



(12) **BẢN MÔ TẢ GIẢI PHÁP HỮU ÍCH THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN  
GIẢI PHÁP HỮU ÍCH**

(19) **Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)** (11)  
**CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ**



**2-0002531**

(51)<sup>7</sup> **A01H 5/04; A01H 4/00** (13) **Y**

(21) 2-2019-00034

(22) 21/01/2019

(45) 25/12/2020 393

(43) 25/03/2019 372A

(73) **CÔNG TY TNHH VAENCO VIỆT NAM (VN)**

Số 18, ngách 72, ngõ 102 đường Trường Chinh, phường Trung Tự, quận Đống Đa, thành phố Hà Nội

(72) **Đình Xuân Tú (VN); Vũ Duy Dũng (VN); Nguyễn Văn Bình (VN); Vũ Duy Tú (VN).**

(54) **QUY TRÌNH NHÂN GIỐNG CÂY SÂM NGỌC LINH (*PANAX VIETNAMENSIS* HA ET GRUSHV.) BẰNG PHƯƠNG PHÁP NUÔI CÂY PHÔI HỮU TÍNH**

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình nhân giống cây sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) bằng phương pháp nuôi cấy mô hữu tính, trong đó phương pháp này bao gồm các bước: a) chuẩn bị mẫu vô trùng; b) thu cụm phôi hữu tính; c) tách phôi hữu tính; d) nhân nhanh phôi; e) nảy mầm phôi; f) bồi dưỡng chồi; g) tạo cây sâm Ngọc Linh nuôi cấy mô hoàn chỉnh; và h) thu cây sâm Ngọc Linh giống. Quy trình theo giải pháp cho phép rút ngắn được quá trình nhân cây sâm Ngọc Linh và tăng được hệ số nhân và tỷ lệ cây phát triển ngoài thực địa cao.

### **Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập**

Giải pháp hữu ích thuộc lĩnh vực công nghệ sinh học ứng dụng trong nông nghiệp, cụ thể là đề cập đến quy trình nhân giống cây sâm Ngọc Linh bằng phương pháp nuôi cấy phôi hữu tính.

### **Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích**

Sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) thuộc họ Nhân sâm (Araliaceae) và là một loại cây dược liệu quý, đặc hữu của vùng núi Ngọc Linh thuộc huyện Tu Mơ Rông, tỉnh Kon Tum và huyện Trà My, tỉnh Quảng Nam. Ngoài tự nhiên, cây sâm này chỉ mọc ở độ cao từ khoảng 1500m đến 2500m so với mặt nước biển và sống dưới tán rừng già, ẩm, nhiều mùn với nhiệt độ ban ngày từ 20°C đến 25°C, ban đêm từ 15°C đến 18°C. Cây sâm Ngọc Linh là một loại cây thân thảo, phát triển chậm, sống lâu năm, cây có chiều cao từ 40cm đến 100cm, thân rễ có sẹo và các đốt như đốt trúc do thân khí sinh rụng hằng năm để lại.

Các nghiên cứu định tính và định lượng đã chỉ ra rằng trong rễ cây sâm Ngọc Linh có khoảng 52 loại saponin khác nhau, trong đó có 26 loại saponin mới. Tỷ lệ saponin của sâm Ngọc Linh lớn hơn nhiều loài của chi panax trên thế giới (tỷ lệ saponin toàn phần lên đến 15,75%, Nguyễn Thượng Dong, "*Sâm Việt Nam và một số cây thuốc thuộc họ nhân sâm*", NXB KHKT, 2007, trang 110) nên sâm Ngọc Linh có tác dụng bổ dưỡng toàn thân, tăng cường sức lực, tăng trí nhớ, tăng cường hưng phấn vỏ đại não, chống stress, bảo vệ gan, điều trị bệnh viêm loét dạ dày, điều hòa hoạt động tim mạch, làm giảm lipid trong máu, ngăn ngừa chứng xơ vữa động mạch, giảm đau, chống viêm. Đặc biệt hoạt chất majonosin-R2 trong sâm Ngọc Linh đã được chứng minh có tác dụng ức chế giai đoạn đầu của bệnh ung thư biểu mô da.

Từ năm 1983, đã có nhiều nghiên cứu về nhân giống cây sâm Ngọc Linh nhằm phát triển cây sâm này thành nguồn dược liệu. Trại dược liệu Trà Linh (Quảng Nam) đã tiến hành nghiên cứu tái sinh cây sâm Ngọc Linh bằng cách cho lai hữu tính và gieo trồng bằng hạt (tỷ lệ nảy mầm khoảng 50-60%) và nhân giống vô tính bằng cách uơm đoạn đầu của thân rễ trong túi polyetylen hoặc uơm trên đất mùn cho tỷ lệ sống và

đâm chồi lên tới 65%. Tuy nhiên, đối với hai cách nhân giống này, tỷ lệ nhân giống bị giới hạn do bị hạn chế về nguồn hạt giống (cây trưởng thành trên 5 năm tuổi mới có thể cho hạt, tỷ lệ đậu ra hoa đậu quả thấp, ở quy mô lớn trung bình trên một tán hoa chỉ thu được 1-3 quả/hạt) và thiếu nguồn đoạn đầu của thân rễ cây sâm này.

Đã có nhiều nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật nuôi cấy mô nhằm nhân nhanh giống cây dược liệu quý này. Ví dụ, Nguyễn Hữu Hổ và cộng sự, Viện Sinh học nhiệt đới, đã tạo ra mô sẹo tái sinh từ lá và củ sau khoảng 2 tháng nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung 3-5 mg/l NAA, sau đó tạo rễ và tạo vi củ trong môi trường  $\frac{1}{2}$  MS có bổ sung 1-3 mg/l NAA trong điều kiện tối với thời gian từ 1 đến 3 tháng. Các tác giả ở Học viện Quân y cũng đã tạo ra sinh khối tế bào củ sâm Ngọc Linh, mở hướng tạo nguồn dược liệu mới mà không cần trồng cây (Bằng độc quyền sáng chế Việt Nam số 1-0007523). Nguyễn Thị Liễu và cộng sự, Nghiên cứu khả năng tạo rễ bất định của sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis*, Ha et Grush v.) trong nuôi cấy *in vitro*, Tạp chí Khoa học ĐHQGHN, Khoa học Tự nhiên và Công nghệ 27 (2011) trang 30-36, cũng đã tái sinh thành công cây sâm Ngọc Linh từ mẫu củ sâm.

Kỹ thuật nuôi cấy thu sinh khối tế bào củ sâm Ngọc Linh có một nhược điểm là cho hàm lượng saponin thấp (chỉ đạt khoảng 3% trọng lượng khô, Nguyễn Thượng Dong và cộng sự, "Sâm Việt Nam và một số cây thuốc thuộc họ nhân sâm", NXB KHKT, 2007, trang 130), chất lượng không được như củ sâm Ngọc Linh ngoài tự nhiên. Đối với kỹ thuật nuôi cấy mô tái sinh cây sâm Ngọc Linh có một nhược điểm là tỷ lệ cây đưa ra bầu để trồng ngoài tự nhiên có tỷ lệ sống rất thấp, chỉ khoảng từ 3 đến 10% (Nguyễn Thượng Dong và cộng sự, "Sâm Việt Nam và một số cây thuốc họ nhân sâm", NXB KHKT, 2007, trang 99-108), nên hiệu quả của việc nhân giống cây sâm Ngọc Linh không cao.

Các phương pháp nhân giống đều dựa vào học thuyết về tính toàn vẹn của tế bào, biệt hóa và phản biệt hóa, do đó, với việc nhân giống vô tính cây sâm Ngọc Linh, việc bắt buộc phải phản biệt hóa tế bào sinh dưỡng trở thành tế bào toàn năng, từ đó biệt hóa để phát triển thành cây hoàn chỉnh. Tuy phương pháp này có khả năng đưa ra với hệ số nhân lớn, nhưng lại rất mất thời gian do quá trình phản biệt hóa tạo thành mô sẹo đối với cây sâm Ngọc Linh kéo dài.

Tuy nhiên, việc nuôi cấy này, khi thành công sẽ tạo ra hàng loạt cây trồng vô tính, có đặc tính sinh trưởng, hình thái và khả năng phát triển giống hệt cây mẹ ban đầu, do đó về lâu dài vùng trồng, phát triển cây sâm Ngọc Linh sẽ bị mất tính đa dạng sinh học, và do đó mất đi tính cân bằng về sinh thái.

Việc trồng cây bằng phương pháp hữu tính, mặc dù đã có thể phát triển được nguồn hạt, nhưng việc tạo ra cây sâm Ngọc Linh giống từ hạt lại cực kỳ khó khăn do bản thân cây sâm Ngọc Linh sinh trưởng rất chậm, quá trình ra hoa, kết quả và tạo hạt và chín rất dài. Ngoài ra, có một điều ảnh hưởng rất lớn đó là thời gian nảy mầm hạt sâm Ngọc Linh trong tự nhiên mất 9-22 tháng với tỷ lệ nảy mầm chỉ đạt từ 3-5 % và mỗi hạt chỉ thu được một cây sâm Ngọc Linh nên đây là một vấn đề lớn trong việc bảo tồn, đa dạng hóa quần thể sâm Ngọc Linh hiện tại, vốn được tạo ra bằng kỹ thuật nhân giống vô tính.

Ngoài ra, đối với kỹ thuật nhân giống cây sâm Ngọc Linh *in vitro*, có ba vấn đề ảnh hưởng đến tỷ lệ cây sâm giống thu được. Thứ nhất, đối với hệ số nhân, khi tăng hệ số nhân sẽ tỷ lệ thuận với tỷ lệ đột biến phôi và tỷ lệ nghịch với chất lượng phôi thu được, do đó cần phải tối ưu các phytohormon sử dụng trong quá trình nhân và phụ thuộc vào loài và kinh nghiệm người nhân giống. Thứ hai, đã biết trong phương pháp nuôi cấy rắn, hệ số nhân thấp, nhưng thu được phôi khỏe hơn, ngược lại, nếu nuôi trong môi trường lỏng, hệ số nhân cao hơn, nhưng tỷ lệ thủy tinh hóa phôi lớn và chất lượng phôi thu được kém. Thứ ba, trong quá trình đưa cây ra ngoài vườn ươm, cây thường bị sốc bởi điều kiện ngoại cảnh khác với điều kiện trong phòng thí nghiệm và bị tấn công bởi vi khuẩn do môi trường dinh dưỡng còn trên thân, củ, rễ cây nuôi cấy là môi trường kích thích vi khuẩn phát triển. Điều này ảnh hưởng trực tiếp đến hiệu suất nhân giống sâm Ngọc Linh.

