BA bằng mT trong môi trường tái sinh đã cho tỷ lệ nảy mầm của phôi tạo thành cây con tăng gấp 2,9 lần [82]. Saeed và Shahzad (2015) sử dụng mT như một chất bổ sung thuộc nhóm cytokinin trong các giai đoạn khác nhau của quá trình phát sinh phôi soma *Albizia lebbek* bao gồm cảm ứng, phát sinh và phát triển và nảy mầm của phôi soma. Tỷ lệ phôi và số phôi trưởng thành cao hơn khi mẫu được nuôi cấy trong môi trường bổ sung 1,2 mg/L mT kết hợp với 2,5 NAA và 11 mg/L glutamine [218]. Ngoài ra, trong giai đoạn nảy mầm, Solórzano-

Cascaante và cộng sự (2018) báo cáo rằng mT có tác động tích cực đến sự nảy mầm của phôi soma đu đủ *Carica* [219]. Kết quả phân tích hàm lượng mT trong nuôi cấy phôi soma sâm Lang Bian cũng cho thấy, đối với cả hai mẫu cấy L-tTCL và P-ITCL, mT được phát hiện với hàm lượng lớn ở giai đoạn ban đầu cũng như giai đoạn cảm ứng cần thiết cho sự phát sinh phôi soma. Sau đó, hàm lượng mT giảm ở giai đoạn tạo mô sẹo có khả năng phát sinh phôi trước khi tăng trở lại ở giai đoạn phôi soma hình cầu với vai trò thúc đẩy sự trưởng thành của phôi.

Vai trò của gibberellin

Trong quá trình tạo phôi hợp tử, GA nội sinh được yêu cầu chủ yếu ở giai đoạn đầu của quá trình phát triển phôi và có thể liên quan đến dây treo. Dây treo của phôi ở giai đoạn hình cầu được phát hiện có chứa một số hormone thực vật như GA, auxin, cytokinin và acid abscisic. Sự tổng hợp GA trong dây treo có vai trò quan trọng cho sự phát triển phôi. Hơn nữa, trong dây treo có các mRNA mã hóa GA₃-oxidase, enzyme sinh tổng hợp gibberellin có hoạt tính sinh học quan trọng. GA₃ và GA₃-oxidase mRNA cũng được tích lũy trong dây treo của các cây họ đậu khác, ví dụ: *Glycine max* và *Cytisus laburnum* [86].

Ngoài ra, trong sự phát sinh phôi soma, GA có tác động đến hướng đặt của các vi ống ở vị trí ngoại vi tế bào, dẫn đến kiểm soát hướng đặt các vi sợi cellulose được tổng hợp trên vách tế bào. GA được bổ sung vào trong môi trường nuôi cấy *M. sativa* cv. Rangeland ở hai giai đoạn khác nhau: trong giai đoạn cảm ứng và biệt hóa đã làm giảm sự tăng sinh mô sẹo và tăng số lượng phôi soma; khả năng phát sinh phôi tăng mạnh khi GA có mặt trong môi trường biệt hóa [220]. Ngoài ra, hàm lượng GA nội sinh (GA₁, GA₃, GA₂₀) cao hơn đáng kể được tìm thấy trong mô sẹo có khả năng phát sinh phôi của ngô, so với hàm lượng GA nội sinh ở mô sẹo không có khả năng phát sinh phôi [221]. Tương tự, trong sự phát sinh phôi soma gián tiếp ở *M. truncatula*, mô sẹo có nguồn gốc từ mẫu lá cảm ứng phát sinh phôi soma chủ yếu đi kèm với quá trình sinh tổng hợp GA₃. Ngoài ra, chất ức chế sinh tổng hợp GA (paclobutrazol) đã ức chế mạnh mẽ sự tăng trưởng của mô sẹo và quá trình phát sinh phôi sau đó [86]. Những kết quả nghiên cứu này chỉ ra rằng GA nội sinh cần thiết cho cả quá trình cảm ứng và quá trình biệt hóa phôi soma. Kết quả phân tích hàm lượng GA₃ trên sâm Lang Bian cũng cho thấy, hàm lượng GA₃ tăng mạnh trong giai đoạn cảm ứng cần thiết cho sự cảm ứng và phát sinh phôi soma.

Vai trò của acid abscisic

Trong toàn bộ quá trình phát sinh phôi soma, ABA được tổng hợp trong tất cả các mô thực vật như cuống lá, lá, mô sẹo, phôi ở các giai đoạn phát triển khác nhau nhưng hàm lượng ABA tương ứng ở các giai đoạn là khác nhau. Sự khác biệt về hàm lượng ABA giữa các mô thực vật cũng như các giai đoạn phát sinh phôi có thể là do ABA được tổng hợp và tồn tại ở hai dạng tự do hoặc liên kết. Một số con đường trao đổi chất mà qua đó ABA có thể được loại bỏ hoặc phân hủy trong mô thực vật như một biện pháp điều chỉnh hàm lượng ABA. ABA có thể được chuyển hóa bằng quá trình oxy hóa, khử hoặc tạo ra dạng liên kết không có hoạt tính [phổ biến nhất là glucosyl ester (ABA-GE)] được tích lũy trong không bào hoặc apoplast [87].

ABA nội sinh có ý nghĩa quan trọng đối với sự khởi đầu của quá trình phôi ở một số thực vật. Nakagawa và cộng sự (2001) đã báo cáo hàm lượng ABA cao hơn ở các dòng mô sẹo có khả năng sinh phôi ở dưa (*Cucumis melo*) [222]. Thi và Pleschka (2005) đã báo cáo về mối quan hệ tích cực giữa hàm lượng ABA nội sinh trong mẫu cây cuống lá và quá trình tạo phôi soma của một số loài *Daucus* [223]. Thêm vào đó, sự phát sinh và phát triển phôi soma *Arabidopsis thaliana* bị ức chế khi bổ sung Fluridone (FL), một chất ức chế sinh tổng hợp ABA, vào trong môi trường nuôi cấy phát sinh phôi soma. Hợp chất này tác động tới phytoene desaturase, tham gia vào quá trình sinh tổng hợp carotenoid – tiền chất để sinh tổng hợp ABA [224]. Ngoài ra, sự tổng hợp và tích lũy ABA là một đặc điểm quan trọng trong việc cải thiện sự phát triển phôi soma của thực vật. ABA được gia tăng tổng hợp trong giai đoạn tích lũy dinh dưỡng dự trữ và tham gia vào quá trình biểu hiện gen liên quan đến tổng hợp các protein dự trữ và protein LEA. Đồng thời, ABA giúp hạn chế sự phá vỡ biểu bì thông qua việc cản phôi tăng trưởng để tiếp tục phát triển bình thường. Ở cây lá kim, ABA thường được bổ sung trong môi trường nuôi cấy để tăng cường sự trưởng thành của phôi soma.

Tuy nhiên, ABA lại có tác động ức chế sự phát triển tiếp tục của phôi soma; số lượng phôi hình cầu và hình thủy lôi được tạo ra nhiều hơn so với phôi có lá mầm. Phôi soma chậm phát triển là do ABA ức chế hoạt động ACC oxidase (ACO), từ đó giảm tổng hợp và hoạt động ethylene, kiểm soát các giai đoạn phát sinh phôi soma. Đồng thời, ABA giúp các phôi hình cầu có sự biểu bì hóa rõ hơn và nhanh chóng đạt đến giai đoạn thủy lôi. Tuy nhiên, nếu tiếp tục duy trì ABA ở hàm lượng cao, phôi sẽ không tiếp tục phát triển và nảy mầm thành cây hoàn chỉnh. Trong nghiên cứu nuôi cấy phôi soma *Medicago* spp cũng cho thấy, hàm lượng ABA tương đối cao trong các mẫu cuống lá ban đầu, sau đó, giảm mạnh trong giai đoạn cảm ứng mô sẹo, nhưng

lại tăng đáng kể ở các phôi đang biệt hóa, tiếp theo đó, hàm lượng này lại giảm ở giai đoạn phôi có lá mầm [225]. Kết quả tương tự cũng được ghi nhận khi cây chuyển mô sẹo *Lycium barbarum* sang môi trường phát sinh phôi, hàm lượng ABA nội sinh tăng lên đáng kể, theo đó hàm lượng cao nhất trùng với giai đoạn tạo tế bào có khả năng phát sinh phôi [226]. Đối với sâm Lang Bian chúng tôi cũng nhận thấy, ABA được phát hiện trong mẫu cây P-tTCL ban đầu, sau đó, tiếp tục gia tăng mạnh ở giai đoạn cảm ứng. Tuy nhiên, hàm lượng ABA lại giảm ở giai đoạn tạo mô sẹo có khả năng phát sinh phôi trước khi tăng trở lại ở giai đoạn phôi hình cầu và giảm ở giai đoạn phôi có lá mầm. Kết quả tương tự cũng được ghi nhận đối với mẫu cây L-tTCL, tuy nhiên, ở giai đoạn đầu không ghi nhận được sự hiện diện của ABA, hàm lượng ABA lại gia tăng ở giai đoạn tạo mô sẹo có khả năng phát sinh phôi và đạt giá trị cao nhất ở giai đoạn phôi hình cầu trước khi giảm ở giai đoạn phôi có lá mầm. Từ các kết quả nghiên cứu cho thấy rằng, ABA có liên quan đến cảm ứng phát sinh phôi soma, đồng thời, tăng cường sự phát triển phôi soma sâm Lang Bian.

Vai trò của acid salicylic

Acid salicylic (SA) đóng vai trò là một yếu tố tín hiệu liên quan đến điều hòa hormone và đề kháng của thực vật. Đối với sự phát sinh phôi soma, nhiều nghiên cứu đã chứng minh, SA thông qua việc ức chế sinh tổng hợp ethylene, có thể thúc đẩy biểu hiện của các protein liên quan đến sự phát sinh phôi soma.

Ngoài ra, SA điều chỉnh quá trình sinh tổng hợp và vận chuyển IAA, do đó tác động đến sự phát sinh hình thái của mẫu cây. Bên cạnh đó, một số nghiên cứu cho thấy rằng SA gây ra sự gia tăng nồng độ hydrogen peroxide (H_2O_2) trong mô thực vật, từ đó thúc đẩy quá trình phát sinh phôi soma. SA làm tăng nồng độ H_2O_2 nội sinh bằng cách tác động đến các enzyme chuyển hóa H_2O_2 để thay đổi trạng thái oxy hóa khử của tế bào và tạo điều kiện thuận lợi cho việc tạo ra SA* để bắt đầu quá trình peroxide hóa lipid, do đó kích hoạt sự biểu hiện của các protein chitinase và glucanase điều hòa quá trình phát sinh phôi soma [227].

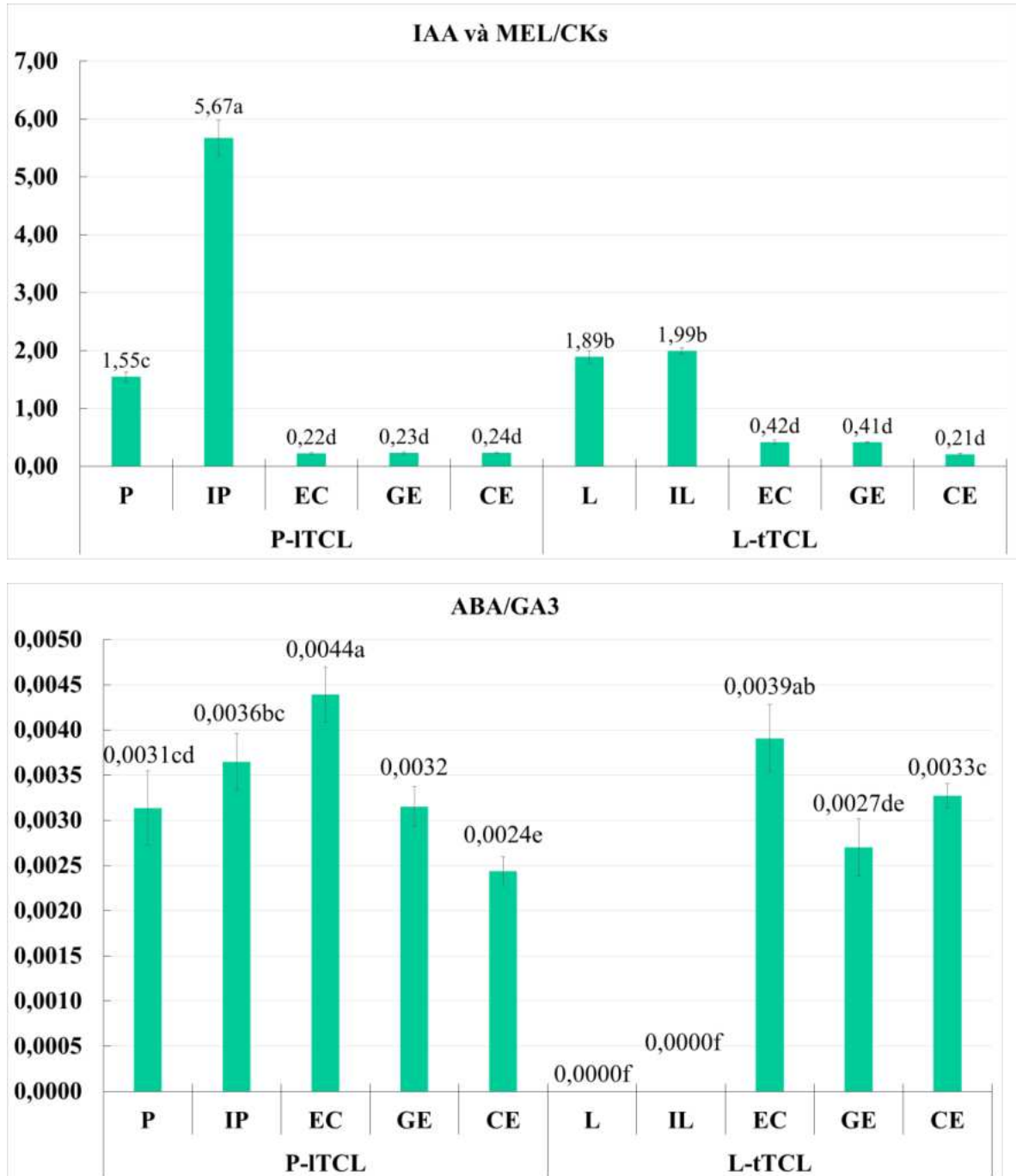
Đã có một số nghiên cứu về tác dụng của SA lên sự phát sinh phôi soma được thực hiện. SA ở nồng độ rất thấp ($1,38 \times 10^{-6}$ mg/L) đã cho hiệu quả trong việc hình thành phôi soma từ mô sẹo của *Coffea arabica* [228]. Tương tự, trong nuôi cấy *Astragalus adsurgens*, SA ở nồng độ thấp hơn 27,6 mg/L phù hợp để cảm ứng sự hình thành phôi soma [229]. Tuy nhiên, theo Hao và cộng sự (2006), nồng độ SA rất cao (70 mg/L) lại có tác dụng cải thiện sự hình thành phôi soma từ các phần gốc lá non của yến mạch (*Avena nuda*) [230]. Kết quả phân tích hàm lượng SA ở mẫu sâm Lang Bian cũng cho thấy, hàm lượng SA ở các mẫu cây L-tTCL và P-tTCL ban đầu

cũng như ở giai đoạn cảm ứng cao, đây cũng là một yếu tố góp phần cảm ứng sự phát sinh phôi soma.

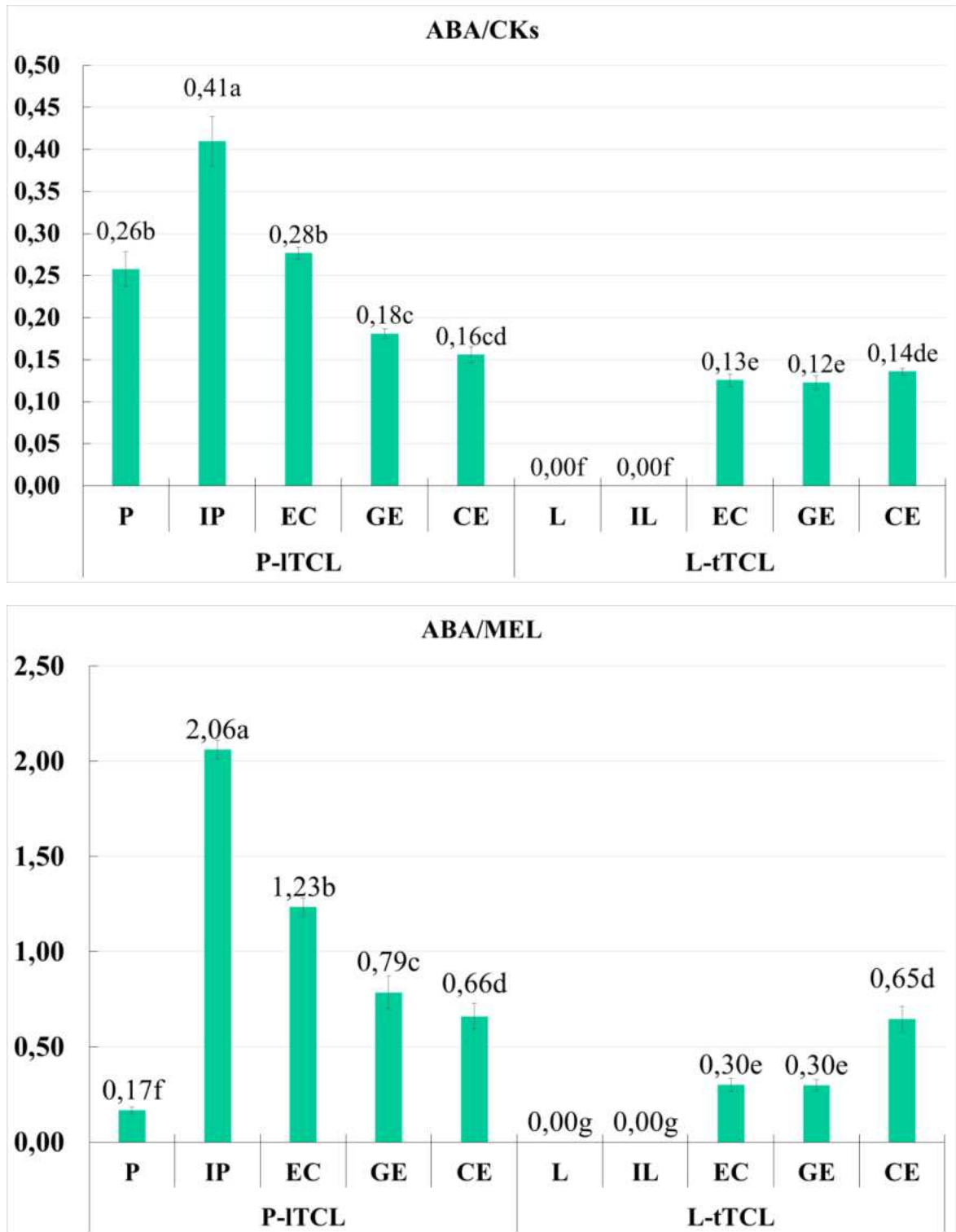
Tùy thuộc vào loại mẫu cây, tỷ lệ hormone nội sinh rất khác nhau trong quá trình phát sinh phôi soma sơ cấp. Tỷ lệ IAA và MEL/CK, ở cả hai loại mẫu cây, đạt cao nhất ở giai đoạn cảm ứng, sau đó giảm mạnh ở giai đoạn hình thành mô sẹo có khả năng phát sinh phôi soma sơ cấp và duy trì ổn định (tăng/giảm nhẹ) ở các giai đoạn phát sinh phôi soma sơ cấp còn lại (Hình 3.13). Trong khi đó, tỷ lệ ABA/GA₃ 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 (Hình 3.13). 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/GA₃ không được quan sát thấy trong mẫu L-tTCL. Tỷ lệ ABA/CKs, ABA/MEL, IAA và MEL/ABA và IAA và MEL/GA₃ (Hình 3.14; Hình 3.15) tăng dần từ thời điểm nuôi cấy đến giai đoạn cảm ứng phát sinh phôi soma sơ cấp và giảm dần ở các giai đoạn tiếp theo đối với mẫu 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 sơ cấp và ổn định hoặc tăng nhẹ (Hình 3.14), và tỷ lệ IAA và MEL/ABA và IAA và MEL/GA₃ giảm trong các giai đoạn còn lại của quá trình phát sinh phôi soma sơ cấp đối với mẫu L-tTCL (Hình 3.15).

Sự phát sinh phôi soma vừa là một phương thức quan trọng để tái sinh thực vật vừa là một trong những lĩnh vực thú vị nghiên cứu về hình thái, sinh lý và nguyên tắc di truyền của quá trình cảm ứng và phát triển phôi soma. Để kiểm soát quá trình này, điều quan trọng là phải hiểu cơ chế sinh lý của quá trình cảm ứng phát sinh phôi soma. Bằng cách tạo điều kiện thuận lợi cho sự truyền tín hiệu giúp lập trình lại các biểu hiện gen, các hormone nội sinh được sử dụng làm phân tử tín hiệu cho quá trình phát sinh phôi soma. Tuy nhiên, chưa có nghiên cứu nào về sự biến động của các hormone liên quan đến quá trình phát sinh phôi soma sơ cấp sâm Lang Bian được công bố. Nhiều nghiên cứu cho rằng polyamine ngoại sinh ảnh hưởng đến sự phát sinh phôi soma bằng cách ảnh hưởng đến hàm lượng phytohormone nội sinh. Việc bổ sung polyamine ngoại sinh trong nuôi cấy phôi soma *Araucaria angustifolia* làm tăng hàm lượng IAA và ABA nội sinh, từ đó cho thấy mối quan hệ trực tiếp giữa polyamine và sự tích lũy ABA, cải thiện chất lượng của phôi soma, đặc biệt là trong giai đoạn trưởng thành [98]. Kết quả tương tự cũng được Wang và cộng sự (2020) báo cáo trong nghiên cứu về ảnh hưởng của spermidine ngoại sinh đối với sự phát sinh phôi soma, nồng độ của bốn loại hormone nội sinh (IAA, ABA, GA và ZEA) đều tăng khi các mẫu được nuôi cấy trong môi trường bổ sung spermidine ngoại sinh.

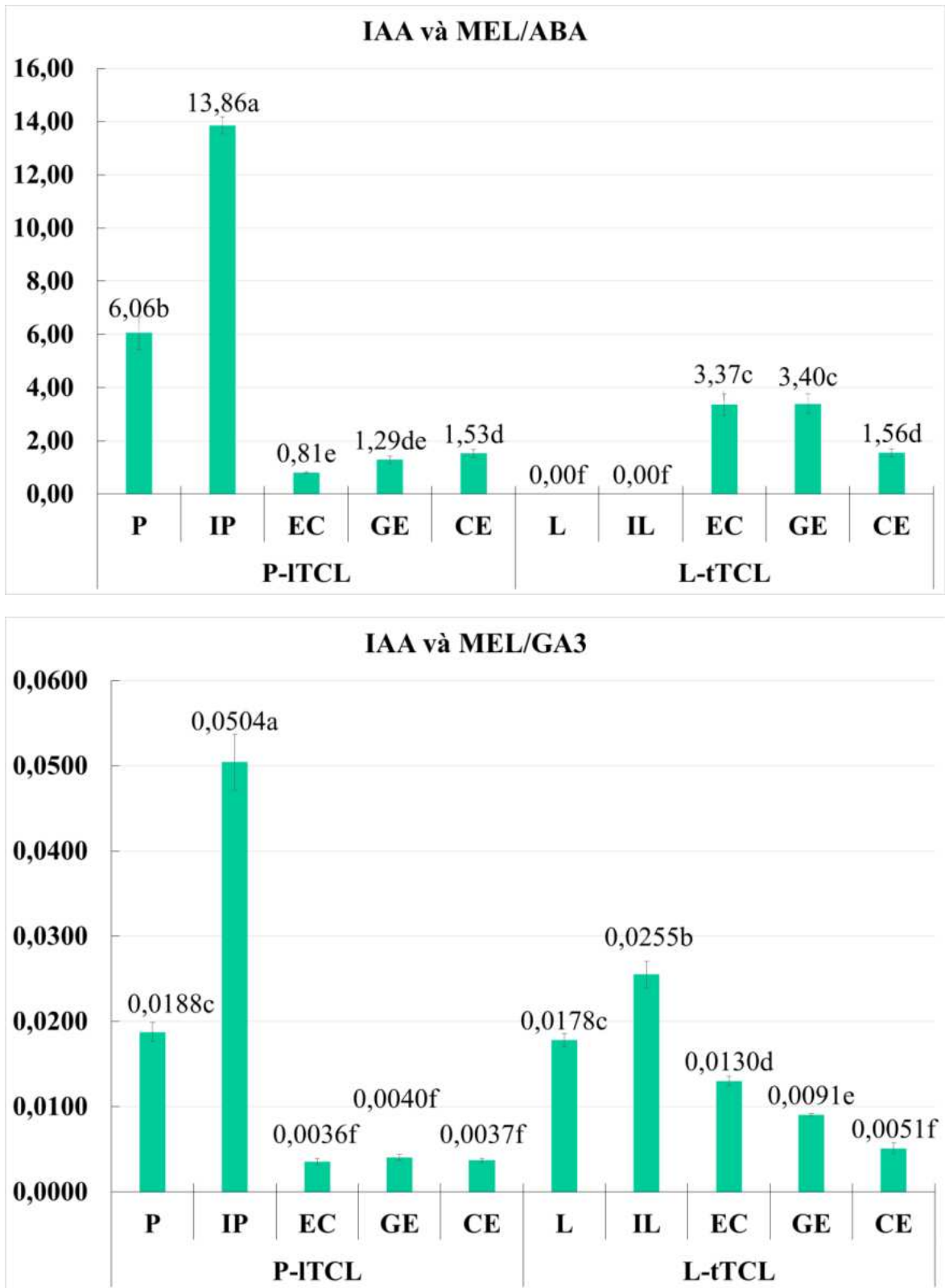
Đặc biệt, hàm lượng IAA trong mô sẹo cao nhất và giảm dần theo quá trình phát sinh và trưởng thành phôi soma. Tương tự IAA, hàm lượng GA có xu hướng tăng nhanh và sau đó giảm dần trong quá trình phát sinh phôi soma khi mẫu được nuôi cấy trong môi trường có bổ sung spermidine ngoại sinh [106].



Hình 3.13. Tỷ lệ IAA và MEL/CKs và ABA/GA₃ của mẫu ở các giai đoạn khác nhau của quá trình phát sinh phôi soma sơ cấp sâu Lang Bian



Hình 3.14. Tỷ lệ ABA/CKs và ABA/MEL của mẫu ở các giai đoạn khác nhau của quá trình phát sinh phôi soma sơ cấp sâm Lang Bian



Hình 3.15. Tỷ lệ IAA và MEL/ABA và IAA và MEL/GA₃ của mẫu ở các giai đoạn khác nhau của quá trình phát sinh phôi soma sơ cấp sâm Lang Bian

Ngược lại, ABA và ZEA có xu hướng tăng ở giai đoạn sau của quá trình phát sinh phôi soma. Do đó, giai đoạn đầu của quá trình phát sinh phôi soma yêu cầu nồng

độ IAA và GA cao, ngược lại, ở các giai đoạn sau lại cần gia tăng nồng độ ABA và ZEA [106]. Trong nghiên cứu quá trình phát sinh phôi ở *Medicago spp.*, sự tổng hợp IAA diễn ra mạnh mẽ với hàm lượng IAA ngày càng tăng từ giai đoạn đầu đến cảm ứng phát sinh phôi. Sau đó, hàm lượng IAA giảm dần [225]. Như vậy, có sự tương quan giữa các giai đoạn phát sinh phôi và sự thay đổi hàm lượng các hormone nội sinh. Ở giai đoạn hoạt hóa tế bào, có sự gia tăng hàm lượng IAA và cytokinin trong tế bào. Khi phôi hình thành và trưởng thành, hàm lượng IAA và cytokinin đều giảm (nhằm giảm tỉ lệ auxin/cytokinin). Hơn nữa, Khai và cộng sự (2021) cũng cho thấy auxin chỉ hiện diện ở giai đoạn cảm ứng quá trình phát sinh phôi soma (ngày nuôi thứ 30), sau đó giảm dần, tạo điều kiện thuận lợi cho phôi soma phát triển; sau 60 - 120 ngày nuôi cấy, các tác giả không ghi nhận được hàm lượng auxin trong mẫu phôi soma *Begonia* [83]. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng tương tự như kết quả của nghiên cứu trên; sau 12 tuần nuôi cấy, hầu hết các phôi soma đều ở giai đoạn thành thực và ở giai đoạn này không phát hiện được sự hiện diện của auxin nội sinh, cụ thể là IAA. Tỷ lệ ABA/GA₃ liên quan đến khả năng sinh trưởng hay ngủ nghỉ của thực vật, cũng như giai đoạn phát triển của phôi soma. Ở các giai đoạn khác nhau của quá trình phát sinh phôi soma *Ormosia henryi* Prain, tỷ lệ IAA/GAs, IAA/ABA, AUX/ABA và AUX/GAs cao, và tỷ lệ GAs/CKs và ABA/CKs thấp thuận lợi cho việc cảm ứng tạo mô sẹo có khả năng phát sinh phôi soma; tuy nhiên, tỷ lệ IAA/CK và AUX/CK thấp hơn ở phôi soma dạng lá mầm, điều này thuận lợi cho sự trưởng thành và biệt hóa phôi soma. Kết quả này phù hợp với lý thuyết, cần có nồng độ AUX thấp và CK cao là cần thiết cho sự trưởng thành và biệt hóa phôi soma [231].

Như vậy, việc nghiên cứu vai trò của các acid amin và spermidine đối với quá trình phát sinh phôi soma sơ cấp của sâm Lang Bian có ý nghĩa rất lớn trong việc tăng hiệu quả sự phát sinh phôi soma sơ cấp và nâng cao chất lượng phôi soma, từ đó tạo nguồn vật liệu cho sự tăng sinh phôi soma thứ cấp ở giai đoạn tiếp theo trong quá trình vi nhân giống. Ngoài ra, ảnh hưởng của các acid amin và polyamine bổ sung vào môi trường nuôi cấy đến một số chỉ tiêu sinh lý - sinh hóa như các enzyme chống oxy hóa và sự biến động của các hormone nội sinh trong quá trình phát sinh phôi soma sơ cấp sâm Lang Bian cũng được ghi nhận và làm rõ trong nghiên cứu này.

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

3.3.1. Ảnh hưởng của môi trường khoáng đến sự phát sinh phôi soma thứ cấp

Trong nuôi cấy các loài thuộc chi *Panax*, nuôi cấy phôi soma thứ cấp có nhiều ưu điểm hơn so với phôi soma sơ cấp, đặc biệt là tốc độ gia tăng sinh khối và mức độ đồng nhất cao [39]. Từ đó, hứa hẹn tạo ra một số lượng lớn cây con có chất lượng

cao trong một thời gian ngắn, giải quyết được nhu cầu nguồn giống cũng như giảm thiểu áp lực khai thác giống trong tự nhiên. Phôi soma sơ cấp được thu nhận từ các nghiên cứu trước sẽ được tiếp tục sử dụng cho quá trình phát sinh và tăng sinh phôi soma thứ cấp nhằm mục tiêu rút ngắn thời gian nhân giống và nâng cao hiệu quả của quá trình vi nhân giống sâm Lang Bian theo con đường phát sinh phôi soma.

Sự hình thành phôi soma thứ cấp, quá trình hình thành phôi soma mới trên bề mặt của phôi soma sơ cấp, giúp nâng cao hiệu quả của quá trình vi nhân giống. Nghiên cứu phát sinh phôi soma thứ cấp đã được ghi nhận ở một số loài thuộc chi *Panax* bao gồm *P. quinquefolius* [69], *P. ginseng* [12], *P. notoginseng* [13], *P. vietnamensis* [39]. Trong nghiên cứu này, kết quả ghi nhận cũng cho thấy sự phát sinh phôi soma thứ cấp từ phôi soma sơ cấp sâm Lang Bian nuôi cấy trên các môi trường khác nhau (SH, MS, ½ MS, WPM và B5) sau 12 tuần nuôi cấy (Bảng 3.10).

Tất cả các phôi soma sơ cấp nuôi cấy trong các môi trường khoáng khác nhau SH; MS; ½ MS; WPM hoặc B5 bổ sung 1,0 mg/L 2,4-D, 30 g/L sucrose và 8,0 g/L agar đều cảm ứng phát sinh phôi soma thứ cấp. Sau 8 tuần nuôi cấy, phôi soma thứ cấp được cảm ứng trên bề mặt phôi soma sơ cấp, có dạng hình cầu và phân bố ở vị trí đầu và thân phôi. Sau đó, các phôi soma thứ cấp tăng sinh tạo thành các cụm phôi soma với các giai đoạn phát triển khác nhau sau 12 tuần nuôi cấy (Hình 3.14). Số phôi soma thứ cấp (39,20 phôi/mẫu), khối lượng tươi (1005,34 mg) và khối lượng khô (77,90 mg) cao nhất được ghi nhận khi mẫu phôi soma sơ cấp nuôi cấy trên môi trường ½ MS sau 12 tuần nuôi cấy. Đồng thời, các phôi soma thứ cấp hình thành trong môi trường ½ MS chủ yếu ở dạng có lá mầm. 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.

Hàm lượng dinh dưỡng khoáng trong môi trường nuôi cấy thiếu hay dư thừa đều có tác động tiêu cực đến sự tăng trưởng tiếp theo của phôi soma. Kết quả nghiên cứu cho thấy môi trường MS cho hiệu quả phát sinh phôi soma thứ cấp cao nhất so với các môi trường SH, WPM và B5 thể hiện các chỉ tiêu theo dõi bao gồm số lượng phôi soma thứ cấp, khối lượng tươi, khối lượng khô (Bảng 3.10). Ngoài ra, sự khác biệt về hàm lượng dinh dưỡng khoáng sẵn có trong môi trường phù hợp cho hoạt động trao đổi chất bên trong tế bào, dẫn đến sự tăng sinh phôi soma thứ cấp.

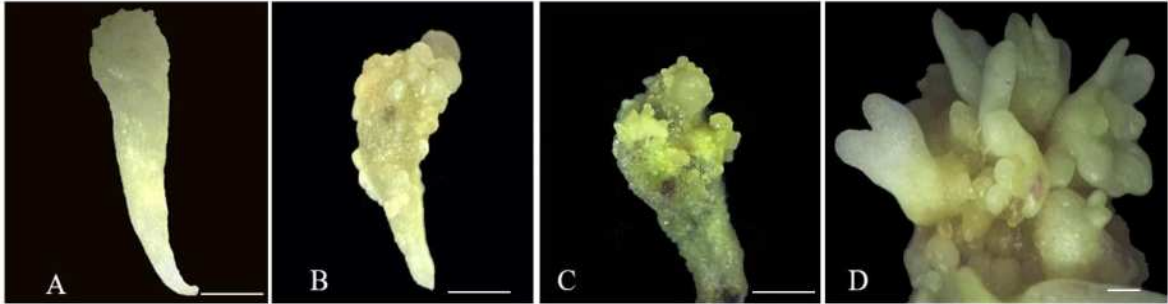
Bảng 3.10. Ảnh hưởng của môi trường khoáng đến sự phát sinh phôi soma thứ cấp sau 12 tuần nuôi cấy

Môi trường	Số lượng phôi soma thứ cấp	Khối lượng tươi (mg)	Khối lượng khô (mg)	Đặc điểm phôi soma thứ cấp
SH	17,70 ± 0,75 ^d	99,90 ± 4,90 ^d	18,95 ± 1,09 ^c	Phôi soma thứ cấp bao gồm các giai đoạn phát triển hình cầu, tim, thủy lồi và lá mầm. phôi soma thứ cấp chủ yếu ở giai đoạn hình cầu và thủy lồi
MS	30,30 ± 3,83 ^b	499,15 ± 25,87 ^b	54,62 ± 3,48 ^b	Phôi soma thứ cấp bao gồm các giai đoạn phát triển hình cầu, tim, thủy lồi và lá mầm mầm với bề mặt trơn nhẵn và tách biệt khỏi nhau. Các phôi soma chủ yếu ở dạng lá mầm
½ MS	39,20 ± 1,52 ^a	1005,34 ± 89,31 ^a	77,90 ± 9,82 ^a	Phôi soma thứ cấp bao gồm các giai đoạn phát triển hình cầu, tim, thủy lồi và lá mầm với bề mặt trơn nhẵn và tách biệt khỏi nhau. Các phôi soma chủ yếu ở dạng lá mầm
WPM	22,90 ± 2,26 ^c	425,75 ± 31,53 ^c	51,04 ± 8,80 ^b	Phôi soma thứ cấp bao gồm các giai đoạn phát triển hình cầu, tim, thủy lồi và lá mầm. Phôi soma thứ cấp chủ yếu ở giai đoạn hình cầu và thủy lồi
B5	22,10 ± 1,78 ^c	101,25 ± 2,27 ^d	17,38 ± 1,29 ^c	Phôi soma thứ cấp bao gồm các giai đoạn phát triển hình cầu, tim, thủy lồi và lá mầm. Phôi soma thứ cấp chủ yếu ở giai đoạn hình cầu

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). Giá trị thể hiện trong bảng là giá trị trung bình ± SD (độ lệch chuẩn).

