

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

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

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



VŨ THỊ HIỀN

**NGHIÊN CỨU QUÁ TRÌNH TÁI SINH VÀ NHÂN
GIỐNG *IN VITRO* CÂY SÂM NGỌC LINH (*Panax
vietnamensis* Ha et Grushv.) BẰNG KỸ THUẬT
NUÔI CÂY LỚP MỎNG TẾ BÀO**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC

TP. HỒ CHÍ MINH – 2018

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

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

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ

VŨ THỊ HIỀN

**NGHIÊN CỨU QUÁ TRÌNH TÁI SINH VÀ NHÂN
GIỐNG *IN VITRO* CÂY SÂM NGỌC LINH (*Panax
vietnamensis* Ha et Grushv.) BẰNG KỸ THUẬT
NUÔI CÂY LỚP MỎNG TẾ BÀO**

Chuyên ngành : **Sinh lý học thực vật**

Mã số : **9.42.01.12**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:

- 1. GS.TS. Dương Tấn Nhựt**
- 2. TS. Thái Xuân Du**

TP. HỒ CHÍ MINH - 2018

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của tôi dưới sự hướng dẫn của PGS.TS. Dương Tấn Nhật. Nghiên cứu này được thực hiện bởi sự hỗ trợ kinh phí của đề tài và dự án của Phòng Sinh học Phân tử và Chọn tạo giống cây trồng - Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên: (1) Đề tài cấp quốc gia: Hệ thống chiếu sáng đơn sắc - nguồn sáng nhân tạo cho nghiên cứu tái sinh và nhân giống một số loại cây trồng nuôi cấy *in vitro*, Mã số: 106.16-2012.32, do Quỹ phát triển khoa học và Công nghệ Quốc (NAFOSTED) thuộc bộ Khoa học và Công nghệ quản lý; (2) Dự án sản xuất cấp Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam: “Hoàn thiện quy trình nhân giống cây sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) với số lượng lớn dưới hệ thống chiếu sáng đơn sắc (LED) phục vụ nhu cầu của tỉnh Quảng Nam. Toàn bộ số liệu và kết quả nghiên cứu trong luận án này là trung thực và chưa từng được sử dụng để công bố trong các công trình nghiên cứu để nhận học vị, các thông tin trích dẫn trong luận án này đều được chỉ rõ nguồn gốc. Tôi xin hoàn toàn chịu trách nhiệm về sự cam đoan này.

Đà Lạt, ngày.....tháng..... năm 2018

Người cam đoan

Vũ Thị Hiền

LỜI CẢM ƠN

Để hoàn thành luận án này, trong suốt thời gian vừa qua tôi đã nhận được rất nhiều sự động viên giúp đỡ của quý thầy cô, đồng nghiệp, bạn bè và những người thân trong gia đình.

Xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc nhất đến thầy Dương Tấn Nhựt (Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên), thầy Thái Xuân Du (Viện Sinh học Nhiệt đới). Quý thầy đã tận tâm hướng dẫn, giúp đỡ, động viên và tạo mọi điều kiện thuận lợi nhất để tôi có thể hoàn thành luận án này.

Cảm ơn ban lãnh đạo Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên, Viện Sinh học Nhiệt đới đã tạo điều kiện thuận lợi cho tôi trong suốt quá trình học tập cũng như trong quá trình thực hiện đề tài này.

Cảm ơn các anh, chị và các em Phòng Sinh học Phân tử và Chọn tạo giống cây trồng - Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên đã giúp đỡ tôi trong suốt thời gian qua.

Cảm ơn tất cả các anh, các em nghiên cứu sinh tại Viện Sinh học Nhiệt Đới, Viện Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp Miền Nam, Viện Công nghệ Sinh học, Đại học Khoa học Huế đã cùng tôi học tập, nghiên cứu, chia sẻ và động viên nhau trong suốt thời gian học tập và thực hiện luận án.

Một tình cảm sâu sắc nhất từ tận đáy lòng, xin dành gửi đến gia đình tôi, những người luôn là nguồn động viên to lớn nhất cho tôi, tạo mọi điều kiện để cho tôi được học tập và nghiên cứu trong suốt những năm học vừa qua.

Và cuối cùng tình thương yêu nhất mẹ gửi đến hai con yêu quý của mẹ. Cảm ơn hai con đã luôn ở bên giúp mẹ có thêm nghị lực để vượt qua mọi khó khăn, vất vả trong cuộc sống. Mẹ mong hai con luôn mạnh khỏe, ngoan và học giỏi.

Đà Lạt, tháng năm 2018

Vũ Thị Hiền

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN	i
LỜI CẢM ƠN	ii
MỤC LỤC.....	iii
DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT.....	xi
DANH MỤC BẢNG.....	xii
DANH MỤC HÌNH	xviii
MỞ ĐẦU	1
1. Tính cấp thiết của đề tài	1
2. Mục tiêu và yêu cầu của đề tài	2
3. Ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài	2
3.1. Phương pháp luận của đề tài	2
3.2. Ý nghĩa khoa học của đề tài	2
3.3. Ý nghĩa thực tiễn của đề tài	3
4. Đối tượng và phạm vi nghiên cứu của đề tài	3
4.1. Đối tượng nghiên cứu	3
4.2. Phạm vi nghiên cứu của đề tài.....	3
5. Những đóng góp mới của luận án.....	3
CHƯƠNG I. TỔNG QUAN TÀI LIỆU	5
1.1. Giới thiệu chi Nhân Sâm.....	5
1.1.1. Hệ thống phân loại chi nhân sâm.....	5
1.1.2. Đặc điểm thực vật	6
1.1.3. Thành phần hóa học.....	6
1.1.4. Giá trị kinh tế và y học của cây Nhân sâm	6
1.1.4.1. Giá trị kinh tế	6
1.1.4.2. Nhân sâm trong y học cổ truyền.....	6
1.1.4.3. Nhân sâm trong y học hiện đại.....	7
1.1.5. Tác dụng dược lý của sâm Triều Tiên <i>Panax ginseng</i> C.A. Meyer, Korean ginseng.....	7
1.2. Sơ lược về cây sâm Ngọc Linh (<i>Panax vietnamensis</i> Ha et Grushv.).....	8
1.2.1. Nguồn gốc và lịch sử phát triển	8
1.2.2. Hình thái thực vật.....	9

1.2.3. Phân bố.....	11
1.2.4. Thành phần hoá học.....	11
1.2.4.1. Thành phần hợp chất saponin	12
1.2.4.2. Các thành phần khác.....	14
1.2.5. Các tác dụng của sâm Ngọc Linh	14
1.2.6. Độc tính	15
1.2.6.1. Rễ và thân rễ.....	15
1.2.6.2. Thân và lá.....	15
1.2.7. Giá trị kinh tế của sâm Ngọc Linh	16
1.2.8. Tình hình trồng cây sâm Ngọc Linh.....	16
1.2.8.1. Hiện trạng và tiềm năng của cây sâm Ngọc Linh	16
1.2.8.2. Các khu vực trồng cây Sâm Ngọc Linh	17
1.2.8.3. Chăm sóc và bảo vệ.....	18
1.2.8.4. Sâu bệnh hại cây sâm Ngọc Linh	18
1.2.9. Tình hình nghiên cứu về sâm Ngọc Linh.....	19
1.2.9.1. Nhân giống truyền thống.....	21
1.2.9.2. Nghiên cứu nhân giống vô tính	22
1.2.9.3. Nghiên cứu về hạt nhân tạo.....	23
1.2.9.4. Nghiên cứu về sự phát sinh phôi	23
1.2.9.5. Nghiên cứu sự hình thành rễ thứ cấp và rễ bất định.....	24
1.2.9.6. Nghiên cứu sự ảnh hưởng của ánh sáng.....	25
1.2.9.7. Nghiên cứu về nhân sinh khối	25
1.2.9.8. Nghiên cứu tạo củ in vitro	26
1.2.9.9. Nghiên cứu về định tính và định lượng saponin	27
1.3. Kỹ thuật lớp mỏng tế bào	27
1.3.1. Khái niệm lớp mỏng tế bào.....	27
1.3.2. Định nghĩa hệ thống lớp mỏng tế bào	28
1.3.3. Những đặc điểm của hệ thống lớp mỏng tế bào.....	29
1.3.4. Ưu điểm của hệ thống lớp mỏng tế bào.....	29
1.3.5. Một số thành tựu đạt được trong ứng dụng phương pháp nuôi cấy	
lớp mỏng tế bào trên đối tượng <i>Panax</i>.....	30
1.3.5.1. Ứng dụng hệ thống TCL trên đối tượng <i>Panax ginseng</i>	30

1.3.5.2. Ứng dụng hệ thống TCL trên đối tượng sâm Ngọc Linh.....	31
1.4. Các yếu tố ảnh hưởng đến khả năng phát sinh hình thái.....	31
1.4.1. Loại mẫu cấy.....	31
1.4.2. Tuổi và tuổi sinh lý của mẫu.....	31
1.4.3. Điều kiện phát triển của mẫu.....	32
1.4.4. Vị trí của mẫu cấy trên cây.....	32
1.4.5. Kích thước của mẫu cấy.....	32
1.4.6. Vết thương.....	32
1.5. Các chất điều hòa sinh trưởng thực vật (phytohormones).....	33
1.5.1. Auxin	33
1.5.2. Cytokinin	34
1.6. Vai trò của ánh sáng đối với tái sinh, sinh trưởng và phát triển ở thực vật... 34	34
1.7. Quá trình tái sinh	35
1.7.1. Giai đoạn phân biệt hóa	35
1.7.2. Giai đoạn cảm ứng với các chất điều hòa sinh trưởng thực vật	36
1.7.3. Giai đoạn phát sinh cơ quan và hình thành chồi.....	36
1.7.4. Chuyển cây con ra vườn ươm, giai đoạn cuối cùng của sự tái sinh.....	36
CHƯƠNG II. VẬT LIỆU, NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU 37	37
2.1. Vật liệu nghiên cứu	37
2.1.1. Vật liệu	37
2.1.2. Thiết bị - dụng cụ, hóa chất và dung môi.....	37
2.1.2.1. Thiết bị - dụng cụ.....	37
2.1.2.2. Hóa chất và dung môi	38
2.2. Nội dung nghiên cứu	38
2.2.1. Nội dung 1: Nghiên cứu quá trình phát sinh hình thái từ các nguồn mẫu khác nhau.....	38
2.2.2. Nội dung 2: Nghiên cứu sự sinh trưởng và phát triển tiếp theo của cây con in vitro ở các điều kiện sinh thái khác nhau	39
2.2.3. Nội dung 3: Định tính và định lượng saponin trong cây sâm in vitro và cây sâm hoàn chỉnh ở giai đoạn vườn ươm.....	39
2.3. Phương pháp nghiên cứu.....	39
2.3.1. Phương pháp nghiên cứu sự phát sinh hình thái.....	39

2.3.2. Phương pháp giải phẫu hình thái thực vật và quan sát bằng kính hiển vi soi nổi.....	39
2.3.3. Phương pháp phân tích hàm lượng saponin.....	40
2.3.3.1. Phương pháp sắc ký lớp mỏng	40
2.3.3.2. Phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC: High Performance Liquid Chromatography)	40
2.4. Phương pháp bố trí thí nghiệm.....	40
2.4.1. Nội dung 1: Nghiên cứu quá trình phát sinh hình thái từ các nguồn mẫu khác nhau.....	40
2.4.1.1. Thí nghiệm 1: Khảo sát ảnh hưởng của CDHSTTV riêng lẻ lên sự phát sinh hình thái của mẫu lá tTCL_L trong điều kiện chiếu sáng và tối hoàn toàn	40
2.4.1.2. Thí nghiệm 2: Khảo sát ảnh hưởng của CDHSTTV riêng lẻ lên sự phát sinh hình thái của mẫu cuống lá tTCL_L trong điều kiện sáng và tối hoàn toàn	42
2.4.1.3. Thí nghiệm 3: Khảo sát ảnh hưởng của CDHSTTV riêng lẻ lên sự phát sinh hình thái của mẫu cuống lá lTCL_C trong điều kiện sáng và tối hoàn toàn	43
2.4.1.4. Thí nghiệm 4: Khảo sát ảnh hưởng của CDHSTTV riêng lẻ lên sự phát sinh hình thái của mẫu thân củ tTCL_R trong điều kiện sáng và tối hoàn toàn	44
2.4.1.5. Thí nghiệm 5: Khảo sát ảnh hưởng giữa sự kết hợp auxin và cytokinin lên sự phát sinh hình thái của mẫu lá tTCL_L trong điều kiện sáng và tối hoàn toàn	45
2.4.1.6. Thí nghiệm 6: Khảo sát ảnh hưởng giữa sự kết hợp auxin và cytokinin lên sự phát sinh hình thái của mẫu cuống lá tTCL_C trong điều kiện chiếu sáng và tối hoàn toàn	47
2.4.1.7. Thí nghiệm 7: Khảo sát ảnh hưởng giữa sự kết hợp auxin và cytokinin lên sự phát sinh hình thái của mẫu cuống lá lTCL_C trong điều kiện chiếu sáng và tối hoàn toàn	48

2.4.1.8. Thí nghiệm 8: Khảo sát ảnh hưởng giữa sự kết hợp auxin và cytokinin lên sự phát sinh hình thái của mẫu thân củ tTCL_R trong điều kiện chiếu sáng và tối hoàn toàn	50
2.4.1.9. Giải phẫu hình thái học.....	52
2.4.1.10. Tạo cây con hoàn chỉnh từ phôi vô tính.....	52
2.4.2. Nội dung 2: Nghiên cứu sự sinh trưởng và phát triển tiếp theo của cây con in vitro ở các điều kiện sinh thái khác nhau	52
2.4.2.1. Thí nghiệm 09: Nghiên cứu quá trình sinh trưởng và phát triển của cây sâm Ngọc Linh nuôi cấy in vitro được đem trồng tại Quảng Nam.....	52
2.4.2.2. Thí nghiệm 10: Nghiên cứu quá trình sinh trưởng và phát triển của cây sâm Ngọc Linh nuôi cấy in vitro được đem trồng tại khu vực Cổng Trời, Vườn Quốc gia Bidoup - Núi Bà (Lâm Đồng)	53
2.4.3. Nội dung 3: Định tính và định lượng saponin trong cây sâm in vitro và cây sâm hoàn chỉnh ở giai đoạn vườn ươm.....	54
2.4.3.1. Thí nghiệm 11: Định tính saponin trong cây sâm Ngọc Linh in vitro, cây sâm con 6 tháng, cây 1 năm và cây 2 năm tuổi được trồng tại Quảng Nam	54
2.4.3.2. Thí nghiệm 12: Định lượng saponin trong cây sâm Ngọc Linh in vitro, cây sâm con 6 tháng, cây 1 năm và cây 2 năm tuổi được trồng tại Quảng Nam	54
2.5. Phương pháp xử lý thống kê	56
2.6. Điều kiện nuôi cấy	56
2.6.1. Điều kiện in vitro	56
2.6.2. Điều kiện ex vitro.....	56
2.7. Thời gian và địa điểm thực hiện đề tài nghiên cứu.....	56
CHƯƠNG III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	58
3.1. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU	58
3.1.1. Nghiên cứu quá trình phát sinh hình thái từ các nguồn mẫu khác nhau..	58
3.1.1.1. Ảnh hưởng của CDHSTTV riêng lẻ lên sự phát sinh hình thái của mẫu lá tTCL_L trong điều kiện chiếu sáng và tối hoàn toàn.....	58
3.1.1.2. Ảnh hưởng của CDHSTTV riêng lẻ lên sự phát sinh hình thái của mẫu cuống lá tTCL_C trong điều kiện chiếu sáng và tối hoàn toàn	63

3.1.1.3. Ảnh hưởng của CDHSTTV riêng lẻ lên sự phát sinh hình thái của mẫu cuống lá <i>ITCL_C</i> trong điều kiện chiếu sáng và tối hoàn toàn	65
3.1.1.4. Ảnh hưởng của CDHSTTV riêng lẻ lên sự phát sinh hình thái của mẫu thân rễ <i>tTCL_R</i> trong điều kiện chiếu sáng và tối hoàn toàn	69
3.1.1.5. Ảnh hưởng sự kết hợp auxin và cytokinin lên sự phát sinh hình thái của mẫu lá <i>tTCL_L</i> trong điều kiện chiếu sáng và tối hoàn toàn.....	73
3.1.1.6. Ảnh hưởng giữa sự kết hợp auxin và cytokinin lên sự phát sinh hình thái của mẫu cuống lá <i>tTCL_C</i> trong điều kiện chiếu sáng và tối hoàn toàn	80
3.1.1.7. Ảnh hưởng giữa sự kết hợp auxin và cytokinin lên sự phát sinh hình thái của mẫu cuống lá <i>ITCL_L</i> trong điều kiện chiếu sáng và tối hoàn toàn.....	86
3.1.1.8. Ảnh hưởng giữa sự kết hợp auxin và cytokinin lên sự phát sinh hình thái của thân rễ <i>tTCL_R</i> trong điều kiện chiếu sáng và tối hoàn toàn.....	94
3.1.1.9. Quan sát sự thay đổi hình thái của phôi vô tính sâm Ngọc Linh	102
3.1.1.10. Tạo cây con hoàn chỉnh từ phôi vô tính	103
3.1.2. Nghiên cứu sự sinh trưởng và phát triển tiếp theo của cây con in vitro ở các điều kiện sinh thái khác nhau.....	104
3.1.2.1. Nghiên cứu quá trình sinh trưởng và phát triển của cây sâm Ngọc Linh nuôi cấy in vitro được đem trồng tại Quảng Nam.....	104
3.1.2.2. Nghiên cứu quá trình sinh trưởng và phát triển của cây sâm Ngọc Linh nuôi cấy in vitro ở Khu vực Cổng Trời, Vườn Quốc gia Bidoup - Núi Bà - Lâm Đồng.....	107
3.1.3. Định tính và định lượng saponin trong cây sâm in vitro và cây sâm hoàn chỉnh ở giai đoạn vườn ươm.....	109
3.1.3.1. Định tính saponin trong cây sâm in vitro, cây sâm con 6 tháng, cây 1 năm và cây 2 năm tuổi được trồng tại núi Ngọc Linh.....	109
3.1.3.2. Định lượng saponin trong cây sâm in vitro, cây sâm con 6 tháng tuổi, cây 1 năm tuổi và cây 2 năm tuổi được trồng tại núi Ngọc Linh	110
3.2. THẢO LUẬN.....	113
3.2.1. Nghiên cứu quá trình phát sinh hình thái từ các nguồn mẫu khác nhau	113
3.2.1.1. Quá trình phát sinh phôi vô tính	114
3.2.1.2. Quá trình tái sinh chồi bất định	116

3.2.1.3. <i>Quá trình hình thành rễ bất định</i>	118
3.2.1.4. <i>Quá trình tạo mô sẹo</i>	119
3.2.2. <i>Quan sát sự thay đổi phát sinh hình thái của phôi vô tính sâm Ngọc Linh</i>	124
3.2.3. <i>Tạo cây con hoàn chỉnh từ phôi vô tính</i>	124
3.2.4. <i>Sự tích lũy saponin ở sâm Ngọc Linh</i>	125
CHƯƠNG 4. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	127
4.1. Kết luận.....	127
4.2. Kiến nghị.....	128
DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH CỦA TÁC GIẢ	130
TÀI LIỆU THAM KHẢO	131
PHỤ LỤC	

DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT

2,4-D	: 2,4-dichlorophenoxy acetic acid
B5	: Gamborg và cộng sự, 1968
BA	: 6-benzyl aminopurine
BAP	:
CDHSTTV	: Chất điều hòa sinh trưởng thực vật
HPLC	: High Performance Liquid Chromatography (sắc ký lỏng hiệu năng cao)
G-	: Ginsenoside
GA₃	: Gibberellin A ₃
G-Rb₁	: Ginsenoside-Rb ₁
G-Rg₁	: Ginsenoside-Rg ₁
IAA	: 3-indole acetic acid
IBA	: 3-indole butyric acid
ITCL	: Longitudinal thin cell layer (lớp mỏng tế bào cắt theo chiều dọc)
Kinetin	: 6-furfuryl aminopurine
LED	: Light-emitting diode
MR₂	: Majonoside-R ₂
MS	: Môi trường Murashige và Skoog, 1962
NAA	: α -naphthalenacetic acid
SH	: Schenk và Hildebrandt, 1972
TCL	: Thin cell layer (lớp mỏng tế bào)
TDZ	: Thidiazuron
tTCL	: Transverse thin cell layer (lớp mỏng tế bào cắt theo chiều ngang)

DANH MỤC BẢNG

<i>Bảng 1.1.</i> Các loài thuộc chi <i>Panax</i> trên thế giới.....	5
<i>Bảng 1.2.</i> Thành phần hoá học chung trong sâm Ngọc Linh.....	11
<i>Bảng 2.1.</i> Nồng độ, loại CDHSTTV và điều kiện chiếu sáng trong thí nghiệm 1.....	41
<i>Bảng 2.2.</i> Nồng độ, loại CDHSTTV và điều kiện chiếu sáng trong thí nghiệm 2.....	42
<i>Bảng 2.3.</i> Nồng độ, loại CDHSTTV và điều kiện chiếu sáng trong thí nghiệm 3.....	43
<i>Bảng 2.4.</i> Nồng độ, loại CDHSTTV và điều kiện chiếu sáng trong thí nghiệm 4.....	44
<i>Bảng 2.5.</i> Sự kết hợp giữa 2,4-D, BA ở các nồng độ và điều kiện chiếu sáng khác nhau trong thí nghiệm phát sinh hình thái của mẫu lá tTCL_L của sâm Ngọc Linh.....	45
<i>Bảng 2.6.</i> Sự kết hợp giữa 2,4-D, TDZ ở các nồng độ và điều kiện chiếu sáng khác nhau trong thí nghiệm phát sinh hình thái của mẫu lá tTCL_L của sâm Ngọc Linh	46
<i>Bảng 2.7.</i> Sự kết hợp giữa NAA, BA ở các nồng độ và điều kiện chiếu sáng khác nhau trong thí nghiệm phát sinh hình thái của mẫu lá tTCL_L của sâm Ngọc Linh	46
<i>Bảng 2.8.</i> Sự kết hợp giữa 2,4-D, BA ở các nồng độ và điều kiện chiếu sáng khác nhau trong thí nghiệm phát sinh hình thái của mẫu cuống lá tTCL_C của sâm Ngọc Linh	47
<i>Bảng 2.9.</i> Sự kết hợp giữa 2,4-D, TDZ ở các nồng độ và điều kiện chiếu sáng khác nhau trong thí nghiệm phát sinh hình thái của mẫu cuống lá tTCL_C của sâm Ngọc Linh	47
<i>Bảng 2.10.</i> Sự kết hợp giữa NAA, BA ở các nồng độ và điều kiện chiếu sáng khác nhau trong thí nghiệm phát sinh hình thái của mẫu cuống lá tTCL_C của sâm Ngọc Linh.....	48
<i>Bảng 2.11.</i> Sự kết hợp giữa 2,4-D, BA ở các nồng độ và điều kiện chiếu sáng khác nhau trong thí nghiệm phát sinh hình thái của mẫu cuống lá ITCL_L của sâm Ngọc Linh.....	49
<i>Bảng 2.12.</i> Sự kết hợp giữa 2,4-D, TDZ ở các nồng độ và điều kiện chiếu sáng khác nhau trong thí nghiệm phát sinh hình thái của mẫu cuống lá ITCL_L của sâm Ngọc Linh.....	49

<i>Bảng 2.13.</i> Sự kết hợp giữa NAA, BA ở các nồng độ và điều kiện chiếu sáng trong khác nhau thí nghiệm phát sinh hình thái của mẫu cuống lá ITCL_L của sâm Ngọc Linh.....	50
<i>Bảng 2.14.</i> Sự kết hợp giữa 2,4-D, BA ở các nồng độ và điều kiện chiếu sáng khác nhau trong thí nghiệm phát sinh hình thái của mẫu thân rễ tTCL_R của sâm Ngọc Linh	51
<i>Bảng 2.15.</i> Sự kết hợp giữa 2,4-D, TDZ ở các nồng độ và điều kiện chiếu sáng khác nhau trong thí nghiệm phát sinh hình thái của mẫu thân rễ tTCL_R của sâm Ngọc Linh	51
<i>Bảng 2.16.</i> Sự kết hợp giữa NAA, BA ở các nồng độ và điều kiện chiếu sáng khác nhau trong thí nghiệm phát sinh hình thái của mẫu thân rễ tTCL_R của sâm Ngọc Linh	51
<i>Bảng 2.17.</i> Pha giai mẫu chuẩn MR ₂ , Rg ₁ , Rb ₁	55
<i>Bảng 3.1.</i> Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng riêng lẻ lên sự phát sinh hình thái của mẫu lá tTCL_L trong điều kiện chiếu sáng 16 giờ/ngày.....	58
<i>Bảng 3.2.</i> Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng riêng lẻ lên sự phát sinh hình thái của mẫu lá tTCL_L trong điều kiện tối hoàn toàn	60
<i>Bảng 3.3.</i> Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng riêng lẻ lên sự phát sinh hình thái của mẫu cuống lá tTCL_C trong điều kiện chiếu sáng 16 giờ/ngày và trong điều kiện tối hoàn toàn.....	63
<i>Bảng 3.4.</i> Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng riêng lẻ lên sự phát sinh hình thái của mẫu cuống lá ITCL_C trong điều kiện chiếu sáng 16 giờ/ngày.....	65
<i>Bảng 3.5.</i> Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng riêng lẻ lên sự phát sinh hình thái của mẫu cuống lá ITCL_C trong điều kiện tối hoàn toàn.....	66
<i>Bảng 3.6.</i> Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng riêng lẻ lên sự phát sinh hình thái của thân rễ tTCL_R trong điều kiện chiếu sáng 16 giờ/ngày.....	70
<i>Bảng 3.7.</i> Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng riêng lẻ lên sự phát sinh hình thái của thân rễ tTCL_R trong điều kiện tối hoàn toàn.....	71
<i>Bảng 3.8.</i> Ảnh hưởng sự kết hợp giữa 2,4-D, BA ở các nồng độ khác nhau lên sự phát sinh hình thái của mẫu lá tTCL_L trong điều kiện chiếu sáng 16 giờ/ngày	74

<i>Bảng 3.9.</i> Ảnh hưởng sự kết hợp giữa 2,4-D, BA ở các nồng độ khác nhau lên sự phát sinh hình thái của mẫu lá tTCL_L trong điều kiện tối hoàn toàn.....	74
<i>Bảng 3.10.</i> Ảnh hưởng sự kết hợp giữa 2,4-D, TDZ ở các nồng độ khác nhau lên sự phát sinh hình thái của mẫu lá tTCL_L trong điều kiện chiếu sáng 16 giờ/ngày.....	76
<i>Bảng 3.11.</i> Ảnh hưởng sự kết hợp giữa 2,4-D, TDZ ở các nồng độ khác nhau lên sự phát sinh hình thái của mẫu lá tTCL_L trong điều kiện tối hoàn toàn.....	76
<i>Bảng 3.12.</i> Ảnh hưởng sự kết hợp giữa NAA, BA ở các nồng độ khác nhau lên sự phát sinh hình thái của mẫu lá tTCL_L trong điều kiện chiếu sáng 16 giờ/ngày.....	78
<i>Bảng 3.13.</i> Ảnh hưởng sự kết hợp giữa NAA, BA ở các nồng độ khác nhau lên sự phát sinh hình thái của mẫu lá tTCL_L trong điều kiện tối hoàn toàn	78
<i>Bảng 3.14.</i> Ảnh hưởng sự kết hợp giữa 2,4-D, BA ở các nồng độ khác nhau lên sự phát sinh hình thái của mẫu cuống lá tTCL_L trong điều kiện chiếu sáng 16 giờ/ngày	80
<i>Bảng 3.15.</i> Ảnh hưởng sự kết hợp giữa 2,4-D, BA ở các nồng độ khác nhau lên sự phát sinh hình thái của mẫu cuống lá tTCL_C trong điều kiện tối hoàn toàn	81
<i>Bảng 3.16.</i> Ảnh hưởng sự kết hợp giữa 2,4-D, TDZ ở các nồng độ khác nhau lên sự phát sinh hình thái của mẫu cuống lá tTCL_C trong điều kiện chiếu sáng 16 giờ/ngày	82
<i>Bảng 3.17.</i> Ảnh hưởng sự kết hợp giữa 2,4-D, TDZ ở các nồng độ khác nhau lên sự phát sinh hình thái của mẫu cuống lá tTCL_C trong điều kiện tối hoàn toàn	83
<i>Bảng 3.18.</i> Ảnh hưởng sự kết hợp giữa NAA, BA ở các nồng độ khác nhau lên sự phát sinh hình thái của mẫu cuống lá tTCL_C trong điều kiện chiếu sáng 16 giờ/ngày.....	84
<i>Bảng 3.19.</i> Ảnh hưởng sự kết hợp giữa NAA, BA ở các nồng độ khác nhau lên sự phát sinh hình thái của mẫu cuống lá tTCL_L trong điều kiện tối hoàn toàn.....	85

<i>Bảng 3.20.</i> Ảnh hưởng sự kết hợp giữa 2,4-D, BA ở các nồng độ khác nhau lên sự phát sinh hình thái của mẫu cuống lá ITCL_L trong điều kiện chiếu sáng 16 giờ/ngày.....	87
<i>Bảng 3.21.</i> Ảnh hưởng sự kết hợp giữa 2,4-D, BA ở các nồng độ khác nhau lên sự phát sinh hình thái của mẫu cuống lá ITCL_C trong điều kiện tối hoàn toàn.....	87
<i>Bảng 3.22.</i> Ảnh hưởng sự kết hợp giữa 2,4-D, TDZ ở các nồng độ khác nhau lên sự phát sinh hình thái của mẫu cuống lá ITCL_C trong điều kiện chiếu sáng 16 giờ/ngày	89
<i>Bảng 3.23.</i> Ảnh hưởng sự kết hợp giữa 2,4-D, TDZ ở các nồng độ khác nhau lên sự phát sinh hình thái của mẫu cuống lá ITCL_C trong điều kiện tối hoàn toàn.....	90
<i>Bảng 3.24.</i> Ảnh hưởng sự kết hợp giữa NAA, BA ở các nồng độ khác nhau lên sự phát sinh hình thái của mẫu cuống lá ITCL_C trong điều kiện chiếu sáng 16 giờ/ngày.....	92
<i>Bảng 3.25.</i> Ảnh hưởng sự kết hợp giữa NAA, BA ở các nồng độ khác nhau lên sự phát sinh hình thái của mẫu cuống lá ITCL_C trong điều kiện tối hoàn toàn	92
<i>Bảng 3.26.</i> Ảnh hưởng sự kết hợp giữa 2,4-D, BA ở các nồng độ khác nhau lên sự phát sinh hình thái của mẫu thân rễ tTCL_R trong điều kiện chiếu sáng 16 giờ/ngày	95
<i>Bảng 3.27.</i> Ảnh hưởng sự kết hợp giữa 2,4-D, BA ở các nồng độ khác nhau lên sự phát sinh hình thái mẫu thân rễ tTCL_R trong điều kiện tối hoàn toàn....	95
<i>Bảng 3.28.</i> Ảnh hưởng sự kết hợp giữa 2,4-D, TDZ ở các nồng độ khác nhau lên sự phát sinh hình thái của mẫu thân rễ tTCL_R trong điều kiện chiếu sáng 16 giờ/ngày	97
<i>Bảng 3.29.</i> Ảnh hưởng sự kết hợp giữa 2,4-D, TDZ ở các nồng độ khác nhau lên sự phát sinh hình thái của mẫu thân rễ tTCL_R trong điều kiện tối hoàn toàn	97

<i>Bảng 3.30.</i> Ảnh hưởng sự kết hợp giữa NAA, BA ở các nồng độ khác nhau lên sự phát sinh hình thái của mẫu thân rễ tTCL_R trong điều kiện chiếu sáng 16 giờ/ngày	99
<i>Bảng 3.31.</i> Ảnh hưởng sự kết hợp giữa NAA, BA ở các nồng độ khác nhau lên sự phát sinh hình thái mẫu thân rễ tTCL_R trong điều kiện tối hoàn toàn..	100
<i>Bảng 3.32.</i> Ảnh hưởng của điều kiện chiếu sáng lên sự sinh trưởng và phát triển của phôi sâm Ngọc Linh.....	103
<i>Bảng 3.33.</i> Tỷ lệ sống sót, sinh trưởng và phát triển của cây sâm Ngọc Linh <i>in vitro</i> ở giai đoạn vườn ươm tại khu vực núi Ngọc Linh xã Trà Linh, huyện Nam Trà My, tỉnh Quảng Nam.....	104
<i>Bảng 3.34.</i> Tỷ lệ sống sót và sinh trưởng của cây sâm Ngọc Linh <i>in vitro</i> ở tại khu vực Cổng Trời, Vườn Quốc gia Bidoup - Núi Bà - Lâm Đồng	107
<i>Bảng 3.35.</i> Hàm lượng saponin trung bình (%)	110

DANH MỤC HÌNH

<i>Hình 1.1.</i> Cây sâm Ngọc Linh <i>Panax vietnamensis</i> Ha et Grushv.....	9
<i>Hình 1.2.</i> Một số đặc điểm hình thái thực vật của sâm Ngọc Linh.....	12
<i>Hình 1.3.</i> Khu vực phân bố, sự sinh trưởng và phát triển của cây sâm Ngọc Linh.....	19
<i>Hình 1.4.</i> Phương pháp cắt lớp mỏng tế bào từ cuống lá.....	28
<i>Hình 2.1.</i> Sơ đồ mô tả quá trình phát sinh hình thái của cây sâm Ngọc Linh thông qua kỹ thuật nuôi cấy lớp mỏng tế bào.	57
<i>Hình 3.1.</i> Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng riêng lẻ lên sự phát sinh hình thái của mẫu lá tTCL_L trong điều kiện chiếu sáng 16 giờ/ngày.	61
<i>Hình 3.2.</i> Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng riêng lẻ lên sự phát sinh hình thái của mẫu lá tTCL_L trong điều kiện tối hoàn toàn.	62
<i>Hình 3.3.</i> Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng riêng lẻ lên sự phát sinh hình thái của mẫu cuống lá tTCL_C.	64
<i>Hình 3.4.</i> Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng riêng lẻ lên sự phát sinh hình thái của mẫu cuống lá tTCL_C trong điều kiện chiếu sáng 16 giờ/ngày.....	68
<i>Hình 3.5.</i> Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng riêng lẻ lên sự phát sinh hình thái của mẫu cuống lá tTCL_C trong điều kiện tối.....	69
<i>Hình 3.6.</i> Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng riêng lẻ lên sự phát sinh hình thái của mẫu thân rễ TCL_R trong điều kiện chiếu sáng 16 giờ/ngày.....	72
<i>Hình 3.7.</i> Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng riêng lẻ lên sự phát sinh hình thái của mẫu thân rễ TCL_R trong điều kiện tối hoàn toàn.....	73
<i>Hình 3.8.</i> Ảnh hưởng sự kết hợp giữa 2,4-D và BA ở các nồng độ khác nhau lên sự phát sinh hình thái của mẫu lá tTCL_L trong điều kiện chiếu sáng 16 giờ/ngày và tối hoàn toàn	75
<i>Hình 3.9.</i> Ảnh hưởng sự kết hợp giữa 2,4-D và TDZ ở các nồng độ khác nhau lên sự phát sinh hình thái của mẫu lá tTCL_L trong điều kiện chiếu sáng 16 giờ/ngày và tối hoàn toàn.	77
<i>Hình 3.10.</i> Ảnh hưởng sự kết hợp giữa NAA và BA ở các nồng độ khác nhau lên sự phát sinh hình thái của mẫu lá tTCL_L trong điều kiện chiếu sáng 16 giờ/ngày và tối hoàn toàn.....	79

<i>Hình 3.11.</i> Ảnh hưởng sự kết hợp giữa 2,4-D và BA ở các nồng độ khác nhau lên sự phát sinh hình thái của mẫu cuống lá tTCL_C trong điều kiện chiếu sáng 16 giờ/ngày và tối hoàn toàn.....	82
<i>Hình 3.12.</i> Ảnh hưởng sự kết hợp giữa 2,4-D và TDZ ở các nồng độ khác nhau lên sự phát sinh hình thái của mẫu cuống lá tTCL_C trong điều kiện chiếu sáng 16 giờ/ngày và tối hoàn toàn.	84
<i>Hình 3.13.</i> Ảnh hưởng sự kết hợp giữa NAA và BA ở các nồng độ khác nhau lên sự phát sinh hình thái của mẫu cuống lá tTCL_C trong điều kiện chiếu sáng 16 giờ/ngày và tối hoàn toàn.....	86
<i>Hình 3.14.</i> Ảnh hưởng sự kết hợp giữa 2,4-D và BA ở các nồng độ khác nhau lên sự phát sinh hình thái của mẫu cuống lá ITCL_C trong điều kiện chiếu sáng 16 giờ/ngày và tối hoàn toàn.	89
<i>Hình 3.15.</i> Ảnh hưởng sự kết hợp giữa 2,4-D và TDZ ở các nồng độ khác nhau lên sự phát sinh hình thái của mẫu cuống lá ITCL_C trong điều kiện chiếu sáng 16 giờ/ngày và tối hoàn toàn.....	91
<i>Hình 3.16.</i> Ảnh hưởng sự kết hợp giữa NAA và BA ở các nồng độ khác nhau lên sự phát sinh hình thái của mẫu cuống lá ITCL_C trong điều kiện chiếu sáng 16 giờ/ngày và tối hoàn toàn.	94
<i>Hình 3.17.</i> Ảnh hưởng sự kết hợp giữa 2,4-D và BA ở các nồng độ khác nhau lên sự phát sinh hình thái của mẫu thân rễ tTCL_R trong điều kiện chiếu sáng 16 giờ/ngày và tối hoàn toàn.....	96
<i>Hình 3.18.</i> Ảnh hưởng sự kết hợp giữa 2,4-D và TDZ ở các nồng độ khác nhau lên sự phát sinh hình thái của mẫu thân rễ tTCL_R trong điều kiện chiếu sáng 16 giờ/ngày và tối hoàn toàn.	98
<i>Hình 3.19.</i> Ảnh hưởng sự kết hợp giữa NAA và BA ở các nồng độ khác nhau lên sự phát sinh hình thái của mẫu thân rễ tTCL_R trong điều kiện chiếu sáng 16 giờ/ngày và tối hoàn toàn.	101
<i>Hình 3.20.</i> Giải phẫu các giai đoạn phát triển của phôi vô tính sâm Ngọc Linh.	102
<i>Hình 3.21.</i> Cây con phát triển và sinh trưởng từ phôi vô tính sâm Ngọc Linh.....	104
<i>Hình 3.22.</i> Các giai đoạn phát triển của cây sâm Ngọc Linh nuôi cấy <i>in vitro</i> tại xã Trà Linh	106

<i>Hình 3.23.</i> Các giai đoạn phát triển của cây sâm Ngọc Linh nuôi cấy <i>in vitro</i> tại Khu vực công trời, vườn quốc gia Bidoup Núi Bà.....	108
<i>Hình 3.24.</i> Định tính saponin (MR2, Rg1, Rb1) trong mẫu cây sâm Ngọc Linh.	110
<i>Hình 3.25.</i> Peak Rg1, MR2, Rb1 trên sắc ký đồ của cây sâm Ngọc Linh <i>in vitro</i>	111
<i>Hình 3.26.</i> Peak Rg1, MR2, Rb1 trên sắc ký đồ của cây sâm Ngọc Linh 6 tháng tuổi.....	111
<i>Hình 3.27.</i> Peak Rg1, MR2, Rb1 trên sắc ký đồ của cây sâm Ngọc Linh 1 năm tuổi.....	112
<i>Hình 3.28.</i> Peak Rg1, MR2, Rb1 trên sắc ký đồ của cây sâm Ngọc Linh 2 năm tuổi.....	112

MỞ ĐẦU

1. Tính cấp thiết của đề tài

Sâm Ngọc Linh là một loài sâm đặc hữu của Việt Nam với tên khoa học là *Panax vietnamensis* Ha et Grushv. Dù chỉ mới được giới y học biết đến từ năm 1973, nhưng có thể nói sâm Ngọc Linh là một trong những phát hiện quan trọng bậc nhất trong lĩnh vực y dược, qua nghiên cứu thực nghiệm các nhà khoa học đã nhận thấy sâm Ngọc Linh không chỉ có các tác dụng dược lý đặc trưng của chi Nhân Sâm mà còn có những tác dụng dược lý điển hình như chống stress, trầm cảm, giảm lo âu, kích thích hệ miễn dịch, kháng các độc tố gây hại tế bào, tác dụng lên sự chống oxy hóa *in vitro* và *in vivo*.... Sâm Ngọc Linh là một trong những loài sâm có hàm lượng saponin khung dammaran cao nhất (khoảng 12 - 15%) và lượng saponin triterpen nhiều nhất so với các loài khác của chi *Panax* trên thế giới [6]. Với những đặc điểm đó, sâm Ngọc Linh không chỉ là loài sâm quý của Việt Nam mà còn của cả thế giới.

Nhân giống sâm Ngọc Linh hiện còn gặp nhiều khó khăn do loài này chỉ trồng được ở khu vực quanh đỉnh núi Ngọc Linh, thời gian nuôi trồng kéo dài từ 6 đến 7 năm thì củ mới tích trữ đủ hoạt chất để thu hoạch. Nhân giống hữu tính theo cách thông thường (giao hạt) không cho kết quả cao vì nhiều lí do: khó thu nhận hạt, hạt khi gieo nằm trong đất sau một thời gian dài mới nảy mầm, vì vậy hạt thường bị các loài động vật, côn trùng gặm nhấm ăn...; ngoài ra, tỷ lệ nảy mầm từ hạt thấp (chỉ đạt từ 30 - 40%). Theo số liệu điều tra, sâm Ngọc Linh đã bị khai thác quá mức và dường như không còn thấy trong tự nhiên và chúng đang nằm trong danh mục 250 loài quý hiếm cần được bảo vệ [24]. Do đó, yêu cầu cấp thiết là tìm được phương pháp hiệu quả giúp nhân giống nhanh và đem lại nguồn sinh khối có hiệu quả từ loài cây dược liệu này.

Kỹ thuật nuôi cấy lớp mỏng tế bào với những ưu điểm như mẫu cấy tiếp xúc trực tiếp với môi trường, mẫu nuôi cấy đồng nhất và nhanh chóng đáp ứng các phản ứng, phân và các cơ quan sơ khởi được hình thành ở tần số cao, tạo ra thực vật hoàn chỉnh,...vv.

Chính vì vậy, đề tài “**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**” được tiến hành với mục đích thu được số lượng cây con lớn với

sức sống cao, rễ và củ phát triển tốt, thích nghi tốt với điều kiện tự nhiên, từ đó góp phần bảo tồn nguồn dược liệu quý này.

2. Mục tiêu và yêu cầu của đề tài

Mục tiêu đề tài là tìm ra nguồn mẫu, phương pháp cắt mẫu, loại và nồng độ chất điều hòa sinh trưởng thực vật (CĐHSTTV), cũng như điều kiện nuôi cấy *in vitro* thích hợp cho các quá trình phát sinh hình thái khác nhau (cảm ứng mô sẹo, phát sinh phôi trực tiếp, tạo rễ, tạo chồi...) của mẫu cây. Những cây sâm Ngọc Linh *in vitro* có nguồn gốc từ nuôi cấy lớp mỏng tế bào (thin cell layer - TCL) được đem trồng thử nghiệm ở tỉnh Quảng Nam để đánh giá khả năng thích ứng của cây sâm Ngọc Linh nuôi cấy *in vitro* tại nơi có các quần thể sâm Ngọc Linh tự nhiên đang sinh sống, so sánh với khả năng sống sót và sinh trưởng của cây sâm Ngọc Linh trồng ở Vườn Quốc gia Bidoup - Núi Bà, Lâm Đồng.

3. Ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài

3.1. Phương pháp luận của đề tài

Quá trình tái sinh của các mô đã biệt hóa, phân biệt hóa và chuyển thành mô non trẻ, có khả năng phân chia tế bào và bước vào chu trình tế bào mới, hình thành cơ quan [78]. Quá trình này chịu sự điều khiển của nhiều nhân tố khác nhau và gồm ba giai đoạn chính là giai đoạn phân biệt hóa; giai đoạn cảm ứng với các chất điều hòa sinh trưởng thực vật; giai đoạn phát sinh cơ quan, hình thành chồi.

Hệ thống nuôi cấy TCL với đặc điểm là giảm số lượng tế bào trong mẫu cây có ý nghĩa quan trọng ảnh hưởng đến quá trình phát triển hay các chương trình biệt hóa mô, cơ quan. Do đó, ứng dụng hệ thống nuôi cấy TCL vào việc tái sinh và nhân giống *in vitro* cây sâm Ngọc Linh sẽ giúp cho mẫu cây có sự đồng nhất về sinh lý và di truyền. Từ đó, tạo nguồn nguyên liệu đồng nhất để nhân giống *in vitro* và bước đầu trồng số lượng lớn cây sâm Ngọc Linh ở các vùng sinh thái thích hợp.

3.2. Ý nghĩa khoa học của đề tài

Đề tài cung cấp những dẫn liệu khoa học về sự phát sinh hình thái từ các nguồn mẫu khác nhau và dưới điều kiện chiếu sáng 16 giờ/ngày và tối hoàn toàn bằng kỹ thuật nuôi cấy lớp mỏng tế bào trên đối tượng cây sâm Ngọc Linh.

Xây dựng các chương trình phát sinh hình thái khác nhau như mô sẹo, phôi, chồi và rễ từ các nguồn mẫu khác nhau.

Thông qua quá trình phát sinh hình thái và điều kiện chiếu sáng để tìm ra nguồn mẫu và điều kiện chiếu sáng phù hợp nhất cho quá trình phát sinh mô sẹo, phôi, chồi và rễ.

Tạo được cây *in vitro* có chất lượng, khả năng sống sót cao phục vụ cho việc trồng chuyên canh tại Núi Bà (Lâm Đồng) và núi Ngọc Linh tại địa bàn tỉnh Quảng Nam.

3.3. Ý nghĩa thực tiễn của đề tài

Xác định được phương pháp tái sinh và nhân giống hiệu quả đối với cây sâm Ngọc Linh *in vitro* bằng kỹ thuật nuôi cấy lớp mỏng tế bào là một trong những nhu cầu quan trọng nhằm cung cấp nguồn giống cho việc trồng và phát triển loài sâm này ở quy mô lớn, góp phần lưu giữ nguồn gen quý, thay thế nguồn giống tự nhiên đang dần bị cạn kiệt do khai thác quá mức.

4. Đối tượng và phạm vi nghiên cứu của đề tài

4.1. Đối tượng nghiên cứu

Đối tượng được thực hiện trong nghiên cứu này là các mẫu lá, cuống lá và mẫu thân rễ của cây sâm Ngọc Linh *in vitro* 3 tháng tuổi được nuôi cấy tại Phòng Sinh học Phân tử và Chọn tạo giống cây trồng - Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên.

4.2. Phạm vi nghiên cứu của đề tài

Đề tài áp dụng kỹ thuật nuôi cấy TCL trên các nguồn mẫu khác nhau như: lá, cuống và thân rễ của cây Sâm Ngọc Linh dưới điều kiện chiếu sáng khác nhau trong quá trình phát sinh hình thái. Ngoài ra, những cây sâm Ngọc Linh có nguồn gốc từ kỹ thuật nuôi cấy lớp mỏng tế bào được tiến hành trồng tại Quảng Nam và Lâm Đồng để so sánh khả năng sống sót và hàm lượng saponin so với cây trồng tự nhiên.

5. Những đóng góp mới của luận án

Những nghiên cứu trước đây trên đối tượng sâm Ngọc Linh chủ yếu là phát sinh hình thái gián tiếp qua mô sẹo. Điều này làm kéo dài thời gian nuôi cấy và làm giảm hiệu quả kinh tế. Việc ứng dụng kỹ thuật nuôi cấy lớp mỏng tế bào (TCL) về sự phát sinh hình thái trên tất cả các nguồn mẫu (lá, cuống lá, thân rễ) trên đối tượng cây sâm Ngọc Linh *in vitro*, đề tài này đã thu được những kết quả khả quan về quá trình phát sinh trực tiếp phôi vô tính, chồi, rễ bất định và mô sẹo từ mẫu cấy. Đây sẽ là hướng đi mới hiệu quả trong việc tái sinh cây sâm Ngọc Linh *in vitro*.

- Xác định được môi trường nuôi cấy thích hợp cho khả năng phát sinh phôi từ lá, tái sinh chồi từ thân rễ nhằm phục vụ cho vi nhân giống.

- Đề tài thu được 10.000 cây sâm Ngọc Linh từ phôi nuôi cấy *in vitro* có khả năng phát triển tốt trong điều kiện tự nhiên (vùng núi Ngọc Linh thuộc tỉnh Quảng Nam và khu vực Cồng trời ở Vườn quốc gia Bidoup - Núi Bà, tỉnh Lâm Đồng)

- Xây dựng được quy trình nhân giống cây sâm Ngọc Linh từ kỹ thuật nuôi cấy TCL và tăng khả năng sống sót của cây từ phôi có nguồn gốc từ nuôi cấy TCL.

CHƯƠNG I

TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. Giới thiệu về chi nhân sâm

1.1.1. Hệ thống phân loại chi nhân sâm

Chi nhân sâm (danh pháp khoa học: *Panax*) là một chi chứa khoảng 11 loài cây có củ phát triển rất chậm thuộc họ nhân sâm (Bảng 1.1).

Bảng 1.1. Các loài thuộc chi *Panax* trên thế giới [131]

Tên khoa học	Tên thông thường	Nguồn gốc
<i>Panax bipinnatifidus</i>	Nhân sâm Himalaya (Himalayan ginseng)	Myanma, Trung Quốc, Ấn Độ, Nepal
<i>Panax ginseng</i> C.A.Meyer	Nhân sâm (Asia ginseng)	Hàn Quốc
<i>Panax japonicus</i> C.A.Meyer	Nhân sâm Nhật bản (Japanese ginseng)	Nhật Bản
<i>Panax notoginseng</i> F.H.Chen	Tam thất (Sanchi ginseng)	Trung Quốc (Yunnan)
<i>Panax pseudoginseng</i> Wall	Giả nhân sâm (Nepal ginseng)	Trung Quốc (Xizang)
<i>Panax quinquefolius</i> L.	Sâm Mỹ (American ginseng)	Bắc Mỹ
<i>Panax stipuleanatus</i> H.T.Tsai et K.M.Feng	Bái tử (Ye-sanchi ginseng)	Trung Quốc (Yunnan), Việt Nam
<i>Panax trifolius</i> L.	Sâm lùn (Dwarf, Peanut ginseng)	Bắc Mỹ
<i>Panax vietnamensis</i> Ha et Grushv.	Sâm Ngọc Linh (Vietnamese ginseng)	Việt Nam
<i>Panax wangianus</i> S.C.Sun	(Wang's Sanqi)	Trung Quốc
<i>Panax zingiberensis</i> C.Y.Wu et Feng	Sâm gừng (Ginger ginseng)	Trung Quốc (Yunnan)

Các loài thuộc chi nhân sâm đã được biết đến và sử dụng từ rất sớm trong y học cổ truyền với tác dụng phục hồi sự suy giảm chức năng và đưa hoạt động của cơ thể trở lại bình thường. Trong đó, loại sâm được biết và sử dụng nhiều nhất là sâm Triều Tiên, cây thuốc bổ hàng đầu của y học cổ truyền phương đông. Ngày nay, với

các hiểu biết trên dược tính của các loài thuộc chi *Panax*, cây sâm ngày càng được sử dụng rộng rãi trong y học và các ngành hóa mỹ phẩm.

1.1.2. Đặc điểm thực vật

Cây nhỏ, cao 30 - 50 cm có thể sống trên 50 năm. Cây mang ở ngọn một vòng 4 - 5 lá. Cuống lá dài, lá kép chân chim, mép lá có răng cưa. Hoa màu trắng nhạt hợp thành tán đơn. Quả hạch, màu đỏ gần hình cầu. Rễ củ phân thành nhiều nhánh giống như hình người nên có tên là nhân sâm. Cây mọc hoang dại và được trồng ở đông bắc Trung Quốc, Triều Tiên, Nga [87].

1.1.3. Thành phần hóa học

Thành phần chính là saponin triterpenoid tetracyclic nhóm dammarane gọi chung là ginsenoside. Phần aglycon là protopanaxadiol và protopanaxatriol.

Trong rễ nhân sâm còn có saponin với aglycon là acid oleanolic: Ginsenoside Ro (acid oleanolic) + 2 glucose + acid glucuronic).

Các thành phần khác: Hợp chất polyacetylen, tinh dầu 0 - 0,5%, 25% vitamin B₁, B₂, các phytosterol 0,029%, glycan.

Lá cũng có chứa saponin loại dammarane là ginsenoside-Rb₁, -Rb₂, -Rc, -F₂, -Re, -Rg₁, -F₁, F₃.

1.1.4. Giá trị kinh tế và y học của cây nhân sâm

1.1.4.1. Giá trị kinh tế

Từ hàng nghìn năm nay, nhân sâm luôn là cây thuốc cổ truyền hàng đầu của phương Đông. Nhân sâm có giá trị rất cao, trong những giai đoạn thị trường phát triển, chỉ một mình Trung Quốc đã thu trên 12 triệu USD một năm. Thị trường của nhân sâm đang mở rộng về phía tây và hứa hẹn một nguồn lợi lớn hơn nữa. Năm 1993, Hội đồng Thực vật Mỹ (American Botanical Council) đã thống kê có khoảng trên 500 sản phẩm nhân sâm thương mại lưu hành ở thị trường Bắc Mỹ.

Châu Á cũng nhập khẩu sâm Mỹ với số lượng lớn. Năm 1997, Mỹ xuất khẩu hợp pháp sang Châu Á 527.547 kg sâm trồng và 22.929 kg sâm hoang dã. Đến năm 1998, Mỹ đã xuất khẩu gần 2 triệu kg. Lượng sâm Mỹ sản xuất tổng cộng của Canada cũng lên đến 4.615.000 kg. Giá của rễ sâm Mỹ ở thị trường là 20 - 45 USD/kg.

1.1.4.2. Nhân sâm trong y học cổ truyền

Nhân sâm dùng làm thuốc bổ: trị các chứng bệnh như tư âm, kiện tỳ, dưỡng huyết, bổ khí, làm đen tóc, làm chắc răng, gia tăng tuổi thọ; dùng làm thuốc giải độc:

trị các chứng bệnh như tiêu độc và dùng điều trị: bệnh tim, hô hấp, bệnh gan, tiết niệu, đau bụng, thấp khớp, tai, mũi, họng [2].

1.1.4.3. Nhân sâm trong y học hiện đại

Dược chất chính của nhân sâm *Panax ginseng* C.A. Meyer là ginsenoside (triterpenic dammaranic saponin). Hai nhóm ginsenoside chính là Rb và Rg có nhóm 20(S) – protopanaxadiol và 20(S) – protopanaxatriol là nhóm sapogenin. Ginsenoside chính của nhóm Rb là Rb₁, Rb₂, Rc và Rd. Ginsenoside của nhóm Rg là Re, Rf và Rg₁. Trong đó, hai ginsenoside quan trọng nhất là Rb₁ và Rg₁ [114].

Ginsenoside nhóm Rb và Rg có những tính chất dược lý khác nhau, đôi khi đối lập nhau. Do đó, cần phân tích chính xác thành phần dược chất để xác định chính xác tác dụng y học khi dùng điều trị. Trong y học hiện đại nhân sâm thể hiện các tác dụng: tăng lực, hồi phục sức, thể hiện tác dụng đối với hệ thần kinh trung ương, cải thiện trí nhớ, chống stress, giải lo âu và chống trầm cảm, chống oxy hóa và chống lão hóa, bảo vệ gan, điều hòa miễn dịch, chống ung thư, hạ glucose huyết, giảm đau, giải độc.

1.1.5. Tác dụng dược lý của sâm Triều Tiên (Panax ginseng C.A. Meyer, Korean ginseng)

Nhân sâm đã được sử dụng hơn 2000 năm ở Hàn Quốc, Trung Quốc, Nhật Bản và các nước Đông Á như là một vị thuốc với danh xưng là “King of medicines” (vua của các phương thuốc). Hồng sâm Triều Tiên (Korean red ginseng) được công nhận là thương phẩm có phẩm chất tốt nhất của sâm Triều Tiên so với Bạch sâm Triều Tiên (Korean white ginseng) với qui trình chế biến dựa trên ba tiêu chí để đảm bảo hiệu lực và độ an toàn cao: (1) gia tăng các tác dụng dược lý như tác dụng kháng ung thư, (2) chống oxy hoá của Hồng sâm mạnh, giảm thiểu tác dụng phụ hay độc tính, (3) các chế phẩm có thể bảo quản được trong thời gian dài.

Những nghiên cứu về dược lý thực nghiệm của Hồng sâm Triều Tiên đã được tiến hành từ thập niên 60 ở Hàn Quốc. Những nghiên cứu về hoá học đã phân lập từ Hồng sâm Triều Tiên thu được 30 ginsenoside khác nhau, các polysaccharid, protein ổn nhiệt, các hợp chất phenolic, các polyacetylen,... Những đặc điểm đa dạng về hoá thực vật đã góp phần làm phong phú tác dụng dược lý của Hồng sâm Triều Tiên. Mỗi ginsenoside đã được chứng minh có tác dụng hiệp lực và đối kháng với các ginsenoside khác. Mặc dù, Hồng sâm Triều Tiên đã có hơn 2000 năm kinh nghiệm sử dụng nhưng những minh chứng bằng khoa học hiện đại về các tác dụng trị liệu của Hồng sâm Triều Tiên vẫn còn là những bí mật cần khám phá.

Y học cổ truyền Phương Đông đã chứng minh Hồng sâm Triều Tiên đóng vai trò quan trọng trong việc dự phòng và điều trị những bệnh lý mãn tính, cần điều trị dài ngày như bệnh tiểu đường, ung thư, bệnh xơ vữa động mạch, huyết khối, cao lipid máu, cao huyết áp, thiếu năng tuần hoàn não, ..., tác dụng tăng cường thể lực và gia tăng sức đề kháng không đặc hiệu của cơ thể. Y học hiện đại đã chứng minh Hồng sâm Triều Tiên duy trì hệ thần kinh trung ương, hệ nội tiết và hệ miễn dịch. Tuy các tác dụng trị liệu của Hồng sâm Triều Tiên không điển hình và tương đối yếu so với các thuốc đặc trị tây y nhưng ít gây tác dụng phụ khi sử dụng dài ngày, nhất là ở những đối tượng bệnh nhân cao tuổi là ưu điểm của Hồng sâm Triều Tiên.

1.2. Sơ lược về cây sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.)

1.2.1. Nguồn gốc và lịch sử phát triển

Cây sâm Ngọc Linh là cây thuốc quý của đồng bào dân tộc Xê Đăng sống trên vùng núi cao thuộc hai tỉnh Kon Tum và Quảng Nam, thân thảo sống đan xen trong quần thể thực vật đa dạng vùng rừng núi hiểm trở, lạnh và mây mù gần như quanh năm, không có dân cư.

Năm 1973, đoàn điều tra dược liệu Ban Dân Y khu 5 do dược sỹ Đào Kim Long và Nguyễn Châu Giang hướng dẫn đã phát hiện được một loài *Panax* mọc thành quần thể ở độ cao 1800 m tại vùng Đăk Lây, huyện Đăk Tô, tỉnh Kon Tum và đặt tên là “sâm Đốt trúc” với tên khoa học sơ bộ xác định là *Panax articulatus* L., họ nhân sâm (*Araliaceae*).

Năm 1974, qua báo cáo của dược sỹ Nguyễn Thới Nhâm về kết quả phân tích sơ bộ thành phần hóa học cây sâm K5 so với cây sâm Triều Tiên và sâm Tam thất. Khu ủy khu 5 đã cho bảo vệ chặt chẽ vùng sâm này và cũng từ đây sâm K5 được sử dụng để chữa bệnh có hiệu quả cho các thương bệnh binh, cán bộ và nhân dân.

Phân loại

Giới : Plantae
 Ngành : Magnoliophyta
 Lớp : Magnoliopsida
 Bộ : Apiales
 Họ : Araliaceae
 Chi : *Panax*
 Loài : *Panax vietnamensis* Ha et Grushv.



Hình 1.1. Cây sâm Ngọc Linh

Trải qua hơn 30 năm, sâm K5 còn gọi là sâm Ngọc Linh hay sâm Việt Nam, một loài sâm đặc hữu của nước ta đã được thế giới biết đến với tên khoa học là *Panax vietnamesis* Ha et Grushv. (Dung và Grushvisky, 1985) và đã xác định thân rễ và rễ củ sâm Việt Nam chứa 52 saponin triterpen trong đó có 26 saponin với tổng số hàm lượng là 10,82% [62]. So với 3 loài sâm quý nhất thế giới thì sâm Triều Tiên chỉ có 25 saponin với tổng số hàm lượng là 3,52%, sâm Mỹ chỉ có 14 saponin với hàm lượng 3,83%, sâm Trung Quốc có 23 saponin với tổng số hàm lượng là 4,87%. Saponin triterpen là thành phần hóa học quan trọng nhất của sâm, tạo nên các tác dụng chủ yếu của sâm. Ngoài ra, nó có 7 hợp chất polyacetylen có tính kháng khuẩn và kháng ung thư, 17 acid béo đặc biệt là acid béo không no như: oleic (13,26%), linoleic (40,04%) và linolenic (2,61%), 18 acid amin trong đó có đủ 8 acid amin cần thiết cho cơ thể và các acid amin chống lão hóa tế bào có tỷ lệ rất cao và còn có 20 nguyên tố đa vi lượng [132].

1.2.2. Hình thái thực vật

Sâm Ngọc Linh là loài cây thân thảo sống lâu năm, thân rễ có sẹo và các đốt do thân khí sinh rụng hàng năm để lại, cao khoảng 40 - 100 cm. Loài sâm này bắt đầu xuất hiện ở độ cao 1.500 m trở lên so với mực nước biển. Từ 1.700 - 2.000 m, cây mọc tập trung thành quần thể dọc bờ suối, có độ ẩm trên 80%, đất nhiều mùn hữu cơ, dưới tán rừng hỗn giao giữa lá rộng và lá kim.

Thân rễ: thân rễ nạc, đường kính 1 - 3,5 cm, chiều dài tùy theo số năm sinh trưởng, màu vàng nhạt hay vàng đất, có nhiều đốt, mang những vết sẹo do thân lụi hàng năm để lại, mỗi vết tương đương với 1 năm tuổi. Thân rễ mang nhiều rễ con

và những vết nhăn dọc, mùi thơm nhẹ, vị đắng hơi ngọt.

Rễ củ: rễ củ nằm cuối thân rễ, dạng con quay, hình trụ, đôi khi có dạng hình người, màu vàng nhạt, mang nhiều rễ con và có vân ngang. Cây sâm trồng có rễ củ phát triển hơn và thường có 3 dạng: dạng củ cà rốt, dạng con quay và phổ biến nhất là dạng một bó củ.

Thân: thân mọc thẳng đứng, màu xanh hoặc hơi tím, đường kính 5 - 8 mm, thường rụng đi hàng năm sau mùa sinh trưởng. Thân rễ có thể phân nhánh nhiều lần và hình thành một bụi sâm nhưng rất hiếm.

Lá: lá kép hình chân vịt, mọc ở đỉnh thân. Cuống lá kép dài 2 - 12 cm, mỗi lá kép thường có 5 lá chét hình trứng ngược, hình mũi mác hoặc hình bầu dục, mép khía răng cưa, đầu lá nhọn, góc lá hình nêm. Gân lá hình lông chim, thường có 10 cặp, gân phụ hình mạng. Phiến lá màu xanh lục, mảnh, dễ rách, có nhiều lông cứng dài 1 - 2 mm, mặt dưới ít hơn.

Hoa: hoa dạng cụm, thường xuất hiện ở cây có 3 lá kép trở lên. Mỗi cụm hoa có 50 - 120 hoa, cuống dài 1 - 1,5 cm. Hoa màu vàng lục nhạt, đường kính 3 - 4 mm, gồm 5 lá đài hợp thành hình chuông, 5 cánh hoa, 5 nhị màu trắng. Bao phấn hình xoan, đính lưng, đĩa hoa hơi lồi. Bầu cao 1 - 1,5 mm, có 2 lá noãn, nhưng thường chỉ có 1 lá noãn phát triển. Mùa hoa thay đổi theo vùng nhưng thường bắt đầu từ tháng 4 đến tháng 6.

Quả: mọc tập trung ở trung tâm của tán lá, dài độ 0,8 - 1 cm và rộng khoảng 0,5 - 0,6 cm, sau hai tháng bắt đầu chuyển từ màu xanh đến xanh thẫm, vàng lục quả mọng, khi chín ngả sang màu đỏ cam với một chấm đen không đều ở đỉnh quả. Mỗi quả chứa một hạt, một số quả chứa 2 hạt và số quả trên cây bình quân khoảng 10 đến 30 quả. Chủ yếu hạt dạng hình thận, một số ít quả hình cầu dẹt chứa 2 hạt. Trọng lượng trung bình của một quả là 275 mg và một hạt là 75 mg. Mùa quả từ tháng 7 đến tháng 9. Ở triền phía đông Ngọc Linh thuộc tỉnh Quảng Nam, mùa ra hoa kết quả có thể chậm hơn 1 tháng so với các vùng ở triền phía tây tỉnh Kon Tum [7].

Vào đầu tháng 1 hàng năm, sâm xuất hiện chồi mới. Cuối tháng 10, phần thân khí sinh tàn lụi dần, lá rụng, để lại một vết sẹo ở đầu củ sâm và cây bắt đầu giai đoạn ngủ đông hết tháng 12. Khi thu hoạch, chỉ nên thu nhận các củ từ 3 tuổi trở lên, tốt nhất là trên 5 tuổi. Mùa đông cũng là mùa thu hoạch tốt nhất phần thân rễ của sâm.

