

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM TP. HCM

TRỊNH VIỆT NGÀ

NGHIÊN CỨU NHÂN GIỐNG CÂY ĐINH LĂNG LÁ NHỎ
(Polyscias fruticosa (L.) Harms) **BẰNG PHƯƠNG PHÁP**
NUÔI CÂY PHÔI VÔ TÍNH

Chuyên ngành: Khoa học Cây trồng

Mã số: 9.62.01.10

LUẬN ÁN TIẾN SĨ NGÀNH NÔNG NGHIỆP

TP. HCM - Năm 2020

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM TP. HCM

TRỊNH VIỆT NGÀ

NGHIÊN CỨU NHÂN GIỐNG CÂY ĐINH LĂNG LÁ NHỎ
(Polyscias fruticosa (L.) Harms) **BẰNG PHƯƠNG PHÁP**
NUÔI CÂY PHÔI VÔ TÍNH

Chuyên ngành: Khoa học Cây trồng

Mã số: 9.62.01.10

LUẬN ÁN TIẾN SĨ NGÀNH NÔNG NGHIỆP

Người hướng dẫn khoa học: PGS.TS. Phạm Thị Minh Tâm

TS. Nguyễn Hữu Hồ

TP. HCM - Năm 2020

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu khoa học mà tôi đã tiến hành và tổ chức thực hiện. Các số liệu và kết quả nêu trong luận án là trung thực.

TP. Hồ Chí Minh, ngày 24 tháng 04 năm 2020

Tác giả luận án

Trịnh Việt Nga

LỜI CẢM ƠN

Để hoàn thành khóa học và luận án tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới:

PGS. TS. Phạm Thị Minh Tâm và TS. Nguyễn Hữu Hồ là những người Thầy, Cô đã tận tình hướng dẫn và giúp đỡ tôi thực hiện luận án.

TS. Bùi Minh Trí, TS. Huỳnh Văn Biết, Ks. Nguyễn Đức Minh Hùng đã chỉ bảo và giúp đỡ tôi rất nhiều về chuyên môn.

Ban Giám hiệu Trường Đại học Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh, quý Thầy Cô Phòng Đào tạo Sau Đại học và Khoa Nông học của Nhà trường đã tạo mọi điều kiện thuận lợi cho tôi trong suốt quá trình học tập và thực hiện luận án.

Lãnh đạo Viện Sinh học Nhiệt đới, Phòng Công nghệ Tế bào Thực vật đã tạo mọi điều kiện thuận lợi giúp tôi hoàn thành được chương trình học tập.

Viện Nghiên cứu Công nghệ Sinh học và Môi trường - Trường Đại học Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh, Trung tâm Sâm và Dược liệu TP. Hồ Chí Minh, Công ty TNHH Khoa học và Công nghệ Khải Hoàn, bạn bè và các đồng nghiệp đã dành cho tôi nhiều sự giúp đỡ quý báu trong suốt năm năm qua.

Các em: Ths. Triệu Thị Bích, Ths. Ngô Thị Anh Khôi, Ths. Nguyễn Xuân Linh, Ths. Nguyễn Cao Kiệt, Ks. Nguyễn Thị Hoài Thương, Ks. Trương Thị Hồng là những cộng sự đã giúp đỡ tôi rất nhiều trong quá trình thực hiện các thí nghiệm khoa học.

Chồng, các con cùng những người thân trong gia đình đã luôn động viên tôi trong những lúc khó khăn.

Ba mẹ đã hết lòng vì con.

TP. Hồ Chí Minh ngày 24 tháng 04 năm 2020

Tác giả luận án

Trịnh Việt Nga

TÓM TẮT

Đề tài “Nghiên cứu nhân giống cây đình lăng lá nhỏ (*Polyscias fruticosa* (L.) Harms) bằng phương pháp nuôi cấy phôi vô tính” đã được tiến hành tại Viện Sinh học Nhiệt đới Thành phố Hồ Chí Minh từ tháng 4 năm 2015 đến tháng 3 năm 2019. Mục tiêu tổng quát của đề tài là xây dựng quy trình nhân giống hoàn chỉnh cây đình lăng lá nhỏ (ĐLLN) thông qua con đường cảm ứng tạo phôi vô tính (Somatic embryo) nhằm đạt được hệ số nhân cao, chất lượng cây giống đồng nhất. Mục tiêu cụ thể gồm: (1) Xác định hàm lượng axit oleanolic của 18 mẫu giống đình lăng và trình tự DNA barcode của 8 mẫu giống ĐLLN; (2) Xác định môi trường nuôi cấy thích hợp hình thành mô sẹo có khả năng phát sinh phôi vô tính; (3) Xác định môi trường và chế độ nuôi cấy phù hợp để cảm ứng, nhân sinh khối phôi và tạo cây hoàn chỉnh từ phôi; (4) Xác định điều kiện thuần dưỡng phù hợp đối với cây con được tạo ra từ phôi vô tính.

Đề tài gồm bốn nội dung: (i) Chọn lọc dòng ĐLLN tiêu biểu và xác định đặc trưng di truyền thông qua việc đánh giá hàm lượng axit oleanolic và phân tích sử dụng chỉ thị phân tử; dòng tiêu biểu này sẽ được sử dụng làm nguồn vật liệu cho các bước nhân giống tiếp theo; (ii) Cảm ứng tạo mô sẹo, sau đó tiếp tục tái biệt hóa để tạo phôi vô tính đối với dòng ĐLLN tiêu biểu; (iii) Xác định điều kiện môi trường nuôi cấy phù hợp cho nhân nhanh sinh khối và đạt được các phôi trưởng thành của dòng ĐLLN tiêu biểu; (iv) Xác định điều kiện chăm sóc sau nuôi cấy mô cho dòng ĐLLN tiêu biểu và đánh giá sự đồng nhất di truyền của các cây con thành phẩm bằng kỹ thuật ISSR.

Kết quả phân tích ghi nhận dòng ĐLLN D7 có hàm lượng axit oleanolic cao nhất (1,18%) và có sự khác biệt di truyền so với các dòng khác thông qua kết quả phân tích HPLC và các chỉ thị DNA barcode.

Mẫu phiến lá cây ĐLLN *in vitro* nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung 2,4-D ở nồng độ 2 mg/L hình thành mô sẹo tốt nhất với tỷ lệ 98,9%, đường kính mô sẹo đạt 1,9 cm, trọng lượng mô sẹo là 219,7 mg, đạt chất lượng tốt ở giai đoạn

40 - 50 ngày sau cấy (NSC). Mô sẹo tạo phôi vô tính tốt nhất khi được nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung BA 1,5 mg/L và NAA 0,1 mg/L với tỷ lệ hình thành phôi đạt 80,0%, số lượng phôi đạt 549 phôi/đĩa sau 45 ngày nuôi cấy. Trên môi trường có bổ sung sucrose 40 g/L, mô sẹo phát sinh phôi tốt nhất với tỷ lệ hình thành phôi đạt 90,8%.

Phôi vô tính tăng sinh khối nhanh nhất khi nuôi cấy trong bioreactor sục khí ở dung lượng 600 mL/phút, hệ số tăng sinh phôi ở 30 NSC là 22,9 lần. Phôi vô tính đơn phát triển tốt trong môi trường 1/2 MS có bổ sung sucrose 15 g/L, adenine sulfate 10 mg/L, kinetin 0,5 mg/L, IBA 0,2 mg/L ở điều kiện nuôi cấy lỏng lắc và bioreactor sục khí. Môi trường SH cho kết quả tạo cây hoàn chỉnh tốt nhất: chiều cao cây đạt 2,5 cm, số lá đạt 8,9 lá/cây, số rễ đạt 7,7 rễ, chiều dài rễ là 6,2 cm, trọng lượng tươi đạt 5,9 g và trọng lượng khô đạt 0,3 g ở 8 NSC.

Sau giai đoạn *in vitro*, cây con ĐLLN phát sinh từ phôi được lấy ra từ bình cấy mô và được trồng trên giá thể 100 % cát kết hợp che sáng trong 7 ngày đầu tiên cho sinh trưởng ổn định nhất: chiều cao cây đạt 3,04 cm, số lá trên cây đạt 5,13 lá/cây, trọng lượng trung bình cây đạt 928,3 mg/cây, tỷ lệ sống cao nhất đạt 84,4 %. Cây phát sinh từ phôi sau khi chuyển sang trồng trong bầu chứa giá thể 1/2 mụn dừa : 1/4 tro trấu : 1/4 phân hữu cơ vi sinh kết hợp bổ sung 0,6 g N + 0,6 g P₂O₅/bầu + 0,3 g K₂O/bầu cho cây sinh trưởng tốt, tỷ lệ xuất vườn cao nhất đạt 92,6 - 100%, chiều cao cây từ 8,9 đến 12,3 cm, có 5,4 - 7,4 lá/cây và từ 6,7 đến 8,7 rễ/cây, trọng lượng cây tươi đạt cao nhất là 20,2 - 34,3 g/cây.

Kết quả đánh giá di truyền bằng kỹ thuật ISSR cho thấy các cây thành phẩm hình thành thông qua con đường phát sinh phôi vô tính đều đồng nhất về mặt di truyền so với cây mẹ.

SUMMARY

The study "**Multiplication of *Polycias fruticosa* (L.) Harms by *in vitro* somatic embryo culture method**" was conducted at the Institute of Tropical Biology - Ho Chi Minh City from April of 2015 to March of 2019. The general objective of the study was to establish the protocol for multiplication and acclimation of *P. fruticosa* through somatic embryogenesis. The specific objectives of the study were to identify: (1) oleanolic acid content of 18 selected samples of *Polycias* spp. and DNA barcode of 8 selected samples of *P. fruticosa*; (2) the optimal culture conditions for induce callus, then re-differentiate the callus to create somatic embryos; (3) the optimal *in-vitro* conditions for rapid embryo multiplication and for plant regeneration; (4) optimal *ex-vitro* conditions for the growth of embryo-derived plantlets.

The study comprised of four contents: (i) to select the prominent *P. fruticosa* samples through the evaluation of oleanolic acid content and to determine genetic characteristics of the selected samples based on molecular marker analysis; The promising samples will be used as material for subsequent propagation steps; (ii) to induce callus, then re-differentiate the callus to create somatic embryos; (iii) to determine the optimal *in-vitro* conditions for rapid embryo multiplication and for plant regeneration; (iv) to determine optimal *ex-vitro* conditions for the growth of embryo-derived plantlets and to evaluate the genetic homogeneity of the plants using ISSR technique.

The results obtained through the genetic evaluation showed that the *matK* and *rbcL* gene regions of the *P. fruticosa* samples seemed highly conserved and variation occurred in the *trnH-psbA* region. Oleanolic acid content was the highest in leaf of the D7 selected sample (1,18%).

The experiment on callus induction from leaf explant was carried out and recorded that the best callus induction obtained on MS medium supplemented with 2,4-D 2 mg/L, the highest callus formation rate was 98.9%, callus diameter at 1.9 cm,

fresh weight of callus at 219.7 mg, embryogenic callus usually formed in the period of 40 - 50 days after culture (DAC). MS medium supplemented with BA 1.5 mg/L and NAA 0.1 mg/L induced the best somatic embryo with induction rate of 80.0%, number of embryos was 549 embryos per plate at 45 DAC. Medium containing sucrose 40 g/L was most effective in inducing somatic embryos with induction rate of 90.8%, number of embryos 287 per plate at 45 DAC.

The somatic embryo reached the highest biomass when cultured by using air - bubble bioreactor with aeration speed of 600 mL/minute, the embryo multiplication rate was 22.9 times at 30 DAC. Single somatic embryos regenerated on the 1/2 MS medium supplemented with sucrose 15 g/L, adenine sulfate 10 mg/L, kinetin 0.5 mg/L and IBA 0.2 mg/L both in shacked flasks and in air - bubble bioreactor. The SH medium was suitable for plant development: the plant height reached up to 2.5 cm with leaves and roots gained 8.9 and 7.7 per plantlets, respectively; the root length obtained 6.2 cm; the fresh weight and dry weight reached 5.9 g and 0.3 g at 84 DAC, respectively.

At the *ex vitro* stage, *P. fruticosa* plantlets in nursery grown well on sand (100%) and shaded during the first 7 days. The plantlet reached a height of 3.0 cm, number of leaves gained 5.1 leaves/plantlet, fresh weight reached 928.3 mg/plantlet, the highest survival rate was 84.4%. These plantlets transplanted into mixed substrate (1/2 coconut dust : 1/4 rice husk : 1/4 organic micro organism) supplemented with 0.6 g N/pot + 0.6 g P₂O₅/pot developed and gained the rate of seedlings varied from 92.6 to 100%, plantlet height varied 8.9 - 12.3 cm, number of leaves and roots ranged 5.4 - 7.4 and 6.7 - 8.7 per plantlet, respectively; the fresh weight recorded at 20.2 - 34.3 g/plantlet.

The result of the genetic evaluation by ISSR technique showed that all somatic embryo derived plants were genetically homogeneous as compared to the mother plant.

MỤC LỤC

	Trang
Trang phụ bì	
Lời cam đoan.....	i
Lời cảm ơn	ii
Tóm tắt	iii
Mục lục.....	vii
Danh sách các chữ viết tắt.....	xi
Danh sách các bảng.....	xiv
Danh sách các hình.....	xviii
MỞ ĐẦU	1
Chương 1 TỔNG QUAN TÀI LIỆU	5
1.1 Giới thiệu sơ lược về cây đinh lăng.....	5
1.1.1 Nguồn gốc và sự phân bố của cây đinh lăng.....	5
1.1.2 Phân loại và sự đa dạng của cây đinh lăng.....	5
1.1.3 Đặc điểm hình thái của cây đinh lăng lá nhỏ	6
1.1.4 Nhu cầu về điều kiện sinh thái của cây đinh lăng	7
1.1.5 Các thành phần hóa học chính và giá trị dược tính của cây đinh lăng	7
1.2 Hiện trạng công tác giống trong phát triển sản xuất cây đinh lăng.....	8
1.3 Phương pháp nuôi cấy mô và kỹ thuật tạo phôi vô tính ở thực vật.....	9
1.3.1 Cơ sở khoa học của nuôi cấy mô và quá trình tạo phôi vô tính	9
1.3.2 Quá trình tạo phôi vô tính.....	11
1.3.3 Ảnh hưởng của các loại mô đến sự tạo phôi vô tính	12
1.3.4 Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng thực vật đến sự tạo phôi vô tính	13
1.3.5 Nuôi cấy mô và tế bào trong dịch lỏng	16
1.3.6 Bioreactor	18

1.4 Tình hình nghiên cứu trên thế giới và trong nước về nuôi cấy mô/phôi vô tính cây đinh lăng và hàm lượng axit oleanolic/saponin ở một số giống đinh lăng.....	19
1.4.1 Tình hình nghiên cứu nuôi cấy mô/phôi vô tính cây đinh lăng trên thế giới và trong nước	19
1.4.2 Hàm lượng axit oleanolic/saponin ở một số giống đinh lăng	22
1.5 Ứng dụng kỹ thuật chỉ thị phân tử DNA trong nghiên cứu đặc điểm di truyền	23
1.5.1 Kỹ thuật mã vạch DNA (DNA barcode).....	23
1.5.2 Kỹ thuật ISSR.....	25
1.6 Thuần dưỡng cây con từ nuôi cấy <i>in vitro</i> ra vườn ươm.....	25
1.6.1 Ảnh hưởng của giá thể đến sinh trưởng của cây trồng sau nuôi cấy mô	25
1.6.2 Ảnh hưởng của ánh sáng đến sinh trưởng của cây con trong vườn ươm.....	27
1.6.3 Ảnh hưởng của phân bón đến sinh trưởng của cây con sau nuôi cấy mô	28
Chương 2 NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	31
2.1 Thời gian và địa điểm nghiên cứu	31
2.2 Nội dung nghiên cứu	31
2.3 Nội dung 1: Đánh giá hàm lượng axit oleanolic của 18 mẫu giống đinh lăng và xác định trình tự DNA barcode của 8 mẫu ĐLLN.....	33
2.4 Nội dung 2: Tạo mô sẹo và tạo phôi vô tính dòng ĐLLN ưu tú	39
2.5 Nội dung 3. Nhân phôi vô tính, tạo phôi vô tính trưởng thành và tạo cây từ phôi vô tính ĐLLN.....	43
2.6 Nội dung 4: Khảo sát sự sinh trưởng ở giai đoạn vườn ươm của dòng ĐLLN đã được nuôi cấy và đánh giá độ đồng nhất di truyền cây con	47
2.7 Phương pháp phân tích dữ liệu.....	54

2.7.1 Phân tích trình tự DNA barcode của 8 mẫu giống ĐLLN	54
2.7.2 Phân tích kết quả điện di chỉ thị ISSR của 8 mẫu đỉnh lăng nghiên cứu.....	55
2.7.3 Phân tích thống kê	55
Chương 3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	56
3.1 Đánh giá hàm lượng axit oleanolic của 18 mẫu giống đỉnh lăng và xác định trình tự DNA barcode của 8 mẫu giống ĐLLN	56
3.1.1 Kết quả đánh giá hàm lượng axit oleanolic của 18 mẫu giống đỉnh lăng.....	56
3.1.2. Xác định trình tự 3 vùng gen DNA barcode của 8 mẫu giống ĐLLN	57
3.2 Cảm ứng tạo mô sẹo và tạo phôi vô tính cây ĐLLN.....	60
3.2.1 Ảnh hưởng của nồng độ 2,4-D đến sự cảm ứng tạo mô sẹo của mẫu phiến lá và cuống lá cây ĐLLN <i>in vitro</i>	60
3.2.2 Ảnh hưởng của 2,4-D đến sự cảm ứng tạo mô sẹo của mẫu phiến lá và cuống lá cây ĐLLN từ vườn ươm.....	65
3.2.3 Ảnh hưởng của nồng độ BA và IBA đến khả năng tạo phôi vô tính ĐLLN từ mô sẹo	72
3.2.4 Ảnh hưởng của nồng độ BA và NAA đến khả năng tạo phôi vô tính ĐLLN từ mô sẹo	75
3.2.5 Ảnh hưởng của loại và nồng độ đường (sucrose, fructose, glucose, maltose) đến khả năng tạo phôi vô tính ĐLLN	81
3.3 Nhân phôi vô tính, tạo phôi trưởng thành và tạo cây từ phôi vô tính ĐLLN.....	85
3.3.1 Ảnh hưởng của trọng lượng mô phôi nuôi cấy ban đầu và tốc độ lắc đến sự gia tăng sinh khối mô phôi vô tính trên hệ thống nuôi cấy lỏng lắc.....	85
3.3.2 Ảnh hưởng của tốc độ sục khí đến sự gia tăng sinh khối phôi vô tính ĐLLN nhân nuôi bằng bioreactor.....	89

3.3.3 Ảnh hưởng của nồng độ kinetin và IBA đến khả năng tạo phôi vô tính ĐLLN trưởng thành.....	91
3.3.4 Ảnh hưởng của môi trường khoáng đến sự tạo cây từ phôi vô tính ĐLLN	95
3.4 Khảo sát sự sinh trưởng ở giai đoạn vườn ươm của dòng ĐLLN đã được nuôi cấy và đánh giá độ đồng nhất di truyền cây con.....	100
3.4.1 Ảnh hưởng của giá thể và chế độ che sáng đến sự sinh trưởng của cây con ĐLLN trong vườn ươm giai đoạn đầu sau <i>in vitro</i>	100
3.4.2 Ảnh hưởng của giá thể và liều lượng đạm đến sinh trưởng của cây ĐLLN ra bầu trong vườn ươm.....	103
3.4.3 Ảnh hưởng của giá thể và liều lượng lân đến sinh trưởng của cây ĐLLN ra bầu trong vườn ươm.....	110
3.4.4 Đánh giá độ đồng nhất di truyền cây con bằng chỉ thị ISSR	117
3.5 Quy trình nhân giống cây ĐLLN bằng phương pháp nuôi cấy phôi vô tính	119
KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ.....	124
DANH MỤC CÔNG TRÌNH CỦA TÁC GIẢ.....	126
TÀI LIỆU THAM KHẢO	127
PHỤ LỤC	

DANH SÁCH CÁC CHỮ VIẾT TẮT

2,4-D	2,4-Dichlorophenoxy acetic acid
ABA	Abscisic acid
ADP	Adenosine diphosphat
ATP	Adenosine triphosphat
BA	Benzyl adenine
BAP	Benzyl amino purine
BOL	Barcode of Life (Mã vạch sự sống)
Bp	Base pair
CBOL	Consortium for the Barcode of Life (Hiệp hội mã vạch sự sống)
CEC	Cation Exchange Capacity (Khả năng trao đổi cation)
cs	Cộng sự
CTAB	Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide
ĐC	Đối chứng
ĐHST	Điều hòa sinh trưởng
ĐLLN	Đỉnh lãng lá nhỏ
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	Deoxyribonucleotide triphosphate
EC	Electrical Conductivity (Độ dẫn điện)
EDTA	Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid
EM	Effective Microorganisms (Vi sinh vật hữu hiệu)
GA	Gibberellin
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Sắc ký lỏng hiệu năng cao)

IAA	Indole-3-acetic acid
IBA	Indole-3-butyric acid
IDT	Integrated DNA Technologies
IEDC	Induced Embryogenic Determined Cell (Tế bào phát sinh phôi)
ISSR	Inter Simple Sequence Repeats (Các chuỗi lặp lại đơn giản giữa)
Kb	Kilo base
LLL	Lần lặp lại
<i>matK</i>	Maturase K
MeOH	Methanol
MS	Murashige and Skoog
NAA	1- Naphthalene acetic acid
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NSC	Ngày sau cấy
NST	Ngày sau trồng
OD	Optical density (Mật độ quang)
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEDC	Pre – Embryogenic Determined Cell (Tế bào tiền phôi)
PEM	Proembryogenic Mass (Khối tiền phôi)
PLB	Protocorm-like body
PVS	Phân vi sinh
<i>rbcL</i>	Ribulose-bisphosphate carboxylase
RNA	Ribonucleic acid
Rnase	Ribonuclease
SDS	Sodium dodecyl sulphate

SSR	Simple Sequence Repeat (Các chuỗi lặp lại đơn giản)
STRs	Short Tandem Repeats
TBE	Tris – borate – EDTA
TDZ	Thidiazuron
TE	Tris – EDTA
<i>trnH-psbA</i>	tRNA-His and photosystem II protein D1

DANH SÁCH CÁC BẢNG

Bảng	Trang
Bảng 1.1 Sự khác nhau giữa quá trình tạo phôi ở cây một và hai lá mầm (Merkle và cs, 1995).....	12
Bảng 2.1 Danh sách 18 mẫu giống đình lăng được thu thập.....	33
Bảng 2.2 Các cặp primer sử dụng khuếch đại vùng gene DNA barcode	35
Bảng 2.3 Thành phần hoá chất sử dụng trong phản ứng PCR.....	38
Bảng 2.4 Chu kỳ nhiệt cơ bản cho phản ứng PCR với cặp primer <i>matK</i>	38
Bảng 2.5 Chu kỳ nhiệt cơ bản cho phản ứng PCR với cặp primer <i>rbcL</i>	38
Bảng 2.6 Chu kỳ nhiệt cơ bản cho phản ứng PCR với cặp primer <i>trnH-psbA</i>	39
Bảng 2.7 Đặc điểm thời tiết khí hậu trong thời gian thí nghiệm năm 2018	47
Bảng 2.8 Đặc điểm lý hóa tính của giá thể thí nghiệm 10.....	48
Bảng 2.9 Đặc điểm lý hóa tính của giá thể ở thí nghiệm 11	48
Bảng 2.10 Các primer ISSR sử dụng trong nghiên cứu	53
Bảng 2.11 Thành phần hoá chất sử dụng trong phản ứng PCR.....	53
Bảng 2.12 Chu kỳ nhiệt cơ bản cho phản ứng PCR của các primer ISSR	54
Bảng 3.1 Hàm lượng axit oleanolic của 18 mẫu giống đình lăng	56
Bảng 3.2 Vị trí các nucleotide khác biệt trên vùng gen <i>trnH-psbA</i> của 8 mẫu giống ĐLLN.....	59
Bảng 3.3 Thời gian hình thành mô sẹo (NSC) và tỷ lệ tạo mô sẹo (%) của mẫu phiến lá và cuống lá cây ĐLLN <i>in vitro</i>	60
Bảng 3.4 Đường kính mô sẹo và trọng lượng tươi của mẫu phiến lá và cuống lá cây ĐLLN <i>in vitro</i> thời điểm 60 NSC	61
Bảng 3.5 Thời gian (NSC) và tỷ lệ tạo mô sẹo (%) của mẫu phiến lá và cuống lá cây ĐLLN từ vườn ươm ở 60 NSC	65
Bảng 3.6 Đường kính mô sẹo, trọng lượng tươi của mẫu phiến lá và cuống lá cây ĐLLN từ vườn ươm thời điểm 60 NSC	66
Bảng 3.7 Ảnh hưởng của nồng độ BA và IBA đến tỷ lệ mẫu cấy tạo phôi vô tính (%) ĐLLN từ mô sẹo thời điểm 60 NSC	72

Bảng 3.8 Ảnh hưởng của nồng độ BA và IBA đến số phôi vô tính hình thành/mẫu cây ĐLLN từ mô sẹo thời điểm 30 - 60 NSC.....	74
Bảng 3.9 Ảnh hưởng của nồng độ BA và NAA đến tỷ lệ mẫu cây tạo phôi vô tính (%) ĐLLN từ mô sẹo thời điểm 60 NSC	75
Bảng 3.10 Ảnh hưởng của nồng độ BA và NAA đến số phôi vô tính hình thành/mẫu cây ĐLLN từ mô sẹo thời điểm 30 - 60 NSC.....	77
Bảng 3.11 Ảnh hưởng của loại và nồng độ đường khác nhau đến tỷ lệ mẫu cây (%) tạo phôi vô tính ĐLLN từ mô sẹo.....	81
Bảng 3.12 Ảnh hưởng của loại và nồng độ đường khác nhau đến số phôi vô tính hình thành/mẫu cây ĐLLN từ mô sẹo thời điểm 30 - 60 NSC.....	83
Bảng 3.13 Ảnh hưởng của trọng lượng mô phôi nuôi cấy ban đầu và tốc độ lắc đến sự gia tăng sinh khối của mô phôi vô tính ĐLLN (g) trên hệ thống nuôi cấy lỏng lắc.....	85
Bảng 3.14 Ảnh hưởng của trọng lượng mô phôi nuôi cấy ban đầu và tốc độ lắc đến hệ số nhân sinh khối mô phôi vô tính ĐLLN trên hệ thống nuôi cấy lỏng lắc.....	86
Bảng 3.15 Ảnh hưởng của tốc độ sục khí đến sự gia tăng sinh khối (g) và hệ số nhân sinh khối phôi vô tính ĐLLN (lần) thời điểm 30 NSC	89
Bảng 3.16 Ảnh hưởng của nồng độ kinetin và IBA đến số phôi hữu hiệu, phôi vô hiệu và tỷ lệ phôi hữu hiệu (%) thời điểm 30 NSC	92
Bảng 3.17 Ảnh hưởng của 4 môi trường khoáng đến số lá (lá/cây) của cây ĐLLN từ phôi vô tính.....	95
Bảng 3.18 Ảnh hưởng của 4 môi trường khoáng đến số rễ (rễ/cây) của cây ĐLLN từ phôi vô tính thời điểm 21 - 84 NSC	96
Bảng 3.19 Ảnh hưởng của 4 môi trường khoáng đến chiều dài rễ (cm) của cây ĐLLN từ phôi vô tính thời điểm 84 NSC.....	96
Bảng 3.20 Ảnh hưởng của 4 môi trường khoáng đến chiều cao của cây ĐLLN (cm) từ phôi vô tính thời điểm 21 - 84 NSC.....	97

Bảng 3.21 Ảnh hưởng của 4 môi trường khoáng đến trọng lượng tươi (g/cây) và trọng lượng khô (g/cây) của cây ĐLLN từ phôi vô tính thời điểm 84 NSC.....	98
Bảng 3.22 Ảnh hưởng của giá thể và chế độ che sáng đến tỷ lệ sống (%) của cây con ĐLLN trong vườn ươm thời điểm 21 NST	100
Bảng 3.23 Ảnh hưởng của giá thể và chế độ che sáng đến chiều cao cây con ĐLLN (cm) trong vườn ươm thời điểm 21 NST	101
Bảng 3.24 Ảnh hưởng của giá thể và chế độ che sáng đến số lá (lá/cây) của cây con ĐLLN trong vườn ươm thời điểm 21 NST.....	101
Bảng 3.25 Ảnh hưởng của giá thể và chế độ che sáng đến trọng lượng tươi và trọng lượng khô của cây con ĐLLN trong vườn ươm ở 21 NST	102
Bảng 3.26 Ảnh hưởng của giá thể và liều lượng đạm đến chiều cao cây ĐLLN (cm) trong vườn ươm thời điểm 10 - 70 NST	103
Bảng 3.27 Ảnh hưởng của giá thể và liều lượng đạm đến số lá (lá/cây) của cây ĐLLN trong vườn ươm thời điểm 10 - 70 NST	105
Bảng 3.28 Ảnh hưởng của giá thể và liều lượng đạm đến số rễ (rễ/cây) của cây ĐLLN trong vườn ươm thời điểm 70 NST.....	106
Bảng 3.29 Ảnh hưởng của giá thể và liều lượng đạm đến chiều dài rễ (cm) của cây ĐLLN trong vườn ươm thời điểm 70 NST	107
Bảng 3.30 Ảnh hưởng của giá thể và liều lượng đạm đến trọng lượng thân lá tươi (g/cây) của cây ĐLLN trong vườn ươm thời điểm 70 NST.....	108
Bảng 3.31 Ảnh hưởng của giá thể và liều lượng đạm đến trọng lượng rễ tươi (g/cây) của cây ĐLLN trong vườn ươm thời điểm 70 NST	109
Bảng 3.32 Ảnh hưởng của giá thể và liều lượng đạm đến tỷ lệ xuất vườn (%) của cây ĐLLN trong vườn ươm thời điểm 70 NST	110
Bảng 3.33 Ảnh hưởng của giá thể và liều lượng lân đến chiều cao (cm) của cây ĐLLN trong vườn ươm thời điểm 10 - 50 NST	111
Bảng 3.34 Ảnh hưởng của giá thể và liều lượng lân đến số lá (lá/cây) của cây ĐLLN trong vườn ươm thời điểm 10 - 50 NST	112

Bảng 3.35 Ảnh hưởng của giá thể và liều lượng lân đến số rễ (rễ/cây) của cây ĐLLN trong vườn ươm thời điểm 50 NST.....	113
Bảng 3.36 Ảnh hưởng của giá thể và liều lượng lân đến chiều dài rễ (cm) của cây ĐLLN trong vườn ươm thời điểm 50 NST	115
Bảng 3.37 Ảnh hưởng của giá thể và liều lượng lân đến trọng lượng thân lá tươi (g/cây) của cây ĐLLN trong vườn ươm thời điểm 50 NST	115
Bảng 3.38 Ảnh hưởng của giá thể và liều lượng lân đến trọng lượng rễ tươi (g/cây) của cây ĐLLN trong vườn ươm thời điểm 50 NST	116
Bảng 3.39 Ảnh hưởng của giá thể và liều lượng lân đến tỷ lệ xuất vườn (%) của cây ĐLLN trong vườn ươm.....	117
Bảng 3.40 Sản phẩm khuếch đại của 12 primer ISSR trên 8 mẫu giống ĐLLN....	118

DANH SÁCH CÁC HÌNH

Hình	Trang
Hình 1.1 Các loài đỉnh lăng ở Việt Nam	6
Hình 1.2 Cây đỉnh lăng lá nhỏ (<i>Polyscias fruticosa</i> (L.) Harms).....	7
Hình 1.3 Quy trình kỹ thuật DNA barcode	23
Hình 2.1 Sơ đồ tóm tắt các nội dung nghiên cứu	32
Hình 2.2 Cây ĐLLN nuôi cấy mô 8 tuần tuổi dùng trồng ở vườn ươm.....	47
Hình 2.3 Toàn cảnh bố trí thí nghiệm 10	49
Hình 3.1 Sản phẩm khuếch đại vùng gen <i>matK</i> ở 8 mẫu giống ĐLLN	57
Hình 3.2 Sản phẩm khuếch đại vùng gen <i>rbcL</i> ở 8 mẫu giống ĐLLN	58
Hình 3.3 Sản phẩm khuếch đại vùng gen <i>trnH-psbA</i> ở 8 mẫu giống ĐLLN.	58
Hình 3.4 Mô sẹo từ mẫu phiến lá ĐLLN <i>in vitro</i> trên môi trường MS có bổ sung 2,4-D với nồng độ 0 mg/L (1), 1 mg/L (2), 2 mg/L (3), và 3 mg/L thời điểm 60 NSC (1 - 4).....	62
Hình 3.5 Mô sẹo từ mẫu cuống lá ĐLLN <i>in vitro</i> trên môi trường MS có bổ sung 2,4-D với nồng độ 0 mg/L (5), 1 mg/L (6), 2 mg/L (7), và 3 mg/L thời điểm 60 NSC (5 – 8).....	63
Hình 3.6 Mô sẹo từ mẫu phiến lá cây ĐLLN <i>in vitro</i> trên môi trường MS có bổ sung 2,4-D với nồng độ 2 mg/L thời điểm 50 NSC (1) và 60 NSC (2).	64
Hình 3.7 Mô sẹo hình thành từ mẫu phiến lá ĐLLN ngoài vườn ươm trên môi trường MS có bổ sung 2,4-D 0 mg/L (1), 1 mg/L (2), 2 mg/L (3), và 3 mg/L thời điểm 60 NSC (1 – 4).....	68
Hình 3.8 Mô sẹo hình thành từ mẫu cuống lá ĐLLN ngoài vườn ươm trên môi trường MS có bổ sung 2,4-D 0 mg/L (5), 1 mg/L (6), 2 mg/L (7), và 3 mg/L thời điểm 60 NSC (5 – 8).....	69
Hình 3.9 Mô sẹo hình thành từ mẫu phiến lá ĐLLN từ vườn ươm trên môi trường MS có bổ sung 2,4-D với nồng độ 2 mg/L thời điểm 50 NSC (1) và 60 NSC (2).	70

Hình 3.10 Hai loại mẫu lá <i>in vitro</i> dùng nuôi cấy và mô sẹo hình thành thời điểm 40 NSC.....	71
Hình 3.11 Các loại mô sẹo hình thành thời điểm 50 NSC.	71
Hình 3.12 Phôi vô tính ĐLLN hình thành trên môi trường MS có bổ sung BA và IBA thời điểm 45 NSC.	73
Hình 3.13 Phôi vô tính ĐLLN hình thành trên môi trường MS có bổ sung BA và NAA thời điểm 45 NSC.....	76
Hình 3.14 Sự khác biệt về khả năng sinh phôi từ mô sẹo được hình thành trên môi trường MS có BA kết hợp với IBA và BA kết hợp với NAA thời điểm 30 NSC.....	79
Hình 3.15 Một số dạng phát triển khác nhau của phôi vô tính ĐLLN.....	80
Hình 3.16 Cụm phôi vô tính ĐLLN hình thành trên môi trường MS + BA 1,5 mg/L + NAA 0,1 mg/L có bổ sung đường sucrose (1), glucose (2), fructose (3), maltose (4) với các nồng độ khác nhau thời điểm 45 NSC	84
Hình 3.17 Mô phôi vô tính ĐLLN trên hệ thống lỏng lắ thời điểm 30 NSC.	87
Hình 3.18 Mô phôi vô tính ĐLLN nuôi cấy trên hệ thống lỏng lắ thời điểm 30 NSC.....	88
Hình 3.19 Phôi vô tính ĐLLN nuôi cấy trên hệ thống lỏng lắ thời điểm 30 NSC.....	88
Hình 3.20 Nuôi nhân phôi vô tính ĐLLN bằng hệ thống bioreactor sục khí.....	90
Hình 3.21 Phôi vô tính ĐLLN thu được qua nuôi cấy bằng bioreactor thời điểm 30 NSC.....	90
Hình 3.22 Các bình nuôi phôi vô tính ĐLLN thời điểm 30 NSC trên hệ thống lỏng lắ.....	91
Hình 3.23 Phôi vô tính ĐLLN qua các bước hình thành cây con thông qua kết hợp nuôi lỏng lắ và nuôi trên môi trường đặc.....	93
Hình 3.24 Bioreactor nuôi cấy phôi đơn ở thời điểm 30 NSC (1), cây con từ phôi (2) và cây phát triển từ phôi (3).....	94

Hình 3.25 Cây ĐLLN nuôi cấy trên 4 loại môi trường khoáng khác nhau thời điểm 84 NSC.....	97
Hình 3.26 Thí nghiệm về ảnh hưởng của giá thể và liều lượng phân đạm đến cây đỉnh lăng lá nhỏ thời điểm 70 NST	104
Hình 3.27 Ảnh hưởng của giá thể và liều lượng đạm đến cây ĐLLN thời điểm 70 NST	107
Hình 3.28 Thí nghiệm về ảnh hưởng của giá thể và liều lượng phân lân đến cây đỉnh lăng lá nhỏ thời điểm 50 NST	112
Hình 3.29 Ảnh hưởng của giá thể và liều lượng lân đến cây ĐLLN thời điểm 50 NST	114
Hình 3.30 Sản phẩm PCR của primer UBC841 khuếch đại từ các mẫu lá đỉnh lăng D1 - D8, M: thang DNA 1 kb.	117
Hình 3.31 Các sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1,5% từ primer UBC841 khuếch đại từ các mẫu lá đỉnh lăng N1 - N20, M: thang DNA 1 kb.	119
Hình 3.32 Các sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1,5% từ primer UBC844 khuếch đại từ các mẫu lá đỉnh lăng N1 - N20, M: thang DNA 1 kb	119
Hình 3.33 Các sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1,5% từ primer UBC856 khuếch đại từ các mẫu lá đỉnh lăng N1 - N20, M: thang DNA 1 kb.	119
Hình 3.34 Tóm tắt quy trình nhân giống cây ĐLLN bằng nuôi cấy phôi vô tính	120

MỞ ĐẦU

Cây đinh lăng - thuộc họ Ngũ gia bì/ họ Sâm (Araliaceae) là một trong những nguồn dược liệu đã được con người biết đến và sử dụng từ lâu. Đinh lăng được sử dụng làm gia vị trong một số món ăn đặc biệt giàu giá trị bồi bổ sức khỏe. Đinh lăng cũng được sử dụng như một vị thuốc trong y học cổ truyền do chứa nhiều hợp chất có dược tính cao thuộc nhóm saponin như axit oleanolic, polyacetylene; riêng axit oleanolic có tác dụng chống oxy hóa, chống căng thẳng thần kinh và các triệu chứng trầm cảm (Vo Duy Huan và cs, 1998). Axit oleanolic còn có tiềm năng như một loại thuốc có khả năng hạn chế sự phát triển của tế bào ung thư và chống đông máu (Zhang và cs, 2017).

Ở Việt Nam, đến nay đã ghi nhận một số công trình nghiên cứu về đa dạng di truyền, kiểu gene và hàm lượng các hoạt chất của một số giống đinh lăng, nhưng còn rất hạn chế. Công tác kiểm nghiệm nguyên liệu dược từ cây đinh lăng chủ yếu vẫn dựa vào phân tích hình thái của mẫu vật nên độ chính xác chưa cao. Do vậy, các nhà phân loại học hiện đang tiếp cận sử dụng một số phương pháp dựa trên cơ sở kỹ thuật sinh học phân tử để nhận biết các mẫu sinh học khác nhau, trong đó mã vạch DNA (DNA barcode) được đánh giá như một kỹ thuật có hiệu quả. Việc nghiên cứu xây dựng mã vạch DNA đặc trưng cho các loài đinh lăng sẽ tạo cơ sở cho các nghiên cứu tiếp theo, theo hướng tiêu chuẩn hóa giống trong canh tác và kiểm định hợp chất thứ cấp trong nguyên liệu dược.

Những năm gần đây, diện tích trồng cây đinh lăng cung cấp nguyên liệu dược ngày càng tăng. Từ đó nhu cầu về cây giống đồng đều, chất lượng tốt cũng tăng lên. Trước đây và hiện nay cây giống đinh lăng được tạo ra chủ yếu từ giâm cành theo phương pháp truyền thống với hệ số nhân giống thấp, cây con không có rễ chính. Cũng đã ghi nhận được kết quả nghiên cứu ứng dụng công nghệ khí canh khi chuyển

cây con *in vitro* ra vườn ươm (có mái che) và nhân giống bằng kỹ thuật giâm cành trên hệ thống khí canh (Trương Thanh Hưng và cs, 2018). Kỹ thuật vi giâm cành *in vitro* (nuôi cấy các đoạn cắt chồi ngọn, đoạn đốt thân) cũng đã được ứng dụng đạt được một số kết quả nhất định, nhưng vẫn chưa cải thiện được hệ số nhân giống. Nhân giống thông qua con đường tạo phôi vô tính (somatic embryo) là phương pháp được các nhà nghiên cứu đánh giá cao, có tiềm năng ứng dụng do hệ số nhân giống rất cao, đồng thời khắc phục được các hạn chế của các phương pháp nhân giống truyền thống nêu trên.

Trước những tồn tại/hạn chế của công tác giống đình lăng hiện nay và trên cơ sở một số kết quả công bố về tạo phôi vô tính trước đây trên cây trồng họ Nhân sâm nói chung và đình lăng nói riêng, việc nhân giống cây đình lăng lá nhỏ bằng nuôi cấy phôi vô tính được thực hiện. Ngoài ra, việc xây dựng kỹ thuật trồng, chăm sóc cây đình lăng giai đoạn sau nuôi cấy mô sẽ góp phần hoàn thiện quy trình nhân giống cung cấp nguồn cây giống tốt phục vụ sản xuất.

Mục tiêu của đề tài

Mục tiêu tổng quát

Xây dựng quy trình nhân giống hoàn chỉnh cây đình lăng lá nhỏ thông qua con đường cảm ứng tạo phôi vô tính nhằm đạt được hệ số nhân cao, chất lượng cây giống đồng nhất.

Mục tiêu cụ thể

Xác định hàm lượng axit oleanolic của 18 mẫu giống đình lăng và trình tự DNA barcode của 8 mẫu giống ĐLLN.

Xác định môi trường nuôi cấy thích hợp hình thành loại mô sẹo có khả năng phát sinh phôi vô tính.

Xác định môi trường và chế độ nuôi cấy phù hợp để cảm ứng, nhân sinh khối phôi và tạo cây hoàn chỉnh từ phôi.

Xác định điều kiện thuần dưỡng phù hợp đối với cây con được tạo ra từ phôi vô tính.

Ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài

Ý nghĩa khoa học

Luận án cung cấp dữ liệu khoa học về sự hình thành phôi vô tính gián tiếp thông qua mô sẹo có nguồn gốc từ các mẫu lá đỉnh lãng lá nhỏ khác nhau.

Xây dựng được quy trình chi tiết cho các công đoạn tạo mô sẹo phôi hóa, tạo và nhân phôi, tạo cây hoàn chỉnh đồng nhất về di truyền và thuần dưỡng cây con giai đoạn vườn ươm.

Luận án đã góp phần hoàn thiện được một số phương pháp bài bản, chi tiết và cung cấp được nhiều dữ liệu khoa học về tạo phôi vô tính có thể sử dụng để tham khảo cho công tác giảng dạy và nghiên cứu khoa học trên đối tượng cây đỉnh lãng nói riêng và cây dược liệu nói chung.

Ý nghĩa thực tiễn

Kết quả nghiên cứu của luận án đã xác định được nguồn mẫu đỉnh lãng có hàm lượng axit oleanolic cao sử dụng để nhân giống thông qua công nghệ phôi vô tính tạo cây con có độ đồng nhất di truyền, hệ số nhân giống cao cung cấp số lượng lớn cây giống đáp ứng cho sản xuất ở quy mô lớn.

Đối tượng và phạm vi nghiên cứu của đề tài

Đối tượng nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu là mô và phôi của cây đỉnh lãng lá nhỏ ở các giai đoạn và thời kỳ phát triển khác nhau.

Phạm vi nghiên cứu

Đề tài áp dụng kỹ thuật tạo phôi vô tính gián tiếp thông qua mô sẹo có nguồn gốc từ lá đỉnh lãng lá nhỏ dưới ảnh hưởng của các môi trường dinh dưỡng và chất điều hòa sinh trưởng thực vật. Ngoài ra sinh trưởng của cây đỉnh lãng hình thành từ phôi vô tính được khảo sát nhằm đánh giá hiệu quả của cách thuần dưỡng cây con giai đoạn vườn ươm.

Điểm mới của đề tài

Xác định được vùng gen *trnH-psbA* là vùng DNA barcode tiềm năng ứng dụng trong việc nhận diện mẫu giống ĐLLN có hàm lượng axit oleanolic cao.

Nhân phôi vô tính cây đỉnh lã lá nhỏ trong bioreactor. Phương pháp tạo phôi vô tính có hệ số nhân giống cao hơn các phương pháp khác, cây từ phôi đồng nhất di truyền với cây mẹ và cây có rễ chính tạo nên giá trị thương phẩm cao.

Bước đầu xây dựng được một quy trình nhân giống từ khâu tạo phôi vô tính cho đến khi hình thành cây con giống xuất vườn. Đây là giải pháp hiệu quả trong nhân giống cây đỉnh lã phục vụ cho sản xuất ở quy mô lớn.

Chương 1

TỔNG QUAN TÀI LIỆU

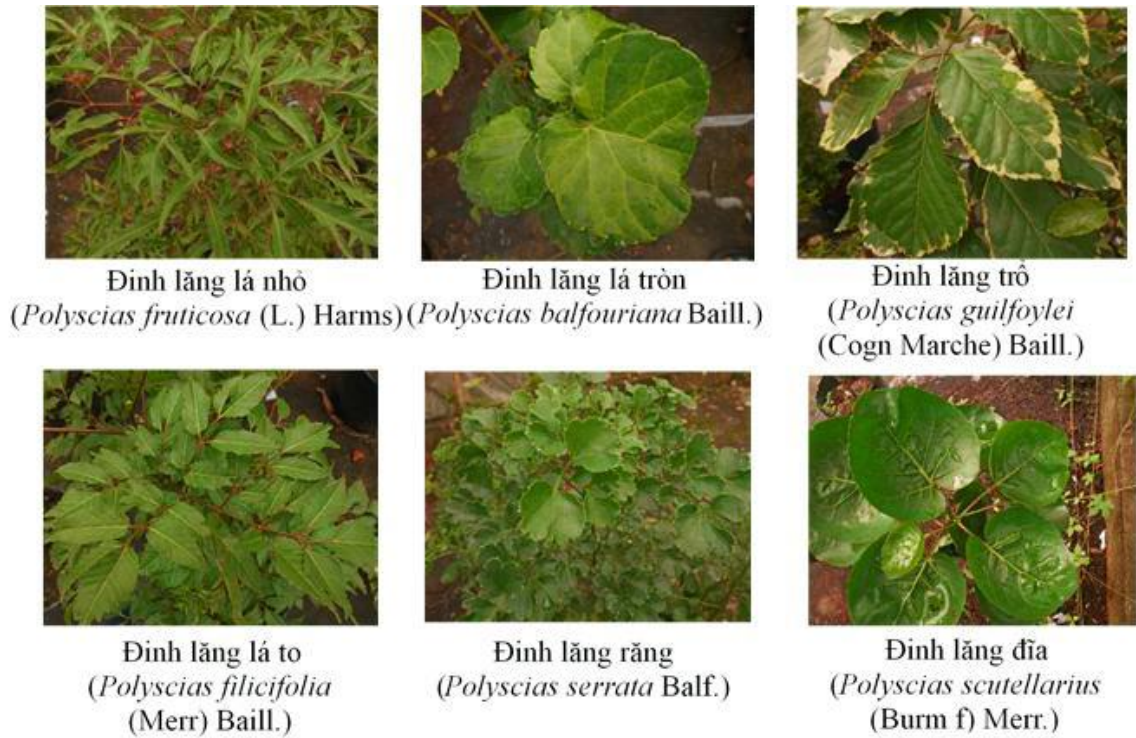
1.1 Giới thiệu sơ lược về cây đinh lăng

1.1.1 Nguồn gốc và sự phân bố của cây đinh lăng

Cây đinh lăng có nguồn gốc ở vùng đảo Polynésie thuộc Thái Bình Dương. Chi đinh lăng có gần 100 loài phân bố ở các vùng nhiệt đới, cận nhiệt đới, nhiều nhất là vùng đảo Thái Bình Dương. Đinh lăng được trồng nhiều ở Đông Nam Á và Châu Á Thái Bình Dương như Lào, Malaysia, Indonesia, Myanma, Papua New Guinea, Philippines, Singapore, Thái Lan và Việt Nam. Ở Việt Nam, đinh lăng đã được trồng từ rất lâu trên khắp cả nước trong các vườn gia đình, đình chùa, trạm xá bệnh viện (Võ Văn Chi và Trần Hợp, 1999).

1.1.2 Phân loại và sự đa dạng của cây đinh lăng

Theo Phạm Hoàng Hộ (2003), ở Việt Nam có sáu loài đinh lăng gồm đinh lăng lá nhỏ (*Polyscias fruticosa* (L.) Harms), đinh lăng lá tròn (*Polyscias balfouriana* Bail.), đinh lăng trỏ (*Polyscias guilfoylei* (Cogn Marche) Bail.) hay còn gọi là đinh lăng viền bạc, đinh lăng lá to (*Polyscias filicifolia* (Merr) Bail.) còn gọi là đinh lăng rắng, đinh lăng đĩa (*Polyscias scutellarius* (Burm f.) Merr.) có lá to tròn, đinh lăng răng (*Polyscias serrata* Balf.) có lá 2 lần kép, thân màu xám trắng. Tất cả các loài đinh lăng đều được dùng làm thuốc, tuy nhiên đinh lăng lá nhỏ được trồng, nghiên cứu và sử dụng phổ biến nhất. Đinh lăng lá nhỏ (*Polyscias fruticosa* (L.) Harms) còn có tên gọi khác là cây gỏi cá, nam dương sâm, là một loại cây thuộc chi đinh lăng (*Polyscias*), họ Ngũ gia bì. Trong chi *Polyscias* có 100 loài. Một số loài được trồng làm cây cảnh và cây thuốc.



Hình 1.1 Các loài đình lăng ở Việt Nam

1.1.3 Đặc điểm hình thái của cây đình lăng lá nhỏ

Đình lăng lá nhỏ (*Polyscias fruticosa* (L.) Harms) có dạng cây bụi xanh tốt quanh năm, cao 0,5 - 2 m, thân tròn sần sùi không gai, có nhiều vết sẹo lồi to màu nâu xám do lá rụng để lại. Lá mọc cách, kép lông chim 2 - 3 lần, dài 20 - 40 cm. Lá chét chia thùy nhọn không đều, màu xanh, bóng ở mặt dưới nhiều hơn, gốc lá và phiến lá thuôn nhọn dài 3 - 5 cm, rộng 0,5 - 1,5 cm; gân lá hình lông chim, gân chính nổi rõ với 3 - 4 cặp gân phụ. Cuống lá dài, tròn, màu xanh sậm, có những đốm xanh nhạt trên cuống, đáy cuống phình to thành bẹ lá. Lá kèm dạng phiến mỏng dính hai bên bẹ lá. Rễ cong queo, mặt cắt ngang có màu vàng nhạt. Mặt ngoài rễ màu trắng xám có nhiều vết nhăn dọc, nhiều lỗ vỏ nằm ngang và vết tích của các rễ con. Hoa đình lăng màu lục nhạt hoặc trắng xám, quả dẹt, màu trắng bạc (Đỗ Huy Bích, 1993).



Hình 1.2 Cây đình lăng lá nhỏ (*Polyscias fruticosa* (L.) Harms)

1.1.4 Nhu cầu về điều kiện sinh thái của cây đình lăng

Đình lăng nói chung, đình lăng lá nhỏ nói riêng là cây lâu năm, có thể sống đến vài chục năm, ưa ẩm, không chịu được ngập úng, chịu hạn tương đối, ưa sáng, nhưng chịu được bóng, tuy nhiên cây phát triển yếu. Cây đình lăng phân bố rộng trên khắp cả nước, ở tất cả các vùng sinh thái, có thể phát triển trên nhiều loại đất, nhưng tốt nhất là đất pha cát. Cây phát triển mạnh trong môi trường có độ ẩm trung bình, nhiệt độ thích hợp từ 16 đến 29°C. Cây phát triển nhanh nhất vào mùa Thu, mùa Xuân và mùa hoa quả thường vào tháng 4 đến tháng 7 (Võ Văn Chi và Trần Hợp, 1999).

1.1.5 Các thành phần hóa học chính và giá trị dược tính của cây đình lăng

Trong rễ đình lăng có chứa alkaloid, glycoside, saponin flavonoid, 13 loại axit amin (trong đó có lysin, methionin, tryptophan, cystein là những axit amin không thể thay thế) và các hợp chất panaxydol, panoxydol, heptadeca - 1,8 (E) - dien - 4,6 diyn - 3,4 diol (Võ Xuân Minh, 1991). Các hợp chất này có tác dụng kháng khuẩn mạnh và chống được một số dạng ung thư. Trong lá đình lăng có chứa saponin triterpene, tinh dầu, phytosterol, tanin, axit hữu cơ, đường khử và hợp chất uronic. Saponin

triterpene có thành phần alkaloid và axit oleanolic, đây là một chất có tác dụng dược tính. Nghiên cứu của Lutomski và cs (1992) đã phân lập được từ rễ cây đinh lăng lá nhỏ 5 hợp chất polyacetylene và trong lá cũng tìm thấy 3 hợp chất, các chất này có tác dụng kháng khuẩn mạnh, trong đó chất panaxynol heptadeca - 1,8 - dien - 4,6 diyn - 3,10 diol có tác dụng chống một số dạng ung thư.

Với nhiều dược tính quý, cây đinh lăng đã thu hút được quan tâm nghiên cứu của các nhà khoa học; sản phẩm từ cây đinh lăng giúp cơ thể phục hồi sức khỏe nhanh (Ngô Ứng Long, 1977). Tăng tiết niệu gấp trên 5 lần, tăng sức đề kháng (Đỗ Tất Lợi, 2004; Nguyễn Khắc Viện, 1989). Chống viêm, giúp hạ sốt và giảm đau, tác dụng chống stress tương tự như nhân sâm (Bensita và cs, 1998). Theo Nguyễn Thị Thu Hương và cs (2001), đinh lăng có tác dụng tăng lực, tăng sức đề kháng của cơ thể (Trần Thị Liên và cs, 2005), kích thích hoạt động của bộ não và nội tiết, chống trầm cảm, phục hồi thời gian ngủ bị rút ngắn bởi stress, giải tỏa lo âu mệt mỏi chống viêm và sơ vữa động mạch, chống oxy hóa, hạ cholesterol (Nguyễn Trần Châu và cs, 2007), bảo vệ gan, kích thích miễn dịch.

1.2 Hiện trạng công tác giống trong phát triển sản xuất cây đinh lăng

Hiện nay, diện tích sản xuất cây đinh lăng nguyên liệu ngày càng được mở rộng, do đó nhu cầu về cây giống trên thị trường có xu hướng tăng nhanh. Vì lý do này, nhu cầu sản xuất số lượng lớn cây giống chất lượng tốt và đồng nhất nhằm cung cấp nguồn nguyên liệu ổn định cho các công ty dược liệu là rất cần thiết. Tuy nhiên, việc sản xuất giống còn tự phát và chưa có được những nghiên cứu bài bản. Thực tế cho thấy, khi sản xuất ở quy mô lớn, việc nhân giống và trồng cây đinh lăng gặp rất nhiều trở ngại như hệ số nhân giống thấp, cây sinh trưởng không đồng đều, tỷ lệ cây xuất vườn thấp (Ninh Thị Phíp, 2013). Hiện nay, có 2 phương pháp nhân giống cây đinh lăng là giâm cành và nuôi cấy mô.

Nhân giống bằng giâm cành vô tính giúp cây con giữ nguyên đặc tính di truyền của bố mẹ. Tuy nhiên nhược điểm của phương pháp nhân giống này là hệ số nhân giống thấp khó đáp ứng đủ cây giống khi sản xuất trên quy mô lớn, cây giâm hom

không có rễ chính mà chỉ có bộ rễ chùm, trong khi nhu cầu sử dụng lại cần có rễ chính.

Theo cách truyền thống, đỉnh lăng chủ yếu được nhân giống bằng phương pháp giâm cành. Nghiên cứu của Ninh Thị Phíp (2013) về một số biện pháp kỹ thuật tăng khả năng nhân giống của cây đỉnh lăng lá nhỏ cho thấy sử dụng giá thể đất và trấu hun giúp cây sinh trưởng phát triển tốt nhất. Sử dụng cành thân có chiều dài cành giâm từ 15 đến 20 cm, xử lý α -NAA nồng độ 2.000 - 3.000 ppm trong thời gian 3 - 5 giây giúp cành giâm ra rễ nhiều. Theo Nguyễn Thị Ngọc Trâm (2013) tốt nhất nên chọn hom ngọn làm giống và hom giống có chiều dài 10 cm, đường kính 1,0 - 1,2 cm, có 3 - 4 đốt trên hom. Sau khi cắt, hom giống chỉ nên bảo quản trong điều kiện khô mát từ 3 đến 5 ngày và tránh kéo dài trên 7 ngày nếu không sẽ ảnh hưởng đến tỷ lệ sống, tỷ lệ ra rễ. Giá thể cần phải xốp, thoáng khí, giữ và thoát nước tốt, sạch sâu bệnh, cỏ dại, không có thuốc trừ sâu và thành phần thường gồm đất, phân bò và tro trấu cho kết quả tốt nhất. Thời điểm chuyển hom ra ruộng thích hợp nhất là sau khi giâm 40 - 45 ngày.

Để đáp ứng đủ nhu cầu cây đỉnh lăng giống cho sản xuất, phương pháp nhân giống bằng nuôi cấy mô thường cho hệ số nhân giống cao, cây con được trẻ hóa, sạch bệnh, dễ tạo được quần thể đồng nhất, có khả năng sản xuất quanh năm.

Cây đỉnh lăng hình thành từ phôi có bộ rễ tương tự như cây từ hạt, tạo ra rễ chính ngoài ra qua nuôi cấy mô còn có khả năng tạo ra sinh khối lớn. Tuy nhiên, phương pháp nuôi cấy phôi còn một số tồn tại như cây giống tạo ra có kích thước nhỏ, giá thành cao hơn so với các phương pháp truyền thống; trong quá trình chuyển cây con ra vườn ươm, tỷ lệ cây con bị chết đáng kể do có sự khác biệt về điều kiện môi trường như ánh sáng, nhiệt độ, ẩm độ, ngoài ra sự khác biệt về môi trường giá thể cũng là yếu tố có ảnh hưởng rất nhiều (Vũ Ngọc Phượng và cs, 2001).

1.3 Phương pháp nuôi cấy mô và kỹ thuật tạo phôi vô tính ở thực vật

1.3.1 Cơ sở khoa học của nuôi cấy mô và quá trình tạo phôi vô tính

Cơ sở của phương pháp nuôi cấy mô và tế bào thực vật đó là dựa vào “tính toàn năng” (totipotency) của tế bào do Haberlandt đề xuất năm 1902. Theo quan niệm

sinh học hiện đại, “tính toàn năng” của tế bào là mỗi tế bào riêng rẽ đã phân hóa đều mang toàn bộ lượng thông tin di truyền cần thiết và đủ của sinh vật đó. Mỗi tế bào thực vật có thể thực hiện đầy đủ tất cả các chức năng sinh lý của cơ thể, khi gặp điều kiện thích hợp đều có thể phát triển thành một cơ thể hoàn chỉnh. Quá trình phát sinh hình thái trong nuôi cấy mô và tế bào thực vật là kết quả của quá trình phân hóa và phản phân hóa của tế bào.

Sự phát sinh phôi vô tính (somatic embryogenesis) là quá trình hình thành phôi hay cấu trúc giống phôi từ các tế bào soma mà không phải từ giao tử hoặc sản phẩm của quá trình kết hợp giao tử. Về mặt cơ chế phân tử sự phát sinh hình thái là một quá trình biểu hiện phức tạp của các gen và được kiểm soát nghiêm ngặt, đảm bảo cho các hệ thống, cơ quan trong cơ thể sống biệt hóa đúng thời điểm cần thiết trong quá trình phát triển cá thể (Merkle và cs, 1995; Yeung, 1995). Vì vậy, việc cảm ứng tạo phôi trải qua những sự kiện như kết thúc biểu hiện của các gen đang hoạt động và thay thế bằng chương trình biểu hiện gen phôi hóa để hình thành phôi vô tính.

Tạo phôi vô tính là kỹ thuật nhân giống thực vật *in vitro* quan trọng, cung cấp công cụ hữu ích cho các nghiên cứu cơ bản về sự phát triển phôi cũng như nhiều khía cạnh liên quan đến sinh lý thực vật (Komamine và cs, 2005).

1.3.1.1 Ưu điểm

(1) Kỹ thuật nuôi cấy mô cho hệ số nhân giống cao, đặc biệt đối với các loài thực vật có đặc trưng tái sinh theo cơ chế phát sinh phôi vô tính; (2) Có thể nhân phôi vô tính trong thời gian dài theo cơ chế tạo phôi thứ cấp; (3) Tái sinh thành cây hoàn chỉnh đơn giản, hình thành được rễ chính; (4) Thuận tiện trong nhân giống quy mô lớn thông qua nuôi cấy lỏng lác và sử dụng bioreactor; (5) Cho phép tạo hạt nhân tạo.

1.3.1.2 Nhược điểm

(1) Khi sử dụng mô sẹo để tạo phôi, khả năng tái sinh phôi bị giảm nếu kéo dài thời gian nuôi cấy và cuối cùng dẫn đến mất hẳn; (2) Khó xác định chính xác độ tuổi sinh lý của mẫu cấy. Điều này có thể ảnh hưởng đến việc cảm ứng tạo phôi vô tính, từ đó dẫn đến sự khác biệt về khả năng tạo phôi của các loại mô cấy khác nhau; (3) Không qua giai đoạn lai chéo như ở phôi hữu tính nên không có ưu thế lai xa.

1.3.2 Quá trình tạo phôi vô tính

Tùy theo từng kiểu tế bào ban đầu mà có hai con đường tạo phôi vô tính (Pierik, 1987; Merkle và cs, 1995; Yeung, 1995). Thứ nhất là con đường tạo phôi vô tính trực tiếp, trong đó phôi hình thành từ tế bào hoặc mô mà không qua giai đoạn tạo mô sẹo, các tế bào này được gọi là PEDC (Pre-Embryogenic Determined Cell - tế bào được xác định có khả năng tiền phôi hóa).

Thứ hai là con đường tạo phôi gián tiếp qua mô sẹo và các tế bào được cảm ứng tạo thành phôi được gọi là IEDC (Induced Embryogenic Determined Cell - tế bào được xác định có khả năng phôi hóa thông qua cảm ứng) (Pierik, 1987). Trong hai con đường trên, kiểu phát sinh gián tiếp là phương pháp phổ biến hơn để sản xuất phôi vô tính, đáp ứng nhiều mục đích khác nhau và đã được mô tả ở hàng trăm loài thực vật.

Vì mang những tiềm năng lớn có khả năng tạo ra số lượng lớn phôi vô tính trong một khoảng thời gian tương đối ngắn, các nghiên cứu hiện nay chủ yếu tập trung vào quá trình tạo phôi gián tiếp thông qua việc tạo thành mô sẹo (Dương Tấn Nhựt và cs, 2008). Nguyên tắc chung của phương pháp này là đưa các tế bào đã biệt hóa trở về lại trạng thái chưa biệt hóa rồi tiếp tục tái biệt hóa thành phôi, trong đó auxin đóng vai trò quan trọng để cảm ứng cho quá trình phản biệt hóa xảy ra (Pierik, 1987; Yeung, 1995).

Kỹ thuật tái sinh thực vật thông qua con đường tạo phôi vô tính bao gồm năm giai đoạn (Dương Tấn Nhựt, 2011):

(1) Nuôi cấy tạo phôi bằng cách chọn lựa mẫu cấy sơ cấp cấy vào môi trường có bổ sung chất điều hòa sinh trưởng, chủ yếu là auxin (đôi khi là cytokinin); (2) Tăng sinh khối trên môi trường rắn hoặc lỏng có bổ sung các chất điều hòa sinh trưởng tương tự như trên; (3) Trước giai đoạn trưởng thành của phôi sử dụng môi trường không có chất điều hòa sinh trưởng để ngăn sự tăng sinh đồng thời kích thích sự tạo phôi và phát triển sớm của phôi; (4) Giai đoạn phôi đạt trạng thái trưởng thành bằng cách nuôi cấy phôi trong môi trường bổ sung ABA và/hoặc giảm áp suất thẩm thấu; (5) Sự tái sinh cây con trên môi trường không có chất điều hòa sinh trưởng.

Quá trình tạo phôi vô tính xảy ra được ở cả cây một và hai lá mầm với đặc điểm chung là đều bắt đầu từ giai đoạn phôi hình cầu sau đó có phân cực hóa dẫn đến xuất hiện tiền lá mầm và tiền rễ, đây là những dấu hiệu quan trọng trong biệt hóa tế bào phôi (Merkle và cs, 1995). Phôi hình cầu là bước đánh dấu sự khởi đầu biệt hóa cấu trúc phôi, tiếp theo là thiết lập trục phôi với sự xuất hiện của các protein đặc hiệu ở nửa bán cầu trên và dưới phôi, từ đó hình thành cực rễ và cực chồi tại các nửa tương ứng (Yeung, 1995).

Tuy nhiên, tùy thuộc vào bản chất là cây một hay hai lá mầm mà quá trình tạo phôi có sự khác nhau ở từng giai đoạn phát triển và được tóm tắt như ở Bảng 1.1.

Bảng 1.1 Sự khác nhau giữa quá trình tạo phôi ở cây một và hai lá mầm (Merkle và cs, 1995)

Cây một lá mầm	Cây hai lá mầm
<i>Tái sinh phôi vô tính qua 3 giai đoạn:</i> hình cầu, hình khiên, lá mầm lớn	<i>Tái sinh phôi vô tính qua 4 giai đoạn:</i> hình cầu, tim, thủy lồi, hai lá mầm
<i>Sự kiện quan trọng nhất:</i> chuyển biến phôi hình cầu sang hình khiên	<i>Sự kiện quan trọng nhất:</i> hình cầu, hình tim
<i>Giai đoạn hình khiên:</i> phôi có dạng đặc trưng với tiền lá mầm và bao lá mầm bao quanh nó	<i>Giai đoạn hình tim và thủy lồi:</i> đánh dấu sự xuất hiện tiền lá mầm
<i>Giai đoạn lá mầm lớn:</i> phôi gồm một lá mầm lớn bao lấy mô phân sinh đỉnh và một cực rễ	<i>Giai đoạn hai lá mầm:</i> phôi gồm hai lá mầm lớn với mô phân sinh chồi ở giữa và một cực rễ

1.3.3 Ảnh hưởng của các loại mô đến sự tạo phôi vô tính

Sự hình thành những mô sẹo có cấu trúc giống phôi từ lá *in vitro* của cây hoa Cát tường trên môi trường MS có bổ sung 2,4-D 0,5 mg/L sau 30 ngày nuôi cấy. Sự hình thành phôi với tần suất cao khi chuyển những mô sẹo có cấu trúc giống phôi sang môi trường MS bổ sung BA 0,5 mg/L và NAA 1,0 mg/L sau 15 ngày nuôi cấy (Dương Tấn Nhựt và cs, 2006). Mẫu lá của cây sâm Ngọc Linh hình thành mô sẹo trên môi trường MS có bổ sung 2,4-D và TDZ. Các mô sẹo này có khả năng tạo phôi

trên môi trường có hàm lượng đường cao; các phôi này phát triển thành cây hoàn chỉnh và có củ nhỏ ở phần gốc (Dương Tấn Nhựt và cs, 2008).

Mô sẹo có nguồn gốc từ chồi non và vảy củ của cây hoa Lily có khả năng tạo phôi thông qua nuôi cấy lớp mỏng tế bào (1,5 - 2,0 mm) trên môi trường MS có bổ sung NAA 1,0 mg/L, TDZ 0,3 mg/L, sucrose 30 g/L, agar 8 g/L trong điều kiện tối. Sau khoảng 8 tuần nuôi cấy, các cụm mô sẹo của Lily có khả năng tạo phôi hình thành từ các lớp mỏng tế bào. Quá trình tạo phôi xảy ra khi chuyển các mô sẹo này sang môi trường nuôi cấy không có chất điều hòa sinh trưởng. Khoảng 80% phôi nảy mầm có đầy đủ cực chồi và cực rễ trên môi trường MS có bổ sung than hoạt tính 1 g/L. Cây con có nguồn gốc từ phôi có tỷ lệ sống sót rất cao. Phát triển bình thường và thích nghi tốt với điều kiện *ex vitro* (Dương Tấn Nhựt và cs, 2008). Protocorm-like body (PLB) của những mẫu lá hình thành qua nuôi cấy phát hoa lan Hồ điệp trong ống nghiệm tạo mô sẹo có cấu trúc giống phôi trên môi trường MS có bổ sung BA 2 mg/L, NAA 0,5 mg/L, nước dừa 20%, than hoạt tính 1 g/L, sucrose 30 g/L và agar 9 g/L. Những mô sẹo này có thể hình thành PLB và tái sinh thành cây trên môi trường Hyponex có bổ sung NAA 0,5 mg/L, BA 2 mg/L, sucrose 30 g/L, than hoạt tính 1 g/L và nước dừa 15%. Những cây lan Hồ điệp có nguồn gốc từ phôi được trồng ra vườn ươm đạt tỷ lệ sống sót cao (Dương Tấn Nhựt và cs, 2008).

1.3.4 Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng thực vật đến sự tạo phôi vô tính

1.3.4.1 Auxin

Có nhiều báo cáo đề cập đến vai trò của auxin trong giai đoạn khởi đầu tạo mô sẹo và phôi. Tác dụng của auxin đến sự tạo phôi có thể là do ảnh hưởng đến cơ chế ngừng biểu hiện gen (Lo Schiavo và cs, 1989). Các chất điều hòa sinh trưởng và stress đóng vai trò trung tâm trong điều hòa tín hiệu, dẫn đến việc tái thiết lập chương trình biểu hiện gen. Điều này dẫn đến kết quả là cảm ứng một loạt các tế bào phân chia dẫn đến tăng trưởng khối mô sẹo không tổ chức hoặc tăng trưởng có cực từ đó đưa đến tạo phôi (Dubits và cs, 1995).

Nhu cầu auxin hoặc các chất điều hòa sinh trưởng thực vật khác cho việc khởi động sự tạo phôi phần lớn lệ thuộc vào giai đoạn phát triển của mô cấy tại thời điểm

đó. Thông thường mô sẹo có khả năng tạo phôi được tạo thành ở môi trường có chứa auxin. Có một cơ chế mà tại đó auxin điều khiển sự tạo phôi là thông qua tác động axit hóa vách tế bào (Kutschera, 1994). Gần đây, ứng dụng một số chất như oligosaccharide, jasmonate, polyamine và brassinosteroid đã cho thấy có tác dụng tạo phôi ở một số loài thực vật.

Auxin rất cần cho việc tăng sinh PEM (proembryogenic mass), nhưng đồng thời lại là chất ức chế PEM phát triển thành phôi vô tính (Komamine và cs, 2005). Mức độ biệt hóa hình thành phôi xảy ra dưới sự hiện diện của auxin tùy thuộc vào từng loài thực vật. Kinh nghiệm cho thấy nếu không được thay môi trường mới mỗi tuần thì phôi vô tính sẽ khởi động ngay sự phát triển của nó.

Nồng độ auxin cao cần thiết cho sự cảm ứng hình thành phôi, song để phôi tiếp tục phát triển thì cần giảm nồng độ auxin hoặc trong một số trường hợp phải loại bỏ hoàn toàn khỏi môi trường nuôi cấy (Komamine và cs, 2005). Nguyên nhân của hiện tượng này chủ yếu do auxin là một yếu tố sinh trưởng, kích thích sự giãn nở của vách tế bào, làm tế bào tăng trưởng về kích thước (Moghaddam và Taha, 2005). Ngoài ra, auxin còn là một yếu tố truyền tín hiệu cảm ứng tạo phôi, đóng vai trò quan trọng trong kênh thông tin, làm tế bào biến đổi sang trạng thái cuối cùng đã được chương trình hóa để tạo thành phôi vô tính (Yeung, 1995).

Auxin tổng hợp như 2,4-D đặc biệt có hiệu quả trong việc thúc đẩy sự hình thành và tăng sinh trong nuôi cấy phôi hơn các loại auxin khác. Để kích thích tăng trưởng của phôi vô tính cần phải chuyển chúng sang môi trường không có auxin. Khi môi trường nuôi cấy không có auxin, các gen liên quan đến quá trình phôi chuyển tiếp sang giai đoạn hình tim sẽ không biểu hiện được (Zimmerman, 1993).

1.3.4.2 Sự kết hợp giữa cytokinin và auxin

Cytokinin là chất điều hòa sinh trưởng thực vật cần thiết cho sự tạo phôi vô tính ở một số loài thực vật. Cytokinin có tác dụng kích thích sự tăng trưởng tế bào với điều kiện có mặt của auxin trong môi trường. Cytokinin tác động trên cả hai bước của sự phân chia tế bào: phân nhân và phân bào. Trong nuôi cấy các mô nghèo

cytokinin thì auxin kích thích sự phân đôi nhiễm sắc thể, thậm chí tạo tế bào hai nhân, nhưng không có sự phân vách. Sự phân vách chỉ xảy ra khi có cytokinin ngoại sinh.

Việc bổ sung cytokinin vào môi trường đã tăng cường cảm ứng tạo phôi ở dưa đỏ, cỏ creeping, cỏ linh lăng, cây hoa anh thảo và cây keo. Rugini (1988) ghi nhận ở cây olive mẫu cấy phôi hợp tử 75 ngày tuổi tạo phôi trên môi trường cơ bản và khi bổ sung BAP 0,5 đến 2,5 μM vào môi trường đã giúp tăng khả năng cảm ứng tạo phôi. Tuy nhiên, thêm NAA hoặc 2,4-D vào môi trường nuôi cấy làm giảm hoặc ngăn cản hoàn toàn khả năng sinh phôi (Lê Thiên Thu và Võ Thị Bạch Mai, 2005). Ở cây hồ tiêu, phôi vô tính đã được tạo ra trên môi trường có cả 2,4-D và TDZ, nhưng phôi vô tính không tạo ra trên môi trường chỉ có 2,4-D. Tương tự, sự tạo phôi vô tính ở *Cayratia japonica* được cảm ứng trên môi trường có 2,4-D kết hợp với TDZ hoặc kinetin (Zhou và cs, 1994), trong khi 2,4-D riêng lẻ không tạo được phôi. 2,4-D 9 μM và kinetin 4,6 μM được dùng để cảm ứng tạo mô sẹo từ rễ, sau đó nuôi cấy trên môi trường bổ sung dicamba 9 μM để hình thành phôi (Wang, 1990).

Các loại cytokinin khác nhau có ảnh hưởng khác nhau đến sự tạo phôi vô tính. Nồng độ của cytokinin và tỷ lệ auxin/ cytokinin là yếu tố quan trọng trong sự điều khiển tạo phôi vô tính. Ở *Solanum carolinense*, loại và nồng độ cytokinin có ảnh hưởng đến khả năng tái sinh của bao phấn, BA ở nồng độ cao và kinetin ở tất cả các nồng độ đều kích thích sự tái sinh cơ quan, trong khi BA ở nồng độ thấp kích thích sự tạo phôi vô tính đồng thời tạo cơ quan (Thomas, 1986).

Cytokinin riêng lẻ cũng đã được dùng như yếu tố cảm ứng cho sự hình thành phôi ở một vài loài thực vật. Ví dụ như Thidiazuron (TDZ) là một chất có hoạt tính giống cytokinin đã được dùng để kích thích tạo phôi vô tính ở nhiều loài thực vật, đặc biệt ở cây đậu và nhiều loài cây 2 lá mầm. Như vậy kiểu di truyền và loại mô cấy có phản ứng khác nhau đối với auxin và cytokinin trong quá trình tạo phôi vô tính (Merkle và cs, 1995).

1.3.5 Nuôi cấy mô và tế bào trong dịch lỏng

Nuôi cấy mô và tế bào trong dịch lỏng có nghĩa là nuôi cấy những mô và tế bào có khả năng sinh trưởng và phát triển trong môi trường dinh dưỡng lỏng. Các tế bào đơn hoặc tế bào cụm nhỏ treo lơ lửng trong dịch lỏng có khả năng phân bào và hoàn tất chu kỳ sinh trưởng của chúng với lượng môi trường nuôi cấy không thay đổi và một chu kỳ sinh trưởng được coi như một lần cấy chuyển. Mẫu nuôi cấy thường được sử dụng là các mô tế bào thực vật như các đoạn thân cây, các loại củ siêu nhỏ. Hiện nay có hai dạng nuôi cấy mô và tế bào trong dịch lỏng: (1) Nuôi cấy với lượng môi trường, thành phần môi trường không thay đổi trong suốt quá trình nuôi cấy; (2) Nuôi cấy với lượng môi trường có thay đổi (theo một chu kỳ nhất định) và thành phần môi trường có thể thay đổi theo ý muốn.

Mật độ tế bào nuôi cấy cũng là một yếu tố quan trọng trong nuôi cấy lỏng nói chung và nuôi cấy tế bào dịch lỏng nói riêng. Mật độ tế bào nuôi cấy tối thiểu là mật độ tới hạn, mà thấp hơn mật độ đó tế bào sẽ không thể sinh sản, phát triển được. Với mật độ tế bào tới hạn, cho phép tạo ra một môi trường tạo điều kiện mà từ đó tế bào bắt đầu sinh sản và sinh trưởng. Môi trường tạo điều kiện được giải thích là môi trường có mật độ tới hạn tế bào, để các tế bào có khả năng tiết ra môi trường một số các chất trao đổi và tích lũy trong môi trường ở hàm lượng đủ cho bắt đầu chu kỳ sinh trưởng của tế bào. Hiện tượng này xảy ra trong pha Lag trước khi bắt đầu sự phân bào. Môi trường tạo điều kiện có thể làm giảm mật độ tối thiểu. Ví dụ từ 10^4 tế bào/mL xuống còn 10^3 tế bào/mL.

Các pha sinh trưởng:

(1) Pha tiềm ẩn (Lag phase): Tăng cường trao đổi chất trong tế bào, tạo các điều kiện phân bào; (2) Pha tăng trưởng theo hàm số mũ (Exponential phase): Sinh khối tế bào tăng theo cấp số nhân, chủ yếu do phân chia tế bào; (3) Pha tăng trưởng tuyến tính (Linear phase): Sinh khối tăng lên chủ yếu do sinh trưởng (tăng kích thước) tế bào; (4) Pha ổn định (Stationary phase): Tế bào đạt được sinh khối cực đại, dần ngừng phát triển. Pha kết thúc chu kỳ.

Một số nguyên tắc trong nuôi cấy dịch lỏng:

(1) Máy lắc được sử dụng để đảm bảo cho môi trường có đủ không khí hòa tan và dinh dưỡng cung cấp đồng nhất cho tế bào; (2) Môi trường lỏng chỉ nên đổ 20 - 30% thể tích bình để tránh cho môi trường bị bắn lên; (3) Tốc độ lắc của máy chỉ nên duy trì ở 80 - 100 vòng/phút, trong một số trường hợp tốc độ có thể biến thiên từ 40 đến 120 vòng/phút; (4) Sinh trưởng của tế bào và cụm tế bào chia làm các pha khác nhau: ban đầu tế bào có thể không sinh trưởng, sau đó sinh trưởng nhanh theo hàm số mũ, chậm dần và cuối cùng dừng lại (Street, 1977); (5) Tế bào sinh sản nhanh trong nuôi cấy dịch lỏng đạt tới mật độ tế bào nhất định thì phải cấy chuyển sang môi trường nuôi cấy mới; (6) Nuôi cấy dịch lỏng tế bào phụ thuộc vào kiểu gen, ví dụ: từ mô sẹo ở cây hồng môn trong môi trường lỏng rất khó thu được dịch lỏng tế bào đơn vì mô sẹo cứng, nhưng người ta lại có thể dễ dàng thu được dịch lỏng tế bào đơn từ mô sẹo ở cây cà rốt.

Whei-Lan Teng và cs (1994) đã kết luận là phôi cà rốt nuôi cấy trong bioreactor có chồi ngắn và rễ tương đối dài. Mavituna và Buyukalaca (1996) đã công bố kết quả nghiên cứu nhân giống ớt ngọt (*Capsicum annuum*) thông qua con đường tạo phôi vô tính sử dụng hệ thống bioreactor cho thấy hệ thống có khuấy trộn cho chất lượng phôi và hiệu suất tốt hơn. Dưới điều kiện tối ưu phôi đạt 98% với 57 phôi/mL.

Ở Việt Nam đã có một số nghiên cứu cho thấy nuôi cấy lỏng lắc cho hiệu quả tốt trên một số đối tượng cây trồng có giá trị kinh tế cao. Nghiên cứu của Đỗ Năng Vịnh và cs công bố vào năm 2005 cho kết luận chế độ nuôi cấy thích hợp với tế bào cây gỗ tẻch là ở tốc độ máy lắc 70 vòng/phút, thể tích dung dịch 40 mL/bình nuôi 250 mL cho hệ số nhân 14,7 lần sau 2 tuần, trên cây sa nhân chế độ thích hợp nhất ở tốc độ máy lắc 60 vòng/phút, thể tích dung dịch 30 mL/bình nuôi 250 mL cho hệ số nhân 11,5 lần sau 2 tuần nuôi và trên cây hồng môn chế độ nuôi cấy thích hợp nhất ở tốc độ máy lắc 80 - 90 vòng/ phút với thể tích dung dịch 25 mL/bình nuôi 250 mL cho hệ số nhân 41,3 lần sau 8 tuần.

Shohael và cs (2005) đã tạo mô sẹo từ lá cây *Eleutherococcus sessiliflorus* trên môi trường MS bổ sung 2,4-D 1 mg/L. Sự tạo phôi tối ưu trên môi trường MS bổ sung GA₃ 4 mg/L. Sử dụng môi trường 1/2 hoặc 1/3 MS tạo cây hoàn chỉnh. Phôi phát sinh thành cây con khi chuyển sang bình bioreactor (3 L) bổ sung 2 L môi trường MS kết hợp GA₃ 4 mg/L.

Nghiên cứu của Mai Trường và cs (2014) cho thấy khi nuôi 10 g phôi vô tính sâm ngọc linh trong bình tam giác 250 mL chứa 50 mL môi trường 1/2 SH có 10% nước dừa ở tốc độ lắc 110 vòng/ phút sau 2 tháng nuôi đạt trọng lượng tươi 29,7 g.

Monja-Mio và cs (2016) đã công bố kết quả nghiên cứu nhân sinh phôi vô tính bằng cách ban đầu ngâm tạm thời trong hệ thống bioreactor có thể làm giảm chi phí lao động và tăng hiệu quả nhân giống, cho phép các cây con chất lượng cao thu được thông qua các phương pháp hiệu quả và được kiểm soát tốt hơn.