Mặt khác, hàm lượng khoáng trong môi trường MS giảm xuống 1/2 MS (hàm lượng khoáng đa lượng giảm đi một nửa) thì số phôi soma tạo thành tăng lên (từ 30,30 phôi tăng đến 39,20 phôi), khối lượng tươi cũng tăng lên gấp 2 lần (từ 499,15 mg tăng lên 1005,34 mg). Kết quả tương tự cũng được ghi nhận trong nuôi cấy phát sinh

phôi soma *Anthurium andraeanum*, giảm hàm lượng NH_4NO_3 trong môi trường MS hoặc giảm hàm lượng khoáng đa lượng trong môi trường MS xuống 1/8 MS có tác dụng kích thích sự phát sinh phôi soma [232]. Như vậy, hiện tượng stress gây ra do thiếu dinh dưỡng trong môi trường có thể cũng là một trong những tác nhân kích thích sự cảm ứng phát sinh phôi soma thứ cấp hiệu quả hơn.



Hình 3.16. Sự phát sinh phôi soma sâm Lang Bian. A. Phôi soma sơ cấp (Thước đo: 1 mm). B. Phôi soma thứ cấp ở giai đoạn hình cầu có nguồn gốc từ phôi soma sơ cấp (Thước đo: 1 mm). C. Sự tăng trưởng của phôi soma thứ cấp (Thước đo: 1 mm). D. Phôi soma thứ cấp ở các giai đoạn phát triển khác nhau (Thước đo: 2 mm).

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

Kết quả nghiên cứu cho thấy hàm lượng đường sucrose khác nhau (0 ; 10 ; 20 ; 30 ; 40 và 50 g/L) có ảnh hưởng rất lớn đến sự phát sinh phôi soma thứ cấp từ phôi soma sơ cấp sâm Lang Bian sau 12 tuần nuôi cấy (Bảng 3.11). Tỷ lệ mẫu phát sinh phôi soma thứ cấp đạt được 100% sau 12 tuần nuôi cấy trong các nghiệm thức môi trường ½ MS có bổ sung 1 mg/L 2,4-D, 8 g/L agar, 20 – 50 g/L đường sucrose; trong khi đó, môi trường không bổ sung đường sucrose, tỷ lệ mẫu tạo phôi soma thứ cấp chỉ đạt 43,33%, mẫu chủ yếu hình thành mô sẹo có màu nâu sậm.

Số phôi soma thứ cấp (47,40 phôi/mẫu), 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 sucrose sau 12 tuần nuôi cấy. Trong môi trường không bổ sung đường sucrose vẫn ghi nhận được sự hình thành phôi soma thứ cấp, tuy nhiên, số lượng phôi soma thứ cấp hình thành, khối lượng tươi và khối lượng khô tương ứng chỉ đạt 9,93 phôi/mẫu; 152,25 mg và 9,75 mg).

Ngoài ra, hàm lượng đường sucrose được bổ sung vào trong môi trường nuôi cấy ảnh hưởng rất lớn đến sự phát triển tiếp theo của phôi soma thứ cấp. Trong cùng một mẫu có thể quan sát các giai đoạn phát triển phôi soma khác nhau (Hình 3.17). Số lượng phôi soma ở các giai đoạn khác nhau thay đổi tùy thuộc vào hàm lượng đường sucrose bổ sung vào môi trường nuôi cấy. Trong môi trường đối chứng không

bổ sung đường sucrose, phôi soma thứ cấp được hình thành chủ yếu dạng hình cầu, hầu hết phôi soma trong nghiệm thức này đều ở trạng thái chưa trưởng thành và chúng 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 sucrose cho tỷ lệ phôi soma ở các giai đoạn hình thủy lồi và có lá mầm cao hơn (79,48%). Tuy nhiên, trong trường hợp tiếp tục gia tăng hàm lượng đường sucrose thì tỷ lệ phôi soma dạng thủy lồi và dạng có lá mầm giảm xuống. Tỷ lệ phôi soma trưởng thành (giai đoạn thủy lồi và lá mầm) trong môi trường bổ sung 50 g/L sucrose chỉ còn tương ứng 31,56% phôi soma hình thủy lồi và 23,40% phôi soma có lá mầm (Hình 3.17).

Bảng 3.11. Ảnh hưởng của hàm lượng đường sucrose đến sự phát sinh phôi soma thứ cấp sau 12 tuần nuôi cấy

Hàm lượng đường sucrose (g/L)	Tỷ lệ mẫu phát sinh phôi soma thứ cấp (%)	Số lượng phôi soma thứ cấp	Khối lượng tươi (mg/mẫu)	Khối lượng khô (mg/mẫu)
0	43,33 ± 9,13 ^c	9,93 ± 0,95 ^f	152,25 ± 39,39 ^e	9,75 ± 0,62 ^e
10	76,67 ± 9,12 ^b	20,10 ± 1,37 ^e	324,12 ± 67,31 ^d	23,43 ± 3,13 ^d
20	100 ± 0,00 ^a	30,78 ± 1,78 ^c	693,55 ± 107,53 ^b	52,54 ± 3,29 ^{bc}
30	100 ± 0,00 ^a	36,20 ± 3,17 ^b	799,53 ± 75,85 ^b	62,99 ± 5,46 ^b
40	100 ± 0,00 ^a	46,97 ± 4,04 ^a	1062,29 ± 116,57 ^a	82,77 ± 3,70 ^a
50	100 ± 0,00 ^a	25,03 ± 3,56 ^d	493,70 ± 163,89 ^c	50,13 ± 4,09 ^c

Ghi chú: Đối chứng là môi trường MS bổ sung 1 mg/L 2,4-D, 8 g/L agar và không bổ sung đường. 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). Giá trị thể hiện trong bảng là giá trị trung bình ± SD (độ lệch chuẩn).

Đường đóng vai trò quan trọng cung cấp năng lượng, xây dựng các đại phân tử sinh học và điều chỉnh thẩm thấu của môi trường nuôi cấy. Các nghiên cứu trước đây cho rằng việc bổ sung đường vào môi trường nuôi cấy gây ra những stress kích hoạt quá trình tạo phôi từ tế bào soma. Do đó, việc thay đổi hàm lượng đường sẽ tác động đến hiệu quả cảm ứng phát sinh phôi soma [233]. Hàm lượng đường phù hợp

cho sự phát sinh phôi soma *Pinus radiata* nằm trong khoảng 10 – 30 g/L [234], 17 g/L đối với *Picea omorika* [235].

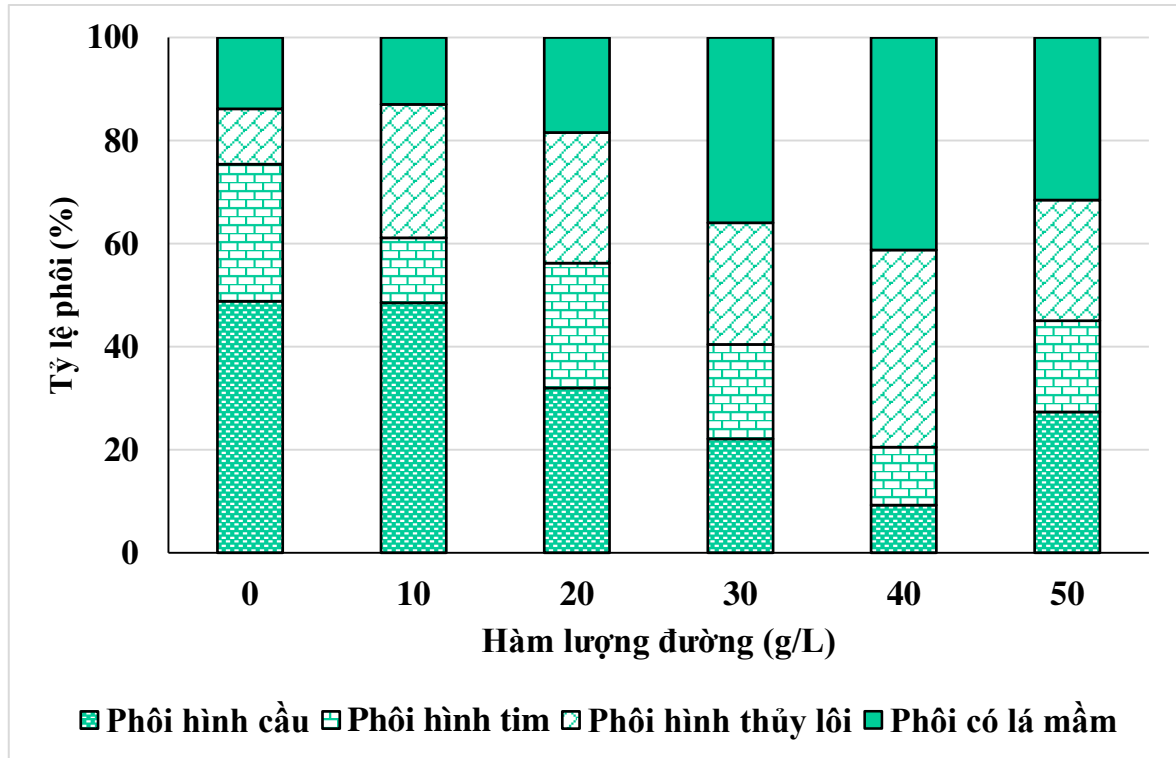
Nhut và cộng sự (2012) cho rằng đường ở hàm lượng thấp làm giảm khả năng phát sinh phôi soma ở sâm Ngọc Linh. Trong các loại đường được sử dụng thì sucrose có tác dụng phát sinh phôi soma tốt hơn so với glucose và fructose và hàm lượng đường sucrose tối ưu nhất cho sự phát sinh phôi soma là 50 g/L [93]. Một số nghiên cứu trên đối tượng khác cũng cho rằng sucrose là lựa chọn tốt nhất cho sự phát sinh phôi soma [122]. Theo Blanc và cộng sự (2002), sucrose thủy phân thành hexose và các hợp chất dự trữ nhanh hơn các nguồn carbon khác, điều này có thể thúc đẩy sự tăng sinh tế bào [236].

Tác động tiêu cực của nồng độ đường sucrose quá cao cũng đã được báo cáo ở các loài thực vật khác như *Paeonia sect. Moutan*, *Euonymus alatus* [57, 237]. Ngược lại, ở *P. quinquefolius*, loài có họ hàng gần với *P. ginseng*, tỷ lệ tạo phôi soma cao nhất ở mức 70 g/L sucrose [69]. Đối với sâm Lang Bian, khả năng phát sinh phôi soma thứ cấp cao nhất thể hiện qua các chỉ tiêu theo dõi như tỷ lệ mẫu phát sinh phôi soma, số phôi soma hình thành cũng như số lượng phôi soma ở giai đoạn thủy lồi và có lá mầm ở hàm lượng đường bổ sung 40 g/L. Vì vậy, nhu cầu về hàm lượng đường tối ưu có thể thay đổi phụ thuộc vào loài.

Song song với vai trò thẩm thấu, đường có thể ảnh hưởng đến sự thành thực phôi soma thông qua tác động đến sự thay đổi hàm lượng ABA nội sinh của mô hoặc tích lũy tinh bột [235]. Sự thành thực của phôi soma là một trong những trở ngại lớn cho quá trình tạo phôi soma ở các loài thực vật khác nhau khi sự phát triển bị dừng lại ở giai đoạn hình cầu. Sự thành thực của phôi soma là điều cần thiết để tái sinh thực vật thành công.

Trong nghiên cứu này, hàm lượng đường sucrose trong môi trường ảnh hưởng đến sự phát triển của phôi soma (Hình 3.15). Ở nghiệm thức đối chứng và bổ sung đường sucrose ở hàm lượng 10 – 20 g/L, tỷ lệ phôi soma hình cầu chiếm tỷ lệ cao. Tuy nhiên, 30 – 40 g/L sucrose đã thúc đẩy quá trình chuyển phôi soma chưa trưởng thành sang giai đoạn trưởng thành, tỷ lệ phôi soma ở giai đoạn hình thủy lồi và có lá mầm tăng lên. Kim và cộng sự (2012) cho rằng nhiều phôi soma *P. ginseng* đã chuyển từ giai đoạn hình cầu sang giai đoạn lá mầm khi được nuôi cấy trong môi trường có bổ sung 2% sucrose [12]. Những kết quả này cho thấy, việc tăng nồng độ sucrose đã cải thiện sự trưởng thành của phôi soma.

Thông thường ở giai đoạn trưởng thành của phôi soma, nồng độ đường cao hơn là cần thiết để ức chế sự nảy mầm sớm của phôi soma, nhưng nồng độ đường quá cao có thể cản trở sự phát triển của phôi soma. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng cho thấy, việc sử dụng đường sucrose ở hàm lượng 50 g/L ảnh hưởng tiêu cực đến sự phát sinh phôi soma thứ cấp và trưởng thành phôi soma (tỷ lệ phôi soma ở giai đoạn hình thủy lồi và có lá mầm thấp hơn). Kết quả tương tự cũng được ghi nhận trên một số đối tượng thực vật như *Picea pungens*, các loài vân sam khác [235].



Hình 3.17. Ảnh hưởng của hàm lượng đường sucrose đến sự phát sinh phôi soma thứ cấp ở các giai đoạn khác nhau sau 12 tuần nuôi cấy

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

Nhiều nghiên cứu đã chứng minh, nước dừa có hiệu quả gia tăng sinh khối mô sẹo có khả năng phát sinh phôi soma cũng như cải thiện sự phát sinh, phát triển phôi soma của mẫu nuôi cấy [114]. Các phôi soma sâm Lang Bian được nuôi cấy trong môi trường $\frac{1}{2}$ MS bổ sung 1,0 mg/L 2,4-D, 40 g/L đường sucrose, 8,0 g/L agar và nước dừa ở hàm lượng khác nhau. Kết quả nghiên cứu cho thấy tất cả các mẫu được nuôi cấy trong các nghiệm thức đối chứng (không bổ sung nước dừa) và bổ sung nước dừa đều phát sinh phôi soma thứ cấp sau 12 tuần nuôi cấy. Tuy nhiên, hàm lượng nước dừa ảnh hưởng rất lớn đến số lượng phôi soma tạo thành cũng như khối lượng tươi, khối lượng khô (Bảng 3.12). Số lượng phôi soma hình thành tăng từ 61,80 phôi/mẫu lên 115,00 phôi/mẫu khi hàm lượng nước dừa bổ sung vào môi trường nuôi

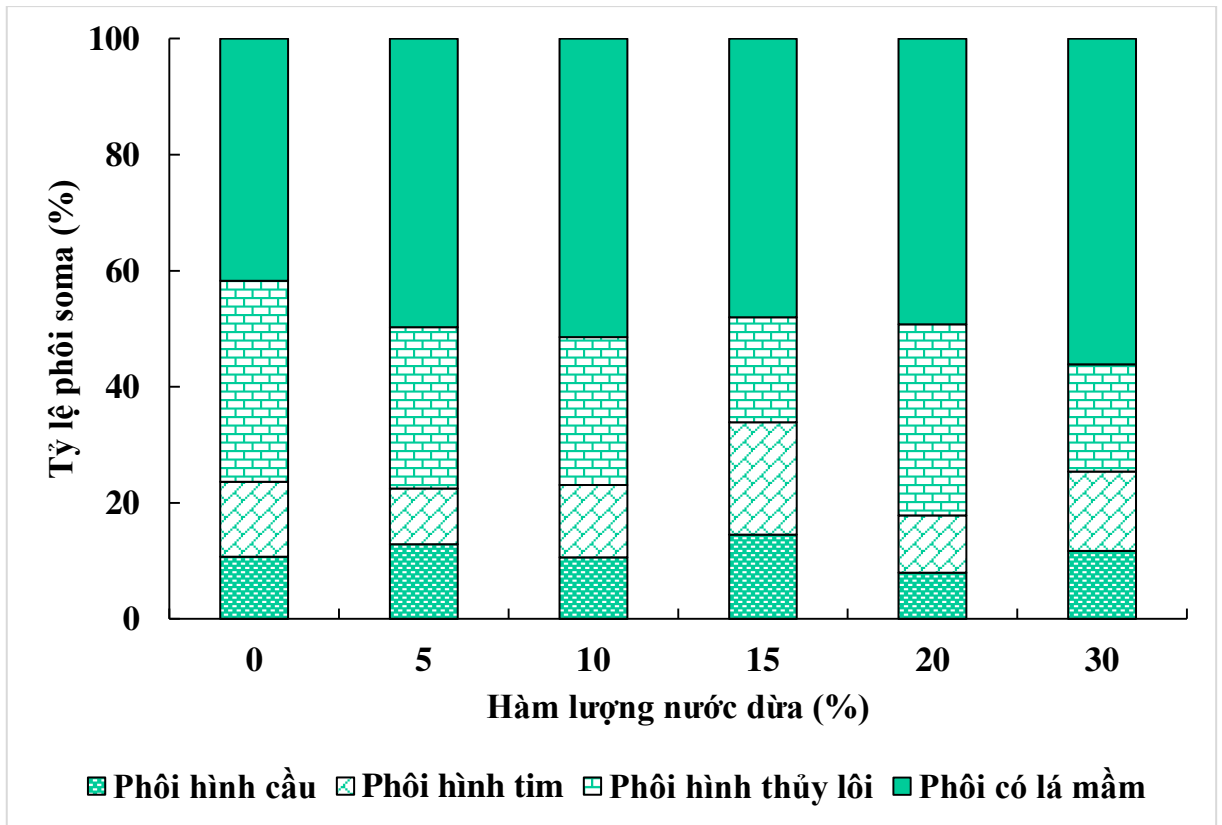
cây tăng từ 5% đến 15% và giảm ở nồng độ từ 20 – 30%. Số lượng phôi soma cao nhất thu được trong môi trường bổ sung 15% nước dừa (115,00 phôi/mẫu) tiếp theo là 10% (77,80 phôi/mẫu), số lượng phôi soma thấp nhất ở các nghiệm thức không bổ sung và bổ sung 30% nước dừa (trương ứng 44,00 và 42,44 phôi/mẫu). Khối lượng tươi và khối lượng khô cao nhất tương ứng là 1954,40 mg và 144,40 mg khi mẫu được nuôi cấy trong môi trường bổ sung 15% nước dừa, tiếp đó là 10 và 20% và thấp nhất là môi trường đối chứng và bổ sung 30% nước dừa.

Bảng 3.12. Ảnh hưởng của hàm lượng nước dừa đến sự phát sinh phôi soma thứ cấp sau 12 tuần nuôi cấy

Hàm lượng nước dừa (%)	Tỷ lệ mẫu phát sinh phôi soma thứ cấp (%)	Số lượng phôi soma thứ cấp	Khối lượng tươi (mg/mẫu)	Khối lượng khô (mg/mẫu)
0	100	44,00 ± 2,80 ^d	936,00 ± 89,43 ^d	74,63 ± 1,36 ^d
5	100	61,80 ± 3,66 ^c	1119,10 ± 66,28 ^c	94,17 ± 5,37 ^c
10	100	77,80 ± 6,68 ^b	1302,30 ± 75,37 ^b	109,50 ± 5,51 ^b
15	100	115,00 ± 7,78 ^a	1954,40 ± 67,33 ^a	144,40 ± 4,22 ^a
20	100	65,00 ± 7,31 ^c	1201,00 ± 91,58 ^c	107,50 ± 5,49 ^b
30	100	42,44 ± 1,29 ^d	841,40 ± 63,90 ^d	68,00 ± 3,16 ^e

Ghi chú: *Đối chứng là môi trường MS bổ sung 1 mg/L 2,4-D, 40 g/L đường sucrose, 8 g/L agar và không bổ sung nước dừa. 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). Giá trị thể hiện trong bảng là giá trị trung bình ±SD (độ lệch chuẩn).*

Phôi soma ở các giai đoạn phát triển khác nhau bao gồm phôi soma hình cầu, tim, thủy lôi và có lá mầm được ghi nhận ở các mẫu được nuôi cấy trong môi trường đối chứng và bổ sung nước dừa. Tuy nhiên, nước dừa còn ảnh hưởng đến sự phát triển của phôi soma thể hiện qua tỷ lệ phôi soma thu nhận được ở giai đoạn khác nhau. Phôi soma ở giai đoạn có lá mầm chiếm tỷ lệ cao hơn so với giai đoạn hình cầu và tim ở các nghiệm thức bổ sung nước dừa (Hình 3.18).



Hình 3.18. Ảnh hưởng của hàm lượng nước dưa đến sự phát sinh phôi soma thứ cấp ở các giai đoạn khác nhau sau 12 tuần nuôi cấy

Nước dưa chứa một số hợp chất hữu cơ và chất dinh dưỡng khoáng cũng như phytohormone bao gồm auxin, cytokinin, gibberellin và acid abscisic [238]. Farhatullah và cộng sự (2007) cũng đã báo cáo rằng nước dưa có chứa Gibberellin-1 (16,7nM), Gibberellin-3 (37,8 nM) được sử dụng trong môi trường nuôi cấy *in vitro* có hiệu quả trong sự tăng sinh mẫu cấy [239]. Ngoài ra, sự hiện diện của cytokinin trong nước dưa đóng vai trò quan trọng trong sự phân chia tế bào, từ đó giúp cho mẫu cấy tăng trưởng.

Bên cạnh đó, thành phần các chất có trong nước dưa, đặc biệt là các hormone tự nhiên có thể tương tác với các hormone nội sinh bên trong mẫu và hormone bổ sung trong môi trường nuôi cấy tác động kích thích sự phân chia tế bào. Các tế bào này sau đó trải qua một loạt các thay đổi về hình thái và sinh hóa và cuối cùng hình thành phôi soma [240].

Hàm lượng nước dưa tối ưu thay đổi tùy thuộc vào từng đối tượng thực vật khác nhau. Trong nghiên cứu nuôi cấy phôi soma cây cọ dừa (*Phoenix dactylifera* L.), Al-Khayri (2010) cho rằng nước dưa có ảnh hưởng tích cực đến sự phát sinh phôi soma của mẫu cấy. Sự phát sinh phôi soma được cải thiện ngay cả ở hàm lượng nước dưa thấp (5%), khả năng phát sinh phôi soma gia tăng khi hàm lượng nước dưa tăng

lên và đạt giá trị cao nhất ở 10 - 15%. Tuy nhiên, hàm lượng nước dừa tăng lên 20% gây ra sự ức chế phát sinh phôi soma. Ngoài ra, thời gian phát sinh phôi soma cũng giảm xuống 30% khi mẫu được cấy trong môi trường bổ sung nước dừa so với đối chứng. Sau 12 tuần nuôi cấy ở nghiệm thức bổ sung 10 và 15 % nước dừa khoảng 90% mẫu phát sinh phôi soma so với 28% trong môi trường đối chứng. Cũng trong nghiên cứu này nước dừa được sử dụng trong giai đoạn nảy mầm có thể ảnh hưởng đến sự phát triển phôi soma và tạo cây hoàn chỉnh [241].

Kết quả tương tự cũng được ghi nhận trong nuôi cấy *Cymbopogon pendulus*, bổ sung nước dừa vào môi trường có tác dụng cải thiện cảm ứng tạo mô sẹo và phát sinh phôi soma [242]. Trong nuôi cấy *Citrullus lanatus* và *Ananas comosus*, 10% nước dừa cho hiệu quả phát sinh phôi soma tốt nhất [243]. Sự phát sinh phôi soma từ mô sẹo có nguồn gốc từ mẫu cấy lá *ex vitro* cây Đinh lăng lá xẻ nhỏ (*Polyscias fruticosa* L. Harms) tốt nhất trong môi trường MS có bổ sung 10% nước dừa kết hợp với 0,5 mg/L BA [244]. Tương tự, nước dừa có tác động tích cực đến khả năng phát sinh phôi soma thứ cấp ở sâm Ngọc Linh. Các lá mầm cắt ra từ phôi có lá mầm *in vitro* được nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung 10% nước dừa và kết hợp 0,2 mg/L IBA tạo mô sẹo sinh phôi và phôi soma [39]. Tuy nhiên, đối với cây chà là hàm lượng nước dừa 20% thích hợp cho sự tăng sinh mô sẹo có khả năng phát sinh phôi và hình thành phôi soma [114]. Khối lượng tươi, khối lượng khô và số lượng phôi soma hình cầu cao nhất đạt được lần lượt là 1,95 g, 0,48 g và 65 phôi. Đối với sâm Lang Bian, nước dừa có ảnh hưởng tích cực đến sự phát sinh và trưởng thành phôi soma thứ cấp từ các phôi soma sơ cấp. Sự phát sinh phôi soma thứ cấp đạt hiệu quả cao nhất trong môi trường ½ MS bổ sung 1,0 mg/L 2,4-D, 40 g/L đường sucrose, 8,0 g/L agar và 15% nước dừa.

3.4. 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*

3.4.1. Tạo cây sâm từ phôi soma thứ cấp

Thông thường, tỷ lệ sống sót của cây con chuyển từ ống nghiệm ra vườn ươm rất thấp vì chúng có bộ rễ kém phát triển và dễ bị nhiễm nấm sau khi chuyển ra đất. Do đó, nghiên cứu tạo củ cho cây con *in vitro* có nguồn gốc từ phôi soma trước khi chuyển ra vườn ươm giúp gia tăng tỷ lệ sống sót của cây con là cần thiết.

Kết quả nghiên cứu cho thấy, các cây con hình thành từ phôi soma thứ cấp và chồi bất định nuôi cấy trong môi trường SH bổ sung 0,5 mg/L BA, 0,5 mg/L NAA, 30g/L đường sucrose, 1,0 g/L than hoạt tính và 8,0 g/L agar 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 củ và rễ bất định (Bảng 3.19).



Hình 3.19. Sự hình thành thân rễ của cây con có nguồn gốc từ phôi soma thứ cấp sau 20 tuần nuôi cấy. Thước đo: 1 cm

Các cây con có nguồn gốc từ phôi soma thứ cấp có sự hình thành củ nhỏ, màu xanh ở phần gốc với tỷ lệ hình thành củ, đường kính củ và chiều dài củ đạt được lần lượt 63,34%, 0,65 cm và 1,27 cm sau 20 tuần nuôi cấy. Đối với cây hình thành từ chồi, sự hình thành mô sẹo được quan sát thấy ở phần gốc chồi, sau đó xuất hiện các rễ bất định màu trắng, mảnh và dài từ khối mô sẹo. Thêm vào đó, không có sự khác biệt về chiều dài rễ ghi nhận giữa hai nguồn mẫu cây, trong khi đó, số rễ bất định hình thành từ chồi (8,14 rễ/mẫu) nhiều hơn so với cây từ phôi soma thứ cấp (6,92 rễ/mẫu) (Bảng 3.13).

Các củ có vai trò là nguồn cung cấp dinh dưỡng cho cây khi chuyển ra trồng ở ngoài điều kiện tự nhiên [245]. Một số kết quả nghiên cứu hình thành thân rễ/củ *in vitro* cũng đã được ghi nhận ở *P. vietnamensis* [10], *P. ginseng* và *P. quinquefolius* [14], *P. ginseng* [15]. Kim và cộng sự (2019) cho rằng việc tạo củ của cây con lai giữa *P. ginseng* và *P. quinquefolius* cho phép chúng có thể thích ứng tốt hơn khi được chuyển ra ngoài vườn ươm với tỷ lệ sống sót lên đến 80% [14]. Tương tự, tỷ lệ sống sót của cây *P. vietnamensis* đã tạo củ đạt đến 93,65 % sau 1 năm trồng trong nhà kính. Như vậy, sự hình thành củ của cây con sâm Lang Bian là một trong những đặc điểm

hứa hẹn giúp cây gia tăng khả năng sống sót khi chuyển ra ngoài vườn ươm trong tương lai.

Bảng 3.13. Sự hình thành thân rễ và rễ bất định của cây con có nguồn gốc từ phôi soma thứ cấp và chồi bất định sau 20 tuần nuôi cấy

Nguồn gốc cây con	Thân rễ			Rễ bất định			Đặc điểm
	Tỷ lệ mẫu tạo thân rễ (%)	Đường kính thân rễ (cm)	Chiều dài thân rễ (cm)	Tỷ lệ mẫu tạo rễ bất định (%)	Số lượng rễ	Chiều dài rễ (cm)	
phôi soma thứ cấp	63,34 ± 6,67	0,65 ± 0,10	1,27 ± 0,12	100 ^{ns}	6,92 ± 0,97 ^b	1,53 ± 0,12 ^{ns}	Cây con hình thành củ màu xanh với các rễ bất định dài, mảnh, màu trắng
Chồi bất định	-	-	-	100	8,14 ± 0,84 ^a	1,59 ± 0,21	Cây con hình thành rễ bất định màu trắng, dài, mảnh. Mô sẹo hình thành ở gốc chồi, sau đó là sự hình thành rễ bất định từ mô sẹo

Ghi chú: Dấu “-“ thể hiện không ghi nhận sự hình thành thân rễ của chồi bất định. 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 $p < 0,05$ (kiểm định T-test). ns: thể hiện không có sự khác biệt mang ý nghĩa thống kê. Giá trị thể hiện trong bảng là giá trị trung bình ± SD (độ lệch chuẩn).

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

Thân rễ của cây con có nguồn gốc từ phôi soma thứ cấp và rễ bất định của cây con có nguồn gốc từ chồi bất định *in vitro* được sử dụng làm nguồn mẫu để xác định và so sánh hàm lượng một số saponin tích lũy. 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 $\mu\text{g/g}$) (Bảng 3.14, Hình 3.20).

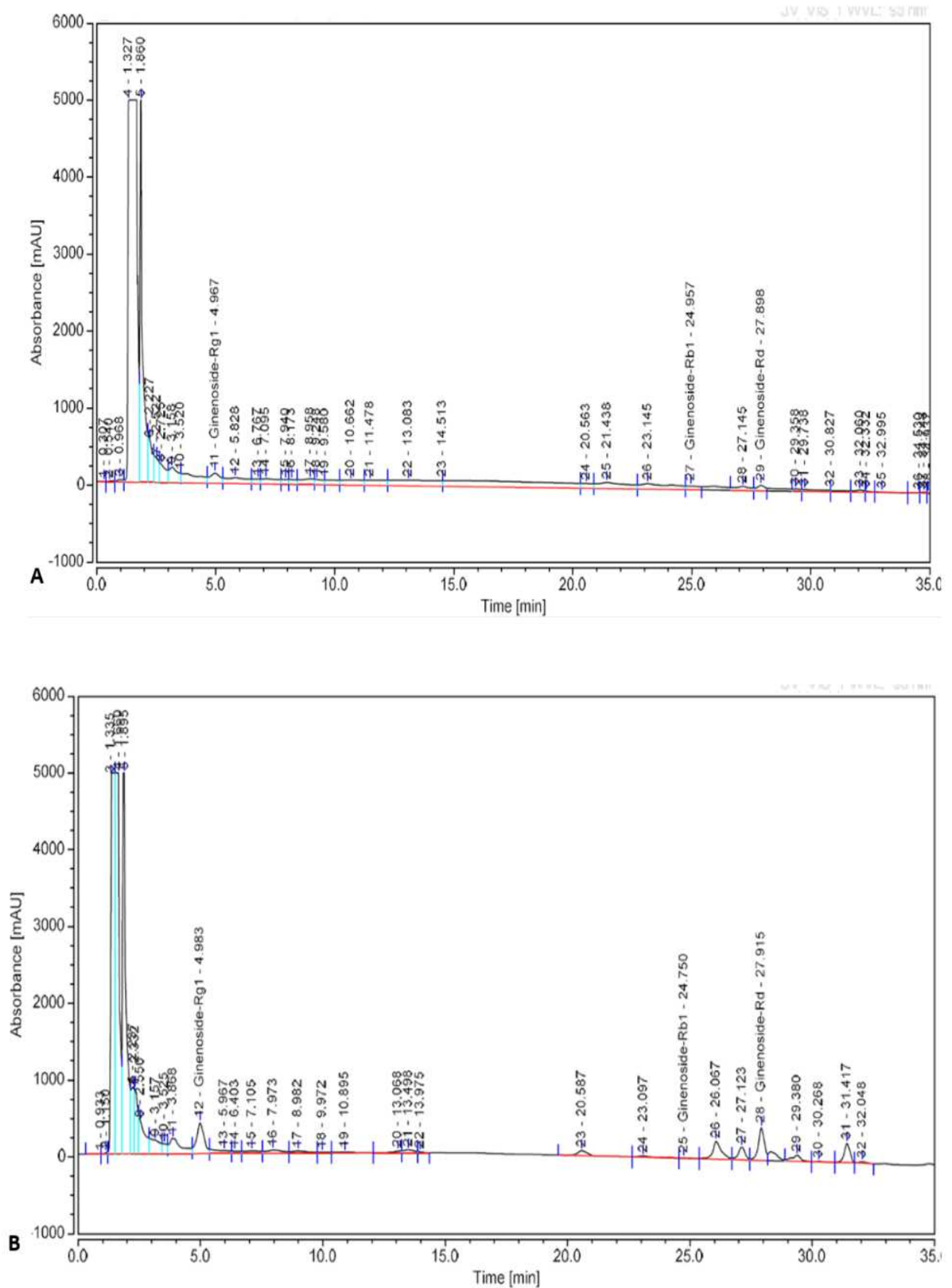
Các loài thuộc chi *Panax* đã được sử dụng rộng rãi ở Trung Quốc, Hàn Quốc, Việt Nam và các nơi khác trên thế giới với công dụng bồi bổ sức khỏe, tăng cường miễn dịch, chống stress, hỗ trợ điều trị tiểu đường và một số bệnh nan y [246]. Saponin được xem là thành phần hoạt chất chủ yếu của các loài sâm, trong đó, các saponin triterpene loại dammaran có vai trò quyết định cho giá trị dược liệu của sâm. Ginsenoside-Rb1, -Rb3, và -Rd là các đại diện chính cho nhóm saponin dẫn suất từ 20(S)-proto*Panaxadiol* (gồm 22 hợp chất); ginsenoside-Re, -Rg1, và notoginsenoside-R1 đại diện cho nhóm dẫn suất từ protopanaxatriol (gồm 17 hợp chất); còn majoside-R1 và -R2 đại diện cho nhóm có cấu trúc occotillol (gồm 11 hợp chất).

Bảng 3.14. Hàm lượng saponin trong thân rễ và rễ bất định sâm Lang Bian 20 tuần tuổi

Loại mẫu	Hàm lượng saponin ($\mu\text{g/g}$)			
	Rg1	Rd	Rb1	Rg1+Rd+Rb1
Thân rễ	703,38 \pm 78,34 ^a	770,67 \pm 57,56 ^a	174,81 \pm 43,15 ^a	1648,86 \pm 52,62 ^a
Rễ bất định	325,79 \pm 65,45 ^b	171,08 \pm 2,48 ^b	4,78 \pm 0,14 ^b	501,65 \pm 50,52 ^b

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 $p < 0,05$ (kiểm định T-test). Giá trị thể hiện trong bảng là giá trị trung bình \pm SD (độ lệch chuẩn).

Cây sâm có thể chứa nhiều loại saponin khác nhau và các cấu trúc này liên quan chặt chẽ với nhau. Sự đa dạng trong cấu trúc đã tạo nên một loạt các saponin khác nhau đang được khai thác và sử dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực như dược phẩm, thực phẩm và mỹ phẩm. Hiện nay, các nhà khoa học đã xác định được trên 50 loại saponin trong các loài *P. ginseng*, *P. notoginseng*, *P. quinquefolius* và *P. vietnamensis* [247].