Do đó, cần có quy trình có khả năng nhân giống cây sâm Ngọc Linh hữu tính với hệ số nhân cao, đảm bảo được khả năng tái sinh cây sâm Ngọc Linh, vừa duy trì được tính đa dạng, bền vững, đồng thời cũng tăng được hệ số nhân giống cây sâm Ngọc Linh từ phôi hữu tính.

#### **Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích**

Mục đích của giải pháp hữu ích là nhằm giải quyết các vấn đề nêu trên. Theo đó, giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình nhân giống cây sâm Ngọc Linh (*Panax*

*vietnamensis* Ha et Grushv.) bằng phương pháp nuôi cấy phôi hữu tính, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) chuẩn bị mẫu vô trùng bằng cách thu hạt của quả sâm Ngọc Linh tươi và ngâm trong dung dịch NaClO 1% trong khoảng thời gian từ 15 đến 20 phút, tiếp đó xử lý bằng dung dịch streptomycin 500mg/l trong 10 phút và dung dịch etanol 70% trong 1 phút, sau khi rửa lại bằng nước cất vô trùng, thu được mẫu hạt sâm Ngọc Linh vô trùng;

b) thu cụm phôi hữu tính bằng cách tách vỏ hạt thu phôi hữu tính và cấy trên môi trường thạch SH bổ sung 70 g/l đường, nuôi trong khoảng từ 4 đến 6 tuần trong điều kiện chiếu sáng từ 12 đến 14 tiếng/ngày thu được cụm phôi hữu tính;

c) tách phôi vô tính hữu tính bằng cách chuyển cụm phôi hữu tính vào môi trường lỏng bao gồm  $\frac{1}{2}$  SH bổ sung 0,1 mg/l kinetin, 0,1 mg/l TDZ, 30 g/l đường theo tỷ lệ từ 1/5 đến 1/10 (trọng lượng/thể tích) và đưa lên máy lắc rung với tốc độ 120 vòng/phút và tần số từ 200 đến 300 hz trong 3 phút để tách rời cụm phôi, thu được mẫu phôi vô tính rời;

d) nhân nhanh phôi vô tính bằng cách bổ sung mẫu phôi vô tính rời vào trong môi trường lỏng bao gồm  $\frac{1}{2}$  SH bổ sung 0,1 mg/l kinetin, 0,1 mg/l TDZ, 30 g/l đường theo tỷ lệ 1/20 (trọng lượng/thể tích) và nuôi cấy trên máy lắc với tốc độ lắc 100 vòng/phút trong 1 tháng để nhân nhanh phôi, sau khi lọc bỏ môi trường, thu phôi vô tính;

e) nảy mầm phôi bằng cách gieo phôi vô tính lên môi trường thạch SH bổ sung 5 mg/l GA3, 30 g/l đường trong hệ thống nuôi ngập chìm tạm thời với tần suất bơm môi trường SH lỏng bổ sung 5mg/l GA3, 30 g/l đường là 4 giờ/lần, mỗi lần ngâm 3 phút, thời gian nuôi cấy 2 tháng, thu được phôi đã nảy mầm và đâm rễ;

f) bồi dưỡng thân củ bằng cách cấy phôi đã nảy mầm và đâm rễ lên môi trường thạch SH bổ sung 1 mg/l BA, 0,5 mg/l NAA, 30 g/l đường, nuôi trong 2 tháng thu được thân củ có chồi và rễ;

g) tạo củ sâm Ngọc Linh có chồi ngủ bằng cách cấy thân củ thu được từ bước f) có kích thước từ 0,2 đến 0,3 cm, dài từ 2,5 đến 3,0 cm vào môi trường thạch SH bổ sung 0,5 mg/l BA, 1 mg/l NAA, 40 g/l đường, nuôi khoảng 3 tháng đến khi trên thân củ xuất hiện chồi ngủ, thu được củ sâm Ngọc Linh có chồi ngủ; và

h) thu cây sâm Ngọc Linh giống bằng cách cấy củ sâm Ngọc Linh có chồi ngủ thu được từ bước g) có kích thước thân củ đạt từ 0,5 đến 1 cm vào môi trường thạch SH chứa 40% khoáng đa lượng nitơ, 170mg/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  và nuôi cấy trong 2 tháng ở nhiệt độ từ 20 đến 22°C, quang chu kỳ từ 8 đến 10 tiếng/ngày thu được cây giống sâm Ngọc Linh hoàn chỉnh.

Theo một phương án ưu tiên, quy trình theo giải pháp hữu ích còn bao gồm bước chuyển cây ra ngoài vườn ươm bằng cách xử lý cây sâm Ngọc Linh giống bằng dung dịch chitosan 3% trước khi đưa ra trồng trên giá thể bao gồm mùn/cát theo tỷ lệ 1:3 trọng lượng.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó các bước từ bước d) đến g) có quang chu kỳ là 12 giờ chiếu sáng/ngày.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó nhiệt độ nuôi cấy nằm trong khoảng từ 18 đến 24°C.

#### **Mô tả vắn tắt các hình vẽ**

Hình 1. Biểu đồ thể hiện ảnh hưởng của thời gian khử trùng bằng  $\text{NaClO}$  1% đến tỷ lệ nhiễm mẫu.

Hình 2. Biểu đồ thể hiện ảnh hưởng của các môi trường nuôi cấy thử nghiệm đến tỷ lệ phát sinh phôi với các công thức thử nghiệm theo Ví dụ 2.

Hình 3. Ảnh chụp của phôi hữu tính thu được từ hạt và phôi được cảm ứng từ mô sẹo thu được từ lá. (A) phôi thu được từ hạt, (B) phôi thu được từ mô sẹo.

Hình 4. Biểu đồ thể hiện hệ số nhân của phôi trên môi trường thạch rắn và môi trường lỏng theo Ví dụ 3. Hệ số nhân trên môi trường lỏng vượt trội so với môi trường thạch, hệ số cao nhất lên tới gần 30 lần.

Hình 5. Ảnh chụp phôi sâm Ngọc Linh thu được bằng phương pháp nuôi cấy trong môi trường lỏng.

Hình 6. Biểu đồ thể hiện nồng độ GA3 đến tỷ lệ nảy mầm của phôi sâm Ngọc Linh theo Ví dụ 4.

Hình 7. Ảnh chụp kết quả thử nghiệm kỹ thuật nuôi ngập chìm tạm thời theo Ví dụ 5.

Hình 8. Ảnh chụp cây sâm Ngọc Linh giống thu được bằng phương pháp theo giải pháp hữu ích trước khi đưa ra trồng ngoài vườn ươm thu được theo Ví dụ 8.

Hình 9. Biểu đồ thể hiện ảnh hưởng của giá thể và điều kiện xử lý cây trước khi đưa ra trồng đến tỷ lệ chết của cây sâm Ngọc Linh.

Hình 10. Ảnh chụp chồi sâm Ngọc Linh khi phát triển trên nền giá thể mùn/cát theo tỷ lệ 1:3 trọng lượng và cây sau khi đưa ra trồng ngoài vườn ươm 3 tháng.

### **Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích**

Sau đây, giải pháp hữu ích mô tả chi tiết các phương án cụ thể, tuy nhiên, các phương án này chỉ nhằm mục đích nhằm bộc lộ giải pháp hữu ích chứ không nhằm mục đích hạn chế phạm vi yêu cầu bảo hộ của giải pháp hữu ích.

Theo giải pháp hữu ích, các môi trường nhân giống được đề cập, ví dụ môi trường SH được sử dụng là môi trường chuẩn đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và có thể tìm thấy trong các tài liệu chuyên ngành. Các chất điều hòa sinh trưởng thực vật, ví dụ, kinetin, axit gibberllic (GA3), thidiazuron (TDZ), 6- Benzylaminopurine (BA), axit 1-naphthaleneacetic (NAA) được sử dụng theo giải pháp đều là những chất điều hòa sinh trưởng thực vật đã biết và được sử dụng rộng rãi trong công nghệ nuôi cấy mô tế bào thực vật, ví dụ, xem “Giáo trình nuôi cấy mô tế bào thực vật”, trường Đại học Nông nghiệp. Ngoài ra, môi trường thạch SH được sử dụng đề cập đến môi trường SH bổ sung từ 7 đến 10 g thạch để tạo ra môi trường đặc để sử dụng trong nuôi cấy mô.

Cây sâm Ngọc Linh được nhân giống theo giải pháp hữu ích có tên khoa học là *Panax vietnamensis* Ha et Grushv., thuộc họ Nhân sâm (Araliaceae) và là một loại cây dược liệu quý, đặc hữu của vùng núi Ngọc Linh thuộc huyện Tu Mơ Rông, tỉnh Kon Tum và huyện Trà My, tỉnh Quảng Nam. Vật liệu được sử dụng để nhân giống được sử dụng là hạt được thu hái từ quả tươi của cây sâm Ngọc Linh.

Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình nhân giống cây sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) bằng phương pháp nuôi cấy phôi hữu tính, trong đó phương pháp này bao gồm các bước: a) chuẩn bị mẫu vô trùng; b) thu cụm phôi hữu tính; c) tách phôi vô tính; d) nhân nhanh phôi vô tính; e) nảy mầm phôi; f) bồi dưỡng thân củ; g) tạo củ sâm Ngọc Linh có chồi ngủ; và h) thu cây sâm Ngọc Linh giống.

Trong bước chuẩn bị mẫu vô trùng, vật liệu được sử dụng để nhân giống là hạt tươi của cây sâm Ngọc Linh. Để thuận lợi cho quá trình nhân, tốt nhất hạt tươi là hạt thu được từ quả chưa chín, nghĩa là mẫu phôi chưa thành thực. Đây là quá trình quyết định đến toàn bộ quá trình nhân giống vì nếu không thu được mẫu khởi đầu sẽ không thực hiện được các bước tiếp theo. Theo đó quả tươi chưa chín được thu hái và bóc lấy hạt tươi, hạt tươi của quả sâm Ngọc Linh này được ngâm để khử trùng bằng dung dịch NaClO 1% trong khoảng thời gian từ 15 đến 20 phút. Tiếp đó, xử lý bằng dung dịch streptomycin 500mg/l trong 10 phút, dung dịch etanol 70% trong 1 phút và rửa sạch lại bằng nước cất vô trùng thu được mẫu vô trùng. Mẫu này là phôi hữu tính chưa thành thực được sử dụng làm vật liệu khởi đầu nuôi cấy.