1.2.3. Phân bố

Đến nay, sâm Ngọc Linh mới chỉ phát hiện được duy nhất ở vùng núi Ngọc Linh thuộc hai tỉnh Quảng Nam và Kon Tum. Đây cũng là giới hạn xa nhất về phía Nam (ở 15° vĩ tuyến Bắc) của bản đồ phân bố chi *Panax* L. trên thế giới.

Ngọc Linh là dãy núi cao thứ hai của Việt Nam, có tọa độ địa lý từ 107°50' - 108°7' kinh tuyến Đông và từ 15°0' - 15°10' vĩ tuyến Bắc, đỉnh cao nhất là Ngọc Linh cao 2.598 m. Những điểm trước đây có sâm Ngọc Linh mọc tự nhiên từ độ cao khoảng 1.500 m đến 2.200 m, chủ yếu tập trung ở 1.800 - 2.000 m, thuộc địa bàn của huyện Đăk Tô (tỉnh Kon Tum) và Trà My (tỉnh Quảng Nam). Về giới hạn cũng như phân bố của loài sâm này ở núi Ngọc Linh hiện nay đã có nhiều thay đổi [7].

1.2.4. Thành phần hoá học

Thành phần hoá học cơ bản và có tính chất chung nhất trong phần trên và dưới mặt đất của sâm Ngọc Linh được trình bày trong bảng sau:

Bảng 1.2. Thành phần hoá học chung trong sâm Ngọc Linh

Thành phần khảo sát	Bộ phận		Tài liệu tham khảo
	Thân rễ và rễ củ (%)	Lá và cọng thân (%)	
Độ ẩm	7,81	9,27	[57, 58, 59, 60]
Độ tro toàn phần	7,80	8,45	
Độ tro sunfat	8,13	-	
Độ tro không tan	1,73	0,46	
Acid amin tự do	1,19 (18 chất)	-	
Lipid	5,68	-	
Acid béo	0,53 (14 chất)	-	
Đường tự do	6,19	-	
Đường	26,77	-	
Tinh bột	2,64	-	
Tinh dầu	0,05 - 0,10	-	
Vitamin C	0,059	-	
Hợp chất steroid β -sitosterol daucosterin	+	-	
Hàm lượng chất tan trong MeOH (%)	39,96	15,44	
Saponin toàn phần	15,75	9,0 - 12,66	



Hình 1.2. Một số đặc điểm hình thái thực vật của Sâm Ngọc Linh

1.2.4.1. Thành phần hợp chất saponin

✓ Phần dưới mặt đất (thân rễ và rễ củ)

Hợp chất saponin được xem là thành phần hoạt chất chủ yếu của cây sâm Ngọc Linh cũng như các loài sâm khác trên thế giới. Khi phân tích các hợp chất hóa học rễ củ sâm Ngọc Linh chứa tới 50 saponin (sâm Triều Tiên có khoảng 25 saponin) và những kết quả nghiên cứu mới nhất cho thấy danh sách saponin của sâm Ngọc Linh lên tới 52 loại bao gồm 26 saponin đã biết và 26 saponin có cấu trúc mới được đặt tên là vina-ginsenoside (VG) -R1 đến -R25 và 20-O-Me-G-Rh₁ [57].

Các saponin dammaran được xem là hoạt chất quyết định cho các tác dụng sinh học có giá trị của sâm Triều Tiên cũng chiếm một tỷ lệ rất cao về hàm lượng và số lượng trong thành phần hợp chất saponin của sâm Ngọc Linh (50/52 saponin phân lập được). Trong đó các saponin dẫn chất của 20(S)-protopanaxadiol gồm 22 hợp chất với đại diện chính là ginsenoside-Rb1, -Rb3, -Rd. Các saponin dẫn chất của protopanaxatriol gồm 17 hợp chất với các đại diện chính là ginsenoside-Re, -Rg1, notoginsenoside-R1. Các saponin có cấu trúc occotillol gồm 11 hợp chất với các đại diện chính là majoside-R1 và -R2 [7].

Theo Yamasaki (2000), các hợp chất saponin mới của sâm Ngọc Linh có một số đặc điểm đáng chú ý như sau [125]:

VG-R1 và VG-R2 là saponin ocotillol có nhóm acetyl trên chuỗi đường ở C-6.

VG-R3 là chất duy nhất thiếu nhóm -OH tại vị trí C-12 trong tất cả các saponin được phân lập từ loài này.

VG-R4 là một saponin dẫn chất của 20(S)-protopanaxatriol có mang một trong hai chuỗi đường ở C-3, trong khi các saponin này được tìm thấy trước đây chỉ mang các chuỗi đường ở C-6 và C-20, hoặc C-6 và C-12.

VG-R5 và -R6 là hai saponin chứa cầu nối α -glycoside hiếm gặp trong tự nhiên. VG-R7 là G-Rd xylosyl hoá.

VG-R8 một mạch, liên kết đôi có hướng tại -OH ở C-25. Cấu trúc này có điểm tương đồng với majonoside F4, 3-O- và 20-O-di β -d-glucoside trên cùng một nhóm aglycone. VG-R9 cũng liên kết đôi có hướng tại C-36 và cấu trúc tương đồng với majonoside-F1.

VG-R10, -R12, -R13, -R14, -R15, -R16, -R17, -R19, -R20, -R21 là các saponin có cấu trúc aglycon mới. VG-R13 là một glycoside đầu tiên phát hiện trong một loài *Panax* có aglycon là dammarenediol. Chất này là một chất trung gian trong quá trình sinh tổng hợp của 20(S)-protopanaxadiol và 20(S)-protopanaxatriol [7].

✓ Phần trên mặt đất (thân và lá)

Có 19 saponin dammaran đã được phân lập từ phần trên mặt đất của sâm Ngọc Linh, bao gồm 11 saponin đã biết và 8 saponin có cấu trúc mới được đặt tên là vinaginsenoside-L1 đến -L8. Khác với phần dưới mặt đất, các saponin dẫn xuất của 20(S)-protopanaxadiol chiếm tỷ lệ rất cao trong thành phần saponin từ phần trên mặt đất, đại diện chính là notoginsenoside-Fc, G-Rb3, N-Fe và VG-L2. Các saponin

20(S)-protopanaxatriol gồm P-RS1, G-Re và G-Rg1 với tỷ lệ thấp. Ngoài ra, còn có các saponin có cấu trúc ocotillol với đại diện chính là VG-R1 nhưng chiếm tỷ lệ thấp.

1.2.4.2. Các thành phần khác

Polyacetylene: 7 hợp chất polyacetylene đã được phân lập ở phân đoạn ít phân cực từ phần dưới mặt đất của sâm Ngọc Linh.

Acid béo: 17 acid béo từ 8 - 20 cacbon, trong đó chiếm tỷ lệ lớn nhất là acid linoleic (40,04%); acid palmitic (29,62%); acid oleic (13,26%); acid stearic (4,48%) và acid linolenic (2,61%).

Acid amin: 18 acid amin đã được xác định. Thành phần này gồm đủ 8 acid amin cần thiết cho cơ thể, một số acid amin có tỷ lệ rất cao như arginine 46,66%, lysine 17,90% và tryptophan 10,20% đã được xác định có tính chống lão hoá tế bào.

Các nguyên tố vi lượng và đa lượng: 20 nguyên tố vi lượng và đa lượng của phần dưới mặt đất sâm Ngọc Linh đã được xác định, trong đó bao gồm một số các nguyên tố có tác dụng sinh học như K, Na, Mg, Mn, Cu, Fe, Co, Zn, Se.

1.2.5. Các tác dụng của sâm Ngọc Linh

Tác dụng lên hệ thần kinh trung ương: sâm Ngọc Linh liều thấp có tác dụng kích thích thần kinh, làm tăng hoạt động vận động và trí nhớ, nhưng liều cao lại ức chế thần kinh.

Tác dụng chống trầm cảm: sâm Ngọc Linh có tác dụng chống trầm cảm ở liều uống một lần 200 mg/kg hoặc liều 50 - 100 mg/kg dùng trong 7 ngày ở chuột trắng; majonosid-R₂ tiêm màng bụng có tác dụng chống trầm cảm ở cả 3 liều 3,1; 6,2 và 12,5 mg/kg [7].

Tác dụng tăng sinh lực: Sâm Ngọc Linh có tác dụng tăng sinh lực trong thí nghiệm chuột bơi, làm tăng sinh lực chống lại sự mệt mỏi, giúp phục hồi sức lực [7].

Tác dụng sinh thích ứng (adaptogenesis): Trong stress vật lý, cho chuột trắng uống sâm Ngọc Linh liều 100 mg/kg có tác dụng làm tăng khả năng chịu đựng của chuột đối với nhiệt độ cao (37 - 42°C) và nhiệt độ thấp (-5°C), làm kéo dài thời gian sống thêm của chuột thí nghiệm.

Trong stress cô lập, chuột trắng được nuôi riêng từng con trong 4 tuần, thời gian ngủ khi tiêm natri barbital giảm đi 30%. Sâm Ngọc Linh liều uống 50 - 200 mg/kg hoặc hoạt chất majonosid-R₂ tiêm màng bụng liều 3,1 - 12,5 mg/kg làm cho thời gian ngủ trở lại bình thường [7].

Tác dụng chống oxy hóa: Trên thí nghiệm *in vivo* dùng dịch nổi của mô não, gan và phân đoạn vi thể gan của chuột trắng, saponin sâm Ngọc Linh ở nồng độ 0,05 - 0,5 mg/kg có tác dụng chống oxy hóa, ức chế sự hình thành MDA (malonyl dialdehyde) là sản phẩm của quá trình oxy hóa lipid màng sinh học [126].

Tác dụng kích thích miễn dịch: Bột chiết sâm Ngọc Linh liều uống 500 mg/kg và majonosid-R₂ tiêm trong màng bụng có tác dụng làm tăng chỉ số thực bào trong thí nghiệm *in vitro* và *in vivo* ở chuột trắng. Dùng liều *E. coli* gây chết chuột trắng. Nếu kết hợp dùng sâm và majonosid-R₂ với liều như trên sẽ làm tăng tỷ lệ chuột sống sót. Có lẽ do thuốc có tác dụng làm tăng đại thực bào đối với *E. coli* [126].

Tác dụng phục hồi máu: Trong thí nghiệm làm giảm hồng cầu và bạch cầu ở động vật thí nghiệm, sâm Ngọc Linh có tác dụng làm phục hồi số lượng hồng cầu và bạch cầu đã bị giảm [1].

Tác dụng dược lý khác: Sâm Ngọc Linh còn có tác dụng 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 đối với gan [1].

1.2.6. Độc tính

1.2.6.1. Rễ và thân rễ

Độc tính cấp: động vật thử nghiệm được cho uống với liều tối đa có thể bơm được qua kim nhưng không gây chết sau 72 giờ quan sát D_{max} là 34 g/kg thể trọng (bột chiết sâm Ngọc Linh) và 10,6 g/kg thể trọng (saponin toàn phần sâm Ngọc Linh). Do đó không thể xác định được LD₅₀ đường uống của sâm Ngọc Linh (LD₅₀: liều làm chết 50% số động vật thử nghiệm trong điều kiện nhất định).

Độc tính bán trường diễn: sâm Ngọc Linh thể hiện độ an toàn khi sử dụng dài ngày. Ở các liều uống tương đương với 1/10, 1/20 và 1/40 của D_{max} sau một tháng sử dụng, bột chiết sâm Ngọc Linh không làm thay đổi về mặt sinh học các chỉ tiêu về huyết học và sinh hoá gan, thậm so với lô đối chứng uống nước cất.

1.2.6.2. Thân và lá

Liều tối đa của cao chiết lá sâm có thể bơm được qua kim mà không gây chết chuột sau 72 giờ quan sát D_{max} là 30 g/kg thể trọng chuột và không xác định được LD₅₀. Liều D_{max} của cao chiết lá sâm tương đương với D_{max} của bột chiết rễ sâm.

Những nghiên cứu trên cho thấy, sâm Ngọc Linh không chỉ thể hiện các tác dụng tiêu biểu của họ Araliaceae mà còn thể hiện một số tác dụng đặc hữu so với sâm Triều Tiên và một số loài sâm khác như tác dụng giải lo âu, tác dụng chống trầm cảm,

tác dụng chống oxy hoá,... Majonoside-R2, hợp chất có hàm lượng cao nhất trong sâm Ngọc Linh được xác định là một hoạt chất quan trọng quyết định những tác dụng dược lý đặc hiệu của sâm Ngọc Linh. Có thể khẳng định, sâm Ngọc Linh là một loài dược liệu quý không chỉ của Việt Nam mà còn của cả thế giới, cần được bảo tồn và nhân giống. Việc ứng dụng công nghệ sinh học vào nhân giống cũng như sinh khối sâm Ngọc Linh là một hướng phát triển đầy triển vọng và rất đáng quan tâm.

1.2.7. Giá trị kinh tế của sâm Ngọc Linh

Các công trình nghiên cứu dược lý và lâm sàng cho thấy, sâm Ngọc Linh có những tác dụng rất giống Nhân sâm. Gần đây, các thử nghiệm dược lý cho thấy majonosid-R2, saponin chủ yếu của sâm Ngọc Linh, có tác dụng chống stress và là một chất xúc tiến chống ung thư quan trọng. Ngoài ra, chúng còn có nhiều tác dụng khác như kích thích hoạt động thần kinh và trí nhớ ở liều thấp, chống trầm cảm, tăng 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 [1]. Theo số liệu phỏng vấn và kết quả điều tra cho thấy 1 kg sâm tươi hiện nay có giá trên 20 triệu đồng, những lúc khan hiếm có thể lên tới 30 - 40 triệu đồng/kg. Theo tính toán sơ bộ nếu trồng 1 ha sâm sau 8 năm sẽ thu lợi nhuận trên 2 tỷ đồng/ha.

1.2.8. Tình hình trồng cây sâm Ngọc Linh

1.2.8.1. Hiện trạng và tiềm năng của cây sâm Ngọc Linh

Để bảo vệ và phát triển cây thuốc quý này cùng với một số cây ôn đới khác, Ủy ban Nhân dân tỉnh Quảng Nam đã cho thành lập trại dược liệu Trà Linh năm 1979. Tính đến tháng 4 năm 1987, trại đã thu được 53,3 kg thân rễ, trồng được 81.000 cây. Đến tháng 9 năm 1992, trại đã có 100.000 cây. Từ năm 1985, trại đã áp dụng các biện pháp bón phân và chăm sóc để tăng năng suất thân rễ, tăng tỷ lệ nảy mầm, tăng tỷ lệ cây sống. Năm 1995 đã tiến hành nhân giống cây bằng lai hữu tính và vô tính. Kết quả bước đầu là số lượng hạt đậu và thu được trên một cây sâm đã tăng từ 6,7 hạt lên 10,2 hạt. Tỷ lệ nảy mầm của hạt gieo trên nền đất đạt 75% nhờ cách chọn hạt tốt ở những cây trên 1 năm tuổi khoẻ mạnh. Về nhân giống vô tính, trại đã chọn cách ươm đoạn đầu của thân rễ trong túi polyethylen và ươm đoạn thân rễ trên mặt đất. Kết quả bước đầu cho thấy, tỷ lệ sống và đâm chồi của đoạn đầu thân rễ cây sâm là 65%. Bằng cách nhân giống hữu tính và vô tính, trại dược liệu đã có 223.000 cây con [34].

Năm 1995, Sở Khoa học Công nghệ và Môi trường tỉnh Quảng Nam đã đầu tư nghiên cứu các biện pháp kỹ thuật nhằm bảo vệ và phát triển cây sâm Ngọc Linh với tổng kinh phí đầu tư 563 triệu đồng. Tuy nhiên, do thiên tai và các yếu tố sinh thái bất lợi như chim chóc, côn trùng, các loại gặm nhấm nên mô hình ươm giống và mô hình vườn sâm trong dân bước đầu không đạt chỉ tiêu số lượng đề ra.

Năm 2003, viện Dược liệu Hà Nội phối hợp với sở Khoa học Công nghệ và Môi trường Kon Tum thực hiện dự án vùng trồng cây sâm Ngọc Linh. Cây sâm được trồng tập trung ở xã Ngọc Lay, huyện Đăk Tô. Năng suất hàng năm ước tính khoảng 50.000 cây. Từ dự án, Kon Tum đã xây dựng một vườn giống trên 1 ha tại huyện Đăk Tô. Trong hai năm 2003, 2004 số cây giống này đã cho thu hoạch 27.000 quả, đáp ứng yêu cầu sản xuất thành công trên 10.000 cây sâm giống, chuyển giao trên 13.500 cây sâm giống cho đồng bào dân tộc thiểu số trồng thử nghiệm. Từ kết quả của dự án, cuối năm 2004, Chính phủ đã đồng ý cho tỉnh Kon Tum triển khai tiếp tục dự án bảo tồn và phát triển cây sâm Ngọc Linh đến năm 2014, với tổng kinh phí thực hiện xấp xỉ 10 tỷ đồng.

Hiện nay, UBND tỉnh Quảng Nam đã phối hợp với Viện Dược liệu – Bộ Y tế và Trung Tâm phát triển sâm Ngọc Linh và Dược liệu Quảng Nam thuộc Sở Y tế, UBND huyện Nam Trà My bảo tồn và phát triển được khoảng gần 70 ha vườn sâm (diện tích ước tính); Trạm Dược liệu Trà Linh đã trồng được trên 10 ha vườn sâm tại địa bàn xã Trà Linh huyện Nam Trà My (Hiện nay còn lại 7,2 ha theo kiểm kê bàn giao). Trại giống Tak ngo trồng khoảng 1 ha; diện tích còn lại do nhân dân trồng phân tán. Số lượng cây hiện có khoảng 653.500 cây.

Năm 2015, tỉnh Quảng Nam đã đưa ra nghị quyết số 194/2015/NQ-HĐND về quy hoạch bảo tồn và phát triển sâm Ngọc Linh trên địa bàn huyện Nam Trà My giai đoạn 2016 - 2020 và định hướng đến năm 2030 với tổng số vốn hơn 34 tỉ và thực hiện trồng đến năm 2020 là trên 600 ha.

Sâm Ngọc Linh là một dược liệu quý và có giá trị kinh tế cao, cần thiết ứng dụng những kỹ thuật mới trong sản xuất để nâng cao giá trị thương mại, xây dựng thương hiệu sâm Ngọc Linh trên thị trường thế giới. Trong đó, bước đầu tiên là hiện đại hóa việc canh tác. Trong nhiều biện pháp, nuôi cấy mô là một kỹ thuật tiên tiến có thể ứng dụng tốt cho sản xuất sản phẩm sâm Ngọc Linh.

1.2.8.2. Các khu vực trồng cây Sâm Ngọc Linh

Hiện nay, hai tỉnh có khu vực trồng và phát triển cây sâm Ngọc Linh đó là

Quảng Nam và Kon Tum. Ở Quảng Nam từ năm 2004, cây sâm Ngọc Linh đã được đem trồng tại các thôn 2, 3 và thôn 4 xã Trà Linh, huyện Nam Trà My. Hiện nay đã được nhân dân trong vùng và Trạm dược liệu Trà Linh thuộc Trung tâm bảo tồn sâm Ngọc Linh và Dược liệu tỉnh Quảng Nam đã trồng thành công sâm Ngọc Linh dưới tán rừng tại khu vực 7 thôn thuộc 3 xã là Trà Linh, Trà Nam và Trà Cang huyện Nam Trà My, cây sâm sinh trưởng, phát triển tốt, có thể nhân rộng trên thực tế trong vùng, riêng 3 thôn tại xã Trà Linh đã có một số diện tích trồng Sâm cho thu hoạch với chất lượng sâm tương đối tốt. Tại Kon Tum có lâm trường sâm Ngọc Linh với chót sâm đóng tại xã Măng Ri, huyện Tu Mơ Rông đây là khu vực trồng sâm nằm trong dự án bảo tồn cây sâm Ngọc Linh của chính phủ do Công ty đầu tư phát triển lâm nghiệp, công nghiệp và dịch vụ Đắc Tô quản lý. Ngoài ra, ở hai tỉnh này còn có các điểm trồng tự phát của người dân.

Các khu vực trồng sâm được gọi là chót sâm, nơi được phân công bảo vệ 24/24. Ngoài người bảo vệ, còn có các phương tiện rào, chông, bẫy sập,... để chống thú rừng, chim, các loại gặm nhấm và chống mất cắp sâm.

1.2.8.3. Chăm sóc và bảo vệ

Công việc chăm sóc chủ yếu là phủ lá chống xói lở ở những nơi tán rừng không che kín, bồi thêm lớp đất mùn hữu cơ, làm cỏ định kỳ, vun xới, sửa lại luống,... Việc bón phân hữu cơ, NPK,... thì chưa được thực hiện do đặc điểm địa hình trở ngại cho việc vận chuyển cũng như khó khăn về mặt kinh tế. Vào mùa khô, nước được dẫn từ nguồn khe suối tưới cho cây để chống hạn.

Tổ chức trực gác 24/24 để bảo vệ. Vào mùa quả, công nhân đặt bẫy chuột và làm các lồng tre có lưới để bảo vệ quả. Tuy nhiên, các biện pháp này không hoàn toàn hữu hiệu và không triệt để nên lượng quả bị chuột và sóc phá hoại rất nhiều [26].

1.2.8.4. Sâu bệnh hại cây sâm Ngọc Linh

Cây sâm có khả năng chống sâu bệnh khá tốt. Thỉnh thoảng cây sâm bị sâu ăn lá nhưng không nhiều. Bệnh phổ biến nhất là bệnh rỉ sắt, thường xuất hiện vào tháng 6 và rộ vào tháng 9. Bệnh thối cổ rễ xuất hiện vào các tháng trong năm nhưng không nghiêm trọng. Cây đang tươi tốt bỗng héo rũ, đào lên thấy phần củ, rễ nhũn dần. Bệnh vàng lá, quăn lá thường xuất hiện ở những luống nhận nhiều ánh sáng mặt trời. Những cây mọc ở nơi này thường không cao khỏe bằng những nơi có ánh sáng yếu nhưng cho quả to và hạt chắc [26].



Hình 1.3. Khu vực phân bố và sự sinh trưởng và phát triển của cây sâm Ngọc Linh. **a:** làng của người Xê Đăng dưới chân núi; **b:** hệ sinh thái rừng trên đỉnh Ngọc Linh; **c:** hệ sinh thái dưới tán rừng; **d:** khu vực trồng sâm dưới tán rừng; **e:** cây sâm Ngọc Linh mới trồng 2 tháng tuổi; **f:** cây sâm 1 năm tuổi; **g:** cây sâm 3 năm tuổi; **h:** cây sâm 7 năm tuổi; **i:** cây sâm trưởng thành đã cho quả; **j:** củ sâm thu hoạch.

1.2.9. Tình hình nghiên cứu về sâm Ngọc Linh

Trên thế giới, hầu hết các nghiên cứu được tiến hành trên các đối tượng thuộc chi *Panax* chủ yếu tập trung vào cây Nhân sâm (*Panax ginseng*). Phôi vô tính nhân sâm đã được cảm ứng thành công trên môi trường trực tiếp từ rễ [48], lá [119], lá mầm [50], phôi hợp tử [51] hoặc gián tiếp qua trung gian mô sẹo được cảm ứng từ

nuôi cấy chồi hoa [112]. Nghiên cứu phát sinh phôi vô tính nhân sâm trong môi trường lỏng cũng được thực hiện bởi Claire và cộng sự năm (2000) [53]. Gorpenchenko và cộng sự (2006) đã nghiên cứu chuyển gen rolC nhờ vi khuẩn *Agrobacterium rhizogenes* để thu nhận những dòng mô sẹo có khả năng phát sinh phôi vô tính [68]. Nhiều phương pháp khác nhau nhằm nâng cao tỷ lệ xuất hiện phôi vô tính nhân sâm cũng đã được nghiên cứu như nuôi cấy trong môi trường lỏng [53], sử dụng các polyamine [53], xử lý thẩm thấu [52].

Một nghiên cứu gần đây về sự phát sinh phôi từ rễ của *Panax assamicus*. Ban. khoảng 4 năm tuổi. Đầu tiên là nhân nhanh mô sẹo trên môi trường MS có bổ sung 5 mg/l 2,4-D. Mô sẹo 8 tuần tuổi được cấy chuyển sang môi trường MS có bổ sung 5 mg/l 2,4-D kết hợp với 0,5 mg/L BAP để tạo mô sẹo có khả năng phát sinh phôi. Sau 3 tháng nuôi cấy trên cùng một môi trường thì hình thành phôi. Sự nảy mầm của phôi đạt cao nhất khi nuôi cấy trong môi trường $\frac{1}{2}$ MS có bổ sung 1,5 mg/l acid gibberellic. Cây con từ phôi sau 4 - 5 tháng được đưa ra vườn ươm trồng với tỷ lệ sống sót 70% [79].

Ở Việt Nam trong hơn 20 năm qua, cây sâm Việt Nam đã được nghiên cứu toàn diện trên nhiều lĩnh vực như: thực vật học, hóa học, dược lý, trồng trọt, nuôi cấy mô, chế phẩm và thử nghiệm lâm sàng, qua các hợp tác với viện, trường ở trong và ngoài nước. Đặc biệt, những công trình nghiên cứu và công bố trong những năm gần đây đã làm sáng tỏ thêm về thành phần hoạt chất chính của chúng.

Trong thời điểm này, có rất nhiều nhóm nghiên cứu về cây sâm Ngọc Linh như Viện Dược liệu, Bộ Y tế, Trung tâm Công nghệ Sinh học TP. Hồ Chí Minh, Trung tâm Sâm và Dược liệu TP. Hồ Chí Minh, Viện Sinh học Nhiệt đới, Sở Khoa học và Công nghệ tỉnh Kon Tum, Sở Khoa học và Công nghệ tỉnh Quảng Nam,... Tuy nhiên, hai nhóm chủ lực nghiên cứu về nuôi cấy mô tế bào sâm Ngọc Linh hiện nay là Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên và Học viện Quân y. Trong đó, Học viện Quân y với ưu thế về trang thiết bị đã phát triển mạnh kỹ thuật tạo sinh khối tế bào sâm Ngọc Linh. Tại Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên đã triển khai đồng thời nhiều hướng nghiên cứu khác nhau như tạo sinh khối rễ, tăng khả năng tích lũy hoạt chất và phát triển thành cây con sâm Ngọc Linh hoàn chỉnh. Qua thời gian nghiên cứu của các nhà khoa học đã đạt được những kết quả nhất định.

1.2.9.1. Nhân giống truyền thống cây sâm Ngọc Linh

a. Kỹ thuật trồng đầu mầm từ cây trưởng thành

Điều kiện tiến hành là ở các vườn trồng tự nhiên ở độ cao 1.800 - 2.000 m dưới tán rừng và một vườn ngoài tán rừng ở độ cao 1.100 m với giàn che nhân tạo. Nguồn phân bón chủ yếu là phân hữu cơ tại chỗ do lớp lá hoai mục tạo thành. Trồng đầu mầm là một kỹ thuật nhân giống vô tính. Sau khi thu hoạch, người ta cắt để lại phần thân rễ sát với thân khí sinh (đầu mầm) và đem trồng lại bằng cách giâm vào đất. Cây trồng bằng đầu mầm ra hoa sau chỉ 1 - 2 năm. Mầm đem trồng càng lớn, chồi càng lớn thì cây phát triển tốt [26].

b. Kỹ thuật xử lý và gieo hạt

Đây là kỹ thuật nhân giống hữu tính. Hạt tươi sau khi loại hạt lép, rửa với nước được đem gieo trồng theo các cách khác nhau để tìm ra điều kiện tối ưu cho sự gieo trồng. Các yếu tố được khảo sát là cách xử lý hạt (bóc vỏ hoặc xử lý hóa chất); độ sâu gieo hạt và vật liệu gieo trồng (gieo trực tiếp hay trong bầu polyethylen - PE). Kết quả các thử nghiệm cho thấy, hạt mới thu, bóc vỏ và gieo ngay ở độ sâu 2 cm cho kết quả nảy mầm cao với tỷ lệ sống sót là 81,33%. Đối với vườn ở độ cao 1800 m từ tháng 1 - 4 có tỷ lệ nảy mầm là 67,21% và cao nhất vào tháng 2. Vườn ở độ cao 1100 m từ tháng 2 - 5 có tỷ lệ nảy mầm là 65,95% và cao nhất vào tháng 3. Ngoài ra, khi xử lý hạt bằng acid nicotinic cho kết quả nảy mầm cao nhất (85,33%). Hạt khi gieo trong bầu polyethylen tỷ lệ cao hơn so với gieo trực tiếp trên luống nhưng không cao hơn nhiều (86,5% so với 82,22%). Do đó, nếu sử dụng bầu polyethylen sẽ tốn kém và ít kinh tế hơn gieo trực tiếp trên luống [7].

Năm 2008, Viện Dược liệu cũng đã hoàn thiện công nghệ sản xuất giống, kỹ thuật trồng dưới tán rừng và quy hoạch phát triển sâm Ngọc Linh tại Kon Tum. Bước đầu xác định giải pháp nhân giống từ hạt trong khay nhựa và trồng sâm Ngọc Linh dưới giàn mái che.

c. Các hạn chế trong nhân giống truyền thống

Hiện nay, tình hình sâm Ngọc Linh tự nhiên bị khai thác bừa bãi và trữ lượng giảm đáng kể so với trước đây. Biện pháp nuôi trồng tại chỗ giúp chủ động nguồn cung cấp sâm và kỹ thuật trồng khá đơn giản, chất lượng ổn định, nên có thể tạo điều kiện cho bà con miền núi xóa đói giảm nghèo. Tuy nhiên, phương pháp này còn có nhiều hạn chế như việc bón các loại phân hữu cơ, NPK và thuốc bảo vệ thực vật chưa thực hiện được do đặc điểm địa hình trở ngại cho việc vận chuyển, cũng như khó khăn

về kinh phí. Do vậy, sâm trồng ngoài tự nhiên dễ bị bệnh rỉ sắt, bệnh thối cổ rễ (rễ nhũn dần), bệnh vàng lá... Số lượng hạt mỗi năm thu được sẽ tăng lên nhưng trên thực tế số lượng này không tăng do nhiều nguyên nhân như hạn chế trong kỹ thuật chăm sóc của công nhân; sự phá hoại của các loại chim, chuột, sóc... ảnh hưởng của thời tiết và các điều kiện bất lợi khác.

Một nhược điểm nữa là cần diện tích canh tác lớn, thời gian trồng kéo dài (khoảng 5 - 6 năm mới thu hoạch được). Hơn nữa, loài sâm này chỉ tăng trưởng trong những điều kiện nhất định, nên những khu vực có thể trồng trọt là rất hạn chế. Mặt khác, lượng sâm thu được cũng không nhiều do củ sâm từ 5 - 6 năm tuổi có khối lượng tươi thấp nhất khoảng 5 - 7 g, lớn nhất chỉ khoảng 50 - 70 g. Củ sâm 6 tuổi mọc nơi đất tốt có trọng lượng 22 - 28 củ/kg. Hiện nay, giá sâm Ngọc Linh tăng lên rất cao, đạt 20 - 30 triệu đồng/kg sâm tươi và 60 - 80 triệu đồng/kg sâm khô nên việc thoát nguồn sâm do khai thác bừa bãi và trộm cắp là một điều rất đáng lo ngại [26].

Từ những khó khăn và thách thức trên, việc ứng dụng kỹ thuật nuôi cấy mô để nhân giống cây sâm Ngọc Linh nhằm tạo ra một nguồn giống lớn cung cấp cho các khu vực trồng sâm Ngọc Linh là một hướng đi phù hợp để giải quyết những hạn chế còn tồn tại của phương pháp nhân giống truyền thống. Mặt khác, bằng phương pháp nuôi cấy mô có thể tạo ra một nguồn giống lớn, cung cấp cho người dân, từ đó, có thể xã hội hóa việc trồng trọt cây sâm Ngọc Linh, mang lại lợi ích kinh tế cho các đồng bào dân tộc và phát triển thương hiệu sâm Việt Nam trên thế giới.

1.2.9.2. Nghiên cứu nhân giống vô tính

Nguyễn Ngọc Dung là một trong những tác giả đầu tiên nghiên cứu nhân giống vô tính sâm Ngọc Linh thông qua tái sinh mô sẹo [8].

Năm 2010, Bộ Y tế đã tiến hành điều tra và lựa chọn vùng di thực trồng sâm Ngọc Linh ở Trà Cang, Trà Nam, Tây Giang và Phước Sơn với độ cao 1.400 - 1.500 m tại Quảng Nam.

Năm 2010, Dương Tấn Nhựt và cộng sự đã nhân giống *in vitro* và trồng thử nghiệm ở vườn ươm. Trong giai đoạn tăng trưởng chồi, môi trường $\frac{1}{2}$ MS được bổ sung 1,0 mg/l BA và 0,5 mg/l NAA, 50 g/l sucrose, 2,0 g/l than hoạt tính và được đặt trong điều kiện ánh sáng đèn LED 70% đỏ và 30% xanh là tốt nhất. Sau 6 tháng trồng 1000 cây sâm *in vitro* ngoài khu vực vườn ươm cho thấy, tốc độ sinh trưởng là nhanh hơn so với cây sâm Ngọc Linh gieo bằng hạt với tỷ lệ sống sót là 87% [22].

Nguyễn Bảo Triệu và cộng sự (2013) cũng đã tiến hành nghiên cứu nuôi cấy *in vitro* sâm Ngọc Linh trên môi trường MS bổ sung 1,0 mg/l 2,4-D, 0,2 mg/l TDZ và trên môi trường SH bổ sung 1,0 mg/l BA, 0,5 mg/l NAA [31].

1.2.9.3. Nghiên cứu về hạt nhân tạo

Hương và Nhựt đã nghiên cứu về khả năng nảy mầm của hạt nhân tạo có nguồn gốc từ phôi vô tính sâm Ngọc Linh. Sau 3 tháng nuôi cấy, hạt nhân tạo với nồng độ 30 g/l sodium alginate trong vỏ hạt cho tỷ lệ nảy mầm (70,36%) cũng như sự sinh trưởng sau nảy mầm là cao nhất (chiều cao chồi đạt 7 mm, chiều dài rễ đạt 11,18 mm). Thời gian giữ hạt trong dung dịch $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 100 mM tối ưu nhất là khoảng 22 phút. Sau 2 tháng nuôi cấy, hạt nhân tạo có bổ sung 1,0 mg/l GA_3 trực tiếp vào vỏ bọc cho tỷ lệ nảy mầm, tỷ lệ hình thành chồi và tỷ lệ hình thành rễ cao hơn so với các chỉ tiêu không bổ sung GA_3 [10].

1.2.9.4. Nghiên cứu về sự phát sinh phôi

Năm 2012, Nhựt và cộng sự đã nghiên cứu ảnh hưởng của spermidine ngoại sinh và proline về sự phát sinh phôi thông qua mô sẹo. Kết quả cho thấy, spermidine ở nồng độ (0,1 mM) và proline (300 mg/l) sự hình thành phôi cao nhất (tương ứng 93,3% và 86,7%). Để tối ưu hóa hơn nữa môi trường nuôi cấy để cảm ứng sự hình thành phôi của sâm Ngọc Linh, ba nguồn carbohydrate (sucrose, glucose và fructose) ở nồng độ 10 - 60 g/l đã được thử nghiệm. Trong số đó, glucose và fructose không phù hợp để tạo phôi soma còn sucrose với nồng độ 50 g/l thì tần số phát sinh phôi cao nhất (86,7%), số lượng phôi/mẫu (167) [101].

Năm 2013, 2014, Mai Trường và cộng sự nghiên cứu khả năng phát sinh phôi từ mô sẹo lá trong môi trường lỏng và trong môi trường không có chất điều hòa sinh trưởng ở quy mô bình tam giác và bioreactor. Mô sẹo có khả năng sinh phôi có sinh khối tăng nhanh khi nuôi cấy trong môi trường lỏng MS + 0,5 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l NAA. Mô phôi có khả năng tăng sinh nhanh trong môi trường lỏng $\text{MS}^{1/2}$ + 0,2 mg/l NAA + 0,2 mg/l BA. Sau nhiều tháng nuôi, rất nhiều phôi soma dạng cầu hình thành và có khả năng nhân ổn định [32, 33].

Năm 2014, Bùi Văn Thế Vinh và cộng sự đã thiết lập hệ thống nuôi cấy *in vitro* để cảm ứng phát sinh phôi vô tính từ mô sẹo. Kết quả thu được sau 8 tuần nuôi cấy tần suất phát sinh phôi cao nhất trên môi trường MS có bổ sung 1 mg/l 2,4-D, 0,2 mg/l kinetin và 0,5 mg/l NAA [36].

1.2.9.5. Nghiên cứu sự hình thành rễ thứ cấp và rễ bất định

Nhóm các nhà nghiên cứu khoa học thuộc Học viện Quân y đã tiến hành nghiên cứu việc nuôi cấy tạo sinh khối tế bào rễ sâm Ngọc Linh trong môi trường MS và môi trường Gamborg được bổ sung chất điều hòa sinh trưởng kinetin, nước dừa và dịch chiết Hoài sơn (*Dioscorea persimilis*) làm cho tế bào phát triển tốt dẫn đến hiệu suất thu hồi sinh khối tế bào rễ sâm Ngọc Linh cao hơn.

Năm 2009, Dương Tấn Nhựt và cộng sự đã thành công trong tạo rễ bất định và rễ thứ cấp từ mô sẹo. Môi trường SH có bổ sung 3,0 mg/l NAA và 0,2 mg/l TDZ cho kết quả phát sinh rễ bất định tốt nhất trong điều kiện tối hoàn toàn và tỷ lệ rễ thứ cấp tạo thành cũng như số rễ thứ cấp trung bình trên một mẫu là cao nhất là (89%) nuôi cấy trên môi trường SH có bổ sung 3,0 mg/l NAA [20].

Nghiên cứu khả năng tạo rễ bất định từ mẫu cây củ tươi trên môi trường MS có bổ sung 50 g/l sucrose, 8 g/l agar, 1 mg/l 2,4-D đã cho kết quả hình thành mô sẹo và rễ bất định tốt nhất sau 2 tháng nuôi cấy [13].

Năm 2012, Dương Tấn Nhựt và cộng sự đã nghiên cứu sự hình thành rễ bất định và rễ thứ cấp trên các hệ thống khác nhau [bình tam giác (3 lít), bioreactor Hàn Quốc (3 lít) và bioreactor BioPia (2 lít)]. Hệ thống nuôi cấy bioreactor Hàn Quốc với thể tích môi trường (2 lít) và khối lượng mẫu ban đầu 11,01 g cho kết quả sinh khối rễ tăng cao nhất (103,59 g) và nghiên cứu ảnh hưởng của một số yếu tố đến sự hình thành rễ bất định có nguồn gốc từ lá *in vitro* và mô sẹo của sâm Ngọc Linh [25].

Trong một nghiên cứu khác, Hương và cộng sự (2012) đã khảo sát ảnh hưởng của nguồn mẫu, kích thước mẫu và một số loại auxin lên khả năng tái sinh rễ bất định của sâm Ngọc Linh. Kết quả thu được cho thấy, mẫu lá có kích thước 1,5 x 1,5 cm là thích hợp nhất cho sự tái sinh rễ bất định trực tiếp (sau 8 tuần nuôi cấy tỷ lệ phát sinh rễ là 100%, số rễ/mẫu là 52,2 và chiều dài rễ là 2,5 cm) và IBA ở nồng độ 5 mg/l là thích hợp nhất cho sự tái sinh rễ bất định sâm Ngọc Linh [11].

Các nhóm nghiên cứu tại Trung tâm Công nghệ Sinh học TP. Hồ Chí Minh và Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên đã báo cáo về những kết quả liên quan đến việc tạo rễ tóc sâm Ngọc Linh bằng phương pháp chuyển gen *rol* nhờ vi khuẩn *Agrobacterium rhizogenes* [9, 15, 18].

Trong nghiên cứu này, rễ bất định sâm Ngọc Linh và rễ tơ chuyển gen được sử dụng để đánh giá khả năng sinh trưởng và tích lũy saponin. Kết quả cho thấy, trong thời gian 2 tháng đầu tốc độ tăng sinh của rễ tơ sâm Ngọc Linh thấp hơn so

với rễ bất định. Nhưng ở các khoảng thời gian nuôi cấy tiếp theo, tốc độ tăng sinh của rễ tơ lại cao hơn rễ bất định. Sau 5 tháng nuôi cấy, tỷ lệ tăng sinh của rễ tơ là 20,87 lần và rễ tơ vẫn còn tiếp tục sinh trưởng; trong khi tỷ lệ tăng sinh của rễ bất định là 13,52 lần và hầu như đã ngừng tăng sinh từ sau tháng thứ 3 và hàm lượng saponin tổng thu được trên toàn bộ chất khô (thu được từ nuôi cấy 10 mg khối lượng tươi sau 5 tháng) của rễ tơ (0,1010 mg) cao hơn rễ bất định (0,0681 mg). [12].

Một nghiên cứu mới nhất năm 2017 về các nano kim loại được thêm vào môi trường MS không có hormone sinh trưởng để đánh giá tác động của chúng lên sự phát triển của rễ bên sâm Ngọc Linh gồm nZnO (0.5-2.5 mg/l), nAg (1 - 3 mg/l) và nCu (1 - 3 mg/l). Kết quả cho thấy, trong các loại nano thì nano Cu ở nồng độ 1,5 mg/l là tối ưu nhất cho sự hình thành rễ bên sâm Ngọc Linh (với 99,3%). Ngoài ra, 2,5 mg/l nAg cũng giúp tăng đáng kể sự phát triển rễ bên sâm Ngọc Linh. Khi bổ sung các nano kim loại ở nồng độ cao trên 2.5 mg/l gây ức chế sự hình thành rễ. Đặc biệt, khi bổ sung nZnO (0,5-2,5 mg/l) đã làm giảm đáng kể số rễ và trên 2 mg/l nZnO giảm cả phần trăm ra rễ [14].

1.2.9.6. Nghiên cứu sự ảnh hưởng của ánh sáng

Năm 2012, Hoàng Văn Cương và cộng sự đã tìm hiểu ảnh hưởng của ánh sáng đơn sắc lên sự sinh trưởng và khả năng tích lũy hoạt chất saponin thông qua nuôi cấy mô sẹo cây sâm Ngọc Linh *in vitro*. Kết quả thu được cho thấy ánh sáng xanh kết hợp ánh sáng đỏ với tỷ lệ 50 : 50, khối lượng tươi và khối lượng khô của mô sẹo từ mẫu lá là lớn nhất (tương ứng 0,748 g và 0,064 g), đây là nguồn sáng thích hợp nhất cho sự sinh trưởng và phát triển của cây sâm Ngọc Linh nuôi cấy *in vitro* [4].

Năm 2013, Ngô Thanh Tài và cộng sự đã nghiên cứu tác động của ánh sáng đèn LED lên khả năng tăng sinh mô sẹo và sự hình thành cây con từ phôi vô tính cây sâm Ngọc Linh. Kết quả cho thấy, mô sẹo đã tăng khối lượng đến 1197 mg dưới điều kiện 100% LED vàng lớn hơn so với nghiệm thức đối chứng sử dụng đèn neon (0,763 g). Nhưng kết hợp (60% LED đỏ + 40% LED xanh dương) thích hợp ở giai đoạn hình thành cây con từ phôi (11,21 cây/mẫu) [28].

1.2.9.7. Nghiên cứu về nhân sinh khối

Năm 2007, 2008, Thanh và cộng sự nuôi cấy tế bào của sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) để sản xuất sinh khối và sản phẩm trao đổi chất

thứ cấp ginsenoside. Ở nồng độ môi trường MS với tỷ lệ 50% hoặc 100% và 30 g/l đường là thích hợp cho sự tích lũy sinh khối tế bào và sự tổng hợp sản phẩm thứ cấp ginsenoside. Nồng độ 30 mM nitrogen là tối ưu cho sự sinh trưởng tế bào và sự tích lũy sản phẩm trao đổi chất thứ cấp ginsenoside. Trong nghiên cứu ảnh hưởng của các nguyên tố đa lượng trong môi trường nuôi cấy thì khi bổ sung NH_4NO_3 với nồng độ 0,5 g/l thu được (6,54 mg/g khối lượng khô) ginsenoside. Sinh khối tế bào và thành phần ginsenoside tăng đáng kể khi bổ sung 1,5 g/l CaCl_2 vào môi trường, với sự tích lũy sản phẩm ginsenoside thu được (5,75 mg/g khối lượng khô) [117, 118].

Năm 2012, Cương và cộng sự đã nghiên cứu ảnh hưởng của 2,4-D, NAA, thành phần khoáng, giá thể, nguồn mẫu, điều kiện nuôi cấy lên sự cảm ứng, tăng sinh mô sẹo “xốp” và bước đầu nuôi cấy huyền phù tế bào cây sâm Ngọc Linh. Kết quả cho thấy, mẫu cây cảm ứng và tăng sinh tạo thành mô sẹo “xốp” với tỷ lệ tạo mô sẹo cao nhất ở nồng độ kết hợp giữa 1,0 mg/l 2,4-D và 1,0 mg/l NAA và cao gấp 1,6 lần so với khi chỉ bổ sung riêng lẻ 2,4-D. Để tạo huyền phù tế bào bằng cách cấy chuyển sang môi trường MS lỏng có bổ sung 1,0 mg/l 2,4-D, 1,0 mg/l NAA, 30 g/l sucrose và được lắc ở tốc độ 100 vòng/phút. Huyền phù tế bào tăng sinh nhanh và thu được sinh khối lớn nhất vào ngày thứ 14 (23,67 mg/ml) [5].

Nghiên cứu ảnh hưởng của 2,4-D, NAA, IBA, BA, KIN, môi trường khoáng và điều kiện chiếu sáng, pH, nồng độ sucrose, thể tích môi trường lên sự tăng sinh huyền phù tế bào sâm Ngọc Linh đã được tiến hành khảo sát. Kết quả cho thấy, tế bào sâm Ngọc Linh tăng trưởng tốt trong môi trường khoáng $\frac{1}{2}\text{MS}$ lỏng có bổ sung 1,5 mg/l NAA, 50 g/l sucrose và pH phù hợp nhất cho tế bào tăng trưởng là 6,3. Thể tích môi trường thích hợp nhất khi nuôi cấy 1,0 g mô sẹo “xốp” sâm Ngọc Linh là 30 ml. Thời gian cấy chuyển thích hợp nhất để duy trì huyền phù tế bào sâm Ngọc Linh là vào đầu pha ổn định khoảng ngày nuôi cấy thứ 14 đến ngày thứ 16. Phôi vô tính sâm Ngọc Linh được hình thành sau 30 ngày nuôi cấy khi huyền phù tế bào được cấy chuyển sang môi trường MS có bổ sung 3,0 mg/l NAA cho thấy khả năng tái sinh của huyền phù tế bào sâm Ngọc Linh là rất cao [6].

1.2.9.8. Nghiên cứu tạo củ *in vitro*

Năm 2011, Hoàng Xuân Chiến và cộng sự đã tiến hành nghiên cứu và cho rằng ở nồng độ 3,0 mg/l ABA thích hợp nhất cho quá trình tạo củ. Các chồi sâm Ngọc Linh *in vitro* được cảm ứng để tạo củ thành công trên môi trường SH có bổ sung 1,0 mg/l NAA và 2,0 mg/l BA trong điều kiện chiếu sáng 16 h/ngày. Nồng độ sucrose tốt

nhất cho quá trình tạo củ sâm là 50 g/l. Hàm lượng saponin trong củ của cây 17 tháng tuổi nuôi trồng ngoài tự nhiên cũng đã được xác định là G-Rb₁ (0,21%), G-Rg₁ (0,17%), MR₂ (0,77%) [3].

1.2.9.9. Nghiên cứu về định tính và định lượng saponin

Năm 2010, Nhựt và cộng sự đã xác định hàm lượng saponin và dư lượng các chất điều hòa sinh trưởng thực vật được xác định thông qua các nguồn mẫu mô sẹo, rễ, chồi nuôi cấy *in vitro*. Kết quả thực nghiệm cho thấy ở mô sẹo, hàm lượng saponin MR₂, G-Rb₁ và G-Rg₁ thấp nhất, kể đến là mô sẹo biệt hóa rễ. Mô sẹo biệt hóa chồi có hàm lượng 3 chất trên là cao nhất và đã xác định dư lượng NAA và BA trong sinh khối Sâm Ngọc Linh nuôi cấy *in vitro*. Kết quả không thấy xuất hiện vạch của NAA cũng như BA trong các mẫu phân tích [21].

Năm 2011, Vinh và Luận đã tiến hành xây dựng và hoàn thiện các phương pháp định lượng saponin bằng kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) dùng trong kiểm định chất lượng của nguyên liệu và chế phẩm sâm Ngọc Linh [35].

Năm 2012, Nhựt và cộng sự đã đánh giá ảnh hưởng của methyl jasmonate lên khả năng tích lũy saponin trong mô sẹo sâm Ngọc Linh nuôi cấy *in vitro*. Qua kết quả định tính cho thấy, các mô sẹo được nuôi cấy trên môi trường bổ sung methyl jasmonate đều có sự hiện diện của MR₂, Rb₁ và Rg₁ với hàm lượng khác nhau. Sau 2 tuần nuôi cấy, mô sẹo trên môi trường bổ sung 15 mg/l MeJA hàm lượng MR₂ và Rb₁ đã gia tăng một cách đáng kể (lần lượt là 1,0995% và 0,1459%) [24].

Khi nghiên cứu ba loại auxin là IBA, NAA và IAA được sử dụng nhằm đánh giá ảnh hưởng của chúng đến khả năng hình thành và tích lũy saponin của rễ bất định sâm Ngọc Linh nuôi cấy *in vitro*. Kết quả định tính cho thấy, rễ bất định hình thành từ ba loại auxin đều có sự hiện diện của MR₂, Rb₁ và Rg₁ với hàm lượng khác nhau. Tuy nhiên, hàm lượng MR₂, một hợp chất saponin chính yếu quyết định tính đặc trưng của sâm Ngọc Linh đạt cao nhất ở môi trường bổ sung 5 mg/l IBA (0,2655%). Kết quả cho thấy, rễ bất định hình thành từ các loại auxin khác nhau thì hàm lượng saponin của chúng cũng khác nhau [29].

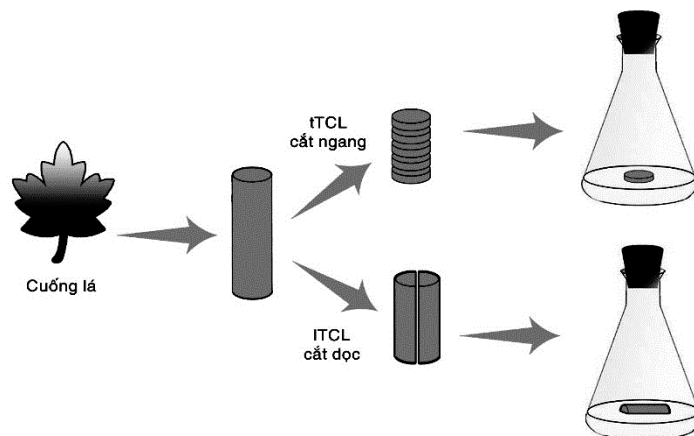
1.3. Kỹ thuật nuôi cấy lớp mỏng tế bào

1.3.1. Khái niệm lớp mỏng tế bào

Khi nghiên cứu về hệ thống ức chế, Trần Thanh Vân nghĩ đến khái niệm về hệ thống lớp mỏng tế bào (Thin Cell Layer - TCL) [120]. Với hệ thống này, GS.

Trần Thanh Vân cố gắng phân tách một hoặc một vài lớp trong những tế bào đã biệt hóa từ một hệ thống cơ quan, mô, hoặc tế bào; và cố gắng chương trình hóa lại chúng trong nuôi cấy *in vitro*, trong đó “biệt hóa” là một tiêu chí quan trọng. Điều này cho phép các nhà nghiên cứu lần theo dấu vết trở lại những sự kiện tại mỗi thời điểm bắt đầu. Không phải như trường hợp chuyển nhân của một tế bào soma vào một tế bào trứng không nhân như trong sinh sản vô tính của cừu Dolly, những tế bào trong hệ thống TCL vẫn giữ nguyên trạng thái có nhân của nó trong tế bào chất và vẫn được chương trình hóa lại một cách đồng loạt để biểu hiện tất cả các trường hợp có thể có của quá trình biệt hóa, mà không chỉ có phôi mới làm được điều đó. Tất cả các quá trình biệt hóa đó được kiểm soát một cách riêng biệt hoặc tái chương trình hóa theo trình tự thời gian hoặc không gian tùy theo người nghiên cứu và không bị áp đặt bởi quá trình phát triển cá thể.

Một đặc tính phổ biến của ITCL và tTCL là tính mỏng, có nghĩa là mảnh cấy có số lượng tế bào càng ít càng tốt. Đặc tính “mỏng” đóng vai trò cực kỳ quan trọng bởi những phân tử marker dự tuyển cho sự biệt hóa có thể được xác định *in situ* trong những tế bào đích (hay tế bào đáp ứng). Sự xác định vị trí như vậy cho phép giới hạn những tế bào đáp ứng [23].



Hình 1.4. Phương pháp cắt lớp mỏng tế bào từ cuống lá [23].

1.3.2. Định nghĩa hệ thống lớp mỏng tế bào

Hệ thống TCL chứa những mẫu cây có kích thước nhỏ được cắt ra từ các cơ quan thực vật khác nhau như chồi lá, rễ, cụm hoa, đế hoa hoặc các cơ quan của hoa, lá mầm, trụ trên hay trụ dưới lá mầm, cùng chồi đỉnh hoặc phôi.

Khi được thu nhận theo chiều dọc, mẫu được gọi là ITCL hoặc khi được thu nhận theo chiều ngang, mẫu được gọi là tTCL.

Vẫn chưa có các định nghĩa chặt chẽ về vấn đề này, nhưng nguyên tắc cơ bản sử dụng về kích cỡ thoáng hơn: các mẫu ITCL (kích thước 1 mm x 10 mm) chỉ bao gồm một loại tế bào, ví dụ một lớp tế bào biểu mô có thể tách ra từ một số cơ quan hoặc vài lớp (3 - 6) từ các tế bào vô; trong khi các mẫu tTCL (0,2 - 0,5 mm hay dày vài mm) bao gồm một số lượng nhỏ các tế bào thuộc các dạng mô khác nhau như: biểu bì, vùng tương tầng, bó gỗ, bó mạch và các tế bào nhu mô [121]. Ngoài ra, còn có hệ thống TCL chỉ dày vài micrometer (μ TCL) phải sử dụng máy vi phẫu để cắt [86], nhưng ở kích cỡ này mẫu dễ bị chết hoặc bị nhiễm khuẩn.

1.3.3. Những đặc điểm của hệ thống lớp mỏng tế bào

Có hai vấn đề cần được giải quyết trong nuôi cấy mô thực vật. Đó là việc xác định vị trí của các tế bào đích và quan sát sự thay đổi của mảnh (mẫu) cấy. Đặc tính “mỏng” giúp chúng ta giải quyết hai vấn đề đó.

- Bằng cách sử dụng các marker của quá trình biệt hóa, có thể xác định vị trí của các tế bào đích (tế bào đáp ứng).

- Có thể quan sát sự thay đổi của mảnh cấy mà không cần phải phá vỡ mảnh cấy bằng cách sử dụng kính hiển vi. Quá trình sinh tổng hợp, chuyển hóa, vận chuyển, điều hòa và vị trí của auxin, ABA, ethylene, cytokinin rất phức tạp, nên những tế bào đáp ứng của hệ thống TCL có thể được sử dụng làm các marker để nghiên cứu các quá trình này.

- Trong hệ thống TCL, các yếu tố nội sinh thường không lớn và quá trình vận chuyển ít phức tạp hơn so với khi sử dụng các mẫu cấy lớn.

- Tế bào đích/tế bào đáp ứng thường tiếp xúc với các tế bào bị thương do cắt ra khỏi cơ quan thông qua những mảnh thành tế bào hoặc oligosaccharide, một dạng của oligogalacturonide.

1.3.4. Ưu điểm của hệ thống lớp mỏng tế bào

Mẫu cấy tiếp xúc trực tiếp với môi trường và diện tích tiếp xúc của mẫu với môi trường lớn nên mẫu dễ dàng hấp thu các chất dinh dưỡng từ môi trường.

Để định vị cho vùng phản ứng do chỉ có 1 loại lớp mỏng tế bào.

Lượng hormone nội sinh trong mẫu thấp vì thế các chất điều hòa sinh trưởng thực vật dễ tác động lên mẫu.

Hệ thống TCL có sự hình thành nhiều loại cấu trúc, có những cấu trúc mới.

Mẫu nuôi cấy đồng nhất và nhanh chóng đáp ứng các phản ứng. Từ đó, rút ngắn thời gian nghiên cứu và chương trình biệt hóa riêng biệt tùy vào mục tiêu và mục đích nghiên cứu.

Phôi và các cơ quan sơ khởi được hình thành ở tần số cao (là do số lượng tế bào được cảm ứng phát sinh hình thái cao).

Nâng cao năng suất chuyển gen thực vật, tiềm năng tái sinh cao và mở rộng ra cho các loài khó tái sinh góp phần cải thiện giống thực vật.

Tạo ra thực vật hoàn chỉnh, ít bị biến đổi.

Không xảy ra sự tương tác giữa các cơ quan và giữa cơ quan với toàn bộ cơ thể thực vật.

1.3.5. Một số thành tựu đạt được trong ứng dụng phương pháp nuôi cấy lớp mỏng tế bào trên đối tượng *Panax*

1.3.5.1. Ứng dụng hệ thống TCL trên đối tượng *Panax ginseng*

Năm 1996, Ahn và cộng sự nghiên cứu về sự phát sinh phôi vô tính trực tiếp thông qua kỹ thuật TCL, sử dụng tTCL từ lá mầm, lá, cuống lá, củ của *Panax ginseng*. Nghiên cứu này nhận thấy có sự phát sinh phôi vô tính trực tiếp từ tTCL của lá mầm sau 9 tuần nuôi cấy và từ tTCL của lá và cuống lá sau 13 tuần nuôi cấy. Khi dùng tTCL từ lá mầm tiến hành những thí nghiệm nhằm nâng cao tỷ lệ phát sinh phôi vô tính thì cũng nhận thấy trên những tTCL lá mầm của cây con từ hạt được xử lý với 2,4-D (5 μ M) kết hợp với BA và Zeatin (BZ) 0,1 μ M, phôi vô tính được quan sát thấy sau 6 tuần nuôi cấy và tỷ lệ phôi vô tính là cao nhất (62%) so với sử dụng 2,4-D riêng lẻ (40%). Khi kết hợp 2,4-D (5 μ M) và BZ (0,1 μ M) sử dụng để xử lý hạt và nuôi cấy tTCL từ lá mầm, quan sát được cả rễ và phôi chỉ sau 3 tuần sau. Dường như nồng độ BZ tăng lên thì tỷ lệ phát sinh phôi vô tính giảm xuống nhưng tỷ lệ phát sinh cơ quan lại tăng lên. Kết quả tương tự cũng được quan sát thấy khi dùng 2,4-D (5 μ M) và TDZ (0,01 μ M). Các phôi vô tính được cấy chuyển trên môi trường chứa cả NAA (0,3 μ M) và BZ (1 μ M), thì giai đoạn phôi hình tim và hình cầu sau 4 tuần nuôi cấy phát triển thành giai đoạn phôi lá mầm giữ nguyên trạng thái ngủ [39].

Năm 2016, Kharwanlang và cộng sự đã nghiên cứu sự phát sinh phôi từ thân rễ của loài *P. pseudoginseng* thông qua nuôi cấy lớp mỏng tế bào. Các thân rễ được cắt theo chiều ngang có kích thước (0,5; 1,0 và 3,0 mm) sau đó cấy vào môi trường MS và SH có bổ sung 2,4-D ở các nồng độ khác nhau để cảm ứng tạo mô sẹo. Để cảm ứng

tạo phôi soma trên hai loại môi trường (MS và ½ MS). Kết quả thu được mẫu thân rễ cắt theo chiều ngang với kích thước 0,5 mm cho khả năng tạo mô sẹo cao nhất trong môi trường MS (84,32%) còn trong môi trường SH chỉ đạt (48,24%) khi có bổ sung 2,4-D. Sự hình thành phôi đạt cao nhất (56,66%) khi mẫu được nuôi cấy trong môi trường MS có bổ sung 2,5 mg/l BAP và 2,4-D, môi trường ½ MS chỉ đạt (40%), tuy nhiên số phôi nhiều nhất (20,60) lại thu được trong môi trường ½ MS khi bổ sung 2,5 mg/l KIN và 2,4-D. Tỷ lệ phôi phát triển thành cây ($28,33 \pm 0,30$) trên môi trường ½ MS với 1,0 mg/l GA₃ Các cây con được đưa ra vườn ươm trồng trong giá thể đất đen, mùn và rơm với tỷ lệ 2:1:1 với tỷ lệ sống sót 70% [78].

1.3.5.2. Ứng dụng hệ thống TCL trên đối tượng sâm Ngọc Linh

Năm 2012, Nhut và cộng sự đã công bố các dạng phát sinh hình thái khác nhau (phôi vô tính, mô sẹo, chồi và rễ) có thể cảm ứng từ các mẫu cây rễ chính của sâm Ngọc Linh thông qua phương pháp nuôi cấy lớp mỏng tế bào. Môi trường thích hợp nhất để cảm ứng sự hình thành phôi vô tính là môi trường MS có bổ sung 0,05 mg/l TDZ. Môi trường MS bổ sung 1,0 mg/l BA và 0,1 mg/l 2,4-D cảm ứng sự tái sinh chồi dưới điều kiện chiếu sáng 16 giờ/ngày trong khi môi trường MS có bổ sung 2,0 mg/l NAA cảm ứng tạo rễ tốt nhất trong điều kiện tối hoàn toàn [100].

1.4. Các yếu tố ảnh hưởng đến khả năng phát sinh hình thái

Vật liệu nuôi cấy là một trong những yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến sự sinh trưởng và phát triển *in vitro*. Những ảnh hưởng có thể được tóm tắt như sau:

1.4.1. Loại mẫu cấy

Chọn đúng mẫu cấy là công đoạn rất quan trọng khi nhân giống dựa trên nền tảng tái sinh cơ quan (trực tiếp hay gián tiếp). Trong vài trường hợp, để sử dụng tái sinh đạt được hiệu quả cao, phải tiến hành chọn loại mẫu cấy có khả năng tái sinh cao nhất, như ở *Brassica carinata*, 86% mẫu cấy lá mầm tạo chồi, 74% mẫu từ thân mầm tạo chồi, và chỉ có 26% tạo ở rễ [71]. Rõ ràng mẫu cấy lá thích hợp nhất cho sự tái sinh chồi bất định.

1.4.2. Tuổi và tuổi sinh lý của mẫu

Tuổi thực của mẫu nuôi cấy và tuổi theo mùa trong năm của mẫu cấy cho thấy có ảnh hưởng quan trọng đến sự biệt hóa tế bào và tuổi sinh lý. Những mô còn non và mềm thường dễ nuôi cấy hơn những mô cứng nhưng cũng có những trường hợp ngoại lệ. Các mẫu cấy từ cuống lá còn non tái sinh tốt hơn những mẫu cấy từ cuống lá già do cơ quan của chúng già hơn nên khả năng tái sinh và phân chia tế bào giảm. Chúng ta

cần lưu ý rằng, khả năng tái sinh của những loài khác nhau tăng lên trong suốt giai đoạn ra hoa: các bộ phận phát hoa còn non đôi khi tái sinh rất mạnh, ví dụ như *Freesia* [43], *Primula obconica* [54].

1.4.3. Điều kiện phát triển mẫu

Các mẫu cây từ nguồn mẫu trong tự nhiên phản ứng khác với các mẫu cây từ nguồn mẫu nhà kính. Nhìn chung, những nguồn mẫu từ nhà kính (thon dài và vàng hơn) tái sinh dễ hơn vật liệu bên ngoài, ví dụ như cây *Rhododendron* [105]. Điều kiện phát triển của những cây nở hoa vào mùa đông như *Begonia* có ảnh hưởng mạnh đến sự hình thành chồi và rễ bất định trong nuôi cấy *in vitro*.

1.4.4. Vị trí của mẫu cây trên cây

Topophysis là hiện tượng mà vị trí của mẫu cây trên cây có ảnh hưởng đến sự sinh trưởng phát triển *in vitro* sau khi tách mẫu. Ever (1984) đã khảo sát hiện tượng topophysis ở cây *Pseudotsuga menziessi*, ông nhận thấy những chồi ban đầu được tách từ những vị trí thấp trên cây phát triển trong môi trường *in vitro* tốt hơn và chồi gốc tăng trưởng nhanh hơn chồi nách [65]. Sự hình thành chồi bất định của các mẫu cây lan Dạ Hương được tách ra từ phần gốc của giả hành tốt hơn từ phần đỉnh. Điều này cũng xảy ra tương tự đối với lily [107]. Điều đáng lưu ý là những mô sẹo phát sinh từ những mẫu cây có nguồn gốc từ các phần khác nhau của cây như rễ, chồi, cuống lá đều có phản ứng *in vitro* giống nhau.

1.4.5. Kích thước mẫu cây

Kích thước của mẫu cây có ảnh hưởng trực tiếp đến phản ứng của mô với môi trường nuôi cấy. Các kích thước nhỏ khó tái sinh hơn mẫu có kích thước lớn do mẫu lớn có nguồn dinh dưỡng dự trữ dồi dào hơn và kích thích tố để duy trì sự nuôi cấy. Tuy nhiên, kích thước mẫu cây cũng có tương tác với nhiều nhân tố khác như tuổi mẫu cây. Trong quá trình nuôi cấy mô *Cumcumis melo* thì tỷ lệ chồi bất định thu được cao khi nuôi cấy những lá nhỏ (0,3 - 0,5 mm) và non (14 ngày) hơn các lá có cùng kích thước nhưng già (21, 28, 35 ngày), hay từ các lá có kích thước lớn (0,6 - 0,9 mm hay 1,0 - 1,2 mm) ở bất cứ độ tuổi nào [75].