Hình 3.20. Sắc ký đồ HPLC thể hiện hàm lượng ginsenoside trong rễ bất định (A) và thân rễ (B) sâm Lang Bian *in vitro*

Một số nghiên cứu về sự khác biệt hàm lượng saponin trong các bộ phận khác nhau của các loài thuộc chi *Panax* cũng đã được báo cáo. Phần dưới và phần trên mặt

đất có sự khác biệt về loại và hàm lượng saponin, saponin trong rễ đa dạng hơn so với lá [248]. Đối với sâm Ngọc Linh, phần rễ và thân rễ được coi là bộ phận chính sử dụng cho các mục đích y học, trong khi đó, phần lá và thân chỉ được sử dụng dưới dạng trà thảo mộc. Do đó, hầu hết các nghiên cứu về các thành phần hóa học và tác dụng dược lý đã được tập trung vào phần thân rễ của sâm Ngọc Linh. Năm mươi saponin triterpene loại dammarane bao gồm 26 hợp chất mới đã được báo cáo ở các bộ phận dưới mặt đất [22]. Bên cạnh đó, Le và cộng sự (2015) đã xác định được hàm lượng 17 saponin trong các bộ phận khác nhau của sâm Ngọc Linh. Hàm lượng saponin trong thân rễ, củ và rễ tương ứng là 195, 156 và 139 mg/g, rất cao so với các loài thuộc chi *Panax* khác [249].

Nhìn chung, qua kết quả phân tích định lượng mẫu thân rễ và rễ bất định sâm Lang Bian cho thấy có sự hiện diện của một số saponin chính bao gồm Rg1, Rd và Rb1 và đây là những loại saponin chính có giá trị dược liệu, có tiềm năng sử dụng trong y học. Trong đó, hàm lượng saponin của thân rễ cao hơn so với rễ bất định. Như vậy, các cây con có nguồn gốc từ phôi soma không những có khả năng hình thành thân rễ hứa hẹn gia tăng tỷ lệ sống sót khi chuyển ra vườn ươm mà còn tích lũy được hàm lượng một số loại saponin cao hơn so với cây con có nguồn gốc từ chồi bất định. Do đó, nuôi cấy phôi soma là một phương pháp đầy hứa hẹn để nhân giống sâm Lang Bian, góp phần giải quyết tình trạng khan hiếm giống hiện nay.

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

Việc sử dụng các hạt nano trong nuôi cấy mô thực vật đã thu hút được sự chú ý đáng kể trong những năm gần đây. Các hạt nano, chủ yếu là AgNPs, đã được báo cáo có tác dụng tăng cường sự tăng trưởng và phát triển của thực vật trong nuôi cấy mô. Nghiên cứu này cho thấy, việc sử dụng 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, 8,0 g/L agar và 1,2 mg/L AgNPs cho thấy tỷ lệ hình thành thân rễ được cải thiện so với đối chứng (không bổ sung AgNPs) (Bảng 3.15). Ngoài ra, bổ sung AgNPs vào môi trường còn giúp tăng tỷ lệ mẫu hình thành thân rễ và cải thiện chất lượng cây con so với nghiệm thức đối chứng (không bổ sung AgNPs). Cây con trên môi trường nuôi cấy bổ sung 1,2 mg/L AgNPs có màu xanh đậm, cứng cáp và phát triển tốt (Hình 3.21).

Bảng 3.15. Sự sinh trưởng tiếp theo của phôi soma thứ cấp sâm Lang Bian trong môi trường có bổ sung AgNPs sau 20 tuần nuôi cấy

Nghiệm thức	Tỷ lệ mẫu hình thành thân rễ (%)	Đường kính thân rễ (cm)	Chiều dài thân rễ (cm)
Đối chứng	47,78 ± 1,92 ^b	0,42 ± 0,03 ^b	1,20 ± 0,02 ^b
1,2 mg/L AgNPs	85,56 ± 1,93 ^a	1,14 ± 0,03 ^a	2,05 ± 0,05 ^a

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 $p < 0,05$ (kiểm định T-test). Giá trị thể hiện trong bảng là giá trị trung bình ± SD (độ lệch chuẩn)



Hình 3.21. Hình thái cây con có nguồn gốc từ phôi soma nuôi cấy trong môi trường không bổ sung (Đối chứng) hoặc có bổ sung 1,2 mg/L AgNPs sau 20 tuần nuôi cấy. Thước đo: 1 cm.

Sau khi được hấp thụ vào bên trong tế bào, AgNPs được tích tụ trong thành tế bào, nguyên sinh chất, ty thể, không bào và lục lạp. Ở đây, AgNPs có tác dụng kích thích sự sinh trưởng, phát triển của thực vật thông qua các tác động đến sự sinh tổng

hợp và phản ứng của các hormone thực vật, tổng hợp ROS, phân chia tế bào và con đường chuyển hóa năng lượng [250].

Hormone đóng vai trò quan trọng trong sự sinh trưởng và phát triển của thực vật. AgNPs ảnh hưởng đến sự sinh trưởng và phát triển của thực vật bằng cách điều chỉnh quá trình sinh tổng hợp hoặc tác động đến các con đường truyền tín hiệu của các hormone như auxin, ethylene và acid salicylic [250]. AgNPs không chỉ ức chế quá trình sinh tổng hợp mà còn tác động đến phản ứng của ethylene đối với thực vật. Syu và cộng sự (2014) đã phân tích mức độ phiên mã của các gen liên quan đến quá trình sinh tổng hợp ethylene và phát hiện ra rằng biểu hiện của các gen mã hóa hai enzyme ACC (1-aminocyclopropanecarboxylic acid) synthase 7 (ACS7) và ACC oxidase 2 (ACO2) bị giảm xuống [251]. Như vậy, AgNP có thể thúc đẩy sự tăng trưởng và phát triển của thực vật bằng cách ức chế quá trình sinh tổng hợp ethylene. Ngoài ra, AgNPs còn tham gia vào quá trình tổng hợp và vận chuyển auxin. AgNP gián tiếp ức chế sự tích tụ auxin ở chóp rễ *Arabidopsis*, thông qua đó ức chế tín hiệu ethylene [252].

Bên cạnh đó, AgNPs còn tác động đến sự tổng hợp ROS trong tế bào. ROS đóng vai trò quan trọng trong việc duy trì sự sinh trưởng và phát triển bình thường của thực vật. Dưới một ngưỡng nhất định, stress oxy hóa có thể thúc đẩy sự tăng trưởng của thực vật. Xu và cộng sự (2017) cho rằng acid salicylic ức chế sự biểu hiện của các gen liên quan đến việc làm sạch ROS, làm tăng hàm lượng ROS và thúc đẩy hoạt động của mô phân sinh rễ [253]. Kết quả tương tự cũng được công bố trong nghiên cứu nuôi cấy chồi *Withania coagulans*, AgNPs ở nồng độ thích hợp kích thích hình thành rễ và sinh trưởng chồi bằng cách điều chỉnh hệ thống chống oxy hóa trong điều kiện stress. Ngược lại, stress oxy hóa quá mức dẫn đến ức chế sự kéo dài rễ [254]. Như vậy, việc xử lý AgNPs ở nồng độ phù hợp tạo ra ROS ở mức thấp, thúc đẩy sự phân chia tế bào và sự phát triển của rễ. Trong khi đó, nồng độ AgNP quá cao tạo ra một lượng lớn ROS và ức chế sự phân chia tế bào. Do đó, AgNPs ở nồng độ thấp thúc đẩy sự phát triển của rễ bằng cách tạo ra sự tích tụ ROS ở nồng độ tối ưu, qua đó, làm gia tăng sự phân chia tế bào để thúc đẩy sự tăng trưởng của mô, tế bào thực vật. Trong khi đó, AgNPs ở nồng độ cao hơn tạo ra ROS dư thừa có thể làm giảm sự phân chia tế bào để ức chế sự phát triển của mẫu cấy.

Ngoài ra, AgNPs còn ảnh hưởng đến sự tăng trưởng của thực vật bằng cách thay đổi biểu hiện của các protein liên quan đến quá trình đường phân và chu trình acid tricarboxylic, đây là hai con đường quan trọng cho quá trình chuyển hóa năng lượng. AgNPs thúc đẩy quá trình oxy hóa pyruvate thành acetyl-CoA cung cấp cho

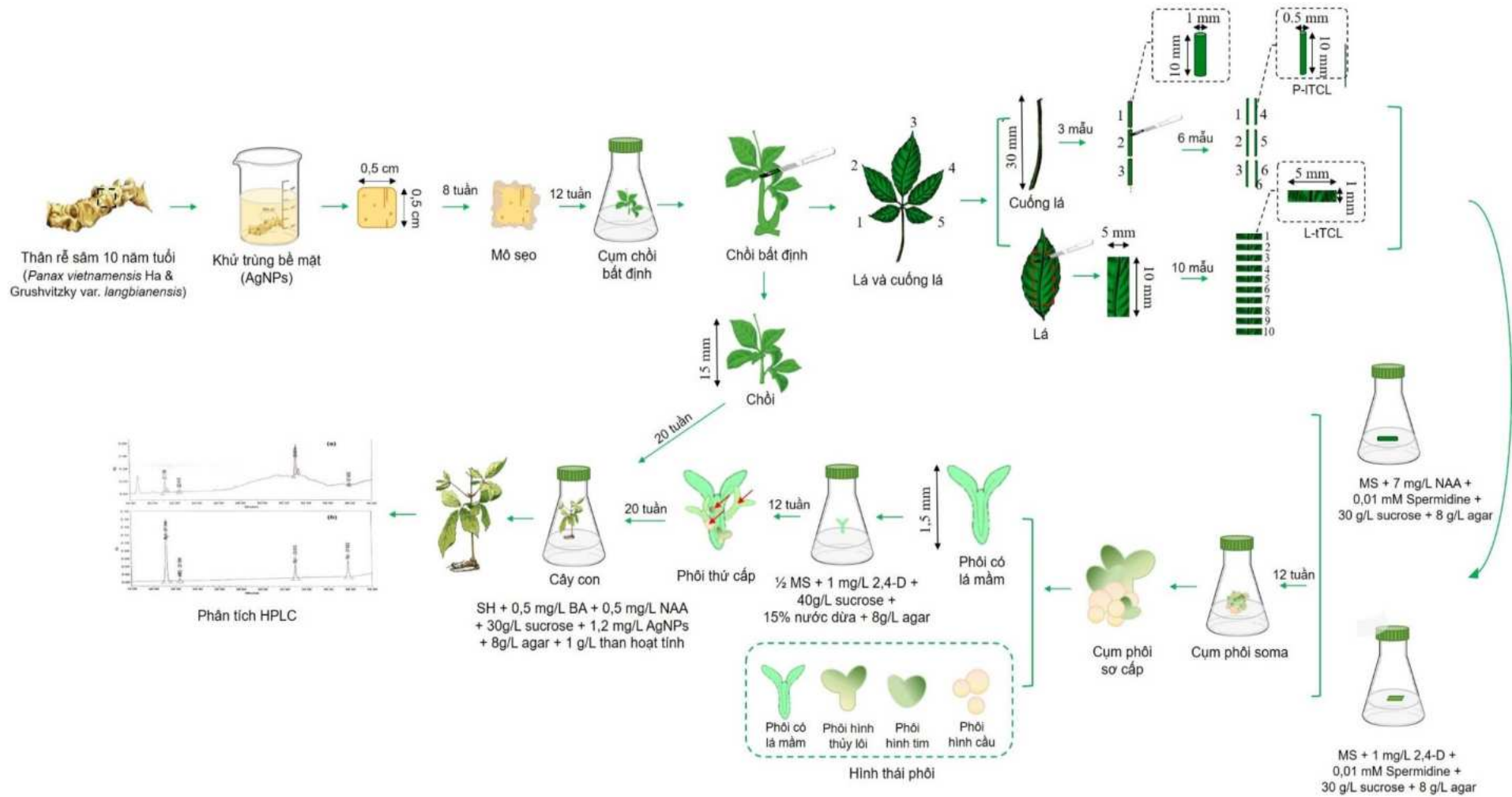
chu trình acid tricarboxylic để kích thích sự sinh trưởng và phát triển của thực vật, thông qua đó tác động đến nguồn cung cấp năng lượng cho tế bào [255]. Ở *Arabidopsis*, AgNPs thúc đẩy hoạt động của chu trình acid tricarboxylic và các con đường chuyển hóa đường để giải phóng nhiều năng lượng cung cấp cho hoạt động sống cho tế bào [256].

Sự hiện diện của AgNPs trong môi trường nuôi cấy đã được chứng minh có khả năng làm gia tăng sự phát sinh hình thái, sinh lý và sinh hóa của các loài thực vật khác nhau. Trong vi nhân giống *T. undulata*, 60 $\mu\text{g/L}$ AgNPs bổ sung trong môi trường nuôi cấy có tác dụng cải thiện chất lượng của cây con [257]. Cho đến nay, chỉ có một báo cáo về ảnh hưởng của AgNPs đến sự hình thành thân rễ sâm Ngọc Linh, Cuong và cộng sự (2021) cho rằng sự sinh trưởng của thân rễ sâm Ngọc Linh được cải thiện rõ rệt khi nuôi cấy trên môi trường có bổ sung 1,2 mg/L AgNPs [10]. Ngoài ra, sự có mặt của AgNPs còn giúp cải thiện các hiện tượng bất thường của sâm Ngọc Linh [10], dâu tây [152], hoa đồng tiền [258]. AgNPs được biết đến với vai trò điều hòa biểu hiện của gen *TuACS* - gen tổng hợp ACC (tiền chất cuối trong con đường tổng hợp ethylene), từ đó, giúp kìm hãm sự già hóa và gia tăng sự tăng trưởng của mẫu cấy. Đồng thời, chúng cũng có vai trò ức chế quá trình sinh tổng hợp ethylene thông qua việc ức chế hoạt động của enzyme l-aminocyclo-propane carboxylic acid (enzyme ACC), giúp kiểm soát hiện tượng thủy tinh thể.

Hơn nữa, AgNPs đã được báo cáo giúp tăng cường tổng hợp các chất chuyển hóa thứ cấp trong thực vật. Các chất chuyển hóa thứ cấp này có vai trò thiết yếu trong cơ chế bảo vệ thực vật và sản xuất các chất hóa học thực vật có giá trị, chẳng hạn như flavonoid, alkaloid và các hợp chất phenolic. AgNPs có vai trò kích thích phản ứng stress ở thực vật, kích hoạt các con đường tín hiệu liên quan đến việc bảo vệ và thích nghi. Trong điều kiện stress, thực vật thường tăng cường tổng hợp các hợp chất thứ cấp như một cơ chế bảo vệ. Các hạt nano xâm nhập vào tế bào thực vật thông qua các cầu liên bào (plasmodesmata) và kích hoạt tín hiệu Ca^{2+} (thông qua việc làm gia tăng tạm thời hàm lượng calcium), kích hoạt tổng hợp các loại oxy hoạt hóa (ROS), hệ thống chống oxy hóa, protein kinase hoạt hóa mitogen (MAPK) bao gồm những protein kinase đặc hiệu liên quan đến việc đáp ứng của thực vật với các điều kiện bất lợi của môi trường. Dẫn đến tái lập trình phiên mã của quá trình trao đổi chất thứ cấp. Đồng thời, ROS cũng đóng vai trò như một phân tử truyền tín hiệu cho các PGRs như acid jasmonic, acid salicylic, ethylene, brassinosteroid có khả năng điều chỉnh các quá trình chuyển hóa thứ cấp [259]. Trong nuôi cấy mô sẹo *Phoenix dactylifera*, AgNP có tác dụng cải thiện sự tổng hợp phenol, tannin, flavonoid và tăng cường tích

lũy sinh khối, hàm lượng protein tổng số [260]. Cuong và cộng sự (2021) cũng cho thấy việc bổ sung AgNPs vào môi trường nuôi cấy giúp tăng cường đáng kể quá trình tổng hợp các hợp chất thứ cấp trong sâm Ngọc Linh [10].

Nhìn chung, việc sử dụng AgNPs trong nuôi cấy mô thực vật đã được chứng minh là có ảnh hưởng đáng kể đến sự tăng trưởng, phát triển và tổng hợp chất chuyển hóa thứ cấp của thực vật. Tuy nhiên, cần nghiên cứu thêm để hiểu đầy đủ các cơ chế liên quan đến việc tăng cường sự phát triển của thực vật và tổng hợp chất chuyển hóa thứ cấp dưới tác động của AgNPs.



Hình 3.22. Sơ đồ quá trình nuôi cấy phôi soma sâm Lang Bian *in vitro*

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

KẾT LUẬN

Nghiên cứu quá trình phát sinh phôi soma sơ cấp và thứ cấp sâm Lang Bian (*P. vietnamensis* var. *langbianensis*), một trong những cây dược liệu quý đặc hữu tại Lâm Đồng, Việt Nam thu nhận được những kết quả như sau:

1. Tạo nguồn mẫu *in vitro*

Hiệu quả khử trùng mẫu thân rễ tốt nhất trong dung dịch AgNPs ở nồng độ 0,15%. Các mẫu thân rễ sau khi khử trùng được nuôi cấy trong môi trường MS bổ sung 1,0 mg/L 2,4-D, 0,2 mg/L TDZ, 30 g/L đường sucrose, 8,0 g/L agar để tạo mô sẹo. Các mẫu mô sẹo kích thích tái sinh chồi bất định khi được cấy chuyển sang môi trường SH bổ sung 2 mg/L BA, 30 g/L đường sucrose, 8,0 g/L agar. Các chồi bất định tiếp tục được nhân nhanh trong môi trường SH có bổ sung 1 mg/L BA, 30 g/L đường sucrose, 8,0 g/L agar.

2. Phát sinh hình thái thông qua nuôi cấy TCL

NAA hoặc 2,4-D có tác dụng tích cực đến sự phát sinh phôi soma 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 phôi soma sơ cấp sâm Lang Bian. Trong đó, cả hai loại mẫu L-tTCL và P-ITCL có hiệu quả phát sinh phôi soma sơ cấp tốt nhất khi được nuôi cấy trong môi trường MS có bổ sung 7 mg/L NAA (đối với mẫu L-tTCL) hoặc 1 mg/L 2,4-D (đối với mẫu P-ITCL), 30 g/L sucrose, 8,0 g/L agar và 1,5 mg/L spermidine thông qua việc tăng cường tổng hợp các enzyme 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 GA₃ cao nhất trong giai đoạn cảm ứng phát sinh phôi soma sơ cấp ở cả hai loại mẫu cây 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. 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 này cũng khác nhau giữa mẫu L-tTCL và P-ITCL.

3. 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 lôi trên môi trường 1/2 MS bổ sung 1,0 mg/L 2,4-D, 40 g/L đường sucrose, 15 % nước dừa và 8,0 g/L agar.

4. 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 *in vitro* 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 có khả năng sinh trưởng và phát triển tốt, cây sinh trưởng khỏe mạnh, lá to, mở rộng, có hình thành thân rễ trong điều kiện *in vitro*, hứa hẹn gia tăng tỷ lệ sống sót khi chuyển cây ra trồng ở ngoài vườn ươm trong tương lai. 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. Đây là những loại saponin chính có giá trị dược liệu, có tiềm năng sử dụng trong y học.

KIẾN NGHỊ

Nghiên cứu đã xác định được một số yếu tố ảnh hưởng đến quá trình phát sinh phôi soma sâm Lang Bian và tạo được nguồn phôi soma cũng như cây con có nguồn gốc từ phôi soma *in vitro*, Chúng tôi đưa ra một số kiến nghị như sau:

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.

DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ

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, **2022**, Micropropagation of Lang Bian ginseng: an endemic medicinal plant, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 151:565–578. <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, **2023**, 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*, 163: 226-236. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2023.10.032>

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Zhang, H., Abid, S., Ahn, J.C., Mathiyalagan, R., Kim, Y.J., Yang, D.C., Wang, Y., 2020, Characteristics of *Panax ginseng* Cultivars in Korea and China, *Molecules*, 25, 2635.
2. Liu, L., Xu, F.R., Wang, Y.Z., 2020, Traditional uses, chemical diversity and biological activities of *Panax* L. (Araliaceae): A review, *Journal of Ethnopharmacology*, 263, 112792.
3. Wen, J., Krupnick, G., Esser, H.J., 2023, *Panaxsiamensis* J. Wen, a new species of the ginseng genus (*Panax*, Araliaceae) from northern Thailand, *PhytoKeys*, 234, pp. 51-59.
4. Xu, F., Valappil, A.K., Mathiyalagan, R., Tran, T.N.A., Ramadhania, Z.M., Awais, M., Yang, D.C., 2023, *In vitro* cultivation and ginsenosides accumulation in *Panax ginseng*: A review, *Plants*, 12, 3165.
5. Burkhart, E.P., Nilson, S.E., Pugh, C.V., Zuiderveen, G.H., 2021, Neither wild nor cultivated: American ginseng (*Panax quinquefolius* L.) seller surveys provide insights into in situ planting and husbandry, *Economic Botany*, 75(2), pp. 126-143.
6. Pais, M.S., 2019, Somatic embryogenesis induction in woody species: the future after OMICs data assessment, *Frontiers in Plant Science*, 10(240), pp. 1-18.
7. Zhang, J.Y., Sun, H.J., Song, I.J., Bae, T.W., Kang, H.G., Ko, S.M., Kwon, Y.I., Kim, I.W., Lee, J., Park, S.Y., Lim, P.O., Kim, Y.H., Lee, H.Y., 2014, Plant regeneration of Korean wild ginseng (*Panax ginseng* Meyer) mutant lines induced by γ -irradiation ((60)Co) of adventitious roots, *Journal of Ginseng Research*, 38(3), pp. 220-225.
8. Qiang, B., Miao, J., Phillips, N., Wei, K., Gao, Y., 2020, Recent advances in the tissue culture of American ginseng (*Panax quinquefolius*), *Chemistry and Biodiversity*, 17, e2000366.
9. You, X., Han, J., Choi, Y.E., 2007, Plant regeneration via direct somatic embryogenesis in *Panax japonicus*, *Plant Biotechnology Reports*, 1, pp. 5-9.
10. Cuong, D.M., Du, P.C., Tung, H.T., Ngan, H.T.M., Luan, V.Q., Phong, T.H., Khai, H.D., Phuong, T.T.B., Nhut, D.T., 2021, Silver nanoparticles as an effective stimulant in micropropagation of *Panax vietnamensis* - a valuable medicinal plant, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 146(3), pp. 577-588.
11. Keshvari, T., Najaphy, A., Kahrizi, D., Zebarjadi, A., 2018, Callus induction and somatic embryogenesis in *Stevia rebaudiana* Bertoni as a medicinal plant, *Cellular and Molecular Biology*, 64(2), pp. 46-49.
12. Kim, Y.J., Lee, O.R., Kim, K.T., Yang, D.C., 2012, High frequency of plant regeneration through cyclic secondary somatic embryogenesis in *Panax ginseng*, *Journal of Ginseng Research*, 36(4), pp. 442 - 448.
13. You, X.L., Tan, X., Dai, J.L., Li, Y.H., Choi, Y.E., 2012, Large-scale somatic embryogenesis and regeneration of *Panax notoginseng*, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 108(2), pp. 333-338.

14. Kim, J.Y., Adhikari, P.B., Ahn, C.H., Kim, D.H., Kim, Y.C., Han, J.Y., Kondeti, S., Choi, Y.E., 2019, High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration of interspecific ginseng hybrid between *Panax ginseng* and *Panax quinquefolius*, *Journal of Ginseng Research*, 43, pp. 38 - 48.
15. Lee, J.W., Do, G.R., Jo, I.H., Hong, C.E., Bang, K.H., Kim, J.U., Park, Y.D., 2021, Zygotic embryo culture is an efficient way to optimize *in vitro* growth in *Panax ginseng*, *Industrial Crops and Products*, 167, 113497.
16. Duy, N.V., Trieu, L.N., Chinh, N.D., Tran, V.T., 2016, A new variety of *Panax* (Araliaceae) from Lam Vien Plateau, Vietnam and its molecular evidence, *Phytotaxa*, 277(1), pp. 047-058.
17. Trieu, L.N., Duy, N.V., Tien, T.V., 2019, Genetic diversity of *Panax vietnamensis* var. *langbianensis* populations in Lam Vien plateau – Vietnam detected by inter simple sequence repeat (ISSR) markers, *Journal of Biotechnology*, 17(4), pp. 651-661.
18. Trương Thị Hồng Hải, Dương Thanh Thủy, Đặng Thanh Long, Hồ Thị Huyền Trân, Nguyễn Mạnh Tuấn, 2018, Đa dạng di truyền dựa trên đặc điểm hình thái của quần thể sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) ở Nam Trà My, Quảng nam, *Tạp chí Khoa học Đại học Huế: Khoa học Tự nhiên*, 127(1C), pp. 203-210.
19. Adil, M., Jeong, B.R., 2018, *In vitro* cultivation of *Panax ginseng* C.A. Meyer, *Industrial Crops and Products*, 122, pp. 239-251.
20. Đỗ Huy Bích, 2003, *Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam*, NXB Khoa học và Kỹ thuật Hà Nội. Tập II, 707 – 717.
21. Nguyen, T.H., Phuong, T.T., 2019, Vietnamese ginseng (*Panax vietnamensis* Ha and Grushv.): Phylogenetic, phytochemical, and pharmacological profiles, *Pharmacognosy Reviews*, 13(26), pp. 59-62.
22. Yamasaki, K., 2000, Bioactive saponins in Vietnamese ginseng, *Panax vietnamensis*, *Pharmaceutical biology*, 38(sup1), pp. 16-24.
23. Trong, T.T., Truong, D.H., Nguyen, H.C., Tran, D.T., Thi, H.T.N., Do Dang, G., Huu, H.N., 2017, Biomass accumulation of *Panax vietnamensis* in cell suspension cultures varies with addition of plant growth regulators and organic additives, *Asian Pacific journal of tropical medicine*, 10(9), pp. 907-915.
24. Jacques, P., Kevers, C., Gaspar, T., Dommes, J., Thonart, P., 2007, Conditioning *Panax vietnamensis* cell mass production in bioreactors, *Acta Botanica Gallica*, 154(1), pp. 21-26.
25. Nguyen, T.T., Nguyen, V.K., Paek, K.Y., 2007, Effecting of medium composition on biomass and ginsenoside production in cell suspension culture of *Panax vietnamensis* Ha et Grushv, *VNU Journal of Science: Natural Sciences and Technology*, 23(4), pp. 269-274.
26. Vũ Tuấn Anh, Chủ Văn Mến, 2015, Ảnh hưởng của thời gian và số lần cấy chuyển đến sự phát triển và hàm lượng hoạt chất của tế bào sâm Ngọc Linh, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam*, 2(8), pp. 36-38.

27. Nguyen, T.T., Ha, T.A., Paek, K.Y., 2008, Effects of macro elements on biomass and ginsenoside production in cell suspension culture of Ngọc Linh ginseng (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv), *VNU Journal of Science: Natural Sciences and Technology*, 24(3), pp. 248-252.
28. Ha, L.T., Pawlicki-Jullian, N., Pillon-Lequart, M., Boitel-Conti, M., Duong, H.X., Gontier, E., 2016, Hairy root cultures of *Panax vietnamensis*, a promising approach for the production of ocotillol-type ginsenosides, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 126, pp. 93-103.
29. Hà Thị Loan, Dương Hoa Xô, Nguyễn Quốc Bình, Nguyễn Hoàng Quân, Vũ Thị Đào, Pawlicki Julian Nathalie, Gontier Eric, 2014, Nghiên cứu tạo rễ tóc sâm Ngọc Linh *Panax vietnamensis* bằng phương pháp chuyển gen rol nhờ vi khuẩn *Agrobacterium rhizogenes*, *Tạp chí Công nghệ sinh học*, 36(1se), pp. 293-300.
30. Nhut, D.T., Duc, H.H., Hoang, N.H., Ngan, H.T.M., Diem, L.T., Tung, H.T., Khai, H.D., Mai, N.T.N., Cuong, D.M., Luan, V.Q., 2022, Efficient transgenic plantlet regeneration from hairy roots via somatic embryogenesis and hardening plantlets of *Panax vietnamensis* by iron nanoparticles-supplied culture, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 151(2), pp. 335-345.
31. Hồ Thanh Tâm, Nguyễn Bá Nam, Hoàng Xuân Chiến, Lê Kim Cương, Ngô Thanh Tài, Nguyễn Cường Việt, Nguyễn Phúc Huy, Trịnh Thị Hương, Trần Hiếu, 2015, Tối ưu hóa một số yếu tố môi trường và điều kiện nuôi cấy đến quá trình tái sinh rễ bất định từ lá sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.), *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 13(3), pp. 865-873.
32. Ket, N.V., Anh, T.T.L., Dung, N.H.U., 2012, Effecting of sucrose concentrations and inoculum density on adventitious root growth in cell suspension culture of *Panax vietnamensis* and initially growth in a bioreactor, *Southeast Asian Journal of Sciences*, 1(2), pp. 215-222.
33. Linh, N.T.N., Cuong, L.K., Tam, H.T., Tung, H.T., Luan, V.Q., Hien, V.T., Loc, N.H., Nhut, D.T., 2019, Improvement of bioactive saponin accumulation in adventitious root cultures of *Panax vietnamensis* via culture periods and elicitation, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 137(1), pp. 101-113.
34. Nhut, D.T., Huy, N.P., Luan, V.Q., Van Binh, N., Nam, N.B., Thuy, L.N.M., Ha, D.T.N., Chien, H.X., Huong, T.T., Cuong, H., 2011, Shoot regeneration and micropropagation of *Panax vietnamensis* Ha et Grushv. from *ex vitro* leaf-derived callus, *African Journal of Biotechnology*, 10(84), pp. 19499-19504.
35. Nhut, D.T., Huy, N.P., Tai, N.T., Nam, N.B., Luan, V.Q., Hien, V.T., Tung, H.T., Vinh, B.T., Luan, T.C., 2015, Light-emitting diodes and their potential in callus growth, plantlet development and saponin accumulation during somatic embryogenesis of *Panax vietnamensis* Ha et Grushv, *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 29(2), pp. 299-308.
36. Diem, L.T., Phong, T.H., Tung, H.T., Khai, H.D., Anh, T.T.L., Mai, N.T.N., Luan, V.Q., Que, T., Phuong, H.T.N., Vinh, B.V.T., Nhut, D.T., 2022, Tetraploid

- induction through somatic embryogenesis in *Panax vietnamensis* Ha et Grushv. by colchicine treatment, *Scientia Horticulturae*, 303, 111254.
37. Dương Tấn Nhựt, Hoàng Xuân Chiến, Nguyễn Bá Trực, Nguyễn Bá Nam, Trần Xuân Tình, Vũ Quốc Luận, Nguyễn Văn Bình, Vũ Thị Hiền, Trịnh Thị Hương, Nguyễn Cửu Thành Nhân, 2010, Nhân giống vô tính cây sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.), *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 8, pp. 1211-1219.
 38. Hien, V.T., Luan, V.Q., Huy, N.P., Nam, N.B., Du, T.X., Nhut, D.T., 2014, Direct somatic embryogenesis from leaf, petiole and rhizome explant of *Panax vietnamensis* Ha et Grushv, *Academia Journal of Biology*, 36(1se), pp. 277-282.
 39. Truong, M., Ha, T.T.N., Loc, P.T., Duc, L.T., Tuan, T.T., Giap, D.D., Thach, B.D., Tri, P.D., Hung, N.D.M., Thanh, N.T., Ket, N.V., Luan, T.C., Ho, N.H., 2013, The study on *in vitro* culture of embryogenic callus and somatic embryo tissue of *Panax vietnamensis* Ha et Grushv., *Vietnam Journal of Biotechnology*, 35(3se), pp. 145-157.
 40. Hien, V.T., Huy, N.P., Chien, H.X., Tung, H.T., Nam, N.B., Luan, V.Q., Nhut, D.T., 2016, Somatic embryogenesis from leaf transverse thin cell layer derived-callus of Vietnamese ginseng (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.), *Vietnam Journal of Biotechnology*, 14(1), pp. 63-73.
 41. Nhut, D.T., Huy, N.P., Tung, H.T., Luan, V.Q., Nam, N.B., 2017, *Leds and their potential in somatic embryogenesis of Panax vietnamensis Ha et Grushv.*, in *Light Emitting Diodes for Agriculture*, Springer, pp. 321-330.
 42. Murashige, T., Skoog, F., 1962, A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures, *Physiologia Plantarum*, 15(3), pp. 473-497.
 43. Trần Thị Kim Hương, Hà Thị Thanh Bình, Nguyễn Mai Thơm, Đào Thu Huế, 2019, Nghiên cứu ảnh hưởng của một số biện pháp kỹ thuật trồng đến khả năng sinh trưởng, phát triển và năng suất của cây sâm Lai Châu, *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*, 17(7), pp. 588-593.
 44. Trương Thị Lan Anh, Nguyễn Khoa Trường, Trần Thị Nhung, Hoàng Việt Hậu, Nguyễn Văn Giang, Nguyễn Thị Bích Liên, Nông Văn Duy, Trần Văn Tiến, 2018, Nghiên cứu các giai đoạn phát triển và gieo ươm sâm Lai Châu (*Panax vietnamensis* var. *fuscidiscus* Komatsu, Shu & Cai), *Tạp chí Khoa học Lâm nghiệp*, (2), pp. 16-24.
 45. Trương Trọng Khôi, Nguyễn Văn Tuấn, Trịnh Ngọc Bon, Bùi Thanh Tân, Nguyễn Thị Hoài Anh, Nguyễn Đình Thượng, Phạm Danh Tuyên, Phạm Quang Tuyên, Trương Tất Đơ, 2024, Đánh giá khả năng thích hợp và xây dựng bản đồ tiềm năng phát triển sâm Lai Châu (*Panax vietnamensis* var. *fuscidiscus*) tại huyện Tam Đường, tỉnh Lai Châu, *Tạp chí Khoa học Lâm nghiệp*, 1, pp. 54-64.
 46. Đinh Xuân Tú, Khuất Thị Mai Lương, Nguyễn Hoàng Nam, Lê Hùng Lĩnh, 2016, Nghiên cứu các yếu tố ảnh hưởng đến sự hình thành mô sẹo trong nuôi cấy *in vitro* cây sâm Lai Châu (*Panax vietnamensis* var. *fuscidiscus*), *Tạp chí Khoa học Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam*, 11(72), pp. 87-92.

