BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC TÂY NGUYÊN

ĐINH VĂN PHÊ

HOÀN THIỆN BIỆN PHÁP KỸ THUẬT SẢN XUẤT CÂY GIỐNG SÂM NGỌC LINH (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.)

LUẬN ÁN TIẾN SĨ NÔNG NGHIỆP

ĐẮK LẮK - NĂM 2023

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

TRƯỜNG ĐẠI HỌC TÂY NGUYÊN

ĐINH VĂN PHÊ

HOÀN THIỆN BIỆN PHÁP KỸ THUẬT SẢN XUẤT CÂY GIỐNG SÂM NGỌC LINH (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.)

LUẬN ÁN TIẾN SĨ NÔNG NGHIỆP

Chuyên ngành : Khoa học Cây trồng

Mã ngành : 9 62 0110

Người hướng dẫn khoa học:

1. PGS.TS. Lê Hùng Lĩnh

2. PGS.TS. Nguyễn Văn Nam

ĐẮK LẮK - NĂM 2023

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của riêng tôi. Các số liệu nêu trong luận án là trung thực và chưa từng được sử dụng để bảo vệ bất cứ một luận án nào khác,các thông tin trích dẫn trong luận án này đều đã được chỉ rõ nguồn gốc.

Đắk Lắk, ngày ... tháng ... năm 2023

Tác giả luận án

Đinh Văn Phê

LỜI CẢM ƠN

Để hoàn thành luận án này, trước hết tôi xin bày tỏ biết ơn sâu sắc trước sự quan tâm, dìu dắt và tận tình hướng dẫn PGS.TS. Lê Hùng Lĩnh và PGS.TS. Nguyễn Văn Nam.

Tôi xin trân thành cám ơn các Thầy, Cô giáo thuộc khoa học Nông lâm nghiệp, phòng Đào tạo Sau đại học, Trường Đại học Tây Nguyên đã quan tâm và tạo điều kiện giúp đỡ tôi trong quá trình thực hiện đề tài.

Tôi xin trân trọng cám ơn lãnh đạo Viện Di truyền Nông nghiệp, Bộ môn Sinh học phân tử đã tạo điều kiện giúp đỡ tôi về mọi mặt để tôi thực hiện đề tài trong suốt thời gian qua.

Tôi xin trân trọng cám ơn PGS.TS. Lê Hùng Lĩnh- chủ nhiệm đề tài "Nghiên cứu xây dựng bộ chỉ thị phân tử phục vụ giám định, khai thác và phát triển sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis*) " *đã tạo điều kiện giúp đỡ tôi trong quá trình thực hiện đề tài.*

Tôi cũng xin bày tỏ lòng biết ơn tới Ban lãnh đạo và cán bộ Hợp tác xã Dược liệu Ngọc Lây, huyện Tu Mơ Rông, tỉnh Kon Tum đã tạo điều kiện giúp tôi trong quá trình thực hiện đề tài.

Xin chân thành cám ơn những người thân và tất cả bạn bè luôn động viên, tạo điều kiện giúp đỡ tôi trong quá trình thực hiện luận án.

Đắk Lắk, ngày ... tháng ... năm 2023

Tác giả luận án

Đinh Văn Phê

THÔNG TIN VỀ NHỮNG KẾT LUẬN MỚI CỦA LUẬN ÁN TIẾN SĨ

Tên luận án: "Hoàn thiện biện pháp kỹ thuật sản xuất cây giống sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.)"

Chuyên ngành: Khoa học Cây trồng; Mã số: 9 62 01 10

1. Tóm tắt nội dung Luận án

Đề tài được thực hiện tại Phòng Sinh học Phân tử thuộc Viện Di truyền Nông nghiệp, Hợp tác xã Dược liệu hữu cơ Tu Mơ Rông, huyện Tu Mơ Rông, tỉnh Kon Tum từ năm 2017-2021 với mục tiêu quan trọng của đề tài: (1) xây dựng quy trình xác định đúng sâm Ngọc Linh bằng mã vạch DNA phục vụ xây dựng được những vườn giống sâm đạt chuẩn; (2) hoàn thiện kỹ thuật sản xuất cây giống sâm Ngọc Linh bằng phương pháp nhân giống *invitro* và hữu tính từ hạt. Sản xuất cây giống sâm đúng phương pháp, áp dụng công nghệ hiện đại trong sinh học phân tử để xác định chính xác đúng cây giống sâm Ngọc Linh sẽ đáp ứng yêu cầu phát triển, cung cấp nguyên liệu dược liệu chất lượng cao một cách bền vững, phục vụ cho nhu cầu trong nước và xuất khẩu.

Đề tài được thực hiện với các nội dung nghiên cứu cơ bản như sau:

- Hiện trạng phát triển và sản xuất cây giống sâm Ngọc gồm: (1) đánh giá thực trạng trồng, quy hoạch bảo tồn và phát triển cây sâm Ngọc Linh trong những năm qua; (2) đánh giá hiện trạng sản xuất cây giống trong thời gian qua; (3) đánh giá một số yếu tố hạn chế trong phát triển và sản xuất cây giống sâm Ngọc Linh.

- Xây dựng bộ chỉ thị đánh giá đúng cây giống sâm Ngọc Linh gồm: (1) thiết kế chỉ thị phân tử DNA sâm Ngọc Linh: (2) xác định chỉ thị phân tử đặc hiệu kiểm định sâm Ngọc Linh.

- Hoàn thiện các biện pháp kỹ thuật sản xuất cây giống sâm Ngọc Linh bằng phương pháp nhân giống *in vitro* gồm: (1) môi trường tối ưu tạo phôi vô

tính; (2) nhân phôi và cây con; (3) tạo rễ và hoàn thiện cây con; (4) ra vườn ươm: tạo môi trường tối ưu cho sự sinh trưởng của cây sâm *in vitro.*

- Hoàn thiện biện pháp kỹ thuật sản xuất cây giống sâm Ngọc Linh bằng phương pháp nhân giống hữu tính từ hạt gồm: (1) xử lý quả/hạt giống sâm Ngọc Linh; (2) phương pháp bảo quản hạt giống (tự nhiên và nhân tạo); (3) giá thể gieo hạt giống.

- Hoàn thiện một số biện pháp kỹ thuật chính trồng sâm Ngọc Linh dưới giàn mái che gồm: (1) nghiên cứu mật độ trồng cây sâm Ngọc Linh thích hợp; (2) nghiên cứu liều lượng phân hữu cơ vi sinh thích hợp đối với cây sâm Ngọc Linh năm thứ 3.

2. Những kết quả mới của luận án

- Đề tài đã đánh giá được diện tích thực trồng sâm Ngọc Linh tại Kon Tum và Quảng Nam hiện nay là 1.425 ha/47.309 ha (chiếm 3% diện tích quy hoạch); sản xuất > 5 triệu cây giống trong thời gian qua và xác định có 5 yếu tố hạn chế trong việc phát triển và sản xuất cây giống sâm Ngọc Linh tại vùng nghiên cứu.

- Đã xác định được chỉ thị phân tử M31 là chỉ thị phân tử đặc hiệu có thể sử dụng xác định đúng giống sâm Ngọc Linh. Đây là phương pháp hiện đại, chính xác, hiệu quả giúp xây dựng được vườn sâm giống thuần chủng, minh bạch thương mại và bảo tồn nguồn gen.

- Hoàn thiện các biện pháp kỹ thuật trong quá trình sản xuất công nghiệp cây giống sâm Ngọc Linh bằng công nghệ nuôi cấy mô tế bào cho tỷ lệ cây giống sâm Ngọc Linh *in vitro* sống cao.

- Hoàn thiện biện pháp kỹ thuật sản xuất cây giống sâm Ngọc Linh từ hạt. Hạt được xử lý ngâm trong dung dịch GA_3 100 ppm trong vòng 45 phút có khả năng phá ngủ nghỉ và tăng tỷ lệ nảy mầm của hạt.

INFORMATION ON NEW CONCLUSIONS OF THE DOCTORAL THESIS

Thesis title: "Improving technical measures to produce Ngoc Linh ginseng (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.)" seedlings.

Specialized: Crop Science; Code: 9 62 01 10

1. Summary of thesis content

The project is done at Department of Molecular Biology at the Institute of Agricultural Genetics, Tu Mo Rong Organic Pharmaceutical Cooperative, Tu Mo Rong district, Kon Tum province from 2017-2021 with the important objectives of the project: (1) building a process to properly identify Ngoc Linh ginseng by DNA barcodes to serve the construction of standard ginseng seed gardens; (2) perfecting the production technique of Ngoc Linh ginseng seedling by *in vitro* and sexual propagation from seeds. Producing ginseng seedlings according to the correct method, applying modern technology in molecular biology to accurately identify Ngoc Linh ginseng seedlings will meet development requirements and provide high-quality medicinal materials in a timely manner. sustainable, serving domestic and export needs.

The study was conducted with the following basic research contents:

- Current status of development and production of Ngoc ginseng seedlings include: (1) evaluates current situation of planting, planning to preserve and develop Ngoc Linh ginseng in recent years; (2) assesses the current state of seedling production in the past time; (3) evaluate alimiting factors in the development and production of Ngoc Linh ginseng seedlings.

- Developing a set of indicators to properly evaluate Ngoc Linh ginseng seedlings, including: (1) designing molecular markers of Ngoc Linh ginseng DNA: (2) identifying specific molecular markers for testing Ngoc Linh ginseng.

- Completing technical measures to produce Ngoc Linh ginseng seedlings by *in vitro* propagation, including: (1) optimal environment for clonal embryogenesis; (2) multiplication of embryos and seedlings; (3) rooting and finishing of seedlings; (4) to the nursery: creating an optimal environment for the growth of ginseng plants *in vitro*.

- Completing technical measures to produce Ngoc Linh ginseng seedlings by means of sexual propagation from seeds, including: (1) treatment of Ngoc Linh ginseng seeds/fruits; (2) seed preservation methods (natural and artificial); (3) seeding medium.

- Completing a number of key technical measures to grow Ngoc Linh ginseng under a canopy, including: (1) studying the appropriate density of Ngoc Linh ginseng; (2) study the appropriate dose of microorganic fertilizer for Ngoc Linh ginseng in the 3rd year.

2. New results of the thesis

- The project has evaluated the actual planting area of Ngoc Linh ginseng in Kon Tum and Quang Nam at present is 1,425 ha/47,309 ha (accounting for 3% of the planned area); produced > 5 million seedlings in the past time and identified 5 limiting factors in the development and production of Ngoc Linh ginseng seedlings in the study area.

- Molecular indicator M31 has been identified as a specific molecular indicator that can be used to properly identify Ngoc Linh ginseng variety. This is a modern, accurate and effective method to help build a purebred ginseng garden, trade transparency and preserve genetic resources.

- Completing technical measures in the process of industrial production of Ngoc Linh ginseng seedlings by tissue culture technology for a high survival rate of Ngoc Linh ginseng seedlings in vitro.

- Perfecting technical measures to produce Ngoc Linh ginseng seedlings from seeds. Treated seeds soaked in 100 ppm GA_3 solution for 45 minutes has the ability to break dormancy and increase seed germination rate.

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN ..... **i**
LỜI CÁM ƠN ..... **ii**
INFORMATION ON NEW CONCLUSIONS OF THE DOCTORAL THESIS ..... **v**
MỤC LỤC ..... **viii**
DANH MỤC BẢNG BIỂU ..... **xiii**
DANH MỤC HÌNH ẢNH ..... **xv**
DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT ..... **xvii**
MỞ ĐẦU **1**
1. Tính cấp thiết của đề tài 1
2. Mục đích và yêu cầu 3
2.1. Mục đích 3
2.2. Yêu cầu 3
3. Ý nghĩa khoa học và thực tiễn 4
3.1. Ý nghĩa khoa học 4
3.2. Ý nghĩa thực tiễn 4
4. Đối tượng và phạm vi nghiên cứu của đề tài 5
5. Địa điểm và thời gian nghiên cứu 5
6. Những đóng góp mới của luận án 5
CHƯƠNG I TỔNG QUAN TÀI LIỆU **6**
1.1. Nguồn gốc chi *Panax* 6
1.2. Các loài nhân sâm Việt Nam 10
1.4. Ứng dụng chỉ thị phân tử trong việc giám định loài nhân sâm 15
1.4.1. Kết quả ứng dụng nghiên cứu ADN mã vạch trong kiểm định nhân sâm trên thế giới 15

1.4.2. Kết quả nghiên cứu ứng dụng chỉ thị phân tử trong nghiên cứu sâm ở Việt Nam 22
1.5. Ứng dụng công nghệ tế bào trong nhân nhanh giống nhân sâm trên thế giới và Việt Nam 25
1.5.1. Nghiên cứu công nghệ tế bào nhân giống sâm trên thế giới 25
1.5.2. Nghiên cứu công nghệ tế bào nhân giống sâm ở Việt Nam 31
1.6. Nghiên cứu biện pháp kỹ thuật nhân giống từ hạt trên thế giới và Việt Nam ... 34
1.6.1. Kết quả nghiên cứu biện pháp kỹ thuật nhân giống từ hạt trên thế giới34
1.6.2. Kết quả nghiên cứu biện pháp kỹ thuật nhân giống từ hạt sâm Ngọc Linh ở Việt Nam 35
1.7. Kết quả nghiên cứu kỹ thuật trồng và chăm sóc nhân sâm 37
1.7.1. Kết quả nghiên cứu kỹ thuật trồng và chăm sóc nhân sâm trên thế giới .. 37
1.7.2. Kết quả nghiên cứu kỹ thuật trồng và chăm sóc sâm Ngọc Linh ở Việt Nam 39
CHƯƠNG II VẬT LIỆU, NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU 42
2.1. Vật liệu nghiên cứu 42
2.1.1. Vật liệu 42
2.1.2. Thiết bị, dụng cụ, môi trường, hóa chất, điều kiện nuôi cấy mô và thiết kế chỉ thị phân tử 44
2.1.2.1. Thiết bị - dụng cụ - hóa chất 44
2.1.2.2. Môi trường nuôi cấy 44
2.1.2.3. Hóa chất và thiết bị, dụng cụ thiết kế chỉ thị phân tử 44
2.2. Thời gian và địa điểm nghiên cứu 45
2.3. Nội dung nghiên cứu 45
2.4. Phương pháp nghiên cứu 45

2.4.1. Nội dung 1: Đánh giá, xác định hiện trạng phát triển và sản xuất cây giống sâm Ngọc Linh 45
2.4.2. Nội dung 2: Nghiên cứu xây dựng bộ chỉ thị phân tử đánh giá đúng cây giống sâm Ngọc Linh. 46
2.4.3. Nội dung 3: Nghiên cứu hoàn thiện biện pháp kỹ thuật sản xuất cây giống sâm Ngọc Linh bằng phương pháp nhân giống invitro 48
2.4.4. Nội dung 4: Nghiên cứu hoàn thiện biện pháp kỹ thuật sản xuất cây giống hữu tính từ hạt 57
2.4.5. Nội dung 5: Nghiên cứu một số biện pháp kỹ thuật chính trồng sâm Ngọc Linh dưới giàn mái che 60
2.5. Phương pháp xử lý số liệu 64
CHƯƠNG III KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN 65
3.1. Xác định hiện trạng phát triển và sản xuất cây giống sâm Ngọc Linh 65
3.1.1. Thực trạng trồng, quy hoạch bảo tồn và phát triển cây sâm Ngọc Linh trong những năm qua 65
3.1.2. Hiện trạng sản xuất cây giống trong thời gian qua 68
3.1.3. Một số yếu tố hạn chế trong phát triển và sản xuất cây giống sâm Ngọc Linh 71
3.2. Nghiên cứu phương pháp xác định đúng cây giống sâm Ngọc Linh bằng chỉ thị phân tử 73
3.2.1. Kết quả thiết kế chỉ thị phân tử DNA sâm Ngọc Linh 74
3.2.2. Kết quả xác định chỉ thị phân tử đặc hiệu kiểm định sâm Ngọc Linh .. 77
3.3. Nghiên cứu hoàn thiện biện pháp kỹ thuật sản xuất cây giống sâm Ngọc Linh bằng phương pháp *invitro* 88
3.3.1. Kết quả nghiên cứu mẫu tạo mô sẹo có khả năng sinh phôi và tạo phôi vô tính giống sâm Ngọc Linh 89
3.3.1.1. Kết quả nghiên cứu phương pháp xử lý mẫu sâm Ngọc Linh 89

3.3.1.2. Kết quả nghiên cứu cảm ứng tạo mô sẹo 96
3.3.1.3. Kết quả nghiên cứu cảm ứng tạo phôi vô tính 98
3.3.2. Kết quả nghiên cứu môi trường nhân phôi và tạo củ cây nuôi cấy mô sâm Ngọc Linh 101
3.3.3. Kết quả nghiên cứu kỹ thuật nhân và nuôi dưỡng củ cây nuôi cấy mô sâm Ngọc Linh 106
3.3.4. Kết quả nghiên cứu tạo cây con hoàn chỉnh mẫu giống sâm Ngọc Linh 108
3.3.5. Kết quả khảo sát khả năng thích ứng của cây giống sâm Ngọc Linh in vitro trong vườn ươm có giàn mái che 114
3.3.5.1. Nghiên cứu ảnh hưởng của giá thể đến khả năng thích ứng của cây giống sâm Ngọc Linh invitro trong vườn ươn có giàn mái che. 114
3.3.5.2. Nghiên cứu ảnh hưởng của tuổi cây đến khả năng thích ứng của cây giống sâm Ngọc Linh in vitro trong vườn ươm có giàn mái che 117
3.4. Nghiên cứu hoàn thiện biện pháp kỹ thuật sản xuất cây giống hữu tính từ hạt sâm Ngọc Linh 120
3.4.1. Kết quả nghiên cứu phương pháp xử lý quả giống/hạt, bảo quản hạt và giá thể gieo hạt đến tỷ lệ nảy mầm, sự sinh trưởng cây giống sâm Ngọc Linh 121
3.4.1.1. Kết quả nghiên cứu xử lý quả/hạt giống sâm Ngọc Linh trước khi gieo 121
3.4.1.2. Kết quả xác định ảnh hưởng của phương pháp bảo quản hạt giống (tự nhiên và nhân tạo) đến tỷ lệ mọc mầm, tỷ lệ hình thành cây con và tỷ lệ xuất vườn cây giống sâm Ngọc Linh 123
3.4.1.3. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của giá thể gieo hạt đến khả năng mọc mầm, sinh trưởng của cây giống sâm Ngọc Linh 125

3.5. Kết quả nghiên cứu một số biện pháp kỹ thuật chính trồng sâm Ngọc Linh dưới giàn mái che 128
3.5.1. Kết quả ảnh hưởng của khoảng cách trồng đến chiều cao, đường kính thân và đường kính tán sâm Ngọc Linh 128
3.5.2. Kết quả ảnh hưởng của khoảng cách trồng đến chiều dài củ, đường kính củ và năng suất cá thể sâm Ngọc Linh 130
3.5.3. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của liều lượng phân bón hữu cơ vi sinh đến dinh dường đất trồng sâm thí nghiệm 132
3.5.4. Kết quả ảnh hưởng của liều lượng phân bón hữu cơ vi sinh đến chiều cao, đường kính thân và đường kính tán sâm Ngọc Linh 135
3.5.5. Kết quả ảnh hưởng của liều lượng phân bón hữu cơ vi sinh đến chiều dài củ, đường kính củ và năng suất cá thể sâm Ngọc Linh 136
KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ 139
4.1. Kết luận 139
4.2. Đề nghị 140
DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH KHOA HỌC ĐÃ CÔNG BỐ CÓ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN 141
TÀI LIỆU THAM KHẢO 143

DANH MỤC BẢNG BIỂU

Bảng 1.1. Những loài sâm được xác định hiện nay 6
Bảng 1.2. Danh sách các loài sâm trên thế giới 7
Bảng 1.3. Sản lượng và doanh số thị trường nhân sâm trên toàn thế giới 12
Bảng 1.4. Giá trị sản xuất nông nghiệp và xuất khẩu Nhân sâm Hàn Quốc 13
Bảng 1.5. Tình hình sản xuất nhân sâm Hàn Quốc 14
Bảng 2.1. Điều kiện phản ứng PCR 47
Bảng 2.2. Công thức thí nghiệm ảnh hưởng của nồng độ Auxin và Cytokinin trong phòng nuôi cấy mô 52
Bảng 3.1. Diện tích sâm Ngọc Linh được triển khai tại huyện Nam Trà My 66
Bảng 3.2: Diện tích đất quy hoạch bảo tồn, phát triển sâm Ngọc Linh theo độ cao 68
Bảng 3.3. Số lượng cây giống sâm Ngọc Linh sản xuất trong thời gian qua 68
Bảng 3.4. Kết quả xác định chỉ thị phân tử đặc hiệu kiểm định sâm Ngọc Linh.....80
Bảng 3.5. Tỷ lệ nhiễm khi xử lý mẫu từ mô củ cây sâm Ngọc Linh 90
Bảng 3.6. Tỷ lệ nhiễm khi xử lý mẫu từ mô chồi mầm cây sâm Ngọc Linh 92
Bảng 3.7. Tỷ lệ nhiễm khi vào mẫu từ mô thân cây sâm Ngọc Linh xử lý bằng 0,7% thiophanate methyl 94
Bảng 3.8. Tỷ lệ nhiễm khi vào mẫu từ mô lá cây sâm Ngọc Linh xử lý bằng 0,7% thiophanate methyl 95
Bảng 3.9. Ảnh hưởng của chất 2,4-D đến sự tạo thành mô sẹo ở cây sâm Ngọc Linh 97
Bảng 3.10. Ảnh hưởng của 2,4-D, NAA và TDZ đến sự tạo thành phôi vô tính từ mô sẹo có khả năng sinh phôi sâm Ngọc Linh 100
Bảng 3.11. Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến sự nảy mầm của phôi thành cây con *in vitro* với củ micro sâm Ngọc Linh 104
Bảng 3.12. Ảnh hưởng của môi trường dinh dưỡng và chất điều tiết sinh trưởng đến khả năng ra rễ của cây có củ micro cây sâm Ngọc Linh 109

Bảng 3.13. Ảnh hưởng của hàm lượng than hoạt tính đến sự sinh trưởng và ra rễ của cây *in vitro* sâm Ngọc Linh 111
Bảng 3.14. Ảnh hưởng của hàm lượng dinh dưỡng cơ bản đến sinh trưởng của cây sâm Ngọc Linh 113
Bảng 3.15. Ảnh hưởng của giá thể đến khả năng thích ứng cây giống sâm Ngọc Linh *in vitro* trong điều kiện vườn ươm có giàn mái che 116
Bảng 3.16. Ảnh hưởng của tuổi cây đến khả năng thích ứng của cây giống *in vitro* trong vườn ươm có giàn mái che 117
Bảng 3.17. Ảnh hưởng của biện pháp xử lý hạt giống đến thời gian mọc, tỷ lệ mọc và hình thành cây con sâm Ngọc Linh 122
Bảng 3.18. Tỷ lệ mọc mầm, tỷ lệ hình thành cây con và tỷ lệ xuất vườn đối với các phương pháp bảo hạt giống khác nhau 124
Bảng 3.19. Khả năng mọc mầm và tỷ lệ hình thành cây con giống sâm Ngọc Linh trên các loại giá thể khác nhau 126
Bảng 3.20. Ảnh hưởng của giá thể gieo hạt đến sinh trưởng cây giống sâm Ngọc Linh (sau khi gieo hạt 10 tháng) 127
Bảng 3.21. Ảnh hưởng của khoảng cách trồng đến chiều cao, đường kính và đường kính tán sâm Ngọc Linh 130
Bảng 3.22. Ảnh hưởng của khoảng cách trồng đến chiều dài củ, đường kính củ và năng suất cá thể sâm Ngọc Linh 131
Bảng 3.23. Một số chỉ tiêu dinh dưỡng đa lượng trong đất thí nghiệm năm thứ 3 134
Bảng 3.24. Ảnh hưởng của liều lượng phân bón hữu cơ vi sinh đến chiều cao, đường kính thân và đường kính tán sâm Ngọc Linh 135
Bảng 3.25. Ảnh hưởng của liều lượng phân bón hữu cơ vi sinh đến chiều dài củ, đường kính củ và năng suất cá thể sâm Ngọc Linh 137

DANH MỤC HÌNH ẢNH

Hình 1.1. Sự phân bố của các loài Sâm trên thế giới.....9
Hình 1.2. Biểu đồ sản lượng sâm trên thế giới 12
Hình 1.3. Biểu đồ giá trị sản phẩm sâm thế giới.....12
Hình 1.4. Biểu đồ giá trị sản xuất nông nghiệp Hàn Quốc 13
Hình 1.5. Biểu đồ giá trị xuất khẩu nông nghiệp Hàn Quốc.....13
Hình 1.6. Biểu đồ diện tích, nhân sâm Hàn Quốc 15
Hình 2.1. Cây giống sâm Ngọc Linh *in vitro* 2 năm tuổi.....56
Hình 2.2. Cây giống *in vitro* sâm Ngọc Linh.....57
Hình 3.1. Trình tự đoạn GSS mã số BZ957983.1 trên NCBI 74
Hình 3.2. Kết quả tìm kiếm đoạn SSR trên trình tự mã số BZ957983.1 bằng chương trình Gramene SSRtool 75
Hình 3.3. Kết quả thiết kế mồi cho đoạn trình tự mã số BZ957983.1 75
Hình 3.4. Kết quả khảo sát chỉ thị phân tử trên gel agarose 2,5%.....77
Hình 3.5. Kết quả điện di sản phẩm PCR bằng chỉ thị E30, E10 và G22 phân biệt sâm Ngọc Linh với một số loài sâm khác.....78
Hình 3.6. Kết quả điện di sản phẩm PCR bằng chỉ thị M7 và M10 phân biệt sâm Ngọc Linh với một số loài sâm khác.....79
Hình 3.7. Kết quả điện di sản phẩm PCR bằng chỉ thị G5 và E29 phân biệt sâm Ngọc Linh với một số loài sâm khác.....80
Hình 3.8. Kết quả điện di sản phẩm PCR bằng chỉ thị SHPT83 phân biệt sâm Ngọc Linh với một số loài sâm khác.....87
Hình 3.9. Mẫu cấy nhiễm nấm 92
Hình 3.10. Mô sẹo sâm Ngọc Linh tạo từ chồi mầm trên môi trường MS+0,5mg/L 2,4-D.....97
Hình 3.11. Mô sẹo có khả năng sinh phôi sâm Ngọc Linh.....99

Hình 3.12. Phôi vô tính sâm Ngọc Linh tạo từ mô sẹo có khả năng sinh phôi 101
Hình 3.13. Sự nảy mầm của phôi thành cây con với củ micro cây sâm Ngọc Linh105
Hình 3.14. Khối mô phôi vô tính sâm Ngọc Linh.....107
Hình 3.15. Cây mô sâm Ngọc Linh phát triển đa chồi trên củ 107
Hình 3.16. Cây sâm Ngọc Linh có củ và chưa có rễ.....108
Hình 3.17. Cây sâm Ngọc Linh *in vitro* trên hai môi trường MS và SH.....110
Hình 3.18. Cây sâm Ngọc Linh *in vitro* hoàn chỉnh với rễ, củ micro, thân lá trên môi trường dinh dưỡng tối ưu.....112
Hình 3.19. Cây sâm Ngọc Linh *in vitro* ở công thức SH1/2 114
Hình 3.20. Cây giống sâm Ngọc Linh *in vitro* trong thí nghiệm.....115
Hình 3.21. Cây giống sâm Ngọc Linh *in vitro* tại HTX dược liệu Tu Mơ Rông...119

DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT

2,4-D	2,4-dichlorophenoxyacetic acid
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism (Đa hình độ dài nhân bản chọn lọc)
BAC	Bacterial artificial chromosome
BA	Benzyladenine
Bp	Base pair
CV	Coefficient of Variation (Hệ số biến thiên)
CT	Công thức
cs	Cộng sự (Dùng cho tài liệu tham khảo tiếng Việt)
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTPs	Deoxyribonucleotide
DT	Diện tích
Đ/C	Đối chứng
EST	Expressed sequence tags (nhãn xác định trình tự biểu hiện)
et al	và cộng sự (dùng cho tài liệu tiếng Anh)
GAPDH	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GSS	Genome survey sequence
GA_3	Gibberellin A_3
HPLC	High-performance liquid chromatography (Sắc ký lỏng hiệu năng cao)
Ha	Hecta
IAA	Indole acetic acid
IBA	Indole butyric acid

ITS	Internal transcribed spacer (Vùng đệm được sao mã)
ISSR	Inter Simple Sequence Repeats (Chuỗi lặp lại đơn giản giữa)
LED	Light emitting diode (đi-ốt phát quang)
LTR-RT	Long Terminal Repeat Retrotransposon
LSD	Least Significant Difference (Sai khác nhỏ nhất có ý nghĩa)
MS	Môi trường Murashige và Skoog, 1962
MatK	Maturase K
NAA	Naphthalene acetic acid
N	Năm thứ
NCBI	National Center for Biotechnology Information (Trung tâm Thông tin Công nghệ Sinh học Quốc gia)
OM	Hàm lượng hữu cơ tổng số
PCR	Polymerase chain reaction
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism (Phân tích đa hình độ dài đoạn cắt giới hạn DNA lục lạp)
RAPD	Randomly Amplified Polymosphic DNA (Đa hình DNA nhân ngẫu nhiên)
RbcL	Ribulose bisphosphate carboxylase large chain
SCAR	Sequence Characterised Amplification (Vùng nhân bản chuỗi được mô tả)
SH	Schenk and Hildebrandt (1972)
STT	Số thứ tự
STS	Sequence Tagged Tite (Kỹ thuật xác định vị trí dán nhãn trình tự)
SNP	Single Nucleotide Polymorphisms (Đa hình nucleotide đơn)

SSR	Simple Sequence Repeates (Các chuỗi lặp lại đơn giản)
TDZ	Thidiazuron
TNHH	Trách Nhiệm Hữu Hạn
UGT	Unique glycosyltranferase

MỞ ĐẦU

1. Tính cấp thiết của đề tài

Sâm Ngọc Linh là loài cây đặc hữu của Việt Nam và được định danh công bố quốc tế là một loài sâm mới với tên khoa học là *Panax vietnamensis* Ha et Grushv bởi tiến sỹ Hà Thị Dụng và giáo sư I. V. Grushvitsky. Sâm Việt Nam (*P.vietnamensis*) được phát hiện từ năm 1973 (Nguyễn Thượng Dong *và cs*., 2007) [3].Thành phần hóa sinh và giá trị dược liệu của sâm Ngọc Linh được tiến hành phân tích bởi nhiều nhóm tác giả (Nguyễn Thị Tâm *và cs*.,2018) [31]; Duc, N. M. *et al*., 1999 [63]; Yamasaki, K, 2000 [140]; Trịnh Thị Hương *và cs*., 2016 [16]). Kết quả từ các nhà khoa học chỉ ra rằng trong củ sâm Ngọc Linh có chứa 52 hoạt chất saponin, cao gấp đôi so với thành phần saponin trong nhân sâm Hàn Quốc (Nguyễn Thị Tâm *và cs*., 2018) [31]. Tại hội nghị quốc tế về sâm, loài sâm này được xếp vào nhóm các loài sâm quý trên thế giới cùng với sâm Triều Tiên (*Panax ginseng* C.A.Mey), sâm Mỹ (*Panaxquinquefolium L.*) và Tam thất (*Panax notoginseng Chen.)* (Đặng Ngọc Phái *và* cs., 2002) [27].

Sâm Ngọc Linh được xác định là cây thuốc quý có giá trị sử dụng với rất nhiều công dụng tốt cho sức khỏe con người và giá trị kinh tế cao nên đã bị mua bán, khai thác cạn kiệt, gần như không còn trong tự nhiên. Trước tình hình đó, Chính phủ đã quyết định thành lập vùng cấm rừng quốc gia ở khu vực có sâm tập trung tại 2 tỉnh Kon Tum và Quảng Nam, đồng thời xếp sâm Ngọc Linh vào danh mục những cây thuốc quý, hiếm cần được ưu tiên bảo vệ theo Nghị định số 160/2013/NĐ-CP của Thủ tướng Chính phủ về tiêu chí xác định loài nguy cấp, quý, hiếm được ưu tiên bảo vệ. Định hướng phát triển sâm Việt Nam trở thành sản phẩm mang thương hiệu quốc gia, ngày 01/01/2021, Thủ tướng Chính phủ đã ký quyết định số 157/QĐ-TTg về việc ban hành

Chương trình phát triển sản phẩm Quốc gia "Sâm Việt Nam" đến năm 2030. Mục tiêu phát triển cây sâm Ngọc Linh trở thành cây kinh tế mạnh xứng tầm là sản phẩm Quốc gia.

Hiện nay, giá trị thương mại sâm Ngọc Linh rất cao từ 150-200 triệu đồng/kg, nên sâm Ngọc Linh đang bị giả mạo, trà trộn với các loài sâm khác không có giá trị. Diện tích trồng và phát triển sâm Ngọc Linh với quy mô nhỏ lẻ, manh mún; hạt giống trôi nổi không có sự quản lý dẫn đến lẫn tạp và thoái hóa giống, việc sản xuất cây giống, trồng phát triển tạo vùng nguyên liệu sâm Ngọc Linh vẫn còn gặp rất nhiều khó khăn. Chưa có quá nhiều đề tài/dự án cho nghiên cứu sản xuất và phát triển cây giống sâm. Việc nhân giống và trồng sâm hiện nay vẫn chủ yếu dựa theo kinh nghiệm truyền thống với hệ số nhân giống thấp, chưa có quy trình sản xuất, nhân giống và kỹ thuật canh tác chuẩn cho cây sâm Ngọc Linh (*Kết quả khảo sát năm 2018*). Để phát triển nhanh được cây sâm theo hướng công nghiệp, cần nhanh chóng nghiên cứu xây dựng quy trình nhân giống, quy trình canh tác để đáp ứng nhu cầu phát triển sâm Ngọc Linh tạo ra sản phẩm hàng hóa và xây dựng thương hiệu cho sâm Ngọc Linh.

Một trong những mục tiêu quan trọng của đề tài là: (1) xây dựng quy trình xác định đúng sâm Ngọc Linh bằng mã vạch DNA phục vụ xây dựng được những vườn giống sâm đạt chuẩn. (2) hoàn thiện kỹ thuật sản xuất cây giống sâm Ngọc Linh bằng phương pháp nhân *invitro* và hữu tính từ hạt. Sản xuất cây giống sâm đúng phương pháp, áp dụng công nghệ hiện đại trong sinh học phân tử để xác định chính xác đúng cây giống sâm Ngọc Linh sẽ đáp ứng yêu cầu phát triển bền vững, cung cấp nguyên liệu dược liệu chất lượng cao một cách bền vững, phục vụ nhu cầu trong nước và xuất khẩu; đem lại công ăn việc làm, nâng cao thu nhập và ổn định đời sống xã hội cho đồng bào dân tộc ở vùng khó khăn là một việc làm rất có ý nghĩa. Vì vậy, đề tài "Hoàn thiện

biện pháp kỹ thuật sản xuất cây giống sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.)" sẽ có ý nghĩa khoa học và thực tiễn, tính ứng dụng cao, hữu ích với người dân và các nhà sản xuất sâm.

2. Mục đích và yêu cầu

2.1. Mục đích

- Xây dựng quy trình xác định đúng giống sâm Ngọc Linh bằng phương pháp chỉ thị phân tử, nhằm phục vụ phát triển các vườn giống sâm gốc chuẩn đảm bảo chất lượng giống.

- Hoàn thiện biện pháp kỹ thuật sản xuất cây giống sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha *et* Grushv.) bằng phương pháp nuôi cấy mô tế bào đáp ứng nhu cầu về cây giống sâm Ngọc Linh hiện nay.

- Hoàn thiện biện pháp kỹ thuật sản xuất cây giống sâm Ngọc Linh bằng hạt đạt tỷ lệ nảy mầm cao, chất lượng cây con tốt.

2.2. Yêu cầu

- Thiết kế chỉ thị phân tử và xác định các chỉ thị đặc hiệu để kiểm định xác định đúng cây giống sâm Ngọc Linh.

- Xác định được thời gian xử lý mẫu cấy thích hợp để giảm tỷ lệ nhiễm vi khuẩn/nấm; môi trường nuôi cấy thích hợp cho sự hình thành và phát triển phôi vô tính, tỷ lệ sống sót và đặc điểm sinh trưởng của cây con *invitro* sâm Ngọc Linh.

- Hoàn thiện biện pháp kỹ thuật nhân giống hữu tính trong điều kiện hạt sâm Ngọc Linh được xử lý, phương pháp bảo quản; nghiên cứu các thành phần giá thể khác nhau để đảm bảo tiêu chuẩn cây con xuất vườn cao và xác định được một số biện pháp kỹ thuật chính (mật độ, liều lượng phân bón) để trồng và phát triển cây sâm.

3. Ý nghĩa khoa học và thực tiễn

3.1. Ý nghĩa khoa học

Sử dụng chỉ thị phân tử để đánh giá đúng nguồn cây giống sâm Ngọc Linh là phương pháp mới, đã được áp dụng trên nhiều đối tượng cây trồng, nhờ đó rút ngắn được thời gian; có độ chính xác và hiệu quả cao trong chọn lọc.

Đề tài nghiên cứu đã góp thêm cơ sở lý luận cho việc sản xuất cây giống sâm Ngọc Linh bằng phương pháp nuôi cấy mô thông qua con đường phát sinh phôi vô tính có ưu điểm vượt trội là hệ số nhân giống cao, tạo ra phôi hoàn chỉnh (rễ, thân lá, củ) và ít chịu biến dị trong quá trình nuôi cấy; phương pháp nhân giống hữu tính từ hạt là xử lý khả năng ngủ nghỉ của hạt để nâng cao hiệu quả sản xuất cây giống.