1.3.6 Bioreactor

Bioreactor được mô tả là một bình phản ứng có những tính chất sau: nuôi cấy trong điều kiện vô trùng, nuôi cấy trong môi trường lỏng, số lượng mẫu cấy nhiều, có khả năng tự động hóa, vi tính hóa thông qua vi điều khiển các yếu tố môi trường như mức độ khuấy trộn, thoáng khí, nhiệt độ, oxygen hòa tan, pH. Các loại bioreactor được sử dụng phổ biến là loại có thể tích 2 - 20 L vì chúng có một số thuận lợi sau: dễ dàng vận hành, có thể vô trùng dễ dàng, giá thành thấp, ít gây hậu quả nghiêm trọng khi bị nhiễm, kích thước nhỏ.

Bioreactor đã từng được sử dụng rộng rãi trong ngành công nghiệp vi sinh, sản xuất các hoạt chất sinh học có nguồn gốc từ động vật và thực vật. Sử dụng một bioreactor cỡ nhỏ (từ 4 đến 10 L) trong khoảng 1 - 2 tháng có thể tạo ra đến 4.000 - 20.000 cây con. Điều này cho thấy khả năng và triển vọng to lớn của việc áp dụng hệ thống bioreactor trong vi nhân giống thương mại đồng thời mở ra một hướng mới trong sản xuất các sản phẩm có hoạt tính sinh học có nguồn gốc thực vật. Nuôi cấy lỏng lắc là bước đầu tiên đơn giản nhất trong nuôi cấy lỏng thoáng khí. Về sau, để đáp ứng với quy mô công nghiệp ngày càng lớn cũng như nhằm tạo sự điều khiển tự động trong nuôi cấy thực vật, hệ thống bioreactor đã ra đời. Mục đích của nuôi cấy

lồng lắc và bioreactor là tăng nhanh số lượng lớn sinh khối, nuôi cấy huyền phù tế bào nhằm chiết xuất các hoạt chất sinh học thứ cấp và đồng thời giúp giảm chi phí trong nhân giống thực vật (Duong Tan Nhut và cs, 2006).

Việc sử dụng bioreactor được xem là một cuộc cách mạng về hệ thống cho nhân giống thực vật thông qua con đường phát sinh cơ quan. Mặc dù nó bị giới hạn trên một số ít loài, nhưng hiện nay bioreactor đang được áp dụng trên một số loài cây cảnh, cây ăn quả và cây rau. Gần đây, người ta đã tiến hành vi nhân giống cây dứa để tăng sinh khối bằng cách sử dụng các cụm chồi trong hệ thống nuôi cấy huyền phù (dâng lên và rút xuống) của bioreactor. Bioreactor hiện nay đã và đang được sử dụng trong vi nhân giống thương mại ở Mỹ, Nhật Bản, Đài Loan, Hàn Quốc, Cuba, Costa Rica, Hà Lan, Tây Ban Nha, Bỉ, Pháp trên các cây cảnh và cây cho củ như khoai tây và cây lâm nghiệp. Một số thành tựu trong nuôi cấy bằng bioreactor: tạo hạt nhân tạo cây gỗ Vân sam (*Picea glauca* [Moench.] Voss.) trong bioreactor (Attree và cs, 1994); tăng trưởng củ *Lilium* giống lai 'Casablanca' bằng bioreactor; tạo trên 1.600 phôi vô tính cây *Coffea arabica* L.

1.4 Tình hình nghiên cứu trên thế giới và trong nước về nuôi cấy mô/phôi vô tính cây đình lăng và hàm lượng axit oleanolic/saponin ở một số giống đình lăng

1.4.1 Tình hình nghiên cứu nuôi cấy mô/phôi vô tính cây đình lăng trên thế giới và trong nước

Sliwinska và cs (2008) đã tạo thành công phôi vô tính loài đình lăng lá to (*Polyscias filicifolia*). Mô sẹo phôi hóa được cảm ứng trên môi trường MS có bổ sung 2,4-D 0,5 mg/L kết hợp với BAP 1 mg/L (tạo được mô sẹo loại I) và 2,4-D 2 mg/L kết hợp với kinetin 0,01 mg/L (tạo được mô sẹo loại II) từ lá cây mô của cây 2 năm tuổi. Mô sẹo loại I là loại mô sẹo chắc và có màu xanh, mô sẹo loại II là loại mô sẹo có cấu trúc xốp và màu trắng kem (cả hai loại mô sẹo trên đều có khả năng tạo phôi). Phôi vô tính sơ cấp và phôi thứ cấp được hình thành trong môi trường lỏng 1/2 MS không có chất ĐHST. Tạo thành cây con cho kết quả tốt nhất trên môi trường Nitsch và Nitsch cải tiến có bổ sung kinetin 0,5 mg/L, IBA 0,1 mg/L và adenine sulfate 10 mg/L.

Hệ số nhân cây đỉnh lăng lá tròn (*Polyscias balfouriana*) (có nguồn gốc từ nuôi cấy chồi ngọn) đạt cao nhất trên môi trường MS có BAP 1,2 mg/L và IBA 0,5 mg/L; tạo rễ cho chồi nhỏ dùng môi trường MS có bổ sung IBA 3 mg/L; các cây *in vitro* khỏe đã được nuôi trồng thành công ở vườn ươm (Ilyas và cs, 2013). Kết quả nghiên cứu nhân giống đỉnh lăng lá nhỏ (*Polyscias fruticosa*) theo cơ chế nhân chồi *in vitro* qua sử dụng chồi ngọn (cây 1 - 3 tháng tuổi) nuôi cấy trên môi trường B5 có bổ sung BA 5 mg/L và kinetin 2 mg/L đã được ghi nhận. Cây tạo rễ tốt, xét cả 2 chỉ tiêu số rễ và chiều dài rễ, khi được nuôi cấy trên môi trường có bổ sung NAA 1 mg/L (Sakr và cs, 2014).

Chưa ghi nhận được công trình công bố ở nước ngoài về tạo và nhân phôi vô tính giống đỉnh lăng lá nhỏ.

Trong nước đã có một số nghiên cứu về nhân giống đỉnh lăng. Nguyễn Ngọc Dung (1998) lần đầu tiên đạt kết quả nhân giống cây đỉnh lăng (*Polyscias fruticosa* (L.) Harms) thông qua con đường tạo cây con từ mô phân sinh chồi, sau 60 ngày nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung BAP 2,0 mg/L.

Trần Thị Liên và cs (2005) đã công bố kết quả nghiên cứu nhân nhanh cây đỉnh lăng lá nhỏ từ vật liệu nuôi cấy là chồi đỉnh và chồi bên còn non của cây. Môi trường sử dụng là MS (Murashige and Skoog), nước dừa 10%, sucrose 30 g /L và các chất điều hòa sinh trưởng thực vật. Lê Thiên Thu và Võ Thị Bạch Mai (2005) đã công bố kết quả nghiên cứu về sự phát sinh hình thái của cây đỉnh lăng lá nhỏ nuôi cấy mô và cho thấy mô sẹo được tạo thành từ các lá non *in vitro* trên môi trường MS có bổ sung 2,4-D 2 mg/L và mô sẹo phát triển tốt nhất trên môi trường này. Sau đó phôi được tạo ra trên môi trường không có chất điều hòa sinh trưởng ngoại sinh. Ở nghiên cứu này, các tác giả đã tạo thành công phôi vô tính đỉnh lăng lá nhỏ.

Mô sẹo 14 tuần tuổi của cây đỉnh lăng (*Polyscias fruticosa*) nuôi trên môi trường MS có bổ sung 2,4-D 2 mg/L và 20% nước dừa là vật liệu tốt nhất để sử dụng làm vật liệu tạo dịch treo tế bào. Môi trường lỏng MS có bổ sung 2,4-D 1 mg/L và nước dừa 20% là môi trường nuôi cấy nhằm thu nhận các dòng tế bào có khả năng sinh phôi. Môi trường lỏng MS có bổ sung 2,4-D 1 mg/L, BA 2 mg/L và nước dừa

20% là môi trường mà các dòng tế bào có khả năng sinh phôi đỉnh lãng tạo chồi. Theo các tác giả, từ số lượng lớn rễ qua nuôi cấy *in vitro* có thể thu nhận saponin bằng các phương pháp ly trích (Phạm Thị Tô Liên và Võ Thị Bạch Mai, 2007).

Nguyễn Vũ Phong và Ngô Thị Tú Trinh (2010) đã công bố kết quả nghiên cứu tạo mô sẹo từ lá và lớp mỏng tế bào thân cây đỉnh lãng lá nhỏ *in vitro* nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung 2,4-D và TDZ hoặc nước dừa với nồng độ khác nhau. Mô sẹo hình thành từ lớp mỏng tế bào thân sau 8 tuần tuổi được nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung các chất ĐHST với các nồng độ khác nhau sau 4 tuần, đã quan sát thấy sự xuất hiện phôi vô tính từ mô sẹo trên môi trường MS bổ sung 40% nước dừa. Việc sử dụng 2,4-D ở nồng độ 1 mg/L kết hợp với TDZ 0,2 mg/L hoặc 20 % nước dừa giúp kích thích phát sinh mô sẹo ở lá và lát mỏng tế bào thân. Môi trường MS bổ sung nước dừa 40% thích hợp tạo phôi vô tính từ mô sẹo xuất phát từ lớp mỏng tế bào thân.

Quy trình nhân giống cây đỉnh lãng *Polyscias fruticosa* đã được xây dựng thông qua nuôi cấy *in vitro* mảnh lá (5 mm x 5mm) cây 2 năm tuổi ở ngoài đồng trên môi trường đặc MS có 2,4-D 3 mg/L để tạo mô sẹo, tái sinh chồi từ mô sẹo trên môi trường có BA 5 mg/L + NAA 0,1 mg/L (tỷ lệ tái sinh là 8,21 chồi/mẫu) và tạo rễ cho chồi (tạo cây) trên môi trường có NAA 0,5 mg/L. Tỷ lệ sống của cây bầu đất (tỷ lệ đất : tro trấu là 1 : 1) sau quá trình thích nghi ở điều kiện tự nhiên là 74% (Bui Dinh Thạch và cs, 2016).

Trương Thị Bích Phượng và cs (2017) đã nghiên cứu ảnh hưởng của chất kích thích sinh trưởng trong nuôi cấy phát sinh hình thái đỉnh lãng *Polyscias fruticosa*. Mô sẹo 8 tuần tuổi nuôi trên môi trường MS bổ sung đường saccharose 3%, agar 8 g/l, 2,4-D 1,0 mg/L được sử dụng làm nguồn nguyên liệu cho nuôi cấy huyền phù. Môi trường MS bổ sung saccharose 3%, 2,4-D 1,5 mg/L là thích hợp nhất cho việc nhân sinh khối tế bào sau 12 tuần nuôi cấy. Môi trường MS bổ sung saccharose 3%, NAA 1,5 mg/L là thích hợp nhất cho tế bào phát sinh phôi và rễ sau 12 tuần nuôi cấy.

Nguyễn Thị Thơ và cs (2018) đã công bố kết quả nghiên cứu nhân giống *in vitro* đỉnh lãng lá nhỏ dùng đoạn đốt thân. Khả năng nhân nhanh chồi đạt cao nhất

(5,47 chồi/mẫu) trên môi trường MS có BAP 1,5 mg/L, kinetin 0,5 mg/L, IBA 0,5 mg/L, sucrose 30 g/L. Môi trường tạo rễ thích hợp là MS có NAA 1 mg/L, than hoạt tính 0,1%, sucrose 30 g/L.

Phan Thị Á Kim và cs (2018) đã nghiên cứu ảnh hưởng của nguồn carbon và một số elicitor (dịch chiết nấm men, salicylic acid và AgNO₃) lên khả năng sinh trưởng của tế bào huyền phù đỉnh lãng *Polyscias fruticosa*. Kết quả cho thấy môi trường MS (Murashige and Skoog) lỏng có bổ sung α -Naphthaleneacetic acid (NAA) 2 mg/L, Kinetin 0,5 mg/L và sucrose 3% là tốt nhất cho khả năng sinh trưởng của tế bào đỉnh lãng; sinh khối tế bào tươi đạt 7,50 g (0,40 g khô) sau 16 ngày nuôi cấy. Tất cả các loại elicitor sử dụng trong nghiên cứu đều ức chế sự sinh trưởng của tế bào huyền phù; nồng độ elicitor càng cao sinh khối tế bào càng giảm. Đây là điều kiện cần thiết để tăng sự tích lũy các hợp chất thứ cấp trong nuôi cấy tế bào huyền phù.

1.4.2 Hàm lượng axit oleanolic/saponin ở một số giống đỉnh lãng

Oleanane saponins ở lá và rễ cây đỉnh lãng lá nhỏ (*Polyscias fruticosa*) đã được ly trích và xác định thành công (Vo Duy Huan và cs, 1998) với kết quả 08 axit oleanolic saponins mới có tên polysciosides A - H cùng với 03 saponin đã biết được ghi nhận.

Nguyễn Thị Phương Thảo và cs (2011) kết luận đỉnh lãng lá xẻ có chứa saponin triterpene với aglycon chính là axit oleanolic. Hàm lượng axit oleanolic trong thân và lá đỉnh lãng lá xẻ khá cao (1,5%), trong khi hàm lượng trong rễ rất thấp (0,063%).

Kết quả nghiên cứu nuôi cấy mô lá đỉnh lãng (*Polyscias fruticosa*) nhằm tạo rễ tơ và định lượng hoạt chất saponin tích lũy ở rễ đã được ghi nhận. Hàm lượng axit oleanolic và saponin thu được tương ứng là 40,1 $\mu\text{g/g}$, 396,2 $\mu\text{g/g}$, qua phân tích định lượng bằng HPLC (Nguyễn Trung Hậu và cs, 2015).

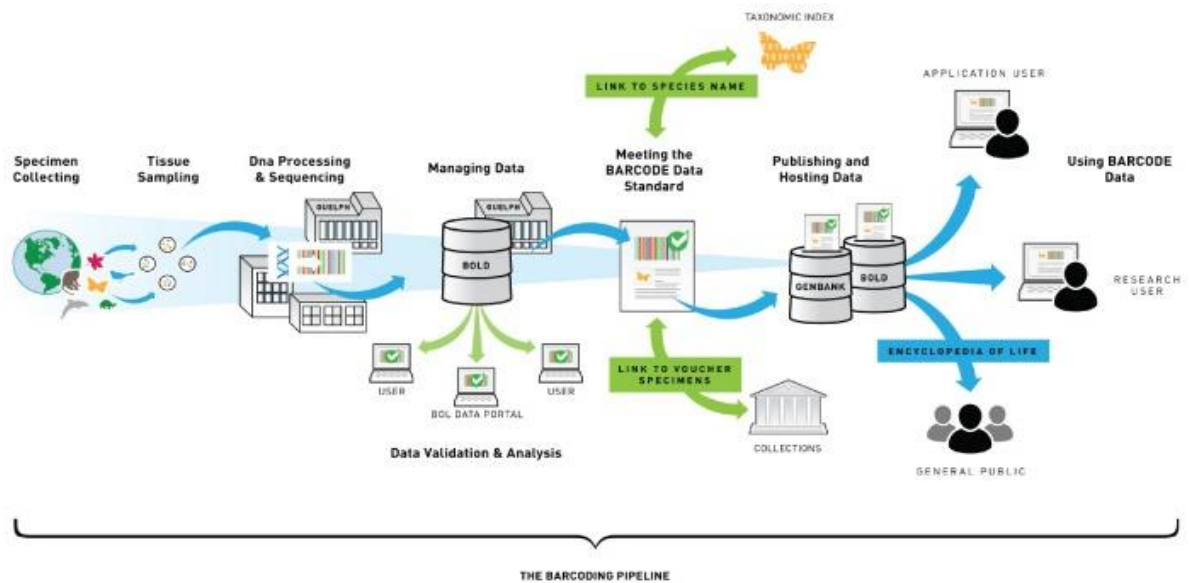
Phạm Thị Thị và cs 2016, đã xác định được đỉnh lãng lá nhỏ 3 năm tuổi có hàm lượng axit oleanolic cao đạt 77,17 $\mu\text{g/g}$.

1.5 Ứng dụng kỹ thuật chỉ thị phân tử DNA trong nghiên cứu đặc điểm di truyền

1.5.1 Kỹ thuật mã vạch DNA (DNA barcode)

Khái niệm DNA barcode được Hebert, nhà nghiên cứu tại Đại học Guelph, Ontario đưa ra lần đầu tiên vào năm 2003, nhằm giúp nhận diện các mẫu sinh vật. DNA barcode dựa trên cơ sở một số trình tự DNA ngắn nằm trong bộ gen của sinh vật giúp nhận diện một loài sinh vật (Mark và Paul, 2008).

Để thúc đẩy việc sử dụng DNA barcode cho tất cả sinh vật sống trên hành tinh này, CBOL (Consortium for the Barcode of Life) đã được thành lập vào tháng 5 năm 2004, với hơn 200 tổ chức từ 50 quốc gia. Mục tiêu ban đầu của CBOL là xây dựng một thư viện trực tuyến trình tự mã vạch cho tất cả các loài chưa được biết đến, có thể làm tiêu chuẩn phân loại cho bất kỳ mẫu DNA nào. Với sự hỗ trợ của CBOL, DNA barcode ngày càng phát triển và trở thành một phương pháp phân loại và định danh loài mới (Sujeewan và Paul, 2007).



Hình 1.3 Quy trình kỹ thuật DNA barcode

(Yuan-Chun Ma và cs, 2013)

Theo Yang và cs (2012), một chuỗi trình tự DNA để trở thành mã vạch lý tưởng phải phù hợp ít nhất ba tiêu chí:

(1) Tính phổ quát - hiện diện trên nhiều loài sinh vật, dễ khuếch đại và tạo sản phẩm.

- (2) Chất lượng trình tự - trình tự có tính đặc hiệu cao và có hiệu suất nhân bản cao.
- (3) Khả năng phân biệt - có khả năng phân biệt đồng thời được nhiều loài.

Ba nguyên tắc quan trọng của DNA barcode là: (1) tiêu chuẩn hóa, (2) tối giản và (3) khả năng mở rộng (Hollingsworth và cs, 2011).

Ba vùng DNA barcode phổ biến mà luận án đã sử dụng bao gồm:

Vùng gen *matK* (*maturaseK*) được phát hiện đầu tiên trên cây thuốc lá (*Nicotiana tabacum*) khi giải trình tự vùng gen *trnK* mã hóa cho tRNA^{Lys} (UUU) của lục lạp. Vùng gen này gồm một đoạn ORF chứa 509 codon nằm trong intron của gen *trnK* và dường như chưa rõ chức năng. Các nghiên cứu sử dụng trình tự gen *matK* để xây dựng cây phả hệ cho thấy gen *matK* có tính đa dạng hơn những gen khác có trong lục lạp và do vậy gen *matK* trở thành gen chỉ thị quan trọng để giúp phân loại thực vật (Asahina và cs, 2010; Sharma và cs, 2012).

Vùng gen *rbcL* (*Ribulose-bisphosphate carboxylase*) trình tự này có chất lượng cao khi làm thử nghiệm trên 7 locus (Hollingsworth và cs, 2009). Sự khác biệt ở mức độ thấp trong trình tự *rbcL* là một trở ngại lớn cho việc xác định các thuốc thảo dược có quan hệ gần gũi với nhau. Tuy nhiên, khi kết hợp trình tự *rbcL* với *trnH-psbA* lại đạt kết quả cao nhất trong việc phân biệt và xác định loài. Chính vì vậy, có thể coi đây là một công cụ quan trọng trong việc nhận dạng, phân biệt các loài (Kress và Erickson, 2007).

Vùng gen *trnH-psbA* cho thấy tỷ lệ khuếch đại thành công cao nhất (100%) và tỷ lệ sai khác là 83% trong số chín locus thử nghiệm, bao gồm cả *ITS*, *rbcL* và *matK* (Kress và cs, 2005). Vì vậy, *trnH-psbA* được coi như 1 trình tự hữu ích để phân biệt các loài thảo mộc với loài giả mạo nó. Một nhược điểm của *trnH-psbA* là nó không tạo ra trình tự có 2 chiều rõ ràng. Sự hiện diện của đoạn poly-A/T trong trình tự *trnH-psbA* làm giảm tỷ lệ thành công giải trình tự DNA. Ngoài ra, việc thêm bớt các nucleotide thường xuyên xảy ra trong khu vực này gây khó khăn cho việc điều chỉnh trình tự, do vậy việc biên tập, chỉnh sửa bằng tay được ưu tiên hơn (Hollingsworth, 2009).

1.5.2 Kỹ thuật ISSR

ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) là các đoạn DNA nằm giữa và được giới hạn bởi hai trình tự microsatellite ngược chiều. Trong đó, các đoạn microsatellite là các trình tự lặp lại đơn giản SSR (Simple Sequence Repeat) hay các trình tự lặp lại ngắn STRs (Short Tandem Repeat) là những vùng trên hệ gen có chứa các motif DNA ngắn lặp lại nhiều lần như ACACACACACACACAC (Wei và Tan, 2015). Nguyên lý tạo ra các băng đa hình khi sử dụng primer ISSR là một trình tự lặp lại nào đó trong hệ gen của sinh vật bị mất, chèn thêm hoặc di chuyển làm thay đổi khoảng cách giữa các trình tự lặp lại.

Kỹ thuật ISSR được sử dụng rất rộng rãi trong nghiên cứu đa dạng di truyền, nghiên cứu đặc điểm di truyền quần thể, lấy dấu di truyền, đánh dấu gen, xác định cây trồng, phân tích nguồn gốc, xác định sự thay đổi hệ gen và đánh dấu con lai (Nguyễn Đức Thành, 2015). So với RAPD (Random amplified polymorphic DNA), phương pháp này đơn giản, nhanh và có độ chính xác cao hơn. So với AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), ISSR có ưu điểm là đơn giản, dễ thực hiện (Kumar và cs, 2014).

1.6 Thuần dưỡng cây con từ nuôi cấy *in vitro* ra vườn ươm

1.6.1 Ảnh hưởng của giá thể đến sinh trưởng của cây trồng sau nuôi cấy mô

1.6.1.1 Vai trò của giá thể đối với cây trồng sau nuôi cấy mô

Theo Kevyn (2004), giá thể được coi là giá đỡ và chứa chất dinh dưỡng nuôi cây, đảm bảo cho cây phát triển. Chất lượng của giá thể là một trong những yếu tố quan trọng ảnh hưởng trực tiếp đến sinh trưởng của cây con trong vườn ươm. Một giá thể tốt hội tụ đủ các điều kiện lý - hóa tính: ổn định được pH, có khả năng giữ ẩm và thoáng khí tốt, đủ chất dinh dưỡng, giúp cây con sinh trưởng khỏe mạnh và nhanh. Một hỗn hợp giá thể nhẹ, thoáng khí, có khả năng giữ nước cao, nhưng nghèo chất dinh dưỡng cũng không giúp cho cây phát triển tốt. Ngược lại, hỗn hợp giá thể chứa nhiều chất dinh dưỡng, nhưng cấu trúc đất nặng, khó thấm nước và thoát nước cũng ảnh hưởng xấu đến cây con. Giá thể thay đổi theo tùy loại cây trồng, phải có những đặc điểm: nhẹ, nhưng phải đủ độ chặt để cây con được vững chắc, chất lượng bầu

không thay đổi tính chất cho đến khi xuất vườn. Thành phần hỗn hợp giá thể thường bao gồm đất, phân bón (hữu cơ, vô cơ) và chất phụ gia. Đất được chọn làm giá thể là đất tốt, có khả năng giữ ẩm và thoát nước tốt, thành phần cơ giới từ cát pha đến thịt nhẹ, pH trung tính, không mang mầm mống sâu bệnh hại.

Dớn là vật liệu được lấy từ rễ và thân cây dương xỉ, thường dùng làm giá thể trồng các loại phong lan, mọc nhiều ở vùng thung lũng Đà Lạt. Ưu điểm của loại giá thể này là giữ ẩm tốt, không đóng rong rêu. Có hai loại dớn chính: dớn sợi và dớn vụn. Dớn sợi là loại dớn già, hóa mục có dạng từng sợi rất được ưa chuộng để làm giá thể trồng lan ở các vùng có khí hậu nóng; dớn vụn là phần còn lại của cây dớn sau khi đã lấy đi phần sợi.

Cát là loại giá thể sạch bệnh, có khả năng thoát nước nhanh, độ thoáng cao giúp rễ cây phát triển tốt. Cát thường được rửa sạch, hấp khử trùng hay phơi khô trước khi sử dụng (John và Harold, 1999).

Tro trấu được hình thành khi trấu bị đốt cháy. Đây là loại giá thể nhẹ, rẻ tiền và rất phổ biến trong nông nghiệp. Tro trấu có cấu trúc rỗng, toi xốp, có khả năng giữ nước, thoát nước nhanh, sạch bệnh, pH = 6,5. Ngoài chức năng làm giá thể, tro trấu còn được dùng như một loại phân bón (Đường Hồng Dật, 2002).

Xơ dừa được lấy từ vỏ quả dừa, nghiền nhỏ và có thể đóng thành bánh để dễ vận chuyển và bảo quản. Trước khi sử dụng cần loại bỏ chất chát (tanin). Xơ dừa là giá thể có khả năng giữ ẩm và thông thoáng khí tốt, nhưng dễ gây úng cho một số cây trồng, có pH từ 6,5 đến 7, trọng lượng riêng thấp, tính ổn định cao. Xơ dừa được sử dụng đơn lẻ hoặc phối trộn với các nguyên liệu khác như: cát, tro trấu, đất, theo tỷ lệ thích hợp, sẽ tạo ra loại giá thể có độ toi xốp cao thông thoáng khí rất thích hợp để trồng các loại cây con trong giai đoạn vườn ươm (John và Harold, 1999).

1.6.1.2 Ảnh hưởng của giá thể đến sinh trưởng của cây sau nuôi cấy mô

Nghiên cứu đối với cây bao báp (*Adansonia grandidieri* L.) được nhân giống từ nuôi cấy *in vitro*, tác giả cho biết cây bao báp *in vitro* được đưa ra giá thể đất và cát với tỉ lệ 1 : 1, thích nghi với điều kiện tự nhiên và cho tỷ lệ sống đạt 93% (Nguyễn Thị Xuân Thu và cs, 2012). Theo Hoàng Thị Thế và cs (2013), giá thể thích hợp cho

cây ba kích (*Gynochthodes officinalis*) từ nhân giống vô tính *in vitro* ở giai đoạn vườn ươm là 50% xơ dừa kết hợp với 50% phế liệu sản xuất nấm ăn.

Nghiên cứu về giá thể giâm cành và xử lý chất điều hòa sinh trưởng cho hom giống cây đinh lăng lá nhỏ (*Polyscias fruticosa* (L.) Harms), Ninh Thị Phíp (2013) cho biết sử dụng giá thể gồm 50% đất và 50% trấu hun giúp cây sinh trưởng phát triển tốt về chiều cao, đường kính thân, số lá/cây cũng như về số rễ. Theo kết quả nghiên cứu của Nguyễn Thị Ngọc Trâm (2013), giá thể giâm hom cho cây đinh lăng cần phải xốp, thoáng khí, giữ và thoát nước tốt, sạch sâu bệnh và cỏ dại, không có thuốc trừ sâu và thành phần gồm đất, phân bò và tro trấu cho kết quả tốt nhất.

Đã có nhiều nghiên cứu về giá thể cho cây con nuôi cấy mô ở giai đoạn vườn ươm, mỗi loại cây thích hợp với những loại giá thể nhất định. Nhìn chung giá thể xơ dừa là phổ biến nhất và được kết hợp một tỷ lệ nhất định với các loại hợp phần khác như cát, tro trấu và dớn. Tuy nhiên còn rất ít những nghiên cứu về giá thể cho cây con đinh lăng *in vitro* ở giai đoạn vườn ươm, vì vậy việc nghiên cứu các loại giá thể trồng cho cây đinh lăng *in vitro* ở giai đoạn vườn ươm là cần thiết.

1.6.2 Ảnh hưởng của ánh sáng đến sinh trưởng của cây con trong vườn ươm

Nói chung, việc che sáng giúp cây con tránh được những tác động xấu của môi trường, đồng thời làm giảm khả năng thoát hơi nước, giảm nhiệt độ cho cây và giá thể (Nguyễn Văn Thêm, 2002). Đối với cây đinh lăng nuôi cấy mô khi đưa ra vườn ươm do có khác biệt về điều kiện sống, các bộ phận của cây đặc biệt là rễ chưa phát triển hoàn thiện vì vậy khi đưa ra vườn ươm phải có chế độ che sáng hợp lý nhằm tạo điều kiện thuận lợi cho cây con sinh trưởng khỏe, tăng được tỷ lệ sống.

Vào vụ Hè che 2 lớp lưới đen, giảm 50% cường độ ánh sáng trong suốt thời kỳ ra ngôi, đảm bảo cường độ ánh sáng khoảng 10.000 - 12.000 lux cho cây con nuôi cấy mô ở giai đoạn vườn ươm (Phan Ngọc Diệp và cs, 2013). Đối với cây đan sâm (*Salvia miltiorrhiza*) *in vitro* khi ra cây được đặt trong nhà lưới, hai tuần đầu tiên được che nắng bằng nylon đen (Lê Tiến Vinh và cs, 2014). Cây dâu tây (*Fragaria*) *in vitro* trong giai đoạn vườn ươm được che 60% ánh sáng trong 5 ngày đầu tiên cho tỷ lệ sống cao (Phạm Xuân Tùng và Phạm Thị Lan, 2014). Cây hoa chuông (*Sinningia*

speciosa) nuôi cấy mô ở giai đoạn vườn ươm cần lượng ánh sáng đầy đủ, dịu nhẹ, cần che sáng cho cây khoảng 50% (Lã Thị Thu Hằng, 2015).

1.6.3 Ảnh hưởng của phân bón đến sinh trưởng của cây con sau nuôi cấy mô

Đạm là nguyên tố không thể thiếu đối với cây trồng nói chung. Ở thời kỳ đầu của giai đoạn sinh trưởng - sinh trưởng sinh dưỡng, cây có nhu cầu về đạm cao để phát triển các cơ quan sinh trưởng: rễ, thân, cành, lá tạo ra sinh khối lớn, là cơ sở cho việc đạt năng suất cao sau này (Nguyễn Như Hà và Lê Thị Bích Đào, 2010).

Lân là một trong những chất cần thiết cho quá trình trao đổi chất, do lân có trong thành phần của nhiều hợp chất hữu cơ quan trọng của cây như glycerophosphat - sản phẩm đầu tiên của quá trình quang hợp; ADP và ATP là các chất dự trữ năng lượng cho các quá trình sinh hóa của cây. Lân có vai trò thúc đẩy sự phát triển của bộ rễ, đặc biệt là đối với sự hình thành rễ bên và lông hút là những bộ phận trực tiếp hấp thu chất dinh dưỡng rất quan trọng của cây. Cây con rất mẫn cảm với lân, việc thiếu lân ở thời kỳ cây con sẽ cho hậu quả rất xấu mà về sau có cung cấp bù đủ lân cho cây trồng cũng không khắc phục được, vì vậy cần phải cung cấp đủ lân ngay từ giai đoạn ban đầu (Nguyễn Như Hà và Lê Thị Bích Đào, 2010).

Kali có vai trò chủ yếu trong việc chuyển hóa năng lượng, quá trình đồng hóa của cây, điều khiển quá trình sử dụng nước, thúc đẩy quá trình sử dụng đạm ở dạng NH_4^+ , giúp cây tăng sức đề kháng, cứng chắc, ít đổ ngã, chống sâu bệnh, chịu hạn tốt (Trịnh Xuân Vũ, 1976).

Hiệu quả của phân lân chậm, nhưng cần nhiều ở giai đoạn sinh trưởng ban đầu nên thường được bón lót với lượng lớn hoặc có thể bón lót toàn bộ. Tuy nhiên đối với đạm và kali, hiệu quả của chúng nhanh và dễ bị rửa trôi nên chủ yếu là dùng để bón thúc (Hoàng Minh Tấn và cs, 2006).

Những kết quả nghiên cứu cho thấy nhu cầu về phân bón cho cây con là thật sự cần thiết để cây sinh trưởng tốt. Tuy nhiên để bón phân có hiệu quả, tiết kiệm chi phí thì phải thí nghiệm với một số liều lượng phân bón, từ đó chọn ra mức bón phân phù hợp, thí nghiệm bón phân cho cây con trong bầu được tính theo trọng lượng bầu, thể tích bầu. Nguyễn Văn Thêm (2002) cho rằng bón phân tổng hợp NPK (16 - 16 - 8) từ

2 đến 3% trọng lượng bầu là thích hợp cho cây con Dầu song nàng (*Dipterocarpus dyeri*) phát triển trong giai đoạn vườn ươm.

Kết quả nghiên cứu của Tô Thị Nhã Trâm và cs (2014) cho thấy ở giai đoạn vườn ươm, tổ hợp chất dinh dưỡng tốt nhất cho sự sinh trưởng và phát triển của cây Tiêu (*Piper nigrum* L.) *in vitro* sau 120 ngày là bón phân N-P-K (16 - 16 - 8) kết hợp với tưới nước 2 lần/ngày làm cho cây sinh trưởng và phát triển tốt nhất.

Cây con đỉnh lăng có đặc điểm là phân cành nhiều, bộ rễ phát triển mạnh, do đó cần phải cung cấp đạm và lân kịp thời, đầy đủ cho bộ rễ để thân cành sinh trưởng, phát triển khỏe mạnh, sớm đạt tiêu chuẩn xuất vườn tại vườn ươm. Vì vậy, việc nghiên cứu ảnh hưởng của các liều lượng phân đạm và lân bón cho cây con đỉnh lăng ở giai đoạn vườn ươm là rất cần thiết.

Tóm lại, các thông tin tổng quan nêu trên đã khái quát về tầm quan trọng của cây đỉnh lăng đối với thực tiễn sản xuất và đời sống. Về các tồn tại/hạn chế hiện nay trong lĩnh vực nhân giống đỉnh lăng và tiềm năng ứng dụng kỹ thuật sinh học phân tử, kỹ thuật nuôi cấy mô (bao gồm giai đoạn *in vitro* và giai đoạn sau cấy mô) phục vụ công tác nhân giống đã tạo cơ sở lý luận và thực tiễn để đề tài triển khai các định hướng nghiên cứu sau đây trên đỉnh lăng/đỉnh lăng lá nhỏ:

- Sử dụng kỹ thuật phân tích hóa lý để xác định hàm lượng axit oleanolic kết hợp ứng dụng kỹ thuật sinh học phân tử nhằm đánh giá sự đa dạng di truyền định hướng xây dựng DNA barcode đối với giống đỉnh lăng quan tâm nghiên cứu là đỉnh lăng lá nhỏ.

- Ứng dụng kỹ thuật tạo phôi vô tính để nhân giống đỉnh lăng lá nhỏ trên cơ sở vận dụng phương pháp luận của quá trình tái sinh phôi từ mô sẹo, nhân phôi và nuôi phôi đến giai đoạn tạo cây trong điều kiện nuôi cấy *in vitro*. Cây con tạo ra đảm bảo đồng nhất về mặt di truyền giống cây mẹ thông qua phân tích DNA.

- Ứng dụng cơ sở khoa học của việc trồng, chăm sóc cây con giai đoạn sau *in vitro* (về tiêu chuẩn cây con, điều kiện giá thể trồng, yêu cầu phân bón, môi trường nuôi trồng phù hợp) để đảm bảo cho cây thích nghi và sinh trưởng tốt trong giai đoạn vườn ươm (*ex vitro*).

Kết quả thực hiện các nội dung nghiên cứu cụ thể của đề tài theo định hướng nêu trên sẽ đáp ứng mục tiêu xây dựng được các bước nhân giống trên đối tượng đỉnh lăng lá nhỏ, với các đặc điểm đã được chọn lọc, bằng phương pháp nuôi cấy phôi vô tính từ giai đoạn *in vitro* đến giai đoạn vườn ươm và kết quả thu được sẽ có giá trị ứng dụng cao trong thực tiễn sản xuất giống.

Chương 2

NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Các thí nghiệm được thực hiện tại Phòng Công nghệ Tế bào Thực vật, Phòng thí nghiệm trọng điểm phía Nam về Công nghệ Tế bào Thực vật thuộc Viện Sinh học Nhiệt đới và Bộ môn Công nghệ Sinh học Thực vật thuộc Viện Nghiên cứu Công nghệ Sinh học và Môi trường, Trường Đại học Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh từ tháng 4 năm 2015 đến tháng 3 năm 2019.

2.2 Nội dung nghiên cứu

Nghiên cứu gồm 4 nội dung

- Nội dung 1: *Đánh giá hàm lượng axit oleanolic của 18 mẫu giống đinh lăng và xác định trình tự DNA barcode của 8 mẫu ĐLLN*

Hàm lượng axit oleanolic của 18 mẫu thuộc 6 loài đinh lăng thu thập được xác định thông qua phương pháp phân tích hóa lý (HPLC). Mẫu giống đinh lăng có hàm lượng axit oleanolic cao được chọn lựa làm vật liệu nghiên cứu tạo phôi vô tính. Trình tự 3 vùng gene ngoài nhân (*matK*, *rbcL*, *trnH-psbA*) của 8 mẫu ĐLLN cũng được phân tích phục vụ cho việc xác lập DNA barcode đặc trưng cho từng giống.

- Nội dung 2: *Tạo mô sẹo và phôi vô tính dòng ĐLLN ưu tú*

Mẫu phiến lá, cuống lá cây ĐLLN *in vitro* và cây lưu giữ ở vườn ươm được cảm ứng tạo mô sẹo có khả năng sinh phôi dưới ảnh hưởng của các chất điều hòa sinh trưởng nhóm auxin. Mô sẹo có khả năng phát sinh phôi được cảm ứng phát sinh phôi vô tính dưới ảnh hưởng của loại môi trường nuôi cấy, chất điều hòa sinh trưởng và loại đường nhằm xác định các yếu tố thích hợp tạo phôi vô tính.

- Nội dung 3: *Nhân phôi vô tính, tạo phôi vô tính trưởng thành và tạo cây từ phôi vô tính ĐLLN*

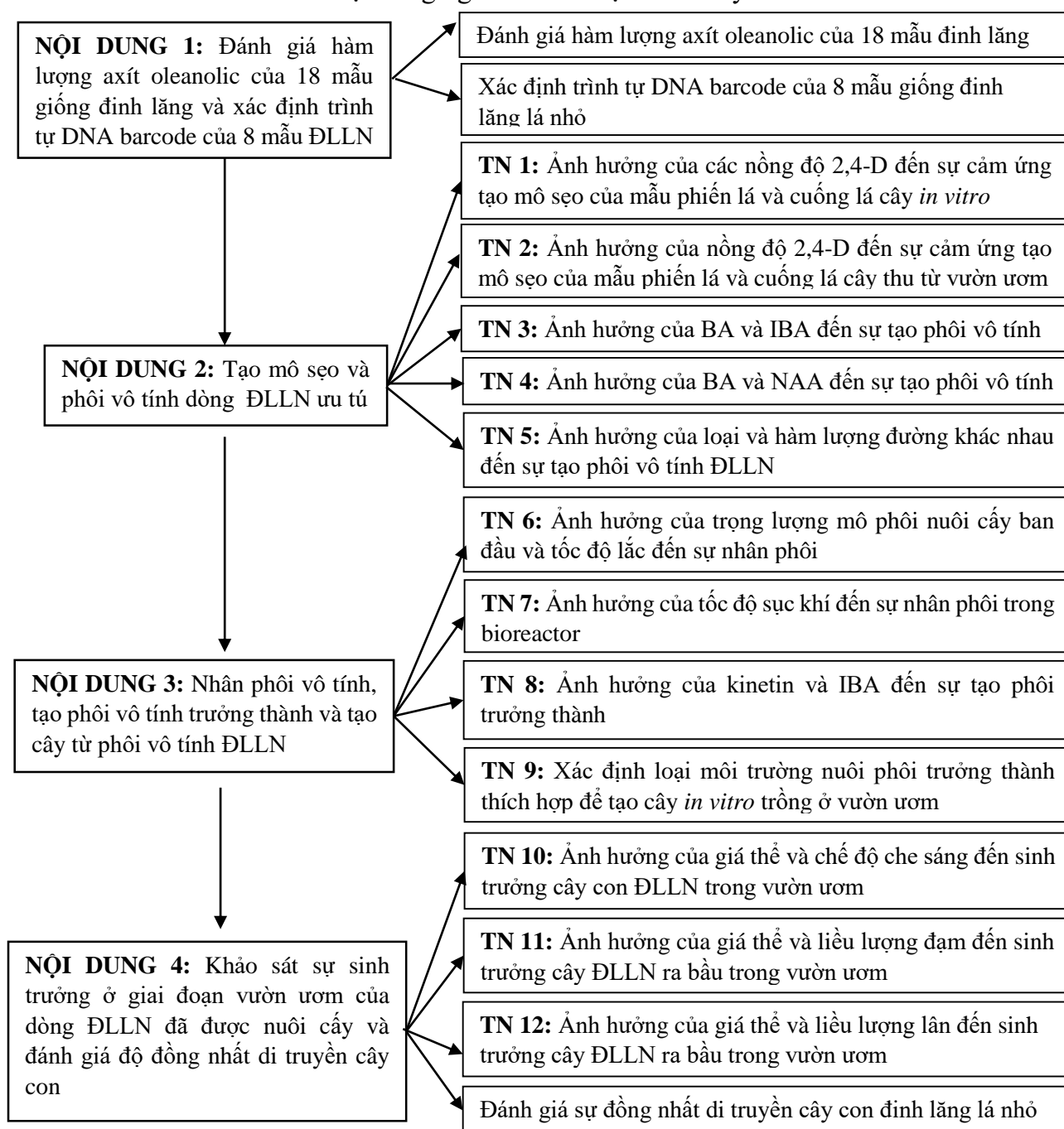
Xác định lượng phôi nuôi cấy và tốc độ lacc phù hợp nhân sinh khối phôi vô tính trong hệ thống lỏng lacc. Ở hệ thống nuôi cấy bioreactor, tốc độ sục khí thích hợp

cho nhân phôi cũng được nghiên cứu. Đồng thời, ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng và môi trường dinh dưỡng khoáng thích hợp tạo cây hoàn chỉnh từ phôi vô tính cũng được xác định.

- Nội dung 4: Khảo sát sự sinh trưởng ở giai đoạn vườn ươm của dòng ĐLLN đã được nuôi cấy và đánh giá độ đồng nhất di truyền cây con

Nghiên cứu phương thức thuần dưỡng cây con *in vitro* ở giai đoạn vườn ươm để cây con thích nghi và sinh trưởng tốt đạt chất lượng xuất vườn. Tính đồng nhất di truyền của cây ĐLLN cũng được kiểm định bằng chỉ thị ISSR.

Sơ đồ tóm tắt các nội dung nghiên cứu được trình bày ở Hình 2.1.



Hình 2.1 Sơ đồ tóm tắt các nội dung nghiên cứu

2.3 Nội dung 1: Đánh giá hàm lượng axit oleanolic của 18 mẫu giống đinh lăng và xác định trình tự DNA barcode của 8 mẫu ĐLLN

2.3.1 Điều kiện phòng thí nghiệm

Nhiệt độ trung bình: 27 - 32°C. Độ ẩm trung bình: 55 - 65%. Ánh sáng tự nhiên, có trang bị đèn huỳnh quang trong trường hợp thiếu sáng. Hệ thống thông gió, quạt gió để không khí luôn thông thoáng.

2.3.2 Vật liệu thí nghiệm

2.3.2.1 Mười tám mẫu giống đinh lăng nghiên cứu

Bảng 2.1 Danh sách 18 mẫu giống đinh lăng được thu thập

STT	Tên mẫu	Ký hiệu mẫu	Điểm thu mẫu	Mô tả	Phân nhóm theo hình thái lá
1	Đinh lăng lá nhỏ	D1	Nguồn giống của Viện Sinh học Nhiệt đới	Lá nhuyển, xẻ thùy, màu xanh	A
2	Đinh lăng lá nhỏ	D2	Tiền Giang	Lá nhuyển, xẻ thùy, màu xanh	A
3	Đinh lăng lá nhỏ	D3	Khánh Hòa	Lá nhỏ, xẻ thùy, màu xanh	B
4	Đinh lăng lá nhỏ	D4	Viện Dược liệu, Hà Nội	Lá nhỏ, xẻ thùy, màu xanh	B
5	Đinh lăng lá nhỏ	D5	Nam Định	Lá nhỏ, xẻ thùy, màu xanh	B
6	Đinh lăng lá nhỏ	D6	Hải Dương	Lá nhỏ, xẻ thùy, màu xanh	B
7	Đinh lăng lá nhỏ	D7	Thủ Đức, TP. HCM (Xuất xứ: Thái Nguyên)	Lá nhỏ, xẻ thùy, màu xanh	B
8	Đinh lăng lá nhỏ	D8	Đồng Nai	Lá nhỏ, xẻ thùy, màu xanh	B

Bảng 2.1 Danh sách 18 mẫu giống đinh lăng được thu thập (tt)

STT	Tên mẫu	Ký hiệu mẫu	Điểm thu mẫu	Mô tả	Phân nhóm theo hình thái lá
9	Đinh lăng lá to	D9	Hải Dương	Lá có xẻ thùy nhiều răng cưa, màu xanh	C
10	Đinh lăng lá to	D10	Côn Đảo	Lá lớn, màu xanh	D
11	Đinh lăng lá to	D11	Nguồn giống của Viện Sinh học Nhiệt đới	Lá lớn, màu xanh	D
12	Đinh lăng lá đĩa	D12	Thủ Đức, TP. HCM	Lá hình đĩa, màu xanh	E
13	Đinh lăng lá răng	D13	Viện Dược Liệu, Hà Nội	Lá hai lần kép có răng cưa, màu xanh	F
14	Đinh lăng lá răng	D14	Côn Đảo	Lá hai lần kép có răng cưa, màu xanh	F
15	Đinh lăng lá tròn	D15	Bình Thuận	Lá to tròn, màu xanh	G
16	Đinh lăng lá tròn	D16	Bình Thuận	Lá to tròn, màu xanh, có viền trắng	G
17	Đinh lăng lá tròn	D17	Bình Thuận	Lá to tròn, màu xanh	G
18	Đinh lăng lá trở	D18	Viện Dược Liệu, Hà Nội	Lá hình bầu dục, có viền màu bạc răng cưa	H

Quy ước cách phân nhóm:

Nhóm A: lá nhuyễn, xẻ thùy, màu xanh; Nhóm B: lá nhỏ, xẻ thùy, màu xanh; Nhóm C: lá có xẻ thùy nhiều răng cưa, màu xanh; Nhóm D: lá to, màu xanh; Nhóm E: lá hình đĩa, màu xanh; Nhóm F: lá hai lần kép có răng cưa, màu xanh; Nhóm G: lá to tròn, màu xanh; Nhóm H: lá hình bầu dục, có viền màu bạc răng cưa

Mười tám mẫu giống đinh lăng được thu thập và lưu giữ 4 năm tại Viện Sinh học Nhiệt đới. Việc xác định hàm lượng axit oleanolic được thực hiện trên 18 mẫu

giống đình lẵng và đánh giá sự khác biệt di truyền trên trình tự 3 vùng DNA barcode của 8 mẫu giống ĐLLN.

2.3.2.2 Các cặp primer được sử dụng trong nghiên cứu

Bảng 2.2 Các cặp primer sử dụng khuếch đại vùng gene DNA barcode

Gen đích	Tên primer	Trình tự primer	Nhiệt độ biến tính của primer (T_m)	Kích thước sản phẩm dự kiến	TLTK
<i>MatK</i>	472F	CCCRTYCATCTGGA AATCTTGGTTC	59,25°C	648 bp	Jing và cs, 2011
	1248R	GCTRTRATAATGAG AAAGATTTCTGC			
<i>rbcL</i>	1F	ATGTCACCACAAA CAGAGACTAA	58,40°C	1375 bp	Sameera và cs, 2011, Olmstead và cs, 1992
	1460R	CTTTTAGTAAAAGA TTGGGCCGAG			
<i>trnH-psbA</i>	psbAF	GTTATGCATGAACG TAATGCTC	60,30°C	504 bp	Srirama và cs, 2010
	trnHR	CGCGCATGGTGGGA TTCACAAATC			

Nhiệt độ biến tính (T_m) của các primer được tính nhờ công cụ OligoAnalyzer tại trang web <https://sg.idtdna.com/calc/analyzer> với nồng độ primer 10 μ M, các thông số khác giữ mặc định. Đây là cơ sở để tìm được nhiệt độ bắt cặp (T_a) tối ưu trong phản ứng PCR.

2.3.2.3 Hóa chất/Dung môi

- **Ly trích DNA:** Hóa chất dùng trong ly trích DNA: Dịch trích DNA (NaCl 0,125 M; Tris-HCl 0,01 M; EDTA 0,01 M; SDS 0,5%); Phenol : chloroform : isoamyl alcohol (25 : 24 : 1); Chloroform : isoamyl alcohol (24 : 1); Isopropanol; Ethanol 70%; Dung dịch TE 1X. Tất cả hoá chất sử dụng được cung cấp từ nhà sản xuất Merck - Đức.

- **Điện di và đo quang phổ:** Agarose; TBE 0,5X; GelRed 10 mg/mL (Hoá chất được cung cấp từ nhà sản xuất Bioline - Anh).

- **Phản ứng PCR:** Primer 10 μ M (Bảng 2.2) (IDT - Mỹ); Master mix 2X (Bioline - Anh); Nước nuclease free (Bioline - Anh).

2.3.2.4 Trang thiết bị thí nghiệm

Máy PCR PTC 100 (MJ Research, Ich - Canada); Bồn điện di Mupid-One (Advance - Nhật Bản); Máy ly tâm lạnh Mikro 22R (Hettich - Đức); Bồn soi gel UV Transilluminator (MRC - Israel); Máy đo quang phổ BioDrop DUO (BioDrop - Anh); Tủ sấy Carbolite (Jencons - Mỹ); Bồn ủ nhiệt (Mettler - Anh); Microwave (Sharp - Nhật Bản).

2.3.3 Phương pháp nghiên cứu

2.3.3.1 Đánh giá hàm lượng axit oleanolic của 18 mẫu giống dinh lăng thu thập tại Việt Nam

Kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) được sử dụng để xác định hàm lượng hoạt chất thuộc nhóm saponin là axit oleanolic của 18 mẫu lá dinh lăng 4 năm tuổi trong bộ sưu tập. Chọn 5 - 10 lá bánh tẻ trên một cây vào buổi sáng mùa khô tháng 2, lấy mẫu lá không bị sâu bệnh, bắt đầu từ vị trí lá thứ 3 tính từ ngọn xuống, đều các hướng xung quanh cây rồi cho mỗi mẫu vào trong một bao ziploc nhỏ có ghi ký hiệu mẫu (~ 10 g/mẫu). Mẫu được gửi phân tích tại Công ty TNHH Khoa học và Công nghệ Khải Hoàn (TP. HCM) để phân tích hàm lượng axit oleanolic của 18 mẫu dinh lăng theo phương pháp HDPP/DL-08 với quy trình sau:

Chuẩn bị mẫu

Mẫu lá được sấy chân không ở 40°C trong khoảng 3 ngày cho đến trọng lượng không đổi sau đó xay mịn, rây với sàng 1 mm và bảo quản đến khi phân tích. Cân $1 \pm 0,001$ g mẫu hòa tan trong 25 mL MeOH, siêu âm trong 30 phút. Chiết mẫu liên tục đến khi mất màu. Gom mẫu, cô quay và định mức đến 50 mL bằng MeOH. Lọc mẫu bằng màng lọc 0,45 μ m.

Hệ thống phân tích:

Phần mềm điều khiển hệ thống Chromeleon. Column: C18 (250 mm×4,6 mm, 5 μ m). C18 guard column (10 mm×4,6 mm, 5 μ m). Pha động, MeOH : H₂O (95 : 5, v/v). Axit oleanolic chuẩn (mã hiệu SKU 42515) đã được sử dụng có độ tinh khiết $\geq 97\%$ (Merck, Đức).

Kết quả định lượng axit oleanolic là cơ sở giúp chọn mẫu đỉnh lã có chất lượng cao, từ đó thực hiện các nghiên cứu để nhân giống.

2.3.3.2 Xác định trình tự DNA barcode của 8 mẫu giống ĐLLN được thu thập tại Việt Nam

Tiến hành lấy mẫu

Chọn 3 - 4 lá (bắt đầu từ lá thứ ba tính từ ngọn xuống) trên một cây, lấy lá không bị sâu bệnh, cho mẫu vào bao ziplock nhỏ có ghi thông tin về mẫu. DNA của lá được ly trích theo phương pháp SDS của Lee và cs (1988), có cải tiến với các bước: (1) Nghiền mẫu (50 mg) trong 600 μ L dung dịch gồm NaCl 0,125M; Tris-HCl 0,01M; EDTA 0,01M; SDS 0,5% sau đó vortex từ 5 - 10 giây và ủ mẫu ở 65°C trong 1 giờ. (2) Thêm 600 μ L Phenol : Chloroform : Isoamyl Alcohol (25 : 24 : 1), vortex. Ly tâm 12.000 vòng/phút trong 10 phút. Hút 1V thể tích dịch nổi. (3) Thêm 1V thể tích Chloroform : Isoamyl Alcohol (24 : 1), vortex nhẹ. Ly tâm 12.000 vòng/phút trong 10 phút. Hút dịch nổi. (4). Thêm 1 V thể tích Isopropanol. Đảo nhẹ, ủ 4°C trong 15 phút. (5) Ly tâm 12.000 vòng/phút trong 10 phút. Bỏ dịch. (6) Rửa ethanol 70% 3 lần. Ly tâm 12.000 vòng/phút trong 3 phút. Bỏ dịch, phơi mẫu. (7) Thêm 50 μ L TE 1X. Bảo quản lạnh - 20°C.

Định tính DNA bằng kỹ thuật điện di

Cân 0,5 g agarose (1%), cho vào 50 mL dung dịch TBE 0,5X làm tan chảy hoàn toàn bằng lò vi ba trong 2 phút, để nguội khoảng 55°C đổ vào khuôn có gắn lược. Chờ gel đông đặc lại khoảng 30 phút sau đó gỡ lược và đặt gel vào bể điện di theo đúng chiều, cho dung dịch đệm TBE 0,5X vào ngập miếng gel khoảng 5 mm. Bơm mẫu vào giếng với tỷ lệ giữa thuốc nhuộm GelRed và DNA là 1 : 5 (trộn đều). Đặt miếng gel lên buồng chụp dưới ánh sáng đèn UV. Chụp ảnh và ghi nhận lại kết quả điện di (ghi nhận chất lượng DNA - độ sáng của băng DNA, độ smear của DNA trên gel điện di).

Định lượng DNA sử dụng máy quang phổ

Lấy mẫu từ tủ lạnh và trộn đều (không dùng vortex), đo OD.

Ghi nhận độ tinh sạch của DNA (A_{260}/A_{280}), thông thường $A_{260}/A_{280} = 1,6 - 2,0$ được coi là mẫu tinh sạch để sử dụng cho phản ứng PCR (Khuất Hữu Thanh, 2006). Hàm lượng DNA được đọc kết quả bằng máy đo quang phổ BioDrop DUO.

Thành phần và điều kiện phản ứng PCR,

Bảng 2.3 Thành phần hoá chất sử dụng trong phản ứng PCR

Thành phần hóa chất	Thể tích (μL)
Nước nuclease free	12,5
Master mix 2X	15
Primer (xuôi + ngược) (10 μM)	1,5
DNA mẫu (50 ng/ μL)	1,0
Tổng thể tích	30

Bảng 2.4 Chu kỳ nhiệt cơ bản cho phản ứng PCR với cặp primer *matK*

Biến tính ban đầu	95°C	5 phút	
Biến tính	95°C	30 giây	} 35 chu kỳ
Gắn primer	52°C	30 giây	
Kéo dài chuỗi	72°C	50 giây	
Ổn định	72°C	7 phút	
Kết thúc phản ứng	4°C	-	

Bảng 2.5 Chu kỳ nhiệt cơ bản cho phản ứng PCR với cặp primer *rbcL*

Biến tính ban đầu	95°C	5 phút	
Biến tính	95°C	1 phút	} 35 chu kỳ
Gắn primer	57°C	1 phút	
Kéo dài chuỗi	72°C	1 phút	
Ổn định	72°C	7 phút	
Kết thúc phản ứng	4°C	-	

Bảng 2.6 Chu kỳ nhiệt cơ bản cho phản ứng PCR với cặp primer *trnH-psbA*

Biến tính ban đầu	95°C	5 phút	
Biến tính	95°C	1 phút	} 35 chu kỳ
Gắn primer	52°C	1 phút	
Kéo dài chuỗi	72°C	1 phút	
Ổn định	72°C	7 phút	
Kết thúc phản ứng	4°C	-	

Điện di sản phẩm PCR với gel agarose 1%. Chụp ảnh và ghi nhận lại kết quả điện di (ghi nhận kích thước, chất lượng sản phẩm PCR thông qua độ sáng của băng sản phẩm PCR, độ smear của sản phẩm PCR trên gel điện di). Sản phẩm PCR sau khi tinh sạch được gửi đi giải trình tự theo hai chiều bằng máy giải trình tự 3130 và theo phương pháp Sanger.

2.4 Nội dung 2: Tạo mô sẹo và tạo phôi vô tính dòng ĐLLN ưu tú

2.4.1 Vật liệu nghiên cứu

2.4.1.1 Mẫu phiến lá, cuống lá, mô sẹo

Để tạo mô sẹo, sử dụng vật liệu mẫu phiến lá, mẫu cuống lá cây ĐLLN *in vitro* và cây vườn ươm (Sử dụng kết quả của nội dung 1). Để tạo phôi vô tính, sử dụng mô sẹo có khả năng sinh phôi hình thành từ nuôi cấy mô sẹo ở 50 NSC (có màu vàng nhạt, khô, kích thước ~ 0,3 cm) có nguồn gốc từ nuôi cấy mẫu phiến lá cây *in vitro*. Sử dụng cụm phôi vô tính để nhân sinh khối (qua nuôi cấy lỏng lắc), dùng phôi vô tính hoàn chỉnh để tạo cây.

2.4.1.2 Môi trường nuôi cấy

Sử dụng môi trường khoáng MS (Murashige - Skoog, 1962), 1/2MS, SH (Schenk và Hildebrandt, 1972), Nitsch và Nitsch (1969) có bổ sung đường sucrose (10 - 50 g/L), có hoặc không có glucose, fructose, maltose (10 - 50 g/L) (tùy thí nghiệm), có hoặc không có nước dừa (20%), có hoặc không có adenine sulfate 10 mg/L, có hoặc không có agar (8 g/L). Môi trường có hoặc không có bổ sung các chất điều hòa sinh trưởng (BA, kinetin, IBA, NAA) với các nồng độ khác nhau (tùy thí nghiệm) (để tạo mô sẹo, tạo phôi, nhân phôi, tạo phôi trưởng thành và tạo cây). Môi

trường được điều chỉnh pH khoảng 5,7 - 6; hấp khử trùng ở 121°C với áp suất 1 atm trong 20 phút.

Hóa chất dùng trong thí nghiệm: 2,4-D; BA; kinetin; NAA; IBA; adenine sulfate. Nguồn gốc: Sigma; Độ tinh khiết của 2,4-D; BA; kinetin và NAA đều > 99%; IBA và adenine sulfate là > 98,5%.

2.4.1.3 Một số thiết bị thí nghiệm

Bioreactor sục khí (Samsung, Hàn Quốc), nồi hấp vô trùng (Model SS - 325 của hãng Tomy Seiko, Nhật Bản), máy đo pH (Thermo, Đức), cân điện tử 4 số (Model XT 220A hãng Precisa, Thụy Sĩ), tủ cấy vô trùng, máy lạnh, tủ lạnh, kính hiển vi quang học (Model MBL 2000 hãng Kruss, Đức), máy lắc tròn điện tử (Model SSL1 của hãng STUART (BIBBY) Anh, quỹ đạo lắc 16 mm).

2.4.1.4 Điều kiện nuôi cấy

Nhiệt độ phòng nuôi cấy: $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Cường độ chiếu sáng: 0 lux (tối) - 3.000 lux, thời gian chiếu sáng: 0 - 12 giờ/ngày (tùy thí nghiệm). Độ ẩm phòng: 70 - 80%

2.4.2 Phương pháp nghiên cứu

2.4.2.1 Thí nghiệm 1: Ảnh hưởng của nồng độ 2,4-D đến sự cảm ứng tạo mô sẹo của mẫu phiến lá và cuống lá cây ĐLLN *in vitro*

Thí nghiệm hai yếu tố: Yếu tố A là 2 loại mẫu (phiến lá và cuống lá), yếu tố B là 4 nồng độ 2,4-D (0 mg/L (ĐC); 1 mg/L; 2 mg/L và 3 mg/L). Thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên, có 8 nghiệm thức, 3 lần lặp lại.

Quy mô thí nghiệm: 10 mẫu/bình x 3 bình/NT x 8 NT x 3 LLL = 720 mẫu.

Môi trường tạo mô sẹo: MS (Murashige và Skoog, 1962, xem Phụ lục) có nước dừa 20%, sucrose 20 g/L, 2,4-D với 4 nồng độ: 0; 1; 2; 3 mg/L. Sử dụng 50 mL môi trường cho 1 bình tam giác 250 mL.

Chuẩn bị mẫu cây: Sử dụng mẫu phiến lá và cuống lá đỉnh lã. Phiến lá được cắt thành các mẫu nhỏ với các kích thước 0,5 x 0,5 cm, trên mẫu phiến lá khía 2 đường vuông góc với gân lá để tạo vết thương. Mẫu cuống lá dài 1 cm, đường kính 0,1 cm, trên mẫu cuống lá khía 10 đường ngang. Mẫu phiến lá được cấy sao cho mặt trên phiến lá và

vết cắt tiếp xúc với bề mặt môi trường; tương tự, vết cắt mẫu cuống lá cũng được cấy tiếp xúc với môi trường.

Các chỉ tiêu và phương pháp theo dõi

Tiến hành lấy chỉ tiêu theo dõi với tất cả 30 mẫu mỗi NT, thời gian ghi nhận và phương pháp theo dõi phụ thuộc vào từng chỉ tiêu.

- Tỷ lệ mẫu tạo mô sẹo (%): Ghi nhận số mẫu tạo mô sẹo ở từng nghiệm thức vào thời điểm 60 NSC và tỷ lệ mẫu tạo mô sẹo được tính = (Số mẫu tạo mô sẹo/ tổng số mẫu cấy) x 100.

Quy ước: Mẫu tạo mô sẹo là những mẫu đã chuyển từ dạng ban đầu (phiến lá và cuống lá) sang dạng cụm tế bào không phân hóa có màu trắng hoặc hơi vàng/vàng.

- Thời gian tạo mô sẹo (NSC): Ghi nhận thời gian bắt đầu hình thành mô sẹo ở từng nghiệm thức.

- Màu sắc của mô sẹo: Quan sát mẫu cấy vào các thời điểm 20, 30, 40, 50, 60 NSC. Quan sát và mô tả màu sắc của mô sẹo: màu trắng, hơi vàng, vàng xám, nâu. Khi mô sẹo chuyển dần sang màu nâu đen có nghĩa là mô đã trở nên già và chết.

- Cấu trúc của mô sẹo: Quan sát mẫu cấy ở 20, 30, 40, 50, 60 NSC. Cấu trúc của mô sẹo: xốp, mềm, mềm ướt, hơi cứng khô. Hơi cứng, màu trắng đục hoặc/và hơi vàng, có bề mặt khô, một số trường hợp bề mặt cụm mô sẹo có cấu trúc dạng hạt nhỏ (granular) là các đặc điểm dễ nhận biết của mô sẹo có khả năng tái sinh phôi.

- Đường kính mô sẹo (cm): Ghi nhận đường kính lớn nhất của mô sẹo ở thời điểm 60 NSC.

- Trọng lượng tươi của mẫu = mẫu + mô sẹo (mg). Ghi nhận trọng lượng tươi của mẫu ở 60 NSC của từng nghiệm thức bằng cách cân trọng lượng của 10 mẫu được tạo thành ở từng nghiệm thức và tính trọng lượng tươi trung bình (mg).

2.4.2.2 Thí nghiệm 2: Ảnh hưởng của nồng độ 2,4-D đến sự cảm ứng tạo mô sẹo của mẫu phiến lá và cuống lá cây thu từ vườn ươm

Thí nghiệm hai yếu tố: Yếu tố C là 2 loại mẫu (phiến lá và cuống lá), yếu tố D là 4 nồng độ 2,4-D (0 mg/L (ĐC); 1 mg/L; 2 mg/L và 3 mg/L). Thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên, có 8 nghiệm thức, 3 lần lặp lại.

Quy mô thí nghiệm: 10 mẫu/bình x 3 bình/NT x 8 NT x 3 LLL = 720 mẫu.

Phương pháp thực hiện: Phiến lá và cuống lá đinh lăng được khử trùng bằng $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ 15% (w/v) trong thời gian 20 phút và được rửa lại 3 lần bằng nước cất. Sau khử trùng, mẫu phiến lá và cuống lá được chuẩn bị và cấy vào môi trường như ở trường hợp mẫu *in vitro*. Sau khi cấy mẫu được nuôi trong điều kiện tối.

Các chỉ tiêu và phương pháp theo dõi

Tương tự như thí nghiệm 1.

2.4.2.3 Thí nghiệm 3: Ảnh hưởng của nồng độ BA và IBA đến khả năng tạo phôi vô tính ĐLLN từ mô sẹo

Thí nghiệm hai yếu tố: Yếu tố E là 4 nồng độ BA (0 mg/L (ĐC); 0,5 mg/L; 1,0 mg/L và 1,5 mg/L), yếu tố F là 3 nồng độ IBA (0 mg/L (ĐC); 0,1 mg/L và 0,5 mg/L). Thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên, có 12 nghiệm thức, 3 lần lặp lại.

Quy mô thí nghiệm: 10 mẫu/ đĩa petri x 3 đĩa/ NT x 12 NT x 3 LLL = 1.080 mẫu.

Phương pháp thực hiện: Sử dụng mô sẹo có khả năng sinh phôi được tạo ra từ TN 1 có màu vàng, chặt, khô và được phân thành các cụm nhỏ với đường kính 0,4 cm và cấy vào đĩa petri chứa 20 mL môi trường MS có bổ sung nước dừa 20%, sucrose 20 g/L. Các chất điều hòa sinh trưởng BA, IBA được bổ sung tương ứng với từng nghiệm thức. Thí nghiệm được đặt dưới ánh sáng đèn huỳnh quang 3.000 lux, nhiệt độ 27°C trong 8 tuần.

Các chỉ tiêu và phương pháp theo dõi

Tiến hành lấy chỉ tiêu theo dõi với tất cả 10 mẫu/ NT, thời gian ghi nhận và phương pháp theo dõi phụ thuộc vào từng chỉ tiêu.

- Tỷ lệ mẫu tạo phôi (%): Theo dõi vào thời điểm 60 NSC bằng cách quan sát dưới kính lúp và ghi nhận số lượng cụm mô sẹo tạo phôi. Tỷ lệ tạo phôi được tính theo công thức sau:

- Tỷ lệ mẫu tạo phôi (%) = Số mẫu cấy tạo phôi/ tổng số mẫu cấy x 100.

- Tổng số phôi (phôi): Ghi nhận ở các thời điểm 30, 45 và 60 NSC số lượng phôi tạo được bằng cách quan sát dưới hiển vi.

Quy ước: Phôi được xác định là phôi vô tính khi là một trong bốn hình thái của phôi vô tính (phôi dạng cầu, dạng tim, dạng thủy lô, dạng phân cực có sự xuất hiện tiền lá mầm và tiền rễ).

2.4.2.4. Thí nghiệm 4: Ảnh hưởng của nồng độ BA và NAA đến khả năng tạo phôi vô tính ĐLLN từ mô sẹo

Tương tự như ở thí nghiệm 3, nhưng môi trường có NAA thay cho IBA.

2.4.2.5 Thí nghiệm 5: Ảnh hưởng của loại và nồng độ đường (sucrose, fructose, glucose, maltose) đến khả năng tạo phôi vô tính ĐLLN từ mô sẹo

Thí nghiệm hai yếu tố: Yếu tố A là 4 loại đường (sucrose; glucose; fructose và maltose), yếu tố B là 5 nồng độ đường (10 g/L (ĐC); 20 g/L; 30 g/L; 40 g/L và 50 g/L). Thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên, có 20 nghiệm thức, 3 lần lặp lại.

Quy mô thí nghiệm: 5 mẫu/đĩa x 3 đĩa/NT x 20 NT x 3 LLL = 900 mẫu

Môi trường nuôi cấy: Kế thừa kết quả của TN 4.

Vật liệu nuôi cấy: Mô sẹo có khả năng sinh phôi (kế thừa kết quả của TN1).

Dụng cụ nuôi cấy là đĩa petri, mỗi đĩa chứa 20 mL môi trường. Thí nghiệm được nuôi cấy trong điều kiện ánh sáng đèn huỳnh quang, cường độ 3.000 lux, thời gian chiếu sáng 12 h/ngày trong thời gian 60 ngày.

Chỉ tiêu và phương pháp theo dõi: Tiến hành lấy chỉ tiêu theo dõi với tất cả 5 mẫu/NT, thời gian ghi nhận và phương pháp theo dõi phụ thuộc vào từng chỉ tiêu tương tự như ở thí nghiệm 3.

2.5 Nội dung 3. Nhân phôi vô tính, tạo phôi vô tính trưởng thành và tạo cây từ phôi vô tính ĐLLN

2.5.1 Vật liệu thí nghiệm: tương tự nội dung 2

2.5.2 Phương pháp nghiên cứu

2.5.2.1 Thí nghiệm 6: Ảnh hưởng của trọng lượng mô phôi nuôi cấy ban đầu và tốc độ lắc đến sự gia tăng sinh khối mô phôi vô tính trên hệ thống nuôi cấy lỏng lắc

Thí nghiệm hai yếu tố: Yếu tố T là hai khối lượng phôi [(0,5 g tương ứng 0,625% - w/v) và 1,0 g tương ứng 1,25% - w/v)], yếu tố K là ba tốc độ lắc (80 vòng/

phút; 100 vòng/phút và 120 vòng/ phút). Thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên, có 6 nghiệm thức (10 bình/nghiệm thức), 3 lần lặp lại.

Phương pháp thực hiện: Do có kích thước nhỏ nên khó có thể tách được phôi với lượng lớn để làm thí nghiệm; do vậy, ở thí nghiệm này, sử dụng cụm mô sẹo đang trong quá trình tái sinh với rất nhiều phôi ở các dạng và kích thước khác nhau phủ trên bề mặt mô sẹo (sau đây gọi tắt vật liệu nuôi cấy là mô phôi). Cân lượng mô phôi thu được từ TN 4, giai đoạn 30 NSC theo từng nghiệm thức cấy vào bình tam giác loại 250 mL có chứa 80 mL môi trường và đặt trên máy lắc. Môi trường nuôi cấy được sử dụng kế thừa từ TN 4, loại và nồng độ đường từ kết quả của TN 5. Tốc độ lắc tương ứng với từng nghiệm thức. Mô được nuôi ở nhiệt độ 27°C, ánh sáng 2.000 lux trong 30 ngày.

Chỉ tiêu và phương pháp theo dõi

- Trọng lượng tươi của cụm phôi (g): Thu sinh khối và cân trọng lượng mô phôi thu được của mỗi nghiệm thức ở các thời điểm 10, 20 và 30 NSC.

- Hệ số nhân sinh khối mô phôi (lần): Sinh khối phôi thu được, được tính hệ số nhân sinh khối mô phôi sau 30 NSC.

Hệ số nhân sinh khối mô phôi = Trọng lượng mô phôi ở 30 NSC/ Trọng lượng mô phôi ban đầu

2.5.2.2 Thí nghiệm 7: Ảnh hưởng của tốc độ sục khí đến sự gia tăng sinh khối phôi vô tính ĐLLN nhân nuôi bằng bioreactor

Thí nghiệm đơn yếu tố: Tốc độ sục khí gồm: (B₁) 400 mL/phút; (N₂) 600 mL/phút; (B₃) 800 mL/phút. Thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên, có 3 nghiệm thức, 3 lần lặp lại, mỗi nghiệm thức 1 bình (9 bình), mỗi bình cấy 9,3 g phôi (0,62% - w/v) được tạo ra từ thí nghiệm 6. Ở thí nghiệm này, vật liệu nuôi cấy là cụm phôi, không có mô sẹo...

Môi trường nuôi cấy: tương tự ở TN 6.

Sục khí được thực hiện liên tục trong suốt quá trình nuôi cấy. Khí được dẫn qua bộ lọc vô trùng sau đó bơm trực tiếp vào môi trường nuôi cấy. Các ống dẫn khí được đặt ở đáy của bình nuôi cấy. Khí vô trùng khi bơm vào bình nuôi cấy sẽ hình

thành các bọt khí tỏa đều ra bình nuôi cấy nhằm cung cấp oxygen cho mô nuôi cấy. Tốc độ sục khí được điều chỉnh trên cơ sở điều chỉnh tốc độ bơm khí. Bơm khí được điều chỉnh ở các mức 400; 600 và 800 mL/phút.

Dụng cụ nuôi cấy là bình bioreactor dung tích 3.000 mL (Samsung, Hàn Quốc), mỗi bình chứa 1.500 mL (kế thừa TN 6) môi trường lỏng có 9,30 g phôi. Thí nghiệm được nuôi cấy trong điều kiện ánh sáng 2.000 lux, 10 giờ/ngày trong 6 tuần.

Chỉ tiêu và phương pháp theo dõi: Tiến hành lấy chỉ tiêu theo dõi với tất cả các mẫu/NT, thời gian ghi nhận và phương pháp theo dõi phụ thuộc vào từng chỉ tiêu.

- Trọng lượng tươi của phôi: Thu và cân sinh khối phôi ở mỗi nghiệm thức sau 30 ngày nuôi.

- Hệ số nhân sinh khối phôi = Trọng lượng sinh khối phôi sau khi nuôi cấy / Trọng lượng sinh khối phôi trước khi nuôi.

2.5.2.3 Thí nghiệm 8: Ảnh hưởng của nồng độ kinetin và IBA đến khả năng tạo phôi vô tính trưởng thành

Thí nghiệm hai yếu tố: Yếu tố K là 4 nồng độ kinetin (0 mg/L (ĐC); 0,5 mg/L; 1 mg/L và 1,5 mg/L), yếu tố I là 3 nồng độ IBA (0 mg/L (ĐC); 0,1 mg/L và 0,5 mg/L). Thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên, có 12 nghiệm thức, 3 lần lặp lại.

Nuôi lỏng lắc: Dùng cụm phôi từ nuôi cấy trong môi trường lỏng lắc (TN 6) hoặc trong bioreactor (TN 7).

Quy mô thí nghiệm: 3 bình/NT x 1 g mẫu/bình x 12 NT x 3 LLL = 108 g.

Cách thực hiện: Ép nhẹ các cụm phôi (~ 50 g) vào thành bình tam giác hoặc trên đĩa petri để phôi tách rời nhau. Cấy 1 g (1,25% - w/v) phôi đơn vào bình tam giác chứa 80 mL môi trường 1/2 MS bổ sung sucrose 15 g/L, adenine sulfate 10 mg/L, kinetin (0; 0,5; 1; 1,5 mg/L) và IBA (0; 0,1; 0,2 mg/L) (theo Sliwinska và cs, 2008).

Chỉ tiêu theo dõi: Tính tỷ lệ phôi trưởng thành hữu hiệu - có lá mầm và rễ mầm phát triển bình thường (%); phôi vô hiệu - có lá mầm hoặc rễ mầm phát triển không bình thường (%) ở thời điểm 30 NSC. Mẫu được nuôi ở điều kiện có nhiệt độ 25 - 27°C và chiếu sáng 12 h/ngày với cường độ ~ 2.000 lux.

Nuôi bioreactor:

Thực hiện thí nghiệm với vật liệu, môi trường và điều kiện nuôi cấy như trên khi dùng bioreactor (tốc độ sục khí 600 mL/phút) để tạo phôi trưởng thành.

2.5.2.4 Thí nghiệm 9: Ảnh hưởng của môi trường khoáng đến sự tạo cây từ phôi vô tính ĐLLN

Thí nghiệm đơn yếu tố: Môi trường gồm 4 loại: (M₁) MS; (M₂) 1/2 MS; (M₃) SH, (M₄) Nitsch & Nitsch. Thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên, có 4 nghiệm thức, 3 lần lặp lại.

Dùng Phôi trưởng thành (PTT) thu được từ TN8.

Quy mô thí nghiệm: 5 bình/NT x 10 PTT/bình x 4 NT x 3 LLL = 600 PTT

Cách thức thực hiện: Gồm 3 bước như sau (1): Chuẩn bị các loại môi trường MS, 1/2 MS, SH, Nitsch & Nitsch không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng, sucrose 20 g/L, agar 8 g/L. (2): Cấy PTT vào bình tam giác với 10 PTT/bình. (3): PTT được nuôi trong môi trường có nhiệt độ 25 - 27°C và chiếu sáng 12 h/ngày với cường độ 3.000 lux.

Các chỉ tiêu và phương pháp theo dõi

Tiến hành lấy chỉ tiêu theo dõi với 50 cây/nghiệm thức cơ sở, thời gian ghi nhận và phương pháp theo dõi tùy thuộc vào từng chỉ tiêu.

- Chiều cao cây (cm), số lá (lá/cây), số rễ (rễ/cây): được đo đếm ở thời điểm 21, 42, 63, 84 NSC.

- Chiều dài rễ (cm): Đo từ góc rễ đến chóp rễ. Đo chiều dài rễ dài nhất của cây con ở thời điểm 84 NSC.

- Trọng lượng tươi (g): Cân trọng lượng tươi của cây ở giai đoạn 84 NSC và tính trọng lượng tươi trung bình với công thức như sau:

$$\text{Trọng lượng tươi trung bình (g)} = \frac{\text{trọng lượng tươi của tổng số cây con}}{\text{tổng số cây con tái sinh}}$$

- Trọng lượng khô (g): Sấy khô cây ở nhiệt độ 50°C, sấy đến khi trọng lượng không đổi.

2.6 Nội dung 4: Khảo sát sự sinh trưởng ở giai đoạn vườn ươm của dòng ĐLLN đã được nuôi cấy và đánh giá độ đồng nhất di truyền cây con

2.6.1 Điều kiện thí nghiệm

Thí nghiệm đã được tiến hành trong vườn ươm là nhà lưới có mái che mưa.

Cường độ ánh sáng của vườn ươm trong thời gian làm thí nghiệm tháng 1 và 2 năm 2018 dao động từ 7.000 - 8.000 lux. Nhiệt độ trung bình trong quá trình thực hiện thí nghiệm từ 28,5 - 31°C, ẩm độ không khí dao động 74 - 82% (Bảng 2.7). Điều kiện này phù hợp cho cây đinh lăng sinh trưởng.

Bảng 2.7 Đặc điểm thời tiết khí hậu trong thời gian thí nghiệm năm 2018

Tháng	Nhiệt độ (°C) TB	Ẩm độ (%) TB
1	28,5	74
2	29,5	75
3	29,5	75
4	31,5	77
5	30,0	79
6	28,5	80
7	27,0	82

- Khay ươm có kích thước (60 x 40 x 7) cm, thể tích giá thể/khay: 1400 cm³

(Thí nghiệm 10)

- Túi trồng PE có kích thước (13 x 9) cm, thể tích bầu: 484 cm³. Giá thể được cho vào bầu, cách miệng bầu 2 cm có thể tích 377 cm³.

2.6.2 Vật liệu thí nghiệm

- **Cây đinh lăng lá nhỏ** đã nuôi cấy *in vitro* được 8 tuần tuổi đạt chiều cao từ 2 cm trở lên, có 4 - 5 lá, 6 - 7 rễ (Thí nghiệm 10) (Hình 2.2).



Hình 2.2 Cây ĐLLN nuôi cấy mô 8 tuần tuổi dùng trồng ở vườn ươm

- **Lưới đen** giảm 50% cường độ ánh sáng của Công ty Cổ phần Vina Tân Á.

- **Vật liệu làm giá thể:** Cát được rửa để loại bỏ tạp chất và bùn bằng nước sạch (Cửa hàng vật liệu xây dựng). Đất cát pha lấy ở độ sâu 0 - 20 cm tại Viện Sinh học Nhiệt đới). Mụn dừa mua từ cơ sở kinh doanh cây cảnh tại Thủ Đức, tiến hành xả chất trước khi xử lý bằng vôi bột (5 kg vôi pha với 200 lít nước ngâm trong 5 - 7 ngày rồi xả lại bằng nước sạch). Tro trấu mua từ các cơ sở bán than sinh học. Dớn dạng sợi của thân và rễ cây dương xỉ được ngâm xả bằng nước sạch trước khi trồng.

Bảng 2.8 Đặc điểm lý hóa tính của giá thể thí nghiệm 10

Chỉ tiêu phân tích	100% cát	80% cát 20% mụn dừa	80% cát 20% tro trấu
Dung trọng (g/cm ³)	-	0,93	1,16
Độ rỗng (%)	-	61,5	45,7
pH _{H₂O} (1 : 5)	6,7	5,9	7,6
EC (1 : 5) (mS/cm)	0,03	0,03	0,1
Chất hữu cơ (%)	0,65	1,97	0,26
N tổng số (%)	0,005	0,02	0,01
P tổng số (% P ₂ O ₅)	0,002	0,001	0,002
K tổng số (% K ₂ O)	0,02	0,01	0,02
CEC (meq/100 g)	0,66	1,14	1,20

(Phân tích tại Bộ môn Thủy Nông Trường Đại học Nông Lâm TP. HCM, 2018)

Bảng 2.9 Đặc điểm lý hóa tính của giá thể ở thí nghiệm 11

Chỉ tiêu phân tích	Dớn	1/3 mụn dừa : 1/3 đất : 1/3 phân chuồng	1/2 mụn dừa : 1/4 tro trấu : 1/4 phân chuồng	1/2 mụn dừa : 1/4 tro trấu : 1/4 hữu cơ vi sinh
Dung trọng (g/cm ³)	0,2	0,67	0,19	0,2
Độ rỗng (%)	84,2	65,9	88,1	82,4
pH _{H₂O} (1 : 5)	6,5	7,6	7,2	7,4
EC (1 : 5) (mS/cm)	2,03	1,14	1,35	2,13
Chất hữu cơ (%)	49,7	7,21	10,48	9,83
N tổng số (%)	0,54	0,21	0,24	0,45
P tổng số (% P ₂ O ₅)	0,041	0,022	0,013	0,033
K tổng số (% K ₂ O)	0,02	0,02	0,04	0,04
CEC (meq/100 g)	26,6	15,79	16,48	16,60

(Phân tích tại Bộ môn Thủy Nông Trường Đại học Nông Lâm TP. HCM, 2018)

Qua Bảng 2.8 và 2.9 cho thấy giá thể có dung trọng thấp dao động 0,19 - 0,67, độ rỗng cao (65,9 - 88,1) giúp cho giá thể có khả năng giữ nước tốt, độ thoáng khí cao, phù hợp làm giá thể trong bầu. pH H₂O dao động 7,2 - 7,6 phù hợp cho cây nuôi cấy mô giai đoạn chuyển vào bầu ươm.