47. Lê Hùng Lĩnh, Đinh Xuân Tú, 2017, Nghiên cứu quá trình tạo phôi vô tính từ mô sẹo trong nuôi cấy *in vitro* sâm Lai Châu (*Panax vietnamensis* var. *fuscidiscus*), *Tạp chí Khoa học Công nghệ Việt Nam*, 2(75), pp. 76-80.
48. Đỗ Văn Hào, Nguyễn Thị Huệ, Nguyễn Thị Thu Thủy, Đặng Thị Ngân, Đào Thị Hồng Bích, Nguyễn Thị Hoàng Anh, Dương Thị Ly Hương, Nguyễn Hữu Tùng, 2017, Thành phần hóa học của phân đoạn ethyl acetat từ rễ cây sâm vũ diệp (*Panax bipinnatifidus* Seem.) thu hái ở Sa Pa, Lào Cai, *Tạp chí Khoa học Đại học Quốc gia Hà Nội: Khoa học Y Dược*, 33(2), pp. 50-55.
49. Dang, T.N., Bui, T.T.V., Tran, T.N.H., Nong, M.H., Cao, T.P.T., Nguyen, T.H.N., Duong, T.L.H., Nguyen, T.H.A., Nguyen, H.T., Vu, D.H., 2019, Saponin composition analysis of the aerial part of *Panax bipinnatifidus* seem. collected in Sa Pa, Lao Cai, *VNU Journal of Science: Medical and Pharmaceutical Sciences*, 35(1), pp. 67-72
50. Lê Hùng Lĩnh, Đinh Xuân Tú, 2017, Nghiên cứu quá trình phát sinh phôi soma từ mô củ cây sâm Vũ Diệp (*Panax bipinnatidus* Seem.), *Tạp chí Khoa học Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam*, 2(75), pp. 72-76.
51. Nguyễn Thị Ngọc Hương, Trần Hùng, Trương Thị Đẹp, 2018, Biến đổi hình thái trong phát sinh phôi soma thông qua nuôi cấy mô sẹo Tam Thất Hoang (*Panax stipuleanatus* H.T.Tsai et K.M.Feng), *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 16(2), pp. 279-284.
52. Nguyễn Thị Ngọc Hương, Trần Hùng, Trương Thị Đẹp, 2016, Tìm hiểu các biến đổi hình thái trong sự phát sinh rễ Tam Thất Hoang (*Panax stipuleanatus* HT Tsai et KM Feng) nuôi cấy *in vitro* và bước đầu định tính oleanolic acid trong rễ tạo thành, *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 14(1), pp. 49-54.
53. Nông Văn Duy, Trần Thái Vinh, Vũ Kim Công, Đặng Thị Thắm, H'Yon Nê Bing, Quách Văn Hợi, 2020, Nghiên cứu đa dạng tài nguyên thực vật ở khu vực Tây Nguyên, *Đa dạng Sinh học và Các chất có Hoạt tính Sinh học. Kỷ yếu Hội nghị Khoa học 45 năm Viện Hàn lâm KHCNVN*, pp. 13-23.
54. Lê Ngọc Triệu, 2017, *Nghiên cứu phân loại và đánh giá đa dạng di truyền quần thể sâm (Panax sp.) phân bố tự nhiên tại Lâm Đồng*, Luận án tiến sĩ nông nghiệp, Viện khoa học Nông nghiệp Việt Nam.
55. Thủ tướng Chính phủ, 2023, *Quyết định số 611/QĐ-TTg của Thủ tướng Chính phủ: Phê duyệt Chương trình phát triển Sâm Việt Nam đến năm 2030, định hướng đến năm 2045*.
56. Méndez-Hernández, H.A., Ledezma-Rodríguez, M., Avilez-Montalvo, R.N., Juárez-Gómez, Y.L., Skeete, A., Avilez-Montalvo, J., De-la-Peña, C., Loyola-Vargas, V.M., 2019, Signaling overview of plant somatic embryogenesis, *Frontiers in Plant Science*, 10, 77.
57. Woo, H.A., Ku, S.S., Jie, E.Y., Kim, H., Kim, H.S., Cho, H.S., Jeong, W.J., Park, S.U., Min, S.R., Kim, S.W., 2021, Efficient plant regeneration from embryogenic cell suspension cultures of *Euonymus alatus*, *Scientific Reports*, 11, 15120.

58. Bùi Văn Thế Vinh, Vũ Thị Thủy, Thái Thương Hiền, Đỗ Khắc Thịnh, Nhựt, D.T., 2014, 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* 12(7), pp. 1140-1148.
59. Kurczyńska, E.U., Gaj, M.D., Ujczak, A., Mazur, E., 2007, Histological analysis of direct somatic embryogenesis in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh, *Planta*, 226, pp. 619-628.
60. Kajala, K., Ramakrishna, P., Fisher, A., C. Bergmann, D., De Smet, I., Sozzani, R., Weijers, D., Brady, S.M., 2014, Omics and modelling approaches for understanding regulation of asymmetric cell divisions in *Arabidopsis* and other angiosperm plants, *Annals of Botany*, 113(7), pp. 1083-1105.
61. Jenik, P.D., Barton, M.K., 2005, Surge and destroy: the role of auxin in plant embryogenesis, *Development*, 132(16), pp. 3577-3585.
62. Butenko, R., Brushwitzky, I., Slepian, L., 1968, Organogenesis and somatic embryogenesis in the tissue culture of *Panax ginseng* CA Meyer, *Bot Zh*, 7, pp. 906-913.
63. Lee, J.W., Bang, K.H., Kim, D.H., Kim, J.U., Kim, Y.C., Jo, I.H., 2023, Embryogenesis and plant regeneration of *Panax ginseng* Meyer via anther culture and ploidy assessment using flow cytometry, *Journal of Plant Biotechnology*, 50(1), pp. 19-26.
64. Horstman, A., Bemer, M., Boutilier, K., 2017, A transcriptional view on somatic embryogenesis, *Regeneration (Oxf)*, 4(4), pp. 201-216.
65. Lee, J.W., Kim, J.U., Bang, K.H., Kwon, N., Kim, Y.C., Jo, I.H., Park, Y.D., 2023, Efficient somatic embryogenesis, regeneration and acclimatization of *Panax ginseng* Meyer: True-to-type conformity of plantlets as confirmed by ISSR analysis, *Plants*, 12, 1270.
66. Lee, J.W., Kwon, N., Kim, J.U., Bang, K.-H., Jung, S.M., Lee, S.W., Kim, D.H., Kim, Y.C., Jo, I.H., Park, Y.D., 2023, *In vitro* micropropagation of commercial ginseng cultivars (*Panax ginseng* Meyer) via somatic embryogenesis compared to traditional seed production, *Horticulturae*, 9, 435.
67. Tang, L.P., Zhang, X.S., Su, Y.H., 2020, Regulation of cell reprogramming by auxin during somatic embryogenesis, *aBIOTECH*, 1(3), pp. 185-193.
68. Punja, Z.K., Feeney, M., Schluter, C., Tautorus, T., 2004, Multiplication and germination of somatic embryos of American ginseng derived from suspension cultures and biochemical and molecular analyses of plantlets, *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 40(3), pp. 329-338.
69. Zhou, S., Brown, D.C., 2006, High efficiency plant production of North American ginseng via somatic embryogenesis from cotyledon explants, *Plant Cell Reports*, 25(3), pp. 166-173.
70. Zhao, S.J., Wang, J.H., Liang, Y.L., Xu, L.X., 2012, Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from hairy roots transformed by *Agrobacterium rhizogenes*

- in *Panax quiquefolium* L., *International Journal of Pharmaceutical and Bio-Medical Science*, 6, pp. 97-100.
71. Kharwanlang, L., Das, M.C., Kumaria, S., Tandon, P., 2016, High frequency somatic embryos induction from the rhizome explant of *Panax pseudoginseng* Wall. Using thin cell layer section, *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*, 7, pp. 31-34.
 72. Vũ Thị Hiền, 2018, *Nghiên cứu quá trình tái sinh và nhân giống in vitro cây sâm Ngọc Linh (Panax vietnamensis Ha et Grushv.) bằng kỹ thuật nuôi cấy lớp mỏng tế bào*, Luận án tiến sĩ nông nghiệp, Học viện Khoa học và Công nghệ.
 73. Prakash, M.G., Gurumurthi, K., 2009, 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*, 100(1), pp. 13-20.
 74. Singh, C., Raj, S.R., Patil, V., Jaiswal, P., Subhash, N., 2013, Plant regeneration from leaf explants of mature sandalwood (*Santalum album* L.) trees under *in vitro* conditions, *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 49, pp. 216-222.
 75. Liang, H., Xiong, Y., Guo, B., Yan, H., Jian, S., Ren, H., Zhang, X., Li, Y., Zeng, S., Wu, K., 2020, Shoot organogenesis and somatic embryogenesis from leaf and root explants of *Scaevola sericea*, *Scientific Reports*, 10(1), pp. 1-11.
 76. Zhou, S., Brown, D.C., 2007, A highly efficient protocol for micropropagation of North American ginseng, *Biotechnology and Sustainable Agriculture 2006 and Beyond*, pp. 425-428.
 77. Liu, S., Zhong, J.J., 1998, Phosphate effect on production of ginseng saponin and polysaccharide by cell suspension cultures of *Panax ginseng* and *Panax notoginseng*, *Process Biochemistry*, 33, pp. 69-74.
 78. Grzyb, M., Wróbel-Marek, J., Kurczyńska, E., Sobczak, M., Mikuła, A., 2020, Symplasmic isolation contributes to somatic embryo induction and development in the tree fern *Cyathea delgadii* Sternb, *Plant and Cell Physiology*, 61(7), pp. 1273-1284.
 79. Majda, M., Robert, S., 2018, The role of auxin in cell wall expansion, *International journal of molecular sciences*, 19, 951.
 80. Chiancone, B., Martorana, L., Gianguzzi, V., Germanà, M.A., 2017, The effects of meta-Topolin and benzyladenine on *in vitro* organogenesis from epicotyl cuttings of Troyer citrange (*Citrus sinensis* [L.] Osbeck × *Poncirus trifoliata* [L.] Raf.), *Acta Horticulturae*, pp. 185-192.
 81. Monticelli, S., Gentile, A., Frattarelli, A., Caboni, E., 2017, Effects of the natural cytokinin meta -Topolin on *in vitro* shoot proliferation and acclimatization of *Prunus* spp, *Acta Horticulturae*, pp. 375-380.
 82. Esteves, P., Clermont, I., Marchand, S., Belzile, F., 2014, Improving the efficiency of isolated microspore culture in six-row spring barley: II-exploring novel growth regulators to maximize embryogenesis and reduce albinism, *Plant Cell Reports*, 33(6), pp. 871-879.

83. Khai, H.D., Vinh, N.Q., Dung, D.M., Dai Nghiep, N., Mai, N.T.N., Tung, H.T., Luan, V.Q., Nhut, D.T., 2021, Alterations in endogenous hormone levels and energy metabolism promoted the induction, differentiation and maturation of *Begonia* somatic embryos under clinorotation, *Plant Science*, 312, 111045.
84. Zan, N.M., 2019, *Phytohormonal effects on the regulation of stem elongation of pea (Pisum sativum) subjected to drying soil*: Lancaster University, United Kingdom.
85. Guo, H., Li, J., Ma, Y., Zhu, Z., Du, L., 2022, Somatic embryogenesis processes and changes in endogenous hormone content of *Cinnamomum camphora* L, *Research Square*, pp. 1-20.
86. Igielski, R., Kępczyńska, E., 2017, Gene expression and metabolite profiling of gibberellin biosynthesis during induction of somatic embryogenesis in *Medicago truncatula* Gaertn, *PLoS One*, 12, e0182055.
87. Kępczyńska, E., Orłowska, A., 2021, Profiles of endogenous ABA, bioactive GAs, IAA and their metabolites in *Medicago truncatula* Gaertn. non-embryogenic and embryogenic tissues during induction phase in relation to somatic embryo formation, *Planta*, 253, pp. 1-13.
88. Liang, Y., Xu, X., Shen, H., Gao, M., Zhao, Y., Bai, X., 2022, Morphological and endogenous phytohormone changes during long-term embryogenic cultures in Korean pine, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 151(2), pp. 253-264.
89. Pasternak, T.P., Prinsen, E., Ayaydin, F., Miskolczi, P., Potters, G., Asard, H., Van Onckelen, H.A., Dudits, D., Fehér, A., 2002, The role of auxin, pH, and stress in the activation of embryogenic cell division in leaf protoplast-derived cells of alfalfa, *Plant physiology*, 129(4), pp. 1807-1819.
90. Ruduś, I., Weiler, E.W., Kępczyńska, E., 2009, Do stress-related phytohormones, abscisic acid and jasmonic acid play a role in the regulation of *Medicago sativa* L. somatic embryogenesis?, *Plant Growth Regulation*, 59, pp. 159-169.
91. Wu, G., Wei, X., Wang, X., Wei, Y., 2021, Changes in biochemistry and histochemical characteristics during somatic embryogenesis in *Ormosia henryi* Prain, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 144, pp. 505-517.
92. Đỗ Đăng Giáp, Nguyễn Thị Kim Loan, Trần Trọng Tuấn, Lê Thanh Tuấn, Huỳnh Lê Thiên Tứ, Thái Xuân Du, Nguyễn Đình Lâm, Dương Tấn Nhựt, 2013, Ảnh hưởng của một số acid amine và spermidine lên sự hình thành phôi vô tính cây cọc rào (*Jatropha curcas* L.), *Tạp chí sinh học*, 35(3), pp. 136-144.
93. Nhut, D.T., Vinh, B.V.T., Hien, T.T., Huy, N.P., Nam, N.B., Chien, H.X., 2012, 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* 11(5), pp. 1084-1091.
94. Biswas, M.K., Islam, R., Hossain, M., 2007, Somatic embryogenesis in strawberry (*Fragaria* sp.) through callus culture, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 90, pp. 49-54.

95. Ageel, S., Elmeer, K., 2011, Effects of casein hydrolysates and glutamine on callus and somatic embryogenesis of date palm (*Phoenix dactylifera* L.), *New York Science Journal*, 4(7), pp. 121-125.
96. El-Shiaty, O.H., El-Sharabasy, S.F., Abd El-Kareim, A.H., 2004, Effect of some amino acids and biotin on callus and proliferation of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) Sewy cultivar, *Arab Journal Biotechnology*, 7, pp. 265-272.
97. Varisai Mohamed, S., Wang, C.S., Thiruvengadam, M., Jayabalan, N., 2004, *In vitro* plant regeneration via somatic embryogenesis through cell suspension cultures of horsegram [*Macrotyloma uniflorum* (Lam.) verdc.], *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 40(3), pp. 284-289.
98. El-Dawayati, M.M., Ghazzawy, H.S., Munir, M., 2018, Somatic embryogenesis enhancement of date palm cultivar Sewi using different types of polyamines and glutamine amino acid concentration under *in-vitro* solid and liquid media conditions, *International Journal of Biosciences*, 12(1), pp. 149-159.
99. Solanki, M., Sinha, A., Shukla, L.I., 2019, Optimization of *in vitro* culture media for improvement in yield of Navara ancient Indian medicinal rice, *Biotech*, 9, 270.
100. Rakesh, B., Sudheer, W., Nagella, P., 2021, Role of polyamines in plant tissue culture: An overview, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 145, pp. 487-506.
101. Silveira, V., Balbuena, T.S., Claudete, S.C., Floh, E.I.S., Guerra, M.P., Handro, W., 2004, Biochemical changes during seed development in *Pinus taeda* L., *Plant Growth Regulation*, 44(2), pp. 147-156.
102. Rajesh, M., Radha, E., Sajin, K., Anitha, K., 2014, Polyamine-induced somatic embryogenesis and plantlet regeneration *in vitro* from plumular explants of dwarf cultivars of coconut (*Cocos nucifera*), *Indian Journal of Agricultural Sciences*, 84, pp. 527-530.
103. Fraguas, C., Villa, F., Lima, G., 2009, Evaluation of exogenous application of polyamines on callus growth of Mangaba tree (*Hancornia speciosa* Gomes), *Revista Brasileira de Fruticultura*, 31, pp. 1206-1210.
104. Dey, A., Hazra, A.K., Nongdam, P., Nandy, S., Tikendra, L., Mukherjee, A., Banerjee, S., Mukherjee, S., Pandey, D.K., 2019, Enhanced bacoside content in polyamine treated *in-vitro* raised *Bacopa monnieri* (L.) Wettst, *South African Journal of Botany*, 123, pp. 259-269.
105. Venkatachalam, V., Subramanyam, K., Elayaraja, D., Karthik, S., Vasudevan, A., Manickavasagam, M., 2017, Assessment of the efficacy of amino acids and polyamines on regeneration of watermelon (*Citrullus lanatus* Thunb.) and analysis of genetic fidelity of regenerated plants by SCoT and RAPD markers, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 130, pp. 1-7.
106. Wang, D., Guo, Y., Long, X., Pan, Y., Yang, D., Li, R., Lu, Y., Chen, Y., Shi, J., Chen, J., 2020, Exogenous spermidine promotes somatic embryogenesis of *Cunninghamia lanceolata* by altering the endogenous phytohormone content, *Phyton*, 89, 27-34.

107. Kevers, C., Le Gal, N., Monteiro, M., Dommes, J., Gaspar, T., 2000, Somatic embryogenesis of *Panax ginseng* in liquid cultures: a role for polyamines and their metabolic pathways, *Plant Growth Regulation*, 31(3), pp. 209-214.
108. Sathish, D., Theboral, J., Vasudevan, V., Pavan, G., Ajithan, C., Appunu, C., Manickavasagam, M., 2019, Exogenous polyamines enhance somatic embryogenesis and *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation efficiency in sugarcane (*Saccharum* spp. hybrid), *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 56(1), pp. 29-40.
109. Sundararajan, S., Sivakumar, H.P., Nayeem, S., Rajendran, V., Subiramani, S., Ramalingam, S., 2020, Influence of exogenous polyamines on somatic embryogenesis and regeneration of fresh and long-term cultures of three elite indica rice cultivars, *Cereal Research Communications*, 49(2), pp. 245-253.
110. Arun, M., Subramanyam, K., Theboral, J., Ganapathi, A., Manickavasagam, M., 2014, Optimized shoot regeneration for Indian soybean: the influence of exogenous polyamines, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 117(2), pp. 305-309.
111. Monteiro, M., Kevers, C., Dommes, J., T., G., 2002, A specific role for spermidine in the initiation phase of somatic embryogenesis in *Panax ginseng* CA Meyer, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 68, pp. 225-232.
112. Paschalidis, K.A., Roubelakis-Angelakis, K.A., 2005, Spatial and temporal distribution of polyamine levels and polyamine anabolism in different organs/tissues of the tobacco plant. Correlations with age, cell division/expansion, and differentiation, *Plant physiology*, 138(1), pp. 142-152.
113. Peixe, A., Raposo, A., Lourenço, R., Cardoso, H., Macedo, E., 2007, Coconut water and BAP successfully replaced zeatin in olive (*Olea europaea* L.) micropropagation, *Scientia Horticulturae*, 113(1), pp. 1-7.
114. Khierallah, H.S., Hussein, N.H., 2013, The role of coconut water and casein hydrolysate in somatic embryogenesis of date palm and genetic stability detection using RAPD markers *Research in Biotechnology*, 4(3), pp. 20-28.
115. Souza, R.A.V.D., Braga, F.T., Setotaw, T.A., Vieira Neto, J., Azevedo, P.H.D., Azevedo, V.H.D., Cançado, G.M.D.A., 2013, Effect of coconut water on growth of olive embryos cultured *in vitro*, *Ciência Rural*, 43(2), pp. 290-296.
116. Bertero, V.G., Beznec, A., Faccio, P., Auteri, M., Arteaga, M., Bonafede, M., Bossio, E., 2020, High-efficiency direct somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf base explants of “peperina” (*Minthostachys verticillata*), *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 56(6), pp. 915-919.
117. Park, J.J., Yoon, S.Y.H., Cho, H.Y., Son, S.Y., Rhee, H.S., Park, J.M., 2006, Patterns of protein expression upon adding sugar and elicitor to the cell culture of *Eschscholtzia californica*, *Plant cell, tissue and organ culture*, 86(2), pp. 257-269.

118. Lee, H.Y., Khorolragchaa, A., Sun, M.S., Kim, Y.J., Kim, Y.J., Kwon, W.S., Yang, D.C., 2013, Plant regeneration from anther culture of *Panax ginseng*, *Korean Journal of Plant Resources*, 26(3), pp. 383-388.
119. Huang, T., Gao, W.Y., Wang, J., Cao, Y., Zhao, Y., Huang, L., Liu, C., 2010, Selection and optimization of a high-producing tissue culture of *Panax ginseng* CA Meyer, *Acta Physiologiae Plantarum*, 32(4), pp. 765-772.
120. Kim, Y., Kim, M., Shim, J., Pulla, R., Yang, D., 2010, Somatic embryogenesis of two new *Panax ginseng* cultivars, Yun-Poong and Chun-Poong, *Russian Journal of Plant Physiology*, 57, pp. 283-289.
121. Ali, M., Abbasi, B.H., Ahmad, N., Ali, S.S., Ali, S., Ali, G.S., 2016, Sucrose-enhanced biosynthesis of medicinally important antioxidant secondary metabolites in cell suspension cultures of *Artemisia absinthium* L, *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 39(12), pp. 1945-1954.
122. Faisal, M., Abdel-Salam, E.M., Alatar, A.A., Qahtan, A.A., 2021, Induction of somatic embryogenesis in *Brassica juncea* L. and analysis of regenerants using ISSR-PCR and flow cytometer, *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(1), pp. 1147-1153.
123. Orłowska, A., Kępczyńska, E., 2020, Oxidative status in *Medicago truncatula* Gaertn. non-embryogenic and embryogenic tissues with particular reference to somatic embryogenesis, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 140, pp. 35-48.
124. Ighodaro, O., Akinloye, O., 2018, First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid, *Alexandria Journal of Medicine*, 54(4), pp. 287-293.
125. Jangra, A., Chaturvedi, S., Kumar, N., Singh, H., Sharma, V., Thakur, M., Tiwari, S., Chhokar, V., 2023, Polyamines: The gleam of next-generation plant growth regulators for growth, development, stress mitigation, and hormonal crosstalk in plants - a systematic review, *Journal of Plant Growth Regulation*, 42(8), pp. 5167-5191.
126. Tyagi, A., Ali, S., Ramakrishna, G., Singh, A., Park, S., Mahmoudi, H., Bae, H., 2023, Revisiting the role of polyamines in plant growth and abiotic stress resilience: Mechanisms, crosstalk, and future perspectives, *Journal of Plant Growth Regulation*, 42(8), pp. 5074-5098.
127. Prudente, D.D.O., Souza, L.B.D., Paiva, R., 2020, Plant somatic embryogenesis: Modulatory role of oxidative stress, *Proceedings of the National Academy of Sciences India Section B - Biological Sciences*, 90, pp. 483-487.
128. Chi, Y.H., Paeng, S.K., Kim, M.J., Hwang, G.Y., Melencion, S.M.B., Oh, H.T., Lee, S.Y., 2013, Redox-dependent functional switching of plant proteins accompanying with their structural changes, *Frontiers in plant science*, 4, 277.
129. Ibáñez, S., Carneros, E., Testillano, P.S., Pérez-Pérez, J.M., 2020, Advances in plant regeneration: shake, rattle and roll, *Plants*, 9, 897.

130. Van, M.T.T., 1973, Direct flower neoformation from superficial tissue of small explants of *Nicotiana tabacum* L, *Planta*, 115, pp. 87-92.
131. Tung, H.T., Suong, P.T., Khai, H.D., Luan, V.Q., Cuong, D.M., Hien, V.T., Nam, N.B., Ngan, H.T.M., Phong, T.H., Nhut, D.T., 2022, Protocorm-like body formation, stem elongation, and enhanced growth of *Anthurium andraeanum* ‘Tropical’ plantlet on medium containing silver nanoparticles, *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 58(1), pp. 70-79.
132. Hanh, N.T.M., Tung, H.T., Khai, H.D., Cuong, D.M., Luan, V.Q., Mai, N.T.N., Anh, T.T.L., Le, B.V., Nhut, D.T., 2022, Efficient somatic embryogenesis and regeneration from leaf main vein and petiole of *Actinidia chinensis* Planch. via thin cell layer culture technology, *Scientia Horticulturae*, 298, 110986.
133. Nhut, D.T., Nga, L., Chien, H.X., Huy, N.P., 2012, Morphogenesis of *in vitro* main root transverse thin cell layers of Vietnamese ginseng (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.), *African Journal of Biotechnology* 11(23), pp. 6274-6289.
134. Sabooni, N., Shekafandeh, A., 2017, Somatic embryogenesis and plant regeneration of blackberry using the thin cell layer technique, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 130(2), pp. 313-321.
135. Lo, K.C., Gansau, J.A., Shih, C.H., Kao, C.Y., 2022, Shoot development through modified transverse thin cell layer (tTCL) culture of *Phalaenopsis* hybrid protocorms, *Horticulturae*, 8, 206.
136. Abdolinejad, R., Shekafandeh, A., Jowkar, A., Gharaghani, A., Alemzadeh, A., 2020, Indirect regeneration of *Ficus carica* by the TCL technique and genetic fidelity evaluation of the regenerated plants using flow cytometry and ISSR, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 143(1), pp. 131-144.
137. Ramírez-Mosqueda, M.A., Iglesias-Andreu, L.G., Armas-Silva, A.A., Cruz-Gutiérrez, E.J., de la Torre-Sánchez, J.F., Leyva-Ovalle, O.R., Galán-Páez, C.M., 2018, Effect of the thin cell layer technique in the induction of somatic embryos in *Pinus patula* Schl. et Cham, *Journal of Forestry Research*, 30(4), pp. 1535-1539.
138. Tung, H.T., Hieu, T., Phong, T.H., Khai, H.D., Hanh, N.T.M., Van, K., Nhut, D.T., 2022, *The Application of Thin Cell Layer Culture Technique in Plant Regeneration and Micropropagation: Latest Achievements*, in *Plant Tissue Culture: New Techniques and Application in Horticultural Species of Tropical Region*, Springer, Singapore, pp. 231-257.
139. Teixeira da Silva, J.A., Dobránszki, J., 2013, Plant Thin Cell Layers: A 40-Year Celebration, *Journal of Plant Growth Regulation*, 32(4), pp. 922-943.
140. Bravo-Ruiz, I.N., González-Arno, M.T., Castañeda-Castro, O., Pastelín-Solano, M.C., Cruz-Cruz, C.A., 2022, *Use of thin cell layer (TCL) to obtain somatic embryogenesis*, in *Somatic Embryogenesis: Methods and Protocols*, Springer, pp. 183-201.
141. Teixeira da Silva, J.A., Dobránszki, J., 2014, Dissecting the concept of the thin cell layer: theoretical basis and practical application of the plant growth correction

- factor to apple, *Cymbidium* and *Chrysanthemum*, *Journal of Plant Growth Regulation*, 33(4), pp. 881-895.
142. Gomes, L.R.P., Franceschi, C.d.R.B., Ribas, L.L.F., 2015, Micropropagation of *Brasiliidium forbesii* (Orchidaceae) through transverse and longitudinal thin cell layer culture, *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, 37(2), pp. 143-149.
 143. Giacomolli Polesi, L., Pacheco de Freitas Fraga, H., Goeten, D., Panato Back, F., de Medeiros Oliveira, E., Steiner, N., Guerra, M.P., 2022, Morphohistological and biochemical features of the *Guadua chacoensis* (Bambusoideae; Poaceae) somatic embryogenesis, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 148(3), pp. 479-499.
 144. Cristian, N.M.P., Anne, K.T.H.E., 2021, A novel genotype-independent technique for successful induction of somatic embryogenesis of adult plants of *Jatropha curcas* L. using petiole transverse Thin Cell Layer (TCL), *African Journal of Biotechnology* 20(2), pp. 85-91.
 145. Ghahremani, R., Daylami, S.D., Mirmasoumi, M., Askari, N., Vahdati, K., 2021, Refining a protocol for somatic embryogenesis and plant regeneration of *Phalaenopsis amabilis* cv. Jinan from mature tissues, *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 45(3), pp. 356-364.
 146. Nongalleima, K.H., Dikash Singh, T.H., Amitabha, D., Deb, L., Sunitibala Devi, H., 2014, Optimization of surface sterilization protocol, induction of axillary shoots regeneration in *Zingiber zerumbet* (L.) Sm. as affected by season, *Biological Rhythm Research*, 45(2), pp. 317-324.
 147. Duan, Y., Zhang, H., Sun, M., Zhao, F., Xue, T., Xue, J., 2019, Use of chlorine dioxide to sterilize medium for tissue culture of potato, *Scientific Reports*, 9, 10232.
 148. World Health Organization. Regional Office for, E., 2000, *Air quality guidelines for Europe: second edition*, WHO Regional Publications, European Series, No. 91, Copenhagen: World Health Organization. Regional Office for Europe.
 149. Steinitz, B., Barr, N., Tabib, Y., Vaknin, Y., Bernstein, N., 2010, Control of *in vitro* rooting and plant development in *Corymbia maculata* by silver nitrate, silver thiosulfate and thiosulfate ion, *Plant Cell Rep*, 29(11), pp. 1315-23.
 150. Branislav, R.N., Krystofova, O., Nejd, L., Adam, V., 2017, Nanoparticles based on essential metals and their phytotoxicity, *Journal of Nanobiotechnology*, 15(1), pp. 1-19.
 151. Hesami, M., Naderi, R., Tohidfar, M., 2019, Modeling and optimizing *in vitro* sterilization of chrysanthemum via multilayer perceptron-non-dominated sorting genetic Algorithm-II (MLP-NSGAI), *Frontiers in Plant Science*, 10, 282.
 152. Tung, H.T., Thuong, T.T., Cuong, D.M., Luan, V.Q., Hien, V.T., Hieu, T., Nam, N.B., Phuong, H.T.N., Khai, H.D., Nhut, D.T., 2021, Silver nanoparticles improved explant disinfection, *in vitro* growth, runner formation and limited ethylene accumulation during micropropagation of strawberry (*Fragaria x ananassa*), *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 145(2), pp. 393-403.

153. Sharma, A., Kumar, V., Giridhar, P., Ravishankar, G.A., 2008, Induction of *in vitro* flowering in *Capsicum frutescens* under the influence of silver nitrate and cobalt chloride and pollen transformation, *Electronic Journal of Biotechnology*, 11(2), pp. 84-89.
154. Đỗ Mạnh Cường, Hoàng Thanh Tùng, Hoàng Đắc Khải, Vũ Quốc Luận, Vũ Thị Hiền, Trương Thị Bích Phượng, Nhựt, D.T., 2020, Nâng cao tần suất phát sinh phôi vô tính cây sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) thông qua khử trùng mẫu cây lá bằng nano bạc và bổ sung nano bạc trong môi trường nuôi cấy, *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 18(3), pp. 517-527.
155. Abdelkawy, A.M., Alshammari, S.O., Hussein, H.-A.A., Abou El-Enain, I.M.M., Abdelkhalek, E.S., Radwan, A.M., Kenawy, S.K.M., Maaty, D.A.M., Abed, N.N., Sabry, S., Mohsen, A., 2023, Effect of silver nanoparticles on tropane alkaloid production of transgenic hairy root cultures of *Hyoscyamus muticus* L. and their antimicrobial activity, *Scientific Reports*, 13, 10397.
156. Lala, S., 2021, Nanoparticles as elicitors and harvesters of economically important secondary metabolites in higher plants: A review, *IET nanobiotechnology*, 15(1), pp. 28-57.
157. Laha, S., Subrahmanyeswari, T., Verma, S.K., Kamble, S.N., Singh, S., Bhattacharyya, S., Gantait, S., 2023, Biogenic synthesis, characterization and application of silver nanoparticles as biostimulator for growth and rebaudioside-A production in genetically stable stevia (*Stevia rebaudiana* Bert.) under *in vitro* conditions, *Industrial Crops and Products*, 197, 116520.
158. Manokari, M., Raj, M.C., Dey, A., Faisal, M., Alatar, A.A., Joshee, N., Shekhawat, M.S., 2023, Silver nanoparticles improved morphogenesis, biochemical profile and micro-morphology of *Gaillardia pulchella* Foug cv. 'Torch Yellow', *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, pp. 1-13.
159. Aghdaei, M., Salehi, H., Sarmast, M.K., 2012, Effects of silver nanoparticles on *Tecomella undulata* (Roxb.) Seem. micropropagation, *Advances in Horticultural Science*, 26(1), pp. 21-24.
160. Do Manh Cuong, Trương Thị Bích Phượng, Dương Tấn Nhựt, 2018, Ảnh hưởng của nano bạc lên khả năng cảm ứng mô sẹo và tái sinh chồi từ mẫu lá cây dâu tây (*Fragaria x ananassa*) nuôi cấy *in vitro*, *Tạp chí Khoa học Đại học Huế: Khoa học Tự nhiên*, 127(1C), pp. 61-70.
161. Hà Thị Mỹ Ngân, 2021, *Nghiên cứu ảnh hưởng của nano kim loại lên việc khắc phục một số hiện tượng bất thường của cây trồng nuôi cấy in vitro*, Luận án tiến sĩ sinh học, Trường Đại học khoa học tự nhiên.
162. Tripathi, D.K., Singh, S., Singh, S., Srivastava, P.K., Singh, V.P., Singh, S., Prasad, S.M., Singh, P.K., Dubey, N.K., Pandey, A.C., 2017, Nitric oxide alleviates silver nanoparticles (AgNps)-induced phytotoxicity in *Pisum sativum* seedlings, *Plant Physiology and Biochemistry*, 110, pp. 167-177.

163. Chau, N.H., Bang, L., Buu, N., Dung, T., Ha, H., Quang, D., 2008, Some results in manufacturing of nanosilver and investigation of its application for disinfection, *Advances in Natural Sciences*, 9(2), pp. 241-248.
164. Schenk, R.U., Hildebrandt, A.C., 1972, Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures, *Canadian Journal of Botany*, 50(1), pp. 199-204.
165. Lloyd, G., McCown, B., 1980, Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture, *Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, Kalmia latifolia, by use of shoot-tip culture*, 30, pp. 421-427.
166. Gamborg, O.L., Miller, R.A., Ojima, K., 1968, Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells, *Experimental Cell Research*, 50(1), pp. 151-158.
167. Gui, F.J., Yang, X.W., Li, L.Y., Tian, J.M., 2007, Simultaneous enantiomer determination of 20 (R)-and 20 (S)-ginsenoside-Rg2 in rat plasma after intravenous administration using HPLC method, *The Journal of Chromatography B*, 850(1-2), pp. 1-6.
168. Peterson, R.L., Peterson, C.A., Melville, L.H., 2008, *Teaching plant anatomy through creative laboratory exercises*: NRC Research Press.
169. Lazo-Javalera, M.F., Troncoso-Rojas, R., Tiznado-Hernandez, M.E., Martinez-Tellez, M.A., Vargas-Arispuro, I., Islas-Osuna, M.A., Rivera-Dominguez, M., 2016, Surface disinfection procedure and *in vitro* regeneration of grapevine (*Vitis vinifera* L.) axillary buds, *SpringerPlus*, 5(1), pp. 1-9.
170. Ngan, H.T.M., Cuong, D.M., Thanh, T.H., Nghiep, N.D., Nhut, D.T., 2020, The effect of cobalt and silver nanoparticles on overcoming leaf abscission and enhanced growth of rose (*Rosa hybrida* L. 'Baby Love') plantlets cultured *in vitro*, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 141(2), pp. 393-405.
171. Tung, H.T., Bao, H.G., Cuong, D.M., Ngan, H.T.M., Hien, V.T., Luan, V.Q., Phuong, H.T.N., Nam, N.B., Trieu, L.N., Truong, N.K., 2021, Silver nanoparticles as the sterilant in large-scale micropropagation of chrysanthemum, *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 57(6), pp. 897-906.
172. Tung, H.T., Van, H.T., Bao, H.G., Khai, H.D., Luan, V.Q., Phong, T.H., Nhut, D.T., 2021, Silver nanoparticles enhanced efficiency of explant surface disinfection and somatic embryogenesis in *Begonia tuberosa* via thin cell layer culture, *Vietnam Journal of Biotechnology*, 19(2), pp. 337-347.
173. Dương Tấn Nhật, Vũ Thị Hiền, Vũ Quốc Luận, Lê Thị Thu Hiền, Nguyễn Hoài Châu, Dương Bảo Trinh, Đỗ Mạnh Cường, Hoàng Thanh Tùng, Nguyễn Phúc Huy, 2018, Khảo sát nano bạc làm chất khử trùng mẫu mới trong nhân giống vô tính cây African violet (*Saintpaulia ionantha* H. Wendl.), *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 16(1), pp. 87-97.