Hoàn thiện biện pháp kỹ thuật sản xuất cây giống sâm Ngọc Linh (nhân giống *invitro* và nhân giống hữu tính từ hạt) và các dữ liệu khoa học thu được có thể làm tài liệu tham khảo có giá trị cho giảng dạy và nghiên cứu khoa học trên đối tượng cây dược liệu này.

3.2. Ý nghĩa thực tiễn

- Phương pháp xác định đúng giống sâm Ngọc Linh bằng các chỉ thị phân tử đặc hiệu giúp xây dựng được vườn sâm đúng giống, minh bạch thương mại và bảo tồn nguồn gen.

- Nghiên cứu hoàn thiện biện pháp kỹ thuật nhân giống nuôi cấy mô là tiền đề cho một bước phát triển trong việc sản xuất số lượng lớn cây con giống sâm Ngọc Linh chất lượng cao ở quy mô hàng hóa.

- Thành công trong việc nhân giống hữu tính bằng việc xử lý ngủ nghỉ hạt (bóc vỏ, phơi âm can và xử lý GA_3), phương pháp bảo quản; gieo hạt đã nứt nanh trên thành phần giá thể khác nhau để đảm bảo cây giống đồng đều có tỷ lệ xuất vườn cao là một định hướng an toàn cho việc sản xuất cây giống

ở quy mô hàng hóa, góp phần tăng cường mở rộng diện tích trồng cây sâm Ngọc Linh đại trà.

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

- Đối tượng nghiên cứu là sâm Ngọc Linh (*P.vietnamensis*)

- Phạm vi nghiên cứu: Nghiên cứu hoàn thiện biện pháp kỹ thuật sản xuất cây giống (nhân giống *invitro*, nhân giống hữu tính từ hạt) sâm Ngọc Linh (*P.vietnamensis*).

5. Địa điểm và thời gian nghiên cứu

- Địa điểm nghiên cứu: Bộ môn Sinh học phân tử thuộc Viện Di truyền Nông nghiệp (Từ Liêm, Hà Nội); vùng trồng sâm Ngọc Linh tại núi Ngọc Linh tỉnh Kon Tum.

- Thời gian nghiên cứu: Năm 2017 - 2021.

6. Những đóng góp mới của luận án

- Đề tài luận án đã đánh giá, xác định được hiện trạng phát triển và sản xuất cây giống sâm Ngọc Linh; điều kiện thời tiết tại vùng trồng sâm qua một số năm và một số yếu tố hạn chế trong phát triển và sản xuất cây giống sâm Ngọc Linh.

- Xây dựng được phương pháp xác định đúng giống sâm Ngọc Linh bằng chỉ thị phân tử DNA mã vạch. Đây là phương pháp hiện đại, chính xác, hiệu quả giúp xây dựng được vườn sâm giống thuần chủng, minh bạch thương mại và bảo tồn nguồn gen.

- Hoàn thiện các biện pháp kỹ thuật trong quá trình sản xuất công nghiệp cây giống sâm Ngọc Linh bằng công nghệ nuôi cấy mô tế bào cho tỷ lệ cây giống sâm Ngọc Linh *in vitro* sống cao.

- Hoàn thiện được các biện pháp kỹ thuật sản xuất cây giống sâm Ngọc Linh từ hạt. Xác định hạt sâm Ngọc Linh phơi âm can, xử lý ngâm trong dung dịch GA_3 100 ppm trong vòng 45 phút có khả năng phá ngủ nghỉ của hạt

CHƯƠNG I
TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. Nguồn gốc chi *Panax*

Nhân sâm (*Ginseng*) thuộc họ Ngũ gia bì (*Araliacaea).* Họ Ngũ gia bì bao gồm khoảng 700 loài thực vật. Cà rốt, cần tây và củ cải cũng thuộc họ này. 700 loài này được chia thành 70 chi, một trong số đó là chi *Panax*. Có 5-13 loài của chi *Panax* (Persons, W.S and Davis, J.M, 2007) [114]. Nhưng trong số đó chỉ có 5 loài đã được đăng ký chính thức (Bảng 1.1). *Panax japonicum* được phát hiện mọc tự nhiên tại miền núi của Nhật Bản từ thời cổ đại. Người Nhật đã trồng nhân sâm *Panax* và xuất khẩu sang Trung Quốc và Hồng Kông (Persons, W.S, 1994) [115]. *Panax notoginseng* có phẩm chất dược lý tương tự như những nhân sâm của 02 loài có giá trị nhất (*P. quinquefolium* và *P. ginseng*) và nó ngày càng trở nên phổ biến như một loại dược thảo. *Panax trifolium*, còn gọi là sâm lùn hoặc lạc, được tìm thấy ở Mỹ (Persons, W.S and Davis, J.M, 2007) [114].

Bảng 1.1. Những loài sâm được xác định hiện nay

STT	Tên latin	Tên thường gọi	Nguồn gốc
1	*Panax ginseng*	Asian or Korean ginseng	Siberia,Korea, China
2	*Panax japonicum*	Japanese ginseng	Japan
3	*Panax notoginseng*		China
4	*Panax trifolium*	Dwarf ginseng, ground nut	North America
5	*Panax quinquefolium*	American ginseng	North America, Canada

Nguồn: Persons and Davis, 2007 [114]

Theo các tác giả (Lee, F.C, 1992 [89]; Li,T.S, 1995 [99]; Smallfield, B.M,1997 [125]) chi *Panax* bao gồm 11 loài và 1 thứ. Dựa vào nguồn gốc địa lý hay trồng thương mại sâm chia thành hai thứ chính đó là sâm Châu Á (*Panax ginseng Asian*) và sâm Mỹ (*Panax quinquefolium American*). Trong đó phần lớn các chi phân bổ ở Châu Á, từ Đông- Bắc Á đến cận Himalaya và chỉ có 3 loài ở vùng Bắc Mỹ (Hình 1.1). Đặc biệt tất cả những loài thuộc chi *Panax* đều có giá trị làm thuốc, một số loài của chi này hiện đang được trồng với quy mô lớn ở nhiều quốc gia và đã trở thành những cây thuốc nổi tiếng, không chỉ trong phạm vi của nền y học cổ truyền Phương Đông mà trên toàn thế giới như Nhân sâm (*P.ginseng*); Giả nhân sâm (*P. pseudoginseng*); sâm Mỹ (*P.quiquefolius*) và Tam thất (*P. notoginseng*) (Nguyễn Tập, 2005) [34]. Hiện nay đã cập nhật 17 loài sâm trên thế giới (Bảng 1.2).

Bảng 1.2. Danh sách các loài sâm trên thế giới

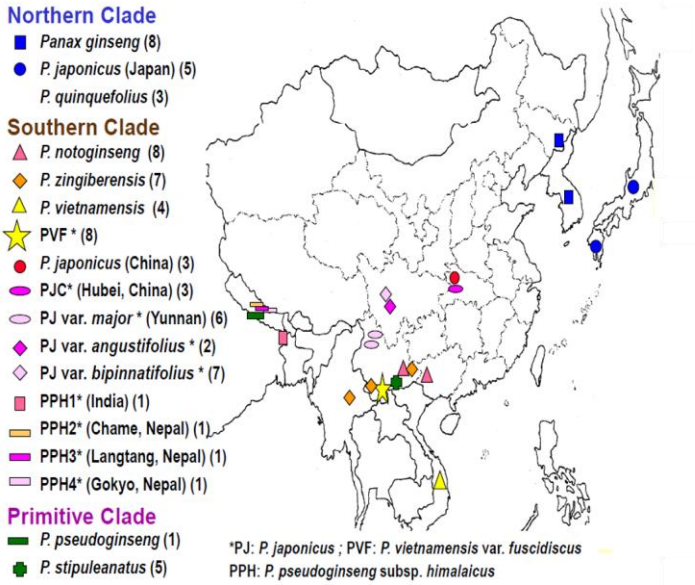
STT	Tên loài	Tên thường gọi	Nguồn trích dẫn
1	*P. ginseng*	Korean ginseng (Sâm Hàn Quốc)	[152]
2	*P. quinquefolius*	American ginseng (Sâm Mỹ)	[153]
3	*P. notoginseng*	Chinese ginseng (Sâm Trung Quốc)	[154]
4	*P. japonicas*	Japanese ginseng (Sâm Nhật Bản)	[155]
5	*P. vietnamensis*	Vietnamese ginseng (Sâm Ngọc Linh)	[156]; [157]; [158]
6	*P. bipinnatifidus*	Feather-leaf bamboo ginseng	[159]
7	*P. stipuleanatus*	Pingpien ginseng	[160]; [161];

			[162]
8	*P. omeiensis*	Omei ginseng	[163]
9	*P. pseudoginseng*	Himalayan ginseng	[164]
10	*P. assamicus*	N/A	[165]
11	*P. shangianus*	N/A	[166]
12	*P. sinensis*	N/A	[167]
13	*P. trifolius*	Dwarf ginseng	[168]
14	*P. variabilis*	N/A	[169]; [170]
15	*P. wangianus*	Narrow-leaved pseudoginseng	[171]; [172]; [173]
16	*P. sokpayensis*	N/A	[174]
17	*P. zingiberensis*	Ginger ginseng	[175]; [176]

Chi *Panax* bao gồm 16-18 loài (Sharma, S. K. and Pandit, M. K, 2009) [121]. Trong số đó, ba loài, *P. ginseng*, *P. notoginseng* và *P. quinquefolius*, được trồng rộng rãi để sản xuất thương mại. Môi trường sống của các loài *Panax* được phân loại thành ba khu vực; Đông Bắc Á, Tây Trung Quốc, và Đông Bắc Mỹ. P. *ginseng* sống ở bán đảo Triều Tiên và Đông Bắc Trung Quốc. *P. japonicus* và *P. notoginseng* được tìm thấy ở Nhật Bản và phương Tây Trung Quốc, tương ứng. *P. quinquefolius* mọc tự nhiên ở miền đông Bắc Mỹ.

Thành phần loài của chi nhân sâm (*Panax L.*) có nhiều thay đổi tùy thuộc các nhóm tác giả. Cho đến nay các tác giả khá thống nhất chi *Panax L.*, họ Nhân sâm *Araliaceae* trên thế giới có 11 loài và 1 thứ (variete) là: Nhân sâm (*P. ginseng*); Giả nhân sâm (*P. pseudoginseng*); Tam thất (*P.notoginseng*); sâm Mỹ (*P.quinquefolius*); Sâm Nhật (*P.japonicus*); Sâm lá hẹp (*P. wangianus*); Sâm vũ diệp (*P.bipinnatifidus*); Sâm vũ diệp lá hẹp (*P. bipinnatifolius* var. angustifolius); Tam thất hoang (*P.stipuleanatus*); Sâm

gừng (*P. zingiberensis*); Sâm ba lá (*P.trifoliatus*) và sâm Ngọc Linh (*P. vietnamensis*) (Nguyễn Thượng Dong *và cs*, 2007) [3].



Hình 1.1. Sự phân bố của các loài Sâm trên thế giới

Nhân sâm (*P.ginseng*) là một vị thuốc quý mà các tác dụng dược lý như: tăng lực, tăng trí nhớ, bảo vệ cơ thể chống stress, bảo vệ và tác động lên hệ miễn dịch giúp chống viêm, bảo vệ tế bào chống lão hóa, tăng sức đề kháng cho cơ thể và điều trị bệnh tim mạch.. đã được nhiều nhà khoa học ngoài nước nghiên cứu chứng minh (Wang,H. *et al*., 2016 [135]; Mahady G.B. *et al*., 2000 [102]; Choi, H.I. *et al*., 2011 [58]; Fernandez-Moriano.*et al*., 2017 [65]; Lee, Y.Y. *et al*., 2021 [98]). Nhân sâm (*P.ginseng*) vốn mọc tự nhiên, đồng thời đây cũng là loài có lịch sử trồng trọt tới vài trăm năm. Loài sâm trồng nhiều sau Nhân sâm là Tam thất (*P. notoginseng*) và Giả nhân sâm (*P. pseudoginseng*). Tại Trung Quốc, Tam thất được trồng với quy mô 1.000 ha ở Châu Vân Sơn (tỉnh Vân Nam) và một số nơi khác thuộc tỉnh Quảng Tây và Quảng Đông. Ngoài ra loài cây thuốc này còn được trồng nhiều ở Nhật Bản, Hàn Quốc và Triều Tiên. Thị trường Nhân sâm thế giới tăng trưởng hàng năm, với giá trị hàng tỉ USD/năm, mang lại nguồn kinh tế đáng kể cho các

Quốc gia trồng sâm. Không những thế, tại một số quốc gia sử dụng Nhân sâm lâu đời như Hàn Quốc, Trung Quốc và Nhật Bản.

1.2. Các loài nhân sâm Việt Nam

Việt Nam, sâm được trồng từ lâu đời và được coi như thần dược bồi bổ sức khoẻ. Theo tác giả Phạm Hoàng Hộ đã xuất bản bộ sách "Cây cỏ Việt Nam" đã ghi nhận có 3 loài Nhân sâm phân bố ở Việt Nam, đó là *P. Bipinatifidus* ở Hoàng Liên Sơn, *P.pseudogingseng* ở Sa Pa và loài *P. schingseng Nees* var. *japonicum*. Năm 1970 bộ sách "Cây cỏ Việt Nam" được tái bản và đã ghi nhận *P. japonica* với phân bố là khu vực núi Lang Bian và Kon Tum (Phạm Hoàng Hộ, 1970) [14]. Tuy nhiên tác giả không đề cập đến *P. vietnamensis*, loài mà đã được 2 tác giả Hà Thị Dụng và Grushvitzky đã công bố năm 1985 (H.T. Dung, I.V. Grushvitzky, 1985) [74]. Tuy nhiên, đến năm 2000, Phạm Hoàng Hộ đã mở rộng việc ghi nhận về chi *Panax* ở Việt Nam, theo đó *P. vietnamensis* phân bố ở Gia Lai và Kon Tum được bổ sung vào phiên bản này, nâng số lượng loài thuộc chi *Panax* ghi nhận tại Việt Nam lên 4 loài (Phạm Hoàng Hộ, 2000) [15]. Ngoài 4 loài *Panax* đã được ghi nhận, theo kết quả công bố của Phan Kế Long *và cs*., 2014b) [22], loài sâm Việt có hai thứ đó là sâm Ngọc Linh (*P. vietnamensis* Ha & Grushv. var. *vietnamensis*) và sâm Lai Châu (*Panax vietnamensis* var. *fuscidiscus*). Theo điều tra nghiên cứu của Viện Dược liệu, Trung tâm Sâm và dược liệu thành phố Hồ Chí Minh, Viện Sinh thái tài nguyên thực vật cho thấy ở Việt Nam có phân bố tự nhiên các loài *P. bipinatifidus*, *P. Pseudogingseng* và *P. vietnamensis*. Điều này được thể hiện rõ hơn trong công bố của tác giả (Nguyễn Tập, 2005) [34] thì ở Việt Nam có 5 loài thuộc chi *Panax*, trong đó đã khẳng định 3 loài mọc tự nhiên và đang là đối tượng bảo tồn, đó là Sâm vũ diệp (*P.bipinatifidus*),Tam thất hoang (*P. stipuleanatus*) phân bổ trên dãy Hoàng Liên Sơn (tỉnh Lào Cai) và đặc biệt là loài sâm Ngọc Linh

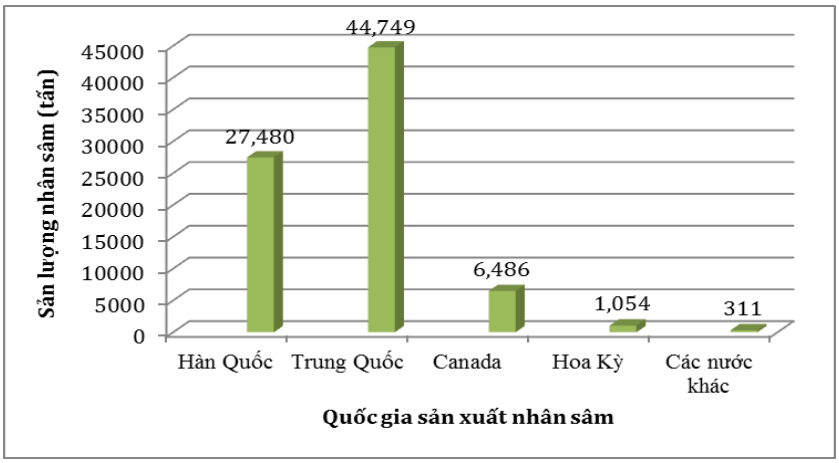
(*P.vietnamensis*) là loài đặc hữu của vùng núi Ngọc Linh (thuộc hai tỉnh Quảng Nam và Kon Tum) và Sâm Lai Châu (*P. vietnamensis* var. f*uscidiscus*). Năm 2011, Nguyễn Thị Phương Trang và đồng tác giả đã công bố phát hiện về một loài sâm mới ở Việt Nam dựa trên phân tích các sai khác trong trình tự vùng ITS so với các loài khác thuộc chi nhân sâm phân bố ở Đông Á (Nguyễn Thị Phương Trang và cs., 2011) [37]. Đến nay một số loài sâm Việt Nam khác cũng đã được phát hiện và nghiên cứu như sâm Nghệ An, sâm Lâm Đồng, sâm Na Hang, Tuyên Quang. Loài *Panax* sp. (Pu Xai Lai Leng, Nghệ An) gần nhất với loài tam thất hoang (*P. stipuleanatus*) (ITS-rDNA: bootstrap 98%, sai khác 2 nucleotide) (Phan Ke Long *và cs.*, 2014a) [21]. Loài *P. vietnamensis* var. *Langbianensis (*núi Lang Biang, Lâm Đồng) là thứ mới của loài sâm Việt Nam (Van Duy, N., *et al*., 2016) [133]. Loài sâm *Panax* sp. (Na Hang,Tuyên Quang) đã xác định là một loài phụ mới vì một số sự khác biệt về đặc điểm hình thái của nó so với các loại sâm khác ở Việt Nam (Bon, T. N.*et al*., 2019) [55].

1.3. Tình hình sản xuất kinh doanh nhân sâm trên thế giới

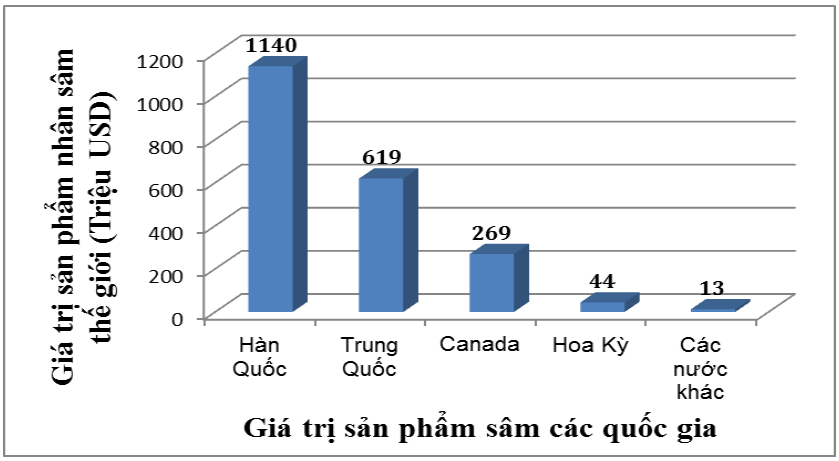
Sâm là sản phẩm hiện đang được phân phối ở 35 nước trên thế giới với mức độ tiêu thụ khác nhau ở từng nước. Mặc dù không có thống kê chính xác về việc sản xuất và phân phối nhân sâm nhưng theo số liệu ước tính của các Công ty nghiên cứu thị trường, 4 nước sản xuất sâm lớn nhất là Trung Quốc (44.749 tấn), Hàn Quốc (27.480 tấn), Canada (6.486 tấn) và Mỹ (1.054 tấn), chiếm hơn 99% sản lượng nhân sâm toàn thế giới (ước tính 80.080 tấn). Thị trường sâm có giá trị ước khoảng 2.085 triệu USD, trong đó thị trường Hàn Quốc vào khoảng 1.140 triệu USD là thị trường phân phối sâm lớn nhất thế giới, tiếp đến là Trung Quốc (619 triệu USD), còn lại các nước khác (326 triệu USD) (Baeg IH and So SH., 2013) [50]. tại bảng 1.3; hình 1.2 và hình 1.3.

Bảng 1.3. Sản lượng và doanh số thị trường nhân sâm trên toàn thế giới

Chỉ tiêu \ Quốc gia	Hàn Quốc	Trung Quốc	Canada	Hoa Kỳ	Các nước khác	Toàn bộ
Sản lượng (tấn)	27.480	44.749	6.486	1.054	311	80.080
Giá trị (triệu USD)	1.140	619	269	44	13	2.085



Hình 1.2. Biểu đồ sản lượng sâm trên thế giới

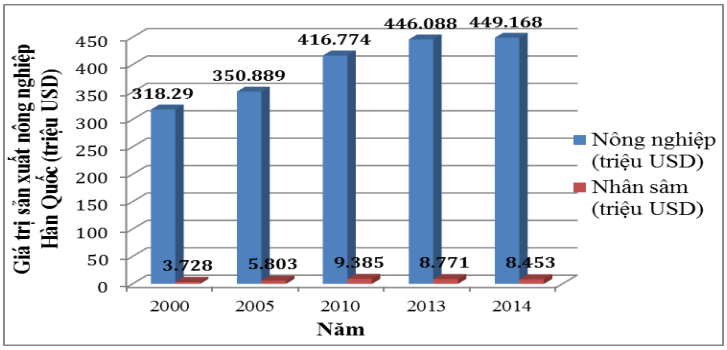


Hình 1.3. Biểu đồ giá trị sản phẩm sâm thế giới

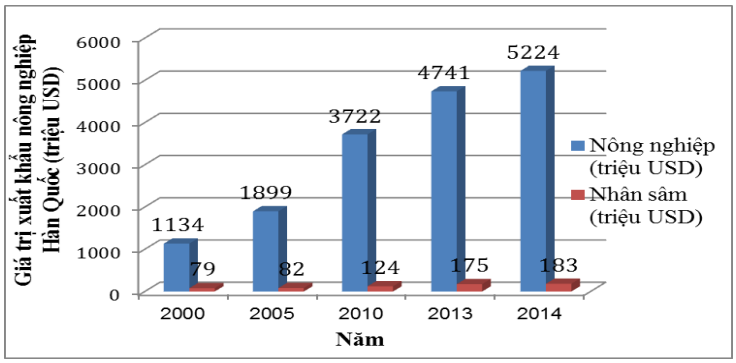
Bảng 1.4. Giá trị sản xuất nông nghiệp và xuất khẩu Nhân sâm Hàn Quốc

Chỉ tiêu / Năm	Sản xuất nông nghiệp		Xuất khẩu	
	Nông nghiệp (triệu USD)	Nhân sâm (triệu USD)	Nông nghiệp (triệu USD)	Nhân sâm (triệu USD)
2000	318.290	3.728	1.134	79
2005	350.889	5.803	1.899	82
2010	416.774	9.385	3.722	124
2013	446.088	8.771	4.741	175
2014	449.168	8.453	5.224	183

Nguồn: Bộ Nông nghiệp, Thực phẩm và Nông thôn, Thống kê nhân sâm 2015



Hình 1.4. Biểu đồ giá trị sản xuất nông nghiệp Hàn Quốc



Hình 1.5. Biểu đồ giá trị xuất khẩu nông nghiệp Hàn Quốc

Tại bảng 1.4, hình 1.4 và 1.5 cho thấy: mặc dù ngành công nghiệp nhân sâm Hàn Quốc chiếm trung bình 1,82 %/năm tổng sản lượng nông nghiệp của Quốc Gia; xuất khẩu đạt trung bình 4,2%/năm, nhưng tỷ lệ sản xuất nhân sâm đã tăng 4,7 lần so với năm 2000. Do đó, mặc dù ngành công nghiệp nhân sâm Hàn Quốc không chiếm tỷ trọng lớn trong ngành nông nghiệp Hàn Quốc, nhưng là một mặt hàng quan trọng hỗ trợ thu nhập của ngành nông nghiệp

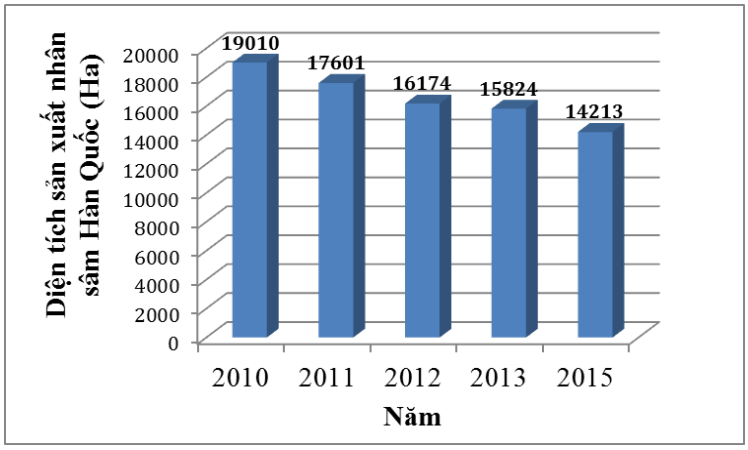
Mặc dù có biến động nhỏ về diện tích trồng nhân sâm của Hàn Quốc kể từ năm 2010, nhưng diện tích vẫn đạt trung bình trên 16.000 ha/năm. Lượng sản xuất trung bình giảm 21,9 %; xuất khẩu tăng trung bình 79,71% so với năm 2010 tại bảng 1.5, hình 1.6.

Sản lượng sâm Hàn Quốc hàng năm ước đạt 23.000 tấn, đem lại doanh thu 2 tỷ USD. Tổng diện tích canh tác là 15.000 ha, năng suất thu hoạch 6 tấn/ha. Lượng sâm xuất khẩu năm 2017 là 6.415 tấn đạt giá trị 160 triệu US) [177].

Bảng 1.5. Tình hình sản xuất nhân sâm Hàn Quốc

Chỉ tiêu / Năm	Diện tích (ha)	Sản lượng (tấn)	Xuất khẩu (tấn)
2010	19.010	26.944	3.298
2011	17.601	26.737	3.712
2012	16.174	26.057	4.380
2013	15.824	21.968	5.118
2015	14.213	21.043	5.927

Nguồn: Bộ Nông nghiệp, Thực phẩm và Nông thôn, Thống kê nhân sâm 2015



Hình 1.6. Biểu đồ diện tích, nhân sâm Hàn Quốc

1.4. Ứng dụng chỉ thị phân tử trong việc giám định loài nhân sâm

1.4.1. Kết quả ứng dụng nghiên cứu ADN mã vạch trong kiểm định nhân sâm trên thế giới

Đối với cây nhân sâm, đây là cây đa bội thể có bộ genom lớn. Do vậy việc áp dụng kỹ thuật phân tử trong nghiên cứu cũng như chọn giống mới luôn đi sau các cây trồng khác. Một số nước thành công trong việc nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật phân tử đã bắt đầu nghiên cứu cây nhân sâm.

Phân tích đa hình chiều dài đoạn cắt giới hạn (Restriction fragment length polymorphism - RFLP) là một phương pháp nhận biết trình tự DNA cụ thể dựa trên sự khác nhau về chiều dài của các đoạn DNA được tạo ra nhờ enzyme cắt giới hạn. Đây là kỹ thuật khá đơn giản, không tốn nhiều thời gian và yêu cầu ít DNA, được sử dụng khá phổ biến để nhận biết và phân loại các loài. Được phát triển lần đầu tiên vào năm 1985, kỹ thuật RFLP đã được ứng dụng trên rất nhiều đối tượng thực vật. Năm 1997, RFLP lần đầu tiên được ứng dụng để so sánh các đoạn trình tự mã hóa 18S rRNA, có kích thước khoảng 500 bp của giống sâm Hàn Quốc, 2 giống *P. japonicus, P. quinquefolius* và một số mẫu sản phẩm thương mại bào chế từ sâm (Fushimi,H *et al*., 1997) [67]. Sự sai khác của đoạn mã hóa 18S rRNA cũng được nghiên cứu trên *P. ginseng* trồng tại Trung Quốc và Hàn Quốc (Um, J.Y.*et al*., 2001) [131].

Từ lâu, việc hoán đổi các giống sâm và một số loài có hình thái tương tự, như hoa phấn (*Mirabilis jalapa*), thương lục (*Phytolacca acinosa*), thương lục Mỹ (*P. americana*) và cát cánh (*Platycodon grandiflorus*) đã diễn ra rất phổ biến trên thị trường (Diao Y. *et al*., 2009 [61], Ngan F. *et al*., 1999 [106]). Một trong những nỗ lực đã được ghi nhận là ứng dụng RFLP trong phân tích vùng ITS1-5, 8S-ITS2 từ rễ khô của 6 mẫu sâm và so sánh với *M. jalapa* và *P. Acinosa (*Ngan F. *et al*., 1999) [106]. Đoạn trình tự này được dùng khá phổ biến trong xác định các giống sâm Hàn Quốc với các loài khác nhau thuộc chi *Panax* phục vụ công tác lai tạo (Kim,O.T.*et al*., 2007) [79]. Để phân biệt *P. ginseng* với *P. americana* và *P. grandiflorus*, các nhà khoa học Trung Quốc đã khuếch đại gen mục tiêu bằng kỹ thuật PCR-RFLP nhằm giúp xác định đột biến điểm và đánh giá sự sai khác của đoạn trình tự 5S rDNA (Diao, Y. *et al.*, 2009) [61]. Bên cạnh đó, một số gen lục lạp khác, điển hình như *psb*A và *rbc*L, cũng được sử dụng để nhận biết các giống sâm. Các nghiên cứu cho thấy, PCR-RFLP có thể nhận dạng giữa các loài *Panax* hoặc với một số loài tương tự sâm, tuy nhiên khả năng phân biệt giữa các giống cùng loài lại chưa hiệu quả (Jo, I.H *et al*., 2017 [76]; Kim J.*et al*., 2007 [81]).

Kỹ thuật phân tích DNA đa hình nhân bản ngẫu nhiên (Random amplification of polymorphic DNA -RAPD) được phát triển dựa trên nguyên lý sử dụng mồi đơn chứa 9-12 nucleotide ngẫu nhiên (tối thiểu là 4 nucleotide) để nhân bản các đoạn DNA bổ sung bất kỳ trong genome. Trong giai đoạn trước, RAPD đã trở thành một công cụ phổ biến để phân tích đa dạng di truyền trong quần thể cây trồng hoặc giữa các giống với ưu điểm về thời gian, chi phí và chỉ đòi hỏi một lượng mẫu nhỏ. Từ năm 1997, RAPD đã bắt đầu được sử dụng để nghiên cứu trên chi *Panax* nhằm phân biệt rễ *P. ginseng* khô thu thập từ 4 vùng sinh thái khác nhau tại Trung Quốc và Hàn Quốc (Um JY. *et al*., 2001) [131]. Với mục tiêu phân tích đa dạng di truyền

hỗ trợ công tác chọn tạo giống, một số lượng lớn chỉ thị RAPD đã được sử dụng để đánh giá các quần thể sâm *P. quinquefolius* tại Canada và Trung Quốc (Bai D. *et al*., 1997 [51]); Shao A.J. *et al*., 2004 [122]). Rất nhiều quần thể *P. ginseng* từ nhiều khu vực khác nhau cho đến nay đã được thu thập để đánh giá đa dạng di truyền và sự khác biệt giữa các giống bằng chỉ thị RAPD (Bang, K.H *et al*., 2013) [52]. Cho đến nay, chỉ thị RAPD được sử dụng rất phổ biến trong phân tích đa dạng di truyền giữa *Panax spp*. do ưu điểm về giá thành, không đòi hỏi trình tự genome của đối tượng và có thể phân tích trên số lượng mẫu lớn. Tuy nhiên, gần như tất cả các chỉ thị RAPD đều là chỉ thị di truyền trội, rất khó để xác định đoạn DNA được nhân là dị hợp (1 bản copy) hay đồng hợp (2 bản copy), nghĩa là không có khả năng phân biệt được cá thể đồng và dị hợp tử. Vì vậy, việc phân biệt giữa các giống thuộc cùng một loài *Panax* bằng chỉ thị RAPD vẫn gặp rất nhiều hạn chế (Jo I.H. *et al*., 2017) [76].

Kỹ thuật xác định vị trí dán nhãn trình tự (Sequence tagged site -STS) được thực hiện dựa trên việc nhân bản các đoạn DNA ngắn (200 - 500 bp) của các vị trí đã xác định trên genome bằng PCR. Chỉ thị đồng trội STS cho phép nhân bản cả locus bằng cách sử dụng cặp mồi PCR có trình tự đặc trưng cho locus đó. Chính vì thế, để phân tích genome giữa các *Panax* spp., thư viện DNA cần phải được thiết lập để xác định và thiết kế các cặp mồi STS đặc hiệu (Bang, K.H. *et al*., 2013) [52]. Cụ thể, mẫu lá từ 6 giống *P. ginseng* (Hàn Quốc), và 2 loài *P. quinquefolius* (Hoa Kỳ) và *P. notoginseng* (Trung Quốc) được sử dụng để tách chiết và xây dựng thư viện. Trên tổng số 214 cặp mồi STS thiết kế theo Primer 3, 4 cặp chỉ thị, bao gồm UFGp163, MFGp108, MFGp81A và UFGp156A đã được xác định có thể phân biệt được một cách chính xác kiểu gen của các mẫu tại 4 vị trí locus. Kết quả của nghiên cứu này

đã đặt ra nền móng cơ bản trong việc tối ưu hóa bộ chỉ thị này thành kít PCR đa mồi (multiplex PCR) nhằm phân biệt các mẫu *Panax*.

Trong thực vật, hiện tượng lặp lại một trật tự nucleotide (1-10 bp) đơn giản diễn ra rất phổ biến. Dựa trên các trình tự này, kỹ thuật phân tích trình tự lặp đơn (Simple sequence repeats - SSR) cho phép phát hiện được sự đa hình về kích thước giữa các trình tự lặp đơn giản, từ đó xây dựng bản đồ liên kết tính trạng mong muốn (Jo I.H. *et al*, 2017) [76]. Năm 2004, nhóm nghiên cứu Hàn Quốc đã xây dựng thành công thư viện nhiễm sắc thể nhân tạo vi khuẩn cho sâm Hàn Quốc để thiết kế các chỉ thị SSR đặc hiệu trong phân biệt các giống sâm Hàn Quốc (Hong C. P. *et al.*, 2004 [72]; Ma, K.H. *et al*, 2007 [103]). Tiếp tục sàng lọc trên thư viện genome, rất nhiều chỉ thị SSR đã được xác định, trong đó bao gồm các chỉ thị SSR cho kết quả đa hình giữa các giống sâm Hàn Quốc và một số chỉ thị SSR đặc hiệu cho phép phân biệt các giống sâm Hàn Quốc với *P. quinquefolius* đã được đề xuất (Kim J. *et al.*,2007 [81]; Van Dan, N. *et al*., 2010 [134]). Ở giai đoạn tiếp theo, công cụ SSR tỏ ra rất hiệu quả trong những vấn đề liên quan đến bảo hộ sản phẩm sâm Hàn Quốc (Jo, I.H. *et al*., 2017) [76]. Kim và cộng sự (2012) đã xây dựng bộ 19 chỉ thị SSR để đánh giá 9 giống sâm đã đăng ký tại Hàn Quốc (Kim N. H. *et al*, 2012b) [82]. Kết quả của nghiên cứu này còn cho phép xác định được con lai F1 giữa 2 giống, tạo tiền đề quan trọng cho công tác lai tạo giống sâm Hàn Quốc chất lượng cao (Kim N. H. *et al*, 2014) [83]. Tại Trung Quốc, nhu cầu kiểm định các giống sâm cũng gặp một số khó khăn. Một số nghiên cứu bước đầu đã xây dựng được hệ thống chỉ thị SSR để phân loại các giống *P. ginseng* hoặc phân biệt giữa *P. notoginseng*, *P. stipuleanatus*, *P. bipinnatifidus* với một số loài có quan hệ gần với chi *Panax* (Yang Cheng, Jun. *et al*., 2008 [143]). Tuy nhiên, nhược điểm cơ bản của phân tích SSR là thời gian và đòi

hỏi kỹ năng kiểm tra sản phẩm điện di trên polyacrylamide (Jo I.H.*et al*., 2017) [76].

Chỉ thị đa hình các nucleotide đơn (Single nucleotide polymorphism - SNP) là những điểm sai khác khi phân tích chi tiết các trình tự DNA nghiên cứu. Những thay đổi này có thể do hiện tượng đột biến điểm làm thêm, bớt hoặc thay thế các nucleotide, tạo ra sự sai khác rất nhỏ giữa các cá thể trong quần thể. Vì vậy, SNP được sử dụng rất nhiều trong nghiên cứu sự khác biệt giữa các loài trong chi *Panax*, hoặc giữa những giống sâm Hàn Quốc. Trong đó, Chunpoong là một trong những giống sâm nổi tiếng của Hàn Quốc, là nguồn nguyên liệu tốt để tạo ra hồng sâm Hàn Quốc. Để phân biệt Chunpoong với một số giống khác như Yunpoong, Gopoong, Sunpoong, Sunwon, Sunweon, Sunhyang (phát triển từ dòng Jakyung), Chungsun (thuộc dòng Chungkyung) và Gumpoong (chọn từ dòng Hwangsook), các nhà khoa học Hàn Quốc đã xác định các SNP từ vùng intron 4 của gen *nad7* trên ty thể mã hóa cho tiểu phần của phức hợp NADH dehydrogenase (Wang,H *et al*.,2010) [136]. Tương tự, nhằm phân biệt Yunpoong với các giống sâm Hàn Quốc và *P. quinquefolius*, các SNP từ vùng exon của gen mã hóa enzyme glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase đã được xác định (Sun, H. *et al*, 2011) [126]. Kết hợp với phương pháp tách nhanh sử dụng NaOH-Tris và kỹ thuật Realtime-PCR với cặp mồi yunF/yunR2 đã được chứng minh có thể sàng lọc ra Yunpoong từ một lượng lớn mẫu sâm kiểm định với độ chính xác cao. Kỹ thuật Realtime-PCR đã được phát triển với đoạn dò huỳnh quang (TaqMan-MGB probe) và những cặp mồi đặc hiệu đã được sử dụng rất phổ biến trong kiểm định các giống sâm Hàn Quốc phát triển từ dòng Jakyung (Jo I.H. *et al*, 2017) [76]. Gần đây, rất nhiều các SNP đã được tìm thấy trên đoạn intron của nhãn xác định trình tự biểu hiện (EST, Expressed sequence tag)

dựa trên genome tham chiếu của giống Chunpoong (Wang, H *et al*., 2010) [136].