- **Phân bón:** Phân bò đã được ủ hoại mục. Phân hữu cơ vi sinh Đầu trâu HCMK7 (Hữu cơ 18%, Nts 2%, P₂O₅hh 2%, K₂Ohh 1% + TE (CaO, MgO, B, Cu, Zn), nấm đối kháng Trichoderma 1 x 10⁶ CFU/gam) của Công ty Bình Điền - Mê Kông. Phân urê (46% N) của Công ty Phân bón và Hóa chất Dầu khí Việt Nam. Super lân (16% P₂O₅) của Công ty Cổ phần Super Phốt phát và Hóa chất Lâm Thao. Kali clorua (60% K₂O) của Công ty Phân bón và Hóa chất Dầu khí Việt Nam.

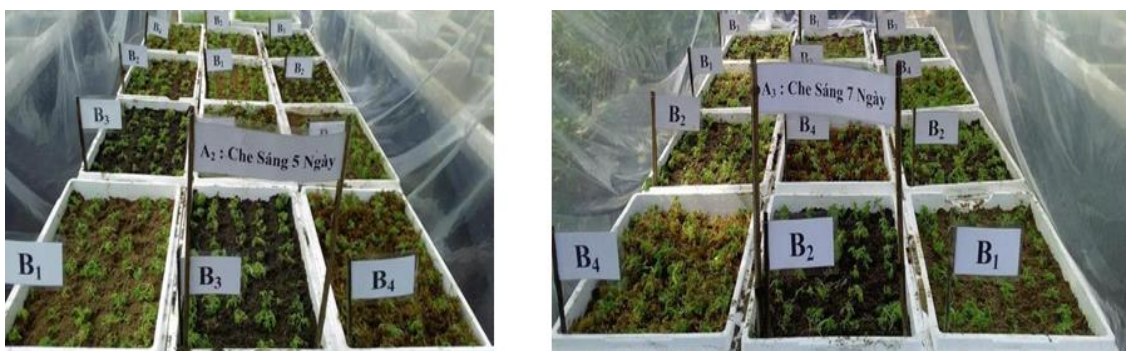
2.6.3 Phương pháp nghiên cứu

2.6.3.1 Thí nghiệm 10: Ảnh hưởng của giá thể và chế độ che sáng đến sự sinh trưởng của cây con ĐLLN trong vườn ươm giai đoạn đầu sau *in vitro*

Thí nghiệm hai yếu tố: Yếu tố A là 3 chế độ che sáng (Che sáng 3 ngày đầu; Che sáng 5 ngày đầu và Che sáng 7 ngày đầu). Yếu tố B là 4 loại giá thể (100% cát; 80% cát : 20% mụn dừa; 80% cát : 20% tro trấu và 100% dớn). Thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên, có 12 nghiệm thức, 3 lần lặp lại.

Quy mô thí nghiệm: 50 cây/ô x 12 nghiệm thức x 3 lần lặp lại = 1.800 cây.

Khoảng cách trồng: 4 x 5 cm



Hình 2.3 Toàn cảnh bố trí thí nghiệm 10

Chỉ tiêu và phương pháp theo dõi

Chỉ tiêu theo dõi: chọn 5 cây trên 1 ô cơ sở theo đường chéo góc. Ghi nhận các chỉ tiêu khi kết thúc thí nghiệm (21 NST).

- Chiều cao cây (cm): Sử dụng thước đo vị trí từ mặt giá thể đến đỉnh sinh trưởng của cây.

- Số lá (lá/cây): Đếm tất cả các lá trên cây.

- Trọng lượng cây tươi (g/cây) được xác định như sau: Chọn 2 cây trên 1 ô cơ sở. Loại bỏ giá thể trên rễ bằng cách rửa nhẹ dưới vòi nước, dùng giấy thấm cho ráo nước, cân trọng lượng toàn cây.

- Trọng lượng cây khô (g/cây): 2 cây trên 1 ô cơ sở đã được cân trọng lượng tươi, cho vào hộp nhôm và đưa vào tủ sấy ở nhiệt độ 48 - 50°C sấy đến khi trọng lượng không đổi, để nguội và cân trọng lượng cây.

- Tỷ lệ cây sống (%) = Số cây sống/tổng số cây ươm x 100. Theo dõi toàn bộ cây trên ô cơ sở khi kết thúc thí nghiệm (21 NST).

Phương pháp thực hiện:

Trộn hỗn hợp vật liệu (đã được xử lý kỹ) theo các tỷ lệ thể tích phối trộn tương ứng với từng nghiệm thức. Sau đó các giá thể được trải đều lên khay trồng có kích thước 60 x 40 x 7 cm. Dùng lưới đen tiến hành che chắn ánh sáng tương ứng cho từng nghiệm thức. Lấy bình cấy mô từ phòng thí nghiệm ra đặt vào kệ vườn ươm cho thích nghi dần với điều kiện môi trường bên ngoài trong một tuần. Sau đó lấy cây con từ bình ra, rửa sạch môi trường bám trên cây con (đặc biệt là rễ) bằng cách rửa 2 - 3 lần nước sạch, khử trùng bằng dung dịch Dithane M-45 phòng trừ nấm bệnh, loại bỏ rễ và lá bị hư thối, thao tác nhẹ nhàng tránh làm tổn thương đến rễ và lá. Tiếp theo đặt cây vào rổ nhựa có trải giấy báo ẩm. Trồng cây vào giá thể trên khay xốp, thao tác nhẹ nhàng tránh làm dập cây. Tiến hành tưới nước định kỳ 2 lần/ngày, tùy thuộc vào điều kiện thời tiết cụ thể trong từng ngày mà có chế độ tưới phù hợp, đảm bảo độ ẩm 60 - 70%. Theo dõi tình hình sâu bệnh hại và phun thuốc phòng trừ nếu có.

2.6.3.2 Thí nghiệm 11: Ảnh hưởng của giá thể và liều lượng đạm đến sinh trưởng của cây ĐLLN ra bầu trong vườn ươm

Thí nghiệm 2 yếu tố: Yếu tố C là 3 loại giá thể (1/3 mụn dừa : 1/3 đất : 1/3 phân chuồng; 1/2 mụn dừa : 1/4 tro trấu : 1/4 phân chuồng và 1/2 mụn dừa : 1/4 tro trấu : 1/4 phân hữu cơ vi sinh). Yếu tố D là 4 mức bón phân urê (46%N) (0,3 g N/bầu;

0,6 g N/bầu; 0,9 g N/bầu và 1,2 g N/bầu). Thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên, có 12 nghiệm thức, 3 lần lặp lại.

Từ kết quả thí nghiệm 10, chọn cây sống đạt tiêu chuẩn chiều cao cây 2 - 3 cm, có 5 - 6 lá để thực hiện thí nghiệm 11.

Phân nền: 0,6 g P₂O₅ + 0,3 g K₂O/bầu (tương đương: 3,8 g super lân + 0,5 g KCl/bầu).

Quy mô thí nghiệm: 10 bầu/NT x 12 nghiệm thức x 3 lần lặp lại = 360 cây (mỗi bầu trồng một cây).

Thời gian thực hiện thí nghiệm: 70 ngày.

Chỉ tiêu và phương pháp theo dõi

- Chỉ tiêu theo dõi: chọn 5 cây ngẫu nhiên của mỗi NT. Theo dõi ghi nhận chỉ tiêu ở thời điểm 10, 30, 50, 70 NST.

+ Chiều cao cây (cm): Sử dụng thước đo vị trí từ mặt giá thể đến đỉnh sinh trưởng của cây.

+ Số lá (lá/ cây): Đếm tất cả các lá trên cây. Đếm 5 cây trên 1 ô cơ sở.

+ Số rễ/cây (rễ): Đếm số rễ chính trên cây sau khi kết thúc thí nghiệm ở 50 NST.

+ Chiều dài rễ (cm): Đo chiều dài rễ dài nhất khi kết thúc thí nghiệm ở 50 NST.

+ Trọng lượng thân lá tươi (g/cây): Cân 1 lần khi kết thúc thí nghiệm ở 50 NST.

+ Trọng lượng rễ tươi (g/cây): Rửa sạch đất, tách rễ khỏi phần thân cây và cân 1 lần khi kết thúc thí nghiệm (50 NST).

+ Tỷ lệ cây con xuất vườn (%) = số cây đủ tiêu chuẩn xuất vườn/tổng số cây ban đầu x 100. Quy ước cây con xuất vườn cây có chiều cao \geq 8 cm (tính từ mặt bầu trở lên).

Phương pháp thực hiện

- Trộn hỗn hợp vật liệu các loại thành giá thể theo các tỷ lệ phối trộn tương ứng với từng nghiệm thức. Các giá thể được cho vào bầu nylon đen có kích thước 13 x 9 cm, tương ứng với thể tích 484,36 cm³, cách miệng bầu 2 cm. Thể tích của giá thể 376,73 cm³. Bầu có đục lỗ (đường kính 6 mm, đục lỗ bên hông và ở đáy, số lỗ đục trung bình là 10 lỗ/1túi) để thoát nước tránh ngập úng. Lấy cây con từ giá thể

trong khay, sau đó trồng ngay vào bầu đã được chuẩn bị. Chú ý thao tác nhẹ nhàng, nhanh gọn để tránh làm dập và héo cây. Phân urê (46% N) ở các liều lượng tương ứng cho từng nghiệm thức được chia ra làm 5 lần bón (5, 15, 25, 35, 45 NST). Mỗi lần bón hòa phân vào 100 mL nước tưới gốc. Tiến hành tưới nước định kỳ 2 lần/ngày, tùy thuộc vào điều kiện thời tiết cụ thể trong từng ngày mà có chế độ tưới phù hợp, đảm bảo độ ẩm 60 - 70%. Theo dõi tình hình sâu bệnh hại và phun thuốc phòng trừ nếu có.

2.6.3.3 Thí nghiệm 12: Ảnh hưởng của giá thể và liều lượng lân đến sinh trưởng của cây ĐLLN ra bầu trong vườn ươm

Thí nghiệm 2 yếu tố: Yếu tố G là 3 loại giá thể (1/3 mụn dừa : 1/3 đất : 1/3 phân chuồng; 1/2 mụn dừa : 1/4 tro trấu : 1/4 phân chuồng và 1/2 mụn dừa : 1/4 tro trấu : 1/4 phân hữu cơ vi sinh). Yếu tố H là 4 mức bón phân lân (0,3 g P₂O₅/bầu; 0,6 g P₂O₅/bầu; 0,9 g P₂O₅/bầu và 1,2 g P₂O₅/bầu). Thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên, có 12 nghiệm thức, 3 lần lặp lại.

Từ kết quả thí nghiệm 10, chọn nghiệm thức tốt nhất, ra giống đại trà, chọn cây sống đạt tiêu chuẩn cao 2 - 3 cm, có 5 - 6 lá thực hiện thí nghiệm 12.

Phân nền: 0,6 g N + 0,3 g K₂O/bầu (tương đương: 1,3 g urê/bầu + 0,5 g KCl/bầu).

Quy mô thí nghiệm: 10 bầu/ô x 12 nghiệm thức x 3 lần lặp lại = 360 cây (mỗi bầu trồng một cây).

Thời gian thực hiện thí nghiệm: 50 ngày.

Chỉ tiêu và phương pháp theo dõi

Chỉ tiêu và phương pháp theo dõi tương tự như ở thí nghiệm 11.

- Chỉ tiêu theo dõi: Chọn 5 cây ngẫu nhiên trên 1 ô cơ sở. Đo khi cây được 10 ngày sau khi vô bầu. Đo 3 lần ở thời điểm 10 NST, 30 NST, 50 NST.

Phương pháp thực hiện

Phương pháp thực hiện thí nghiệm tương tự như thí nghiệm 11.

2.6.3.4 Kiểm tra tính đồng nhất di truyền của cây con ĐLLN tạo từ phôi vô tính

Bảng 2.10 Các primer ISSR sử dụng trong nghiên cứu

Tên primer	Trình tự primer	Nhiệt độ biến tính của primer (T_m)	TLTK
UBC811	(GA) ₈ C	52,8°C	Được công bố bởi NAPS Unit (UBC primers set#9)
UBC825	(AC) ₈ T	57,4°C	
UBC840	(GA) ₈ YT	53,2°C	
UBC841	(GA) ₈ YC	54,2°C	
UBC843	(CT) ₈ RA	52,9°C	
UBC844	(CT) ₈ RC	54,3°C	
UBC854	(CT) ₈ RG	53,9°C	
UBC855	(AC) ₈ YT	58,9°C	
UBC856	(AC) ₈ YA	58,6°C	
UBC860	(TG) ₈ RA	58,8°C	
UBC880	(GGAGA) ₃	55,0°C	
UBC890	VHV(GT) ₇	58,3°C	

Nhiệt độ biến tính (T_m) của các primer được tính dựa trên công cụ OligoAnalyzer tại trang web <https://sg.idtdna.com/calc/analyzer> với nồng độ primer 10 μ M, các thông số khác giữ mặc định. Đây là cơ sở để tìm được nhiệt độ bắt cặp (T_a) tối ưu trong phản ứng PCR.

Chọn lọc chỉ thị ISSR: các hóa chất, thiết bị sử dụng tương tự phần xác định trình tự vùng gene DNA barcode của 8 mẫu ĐLLN ở nội dung 1, thành phần phản ứng PCR và chu kỳ nhiệt cơ bản theo Bảng 2.11 và 2.12:

Bảng 2.11 Thành phần hoá chất sử dụng trong phản ứng PCR

Thành phần hóa chất	Thể tích (μ L)
Nước nuclease free	4,25
Master mix 2X	6,25
Primer (10 μ M)	1,0
DNA mẫu (50 ng/ μ L)	1
Tổng thể tích	12,5

Bảng 2.12 Chu kỳ nhiệt cơ bản cho phản ứng PCR của các primer ISSR

Biến tính ban đầu	95°C	5 phút	
Biến tính	94°C	1 phút	} 40 chu kỳ
Gắn mồi	55°C	1 phút	
Kéo dài chuỗi	72°C	2 phút	
Ổn định	72°C	6 phút	
Kết thúc phản ứng	4°C	-	

Sàng lọc primer ISSR có độ đa hình cao đối với cây ĐLLN, thí nghiệm sẽ tiến hành khuếch đại trên mẫu DNA từ các dòng ĐLLN đã thu thập với 12 primer ISSR. Sau khi khuếch đại sẽ ghi nhận tổng số băng khuếch đại, số băng đa hình từ đó tính được tỷ lệ số băng đa hình của 12 primer. Sẽ tiến hành chọn ra các primer có tỷ lệ đa hình cao nhất để kiểm tra tính đồng nhất di truyền của các cây con ĐLLN được hình thành từ phôi vô tính.

Kiểm tra tính đồng nhất di truyền: chọn ngẫu nhiên 4 cây ĐLLN trong số 100 cây ở mỗi lần ra cây để thu được 20 cây từ 5 lần ra cây. Sử dụng mẫu DNA của 20 cây ĐLLN tạo từ phôi sau khi đem trồng ngoài vườn ươm được 4 tháng ký hiệu N1 - N20 để kiểm tra tính đồng nhất. Chọn các primer hỗ trợ tốt nhất từ kết quả chọn lọc chi thị ISSR. Các hóa chất, thiết bị sử dụng tương tự phần đánh giá sự khác biệt di truyền của 8 mẫu ĐLLN ở nội dung 1, thành phần hóa chất và chu trình nhiệt cơ bản tương tự phần chọn lọc chi thị ISSR.

2.7 Phương pháp phân tích dữ liệu

2.7.1 Phân tích trình tự DNA barcode của 8 mẫu giống ĐLLN

Phản ứng PCR của từng mẫu phân tích được tiến hành 3 lần lặp lại, các mẫu có sản phẩm DNA khuếch đại có kích thước bằng nhau được sử dụng cho việc giải trình tự. Lựa chọn một sản phẩm PCR ở mỗi mẫu để tinh sạch và giải trình tự hai chiều nhằm đảm bảo tính chính xác của các nucleotide. Các trình tự được hiệu chỉnh bằng chương trình BioEdit 7.0.5.3. Trên cơ sở kết quả giải trình tự các sản phẩm PCR sẽ tiến hành đánh giá sự khác biệt ở mức độ nucleotide giữa 8 mẫu bởi công cụ Clustal Omega tại trang web <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>. Xác định sự tương

đồng giữa các mẫu phân tích với các loài trên thế giới bằng cách sử dụng công cụ BLAST (NCBI, USA).

2.7.2 Phân tích kết quả điện di chỉ thị ISSR của 8 mẫu đỉnh lã nghiên cứu

Sử dụng phần mềm Microsoft Excel 2016 để ghi nhận dưới dạng nhị phân các băng DNA thu được. Sự hiện diện hoặc không hiện diện của một băng nào đó trên gel sẽ được ghi nhận lần lượt là 1 và 0.

2.7.3 Phân tích thống kê

Số liệu thí nghiệm được thu thập tổng hợp bằng phần mềm Microsoft Excel 2016 và xử lý thống kê theo phương pháp phân tích phương sai (ANOVA), kết quả phân hạng theo Duncan bằng chương trình SAS 9.1.

Chương 3

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Đánh giá hàm lượng axit oleanolic của 18 mẫu giống đình lăng và xác định trình tự DNA barcode của 8 mẫu giống ĐLLN

3.1.1 Kết quả đánh giá hàm lượng axit oleanolic của 18 mẫu giống đình lăng

Bảng 3.1 Hàm lượng axit oleanolic của 18 mẫu giống đình lăng

Nhóm giống ĐL	Nơi thu mẫu	Ký hiệu	Hàm lượng axit oleanolic (%)
ĐL lá nhỏ	Nguồn giống của Viện SHNĐ	D1	1,12
ĐL lá nhỏ	Tiền Giang	D2	1,08
ĐL lá nhỏ	Khánh Hòa	D3	1,15
ĐL lá nhỏ	Viện Dược liệu, Hà Nội	D4	1,14
ĐL lá nhỏ	Nam Định	D5	1,07
ĐL lá nhỏ	Hải Dương	D6	1,12
ĐL lá nhỏ	Thủ Đức, TP. HCM (Xuất xứ: Thái Nguyên)	D7	1,18
ĐL lá nhỏ	Đồng Nai	D8	1,09
ĐL lá to	Hải Dương	D9	0,69
ĐL lá to	Côn Đảo	D10	0,78
ĐL lá to	Nguồn giống của Viện SHNĐ	D11	0,72
ĐL lá đĩa	Thủ Đức, TP. HCM	D12	1,01
ĐL lá rang	Viện Dược liệu, Hà Nội	D13	0,87
ĐL lá răng	Côn Đảo	D14	0,93
ĐL lá tròn	Bình Thuận	D15	0,97
ĐL lá tròn	Bình Thuận	D16	0,91
ĐL lá tròn	Bình Thuận	D17	0,88
ĐL lá trở	Viện Dược liệu, Hà Nội	D18	1,04

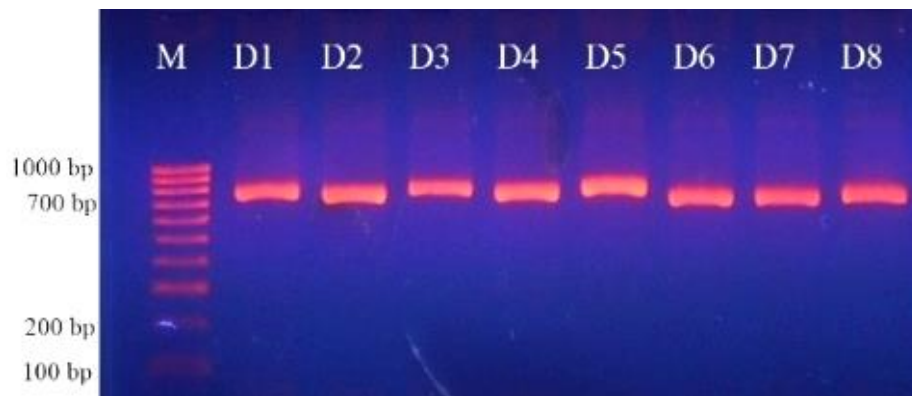
(Kết quả phân tích đính kèm phụ lục)

Kết quả phân tích cho thấy các mẫu đỉnh lãg có chứa hàm lượng axit oleanolic dao động từ 0,69 đến 1,18%. Nhóm đỉnh lãg lá to (D10 - D11) chứa hàm lượng axit oleanolic thấp nhất (0,69 - 0,78%) so với các nhóm mẫu đỉnh lãg khác; kế đến là nhóm đỉnh lãg lá răng (D13 - D14) chứa hàm lượng axit oleanolic dao động từ 0,87 đến 0,93%; nhóm đỉnh lãg lá tròn (D15 - D17) đạt 0,88 - 0,97%; nhóm đỉnh lãg lá đĩa (D12) đạt 1,01%; nhóm đỉnh lãg lá trỏ (D18) đạt 1,04%; và nhóm ĐLLN (D1 - D8) chứa hàm lượng axit oleanolic cao nhất so với các nhóm mẫu đỉnh lãg khác, dao động từ 1,07 đến 1,18%, trong đó Mẫu ĐLLN D7 có hàm lượng axit oleanolic cao nhất đạt 1,18% (Bảng 3.1). Kết quả trên tương tự với nghiên cứu của Nguyễn Thị Phương Thảo và cs (2011) khi phân tích mẫu thân lá đỉnh lãg lá xẻ với hàm lượng axit oleanolic đạt 1,5%. Từ kết quả phân tích này, mẫu ĐLLN D7 được du nhập về Thủ Đức, TP. Hồ Chí Minh (xuất xứ từ Thái Nguyên) được chọn làm vật liệu nghiên cứu nhân phôi vô tính.

3.1.2. Xác định trình tự 3 vùng gen DNA barcode của 8 mẫu giống ĐLLN

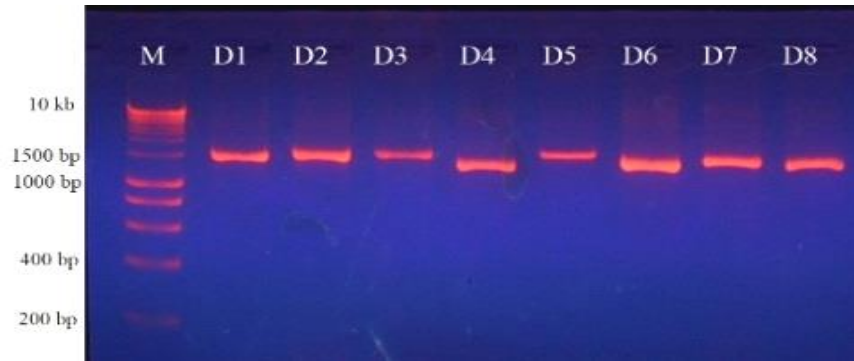
3.1.2.1 Trình tự vùng gen

Các mẫu ĐLLN (D1 – D8) có hàm lượng axit oleanolic cao nhất được sử dụng để đánh giá sự khác biệt di truyền. Kết quả kiểm tra sản phẩm khuếch đại các vùng gen *matK*, *rbcL* và *trnH-psbA* trên gel agarose 1,5% (Hình 3.1, Hình 3.2 và Hình 3.3) cho thấy ba vùng gen *matK*, *rbcL* và *trnH-psbA* đều được khuếch đại tốt ở 8 mẫu đỉnh lãg lá nhỏ nghiên cứu.



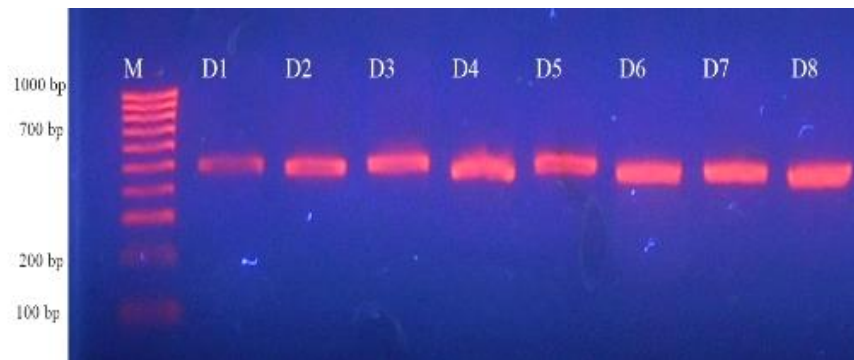
Hình 3.1 Sản phẩm khuếch đại vùng gen *matK* ở 8 mẫu giống ĐLLN

M: thang DNA 100 bp, D1 - D8: các mẫu giống ĐLLN.



Hình 3.2 Sản phẩm khuếch đại vùng gen *rbcL* ở 8 mẫu giống ĐLLN

M: thang DNA 1 kb, D1 - D8: các mẫu giống ĐLLN.



Hình 3.3 Sản phẩm khuếch đại vùng gen *trnH-psbA* ở 8 mẫu giống ĐLLN.

M: thang DNA 100 bp, D1 - D8: các mẫu giống ĐLLN.

Các sản phẩm khuếch đại tạo ra một băng duy nhất với kích thước khoảng 700 bp (gen *matK*), 1.400 bp (gen *rbcL*) và 500 bp (gen *trnH-psbA*), phù hợp để thực hiện tiếp tục bước giải trình tự.

3.1.2.2 Sự tương đồng và khác biệt trình tự nucleotide các vùng gen *matK*, *rbcL* và *trnH-psbA* của 8 mẫu giống ĐLLN

Ở vùng gen *matK* và *rbcL*, trình tự nucleotide hoàn toàn giống nhau 100%. Điều này chứng tỏ đối với *Polyscias fruticosa*, đây là hai vùng gen có tính bảo tồn cao, không hỗ trợ nhận diện các mẫu ĐLLN.

Kết quả so sánh bắt cặp cho thấy vùng *trnH-psbA* của 8 mẫu khác nhau ở 21 vị trí nucleotide. Trong đó, các vị trí 10, 20 và 31 cho thấy mẫu ĐLLN D7 có sự đặc trưng chứa Cytosine (C) khác biệt so với các mẫu khác.

Bảng 3.2 Vị trí các nucleotide khác biệt trên vùng gen *trnH-psbA* của 8 mẫu giống ĐLLN

Các mẫu giống đỉnh lăng	Vị trí vùng gen <i>trnH-psbA</i>		
	10	20	31
Đỉnh lăng lá nhỏ (D1)	A	T	C
Đỉnh lăng lá nhỏ (D2)	C	T	C
Đỉnh lăng lá nhỏ (D3)	A	C	C
Đỉnh lăng lá nhỏ (D4)	A	T	C
Đỉnh lăng lá nhỏ (D5)	A	T	G
Đỉnh lăng lá nhỏ (D6)	A	T	C
Đỉnh lăng lá nhỏ (D7)	C	C	C
Đỉnh lăng lá nhỏ (D8)	A	T	C

Nhìn chung vùng gen *trnH-psbA* có sự khác biệt nucleotide nhiều hơn so với hai vùng gen *matK* và *rbcL*.

Kiểm tra bằng công cụ BLAST cho thấy trình tự vùng *matK* của 8 mẫu giống ĐLLN có mức độ tương đồng 100% với hai loài *Polyscias fruticosa* voucher VTN993 (KX768333.1) và *Polyscias balfouriana* voucher Hosam00272 (KX783763.1). Đối với vùng *rbcL* cho thấy cả 8 mẫu giống ĐLLN có mức độ bao phủ 99% và độ tương đồng 98% với loài *Polyscias guilfoylei* (U50251.1). Đối với vùng gen *trnH-psbA* kết quả cho thấy 8 mẫu giống ĐLLN có độ bao phủ 92% và độ tương đồng 96% – 97% với giống *Polyscias australiana* voucher Wen 10707 (JX106123.1), có độ bao phủ 92% và độ tương đồng 95% – 97% với giống *Polyscias* sp. Wen 10765 (JX106126.1), có độ bao phủ 83% – 84% và độ tương đồng 97% – 99% với loài *Polyscias fruticosa* (HQ220595.1).

Như vậy, thực hiện BLAST trình tự 8 mẫu giống ĐLLN ở các vùng *matK*, *rbcL*, *trnH-psbA* cho thấy các vùng gen trên của 8 mẫu giống ĐLLN trong nghiên cứu có sự tương đồng cao với các loài đỉnh lăng khác nhau trên ngân hàng gen.

Từ các kết quả trên, dòng ĐLLN D7 phù hợp để lựa chọn thực hiện các nghiên cứu tạo mô sẹo và tạo phôi tiếp theo.

3.2 Cảm ứng tạo mô sẹo và tạo phôi vô tính cây ĐLLN

3.2.1 Ảnh hưởng của nồng độ 2,4-D đến sự cảm ứng tạo mô sẹo của mẫu phiến lá và cuống lá cây ĐLLN *in vitro*

3.2.1.1 Thời gian hình thành và tỷ lệ mẫu tạo mô sẹo của mẫu phiến lá và cuống lá cây ĐLLN *in vitro*

Bảng 3.3 Thời gian hình thành mô sẹo (NSC) và tỷ lệ tạo mô sẹo (%) của mẫu phiến lá và cuống lá cây ĐLLN *in vitro*

Chỉ tiêu theo dõi	Loại mẫu (A)	Nồng độ 2,4-D (mg/L) (B)				TB (A)
		0	1	2	3	
Thời gian hình thành mô sẹo (NSC)	Phiến lá	Không tạo mô sẹo	21	21	23	
	Cuống lá	Không tạo mô sẹo	23	22	24	
Tỷ lệ mẫu tạo mô sẹo (%)	Phiến lá	0,0 ^e	93,3 ^b	98,9 ^a	86,7 ^c	69,7 ^A
	Cuống lá	0,0 ^e	80,0 ^{cd}	97,8 ^a	74,4 ^d	63,1 ^B
	TB (B)	0,0 ^C	86,7 ^B	98,3 ^A	80,6 ^B	
CV = 6,7%; F _A = 16,3 ^{**} ; F _B = 613,8 ^{**} ; F _{A*B} = 3,2 [*]						

Trong cùng một nhóm trung bình, các ký tự khác nhau theo sau các giá trị trung bình khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê; *: có ý nghĩa ở mức $0,01 < P \leq 0,05$; **: rất có ý nghĩa ở mức $P \leq 0,01$ (Số liệu đã được chuyển đổi sang dạng $\sqrt{x + 0,5}$ khi phân tích thống kê).

Kết quả ở Bảng 3.3 cho thấy mẫu phiến lá nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung 2,4-D ở nồng độ 1 mg/L và 2 mg/L tạo mô sẹo sớm nhất vào thời điểm 21 NSC. Mẫu cuống lá phát sinh mô sẹo chậm hơn mẫu phiến lá. Mẫu cuống lá nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung 2,4-D ở nồng độ 3 mg/L tạo mô sẹo chậm nhất (24 NSC). Mẫu phiến lá hay mẫu cuống lá nuôi cấy trên môi trường MS không bổ sung 2,4-D không có biểu hiện hình thành mô sẹo. Ở nồng độ 1 - 2 mg/L 2,4-D không có sự khác biệt, tuy nhiên khi tăng lên 3 mg/L thì quá trình tạo mô sẹo bị ức chế.

Tỷ lệ trung bình tạo mô sẹo ở mẫu phiến lá đạt 69,7% và có sự khác biệt so với mẫu cuống lá. Có thể mẫu cuống lá có kết cấu chặt/cứng đặc trưng của tế bào do vậy không tạo thuận lợi cho sự hình thành mô sẹo. Ảnh hưởng của 2,4-D đến tỷ lệ

mẫu tạo mô sẹo cho thấy khi nuôi cấy mẫu phiến lá hay mẫu cuống lá thì ở nồng độ 2 mg/L cho tỷ lệ mẫu tạo mô sẹo cao nhất đạt 98,3% và khác biệt so với các nồng độ 2,4-D còn lại. Trên môi trường không bổ sung 2,4-D ở cả hai loại mẫu của lá đều không hình thành mô sẹo.

Kết quả này tương tự kết quả của Lê Thiên Thư và Võ Thị Bạch Mai (2005) khi tạo ra được mô sẹo từ lá non *in vitro* trên môi trường MS có bổ sung 2,4-D với nồng độ 2 mg/L và mô sẹo phát triển tốt nhất trên môi trường này.

Tác động của các chất điều hòa sinh trưởng ngoại sinh đóng vai trò trung tâm trong điều hòa tín hiệu, dẫn đến việc tái thiết lập chương trình biểu hiện gen. Điều này dẫn đến kết quả là cảm ứng một loạt các quá trình phân chia tế bào dẫn đến sự hình thành và tăng trưởng mô sẹo theo cách vô tổ chức hoặc tăng trưởng có cực từ đó dẫn đến tạo phôi (Dubits và cs, 1995). Kết quả trong nghiên cứu này cho thấy 2,4-D đã ảnh hưởng rõ rệt tới khả năng tạo mô sẹo.

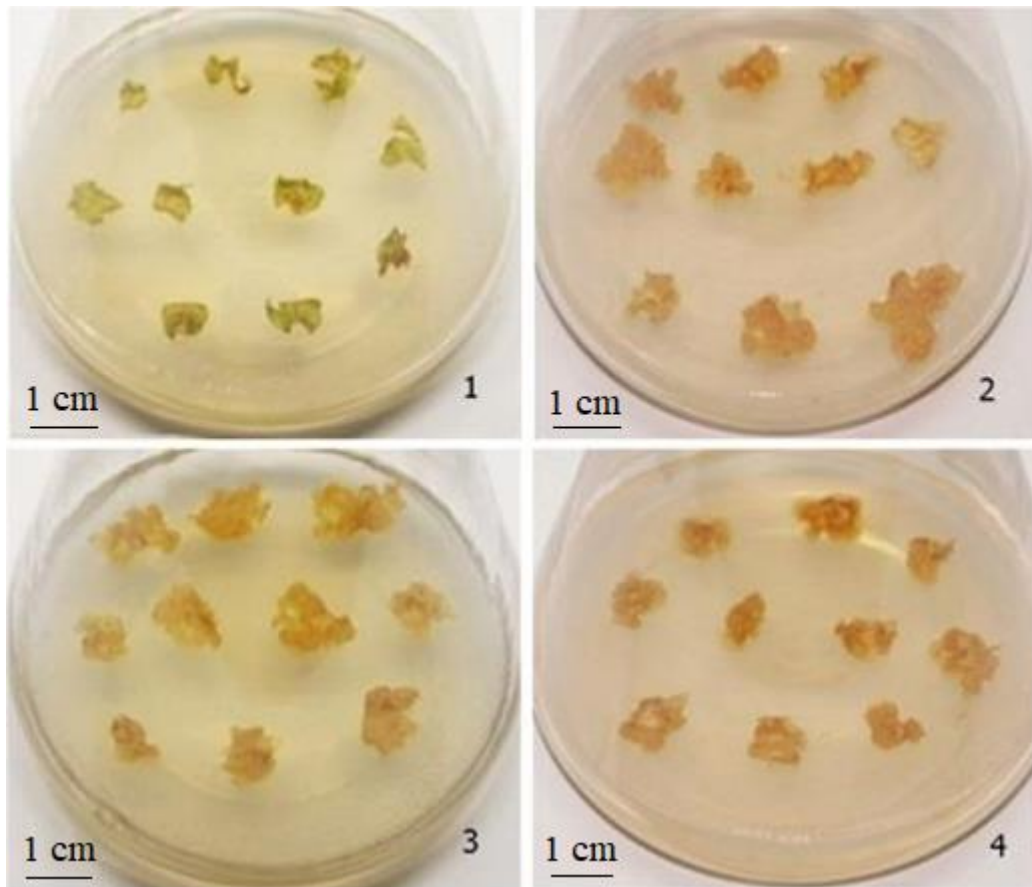
3.2.1.2 Đường kính mô sẹo và trọng lượng tươi của mẫu phiến lá và cuống lá cây ĐLLN *in vitro*

Bảng 3.4 Đường kính mô sẹo và trọng lượng tươi của mẫu phiến lá và cuống lá cây ĐLLN *in vitro* thời điểm 60 NSC

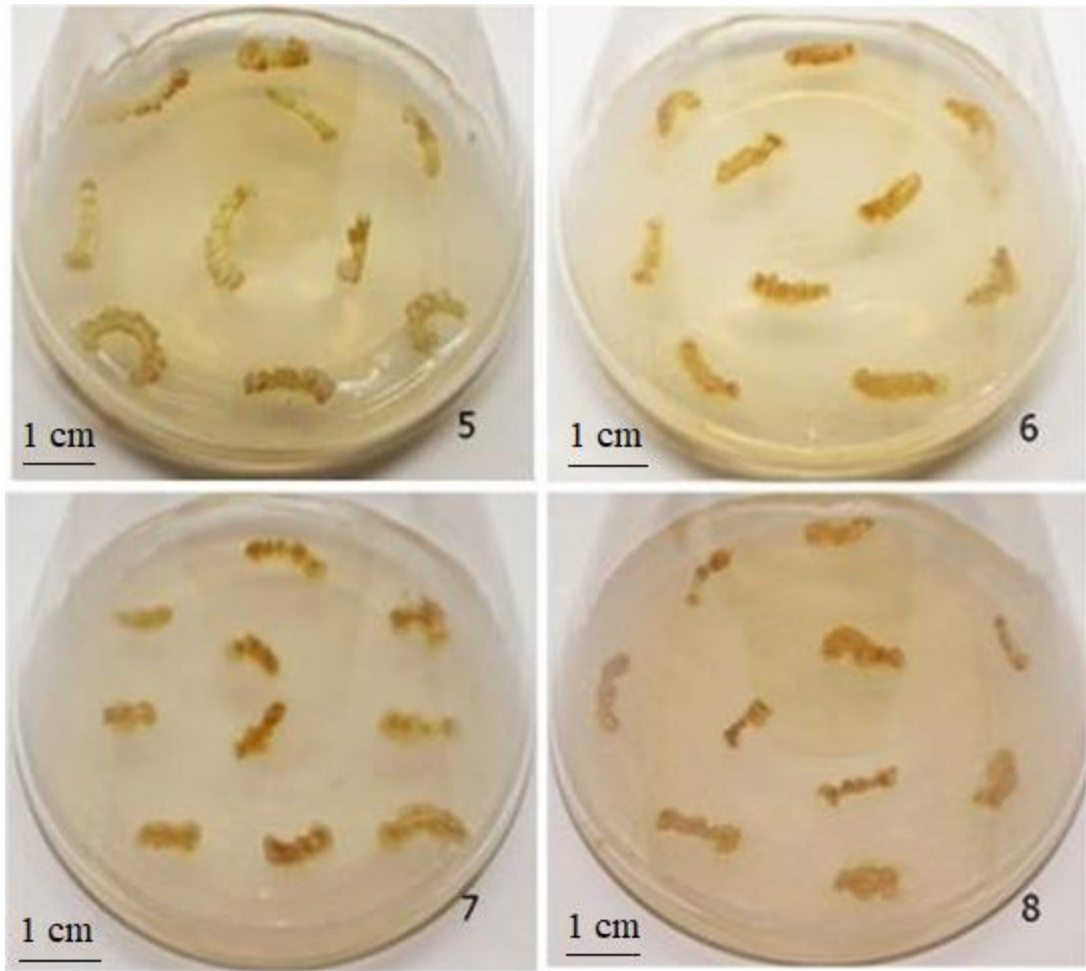
Chỉ tiêu	Loại mẫu (A)	Nồng độ 2,4-D (mg/L) (B)				TB (A)
		0	1	2	3	
Đường kính mô sẹo (cm)	Phiến lá	0,0 ^c	1,6 ^a	1,9 ^a	1,5 ^a	1,2 ^A
	Cuống lá	0,0 ^c	0,7 ^b	0,7 ^b	0,7 ^b	0,5 ^B
	TB (B)	0,0 ^B	1,1 ^A	1,3 ^A	1,1 ^A	
CV = 6,5%; F _A = 89,8 ^{**} ; F _B = 89,2 ^{**} ; F _{A*B} = 10,5 ^{**}						
Trọng lượng tươi của mẫu (mg)	Phiến lá	30,0 ^f	177,3 ^b	219,7 ^a	82,0 ^d	127,3 ^A
	Cuống lá	57,3 ^e	96,0 ^{cd}	112,7 ^c	91,7 ^{cd}	89,4 ^B
	TB (B)	43,7 ^D	136,7 ^B	166,2 ^A	86,8 ^C	
CV = 8,6%; F _A = 98,5 ^{**} ; F _B = 201,6 ^{**} ; F _{A*B} = 75,6 ^{**}						

Trong cùng một nhóm trung bình, các ký tự khác nhau theo sau các giá trị trung bình khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê; *: có ý nghĩa ở mức $0,01 < P \leq 0,05$; **: rất có ý nghĩa ở mức $P \leq 0,01$ (Số liệu đã được chuyển đổi sang dạng $\sqrt{x + 0,5}$ khi phân tích thống kê).

Mẫu phiến lá nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung 2,4-D ở các nồng độ 1, 2 và 3 mg/L có đường kính mô sẹo lần lượt đạt 1,6 cm, 1,9 cm và 1,5 cm và có sự khác biệt so với mô sẹo hình thành từ cuống lá. Trọng lượng mẫu (chủ yếu là mô sẹo) trung bình các nghiệm thức lớn hơn ở mẫu phiến lá đạt 127,3 mg và có sự khác biệt so với mô sẹo hình thành từ mẫu cuống lá. Mẫu phiến lá trên môi trường MS có bổ sung 2,4-D nồng độ 2 mg/L cho trọng lượng mô sẹo lớn nhất đạt 219,7 mg, có sự khác biệt so với các nồng độ còn lại trong thí nghiệm. Tương tự ở nồng độ 2 mg/L 2,4-D trọng lượng mô sẹo cuống lá lớn nhất chỉ đạt 166,2 mg và có sự khác biệt so với các nồng độ còn lại trong thí nghiệm.



Hình 3.4 Mô sẹo từ mẫu phiến lá ĐLLN *in vitro* trên môi trường MS có bổ sung 2,4-D với nồng độ 0 mg/L (1), 1 mg/L (2), 2 mg/L (3), và 3 mg/L thời điểm 60 NSC (1 - 4).



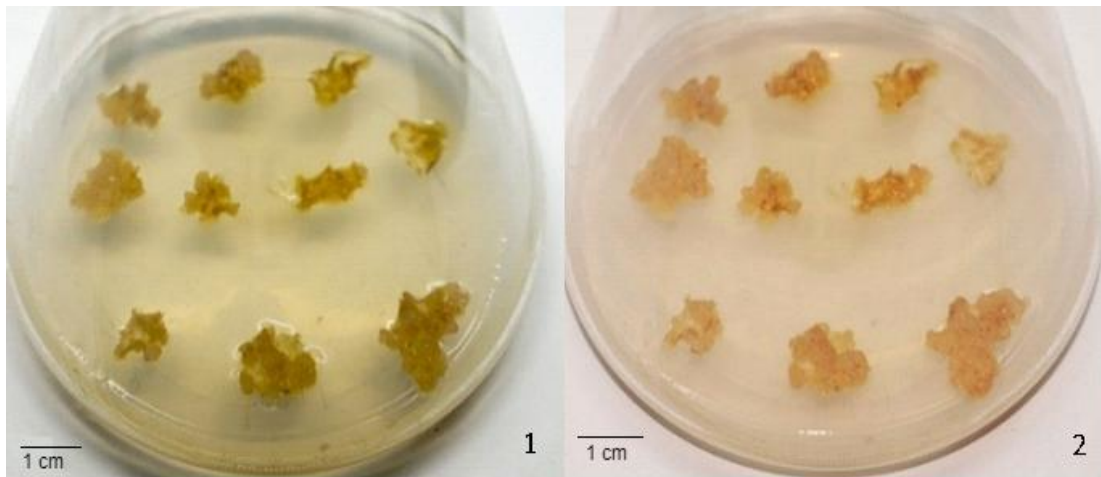
Hình 3.5 Mô sẹo từ mẫu cuống lá DLLN *in vitro* trên môi trường MS có bổ sung 2,4-D với nồng độ 0 mg/L (5), 1 mg/L (6), 2 mg/L (7), và 3 mg/L thời điểm 60 NSC (5 – 8).

3.2.1.3 Màu sắc, cấu trúc mô sẹo ở mẫu phiến lá và cuống lá cây *in vitro*

Kết quả ghi nhận cho thấy ở mẫu phiến lá và cuống lá tại các thời điểm 30 - 60 NSC trên môi trường không bổ sung 2,4-D đều không tạo mô sẹo. Với nồng độ 2,4-D từ 1 đến 3 mg/L, ở giai đoạn 30 - 50 NSC đều cho mô sẹo với màu sắc và cấu trúc khác nhau - trắng/hơi trắng, hơi vàng, hơi xám; xốp, mềm ướt, khô bề mặt.

Khi không bổ sung 2,4-D, mẫu phiến lá và cuống lá về màu sắc và hình dạng vẫn giữ nguyên. Tại các vết cắt có hiện tượng hóa nâu. Mẫu phiến lá và cuống lá nuôi cấy trên các môi trường có bổ sung 2,4-D đều có hiện tượng tạo mô sẹo. Giai đoạn

đầu sau khi cấy, mẫu phiến lá và cuống lá đều có biểu hiện hấp thụ môi trường, tế bào trương lên, mẫu phiến lá và cuống lá mất dần màu xanh và chuyển sang màu vàng. Ở 20 NSC, mẫu nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung 2,4-D bắt đầu hình thành mô sẹo. Từ các vết cắt, tế bào mô sẹo bắt đầu hình thành và có màu hơi vàng, mềm, ướt. Giai đoạn 30 - 50 NSC mô sẹo tăng nhanh về kích thước, giữ lại mô hơi vàng, có bề mặt khô hơn, có thể đây là loại mô có khả năng sinh phôi cao. Sau 50 NSC, mô sẹo dần chuyển sang màu vàng nâu - biểu hiện hóa già (Hình 3.6).



Hình 3.6 Mô sẹo từ mẫu phiến lá cây ĐLLN *in vitro* trên môi trường MS có bổ sung 2,4-D với nồng độ 2 mg/L thời điểm 50 NSC (1) và 60 NSC (2).

Ở nghiên cứu này, sự hình thành loại mô vàng, hơi khô ở thời điểm muộn của quá trình nuôi cấy tạo mô sẹo (sau 6 - 7 tuần) khá tương hợp với kết quả nghiên cứu của Trương Thị Bích Phượng và cs (2017) khi kết luận mô sẹo (từ gốc bẹ lá kích thước 1,0 cm) chuyển sang dạng rắn hơn, mô sẹo có kích thước lớn, ngả màu vàng xanh sau 8 tuần nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung 2,4-D (1 mg/L) (trước thời điểm 8 tuần chỉ ghi nhận mô sẹo xốp). Tương tự, ở cuối giai đoạn nuôi cấy (sau 50 ngày), mô sẹo cũng bắt đầu chuyển sang màu nâu như ở trường hợp nuôi cấy của các tác giả trên (sau 10 tuần). Kết quả nghiên cứu của Bui Dinh Thạch và cs (2016) cũng cho thấy mô sẹo cứng, vàng hơi xanh hình thành nhiều chỉ sau 4 tuần nuôi cấy trên môi trường MS có 2,4-D (1 - 5 mg/L) và nhiều hơn so với môi trường có NAA (1 - 5 mg/L).

3.2.2 Ảnh hưởng của 2,4-D đến sự cảm ứng tạo mô sẹo của mẫu phiến lá và cuống lá cây ĐLLN từ vườn ươm

3.2.2.1 Ảnh hưởng của nồng độ 2,4-D đến thời gian và tỷ lệ tạo mô sẹo của mẫu phiến lá và cuống lá cây ĐLLN từ vườn ươm

Bảng 3.5 Thời gian (NSC) và tỷ lệ tạo mô sẹo (%) của mẫu phiến lá và cuống lá cây ĐLLN từ vườn ươm ở 60 NSC

Chỉ tiêu theo dõi	Loại mẫu (A)	Nồng độ 2,4-D (mg/L) (B)				TB (A)
		0	1	2	3	
Thời gian hình thành mô sẹo (NSC)	Phiến lá	Không tạo mô sẹo	22	22	23	
	Cuống lá	Không tạo mô sẹo	24	24	25	
Tỷ lệ mẫu tạo mô sẹo (%)	Phiến lá	0,0 ^f	93,3 ^b	97,8 ^a	80,0 ^c	67,8 ^A
	Cuống lá	0,0 ^f	53,3 ^d	64,5 ^d	33,3 ^e	37,8 ^B
	TB (B)	0,0 ^D	73,3 ^B	81,1 ^A	56,7 ^C	

CV = 6,7%; F_A = 16,3^{**}; F_B = 613,8^{**}; F_{A*B} = 3,2^{*}

*Trong cùng một nhóm trung bình, các kí tự khác nhau theo sau các giá trị trung bình khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê; **: rất có ý nghĩa ở mức $P \leq 0,01$ (Số liệu đã được chuyển đổi sang dạng $\sqrt{x + 0,5}$ khi phân tích thống kê).*

Mẫu phiến lá nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung 2,4-D ở nồng độ 1 mg/L và 2 mg/L tạo mô sẹo sớm nhất vào thời điểm 22 NSC. Mẫu cuống lá phát sinh mô sẹo chậm hơn mẫu phiến lá, trong đó mẫu cuống lá nuôi cấy trên môi trường bổ sung 3 mg/L 2,4-D tạo mô sẹo chậm nhất (25 NSC). Các nghiệm thức không bổ sung 2,4-D đều không tạo mô sẹo (Bảng 3.5).

Tỷ lệ trung bình tạo mô sẹo cao nhất ở mẫu phiến lá đạt 67,8% và khác biệt so với mẫu cuống lá. Nồng độ 2 mg/L 2,4-D cho tỷ lệ trung bình mẫu tạo mô sẹo cao nhất đạt 81,1 % khác biệt so với các nồng độ 2,4-D còn lại trong thí nghiệm. Mẫu phiến lá nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung 2,4-D ở nồng độ 2 mg/L có tỷ lệ tạo mô sẹo cao nhất đạt 97,8 %; khác biệt với tất cả các nồng độ còn lại trong thí nghiệm.

3.2.2.2 Ảnh hưởng của nồng độ 2,4-D đến đường kính mô sẹo và trọng lượng tươi của mẫu phiến lá và cuống lá cây ĐLLN từ vườn ươm

Bảng 3.6 Đường kính mô sẹo, trọng lượng tươi của mẫu phiến lá và cuống lá cây ĐLLN từ vườn ươm thời điểm 60 NSC

Chỉ tiêu	Loại mẫu (A)	Nồng độ 2,4-D (mg/L) (B)				
		0	1	2	3	TB (A)
Đường kính mô sẹo (cm)	Phiến lá	0,0 ^c	1,3 ^a	1,4 ^a	1,1 ^a	0,9 ^A
	Cuống lá	0,0 ^c	0,7 ^b	0,7 ^b	0,6 ^b	0,5 ^B
	TB (B)	0,0 ^B	1,0 ^A	1,1 ^A	0,9 ^A	
CV = 5,3%; F _A = 54,7 ^{**} ; F _B = 112,1 ^{**} ; F _{A*B} = 6,4 ^{**}						
Trọng lượng tươi của mẫu (mg)	Phiến lá	30,0 ^e	88,3 ^a	95,3 ^a	60,0 ^b	68,4 ^A
	Cuống lá	37,0 ^{de}	46,7 ^{cd}	57,0 ^{bc}	45,3 ^{cd}	46,5 ^B
	TB (B)	33,5 ^C	67,5 ^A	76,2 ^A	52,7 ^B	
CV = 9,2%; F _A = 103,7 ^{**} ; F _B = 75,4 ^{**} ; F _{A*B} = 27,7 ^{**}						

Trong cùng một nhóm trung bình, các kí tự khác nhau theo sau các giá trị trung bình khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê; **: rất có ý nghĩa ở mức $P \leq 0,01$ (Số liệu đã được chuyển đổi sang dạng $\sqrt{x + 0,5}$ khi phân tích thống kê)

Kết quả cho thấy đường kính trung bình mô sẹo lớn hơn ở mẫu phiến lá đạt 0,9 cm và có sự khác biệt so với mẫu cuống lá. Khi xét về ảnh hưởng của 2,4-D cho thấy ở ba nồng độ 2,4-D 1, 2 và 3 mg/L cho đường kính trung bình mô sẹo lần lượt là 1,0 cm, 1,1 cm và 0,9 cm; có sự khác biệt so với việc không sử dụng 2,4-D. Giữa ba nồng độ trên, sự khác biệt không có ý nghĩa. Mẫu phiến lá nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung 2,4-D ở các nồng độ 1, 2 và 3 mg/L cho đường kính mô sẹo lớn nhất đạt lần lượt là 1,3. 1,4 và 1,1 cm; có sự khác biệt so với mẫu cuống lá (giữa ba nồng độ trên có sự khác biệt không có ý nghĩa).

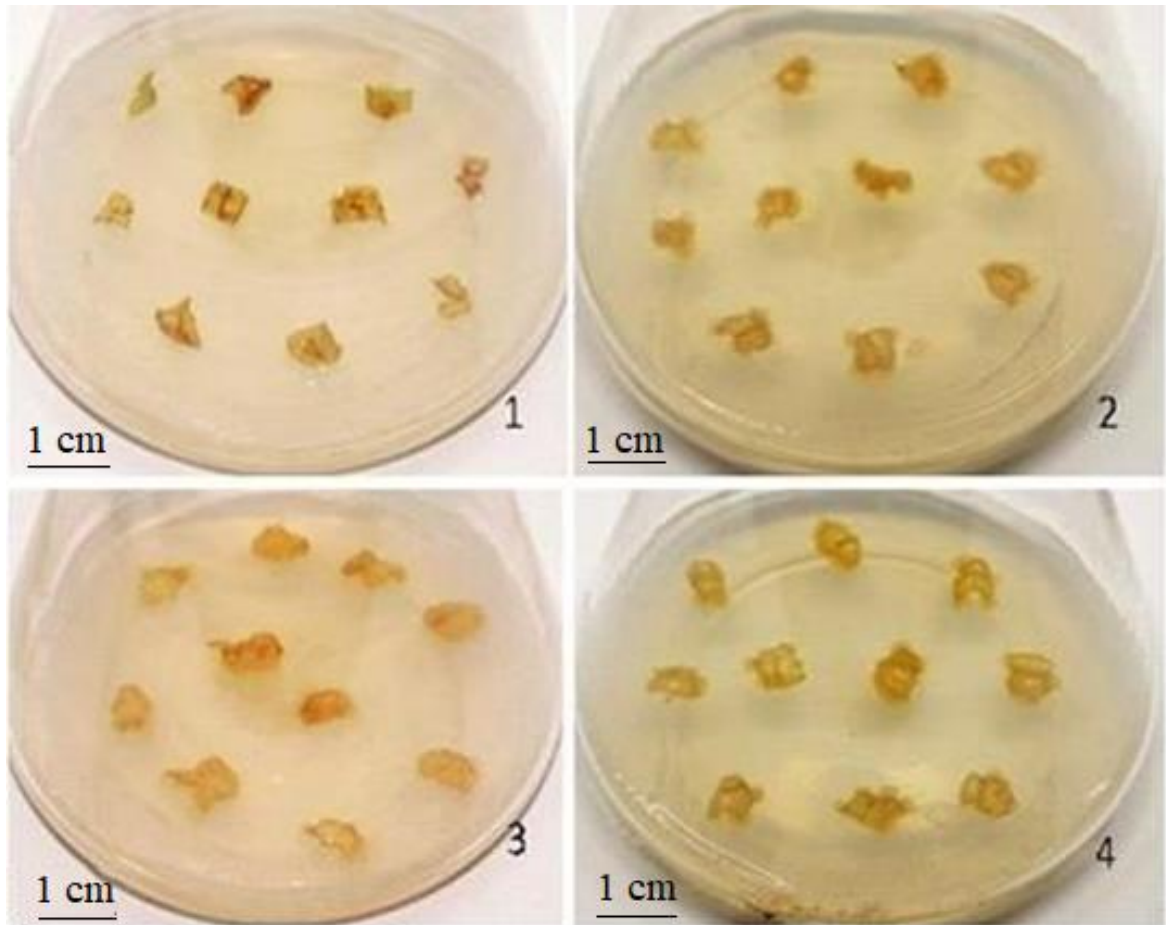
Mẫu phiến lá cây *in vitro* tạo mô sẹo sớm hơn (21 NSC) mẫu phiến lá cây ngoài vườn ươm (22 NSC). Ngoài ra mẫu phiến lá cây *in vitro* nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung 2,4-D ở nồng độ 2 mg/L cho tỷ lệ tạo mô sẹo (98,9 %) (Bảng 3.3) tốt hơn mẫu phiến lá cây ngoài vườn ươm nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung 2,4-D cùng nồng độ (97,8%); có thể do cây *in vitro* với tế bào ở trạng thái sinh

lý được “trẻ hóa” (juvenilization) nên đáp ứng tạo mô sẹo tốt hơn so với mô cây ngoài vườn ươm.

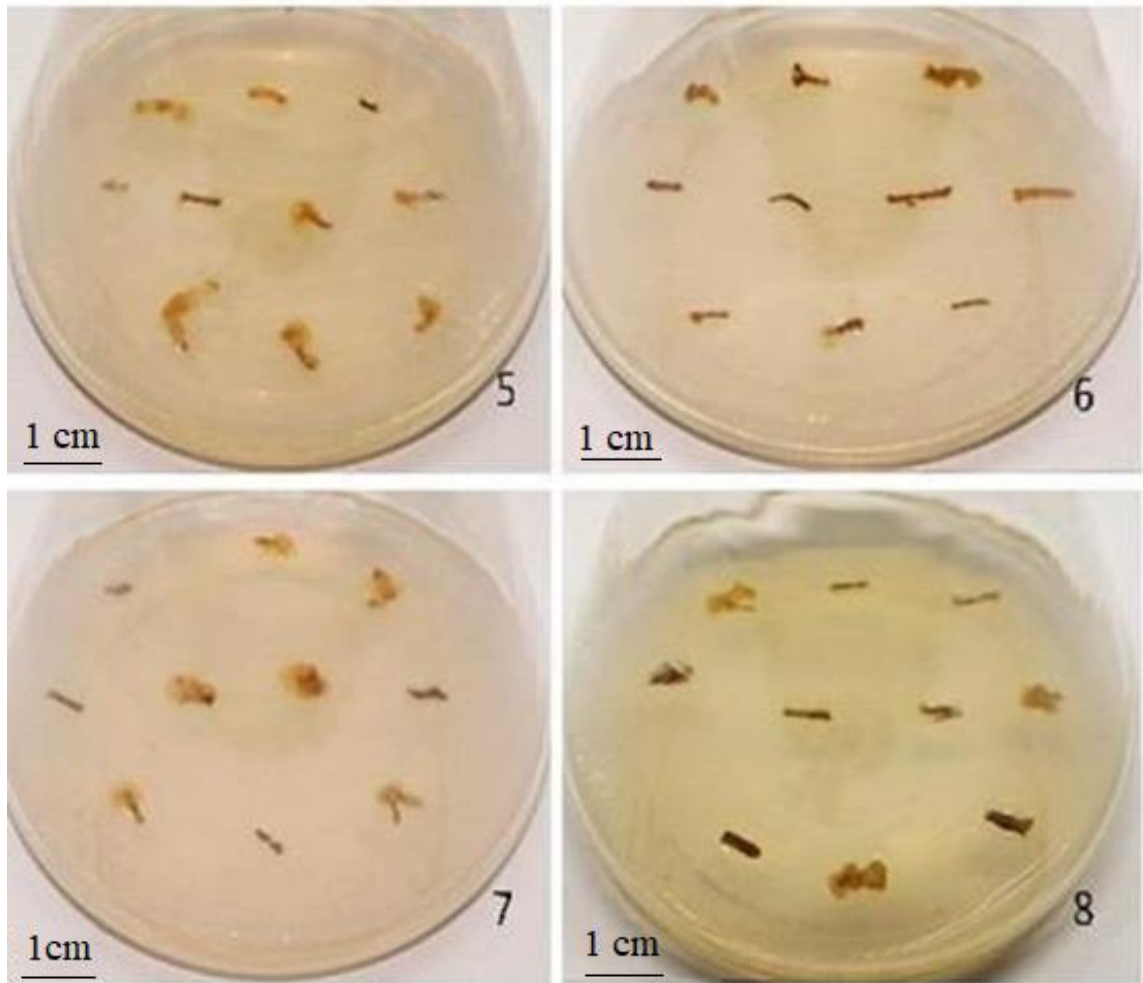
Kết quả cho thấy trọng lượng lớn nhất ở mẫu phiến lá đạt 68,4 mg và có sự khác biệt so với mẫu cuống lá. Ảnh hưởng của 2,4-D cho thấy hai nồng độ 2,4-D là 1 mg/L và 2 mg/L cho trọng lượng trung bình mẫu lớn nhất đạt lần lượt là 67,5 mg và 76,2 mg; có sự khác biệt so với các nồng độ 2,4-D còn lại trong thí nghiệm (giữa hai nồng độ trên có sự khác biệt không có ý nghĩa). Mẫu phiến lá nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung nồng độ 2,4-D 1 mg/L và 2 mg/L cho trọng lượng mô sẹo đạt lần lượt là 88,3 mg và 95,3 mg; có sự khác biệt so với mẫu phiến lá và cuống lá nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung 2,4-D ở các nồng độ còn lại trong thí nghiệm (giữa hai nồng độ trên có sự khác biệt không có ý nghĩa).

So sánh số liệu ở Bảng 3.6 với Bảng 3.4 nhận thấy trọng lượng mô sẹo ở Bảng 3.6 chỉ bằng 50% so với kết quả ở Bảng 3.4; điều này cho thấy mô sẹo từ mẫu ngoài vườn ươm có tốc độ tăng trưởng chậm hơn mô sẹo từ mẫu *in vitro*. Kết quả này có thể do cây ngoài vườn ươm chưa được “trẻ hóa” còn cây *in vitro* sau quá trình “trẻ hóa” nên có sức sống cao, hơn nữa đã quen với điều kiện nuôi cấy *in vitro* do vậy mô sẹo có sự phát triển nhanh hơn.

Đối với cây lá rộng thường dùng 2,4-D với nồng độ từ 1 đến 3 mg/L để kích thích sự hình thành mô sẹo. Trọng lượng tươi của mô sẹo tăng dần ở nồng độ 2,4-D từ 1 đến 2 mg/L và giảm ở nồng độ 3 mg/L. Nồng độ auxin thấp hơn hoặc cao hơn đều hạn chế sự gia tăng sinh khối. Nồng độ auxin tối ưu sẽ hoạt hóa một số enzyme, dẫn đến tăng hàm lượng DNA, RNA và protein giúp cho sự phân chia của tế bào mô sẹo diễn ra nhanh hơn (Taiz và Zeiger, 2002). Nồng độ auxin ngoại sinh thấp hơn nồng độ tối ưu sẽ làm giảm IAA nội sinh cần thiết cho sự hoạt hóa các enzyme liên quan đến sự phiên mã RNA. Trong khi đó, nồng độ auxin quá cao sẽ cảm ứng sinh tổng hợp ethylene và sự tích lũy ethylene dù chỉ một lượng nhỏ trong bình nuôi cấy có thể ức chế sự sinh trưởng và phát triển của nhiều mẫu cây thực vật (George và cs, 2008).



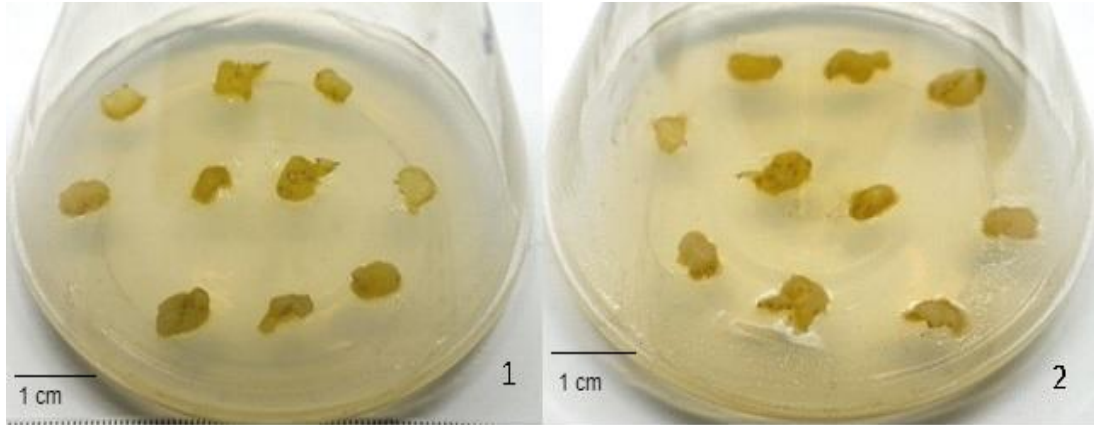
Hình 3.7 Mô sẹo hình thành từ mẫu phiến lá ĐLLN ngoài vườn ươm trên môi trường MS có bổ sung 2,4-D 0 mg/L (1), 1 mg/L (2), 2 mg/L (3), và 3 mg/L thời điểm 60 NSC (1 – 4).



Hình 3.8 Mô sẹo hình thành từ mẫu cuống lá DLLN ngoài vườn ươm trên môi trường MS có bổ sung 2,4-D 0 mg/L (5), 1 mg/L (6), 2 mg/L (7), và 3 mg/L thời điểm 60 NSC (5 – 8).

3.2.2.3 Ảnh hưởng của nồng độ 2,4-D đến màu sắc, cấu trúc mô sẹo ở hai loại mẫu của lá cây từ vườn ươm

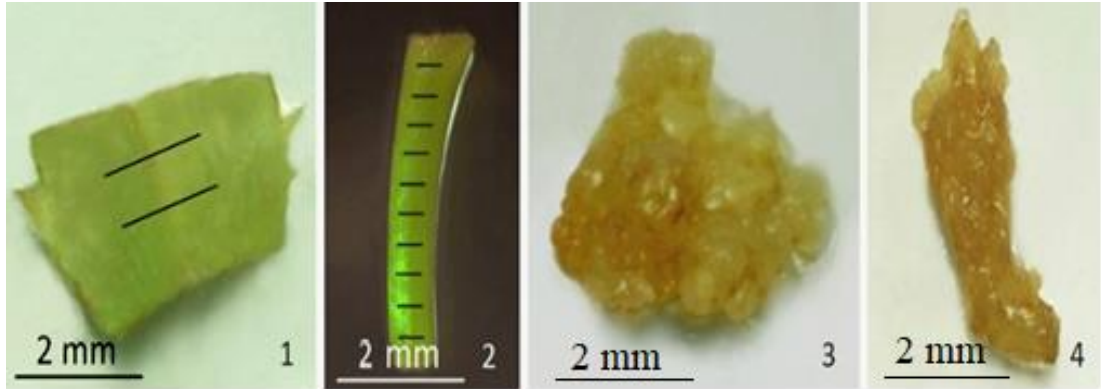
Mẫu phiến lá và cuống lá tại các thời điểm 30 - 60 NSC trên môi trường không bổ sung 2,4-D đều không tạo mô sẹo; với các nồng độ từ 1 đến 3 mg/L ở 30 - 50 NSC nhìn chung đều cho mô sẹo với màu sắc và cấu trúc tương tự trường hợp cảm ứng từ cây *in vitro*. Điểm khác biệt dễ nhận thấy là mô sẹo có khả năng sinh phôi hình thành muộn và ít hơn khi sử dụng mẫu từ cây vườn ươm.



Hình 3.9 Mô sẹo hình thành từ mẫu phiến lá ĐLLN từ vườn ươm trên môi trường MS có bổ sung 2,4-D với nồng độ 2 mg/L thời điểm 50 NSC (1) và 60 NSC (2).

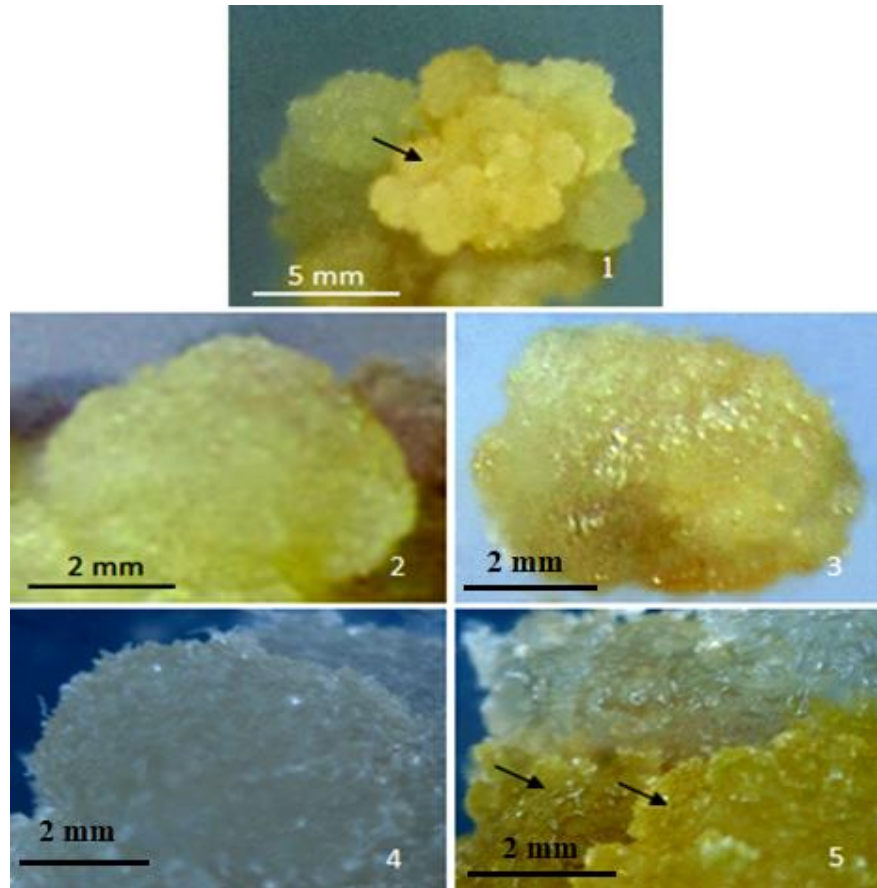
Khi không bổ sung 2,4-D thì màu sắc và hình dạng của mẫu phiến lá và cuống lá vẫn giữ nguyên, tại các vết cắt có hiện tượng hóa nâu. Tương tự trường hợp trên, giai đoạn đầu sau cấy mẫu phiến lá và cuống lá đều có biểu hiện hấp thụ môi trường, mất dần màu xanh và chuyển sang vàng. Khoảng 20 NSC, mẫu phiến lá và cuống lá nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung 2,4-D bắt đầu hình thành mô sẹo. Ở giai đoạn 30 - 50 NSC mô sẹo tăng nhanh về kích thước. Sau 50 NSC, mô sẹo cũng dần chuyển sang màu vàng nâu.

Kết quả các thí nghiệm tạo mô sẹo trên cho thấy điểm chung là mô sẹo hình thành có màu sắc và cấu trúc khác nhau - hơi trắng /trắng xốp, hơi vàng xốp, hơi xám mềm ướt; hơi vàng và khô bề mặt (Hình 3.9). Các loại mô sẹo xốp, ướt với màu sắc trắng/xám thường không có khả năng sinh phôi hoặc có khả năng sinh phôi thấp. Đến cuối giai đoạn nuôi cấy (30 - 50 NSC), ghi nhận có sự hình thành loại mô sẹo hơi vàng có kết cấu chắc và khô hơn, có thể đây là loại mô sẹo có khả năng tái sinh phôi. Về nguyên tắc có thể nhân sinh khối loại mô sẹo này phục vụ thí nghiệm, nhưng tránh thực hiện trong thời gian dài để hạn chế đến mức thấp nhất khả năng xảy ra biến dị. Ngoài ra, các kết quả đã trình bày, sự hình thành mô sẹo từ mô cây *in vitro* tốt hơn so với mô từ cây vườn ươm nên chỉ mô sẹo có nguồn gốc từ mô lá cây *in vitro* có khả năng sinh phôi được sử dụng cho các nghiên cứu về tái sinh phôi vô tính.



Hình 3.10 Hai loại mẫu lá *in vitro* dùng nuôi cấy và mô sẹo hình thành thời điểm 40 NSC.

1 và 2: Mẫu phiến lá và cuống lá; 3 và 4 - Mô sẹo phiến lá và cuống lá (gạch đen chỉ vết cắt trên mô).



Hình 3.11 Các loại mô sẹo hình thành thời điểm 50 NSC.

1. Mô sẹo hơi vàng khô, có khả năng sinh phôi (vị trí mũi tên); 2. Cận cảnh mô sẹo vàng khô; 3. Mô sẹo vàng xám, mềm ướt; 4. Mô sẹo trắng xốp; 5. Mô sẹo vàng xốp (vị trí mũi tên).

3.2.3 Ảnh hưởng của nồng độ BA và IBA đến khả năng tạo phôi vô tính ĐLLN từ mô sẹo

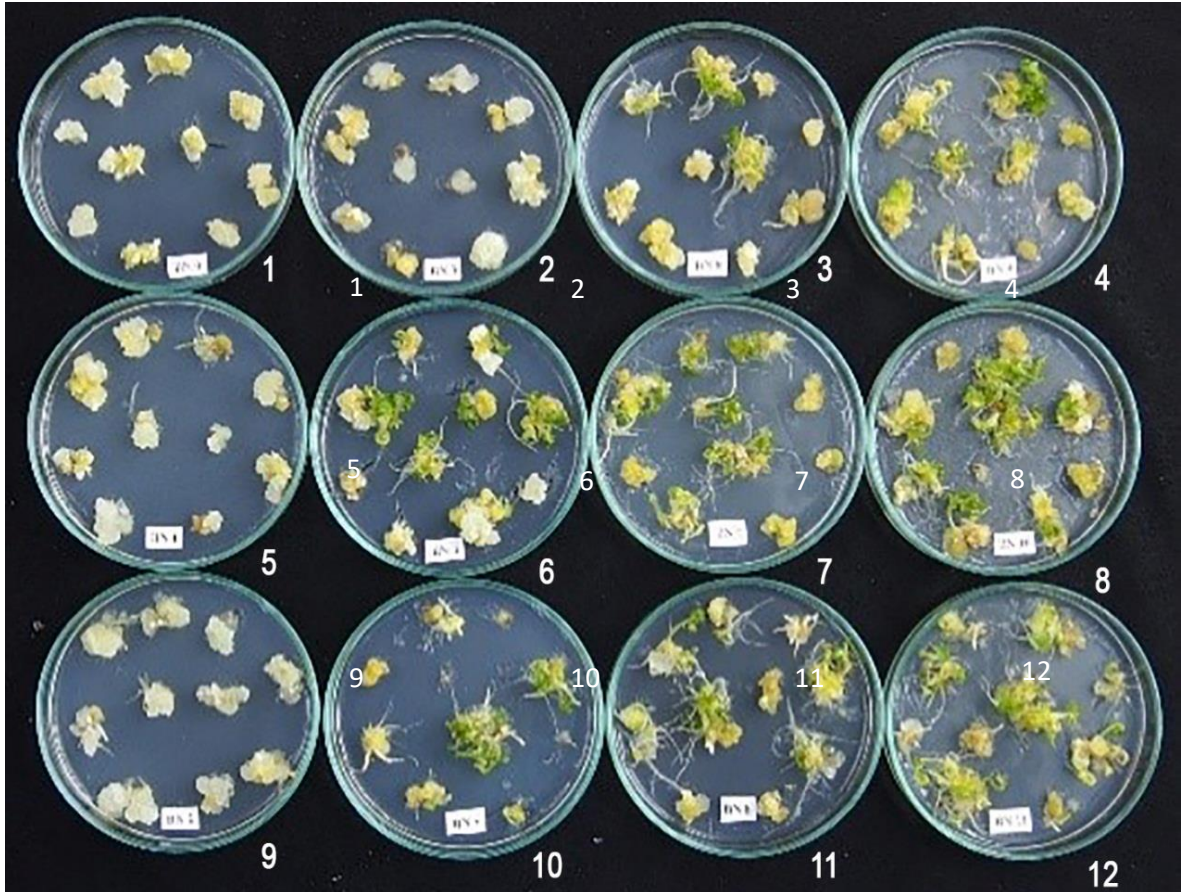
3.2.3.1 Ảnh hưởng của nồng độ BA và IBA đến tỷ lệ mẫu cấy tạo phôi vô tính ĐLLN từ mô sẹo

Bảng 3.7 Ảnh hưởng của nồng độ BA và IBA đến tỷ lệ mẫu cấy tạo phôi vô tính (%) ĐLLN từ mô sẹo thời điểm 60 NSC

Nồng độ BA (mg/L) (A)	Nồng độ IBA (mg/L) (B)			TB (A)
	0	0,1	0,5	
0	10,0 ^f	36,7 ^e	43,3 ^{de}	30,0 ^C
0,5	46,7 ^{c-e}	50,0 ^{b-e}	53,3 ^{b-e}	50,0 ^B
1,0	56,7 ^{b-d}	63,3 ^{a-c}	63,3 ^{a-c}	61,1 ^{AB}
1,5	66,7 ^{ab}	76,7 ^a	66,7 ^{ab}	73,3 ^A
TB (B)	45,0 ^B	56,7 ^A	56,7 ^A	
CV = 12,3%; F _A = 31,8 ^{**} ; F _B = 7,3 ^{**} ; F _{A*B} = 2,9 [*]				

*Trong cùng một nhóm trung bình, các ký tự khác nhau theo sau các giá trị trung bình khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê; *: có ý nghĩa ở mức $0,01 < P \leq 0,05$; **: rất có ý nghĩa ở mức $P \leq 0,01$ (Số liệu đã được chuyển đổi sang dạng $\arcsin \sqrt{x}$ khi phân tích thống kê).*

Bảng 3.7 cho thấy tỷ lệ mẫu cấy tạo phôi cao nhất ở nồng độ BA 1,5 mg/L là 73,3 % và có sự khác biệt so với các nồng độ BA còn lại. Hai nồng độ IBA 0,1 mg/L và 0,5 mg/L cho tỷ lệ tạo phôi cao nhất đạt 56,7 %. Tổ hợp nồng độ BA 1,5 mg/L và IBA 0,1 mg/L cho tỷ lệ tạo phôi cao nhất đạt 76,7 % và có sự khác biệt. Trên môi trường không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng cũng có hiện tượng tạo phôi vô tính từ mô sẹo, nhưng tỷ lệ tạo phôi chỉ đạt 10,0%.



Hình 3.12 Phôi vô tính ĐLLN hình thành trên môi trường MS có bổ sung BA và IBA thời điểm 45 NSC.

BA : IBA (mg/L): 0 : 0 (1); 0 : 0,1 (2); 0 : 0,5 (3); 0,5 : 0 (4); 0,5 : 0,1 (5); 0,5 : 0,5(6); 1 : 0 (7); 1 : 0,1 (8); 1 : 0,5 (9); 1,5 : 0 (10); 1,5 : 0,1 (11); 1,5 : 0,5 (12).

3.2.3.2 Ảnh hưởng của BA và IBA đến số phôi vô tính hình thành /mẫu cấy ĐLLN từ mô sẹo

Bảng 3.8 cho thấy có sự cảm ứng tạo phôi từ mô sẹo trên môi trường MS có bổ sung các chất điều hòa sinh trưởng BA và IBA. Sự tương tác giữa BA và IBA đến sự tạo phôi vô tính có sự khác biệt rõ. Trên môi trường không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng vẫn có hiện tượng tạo phôi vô tính.

Bảng 3.8 Ảnh hưởng của nồng độ BA và IBA đến số phôi vô tính hình thành/mẫu cây ĐLLN từ mô sẹo thời điểm 30 - 60 NSC

Thời điểm theo dõi (NSC)	Nồng độ BA (mg/L) (A)	Nồng độ IBA (mg/L) (B)			
		0	0,1	0,5	TB (A)
30	0,0	3 ^d	5 ^d	37 ^c	15 ^C
	0,5	56 ^c	76 ^{bc}	77 ^{bc}	69 ^B
	1,0	161 ^{ab}	271 ^a	181 ^{ab}	204 ^A
	1,5	196 ^a	293 ^a	186 ^{ab}	189 ^A
	TB (B)	104 ^B	161 ^A	120 ^A	
CV = 9,3%; F _A = 141,5 ^{**} ; F _B = 10,0 ^{**} ; F _{A*B} = 9,7 ^{**}					
45	0,0	4 ^d	5 ^d	50 ^c	20 ^C
	0,5	71 ^c	93 ^{bc}	89 ^{bc}	84 ^B
	1,0	190 ^{ab}	276 ^a	204 ^{ab}	223 ^A
	1,5	227 ^{ab}	325 ^a	248 ^a	262 ^A
	TB (B)	123 ^B	175 ^A	148 ^A	
CV = 9,2%; F _A = 137,7 ^{**} ; F _B = 11,6 ^{**} ; F _{A*B} = 10,0 ^{**}					
60	0,0	2 ^e	5 ^e	18 ^d	8 ^D
	0,5	42 ^c	56 ^c	48 ^c	49 ^C
	1,0	64 ^{bc}	128 ^{ab}	125 ^{ab}	106 ^B
	1,5	183 ^a	207 ^a	241 ^a	206 ^A
	TB (B)	73 ^B	99 ^{AB}	108 ^A	
CV = 10,6%; F _A = 138,0 ^{**} ; F _B = 10,5 ^{**} ; F _{A*B} = 3,3 [*]					

Trong cùng một nhóm trung bình, các ký tự khác nhau theo sau các giá trị trung bình khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê; *: có ý nghĩa ở mức $0,01 < P \leq 0,05$; **: rất có ý nghĩa ở mức $P \leq 0,01$ (Số liệu đã được chuyển đổi sang dạng logarit khi phân tích thống kê)

Tại thời điểm 60 NSC, khi xét ảnh hưởng của BA cho thấy ở nồng độ BA 1,5 mg/L cho số lượng trung bình phôi hình thành cao nhất là 206; có sự khác biệt so với các nồng độ BA còn lại. IBA ở nồng độ 0,5 mg/L cho số lượng phôi hình thành cao nhất là 108 có sự khác biệt so với các nồng độ IBA còn lại. Ba tổ hợp nồng độ BA 1,5 mg/L với IBA 0 mg/L; BA 1,5 mg/L với IBA 0,1 mg/L và BA 1,5 mg/L với IBA 0,5 mg/L cùng cho số lượng phôi hình thành cao nhất đạt lần lượt là 183, 207 và 241 phôi có sự khác biệt so với tổ hợp các nồng độ BA còn lại. Kết quả ở các nghiệm thức không xử lý BA và IBA cũng tạo phôi, nhưng đạt số lượng thấp. Kết quả này phù hợp

với kết quả của Lê Thiên Thu và Võ Thị Bạch Mai (2005) khi đạt được sự hình thành phôi, nhưng với tỷ lệ rất thấp.

Mô sẹo bắt đầu tạo phôi trong giai đoạn từ 15 đến 20 ngày và trong giai đoạn từ 30 đến 45 ngày có sự tăng nhanh về số lượng. Tuy nhiên từ giai đoạn 45 đến 60 ngày sau cấy, số lượng phôi thu được giảm rõ rệt, một số cụm phôi có biểu hiện hóa nâu và chết. Kết quả cho thấy BA là cytokinin có ảnh hưởng rõ rệt đến sự tạo phôi vô tính của cây đinh lăng lá nhỏ, với mức nồng độ BA cao đã cho số lượng phôi nhiều hơn. Nồng độ BA 1,5 mg/L đã cho kết quả tạo phôi tốt nhất ở thời điểm 30 - 60 NSC. Nồng độ auxin IBA cao nhất 0,5 mg/L cho kết quả tạo phôi tốt. Tuy nhiên chỉ nên duy trì nuôi cấy đến 45 ngày để tránh thất thu phôi khi nuôi cấy trong thời gian dài hơn.