174. Đồng Huy Giới, Bùi Thị Thu Hương, 2019, Nghiên cứu sử dụng nano bạc trong nhân giống *in vitro* lan hồ điệp vàng (*Phalaenopsis* sp.), *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Lâm nghiệp* 1, pp. 19-24.
175. Bùi Thị Thanh Phương, Nguyễn Phương Lan, Đỗ Thị Kim Trang, Trần Bảo Trâm, Phan Xuân Bình Minh, 2020, Ảnh hưởng của nano bạc đến khả năng nhân giống *in vitro* cây Tràu tiên (*Asarum glabrum* Merr.), *Tạp chí Khoa học Công nghệ Việt Nam*, 62(6), pp. 10-23.
176. Tripathi, D.K., Singh, S., Singh, V.P., Prasad, S.M., Dubey, N.K., Chauhan, D.K., 2017, Silicon nanoparticles more effectively alleviated UV-B stress than silicon in wheat (*Triticum aestivum*) seedlings, *Plant Physiology and Biochemistry*, 110, pp. 70-81.
177. Syu, Y.Y., Hung, J.H., Chen, J.C., Chuang, H.W., 2014, Impacts of size and shape of silver nanoparticles on Arabidopsis plant growth and gene expression, *Plant Physiology and Biochemistry*, 83, pp. 57-64.
178. Thân Thị Minh Phương, 2011, *Khảo sát ảnh hưởng của một số chất điều hòa sinh trưởng thực vật và một số chất hữu cơ trong nuôi cấy in vitro sâm Ngọc Linh (Panax vietnamensis Ha et Grushv.)*, Khóa luận tốt nghiệp. Đại học Nông Lâm thành phố Hồ Chí Minh.
179. Thu, H.T.M., Naing, A.H., Jeong, H.Y., Kim, C.K., 2020, Regeneration of genetically stable plants from *in vitro* vitrified leaves of different carnation cultivars, *Plants*, 9, 950.
180. Hieu, T., Phong, T.H., Khai, H.D., Mai, N.T.N., Cuong, D.M., Luan, V.Q., Tung, H.T., Nam, N.B., Tan Nhut, D., 2022, Efficient production of vigorous passion fruit rootstock for *in vitro* grafting, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 148(3), pp. 635-648.
181. Ahn, I.O., Van Le, B., Gendy, C., Tran Than Van, K., 1996, Direct somatic embryogenesis through thin cell layer culture in *Panax ginseng*, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 45(3), pp. 237-243.
182. Lei, X., Wang, Q., Yang, H., Qi, Y., Hao, X., Wang, Y., 2021, Vitrification and proteomic analysis of embryogenic callus of *Panax ginseng* CA Meyer, *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 57(1), pp. 118-127.
183. Zhao, Y., Guo, W.H., Sun, X.Y., Li, K.H., Liu, K.J., Wang, J., Wang, Y., Tan, X., You, X.L., 2020, A culture system for the stable and high-efficiency proliferation of adventitious roots of *Panax notoginseng* and ginsenoside accumulation, *Industrial Crops and Products*, 157, 112882.
184. Qiu, X.M., Sun, Y.Y., Ye, X.Y., Li, Z.G., 2020, Signaling role of glutamate in plants, *Frontiers in Plant Science*, 10, 1743.
185. Rai, M.K., Jaiswal, V., Jaiswal, U., 2009, Effect of selected amino acids and polyethylene glycol on maturation and germination of somatic embryos of guava (*Psidium guajava* L.), *Scientia Horticulturae*, 121(2), pp. 233-236.
186. Rahmouni, S., El Ansari, Z.N., Badoc, A., Martin, P., El Kbiach, M.L.B., Lamarti, A., 2020, Effect of amino acids on secondary somatic embryogenesis of

- Moroccan cork oak (*Quercus suber* L.) tree, *American Journal of Plant Sciences*, 11(5), pp. 626-641.
187. Nandhakumar, N., Kumar, K., Sudhakar, D., Soorianathasundaram, K., 2018, Plant regeneration, developmental pattern and genetic fidelity of somatic embryogenesis derived *Musa* spp, *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 16(2), pp. 587-598.
 188. Rathore, J.S., Rai, M.K., Shekhawat, N., 2012, Induction of somatic embryogenesis in gum arabic tree [*Acacia senegal* (L.) Willd.], *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 18, pp. 387-392.
 189. Pintos, B., Manzanera, J.A., Bueno, M.A., 2010, Oak somatic and gametic embryos maturation is affected by charcoal and specific amino acids mixture, *Annals of Forest Science*, 67, 205.
 190. Martínez, M., San José, M.C., Vieitez, A., Cernadas, M.J., Ballester, A., Corredoira, E., 2017, Propagation of mature *Quercus ilex* L.(holm oak) trees by somatic embryogenesis, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 131, pp. 321-333.
 191. Pawar, B., Kale, P., Bahurupe, J., Jadhav, A., Kale, A., Pawar, S., 2015, Proline and glutamine improve *in vitro* callus induction and subsequent shooting in rice, *Rice Science*, 22(6), pp. 283-289.
 192. Szabados, L., Savouré, A., 2010, Proline: a multifunctional amino acid, *Trends in Plant Science*, 15(2), pp. 89-97.
 193. Podwyszyńska, M., Marasek Ciolakowska, A., 2020, Micropropagation of tulip via somatic embryogenesis, *Agronomy*, 10, 1857.
 194. Gerdakaneh, M., Mozafari, A.-A., sioseh-mardah, A., Sarabi, B., 2011, Effects of different amino acids on somatic embryogenesis of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.), *Acta Physiologiae Plantarum*, 33, pp. 1847-1852.
 195. Mattoo, A., Fatima, T., Upadhyay, R., Handa, A., 2015, *Polyamines in plants: biosynthesis from arginine, and metabolic, physiological and stress-response roles*, in *Amino acids in higher plants*, CAB International Wallingford UK, pp. 177-194.
 196. Takeda, T., Hayakawa, F., Oe, K., Matsuoka, H., 2002, Effects of exogenous polyamines on embryogenic carrot cells, *Biochemical Engineering Journal*, 12(1), pp. 21-28.
 197. Kadioglu, A., Turgut, R., Palavan-Ünsal, N., Saruhan, N., 2002, Effect of polyamines on leaf rolling during drought stress in *Ctenanthe setosa* (Rosc.) Eichler, *Israel Journal of Plant Sciences*, 50(1), pp. 19-23.
 198. Elbl, P., Lira, B.S., Andrade, S.C.S., Jo, L., dos Santos, A.L.W., Coutinho, L.L., Floh, E.I.S., Rossi, M., 2015, Comparative transcriptome analysis of early somatic embryo formation and seed development in Brazilian pine, *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 120, pp. 903-915.

199. Krishnan, S.R.S., Siril, E.A., 2017, Auxin and nutritional stress coupled somatic embryogenesis in *Oldenlandia umbellata* L, *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 23(2), pp. 471-475.
200. Grzyb, M., Mikula, A., 2019, Explant type and stress treatment determine the uni- and multicellular origin of somatic embryos in the tree fern *Cyathea delgadii* Sternb, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 136(2), pp. 221-230.
201. Mansoor, S., Ali Wani, O., Lone, J.K., Manhas, S., Kour, N., Alam, P., Ahmad, A., Ahmad, P., 2022, Reactive oxygen species in plants: From source to sink, *Antioxidants*, 11, 225.
202. Nguyễn Văn Mã, 2015, *Sinh lý chống chịu điều kiện môi trường bất lợi của thực vật*, Nhà xuất bản Đại học Quốc gia Hà Nội.
203. Fortunato, S., Nigro, D., Lasorella, C., Marcotuli, I., Gadaleta, A., de Pinto, M.C., 2023, The Role of Glutamine Synthetase (GS) and Glutamate Synthase (GOGAT) in the Improvement of Nitrogen Use Efficiency in Cereals, *Biomolecules*, 13(12).
204. Kan, C.C., Chung, T.Y., Juo, Y.A., Hsieh, M.H., 2015, Glutamine rapidly induces the expression of key transcription factor genes involved in nitrogen and stress responses in rice roots, *BMC Genomics*, 16, pp. 1-15.
205. Ji, Y., 2011, *The role of cytosolic glutamine synthetases in abiotic stress and development in Arabidopsis thaliana*, Master thesis, University of Saskatchewan Saskatoon.
206. Medeiros, M., Silva, M., Granja, M., Silva-Junior, G., Camara, T., Willadino, L., 2014, Effect of exogenous proline in two sugarcane genotypes grown *in vitro* under salt stress, *Acta Biológica Colombiana*, 20.
207. Kibria, M., Farzana, K., Matin, M., Hoque, M., 2016, Mitigating water stress in wheat (BARI Gom-26) by exogenous application of proline, *Fundamental and Applied Agriculture*, 1, pp. 118-123.
208. Mandal, C., Ghosh, N., Maiti, S., Das, K., Gupta, S., Dey, N., Adak, M., 2013, Antioxidative responses of *Salvinia* (*Salvinia natans* Linn.) to aluminium stress and its modulation by polyamine, *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 19, pp. 91-103.
209. Zhong, M., Song, R., Wang, Y., Shu, S., Sun, J., Guo, S., 2020, TGase regulates salt stress tolerance through enhancing bound polyamines-mediated antioxidant enzymes activity in tomato, *Environmental and Experimental Botany*, 179, 104191.
210. Loyola-Vargas, V.M., Ochoa-Alejo, N., 2016, *Somatic Embryogenesis. An Overview*, in *Somatic embryogenesis. An overview in Somatic Embryogenesis: Fundamental Aspects and Applications*, V.M. Loyola-Vargas and N. Ochoa-Alejo, Editors, Springer International Publishing: Cham, pp. 1-8.
211. Richard, C., Lescot, M., Inzé, D., De Veylder, L., 2002, Effect of auxin, cytokinin, and sucrose on cell cycle gene expression in *Arabidopsis thaliana* cell suspension cultures, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 69, pp. 167-176.

212. Ayil-Gutiérrez, B., Galaz-Ávalos, R.M., Peña-Cabrera, E., Loyola-Vargas, V.M., 2013, Dynamics of the concentration of IAA and some of its conjugates during the induction of somatic embryogenesis in *Coffea canephora*, *Plant Signaling and Behavior*, 8, e26998.
213. Sun, Q., Zhang, N., Wang, J., Cao, Y., Li, X., Zhang, H., Zhang, L., Tan, D.X., Guo, Y.D., 2016, A label-free differential proteomics analysis reveals the effect of melatonin on promoting fruit ripening and anthocyanin accumulation upon postharvest in tomato, *Journal of Pineal Research*, 61(2), pp. 138-153.
214. Zhao, Y., Qi, L.W., Wang, W.M., Saxena, P.K., Liu, C.Z., 2011, Melatonin improves the survival of cryopreserved callus of *Rhodiola crenulata*, *Journal of Pineal Research*, 50(1), pp. 83-88.
215. Ramakrishna, A., Giridhar, P., Sankar, K.U., Ravishankar, G.A., 2012, Endogenous profiles of indoleamines: serotonin and melatonin in different tissues of *Coffea canephora* P ex Fr. as analyzed by HPLC and LC-MS-ESI, *Acta Physiologiae Plantarum*, 34, pp. 393-396.
216. Bezirganoglu, I., 2021, Promoting effects of melatonin supplements on the embryogenic callus maintainance in alfalfa (*Medicago sativa* L.), *Journal of the Institute of Science and Technology*, 11(2), pp. 927-932.
217. Saharan, V., Yadav, R., Yadav, N., Wiesman, Z., 2011, Somatic embryogenesis and plant regeneration of *Balanites aegyptiaca* Del (L.): an industrial important arid tree, *Journal of Cell and Tissue Research*, 11, 2529.
218. Saeed, T., Shahzad, A., 2015, High frequency plant regeneration in Indian Siris via cyclic somatic embryogenesis with biochemical, histological and SEM investigations, *Industrial Crops and Products*, 76, pp. 623-637.
219. Solórzano-Cascante, P., Sánchez-Chiang, N., Jiménez, V.M., 2018, Explant type, culture system, 6-benzyladenine, meta-topolin and encapsulation affect indirect somatic embryogenesis and regeneration in *Carica papaya* L., *Frontiers in Plant Science*, 9, 419213.
220. Ruduś, I., Kępczyńska, E., Kępczyński, J., 2002, Regulation of *Medicago sativa* L. somatic embryogenesis by gibberellins, *Plant growth regulation*, 36, pp. 91-95.
221. Jiménez, V.c.M., Bangerth, F., 2001, Hormonal status of maize initial explants and of the embryogenic and non-embryogenic callus cultures derived from them as related to morphogenesis *in vitro*, *Plant science*, 160(2), pp. 247-257.
222. Nakagawa, H., Saijyo, T., Yamauchi, N., Shigyo, M., Kako, S., Ito, A., 2001, Effects of sugars and abscisic acid on somatic embryogenesis from melon (*Cucumis melo* L.) expanded cotyledon, *Scientia Horticulturae*, 90(1-2), pp. 85-92.
223. Thi, L.T., Pleschka, E., 2005, Somatic embryogenesis of some *Daucus* species influenced by ABA, *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 79(1), pp. 1-4.

224. Su, Y.H., Su, Y.X., Liu, Y.G., Zhang, X.S., 2013, Abscisic acid is required for somatic embryo initiation through mediating spatial auxin response in *Arabidopsis*, *Plant Growth Regulation*, 69, pp. 167-176.
225. Kępczyńska, E., Kępczyński, J., 2023, Hormonal regulation of somatic embryogenesis in *Medicago* spp., *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 155(3), pp. 613-625.
226. Cui, K., Pei, X., Qin, L., Wang, J., Wang, Y., 1998, Effects of modulation of abscisic acid during somatic embryogenesis in *Lycium barbarum* L., *Shi yan Sheng wu xue bao*, 31(2), pp. 195-201.
227. Bezirganoglu, I., Yazıcılar, B., 2023, Salicylic acid improves somatic embryogenesis system in triticale using mature embryos, *Eurasian Journal of Molecular and Biochemical Sciences*, 2(1), pp. 14-18.
228. Quiroz-Figueroa, F., Méndez-Zeel, M., Larqué-Saavedra, A., Loyola-Vargas, V., 2001, Picomolar concentrations of salicylates induce cellular growth and enhance somatic embryogenesis in *Coffea arabica* tissue culture, *Plant Cell Reports*, 20, pp. 679-684.
229. Luo, J.P., Jiang, S.T., Pan, L.J., 2001, Enhanced somatic embryogenesis by salicylic acid of *Astragalus adsurgens* Pall.: relationship with H₂O₂ production and H₂O₂-metabolizing enzyme activities, *Plant Science*, 161(1), pp. 125-132.
230. Hao, L., Zhou, L., Xu, X., Cao, J., Xi, T., 2006, The role of salicylic acid and carrot embryogenic callus extracts in somatic embryogenesis of naked oat (*Avena nuda*), *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 85, pp. 109-113.
231. Wu, G.Y., Wei, X.L., Wang, X., Wei, Y., 2020, Induction of somatic embryogenesis in different explants from *Ormosia henryi* Prain, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 142(2), pp. 229-240.
232. Wang, G., Xu, C., Yan, S., Xu, B., 2019, An efficient somatic embryo liquid culture system for potential use in large-scale and synchronic production of *Anthurium andraeanum* seedlings, *Frontiers in Plant Science*, 10(29), pp. 1-9.
233. Lee, J.W., Kwon, N., Kim, J.U., Bang, K.H., Jung, S.M., Lee, S.W., Kim, D.H., Kim, Y.C., Jo, I.H., Park, Y.D., 2023, *In vitro* micropropagation of commercial ginseng cultivars (*Panax ginseng* meyer) via somatic embryogenesis compared to traditional seed production, *Horticulturae*, 9, 435.
234. Montalbán, I., De Diego, N., Moncaleán, P., 2012, Enhancing initiation and proliferation in radiata pine (*Pinus radiata* D. Don) somatic embryogenesis through seed family screening, zygotic embryo staging and media adjustments, *Acta Physiologiae Plantarum*, 34, pp. 451-460.
235. Hazubska-Przybył, T., Kalemba, E.M., Ratajczak, E., Bojarczuk, K., 2016, Effects of abscisic acid and an osmoticum on the maturation, starch accumulation and germination of *Picea* spp. somatic embryos, *Acta Physiologiae Plantarum*, 38, pp. 1-14.
236. Blanc, G., Lardet, L., Martin, A., Jacob, J.L., Carron, M.P., 2002, Differential carbohydrate metabolism conducts morphogenesis in embryogenic callus of

- Hevea brasiliensis* (Mull. Arg.), *Journal of Experimental Botany*, 53(373), pp. 1453-1462.
237. Du, Y., Cheng, F., Zhong, Y., 2020, Induction of direct somatic embryogenesis and shoot organogenesis and histological study in tree peony (*Paeonia sect. Moutan*), *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 141, pp. 557-570.
238. Lukose, R.M., 2013, The chemical composition of tender coconut (*Cocos nucifera* L.) water and coconut meat and their biological effect in human body, *International Journal of Green and Herbal Chemistry*, 2(3), pp. 723-729.
239. Farhatullah, F., Abbas, Z., Abbas, S., 2007, *In vitro* effects of gibberellic acid on morphogenesis of potato explant, *International Journal of Agriculture and Biology* 9, pp. 181-182.
240. Jiménez, V.M., 2001, Regulation of *in vitro* somatic embryogenesis with emphasis on to the role of endogenous hormones, *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 13, pp. 196-223.
241. Al-Khayri, J., 2010, Somatic embryogenesis of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) improved by coconut water, *Biotechnology*, 9(4), pp. 477-484.
242. Bhattacharya, S., Bandopadhyay, T., Ghosh, P., 2010, Somatic embryogenesis in *Cymbopogon pendulus* and evaluation of clonal fidelity of regenerants using ISSR marker, *Scientia Horticulturae*, 123(4), pp. 505-513.
243. Krug, M.G.Z., Stipp, L.C.L., Rodriguez, A.P.M., Mendes, B.M.J., 2005, *In vitro* organogenesis in watermelon cotyledons, *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 40, pp. 861-865.
244. Tô Thị Nhã Trâm, Trương Phi Yến, Tôn Trang Ánh, Hoàng Thanh Tùng, Hà Thị Mỹ Ngân, Dương Tấn Nhựt, 2020, Phát sinh phôi soma cây Đinh lăng lá xẻ nhỏ (*Polyscias fruticosa* L. Harms) thông qua nuôi cấy mẫu lá *ex vitro*, *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 18(3), pp. 497-506.
245. Hoàng Xuân Chiến, Ngô Thanh Tài, Nguyễn Bá Trực, Trần Xuân Tình, Lâm Bích Thảo, Trần Công Luận, Dương Tấn Nhựt, 2011, 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*, 9(3), pp. 317-331.
246. Faizal, A., Geelen, D., 2013, Saponins and their role in biological processes in plants, *Phytochemistry Reviews*, 12, pp. 877-893.
247. Nguyễn Thị Nhật Linh, Nguyễn Hoàng Lộc, Dương Tấn Nhựt, 2018, Ứng dụng elicitor vào sản xuất saponin trong nuôi cấy *in vitro* các loài thuộc chi Nhân sâm, *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 16(2), pp. 211-221.
248. Zhang, K., Wang, X., Ding, L., Li, J., Qu, C.L., Chen, L.G., Jin, H.Y., Zhang, H.Q., 2008, Determination of seven major ginsenosides in different parts of *Panax quinquefolius* L.(American Ginseng) with different ages, *Chemical Research in Chinese Universities*, 24(6), pp. 707-711.

249. Le, T.H., Lee, G.J., Vu, H.K., Kwon, S.W., Nguyen, N.K., Park, J.H., Nguyen, M.D., 2015, Ginseng saponins in different parts of *Panax vietnamensis*, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin (Tokyo)*, 63(11), pp. 950-954.
250. Zhang, N., Sun, J., Yin, L., Liu, J., Chen, C., 2023, Silver nanoparticles: From *in vitro* green synthesis to *in vivo* biological effects in plants, *Advanced Agrochem*, 2(4), pp. 313-323.
251. Syu, Y.-y., Hung, J.-H., Chen, J.-C., Chuang, H.-w., 2014, Impacts of size and shape of silver nanoparticles on Arabidopsis plant growth and gene expression, *Plant Physiology and Biochemistry*, 83, pp. 57-64.
252. Sun, J., Wang, L., Li, S., Yin, L., Huang, J., Chen, C., 2017, Toxicity of silver nanoparticles to Arabidopsis: Inhibition of root gravitropism by interfering with auxin pathway, *Environmental toxicology and chemistry*, 36(10), pp. 2773-2780.
253. Xu, L., Zhao, H., Ruan, W., Deng, M., Wang, F., Peng, J., Luo, J., Chen, Z., Yi, K., 2017, Abnormal inflorescence meristem functions in salicylic acid biosynthesis to maintain proper reactive oxygen species levels for root meristem activity in rice, *The Plant Cell*, 29(3), pp. 560-574.
254. Tripathi, D., Rai, K.K., Pandey-Rai, S., 2021, Impact of green synthesized WcAgNPs on *in-vitro* plant regeneration and withanolides production by inducing key biosynthetic genes in *Withania coagulans*, *Plant Cell Reports*, 40, pp. 283-299.
255. Mustafa, G., Sakata, K., Hossain, Z., Komatsu, S., 2015, Proteomic study on the effects of silver nanoparticles on soybean under flooding stress, *Journal of proteomics*, 122, pp. 100-118.
256. Ke, M., Qu, Q., Peijnenburg, W., Li, X., Zhang, M., Zhang, Z., Lu, T., Pan, X., Qian, H., 2018, Phytotoxic effects of silver nanoparticles and silver ions to *Arabidopsis thaliana* as revealed by analysis of molecular responses and of metabolic pathways, *Science of the total environment*, 644, pp. 1070-1079.
257. Sarmast, M., Niazi, A., Salehi, H., Abolmoghadam, A., 2015, Silver nanoparticles affect ACS expression in *Tecomella undulata in vitro* culture, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 121, pp. 227-236.
258. Tung, H.T., Nguyen, P.L.H., Van Lich, T., Ngan, H.T.M., Luan, V.Q., Khai, H.D., Mai, N.T.N., Vinh, B.V.T., Nhut, D.T., 2022, Enhanced shoot and plantlet quality of Gerbera (*Gerbera jamesonii* Revolution Yellow) cultivar on medium containing silver and cobalt nanoparticles, *Scientia Horticulturae*, 306, 111445.
259. Selvakesavan, R.K., Kruszka, D., Shakya, P., Mondal, D., Franklin, G., 2023, Impact of nanomaterials on plant secondary metabolism, *Nanomaterial interactions with plant cellular mechanisms and macromolecules and agricultural implications*, pp. 133-170.
260. Salih, A.M., Al-Qurainy, F., Khan, S., Nadeem, M., Tarroum, M., Shaikhaldein, H.O., 2022, Biogenic silver nanoparticles improve bioactive compounds in medicinal plant *Juniperus procera in vitro*, *Frontiers in Plant Science*, 13, 962112.

Số: 855 /QĐ-HVKHCN

Hà Nội, ngày 07 tháng 07 năm 2024

QUYẾT ĐỊNH
Về việc thành lập Hội đồng đánh giá luận án tiến sĩ cấp Học viện

GIÁM ĐỐC
HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ

Căn cứ Quyết định số 303/QĐ-VHL ngày 01/03/2023 của Chủ tịch Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam về việc ban hành Quy chế tổ chức và hoạt động của Học viện Khoa học và Công nghệ;

Căn cứ Thông tư số 08/2017/TT-BGDĐT ngày 04/04/2017 của Bộ trưởng Bộ Giáo dục và Đào tạo ban hành Quy chế tuyển sinh và đào tạo trình độ tiến sĩ;

Căn cứ Quyết định số 1948/QĐ-HVKHCN ngày 28/12/2018 của Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ về việc ban hành Quy định đào tạo trình độ tiến sĩ tại Học viện Khoa học và Công nghệ;

Căn cứ Quyết định số 1202/QĐ-HVKHCN ngày 21/10/2019 của Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ về việc công nhận nghiên cứu sinh trúng tuyển năm 2019, Chương trình thông thường - Tháng 09/2019;

Căn cứ Quyết định số 902/QĐ-HVKHCN ngày 14/07/2023 của Giám đốc Học viện về việc gia hạn thời gian học tập lần 1: 12 tháng từ 21/10/2023-21/10/2024 cho NCS. Trương Thị Lan Anh;

Xét đề nghị của Trưởng phòng Đào tạo.

QUYẾT ĐỊNH:

Điều 1. Thành lập Hội đồng đánh giá luận án tiến sĩ cấp Học viện cho nghiên cứu sinh Trương Thị Lan Anh với đề tài:

Nghiên cứu quá trình phát sinh phôi soma Sâm langbian (*Panax vietnamensis* var. *langbianensis*)

Ngành: Sinh lý học thực vật

Mã số: 9 42 01 12

Danh sách thành viên Hội đồng đánh giá luận án kèm theo Quyết định này.

Điều 2. Hội đồng có trách nhiệm đánh giá luận án tiến sĩ theo đúng quy chế hiện hành của Bộ Giáo dục và Đào tạo, Học viện Khoa học và Công nghệ.

Quyết định có hiệu lực tối đa 90 ngày kể từ ngày ký. Hội đồng tự giải thể sau khi hoàn thành nhiệm vụ.

Điều 3. Trưởng phòng Tổ chức - Hành chính và Truyền thông, Trưởng phòng Đào tạo, Trưởng phòng Kế toán, các thành viên có tên trong danh sách Hội đồng và nghiên cứu sinh có tên tại Điều 1 chịu trách nhiệm thi hành Quyết định này. /

Nơi nhận:

- Như Điều 3;
- Lưu hồ sơ NCS;
- Lưu: VT, ĐT, MT17.



GS.TS. Vũ Đình Lâm

**DANH SÁCH HỘI ĐỒNG ĐÁNH GIÁ LUẬN ÁN TIẾN SĨ
CẤP HỌC VIỆN**



(Kèm theo Quyết định số 855/QĐ-HVKHCN ngày 08/07/2024
của Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ)

Cho luận án của nghiên cứu sinh: Trương Thị Lan Anh

Về đề tài: Nghiên cứu quá trình phát sinh phôi soma Sâm langbian (*Panax vietnamensis* var. *langbianensis*)

Ngành: Sinh lý học thực vật Mã số: 9 42 01 12

Thầy hướng dẫn: 1. GS.TS. Dương Tấn Nhựt

- Viện Nghiên cứu khoa học Tây Nguyên, Viện Hàn lâm KHCNVN

2. PGS.TS. Nguyễn Phương Thảo

- Trường Đại học Quốc tế, Đại học Quốc gia TP. HCM

TT	Họ và tên, học hàm, học vị	Chuyên ngành	Cơ quan công tác	Chức trách trong Hội đồng
1	GS.TS. Nguyễn Huy Hoàng	Công nghệ sinh học	Viện Nghiên cứu hệ gen, Viện Hàn lâm KHCNVN	Chủ tịch
2	PGS.TS. Nguyễn Du Sanh	Sinh lý học thực vật	Trường Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia TP.HCM	Phản biện 1
3	PGS.TS. Nguyễn Vũ Phong	Công nghệ sinh học	Trường Đại học Nông lâm TP.HCM, Bộ Giáo dục và Đào tạo	Phản biện 2
4	PGS.TS. Hoàng Thị Kim Hồng	Sinh lý học thực vật	Trường Y Dược, Đại học Duy Tân	Phản biện 3
5	TS. Nguyễn Bá Nam	Khoa học cây trồng	Trường Đại học Đà Lạt, Bộ Giáo dục và Đào tạo	Ủy viên - Thư ký
6	PGS.TS. Trần Thanh Hương	Sinh lý học thực vật	Trường Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia TP.HCM	Ủy viên
7	PGS.TS. Trương Thị Bích Phượng	Sinh lý học thực vật	Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế	Ủy viên

(Hội đồng gồm 07 thành viên)./. *Jc*

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM
HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ
-----000-----



DANH SÁCH HỘI ĐỒNG
ĐÁNH GIÁ LUẬN ÁN TIẾN SĨ CẤP HỌC VIỆN

Nghiên cứu sinh: Trương Thị Lan Anh

Đề tài: Nghiên cứu quá trình phát sinh phôi soma Sâm langbian (*Panax vietnamensis* var. *langbianensis*)

Ngành: Sinh lý học thực vật

Mã số: 9 42 01 12

Thời gian: Bắt đầu từ 14h00, Thứ Sáu ngày 23 tháng 08 năm 2024.

TT	CHỨC DANH KHOA HỌC HỌ VÀ TÊN	ĐƠN VỊ CÔNG TÁC	TRÁCH NHIỆM	CHỮ KÝ
1.	GS.TS. Nguyễn Huy Hoàng	Viện Nghiên cứu hệ gen, Viện Hàn lâm KHCNVN	Chủ tịch	
2.	PGS.TS. Nguyễn Du Sanh	Trường Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia TP.HCM	Phản biện 1	
3.	PGS.TS. Nguyễn Vũ Phong	Trường Đại học Nông lâm TP.HCM, Bộ Giáo dục và Đào tạo	Phản biện 2	
4.	PGS.TS. Hoàng Thị Kim Hồng	Trường Y Dược, Đại học Duy Tân	Phản biện 3	
5.	TS. Nguyễn Bá Nam	Trường Đại học Đà Lạt, Bộ Giáo dục và Đào tạo	Ủy viên - Thư ký	
6.	PGS.TS. Trần Thanh Hương	Trường Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia TP.HCM	Ủy viên	
7.	PGS.TS. Trương Thị Bích Phượng	Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế	Ủy viên	

Danh sách này gồm 07 thành viên./.

BẢN NHẬN XÉT LUẬN ÁN TIẾN SĨ

Họ và tên người viết nhận xét luận án: Nguyễn Huy Hoàng

Học hàm, học vị: GS.TS.

Cơ quan công tác: Viện Nghiên cứu hệ gen

Họ và tên nghiên cứu sinh: Trương Thị Lan Anh

Tên đề tài luận án: Nghiên cứu quá trình phát sinh phôi soma sâm Lang Bian (*Panax vietnamensis* var. *langbianensis*)

Ý KIẾN NHẬN XÉT

1. Tính cần thiết, thời sự, ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài

Việc chăm sóc sức khoẻ sử dụng các dạng thực phẩm chức năng có nguồn gốc tự nhiên hiện nay đang là một xu thế trên thế giới và Việt Nam. Việc sử dụng các dạng thực phẩm chức năng này có tính an toàn và phòng tránh từ xa. Chính vì vậy, các nguồn thảo dược quý hiếm trong tự nhiên ngày càng cạn kiệt. Trong các dược thảo quý hiếm của Việt Nam phải kể đến chi Sâm (*Panax*) trong đó như sâm Ngọc Linh, sâm Lai Châu,... Gần đây các nhà nghiên cứu Việt Nam cũng đã phát hiện thêm một loại sâm mới tại tại huyện Lạc Dương, tỉnh Lâm Đồng và đặt tên là sâm Lang Bian. Sâm Lang Bian đang bị khai thác một bừa bãi, đến nay rất khó có thể tìm thấy các cá thể trong rừng tại tỉnh Lâm Đồng.

Chính vì vậy để bảo tồn và phát triển nguồn dược liệu quý hiếm giống sâm Lang Bian tại tỉnh Lâm Đồng, chúng ta cần phải nghiên cứu áp dụng các kỹ thuật khoa học nhân giống nhằm bảo tồn và đưa vào sản xuất. Trong đó việc nuôi cấy phôi soma là phương pháp đã và đang được áp dụng trên các giống sâm chi *Panax*. Do vậy đề tài nghiên cứu quá trình phát sinh phôi soma sâm Lang Bian sẽ góp phần trong việc bảo tồn phát triển nguồn dược liệu quý hiếm cũng như áp dụng vào cuộc sống bằng nguồn dược liệu này.

2. Sự không trùng lặp của đề tài nghiên cứu so với các công trình, luận văn, luận án đã công bố ở trong và ngoài nước; tính trung thực, rõ ràng và đầy đủ trong trích dẫn tài liệu tham khảo

Đề tài sử dụng nguồn dược liệu thu thập từ tại Lâm Đồng, Việt Nam giống sâm Lang Bian có tính chất bản địa mới được phát hiện năm 2016 do đó không có sự trùng lặp, trước đó các nghiên cứu tập trung vào sâm Ngọc Linh. Nghiên cứu sinh sử dụng 284 tài liệu tham khảo trong và ngoài nước được trích dẫn rõ ràng trong luận án.

3. Sự phù hợp giữa tên đề tài với nội dung, giữa nội dung với chuyên ngành và mã số chuyên ngành

Tên và nội dung cũng như chuyên ngành của nghiên cứu sinh là sinh lý học thực vật là hoàn toàn phù hợp với mã số 9420112.

4. Độ tin cậy và tính hiện đại của phương pháp đã sử dụng để nghiên cứu

Các phương pháp sử dụng được thực hiện có tính chọn lọc và kế thừa tại phòng thí nghiệm chuyên sâu về nuôi cấy mô thực vật như: Khử trùng bề mặt mẫu thực vật, nuôi cấy lớp mỏng tế bào,... các phương pháp hoá sinh như: hoạt tính enzyme chống oxy hoá (SOD, CAT và APX), phương pháp quang phổ tử ngoại, sắc ký lỏng siêu hiệu năng,... Ngoài ra còn sử dụng các phần mềm tin sinh học để phân tích số liệu. Các phương pháp này mang tính thường qui, hiện đại, có độ tin cậy cao, đáp ứng các nội dung đề ra.

5. Kết quả nghiên cứu mới của tác giả; những đóng góp mới cho sự phát triển khoa học chuyên ngành; đóng góp mới phục vụ cho sản xuất, kinh tế, quốc phòng, xã hội và đời sống. Ý nghĩa khoa học, giá trị và độ tin cậy của những kết quả đó.

Kết quả của đề tài: áp dụng được AgNPs khử trùng vào các mẫu thân rễ có tác dụng kích thích mẫu tái sinh chồi bất định. Phát sinh được hình thái nuôi cấy phôi soma lớp mỏng tế bào thông qua một số chất ảnh hưởng tới quá trình nuôi cấy như Auxin, Glutamine, proline, spermidine. Phát sinh hình thái phôi soma thứ cấp từ sơ cấp. Cuối cùng tạo được cây sâm từ phôi soma thứ cấp ngoài ra cũng xác định thêm hàm lượng saponin tích trong cây sâm Lang Bian.

Kết quả của đề tài có ý nghĩa trong việc nhân giống sâm Lang Bian tại tỉnh Lâm Đồng góp phần vào việc bảo tồn và phát triển nguồn dược liệu quý hiếm. Đây sẽ là tiền đề để phát triển nguồn giống phát triển nguồn dược liệu cho tỉnh Lâm Đồng góp phần phát triển kinh tế cho người dân, mang tính chất đặc hữu vùng miền của Việt Nam.

Kết quả này có độ tin cậy cao về khoa học được thông qua các bài báo khoa học quốc tế uy tín được cộng đồng thế giới công nhận. Đây cũng sẽ là nguồn tài liệu quan trọng trong nghiên cứu và giảng dạy tại các viện nghiên cứu và trường đại học trong và ngoài nước.

6. Ưu điểm và nhược điểm về nội dung, kết cấu và hình thức của luận án

Ưu điểm của luận án:

luận án được triển khai 4 nội dung nghiên cứu từ việc: Tạo nguồn mẫu in vitro (có độ tin cậy cao và chất lượng từ vật liệu đầu vào); Phát sinh phôi soma sơ cấp thông qua nuôi cấy lớp mỏng tế bào; Phát sinh phôi soma thứ cấp; Tạo cây sâm từ phôi soma thứ cấp và xác định hàm lượng saponin tích lũy trong cây sâm Lang Bian in vitro. Kết cấu các nội dung logic, hợp lý, có tính khoa học. Các kết quả rõ ràng được minh chứng bằng các hình ảnh, bảng biểu đẹp, phân tích kết quả rõ ràng có sự đánh giá, so sánh với các nghiên cứu trên các đối tượng nghiên cứu khác trước đó, dẫn chứng so sánh tài liệu tham khảo sát với nội dung nghiên cứu.

Hình thức của luận án được phân bố hợp lý: Mở đầu 3 trang, Tổng quan tài liệu: 38 trang, Vật liệu và nội dung và phương pháp nghiên cứu: 14 trang, Kết quả và thảo luận 58 trang, Kết luận và kiến nghị: 2 trang; Tài liệu tham khảo trong và ngoài nước 284 tài liệu: các tài liệu mới và cập nhật.

Nhược điểm của luận án:

Hình thức: Mục lục: Mở đầu không cần thiết phải viết toàn bộ tên các mục tại phần mở đầu (Không có ý nghĩa nhiều về thông tin vì quá ngắn và phần này mang tính giới thiệu). Một số bảng cần được đặt gần với câu văn trích dẫn để có thể tiện theo dõi như bảng 1.5, bảng 1.6: nên đưa vào một câu văn (Xem lại trích dẫn bảng trang 36).

Nội dung:

- + Phần tổng quan nên có thêm thông tin về các giống sâm khác ngoài sâm Ngọc Linh có giá trị kinh tế, nghiên cứu khác như sâm Lai Châu,... hoặc cách viết thể hiện được mang tính chất tổng thể về các giống sâm mới quý hiếm tại Việt Nam.
- + Nếu có thêm sơ đồ nghiên cứu tổng thể sau phần tổng quan hoặc trong phần vật liệu phương pháp nghiên cứu thì sẽ có cái nhìn tổng thể các nội dung thực hiện.
- + Phần phương pháp nghiên cứu không nhất thiết phải viết mục 2.3.1 Cách tiếp cận (mang tính đề tài nghiên cứu: các thông tin ở đây đưa ra không có ý nghĩa nhiều). Nếu có thêm hình ảnh về cây sâm Lang bian 10 năm thì có luận án có ý nghĩa nhiều hơn trong phần vật liệu thực vật. Thiết bị máy lớn nên được đưa vào danh mục như HPLC, UHPLC.
- + Số lượng tài liệu tham khảo là 284 khá dài so với một luận án (nên bỏ bớt một số tài liệu tham khảo quá lâu từ lâu từ năm 1972, 1974, 1980..).
- + Một số từ viết tắt tuy đã có trong danh mục ký hiệu chữ viết tắt, tuy nhiên khi bắt đầu viết trong câu văn đầu tiên cũng nên có chú thích bên cạnh để người đọc tiện theo dõi.