Nhóm nghiên cứu Mỹ và Trung Quốc đã nghiên cứu mã vạch trong kiểm định 95 mẫu giống nhâm sâm với 11 DNA barcoding loci. Nhóm tác giả đã tìm thấy sự khác biệt đáng kể trong các vùng mã vạch tiềm năng. Sử dụng DNA barcoding loci như: matK, psbK-I, psbM-trnD, rps16 và nad1, có thể xác định khác nhau đáng kể trong các loài Nhân sâm. Đặc biệt các tác giả đã chứng minh rằng sự kết hợp của psbA-trnH và ITS là đủ để xác định tất cả các loài và các nhóm trong chi (Zuo Y. *et al*., 2011) [150].

Tại Hàn Quốc, việc sử dụng các chỉ thị phân tử trong phân loại chi *Panax* đã được triển khai nhiều và đạt được nhiều kết quả mang tính ứng dụng cao. Trường Đại học tổng hợp Chungnam Hàn Quốc đã nghiên cứu xây dựng thư viện BAC-end cho cây sâm Hàn Quốc. Thư viện BAC (bacterial artificial chromosome) gồm 106,368 clone với chiều dài trung bình khoảng 98.61 kb (Hong C. P. *et al*., 2004) [72]. Từ thư viện BAC các nhà khoa học đã thiết kế các chỉ thị phân tử SSR và thành công trong việc xác định chỉ thị phân tử đặc hiệu trong phân biệt các giống sâm của Hàn Quốc và trên thế giới. Trường Đại học Chung Ang Hàn Quốc đã nghiên cứu sự khác nhau giữa các loài nhân sâm bằng chỉ thị phân tử RAPD. Kết quả mồi OP-5A cho đơn băng ADN với các mẫu nhân sâm. Mồi chỉ thị RAPD 13B chỉ sự khác nhau giữa các loài sâm (Shim Y.H. *et al*., 2003) [123]. Trường Đại học *William & Mary* của Mỹ đã nghiên cứu đa dạng di truyền sâm Mỹ và nghiên cứu chọn giống sâm bằng chỉ thị phân tử (Grubbs, H.J. and Case, M.A, 2004) [69]. Ấn Độ đã nghiên cứu di truyền tính trạng hình thái và sử dụng chỉ thị RAPD nghiên cứu ba loài sâm (Mathur A. *et al*., 2003) [104].

Năm 2007, Kim và cộng sự đã phát triển các chỉ thị Microsatellite mới để nhận dạng *P. ginseng (*Kim J.*et al*., 2007) [81]. Nhóm nghiên cứu đã xây

dựng một thư viện được làm giàu microsatellite của *P. ginseng* và 251 trình tự mới được xác định. Thông qua việc xác định kiểu gen của 91 microsatellite bằng cách sử dụng tập hợp các mồi đặc hiệu cho chỉ thị, nhóm tác giả đã xác định 11 chỉ thị đa hình trong loài cũng như 14 chỉ thị đa hình phân biệt *P. ginseng* và *P. quinquefolius*. Nghiên cứu này đã cho thấy các chỉ thị microsatellite có thể hữu dụng cho phân tích liên kết, chọn giống di truyền và việc xác định các loài thuộc chi *Panax*.

Nguyen Van Dan và cộng sự (2010) dựa vào 2492 trình tự BAC (bacterial artificial chromosome) đại diện cho DNA bộ gen của *P. ginseng* để chọn lọc 35 microsatellite có kiểu đơn vị lặp từ 11 đến 30 nucleotide (Van Dan, N., *et al*., 2010) [134]. Thử nghiệm 35 cặp mồi được thiết kế cho thấy 12 trong số chúng là đa hình, 19 là đơn hình và 3 không có sản phẩm khuếch đại. Thử nghiệm thêm các chủng *P. quinquefolius* cho thấy các mồi có khả năng khuếch đại. Từ đó, nhóm tác giả đề xuất có thể sử dụng các chỉ thị ISSR có được trong việc phân biệt các chủng *P. ginseng* và *P. quinquefolius*, cũng như việc lập bản đồ gen và đánh giá mức độ bảo tồn.

Năm 2011, Lee và cộng sự đã phát triển một chỉ thị SCAR dẫn xuất từ ISSR để nhận dạng các chủng sâm *P. ginseng* có đặc tính tốt phục vụ cho chọn giống (Lee J.W.*et al*., 2011) [96]. 34 trong số 85 mồi ISR hình thành locus đa hình. Các mồi UBC-821, UBC-868 và UBC-878 làm nảy sinh các band đa hình giữa các chủng *P. ginseng* và cho phép phân biệt chúng với các mẫu *P. quinquefolius* và *P. notoginseng*. Hệ chỉ thị SCAR được đưa vào để làm tăng khả năng tái lặp của đa hình. Thêm vào đó, đa hình đặc hiệu cho chủng sâm Sunwon được hình thành bằng cách xử lý sản phẩm PCR bằng mồi PgI821C650 với enzyme giới hạn *TaqI*. Kết quả này là công cụ chỉ thị DNA hữu ích để xác định nhân sâm Hàn Quốc, đặc biệt là chủng Sunwon, quản lý hạt giống và các chương trình chọn giống hỗ trợ bằng chỉ thị phân tử.

Tác giả Hongtao Wang Trung tâm nghiên cứu và sản xuất sâm của Hàn Quốc đã nghiên cứu xác định chỉ thị phân tử đặc hiệu phân biệt giống sâm Chunpoong với các giống sâm khác (Wang, H *et al*., 2010) [136]. Giống nhân sâm Chunpoong là một giống nhập nội chất lượng cao và năng suất cao trong số 9 giống nhân sâm Hàn Quốc. Trung tâm đã nghiên cứu quy trình kiểm định giống Chunpoong bằng chỉ thị phân tử sử dụng các trình tự ADN của ty lạp thể (COX2) trên vị trí intron I và intron II. Chỉ thị phân tử SNP đặc hiệu đã được nghiên cứu dùng phân biệt giống nhân sâm Chunpoong với các giống nhân sâm khác một cách đơn giản và chính xác. Hua Sun và ctv (2011) đã thiết kế chỉ thị phân tử SNP dựa trên sự phân tích chỉ thị phân tử EST (expressed sequence tags) trên vùng exon của gene glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (Sun, H. *et al*., 2011) [126]. Chỉ thị phân tử SNP này đặc hiệu phân biệt giữa giống nhân sâm Yunpoong của Hàn Quốc với 12 giống nhân sâm khác. Sử dụng phương pháp kiểm định phân tử này rất đơn giản được dựa trên phương pháp NaOH - Tris và thực hiện phản ứng bằng real-time polymerase chain reaction (PCR). Với phương pháp này chỉ mất một phút để tách chiết được ADN và có thể sử dụng trực tiếp chạy phản ứng real-time PCR.

1.4.2. Kết quả nghiên cứu ứng dụng chỉ thị phân tử trong nghiên cứu sâm ở Việt Nam

Mặc dù cũng đã có một số công trình nghiên cứu về thành phần hóa học, trồng, nhân giống và chế biến đã được thực hiện, tuy nhiên cho đến nay những công bố khoa học về sâm Việt Nam, đặc biệt việc nghiên cứu về hệ gen, đánh giá đa dạng di truyền ở mức độ phân tử còn rất nhiều hạn chế. Năm 2003, tác giả Zhu và cộng sự đã tiến hành nghiên cứu đa dạng di truyền các mẫu sâm Việt Nam dựa trên trình tự *trn*K và 18S rRNA (Zhu,S. *et al*., 2003)

[148]. Kết quả ghi nhận mẫu sâm Ngọc Linh và sâm Lai Châu có quan hệ gần gũi với bootstrap 74%. Năm 2007, Nguyễn Tập *và* cs đã sử dụng kỹ thuật RAPD để xây dựng cơ sở dữ liệu DNA của một số cây thuốc quan trong đó có sâm Ngọc Linh (Nguyễn Tập *và cs*., 2007) [35]. Đã có một số tác giả trong nước sử dụng chỉ thị phân tử trong nghiên cứu đa dạng di truyền các loài sâm Việt Nam. Cụ thể, Nguyễn Thị Phương Trang và cộng sự (2011) đã tiến hành phân tích mối quan hệ di truyền của sâm Ngọc Linh (*P.vietnamensis*) với các loài trong chi *Panax* trên cơ sở trình tự nucleotide vùng ITS-rADN. Kết quả này chỉ ra rằng, các mẫu sâm Vũ Diệp thuộc 1 nhánh riêng biệt so với sâm Ngọc Linh (Nguyễn Thị Phương Trang *và cs*., 2011) [38].

Việc sử dụng các mã vạch phân tử đã được áp dụng nhưng chưa phong phú và toàn diện. Các vùng gen mã vạch được sử dụng chủ yếu là vùng *matK* và ITS (Nguyễn Văn Đạt., 2013) [7]. Vũ Huyền Trang và cs (2013) đã nghiên cứu xây dựng mã vạch DNA cho sâm Ngọc Linh trên cơ sở 5 chỉ thị DNA mã vạch *psbA-trnH, matK, trnL, rbcL và* ITS. Nhóm tác giả đã chứng minh trong 5 chỉ thị mã vạch nghiên cứu; *psbA-trnH* là chỉ thị có tiềm năng nhất, cho phép phân biệt sâm Ngọc Linh với các loài sâm khác trên thế giới với độ chính xác cao (Vũ Huyền Trang *và cs*., 2013) [39].Việc xác định được các chỉ thị phân tử cho phép xác định chính xác được loài sâm này đóng vai trò quan trọng trong việc bảo tồn, sản xuất và đảm bảo chất lượng sản phẩm cho thương hiệu sâm Ngọc Linh.

Tác giả Phan Kế Long và cộng sự (2014) khi phân tích mối quan hệ họ hàng các mẫu sâm thuộc chi *Panax* trên cơ sở trình tự nucleotide vùng *mat*K và ITS-rADN cũng chỉ ra rằng, các mẫu tam thất hoang hay còn gọi là tam thất trắng thuộc 1 nhánh riêng biệt so với sâm Ngọc Linh và sâm Lai Châu (Phan Kế Long *và cs*, 2014b) [22]. Kết quả nghiên cứu ghi nhận, hai thứ sâm Lai Châu (*P. vietnamensis* var. *fuscidiscus*) và sâm Ngọc Linh (*P.*

vietnamensis var. *vietnamensis*) của loài sâm Việt (*P. vietnamensis* Ha & Grushv.) có quan hệ chị em với bootstrap 88% và 81%. Năm 2015, tác giả Nguyen Van Binh đã nghiên cứu giải trình tự hoàn thiện genome lục lạp trên sâm Ngọc Linh (*P. vietnamensis*). Kết quả này đóng vai trò rất quan trọng trong việc nghiên cứu mối quan hệ di truyền của sâm Ngọc Linh với các loài khác trong họ *Araliaceae* và là cơ sở dữ liệu cho việc thiết kế các chỉ thị phân tử đặc trưng cho loài (Nguyen, B. *et al*., 2015) [107]. Năm 2016, tác giả Le Ngoc Trieu và cộng sự đã tiến hành đánh giá đa dạng di truyền quần thể tam thất hoang (*P.stipuleanatus*) thu thập ở miền Bắc Việt Nam bởi chuỗi lặp đơn giản giữa (ISSR), kết quả thu được các mẫu tam thất hoang có độ đa dạng cao (Trieu, L. N, *et al*., 2016) [130].Gần đây, Nguyen Thi Phuong Trang và cs (2017) cũng ứng dụng ADN Barcoding để xác thực một số loài trong chi *Panax*, trong đó có sâm Ngọc Linh và sâm Lai Châu (Trang,N.T.,*et al*., 2017) [129]. Năm 2018, tác giả Phạm Quang Tuyến và cộng sự đã đánh giá đa dạng di truyền của 24 mẫu sâm Lai Châu thu thập tại Mường Tè, Lai Châu. Kết quả phân tích về quan hệ phát sinh giữa 24 mẫu sâm Lai Châu nghiên cứu và taxon cùng chi với đối tượng nghiên cứu có quan hệ với *P.vietnamensis var. fuscidiscus*, trên vùng bảo tồn ITS1-5,8S rDNA-ITS2 hay vùng gen ITS-rADN. Mức tương đồng di truyền của 24 mẫu này dao động trong khoảng 96,27 đến 100%. **(**Phạm Quang Tuyến *và cs*., 2018) [44]. Năm 2020, tác giả Vũ Đình Duy và cộng sự đã sử dụng mã vạch DNA vùng gen nhân (*ITS-rDNA*) và vùng gen lục lạp (*matK*) của 32 mẫu sâm tự nhiên tại núi Phu Xai Lai Leng, huyện Kỳ Sơn, tỉnh Nghệ An để xác định loài sâm thuộc chi *Panax*. Kết quả 43/616 vị trí nucleotide có giá trị mang thông tin được xác định ở vùng gen *ITS-rDNA* và 66/1433 vị trí nucleotide biến đổi, 29/1433 vị trí nucleotide có giá trị mang thông tin (*matK*) (Vũ Đình Duy *và cs*., 2020) [6].

Việc ứng dụng xây dựng bộ mã vạch phân tử xác định các loài, phục vụ bảo tồn quỹ gen và giám sát thương mại có ý nghĩ khoa học và cấp bách hiện nay (Nguyễn Quang Thạch và Bùi Chí Bửu, 2021) [36].

1.5. Ứng dụng công nghệ tế bào trong nhân nhanh giống nhân sâm trên thế giới và Việt Nam

1.5.1. Nghiên cứu công nghệ tế bào nhân giống sâm trên thế giới

Trên thế giới việc nhân giống các loài sâm bằng sử dụng các kỹ thuật của công nghệ tế bào được sử dụng phổ biến ở các nước như Trung Quốc, Hàn Quốc, Nhật Bản…. Phương pháp nhân giống vô tính được sử dụng bao gồm nuôi cấy đỉnh sinh trưởng, Callus và nhiều phương pháp khác. Đây là phương pháp nhân giống hiệu quả, giống đồng nhất đảm bảo được những đặc tính mong muốn của cây mẹ và đáp ứng được nhu cầu giống cây.

Có rất nhiều phương pháp nhân giống vô tính ngoài tự nhiên và trong *in vitro*, một số phương pháp chính đã được áp dụng với các loài sâm trên thế giới như sau:

Nuôi cấy chồi đỉnh và chồi lá

Năm 1997, các nhà khoa học Nhật Bản là Shoyama and S. Shiraishi; (Shoyama, Y. *et al.*, 1997) [124]. Faculty of Pharmaceutical Sciences Kyushu University Japan đã thực hiện nhân nhanh cây sâm Tam thất (*P.notoginseng*) từ việc nuôi cấy các chồi hoa và cuống lá trên môi trường MS + 1mg/L 2,4D. Sau 18 tuần, phần chồi này sẽ được chuyển sang môi trường sinh chồi chứa BA và GA nuôi trong 6 tuần rồi chuyển tiếp sang môi trường ra rễ có chứa NAA. Kết quả sẽ thu được cây sâm Tam thất có rễ hoàn chỉnh sau 4 tuần.

Nuôi cấy lớp tế bào mỏng từ lát cắt tế bào

Claire Kevers and CS ở University of Liège, Beligium năm 2000 đã nghiên cứu về quy trình nuôi cấy tế bào vô tính cây Nhân sâm (*P. ginseng*) trong môi trường lỏng. Hay một nghiên cứu khác của Kee -Yoeup & CS;

Chungbuk National University, Korea (2000) (Claire K.*et al*., 2000) [60] đưa ra quy trình sản xuất Nhân sâm bằng sử dụng Biorectors. Callus được tạo thành qua nuôi cấy lát cắt rễ Nhân sâm trên môi trường: MS + 2,4D + kinetin. Môi trường ra rễ MS + IBA + kinetin.

Nuôi cấy các dạng mô sinh tạo callus

Các nhà khoa học đã nhận thấy rằng callus có thể tiếp tục được duy trì nếu được nuôi cấy trong môi trường tương tự, hay phát triển tiếp tục thành một trong các dạng: tạo rễ, tạo chồi, và thể chứa phôi.

Ngoài việc nghiên cứu các phương pháp nuôi cấy các nhà khoa học còn nghiên cứu các yếu tố ảnh hưởng đến sinh trưởng của cây sâm *in vitro*. Có rất nhiều nhân tố ảnh hưởng đến quá trình nuôi cấy *invitro* như:

Ảnh hưởng của ánh sáng: Theo tác giả Yang, D. C and CS 1997; Chungbuk National University, Korea (1997) (Yang, D. C.*et al*., 1997) [141] đã chứng minh được rễ củ của nhân sâm khi nuôi cấy trên môi trường 1/2 MS lỏng, sự hình thành lục lạp và sắc lạp tăng dần khi tăng cường độ chiếu sáng từ 1000 lên 3500 lux, giảm khi tăng lên đến 7000 lux. Tổng số lục lạp được sản sinh khi được chiếu sáng dưới ánh sáng xanh cao hơn các loại ánh sáng khác nhưng chỉ bằng 40% tổng số lục lạp sinh ra khi được chiếu dưới ánh sáng trắng (cường độ 3500 lux). Việc sản sinh lục lạp sẽ có hiệu quả hơn khi quá trình nuôi cấy được giữ trong tối 1 tuần sau đó sẽ chuyển ra chiếu sáng trong 4 tuần tiếp theo.

Những năm gần đây, đèn LED (đi-ốt phát quang) là chủ đề nghiên cứu trong lĩnh vực tăng trưởng và phát triển thực vật. Tuy nhiên, có rất ít nghiên về việc sử dụng đèn LED nuôi cấy *in vitro P. vietnamensis*, một trong những loài cây thuốc quan trọng thuộc chi *Panax*. Nghiên cứu này xem xét ảnh hưởng của các loại đèn LED khác nhau đến sự phát triển của mô sẹo và sự hình thành thực vật của *P. vietnamensis*. Kết quả cho thấy sự khác biệt đáng

kể trong tăng trưởng và phát triển, như ánh sáng khác nhau điều kiện thích hợp cho các giai đoạn khác nhau. Mô sẹo 70 mg khối lượng tươi nuôi cấy dưới đèn LED vàng sinh trưởng của 1197 mg trọng lượng tươi và 91,7 mg trọng lượng khô, trong khoảng thời gian ba tháng. Sự hình thành cây trồng hiệu quả nhất thu được khi mô sẹo tạo phôi được nuôi cấy dưới sự kết hợp của 60% đèn LED đỏ và 40% đèn LED xanh lam với trung bình 11,21 cây con/mẫu; khối lượng tươi và trọng lượng khô của chồi lần lượt là 1147 và 127 mg và chiều cao cây trung bình là 3,1 cm. (Nhut, D. T. *et al*., 2015) [108].

Ảnh hưởng của chất khoáng và vitamin: Các chất khoáng đóng vai trò rất quan trọng. Ví dụ: Mg là một phần của diệp lục. Ca và Axit Boric là thành phần của màng tế bào, N là thành phần quan trọng của amino axit, vitamin, protein và các axit nucleic. Tương tự Fe, Zn và Mo. Mg và nhiều nguyên tố vi lượng cũng là thành phần quan trọng của các ezyme. Các ion của các muối hoà tan đóng vai trò quan trọng ổn định áp suất thẩm thấu của môi trường và tế bào, duy trì thế điện hoá của thực vật. Ví dụ: K và C rất quan trọng trong điều hoà tính thấm chọn lọc của tế bào, duy trì điện thế và tham gia hoạt hoá nhiều enzyme. Trong môi trường (MT) nuôi cấy các muối khoáng được chia thành các nguyên tố đa lượng và vi lượng. Đa lượng gồm 6 nguyên tố Mg, Ca, P, S, N và K. Các nguyên tố vi lượng Fe, Mn, Zn, Cu, Mo, Co, B, I, Ni, Cl, Al... Các MT khác nhau có thành phần và hàm lượng chất khoáng khác nhau. Tất cả các tế bào nuôi cấy đều có khả năng tổng hợp tất cả các loại vitamin nhưng thường với số lượng dưới mức yêu cầu. Để mô có sức sinh trưởng tốt phải bổ sung vào MT một hay nhiều loại vitamin. Các vitamin cần thiết cho các phản ứng sinh hoá. Các vitamin sau đây được sử dụng phổ biến: Inositol, Thiamine HCl (B1), Pyridoxine HCl (B6), Nicotinic Axit. Ảnh hưởng của vitamin lên sự phát triển của tế bào nuôi cấy *in vitro* ở các loài khác nhau là khác nhau hoặc thậm chí còn gây hại cho thực vật.

Sự hấp thu các nguyên tố khoáng từ môi trườnng nuôi cấy trong quá trình cảm ứng và suốt giai đoạn đầu phát sinh phôi vô tính đã được chứng minh (Dussert,S. *et al.*,1995 [62]; Fisichella, M. *et al.*, 2000[66]).

Ảnh hưởng của chất điều hoà sinh trưởng: Bên cạnh các chất dinh dưỡng cung cấp cho mô nuôi cấy, việc bổ sung các chất điều hoà sinh trưởng như Auxin, Cytokine... là rất cần thiết để kích thích sự sinh trưởng, phát triển và sự phân hoá cơ quan, cung cấp sức sống cho mô và các tổ chức. Tuy vậy, yêu cầu đối với chất này thay đổi tuỳ theo loài thực vật, loại mô, hàm lượng chất điều hoà sinh trưởng nội sinh của chúng. Với các loài sâm nuôi cấy *in vitro* người ta sử dụng một hay nhiều loại chất điều hoà sinh trưởng phù hợp, ví dụ 2,4D, NAA, BAP, Kinetin,... Trong đó 2,4D, IAA thuộc nhóm Auxin kích thích phân chia tế bào, tạo và nhân mô sẹo, kích thích tạo chồi bên, kích thích sự ra rễ và phát sinh chồi phụ trong nuôi cấy mô. BAP, Kinetin trong MT nuôi cấy mô cần cho sự phân chia tế bào và phân hoá chồi từ mô sẹo hoặc từ các cơ quan, kích thích phát sinh chồi nách và kìm hãm ảnh hưởng ưu thế của chồi đỉnh, tăng diện tích phiến lá do kích thích sự lớn lên của tế bào, có thể tăng sự mở khí khổng của một số loài, ức chế sự hình thành rễ, ức chế quá trình hoá già ở lá, kích thích tạo diệp lục (Langhansova, L, 2012) [88]) lại nghiên cứu về tác động của các chất điều tiết sinh trưởng đến quá trình tạo rễ bất định trong công nghệ nuôi cấy Nhân sâm trong môi trường lỏng. Kết quả cho thấy, sự kết hợp giữa kinetin, NAA hay IBA đều cho khả năng tạo callus và rễ bất định cao

- *Các yếu tố ảnh hưởng khác*

Agar: Nuôi cấy tĩnh nên sử dụng Agar là một loại tinh bột được chế từ rong biển và mô được cấy trên bề mặt của MT để tránh tình trạng mô có thể bị chìm và chết vì thiếu Oxi. Chỉ nên dùng Agar với nồng độ 0,6-0,8% để nuôi cấy các loài sâm.

Nguồn Các-bon: Đường sucrose là nguồn carbon chủ yếu và được sử dụng trong MT, kể cả khi mẫu nuôi cấy là các chồi xanh có khả năng quang hợp. Khi đường Sucroze bị phân huỷ một phần tạo điều kiện tốt cho cây hấp thụ. Một số đường khác như Maltose, Glucose... cũng có thể được sử dụng trong nuôi cấy tế bào thực vật. Năm 2000, theo tác giả Yu, K. W. and Paek, K. Y; Chungbuk National University, Korea (Yu, K.W.and Paek, K.Y, 2000) [145] nghiên cứu và thấy rằng khi hàm lượng đường tăng sẽ làm tăng khối lượng khô của củ nhân sâm khi thu hoạch, khối lượng khô của củ sâm tăng đến hàm lượng đường trong môi trường là 50g/l nhưng giảm khi tăng tới 70g/l. Nói chung, sản xuất nhân sâm cho năng suất cao nhất khi hàm lượng đường trong môi trường khoảng từ 20- 30g/l.

pH: MT chuẩn độ pH từ 4,5-5,8, không chuẩn pH thấp hơn 4 và cao hơn 7. (Pierik, R.L.M, 1987 [116]; Vacin, E.F. and Went,F.W,1949 [132]).

Đối với kỹ thuật nhân giống *in vitro* thông thường có nhiều ưu điểm nhưng đã có những hạn chế khi ứng dụng ở mức độ công nghiệp, đó là giá thành cao ở cây thành phẩm. Để cải thiện điều này phải thay đổi phương thức nhân giống.

Giới thiệu công nghệ: Công nghệ nuôi cấy tế bào lớp mỏng, phôi vô tính, bioreactor và công nghệ vườn ươm là 4 loại công nghệ có liên quan chặt chẽ và đang được sử dụng rộng rãi trong nhân giống công nghiệp ở nhiều loại cây trồng. Đối với một số loại cây trồng quá trình nhân giống bao gồm cả 4 khâu: Nuôi cấy tế bào lớp mỏng - Mô sẹo phôi hóa - Nhân nhanh mô sẹo phôi hóa trong bioreactor - Phát sinh phôi vô tính, chồi, cây trong bioreactor hoặc bình nuôi cấy truyền thống - Cây hoàn chỉnh hoặc phôi chín - Vườn ươm - Sản xuất đại trà. Đối với một số cây khác việc ứng dụng cả 4 loại công nghệ là không cần thiết. Việc lựa chọn công nghệ phụ thuộc trước hết vào kiểu gen của cây, mô nuôi cấy, điều kiện thực tế và mục tiêu nhân giống.

Nghiên cứu sản xuất giống nhân sâm trong nuôi trồng nhân tạo sẽ giúp rút ngắn được thời gian và khả năng nhân gấp bội sẽ đáp ứng được yêu cầu đưa nhân sâm thành sản phẩm thương mại có năng suất cao. Ở nghiên cứu này bình bioreactor từ 5 đến 20L sẽ được sử dụng để nuôi cấy nhân sâm *Panax ginseng*. Callus được tạo thành qua nuôi cấy rễ Nhân sâm trên môi trường: MS + sucrose + 2,4D + 0 kinetin. Sau đó calluss sẽ được chuyển sang môi trường ra rễ MS + IBA + kinetin. Môi trường nuôi lỏng 1/2MS + NAA cho kết quả rễ tăng trưởng lớn hơn môi trường 1/2MS + IBA. Hay một nghiên cứu khác của Lee và cs; Bioherb Research Institute, Kangwon National University, Republic of Korea (2009). Thân rễ cắt khúc dài từ 0,5-2cm nuôi trong máy Bioreactor từ 2L, 7L và 15L (Lee, J.G.*et al*., 2009) [95].

Trên thế giới, hầu hết các nghiên cứu được tiến hành trên các đối tượng thuộc chi *Panax* chủ yếu tập trung vào cây Nhân sâm (*P. ginseng*). Phôi vô tính Nhân sâm đã được cảm ứng thành công trên môi trường trực tiếp từ rễ (AsakaY.*et al*.,1993 [49]; Chang W.C. and Hsing Y.I, 1980 [57]), lá (Tirajoh A., Kyung T.S. and Punja Z.K, 1998) [128], lá mầm (Choi Y.E. and Soh W.Y., 1994) [59], hoặc gián tiếp qua trung gian mô sẹo được cảm ứng từ nuôi cấy chồi hoa (Shoyama Y. *et al*.,1997) [124]). Nghiên cứu phát sinh phôi vô tính Nhân sâm trong môi trường lỏng cũng đượcc thực hiện bởi Claire và cs (Claire K. *et al*., 2000) [60]) Gorpenchenko và cs. đã nghiên cứu chuyển gen *rol*C nhờ vi khuẩn *Agrobacterium rhizogenes* để thu nhận những dòng mô sẹo có khả năng phát sinh phôi vô tính (Gorpenchenko T.Y. *et al*., 2006) [68]. You, năm 2012 phát triển phương pháp nhân giống quy mô lớn *P. notoginseng* bằng cách sử dụng lỏng lắc (100 vòng/phút) và bioreactor, tái sinh thành công cây con trong điều kiện *ex-vitro*. Phôi có nguồn gốc từ callus của rễ trên môi MS có chứa 1,0 mg/l 2,4-D sau 5 tuần nuôi cấy. Tần số cao nhất (100%) của phôi vô tính, với trung bình 32,7 phôi vô tính trên mỗi mô

sẹo, thu được trên callus phôi được ủ trên môi trường có chứa 0,5 mg/L 2,4-D. Để tăng tỷ lệ hình thành phôi vô tính, 10g phôi vô tính giai đoạn hình cầu được chuyển vào bioreacter chứa 1,5l môi trường 1/2MS không bổ sung chất điều hòa sinh tưởng trong thời gian 4 tuần; những phôi vô tính giai đoạn hình cầu này sau đó phát triển thành phôi mầm. Tuy nhiên trên môi trường không có chất điều hòa sinh trưởng phôi mầm chỉ phát triển rễ nhưng không phát triển chồi. Phôi cần chuyển sang môi trường 1/2 MS với 2.0 mg/l GA_3 trong 2 tuần để kích nảy mầm thành cây (You,X.L. *et al*., 2012) [144].

1.5.2. Nghiên cứu công nghệ tế bào nhân giống sâm ở Việt Nam

Một số Trung tâm, Viện nghiên cứu Sâm và doanh nghiệp đang tiến hành nghiên cứu tạo giống sâm Ngọc Linh bằng phương pháp nuôi cấy mô như: Trung tâm Uơm tạo và hỗ trợ doanh nghiệp Khoa học và Công nghệ trực thuộc Bộ Khoa học và Công nghệ tại huyện Đăk Tô, tỉnh Kon Tum; Công ty Sâm Sâm...tỉnh Quảng Nam. Đối với tỉnh Gia Lai, hiện tại, có doanh nghiệp đang trình các cấp có thẩm quyền cho chủ trương đầu tư và giấy chứng nhận đầu tư cho 01 dự án đầu tư Trung tâm giống cây dược liệu công nghệ cao, trong đó sản xuất cây giống sâm Ngọc Linh với quy mô sản xuất cây giống ở mức 1,5 triệu cây/năm. Quy trình sản xuất cây giống sâm bằng phương pháp vô tính chủ yếu như sau: Phôi được lấy từ các bộ phận của cây khoảng 9 tháng sau đó cây rút bình đưa ra ngoài vườn ươm khoảng 6-8 tháng, khi cây có củ với đầu mầm, đường kính củ lớn hơn 0,7cm, củ hình con quay, màu xanh, không dính phôi, có tối thiểu 2-3 rễ đưa ra huấn luyện khi có một lá thật, chiều cao >5cm. Thời gian huấn luyện quen với môi trường trên núi 5-7 ngày sau đó mới rút bình. Thời gian ươm 3-5 tháng dưới tán rừng. Tỉ lệ sống đạt trên 80%.

Nguyễn Ngọc Dung là một trong những tác giả đầu tiên nghiên cứu nhân giống vô tính sâm Ngọc Linh bằng con đường sinh học thông qua tái sinh từ

mô sẹo (Nguyễn Ngọc Dung, 1995 [4]; Dương Tấn Nhựt *và cs*, 2010 [25]) cũng đã tiến hành nhân giống vô tính cây sâm Ngọc Linh thông qua con đường phát sinh cơ quan. Trong nghiên cứu này quy trình nhân giống *in vitro* và trồng thử nghiệm ở giai đoạn vườn ươm đã được trình bày. Mô sẹo được cảm ứng ở các mẫu củ sâm Ngọc Linh cắt mỏng trên môi trường MS bổ sung 1,0 mg/l 2,4-D và 0,2 mg/l TDZ trong điều kiện chiếu sáng 16 giờ/ngày. Môi trường tốt nhất cho tỷ lệ tăng sinh khối mô sẹo là môi trường MS bổ sung 1,0 mg/l 2,4-D kết hợp 0,2 mg/l TDZ. Số chồi tái sinh từ mô sẹo đạt cao nhất trên môi trường SH bổ sung 1,0 mg/l BA, 1,0 mg/l NAA và 2 g/l than hoạt tính. Trong giai đoạn tăng trưởng chồi, môi trường 1/2 MS được bổ sung 1,0 mg/l BA và 0,5 mg/l NAA, 50 g/l sucrose, 2,0 g/l than hoạt tính, trong điều kiện ánh sáng đèn LED 70% đỏ và 30% xanh là tốt nhất. 1000 cây sâm *in vitro* sau 6 tháng trồng ngoài khu vực vườn ươm cho thấy tốc độ sinh trưởng là nhanh hơn so với cây sâm Ngọc Linh gieo bằng hạt với tỷ lệ sống sót là 87%.

(Nguyễn Bảo Triệu *và cs.*, 2013) [40] cũng đã tiến hành nghiên cứu nuôi cấy *in vitro* sâm Ngọc Linh trên môi trường MS bổ sung 1,0 mg/l 2,4-D, 0,2 mg/l TDZ và trên môi trường SH bổ sung 1,0 mg/l BA, 0,5 mg/l NAA. (Mai Trường *và cs.*, 2014) [42] đã tiến hành nghiên cứu về tạo và nhân phôi vô tính sâm Ngọc Linh trong môi trường lỏng. Lá cây *in vivo* (sau khử trùng) được nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung 1,0 mg/l 2,4-D, 0,2 mg/l kinetin để tạo mô sẹo. Sau đó, mô sẹo được cấy chuyền sang môi trường MS lỏng (lắc) bổ sung 1,0 mg/l 2,4-D, 0,2 mg/l kinetin, 500 mg/l casein hydrolysate để tạo huyền phù tế bào. Sau 2 tháng, huyền phù tế bào được chuyển sang nuôi cấy trong môi trường B5 lỏng (lắc) có 3,0 mg/l IBA. Mảnh lá mầm (của cây mầm từ phôi) và phôi vô tính non được nuôi cấy trên môi trường MS có 10% nước dừa, có hoặc không có 0,2 mg/l IBA để tạo mô sẹo sinh phôi và phôi thứ cấp. Mô sẹo sinh phôi và phôi thứ cấp này cũng đã được dùng để nhân nuôi trong

môi trường lỏng có và không có chất điều tiết sinh trưởng ở quy mô bình tam giác và bioreactor. Những kết quả đã tạo cơ sở để nhân giống quy mô lớn và thu hợp chất thứ cấp.

Hoàng Xuân Chiến và cs. (2011) đã thử nghiệm khả năng tạo củ *in vitro* và xác định hàm lượng saponin ở các cây trồng thử nghiệm 17 tháng tuổi. Các hệ phức hợp của GA/ABA và auxin/cytokinin trong quá trình hình thành củ cũng được các tác giả khảo sát. Nồng độ ABA thích hợp nhất cho quá trình tạo củ là 3,0 mg/l. GA_3 ức chế khả năng tạo củ *in vitro* cây sâm Ngọc Linh. Các chồi cây sâm Ngọc Linh *in vitro* được cảm ứng để tạo củ thành công trên môi trường SH có bổ sung 1,0 mg/l NAA và 2,0 mg/l BA trong điều kiện chiếu sáng 16 giờ/ngày. Nồng độ đường sucrose tốt nhất cho quá trình tạo củ sâm là 50 g/l. Hàm lượng saponin trong củ của những cây 17 tháng tuổi nuôi trồng ngoài tự nhiên cũng đã được xác định là G-Rb1 (0,21%), G-Rg_1 (0,17%), MR_2 (0,77%) (Hoàng Xuân Chiến và cs., 2011[1]; Dương Tấn Nhựt *và cs.*, 2012 [26]) đã công bố các dạng phát sinh hình thái khác nhau (phôi vô tính, mô sẹo, chồi và rễ) có thể được cảm ứng từ các mẫu cấy rễ chính của sâm Ngọc Linh thông qua phương pháp nuôi cấy lớp mỏng tế bào. Môi trường thích hợp nhất để cảm ứng sự hình thành phôi vô tính là môi trường MS bổ sung 0,05 mg/l TDZ. Môi trường MS bổ sung1,0 mg/l BA và 0,1 mg/l 2,4-D cảm ứng sự tái sinh chồi dưới điều kiện chiếu sáng 16 giờ/ngày trong khi môi trường MS bổ sung 2,0 mg/l NAA cảm ứng tạo rễ tốt nhất trong điều kiện tối hoàn toàn. Trong những năm gần đây việc ứng dụng thành công phương pháp nuôi cấy *invitro*, trong đó nuôi cấy phôi vô tính thông qua giai đoạn mô sẹo để nhân nhanh sâm Ngọc Linh, sâm Lai Châu và sâm Vũ Diệp để phục vụ bảo tồn và phát triển dược liệu quý này (Đinh Xuân Tú và cs., 2016 [45]; Lê Hùng Lĩnh và Đinh Xuân Tú, 2017a [19]; Lê Hùng Lĩnh và Đinh Xuân Tú, 2017b [20]).