3.2.4 Ảnh hưởng của nồng độ BA và NAA đến khả năng tạo phôi vô tính ĐLLN từ mô sẹo

3.2.4.1 Ảnh hưởng của nồng độ BA và NAA đến tỷ lệ tạo phôi vô tính ĐLLN từ mô sẹo

Bảng 3.9 Ảnh hưởng của nồng độ BA và NAA đến tỷ lệ mẫu cấy tạo phôi vô tính (%) ĐLLN từ mô sẹo thời điểm 60 NSC

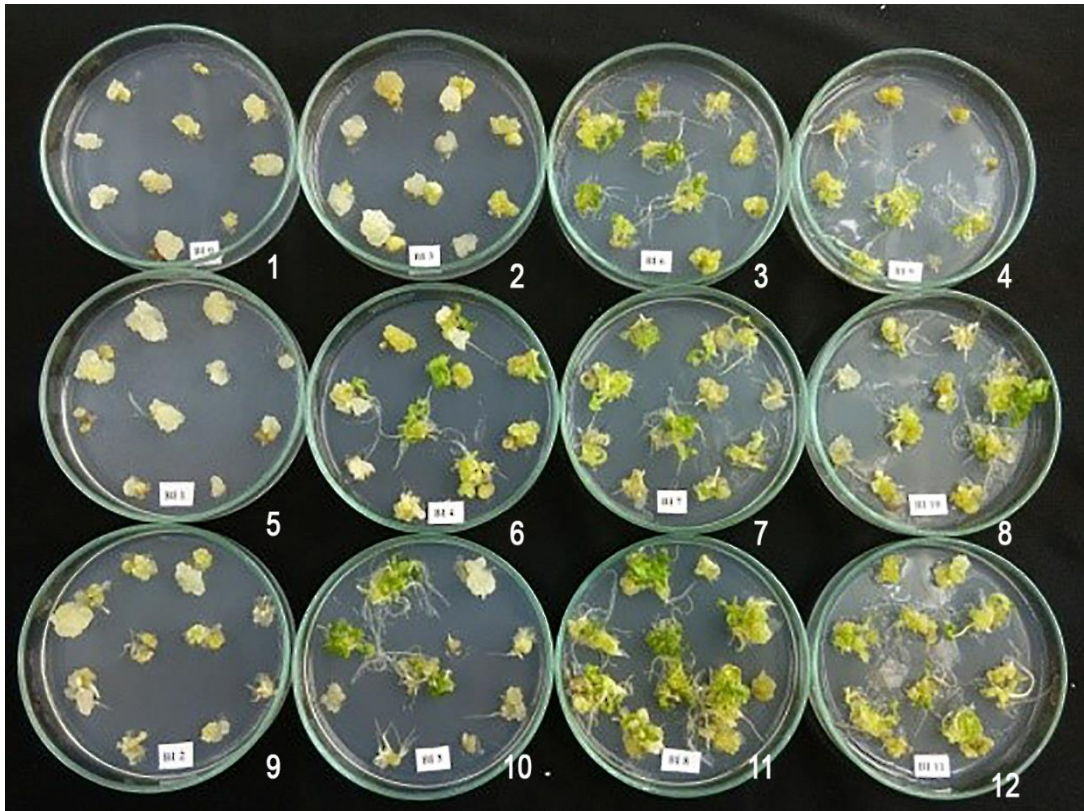
Nồng độ BA (mg/L) (A)	Nồng độ NAA (mg/L) (B)			TB (A)
	0	0,1	0,5	
0	10,0 ^c	50,0 ^b	53,3 ^{ab}	37,8 ^C
0,5	53,3 ^{ab}	53,3 ^{ab}	56,7 ^{ab}	54,4 ^B
1,0	63,3 ^{ab}	66,7 ^{ab}	66,7 ^{ab}	65,6 ^{AB}
1,5	66,7 ^{ab}	80,0 ^a	70,0 ^{ab}	72,2 ^A
TB (B)	48,3 ^B	62,5 ^A	61,7 ^A	
CV = 13,6%; F _A = 17,9 ^{**} ; F _B = 7,4 ^{**} ; F _{A*B} = 3,8 ^{**}				

*Trong cùng một nhóm trung bình, các ký tự khác nhau theo sau các giá trị trung bình khác nhau thể hiện sự khác biệt rất có ý nghĩa về mặt thống kê; **: rất có ý nghĩa ở mức $P \leq 0,01$ (Số liệu đã được chuyển đổi sang dạng arcsin \sqrt{x} khi phân tích thống kê).*

Bảng 3.9 cho thấy tỷ lệ tạo phôi cao nhất ở nồng độ BA 1,5 mg/L đạt 72,2%. Khi xét đến ảnh hưởng của NAA, hai nồng độ NAA 0,1 mg/L và 0,5 mg/L đều cho

tỷ lệ tạo phôi đạt lần lượt là 62,5% và 61,7%. Tổ hợp nồng độ BA 1,5 mg/L với NAA 0,1 mg/L cho tỷ lệ tạo phôi cao nhất là 80,0%. Trên môi trường không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng có hiện tượng tạo phôi vô tính với tỷ lệ tạo phôi là 10,0%. So sánh số liệu ở Bảng 3.9 với Bảng 3.7 thì số liệu Bảng 3.9 cho thấy tỷ lệ tạo phôi cao hơn.

Đánh giá khả năng tạo phôi từ mô sẹo cho thấy trên môi trường có BA và NAA phôi vô tính tạo ra với số lượng nhiều hơn và mức độ tăng trưởng phôi cũng tốt hơn sau 45 ngày nuôi cấy (Hình 3.13). Do vậy đến cuối giai đoạn nuôi cấy (60 NSC), tái sinh phôi ở tổ hợp BA và NAA tốt hơn ở tổ hợp BA và IBA ở cả hai chỉ tiêu số lượng phôi/mẫu và tỷ lệ mẫu cấy sinh phôi. Theo nghiên cứu này, auxin nào phù hợp hơn là do quy định bởi kiểu gene cây trồng - ở đây là auxin NAA thích hợp với ĐLLN.



Hình 3.13 Phôi vô tính ĐLLN hình thành trên môi trường MS có bổ sung BA và NAA thời điểm 45 NSC.

BA : NAA (mg/L): 0 : 0 (1); 0 : 0,1 (2); 0 : 0,5 (3); 0,5 : 0 (4); 0,5 : 0,1 (5); 0,5 : 0,5 (6); 1 : 0 (7); 1 : 0,1 (8); 1 : 0,5 (9); 1,5 : 0 (10); 1,5 : 0,1 (11); 1,5 : 0,5 (12).

3.2.4.2 Ảnh hưởng của nồng độ BA và NAA đến số phôi vô tính hình thành/mẫu cây ĐLLN từ mô sẹo

Bảng 3.10 thể hiện kết quả ảnh hưởng của BA và NAA đến quá trình tạo phôi vô tính từ mô sẹo có sự khác biệt rõ. Có sự tương tác giữa BA và NAA đến sự tạo phôi vô tính.

Tại thời điểm 45 NSC, khi xét đến ảnh hưởng của nồng độ BA cho thấy ở nồng độ BA 1,5 mg/L cho số lượng trung bình phôi hình thành cao nhất là 336 phôi. Khi xét đến ảnh hưởng của NAA thì thấy NAA ở nồng độ 0,1 mg/L cho số lượng trung bình phôi hình thành cao nhất đạt 269 phôi; Tổ hợp nồng độ BA 1,5 mg/L và NAA 0,1 mg/L cho số lượng phôi hình thành cao nhất với số lượng đạt 549 phôi, có sự khác biệt so với các nồng độ BA và NAA còn lại trong thí nghiệm.

Bảng 3.10 Ảnh hưởng của nồng độ BA và NAA đến số phôi vô tính hình thành/mẫu cây ĐLLN từ mô sẹo thời điểm 30 - 60 NSC

Thời điểm theo dõi (NSC)	Nồng độ BA (mg/L) (A)	Nồng độ NAA (mg/L) (B)			
		0	0,1	0,5	TB (A)
30	0	5 ^g	15 ^f	86 ^e	35 ^D
	0,5	95 ^{de}	155 ^{b-e}	120 ^{c-e}	123 ^C
	1,0	177 ^{b-e}	238 ^{a-d}	178 ^{b-e}	198 ^B
	1,5	242 ^{a-c}	444 ^a	286 ^{ab}	334 ^A
	TB (B)	130 ^B	213 ^A	168 ^A	
CV = 7,6%; F _A = 116,8**; F _B = 18,8**; F _{A*B} = 13,7**					
45	0	5 ^c	15 ^c	98 ^b	39 ^C
	0,5	178 ^b	227 ^{ab}	188 ^{ab}	198 ^B
	1,0	243 ^{ab}	287 ^{ab}	258 ^{ab}	262 ^{AB}
	1,5	267 ^{ab}	549 ^a	298 ^{ab}	336 ^A
	TB (B)	173 ^B	269 ^A	211 ^A	
CV = 9,2%; F _A = 85,9**; F _B = 9,4**; F _{A*B} = 9,1**					
60	0	4 ^d	10 ^d	46 ^{bc}	20 ^C
	0,5	47 ^{bc}	67 ^{a-c}	51 ^{bc}	55 ^B
	1,0	82 ^{a-c}	99 ^{a-c}	93 ^{a-c}	92 ^{AB}
	1,5	116 ^{a-c}	173 ^a	145 ^{ab}	144 ^A
	TB (B)	62 ^B	87 ^A	84 ^A	
CV = 12,5%; F _A = 47,1**; F _B = 6,1**; F _{A*B} = 4,3**					

*Trong cùng một nhóm trung bình, các ký tự khác nhau theo sau các giá trị trung bình khác nhau thể hiện sự khác biệt rất có ý nghĩa về mặt thống kê; **: rất có ý nghĩa ở mức $P \leq 0,01$ (Số liệu đã được chuyển đổi sang dạng logarit khi phân tích thống kê).*

Tại thời điểm 60 NSC, khi xét đến ảnh hưởng của nồng độ BA cho thấy ở nồng độ BA 1,5 mg/L cho số lượng trung bình phôi hình thành cao nhất đạt 144 phôi, có sự khác biệt so với các nồng độ BA còn lại trong thí nghiệm. Khi xét về ảnh hưởng của NAA cho thấy NAA ở nồng độ 0,1 mg/L cho số lượng trung bình phôi hình thành cao nhất đạt 87 phôi và có sự khác biệt so với các nồng độ NAA còn lại. Tổ hợp nồng độ BA 1,5 mg/L và NAA 0,1 mg/L cho số lượng phôi hình thành cao nhất với số lượng là 173 phôi và có sự khác biệt so với các nồng độ BA và NAA còn lại trong thí nghiệm.

Kết quả ở Bảng 3.8 và 3.10 cho thấy số phôi đạt được tối đa ở thời điểm 45 NSC.

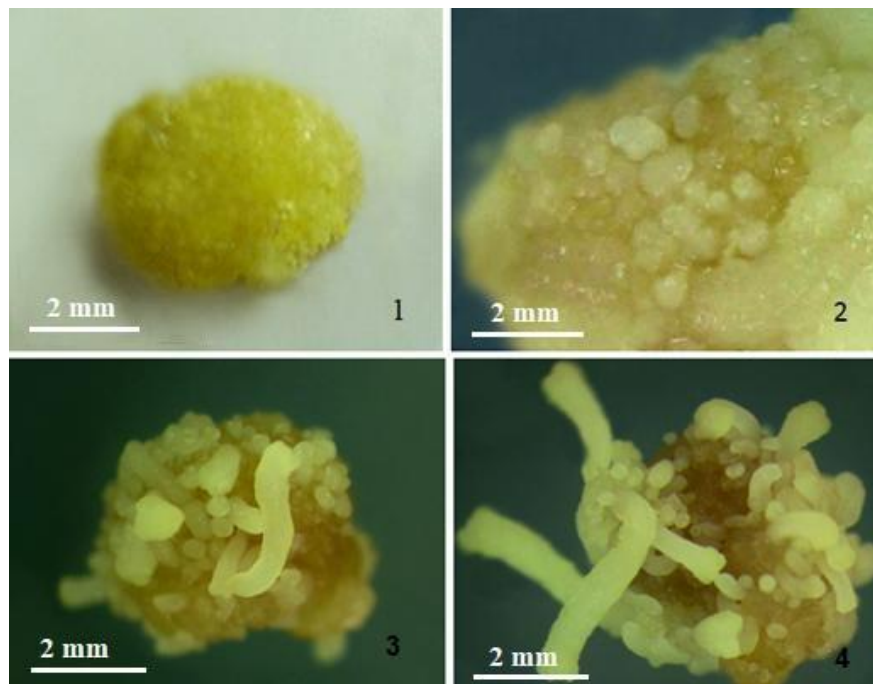
Kết quả thí nghiệm cho thấy mô sẹo nuôi nhân trên môi trường MS có bổ sung BA và NAA cũng tạo được phôi. Điều này cũng tương tự như nghiên cứu của Huỳnh Thị Đan San và Võ Thị Bạch Mai (2009) đã nuôi cấy mô sẹo lá cây Hà thủ ô đỏ trên môi trường MS bổ sung NAA và BA, sau 8 tuần nuôi cũng đã tạo được những tế bào có khả năng sinh phôi. Sự kết hợp giữa BA và NAA cho kết quả tạo phôi tốt hơn sự kết hợp giữa BA và IBA. Khi có sự kết hợp giữa BA và NAA, mô sẹo có khả năng tạo phôi vô tính tương tự như tạo phôi ở cây Mỏ quạ (Lê Hồng Giang và Nguyễn Bảo Toàn, 2011).

Sự kết hợp giữa cytokinin và auxin có khả năng thúc đẩy quá trình cảm ứng tạo phôi. Các kết quả trong nghiên cứu cho thấy cytokinin là chất điều hòa sinh trưởng cần thiết cho sự tạo phôi ở cây ĐLLN, BA có tác dụng kích thích sự tăng trưởng tế bào cùng với sự có mặt của IBA trong môi trường ở nồng độ thấp. Komamine và cs (2005) cho rằng nồng độ auxin cao là cần thiết cho sự cảm ứng hình thành phôi, song để phôi tiếp tục phát triển thì auxin cần nồng độ thấp hơn hoặc trong một số trường hợp phải loại bỏ hoàn toàn auxin khỏi môi trường nuôi cấy. Sharp và cs (1980) ghi nhận rằng auxin cảm ứng tạo phôi của tế bào mô sẹo hoặc huyền phù tế bào, nhưng chính nó lại làm cho những tế bào được cảm ứng này ngừng phân chia. Kết quả nghiên cứu tạo phôi vô tính ở cây ĐLLN phù hợp với các nhận định nêu trên. Mô sẹo cây ĐLLN cho kết quả tạo phôi tốt trên môi trường MS bổ sung auxin ở nồng độ thấp cùng với sự có mặt của BA.

Mô sẹo nuôi cấy trên môi trường không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng vẫn có hiện tượng tạo phôi. Điều này tương tự với nghiên cứu của Lê Thiên Thư và Võ

Thị Bạch Mai (2005) đã tạo được phôi trên môi trường không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng. Sliwinska và cs (2008) cũng đã tạo thành công phôi vô tính cây đỉnh lãng lá to/đỉnh lãng rãng (*Polycias filicifolia*) khi nuôi cấy trên môi trường lỏng 1/2 MS không có chất điều hòa sinh trưởng. Mô sẹo trên môi trường có bổ sung auxin ở nồng độ cao/auxin mạnh khi được chuyển sang môi trường không có bổ sung chất điều hòa sinh trưởng thực vật hoặc môi trường có bổ sung auxin nồng độ thấp hơn/auxin yếu thường có cảm ứng sinh phôi vô tính. Trương Thị Bích Phượng và cs (2017) đã ghi nhận được sự hình thành nhiều cụm tế bào đỉnh lãng *Polycias fruticosa* phát sinh phôi vô tính và rễ khi nuôi cấy huyền phù tế bào (sau 12 tuần) trong môi trường lỏng MS chỉ bổ sung auxin có hoạt tính thấp hơn - NAA (1,5 mg/L) so với auxin có hoạt tính cao 2,4-D (1,5 mg/L, chỉ nhận được sinh khối tế bào).

Kết quả thí nghiệm tạo phôi vô tính dùng hai loại tổ hợp chất điều hòa sinh trưởng BA kết hợp IBA và BA kết hợp NAA nói trên cho thấy có điểm chung là đều ghi nhận được các dạng phát triển khác nhau của phôi tuần tự từ phôi dạng cầu, dạng tim, dạng thủy lôi (torpedo) đến dạng có hai cực.



Hình 3.14 Sự khác biệt về khả năng sinh phôi từ mô sẹo được hình thành trên môi trường MS có BA kết hợp với IBA và BA kết hợp với NAA thời điểm 30 NSC.

(1) Mô sẹo có khả năng tái sinh phôi dùng nuôi cấy; (2) Mô sẹo ở giai đoạn đầu của sự tái sinh phôi với nhiều phôi dạng cầu; (3) Sự khác biệt về số phôi và sự phát triển của phôi tái sinh trên môi trường có 1,5 mg/L BA kết hợp 0,1 mg/L IBA và (4) phôi tái sinh trên môi trường có 1,5 mg/L BA kết hợp 0,1 mg/L NAA

Đối với thực vật nói chung và một số loài cây thuộc họ Sâm nói riêng thì môi trường MS có bổ sung 2,4-D (1 - 3 mg/L) là môi trường thường được sử dụng để tạo mô sẹo (Kim và cs, 2006; Kharwanlang và cs, 2016) theo con đường phát sinh cơ quan (organogenesis pathway) hoặc con đường sinh phôi vô tính (somatic embryogenesis). Để tạo phôi từ mô sẹo, sử dụng kết hợp loại auxin (có hoạt tính sinh lý yếu hơn 2,4-D) với cytokinin thường làm tăng hiệu quả phát sinh phôi vô tính gián tiếp hoặc trực tiếp, cụ thể là bổ sung thêm kinetin/BA (0,25 - 5 mg/L) vào môi trường đã làm tăng tỷ lệ sinh phôi ở loài *Panax pseudoginseng* (Kharwanlang và cs, 2016); Môi trường tạo phôi có bổ sung BA (0,1 mg/L) và NAA (0,5 mg/L), có hoặc không có 2,4-D (0,5 mg/L) được kết luận là thích hợp cho sự hình thành phôi vô tính từ mô sẹo sâm Triều Tiên *Panax ginseng* (Tang, 2000).



Hình 3.15 Một số dạng phát triển khác nhau của phôi vô tính ĐLLN

(1) Giai đoạn phôi dạng cầu; (2) Giai đoạn phôi dạng tim; (3) Giai đoạn phôi dạng thủy lô; (4) Giai đoạn phôi phân cực mầm và rễ.

Kết quả tác động tích cực của môi trường MS bổ sung 2,4-D đối với sự hình thành mô sẹo cũng như BA kết hợp IBA/NAA đối với sự hình thành phôi ĐLLN ở nghiên cứu này đều phù hợp với kết quả nghiên cứu của các tác giả nêu trên.

3.2.5 Ảnh hưởng của loại và nồng độ đường (sucrose, fructose, glucose, maltose) đến khả năng tạo phôi vô tính ĐLLN

3.2.5.1 Ảnh hưởng của loại và nồng độ đường khác nhau đến tỷ lệ mẫu cấy tạo phôi vô tính ĐLLN từ mô sẹo

Bảng 3.11 Ảnh hưởng của loại và nồng độ đường khác nhau đến tỷ lệ mẫu cấy (%) tạo phôi vô tính ĐLLN từ mô sẹo

Nồng độ đường (g/L)	Loại đường				TB (A)
	Su.	Glu.	Fru.	Malt.	
10	68,3 ^{cd}	63,2 ^d	68,3 ^{cd}	59,5 ^d	64,9 ^C
20	70,1 ^{bc}	68,3 ^{cd}	70,1 ^{bc}	68,3 ^{cd}	69,5 ^C
30	77,5 ^b	70,1 ^{bc}	77,5 ^b	70,1 ^{bc}	75,3 ^B
40	90,8 ^a	77,5 ^b	77,5 ^b	70,1 ^{bc}	80,3 ^A
50	89,6 ^a	77,5 ^b	77,5 ^b	70,1 ^{bc}	79,9 ^{AB}
TB (B)	80,8 ^A	72,2 ^{BC}	74,9 ^B	68,6 ^C	
CV = 8,0% F _A = 20,8** F _B = 26,3** F _{A*B} = 2,3*					

Trong cùng một nhóm giá trị trung bình, các số có cùng ký tự đi kèm thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê. ns: không khác biệt; *: có ý nghĩa ở mức $0,01 < P \leq 0,05$; **: rất có ý nghĩa ở mức $P \leq 0,01$ (Số liệu đã được chuyển đổi sang dạng $\arcsin \sqrt{x}$ khi phân tích thống kê).

Tại thời điểm 45 NSC, đối với yếu tố loại đường cho thấy đường sucrose cho kết quả tốt nhất đạt 80,8% tỷ lệ tạo phôi và đường glucose, đường maltose thấp hơn lần lượt đạt 72,2% và 68,6%. Ở yếu tố nồng độ đường, 40 g/L và 50 g/L cho kết quả về tỷ lệ tạo phôi tốt nhất lần lượt đạt 80,3% và 79,9% trong khi đó thấp hơn ở nồng độ 10 g/L và 20 g/L chỉ đạt lần lượt là 64,9% và 69,5%. Sự tương tác giữa đường sucrose với nồng độ 40 g/L và 50 g/L cho kết quả tạo phôi tốt nhất đạt lần lượt 90,8% và 89,6%.

Loại đường (sucrose, glucose, fructose, maltose) và nồng độ sử dụng có vai trò quan trọng đối với sinh trưởng của mô tế bào nuôi cấy *in vitro* nói chung, với từng

giai đoạn phát triển khác nhau của phôi vô tính từ thời điểm phát sinh đến khi trưởng thành (maturation) (Hassan và Taha, 2012; Businge và cs., 2013) và phụ thuộc nghiêm ngặt vào loài/kiểu gene thực vật dùng nghiên cứu (Yancheva và Roichev, 2005). Kulkami và Bapat (2013) cho biết maltose là loại đường thích hợp nhất để duy trì nuôi cấy huyền phù tế bào có khả năng sinh phôi của chuối *Musa* (kiểu gene Rajeli AAB), nhưng đối với nuôi cấy tế bào cây nho, sucrose lại là tác nhân thích hợp trong tạo cảm ứng và phát triển mô sẹo có khả năng sinh phôi (Yancheva và Roichev, 2005). Đối với tạo phôi vô tính từ mô sẹo lá mầm phôi hợp tử sâm *Panax ginseng* - loài cùng họ với ĐLLN, glucose được kết luận là thích hợp nhất (Tang, 2000).

Nồng độ đường từ 20 - 50 g/L là thích hợp được sử dụng phổ biến vì vừa đáp ứng cung cấp năng lượng và tạo cân bằng áp suất thẩm thấu cho mô tế bào nuôi cấy. Nhut DT và cs (2012) cho thấy 40 - 50 g/L sucrose tạo tỷ lệ sinh phôi vô tính tốt, cao nhất (86,7%) ở trường hợp 50 g/L, từ mô sẹo sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis*); ngược lại, glucose và fructose được cho là không phù hợp. Cunha và Fernandes-Ferreira (1999) kết luận 40 g/L glucose/fructose thích hợp đối với nuôi cấy tạo phôi vô tính cây Lanh (flax) *Linum usitatissimum*, nhưng sucrose lại có tác động ngược lại - ngăn cản quá trình cảm ứng và phát triển của phôi.

3.2.5.2 Ảnh hưởng của loại và nồng độ đường khác nhau đến số phôi vô tính hình thành/mẫu cấy ĐLLN từ mô sẹo

Bảng 3.12 Ảnh hưởng của loại và nồng độ đường khác nhau đến số phôi vô tính hình thành/mẫu cấy ĐLLN từ mô sẹo thời điểm 30 - 60 NSC

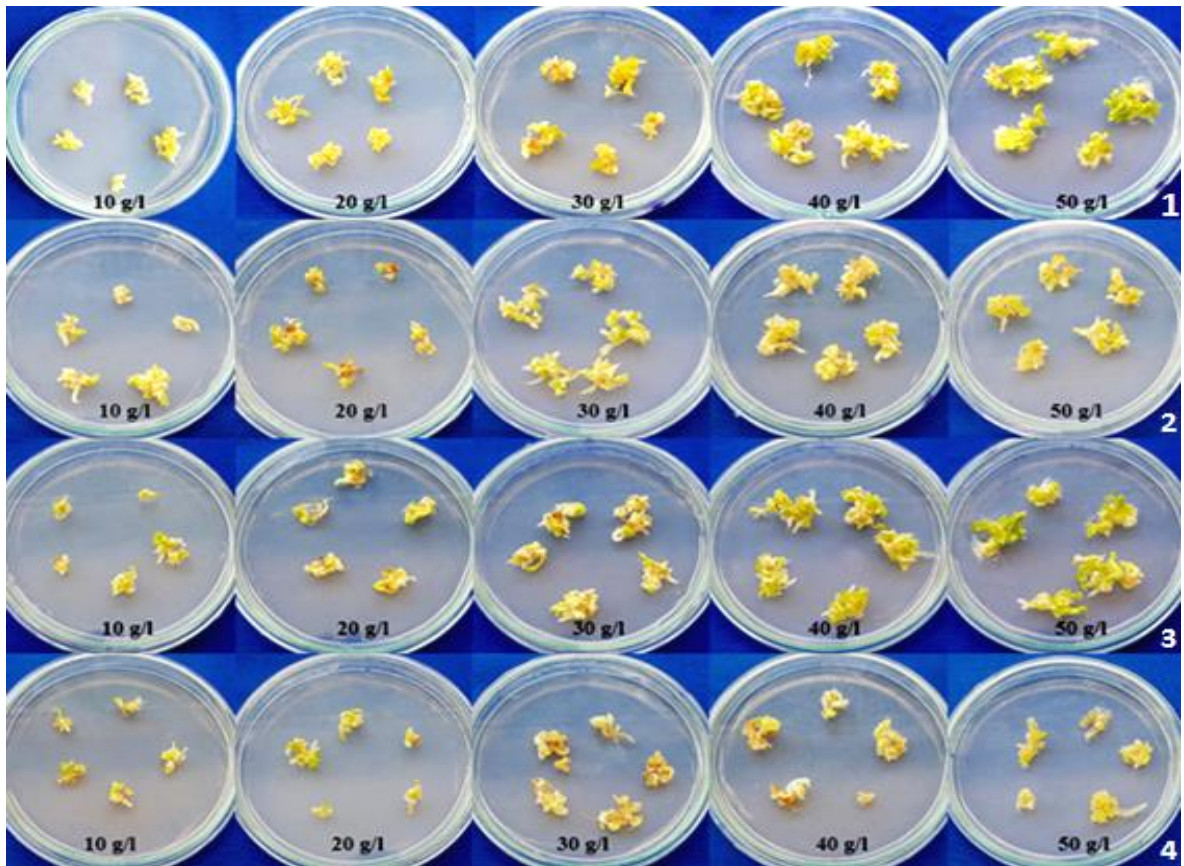
Thời điểm theo dõi (NSC)	Nồng độ đường (g/L)	Loại đường				TB (A)
		Su.	Glu.	Fru.	Malt.	
30	10	82,0 ^{fg}	74,0 ^{gh}	48,3 ⁱ	59,3 ^{hi}	65,9 ^E
	20	112,0 ^{cd}	103,3 ^{de}	75,7 ^{f-h}	79,0 ^{fg}	92,5 ^D
	30	133,3 ^b	121,7 ^{b-d}	93,3 ^{e-g}	93,3 ^{ef}	110,2 ^C
	40	171,0 ^a	136,3 ^b	118,0 ^{b-d}	119,3 ^{b-d}	136,2 ^A
	50	119,6 ^{b-d}	117,7 ^{b-d}	110,3 ^{de}	131,3 ^{bc}	119,7 ^B
	TB (B)	123,6 ^A	110,6 ^B	88,9 ^C	96,5 ^C	
CV = 7,5%; F _A = 57,0 ^{**} ; F _B = 140,0 ^{**} ; F _{A*B} = 5,7 ^{**}						
45	10	115,0 ^{gh}	107,0 ^{hi}	91,3 ⁱ	100,3 ^{hi}	103,4 ^D
	20	153,3 ^{c-e}	137,0 ^{ef}	102,7 ^{hi}	110,7 ^h	125,9 ^C
	30	170,3 ^{bc}	161,3 ^{b-d}	129,7 ^{fg}	134,7 ^{ef}	149,0 ^B
	40	287,0 ^a	179,0 ^b	158,0 ^{cd}	152,7 ^{c-e}	194,2 ^A
	50	161,7 ^{b-d}	152,0 ^{c-e}	145,7 ^{d-f}	165,0 ^{b-d}	156,1 ^B
	TB (B)	177,5 ^A	147,3 ^B	132,7 ^C	125,5 ^C	
CV = 5,4%; F _A = 129,4 ^{**} ; F _B = 226,9 ^{**} ; F _{A*B} = 29,7 ^{**}						
60	10	97,0 ^{hi}	88,3 ^{ij}	72,3 ^j	83,7 ^{ij}	85,3 ^D
	20	136,3 ^{c-f}	117,0 ^{fg}	87,0 ^{ij}	96,7 ^{hi}	109,3 ^C
	30	153,7 ^{cd}	143,0 ^{b-d}	112,3 ^{gh}	118,7 ^{e-g}	131,9 ^B
	40	196,0 ^a	159,0 ^b	141,7 ^{b-d}	137,3 ^{c-e}	158,5 ^A
	50	141,0 ^{b-d}	135,3 ^{c-f}	128,7 ^{d-g}	148,7 ^{b-d}	138,4 ^B
	TB (B)	144,9 ^A	128,5 ^B	108,4 ^C	117,0 ^C	
CV = 6,6%; F _A = 34,3 ^{**} ; F _B = 139,2 ^{**} ; F _{A*B} = 5,7 ^{**}						

Trong cùng một nhóm giá trị trung bình, các số có cùng ký tự đi kèm thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê. ns: không khác biệt; *: có ý nghĩa ở mức $0,01 < P \leq 0,05$; **: rất có ý nghĩa ở mức $P \leq 0,01$.

Tại thời điểm 60 NSC, trong số các loại đường cho thấy đường sucrose cho kết quả tốt nhất đạt 144,9 phôi trong khi đường fructose và đường maltose đều thấp hơn lần lượt đạt 108,4 phôi và 117,0 phôi. Ở yếu tố nồng độ đường, 40 g/L cho kết quả tốt nhất đạt 158,5 phôi và thấp nhất ở nồng độ 10 g/L chỉ đạt 85,3 phôi. Sự tương

tác giữa đường sucrose với nồng độ 40 g/L cho kết quả tốt nhất đạt 196,0 phôi. Từ 45 NSC đến 60 NSC, số phôi bắt đầu giảm khi các cụm phôi bắt đầu hóa nâu và chết. Qua đó cho thấy, khi sử dụng đường sucrose với nồng độ 40 g/L cho kết quả tốt nhất, thích hợp để nuôi cấy tăng số lượng phôi.

Kết quả nghiên cứu ở trường hợp ĐLLN cho thấy 40 g/L sucrose là nồng độ thích hợp đối với sự hình thành và phát triển phôi vô tính xét ở cả hai chỉ tiêu tỷ lệ mẫu tạo phôi và số phôi/mẫu. Glucose và fructose đều có tác động kém hơn đến khả năng cảm ứng tạo phôi. Kết quả này phù hợp với thực tiễn nghiên cứu về ảnh hưởng của loại và nồng độ đường đến nuôi cấy mô tế bào trên nhiều loài thực vật khác nhau như đã nêu trên.



Hình 3.16 Cụm phôi vô tính ĐLLN hình thành trên môi trường MS + BA 1,5 mg/L + NAA 0,1 mg/L có bổ sung đường sucrose (1), glucose (2), fructose (3), maltose (4) với các nồng độ khác nhau thời điểm 45 NSC

3.3 Nhân phôi vô tính, tạo phôi trưởng thành và tạo cây từ phôi vô tính ĐLLN

3.3.1 Ảnh hưởng của trọng lượng mô phôi nuôi cấy ban đầu và tốc độ lắc đến sự gia tăng sinh khối mô phôi vô tính trên hệ thống nuôi cấy lỏng lắc

Bảng 3.13 cho thấy khi nuôi mô phôi trên hệ thống nuôi cấy lỏng lắc, trọng lượng phôi nuôi cấy ban đầu ảnh hưởng đến sinh khối mô phôi tạo ra. Bên cạnh đó ảnh hưởng của tốc độ lắc đến khả năng tăng sinh mô phôi cũng rõ rệt. Tuy nhiên, ảnh hưởng của sự tương tác giữa trọng lượng mô phôi nuôi cấy ban đầu và tốc độ lắc đến sinh khối mô phôi có sự khác biệt không có ý nghĩa.

Bảng 3.13 Ảnh hưởng của trọng lượng mô phôi nuôi cấy ban đầu và tốc độ lắc đến sự gia tăng sinh khối của mô phôi vô tính ĐLLN (g) trên hệ thống nuôi cấy lỏng lắc

Thời gian theo dõi (NSC)	Trọng lượng mô phôi nuôi cấy ban đầu (g) (A)	Tốc độ lắc (vòng/ phút) (B)			
		80	100	120	TB (A)
10	0,5	0,5	0,6	0,7	0,6 ^B
	1,0	1,0	1,1	1,0	1,0 ^A
	TB (B)	0,7 ^B	0,9 ^A	0,9 ^A	
	CV = 12,5%; F _A = 64,8 ^{**} ; F _B = 8,5 ^{**} ; F _{A*B} = 1,5 ^{ns}				
20	0,5	1,0	1,6	2,1	1,6 ^B
	1,0	2,9	4,2	4,2	3,8 ^A
	TB (B)	2,0 ^B	2,9 ^A	3,2 ^A	
	CV = 9,3%; F _A = 344,7 ^{**} ; F _B = 38,9 ^{**} ; F _{A*B} = 3,2 ^{ns}				
30	0,5	2,5	4,1	3,5	3,3 ^B
	1,0	5,2	7,5	6,2	6,3 ^A
	TB (B)	3,8 ^C	5,8 ^A	4,9 ^B	
	CV = 8,17%; F _A = 258,7 ^{**} ; F _B = 37,2 ^{**} ; F _{A*B} = 1,7 ^{ns}				

Trong cùng một nhóm giá trị trung bình, các số có cùng ký tự đi kèm thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê. *: có ý nghĩa ở mức $0,01 < P \leq 0,05$; **: rất có ý nghĩa ở mức $P \leq 0,01$; ns: không có ý nghĩa thống kê.

Tại thời điểm 30 NSC, trọng lượng mô phôi nuôi cấy ban đầu 1,0 g đã làm gia tăng nhiều nhất và đạt 6,3 g; có sự khác biệt rõ so với trọng lượng mô phôi nuôi cấy ban đầu 0,5 g. Tốc độ lắc 100 vòng/ phút đã làm gia tăng trọng lượng nhiều nhất đạt

5,8 g; có sự khác biệt so với các tốc độ lắ còn lại. Trọng lượng mô phôi nuôi cấy ban đầu 1 g và tốc độ lắ 100 vòng/ phút đã làm gia tăng trọng lượng nhiều nhất với trọng lượng tăng sinh đạt 7,5 g.

Bảng 3.14 Ảnh hưởng của trọng lượng mô phôi nuôi cấy ban đầu và tốc độ lắ đến hệ số nhân sinh khối mô phôi vô tính ĐLLN trên hệ thống nuôi cấy lỏng lắ

Thời gian theo dõi (NSC)	Trọng lượng mô phôi nuôi cấy ban đầu (g) (A)	Tốc độ lắ (vòng/ phút) (B)			
		80	100	120	TB (A)
10	0,5	2,0	2,2	2,4	2,2 ^A
	1,0	0,8	2,1	2,0	2,0 ^B
	TB (B)	1,9 ^B	2,2 ^A	2,2 ^A	
CV = 7,6%; F _A = 9,1 [*] ; F _B = 6,4 [*] ; F _{A*B} = 1,0 ^{ns}					
20	0,5	3,1 ^c	4,3 ^b	5,3 ^a	4,8 ^A
	1,0	3,9 ^b	5,2 ^a	5,2 ^a	4,2 ^B
	TB (B)	3,5 ^B	4,7 ^A	5,2 ^A	
CV = 6,7%; F _A = 17,2 ^{**} ; F _B = 54,2 ^{**} ; F _{A*B} = 4,7 [*]					
30	0,5	5,9	9,1	8,0	7,7
	1,0	6,2	8,5	7,2	7,3
	TB (B)	6,1 ^C	8,8 ^A	7,6 ^B	
CV = 7,7%; F _A = 1,6 ^{ns} ; F _B = 34,6 ^{**} ; F _{A*B} = 1,3 ^{ns}					

*Trong cùng một nhóm giá trị trung bình, các số có cùng ký tự đi kèm thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê. *: có ý nghĩa ở mức $0,01 < P \leq 0,05$; **: rất có ý nghĩa ở mức $P \leq 0,01$; ns: không có ý nghĩa thống kê.*

Bảng 3.14 cho thấy khi nuôi nhân mô phôi vô tính trên hệ thống nuôi cấy lỏng lắ thì tốc độ lắ có ảnh hưởng rõ đến hệ số nhân mô phôi. Trọng lượng mô phôi nuôi cấy ban đầu có ảnh hưởng rõ đến hệ số nhân mô phôi.

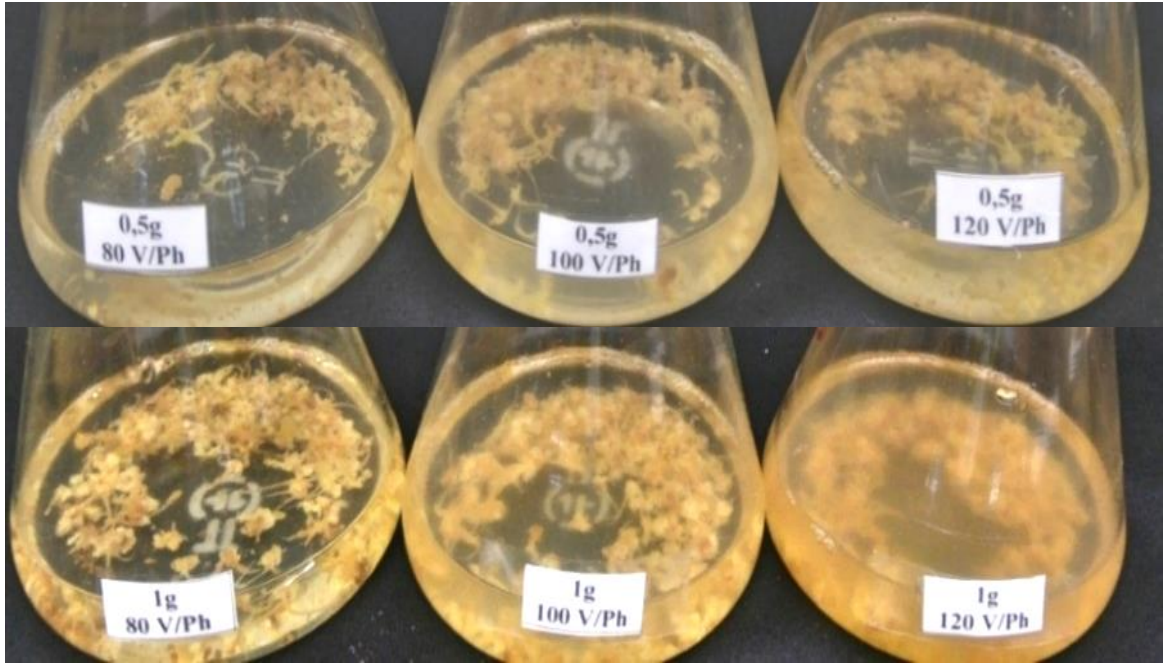
Tại thời điểm 30 NSC, với trọng lượng mô phôi nuôi cấy ban đầu 0,5 g đã cho hệ số nhân mô phôi cao nhất đạt 7,7 lần; có sự khác biệt so với trọng lượng mô phôi nuôi cấy ban đầu 1g. Tốc độ lắ 100 vòng/phút cho hệ số nhân sinh khối mô phôi cao nhất đạt 8,8 lần; có sự khác biệt so với các tốc độ lắ còn lại. Với trọng lượng mô phôi nuôi cấy ban đầu 0,5 g và tốc độ lắ 100 vòng/ phút đã cho hệ số nhân cao nhất đạt 9,1 lần.



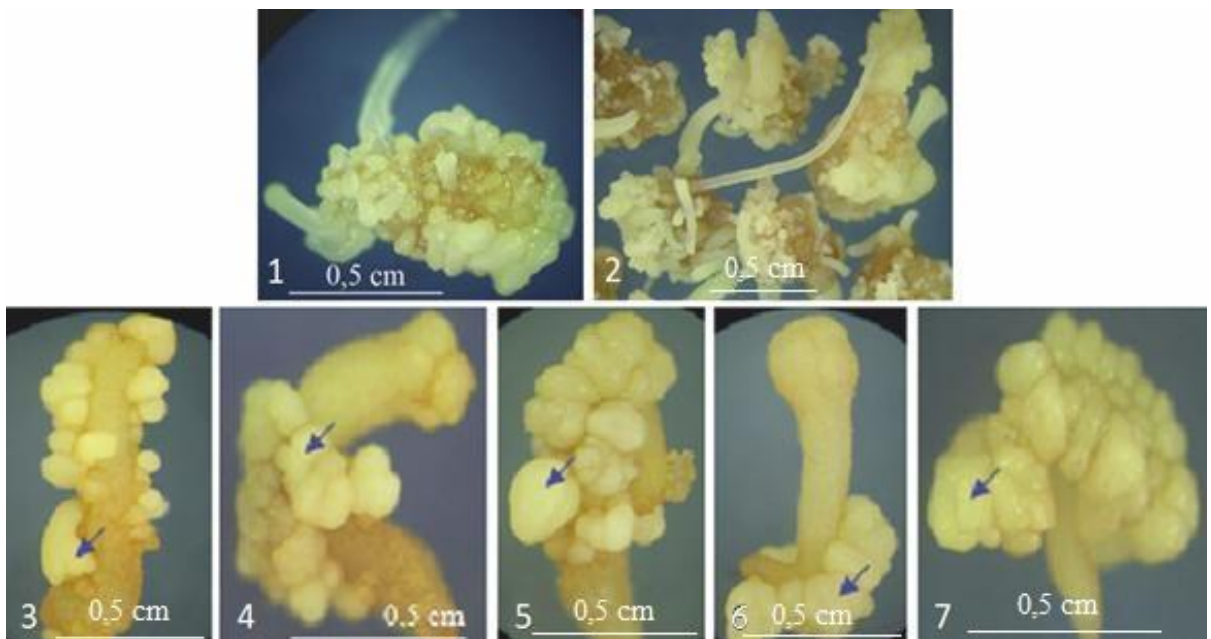
Hình 3.17 Mô phôi vô tính ĐLLN trên hệ thống lỏng lắc thời điểm 30 NSC.

Như vậy nuôi cấy lỏng lắc đã cho hiệu quả tốt trong việc tăng sinh mô phôi vô tính ĐLLN. Mô phôi phát sinh nhiều hình thái khác nhau và liên tục tạo phôi thứ cấp. Ở tốc độ lắc 100 vòng/phút và 120 vòng/phút cung cấp không khí hòa tan và dinh dưỡng đồng nhất giúp phôi phát triển tốt, tuy nhiên ở tốc độ lắc 120 vòng/phút phôi có hiện tượng nhanh hóa nâu và dung dịch nuôi cấy hóa đục. Ở tốc độ lắc 80 vòng/phút mô phôi có màu vàng đậm và hóa già nhanh chóng so với hai tốc độ trên. Với khối mô phôi nuôi cấy ban đầu 1 g giúp mô phôi nhanh chóng đạt điều kiện mật độ tới hạn và bắt đầu chu kỳ sinh trưởng sớm hơn. Mô phôi vô tính tăng sinh chậm ở giai đoạn từ 0 đến 10 NSC vì mật độ còn thấp và đang dần tăng sinh để đạt điều kiện mật độ tới hạn bắt đầu chu kỳ sinh trưởng. Giai đoạn từ 10 đến 20 NSC mật độ có sự tăng nhanh chóng và đạt đến mật độ tới hạn tạo điều kiện tốt cho việc tăng sinh mô phôi. Giai đoạn từ 20 đến 30 NSC, mô phôi vẫn tăng sinh nhanh tuy nhiên mô phôi dần chuyển sang màu vàng sậm và hóa già.

Trong quá trình nuôi lỏng lắc theo thời gian trong điều kiện thích hợp, mô sẹo dần thoái hóa, phôi sơ cấp (primary) liên tục tạo phôi thứ cấp (secondary) dẫn đến hình thành lượng lớn cụm phôi (multiple/poly-embryos) theo cơ chế tạo phôi bất định (adventitious embryogenesis) (Hình 3.19). Thực tế nghiên cứu cho thấy, sau khoảng 3 tháng nuôi cấy, sản phẩm nhận được toàn là sinh khối phôi, không còn mô sẹo. Sản phẩm phôi này phục vụ cho nghiên cứu nuôi nhân sinh khối bằng hệ thống bioreactor.



Hình 3.18 Mô sẹo vô tính ĐLLN nuôi cấy trên hệ thống lỏng lắc thời điểm 30 NSC



Hình 3.19 Phôi vô tính ĐLLN nuôi cấy trên hệ thống lỏng lắc thời điểm 30 NSC

(1) Vật liệu cụm phôi sơ cấp giai đoạn 20 NSC dùng nuôi lỏng lắc, (2) Cận cảnh cụm phôi nuôi giai đoạn 20 NSC (10X), (3) Sự hình thành phôi thứ cấp từ phôi sơ cấp (mũi tên chỉ vị trí phôi thứ cấp) với phôi hình thành trên khắp cơ thể phôi, (4) trên thân phôi, (5) trên phần ngọn và thân phôi, (6) trên phần thân và rễ phôi và (7) chỉ trên phần ngọn của phôi (chụp dưới kính hiển vi soi nổi với độ phóng đại 20X).

Sinh trưởng mô tế bào trong quá trình nuôi lỏng lác chịu ảnh hưởng bởi hai yếu tố quan trọng là trọng lượng tươi mô tế bào nuôi cấy ban đầu (inoculum size/density) và sự thông khí (aeration) nhờ tốc độ lắc/khuấy. Theo nhiều tài liệu, sinh khối tươi mô tế bào nuôi cấy ban đầu thích hợp dao động từ 0,05% đến 2% w/v (cấy 0,5 g - 20 g sinh khối/L môi trường). Liên quan đến tạo phôi vô tính, Guillou và cs (2018) đã sử dụng 2% sinh khối tươi mô sẹo sinh phôi để tạo huyền phù tế bào và cũng kết luận 5% sinh khối huyền phù tế bào là thích hợp để tạo phôi vô tính cây ca cao (*Theobroma cacao*) qua nuôi cấy lỏng lác dùng bình tam giác loại 250 mL. Sinh khối phôi nuôi cấy ban đầu 1,25% (1 g) là thích hợp ở nghiên cứu nuôi phôi lỏng lác ĐLLN này cơ bản phù hợp với thực tiễn nghiên cứu chung ở lĩnh vực này.

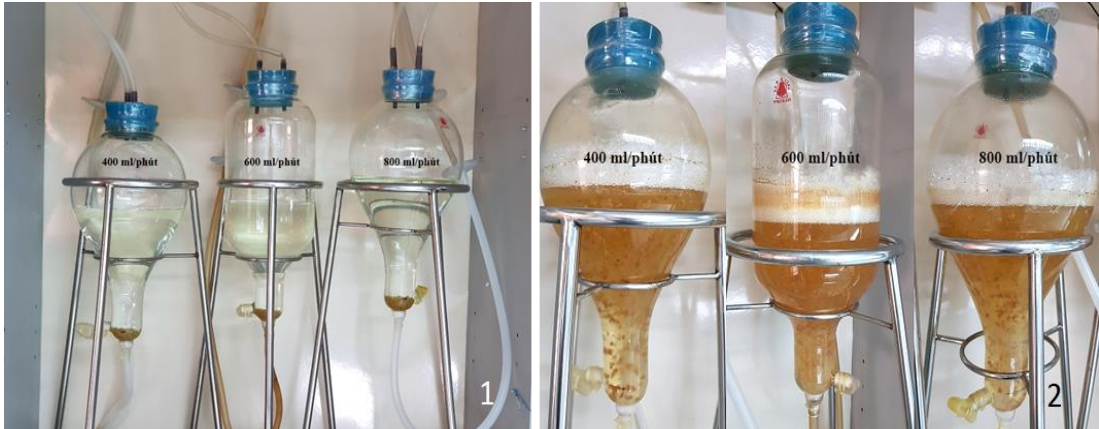
3.3.2 Ảnh hưởng của tốc độ sục khí đến sự gia tăng sinh khối phôi vô tính ĐLLN nhân nuôi bằng bioreactor

Bảng 3.15 Ảnh hưởng của tốc độ sục khí đến sự gia tăng sinh khối (g) và hệ số nhân sinh khối phôi vô tính ĐLLN (lần) thời điểm 30 NSC

Tốc độ sục khí (mL/phút)	400	600	800
Sinh khối phôi sau nuôi cấy (g)	196,7 ^b	214,6 ^a	191,5 ^b
Hệ số nhân sinh khối phôi (lần)	21,0 ^b	22,9 ^a	20,4 ^b
	CV = 3,9%	F = 7,3*	

*Trong cùng một hàng, những giá trị theo sau có cùng ký tự sự khác biệt không có ý nghĩa trong thống kê; *: có ý nghĩa ở mức $0,01 < P \leq 0,05$*

Ở thời điểm 30 NSC, các bioreactor chứa nhiều bọt khí nên thí nghiệm thu chỉ tiêu một lần và dừng lại. Kết quả ở thời điểm này cho thấy tốc độ sục khí 600 mL/phút cho trọng lượng tươi của phôi và hệ số nhân sinh khối phôi đạt cao nhất lần lượt là 214,6 g và 22,9 lần so với các nghiệm thức còn lại. Như vậy, qua thí nghiệm trên, tốc độ sục khí 600 mL/phút là thích hợp nhất cho sự gia tăng sinh khối phôi.



Hình 3.20 Nuôi nhân phôi vô tính ĐLLN bằng hệ thống bioreactor sục khí
(1) Các bioreactor thời điểm mới cấy phôi; (2) Các bioreactor nuôi phôi thời điểm 30 NSC (từ trái qua phải có tốc độ sục khí lần lượt là 400 mL/phút, 600 mL/phút và 800 mL/phút).



Hình 3.21 Phôi vô tính ĐLLN thu được qua nuôi cấy bằng bioreactor thời điểm 30 NSC.

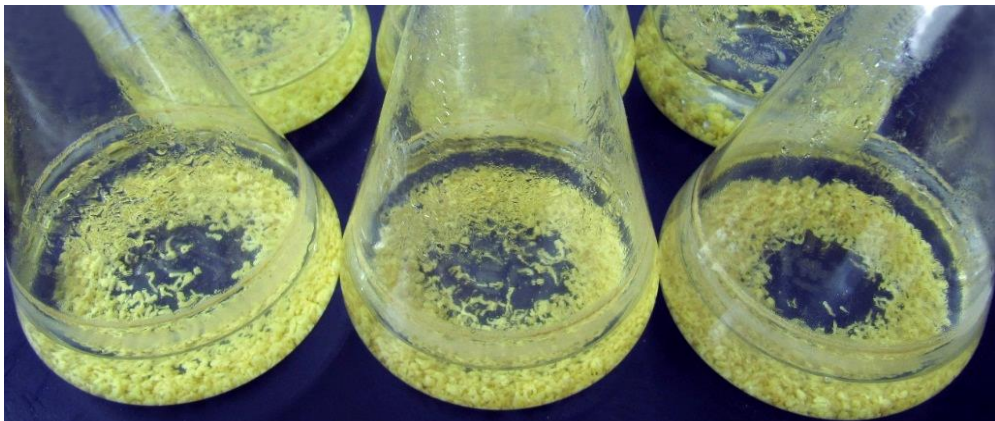
Tương tự trường hợp nuôi lỏng lác, trọng lượng mô tế bào dùng trong nghiên cứu nuôi bằng hệ thống bioreactor thường dao động trong khoảng 0,05% - 2% w/v (0,5 g - 20 g/L). Đối với bioreactor hiệu quả nuôi cấy còn phụ thuộc vào tốc độ sục khí, dao động từ 0,1 vvm đến 1 vvm (lít không khí/lít môi trường/phút) tùy theo loại, kích cỡ, cấu trúc, mật độ vật liệu nuôi cấy, thời điểm cần tăng cường sục khí. Kết quả công bố của Ducos và cs (2007) cho thấy 0,5 g sinh khối tế bào sinh phôi cà phê Robusta (*Coffea canephora*) thích hợp cho nuôi cấy tạo phôi vô tính dạng thủy lôi bằng hệ thống bioreactor có cánh khuấy (stirred) và 1 g thích hợp đối với nuôi cấy tạo phôi cà phê Arabica (*Coffea arabica* F1) dạng có 2 lá mầm bằng bioreactor ngập chìm tạm thời (TIB - Temporary Immersion Bioreactor) RITA®. Trọng lượng 5 g là

phù hợp cho nuôi cấy phát triển sinh khối mô sẹo sinh phôi bằng bioreactor dạng cầu có sục khí (0,1 vvm) dùng cho tạo phôi vô tính, tạo chồi từ phôi *Allium* (Wua và cs, 2015). Tốc độ sục khí 0,8 vvm và 0,5 vvm thích hợp đối với nuôi cấy rễ tơ *Hyoscyamus niger* (Jaremicz và cs, 2014) và rễ bất định *Talinum paniculatum* (Manuhara và cs, 2015) bằng bioreactor sục khí. Các thông số về trọng lượng mô cấy ban đầu và tốc độ sục khí đã được xác định ở nghiên cứu trên ĐLLN này tương hợp với kết quả của các tác giả nêu trên.

Kết quả nghiên cứu nhân phôi thành công bằng phương pháp nuôi lỏng lắc và bằng bioreactor với hệ số gia tăng cao cho thấy sinh khối phôi nhận được chủ yếu có kết cấu cụm (cluster). Kết quả này tạo tiền đề quan trọng cho nghiên cứu nuôi nhân phôi quy mô lớn sau này phục vụ nhân giống, tách thu hợp chất thứ cấp và một số nghiên cứu khác (biến nạp gene).

3.3.3 Ảnh hưởng của nồng độ kinetin và IBA đến khả năng tạo phôi vô tính ĐLLN trưởng thành

Quá trình nuôi cụm phôi lỏng lắc và bằng bioreactor đã thu được lượng rất lớn phôi ở dạng cụm, các phôi trên cụm do ở giai đoạn chưa trưởng thành nên có kích thước nhỏ (~ 3 - 6 mm). Cũng ghi nhận được trường hợp phôi đơn (single/ isolated) treo (suspended) vào môi trường tuy không nhiều, theo nghiên cứu do các phôi này đã đến giai đoạn có cấu trúc khá hoàn chỉnh và cũng do tác động cơ học của quá trình lắc hoặc sục khí.



Hình 3.22 Các bình nuôi phôi vô tính ĐLLN thời điểm 30 NSC trên hệ thống lỏng lắc

Ở nghiên cứu này, các cụm phôi nuôi lỏng lắ (Hình 3.22) được sử dụng để tạo nguồn phôi đơn ban đầu. Qua thao tác dùng que cấy ép nhẹ các cụm phôi vào thành bình tam giác, dễ dàng thu được lượng lớn phôi đơn ở dạng chưa trưởng thành. Sau đó, tập hợp các phôi đơn nhỏ này được tiếp tục nuôi cấy cũng trong môi trường lỏng lắ để phôi phát triển. Xác định nồng độ kinetin và IBA thích hợp cho tạo phôi hữu hiệu thời điểm 30 NSC.

Bảng 3.16 Ảnh hưởng của nồng độ kinetin và IBA đến số phôi hữu hiệu, phôi vô hiệu và tỷ lệ phôi hữu hiệu (%) thời điểm 30 NSC

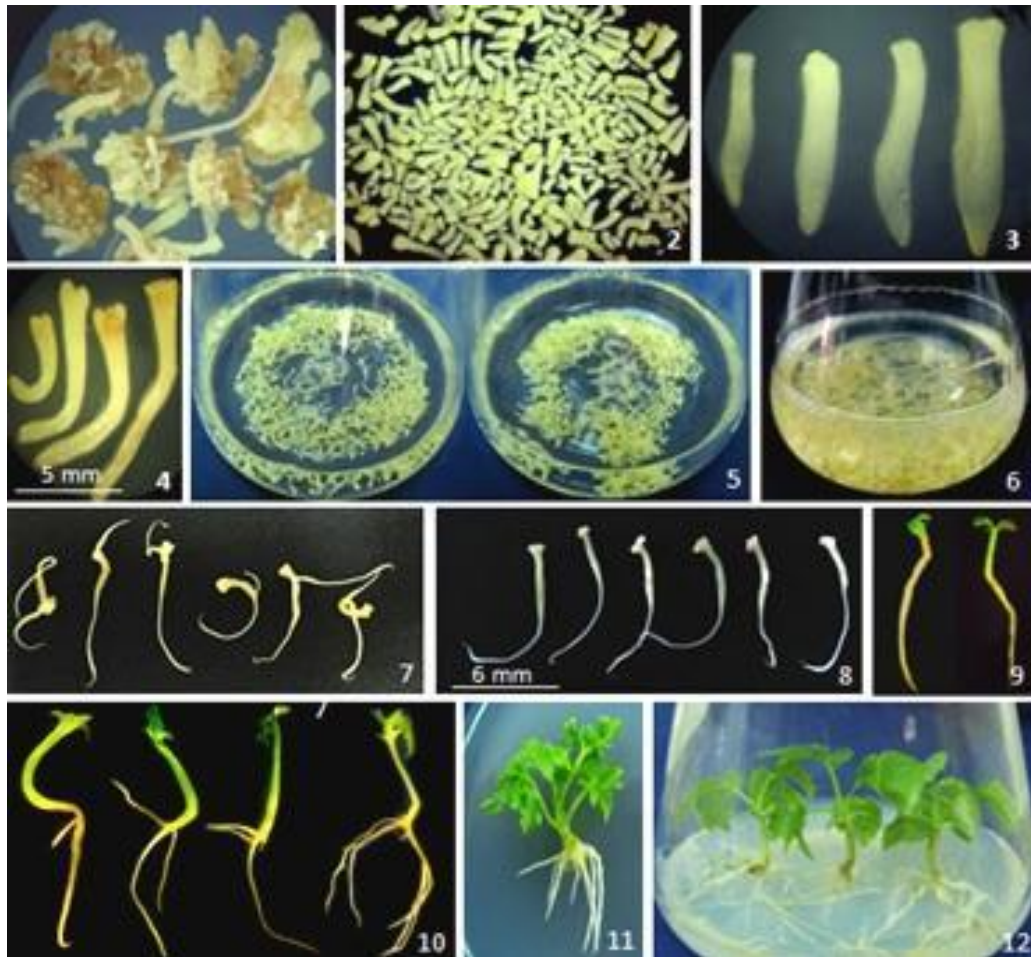
Chỉ tiêu	KIN (mg/L)	IBA (mg/L)			TB (KIN)
		0	0,1	0,2	
Số phôi hữu hiệu	0	73,3 ^{bc}	81,7 ^b	76,0 ^{bc}	77,0 ^A
	0,5	61,3 ^d	73,0 ^{bc}	93,3 ^a	75,9 ^A
	1,0	62,7 ^d	79,0 ^{bc}	75,7 ^{bc}	72,4 ^A
	1,5	55,3 ^d	71,7 ^c	72,7 ^{bc}	66,6 ^B
	TB (IBA)	63,2 ^B	76,3 ^A	79,4 ^A	
	CV (%) = 5,0%	F _A = 14,7 ^{**}		F _B = 66,2 ^{**}	F _{A*B} = 11,2 ^{**}
Số phôi vô hiệu	0	41,7 ^a	41,3 ^a	39,0 ^{ab}	40,7 ^A
	0,5	31,7 ^d	40,3 ^{ab}	36,7 ^{bc}	36,2 ^B
	1,0	29,7 ^{de}	38,0 ^{ab}	36,7 ^{bc}	34,8 ^B
	1,5	27,0 ^e	33,7 ^{cd}	32,7 ^{cd}	31,1 ^C
	TB (IBA)	32,5 ^C	38,3 ^A	36,3 ^B	
	CV (%) = 4,7%	F _A = 48,2 ^{**}		F _B = 36,0 ^{**}	F _{A*B} = 6,5 ^{**}
Tỷ lệ phôi hữu hiệu (%)	0	63,7 ^d	66,4 ^{b-d}	66,1 ^{b-d}	65,4 ^B
	0,5	65,9 ^{b-d}	64,4 ^{cd}	71,8 ^a	67,4 ^A
	1,0	67,9 ^{bc}	67,5 ^{b-d}	67,4 ^{b-d}	67,6 ^A
	1,5	67,2 ^{b-d}	68,0 ^{bc}	69,1 ^{ab}	68,1 ^A
	TB (IBA)	66,2 ^B	66,6 ^B	68,6 ^A	
	CV (%) = 2,2%	F _A = 5,7 ^{**}		F _B = 9,0 ^{**}	F _{A*B} = 5,4 ^{**}

*Trong cùng một nhóm giá trị trung bình, những giá trị theo sau có cùng ký tự sự khác biệt có ý nghĩa trong thống kê; **: rất có ý nghĩa ở mức $P \leq 0,01$; ns: không có ý nghĩa thống kê.*

Kinetin nồng độ 1,5 mg/L cho số phôi hữu hiệu thấp nhất chỉ đạt 66,6 phôi, trong khi các nồng độ khác đều đạt trên 70 phôi. Đối với IBA, khi không bổ sung IBA thì số phôi hữu hiệu thấp nhất chỉ đạt 63,2 phôi. Khi kết hợp kinetin với IBA, cho thấy IBA 0,2 mg/L và kinetin 0,5 mg/L cho kết quả cao nhất - đạt 93,3 phôi, khác biệt rất rõ so với các nghiệm thức còn lại.

Về tỷ lệ phôi hữu hiệu ở thời điểm 30 NSC, khi kết hợp IBA 0,2 mg/L và kinetin 0,5 mg/L cho kết quả cao nhất đạt 71,8%, khác biệt so với các nghiệm thức còn lại.

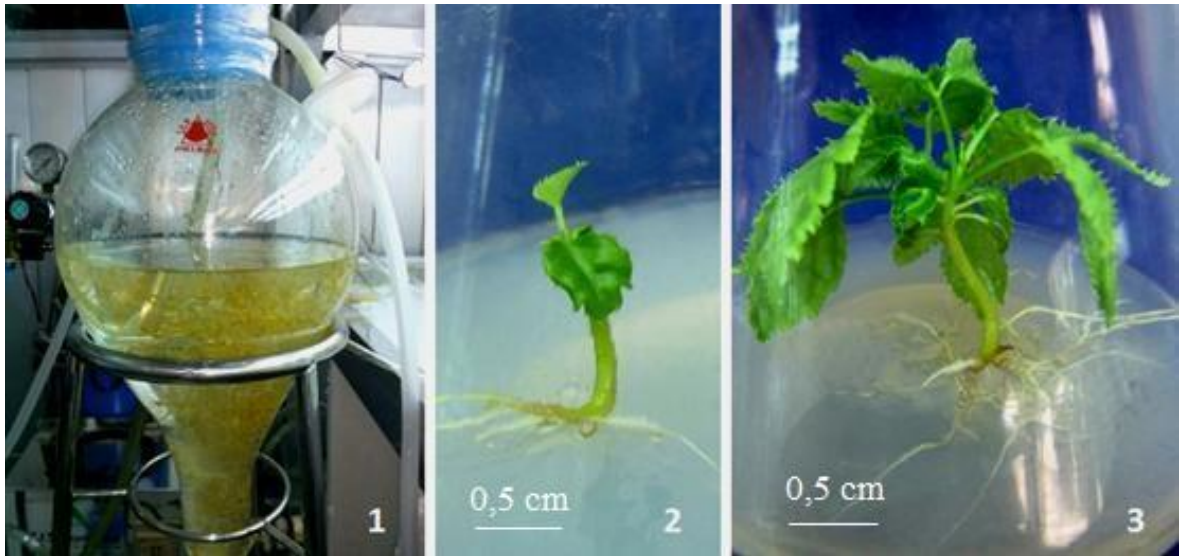
Phôi hữu hiệu phát triển thành cây sau ~ 84 ngày nuôi cấy trên môi trường SH không có chất điều hòa sinh trưởng (Hình 3.23.12).



Hình 3.23 Phôi vô tính ĐLLN qua các bước hình thành cây con thông qua kết hợp nuôi lỏng lác và nuôi trên môi trường đặc

(1) Vật liệu cụm phôi dùng tách thu phôi đơn, (2,3) Phôi dùng nuôi cấy, (4,5) Phôi phát triển, (6) Phôi đơn ở cuối giai đoạn nuôi cấy (30 NSC), (7) Phôi không hữu hiệu, (8) Phôi hữu hiệu (30 NSC), (9, 10) Phôi phát triển thành cây con với rễ trụ điển hình, (11) Cây nuôi cấy từ chồi ngọn - không có lá mầm chỉ có rễ bất định khác biệt với cây từ phôi, (12) Cây có nguồn gốc từ phôi.

Bioreactor sục khí đã được sử dụng để nuôi cấy phôi. Kết quả cho thấy, thời điểm 30 NSC, đã có rất nhiều phôi trưởng thành với kích thước 1 - 1,5 cm. Các phôi trưởng thành sau đó phát triển thành cây (Hình 3.23) qua cấy chuyển sang môi trường có thành phần như đã sử dụng đối với phôi nuôi cấy lỏng lác. Kết quả theo dõi 216 phôi từ bioreactor thì có tới 192 là phôi hữu hiệu, chiếm tỷ lệ ~89% (số liệu không công bố chi tiết) - cao hơn so với nuôi cấy lỏng lác (~ 72%), có thể là do trong điều kiện có sục khí tốt nên phôi phát triển theo hướng tích cực hơn kiểu hình bình thường.



Hình 3.24 Bioreactor nuôi cấy phôi đơn ở thời điểm 30 NSC (1),
cây con từ phôi (2) và cây phát triển từ phôi (3)

Môi trường với nồng độ khoáng thấp (1/2 MS), nồng độ đường thấp (15 g/L), sử dụng kinetin và IBA đã tạo điều kiện thuận lợi cho phôi thứ cấp đỉnh lãg lá to (*Polyscias filicifolia*) phát triển, tạo chồi và cây bình thường (Sliwinska và cs, 2008). Trên ĐLLN, do các yếu tố trên nên phôi nuôi cấy không có khuynh hướng tạo phôi thứ cấp, khác với mục tiêu là nhân phôi khi dùng BA, NAA (là các chất ĐHST có hoạt tính sinh lý mạnh hơn kinetin, IBA) kết hợp dùng môi trường MS với nồng độ khoáng theo chuẩn và nồng độ đường cao hơn (20 g/L).

Tóm lại, đã thực hiện thành công nghiên cứu tạo và nuôi phôi đơn đến giai đoạn phát triển thành cây thông qua hai phương pháp nuôi lỏng lác và bioreactor, tạo tiền đề rất thuận lợi cho nghiên cứu nhân giống ĐLLN.

3.3.4 Ảnh hưởng của môi trường khoáng đến sự tạo cây từ phôi vô tính ĐLLN

3.3.4.1 Ảnh hưởng của 4 môi trường khoáng đến sinh trưởng của phôi vô tính ĐLLN

Từ kết quả Bảng 3.17 cho thấy, số lá ở 21 NSC không có sự khác biệt giữa các môi trường nuôi cấy. Ở giai đoạn này, mẫu cây chỉ vừa bắt đầu ra lá mới, vì vậy ảnh hưởng của các loại môi trường đến sự ra lá của cây không rõ rệt.

Bảng 3.17 Ảnh hưởng của 4 môi trường khoáng đến số lá (lá/cây) của cây ĐLLN từ phôi vô tính

Môi trường nuôi cấy	Thời điểm theo dõi			
	21 NSC	42 NSC	63NSC	84 NSC
MS	2,7	3,9 ^{ab}	5,5 ^b	6,8 ^b
1/2 MS	2,6	3,3 ^b	5,5 ^b	7,7 ^{ab}
SH	3,0	4,7 ^a	7,8 ^a	8,9 ^a
Nitsch & Nitsch	2,3	3,2 ^b	5,1 ^b	6,4 ^b
CV (%)	13,5	12,5	13,8	10,0
F	2,1 ^{ns}	6,3 [*]	6,8 [*]	6,4 [*]

*Trong cùng một cột, những giá trị theo sau có cùng ký tự khác biệt có ý nghĩa trong thống kê; ns: không có ý nghĩa thống kê; *: có ý nghĩa ở mức $0,01 < P \leq 0,05$.*

Ở các thời điểm 42, 63 và 84 NSC, sự khác biệt của số lá giữa các môi trường có ý nghĩa. Cây được nuôi cấy trong môi trường SH có số lá cao nhất đạt 4,7 lá ở thời điểm 42 NSC và 7,8 lá ở thời điểm 63 NSC, có sự khác biệt với các mẫu cây được nuôi cấy trong các môi trường 1/2 MS, Nitsch & Nitsch. Ở thời điểm 84 NSC, số lá cao nhất vẫn ở cây được nuôi cấy trong môi trường SH là 8,9 lá. Ở các môi trường khác đều có số lá thấp hơn.

Kết quả thể hiện ở Bảng 3.18 cho thấy sau 84 ngày nuôi cấy, tất cả các môi trường đều cho rễ 100%. Ở thời điểm 21 NSC, số lượng rễ dao động trong khoảng 0,8 - 1,2 rễ, sự hình thành rễ giữa các môi trường khác biệt không có ý nghĩa.

Sau 84 NSC, mẫu cây nuôi cấy ở môi trường SH vẫn cho kết quả tốt nhất đạt 7,7 rễ, kết quả thấp nhất là mẫu cây được nuôi cấy trong môi trường Nitsch & Nitsch chỉ với 4,4 rễ. Sự khác biệt này rất có ý nghĩa. Môi trường SH tỏ ra thích hợp cho sự tạo rễ của cây.

Bảng 3.18 Ảnh hưởng của 4 môi trường khoáng đến số rễ (rễ/cây) của cây ĐLLN từ phôi vô tính thời điểm 21 - 84 NSC

Môi trường nuôi cấy	Thời điểm theo dõi			
	21 NSC	42 NSC	63NSC	84 NSC
MS	0,9	2,7 ^b	3,3 ^c	5,3 ^{bc}
1/2 MS	0,9	2,9 ^b	4,8 ^b	6,7 ^{ab}
SH	0,8	4,1 ^a	6,5 ^a	7,7 ^a
Nitsch & Nitsch	1,2	2,6 ^b	3,3 ^c	4,4 ^c
CV (%)	17,2	13,4	11,5	11,5
F	3,5 ^{ns}	9,0 ^{**}	25,7 ^{**}	13,8 ^{**}

Trong cùng một cột, những giá trị theo sau có cùng ký tự sự khác biệt có ý nghĩa trong thống kê; *: có ý nghĩa ở mức $0,01 < P \leq 0,05$; **: rất có ý nghĩa ở mức $P \leq 0,01$

Bảng 3.19 Ảnh hưởng của 4 môi trường khoáng đến chiều dài rễ (cm) của cây ĐLLN từ phôi vô tính thời điểm 84 NSC

Môi trường nuôi cấy	Chiều dài rễ (cm)
MS	4,3 ^b
1/2 MS	3,4 ^{bc}
SH	6,2 ^a
Nitsch & Nitsch	2,7 ^c
CV (%)	12,0
F	27,0 ^{**}

Trong cùng một cột, các số có cùng ký tự đi kèm thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê. **: rất có ý nghĩa ở mức $P \leq 0,01$.

Kết quả ở Bảng 3.19 cho thấy cây được nuôi cấy trong môi trường SH có chiều dài rễ dài nhất là 6,2 cm, khác biệt so với các môi trường MS, 1/2 MS, Nitsch & Nitsch. Cây nuôi cấy trong môi trường Nitsch & Nitsch có chiều dài rễ thấp nhất (2,7 cm).

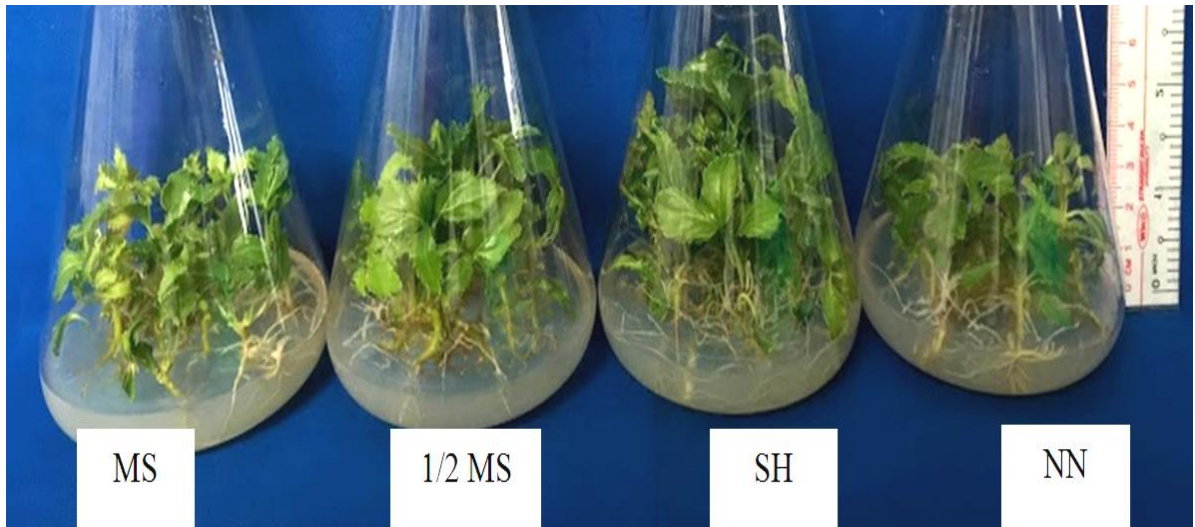
Kết quả ở hai Bảng 3.18, Bảng 3.19 và Hình 3.23 cho thấy có sự ảnh hưởng rõ rệt của các loại môi trường đến sự hình thành rễ của cây đỉnh lăng và môi trường SH cho kết quả tốt nhất.

Về chiều cao cây, Bảng 3.20 cho thấy ở thời điểm 84 NSC, môi trường SH cho chiều cao cây cao nhất đạt 2,5 cm, kết quả tương tự ở môi trường 1/2 MS (2,27 cm). Môi trường Nitsch & Nitsch cho kết quả thấp nhất (2,0 cm).

Bảng 3.20 Ảnh hưởng của 4 môi trường khoáng đến chiều cao của cây ĐLLN (cm) từ phôi vô tính thời điểm 21 - 84 NSC

Môi trường nuôi cấy	Thời điểm theo dõi			
	21 NSC	42 NSC	63NSC	84 NSC
MS	1,2	1,4	1,6	2,1 ^b
1/2 MS	1,2	1,5	1,7	2,3 ^{ab}
SH	1,4	1,7	1,9	2,5 ^a
Nitsch & Nitsch	1,4	1,5	1,6	2,0 ^b
CV (%)	13,8	11,4	11,4	7,6
F	1,4 ^{ns}	1,3 ^{ns}	2,2 ^{ns}	5,5 [*]

*Trong cùng một cột, những giá trị theo sau có cùng ký tự sự khác biệt có ý nghĩa trong thống kê; ns: không có ý nghĩa; *: có ý nghĩa ở mức $0,01 < P \leq 0,05$.*



Hình 3.25 Cây ĐLLN nuôi cấy trên 4 loại môi trường khoáng khác nhau thời điểm 84 NSC.

3.3.4.2 Ảnh hưởng của 4 môi trường khoáng đến trọng lượng tươi và trọng lượng khô của cây ĐLLN từ phôi vô tính

Kết quả Bảng 3.21 cho thấy trọng lượng tươi và trọng lượng khô của cây được nuôi cấy trên môi trường SH cho kết quả cao nhất đạt lần lượt là 5,9 g và 0,3 g. Cây

được nuôi cấy trên môi trường Nitsch & Nitsch có trọng lượng tươi và khô thấp nhất là 4,20 g và 0,2 g.

Bảng 3.21 Ảnh hưởng của 4 môi trường khoáng đến trọng lượng tươi (g/cây) và trọng lượng khô (g/cây) của cây ĐLLN từ phôi vô tính thời điểm 84 NSC

Môi trường nuôi cấy	Trọng lượng tươi (g)	Trọng lượng khô (g)
MS	4,5 ^b	0,3 ^b
1/2 MS	4,8 ^{ab}	0,3 ^b
SH (Schenk & Hildebrandt, 1972)	5,9 ^a	0,3 ^a
Nitsch & Nitsch	4,2 ^b	0,2 ^b
CV (%)	13,2	13,2
F	4,2*	6,3*

Trong cùng cột, các số có cùng ký tự đi kèm thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê. *: có ý nghĩa ở mức $0,01 < P \leq 0,05$.

Qua các kết quả trên cho thấy môi trường SH là môi trường thích hợp nhất cho sự phát triển cây ĐLLN.

Trong nghiên cứu nuôi cấy mô thực vật *in vitro* thì thành phần và hàm lượng khoáng của môi trường có vai trò quan trọng đối với sự tăng trưởng của cây. Đối với các loài thực vật khác nhau, thành phần và hàm lượng khoáng thích hợp có thể khác nhau. Kết quả nghiên cứu tạo cây ở ĐLLN cho thấy cây sinh trưởng tốt nhất ở môi trường SH và thấp nhất ở môi trường Nitsch & Nitsch, nguyên nhân có thể do cây ĐLLN thích hợp với môi trường có tổng lượng khoáng ở mức trung bình (môi trường SH) ~ 3.183 mg/L so với tổng lượng khoáng của các môi trường MS, 1/2 MS, Nitch & Nitch lần lượt là 4.302 mg/L (cao) và 2.151 mg/L, 2.070 mg/L (thấp). Ngoài ra, cũng có thể do cây ĐLLN có nhu cầu cao đối với KNO_3 (2,500 mg/L) ở môi trường SH so với MS, 1/2 MS, Nitch & Nitch lần lượt chỉ là 1.900 mg/L, 950 mg/L, 950 mg/L.

Kết quả xác định được môi trường SH thích hợp trong nghiên cứu này tương tự như kết quả nghiên cứu trên một số loài cùng họ Araliaceae của một số tác giả trong và ngoài nước khi cho rằng SH là môi trường thích hợp dùng nghiên cứu tạo và nuôi chồi bất định (shoot organogenesis) sâm *Panax ginseng* (Tang, 2000); tạo chồi từ phôi vô tính sâm *Panax quinquefolius* (Zhou và Brown, 2006); nuôi chồi tạo cây

sâm Ngọc Linh *Panax vietnamensis* (Duong Tan Nhut và cs., 2011). Nghiên cứu của Zhang và cs (2014), qua nuôi dòng cây *Panax ginseng* đột biến có nguồn gốc phôi vô tính tái sinh từ mô sẹo cho thấy môi trường SH thích hợp hơn MS.

Liên quan đến chỉ tiêu rễ và môi trường, theo nghiên cứu của Nguyễn Thị Liễu và cs (2011) về khả năng tạo rễ bất định của sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis*) trong nuôi cấy mô, kết quả mẫu rễ được nuôi cấy trong môi trường Gamborg có bổ sung IBA cho kết quả cao nhất, nhưng bên cạnh đó môi trường SH cũng cho kết quả khả quan. Ngoài ra, Hoàng Xuân Chiến và cs (2011) cũng đã có khảo sát ảnh hưởng các loại môi trường đến sự tạo rễ của sâm Ngọc Linh trong nuôi cấy mô và kết quả ghi nhận được cho thấy môi trường SH cho kết quả tốt nhất.

Nuôi cấy *in vitro* là bước sau cùng của quá trình vi nhân giống (micropropagation) và kết quả nuôi cấy đạt tăng trưởng chiều cao, bộ lá và bộ rễ tốt sẽ tạo điều kiện thuận lợi cho giai đoạn ra cây ở vườn ươm sau này.

Tóm lại, dựa trên định hướng dùng vật liệu phôi vô tính phục vụ nhân giống cây ĐLLN, hệ thống các bước nghiên cứu từ nuôi cấy tạo mô sẹo, tạo phôi, nhân phôi, tạo chồi đến tạo cây *in vitro* đã được xây dựng thành công với các chỉ tiêu cụ thể cho từng giai đoạn.

3.4 Khảo sát sự sinh trưởng ở giai đoạn vườn ươm của dòng ĐLLN đã được nuôi cấy và đánh giá độ đồng nhất di truyền cây con

3.4.1 Ảnh hưởng của giá thể và chế độ che sáng đến sự sinh trưởng của cây con ĐLLN trong vườn ươm giai đoạn đầu sau *in vitro*

3.4.1.1 Ảnh hưởng của giá thể và chế độ che sáng đến tỷ lệ sống của cây con ĐLLN trong vườn ươm

Bảng 3.22 Ảnh hưởng của giá thể và chế độ che sáng đến tỷ lệ sống (%) của cây con ĐLLN trong vườn ươm thời điểm 21 NST

Loại giá thể (B)	Chế độ che sáng (A)			TB (B)
	3 ngày	5 ngày	7 ngày	
100 cát	72,6 ^c	77,8 ^b	84,4 ^a	78,3 ^A
80 cát 20 mụn dừa	71,1 ^{cd}	72,6 ^c	79,3 ^b	74,3 ^B
80 cát 20 tro trấu	68,9 ^{cde}	68,9 ^{cde}	71,9 ^{cd}	69,9 ^C
100 dớn	64,4 ^f	65,9 ^{ef}	68,2 ^{cde}	66,2 ^D
TB (A)	69,3 ^B	71,3 ^B	75,9 ^A	
CV (%) = 3,1	F _A = 28,4 ^{**}		F _B = 50,5 ^{**}	F _{A*B} = 2,8 [*]

Trong cùng một nhóm trung bình những giá trị có cùng ký tự theo sau khác biệt không có ý nghĩa thống kê; *: có ý nghĩa ở mức $0,01 < P \leq 0,05$; **: rất có ý nghĩa ở mức $P \leq 0,01$.

Kết quả ở Bảng 3.22 cho thấy chế độ che sáng ảnh hưởng rất lớn đến tỷ lệ sống của cây con khi mới ra bình. Cây con được che sáng trong 7 ngày đầu có tỷ lệ sống cao nhất đạt 75,9%, khác biệt so với cây con được che sáng trong 5 ngày chỉ đạt 71,3% và che sáng trong 3 ngày có tỷ lệ sống thấp nhất 69,5%. Khi trồng trên giá thể cát thì tỷ lệ cây sống cao nhất là 78,3%, khác biệt so với khi được trồng trên các giá thể khác trong thí nghiệm. Trồng trên giá thể cát kết hợp với che sáng trong 7 ngày đầu cho tỷ lệ sống cao nhất là 84,4%, khác biệt so với tỷ lệ cây định lã ở các nghiệm thức còn lại trong thí nghiệm. Lã Thị Thu Hằng (2015) nghiên cứu giá thể cho cây hoa chuông (*Sinningia speciosa*) *in vitro* giai đoạn vườn ươm cho rằng cát là giá thể ươm cây thích hợp nhất, tỷ lệ cây sống đạt cao nhất 97,9 - 100%, cây sinh trưởng tốt, đồng đều, cây nuôi cấy mô ở giai đoạn vườn ươm cần lượng ánh sáng đầy đủ, dịu nhẹ, cần che sáng cho cây khoảng 50%.