7. Nội dung của luận án đã được công bố trên tạp chí, kỷ yếu hội nghị khoa học nào và giá trị của các công trình đã công bố

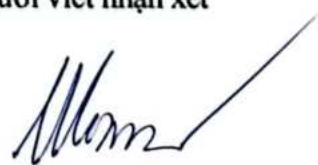
Nội dung luận án được đăng trên 2 bài báo quốc tế: 1 trên tạp chí Plant cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC) 2022: Q1, IF>2,8, H-index 98. Một bài trên tạp chí: South African Journal of Botany 2023: Q2, IF> 3, H-index 83. NCS đều là tác giả chính của 2 bài báo quốc tế SCIE, các nội dung của bài báo là một phần của kết quả nghiên cứu, đã cho thấy NCS đã thực hiện và làm chủ các kỹ thuật trong các nội dung nghiên cứu.

8. Kết luận chung:

NCS Trương Thị Lan Anh đã thực hiện nội dung của luận án có khối lượng công việc nghiên cứu khoa học, logic, hợp lý, công việc đồ sộ. Các nội dung của luận án đáp ứng với một luận án tiến sĩ chuyên ngành Sinh lý học thực vật. Đề nghị Hội đồng cho phép NCS được bảo vệ để nhận học vị TS.

Hà Nội, ngày 26 tháng 7 năm 2024

Người viết nhận xét



Nguyễn Huy Hoàng

BẢN NHẬN XÉT LUẬN ÁN TIẾN SĨ

Họ và tên người viết nhận xét luận án: **Nguyễn Du Sanh**

Học hàm, học vị: **PGS.TS**

Cơ quan công tác: **Trường ĐHKHTN- ĐHQGTPHCM**

Họ và tên nghiên cứu sinh: **Trương Thị Lan Anh**

Tên đề tài luận án: **Nghiên cứu quá trình phát sinh phôi soma sâm Lang Bian (*Panax vietnamensis* var. *langbianensis*)**

Ý KIẾN NHẬN XÉT

1. Tính cần thiết, thời sự, ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài

Sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) là loài sâm đặc hữu, có giá trị dược liệu rất cao vì có chứa hàm lượng cao saponin đặc trưng MR2, G-Rb1 và G-Rg1. Trong tự nhiên, sự hiện diện ngày càng bị thu hẹp do khai thác quá mức. Sâm Lang Bian (*Panax vietnamensis* var. *langbianensis*) là một thứ loài mới được phát hiện và công bố vào năm 2016 với sự phân bố hạn hẹp, nên việc nghiên cứu để bảo tồn và phát triển thứ loài này là một công việc rất cần thiết, có ý nghĩa khoa học. Muốn phát triển vùng trồng sâm Ngọc Linh *langbianensis* (dù phục vụ cho việc bảo tồn hay để khai thác) đều đòi hỏi phải sản xuất được nhiều cây giống có chất lượng cao, sống và cho thân rễ ngoài tự nhiên. Đây là một việc làm cần thiết vì nghiên cứu tạo cây sâm Ngọc Linh qua sự phát sinh phôi soma nếu thành công sẽ là một nguồn tư liệu quý về đối tượng (dược liệu) và phương pháp phù hợp để có thể đưa ra quy trình áp dụng cho các loại cây trồng có giá trị kinh tế khác. Chính vì thế, luận án có ý nghĩa khoa học và thực tiễn qua việc sử dụng thành tựu của công nghệ sinh học thực vật trong nghiên cứu một loài đặc sản, quý, hiếm, phân bố hẹp ở nước ta.

2. Sự không trùng lặp của đề tài nghiên cứu so với các công trình, luận văn, luận án đã công bố ở trong và ngoài nước; tính trung thực, rõ ràng và đầy đủ trong trích dẫn tài liệu tham khảo

Trên thế giới, có nhiều nghiên cứu về chi *Panax* ở các khía cạnh khác nhau đặc biệt chú trọng về dược tính. Ở Việt Nam gần đây các loại nhân sâm cũng được nhiều nhà khoa học quan tâm. Bản thân chưa thấy có sự trùng lặp về nội dung của công trình và luận án được công bố trước đây (đặc biệt với đối tượng là sâm Lang Bian). Đây là một công trình nghiên cứu khá chi tiết về nuôi cấy tạo nguồn mẫu (từ mẫu thân rễ 10 năm tuổi thu nhận ngoài tự nhiên, được khử trùng bằng dung dịch AgNPs và với kỹ thuật cắt lớp mỏng (TCL) đã đưa được mẫu vào ống nghiệm). Các mẫu cấy vô trùng này được sử dụng để tạo phôi soma qua việc bổ sung glutamine, proline, spermidine bên cạnh PGRs vào môi trường để khảo sát sự tạo phôi *in vitro* (sơ cấp) và (thứ cấp). Các phôi soma thứ cấp này được khảo sát sự sinh trưởng và tạo củ *in vitro* để thành các cây sâm Lang Bian con có chứa saponin so với cây sâm con sinh trưởng từ chồi bất định, đặc biệt là việc bổ sung 1,2 mg/L AgNPs vào môi trường giúp cho cây con tăng trưởng gấp đôi sau 20 tuần nuôi cấy (tr.111-112). Các kết quả thí nghiệm thu nhận được trình bày rõ; Các ghi nhận và lý giải có liên quan đến sự hình thành và phát triển phôi soma sâm Lang Bian đều được trích dẫn.

3. Sự phù hợp giữa tên đề tài với nội dung, giữa nội dung với chuyên ngành và mã số chuyên ngành

Tên đề tài luận án đã thể hiện đầy đủ qua nội dung nghiên cứu và phù hợp với ngành Sinh lý học thực vật và mã số 9.42. 01.12. Nội dung luận án phù hợp với cách đặt vấn đề (nêu được lý do và mục đích nghiên cứu). Luận án gồm 4 nội dung với 9 thí nghiệm được thực hiện. Đã thu thập được các số liệu chứng minh cho mục tiêu đề ra dựa vào các phương pháp được sử dụng trong nuôi cấy *in vitro* xử lý vật liệu bằng dung dịch AgNPs. Với kỹ thuật nuôi cấy lớp mỏng (TCL) đã tạo ra nguồn vật liệu *in vitro*. Từ nguồn vật liệu này đã nghiên cứu tiếp sự tạo phôi soma sơ cấp và thứ cấp với hàm lượng đường, nước dừa cùng các hóa chất như glutamine, proline, spermidine bên cạnh PGRs. Các phôi soma thứ cấp được cho tiếp tục sinh trưởng *in vitro* có bổ sung 1,2 mg/L AgNPs để theo dõi sự tạo thân rễ. Các thí nghiệm đã đạt được nhiều kết quả rất đáng chú ý.

4. Độ tin cậy và tính hiện đại của phương pháp đã sử dụng để nghiên cứu

Phương pháp nghiên cứu trong luận án là các phương pháp thường được sử dụng trong nghiên cứu về sinh lý học thực vật trong ống nghiệm như: khử trùng mẫu, kỹ thuật nuôi cấy lớp mỏng (TCL), tạo phôi soma (sơ & thứ cấp), tái sinh chồi, tạo cây con bằng cách sử dụng phytohormone (PGRs), polyamine cùng các yếu tố môi trường tác động đến sự sinh trưởng và tạo thân rễ của cây sâm Lang Bian trong điều kiện nuôi cấy *in vitro*. Bảng số liệu có tính thống kê; Hình ảnh minh họa rõ, có ghi chú bổ sung và thêm các lý giải (thảo luận) đã thuyết phục được người đọc.

5. Kết quả nghiên cứu mới của tác giả; những đóng góp mới cho sự phát triển khoa học chuyên ngành; đóng góp mới phục vụ cho sản xuất, kinh tế, quốc phòng, xã hội và đời sống. Ý nghĩa khoa học, giá trị và độ tin cậy của những kết quả đó.

Đã sử dụng AgNPs để khử trùng thân rễ ban đầu của sâm Lang Bian, dùng môi trường có bổ sung BA để tạo nguồn mẫu ban đầu cho việc nhân giống *in vitro*. Các thí nghiệm đã đưa ra được các thông số về tái sinh chồi và tạo phôi soma (phôi sinh dưỡng). Đặc biệt, đã sử dụng hàm lượng đường, nước dừa và bổ sung các polyamine như: glutamine, proline, spermidine bên cạnh PGRs để khảo sát quá trình tạo phôi soma sơ cấp và thứ cấp của thứ loài sâm Lang Bian. Từ các phôi soma thứ cấp khi có bổ sung 1,2 mg/L AgNPs đã tạo ra được cây con có thân củ *in vitro* nhanh gấp đôi so với đối chứng sau 20 tuần nuôi cấy. Từ đây có thể đưa ra trồng trong nhà ươm và có thể xây dựng được qui trình vi nhân giống cây sâm Lang Bian.

6. Ưu điểm và nhược điểm về nội dung, kết cấu và hình thức của luận án

Luận án phù hợp với cách đặt vấn đề (nêu được lý do và mục đích nghiên cứu). Luận án gồm 4 nội dung với 09 thí nghiệm được thực hiện, đã thu thập được các số liệu chứng minh cho mục tiêu đề ra dựa trên các phương pháp được sử dụng trong nuôi cấy *in vitro* xử lý hóa chất để tạo ra phôi soma và bước đầu tạo ra được cây sâm Lang Bian *in vitro* có tích lũy saponin (một dược chất của sâm) *in vitro*. Luận án có đầy đủ các phần theo quy định. Luận án trình bày trong 148 trang. Các phần được phân phối hợp lý. Mở đầu: (03 trang) với phần đặt vấn đề rõ (nêu được lý do và mục đích nghiên cứu); **Chương 1: Tổng quan tài liệu** (38 trang) tương đối đầy đủ (liên quan đến đối tượng, nội dung

nghiên cứu qua tham khảo các tài liệu đã xuất bản); **Chương 2: Vật liệu, Nội dung và Phương pháp Nghiên cứu** : (14 trang) Tương đối đầy đủ, rõ ràng; Gồm 4 nội dung với 09 thí nghiệm được thực hiện. **Nội dung 1:** Từ việc khử trùng bề mặt thân rễ bằng dung dịch AgNPs (tr.44- 46); Đến việc bổ sung dung dịch BA để nhân nhanh chồi *in vitro* (tr.46); **Nội dung 2:** Từ các lá và cuống lá của chồi qua kỹ thuật TCL (cắt ngang hay dọc) dưới ảnh hưởng của auxin và các loại polyamine để theo dõi sự phát sinh phôi sơ cấp (tr.46- 50); **Nội dung 3:** Từ các phôi soma hình thành đến dạng phôi thùy lồi (torpedo shape) được sử dụng để tạo các phôi soma thứ cấp trên các môi trường khoáng, hàm lượng đường cùng nước dừa khác nhau (tr.50- 53) **Nội dung 4:** Từ các phôi soma thứ cấp có lá mầm (cao 1,5 mm) và từ chồi bất định (cao 1,5 cm) được nuôi cấy để theo dõi sự sinh trưởng và sự tạo thân rễ (củ sâm) cũng như định lượng saponin sau 20 tuần. Đặc biệt với nghiệm thức bổ sung AgNPs 1,2 mg/L(tr.54); Hình thái, cấu trúc của mỗi giai đoạn sinh trưởng và phát triển cũng như các số liệu được ghi nhận. **Chương 3: Kết quả và Thảo luận:** (58 trang) Các kết quả của từng thí nghiệm được thể hiện qua hình ảnh, bảng biểu với số liệu có tính thống kê; Các kết quả được lý giải (thảo luận) logic qua các tài liệu tham khảo có liên quan. Cuối phần có một trang minh họa về quá trình nuôi cấy tạo phôi soma sâm Lang Bian *in vitro* (tr.54). **Kết luận và Kiến nghị:** (2 trang) Dựa trên kết quả thực nghiệm đã đúc kết lại các nội dung đặt ra và dựa vào đó đề xuất các công việc có liên quan. **Phần công trình đã công bố:** (1 trang) với 2 bài báo viết bằng tiếng Anh đăng trên 2 tạp chí, nhà xuất bản có uy tín ở nước ngoài. **Tài liệu tham khảo:** (32 trang) với 284 tài liệu bằng tiếng Việt và tiếng Anh có liên quan đến nội dung luận án và có tính cập nhật.

Ưu điểm:

Trình bày sạch đẹp, rõ ràng. Ít lỗi in ấn. Mỗi thí nghiệm đều có hình ảnh, bảng biểu đi kèm, lý giải các kết quả thể hiện qua nhiều tài liệu tham khảo phong phú và có tính cập nhật. Mỗi phần đều có tóm tắt nên dễ theo dõi. Đặc biệt nhất là phần tạo phôi soma sâm Lang Bian *in vitro* có nhiều thông tin rất đáng trân trọng. Từ đó đưa ra việc xây dựng quy trình vi nhân giống sẽ có sức thuyết phục cao hơn.

Hạn chế:

- Ở TN8 (tr.53): phôi soma dạng cây mầm và chồi bất định được nuôi.... (đây là 2 phần vật liệu riêng cần phải tách biệt);

- Phần Kết quả và Thảo luận: Việc nhân giống *in vitro* cây sâm Ngọc Linh gần đây đã có nhiều nghiên cứu với các phương pháp thường quy. Ở luận án này (sâm Lang Bian) tác giả có nghiên cứu thêm một số yếu tố mới (AgNPs= cho khử trùng và cho sự sinh trưởng tiếp theo của **phôi soma thứ cấp**), (bổ sung glutamine, proline, spermidine bên cạnh PGRs để khảo sát quá trình tạo **phôi soma sơ cấp**), các loại môi trường với một vài yếu tố bổ sung như hàm lượng đường, nước dừa. Tác giả đã giải thích (thảo luận) các kết quả từ điều kiện thí nghiệm trong LA so với các kết quả đã công bố trước. Tuy nhiên:

- Chưa lý giải vai trò của spermidine trên sự phát triển phôi soma sơ cấp trên cả hai loại vật liệu từ phiến lá và cuống lá. Trong khi đó lại đưa vào vai trò của melatonin (tr.90), acid salicylic (tr.94).

- Cũng chưa thấy lý giải vai trò của AgNPs trong sự sinh trưởng của phôi soma thứ cấp

thành cây con có thân rễ.

- Trong quá trình phát triển phôi soma sẽ có nhiều bất thường khi so sánh với sự phát triển phôi hợp tử. Chưa thấy tác giả đề cập đến hiện tượng này. Các phôi bất thường này vì sao lại có? Khả năng sinh trưởng thành cây có thân rễ như thế nào? Khi so sánh với sâm Ngọc linh hiện tượng bất thường giảm và làm tăng hợp chất thứ cấp như nghiên cứu của [10] khi sử dụng AgNPs (tr. 111,112).

- Nên có phần phụ lục minh họa thêm cho nội dung luận án

7. Nội dung của luận án đã được công bố trên tạp chí, kỷ yếu hội nghị khoa học nào và giá trị của các công trình đã công bố

Có 02 bài báo được công bố trên tạp chí chuyên ngành có uy tín ở nước ngoài: năm 2022 = 01 bài (Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC) (2022) 151:565–578), năm 2023 = 01 bài (South African Journal of Botany 163 (2023) 226_236) có liên quan đến nội dung luận án với tên tác giả luận án là người đứng đầu.

8. Kết luận chung:

So với yêu cầu thì luận án đáp ứng được yêu cầu về nội dung của một luận án tiến sĩ.

Bản tóm tắt đã thể hiện tương đối đầy đủ và trung thực nội dung của luận án.

Đề nghị luận án được đưa ra bảo vệ cấp Học viện để nhận bằng tiến sĩ ngành Sinh lý học Thực vật.

Tp. Hồ Chí Minh, ngày 27 tháng 07 năm 2024

Người viết nhận xét

(Phản biện1)



Nguyễn Du Sanh

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM

Độc lập – Tự do – Hạnh Phúc

BẢN NHẬN XÉT LUẬN ÁN TIẾN SĨ

Họ và tên người viết nhận xét luận án: Hoàng Thị Kim Hồng

Học hàm, học vị: PGS.TS. (Giảng viên Cao cấp)

Cơ quan công tác: Trường Y Dược, Đại học Duy Tân, Đà Nẵng

Họ và tên nghiên cứu sinh: Trương Thị Lan Anh

Tên đề tài luận án: Nghiên cứu quá trình phát sinh phôi soma sâm Lang Bian (*Panax vietnamensis* var. *langbianensis*)

Ý KIẾN NHẬN XÉT

1. Tính cần thiết, thời sự, ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài

Sâm Lang Bian (*Panax vietnamensis* var. *langbianensis*) là một đối tượng thực vật thuộc chi Sâm (*Panax*), được phát hiện ở vùng núi Langbian thuộc huyện Lạc Dương và Hòn Nga, tỉnh Lâm Đồng. Ở Việt Nam, sâm Lang Bian chỉ mới được nghiên cứu về đặc điểm phân bố trong năm 2016; và nghiên cứu đa dạng di truyền, trong năm 2019. Năm 2023, Sở Khoa học và Công nghệ tỉnh Lâm Đồng đã phê duyệt đề tài cấp cơ sở: “Sưu tập bảo tồn chuyển vị nguồn gen Sâm Langbian (*Panax vietnamensis* var. *langbianensis*) phân bố ở tỉnh Lâm Đồng” và giao Trường Đại học Đà Lạt chủ trì thực hiện với mục tiêu: Sưu tập và bảo tồn chuyển vị thành công nguồn gen Sâm Langbian phân bố ở Lâm Đồng. Do giá trị của Sâm Lang Bian rất lớn nhưng hiện nay thông tin về loại sâm này còn rất ít, chưa được khám phá và khai thác nhiều.

Đề tài luận án: “Nghiên cứu quá trình phát sinh phôi soma sâm Lang Bian (*Panax vietnamensis* var. *langbianensis*)” được nghiên cứu sinh (NCS) Trương Thị Lan Anh thực hiện nhằm tạo ra nguồn cây giống sâm Lang Bian *in vitro* có thân rễ tích lũy saponine Rg1, Rd và Rb1, là những loại saponine có giá trị dược liệu, có tiềm năng sử dụng trong y học. Kết quả trong nghiên cứu này sẽ là tiền đề và cơ sở khoa học cho việc tạo ra một lượng lớn nguồn cây giống sâm Lang Bian *in vitro* thông qua quá trình phát sinh phôi soma để phục vụ cho công tác trồng, bảo tồn và phát triển loại cây này ở Việt Nam.

Hướng nghiên cứu của đề tài này là một hướng nghiên cứu mới, cần thiết, mang tính thời sự, có ý nghĩa khoa học và ý nghĩa thực tiễn.

2. Sự không trùng lặp của đề tài nghiên cứu so với các công trình, luận văn, luận án đã công bố ở trong và ngoài nước; tính trung thực rõ ràng và đầy đủ trong trích dẫn tài liệu tham khảo

Đề tài nghiên cứu quá trình phát sinh phôi soma sâm Lang Bian của NCS Trương Thị Lan Anh là công trình đầu tiên ở nước ta đã ứng dụng kỹ thuật nuôi cấy tế bào để tạo nguồn mẫu *in vitro* sử dụng trong các nghiên cứu phát sinh phôi soma sơ cấp và thứ cấp thông qua nuôi cấy lớp mỏng tế bào (TCL), và tạo được cây sâm *in vitro* từ phôi soma thứ cấp có tích lũy saponin. Nghiên cứu này hướng đến việc thiết lập một quy trình nhân giống *in vitro* cây sâm Lang Bian ở quy mô phòng thí nghiệm thông qua kỹ thuật nuôi cấy lớp mỏng tế bào và là cơ sở khoa học để có thể phát triển cây sâm Lang Bian *in vitro* có tích lũy saponin ngoài tự nhiên.

Đề tài nghiên cứu trong luận án này là một đề tài hoàn toàn mới, không trùng lặp với các công trình, luận văn, luận án đã công bố trong và ngoài nước.

Luận án đã tham khảo và trích dẫn từ 290 tài liệu khác nhau, trong đó có dưới 10% tài liệu tiếng Việt, được trình bày chung với hơn 90% tài liệu tiếng Anh. Trong số các tài liệu được tham khảo thì tài liệu mới nhất được công bố trong 2023, trong đó có khoản 85 tài liệu mới được công bố trong 5 năm gần đây (từ 2019 đến 2023), chiếm khoản 29% tài liệu tham khảo (TLTK) trong toàn luận án. Nguồn TLTK này được tác giả tham khảo và trích dẫn tương đối rõ ràng, đầy đủ và trung thực.

3. Sự phù hợp giữa tên đề tài luận án với nội dung, giữa nội dung với chuyên ngành đào tạo và mã số chuyên ngành.

Tên đề tài luận án phù hợp với chuyên ngành đào tạo Sinh lý thực vật. Các nội dung thực hiện trong đề tài này phù hợp với chuyên ngành và mã số ngành đào tạo Sinh lý thực vật.

4. Độ tin cậy và tính hiện đại của phương pháp đã sử dụng để nghiên cứu

Luận án đã trình bày hoàn chỉnh các phương pháp thực nghiệm và kết quả đạt được trong nghiên cứu quá trình phát sinh phôi soma sâm Lang Bian qua bốn giải đoạn:

- (1) Tạo nguồn mẫu *in vitro*
- (2) Phát sinh phôi soma thông qua nuôi cấy lớp mỏng tế bào (TCL);
- (3) Phát sinh phôi soma thứ cấp;
- (4) Tạo cây sâm từ phôi soma thứ cấp và tích lũy saponin cây sâm Lang Bian *in vitro*.

Luận án đã cung cấp hoàn chỉnh phương pháp nghiên cứu tạo nguồn mẫu *in vitro* từ thân rễ sâm Lang Bian tự nhiên 10 năm tuổi, sử dụng cho nghiên cứu phát sinh phôi soma thông qua nuôi cấy TCL. Phát hiện được vai trò của AgNPs trong khử trùng mẫu và nhân nhanh chồi sâm Lang Bian, đồng thời xác định được các yếu tố ảnh hưởng chính đến quá trình phát sinh phôi soma thứ cấp và điều kiện tối ưu để tạo cây sâm Lang Bian *in vitro* từ phôi soma thứ cấp có hàm lượng saponin tích lũy cao.

Thiết bị, dụng cụ và hóa chất dùng trong luận án này hầu hết có nguồn gốc từ các hãng cung cấp chuyên nghiệp và uy tín của một số Quốc gia nổi tiếng trên thế giới. Ngoại trừ dung dịch nano bạc (AgNPs) được cung cấp bởi Viện Công Nghệ Môi Trường ở Việt Nam, còn tất cả các hóa chất khác được sử dụng trong luận án đều có nguồn gốc từ Nhật Bản, Đức, Hà Lan và Mỹ Hầu và có độ tinh sạch rất cao (96% -99%).

Những phương pháp nghiên cứu và kết quả thực nghiệm mà luận án đạt được trên đối tượng sâm Lang Bian là hoàn toàn mới, vừa có giá trị khoa học và thực tiễn, vừa có độ tin cậy cao.

5. Kết quả nghiên cứu mới của tác giả, những đóng góp gì mới cho sự phát triển khoa học chuyên ngành; đóng góp mới phục vụ cho sản xuất, kinh tế, quốc phòng, xã hội và đời sống. Ý nghĩa khoa học, giá trị thực tiễn và độ tin cậy của các kết quả đó.

Luận án thực hiện với 4 nội dung nghiên cứu chính: (1) Tạo nguồn mẫu *in vitro*; (2) Phát sinh phôi soma sơ cấp thông qua nuôi cấy lớp mỏng tế bào (TCL); (3) Phát sinh phôi soma thứ cấp; (4) Tạo cây sâm từ phôi soma thứ cấp và tích lũy saponin cây sâm Lang Bian *in vitro*.

Các kết quả thu được từ các nội dung này là những kết quả hoàn toàn mới và có giá trị khoa học và thực tiễn rõ rệt. Các nội dung của luận án được thực hiện với số lượng mẫu lớn và có lặp lại. Phương pháp bố trí thí nghiệm trong luận án nhìn chung khá hợp lý, logic và có tính khoa học. Kết quả của luận án được trình bày tuần tự qua từng nội dung, được nhận xét, so sánh và thảo luận với một số kết quả tương tự đạt được từ các đối tượng thực vật khác đã được công bố bởi một số tác giả trong và ngoài nước, từ đó khẳng định tính hợp lý của các kết quả đã đạt được trong toàn luận án, đồng thời làm rõ những phát hiện mới trong đề tài luận án này.

Kết quả của luận án đã được tác giả trình bày thông qua 22 bảng số liệu và 27 hình chụp các mẫu nghiên cứu trong toàn luận án. Số liệu về kết quả nghiên cứu của luận án được trình bày trong các bảng đều có xử lý thống kê và thể hiện sự khác biệt rõ rệt trong từng nội dung nghiên cứu. Các hình ảnh chụp mẫu của luận án được trình bày khá rõ ràng và có thước chuẩn kèm theo trên từng mẫu chụp, để quan sát và theo dõi. Số liệu trình bày trong luận án có tính mới và có độ tin cậy cao.

Kết quả của luận án này sẽ góp phần thiết lập và hoàn thiện quy trình nhân giống *in vitro* cây sâm Lang Bian thông qua quá trình phát sinh phôi soma để tạo ra nguồn giống cây sâm *in vitro* có thân rễ tích lũy saponine.

Mẫu thân rễ sâm Lang Bian *in vitro* 20 tuần tuổi, tích lũy saponine Rg1, Rd và Rb1, là những loại saponine có giá trị dược liệu, có tiềm năng sử dụng trong y học.

Nguồn cây sâm Lang Bian *in vitro* phát sinh từ phôi soma thứ cấp có hàm lượng saponin tích lũy cao sẽ là nguồn nguyên liệu quý giá trong việc nhân giống và phát triển cây sâm Lang Bian ngoài tự nhiên trên diện tích rộng.

Kết quả đạt được trong luận án này sẽ tạo tiền đề cho các nghiên cứu ứng dụng tiếp theo trong nhân giống và phát triển cây giống *in vitro* này trong điều kiện tự nhiên nhằm phục vụ sản xuất, kinh tế và đời sống của người dân.

6. Ưu điểm và nhược điểm về nội dung, kết cấu và hình thức của luận án

Ưu điểm

Nhìn chung luận án được chuẩn bị và trình bày khá tốt cả về hình thức lẫn nội dung. Các nội dung thực hiện trong luận án phù hợp với tên đề tài và đáp ứng mục tiêu đề ra. Kết quả thu được trong luận án có tính mới, có giá trị khoa học và thực tiễn rõ rệt. Số liệu từ kết quả có xử lý sai

số, các bảng và hình ảnh minh chứng được trình bày trong phần kết quả là rõ ràng, nên kết quả luận án có độ tin cậy.

Nhược điểm

Phần trình bày luận án vẫn còn một số sai sót nhỏ cần góp ý cụ thể như sau:

Thông nhất cách trình bày từ “sâm” hay “Sâm” trong toàn luận án (ví dụ ở trang 3).

- Trang 11: Kiểm tra lại nguồn gốc của Hình 1.1 nếu hình này không phải do NCS phát thảo mà trích dẫn từ tài liệu 16 thì bổ sung TLTK vào sau tên hình.
- Trang 13: Bổ sung TLTK vào đoạn cuối trang khi trình bày khái niệm về phôi soma.
- Số liệu về tỷ lệ mẫu phát sinh phôi soma (%) ở bảng 3.7 cho thấy giá trị này ở mẫu đối chứng ($93,32 \pm 9,15^a$) và mẫu có bổ sung 7,5 spermidine chứng ($93,32 \pm 9,15^a$) trùng khớp nhau 100% về giá trị chính và sai số nên cần kiểm tra xem số liệu này có bị nhầm lẫn không.

- Luận án này sử dụng rất nhiều loại môi trường nuôi cấy như MS, 1/2MS, SH có chứa thêm một số chất cơ bản trong kỹ thuật nuôi cấy mô tế bào như agar, tween-80, than hoạt tính, ...sau đó mới bổ sung thêm một số yếu tố bên ngoài như sucrose, nước dừa, NAA và 2,4-D, BA, TDZ, AgNPs, spermidine... để đánh giá tác động của các yếu tố này lên quá trình phát sinh phôi soma và tạo cây sâm *in vitro*. Tuy nhiên, khi trình bày cách tiến hành thí nghiệm trong phần “Phương pháp nghiên cứu” hoặc đưa ra kết luận về kết quả đạt được trong mỗi thí nghiệm ở phần: “Kết quả và Thảo luận”, NCS chỉ nêu riêng tên môi trường hoặc yếu tố tác động mà mình đang nghiên cứu chứ không nêu rõ đầy đủ môi trường nuôi cấy có các thành phần khác kèm theo mà mình sử dụng để kết hợp với yếu tố cần nghiên cứu.

Ví dụ cách tiến hành của thí nghiệm 2 (trang 46) được trình bày như sau: “ Các chồi sâm Lang Bian *in vitro* (kích thước khoảng 1 cm) được cấy trong môi trường SH có bổ sung BA...” là chưa chính xác vì môi trường SH không có chứa sucrose, agar mà thực tế môi trường nuôi cấy trong thí nghiệm này có chứa 30g/L sucrose và 8 g/L agar.

Ở đoạn cuối trang 71 có kết luận: “Sau 12 tuần nuôi cấy trên môi trường bổ sung spermidine, kết quả cho thấy spermidine ở nồng độ thấp (1,5-7,5 mg/L) có tác dụng tích cực đối với sự phát sinh phôi soma sơ cấp từ mẫu cấy L-tTCL.... Kết luận này chưa rõ ràng, NCS cần phải nêu cụ thể tên môi trường nuôi cấy và các thành phần cơ bản khác có trong môi trường nghiên cứu trước khi bổ sung spermidine). (Lưu ý góp ý này và chỉnh sửa tương tự trong các thí nghiệm còn lại của luận án).

Trang 70, kết luận : “Tóm lại auxin có ảnh hưởng đến sự phát sinh phôi soma sơ cấp từ các nguồn mẫu cấy L-tTCL và P-ITCL” là chưa chính xác bởi vì auxin là một nhóm chất kích thích sinh trưởng chứa nhiều chất khác nhau, trong khi luận án này chỉ nghiên cứu 2 chất là NAA và 2,4-D, do vậy NCS cần đưa ra kết luận đối với các chất mình đang nghiên cứu, không nên kết luận chung cho toàn nhóm auxin.

- Mục 3.1.1 và Bảng 3.1 ở chương: “Kết quả và thảo luận” nếu có thêm thí nghiệm mẫu đối chứng khử trùng bình thường như mẫu thí nghiệm và có dùng Tween 80 trong 30 phút nhưng không xử lý với AgNPs thì kết quả sẽ có tính thuyết phục hơn.

Ở trang 93 tên “*Arabidopsis thaliana*” cần in nghiêng “*Arabidopsis thaliana*”.

Tiêu đề của Hình 3.14 nên lược bỏ từ “thứ cấp” và điều chỉnh lại thành: “Sự phát sinh phôi soma sâm Lang Bian” vì trong hình này có cả hai loại hình phôi soma sơ cấp và thứ cấp. Ngoài ra, hình D là ảnh chụp hình phôi soma thứ cấp đã phát triển chứ không phải là các giai đoạn phát triển của phôi soma thứ cấp.

Tất cả môi trường nuôi cấy trong luận án này đều sử dụng 8,0g/L agar, nhưng trong mục 3.4.3 môi trường SH có sử dụng 9,0g/L agar, cần kiểm tra xem có nhầm lẫn không nếu không thì cần giải thích vì sao ở thí nghiệm này lại sử dụng nồng độ agar cao hơn các thí nghiệm khác.

Có 4 kết luận tác giả đưa ra trong luận án đều là các kết luận mới thu được từ nghiên cứu quá trình nghiên cứu phát sinh phôi soma sâm Lang Bian. Tuy nhiên cách trình bày mỗi kết luận chưa được rõ ràng và chính xác, cần lưu ý để diễn đạt thuyết phục hơn.

Một số điểm đáng lưu ý như sau:

Kết luận 1. “AgNPs ở nồng độ 0,15% không những cho hiệu quả tốt trong khử trùng mẫu thân rễ mà còn kích thích mẫu tái sinh chồi bất định” là kết luận không chính xác.

Góp ý: Kết luận này chưa đầy đủ vì thiếu môi trường nuôi cấy cơ bản trước khi bổ sung AgNPs. Cần lưu ý thêm trong phần trình bày cách tiến hành thí nghiệm này ở phần “Phương pháp thí nghiệm”, luận án chỉ trình bày một chất duy nhất là AgNPs không có môi trường nuôi cấy kèm các chất cơ bản đã sử dụng.

Kết luận 2. Kết luận: “Auxin có tác dụng tích cực đến sự phát sinh phôi soma thứ cấp từ các mẫu TCL...” là chưa chính xác.

Góp ý: Chỉ nên kết luận cho 2 chất trong nhóm auxin được sử dụng trong thí nghiệm này (xem góp ý ở trang 70 để trình bày hợp lý hơn).

Kiểm tra lại từ “thứ cấp” trong đoạn 2 của kết luận 2: “Glutamine, proline và spermidine đều có ảnh hưởng đến sự phát sinh phôi soma thứ cấp sâm Lang Bian, trong đó 1,5mg/L spermidine cho hiệu quả phát sinh phôi soma thứ cấp tốt nhất đối với cả hai loại mẫu thông qua nuôi cấy TCL lá vL-tTCL và cuống lá P-ITCL *in vitro*” vì các chất này được bố trí trong thí nghiệm để phát sinh phôi sơ cấp (trình bày ở mục 3.2.2 trang 70).

Sửa từ “enzym” thành “enzyme”.

Kết luận 3. Bổ sung 8,0 g/L agar vào kết luận 3: “Phôi soma thứ cấp chủ yếu có dạng lá mầm thu được từ nuôi cấy phôi soma sơ cấp dạng thùy lõi trên môi trường 1/2 MS bổ sung 1,0 mg/L 2,4 D, 40g/L sucrose và 15% nước dừa là nguồn vật liệu quan trọng trong nhân sinh khối sâm Lang Bian”. Vì trong bố trí thí nghiệm này môi trường nuôi cấy có chứa 8,0 g/L agar.

Kết luận 4. Thiếu thông tin về tên môi trường nuôi cấy cơ bản và thành phần bổ sung vào môi trường nuôi cấy cơ bản trước khi bổ sung AgNPs.

Góp ý: Có thể điều chỉnh như sau:

Cây con *in vitro* sâm Lang Bian có nguồn gốc từ phôi soma thứ cấp nuôi cấy trong môi trường SH có 30 g/L sucrose, 9,0 g/L agar, 1,0 g/L than hoạt tính, 0,5 mg/L BA, 0,5 mg/L NAA, bổ sung 1,2 mg/L AgNPs có khả năng sinh trưởng và phát triển tốt, cây sinh trưởng khỏe mạnh, lá to....”

Kiểm tra một số lỗi đánh máy và rà soát lại tất cả các TLTK được liệt kê trong phần TLTK đã được trích dẫn trong toàn luận án, loại bỏ các TLTK (nếu có) trong Danh mục TLTK nhưng chưa được trích dẫn trong luận án và ngược lại.

7. Nội dung của luận án đã được công bố trên tạp chí, kỹ yếu hội nghị khoa học nào và giá trị của các công trình đã công bố

Trong luận án này, tác giả đã công bố 2 bài báo trên các tạp chí Quốc tế, trong đó bài báo: “Micropropagation of Lang Bian ginseng: an endemic medicinal plant” được công bố trên tạp chí: “Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)” và bài báo: “Effect of spermidine, glutamine, and proline on somatic embryogenesis and silver nanoparticles supplied culture improved rhizome formation of *Panax vietnamensis* var. *langbianensis*” được công bố trên tạp chí: “South African Journal of Botany”. Hai bài báo được công bố đã phản ánh các kết quả chủ yếu của luận án và được đăng tải trên các tạp chí Quốc tế uy tín thuộc nhóm SCIE của Web of Science và thuộc nhóm Q1, Q2 theo Scimago Journal & Country Rank. Do vậy, hai bài báo đã được đăng của NCS trên hai tạp chí Quốc tế uy tín này đã đáp ứng về nội dung và chất lượng yêu cầu công bố của một luận án tiến sĩ.