1.6. Nghiên cứu biện pháp kỹ thuật nhân giống từ hạt trên thế giới và Việt Nam

1.6.1. Kết quả nghiên cứu biện pháp kỹ thuật nhân giống từ hạt trên thế giới

Theo Đỗ Tất Lợi (1999), nhân sâm được trồng từ cây gieo ươm từ hạt, chọn những cây sâm khỏe tuổi 4 và tuổi 5 (vùng Đông Bắc -Trung Quốc chọn những cây đã được 5-6 tuổi) vì cây 3 năm tuổi chưa đủ khỏe, còn cây sáu năm tuổi hạt lại quá cứng khó nảy mầm, vào cuối tháng 7 (Đỗ Tất Lợi, 1999) [23]. Hạt sâm Triều Tiên chín nếu để rụng xuống một cách tự nhiên thì cuối tháng 5 năm sau (khoảng 270-300 ngày) hạt mới bắt đầu mọc mầm đạt 47 % (Jun Yeon Won. *et al*, 1988) [78].

Cây nhân sâm được nhân giống hữu tính từ hạt phân tầng, thường được trồng vào mùa thu (tháng 9 đến tháng 10) để tạo cây con một năm vào mùa xuân năm sau (tháng 4 đến tháng 5). Hạt nhân sâm có phôi kém phát triển tại thời điểm phát tán, được phân biệt bằng lớp vỏ hạt rất dày và cứng, cần có điều kiện nhiệt độ lạnh cụ thể để phát triển phôi và sự xuất hiện của các lá mầm và lá mầm có khả năng ngủ sinh lý hình thái (Baskin and Carol, 2004 [53]; John,TA. and Dean, Louttit, 1995 [77]; Lee, J. S.*et al*., 2008 [94]).

Theo kết quả nghiên cứu của Baranov (1966) cho thấy: hạt sâm Châu Á và sâm Bắc Mỹ vừa mới thu hoạch phôi vẫn chưa phát triển hoàn (Baranov, 1966) [54]. Kết quả này cũng được ghi nhận trong báo cáo của của tác giả (Hovius, 1997) [70]. Kích thước phôi của hạt mới thu hoạch có chiều dài trung bình chỉ đạt 0,5mm, để hạt sâm nảy mầm sau khi chín hạt cần phải trải qua quá trình phân tầng nhằm hoàn thiện về cấu trúc và sinh lý của phôi (Xiao,P. *et al*., 1987) [139]. Kết quả phân tầng hạt nhân sâm ở nhiệt độ 15-20^{0}C phôi phát triển lá mầm, trụ dưới lá mầm, trụ trên lá mầm, rễ mầm và đạt chiều dài khoảng 3,0- 4,0mm (Yu, H. *et al*., 2019) [146].

Nhiều nghiên cứu đã được thực hiện để cải thiện khả năng nảy mầm của hạt và trạng thái ngủ của hạt nhân sâm bằng cách sử dụng các hormone thực vật ngoại sinh (Kim, Y.H. *et al*., 2014 [84]; Lee, J. S. *et al*., 2008 [94]), điều kiện làm lạnh tối ưu (Kwon, W. S. *et al*., 1998) [84], xử lý hóa chất (Yang, D. *et al*., 1982) [142]; sự phát triển của phôi và nhiệt độ (John, TA and Dean, Louttit, 1995 [77]; Proctor, JTA. and Bailey, WG, 1987 [119]).Tuy nhiên, các nghiên cứu hạn chế trên đã được thực hiện để phát triển các phương pháp làm nhanh nảy mầm (rút ngắn thời gian) và cải thiện khả năng ngủ nghỉ và kích thích sự nảy mầm của hạt, như một giải pháp thay thế cho các phương pháp gieo hạt truyền thống khác.

Để nâng cao tỷ lệ nảy mầm của hạt nhân sâm, người ta đã sử dụng phương pháp bảo quản hạt trong cát ẩm để phôi phát triển và tách lớp vỏ hạt trong điều kiện nhiệt độ thấp và độ ẩm cao (phá ngủ nghỉ của hạt) (Li, T. S.*et al*., 2000 [100]; Won, J. Y. *et al*,1988 [138]). Sự rụng lớp vỏ hạt và tỷ lệ sống sót của cây nhân sâm không bị ảnh hưởng bởi kích thước hạt giống (dài x rộng x dày) (Lee, J. S.*et al*., 2008) [94]). Hạt nhân sâm đã (phá tình trạng ngủ của hạt) với các phôi đủ kích thước không nảy mầm ở nhiệt độ trong phòng (15-20^{0}C) (Kwon,W.S.*et al*.,1998) [85]). Mặt khác, nhiều nghiên cứu cải thiện sự nảy mầm và tình trạng ngủ của hạt nhân sâm bằng gibberellic acid (GA_3), Kinetin, hoặc benzyladenine (BA) đã được tiến hành (Kim,Y.H.*et al*., 2014) [84]. Nghiên cứu của tác giả Xiao (1987) trên đối tượng nhân sâm (*P.gineng*) cho thấy, tỷ lệ nảy mầm đối với hạt được xử lý bằng GA_3 cao gấp 2-3 lần so với hạt không xử lý (Xiao, P.*et al*., 1987) [139]).

1.6.2. Kết quả nghiên cứu biện pháp kỹ thuật nhân giống từ hạt sâm Ngọc Linh ở Việt Nam

Phương pháp nhân giống hữu tính từ hạt là một phương pháp có lợi, vì có hệ số nhân giống cao, dễ bảo quản và vận chuyển. Tuy nhiên, một số hạt

giống nói chung và cây thuốc nói riêng có thời gian bảo quản ngắn, tỷ lệ mọc mầm của hạt nếu bảo quản thời gian quá dài sẽ giảm sức nảy mầm; thông thường chỉ sử dụng loại hạt của vụ trước đó để gieo trồng. Nếu để hạt cách nhiều năm, tỷ lệ mọc sẽ thấp hoặc không mọc (Hoàng Minh Tấn, Nguyễn Quang Thạch,1996) [33].

Kỹ thuật nhân giống hữu tính từ hạt: Hạt tươi sau khi loại hạt lép, rửa với nước được đem gieo trồng theo các cách khác nhau để tìm ra điều kiện tối ưu cho sự gieo trồng. Các yếu tố được khảo sát là cách xử lý hạt (bóc vỏ hoặc xử lý hóa chất); Kết quả các thử nghiệm cho thấy, hạt mới thu, bóc vỏ và gieo ngay ở độ sâu 2 cm cho kết quả nảy mầm cao với tỷ lệ sống sót là 81,33%. Ngoài ra, khi xử lý hạt bằng Acid nicotinic cho kết quả nảy mầm cao nhất (85,33%) (Nguyễn Thượng Dong *và cs*., 20007) [3].

Khi nghiên cứu ảnh hưởng của phương pháp thu hoạch và xử lý hạt giống cho thấy: khi thu hái có chọn lọc, đãi vỏ có các chỉ tiêu về thời gian mọc mầm, tỷ lệ mọc mầm, tỷ lệ hình thành cây con cao hơn thu hái đại trà, không đãi vỏ (170 ngày sau gieo; tỷ lệ mọc mầm 83,37% và cho tỷ lệ hình thành cây con (82,09%) so với 180 ngày, tỷ lệ mọc mầm 50,68%; tỷ lệ hình thành cây con là 38,80%. Đối với phương pháp bảo quản hạt giống: khi thu hạt giống từ những quả có từ 2-3 chấm đen ở đỉnh, đãi vỏ và đưa vào bảo quản dưới lớp cát sạch, độ ẩm (75-80%), sâu 5 cm cho tỷ lệ nảy mầm cao hơn so với ủ hạt trực tiếp trên vườn giống (80,51 % so với 65,50%); hạt bảo quản 4 tháng vẫn có chất lượng tốt; hạt gieo trên khay nhựa với giá thể là 50% đất rừng + 50% mùn núi cho thời gian mọc mầm ngắn, tỷ lệ mọc mầm cao hơn so với gieo hạt trên đất rừng (165 ngày, tỷ l lệ nảy mầm 85,52% so với 190 ngày, tỷ lệ mọc mầm 63,54%) (Trần Thị Liên, 2011) [18].

Trong nghiên cứu giá thể và phương thức gieo hạt nhằm để rút ngắn thời gian mọc mầm đồng thời nâng cao tỷ lệ mọc mầm của hạt sâm cho thấy:

khi gieo hạt trên giá thể mùn núi (100% mùn núi) với phương thức sắp xếp theo thứ tự hạt cách hạt 1-3 cm cho thời gian mọc mầm ngắn và tỷ lệ nảy mầm cao hơn so gieo trên giá thể đất rừng (100% đất rừng), sắp xếp hạt 1-3 cm (165-195 ngày, tỷ lệ nảy mầm 51,64% so với 180-210 ngày, tỷ lệ mọc mầm 38,2% (Nguyễn Bá Hoạt, 2004) [11]. Khi nghiên cứu ảnh hưởng của tỷ lệ giá thể đến tỷ lệ mọc mầm của sâm Lai Châu tác giả (Phạm Quang Tuyến *và* cs., 2016a) [43] đã cho thấy giá thể gieo hạt sâm Lai Châu tốt nhất trên mùn (100% mùn) đạt tỷ lệ mọc mầm 71,33%.

Trong nghiên cứu tối ưu hóa một số điều kiện nhằm làm tăng khả năng mọc mầm của hạt giống cũng như sinh trưởng của cây sâm Ngọc Linh ở trong giai đoạn vườn ươm đã chỉ ra rằng; hạt giống có khả năng mọc mầm tốt (sau 8 tháng gieo hạt) khi thu hái từ cây mẹ có độ tuổi trên 6 năm; tỷ lệ mọc mầm của hạt giống tăng lên đáng kể khi hạt được ngâm ủ ở điều kiện 45^0C trong vòng 8 giờ trước khi được gieo trong cát suối ẩm (Trương Thị Hồng Hải và cs., 2019) [10].

Một nhược điểm của hạt sâm là rất khó nảy mầm và tỷ lệ nảy mầm thấp. Thời gian hạt nằm trong đất (từ gieo đến hạt nảy mầm) ít nhất cũng là 150 ngày, dài nhất 200 ngày, tỷ lệ nảy mầm có khi chỉ đạt dưới 10%; trung bình cũng chỉ đạt 50-60%. Ở núi Ngọc Linh đã tiến hành một thực nghiệm xử lý hạt (quả) trước khi gieo. Kết quả phương pháp xử lý tốt nhất là ủ quả trong 5 ngày, sau đó đãi sạch vỏ rồi đem gieo; thời gian nảy mầm 178 ngày và tỷ lệ mọc mầm đạt 83,9% với điều kiện quả khi thu hoạch phải có màu chín đỏ tươi (Nguyễn Bá Hoạt và cs., 2005) [12].

1.7. Kết quả nghiên cứu kỹ thuật trồng và chăm sóc nhân sâm

1.7.1. Kết quả nghiên cứu kỹ thuật trồng và chăm sóc nhân sâm trên thế giới

a) Kỹ thuật trồng sâm dưới tán rừng

Nhân sâm Triều Tiên là loài sâm đặc hữu của Triều Tiên được trồng ở Châu Á, ở miền Bắc - Trung Quốc, Hàn Quốc và phía Đông Siberia, vùng Viễn Đông của Liên Xô cũ ngoài ra được trồng ở Nhật Bản, Mỹ nhưng nổi tiếng là sâm Triều Tiên và Trung Quốc (Đỗ Tất Lợi,1999) [23], cây sinh trưởng ở vĩ tuyến 39-48^0, biên độ nhiệt tối cao là 28,7 ^{0}C, tối thấp là -40 ^{0}C và nhiệt độ trung bình là 10,7 ^{0}C. Lượng mưa trung bình là 1.000 mm/năm, thời gian có tuyết trong năm từ 160 -170 ngày (Lee J.C.*et al*., 1983) [92].

* Kỹ thuật trồng nhân sâm dưới tán rừng tại TriềuTiên (Fabio.S, 2000 [64]; Đỗ Tất Lợi,1999 [23]) *có phụ lục đính kèm (phụ luc 1)*

***** Kỹ thuật trồng sâm Mỹ dưới tán rừng tại Ohio (Carroll and Apsley, 2003) [56] *có phụ lục đính kèm (phụ lục 2)*

b) Kỹ thuật trồng nhân sâm dưới giàn mái che

Nhân sâm trồng ở Khai Thành - Triều Tiên cũng được trồng nhiều trong giàn mái che. Giàn mái che để trồng nhân sâm là loại giàn mái che dốc theo từng luống, vì nhân sâm được trồng trên những cánh đồng bằng phẳng nên phải làm giàn có mái dốc trên từng luống để đảm bảo thoát nước cho cây. Độ cao của giàn che phụ thuộc vào tuổi của cây sâm, đối với cây sâm trồng năm đầu tiên, giàn che phía trước cao 0,81 m, phía sau cao 0,54 m, năm thứ 5 (nhân sâm đạt 6 năm tuổi), giàn mái che có cột trước cao 1,12 m và cột sau cao 0,87 m. Trong một năm, các tháng khác nhau, tuổi cây khác nhau thì vật liệu che trên giàn cũng khác nhau nhằm đảm bảo ánh sáng cho cây sinh trưởng và phát triển (Suh S.O.*et al*., 2002 [127]; Parmenter, G and Littlejohn,R 2000 [113]). Nhân sâm (*P.ginseng)* được trồng ở Hàn Quốc có ba loại giàn mái che chính là làm tấm nhựa xốp bồ đề, tấm gỗ thông và tấm che nilon đen (Lee J.C. *et al*., 1980) [90]. Cây quang hợp tốt ở nhiệt độ 20 ^{0}C và cường độ ánh sáng ở mức 3.500 lux. Bộ rễ cây sâm phát triển tốt nhất khi

cây được trồng trong giàn mái che lợp bằng nilon đen (Parmenter,G and Littlejohn,R, 2000 [113]; Lee I.C.*et al*., 1980 [90]; Oh S.H, 2004 [110]).

1.7.2. Kết quả nghiên cứu kỹ thuật trồng và chăm sóc sâm Ngọc Linh ở Việt Nam

a) Nghiên cứu về thời vụ trồng

Hiện nay trong sản xuất có 2 thời vụ trồng sâm Ngọc Linh:

Thời vụ 1: trồng từ tháng 9 đến tháng 11 khi cây chuẩn bị ngủ đông, đây là thời vụ chính.

Thời vụ 2: trồng từ tháng 4 đến tháng 5 khi cây đã mọc có lá ổn định hoàn toàn. Đây là thời vụ chủ yếu dành cho việc trồng cây giống có 2 năm tuổi (18 tháng đến 24 tháng) và dùng cho việc trồng dặm.

Viện dược liệu đã tiến hành nghiên cứu về thời vụ trồng trong 3 năm (2001-2003) tại Ngọc Linh - Kon Tum về 2 thời vụ trồng tháng 4 và tháng 10; cây đem trồng 18 tháng tuổi (cây 2 năm). Kết quả thời vụ trồng thích hợp (cho cây giống 18 tháng tuổi) là vào tháng 10 (Nguyễn Bá Hoạt, 2010) [13].

Trồng sâm Ngọc Linh ở nhiều thời vụ (tháng 4, tháng 5; tháng 8, tháng 9 và tháng 10 trong năm), trong đó thời vụ 15/8 (chính vụ), cây có tỷ lệ sống cao (đạt 68%), chỉ số diện tích lá (0,9933 m^2lá/m^2đất), năng suất lý thuyết (54,61 tạ/ha) cao hơn hẳn các thời vụ trồng sớm hay trồng muộn. Điều kiện không trồng được vào thời vụ chính (15/8) thì trồng thời vụ sớm (15/4;15/5) thuận lợi hơn vụ muộn (15/9,15/10) (Trần Thị Liên, 2011) [18]

b) Nghiên cứu về mật độ, khoảng cách trồng

Cây sâm được trồng trên hố với khoảng cách hố từ 20 - 35 cm. Viện Dược liệu đã tiến hành nghiên cứu mật độ, khoảng cách trồng với thí nghiệm trồng cây giống 18 và 24 tháng tuổi; thời vụ trồng vào tháng 4 và tháng 10 tại Ngọc Linh, Kon Tum. Kết quả cả 2 thời vụ trồng (tháng 4 và tháng 10) mật độ trồng đối với sâm Ngọc Linh thích hợp nhất là 16 cây/m^2 với khoảng cách

cây 20 x 30 cm. Như vậy, kết quả trên đối với sâm Ngọc Linh của Viện Dược liệu cũng phù hợp với kết luận của nhân sâm Triều Tiên (Nguyễn Bá Hoạt, 2005) [12].

c) Nghiên cứu về phân bón:

- Lượng phân bón cho 1 ha: Mùn núi 80 -100 tấn; Phân vi sinh: 1500 kg; Ure: 100 kg; Supe lân: 200 kg; Kali clorua: 100 kg (Nguyễn Bá Hoạt, 2010) [13].

- Bón phân cho sâm Ngọc Linh với 3 mức: 80 tấn mùn núi + 40 kg P_2O_5 + 60 kg K_2O/ha (mức 1); 80 tấn mùn núi + 30 kg P_2O_5 + 60 kg K_2O/ha (mức 2); 80 tấn mùn núi + 20 kg P_2O_5 + 80 kg K_2O /ha (mức 3) đều sinh trưởng, tạo lập năng suất và chất lượng cao trong điều kiện mái che cho năng suất lần lượt 82,83; 82,17 và 81,51 tạ/ha (Trần Thị Liên,2011) [18].

d) Một số quy trình kỹ thuật trồng sâm Ngọc Linh

Năm 2006, Viện Dược liệu ban hành " Quy trình trồng sâm Ngọc Linh dưới tán rừng" (Nguyễn Bá Hoạt *và cs*., 2006) có phụ lục đính kèm (*phụ lục 3*)

Năm 2010, Viện Dược liệu ban hành " Quy trình trồng sâm Ngọc Linh dưới giàn mái che" (Nguyễn Bá Hoạt *và cs*., 2010) có phụ lục đính kèm (*phụ lục 4*)

Năm 2016, Sở Nông nghiệp và Phát triển nông thôn tỉnh Quảng Nam ban hành Quy trình hướng dẫn tạm thời "*Kỹ thuật trồng và Chăm sóc cây sâm Ngọc Linh dưới tán rừng trên địa bàn tỉnh Quảng Nam*" (Quyết định số 333/QĐ-SNN&PTNT ngày 29 tháng 6 năm 2016 có phụ lục đính kèm (*phụ lục 5)*

Năm 2017, Ủy ban Nhân dân tỉnh KonTum ban hành Quy trình tạm thời "*Kỹ thuật trồng và Chăm sóc cây sâm Ngọc Linh trên địa bàn tỉnh Kon Tum*" (Quyết định số: 649/QĐ-UBND, ngày 10 tháng 7 năm 2017) có phụ lục đính kèm (*phụ lục 6*)

Năm 2019, Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế xây dựng bản "Hướng dẫn nhân giống sâm Ngọc Linh bằng hạt" thuộc đề tài cấp tỉnh "*Nghiên cứu ứng*

dụng tiến bộ khoa học và công nghệ về nhân giống hữu tính nhằm nâng cao tỷ lệ và chất lượng cây giống sâm Ngọc Linh tại huyện Nam Trà My, tỉnh Quảng Nam" (Trương Thị Hồng Hải *và* cs., 2019) có phụ lục đính kèm (*phụ lục 7*)

Tóm lại, Qua các tài liệu tham khảo cho thấy: Hiện nay, sâm tam thất và các loài sâm khác đang được đem vào trồng tại vùng sâm Ngọc Linh gây lẫn tạp và thoái hóa giống. Vùng quy hoạch trồng sâm tại Kon Tum và Quảng Nam với diện tích rất lớn (>32.000 ha) với mật độ trồng trung bình là 25.000 cây/ha. Do vậy, lượng cây giống cần sản xuất để phục vụ trồng và phát triển của vùng là rất lớn (>800 triệu cây giống). Bên cạnh đó việc nhân giống từ nuôi cấy mô hiện đang trong giai đoạn trồng thử nghiệm để đánh giá khả năng sinh trưởng phát triển sau đó mới có kế hoạch nhân rộng trong thời gian tới. Nhân giống từ hạt sâm Ngọc Linh gặp nhiều khó khăn như hạt mọc mầm chậm, mọc mầm phụ thuộc vào thời tiết, do đó tỷ lệ nảy mầm thấp và không ổn định ảnh hưởng đến chất lượng cây giống xuất vườn. Cây sâm Ngọc Linh là cây có cùng họ, cùng chi với nhân sâm Triều Tiên. Trên cơ sở đó, dựa vào các kết quả nghiên cứu của thế giới về các biện pháp kỹ thuật nhân giống từ hạt, kết hợp với các kết quả nghiên cứu về một số biện pháp kỹ thuật canh tác (mật độ, phân bón) của các tác giả trong nước về trồng và phát triển cây giống sâm Ngọc Linh dưới tán rừng tự nhiên và dưới giàn mái che để hoàn thiện kỹ thuật trồng và chăm sóc tại vùng nghiên cứu.

CHƯƠNG II
VẬT LIỆU, NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

2.1.1. Vật liệu

- Các mẫu lá, củ, hạt giống sâm Ngọc Linh (*P. vietnamensis*) được thu thập tại Kon Tum, phục vụ công tác nhân giống *in vitro* và tách chiết ADN. Các mẫu lá và củ sâm Vũ Diệp (*P. bipinatifidus*), tam thất hoang (*P. stipuleanatus*) được thu thập tại Sa Pa, tỉnh Lào Cai. Các mẫu sâm Lai Châu (*P. vietnamensis* var. *fuscidiscus*) được thu thập tại tỉnh Lai Châu. Các mẫu sâm Hàn Quốc được thu thập thông qua Chương trình hợp tác với Hàn Quốc phục vụ cho việc tách chiết ADN chạy kiểm định.

- Các chỉ thị phân tử thiết kế dựa trên genome của lục lạp và gen nhân

- Cây giống sâm Ngọc Linh, được sử dụng trong các thí nghiệm dưới giàn mái che là cây giống có một năm tuổi đủ tiêu chuẩn xuất vườn theo tiêu chuẩn của Công ty TNHH MTV Lâm nghiệp Đăk Tô và Công ty Cổ phần sâm Ngọc Linh Kon Tum cụ thể như sau:

+ Tuổi cây: đạt 12 tháng tuổi;

+ Hình thái cây: có 01 lá kép, lá có màu xanh đến xanh đậm;

+ Chiều cao thân khí sinh trung bình: Từ 10 cm trở lên;

+ Đường kính củ từ 5 mm trở lên; có từ 2- 3 rễ chính trở lên.

- Hạt giống sâm sử dụng trong các thí nghiệm nhân giống đều thu hái trên cây đã có 5 năm tuổi tại Hợp tác xã Dược liệu hữu cơ Tu Mơ Rông, xã Ngọc Lây, huyện Tu Mơ Rông, tỉnh Kon Tum.

- Thành phần dinh dưỡng phân hữu cơ vi sinh ủ hoai từ lá, cành cây rừng: pH_{H2O} (5,34); OM (21,06%); đạm tổng số N (0,42%), lân tổng số P_2O_5 (0,14%), kali tổng số (0,04%); đạm dễ tiêu dạng NH_4 (440,59 mg/100g), đạm

dễ tiêu dạng NO_3 (33,89 mg/100g), P_2O_5 dễ tiêu (3,65mg/100g), K_2O dễ tiêu (6,33mg/100g). Sinh học: vi sinh vật phân giải lân vô cơ khó tan (9,0 x 10^5CFU/g); vi sinh vật phân giải cellulose (5,3 x 10^5 CFU/g) và vi sinh vật cố định đạm (6,3 x 10^5CFU/g).

- Thành phần dinh dưỡng mùn núi: Dinh dưỡng: pH_{H2O} (3,80); OM (34,40%); đạm tổng số N (1,12 %), lân tổng số P_2O_5 (0,49%), K_2O tổng số (0,05%); đạm dễ tiêu dạng NH_4 **(**100,8 ppm), P_2O_5 dễ tiêu (1,61mg/100g), K_2O dễ tiêu (24,80 mg/100g).

- Thành phần dinh dưỡng đất rừng tự nhiên: pH_{H2O} (3,87); OM (9,01%); đạm tổng số N (0,42 %), P_2O_5 tổng số (0,33%), K_2O tổng số (0,05%); đạm dễ tiêu dạng NH_4 **(**28ppm), đạm dễ tiêu dạng NO_3 (8ppm), P_2O_5 dễ tiêu (0,49 mg/100g), K_2O dễ tiêu (12,44 mg/100g); Ca^{2+} trao đổi (1,04lđl/100g); Mg^{2+} trao đổi (0,03 lđl/100g). Thành phần cơ giới sét (50,72%); thịt (41,62%); cát (7,67%).

- Cát suối: cát được lấy từ suối, rửa sạch, phơi khô.

- Phân bón các loại: Ure: 46% N; Super lân P_2O_5: 17%; Kali clorua: 57% K_2O.

- Đá trân châu: Khoáng chất chủ yếu là SiO2 (70%) và các khoáng chất khác có độ pH: 7,0

- Phân hữu cơ khoáng vermiculite: Vermiculite là một nhóm khoáng chất (sắt-magiê-nhôm).

- Rêu than bùn Peatman: Thành phần 50% than bùn khối 5-10 mm; 50% than bùn trắng 0-20 mm; Độ pH: 5,5 - 6,5

- Phân hữu cơ (phân vermi): gồm Hữu cơ: 60% + Axit humic: 9% + Axit fulvic: 3% + Axit amin và các đa trung vi lượng + Trichoderma, bacillus…

2.1.2. Thiết bị, dụng cụ, môi trường, hóa chất, điều kiện nuôi cấy mô và thiết kế chỉ thị phân tử

2.1.2.1. Thiết bị - dụng cụ - hóa chất

Thiết bị và dụng cụ trong nuôi cấy *in vitro* gồm có: cân điện tử, bếp điện, máy, cất nước, máy đo pH, nồi hấp vô trùng, dao cấy, đĩa cấy, panh cấy, kéo, bình nuôi cấy100 ml và 250 ml, dây thun, nilon, găng tay, khẩu trang; dung dịch cồn, thiophanate methyl 0,7%; Streptomycin, sodium hypochlorite và ethyl alcohol 70%.

2.1.2.2. Môi trường nuôi cấy

Môi trường dinh dưỡng cơ bản MS được sử dụng (Murashige and Skoog,1962) và SH (Schenk and Hildebrandt,1972) có bổ sung thêm 7g/L agar, 30g/L sucrose và các chất điều hòa sinh trưởng khác nhau. Môi trường nuôi cấy được hấp khử trùng 20 phút ở 121°C, 1 atm. Nhiệt độ phòng nuôi cấy 21-23° C. Thời gian chiếu sáng 12 - 14 giờ/ngày, cường độ chiếu sáng 1800 - 2000 lux.

2.1.2.3. Hóa chất và thiết bị, dụng cụ thiết kế chỉ thị phân tử

- Các chỉ thị SSR

- Các thiết bị máy móc sử dụng: Thiết bị được sử dụng thuộc Phòng Sinh học Phân tử Viện Di truyền Nông nghiệp bao gồm :

+ Máy đo pH

+ Máy li tâm (Beckman)

+ Máy PCR System 9700 (Pharmacia)

+ Máy điện di (Bio-Rad)

+ Máy đo quang phổ, máy soi UV, lò vi sóng…

- Các hóa chất sử dụng: chiết ADN, PCR của hãng chuyên dụng thuộc quản lý của Phòng Sinh học Phân Tử - Viện Di truyền Nông nghiệp.

2.2. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

- Thời gian thực hiện: Năm 2017 - 2021

- Địa điểm nghiên cứu:

+ Hợp tác xã Dược liệu hữu cơ Tu Mơ Rông, huyện Tu Mơ Rông, tỉnh Kon Tum. Độ cao >1.200 m so với mực nước biển.

+ Phòng thí nghiệm thuộc Bộ môn Sinh học Phân tử -Viện Di truyền; phòng phân tích Trung tâm - Viện Khoa học Kỹ thuật Nông lâm nghiệp Tây Nguyên (WASI).

2.3. Nội dung nghiên cứu

Nội dung 1: Đánh giá, xác định hiện trạng phát triển và sản xuất cây giống sâm Ngọc Linh

Nội dung 2: Nghiên cứu xây dựng bộ chỉ thị phân tử đánh giá đúng cây giống sâm Ngọc Linh

Nội dung 3: Nghiên cứu hoàn thiện biện pháp kỹ thuật sản xuất cây giống sâm Ngọc Linh bằng phương pháp *invitro*

Nội dung 4: Nghiên cứu hoàn thiện biện pháp kỹ thuật sản xuất cây giống sâm Ngọc Linh hữu tính từ hạt

Nội dung 5: Nghiên cứu một số biện pháp kỹ thuật chính trồng sâm Ngọc Linh dưới giàn mái che

2.4. Phương pháp nghiên cứu

2.4.1. Nội dung 1: Đánh giá, xác định hiện trạng phát triển và sản xuất cây giống sâm Ngọc Linh

- Nội dung thu thập:

+ Thu thập dữ liệu về điều kiện khí hậu tại huyện Tu Mơ Rông (*phụ lục 8*)

+ Thu thập số liệu về thực trạng trồng; quy hoạch bảo tồn và phát triển và sản xuất cây giống sâm Ngọc Linh

+ Thu thập các yếu tố hạn chế trong phát triển và sản xuất cây giống sâm Ngọc Linh

- Phương pháp thu thập: Thu thập số liệu thứ cấp tại địa bàn, phỏng vấn người dân, các hộ, doanh nghiệp trồng và sản xuất cây giống sâm Ngọc Linh

2.4.2. Nội dung 2: Nghiên cứu xây dựng bộ chỉ thị phân tử đánh giá đúng cây giống sâm Ngọc Linh.

* Phương pháp thiết kế chỉ thị phân tử và xác định chỉ thị phân tử đặc hiệu phục vụ kiểm định cây giống sâm Ngọc Linh

Bước 1: Thông tin về hệ gen nhân của *P. ginseng* (Jayakody,M.*et al*., 2018) [75] được khai thác trên các cơ sở dữ liệu chứa trình tự lặp đơn giản (microsatellite), trình tự Genome survey sequence (GSS), Expressed sequence tag (EST) và trình tự lục lạp trên ngân hàng gen NCBI (Wheeler,D.L.*et al*., 2008) [137] được sử dụng làm hệ tham chiếu cho sâm Ngọc Linh. Sử dụng chương trình chuyên dụng (Gramene SSRtool) [151] để tìm ra các đoạn SSR.

Bước 2: Bảng kết quả thu được sẽ thống kê số lượng đoạn SSR, số lượng từng loại nucleotide, đơn vị lặp và vị trí của đoạn lặp trên trình tự, từ đó sàng lọc các SSR có đơn vị lặp cao. Cụ thể, các đơn vị lặp cao với các thông số là ≥10 đơn vị lặp cho đoạn lặp chứa đơn nucleotide, ≥5 đơn vị lặp cho đoạn lặp chứa 2 nucleotide, ≥4 đơn vị lặp cho đoạn lặp chứa 3 nucleotide, ≥3 đơn vị lặp cho đoạn lặp chứa 4 - 6 nucleotide và ≥2 đơn vị lặp cho đoạn lặp liền kề nhiều hơn 7 nucleotide.

Bước 3: Thiết kế đoạn mồi cho phản ứng PCR bằng chương trình Primer3 với các thông số mặc định (Rozen,S and Skaletsky,H, 2000) [120]. Trình tự mồi xuôi và môi ngược được gửi sang công ty IDT (Intergrated DNA Technologies, Hoa Kỳ) tổng hợp.

* Các kỹ thuật sinh học phân tử bao gồm:

a) Tách chiết ADN

Tách chiết ADN tổng số được thực hiện theo phương pháp CTAB mô tả trong nghiên cứu gần đây (Li, J. *et al*., 2013) [101]. Nồng độ và độ tinh sạch của mẫu ADN được kiểm tra bằng máy NanoDrop2000 (ThermoFisher, Hoa Kỳ).

b) Đo nồng độ và độ tinh sạch ADN bằng máy Nanodrop2000 (ThermoFisher, Hoa Kỳ). Pha loãng thành nồng độ 30ng/µl để cho chạy phản ứng PCR.

c) Phản ứng PCR: Phản ứng PCR được tiến hành trên máy chu kỳ nhiệt Mastercycler Pro (Eppendorf, Đức). Tổng dung dịch phản ứng là 25 µl, bao gồm H2O (17 µl), Buffer (10X) và MgCl2 (25mM) (2,5 µl), dNTPs (2,5mM) (2,0 µl), Taq (500U) (0,5 µl), Primer F+R (20 pmol) (2 µl), ADN (20 ng) (1,0 µl). Điều kiện phản ứng PCR được minh họa tại bảng 2.1.

Bảng 2.1. Điều kiện phản ứng PCR

STT	Giai đoạn phản ứng	Điều kiện phản ứng	
1	Khởi đầu	94°C - 5 phút	
2	Biến tính	94°C - 30 giây	35 chu kỳ
3	Gắn mồi	(52 ÷ 60°C) - 45 giây	
4	Kéo dài	72°C - 2 phút	
5	Kết thúc kéo dài	72°C - 7 phút	
6	Bảo quản	4°C - ∞	

d) Sản phẩm PCR được tiến hành chạy điện di trên gel agarose 2,5% có bổ sung EtBr (ở hiệu điện thế 150V thời gian 70 phút) và gel polyacrylamide 6,0% (ở hiệu điện thế 100V thời gian 90 phút) với thang ADN chuẩn 1 kb Plus (Thermo Scientific, Anh) trong dung dịch đệm Tris-boric acid-EDTA 0,5X (Morgante, M. *et al*., 1998) [105]. Gel polyacrylamide 6,0% sau khi

điện di được nhuộm bằng EtBr trong 15 phút sau đó đặt gel vào máy soi UV và chụp ảnh.

2.4.3. Nội dung 3: Nghiên cứu hoàn thiện biện pháp kỹ thuật sản xuất cây giống sâm Ngọc Linh bằng phương pháp nhân giống invitro

Thí nghiệm 1: Ảnh hưởng của phương pháp vào mẫu từ mô củ sâm Ngọc Linh đến tỷ lệ nhiễm khuẩn

Mục đích: xác định phương pháp vô trùng tối ưu đối để giảm tỷ lệ nhiễm khuẩn với mẫu là mô củ sâm Ngọc Linh

Cách tiến hành: loại bỏ phần rễ và đất xung quanh, dùng bàn chải rửa sạch sơ bộ dưới vòi nước chảy. Dùng bông cồn 70% lau vệ sinh bề mặt củ, sau đó cắt củ ra thành từng khối vuông phù hợp ngâm trong dung dịch chứa 0,7% thiophanate methyl trong 30 phút. Tiếp theo các khối vuông được rửa sạch bằng nước cất vô trùng, ngâm tiếp trong dung dịch kháng sinh 500mg/L Streptomycin.

Thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên (CRD), một yếu tố (thời gian xử lý mẫu khác nhau) cho chất khử trùng là dung dịch 500mg/L Streptomycin, gồm 5 công thức, lặp lại 5 lần, mỗi lần tương ứng với 1 bình, mỗi bình 8 miếng mẫu. Tổng số miếng mẫu: 5 CT x 8 mẫu/CT x 5 lần lặp = 200 mẫu theo thời gian các công thức khác nhau: CT1: 0 phút (Đ/C); CT2: 5 phút; CT3: 10 phút; CT4:15 phút; CT5: 20 phút rửa lại bằng nước cất vô trùng, rồi xử lý bằng dung dịch sodium hypochlorite 1,5% trong 15 phút. Cuối cùng rửa lại 3 lần bằng nước cất vô trùng và để cho ráo nước. Dùng dao loại bỏ hết phần bề mặt xung quanh tiếp xúc với hóa chất khi vô trùng, rồi cắt mẫu thành từng lát mỏng có kích thước 1×5×5mm và đưa vào môi trường nuôi cấy sau 4 tuần.

Chỉ tiêu theo dõi: Quan sát không nhiễm nấm, nhiễm khuẩn sau 4 tuần nuôi cấy. Tỷ lệ mẫu sạch bệnh (%) = tổng số mẫu sạch bệnh/tổng số mẫu nuôi cấy x 100

Thí nghiệm 2*: Ảnh hưởng của phương pháp vào mẫu từ mô chồi mầm sâm Ngọc Linh đến tỷ lệ nhiễm nấm, nhiễm khuẩn*

Mục đích: xác định phương pháp vô trùng tối ưu để giảm tỷ lệ nhiễm nấm đối với mẫu là mô chồi mầm.

Cách tiến hành: lựa chọn các chồi mẫu làm vật liệu không bị sâu bệnh, rửa sạch sơ bộ dưới vòi nước chảy tránh làm tổn thương bề mặt mẫu; cắt nhỏ kích thước các mô chồi mầm cho phù hợp và ngâm trong dung dịch ethyl alcohol 70% theo thời gian khác nhau.

Thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên (CRD) một yếu tố (thời gian xử lý mẫu khác nhau) cho chất khử trùng là ethanol gồm 5 công thức, lặp lại 5 lần, mỗi lần tương ứng với 1 bình, mỗi bình 4 miếng mẫu . Tổng số miếng mẫu: 5 CT x 4 mẫu/CT x 5 lần lặp = 100 mẫu theo thời gian các công thức khác nhau: CT1: 0 phút (Đ/C); CT2: 1 phút; CT3: 3 phút; CT4: 5 phút; CT5: 10 phút. Sau đó rửa sạch các mẫu bằng nước cất vô trùng, rồi xử lý bằng 0,7% thiophanate methyl trong 30 phút và dung dịch sodium hypochlorite 1,5% trong 10 phút. Tiếp theo rửa lại mẫu 3 lần bằng nước cất vô trùng rồi để ráo nước. Cắt mẫu thành từng miếng có kích thước 1×5×5mm và đưa vào môi trường nuôi cấy.