3.4.1.2 Ảnh hưởng của giá thể và chế độ che sáng đến chiều cao, số lá của cây con ĐLLN trong vườn ươm

Bảng 3.23 Ảnh hưởng của giá thể và chế độ che sáng đến chiều cao cây con ĐLLN (cm) trong vườn ươm thời điểm 21 NST

Giá thể (B) (%)	Chế độ che sáng (A)			TB (B)
	3 ngày	5 ngày	7 ngày	
100 cát	2,9	3,0	3,0	3,0 ^A
80 cát 20 mụn dừa	2,8	2,8	2,9	2,8 ^{AB}
80 cát 20 tro trấu	2,7	2,8	2,7	2,7 ^B
100 dớn	2,6	2,8	2,5	2,6 ^B
TB (A)	2,8	2,9	2,8	
CV (%) = 5,5	$F_A = 1,6^{ns}$	$F_B = 9,5^{**}$	$F_{A*B} = 1,5^{ns}$	

Trong cùng một nhóm trung bình những giá trị có cùng ký tự theo sau khác biệt không có ý nghĩa thống kê; **: rất có ý nghĩa ở mức $P \leq 0,01$; ns: không có ý nghĩa thống kê.

Bảng 3.23 cho thấy khi cây được che sáng trong 3 đến 5 ngày hay 7 ngày đầu đều đạt chiều cao gần giống nhau, dao động từ 2,8 đến 2,9 cm, khác biệt không có ý nghĩa. Tương tự, tương tác giữa chế độ che sáng và giá thể trồng đều cho chiều cao cây đỉnh lãng khác biệt không có ý nghĩa. Trong khi đó cây đỉnh lãng trồng trên giá thể 100% cát có chiều cao cây cao nhất ở 21 NST là 3,0 cm, khác biệt so với chiều cao cây được trồng ở các giá thể còn lại trong thí nghiệm (Bảng 3.23).

Bảng 3.24 Ảnh hưởng của giá thể và chế độ che sáng đến số lá (lá/cây) của cây con ĐLLN trong vườn ươm thời điểm 21 NST

Giá thể (B) (%)	Chế độ che sáng (A)			TB (B)
	3 ngày	5 ngày	7 ngày	
100 cát	5,1 ^a	5,0 ^a	5,1 ^a	5,1 ^A
80 cát 20 mụn dừa	5,0 ^a	5,0 ^a	5,1 ^a	5,0 ^B
80 cát 20 tro trấu	3,9 ^b	5,0 ^a	4,9 ^a	4,7 ^B
100 dớn	4,7 ^a	5,1 ^a	5,0 ^a	4,9 ^B
TB (A)	4,7 ^B	5,0 ^A	5,1 ^A	
CV (%) = 5,9	$F_A = 5,8^{**}$	$F_B = 3,7^*$	$F_{A*B} = 2,7^*$	

Trong cùng một nhóm trung bình những giá trị có cùng ký tự theo sau khác biệt không có ý nghĩa thống kê; *: có ý nghĩa ở mức $0,01 < P \leq 0,05$; **: rất có ý nghĩa ở mức $P \leq 0,01$.

Bảng 3.24 cho thấy thời gian che sáng khác nhau có ảnh hưởng rõ đến số lá/cây. Số lá ở cây được che sáng trong 7 ngày cao nhất (5,1 lá/cây), khác biệt so với cây được che sáng trong 3 ngày (4,7 lá/cây). Cây đỉnh lăng hình thành từ phôi được trồng trên các loại giá thể kết hợp với các chế độ che sáng khác nhau ảnh hưởng rõ đến số lá/cây. Số lá cây đỉnh lăng được trồng trên giá thể 100% cát kết hợp với che sáng 7 ngày đầu cho số lá/cây cao nhất là 5,1 lá/cây, khác biệt so với số lá/cây ở cây đỉnh lăng được trồng trên giá thể 80% cát 20% tro trấu kết hợp với chế độ che sáng trong 3 ngày đầu cho số lá thấp nhất là 3,9 lá/cây.

3.4.1.3 Ảnh hưởng của giá thể và chế độ che sáng đến trọng lượng tươi và khô của cây con ĐLLN trong vườn ươm

Bảng 3.25 Ảnh hưởng của giá thể và chế độ che sáng đến trọng lượng tươi và trọng lượng khô của cây con ĐLLN trong vườn ươm ở 21 NST

Chỉ tiêu	Giá thể (B) (%)	Chế độ che sáng (A)			TB (B)
		3 ngày	5 ngày	7 ngày	
Trọng lượng tươi (mg/cây)	100 cát	860	876	928	888
	80 cát 20 mụn dừa	800	829	857	828
	80 cát 20 tro trấu	816	847	850	837
	100 dớn	840	856	836	844
	TB (A)	829	852	867	
	CV (%) = 7,4	$F_A = 1,2^{ns}$	$F_B = 1,6^{ns}$	$F_{A*B} = 0,3^{ns}$	
Trọng lượng khô (mg/cây)	100 cát	88,6	90,0	95,2	91,3
	80 cát 20 mụn dừa	84,5	86,0	90,6	87,0
	80 cát 20 tro trấu	85,5	86,4	86,4	86,1
	100 dớn	87,4	87,6	84,0	86,3
	TB (A)	86,5	87,5	89,1	
	CV (%) = 6,9	$F_A = 0,5^{ns}$	$F_B = 1,4^{ns}$	$F_{A*B} = 0,5^{ns}$	

Trong cùng một nhóm trung bình những giá trị có cùng ký tự theo sau khác biệt không có ý nghĩa thống kê; ns: không có ý nghĩa thống kê.

Bảng 3.25 cho thấy chế độ che sáng, giá thể trồng cũng như tương tác giữa chế độ che sáng và giá thể trồng đều không tác động đến trọng lượng tươi và khô của cây đỉnh lăng trong vườn ươm.

Nhìn chung, cây ĐLLN con được ươm trên giá thể 100% cát kết hợp với che sáng trong 7 ngày đầu cho chiều cao, số lá và tỷ lệ cây sống cao nhất so với các nghiệm thức còn lại.

3.4.2 Ảnh hưởng của giá thể và liều lượng đạm đến sinh trưởng của cây ĐLLN ra bầu trong vườn ươm

3.4.2.1 Ảnh hưởng của giá thể và liều lượng đạm đến chiều cao và số lá của cây ĐLLN trong vườn ươm

Bảng 3.26 Ảnh hưởng của giá thể và liều lượng đạm đến chiều cao cây ĐLLN (cm) trong vườn ươm thời điểm 10 - 70 NST

NST	Giá thể (C)	Liều lượng đạm (g/bầu) (D)				TB (C)
		0,3	0,6	0,9	1,2	
10	1/3 MD : 1/3 Đ : 1/3 PC	5,1	5,4	5,1	5,4	5,3
	1/2 MD : 1/4 TT : 1/4 PC	5,4	5,5	5,5	5,9	5,6
	1/2 MD : 1/4 TT : 1/4 PVS	5,7	6,4	4,7	4,6	5,4
	TB (D)	5,4	5,8	5,1	5,3	
CV (%) = 14,1		F _C = 0,6 ^{ns}		F _D = 1,1 ^{ns}		F _{C*D} = 1,6 ^{ns}
30	1/3 MD : 1/3 Đ : 1/3 PC	6,5	6,8	6,4	7,0	6,7
	1/2 MD : 1/4 TT : 1/4 PC	6,9	6,5	6,9	6,9	6,8
	1/2 MD : 1/4 TT : 1/4 PVS	6,7	8,1	6,6	5,6	6,8
	TB (D)	6,7	7,1	6,6	6,5	
CV (%) = 14,04		F _C = 0,1 ^{ns}		F _D = 0,7 ^{ns}		F _{C*D} = 1,7 ^{ns}
50	1/3 MD : 1/3 Đ : 1/3 PC	8,4 ^{cd}	9,1 ^{bc}	8,5 ^{bcd}	9,4 ^{abc}	8,8
	1/2 MD : 1/4 TT : 1/4 PC	8,7 ^{bcd}	8,9 ^c	9,6 ^{ab}	8,9 ^{bc}	9,0
	1/2 MD : 1/4 TT : 1/4 PVS	8,6 ^{bcd}	10,1 ^a	8,8 ^{bcd}	7,8 ^d	8,8
	TB (D)	8,6 ^B	9,4 ^A	8,9 ^{AB}	8,7 ^B	
CV (%) = 4,8		F _C = 1,0 ^{ns}		F _D = 6,5 ^{**}		F _{C*D} = 7,8 ^{**}
70	1/3 MD : 1/3 Đ : 1/3 PC	10,7 ^{cde}	11,4 ^b	10,5 ^{de}	11,3 ^{bc}	10,9
	1/2 MD : 1/4 TT : 1/4 PC	10,9 ^{bcd}	10,9 ^{b-e}	11,4 ^b	10,9 ^{bcd}	11,0
	1/2 MD : 1/4 TT : 1/4 PVS	10,6 ^{de}	12,3 ^a	11,1 ^{bcd}	10,2 ^e	11,1
	TB (D)	10,7 ^B	11,5 ^A	10,9 ^B	10,8 ^B	
CV (%) = 2,3		F _C = 0,4 ^{ns}		F _D = 17,8 ^{**}		F _{C*D} = 16,7 ^{**}

Trong cùng một nhóm trung bình những giá trị có cùng ký tự theo sau khác biệt không có ý nghĩa thống kê; **: rất có ý nghĩa ở mức $P \leq 0,01$; ns: không có ý nghĩa thống kê.

Bảng 3.26 cho thấy cây đinh lăng từ phôi được trồng trên 3 loại giá thể trong thí nghiệm có chiều cao cây khác biệt không có ý nghĩa trong suốt thời gian thí nghiệm, chiều cao cây dao động từ 10,9 đến 11,1 cm ở 70 NST. Trong khi đó, liều lượng bón phân đạm chỉ thể hiện rõ trên chiều cao cây ở 50 và 70 NST. Bón 0,6 g N/bầu làm tăng chiều cao cây, đạt 9,4 cm ở 50 NST và 11,5 cm ở 70 NST, khác biệt so với chiều cao cây đinh lăng được bón ở các liều lượng phân đạm khác. Tương tự, trồng cây đinh lăng trên giá thể 1/2 mụn dừa : 1/4 tro trấu : 1/4 phân hữu cơ vi sinh kết hợp bón 0,6 g N/bầu cho cây cao nhất đạt 10,1 cm ở 50 NST và 12,3 cm ở 70 NST, khác biệt so với chiều cao cây đinh lăng được trồng ở 3 loại giá thể kết hợp bón những liều lượng đạm khác trong thí nghiệm. Như vậy cây đinh lăng được trồng trên giá thể 1/2 mụn dừa : 1/4 tro trấu : 1/4 phân hữu cơ vi sinh kết hợp với bón phân đạm 0,6 g N/bầu cho chiều cao cây cao nhất ở tất cả các thời điểm.



Hình 3.26 Thí nghiệm về ảnh hưởng của giá thể và liều lượng phân đạm đến cây đinh lăng lá nhỏ thời điểm 70 NST

Bảng 3.27 Ảnh hưởng của giá thể và liều lượng đạm đến số lá (lá/cây) của cây ĐLLN trong vườn ươm thời điểm 10 - 70 NST

NST	Giá thể (C)	Liều lượng đạm (g/bầu) (D)				TB (C)
		0,3	0,6	0,9	1,2	
10	1/3 MD : 1/3 Đ : 1/3 PC	4,5	4,6	5,9	4,2	4,8
	1/2 MD : 1/4 TT : 1/4 PC	4,9	6,0	4,3	4,7	4,9
	1/2 MD : 1/4 TT : 1/4 PVS	4,6	5,3	4,5	3,9	4,6
	TB (D)	4,6	5,3	4,9	4,3	
CV (%) = 19,3		F _C = 0,5 ^{ns}		F _D = 2,1 ^{ns}		F _{C*D} = 1,4 ^{ns}
30	1/3 MD : 1/3 Đ : 1/3 PC	4,3	4,6	4,8	4,7	4,6
	1/2 MD : 1/4 TT : 1/4 PC	4,7	4,7	5,4	4,7	4,8
	1/2 MD : 1/4 TT : 1/4 PVS	4,7	5,0	4,6	4,5	4,7
	TB (D)	4,5	4,8	4,9	4,60	
CV (%) = 7,3		F _C = 1,9 ^{ns}		F _D = 2,7 ^{ns}		F _{C*D} = 1,7 ^{ns}
50	1/3 MD : 1/3 Đ : 1/3 PC	4,4	5,4	5,4	4,6	4,9 ^B
	1/2 MD : 1/4 TT : 1/4 PC	5,1	5,5	5,4	5,1	5,3 ^A
	1/2 MD : 1/4 TT : 1/4 PVS	5,1	5,4	5,0	4,8	5,1 ^{AB}
	TB (D)	4,8 ^B	5,4 ^A	5,3 ^A	4,8 ^B	
CV (%) = 5,7		F _C = 3,6 [*]		F _D = 10,3 ^{**}		F _{C*D} = 1,9 ^{ns}
70	1/3 MD : 1/3 Đ : 1/3 PC	4,9 ^{ab}	5,1 ^{ab}	5,3 ^a	4,7 ^b	4,9
	1/2 MD : 1/4 TT : 1/4 PC	4,9 ^{ab}	5,4 ^a	5,1 ^{ab}	5,1 ^{ab}	5,1
	1/2 MD : 1/4 TT : 1/4 PVS	5,1 ^{ab}	5,4 ^a	4,7 ^b	5,1 ^{ab}	5,1
	TB (D)	5,0 ^B	5,3 ^A	5,0 ^B	4,9 ^B	
CV (%) = 4,0		F _C = 1,4 ^{ns}		F _D = 5,3 ^{**}		F _{C*D} = 4,7 ^{**}

*Trong cùng một nhóm trung bình những giá trị có cùng ký tự theo sau khác biệt không có ý nghĩa thống kê; *: có ý nghĩa ở mức $0,01 < P \leq 0,05$; **: rất có ý nghĩa ở mức $P \leq 0,01$; ns: không có ý nghĩa thống kê.*

Bảng 3.27 cho thấy giá thể chỉ tác động đến số lá/cây đỉnh lã trong vườn ươm ở 50 NST. Cây đỉnh lã được trồng trên giá thể 1/2 mụn dừa : 1/4 tro trấu : 1/4 phân chuồng cho số lá/cây nhiều nhất là 5,3 lá/cây, khác biệt có ý nghĩa so với số lá/cây đỉnh lã được trồng trên 2 loại giá thể còn lại trong thí nghiệm. Ở 70 NST, số lá/cây dao động 4,9 - 5,1 lá/cây ở 3 loại giá thể. Ảnh hưởng của liều lượng bón đạm

đến số lá/cây chỉ thể hiện ở 50 đến 70 NST. Bón 0,6 g N hay 0,9 g N/bầu đều cho cây đình lăng có lá nhiều nhất lần lượt là 5,4 và 5,3 lá/cây ở 50 NST, khác biệt có ý nghĩa so với cây đình lăng được bón phân đạm ở các liều lượng còn lại trong thí nghiệm. Tuy nhiên ở 70 NST, bón 0,6 g N/bầu cho số lá/cây đình lăng nhiều nhất. Trong khi đó, ảnh hưởng của sự kết hợp giữa giá thể và liều lượng bón phân đạm đến số lá/cây đình lăng chỉ khác biệt giữa các nghiệm thức ở 70 NST. Trồng cây đình lăng trên giá thể 1/2 mụn dừa : 1/4 tro trấu : 1/4 phân chuồng và 1/2 mụn dừa : 1/4 tro trấu : 1/4 phân hữu cơ vi sinh kết hợp bón 0,6 g N/bầu cho số lá/cây đình lăng cao nhất đạt 5,4 lá/cây ở 70 NST.

3.4.2.2 Ảnh hưởng của giá thể và liều lượng đạm đến số rễ và chiều dài rễ của cây ĐLLN trong vườn ươm

Bảng 3.28 Ảnh hưởng của giá thể và liều lượng đạm đến số rễ (rễ/cây) của cây ĐLLN trong vườn ươm thời điểm 70 NST

Giá thể (C)	Liều lượng phân đạm (g/bầu) (D)				TB (C)
	0,3	0,6	0,9	1,2	
1/3 MD : 1/3 Đ : 1/3 PC	4,0 ^e	7,7 ^{ab}	8,0 ^{ab}	4,7 ^{de}	6,1 ^B
1/2 MD : 1/4 TT : 1/4 PC	5,0 ^{cde}	6,7 ^{a-d}	7,7 ^{ab}	7,0 ^{a-d}	6,6 ^{AB}
1/2 MD : 1/4 TT : 1/4 PVS	7,7 ^{ab}	8,7 ^a	7,3 ^{abc}	5,7 ^{b-e}	7,3 ^A
TB (D)	5,6 ^B	7,7 ^A	7,7 ^A	5,8 ^B	
CV (%) = 14,1	F _C = 5,3 [*]		F _D = 13,6 ^{**}		F _{C*D} = 5,5 ^{**}

*Trong cùng một nhóm trung bình những giá trị có cùng ký tự theo sau khác biệt không có ý nghĩa thống kê; *: có ý nghĩa ở mức $0,01 < P \leq 0,05$; **: rất có ý nghĩa ở mức $P \leq 0,01$.*

Bảng 3.28 cho thấy số rễ cây đình lăng được trồng trên giá thể 1/2 mụn dừa : 1/4 tro trấu : 1/4 phân hữu cơ vi sinh đạt cao nhất là 7,3 rễ/cây, khác biệt có ý nghĩa so với số rễ cây đình lăng được trồng trên giá thể 1/3 mụn dừa : 1/3 đất : 1/3 phân chuồng có số rễ thấp nhất (6,1 rễ/cây). Cây đình lăng được bón 0,6 g và 0,9 g N/bầu cho số rễ cao nhất đều đạt 7,7 rễ/cây, khác biệt so với số rễ cây đình lăng được bón 0,3 g và 1,2 g N/bầu cho số rễ thấp hơn lần lượt là 5,6 và 5,8 rễ/cây. Cây đình lăng được trồng trên các loại giá thể kết hợp với bón phân đạm ở các liều lượng khác nhau cho số rễ có sự khác biệt. Số rễ cây đình lăng được trồng trên giá thể 1/2 mụn dừa : 1/4 tro trấu : 1/4 phân hữu cơ vi sinh kết hợp với bón 0,6 g N/bầu đạt cao nhất là 8,67

rễ/cây, số rễ cây định lãg được trồng trên giá thể 1/3 mụn dừa : 1/3 đất : 1/3 phân chuồng kết hợp bón 0,3 g N/bầu cho số rễ thấp nhất (4,0 rễ/cây).



Hình 3.27 Ảnh hưởng của giá thể và liều lượng đạm đến cây ĐLLN thời điểm 70 NST

Bảng 3.29 Ảnh hưởng của giá thể và liều lượng đạm đến chiều dài rễ (cm) của cây ĐLLN trong vườn ươm thời điểm 70 NST

Giá thể (C)	Liều lượng phân đạm (g/bầu) (D)				TB (C)
	0,3	0,6	0,9	1,2	
1/3 MD : 1/3 Đ : 1/3 PC	13,5	14,0	14,0	13,7	13,8
1/2 MD : 1/4 TT : 1/4 PC	12,8	16,3	16,2	13,2	14,6
1/2 MD : 1/4 TT : 1/4 PVS	15,2	19,6	14,2	12,1	15,3
TB (D)	13,8 ^B	16,6 ^A	14,8 ^{AB}	13,0 ^B	
CV (%) = 16,7	F _C = 1,1 ^{ns}		F _D = 3,7 ^{**}		F _{C*D} = 1,6 ^{ns}

Trong cùng một nhóm trung bình những giá trị có cùng ký tự theo sau khác biệt không có ý nghĩa thống kê; *: có ý nghĩa ở mức $0,01 < P \leq 0,05$; **: rất có ý nghĩa ở mức $P \leq 0,01$; ns: không có ý nghĩa thống kê.

Bảng 3.29 cho thấy cây đinh lăng được trồng trên các giá thể khác nhau khác biệt không có ý nghĩa, dao động từ 13,8 đến 15,3 cm. Tương tự, sự tương tác giữa giá thể trồng và liều lượng đạm bón ảnh hưởng đến chiều dài rễ cây đinh lăng cũng khác biệt không có ý nghĩa giữa các nghiệm thức khác. Ngược lại, chiều dài rễ cây đinh lăng khi được bón 0,6 g N/bầu đạt cao nhất là 16,6 cm, khác biệt so với số rễ cây đinh lăng được bón phân đạm liều lượng 0,3 g N/bầu (13,8 cm) hay 1,2 g N/bầu cho chiều dài rễ thấp nhất (13,0 cm).

3.4.2.3 Ảnh hưởng của giá thể và liều lượng đạm đến trọng lượng thân lá tươi và rễ tươi của cây ĐLLN trong vườn ươm

Bảng 3.30 Ảnh hưởng của giá thể và liều lượng đạm đến trọng lượng thân lá tươi (g/cây) của cây ĐLLN trong vườn ươm thời điểm 70 NST

Giá thể (C)	Liều lượng phân đạm (g/bầu) (D)				TB (C)
	0,3	0,6	0,9	1,2	
1/3 MD : 1/3 Đ : 1/3 PC	12,7 ^{bc}	26,7 ^a	27,2 ^a	20,2 ^{ab}	21,7 ^{AB}
1/2 MD : 1/4 TT : 1/4 PC	23,8 ^a	25,2 ^a	27,4 ^a	25,1 ^a	25,4 ^A
1/2 MD : 1/4 TT : 1/4 PVS	26,9 ^a	27,8 ^a	20,0 ^{ab}	7,7 ^c	20,6 ^B
TB (D)	21,2 ^{BC}	26,5 ^A	24,8 ^{AB}	17,7 ^C	
CV (%) = 15,0	F _C = 6,5 ^{**}		F _D = 12,4 ^{**}		F _{C*D} = 11,5 ^{**}

*Trong cùng một nhóm trung bình những giá trị có cùng ký tự theo sau khác biệt không có ý nghĩa thống kê; **: rất có ý nghĩa ở mức $P \leq 0,01$.*

Bảng 3.30 cho thấy trọng lượng trung bình thân lá tươi cây đinh lăng từ phối được trồng trên giá thể 1/2 mụn dừa : 1/4 tro trấu : 1/4 phân chuồng đạt cao nhất là 25,4 g/cây, khác biệt so với trọng lượng thân lá tươi cây đinh lăng được trồng trên giá thể giá thể 1/2 mụn dừa : 1/4 tro trấu : 1/4 phân hữu cơ vi sinh chỉ đạt 20,6 g/cây. Tương tự, liều lượng bón phân đạm ảnh hưởng đến trọng lượng thân lá tươi cây đinh lăng. Trọng lượng trung bình thân lá tươi của cây đinh lăng ở nghiệm thức được bón 0,6 g N/bầu đạt cao nhất là 26,5 g/cây, khác biệt so với trọng lượng thân lá tươi của cây đinh lăng được bón 0,3 g hay 1,2 g N/bầu đạt thấp hơn (21,2 - 17,7 g/cây). Cây đinh lăng được trồng trên các loại giá thể kết hợp với bón phân đạm ở các liều lượng khác nhau đã có tác động đến trọng lượng thân lá tươi cây đinh lăng. Trọng lượng

thân lá tươi của cây được trồng trên giá thể 1/2 mụn dừa : 1/4 tro trấu : 1/4 phân hữu cơ vi sinh kết hợp bón 0,6 g N/bầu đạt cao nhất là 27,8 g/cây.

Bảng 3.31 Ảnh hưởng của giá thể và liều lượng đạm đến trọng lượng rễ tươi (g/cây) của cây ĐLLN trong vườn ươm thời điểm 70 NST

Giá thể (C)	Liều lượng phân đạm (g/bầu) (D)				TB (C)
	0,3	0,6	0,9	1,2	
1/3 MD : 1/3 Đ : 1/3 PC	3,7 ^d	4,3 ^{cd}	4,9 ^{bc}	4,1 ^{cd}	4,3 ^B
1/2 MD : 1/4 TT : 1/4 PC	3,9 ^d	5,5 ^b	4,9 ^{bc}	4,4 ^{cd}	4,6 ^A
1/2 MD : 1/4 TT : 1/4 PVS	5,7 ^{ab}	6,6 ^a	3,8 ^d	2,1 ^e	4,5 ^{AB}
TB (D)	4,4 ^B	5,5 ^A	4,5 ^B	3,5 ^C	
CV (%) = 8,5	F _C = 3,5 [*]		F _D = 38,4 ^{**}		F _{C*D} = 29,0 ^{**}

*Trong cùng một nhóm trung bình những giá trị có cùng ký tự theo sau khác biệt không có ý nghĩa thống kê; *: có ý nghĩa ở mức $0,01 < P \leq 0,05$; **: rất có ý nghĩa ở mức $P \leq 0,01$.*

Bảng 3.31 cho thấy trọng lượng trung bình rễ tươi của cây đình lăng được trồng trên giá thể 1/2 mụn dừa : 1/4 tro trấu : 1/4 phân chuồng cao nhất đạt 4,6 g/cây có sự khác biệt có ý nghĩa so với trọng lượng rễ tươi của cây đình lăng được trồng trên giá thể 1/3 mụn dừa : 1/3 đất : 1/3 phân chuồng đạt thấp nhất là 4,3 g/cây. Trong khi đó, trọng lượng trung bình rễ tươi của cây đình lăng được bón 0,6 g N/bầu đạt cao nhất là 5,5 g/cây, khác biệt so với các nghiệm thức còn lại, cây đình lăng được bón 1,2 g N/bầu cho trọng lượng rễ tươi thấp nhất là 3,5 g/cây. Cây đình lăng được trồng trên các loại giá thể kết hợp với bón phân đạm ở các liều lượng khác nhau có ảnh hưởng khác biệt rất rõ đến trọng lượng rễ tươi của cây đình lăng. Trọng lượng rễ tươi của cây đình lăng được trồng trên giá thể 1/2 mụn dừa : 1/4 tro trấu : 1/4 phân hữu cơ vi sinh kết hợp với bón 0,6 g N/bầu cho trọng lượng rễ tươi cao nhất đạt 6,6 g/cây.

3.4.2.4 Ảnh hưởng của giá thể và liều lượng đạm đến tỷ lệ xuất vườn của cây ĐLLN trong vườn ươm

Bảng 3.32 Ảnh hưởng của giá thể và liều lượng đạm đến tỷ lệ xuất vườn (%) của cây ĐLLN trong vườn ươm thời điểm 70 NST

Giá thể (C)	Liều lượng phân đạm (g/bầu) (D)				TB (C)
	0,3	0,6	0,9	1,2	
1/3 MD : 1/3 Đ : 1/3 PC	55,6	70,4	81,5	63,0	67,6 ^B
1/2 MD : 1/4 TT : 1/4 PC	63,0	81,5	88,9	66,7	75,0 ^A
1/2 MD : 1/4 TT : 1/4 PVS	70,4	92,6	85,2	66,7	78,7 ^A
TB (D)	63,0 ^B	81,5 ^A	85,2 ^A	65,4 ^B	
CV (%) = 8,3	F _C = 10,2 ^{**}		F _D = 29,9 ^{**}		F _{C*D} = 1,8 ^{ns}

*Trong cùng một nhóm trung bình những giá trị có cùng ký tự theo sau khác biệt không có ý nghĩa thống kê; **: rất có ý nghĩa ở mức $P \leq 0,01$; ns: không có ý nghĩa thống kê.*

Bảng 3.32 cho thấy cây đinh lăng từ phân được trồng trên hai loại giá thể 1/2 mụn dừa : 1/4 tro trấu : 1/4 phân chuồng hay 1/2 mụn dừa : 1/4 tro trấu : 1/4 phân hữu cơ vi sinh đều cho tỷ lệ xuất vườn cao nhất dao động từ 75,0 đến 78,7 %.

Bón phân đạm với liều lượng 0,6 - 0,9 g N/bầu cho tỷ lệ xuất vườn cao nhất đạt 81,5 - 85,2%, khác biệt so với cây đinh lăng được bón phân đạm ở liều lượng 0,3 g N/bầu hay 1,2 g N/bầu đều cho tỷ lệ xuất vườn thấp nhất. Cây đinh lăng trồng trên giá thể 1/2 mụn dừa ; 1/4 tro trấu : 1/4 phân hữu cơ vi sinh kết hợp với bón 0,6 g N/bầu cho tỷ lệ xuất vườn cao nhất là 92,6 %.

3.4.3 Ảnh hưởng của giá thể và liều lượng lân đến sinh trưởng của cây ĐLLN ra bầu trong vườn ươm

3.4.3.1 Ảnh hưởng của giá thể và liều lượng lân đến chiều cao và số lá của cây ĐLLN trong vườn ươm

Bảng 3.33 cho thấy giá thể chỉ thể hiện tác động rõ rệt đến chiều cao cây đinh lăng ở 30 và 50 NST. Cây đinh lăng được trồng trên giá thể 1/2 mụn dừa : 1/4 tro trấu : 1/4 phân hữu cơ vi sinh làm tăng chiều cao cây đạt 6,9 cm ở 30 NST và 8,5 cm ở 50 NST, khác biệt có ý nghĩa so với cây đinh lăng được trồng trên 2 loại giá thể còn lại

trong thí nghiệm. Liều lượng bón phân lân tác động rõ rệt đến chiều cao cây đỉnh lãng từ phôi trong suốt thời gian thí nghiệm. Cây đỉnh lãng được bón 0,9 g P₂O₅/bầu cho chiều cao cao nhất là 5,2 cm ở 10 NST và 7,1 cm ở 30 NST, khác biệt so với cây đỉnh lãng được bón phân lân ở các liều lượng còn lại trong thí nghiệm. Tuy nhiên ở 50 NST, cây đỉnh lãng được bón 0,6 g P₂O₅/bầu đạt chiều cao cao nhất là 8,6 cm, khác biệt nhiều so với cây đỉnh lãng được bón 0,3 g P₂O₅/bầu hay 1,2 g P₂O₅/bầu. Cây đỉnh lãng được trồng trên các loại giá thể kết hợp với bón phân lân ở các liều lượng khác nhau đều cho chiều cao cây khác biệt không có ý nghĩa, chiều cao cây dao động 7,7 - 8,9 cm ở 50 NST.

Bảng 3.33 Ảnh hưởng của giá thể và liều lượng lân đến chiều cao (cm) của cây ĐLLN trong vườn ươm thời điểm 10 - 50 NST

NST	Giá thể (G)	Liều lượng P ₂ O ₅ (g/bầu) (H)				TB (G)
		0,3	0,6	0,9	1,2	
10	1/3 MD : 1/3 Đ : 1/3 PC	4,5	4,6	4,6	4,4	4,5
	1/2 MD : 1/4 TT : 1/4 PC	4,4	4,5	5,5	4,5	4,7
	1/2 MD : 1/4 TT : 1/4 PVS	4,5	4,6	5,4	4,8	4,8
	TB (H)	4,4 ^B	4,6 ^B	5,2 ^A	4,6 ^B	
CV (%) = 6,7	F _G = 2,5 ^{ns}	F _H = 10,3 [*]		F _{G*H} = 2,1 ^{ns}		
30	1/3 MD : 1/3 Đ : 1/3 PC	6,3	6,7	6,8	6,5	6,6 ^B
	1/2 MD : 1/4 TT : 1/4 PC	6,5	6,6	7,1	6,6	6,7 ^{AB}
	1/2 MD : 1/4 TT : 1/4 PVS	6,6	6,9	7,5	6,4	6,9 ^A
	TB (H)	6,5 ^B	6,8 ^B	7,1 ^A	6,5 ^B	
CV (%) = 3,9	F _G = 3,8 [*]	F _H = 11,8 ^{**}		F _{G*H} = 1,4 ^{ns}		
50	1/3 MD : 1/3 Đ : 1/3 PC	7,9	8,2	8,4	8,2	8,2 ^B
	1/2 MD : 1/4 TT : 1/4 PC	7,8	8,6	8,3	7,7	8,1 ^B
	1/2 MD : 1/4 TT : 1/4 PVS	8,0	8,9	8,6	8,3	8,5 ^A
	TB (H)	7,9 ^C	8,6 ^A	8,4 ^{AB}	8,1 ^{BC}	
CV (%) = 4,0	F _G = 4,0 [*]	F _H = 7,7 ^{**}		F _{G*H} = 1,2 ^{ns}		

*Trong cùng một nhóm trung bình những giá trị có cùng ký tự theo sau khác biệt không có ý nghĩa thống kê; *: có ý nghĩa ở mức 0,01 < P ≤ 0,05; **: rất có ý nghĩa ở mức P ≤ 0,01; ns: không có ý nghĩa thống kê.*



Hình 3.28 Thí nghiệm về ảnh hưởng của giá thể và liều lượng phân lân đến cây đinh lăng lá nhỏ thời điểm 50 NST

Bảng 3.34 Ảnh hưởng của giá thể và liều lượng lân đến số lá (lá/cây) của cây ĐLLN trong vườn ươm thời điểm 10 - 50 NST

NST	Giá thể (G)	Liều lượng lân (g/bầu) (H)				TB (G)
		0,3	0,6	0,9	1,2	
10	1/3 MD : 1/3 Đ : 1/3 PC	5,1	5,4	5,9	5,3	5,4
	1/2 MD : 1/4 TT : 1/4 PC	5,2	5,3	5,6	5,3	5,4
	1/2 MD : 1/4 TT : 1/4 PVS	5,5	5,8	6,1	5,5	5,7
	TB (H)	5,2 ^B	5,5 ^{AB}	5,9 ^A	5,4 ^B	
CV (%) = 7,5 F _G = 2,8 ^{ns}		F _H = 3,9 [*]				F _{G*H} = 0,3 ^{ns}
30	1/3 MD : 1/3 Đ : 1/3 PC	5,4 ^{de}	5,4 ^{de}	5,7 ^{be}	5,7 ^{be}	5,5 ^B
	1/2 MD : 1/4 TT : 1/4 PC	5,2 ^e	5,9 ^{abc}	6,1 ^{ab}	6,1 ^{ab}	5,8 ^{AB}
	1/2 MD : 1/4 TT : 1/4 PVS	5,8 ^{a-d}	6,3 ^a	5,8 ^{a-d}	5,7 ^{be}	5,9 ^A
	TB (H)	5,5 ^B	5,9 ^A	5,9 ^A	5,8 ^{AB}	
CV (%) = 4,6 F _G = 6,5 ^{**}		F _H = 3,8 ^{**}				F _{G*H} = 3,5 [*]
50	1/3 MD : 1/3 Đ : 1/3 PC	6,2 ^d	6,7 ^{bcd}	6,9 ^{ab}	7,0 ^{ab}	6,7 ^{AB}
	1/2 MD : 1/4 TT : 1/4 PC	6,3 ^{cde}	6,9 ^{ab}	6,8 ^{bc}	6,2 ^{de}	6,6 ^B
	1/2 MD : 1/4 TT : 1/4 PVS	6,2 ^{de}	7,3 ^a	7,2 ^{ab}	6,7 ^{bc}	6,9 ^A
	TB (H)	6,2 ^B	7,0 ^A	6,9 ^A	6,7 ^A	
CV (%) = 4,0 F _G = 3,7 [*]		F _H = 15,1 ^{**}				F _{G*H} = 3,1 [*]

Trong cùng một nhóm trung bình những giá trị có cùng ký tự theo sau khác biệt không có ý nghĩa thống kê; *: có ý nghĩa ở mức $0,01 < P \leq 0,05$; **: rất có ý nghĩa ở mức $P \leq 0,01$; ns: không có ý nghĩa thống kê.

Bảng 3.34 cho thấy giá thể chỉ thể hiện tác động rõ rệt đến số lá/cây đỉnh lã ở 30 và 50 NST. Cây đỉnh lã được trồng trên giá thể 1/2 mụn dừa : 1/4 tro trấu : 1/4 phân hữu cơ sinh cho số lá/cây nhiều nhất là 5,9 lá/cây ở 30 NST và 6,9 lá/cây ở 50 NST, khác biệt có ý nghĩa so với số lá cây đỉnh lã được trồng trên 2 loại giá thể còn lại trong thí nghiệm. Phân lân tác động đến số lá cây đỉnh lã trong suốt thời gian thí nghiệm. Tại thời điểm 50 NST, cây đỉnh lã được bón 0,6 g P₂O₅/bầu cho số lá nhiều nhất là 6,9 lá/cây, khác biệt so với cây đỉnh lã được bón 0,3 g P₂O₅/bầu có số lá/cây thấp nhất là 6,2 lá/cây. Cây đỉnh lã được trồng trên các loại giá thể kết hợp với bón phân lân ở các liều lượng khác nhau đã ảnh hưởng rõ đến số lá/cây ở 30 và 50 NST. Cây đỉnh lã được trồng trên giá thể 1/2 mụn dừa : 1/4 tro trấu : 1/4 phân hữu cơ vi sinh kết hợp bón 0,6 g P₂O₅/bầu cho số lá/cây cao nhất là 6,3 lá/cây ở 30 NST và 7,3 lá/cây ở 50 NST.

3.4.3.2 Ảnh hưởng của giá thể và liều lượng lân đến số rễ và chiều dài rễ của cây ĐLLN trong vườn ươm

Bảng 3.35 Ảnh hưởng của giá thể và liều lượng lân đến số rễ (rễ/cây) của cây ĐLLN trong vườn ươm thời điểm 50 NST

Giá thể (H)	Liều lượng lân (g/bầu) (G)				TB (G)
	0,3	0,6	0,9	1,2	
1/3 MD : 1/3 Đ : 1/3 PC	3,7 ^e	6,3 ^{abc}	6,7 ^{ab}	5,3 ^{bcd}	5,5 ^B
1/2 MD : 1/4 TT : 1/4 PC	5,3 ^{bcd}	7,3 ^a	6,7 ^{ab}	5,0 ^{cde}	6,1 ^A
1/2 MD : 1/4 TT : 1/4 PVS	5,7 ^{bcd}	6,7 ^{ab}	4,7 ^{de}	4,7 ^{de}	5,4 ^B
TB (H)	4,9 ^C	6,8 ^A	6,0 ^B	5,0 ^C	
CV (%) = 9,8	F _G = 5,2 [*]		F _H = 23,5 ^{**}		F _{G*H} = 7,6 ^{**}

*Trong cùng một nhóm trung bình những giá trị có cùng ký tự theo sau khác biệt không có ý nghĩa thống kê; *: có ý nghĩa ở mức 0,01 < P ≤ 0,05; **: rất có ý nghĩa ở mức P ≤ 0,01.*

Bảng 3.35 cho thấy số rễ cây đỉnh lã được trồng trên giá thể 1/2 mụn dừa : 1/4 tro trấu : 1/4 phân chuồng đạt cao nhất (6,1 rễ/cây), khác biệt có ý nghĩa so với cây đỉnh lã được trồng trên 2 loại giá thể còn lại cho số rễ thấp hơn (5,4 - 5,5 rễ/cây). Liều lượng phân lân tác động rõ rệt đến số rễ cây đỉnh lã từ phân trong giai đoạn vườn ươm. Bón 0,6 g P₂O₅/bầu cho số rễ cao nhất là 6,8 rễ, khác biệt so với số rễ cây đỉnh lã được bón phân lân ở các liều lượng còn lại trong thí nghiệm. Cây

đỉnh lăng được trồng trên các loại giá thể kết hợp với bón phân lân ở các liều lượng khác nhau tác động rõ đến số rễ cây đỉnh lăng, sự khác biệt rất có ý nghĩa. Số rễ cây đỉnh lăng được trồng trên giá thể 1/2 mụn dừa : 1/4 tro trấu : 1/4 phân chuồng kết hợp với bón 0,6 g P₂O₅/bầu đạt cao nhất (7,3 rễ/cây), khác biệt rất rõ so với cây đỉnh lăng được trồng trên giá thể 1/3 mụn dừa : 1/3 đất : 1/3 phân chuồng kết hợp bón 0,3 g P₂O₅/bầu cho số rễ thấp nhất (3,7 rễ/cây).



Hình 3.29 Ảnh hưởng của giá thể và liều lượng lân đến cây ĐLLN thời điểm 50 NST

Bảng 3.36 cho thấy cây đỉnh lăng được trồng trên giá thể 1/2 mụn dừa : 1/4 tro trấu : 1/4 phân hữu cơ vi sinh cho chiều dài rễ dài nhất (12,9 cm), khác biệt rất có ý nghĩa so với cây đỉnh lăng được trồng trên giá thể 1/3 mụn dừa : 1/3 đất : 1/3 phân chuồng đạt thấp nhất 11,2 cm.

Cây đỉnh lăng được bón 0,6 g và 0,9 g P₂O₅/bầu cho chiều dài rễ dài nhất là 13,8 cm và 13,0 cm, khác biệt so với cây đỉnh lăng được bón 0,3 g P₂O₅/bầu hay 1,2 g P₂O₅/bầu cho chiều dài rễ thấp nhất là 11,3 cm và 10,7 cm.

Bảng 3.36 Ảnh hưởng của giá thể và liều lượng lân đến chiều dài rễ (cm) của cây ĐLLN trong vườn ươm thời điểm 50 NST

Giá thể (H)	Liều lượng lân (g/bầu) (G)				TB (G)
	0,3	0,6	0,9	1,2	
1/3 MD : 1/3 Đ : 1/3 PC	9,8	13,1	11,7	10,1	11,2 ^B
1/2 MD : 1/4 TT : 1/4 PC	11,8	13,9	14,4	9,9	12,5 ^{AB}
1/2 MD : 1/4 TT : 1/4 PVS	12,4	14,3	13,0	12,2	12,9 ^A
TB (H)	11,3 ^B	13,8 ^A	13,0 ^A	10,7 ^B	
CV (%) = 9,8	F _G = 7,3 ^{**}		F _H = 12,8 ^{**}		F _{G*H} = 1,5 ^{ns}

Trong cùng một nhóm trung bình những giá trị có cùng ký tự theo sau khác biệt không có ý nghĩa thống kê; **: rất có ý nghĩa ở mức $P \leq 0,01$; ns: không có ý nghĩa thống kê.

3.4.3.3 Ảnh hưởng của giá thể và liều lượng lân đến trọng lượng thân lá tươi và rễ tươi của cây ĐLLN trong vườn ươm

Bảng 3.37 Ảnh hưởng của giá thể và liều lượng lân đến trọng lượng thân lá tươi (g/cây) của cây ĐLLN trong vườn ươm thời điểm 50 NST

Giá thể (H)	Liều lượng lân (g/bầu) (G)				TB (G)
	0,3	0,6	0,9	1,2	
1/3 MD : 1/3 Đ : 1/3 PC	12,3	13,8	14,2	12,1	13,1 ^B
1/2 MD : 1/4 TT : 1/4 PC	12,6	15,4	14,1	12,0	13,5 ^{AB}
1/2 MD : 1/4 TT : 1/4 PVS	12,8	15,7	13,9	12,4	13,7 ^A
TB (H)	12,5 ^C	14,9 ^A	14,1 ^B	12,1 ^C	
CV (%) = 4,4	F _G = 3,4 [*]		F _H = 45,6 ^{**}		F _{G*H} = 2,2 ^{ns}

Trong cùng một nhóm trung bình những giá trị có cùng ký tự theo sau khác biệt không có ý nghĩa thống kê; *: có ý nghĩa ở mức $0,01 < P \leq 0,05$; **: rất có ý nghĩa ở mức $P \leq 0,01$; ns: không có ý nghĩa thống kê.

Bảng 3.37 cho thấy trọng lượng thân lá tươi của cây đỉnh lăng được trồng trên giá thể 1/2 mụn dừa : 1/4 tro trấu : 1/4 phân hữu cơ vi sinh đạt cao nhất là 13,7 g/cây, có khác biệt so với nghiệm thức 1/3 mụn dừa : 1/3 đất : 1/3 phân chuồng cho trọng lượng thân lá tươi thấp nhất là 13,1 g/cây. Bón phân lân ở các liều lượng khác nhau tác động rõ rệt đến trọng lượng thân lá tươi cây đỉnh lăng. Cây đỉnh lăng được bón 0,6 g P₂O₅/bầu cho trọng lượng thân lá tươi cao nhất là 14,9 g/cây, khác biệt so với trọng lượng thân lá tươi cây đỉnh lăng được bón 0,3 g; 0,9 g hay 1,2 g P₂O₅/bầu.

Bảng 3.38 Ảnh hưởng của giá thể và liều lượng lân đến trọng lượng rễ tươi (g/cây) của cây ĐLLN trong vườn ươm thời điểm 50 NST

Loại giá thể (H)	Liều lượng lân (g/bầu) (G)				TB (G)
	0,3	0,6	0,9	1,2	
1/3 MD : 1/3 Đ : 1/3 PC	3,3	3,7	3,9	3,6	3,6 ^B
1/2 MD : 1/4 TT : 1/4 PC	3,6	4,8	4,5	3,7	4,1 ^A
1/2 MD : 1/4 TT : 1/4 PVS	3,4	4,6	3,4	3,5	3,7 ^B
TB (H)	3,4 ^B	4,4 ^A	3,9 ^{AB}	3,6 ^B	
CV (%) = 11,6	F _G = 4,4*		F _H = 7,5**		F _{G*H} = 1,9 ^{ns}

*Trong cùng một nhóm trung bình những giá trị có cùng ký tự theo sau khác biệt không có ý nghĩa thống kê; *: có ý nghĩa ở mức $0,01 < P \leq 0,05$; **: rất có ý nghĩa ở mức $P \leq 0,01$.*

Bảng 3.38 cho thấy cây đỉnh lăng được trồng trên giá thể 1/2 mụn dừa : 1/4 tro trấu : 1/4 phân chuồng cho trọng lượng rễ tươi đạt cao nhất là 4,1 g/cây, khác biệt so với trọng lượng rễ tươi cây đỉnh lăng được trồng trên 2 loại giá thể còn lại trong thí nghiệm. Liều lượng bón phân lân tác động đến trọng lượng rễ tươi cây đỉnh lăng. Bón 0,6 g P₂O₅/bầu cho trọng lượng rễ tươi cao nhất là 4,4 g/cây; ở các nghiệm thức còn lại kết quả đều thấp hơn.

3.4.3.4 Ảnh hưởng của giá thể và liều lượng lân đến tỷ lệ xuất vườn của cây ĐLLN

Kết quả ở Bảng 3.39 cho thấy giá thể tác động rõ đến tỷ lệ xuất vườn của cây đỉnh lăng. Cây đỉnh lăng được trồng trên giá thể 1/2 mụn dừa : 1/4 tro trấu : 1/4 phân hữu cơ vi sinh cho tỷ lệ xuất vườn cao nhất đạt 86,1%, khác biệt so với cây đỉnh lăng được trồng trên giá thể 1/3 mụn dừa : 1/3 đất : 1/3 phân chuồng hay 1/2 mụn dừa : 1/4 tro trấu : 1/4 phân chuồng cho tỷ lệ xuất vườn thấp hơn dao động từ 78,7% đến 79,6%. Cây đỉnh lăng được bón 0,6 g P₂O₅/bầu hay 0,9 g P₂O₅/bầu cho tỷ lệ xuất vườn cao nhất dao động từ 87,7% đến 92,6%, khác biệt so với cây đỉnh lăng được bón 0,3 g P₂O₅/bầu hay 1,2 g P₂O₅/bầu cho tỷ lệ xuất vườn thấp hơn dao động trong khoảng 70,4 - 75,3%. Cây đỉnh lăng được trồng trên giá thể 1/2 mụn dừa : 1/4 tro trấu : 1/4 phân hữu cơ vi sinh kết hợp với bón 0,6 g P₂O₅/bầu cho tỷ lệ xuất vườn cao nhất 100%, còn ở giá thể 1/3 mụn dừa : 1/3 đất : 1/3 phân chuồng kết hợp với bón 0,3 g P₂O₅/bầu cho tỷ lệ xuất vườn thấp nhất chỉ có 66,7%.

Bảng 3.39 Ảnh hưởng của giá thể và liều lượng lân đến tỷ lệ xuất vườn (%) của cây ĐLLN trong vườn ươm

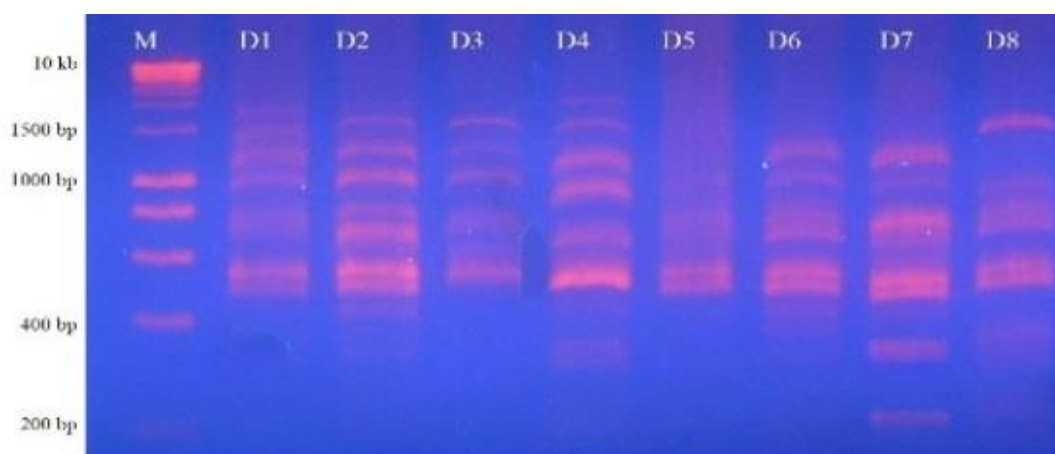
Giá thể (H)	Liều lượng lân (g/bầu) (G)				TB (G)
	0,3	0,6	0,9	1,2	
1/3 MD : 1/3 Đ : 1/3 PC	66,7	81,5	92,6	74,1	78,7 ^B
1/2 MD : 1/4 TT : 1/4 PC	70,4	81,5	92,6	74,1	79,6 ^B
1/2 MD : 1/4 TT : 1/4 PVS	74,1	100,0	92,6	77,8	86,1 ^A
TB (H)	70,4 ^B	87,7 ^A	92,6 ^A	75,3 ^B	
CV (%) = 7,9	F _G = 4,8*		F _H = 23,6**		F _{G*H} = 1,6 ^{ns}

Trong cùng một nhóm trung bình những giá trị có cùng ký tự theo sau khác biệt không có ý nghĩa thống kê; *: có ý nghĩa ở mức $0,01 < P \leq 0,05$; **: rất có ý nghĩa ở mức $P \leq 0,01$; ns: không có ý nghĩa thống kê.

3.4.4 Đánh giá độ đồng nhất di truyền cây con bằng chỉ thị ISSR

3.4.4.1 Sàng lọc primer ISSR

Để chọn lựa primer sử dụng đánh giá tính đồng nhất di truyền của cây con, 12 primer ISSR được sử dụng khuếch đại DNA của 8 mẫu giống ĐLLN bằng kỹ thuật PCR. Tất cả các primer đều cho sản phẩm khuếch đại, các sản phẩm có kích thước nằm trong khoảng 200 - 3000 bp (Hình 3.30). Số băng tạo thành từ 6 - 12 cho mỗi primer, số băng đa hình dao động từ 2 đến 12. Mức độ đa hình của 12 primer ISSR được trình bày ở Bảng 3.41.



Hình 3.30 Sản phẩm PCR của primer UBC841 khuếch đại từ các mẫu lá đỉnh lãng D1 - D8, M: thang DNA 1 kb.

(Hình điện di của các primer còn lại được trình bày tại phần phụ lục hình ảnh trang 143).

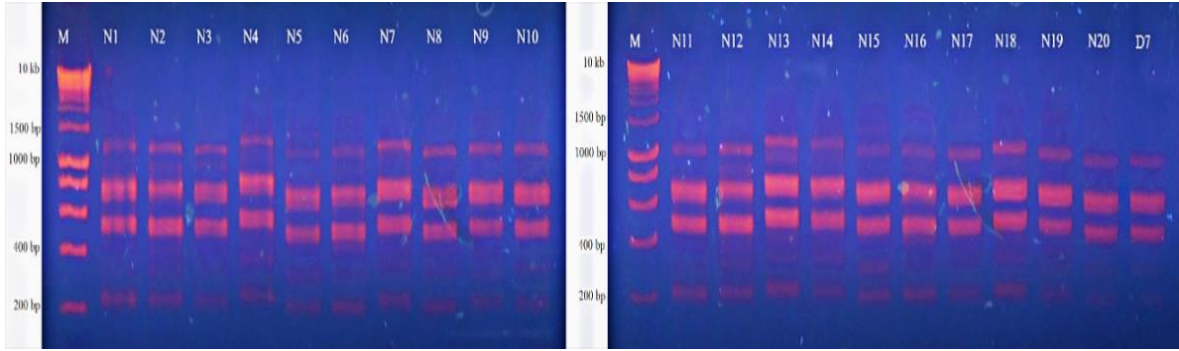
Bảng 3.40 Sản phẩm khuếch đại của 12 primer ISSR trên 8 mẫu giống ĐLLN

Primer	Kích thước sản phẩm tạo thành (bp)	Tổng số băng	Số băng đa hình	Tỉ lệ đa hình (%)
UBC811	300 - 1500	7	5	71,4
UBC825	400 - 2500	7	6	85,7
UBC840	300 - 2000	7	4	57,1
UBC841	200 - 2000	12	12	100
UBC843	300 - 3000	6	5	83,3
UBC844	400 - 1500	6	6	100
UBC854	200 - 2000	8	7	87,5
UBC855	300 - 2500	8	7	87,5
UBC856	600 - 3000	6	6	100
UBC860	200 - 1400	6	5	83,3
UBC880	200 - 1500	9	2	22,2
UBC890	400 - 1500	7	5	71,4

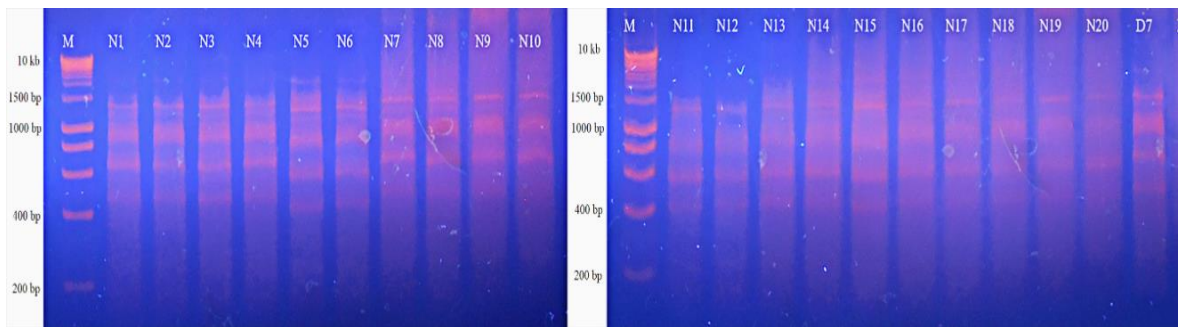
Trong 12 primer khảo sát, 3 primer UBC841, UBC844, UBC856 cho tỷ lệ đa hình tuyệt đối (100%). Kết quả điện di tạo các băng sáng rõ, cho thấy các primer này thích hợp nhất sử dụng để đánh giá sự đồng nhất di truyền cây con tạo thành từ phôi vô tính.

3.4.4.2 Đánh giá tính đồng nhất di truyền của các mẫu cây từ phôi vô tính

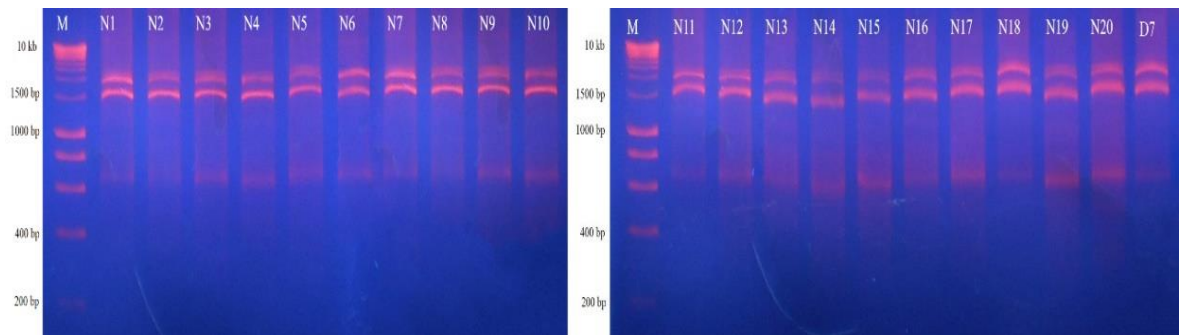
Để đánh giá tính đồng nhất di truyền của cây con tạo thành từ phôi vô tính, DNA từ 20 mẫu cây con được tách chiết và thực hiện phản ứng PCR với 3 primer. Các sản phẩm khuếch đại tạo ra từ cây con hoàn toàn đồng hình với các sản phẩm khuếch đại từ mẫu giống ĐLLN D7 sử dụng tạo phôi, chứng tỏ các cây con tạo ra từ phôi vô tính vẫn ổn định, đồng nhất di truyền với nhau và đồng nhất hoàn toàn với cây mẹ ban đầu (Hình 3.31, Hình 3.32, Hình 3.33).



Hình 3.31 Các sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1,5% từ primer UBC841 khuếch đại từ các mẫu lá đỉnh lã N1 - N20, M: thang DNA 1 kb.



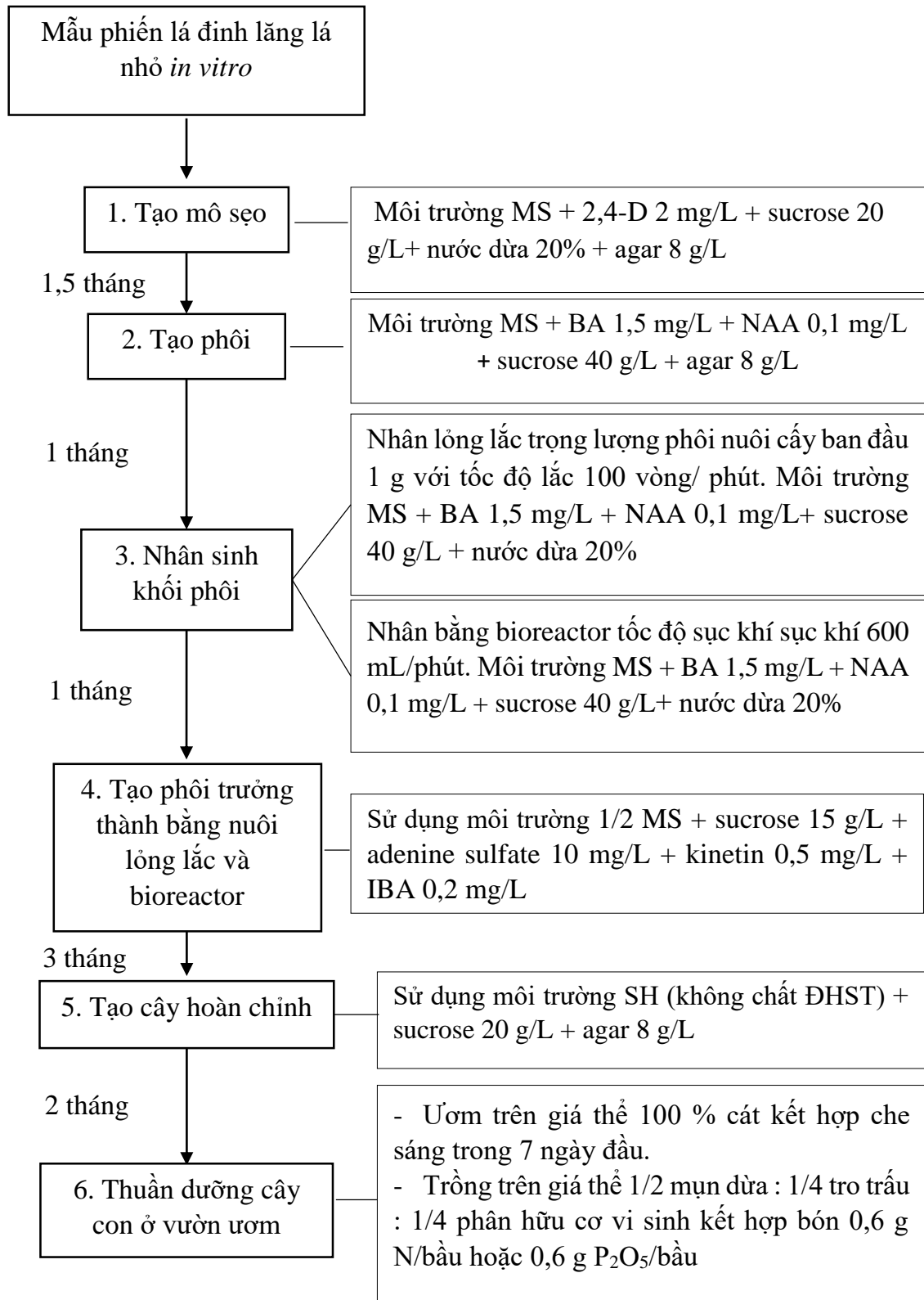
Hình 3.32 Các sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1,5% từ primer UBC844 khuếch đại từ các mẫu lá đỉnh lã N1 - N20, M: thang DNA 1 kb



Hình 3.33 Các sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1,5% từ primer UBC856 khuếch đại từ các mẫu lá đỉnh lã N1 - N20, M: thang DNA 1 kb.

3.5 Quy trình nhân giống cây ĐLLN bằng phương pháp nuôi cấy phôi vô tính

Căn cứ vào các kết quả nghiên cứu đạt được từ các thí nghiệm, bước đầu đề xuất quy trình nhân giống cây ĐLLN bằng phương pháp nuôi cấy phôi vô tính.



Hình 3.34 Tóm tắt quy trình nhân giống cây ĐLLN bằng nuôi cấy phôi vô tính

Chi tiết các bước của quy trình

Bước 1: Tạo mô sẹo

- Sử dụng mẫu phiến lá cây ĐLLN *in vitro* đã được nhân nuôi trong 06 tuần.
- Môi trường nuôi cấy sử dụng: Môi trường MS bổ sung nước dừa 20%, sucrose 20 g/L, 2,4-D 2 mg/L và agar 8g/L. Cấy 10 mẫu vào bình tam giác loại 250 mL có chứa 50 mL môi trường.
- Phiến lá đỉnh lãng được cắt thành các mẫu nhỏ với kích thước: ~ 0,5 x 0,5 cm, trên mẫu phiến lá khía 2 đường vuông góc với gân lá để tạo vết thương. Cấy đặt mặt phiến lá có khía tiếp xúc với môi trường.
- Sau khi cấy, mẫu được nuôi ở điều kiện tối trong 40 - 50 ngày.

Bước 2: Tạo phôi vô tính

- Sử dụng mô sẹo có màu vàng, khô và được cắt thành các cụm nhỏ với đường kính ~ 0,6 cm.
- Môi trường nuôi cấy sử dụng: Môi trường MS có bổ sung nước dừa 20%, sucrose 40 g/L, BA 1,5 mg/L, NAA 0,1 mg/L và agar 8 g/L. Cấy 10 mẫu vào đĩa petri chứa 20 mL môi trường.
- Sau khi cấy, mẫu được đặt dưới ánh sáng đèn huỳnh quang 3.000 lux, nhiệt độ 27°C trong 8 tuần.

Bước 3: Nhân phôi vô tính

- Môi trường nuôi cấy sử dụng: Môi trường MS bổ sung nước dừa 20%, đường sucrose 40 g/L, BA 1,5 mg/L và NAA 0,1 mg/L.

Nhân phôi bằng kỹ thuật lỏng lắc

- Trọng lượng phôi nuôi cấy ban đầu 1 g (1,25% - w/v) cấy vào bình tam giác loại 250 mL có chứa 80 mL môi trường và đặt trên máy lắc với tốc độ 100 vòng/phút.

Nhân phôi bằng bioreactor

- Trọng lượng phôi nuôi cấy ban đầu 9,30 g phôi (0,62% - w/v) cấy vào bình bioreactor dung tích 3.000 mL có chứa 1.500 mL môi trường với tốc độ sục khí là 600 mL/phút.
- Sau khi cấy, mẫu ở cả hai trường hợp trên được nuôi ở nhiệt độ 27°C, ánh sáng 2.000 lux trong 30 ngày.

Bước 4: Tạo phôi vô tính trưởng thành

- Vật liệu: Ép nhẹ các cụm phôi (từ nuôi lỏng lắ) vào thành bình tam giác hoặc trên đĩa Petri để thu nguồn phôi đơn (chưa hoàn chỉnh) treo vào môi trường.

- Phương pháp nuôi: Nuôi lỏng lắ: Cấy 1 g (1,25% - w/v) phôi chưa trưởng thành vào bình tam giác loại 250 mL chứa 80 mL môi trường và đặt trên máy lắc với tốc độ 100 vòng/phút. Nuôi bằng bioreactor: Trọng lượng phôi chưa trưởng thành được nuôi cấy, loại bioreactor và lượng môi trường sử dụng, tốc độ sục khí (trưng tự bước 3 nêu trên). Mẫu được nuôi trong 30 ngày ở điều kiện có nhiệt độ 25 - 27°C và chiếu sáng 12 h/ngày với cường độ ~ 2.000 lux.

- Môi trường nuôi phôi đến giai đoạn trưởng thành: Môi trường lỏng 1/2 MS bổ sung sucrose 15 g/L, adenine sulfate 10 mg/L, kinetin 0,5 mg/L và IBA 0,2 mg /L. Mẫu được nuôi 30 ngày ở điều kiện có nhiệt độ 25 - 27°C và chiếu sáng 12 h/ngày với cường độ 3.000 lux

Bước 5: Tạo cây từ phôi vô tính

- Môi trường SH (không chất ĐHST) có bổ sung sucrose 20 g/L và agar 8 g/L. Cấy các phôi đơn hoàn chỉnh vào bình tam giác thể tích 250 mL có chứa 50 mL môi trường với 10 phôi/bình.

- Mẫu được nuôi trong 84 ngày ở điều kiện có nhiệt độ 25 - 27°C và chiếu sáng 12 h/ngày với cường độ 3.000 lux.

Bước 6: Trồng cây ở vườn ươm

Trồng cây định lắ cấy mô trong khay cát ở giai đoạn đầu của vườn ươm.

- Bình cây tạo từ phôi lấy ra từ phòng thí nghiệm được đặt vào kệ vườn ươm cho thích nghi dần với điều kiện môi trường bên ngoài trong một tuần.

- Lắ cây con từ bình ra, rửa sạch môi trường dính trên cây con (đặc biệt là rễ), sau đó rửa bằng dung dịch Dithane M-45.

- Giá thể cát được xử lý kỹ trước khi trồng, được phơi trong điều kiện có cường độ ánh sáng mạnh và nhiệt độ cao, đảm bảo độ ẩm 50 - 60%.

- Trồng trên giá thể 100 % cát trên khay xếp kết hợp che sáng trong 7 ngày.

Trồng và chăm sóc cây ĐLLN trong giai đoạn vườn ươm.

- Sử dụng túi nylon đen có kích thước 13 x 9 cm, tương ứng với thể tích 484,36 cm³, túi bầu có đục lỗ để thoát nước.

- Trộn hỗn hợp vật liệu giá thể theo các tỷ lệ 1/2 mụn dừa : 1/4 tro trấu : 1/4 phân hữu cơ vi sinh kết hợp bón 0,6 g N/bầu hoặc 0,6 g P₂O₅/bầu.

- Phân nền: 0,6g P₂O₅ + 0,3 g K₂O/bầu (tương đương: 3,8 g super lân + 0,5 g KCl/bầu).

- Chuyển cây con từ giá thể trong khay, sau đó trồng ngay vào bầu đã được chuẩn bị. Chú ý thao tác nhẹ nhàng, nhanh gọn để tránh làm dập và héo cây. Trồng trong thời gian 50 ngày.

- Điều kiện vườn ươm: nhà lưới có mái che mưa. Quy trình trồng kéo dài trong 50 ngày, nhiệt độ trung bình 28,5 - 31°C, độ ẩm không khí dao động 74 - 82% thích hợp cho sinh trưởng của cây đỉnh lăng.

Phạm vi áp dụng của quy trình

Quy trình nhân giống cây ĐLLN bằng phương pháp nuôi cấy phôi vô tính này được xây dựng trên đối tượng ĐLLN D7. Có thể mô phỏng các bước nghiên cứu trên để xây dựng quy trình nhân giống đối với các mẫu/dòng ĐLLN và đỉnh lăng khác cũng như đối với một số loài cây có đặc trưng tái sinh phôi vô tính cao.

KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

Kết luận

Dòng ĐLLN D7 có hàm lượng axit oleanolic cao nhất (1,18%) thông qua phân tích HPLC được chọn làm vật liệu tạo phôi. Dòng D7 thể hiện sự khác biệt về mặt di truyền rõ nhất đối với các mẫu giống còn lại ở vùng trnH-psbA.

Mẫu phôi lá cây ĐLLN in vitro cho kết quả tạo mô sẹo tốt nhất, đặc biệt trên môi trường đặc MS có bổ sung 2,4-D 2 mg/L. Mô sẹo được tiếp tục nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung BA 1,5 mg/L, NAA 0,1 mg/L và sucrose 40 g/L đã cho kết quả hình thành phôi tốt nhất.

Đã thực hiện thành công nghiên cứu nhân sinh khối phôi vô tính bằng phương pháp nuôi cấy lỏng lác và bằng hệ thống bioreactor sục khí dùng môi trường 1/2 MS có bổ sung sucrose 15 g/L, adenine sulfate 10 mg/L, kinetin 0,5 mg/L, IBA 0,2 mg/L; phôi trưởng thành chuyển vào môi trường SH đều tạo được cây hoàn chỉnh. Kết quả trên tạo cơ sở cho nhân giống quy mô lớn ĐLLN.

Cây đinh lăng lá nhỏ hình thành từ phôi vô tính sau khi lấy từ bình cấy mô được trồng trên giá thể 100 % cát kết hợp che sáng trong 7 ngày đầu tiên sinh trưởng tốt và cho tỷ lệ sống cao nhất; cây con sau khi thuần dưỡng được chuyển ra bầu phát triển tốt trên giá thể 1/2 mụn dừa : 1/4 tro trấu : 1/4 phân hữu cơ vi sinh có bổ sung 0,6 g N/bầu hoặc 0,6 g P₂O₅/bầu kết hợp với 0,3 g K₂O/bầu, tỷ lệ xuất vườn đạt trên 90%.

Đã xây dựng được quy trình nhân giống hoàn chỉnh đối với dòng ĐLLN D7 bằng phương pháp nuôi cấy tạo phôi vô tính.

Kết quả sử dụng chỉ thị ISSR cho thấy cây tạo thành từ phôi vô tính đồng nhất về mặt di truyền và hoàn toàn giống với cây mẹ.

Đề nghị

Tiếp tục trồng và đánh giá chất lượng cây ở giai đoạn thu hoạch.

Có thể áp dụng kỹ thuật nhân giống phôi vô tính *in vitro* cây ĐLLN để tạo ra được một quần thể cây đồng nhất.

Nghiên cứu sử dụng thêm một số loại giá thể và phân bón khác nhằm giúp cây con từ cây mô sinh trưởng khỏe mạnh trong giai đoạn vườn ươm.

DANH MỤC CÔNG TRÌNH CỦA TÁC GIẢ

1. Trịnh Việt Nga, Nguyễn Đức Minh Hùng, Phạm Thị Minh Tâm, Bùi Minh Trí, Ngô Thị Anh Khôi, Nguyễn Hữu Hồ, 2017. Ảnh hưởng của nồng độ BA, IBA và NAA đến sự cảm ứng tạo phôi vô tính ở cây đinh lăng lá nhỏ (*Polyscias fruticosa* (L.) Harms). *Kỷ yếu Hội nghị sinh lý thực vật lần thứ hai (ISBN 978-604-60-2664-8)*. Trang 226-234.
2. Trịnh Việt Nga, Nguyễn Đức Minh Hùng, Bùi Minh Trí, Ngô Thị Anh Khôi, Triệu Thị Bích, Phạm Thị Minh Tâm, Nguyễn Hữu Hồ, 2019. Nuôi nhân *in vitro* phôi vô tính cây đinh lăng lá nhỏ (*Polyscias fruticosa* (L.) Harms) trên hệ thống nuôi cấy lỏng lác. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn (ISSN 1859-4581)*. Số 05/2019. Trang 25-34.
3. Trịnh Việt Nga, Nguyễn Cao Kiệt, Bùi Minh Trí, Phạm Thị Minh Tâm, Nguyễn Hữu Hồ, Huỳnh Văn Biết, 2019. Phân tích trình tự DNA barcode của một số mẫu đinh lăng được thu thập tại Việt Nam. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn (ISSN 1859-4581)*. Số 14/2019. Trang 25-34.
4. Trịnh Việt Nga, Nguyễn Cao Kiệt, Bùi Minh Trí, Phạm Thị Minh Tâm, Nguyễn Hữu Hồ, Huỳnh Văn Biết, 2020. Đánh giá hàm lượng axit oleanolic và đa dạng di truyền nguồn gen đinh lăng lá nhỏ (*Polyscias fruticosa* (L.) Harms) thu thập tại Việt Nam. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn (ISSN 1859-4581)*. Số 10/2020.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Asahina H., Shinozaki J., Masuda K., Morimitsu Y. and Satake M., 2010. Identification of medicinal *Dendrobium* species by phylogentic analyses using *matK* and *rbcL* sequences, *J. Nat. Med.*, 64(2): 133-138.
2. Attree S.M., Pomeroy M.K., Fowke L.C., 1994. Production of vigorous, desiccation tolerant white spruce (*Picea glauca* [Moench.] Voss.) synthetic seeds in a reactor. *Plant Cell Rep.* 13: 601-606.
3. Bensita M.B., Nilani P. & Sandhya M.S., 1998. Studies on the adaptogenic and antibacterial properties of *Polyscias fruticosa* (L) Harms. *Ancient Science of Life* 18: 3-4.
4. Bui Đình Thạch, Le Nguyen Tu Linh, Diep Trung Cang, Trinh Thi Ben, Tran Thi Linh Giang, Nguyen Pham Ai Uyen and Ngo Ke Suong, 2016. Protocol establishment for multiplication and regeneration of *Polyscias fruticosa* L. Harms – an important medicinal plant in Vietnam. *European Journal of Biotechnology and Genetic Engineering*, 3(1): 31-37.
5. Businge E., Bygdell J., Wingsle G., Moritz T. and Egertsdotter U., 2013. The effect of carbohydrates and osmoticum on storage reserve accumulation and germination of Norway spruce somatic embryos. *Physiol. Plant.* 149(2): 273-85.
6. Cunha A. and Fernandes-Ferreira M., 1999. Influence of medium parameters on somatic embryogenesis from hypocotyl explants of flax (*Linum usitatissimum* L.). *Journal of Plant Physiology* 155(4-5): 591-597.
7. Đỗ Huy Bích, 1993. *Tài nguyên cây thuốc Việt Nam*. Viện Dược liệu, Chương trình tạo nguồn nguyên liệu làm thuốc. NXB Khoa học Kỹ thuật, Hà Nội, tr. 394-395, 398-400.
8. Đỗ Năng Vịnh, 2005. Báo cáo tổng kết đề tài KC 04.19. *Nghiên cứu áp dụng công nghệ phi vô tính, hạt nhân tạo trong nhân nhanh một số cây có giá trị kinh tế*. Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn.
9. Đỗ Tất Lợi, 2004. *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*. Nhà xuất bản Y Học, Hà Nội, Việt Nam, tr. 828-831.
10. Dubits D., Gyorgyey J., Bogre L. and Bako L., 1995. Molecular biology of somatic embryogenesis. In: *In vitro Embryogenesis in Plants*. Thorpe TA (ed.) Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, p. 267-308.

11. Ducos J.P., Lambot C. and Pétiard V., 2007. Bioreactors for coffee mass propagation by somatic embryogenesis. *International Journal of Plant Developmental Biology* 1(1): 1-12.
12. Đường Hồng Dật, 2002. *Cẩm nang phân bón*. NXB Hà Nội, 160 trang.
13. Dương Tấn Nhựt, 2011. *Công nghệ sinh học thực vật: Nghiên cứu cơ bản và ứng dụng*. NXB Nông nghiệp, 536 trang.
14. Duong Tan Nhut, Nguyen Phuc Huy, Vu Quoc Luan, Nguyen Van Binh, Nguyen Ba Nam, Le Nu Minh Thuy, Dang Thi Ngoc Ha, Hoang Xuan Chien, Trinh Thi Huong, Hoang Van Cuong, Le Kim Cuong and Vu Thi Hien, 2011. Shoot regeneration and micropropagation of *Panax vietnamensis* Ha et Grushv. from *ex vitro* leaf-derived callus. *African Journal of Biotechnology* 10(84): 19499-19504.
15. Duong Tan Nhut, Nguyen Sy Tuan, Hua My Ngoc, Phan Nha Uyen, Nguyen Trinh Don, Nguyen Thanh Mai and Ja Jaime A. Teixeira da Silva, 2006. Somatic embryogenesis induction from *in vitro* leaf cultures of lisianthus (*Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn.). *Propagation of Ornamental Plants* 6 (3): 121-127.
16. Dương Tấn Nhựt, Nguyễn Thụy Minh Hạnh, Nguyễn Bá Nam, Nguyễn Văn Bình và Vũ Quốc Luận, 2008. Các con đường phát triển của phôi vô tính thực vật. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 6: 397-414.
17. George Edwin F., Hall Michael A. and De Klerk Geert-Jan, 2008. Plant propagation by tissue culture. *Plant Propagation by Tissue Culture* 1: 283-333.
18. Guillou C., Fillodeau A., Brulard E., Breton D., De Faria Maraschin S., Verdier D., Simon M. and Ducos J.P., 2018. Indirect somatic embryogenesis of *Theobroma cacao* L. in liquid medium and improvement of embryo-to-plantlet conversion rate. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 54: 377-391.
19. Haberlandt G., 1902. Culturversuche mit isolierten Pflanzenzellen. *Sitz-Ber. Mat. Nat. Kl. Kais. Akad. Wiss. Wien* 111: 69-92.
20. Hassan M.M. and Taha R.A., 2012. Callogenesis, somatic embryogenesis and regeneration of date palm *Phoenix dactylifera* L. cultivars affected by carbohydrate sources. *International Journal of Agricultural Research* 7(5): 231-242.
21. Hoàng Minh Tấn, Nguyễn Quang Thạch và Vũ Quang Sáng, 2006. *Giáo trình Sinh lý thực vật*. Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội, 392 trang.

22. Hoàng Thị Thê, Nguyễn Thị Phương Thảo, Ninh Thị Thảo và Nguyễn Thị Thủy, 2013. Quy trình nhân giống in vitro cây ba kích (*Morinda officenalis* How). *Tạp chí Khoa học và Phát triển* 11(3): 285-292.
23. Hoàng Xuân Chiến, Ngô Thanh Tài, Nguyễn Bá Trực, Trần Xuân Tình, Lâm Bích Thảo, Trần Công Luận và Dương Tấn Nhựt, 2011. Nghiên cứu một số yếu tố tạo củ sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) in vitro và xác định hàm lượng saponin trong cây tạo từ củ trồng thử nghiệm ở núi Ngọc Linh. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 9(3): 325-339.
24. Hollingsworth P. M, Graham S. W and Little D. P, 2011. Choosing and using a Plant DNA Barcode. *PLoS ONE*, 6(5): 1-13.
25. Hollingsworth P. M., Forrest L. L., Spouge J. L., Hajibabaei M., Ratnasingham S., van der Bank M., Chase M. W., Cowan R. S., Erickson D. L. and Fazekas A. J., 2009. A DNA barcode for land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(31):12794-12797.
26. Huỳnh Thị Đan San và Võ Thị Bạch Mai, 2009. Tìm hiểu sự phát sinh phôi soma từ mô sẹo lá cây hà thủ ô đỏ *Polygonum multiflorum* Thunb. in vitro. *Tạp chí Phát triển KH&CN* 12(17): 81-85.
27. Ilyas S., Naz S., Javad S., Shehzadi K., Tariq A., Munir N. Aamir Ali A., 2013. Influence of cytokinins, sucrose and pH on adventitious shoot regeneration of *Polyscias balfouriana* (*Balfour aralia*). *Journal of Medicinal Plants Research* 7(42): 3098-3104.
28. Jaremicz Z., Luczkiewicz M., Kokotkiewicz A., Krolicka A., Sowinski P., 2014. Production of tropane alkaloids in *Hyoscyamus niger* (black henbane) hairy roots grown in bubble-column and spray bioreactors. *Biotechnol. Lett.* 36: 843-853.
29. Jing Y., Xue J.H. and Zhou S.L., 2011. New universal *matK* primers for DNA barcoding angiosperms. *Journal of Systematics and Evolution* 49 (3): 176-181.
30. John M.D., and Harold F.W., 1999. *Floriculture: Principles and Species*, Pearson Publisher, 613 pages.
31. Kevyn E.W, 1999. *Good tree nursery practices, practical guidelines for community nurseries*. International Centre for Research in Agroforestry PO Box 30677, Nairobi, Kenya, 95 pages.
32. Kharwanlang L., Das M.C., Kumaria S. and Tandon P., 2016. High frequency somatic embryos induction from the rhizome explant of *Panax pseudoginseng* Wall. using thin cell layer section. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology* 7(3): 32-40.

33. Khuất Hữu Thanh, 2006. *Cơ sở di truyền phân tử và kỹ thuật gen*. NXB Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội, 167 trang.
34. Kim O.T., Kim T.S., In D.S., Bang K.H., Kim Y.C., Choi Y.E., Cha S.W. and Seong N.S., 2006. Optimization of direct somatic embryogenesis from mature zygotic embryos of *Panax ginseng* C. A. Meyer. *Journal of Plant Biology* 49(5): 348-352.
35. Komamine A., Murata N. and Nomura K., 2005. SIVB Symposium Proceedings: Mechanism of somatic embryogenesis in carrot suspension cultures - Morphology, physiology, biochemistry and molecular biology. *In vitro Cell. Dev. Biol. - Plant* 41: 6-10.
36. Kress WJ and Erickson DL, 2007. A two-locus global DNA barcode for land plants: the coding *rbcL* gene complements the non-coding *trnH-psbA* spacer region. *PLoS One* 2(6): 1-10.
37. Kress, J.W., Wurdack, K. J., Zimmer, E. A., Weigt, L. A. and Janzen, D. H. , 2005. Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(23): 8369–8374.
38. Kulkarni V.M. and Bapat V.A., 2013. Somatic embryogenesis and plant regeneration from cell suspension cultures of Rajeli (AAB), an endangered banana cultivar. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology* 22(1): 132-137.
39. Kumar A., Mishra P., Singh S.C., Sundaresan V., 2014. Efficiency of ISSR and RAPD markers in genetic divergence analysis and conservation management of *Justicia adhatoda* L., a medicinal plant. *Plant Syst. Evol.* 2014; 300: 1409-1420. DOI: 10.1007/s00606-013-0970-z.
40. Kutschera U., 1994. The current status of the acid growth hypothesis. *New Phytol.* 126: 549-569.
41. Lã Thị Thu Hằng, 2015. *Nghiên cứu kỹ thuật nhân giống in vitro và trồng cây hoa chuông (Sinningia speciosa) tại tỉnh Thừa Thiên Huế*. Luận án Tiến sỹ Nông nghiệp, Đại học Huế, Trường Đại học Nông Lâm.
42. Lâm Ngọc Phương và Nguyễn Bảo Vệ, 2005. Ảnh hưởng của thành phần chất nền ươm cây đến sự sinh trưởng và phát triển của cây con dưa hấu tam bội *ex vitro*. *Tạp chí Nghiên cứu Khoa học* 04: 9-15.
43. Lê Hồng Giang và Nguyễn Bảo Toàn, 2011. Sự hình thành mô sẹo, phôi và cây con ở cây mỏ quạ *in vitro* (*Dischidia rafflesiana* Wall.). *Tạp chí Khoa học* 20: 61-67.