1.4.6. Vết thương

Sự tổn thương trên bề mặt mẫu cây đóng vai trò quan trọng trong sự tái sinh mẫu cây. Bề mặt tổn thương tăng lên làm gia tăng sự hấp thu chất dinh dưỡng và các chất điều hòa sinh trưởng, đồng thời ethylen được tạo ra nhiều hơn. Ngoài ra, có thể tăng cường sự hình thành rễ bằng vết thương. Đối với những mẫu bị cắt, tỷ lệ bề mặt

bị tổn thương cũng ảnh hưởng đến khả năng tái sinh. Ảnh hưởng của vết thương lên sự tái sinh mẫu cây từ giả hành Lily đã được Aartrijk chứng minh vào năm 1994 [38].

1.5. Các chất điều hòa sinh trưởng thực vật (phytohormones)

Các chất điều hòa sinh trưởng thực vật (PGRs) đóng vai trò then chốt trong kiểm soát sự sinh trưởng, biệt hóa, phát triển và sinh sản của thực vật, ảnh hưởng đến các quá trình sinh lý ở các nồng độ khác nhau. Tế bào mô trong hệ thống TCL sẽ phụ thuộc vào môi trường nhiều hơn, nhạy cảm hơn với các chất điều hòa sinh trưởng thực vật [19].

1.5.1. Auxin

Auxin có tác dụng tốt đến các quá trình sinh trưởng của tế bào, hoạt động của tầng phát sinh, sự hình thành rễ, hiện tượng ưu thế ngọn, tính hướng của thực vật, sinh trưởng của quả và tạo ra quả không hạt... Auxin điều hòa sự sinh trưởng của tế bào, đặc biệt theo chiều ngang làm tế bào phình ra. Hiệu quả đặc trưng của auxin là tác động lên sự giãn của thành tế bào: IAA làm giảm pH trong thành tế bào, hoạt hóa enzyme phân hủy các polysaccharide liên kết giữa các sợi cellulose làm cho chúng lỏng lẻo và tạo điều kiện cho thành tế bào giãn ra dưới tác dụng của áp suất thẩm thấu không bào trung tâm. Bên cạnh đó, auxin còn ảnh hưởng lên sự phân chia của tế bào. Tuy nhiên, các ảnh hưởng của auxin lên sự giãn và phân chia của thành tế bào có liên quan tới tác động tương hỗ với các phytohormone khác (gibberellin, cytokinin).

Auxin gây ra tính hướng động của cây, gây ra hiện tượng ưu thế ngọn, điều hòa sự hình thành rễ: trong sự hình thành rễ đặc biệt là rễ phụ, hiệu quả của auxin là rất đặc trưng. Sự hình thành rễ phụ có thể chia ra làm 3 giai đoạn: giai đoạn đầu là phản phân hóa tế bào trước tầng phát sinh; tiếp theo là xuất hiện mầm rễ và cuối cùng mầm rễ sinh trưởng thành rễ phụ chọc thủng vỏ và ra ngoài. Để khởi xướng sự phản phân hóa của tế bào mạnh mẽ cần hàm lượng auxin khá cao. Các giai đoạn sinh trưởng của rễ cần ít auxin, nếu nồng độ auxin cao sẽ ức chế sự phát triển của rễ. Vai trò của auxin trong sự phân hóa rễ thể hiện rất rõ trong vi nhân giống, việc sử dụng auxin để điều hòa sự ra rễ là cực kỳ quan trọng và bắt buộc. Auxin điều hòa sự hình thành, sinh trưởng của quả và tạo quả không hạt. Auxin kìm hãm sự rụng lá, tăng sự tạo quả và phòng rụng nụ, quả non, làm tăng năng suất cây trồng. Auxin tác động lên sự vận động của nguyên sinh chất và làm tăng tốc độ lưu động của nguyên sinh chất. Auxin ảnh hưởng đến các quá trình trao đổi chất: điều hòa sự tổng hợp

các polymer và ức chế sự phân hủy chúng. Auxin tác động đến các hoạt động như quang hợp, hô hấp, vận chuyển các chất trong cây. Auxin gồm có hai loại là auxin có nguồn gốc nội sinh được thực vật tổng hợp và auxin tổng hợp do con người tạo ra. Các loại auxin tổng hợp thông dụng thường dùng: IAA, IBA, NAA, 2,4-D [37].

1.5.2. Cytokinin

Gồm một số loại chính như: kinetin, 2iP, N6-(2-isopentyl) adenine, BA (hay BAP), TDZ.

Các cytokinin có liên quan tới sự phát triển thực vật và điều hòa sự phân chia tế bào. Cùng với auxin, các cytokinin cần cho sự phân chia và biệt hóa tế bào ở nhiều loài thực vật. Trong nuôi cấy mô, chúng cũng cảm ứng sự phát triển lục lạp và hình thành chồi. Cytokinin có vai trò kiểm soát quá trình phát sinh phôi sinh dưỡng ở một số loài, làm chậm sự lão hóa mô và thúc đẩy sự hình thành cơ quan chồi, bật chồi bên, phát triển lục lạp, mở rộng lá, tạo khối u và hiện tượng mô phân sinh ngọn phát triển ngang và ức chế sự kéo dài tế bào ở thân và rễ [19].

Nồng độ cytokinin quá cao sẽ tạo ra một số lượng lớn chồi bất định nhưng giảm chất lượng của chồi mới. Các kinh nghiệm trong việc nhân giống cây trồng cho thấy chất lượng chồi bất định rất quan trọng trong sự tái sinh cây [55].

1.6. Vai trò của ánh sáng đối với sự tái sinh, sinh trưởng và phát triển ở thực vật

Ánh sáng tác động lên sự phát sinh cơ quan và hình thành chồi của quá trình tái sinh, quá trình hình thành mô sẹo, phôi đều chịu ảnh hưởng của ánh sáng [104]. Debergh và cộng sự năm 1992 đã báo cáo, cường độ ánh sáng điều hòa kích cỡ lá và thân cũng như phát sinh hình thái của thực vật [56]. Ánh sáng có ảnh hưởng rất lớn lên quá trình quang phát sinh hình thái ở thực vật thông qua các quang thụ quan của cây [76].

Sự chiếu sáng có ảnh hưởng lên sự sinh trưởng của tế bào, mô thực vật và sự sinh tổng hợp chất biến dưỡng sơ cấp và thứ cấp [104]. Nhìn chung, chúng tăng theo cường độ chiếu sáng và hiện tượng bão hòa ánh sáng xuất hiện sau khi cường độ chiếu sáng đạt đến điểm bão hòa ánh sáng, khác nhau từ loài này đến loài khác [129]. Sự chiếu sáng với cường độ ánh sáng và chất lượng phổ ánh sáng khác nhau có tác động đáng kể lên sự sinh trưởng của mô sẹo của *Cistanche deserticola* và sự sinh tổng hợp phenylethanoid glycosides, một thành phần có vai trò quan trọng trong việc ổn định chức năng sinh sản, tiếp nhận các gốc oxygen tự do và chống lão hóa do sự biến đổi hoạt tính của phenylalanine ammonia lyase (PAL), enzyme then chốt xúc tác cho

sự bố trí cố định trong không gian, kháng, khử nhóm ammonia từ cả phenylalanine và tyrosine để tạo ra cinamic acid và các tiền chất của nó [104].

Ánh sáng trắng là tổng hợp của các loại ánh sáng có bước sóng khác nhau (400 - 800 nm), thích hợp cho nhiều loại đáp ứng của thực vật. Trong suốt thời gian nuôi cấy dịch huyền phù của *Perilla frutescens*, ánh sáng trắng với cường độ $20 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ tỏ ra rất hiệu quả và lượng anthocyanin được tạo ra cao gấp hai lần so với không chiếu sáng [129].

Ánh sáng xanh thúc đẩy sự sinh trưởng của mô sẹo nhưng lại ức chế sự kéo dài thân. Mô sẹo được nuôi cấy dưới ánh sáng xanh 435 nm cho nhiều sinh khối (18,4 g khối lượng khô) và PeG (2,4 g/l) cao nhất, lần lượt cao hơn 19 và 41% so với khi nuôi cấy dưới ánh sáng trắng. Điều này được giải thích do hoạt tính của PAL trong mô sẹo được nuôi cấy dưới ánh sáng xanh cao hơn so với dưới ánh sáng trắng [104].

1.7. Quá trình tái sinh

Tái sinh là quá trình các mô đã biệt hóa phản biệt hóa và chuyển thành mô non trẻ, có khả năng phân chia tế bào và bước vào chu trình tế bào mới, hình thành cơ quan [81]. Quá trình này gồm ba giai đoạn chính, chịu sự điều hòa của nhiều nhân tố khác nhau.

1.7.1. Giai đoạn phản biệt hóa

Mô đã biệt hóa là những mô đảm nhiệm những chức năng chuyên biệt của thực vật, những mô này không có khả năng phân chia tế bào hoặc khả năng phân chia tế bào thấp. Sự phản biệt hóa xảy ra khi mô được tách ra khỏi cây mẹ và đáp ứng với những thay đổi trong môi trường dinh dưỡng nhân tạo thông qua vùng bị thương. Những dấu hiệu liên quan đến vết thương đóng vai trò quan trọng trong quá trình phản biệt hóa. Động lực của quá trình này là do sự tái lập trình lại chương trình sinh lý tế bào, thay đổi sự trao đổi chất, phục hồi khả năng phân chia tế bào, phản biệt hóa, tái biệt hóa, phát sinh hình thái, ... tất cả đều được khởi xướng bởi sự thay đổi sâu sắc ở cấp độ phân tử. Các tế bào phản biệt hóa trải qua nhiều thay đổi sinh lý, sinh hóa khác nhau như vách tế bào lỏng lẻo, thay đổi trạng thái xoắn của nhiễm sắc thể và biểu hiện gene dẫn đến thay đổi trạng thái sinh lý, sinh hóa, hình thái của mô. Auxin có vai trò quan trọng trong giai đoạn này, nó kích thích sự lỏng lẻo của vách tế bào thông qua hoạt động acid hóa vách tế bào và kích thích phân chia tế bào, 2,4-D có tác động mạnh đến quá trình phản biệt hóa và kích thích hình thành mô sẹo. Đối với nhiều loài thực vật, 2,4-D thường được dùng để phản biệt hóa và cảm ứng tạo mô sẹo. Mức độ

phản biệt hóa của tế bào có liên quan đến sự methyl hóa của DNA [74]. Thời gian cảm ứng phản biệt hóa thay đổi tùy theo loại thực vật, nhưng thông thường quá trình này diễn ra nhanh. Duy trì mẫu cấy lâu trong môi trường chứa auxin sẽ cảm ứng mạnh sự hình thành mô sẹo. Chỉ một vài nhóm tế bào trong mô có khả năng cảm ứng với môi trường và tái sinh [81]. Ở những mô non có một vài nhóm tế bào không cần giai đoạn phản biệt hóa mà đáp ứng trực tiếp với môi trường tái sinh.

1.7.2. Giai đoạn cảm ứng với các chất điều hòa sinh trưởng thực vật

Những tế bào phản biệt hóa cảm ứng với các chất điều hòa sinh trưởng thực vật, chúng gia tăng sự phân chia tế bào và tái lập chương trình phát triển theo những hướng khác nhau. Nồng độ, loại và thời gian tác động của các chất điều hòa sinh trưởng thực vật ngoại sinh đóng vai trò rất quan trọng, quyết định hướng tái sinh của mô trong giai đoạn này. Thông thường tỷ lệ cytokinin/auxin cao hình thành chồi, tỷ lệ cytokinin/auxin thấp hình thành rễ, tỷ lệ này cân bằng cảm ứng tạo mô sẹo.

Nồng độ và loại auxin dùng trong cảm ứng phản biệt hóa ở giai đoạn đầu cũng tác động đến sự cảm ứng trong giai đoạn sau [109]. Nồng độ auxin cao cảm ứng sự hình thành mô sẹo và tái sinh chồi hoặc rễ từ mô sẹo, nếu nồng độ auxin thấp kích thích sự tái sinh chồi hoặc hình thành rễ trực tiếp từ mô cấy.

1.7.3. Giai đoạn phát sinh cơ quan và hình thành chồi

Những mô cảm ứng hình thành những cụm tế bào có tổ chức, phân chia tế bào và tạo cơ quan. Những nhân tố điều khiển sự phân chia và biệt hóa tế bào đóng vai trò quan trọng trong giai đoạn này, chúng quyết định chất lượng của chồi tái sinh.

1.7.4. Chuyển cây con ra vườn ươm, giai đoạn cuối cùng của sự tái sinh

Cây con được tái sinh từ môi trường nuôi cấy quen với việc phát triển trong điều kiện vô trùng, ẩm ướt. Do vậy, khi chuyển ra bên ngoài môi trường khắc nghiệt hơn. Các cây con *in vitro* có xu hướng tạo một lớp biểu bì kém phát triển và ít chịu khô hạn. Điều quan trọng là duy trì độ ẩm cao lúc đầu và giảm dần độ ẩm để cây con thích ứng với môi trường bên ngoài là cần thiết. Các cây con *in vitro* thiếu sự phát triển lớp biểu bì ở bề mặt lá làm cho cây dễ nhiễm bệnh [90]. Vì vậy, cần chuyển cây ra giá thể nuôi cấy tiệt trùng trong môi trường sạch.

CHƯƠNG II

VẬT LIỆU, NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

2.1.1. Vật liệu

Nguồn mẫu cho quá trình phát sinh hình thái: lá, cuống lá và thân rễ của cây sâm Ngọc Linh *in vitro* 3 tháng tuổi nuôi cấy trên môi trường SH [110] bổ sung 30 g/l đường sucrose, 0,5 g/l than hoạt tính và 9 g/l agar [22]. Nguồn mẫu sử dụng cho các thí nghiệm được lấy từ những cây khoẻ mạnh, không biểu hiện biến dị, không bị thuỷ tinh thể, có đầy đủ lá, thân, củ và rễ.

Cụm phôi vô tính sâm Ngọc Linh nuôi cấy *in vitro* 2,5 tháng tuổi có cấu trúc đồng đều nhau và khối lượng khoảng 30 mg ở thí nghiệm phát sinh hình thái, nguồn mẫu này được cấy vào môi trường thích hợp để tạo cây con hoàn chỉnh.

Cây sâm Ngọc Linh *in vitro* hoàn chỉnh (có củ và lá, đạt chiều cao khoảng 3 cm) được trồng thực nghiệm tại hai khu vực Lâm Đồng và Quảng Nam để khảo sát khả năng sống sót, sinh trưởng và phát triển của cây nuôi cấy *in vitro*.

Nguồn mẫu để xác định hoạt chất: cây sâm Ngọc Linh *in vitro*, cây sâm Ngọc Linh 6 tháng tuổi, 1 năm tuổi và 2 năm tuổi trồng ở núi Ngọc Linh thuộc xã Trà Linh, huyện Nam Trà My, tỉnh Quảng Nam được thu thập và sấy khô, sau đó mẫu được phân tích hoạt chất.

2.1.2. Thiết bị - dụng cụ, hóa chất và dung môi

2.1.2.1. Thiết bị - dụng cụ

Thiết bị và dụng cụ trong nuôi cấy *in vitro* gồm có: cân điện tử, bếp điện, máy cất nước, máy đo pH, nồi hấp vô trùng, dao cấy, đĩa cấy, panh cấy, kéo, bình nuôi cấy 100 ml và 250 ml, dây thun, nylon, găng tay, khẩu trang. Dụng cụ được khử trùng bằng autoclave ở 121°C, 1 atm trong 20 phút. Máy đo cường độ ánh sáng LI-250A Light meter (LICOR Biosciences UK Ltd.).

Thiết bị dùng trong giải phẫu hình thái học: chai nhỏ có nút đậy kín để xử lý mẫu, ống nhỏ giọt, đèn cồn, lam kính, lamel, dao lam, kẹp nhọn và kim mũi giáo, bộ dụng cụ nhuộm mẫu, kính hiển vi soi nổi.

Thiết bị dùng trong phân tích HPLC (High-performance Liquid chromatography: sắc ký lỏng hiệu năng cao) bao gồm máy HPLC của Shimadzu với

hệ thống bơm LC-20A-D, Degasser DGU-20A5, đầu dò DDA SPD-M20A và cột Supelco C18; máy siêu âm Ultrasonic LC 60H, tủ sấy Sanyo MOV-112, tủ sấy Menmert, cân kỹ thuật Precisa (Nhật Bản), đèn UV hai bước sóng 254 nm, 365 nm, Viber Luormat (Pháp), bếp cách thủy Menmert WB.14, bản mỏng tráng sẵn Silica gel 60F₂₅₄ (Merck).

2.1.2.2. Hóa chất và dung môi

Các thành phần khoáng đa lượng (N, P, K, Ca, Mg, S), vi lượng (Fe, Cu, Mn, Mo, B, I, Co, Zn), vitamin dùng để pha môi trường nuôi cấy được cung cấp bởi hãng hóa chất Merck (Đức). Các chất điều hòa sinh trưởng thực vật (TDZ, 2,4-D, NAA, BA) được cung cấp bởi hãng Duchefa (Hà Lan). Nguồn carbohydrate (sucrose) được cung cấp bởi Công ty đường Biên Hòa (Việt Nam), agar để sử dụng làm đông đặc môi trường được cung cấp bởi Công ty TNHH Nam Hạ Long (Việt Nam).

Hóa chất trong giải phẫu: Javen, acid acetic và phẩm nhuộm hai màu đỏ carmin-xanh iod.

Rg₁: Có độ tinh sạch > 98% HPLC thuộc hãng Nacalai Tesque, Kyoto, Nhật Bản; Rb₁: có độ tinh sạch > 98% HPLC thuộc hãng ICN Biomedicals Inc; MR₂: được chiết từ Trung tâm Sâm và Dược liệu thành phố Hồ Chí Minh. Dung môi để chạy sắc ký lớp mỏng là: Cloroform:methanol:nước (65:35:10).

2.2. Nội dung nghiên cứu

2.2.1. Nội dung 1: Nghiên cứu quá trình phát sinh hình thái từ các nguồn mẫu khác nhau

Nghiên cứu ảnh hưởng của CDHSTTV riêng lẻ lên sự phát sinh hình thái của mẫu lá tTCL_L, cuống lá tTCL_C, cuống lá lTCL_C và thân rễ tTCL_R trong điều kiện chiếu sáng và tối hoàn toàn.

Nghiên cứu ảnh hưởng giữa sự kết hợp auxin và cytokinin lên sự phát sinh hình thái của mẫu lá tTCL_L, cuống lá tTCL_C, cuống lá lTCL_C và thân rễ tTCL_R trong điều kiện chiếu sáng và tối hoàn toàn.

Nghiên cứu quá trình phát triển của phôi sâm Ngọc Linh.

Tạo cây con hoàn chỉnh từ phôi vô tính

2.2.2. Nội dung 2: Nghiên cứu sự sinh trưởng và phát triển tiếp theo của cây con *in vitro* ở các điều kiện sinh thái khác nhau

Nghiên cứu quá trình sinh trưởng và phát triển của cây sâm Ngọc Linh nuôi cấy *in vitro* được trồng tại xã Trà Linh, huyện Nam Trà My, tỉnh Quảng Nam và khu vực Công Trời, Vườn Quốc gia Bidoup - Núi Bà, Lâm Đồng.

2.2.3. Nội dung 3: Định tính và định lượng saponin trong cây sâm Ngọc Linh *in vitro* và trong cây sâm Ngọc Linh ở giai đoạn vườn ươm

Định tính và định lượng saponin trong cây sâm Ngọc Linh *in vitro*, cây sâm Ngọc Linh 6 tháng, cây 1 năm và cây 2 năm tuổi được trồng ở các điều kiện sinh thái khác nhau.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Phương pháp nghiên cứu sự phát sinh hình thái

Mẫu lá sâm Ngọc Linh *in vitro* được cắt theo chiều ngang tTCL_L với kích thước mỗi mẫu cắt 1 mm × 10 mm (rộng × dài).

Mẫu cuống lá sâm Ngọc Linh *in vitro* được cắt ngang tTCL_C với kích thước mỗi mẫu cắt 1 mm × 1 mm (dày × đường kính).

Mẫu cuống lá sâm Ngọc Linh *in vitro* được cắt ngang, mỗi đoạn cắt dài 10 mm, sau đó chẻ đôi thành hai mảnh theo chiều dọc ITCL_C dày khoảng 1 mm.

Mẫu thân rễ sâm Ngọc Linh *in vitro* được cắt ngang tTCL_R với kích thước mỗi mẫu cắt 1 mm × 5 mm (dày × đường kính).

Các nguồn mẫu khác nhau được cấy vào môi trường có bổ sung các chất điều hòa sinh trưởng khác nhau tùy thuộc vào từng giai đoạn phát triển của mẫu cấy và đặt dưới điều kiện chiếu sáng khác nhau nhằm nghiên cứu sự phát sinh hình thái của các nguồn mẫu khác nhau.

2.3.2. Phương pháp giải phẫu hình thái thực vật và quan sát bằng kính hiển vi soi nổi

Giải phẫu hình thái thực vật bằng phương pháp nhuộm đơn, nhuộm kép hay nhuộm hai màu. Nguyên tắc chung của việc nhuộm màu: các tế bào sống (tế bào nhu mô, vùng mô phân sinh có tế bào chất đậm đặc, hoạt động trao đổi chất diễn ra mạnh) sẽ bắt màu hồng, với vùng mô phân sinh chứa các tế bào có kích thước nhỏ, nằm gần nhau dưới kính hiển vi sẽ bắt màu hồng đậm; còn các tế bào chuyên hóa hoặc đã chết (các tế bào mô mạch hóa gỗ) sẽ bắt màu xanh.

2.3.3. Phương pháp phân tích hàm lượng saponin

2.3.3.1. Phương pháp sắc ký lớp mỏng

Dung dịch mẫu thử được chấm trên lớp mỏng hấp phụ (thường là silica gel). Một dung môi triển khai (pha động) di chuyển dọc theo bản mỏng sẽ làm di chuyển các cấu tử của mẫu thử theo một vận tốc khác nhau, tạo thành một sắc đồ có nhiều vết Rf khác nhau. Rf của một chất A là tỉ số giữa đoạn đường di chuyển của chất A (I_A) và đoạn đường di chuyển của dung môi (I_0) tính từ mức xuất phát mẫu thử: $Rf_A = I_A/I_0$. Trị số Rf luôn luôn $< 1,00$ và chỉ lấy đúng 2 số lẻ [32].

2.3.3.2. Phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao

HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) là kỹ thuật sắc ký tách hỗn hợp trên cột được nhồi đầy bằng các hạt có kích thước $\leq 10 \mu\text{m}$. Do vậy, phải dùng một bơm có áp suất cao khoảng 300 atm để đẩy pha động qua cột với tốc độ dòng khoảng vài ml/phút và cho phép phân giải nhanh một lượng mẫu nhỏ cỡ 20 μg . Việc định lượng các chất bằng HPLC có thể dựa vào sự so sánh chiều cao của đỉnh hay so sánh diện tích đỉnh của chất cần xác định với một hay nhiều mẫu chuẩn. Có nhiều phương pháp định lượng, nhưng thí nghiệm này chúng tôi dùng chuẩn ngoại. So sánh trực tiếp chiều cao hoặc diện tích đỉnh của mẫu thử với chiều cao hoặc diện tích đỉnh của một dung dịch chất chuẩn tương ứng có nồng độ đã biết. Phương pháp được áp dụng phổ biến trong HPLC để định lượng các chất. Ưu điểm của phương pháp này là chính xác, chỉ cần lưu ý đến sự phân tách của hợp chất cần xác định nên việc tiến hành định lượng khá đơn giản. Nhược điểm của phương pháp này là các sai số có thể xảy ra khi tiêm sẽ ảnh hưởng trực tiếp đến kết quả định lượng [32].

2.4. Phương pháp bố trí thí nghiệm

2.4.1. Nội dung 1: Nghiên cứu quá trình phát sinh hình thái từ nguồn mẫu khác nhau

2.4.1.1 Thí nghiệm 1: Khảo sát ảnh hưởng của CDHSTTV riêng lẻ lên sự phát sinh hình thái của mẫu lá tTCL_L trong điều kiện chiếu sáng và tối hoàn toàn

Mục đích: Nghiên cứu ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng và điều kiện chiếu sáng lên sự phát sinh hình thái của mẫu lá tTCL_L.

Cách tiến hành: Lá sâm Ngọc Linh từ những cây sâm Ngọc Linh 3 tháng tuổi nuôi cấy *in vitro* được cắt theo chiều ngang tTCL_L với kích thước mỗi mẫu cắt 1 mm \times 10 mm (rộng \times dài), được cấy trên môi trường MS [92] có bổ sung 30 g/l

sucrose, 8 g/l agar và các chất điều hòa sinh trưởng thực vật (CDHSTTV): α -naphthaleneacetic acid (NAA), 2,4-Dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D), 6-benzyladenine (BA) và Thidiazuron (TDZ) ở các nồng độ khác nhau được trình bày trong bảng 2.1. Môi trường nuôi cấy được điều chỉnh pH về 5,7 - 5,8; sau đó được đóng vào bình thủy tinh 250 ml (30 ml môi trường/bình) và hấp khử trùng ở 121°C, 1 atm trong 30 phút. Bình nuôi cấy sẽ được đặt dưới điều kiện chiếu sáng 16 giờ/ngày (đối với thí nghiệm có chiếu sáng) và tối hoàn toàn (đối với thí nghiệm trong tối).

Bảng 2.1. Nồng độ, loại CDHSTTV và điều kiện chiếu sáng khác nhau ở thí nghiệm 1

STT	Nồng độ CDHSTTV (mg/l)			
	TDZ	BA	NAA	2,4-D
1	-	-	-	-
2	0,01	-	-	-
3	0,05	-	-	-
4	0,1	-	-	-
5	0,2	-	-	-
6	0,5	-	-	-
7	1,0	-	-	-
8	-	0,1	-	-
9	-	0,2	-	-
10	-	0,5	-	-
11	-	1,0	-	-
12	-	2,0	-	-
13	-	-	0,1	-
14	-	-	0,2	-
15	-	-	0,5	-
16	-	-	1,0	-
17	-	-	2,0	-
18	-	-	-	0,1
19	-	-	-	0,2
20	-	-	-	0,5
21	-	-	-	1,0
22	-	-	-	2,0

Phương pháp bố trí thí nghiệm: theo phương pháp hoàn toàn ngẫu nhiên (Completely Randomized Design, CDR). Mỗi nghiệm thức lặp lại 3 lần, mỗi công thức thí nghiệm 90 mẫu, số liệu được ghi nhận với 30 mẫu/công thức thí nghiệm.

Chỉ tiêu theo dõi: Sau 10 tuần nuôi cấy, các chỉ tiêu như tỷ lệ mẫu phát sinh hình thái khác nhau (cảm ứng mô sẹo, phát sinh phôi trực tiếp, tạo rễ, tạo chồi,...) của mẫu cấy được ghi nhận.

2.4.1.2. *Thí nghiệm 2: Khảo sát ảnh hưởng của CĐHSTTV riêng lẻ lên sự phát sinh hình thái của mẫu cuống lá tTCL_C trong điều kiện chiếu sáng và tối hoàn toàn*

Mục đích: Nghiên cứu ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng và điều kiện chiếu sáng lên sự phát sinh hình thái của mẫu cuống lá tTCL_C.

Cách tiến hành: Cuống lá sâm Ngọc Linh từ những cây sâm Ngọc Linh 3 tháng tuổi nuôi cấy *in vitro* được cắt theo chiều ngang tTCL_C với kích thước mỗi mẫu cắt 1 mm × 1 mm (dày × đường kính), cấy trên môi trường MS [92] có bổ sung 30 g/l sucrose, 8 g/l agar và các CĐHSTTV: TDZ, BA, NAA và 2,4-D ở các nồng độ khác nhau được trình bày trong Bảng 2.2. Môi trường nuôi cấy được điều chỉnh pH về 5,7 - 5,8; sau đó được đông vào bình thủy tinh 250 ml (30 ml môi trường/bình) và hấp khử trùng ở 121°C, 1 atm trong 30 phút. Bình nuôi cấy được đặt dưới điều kiện chiếu sáng 16 giờ/ngày (đối với thí nghiệm có chiếu sáng) và tối hoàn toàn (đối với thí nghiệm trong tối).

Bảng 2.2. Nồng độ, loại CĐHSTTV và điều kiện chiếu sáng khác nhau ở thí nghiệm 2

STT	Nồng độ CĐHSTTV (mg/l)			
	TDZ	BA	NAA	2,4-D
1	-	-	-	-
2	0,01	-	-	-
3	0,05	-	-	-
4	0,1	-	-	-
5	0,2	-	-	-
6	0,5	-	-	-
7	1,0	-	-	-
8	-	0,1	-	-
9	-	0,2	-	-
10	-	0,5	-	-
11	-	1,0	-	-
12	-	2,0	-	-
13	-	-	0,1	-
14	-	-	0,2	-
15	-	-	0,5	-
16	-	-	1,0	-
17	-	-	2,0	-
18	-	-	-	0,1
19	-	-	-	0,2
20	-	-	-	0,5
21	-	-	-	1,0
22	-	-	-	2,0

Phương pháp bố trí thí nghiệm: theo phương pháp hoàn toàn ngẫu nhiên (Completely Randomized Design, CDR). Mỗi nghiệm thức lặp lại 3 lần, mỗi công thức thí nghiệm 90 mẫu, số liệu được ghi nhận với 30 mẫu/công thức thí nghiệm.

Chỉ tiêu theo dõi: Sau 10 tuần nuôi cấy, ghi nhận các chỉ tiêu như tỷ lệ mẫu phát sinh hình thái khác nhau (cảm ứng mô sẹo, phát sinh phôi trực tiếp, tạo rễ, tạo chồi,...) của mẫu cấy.

2.4.1.3. Thí nghiệm 3: Khảo sát ảnh hưởng của CDHSTTV riêng lẻ lên sự phát sinh hình thái của mẫu cuống lá ITCL_C trong điều kiện chiếu sáng và tối hoàn toàn

Mục đích: Nghiên cứu ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng và điều kiện chiếu sáng lên sự phát sinh hình thái của mẫu cuống lá ITCL_C.

Cách tiến hành: Cuống lá sâm Ngọc Linh từ những cây sâm Ngọc Linh 3 tháng tuổi nuôi cấy *in vitro* được cắt theo chiều dọc ITCL_C với kích thước mỗi mẫu dài 10 mm, sau đó chẻ đôi thành hai mảnh theo chiều dọc ITCL_C có độ dày khoảng 1 mm, cấy trên môi trường MS [92] có bổ sung 30 g/l sucrose, 8 g/l agar và các CDHSTTV: TDZ, BA, NAA và 2,4-D ở các nồng độ khác nhau được trình bày trong Bảng 2.3.

Bảng 2.3. Nồng độ, loại CDHSTTV và điều kiện chiếu sáng khác nhau ở thí nghiệm 3

STT	Nồng độ CDHSTTV (mg/l)			
	TDZ	BA	NAA	2,4-D
1	-	-	-	-
2	0,01	-	-	-
3	0,05	-	-	-
4	0,1	-	-	-
5	0,2	-	-	-
6	0,5	-	-	-
7	1,0	-	-	-
8	-	0,1	-	-
9	-	0,2	-	-
10	-	0,5	-	-
11	-	1,0	-	-
12	-	2,0	-	-
13	-	-	0,1	-
14	-	-	0,2	-
15	-	-	0,5	-
16	-	-	1,0	-
17	-	-	2,0	-
18	-	-	-	0,1
19	-	-	-	0,2
20	-	-	-	0,5
21	-	-	-	1,0
22	-	-	-	2,0

Môi trường nuôi cấy được điều chỉnh pH về 5,7 - 5,8; được đóng vào bình thủy tinh 250 ml (30 ml môi trường/bình), hấp khử trùng ở 121°C, 1 atm trong 30 phút.

Bình nuôi cấy sẽ được đặt dưới điều kiện chiếu sáng 16 giờ/ngày (đối với thí nghiệm có chiếu sáng) và tối hoàn toàn.

Chỉ tiêu theo dõi: Sau 10 tuần nuôi cấy, ghi nhận các chỉ tiêu như tỷ lệ mẫu phát sinh hình thái khác nhau (cảm ứng mô sẹo, phát sinh phôi trực tiếp, tạo rễ, tạo chồi,...) của mẫu cấy.

Phương pháp bố trí thí nghiệm: theo phương pháp hoàn toàn ngẫu nhiên (Completely Randomized Design, CDR). Mỗi nghiệm thức lặp lại 3 lần, mỗi công thức thí nghiệm 90 mẫu, số liệu được ghi nhận với 30 mẫu/công thức thí nghiệm.

2.4.1.4. Thí nghiệm 4: Khảo sát ảnh hưởng của CDHSTTV riêng lẻ lên sự phát sinh hình thái của mẫu thân rễ tTCL_R trong điều kiện chiếu sáng và tối hoàn toàn

Mục đích: Nghiên cứu ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng và điều kiện chiếu sáng lên sự phát sinh hình thái của mẫu thân rễ tTCL_R.

Bảng 2.4. Nồng độ, loại CDHSTTV và điều kiện chiếu sáng khác nhau ở thí nghiệm 4

STT	Nồng độ CDHSTTV (mg/l)			
	TDZ	BA	NAA	2,4-D
1	-	-	-	-
2	0,01	-	-	-
3	0,05	-	-	-
4	0,1	-	-	-
5	0,2	-	-	-
6	0,5	-	-	-
7	1,0	-	-	-
8	-	0,1	-	-
9	-	0,2	-	-
10	-	0,5	-	-
11	-	1,0	-	-
12	-	2,0	-	-
13	-	-	0,1	-
14	-	-	0,2	-
15	-	-	0,5	-
16	-	-	1,0	-
17	-	-	2,0	-
18	-	-	-	0,1
19	-	-	-	0,2
20	-	-	-	0,5
21	-	-	-	1,0
22	-	-	-	2,0

Cách tiến hành: Thân rễ sâm Ngọc Linh từ cây sâm Ngọc Linh 3 tháng tuổi nuôi cấy *in vitro* được cắt theo chiều ngang tTCL_R với kích thước mỗi mẫu cắt 1 mm × 5 mm (dày × đường kính), được cấy trên môi trường MS [92] có bổ sung 30

g/l sucrose, 8 g/l agar và các CDHSTTV: TDZ, BA, NAA và 2,4-D ở các nồng độ khác nhau được trình bày trong bảng 2.4. Môi trường nuôi cấy được điều chỉnh pH về 5,7 - 5,8; sau đó được đong vào bình thủy tinh 250 ml (30 ml môi trường/bình) và hấp khử trùng ở 121°C, 1 atm trong 30 phút. Bình nuôi cấy sẽ được đặt dưới điều kiện chiếu sáng 16 giờ/ngày (đối với thí nghiệm có chiếu sáng) và tối hoàn toàn (đối với thí nghiệm trong tối).

Chỉ tiêu theo dõi: Sau 10 tuần nuôi cấy, các chỉ tiêu như tỷ lệ mẫu phát sinh hình thái khác nhau (cảm ứng mô sẹo, phát sinh phôi trực tiếp, tạo rễ, tạo chồi,...) của mẫu cấy được ghi nhận.

Phương pháp bố trí thí nghiệm: theo phương pháp hoàn toàn ngẫu nhiên (Completely Randomized Design, CDR). Mỗi nghiệm thức lặp lại 3 lần, mỗi công thức thí nghiệm 90 mẫu, số liệu được ghi nhận với 30 mẫu/công thức thí nghiệm.

2.4.1.5. Thí nghiệm 5: Khảo sát ảnh hưởng giữa sự kết hợp auxin và cytokinin lên sự phát sinh hình thái của mẫu lá tTCL_L ở điều kiện chiếu sáng và tối hoàn toàn

Mục đích: Nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ auxin kết hợp cytokinin và điều kiện chiếu sáng lên sự phát sinh hình thái của mẫu lá tTCL_L.

Cách tiến hành: Lá sâm Ngọc Linh từ cây sâm Ngọc Linh 3 tháng tuổi nuôi cấy *in vitro* được cắt theo chiều ngang tTCL_L với kích thước mỗi mẫu cắt 1 mm × 10 mm (rộng × dài), được cấy trên môi trường MS [92] có bổ sung 30 g/sucrose, 8 g/l agar và các chất CDHSTTV được kết hợp với nhau (2,4-D + BA; 2,4-D + TDZ; NAA + BA) ở các nồng độ khác nhau được trình bày trong bảng 2.5; 2.6 và 2.7.

Bảng 2.5. Sự kết hợp giữa 2,4-D, BA ở các nồng độ và điều kiện chiếu sáng khác nhau trong thí nghiệm phát sinh hình thái của mẫu lá tTCL_L của sâm Ngọc Linh

STT	Nồng độ chất CDHSTTV (mg/l)	
	2,4-D	BA
1	1,0	-
2	1,0	0,1
3	1,0	0,2
4	1,0	0,5
5	1,0	1,0
6	1,0	2,0
7	-	1,0
8	0,1	1,0
9	0,2	1,0
10	0,5	1,0
11	2,0	1,0

Bảng 2.6. Sự kết hợp giữa 2,4-D và TDZ ở các nồng độ và điều kiện chiếu sáng khác nhau trong thí nghiệm phát sinh hình thái của mẫu lá tTCL_L của sâm Ngọc Linh

STT	Nồng độ chất CDHSTTV (mg/l)	
	2,4-D	TDZ
1	1,0	-
2	1,0	0,01
3	1,0	0,05
4	1,0	0,1
5	1,0	0,2
6	1,0	0,5
7	1,0	1,0
8	-	0,2
9	0,1	0,2
10	0,2	0,2
11	0,5	0,2
12	2,0	0,2

Bảng 2.7. Sự kết hợp giữa NAA, BA ở các nồng độ và điều kiện chiếu sáng khác nhau trong thí nghiệm phát sinh hình thái của mẫu lá tTCL_L của sâm Ngọc Linh

STT	Nồng độ chất CDHSTTV (mg/l)	
	NAA	BA
1	1,0	-
2	1,0	0,1
3	1,0	0,2
4	1,0	0,5
5	1,0	1,0
6	1,0	2,0
7	-	1,0
8	0,1	1,0
9	0,2	1,0
10	0,5	1,0
11	2,0	1,0

Môi trường nuôi cấy được điều chỉnh pH về 5,7 - 5,8; sau đó được đóng vào bình thủy tinh 250 ml (30 ml môi trường/bình) và hấp khử trùng ở 121°C, 1 atm trong 30 phút. Bình nuôi cấy sẽ được đặt dưới điều kiện chiếu sáng 16 giờ/ngày (đối với thí nghiệm có chiếu sáng) và tối hoàn toàn (đối với thí nghiệm trong tối).

Phương pháp bố trí thí nghiệm: theo phương pháp hoàn toàn ngẫu nhiên (Completely Randomized Design, CDR). Mỗi nghiệm thức lặp lại 3 lần, mỗi công thức thí nghiệm 90 mẫu, số liệu được ghi nhận với 30 mẫu/công thức thí nghiệm.

Chỉ tiêu theo dõi: Sau 10 tuần nuôi cấy, các chỉ tiêu như tỷ lệ mẫu phát sinh hình thái khác nhau (cảm ứng mô sẹo, phát sinh phôi trực tiếp, tạo rễ, tạo chồi,...) của mẫu cấy được ghi nhận.

2.4.1.6. *Thí nghiệm 6: Khảo sát ảnh hưởng giữa sự kết hợp auxin và cytokinin lên sự phát sinh hình thái của mẫu cuống lá tTCL_C trong điều kiện sáng và tối hoàn toàn*

Mục đích: Nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ auxin kết hợp cytokinin và điều kiện chiếu sáng lên sự phát sinh hình thái của mẫu cuống lá tTCL_C.

Bảng 2.8. Sự kết hợp giữa 2,4-D, BA ở các nồng độ và điều kiện chiếu sáng khác nhau trong phát sinh hình thái của mẫu cuống lá tTCL_C của sâm Ngọc Linh

STT	Nồng độ chất CDHSTTV (mg/l)	
	2,4-D	BA
1	1,0	-
2	1,0	0,1
3	1,0	0,2
4	1,0	0,5
5	1,0	1,0
6	1,0	2,0
7	-	1,0
8	0,1	1,0
9	0,2	1,0
10	0,5	1,0
11	2,0	1,0

Bảng 2.9. Sự kết hợp giữa 2,4-D, TDZ ở các nồng độ và điều kiện chiếu sáng khác nhau trong phát sinh hình thái của mẫu cuống lá tTCL_C của sâm Ngọc Linh

STT	Nồng độ chất CDHSTTV (mg/l)	
	2,4-D	TDZ
1	1,0	-
2	1,0	0,01
3	1,0	0,05
4	1,0	0,1
5	1,0	0,2
6	1,0	0,5
7	1,0	1,0
8	-	0,2
9	0,1	0,2
10	0,2	0,2
11	0,5	0,2
12	2,0	0,2

Bảng 2.10. Sự kết hợp giữa NAA, BA ở các nồng độ và điều kiện chiếu sáng khác nhau trong phát sinh hình thái của mẫu cuống lá tTCL_C của sâm Ngọc Linh

STT	Nồng độ chất CDHSTTV (mg/l)	
	NAA	BA
1	1,0	-
2	1,0	0,1
3	1,0	0,2
4	1,0	0,5
5	1,0	1,0
6	1,0	2,0
7	-	1,0
8	0,1	1,0
9	0,2	1,0
10	0,5	1,0
11	2,0	1,0

Cách tiến hành: Cuống lá sâm Ngọc Linh từ cây sâm Ngọc Linh 3 tháng tuổi nuôi cấy *in vitro* được cắt theo chiều ngang tTCL_C với kích thước mỗi mẫu cắt 1 mm × 1 mm (dày × đường kính), được cấy trên môi trường MS [92] có bổ sung 30 g/l sucrose, 8 g/l agar và các CDHSTTV được kết hợp với nhau (2,4-D + BA; 2,4-D + TDZ; NAA + BA) ở các nồng độ khác nhau được trình bày trong Bảng 2.8; 2.9 và 2.10. Môi trường nuôi cấy được điều chỉnh pH về 5,7 - 5,8; sau đó được đông vào bình thủy tinh 250 ml (30 ml môi trường/bình) và hấp khử trùng ở 121°C, 1 atm trong 30 phút. Bình nuôi cấy sẽ được đặt ở điều kiện chiếu sáng 16 giờ/ngày (đối với thí nghiệm có chiếu sáng) và tối hoàn toàn (đối với thí nghiệm trong tối).

Phương pháp bố trí thí nghiệm: theo phương pháp hoàn toàn ngẫu nhiên (Completely Randomized Design, CDR). Mỗi nghiệm thức lặp lại 3 lần, mỗi công thức thí nghiệm 90 mẫu, số liệu được ghi nhận với 30 mẫu/công thức thí nghiệm. \

Chỉ tiêu theo dõi: Sau 10 tuần nuôi cấy, các chỉ tiêu như tỷ lệ mẫu phát sinh hình thái khác nhau (cảm ứng mô sẹo, phát sinh phôi trực tiếp, tạo rễ, tạo chồi,...) của mẫu cấy được ghi nhận.

2.4.1.7. Thí nghiệm 7: Khảo sát ảnh hưởng giữa sự kết hợp auxin và cytokinin lên sự phát sinh hình thái của mẫu cuống lá ITCL_C trong điều kiện sáng và tối hoàn toàn

Mục đích: Nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ auxin kết hợp cytokinin và điều kiện chiếu sáng lên sự phát sinh hình thái của mẫu cuống lá ITCL_C.

Cách tiến hành: Cuống lá sâm Ngọc Linh từ cây sâm Ngọc Linh 3 tháng tuổi nuôi cấy *in vitro* được cắt theo chiều dọc ITCL_C với kích thước mỗi mẫu cắt dài 10 mm, sau đó chẻ đôi thành hai mảnh theo chiều dọc ITCL_C có độ dày khoảng 1 mm, được cấy úp trên môi trường MS [92] có bổ sung 30 g/l sucrose, 8 g/l agar và các CDHSTTV được kết hợp với nhau (2,4-D + BA; 2,4-D + TDZ; NAA + BA) ở các nồng độ khác nhau được trình bày trong Bảng 2.11; 2.12 và 2.13.

Bảng 2.11. Sự kết hợp giữa 2,4-D, BA ở các nồng độ và điều kiện chiếu sáng khác nhau trong phát sinh hình thái của mẫu cuống lá ITCL_C của sâm Ngọc Linh

STT	Nồng độ chất CDHSTTV (mg/l)	
	2,4-D	BA
1	1,0	-
2	1,0	0,1
3	1,0	0,2
4	1,0	0,5
5	1,0	1,0
6	1,0	2,0
7	-	1,0
8	0,1	1,0
9	0,2	1,0
10	0,5	1,0
11	2,0	1,0

Bảng 2.12. Sự kết hợp giữa 2,4-D, TDZ ở các nồng độ và điều kiện chiếu sáng khác nhau trong phát sinh hình thái của mẫu cuống lá ITCL_C của sâm Ngọc Linh

STT	Nồng độ chất CDHSTTV (mg/l)	
	2,4-D	TDZ
1	1,0	-
2	1,0	0,01
3	1,0	0,05
4	1,0	0,1
5	1,0	0,2
6	1,0	0,5
7	1,0	1,0
8	-	0,2
9	0,1	0,2
10	0,2	0,2
11	0,5	0,2
12	2,0	0,2

Bảng 2.13. Sự kết hợp giữa NAA, BA ở các nồng độ và điều kiện chiếu sáng khác nhau trong phát sinh hình thái của mẫu cuống lá ITCL_C của sâm Ngọc Linh

STT	Nồng độ chất CDHSTTV (mg/l)	
	NAA	BA
1	1,0	-
2	1,0	0,1
3	1,0	0,2
4	1,0	0,5
5	1,0	1,0
6	1,0	2,0
7	-	1,0
8	0,1	1,0
9	0,2	1,0
10	0,5	1,0
11	2,0	1,0

Môi trường nuôi cấy được điều chỉnh pH về 5,7 - 5,8; sau đó được đông vào bình thủy tinh 250 ml (30 ml môi trường/bình) và hấp khử trùng ở 121°C, 1 atm trong 30 phút. Bình nuôi cấy sẽ được đặt dưới điều kiện chiếu sáng 16 giờ/ngày (thí nghiệm chiếu sáng) và tối hoàn toàn (thí nghiệm trong tối).

Phương pháp bố trí thí nghiệm: theo phương pháp hoàn toàn ngẫu nhiên (Completely Randomized Design, CDR). Mỗi nghiệm thức lặp lại 3 lần, mỗi công thức thí nghiệm 90 mẫu, số liệu được ghi nhận với 30 mẫu/công thức thí nghiệm.

2.4.1.8. Thí nghiệm 8: Khảo sát ảnh hưởng giữa sự kết hợp auxin và cytokinin lên sự phát sinh hình thái của mẫu thân rễ tTCL_R trong điều kiện chiếu sáng và tối hoàn toàn

Mục đích: Nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ auxin kết hợp cytokinin và điều kiện chiếu sáng lên sự phát sinh hình thái của mẫu thân rễ tTCL_R.

Cách tiến hành: Thân rễ sâm Ngọc Linh từ những cây sâm Ngọc Linh 3 tháng tuổi nuôi cấy *in vitro* được cắt theo chiều ngang tTCL_R với kích thước mỗi mẫu cắt 1 mm × 5 mm (dày × đường kính), được cấy trên môi trường MS [92] có bổ sung 30 g/l sucrose, 8 g/l agar và các CDHSTTV được kết hợp với nhau (2,4-D + BA; 2,4-D + TDZ; NAA + BA) ở các nồng độ khác nhau được trình bày trong Bảng 2.14; 2.15 và 2.16. Môi trường nuôi cấy được điều chỉnh pH về 5,7 - 5,8; sau đó được đông vào bình thủy tinh 250 ml (30 ml môi trường/bình) và hấp khử trùng ở 121°C, 1 atm trong 30 phút. Bình nuôi cấy sẽ được đặt dưới điều kiện chiếu sáng 16 giờ/ngày (đối với thí nghiệm có chiếu sáng) và tối hoàn toàn (đối với thí nghiệm trong tối).

Bảng 2.14. Sự kết hợp giữa 2,4-D, BA ở các nồng độ và điều kiện chiếu sáng khác nhau trong phát sinh hình thái của mẫu thân rễ tTCL_R của sâm Ngọc Linh

STT	Nồng độ chất CDHSTTV (mg/l)	
	2,4-D	BA
1	1,0	-
2	1,0	0,1
3	1,0	0,2
4	1,0	0,5
5	1,0	1,0
6	1,0	2,0
7	-	1,0
8	0,1	1,0
9	0,2	1,0
10	0,5	1,0
11	2,0	1,0

Bảng 2.15. Sự kết hợp giữa 2,4-D, TDZ ở các nồng độ và điều kiện chiếu sáng khác nhau trong thí nghiệm phát sinh hình thái của mẫu rễ tTCL_R của sâm Ngọc Linh

STT	Nồng độ chất CDHSTTV (mg/l)	
	2,4-D	TDZ
1	1,0	-
2	1,0	0,01
3	1,0	0,05
4	1,0	0,1
5	1,0	0,2
6	1,0	0,5
7	1,0	1,0
8	-	0,2
9	0,1	0,2
10	0,2	0,2
11	0,5	0,2
12	2,0	0,2

Bảng 2.16. Sự kết hợp giữa NAA, BA ở các nồng độ và điều kiện chiếu sáng khác nhau trong phát sinh hình thái của mẫu thân rễ tTCL_R của sâm Ngọc Linh

STT	Nồng độ chất CDHSTTV (mg/l)	
	NAA	BA
1	1,0	-
2	1,0	0,1
3	1,0	0,2
4	1,0	0,5
5	1,0	1,0
6	1,0	2,0
7	-	1,0
8	0,1	1,0
9	0,2	1,0
10	0,5	1,0
11	2,0	1,0

Phương pháp bố trí thí nghiệm: theo phương pháp hoàn toàn ngẫu nhiên (Completely Randomized Design, CDR). Mỗi nghiệm thức lặp lại 3 lần, mỗi công thức thí nghiệm 90 mẫu, số liệu được ghi nhận với 30 mẫu/công thức thí nghiệm.

Chỉ tiêu theo dõi: Sau 10 tuần nuôi cấy, các chỉ tiêu như tỷ lệ mẫu phát sinh hình thái khác nhau (cảm ứng mô sẹo, phát sinh phôi trực tiếp, tạo rễ, tạo chồi,...) của mẫu cấy được ghi nhận.

2.4.1.9. Giải phẫu hình thái học

Mục đích: Quan sát quá trình phát triển của phôi.

Cách tiến hành: Mô nuôi cấy được cắt thành các lát mỏng đi qua trục rễ hoặc chồi. Lát cắt được xử lý với Javel 5% trong 15 phút để loại bỏ nội chất tế bào sau đó rửa với nước cất rồi xử lý tiếp tục với acid acetic 3% trong 5 phút để loại bỏ Javel trước khi tiến hành nhuộm với phẩm nhuộm 2 màu (acetocarmine và iodine) trong 3 phút. Tiếp đó, đặt mẫu vật lên lamel kính, đặt lamel lên và quan sát dưới kính hiển vi quang học với độ phóng đại tăng dần.

Chỉ tiêu theo dõi: Các dạng hình thái của phôi vô tính.

2.4.1.10. Tạo cây con hoàn chỉnh từ phôi vô tính sâm Ngọc Linh

Mục đích: Tạo được cây con *in vitro* khỏe mạnh, đồng đều về hình thái và có sức sống tốt để phục vụ cho các thí nghiệm tiếp theo.

Cách tiến hành: Nguồn mẫu phôi thu nhận được ở các thí nghiệm phát sinh hình thái được nuôi cấy trên môi trường SH có bổ sung 1 mg/l BA, 0,5 mg/l NAA, 50 g/l sucrose, 9 g/l agar, 1 g/l than hoạt tính dưới điều kiện chiếu sáng khác nhau [4].

Chỉ tiêu theo dõi: Sau 8 tuần nuôi cấy, tiến hành ghi nhận chiều cao cây, số lá và số lượng rễ.

2.4.2. Nội dung 2: Nghiên cứu sự sinh trưởng và phát triển tiếp theo của cây sâm Ngọc Linh *in vitro* ở các điều kiện sinh thái khác nhau.

2.4.2.1. Thí nghiệm 09: Nghiên cứu quá trình sinh trưởng và phát triển của cây sâm Ngọc Linh nuôi cấy *in vitro* trồng tại Quảng Nam

Mục đích: Đánh giá khả năng thích nghi của cây sâm Ngọc Linh nuôi cấy *in vitro* tại nơi có các quần thể sâm Ngọc Linh tự nhiên đang sinh sống.

Cách tiến hành: Cây con sâm Ngọc Linh 8 tuần tuổi có nguồn gốc từ phôi nuôi cấy bằng kỹ thuật TCL, cây được lấy ra khỏi bình nuôi cấy, rửa sạch agar và bảo quản

trong hộp nhựa tròn, dưới đáy hộp có một lớp bông thấm nước vừa đủ để giữ ẩm, tránh mất nước trong thời gian chuyển mẫu đến khu vực trồng. Thời gian tiến hành trồng được bố trí vào tháng 09 đầu mùa mưa. Tổng số lượng cây sâm Ngọc Linh *in vitro* được trồng là 800 cây, chia làm 4 luống. Vườn ươm thí nghiệm được thiết lập chủ yếu ở khu vực núi cao thuộc địa bàn dãy Núi Ngọc Linh - xã Trà Linh, huyện Nam Trà My, tỉnh Quảng Nam. Đây là thí nghiệm quan trọng cho phép chúng ta đánh giá được tiềm năng và triển vọng của cây sâm Ngọc Linh nuôi cấy *in vitro* trong việc cung cấp nguồn giống cho các khu vực trồng cây sâm Ngọc Linh cũng như phát triển và bảo tồn quần thể sâm Ngọc Linh đang bị khai thác cạn kiệt trong tự nhiên.

Chỉ tiêu theo dõi: Tỷ lệ sống sót, tỷ lệ mọc lá mới và sự hình thành củ nhánh đối với cây 6 tháng, cây 1 năm tuổi, cây 1,5 năm tuổi và cây 2 năm.

2.4.2.2. Thí nghiệm 10: Nghiên cứu quá trình sinh trưởng và phát triển của cây sâm Ngọc Linh nuôi cấy in vitro trồng tại khu vực Cổng Trời, rừng quốc gia Bidoup - Núi Bà (Lâm Đồng)

Mục đích: Đánh giá sự thích ứng của cây sâm Ngọc Linh nuôi cấy *in vitro* tại Vườn Quốc gia Bidoup - Núi Bà (Lâm Đồng) và so sánh khả năng sống sót và sinh trưởng của cây sâm với các vị trí thiết lập tại địa bàn tỉnh Quảng Nam

Cách tiến hành: Cây con sâm Ngọc Linh 8 tuần tuổi có nguồn gốc từ phôi nuôi cấy bằng kỹ thuật TCL, cây được lấy ra khỏi bình nuôi cấy, rửa sạch agar và bảo quản trong hộp nhựa tròn, dưới đáy hộp có một lớp bông thấm nước vừa đủ để giữ ẩm, tránh mất nước trong thời gian chuyển mẫu đến khu vực trồng. Thời gian tiến hành trồng được bố trí vào tháng 09 năm 2014. Tổng số lượng cây sâm Ngọc Linh *in vitro* được trồng là 800 cây, chia làm 4 luống. Vườn ươm thí nghiệm được thiết lập tại khu vực Cổng Trời trong phân khu bảo vệ nghiêm ngặt rừng quốc gia Bidoup - Núi Bà (Lâm Đồng) và có nhiều nét tương đồng với khu vực dãy Núi Ngọc Linh - xã Trà Linh - huyện Nam Trà My - tỉnh Quảng Nam về khí hậu (khí hậu cao nguyên nhiệt đới gió mùa với hai mùa, mùa mưa từ tháng 4 đến tháng 11, mùa khô từ tháng 12 đến tháng 3).

Chỉ tiêu theo dõi: Tỷ lệ sống sót, tỷ lệ mọc lá mới và sự hình thành củ nhánh đối với cây 6 tháng, cây 1 năm tuổi, cây 1,5 năm tuổi và cây 2 năm.

Các yếu tố môi trường bao gồm ánh sáng, nhiệt độ, độ ẩm, đất đai, chế độ phân bón và kỹ thuật chăm sóc.

2.4.3. Nội dung 3: Định tính và định lượng saponin trong cây sâm Ngọc Linh *in vitro* và trong cây sâm Ngọc Linh ở giai đoạn vườn ươm

2.4.3.1. *Thí nghiệm 11: Định tính hàm lượng saponin trong cây sâm Ngọc Linh in vitro, cây sâm con 6 tháng, cây sâm 1 năm và cây sâm 2 năm tuổi được trồng tại Quảng Nam*

Mục đích: Định tính saponin trong cây sâm Ngọc Linh *in vitro*, cây sâm Ngọc Linh 6 tháng tuổi, 1 năm tuổi và 2 năm tuổi được trồng tại Quảng Nam.

Định tính saponin bằng sắc ký lớp mỏng:

Chuẩn bị mẫu

Chiết siêu âm 1 g mẫu với methanol (MeOH) (20 ml/lần, mỗi lần 10 phút, 9 lần), lọc và cô dịch lọc đến cạn.

Hòa cồn với 10 ml nước và 20 ml diethyl ether, lắc đều, loại dịch diethyl ether. Dịch nước được tiếp tục lắc với n-butanol (n-BuOH) bão hòa nước, đem cô cách thủy dịch n-BuOH đến cạn, hòa cồn trong MeOH làm mẫu thử.

Chuẩn bị bản mỏng silica gel

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

Chuẩn bị dung môi: Cloroform:methanol:nước (65:35:10, lấy lớp dưới)

Tiến hành

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

2.4.3.2. *Thí nghiệm 12: Định lượng saponin trong cây sâm Ngọc Linh in vitro, cây sâm con 6 tháng, cây sâm 1 năm và cây sâm 2 năm tuổi*

Mục đích: Định lượng saponin trong cây sâm Ngọc Linh *in vitro*, cây sâm con 6 tháng tuổi, 1 năm tuổi và 2 năm tuổi được trồng tại Quảng Nam.

Định lượng saponin (MR₂, Rb₁, Rg₁) bằng phương pháp HPLC. Dựng đường chuẩn định lượng saponin (các chuẩn MR₂, Rg₁, Rb₁). Cân chất chuẩn: 3,6 mg MR₂; 0,97 mg Rg₁; 1,2 mg Rb₁ pha trong bình định mức 10 ml với acetonitrile và nước (tỷ

lệ 7:3) để có được dung dịch mẹ. Từ dung dịch mẹ pha giai mẫu với nồng độ tương ứng như bảng 2.17.

Bảng 2.17. Pha giai mẫu chuẩn MR₂, Rg₁, Rb₁

STT \ Nồng độ	MR ₂ (µg/ml)	Rg ₁ (µg/ml)	Rb ₁ (µg/ml)
1	72	97,0	24
2	144	77,6	48
3	216	58,2	72
4	288	38,8	96
5	360	19,4	120

Tiêm các mẫu chuẩn ở nồng độ khác nhau vào máy HPLC, ghi nhận diện tích đỉnh tương ứng với mỗi nồng độ, dựng đường tuyến tính biểu diễn mối tương quan giữa diện tích đỉnh và nồng độ.

Áp dụng quy trình định lượng saponin (MR₂, Rg₁, Rb₁) cho mẫu mô sẹo sâm Ngọc Linh.

Chuẩn bị mẫu tương tự như sắc ký lớp mỏng.

Cẩn n-butanol hòa với 10 ml methanol, trích 2 ml cô cách thủy đến cạn. Hòa cẩn với nước và acetonitrile (1:2), lọc qua màng lọc 0,45 µm, dịch lọc bơm vào máy HPLC và ghi nhận diện tích đỉnh.

Công thức xác định hàm lượng (%):

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

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

Chỉ tiêu theo dõi

Các vết R_f của MR₂, G-Rb₁, G-Rg₁ và hàm lượng saponin toàn phần, MR₂, G-Rb₁, G-Rg₁ trong cây sâm Ngọc Linh *in vitro*, cây sâm Ngọc Linh 6 tháng, cây 1 năm và cây 2 năm.

2.5. Phương pháp xử lý thống kê

Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên (Completely Randomized Design, CDR. Trung bình của các chỉ tiêu theo dõi giữa các công thức thí nghiệm được xử lý bằng phương pháp phân tích phương sai (ANOVA), sau đó so sánh với phép thử Duncan ở mức tin cậy $\alpha < 0,05$ bằng phần mềm SPSS 16.0 [61].

2.6. Điều kiện nuôi cấy

2.6.1. Điều kiện *in vitro*

Các thí nghiệm được thực hiện trong điều kiện phòng nuôi có độ ẩm từ 55 - 60%, nhiệt độ $25 \pm 2^\circ\text{C}$, cường độ chiếu sáng $40 - 45 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, thời gian chiếu sáng 16 giờ/ngày (đối với thí nghiệm có chiếu sáng), tối hoàn toàn (đối với thí nghiệm trong tối).

2.6.2. Điều kiện *ex vitro*

Tại Lâm Đồng: Thí nghiệm được bố trí ở khu vực Công Trời trong phân khu bảo vệ nghiêm ngặt. Hệ sinh thái rừng thuộc kiểu rừng kín thường xanh lá rụng, độ cao trung bình từ 1.800 - 1.900 m, nhiệt độ $15 - 20^\circ\text{C}$, độ ẩm 80 - 85%, cường độ ánh sáng đo được tại vị trí thiết lập vườn ươm dao động từ $8 - 19 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ trong ngày.

Tại khu vực núi Ngọc Linh (Quảng Nam): thí nghiệm được thực hiện tại vườn Tắc Ngo, Xã Trà Linh, Huyện Nam Trà My, Tỉnh Quảng Nam, trồng dưới tán rừng tự nhiên với các điều kiện như sau: Nhiệt độ $13 - 20^\circ\text{C}$, độ ẩm 80 - 90%, ánh sáng tự nhiên dưới tán rừng, độ cao từ 1.600 - 1.800 m, khu vực trồng có lớp thảm mục dày, các cây sâm được trồng trên luống, cây cách cây 10 cm, hàng cách hàng 10 cm.

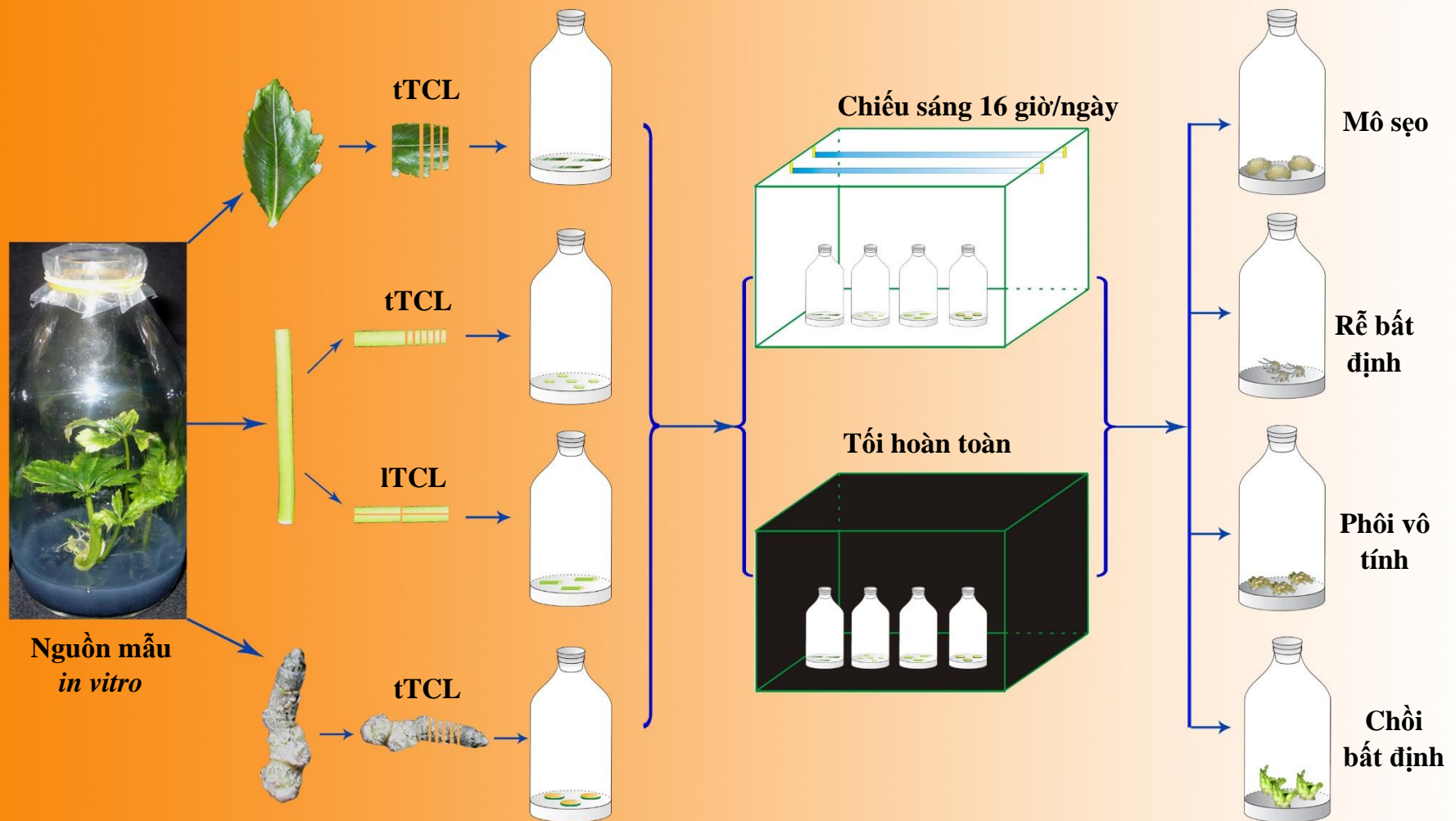
2.7. Thời gian và địa điểm thực hiện đề tài nghiên cứu

- Thí nghiệm 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 và tạo cây con hoàn chỉnh được tiến hành tại Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên - Lâm Đồng.