Chỉ tiêu theo dõi: Quan sát, không nhiễm nấm, nhiễm khuẩn sau 4 tuần nuôi cấy. Tỷ lệ mẫu sạch bệnh (%) = tổng số mẫu sạch bệnh/tổng số mẫu nuôi cấy x 100

Thí nghiệm 3: Ảnh hưởng của phương pháp vào mẫu từ mô thân sâm Ngọc Linh đến tỷ lệ nhiễm nấm.

Mục đích: xác định phương pháp vô trùng tối ưu để giảm tỷ lệ nhiễm nấm, nhiễm khuẩn đối với mẫu mô thân.

Cách tiến hành: lựa chọn thân cây không bị sâu bệnh, rửa sạch sơ bộ dưới vòi nước chảy tránh làm tổn thương bề mặt mẫu. Sau đó dùng bông cồn

70% lau nhẹ nhàng bề mặt mẫu. Bước tiếp theo xử lý mẫu bằng dung dịch 0,7% thiophanate methyl.

Thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên (CRD) một yếu tố (thời gian xử lý mẫu khác nhau) cho chất khử trùng là dung dịch 0,7% thiophanate methyl, gồm 5 công thức, lặp lại 5 lần, mỗi lần tương ứng với 1 bình, mỗi bình 7 miếng mẫu. Tổng số miếng mẫu: 5 CT x 5 mẫu/CT x 5 lần lặp = 125 mẫu theo thời gian các công thức khác nhau: CT1: 0 phút (Đ/C); CT2: 10 phút; CT3: 20 phút; CT4: 30 phút; CT5: 40 phút). Tiếp theo, rửa lại mẫu 3 lần bằng nước cất vô trùng và ngâm mẫu 10 phút trong dung dịch 1,5% sodium hypochlorite. Cuối cùng, rửa lại mẫu 3 lần bằng nước cất vô trùng rồi để ráo nước. Cắt mẫu thành từng miếng dài 0,8cm và đưa vào môi trường nuôi cấy.

Chỉ tiêu theo dõi: Quan sát, không nhiễm nấm, nhiễm khuẩn sau 4 tuần nuôi cấy. Tỷ lệ mẫu sạch bệnh (%) = tổng số mẫu sạch bệnh/tổng số mẫu nuôi cấy x 100

Thí nghiệm 4: Ảnh hưởng của phương pháp vào mẫu từ mô lá *sâm Ngọc Linh đến tỷ lệ nhiễm nấm, nhiễm khuẩn*

Mục đích: xác định phương pháp vô trùng đối với mẫu là mô lá. Chuẩn bị mẫu: lựa chọn lá cây không bị sâu bệnh, rửa sạch sơ bộ dưới vòi nước chảy tránh làm tổn thương bề mặt mẫu. Sau đó dùng bông cồn 70% lau nhẹ nhàng bề mặt mẫu.

Cách tiến hành: bước tiếp theo xử lý mẫu bằng dung dịch 0,7% thiophanate methyl.

Thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên (CRD) một yếu tố (thời gian xử lý khác nhau) cho chất khử trùng là dung dịch 0,7% thiophanate methyl, gồm 5 công thức, lặp lại 5 lần, mỗi lần tương ứng với 1 bình, mỗi bình 7 miếng mẫu. Tổng số miếng mẫu: 5 CT x7 mẫu/CT x 5 lần lặp = 175 mẫu theo theo thời gian các công thức khác nhau: CT1: 0 phút

(Đ/C); CT2: 10 phút; CT3: 20 phút; CT4: 30 phút; CT5: 40 phút. Tiếp theo, rửa lại mẫu 3 lần bằng nước cất vô trùng và ngâm mẫu 10 phút trong dung dịch 1,5% sodium hypochlorite. Cuối cùng, rửa lại mẫu 3 lần bằng nước cất vô trùng rồi để ráo nước. Cắt mẫu thành từng miếng với kích thước 5×5mm và đưa vào môi trường nuôi cấy.

Chỉ tiêu theo dõi: Quan sát, không nhiễm nấm, nhiễm khuẩn sau 4 tuần nuôi cấy. Tỷ lệ mẫu sạch bệnh (%) = tổng số mẫu sạch bệnh/tổng số mẫu nuôi cấy x 100

Thí nghiệm 5: Ảnh hưởng của nồng độ 2,4-D đến quá trình cảm ứng tạo mô sẹo ở sâm Ngọc Linh

Mục đích: xác định nồng độ 2,4 D thích hợp cho quá trình cảm ứng tạo mô sẹo từ mô củ và chồi mầm.

Cách tiến hành: sau khi khử trùng cắt mỏng tế bào từ mô củ, mô chồi mầm, được nuôi cấy trên môi trường nuôi cấy MS cơ bản với dải nồng độ 2,4-D khác nhau (0,3; 0,5; 1,0 mg/L). Đánh giá khả năng cảm ứng tạo mô sẹo

Thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên (CRD) một yếu tố (nồng độ 2,4 D), gồm 4 MT (môi trường) được thực hiện với 3 lần lặp lại, mỗi lần tương ứng với 5 bình, mỗi bình 5 miếng mẫu. Tổng số miếng mẫu: 4 MT x 5 mẫu/MT x 5 lần lặp = 100 mẫu. MT1: Môi trường MS không có chất điều hòa sinh trưởng (Đ/C); MT2: MS + 0,3mg/L 2,4-D; MT3: MS + 0,5mg/L 2,4-D; MT4: MS + 1,0 mg/L 2,4-D.

Chỉ tiêu theo dõi: tỷ lệ % hình thành mô sẹo = tổng số mô sẹo/tổng số mẫu cấy x 100; đặc điểm màu sắc mô sẹo

Thí nghiệm 6: Ảnh hưởng của nồng độ Auxin và Cytokinin đến tỷ lệ cảm ứng tạo và nhân phôi vô tính

Phương pháp tạo mô sẹo có khả năng sinh phôi

Mục đích: xác định nồng độ Auxin (2,4 D và NAA) kết hợp Cytokinin

(TDZ) có khả năng cảm ứng mô sẹo có khả năng sinh phôi.

Cách tiến hành: Mô sẹo có khả năng phát sinh phôi được cấy chuyển sang môi trường MS có hàm lượng đường sucrose 30g/L. Đánh giá khả năng hình thành phôi vô tính sau 2-3 tháng nuôi cấy không chuyển.

Phương pháp bố trí thí nghiệm: Thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên (CRD) hai yếu tố, gồm 15 CT với 3 lần nhắc lại, mỗi lần tương ứng với 5 bình, mỗi bình 5 mẫu. Tổng số mẫu: 15 CT x 5 mẫu/CT x 5 lần lặp = 375 mẫu

Yếu tố 1 (Nồng độ Auxin): 2,4-D (0,5-1,0 mg/L); NAA (0,5-1,0mg/L);, 1,0 mg/L + 1,0mg/L TDZ

Yếu tố 2 (Nồng Cytokinin): TDZ (0, 0,1; 0,3; 0,5; 1,0 mg/L)

Bảng 2.2. Công thức thí nghiệm ảnh hưởng của nồng độ Auxin và Cytokinin trong phòng nuôi cấy mô

Auxin / Cytokinin	A1(0,5 mg/L 2,4D)	A2 (0,5 mg/L NAA)	A3 (1,0 mg/L 2,4 D+ 1,0 mg/L NAA)
C0 (0mg/L)	A1Co (CT1)	A2 Co(CT2)	A3Co (CT3)
C1 (0,1 mg/L)	A1 C1(CT4)	A2C1 (CT5)	A3C1(CT6)
C2 (0,3 mg/L)	A1C2 (CT7)	A2C2 (CT8)	A3C2 (CT9)
C3 (0,5 mg/L)	A1C3 (CT10)	A2C3 (CT11)	A3C3 (CT12)
C4 (1,0 mg/L)	A1C4(CT13)	A2C4 (CT14)	A3C4(CT5)

Ghi chú: A: các mức nồng độ Auxin; C: các mức nồng độ Cytokinin

Các chỉ tiêu theo dõi:

- Tỷ lệ phôi vô tính được tạo thành (%)= số phôi vô tính/tổng số mô sẹo x100
- Tỷ lệ số phôi vô tính/mô sẹo (phôi)

Thí nghiệm 7: Ảnh hưởng của chất điều tiết sinh trưởng đến khả năng

nảy mầm phôi vô tính và phát triển thành cây con in vitro với củ micro sâm Ngọc Linh

Mục đích: xác định nồng độ chất điều tiết sinh trưởng thích hợp đến khả năng nảy mầm phôi vô tính và phát triển thành cây con *invitro (có củ micro)*

Cách tiến hành: Phôi vô tính được nuôi cấy trên môi trường cơ bản MS với nồng độ đường 30 g/l tối ưu theo dõi đánh giá sau 6 tuần nuôi cấy. Thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên (CRD) một yếu tố, gồm 8 môi trường với 3 lần nhắc lại, mỗi lần tương ứng với 5 bình, bao gồm các môi trường sau:

MT1- ĐC: MS ; MT2: MS + 0,5 mg/L GA_3; MT3: MS + 1,0 mg/L GA_3; MT4: MS + 3,0 mg/L GA_3; MT5: MS + 5,0 mg/L GA_3;MT6: MS + 1,0 mg/L NAA + 0,5 mg/L BA; MT7: MS + 1,0 mg/L NAA + 1,0 mg/L BA; MT8: MS + 0,5 mg/L NAA + 1,0 mg/L BA.

Chỉ tiêu theo dõi: Tỷ lệ phôi nảy mầm thành cây con *in vitro* sau 6 tuần nuôi cấy (%) = số phôi hình thành cây con/tổng số phôi vô tính x100. Đặc điểm của cây con *in vitro*

Thí nghiệm 8: Ảnh hưởng của nồng độ chất điều tiết sinh trưởng (BA và NAA) trên môi trường dinh dưỡng(MS và SH) đến quá trình tăng trưởng cây con hoàn chỉnh

Mục đích: xác định nồng độ NAA kết hợp với BA thích hợp trên nền môi trường dinh dưỡng cơ bản MS và SH đến khả năng ra rễ của cây có củ micro cây sâm Ngọc Linh.

Cách tiến hành: cây con thu được ở các thí nghiệm trên sẽ được cấy vào môi trường MS và SH với nồng độ 1mg/l NAA và các nồng độ BA khác nhau (0,2; 0,5mg/l), theo dõi đánh giá sau 90 ngày nuôi cấy.

Thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên (CRD) hai yếu tố, gồm 6 Môi trường: MT1: MS + 1,0 mg/L NAA + 0,5 mg/L BA; MT2: MS

+ 1,0 mg/L NAA + 0,2 mg/L BA; MT3: MS + 1,0 mg/L NAA, MT4: SH + 1,0 mg/L NAA + 0,5 mg/L BA; MT5: SH + 1,0 mg/L NAA + 0,2 mg/L BA; MT6: SH + 1,0 mg/L NAA và lặp lại 3 lần, mỗi lần tương ứng với 1 bình, mỗi bình 5 cây. Tổng số cây: 6 MT x 5 cây/MT x 3 lần lặp = 90 cây.

Chỉ tiêu theo dõi: số rễ/cây con hoàn chỉnh (rễ): đếm số rễ cây con của 90 cây hoàn chỉnh rồi tính giá trị trung bình.

Thí nghiệm 9: Ảnh hưởng của nồng độ than hoạt tính đến sinh trưởng và khả năng ra rễ tạo cây con hoàn chỉnh

Mục đích: Xác định nồng độ than hoạt tính thích hợp đến khả năng ra rễ tạo cây con hoàn chỉnh .

Cách tiến hành: Sau khi xác định được môi trường tối ưu cho sự phát triển của rễ, cây con với chiều cao đồng đều 2,5 - 3 cm, đường kính củ 0,3 - 0,4 cm, có lá thật được tiến hành nghiên cứu ảnh hưởng của than hoạt tính với nồng độ (0,2; 0,5; 1 mg/l) tới sự sinh trưởng và ra rễ của cây con hoàn chỉnh

Thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên (CRD) một yếu tố, gồm 4 công thức: CT1 (Đ/C): không bổ sung than hoạt tính; CT2: 0,2 g/L; CT3: 0,5 g/L; CT4: 1g/L, lặp lại 3 lần, mỗi lần tương ứng với 1 bình, mỗi bình 5 cây. Tổng số cây: 4 CT x 5 cây/CT x 3 lần lặp = 60 cây, theo dõi đánh giá sau 90 ngày nuôi cấy.

Chỉ tiêu theo dõi: số rễ/cây con hoàn chỉnh (rễ) = đếm số rễ cây con của 90 cây hoàn chỉnh rồi tính giá trị trung bình.

Thí nghiệm 10: Ảnh hưởng của nồng độ dinh dưỡng cơ bản trong môi trường tối ưu đến sinh trưởng của cây in vitro

Mục đích : Xác định nồng độ dinh dưỡng cơ bản trong môi trường tối ưu đến sinh trưởng của cây *in vitro*.

Cách tiến hành: cây con hoàn chỉnh với chiều cao đồng đều 2,5 - 3 cm, đường kính củ 0,3 - 0,4 cm, có lá thật được nuôi cấy trong môi trường dinh

dưỡng tối ưu với hàm lượng dinh dưỡng cơ bản đầy đủ SH (Schenk, Hidebrandt, 1972), SH1/2 (Môi trường SH có thành phần đa lượng và vi lượng giảm một nửa) và SH1/3 (Môi trường SH có thành phần đa lượng và vi lượng giảm 1/3) từ đó đánh giá sinh trưởng của cây *in vitro.*

Thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên (CRD) một yếu tố, gồm 3 môi trường: MT1 (Đ/C): SH; MT2: SH1/2 ; MT3: SH1/3, lặp lại 3 lần, mỗi lần tương ứng với 1 bình, mỗi bình 5 cây. Tổng số cây: 3 MT x 5 cây/MT x 3 lần lặp = 45 cây, theo dõi đánh giá sau 90 ngày nuôi cấy.

Chỉ tiêu theo dõi: số rễ/cây (rễ) = đếm số rễ cây con của 45 cây hoàn chỉnh rồi tính giá trị trung bình; chiều cao cây con hoàn chỉnh (cm) = Đo từ đầu thân rễ đến lá dài nhất

Thí nghiệm 11: Đánh giá ảnh hưởng của giá thể đến khả năng thích ứng của cây giống in vitro trong vườn ươm.

Mục đích: xác định loại giá thể và khả năng thích ứng cây giống sâm Ngọc Linh trong vườn ươm.

Cách tiến hành : Cây con khỏe 2 năm tuổi có củ và rễ tơ (1-2 cm), chiều cao cây đồng đều khoảng 5 cm có nguồn gốc từ phôi vô tính, cây được trồng trong bầu chứa giá thể dinh dưỡng khác nhau và đặt trồng trên luống trong vườn ươm dưới giàn mái che. Thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên (CRD) một yếu tố, gồm 4 công thức, lặp lại 3 lần. Tổng số cây thí nghiệm: 4 CT x 30 cây/CT x 3 lần lặp = 360 cây.

CT1: Giá thể là 100% đất mùn núi (Đ/C)

CT2: Giá thể là hỗn hợp gồm đất mùn núi và đá perlite trộn theo tỷ lệ 1:3

CT3: Giá thể là hỗn hợp gồm đất mùn núi, khoáng vermiculite và đá perlite trộn theo tỷ lệ 2:3:1;

CT4: Giá thể là hỗn hợp gồm đất mùn núi, phân hữu cơ, và bùn rêu (peat moss) trộn theo tỷ lệ 2:1:1.

Điều kiện nhà lưới vườn ươm: Trong điều kiện nhà lưới kiên cố tại Hợp tác xã Dược liệu Tu Mơ Rông, huyện Tu Mơ Rông, tỉnh Kon Tum; nhiệt độ trung bình ngày đêm dao động từ 13 - 20 ^{0}C; số giờ nắng trung bình tháng trong năm 193 giờ và độ che phủ trên 85% (sử dụng lưới màu đen).

Hình 2.1. Cây giống sâm Ngọc Linh *in vitro* 2 năm tuổi

Các chỉ tiêu theo dõi cây giống *in vitro* trong vườn ươm:

Tỉ lệ cây sống sót (%): tổng số cây sống sót/tổng số cây trồng x 100

Chiều cao cây (cm): Đo từ đầu thân rễ đến lá dài nhất.

Tăng trưởng chiều cao (cm): Chiều cao sau - chiều cao ban đầu.

Đặc điểm sinh trưởng: Quan sát, đánh giá các đặc điểm sinh trưởng của cây

Thí nghiệm 12: Đánh giá ảnh hưởng của tuổi cây đến khả năng thích ứng của cây giống in vitro trong vườn ươm.

Mục đích: xác định được tuổi cây giống *in vitro* thích hợp khi đưa ra vườn ươm dưới giàn mái che.

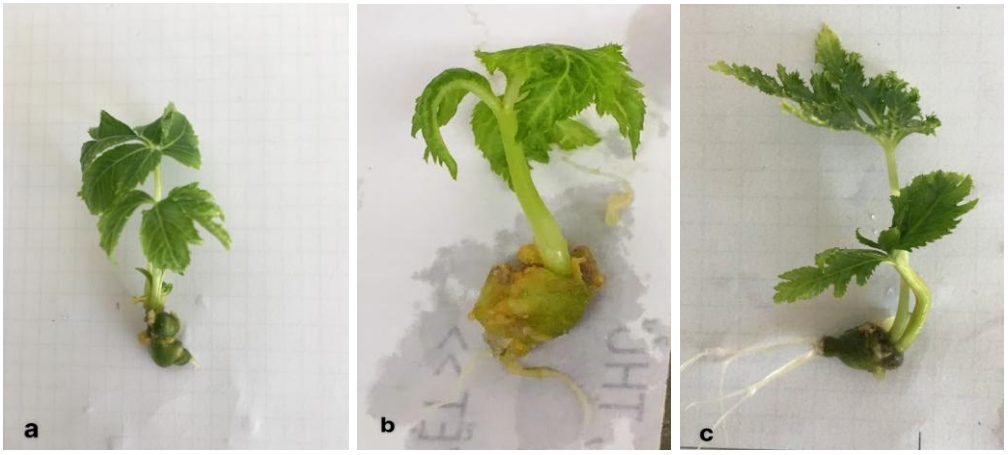
Cách tiến hành : Cây giống nghiên cứu trong thí nghiệm được lấy từ các nghiên cứu trước đó với độ tuổi từ 1-2 năm tuổi. Cây thí nghiệm có sức sống tốt, chiều cao cây ở các độ tuổi đồng đều được trồng trong bầu chứa giá thể dinh dưỡng tốt nhất (Công thức giá thể tốt nhất ở thí nghiệm 11) và đặt trồng trên luống trong vườn ươm dưới giàn mái che (độ che phủ 85%). Thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên (CRD) một yếu tố, gồm 3 công thức, lặp lại 3 lần.

Tổng số cây thí nghiệm: 3CT x 30 cây/CT x 3 lần lặp = 270 cây. Thời gian theo dõi sau 60 ngày trồng.

CT1: Cây giống *in vitro* 1 năm tuổi

CT2: Cây giống *in vitro* 1,5 năm tuổi

CT3: Cây giống *in vitro* 2 năm tuổi



Hình 2.2. Cây giống *in vitro* sâm Ngọc Linh

Ghi chú: a) Cây giống *in vitro* 1 năm tuổi; b) Cây giống *in vitro* 1,5 năm tuổi; Cây giống *in vitro* 2 năm tuổi

Các chỉ tiêu theo dõi cây giống *in vitro* trong vườn ươm

Tỉ lệ cây sống sót (%): tổng số cây sống sót/tổng số cây trồng x 100

Chiều cao cây (cm): Đo từ đầu thân rễ đến lá dài nhất.

Tăng trưởng chiều cao (cm): Chiều cao sau - chiều cao ban đầu.

Đặc điểm sinh trưởng: Quan sát, đánh giá các đặc điểm sinh trưởng của cây.

2.4.4. Nội dung 4: Nghiên cứu hoàn thiện biện pháp kỹ thuật sản xuất cây giống hữu tính từ hạt

Thí nghiệm 13: Nghiên cứu biện pháp xử lý quả/hạt giống sâm Ngọc Linh trước khi gieo

CT1: Quả chưa bỏ vỏ thịt gieo ngay

CT2: Quả đã bỏ vỏ thịt lấy hạt gieo ngay

CT3: Quả chưa bỏ vỏ thịt được phơi âm can

CT4: Quả đã bỏ vỏ thịt, hạt được phơi âm can

CT5: Hạt phơi âm can được ngâm trong GA_3 70 ppm trong vòng 45 phút

CT6: Hạt phơi âm can được ngâm trong GA_3 100 ppm trong vòng 45 phút

CT7: Hạt phơi âm can được ngâm trong GA_3 150 ppm trong vòng 45 phút

Phương pháp phơi âm can: Hạt sâm được trải đều trên nong nia, đặt trong điều kiện phòng râm mát 2 - 3 ngày đến khi se vỏ hạt (độ ẩm 20%) trước khi bố trí thí nghiệm. Các hạt được gieo trên luống, cùng một loại giá thể (50% đất rừng tự nhiên + 50% mùn núi), cùng thời vụ và chế độ chăm sóc như nhau.

Thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên (CRD) một yếu tố gồm 7 công thức (CT), mỗi công thức 30 hạt, lặp lại 3 lần. Tổng số hạt thí nghiệm: 7 CT x 30 hạt/CT x 3 lần lặp = 630 hạt.

Thí nghiệm 14: Ảnh hưởng của phương pháp bảo quản hạt giống (tự nhiên và nhân tạo) đến tỷ lệ mọc mầm hạt, tỷ lệ hình thành cây con và tỷ lệ xuất vườn cây giống sâm Ngọc Linh

Do hạt giống sâm Ngọc Linh có thời gian ngủ nghỉ dài (từ 120-150 ngày). Vì vậy, sau khi thu quả giống đem gieo ngay hoặc đưa vào bảo quản thì thời gian 120 ngày sau khi thu hạt giống, hạt vẫn trong thời gian ngủ nghỉ và chưa nảy mầm. Quả sâm sau khi thu hoạch (thu quả ngày 5/9/2018).

Thông tin về phương pháp bảo quản hạt giống tham khảo theo kinh nghiệm của người dân bản địa (thu hoạch quả sâm vào thời vụ 30/8 khi quả sâm đã ở giai đoạn chín thành thục chất lượng quả tốt hơn cả); tham khảo phương pháp bảo quản hạt của Hàn Quốc và kết hợp với khảo sát thực địa năm 2018.

- Thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên một yếu tố (CRD), gồm 4 công thức (CT), mỗi công thức 30 hạt và được lặp lại 3 lần. Tổng số hạt thí nghiệm: 4 CT x 30 hạt/CTx 3 lần lặp = 360 hạt.

+ CT1: Hạt giống đem gieo sau khi thu hoạch (đã tách vỏ thịt) được ủ trong mùn núi (Đ/C).

Cụ thể: Quả sau khi thu hoạch được chà sát cho vỏ quả bong ra, đãi, rửa sạch vỏ quả sau đó để ráo nước ủ trong mùn núi.

+ CT2: Hạt giống sau khi thu hoạch (đã tách vỏ thịt) được ủ trong cát suối (độ ẩm 75- 80%).

Cụ thể: Quả sau khi thu hoạch được chà sát cho vỏ quả bong ra, đãi, rửa sạch vỏ quả sau đó để ráo nước đem bảo quản trong cát suối sâu 50 cm trong 120 ngày, sau đó đem gieo.

+ CT3: Hạt giống sau khi thu hoạch (đã tách vỏ thịt) được ủ trong giá thể 50% mùn núi + 50% cát (độ ẩm 75- 80%)

Cụ thể: Quả sau khi thu hoạch được chà sát cho vỏ quả bong ra, đãi, rửa sạch vỏ quả sau đó để ráo nước đem bảo quản trong giá thể 50% mùn núi + 50 cát suối sâu 50 cm trong 120 ngày, sau đó đem gieo

+ CT4: Hạt giống sau khi thu hoạch (đã tách vỏ thịt) được ủ trong cát (độ ẩm 75-80%), đặt trong điều kiện nhân tạo 10^0C trong 120 ngày.

Cụ thể: Quả sau khi thu hoạch được chà sát cho vỏ quả bong ra, đãi, rửa sạch vỏ quả sau đó để ráo nước đem ủ trong cát, đặt trong điều kiện nhân tạo 10^0C trong 120 ngày (Li,T.S.*et al*., 2000 [100]; Won JY. *et al*., 1988 [138]).

<u>Thí nghiệm 15</u>: Ảnh hưởng của giá thể gieo hạt đến tỷ lệ mọc mầm của hạt sâm Ngọc Linh

Thí nghiệm được bố trí theo phương pháp ngẫu nhiên hoàn toàn (CRD) một yếu tố, gồm 5 công thức (CT), mỗi công thức 30 hạt (đã nứt nanh) và được lặp lại 3 lần. Tổng số hạt thí nghiệm: 5 CT x 30 hạt/CT x 3 lần lặp = 450 hạt.

Cụ thể: sử dụng hạt đã nứt nanh ở các nghiên cứu trước đó. Hạt được gieo vào các Khay nhựa kích thước (20 cm x 30 cm x 40 cm), đáy thùng đục lỗ (đường kính lỗ 1,5 cm) để thoát nước tốt và được đặt lên giá bằng thanh gỗ cách mặt đất 100 cm để hạn chế nấm bệnh, côn trùng dưới đất gây hại.

+ CT1: gieo hạt trong đất rừng 100% đất rừng (Đ/C)

+ CT2: gieo hạt trong giá thể mùn (100% mùn núi)

+ CT3: gieo hạt trong giá thể phân hữu cơ ủ hoai mục (100% phân hữu cơ)

+ CT4: gieo hạt trong giá thể 50% mùn núi + 50% đất rừng

+ CT5: gieo hạt trong giá thể 50% mùn núi + 50% phân hữu cơ hoai mục

2.4.5. Nội dung 5: Nghiên cứu một số biện pháp kỹ thuật chính trồng sâm Ngọc Linh dưới giàn mái che

Thí nghiệm 16: Ảnh hưởng của khoảng cách trồng đến sinh trưởng, phát triển và năng suất cá thể cây sâm Ngọc Linh

- Thí nghiệm được bố trí theo phương pháp khối ngẫu nhiên đầy đủ (RCBD) một yếu tố, gồm 4 công thức (CT), lặp lại 3 lần. Diện tích ô cơ sở 10 m^2/ô. Tổng diện tích thí nghiệm = 4 CT x 10 m^2/CT x 3 lần lặp = 150 m^2 (bao gồm cả diện tích bảo vệ).

CT1: 20 x 20 cm (25 cây/m^2)

CT2: 20 cm x 30 cm (16 cây/m^2)

CT3: 25 cm x 30 cm (13 cây/m^2)

CT4: 30 cm x 30 cm (11 cây/m^2)

- Sơ đồ thí nghiệm

LN I	CT 1	CT 3	CT 4	CT 2
LN II	CT 3	CT 2	CT 1	CT 4
LN III	CT 4	CT 1	CT 3	CT 2

- Điều kiện thí nghiệm:

+ Mật độ trồng này được tính trên 1m^2 luống mà không kể rãnh luống

+ Phân bón nền với lượng: 80 tấn mùn núi + 20 N+ 20 P_2O_5 + 20 K_2O/ha

+ Thời vụ trồng: 15/8/2018

+ Sử dụng cây giống gieo từ hạt đảm bảo tiêu chuẩn xuất vườn (*phụ lục 6)*: Quy trình tạm thời kỹ thuật trồng và chăm sóc cây sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha *et Grushv*) trên địa bàn tỉnh Kon Tum, năm 2017.

Thí nghiệm 17: Ảnh hưởng của liều lượng phân hữu cơ vi sinh đến sinh trưởng và năng suất của cây sâm Ngọc Linh

- Xây dựng công thức, số lần bón phân bón dựa trên kết quả khảo sát năm 2018 và tham khảo tài liệu trong và ngoài nước:

+ Lượng phân bón cho 1 ha sâm Ngọc Linh: Mùn núi 80-100 tấn; Phân vi sinh: 1.500kg; Urê: 100kg; Supe lân: 200kg; Kali clorua: 100kg. Quy ra tương đương với lượng bón 80-100 tấn mùn núi + 1.500 kg Phân vi sinh + 46 N + 32 P_2O_5 + 56 K_2O/ha (Nguyễn Bá Hoạt, 2010) [13].

+ Lượng phân hóa học cho 1 ha sâm Mỹ: 20 P_2O_5 + 20 K_2O/ha (bón lót) trong năm đầu và 20 N + 20 P_2O_5 + 20 K_2O/ha bón thúc trong năm sau (Carroll C and Apsley D, 2003) [56].

+ Số lần bón phân hóa học NK là 4 lần: lần 1: 15/4; lần 2: 15/6; lần 3:15/8 và lần 4:15/10. Phân P_2O_5 được bón 2 lần; lần 1 (15/4); lần 2 bón (15/8) theo quy trình bón phân NPK cho sâm Tam Thất 3 tuổi (Xiao, P. *et al*., 2016) [139].

- Thí nghiệm được bố trí theo phương pháp khối ngẫu nhiên hoàn toàn (RCBD) một nhân tố, gồm 5 công thức (CT), lặp lại 3 lần. Diện tích ô cơ sở 10 m^2/ô. Tổng diện tích thí nghiệm = 5 CT x 10 m^2/CT x 3 lần lặp = 200 m^2 (bao gồm cả diện tích bảo vệ).

Vì là thí nghiệm bước đầu nghiên cứu về liều lượng phân bón hữu cơ vi

sinh cho sâm Ngọc Linh trồng dưới giàn mái che. Do vậy phân hữu cơ vi sinh ủ hoai mục và mùn núi (nền) được dùng để bón lót 100% trong năm thứ nhất

CT1: 80 tấn mùn núi (nền) + 5.000 kg Phân hữu cơ vi sinh ủ hoai+ 20 N/ha

CT2: 80 tấn mùn núi (nền) + 7.500 kg Phân hữu cơ vi sinh ủ hoai + 20 P_2O_5 + 20 K_2O/ha

CT3: 80 tấn mùn núi (nền) + 10.000 kg Phân hữu cơ vi sinh ủ hoai+ 20 P_2O_5 + 40 K_2O/ha

CT4: 80 tấn mùn núi (nền) + 12.500 kg Phân hữu cơ vi sinh ủ hoai + 20 P_2O_5 + 60 K_2O/ha

CT5: 80 tấn mùn núi (nền) + 15.000 kg Phân hữu cơ vi sinh ủ hoai+ 20 P_2O_5 + 80 K_2O/ha

- Sơ đồ thí nghiệm

LN I	CT 1	CT 3	CT 4	CT 2	CT5
LN II	CT 3	CT 2	CT 5	CT 4	CT1
LN III	CT 5	CT 1	CT 3	CT 2	CT4

Lượng phân khoáng được chia làm 2 lần bón và được chia đều cho các năm thứ 2 và thứ 3.

Phương pháp bón: Thường bón thúc vào năm thứ 2 và thứ 3. Khi cây đã bắt đầu có lá vàng; bón phân giữa các hàng cây (không bón cả bốn bên), bón cách rễ 4-5 cm, đào lỗ nhỏ sâu 6-7 cm, cho phân xuống hố và sau đó lấp đất lại.

- Điều kiện thí nghiệm:

+ Thời vụ trồng: 15/8/2018

+ Sử dụng cây giống đảm bảo tiêu chuẩn xuất vườn (như thí nghiệm 16)

+ Khoảng cách trồng 30 x 20 cm (160.000 cây/ha)

*** Phương pháp theo dõi các chỉ tiêu:**

- Chỉ tiêu theo dõi về gieo hạt ươm hạt giống của sâm Ngọc Linh

+ Thời gian mọc mầm (ngày): tính từ khi gieo đến khi đạt 10% số hạt mọc mầm.

+ Tỷ lệ hạt mọc mầm (%): tổng số hạt mọc mầm/tổng số hạt gieo x 100

+ Tỷ lệ hình thành cây con (%): tổng số cây con/tổng số hạt gieo x 100

+ Tỷ lệ xuất vườn (%) = Số cây đạt tiêu chuẩn xuất vườn/tổng số cây con hình thành x 100

- Chỉ tiêu theo dõi về sinh trưởng của cây sâm Ngọc Linh

+ Chiều cao cây (cm): đo từ mặt đất đến đầu mút cao nhất của lá.

+ Đường kính thân (mm): đo bằng thước panme, cách gốc 3 cm.

+ Đường kính tán (cm): đo tại hai đường chéo góc trên tán cây, tính giá trị trung bình

+ Chiều dài củ (cm): dùng thước đo chiều dài củ

+ Chiều dài lá chét (cm): đo từ gốc cuống lá đến ngọn lá dài nhất

+ Chiều rộng lá chét (cm): đo vị trí rộng nhất 2 mép lá

- Theo dõi chỉ tiêu về năng suất của cây sâm Ngọc Linh

+ Đường kính củ (cm): lấy ngẫu nhiên 30 cây, dùng thước kẹp để đo đường kính củ

+ Chiều dài củ (cm): dùng thước đo chiều dài củ

+ Năng suất cá thể (g/củ): lấy ngẫu nhiên 30 cây, cân khối lượng củ khi thu hoạch của một cây trung bình.

- Kỹ thuật trồng, chăm sóc và tiêu chuẩn hạt giống dựa vào Quy trình tạm thời kỹ thuật trồng và chăm sóc cây sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv) trên địa bàn Kon Tum năm 2017 và Quy trình trồng sâm Ngọc Linh dưới giàn che mái (Nguyễn Bá Hoạt và *cs*.,2010).

***Phương pháp lấy mẫu đất và vi sinh vật thí nghiệm**

Trước khi trồng cây sâm Ngọc Linh, mẫu đất tầng mặt (0 - 20 cm) được lấy và tiến hành phân tích bằng các phương pháp thông dụng hiện nay tại Phòng thí nghiệm Trung tâm thuộc Viện Khoa học Kỹ thuật Nông lâm nghiệp Tây Nguyên (WASI). Các phương pháp xác định tính chất đất bao gồm: pH_{KCl} theo TCVN 5979:2011); Nts (theo TCVN 6498:1999), P_2O_5 ts (theo TCVN 8940:2011), K_2O ts (theo TCVN 8660:2011); Ndt (theo TCVN 5255:2009), P_2O_5 dt (theo TCVN 8942:2011), K_2O dt (TCVN 8660:2011); Ca^{2+} trao đổi (theo TCVN 4405:1987), Mg^{2+} trao đổi (TCVN4405:1987). Thành phần cơ giới đất (theo TCVN 8567: 2010).

Vi sinh vật cố định đạm (theo TCVN 6166:2002); vi sinh vật phân giải lân (theoTCVN 6167:1996); vi sinh vật phân giải cellulose (theoTCVN 6168:2002); vi sinh vật tổng (theo TCVN 4884: 2005).

2.5. Phương pháp xử lý số liệu

Các số liệu thí nghiệm được thu thập và xử lý thống kê theo phương pháp phân tích phương sai ANOVA 1 và 2 nhân tố. Các số liệu % được chuyển đổi sang dạng arcsin$\sqrt{x}$ trước khi xử lý thống kê.

Các kết quả được sử lý thống kê bằng phần mềm IRRISTAT 5.0, Excel 2010 và Statgraphics Centurion XVII theo phương pháp LSD Multiple Range Test ở mức ý nghĩa 5%

CHƯƠNG III
KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Xác định hiện trạng phát triển và sản xuất cây giống sâm Ngọc Linh

3.1.1. Thực trạng trồng, quy hoạch bảo tồn và phát triển cây sâm Ngọc Linh trong những năm qua

Hiện nay, tỉnh Kon Tum đã trồng được khoảng 500 ha sâm Ngọc Linh. Trong đó, Công ty Cổ phần sâm Ngọc Linh là 470 ha, Công ty TNHH Một thành viên Lâm nghiệp Đăk Tô là 15 ha,Trung tâm Ươm tạo và hỗ trợ doanh nghiệp Khoa học Công nghệ 05 ha và một số diện tích do người dân trồng. Đồng thời tỉnh kêu gọi đầu tư nhiều dự án trồng sâm Ngọc Linh như: Dự án đầu tư của Bộ khoa học và Công nghệ với diện tích dự kiến 500 ha; Dự án đầu tư của Công ty Cổ phần sâm Ngọc Linh Kon Tum với diện tích 5.036 ha; Dự án trồng sâm của Công ty Lâm nghiệp Đăk Tô diện tích 78,8 ha; Dự án của Công ty Cổ phần Dược phẩm Việt Nam với diện tích khoảng 400 ha; Dự án của Công ty TNHH Thái Hòa với diện tích xin thuê là 263,5 ha; Dự án của Công ty TNHH Trung Hòa với diện tích khoảng 410 ha (Sở Nông nghiệp và Phát triển nông thôn Kon Tum, 2017) [29].