44. Lê Thiên Thư và Võ Thị Bạch Mai, 2005. Nghiên cứu về sự phát sinh hình thái trong nuôi cấy *in vitro* cây đinh lăng *Polyscias fruticosa* (L.) Harm. *Tạp chí Phát triển khoa học và Công nghệ - Đại học Quốc gia TP. HCM* 8(11): 47-51.
45. Lê Tiến Vinh, Ninh Thị Thảo, Lã Hoàng Anh, Nguyễn Thị Thủy và Nguyễn Thị Phương Thảo, 2014. Quy trình nhân giống *in vitro* cây đàn sâm (*Salvia miltiorrhiza* Bunge). *Tạp chí Khoa học và Phát triển* 12 (5): 744-752.
46. Lee S.B., Milgroom M.G. and Taylor J.W., 1988. A rapid, high yield mini-prep method for isolation of total genomic DNA from fungi. *Fungal Genetics Newsletter* 35: 23-24.
47. Lo Schiavo F., Pitto L., Giuliano G., Torti G., Nuti Ronchi V., Marazziti D., Veraga R., Orselli S. and Terzi M., 1989. DNA methylation of embryogenic carrot cell cultures and its variations as caused by maturation, differentiation, hormones and hypomethylation drugs. *Theor App Genet* 77(3): 325-331.
48. Lutomski J., Luan T. C. and Hoa T. T., 1992. Polyacetylenes in the Araliaceae family. *Herba Polonica*. 38(1): 3-11.
49. 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 và Nguyễn Hữu Hồ, 2014. Tạo và nhân phôi vô tính sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) trong môi trường lỏng. *Tạp chí Khoa học và Phát triển* 12(7); 1085-1095.
50. Manuhara Y.S.W., Kristanti A.N., Utami E.S.W., 2015. Optimization of culture conditions of *Talinum paniculatum* Gaertn. adventitious roots in balloon type bubble bioreactor using aeration rate and initial inoculum density. *Asian Journal of Biological Sciences* 8 (2): 83-92.
51. Mark Y. S. and Paul D.N.H., 2008. *Barcode of life*, Scientific American, pp. 82-88.
52. Mavituna F. and Buyukalacai S., 1996. Somatic embryogenesis of pepper in bioreactors: a study of bioreactor type and oxygen-uptake rates. *Appl Microbiol Biotechnol* 46: 327-333.
53. Merkle SA., Parrott WA. and Flinn BS., 1995. Morphogenic aspects of somatic embryogenesis. In *In vitro Embryogenesis in Plants*, Thorpe TA (ed.) Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, pp. 155-203.
54. Moghaddam B.E and Taha R.M., 2005. Cellular behavior in embryogenic and non-embryogenic sugar beet calluses. *In vitro Cell Dev. Biol. - Plant* 41: 465-469.

55. Monja-Mio Kelly Maribel, Miguel Ángel Herrera-Alamillo, Manuel L. Robert, 2016. Somatic embryogenesis in temporary Immersion bioreactors. In: *Somatic embryogenesis: Fundamental Aspects and Applications*, pp. 435-454. DOI: 10.1007/978-3-319-33705-0_24.
56. Murashige T. and Skoog F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
57. Ngô Ứng Long, 1977. Tác dụng tăng lực và bổ sung của đỉnh lãng. Tóm tắt công trình đỉnh lãng 1964 - 1974. *Nội san Đại học Quân Y*: 41-45.
58. Nguyễn Đức Thành, 2015. *Các kỹ thuật chỉ thị DNA trong nghiên cứu và chọn lọc thực vật*. NXB Khoa học Tự nhiên và Công nghệ, Hà Nội, 413 trang.
59. Nguyễn Khắc Viện, 1989. *Góp phần nghiên cứu tác dụng dược lý của cao rễ đỉnh lãng trên một số chức năng của cơ thể*. Học viện Quân y Hà Nội, 116 trang.
60. Nguyễn Ngọc Dung, 1998. *Nhân giống cây đỉnh lãng Polyscias fruticosa (L. Harms) thông qua con đường tạo phôi soma trong nuôi cấy in-vitro*, NXB. Nông nghiệp, TP. Hồ Chí Minh.
61. Nguyễn Như Hà và Lê Thị Bích Đào, 2010. *Giáo trình phân bón I*. NXB Nông Nghiệp, 167 trang.
62. Nguyễn Thị Liễu, Nguyễn Trung Thành và Nguyễn Văn Kết, 2011. Nghiên cứu khả năng tạo rễ bất định của sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) trong nghiên cứu *in vitro*. *Tạp chí Khoa học – Đại học Quốc gia Hà Nội*, 27: 30-36.
63. Nguyễn Thị Ngọc Trâm, 2013. Báo cáo kết quả khoa học và công nghệ “*Phát triển và nghiên cứu nguồn gen cây đỉnh lãng làm nguyên liệu sản xuất thuốc*”. Bộ khoa học và Công nghệ.
64. Nguyễn Thị Phương Thảo, Võ Thị Bạch Tuyết và Nguyễn Minh Đức, 2011. Xây dựng phương pháp định lượng axit oleanolic trong đỉnh lãng lá xẻ (*Polyscias fruticosa (L.) Harms.*) bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao. *Tạp chí Y học - TP. HCM* 15 (1): 593-597.
65. Nguyễn Thị Thơ, Khuất Thị Hải Ninh, Vũ Thị Phan, Lê Việt Việt và Bùi Văn Thắng, 2018. Nhân giống *in vitro* đỉnh lãng lá nhỏ (*Polyscias fruticosa L. Harms*). *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Lâm nghiệp* 4: 15-21.
66. Nguyễn Thị Thu Hương, Lương Kim Bích và Nguyễn Thới Nhâm, 2001. *Tác dụng dược lý cao toàn phần chiết xuất từ rễ và lá đỉnh lãng (Polyscia fruticosa (L.) Harms.)*. Công trình nghiên cứu khoa học 1987-2000, Viện Dược liệu. NXB Khoa Học và Kỹ Thuật: tr. 241-244.

67. Nguyễn Thị Xuân Thu, Đỗ Trung Đông và Lê Văn Tường Huân, 2012. Nghiên cứu nuôi cấy mô cây Bao báp (*Adansonia grandidieri* L.). *Tạp chí khoa học - Đại học Huế* 7A (6): 165-174.
68. Nguyễn Trần Châu, Đỗ Mai Anh và Nguyễn Phương Dung, 2007. Nghiên cứu một số tác dụng dược lý thực nghiệm của sản phẩm cây mô từ cây đinh lăng *Polyscias fruticosa* (L.) Harms - Araliacea. *Tạp chí Nghiên cứu Y học - TP. HCM* 11(2): 126-131.
69. Nguyễn Trung Hậu, Lê Thị Như Thảo và Trần Văn Minh, 2015. Nuôi cấy mô lá đinh lăng (*Polyscias fruticosa* L. Harms) tạo rễ tơ và định lượng hoạt chất saponin tích lũy. *Tạp chí Sinh học* 37(1se): 184-189.
70. Nguyễn Văn Thêm, 2002. *Sinh thái rừng*. NXB Nông nghiệp, 394 trang.
71. Nguyễn Vũ Phong và Ngô Thị Tú Trinh, 2010. Nghiên cứu tạo phôi vô tính cây đinh lăng lá nhỏ (*Polyscias fruticosa* L. Harms). *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 8(3B): 1241-1247.
72. Nhut D.T., Vinh B.V.T., Hien T.T., Huy N.P., Nam N.B. and Chien H.X., 2012. Effects of spermidine, proline and carbohydrate sources on somatic embryogenesis from main root transverse thin cell layers of Vietnamese ginseng (*Panax vietnamensis* Ha et. Grushv.). *African Journal of Biotechnology* 11(5): 1084-1091.
73. Ninh Thị Phíp, 2013. Một số biện pháp kỹ thuật tăng khả năng nhân giống của cây đinh lăng lá nhỏ *Polyscias fruticosa* (L.) Harms. *Tạp chí Khoa học và Phát triển* 11 (2): 168-173.
74. Nitsch J.P. and Nitsch C., 1969. Haploid plants from pollen grains. *Science* 163: 85-87 (<http://dx.doi.org/10.1126/science.163.3862.85>).
75. Olmstead R.G., H.J. Michaels K.M. Scott, and Palmer J.D., 1992. Monophyly of the Asteridae and identification of their major lineages inferred from DNA sequences of *rbcL*. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 79: 249-265.
76. Phạm Hoàng Hộ, 2003. *Cây cỏ Việt Nam*, quyển II, tái bản lần 2. NXB Trẻ, tr. 516-518.
77. Phạm Thị Thì, Nguyễn Thoại Ân, Phạm Văn Thắng, Đoàn Thị Quỳnh Hương và Dương Ngọc Kiều Thi, 2016. Xây dựng quy trình nhân nhanh cây đinh lăng có hàm lượng saponin cao bằng phương pháp *in vitro*. *Tạp chí Khoa học - Trường Đại học Cần Thơ* 44: 104-112.
78. Phạm Thị Tô Liên và Võ Thị Bạch Mai, 2007. Bước đầu nghiên cứu sự tạo dịch treo tế bào cây đinh lăng *Polyscias fruticosa* L. Harms. *Tạp chí Phát triển KH&CN* 10(7): 11-16.

79. Phạm Xuân Tùng và Phạm Thị Lan, 2009. Ảnh hưởng của biện pháp xử lý khử trùng mẫu và các yếu tố môi trường trong nhân nhanh giống dâu tây in vitro. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 7(3): 112-117.
80. Phan Ngọc Diệp, Bùi Thị Hồng, Đặng Văn Đông và Trịnh Khắc Quang, 2013. *Kết quả nghiên cứu của dự án “Phát triển một số giống hoa chất lượng cao giai đoạn 2006 - 2010”*. Viện Nghiên cứu Rau quả.
81. Phan Thị Á Kim, Nguyễn Thị Hà Ngân, Lê Thị Anh Thư, Lê Văn Tường Huân, 2018. Ảnh hưởng của nguồn carbon và một số elicitor lên khả năng sinh trưởng của tế bào huyền phù đỉnh lãng (*Polyscias fruticosa* L. Harms). *Tạp chí Khoa học ĐH Huế*, 127(1): 85-94.
82. Pierik R.L.M, 1987. *In vitro culture of higher plants (Handbook)*. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers, 344 pages.
83. Rugini E., 1988. Somatic embryogenesis and plant regeneration in olive (*Olea europaea* L.). *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 14(3): 207-214.
84. Sakr S.S., Melad S.S., El-Shamy M.A. and Abd Elhafez A.E., 2014. *In vitro* propagation of *Polyscias fruticosa* plant. *International Journal of Plant & Soil Science* 3(10): 1254-1265.
85. Sameera O. Bafeel, Ibrahim A. Arif, Mohammad A. Bakir, Haseeb A. Khan, Ahmad H. Al Farhan, Ali A. Al Homaidan, Anis Ahamed and Jacob Thoma, 2011. Comparative evaluation of PCR success with universal primers of maturase K (*matK*) and ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase oxygenase large subunit (*rbcL*) for barcoding of some arid plants. *Plant Omics Journal* 4(4): 195-198.
86. Schenk R.U. and Hildebrandt A.C., 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell culture. *Can. J. Bot.* 50: 199-204.
87. Sharma S.K., Dkhar J., Kumaria S., Tandon P., and Rao S.R, 2012. Assessment of phylogentic inter-relationships in the genus *Cymbidium* (Orchidaceae) based on internal transcribed spacer region of rDNA, *Gen*, 495(1): 10-15.
88. Sharp W.R., Sondah M.R., Caldas L.S and Maraffa S.B., 1980. The physiology of *in vitro* asexual embryogenesis. *Horticultural Review*, New York, 2: 268-310.
89. Shohael A.M., Chakrabarty D., Yu K.W., Hahn E.J. and K.Y. Paek, 2005. Application of Bioreactor system for large-scale production of *Eleutherococcus sessiliflorus* somatic embryos in an air-lift Bioreactor and production of eleutherosides. *Journal of Biotechnology* 120: 228-236.

90. Sliwinska A., Olszowska O., Furmanowa M. and Nosov A., 2008. Rapid multiplication of *Polyscias filicifolia* by secondary somatic embryogenesis. *In vitro Cell. Dev. Biol. - Plant* (44): 69-77.
91. Srirama R., Senthilkumar U., Sreejayan N., Ravikanth G., Gurumurthy B.R., Shivanna M.B., Sanjappa M., Ganeshaiyah K.N., Shaanker R.U., 2010. Assessing species admixtures in raw drug trade of *Phyllanthus*, a hepatoprotective plant using molecular tools. *J Ethnopharmacol.* Jul 20; 130(2): 208-15. DOI: 10.1016/j.jep.2010.04.042. Epub 2010 May 8.
92. Street H.E., 1977. *Plant Tissue and Cell Culture*. Botanical Monographs Vol. 11. Oxford and London: Blackwell Scientific Publications, 614 pages.
93. Sujeevan R. and Paul D. N. Hebert, 2007. The Barcode of Life Data System. *Mol. Ecol. Notes.* May 1, 7(3): 355-364.
94. Taiz L. and Zeiger E., 2002. *Plant Physiology*. 3rd Edition, Sinauer Associates, Inc. Publishers, Sunderland, MA, USA, 690 pages.
95. Tang W., 2000. High-frequency plant regeneration via somatic embryogenesis and organogenesis and *in vitro* flowering of regenerated plantlets in *Panax ginseng*. *Plant Cell Rep.* 19(7): 727-732.
96. Thomas L.R., 1986. Pollen embryogenesis in anther cultures of *Solanum carolinense* L. *Plant Cell Reports* 5(4): 273-275.
97. Tô Thị Nhã Trâm, Hồ Ngọc Hân, Nguyễn Thị Kim Linh, Hoàng Văn Cương, Hoàng Xuân Chiến, Lê Đình Đôn và Dương Tấn Nhựt, 2014. Khả năng tạo cây từ phôi vô tính và bước đầu áp dụng kỹ thuật giảm cành *ex vitro* trong nhân giống cây Tiêu (*Piper nigrum* L.). *Tạp chí Khoa học và Phát triển* 20 (7): 988-995.
98. Trần Thị Liên, Nguyễn Văn Thuận và Đoàn Thị Thanh Nhân, 2005. Nghiên cứu nhân nhanh cây đỉnh lăng *Polyscias fruticosa* (L. Harms) bằng phương pháp *in vitro*. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn* 14: 35-40.
99. Trịnh Xuân Vũ, 1976. *Sinh lý thực vật*. NXB Nông nghiệp Hà Nội, 420 trang.
100. Trương Thanh Hưng, Nguyễn Quang Thạch, Trần Thị Quý, Ngô Thị Lam Giang, Phạm Hữu Nhượng, 2018. Nghiên cứu sử dụng công nghệ khí canh trong nhân giống vô tính cây đỉnh lăng lá nhỏ (*Polyscias fruticosa*). *Tạp chí Khoa học Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam*, 1: 102-105.
101. Trương Thị Bích Phượng, Văn Phú Trung, Nguyễn Đức Tuấn, Phạm Phú Bình, 2017. Ảnh hưởng của chất kích thích sinh trưởng trong nuôi cấy phát sinh hình thái *in vitro* đỉnh lăng (*Polyscias fruticosa* (L.) Harms). Báo cáo Hội nghị Khoa học toàn quốc về Sinh thái và Tài nguyên sinh vật lần thứ 7, Viện

Sinh thái và Tài nguyên sinh vật và Học viện Khoa học và Công nghệ (Viện Hàn lâm KH&CNVN), Hà nội, 20/10/2017. NXB Khoa học Tự nhiên và Công nghệ, Hà Nội, tr. 1866 -1872.

102. Vo D.H., Yamamura S., Ohtani K., Kasai R., Yamasaki K., Nguyen T.N., Hoang M.C., 1998. Oleanane saponins from *Polyscias fruticosa*. *Phytochemistry* 47(3): 451-457.
103. Võ Văn Chi và Trần Hợp, 1999. *Cây cỏ có ích ở Việt Nam*, Tập 1. NXB Giáo Dục, tr. 425-428.
104. Võ Xuân Minh, 1991. Góp phần nghiên cứu về thành phần hóa học và dạng bào chế của cây đinh lăng. *Tạp chí dược học* 3: 19-21.
105. Vũ Ngọc Phượng, Đoàn Thị Ái Thuyền, Lưu Việt Dũng, Thái Xuân Du và Nguyễn Văn Uyên, 2001. Quy trình ươm cây hồng (*Paulownia fortunei*) giai đoạn sau ống nghiệm. *Trong Công nghệ sinh học và Nông nghiệp sinh thái bền vững*. NXB Nông Nghiệp, tr. 63-68.
106. Wang A.S., 1990. Callus induction and plant regeneration of American ginseng. *HortScience* 25(5): 571-572.
107. Wang X., 2011. Inter-simple sequence repeats (ISSR) molecular fingerprinting markers for authenticating the genuine species of rhubara. *Journal of Medicinal Plants Research* 5(5): 758-764.
108. Wei L.Ng. and Tan S.G., 2015. Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) markers: Are we doing it right?. *ASM Science Journal* 9(1): 30-39.
109. Whei-Lan Teng, Liu Y.J., Tsai Y.C. and Soong T.S., 1994. Somatic embryogenesis of carrot in bioreactor culture systems. *Hortscience* 29 (11): 1349-1352.
110. Wua X., Yang F., Piao X.C., Li K.H., ML M.L. and Dai Y., 2015. High-frequency plantlet regeneration by somatic embryogenesis from mature zygotic embryos of onion. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 43(4): 249-260.
111. Yancheva S.D. and Roichev V., 2005. Carbohydrate source can influence the efficiency of somatic embryogenesis in seedless grapes (*Vitis vinifera* L.). *Biotechnol. & Biotechnol. Eq.* 2: 62-66.
112. Yang H., Dong Y., Gu Z., Liang N. and Yang J., 2012. A preliminary assessment of *matK*, *rbcL* and *trnH-psbA* as DNA barcodes for Calamus (Arecaceae) species in China with note on ITS. *Ann. Bot. Fennici* 49: 319-330.
113. Yao H., S.J.Y., Ma X. Y., Liu C., Li Y., Xu H. X., Han J. P., Duan L. S., Chen S. L., 2009. Identification of Dendrobium species by a candidate DNA

- barcode sequence: the chloroplast *psbA-trnH* intergenic region. *Planta Medica* 75: 667-669.
114. Yeung E.C., 1995. Structural and developmental patterns in somatic embryogenesis. In: *In vitro Embryogenesis in Plants*, Trevor A. Thorpe, pp. 205-247.
115. Yuan-Chun Ma, Shi-Lin Chen, Thibault M.E.J.M., 2013. Enhancing quality control of botanical medicine in the 21st century from the perspective of industry: the use of chemical profiling and DNA barcoding to ensure accurate identity. *HerbalGram* 97:58-67
116. Zhang J.Y., Sun H.J., Song I.J., Bae T.W., Kang H.G., Ko S.M., Kwon Y.I., Kim I.W., Lee J., Park S.Y., Lim P.O., Kim Y.H. and Lee H.Y., 2014. Plant regeneration of Korean wild ginseng (*Panax ginseng* Meyer) mutant lines induced by γ -irradiation (^{60}Co) of adventitious roots. *J Ginseng Res* 38: 220-225.
117. Zhang Z, Jiang M, Xie X, Yang H, Wang X, Xiao L, Wang N, 2017. Axít oleanolic ameliorates high glucose-induced endothelial dysfunction via PPAR δ activation, *Sci Rep* 7: 1-8.
118. Zhou P., Mark S.S., Young R. and Thiele DJ., 1994. A system for gene cloning and manipulation in the yeast *Candida glabrata*. *Department of Biological Chemistry, University of Michigan, Medical School - Ann Arbor, MI 48109-0606, USA* ([https://doi.org/10.1016/0378-1119\(94\)90368-9](https://doi.org/10.1016/0378-1119(94)90368-9)): 135-140.
119. Zhou S. and Brown D.C.W., 2006. High efficiency plant production of North American ginseng via somatic embryogenesis from cotyledon explants. *Plant Cell Rep.* 25: 166-173.
120. Zimmerman JL., 1993. Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. *Plant Cell* 5: 1411-1423.

PHỤ LỤC

Danh sách các phụ lục

- Phụ lục thành phần môi trường
- Phụ lục sơ đồ bố trí thí nghiệm
- Phụ lục hình ảnh
- Phụ lục trình tự gene
- Phụ lục số liệu
- Phụ lục kết quả phân tích axit oleanolic

Phụ lục thành phần môi trường

Thành phần môi trường MS (Murashige & Skoong, 1962)

Nguyên tố	Nồng độ (mg/L)
Khoáng đa lượng	
CaCl ₂ .2H ₂ O (Duchefa)	440
KH ₂ PO ₄ (Duchefa)	170
KNO ₃ (Duchefa)	1900
MgSO ₄ .7H ₂ O (Duchefa)	370
NH ₄ NO ₃ (Duchefa)	1650
Khoáng vi lượng	
CoCl ₂ .6H ₂ O (Duchefa)	0,025
CuSO ₄ .5H ₂ O (Duchefa)	0,025
FeNaEDTA (Sigma)	36,7
H ₃ BO ₃ (Duchefa)	6,20
KI (Duchefa)	0,83
MnSO ₄ .H ₂ O (Duchefa)	16,9
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O (Duchefa)	0,25
ZnSO ₄ .7H ₂ O (Duchefa)	8,60
Vitamin	
Glycine	2
Pyridoxine hydrochloride (Duchefa)	0,5
Myo-Inositol (Duchefa)	100
Axít Nicotinic (Duchefa)	0,5
Thiamine hydrochloride (Duchefa)	0,1

Thành phần môi trường SH (Schenk & Hildebrandt)

Nguyên tố	Nồng độ (mg/L)
Khoáng đa lượng	
CaCl ₂ .2H ₂ O (Duchefa)	200
KNO ₃ (Duchefa)	2500
MgSO ₄ .7H ₂ O (Duchefa)	400
NaH ₂ PO ₄ (Duchefa)	300
Khoáng vi lượng	
H ₃ BO ₃ (Duchefa)	5,0
CoCl ₂ .6H ₂ O (Duchefa)	0,1
CuSO ₄ .5H ₂ O (Duchefa)	0,2
Na ₂ EDTA	20
FeSO ₄ .7H ₂ O (Sigma)	15
MnSO ₄ .H ₂ O (Duchefa)	10
KI (Duchefa)	1,0
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O (Duchefa)	0,1
ZnSO ₄ .7H ₂ O (Duchefa)	1,0
Vitamin	
Myo-Inositol (Duchefa)	1000
Glycine	30
Axít Nicotinic (Duchefa)	5,0
Pyridoxine hydrochloride (Duchefa)	8,0
Thiamine hydrochloride (Duchefa)	5,0

Thành phần môi trường Nitsch & Nitsch

Nguyên tố	Nồng độ (mg/L)
Khoáng đa lượng	
CaCl ₂ .2H ₂ O (Duchefa)	219,84
KNO ₃ (Duchefa)	950
MgSO ₄ .7H ₂ O (Duchefa)	185
KH ₂ PO ₄ (Duchefa)	68
Khoáng vi lượng	
H ₃ BO ₃ (Duchefa)	10
CuSO ₄ .5H ₂ O (Duchefa)	0,025
Na ₂ EDTA	37,3
FeSO ₄ .7H ₂ O (Sigma)	27,8
MnSO ₄ .H ₂ O (Duchefa)	18,9
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O (Duchefa)	0,25
ZnSO ₄ .7H ₂ O (Duchefa)	10
Vitamin	
Myo-Inositol (Duchefa)	100
Glycine	2,0
Axít Nicotinic (Duchefa)	5,0
Pyridoxine hydrochloride (Duchefa)	0,5
Thiamine hydrochloride (Duchefa)	0,5

Phụ lục sơ đồ bố trí thí nghiệm

Thí nghiệm 1. Ảnh hưởng của các nồng độ 2,4-D đến khả năng tạo mô sẹo của mẫu phiến lá và cuống lá cây *in vitro*.

A ₁ B ₁	A ₂ B ₂	A ₁ B ₂	A ₁ B ₃
A ₁ B ₄	A ₂ B ₁	A ₁ B ₄	A ₂ B ₁
A ₂ B ₃	A ₁ B ₂	A ₂ B ₃	A ₁ B ₁
A ₁ B ₃	A ₁ B ₄	A ₂ B ₂	A ₂ B ₄
A ₂ B ₂	A ₂ B ₄	A ₁ B ₃	A ₂ B ₃
A ₁ B ₁	A ₁ B ₂	A ₂ B ₁	A ₂ B ₄

Thí nghiệm 2. Ảnh hưởng của nồng độ 2,4-D đến khả năng tạo mô sẹo mẫu phiến lá và cuống lá cây thu từ vườn ươm

C ₁ D ₂	C ₁ D ₃	C ₁ D ₁	C ₂ D ₁
C ₁ D ₄	C ₂ D ₂	C ₁ D ₂	C ₂ D ₃
C ₁ D ₃	C ₂ D ₁	C ₂ D ₂	C ₂ D ₄
C ₂ D ₄	C ₂ D ₃	C ₂ D ₃	C ₁ D ₁
C ₂ D ₁	C ₂ D ₂	C ₁ D ₃	C ₂ D ₄
C ₁ D ₂	C ₁ D ₄	C ₁ D ₁	C ₁ D ₄

Thí nghiệm 3. Ảnh hưởng của nồng độ BA và IBA đến khả năng tạo phôi từ mô sẹo

E ₃ F ₃	E ₂ F ₁	E ₁ F ₁	E ₃ F ₁	E ₄ F ₃	E ₄ F ₃
E ₁ F ₃	E ₃ F ₂	E ₄ F ₁	E ₂ F ₂	E ₁ F ₂	E ₃ F ₁
E ₄ F ₁	E ₂ F ₃	E ₁ F ₂	E ₃ F ₃	E ₄ F ₂	E ₂ F ₂
E ₁ F ₃	E ₁ F ₂	E ₁ F ₁	E ₂ F ₁	E ₂ F ₂	E ₄ F ₃
E ₄ F ₂	E ₂ F ₁	E ₃ F ₁	E ₃ F ₃	E ₁ F ₁	E ₄ F ₂
E ₁ F ₃	E ₃ F ₂	E ₂ F ₃	E ₃ F ₂	E ₂ F ₃	E ₄ F ₁

Thí nghiệm 4: Ảnh hưởng của nồng độ BA và NAA đến khả năng tạo phôi từ mô sẹo

G ₄ H ₁	G ₄ H ₁	G ₁ H ₁	G ₂ H ₂	G ₄ H ₂	G ₄ H ₂
G ₂ H ₁	G ₃ H ₁	G ₂ H ₂	G ₄ H ₂	G ₃ H ₂	G ₃ H ₁
G ₁ H ₃	G ₂ H ₃	G ₄ H ₃	G ₂ H ₃	G ₁ H ₂	G ₃ H ₂
G ₁ H ₂	G ₃ H ₃	G ₂ H ₁	G ₁ H ₃	G ₃ H ₂	G ₄ H ₃
G ₂ H ₂	G ₃ H ₃	G ₁ H ₂	G ₃ H ₃	G ₂ H ₁	G ₄ H ₃
G ₁ H ₁	G ₁ H ₃	G ₃ H ₁	G ₁ H ₁	G ₂ H ₃	G ₄ H ₁

Thí nghiệm 5. Ảnh hưởng của các loại đường (sucrose, fructose, glucose, maltose) và nồng độ đến khả năng tạo phôi

A ₁ B ₁	A ₁ B ₂	A ₁ B ₃	A ₁ B ₄	A ₁ B ₅	A ₁ B ₃	A ₁ B ₄	A ₁ B ₅	A ₁ B ₁	A ₁ B ₂
A ₂ B ₁	A ₂ B ₂	A ₂ B ₃	A ₂ B ₄	A ₂ B ₅	A ₂ B ₃	A ₂ B ₄	A ₂ B ₅	A ₂ B ₁	A ₂ B ₂
A ₃ B ₁	A ₃ B ₂	A ₃ B ₃	A ₃ B ₄	A ₃ B ₅	A ₃ B ₃	A ₃ B ₄	A ₃ B ₅	A ₃ B ₁	A ₃ B ₂
A ₄ B ₁	A ₄ B ₂	A ₄ B ₃	A ₄ B ₄	A ₄ B ₅	A ₄ B ₃	A ₄ B ₄	A ₄ B ₅	A ₄ B ₁	A ₄ B ₂
A ₁ B ₁	A ₁ B ₂	A ₁ B ₃	A ₁ B ₄	A ₂ B ₁	A ₂ B ₂	A ₂ B ₃	A ₂ B ₄	A ₁ B ₅	A ₂ B ₅
A ₃ B ₁	A ₃ B ₂	A ₃ B ₃	A ₃ B ₄	A ₄ B ₁	A ₄ B ₂	A ₄ B ₃	A ₄ B ₄	A ₃ B ₅	A ₄ B ₅

Thí nghiệm 6. Ảnh hưởng của trọng lượng phôi nuôi cấy ban đầu và tốc độ lắc đến khả năng nhân phôi trên hệ thống nuôi cấy lỏng lắc

T ₂ K ₁	T ₁ K ₁	T ₁ K ₁
T ₁ K ₁	T ₂ K ₁	T ₂ K ₁

T ₁ K ₃	T ₁ K ₃	T ₂ K ₃
T ₂ K ₃	T ₁ K ₃	T ₂ K ₃

T ₁ K ₂	T ₂ K ₂	T ₂ K ₂
T ₁ K ₂	T ₂ K ₂	T ₁ K ₂

Máy lắc 1

Máy lắc 2

Máy lắc 3

Thí nghiệm 7. Ảnh hưởng của tốc độ sục khí đến khả năng nhân phôi bằng hệ thống bioreactor

B ₁	B ₂	B ₃
B ₂	B ₁	B ₃
B ₃	B ₂	B ₁

Thí nghiệm 8. Ảnh hưởng của kinetin và IBA đến khả năng phát triển phôi đơn; tạo chồi đơn, cây đơn từ phôi đơn

K ₁ I ₁	K ₁ I ₂	K ₁ I ₃	K ₁ I ₃	K ₁ I ₂	K ₁ I ₁	K ₁ I ₁	K ₁ I ₂	K ₁ I ₃
K ₂ I ₁	K ₂ I ₂	K ₂ I ₃	K ₂ I ₃	K ₂ I ₂	K ₂ I ₁	K ₃ I ₁	K ₃ I ₂	K ₃ I ₃
K ₃ I ₁	K ₃ I ₂	K ₃ I ₃	K ₃ I ₃	K ₃ I ₂	K ₃ I ₁	K ₂ I ₁	K ₂ I ₂	K ₂ I ₃
K ₁ I ₁	K ₁ I ₂	K ₁ I ₃	K ₁ I ₃	K ₁ I ₂	K ₁ I ₁	K ₁ I ₁	K ₁ I ₂	K ₁ I ₃

Thí nghiệm 9. Xác định loại môi trường thích hợp cho nuôi cấy chồi phát triển thành cây

M ₁	M ₂	M ₃	M ₄
M ₃	M ₄	M ₁	M ₂
M ₂	M ₃	M ₁	M ₄

Thí nghiệm 10. Ảnh hưởng của giá thể, chế độ che sáng đến sinh trưởng của cây đinh lăng mới ra mô trong giai đoạn đầu ở vườn ươm

A1: Che sáng 3 ngày

A2: Che sáng 5 ngày

A3: Che sáng 7 ngày

B3	B4	B2
B1	B3	B4
B4	B2	B1
B2	B1	B3

B4	B3	B1
B1	B4	B3
B2	B1	B2
B3	B2	B4

B1	B2	B4
B2	B4	B2
B4	B3	B1
B3	B1	B3

Thí nghiệm 11. Ảnh hưởng của giá thể và liều lượng đạm đến sinh trưởng của cây đinh lăng vô bầu trong giai đoạn vườn ươm.

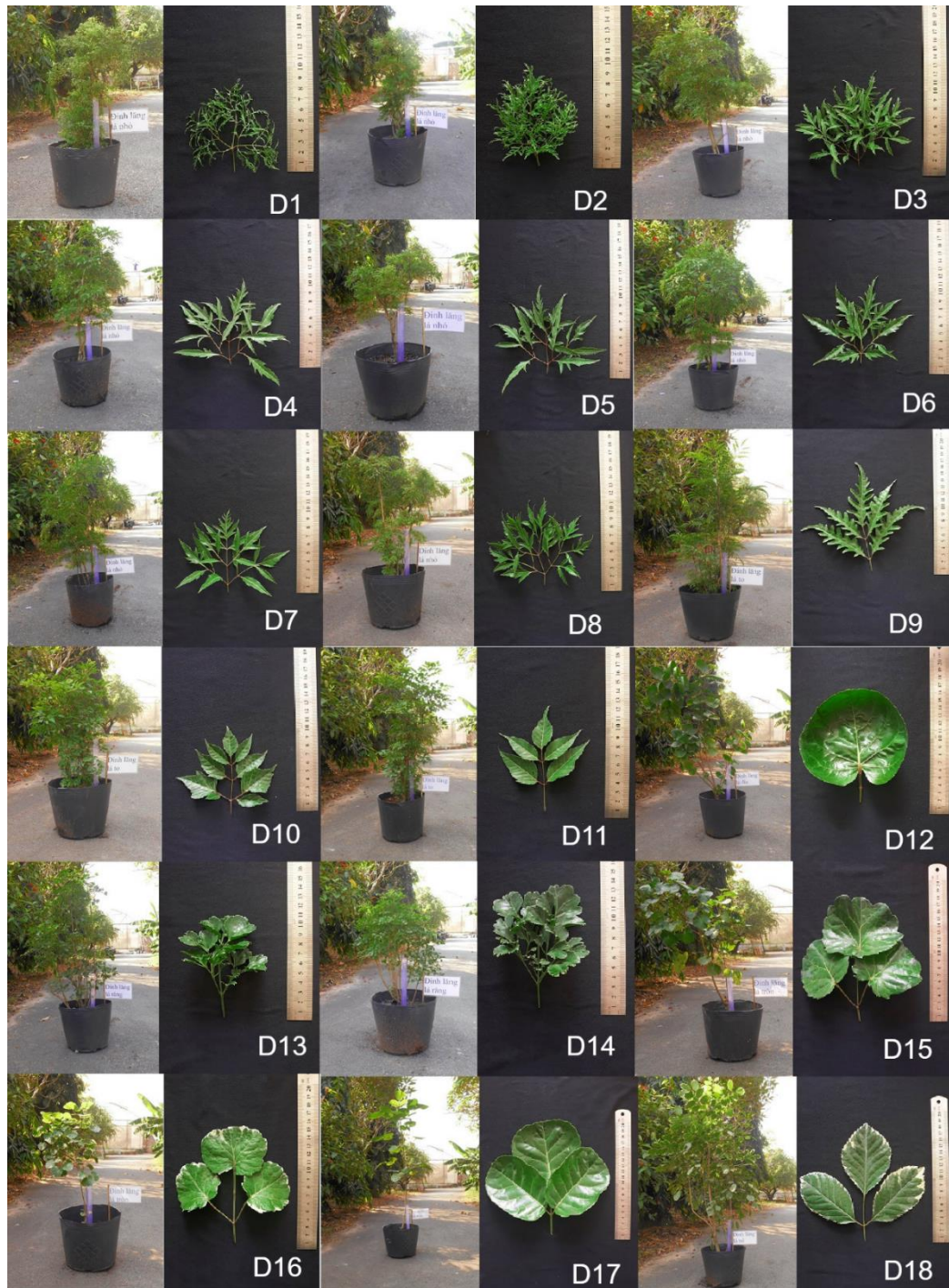
C2D2	C1D1	C3D4	C1D2	C3D1	C2D4	C2D2	C3D2	C1D3
C2D4	C3D3	C1D4	C2D4	C2D1	C1D4	C1D4	C3D3	C3D4
C3D2	C1D3	C2D2	C3D4	C1D3	C3D1	C2D3	C1D1	C2D1
C1D1	C2D1	C3D1	C1D2	C2D3	C2D3	C3D2	C1D2	C3D3

Thí nghiệm 12. Ảnh hưởng của giá thể và liều lượng lân đến sinh trưởng của cây đinh lăng vô bầu trong giai đoạn vườn ươm

G2H2	G1H1	G2H4	G2H3	G1H1	G3H2	G2H4	G1H3	G2H1
G3H4	G3H1	G1H2	G1H3	G2H1	G1H2	G1H1	G3H1	G1H2
G2H1	G1H4	G2H3	G3H1	G3H4	G3H3	G3H4	G3H3	G2H3
G3H2	G3H3	G1H3	G2H4	G1H4	G2H2	G2H2	G1H4	G3H2

Phụ lục hình ảnh

Hình dạng các mẫu đỉnh lăng nghiên cứu (18 mẫu)



Hình PL1 Hình dạng cây và lá các mẫu đỉnh lăng sử dụng nghiên cứu D1 – D18



Hình PL2 Nhân phôi vô tính đỉnh lãg lá nhỏ bằng phương pháp nuôi lỏng lắc



Hình PL3 Cây đỉnh lãg lá nhỏ tạo từ phôi vô tính giai đoạn 4 tháng sau khi ra vườn ươm

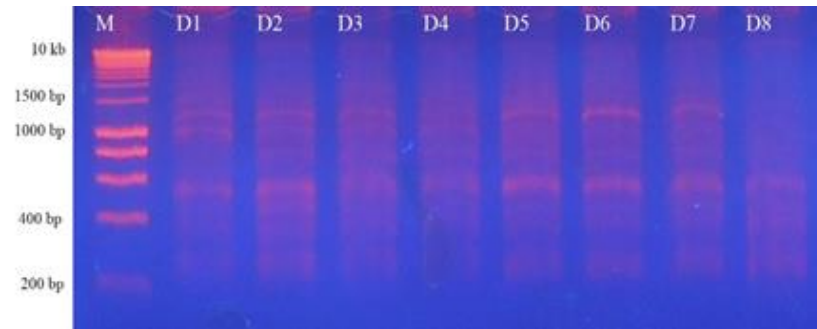


Hình PL4 Toàn cảnh bố trí thí nghiệm 11

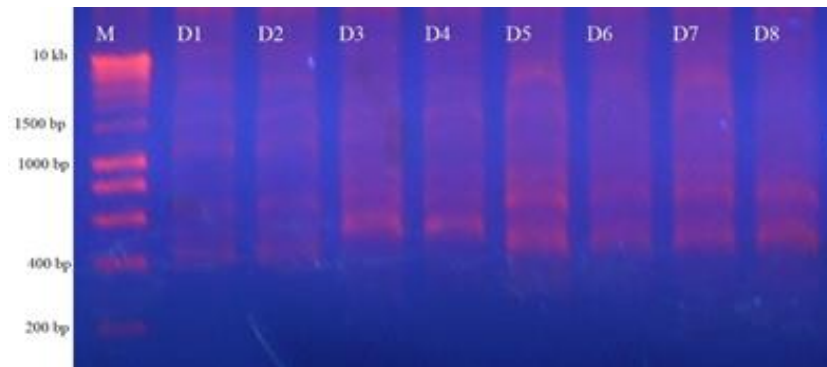


Hình PL5 Toàn cảnh bố trí thí nghiệm 12 tại thời điểm 30 NST

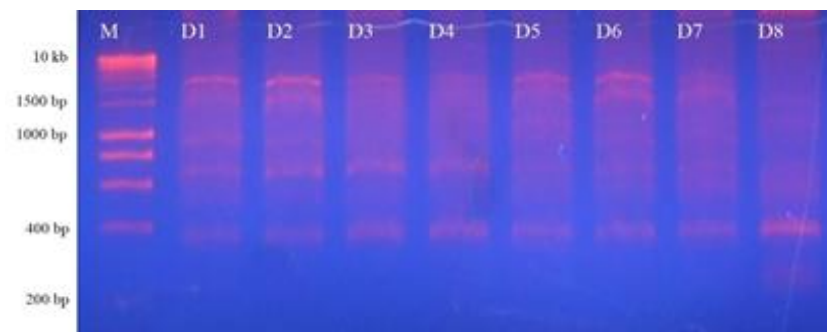
Hình điện di sản phẩm PCR qua khuếch đại của các primer ISSR



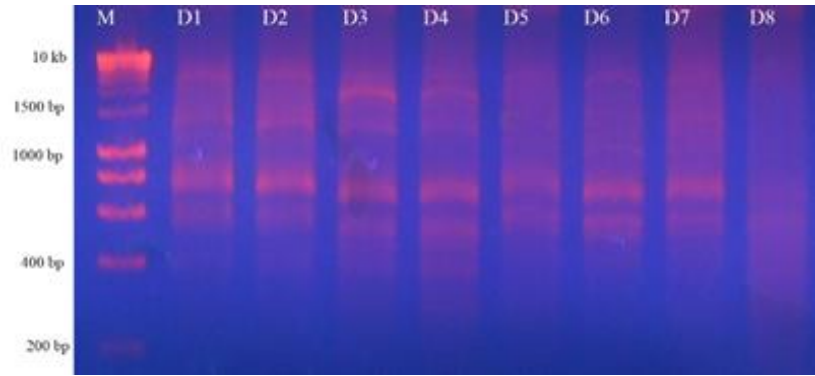
Hình PL6 Sản phẩm PCR của primer UBC811 khuếch đại từ các mẫu lá đỉnh lãng
D1 - D8, M: thang DNA 1 kb



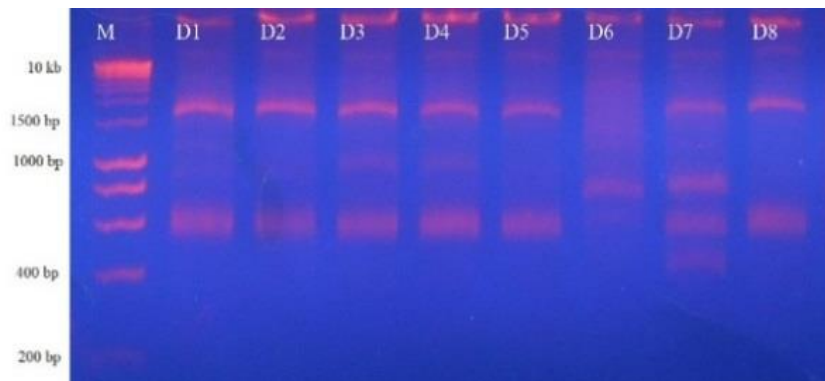
Hình PL7 Sản phẩm PCR của primer UBC825 khuếch đại từ các mẫu lá đỉnh lãng
D1 - D8, M: thang DNA 1 kb



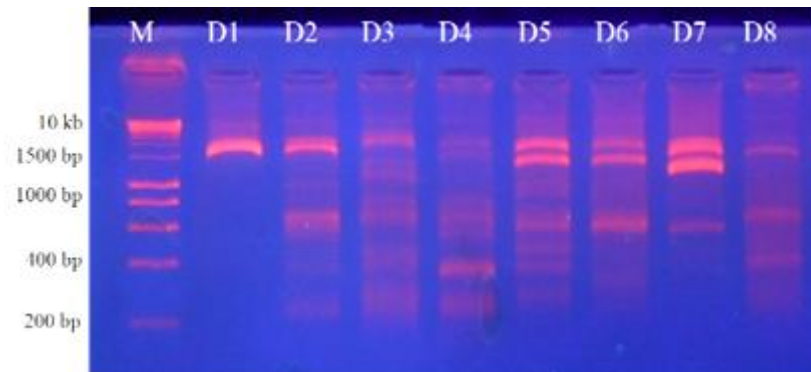
Hình PL8 Sản phẩm PCR của primer UBC840 khuếch đại từ các mẫu lá đỉnh lãng
D1 - D8, M: thang DNA 1 kb



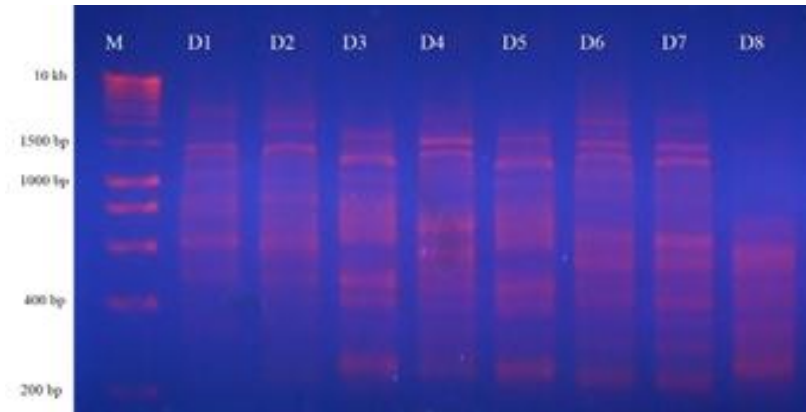
Hình PL9 Sản phẩm PCR của primer UBC843 khuếch đại từ các mẫu lá đỉnh lãg
D1 - D8, M: thang DNA 1 kb



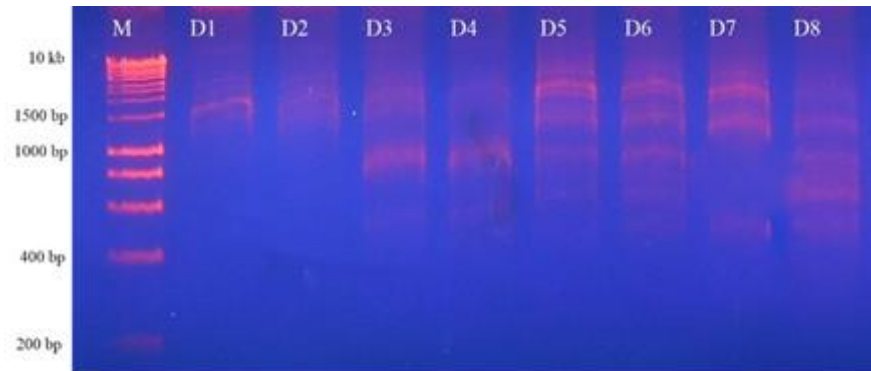
Hình PL10 Sản phẩm PCR của primer UBC844 khuếch đại từ các mẫu lá đỉnh lãg
D1 - D8, M: thang DNA 1 kb



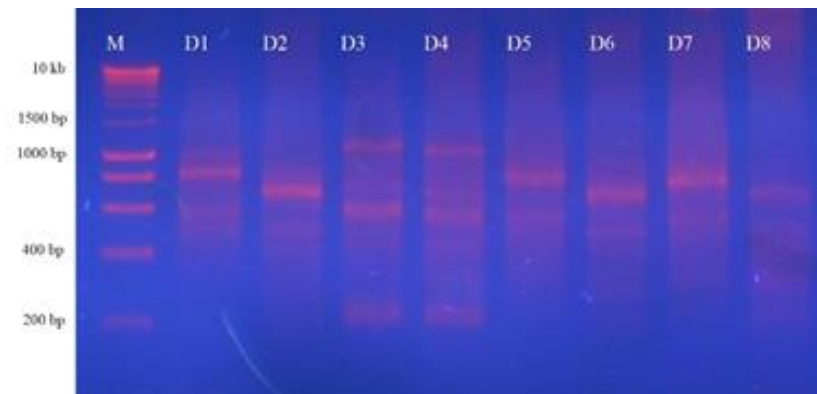
Hình PL11 Sản phẩm PCR của primer UBC854 khuếch đại từ các mẫu lá đỉnh lãg
D1 - D18, M: thang DNA 1 kb



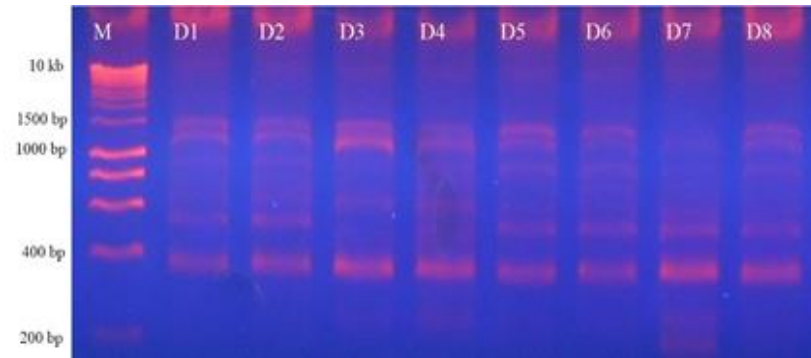
Hình PL12 Sản phẩm PCR của primer UBC855 khuếch đại từ các mẫu lá đỉnh lãng D1 - D8, M: thang DNA 1 kb



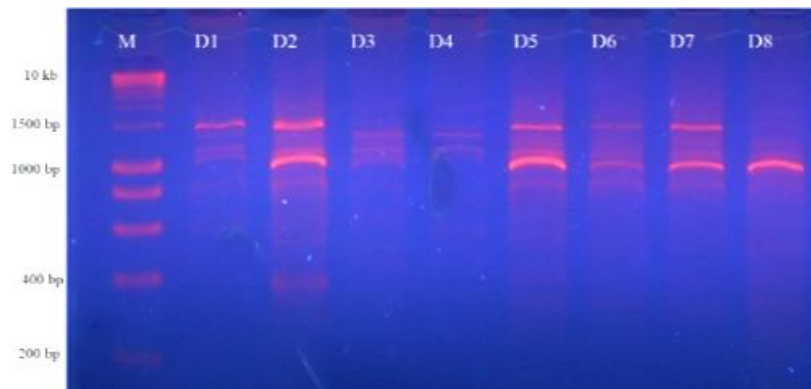
Hình PL13 Sản phẩm PCR của primer UBC856 khuếch đại từ các mẫu lá đỉnh lãng D1 - D8, M: thang DNA 1 kb



Hình PL14 Sản phẩm PCR của primer UBC860 khuếch đại từ các mẫu lá đỉnh lãng D1 - D8, M: thang DNA 1 kb



Hình PL15 Sản phẩm PCR của primer UBC880 khuếch đại từ các mẫu lá đing lăng
D1 - D8, M: thang DNA 1 kb



Hình PL16 Sản phẩm PCR của primer UBC890 khuếch đại từ các mẫu lá đing lăng
D1 - D18, M: thang DNA 1 kb

Phụ lục trình tự gene

Trình tự 8 mẫu đỉnh lãg lá nhỏ vùng gen *matK*

>D1

CCTTCGCTACTGGGTAAAAGATGCTTCTTCTTTGCATTTATTACGATTCTTTCTCCACGA
GTATTGTAATTGGAATACTCCAAATAAAGCCGGTCTTCTTCTTCAAAAAGAAATCAAAG
ACTATTCTTCTTCCTATATAATTCTCATCTATGTGAATACGAATCCATCTTCATCTTTCT
CCGTAACCAATCTTCTCATTTACGCTCAACATCTTCTGGAACCCCTTCTTGAACGAATATA
TTTCTATGGAAAAATAAAATATCTTGTAAGTCTTTGTTAAGGCTTTTCAAGTCAATCT
ATTGTTGTTGAAGGATCCTTTCATGCATTATGTTAGGTATCAAGGAAAATCAATTCTCGC
TTCAAAGGGACGCCCTTTTAAATGAAAAAATGGACATATTACTTTGTTAATTTATGGCA
ATGTCATTTTTACCTGTGGTCTCAACCGGGAAGGATCTGTATAAACCAATTATAACAATAA
TTCCCTCGACCTTCTGGGCTATCTATCAAGTGCGCGGCTAAACCCTTCAATGGTACGCGG
TCAAATGCTAGAAAATTCATTTCTAATTGATAATGCTATTAATAAGTTCGATACTTTTGT
TCCAATTATTCCTCTGATTGGATCATTGGCTAAAGCGAAATTTTGTA

>D2

CCTTCGCTACTGGGTAAAAGATGCTTCTTCTTTGCATTTATTACGATTCTTTCTCCACGA
GTATTGTAATTGGAATACTCCAAATAAAGCCGGTCTTCTTCTTCAAAAAGAAATCAAAG
ACTATTCTTCTTCCTATATAATTCTCATCTATGTGAATACGAATCCATCTTCATCTTTCT
CCGTAACCAATCTTCTCATTTACGCTCAACATCTTCTGGAACCCCTTCTTGAACGAATATA
TTTCTATGGAAAAATAAAATATCTTGTAAGTCTTTGTTAAGGCTTTTCAAGTCAATCT
ATTGTTGTTGAAGGATCCTTTCATGCATTATGTTAGGTATCAAGGAAAATCAATTCTCGC
TTCAAAGGGACGCCCTTTTAAATGAAAAAATGGACATATTACTTTGTTAATTTATGGCA
ATGTCATTTTTACCTGTGGTCTCAACCGGGAAGGATCTGTATAAACCAATTATAACAATAA
TTCCCTCGACCTTCTGGGCTATCTATCAAGTGCGCGGCTAAACCCTTCAATGGTACGCGG
TCAAATGCTAGAAAATTCATTTCTAATTGATAATGCTATTAATAAGTTCGATACTTTTGT
TCCAATTATTCCTCTGATTGGATCATTGGCTAAAGCGAAATTTTGTA

>D3

CCTTCGCTACTGGGTAAAAGATGCTTCTTCTTTGCATTTATTACGATTCTTTCTCCACGA
GTATTGTAATTGGAATACTCCAAATAAAGCCGGTCTTCTTCTTCAAAAAGAAATCAAAG
ACTATTCTTCTTCCTATATAATTCTCATCTATGTGAATACGAATCCATCTTCATCTTTCT
CCGTAACCAATCTTCTCATTTACGCTCAACATCTTCTGGAACCCCTTCTTGAACGAATATA
TTTCTATGGAAAAATAAAATATCTTGTAAGTCTTTGTTAAGGCTTTTCAAGTCAATCT
ATTGTTGTTGAAGGATCCTTTCATGCATTATGTTAGGTATCAAGGAAAATCAATTCTCGC
TTCAAAGGGACGCCCTTTTAAATGAAAAAATGGACATATTACTTTGTTAATTTATGGCA
ATGTCATTTTTACCTGTGGTCTCAACCGGGAAGGATCTGTATAAACCAATTATAACAATAA
TTCCCTCGACCTTCTGGGCTATCTATCAAGTGCGCGGCTAAACCCTTCAATGGTACGCGG

TCAAATGCTAGAAAATTCATTTCTAATTGATAATGCTATTAATAAGTTCGATACTTTTGT
TCCAATTATTCCTCTGATTGGATCATTGGCTAAAGCGAAATTTTGTA

>D4

CCTTCGCTACTGGGTAAAAGATGCTTCTTCTTTGCATTTATTACGATTCTTTCTCCACGA
GTATTGTAATTGGAATACTCCAAATAAAGCCGGTTCTTCTTCTTCAAAAAGAAATCAAAG
ACTATTCTTCTTCTATATAATTCTCATCTATGTGAATACGAATCCATCTTCATCTTTCT
CCGTAACCAATCTTCTCATTTACGCTCAACATCTTCTGGAACCCTTCTTGAACGAATATA
TTTCTATGGAAAAATAAAATATCTTGTAAGTCTTTGTTAAGGCTTTTCAAGTCAATCT
ATTGTTGTTGAAGGATCCTTTCATGCATTATGTTAGGTATCAAGGAAAATCAATTCTCGC
TTCAAAAAGGGACGCCCTTTTAAATGAAAAAATGGACATATTACTTTGTTAATTTATGGCA
ATGTCATTTTTACCTGTGGTCTCAACCGGGAAGGATCTGTATAAACCAATTATACAATAA
TTCCCTCGACCTTCTGGGCTATCTATCAAGTGCGCGGCTAAACCCTTCAATGGTACGCGG
TCAAATGCTAGAAAATTCATTTCTAATTGATAATGCTATTAATAAGTTCGATACTTTTGT
TCCAATTATTCCTCTGATTGGATCATTGGCTAAAGCGAAATTTTGTA

>D5

CCTTCGCTACTGGGTAAAAGATGCTTCTTCTTTGCATTTATTACGATTCTTTCTCCACGA
GTATTGTAATTGGAATACTCCAAATAAAGCCGGTTCTTCTTCTTCAAAAAGAAATCAAAG
ACTATTCTTCTTCTATATAATTCTCATCTATGTGAATACGAATCCATCTTCATCTTTCT
CCGTAACCAATCTTCTCATTTACGCTCAACATCTTCTGGAACCCTTCTTGAACGAATATA
TTTCTATGGAAAAATAAAATATCTTGTAAGTCTTTGTTAAGGCTTTTCAAGTCAATCT
ATTGTTGTTGAAGGATCCTTTCATGCATTATGTTAGGTATCAAGGAAAATCAATTCTCGC
TTCAAAAAGGGACGCCCTTTTAAATGAAAAAATGGACATATTACTTTGTTAATTTATGGCA
ATGTCATTTTTACCTGTGGTCTCAACCGGGAAGGATCTGTATAAACCAATTATACAATAA
TTCCCTCGACCTTCTGGGCTATCTATCAAGTGCGCGGCTAAACCCTTCAATGGTACGCGG
TCAAATGCTAGAAAATTCATTTCTAATTGATAATGCTATTAATAAGTTCGATACTTTTGT
TCCAATTATTCCTCTGATTGGATCATTGGCTAAAGCGAAATTTTGTA

>D6

CCTTCGCTACTGGGTAAAAGATGCTTCTTCTTTGCATTTATTACGATTCTTTCTCCACGA
GTATTGTAATTGGAATACTCCAAATAAAGCCGGTTCTTCTTCTTCAAAAAGAAATCAAAG
ACTATTCTTCTTCTATATAATTCTCATCTATGTGAATACGAATCCATCTTCATCTTTCT
CCGTAACCAATCTTCTCATTTACGCTCAACATCTTCTGGAACCCTTCTTGAACGAATATA
TTTCTATGGAAAAATAAAATATCTTGTAAGTCTTTGTTAAGGCTTTTCAAGTCAATCT
ATTGTTGTTGAAGGATCCTTTCATGCATTATGTTAGGTATCAAGGAAAATCAATTCTCGC
TTCAAAAAGGGACGCCCTTTTAAATGAAAAAATGGACATATTACTTTGTTAATTTATGGCA
ATGTCATTTTTACCTGTGGTCTCAACCGGGAAGGATCTGTATAAACCAATTATACAATAA
TTCCCTCGACCTTCTGGGCTATCTATCAAGTGCGCGGCTAAACCCTTCAATGGTACGCGG

TCAAATGCTAGAAAATTCATTTCTAATTGATAATGCTATTAATAAGTTCGATACTTTTGT
TCCAATTATTCCTCTGATTGGATCATTGGCTAAAGCGAAATTTTGTA

>D7

CCTTCGCTACTGGGTAAAAGATGCTTCTTCTTTGCATTTATTACGATTCTTTCTCCACGA
GTATTGTAATTGGAATACTCCAAATAAAGCCGGTTCTTCTTCTTCAAAAAGAAATCAAAG
ACTATTCTTCTTCTATATAATTCTCATCTATGTGAATACGAATCCATCTTCATCTTTCT
CCGTAACCAATCTTCTCATTTACGCTCAACATCTTCTGGAACCCTTCTTGAACGAATATA
TTTCTATGGAAAAATAAAATATCTTGTAAGTCTTTGTTAAGGCTTTTCAAGTCAATCT
ATTGTTGTTGAAGGATCCTTTCATGCATTATGTTAGGTATCAAGGAAAATCAATTCTCGC
TTCAAAAAGGGACGCCCTTTTAAATGAAAAAATGGACATATTACTTTGTTAATTTATGGCA
ATGTCATTTTTACCTGTGGTCTCAACCGGGAAGGATCTGTATAAACCAATTATAACAATA
TTCCCTCGACCTTCTGGGCTATCTATCAAGTGCGCGGCTAAACCCTTCAATGGTACGCGG
TCAAATGCTAGAAAATTCATTTCTAATTGATAATGCTATTAATAAGTTCGATACTTTTGT
TCCAATTATTCCTCTGATTGGATCATTGGCTAAAGCGAAATTTTGTA

>D8

CCTTCGCTACTGGGTAAAAGATGCTTCTTCTTTGCATTTATTACGATTCTTTCTCCACGA
GTATTGTAATTGGAATACTCCAAATAAAGCCGGTTCTTCTTCTTCAAAAAGAAATCAAAG
ACTATTCTTCTTCTATATAATTCTCATCTATGTGAATACGAATCCATCTTCATCTTTCT
CCGTAACCAATCTTCTCATTTACGCTCAACATCTTCTGGAACCCTTCTTGAACGAATATA
TTTCTATGGAAAAATAAAATATCTTGTAAGTCTTTGTTAAGGCTTTTCAAGTCAATCT
ATTGTTGTTGAAGGATCCTTTCATGCATTATGTTAGGTATCAAGGAAAATCAATTCTCGC
TTCAAAAAGGGACGCCCTTTTAAATGAAAAAATGGACATATTACTTTGTTAATTTATGGCA
ATGTCATTTTTACCTGTGGTCTCAACCGGGAAGGATCTGTATAAACCAATTATAACAATA
TTCCCTCGACCTTCTGGGCTATCTATCAAGTGCGCGGCTAAACCCTTCAATGGTACGCGG
TCAAATGCTAGAAAATTCATTTCTAATTGATAATGCTATTAATAAGTTCGATACTTTTGT
TCCAATTATTCCTCTGATTGGATCATTGGCTAAAGCGAAATTTTGTA

Trình tự 8 mẫu đỉnh lãg lá nhỏ vùng gen *rbcL*

>D1

ATTACAAATTGACTTATTATACTCCTGACTATGAAACCAAAGATACTGATATCTTGGCAG
CATTCCGAGTAACTCCTCAACCTGGAGTTCCACCTGAAGAAGCAGGGGCTGCGGTAGCTG
CCGAATCTTCTACTGGTACATGGACAACCTGTGTGGACCGATGGACTTACCAGCCTTGATC
GTTACAAAGGGCGATGCTACGGAATCGAGCCCGTTACTGGAGAAGAAAATCAATATATTG
CTTATGTAGCTTACCCATTAGACCTTTTTGAAGAGGGTTCTGTTACTAATATGTTTACTT
CCATTGTAGGTAATGTATTTGGGTTCAAAGCCCTGCGTGCTCTACGTCTGGAAGATCTGC
GAATCCCTGTTGCTTATATTAATAAACTTTCCAAGGACCGCCTCATGGCATCCAAGTTGAGA
GAGATAAATTGAACAAGTATGGTCGTCCCTATTGGGATGTAATAAACCTAAATTGG

GGTTATCTGCTAAAACTACGGTAGAGCGGTTTATGAATGTCTCCGTGGTGGACTTGATT
TTACCAAAGACGATGAGAACGTGAACTCCCAACCATTTATGCGTTGGAGAGATCGTTTCT
TATTTTGTGCCGAAGCACTTTTTAAAGCACAGGCTGAAACAGGTGAAATCAAAGGGCATT
ACTTTAATGCTACTGCGGGTACATGCGAAGAAATGATGAAAAGGGCTATGTGTGCCAGAG
AATTGGGAGTTCCTATCGTAATGCATGATTACTTAACAGGGGGATTCACTGCAAATACTA
CCTTGGCTCATTATTGCCGAGATAATGGCCTACTTCTTCACATCCACCGCGCAATGCATG
CAGTTATTGATAGACAGAAGAATCATGGTATGCACTTTCGTGTACTAGCTAAAGGGTTAC
GTATGTCTGGTGGAGATCATATTCACGCCGGTACCGTAGTAGGTAACTTGAAGGGGAAA
GAGACATCACTTTGGGCTTTGTTGATTTACTGCGTGATGATTTTCGTTGCAAAGATCGAA
GTCGCGGTATTTATTTACCCAAGATTGGGTCTCTCTACCAGGTGTTCTGCCCGTGGCTT
CGGGGGGTATTCACGTTTGGCATATGCCTGCTCTGACCGAGATCTTTGGGGATGATTCCG
TACTACAGTTCGGTGGAGGAACTTTAGGACACCCTTGGGGAAATGCACCCGGTGCCGTAG
CTAATCGAGTAGCTCTAGAAGCATGTGTACAAGCTCGTAATGAGGGACGTGATCTTGCTC
GTGAAGGTAATGAAATCATCCGTGAGGCTGCTAAATGGAGCCCTGAACTAGCTGCTGCTT
GTGAGGTATGGAAGGAGATCAAATTTGAATTTGAAGCAATGGATACTTTGTAATC

>D2

ATTACAAATTGACTTATTATACTCCTGACTATGAAACCAAAGATACTGATATCTTGGCAG
CATTCCGAGTAACTCCTCAACCTGGAGTTCACCTGAAGAAGCAGGGGCTGCGGTAGCTG
CCGAATCTTCTACTGGTACATGGACAACCTGTGTGGACCGATGGACTTACCAGCCTTGATC
GTTACAAAGGGCGATGCTACGGAATCGAGCCCGTTACTGGAGAAGAAAATCAATATATTG
CTTATGTAGCTTACCATTAGACCTTTTTGAAGAGGGTTCTGTTACTAATATGTTTACTT
CCATTGTAGGTAATGTATTTGGGTTCAAAGCCCTGCGTGCTCTACGTCTGGAAGATCTGC
GAATCCCTGTTGCTTATATTTAAACTTTCCAAGGACCGCCTCATGGCATCCAAGTTGAGA
GAGATAAATTGAACAAGTATGGTCGTCCCCTATTGGGATGTACTATTAACCTAAATTGG
GGTTATCTGCTAAAACTACGGTAGAGCGGTTTATGAATGTCTCCGTGGTGGACTTGATT
TTACCAAAGACGATGAGAACGTGAACTCCCAACCATTTATGCGTTGGAGAGATCGTTTCT
TATTTTGTGCCGAAGCACTTTTTAAAGCACAGGCTGAAACAGGTGAAATCAAAGGGCATT
ACTTTAATGCTACTGCGGGTACATGCGAAGAAATGATGAAAAGGGCTATGTGTGCCAGAG
AATTGGGAGTTCCTATCGTAATGCATGATTACTTAACAGGGGGATTCACTGCAAATACTA
CCTTGGCTCATTATTGCCGAGATAATGGCCTACTTCTTCACATCCACCGCGCAATGCATG
CAGTTATTGATAGACAGAAGAATCATGGTATGCACTTTCGTGTACTAGCTAAAGGGTTAC
GTATGTCTGGTGGAGATCATATTCACGCCGGTACCGTAGTAGGTAACTTGAAGGGGAAA
GAGACATCACTTTGGGCTTTGTTGATTTACTGCGTGATGATTTTCGTTGCAAAGATCGAA
GTCGCGGTATTTATTTACCCAAGATTGGGTCTCTCTACCAGGTGTTCTGCCCGTGGCTT
CGGGGGGTATTCACGTTTGGCATATGCCTGCTCTGACCGAGATCTTTGGGGATGATTCCG
TACTACAGTTCGGTGGAGGAACTTTAGGACACCCTTGGGGAAATGCACCCGGTGCCGTAG

CTAATCGAGTAGCTCTAGAAGCATGTGTACAAGCTCGTAATGAGGGACGTGATCTTGCTC
GTGAAGGTAATGAAATCATCCGTGAGGCTGCTAAATGGAGCCCTGAACTAGCTGCTGCTT
GTGAGGTATGGAAGGAGATCAAATTTGAATTTGAAGCAATGGATACTTTGTAATC

>D3

ATTACAAATTGACTTATTATACTCCTGACTATGAAACCAAAGATACTGATATCTTGGCAG
CATTCCGAGTAACTCCTCAACCTGGAGTTCCACCTGAAGAAGCAGGGGCTGCGGTAGCTG
CCGAATCTTCTACTGGTACATGGACAACCTGTGTGGACCGATGGACTTACCAGCCTTGATC
GTTACAAAGGGCGATGCTACGGAATCGAGCCCGTTACTGGAGAAGAAAATCAATATATTG
CTTATGTAGCTTACCCATTAGACCTTTTTGAAGAGGGTTCTGTTACTAATATGTTTACTT
CCATTGTAGGTAATGTATTTGGGTTCAAAGCCCTGCGTGCTCTACGTCTGGAAGATCTGC
GAATCCCTGTTGCTTATATTA AAACTTTCCAAGGACCGCCTCATGGCATCCAAGTTGAGA
GAGATAAATTGAACAAGTATGGTCGTCCCCTATTGGGATGTACTATTAACCTAAATTGG
GGTTATCTGCTAAAACTACGGTAGAGCGGTTTTATGAATGTCTCCGTGGTGGACTTGATT
TTACCAAAGACGATGAGAACGTGAACTCCCAACCATTTATGCGTTGGAGAGATCGTTTCT
TATTTTGTGCCGAAGCACTTTTTAAAGCACAGGCTGAAACAGGTGAAATCAAAGGGCATT
ACTTTAATGCTACTGCGGGTACATGCGAAGAAATGATGAAAAGGGCTATGTGTGCCAGAG
AATTGGGAGTTCCTATCGTAATGCATGATTACTTAACAGGGGGATTCACTGCAAATACTA
CCTTGGCTCATTATTGCCGAGATAATGGCCTACTTCTTCACATCCACCGCGCAATGCATG
CAGTTATTGATAGACAGAAGAATCATGGTATGCACCTTCGTGTACTAGCTAAAGGGTTAC
GTATGTCTGGTGGAGATCATATTCACGCCGGTACCGTAGTAGGTAACTTGAAGGGGAAA
GAGACATCACTTTGGGCTTTGTTGATTTACTGCGTGATGATTTTCGTTGCAAAGATCGAA
GTCGCGGTATTTATTTACCCAAGATTGGGTCTCTCTACCAGGTGTTCTGCCCCGTGGCTT
CGGGGGGTATTCACGTTTGGCATAATGCCTGCTCTGACCGAGATCTTTGGGGATGATTCCG
TACTACAGTTCGGTGGAGGAACTTTAGGACACCCTTGGGGAAATGCACCCGGTGCCGTAG
CTAATCGAGTAGCTCTAGAAGCATGTGTACAAGCTCGTAATGAGGGACGTGATCTTGCTC
GTGAAGGTAATGAAATCATCCGTGAGGCTGCTAAATGGAGCCCTGAACTAGCTGCTGCTT
GTGAGGTATGGAAGGAGATCAAATTTGAATTTGAAGCAATGGATACTTTGTAATC

>D4

ATTACAAATTGACTTATTATACTCCTGACTATGAAACCAAAGATACTGATATCTTGGCAG
CATTCCGAGTAACTCCTCAACCTGGAGTTCCACCTGAAGAAGCAGGGGCTGCGGTAGCTG
CCGAATCTTCTACTGGTACATGGACAACCTGTGTGGACCGATGGACTTACCAGCCTTGATC
GTTACAAAGGGCGATGCTACGGAATCGAGCCCGTTACTGGAGAAGAAAATCAATATATTG
CTTATGTAGCTTACCCATTAGACCTTTTTGAAGAGGGTTCTGTTACTAATATGTTTACTT
CCATTGTAGGTAATGTATTTGGGTTCAAAGCCCTGCGTGCTCTACGTCTGGAAGATCTGC
GAATCCCTGTTGCTTATATTA AAACTTTCCAAGGACCGCCTCATGGCATCCAAGTTGAGA
GAGATAAATTGAACAAGTATGGTCGTCCCCTATTGGGATGTACTATTAACCTAAATTGG

GGTTATCTGCTAAAACTACGGTAGAGCGGTTTATGAATGTCTCCGTGGTGGACTTGATT
TTACCAAAGACGATGAGAACGTGAACTCCCAACCATTTATGCGTTGGAGAGATCGTTTCT
TATTTTGTGCCGAAGCACTTTTTAAAGCACAGGCTGAAACAGGTGAAATCAAAGGGCATT
ACTTTAATGCTACTGCGGGTACATGCGAAGAAATGATGAAAAGGGCTATGTGTGCCAGAG
AATTGGGAGTTCCTATCGTAATGCATGATTACTTAACAGGGGGATTCACTGCAAATACTA
CCTTGGCTCATTATTGCCGAGATAATGGCCTACTTCTTCACATCCACCGCGCAATGCATG
CAGTTATTGATAGACAGAAGAATCATGGTATGCACTTTCGTGTACTAGCTAAAGGGTTAC
GTATGTCTGGTGGAGATCATATTCACGCCGGTACCGTAGTAGGTAACTTGAAGGGGAAA
GAGACATCACTTTGGGCTTTGTTGATTTACTGCGTGATGATTTTCGTTGCAAAGATCGAA
GTCGCGGTATTTATTTACCCAAGATTGGGTCTCTCTACCAGGTGTTCTGCCCGTGGCTT
CGGGGGGTATTCACGTTTGGCATATGCCTGCTCTGACCGAGATCTTTGGGGATGATTCCG
TACTACAGTTCGGTGGAGGAACTTTAGGACACCCTTGGGGAAATGCACCCGGTGCCGTAG
CTAATCGAGTAGCTCTAGAAGCATGTGTACAAGCTCGTAATGAGGGACGTGATCTTGCTC
GTGAAGGTAATGAAATCATCCGTGAGGCTGCTAAATGGAGCCCTGAACTAGCTGCTGCTT
GTGAGGTATGGAAGGAGATCAAATTTGAATTTGAAGCAATGGATACTTTGTAATC

>D5

ATTACAAATTGACTTATTATACTCCTGACTATGAAACCAAAGATACTGATATCTTGGCAG
CATTCCGAGTAACTCCTCAACCTGGAGTTCACCTGAAGAAGCAGGGGCTGCGGTAGCTG
CCGAATCTTCTACTGGTACATGGACAACCTGTGTGGACCGATGGACTTACCAGCCTTGATC
GTTACAAAGGGCGATGCTACGGAATCGAGCCCGTTACTGGAGAAGAAAATCAATATATTG
CTTATGTAGCTTACCATTAGACCTTTTTGAAGAGGGTTCTGTTACTAATATGTTTACTT
CCATTGTAGGTAATGTATTTGGGTTCAAAGCCCTGCGTGCTCTACGTCTGGAAGATCTGC
GAATCCCTGTTGCTTATATTA AAACTTTCCAAGGACCGCCTCATGGCATCCAAGTTGAGA
GAGATAAATTGAACAAGTATGGTCGTCCCCTATTGGGATGTACTATTAACCTAAATTGG
GGTTATCTGCTAAAACTACGGTAGAGCGGTTTATGAATGTCTCCGTGGTGGACTTGATT
TTACCAAAGACGATGAGAACGTGAACTCCCAACCATTTATGCGTTGGAGAGATCGTTTCT
TATTTTGTGCCGAAGCACTTTTTAAAGCACAGGCTGAAACAGGTGAAATCAAAGGGCATT
ACTTTAATGCTACTGCGGGTACATGCGAAGAAATGATGAAAAGGGCTATGTGTGCCAGAG
AATTGGGAGTTCCTATCGTAATGCATGATTACTTAACAGGGGGATTCACTGCAAATACTA
CCTTGGCTCATTATTGCCGAGATAATGGCCTACTTCTTCACATCCACCGCGCAATGCATG
CAGTTATTGATAGACAGAAGAATCATGGTATGCACTTTCGTGTACTAGCTAAAGGGTTAC
GTATGTCTGGTGGAGATCATATTCACGCCGGTACCGTAGTAGGTAACTTGAAGGGGAAA
GAGACATCACTTTGGGCTTTGTTGATTTACTGCGTGATGATTTTCGTTGCAAAGATCGAA
GTCGCGGTATTTATTTACCCAAGATTGGGTCTCTCTACCAGGTGTTCTGCCCGTGGCTT
CGGGGGGTATTCACGTTTGGCATATGCCTGCTCTGACCGAGATCTTTGGGGATGATTCCG
TACTACAGTTCGGTGGAGGAACTTTAGGACACCCTTGGGGAAATGCACCCGGTGCCGTAG

CTAATCGAGTAGCTCTAGAAGCATGTGTACAAGCTCGTAATGAGGGACGTGATCTTGCTC
GTGAAGGTAATGAAATCATCCGTGAGGCTGCTAAATGGAGCCCTGAACTAGCTGCTGCTT
GTGAGGTATGGAAGGAGATCAAATTTGAATTTGAAGCAATGGATACTTTGTAATC

>D6

ATTACAAATTGACTTATTATACTCCTGACTATGAAACCAAAGATACTGATATCTTGGCAG
CATTCCGAGTAACTCCTCAACCTGGAGTTCCACCTGAAGAAGCAGGGGCTGCGGTAGCTG
CCGAATCTTCTACTGGTACATGGACAACCTGTGTGGACCGATGGACTTACCAGCCTTGATC
GTTACAAAGGGCGATGCTACGGAATCGAGCCCGTTACTGGAGAAGAAAATCAATATATTG
CTTATGTAGCTTACCCATTAGACCTTTTTGAAGAGGGTTCTGTTACTAATATGTTTACTT
CCATTGTAGGTAATGTATTTGGGTTCAAAGCCCTGCGTGCTCTACGTCTGGAAGATCTGC
GAATCCCTGTTGCTTATATTA AAACTTTCCAAGGACCGCCTCATGGCATCCAAGTTGAGA
GAGATAAATTGAACAAGTATGGTCGTCCCCTATTGGGATGTACTATTAACCTAAATTGG
GGTTATCTGCTAAAACTACGGTAGAGCGGTTTATGAATGTCTCCGTGGTGGACTTGATT
TTACCAAAGACGATGAGAACGTGAACTCCCAACCATTTATGCGTTGGAGAGATCGTTTCT
TATTTTGTGCCGAAGCACTTTTTAAAGCACAGGCTGAAACAGGTGAAATCAAAGGGCATT
ACTTTAATGCTACTGCGGGTACATGCGAAGAAATGATGAAAAGGGCTATGTGTGCCAGAG
AATTGGGAGTTCCTATCGTAATGCATGATTACTTAACAGGGGGATTCACTGCAAATACTA
CCTTGGCTCATTATTGCCGAGATAATGGCCTACTTCTTCACATCCACCGCGCAATGCATG
CAGTTATTGATAGACAGAAGAATCATGGTATGCACCTTCGTGTACTAGCTAAAGGGTTAC
GTATGTCTGGTGGAGATCATATTCACGCCGGTACCGTAGTAGGTAACTTGAAGGGGAAA
GAGACATCACTTTGGGCTTTGTTGATTTACTGCGTGATGATTTTCGTTGCAAAGATCGAA
GTCGCGGTATTTATTTACCCAAGATTGGGTCTCTCTACCAGGTGTTCTGCCCGTGGCTT
CGGGGGTATTACGTTTGGCATAATGCCTGCTCTGACCGAGATCTTTGGGGATGATTCCG
TACTACAGTTCGGTGGAGGAACTTTAGGACACCCTTGGGGAAATGCACCCGGTGCCGTAG
CTAATCGAGTAGCTCTAGAAGCATGTGTACAAGCTCGTAATGAGGGACGTGATCTTGCTC
GTGAAGGTAATGAAATCATCCGTGAGGCTGCTAAATGGAGCCCTGAACTAGCTGCTGCTT
GTGAGGTATGGAAGGAGATCAAATTTGAATTTGAAGCAATGGATACTTTGTAATC

>D7

ATTACAAATTGACTTATTATACTCCTGACTATGAAACCAAAGATACTGATATCTTGGCAG
CATTCCGAGTAACTCCTCAACCTGGAGTTCCACCTGAAGAAGCAGGGGCTGCGGTAGCTG
CCGAATCTTCTACTGGTACATGGACAACCTGTGTGGACCGATGGACTTACCAGCCTTGATC
GTTACAAAGGGCGATGCTACGGAATCGAGCCCGTTACTGGAGAAGAAAATCAATATATTG
CTTATGTAGCTTACCCATTAGACCTTTTTGAAGAGGGTTCTGTTACTAATATGTTTACTT
CCATTGTAGGTAATGTATTTGGGTTCAAAGCCCTGCGTGCTCTACGTCTGGAAGATCTGC
GAATCCCTGTTGCTTATATTA AAACTTTCCAAGGACCGCCTCATGGCATCCAAGTTGAGA
GAGATAAATTGAACAAGTATGGTCGTCCCCTATTGGGATGTACTATTAACCTAAATTGG

GGTTATCTGCTAAAACTACGGTAGAGCGGTTTATGAATGTCTCCGTGGTGGACTTGATT
TTACCAAAGACGATGAGAACGTGAACTCCCAACCATTTATGCGTTGGAGAGATCGTTTCT
TATTTTGTGCCGAAGCACTTTTTAAAGCACAGGCTGAAACAGGTGAAATCAAAGGGCATT
ACTTTAATGCTACTGCGGGTACATGCGAAGAAATGATGAAAAGGGCTATGTGTGCCAGAG
AATTGGGAGTTCCTATCGTAATGCATGATTACTTAACAGGGGGATTCACTGCAAATACTA
CCTTGGCTCATTATTGCCGAGATAATGGCCTACTTCTTCACATCCACCGCGCAATGCATG
CAGTTATTGATAGACAGAAGAATCATGGTATGCACTTTCGTGTACTAGCTAAAGGGTTAC
GTATGTCTGGTGGAGATCATATTCACGCCGGTACCGTAGTAGGTAACTTGAAGGGGAAA
GAGACATCACTTTGGGCTTTGTTGATTTACTGCGTGATGATTTTCGTTGCAAAGATCGAA
GTCGCGGTATTTATTTACCCAAGATTGGGTCTCTCTACCAGGTGTTCTGCCCGTGGCTT
CGGGGGGTATTCACGTTTGGCATATGCCTGCTCTGACCGAGATCTTTGGGGATGATTCCG
TACTACAGTTCGGTGGAGGAACTTTAGGACACCCTTGGGGAAATGCACCCGGTGCCGTAG
CTAATCGAGTAGCTCTAGAAGCATGTGTACAAGCTCGTAATGAGGGACGTGATCTTGCTC
GTGAAGGTAATGAAATCATCCGTGAGGCTGCTAAATGGAGCCCTGAACTAGCTGCTGCTT
GTGAGGTATGGAAGGAGATCAAATTTGAATTTGAAGCAATGGATACTTTGTAATC

>D8

ATTACAAATTGACTTATTATACTCCTGACTATGAAACCAAAGATACTGATATCTTGGCAG
CATTCCGAGTAACTCCTCAACCTGGAGTTCACCTGAAGAAGCAGGGGCTGCGGTAGCTG
CCGAATCTTCTACTGGTACATGGACAACCTGTGTGGACCGATGGACTTACCAGCCTTGATC
GTTACAAAGGGCGATGCTACGGAATCGAGCCCGTTACTGGAGAAGAAAATCAATATATTG
CTTATGTAGCTTACCATTAGACCTTTTTGAAGAGGGTTCTGTTACTAATATGTTTACTT
CCATTGTAGGTAATGTATTTGGGTTCAAAGCCCTGCGTGCTCTACGTCTGGAAGATCTGC
GAATCCCTGTTGCTTATATTA AAACTTTCCAAGGACCGCCTCATGGCATCCAAGTTGAGA
GAGATAAATTGAACAAGTATGGTCGTCCCCTATTGGGATGTACTATTAACCTAAATTGG
GGTTATCTGCTAAAACTACGGTAGAGCGGTTTATGAATGTCTCCGTGGTGGACTTGATT
TTACCAAAGACGATGAGAACGTGAACTCCCAACCATTTATGCGTTGGAGAGATCGTTTCT
TATTTTGTGCCGAAGCACTTTTTAAAGCACAGGCTGAAACAGGTGAAATCAAAGGGCATT
ACTTTAATGCTACTGCGGGTACATGCGAAGAAATGATGAAAAGGGCTATGTGTGCCAGAG
AATTGGGAGTTCCTATCGTAATGCATGATTACTTAACAGGGGGATTCACTGCAAATACTA
CCTTGGCTCATTATTGCCGAGATAATGGCCTACTTCTTCACATCCACCGCGCAATGCATG
CAGTTATTGATAGACAGAAGAATCATGGTATGCACTTTCGTGTACTAGCTAAAGGGTTAC
GTATGTCTGGTGGAGATCATATTCACGCCGGTACCGTAGTAGGTAACTTGAAGGGGAAA
GAGACATCACTTTGGGCTTTGTTGATTTACTGCGTGATGATTTTCGTTGCAAAGATCGAA
GTCGCGGTATTTATTTACCCAAGATTGGGTCTCTCTACCAGGTGTTCTGCCCGTGGCTT
CGGGGGGTATTCACGTTTGGCATATGCCTGCTCTGACCGAGATCTTTGGGGATGATTCCG
TACTACAGTTCGGTGGAGGAACTTTAGGACACCCTTGGGGAAATGCACCCGGTGCCGTAG

CTAATCGAGTAGCTCTAGAAGCATGTGTACAAGCTCGTAATGAGGGACGTGATCTTGCTC
GTGAAGGTAATGAAATCATCCGTGAGGCTGCTAAATGGAGCCCTGAACTAGCTGCTGCTT
GTGAGGTATGGAAGGAGATCAAATTTGAATTTGAAGCAATGGATACTTTGTAATC

Trình tự 8 mẫu định lãg lá nhỏ vùng gen *trnH-psbA*

>D1

GTAATGCTCATAACTTCCCTCTAGACCTAGCTGCCGTTGAAGCTCCCTTTACAAAAGGAT
AAGACCCCGTTTTAGGGTATACGAGTTTTTTTTTTTGAATAAAAAGGAGCAATAACCTCT
TTCTTGTTCTATCAAGAGGGCGGTATTGCTCCTTTTTTTTATTTAGTAGTATTTGATAGTT
TCTTTAAACTTATTTTATTTAAAGAAAGGTCGTTTTCTTTTTATCGGTTGGTTCATGAGT
GAGTATCATGCTTTCGTTCTGTATTAATCCTTAATTTAGAATTTAGCTATTTTTTCCCAA
TCTTTTGGGAAGTTTTTTTTTTAAAGAAAAGATGAAAATGTTGGACTTTTTACTTAGTTA
AGTTAATACTTAATATTTTTATCTCGAAAAAAAAGAAAGATAAGAAAGAAATAATGATGA
TATGGTAAAAATTTAATCTTTTGAAACGTAAGGAAAAGAATAATAAGGGGGCGGATGTAC
CCAAGTGGATCAAGGCAGGGGATT

>D2

GTAATGCTCCTAACTTCCCTCTAGACCTAGCTGCCGTTGAAGCTCCCTTTACAAAAGGAT
AAGACCCCGTTTTAGGGTTTTCGAGTTTTTTTTTTTTGAAATAAAAAGGAGCAATAACCTC
TTCTTGTTTTATCAAGAGGGCGGTATTGCTCCTTTTTTTTATTTAGTAGTATTTGATAGT
TTCTTTAAACTTATTTTATTTAAAGAAAGGTCGTTTTCTTTTTATCGGTTGGTTCATGAG
TGAGTATCATGCTTTCGTTCTGTATTAATCATTAACTAGAATTTAGCTATTTCTTCCCA
ATCTTTTGGGAAGTTTTTTTTTTAAAGAAAAGATGAAAATGTTGGACTTTTTACTTAGTTA
AGTTAATACTTAATATTTTTATCTCGAAAAAAAAGAAAGATAAGAAAGAAATAATGATGA
TATGGTAAAAATTTAATCTTTTGAAACGTAAGGAAAAGAATAATAAGGGGGCGGATGTAC
CCAAGTGGATCAGGGCAGGGGATT

>D3

GTAATGCTCATAACTTCCCCCTAGACCTAGCTGCTGTTGAAGCTCCCTTTTCAAATGGAT
AAGACCCCGTTTTAGGGTTTACGAGTTTTTTTTTTTTGAAATAAAAAGGAGCAATAACCTCT
TTCTTGTTTTATCAAGAGGGCGGTATTGCTCCTTTTTTTTATTTAGTAGTATTTGATAGTT
TCTTTAAACTTATTTTATTTAAAGAAAGGTCGTTTTTTTTTTATCGGTTGGTTCCTGAGT
GAGTATCATGCTTTCGTTCTGTATTAATCATTAAATTTAGAATTTAGCTATTTTTTCCCAA
TCTTTTGGGAAGTTTTTTTTTTAAAGAAAAGATGAAAATGTTGGACTTTTTACTTAGTTA
AGTTAATACTTAATATTTTTATCTCGAAAAAAAAGAAAGATAAGAAAGAAATAATGATGA
TATGGTAAAAATTTAATCTTTTGAAACGTAAGGAAAAAATAATAAGGGGGCGGATGTAG
CCAAGTGGATCAAGGCAGTGAATT

>D4

GTAATGCTCATAACTTCCCTCTAGACCTAGCTGCCGTTGAAGCTCCATTTACAAAAGGAT

AAGACCCGGTTTTAGGGTTTACGAGTTTTTTTTTTGAAATAAAAAGGAGCAATAACCTCTT
TCTTGTTTTATCAAGAGGGCGGTATTGCTCCTTTTTTTATTTAGTAGTATTTGATAGTTT
CTTTAAACTTATTTTATTTAAAGAAAGGTCGTTTTTTTTTTATCGGTTGGTTCCTGAGTG
AGTATCATGCTTTCGTTTTGTATTAATCCTTAATTTAGAATTTAGCTATTTTTTCCCAAT
CTTTGGGAAGTTTTTTTTTTAAAGAAAAGATGAAAATGTTGGACTTTTTACTTAGTTAA
GTTAATACTTAATATTTTTATCTCGAAAAAAAAGAAAGATAAGAAAGAAATAATGATGAT
ATGGTAAAAATTTAATCTTTTGAAACGTAAGGAAAAAAATAATAAGGGGGCGGATGTACC
CAAGTGGATCAAGGCAGTGGATT

>D5

GTAATGCTCATAACTTCCCTCTAGACCTAGGTGCTGTTGAAGCTCCCTTTACAAAAGGAT
AAGACCCCGTTTTAGGGTTTACGAGTTTTTTTTTTGAAATAAAAAGGAGCAATAACCTCT
TTCTTGTTTTATCAAGAGGGCGGTATTGCTCCTTTTTTTATTTAGTAGTATTTGATAGTT
TCTTTAAACTTATTTTATTTAAAGAAAGGTCGTTTTTTTTTTATCGGTTGGTTCCTGAGT
GAGTATCATGCTTTCGTTTTGTTTTAATCCTTAATTTAGAATTTAGCTATTTTTTCCCAA
TCTTTGGGAAGTTTTTTTTTTAAAGAAAAGATGAAAATGTTGGACTTTTTACTTAGTTA
AGTTAATACTTAATATTTTTATCTCGAAAAAAAAGAAAGATAAGAAAGAAATAATGATGA
TATGGTAAAAATTTAATCTTTTGAAACGTAAGGAAAAAAATAATAAGGGGGCGGATGTAC
CCAAGTGGATCAAGGCAGTGGATT

>D6

GTAATGCTCATAACTTCCCTCTAGACCTAGCTGCTGTTGAAGCTCCCTTTACAAAAGGAT
AAGACCCCGTTTTAGGGTTTTTCGAGTTTTTTTTTTGAAATAAAAAGGAGCAATAACCTCT
TTCTTGTTTTATCAAGAGGGCGGTATTGCTCCTTTTTTTATTTAGTAGTATTTGATAGTT
TCTTTAAACTTATTTTATTTAAAGAAAGGTCGTTTTTTTTTTATCGGTTGGTTCATGAGT
GAGTATCATGCTTTCGTTCTGTATTAATCCTTAATTTAGAATTTAGCTATTTTTTCCCAA
TTTTTTGGGAAGTTTTTTTTTTAAAGAAAAGATGAAAATGTTGGACTTTTTACTTAGTTA
AGTTAATACTTAATATTTTTATCTCGAAAAAAAAGAAAGATAAGAAAGAAATAATGATGA
TATGGTAAAAATTTAATCTTTTGAAACGTAAGGAAAAAAATAATAAGGGGGCGGATGTAC
CCAAGTGGATCAAGGCAGTGGATT

>D7

GTAATGCTCCTAACTTCCCCCTAGACCTAGCTGCCGTTGAAGCTCCCTTTACAAAAGGAT
AAGACCCCGTTTTAGGGTTTTTCGAGTTTTTTTTTTGAAATAAAAAGGAGCAATAACCTCT
TTCTTGTTTTATCAAGAGGGCGGTATTGCTCCTTTTTTTATTTAGTAGTATTTGATAGTT
TCTTTAAACTTATTTTATTTAAAGAAAGGTCGTTTTTTTTTTATCGGTTGGTTCCTGAGT
GAGTATCATGCTTTCGTTTTGTATTAATCCTTAATTTAGAATTTAGCTATTTTTTCCCAA
TTTTTTGGGAAGTTTTTTTTTTAAAGAAAAGATGAAAATGTTGGACTTTTTACTTAGTTA
AGTTAATACTTAATATTTTTATCTCGAAAAAAAAGAAAGATAAGAAAGAAATAATGATGA

TATGGTAAAAATTTAATCTTTTGAAACGTAAGGAAAAAATAATAAGGGGGCGGATGTAG
CCAAGTGGATCAAGGCAGTGGATT

>D8

GTAATGCTCATAACTTCCCTCTAGACCTAGCTGCTCGTTGAAGCTCCCTTTACAAAAGGA
TAAGACCCGGTTTTAGGGTTTACGAGTTTTTTTTTTGAAATAAAAAGGAGCAATAACCTC
TTTCTTGTTTTATCAAGAGGGCGGTATTGCTCCTTTTTTTATTTAGTAGTATTTGATAGT
TTCTTTAAACTTATTTTTATTTAAAGAAAGGTCGTTTTCTTTTTATCGGTTGGTTCCTGAG
TGAGTATCATGCTTTCGTTCTGTATTAATCCTTAATTTAGAATTTAGCTATTTTTTCCCA
ATCTTTTGGGAAGTTTTTTTTTTAAAGAAAAGATGAAAATGTTGGACTTTTTACTTAGTT
AAGTTAATACTTAATATTTTTATCTCGAAAAAAGAAAGATAAGAAAGAAATAATGATG
ATATGGTAAAAATTTAATCTTTTGAAACGTAAGGAAAAAATAATAAGGGGGCGGATGTA
GCCAAGTGGATCAAGGCAGTGGATT

Một số ký hiệu nucleotide của các primer ISSR (Bảng 3.2)

Ký hiệu R = G hoặc A

Ký hiệu Y = T hoặc C

Ký hiệu V = A hoặc C hoặc G

Ký hiệu H = A hoặc C hoặc T

Phụ lục số liệu

1. Ảnh hưởng của nồng độ chất điều hòa sinh trưởng 2,4-D và 2 loại mô của cây đinh lăng *in vitro* đến quá trình tạo mô sẹo.