Trong bước thu cụm phôi hữu tính, mẫu hạt sau khi được vô trùng được tách vỏ thu lấy phần phôi hữu tính. Phôi được cấy trên môi trường thạch SH bổ sung 70 g/l đường. Trong quá trình nuôi cấy, giữ nhiệt độ trong khoảng từ 18 đến 24°C, tốt nhất là khoảng 20°C và nuôi trong khoảng từ 4 đến 6 tuần. Thời gian chiếu sáng từ 12 đến 14 tiếng/ngày. Sau khi nuôi cấy, phôi hữu tính ban đầu được phát triển thành cụm phôi. Cụm phôi hữu tính này được sử dụng như vật liệu thứ cấp để nhân thành số lượng nhiều phôi đơn lẻ.

Trong bước tách phôi vô tính, do cụm phôi hữu tính có xu hướng gắn với nhau, thông thường phải sử dụng dao cắt để tách các phôi đơn lẻ với nhau để tạo ra phôi vô tính, điều này xảy ra tổn thương phôi. Do đó, việc tách các phôi ra khỏi cụm phôi không những là yếu tố quyết định đến chất lượng cây con mà còn là yếu tố quyết định đến hiệu suất nhân giống của quy trình.

Để thực hiện quá trình này, các tác giả đã đưa ra phương pháp nuôi cấy cụm phôi trong môi trường lỏng kết hợp lắc rung. Theo đó, các cụm phôi hữu tính được chuyển vào môi trường nuôi cấy lỏng bao gồm ½ SH bổ sung 0,1 mg/l kinetin, 0,1 mg/l TDZ, 30 g/l đường theo tỷ lệ từ 1/5 đến 1/10 (trọng lượng/thể tích). Tiếp đó môi trường này được đưa lên máy lắc rung với tốc độ 120 vòng/phút. Trong quá trình lắc kết hợp rung với tần số từ 200 đến 300 hz. Bất ngờ là trong vòng 3 phút, cụm phôi được tự tách rời thành các phôi đơn lẻ. Theo đó, thu được phôi rời mà không cần qua giai đoạn cắt và cấy trên môi trường thạch như phương pháp nuôi cấy thông thường.



Trong bước nhân nhanh phôi, các mẫu phôi vô tính rời thu được sau khi rung lắc được cấy vào môi trường nuôi cấy lỏng bao gồm ½ SH bổ sung 0,1 mg/l kinetin, 0,1 mg/l TDZ, 30 g/l đường theo tỷ lệ 1/20 (trọng lượng/thể tích). Quá trình nuôi cấy được thực hiện trên máy nuôi cấy lắc với tốc độ lắc 100 vòng/phút. Quá trình lắc này giúp những phôi vô tính được nhân lên và sau đó tự tách rời mà không tạo thành các cụm phôi, thuận lợi cho quá trình nhân phôi. Sau trong 1 tháng nuôi cấy, lọc bỏ môi trường, thu phôi vô tính.

Do hệ số nhân của quá trình này sẽ ảnh hưởng trực tiếp đến hệ số nhân giống của cả quá trình, trong bước này, các tác giả đã phát hiện ra rằng, với tốc độ lắc cao, tỷ lệ nhân phôi cao, nhưng chất lượng phôi thu được kém, ngược lại, nếu lắc với tốc độ thấp thì tỷ lệ tạo phôi thấp, phôi có kích thước lớn hơn. Tuy nhiên, nếu giảm tốc độ lắc thì ngoài việc có thể thu được cụm phôi, còn tăng tỷ lệ thủy tinh hóa mẫu. Do đó, với tốc độ lắc 100 vòng/phút, các tác giả đã cân bằng được tỷ lệ nhân giống với chất lượng phôi thu được.

Trong bước nảy mầm phôi, các mẫu phôi vô tính được gieo lên môi trường thạch SH bổ sung 5 mg/l GA3, 30 g/l đường. Quá trình này được thực hiện trong môi trường hệ thống nuôi ngập chìm tạm thời. Theo đó quá trình nuôi cấy được bơm môi trường nuôi cấy lỏng bao gồm ½ SH bổ sung 0,1 mg/l kinetin, 0,1 mg/l TDZ, 30 g/l đường theo tỷ lệ 1/20 (trọng lượng/thể tích) như trong bước nhân nhanh phôi. Quá trình này được thực hiện với tần suất bơm 4 giờ/lần, mỗi lần ngâm 3 phút. Thời gian chiếu sáng (quang chu kỳ) được giữ 12 giờ chiếu sáng/ngày và nhiệt độ nuôi cấy ưu tiên nằm trong khoảng từ 18 đến 24°C. Thời gian nuôi cấy được thực hiện trong 2 tháng thu được các mẫu phôi đã nảy mầm và đâm rễ. Các phôi vô tính đã nảy mầm này được bồi dưỡng thành chồi để từ đó phát triển thành cây sâm Ngọc Linh hoàn chỉnh.

Trong bước bồi dưỡng thân củ, các mẫu phôi đã nảy mầm và đâm rễ được cấy lên môi trường thạch SH bổ sung 1 mg/l BA, 0,5 mg/l NAA, 30 g/l đường. Quá trình nuôi cấy được thực hiện trong 2 tháng trong điều kiện chiếu sáng (quang chu kỳ) được giữ 12 giờ chiếu sáng/ngày và nhiệt độ nuôi cấy ưu tiên nằm trong khoảng từ 18 đến 24°C. Sau khi nuôi cấy, thu được thân củ cây sâm Ngọc Linh có đủ chồi và rễ.

Trong bước tạo củ sâm Ngọc Linh có chồi ngủ, tiến hành cấy các thân củ có kích thước từ 0,2 đến 0,3 cm, dài từ 2,5 đến 3,0 cm thu được vào môi trường thạch SH bổ

sung 0,5 mg/l BA, 1 mg/l NAA, 40 g/l đường. Quá trình nuôi cấy được thực hiện trong 3 tháng với thời gian chiếu sáng (quang chu kỳ) được giữ 12 giờ chiếu sáng/ngày và nhiệt độ nuôi cấy ưu tiên nằm trong khoảng từ 18 đến 24°C. Sau khi nuôi cấy, phần lá trên củ sâm sẽ rụng đi, xuất hiện chồi ngủ, thu được củ sâm Ngọc Linh có chồi ngủ.

Trong bước thu cây sâm Ngọc Linh giống, tiến hành cấy củ sâm Ngọc Linh có chồi ngủ thu được ở trên có kích thước thân củ đạt từ 0,5 đến 1 cm vào môi trường thạch SH chứa 40% khoáng đa lượng nitơ, 170 mg/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  và nuôi cấy trong 2 tháng ở nhiệt độ từ 20 đến 22°C, quang chu kỳ từ 8 đến 10 tiếng/ngày thu được cây giống sâm Ngọc Linh hoàn chỉnh. Cần lưu ý rằng, quá trình chuyển từ cây trong ống nghiệm ra ngoài vườn ươm cần trải qua một giai đoạn thích ứng cây với điều kiện môi trường ngoại cảnh. Các tác giả nhận thấy rằng, bằng việc giảm lượng nitơ trong khoáng đa lượng của môi trường SH đồng thời tăng lượng kali trong môi trường nuôi cấy, cây sâm Ngọc Linh thu được cứng cáp, có khả năng thích nghi tốt với môi trường bên ngoài mà không cần phải trải qua giai đoạn huấn luyện ngoài vườn ươm. Điều này làm tăng tỷ lệ sống của cây sâm Ngọc Linh nuôi cấy mô khi đưa ra ngoài vườn ươm.

Trong quá trình chuyển cây sâm Ngọc Linh từ trong ống nghiệm ra ngoài vườn ươm cây thường bị sốc một phần do thay đổi điều kiện phát triển, một phần do sự tấn công của vi khuẩn trực tiếp lên các mô. Ngoài ra, trong các nghiên cứu đã chỉ ra rằng, một yếu tố tác động lớn đến việc chuyển cây từ trong ống nghiệm ra ngoài vườn ươm là do sự mất nước vì trong quá trình nuôi cấy, cây luôn được giữ trong môi trường có độ ẩm cao, khi chuyển cây ra ngoài vườn ươm, cây dễ bị héo, do đó tỷ lệ chết thường cao. Trước đây, tỷ lệ chết của cây sâm Ngọc Linh nuôi cấy mô ra ngoài vườn ươm lên tới 90% (xem, Nguyễn Thượng Dong và cộng sự). Những năm gần đây, mặc dù có một số cải tiến liên quan đến giá thể, dung dịch rửa, tuy nhiên, đối với giá thể, nếu sử dụng các giá thể trơ (ví dụ, cát, đất khử trùng...), hoặc giá thể được khử trùng thì cây khó phát triển trong giai đoạn sau, nếu sử dụng các giá thể hữu cơ, ví dụ mùn đất, bã cà phê thì cây lại khó thích nghi giai đoạn đầu và dễ bị chết nhũn. Ngoài ra, việc sử dụng các dung dịch khử trùng, ví dụ, thuốc tím, thuốc trừ nấm sẽ tác động trực tiếp đến mô ngoài của cây sâm, khiến cho cây sâm dễ bị tổn thương và khó phát triển.

Các tác giả đã nghiên cứu và phát hiện ra rằng, việc xử lý cây sâm Ngọc Linh nuôi cấy mô bằng dung dịch chitosan 3% trước khi đưa ra trồng trên giá thể bao gồm mùn/cát theo tỷ lệ 1:3 trọng lượng sẽ cho tỷ lệ sống cao, lên tới 90%. Theo đó, cây sâm Ngọc Linh nuôi cấy mô sau khi rửa sạch môi trường thạch bám trên cây giống,

được xử lý bằng dung dịch chitosan 3% trong 3 phút trước khi trồng trên giá thể mùn/cát.

Theo đó, giải pháp hữu ích thu được cây giống sâm Ngọc Linh với thời gian được rút gọn ít nhất 6 tháng do không trải qua thời gian cảm ứng tạo mô sẹo, đồng thời thu được cây sâm Ngọc Linh từ mô hữu tính với lượng lớn cho phép đảm bảo được tính đa dạng sinh học của quần thể sâm khi trồng ngoài tự nhiên.

### Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

#### *Ví dụ 1. Xác định thời gian khử trùng đến tỷ lệ nhiễm mẫu*

Để xác định khả năng khử trùng mẫu, tiến hành thử nghiệm với mẫu là quả sâm Ngọc Linh tươi. Sau khi đãi vỏ và rửa sạch hạt bằng nước cất nhiều lần, chọn ra các hạt có hình dạng đặc trưng, kích thước đồng đều màu trắng ngà hoặc vàng nhạt để sử dụng. Tiến hành thử nghiệm với dung dịch 1% NaClO với thời gian xử lý khác nhau. Tiếp đó các mẫu đều được xử lý bằng Streptomycin (500mg/l) trong 10 phút, dung dịch ethanol 70% trong 1 phút theo các phương pháp thông thường. Các công thức bên dưới, mỗi công thức được thực hiện lặp lại 3 lần với mỗi lần 20 mẫu, kết quả được đánh giá với theo thống kê Duncan.

ĐC: Rửa hạt bằng nước cất

CT1: Rửa bằng dung dịch 1% NaClO trong 5 phút

CT2: Rửa bằng dung dịch 1% NaClO trong 10 phút

CT3: Rửa bằng dung dịch 1% NaClO trong 15 phút

CT4: Rửa bằng dung dịch 1% NaClO trong 20 phút

Các công thức được thực hiện trong tủ cấy vô trùng, sau khi xử lý bằng NaClO, mẫu được rửa sạch bằng nước cất và xử lý bằng dung dịch Streptomycin (500mg/l) trong 10 phút và rửa sạch lại bằng nước cất. Sau đó mẫu được tách bỏ vỏ hạt và lựa chọn phần phôi hữu tính cấy vào các môi trường khảo sát.

Kết quả thử nghiệm được thể hiện trên Bảng 1 và Hình 1.

Bảng 1. Ảnh hưởng của thời gian khử trùng đến tỷ lệ nhiễm mẫu

Công thức thử nghiệm	Tổng số mẫu	Tỷ lệ nhiễm trung bình	Độ lệch chuẩn	Thử nghiệm Duncan
ĐC	20	100,00	0,00	a
CT1	20	83,33	12,58	b

Công thức thử nghiệm	Tổng số mẫu	Tỉ lệ nhiễm trung bình	Độ lệch chuẩn	Thử nghiệm Duncan
CT2	20	43,33	10,41	c
CT3	20	3,33	2,89	d
CT4	20	3,33	2,89	d

Kết quả thử nghiệm cho thấy, khi mẫu được xử lý chỉ bằng dung dịch Streptomycin (500mg/l) trong 10 phút sẽ bị nhiễm mẫu 100%, ngược lại, khi tiền xử lý bằng dung dịch 1% NaClO cho thấy khả năng khử khuẩn hiệu quả, đặc biệt với dung dịch 1% NaClO xử lý từ 15 đến 20 phút, hiệu quả vô trùng là tốt nhất.

Các thử nghiệm với dung dịch NaClO nồng độ cao hơn hoặc kéo dài thời gian xử lý đều cho thấy tỷ lệ khử trùng tốt, tuy nhiên lại gây tác động lên phôi mầm, ảnh hưởng đến chất lượng nhân phôi (dữ liệu không thể hiện).

#### ***Ví dụ 2. Thử nghiệm tạo cụm phôi hữu tính sâm Ngọc Linh***

Thông thường, mỗi phôi hữu tính chỉ phát sinh thành một cây, do đó cần nhân các phôi hữu tính này thành nhiều phôi để có thể nâng cao hệ số nhân giống. Thử nghiệm tiến hành trên hai môi trường nuôi cấy là môi trường MS và môi trường SH. Các công thức bên dưới, mỗi công thức được thực hiện lặp lại 3 lần với mỗi lần 20 mẫu, kết quả được đánh giá với theo thống kê Duncan.

CT1: ½ SH bổ sung 70 g/l đường sucroza

CT2: ½ MS bổ sung 70 g/l đường sucroza

CT3: SH bổ sung 70 g/l đường sucroza

CT2: MS bổ sung 70 g/l đường sucroza

CT5: ½ MS + 0,2 mg/L 2,4-D + 70g/l sucroza

CT6: ½ MS + 0,5 mg/L 2,4-D + 70g/l sucroza

CT7: ½ SH + 0,2 mg/L TDZ+ 70g/l sucroza

CT8: ½ SH + 0,5 mg/L TDZ + 70g/l sucroza

CT9: SH + 1 mg/L NAA + 70g/l sucroza

CT10: MS + 3 mg/L IBA + 70g/l sucroza

Hạt vô trùng được tách bỏ phần vỏ và lựa chọn phần nội nhũ chứa phôi hữu tính cấy vào các môi trường nêu trên. Kết quả thử nghiệm cho thấy, quá trình phát sinh

phôi trực tiếp từ phôi hạt diễn ra tương đối nhanh từ 1-3 tháng. Kết quả được thể hiện trên Bảng 2 và Hình 2.

Bảng 2. Kết quả thử nghiệm phát sinh phôi

Mẫu	Số mẫu ban đầu	Tỉ lệ tạo phôi trung bình	Độ lệch chuẩn	Thử nghiệm Duncan
CT1	20	18,33	10,41	a
CT2	20	16,67	5,77	a
CT3	20	43,33	12,58	c
CT4	20	13,33	5,77	ab
CT5	20	13,33	2,89	ab
CT6	20	15,00	8,66	a
CT7	20	1,67	2,89	b
CT8	20	15,00	5,00	a
CT9	20	10,00	8,66	ab
CT10	20	11,67	7,64	ab

Đặc biệt là ở môi trường nuôi cấy bao gồm SH + 70g/l sucroza có khả năng phát sinh phôi vô tính trực tiếp sau 4 tuần với tỷ lệ mẫu cảm ứng tạo phôi cao nhất đạt 43,33%. So sánh với quá trình cảm ứng tạo phôi vô tính từ mẫu thân lá thông qua mô sẹo (callus) thì mẫu hạt được cấy vào môi trường có nồng độ đường cao, không có chất kích thích sinh trưởng có khả năng tạo phôi vô tính nhanh gấp 3-6 lần, ít gây đột biến gen hơn. Đối với trường hợp tạo phôi từ mô sẹo, quá trình tạo phôi nhanh nhanh và chất lượng phôi thu được tốt hơn. Hình 3 cho thấy chất lượng phôi thu được từ phôi của hạt (a) có chất lượng vượt trội so với phôi được cảm ứng từ mô sẹo bằng phương pháp thông thường (b).

### ***Ví dụ 3. Thử nghiệm nhân nhanh phôi hữu tính sâm Ngọc Linh***

Để thử nghiệm điều kiện nhân nhanh phôi hữu tính sâm Ngọc Linh, tiến hành thử nghiệm trên môi trường thạch và môi trường lỏng lắc. Các công thức bên dưới, mỗi công thức được thực hiện lặp lại 3 lần với mỗi lần 20 mẫu, kết quả được đánh giá với theo thống kê Duncan.

Các phôi hữu tính được tách bằng cách chuyển cụm phôi hữu tính vào môi trường lỏng bao gồm ½ SH bổ sung 0,1 mg/l kinetin, 0,1 mg/l TDZ, 30 g/l đường theo tỷ lệ từ 1/5 đến 1/10 (trọng lượng/thể tích) và đưa lên máy lắc rung với tốc độ 300

vòng/phút trong 3 phút để tách rời cụm phôi, thu được phôi rời, các phôi rời này được sử dụng để nhân nhanh phôi

Trong môi trường thạch, sử dụng môi trường  $\frac{1}{2}$  SH, bổ sung 7 g/l thạch, 30 g/l đường sucroza, các công thức thử nghiệm được bố trí như sau:

CT1:  $\frac{1}{2}$  SH + 0,1 mg/l kinetin

CT2:  $\frac{1}{2}$  SH + 0,1 mg/l kinetin + 0,05 mg/l TDZ

CT3:  $\frac{1}{2}$  SH + 0,1 mg/l kinetin + 0,1 mg/l TDZ

CT4:  $\frac{1}{2}$  SH + 0,1 mg/l kinetin + 0,2 mg/l TDZ

Trong môi trường lỏng, các công thức thử nghiệm như trên nhưng không bổ sung thạch. Các môi trường được hấp tiệt trùng ở 121°C trong 20 phút. Kết quả thử nghiệm được thể hiện trên các bảng 3 và 4 và Hình 4.

Bảng 3. Kết quả thử nghiệm hệ số nhân trên môi trường thạch rắn

Mẫu	Khối lượng phôi ban đầu (g)	Trung bình khối lượng phôi sau 4 tuần (g)	Trung bình tỷ lệ tăng khối lượng (lần)	Độ lệch chuẩn
CT1	0,5	4,34	8,68	2,68
CT2	0,5	3,67	7,34	1,46
CT3	0,5	6,52	13,03	1,77
CT4	0,5	4,98	9,95	2,77

Bảng 4. Kết quả thử nghiệm hệ số nhân trên môi trường lỏng

Mẫu	Khối lượng phôi ban đầu (g)	Trung bình khối lượng phôi sau 4 tuần (g)	Trung bình tỷ lệ tăng khối lượng (lần)	Độ lệch chuẩn
CT1	0,5	4,16	8,33	2,95
CT2	0,5	6,34	12,68	3,76
CT3	0,5	14,12	28,24	3,44
CT4	0,5	9,76	19,51	3,32

Kết quả thể hiện cho thấy, quá trình nhân nhanh phôi thu được trên môi trường lỏng ở trạng thái rời rạc, đơn phôi. Theo đó, đối với CT3, hệ số nhân phôi thu trong điều kiện lắc thu được là cao nhất và khối lượng trung bình phôi thu được là lớn nhất. Trái với trường hợp lỏng lắc, phôi hình thành trên môi trường thạch rắn có dạng cụm,

kết cấu dính chắc. Ngoài ra, sự tăng trưởng khối lượng phôi trên môi trường lỏng lác đạt 28,24%, cao gấp hơn 2 lần so với môi trường thạch rắn (13,03%) từ cùng một lượng phôi ban đầu là 0,5g sau 4 tuần nuôi cấy. Chứng tỏ sự hiệu quả của môi trường lỏng lác so với môi trường thạch rắn thông thường.