Theo số liệu điều tra năm 2013, trên địa bàn huyện Nam Trà My, tỉnh Quảng Nam tại bảng 3.1, các quần thể sâm Ngọc Linh (khoảng 653.500 cây) phân bố tại một số xã quanh đỉnh Ngọc Linh với tổng diện tích 65,35 ha, bao gồm xã Trà Linh (61,5 ha), Trà Nam (1,2 ha) và Trà Cang (2,65 ha) và đang được bảo tồn nghiêm ngặt tại 27 điểm trồng (Sở Nông nghiệp và Phát triển nông thôn Quảng Nam, năm 2015*)* [30]. Đến nay diện tích thực tế trồng được là trên 925 ha bao gồm của Doanh nghiệp và hộ gia đình. Ngoài ra tỉnh Quảng Nam đã phê duyệt cho thuê môi trường rừng (MTR) để trồng sâm Ngọc Linh là 1.428,96 ha, trong đó: Hộ gia đình, cá nhân: 428,96 ha; tổ chức doanh

nghiệp: 1.000 ha. (Đề án phát triển sâm Ngọc Linh tỉnh Quang Nam giai đoạn 2022-2030*)* [8]. Giá trị kinh tế: sau khi chứng nhận chỉ dẫn địa lý được công nhận, giá trị của sâm Ngọc Linh cũng tăng cao, giá cây giống 1 năm tuổi từ 250 - 300.000 đồng/cây; giá sâm các loại từ 75 - 100 triệu đồng/kg. Cá biệt, loại 1 củ 200 gram có giá từ 150 - 200 triệu đồng/kg. Mỗi ha sau 5 năm trồng sẽ thu lợi nhuận từ 30 - 50 tỷ đồng (Ho, V. H.and Pham, Q. T, 2020) [73].

Bảng 3.1. Diện tích sâm Ngọc Linh được triển khai tại huyện Nam Trà My

TT	xã	Số lượng cây	Diện tích (ha)	Số lượng điểm
1	Trà Linh	615.000	61,5	21
2	Trà Nam	12.400	1,20	02
3	Trà Cang	26.5000	2,65	04
Cộng		**653.500**	**65,35**	**27**

Nguồn: Sở Nông nghiệp và Phát triển nông thôn Quảng Nam, năm 2015 [30].

Hiện nay, Kon Tum và Quảng Nam đã quy hoạch khu vực bảo tồn, lưu giữ và phát triển sâm Ngọc Linh theo độ cao với tổng diện tích là: 47.309 ha tại bảng 3.2, cụ thể như sau:

Kon Tum: Tổng diện tích quy hoạch là 31.742 ha, giai đoạn 2012-2020, tầm nhìn đến năm 2025, thuộc địa bàn 02 huyện Đăk Glei và Tu Mơ Rông đã được Ủy ban nhân tỉnh Kon Tum phê duyệt năm 2013 [28], trong đó khu vực có độ cao từ 1.200 - 1.500 m là 14.754 ha (vùng đệm, hình thành đai bảo vệ lõi, bảo vệ môi trường sinh thái) chiếm 46,48%; độ cao > 1.500 m là 16.988 ha (vùng trồng sâm) chiếm 53,52%. Giai đoạn 2010 -2016, Công ty TNHH Một thành viên Lâm nghiệp Đăk Tô đã bảo tồn và thực hiện thành công một số

đề tài dự án cấp tỉnh và cấp nhà nước, bảo tồn và phát triển được 20 ha vườn giống gốc sâm Ngọc Linh. Lô sâm khoảng 10 tuổi được trồng trên diện tích gần 2 ha, còn lại chủ yếu với độ tuổi 3-5 tuổi, toàn bộ diện tích thuộc quản lý của doanh nghiệp này nằm trên địa bàn xã Măng Ri, huyện Tu Mơ Rông (Ủy ban nhân dân huyện Tu Mơ Rông, 2016) [47].

Quảng Nam: Năm 2015, Sở Nông nghiệp và Phát triển nông thôn tỉnh Quảng Nam đã Quy hoạch, bảo tồn và phát triển cây sâm Ngọc Linh trên địa bàn huyện Nam Trà My giai đoan 2014-2020 theo đó, tổng diện tích đất quy hoạch bảo tồn, phát triển sâm Ngọc Linh theo độ cao là 15.567 ha, trong đó khu vực có độ cao từ 1.200 - 1.500 m là 13.329 ha (chiếm 85,62%); >1.500 m là 2.238 ha (chiếm 14,38%). Giai đoạn 2013 - 2018; 7 xã trong vùng quy hoạch bảo tồn sâm đã được tỉnh Quảng Nam hỗ trợ 11.500 cây sâm Ngọc Linh loại 01 năm tuổi; hỗ Trợ trại giống Tắk Ngo: 1.300 cây loại 01 năm tuổi; 3.934 cây loại 02 năm tuổi; 500 cây loại 03 năm tuổi; 1.439 cây loại 04 tuổi và 1.192 cây loại 05 tuổi để phục vụ sản xuất trong vùng quy hoạch (Ủy ban nhân dân huyện Nam Trà My, 2013) [48].

Tóm lại; hiện trạng đất lâm nghiệp có điều kiện thuận lợi để phát triển cây sâm Ngọc Linh của vùng là rất lớn là 47.309 ha. Tuy nhiên, diện tích phát triển cây sâm chủ yếu hiện nay thuộc sở hữu của các Doanh nghiệp nhà nước; Doanh nghiệp tư nhân và còn lại diện tích trong nhân dân với mục đích bảo tồn và phát triển với diện tích là 1.425 ha chiếm 3 % về tổng diện tích quy hoạch. Do vậy, việc nghiên cứu, hoàn thiện biện pháp kỹ thuật sản xuất cây giống sâm Ngọc Linh (nhân giống *in vitro* và nhân giống hữu tính từ hạt) là rất cần thiết để cung ứng cây giống đảm bảo chất lượng nhằm phục vụ mở rộng diện tích trồng cây sâm theo quy hoạch của từng địa phương.

Bảng 3.2: Diện tích đất quy hoạch bảo tồn, phát triển sâm Ngọc Linh theo độ cao

TT	Tỉnh	Tổng diện tích (ha)	1.200-1.500 m (ha)	>1.500 m (ha)
1	Kon Tum	31.742	14.754	16.988
2	Quảng Nam	15.567	13.329	2.238
Tổng		**47.309**	**19.226**	**19.226**

Nguồn: Quy hoạch phát triển sâm Ngọc Linh tỉnh Kon Tum[28]; Đề án phát triển sâm Ngọc Linh tỉnh Quang Nam [8].

3.1.2. Hiện trạng sản xuất cây giống trong thời gian qua

Bảng 3.3. Số lượng cây giống sâm Ngọc Linh sản xuất trong thời gian qua

TT	Tỉnh	Cơ sở vườn ươm giống	Diện tích (ha)	Số lượng cây giống (cây)
1	Kon Tum	3	-	4.050.000
2	Quảng Nam	2	14,07	1.300.000
Tổng số		**5**	**14,07**	**5.350.000**

Hiện nay, trên địa bàn tỉnh Kon Tum nguồn cung cấp cây sâm Ngọc Linh từ hạt có 3 cơ sở ươm giống đảm bảo chất lượng có nguồn gốc với số lượng sản xuất cây giống trong những năm qua là 4.050.000 cây tại bảng 3.3. Trong đó Công ty Cổ phần sâm Ngọc Linh Kon Tum có vai trò rất lớn trong việc bảo tồn, lưu giữ nguồn gene và tạo vườn giống gốc, hàng năm Công ty sản xuất với số lượng 1.000.000 cây giống đảm bảo chất lượng và rõ nguồn gốc để phục vụ việc mở rộng diện tích vùng quy hoạch trồng sâm.

Quảng Nam nguồn cây giống sâm Ngọc Linh từ hạt được cung cấp chủ yếu từ 02 đơn vị do Nhà nước quản lý là Trung tâm Phát triển sâm Ngọc Linh

và Dược liệu Quảng Nam với diện tích trồng sâm là 8,5 ha và Trung tâm Kỹ thuật nông nghiệp huyện Nam Trà My (trước đây là Trung tâm Phát triển Sâm Ngọc Linh huyện Nam Trà My) với diện tích 3,5 ha với số lượng 1.300.000 cây giống. Ngoài ra, lượng cây giống trong nhân dân (tại các điểm trồng sâm) và doanh nghiệp sản xuất từ 500.000 - 1.000.000 cây giống/năm. Tuy số lượng cây giống cung ứng trong những năm gần đây có tăng đáng kể, nhưng nhu cầu mở rộng và phát triển cây sâm Ngọc Linh trên địa bàn tỉnh là rất lớn (vùng quy hoạch phát triển lên đến 15.567 ha).

Về xác nhận nguồn gốc, xuất xứ sâm Ngọc Linh: Trong thời gian qua, trên địa bàn tỉnh có 03 cá nhân, tổ chức và doanh nghiệp trồng sâm Ngọc Linh đã được Sở Nông nghiệp và Phát triển nông thôn Quang Nam tiến hành xác nhận nguồn gốc, xuất xứ cụ thể: năm 2019: tổng số 39.343 cây. Trong đó, hộ gia (12.621 cây) và Công ty Cổ phần thương mại Dược Sâm Ngọc Linh (26.722 cây); năm 2020: tổng số 213.418 cây (Công ty TNHH Sâm Sâm: 4.052 cây và Trung tâm Phát triển sâm Ngọc Linh và Dược liệu Quảng Nam: 209.366 cây); năm 2021: tổng số 18.566 cây. Như vậy, đến thời điểm hiện tại có 271.327 cây sâm Ngọc Linh được xác nhận nguồn gốc, xuất xứ là cơ sở để sản xuất cây giống đạt chất lượng tốt (Đề án phát triển sâm Ngọc Linh tỉnh Quang Nam giai đoạn 2022-2030) [8].

Về phát triển giống sâm Ngọc Linh tỉnh Kon Tum và Quảng Nam đã tập trung sản xuất cây giống từ hạt và nuôi cấy mô cụ thể:

(1) Nhân giống bằng hạt dựa trên phương pháp kỹ thuật truyền thống: Lựa chọn cây mẹ để lấy hạt: Cây sâm lấy giống phải đạt được một số tiêu chuẩn sau: (i) Cây có độ tuổi từ 5 năm tuổi trở lên; (ii) cây không bị sâu bệnh, không bị tổn thương cơ giới hoặc các tổn thương khác và (iii) cây có biểu hiện đặc trưng của giống sâm Ngọc Linh gốc, không bị lai tạp. Cây sâm lấy hạt cần có những chăm sóc đặc biệt như: Chế độ bón phân (mùn), tưới nước,

chế độ ánh sáng. Quả sâm lấy hạt phải đạt độ chín nhất định: quả có màu đỏ tươi và xuất hiện chấm đen ở đầu; cụm quả đạt độ chín tiêu chuẩn phải từ 6 đến 10 ngày; thường từ 2 - 3 ngày thu hạt một lần. Gieo hạt giống: Hạt sâm giống được gieo trong rãnh sâu khoảng 5 - 10 cm với mật độ nhất định. Trước khi gieo, hạt được đãi vỏ cẩn thận và xử lý ngâm trong nước tỏi với tỷ lệ 1 phần tỏi 9 phần nước để phòng nấm bệnh. Hạt được gieo vào mùa mưa (tháng 8, 9). Sau khi gieo tiến hành rào lưới bảo vệ và phủ cỏ tranh lên mặt luống trong suốt mùa mưa, đến tháng 1 năm sau. Lựa chọn cây giống: chọn những cây có rễ củ hình con quay, chọn cây giống 1 năm tuổi trở lên, có một lá kép (đối với cây giống được sản xuất từ hạt), chọn cây có chiều cao thân từ 13 - 15 cm (tính từ cổ rễ), chiều dài củ từ 1 cm trở lên, đường kính củ từ 0,5 cm trở lên, lá xanh hoặc xanh đậm, không bị đốm hay bị úa vàng, không có dấu hiệu sâu bệnh. Ngoài ra, cây giống thường có một hoặc ba rễ chính hình thành dạng chân đế. Trong quá trình vận chuyển cây giống đến địa điểm trồng không để cây bị xây sát, hoặc bị dập gãy, đồng thời dùng các vật liệu để giữ ẩm cho cây giống.

(2) Nhân cây giống bằng phương pháp nuôi cấy mô tế bào:

Nhân cây giống bằng phương pháp nuôi cấy mô tế bào đã được một số Trung tâm, Viện nghiên cứu sâm và doanh nghiệp đang tiến hành nghiên cứu tạo giống sâm Ngọc Linh bằng phương pháp nuôi cấy mô như: Trung tâm Uơm tạo và Hỗ trợ doanh nghiệp Khoa học và Công nghệ trực thuộc Bộ Khoa học và Công nghệ tại huyện Đăk Tô, tỉnh Kon Tum; Công ty Sâm Sâm tỉnh Quảng Nam, đề tài nghiên cứu "Nghiên cứu nhân vô tính và sản xuất sinh khối rễ cây sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv-Araliaceae)" Nhiệm vụ cấp địa phương, đề tài "Ứng dụng hệ thống chiếu sáng đơn sắc (LED) trong nghiên cứu nhân nhanh cây sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv)" Đề tài cấp Viện Hàn lâm Khoa hoc và Công nghệ Việt Nam.

Tỉnh Gia Lai có doanh nghiệp đang trình các cấp có thẩm quyền cho chủ trương đầu tư và giấy chứng nhận đầu tư cho 01 dự án đầu tư Trung tâm giống cây dược liệu công nghệ cao, trong đó sản xuất cây giống sâm Ngọc Linh với quy mô sản xuất cây giống ở mức 1,5 triệu cây/năm. Quy trình sản xuất cây giống sâm bằng phương pháp *invitro* chủ yếu như sau: Phôi được lấy từ các bộ phận của cây khoảng 9 tháng sau đó cây rút bình đưa ra ngoài vườn ươm khoảng 6-8 tháng, khi cây có củ với đầu mầm, đường kính củ (>0,7cm), củ hình con quay, màu xanh, không dính phôi, có tối thiểu 2-3 rễ đưa ra huấn luyện khi có một lá thật, chiều cao >5cm. Thời gian huấn luyện quen với môi trường trên núi 5-7 ngày sau đó mới rút bình. Thời gian ươm 3-5 tháng dưới tán rừng. Tỷ lệ sống đạt trên 80%.

3.1.3. Một số yếu tố hạn chế trong phát triển và sản xuất cây giống sâm Ngọc Linh

Từ trước tới nay người dân chủ yếu nhân giống bằng cách gieo hạt sâm trực tiếp vào đất. Các phương pháp như nhân giống bằng đầu mầm của thân ngầm có giá thành cây giống cao, người sản xuất không chấp nhận. Hiện nay, biện pháp kỹ thuật trồng sâm dưới tán rừng tự nhiên là phổ biến, trên đối tượng cây sâm hầu như chưa trồng cây dưới giàn có mái che. Trong quá trình tìm hiểu, thực trạng trồng và sản xuất cây giống sâm Ngọc Linh còn bộc lộ rất nhiều yếu tố hạn chế. Qua khảo sát cho thấy các yếu tố hạn chế chủ yếu là:

(1). Thiếu vốn và cây giống là hai yếu tố hạn chế lớn nhất của các nông hộ. Canh tác sâm cần nguồn vốn lớn để đầu tư vật tư (giống, vật tư khác) và chi phí công chăm sóc (>4,9 tỷ đồng/ha cho trồng mới). Nguồn giống cây đang ngày càng khan hiếm trong tự nhiên, trong khi đó các cơ sở sản xuất giống được cấp giấy chứng nhận đạt chuẩn lại chưa có đủ số lượng giống để cấp ra thị trường. Việc nhân giống theo phương thức truyền thống mất nhiều thời gian. Phải tới năm thứ 4-5 mới có thể lấy hạt làm giống cung cấp ra thị trường. Chính vì sự khan hiếm trong nguồn giống mà giá mua hạt giống từ 100-

150.000 đ/hạt, cây giống 200 -300.000 đ/cây. Do nguồn vốn hạn chế, nhiều hộ không đủ khả năng mở rộng quy mô trồng, không dám tiếp cận nguồn vốn vay từ các ngân hàng. Điều đó khiến cho nhiều hộ, đặc biệt là hộ nghèo gặp khó khăn trong việc đầu tư mở rộng diện tích trồng sâm.

(2). Khả năng tiếp cận thông tin khoa học kỹ thuật (nhận dạng đúng, tiêu chuẩn cây giống; kỹ thuật canh tác, nông nghiệp ứng dụng công nghệ cao…) của hộ trồng sâm còn hạn chế. Phương thức canh tác và kiến thức kỹ thuật của nông hộ chỉ là kiến thức bản địa được đúc rút từ trải nghiệm của cộng đồng trong quá trình trồng, chăm sóc sâm và học hỏi từ những người đi trước. Phần lớn nông hộ chưa được tập huấn kỹ thuật canh tác sâm một cách bài bản. Trong quá trình khảo sát cho thấy: hầu hết các hộ khảo sát không trồng theo khoảng cách và mật độ khuyến cáo, không bón phân cũng như không hiểu biết về phân bón để bón; chưa có kiến thức trong phòng trừ sâu bệnh hại cho cây sâm Ngọc Linh.

(3). Trình độ học vấn của nông hộ - phần lớn là người Xê Đăng còn thấp (đa phần mới học hết cấp 1), bởi vậy họ cũng không có nhiều kiến thức và năng lực để ứng dụng khoa học kỹ thuật vào canh tác. Thêm vào đó giao thông đi lại khó khăn do các diện tích trồng sâm được trồng trên núi cao (>1.500 m). Do vậy, việc vận chuyển vật tư nông nghiệp để phục vụ canh tác sâm là một hạn chế đặc biệt là các tháng mùa mưa.

(4). Điều kiện sinh thái với diện tích đất canh tác còn hạn chế khiến việc canh tác sâm chỉ được thực hiện ở quy mô nhỏ, chưa có số lượng thành phẩm đủ lớn để chế biến, chưa được chứng nhận thương hiệu đối với sản phẩm sâm củ. Nông hộ thường bán củ tươi trực tiếp cho thương lái hay người thu mua nhỏ nên việc đánh giá chất lượng sâm còn mang tính chủ quan, theo kinh nghiệm.

(5). Hiện nay, vùng trồng sâm Ngọc Linh đang chịu tác động của hiện tượng biến đổi khí hậu; thời tiết diễn biến cực đoan như lượng mưa ít, ẩm độ không khí thấp, nhiệt độ không khí cao so với quy luật bình thường (có những ngày ẩm độ đo được 40%, nhiệt độ 30 ^{o}C); nguồn nước tại các dòng suối cạn kiệt dần. Bên cạnh đó, tình hình dịch hại trên cây sâm con diễn biến rất phức tạp, áp lực sâu bệnh hại rất lớn; đặc biệt là bệnh đốm vòng, sương mai, lỡ cổ rễ, thối rễ,... làm chết hàng loạt cây con.

3.2. Nghiên cứu phương pháp xác định đúng cây giống sâm Ngọc Linh bằng chỉ thị phân tử

Sâm Ngọc Linh là cây dược liệu có giá trị kinh tế rất cao. Hiện nay, có rất nhiều các sản phẩm được làm giả sâm Ngọc Linh, điều này ảnh hưởng đến giá trị thương mại, uy tín, chất lượng và niềm tin đối với sâm Ngọc Linh. Hơn thế nhiều các loài sâm, tam thất có hình thái tương tự sâm Ngọc Linh cũng được đem vào núi Ngọc Linh để trồng. Trước đây, việc phân biệt sâm Ngọc Linh với các loài sâm và tam thất khác chủ yếu dựa vào các đặc điểm hình thái như lá và củ. Tuy nhiên phương pháp này rất khó phân biệt vì hình thái cây phụ thuộc rất nhiều vào điều kiện môi trường sống. Một số phương pháp phân tích hàm lượng dược chất (saponin) cũng đã được áp dụng để phân biệt giữa các loài sâm. Tuy nhiên phương pháp phân tích hóa học thường có giá thành cao, tốn nhiều thời gian, đòi hỏi lượng mẫu nhiều và độ chuẩn xác không cao, đặc biệt các hợp chất thứ cấp bị tác động bởi nhiều yếu tố như: điều kiện và phương pháp nuôi trồng, phương pháp thu hoạch, bảo quản và chế biến. Hơn nữa, một số loài sâm tương tự sâm Ngọc Linh cũng chứa hàm lượng dược chất saponin MR2. Xuất phát từ các hạn chế và nhu cầu thực tiễn, việc xây dựng phương pháp xác định sâm Ngọc Linh bằng chỉ thị phân tử DNA là rất cấp thiết để phát triển sâm Ngọc Linh.

3.2.1. Kết quả thiết kế chỉ thị phân tử DNA sâm Ngọc Linh

Để thiết kế xây dựng bộ chỉ thị phân tử phục vụ đánh giá và nghiên cứu di truyền sâm Ngọc Linh, đề tài đã khai thác thông tin về hệ gen của nhân sâm trên các cơ sở dữ liệu trình tự các đoạn lặp đơn giản (microsatellite), trình tự Genome survey sequence (GSS), Expressed sequence tag (EST) trên ngân hàng gen (NCBI) và trình tự gen lục lạp (Hình 3.1).

PgH007H09d Panax ginseng BAC library (PgH BAC) Panax ginseng genomic clone PgH007H09, genomic survey sequence

GenBank: BZ957983.1

GenBank Graphics

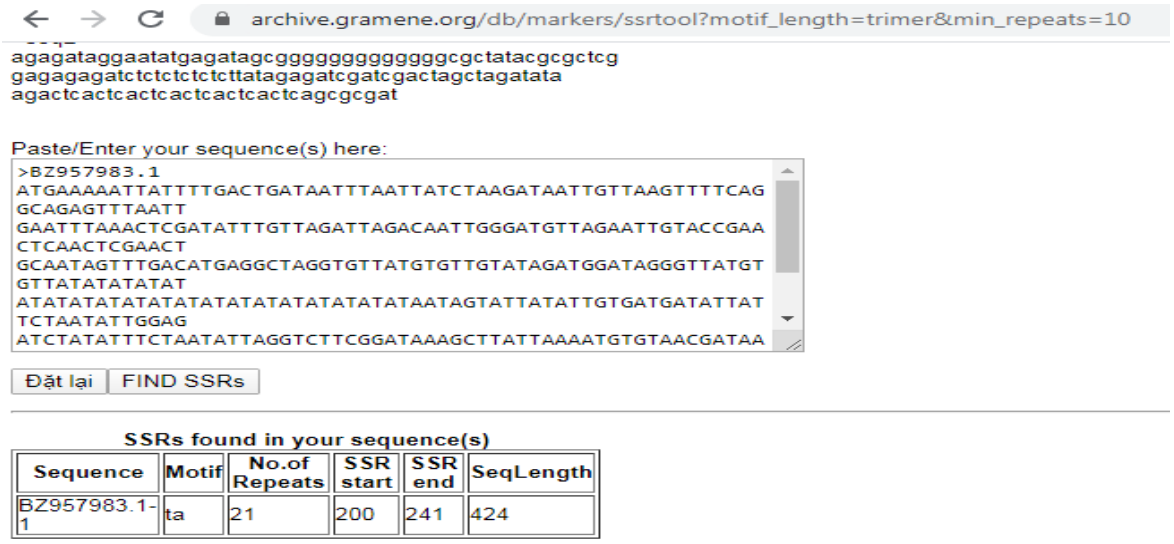
```
>BZ957983.1 PgH007H09d Panax ginseng BAC library (PgH BAC) Panax ginseng genomic clone
PgH007H09, genomic survey sequence
ATGAAAAATTATTTTGACTGATAATTTAATTATCTAAGATAATTGTTAAGTTTTCAGGCAGAGTTTAATT
GAATTTAAACTCGATATTTGTTAGATTAGACAATTGGGATGTTAGAATTGTACCGAACTCAACTCGAACT
GCAATAGTTTGACATGAGGCTAGGTGTTATGTGTTGTATAGATGGATAGGGTTATGTGTTATATATATAT
ATATATATATATATATATATATATATATATATAATAGTATTATATTGTGATGATATTATTCTAATATTGGAG
ATCTATATTTCTAATATTAGGTCTTCGGATAAAGCTTATTAAAATGTGTAACGATAATCAACGAAATAGG
CAAGTTTATCTTAACTCTACTTAGAGTTGTTTCATTCAGATATGCTTATAGTTAATCATTGCTGATTGTC
ATGT
```

Hình 3.1. Trình tự đoạn GSS mã số BZ957983.1 trên NCBI

Các đoạn trình tự nhân sâm đã xác định sẽ được xử lý bằng phần mềm chuyên dụng Gramene SSRtool để tìm ra vị trí, thành phần các đoạn SSR (lặp từ 2-6 nucleotide) và số lượng đơn vị lặp. Phần mềm Tandem repeat finder được sử dụng để tìm ra các đoạn lặp liền kề có chiều dài nhiều hơn 6 nucleotide. Tổng hợp kết quả thu được sẽ thống kê số lượng đoạn SSR, đoạn lặp liền kề, số lượng từng loại nucleotide, đơn vị lặp và vị trí của đoạn lặp trên trình tự, từ đó sàng lọc các SSR có đơn vị lặp cao. Các thông số bao gồm: ≥10 đơn vị lặp cho đoạn lặp chứa đơn nucleotide, ≥5 đơn vị lặp cho đoạn lặp chứa 2 nucleotide, ≥4 đơn vị lặp cho đoạn lặp chứa 3 nucleotide và ≥3 đơn vị lặp cho đoạn lặp chứa 4-6 nucleotide.

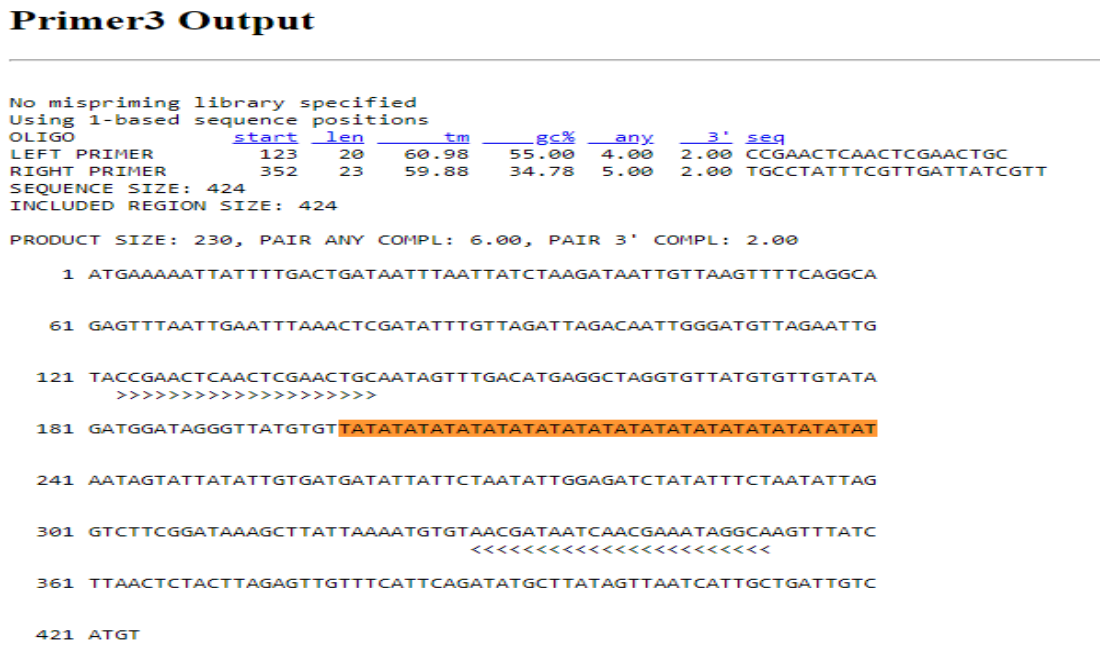
Kết quả ở hình 3.2 cho thấy, trình tự mã số BZ957983.1 có chiều dài 424 nucleotide, trong đó có chứa SSR kiểu lặp TA với 21 lần lặp lại. Điểm bắt đầu của đoạn lặp từ nucleotide số 200 và kết thúc ở nucleotide số 241. Đây là

đoạn trình tự có chứa SSR với đơn vị lặp cao, trình tự này được lựa chọn cho thiết kế chỉ thị phân tử. Đoạn trình tự lựa chọn này được sử dụng qua chương trình Primer3 để thiết kế mồi cho phản ứng PCR nhân đoạn lặp lên.



Hình 3.2. Kết quả tìm kiếm đoạn SSR trên trình tự mã số BZ957983.1 bằng chương trình Gramene SSRtool

Kết quả thiết kê chỉ thị phân tử cho đoạn lặp trên trình tự mã số BZ957983.1 bằng chương trình Primer3 được thể hiện trên hình 3.3.



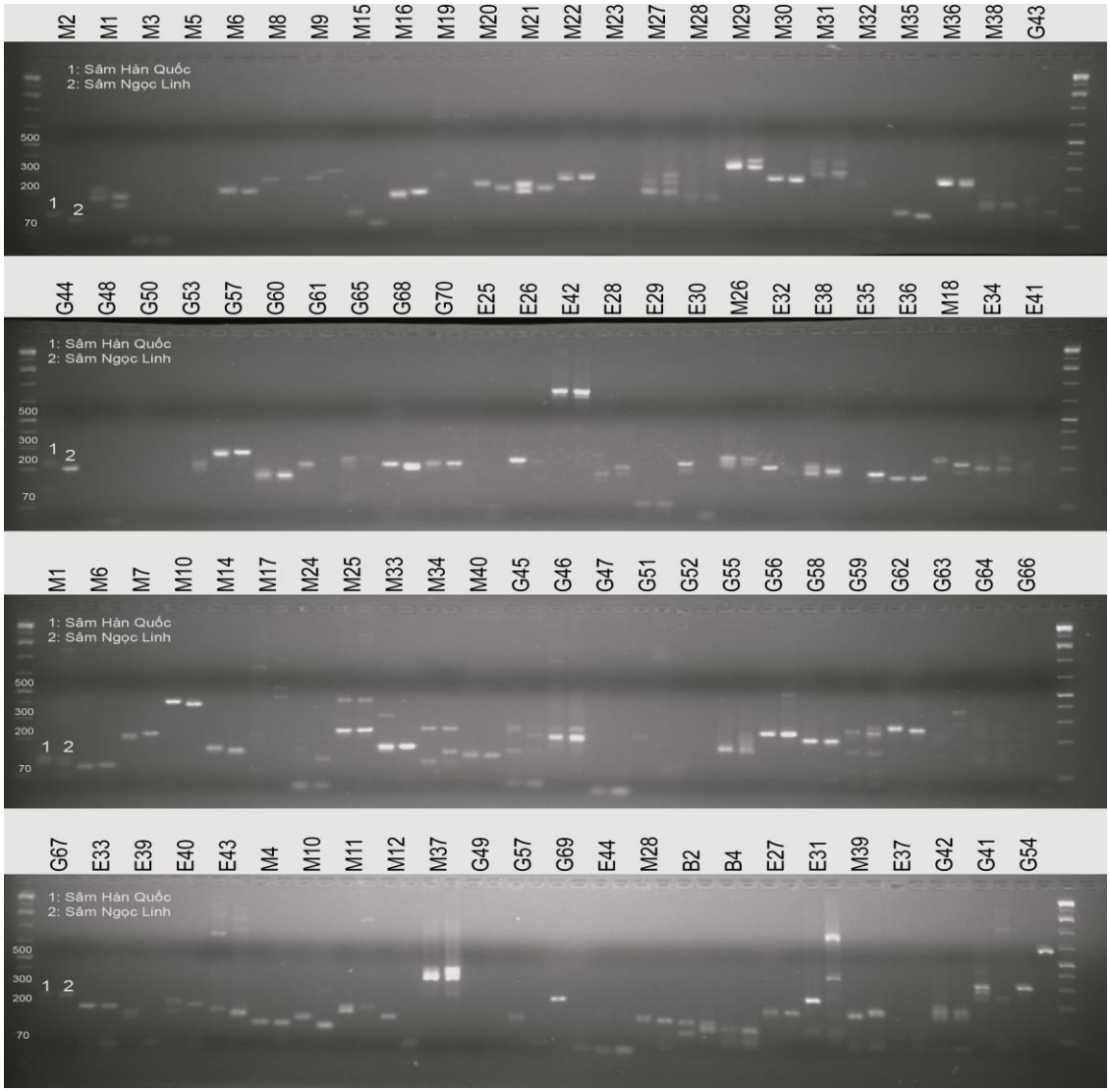
Primer3 Output

```
No mispriming library specified
Using 1-based sequence positions
OLIGO            start  len      tm     gc%   any    3'  seq
LEFT PRIMER        123   20   60.98   55.00  4.00  2.00 CCGAACTCAACTCGAACTGC
RIGHT PRIMER       352   23   59.88   34.78  5.00  2.00 TGCCTATTTCGTTGATTATCGTT
SEQUENCE SIZE: 424
INCLUDED REGION SIZE: 424

PRODUCT SIZE: 230, PAIR ANY COMPL: 6.00, PAIR 3' COMPL: 2.00

  1 ATGAAAAATTATTTTGACTGATAATTTAATTATCTAAGATAATTGTTAAGTTTTCAGGCA

 61 GAGTTTAATTGAATTTAAACTCGATATTTGTTAGATTAGACAATTGGGATGTTAGAATTG

121 TACCGAACTCAACTCGAACTGCAATAGTTTGACATGAGGCTAGGTGTTATGTGTTGTATA
      >>>>>>>>>>>>>>>>>>>>

181 GATGGATAGGGTTATGTGTTATATATATATATATATATATATATATATATATATATATAT

241 AATAGTATTATATTGTGATGATATTATTCTAATATTGGAGATCTATATTTCTAATATTAG

301 GTCTTCGGATAAAGCTTATTAAAATGTGTAACGATAATCAACGAAATAGGCAAGTTTATC
                                <<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<

361 TTAACTCTACTTAGAGTTGTTTCATTCAGATATGCTTATAGTTAATCATTGCTGATTGTC

421 ATGT
```

Hình 3.3. Kết quả thiết kế mồi cho đoạn trình tự mã số BZ957983.1

Kết quả tại hình 3.3 thể hiện các thông số liên quan đến chỉ thị phân tử đã thiết kế bao gồm điểm bắt đầu, độ dài, nhiệt độ gắn mồi, trình tự của mồi xuôi và mồi ngược. Kích thước sản phẩm khuếch đại của phản ứng PCR bởi chỉ thị đã thiết kế là 230 bp. Kết quả tổng hợp thông tin về chỉ thị phân tử G58 thiết kế trên đoạn trình tự trên hệ gen nhân sâm mã số BZ957983.1 trên ngân hàng gen được trình bày trong phần *(phụ lục 9)* .

Trên cơ sở phương pháp thiết kế chỉ thị phân tử trên, đề tài luận án đã sử dụng 2000 đoạn trình tự và đã thiết kế được 90 chỉ thị phân tử có chứa đoạn lặp đơn giản với đơn vị lặp cao nhất. Thông tin chi tiết của 90 chỉ thị được thể hiện trong phần (*phụ lục 9*). 90 chỉ thị phân tử thiết kế dựa trên dữ liệu trình tự các đoạn lặp đơn giản hệ gen nhân sâm, trình tự Genome survey sequence (GSS), Expressed sequence tag (EST) và trình tự gen lục lạp được chạy xác định khả năng nhân bội trên DNA sâm Ngọc Linh (*P. vietnamensis*) và nhân sâm Hàn Quốc (*P.ginseng*). Kết quả cho thấy: 78/90 chỉ thị bắt cặp tốt với ADN của 2 loài nghiên cứu và cho sản phẩm điện di rõ nét (Hình 3.4). Sản phẩm PCR của hầu hết 78 chỉ thị được nhân lên có kích thước như dự kiến, đa số có kích thước từ 100÷300 bp. Kết quả nghiên cứu ứng dụng trình tự microsatellite, GSS, EST và trình tự gen lục lạp của *P. ginseng* để thiết kế chỉ thị phân tử phục vụ kiểm định và phân tích di truyền *P. vietnamensis* là hướng đi mới và đã đạt được kết quả tốt cho mục tiêu thiết kế chỉ thị cho kiểm định và phân tích di truyền các loài sâm Việt Nam.



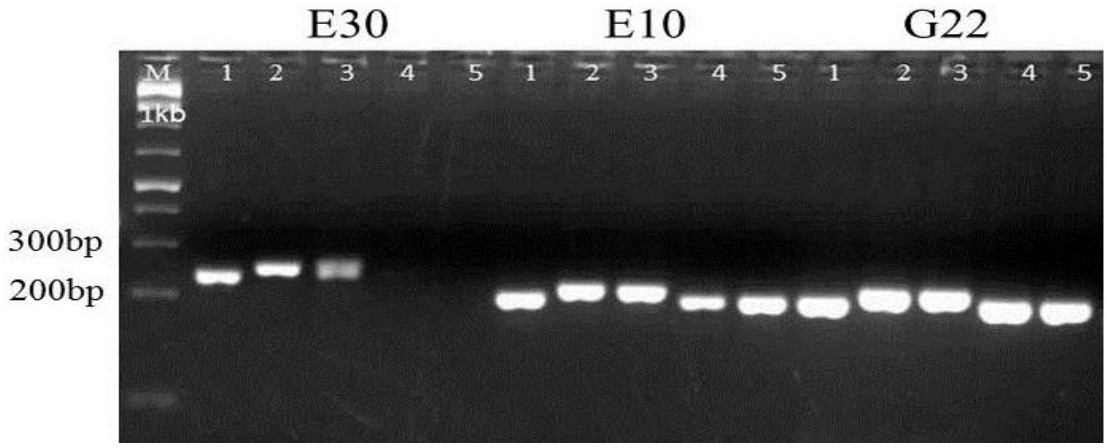
Hình 3.4. Kết quả khảo sát chỉ thị phân tử trên gel agarose 2,5%

Ghi chú: 1: ADN sâm Hàn Quốc, 2: ADN sâm Ngọc Linh, phía trên là tên chỉ thị thiết kế

3.2.2. Kết quả xác định chỉ thị phân tử đặc hiệu kiểm định sâm Ngọc Linh

Để xác định chỉ thị phân tử đặc hiệu kiểm định sâm Ngọc Linh, 78 chỉ thị phân tử có khả năng nhân bội DNA tốt đối với sâm Ngọc Linh và sâm Hàn Quốc được sử dụng chạy khảo sát trên các mẫu DNA các loài sâm (sâm Hàn Quốc, sâm Ngọc Linh, sâm Lai Châu, sâm Vũ Diệp, tam thất hoang). Kết quả xác định chỉ thị phân tử đặc hiệu kiểm định sâm Ngọc Linh được thể hiện qua hình 3.5, 3.6, 3.7, 3.8 và bảng 3.4.