1.1. Ảnh hưởng của nồng độ chất điều hòa sinh trưởng 2,4-D đến tỷ lệ tạo sẹo của mẫu phiến lá và cuống lá cây đinh lăng *in vitro*

2 YEU TO HOAN TOAN NGAU NHIEN
The GLM Procedure
Dependent Variable: TL1

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	7	25125.26205	3589.32315	266.75	<.0001
Error	16	215.29073	13.45567		
Corrected Total	23	25340.55278			

R-Square 0.991504
Coeff Var 6.711447
Root MSE 3.668197
TL1 Mean 54.65583

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
A	1	219.37307	219.37307	16.30	0.0010
B	3	24776.14175	8258.71392	613.77	<.0001
A*B	3	129.74723	43.24908	3.21	0.0511

Alpha 0.01
Error Degrees of Freedom 16
Error Mean Square 13.45567
Number of Means 2
Critical Range 4.374
Means with the same letter are not significantly different.
Duncan Grouping Mean N A
A 57.679 12 1
B 51.633 12 2
Alpha 0.01
Error Degrees of Freedom 16
Error Mean Square 13.45567
Number of Means 2 3 4
Critical Range 6.186 6.452 6.626
Means with the same letter are not significantly different.
Duncan Grouping Mean N B
A 84.480 6 3
B 69.425 6 2
B 64.198 6 4
C 0.520 6 1

1.2. Ảnh hưởng của nồng độ chất điều hòa sinh trưởng 2,4-D đến đường kính mô sẹo của mẫu phiến lá và cuống lá cây đinh lăng *in vitro*

2 YEU TO HOAN TOAN NGAU NHIEN
The GLM Procedure
Dependent Variable: TL1

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	7	2.11133333	0.30161905	55.60	<.0001
Error	16	0.08680000	0.00542500		
Corrected Total	23	2.19813333			

R-Square 0.960512
Coeff Var 6.498935
Root MSE 0.073655
TL1 Mean 1.133333

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
A	1	0.48735000	0.48735000	89.83	<.0001
B	3	1.45243333	0.48414444	89.24	<.0001
A*B	3	0.17155000	0.05718333	10.54	0.0005

Alpha 0.01
Error Degrees of Freedom 16
Error Mean Square 0.005425
Number of Means 2
Critical Range .08783
Means with the same letter are not significantly different.
Duncan Grouping Mean N A

```

      A    1.27583    12    1
      B    0.99083    12    2
      Alpha    0.01
      Error Degrees of Freedom    16
      Error Mean Square    0.005425
      Number of Means    2    3    4
      Critical Range    .1242    .1295    .1330
      Means with the same letter are not significantly different.
      Duncan Grouping    Mean    N    B
      A    1.31833    6    3
      A    1.26333    6    2
      A    1.24167    6    4
      B    0.71000    6    1
      Alpha    0.01
      Error Degrees of Freedom    16
      Error Mean Square    0.005425
      Number of Means    2    3    4    5    6    7    8
      Critical Range    .1757    .1832    .1882    .1917    .1944    .1965    .1983
      Means with the same letter are not significantly different.
      Duncan Grouping    Mean    N    AB
      A    1.54000    3    1    3
      A    1.44000    3    1    2
      A    1.41333    3    1    4
      B    1.09667    3    2    3
      B    1.08667    3    2    2
      B    1.07000    3    2    4
      C    0.71000    3    1    1
      C    0.71000    3    2    1

```

1.3. Ảnh hưởng của nồng độ chất điều hòa sinh trưởng 2,4-D đến trọng lượng tươi của mô sẹ của mẫu phiến lá và cuống lá cây đinh lăng *in vitro*

2 YEU TO HOAN TOAN NGAU NHIEN
The GLM Procedure

Dependent Variable: TL1

```

      Sum of
      Source      DF      Squares    Mean Square    F Value    Pr > F
      Model        7    81106.00000    11586.57143    132.86    <.0001
      Error       16    1395.33333     87.20833
      Corrected Total    23    82501.33333
      R-Square    0.983087
      Coeff Var    8.620191
      Root MSE    9.338540
      TL1 Mean    108.3333
      Source      DF    Type III SS    Mean Square    F Value    Pr > F
      A            1    8588.16667     8588.16667     98.48    <.0001
      B            3    52749.00000    17583.00000    201.62    <.0001
      A*B          3    19768.83333     6589.61111     75.56    <.0001
      Alpha      0.01
      Error Degrees of Freedom    16
      Error Mean Square    87.20833
      Number of Means    2
      Critical Range    11.14
      Means with the same letter are not significantly different.
      Duncan Grouping    Mean    N    A
      A    127.250    12    1
      B    89.417    12    2
      Alpha    0.01
      Error Degrees of Freedom    16
      Error Mean Square    87.20833
      Number of Means    2    3    4
      Critical Range    15.75    16.42    16.87
      Means with the same letter are not significantly different.
      Duncan Grouping    Mean    N    B
      A    166.167    6    3
      B    136.667    6    2
      C    86.833    6    4
      D    43.667    6    1
      Alpha    0.01

```

	Error Degrees of Freedom	16
	Error Mean Square	87.20833
Number of Means	2 3 4 5 6 7 8	
Critical Range	22.27 23.23 23.86 24.31 24.65 24.92 25.14	
Means with the same letter are not significantly different.		
	Duncan Grouping	Mean N AB
	A	219.667 3 1 3
	B	177.333 3 1 2
	C	112.667 3 2 3
	D C	96.000 3 2 2
	D C	91.667 3 2 4
	D	82.000 3 1 4
	E	57.333 3 2 1
	F	30.000 3 1 1

2. Ảnh hưởng của nồng độ chất điều hòa sinh trưởng 2,4-D và 2 loại mô của cây đĩnh lăng ngoài vườn ươm đến quá trình tạo mô sẹo

2.1. Ảnh hưởng của nồng độ chất điều hòa sinh trưởng 2,4-D đến tỷ lệ tạo mô sẹo của mẫu phiến lá và cuống lá cây đĩnh lăng ngoài vườn ươm

2 YEU TO HOAN TOAN NGAU NHIEN
The GLM Procedure

Dependent Variable: TL1

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	7	20904.31636	2986.33091	197.30	<.0001
Error	16	242.17533	15.13596		
Corrected Total	23	21146.49170			
	R-Square	Coeff Var	Root MSE	TL1 Mean	
	0.988548	8.639227	3.890496	45.03292	

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
A	1	2906.86070	2906.86070	192.05	<.0001
B	3	17020.49655	5673.49885	374.84	<.0001
A*B	3	976.95911	325.65304	21.52	<.0001

Alpha 0.01

Error Degrees of Freedom 16

Error Mean Square 15.13596

Number of Means 2

Critical Range 4.639

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	A
A	56.038	12	1
B	34.028	12	2

Alpha 0.01

Error Degrees of Freedom 16

Error Mean Square 15.13596

Number of Means 2 3 4

Critical Range 6.561 6.843 7.027

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	B
A	69.047	6	3
B	61.138	6	2
C	49.427	6	4
D	0.520	6	1

Alpha 0.01

Error Degrees of Freedom 16

Error Mean Square 15.13596

Number of Means 2 3 4 5 6 7 8

Critical Range 9.28 9.68 9.94 10.13 10.27 10.38 10.47

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	AB
A	84.663	3	1 3
B	75.363	3	1 2
C	63.607	3	1 4
D	53.430	3	2 3

D	46.913	3	2	2
E	35.247	3	2	4
F	0.520	3	1	1
F	0.520	3	2	1

2.2. Ảnh hưởng của nồng độ chất điều hòa sinh trưởng 2,4-D đến đường kính mô sẹ của mẫu phiến lá và cuống lá cây đinh lăng ngoài vườn ươm

2 YEU TO HOAN TOAN NGAU NHIEN
The GLM Procedure

Dependent Variable: TL1

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	7	1.36502917	0.19500417	58.57	<.0001
Error	16	0.05326667	0.00332917		
Corrected Total	23	1.41829583			

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
A	1	0.18200417	0.18200417	54.67	<.0001
B	3	1.11961250	0.37320417	112.10	<.0001
A*B	3	0.06341250	0.02113750	6.35	0.0049

Alpha 0.01
Error Degrees of Freedom 16
Error Mean Square 0.003329
Number of Means 2
Critical Range .06880
Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	A
A	1.16750	12	1
B	0.99333	12	2

Alpha 0.01
Error Degrees of Freedom 16
Error Mean Square 0.003329
Number of Means 2 3 4
Critical Range .0973 .1015 .1042
Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	B
A	1.24000	6	3
A	1.21500	6	2
A	1.15667	6	4
B	0.71000	6	1

Alpha 0.01
Error Degrees of Freedom 16
Error Mean Square 0.003329
Number of Means 2 3 4 5 6 7 8
Critical Range .1376 .1435 .1474 .1502 .1523 .1540 .1553
Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	AB
A	1.37333	3	1 3
A	1.32000	3	1 2
A	1.26667	3	1 4
B	1.11000	3	2 2
B	1.10667	3	2 3
B	1.04667	3	2 4
C	0.71000	3	1 1
C	0.71000	3	2 1

2.3. Ảnh hưởng của nồng độ chất điều hòa sinh trưởng 2,4-D đến trọng lượng tươi của mô sẹ của mẫu phiến lá và cuống lá cây đinh lăng ngoài vườn ươm

The GLM Procedure

Dependent Variable: TL1

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
--------	----	----------------	-------------	---------	--------


```

Model          7  11491.29167  1641.61310  59.07  <.0001
Error          16  444.66667  27.79167
Corrected Total 23  11935.95833
R-Square      0.962746
Coeff Var    9.174962
Root MSE    5.271780
TL1 Mean    57.45833
Source        DF  Type III SS  Mean Square  F Value  Pr > F
A             1  2882.041667  2882.041667  103.70  <.0001
B             3  6286.791667  2095.597222  75.40  <.0001
A*B          3  2322.458333  774.152778  27.86  <.0001
Alpha                0.01
Error Degrees of Freedom  16
Error Mean Square      27.79167
Number of Means        2
Critical Range         6.286
Means with the same letter are not significantly different.
Duncan Grouping      Mean  N  A
A          68.417  12  1
B          46.500  12  2
Alpha                0.01
Error Degrees of Freedom  16
Error Mean Square      27.79167
Number of Means        2  3  4
Critical Range         8.890  9.272  9.522
Means with the same letter are not significantly different.
Duncan Grouping      Mean  N  B
A          76.167  6  3
A          67.500  6  2
B          52.667  6  4
C          33.500  6  1
Alpha                0.01
Error Degrees of Freedom  16
Error Mean Square      27.79167
Number of Means        2  3  4  5  6  7  8
Critical Range      12.57  13.11  13.47  13.72  13.91  14.07  14.19
Means with the same letter are not significantly different.
Duncan Grouping      Mean  N  AB
A          95.333  3  1  3
A          88.333  3  1  2
B          60.000  3  1  4
C B         57.000  3  2  3
C D         46.667  3  2  2
C D         45.333  3  2  4
E D          37.000  3  2  1
E           30.000  3  1  1

```

3. Ảnh hưởng của nồng độ BA và IBA đến cảm ứng tạo phôi từ mô sẹo

3.1. Ảnh hưởng của nồng độ BA và IBA đến sự cảm ứng tạo phôi vô tính ở cây đinh lăng lá nhỏ thời điểm 45 NSC

```

2 YEU TO HOAN TOAN NGAU NHIEN
The GLM Procedure
Dependent Variable: TL1
Sum of
Source        DF  Squares  Mean Square  F Value  Pr > F
Model        11  79.85596824  7.25963348  45.13  <.0001
Error        24  3.86044105  0.16085171
Corrected Total 35  83.71640929
R-Square      0.953887
Coeff Var    9.176943
Root MSE    0.401063
TL1 Mean    4.370336
Source        DF  Type III SS  Mean Square  F Value  Pr > F
A             3  66.44958059  22.14986020  137.70  <.0001
B             2  3.74282473  1.87141237  11.63  0.0003
A*B           6  9.66356292  1.61059382  10.01  <.0001
Alpha                0.01
Error Degrees of Freedom  24
Error Mean Square      0.160852
Number of Means        2  3  4
Critical Range         .5288  .5515  .5667

```

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	A
A	5.5684	9	4
A	5.3813	9	3
B	4.3808	9	2
C	2.1509	9	1

Alpha 0.01
Error Degrees of Freedom 24
Error Mean Square 0.160852
Number of Means 2 3
Critical Range .4580 .4776

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	B
A	4.7771	12	3
B A	4.3455	12	2
B	3.9884	12	1

Alpha 0.01
Error Degrees of Freedom 24
Error Mean Square 0.160852

Number of Means	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Critical Range	0.916	0.955	0.981	1.001	1.016	1.027	1.037	1.046	1.053	1.059	1.064

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	AB
A	5.7824	3	4 2
A	5.6075	3	3 2
A	5.5080	3	4 3
B A	5.4148	3	4 1
B A	5.3060	3	3 3
B A	5.2303	3	3 1
B C	4.4737	3	2 3
B C	4.4708	3	2 2
C	4.1978	3	2 1
C	3.8206	3	1 3
D	1.5214	3	1 2
D	1.1107	3	1 1

3.2. Ảnh hưởng của nồng độ BA và IBA đến tỷ lệ tạo chồi vô tính ở cây đinh lăng lá nhỏ thời điểm 60 NSC

2 YEU TO HOAN TOAN NGAU NHIEN
The GLM Procedure

Dependent Variable: TL1

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	11	75.58013266	6.87092115	41.34	<.0001
Error	24	3.98890282	0.16620428		
Corrected Total	35	79.56903548			

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
A	3	68.82351289	22.94117096	138.03	<.0001
B	2	3.48034507	1.74017253	10.47	0.0005
A*B	6	3.27627470	0.54604578	3.29	0.0167

Alpha 0.01
Error Degrees of Freedom 24
Error Mean Square 0.166204
Number of Means 2 3 4
Critical Range .5376 .5606 .5760

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	A
A	5.3344	9	4
B	4.5980	9	3
C	3.8078	9	2
D	1.6404	9	1

Alpha 0.01
Error Degrees of Freedom 24
Error Mean Square 0.166204
Number of Means 2 3
Critical Range .4655 .4855

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	B
A	4.2132	12	3
B A	3.8694	12	2
B	3.4528	12	1

Alpha 0.05
Error Degrees of Freedom 24
Error Mean Square 0.166204

Number of Means	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Critical Range	.6870	.7216	.7438	.7594	.7711	.7802	.7873	.7931	.7979	.8018	.8050

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	AB
A	5.4792	3	4
A	5.3231	3	4
A	5.2010	3	4
B A	4.8274	3	3
B A	4.8176	3	3
B C	4.1489	3	3
C	3.9407	3	2
C	3.8496	3	2
C	3.6330	3	2
D	2.7066	3	1
E	1.3863	3	1
E	0.8283	3	1

3.4. Ảnh hưởng của nồng độ BA và IBA đến tỷ lệ tạo phôi vô tính ở cây đinh lăng lá nhỏ

2 YEU TO HOAN TOAN NGAU NHIEN
The GLM Procedure

Dependent Variable: TL1

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	11	4145.121340	376.829213	11.58	<.0001
Error	24	780.997211	32.541550		
Corrected Total	35	4926.118551			

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
A	3	3108.740703	1036.246901	31.84	<.0001
B	2	477.588769	238.794384	7.34	0.0033
A*B	6	558.791868	93.131978	2.86	0.0301

Alpha 0.01
Error Degrees of Freedom 24
Error Mean Square 32.54155

Number of Means	2	3	4
Critical Range	7.522	7.845	8.060

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	A
A	57.260	9	4
B A	51.493	9	3
B	45.000	9	2
C	32.271	9	1

Alpha 0.01
Error Degrees of Freedom 24
Error Mean Square 32.54155

Number of Means	2	3
Critical Range	6.514	6.794

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	B
A	49.231	12	2
A	48.930	12	3
B	41.358	12	1

Alpha 0.05
Error Degrees of Freedom 24
Error Mean Square 32.54155

Number of Means	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Critical Range	9.61	10.10	10.41	10.63	10.79	10.92	11.02	11.10	11.16	11.22	11.26

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping		Mean	N	AB
A		61.923	3	4 2
B	A	55.075	3	4 1
B	A	54.782	3	4 3
B	A C	52.859	3	3 3
B	A C	52.775	3	3 2
B	D C	48.846	3	3 1
B	E D C	46.923	3	2 3
B	E D C	45.000	3	2 2
E	D C	43.077	3	2 1
E	D	41.154	3	1 3
E		37.225	3	1 2
F		18.435	3	1 1

4. Ảnh hưởng của nồng độ BA và NAA đến khả năng hình thành phôi từ mô sẹo

4.1. Ảnh hưởng của nồng độ BA và NAA đến sự cảm ứng tạo phôi vô tính ở cây đinh lăng lá nhỏ tại thời điểm 45 NSC

2 YEU TO HOAN TOAN NGAU NHIEN
The GLM Procedure
Dependent Variable: TL1

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	11	66.03317870	6.00301625	30.09	<.0001
Error	24	4.78765437	0.19948560		
Corrected Total	35	70.82083307			

R-Square 0.932398
Coeff Var 9.184659
Root MSE 0.446638
TL1 Mean 4.862871

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
A	3	51.39190806	17.13063602	85.87	<.0001
B	2	3.72851856	1.86425928	9.35	0.0010
A*B	6	10.91275208	1.81879201	9.12	<.0001

Alpha 0.01
Error Degrees of Freedom 24
Error Mean Square 0.199486
Number of Means 2 3 4
Critical Range .5889 .6142 .6311
Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping		Mean	N	A
A		5.8523	9	4
B	A	5.5419	9	3
B		5.2283	9	2
C		2.8290	9	1

Alpha 0.01
Error Degrees of Freedom 24
Error Mean Square 0.199486
Number of Means 2 3
Critical Range .5100 .5319
Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping		Mean	N	B
A		5.2342	12	3
B	A	4.9051	12	2
B		4.4493	12	1

Alpha 0.01
Error Degrees of Freedom 24
Error Mean Square 0.199486
Number of Means 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
Critical Range 1.020 1.064 1.093 1.114 1.131 1.144 1.155 1.164 1.172 1.179 1.185
Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping		Mean	N	AB
A		6.2933	3	4 2
B	A	5.6850	3	4 3
B	A	5.6184	3	3 2
B	A	5.5787	3	4 1
B	A	5.5390	3	3 3
B	A	5.4682	3	3 1
B	A	5.3916	3	2 2

B	A	5.1900	3	2	3
B		5.1032	3	2	1
B		4.5229	3	1	3
C		2.3169	3	1	2
C		1.6472	3	1	1

4.2. Ảnh hưởng của nồng độ BA và NAA đến sự cảm ứng tạo phôi vô tính ở cây đinh lăng lá nhỏ tại thời điểm 60 NSC

2 YEU TO HOAN TOAN NGAU NHIEN
The GLM Procedure

Dependent Variable: TL1

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	11	43.10610471	3.91873679	16.29	<.0001
Error	24	5.77363207	0.24056800		
Corrected Total	35	48.87973679			

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
A	3	33.99189663	11.33063221	47.10	<.0001
B	2	2.92953581	1.46476790	6.09	0.0073
A*B	6	6.18467227	1.03077871	4.28	0.0045

Alpha 0.01
Error Degrees of Freedom 24
Error Mean Square 0.240568
Number of Means 2 3 4
Critical Range .6467 .6745 .6930
Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping Mean N A

A	4.9346	9	4
B A	4.4776	9	3
B	3.8678	9	2
C	2.3598	9	1

Alpha 0.01
Error Degrees of Freedom 24
Error Mean Square 0.240568
Number of Means 2 3
Critical Range .5601 .5841
Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping Mean N B

A	4.2137	12	3
B A	3.9880	12	2
B	3.5281	12	1

Alpha 0.01
Error Degrees of Freedom 24
Error Mean Square 0.240568
Number of Means 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
Critical Range 1.120 1.168 1.200 1.224 1.242 1.257 1.269 1.279 1.287 1.295 1.301
Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping Mean N AB

A	5.1223	3	4	2
B A	4.9481	3	4	3
B A C	4.7333	3	4	1
B A C	4.5648	3	3	2
B A C	4.5142	3	3	3
B A C	4.3538	3	3	1
B A C	4.0935	3	2	2
B	3.7566	3	2	1
B	3.7535	3	2	3
C	3.6388	3	1	3
D	2.1716	3	1	2
D	1.2689	3	1	1

4.4. Ảnh hưởng của nồng độ BA và NAA đến tỷ lệ tạo phôi vô tính ở cây đinh lăng lá nhỏ

The GLM Procedure

Dependent Variable: TL1

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	11	4097.071650	372.461059	8.30	<.0001
Error	24	1076.904518	44.871022		
Corrected Total	35	5173.976168			

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
A	3	2410.641529	803.547176	17.91	<.0001
B	2	664.850594	332.425297	7.41	0.0031
A*B	6	1021.579528	170.263255	3.79	0.0084

Alpha 0.01

Error Degrees of Freedom 24

Error Mean Square 44.87102

Number of Means 2 3 4

Critical Range 8.833 9.212 9.465

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping Mean N A

A	58.500	9	4
B A	54.308	9	3
B	47.592	9	2
C	36.842	9	1

Alpha 0.01

Error Degrees of Freedom 24

Error Mean Square 44.87102

Number of Means 2 3

Critical Range 7.649 7.978

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping Mean N B

A	52.732	12	2
A	51.950	12	3
B	43.250	12	1

Alpha 0.01

Error Degrees of Freedom 24

Error Mean Square 44.87102

Number of Means 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

Critical Range 15.30 15.96 16.39 16.71 16.96 17.16 17.33 17.46 17.58 17.69 17.77

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping Mean N AB

A	63.930	3	4	2
B A	56.789	3	4	3
B A	55.075	3	3	3
B A	54.991	3	3	2
B A	54.782	3	4	1
B A	52.859	3	3	1
B A	48.930	3	2	3
B A	47.007	3	1	3
B A	46.923	3	2	2
B A	46.923	3	2	1
B	45.084	3	1	2
C	18.435	3	1	1

5. Kết quả ảnh hưởng của loại đường và hàm lượng đường đến khả năng tạo phôi của mẫu đỉnh lăng lá nhỏ ở 30 NSC

5.1. Kết quả ảnh hưởng của loại đường và hàm lượng đường đến số phôi của mẫu đỉnh lăng lá nhỏ ở 45 NSC

The GLM Procedure

Dependent Variable: SP

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
--------	----	----------------	-------------	---------	--------

Model	19	101516.1833	5342.9570	86.95	<.0001
Error	40	2458.0000	61.4500		
Corrected Total	59	103974.1833			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	SP Mean
0.976360	5.379621	7.839005	145.7167

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
A	3	23862.45000	7954.15000	129.44	<.0001
B	4	55763.76667	13940.94167	226.87	<.0001
A*B	12	21889.96667	1824.16389	29.69	<.0001

*Trắc nghiệm phân hạng yếu tố loại đường

The GLM Procedure

Duncan's Multiple Range Test for SP

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha	0.01
Error Degrees of Freedom	40
Error Mean Square	61.45

Number of Means	2	3	4
Critical Range	7.741	8.072	8.295

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	A
A	177.467	15	Su
B	147.267	15	Glu
C	132.667	15	Malt
C	125.467	15	Fru

*Trắc nghiệm phân hạng yếu tố hàm lượng đường

The GLM Procedure

Duncan's Multiple Range Test for SP

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha	0.01
Error Degrees of Freedom	40
Error Mean Square	61.45

Number of Means	2	3	4	5
Critical Range	8.655	9.025	9.274	9.458

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	B
A	194.167	12	40
B	156.083	12	50
B	149.000	12	30
C	125.917	12	20

D 103.417 12 10

*Trắc nghiệm phân hạng yếu tố loại đường x hàm lượng đường

The GLM Procedure

Duncan's Multiple Range Test for SP

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha 0.01
Error Degrees of Freedom 40
Error Mean Square 61.45

Number of Means	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Critical Range	17.31	18.05	18.55	18.92	19.21	19.44	19.64	19.80	19.95	20.08
Number of Means	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
Critical Range	20.19	20.29	20.38	20.46	20.54	20.60	20.67	20.72	20.78	

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	AB
A	287.000	3	Su 40
B	179.000	3	Glu 40
C B	170.333	3	Su 30
C B D	165.000	3	Malt 50
C B D	161.667	3	Su 50
C B D	161.333	3	Glu 30
C D	158.000	3	Fru 40
C E D	153.333	3	Su 20
C E D	152.667	3	Malt 40
C E D	152.000	3	Glu 50
F E D	145.667	3	Fru 50
F E	137.000	3	Glu 20
F E	134.667	3	Malt 30
F G	129.667	3	Fru 30
H G	115.000	3	Su 10

The GLM Procedure

Duncan's Multiple Range Test for SP

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	AB
H	110.667	3	Malt 20
H I	107.000	3	Glu 10
H I	102.667	3	Fru 20
H I	100.333	3	Malt 10
I	91.333	3	Fru 10

5.2. Kết quả ảnh hưởng của loại đường và hàm lượng đường đến số phôi của mẫu đỉnh lăng lá nhỏ ở 60 NSC

The GLM Procedure

Dependent Variable: SP

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	19	53872.31667	2835.38509	41.47	<.0001
Error	40	2734.66667	68.36667		

Corrected Total 59 56606.98333

R-Square Coeff Var Root MSE SP Mean
0.951690 6.631531 8.268414 124.6833

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
A	3	11155.25000	3718.41667	54.39	<.0001
B	4	38053.23333	9513.30833	139.15	<.0001
A*B	12	4663.83333	388.65278	5.68	<.0001

*Trắc nghiệm phân hạng yếu tố loại đường

The GLM Procedure

Duncan's Multiple Range Test for SP

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha 0.01
Error Degrees of Freedom 40
Error Mean Square 68.36667

Number of Means	2	3	4
Critical Range	8.165	8.514	8.749

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	A
A	144.800	15	Su
B	128.533	15	Glu
C	117.000	15	Malt
D	108.400	15	Fru

*Trắc nghiệm phân hạng yếu tố hàm lượng đường

The GLM Procedure

Duncan's Multiple Range Test for SP

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha 0.01
Error Degrees of Freedom 40
Error Mean Square 68.36667

Number of Means	2	3	4	5
Critical Range	9.129	9.519	9.782	9.976

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	B
A	158.500	12	40
B	138.417	12	50
B	131.917	12	30
C	109.250	12	20
D	85.333	12	10

*Trắc nghiệm phân hạng yếu tố loại đường x hàm lượng đường

The GLM Procedure

Duncan's Multiple Range Test for SP

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha 0.01
Error Degrees of Freedom 40
Error Mean Square 68.36667

Number of Means	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Critical Range	18.26	19.04	19.56	19.95	20.26	20.51	20.71	20.89	21.04	21.18
Number of Means	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
Critical Range	21.29	21.40	21.50	21.58	21.66	21.73	21.80	21.86	21.91	

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	AB
A	196.000	3	Su 40
B	159.000	3	Glu 40
C	153.667	3	Su 30
C	148.667	3	Malt 50
C	143.000	3	Glu 30
C	141.667	3	Fru 40
C	141.000	3	Su 50
C	137.333	3	Malt 40
C	136.333	3	Su 20
C	135.333	3	Glu 50
G	128.667	3	Fru 50
G	118.667	3	Malt 30
G	117.000	3	Glu 20
G	112.333	3	Fru 30
I	97.000	3	Su 10

The GLM Procedure

Duncan's Multiple Range Test for SP

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	AB
I	96.667	3	Malt 20
I	88.333	3	Glu 10
I	87.000	3	Fru 20
I	83.667	3	Malt 10
J	72.333	3	Fru 10

5.4 Kết quả ảnh hưởng của loại đường và hàm lượng đường đến tỷ lệ tạo phôi của mẫu dinh lăng lá nhỏ

The GLM Procedure
Dependent Variable: TLTP

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	19	2861.215100	150.590268	10.28	<.0001
Error	40	586.098133	14.652453		
Corrected Total	59	3447.313233			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	TLTP Mean
0.829984	7.976631	3.827852	47.98833

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
A	3	913.006113	304.335371	20.77	<.0001
B	4	1538.469717	384.617429	26.25	<.0001
A*B	12	409.739270	34.144939	2.33	0.0226

*Trắc nghiệm phân hạng yếu tố loại đường

The GLM Procedure

Duncan's Multiple Range Test for TLTP

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha	0.01
Error Degrees of Freedom	40
Error Mean Square	14.65245

Number of Means	2	3	4
Critical Range	3.780	3.942	4.050

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	A
A	53.947	15	Su
B	48.507	15	Fru
C B	46.183	15	Glu
C	43.316	15	Malt

*Trắc nghiệm phân hạng yếu tố nồng độ đường

The GLM Procedure

Duncan's Multiple Range Test for TLTP

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha	0.01
Error Degrees of Freedom	40
Error Mean Square	14.65245

Number of Means	2	3	4	5
Critical Range	4.226	4.407	4.529	4.619

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	B
A	53.448	12	40
B A	53.070	12	50
B	48.887	12	30
C	44.050	12	20
C	40.488	12	10

*Trắc nghiệm phân hạng loại đường x nồng độ đường

The GLM Procedure

Duncan's Multiple Range Test for TLTP

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	40
Error Mean Square	14.65245

Number of Means	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Critical Range	6.317	6.642	6.854	7.008	7.125	7.217	7.292	7.355	7.407	7.452

Number of Means	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Critical Range	7.491	7.524	7.553	7.578	7.600	7.620	7.637	7.652	7.666

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	AB
A	65.187	3	Su 40
A	63.677	3	Su 50
B	50.830	3	Glu 40
B	50.830	3	Su 30
B	50.830	3	Fru 50
B	50.830	3	Glu 50
B	50.830	3	Fru 30
B	50.830	3	Fru 40
C B	46.943	3	Su 20
C B	46.943	3	Malt 40
C B	46.943	3	Malt 50

C B	46.943	3	Glu	30
C B	46.943	3	Malt	30
C B	46.943	3	Fru	20
C D	43.100	3	Glu	20

6. Khảo sát nhân phân trên hệ thống nuôi cấy lỏng lắc

6.3 Ảnh hưởng của trọng lượng phân nuôi cấy ban đầu và tốc độ lắc để khả năng tăng sinh của phân vô tính cây đinh lăng lá nhỏ trên hệ thống nuôi cấy lỏng lắc tại thời điểm 30 NSC

Dependent Variable: TL3

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	5	52.47969444	10.49593889	67.29	<.0001
Error	12	1.87180000	0.15598333		
Corrected Total	17	54.35149444			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	TL3 Mean
0.965561	8.176021	0.394947	4.830556

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
A	1	40.35013889	40.35013889	258.68	<.0001
B	2	11.59147778	5.79573889	37.16	<.0001
A*B	2	0.53807778	0.26903889	1.72	0.2196

Alpha	0.01
Error Degrees of Freedom	12
Error Mean Square	0.155983
Number of Means	2
Critical Range	.5687

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	A
A	6.3278	9	2
B	3.3333	9	1

Alpha	0.01	
Error Degrees of Freedom	12	
Error Mean Square	0.155983	
Number of Means	2	3
Critical Range	.6965	.7262

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	B
A	5.7983	6	2
B	4.8600	6	3
C	3.8333	6	1

6.4 Ảnh hưởng của trọng lượng phân nuôi cấy ban đầu và tốc độ lắc để hệ số nhân sinh khối của phân vô tính cây đinh lăng lá nhỏ trên hệ thống nuôi cấy lỏng lắc tại thời điểm 30 NSC

The GLM Procedure
Class Level Information

Class	Levels	Values
A	2	1 2
B	3	1 2 3
AB	6	1 1 2 1 3 2 1 2 2 2 3

Number of Observations Read 18
Number of Observations Used 18

The GLM Procedure
Dependent Variable: TL3

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	5	24.36096111	4.87219222	14.66	<.0001
Error	12	3.98780000	0.33231667		
Corrected Total	17	28.34876111			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	TL3 Mean

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
A	1	0.51680556	0.51680556	1.56	0.2362
B	2	22.97547778	11.48773889	34.57	<.0001
A*B	2	0.86867778	0.43433889	1.31	0.3065

Duncan Grouping	Mean	N	A
A	7.6667	9	1
A	7.3278	9	2

Alpha	0.01		
Error Degrees of Freedom	12		
Error Mean Square	0.332317		
Number of Means	2 3		
Critical Range	1.017 1.060		
Means with the same letter are not significantly different.			
Duncan Grouping	Mean	N	B
A	8.8267	6	2
B	7.6000	6	3
C	6.0650	6	1

7. Ảnh hưởng tốc độ sục khí đến sự nhân phôi trong bioreactor

7.1 Ảnh hưởng tốc độ sục khí trong bioreactor đến trọng lượng tươi của phôi ở giai đoạn 30 NSC (mg)

The GLM Procedure

Dependent Variable: TLTCP

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	2	878.346689	439.173344	7.33	0.0245
Error	6	359.532867	59.922144		
Corrected Total	8	1237.879556			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	HSTS Mean
0.709557	3.852705	7.740940	200.9222

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
NT	2	878.3466889	439.1733444	7.33	0.0245

* Trắc nghiệm phân hạng

The GLM Procedure

Duncan's Multiple Range Test for TLTCP

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha	0.05		
Error Degrees of Freedom	6		
Error Mean Square	59.92214		
Number of Means	2 3		
Critical Range	15.47 16.03		
Means with the same letter are not significantly different.			
Duncan Grouping	Mean	N	NT
A	214.560	3	600
B	196.730	3	400
B	191.477	3	800

7.2. Ảnh hưởng tốc độ sục khí trong bioreactor đến hệ số gia tăng sinh khối của phôi ở giai đoạn 30 NSC (mg)

The GLM Procedure
Dependent Variable: HSNSK

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	2	10.00430186	5.00215093	7.33	0.0245
Error	6	4.09505193	0.68250866		
Corrected Total	8	14.09935379			

R-Square Coeff Var Root MSE HSNSK Mean
0.709557 3.852704 0.826141 21.44314

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
NT	2	10.00430186	5.00215093	7.33	0.0245

*Trắc nghiệm phân hạng

The GLM Procedure
Duncan's Multiple Range Test for HSNSK
NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha 0.05
Error Degrees of Freedom 6
Error Mean Square 0.682509

Number of Means 2 3
Critical Range 1.651 1.711
Means with the same letter are not significantly different.
Duncan Grouping Mean N NT
A 22.8986 3 600
B 20.9957 3 400
B 20.4351 3 800

8. Ảnh hưởng của kinetin và IBA đến khả năng tạo chồi, tạo cây từ phôi đơn

8.1 Kết quả số cây hữu hiệu

The GLM Procedure
Dependent Variable: SCHH

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	11	3292.972222	299.361111	22.17	<.0001
Error	24	324.000000	13.500000		
Corrected Total	35	3616.972222			

R-Square Coeff Var Root MSE SPHH Mean
0.910422 5.035114 3.674235 72.97222

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
A	3	595.638889	198.546296	14.71	<.0001
B	2	1787.722222	893.861111	66.21	<.0001
A*B	6	909.611111	151.601852	11.23	<.0001

*Trắc nghiệm phân hạng kinetin

The GLM Procedure
Duncan's Multiple Range Test for SPHH
NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha 0.01
Error Degrees of Freedom 24
Error Mean Square 13.5

Number of Means 2 3 4
Critical Range 4.845 5.053 5.191

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	A
A	77.000	9	0
A	75.889	9	0.5
A	72.444	9	1
B	66.556	9	1.5

* Trắc nghiệm phân hạng IBA

The GLM Procedure

Duncan's Multiple Range Test for SPHH

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha	0.01
Error Degrees of Freedom	24
Error Mean Square	13.5

Number of Means	2	3
Critical Range	4.196	4.376

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	B
A	79.417	12	0.2
A	76.333	12	0.1
B	63.167	12	0

* Trắc nghiệm phân hạng kinetin x IBA

The GLM Procedure

Duncan's Multiple Range Test for SCHH

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha	0.01
Error Degrees of Freedom	24
Error Mean Square	13.5

Number of Means	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Critical Range	8.391	8.752	8.992	9.168	9.304	9.413	9.503	9.579	9.644	9.701	9.750

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	AB
A	93.333	3	0.5 0.2
B	81.667	3	0 0.1
C B	79.000	3	1 0.1
C B	76.000	3	0 0.2
C B	75.667	3	1 0.2
C B	73.333	3	0 0
C B	73.000	3	0.5 0.1
C B	72.667	3	1.5 0.2
C	71.667	3	1.5 0.1
D	62.667	3	1 0
D	61.333	3	0.5 0
D	55.333	3	1.5 0

8.2 Kết quả số cây vô hiệu

Dependent Variable: SCVH		The GLM Procedure			
Source	DF	Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	11	745.6388889	67.7853535	23.24	<.0001
Error	24	70.0000000	2.9166667		
Corrected Total	35	815.6388889			
R-Square	0.914178	Coeff Var	4.784568	Root MSE	1.707825
				SPVH Mean	35.69444
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
A	3	421.6388889	140.5462963	48.19	<.0001
B	2	209.7222222	104.8611111	35.95	<.0001

A*B 6 114.277778 19.0462963 6.53 0.0003

***Trắc nghiệm phân hạng kinetin**

The GLM Procedure

Duncan's Multiple Range Test for SCVH

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha 0.01
 Error Degrees of Freedom 24
 Error Mean Square 2.916667

Number of Means 2 3 4
 Critical Range 2.252 2.349 2.413

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	A
A	40.6667	9	0
B	36.2222	9	0.5
B	34.7778	9	1
C	31.1111	9	1.5

*** Trắc nghiệm phân hạng IBA**

The GLM Procedure

Duncan's Multiple Range Test for SCVH

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha 0.01
 Error Degrees of Freedom 24
 Error Mean Square 2.916667

Number of Means 2 3
 Critical Range 1.950 2.034

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	B
A	38.3333	12	0.1
B	36.2500	12	0.2
C	32.5000	12	0

*** Trắc nghiệm phân hạng kinetin x IBA**

The GLM Procedure

Duncan's Multiple Range Test for SCVH

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha 0.01
 Error Degrees of Freedom 24
 Error Mean Square 2.916667

Number of Means 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
 Critical Range 3.900 4.068 4.179 4.261 4.324 4.375 4.417 4.453 4.483 4.509 4.532

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	AB
A	41.667	3	0
A	41.333	3	0.1
B A	40.333	3	0.5 0.1
B A	39.000	3	0 0.2
B A	38.000	3	1 0.1
B C	36.667	3	0.5 0.2
B C	36.667	3	1 0.2
D C	33.667	3	1.5 0.1
D C	32.667	3	1.5 0.2
D	31.667	3	0.5 0
D E	29.667	3	1 0
E	27.000	3	1.5 0

8.3 Kết quả tỷ lệ cây hữu hiệu

The GLM Procedure
Dependent Variable: TLCHH

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	11	147.1528306	13.3775301	6.12	0.0001
Error	24	52.4612667	2.1858861		
Corrected Total	35	199.6140972			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	TLPHH Mean
0.737187	2.203070	1.478474	67.10972

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
A	3	37.09620833	12.36540278	5.66	0.0045
B	2	39.10873889	19.55436944	8.95	0.0013
A*B	6	70.94788333	11.82464722	5.41	0.0012

*Trắc nghiệm phân hạng kinetin

The GLM Procedure
Duncan's Multiple Range Test for TLCHH
NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha	0.01
Error Degrees of Freedom	24
Error Mean Square	2.185886

Number of Means	2	3	4
Critical Range	1.949	2.033	2.089

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	A
A	68.0800	9	1.5
A	67.5767	9	1
A	67.3733	9	0.5
B	65.4089	9	0

*Trắc nghiệm phân hạng IBA

The GLM Procedure
Duncan's Multiple Range Test for TLCHH
NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha	0.01
Error Degrees of Freedom	24
Error Mean Square	2.185886

Number of Means	2	3
Critical Range	1.688	1.761

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	B
A	68.5658	12	0.2
B	66.5800	12	0.1
B	66.1833	12	0

*Trắc nghiệm phân hạng kinetin x IBA

The GLM Procedure
Duncan's Multiple Range Test for TLCHH
NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha	0.01
Error Degrees of Freedom	24
Error Mean Square	2.185886

Number of Means	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Critical Range	3.377	3.522	3.618	3.689	3.744	3.788	3.824	3.855	3.881	3.903	3.923

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	AB
A	71.797	3	0.5 0.2
B A	69.050	3	1.5 0.2
B C	68.033	3	1.5 0.1
B C	67.857	3	1 0
B C D	67.523	3	1 0.1
B C D	67.350	3	1 0.2
B C D	67.157	3	1.5 0
B C D	66.400	3	0 0.1
B C D	66.067	3	0 0.2
B C D	65.960	3	0.5 0
C D	64.363	3	0.5 0.1
D	63.760	3	0 0

9. Xác định loại môi trường thích hợp cho sự phát triển cây đinh lăng tạo từ phôi vô tính

9.1 Số lá

Số lá 84 NSC

Source	DF	Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	3	10.73333333	3.57777778	6.43	0.0159
Error	8	4.45333333	0.55666667		
Corrected Total	11	15.18666667			
		R-Square	Coeff Var	Root MSE	SOLA84NSC Mean
		0.706760	10.03723	0.746101	7.433333
Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
NT	3	10.73333333	3.57777778	6.43	0.0159
		Alpha			0.05
		Error Degrees of Freedom			8
		Error Mean Square			0.556667
		Duncan Grouping	Mean	N	NT
			A	8.8667	3 3
			B A	7.6667	3 2
			B	6.8000	3 1
B		6.4000	3	4	

9.2 Số rễ

Số rễ 84 NSC

Source	DF	Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	3	19.90666667	6.63555556	13.82	0.0016
Error	8	3.84000000	0.48000000		
Corrected Total	11	23.74666667			
		R-Square	Coeff Var	Root MSE	SORE84NSC Mean
		0.838293	11.48321	0.692820	6.033333
Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
NT	3	19.90666667	6.63555556	13.82	0.0016
		Alpha			0.01
		Error Degrees of Freedom			8
		Error Mean Square			0.48
		Duncan Grouping	Mean	N	NT
			A	7.7333	3 3
			B A	6.7333	3 2
			B C	5.2667	3 1
			C	4.4000	3 4

9.3 Chiều dài rễ

Source	DF	Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	3	19.98986667	6.66328889	26.98	0.0002

Error	8	1.9760000	0.2470000			
Corrected Total	11	21.9658667				
		R-Square	Coeff Var	Root MSE	CDR Mean	
		0.910042	11.96607	0.496991	4.153333	
Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F	
NT	3	19.9898667	6.6632889	26.98	0.0002	
		Alpha		0.01		
		Error Degrees of Freedom		8		
		Error Mean Square		0.247		
		Duncan Grouping	Mean	N	NT	
			A	6.1600	3	3
			B	4.3333	3	1
			C	3.3867	3	2
			C	2.7333	3	4

9.4 Chiều cao cây

Chiều cao cây 84 NSC

				Sum of		
Source	DF	Squares	Mean Square	F Value	Pr > F	
Model	3	0.4657000	0.1552333	5.50	0.0240	
Error	8	0.2256000	0.0282000			
Corrected Total	11	0.6913000				
		R-Square	Coeff Var	Root MSE	CCC84NSC Mean	
		0.673658	7.615808	0.167929	2.205000	
Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F	
NT	3	0.4657000	0.1552333	5.50	0.0240	
		Alpha		0.05		
		Error Degrees of Freedom		8		
		Error Mean Square		0.0282		
		Duncan Grouping	Mean	N	N	
			A	2.5000	3	3
			B	2.2667	3	2
			B	2.0467	3	1
			B	2.0067	3	4

9.5 Trọng lượng tươi

				Sum of		
Source	DF	Squares	Mean Square	F Value	Pr > F	
Model	3	5.16119367	1.72039789	4.23	0.0456	
Error	8	3.25116333	0.40639542			
Corrected Total	11	8.41235700				
		R-Square	Coeff Var	Root MSE	TLT Mean	
		0.613525	13.17812	0.637492	4.837500	
Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F	
NT	3	5.16119367	1.72039789	4.23	0.0456	
		Alpha		0.05		
		Error Degrees of Freedom		8		
		Error Mean Square		0.406395		
		Duncan Grouping	Mean	N	NT	
			A	5.9157	3	3
			B	4.7790	3	2
			B	4.4593	3	1
			B	4.1960	3	4

9.6 Trọng lượng khô

				Sum of		
Source	DF	Squares	Mean Square	F Value	Pr > F	
Model	3	0.02287025	0.00762342	6.28	0.0169	
Error	8	0.00970800	0.00121350			
Corrected Total	11	0.03257825				
		R-Square	Coeff Var	Root MSE	CCC Mean	
		0.702010	13.18272	0.034835	0.264250	
Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F	
NT	3	0.02287025	0.00762342	6.28	0.0169	
		Alpha		0.05		
		Error Degrees of Freedom		8		

Error Mean Square	0.001214
Duncan Grouping	Mean N NT
A	0.33333 3 3
B	0.26200 3 2
B	0.24833 3 1
B	0.21333 3 4

10. Ảnh hưởng của giá thể, chế độ che sáng đến sinh trưởng cây đinh lăng mới ra mô trong giai đoạn vườn ươm

10.1 Tỷ lệ sống

Dependent Variable: TLS

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	11	1110.973937	100.997631	20.45	<.0001
Error	24	118.518519	4.938272		
Corrected Total	35	1229.492456			
R-Square	0.903604	Coeff Var	3.079555	Root MSE	2.222222
				TL Mean	72.16049
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
A	2	280.1097395	140.0548697	28.36	<.0001
B	3	747.7366255	249.2455418	50.47	<.0001
A*B	6	83.1275720	13.8545953	2.81	0.0326
Alpha		0.01			
Error Degrees of Freedom	24				
Error Mean Square	4.938272				
Duncan Grouping	Mean N A				
A	75.9259 12 3				
B	71.2963 12 2				
B					
B	69.2593 12 1				
Alpha		0.01			
Error Degrees of Freedom	24				
Error Mean Square	4.938272				
Duncan Grouping	Mean N B				
A	78.272 9 1				
B	74.321 9 2				
C	69.877 9 3				
Alpha		0.05			
Error Degrees of Freedom	24				
Error Mean Square	4.938272				
Duncan Grouping	Mean N AB				
A	84.444 3 3 1				
B	79.259 3 3 2				
B	77.778 3 2 1				
C	72.593 3 2 2				
C	72.593 3 1 1				
D C	71.852 3 3 3				
D C	71.111 3 1 2				
D C E	68.889 3 2 3				
D C E	68.889 3 1 3				
D F E	68.148 3 3 4				
F E	65.926 3 2 4				
F	64.444 3 1 4				

10.2 Chiều cao cây

```

2 YEU TO HOAN TOAN NGAU NHIEN
The GLM Procedure
Class Level Information
Class Levels Values
A 3 1 2 3
B 4 1 2 3 4
Number of Observations Read 36
Number of Observations Used 36

```

Dependent Variable: CCC

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F						
Model	11	0.94235556	0.08566869	3.57	0.0044						
Error	24	0.57620000	0.02400833								
Corrected Total	35	1.51855556									
	R-Square	Coeff Var	Root MSE	TL Mean							
	0.620560	5.531599	0.154946	2.801111							
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F						
A	2	0.07593889	0.03796944	1.58	0.2264						
B	3	0.65237778	0.21745926	9.06	0.0003						
A*B	6	0.21403889	0.03567315	1.49	0.2252						
	Alpha		0.05								
	Error Degrees of Freedom		24								
	Error Mean Square		0.024008								
	Duncan Grouping	Mean	N	A							
	A	2.85750	12	2							
	A	2.80083	12	3							
	A	2.74500	12	1							
	Alpha		0.01								
	Error Degrees of Freedom		24								
	Error Mean Square		0.024008								
	Duncan Grouping	Mean	N	B							
	A	2.99556	9	1							
	B A	2.84333	9	2							
	B	2.73222	9	3							
	B	2.63333	9	4							
	Alpha		0.05								
	Error Degrees of Freedom		24								
	Error Mean Square		0.024008								
Number of Means	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Critical Range	.2611	.2742	.2827	.2886	.2931	.2965	.2992	.3014	.3032	.3047	.3059

Duncan Grouping	Mean	N	AB
A	3.0433	3	3
A	3.0367	3	2
B	2.9700	3	3
B	2.9067	3	1
B	2.8100	3	2
B	2.8033	3	2
B	2.7800	3	2
B	2.7567	3	1
B	2.7133	3	3
B	2.7033	3	1
D	2.6133	3	1
D	2.4767	3	3

10.3 Số lá

2 YEU TO HOAN TOAN NGAU NHIEN

The GLM Procedure

Class Level Information

Class	Levels	Values
A	3	1 2 3
B	4	1 2 3 4

Dependent Variable: SL

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	11	3.32083333	0.30189394	3.54	0.0046
Error	24	2.04666667	0.08527778		
Corrected Total	35	5.36750000			
	R-Square	Coeff Var	Root MSE	TL Mean	
	0.618693	5.929413	0.292024	4.925000	
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
A	2	0.98166667	0.49083333	5.76	0.0091
B	3	0.94305556	0.31435185	3.69	0.0258
A*B	6	1.39611111	0.23268519	2.73	0.0364
	The GLM Procedure				
	Duncan's Multiple Range Test for SL				

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

```

Alpha          0.01
Error Degrees of Freedom    24
Error Mean Square    0.085278
Duncan Grouping   Mean   N   A
A    5.0500    12   3
A    5.0333    12   2
B    4.6917    12   1

```

```

Alpha          0.05
Error Degrees of Freedom    24
Error Mean Square    0.085278
Duncan Grouping   Mean   N   B
A    5.0667    9   1
A    5.0333    9   2
A    4.9444    9   4
B    4.6556    9   3

```

```

Alpha          0.05
Error Degrees of Freedom    24
Error Mean Square    0.085278
Duncan Grouping   Mean   N   AB
A    5.1333    3   3   1
A    5.0667    3   3   2
A    5.0667    3   2   4
A    5.0667    3   1   1
A    5.0333    3   2   3
A    5.0333    3   2   2
A    5.0333    3   3   4
A    5.0000    3   2   1
A    5.0000    3   1   2
A    4.9667    3   3   3
A    4.7333    3   1   4
B    3.9667    3   1   3

```

10.4 Trọng lượng cây tươi

The GLM Procedure
Dependent Variable: TLT

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	11	34176.1475	3106.9225	0.80	0.6421
Error	24	93600.0000	3900.0000		
Corrected Total	35	127776.1475			

Source	R-Square	Coeff Var	Root MSE	TLT Mean	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
A	0.267469	7.350443	62.44998	849.6083	2	9147.24500	4573.62250	1.17	0.3266
B					3	18847.96750	6282.65583	1.61	0.2130
A*B					6	6180.93500	1030.15583	0.26	0.9483

10.5 Trọng lượng cây khô

The GLM Procedure
Dependent Variable: TLK

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	11	317.690000	28.880909	0.78	0.6561
Error	24	888.000000	37.000000		
Corrected Total	35	1205.690000			

Source	R-Square	Coeff Var	Root MSE	TLK Mean	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
A	0.263492	6.937194	6.082763	87.68333	2	39.620000	19.810000	0.54	0.5923
B					3	158.330000	52.776667	1.43	0.2596

A*B 6 119.740000 19.956667 0.54 0.7730

11. Ảnh hưởng của giá thể và liều lượng đạm đến sinh trưởng của cây đinh lăng vô bầu trong giai đoạn vườn ươm

11.1 Chiều cao cây

Chiều cao cây 70 NST

Dependent Variable: CCC

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F	
Model	11	10.19270000	0.92660909	14.06	<.0001	
Error	24	1.58180000	0.06590833			
Corrected Total	35	11.77450000				
	R-Square	Coeff Var	Root MSE	TL Mean		
	0.865659	2.329991	0.256726	11.01833		
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F	
A	2	0.05795000	0.02897500	0.44	0.6494	
B	3	3.51930000	1.17310000	17.80	<.0001	
A*B	6	6.61545000	1.10257500	16.73	<.0001	
	Alpha		0.05			
	Error Degrees of Freedom		24			
	Error Mean Square		0.065908			
	Duncan Grouping	Mean	N	A		
	A	11.0550	12	3		
	A	11.0375	12	2		
	A	10.9625	12	1		
	Alpha		0.01			
	Error Degrees of Freedom		24			
	Error Mean Square		0.065908			
	Duncan Grouping	Mean	N	B		
	A	11.5367	9	2		
	B	10.9867	9	3		
	B	10.8133	9	4		
	B	10.7367	9	1		
	Alpha		0.01			
	Error Degrees of Freedom		24			
	Error Mean Square		0.065908			
	Duncan Grouping	Mean	N	AB		
	A	12.3400	3	3	2	
	B	11.4100	3	2	3	
	B	11.3900	3	1	2	
	C	B	11.3000	3	1	4
	C	B D	11.0900	3	3	3
	C	B D	10.9600	3	2	1
	C	B D	10.9000	3	2	4
	C	E B D	10.8800	3	2	2
	C	E D	10.7000	3	1	1
	E	D	10.5500	3	3	1
	E	D	10.4600	3	1	3
	E		10.2400	3	3	4

11.2 Số lá/cây

Số lá/cây 70 NST

Dependent Variable: S0 LA

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	11	1.87888889	0.17080808	4.24	0.0015
Error	24	0.96666667	0.04027778		
Corrected Total	35	2.84555556			
	R-Square	Coeff Var	Root MSE	TL Mean	
	0.660289	3.965399	0.200693	5.061111	
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
A	2	0.11555556	0.05777778	1.43	0.2579

B	3	0.63444444	0.21148148	5.25	0.0063
A*B	6	1.12888889	0.18814815	4.67	0.0028
Alpha 0.05					
Error Degrees of Freedom 24					
Error Mean Square 0.040278					
Duncan Grouping Mean N A					
A	5.11667	12	2		
A	5.08333	12	3		
A	4.98333	12	1		
Alpha 0.01					
Error Degrees of Freedom 24					
Error Mean Square 0.040278					
Duncan Grouping Mean N B					
A	5.28889	9	2		
B	5.00000	9	1		
B	5.00000	9	3		
Alpha 0.01					
Error Degrees of Freedom 24					
Error Mean Square 0.040278					
Duncan Grouping Mean N AB					
A	5.4000	3	2	2	
A	5.4000	3	3	2	
A	5.2667	3	1	3	
B A	5.1333	3	3	1	
B A	5.1333	3	3	4	
B A	5.0667	3	1	2	
B A	5.0667	3	2	3	
B A	5.0667	3	2	4	
B A	4.9333	3	2	1	
B A	4.9333	3	1	1	
B	4.6667	3	3	3	
B	4.6667	3	1	4	

11.3 S^ó r^ẽ

Dependent Variable: SO RE

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	11	72.66666667	6.60606061	7.43	<.0001
Error	24	21.33333333	0.88888889		
Corrected Total	35	94.00000000			
R-Square		Coeff Var	Root MSE	TL Mean	
	0.773050	14.14214	0.942809	6.66667	
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
A	2	9.50000000	4.75000000	5.34	0.0120
B	3	36.22222222	12.07407407	13.58	<.0001
A*B	6	26.94444444	4.49074074	5.05	0.0018
Alpha 0.05					
Error Degrees of Freedom 24					
Error Mean Square 0.888889					
Duncan Grouping Mean N A					
A	7.3333	12	3		
B A	6.5833	12	2		
B	6.0833	12	1		
Alpha 0.01					
Error Degrees of Freedom 24					
Error Mean Square 0.888889					
Duncan Grouping Mean N B					
A	7.6667	9	3		
A	7.6667	9	2		
B	5.7778	9	4		
B	5.5556	9	1		
Alpha 0.01					
Error Degrees of Freedom 24					
Error Mean Square 0.888889					
Duncan Grouping Mean N AB					
A	8.6667	3	3	2	
B A	8.0000	3	1	3	
B A	7.6667	3	3	1	
B A	7.6667	3	1	2	

1

B	A	7.6667	3	2	3		
B	A	C	7.3333	3	3	3	
B	D	A	C	7.0000	3	2	4
B	D	A	C	6.6667	3	2	2
B	D	E	C	5.6667	3	3	4
D	E	C	5.0000	3	2	1	
D	E		4.6667	3	1	4	
E			4.0000	3	1	1	

11.4 Chiều dài rễ

Dependent Variable: CDR

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	11	135.4418750	12.3128977	2.07	0.0655
Error	24	142.4550000	5.9356250		
Corrected Total	35	277.8968750			
	R-Square	Coeff Var	Root MSE	TL Mean	
	0.487382	16.74922	2.436314	14.54583	
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
A	2	13.38875000	6.69437500	1.13	0.3403
B	3	66.33187500	22.11062500	3.73	0.0249
A*B	6	55.72125000	9.28687500	1.56	0.2006
	Alpha	0.05			
	Error Degrees of Freedom	24			
	Error Mean Square	5.935625			
	Duncan Grouping	Mean	N	A	
	A	15.2500	12	3	
	A	14.6250	12	2	
	A	13.7625	12	1	
	Alpha	0.05			
	Error Degrees of Freedom	24			
	Error Mean Square	5.935625			
	Duncan Grouping	Mean	N	B	
	A	16.617	9	2	
	B	14.783	9	3	
	B	13.817	9	1	
	B	12.967	9	4	
	Alpha	0.05			
	Error Degrees of Freedom	24			
	Error Mean Square	5.935625			
	Duncan Grouping	Mean	N	AB	
	A	19.550	3	3	2
	B	16.300	3	2	2
	B	16.200	3	2	3
	B	15.200	3	3	1
	B	14.200	3	3	3
	B	14.000	3	1	2
	B	13.950	3	1	3
	B	13.650	3	1	4
	B	13.450	3	1	1
	B	13.200	3	2	4
	B	12.800	3	2	1
	B	12.050	3	3	4

11.6 Trọng lượng thân lá tươi

Dependent Variable: KLTT

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	11	1362.389910	123.853628	10.84	<.0001
Error	24	274.115836	11.421493		
Corrected Total	35	1636.505746			
	R-Square	Coeff Var	Root MSE	TL Mean	
	0.832499	14.99024	3.379570	22.54514	
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
A	2	149.3020250	74.6510125	6.54	0.0054
B	3	423.8744265	141.2914755	12.37	<.0001
A*B	6	789.2134588	131.5355765	11.52	<.0001

The GLM Procedure

Duncan's Multiple Range Test for KLTT

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha	0.01		
Error Degrees of Freedom	24		
Error Mean Square	11.42149		
Number of Means	2	3	
Critical Range	3.859	4.025	
Duncan Grouping	Mean	N	A
A	25.352	12	2
B A	21.700	12	1
B	20.584	12	3
Alpha	0.01		
Error Degrees of Freedom	24		
Error Mean Square	11.42149		
Number of Means	2	3	4
Critical Range	4.456	4.648	4.775
Means with the same letter are not significantly different.			
Duncan Grouping	Mean	N	B
A	26.543	9	2
B A	24.831	9	3
B C	21.155	9	1
C	17.651	9	4
Alpha	0.01		
Error Degrees of Freedom	24		
Error Mean Square	11.42149		
Duncan Grouping	Mean	N	AB
A	27.772	3	3
A	27.350	3	2
A	27.182	3	1
A	26.943	3	3
A	26.707	3	1
A	25.152	3	2
A	25.081	3	2
A	23.826	3	2
B A	20.213	3	1
B A	19.962	3	3
B C	12.698	3	1
C	7.659	3	3

11.7 Trọng lượng rễ tươi

Dependent Variable: KLRT

		Sum of			
Source	DF	Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	11	43.26607050	3.93327914	26.95	<.0001
Error	24	3.50253900	0.14593913		
Corrected Total	35	46.76860950			
R-Square		Coeff Var	Root MSE	TL Mean	
	0.925109	8.531989	0.382020	4.477500	
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
A	2	1.02388763	0.51194381	3.51	0.0461
B	3	16.82766650	5.60922217	38.44	<.0001
A*B	6	25.41451638	4.23575273	29.02	<.0001
Alpha	0.05				
Error Degrees of Freedom	24				
Error Mean Square	0.145939				
Number of Means	2	3			
Critical Range	.3219	.3381			
Duncan Grouping	Mean	N	A		
A	4.6448	12	2		
B A	4.5411	12	3		
B	4.2466	12	1		
Alpha	0.01				
Error Degrees of Freedom	24				
Error Mean Square	0.145939				
Duncan Grouping	Mean	N	B		
A	5.4455	9	2		
B	4.5383	9	3		

B	4.4102	9	1
C	3.5160	9	4
Alpha			0.01
Error	Degrees of Freedom		24
Error	Mean Square		0.145939
Duncan	Grouping	Mean	N AB
A	6.5455	3	3 2
B A	5.7105	3	3 1
B	5.4715	3	2 2
B C	4.9470	3	1 3
B C	4.8965	3	2 3
D C	4.3500	3	2 4
D C	4.3195	3	1 2
D C	4.0610	3	1 4
D	3.8610	3	2 1
D	3.7715	3	3 3
D	3.6590	3	1 1
E	2.1370	3	3 4

11.8 Tỷ lệ xuất vườn

Dependent Variable: TLXV

		Sum of			
Source	DF	Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	11	4563.559031	414.869003	11.00	<.0001
Error	24	905.168733	37.715364		
Corrected Total	35	5468.727764			
R-Square		Coeff Var	Root MSE	CCC Mean	
0.834483		8.325126	6.141284	73.76806	
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
A	2	768.021956	384.010978	10.18	0.0006
B	3	3384.096742	1128.032247	29.91	<.0001
A*B	6	411.440333	68.573389	1.82	0.1379
Alpha					0.01
Error	Degrees of Freedom				24
Error	Mean Square				37.71536
Duncan	Grouping	Mean	N A		
A	78.706	12	3		
A	75.003	12	2		
B	67.596	12	1		
Alpha					0.01
Error	Degrees of Freedom				24
Error	Mean Square				37.71536
Duncan	Grouping	Mean	N B		
A	85.187	9	3		
A	81.483	9	2		
B	65.436	9	4		
B	62.967	9	1		
Alpha					0.05
Error	Degrees of Freedom				24
Error	Mean Square				37.71536
Duncan	Grouping	Mean	N AB		
A	92.593	3	3 2		
A	88.890	3	2 3		
A	85.187	3	3 3		
B A	81.483	3	2 2		
B A	81.483	3	1 3		
B C	70.373	3	1 2		
B C	70.373	3	3 1		
D C	66.670	3	3 4		
D C	66.670	3	2 4		
D C	62.967	3	2 1		
D C	62.967	3	1 4		
D	55.560	3	1 1		

12. Ảnh hưởng của giá thể và liều lượng lân đến sinh trưởng của cây đinh lăng vô bầu trong giai đoạn vườn ươm

12.1 Chiều cao cây

Chiều cao cây 50 NST

Dependent Variable: CCC

Source	DF	Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	11	4.13090000	0.37553636	3.47	0.0052
Error	24	2.59400000	0.10808333		
Corrected Total	35	6.72490000			
	R-Square	Coeff Var	Root MSE	CCC Mean	
	0.614269	3.985779	0.328760	8.248333	
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
G	2	0.87251667	0.43625833	4.04	0.0308
H	3	2.51087778	0.83695926	7.74	0.0009
G*H	6	0.74750556	0.12458426	1.15	0.3635
	Alpha	0.05			
	Error Degrees of Freedom	24			
	Error Mean Square	0.108083			
Duncan Grouping	Mean	N	G		
A	8.4658	12	3		
B	8.1692	12	1		
B	8.1100	12	2		
	Alpha	0.01			
	Error Degrees of Freedom	24			
	Error Mean Square	0.108083			
Duncan Grouping	Mean	N	H		
A	8.5644	9	2		
B A	8.4422	9	3		
B C	8.0689	9	4		
C	7.9178	9	1		
	Alpha	0.05			
	Error Degrees of Freedom	24			
	Error Mean Square	0.108083			
Duncan Grouping	Mean	N	GH		
A	8.9333	3	3	2	
B A	8.6267	3	3	3	
B A	8.5733	3	2	2	
B A C	8.3933	3	1	3	
B D C	8.3067	3	2	3	
B D C	8.2633	3	3	4	
B D C	8.2233	3	1	4	
B D C	8.1867	3	1	2	
B D C	8.0400	3	3	1	
D C	7.8733	3	1	1	
D C	7.8400	3	2	1	
D	7.7200	3	2	4	

12.2 Số lá

Số lá 50 NST

Dependent Variable: SO LA

Source	DF	Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	11	5.06515556	0.46046869	6.46	<.0001
Error	24	1.71040000	0.07126667		
Corrected Total	35	6.77555556			
	R-Square	Coeff Var	Root MSE	SO LA Mean	
	0.747563	3.979171	0.266958	6.708889	
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
G	2	0.52975556	0.26487778	3.72	0.0392
H	3	3.22462222	1.07487407	15.08	<.0001
G*H	6	1.31077778	0.21846296	3.07	0.0226
	Alpha	0.05			
	Error Degrees of Freedom	24			
	Error Mean Square	0.071267			
Duncan Grouping	Mean	N	G		
A	6.8667	12	3		
B A	6.6883	12	1		
B	6.5717	12	2		
	Alpha	0.01			

```

Error Degrees of Freedom 24
Error Mean Square 0.071267
Duncan Grouping Mean N H
A 6.9756 9 2
A 6.9689 9 3
A 6.6467 9 4
B 6.2444 9 1
Alpha 0.05
Error Degrees of Freedom 24
Error Mean Square 0.071267
Duncan Grouping Mean N GH
A 7.3333 3 3 2
B A 7.1933 3 3 3
B A 6.9867 3 1 4
B A 6.9067 3 2 2
B A 6.8933 3 1 3
B C 6.8200 3 2 3
B C 6.7333 3 3 4
B C D 6.6867 3 1 2
E C D 6.3400 3 2 1
E D 6.2200 3 2 4
E D 6.2067 3 3 1
E 6.1867 3 1 1

```

12.3 Số Rẽ

Dependent Variable: SO RE

```

Sum of
Source DF Squares Mean Square F Value Pr > F
Model 11 38.6666667 3.51515152 11.50 <.0001
Error 24 7.33333333 0.30555556
Corrected Total 35 46.00000000
R-Square Coeff Var Root MSE SO RE Mean
0.840580 9.754779 0.552771 5.666667
Source DF Type III SS Mean Square F Value Pr > F
G 2 3.16666667 1.58333333 5.18 0.0135
H 3 21.55555556 7.18518519 23.52 <.0001
G*H 6 13.94444444 2.32407407 7.61 0.0001
Alpha 0.05
Error Degrees of Freedom 24
Error Mean Square 0.305556
Duncan Grouping Mean N G
A 6.0833 12 2
B 5.5000 12 1
B 5.4167 12 3
Alpha 0.01
Error Degrees of Freedom 24
Error Mean Square 0.305556
Duncan Grouping Mean N H
A 6.7778 9 2
B 6.0000 9 3
C 5.0000 9 4
C 4.8889 9 1
Alpha 0.01
Error Degrees of Freedom 24
Error Mean Square 0.305556
Duncan Grouping Mean N GH
A 7.3333 3 2 2
B A 6.6667 3 1 3
B A 6.6667 3 2 3
B A 6.6667 3 3 2
B A C 6.3333 3 1 2
B D C 5.6667 3 3 1
B D C 5.3333 3 2 1
B D C 5.3333 3 1 4
E D C 5.0000 3 2 4
E D 4.6667 3 3 3
E D 4.6667 3 3 4
E 3.6667 3 1 1

```

12.4 Chiều dài Rẽ

Dependent Variable: CDR

		Sum of			
Source	DF	Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	11	89.5230556	8.1384596	5.64	0.0002
Error	24	34.6533333	1.4438889		
Corrected Total	35	124.1763889			
		R-Square	Coeff Var	Root MSE	CDR Mean
		0.720935	9.833665	1.201619	12.21944
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
G	2	21.21055556	10.60527778	7.34	0.0032
H	3	55.49638889	18.49879630	12.81	<.0001
G*H	6	12.81611111	2.13601852	1.48	0.2274
		Alpha	0.01		
		Error Degrees of Freedom	24		
		Error Mean Square	1.443889		
		Duncan Grouping	Mean	N	G
		A	12.9750	12	3
		B A	12.5167	12	2
		B	11.1667	12	1
		Alpha	0.01		
		Error Degrees of Freedom	24		
		Error Mean Square	1.443889		
		Duncan Grouping	Mean	N	H
		A	13.7889	9	2
		A	13.0333	9	3
		B	11.3444	9	1
		B	10.7111	9	4
		Alpha	0.05		
		Error Degrees of Freedom	24		
		Error Mean Square	1.443889		
		Duncan Grouping	Mean	N	GH
		A	14.3667	3	2
		A	14.3000	3	3
		B A	13.9667	3	2
		B A	13.1000	3	1
		B A	13.0000	3	3
		B A	12.4333	3	3
		B A C	12.1667	3	3
		B D C	11.8333	3	2
		B D C	11.7333	3	1
		D C	10.0667	3	1
		D	9.9000	3	2
		D	9.7667	3	1

12.5 Trọng lượng thân lá tươi

Dependent Variable: KL THAN TUOI

		Sum of			
Source	DF	Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	11	53.41305556	4.85573232	14.23	<.0001
Error	24	8.19006667	0.34125278		
Corrected Total	35	61.60312222			
		R-Square	Coeff Var	Root MSE	KL THAN TUOI Mean
		0.867051	4.352068	0.584168	13.42278
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
G	2	2.32568889	1.16284444	3.41	0.0498
H	3	46.68874444	15.56291481	45.61	<.0001
G*H	6	4.39862222	0.73310370	2.15	0.0846
		Alpha	0.05		
		Error Degrees of Freedom	24		
		Error Mean Square	0.341253		
		Duncan Grouping	Mean	N	G
		A	13.6650	12	3
		B A	13.5317	12	2
		B	13.0717	12	1
		Alpha	0.01		
		Error Degrees of Freedom	24		
		Error Mean Square	0.341253		
		Duncan Grouping	Mean	N	H
		A	14.9600	9	2

B	14.0533	9	3
C	12.5356	9	1
C	12.1422	9	4
Alpha		0.05	
Error Degrees of Freedom			24
Error Mean Square		0.341253	
Duncan Grouping	Mean	N	GH
A	15.6567	3	3
A	15.4100	3	2
B	14.1600	3	1
B	14.1067	3	2
B	13.8933	3	3
B	13.8133	3	1
C	12.7467	3	3
C	12.6000	3	2
C	12.3633	3	3
C	12.2600	3	1
C	12.0533	3	1
C	12.0100	3	2

12.6 Trọng lượng rễ tươi

Dependent Variable: KL RE TUOI

		Sum of				
Source	DF	Squares	Mean Square	F Value	Pr > F	
Model	11	8.42675374	0.76606852	3.87	0.0027	
Error	24	4.74568283	0.19773678			
Corrected Total	35	13.17243658				
	R-Square	Coeff Var	Root MSE	KL RE TUOI Mean		
	0.639726	11.61207	0.444676	3.829431		
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F	
G	2	1.74095735	0.87047867	4.40	0.0235	
H	3	4.41803324	1.47267775	7.45	0.0011	
G*H	6	2.26776315	0.37796053	1.91	0.1201	

Alpha		0.05	
Error Degrees of Freedom			24
Error Mean Square		0.197737	
Duncan Grouping	Mean	N	G
A	4.1340	12	2
B	3.7316	12	3
B	3.6227	12	1
Alpha		0.01	
Error Degrees of Freedom			24
Error Mean Square		0.197737	
Duncan Grouping	Mean	N	H
A	4.3651	9	2
B A	3.9030	9	3
B	3.6052	9	4
B	3.4444	9	1
Alpha		0.05	
Error Degrees of Freedom			24
Error Mean Square		0.197737	
Duncan Grouping	Mean	N	GH
A	4.8253	3	2
B A	4.5787	3	3
B A C	4.4547	3	2
B D C	3.8767	3	1
D C	3.6913	3	1
D C	3.6823	3	2
D	3.6030	3	1
D	3.5737	3	2
D	3.5303	3	3
D	3.4398	3	3
D	3.3777	3	3
D	3.3197	3	1

12.7 Tỷ lệ xuất vườn

Dependent Variable: TLXV

		Sum of				
Source	DF	Squares	Mean Square	F Value	Pr > F	

Model	11	3702.963000	336.633000	8.18	<.0001
Error	24	987.456800	41.144033		
Corrected Total	35	4690.419800			

	R-Square	Coeff Var	Root MSE	TLXV Mean
	0.789474	7.871992	6.414361	81.48333

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
G	2	390.868317	195.434158	4.75	0.0183
H	3	2907.511689	969.170563	23.56	<.0001
G*H	6	404.582994	67.430499	1.64	0.1798

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	24
Error Mean Square	41.14403

Duncan Grouping	Mean	N	G
A	86.113	12	3
B	79.632	12	2
B	78.706	12	1

Alpha	0.01
Error Degrees of Freedom	24
Error Mean Square	41.14403

Duncan Grouping	Mean	N	H
A	92.593	9	3
A	87.656	9	2
B	75.311	9	4
B	70.373	9	1

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	24
Error Mean Square	41.14403

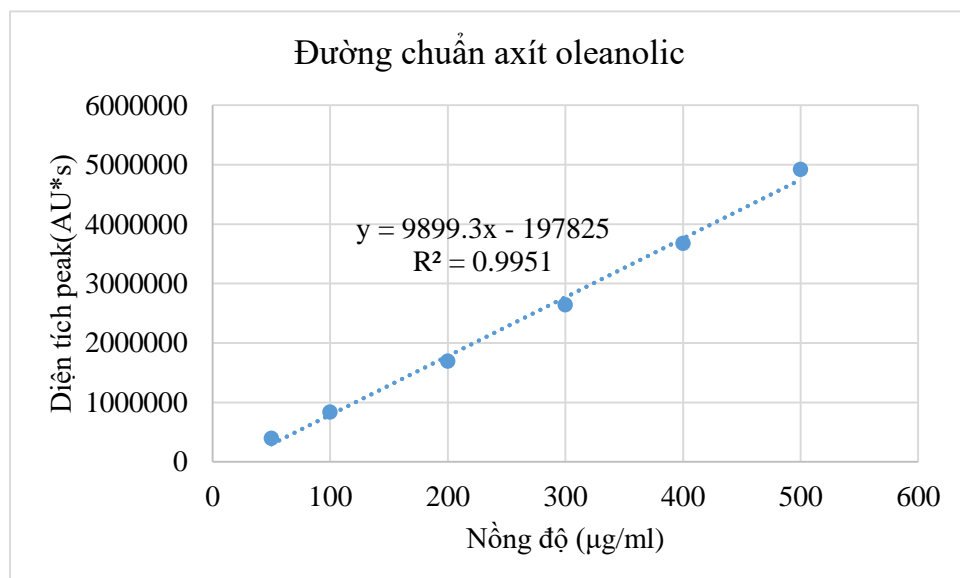
Duncan Grouping	Mean	N	GH
A	100.000	3	3 2
B A	92.593	3	1 3
B A	92.593	3	2 3
B A	92.593	3	3 3
B C	81.483	3	2 2
B C	81.483	3	1 2
D C	77.780	3	3 4
D C	74.077	3	3 1
D C	74.077	3	2 4
D C	74.077	3	1 4
D C	70.373	3	2 1
D	66.670	3	1 1

Phụ lục kết quả phân tích axit oleanolic

1. Đường chuẩn axit oleanolic

Bảng 1: Diện tích peak axit oleanolic chuẩn

Nồng độ ($\mu\text{g/ml}$)	Diện tích (AU*s)
50	394929
100	836721
200	1694101
300	2639022
400	3673143
500	4919102



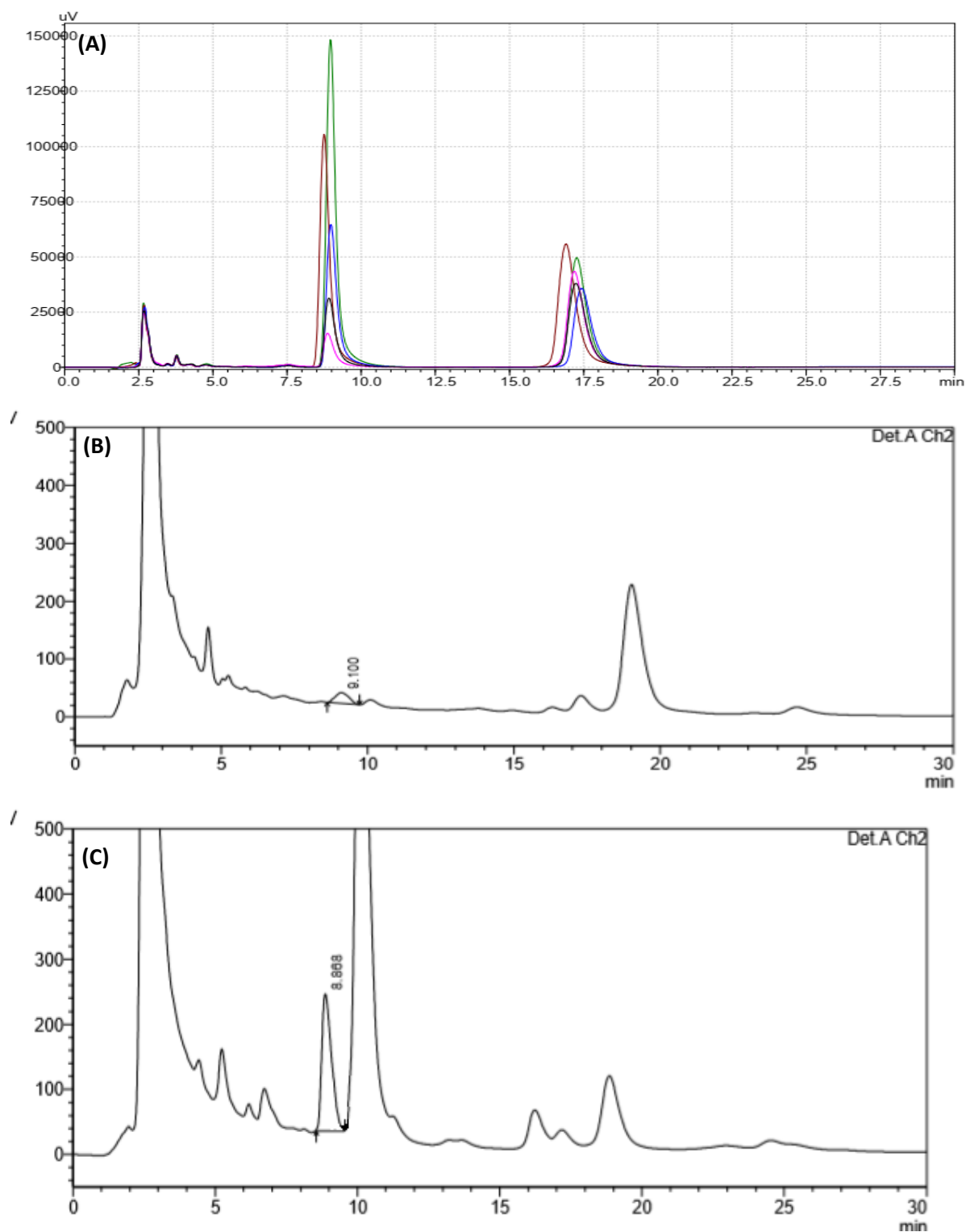
Hình 1: Đường chuẩn axit oleanolic

Đường chuẩn axit oleanolic là đường tuyến tính có dạng $y = 9899,3x - 197825$ ($R^2 = 0,9951$). Trong đó x là nồng độ axit oleanolic ($\mu\text{g/ml}$), y là diện tích peak HPLC (AU*s). Hàm lượng saponin toàn phần tính theo axit oleanolic trong mẫu dược liệu được xác định theo công thức:

$$X(\%) = \frac{(A_s + 197825)}{9899,3} \cdot \frac{V \cdot p}{m(100 - h)} \cdot 10^{-4}$$

Trong đó: A_s : diện tích peak mẫu thử; V: thể tích định mức (ml); p: độ tinh khiết của chuẩn axit oleanolic (p = 98%); m: khối lượng mẫu thử phân tích (g), h: độ ẩm dược liệu (%).