**Ví dụ 4. Thử nghiệm điều kiện nảy mầm phôi sâm Ngọc Linh**

Trong phương pháp nuôi cấy mô tế bào thực vật bằng các hệ thống thùng nuôi cấy, việc sử dụng GA<sub>3</sub> là một phương thức phổ biến nhằm điều chỉnh các phôi nảy mầm đồng nhất nhằm tạo nguyên liệu để sản xuất cây giống số lượng lớn, nhanh chóng đồng đều. Có hai phương thức sử dụng GA<sub>3</sub> chính là bổ sung trực tiếp vào môi trường nuôi cấy hoặc xử lý phôi bằng GA<sub>3</sub> trước khi đưa vào hệ thống nuôi cấy. Thử nghiệm nảy mầm phôi với GA<sub>3</sub> được bổ sung trực tiếp vào môi trường nuôi cấy nhằm nghiên cứu môi trường bổ sung nồng độ GA<sub>3</sub> khác nhau. Các công thức bên dưới, mỗi công thức được thực hiện lặp lại 3 lần với mỗi lần 20 mẫu.

ĐC: SH bổ sung 30 g/l đường sucroza

CT1: SH bổ sung 30 g/l đường sucroza + 1 mg/l GA<sub>3</sub>

CT2: SH bổ sung 30 g/l đường sucroza + 3 mg/l GA<sub>3</sub>

CT3: SH bổ sung 30 g/l đường sucroza + 5 mg/l GA<sub>3</sub>

CT4: SH bổ sung 30 g/l đường sucroza + 7 mg/l GA<sub>3</sub>

Phôi được gieo lên trên môi trường thạch SH, thời gian nuôi cấy 2 tháng. Kết quả được thể hiện trên Bảng 5.

Bảng 5. Ảnh hưởng của nồng độ GA<sub>3</sub> đến tỷ lệ nảy mầm phôi sâm Ngọc Linh

Mẫu	Tỷ lệ nảy mầm (%)
ĐC	6,11±2,55
CT1	44,17±5,46
CT2	58,61±4,88
CT3	87,22±8,22
CT4	33,06±5,91

Kết quả thử nghiệm cho thấy khi không có GA<sub>3</sub> (ĐC) phôi hầu như không thể nảy mầm tỷ lệ nảy mầm chỉ đạt 6,11%, khi nồng độ GA<sub>3</sub> tăng dần từ 1-5 mg/l thì tỷ lệ

nảy mầm tăng và đạt 87,22 % ở 5 mg/l GA<sub>3</sub>. Tuy nhiên khi tăng nồng độ quá 5 mg/l thì khả năng nảy mầm bị ức chế và giảm mạnh chỉ còn 33,06 %. Do đó, nồng độ tối ưu để nảy mầm phôi sâm Ngọc Linh là SH bổ sung 30 g/l đường sucroza + 5 mg/l GA<sub>3</sub>.

**Ví dụ 5. Thử nghiệm thời gian nuôi ngập chìm tạm thời đến sự phát triển phôi sâm Ngọc Linh**

Thử nghiệm nhằm tìm ra điều kiện tối ưu trong hệ thống nuôi ngập chìm tạm thời, theo đó, các mẫu được nuôi cấy trên môi trường thạch và định kỳ được bổ sung lượng dưỡng chất bằng phương pháp ngâm chìm. Quá trình này sẽ giúp đẩy nhanh tốc độ trao đổi chất của phôi với môi trường. Tuy nhiên, đi kèm theo đó là tỷ lệ thủy tinh hóa phôi gây hỏng mẫu. Thử nghiệm nhằm xác định điều kiện tối ưu trong điều kiện ngâm và tần suất ngâm. Các công thức bên dưới, mỗi công thức được thực hiện lặp lại 3 lần với mỗi lần 20 mẫu, chỉ tiêu đánh giá dựa trên tỷ lệ nảy mầm và tỷ lệ thủy tinh hóa mẫu nuôi cấy.

Để đánh giá ảnh hưởng của thời gian ngâm đến tỷ lệ nảy mầm của phôi sâm Ngọc Linh, các công thức được bố trí với các thời gian ngâm 1, 2, 3, 5 và 10 phút. Chỉ tiêu theo dõi bao gồm tỷ lệ nảy mầm (%), chiều dài chồi (cm), tỷ lệ phôi thủy tinh hóa (%). Kết quả được thể hiện trên Bảng 6.

Bảng 6. Ảnh hưởng của thời gian ngâm đến tỉ lệ nảy mầm của phôi sâm Ngọc Linh

Thời gian ngâm (phút)	Tỉ lệ nảy mầm (%)	Chiều dài chồi (cm)	Tỉ lệ phôi thủy tinh (%)
1	46,67±6,67	2,03±0,11	8±2
2	65,56±8,82	2,93±0,38	7±2
3	91,11±8,39	4,53±0,44	6±1
5	50,00±8,39	1,49±0,09	16±4
10	40,00±5,77	1,01±0,06	15±2

Kết quả quan sát cho thấy, sau 2 tuần nuôi cấy phôi bắt đầu kéo dài và hình thành chồi, đồng thời ghi nhận sự xuất hiện của các phôi bị thủy tinh hóa, sau 3 tuần nuôi cấy xuất hiện các chồi bị tủy tinh hóa. Theo kết quả cho thấy, thời gian ngâm tối ưu là 3 phút sẽ cho tỷ lệ nảy mầm cao, chiều dài chồi phát triển mạnh với tỷ lệ phôi bị thủy tinh hóa giảm. Thử nghiệm cho thấy thời gian ngâm tối ưu để phôi nảy mầm đạt tỉ lệ cao nhất là 3 phút cây đạt 91,11±8,39 % tỉ lệ nảy mầm, chiều dài chồi trung bình đạt



4,53±0,44 cm, tuy nhiên vẫn tồn tại 6% tỉ lệ phôi, chồi bị thủy tinh hóa. Trong khoảng từ 1-3 phút, thời gian ngâm tăng thì tỉ lệ nảy mầm và chiều dài chồi tăng, tuy nhiên khi ngâm lâu hơn 3 phút phôi sẽ bị ức chế dẫn tới tỉ lệ thủy tinh hóa tăng, đồng thời tỉ lệ nảy mầm và chiều dài chồi giảm mạnh.

Trong thí nghiệm về ảnh hưởng của thời gian ngâm tới tỉ lệ nảy mầm sâm Ngọc Linh, với chu kì tuần hoàn ở các mốc thời gian ngâm khác nhau đều tồn tại chồi ở trạng thái thủy tinh hóa, điều này chứng tỏ thời gian ngâm là một yếu tố quan trọng nhưng không phải là yếu tố quyết định đến tỉ lệ thủy tinh hóa trong nuôi cấy bán ngập chìm. Do đó, để xác định điều kiện tối ưu trong tần suất bơm ngập chìm, các thử nghiệm được tiến hành đối với các chu kỳ bơm 2, 4, 6, 8 và 12 giờ. Kết quả được thể hiện trên Bảng 7.

Bảng 7. Ảnh hưởng của tần suất ngâm đến khả năng nảy mầm và tỷ lệ thủy tinh hóa phôi sâm Ngọc Linh

Tần suất (giờ)	Tỉ lệ nảy mầm (%)	Chiều dài chồi (cm)	Tỉ lệ phôi thủy tinh (%)
2	33,33±6,67	1,95±0,26	54,44±11,71
4	57,78±11,71	3,46±0,23	46,67±10
6	95,56±1,92	5,98±0,61	0
8	81,11±10,18	3,98±0,45	0
12	77,78±10,18	2,06±0,44	0

Theo kết quả trên thấy rằng, với thời gian ngâm tối ưu cho phôi nảy mầm là 3 phút trên môi trường 1/2 SH + 1 mg/l NAA + 0,5 mg/l BA + 5 mg/l GA<sub>3</sub> + 30 g/l Sucroza. Ở chu kì từ 2 đến 12 giờ nhận thấy càng kéo dài tần suất ngập chìm thì tỉ lệ phôi, chồi bị thủy tinh hóa giảm, ở chu kì 6 tiếng phôi có tỉ lệ nảy mầm cao nhất đạt 95,56±1,92%, đồng thời ở tần suất này cũng thu được chồi ở có chiều dài lớn nhất đạt 5,98±0,61 cm. Thời gian tần suất tối ưu để phôi nảy mầm là 3 phút ngâm ở chu kì 6 giờ.

Chu kì luân chuyển môi trường trên TIS để phôi sâm Ngọc Linh nảy mầm tương đồng với *E. sessiliflorus* Shohael (2005), tuy nhiên thời gian ngâm của sâm Ngọc Linh 3 phút ngắn hơn nhiều lần so với các loài trong họ Sâm Araliaceae như *E. sessiliflorus* 15 phút hoặc 60 phút, *K. septemlobus* 30 phút. Chứng tỏ sâm Ngọc Linh có như cầu hấp thụ dinh dưỡng khác biệt so với các loài khác trong cùng họ nhưng lại tương đồng với đa số các loài phổ biến đã biết do thời gian ngâm <15 phút.

**Ví dụ 6. Ảnh hưởng của nồng độ đường sucroza đến khả năng phát triển của cây sâm Ngọc Linh *in vitro***

Để bồi dưỡng chồi, tiến hành xác định nồng độ tối ưu cho sự phát triển củ có chồi mầm (phân đốt) của cây sâm *in vitro* nhằm nâng cao khả năng sống sót trong điều kiện huấn luyện trước khi đưa ra vườn ươm, các thử nghiệm được thực hiện với mầm cây sâm Ngọc Linh với các nồng độ đường khác nhau.

Các thử nghiệm được thực hiện trên môi trường thạch SH bổ sung các nồng độ đường sucroza 2%, 3%, 4%, 5% và 6%, thời gian nuôi cấy 90 ngày. Theo đó, tất cả cây *in vitro* có đường kính củ micro nhỏ hơn 0,2cm sinh trưởng phát triển rất kém, đồng thời xuất hiện nhiều phôi thứ cấp sau 5-6 tuần nuôi cấy. Đặc biệt là ở môi trường có nồng độ đường càng cao thì sự tăng sinh về phôi thứ cấp càng mạnh. Trong khi đó, tất cả cây cấy chuyển có củ micro với đường kính lớn hơn 0,2-0,3cm được ghi nhận vẫn có sự tăng trưởng nhưng mức độ lại tùy thuộc vào nồng độ đường sử dụng. Kết quả được thể hiện trên bảng 8.