Một số kết quả điện di sản phẩm PCR với chỉ thị E30, E10, G22, M7, M10, G5 và E29 được thể hiện trên hình 3.5, 3.6 và 3.7.

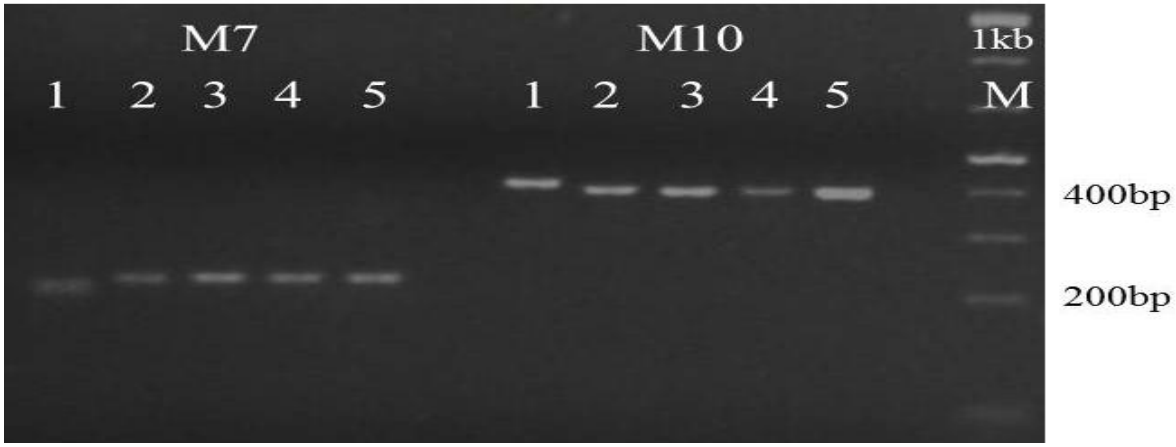


Hình 3.5. Kết quả điện di sản phẩm PCR bằng chỉ thị E30, E10 và G22 phân biệt sâm Ngọc Linh với một số loài sâm khác

Ghi chú: 1: sâm Hàn Quốc, 2: sâm Ngọc Linh, 3: sâm Lai Châu, 4: sâm Vũ Diệp, 5: tam thất hoang. 1kb là thang vạch chuẩn (ladder).

Kết quả tại hình 3.5 cho thấy, chỉ thị E30 cho kích thước sản phẩm của sâm Hàn Quốc (khoảng 240bp) khác biệt so với 2 loài sâm Ngọc Linh và sâm Lai Châu (khoảng 250bp). Sâm Vũ Diệp và Tam thất hoang không cho kết quả bắt cặp với mồi của chỉ thị này. Chỉ thị E10 cho kích thước sản phẩm lớn nhất ở nhóm sâm Ngọc Linh và sâm Lai Châu, tương đương 210bp. Kích thước sản phẩm PCR ở mẫu sâm Hàn Quốc nhỏ hơn, khoảng 200bp. Còn lại kích thước của băng ADN mẫu sâm Vũ Diệp và tam thất hoang tương đồng, khoảng 190bp. Chỉ thị G22 cho kết quả tương tự với chỉ thị E10 với kích thước sản phẩm PCR nhỏ hơn. Kích thước sản phẩm lớn nhất ở nhóm sâm Ngọc Linh và sâm Lai Châu, tương đương 200bp. Kích thước sản phẩm PCR ở mẫu sâm Hàn Quốc nhỏ hơn, khoảng 190bp. Còn lại kích thước của băng ADN mẫu sâm Vũ Diệp và tam thất hoang tương đồng, khoảng 175bp.

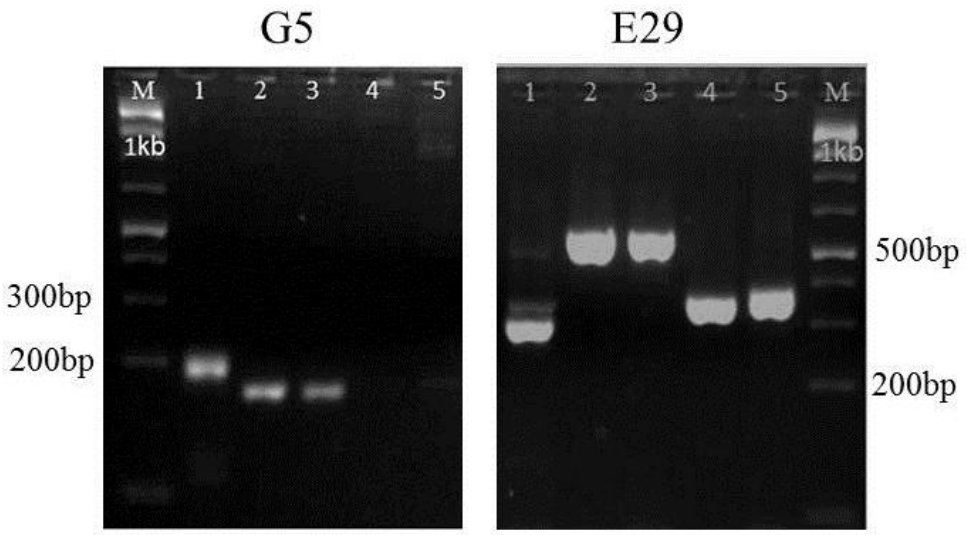
Kết quả điện di sản phẩm PCR với chỉ thị M7 và M10 cho thấy, cả 2 chỉ thị đặc hiệu riêng cho sâm Hàn Quốc và chưa thể phân biệt được sâm Ngọc Linh với các loài sâm còn lại (Hình 3.6).



Hình 3.6. Kết quả điện di sản phẩm PCR bằng chỉ thị M7 và M10 phân biệt sâm Ngọc Linh với một số loài sâm khác

Ghi chú: 1: sâm Hàn Quốc, 2: sâm Ngọc Linh, 3: sâm Lai Châu, 4: sâm Vũ Diệp, 5: tam thất hoang. 1kb là thang vạch chuẩn (ladder).

Chỉ thị G5 cho kết quả tương tự như chỉ thị E30, kích thước sản phẩm của sâm Hàn Quốc (khoảng 200bp) khác biệt so với 2 loài sâm Ngọc Linh và sâm Lai Châu (khoảng 180bp). Sâm Vũ Diệp và tam thất hoang không cho kết quả bắt cặp với mồi của chỉ thị này (Hình 3.7). Chỉ thị E29 cho kích thước sản phẩm PCR khá lớn, nhóm sâm Ngọc Linh và sâm Lai Châu tương đồng đạt khoảng 530bp. Nhóm sâm Vũ Diệp và tam thất hoang cho kích thước tương đương, khoảng 350bp. Kích thước nhỏ nhất ghi nhận ở mẫu sâm Hàn Quốc đạt khoảng 300bp.



Hình 3.7. Kết quả điện di sản phẩm PCR bằng chỉ thị G5 và E29 phân biệt sâm Ngọc Linh với một số loài sâm khác

Ghi chú: 1: sâm Hàn Quốc, 2: sâm Ngọc Linh, 3: sâm Lai Châu, 4: sâm Vũ Diệp, 5: tam thất hoang. 1kb là thang vạch chuẩn (ladder).

Bảng 3.4. Kết quả xác định chỉ thị phân tử đặc hiệu kiểm định sâm Ngọc Linh

STT	Kí hiệu	Kích thước sản phẩm	Alleles cho mỗi loài				
			Pg	Pv	Pv fusidiscus	Pb	Ps
1	G1	182	**B**	**A**	**A**	-	-
2	G2	247	**B**	**A**	**A**	-	**B**
3	G20	276	**A**	**B**	**B**	**C**	**C**
4	G24	221	**A**	**A**	-	-	-
5	G34	205	**A**	**B**	**B**	-	-
6	G36	219	**A**	**A**	-	-	-

STT	Kí hiệu	Kích thước sản phẩm	Alleles cho mỗi loài				
			Pg	Pv	Pv fusidiscus	Pb	Ps
7	G41	299	**AB**	**A**	**A**	-	-
8	G42	166	**A**	**A**	-	-	-
9	G43	162	**A**	**A**	-	-	-
10	G46	204	-	**A**	-	-	-
11	G48	239	**A**	**A**	-	-	-
12	G50	175	**A**	**A**	-	-	-
13	G51	205	-	**A**	-	-	-
14	G52	249	**A**	**A**	-	-	-
15	G53	250	-	**A**	-	-	-
16	G54	319	**A**	**BC**	**BC**	-	-
17	G55	168	**C**	**AC**	**AC**	**B**	**B**
18	G56	250	**A**	**A**	-	-	-
19	G57	152	**A**	**A**	-	-	-
20	G58	230	**B**	**B**	-	-	-

STT	Kí hiệu	Kích thước sản phẩm	Alleles cho mỗi loài				
			Pg	Pv	Pv fusidiscus	Pb	Ps
21	G59	244	**C**	**B**	**B**	-	**A**
22	G60	176	**A**	**A**	-	-	-
23	G61	225	**A**	**A**	-	-	-
24	G62	238	**C**	**B**	**B**	**A**	**A**
25	G63	228	**A**	**B**	**B**	-	-
26	G64	289	-	**A**	-	-	-
27	G65	250	**A**	**A**	-	-	-
28	G66	235	-	**A**	-	-	-
29	G67	230	**A**	**A**	-	-	-
30	G68	220	**B**	**A**	**A**	**C**	**C**
31	G69	243	**AC**	**A**	**A**	**B**	**B**
32	G70	227	**A**	**A**	-	-	-
33	E1	288	**A**	**A**	-	-	-
34	E3	240	**A**	**A**	-	-	-

STT	Kí hiệu	Kích thước sản phẩm	Alleles cho mỗi loài				
			Pg	Pv	Pv fusidiscus	Pb	Ps
35	E5	250	-	A	-	-	-
36	E13	179	A	A	-	-	-
37	E14	224	B	A	A	B	B
38	E16	237	A	A	-	-	-
39	E19	191	B	A	A	-	-
40	E20	212	A	B	B	-	-
41	E21	171	-	A	-	-	-
42	E23	298	AB	C	A	B	B
43	E24	209	B	A	A	-	-
44	E25	196	-	A	-	-	-
45	E26	235	A	A	-	-	-
46	E27	186	B	B	-	-	-
47	E28	207	A	AB	AB	-	-
48	E29	235	A	A	-	-	-

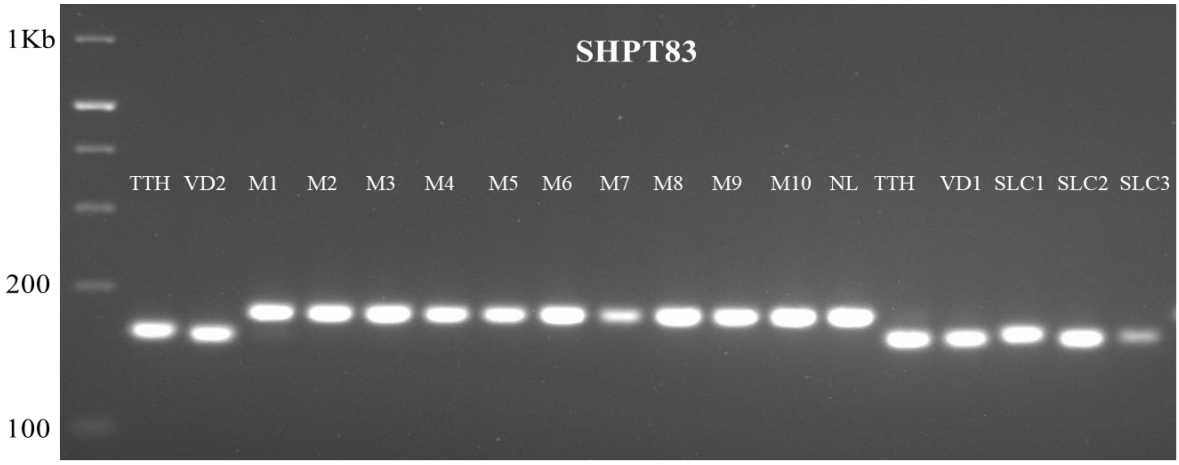
STT	Kí hiệu	Kích thước sản phẩm	Alleles cho mỗi loài				
			Pg	Pv	Pv fusidiscus	Pb	Ps
49	E31	246	**B**	**A**	**A**	-	**CD**
50	E32	199	**C**	**AC**	**AC**	**B**	**B**
51	E33	173	**A**	**A**	-	-	-
52	E34	182	**A**	**A**	-	-	-
53	E35	160	**B**	**B**	-	-	-
54	E36	246	**A**	**A**	-	-	-
55	E37	199	-	**A**	-	-	-
56	E38	189	**B**	**B**	-	-	-
57	E39	150	**AC**	**A**	**A**	**B**	**B**
58	E40	200	**B**	**A**	**A**	-	-
59	E41	217	-	**A**	-	-	-
60	E42	249	**A**	**A**	-	-	-
61	E44	159	**A**	**A**	-	-	-
62	M1	199	**BC**	**A**	**A**	-	-

STT	Kí hiệu	Kích thước sản phẩm	Alleles cho mỗi loài				
			Pg	Pv	Pv fusidiscus	Pb	Ps
63	M2	154	A	A	-	-	-
64	M11	163	A	A	-	-	-
65	M12	142	A	A	-	-	-
66	M13	153	-	A	-	-	-
67	M14	166	A	CD	CD	-	B
68	M15	100	B	A	A	-	-
69	M16	161	A	B	B	-	-
70	M17	196	A	A	-	-	-
71	M18	199	B	A	A	A	A
72	M19	223	A	A	-	-	-
73	M20	218	B	A	A	B	B
74	M22	224	AB	A	A	-	C
75	M23	213	-	A	-	-	-
76	M24	154	B	A	A	-	-

STT	Kí hiệu	Kích thước sản phẩm	Alleles cho mỗi loài				
			Pg	Pv	Pv fusidiscus	Pb	Ps
77	M25	243	A	A	-	-	-
78	M26	247	A	A	-	-	-
79	M27	179	B	B	-	-	-
80	M28	150	CD	B	B	A	C
81	M29	248	B	B	-	-	-
82	M30	230	B	B	-	-	-
83	M31	175	B	A	C	C	C
84	M32	223	A	A	-	-	-
85	M33	168	A	A	-	-	-
86	M34	115	B	B	-	-	-
87	M35	104	AB	A	A	-	B
88	M36	219	B	B	-	-	-
89	M38	166	A	A	-	-	-
90	M40	151	A	A	-	-	-

Ghi chú: Pg (sâm Hàn Quốc), Pv (sâm Ngọc Linh), Pv fusidiscus (sâm Lai Châu), Pb (sâm Vũ Diệp) và Ps (tam thất hoang). G-thiết kế từ trình tự Genome survey sequence (GSS) hệ gen nhân; E-thiết kế từ Expressed sequence tag (EST) hệ gen nhân và M-thiết kế từ trình tự lặp đơn giản (microsatellite) hệ gen nhân.

Kết quả chạy xác định chỉ thị phân tử đặc hiệu sử dụng kiểm định Sâm Ngọc Linh đã xác định được chỉ thị phân tử M31 cho kết quả đặc hiệu phân biệt rõ giữa sâm Ngọc Linh với tất cả 4 loài còn lại, thể hiện ở vạch kích thước băng ADN đạt 178 bp, lớn hơn so với các loài còn lại (Hình 3.8).



Hình 3.8. Kết quả điện di sản phẩm PCR bằng chỉ thị SHPT83 phân biệt sâm Ngọc Linh với một số loài sâm khác

NL (sâm Ngọc Linh), VD (sâm Vũ Diệp), TTH (tam thất hoang), LC (sâm Lai Châu) và M1- M10 là các mẫu sâm Ngọc Linh kiểm tra.

1Kb là thang vạch chuẩn (ladder).

Kết luận: Đề tài luận án đã thiết kế được 90 chỉ thị phân tử, 78/90 chỉ thị phân tử có khả năng nhân bội DNA sâm Ngọc Linh. Đã xác định được chỉ thị phân tử M31 là chỉ thị phân tử đặc hiệu có thể sử dụng xác định đúng giống sâm Ngọc Linh sử dụng trong tuyển chọn và kiểm tra độ đúng giống sản xuất giống sâm Ngọc Linh.

3.3. Nghiên cứu hoàn thiện biện pháp kỹ thuật sản xuất cây giống sâm Ngọc Linh bằng phương pháp *invitro*

Sâm Ngọc Linh là loại cây thảo mộc lâu năm, cây từ 3-4 năm tuổi bắt đầu ra hoa kết quả. Do vậy việc phát triển quần thể để chọn lọc mất rất nhiều thời gian. Sâm Ngọc Linh là cây tự thụ phấn, nhưng đôi khi có việc thụ phấn chéo do các loài côn trùng mang phấn từ cây này sang cây khác dẫn đến quần thể sâm không đồng nhất. Sâm có quả là quả mọng, quả chứa hạt 1-2 hạt, mỗi cây có khoảng 10-20 quả do vậy hệ số nhân giống rất thấp.

Ngày nay, việc ứng dụng các kỹ thuật trồng trọt hiện đại trong nông nghiệp đã góp phần nâng cao rõ rệt đối với năng suất và chất lượng của cây trồng. Sản xuất cây giống sâm Ngọc Linh bằng phương pháp nhân giống *invitro* cho hiệu quả nhân giống nhanh, đồng nhất về chất lượng cây giống từ một nguồn mẫu đầu vào, đáp ứng được nhu cầu về số lượng và chất lượng cây giống cho sản xuất quy mô lớn. Nhân giống sâm Ngọc Linh bằng phương pháp nhân giống *invitro* đã được một số nhà nghiên cứu thực hiện nhưng cho đến nay vẫn còn gặp một số khó khăn về kỹ thuật, đặc biệt là tỷ lệ cây sống từ phòng nuôi cấy mô đưa ra vườn ươm. Nên việc nghiên cứu hoàn thiện các biện pháp kỹ thuật sản xuất cây giống sâm Ngọc Linh bằng phương pháp nhân giống *invitro* là một trong những mục tiêu quan trọng của luận án. Việc nhân giống và trồng trọt đúng phương pháp đáp ứng yêu cầu bảo tồn nguồn gen, phát triển bền vững, vừa đáp ứng được yêu cầu cung cấp nguyên liệu sau này của công nghiệp dược chất lượng cao nhờ nguồn nguyên liệu ban đầu ổn định về lượng và chất.

3.3.1. Kết quả nghiên cứu mẫu tạo mô sẹo có khả năng sinh phôi và tạo phôi vô tính giống sâm Ngọc Linh

3.3.1.1. Kết quả nghiên cứu phương pháp xử lý mẫu sâm Ngọc Linh

Trong kỹ thuật nuôi cấy *in vitro* mô thực vật, bước vào mẫu tạo vật liệu vô trùng đóng vai trò rất quan trọng, đây là tiền đề để thực hiện các bước nghiên cứu tiếp theo như tái sinh trực tiếp hoặc tạo mô sẹo (callus), biệt hóa tế bào mô sẹo thành phôi, chồi, hay rễ. Tuy nhiên, các quy trình vào mẫu tạo vật liệu sạch bệnh không giống nhau, nó phụ thuộc vào đối tượng nghiên cứu, cơ quan bộ phận dùng làm mô cấy, cũng như loại hóa chất và cách thức sử dụng khi khử trùng.

Đối với cây tinh dầu và cây dược liệu nói chung thì quá trình vào mẫu tương đối khó khăn, tỷ lệ nhiễm khuẩn và nhiễm nấm nội sinh của mẫu cấy rất cao. Theo nhiều nhà nghiên cứu, cây dược liệu có chứa nhiều hợp chất trao đổi thứ cấp và hợp chất phenolic là nguyên nhân gây khó khăn cho việc vào mẫu. Vì vậy, việc tìm ra quy trình vào mẫu, kiểm soát tỷ lệ nhiễm cho từng đối tượng, từng bộ phận, cơ quan cây thuốc luôn là bài toán đố cho các nhà nuôi cấy mô. Với mục tiêu vào mẫu thành công cây dược liệu các nhà nghiên cứu đã sử dụng rất nhiều hóa chất khác nhau như: dung dịch 0,2% $HgCl_2$, kháng sinh penicillin, dung dịch sodium hypochlorite, 70% ethanol… để xử lý mẫu theo quy trình riêng (Nhut D.T.*et al*., 2012 [109]; Kwon, J.H. *et al*., 2003) [87].

Sâm Ngọc Linh là cây dược liệu sống lâu năm, thân rễ nằm trong đất thường được gọi là củ (hay thân ngầm). Củ là cơ quan dự trữ dinh dưỡng, trong đó có chứa các nguyên tố khoáng, các hợp chất trao đổi thứ cấp, hợp chất phenolic, saponins (Zhang, J. Y.*et al*., 2014) [149]. Hàm lượng các chất này chứa trong củ nhiều hơn các bộ phận còn lại khác của cây. Chính vì vậy, việc vào mẫu tạo vật liệu sạch bệnh sẽ khó khăn hơn so với vào mẫu từ mô chồi mầm và thời gian cảm ứng tạo thành mô sẹo sẽ lâu hơn.

Trong nghiên cứu tạo vật liệu sạch bệnh từ mô củ, đề tài sử dụng ethanol

70%, dung dịch kháng sinh streptomycin 500mg/L theo các công thức thời gian khác nhau. Theo dõi và quan sát sau 4 tuần nuôi cấy. Kết quả nhận thấy, yếu tố gây nhiễm mẫu mô củ (thân rễ) chủ yếu là do vi khuẩn nội sinh. Mẫu không được xử lý bằng streptomycin 500mg/L (CT1-ĐC) bị nhiễm khuẩn từ rất sớm (vào ngày thứ 3 sau cấy), sau đó tăng mạnh và đến ngày thứ 10 các bình đã bị nhiễm khuẩn 90%. Đối với công thức vô trùng mẫu còn lại (CT2, CT3, CT4, CT5), hiện tượng nhiễm khuẩn xuất hiện muộn hơn vào ngày thứ 7 sau cấy. Hiện tượng nhiễm này tiếp tục gia tăng trong tuần thứ 2 và từ tuần thứ 3 trở đi không thấy xuất hiện thêm mẫu nhiễm.

Phân tích kết quả thống kê số mẫu bị nhiễm sau 4 tuần ở bảng 3.5 cho thấy, số mẫu nhiễm tỷ lệ nghịch với thời gian xử lý mẫu bằng streptomycin 500mg/L. Nghĩa là tỷ lệ nhiễm giảm khi thời gian xử lý mẫu bằng streptomycin 500mg/L tăng đến 20 phút. Công thức vô trùng mẫu CT5 cho kết quả số mẫu nhiễm ít nhất là 10,0% sai khác có ý nghĩa thống kê ở mức 0.05 so với các công thức còn lại.

Bảng 3.5. Tỷ lệ nhiễm khi xử lý mẫu từ mô củ cây sâm Ngọc Linh

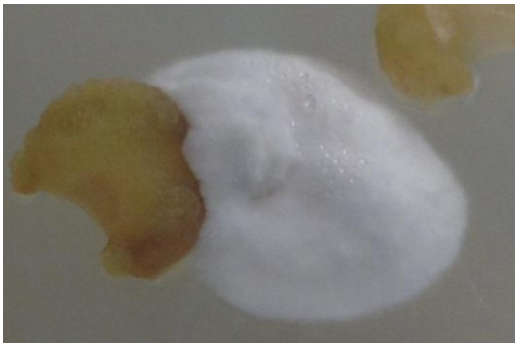
Thời gian xử lý mẫu bằng streptomycin 500mg/L	Tổng số mẫu (miếng)	Số mẫu nhiễm (miếng)	Tỷ lệ nhiễm (%)
CT1 - ĐC: 0 phút	40	36,0	90,0[a]
CT2: 5 phút	40	28,0	70,1[b]
CT3: 10 phút	40	25,0	62,5[c]
CT4: 15 phút	40	5,7	14,2[d]
CT5: 20 phút	40	4,0	10,0[e]
$LSD_{0,05}$	-	-	4,1
CV (%)	-	-	4,4

Ghi chú: CT (công thức); các ký tự khác nhau a,b,c,d,e... trên cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa ở mức α= 0,05 theo phép thử LSD Multiple Range Test

Như vậy, phương án tối ưu vô trùng mẫu tạo vật liệu sạch từ mô củ của cây sâm Ngọc Linh ở nghiên cứu này là mẫu được xử lý mẫu bằng streptomycin 500mg/L trong 20 phút. Quy trình vào mẫu từ mô củ sâm Ngọc Linh được tóm tắt như sau: Loại bỏ phần rễ và đất xung quanh củ, dùng bàn chải rửa sạch dưới vòi nước chảy. Dùng bông cồn 70% lau vệ sinh bề mặt củ, sau đó cắt củ ra thành từng khối vuông phù hợp, xử lý 30 phút qua chất diệt nấm 0,7% thiophanate methyl, rửa sạch 3 lần bằng nước cất vô trùng. Bước tiếp theo ngâm mẫu 20 phút trong dung dịch chứa 500mg/L Streptomycin. Rửa lại bằng nước cất vô trùng, sau đó xử lý bằng dung dịch sodium hypochlorite 1,5% trong 15 phút. Cuối cùng rửa lại 3 lần bằng nước cất vô trùng và để cho ráo nước. Dùng dao loại bỏ hết phần bề mặt xung quanh tiếp xúc với hóa chất khi vô trùng, rồi cắt mẫu thành từng lát mỏng có kích thước 1×5×5mm và đưa vào môi trường nuôi cấy.

Ngoài bộ phận vào mẫu là mô củ, mô chồi mầm thường được sử dụng để vào mẫu vì mô còn non, khả năng tạo mô sẹo cao và nhanh hơn khi vào mẫu từ mô củ. Tuy nhiên, do mô còn non nên quá trình vô trùng mẫu gặp nhiều khó khăn do dễ làm tổn thương mẫu. Trong nghiên cứu vào mẫu từ mô chồi mầm sâm Ngọc Linh, theo dõi và quan sát sau 4 tuần nuôi cấy kết quả cho thấy hiện tượng mẫu nhiễm gia tăng mạnh trong 2 tuần đầu, sau đó giảm dần và từ tuần thứ 4 trở đi thì không xuất hiện thêm mẫu bị nhiễm. Hiện tượng nhiễm ở các lát cắt mô chồi mầm chủ yếu là do nấm gây ra, ban đầu nấm xuất hiện ở viền xung quanh mẫu, sau đó lan dần bao phủ kín bề mặt mẫu và làm chết mẫu (Hình 3.9).

Đánh giá và phân tích kết quả sau 4 tuần nuôi cấy cho thấy, tỷ lệ nhiễm giảm dần, đạt cực tiểu khi thời gian xử lý mẫu bằng ethanol 70% là 5 phút, sau đó tỷ lệ nhiễm lại tăng dần khi thời gian xử lý mẫu trong ethanol 70% tăng tại bảng 3.6.



Hình 3.9. Mẫu cấy nhiễm nấm

Lý giải cho việc này là khi không xử lý mẫu bằng ethanol 70% (CT1-ĐC: 0 phút), hoặc xử lý trong thời gian chưa đủ (1 phút, 3 phút) thì bề mặt mẫu vẫn chưa được vô trùng hiệu quả dẫn tới tỷ lệ nhiễm cao. Ngược lại, khi xử lý mẫu lâu hơn 5 phút (10 phút) trong cồn 70% có thể làm bề mặt chồi mầm bị tổn thương, trên mặt chồi mầm xuất hiện các vết, chấm nhỏ. Mật độ và kích thước các chấm này tăng khi thời gian xử lý tăng, đây cũng chính là nguyên nhân gây nhiễm khi thời gian xử lý bằng cồn 70% quá 5 phút.

Bảng 3.6. Tỷ lệ nhiễm khi xử lý mẫu từ mô chồi mầm cây sâm Ngọc Linh

Thời gian ngâm mẫu trong dung dịch 70% ethanol	Tổng số mẫu (miếng)	Số mẫu nhiễm (miếng)	Tỷ lệ nhiễm, (%)
CT1-ĐC: 0 phút	20	20,0	90,0[a]
CT2: 1 phút	20	4,7	23,3[c]
CT3: 3 phút	20	4,0	20,0[d]
CT4: 5 phút	20	1,0	5,0[e]
CT5:10 phút	20	6,3	31,7[b]
$LSD_{0,05}$	-	-	3,2
CV (%)	-	-	5,0

Ghi chú: CT (công thức); các ký tự khác nhau a,b,c,d,e... trên cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa ở mức α= 0,05 theo phép thử LSD Multiple Range Test

Như vậy, thời gian tối ưu xử lý mẫu bằng ethanol 70% đối với mô chồi mầm cây sâm Ngọc Linh là 5 phút. Với lượng thời gian này, mẫu chồi mầm được vô trùng khá tốt, không gây tổn thương bề mặt và cho tỷ lệ nhiễm thấp nhất là CT4 (5,0%) sai khác có ý nghĩa thống kê ở mức 0.05 so với các công thức còn lại.

Quy trình vào mẫu từ mô chồi mầm được tóm tắt như sau: Lựa chọn các chồi mẫu làm vật liệu không bị sâu bệnh, rửa sạch sơ bộ dưới vòi nước chảy tránh làm tổn thương bề mặt mẫu. Tiến hành cắt nhỏ kích thước các mô cho phù hợp và xử lý trong dung dịch ethyl alcohol 70% trong vòng 5 phút. Sau đó rửa sạch các mẫu bằng nước cất vô trùng, tiến hành xử lý bằng 0,7% thiophanate methyl trong 30 phút và dung dịch sodium hypochlorite 1,5% trong 10 phút. Tiếp theo rửa lại mẫu 3 lần bằng nước cất vô trùng rồi để ráo nước. Cắt mẫu thành từng miếng có kích thước 1×5×5mm và đưa vào môi trường nuôi cấy.

Từ kết quả nghiên cứu vào mẫu thành công tạo nguồn vật liệu *in vitro* từ mô chồi mầm cây sâm Ngọc Linh trên cơ sở sử dụng dung dịch 70% ethanol và 1,5% sodium hypochlorite để xử lý mẫu. Qua đó nhận thấy rằng, để vào mẫu thành công từ các bộ phận như chồi mầm, thân, lá của các loài cây sâm đốt như sâm Ngọc Linh cần kiểm soát tốt tỷ lệ nhiễm nấm là chủ yếu. Trong nghiên cứu vào mẫu từ mô thân và lá cây sâm Ngọc Linh, đề tài sử dụng chất diệt nấm 0,7% thiophanate methyl như là một khâu trong quy trình theo 5 công thức khác nhau Đánh giá và phân tích kết quả sau 4 tuần nuôi cấy cho thấy, tỷ lệ nhiễm nấm tỷ lệ nghịch với thời gian xử lý mẫu bằng 0,7% thiophanate methyl. Trong giới hạn từ 0 đến 40 phút, thời gian xử lý mẫu bằng 0,7% thiophanate methyl càng lớn thì tỷ lệ mẫu nhiễm càng nhỏ

Phân tích kết quả ở bảng 3.7 chỉ ra rằng, giữa các công thức nghiên cứu có sai khác đáng kể về tỷ lệ nhiễm nấm khi thời gian xử lý mẫu trong 0,7%

thiophanate methyl thay đổi. Tỷ lệ mẫu nhiễm thấp nhất bằng 4,0% khi thời gian xử lý mẫu là 40 phút, thấp nhất là CT5 (4,0%)

Bảng 3.7. Tỷ lệ nhiễm khi vào mẫu từ mô thân cây sâm Ngọc Linh xử lý bằng 0,7% thiophanate methyl

Thời gian xử lý mẫu trong dung dịch 0,7% thiophanate methyl	Tổng số mẫu (miếng)	Số mẫu nhiễm (miếng)	Tỷ lệ nhiễm (%)
CT1-ĐC: 0 phút	25	22,5	90,0[a]
CT2: 10 phút	25	17,2	68,9[b]
CT3: 20 phút	25	10,3	41,3[c]
CT4: 30 phút	25	4,7	18,7[d]
CT5: 40 phút	25	1,0	4,0[e]
$LSD_{0,05}$	-	-	4,3
CV (%)	-	-	5,2

Ghi chú: CT (công thức); các ký tự khác nhau a,b,c,d,e... trên cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa ở mức α= 0,05 theo phép thử LSD Multiple Range Test

Như vậy, thời gian tối ưu xử lý mẫu bằng dung dịch 0,7% thiophanate methyl đối với mô thân cây sâm Ngọc Linh là 40 phút. Với lượng thời gian này, mẫu thân được vô trùng khá tốt, không gây tổn thương bề mặt và cho tỷ lệ nhiễm thấp nhất (4%) sai khác có ý nghĩa thống kê ở mức 0.05 so với các công thức còn lại.

Tương tự việc từ mô thân, việc vào mẫu từ mô lá sẽ có nguy cơ nhiễm nấm nhiều hơn nhiễm khuẩn. Để kiểm soát tốt tỷ lệ nhiễm nấm khi vào mẫu, đề tài tiến hành tiền xử lý mẫu lá bằng dung dịch thuốc diệt nấm 0,7%

thiophanate methyl theo các công thức thời gian khác nhau. Kết quả vào mẫu được tổng hợp ở bảng 3.8. Xử lý mẫu lá của cây sâm Ngọc Linh trong 0,7% thiophanate methyl cho kết quả tương tự như khi xử lý mẫu chồi mầm và mẫu thân, thời gian xử lý bằng dung dịch diệt nấm trong 40 phút đạt kết quả tốt nhất. Tỷ lệ mẫu nhiễm chiếm thấp nhất là CT5 (11,4 %) sai khác có ý nghĩa thống kê ở mức 0.05 so với các công thức còn lại.

Bảng 3.8. Tỷ lệ nhiễm khi vào mẫu từ mô lá cây sâm Ngọc Linh xử lý bằng 0,7% thiophanate methyl

Thời gian xử lý mẫu trong dung dịch 0,7% thiophanate methyl	Tổng số mẫu, (miếng)	Số mẫu nhiễm, (miếng)	Tỷ lệ nhiễm, (%)
CT1- ĐC: 0 phút	35	31,5	90,0[a]
CT2: 10 phút	35	23,8	68,1[b]
CT3: 20 phút	35	17,7	50,5[c]
CT4: 30 phút	35	6,7	20,0[d]
CT5: 40 phút	35	4,0	11,4[e]
$LSD_{0,05}$	-	-	6,9
CV (%)	-	-	7,6

Ghi chú: CT (công thức); các ký tự khác nhau a,b,c,d,e... trên cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa ở mức α= 0,05 theo phép thử LSD Multiple Range Test

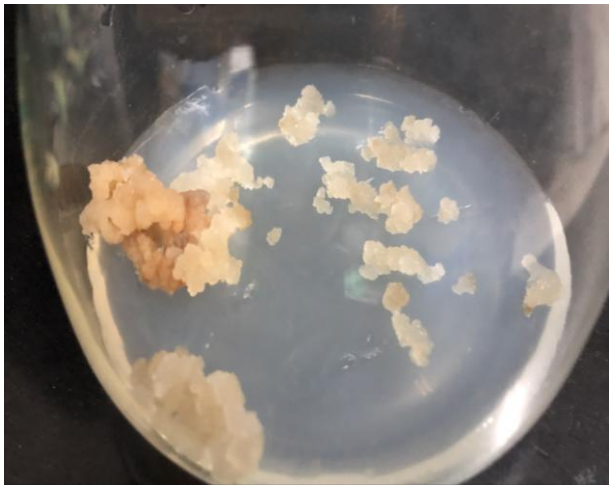
Quy trình vào mẫu từ mô thân và mô lá được tóm tắt như sau: Lựa chọn thân, lá cây không bị sâu bệnh, rửa sạch sơ bộ dưới vòi nước chảy tránh làm tổn thương bề mặt mẫu. Sau đó dùng bông cồn 70% lau nhẹ nhàng bề mặt mẫu. Bước tiếp theo xử lý mẫu bằng dung dịch 0,7%

thiophanate methyl trong 40 phút. Tiếp theo, rửa lại mẫu 3 lần bằng nước cất vô trùng và ngâm mẫu 10 phút trong dung dịch 1,5% sodium hypochlorite. Cuối cùng, rửa lại mẫu 3 lần bằng nước cất vô trùng rồi để ráo nước. Cắt mẫu thân thành từng miếng dài 0,8cm, cắt mẫu lá thành từng miếng với kích thước 5×5mm và đưa vào môi trường nuôi cấy.

3.3.1.2. Kết quả nghiên cứu cảm ứng tạo mô sẹo

Trong nuôi cấy *in vitro* thực vật, sự hình thành mô sẹo là một quá trình sinh học phức tạp, dưới tác động của các chất điều hòa sinh trưởng auxin hoặc cytokinin, các tế bào tại vị trí mô bị tổn thương phân chia hỗn độn không ngừng tạo thành khối tế bào phản biệt hóa. Quá trình này không chỉ phụ thuộc vào thành phần và nồng độ chất kích thích mà còn phụ thuộc nhiều vào kiểu gen và trạng thái tế bào ở vị trí lấy mẫu. Tế bào nào càng trẻ hóa thì càng dễ bị tác động, kích thích, quá trình tạo mô sẹo diễn ra nhanh và hiệu quả cao hơn so với tế bào già hóa. Trong nghiên cứu tạo mô sẹo ban đầu, đề tài tiến hành nuôi cấy lát cắt mỏng tế bào mô củ và chồi mầm trên môi trường MS có bổ sung 2,4-D với nồng độ khác nhau nhằm đánh giá ảnh hưởng của chất này tới sự hình thành mô sẹo. Theo dõi và quan sát thí nghiệm nhận thấy, quá trình cảm ứng tạo mô sẹo ở cây sâm Ngọc Linh diễn ra tương đối nhanh. Sau hai tuần nuôi cấy, bề mặt lát cắt mỏng của miếng mẫu bắt đầu se căng và chuyển sang màu vàng nhạt. Sang tuần thứ 3, toàn bộ miếng mẫu phồng lên tạo thành khối mô sẹo xốp, có màu vàng nhạt (Hình 3.10).