- Thí nghiệm 09 và 10 được tiến hành tại Vườn Quốc gia Bidoup - Núi Bà - Lâm Đồng và vườn Sâm Tắc Ngo - xã Trà Linh, huyện Nam Trà My, tỉnh Quảng Nam.

- Thí nghiệm 11 và 12 được tiến hành tại Trung tâm Sâm và Dược liệu TP Hồ Chí Minh.

- Thời gian thực hiện từ tháng 08/2012 - 12/2016.



Hình 2.1. Sơ đồ mô tả quá trình phát sinh hình thái của cây Sâm Ngọc Linh thông qua kỹ thuật nuôi cấy lớp mỏng tế bào

CHƯƠNG III

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1.1. Nghiên cứu quá trình phát sinh hình thái từ các nguồn mẫu khác nhau

3.1.1.1. Ảnh hưởng của CDHSTTV riêng lẻ lên sự phát sinh hình thái của mẫu lá tTCL_L trong điều kiện chiếu sáng và tối hoàn toàn

Lớp mỏng mẫu lá tTCL_L *in vitro* được nuôi cấy trong môi trường bổ sung CDHSTTV riêng lẻ. Sau 10 tuần nuôi cấy, kết quả được quan sát và ghi nhận thể hiện trong bảng 3.1; 3.2 và hình 3.1; 3.2.

Bảng 3.1. Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng riêng lẻ lên sự phát sinh hình thái của mẫu lá tTCL_L trong điều kiện chiếu sáng 16 giờ/ngày

CDHST TV	Nồng độ (mg/l)	Phôi (%)	Mô sẹo (%)	Rễ (%)	Số rễ/mẫu	Đặc điểm
ĐC	0	0 e	0 d	0 e	0 e	Mẫu chết
TDZ	0,01	0 e	0 d	0 e	0 e	Mẫu chết
TDZ	0,05	0 e	0 d	0 e	0 e	Mẫu chết
TDZ	0,1	0 e	0 d	0 e	0 e	Mẫu chết
TDZ	0,2	0 e	0 d	0 e	0 e	Mẫu chết
TDZ	0,5	0 e	0 d	0 e	0 e	Mẫu chết
TDZ	1,0	0 e	0 d	0 e	0 e	Mẫu chết
BA	0,1	0 e	0 d	0 e	0 e	Mẫu sống nhưng không cảm ứng
BA	0,2	0 e	0 d	0 e	0 e	Mẫu sống nhưng không cảm ứng
BA	0,5	0 e	0 d	0 e	0 e	Mẫu sống nhưng không cảm ứng
BA	1,0	0 e	0 d	0 e	0 e	Mẫu sống nhưng không cảm ứng
BA	2,0	0 e	0 d	0 e	0 e	Mẫu sống nhưng không cảm ứng
2,4-D	0,1	0 e	0 d	0 e	0 e	Mẫu chết
2,4-D	0,2	43,3 d	0 d	0 e	0 e	Số lượng phôi ít, hình cầu

2,4-D	0,5	70,6 b	44,4 c	0 e	0 e	Số lượng phôi ít có dạng hình cầu, tim và 2 lá mầm
2,4-D	1,0	86,3 a	97,7 a	42,1 b	2,86 a	Mô sẹo có màu nâu, cứng Phôi tạo thành cụm
2,4-D	2,0	49,6 c	76,6 b	9,9 d	1,06 c	Mô sẹo có màu trắng, nâu, cứng. Số lượng phôi ít
NAA	0,1	0 e	0 d	0 e	0 e	Mẫu chết
NAA	0,2	0 e	0 d	0 e	0 e	Mẫu chết
NAA	0,5	0 e	0 d	0 e	0 e	Mẫu chết
NAA	1,0	70,0 b	74,4 b	26,6 c	0,64 d	Phôi dạng hình tim, cầu Rễ ít, ngắn Mô sẹo có màu nâu đen
NAA	2,0	89,0 a	97,7 a	63,3 a	2,59 b	Phôi hình tim, cầu, lá mầm và thủy lồi Rễ màu trắng, ngắn Mô sẹo có màu nâu đen

Ghi chú: Những chữ cái khác nhau (a, b, ...) được nêu trong cùng một cột biểu diễn sự khác nhau có ý nghĩa với $\alpha = 0,05$ trong Duncan's test.

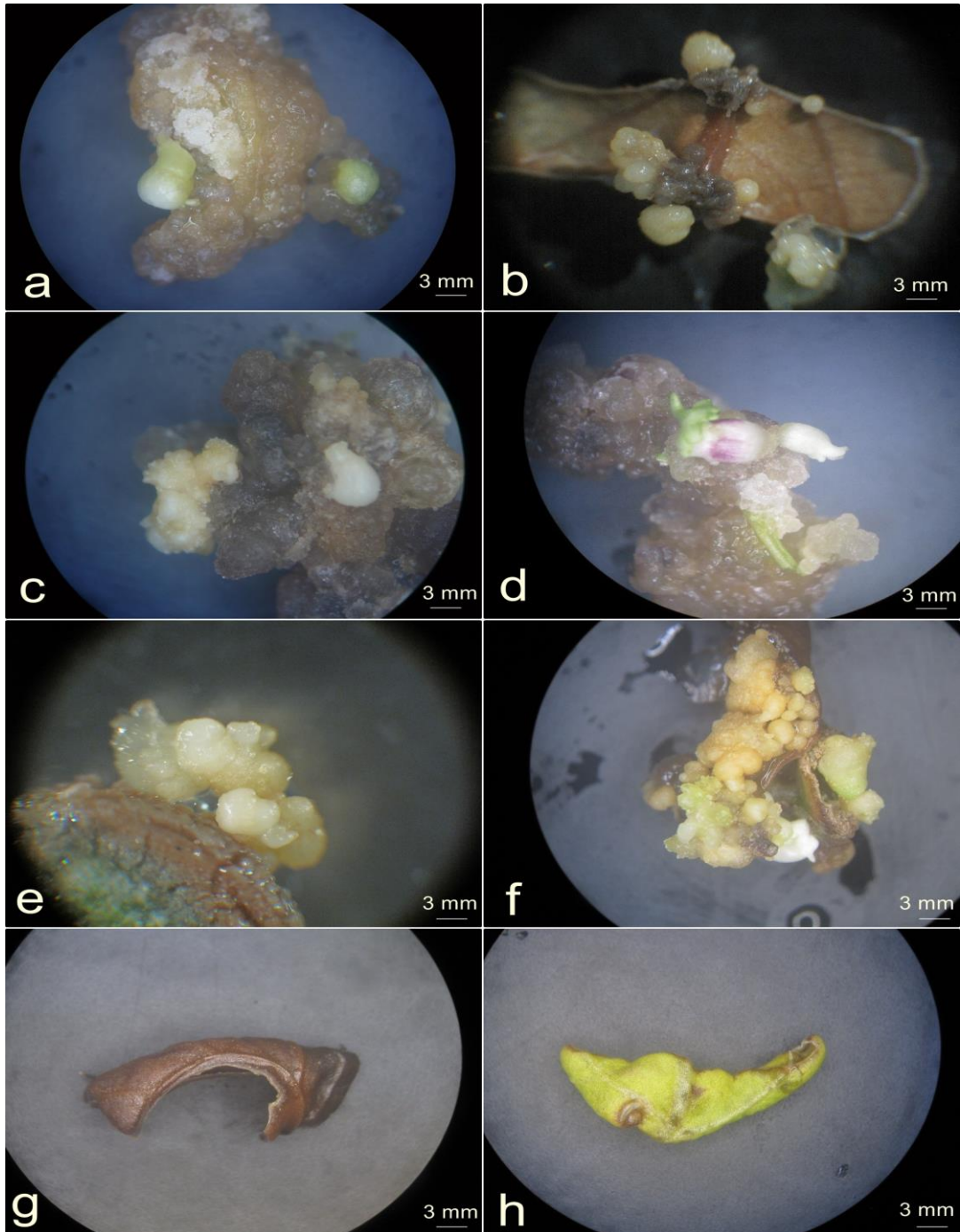
Kết quả nuôi cấy trong điều kiện chiếu sáng và tối hoàn toàn cho thấy, trên môi trường đối chứng (không bổ sung CĐHSTTV) và môi trường bổ sung TDZ, BA ở các nồng độ khác nhau, tất cả mẫu lá tTCL_L đều chết hoặc mẫu sống nhưng không cảm ứng (Bảng 3.1 và Bảng 3.2). Như vậy, môi trường bổ sung TDZ và BA không thích hợp cho sự phát sinh hình thái của mẫu lá tTCL_L. Trong khi đó, nồng độ 2,4-D và NAA bổ sung riêng lẻ vào môi trường thì mẫu lá tTCL_L cho các kiểu phát sinh hình thái là phôi, mô sẹo hay rễ.

Trong điều kiện chiếu sáng, sau 10 tuần nuôi cấy, kết quả thu được cho thấy, mẫu lá tTCL_L khi được nuôi cấy trên môi trường có bổ sung 2,4-D và NAA ở nồng độ 1 - 2 mg/l cho sự phát sinh cả phôi, mô sẹo và rễ. Tỷ lệ phát sinh phôi trực tiếp cao nhất (89,0%) được ghi nhận khi mẫu lá tTCL_L được nuôi cấy trên môi trường có bổ sung 2 mg/l NAA (Hình 3.1f). Phôi hình thành có dạng hình cầu, hình tim, hình thủy lồi và cả lá mầm. Mô sẹo hình thành có dạng xốp, cứng, màu trắng trong và màu nâu đen được quan sát trên môi trường MS có bổ sung NAA hoặc 2,4-D. Rễ phát sinh từ mẫu trên cả môi trường có bổ sung 2,4-D và NAA đều có màu trắng trong, mảnh và phân nhánh.

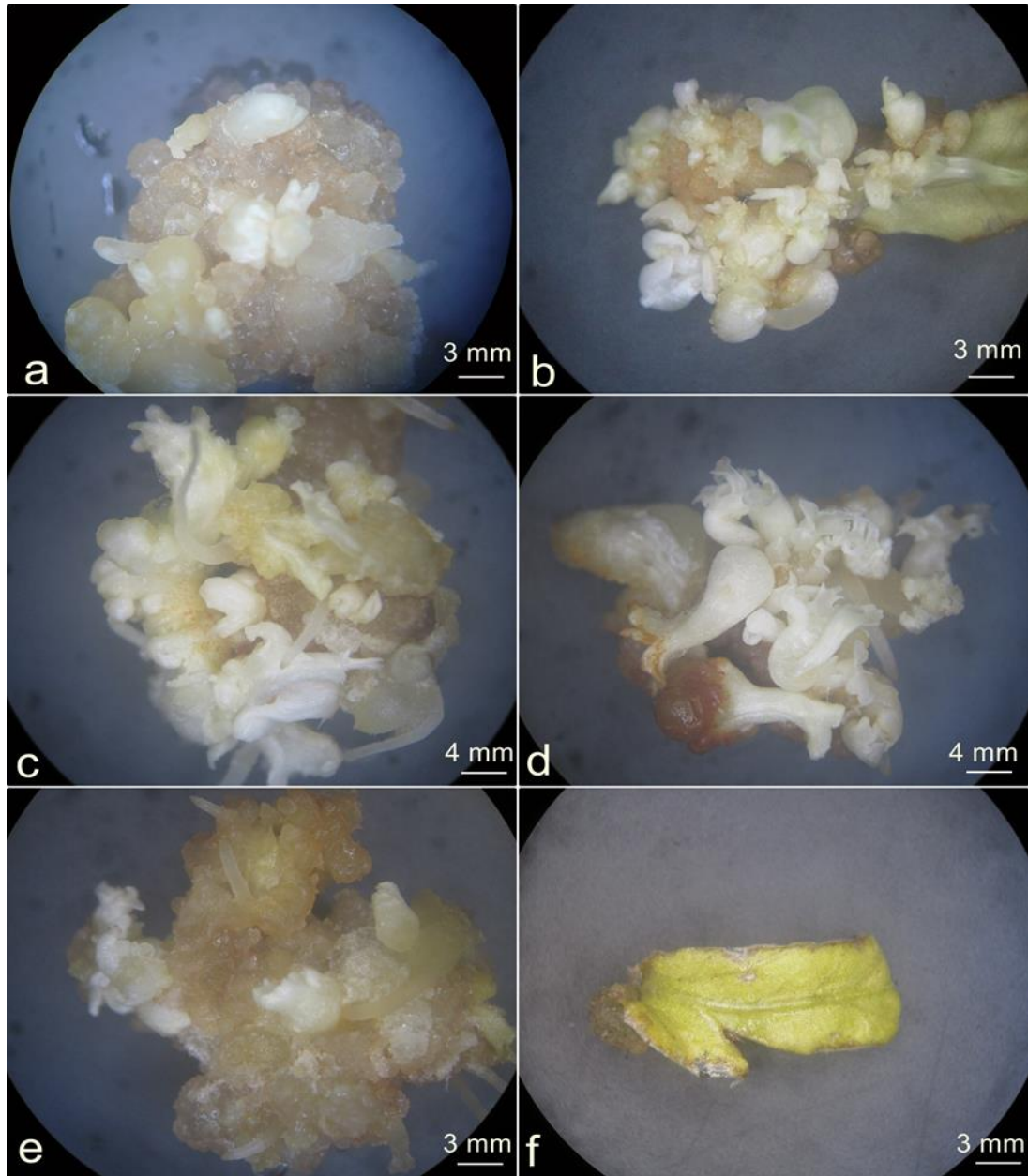
Bảng 3.2. Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng riêng lẻ lên sự phát sinh hình thái của mẫu lá tTCL_L trong điều kiện tối hoàn toàn

CDHSTTV	Nồng độ (mg/l)	Phôi (%)	Mô sẹo (%)	Rễ (%)	Số rễ/mẫu	Đặc điểm
ĐC	0	0 f	0 d	0 d	0 d	Mẫu chết
TDZ	0,01	0 f	0 d	0 d	0 d	Mẫu chết
TDZ	0,05	0 f	0 d	0 d	0 d	Mẫu chết
TDZ	0,1	0 f	0 d	0 d	0 d	Mẫu chết
TDZ	0,2	0 f	0 d	0 d	0 d	Mẫu chết
TDZ	0,5	0 f	0 d	0 d	0 d	Mẫu chết
TDZ	1,0	0 f	0 d	0 d	0 d	Mẫu chết
BA	0,1	0 f	0 d	0 d	0 d	Mẫu sống, không cảm ứng
BA	0,2	0 f	0 d	0 d	0 d	Mẫu sống, không cảm ứng
BA	0,5	0 f	0 d	0 d	0 d	Mẫu sống, không cảm ứng
BA	1,0	0 f	0 d	0 d	0 d	Mẫu sống, không cảm ứng
BA	2,0	0 f	0 d	0 d	0 d	Mẫu sống, không cảm ứng
2,4-D	0,1	37,6 e	0 d	0 d	0 d	Phôi hình cầu, hình tim
2,4-D	0,2	84,3 b	39,9 b	0 d	0 d	Phôi hình cầu, hình tim, hai lá mầm
2,4-D	0,5	71,6 c	96,6 a	73,3 b	2,74 b	Phôi hình cầu, hình tim, hai lá mầm Rễ màu trắng trong
2,4-D	1,0	92,0 a	98,8 a	79,9 a	2,87 a	Phôi hình cầu, hình tim, hai lá mầm. Rễ màu trắng
2,4-D	2,0	47,3 d	97,7 a	57,7 c	2,63 c	Mô sẹo màu trắng, vàng. Phôi ít, rễ màu trắng
NAA	0,1	0 f	0 d	0 d	0 d	Mẫu chết
NAA	0,2	0 f	0 d	0 d	0 d	Mẫu chết
NAA	0,5	0 f	0 d	0 d	0 d	Mẫu chết
NAA	1,0	0 f	0 d	0 d	0 d	Mẫu chết
NAA	2,0	0 f	13,3 c	0 d	0 d	Mô sẹo màu vàng rất ít, mọc ở mép ngoài của lá

Ghi chú: Những chữ cái khác nhau (a, b, ...) được nêu trong cùng một cột biểu diễn sự khác nhau có ý nghĩa với $\alpha = 0,05$ trong Duncan's test.



Hình 3.1. Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng riêng lẻ lên sự phát sinh hình thái của mẫu lá tTCL_L trong điều kiện chiếu sáng 16 giờ/ngày. a. 0,2 mg/l 2,4-D; b. 0,5 mg/l 2,4-D; c. 1,0 mg/l 2,4-D; d. 1,0 mg/l 2,4-D; e. 1,0 mg/l NAA; f. 2,0 mg/l NAA; g. TDZ; h. BA.



Hình 3.2. Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng riêng lẻ lên sự phát sinh hình thái của mẫu lá tTCL_L trong điều kiện tối hoàn toàn. a. 0,1 mg/l 2,4-D; b. 0,2 mg/l 2,4-D; c. 0,5 mg/l 2,4-D; d. 1,0 mg/l 2,4-D; e. 2,0 mg/l 2,4-D; f. 2,0 mg/l NAA.

Ở điều kiện nuôi cấy trong tối hoàn toàn mẫu lá tTCL_L phát sinh cả phôi, mô sẹo và rễ trên môi trường bổ sung 2,4-D ở nồng độ từ 0,5 - 2 mg/l (Bảng 3.2, Hình 3.2 c, d, e). Khi bổ sung 2,4-D nồng độ thấp từ 0,1 - 0,2 mg/l thì chỉ phát sinh phôi hoặc phát sinh thêm mô sẹo. Trong khi đó, tỷ lệ mẫu tạo phôi cao nhất 92% ở nồng độ 1 mg/l 2,4-D trong điều kiện tối (Hình 3.2 d) nhưng số phôi hình thành cao nhất lại thu được ở nồng độ 0,2 mg/l 2,4-D (Hình 3.2 b).

Khi bổ sung NAA vào môi trường nuôi cấy ở nồng độ thấp (0,1 - 1 mg/l) trong điều kiện tối thì mẫu chết, nhưng khi tăng nồng độ 2 mg/l NAA kết quả cho thấy tỷ lệ mẫu phát sinh mô sẹo (13,3%) và không quan sát thấy sự phát sinh phôi và rễ.

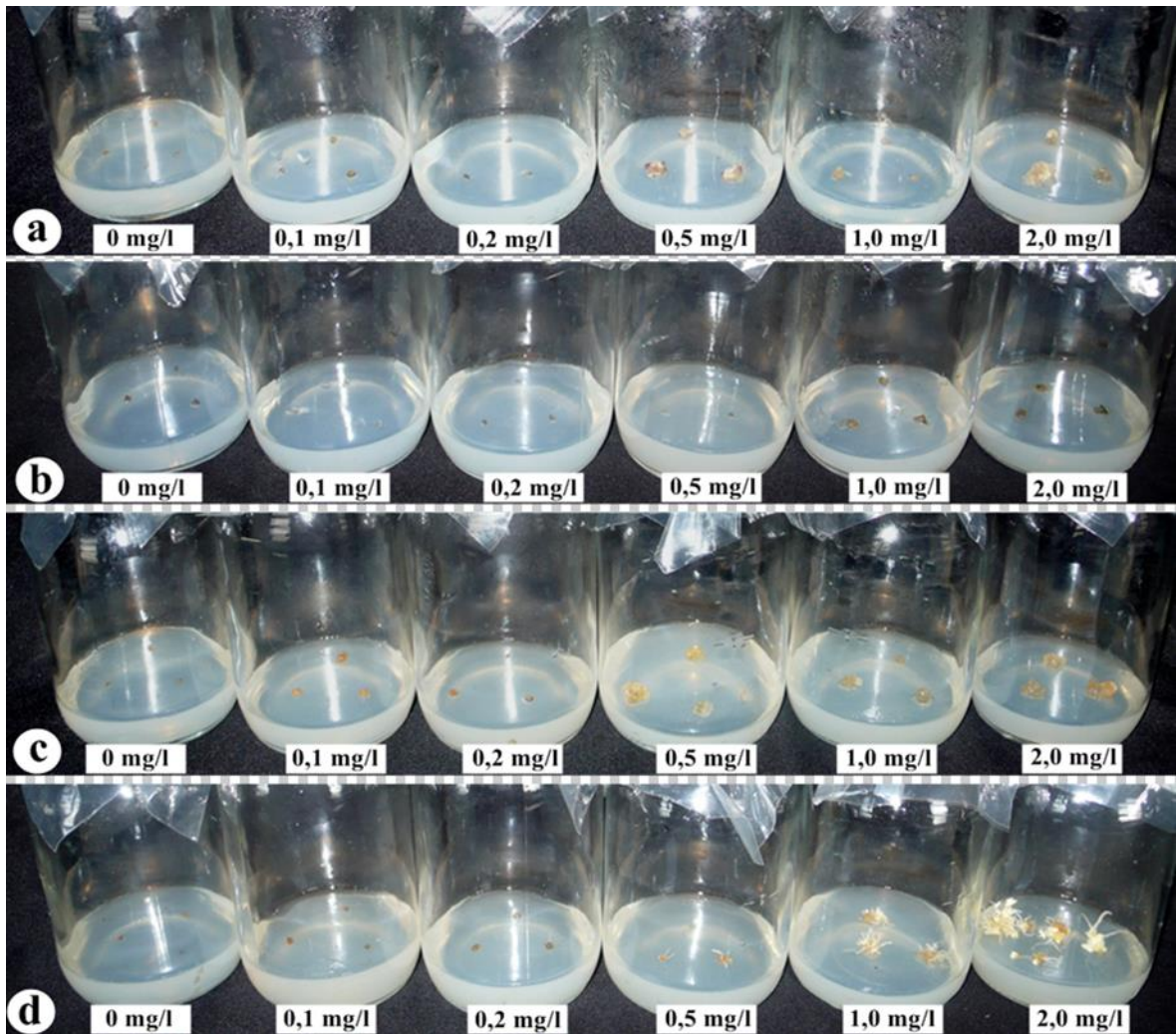
3.1.1.2. Ảnh hưởng của CDHSTTV riêng lẻ lên sự phát sinh hình thái của mẫu cuống lá tTCL_C trong điều kiện chiếu sáng và tối hoàn toàn

Sau 10 tuần nuôi cấy, các chỉ tiêu về phát sinh hình thái được trình bày trong bảng 3.3 và hình 3.3.

Bảng 3.3. Ảnh hưởng của CDHSTTV riêng lẻ lên sự phát sinh hình thái của mẫu cuống lá tTCL_C trong điều kiện chiếu sáng 16 giờ/ngày và trong điều kiện tối hoàn toàn.

CDH STTV	Nồng độ (mg/l)	Mô sẹo (%)	Mô sẹo (%)	Rễ (%)	Số rễ/mẫu	Đặc điểm
		Sáng	Tối			
ĐC	0	0 e	0 e	0 d	0 d	Mẫu chết
TDZ	0,01	0 e	0 e	0 d	0 d	Mẫu chết
TDZ	0,05	0 e	0 e	0 d	0 d	Mẫu chết
TDZ	0,1	0 e	0 e	0 d	0 d	Mẫu chết
TDZ	0,2	0 e	0 e	0 d	0 d	Mẫu chết
TDZ	0,5	0 e	0 e	0 d	0 d	Mẫu chết
TDZ	1,0	0 e	0 e	0 d	0 d	Mẫu chết
BA	0,1	0 e	0 e	0 d	0 d	Mẫu chết
BA	0,2	0 e	0 e	0 d	0 d	Mẫu chết
BA	0,5	0 e	0 e	0 d	0 d	Mẫu chết
BA	1,0	0 e	0 e	0 d	0 d	Mẫu chết
BA	2,0	0 e	0 e	0 d	0 d	Mẫu chết
2,4-D	0,1	0 e	0 e	0 d	0 d	Mẫu chết
2,4-D	0,2	0 e	0 e	0 d	0 d	Mẫu chết
2,4-D	0,5	0 e	83,3 a	0 d	0 d	Mô sẹo màu vàng, xốp
2,4-D	1,0	16,6 d	63,3 b	0 d	0 d	Mô sẹo màu vàng, xốp
2,4-D	2,0	63,3 c	33,3 d	0 d	0 d	Mô sẹo màu nâu
NAA	0,1	0 e	0 e	0 d	0 d	Mẫu chết
NAA	0,2	0 e	0 e	0 d	0 d	Mẫu chết
NAA	0,5	0 e	0 e	31,3 c	2,0 c	Rễ ngắn, màu trắng
NAA	1,0	86,6 a	0 e	75,5 b	6,4 b	Mô sẹo màu đen, ít. Rễ màu trắng, phân nhánh
NAA	2,0	76,6 b	46,6 c	89,9 a	15,5 a	Mô sẹo màu vàng, ít. Rễ nhiều, màu trắng, phân nhánh

Ghi chú: Những chữ cái khác nhau (a, b, ...) được nêu trong cùng một cột biểu diễn sự khác nhau có ý nghĩa với $\alpha = 0,05$ trong Duncan's test.



Hình 3.3. Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng riêng lẻ lên sự phát sinh hình thái của mẫu cuống lá tTCL_C. a. 2,4-D trong điều kiện chiếu sáng 16 giờ/ngày; b. NAA trong điều kiện chiếu sáng 16 giờ/ngày; c. 2,4-D trong điều kiện tối hoàn toàn; d. NAA trong điều kiện tối hoàn toàn.

Cuống lá tTCL_C không phát sinh phôi khi nuôi cấy trên môi trường với các CDHSTTV được khảo sát dưới cả điều kiện sáng và tối hoàn toàn. Cuống lá tTCL_C phát sinh mô sẹo khi được nuôi cấy trên môi trường có bổ sung 1 - 2 mg/l 2,4-D hoặc NAA dưới điều kiện sáng. Trong đó, tỷ lệ phát sinh mô sẹo cao nhất 86,6% trên môi trường có bổ sung 1 mg/l NAA nhưng mô sẹo hóa đen sau đó thì chết (Hình 3.3 b), ngược lại cũng ở nồng độ này thì các mẫu nuôi trong điều kiện tối không cho sự phát sinh mô sẹo mà lại cho sự hình thành rễ. Mẫu được nuôi cấy trong môi trường có bổ sung 2 mg/l NAA trong điều kiện chiếu sáng cho sự phát sinh mô sẹo còn trong điều kiện tối phát sinh cả mô sẹo và rễ (tỷ lệ mẫu tạo rễ 89,9 %). Mô sẹo phát sinh cao nhất 83,3% trên môi trường bổ sung 0,5 mg/l 2,4-D ở điều kiện tối. Mô sẹo hình thành trên các môi trường có 2,4-D hoặc NAA ở cả điều kiện tối và sáng, mô sẹo xộp có

màu vàng nhạt, màu nâu và màu đen. Nhưng cũng ở điều kiện sáng và tối hoàn toàn thì lại không cho sự phát sinh phôi. Mẫu được nuôi cấy trên môi trường có BA, TDZ hoặc không bổ sung CDHSTTV không cảm ứng phát sinh các dạng hình thái. Mẫu cuống lá tTCL_C khi được nuôi cấy trên môi trường có bổ sung 2,4-D hoặc NAA ở nồng độ cao (1 - 2 mg/l) dưới điều kiện tối hoàn toàn cho khả năng phát sinh hình thái tương tự như dưới điều kiện sáng. Sự phát sinh rễ được quan sát thấy ở các mẫu được nuôi cấy trên môi trường có bổ sung 0,5 - 2 mg/l NAA (Bảng 3.3, hình 3.3 d).

3.1.1.3. Ảnh hưởng của CDHSTTV riêng lẻ lên sự phát sinh hình thái của mẫu cuống lá ITCL_C trong điều kiện chiếu sáng và tối hoàn toàn

Các chỉ tiêu được ghi nhận sau 10 tuần nuôi cấy thể hiện qua bảng 3.4, 3.5 và hình 3.4, 3.5.

Bảng 3.4. Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng riêng lẻ lên sự phát sinh hình thái của mẫu cuống lá ITCL_C trong điều kiện chiếu sáng 16 giờ/ngày

CDHSTTV	Nồng độ (mg/l)	Phôi (%)	Mô sẹo (%)	Rễ (%)	Số rễ/mẫu	Đặc điểm
ĐC	0	0 e	0 e	0 f	0 c	Mẫu chết
TDZ	0,01	0 e	0 e	0 f	0 c	Mẫu chết
TDZ	0,05	0 e	0 e	0 f	0 c	Mẫu chết
TDZ	0,1	0 e	0 e	0 f	0 c	Mẫu chết
TDZ	0,2	0 e	0 e	0 f	0 c	Mẫu chết
TDZ	0,5	0 e	0 e	0 f	0 c	Mẫu chết
TDZ	1,0	0 e	0 e	0 f	0 c	Mẫu chết
BA	0,1	0 e	0 e	0 f	0 c	Mẫu chết
BA	0,2	0 e	0 e	0 f	0 c	Mẫu chết
BA	0,5	0 e	0 e	0 f	0 c	Mẫu chết
BA	1,0	0 e	0 e	0 f	0 c	Mẫu chết
BA	2,0	0 e	0 e	0 f	0 c	Mẫu chết
2,4-D	0,1	0 e	0 e	0 f	0 c	Mẫu chết
2,4-D	0,2	23 d	24,4 d	25,6 d	0,8 c	Phôi ít. Mô sẹo màu nâu đen và cứng
2,4-D	0,5	59,6 c	89,9 b	79,9 a	4,7 ab	Phôi tạo thành cụm, hình cầu, hình tim, hai lá mầm

						Mô sẹo màu nâu và vàng, cứng. Rễ dài, màu xanh
2,4-D	1,0	86,3 a	97,7 a	85,5 a	6,2 a	Phôi nhiều, hình cầu, hình tim, hai lá mầm và thùy lõi Mô sẹo có màu nâu. Rễ nhiều, có màu hơi vàng
2,4-D	2,0	69,6 b	98,8 a	71 b	4,0 b	Phôi chỉ phát sinh ở hai đầu cuống lá, hình tim, hình cầu Mô sẹo có màu nâu, cứng Rễ màu trắng trong, ít
NAA	0,1	0 e	0 e	0 f	0 c	Mẫu chết
NAA	0,2	0 e	0 e	0 f	0 c	Mẫu chết
NAA	0,5	0 e	0 e	0 f	0 c	Mẫu chết
NAA	1,0	58,6 c	84,4 c	10,6 e	3,1 b	Mô sẹo nhiều, màu tím đặc trưng. Phôi có màu tím, trắng, mọc thành cụm
NAA	2,0	84,0 a	96,6 a	37,7 c	4,0 b	Phôi có màu hơi ngả vàng, dạng hình cầu, hình tim Mô sẹo màu nâu đen, ít

Ghi chú: Những chữ cái khác nhau (a, b, ...) được nêu trong cùng một cột biểu diễn sự khác nhau có ý nghĩa với $\alpha = 0,05$ trong Duncan's test.

Bảng 3.5. Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng riêng lẻ lên sự phát sinh hình thái của mẫu cuống lá ITCL_C trong điều kiện tối hoàn toàn

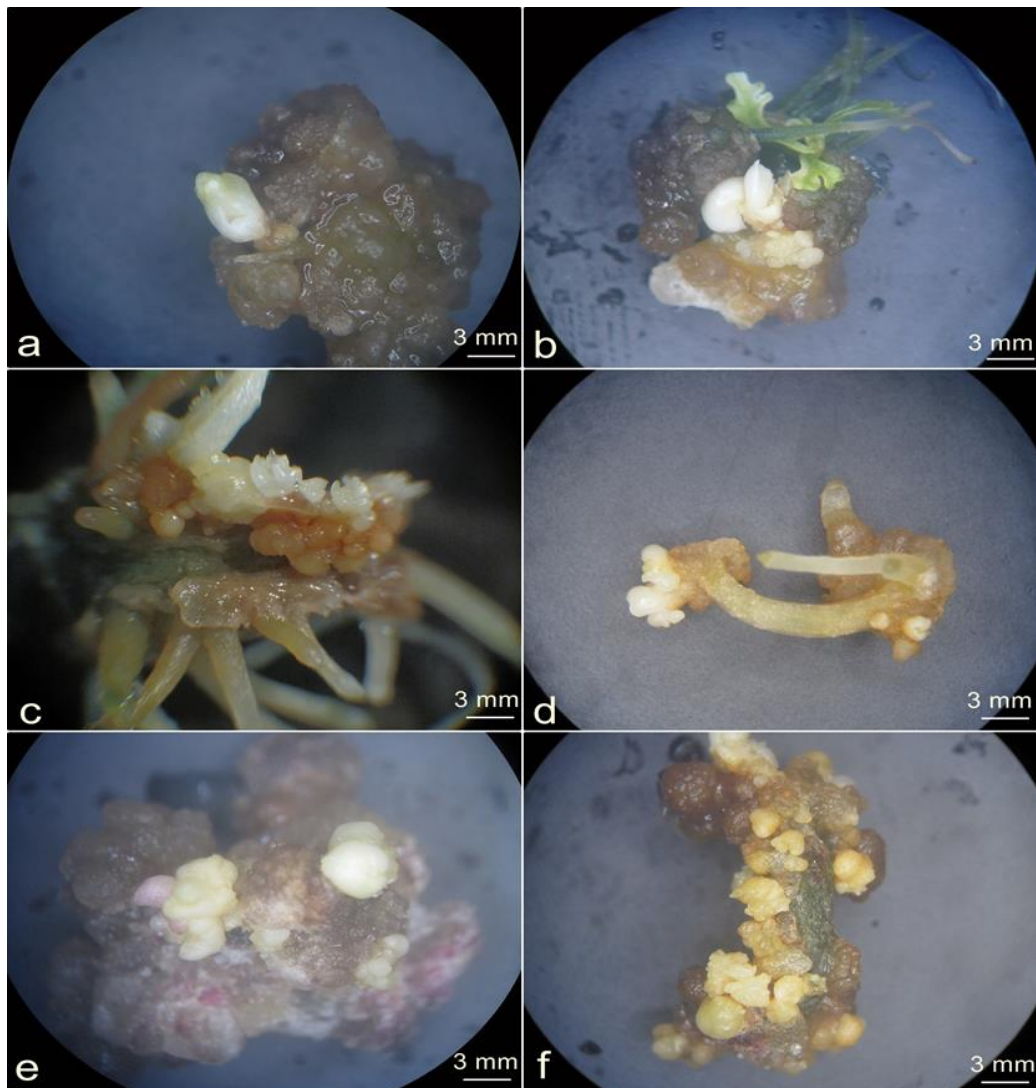
CĐHSTTV	Nồng độ (mg/l)	Phôi (%)	Mô sẹo (%)	Rễ (%)	Số rễ/mẫu	Đặc điểm
ĐC	0	0 c	0 e	0 g	0 f	Mẫu chết
TDZ	0,01	0 c	0 e	0 g	0 f	Mẫu chết
TDZ	0,05	0 c	0 e	0 g	0 f	Mẫu chết
TDZ	0,1	0 c	0 e	0 g	0 f	Mẫu chết
TDZ	0,2	0 c	0 e	0 g	0 f	Mẫu chết
TDZ	0,5	0 c	0 e	0 g	0 f	Mẫu chết
TDZ	1,0	0 c	0 e	0 g	0 f	Mẫu chết
BA	0,1	0 c	0 e	0 g	0 f	Mẫu chết
BA	0,2	0 c	0 e	0 g	0 f	Mẫu chết

BA	0,5	0 c	0 e	0 g	0 f	Mẫu chết
BA	1,0	0 c	0 e	0 g	0 f	Mẫu chết
BA	2,0	0 c	0 e	0 g	0 f	Mẫu chết
2,4-D	0,1	0 c	46,6 d	11,0 f	0,34 ef	Mô sẹo có cấu trúc giống phôi. Rễ ít, màu vàng
2,4-D	0,2	0 c	67,7 c	35,5 de	0,91 d	Mô sẹo nhiều, màu trắng và vàng. Rễ màu trắng
2,4-D	0,5	49,6 b	84,4 b	41,1 cd	0,51 e	Phôi ít, có dạng hình cầu. Mô sẹo màu nâu. Rễ ít, ngắn
2,4-D	1,0	69,6 a	94,4 a	46,6 c	1,87 c	Mô sẹo màu trắng, xốp. Rễ trắng và trong. Phôi ít
2,4-D	2,0	0 c	0 e	0 g	0 f	Mẫu chết
NAA	0,1	0 c	0 e	0 g	0 f	Mẫu chết
NAA	0,2	0 c	0 e	0 g	0 f	Mẫu chết
NAA	0,5	0 c	0 e	31,1 e	0,94 d	Rễ ít, màu trắng
NAA	1,0	0 c	45,5 d	61,1 b	6,09 b	Mô sẹo ít có màu vàng Rễ ngắn, màu trắng đục
NAA	2,0	0 c	81 b	94,4a	19,2 a	Mô sẹo ít có màu vàng Rễ ngắn, nhiều có màu trắng đục

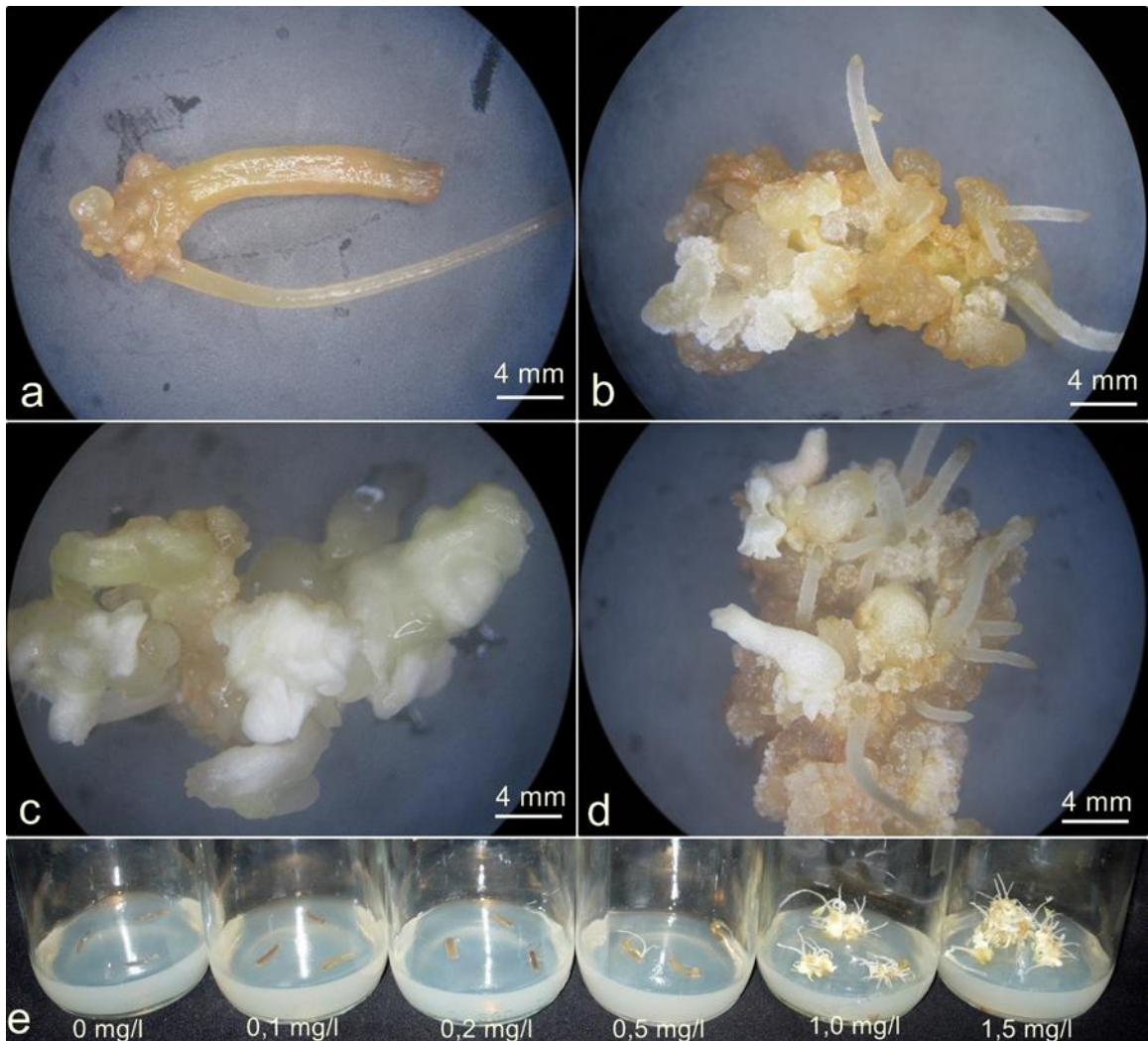
Ghi chú: Những chữ cái khác nhau (a, b, ...) được nêu trong cùng một cột biểu diễn sự khác nhau có ý nghĩa với $\alpha = 0,05$ trong Duncan's test.

Trong điều kiện chiếu sáng các mẫu được nuôi cấy trên môi trường có bổ sung 0,2 - 2 mg/l 2,4-D hoặc 2 mg/l NAA thì có sự phát sinh phôi, mô sẹo và rễ (Bảng 3.4, hình 3.4 b, c, d, e và f), mô sẹo hình thành cứng, có màu trắng đục. Các dạng hình thái phôi, rễ và mô sẹo cũng được ghi nhận trên môi trường có bổ sung 0,5 - 1 mg/l 2,4-D dưới điều kiện tối hoàn toàn, phôi ít, mô sẹo tạo thành có màu trắng hoặc màu nâu. Tuy nhiên, trong điều kiện sáng tỷ lệ mẫu tạo phôi tương đối cao, đạt 86,3% ở môi trường có bổ sung 1 mg/l 2,4-D (Hình 3.4 c), phôi thu được có dạng hình cầu, hình tim, hình thủy lôi và cả phôi lá mầm. Cũng trong điều kiện chiếu sáng mẫu được nuôi cấy trên môi trường có bổ sung 1 mg/l NAA cho sự phát sinh phôi và mô sẹo mà không có sự hình thành rễ, ở nồng độ 2 mg/l NAA lại có sự phát sinh mô sẹo, rễ và phôi (tỷ lệ mẫu tạo phôi là 84,0%) (Hình 3.4 f), phôi thu được cũng có dạng hình

cầu và hình tim. Còn trong điều kiện tối thì ở nồng độ 2 mg/l NAA chỉ cho sự phát sinh mô sẹo và rễ (tỷ lệ mẫu tạo rễ/số rễ đạt cao nhất 94,4%/19,2 rễ) (Bảng 3.5). Môi trường có bổ sung 0,1 - 0,2 mg/l 2,4-D, 1 mg/l NAA dưới điều kiện tối hoàn toàn thì cho sự hình thành rễ hoặc sự phát sinh mô sẹo (Bảng 3.5), mô sẹo có cấu trúc giống phôi có màu trắng và vàng, rễ ít cũng có màu trắng và vàng. Như vậy, đối với mẫu cuống lá ITCL_C cấy trên môi trường có bổ sung 1 mg/l 2,4-D trong điều kiện chiếu sáng cho tỷ lệ tạo phôi và mô sẹo đạt tốt nhất (Bảng 3.4), còn ở môi trường có bổ sung 2 mg/l NAA trong điều kiện tối cho sự hình thành rễ cao nhất. Rễ phát sinh từ mẫu trên cả môi trường có bổ sung 2,4-D và NAA đều có màu trắng trong, mảnh và phân nhánh.



Hình 3.4. Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng riêng lẻ lên sự phát sinh hình thái của mẫu cuống lá ITCL_C trong điều kiện chiếu sáng 16 giờ/ngày. a. 0,2 mg/l 2,4-D; b. 0,5 mg/l 2,4-D; c. 1,0 mg/l 2,4-D; d. 2,0 mg/l 2,4-D; e. 1,0 mg/l NAA; f. 2,0 mg/l NAA.



Hình 3.5. Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng riêng lẻ lên sự phát sinh hình thái của mẫu cuống lá ITCL_C trong điều kiện tối. a. 0,1 mg/l 2,4-D; b. 0,2 mg/l 2,4-D; c. 0,5 mg/l 2,4-D; d. 1,0 mg/l 2,4-D; e. 0 - 2 mg/l NAA.

3.1.1.4. Ảnh hưởng của CDHSTTV riêng lẻ lên sự phát sinh hình thái của mẫu thân rễ tTCL_R trong điều kiện chiếu sáng và tối hoàn toàn

Sau 10 tuần nuôi cấy, kết quả của thí nghiệm được ghi nhận ở bảng 3.6 và 3.7 và hình 3.6, 3.7. Qua bảng 3.6 và 3.7 cho thấy ở mẫu thân rễ tTCL_R được cấy trên môi trường có bổ sung BA, TDZ hoặc không bổ sung CDHSTTV không phù hợp cho sự phát sinh các dạng hình thái trong cả điều kiện chiếu sáng và tối hoàn toàn.

Sự phát sinh 3 dạng hình thái (phôi, mô sẹo và rễ) được ghi nhận khi mẫu được nuôi cấy trên môi trường có bổ sung 1 - 2 mg/l NAA dưới điều kiện sáng hoặc môi trường có bổ sung 0,2 - 0,5 mg/l 2,4-D dưới điều kiện tối hoàn toàn. Mẫu thân rễ tTCL_R được nhận thấy là phù hợp nhất cho sự phát sinh rễ (98,8%) khi nuôi cấy trên môi trường có bổ sung NAA ở nồng độ 2 mg/l dưới điều kiện tối hoàn toàn và 83,3% trong điều kiện chiếu sáng (Bảng 3.6; 3.7, hình 3.7 e).

Bảng 3.6. Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng riêng lẻ lên sự phát sinh hình thái của mẫu thân rễ tTCL_R trong điều kiện chiếu sáng 16 giờ/ngày

CĐHSTTV	Nồng độ (mg/l)	Phôi (%)	Mô sẹo (%)	Rễ (%)	Số rễ/mẫu	Đặc điểm
ĐC	0	0 g	0 f	0 c	0 c	Mẫu chết
TDZ	0,01	0 g	0 f	0 c	0 c	Mẫu chết
TDZ	0,05	0 g	0 f	0 c	0 c	Mẫu chết
TDZ	0,1	0 g	0 f	0 c	0 c	Mẫu chết
TDZ	0,2	0 g	0 f	0 c	0 c	Mẫu chết
TDZ	0,5	0 g	0 f	0 c	0 c	Mẫu chết
TDZ	1,0	0 g	0 f	0 c	0 c	Mẫu chết
BA	0,1	0 g	0 f	0 c	0 c	Mẫu chết
BA	0,2	0 g	0 f	0 c	0 c	Mẫu chết
BA	0,5	0 g	0 f	0 c	0 c	Mẫu chết
BA	1,0	0 g	0 f	0 c	0 c	Mẫu chết
BA	2,0	0 g	0 f	0 c	0 c	Mẫu chết
2,4-D	0,1	0 g	75,5 c	0 c	0 c	Mô sẹo ít, màu trắng
2,4-D	0,2	31,0 f	87,7 b	0 c	0 c	Mô sẹo nhiều, màu trắng. Phôi rất ít, hình cầu
2,4-D	0,5	57,3 d	89,9 b	0 c	0 c	Mô sẹo nhiều, màu nâu. Phôi mọc thành cụm, hình cầu và hình tim
2,4-D	1,0	79,6 b	97,7 a	0 c	0 c	Mô sẹo nhiều, màu nâu đen. Phôi hình cầu, hình tim, lá mầm
2,4-D	2,0	91,0 a	88,8 b	0 c	0 c	Mô sẹo nhiều, màu nâu đen. Phôi nhiều, hình cầu, hình tim và lá mầm
NAA	0,1	0 g	0 f	0 c	0 c	Mẫu chết
NAA	0,2	71,0 c	0 f	0 c	0 c	Phôi hình cầu, hình tim, hai lá mầm, hình thủy lồi
NAA	0,5	70,6 c	0 f	0 c	0 c	Phôi hình cầu, hình tim, hai lá mầm, hình thủy lồi
NAA	1,0	48,6 e	44,4 e	74,4 b	5,09 b	Phôi hình cầu, hình tim Rễ ít, màu trắng
NAA	2,0	47,3 e	67,7 d	83,3 a	9,24 a	Phôi hình cầu, hai lá mầm Mô sẹo màu hơi vàng. Rễ ngắn, màu trắng

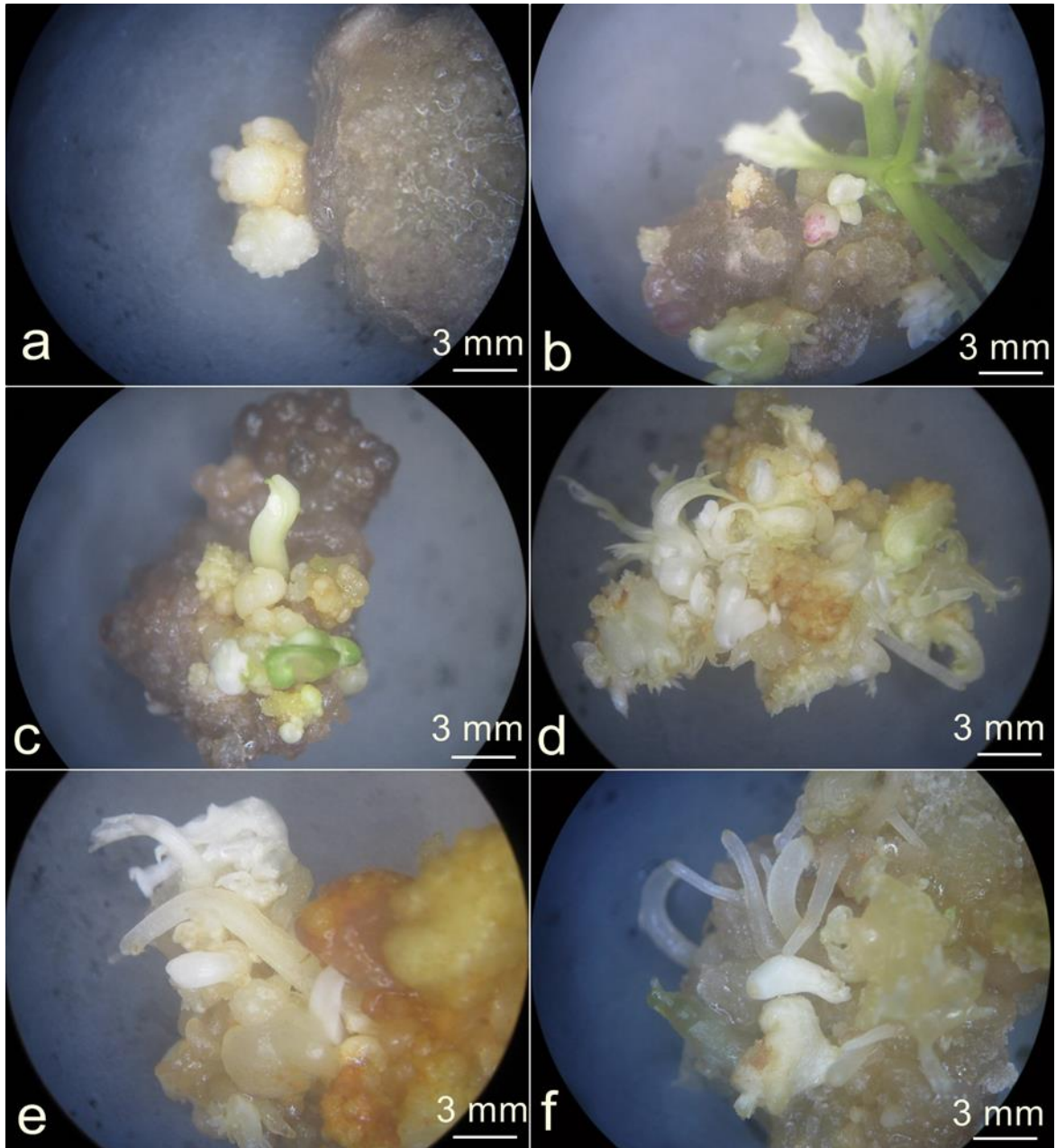
Ghi chú: Những chữ cái khác nhau (a, b, ...) được nêu trong cùng một cột biểu diễn sự khác nhau có ý nghĩa với $\alpha = 0,05$ trong Duncan's test.

Bảng 3.7. Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng riêng lẻ lên sự phát sinh hình thái của mẫu thân rễ tTCL_R trong điều kiện tối hoàn toàn

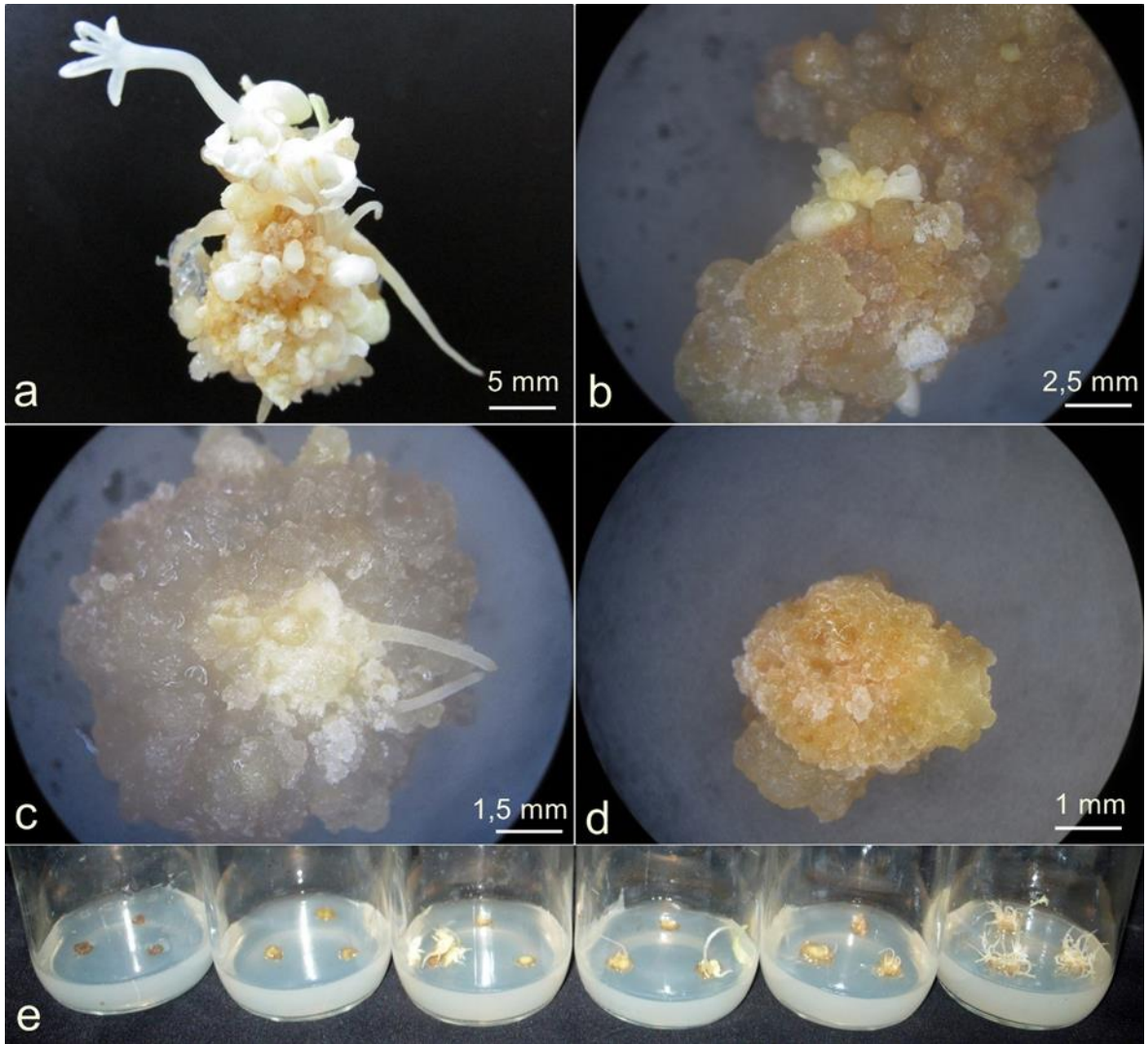
CDHSTTV	Nồng độ (mg/l)	Phôi (%)	Mô sẹo (%)	Rễ (%)	Số rễ/mẫu	Đặc điểm
ĐC	0	0 d	0 f	0 d	0 c	Mẫu chết
TDZ	0,01	0 d	0 f	0 d	0 c	Mẫu chết
TDZ	0,05	0 d	0 f	0 d	0 c	Mẫu chết
TDZ	0,1	0 d	0 f	0 d	0 c	Mẫu chết
TDZ	0,2	0 d	0 f	0 d	0 c	Mẫu chết
TDZ	0,5	0 d	0 f	0 d	0 c	Mẫu chết
TDZ	1,0	0 d	0 f	0 d	0 c	Mẫu chết
BA	0,1	0 d	0 f	0 d	0 c	Mẫu chết
BA	0,2	0 d	0 f	0 d	0 c	Mẫu chết
BA	0,5	0 d	0 f	0 d	0 c	Mẫu chết
BA	1,0	0 d	0 f	0 d	0 c	Mẫu chết
BA	2,0	0 d	0 f	0 d	0 c	Mẫu chết
2,4-D	0,1	56,3 b	41,1 c	0 d	0 c	Phôi hình cầu. Mô sẹo ít, màu vàng
2,4-D	0,2	84,0 a	61 b	24,4 c	0,93 b	Phôi hình cầu, hình tim, hai lá mầm. Mô sẹo màu vàng
2,4-D	0,5	46,3 c	91 a	27,7 c	0,69 bc	Phôi ít. Mô sẹo nhiều, màu vàng
2,4-D	1,0	0 d	95,5 a	44,4 b	0,58 bc	Mô sẹo ở xung quanh màu nâu đen, cứng Rễ ít có màu trắng trong
2,4-D	2,0	0 d	31 d	0 d	0 c	Mô sẹo có màu vàng
NAA	0,1	0 d	0 f	0 d	0 c	Mẫu chuyển màu vàng
NAA	0,2	0 d	0 f	28,2 c	1,28 b	Rễ ngắn, màu trắng
NAA	0,5	0 d	24,4 e	48,8 b	0,59 bc	Rễ ít
NAA	1,0	0 d	0 f	52,2 b	1,37 b	Rễ ít, ngắn, màu vàng
NAA	2,0	0 d	0 f	98,8 a	21,7 a	Rễ nhiều, mảnh, phân nhánh, màu trắng

Ghi chú: Những chữ cái khác nhau (a, b, ...) được nêu trong cùng một cột biểu diễn sự khác nhau có ý nghĩa với $\alpha = 0,05$ trong Duncan's test.

Môi trường có bổ sung 0,2 - 2 mg/l 2,4-D và NAA trong điều kiện chiếu sáng đều cho sự phát sinh phôi. Trong đó, tỷ lệ phát sinh phôi vô tính cao nhất là môi trường bổ sung 2 mg/l 2,4-D (91,0%). Phôi có dạng hình cầu, hình tim và hai lá mầm (Hình 3.6 c), tiếp theo là môi trường bổ sung 0,2 - 0,5 mg/l NAA với tỷ lệ phát sinh phôi tương đương nhau (71,0% - 70,6%). Còn mẫu được nuôi cấy trong môi trường có bổ sung 0,2 mg/l 2,4-D trong điều kiện tối thích hợp cho sự phát sinh phôi (84,0%).



Hình 3.6. Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng riêng lẻ lên sự phát sinh hình thái của mẫu thân rễ tTCL_R trong điều kiện chiếu sáng 16 giờ/ngày. a. 0,5 mg/l 2,4-D; b. 1 mg/l 2,4-D; c. 2 mg/l 2,4-D; d. 0,2 và 0,5 mg/l NAA; e. 1 mg/l NAA; f. 2 mg/l NAA.



Hình 3.7. Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng riêng lẻ lên sự phát sinh hình thái của mẫu thân rễ tTCL_R trong điều kiện tối hoàn toàn. a. 0,2 mg/l 2,4-D; b. 0,5 mg/l 2,4-D; c. 1 mg/l 2,4-D; d. 2 mg/l NAA; e. 0; 0,1; 0,2; 0,5; 1,0 và 2 mg/l NAA từ trái qua phải.

Trong thí nghiệm này tỷ lệ phát sinh mô sẹo cao nhất thu được ở môi trường có bổ sung 1 mg/l 2,4-D trong điều kiện chiếu sáng và tối hoàn toàn (97,7% và 95,5%). Mô sẹo màu nâu đen, dạng cứng. Tuy nhiên, cũng ở nồng độ này thì trong điều kiện chiếu sáng có cả sự phát sinh phôi (Hình 3.6 b).

3.1.1.5. Ảnh hưởng giữa sự kết hợp auxin và cytokinin lên sự phát sinh hình thái của mẫu lá tTCL_L trong điều kiện chiếu sáng và tối hoàn toàn

Mẫu lá tTCL_L của cây sâm Ngọc Linh *in vitro* được đặt trên mặt môi trường bổ sung 2,4-D kết hợp với BA, 2,4-D kết hợp với TDZ và NAA kết hợp với BA ở các nồng độ khác nhau. Kết quả thu được sau 10 tuần nuôi cấy được thể hiện ở bảng 3.8, 3.9, 3.10, 3.11, 3.12, 3.13; hình 3.8, 3.9, 3.10.

Bảng 3.8. Ảnh hưởng sự kết hợp giữa 2,4-D và BA ở các nồng độ khác nhau lên sự phát sinh hình thái của mẫu lá tTCL_L trong điều kiện chiếu sáng 16 giờ/ngày

CDHSTTV (mg/l)		Loại hình thái phát sinh	Đặc điểm
2,4-D	BA	Mô sẹo (%)	
1,0	0,1	100 a	Mô sẹo màu trắng xanh, cứng
1,0	0,2	100 a	Mô sẹo màu trắng xanh, cứng, nhiều
1,0	0,5	100 a	Mô sẹo màu trắng sữa và vàng, xốp
1,0	1,0	93,3 b	Mô sẹo màu vàng xanh, cứng, ít
1,0	2,0	90 c	Mô sẹo màu vàng nhạt, xốp, ít
0,1	1,0	47,7 f	Mô sẹo màu vàng nâu, rất ít
0,2	1,0	60,0 e	Mô sẹo màu xanh và vàng nâu, cứng, rất ít
0,5	1,0	80,0 d	Mô sẹo màu vàng nâu, cứng, ít
2,0	1,0	100 a	Mô sẹo màu trắng sữa và vàng, mềm xốp, nhiều

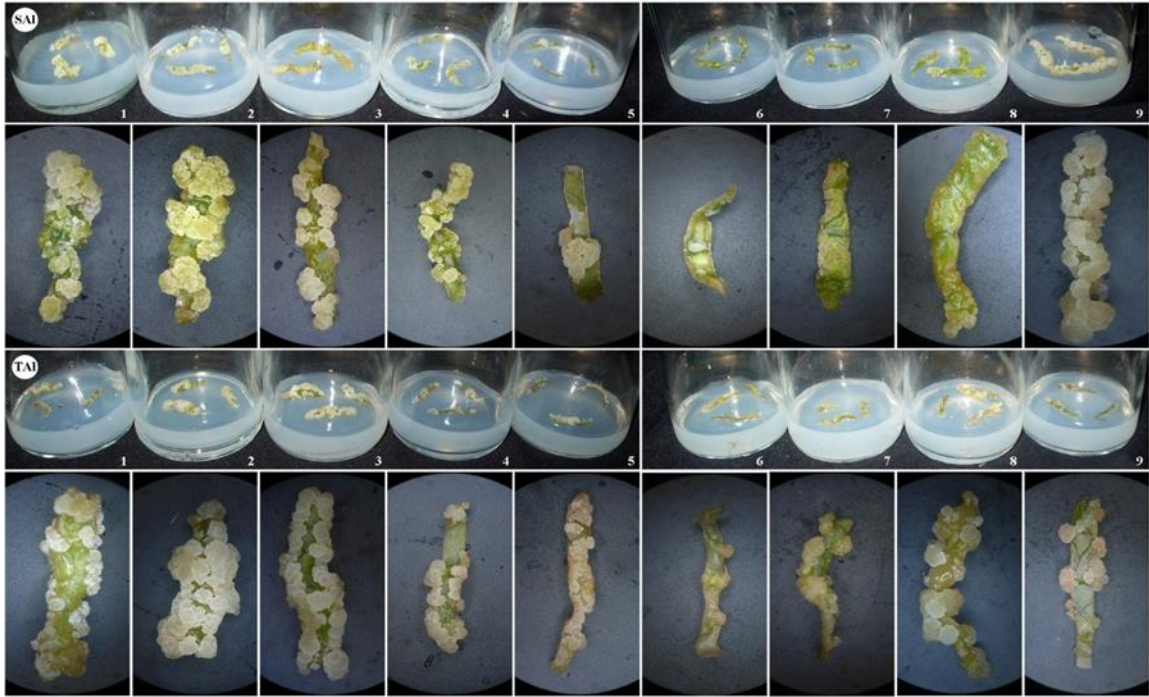
Ghi chú: Những chữ cái khác nhau (a, b, ...) được nêu trong cùng một cột biểu diễn sự khác nhau có ý nghĩa với $\alpha = 0,05$ trong Duncan's test.