8. Kết luận chung:

Bản tóm tắt luận án trình bày bằng tiếng Anh và tiếng Việt phản ánh trung thực các phần cơ bản của luận án, đồng thời tóm tắt được các nội dung và kết quả chính của luận án chính thức.

Bản luận án chính thức có nội dung và hình thức phù hợp, đáp ứng đầy đủ các yêu cầu của một luận án tiến sĩ của chuyên ngành Sinh lý thực vật.

Các công bố của luận án có chất lượng rất tốt, phù hợp với nội dung nghiên cứu và thời gian qui định của luận án Tiến sĩ. Số lượng và chất lượng bài báo khoa học của NCS đáp ứng và đạt yêu cầu công bố của một luận án Tiến sĩ.

Luận án đủ điều kiện đưa ra bảo vệ trước Hội đồng đánh giá luận án tiến sĩ cấp Học viện và tôi đánh giá cao về chất lượng và giá trị của luận án này và đồng ý để NCS bảo vệ luận án tiến sĩ cấp Học viện.

Huế, ngày 24 tháng 07 năm 2024



Hoàng Thị Kim Hồng

BẢN NHẬN XÉT LUẬN ÁN TIẾN SĨ

Họ và tên người viết nhận xét luận án: Nguyễn Vũ Phong

Học hàm, học vị: Phó giáo sư, tiến sĩ

Cơ quan công tác: Trường Đại học Nông lâm, Thành phố Hồ Chí Minh

Họ và tên nghiên cứu sinh: Trương Thị Lan Anh

Tên đề tài luận án: Nghiên cứu quá trình phát sinh phôi soma sâm Lang Bian (*Panax vietnamensis* var *langbianensis*)

Ý KIẾN NHẬN XÉT

1. Tính cần thiết, thời sự, ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài

Ở Việt Nam, sâm Lang Bian được nghiên cứu về đặc điểm phân bố (2016) và đa dạng di truyền (2019). Các kết quả của luận án có thể được sử dụng để quá trình phát sinh phôi soma một cách có hiệu quả, phục vụ cho vi nhân giống loài sâm này, góp phần giải quyết tình trạng khan hiếm giống phục vụ sản xuất loài dược liệu quý này.

2. Sự không trùng lặp của đề tài nghiên cứu so với các công trình, luận văn, luận án đã công bố ở trong và ngoài nước; tính trung thực, rõ ràng và đầy đủ trong trích dẫn tài liệu tham khảo

Luận án có tính mới, không trùng lặp với công bố trước đây.

Tài liệu được trích dẫn rõ ràng, đầy đủ, trung thực có độ tin cậy cao.

3. Sự phù hợp giữa tên đề tài với nội dung, giữa nội dung với chuyên ngành và mã số chuyên ngành

Tên đề tài luận án phù hợp với nội dung thực hiện. Nội dung thực hiện phù hợp với chuyên ngành Sinh lý học thực vật.

4. Độ tin cậy và tính hiện đại của phương pháp đã sử dụng để nghiên cứu

Các thí nghiệm được thực hiện với số lượng mẫu lớn và có lặp lại, phương pháp bố trí thí nghiệm hợp lý, logic. Số liệu được xử lý thống kê, phù hợp và đáng tin cậy.

Phương pháp nghiên cứu thường qui, phù hợp với các nội dung nghiên cứu, được thiết kế hợp lý, rõ ràng, chi tiết.

5. Kết quả nghiên cứu mới của tác giả; những đóng góp mới cho sự phát triển khoa học chuyên ngành; đóng góp mới phục vụ cho sản xuất, kinh tế, quốc phòng, xã hội và đời sống. Ý nghĩa khoa học, giá trị và độ tin cậy của những kết quả đó.

1. Xác định tác dụng hữu ích của AgNPs trong khử trùng mẫu và nhân nhanh chồi sâm Lang Bian, tạo nguồn mẫu *in vitro*.
2. Đã xác định nồng độ NAA và 2,4-D, và spermidine thích hợp cho tạo phôi soma sơ cấp từ mẫu cây L-tTCL và P-ITCL.

3. Đã xác định được môi trường phù hợp cho sự phát sinh phôi soma thứ cấp, cung cấp dữ liệu khoa học có tính chất tham khảo trong tạo phôi soma các loài sâm khác.
4. Đã tạo cây sâm từ phôi soma thứ cấp, có thể ứng dụng tạo nguồn giống phục vụ sản xuất.

6. Ưu điểm và nhược điểm về nội dung, kết cấu và hình thức của luận án

Ưu điểm: Kết quả nghiên cứu phong phú, sự sắp xếp các phần cân đối, hợp lý, số liệu đáng tin cậy. Kết quả của đề tài cung cấp dữ liệu khoa học cho công tác nhân giống sâm Lang Bian, có thể tham khảo cho các đối tượng cây trồng khác. Hình thức và nội dung luận án đáp ứng yêu cầu của luận án Tiến sĩ.

Những hạn chế của luận án: Một số hạn chế về hình thức, nội dung và văn phong có thể điều chỉnh, sửa chữa hoàn thiện được đánh dấu trong luận án.

7. Nội dung của luận án đã được công bố trên tạp chí, kỷ yếu hội nghị khoa học nào và giá trị của các công trình đã công bố

Nội dung luận án đã công bố 01 bài báo trên tạp chí Plant Cell, Tissue and Organ Culture (Q1) và 01 bài báo đăng trên tạp chí South African Journal of Botany (Q2). Hai bài báo được công bố đã phản ánh các kết quả chủ yếu của luận án.

8. Kết luận chung:

Luận án đáp ứng đầy đủ yêu cầu về nội dung và hình thức đối với một luận án tiến sĩ ngành Sinh lý học thực vật

Bản tóm tắt phản ánh trung thực nội dung cơ bản của luận án.

Đồng ý cho NCS trình luận án ra bảo vệ tại hội đồng chấm luận án tiến sĩ cấp Học viện để nhận bằng tiến sĩ.

Tp. HCM, ngày 25 tháng 7 năm 2024

Người viết nhận xét



Nguyễn Vũ Phong

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM

Độc lập - Tự do - Hạnh phúc

BẢN NHẬN XÉT LUẬN ÁN TIẾN SĨ

Họ và tên người viết nhận xét luận án: Nguyễn Bá Nam

Học hàm, học vị: Tiến sĩ

Cơ quan công tác: Trung Tâm nghiên cứu đa dạng sinh học và biến đổi khí hậu
- Trường Đại học Đà Lạt

Họ và tên nghiên cứu sinh: Trương Thị Lan Anh

Tên Đề tài luận án: Nghiên cứu quá trình phát sinh phôi soma sâm Lang Bian
(*Panax vietnamensis* var. *Langbianensis*)

Ý KIẾN NHẬN XÉT

1. Tính cần thiết, thời sự, ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài

Luận án “ Nghiên cứu quá trình phát sinh phôi soma sâm Lang Bian (*Panax vietnamensis* var. *Langbianensis*) ” đã đáp ứng được tính cần thiết, thời sự, có ý nghĩa khoa học và thực tiễn. Cách đặt vấn đề và giải quyết vấn đề của luận án được nhận xét là hợp lý.

2. Sự không trùng lặp của tên đề tài nghiên cứu so với các công trình, luận văn, luận án đã công bố ở trong và ngoài nước; Tính trung thực, rõ ràng và đầy đủ trong trích dẫn tài liệu tham khảo

Đã có một số công trình nghiên cứu về sự phát sinh phôi của các loại sâm nhưng đối tượng sâm Lang Bian là một đối tượng mới, đề tài nghiên cứu của tác giả không trùng lặp với các công trình đã công bố.

Phần tài liệu tham khảo gồm 284 tài liệu. Các tài liệu trình bày theo quy định, nội dung phù hợp với nội dung nghiên cứu của đề tài. Tài liệu được trích dẫn chính xác, rõ ràng và theo quy định. Các trích dẫn trong luận án đầy đủ.

3. Sự phù hợp giữa tên đề tài với nội dung, giữa nội dung với chuyên ngành và mã số chuyên ngành

Tên luận án phù hợp với nội dung nghiên cứu và phù hợp với chuyên ngành sinh lý thực vật cùng mã số chuyên ngành được đào tạo.

4. Độ tin cậy và tính hiện đại của phương pháp đã sử dụng để nghiên cứu

Luận án được thực hiện trên đối tượng sâm Lang Bian một loại dược liệu quý ở Việt Nam, tác giả đã sử dụng các phương pháp nghiên cứu: Phương pháp bố trí thí nghiệm vi nhân giống; Phương pháp xác định hàm lượng hormone nội sinh; Phương pháp xác định hoạt tính các enzyme chống oxy hóa (Superoxide dismutase, catalase, ascorbate peroxidase, 2,2-Diphenyl-1-picrylhydazyl); Phương pháp sử dụng hệ thống sắc ký siêu hiệu năng ghép đầu dò UV để xác định hàm lượng hợp chất thứ cấp: Saponin; Phương pháp quan sát giải phẫu hình thái phôi soma; Phương pháp theo dõi thí nghiệm, đánh giá các chỉ tiêu của các thí nghiệm. Số liệu được xử lý thống kê đảm bảo độ tin cậy. Các phương pháp tác giả sử dụng để nghiên cứu phù hợp cho thực hiện các nội dung nghiên cứu thực nghiệm mang tính hiện đại và độ tin cậy cao.

4. Kết quả nghiên cứu mới của tác giả; những đóng góp mới cho sự phát triển của khoa học chuyên ngành; đóng góp mới phục vụ cho sản xuất, kinh tế, quốc phòng, xã hội và đời sống. Ý nghĩa khoa học, giá trị và độ tin cậy của những kết quả đó

Dựa trên đối tượng thực vật cây Sâm Lang Bian (*P.vietnamensis* var. *Langbianensis*), tác giả đã tiến hành nghiên cứu quá trình phát sinh phôi soma và tạo củ *in vitro*.

Phần mở đầu: tác giả trình bày tầm quan trọng của sâm Lang Bian, là một đối tượng mới và có nhiều giá trị về dược liệu.

Phần tổng quan tài liệu: Trình bày tổng quan đầy đủ các công bố trong và ngoài nước liên quan với nội dung nghiên cứu của luận án.

Phần vật liệu và phương pháp nghiên cứu:

Vật liệu nghiên cứu là mẫu thân rễ cây sâm Lang Bian 10 năm tuổi, mẫu cuống lá, lá *in vitro*; mẫu phôi soma dạng hình thùy lõi và mẫu phôi soma dạng hình lá mầm được tách ra từ cụm phôi; phần thân rễ và rễ bất định. Có 4 nội dung nghiên cứu:

1. Tạo nguồn mẫu *in vitro*
2. Phát sinh hình thái thông qua nuôi cấy TCL
3. Tăng sinh phôi thứ cấp

4. Tạo cây sâm từ phôi Soma thứ cấp và tích lũy saponin ở sâm Lang Bian

Kết quả nghiên cứu: Kết quả nghiên cứu tác giả cho thấy AgNPs 0,15% ở 30 phút có tác dụng khử trùng mẫu thân rễ và kích thích tái sinh chồi hiệu quả. Ở nồng độ 1 mg/L BA hiệu quả nhân chồi *in vitro* cũng được thấy rõ. Cả hai loại mẫu cây lá và cuống lá đều có khả năng phát sinh phôi soma cao, bổ sung spermidine ở nồng độ 1,5 mg/L giúp quá trình phát sinh phôi soma diễn ra thuận lợi và giảm được các tác nhân oxy hóa. Bổ sung đường và nước dừa cũng được nhận định là thích hợp cho việc cải thiện sự phát sinh phôi soma và hình thành phôi soma thứ cấp, hàm lượng saponin trong mẫu rễ bất định và thân rễ *in vitro* 20 tuần tuổi đều có sự hiện diện của ginsenoside Rg1, Rd, Rb1 (đây là những loại saponin có giá trị dược liệu). Qua kết quả thu được, cho thấy tác giả đã thực hiện một khối lượng công việc lớn và kết quả thu được có ý nghĩa về mặt lý luận và trong thực tiễn ứng dụng sản xuất thương mại.

6. Ưu điểm và nhược điểm về nội dung, kết cấu và hình thức của luận án

Từ các kết quả nghiên cứu của mình tác giả đã rút ra 4 kết luận tổng kết đầy đủ các nội dung nghiên cứu của đề tài, đáp ứng được mục tiêu nghiên cứu.

Ưu điểm: Kết quả nghiên cứu phong phú, sự sắp xếp các phần khá hợp lý, số liệu đáng tin cậy. Phần kết luận, tổng kết được các nội dung nghiên cứu của đề tài. Các kết quả luận án đạt được có ý nghĩa khoa học và thực tiễn, dung lượng đảm bảo. Hình thức và Nội dung luận án đáp ứng yêu cầu của một luận án Tiến sĩ.

Những hạn chế của luận án:

- Ở mục tổng quan tài liệu ngoài việc nêu ra các yếu tố tác động đến sự hình thành phôi soma, tác giả cần bổ sung thêm các cơ chế phát sinh phôi soma (vì chuyên ngành của NCS là sinh lý thực vật nên cần bổ sung rõ phần con đường hình thành phôi soma ở thực vật); cơ chế ảnh hưởng của các loại enzyme oxy hóa đến mẫu cây.

- Ở mục kết quả, 3.1.2; 3.2.1: cần bổ sung thêm cơ chế tác động của Cytokinin, Auxin, các loại acid amin ảnh hưởng đến sự hình thành chồi và phát sinh phôi.

7. Nội dung của luận án đã được công bố trên tạp chí, kỷ yếu hội nghị khoa học nào và giá trị của các công trình công bố

NCS có hai bài báo quốc tế Q1 và Q2 (đứng tên đầu) trên hai tạp chí uy tín trong lĩnh vực chuyên môn là Plant Cell Tissue and Organ Culture và South African Journal of Botany. Phù hợp với nội dung nghiên cứu và đáp ứng yêu cầu đối với luận án tiến sĩ.

8. Kết luận chung:

a. Luận án của NCS Trương Thị Lan Anh có nội dung tốt, các kết quả luận án có ý nghĩa khoa học và thực tiễn, dung lượng đảm bảo cho 1 luận án Tiến sĩ để được bảo vệ tại Hội đồng cấp Học Viện.

b. Đồng ý cho NCS được bảo vệ tại hội đồng cấp Học Viện.

c. Nội dung và hình thức của luận án đã đáp ứng các yêu cầu của một luận án tiến sĩ nêu ở Quy chế đào tạo Sau đại học. Sau khi chỉnh sửa các lỗi như đã nêu trên, luận án đủ điều kiện đưa ra bảo vệ trước Hội đồng chấm luận án Tiến sĩ cấp Học viện để NCS nhận học vị Tiến sĩ.

Lâm Đồng, ngày 26 tháng 07 năm 2024

Người viết nhận xét



Nguyễn Bá Nam

BẢN NHẬN XÉT LUẬN ÁN TIẾN SĨ

Họ và tên người viết nhận xét luận án: Trần Thanh Hương

Học hàm, học vị: Phó giáo sư, tiến sĩ

Cơ quan công tác: Trường Đại học Khoa học Tự nhiên – ĐHQG Tp. HCM

Họ và tên nghiên cứu sinh: Trương Thị Lan Anh

Tên đề tài luận án: Nghiên cứu quá trình phát sinh phôi soma sâm Lang Bian (*Panax vietnamensis* var. *langbianensis*).

Ý KIẾN NHẬN XÉT

1. Tính cần thiết, thời sự, ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài

Sâm Lang Bian là một thứ thuộc loài sâm Việt Nam, được phát hiện và công bố năm 2016. Hiện nay, sâm Lang Bian tồn tại với số lượng cá thể khá ít, chủ yếu tập trung tại vùng núi Lang Bian, thuộc tỉnh Lâm Đồng. Do đó, cùng với sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv) và sâm Lai Châu (*Panax vietnamensis* var. *fuscidiscus*), sâm Lang Bian (*Panax vietnamensis* var. *langbianensis*) cũng cần được bảo vệ và phát triển. Trong các phương pháp có thể giúp bảo tồn và phát triển thực vật, vi nhân giống qua con đường tạo phôi soma là một trong những phương pháp hiệu quả, đã được thực hiện thành công ở nhiều đối tượng, trong đó có Sâm Ngọc Linh. Chính vì vậy, đề tài “Nghiên cứu quá trình phát sinh phôi soma sâm Lang Bian (*Panax vietnamensis* var. *langbianensis*)” vừa có ý nghĩa khoa học, vừa có giá trị thực tiễn.

2. Sự không trùng lặp của đề tài nghiên cứu so với các công trình, luận văn, luận án đã công bố ở trong và ngoài nước; tính trung thực, rõ ràng và đầy đủ trong trích dẫn tài liệu tham khảo

Chưa thấy có sự trùng lặp với các công trình, luận văn, luận án đã công bố trong và ngoài nước. Tài liệu tham khảo được trích dẫn khá rõ ràng và đầy đủ.

3. Sự phù hợp giữa tên đề tài với nội dung, giữa nội dung với chuyên ngành và mã số chuyên ngành

Tên đề tài phù hợp với nội dung nghiên cứu và nội dung nghiên cứu phù hợp với chuyên ngành và mã số chuyên ngành Sinh lý học thực vật.

4. Độ tin cậy và tính hiện đại của phương pháp đã sử dụng để nghiên cứu

Để thực hiện luận án, nghiên cứu sinh đã sử dụng kỹ thuật nuôi cấy *in vitro* và các phương pháp đo đạc thường được sử dụng trong các phòng thí nghiệm Sinh lý thực vật. Các thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên và có lặp lại nên có thể tin cậy.

5. Kết quả nghiên cứu mới của tác giả; những đóng góp mới cho sự phát triển khoa học chuyên ngành; đóng góp mới phục vụ cho sản xuất, kinh tế, quốc phòng, xã hội và đời sống. Ý nghĩa khoa học, giá trị và độ tin cậy của những kết quả đó.

Kết quả nghiên cứu của luận án góp phần cung cấp thêm thông tin về sự phát sinh phôi soma ở sâm Lang Bian, làm cơ sở cho việc vi nhân giống và bảo tồn giống cây này. Hầu hết các số liệu trong luận án đều được xử lý thống kê nên có thể tin cậy.

Sau đây là các kết quả đáng chú ý của luận án:

- Hiệu quả tạo phôi sơ cấp đạt cao nhất khi nuôi cấy lát mỏng cuống lá được cắt theo chiều dọc (P-1TCL) trên môi trường MS có bổ sung 2,4-D 1 mg/L và spermidine 1,5 mg/L.
- Môi trường thích hợp cho sự tăng sinh phôi soma là ½ MS (hàm lượng khoáng đa lượng giảm một nửa) có bổ sung 2,4-D 1 mg/L, sucrose 40 g/L và nước dừa 15%.

6. Ưu điểm và nhược điểm về nội dung, kết cấu và hình thức của luận án

Ưu điểm của luận án có nội dung phong phú với khá nhiều thí nghiệm được thực hiện. Các kết quả nghiên cứu đều được nghiên cứu sinh nhận xét và thảo luận. Kết cấu và cách trình bày luận án khá hợp lý với đầy đủ các phần của một luận án tiến sĩ. Tuy nhiên, luận án vẫn còn một vài điểm cần bổ sung và chỉnh sửa như sau:

- Trong phần mở đầu: mục tiêu nghiên cứu của luận án được nghiên cứu sinh trình bày khá chi tiết theo từng nội dung nghiên cứu nhưng chưa tập trung trả lời cho câu hỏi “Nghiên cứu quá trình phát sinh phôi soma sâm Lang Bian (*Panax vietnamensis* var. *langbianensis*) để làm gì?”
- Phần vật liệu, nội dung và phương pháp nghiên cứu:
 - + Về vật liệu nghiên cứu: ở mục 2.1.1. Vật liệu thực vật, chỉ nên trình bày vật liệu khởi đầu cho nghiên cứu là gì. Tuy nhiên, ở mỗi thí nghiệm, nghiên cứu

sinh nên trình bày ngắn gọn nhưng rõ ràng về nguồn gốc của vật liệu sử dụng (ví dụ: chồi/phôi đang tăng trưởng trên môi trường nào?).

- + Xem lại các bước tiến hành thí nghiệm ở thí nghiệm 2 (trang 46).
- + Mô tả rõ hơn về “N: Hệ số mẫu L-tTCL hoặc P-1TCL” (Trang 47), phương pháp xác định hàm lượng các chất nội sinh (trang 49, 50), số mẫu và số lần lặp lại ở mỗi nghiệm thức (trang 55),...
- + Ở mục 2.4. Quan sát hình thái giải phẫu (trang 54): nghiên cứu sinh có thực hiện “...quan sát trên kính hiển vi điện tử truyền suốt” hay không?, làm thế nào để “cắt thành từng lát mỏng 30 – 40 μm ”?
- + Bổ sung thông tin cụ thể việc thực hiện các thí nghiệm, phân tích: phần nào do nghiên cứu sinh trực tiếp thực hiện, phần nào do các thành viên thuộc nhóm nghiên cứu hỗ trợ thực hiện.
- **Phản kết quả và thảo luận:**
 - + Xem lại các cụm từ “Mẫu phát sinh phôi (%)”, “Mô sẹo (%)”, “Rễ bất định (%)”... (bảng 3.3, 3.4,...).
 - + Các nghiệm thức đối chứng trong các bảng và hình nên được mô tả.
 - + Một số hình không rõ (hình 3.4B, E, F); hoặc có kích thước nhỏ (hình 3.10, 3.13,...) nên khó theo dõi.
 - + Hình 3.17. Sắc ký đồ HPLC... (trang 109) nên được chuyển sang phần phụ lục.
 - + Vài số liệu chưa được xử lý thống kê (Hình 3.16) hay kết quả xử lý thống kê chưa được trình bày (bảng 3.13, 3.14).
 - + Để “Nghiên cứu quá trình phát sinh phôi soma sâm Lang Bian”, nghiên cứu sinh đã tiến hành hành khảo sát khá nhiều yếu tố ảnh hưởng lên sự phát sinh phôi sơ cấp và thứ cấp. Tuy nhiên, các thay đổi hình thái, đặc biệt ở mức tế bào trong quá trình phát sinh phôi chưa được phân tích kỹ. Do đó, chi tiết của quá trình phát sinh phôi soma ở sâm Lang Bian chưa được làm rõ.
- **Kết luận và đề nghị:**
 - + Kết luận nên được trình bày cụ thể hơn.
 - + Phần kiến nghị nên được ngắn gọn nhưng cụ thể.

- Phần tài liệu tham khảo: để dễ tham khảo, nghiên cứu sinh nên sắp xếp phần này theo thứ tự ABC.
- Về kết cấu:
 - + Nên bổ sung trang tóm tắt tiếng Việt và tiếng Anh.
 - + Bổ sung phần phụ lục với các thông tin chi tiết về sự khác biệt thành phần môi trường khoáng đã sử dụng trong thí nghiệm, các dữ liệu dùng để xác định hàm lượng các chất nội sinh,...
- Về hình thức: kiểm tra và chỉnh sửa các lỗi về kỹ thuật trình bày như lỗi đánh máy, cách viết câu,...
-

7. Nội dung của luận án đã được công bố trên tạp chí, kỷ yếu hội nghị khoa học nào và giá trị của các công trình đã công bố

Nội dung của luận án đã được nghiên cứu sinh cùng các cán bộ hướng dẫn và tập thể nhóm nghiên cứu đã công bố trong 2 bài báo, bao gồm: 1 bài đăng trên tạp chí “Plant Cell, Tissue and Organ Culture” và 1 bài đăng trên tạp chí “South African Journal of Botany”. Cả 2 tạp chí đều là tạp chí có uy tính, thuộc danh mục SCIE (Q1 và Q2), được công nhận bởi Hội đồng học hàm.

8. Kết luận chung:

- Luận án đáp ứng các yêu cầu về hình thức và nội dung của một luận án tiến sĩ, ngoại trừ một số điểm cần bổ sung và chỉnh sửa như đã được trình bày ở mục 6.
- Đề nghị cho nghiên cứu sinh được bảo vệ trước hội đồng đánh giá luận án tiến sĩ cấp Học viện.

Tp. HCM, ngày 26 tháng 7 năm 2024

Người viết nhận xét



Trần Thanh Hương

BẢN NHẬN XÉT LUẬN ÁN TIẾN SĨ

Họ và tên người viết nhận xét luận án: Trương Thị Bích Phượng

Học hàm, học vị: PGS.TS.

Cơ quan công tác: Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế

Họ và tên nghiên cứu sinh: Trương Thị Lan Anh

Tên đề tài luận án: Nghiên cứu quá trình phát sinh phôi soma sâm Lang Bian (*Panax vietnamensis* var. *langbianensis*)

Ý KIẾN NHẬN XÉT

1. Tính cần thiết, thời sự, ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài

Sâm Lang Bian (*Panax vietnamensis* var. *langbianensis*) là một **thứ** (varietas) trong sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis*) được phát hiện phân bố ở Lang Bian và Hòn Nga, tỉnh Lâm Đồng, Việt Nam. Sâm Lang Bian là một loại dược liệu quý, có giá trị y học cao, do vậy nhu cầu sử dụng sâm ngày càng tăng. Cũng như sâm Ngọc Linh hiện nay sâm Lang Bian bị người dân khai thác triệt để dùng làm thuốc và thương mại hóa. Hiện nay quần thể sâm Lang Bian còn số lượng cá thể ít và phân bố rải rác.

Phương pháp phát sinh phôi soma được ứng dụng trong vi nhân giống cho phép sản xuất số lượng lớn cây giống có chất lượng cao, đồng nhất về di truyền và giảm thời gian nuôi trồng. Nghiên cứu phát sinh phôi soma là một hướng ứng dụng công nghệ sinh học trong nông nghiệp, góp phần nâng cao năng suất và chất lượng sản phẩm nông nghiệp. Nghiên cứu phát sinh phôi soma giúp bảo tồn nguồn gen và phát triển giống cây trồng quý một cách hiệu quả. Việc phát triển cây giống từ phôi soma trong vi nhân giống giúp giảm áp lực khai thác từ tự nhiên, bảo vệ môi trường và đa dạng sinh học.

Đề tài vì vậy mà có ý nghĩa về lý luận khoa học đồng thời có giá trị thực tiễn cấp thiết.

2. Sự không trùng lặp của đề tài nghiên cứu so với các công trình, luận văn, luận án đã công bố ở trong và ngoài nước; tính trung thực, rõ ràng và đầy đủ trong trích dẫn tài liệu tham khảo

Đã có các nghiên cứu về nhân giống *in vitro* cây sâm *Panax vietnamensis*, nhưng nghiên cứu của tác giả là công bố đầu tiên về Nghiên cứu phát sinh phôi soma sâm Lang Bian. Đề tài không trùng lặp với các công trình đã công bố. Số liệu được thể hiện đầy đủ, rõ ràng trong báo cáo.

Các tài liệu được trích dẫn rõ ràng, đầy đủ và trung thực

Phần tài liệu tham khảo (32 trang) gồm 284 tài liệu có 26 tài liệu tiếng Việt, 258 tài liệu tiếng Anh, trong đó 85/284 tài liệu (29,9%) được xuất bản từ năm 2019 đến nay. Các tài liệu trình bày theo quy định, nội dung phù hợp với nội dung nghiên cứu của đề tài. Tài liệu được trích dẫn chính xác, rõ ràng và theo quy định. Các trích dẫn trong luận án đầy đủ và theo quy định.

3. Sự phù hợp giữa tên đề tài với nội dung, giữa nội dung với chuyên ngành và mã số chuyên ngành

Các nội dung thực hiện của đề tài phù hợp với chuyên ngành và mã số của chuyên ngành Sinh lý học thực vật.

4. Độ tin cậy và tính hiện đại của phương pháp đã sử dụng để nghiên cứu

Trên đối tượng cây sâm Lang Bian (*Panax vietnamensis* var. *langbianensis*) 10 năm tuổi thu tại vườn ươm núi Lang Bian và cây sâm Lang Bian *in vitro* 12 tuần tuổi được khoa Nông Lâm, trường Đại học Đà Lạt cung cấp, tác giả đã sử dụng các phương pháp: Phương pháp bố trí thí nghiệm Tạo nguồn mẫu *in vitro* sâm Lang Bian, Phát sinh phôi soma, Tạo cây từ phôi soma thứ cấp, Phương pháp xác định saponin bằng HPLC, Phương pháp quan sát giải phẫu hình thái phôi soma ở các giai đoạn phát triển khác nhau, phương pháp theo dõi thí nghiệm, đánh giá các chỉ tiêu của các thí nghiệm. Số liệu được xử lý thống kê đảm bảo độ tin cậy. Các phương pháp tác giả sử dụng để nghiên cứu là các phương pháp đã được nhiều tác giả trong và ngoài nước thực hiện cho các nghiên cứu tương tự cho các nghiên cứu theo hướng này. Các phương pháp nghiên cứu phù hợp cho thực hiện các nội dung nghiên cứu.

5. Kết quả nghiên cứu mới của tác giả; những đóng góp mới cho sự phát triển khoa học chuyên ngành; đóng góp mới phục vụ cho sản xuất, kinh tế, quốc phòng, xã hội và đời sống. Ý nghĩa khoa học, giá trị và độ tin cậy của những kết quả đó.

Về hình thức luận án:

Luận án được trình bày trong 148 trang, gồm 5 phần: Mở đầu (3 trang), Tổng quan nghiên cứu (38 trang), Nội dung, Vật liệu và Phương pháp nghiên cứu (14 trang), Kết quả và thảo luận (58 trang), Kết luận và kiến nghị (2 trang). Phần tài liệu tham khảo (32 trang). Tác giả đã sử dụng 15 bảng, 20 hình, rõ, đẹp ở phần kết quả được chú thích đầy đủ rõ ràng để biện luận và minh họa cho nghiên cứu của tác giả. Nhìn chung, bố cục luận án cân đối, các phần của luận văn được trình bày rõ ràng, mạch lạc, theo đúng quy định. Các hình, bảng được chú thích theo đúng quy định. Qua đó cho thấy hình thức luận án đáp ứng yêu cầu theo quy định. Kết quả thu được cho thấy tác giả đã thực hiện các nội dung đáp ứng mục tiêu đặt ra của đề tài.

Về Nội dung luận án:

Trên nguồn nguyên liệu là mẫu thân rễ cây sâm Lang Bian 10 năm tuổi và mẫu lá, cuống lá của cây sâm *in vitro* 12 tuần tuổi, tác giả đã tiến hành nghiên cứu tạo nguồn mẫu cấy và khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình phát sinh phôi soma và bước đầu tạo cây sâm Lang Bian hoàn chỉnh trong điều kiện nuôi cấy *in vitro*.

Mở đầu: tác giả giới thiệu sự cần thiết nghiên cứu quá trình phát sinh phôi soma sâm Lang Bian

Tổng quan tài liệu: Trình bày tổng quan đầy đủ các công bố trong và ngoài nước liên quan với nội dung nghiên cứu của đề tài, gồm: Tổng quan về chi *Panax* và tình hình nghiên cứu; Nuôi cấy phôi soma, Kỹ thuật nuôi cấy lớp mỏng tế bào, Nano bạc trong khử trùng và kích thích sinh trưởng mẫu cấy. Phần tổng quan các vấn đề nghiên cứu của tác giả là cơ sở cho tác giả thực hiện có kết quả nghiên cứu của mình.

Về vật liệu và phương pháp nghiên cứu: Vật liệu nghiên cứu là mẫu thân rễ cây sâm Lang Bian 10 năm tuổi và mẫu lá, cuống lá của cây sâm *in vitro* 12 tuần tuổi. Các phương pháp tác giả sử dụng để nghiên cứu là các phương pháp đã được nhiều tác giả trong và ngoài nước thực hiện cho các nghiên cứu tương tự và đó cũng là các phương pháp kinh điển cho các nghiên cứu theo hướng này.

Kết quả nghiên cứu: Qua quá trình nghiên cứu, tác giả đã thu được các kết quả trình bày trong các phần có liên hệ mật thiết nhau: nghiên cứu tạo nguồn mẫu *in vitro* sâm Lang Bian, Phát sinh phôi soma sơ cấp và thứ cấp, Tạo cây sâm từ phôi soma thứ cấp và xác định saponin tích lũy trong cây sâm Lang Bian *in vitro*.

Kết quả nghiên cứu tác giả đã cho thấy AgNP 0,15% cho hiệu quả khử trùng mẫu tốt và có tác dụng kích thích mẫu tái sinh chồi bất định. Môi trường SH bổ sung 1,0 mg/L BA, chồi sâm nhân nhanh tốt nhất với 12,60 chồi/mẫu, khối lượng tươi đạt 478,88 mg. Môi trường MS bổ sung 7 mg/L NAA cho tỷ lệ mẫu L-tTCL phát sinh phôi soma sơ cấp cao nhất (86,66%), môi trường bổ sung 1,5 mg/L 2,4-D cho số phôi soma cao nhất (40,40 phôi). Hệ số tăng điều chỉnh tăng trưởng (GCF) của mẫu L-tTCL cao nhất ở môi trường bổ sung 7,0 mg/L NAA.

Glutamine, proline và spermidine đều có ảnh hưởng đến quá trình phát sinh phôi soma thứ cấp. Môi trường MS bổ sung 1,5 mg/L spermidin, mẫu cấy L-tTCL và mẫu cây P-tTCL phát sinh phôi soma thứ cấp tốt nhất (đạt 93,32% mẫu phát sinh phôi; 54,20 phôi trên mẫu cấy L-tTCL và đạt 96,66% mẫu phát sinh phôi; 68,80 phôi trên mẫu cấy P-tTCL) và hoạt tính của các enzyme chống oxy hóa (SOD, CAT và APX) đạt cao nhất. Có sự biến động của hormone nội sinh trong từng giai đoạn của quá trình phát sinh phôi soma.

Môi trường 1/2MS thích hợp cho sự hình thành phôi soma thứ cấp với số lượng phôi tạo thành (39,2 phôi), khối lượng tươi (1005,34 mg/mẫu cụm phôi) và

khô lượng khô (77,90 mg/mẫu cụm phôi). Trên môi trường SH bổ sung 0,5 mg/L BA, 0,5 mg/L NAA, 1,2 mg/L AgNP giúp tăng tỷ lệ mẫu tạo thân rễ và cải thiện chất lượng cây con so với đối chứng. Kết quả phân tích hàm lượng saponin cho thấy mẫu rễ bất định và thân rễ sâm Lang Bian *in vitro* 20 tuần tuổi đều có sự hiện diện của saponin Rg1, Rd và Rb1, trong đó hàm lượng saponin Rg1, Rd, Rb1 và Rg1+Rd+Rb1 trong thân rễ cao hơn so với rễ bất định

Những phát hiện này là cơ sở cho nghiên cứu tiếp theo về nhân giống hiệu quả sâm Lang Bian phục vụ công tác gây trồng.

Trong quá trình nghiên cứu, tác giả đã thành công trong xác định ảnh hưởng của một số yếu tố gồm loại mẫu cấy lớp mỏng (L-iTCL, P-iTCL), loại môi trường nuôi cấy (MS, SH, WMP, B5), chất điều hòa sinh trưởng (2,4-D, NAA, IBA, TDZ, BA, Kinetin), nano bạc, spermidin, prolin, glutamine đến sự phát sinh phôi soma, tạo cây *in vitro* và sinh trưởng tiếp theo của cây sâm Lang Bian.

Qua kết quả thu được cho thấy tác giả đã thực hiện một khối lượng công việc lớn và kết quả thu được có ý nghĩa về mặt lý luận và có khả năng ứng dụng vào thực tiễn.

6. Ưu điểm và nhược điểm về nội dung, kết cấu và hình thức của luận án

Từ các kết quả nghiên cứu của mình tác giả đã rút ra các kết luận tổng kết đầy đủ các nội dung nghiên cứu của đề tài, đáp ứng được mục tiêu nghiên cứu.