Bảng 8: Ảnh hưởng của nồng độ đường đến khả năng sinh trưởng của cây sâm Ngọc Linh *in vitro*

Công thức	Môi trường	Khối lượng cây (g)	Chiều cao cây (cm)	Đặc điểm
CT1	SH + 2% sucroza	0,62	5,0	Củ không có chồi mầm
CT2	SH + 3% sucroza	0,75	5,8	Củ có chồi mầm
CT3	SH + 4% sucroza	1,32	6,5	
CT4	SH + 5% sucroza	1,28	6,1	
CT5	SH + 6% sucroza	1,25	5,9	
CV%		5,4	4,0	-
LSD 0,05		0,10	0,42	-

Theo kết quả trên bảng 8 thấy rằng, khối lượng cây *in vitro* sau 90 ngày nuôi cấy dao động trong khoảng từ 0,62 đến 1,32g. Trong đó, cây nuôi cấy trong môi trường có nồng độ đường sucroza từ 4-6% có khối lượng sinh khối đạt trên 1,0g. Đặc biệt là cây nuôi cấy ở công thức CT3 (4% sucroza) có khối lượng lớn nhất. Cây có khối lượng sinh khối nhỏ nhất đạt 0,62g được ghi nhận ở môi trường có nồng độ sucroza nhỏ nhất. Như vậy, đường sucroza có ảnh hưởng tích cực đến sự tăng trưởng của cây sâm Ngọc Linh *in vitro*.

Đánh giá sự phát triển về chiều cao cây và sự xuất hiện chồi mầm ở củ, sau 90 ngày nuôi cấy chồi mầm xuất hiện ở hầu hết các nghiệm thức, trừ công thức CT1, và chiều cao cây nằm trong khoảng từ 5,0 đến 6,5cm. Cây đạt chiều cao lớn nhất là 6,5cm ở môi trường SH có bổ sung 4% sucroza (bảng 8). Quan sát hình thái lá chúng tôi thấy, sau khi cấy chuyển vào môi trường SH có bổ sung từ 2 đến 4% sucroza lá cây phát triển bình thường. Trong khi đó, cây ở môi trường có nồng độ đường sucroza từ 5 đến 6% lại thấy hiện tượng héo và khô trắng viền lá sau từ 1 đến 2 ngày cấy chuyển. Điều đó chứng tỏ ở nồng độ đường từ 5 đến 6% cây chưa kịp thích nghi và bị hạn chế hấp thu nước dẫn đến hiện tượng héo viền lá. Như vậy, môi trường SH có bổ sung 4% đường sucroza là thích hợp nhất cho sự phát triển củ có chồi mầm của cây sâm Ngọc Linh *in vitro*.

#### ***Ví dụ 7. Xác định điều kiện phát triển cây sâm Ngọc Linh giống***

Để thử nghiệm điều kiện phát triển cây sâm Ngọc Linh giống, tiến hành thử nghiệm với các môi trường SH và MS với lượng nitơ khả dụng khác nhau. Theo đó, các mẫu sâm Ngọc Linh thu ở ví dụ 6 có kích thước thân củ đạt từ 0,5 đến 1 cm được cấy vào các môi trường bên dưới và nuôi cấy trong 2 tháng ở nhiệt độ từ 20 đến 22°C, quang chu kỳ từ 8 đến 10 tiếng/ngày. Kết quả được thể hiện trên Bảng 9.

Bảng 9: Ảnh hưởng của môi trường đến sự thích nghi của cây

Công thức	Môi trường	Tỉ lệ sống (%)	Trung bình số rễ /cây	Chiều cao thân, (cm)	Đặc điểm sinh trưởng
CT1	SH	20	2,2	6,1	-Sinh trưởng chậm, rễ ngắn, củ phát triển chậm -Lá xanh đậm, thân cứng cáp
CT2	SH1/2	25	3,5	5,7	
CT3	MS	30	1,5	5,5	
CT4	MS1/2	25	2,8	5,6	
CT5	2/5 Nitơ của SH + 170mg/l KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	100	5,1	6,6	- Sinh trưởng khỏe, lá xanh đậm, củ và rễ phát triển
CT6	2/5 Nitơ của SH + 170mg/l KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + 10 g/l đường	100	4,8	6,8	

Theo kết quả trên cho thấy, trong cùng một điều kiện nuôi cấy, chỉ khác hàm lượng dinh dưỡng cơ bản (SH, MS) đã có sự khác nhau về sự sinh trưởng và phát triển của cây sâm Ngọc Linh *in vitro*. Khi hàm lượng dinh dưỡng cơ bản trong môi trường

nuôi cấy giảm chúng tôi ghi nhận có sự tăng về số lượng rễ/cây. Số lượng rễ tăng từ 1,5 (CT3) đến 2,8 (CT4) ở môi trường MS, và tăng từ 2,2 (CT1) đến 3,5 (CT2) đối với loại môi trường cơ bản SH. Và đặc biệt số lượng rễ tăng mạnh đạt 4,8-5,1 rễ/cây khi giảm hàm lượng đa lượng N xuống còn 2/5 của môi trường SH đồng thời bổ sung thêm 170mg/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Điều đó chứng tỏ ở môi trường nghèo N khoáng đa lượng, giàu P hơn kích thích bộ rễ cây phát triển hơn.

**Ví dụ 9. Xác định điều kiện đưa cây sâm Ngọc Linh giống ra ngoài vườn ươm**

Để xử lý cây trước khi đưa ra vườn ươm, các thử nghiệm được tiến hành đối với cây được xử lý chitosan và không được xử lý bằng chitosan. Theo đó, cây giống sâm Ngọc Linh hoàn chỉnh thu được từ ví dụ 8 được xử lý bằng dung dịch chitosan 3% hoặc không trước khi trồng trên giá thể bao gồm CT1: Mùn rùng, CT2: 2/3 mùn rùng + 1/3 cát, CT3: 1/3 mùn rùng + 2/3 cát và CT4: 1/5 mùn rùng + 4/5 cát.

Kết quả cho thấy, đối với nhóm không được xử lý bằng chitosan, tỷ lệ nhiễm bệnh (thối nhũn) cao, lên tới 90%. Ngược lại đối với nhóm được xử lý bằng chitosan, tỷ lệ sống cao, đạt 75 đến 91%. Cần lưu ý rằng, đã có một số nghiên cứu báo cáo cho rằng tỷ lệ cây sâm Ngọc Linh sống cao nếu được xử lý bằng thuốc khử trùng và trồng trên giá thể trợ, ví dụ bã cà phê, tuy nhiên, các tác giả đã nghiên cứu và thấy rằng, đối với cây sâm Ngọc Linh, điều kiện tốt nhất để phát triển là được trồng trực tiếp trên mùn rùng, do đó, các điều kiện tối ưu không chỉ nhằm cây sâm khi ra vườn ươm đạt tỷ lệ sống cao, mà còn phải đảm bảo được yếu tố phát triển lâu dài trên môi trường tự nhiên. Kết quả thử nghiệm đối với nhóm được xử lý bằng chitosan được thể hiện trên Bảng 10 và Hình 9.

Bảng 10. Ảnh hưởng của giá thể đến khả năng phát triển của cây sâm Ngọc Linh

Công thức	Số lượng rễ trung bình	Chiều dài rễ (cm)	Tỷ lệ sống (%)	Màu sắc lá
Mùn rùng	1,34	0,52	75,56	Lá màu xanh nhạt, mép bị vàng nhiều
2/3 mùn rùng + 1/3 cát	3,33	1,04	81,11	Lá màu xanh, mép bị vàng ít
1/3 mùn rùng + 2/3 cát	4,67	1,89	91,11	Lá màu xanh đậm
1/5 mùn rùng + 4/5 cát	3,67	0,81	84,44	Lá màu xanh, mép ít bị vàng,

Theo đó, thấy rằng, để cây sâm Ngọc Linh nuôi cấy mô chuyển ra ngoài vườn ươm có tỷ lệ sống cao trên môi trường mùn rừng, điều kiện tốt nhất là xử lý cây giống sâm Ngọc Linh hoàn chỉnh bằng dung dịch chitosan 3% trước khi đưa ra trồng trên giá thể bao gồm mùn/cát theo tỷ lệ 1:3 trọng lượng.

### **Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích**

Quy trình nhân giống sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) theo giải pháp cho phép phát triển được nguồn cây sâm Ngọc Linh từ mẫu hạt chưa thành thực với hệ số nhân cao. Quy trình theo giải pháp hữu ích cho phép tạo cây sâm Ngọc Linh hữu tính giúp bảo toàn được tính đa dạng sinh học trong quần thể sâm Ngọc Linh nuôi cấy mô. Điều này giúp phát triển bền vững ngành nuôi trồng sâm Ngọc Linh.

Bằng cách tối ưu hóa các điều kiện, kết hợp với kỹ thuật nuôi cấy lỏng, nuôi cấy bán ngập chìm và thay đổi thành phần môi trường nhằm thích nghi cây giống, quy trình nhân giống sâm Ngọc Linh cho phép giảm thời gian nhân giống, tăng hệ số nhân, tỷ lệ tạo phôi, nảy mầm, giảm được tỷ lệ thủy tinh hóa và tỷ lệ đột biến. Quy trình cho phép nhân trực tiếp phôi từ mẫu phôi chưa thành thực với hệ số nhân và chất lượng cây thu được cân bằng nhằm thu được cây giống sâm Ngọc Linh khỏe mạnh, có sức sống cao trước khi đưa ra ngoài vườn ươm.

Bằng kỹ thuật nuôi trong môi trường lỏng, kết hợp rung lắc cho phép thu được các mẫu phôi rời mà không gây tổn thương phôi, ngoài ra việc nuôi cấy trong môi trường bán ngập chìm giúp cây phát triển nhanh, đồng thời việc sử dụng dung dịch chitosan trong xử lý cây trước khi đưa ra ngoài vườn ươm tránh được sự tấn công của vi khuẩn gây thối đồng thời giữ được cây sâm khỏe mạnh, thích nghi nhanh với môi trường thực địa.

## YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình nhân giống cây sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) bằng phương pháp nuôi cấy phôi hữu tính, trong đó quy trình này bao gồm các bước:
  - a) chuẩn bị mẫu vô trùng bằng cách thu hạt của quả sâm Ngọc Linh tươi và ngâm trong dung dịch NaClO 1% trong khoảng thời gian từ 15 đến 20 phút, tiếp đó xử lý bằng dung dịch streptomycin 500mg/l trong 10 phút và dung dịch etanol 70% trong 1 phút, sau khi rửa lại bằng nước cất vô trùng, thu được mẫu hạt sâm Ngọc Linh vô trùng;
  - b) thu cụm phôi hữu tính bằng cách tách vỏ hạt thu phôi hữu tính và cấy trên môi trường thạch SH bổ sung 70 g/l đường, nuôi trong khoảng từ 4 đến 6 tuần trong điều kiện chiếu sáng từ 12 đến 14 tiếng/ngày thu được cụm phôi hữu tính;
  - c) tách phôi vô tính hữu tính bằng cách chuyển cụm phôi hữu tính vào môi trường lỏng bao gồm ½ SH bổ sung 0,1 mg/l kinetin, 0,1 mg/l TDZ, 30 g/l đường theo tỷ lệ từ 1/5 đến 1/10 (trọng lượng/thể tích) và đưa lên máy lắc rung với tốc độ 120 vòng/phút và tần số từ 200 đến 300 hz trong 3 phút để tách rời cụm phôi, thu được mẫu phôi vô tính rời;
  - d) nhân nhanh phôi vô tính bằng cách bổ sung mẫu phôi vô tính rời vào trong môi trường lỏng bao gồm ½ SH bổ sung 0,1 mg/l kinetin, 0,1 mg/l TDZ, 30 g/l đường theo tỷ lệ 1/20 (trọng lượng/thể tích) và nuôi cấy trên máy lắc với tốc độ lắc 100 vòng/phút trong 1 tháng để nhân nhanh phôi, sau khi lọc bỏ môi trường, thu phôi vô tính;
  - e) nảy mầm phôi bằng cách gieo phôi vô tính lên môi trường thạch SH bổ sung 5 mg/l GA3, 30 g/l đường trong hệ thống nuôi ngập chìm tạm thời với tần suất bơm môi trường SH lỏng bổ sung 5mg/l GA3, 30 g/l đường là 4 giờ/lần, mỗi lần ngâm 3 phút, thời gian nuôi cấy 2 tháng, thu được phôi đã nảy mầm và đâm rễ;
  - f) bồi dưỡng thân củ bằng cách cấy phôi đã nảy mầm và đâm rễ lên môi trường thạch SH bổ sung 1 mg/l BA, 0,5 mg/l NAA, 30 g/l đường, nuôi trong 2 tháng thu được thân củ có chồi và rễ;
  - g) tạo củ sâm Ngọc Linh có chồi ngủ bằng cách cấy thân củ thu được từ bước f) có kích thước từ 0,2 đến 0,3 cm, dài từ 2,5 đến 3,0 cm vào môi trường thạch SH bổ sung 0,5 mg/l BA, 1 mg/l NAA, 40 g/l đường, nuôi khoảng 3 tháng đến khi trên thân củ xuất hiện chồi ngủ, thu được củ sâm Ngọc Linh có chồi ngủ; và

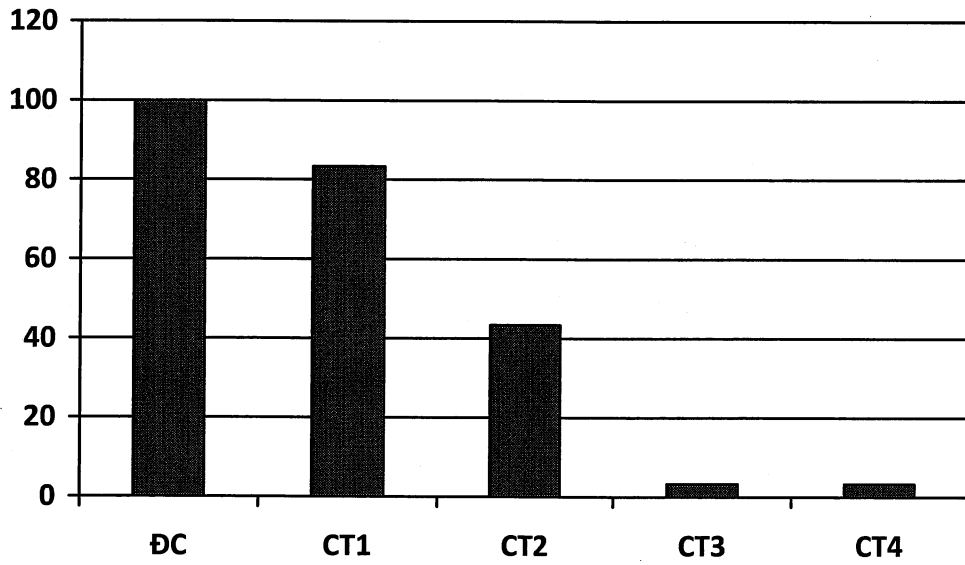
h) thu cây sâm Ngọc Linh giống bằng cách cây củ sâm Ngọc Linh có chồi ngủ thu được từ bước g) có kích thước thân củ đạt từ 0,5 đến 1 cm vào môi trường thạch SH chứa 40% khoáng đa lượng nitơ, 170mg/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  và nuôi cấy trong 2 tháng ở nhiệt độ từ 20 đến 22°C, quang chu kỳ từ 8 đến 10 tiếng/ngày thu được cây giống sâm Ngọc Linh hoàn chỉnh.

2. Quy trình theo điểm 1, trong đó quy trình này còn bao gồm bước chuyển cây ra ngoài vườn ươm bằng cách xử lý cây sâm Ngọc Linh giống bằng dung dịch chitosan 3% trước khi đưa ra trồng trên giá thể bao gồm mùn/cát theo tỷ lệ 1:3 trọng lượng.

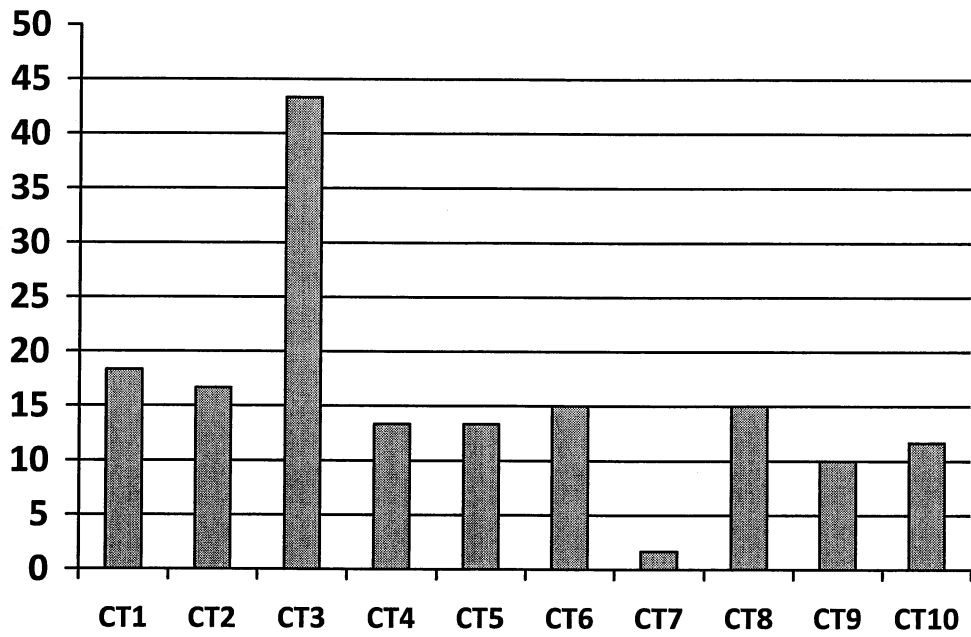
3. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó các bước từ bước d) đến g) có quang chu kỳ là 12 giờ chiếu sáng/ngày.

4. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó nhiệt độ nuôi cấy phôi nằm trong khoảng từ 18 đến 24°C.