Bảng 3.9. Ảnh hưởng sự kết hợp giữa 2,4-D và BA ở các nồng độ khác nhau lên sự phát sinh hình thái của mẫu lá tTCL_L trong điều kiện tối hoàn toàn

CDHSTTV (mg/l)		Loại hình thái phát sinh		Đặc điểm
2,4-D	BA	Mô sẹo (%)	Tạo rễ (%)	
1,0	0,1	100 a	27,3 a	Mô sẹo màu trắng sữa và vàng, xốp
1,0	0,2	100 a	25,5 b	Mô sẹo màu trắng sữa, xốp, nhiều
1,0	0,5	100 a	0 c	Mô sẹo màu trắng sữa và trắng trong, xốp
1,0	1,0	100 a	0 c	Mô sẹo màu trắng sữa và trắng trong, mềm xốp
1,0	2,0	93,3 b	0 c	Mô sẹo màu vàng nâu, mềm, ít
0,1	1,0	73,3 d	0 c	Mô sẹo màu vàng nâu trong, cứng, rất ít
0,2	1,0	80,0 c	0 c	Mô sẹo màu vàng nâu, trong, cứng, ít
0,5	1,0	93,3 b	0 c	Mô sẹo màu trắng sữa và trắng trong, mềm xốp
2,0	1,0	93,3 b	0 c	Mô sẹo màu trắng và đỏ nâu, xốp

Ghi chú: Những chữ cái khác nhau (a, b, ...) được nêu trong cùng một cột biểu diễn sự khác nhau có ý nghĩa với $\alpha = 0,05$ trong Duncan's test.

Qua kết quả thu được sau 10 tuần nuôi cấy cho thấy, mẫu lá tTCL_L được nuôi cấy ở 2 điều kiện chiếu sáng khác nhau đều hình thành mô sẹo, mẫu vẫn giữ nguyên màu xanh, có mẫu phồng lên, tăng kích thước (Bảng 3.8 và 3.9).



Hình 3.8. Ảnh hưởng sự kết hợp giữa 2,4-D và BA ở các nồng độ khác nhau lên sự phát sinh hình thái của mẫu lá tTCL_L. Từ SA1 đến SA5: 1,0 mg/l 2,4-D kết hợp với BA (0,1; 0,2; 0,5; 1,0; 2,0 mg/l); SA6 đến SA9: 1,0 mg/l BA kết hợp với 2,4-D (0,1; 0,2; 0,5; 2,0 mg/l) trong điều kiện chiếu sáng. Từ TA1 đến TA5: 1,0 mg/l 2,4-D kết hợp với BA (0,1; 0,2; 0,5; 1,0; 2,0 mg/l); TA6 đến TA9: 1,0 mg/l BA kết hợp với 2,4-D (0,1; 0,2; 0,5; 2,0 mg/l) trong điều kiện tối hoàn toàn.

Mô sẹo phát sinh chủ yếu ở các vết cắt và ít hơn trên bề mặt mẫu (Hình 3.8). Mẫu nuôi cấy trong điều kiện chiếu sáng và tối hoàn toàn cho tỷ lệ hình thành mô sẹo là tương đương nhau. Nhìn chung, các mẫu nuôi cấy ở môi trường có bổ sung 1,0 mg/l 2,4-D kết hợp với BA ở các nồng độ khác nhau, mô sẹo nhiều và đồng đều hơn các nghiệm thức bổ sung 1,0 mg/l BA kết hợp với 2,4-D ở các nồng độ khác nhau. Tỷ lệ mô sẹo phát sinh cao nhất đạt tới 100% ở các mẫu nuôi cấy trên môi trường có bổ sung 1,0 mg/l 2,4-D kết hợp với 0,1; 0,2; 0,5 mg/l BA và 2,0 mg/l 2,4-D kết hợp với 1,0 mg/l BA trong điều kiện chiếu sáng, còn trong điều kiện tối hoàn toàn tỷ lệ hình thành mô sẹo đạt 100% khi kết hợp 1,0 mg/l 2,4-D với 0,1; 0,2; 0,5; 1,0 mg/l BA, đặc biệt trong tỷ lệ BA thấp cho cả sự hình thành rễ. Trong đó, ở nồng độ 1,0 mg/l 2,4-D và 0,2 mg/l BA có lượng mô sẹo hình thành nhiều nhất, trong điều kiện chiếu sáng mô sẹo có màu trắng xanh, trong điều kiện tối mô sẹo có màu trắng sữa đến vàng xốp, hình thành ở vị trí mép cắt và trên cả bề mặt mẫu. Còn mẫu được nuôi cấy trong

môi trường có bổ sung 1 mg/l BA kết hợp với 0,1 mg/l 2,4-D trong điều kiện sáng tỷ lệ mô sẹo hình thành là thấp nhất 47,7%, mô sẹo màu vàng nâu và ít (Bảng 3.8).

Bảng 3.10. Ảnh hưởng sự kết hợp giữa 2,4-D và TDZ ở các nồng độ khác nhau lên sự phát sinh hình thái của mẫu lá tTCL_L trong điều kiện chiếu sáng 16 giờ/ngày

CDHSTTV (mg/l)		Loại hình thái phát sinh	Đặc điểm hình thái
2,4-D	TDZ	Mô sẹo (%)	
1,0	0,01	100 a	Mô sẹo màu trắng và vàng, xốp
1,0	0,05	100 a	Mô sẹo màu trắng xanh và vàng nâu, cứng
1,0	0,1	100 a	Mô sẹo màu trắng xanh và vàng đỏ, cứng, nhiều
1,0	0,2	100 a	Mô sẹo màu trắng xanh và vàng, mềm, ít
1,0	0,5	100 a	Mô sẹo màu trắng xanh và vàng đỏ, cứng, ít
1,0	1,0	100 a	Mô sẹo màu trắng và vàng nâu, mềm xốp
0,1	0,2	80 b	Mô sẹo màu trắng xốp và xanh cứng, ít
0,2	0,2	80 b	Mô sẹo màu xanh, cứng, ít
0,5	0,2	100 a	Mô sẹo màu trắng và nâu, xốp
2,0	0,2	73,3 c	Mô sẹo màu trắng xanh và vàng nâu, mềm

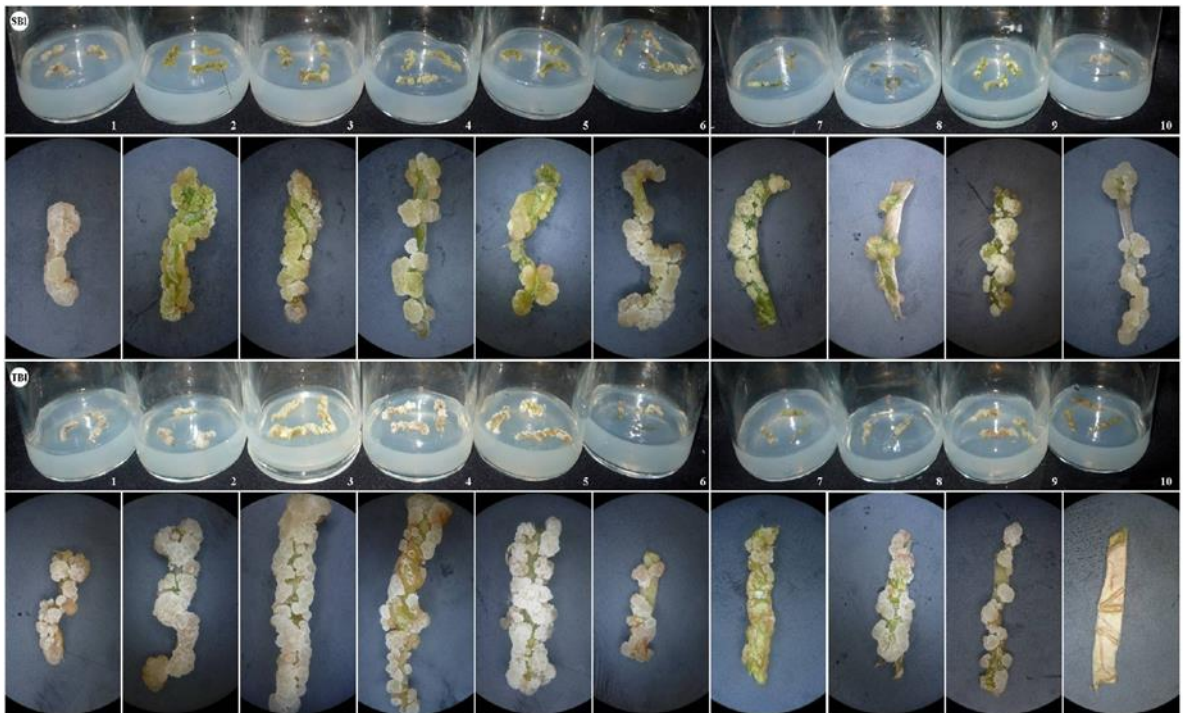
Ghi chú: Những chữ cái khác nhau (a, b, ...) được nêu trong cùng một cột biểu diễn sự khác nhau có ý nghĩa với $\alpha = 0,05$ trong Duncan's test.

Bảng 3.11. Ảnh hưởng sự kết hợp giữa 2,4-D và TDZ ở các nồng độ khác nhau lên sự phát sinh hình thái của mẫu lá tTCL_L trong điều kiện tối hoàn toàn

CDHSTTV (mg/l)		Loại hình thái phát sinh	Đặc điểm hình thái
2,4-D	TDZ	Mô sẹo (%)	
1,0	0,01	100 a	Mô sẹo màu vàng nâu, mềm xốp
1,0	0,05	100 a	Mô sẹo màu trắng sữa và vàng, xốp
1,0	0,1	100 a	Mô sẹo màu trắng sữa, xốp, nhiều
1,0	0,2	100 a	Mô sẹo màu trắng và vàng nâu, ít
1,0	0,5	100 a	Mô sẹo màu trắng sữa và trắng trong, xốp
1,0	1,0	86,7 c	Mô sẹo màu trắng sữa và vàng nâu, mềm, ít
0,1	0,2	80,0 d	Mô sẹo màu trắng trong và nâu, mềm, ít
0,2	0,2	93,3 b	Mô sẹo màu trắng và nâu, mềm
0,5	0,2	93,3 b	Mô sẹo màu trắng sữa và vàng nâu, xốp, ít
2,0	0,2	0 e	Mẫu chết

Ghi chú: Những chữ cái khác nhau (a, b, ...) được nêu trong cùng một cột biểu diễn sự khác nhau có ý nghĩa với $\alpha = 0,05$ trong Duncan's test.

Qua bảng 3.10, 3.11, chúng tôi quan sát thấy, mẫu ban đầu từ màu xanh chuyển sang vàng, một số hóa nâu, mô sẹo phát sinh tương đối đồng đều và nhiều với cùng tỷ lệ là 100% trên các môi trường bổ sung 1,0 mg/l 2,4-D kết hợp với TDZ ở các nồng độ từ 0,01 đến 1,0 mg/l trong điều kiện chiếu sáng và TDZ từ 0,01 đến 0,5 mg/l trong điều kiện tối hoàn toàn. So với các mẫu cấy trên môi trường có bổ sung 2,4-D và BA thì sự kết hợp giữa 2,4-D và TDZ có tỷ lệ cũng như lượng mô sẹo hình thành là cao hơn. Lượng mô sẹo hình thành trên mẫu cấy lá tTCL_L đặt trong điều kiện tối nhiều hơn trong điều kiện sáng. Mẫu đặt ở điều kiện chiếu sáng mô sẹo thường có màu xanh, dạng cứng, còn mẫu trong tối lại cho mô sẹo màu trắng và vàng xốp (Hình 3.9). Khi quan sát bằng mắt thường thì nhận thấy rằng mẫu cấy lá tTCL_L được nuôi cấy trên môi trường bổ sung 1,0 mg/l 2,4-D kết hợp với 0,1 mg/l TDZ trong điều kiện tối cho lượng mô sẹo hình thành nhiều và đồng đều nhất, mô sẹo phát sinh xung quanh vết cắt và khắp bề mặt mẫu, có màu trắng sữa, xốp. Ở các mẫu lá tTCL_L nuôi cấy trên môi trường bổ sung 0,2 mg/l TDZ kết hợp với 2,4-D ở nồng độ từ 0,1 đến 2,0 mg/l cả trong điều kiện sáng và tối cho tỷ lệ phát sinh mô sẹo thấp và ít hơn, đặc biệt là mẫu lá tTCL_L nuôi trong môi trường 0,2 mg/l TDZ kết hợp với 2,0 mg/l 2,4-D trong điều kiện tối mẫu đều chết.



Hình 3.9. Ảnh hưởng sự kết hợp giữa 2,4-D và TDZ ở các nồng độ khác nhau lên sự phát sinh hình thái của mẫu lá tTCL_L. **SB1 đến SB6:** 1,0 mg/l 2,4-D kết hợp với TDZ (0,01; 0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 1,0 mg/l); **SB7 đến SB10:** 0,2 mg/l TDZ kết hợp với 2,4-D (0,1; 0,2; 0,5; 2,0 mg/l) trong điều kiện chiếu sáng. Từ **TB1 đến TB6:** 1,0

mg/l 2,4-D kết hợp với TDZ (0,01; 0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 1,0 mg/l) và **TB7 đến TB10:** 0,2 mg/l TDZ kết hợp với 2,4-D (0,1; 0,2; 0,5; 2,0) mg/l ở điều kiện tối hoàn toàn.

Bảng 3.12. Ảnh hưởng sự kết hợp giữa NAA và BA ở các nồng độ khác nhau lên sự phát sinh hình thái của mẫu lá tTCL_L trong điều kiện chiếu sáng 16 giờ/ngày

CDHSTTV (mg/l)		Loại hình thái phát sinh	Đặc điểm
NAA	BA	Mô sẹo (%)	
1,0	0,1	13,3 c	Mô sẹo màu xanh, cứng, rất ít
1,0	0,2	0 d	Mẫu chết
1,0	0,5	0 d	Mẫu chết
1,0	1,0	33,3 b	Mô sẹo màu nâu, phát sinh rất ít
1,0	2,0	0 d	Mẫu sống nhưng chưa cảm ứng
0,1	1,0	0 d	Mẫu chết
0,2	1,0	0 d	Mẫu chết
0,5	1,0	0 d	Mẫu chết
2,0	1,0	60 a	Mô sẹo màu xanh, cứng, rất ít

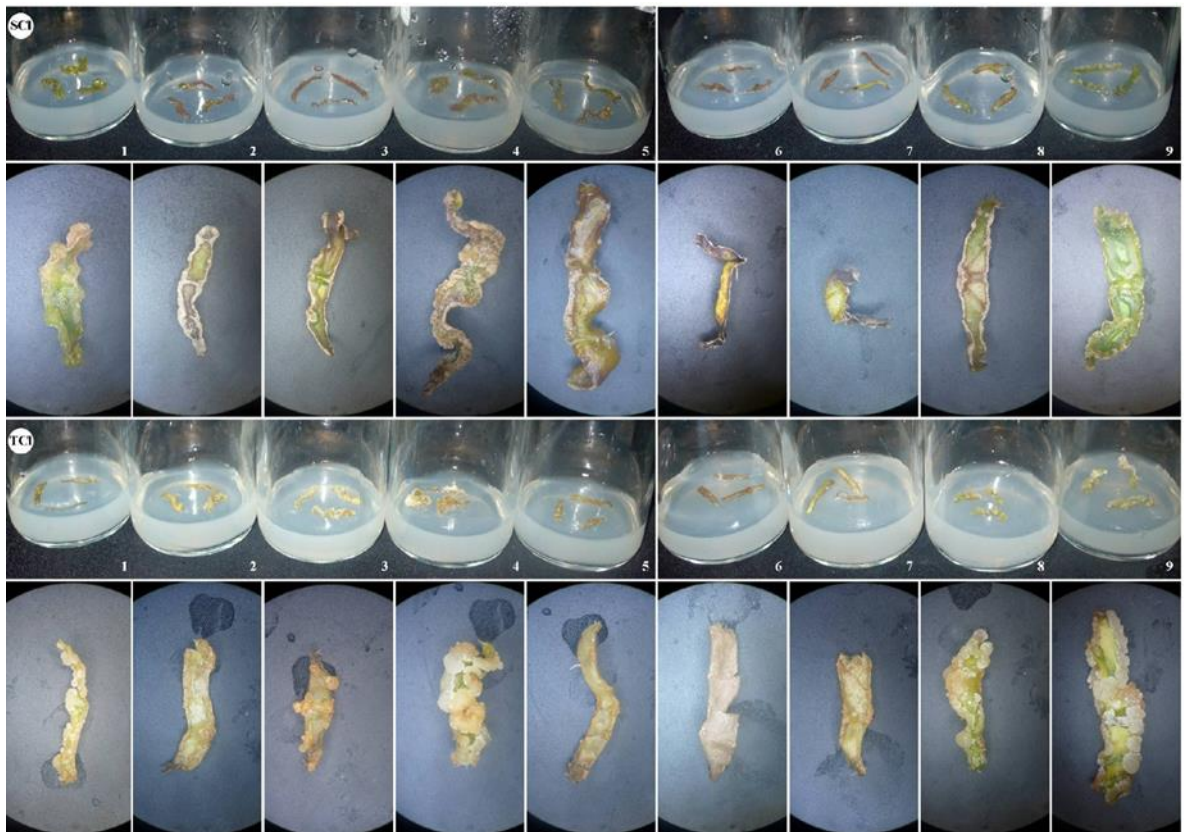
Ghi chú: Những chữ cái khác nhau (a, b, ...) được nêu trong cùng một cột biểu diễn sự khác nhau có ý nghĩa với $\alpha = 0,05$ trong Duncan's test.

Bảng 3.13. Ảnh hưởng sự kết hợp giữa NAA và BA ở các nồng độ khác nhau lên sự phát sinh hình thái của mẫu lá tTCL_L trong điều kiện tối hoàn toàn

CDHSTTV (mg/l)		Loại hình thái phát sinh	Đặc điểm
NAA	BA	Mô sẹo (%)	
1,0	0,1	40 e	Mô sẹo màu trắng trong và vàng nâu, mềm, ít
1,0	0,2	33,3 f	Mô sẹo màu nâu, phát sinh rất ít
1,0	0,5	53,3 d	Mô sẹo màu nâu, cứng, phát sinh rất ít
1,0	1,0	93,3 b	Mô sẹo màu trắng và vàng nâu, mềm
1,0	2,0	13,3 g	Mô sẹo màu vàng nâu, ít
0,1	1,0	0 h	Mẫu sống nhưng chưa cảm ứng
0,2	1,0	0 h	Mẫu chết
0,5	1,0	90,0 c	Mô sẹo màu trắng xanh, vàng nâu, cứng, ít
2,0	1,0	100 a	Mô sẹo màu trắng và nâu, mềm

Ghi chú: Những chữ cái khác nhau (a, b, ...) được nêu trong cùng một cột biểu diễn sự khác nhau có ý nghĩa với $\alpha = 0,05$ trong Duncan's test.

So với môi trường bổ sung 2,4-D kết hợp với BA và 2,4-D kết hợp với TDZ thì trong các nghiệm thức của môi trường có bổ sung NAA kết hợp với BA thì mô sẹo tạo thành với tỷ lệ thấp và không đồng đều (Bảng 3.12, 3.13). Mẫu lá tTCL_L ban đầu hầu hết chuyển từ xanh sang vàng, một số hóa nâu và chết. Mẫu nuôi cấy trong điều kiện tối cho tỷ lệ phát sinh mô sẹo cao hơn trong điều kiện sáng (Hình 3.10). Tỷ lệ mẫu phát sinh mô sẹo cao nhất là 100% (Bảng 3.13) trong môi trường có bổ sung 2,0 mg/l NAA kết hợp với 1,0 mg/l BA trong điều kiện tối, cũng trên môi trường này, khi nuôi cấy trong điều kiện sáng thì lại cho tỷ lệ hình thành mô sẹo thấp 60% (Bảng 3.12). Như vậy, điều kiện tối phù hợp với sự phát sinh mô sẹo ở mẫu lá. Lượng mô sẹo tạo thành trên mỗi mẫu trong môi trường này ít và không đồng đều, mô sẹo phát sinh tại mép cắt. Qua đó cho thấy, môi trường NAA kết hợp với BA ở các nồng độ không phù hợp cho quá trình hình thành mô sẹo ở mẫu lá.



Hình 3.10. Ảnh hưởng sự kết hợp giữa NAA và BA ở các nồng độ khác nhau lên sự phát sinh hình thái của mẫu lá tTCL_L. **SC1 đến SC5:** 1,0 mg/l NAA kết hợp với BA (0,1; 0,2; 0,5; 1,0; 2,0 mg/l). **SC6 đến SC9:** 1,0 mg/l BA kết hợp với NAA (0,1; 0,2; 0,5; 2,0 mg/l) trong điều kiện chiếu sáng. **TC1 đến TC5:** 1,0 mg/l NAA kết hợp với BA (0,1; 0,2; 0,5; 1,0; 2,0 mg/l). **TC6 đến TC9:** 1,0 mg/l BA kết hợp với NAA (0,1; 0,2; 0,5; 2,0 mg/l) trong điều kiện tối hoàn toàn.

Qua kết quả thu được khi khảo sát ảnh hưởng sự kết hợp giữa 1 auxin và 1 cytokinin lên sự phát sinh hình thái của mẫu lá tTCL_L trong điều kiện chiếu sáng và tối hoàn toàn chúng tôi nhận thấy, sự kết hợp giữa 2,4-D và TDZ ở các nồng độ khác nhau đều phù hợp cho việc phát sinh mô sẹo ở mẫu lá. Trong đó, thích hợp nhất cho việc tạo mô sẹo ở mẫu lá tTCL_L là môi trường bổ sung 1,0 mg/l 2,4-D kết hợp với 0,1 mg/l TDZ được nuôi cấy trong điều kiện tối hoàn toàn. Môi trường bổ sung NAA và BA không thích hợp cho sự phát sinh mô sẹo ở mẫu lá tTCL_L.

3.1.1.6. Ảnh hưởng giữa sự kết hợp auxin và cytokinin lên sự phát sinh hình thái của mẫu cuống lá tTCL_C trong điều kiện chiếu sáng và tối hoàn toàn

Sau 10 tuần nuôi cấy, kết quả được quan sát, ghi nhận và so sánh hiệu quả của từng cặp chất 2,4-D kết hợp với BA, 2,4-D kết hợp với TDZ và BA kết hợp với NAA được thể hiện ở các bảng 3.14, 3.15, 3.16, 3.17, 3.18, 3.19 và các hình 3.11, 3.12, 3.13.

Bảng 3.14. Ảnh hưởng sự kết hợp giữa 2,4-D và BA ở các nồng độ khác nhau lên sự phát sinh hình thái của mẫu cuống lá tTCL_C trong điều kiện chiếu sáng 16 giờ/ngày

CDHSTTV (mg/l)		Loại hình thái phát sinh	Đặc điểm
2,4-D	BA	Mô sẹo (%)	
1,0	0,1	98,8 a	Mô sẹo xanh, đỏ nâu, cứng, ít
1,0	0,2	98,8 a	Mô sẹo màu trắng vàng, mềm
1,0	0,5	98,8 a	Mô sẹo màu vàng, mềm
1,0	1,0	97,7 a	Mô sẹo màu trắng sữa, xanh và nâu đỏ, cứng, ít
1,0	2,0	74,4 c	Mô sẹo màu vàng nhạt, xốp, rất ít
0,1	1,0	96,6 a	Mô sẹo màu xanh, cứng, rất ít
0,2	1,0	98,8 a	Mô sẹo màu xanh và trắng, cứng
0,5	1,0	98,8 a	Mô sẹo xanh tím và vàng tím, cứng, nhiều
2,0	1,0	86,6 b	Mô sẹo màu vàng, xốp, ít

Ghi chú: Những chữ cái khác nhau (a, b, ...) được nêu trong cùng một cột biểu diễn sự khác nhau có ý nghĩa với $\alpha = 0,05$ trong Duncan's test.

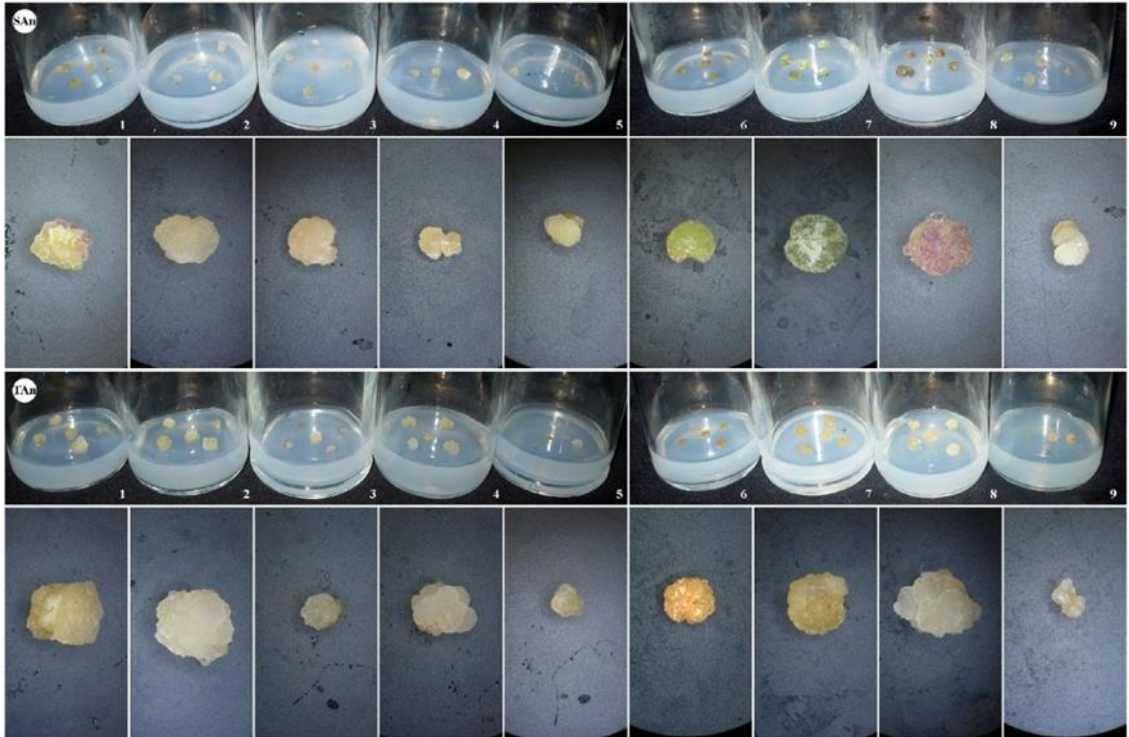
Bảng 3.15. Ảnh hưởng sự kết hợp giữa 2,4-D và BA ở các nồng độ khác nhau lên sự phát sinh hình thái của mẫu cuống lá tTCL_C trong điều kiện tối hoàn toàn

CĐHSTTV (mg/l)		Loại hình thái phát sinh	Đặc điểm
2,4-D	BA	Mô sẹo (%)	
1,0	0,1	97,7 a	Mô sẹo màu vàng nhạt, mềm
1,0	0,2	98,8 a	Mô sẹo màu trắng sữa và vàng, xốp, nhiều
1,0	0,5	97,7 a	Mô sẹo màu trắng sữa và vàng nhạt, xốp
1,0	1,0	97,7 a	Mô sẹo màu vàng nhạt, nâu vàng, xốp, ít
1,0	2,0	98,8 a	Mô sẹo màu vàng nhạt, nâu vàng, xốp, ít
0,1	1,0	97,7 a	Mô sẹo cứng, màu vàng
0,2	1,0	96,6 a	Mô sẹo màu vàng nâu, mềm
0,5	1,0	97,7 a	Mô sẹo màu trắng sữa và vàng, mềm, xốp
2,0	1,0	96,6 a	Mô sẹo màu vàng, mềm, ít

Ghi chú: Những chữ cái khác nhau (a, b, ...) được nêu trong cùng một cột biểu diễn sự khác nhau có ý nghĩa với $\alpha = 0,05$ trong Duncan's test.

Các mẫu cuống lá tTCL_C được nuôi cấy trong điều kiện chiếu sáng và tối hoàn toàn đều phát sinh mô sẹo với tỷ lệ cao trên 70% (Bảng 3.14, 3.15). Mẫu cấy vào môi trường có bổ sung 1 mg/l 2,4-D kết hợp với 2,0 mg/l BA trong điều kiện chiếu sáng cho tỷ lệ hình thành mô sẹo thấp nhất 74,4%. Tất cả các nghiệm thức còn lại của điều kiện chiếu sáng và tối hoàn toàn có tỷ lệ mẫu hình thành mô sẹo không có sự khác biệt nhiều. Hầu hết lượng mô sẹo phát sinh trên mỗi mẫu cấy ít và không đồng đều. Bên cạnh mô sẹo phát sinh có màu trắng sữa hay vàng ở các môi trường nuôi cấy khác nhau thì mẫu được cấy vào môi trường có bổ sung 1 mg/l BA kết hợp với 0,1 và 0,2 mg/l 2,4-D trong điều kiện sáng thì mô sẹo cứng, màu xanh (Hình 3.11).

Như vậy, mẫu cuống lá tTCL_C nuôi cấy trong môi trường có bổ sung 1,0 mg/l 2,4-D kết hợp với 0,2 mg/l BA nuôi cấy trong điều kiện tối hoàn toàn, lượng mô sẹo phát sinh nhiều nhất, mô sẹo trên môi trường này có màu trắng sữa, mềm xốp.



Hình 3.11. Ảnh hưởng sự kết hợp giữa 2,4-D và BA ở các nồng độ khác nhau lên sự phát sinh hình thái của mẫu cuống lá tTCL_C. **SA1 đến SA5:** 1,0 mg/l 2,4-D kết hợp với BA (0,1; 0,2; 0,5; 1,0; 2,0 mg/l). **SA6 đến SA9:** 1,0 mg/l BA kết hợp với 2,4-D (0,1; 0,2; 0,5; 2,0 mg/l) trong điều kiện chiếu sáng. **TA1 đến TA5:** 1,0 mg/l 2,4-D kết hợp với BA (0,1; 0,2; 0,5; 1,0; 2,0 mg/l). **TA6 đến TA9** là 1,0 mg/l BA kết hợp với 2,4-D (0,1; 0,2; 0,5; 2,0 mg/l) trong điều kiện tối hoàn toàn.

Bảng 3.16. Ảnh hưởng sự kết hợp giữa 2,4-D và TDZ ở các nồng độ khác nhau lên sự phát sinh hình thái của mẫu cuống lá tTCL_C trong điều kiện chiếu sáng 16 giờ/ngày

CĐHSTTV (mg/l)		Loại hình thái phát sinh Mô sẹo (%)	Đặc điểm
2,4-D	TDZ		
1,0	0,01	100 a	Mô sẹo màu trắng và xanh, mềm xốp
1,0	0,05	100 a	Mô sẹo màu vàng nâu, mềm, ít
1,0	0,1	100 a	Mô sẹo màu trắng sữa và vàng, xốp, nhiều
1,0	0,2	100 a	Mô sẹo màu trắng sữa và vàng, xốp, ít
1,0	0,5	100 a	Mô sẹo màu trắng, nâu và xanh, phát sinh không đồng đều, ít
1,0	1,0	100 a	Mô sẹo màu trắng sữa và vàng, xốp
0,1	0,2	100 a	Mô sẹo màu xanh, cứng, kích thước nhỏ
0,2	0,2	86,7 b	Mô sẹo màu xanh và vàng nâu, dạng cứng mềm không đồng đều, ít

0,5	0,2	100 a	Mô sẹo màu trắng sữa và vàng, xốp
2,0	0,2	0 c	Mẫu chết

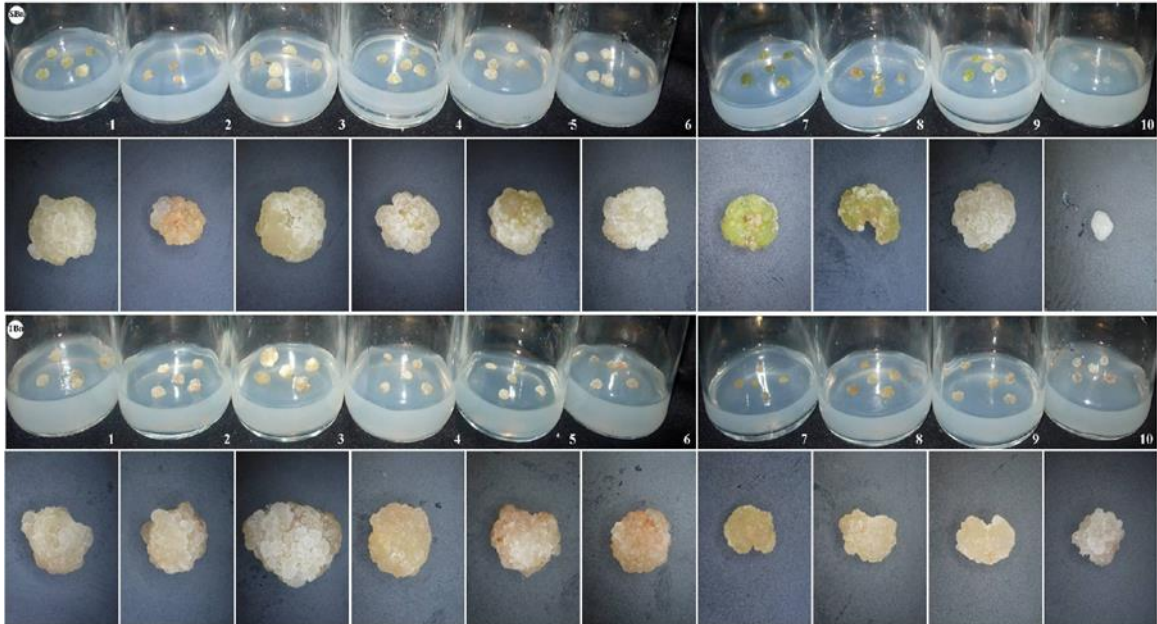
Ghi chú: Những chữ cái khác nhau (a, b, ...) được nêu trong cùng một cột biểu diễn sự khác nhau có ý nghĩa với $\alpha = 0,05$ trong Duncan's test.

Bảng 3.17. Ảnh hưởng sự kết hợp giữa 2,4-D và TDZ ở các nồng độ khác nhau lên sự phát sinh hình thái của mẫu cuống lá tTCL_C trong điều kiện tối hoàn toàn

CĐHSTTV (mg/l)		Loại hình thái phát sinh	Đặc điểm
2,4-D	TDZ	Mô sẹo (%)	
1,0	0,01	100 a	Mô sẹo màu trắng trong và vàng nâu, mềm
1,0	0,05	100 a	Mô sẹo màu vàng nâu, mềm
1,0	0,1	100 a	Mô sẹo màu trắng sữa và vàng, xốp, nhiều
1,0	0,2	100 a	Mô sẹo màu vàng trong, mềm
1,0	0,5	100 a	Mô sẹo màu vàng và đỏ nâu, mềm
1,0	1,0	100 a	Mô sẹo màu đỏ nâu, mềm, ít
0,1	0,2	93,3 b	Mô sẹo màu vàng nâu, cứng, ít
0,2	0,2	93,3 b	Mô sẹo màu vàng, mềm, ít
0,5	0,2	79,9 c	Mô sẹo màu trắng và vàng, xốp
2,0	0,2	100 a	Mô sẹo màu trắng sữa, xốp, ít

Ghi chú: Những chữ cái khác nhau (a, b, ...) được nêu trong cùng một cột biểu diễn sự khác nhau có ý nghĩa với $\alpha = 0,05$ trong Duncan's test.

Kết quả ở bảng 3.16 và 3.17 cho thấy, tỷ lệ mô sẹo tạo thành trong môi trường 2,4-D kết hợp với TDZ cao hơn so với môi trường có bổ sung (2,4-D và BA). Dạng và lượng mô sẹo trong điều kiện tối là đồng đều hơn so với mẫu đặt trong điều kiện sáng. Khi mẫu được nuôi cấy trong môi trường có bổ sung 1,0 mg/l 2,4-D kết hợp với TDZ ở các nồng độ từ 0,01 đến 1,0 mg/l trong điều kiện sáng và trong tối thì lượng mô sẹo phát sinh nhiều và đồng đều hơn so với sự kết hợp ngược lại (0,2 mg/l TDZ kết hợp với 2,4-D ở nồng độ từ 0,1 đến 2,0 mg/l). So sánh hình dạng mô sẹo, mẫu cuống lá tTCL_C đặt trong điều kiện sáng có màu trắng sữa xốp và xanh cứng, còn mẫu đặt trong tối có màu trắng, vàng đến vàng nâu, dạng mềm xốp.



Hình 3.12. Ảnh hưởng sự kết hợp giữa 2,4-D và TDZ ở các nồng độ khác nhau lên sự phát sinh hình thái của mẫu cuống lá tTCL_C. **SBn1 đến SBn6:** 1,0 mg/l 2,4-D kết hợp với TDZ (0,01; 0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 1,0 mg/l); **SBn7 đến SBn10:** 0,2 mg/l TDZ kết hợp với 2,4-D (0,1; 0,2; 0,5; 2,0 mg/l) trong điều kiện chiếu sáng. **TBn1 đến TBn6:** 1,0 mg/l 2,4-D kết hợp với TDZ (0,01; 0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 1,0 mg/l); **TBn7 đến TBn10:** 0,2 mg/l TDZ kết hợp với 2,4-D (0,1; 0,2; 0,5; 2,0 mg/l) trong điều kiện tối hoàn toàn.

Bảng 3.18. Ảnh hưởng sự kết hợp giữa NAA và BA ở các nồng độ khác nhau lên sự phát sinh hình thái của mẫu cuống lá tTCL_C trong điều kiện chiếu sáng 16 giờ/ngày

CDHSTTV (mg/l)		Loại hình thái phát sinh	Đặc điểm
NAA	BA	Mô sẹo (%)	
1,0	0,1	100 a	Mô sẹo chết
1,0	0,2	100 a	Mô sẹo chết
1,0	0,5	100 a	Mô sẹo màu trắng và vàng, cứng, nhiều
1,0	1,0	100 a	Mô sẹo màu trắng và vàng, cứng
1,0	2,0	100 a	Mô sẹo màu vàng nâu và cứng
0,1	1,0	0 c	Mẫu chết
0,2	1,0	0 c	Mẫu chết
0,5	1,0	0 c	Mẫu chết
2,0	1,0	86,6 b	Mô sẹo màu vàng nâu, cứng, ít

Ghi chú: Những chữ cái khác nhau (a, b, ...) được nêu trong cùng một cột biểu diễn sự khác nhau có ý nghĩa với $\alpha = 0,05$ trong Duncan's test.

Môi trường cho tỷ lệ hình thành mô sẹo cao nhất cũng như lượng mô sẹo nhiều nhất là môi trường bổ sung 1,0 mg/l 2,4-D và 0,1 mg/l TDZ được nuôi cấy trong điều kiện tối, tiếp theo là mẫu cấy trong môi trường 1,0 mg/l 2,4-D và 0,1 mg/l TDZ trong điều kiện sáng.

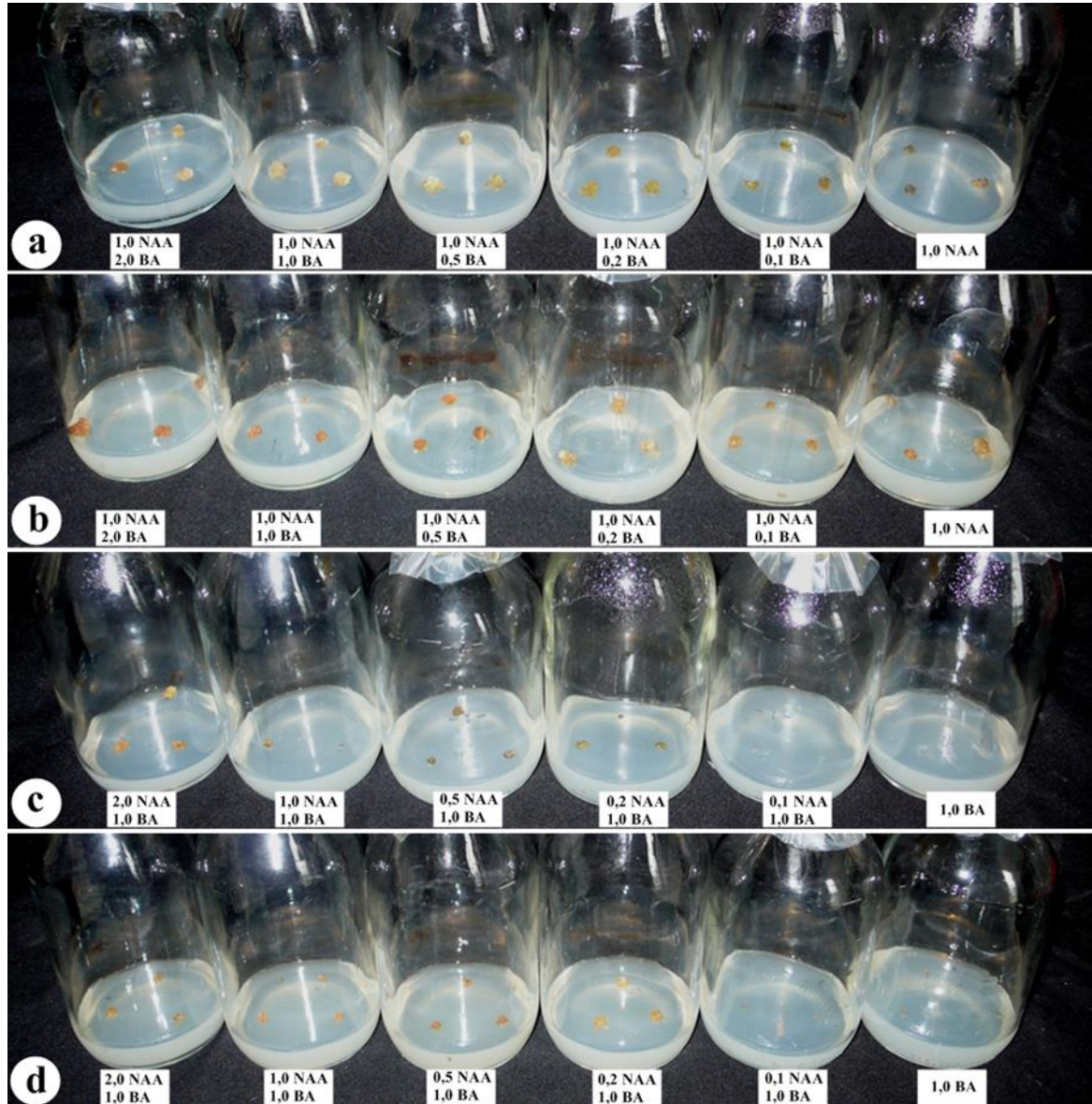
Bảng 3.19. Ảnh hưởng sự kết hợp giữa NAA và BA ở các nồng độ khác nhau lên sự phát sinh hình thái của mẫu cuống lá tTCL_C trong điều kiện tối hoàn toàn

CDHSTTV (mg/l)		Loại hình thái phát sinh	Đặc điểm
NAA	BA	Mô sẹo (%)	
1,0	0,1	100 a	Mô sẹo màu vàng nâu, mềm, rất ít
1,0	0,2	100 a	Mô sẹo màu trắng sữa và vàng, xốp, ít
1,0	0,5	100 a	Mô sẹo màu vàng nâu, mềm, ít
1,0	1,0	100 a	Mô sẹo màu vàng nâu, mềm, ít
1,0	2,0	100 a	Mô sẹo màu vàng nâu, mềm, ít
0,1	1,0	0 b	Mẫu chết
0,2	1,0	100 a	Mô sẹo màu vàng nâu, mềm, ít
0,5	1,0	100 a	Mô sẹo màu vàng nâu, mềm, ít
2,0	1,0	100 a	Mô sẹo màu vàng nâu, mềm, ít

Ghi chú: Những chữ cái khác nhau (a, b, ...) được nêu trong cùng một cột biểu diễn sự khác nhau có ý nghĩa với $\alpha = 0,05$ trong Duncan's test.

Nhìn vào bảng 3.18 và 3.19 cho thấy, mẫu cuống lá cuống lá tTCL_C trên môi trường bổ sung 1 mg/l NAA kết hợp với BA ở các nồng độ khác nhau được nuôi cấy trong điều kiện sáng và tối cho tỷ lệ phát sinh mô sẹo cao hơn mẫu cuống lá tTCL_C cấy vào môi trường có bổ sung 1 mg/l BA kết hợp với NAA ở các nồng độ NAA (0,1; 0,2; 0,5; 1,0 và 2,0 mg/l). Tuy nhiên, so với môi trường bổ sung 2,4-D kết hợp với BA, 2,4-D kết hợp với TDZ, sự phát sinh mô sẹo trên môi trường này thấp, mô sẹo phát sinh không đồng đều trong cả 2 điều kiện chiếu sáng và tối hoàn toàn (Hình 3.13). Cùng với một số nghiệm thức cho tỷ lệ phát sinh mô sẹo là 100% nhưng mô sẹo có màu vàng nâu và chết. Còn mẫu cuống lá tTCL_C được nuôi cấy trong điều kiện chiếu sáng có bổ sung 1 mg/l NAA kết hợp với 0,5 và 1 mg/l BA mô sẹo có màu trắng vàng và nhiều. Từ các kết quả thu được ở thí nghiệm 6 chúng tôi nhận thấy rằng môi trường bổ sung 1,0 mg/l 2,4-D kết hợp với TDZ ở các nồng độ từ 0,01 đến 1,0 mg/l thích hợp cho việc hình thành mô sẹo ở mẫu cuống lá tTCL_C và sự hình thành

mô sẹo cao nhất là môi trường bổ sung 1,0 mg/l 2,4-D và 0,1 mg/l TDZ trong điều kiện tối. NAA và BA không phù hợp để tạo mô sẹo từ mẫu cuống lá tTCL_C.



Hình 3.13. Ảnh hưởng sự kết hợp giữa NAA và BA ở các nồng độ khác nhau lên sự phát sinh hình thái của mẫu cuống lá tTCL_C. **Hình a và c:** 1,0 mg/l NAA kết hợp với BA (0,1; 0,2; 0,5; 1,0; 2,0 mg/l) và 1,0 mg/l BA kết hợp với NAA (0,1; 0,2; 0,5; 2,0 mg/l) trong điều kiện chiếu sáng. **Hình b và d:** 1,0 mg/l NAA kết hợp với BA (0,1; 0,2; 0,5; 1,0; 2,0 mg/l) và 1,0 mg/l BA kết hợp với NAA (0,1; 0,2; 0,5; 2,0 mg/l) trong điều kiện tối hoàn toàn.

3.1.1.7. Ảnh hưởng giữa sự kết hợp auxin và cytokinin lên sự phát sinh hình thái của mẫu cuống lá ITCL_C trong điều kiện chiếu sáng và tối hoàn toàn

Trong thí nghiệm này, chúng tôi tiếp tục nghiên cứu sự cảm ứng phát sinh hình thái của mẫu cuống lá ITCL_C khi chúng được nuôi cấy trên các môi trường bổ sung

các CDHSTTV được sử dụng phối hợp và được đặt trong 2 điều kiện chiếu sáng khác nhau, đồng thời qua đó so sánh với sự phát sinh hình thái ở mẫu cuống lá tTCL_C.

Kết quả ghi nhận sau 10 tuần nuôi cấy thể hiện từ bảng 3.20 đến 3.25 và các hình 3.14, 3.15, 3.16.

Bảng 3.20. Ảnh hưởng sự kết hợp giữa 2,4-D và BA ở các nồng độ khác nhau lên sự phát sinh hình thái của mẫu cuống lá ITCL_C trong điều kiện chiếu sáng 16 giờ/ngày

CDHSTTV (mg/l)		Loại hình thái phát sinh		Đặc điểm
2,4-D	BA	Mô sẹo (%)	Tạo phôi (%)	
1,0	0,1	100 a	24,4 c	Mô sẹo màu nâu đỏ, xanh, vàng, cứng, ít
1,0	0,2	93,3 b	48,8 a	Mô sẹo màu trắng sữa, đỏ, xốp, phân bố đồng đều
1,0	0,5	86,6 c	31,0 b	Mô sẹo màu xanh, đỏ, trắng đục, cứng, ít
1,0	1,0	66,7 d	3,3 d	Mô sẹo màu đỏ, nâu vàng, xanh nhạt, ít, phân bố không đồng đều
1,0	2,0	13,3 e	0 d	Mô sẹo màu vàng nhạt, đỏ, rất ít
0,1	1,0	86,6 c	0 d	Cảm ứng mô sẹo rất ít
0,2	1,0	100 a	0 d	Mô sẹo màu nâu, cứng, rất ít
0,5	1,0	93,3 b	0 d	Mô sẹo màu vàng, xanh, phát sinh 1 đầu vị trí cắt
2,0	1,0	100 a	0 d	Mô sẹo màu trắng sữa và vàng, xốp, phát sinh 2 đầu vị trí cắt và khắp bề mặt mẫu, nhiều vụn

Ghi chú: Những chữ cái khác nhau (a, b, ...) được nêu trong cùng một cột biểu diễn sự khác nhau có ý nghĩa với $\alpha = 0,05$ trong Duncan's test.

Bảng 3.21. Ảnh hưởng sự kết hợp giữa 2,4-D và BA ở các nồng độ khác nhau lên sự phát sinh hình thái của mẫu cuống lá ITCL_C trong điều kiện tối hoàn toàn

CDHSTTV (mg/l)		Loại hình thái phát sinh		Đặc điểm
2,4-D	BA	Mô sẹo (%)	Tạo phôi (%)	
1,0	0,1	100 a	0 b	Mô sẹo màu nâu, nâu vàng, trắng sữa, xốp, mô sẹo phân bố không đồng đều
1,0	0,2	100 a	21,0 a	Mô sẹo màu trắng sữa, xốp, nhiều
1,0	0,5	100 a	0 b	Mô sẹo màu trắng sữa, xốp, không đồng đều
1,0	1,0	100 a	0 b	Mô sẹo màu trắng sữa và vàng, xốp, ít

1,0	2,0	100 a	0 b	Mô sẹo màu trắng đục, xốp
0,1	1,0	46,7 d	0 b	Mô sẹo màu hơi ngả vàng, cứng, rất ít
0,2	1,0	80,0 c	0 b	Mô sẹo màu nâu và vàng, cứng, phát sinh 2 đầu vị trí cắt và rải rác trên bề mặt mẫu
0,5	1,0	93,3 b	0 b	Mô sẹo màu trắng sữa, xốp, phát sinh chủ yếu 1 hoặc 2 đầu vị trí cắt và rải rác bề mặt mẫu
2,0	1,0	100 a	0 b	Mô sẹo màu vàng và nâu, xốp, ít

Ghi chú: Những chữ cái khác nhau (a, b, ...) được nêu trong cùng một cột biểu diễn sự khác nhau có ý nghĩa với $\alpha = 0,05$ trong Duncan's test.

Kết quả thu được sau 10 tuần nuôi cấy, mô sẹo hình thành ở một số nghiệm thức với tỷ lệ cao (có nhiều mẫu cho tỷ lệ phát sinh mô sẹo là 100%). Mẫu cuống lá ITCL_C đặt trong điều kiện chiếu sáng sáng vẫn giữ màu xanh, trong khi các mẫu đặt trong điều kiện tối đều chuyển sang màu vàng (Hình 3.14). Môi trường 1,0 mg/l 2,4-D kết hợp với BA ở các nồng độ phù hợp cho việc tạo mô sẹo hơn so với môi trường bổ sung 1,0 BA kết hợp với 2,4-D ở các nồng độ khác nhau. Tỷ lệ mô sẹo phát sinh trong điều kiện tối đồng đều hơn ở điều kiện sáng, môi trường bổ sung 1,0 mg/l 2,4-D kết hợp với BA từ 0,1 đến 2,0 mg/l và 1 mg/l BA kết hợp với 2 mg/l 2,4-D trong điều kiện tối đều cho tỷ lệ hình thành mô sẹo là 100%. Ở điều kiện sáng, mô sẹo hình thành cao nhất (100%) ở môi trường có bổ sung 1 mg/l 2,4-D kết hợp với 0,2 mg/l BA và 1 mg/l BA kết hợp với 2 mg/l 2,4-D. Lượng mô sẹo hình thành nhiều nhất ở môi trường bổ sung 1,0 mg/l 2,4-D và 0,2 mg/l BA đặt trong điều kiện tối, ở môi trường này, mô sẹo phát sinh nhiều ở hai đầu và cả bề mặt mẫu. Mô sẹo hình thành có màu trắng sữa, vàng và đỏ, ngoài sáng cho dạng mô sẹo cứng, còn trong điều kiện tối lại cho dạng mô sẹo mềm xốp.



Hình 3.14. Ảnh hưởng sự kết hợp giữa 2,4-D và BA ở các nồng độ khác nhau lên sự phát sinh hình thái của mẫu cuống lá ITCL_C. **SA1 đến SA5:** 1,0 mg/l 2,4-D kết hợp với BA (0,1; 0,2; 0,5; 1,0; 2,0 mg/l); **SA6 đến SA9:** 1,0 mg/l BA kết hợp với 2,4-D (0,1; 0,2; 0,5; 2,0 mg/l) trong điều kiện chiếu sáng. **TA1 đến TA5:** 1,0 mg/l 2,4-D kết hợp với BA (0,1; 0,2; 0,5; 1,0; 2,0 mg/l); **TA6 đến TA9:** 1,0 mg/l BA kết hợp với 2,4-D (0,1; 0,2; 0,5; 2,0 mg/l) trong điều kiện tối hoàn toàn.

Bảng 3.22. Ảnh hưởng sự kết hợp giữa 2,4-D và TDZ ở các nồng độ khác nhau lên sự phát sinh hình thái của mẫu cuống lá ITCL_C trong điều kiện chiếu sáng 16 giờ/ngày

CDHSTTV (mg/l)		Loại hình thái phát sinh	Đặc điểm
2,4-D	TDZ	Mô sẹo (%)	
1,0	0,01	86,6 c	Mô sẹo màu trắng sữa, trắng trong, mềm, ít, phát sinh chủ yếu 1 đầu vị trí cắt
1,0	0,05	93,3 b	Mô sẹo phát sinh ít, trên bề mặt mẫu có màu trắng sữa, xốp. Mô sẹo ở 2 đầu màu nâu đỏ, mềm
1,0	0,1	93,3 b	Mô sẹo màu trắng xanh và trắng trong, cứng
1,0	0,2	100 a	Mô sẹo màu trắng sữa và nâu đỏ, mềm xốp, kích thước lớn. Mô sẹo phát sinh 2 đầu và bề mặt mẫu
1,0	0,5	100 a	Mô sẹo màu trắng xanh, cứng, phát sinh chủ yếu 1 đầu mẫu cấy
1,0	1,0	93,3 b	Mô sẹo màu trắng sữa, xốp và nâu đỏ, mềm, phát sinh không đồng đều ở 2 đầu

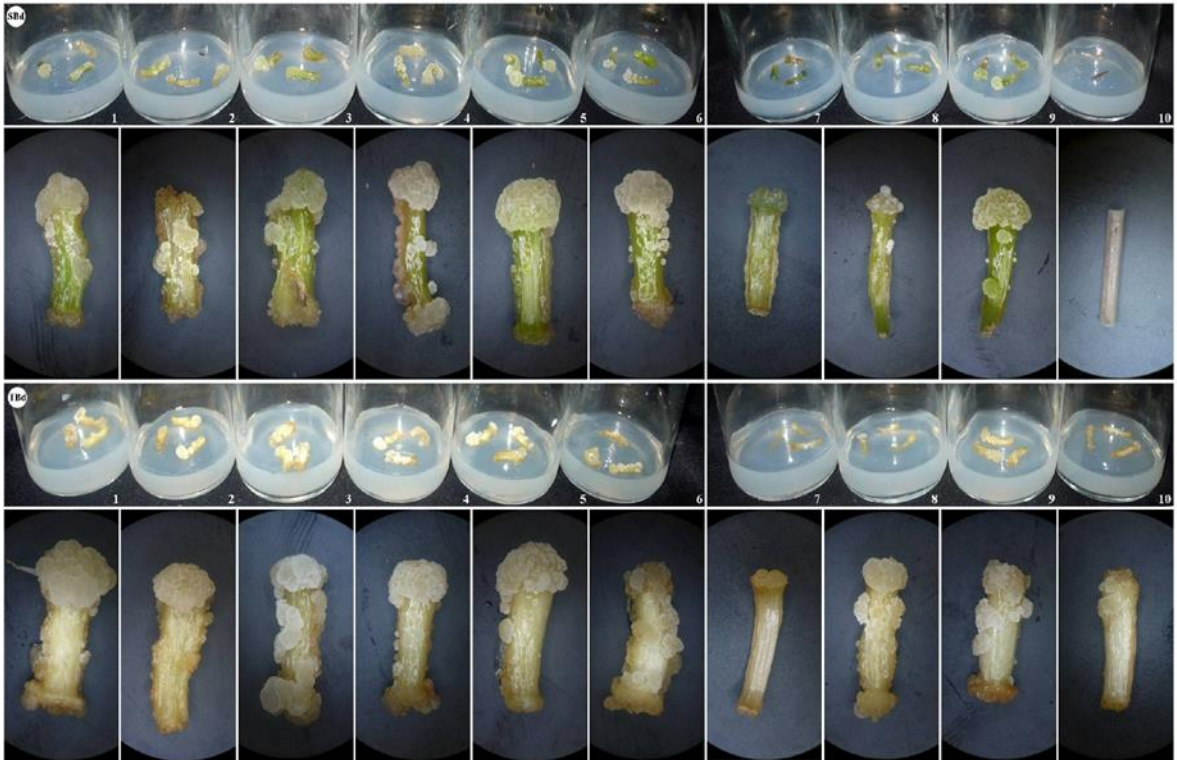
0,1	0,2	73,3 d	Mô sẹo màu xanh, cứng, rất ít ở 1 đầu mẫu cây
0,2	0,2	73,3 d	Mô sẹo màu trắng sữa, xốp, rất ít và vụn, phát sinh chủ yếu 1 đầu
0,5	0,2	93,3 b	Mô sẹo màu trắng xanh, xốp, nhiều, phát sinh 1 đầu và rải rác trên bề mặt
2,0	0,2	0 e	Mẫu chết

Ghi chú: Những chữ cái khác nhau (a, b, ...) được nêu trong cùng một cột biểu diễn sự khác nhau có ý nghĩa với $\alpha = 0,05$ trong Duncan's test.

Bảng 3.23. Ảnh hưởng sự kết hợp giữa 2,4-D và TDZ ở các nồng độ khác nhau lên sự phát sinh hình thái của mẫu cuống lá ITCL_C trong điều kiện tối hoàn toàn

CDHSTTV (mg/l)		Loại hình thái phát sinh	Đặc điểm
2,4-D	TDZ	Mô sẹo (%)	
1,0	0,01	93,3 b	Mô sẹo màu trắng sữa, xốp và vàng nâu, mềm, nhiều ở 1 đầu
1,0	0,05	100 a	Mô sẹo màu trắng sữa và vàng, xốp, phát sinh chủ yếu tại 1 đầu mẫu cây
1,0	0,1	100 a	Mô sẹo màu trắng sữa và trắng trong, xốp, nhiều, phát sinh ở 2 đầu và bề mặt mẫu
1,0	0,2	100 a	Mô sẹo màu trắng sữa và vàng nâu, mềm xốp, phát sinh không đồng đều ở 2 đầu
1,0	0,5	93,3 b	Mô sẹo màu trắng sữa và vàng, xốp, nhiều, phát sinh chủ yếu 1 đầu
1,0	1,0	86,6 c	Mô sẹo màu trắng và vàng, mềm xốp, phát sinh ít ở 2 đầu và bề mặt mẫu
0,1	0,2	0 e	Mẫu sống nhưng chưa cảm ứng
0,2	0,2	80,0 d	Mô sẹo màu trắng và vàng nâu, mềm, phát sinh ít ở 2 đầu và bề mặt mẫu
0,5	0,2	100 a	Mô sẹo màu trắng và vàng nâu, mềm xốp, phát sinh ít ở 2 đầu và bề mặt mẫu
2,0	0,2	86,6 c	Mô sẹo màu vàng nâu, mềm, ít ở 1 đầu mẫu

Ghi chú: Những chữ cái khác nhau (a, b, ...) được nêu trong cùng một cột biểu diễn sự khác nhau có ý nghĩa với $\alpha = 0,05$ trong Duncan's test.



Hình 3.15. Ảnh hưởng sự kết hợp giữa 2,4-D và TDZ ở các nồng độ khác nhau lên sự phát sinh hình thái của mẫu cuống lá ITCL_C. **SBd1 đến SBd6:** 1,0 mg/l 2,4-D kết hợp với TDZ (0,01; 0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 1,0 mg/l); **SBd7 đến SBd10:** 0,2 mg/l TDZ kết hợp với 2,4-D (0,1; 0,2; 0,5; 2,0 mg/l) trong điều kiện chiếu sáng. **TBd1 đến TBd6:** 1,0 mg/l 2,4-D kết hợp với TDZ (0,01; 0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 1,0 mg/l); **TBd7 đến TBd10:** 0,2 mg/l TDZ kết hợp với 2,4-D (0,1; 0,2; 0,5; 2,0 mg/l) trong điều kiện tối hoàn toàn.

Kết quả bảng 3.22 và 3.23 cho thấy, môi trường bổ sung 1,0 mg/l 2,4-D kết hợp với TDZ ở nồng độ từ 0,01 đến 1,0 mg/l cho tỷ lệ phát sinh mô sẹo cao, số lượng mô sẹo nhiều và đồng đều ở cả điều kiện chiếu sáng và tối hoàn toàn. Tuy nhiên, trong điều kiện tối cho tỷ lệ hình thành mô sẹo cao hơn ở điều kiện chiếu sáng. Ở một số nghiệm thức cho tỷ lệ hình thành mô sẹo là 100%, trong đó khi quan sát thì nhận thấy lượng mô sẹo được nuôi cấy trong môi trường có bổ sung 1,0 mg/l 2,4-D kết hợp với 0,1 mg/l TDZ trong điều kiện tối là nhiều nhất, mô sẹo phát sinh ở cả hai đầu và trên bề mặt mẫu cuống lá ITCL_C, trong khi các môi trường khác, mô sẹo chủ yếu tạo thành ở 1 đầu mẫu. Các mẫu cuống lá ITCL_C ở điều kiện sáng vẫn còn màu xanh và mô sẹo thường có dạng cứng, còn trong tối mẫu đã chuyển sang vàng và mô sẹo ở dạng mềm, xốp (Hình 3.15).

Bảng 3.24. Ảnh hưởng sự kết hợp giữa NAA và BA ở các nồng độ khác nhau lên sự phát sinh hình thái của mẫu cuống lá ITCL_C trong điều kiện chiếu sáng 16 giờ/ngày

CDHSTTV (mg/l)		Loại hình thái phát sinh		Đặc điểm
NAA	BA	Mô sẹo (%)		
1,0	0,1	60,0 c		Mô sẹo màu xanh nâu, cứng, phát sinh rất ít ở 2 đầu mẫu cây
1,0	0,2	53,3 d		Mô sẹo màu xanh, cứng, phát sinh ít ở 1 đầu mẫu cây
1,0	0,5	13,3 f		Mô sẹo màu nâu, phát sinh rất ít
1,0	1,0	46,6 e		Mô sẹo màu nâu, cứng, phát sinh ít ở 2 đầu mẫu cây
1,0	2,0	80,0 b		Mô sẹo màu xanh và vàng nâu, cứng, phát sinh ít ở 1 đầu và rải rác trên bề mặt mẫu
0,1	1,0	0 g		Mẫu chết
0,2	1,0	0 g		Mẫu chết
0,5	1,0	0 g		Mẫu chết
2,0	1,0	93,3 a		Mô sẹo màu trắng và vàng nâu, cứng, phát sinh chủ yếu ở 1 đầu và rải rác trên bề mặt mẫu

Ghi chú: Những chữ cái khác nhau (a, b, ...) được nêu trong cùng một cột biểu diễn sự khác nhau có ý nghĩa với $\alpha = 0,05$ trong Duncan's test.

Bảng 3.25. Ảnh hưởng sự kết hợp giữa NAA và BA ở các nồng độ khác nhau lên sự phát sinh hình thái của mẫu cuống lá ITCL_C trong điều kiện tối hoàn toàn

CDHSTTV (mg/l)		Loại hình thái phát sinh			Đặc điểm
NAA	BA	Mô sẹo (%)	Rễ bất định		
			Rễ (%)	Số rễ/mẫu	
1,0	0,1	86,6 c	80,0 b	1,1 b	Mô sẹo màu vàng nâu, mềm, phát sinh nhiều ở 1 đầu và rải rác trên bề mặt mẫu Rễ nhỏ, dài, màu trắng sữa
1,0	0,2	100 a	93,3 a	3,9 a	Mô sẹo màu vàng và vàng nâu, mềm, phát sinh ít ở 2 đầu và trên bề mặt mẫu Rễ nhỏ, dài, màu trắng sữa
1,0	0,5	93,3 b	7,7 c	0 c	Mô sẹo màu trắng trong và vàng, mềm, ít Rễ nhỏ, ngắn, màu trắng sữa

1,0	1,0	86,6 c	0 d	0 c	Mô sẹo màu vàng, mềm, ít, phần lớn phát sinh ở 1 đầu mẫu
1,0	2,0	86,6 c	0 d	0 c	Mô sẹo màu vàng nâu, mềm, phát sinh ở 1 đầu mẫu cây
0,1	1,0	0 d	0 d	0 c	Mẫu chết
0,2	1,0	0 d	0 d	0 c	Mẫu chết
0,5	1,0	0 d	0 d	0 c	Mẫu sống nhưng chưa cảm ứng
2,0	1,0	100 a	0 d	0 c	Mô sẹo màu trắng sữa và trắng trong, mềm xốp, nhiều ở 1 đầu và trên bề mặt mẫu

Ghi chú: Những chữ cái khác nhau (a, b, ...) được nêu trong cùng một cột biểu diễn sự khác nhau có ý nghĩa với $\alpha = 0,05$ trong Duncan's test.