2. Hàm lượng saponin toàn phần tính theo axit oleanolic trong dược liệu



Hình 2: Sắc ký đồ chuẩn axit oleanolic và các mẫu phân tích

A: chuẩn axit oleanolic; B: mẫu dịch nước; C: mẫu đỉnh lãg nuôi cấy

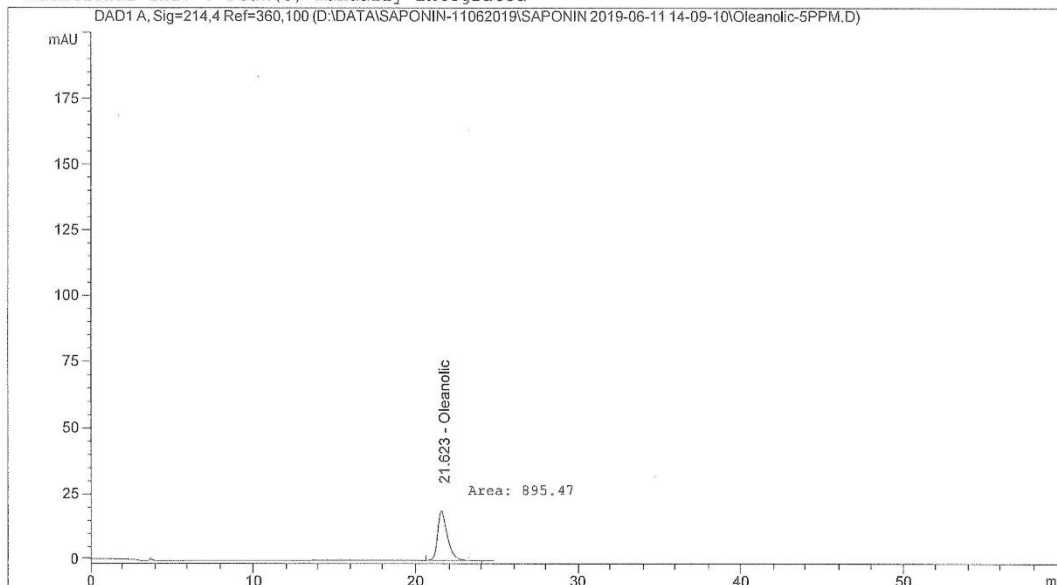
Bảng 2: Hàm lượng saponin toàn phần tính theo axit oleanolic trong mẫu phân tích

Mẫu	Diện tích peak (AU*s)	Nồng độ axit oleanolic trong mẫu thử ($\mu\text{g/ml}$)	Hàm lượng saponin toàn phần tính theo axit oleanolic (%)	Hàm lượng trung bình (%)
Dịch nước	127531	32,87	0,0129	0,0131 \pm 0,0028
	141520	34,28	0,0134	
	130999	33,22	0,0130	
Đinh lăng nuôi cấy	4709602	495,73	1,281	1,267 \pm 0,017
	4582582	482,90	1,247	
	4679081	492,65	1,273	

Data File D:\DATA\SAPONIN-11062019\SAPONIN 2019-06-11 14-09-10\Oleanolic-5PPM.D
Sample Name: Oleanolic-5PPM

```
=====
Acq. Operator   : HT                               Seq. Line :    1
Acq. Instrument : Instrument 1                     Location  : Vial 20
Injection Date  : 11-Jun-19 12:00:11              Inj       :    1
                                                    Inj Volume: 50.0 µl

Acq. Method     : D:\DATA\SAPONIN-11062019\SAPONIN 2019-06-11 14-09-10\Oleanolic.M
Last changed    : 11-Jun-19 11:34:20 by HT
                  (modified after loading)
Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\OLEANOLIC11062019.M
Last changed    : 11-Jun-19 9:00:22 by HT
                  (modified after loading)
Additional Info  : Peak(s) manually integrated
=====
```



External Standard Report

```
Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : 11-Jun-19 12:30:51
Multiplier:    : 1.0000
Dilution:     : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
```

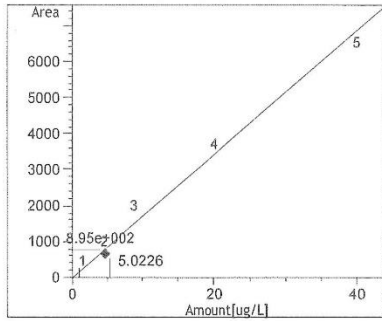
Signal 1: DAD1 A, Sig=214,4 Ref=360,100

RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [ug/L]	Grp	Name
21.623	MM	895.47563	5.600896e-3	5.02269		Oleanolic

Totals : 5.02269

Data File D:\DATA\SAPONIN-11062019\SAPONIN 2019-06-11 14-09-10\Oleanolic-5PPM.D
Sample Name: Oleanolic-5PPM

=====
Calibration Curves
=====



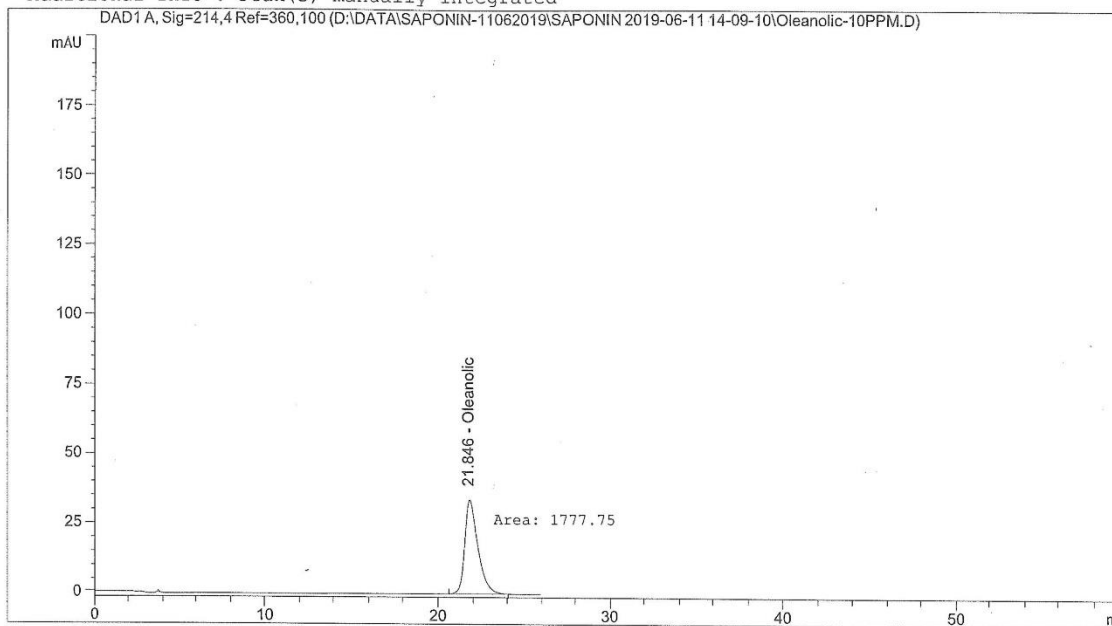
Oleanolic at exp. RT: 21.665
DAD1 A, Sig=214,4 Ref=360,100
Correlation: 0.99929
Residual Std. Dev.: 112.65452
Formula: $y = mx + b$
m: 175.10978
b: -118.96124
x: Amount
y: Area

=====
*** End of Report ***

Sample Name: Oleanolic-10PPM

```
=====
Acq. Operator   : HT                               Seq. Line :    1
Acq. Instrument : Instrument 1                     Location  : Vial 21
Injection Date  : 11-Jun-19 12:30:31              Inj       :    1
                                                    Inj Volume: 50.0 µl

Acq. Method     : D:\DATA\SAPONIN-11062019\SAPONIN 2019-06-11 14-09-10\Oleanolic.M
Last changed    : 11-Jun-19 11:34:20 by HT
                (modified after loading)
Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\OLEANOLIC11062019.M
Last changed    : 11-Jun-19 9:00:22 by HT
                (modified after loading)
Additional Info  : Peak(s) manually integrated
=====
```



External Standard Report

```
Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : 11-Jun-19 13:00:51
Multiplier:    : 1.0000
Dilution:      : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
```

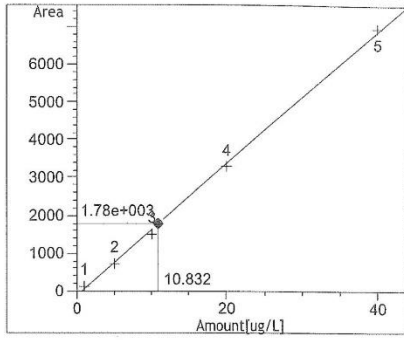
Signal 1: DAD1 A, Sig=214,4 Ref=360,100

RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [ug/L]	Grp	Name
21.846	MM	1777.75403	6.09284e-3	10.83158		Oleanolic

Totals : 10.83158

Sample Name: Oleanolic-10PPM

=====
Calibration Curves
=====



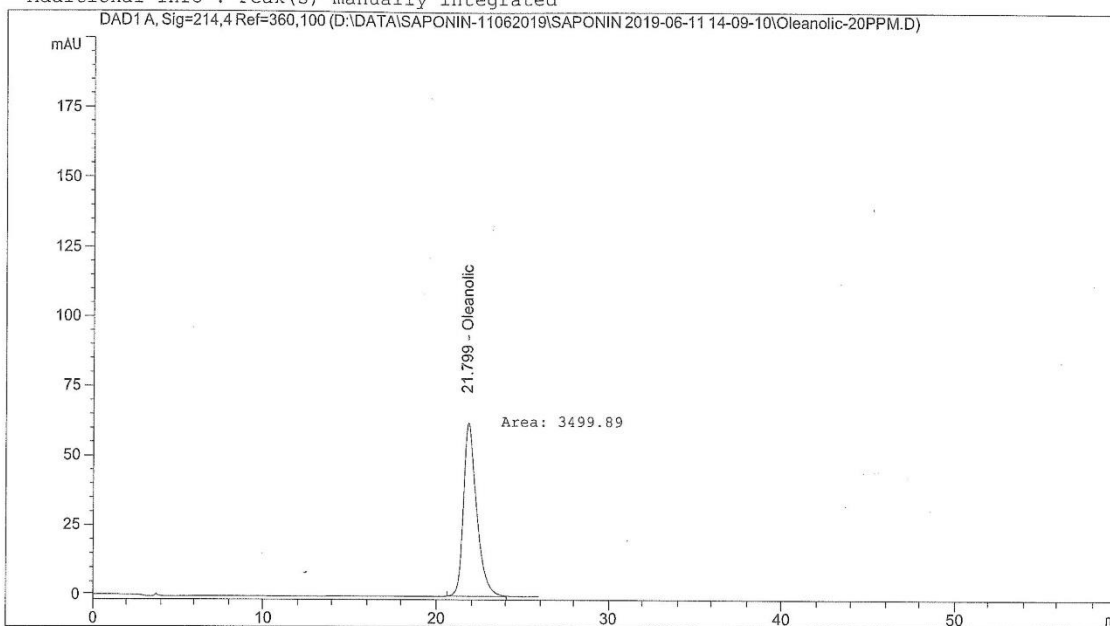
Oleanolic at exp. RT: 21.665
DAD1 A, Sig=214,4 Ref=360,100
Correlation: 0.99929
Residual Std. Dev.: 112.65452
Formula: $y = mx + b$
m: 175.10978
b: -118.96124
x: Amount
y: Area

=====
*** End of Report ***
=====

Sample Name: Oleanolic-20PPM

```
=====
Acq. Operator   : HT                               Seq. Line :    1
Acq. Instrument : Instrument 1                       Location  : Vial 22
Injection Date  : 11-Jun-19 13:01:01                Inj       :    1
                                                    Inj Volume: 50.0 µl

Acq. Method     : D:\DATA\SAPONIN-11062019\SAPONIN 2019-06-11 14-09-10\Oleanolic.M
Last changed    : 11-Jun-19 11:34:20 by HT
                  (modified after loading)
Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\OLEANOLIC11062019.M
Last changed    : 11-Jun-19 9:00:22 by HT
                  (modified after loading)
Additional Info  : Peak(s) manually integrated
=====
```



External Standard Report

```
Sorted By           : Signal
Calib. Data Modified : 11-Jun-19 13:30:23
Multiplier:         : 1.0000
Dilution:           : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
```

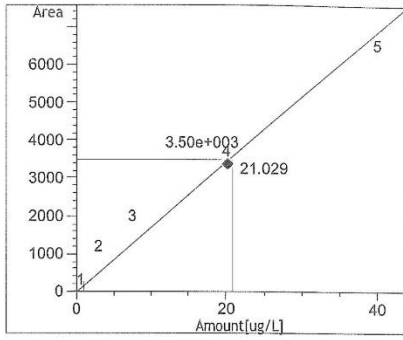
Signal 1: DAD1 A, Sig=214,4 Ref=360,100

RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [ug/L]	Grp	Name
21.799	MM	3499.89014	6.00859e-3	21.02940		Oleanolic

Totals : 21.02940

Sample Name: Oleanolic-20PPM

=====
Calibration Curves
=====



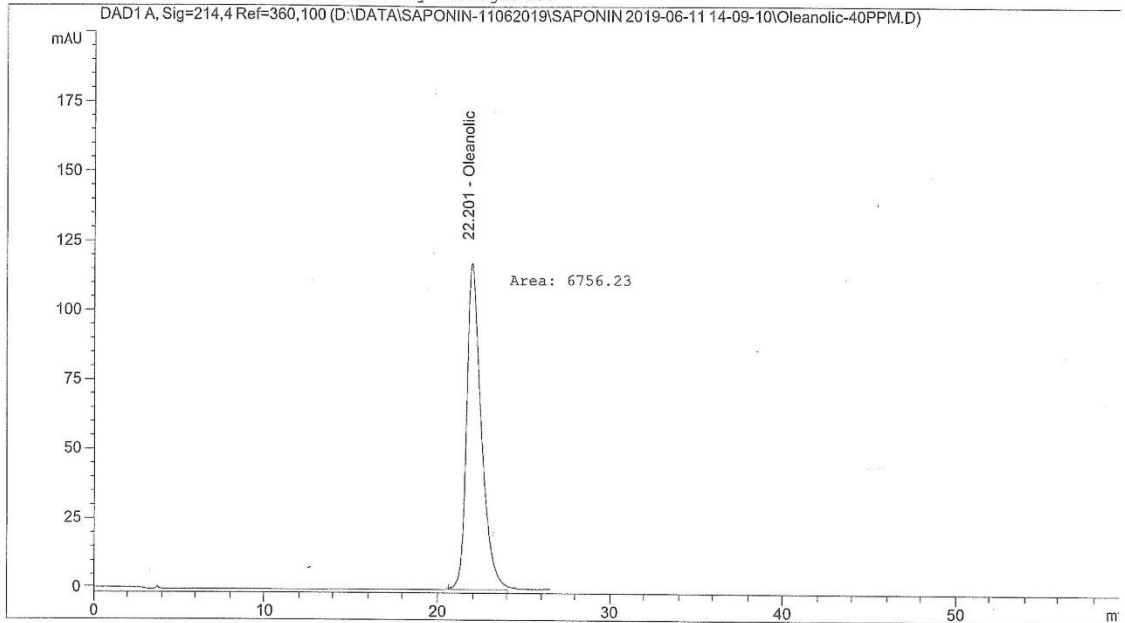
Oleanolic at exp. RT: 21.665
DAD1 A, Sig=214,4 Ref=360,100
Correlation: 0.99929
Residual Std. Dev.: 112.65452
Formula: $y = mx + b$
m: 175.10978
b: -118.96124
x: Amount
y: Area

=====
*** End of Report ***
=====

Sample Name: Oleanolic-40PPM

```
=====
Acq. Operator   : HT                               Seq. Line :    1
Acq. Instrument : Instrument 1                     Location  : Vial 23
Injection Date  : 11-Jun-19 13:31:23              Inj       :    1
                                                    Inj Volume: 50.0 µl

Acq. Method     : D:\DATA\SAPONIN-11062019\SAPONIN 2019-06-11 14-09-10\Oleanolic.M
Last changed    : 11-Jun-19 11:34:20 by HT
                  (modified after loading)
Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\OLEANOLIC11062019.M
Last changed    : 11-Jun-19 9:00:22 by HT
                  (modified after loading)
Additional Info  : Peak(s) manually integrated
=====
```



External Standard Report

```
Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : 11-Jun-19 14:01:12
Multiplier:    : 1.0000
Dilution:      : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
```

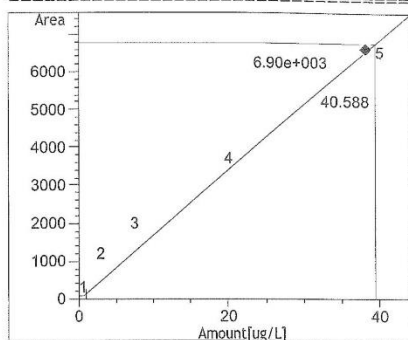
Signal 1: DAD1 A, Sig=214,4 Ref=360,100

RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [ug/L]	Grp	Name
22.201	MM	6756.23142	6.00756e-3	40.58847		Oleanolic

Totals : 40.58847

Sample Name: Oleanolic-40PPM

=====
Calibration Curves
=====

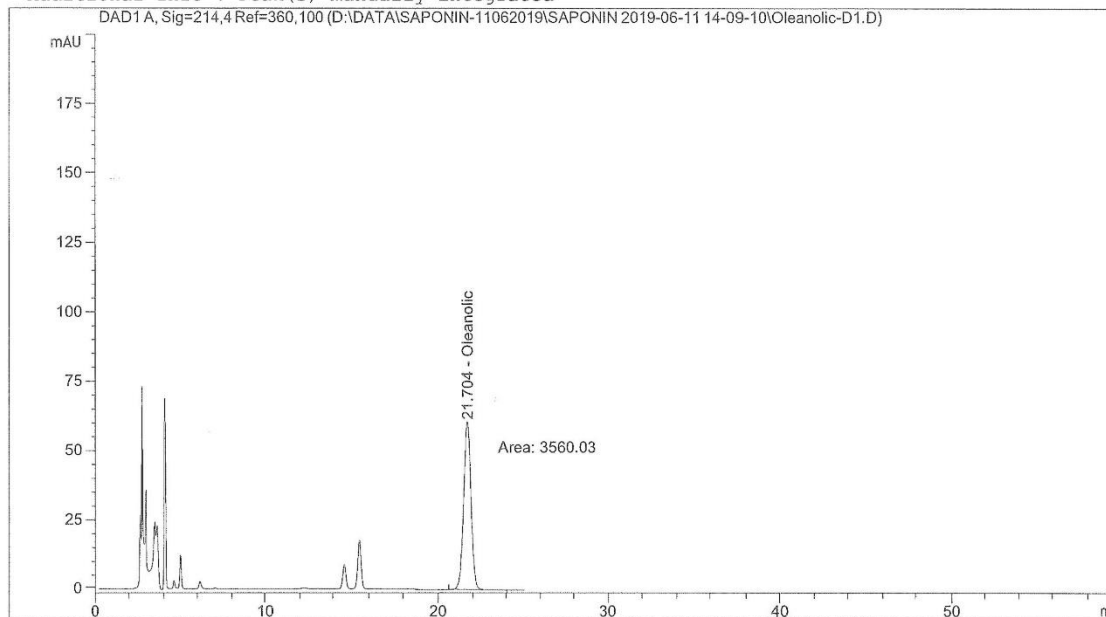


Oleanolic at exp. RT: 22.201
DAD1 A, Sig=214,4 Ref=360,100
Correlation: 0.99929
Residual Std. Dev.: 112.65452
Formula: $y = mx + b$
m: 175.10978
b: -118.96124
x: Amount
y: Area

=====
*** End of Report ***
=====

Sample Name: Oleanolic-D1

```
=====
Acq. Operator   : HT                               Seq. Line :    1
Acq. Instrument : Instrument 1                     Location  : Vial 24
Injection Date  : 11-Jun-19 14:01:49              Inj       :    1
                                                    Inj Volume: 50.0 µl
Acq. Method     : D:\DATA\SAPONIN-11062019\SAPONIN 2019-06-11 14-09-10\Oleanolic.M
Last changed    : 11-Jun-19 11:34:20 by HT
                  (modified after loading)
Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\OLEANOLIC11062019.M
Last changed    : 11-Jun-19 9:00:22 by HT
                  (modified after loading)
Additional Info  : Peak(s) manually integrated
=====
```



External Standard Report

```
Sorted By           : Signal
Calib. Data Modified : 11-Jun-19 14:32:33
Multiplier:         : 1.0000
Dilution:           : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
```

Signal 1: DAD1 A, Sig=214,4 Ref=360,100

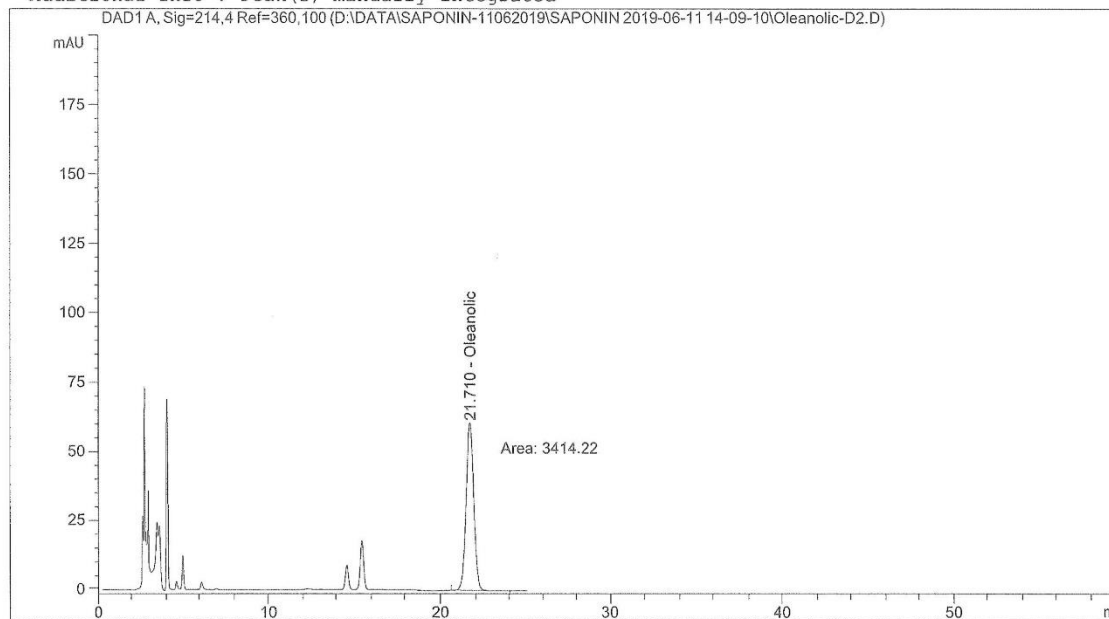
RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [ug/L]	Grp	Name
21.704	MM	3560.03175	6.00094e-3	21.36354		Oleanolic

Totals : 21.36354

*** End of Report ***

Sample Name: Oleanolic-D2

```
=====
Acq. Operator   : HT                               Seq. Line :    1
Acq. Instrument : Instrument 1                     Location  : Vial 25
Injection Date  : 11-Jun-19 14:32:09              Inj       :    1
                                                    Inj Volume: 50.0 µl
Acq. Method     : D:\DATA\SAPONIN-11062019\SAPONIN 2019-06-11 14-09-10\Oleanolic.M
Last changed    : 11-Jun-19 11:34:20 by HT
                : (modified after loading)
Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\OLEANOLIC11062019.M
Last changed    : 11-Jun-19 9:00:22 by HT
                : (modified after loading)
Additional Info  : Peak(s) manually integrated
=====
```



External Standard Report

```
Sorted By           : Signal
Calib. Data Modified : 11-Jun-19 15:02:48
Multiplier:         : 1.0000
Dilution:           : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
```

Signal 1: DAD1 A, Sig=214,4 Ref=360,100

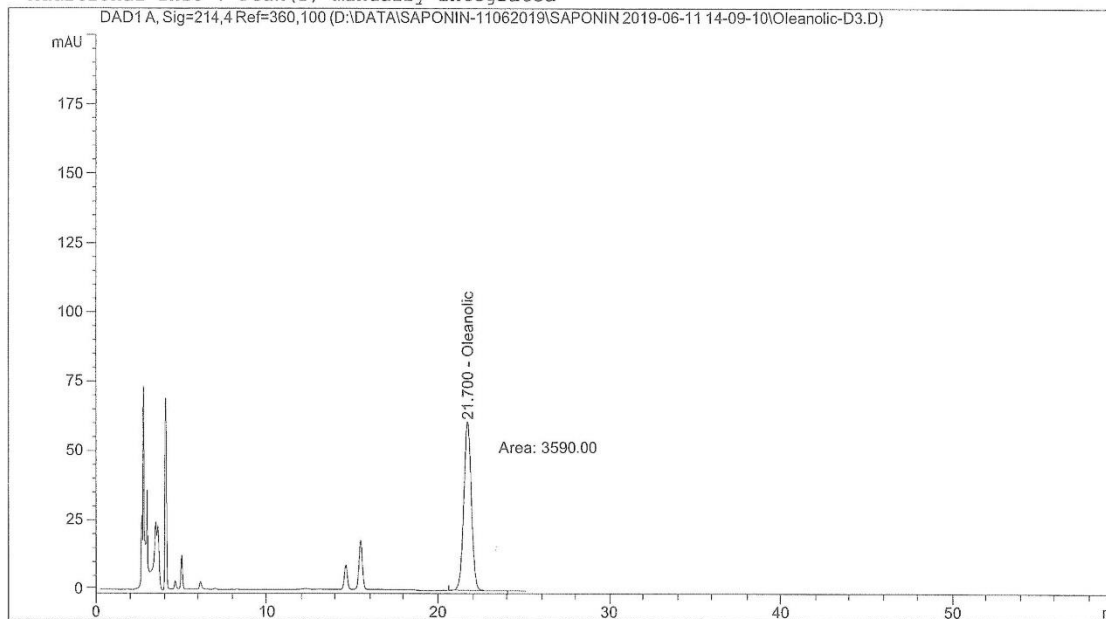
RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [ug/L]	Grp	Name
21.710	MM	3414.22317	5.98530e-3	20.43515		Oleanolic

Totals : 20.43515

*** End of Report ***

Sample Name: Oleanolic-D3

```
=====
Acq. Operator   : HT                               Seq. Line :    1
Acq. Instrument : Instrument 1                       Location  : Vial 26
Injection Date  : 11-Jun-19 15:02:59                Inj       :    1
                                                    Inj Volume: 50.0 µl
Acq. Method     : D:\DATA\SAPONIN-11062019\SAPONIN 2019-06-11 14-09-10\Oleanolic.M
Last changed    : 11-Jun-19 11:34:20 by HT
                  (modified after loading)
Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\OLEANOLIC11062019.M
Last changed    : 11-Jun-19 9:00:22 by HT
                  (modified after loading)
Additional Info  : Peak(s) manually integrated
=====
```



External Standard Report

```
Sorted By           : Signal
Calib. Data Modified : 11-Jun-19 15:03:25
Multiplier          : 1.0000
Dilution            : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
```

Signal 1: DAD1 A, Sig=214,4 Ref=360,100

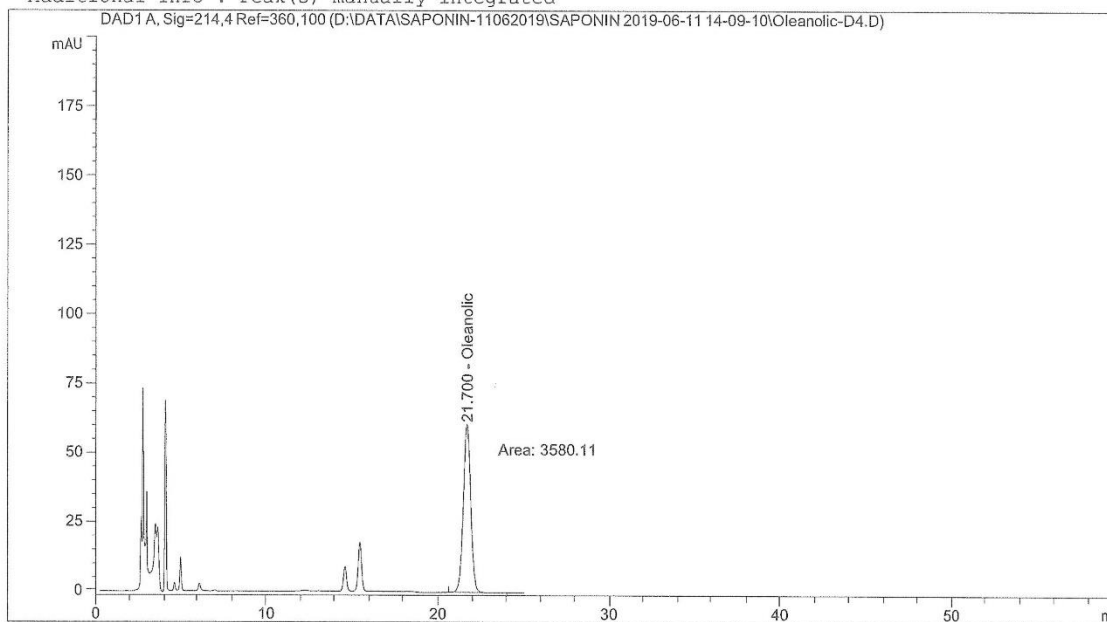
RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [ug/L]	Grp	Name
21.700	MM	3590.00025	6.00000e-3	21.54000		Oleanolic

Totals : 21.54000

*** End of Report ***

Sample Name: Oleanolic-D4

```
=====
Acq. Operator   : HT                               Seq. Line : 1
Acq. Instrument : Instrument 1                     Location  : Vial 27
Injection Date  : 11-Jun-19 15:33:03              Inj       : 1
                                                    Inj Volume: 50.0 µl
Acq. Method     : D:\DATA\SAPONIN-11062019\SAPONIN 2019-06-11 14-09-10\Oleanolic.M
Last changed    : 11-Jun-19 11:34:20 by HT
                  (modified after loading)
Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\OLEANOLIC11062019.M
Last changed    : 11-Jun-19 9:00:22 by HT
                  (modified after loading)
Additional Info  : Peak(s) manually integrated
=====
```



External Standard Report

```
Sorted By           : Signal
Calib. Data Modified : 11-Jun-19 16:03:25
Multiplier          : 1.0000
Dilution            : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
```

Signal 1: DAD1 A, Sig=214,4 Ref=360,100

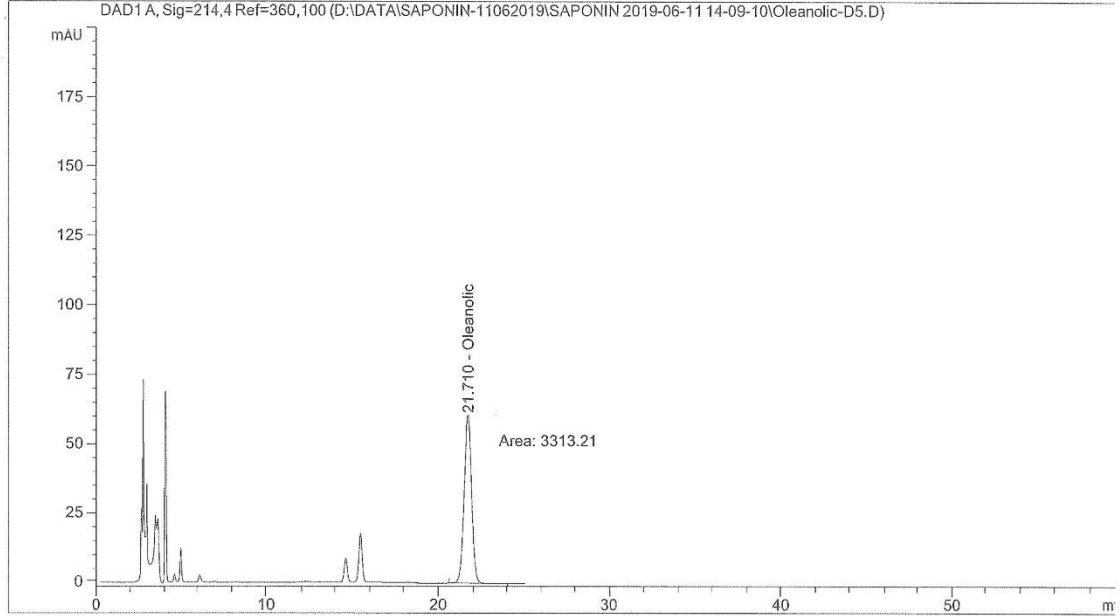
RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [ug/L]	Grp	Name
21.700	MM	3580.11000	6.00000e-3	21.48066		Oleanolic

Totals : 21.48066

*** End of Report ***

Sample Name: Oleanolic-D5

```
=====
Acq. Operator   : HT                               Seq. Line :    1
Acq. Instrument : Instrument 1                     Location  : Vial 28
Injection Date  : 11-Jun-19 16:03:58              Inj       :    1
                                                    Inj Volume: 50.0 µl
Acq. Method     : D:\DATA\SAPONIN-11062019\SAPONIN 2019-06-11 14-09-10\Oleanolic.M
Last changed    : 11-Jun-19 11:34:20 by HT
                (modified after loading)
Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\OLEANOLIC11062019.M
Last changed    : 11-Jun-19 9:00:22 by HT
                (modified after loading)
Additional Info  : Peak(s) manually integrated
=====
```



External Standard Report

```
Sorted By           : Signal
Calib. Data Modified : 11-Jun-19 16:34:31
Multiplier:         : 1.0000
Dilution:           : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
```

Signal 1: DAD1 A, Sig=214,4 Ref=360,100

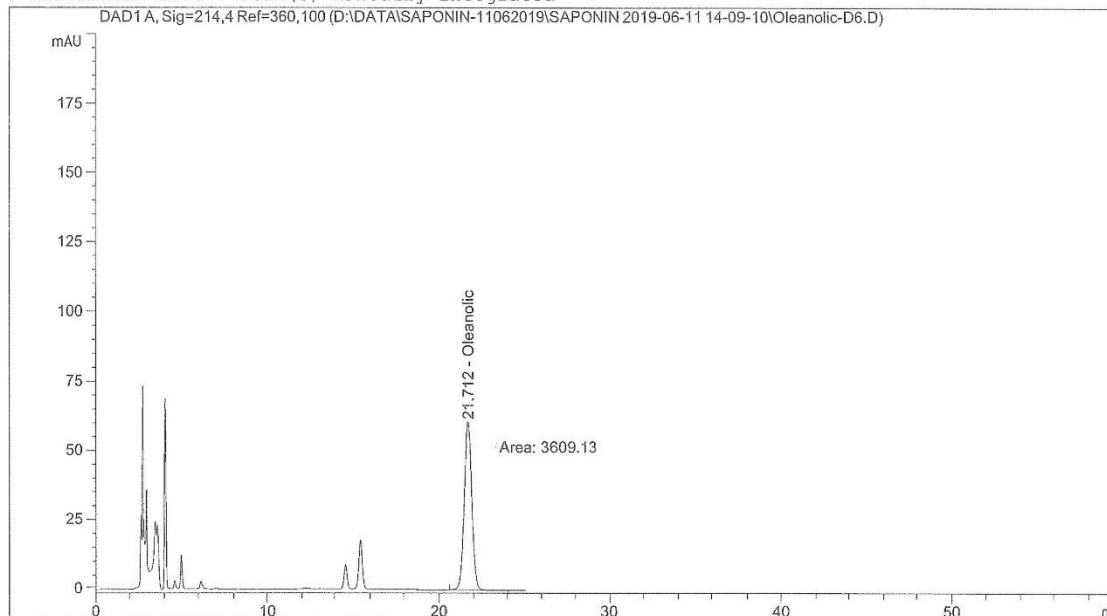
RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [ug/L]	Grp	Name
21.710	MM	3313.21816	6.01635e-3	19.93348		Oleanolic

Totals : 19.93348

*** End of Report ***

Sample Name: Oleanolic-D6

```
=====
Acq. Operator   : HT                               Seq. Line : 1
Acq. Instrument : Instrument 1                     Location  : Vial 29
Injection Date  : 11-Jun-19 16:33:05              Inj       : 1
                                                    Inj Volume: 50.0 µl
Acq. Method     : D:\DATA\SAPONIN-11062019\SAPONIN 2019-06-11 14-09-10\Oleanolic.M
Last changed    : 11-Jun-19 11:34:20 by HT
                (modified after loading)
Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\OLEANOLIC11062019.M
Last changed    : 11-Jun-19 9:00:22 by HT
                (modified after loading)
Additional Info  : Peak(s) manually integrated
=====
```



External Standard Report

```
Sorted By           : Signal
Calib. Data Modified : 11-Jun-19 17:04:45
Multiplier:         : 1.0000
Dilution:           : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
```

Signal 1: DAD1 A, Sig=214,4 Ref=360,100

RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [ug/L]	Grp	Name
21.712	MM	3609.13987	5.99443e-3	21.63474		Oleanolic

Totals : 21.63474

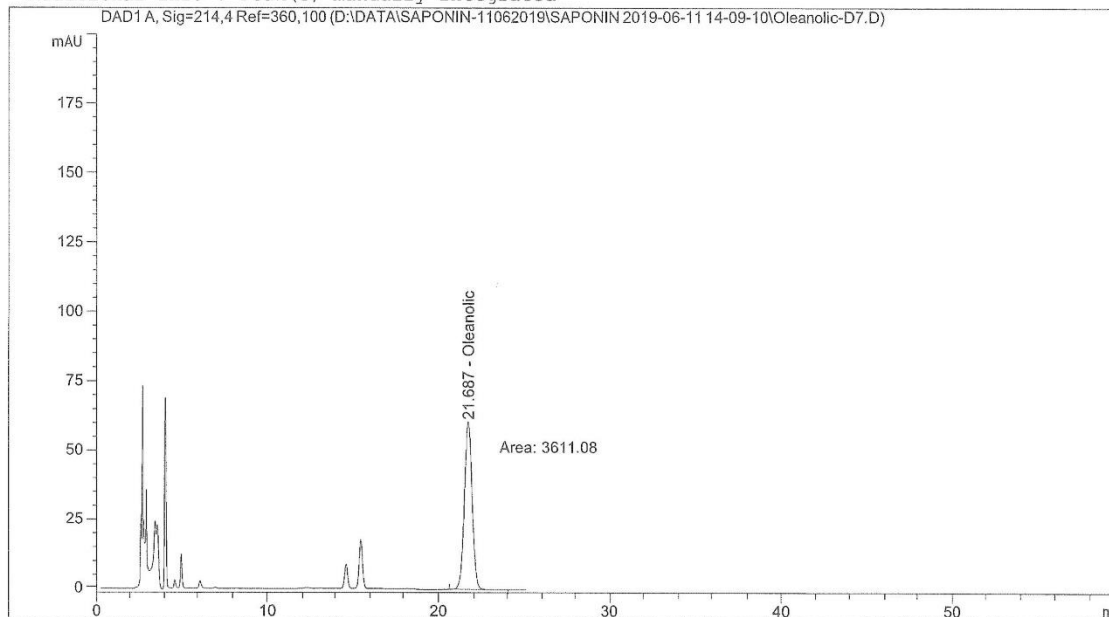
*** End of Report ***

Sample Name: Oleanolic-D7

```

=====
Acq. Operator   : HT                               Seq. Line :    1
Acq. Instrument : Instrument 1                     Location  : Vial 30
Injection Date  : 11-Jun-19 17:05:15              Inj       :    1
                                                Inj Volume : 50.0 µl
Acq. Method     : D:\DATA\SAPONIN-11062019\SAPONIN 2019-06-11 14-09-10\Oleanolic.M
Last changed    : 11-Jun-19 11:34:20 by HT
                  (modified after loading)
Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\OLEANOLIC11062019.M
Last changed    : 11-Jun-19 9:00:22 by HT
                  (modified after loading)
Additional Info  : Peak(s) manually integrated
=====

```



External Standard Report

```

=====
Sorted By       : Signal
Calib. Data Modified : 11-Jun-19 17:35:12
Multiplier:     : 1.0000
Dilution:       : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: DAD1 A, Sig=214,4 Ref=360,100

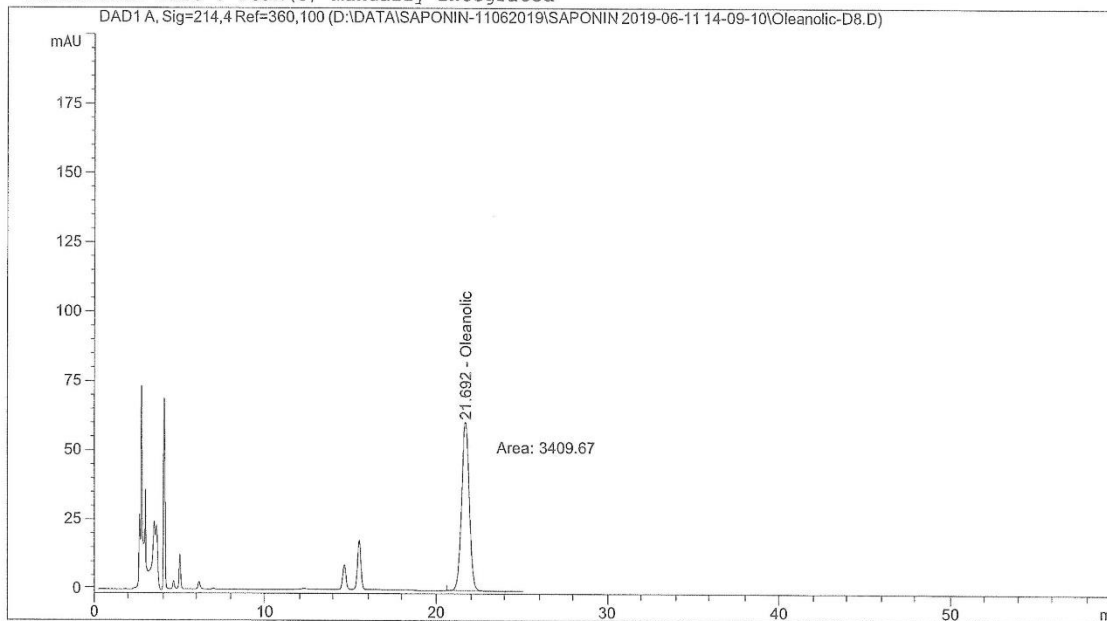
RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [ug/L]	Grp	Name
21.687	MM	3611.08123	6.00143e-3	21.67165		Oleanolic

Totals : 21.67165

*** End of Report ***

Sample Name: Oleanolic-D8

```
=====
Acq. Operator   : HT                               Seq. Line :    1
Acq. Instrument : Instrument 1                     Location  : Vial 31
Injection Date  : 11-Jun-19 17:35:34              Inj       :    1
                                                    Inj Volume: 50.0 µl
Acq. Method    : D:\DATA\SAPONIN-11062019\SAPONIN 2019-06-11 14-09-10\Oleanolic.M
Last changed   : 11-Jun-19 11:34:20 by HT
                (modified after loading)
Analysis Method: C:\CHEM32\1\METHODS\OLEANOLIC11062019.M
Last changed   : 11-Jun-19 9:00:22 by HT
                (modified after loading)
Additional Info : Peak(s) manually integrated
=====
```



External Standard Report

```
Sorted By           : Signal
Calib. Data Modified: 11-Jun-19 18:06:03
Multiplier          : 1.0000
Dilution            : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
```

Signal 1: DAD1 A, Sig=214,4 Ref=360,100

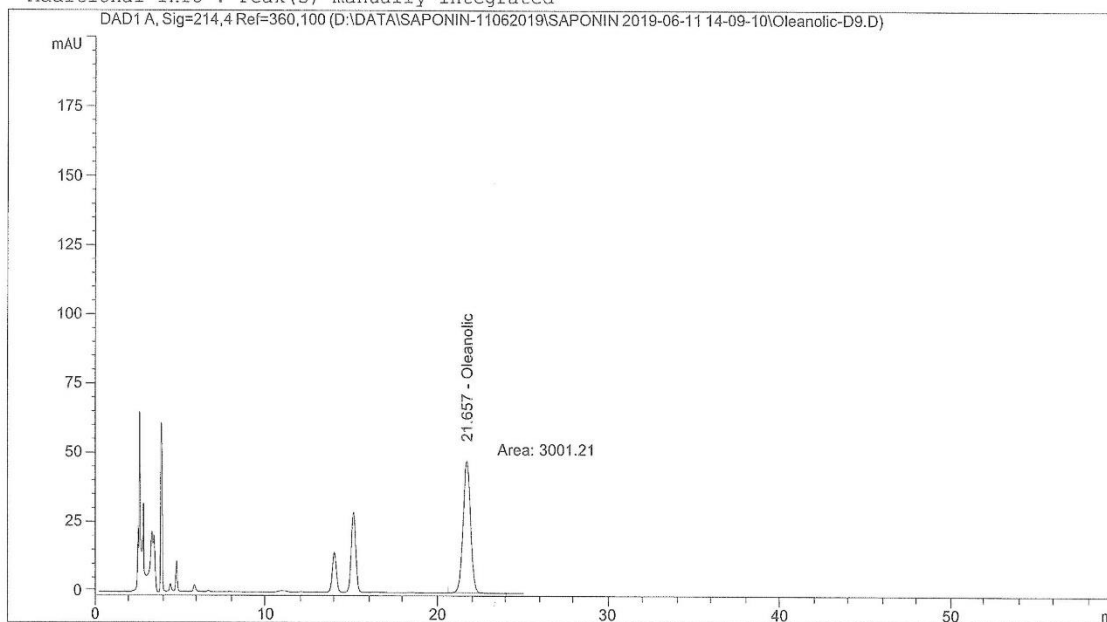
RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [µg/L]	Grp	Name
21.692	MM	3409.67165	5.99812e-3	20.45162		Oleanolic

Totals : 20.45162

*** End of Report ***

Sample Name: Oleanolic-D9

```
=====
Acq. Operator   : HT                               Seq. Line : 1
Acq. Instrument : Instrument 1                     Location  : Vial 32
Injection Date  : 11-Jun-19 18:07:08              Inj       : 1
                                                    Inj Volume: 50.0 µl
Acq. Method     : D:\DATA\SAPONIN-11062019\SAPONIN 2019-06-11 14-09-10\Oleanolic.M
Last changed    : 11-Jun-19 11:34:20 by HT
                  (modified after loading)
Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\OLEANOLIC11062019.M
Last changed    : 11-Jun-19 9:00:22 by HT
                  (modified after loading)
Additional Info  : Peak(s) manually integrated
=====
```



External Standard Report

```
Sorted By           : Signal
Calib. Data Modified : 11-Jun-19 18:38:12
Multiplier          : 1.0000
Dilution            : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
```

Signal 1: DAD1 A, Sig=214,4 Ref=360,100

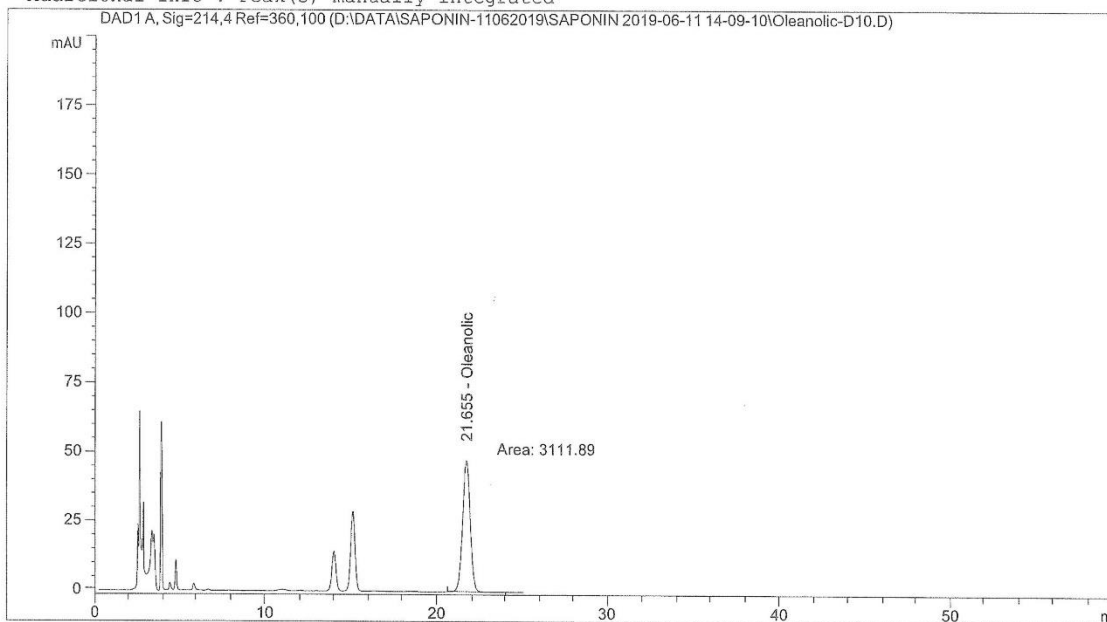
RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [ug/L]	Grp	Name
21.657	MM	3001.21985	6.00098e-3	18.01026		Oleanolic

Totals : 18.01026

*** End of Report ***

Sample Name: Oleanolic-D10

```
=====
Acq. Operator   : HT                               Seq. Line : 1
Acq. Instrument : Instrument 1                     Location  : Vial 33
Injection Date  : 11-Jun-19 18:38:14              Inj       : 1
                                                    Inj Volume: 50.0 µl
Acq. Method     : D:\DATA\SAPONIN-11062019\SAPONIN 2019-06-11 14-09-10\Oleanolic.M
Last changed    : 11-Jun-19 11:34:20 by HT
                  (modified after loading)
Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\OLEANOLIC11062019.M
Last changed    : 11-Jun-19 9:00:22 by HT
                  (modified after loading)
Additional Info  : Peak(s) manually integrated
=====
```



External Standard Report

```
Sorted By           : Signal
Calib. Data Modified : 11-Jun-19 19:09:00
Multiplier          : 1.0000
Dilution            : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
```

Signal 1: DAD1 A, Sig=214,4 Ref=360,100

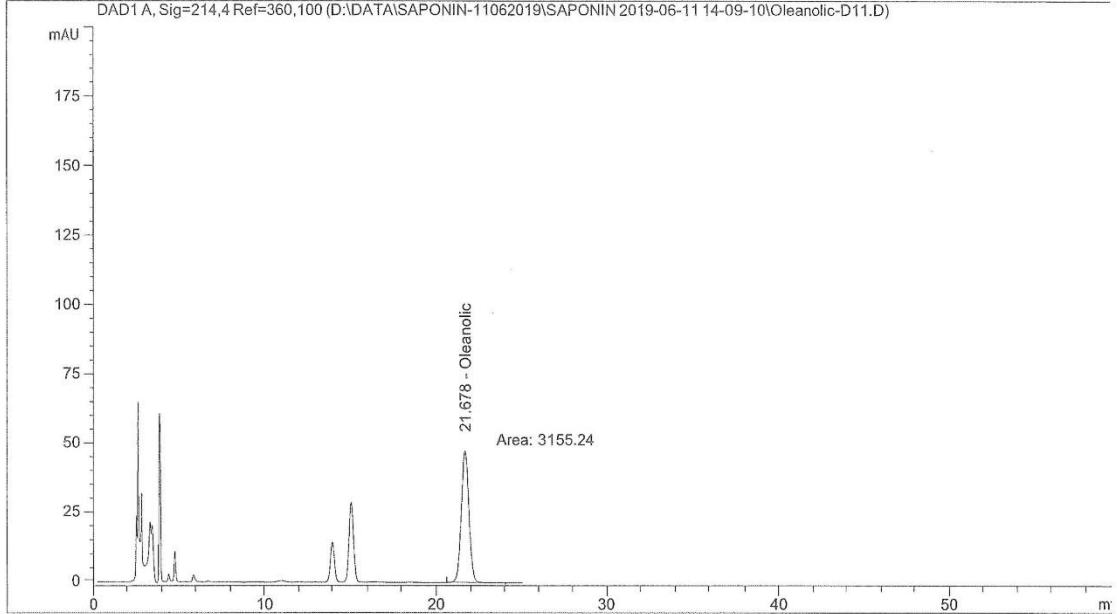
RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [µg/L]	Grp	Name
21.655	MM	3111.89101	6.00111e-3	18.67480		Oleanolic

Totals : 18.67480

*** End of Report ***

Sample Name: Oleanolic-D11

```
=====
Acq. Operator   : HT                               Seq. Line :    1
Acq. Instrument : Instrument 1                     Location  : Vial 34
Injection Date  : 11-Jun-19 19:09:56              Inj       :    1
                                                    Inj Volume: 50.0 µl
Acq. Method     : D:\DATA\SAPONIN-11062019\SAPONIN 2019-06-11 14-09-10\Oleanolic.M
Last changed    : 11-Jun-19 11:34:20 by HT
                  (modified after loading)
Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\OLEANOLIC11062019.M
Last changed    : 11-Jun-19 9:00:22 by HT
                  (modified after loading)
Additional Info  : Peak(s) manually integrated
=====
```



External Standard Report

```
Sorted By           : Signal
Calib. Data Modified : 11-Jun-19 19:40:17
Multiplier:         : 1.0000
Dilution:           : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
```

Signal 1: DAD1 A, Sig=214,4 Ref=360,100

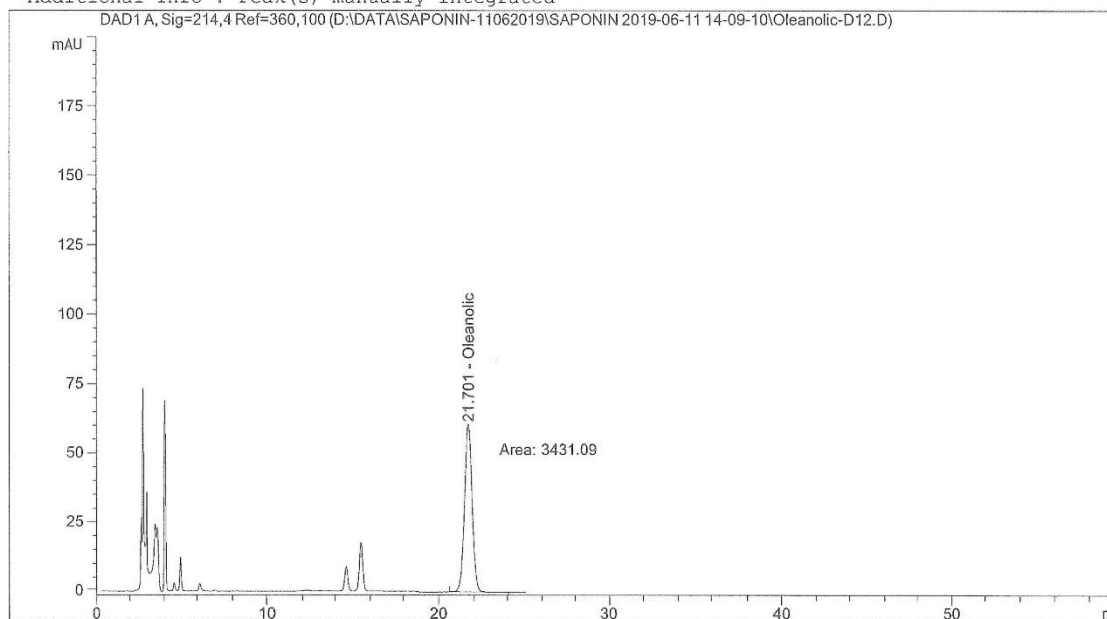
RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [ug/L]	Grp	Name
21.678	MM	3155.24540	6.00098e-3	18.93456		Oleanolic

Totals : 18.93456

*** End of Report ***

Sample Name: Oleanolic-D12

```
=====
Acq. Operator   : HT                               Seq. Line :    1
Acq. Instrument : Instrument 1                     Location  : Vial 35
Injection Date  : 11-Jun-19 19:40:54              Inj       :    1
                                                    Inj Volume: 50.0 µl
Acq. Method     : D:\DATA\SAPONIN-11062019\SAPONIN 2019-06-11 14-09-10\Oleanolic.M
Last changed    : 11-Jun-19 11:34:20 by HT
                  (modified after loading)
Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\OLEANOLIC11062019.M
Last changed    : 11-Jun-19 9:00:22 by HT
                  (modified after loading)
Additional Info : Peak(s) manually integrated
=====
```



External Standard Report

```
Sorted By           : Signal
Calib. Data Modified : 11-Jun-19 20:11:05
Multiplier:         : 1.0000
Dilution:           : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
```

Signal 1: DAD1 A, Sig=214,4 Ref=360,100

RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [ug/L]	Grp	Name
21.701	MM	3431.09185	5.98635e-3	20.53972		Oleanolic

Totals : 20.53972

*** End of Report ***

Sample Name: Oleanolic-D13

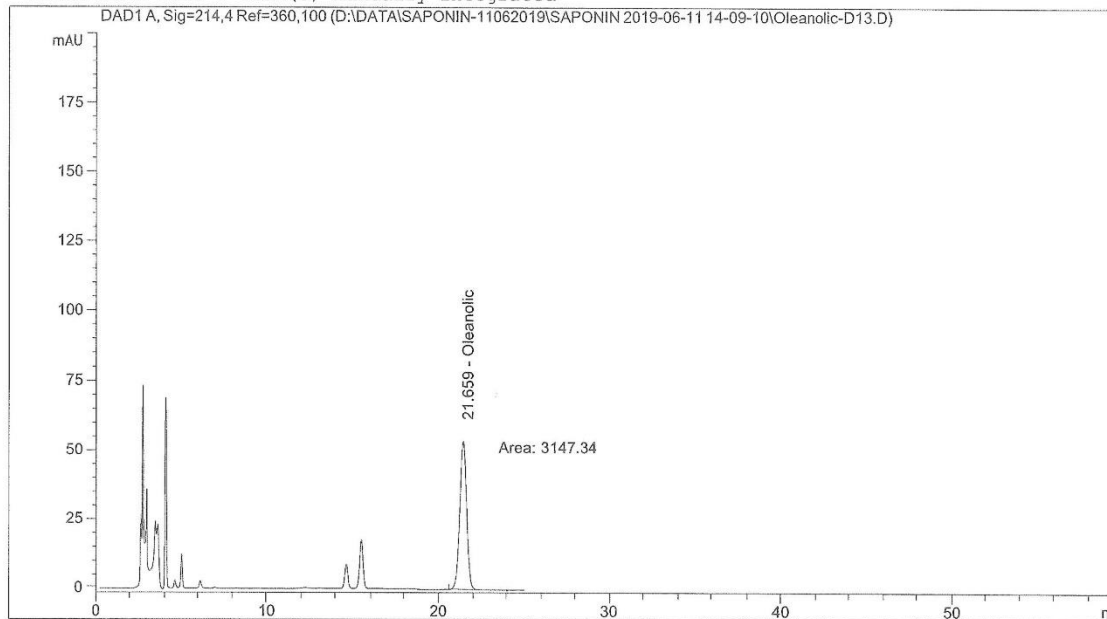
=====

Acq. Operator	: HT	Seq. Line	: 1
Acq. Instrument	: Instrument 1	Location	: Vial 36
Injection Date	: 11-Jun-19 20:12:16	Inj	: 1
		Inj Volume	: 50.0 µl

Acq. Method : D:\DATA\SAPONIN-11062019\SAPONIN 2019-06-11 14-09-10\Oleanolic.M
Last changed : 11-Jun-19 11:34:20 by HT
(modified after loading)

Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\OLEANOLIC11062019.M
Last changed : 11-Jun-19 9:00:22 by HT
(modified after loading)

Additional Info : Peak(s) manually integrated



=====

External Standard Report

=====

Sorted By : Signal
Calib. Data Modified : 11-Jun-19 20:42:45
Multiplier: : 1.0000
Dilution: : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=214,4 Ref=360,100

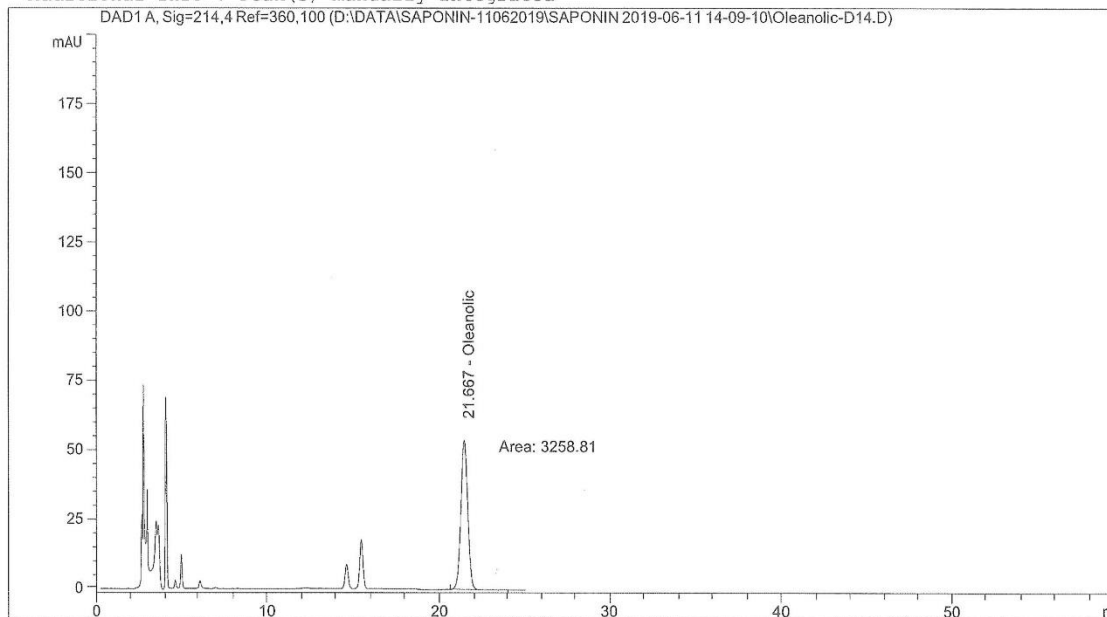
RetTime	Type	Area	Amt/Area	Amount	Grp	Name
[min]		[mAU*s]		[ug/L]		
21.659	MM	3147.34218	5.98635e-3	18.84109		Oleanolic

Totals : 18.84109

*** End of Report ***

Sample Name: Oleanolic-D14

```
=====
Acq. Operator   : HT                               Seq. Line :    1
Acq. Instrument : Instrument 1                       Location  : Vial 37
Injection Date  : 11-Jun-19 20:42:59                Inj       :    1
                                                    Inj Volume: 50.0 µl
Acq. Method     : D:\DATA\SAPONIN-11062019\SAPONIN 2019-06-11 14-09-10\Oleanolic.M
Last changed    : 11-Jun-19 11:34:20 by HT
                  (modified after loading)
Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\OLEANOLIC11062019.M
Last changed    : 11-Jun-19 9:00:22 by HT
                  (modified after loading)
Additional Info : Peak(s) manually integrated
=====
```



External Standard Report

```
Sorted By           : Signal
Calib. Data Modified : 11-Jun-19 21:13:03
Multiplier:         : 1.0000
Dilution:           : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
```

Signal 1: DAD1 A, Sig=214,4 Ref=360,100

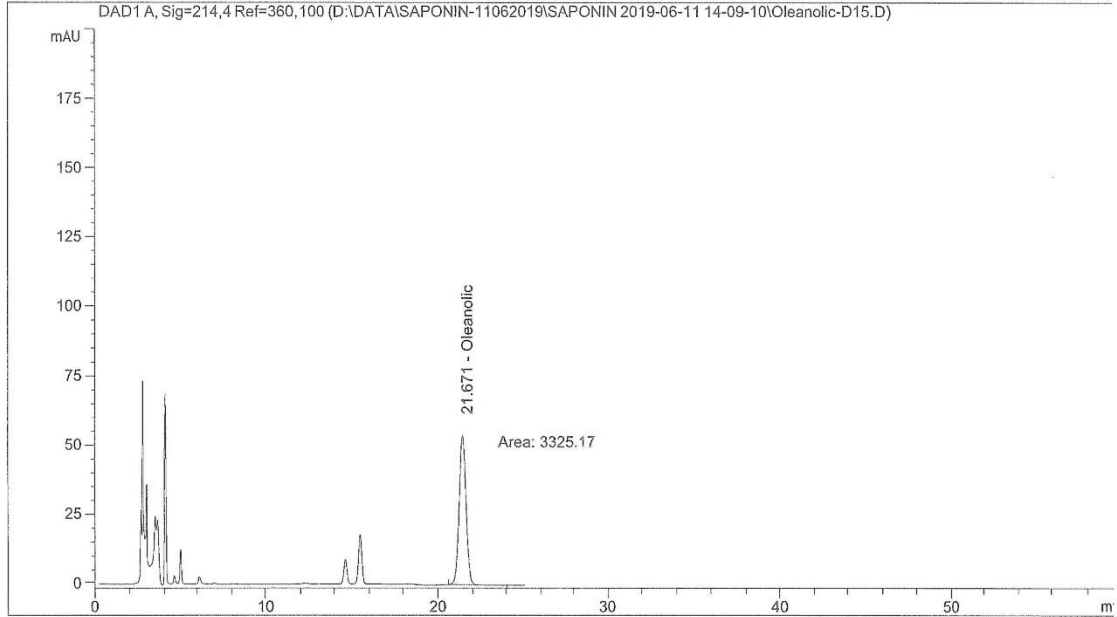
RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [ug/L]	Grp	Name
21.667	MM	3258.80913	6.00073e-3	19.55523		Oleanolic

Totals : 19.55523

*** End of Report ***

Sample Name: Oleanolic-D15

```
=====
Acq. Operator   : HT                               Seq. Line : 1
Acq. Instrument : Instrument 1                     Location  : Vial 38
Injection Date  : 11-Jun-19 21:13:58              Inj       : 1
                                                    Inj Volume: 50.0 µl
Acq. Method     : D:\DATA\SAPONIN-11062019\SAPONIN 2019-06-11 14-09-10\Oleanolic.M
Last changed    : 11-Jun-19 11:34:20 by HT
                  (modified after loading)
Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\OLEANOLIC11062019.M
Last changed    : 11-Jun-19 9:00:22 by HT
                  (modified after loading)
Additional Info  : Peak(s) manually integrated
=====
```



External Standard Report

```
Sorted By           : Signal
Calib. Data Modified : 11-Jun-19 21:44:23
Multiplier:         : 1.0000
Dilution:           : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
```

Signal 1: DAD1 A, Sig=214,4 Ref=360,100

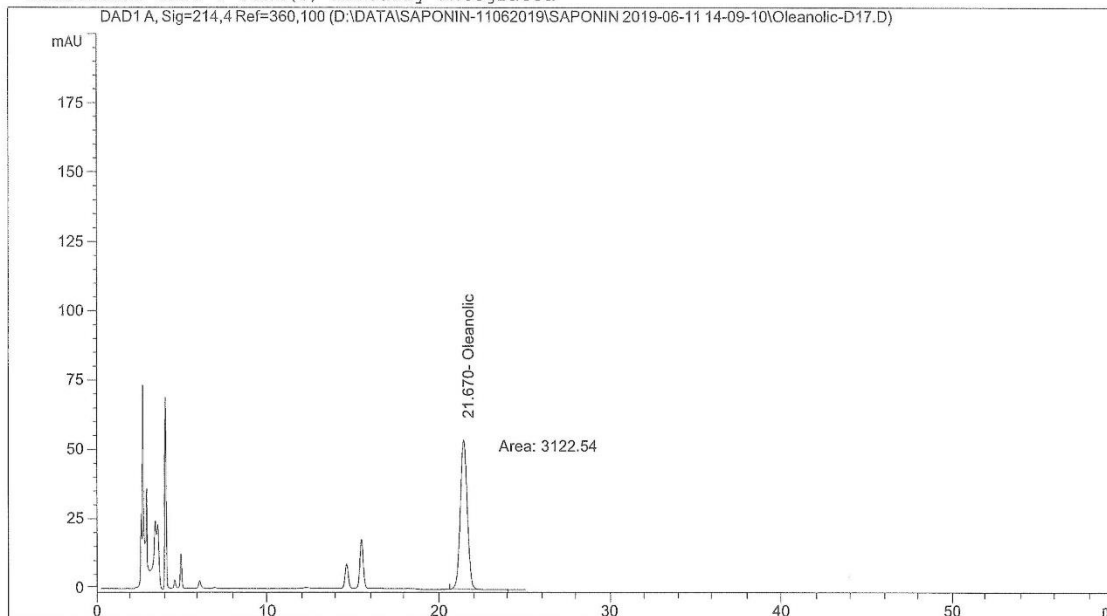
RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [ug/L]	Grp	Name
21.671	MM	3325.17923	6.00044e-3	19.55254		Oleanolic

Totals : 19.55254

*** End of Report ***

Sample Name: Oleanolic-D17

```
=====
Acq. Operator   : HT                               Seq. Line :    1
Acq. Instrument : Instrument 1                     Location  : Vial 40
Injection Date  : 11-Jun-19 22:15:44              Inj       :    1
                                                    Inj Volume: 50.0 µl
Acq. Method     : D:\DATA\SAPONIN-11062019\SAPONIN 2019-06-11 14-09-10\Oleanolic.M
Last changed    : 11-Jun-19 11:34:20 by HT
                : (modified after loading)
Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\OLEANOLIC11062019.M
Last changed    : 11-Jun-19 9:00:22 by HT
                : (modified after loading)
Additional Info  : Peak(s) manually integrated
=====
```



External Standard Report

```
Sorted By           : Signal
Calib. Data Modified : 11-Jun-19 22:46:10
Multiplier:         : 1.0000
Dilution:           : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
```

Signal 1: DAD1 A, Sig=214,4 Ref=360,100

RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [ug/L]	Grp	Name
21.670	MM	3122.54162	6.00098e-3	18.73831		Oleanolic

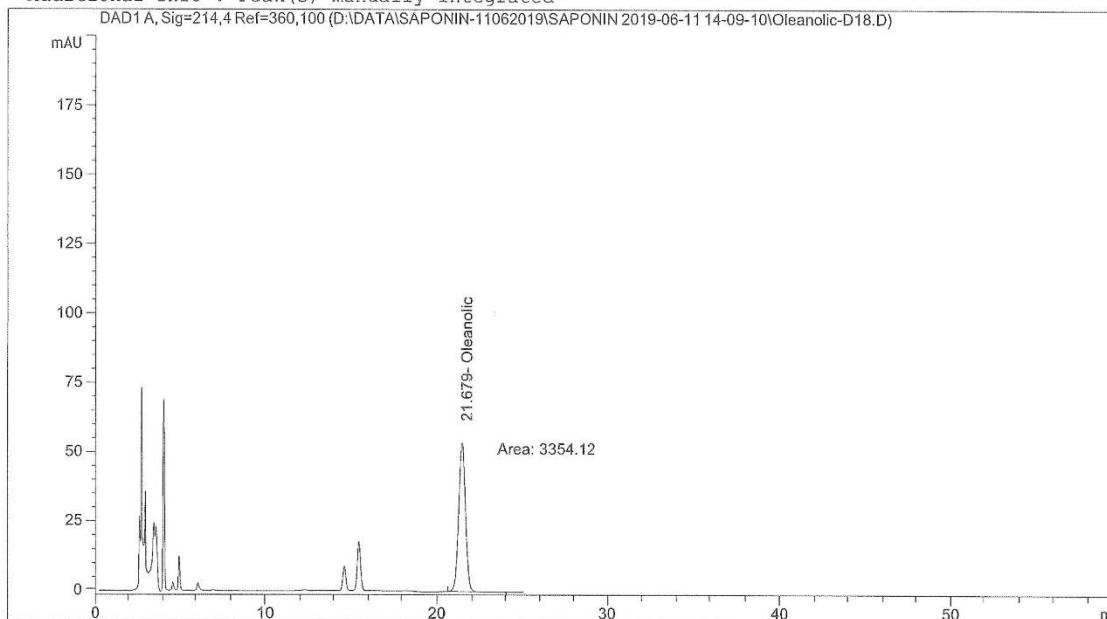
Totals : 18.73831

*** End of Report ***

Sample Name: Oleanolic-D18

```
=====
Acq. Operator   : HT                               Seq. Line :    1
Acq. Instrument : Instrument 1                     Location  : Vial 41
Injection Date  : 11-Jun-19 22:46:19              Inj       :    1
                                                    Inj Volume: 50.0 µl

Acq. Method     : D:\DATA\SAPONIN-11062019\SAPONIN 2019-06-11 14-09-10\Oleanolic.M
Last changed    : 11-Jun-19 11:34:20 by HT
                : (modified after loading)
Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\OLEANOLIC11062019.M
Last changed    : 11-Jun-19 9:00:22 by HT
                : (modified after loading)
Additional Info : Peak(s) manually integrated
=====
```



External Standard Report

```
Sorted By           : Signal
Calib. Data Modified : 11-Jun-19 23:17:10
Multiplier          : 1.0000
Dilution            : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
```

Signal 1: DAD1 A, Sig=214,4 Ref=360,100

RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [ug/L]	Grp	Name
21.679	MM	3354.12876	6.00109e-3	21.12843		Oleanolic

Totals : 21.12843

*** End of Report ***



KẾT QUẢ THỬ NGHIỆM

TEST REPORT

Số/ No.: 1906143


Ngày/ Date: 16/06/2019

- Tên khách hàng/ Client's name:** Nguyễn Cao Kiệt
- Địa chỉ/ Address:** Đại học Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh, khu phố 6, phường Linh Trung, quận Thủ Đức, Tp. Hồ Chí Minh
- Tên mẫu/ Name of sample:** Lá đinh lăng
- Số niêm phong/ Seal No.:** N/A
- Mô tả mẫu/ Sample description:** Mẫu lá tươi
- Ngày nhận mẫu/ Receiving date:** 11/06/2019
- Ngày phân tích/ Analysing date:** 11/06/2019 - 16/06/2019
- Kết quả thử nghiệm/ Test result:**

Stt/ No.	Tên mẫu/ Sample name	Chỉ tiêu/ Parameter	Đơn vị tính/ Unit	Kết quả/ Result	Phương pháp/ Test method
1	D1	Acid oleanolic	% (w/w)	1.12	HDPP/DL-08
2	D2			1.08	
3	D3			1.15	
4	D4			1.14	
5	D5			1.07	
6	D6			1.12	
7	D7			1.18	
8	D8			1.09	
9	D9			0.69	
10	D10			0.78	
11	D11			0.72	
12	D12			1.01	
13	D13			0.87	
14	D14			0.93	
15	D15			0.97	
16	D16			0.91	
17	D17			0.88	
18	D18			1.04	

Note/Ghi chú:

- (*) Phương pháp được VILAS công nhận/ *Method is accredited by VILAS*
- (**) Chỉ tiêu được thực hiện bởi nhà thầu phụ/ *Parameter is tested by subcontractor*
- Tên mẫu được ghi theo yêu cầu của khách hàng/ *Name of sample is written as client's request.*
- Kết quả phân tích chỉ có giá trị trên mẫu thử/ *This result is valid on tested sample only.*
- Không được sao chép một phần kết quả thử nghiệm này nếu không được sự đồng ý bằng văn bản của công ty TNHH Khoa học và Công nghệ Khai Hoàn/ *This test report shall not be reproduced except in full, without the written approval of Khai Hoan Scitech.*

Đại diện công ty/ On behalf of Khai Hoan**Nguyễn Thành Lộc**