Ưu điểm: Mục tiêu và nội dung nghiên cứu phù hợp với tên đề tài luận án và chuyên ngành Sinh lý học thực vật. Kết quả nghiên cứu phong phú, sự sắp xếp các phần cân đối, hợp lý, số liệu đáng tin cậy. Phần kết luận tổng kết được các nội dung nghiên cứu của đề tài. Các kết quả luận án đạt được là rất lớn, có ý nghĩa khoa học và thực tiễn, dung lượng đảm bảo. Kết quả của đề tài cung cấp cơ sở cho nghiên cứu ứng dụng nhân nhanh phôi soma sâm Lang Bian ở quy mô sản xuất, cung cấp nguồn nguyên liệu cho phát triển cây sâm Lang Bian *in vitro*, đáp ứng nhu cầu cây giống phục vụ công tác gây trồng. Về hình thức, luận án ít lỗi chính tả, các hình vẽ mô tả rõ và đẹp. Hình thức và Nội dung luận án đáp ứng yêu cầu của luận án Tiến sĩ.

Những hạn chế của luận án:

*** Phần mở đầu:**

Câu: “Phôi soma tiếp tục tăng sinh khối thông qua các chu kỳ hình thành phôi soma thứ cấp” (ưu điểm). Bên cạnh đó, cây con được chuyển từ điều kiện *in vitro* ra *ex vitro* có tỷ lệ sống rất thấp” (nhược điểm → ...”Bên cạnh ưu điểm, phương pháp vi nhân giống có nhược điểm là cây con...”

*** Phần Phương pháp:**

+ Thiết bị: kính hiển vi truyền suốt (trang 42)/Kính hiển vi điện tử truyền suốt (trang 55) → chính xác loại kính hiển vi sử dụng cho quan sát vi phẫu? (liên

quan độ dày lát cắt mẫu, địa điểm thực hiện)

+ Hóa chất: bổ sung TDZ

+ Nội dung 1. Thí nghiệm 1. Lắc mẫu trong ethanol 70% trong 10 phút (trang 44)?

Hình 2.1. Kiểm tra trình bày Sơ đồ thí nghiệm nghiên cứu tác động của AgNP (trang 45).

- Cụ thể về phương pháp chuẩn bị môi trường có bổ sung amino acid (glutamine, Proline), polyamine (spermidine) vào môi trường nuôi cấy (trang 48). Đặc biệt là Glutamine không ổn định ở nhiệt độ cao và có thể phân hủy khi tiệt trùng bằng autoclave.

+ Ở Thí nghiệm Định lượng hormone nội sinh, bổ sung loại hormone cần định lượng và phương pháp định lượng.

+ Bổ sung thời gian nuôi cấy ở Thí nghiệm 4 (trang 48), thống nhất với các thí nghiệm trên.

+ Câu "Sử dụng phần mềm phân tích thống kê SPSS 16.0 để xử lý các số liệu thu được, thực hiện so sánh ANOVA 1 yếu tố theo phương pháp Duncan test với $p < 0,05$ " → Nên chỉnh lại để câu rõ ràng và chính xác hơn: "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 $p < 0,05$."

- Kiểm tra các test thống kê sử dụng cho các biến đã hợp lý chưa?

- Phương pháp xử lý thống kê: Phân tích thống kê Duncan's test (trang 55), nhưng ở Bảng 3.13, 3.14 sử dụng kiểm định bằng T-test (trang 107, 108)?

* Kết quả:

- Phân phương pháp thực hiện phân tích ANOVA một yếu tố: Bổ sung làm rõ phân tích thống kê ở Bảng 3.1 (trang 56) có 3 biến phụ thuộc: Tỷ lệ mẫu nhiễm, Tỷ lệ mẫu hoại tử và Tỷ lệ mẫu sống; Bảng 3.2 (trang 62) có 2 nhân tố: Cytokinin: BA và Kinetin và nồng độ (4 nồng độ), có 3 biến phụ thuộc: Số chồi, chiều cao chồi và khối lượng tươi; Bảng 3.3. (trang 66), Bảng 3.4 (trang 67),...

- Số liệu Bảng 3.6. (trang 72). Số phôi soma trên mẫu ở 30 mg/L spermidine và 300-400 mg/L Proline?

- Bổ sung chú thích SD/SE vào các Biểu đồ ở Hình 3.1 (trang 57), Hình 3.8 (trang 77), Hình 3.9 (trang 86), Hình 3.10 (trang 87), Hình 3.11 (trang 88), Hình 3.12 (trang 89), Hình 3.13. (trang 96) để thống nhất với trình bày ở các Bảng.

- Xem lại đơn vị đo hoạt độ enzyme: superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), và ascorbate peroxidase (APX) U/g prot (trang 49)? → U/mg protein hoặc U/g fresh weight (FW)

- Bảng 3.13, Bảng 3.14: bổ sung chú thích ý nghĩa thống kê lên Bảng (*, **, *** hoặc ns)

- Hình thức:
- + Thống nhất trình bày đề mục “2.2.2.2. Nội dung 2.” (trang 46) → nghiêng, nhạ
- + Thống nhất cách trình bày các thí nghiệm: Thí nghiệm 2. “cách tiến hành” (trang 46)
- + Thêm dấu cách giữa phần số và phần đơn vị (trang 45, 50, 113)
- + Chú thích chữ viết tắt đơn vị U/g prot (trang 49)
- + “Định lượng hàm lượng hormone nội sinh” (trang 49) → “Định lượng hormone nội sinh”.
- + Phần kết luận: Bổ sung loại môi trường nuôi cấy sử dụng cho nghiên cứu Phát sinh hình thái thông qua nuôi cấy TCL.

7. Nội dung của luận án đã được công bố trên tạp chí, kỷ yếu hội nghị khoa học nào và giá trị của các công trình đã công bố

Hai công trình đã công bố của NCS năm 2022 và 2023 trên các tạp chí uy tín quốc tế, trong đó có 1 bài đăng ở TC PCTOC (Q1) và 1 bài đăng ở South Africa journal of Botany (Q2). Các bài báo có tên và nội dung phù hợp với kết quả đề tài của luận án. Các bài báo công bố trong khoảng thời gian thực hiện luận án.

8. Kết luận chung:

Luận án của NCS. Trương Thị Lan Anh có nội dung tốt, các kết quả luận án đạt được là rất lớn, có ý nghĩa khoa học và thực tiễn, dung lượng đảm bảo cho một luận án tiến sĩ. Đề tài không trùng lặp với các luận án đã công bố, đúng mã số chuyên ngành. Nội dung và hình thức của luận án đã đáp ứng các yêu cầu của một luận án tiến sĩ nêu ở Quy chế đào tạo Sau đại học, bản tóm tắt luận án phản ánh trung thực nội dung cơ bản của luận án. Luận án đủ điều kiện đưa ra bảo vệ trước Hội đồng chấm luận án cấp Học viện để NCS nhận học vị Tiến sĩ.

....., ngày 28 tháng 7 năm 2024

Người viết nhận xét



Trương Thị Bích Phượng

Lâm Đồng, ngày 23 tháng 08 năm 2024

QUYẾT NGHỊ
CỦA HỘI ĐỒNG ĐÁNH GIÁ LUẬN ÁN TIẾN SĨ CẤP HỌC VIỆN

Tên nghiên cứu sinh: **Trương Thị Lan Anh**

Về đề tài: “Nghiên cứu quá trình phát sinh phôi soma sâm Lang Bian (*Panax vietnamensis* var. *Langbianensis*)”

Chuyên ngành: Sinh lý thực vật Mã số: 9 42 01 12

Người hướng dẫn: 1. GS.TS. Dương Tấn Nhựt

- Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên, Viện Hàn lâm KHCNVN

2. PGS.TS. Nguyễn Phương Thảo

- Trường Đại học Quốc Tế - Đại học Quốc Gia TP. HCM

Số thành viên Hội đồng đánh giá luận án tiến sĩ cấp Học viện có mặt: 7/7

Hội đồng đánh giá luận án tiến sĩ cấp Học viện của NCS. Trương Thị Lan Anh đã họp từ 14 giờ 00 đến 17 giờ 45 tại Phòng họp tầng 1, Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên, 116 Xô Viết Nghệ Tĩnh, Phường 7, Đà Lạt, Lâm Đồng

Sau khi nghe nghiên cứu sinh Trương Thị Lan Anh trình bày nội dung luận án trong thời gian 30 phút, Hội đồng đã nghe các phản biện phát biểu nhận xét luận án; nghe thư ký Hội đồng đọc bản tổng hợp các ý kiến nhận xét luận án của các thành viên khác trong Hội đồng và nhận xét tóm tắt luận án của các nhà khoa học gửi đến. Hội đồng đã tiến hành thảo luận chung tại Hội trường, sau đó Hội đồng đã họp riêng và nhất trí quyết nghị như sau:

1. Kết quả bỏ phiếu đánh giá luận án của Hội đồng: 7/7 phiếu tán thành, 4/7 phiếu xuất sắc
2. Những kết luận khoa học cơ bản, những điểm mới, đóng góp mới của luận án: Luận án có tính mới, các nội dung nghiên cứu của luận án chưa được nghiên cứu trước đó, kết quả từ nghiên cứu có đóng góp cho khoa học và là dẫn liệu tham khảo có giá trị trong nghiên cứu về các loài sâm Việt Nam nói chung và Sâm Lang bian nói riêng và là tài liệu phong phú trong giảng dạy lĩnh vực sinh lý thực vật. Các đóng góp mới của luận án bao gồm: (1) Đề tài đã sử dụng nano Bạc khử trùng mẫu thân Lang Bian và nhân nhanh chồi sử dụng môi trường nuôi cấy có bổ sung BA để tạo nguồn mẫu ban đầu trong nghiên cứu quá trình phát sinh phôi soma sâm Lang Bian *in vitro*; (2) đánh giá được một số yếu tố tác động đến quá trình phát sinh phôi soma sơ cấp và thứ cấp thông qua nuôi cấy lớp mỏng tế bào; (3) Đã tạo ra được cây con có nguồn gốc từ phôi soma thứ cấp hình thành thân rễ *in vitro* có tích lũy saponin, có thể chủ động được nguồn cây giống phục vụ cho công tác bảo tồn và phát triển.
3. Cơ sở khoa học, độ tin cậy của những luận điểm và những kết luận nêu trong luận án: Các phương pháp nghiên cứu sử dụng trong luận án là thường quy phù hợp chuyên ngành, các kết quả nghiên cứu của luận án có cơ sở khoa học, không trùng lặp với các nghiên cứu trước đó và có độ tin cậy cao.

4. Ý nghĩa về lý luận, thực tiễn và những đề nghị sử dụng các kết quả nghiên cứu của luận án: Các kết quả của luận án có thể được sử dụng để tạo ra phôi soma sơ cấp và thứ cấp một cách có hiệu quả, phục vụ công tác nhân giống Sâm Lang biến *in vitro*, góp phần cung cấp số lượng lớn cây giống phục vụ cho công tác bảo tồn và phát triển đối tượng sâm đặc hữu và quý hiếm tại Lâm Đồng.
5. Những thiếu sót về nội dung và hình thức của luận án: Nội dung và hình thức phù hợp, tuy nhiên vẫn còn một số các thiếu sót cần chỉnh sửa và hoàn thiện theo nội dung góp ý của các thành viên trong hội đồng (theo như bản nhận xét).
6. Mức độ đáp ứng các yêu cầu của luận án: Nội dung nghiên cứu đáp ứng yêu cầu của luận án tiến sĩ
7. Những điểm cần bổ sung, sửa chữa (nếu có) trước khi nộp luận án cho Thư viện Quốc gia Việt Nam:
 - Chỉnh sửa theo các ý kiến góp ý của các thành viên trong Hội đồng.
 - Bổ sung mục tiêu chung cho luận án;
 - bổ sung thêm thông tin một số giống Sâm Khác ở Việt Nam
 - Chỉnh sửa phần kết luận trọng tâm, cụ thể, phù hợp với kết quả hơn.
8. Kết luận:
 - Luận án đáp ứng đầy đủ các yêu cầu của một luận án Tiến sĩ chuyên ngành Sinh lý thực vật
 - Bản tóm tắt của luận án phản ánh trung thành các nội dung cơ bản của luận án.
 - Căn cứ kết quả bỏ phiếu, Hội đồng đánh giá luận án tiến sĩ cấp Học viện đề nghị cấp học vị Tiến sĩ Sinh lý thực vật cho nghiên cứu sinh Trương Thị Lan Anh.

THƯ KÝ HỘI ĐỒNG



Nguyễn Bá Nam

CHỦ TỊCH HỘI ĐỒNG



Nguyễn Huy Hoàng

XÁC NHẬN CỦA CƠ SỞ ĐÀO TẠO

**KT. GIÁM ĐỐC
PHÓ GIÁM ĐỐC**



Nguyễn Thị Trung

Lâm Đồng, ngày 23 tháng 08 năm 2024

BIÊN BẢN HỘI ĐỒNG ĐÁNH GIÁ LUẬN ÁN TIẾN SĨ CẤP HỌC VIỆN

Nghiên cứu sinh: **Trương Thị Lan Anh**

Đề tài: “Nghiên cứu quá trình phát sinh phôi soma sâm Lang Bian (*Panax vietnamensis* var. *Langbianensis*)”

Chuyên ngành: Sinh lý thực vật

Mã số: 9 42 01 12

Người hướng dẫn: 1. GS.TS. Dương Tấn Nhựt

- Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên, Viện Hàn lâm KHCNVN

2. PGS.TS. Nguyễn Phương Thảo

- Trường Đại học Quốc Tế - Đại học Quốc Gia TP. HCM

Quyết định thành lập Hội đồng số: 76/QĐ-HVKHCN ngày 28/02/2024 của Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ.

Thời gian họp: 14 giờ ngày 23 tháng 8 năm 2024

Địa điểm: Phòng họp tầng 1, Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên, 116 Xô Viết Nghệ Tĩnh, phường 7, Đà Lạt, Lâm Đồng

NỘI DUNG

1. Từ 14 giờ 00 đến 14 giờ 30:

- Đại diện cơ sở đào tạo tuyên bố lý do, đọc Quyết định thành lập Hội đồng đánh giá luận án cấp Học viện. Đề nghị Chủ tịch Hội đồng điều khiển buổi họp.

- Chủ tịch Hội đồng điều khiển buổi họp:

+ Tuyên bố số thành viên Hội đồng có mặt: 07/7 (có danh sách kèm theo)

+ Số khách mời tham dự buổi bảo vệ: 11 người.

+ Thư ký hội đồng đọc lý lịch khoa học và kết quả học tập của nghiên cứu sinh.

2. Từ 14 giờ 20 đến 14 giờ 50:

- Nghiên cứu sinh **Trương Thị Lan Anh** trình bày nội dung luận án.

3. Từ 14 giờ 50 đến 16 giờ 00:

- Phản biện 1: PGS. TS. Nguyễn Du Sanh, đọc nhận xét luận án, nêu lên các ưu nhược điểm và những điều cần chỉnh sửa bổ sung (kèm theo toàn văn nhận xét).

- Phản biện 2: PGS. TS. Nguyễn Vũ Phong, đọc nhận xét luận án, nhất trí với ý kiến của phản biện 1, nêu lên các ưu nhược điểm và những điều cần chỉnh sửa bổ sung (kèm theo toàn văn nhận xét).



- Phản biện 3: PGS. TS. Hoàng Thị Kim Hồng, tán đồng với ý kiến của 2 phản biện trước, đọc nhận xét luận án, nêu các ưu nhược điểm và những điều cần chỉnh sửa bổ sung (kèm theo toàn văn nhận xét).

Các câu hỏi của thành viên Hội đồng và câu trả lời của nghiên cứu sinh: (ghi rõ họ tên, học vị, chức danh khoa học của người hỏi)

Câu hỏi:

1. PGS. TS. Nguyễn Du Sanh:

- Vai trò của spermidine và nano bạc đến sự hình thành và sinh trưởng của phôi?
- Hiện tượng bất thường trong quá trình phát sinh phôi soma?

2. PGS. TS. Nguyễn Vũ Phong:

- Phương pháp thu số liệu đối với tỷ lệ phôi ở các giai đoạn khác nhau?
- Cơ sở chọn 1,2 mg/L nano bạc nghiên cứu khả năng sinh trưởng và tạo thân rễ?
- Tại sao chọn rễ bất định và thân rễ để xác định hàm lượng saponin?

Trả lời của nghiên cứu sinh Trương Thị Lan Anh đối với phản biện:

Nghiên cứu sinh cảm ơn và tiếp nhận các ý kiến đóng góp của hội đồng, sẽ nghiêm túc chỉnh sửa theo góp ý, một số giải trình của Nghiên cứu sinh:

1. Vai trò của spermidine đến sự hình thành và sinh trưởng của phôi?

Thúc đẩy sự phân chia tế bào; Điều chỉnh sự biểu hiện của gen liên quan đến phát sinh phôi soma; Bảo vệ tế bào chống lại stress oxy hóa.

2. Vai trò của nano bạc đến sự hình thành và sinh trưởng của phôi?

Điều chỉnh tổng hợp và tác động các con đường truyền tín hiệu hormone; Chuyển hóa năng lượng; Tăng cường tổng hợp các chất chống oxy hóa; Tổng hợp các hoạt chất thứ cấp như một cơ chế bảo vệ.

3. Hiện tượng bất thường trong quá trình phát sinh phôi soma?

Trong quá trình nuôi cấy có phát hiện một số phôi bất thường chẳng hạn hiện tượng đa phôi, phôi thiếu cực chồi hoặc cực rễ, phôi có nhiều lá mầm. Tuy nhiên, tỉ lệ phôi bất thường ghi nhận không nhiều. Nguyên nhân: Tùy thuộc vào đối tượng thực vật, kiểu gen, tính ổn định di truyền, nguồn gốc phôi soma (trực tiếp hoặc gián tiếp), chất điều hòa sinh trưởng thực vật.

4. Phương pháp thu số liệu đối với tỷ lệ phôi ở các giai đoạn khác nhau: Cụm phôi được quan sát dưới kính lúp soi nổi, phôi ở các giai đoạn khác nhau được tách rời, đếm số lượng và tính tỷ lệ phôi hình thành ở các giai đoạn.

5. Cơ sở chọn 1,2 mg/L nano bạc nghiên cứu khả năng sinh trưởng và tạo thân rễ?

Luận án kế thừa nghiên cứu của Cuong và cộng sự (2021): sử dụng 1,2 mg/L AgNPs cho hiệu quả tốt nhất đối với sự sinh trưởng và tạo thân rễ cây sâm Ngọc Linh *in vitro*.

7. Tại sao lại chọn rễ bất định và thân rễ để xác định hàm lượng saponin?

Đối với các loài thuộc chi *Panax*, hàm lượng saponin thường tập trung tích lũy trong phần rễ, trong khi các bộ phận khác của cây như thân, lá có hàm lượng saponin tích lũy rất thấp. Do đó, đề tài sử dụng phần thân rễ và rễ bất định để nghiên cứu khả năng tích lũy saponin dưới tác động của các điều kiện nuôi cấy.

Ý kiến nhận xét từ các thành viên khác của hội đồng:

- PGS. TS. Trần Thanh Hương, nhất trí với ý kiến nhận xét của 3 thành viên phản biện, đọc bản nhận xét luận án, nêu lên các ưu nhược điểm và một số điểm cần bổ sung, chỉnh sửa (kèm theo toàn văn nhận xét).

- PGS. TS. Trương Thị Bích Phượng: nhất trí với ý kiến nhận xét của 3 thành viên phản biện, đọc bản nhận xét luận án, nêu lên các ưu nhược điểm và một số điểm cần bổ sung, chỉnh sửa (kèm theo toàn văn nhận xét).

Câu hỏi:

Trình bày cụ thể về phương pháp chuẩn bị môi trường có bổ sung amino acid (glutamine), polyamine (spermidine) vào môi trường nuôi cấy?

- GS.TS. Nguyễn Huy Hoàng: đọc nhận xét và nêu lên các ưu nhược điểm cũng như một số lỗi cần chỉnh sửa để luận án được hoàn thiện hơn (kèm theo toàn văn nhận xét).

Câu hỏi:

+ Xác định hàm lượng các chất nước dừa đảm bảo như thế nào đối với thí nghiệm?

+ Phần tổng quan nên có thêm thông tin về các giống sâm khác ngoài sâm Ngọc Linh có giá trị kinh tế, nghiên cứu khác như sâm Lai Châu,... hoặc cách viết thể hiện được mang tính chất tổng thể về các giống sâm mới quý hiếm tại Việt Nam.

- TS. Nguyễn Bá Nam, đọc nhận xét và nêu lên các ưu nhược điểm cũng như một số lỗi cần chỉnh sửa để luận án được hoàn thiện hơn (kèm theo toàn văn nhận xét).

Trả lời của nghiên cứu sinh đối với các thành viên khác:

Nghiên cứu sinh cảm ơn và tiếp nhận các ý kiến đóng góp của hội đồng, sẽ nghiêm túc chỉnh sửa theo góp ý.

1. Nghiên cứu sinh bổ sung cụ thể phương pháp chuẩn bị môi trường có bổ sung amino acid (glutamine), polyamine (spermidine) vào môi trường nuôi cấy. Glutamine và spermidine không ổn định ở nhiệt độ cao và có thể phân hủy khi tiệt trùng bằng autoclave nên được bổ sung vào môi trường nuôi cấy (đã hấp khử trùng) qua màng lọc.

2. Luận án sẽ bổ sung nguồn gốc cụ thể nước dừa sử dụng trong thí nghiệm nghiên cứu: Nước dừa sử dụng cho thí nghiệm được thu từ trái dừa non khoảng 7-8 tháng tuổi, giống dừa xiêm (*Cocos nucifera*)

3. Luận án sẽ bổ sung thêm thông tin về các giống sâm khác ngoài sâm Ngọc Linh có giá trị kinh tế, nghiên cứu khác như sâm Lai Châu vào phần tổng quan.

Ý kiến của Giáo viên hướng dẫn:

GS. TS. Dương Tấn Nhật: cảm ơn các ý kiến đóng góp của các thành viên hội đồng, nghiên cứu sinh cần tiếp thu và chỉnh sửa một cách nghiêm túc.

4. Từ 16 giờ 40 đến 17 giờ 00: Nghỉ giải lao

5. Từ 17 giờ 00 đến 17 giờ 30: Họp hội đồng riêng

- Thông qua kết luận của Hội đồng (có văn bản kèm theo).
- Ghi phiếu nhận xét luận án.

Kết quả kiểm phiếu 7/7 thành viên tán thành và đề nghị Học viện cấp học vị Tiến sĩ Sinh lý thực vật cho nghiên cứu sinh **Trương Thị Lan Anh**.

6. Từ 17 giờ 30 đến 17 giờ 45

- Chủ tịch Hội đồng đọc kết luận của hội đồng đánh giá luận án.
- Hội đồng kết thúc lúc 17 giờ 45 phút, Thứ Sáu, ngày 23 tháng 08 năm 2024.

THƯ KÝ HỘI ĐỒNG

CHỦ TỊCH HỘI ĐỒNG


Nguyễn Bội Nam


Nguyễn Huy Hoàng

XÁC NHẬN CỦA CƠ SỞ ĐÀO TẠO

**KT. GIÁM ĐỐC
PHÓ GIÁM ĐỐC**




Nguyễn Thị Trung



**BẢN GIẢI TRÌNH CHỈNH SỬA, BỔ SUNG LUẬN ÁN TIẾN SĨ
CẤP HỌC VIỆN**

Ngày 23 tháng 08 năm 2024, Học viện Khoa học và Công nghệ đã tổ chức đánh giá luận án tiến sĩ cấp Học viện cho nghiên cứu sinh Trương Thị Lan Anh theo Quyết định số 855/QĐ-HVKHCN ngày 08 tháng 07 năm 2024 của Giám đốc Học viện.

Đề tài: Nghiên cứu quá trình phát sinh phôi soma Sâm langbian (*Panax vietnamensis* var. *langbianensis*)

Ngành: Sinh lý học thực vật,

Mã số: 9 42 01 12

Người hướng dẫn khoa học: GS.TS. Dương Tấn Nhựt

PGS.TS. Nguyễn Phương Thảo

Theo Biên bản của Hội đồng, NCS phải bổ sung và chỉnh sửa luận án các điểm sau đây:

STT	Nội dung đề nghị chỉnh sửa, bổ sung	Nội dung đã được chỉnh sửa, bổ sung
1	Bổ sung, chỉnh sửa hình thức trình bày theo ý kiến đóng góp của thành viên trong Hội đồng	<p>NCS ghi nhận và đã chỉnh sửa theo ý kiến của Hội đồng:</p> <ul style="list-style-type: none">- NCS đã thống nhất cách trình bày từ “sâm” trong toàn luận án- Hình 1.1 do NCS phát thảo, không phải trích dẫn từ tài liệu 16 (Trang 13)- Tiêu đề của Hình 3.14 điều chỉnh lại thành: “Sự phát sinh phôi soma sâm Lang Bian”, Hình D điều chỉnh thành “Phôi soma thứ cấp ở các giai đoạn phát triển khác nhau” (Trang 110)- NCS đã kiểm tra và chỉnh sửa các lỗi về kỹ thuật trình bày trong toàn luận án- NCS đã rà soát và bổ sung một số từ viết tắt trong toàn luận án- NCS đã thay đổi vị trí của bảng 1.5, bảng 1.6 gần với câu văn trích dẫn để tiện theo dõi (Trang 21 và trang 32)- NCS đã chỉnh sửa các cụm từ thành “Tỷ lệ mẫu phát sinh phôi (%)”, “Tỷ lệ mẫu

		<p>tạo mô sẹo (%)”, “Tỷ lệ mẫu tạo rễ bất định (%)” ở bảng 3.3 và 3.4 (Trang 74, trang 75)</p>
2	Bổ sung mục tiêu chung cho luận án	<p>NCS đã bổ sung mục tiêu nghiên cứu chung của luận án theo góp ý của Hội đồng (Trang 2): “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 <i>in vitro</i> có tích lũy saponin”</p>
3	Bổ sung thêm thông tin một số giống sâm khác ở Việt Nam ngoài sâm Ngọc Linh	<p>NCS đã bổ sung thêm thông tin và tình hình nghiên cứu một số giống sâm khác tại Việt Nam ngoài sâm Ngọc Linh (Trang 9 -11)</p>
4	Ở mục tổng quan tài liệu bổ sung thêm quá trình phát sinh phôi soma và ảnh hưởng của các loại enzyme chống oxy hóa đến mẫu cấy	<p>NCS đã bổ sung quá trình phát sinh phôi soma và ảnh hưởng của các loại enzyme chống oxy hóa đến mẫu cấy:</p> <p>- <i>Quá trình phát sinh phôi soma</i> (Trang 17 – 19):</p> <p>“Tế bào bắt đầu phân chia lần đầu tiên theo chiều ngang tạo thành hai tế bào không đều nhau, bao gồm một tế bào ngọn (kích thước nhỏ, nguồn gốc của phôi soma) và một tế bào gốc (kích thước lớn hơn, nguồn gốc của dây treo). Sau các lần phân chia, các tiền bì (protoderm), sơ khởi và phôi soma ở giai đoạn hình cầu xuất hiện. Giai đoạn phôi hình cầu là khởi đầu của sự phân hóa cấu trúc trong quá trình phát sinh phôi soma, tiền bì đóng vai trò như lớp ngoài của phôi giúp phôi tạo hình dạng thông qua tác động vật lý với các tế bào bên trong, đồng thời điều hòa sự phân chia và biệt hóa tế bào trong phôi [59]</p> <p>Tiếp sau đó, các vùng mô phân sinh chồi và rễ được hình thành và thường bắt đầu vào cuối giai đoạn phôi hình cầu và cấu trúc này được nhận thấy rõ ràng ở giai đoạn phôi có lá mầm. (Hình 1.2).”</p> <p>- <i>Ảnh hưởng của các loại enzyme chống oxy hóa đến mẫu cấy</i> (trang 38 – 39)</p>

		<p>“Nhiều nghiên cứu chứng minh rằng có mối quan hệ giữa việc tăng cường sản xuất ROS và cải thiện khả năng phát sinh phôi soma ở nhiều đối tượng thực vật. Tuy nhiên, mức độ ROS vừa phải có thể cảm ứng các tế bào soma thay đổi hình thái và biệt hóa. Ngược lại, hàm lượng ROS quá mức sẽ phá vỡ tính thấm của màng và cũng như các đại phân tử sinh học như lipid, protein và acid nucleic, dẫn đến mất tính toàn năng của tế bào và thậm chí làm chết tế bào [130]. Để hạn chế ảnh hưởng của ROS, thực vật có cơ chế kiểm soát hàm lượng ROS bằng cách sinh tổng hợp các enzyme chống oxy hóa như catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) và ascorbate peroxidase (APX), cũng như các chất chống oxy hóa không phải enzyme như ascorbate, glutathiol dạng khử (GSH), α – tocopherol (vitamin E), carotenoid, proline, glycine betain, polyamine. Các chất chống oxy hóa này bảo vệ tế bào thông qua việc loại bỏ các ROS, tương tác với các gốc hữu cơ để làm gián đoạn chuỗi oxy hóa, chuyển đổi peroxide tạo ra các sản phẩm bền như rượu, aldehyde, giảm nồng độ oxy tự do.”</p>
5	<p>Ở mục 2.1.1. ở mỗi thí nghiệm nên trình bày ngắn gọn nguồn gốc của vật liệu sử dụng</p>	<p>NCS đã chỉnh sửa bổ sung nguồn gốc vật liệu sử dụng và môi trường nuôi cấy cụ thể cho từng thí nghiệm (Trang 51, 53, 57 và 59)</p> <p><i>Thí nghiệm 1:</i> “Vật liệu là mẫu thân rễ (đường kính 1,5 cm) của cây sâm Lang Bian 10 năm tuổi được thu thập từ vùng núi Langbiang (Lâm Đồng, Việt Nam) với chiều dài thân rễ khoảng 9 cm, không biểu hiện sâu bệnh được sử dụng làm nguồn vật liệu ban đầu cho nghiên cứu.” (Trang 51)</p> <p><i>Thí nghiệm 2:</i> “Các mẫu cây lá, cuống lá của cây sâm Lang Bian <i>in vitro</i> 12 tuần tuổi nuôi cấy trong môi trường MS có bổ sung 30 g/L sucrose, 8,0 g/L agar và BA hoặc kinetin (kết quả tốt nhất thu được từ thí nghiệm 2) sử dụng làm nguồn mẫu cho</p>

		các thí nghiệm phát sinh phôi soma sơ cấp.” (Trang 53)
6	Mô tả rõ hơn về “N: Hệ số mẫu L-tTCL hoặc P-tTCL”	NCS đã mô tả rõ hơn về cách tính hệ số mẫu N (Trang 54): “Hệ số mẫu L-tTCL (NL-tTCL) là 10 tương ứng với số lượng mẫu L-tTCL thu được từ một mẫu lá hoặc P-tTCL (NP-tTCL) là 6 tương ứng với số lượng mẫu P-tTCL thu được từ một mẫu cuống lá”.
7	Mô tả rõ hơn về phương pháp xác định hàm lượng các hormone nội sinh và nêu cụ thể các hormone nội sinh cần phân tích	NCS đã bổ sung phương pháp xác định hàm lượng các hormone nội sinh và nêu cụ thể các hormone nội sinh cần phân tích (Trang 56 - 57)
8	Cụ thể về phương pháp chuẩn bị môi trường có bổ sung glutamine	NCS đã trình bày cụ thể phương pháp chuẩn bị môi trường và bổ sung glutamine (Trang 49): “Glutamine dạng bột (Độ tinh khiết > 99%, Sigma-Aldrich, Hoa Kỳ) được điều chỉnh đến nồng độ mong muốn bằng nước cất vô trùng và bổ sung vào môi trường nuôi cấy đã được hấp tiệt trùng qua màng lọc khử trùng (0,45 µm, Sigma-Aldrich, USA)”
9	NCS cần nêu rõ thành phần môi trường nuôi cấy kết hợp với yếu tố cần nghiên cứu.	NCS đã bổ sung đầy đủ môi trường nuôi cấy có các thành phần khác kèm theo kết hợp với yếu tố cần nghiên cứu - Mục 3.2.1.1.: “Sự phát sinh hình thái từ mẫu L-tTCL sâm Lang Bian nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung 30 g/L sucrose, 8,0 g/L agar và auxin (2,4-D, NAA và IBA.)” (Trang 71) - Mục 3.2.1.2.: “Đối với mẫu L-tTCL, sự phát sinh phôi tốt nhất ghi nhận được trong môi trường MS có bổ sung 7 mg/L NAA, 30 g/L sucrose và 8,0 g/L agar. Đối với mẫu P-tTCL, môi trường MS bổ sung 1 mg/L 2,4-D, 30 g/L sucrose và 8,0 g/L agar phù hợp cho sự phát sinh phôi soma.” (Trang 78)
10	NCS cần đưa ra kết luận đối với các chất mình đang nghiên cứu, không nên kết luận chung cho toàn nhóm auxin.	NCS đã trình bày lại kết luận và chỉ kết luận với các chất nghiên cứu, cụ thể là 2,4-D và NAA Mục 3.2.1.2.: “Đối với mẫu L-tTCL, sự

		<p>phát sinh phôi tốt nhất ghi nhận được trong môi trường MS có bổ sung 7 mg/L NAA, 30 g/L sucrose và 8,0 g/L agar. Đối với mẫu P-ITCL, môi trường MS bổ sung 1 mg/L 2,4-D, 30 g/L sucrose và 8,0 g/L agar phù hợp cho sự phát sinh phôi soma.” (Trang 78)</p>
11	<p>Lý giải vai trò của AgNPs trong sự sinh trưởng của phôi soma thứ cấp thành cây con có thân rễ</p>	<p>NCS đã bổ sung vai trò của AgNPs trong sự sinh trưởng của phôi soma thứ cấp thành cây con có thân rễ (Trang 123 - 124)</p> <p>AgNPs có tác dụng kích thích sự sinh trưởng, phát triển của thực vật thông qua các tác động đến sự sinh tổng hợp và phản ứng của các hormone thực vật, tổng hợp ROS, phân chia tế bào và con đường chuyển hóa năng lượng [285].</p> <p>AgNPs ảnh hưởng đến sự sinh trưởng và phát triển của thực vật bằng cách điều chỉnh quá trình sinh tổng hợp hoặc tác động đến các con đường truyền tín hiệu của các hormone như auxin, ethylene và acid salicylic.</p> <p>AgNPs ảnh hưởng đến sự tăng trưởng của thực vật bằng cách thay đổi biểu hiện của các protein liên quan đến quá trình đường phân và chu trình acid tricarboxylic, đây là hai con đường quan trọng cho quá trình chuyển hóa năng lượng. AgNPs thúc đẩy quá trình oxy hóa pyruvate thành acetyl-CoA cung cấp cho chu trình acid tricarboxylic để kích thích sự sinh trưởng và phát triển của thực vật, thông qua đó tác động đến nguồn cung cấp năng lượng cho tế bào [291]”</p>
12	<p>Chỉnh sửa phần kết luận trọng tâm, cụ thể, phù hợp với kết quả hơn</p>	<p>NCS đã chỉnh sửa phần kết luận trọng tâm, cụ thể, phù hợp với kết quả của luận án (Trang 127)</p>
13	<p>Kiểm tra một số lỗi đánh máy và rà soát lại tất cả các TLTK được liệt kê trong phần TLTK đã được trích dẫn trong toàn luận án, loại bỏ các TLTK (nếu có) trong Danh mục</p>	<p>- NCS đã kiểm tra và sửa chữa các lỗi đánh máy. - NCS đã rà soát lại tất cả các TLTK trong toàn luận án.</p>

TLTK nhưng chưa được trích dẫn trong luận án và ngược lại.	
--	--

Nghiên cứu sinh chân thành cảm ơn Quý thầy, cô trong Hội đồng đánh giá luận án tiến sĩ cấp Học viện đã góp ý và tạo cơ hội cho NCS hoàn thiện luận án của mình.

Xin trân trọng cảm ơn./.

Hà Nội, ngày 29 tháng 8 năm 2024

TẬP THỂ HƯỚNG DẪN

NGHIÊN CỨU SINH

GS.TS. Dương Tân Nhựt

PGS.TS. Nguyễn Phương Thảo

Trương Thị Lan Anh

**XÁC NHẬN CỦA HỌC VIỆN
KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ** *ghe*

**KT. GIÁM ĐỐC
PHÓ GIÁM ĐỐC**



Trung
Nguyễn Thị Trung

CHỦ TỊCH HỘI ĐỒNG

GS.TS. Nguyễn Huy Hoàng