Kết quả bảng 3.24 và 3.25 cho thấy, mẫu cuống lá ITCL_C sau 10 tuần nuôi cấy ở các nghiệm thức đều chuyển từ màu xanh sang màu vàng hoặc vàng nâu, trừ mẫu cây trong môi trường có bổ sung 1 mg/l NAA kết hợp 0,2 mg/l BA trong điều kiện chiếu sáng mẫu vẫn giữ màu xanh, mô sẹo hình thành cũng có màu xanh cứng đặc trưng (Hình 3.16). Trong điều kiện sáng và tối, tỷ lệ và lượng mô sẹo hình thành là tương đương nhau. Tỷ lệ mô sẹo phát sinh cao khi mẫu được nuôi cấy trên môi trường có bổ sung 1 mg/l NAA kết hợp 0,2 mg/l BA và môi trường 1 mg/l BA kết hợp với 2 mg/l NAA (100%) trong điều kiện tối. Trong đó, lượng mô sẹo hình thành trên môi trường 1,0 mg/l BA và 2,0 mg/l NAA trong điều kiện tối quan sát thấy là nhiều nhất, mô sẹo có màu trắng sữa hay vàng, phát sinh ở 1 đầu và rải rác trên bề mặt mẫu. Ở một số môi trường khác, mẫu ban đầu sống nhưng chưa cảm ứng hoặc hóa nâu và chết. So với sự kết hợp giữa 2,4-D với BA và 2,4-D với TDZ thì môi trường này cho tỷ lệ cũng như lượng mô sẹo thấp hơn nhiều.

Điều khác biệt là mẫu cuống lá ITCL_C đặt trong điều kiện tối cho tỷ lệ phát sinh rễ tương đối cao trên môi trường có bổ sung 1,0 mg/l NAA kết hợp lần lượt với 0,1 và 0,2 mg/l BA. Trong đó, mẫu cây trên môi trường 1,0 mg/l NAA kết hợp với 0,2 mg/l BA có tỷ lệ cao (93,3%) với số rễ trung bình là 3,9 rễ/mẫu. Rễ nhỏ, dài, phát sinh ở 1 đầu mẫu. Trong các chất kết hợp với nhau, đây là môi trường duy nhất cho sự hình thành rễ bất định, tuy tỷ lệ và số rễ trung bình không cao bằng khi sử dụng NAA riêng lẻ ở cùng loại mẫu cuống lá ITCL_C.



Hình 3.16. Ảnh hưởng sự kết hợp giữa NAA và BA ở các nồng độ khác nhau lên sự phát sinh hình thái của mẫu cuống lá ITCL_C. **SCd1 đến SCd5:** 1,0 mg/l NAA kết hợp với BA (0,1; 0,2; 0,5; 1,0; 2,0 mg/l); **SCd6 đến SCd9:** 1,0 mg/l BA kết hợp với NAA (0,1; 0,2; 0,5; 2,0 mg/l) trong điều kiện chiếu sáng. **TCd1 đến TCd5:** 1,0 mg/l NAA kết hợp với BA (0,1; 0,2; 0,5; 1,0; 2,0 mg/l); **TCd6 đến TCd9:** 1,0 mg/l BA kết hợp với NAA (0,1; 0,2; 0,5; 2,0 mg/l) trong điều kiện tối hoàn toàn.

Trong thí nghiệm này, chúng tôi nhận thấy môi trường thích hợp cho sự phát sinh mô sẹo ở mẫu cuống lá ITCL_C là môi trường bổ sung 1,0 mg/l 2,4-D kết hợp với 0,1 mg/l TDZ khi mẫu được đặt trong điều kiện tối hoàn toàn. So sánh với cùng loại mẫu cây là cuống lá, được nuôi cấy trên cùng môi trường và điều kiện chiếu sáng, chúng tôi nhận thấy mô sẹo chủ yếu phát sinh ở vị trí cắt, nên mẫu cuống lá tTCL_C sẽ tiết kiệm số lượng mẫu hơn mẫu cuống lá ITCL_C. Từ đó cho thấy, mẫu cuống lá tTCL_L thích hợp cho sự phát sinh mô sẹo hơn mẫu cuống lá ITCL_C.

3.1.1.8. Ảnh hưởng giữa sự kết hợp auxin và cytokinin lên sự phát sinh hình thái của mẫu thân rễ tTCL_R trong điều kiện chiếu sáng và tối hoàn toàn

Trong thí nghiệm này, chúng tôi sử dụng nguồn mẫu thân rễ của cây sâm Ngọc Linh *in vitro* đồng đều về độ tuổi, kích thước và hình dạng. Mẫu thân rễ được cắt theo chiều ngang tTCL_R, cấy vào môi trường bổ sung các CĐHSTTV phối hợp với nhau và đặt ở 2 điều kiện chiếu sáng và tối hoàn toàn. Sau 10 tuần nuôi cấy, kết quả được ghi nhận ở các bảng 3.26 đến 3.31 và các hình 3.17, 3.18, 3.19.

Bảng 3.26. Ảnh hưởng sự kết hợp giữa 2,4-D và BA ở các nồng độ khác nhau lên sự phát sinh hình thái của mẫu thân rễ tTCL_R trong điều kiện chiếu sáng 16 giờ/ngày

CDHSTTV (mg/l)		Loại hình thái phát sinh	Đặc điểm
2,4-D	BA	Mô sẹo (%)	
1,0	0,1	100 a	Mô sẹo màu trắng và nâu vàng, cứng, nhiều
1,0	0,2	100 a	Mô sẹo màu trắng vàng nâu, cứng, nhiều
1,0	0,5	100 a	Mô sẹo màu trắng sữa, xốp, nhiều
1,0	1,0	100 a	Mô sẹo màu trắng sữa, mềm, nhiều
1,0	2,0	100 a	Mô sẹo màu trắng xanh, vàng nhạt, xốp
0,1	1,0	34,4 e	Mô sẹo màu nâu đen, cứng, ít
0,2	1,0	66,6 c	Mô sẹo màu vàng nâu, cứng, ít
0,5	1,0	50 d	Mô sẹo màu vàng nâu, mềm xốp, ít
2,0	1,0	72,2 b	Mô sẹo màu trắng sữa và vàng, cứng, ít

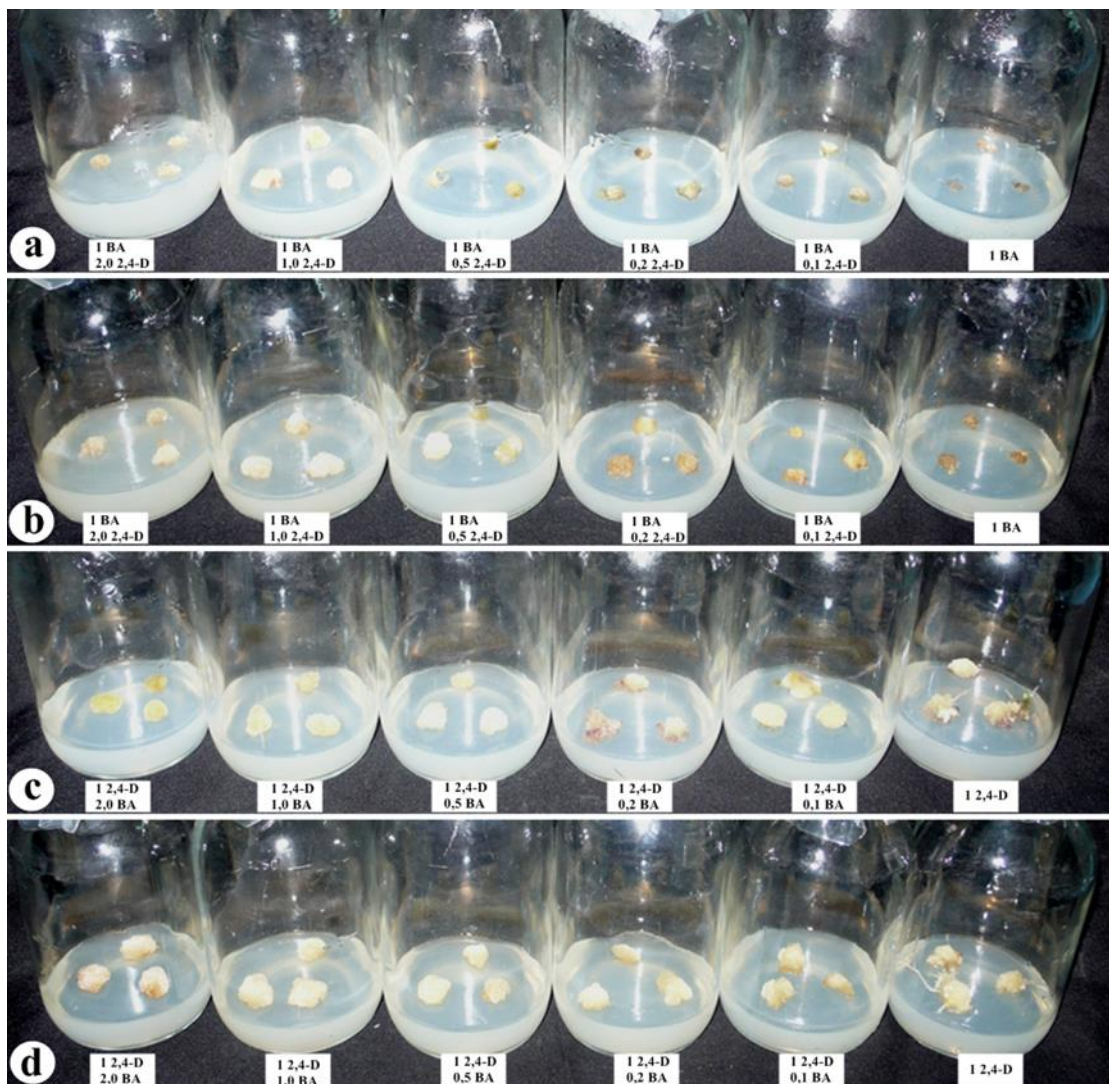
Ghi chú: Những chữ cái khác nhau (a, b, ...) được nêu trong cùng một cột biểu diễn sự khác nhau có ý nghĩa với $\alpha = 0,05$ trong Duncan's test.

Bảng 3.27. Ảnh hưởng sự kết hợp giữa 2,4-D và BA ở các nồng độ khác nhau lên sự phát sinh hình thái của mẫu thân rễ tTCL_R trong điều kiện tối hoàn toàn

CDHSTTV (mg/l)		Loại hình thái phát sinh	Đặc điểm
2,4-D	BA	Mô sẹo (%)	
1,0	0,1	100 a	Mô sẹo màu trắng, vàng, cứng, nhiều
1,0	0,2	100 a	Mô sẹo màu trắng sữa, vàng, cứng, nhiều
1,0	0,5	100 a	Mô sẹo màu trắng sữa, xốp, nhiều
1,0	1,0	100 a	Mô sẹo màu trắng sữa, xốp, nhiều
1,0	2,0	100 a	Mô sẹo màu vàng và trắng sữa, xốp, nhiều
0,1	1,0	13,3 e	Mô sẹo màu vàng, cứng, ít
0,2	1,0	73,3 d	Mô sẹo màu vàng nâu, cứng, ít
0,5	1,0	83,3 c	Mô sẹo có màu trắng sữa, vàng nâu, cứng, ít
2,0	1,0	86,6 b	Mô sẹo màu vàng và trắng, cứng, ít

Ghi chú: Những chữ cái khác nhau (a, b, ...) được nêu trong cùng một cột biểu diễn sự khác nhau có ý nghĩa với $\alpha = 0,05$ trong Duncan's test.

Kết quả bảng 3.26 và 3.27 cho thấy, các mẫu thân rễ tTCL_R cấy vào môi trường có bổ sung 1 mg/l 2,4-D kết hợp với BA ở các nồng độ khác nhau đều cảm ứng phát sinh mô sẹo với tỷ lệ cao (100%) ở cả điều kiện chiếu sáng và tối hoàn toàn (Bảng 3.26 và 3.27). Ngược lại, trong môi trường có bổ sung 1 mg/l BA kết hợp với 2,4-D thì tỷ lệ tạo mô sẹo không cao, thấp nhất là trong môi trường có bổ sung 1 mg/l BA kết hợp với 0,1 mg/l 2,4-D trong điều kiện tối 13,3%. Mô sẹo hình thành trong điều kiện sáng và tối đa số có cấu trúc chắc, có màu trắng sữa, màu vàng và vàng nâu (Hình 3.17). Trong môi trường cho sự hình thành mô sẹo với lượng nhiều và đồng đều là môi trường bổ sung 1,0 mg/l 2,4-D và 1,0 mg/l BA trong điều kiện tối.



Hình 3.17. Ảnh hưởng sự kết hợp giữa 2,4-D và BA ở các nồng độ khác nhau lên sự phát sinh hình thái của mẫu thân rễ tTCL_R. **Hình a và c:** 1,0 mg/l BA kết hợp với 2,4-D (0,1; 0,2; 0,5; 2,0 mg/l) và 1,0 mg/l 2,4-D kết hợp với BA (0,1; 0,2; 0,5; 1,0; 2,0 mg/l) trong điều kiện chiếu sáng. **Hình b và d:** 1,0 mg/l BA kết hợp với 2,4-D (0,1; 0,2; 0,5; 2,0 mg/l) và 1,0 mg/l 2,4-D kết hợp với BA (0,1; 0,2; 0,5; 1,0; 2,0 mg/l). trong điều kiện tối hoàn toàn.

Bảng 3.28. Ảnh hưởng sự kết hợp giữa 2,4-D và TDZ ở các nồng độ khác nhau lên sự phát sinh hình thái của mẫu thân rễ tTCL_R trong điều kiện chiếu sáng 16 giờ/ngày

CDHSTTV (mg/l)		Loại hình thái phát sinh		Đặc điểm
2,4-D	TDZ	Mô sẹo (%)	Chồi (%)	
1,0	0,01	100 a	0 b	Mô sẹo có màu trắng
1,0	0,05	100 a	0 b	Mô sẹo màu trắng và vàng nâu, mềm, ít
1,0	0,1	100 a	0 b	Mô sẹo màu trắng xanh, cứng, nhiều
1,0	0,2	100 a	0 b	Mô sẹo màu trắng sữa và vàng, xốp
1,0	0,5	86,6 b	0 b	Mô sẹo màu trắng sữa và nâu, xốp
1,0	1,0	86,6 b	0 b	Mô sẹo màu vàng nâu và trắng xanh, mềm xốp
0,1	0,2	33,3 d	42 a	Mẫu màu đen, cứng Một vài mẫu phát sinh chồi, chồi có 3 lá màu xanh trắng
0,2	0,2	33,3 d	42 a	Mẫu màu đen, cứng Một vài mẫu phát sinh chồi, chồi có 3 lá màu xanh trắng
0,5	0,2	86,6 b	0 b	Mô sẹo ở giữa màu trắng sữa, xốp, viền có màu vàng nâu, cứng
2,0	0,2	80,0 c	0 b	Mô sẹo màu trắng sữa, màu vàng, cứng

Ghi chú: Những chữ cái khác nhau (a, b, ...) được nêu trong cùng một cột biểu diễn sự khác nhau có ý nghĩa với $\alpha = 0,05$ trong Duncan's test.

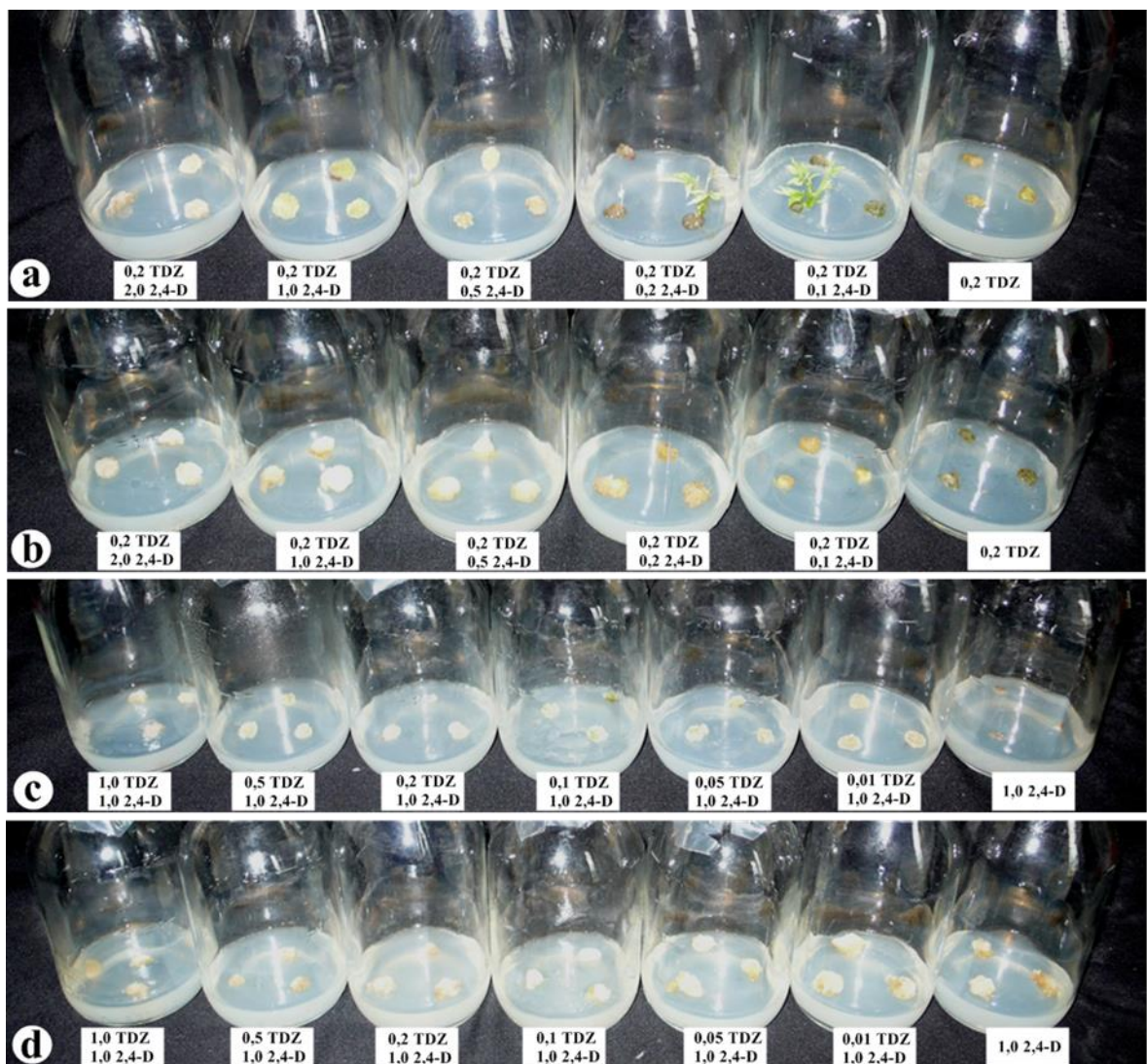
Bảng 3.29. Ảnh hưởng sự kết hợp giữa 2,4-D và TDZ ở các nồng độ khác nhau lên sự phát sinh hình thái của mẫu thân rễ tTCL_R trong điều kiện tối hoàn toàn

CDHSTTV (mg/l)		Loại hình thái phát sinh		Đặc điểm
2,4-D	TDZ	Mô sẹo (%)		
1,0	0,01	100 a		Mô sẹo màu trắng sữa và vàng nâu, xốp, nhiều
1,0	0,05	100 a		Mô sẹo màu trắng sữa và vàng, xốp, nhiều
1,0	0,1	100 a		Mô sẹo màu trắng sữa và vàng nâu, xốp
1,0	0,2	100 a		Mô sẹo màu vàng nâu, trong và mềm
1,0	0,5	93,3 b		Mô sẹo màu trắng và vàng nâu, mềm xốp, ít
1,0	1,0	80,0 c		Mô sẹo màu trắng và vàng nâu, ít

0,1	0,2	33,3 d	Mô sẹo màu vàng, cứng, rất ít
0,2	0,2	80,0 c	Mô sẹo màu vàng, xốp
0,5	0,2	93,3 b	Mô sẹo màu trắng sữa, vàng, mềm, nhiều
2,0	0,2	93,3 b	Mô sẹo màu trắng sữa, mềm, ít

Ghi chú: Những chữ cái khác nhau (a, b, ...) được nêu trong cùng một cột biểu diễn sự khác nhau có ý nghĩa với $\alpha = 0,05$ trong Duncan's test.

Sau 10 tuần nuôi cấy, kết quả cho thấy, mẫu thân rễ tTCL_R nuôi cấy trên môi trường bổ sung 2,4-D và TDZ trong 2 điều kiện chiếu sáng cho tỷ lệ phát sinh mô sẹo là tương đương.



Hình 3.18. Ảnh hưởng sự kết hợp giữa 2,4-D và TDZ ở các nồng độ khác nhau lên sự phát sinh hình thái của mẫu thân rễ tTCL_R. **Hình a và c:** 0,2 mg/l TDZ kết hợp với 2,4-D (0,1; 0,2; 0,5; 2,0 mg/l) và 1,0 mg/l 2,4-D kết hợp với TDZ (0,01; 0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 1,0 mg/l) trong điều kiện chiếu sáng. **Hình b và d:** 0,2 mg/l TDZ kết hợp với 2,4-D (0,1; 0,2; 0,5; 2,0 mg/l) và 1,0 mg/l 2,4-D kết hợp với TDZ (0,01; 0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 1,0 mg/l) trong điều kiện tối hoàn toàn.

Mô sẹo tạo thành trên môi trường bổ sung 1,0 mg/l 2,4-D và TDZ từ 0,05 đến 1,0 mg/l đồng đều và nhiều hơn các môi trường khác (Hình 3.18). Mẫu cho tỷ lệ phát sinh mô sẹo cao là trong môi trường có bổ sung 1 mg/l 2,4-D kết hợp với TDZ từ 0,01 đến 0,2 mg/l (100%). Trong đó, môi trường bổ sung 1,0 mg/l 2,4-D kết hợp với 0,01 mg/l TDZ trong điều kiện tối và môi trường 0,2 mg/l TDZ kết hợp với 0,5 mg/l 2,4-D lượng mô sẹo hình thành cao như nhau, chỉ khác cấu trúc, mô sẹo trong điều kiện sáng có màu trắng xanh còn trong tối lại có màu trắng sữa, xốp hơn mô sẹo ở điều kiện sáng. So sánh với môi trường bổ sung 2,4-D và BA (Bảng 3.26, 3.27) thì mẫu cấy trên môi trường bổ sung 1,0 mg/l 2,4-D kết hợp với TDZ ở nồng độ từ 0,01 đến 1,0 mg/l sự phát sinh mô sẹo không đều, kích thước mô sẹo nhỏ hơn và đặc biệt mẫu được cấy trên môi trường có bổ sung 0,2 mg/l TDZ kết hợp 0,1 và 0,2 mg/l 2,4-D trong điều kiện chiếu sáng có sự hình thành chồi, tuy nhiên, khi quan sát thì nhận thấy những chồi này là do mẫu có chứa mắt ngủ lên phát triển thành chồi.

Bảng 3.30. Ảnh hưởng sự kết hợp giữa NAA và BA ở các nồng độ khác nhau lên sự phát sinh hình thái của mẫu thân rễ tTCL_R trong điều kiện chiếu sáng 16 giờ/ngày

CDHSTTV (mg/l)		Loại hình thái phát sinh	Đặc điểm
NAA	BA	Mô sẹo (%)	
1,0	0,1	100 a	Mô sẹo màu trắng xanh, cứng, nhiều
1,0	0,2	86,7 b	Mô sẹo màu xanh, trắng, vàng ở viền, cứng, ít
1,0	0,5	86,7 b	Mô sẹo màu xanh, cứng, ít
1,0	1,0	80,0 c	Mô sẹo màu xanh nâu, cứng, ít
1,0	2,0	50 e	Mô sẹo màu nâu đen, trắng, cứng, ít
0,1	1,0	0 f	Mẫu chết
0,2	1,0	0 f	Mẫu chết
0,5	1,0	0 f	Mẫu chết
2,0	1,0	73,3 d	Mô sẹo màu vàng xanh, cứng, ít

Ghi chú: Những chữ cái khác nhau (a, b, ...) được nêu trong cùng một cột biểu diễn sự khác nhau có ý nghĩa với $\alpha = 0,05$ trong Duncan's test.

Bảng 3.31. Ảnh hưởng sự kết hợp giữa NAA và BA ở các nồng độ khác nhau lên sự phát sinh hình thái của mẫu thân rễ tTCL_R trong điều kiện tối hoàn toàn

CDHSTTV (mg/l)		Loại hình thái phát sinh	Đặc điểm
NAA	BA	Mô sẹo (%)	
1,0	0,1	100 a	Mô sẹo màu trắng, vàng, mềm, ít
1,0	0,2	86,6 c	Mô sẹo màu nâu ở xung quanh, mềm, ít
1,0	0,5	80,0 d	Mô sẹo màu trắng, nâu xung quanh, ít
1,0	1,0	80,0 d	Mô sẹo màu vàng nâu, trắng, mềm, ít
1,0	2,0	73,3 e	Mô sẹo có màu vàng nâu, ít
0,1	1,0	0 g	Mẫu chết
0,2	1,0	0 g	Mẫu chết
0,5	1,0	33,3 f	Mô sẹo màu nâu đen và rất ít
2,0	1,0	93,3 b	Mô sẹo màu trắng vàng, cứng

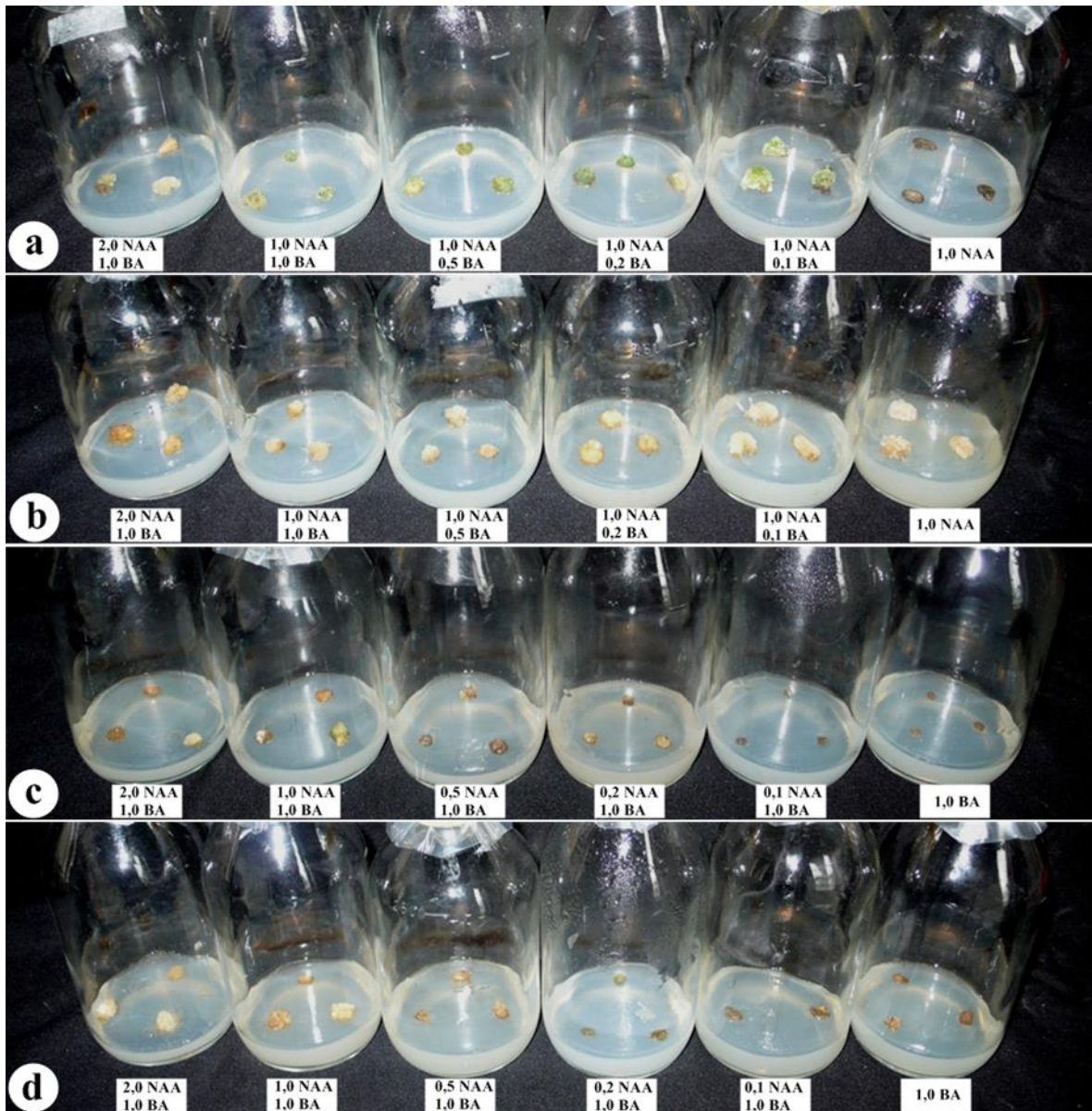
Ghi chú: Những chữ cái khác nhau (a, b, ...) được nêu trong cùng một cột biểu diễn sự khác nhau có ý nghĩa với $\alpha = 0,05$ trong Duncan's test.

Kết quả bảng 3.30, 3.31 và hình 3.19 cho thấy, ở cả 2 điều kiện chiếu sáng và tối hoàn toàn, tỷ lệ và lượng mô sẹo tạo thành trên các mẫu thân rễ tTCL_R ở hầu hết các môi trường đều thấp và không đồng đều. Môi trường có bổ sung 1 mg/l NAA kết hợp với BA ở các nồng độ khác nhau thì tỷ lệ và lượng mô sẹo cao hơn khi bổ sung 1,0 mg/l BA kết hợp với NAA ở cả hai điều kiện sáng và tối hoàn toàn. Khi mẫu nuôi cấy trong môi trường có bổ sung 1 mg/l NAA kết hợp với 0,1 mg/l BA cho tỷ lệ tạo mô sẹo cao (100%) cả trong điều kiện sáng và tối. Tuy nhiên, mô sẹo trong điều kiện sáng có màu trắng xanh còn trong tối có màu trắng sữa và vàng. Ở các môi trường khác, hầu hết các mẫu chết và hóa nâu hoặc phát sinh mô sẹo với tỷ lệ rất thấp. Qua đó, ta thấy được sự kết hợp giữa NAA và BA không phù hợp cho sự hình thành mô sẹo ở mẫu thân rễ tTCL_R.

Qua các kết quả thu được ở thí nghiệm 8, chúng tôi nhận thấy, tùy vào từng mục đích và hướng nghiên cứu mà môi trường thích hợp cho sự hình thành mô sẹo và lượng mô sẹo ở mẫu thân rễ tTCL_R là 1,0 mg/l 2,4-D kết hợp với 0,1 mg/l BA trong điều kiện sáng hay 1,0 mg/l 2,4-D với 0,01 mg/l TDZ trong điều kiện tối và 1 mg/l NAA kết hợp với 0,1 mg/BA ở cả hai điều kiện sáng và tối.

Tuy nhiên, khi so sánh với tỷ lệ phát sinh mô sẹo ở mẫu lá tTCL_L (thí nghiệm 5) và mẫu cuống lá tTCL_C (thí nghiệm 6) thì lượng mô sẹo phát sinh trong mẫu thân củ tTCL_R trong thí nghiệm này không cao.

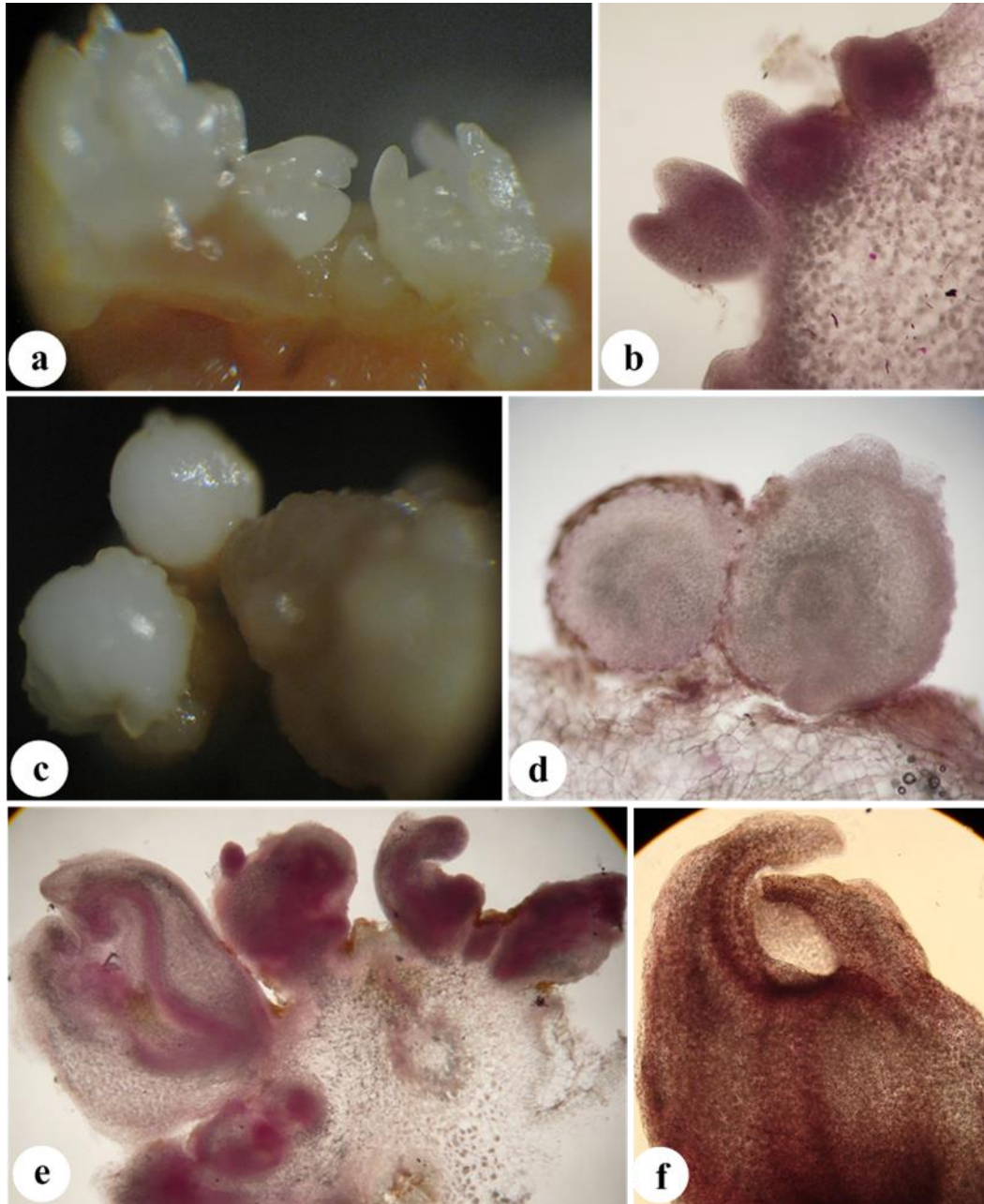
Như vậy, cũng như mẫu lá tTCL_L, cuống lá tTCL_C, cuống lá tTCL_C, sự kết hợp giữa NAA và BA không thích hợp cho sự phát sinh mô sẹo ở mẫu thân rễ tTCL_R.



Hình 3.19. Ảnh hưởng sự kết hợp giữa NAA và BA ở các nồng độ khác nhau lên sự phát sinh hình thái của mẫu thân rễ tTCL_R. **Hình a và c:** 1,0 mg/l NAA kết hợp với BA (0,1; 0,2; 0,5; 1,0; 2,0 mg/l) và 1,0 mg/l BA kết hợp với NAA (0,1; 0,2; 0,5; 2,0 mg/l) trong điều kiện chiếu sáng. **Hình b và d:** 1,0 mg/l NAA kết hợp với BA (0,1; 0,2; 0,5; 1,0; 2,0 mg/l) và 1,0 mg/l BA kết hợp với NAA (0,1; 0,2; 0,5; 2,0 mg/l) trong điều kiện tối hoàn toàn.

3.1.1.9. *Quan sát sự thay đổi phát sinh hình thái của phôi vô tính sâm Ngọc Linh*

Kết quả giải phẫu và hình chụp soi nổi các hình dạng phát triển của phôi cho thấy phôi thu nhận từ các nghiệm thức không có sự khác biệt về hình thái và nó tồn tại ở các dạng chính là hình cầu, hình tim, hình thủy lô và hình hai lá mầm (Hình 3.20).



Hình 3.20. Hình giải phẫu các giai đoạn phát triển của phôi vô tính sâm Ngọc Linh. a và b: phôi hình tim; c và d: phôi hình cầu; e: phôi hai lá mầm; f: phôi hình thủy lô

Qua kết quả thu nhận được ở trên cho thấy, phôi sâm Ngọc Linh trải qua các giai đoạn giống như phôi ở đa số thực vật bậc cao. Cho đến nay, phôi vô tính được

nghiên cứu trên 130 loài, bao gồm các loài ngũ cốc, các loài cỏ, cây họ đậu và các cây có hình quả nón [126]. Bên cạnh đó, hầu hết các nghiên cứu này tập trung vào sự phát triển của phôi hơn là quá trình phát sinh hình thái và phát triển để xác định được đặc điểm sinh lý, sinh hóa của phôi. Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng lên hình thái phôi vô tính được đề cập tổng quát ở một số đối tượng như cà rốt, lúa. Tuy nhiên, những hiểu biết này chưa toàn diện cả về bề sâu và bề rộng của vấn đề. Kỹ thuật tạo phôi vô tính đã và đang khẳng định những đặc tính ưu việt của nó trong công nghiệp vi nhân giống. Chính vì thế, việc xây dựng quy trình tối ưu đối với một đối tượng cụ thể như sâm Ngọc Linh chúng tôi đã nghiên cứu quá trình phát sinh hình thái bằng kỹ thuật nuôi cấy lớp mỏng tế bào cũng như quá trình sinh trưởng và phát triển của phôi vô tính là một việc làm thiết yếu.

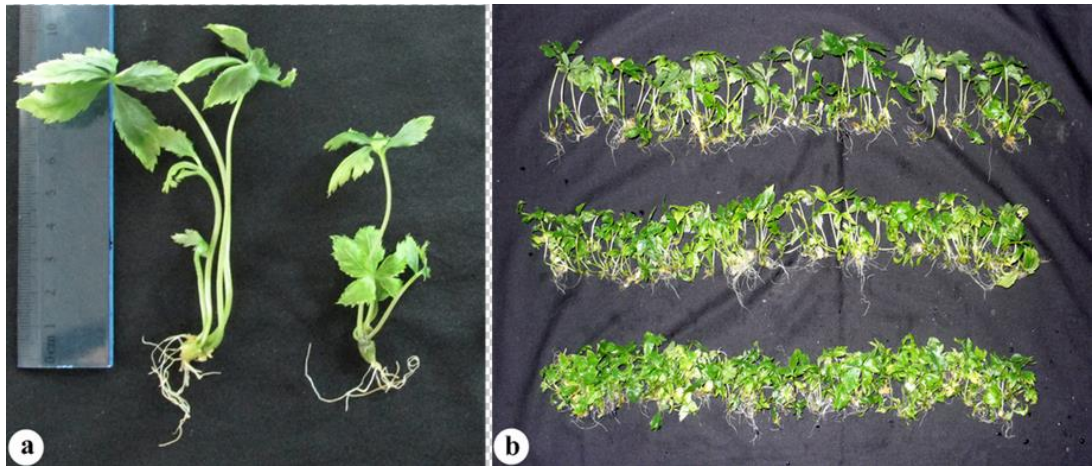
3.1.1.10. Tạo cây con hoàn chỉnh từ phôi vô tính

Sau 8 tuần nuôi cấy trên môi trường SH có bổ sung 1 mg/l BA (6-benzyladenine), 0,5 mg/l NAA (α -naphthaleneacetic acid), 50 g/l sucrose, 9 g/l agar, 1 g/l than hoạt tính [4], kết quả đáp ứng sự sinh trưởng và phát triển của phôi thành cây con hoàn chỉnh dưới điều kiện chiếu sáng khác nhau được ghi nhận ở bảng 3.32 và hình 3.21.

Bảng 3.32. Ảnh hưởng của điều kiện chiếu sáng lên sự sinh trưởng và phát triển của phôi sâm Ngọc Linh.

Điều kiện chiếu sáng	Chiều cao cây (cm)	Số lá	Số rễ	Đặc điểm hình thái
Sáng	5	2	12	Lá có màu xanh đậm, xòe to Củ to
Tối	7	1	4	Củ nhỏ, thân mảnh vươn cao, lá nhỏ có màu trắng Nhiều phôi không tạo thành cây hoàn chỉnh mà lại cho sự tạo chồi

Kết quả nghiên cứu trong đề tài này cũng nhận thấy, dưới điều kiện chiếu sáng phù hợp thì cây đều có củ to (chiều dài củ khoảng 1 – 1,5 cm, đường kính củ khoảng 0,5 -0,7 cm), bộ lá phát triển đồng đều, hình thái lá bình thường và có cấu trúc giống với những cây sinh trưởng ngoài tự nhiên. Do đó, khả năng thích nghi của chúng ngoài vườn ươm có thể là rất cao. Từ đó chúng tôi tiếp tục tạo một lượng cây lớn (10.000 cây) từ phôi để làm thí nghiệm tiếp theo và đem đi trồng ở Quảng Nam.



Hình 3.21. Cây con phát triển và sinh trưởng từ phôi vô tính sâm Ngọc Linh. a. Cây phát triển từ phôi vô tính; b. Cây sâm *in vitro* từ phôi được mang ra ngoài điều kiện sinh thái khác nhau.

3.1.2. Nghiên cứu sự sinh trưởng và phát triển của cây con *in vitro* ở điều kiện sinh thái khác nhau

3.1.2.1. Quá trình sinh trưởng và phát triển của cây sâm Ngọc Linh nuôi cấy *in vitro* được đem trồng tại Quảng Nam

Thí nghiệm khảo sát khả năng thích ứng của cây sâm Ngọc Linh với điều kiện sinh thái tự nhiên, nơi mà có các điều kiện ngoại cảnh thích hợp cho sự sinh trưởng và phát triển của cây sâm Ngọc Linh. Chúng tôi đã tiến hành trồng vào tháng 9, đầu mùa mưa năm 2014. Do trại trồng sâm nằm trên núi cao đi lại rất khó khăn nhất là mùa mưa, vì vậy, chúng tôi tiến hành thu kết quả 06 tháng, 1 năm, 2 năm tuổi một lần để điều tra khả năng sống sót của cây sâm Ngọc Linh *in vitro* và tỷ lệ mọc lá mới sau thời gian ngủ đông.

Bảng 3.33. Kết quả khảo sát tỷ lệ sống sót, sinh trưởng và phát triển của cây sâm Ngọc Linh *in vitro* ở giai đoạn vườn ươm tại khu vực núi Ngọc Linh xã Trà Linh, huyện Nam Trà My, tỉnh Quảng Nam, trồng vào đầu mùa mưa (tháng 09 năm 2014)

Thời gian điều tra	Tỷ lệ sống sót (%)	Tỷ lệ mọc lá mới (%)	Hình thành củ nhánh (%)
06 tháng sau khi trồng	93	66	20
1 năm sau khi trồng	91	78	45
1,5 năm sau khi trồng	90	87	70
2 năm sau khi trồng	90	87	100

Ghi chú: tỷ lệ % mọc lá mới và hình thành củ nhánh được tính theo tỷ lệ sống của cây

Ngoài ra, đối với các cây sâm Ngọc Linh có độ tuổi từ 06 tháng tuổi trở lên, chúng tôi còn khảo sát thêm chỉ tiêu hình thành củ nhánh, đây là một chỉ tiêu quan trọng để đánh giá tốc độ sinh trưởng của cây sâm Ngọc Linh nuôi cấy *in vitro* so với cây trồng bằng hạt. Chúng tôi đã phải tiến hành 6 tháng điều tra và thu thập số liệu một lần. Kết quả được trình bày ở bảng 3.33.

Hầu hết các cây sâm Ngọc Linh được tạo ra trong môi trường *in vitro* khi đem trồng trong điều kiện *ex vitro* đều rụng lá, chỉ còn thân củ ở trạng thái ngủ nằm trong đất. Sáu tháng sau khi trồng từ thân củ này cây sâm sẽ ra rễ, sau đó phát triển chồi và bộ lá mới.

Việc tiến hành bố trí thí nghiệm thiết lập vườn ươm ở khu vực có hệ sinh thái đặc trưng phù hợp với sự phát triển của cây sâm Ngọc Linh là một hướng đi đúng nhằm khảo sát sự thích ứng của cây sâm Ngọc Linh nuôi cấy *in vitro* trong điều kiện tự nhiên. Kết quả ở bảng 3.33 cho thấy, sau 6 tháng trồng tại khu vực núi Ngọc Linh xã Trà Linh, huyện Nam Trà My, tỉnh Quảng Nam với các điều kiện sinh thái đặc trưng. Trong tổng số 800 cây sâm Ngọc Linh *in vitro* được trồng ngoài tự nhiên thì tỷ lệ sống của cây đạt 93%, nhiều cây sau 6 tháng đã đạt chiều dài của chồi mới lên tới 14 cm, đặc biệt có tới 66% cây có hai chồi trên một củ, nhiều cây đạt 4 – 5 chồi trên một củ trong khi đó cây sâm gieo bằng hạt chỉ có một chồi duy nhất điều đó cho thấy tốc độ sinh trưởng của cây sâm Ngọc Linh *in vitro* so với cây sâm gieo bằng hạt là nhanh hơn. Rễ của cây sâm Ngọc Linh *in vitro* sau 6 tháng trồng với chiều dài trung bình của rễ lên tới 12 cm là một dấu hiệu đáng mừng cho phép cây sâm Ngọc Linh *in vitro* phát triển và sinh trưởng tốt ngoài tự nhiên (Hình 3.22 d).

Một điều đáng ghi nhận là sau 6 tháng trồng đã có 20% cây sâm hình thành củ nhánh (Hình 3.22 e), đây là một kết quả cho thấy quá trình sinh trưởng và phát triển của cây sâm Ngọc Linh nuôi cấy *in vitro* vượt xa nhiều so với cây sâm Ngọc Linh trồng bằng hạt. Thông thường, cây sâm Ngọc Linh tự nhiên trồng từ khi gieo hạt đến khi hình thành củ nhánh mới phải mất ít nhất là 2 năm, một năm ở giai đoạn vườn ươm và một năm trải qua mùa sinh trưởng đầu tiên để hình thành củ nhánh mới. Lý do chính cây sâm Ngọc Linh nuôi cấy *in vitro* có tốc độ sinh trưởng nhanh hơn cây sâm Ngọc Linh gieo bằng hạt đó là do trong quá trình nuôi cấy, các cây sâm Ngọc Linh có nguồn gốc từ phôi vô tính đã có sẵn cực chồi và cực rễ, đồng thời đã được

hình thành thân củ ở trong ống nghiệm. Đây là một lợi thế rất lớn của cây nuôi cấy mô, trong khi đó đối với cây sâm gieo bằng hạt, hạt trước khi nảy mầm nó phải ngủ trong đất 8 tháng đến một năm mới nảy mầm.



Hình 3.22. Các giai đoạn phát triển của cây sâm Ngọc Linh nuôi cấy *in vitro* tại xã Trà Linh: a. Vườn sâm lúc 0 ngày tuổi; b. cây sâm mọc lá mới sau thời gian ở trạng thái ngủ; c và d. vườn sâm và cây sâm 06 tháng tuổi và 1 năm tuổi; e. củ sâm phân nhánh; f. cây sâm 6 tháng tuổi; g. cây sâm 2 năm tuổi.

Trong thí nghiệm này, sau 6 tháng tỷ lệ cây sâm Ngọc Linh *in vitro* bị chết là khá thấp (7%), nguyên nhân chủ yếu dẫn đến cây bị chết là do vườn ươm được thiết lập ở khu vực núi cao đi lại khó khăn cho nên việc chăm sóc và phòng ngừa sâu bệnh

chưa được thực hiện tốt, đó cũng là một trong những nguyên nhân làm giảm tỷ lệ sống sót của cây. Sau 2 năm tuổi thì tỷ lệ sống của cây sâm Ngọc Linh duy trì và đạt khoảng (90%); tỷ lệ mọc lá mới sau thời gian ở trạng thái ngủ là (87%) đặc biệt cây 2 năm tuổi có sự hình thành củ nhánh là 100% và có xu thế phát triển thành một bụi. Thông thường ở trong tự nhiên cây sâm Ngọc Linh chỉ có một chồi duy nhất, mỗi năm lại rụng đi và thay một chồi mới. Trong khi đó, hình thái của củ sâm nuôi cấy *in vitro* thường phát triển nhiều cụm chồi, xét về tốc độ sinh trưởng rõ ràng dạng cụm phát triển nhanh hơn, nhưng về chất lượng của củ cần phải có những nghiên cứu tiếp theo để đánh giá chính xác vấn đề này.

3.1.2.2. Nghiên cứu quá trình sinh trưởng và phát triển của cây sâm Ngọc Linh nuôi cấy in vitro ở tại Khu vực Cồng Trời, Vườn quốc gia Bidoup Núi Bà, Lâm Đồng (trồng vào mùa mưa: tháng 9 năm 2014)

Chúng tôi đã tiến hành trồng thử nghiệm đồng thời 800 cây con sâm Ngọc Linh *in vitro* ở tại Khu vực Cồng Trời, Vườn quốc gia Bidoup Núi Bà, huyện Lạc Dương, tỉnh Lâm Đồng, để so sánh với cây sâm Ngọc Linh trồng ở Quảng Nam. Kết quả bước đầu cho thấy, điều kiện sinh thái thổ nhưỡng khác nhau cũng ảnh hưởng rõ đến tỷ lệ sống của sâm Ngọc Linh trồng ở Lâm Đồng. Tỷ lệ sống chỉ đạt 70%, tỷ lệ mọc lá mới sau thời gian ngủ đông đạt 30% và quá trình phát triển của hệ rễ cũng chậm hơn so với trồng tại Quảng Nam. Bên cạnh đó, cây sinh trưởng và phát triển chậm, bị sâu bệnh, côn trùng gặm nhấm phá hoại,... (Bảng 3.34).

Hầu hết các cây sâm tạo ra trong môi trường *in vitro* khi đem trồng trong điều kiện *ex vitro* đều rụng lá, chỉ còn thân củ ở trạng thái ngủ nằm trong đất, từ thân củ này cây sâm sẽ ra rễ, sau đó phát triển chồi và bộ lá mới.

Bảng 3.34. Kết quả khảo sát tỷ lệ sống sót và sinh trưởng của cây sâm Ngọc Linh in vitro ở tại khu vực Cồng Trời, Vườn quốc gia Bidoup Núi Bà Lâm Đồng

Thời gian điều tra	Tỷ lệ sống sót (%)	Tỷ lệ Mọc lá mới (%)	Hình thành củ nhánh (%)
06 tháng sau khi trồng	70	30	0
1 năm sau khi trồng	60	40	20
1,5 năm sau khi trồng	50	50	30
2 năm sau khi trồng	50	50	50

Ghi chú: tỷ lệ % mọc lá mới và hình thành củ nhánh được tính theo tỷ lệ sống của cây

Việc trồng thử nghiệm cây sâm Ngọc Linh có nguồn gốc từ phôi vô tính ở những khu vực có điều kiện sinh thái tương tự đỉnh núi Ngọc Linh nếu thành công hứa hẹn sẽ có khả năng di thực và phát triển loài cây dược liệu có giá trị kinh tế cao trong tương lai.



Hình 3.23. Các giai đoạn phát triển của cây sâm Ngọc Linh nuôi cấy *in vitro* tại Khu vực công trời, vườn quốc gia Bidoup Núi Bà: a. Vườn sâm lúc 0 ngày tuổi; b. Vườn sâm 1 năm tuổi; c. Cây sâm mọc lá mới sau thời gian ở trạng thái ngủ; d. Cây sâm 6 tháng tuổi; e. Củ sâm phân nhánh; f và g. Cây sâm 06 tháng tuổi và 2 năm tuổi.

Như vậy, cây sâm Ngọc Linh có nguồn gốc từ phôi vô tính trồng ở điều kiện sinh thái tương tự như đỉnh núi Ngọc Linh bước đầu cũng có những kết quả đáng ghi nhận. Tuy nhiên, kết quả này cũng còn nhiều hạn chế như tỷ lệ sống và mọc lá mới sau thời gian ở trạng thái ngủ không cao, quá trình cây sinh trưởng và phát triển rất chậm, chính vì thế, số lượng cây thu thập không đủ để xác định hàm lượng saponin. Do vậy, để xác định hiệu quả trồng sâm Ngọc Linh ở điều kiện sinh thái giống vùng núi Ngọc Linh cần phải có những nghiên cứu sâu hơn về thổ nhưỡng và các yếu tố liên quan khác để tiệm cận những yếu tố này và xây dựng quy trình trồng phù hợp nhất cho sự sinh trưởng và phát triển của cây sâm Ngọc Linh ở Lâm Đồng. Trong giới hạn của đề tài này, chúng tôi chỉ dùng nguồn mẫu sâm Ngọc Linh trồng tại Quảng Nam để định tính và định lượng saponin.

3.1.3. Định tính và định lượng saponin trong cây sâm Ngọc Linh *in vitro* và trong cây sâm Ngọc Linh ở giai đoạn vườn ươm

*3.1.3.1. Định tính saponin trong cây sâm *in vitro*, cây sâm con 6 tháng, cây 1 năm và cây 2 năm được trồng tại núi Ngọc Linh*

Để so sánh hàm lượng saponin ở các giai đoạn khác nhau của cây sâm Ngọc Linh *in vitro* được trồng ở Quảng Nam. Những mẫu sau khi thu thập được tiến hành xử lý mẫu để chạy sắc ký lớp mỏng và phân tích bằng HPLC.

Kết quả phân tích bằng sắc ký lớp mỏng cho thấy các mẫu cây sâm Ngọc Linh có nguồn gốc từ nuôi cấy lớp mỏng tế bào (cây sâm *in vitro*, cây sâm con 6 tháng tuổi, cây 1 năm tuổi và cây 2 năm tuổi) đều có sự xuất hiện của 3 vết saponin Rg₁, Rb₁, MR₂ khi các bản mỏng được chạy trên dung môi cloroform:methanol:nước = 65:35:10. Điều này chứng tỏ rằng, trong các cây sâm Ngọc Linh nuôi cấy *in vitro* và *ex vitro* có sự hiện diện đầy đủ cả 3 loại của Rg₁, Rb₁, MR₂. Ngoài ra, ở mẫu sâm Ngọc Linh còn xuất hiện các vết tương đồng với sâm ngoài tự nhiên, điều này chứng tỏ rằng trong cây sâm Ngọc Linh được nuôi cấy bằng kỹ thuật lớp mỏng tế bào còn có mặt của nhiều loại saponin khác tương tự như saponin của cây ngoài tự nhiên (Hình 3.24). Như vậy, kết quả định tính cho thấy các mẫu trên đều có chứa saponin. Để xác định được hàm lượng của thì chúng tôi tiến hành định lượng bằng HPLC.



Hình 3.24. Định tính saponin (MR₂, Rg₁, Rb₁) trong mẫu cây sâm Ngọc Linh. 1: cây sâm *in vitro*; 2: cây sâm *ex vitro* 6 tháng tuổi; 3: cây sâm *ex vitro* 1 năm tuổi; 4: cây sâm 2 năm tuổi và c: sâm tự nhiên 2 năm tuổi. Bảng sắc ký lớp mỏng chạy trên hệ dung môi cloroform:methanol:nước (65:35:10).

3.1.3.2. Định lượng saponin trong cây sâm *in vitro*, cây sâm con 6 tháng tuổi, cây 1 năm tuổi và cây 2 năm được trồng tại núi Ngọc Linh

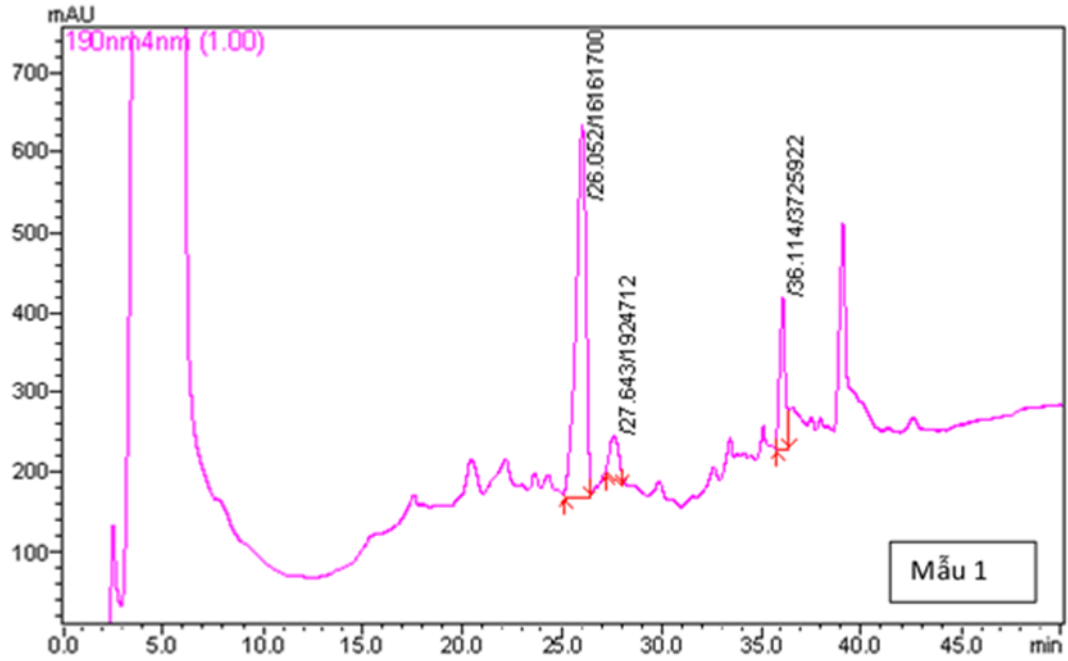
Khi phân tích ở bước sóng 190 nm chúng tôi nhận thấy sau khoảng 26 phút xuất hiện đỉnh của Rg₁, 27 phút xuất hiện đỉnh của MR₂ và 36 phút xuất hiện đỉnh Rb₁ (Hình 3.25 đến 3.28). Kết quả phân tích HPLC cho thấy, độ tuổi cũng ảnh hưởng đến quá trình tích lũy hoạt chất saponin trong cây sâm Ngọc Linh có nguồn gốc từ phôi nuôi cấy *in vitro* (Bảng 3.36). Hàm lượng saponin Rg₁ và Rb₁ là cao nhất khi cây được 2 năm tuổi và trồng ở núi Ngọc Linh tương ứng là (1,02% và 1,74%), hàm lượng Rg₁ thấp nhất ở cây 6 tháng tuổi (0,70%).

Bảng 3.35. Hàm lượng saponin trong cây sâm Ngọc Linh *in vitro* và *ex vitro*

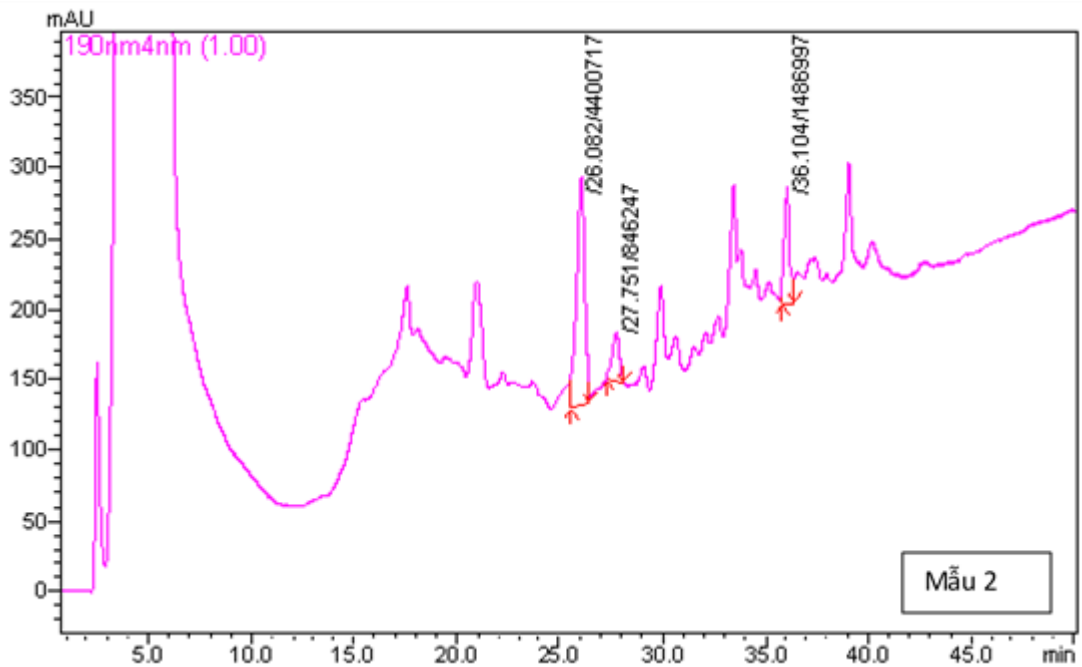
Mẫu	Rg ₁ (%)	Rb ₁ (%)	MR ₂ (%)	Tổng (%)
1 (cây <i>in vitro</i>)	0,68	0,51	0,97	2,17
2 (cây 6 tháng tuổi)	0,11	0,11	0,47	0,70
3 (cây 1 năm tuổi)	0,96	0,85	0,87	2,69
4 (cây 2 năm tuổi)	1,02	1,74	0,77	3,54

Ghi chú; Kết quả được tính trên 1 g chất khô.

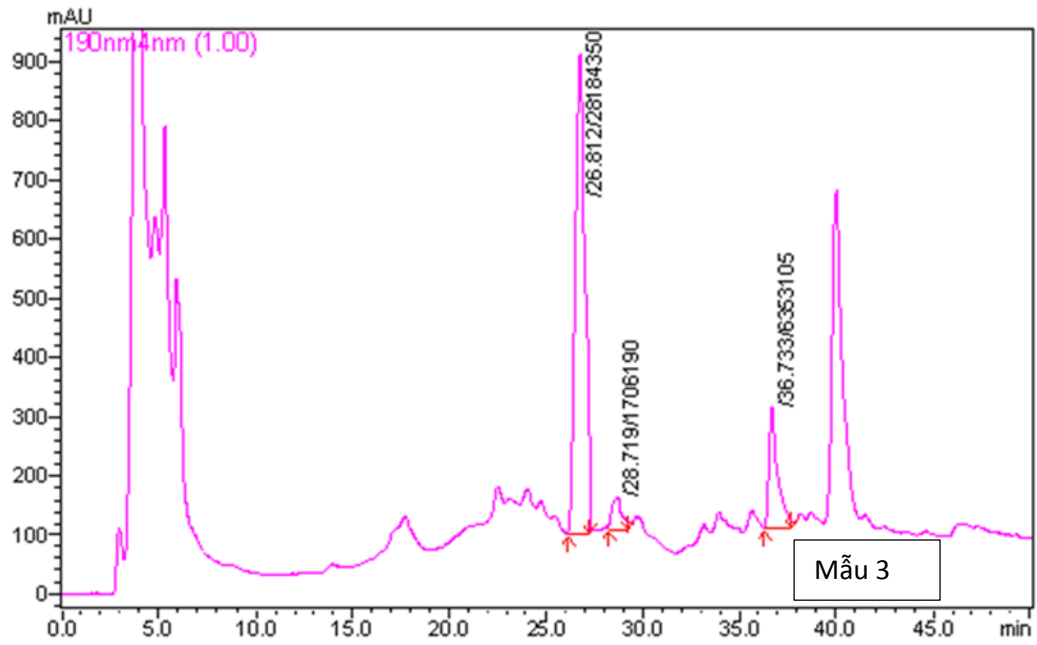
Như vậy, hàm lượng saponin tổng ở cây sâm *ex vitro* 2 năm là cao nhất (3,54%), kết quả này cũng tương tự với cây sâm 1 năm tuổi trồng ngoài tự nhiên.



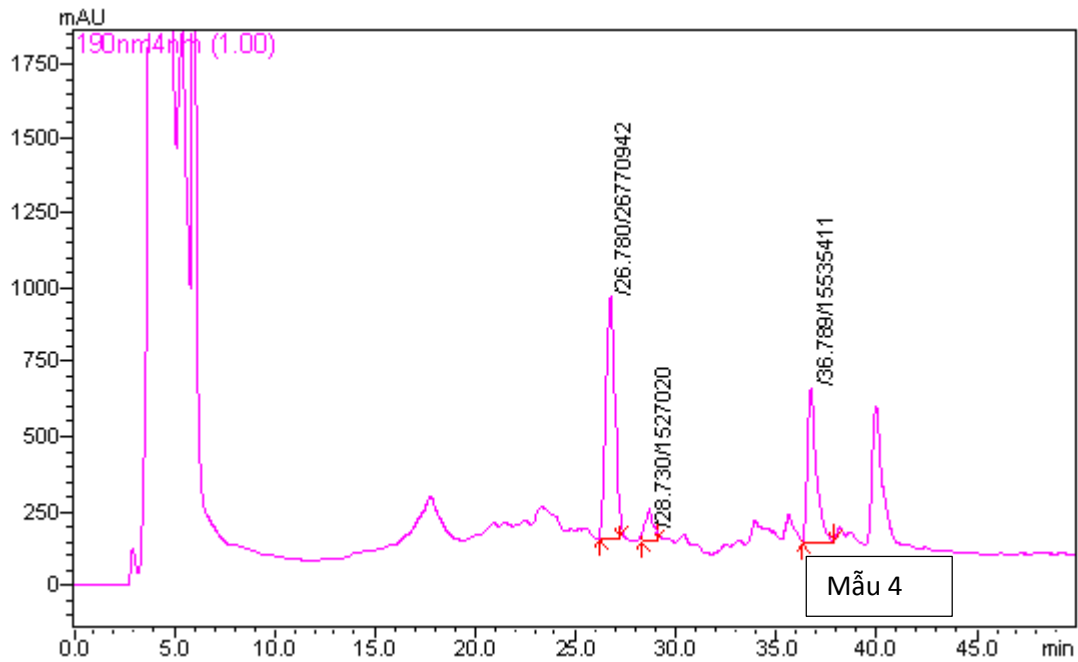
Hình 3.25. Peak Rg1, MR2, Rb1 trên sắc ký đồ của cây sâm Ngọc Linh *in vitro*.