HÌNH 1

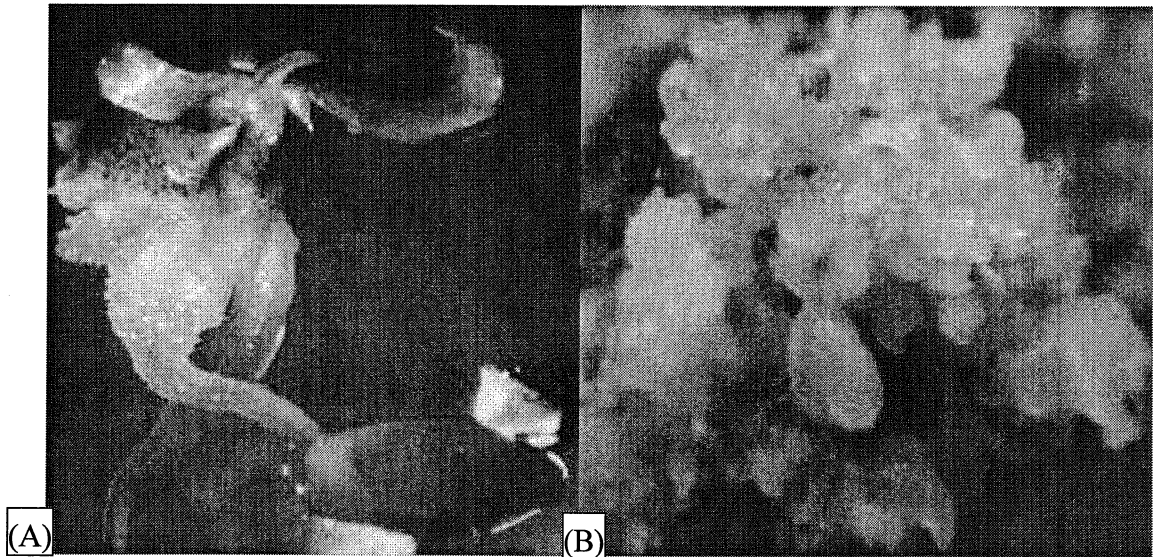


HÌNH 2

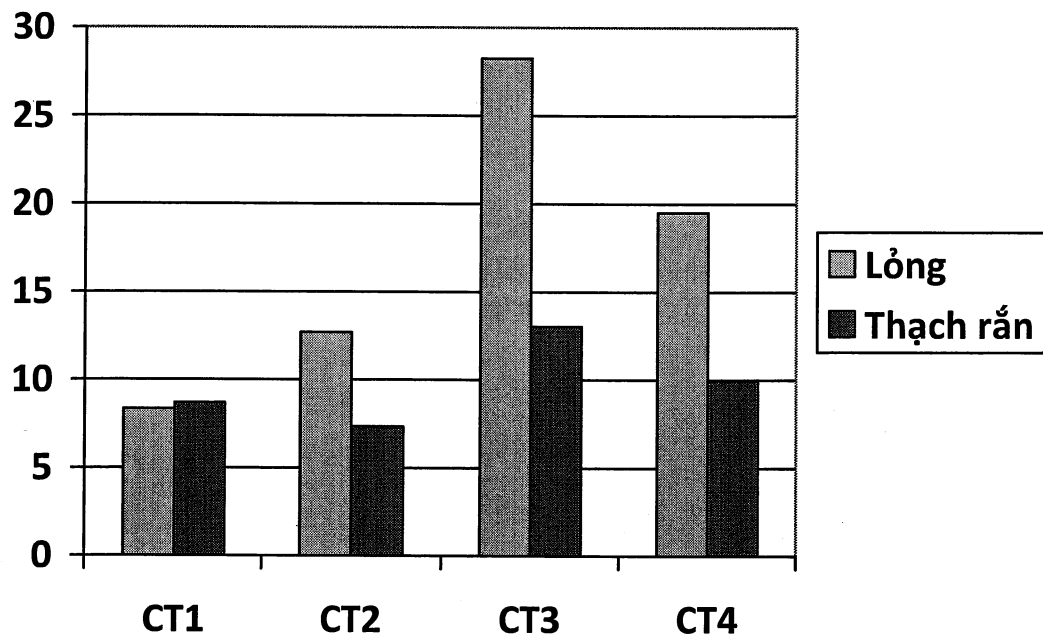




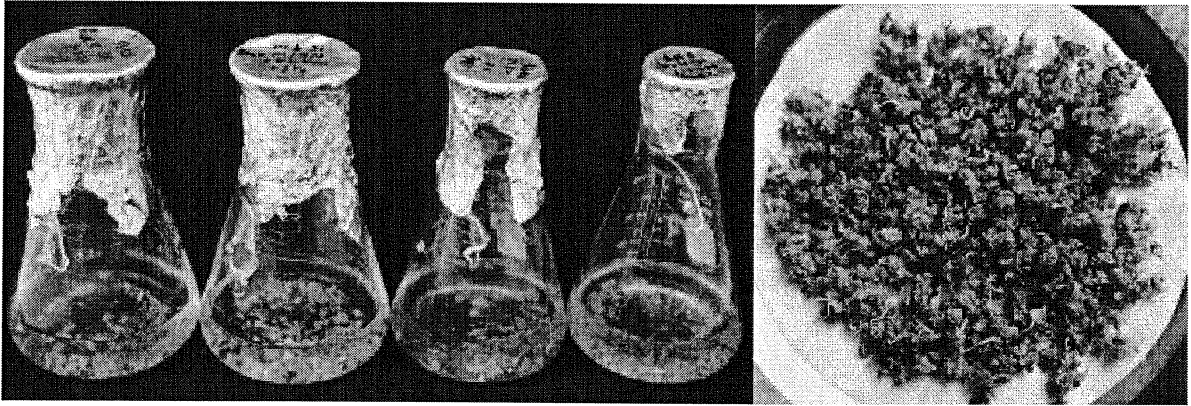
HÌNH 3



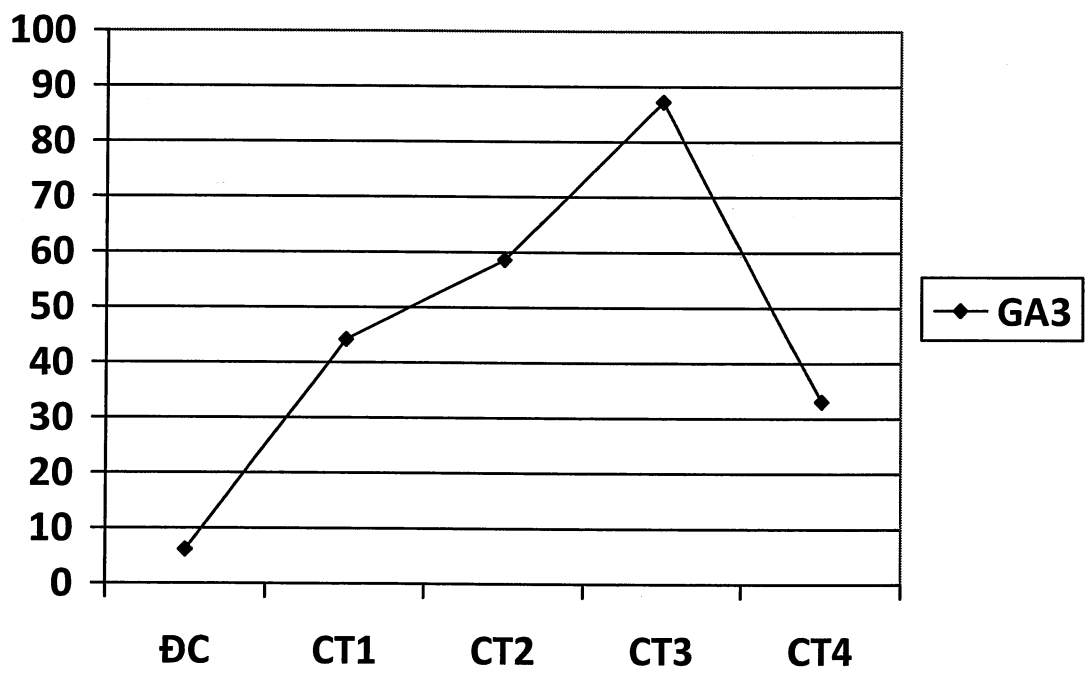
HÌNH 4



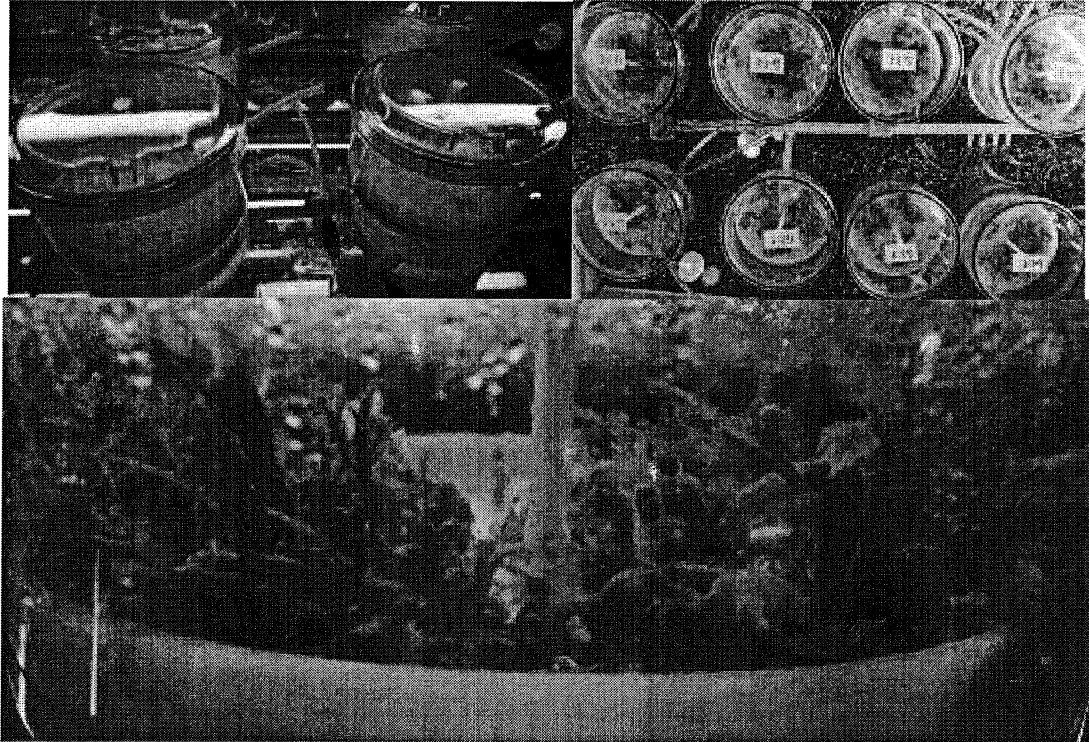
HÌNH 5



HÌNH 6



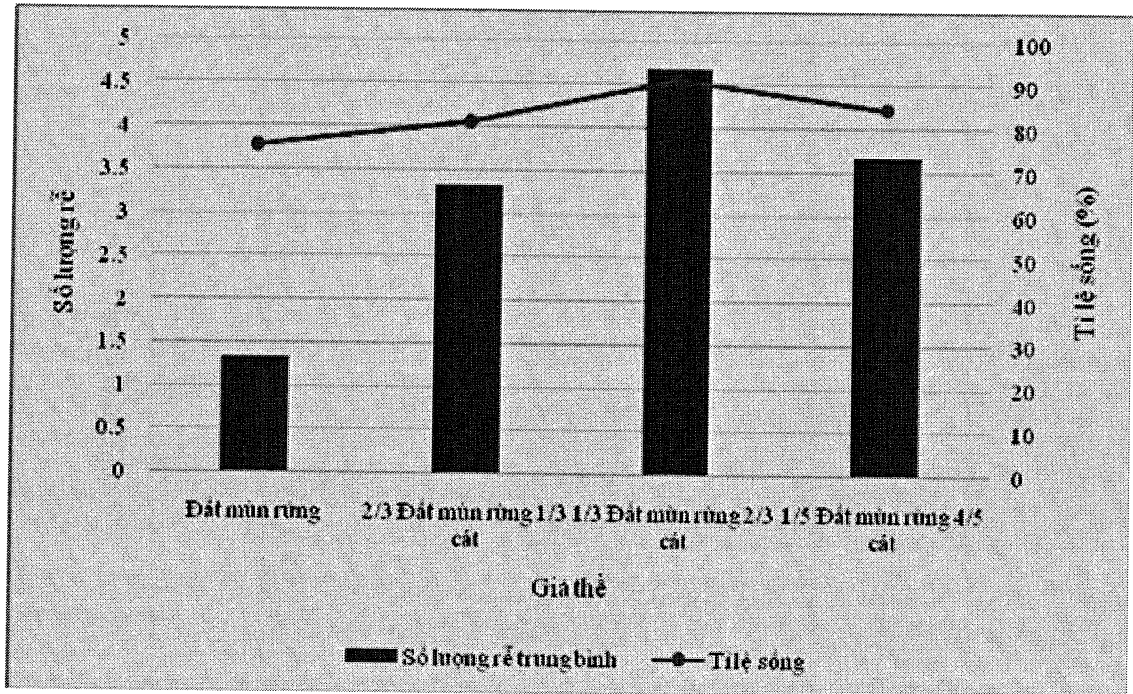
HÌNH 7



HÌNH 8



HÌNH 9



HÌNH 10