Hình 3.26. Peak Rg1, MR2, Rb1 trên sắc ký đồ của cây sâm Ngọc Linh 6 tháng tuổi.



Hình 3.27. Peak Rg1, MR2, Rb1 trên sắc ký đồ của cây sâm Ngọc Linh 1 năm tuổi.



Hình 3.28. Peak Rg1, MR2, Rb1 trên sắc ký đồ của cây sâm Ngọc Linh 2 năm tuổi.

3.2. THẢO LUẬN

3.2.1. Nghiên cứu quá trình phát sinh hình thái từ các nguồn mẫu khác nhau

Kỹ thuật lớp mỏng tế bào - TCL được Giáo sư K. Trần Thanh Vân đưa vào nghiên cứu phát sinh hình thái thực vật năm 1970. Cho đến nay, kỹ thuật TCL đã được ứng dụng thành công trên nhiều đối tượng khác nhau như cây Thuốc lá (*Nicotiana tobacum*), Lily (*Lilium longiflorum*), Cúc (*Chrysanthemum*)... Cây Thuốc lá là đối tượng được nghiên cứu nhiều nhất và bốn chương trình phát sinh hình thái gồm phát sinh hoa trực tiếp, chồi trực tiếp, rễ trực tiếp và mô sẹo được cảm ứng từ mẫu ITCL của nhánh hoa ở loài cây này. Tiếp theo những thành công của việc ứng dụng hệ thống lớp mỏng tế bào trên cây Thuốc lá [122], việc ứng dụng kỹ thuật này đã đạt được những thành tựu khả quan ở các loài cây khác. Ohki (1994) đã thành công trong việc tái sinh hơn 70.000 cây *African violet* từ mẫu lá trong vòng 3 - 4 tháng [103]. Nhut và cộng sự (2001) đã sử dụng kỹ thuật TCL như là một công cụ và giải pháp hiệu quả trong nuôi cấy *in vitro* cây Lily [99]. Trên đối tượng cây sâm, kỹ thuật TCL đã được Ahn và cộng sự (1996) sử dụng để tái sinh phôi vô tính trực tiếp từ lá mầm [39]. Hệ thống TCL với đặc trưng là tính “mỏng”, nhưng cho sự phát triển nhanh chóng và đồng nhất của mẫu cấy, là một kỹ thuật có tính ứng dụng cao đối với các loài cây quý hiếm, cụ thể là đối tượng cây sâm Ngọc Linh được nghiên cứu trong đề tài này. Ngoài ra, việc ứng dụng kỹ thuật TCL đem lại nhiều lợi ích như: mẫu cấy tiếp xúc trực tiếp với môi trường nên dễ dàng hấp thu các chất dinh dưỡng, lượng hormone nội sinh trong mẫu thấp, vì thế các CDHSTTV dễ dàng tác động lên mẫu, hệ thống TCL có sự hình thành nhiều loại cấu trúc kể cả những cấu trúc mới, phôi và các cơ quan sơ khởi được hình thành ở tần số cao [19]. Trong nghiên cứu này, kỹ thuật TCL đã được ứng dụng trong nghiên cứu phát sinh hình thái cây sâm Ngọc Linh, những kết quả thu được cho thấy, từ mẫu cấy TCL có thể điều khiển được các chương trình biệt hóa khác nhau như phôi, chồi trực tiếp, rễ bất định và mô sẹo tùy thuộc vào nguồn gốc mẫu cấy và điều kiện nuôi cấy. Trong các kiểu phát sinh hình thái kể trên, sự phát sinh phôi trực tiếp có ý nghĩa quan trọng trong quá trình nhân giống vì từ phôi có thể hình thành nên cây hoàn chỉnh đầy đủ các bộ phận thân, củ, lá và rễ.

3.2.1.1. Quá trình phát sinh phôi vô tính

Phôi vô tính được hình thành từ các nguồn mẫu ban đầu khác nhau, phổ biến nhất là từ phôi hợp tử, từ phát hoa non, rễ, lá, trụ dưới lá mầm hoặc một cách trực tiếp từ mầm của phôi hợp tử hoặc lá mầm. Những điều kiện cần cho sự phát sinh phôi vô tính ở các loài thực vật khác nhau thì khác nhau. Ở phần lớn các loài thực vật, khả năng phát sinh phôi bị hạn chế ở những mô nhất định. Những thí nghiệm nuôi cấy mô cho thấy, giữa các cơ quan khác nhau của cây tồn tại một gradient phản ứng phát sinh phôi. Các mô có nguồn gốc từ phôi thì có khả năng phát sinh phôi cao nhất và khả năng này giảm dần ở trụ dưới lá mầm, cuống lá, lá và rễ [97].

Năm 1992, Jiu đã thành công trong việc tạo thành mô sẹo, phôi, chồi và cây con có nguồn gốc từ củ *Panax ginseng*. Các tTCL của thân, lá, rễ hoặc phôi cũng được sử dụng để nghiên cứu phát sinh phôi vô tính và tái sinh chồi ở nhiều loài khác nhau [73]. Trong các thí nghiệm, chúng tôi ghi nhận được kết quả sự phát sinh phôi vô tính hầu hết các bộ phận của cây sâm Ngọc Linh *in vitro*, trong đó, mẫu lá tTCL_L *in vitro* cho tỷ lệ phát sinh phôi vô tính trực tiếp không qua giai đoạn mô sẹo là cao hơn so với lớp mỏng từ cuống lá và thân củ. Kết quả này ngược lại với kết quả của Ahn và cộng sự (1996) trên đối tượng *Panax ginseng*, phôi vô tính được cảm ứng trực tiếp và hiệu quả từ mẫu cây tTCL của lá mầm, lá và cuống lá được cắt từ các cây con, trong khi sự phát sinh phôi vô tính mẫu tTCL có nguồn gốc từ củ *Panax ginseng* lại bị giới hạn [39].

Trong nuôi cấy phôi, nồng độ của các chất điều hòa sinh trưởng là rất quan trọng đối với phản ứng tối ưu của mẫu cây. Tùy thuộc vào loài thực vật mà môi trường nuôi cấy có thể bổ sung auxin hay cytokinin. Các cytokinin được dùng cho cảm ứng phát sinh phôi ở các loài thực vật hai lá mầm. Các cytokinin như kinetin, zeatin và TDZ cho kết quả phát sinh phôi tốt tùy thuộc vào loại thực vật. Ở nhiều loài, TDZ riêng lẻ có thể thay thế cả auxin và cytokinin cần thiết cho sự phát sinh phôi soma [67]. Ở cây Thuộc lá [67], cây Đậu phộng [93], cây Chickpea [95] khi sử dụng TDZ riêng lẻ, tỷ lệ phát sinh phôi vô tính thường cao hơn nhiều so với các thí nghiệm trước đây thu được khi sử dụng các chất điều hòa sinh trưởng thực vật khác. Trong một số trường hợp, có sự hình thành cả chồi và phôi soma [42]. Ngoài TDZ, NAA cũng có tác dụng kích thích sự phát sinh phôi vô tính được chứng minh thông qua nghiên cứu trên một số loài như Đậu tương [84], Cà rốt [40]. Một số loài cây thân gỗ như *Sesbania*

sesban var. *bicolor* thì NAA có tác dụng kích thích sự đáp ứng phôi [108]. Đối với chi *Panax*, phương pháp tạo phôi vô tính đã được nghiên cứu nhiều trên các loài *P. quinquefolium* [128]; *P. ginseng* [53]; *P. japonicus* [127]. Phôi vô tính cây sâm Mỹ (*P. quinquefolium*) hình thành trên môi trường MS có bổ sung 1 mg/l 2,4-D kết hợp với 1 mg/l NAA từ mẫu cây lá mầm [119]. Phôi vô tính *P. japonicus* lại hình thành trên môi trường MS có bổ sung 4,4 μ M 2,4-D từ phôi hợp tử [127]. Phôi vô tính *P. ginseng* được tạo ra từ lá mầm trên môi trường MS có bổ sung 0,5 mg/l 2,4-D kết hợp 0,1 mg/l BA [39].

Các nghiên cứu trên đều cho thấy, auxin có vai trò rất lớn trong nghiên cứu tạo phôi vô tính ở các loài thuộc chi *Panax* và các nghiên cứu này đều được thực hiện trong điều kiện chiếu sáng với thời gian 16 giờ/ngày. Trong nghiên cứu này, phôi vô tính cây sâm Ngọc Linh được hình thành trên môi trường MS có bổ sung NAA và 2,4-D ở các nồng độ khác nhau với các loại mẫu cây khác nhau. Các mẫu cây trên môi trường có bổ sung 2,4-D đều có khả năng hình thành phôi vô tính không phụ thuộc điều kiện chiếu sáng và loại mẫu cây. Tuy nhiên, ở nồng độ từ 0,2 - 1 mg/l 2,4-D, tỷ lệ hình thành phôi vô tính ở các nghiệm thức tốt hơn so với các nồng độ khác. Trong điều kiện tối mẫu lá tTCL_L cấy trên môi trường có bổ sung 1 mg/l 2,4-D cho tỷ lệ mẫu hình thành phôi cao nhất (92%), tiếp theo là mẫu thân rễ tTCL_R nuôi cấy trên môi trường có bổ sung 2 mg/l 2,4-D trong điều kiện sáng là (91%). Tuy nhiên, khi quan sát mẫu thì chúng tôi nhận thấy nguồn mẫu lá tTCL_L cấy trên môi trường có bổ sung 2 mg/l NAA trong điều kiện chiếu sáng thì tỷ lệ mẫu hình thành mô sẹo là (89%) nhưng phôi hình thành/mẫu nhiều. Ở các nghiệm thức còn lại cũng cho sự phát sinh phôi nhưng với tỷ lệ thấp. Một số mẫu cùng lúc cho hai loại hình thái phát sinh (mô sẹo và rễ bất định, phôi và rễ bất định). Theo Laux và Jurgens (1997), sự phân bố không tương xứng của các tế bào phân cực và sự quyết định chương trình phát sinh phôi phụ thuộc vào vị trí của mặt phẳng phân chia tế bào [83]. Mặt phẳng phân chia tế bào đóng vai trò quan trọng trong suốt quá trình hình thành phôi bởi khi phân chia tế bào bao gồm phân chia tế bào chất và các phân tử điều hòa. Kết quả của việc phân chia bất đối xứng là các tế bào con sinh ra được thừa hưởng những thành phần quyết định khác nhau từ tế bào chất, do đó nó mang những chương trình phát triển khác nhau [70], điều này giải thích cho sự phát sinh hai hình thái khác nhau trên cùng một vị trí vết thương.

Phôi vô tính có thể được tạo ra trong những điều kiện sáng và tối khác nhau. Có những loài có nhu cầu ánh sáng cao nhưng cũng có những loài sự hình thành phôi xảy ra trong điều kiện tối hoàn toàn. Việc cảm ứng phôi ở cây *Podophyllum* cần điều kiện tối hoàn toàn [41]. Ở cây Vân sam Naury thì việc hình thành phôi vô tính chỉ có thể thực hiện được trong điều kiện tối hoàn toàn nếu có sự hiện diện của ammonium trong môi trường và việc loại bỏ ammonium ra khỏi môi trường là hoàn toàn cần thiết trước khi việc tạo phôi được tiến hành ngoài sáng [123].

Ở các thí nghiệm, mẫu đặt ở điều kiện sáng và tối đều phát sinh phôi. Ở điều kiện sáng, quá trình cảm ứng phát sinh phôi xảy ra khi nồng độ 2,4-D và NAA từ (0,2 - 2 mg/l), trong khi đó, ở điều kiện tối thì sự cảm ứng phát sinh phôi là 0,1 mg/l 2,4-D. Qua đó cho thấy, ánh sáng cũng là một yếu tố quan trọng tác động đến quá trình phát sinh phôi ở đối tượng này.

Như vậy mẫu lá tTCL_L nuôi cấy trong môi trường bổ sung 2 mg/l NAA ở điều kiện chiếu sáng 16 giờ/ngày là thích hợp cho sự phát sinh phôi vô tính ở sâm Ngọc Linh.

3.2.1.2. Quá trình tái sinh chồi bất định

Phương pháp TCL đã được ứng dụng đầu tiên trong nghiên cứu về sự phát sinh hình thái, sự biệt hóa cơ quan và sự phát triển một cách rất sâu sắc trên một số đối tượng. Quá trình phát sinh hoa trực tiếp, chồi trực tiếp và mô sẹo không phát sinh cơ quan được cảm ứng từ mẫu ITCL thu được ở nhánh cây Thuốc lá (*Nicotiana tobacum*) [123], hay mẫu tTCL của đốt thân cây hoa Cúc [116], cuống lá, gân lá và các phiến mỏng ở *African violet* [103]. Mulin và Tran Thanh Van (1989) đã chứng minh có thể tái sinh được các chồi *in vitro* từ các tế bào biểu bì thu nhận từ lóng đầu tiên ở các nhánh đang cho hoa ở loài *Pentunia hybrida*, mẫu ITCL của cuống Hoa hồng [91]. Năm 1992, Jiu công bố thành công trong việc tạo thành mô sẹo, chồi, phôi và cây con từ củ sâm *Panax ginseng* [73]. Như vậy, phụ thuộc vào từng đối tượng mà kết quả sự hình thành chồi bất định là khác nhau. Các thí nghiệm được chúng tôi tiến hành ở 3 loại cơ quan là mẫu lá, cuống lá và thân rễ tTCL_R, chúng tôi nhận thấy mẫu thân rễ tTCL_R là cơ quan duy nhất tái sinh chồi bất định, điều đặc biệt là ở mỗi mẫu, thường chỉ một chồi được hình thành, các chồi này phát sinh trực tiếp ở vị trí mép củ. Tuy nhiên, với cùng kỹ thuật TCL, so với đối tượng khác đã được nghiên cứu trước đây, tỷ lệ tái sinh chồi trực tiếp trong các thí nghiệm này là không cao.

Trong quá trình nuôi cấy, các chất điều hòa sinh trưởng có tác dụng điều chỉnh sự phát sinh chồi bất định, quan trọng nhất là sự có mặt của cytokinin. Các cytokinin (BA, kinetin, TDZ) cảm ứng sự phân chia tế bào và sự hình thành chồi [113]. BA là một trong những cytokinin hữu ích dùng để kích thích nhân chồi và được sử dụng rộng rãi trong vi nhân giống thực vật bởi vì BA không bị mất hoạt tính khi hấp khử trùng, có tác dụng kích thích sự phân chia tế bào và có chức năng phá vỡ hiện tượng ưu thế ngọn. Tuy nhiên, trong rất nhiều các nghiên cứu, việc bổ sung TDZ ở các nồng độ khác nhau được xem là phương pháp tối ưu hình thành chồi nách cũng như chồi bất định trên các mẫu cấy như trong khảo sát sự hình thành chồi bất định ở các mẫu Cầm chướng [102], sự hình thành chồi nách ở cây Phong lan [77], cây Đỗ quyên [45]. TDZ kích thích sự tái sinh chồi từ nhiều nguồn mẫu khác nhau của các loài cây khó nhân giống và các loài cây thuốc cũng đã được nghiên cứu nhiều [94]. Trong nghiên cứu này, trên đối tượng cây sâm Ngọc Linh *in vitro*, TDZ cũng cho tỷ lệ tái sinh chồi khi kết hợp với 0,1 và 0,2 mg/l 2,4-D trong điều kiện chiếu sáng. Tuy nhiên, chồi có 3 lá màu trắng, nhỏ. Kết quả này thấp hơn nhiều so với tỷ lệ tạo chồi ở lớp mỏng cuống lá cây Thu hải đường (*Begonia tuberosus*) là 83,3% khi sử dụng môi trường MS $\frac{1}{2}$ bổ sung 0,2 mg/l TDZ riêng lẻ [98]. Cũng trong nghiên cứu của Nhut và cộng sự (2005), sự tái sinh chồi trực tiếp từ lớp mỏng cuống lá cây Thu hải đường (*Begonia tuberosus*) đạt tỷ lệ rất cao (100%) trên môi trường bổ sung 0,2 mg/l NAA và 0,2 mg/l TDZ [98]. Để kích thích sự tạo chồi trực tiếp thường có sự kết hợp của auxin và cytokinin, sự cân bằng giữa hai loại chất điều hòa sinh trưởng này là một trong những yếu tố kiểm soát sự phát triển [16]. Sự hình thành chồi với tỷ lệ thấp ở môi trường bổ sung riêng lẻ TDZ hay BA có thể do hàm lượng auxin nội sinh của mẫu cấy, vì mẫu cấy có kích thước nhỏ nên hàm lượng CĐHSTTV nội sinh là không đáng kể, do đó mà lượng cytokinin bổ sung vào môi trường là không đủ để mẫu phát sinh tối ưu chồi bất định khi vắng mặt hoặc hàm lượng auxin nội sinh thấp. Điều này được chúng tôi quan sát thấy có sự tái sinh chồi ở thí nghiệm 8, ở môi trường bổ sung 0,2 mg/l TDZ kết hợp với 0,1 và 0,2 mg/l 2,4-D (Bảng 3.28), tỷ lệ tái sinh chồi là 42% trong điều kiện chiếu sáng, chồi cao khoảng 2 cm, lá có màu trắng xanh. Các nghiệm thức còn lại đều không cho sự tái sinh chồi. Như vậy, ở đối tượng sâm Ngọc Linh chỉ có mẫu thân củ tTCL_R phù hợp cho quá trình tái sinh chồi bất định.

3.2.1.3. Quá trình hình thành rễ bất định

Rễ bất định xuất hiện do sự biệt hóa của mô phân sinh bên (trụ tầng, trụ bì...). Khả năng tái phân chia này có thể có nguồn gốc nội sinh hoặc ngoại sinh, có thể từ mô phân sinh cấp một hoặc cũng có thể từ mô phân sinh cấp hai [30].

Ánh sáng có tác dụng ngăn cản sự ra rễ. Cây *Prunus cerasifera* tăng trưởng trong tối ra rễ dễ hơn cây trồng ngoài sáng. Một số ít cây như *Helianthus tuberosus* và Lily có phản ứng tích cực với ánh sáng trong sự ra rễ. Cường độ ánh sáng cao cản trở sự ra rễ mạnh hơn cường độ ánh sáng thấp. Tuy nhiên, cúc, đồng tiền lại ra rễ tốt trong điều kiện ánh sáng có cường độ cao [16].

Ở các thí nghiệm, chúng tôi tiến hành trong cả 2 điều kiện tối và sáng, so sánh các nghiệm thức có tạo rễ bất định trong cả hai điều kiện, chúng tôi nhận thấy tỷ lệ hình thành rễ bất định trong điều kiện tối hoàn toàn cao hơn hẳn so với điều kiện chiếu sáng.

Trong quá trình phân hóa tế bào và cơ quan, vai trò điều chỉnh của các chất điều hòa sinh trưởng là rất quan trọng. Auxin quyết định sự phân hóa rễ và có khi người ta xem auxin như là một chất kích thích ra rễ [37]. Các auxin có vai trò quan trọng trong quá trình ra rễ [96], mặc dù một số trường hợp chúng không có tác dụng hoặc gây tác động bất lợi. Đối với một số loài, auxin cần cho sự hình thành rễ từ các đoạn cắt [64] nhưng có một số loài thì không [86]. Có nhiều báo cáo trái ngược nhau về tác dụng của các loại auxin khác nhau. Các mẫu cây thường phản ứng tốt khi thêm auxin ngoại sinh, nhưng trong mọi trường hợp thường chịu ảnh hưởng của loại mẫu cây, tuổi của cây mẫu, dạng auxin sử dụng, thời gian tiếp xúc [96].

Theo Kull và Arditti, auxin kích thích sự phát triển của rễ và sự tăng trọng lượng tươi của mẫu, trong đó NAA và IBA được nhận thấy là có hiệu quả hơn so với IAA. NAA thường được sử dụng trong nhiều thí nghiệm tái sinh [82].

Theo kết quả chúng tôi thu được, các auxin 2,4-D và NAA đều có khả năng kích thích ra rễ. Tuy nhiên, tỷ lệ ra rễ ở môi trường bổ sung 2,4-D là thấp hơn nhiều so với NAA. Ở nhiều môi trường bổ sung 1,0 và 2,0 mg/l NAA trong điều kiện tối cho tỷ lệ ra rễ rất cao [mẫu cuống lá tTCL_C (89,9%, 15,5 rễ/mẫu); mẫu cuống lá ITCL_C (94,4%, 19,2 rễ/mẫu); mẫu thân rễ tTCL_R (98,8%, 21,7 rễ/mẫu)]; trong đó, ở mẫu thân rễ tTCL_R với nồng độ 2,0 mg/l NAA cho số rễ trung bình là cao nhất

(21,7 rễ/mẫu). Mẫu cuống lá ITCL trên môi trường bổ sung 1,0; 2,0 mg/l NAA có sự phát sinh đồng thời rễ và mô sẹo hay rễ và phôi trên cùng vị trí vết thương.

3.2.1.4. Quá trình tạo mô sẹo

Khi tiến hành khảo sát sự phát sinh hình thái ở đối tượng sâm Ngọc Linh, chúng tôi nhận thấy, với môi trường chỉ bổ sung riêng lẻ chất ĐHSTTV, khả năng tạo mô sẹo cao nhất thu được ở mẫu lá. Trong các nghiên cứu áp dụng kỹ thuật nuôi cấy lớp mỏng tế bào, tTCL từ lá được sử dụng như là một nguồn mẫu phổ biến do lá có thể tái sinh liên tục và đều đặn, việc thu mẫu lá không làm chết cây mẹ. Cuống lá cây *Panax ginseng* C.A. Mayer đã được nghiên cứu cảm ứng mô sẹo thành công bởi Jiu vào năm 1992 [73]. Mẫu tTCL từ cuống lá đã được nhiều nhà khoa học nghiên cứu trên các loài khác nhau. Lá và cuống lá là một trong những cơ quan thường được sử dụng làm vật liệu tạo mô sẹo. Nguyên nhân là do cấu trúc đặc trưng của chúng. Nhu mô thịt lá, phần chủ yếu của phiến lá, có vách sơ cấp mỏng còn tiềm năng phân chia tế bào. Nhờ tiềm năng này, các tế bào nhu mô có vai trò hàn gắn vết thương và thường được dùng trong nuôi cấy tế bào *in vitro*. Cuống lá là mẫu chứa các mô phân sinh lóng, có nguồn gốc từ mô phân sinh ngọn, nhưng ở xa mô phân sinh ngọn, xen kẽ giữa những vùng mô đã ít nhiều phân hóa. Các tế bào nhu mô của mộc và libe, các tế bào tiết và các tế bào nhu mô tủy là những tế bào có khả năng tạo mô sẹo cao [16].

Một số nghiên cứu về ảnh hưởng của loại cơ quan đến khả năng tạo mô sẹo và biệt hóa cơ quan từ mô sẹo đã được tiến hành trên các đối tượng thuộc chi Nhân sâm. Lim và cộng sự (1997) sử dụng nguồn nguyên liệu ban đầu để khởi tạo mô sẹo là lá, trụ thượng diệp, cuống hoa và rễ từ cây sâm Triều Tiên *P. ginseng* nuôi cấy *in vitro* và tất cả các mẫu đều tạo mô sẹo cứng chắc và có khả năng tạo rễ bất định [88]. Nghiên cứu của Tirajoh và cộng sự (1998) trên đối tượng sâm Mỹ *Panax quinquefolium* L. cho thấy đối với mẫu ban đầu là rễ, mô sẹo hình thành sau 2 - 3 tuần nuôi cấy, mô sẹo cứng chắc, màu vàng nhạt, tạo phôi soma sau 3 tháng nuôi cấy với tỷ lệ 15,7%. Trụ thượng diệp và lá của cây giống *in vitro* cho mô sẹo sau 2 tuần nuôi cấy, mô sẹo ở dạng xốp và mềm, tạo phôi soma sau 6 tháng với tỷ lệ 2%, trong khi đó mô sẹo hình thành từ mẫu lá *in vivo* cũng cho mô sẹo dạng xốp và mềm, tạo được phôi soma sau 7 tháng với tỷ lệ 30% [119]. Trong một nghiên cứu khác của Gao và cộng sự (2005) trên đối tượng sâm Tâm thất *Panax notoginseng*, rễ bên tạo mô sẹo sau 10 ngày và rễ bất định sau 35 ngày nuôi cấy, mẫu cuống lá tạo mô sẹo sau 14

ngày và rễ bất định sau 45 ngày nuôi cấy, còn các mẫu lá, chồi và rễ không có khả năng biệt hoá tạo rễ bất định. Những kết quả này cho thấy, dù cùng chi, khác loài hay ngay cả cùng loài thì khả năng phát sinh mô sẹo của các cơ quan là hoàn toàn khác nhau [66].

Trên đối tượng sâm Ngọc Linh, nghiên cứu của Trung tâm Sâm từ năm 1984 đã khảo sát ảnh hưởng của sự hình thành và tăng trưởng mô sẹo từ các bộ phận khác nhau của loài sâm này. Nghiên cứu cho thấy mẫu lá có gân chính hình thành mô sẹo trong 3 - 4 tuần với tỷ lệ 100%, rễ hình thành trong 1 - 2 tuần với tỷ lệ 96,76%, còn thân phát sinh trong 4 tuần với tỷ lệ 100% và chỉ có 20% hạt hình thành mô sẹo trong vòng 12 tuần [7]. Khi tiến hành nghiên cứu khả năng tạo mô sẹo ban đầu trên lá, cuống lá và củ sâm Ngọc Linh *in vitro*, chúng tôi nhận thấy dưới ảnh hưởng của auxin và cytokinin, lá, cuống lá và củ sâm Ngọc Linh đều tạo mô sẹo với tỷ lệ rất cao (100%), nhưng lượng mô sẹo ở mẫu củ ít hơn so với mẫu lá và cuống lá. Mô sẹo có cấu trúc đa dạng, màu vàng nhạt, trắng sữa, đỏ, tím nâu, gồm dạng cứng chắc và mềm xốp. Đây là những dạng mô sẹo có khả năng tái sinh cao, phù hợp cho các quá trình biệt hóa sau này. Việc tạo mô sẹo ở mẫu củ không cao trong các thí nghiệm phù hợp với một số nghiên cứu. Củ sâm *Panax ginseng* được nghiên cứu cảm ứng mô sẹo đầu tiên bởi Butenko và các cộng sự vào năm 1968 [46]. Jhang và cộng sự (1974), tiếp tục nghiên cứu khả năng cảm ứng mô sẹo từ củ *Panax ginseng* và phát sinh hình thái từ mô sẹo này tuy nhiên vẫn còn sự hạn chế khi biệt hóa cấu trúc từ mô sẹo phát triển thành rễ, phôi và cây con [72].

Việc sử dụng lá và cuống lá làm nguồn nguyên liệu ban đầu cho quá trình phát sinh mô sẹo, cũng đồng thời là nguồn nguyên liệu cho các quá trình biệt hóa sau này có một số ưu điểm so với việc sử dụng củ sâm *in vitro*. Phải trải qua thời gian nuôi cấy khá lâu, củ sâm phải đạt độ tuổi phù hợp mới có thể sử dụng làm nguồn nguyên liệu ban đầu, mặt khác việc dùng nguồn mẫu ban đầu là củ sâm *in vitro* sẽ khó thu được kết quả chính xác do kích thước và hình dạng của củ sâm là không đồng đều. Nếu sử dụng nguồn nguyên liệu là lá sẽ chủ động hơn và nguồn nguyên liệu ban đầu là nhiều hơn. Ngoài ra, mô sẹo từ lá cũng có khả năng biệt hóa tạo chồi và rễ bất định [19]. Xét khía cạnh sử dụng kỹ thuật TCL vào quá trình phát sinh mô sẹo, sự tổn thương về mặt vật lý ở mẫu lá tTCL cao hơn so với mẫu tTCL và lTCL cuống lá, mà phản ứng tạo mô sẹo lại thường xảy ra tại các vùng tổn thương về mặt vật lý và hóa

học, qua đó chúng tôi nhận thấy mẫu lá tTCL_L tạo sinh khối mô sẹo cao hơn mẫu cuống lá tTCL_C và lTCL_C. Với tất cả những lý do trên, có thể kết luận mẫu lá tTCL_L thích hợp trong sự phát sinh mô sẹo ở cây sâm Ngọc Linh.

Auxin có vai trò quan trọng trong sự tạo mô sẹo. Auxin có tác động rõ ràng lên sự kéo dài tế bào. Hiệu quả này nối tiếp sau sự gia tăng tính đàn hồi của thành tế bào và cho sự xâm nhập nước vào tế bào, sự đề kháng của thành tế bào giảm đi và tế bào tự kéo dài ra [17]. Auxin được sử dụng để tạo mô sẹo với loại và nồng độ thay đổi khác nhau tùy thuộc vào vật liệu nuôi cấy. Trong môi trường nuôi cấy, auxin kích thích sự phân chia tế bào (tạo mô sẹo), kích thích sự tạo rễ bất định và gây ra sự phát sinh phôi từ tế bào soma của huyền phù tế bào. Trong số các ĐHSTTV được bổ sung vào môi trường thì 2,4-D là một auxin tổng hợp thường được sử dụng để kích thích sự hình thành mô sẹo, bởi vì một trong những đặc điểm chính của nó là kích thích sự phân chia tế bào trong mô rất hiệu quả ở nhiều loài thực vật. Điều này phù hợp với những kết quả thu được từ thí nghiệm 1 đến thí nghiệm 4. Trên môi trường bổ sung riêng lẻ các chất ĐHSTTV, tác dụng của 2,4-D ở các nồng độ khác nhau cho sự phát sinh mô sẹo với tỷ lệ tương đối cao, ở môi trường bổ sung 1 và 2 mg/l 2,4-D cao nhất là 98,8% (bảng 3.2 và 3.4) tỷ lệ tạo mô sẹo ở các nghiệm thức còn lại đều thấp hơn. Qua đó cho thấy, mặc dù 2,4-D có hoạt tính rất yếu trong kích thích tạo chồi bất định và rễ bất định, nhưng là loại auxin kích thích tạo mô sẹo và phôi soma rất hiệu quả. Tuy nhiên, auxin riêng lẻ không đủ kích thích sự phân chia của các tế bào nhu mô tủy của một vài loại cây, mà cần tới sự kết hợp với cytokinin. Cytokinin có hiệu quả rất rõ trên sự phân chia tế bào. Khi không có cytokinin thì pha giữa của chu trình tế bào sẽ bị kéo dài nên cytokinin cần thiết trong sự điều hòa, sinh tổng hợp protein tế bào trong sự tăng trưởng và phát triển của tế bào. Trong nuôi cấy mô, nếu lượng cytokinin không đủ thì sự phân chia của nhân tế bào sẽ bị chặn lại tại một giai đoạn trong chu trình tế bào. Người ta còn cho rằng sự phân chia tế bào trong mô sẹo khi không có sự hiện diện của cytokinin trong môi trường nuôi cấy vẫn có thể diễn ra là do tế bào đã tự tổng hợp được auxin nội sinh [16].

Những nghiên cứu trên các đối tượng thuộc chi *Panax* cho thấy dù từ nguồn mẫu nào, giai đoạn khởi tạo mô sẹo đều thường có sự kết hợp giữa cytokinin và auxin. Đối với sâm Triều Tiên, nếu nguồn mẫu là hạt thì môi trường khởi tạo mô sẹo là MS bổ sung 1,0 mg/l 2,4-D; 0,01 mg/l Kin và 30 g/l sucrose [42]. Qua đó, có thể thấy

2,4-D là một auxin thông dụng cho quá trình khởi tạo mô sẹo của các loài thuộc chi Nhân sâm *Panax L.*

Trên đối tượng sâm Ngọc Linh, nghiên cứu của Trung tâm sâm cho thấy 2,4-D kết hợp với kinetin làm tăng sự hình thành và phát triển mô sẹo mạnh hơn so với tổ hợp IAA và Kin [7]. Trong thí nghiệm nghiên cứu phát sinh hình thái sâm Ngọc Linh, chúng tôi tiến hành khảo sát ảnh hưởng giữa sự kết hợp auxin và cytokinin lên mẫu cấy TCL, hầu hết các nghiệm thức từ thí nghiệm 4 đến thí nghiệm 8 đều cảm ứng tạo mô sẹo, trong đó, việc kết hợp giữa 2,4-D với TDZ thích hợp nhất cho quá trình phát sinh mô sẹo, tiếp theo là môi trường bổ sung 2,4-D với BA. Môi trường bổ sung NAA và BA không phù hợp cho việc tạo mô sẹo ở tất cả các cơ quan của sâm Ngọc Linh. Kết quả ghi nhận được từ các thí nghiệm cho thấy, lá và cuống lá được nuôi cấy trên môi trường bổ sung 1,0 mg/l 2,4-D kết hợp với TDZ ở các nồng độ từ 0,01 đến 1,0 mg/l đều cho tỷ lệ phát sinh mô sẹo rất cao, trong đó nồng độ 0,1 mg/l TDZ cho lượng mô sẹo là nhiều nhất. Tuy nhiên, khi gia tăng nồng độ TDZ lên 0,2 mg/l TDZ và 2,4-D lên 2,0 mg/l hay giảm nồng độ 2,4-D xuống 0,5; 0,2; 0,1 mg/l thì tỷ lệ cũng như lượng mô sẹo rất thấp, thậm chí một số mẫu không cảm ứng. Theo Rakhakrishnan và cộng sự (2001), tế bào chỉ có thể sử dụng một lượng vừa đủ auxin và bất cứ một sự vượt ngưỡng cho phép nào cũng ức chế sự phát triển của tế bào [106]. Vậy nồng độ 2,4-D dưới 0,5 mg/l và trên 2,0 mg/l trở lên là không phù hợp cho quá trình phát sinh mô sẹo từ lá sâm Ngọc Linh.

Ở môi trường bổ sung 2,4-D kết hợp với BA, tỷ lệ phát sinh mô sẹo cao ở môi trường bổ sung 1,0 mg/l 2,4-D kết hợp với 0,1; 0,2; 0,5 mg/l BA, tuy nhiên lượng mô sẹo so với 2,4-D kết hợp với TDZ là thấp hơn. Các mẫu lá, cuống lá và củ được nuôi cấy trên môi trường bổ sung NAA kết hợp với BA cho tỷ lệ tạo mô sẹo rất thấp, ở nhiều nghiệm thức, các mẫu đều hóa nâu và chết. Do đó, có thể kết luận NAA và BA không phù hợp cho quá trình khởi tạo mô sẹo của sâm Ngọc Linh. Riêng ở nồng độ 1,0 mg/l NAA và 0,1; 0,2 mg/l BA có hiện tượng tạo rễ bất định. Cuống lá chỉ tạo rễ ở một đầu, đầu còn lại không có hiện tượng gì (Hình 3.18). Điều này có thể do auxin quyết định sự phân hóa rễ. Khi nồng độ auxin cao hơn nồng độ cytokinin hoặc khi chỉ xử lý với auxin thì rễ sẽ được hình thành. Trong rễ thì cực ngọn giàu auxin hơn và do đó kích thích sự hình thành rễ, còn cực đối diện nghèo auxin kích thích sự xuất hiện chồi [16].

Với các kết quả trên, cho thấy mô sẹo phát sinh tốt nhất ở mẫu lá tTCL_L nuôi cấy trong môi trường MS bổ sung 1,0 mg/l 2,4-D kết hợp với 0,1 mg/l TDZ .

Điều kiện chiếu sáng và khả năng phát sinh mô sẹo

Tùy theo loại mẫu cây, ánh sáng cần hoặc không cần trong suốt thời gian tạo mô sẹo. Đối với mẫu lá, trong đa số trường hợp, sự tạo mô sẹo trong tối thường tốt hơn ngoài sáng [16]. Tuy nhiên, trong một số trường hợp, mẫu cây lại tạo mô sẹo tốt hơn trong điều kiện chiếu sáng. Nghiên cứu của Elmeer và Hennerty (2008) về sự kết hợp giữa auxin và ánh sáng trên đối tượng *Cucumis sativus* cho thấy mô sẹo phát sinh từ lá có trọng lượng tươi cao nhất với sự kết hợp giữa 2,0 mg/l 2,4-D và điều kiện chiếu sáng là 16 giờ/ngày [63].

Trong các nghiên cứu trên đối tượng thuộc chi Nhân sâm, nhiều tác giả sử dụng điều kiện tối để cảm ứng và nhân mô sẹo từ các cơ quan như rễ, lá, cuống lá, trụ hạ diệp,... [80]. Tuy nhiên, khi kết hợp giữa điều kiện chiếu sáng 16 giờ/ngày với môi trường 1,0 mg/l 2,4-D và 0,01 mg/l Kin để cảm ứng tạo mô sẹo trên lá, cuống lá, cuống hoa và rễ của cây sâm Triều Tiên *in vitro*, Lim và Lee (1997) nhận thấy lá và cuống lá phát sinh mô sẹo với tỷ lệ cao (98% và 100%), ngoài ra mô sẹo hình thành có khả năng biệt hóa tạo rễ về sau [88]. Kết quả thu được ở các thí nghiệm cho thấy tỷ lệ phát sinh mô sẹo là tương đương nhau ở 2 điều kiện chiếu sáng, ở mỗi điều kiện, cấu trúc mô sẹo lại có sự khác nhau. Ở điều kiện chiếu sáng, mô sẹo có dạng cứng chắc, màu trắng vàng, xanh, đôi khi có màu đỏ nâu, qua đó cho thấy ánh sáng không cảm ứng tạo phenol ở loài này. Trong khi đó, mô sẹo trong điều kiện tối có dạng mềm, xốp, màu trắng sữa, vàng đến nâu. Mô sẹo hình thành ở dạng xốp chứa nhiều tế bào xốp với nhân nhỏ, chất tế bào loãng và tế bào không to. Mô sẹo dạng cứng thì các tế bào chắc, nhân to, tế bào đậm đặc và không bào nhỏ. Trong đó, khả năng tái sinh sẽ dễ mất đi ở mô sẹo xốp nhưng vẫn duy trì ở mô sẹo cứng [37]. Như vậy, tùy vào mục đích của từng hướng nghiên cứu, mỗi dạng mô sẹo có thể được ứng dụng trong các chương trình biệt hóa tiếp theo.

Như vậy, việc ứng dụng kỹ thuật TCL trên đối tượng cây sâm Ngọc Linh *in vitro* trong đề tài này đã thu được những kết quả khả quan trong quá trình phát sinh trực tiếp phôi vô tính, chồi, rễ bất định và mô sẹo từ mẫu cây. Từ những kết quả nghiên cứu từ thí nghiệm 1 đến thí nghiệm 8 chúng tôi đã sử dụng nguồn mẫu phôi

vô tính cho các thí nghiệm tiếp theo. Hy vọng đây sẽ là hướng đi mới hiệu quả trong việc tái sinh cây sâm Ngọc Linh *in vitro*.

3.2.2. Quan sát sự thay đổi phát sinh hình thái của phôi vô tính sâm Ngọc Linh

Phát sinh phôi vô tính là quá trình tái sinh *in vitro* trong đó những cấu trúc lưỡng cực được hình thành từ tế bào sinh dưỡng mà không có sự kết nối mạch dẫn với mô mẹ ban đầu. Vì vậy, điều quan trọng là phải xác định những giai đoạn trong tiến trình này thông qua các đặc tính về hình thái và cấu trúc mô học. Trong nghiên cứu này, những thay đổi về hình thái được ghi nhận bằng cách quan sát lát cắt mô học của phôi vô tính ở tất cả các giai đoạn chuyên biệt dưới kính hiển vi huỳnh quang và kính hiển vi điện tử quét.

Sự đa dạng của các cấu trúc phôi khác nhau cũng được ghi nhận trong quá trình phát sinh phôi vô tính sâm Ngọc Linh trong các môi trường thí nghiệm. Một số phôi có chồi và lá mầm tương tự như phôi hợp tử. Trong khi đó, các thể phôi bất thường khác xuất hiện trong suốt giai đoạn sớm của quá trình hình thành các lá mầm cũng như quá trình phát triển của lá mầm như các dạng phôi không có lá mầm, lá mầm hình quạt. Tuy nhiên, tỷ lệ biến dị của phôi vô tính không đáng kể. Canhoto và Cruz đã ghi nhận một lượng lớn phôi bất thường ở cây *Feijoa sellowiana* liên quan đến nguồn gốc đa tế bào của phôi [47]. Halperin và Wetherell đã ghi nhận rằng hàm lượng 2,4-D cao có thể gây ra những bất thường hay ức chế sự phát triển của mô phân sinh ngọn cây cà rốt [69].

3.2.3. Tạo cây con hoàn chỉnh từ phôi vô tính

Các điều kiện chiếu sáng khác nhau có ảnh hưởng không giống nhau đến quá trình tăng trưởng của phôi sâm Ngọc Linh nuôi cấy *in vitro*. Thông qua các chỉ tiêu theo dõi, các cây sâm dưới điều kiện chiếu sáng 16 giờ/ngày đều sinh trưởng và phát triển vượt bậc so với trong điều kiện tối hoàn toàn. Về hình thái những cây sinh trưởng trong điều kiện chiếu sáng có củ và cuống lá to, lá mở rộng và màu xanh đậm. Còn trong điều kiện tối thì cây sâm Ngọc Linh rất yếu, củ nhỏ, cuống lá mỏng và lá có màu trắng và có sự tạo chồi nên khó thích nghi trong điều kiện vườn ươm. Chất lượng của cây vi nhân giống phụ thuộc rất nhiều vào các điều kiện nuôi cấy. Trong đó, nhân tố môi trường ảnh hưởng quyết định đến chất lượng cây giống như nhiệt độ, nồng độ carbon dioxide (CO₂), chất dinh dưỡng, thời gian và cường độ chiếu sáng. Những nhân tố này tác động đến quá trình đồng hóa CO₂, khả năng hút nước, tốc độ thoát

hơi nước, tăng trưởng, phát sinh hình thái thực vật,... Trong các tác nhân kể trên, ánh sáng đóng vai trò quan trọng đến hoạt động sinh lý của thực vật. Khi sinh trưởng dưới các điều kiện chiếu sáng khác nhau, thực vật sẽ thay đổi bộ máy quang hợp để thích nghi với từng điều kiện chiếu sáng nhất định nhằm duy trì được khả năng quang hợp với từng chế độ chiếu sáng riêng biệt [124]. Cường độ ánh sáng thấp kéo theo việc tăng tỷ lệ Chlorophyll *a/b*, cường độ ánh sáng cao sẽ gia tăng hệ thống quang hợp, tăng phức hệ cytochrome *b₆/f*, ATP synthase và các enzyme trong chu trình Calvin đặc biệt là Rubisco [124]. Trong nghiên cứu của Lee và cộng sự (2007) cho thấy, ở cường độ ánh sáng $30 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ cây *Withania somnifera* nuôi cấy *in vitro* sinh trưởng tốt nhất, tuy nhiên, ở cường độ ánh sáng $60 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ thì hàm lượng chlorophyll, carotenoid, số lượng khí khổng, tốc độ quang hợp, sự thoát hơi nước là cao nhất [85]. Ánh sáng không chỉ cung cấp cho thực vật nguồn năng lượng để duy trì sự phát triển mà còn là nguồn thông tin trong phát sinh hình thái thực vật như quá trình nảy mầm, nở hoa và quy luật đóng mở khí khổng [115]. Deberg và cộng sự (1992) đã báo cáo rằng cường độ ánh sáng điều hòa kích cỡ lá và thân cũng như con đường phát sinh hình thái của chúng, đồng thời nó còn liên quan đến sự hình thành sắc tố và hiện tượng mọng nước ở cây con *in vitro* [58]. Ngoài ra, chất lượng ánh sáng có ảnh hưởng đến nhiều đặc tính như sự kéo dài thân cây Cúc [128], sự hình thành chồi nách ở cây Nho [49] và sự hình thành rễ ở cây Lê [44]. Ánh sáng là năng lượng cho quang hợp, nó điều chỉnh nhiều hoạt động sống và phát triển thực vật. Vấn đề ở đây là phải cung cấp, kiểm soát ánh sáng với lượng và chất một cách hiệu quả để tạo ra cây con có chất lượng tốt nhất và giảm giá thành sản xuất [108].

3.2.4. Sự tích lũy saponin ở sâm Ngọc Linh

Saponin là một loại Glycosyd tự nhiên phổ biến trong thành phần của nhiều loại thực vật. Saponin được chia ra thành 3 nhóm chính gồm: triterpenoit saponin, steroid saponin và glicoanaloit dạng steroid. Các nhóm của saponin cũng gồm các loại axit, trung tính hoặc kiềm. Trong đó, nhóm triterpenoit saponin thường ở dạng trung tính hay axit. Nhóm Steroit saponin nhóm spirostan và furostan là trung tính và nhóm glicoanaloit là loại kiềm. Trong thành phần sâm Ngọc Linh chứa chủ yếu các saponin triterpen, trong đó hàm lượng saponin khung pammaran thuộc hàng cao nhất trong các loại sâm và có số lượng saponin lớn nhất so với các loài thuộc chi *Panax*. Tuy nhiên qua các nghiên cứu thì các nguồn mẫu và độ tuổi khác nhau cũng

chứa hàm lượng saponin khác nhau. Các chuyên gia Viện Dược liệu chỉ ra rằng thành phần hóa học trong lá và cọng của loại sâm này đã phân lập được 19 saponin pammaran, với 8 saponin có cấu trúc đặc biệt. Sâm Ngọc Linh còn chứa hàm lượng tinh dầu lớn, là 0,1%. Trong nghiên cứu này đã xác định được hàm lượng Rg1 và Rb1 là cao nhất khi cây được 2 năm tuổi và trồng ở núi Ngọc Linh tương ứng là (1,02% và 1,74%), MR2 (0,77%). Kết quả hàm lượng MR2 cũng tương tự với kết quả của Chiến và cộng sự (năm 2011) khi nghiên cứu ở cây sâm 17 tháng tuổi nhưng hàm lượng Rg1 và Rb1 thì cao hơn rất nhiều so với của Chiến và cộng sự [Rb1 (0,21%), GRg1 (0,17%), MR2 (0,77%)] [3].

CHƯƠNG IV

KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

4.1. Kết luận

Mẫu lá tTCL_L cho khả năng phát sinh phôi trực tiếp và số phôi cao nhất (89,6%; 29 phôi/mẫu) khi nuôi cấy trong môi trường bổ sung 2 mg/l NAA ở điều kiện chiếu sáng 16 giờ/ngày.

Mẫu cuống lá lTCL_C, mẫu lá tTCL_L khi nuôi cấy trong môi trường có bổ sung 1,0 và 2,0 mg/l 2,4-D trong điều kiện chiếu sáng và tối cho tỷ lệ phát sinh mô sẹo cao nhất (97,7%; 98,8%).

Mẫu thân rễ tTCL_R nuôi cấy trong môi trường bổ sung 2 mg/l NAA trong điều kiện tối cho tỷ lệ phát sinh rễ là 98,8% và 21,7 rễ/mẫu.

Tỷ lệ tái sinh chồi cao nhất 42% ở nguồn mẫu thân rễ tTCL_R khi được nuôi cấy trên môi trường bổ sung 0,2 mg/l TDZ kết hợp với 0,2 mg/l 2,4-D trong điều kiện sáng.

Mẫu lá tTCL_L, cuống lá tTCL_C và lTCL_C, và thân rễ tTCL_R được nuôi cấy trên môi trường có bổ sung 2,4-D kết hợp với BA hoặc TDZ ở các nồng độ khác nhau dưới cả điều kiện sáng và tối hoàn toàn cho khả năng phát sinh mô sẹo cao nhất.

Phôi thu được ở tất cả các nghiệm thức không có sự khác biệt về hình thái và nó tồn tại ở các dạng chính là hình cầu, hình tim, hình thủy lồi và hình hai lá mầm.

Phôi cấy vào môi trường SH có bổ sung 1 mg/l BA, 0,5 mg/l NAA, 50 g/l sucrose, 9 g/l agar, 1 g/l than hoạt tính được nuôi cấy trong điều kiện chiếu sáng 16 giờ/ngày thì cây đều có củ to, bộ lá đều phát triển, hình thái lá bình thường và có cấu trúc giống với những cây sinh trưởng ngoài tự nhiên.

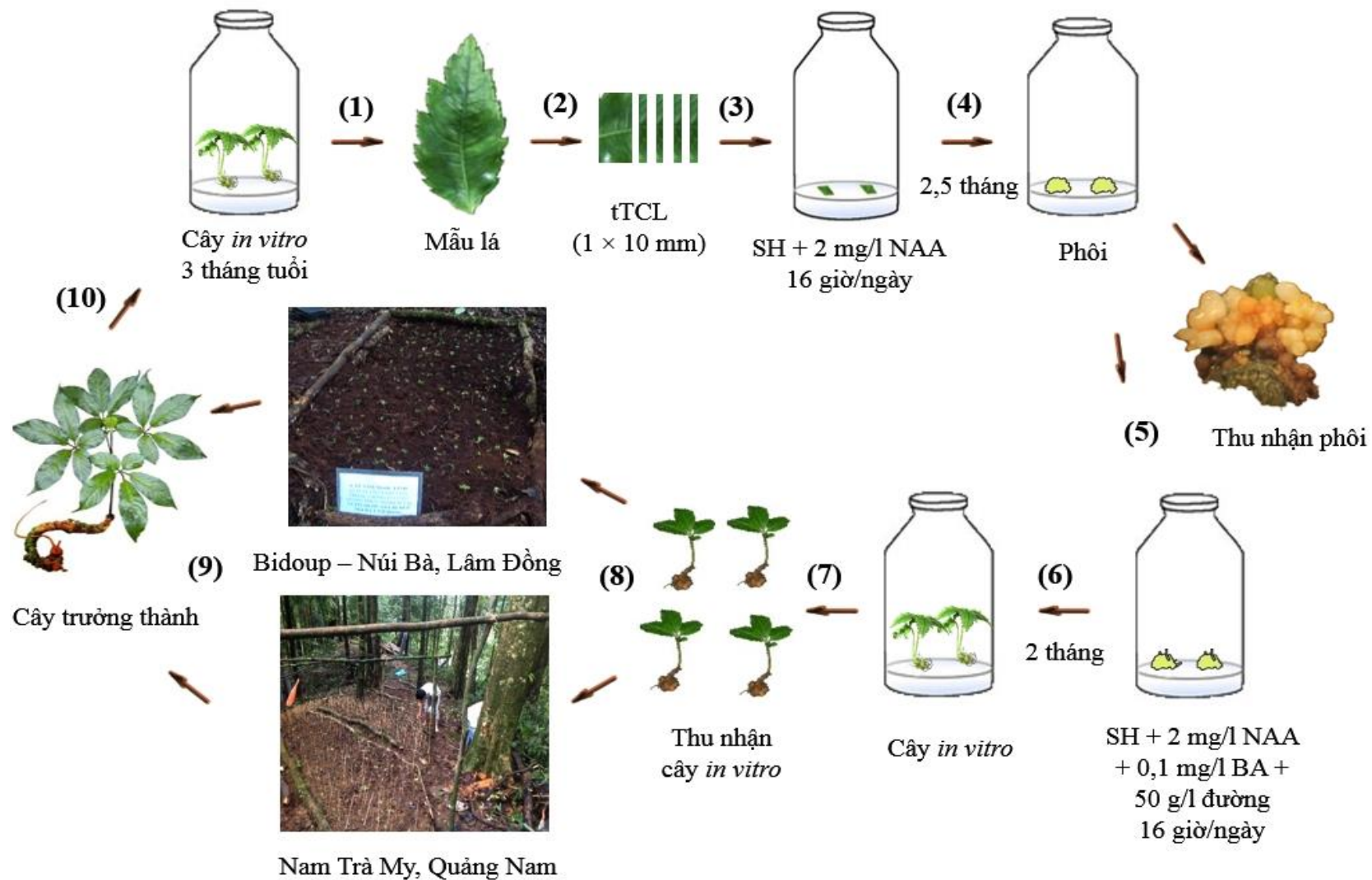
Đề tài đã thu được 10.000 cây giống sâm Ngọc Linh. Tỷ lệ sống của cây đạt cao nhất (90%); tỷ lệ hình thành lá mới sau thời gian ngủ là (87%) đặc biệt cây 2 năm tuổi có sự hình thành củ nhánh là 100% và có xu thế phát triển thành một bụi khi được trồng ở núi Ngọc Linh, xã Trà Linh, huyện Nam Trà My, tỉnh Quảng Nam. Còn những cây trồng ở Bidoup Núi Bà tỷ lệ sống chỉ đạt 70%, tỷ lệ mọc lá mới sau thời gian ngủ đông đạt 30% và quá trình phát triển của hệ rễ cũng chậm hơn so với trồng tại Quảng Nam.

Hàm lượng saponin tổng thu được cao nhất khi cây được 2 năm tuổi và trồng ở núi Ngọc Linh tương ứng là (3,54%).

4.2. Đề nghị

Khảo sát thêm các vị trí của mẫu và cách đặt mẫu cây lên khả năng phát sinh hình thái.

Tiếp tục theo dõi các chỉ tiêu sinh trưởng và phân tích hàm lượng saponin tích lũy trong cây sâm Ngọc Linh có nguồn gốc từ nuôi cấy lớp mỏng tế bào ở các độ tuổi khác nhau.



Sơ đồ tóm tắt quy trình nhân giống vô tính sâm Ngọc Linh thông qua nuôi cấy tTCL mẫu lá.

- (1) thu nhận mẫu lá *in vitro*; (2) mẫu lá tTCL; (3) mẫu lá được cấy vào môi trường SH + 2 mg/l NAA (16 giờ/ngày); (4) Phát sinh phôi sau 2,5 tháng nuôi cấy; (5) Cấy chuyên phôi vào môi trường SH + 2 mg/l NAA + 0,1 mg/l BA + 50 g/l đường (16 giờ/ngày); (6) tạo cây *in vitro* sau 2 tháng; (7) thu nhận cây *in vitro*; (8) trồng thử nghiệm; (9) cây trưởng thành; (10) vào mẫu.

CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ LIÊN QUAN TỚI LUẬN ÁN

1. **Vũ Thị Hiền**, Vũ Quốc Luận, Nguyễn Phúc Huy, Nguyễn Bá Nam, Bùi Văn Thế Vinh, Thái Xuân Du, Dương Tấn Nhựt. 2014. Phát sinh phôi trực tiếp từ lá, cuống lá và thân rễ cây sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.). *Tạp chí Sinh học*, 36(1SE): 277-282.
2. **Vũ Thị Hiền**, Vũ Quốc Luận, Nguyễn Phúc Huy, Nguyễn Bá Nam, Nguyễn Thị Kim Loan, Nguyễn Thanh Sang, Vũ Thị Thủy, Nguyễn Hồng Hoàng, Thái Xuân Du, Dương Tấn Nhựt. 2015. Sử dụng kỹ thuật nuôi cấy lớp mỏng tế bào trong nghiên cứu quá trình phát sinh hình thái của cây sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) *in vitro*. *Tạp chí Khoa học và Phát triển*, 13(4): 661-669.
3. **Vũ Thị Hiền**, Nguyễn Phúc Huy, Bùi Văn Thế Vinh, Hoàng Xuân Chiến, Hoàng Thanh Tung, Nguyễn Bá Nam, Vũ Quốc Luận, Dương Tấn Nhựt. 2015. Somatic embryogenesis from leaf transverse thin cell layer derived-callus of Vietnamese ginseng (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.). *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 13(4): 1-11.
4. Dương Tấn Nhựt, Hoàng Thanh Tung, **Vũ Thị Hiền**, Nguyễn Bá Nam, Nguyễn Phúc Huy, Vũ Quốc Luận. 2016. Assessment of the possibility of flowering, fruiting and saponin accumulation of somatic embryo-derived *Panax vietnamensis* Ha et Grushv plants growing in Kon Tum and Quang Nam. *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 14(1A): 263-268.
5. Dương Tấn Nhựt, Nguyễn Phúc Huy, Ngô Thanh Tài, Nguyễn Bá Nam, Vũ Quốc Luận, **Vũ Thị Hiền**, Hoàng Thanh Tung, Bùi Văn Thế Vinh, Trần Công Luận. 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): 299-308.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tiếng Việt

1. Đỗ Hữu Bích, *Từ điển cây thuốc và động vật làm thuốc Việt Nam II*, NXB. Khoa học Kỹ thuật, Hà Nội, 2003.
2. Tào Duy Cần, *Thuốc Nam thuốc Bắc và các phương pháp chữa bệnh xếp theo bệnh*, NXB. Khoa học Kỹ thuật, Hà Nội, 2002.
3. Hoàng Xuân Chiến, Ngô Thanh Tài, Nguyễn Bá Trực, Trần Xuân Tình, Lâm Bích Thảo, Trần Công Luận, Dương Tấn Nhựt, Nghiên cứu một số yếu tố tạo củ sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) *in vitro* và xác định hàm lượng saponin trong cây tạo từ củ trồng thử nghiệm ở núi Ngọc Linh, *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 2011, 9(3), 325-339.
4. Hoàng Văn Cương, Nguyễn Bá Nam, Bùi Thế Vinh, Trần Công Luận, Dương Tấn Nhựt, Ảnh hưởng của ánh sáng đơn sắc lên sự sinh trưởng và khả năng tích lũy hoạt chất saponin thông qua nuôi cấy mô sẹo và cây sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) *in vitro*, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*, 2012, 50(4), 475-490.
5. Lê Kim Cương, Hoàng Xuân Chiến, Nguyễn Bá Nam, Trịnh Thị Hương, Dương Tấn Nhựt, Ảnh hưởng của một số yếu tố lên khả năng tăng sinh mô sẹo “xốp” và bước đầu nuôi cấy huyền phù tế bào sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.), *Tạp chí Sinh học*, 2012, 34(3SE), 265-276.
6. Lê Kim Cương, Nguyễn Hồng Hoàng, Dương Tấn Nhựt, Ảnh hưởng của một số yếu tố lên sự tăng sinh và tái sinh huyền phù tế bào Sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.), *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 2016, 14(1), 75-86.
7. Nguyễn Thượng Đông, Trần Công Luận, Nguyễn Thị Thu Hương, *Sâm Việt Nam và một số cây thuốc họ nhân sâm*, NXB. Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội, 2007.
8. Nguyễn Ngọc Dung, *Nhân giống sâm Ngọc Linh (Panax vietnamensis) bằng con đường sinh học*, NXB. Nông nghiệp, Hà Nội, 1995, 43-100.
9. Nguyễn Hồng Hoàng, Trịnh Thị Hương, Lê Kim Cương, Vũ Thị Hiền, Nguyễn Bá Nam, Nguyễn Phúc Huy, Vũ Quốc Luận, Hà Thị Mỹ Ngân, Phạm Bích Ngọc, Chu Hoàng Hà, Dương Tấn Nhựt, Khảo sát một số yếu tố ảnh hưởng

- đến sự sinh trưởng của rễ tơ sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) chuyển gen, *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 2014, 12(3), 467-476.
10. Trịnh Thị Hương, Dương Tấn Nhựt, Khả năng nảy mầm của hạt nhân tạo có nguồn gốc từ phôi vô tính cây sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.), *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 2011, 9(4), 443-453.
 11. Trịnh Thị Hương, Hồ Thanh Tâm, Hà Thị Mỹ Ngân, Ngô Thanh Tài, Nguyễn Phúc Huy, Hoàng Xuân Chiến, Nguyễn Bá Nam, Vũ Quốc Luận, Vũ Thị Hiền, Nguyễn Thị Thúy Hằng, Phạm Bích Ngọc, Chu Hoàng Hà, Dương Tấn Nhựt, Ảnh hưởng của nguồn mẫu, kích thước mẫu và một số loại auxin lên khả năng tái sinh rễ bất định của sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) nuôi cấy *in vitro*, *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 2012, 10(4), 877-886.
 12. Trịnh Thị Hương, Nguyễn Thị Nhật Linh, Phạm Bích Ngọc, Chu Hoàng Hà, Dương Tấn Nhựt, Đánh giá khả năng sinh trưởng và tích lũy saponin của rễ bất định và rễ tơ cây sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.), *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 2016, 14(2), 231-236.
 13. Nguyễn Thị Liễu, Nguyễn Trung Thành, Nguyễn Văn Kết, Nghiên cứu khả năng tạo rễ bất định của sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) trong nuôi cấy *in vitro*, *Tạp chí Khoa học ĐHQGHN, Khoa học Tự nhiên và Công nghệ*, 2011, 27(1), 30-36.
 14. Nguyen Thi Nhat Linh, Hoang Thanh Tung, Vu Thi Hien, Vu Quoc Luan, Nguyen Phuc Huy, Nguyen Hoang Loc, Duong Tan Nhut, Effect of metal nanoparticles on the growth of Ngoc Linh ginseng (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) lateral roots cultured *in vitro*, *Tạp chí Đại học Huế*, 2017, 126(1C), 47-55.
 15. Hà Thị Loan, Dương Hoa Xô, Nguyễn Quốc Bình, Nguyễn Hoàng Quân, Vũ Thị Đào, Nathalie Pawlicki-Jullian, Eric Contier, Nghiên cứu tạo rễ tóc sâm Ngọc Linh *Panax vietnamensis* bằng phương pháp chuyển gen *Rol* nhờ vi khuẩn *Agrobacterium rhizogenes*, *Tạp chí Sinh học*, 2014, 36(1SE), 293-300.
 16. Nguyễn Đức Lượng, Lê Thị Thủy Tiên, *Công nghệ tế bào*, NXB. Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh, 2006.

17. Võ Thị Bạch Mai, *Sự phát triển của chồi và rễ*, NXB. Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh, 2004.
18. Hà Thị Mỹ Ngân, Trịnh Thị Hương, Nguyễn Bá Nam, Lê Kim Cương, Nguyễn Phúc Huy, Vũ Thị Hiền, Vũ Quốc Luận, Nguyễn Hồng Hoàng, Ngô Thanh Tài, Nguyễn Đình Trọng, Phạm Bích Ngọc, Chu Hoàng Hà, Dương Tấn Nhựt, Chuyển gen tạo rễ tóc Sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) qua trung gian vi khuẩn *Agrobacterium rhizogenes*, *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 2013, 11(3), 479-486.
19. Dương Tấn Nhựt, *Hệ thống nuôi cấy lớp mỏng tế bào trong nghiên cứu tái sinh, nhân giống và chuyển gene thực vật*, NXB. Nông Nghiệp, 2006.
20. Dương Tấn Nhựt, Phan Quốc Tâm, Vũ Quốc Luận, Nguyễn Văn Bình, Đặng Thị Ngọc Hà, Hoàng Xuân Chiến, Nguyễn Cửu Thành Nhân, Nguyễn Bá Nam, Nguyễn Bá Trục, Lê Nữ Minh Thùy, Phan Lê Hà Nguyễn, Vũ Thị Hiền, Lâm Thị Mỹ Hằng, Nguyễn Thị Thúy Hằng, Nguyễn Thành Hải, Nghiên cứu sự hình thành rễ bất định và rễ thứ cấp của sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.), *Kỷ yếu Hội nghị Công nghệ Sinh học Toàn quốc các tỉnh phía Nam*, NXB. Khoa học và Kỹ thuật, 2009, 252-258.
21. Dương Tấn Nhựt, Lâm Thị Mỹ Hằng, Bùi Thế Vinh, Phan Quốc Tâm, Nguyễn Bá Nam, Nguyễn Cửu Thành Nhân, Hoàng Xuân Chiến, Lê Nữ Minh Thùy, Vũ Thị Hiền, Nguyễn Văn Bình, Vũ Quốc Luận, Trần Công Luận, Đoàn Trọng Đức, Xác định hàm lượng saponin và dư lượng một số chất điều hòa sinh trưởng trong callus, chồi và rễ sâm Ngọc Linh nuôi cấy *in vitro*, *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 2010, 8(2), 189-202.
22. Dương Tấn Nhựt, Hoàng Xuân Chiến, Nguyễn Bá Trục, Nguyễn Bá Nam, Trần Xuân Tình, Vũ Quốc Luận, Nguyễn Văn Bình, Vũ Thị Hiền, Trịnh Thị Hương, Nguyễn Cửu Thành Nhân, Lê Nữ Minh Thùy, Lý Thị Mỹ Nga, Thái Thương Hiền, Nguyễn Thành Hải, Nhân giống vô tính cây sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.), *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 2010, 8(3B), 1211-1219.
23. Dương Tấn Nhựt, *Công nghệ sinh học thực vật: Nghiên cứu cơ bản và ứng dụng*, NXB. Nông Nghiệp, Thành phố Hồ Chí Minh, 2011.

24. Dương Tấn Nhựt, Nguyễn Bá Phong, Lê Nữ Minh Thùy, Hoàng Văn Cường, Hoàng Xuân Chiến, Bùi Thế Vinh, Trần Công Luận, Bước đầu đánh giá ảnh hưởng của methyl jasmonate lên khả năng tích lũy saponin trong mô sẹo sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) nuôi cấy *in vitro*, *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 2012, 10(4A), 867-875.
25. Dương Tấn Nhựt, Nguyễn Cửu Thành Nhân, Hoàng Xuân Chiến, Nguyễn Phúc Huy, Nguyễn Bá Nam, Trần Xuân Ninh, Phạm Phong Hải, Vũ Quốc Luận, Phan Quốc Tâm, Vũ Thị Hiền, Trịnh Thị Hương, Trần Công Luận, Paek Kee Yoeup, Một số hệ thống nuôi cấy trong nghiên cứu nhân nhanh rễ bất định và rễ thứ cấp cây sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.), *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 2012, 10(4A), 887-897.
26. Đặng Ngọc Phái, Nguyễn Như Chính, Nguyễn Minh Đức, Trần Thị Vi Cầm, Lê Thế Tùng, Nguyễn Minh Cang, *Tình hình trồng trọt - phát triển cây sâm Việt Nam và một số kết quả nghiên cứu về cây sâm Việt Nam*, Y học Thành Phố Hồ Chí Minh, 2002, 6, 12-18.
27. *Sách đỏ Việt Nam*, NXB Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội, 1996.
28. Ngô Thanh Tài, Nguyễn Bá Nam, Hồ Thanh Tâm, Hà Thị Mỹ Ngân, Dương Tấn Nhựt, Nghiên cứu tác động của ánh sáng đèn LED lên khả năng tăng sinh mô sẹo và sự hình thành cây hoàn chỉnh từ phôi vô tính cây sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.), *Kỷ yếu Hội nghị CNSH toàn quốc*, Hà Nội, 2013, 1038-1042.
29. Hồ Thanh Tâm, Trịnh Thị Hương, Hà Thị Mỹ Ngân, Hoàng Xuân Chiến, Nguyễn Bá Nam, Nguyễn Phúc Huy, Vũ Thị Hiền, Vũ Quốc Luận, Lê Kim Cương, Bùi Thế Vinh, Trần Công Luận, Phạm Bích Ngọc, Chu Hoàng Hà, Dương Tấn Nhựt, Ảnh hưởng của IBA, NAA và IAA lên khả năng hình thành và tích lũy saponin của rễ bất định sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) nuôi cấy *in vitro*, *Kỷ yếu hội nghị CNSH toàn quốc*, Hà Nội, 2013, 1043-1048.
30. Hoàng Minh Tấn, Nguyễn Quang Thạch và Trần Văn Phẩm, *Giáo trình sinh lý thực vật*. NXB. Nông nghiệp, Hà Nội, 1994, 790-791.

31. Nguyễn Bảo Triệu, Nguyễn Thanh Tùng, Trương Thị Bích Phượng, Nuôi cấy *in vitro* sâm Ngọc Linh (*Panax vietnammensis* Ha et Grushv.), *Tạp chí Khoa học*, Đại học Huế, 2013, 79(1), 107-115.
32. Mai Trường, Trần Thị Ngọc Hà, Phan Tường Lộc, Lê Tấn Đức, Trần Trọng Tuấn, Đỗ Đăng Giáp, Bùi Đình Thạch, Phạm Đức Trí, Nguyễn Đức Minh Hùng, Nguyễn Thị Thanh, Nguyễn Văn Kết, Trần Công Luận, Nguyễn Hữu Hồ, Nghiên cứu nuôi cấy mô sẹo có khả năng sinh phôi và mô phôi soma sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.), *Tạp chí Sinh học*, 2013, 35(3SE), 145-157.
33. Mai Trường, Trần Thị Ngọc Hà, Trần Trọng Tuấn, Phan Tường Lộc, Đỗ Đăng Giáp, Bùi Đình Thạch, Nguyễn Thị Ngọc Hân, Phạm Đức Trí, Lê Tấn Đức, Nguyễn Đức Minh Hùng, Nguyễn Văn Kết, Nguyễn Hữu Hồ, Tạo và nhân phôi soma sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) trong môi trường lỏng, *Tạp chí Khoa học và Phát triển*, 2014, 7(12), 1058-1095.
34. TT y tế Quảng Nam- Đà Nẵng, *Báo cáo điều tra trừ lượng, khoanh vùng cây sâm K5 Tỉnh Quảng Nam - Đà Nẵng*, 1979.
35. Bùi Thế Vinh, Trần Công Luận, Xây dựng phương pháp định lượng G-Rb1, G-Rg1 và MR2 trong sâm Việt Nam bằng kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao, *Tạp chí Dược liệu*, 2011, 16(1+2), 44-50.
36. Bùi Văn Thế Vinh, Vũ Thị Thủy, Thái Thương Hiền, Đỗ Khắc Thịnh, Dương Tấn Nhựt, Nghiên cứu hình thái giải phẫu và cấu trúc phôi trong quá trình phát sinh phôi vô tính sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.), *Tạp chí Khoa học và Phát triển*, 2014, 7(12), 1140-1148.
37. Vũ Văn Vụ, *Sinh lý thực vật ứng dụng*, NXB. Giáo dục, Hà Nội, 1999, 5-33.

Tiếng Anh

38. J. Aartijk, G.J. Blom-Barhoon, *Adventitious bud formation from bulb-scale explants of *Lilium specciosum* Thumb. in vitro. Interacting effects of NAA, IBA, wounding and temperature*, *Journal of Plant Physiology*, 1994, 116, 409-416.
39. I.O Ahn, B.V. Le, C Gendy, K.T.T. Van, *Direct somatic embryogenesis through thin cell layer culture in *Panax ginseng**, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1996, 45(3), 237-243.

40. P.V. Ammirato, F.C. Steward, *Some effects of environment of embryos from cultured free cell*, Botanical Gazette Journal, 1971, 132, 149-148.
41. N. Arumugam, S.S. Bhojwani, *Somatic embryogenesis in tissue cultures of Podophyllum hexandrum*, Canadian Journal of Botany, 1990, 68, 487-491.
42. S. Arya, I.D.I. Arya, T. Eriksson, *Rapid multiplication of adventitious somatic embryos of Panax ginseng*, Plant Cell Tissue and Organ Culture, 1993, 34, 157-162.
43. Y.P.S. Baja, R.L.M. Pierik, *Vegetative propagation of Freesia through callus cultures*, Netherlands Journal of Agricultural Science, 1974, 22, 153-159.
44. G. Bertazza, R. Baradil, S. Predieri, *Light effects on in vitro rooting of pear cultivars of different rhizogenic ability*, Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1995, 41, 139-143.
45. B.A. Briggs, S.M. McCulloch, L.A. Edick, *Micropropagation of azaleas using thidiazuron*, Acta Horticulturae, 1988, 226, 205-208.
46. R.G. Butenko, I.V. Brushwitzky, L.I. Sepyan, *Organogenesis and somatic embryogenesis in the tissue culture of Panax ginseng C. A. Meyer*, Botanical Garden of the University of Zürich, 1968, 7, 906-913.
47. J.M. Canhoto, G.S. Cruz, *Histodifferentiation of somatic embryos in cotyledons of pineapple guava (Feijoa sellowiana Berg)*, Protoplasma, 1996, 191(1-2), 34-45.
48. W.C. Chang, Y.I. Hsing, *In vitro flowering of embryoids derived from mature root callus of ginseng (Panax ginseng)*, Nature, 1980, 284, 341-342.
49. R. Chee, R.M. Pool, *Morphogenetic responses to propagule trimming, spectral irradiance, and photoperiod of grapevine shoots recultured in vitro*, Horticultural Science, 1989, 114, 350-354.
50. Y.E. Choi, W.Y. Soh, *Origin of somatic embryo induced from cotyledons of zygotic embryos at various developmental stages of ginseng*, Journal of Plant Biology, 1994, 37, 365-370.
51. Y.E. Choi, W.Y. Soh, *Effect of plumule and radicle on somatic embryogenesis in the cultures of ginseng zygotic embryos*, Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1996, 45, 137 -143.

52. Y.E. Choi, W.Y. Soh, *Enhanced somatic single embryo formation by plasmolysing pretreatment from cultured ginseng cotyledons*, *Plant Science*, 1997, 130(2), 197-206.
53. K. Claire, N. Le Gal, M. Monteiro, J. Dommès, T. Gaspar, *Somatic embryogenesis of panax ginseng in liquid cultures: a role for polyamines and their metabolic pathways*, *Plant Growth Regulation*, 2000, 31, 209-214.
54. M. Coumans, M.F. Coumans-Gilics, J. Delhez, T. Gaspar, *Mass propagation of Primula obconica*, *Acta Horticulturae*, 1979, 91, 287-293.
55. D. Davis, J. Allen, R.M. Consenza, *Segmenting local residents by their attitudes, interested and opinions toward tourism*, *Journal of Travel Research*, 1988, 27(2), 2-8.
56. P.C. Debergh, C.J. Aitken, D. Cohen, B. Grout, S. Von Amold, R. Zimmerman, M. Ziv, *Reconsideration of the term 'vitrification' as used in micropropagation*, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1992, 30, 135-140.
57. N.M. Duc, R. Kasai, K. Ohtani, A. Ito, K. Yamasaki, T. N. Nguyen, O. Tanaka, *New saponins from Vietnamese ginseng: highlights on biogenesis of dammarane triterpenoids*, *Advances in experimental medicine and biology*, 1996, 404, 129-149.
58. N.M. Duc, N.T. Nham, Kasai R., A. Ito, K. Yamasaki, O. Tanaka, *Saponins from Vietnamese Ginseng, Panax vietnamensis Ha et Grushv. Collected in Central Vietnam. I*, *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, 1993, 41(11), 2010-2014.
59. N.M, Duc., N.T. Nham, R. Kasai, A. Ito, K. Yamasaki, O. Tanaka, *Saponins from Vietnamese Ginseng, Panax vietnamensis Ha et Grushv. Collected in Central Vietnam. II*", *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, 1994, 42(1), 115-122.
60. N. M. Duc, N. T. Nham, R. Kasai, A. Ito, K. Yamasaki, O. Tanaka, *Saponins from Vietnamese Ginseng, Panax vietnamensis Ha et Grushv. Collected in Central Vietnam. III*", *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, 1994, 42(3), 634-640.
61. D.B. Duncan, *Multiple range and multiple F tests*, *Biometrics*, 1955, 11, 1-42.

62. H.T. Dung, I.V. Grushvitzky, *A new species of the genus Panax L., Araliaceae in Vietnam: Panax vietnamensis Ha et Grushv.*, Botanical Journal of Vietnam, 1985, 70, 518-522.
63. K.M.S. Elmeer, M.J. Hennerty, *Observations on the combined effects of light, NAA and 2,4-D on somatic embryogenesis of cucumber (Cucumis sativus) hybrids*, Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2008, 95(3), 381-384.
64. J.E. Erwin, D. Schwarze, R. Donahue, *Factors affecting propagation of Clematis by stem cuttings*, Horticulture Technology, 1997, 7(4), 408-410.
65. Evers, *Growth and morphogenesis of shoots initials of Douglas fir, Pseudotsuga mansiesu (Mirb) Franco in vitro*, Dissertation of Agriculture University Wageningen, the Netherlands, 1981, 1-6.
66. X. Gao, C. Zhu, W. Jia, W. Gao, M. Qiu, Y. Zhang, P. Xiao, *Induction and characterization of adventitious roots directly from the explants of Panax notoginseng*, Biotechnology Letters, 2005, 27(22), 1771-1775.
67. R. Gill, P.K. Saxena, *Somatic embryogenesis in Nicotiana tabacum L.: induction by TDZ of direct embryo differentiation from cultured leaf discs*, Plant Cell Reports, 1993, 12(3), 154-159.
68. T.Y. Gorpenchenko, K.V. Kiselev, V.P. Bulgakov, G.K. Tchernoded, E.A. Bragina, M.V. Khodakovskaya, O.G. Koren, T.B. Batygina, Y.N. Zhuravlev, *The Agrobacterium rhizogenes rolC-gene-induced somatic embryogenesis and shoot organogenesis in Panax ginseng transformed calluses*, Planta, 2006, 223, 457-467.
69. W. Halperin, D.F. Wetherell, *Adventive embryony in tissue cultures of the wild carrot, Daucus carota*, American Journal of Botany, 1964, 51, 274-283.
70. Y. Helariutta, H. Fukaki, J. Wysocka-Diller, J. Jung, G. Sena, M.T. Hauser, P. N. Benfey, *The short-root gene controls radial patterning of the Arabidopsis root through radial signaling*, Cell, 2000, 101(5), 555-567.
71. S.K. Jaiswal, S.S. Bhojwaini, S.P. Bhatnagar, *In vitro regeneration potentialities of seedling explants of Brassica carinata A. Braun*, Phytomorphology, 1987, 37, 235-241.
72. J.J. Jhang, E.J. Staba, J.Y. Kim, *American and Korean ginseng tissue culture: Growth, chemical analysis and plantlet production*, In Vitro, 1974, 9(4), 253-

259.

73. S.Y. Jiu, *Plant generation from adventitious root-derived calli of Panax ginseng* C. A. Meyer, Journal of the Agricultural Association of China New Series, 1992, 0(159), 41-48.
74. S.M. Kaeppler, H.F. Kaeppler, Y. Rhee, *Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants*, Plant Molecular Biology, 2000, 43, 179-188.
75. R. Kathal, S.P. Bhatnagar, S.S. Bhojwani, *Regeneration of plants from leaf explants of Cucumis melon cv. Pusa Shaibati*, Plant Cell Reports, 1988, 7, 449-451.
76. R.E. Kendrick, G.H.M. Kronenberg, *Photomorphogenesis in plants*, Dordrech: Kluwer Academic Publishers, 1994.
77. H.R. Kerns, M.M. Meyer, *Tissue culture propagation of maple hybrid using thidiazuron to stimulate shoot tip proliferation*, Horticultural Science, 1986, 21, 1209-1210.
78. L. Kharwanlang, C.D. Meera, S. Kumaria, P. Tandon, *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, 2016, 7(3), 32-40.
79. L. Kharwanlang, C.D. Meera, S. Kumaria, P. Tandon, *Histological and SEM studies on somatic embryogenesis in rhizome-derived callus of Panax assamicus. Ban*, The Pharma Innovation Journal, 2016, 5(4), 93-99.
80. J.H. Kim, E.J. Chang, H.I. Oh, *Saponin production in submerged adventitious root culture of Panax ginseng as affected by culture conditions and elicitors*, Asia-Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology, 2005, 13(2), 87-91.
81. G.J. Klerk, B. Arnholdt-Schimtt, R. Lieberei, K.H. Neuman, *Regeneration of roots, shoots, embryos, physiological, biochemical and molecular aspects*, Biologia Plantarum, 1997, 39(7), 53-66.
82. T. Kull, J. Arditti, *Orchid biology Reviews and perspective*, Kluwer Academic Publishers, the Netherland, 2002, 8, 443-487.
83. T. Laux, G. Jergens, *Embryogenesis: A new start in life*, Plant Cell, 1997, 9, 989-1000.

84. P.A. Lazzeri, D.E. Hildebrand, G.B. Collins, *Soybean somatic embryogenesis: effects of nutritional, physical and chemical factors*, Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1987, 10, 209-220.
85. S.H. Lee, R.K. Tewari, E.J. Hahn, K.Y. Paek, *Photon flux density and light quality induce changes in growth, stomatal development, photosynthesis and transpiration of Withania Somnifera (L.) Dunal. Plantlets*, Plant Cell, Tissue Organ Cult, 2007, 90, 141-151.
86. O.Y. Lee–Stadleman, S. Lee, W.P. Hackett, P.E. Read, *The formation of adventitious buds in vitro on micro-sections of hybrid Populus leaf mid veins*, Plant Science, 1989, 61, 263-272.
87. S. Li, J. Li, X.L. Yang, Z. Cheng, W.J. Zhang, *Genetic diversity and differentiation of cultivated ginseng (Panax ginseng C.A. Meyer) populations in North-east China revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) markers*, Genetic Resources and Crop Evolution, 2011, 58, 815-824.
88. H.T. Lim, H.S. Lee, *Regeneration of Panax ginseng C.A. Meyer by organogenesis DNA analysis of regenerants*, Plant Cell, Tissue Organ Culture, 1997, 49, 179-187.
89. B.K. Maynard, N.L. Bassuk, *Rooting softwood cuttings of Acer griseum: Promotion by stockplant etiolation, inhibition by catechol*, Horticultural Science, 1990, 25, 200-202.
90. R.D. Michael, P. Anthony, *Plant Cell Culture Essential Methods*, John Wiley and Sons, Ltd, 2010, 1-337.
91. M. Mulin, K. Tran Thanh Van, *Obtention of in vitro flowers from thin epidermal cell layers of Petunia hybrid*, Plant Science, 1989, 62, 113-121.
92. T. Murashige, F. Skoog, *A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures*, Physiologia Plantarum, 1962, 15, 473-496.
93. B.N.S. Murthy, S.J. Murch, P.K. Saxena, *TDZ-induced somatic embryogenesis in intact seedlings of peanut (Arachis hypogaea): endogenous growth regulator levels and significance of cotyledons*, Plant Physiology, 1995, 94, 268-276.

94. B.N.S. Murthy, S.J. Murch, P.K. Saxena, *Thidiazuron: a potent regulator of in vitro plant morphogenesis*, *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 1998, 34, 267-275.
95. B.N.S. Murthy, J. Victor, R. Singh, *In vitro regeneration of Chickpea (Cicer arietinum L.): Stimulation of direct organogenesis and somatic embryogenesis by TDZ*, *Plant Growth Regulation*, 1996, 19, 233-240.
96. G. Nemeth, *Induction of rooting*, In: Y.P.S. Bajaj (ed), *Biotechnology in Agriculture and Forestry, Tree I*. Springer. Berlin Heidelberg New York Tokyo, 1986, 1, 49-64.
97. K.H. Neumann, *Some studies on somatic embryogenesis: A tool in plant biotechnology*, Based on a lecture at the 87th Indian Science congress Jan in Pune, India, 2000, (<http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2000/321>).
98. D.T. Nhut, N.T. Hai, P.X. Huyen, D.T. Quynh Huong, N.T. Thuy Hang, J.A.T. da Silva, *Thidiazuron induces high frequency shoot bud formation from Begonia petiole transverse thin cell layer culture*, *Propagation of Ornamental Plants*, 2005, 5(3), 151-157.
99. D.T.hut, V.B.Le, J.A.T. da Silva, C.R. Aswath, *Thin cell layers culture system in Lilium: regeneration and transformation perspectives*, *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*, 2001, 37(5), 516-523.
100. D.T. Nhut, L.T.M. Nga, H.X. Chien, N.P. Huy, *Morphogenesis of in vitro main root transverse thin cell layers of Vietnam ginseng (Panax vietnamensis Ha et Grushv.)*, *African Journal of Biotechnology*, 2012, 11(23), 6274-6289.
101. D.T. Nhut, B.V.T. Vinh, T.T. Hien, N.P. Huy, N.B. Nam and H.X. Chien *Effects of spermidine, proline and carbohydrate sources on somatic embryogenesis from main root transverse thin cell layers of Vietnamese ginseng (Panax vietnamensis Ha et Grushv.)*. *African Journal of Biotechnology*, 2012, 11(5), 1084-1091.
102. G. Nugent, T. Wardley-Richardson, *Plant regeneration from stem and petal of carnation (Dianthus caryophyllus L.)*, *Plant Cell Reports*, 1991, 10, 477-480.
103. S. Ohki, *Scanning electron microscopy of shoot differentiation in vitro from leaf explants of the African violet*, *Plant Cell, Tissue Organ Culture*, 1994, 36, 157-162.

104. J. Ouyang, X. Wang, B. Zhao, Y. Wang, *Light intensity and spectral quality influencing the callus growth of Cistanche deserticola and biosynthesis of phenylethanoid glycosides*, Plant Science, 2003, 165, 657-661.
105. R.L.M. Pierik, H.H.M. Steegmans, *Analysis of adventitious root formation in isolated stem explants of Rhododendron*, Horticultural Science, 1975, 3, 1-20.
106. T. Radhakrishna, T.G.K. Murthy, K. Chandran, A. Banyopadhyay, *Somatic embryogenesis in Arachis hypogaea*, Australian Journal of Botany, 2001, 49, 753-759.
107. S.M. Robb, *The culture of excised tissue from bulb scales of Lilium speciosum*, Journal of Experimental Botany, 1957, 8, 348-352.
108. J.C. Sager, R.M. Wheeler, *Application of sunlight and lamps for plant irradiation in space bases*, Advance Spares, 1992, 12(5), 133-140.
109. R. Schaffer, N. Ramsey, A. Samach, S. Corden, J. Putterill, I.A. Carre, G. Coupland, *The late elongated hypocotyl mutation of Arabidopsis disrupts circadian rhythms and the photoperiodic control of flowering*, Cell, 1998, 93(7), 1219-1229.
110. R.U. Schenk, A.C. Hildebrandt, *Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures*, Canadian Journal of Botany, 1972, 50(1), 199-204.
111. S. Shahana, S.C. Gupta, *Somatic embryogenesis in Sesbania sesban var. bicolor: A multipurpose fabaceous woody species*, Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2002, 69(3), 289-292.
112. Y. Shoyama, X.X. Zhu, R. Nakai, S. Shiraishi, H. Kohda, *Micropropagation of Panax notoginseng by somatic embryogenesis and RAPD analysis of regenerated plantlets*, Plant Cell Reports, 1997, 16, 450-453.
113. F. Skoog, C.O. Miller, *Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro*, In: *Biological action of growth substances. XI Symposium of the Society of Experimental Biology*. Cambridge University Press, 1957, 11, 118-131.

114. O. Tanaka, R. Kasai, *Saponins of Ginseng and related plants*. In: W. Herz, H. Griesebach, G.W. Kirby, C. Tamm (eds), *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, New York, Springer-Verlag, 1984, 46, 1-76.
115. A.R. Taylor, S.M. Assmann, *Apparent absence of a redox requirement for blue light activation of pump current in broad bean guard cells*, *Plant Physiol*, 2001, 125, 329-38.
116. J.A. Teixeira da Silva, S. Fukai, *Chrysanthemum organogenesis through thin cell layer technology and plant growth regulator control*, *Asian Journal of Plant Sciences*, 2003, 2, 505-514.
117. N.T. Thanh, N.V. Ket, K.Y. Paek, *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*, 2007, 23, 269-274
118. N.T. Thanh, H.T. Anh, K.Y. Paek, *Effects of macro elements on biomass and ginsenoside production in cell suspension culture of Ngoc Linh ginseng (Panax vietnamensis Ha et Grushv.)*, *VNU Journal of Science, Natural Sciences and Technology*, 2008, 24, 248-252.
119. A. Tirajoh, T.S. Kyung, Z.K. Punja, *Somatic embryogenesis and plantlet regeneration in American ginseng (Panax quinquefolium L.)*, *In Vitro Cellular Development Biology*, 1998, 34, 203-211.
120. K. Tran Thanh Van, *Control of morphogenesis by inherent and exogenously applied factors in thin cell layers*, *International Review of Cytology*, 1980, 32, 291-311.
121. K. Tran Thanh Van, C. Gendy, *Thin cell layer (TCL) method to programme morphogenetic patterns*, *Plant Tissue Culture Manual*, 1996, 114, 1-25.
122. K. Tran Thanh Van, P. Toubart, A. Cousson, A.G. Darvill, D.J. Gollin, P. Chelf, P. Albersheim, *Manipulation of the morphogenetic pathways of tobacco explants by oligosaccharide*, *Nature*, 1985a, 314, 615-617.
123. S.A. Verhagen, S.R. Wann, *Norway spruce somatic embryogenesis: high frequency from light-culture matured embryo*, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1989, 16, 103-111.

124. R.G.Walters, F. Shephard, J.J.M. Rogers, S.A. Rolfe, P. Horton, *Identification of mutants of Arabidopsis defective in acclimation of photosynthesis to the light environment*. Plant Physiol, 2003, 131, 472-481.
125. K. Yamasaki, *Bioactive saponins in Vietnamese ginseng, Panax vietnamensis*, Pharmaceutical Biology, 2000, 28, 16-24.
126. K. Yobimoto, K. Matsumoto, N.T.T. Huong, R. Kasai, K. Yamasaki H. Watanabe, *Suppressive effects of Vietnamese ginseng saponin and its major component majonoside-R2 on psychological stress-induced enhancement of lipid peroxidation in the mouse brain*, Pharmacology Biochemistry and Behavior, 2000, 66(3), 661-665.
127. X.L. You, J.Y. Han, Y.E. Choi, *Plant regeneration via direct somatic embryogenesis in Panax japonicus*, Plant Biotechnology Reports, 2007, 1, 5-9.
128. M. Zhiyu, H. Shimizu, S. Moriizumi, M. Miyata, *Effect of light intensity, Quality and photoperiod on stem elongation of Chrysanthemum cv. Reagan*, Environment Control in Biology, 2007, 45(1), 19-25.
129. J.J. Zhong, T. Seki, S.I. Kinoshita, T. Yoshida, *Effect of light irradiance on anthocyanin production by suspended culture of Perilla frutescens*, Biotechnology and Bioengineering, 1991, 38, 653-658.
130. S. Zhou, D.C.W. Brown, *High efficiency plant production of North American ginseng via somatic embryogenesis from cotyledon explants*, Plant Cell Reports, 2005, 25, 166-173.

Tài liệu internet

131. (<http://www.theplantlist.org/browse/A/Araliaceae/Panax>)
132. https://vi.wikipedia.org/wiki/Sâm_Ngọc_Linh

PHÂN TÍCH THỐNG KÊ SỐ LIỆU CÁC THÍ NGHIỆM KHẢO SÁT SỰ PHÁT SINH HÌNH THÁI CỦA CÁC LOẠI MẪU CÂY

1. Thí nghiệm 1. Ảnh hưởng của CDHSTTV riêng lẻ lên sự phát sinh hình thái của mẫu lá tTCL_L trong điều kiện chiếu sáng và tối hoàn toàn

Bảng 3.1. Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng riêng lẻ lên sự phát sinh hình thái của mẫu lá tTCL_L trong điều kiện chiếu sáng 16 giờ/ngày

tylemaulasangtaophoi						
SLLL	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
Duncan ^a 1	3	.000				
2	3	.000				
3	3	.000				
4	3	.000				
5	3	.000				
6	3	.000				
7	3	.000				
8	3	.000				
9	3	.000				
10	3	.000				
11	3	.000				
12	3	.000				
13	3	.000				
18	3	.000				
19	3	.000				
20	3	.000				
14	3		43.333			
17	3			49.667		
21	3				70.000	
15	3				70.667	
16	3					86.333
22	3					89.000
Sig.		1.000	1.000	1.000	.757	.219

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

sophoilasang						
SLLL	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
Duncan ^a 1	3	.000				
2	3	.000				
3	3	.000				
4	3	.000				
5	3	.000				
6	3	.000				
7	3	.000				
8	3	.000				
9	3	.000				
10	3	.000				
11	3	.000				
12	3	.000				
13	3	.000				
18	3	.000				
19	3	.000				
20	3	.000				
14	3	.900				
17	3	.920				
15	3		2.233			
16	3			4.367		
21	3				7.553	
22	3					29.497
Sig.		.206	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

mautaomoseolasang

SLLL	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
Duncan ^a 1	3	.000			
2	3	.000			
3	3	.000			
4	3	.000			
5	3	.000			
6	3	.000			
7	3	.000			
8	3	.000			
9	3	.000			
10	3	.000			
11	3	.000			
12	3	.000			
13	3	.000			
14	3	.000			
18	3	.000			
19	3	.000			
20	3	.000			
15	3		44.433		
21	3			74.433	
17	3			76.633	
16	3				97.733
22	3				97.767
Sig.		1.000	1.000	.170	.983

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

sorelasang

SLLL	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
Duncan ^a 1	3	.000				
2	3	.000				
3	3	.000				
4	3	.000				
5	3	.000				
6	3	.000				
7	3	.000				
8	3	.000				
9	3	.000				
10	3	.000				
11	3	.000				
12	3	.000				
13	3	.000				
14	3	.000				
15	3	.000				
18	3	.000				
19	3	.000				
20	3	.000				
21	3		.640			
17	3			1.063		
22	3				2.593	
16	3					2.867
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

tylemautaorelasang

		Subset for alpha = 0.05					
SLLL	N	1	2	3	4	5	
Duncan ^a	1	2	.000				
	2	3	.000				
	3	3	.000				
	4	3	.000				
	5	3	.000				
	6	3	.000				
	7	3	.000				
	8	3	.000				
	9	3	.000				
	10	3	.000				
	11	3	.000				
	12	3	.000				
	13	3	.000				
	14	3	.000				
	15	3	.000				
	18	3	.000				
	19	3	.000				
	20	3	.000				
	17	3		9.967			
	21	3			26.633		
	16	3				42.167	
	22	3					63.300
Sig.			1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.933.

Bảng 3.2. Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng riêng lẻ lên sự phát sinh hình thái của mẫu lá tTCL_L trong điều kiện tối hoàn toàn

		tyletaophoitoila						
SLLL	N	Subset for alpha = 0.05						
		1	2	3	4	5	6	
Duncan ^a	1	3	.000					
	2	3	.000					
	3	3	.000					
	4	3	.000					
	5	3	.000					
	6	3	.000					
	7	3	.000					
	8	3	.000					
	9	3	.000					
	10	3	.000					
	11	3	.000					
	12	3	.000					
	18	3	.000					
	19	3	.000					
	20	3	.000					
	21	3	.000					
	22	3	.000					
	13	3		37.667				
	17	3			47.333			
	15	3				71.667		
	14	3					84.333	
	16	3						92.000
Sig.			1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

sophoitoila

SLLL		N	Subset for alpha = 0.05				
			1	2	3	4	5
Duncan ^a	1	3	.000				
	2	3	.000				
	3	3	.000				
	4	3	.000				
	5	3	.000				
	6	3	.000				
	7	3	.000				
	8	3	.000				
	9	3	.000				
	10	3	.000				
	11	3	.000				
	12	3	.000				
	18	3	.000				
	19	3	.000				
	20	3	.000				
	21	3	.000				
	22	3	.000				
	13	3		1.873			
	17	3		2.150			
	16	3			6.763		
	15	3				7.373	
	14	3					8.910
Sig.			1.000	.173	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

tyletaomoseolatoi

SLLL	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
Duncan ^a 1	3	.000			
2	3	.000			
3	3	.000			
4	3	.000			
5	3	.000			
6	3	.000			
7	3	.000			
8	3	.000			
9	3	.000			
10	3	.000			
11	3	.000			
12	3	.000			
13	3	.000			
18	3	.000			
19	3	.000			
20	3	.000			
21	3	.000			
22	3		13.300		
14	3			39.967	
16	3				96.633
17	3				97.767
15	3				98.867
Sig.		1.000	1.000	1.000	.100

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

tylemautaorelatoi

SLLL		N	Subset for alpha = 0.05			
			1	2	3	4
Duncan ^a	1	3	.000			
	2	3	.000			
	3	3	.000			
	4	3	.000			
	5	3	.000			
	6	3	.000			
	7	3	.000			
	8	3	.000			
	9	3	.000			
	10	3	.000			
	11	3	.000			
	12	3	.000			
	13	3	.000			
	14	3	.000			
	18	3	.000			
	19	3	.000			
	20	3	.000			
	21	3	.000			
	22	3	.000			
	17	3		57.733		
	15	3			73.300	
	16	3				79.967
Sig.			1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

2. Thí nghiệm 2. Ảnh hưởng của CDHSTTV riêng lẻ lên sự phát sinh hình thái của mẫu cường lá tTCL_C trong điều kiện chiếu sáng và tối hoàn toàn

Bảng 3.3. Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng riêng lẻ lên sự phát sinh hình thái của mẫu cường lá tTCL_C trong điều kiện chiếu sáng 16 giờ/ngày và trong điều kiện tối hoàn toàn

		tylemoseocngangsang					
SLLL	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	
Duncan ^a	1	3	.000				
	2	3	.000				
	3	3	.000				
	4	3	.000				
	5	3	.000				
	6	3	.000				
	7	3	.000				
	8	3	.000				
	9	3	.000				
	10	3	.000				
	11	3	.000				
	12	3	.000				
	13	3	.000				
	14	3	.000				
	15	3	.000				
	18	3	.000				
	19	3	.000				
	20	3	.000				
	16	3		16.667			
	17	3			63.300		
	22	3				76.667	
	21	3					86.633
Sig.			1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

tylemoseocngangsangtoi

SLLL		N	Subset for alpha = 0.05				
			1	2	3	4	5
Duncan ^a	1	3	.000				
	2	3	.000				
	3	3	.000				
	4	3	.000				
	5	3	.000				
	6	3	.000				
	7	3	.000				
	8	3	.000				
	9	3	.000				
	10	3	.000				
	11	3	.000				
	12	3	.000				
	13	3	.000				
	14	3	.000				
	18	3	.000				
	19	3	.000				
	20	3	.000				
	21	3	.000				
	17	3		33.300			
	22	3			46.633		
	16	3				63.300	
15	3					83.300	
Sig.			1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

tylerecngangtoi

SLLL	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
Duncan ^a 1	3	.000			
2	3	.000			
3	3	.000			
4	3	.000			
5	3	.000			
6	3	.000			
7	3	.000			
8	3	.000			
9	3	.000			
10	3	.000			
11	3	.000			
12	3	.000			
13	3	.000			
14	3	.000			
15	3	.000			
16	3	.000			
17	3	.000			
18	3	.000			
19	3	.000			
20	3		31.333		
21	3			75.500	
22	3				89.967
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

tylemoseocngangsang

SLLL	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
Duncan ^a 1	3	.000			
2	3	.000			
3	3	.000			
4	3	.000			
5	3	.000			
6	3	.000			
7	3	.000			
8	3	.000			
9	3	.000			
10	3	.000			
11	3	.000			
12	3	.000			
13	3	.000			
14	3	.000			
15	3	.000			
16	3	.000			
17	3	.000			
18	3	.000			
19	3	.000			
20	3		2.063		
21	3			6.430	
22	3				15.520
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

3. Thí nghiệm 3. Ảnh hưởng của CDHSTTV riêng lẻ lên sự phát sinh hình thái của mẫu cường lá ITCL_C trong điều kiện chiếu sáng và tối hoàn toàn

Bảng 3.4. Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng riêng lẻ lên sự phát sinh hình thái của mẫu cường lá ITCL_C trong điều kiện chiếu sáng 16 giờ/ngày

		tyletaophoidocsang					
		Subset for alpha = 0.05					
SLLL	N	1	2	3	4	5	
Duncan ^a	1	3	.000				
	2	3	.000				
	3	3	.000				
	4	3	.000				
	5	3	.000				
	6	3	.000				
	7	3	.000				
	8	3	.000				
	9	3	.000				
	10	3	.000				
	11	3	.000				
	12	3	.000				
	13	3	.000				
	18	3	.000				
	19	3	.000				
	20	3	.000				
	14	3		23.000			
	21	3			58.667		
	15	3				59.667	
	17	3				69.667	
	22	3				84.000	
	16	3				86.333	
	Sig.		1.000	1.000	.676	1.000	.331

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

sophoicdocsang

SLLL		N	Subset for alpha = 0.05				
			1	2	3	4	5
Duncan ^a	1	3	.000				
	2	3	.000				
	3	3	.000				
	4	3	.000				
	5	3	.000				
	6	3	.000				
	7	3	.000				
	8	3	.000				
	9	3	.000				
	10	3	.000				
	11	3	.000				
	12	3	.000				
	13	3	.000				
	18	3	.000				
	19	3	.000				
	20	3	.000				
	14	3	.333				
	21	3		2.753			
	15	3			3.887		
	17	3				5.373	
22	3					13.207	
16	3					13.667	
Sig.			.540	1.000	1.000	1.000	.311

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

tyletaomoseo

SLLL		N	Subset for alpha = 0.05				
			1	2	3	4	5
Duncan ^a	1	3	.000				
	2	3	.000				
	3	3	.000				
	4	3	.000				
	5	3	.000				
	6	3	.000				
	7	3	.000				
	8	3	.000				
	9	3	.000				
	10	3	.000				
	11	3	.000				
	12	3	.000				
	13	3	.000				
	18	3	.000				
	19	3	.000				
	20	3	.000				
	14	3		24.400			
	21	3			84.433		
	15	3				89.967	
	22	3					96.633
16	3					97.767	
17	3					98.933	
Sig.			1.000	1.000	1.000	1.000	.313

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

tylemautaorecdocsang

SLLL	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
Duncan ^a 1	3	.000					
2	3	.000					
3	3	.000					
4	3	.000					
5	3	.000					
6	3	.000					
7	3	.000					
8	3	.000					
9	3	.000					
10	3	.000					
11	3	.000					
12	3	.000					
18	3	.000					
19	3	.000					
20	3	.000					
21	3	.000					
14	3		10.667				
13	3			25.667			
22	3				37.767		
17	3					71.067	
15	3						79.967
16	3						85.533
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	.063

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

sorecdocsang

SLLL	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Duncan ^a 1	3	.000		
2	3	.000		
3	3	.000		
4	3	.000		
5	3	.000		
6	3	.000		
7	3	.000		
8	3	.000		
9	3	.000		
10	3	.000		
11	3	.000		
12	3	.000		
18	3	.000		
19	3	.000		
20	3	.000		
21	3	.000		
22	3	.353		
14	3	.853		
13	3		3.163	
17	3		4.017	
15	3		4.773	4.773
16	3			6.207
Sig.		.431	.094	.115

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Bảng 3.5. Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng riêng lẻ lên sự phát sinh hình thái của mẫu cường lá ITCL_C trong điều kiện tối hoàn toàn

tylemautaophoicdocsang				
SLLL	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Duncan ^a 1	3	.000		
2	3	.000		
3	3	.000		
4	3	.000		
5	3	.000		
6	3	.000		
7	3	.000		
8	3	.000		
9	3	.000		
10	3	.000		
11	3	.000		
12	3	.000		
13	3	.000		
14	3	.000		
17	3	.000		
18	3	.000		
19	3	.000		
20	3	.000		
21	3	.000		
22	3	.000		
15	3		49.667	
16	3			69.667
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

sophoicdaitoi				
SLLL	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Duncan ^a 1	3	.000		
2	3	.000		
3	3	.000		
4	3	.000		
5	3	.000		
6	3	.000		
7	3	.000		
8	3	.000		
9	3	.000		
10	3	.000		
11	3	.000		
12	3	.000		
13	3	.000		
14	3	.000		
17	3	.000		
18	3	.000		
19	3	.000		
20	3	.000		
21	3	.000		
22	3	.000		
15	3		3.797	
16	3			5.920
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

tyletaomoseocdaitoi

SLLL		N	Subset for alpha = 0.05				
			1	2	3	4	5
Duncan ^a	1	3	.000				
	2	3	.000				
	3	3	.000				
	4	3	.000				
	5	3	.000				
	6	3	.000				
	7	3	.000				
	8	3	.000				
	9	3	.000				
	10	3	.000				
	11	3	.000				
	12	3	.000				
	17	3	.000				
	18	3	.000				
	19	3	.000				
	20	3	.000				
	21	3		45.500			
	14	3		46.633			
	13	3			67.733		
	22	3				81.067	
15	3				84.467		
16	3					94.400	
Sig.			1.000	.549	1.000	.077	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

tylemautaorecdaitoi

SLLL		N	Subset for alpha = 0.05							
			1	2	3	4	5	6	7	
Duncan ^a	1	3	.000							
	2	3	.000							
	3	3	.000							
	4	3	.000							
	5	3	.000							
	6	3	.000							
	7	3	.000							
	8	3	.000							
	9	3	.000							
	10	3	.000							
	11	3	.000							
	12	3	.000							
	17	3	.000							
	18	3	.000							
	19	3	.000							
	13	3		11.067						
	20	3			31.100					
	15	3			35.533	35.533				
	14	3				41.100	41.100			
	16	3					46.633			
	21	3						61.100		
	22	3								94.400
	Sig.		1.000	1.000	.239	.141	.143	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

sorecdaitoi

SLLL		N	Subset for alpha = 0.05					
			1	2	3	4	5	6
Duncan ^a	1	3	.000					
	2	3	.000					
	3	3	.000					
	4	3	.000					
	5	3	.000					
	6	3	.000					
	7	3	.000					
	8	3	.000					
	9	3	.000					
	10	3	.000					
	11	3	.000					
	12	3	.000					
	17	3	.000					
	18	3	.000					
	19	3	.000					
	13	3	.340	.340				
	15	3		.517				
	14	3			.910			
	20	3			.943			
	16	3				1.877		
	21	3					6.097	
	22	3						19.230
Sig.			.074	.256	.829	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

4. Thí nghiệm 4. Ảnh hưởng của CDHSTTV riêng lẻ lên sự phát sinh hình thái của mẫu thân rễ tTCL_R trong điều kiện chiếu sáng và tối hoàn toàn

Bảng 3.6. Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng riêng lẻ lên sự phát sinh hình thái của mẫu thân rễ tTCL_R trong điều kiện chiếu sáng 16 giờ/ngày

tylemautaophoicusang									
SLLL	N	Subset for alpha = 0.05							
		1	2	3	4	5	6	7	
Duncan ^a	1	3	.000						
	2	3	.000						
	3	3	.000						
	4	3	.000						
	5	3	.000						
	6	3	.000						
	7	3	.000						
	8	3	.000						
	9	3	.000						
	10	3	.000						
	11	3	.000						
	12	3	.000						
	13	3	.000						
	18	3	.000						
	14	3		31.000					
	22	3			47.333				
	21	3			48.667				
	15	3				57.333			
	20	3					70.667		
	19	3					71.000		
	16	3						79.667	
	17	3							91.000
	Sig.		1.000	1.000	.633	1.000	.905	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

sophoicusang

SLLL		N	Subset for alpha = 0.05				
			1	2	3	4	5
Duncan ^a	1	3	.000				
	2	3	.000				
	3	3	.000				
	4	3	.000				
	5	3	.000				
	6	3	.000				
	7	3	.000				
	8	3	.000				
	9	3	.000				
	10	3	.000				
	11	3	.000				
	12	3	.000				
	13	3	.000				
	18	3	.000				
	14	3	.410				
	15	3		2.450			
	21	3		2.783	2.783		
	22	3		2.840	2.840		
	16	3			3.427		
	17	3				10.567	
	19	3					13.533
	20	3					14.120
	Sig.		.378	.343	.118	1.000	.132

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Tylemautaomoseocusang

SLLL		N	Subset for alpha = 0.05						
			1	2	3	4	5	6	
Duncan ^a	1	3	.000						
	2	3	.000						
	3	3	.000						
	4	3	.000						
	5	3	.000						
	6	3	.000						
	7	3	.000						
	8	3	.000						
	9	3	.000						
	10	3	.000						
	11	3	.000						
	12	3	.000						
	18	3	.000						
	19	3	.000						
	20	3	.000						
	21	3		44.400					
	22	3			67.733				
	13	3				75.500			
	14	3					87.733		
	17	3						88.867	
	15	3							89.967
	16	3							97.733
	Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	.483	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

tylemautaorecusang

SLLL	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Duncan ^a 1	3	.000		
2	3	.000		
3	3	.000		
4	3	.000		
5	3	.000		
6	3	.000		
7	3	.000		
8	3	.000		
9	3	.000		
10	3	.000		
11	3	.000		
12	3	.000		
13	3	.000		
14	3	.000		
15	3	.000		
16	3	.000		
17	3	.000		
18	3	.000		
19	3	.000		
20	3	.000		
21	3		74.400	
22	3			83.300
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

sorecusang

SLLL	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Duncan ^a 1	3	.000		
2	3	.000		
3	3	.000		
4	3	.000		
5	3	.000		
6	3	.000		
7	3	.000		
8	3	.000		
9	3	.000		
10	3	.000		
11	3	.000		
12	3	.000		
13	3	.000		
14	3	.000		
15	3	.000		
16	3	.000		
17	3	.000		
18	3	.000		
19	3	.000		
20	3	.000		
21	3		5.097	
22	3			9.240
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Bảng 3.7. Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng riêng lẻ lên sự phát sinh hình thái của mẫu thân rễ tTCL_R trong điều kiện tối hoàn toàn

tylemautaophocutoi						sophocutoi					
SLLL	N	Subset for alpha = 0.05				SLLL	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4			1	2	3	4
Duncan ^a 1	3	.000				Duncan ^a 1	3	.000			
2	3	.000				2	3	.000			
3	3	.000				3	3	.000			
4	3	.000				4	3	.000			
5	3	.000				5	3	.000			
6	3	.000				6	3	.000			
7	3	.000				7	3	.000			
8	3	.000				8	3	.000			
9	3	.000				9	3	.000			
10	3	.000				10	3	.000			
11	3	.000				11	3	.000			
12	3	.000				12	3	.000			
16	3	.000				16	3	.000			
17	3	.000				17	3	.000			
18	3	.000				18	3	.000			
19	3	.000				19	3	.000			
20	3	.000				20	3	.000			
21	3	.000				21	3	.000			
22	3	.000				22	3	.000			
15	3		46.333			15	3		2.220		
13	3			56.333		13	3			6.120	
14	3				84.000	14	3				12.520
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

tylemoseocutoi

SLLL		N	Subset for alpha = 0.05					
			1	2	3	4	5	6
Duncan ^a	1	3	.000					
	2	3	.000					
	3	3	.000					
	4	3	.000					
	5	3	.000					
	6	3	.000					
	7	3	.000					
	8	3	.000					
	9	3	.000					
	10	3	.000					
	11	3	.000					
	12	3	.000					
	18	3	.000					
	19	3	.000					
	21	3	.000					
	22	3	.000					
	20	3		24.400				
	17	3			31.067			
	13	3				41.100		
14	3					61.067		
15	3						91.067	
16	3						95.533	
Sig.			1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	.123

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

tyletaorecutoi

SLLL	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
Duncan ^a 1	3	.000			
2	3	.000			
3	3	.000			
4	3	.000			
5	3	.000			
6	3	.000			
7	3	.000			
8	3	.000			
9	3	.000			
10	3	.000			
11	3	.000			
12	3	.000			
13	3	.000			
17	3	.000			
18	3	.000			
16	3		24.400		
14	3		27.767		
19	3		28.200		
15	3			44.400	
20	3			48.833	
21	3			52.200	
22	3				98.867
Sig.		1.000	.453	.124	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

sorecutoi

SLLL	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Duncan ^a 1	3	.000		
2	3	.000		
3	3	.000		
4	3	.000		
5	3	.000		
6	3	.000		
7	3	.000		
8	3	.000		
9	3	.000		
10	3	.000		
11	3	.000		
12	3	.000		
13	3	.000		
17	3	.000		
18	3	.000		
16	3	.587	.587	
20	3	.597	.597	
15	3	.697	.697	
14	3		.930	
19	3		1.287	
21	3		1.373	
22	3			21.783
Sig.		.110	.054	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

5. Thí nghiệm 5. Ảnh hưởng giữa sự kết hợp auxin và cytokinin lên sự phát sinh hình thái của mẫu lá tTCL_L trong điều kiện chiếu sáng và tối hoàn toàn

Bảng 3.8. Ảnh hưởng sự kết hợp giữa 2,4-D và BA ở các nồng độ khác nhau lên sự phát sinh hình thái của mẫu lá tTCL_L trong điều kiện chiếu sáng 16 giờ/ngày

tyleseolasangDB

sIII	N	Subset for alpha = 0.05						
		1	2	3	4	5	6	
Duncan ^a	6	3	47.7733					
	7	3		60.0000				
	8	3			80.0000			
	5	3				90.0000		
	4	3					93.3267	
	1	3						1.0000E2
	2	3						1.0000E2
	3	3						1.0000E2
	9	3						1.0000E2
	Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Bảng 3.9. Ảnh hưởng sự kết hợp giữa 2,4-D và BA ở các nồng độ khác nhau lên sự phát sinh hình thái của mẫu lá tTCL_L trong điều kiện tối hoàn toàn

tyleseolatoiDB

SLLL	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	
Duncan ^a	6	3	73.3267			
	7	3		80.0000		
	5	3			93.3300	
	8	3			93.3300	
	9	3			93.3300	
	1	3				1.0000E2
	2	3				1.0000E2
	3	3				1.0000E2
	4	3				1.0000E2
	Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Bảng 3.10. Ảnh hưởng sự kết hợp giữa 2,4-D và TDZ ở các nồng độ khác nhau lên sự phát sinh hình thái của mẫu lá tTCL_L trong điều kiện chiếu sáng 16 giờ/ngày

tyleseolaSANGTD				
SLLL	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Duncan ^a	10	3	73.3267	
	7	3		80.0000
	8	3		80.0000
	1	3		1.0000E2
	2	3		1.0000E2
	3	3		1.0000E2
	4	3		1.0000E2
	5	3		1.0000E2
	6	3		1.0000E2
	9	3		1.0000E2
	Sig.		1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Bảng 3.11. Ảnh hưởng sự kết hợp giữa 2,4-D và TDZ ở các nồng độ khác nhau lên sự phát sinh hình thái của mẫu lá tTCL_L trong điều kiện tối hoàn toàn

tyleseolaTOITD						
SLLL	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
Duncan ^a	10	3	.0000			
	7	3		80.0000		
	6	3			86.6600	
	8	3				93.3267
	9	3				93.3300
	1	3				1.0000E2
	2	3				1.0000E2
	3	3				1.0000E2
	4	3				1.0000E2
	5	3				1.0000E2
	Sig.		1.000	1.000	1.000	.998

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Bảng 3.12. Ảnh hưởng sự kết hợp giữa NAA và BA ở các nồng độ khác nhau lên sự phát sinh hình thái của mẫu lá tTCL_L trong điều kiện chiếu sáng 16 giờ/ngày

tyleseolASANGNB

SLLL	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	
Duncan ^a	2	3	.0000			
	3	3	.0000			
	5	3	.0000			
	6	3	.0000			
	7	3	.0000			
	8	3	.0000			
	1	3		13.3267		
	4	3			33.3300	
	9	3				60.0000
Sig.			1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Bảng 3.13. Ảnh hưởng sự kết hợp giữa NAA và BA ở các nồng độ khác nhau lên sự phát sinh hình thái của mẫu lá tTCL_L trong điều kiện tối hoàn toàn

tyleseolATOINB

SLLL	N	Subset for alpha = 0.05								
		1	2	3	4	5	6	7	8	
Duncan ^a	6	3	.0000							
	7	3	.0000							
	5	3		13.3300						
	2	3			33.3300					
	1	3				40.0000				
	3	3					53.3300			
	8	3						90.0000		
	4	3							93.3267	
	9	3								1.0000E2
Sig.			1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

6. Thí nghiệm 6: Ảnh hưởng giữa sự kết hợp auxin và cytokinin lên sự phát sinh hình thái của mẫu cuống lá tTCL_C trong điều kiện chiếu sáng và tối hoàn toàn

Bảng 3.14. Ảnh hưởng sự kết hợp giữa 2,4-D và BA ở các nồng độ khác nhau lên sự phát sinh hình thái của mẫu cuống lá tTCL_L trong điều kiện chiếu sáng 16 giờ/ngày

tyleseocngangsangDB

SLLL	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Duncan ^a 5	3	74.4367		
9	3		86.6600	
6	3			96.6633
2	3			97.7733
4	3			97.7733
3	3			98.8667
1	3			98.8867
7	3			98.8867
8	3			98.8867
Sig.		1.000	1.000	.463

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Bảng 3.15. Ảnh hưởng sự kết hợp giữa 2,4-D và BA ở các nồng độ khác nhau lên sự phát sinh hình thái của mẫu cuống lá tTCL_L trong điều kiện tối hoàn toàn

tyleseocngangTOIDB

SLLL	N	Subset for alpha = 0.05
		1
Duncan ^a 7	3	96.6600
6	3	96.6633
9	3	96.6633
1	3	97.7733
3	3	97.7733
4	3	97.7733
8	3	97.7733
2	3	98.8867
5	3	98.8867
Sig.		.296

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Bảng 3.16. Ảnh hưởng sự kết hợp giữa 2,4-D và TDZ ở các nồng độ khác nhau lên sự phát sinh hình thái của mẫu cuống lá tTCL_C trong điều kiện chiếu sáng 16 giờ/ngày

tyleseocngangsangDT

SLLL	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Duncan ^a	10	3	.0000	
	8	3		86.6600
	1	3		1.0000E2
	2	3		1.0000E2
	3	3		1.0000E2
	4	3		1.0000E2
	5	3		1.0000E2
	6	3		1.0000E2
	7	3		1.0000E2
	9	3		1.0000E2
	Sig.		1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Bảng 3.17. Ảnh hưởng sự kết hợp giữa 2,4-D và TDZ ở các nồng độ khác nhau lên sự phát sinh hình thái của mẫu cuống lá tTCL_C trong điều kiện tối hoàn toàn

tyleseocngangtoiDT

SLLL	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Duncan ^a	9	3	79.9933	
	7	3		93.3267
	8	3		93.3300
	1	3		1.0000E2
	2	3		1.0000E2
	3	3		1.0000E2
	4	3		1.0000E2
	5	3		1.0000E2
	6	3		1.0000E2
	10	3		1.0000E2
	Sig.		1.000	.998

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Bảng 3.18. Ảnh hưởng sự kết hợp giữa NAA và BA ở các nồng độ khác nhau lên sự phát sinh hình thái của mẫu cuống lá tTCL_C trong điều kiện chiếu sáng 16 giờ/ngày

tyleseocngangsangNB

SLLL	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Duncan ^a 6	3	.0000		
7	3	.0000		
8	3	.0000		
9	3		86.6600	
1	3			1.0000E2
2	3			1.0000E2
3	3			1.0000E2
4	3			1.0000E2
5	3			1.0000E2
10	3			1.0000E2
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Bảng 3.19. Ảnh hưởng sự kết hợp giữa NAA và BA ở các nồng độ khác nhau lên sự phát sinh hình thái của mẫu cuống lá tTCL_C trong điều kiện tối hoàn toàn

tyleseocngangtoiNB

sIII	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
Duncan ^a 6	3	.0000	
7	3		98.8867
1	3		100.0000
2	3		100.0000
3	3		100.0000
4	3		100.0000
5	3		100.0000
8	3		100.0000
9	3		100.0000
Sig.		1.000	.079

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

7. Thí nghiệm 7. Ảnh hưởng giữa sự kết hợp auxin và cytokinin lên sự phát sinh hình thái của mẫu cuống lá ITCL_C trong điều kiện chiếu sáng và tối hoàn toàn

Bảng 3.20. Ảnh hưởng sự kết hợp giữa 2,4-D và BA ở các nồng độ khác nhau lên sự phát sinh hình thái của mẫu cuống lá ITCL_C trong điều kiện chiếu sáng 16 giờ/ngày

tyletaophoicdaitoiBD

SLLL	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
Duncan ^a 5	3	.0000			
6	3	.0000			
7	3	.0000			
8	3	.0000			
9	3	.0000			
4	3	3.3333			
1	3		24.4200		
3	3			31.0667	
2	3				48.8667
Sig.		.199	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

tyletaomoseocdaisangDB

SLLL	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
Duncan ^a 5	3	13.3300				
4	3		66.6600			
3	3			86.6600		
6	3			86.6600		
2	3				93.3267	
8	3				93.3300	
1	3					1.0000E2
7	3					1.0000E2
9	3					1.0000E2
Sig.		1.000	1.000	1.000	.999	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Bảng 3.21. Ảnh hưởng sự kết hợp giữa 2,4-D và BA ở các nồng độ khác nhau lên sự phát sinh hình thái của mẫu cuống lá ITCL_C trong điều kiện tối hoàn toàn

		tyleseocdaitoiDB				
sIII	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	
Duncan ^a	6	3	46.6633			
	7	3		79.9933		
	8	3			93.3300	
	1	3				1.0000E2
	2	3				1.0000E2
	3	3				1.0000E2
	4	3				1.0000E2
	5	3				1.0000E2
	9	3				1.0000E2
	Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Bảng 3.22. Ảnh hưởng sự kết hợp giữa 2,4-D và TDZ ở các nồng độ khác nhau lên sự phát sinh hình thái của mẫu cuống lá ITCL_C trong điều kiện chiếu sáng 16 giờ/ngày

		tyleseocdaisangTD					
SLLL	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	
Duncan ^a	10	3	.0000				
	7	3		73.3267			
	8	3		73.3300			
	1	3			86.6600		
	2	3				93.3267	
	6	3				93.3267	
	3	3				93.3300	
	9	3				93.3300	
	4	3					1.0000E2
	5	3					1.0000E2
	Sig.		1.000	.998	1.000	.998	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Bảng 3.23. Ảnh hưởng sự kết hợp giữa 2,4-D và TDZ ở các nồng độ khác nhau lên sự phát sinh hình thái của mẫu cuống lá ITCL_C trong điều kiện tối hoàn toàn
tyleseocdaitoiTD

SLLL	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	
Duncan ^a	7	3	.0000				
	8	3		79.9900			
	6	3			86.6600		
	10	3			86.6600		
	5	3				93.3267	
	1	3				93.3300	
	2	3					1.0000E2
	3	3					1.0000E2
	4	3					1.0000E2
	9	3					1.0000E2
Sig.			1.000	1.000	1.000	.997	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Bảng 3.24. Ảnh hưởng sự kết hợp giữa NAA và BA ở các nồng độ khác nhau lên sự phát sinh hình thái của mẫu cuống lá ITCL_C trong điều kiện tối hoàn toàn
tyleseocdaisangNB

SLLL	N	Subset for alpha = 0.05						
		1	2	3	4	5	6	7
Duncan ^a	6	3	.0000					
	7	3	.0000					
	8	3	.0000					
	3	3		13.3300				
	4	3			46.6633			
	2	3				53.3300		
	1	3					59.9933	
	5	3						79.9900
	9	3						93.3267
Sig.			1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Bảng 3.25. Ảnh hưởng sự kết hợp giữa NAA và BA ở các nồng độ khác nhau lên sự phát sinh hình thái của mẫu cuống lá ITCL_C trong điều kiện chiếu sáng 16 giờ/ngày

tyleseocdaitoiNB

		N	Subset for alpha = 0.05			
SLLL			1	2	3	4
Duncan ^a	6	3	.0000			
	7	3	.0000			
	8	3	.0000			
	5	3		86.6600		
	1	3		86.6600		
	4	3		86.6600		
	3	3			93.3267	
	2	3				1.0000E2
	9	3				1.0000E2
	Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

tyletaorecdaitoiNB

		N	Subset for alpha = 0.05			
SLLL			1	2	3	4
Duncan ^a	4	3	.0000			
	5	3	.0000			
	6	3	.0000			
	7	3	.0000			
	8	3	.0000			
	9	3	.0000			
	3	3		7.7700		
	1	3			79.9933	
	2	3				93.3300
	Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

8. Thí nghiệm 8. Ảnh hưởng giữa sự kết hợp auxin và cytokinin lên sự phát sinh hình thái của mẫu thân rễ tTCL_R trong điều kiện chiếu sáng và tối hoàn toàn

Bảng 3.26. Ảnh hưởng sự kết hợp giữa 2,4-D và BA ở các nồng độ khác nhau lên sự phát sinh hình thái của mẫu thân rễ tTCL_R trong điều kiện chiếu sáng 16 giờ/ngày

tyleseocusangDB							
SLLL	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	
Duncan ^a	6	3	34.4400				
	8	3		50.0000			
	7	3			66.6600		
	9	3				72.2167	
	1	3					1.0000E2
	2	3					1.0000E2
	3	3					1.0000E2
	4	3					1.0000E2
	5	3					1.0000E2
Sig.			1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Bảng 3.27. Ảnh hưởng sự kết hợp giữa 2,4-D và BA ở các nồng độ khác nhau lên sự phát sinh hình thái của mẫu thân rễ tTCL_R trong điều kiện tối hoàn toàn

tyleseocutoiDB							
SLLL	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	
Duncan ^a	6	3	13.3300				
	7	3		73.3267			
	8	3			83.3300		
	9	3				86.6600	
	1	3					1.0000E2
	2	3					1.0000E2
	3	3					1.0000E2
	4	3					1.0000E2
	5	3					1.0000E2
Sig.			1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Bảng 3.28. Ảnh hưởng sự kết hợp giữa 2,4-D và TDZ ở các nồng độ khác nhau lên sự phát sinh hình thái của mẫu thân rễ tTCL_R trong điều kiện chiếu sáng 16 giờ/ngày

tyleseocUSANGDT

SLLL	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
Duncan ^a 7	3	33.3300			
8	3	33.3300			
10	3		79.9900		
6	3			86.6600	
5	3			86.6600	
9	3			86.6600	
1	3				1.0000E2
2	3				1.0000E2
3	3				1.0000E2
4	3				1.0000E2
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Bảng 3.29. Ảnh hưởng sự kết hợp giữa 2,4-D và TDZ ở các nồng độ khác nhau lên sự phát sinh hình thái của mẫu thân rễ tTCL_R trong điều kiện tối hoàn toàn

tyleseocuTOIDT

sIII	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
Duncan ^a 7	3	33.3300			
6	3		79.9900		
8	3		79.9900		
5	3			93.3267	
9	3			93.3300	
10	3			93.3300	
1	3				1.0000E2
2	3				1.0000E2
3	3				1.0000E2
4	3				1.0000E2
Sig.		1.000	1.000	.997	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Bảng 3.30. Ảnh hưởng sự kết hợp giữa NAA và BA ở các nồng độ khác nhau lên sự phát sinh hình thái của mẫu thân rễ tTCL_R trong điều kiện chiếu sáng 16 giờ/ngày

tyleseocuSANGNB

sIII	N	Subset for alpha = 0.05						
		1	2	3	4	5	6	
Duncan ^a	6	3	.0000					
	7	3	.0000					
	8	3	.0000					
	5	3		50.0000				
	9	3			73.3300			
	4	3				79.9900		
	3	3					86.6600	
	2	3					86.6600	
	1	3						1.0000E2
Sig.			1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Bảng 3.31. Ảnh hưởng sự kết hợp giữa NAA và BA ở các nồng độ khác nhau lên sự phát sinh hình thái của mẫu thân rễ tTCL_R trong điều kiện tối hoàn toàn

tyleseoCUTOINB

SLLL	N	Subset for alpha = 0.05						
		1	2	3	4	5	6	7
Duncan ^a	6	3	.0000					
	7	3	.0000					
	8	3		33.3300				
	5	3			73.3300			
	3	3				79.9900		
	4	3				79.9900		
	2	3					86.6600	
	9	3						93.3267
	1	3						1.0000E2
Sig.			1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Phân tích hàm lượng saponin

Mẫu Diện tích pic	Rg1			Rb1			MR2		
	Lần 1	2	3	Lần 1	2	3	Lần 1	2	3
1	18211777	18032164	17986332	3870216	3856213	3812356	1924712	1902561	1936912
2	2713279	2695487	2711452	805672	806124	805962	846247	842363	839461
3	25476066	25462231	25468952	6363105	6352314	6360023	1706190	1713324	1705893
4	27085163	27025691	27100368	12987042	12922361	12947563	1527020	1513263	1512986

Mẫu	Rg1			Rb1			MR2		
	Lần 1	2	3	Lần 1	2	3	Lần 1	2	3
1	1266.667	1254.172	1250.984	953.796	950.3354	939.4968	1797.667	1777.063	1809.015
2	188.5109	187.2732	188.3838	196.4452	196.5569	196.5169	794.5279	790.9152	788.2159
3	1772.009	1771.047	1771.514	1569.872	1567.205	1569.11	1594.408	1601.044	1594.132
4	1883.946	1879.809	1885.004	3206.867	3190.882	3197.11	1427.752	1414.956	1414.698

Mẫu	Rg1			Rb1			MR2			
	Lần 1	2	3	Lần 1	2	3	Lần 1	2	3	
1	2.033	0.623053	0.616907	0.615339	0.469157	0.467455	0.462123	0.884244	0.874109	0.889825
2	1.8342	0.102776	0.102101	0.102706	0.107101	0.107162	0.10714	0.433174	0.431204	0.429733
3	2.0298	0.872997	0.872523	0.872753	0.773412	0.772098	0.773037	0.7855	0.788769	0.785364
4	2.0275	0.929197	0.927156	0.929718	1.581685	1.573801	1.576873	0.704193	0.697882	0.697755

Hàm lượng saponin trung bình (%)

Mẫu	Rg1	Rb1	MR2
1	0.618433	0.466245	0.882726
2	0.102527	0.107135	0.43137
3	0.872758	0.772849	0.786544
4	0.92869	1.577453	0.699944

Hàm lượng khô tuyệt đối trừ ẩm (%)

Mẫu	Độ ẩm (%)	Rg1	Rb1	MR2
1	9.3	0.681845	0.514052	0.973237
2	9.1	0.112792	0.11786	0.474555
3	9.6	0.96544	0.854921	0.870071
4	9.5	1.026177	1.743042	0.773418

Môi trường SH (Schenk và Hildebrandt 1972)

STT	TÊN HÓA CHẤT	mg/L
	KNO ₃	2500,00
	NH ₄ H ₂ PO ₄	300,00
	MnSO ₄ .H ₂ O	10,00
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	1,00
	H ₃ BO ₃	5,00
	KI	1,00
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,10
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,20
	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,10
	CaCl ₂ .2H ₂ O	200,02
	MgSO ₄ .7H ₂ O	399,39
	Na ₂ EDTA	20,00
	FeSO ₄ .7H ₂ O	15,00
	Myo-Inositol	1000,00
	Thiamine HCl (B1)	5,00
	Pyridoxine HCl (B6)	0,50
	Nicotinic acid	5,00

Môi trường MS (Murashige và Skoog 1962)

STT	TÊN HÓA CHẤT	mg/L
	KNO ₃	1900,00
	NH ₄ NO ₃	1650,00
	KH ₂ PO ₄	170,00
	MnSO ₄ .H ₂ O	16,900
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,600
	H ₃ BO ₃	6,200
	KI	0,830
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,250
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025
	CaCl ₂ .2H ₂ O	439,82
	MgSO ₄ .7H ₂ O	369,67
	Na ₂ EDTA	37,3
	FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8
	Myo-Inositol	100,00
	Thiamine HCl (B1)	0,10
	Pyridoxine HCl (B6)	0,50
	Nicotinic acid	0,50
	Glycine	2,00