Phân tích kết quả ở bảng 3.9 cho thấy, chất điều hòa sinh trưởng 2,4-D ảnh hưởng rõ rệt tới khả năng cảm ứng tạo thành mô sẹo ở cây sâm Ngọc Linh. Trong tất cả các môi trường nghiên cứu, chỉ có môi trường MS làm đối chứng (Đ/C) không tạo thành mô sẹo, các môi trường còn lại đều cảm ứng hình thành mô sẹo với tỷ lệ phụ thuộc vào nồng độ 2,4-D có trong môi trường và loại mô cấy.



Hình 3.10. Mô sẹo sâm Ngọc Linh tạo từ chồi mầm trên môi trường MS+0,5mg/L 2,4-D

Bảng 3.9. Ảnh hưởng của chất 2,4-D đến sự tạo thành mô sẹo ở cây sâm Ngọc Linh

Môi trường	**Môi trường nuôi cấy**	**TB tỷ lệ tạo thành mô sẹo (%)**		**Đặc điểm**
		Củ	Chồi mầm	
ĐC	MS	0,0[a]	0,0[a]	Không có
MT1	MS + 0,3mg/L 2,4-D	62,5[b]	71,6[c]	Có màu vàng nhạt, xốp
MT2	MS + 0,5mg/L 2,4-D	60,0[c]	90,0[d]	
MT3	MS + 1,0mg/L 2,4-D	70,2[d]	63,4[b]	
$LSD_{0,05}$	-	2,0	2,0	-
CV (%)	-	2,1	1,9	-

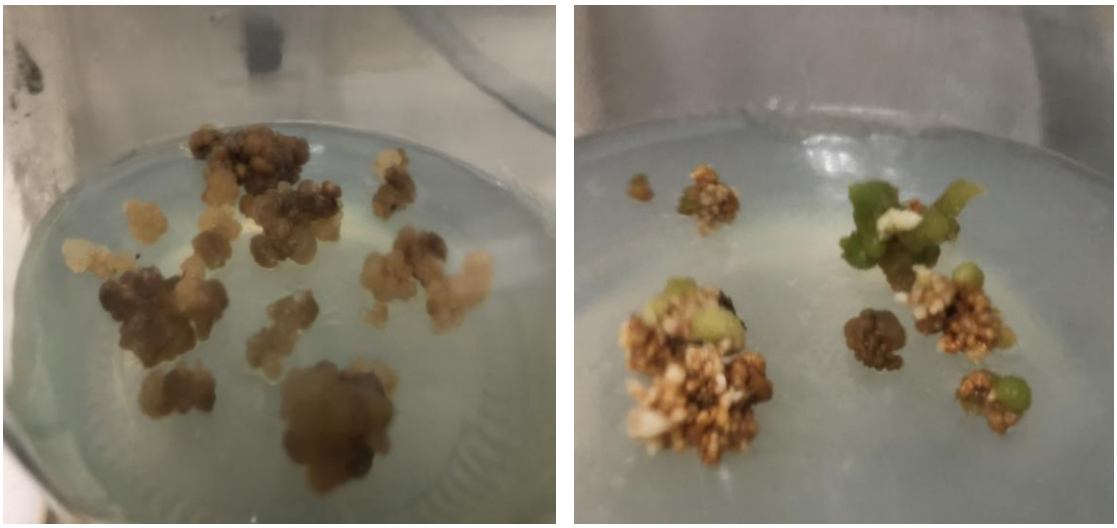
Ghi chú: CT (công thức); các ký tự khác nhau a,b,c,d. trên cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa ở mức α= 0,05 theo phép thử LSD Multiple Range Test

Kết quả trong nghiên cứu này cho thấy, mô cấy từ chồi mầm dễ tạo thành mô sẹo so với mẫu cấy từ củ mặc dù ở nồng độ 2,4-D thấp. Tỷ lệ mô sẹo tạo thành từ mô củ đạt cao nhất là 70,2% ở môi trường có bổ sung 1,0mg/L 2,4-D sai khác có ý nghĩa thống kê ở mức 0.05 so với các công thức còn lại. Trong khi đó tỷ lệ tạo thành mô sẹo từ chồi mầm đạt cao nhất là 90% ở môi trường chứa 0,5 mg/L 2,4-D và 71,6% ở môi trường chứa 0,3 mg/L 2,4-D sai khác có ý nghĩa thống kê ở mức 0.05 đối với MT3 và môi trường đối chứng (MS). Điều này cho thấy tế bào ở các mô càng trẻ hóa thì càng dễ cảm ứng tạo thành mô sẹo. Tuy nhiên, tỷ lệ tạo thành mô sẹo từ chồi mầm giảm khi nồng độ 2,4-D tăng đến 1mg/L. Kết quả này tương tự với kết quả của một số nghiên cứu trước đó ở cây sâm Hàn Quốc *P.ginseng* (Kwon, J.H. *et al*., 2003) [87]; Zhang, J. Y. *et al*., 2014 [149]). Tỷ lệ tạo thành mô sẹo đạt cao nhất trên môi trường MS + 0,5mg/L 2,4-D, và tỷ lệ này bị giảm đáng kể khi nồng độ 2,4-D tăng cao. Khi nồng độ 2,4-D trong môi trường nuôi cấy lớn hơn 3mg/L, quá trình cảm ứng tạo mô sẹo sẽ bị ức chế, dẫn đến không tạo thành mô sẹo (Kwon, J.H. *et al*., 2003) [87]. Một kết quả nghiên cứu khác ở cây sâm Ngọc Linh cho thấy tỷ lệ tạo thành mô sẹo cao nhất đạt 40% khi nồng độ 2,4-D bằng 1mg/L (Nhut D.T.*et al*., 2012) [109]). Điều đó cho thấy rằng trong cùng một loài, các mẫu nghiên cứu khác nhau, vị trí lấy mẫu khác nhau sẽ có khả năng cảm ứng tạo mô sẹo khác nhau.

3.3.1.3. Kết quả nghiên cứu cảm ứng tạo phôi vô tính

Để cảm ứng tạo phôi vô tính, trước tiên cần tạo mô sẹo có khả năng sinh phôi. Trong nghiên cứu này, đề tài tiến hành nuôi cấy mô sẹo ban đầu trên môi trường MS có hàm lượng đường cao (70g/L) và giảm nồng độ 2,4-D đến 0,1 mg/L. Kết quả sau 7-10 ngày nuôi cấy ở trong tối và 4 tuần ở điều kiện chiếu sáng 12-14 giờ/ngày thu được mô sẹo có khả năng sinh phôi. Mô sẹo có khả năng sinh phôi (KNSP) là khối mô gồm nhiều tế bào nhỏ, có cùng đường

kính (kích thước), có hoạt động biến dưỡng rất mạnh mẽ và cường độ tổng hợp axit ribonucleic cao (Hình 3.11).



Hình 3.11. Mô sẹo có khả năng sinh phôi sâm Ngọc Linh

Kết quả trên trái ngược với một số nghiên cứu khác trên sâm Ngọc Linh của một số tác giả trong nước. Theo báo cáo của Dương Tấn Nhựt và cs (2012), môi trường có bổ sung 2mg/L NAA thích hợp cho việc tạo phôi vô tính sâm Ngọc Linh sau 8 tuần nuôi cấy ở trong tối (Nhut D.T.*et al*., 2012) [109]. Một nghiên cứu khác của Mai Trường và cs (2013) cho thấy sâm Ngọc Linh cũng tạo phôi vô tính (mô phôi) trong môi trường MS bổ sung 1,0 mg/L 2,4-D, 1mg/L NAA, 0,2mg/L Kinetin và 10% nước dừa (Mai Trường và cs.,2013) [41]. Bên cạnh đó, Zhang *et al*. (2014) đã chỉ ra rằng, chất 2,4-D ở nồng độ 0,5mg/L rất thích hợp trong cảm ứng tạo phôi ở cây sâm *P. notoginseng* và sâm *P. ginseng (*Zhang, J. Y. *et al*., 2014) [149]. Điều này cho thấy sự khác biệt về loài cũng là một nguyên nhân dẫn đến khả năng cảm ứng tạo phôi vô tính khác nhau. Kết quả nghiên cứu trên mẫu sâm Ngọc Linh ở bảng 3.10 cho thấy, phôi vô tính được hình thành ở các môi trường có bổ sung đồng thời 0,5 mg/L NAA và TDZ; hoặc 1,0 mg/L 2,4-D và 1,0 mg/L NAA; hoặc 1,0 mg/L 2,4-D, 1,0 mg/L NAA và TDZ. Tuy nhiên, thời gian và tỷ lệ phôi vô tính được tạo thành lại khác biệt giữa các môi trường nuôi cấy.

Bảng 3.10. Ảnh hưởng của 2,4-D, NAA và TDZ đến sự tạo thành phôi vô tính từ mô sẹo có khả năng sinh phôi sâm Ngọc Linh

CT	Tổ hợp	TDZ mg/L	Tỷ lệ phôi vô tính được tạo thành (%)	TB số phôi vô tính/mô sẹo
CT1	0,5 mg/L 2,4-D	0	0	0
CT2	0,5 mg/L NAA	0	0	0
CT3	1,0 mg/L 2,4-D + 1,0 mg/L NAA	0	35,0[b]	12,2c
CT4	0,5 mg/L 2,4-D	0,1	0	0
CT5	0,5 mg/L NAA	0,1	45,0[c]	12,6[b]
CT6	1,0 mg/L 2,4-D + 1,0 mg/L NAA	0,1	55,0[d]	13,6[d]
CT7	0,5 mg/L 2,4-D	0,3	0	0
CT8	0,5 mg/L NAA	0,3	74,6[e]	18,5[f]
CT9	1,0 mg/L 2,4-D + 1,0 mg/L NAA	0,3	79,0[e]	17,5[e]
CT10	0,5 mg/L 2,4-D	0,5	0	0
CT11	0,5 mg/L NAA	0,5	50,0[cd]	16,3[d]
CT12	1,0 mg/L 2,4-D + 1,0 mg/L NAA	0,5	89,0[f]	20,1[g]
CT13	0,5 mg/L 2,4-D	1,0	0	0
CT14	0,5 mg/L NAA	1,0	20,0[a]	12,1[b]
CT15	1,0 mg/L 2,4-D + 1,0 mg/L NAA	1,0	45,0[c]	10,7[a]
LSD0.05			8,7	0,5
CV (%)			3,3	2,0

Ghi chú: các ký tự khác nhau a,b,c,d,e.f,g.h trên cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa ở mức α= 0,05 theo phép thử LSD Multiple Range Test

Đối với môi trường nuôi cấy chỉ bổ sung 1 mg/L 2,4-D và 1,0 mg/L NAA thì quá trình phát sinh phôi diễn ra tương đối chậm (12 tuần) với tỷ lệ phôi vô tính được tạo thành đạt thấp nhất là CT3 (35,0%) và số lượng phôi trung bình trên một mẫu cấy đạt 12,2 phôi/mẫu. Trong khi đó, ở môi trường có bổ sung TDZ quá trình phát sinh phôi diễn ra sớm hơn (8 tuần) và tỷ lệ tạo thành phôi cũng như số lượng phôi trên một mẫu cấy đều cao hơn. Môi trường được bổ sung 1,0 mg/L 2,4-D +1,0 mg/L NAA và 0,5 mg/L TDZ có tỷ lệ phát sinh phôi và số lượng phôi vô tính trung bình/ mẫu cấy đạt cao nhất là CT12 lần lượt là 89,0% và 20,1 phôi/mẫu, khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 0.05 đối với tất cả các môi trường nuôi cấy còn lại (Hình 3.12).

Sau khi hình thành, phôi vô tính sơ cấp phát triển thành phôi thứ cấp và được nhân với số lượng lớn trên môi trường MS có bổ sung 1 mg/L NAA và 0,5 mg/L BA.

Hình 3.12. Phôi vô tính sâm Ngọc Linh tạo từ mô sẹo có khả năng sinh phôi

3.3.2. Kết quả nghiên cứu môi trường nhân phôi và tạo củ cây nuôi cấy mô sâm Ngọc Linh

Trên môi trường cảm ứng, phôi vô tính phát triển chậm, đôi khi ngừng sinh trưởng hoặc bắt đầu quá trình hình thành phôi thứ cấp. Tất cả điều đó dẫn tới kích thước phôi nhỏ, phôi trưởng thành không thể nảy mầm thành cây con có đầy đủ chồi và rễ củ. Cytokinin là một nhóm hợp chất kích thích sự tái sinh chồi ở các đoạn cắt, mô sẹo trong nuôi cấy *in vitro*. Trong nhóm chất điều hòa

sinh trưởng Cytokinin, BA được sử dụng rộng rãi trên các đối tượng khác nhau dựa vào tác động rõ rệt của nó lên sự hình thành chồi bất định.

Đề tài tiến hành nghiên cứu ảnh hưởng riêng lẻ của BA lên sự tái sinh chồi từ phôi trên mẫu sâm Ngọc Linh được vào mẫu từ mô chồi. Kết quả nghiên cứu sau 6 tuần nuôi cấy cho thấy môi trường dinh dưỡng MS có bổ sung 1,0 mg/l BA là môi trường tối ưu cho quá trình tái sinh chồi từ phôi ở mẫu sâm Ngọc Linh.

Trong khi cytokinin kích thích sự tổng hợp diệp lục tố trong mô sẹo và huyền phù tế bào thì auxin lại là yếu tố ngăn cản. Khi so sánh IAA và NAA thì hai loại này ít có tác dụng ngăn cản sự tổng hợp diệp lục tố hơn là 2,4 D. Auxin thường được bổ sung vào môi trường nuôi cấy để kích thích tạo mô sẹo. Ngoài ra Auxin còn phân tách các tế bào trong huyền phù tế bào và làm cho các tế bào kết dính lại với nhau. Nồng độ trong môi trường cao sẽ ngăn cản sự phát sinh hình thái nhưng lại cảm ứng sự phát sinh phôi vô tính từ các tế bào có khả năng sinh phôi. Auxin và cytokinin, đặc biệt là tỷ lệ giữa chúng đóng vai trò cần thiết cho việc tái sinh chồi. Cytokinin thường thúc đẩy hoạt động hình thành chồi và quá trình này thường gia tăng bởi nồng độ auxin thấp.

Đề tài nghiên cứu ảnh hưởng của BA và NAA đến khả năng tái sinh chồi từ phôi. Trong thí nghiệm này, khi kết hợp giữa auxin và cytokinin nhận thấy có sự khác biệt đáng kể trong các tổ hợp BA và NAA khác nhau. Kết quả đánh giá ảnh hưởng của BA và NAA trong môi trường MS lên khả năng tái sinh chồi từ phôi mẫu sâm Ngọc Linh cho thấy, tỷ lệ 2:1 giữa BA và NAA với nồng độ 1mg/l: 0,5 mg/l cho kết quả tốt nhất lên khả năng tái sinh chồi từ phôi.

Một trong những thành phần quan trọng không thể thiếu được trong nuôi cấy mô thực vật, ngoài các chất điều tiết sinh trưởng thì nồng độ đường có ảnh hưởng khá đáng kể về số lượng và khối lượng chồi. Kết quả cho thấy, môi

trường dinh dưỡng MS có bổ sung 30g/l đường tối ưu cho khả năng tái sinh chồi từ phôi ở mẫu sâm Ngọc Linh.

Để tối ưu sự phát triển của phôi thành cây con hoàn chỉnh, thí nghiệm tiến hành nghiên cứu ảnh hưởng của chất GA_3, NAA, và BA đến khả năng nảy mầm của phôi thành cây con *in vitro* với củ micro (củ mini). Đánh giá tỷ lệ nảy mầm và phát triển của phôi thành cây con sau 6 tuần nuôi cấy, kết quả được trình bày ở bảng 3.11.

Phân tích kết quả ở bảng 3.11 cho thấy, tất cả môi trường nuôi cấy có bổ sung chất điều tiết sinh trưởng GA_3 , NAA và BA đều cho tỷ lệ phôi nảy mầm cao hơn so với MT1-ĐC (không có chất điều tiết sinh trưởng). Tuy nhiên, đặc điểm phát triển của các cây con *in vitro* ở các môi trường này lại tùy thuộc vào loại và nồng độ chất điều tiết sinh trưởng sử dụng.

Từ bảng 3.11 có thể thấy rằng, tất cả môi trường chứa GA_3 (MT2, MT3, MT4, và MT5) đều cho phôi nảy mầm thành cây con với thân lá phát triển mạnh nhưng lại không có củ micro. Điều đó chứng tỏ, đối với cây sâm Ngọc Linh chất điều tiết sinh trưởng GA_3 khi sử dụng đơn lẻ trong môi trường nuôi cấy chỉ có tác dụng kích thích sự nảy mầm của phôi vô tính. Kết quả này tương tự với kết quả nghiên cứu của tác giả (Zhang, J. Y. *et al*., 2014) [149] trên đối tượng sâm Hàn Quốc (*P.ginseng*). Bên cạnh đó, ở các công thức thí nghiệm còn lại (MT6, MT7 và MT8) đều có phôi nảy mầm thành cây con sinh trưởng phát triển tốt với củ micro được tạo thành (Hình 3.13), đặc biệt ở MT8 (MS + 1,0 mg/L BA và 0,5 mg/L NAA) có tỷ lệ phôi nảy mầm chuyển thành cây con với củ micro cao nhất đạt 70,60%, khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 0.05 đối với các môi trường còn lại, loại trừ MT5 (MS + 5,0 mg/L GA_3) Đây là đặc điểm rất quan trọng quyết định sự phát triển của củ *in vitro* ở giai đoạn tiếp theo cũng như tỷ lệ sống sót của cây *in vitro* ở giai đoạn vườn ươm. Như vậy, trong trường hợp này chất điều tiết sinh trưởng BA và NAA ở nồng

độ nhất định có tác dụng không chỉ kích thích sự nảy mầm của phôi mà còn giúp cây con phát triển tạo củ micro. Trong kết quả của một số nghiên cứu trước đó cũng chỉ ra rằng, ở nồng độ BA thích hợp có tác dụng tạo củ micro ở một số loài khác (Omokolo, N.*et al*., 2003 [112]; Piao,X.C. *et al*., 2003 [117]; Poornima,G.N and Ravishankar, R. V, 2007 [118]).

Một báo cáo khác cho rằng, BA có thể được chuyển hóa dễ dàng hơn các chất điều hòa sinh trưởng được tổng hợp bởi mô thực vật và có khả năng kích thích sản xuất hooc môn tự nhiên zeatin trong mô (Zaerr JB. and Mapes MO, 1982) [147].

Bảng 3.11. Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến sự nảy mầm của phôi thành cây con *in vitro* với củ micro sâm Ngọc Linh

Môi trường	**Thành phần môi trường nuôi cấy**	**Tỷ lệ phôi nảy mầm thành cây con *in vitro* sau 6 tuần nuôi cấy (%)**	**Đặc điểm của cây con *in vitro***
MT1-ĐC	MS	26,5[a]	Cây phát triển chậm, không có củ micro
MT2	MS + 0,5 mg/L GA_3	31,0[b]	Cây phát triển thân lá, không tạo củ micro
MT3	MS + 1,0 mg/L GA_3	38,5[c]	Cây phát triển thân lá, không tạo củ micro
MT4	MS + 3,0 mg/L GA_3	51,5[e]	Cây phát triển thân lá, không tạo củ micro
MT5	MS + 5,0 mg/L GA_3	69,7[g]	Cây phát triển thân lá, không tạo củ micro
MT6	MS + 1,0 mg/L NAA + 0,5 mg/L BA	60,5[f]	Cây phát triển với củ micro

MT7	MS + 1,0 mg/L NAA + 1,0 mg/L BA	45,5^{d}	Cây phát triển với củ micro
MT8	MS + 0,5 mg/L NAA + 1,0 mg/L BA	70,6^{g}	Cây phát triển tốt với củ micro
$LSD_{0,05}$		1,14	-
CV (%)		1,3	-

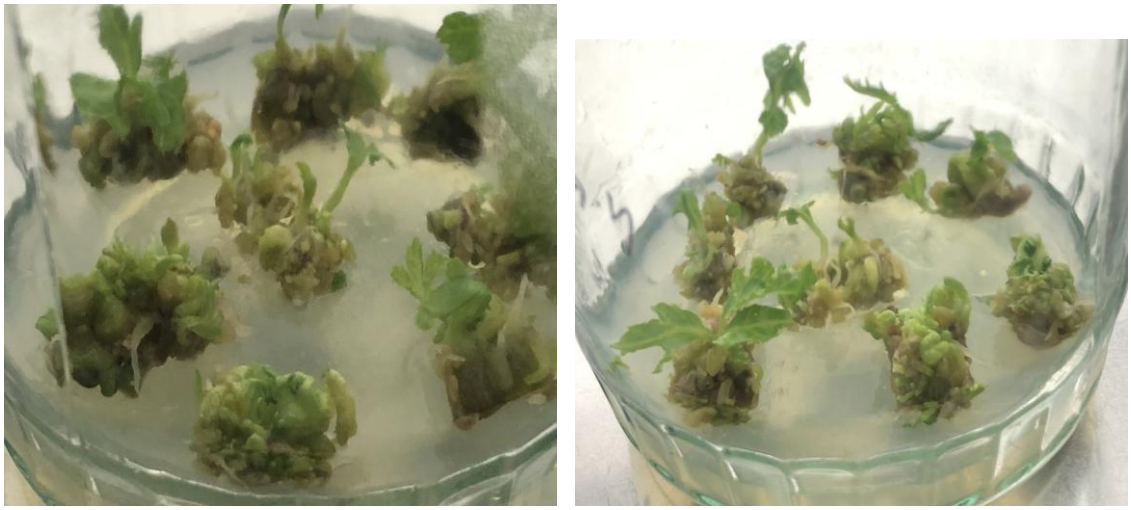
Ghi chú: MT (Môi trường); các ký tự khác nhau a,b,c,d,e.f,g trên cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa ở mức α= 0,05 theo phép thử LSD Multiple Range Test

Hình 3.13. Sự nảy mầm của phôi thành cây con với củ micro cây sâm Ngọc Linh

Như vậy, môi trường tối ưu cho sự nảy mầm của phôi vô tính phát triển thành cây con *in vitro* có củ micro ở cây sâm Ngọc Linh là MS + 0,5 mg/L NAA + 1,0 mg/L BA. Trong quá trình này, các khối mô phôi ở giai đoạn đầu có khả năng phát triển rất nhanh, đây là giai đoạn để nhân phôi lượng lớn phục vụ nhân cây giống (Hình 3.13; Hình 3.14).

3.3.3. Kết quả nghiên cứu kỹ thuật nhân và nuôi dưỡng củ cây nuôi cấy mô sâm Ngọc Linh

Nhân và nuôi dưỡng củ sâm Ngọc Linh trong môi trường nhân tạo MS + 0,5 mg/L NAA + 1,0 mg/L BA + 30g/l sucrose là giai đoạn quan trọng quyết định tỷ lệ sống của cây từ phòng thí nghiệm ra vườn ươm. Đặc tính của loài nhân sâm nói chung và sâm Ngọc Linh nói riêng là cây rụng lá vào mùa đông, trước khi cây rụng lá cây chuyển hóa dinh dưỡng từ thân, lá xuống củ. Do vậy, điều quan trọng nhất của cây mô sâm Ngọc Linh khác với cây trồng khác là phải có củ đủ lớn để duy trì và bật chồi vào đầu xuân năm sau. Trong đề tài này, việc nghiên cứu môi trường, kỹ thuật lựa chọn và thời gian nuôi dưỡng tạo cây nuôi cấy mô đạt kích thước củ luôn được đặt lên hàng đầu. Sau khi tạo phôi vô tính có thể lựa chọn được các cây mô bao gồm củ micro riêng biệt. Các cây này sẽ được lựa chọn và đưa vào môi trường nuôi dưỡng để phát triển củ có kích thước đủ lớn. Bên cạnh các phôi đơn tính riêng lẻ, khối phôi lớn trong quá trình phát triển sẽ dính gắn chặt vào nhau tạo mô lớn sau này có thể hình thành củ (Hình 3.14; hình 3.15). Các khối mô phôi này được lựa chọn, cắt tỉa tạo các cây nuôi cấy mô với thân củ tương đối lớn và cũng được chuyển sang môi trường nuôi dưỡng củ để phát triển thành cây hoàn chỉnh. Trong quá trình nuôi dưỡng tạo cây hoàn chỉnh, các chồi vẫn có thể nảy trên thân củ cây nuôi cấy mô và các chồi này cũng có thể được cắt riêng để tạo cây mới. (Hình 3.15).



Hình 3.14. Khối mô phôi vô tính sâm Ngọc Linh

Hình 3.15. Cây mô sâm Ngọc Linh phát triển đa chồi trên củ

Các cây phát triển từ khối phôi lớn có kích thước củ to, sinh trưởng và phát triển nhanh, khỏe. Để đạt được kích thước củ lớn như vậy, cây sâm Ngọc Linh phát triển từ phôi đơn lẻ có thể phải mất từ 1- 2 năm. Trong khi cây nuôi cấy mô sâm Ngọc Linh phát triển từ khối mô phôi mất khoảng 6-8 tháng. Việc tạo và nuôi dưỡng, phát triển củ cây mô sâm Ngọc Linh là yếu tố mới, then chốt trong hoàn thiện kỹ thuật sản xuất cây giống sâm Ngọc Linh nuôi cấy mô.

3.3.4. Kết quả nghiên cứu tạo cây con hoàn chỉnh mẫu giống sâm Ngọc Linh

Để đảm bảo khả năng sống sót cao khi đưa cây sâm *in vitro* ra vườn ươm trồng thì tạo củ micro cho cây chỉ là một trong những điều kiện cần nhưng chưa đủ. Cây *in vitro* muốn sống sót được cần phải có củ và bộ rễ khỏe. Chính vì vậy, đề tài tiến hành nuôi cấy cây có củ micro nhận được từ phôi nảy mầm vào hai môi trường MS và SH có bổ sung chất điều tiết sinh trưởng NAA (1,0 mg/L) riêng rẽ hoặc kết hợp với BA (0,2-0,5 mg/L) để đánh giá tác động của chúng đến khả năng ra rễ của cây có củ sau 90 ngày nuôi cấy. Hình ảnh minh họa cây sâm Ngọc Linh có củ và chưa có rễ (Hình 3.16).

Hình 3.16. Cây sâm Ngọc Linh có củ và chưa có rễ

Kết quả nghiên cứu ở bảng 3.12 cho thấy, loại môi trường dinh dưỡng và chất điều tiết sinh trưởng sử dụng có ảnh hưởng đáng kể tới khả năng ra rễ của cây *in vitro* sâm Ngọc Linh. Xét về yếu tố môi trường dinh dưỡng, nhận thấy môi trường SH thể hiện ưu thế vượt trội về số lượng rễ tạo thành so với môi trường MS (Hình 3.17). Kết quả này tương tự với kết quả đã công bố trên sâm Mỹ và sâm Hàn Quốc của nhóm tác giả Zhang *et al*. (2014) cho rằng hàm lượng muối NH_4NO_3 có trong môi trường MS cao hơn 8 lần trong môi trường SH là nguyên nhân hạn chế sự phát triển của rễ (Zhang,J.Y. *et al.*,2014 [149]).

Bảng 3.12. Ảnh hưởng của môi trường dinh dưỡng và chất điều tiết sinh trưởng đến khả năng ra rễ của cây có củ micro cây sâm Ngọc Linh

Môi trường cơ bản	**Nồng độ chất điều tiết sinh trưởng**	**Số lượng rễ trung bình, (cái)**		**Trung bình**
		MS	SH	
MT1	1,0 mg/L NAA + 0,5 mg/L BA	$1,2^{a}$	$2,6^{a}$	1,9
MT2	1,0 mg/L NAA + 0,2 mg/L BA	$1,6^{b}$	$3,8^{b}$	2,7
MT3	1,0 mg/L NAA	$2,0^{c}$	$5,5^{c}$	3,7
TB		1,6	4,0	-
$LSD_{0,05}$		0,2	0,4	-
CV (%)		6,4	4,5	-

Ghi chú: MT (Môi trường);các ký tự khác nhau a,b,c.trên cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa ở mức α= 0,05 theo phép thử LSD Multiple Range Test

Hình 3.17. Cây sâm Ngọc Linh *in vitro* trên hai môi trường MS và SH

Phân tích ảnh hưởng của chất điều tiết sinh trưởng tới khả năng ra rễ của cây *in vitro* sâm Ngọc Linh cho thấy rằng, khi bổ sung 1,0 mg/L NAA vào môi trường dinh dưỡng thì cây có số lượng rễ là lớn nhất (3,7 rễ). Khi bổ sung kết hợp 1,0 mg/L NAA với BA (0,2-0,5 mg/L) vào môi trường thì số lượng rễ tạo thành giảm, số lượng rễ đạt thấp nhất là 1,9 rễ (bổ sung 1,0 mg/L NAA + 0,5 mg/L BA). Tuy nhiên, kết quả quan sát sự sinh trưởng của cây nhận thấy, ở môi trường có bổ sung BA thì cây phát triển tốt hơn so với môi trường chỉ có NAA.

Tổng hợp các kết quả phân tích cho thấy, môi trường SH có bổ sung 1,0 mg/L NAA và 0,2 mg/L BA là tối ưu cho sự sinh trưởng và ra rễ của cây con với củ micro sâm Ngọc Linh.

Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của hàm lượng than hoạt tính tới sự sinh trưởng và ra rễ của cây *in vitro* sâm Ngọc Linh sau 90 ngày nuôi cấy cho thấy, than hoạt tính ảnh hưởng đáng kể tới sự sinh trưởng của cây (Bảng 3.14)

Ở nồng độ than hoạt tính thích hợp 0,2 g/L trong môi trường SH + 1,0 mg/L NAA + 0,2 mg/L BA cây sinh trưởng bình thường, lá có màu xanh đậm, thân cây cứng, củ chắc và số lượng trung bình rễ nhiều nhất là CT3 (4,5 rễ) sai khác có ý nghĩa thống kê ở mức 0.05 so với các công thức còn lại (Hình 3.18). Khi lượng than hoạt tính bổ sung vào môi trường từ 0,5-1,0 g/L, quan

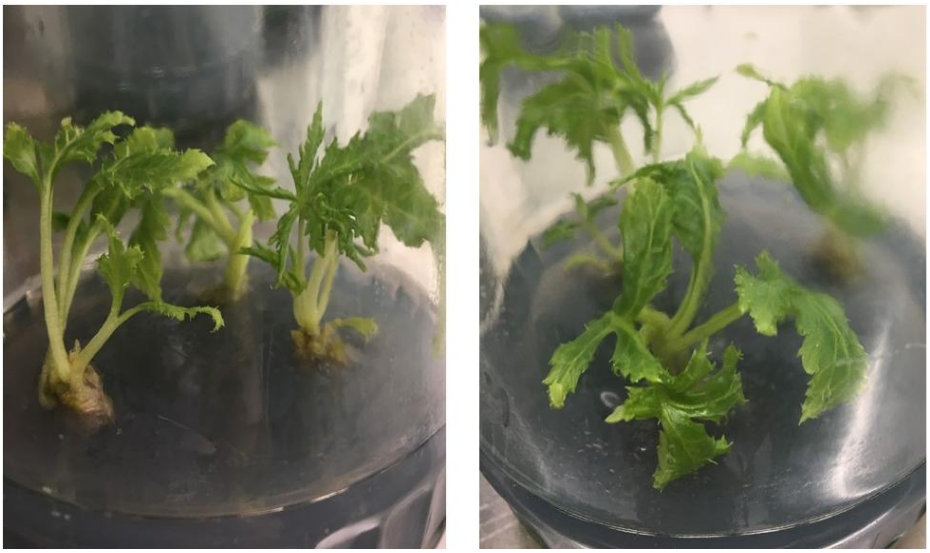
sát thấy cây sinh trưởng rất chậm, viền lá cây thường bị héo tạo thành màu trắng khi mới cấy chuyển, số lượng rễ tạo thành trung bình sau 8-12 tuần ít (1,2-2,3 rễ), đặc biệt là ở môi trường bổ sung 1,0 g/L than hoạt tính còn có hiện tượng cây bị chết.

Áp dụng kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của hàm lượng than hoạt tính tới sự sinh trưởng và ra rễ của cây con có củ micro sâm Ngọc Linh lên 3 loài sâm Vũ Diệp, Tam thất hoang và sâm Lai Châu khẳng định hiệu quả cao của môi trường SH + 1,0 mg/L NAA + 0,2 mg/L BA + 0,2 g/L than hoạt tính tới sự ra rễ tạo cây con hoàn chỉnh.

Bảng 3.13. Ảnh hưởng của hàm lượng than hoạt tính đến sự sinh trưởng và ra rễ của cây *in vitro* sâm Ngọc Linh

CT	Hàm lượng than hoạt tính, g/L	Môi trường nuôi cấy	Số lượng rễ, cái	Đặc điểm sinh trưởng
CT1	1,0	SH + 1,0 mg/L NAA + 0,2 mg/L BA	$1,2^{a}$	Cây sinh trưởng rất chậm, trắng viền lá
CT2	0,5		$2,3^{b}$	Cây sinh trưởng chậm, trắng viền lá
CT3	0,2		$4,5^{d}$	Cây sinh trưởng bình thường, lá xanh đậm, cứng cây
CT4	0,0		$3,8^{c}$	Cây sinh trưởng tốt, lá xanh non
$LSD_{0,05}$		-	0,2	-
CV (%)		-	3,3	-

Ghi chú: CT (Công thức);các ký tự khác nhau a,b,c,d trên cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa ở mức α= 0,05 theo phép thử LSD Multiple Range Test



Hình 3.18. Cây sâm Ngọc Linh *in vitro* hoàn chỉnh với rễ, củ micro, thân lá trên môi trường dinh dưỡng tối ưu

Cây *in vitro* trên môi trường tối ưu SH + 1,0 mg/L NAA + 0,2 mg/L BA + 0,2 g/L than hoạt tính tiếp tục được cấy chuyển sang môi trường mới để tạo điều kiện cho cây phát triển hoàn thiện hơn về cấu trúc và có khả năng sống sót ngoài vườn ươm. Trong thí nghiệm này, đề tài tiến hành nghiên cứu ảnh hưởng của hàm lượng dinh dưỡng cơ bản trong môi trường SH đến sự sinh trưởng của cây *in vitro* sâm Ngọc Linh trước khi đưa ra vườn ươm. Kết quả theo dõi, đánh giá đặc điểm sinh trưởng phát triển của cây sau 90 ngày nuôi cấy được trình bày trong bảng 3.14 cho thấy, trong cùng một điều kiện nuôi cấy, chỉ khác hàm lượng dinh dưỡng cơ bản (SH, SH1/2, SH1/3) đã có sự khác nhau về sự sinh trưởng và phát triển của cây sâm Ngọc Linh *in vitro*. Khi hàm lượng dinh dưỡng cơ bản trong môi trường nuôi cấy giảm một nửa kết quả ghi nhận có sự tăng về số lượng rễ/cây. Tuy nhiên, trong môi trường nuôi cấy giảm còn 1/3 hàm lượng dinh dưỡng cơ bản (môi trường SH có thành phần đa lượng và vi lượng giảm 1/3) ghi nhận số lượng rễ tương đương trong môi trường có đầy đủ hàm lượng dinh dưỡng. Trong nghiên cứu này,

kết quả cho thấy, môi trường MT2 cho số lượng rễ cây nhiều nhất là MT2 (5,1 rễ/cây) sai khác có ỹ nghĩa thống kê ở mức 0.05 so với các công thức còn lại.

Bảng 3.14. Ảnh hưởng của hàm lượng dinh dưỡng cơ bản đến sinh trưởng của cây sâm Ngọc Linh

Môi trường	Môi trường		Số rễ/cây (rễ)	Chiều cao cây (cm)	Đặc điểm sinh trưởng
MT1	SH + 30g/l sucrose	+ 1,0 mg/L NAA + 0,2 mg/L BA + 0,2 g/L than hoạt tính	4,4[a]	6,5[b]	Nhanh, khỏe, không sinh phôi soma ở gốc
MT2	SH1/2 + 30g/l sucrose		5,1[b]	6,8[b]	Nhanh, khỏe, không sinh phôi soma ở gốc
MT3	SH1/3 + 30g/l sucrose		4,5[a]	5,2[a]	Chậm, yếu, không sinh phôi soma ở gốc
$LSD_{.05}$			0,28	0,45	-
CV (%)			2,5	3,2	-

Ghi chú: MT(môi trường);các ký tự khác nhau a,b,c trên cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa ở mức α= 0,05 theo phép thử LSD Multiple Range Test

Phân tích về chiều cao và đặc điểm sinh trưởng của cây kết quả nhận thấy, khi hàm lượng dinh dưỡng cơ bản thấp nhất (SH1/3) cây sinh trưởng phát triển chậm và có chiều cao đo được sau 90 ngày nuôi cấy đạt 5,2 cm.

Đáng chú ý nhất là ở công thức MT2 (SH1/2) có cây sinh trưởng khỏe, cứng cáp, không tạo phôi thứ cấp ở rễ và có chiều cao cây đạt 6,8cm, sai khác có ý nghĩa thống kê ở mức 0.05 so với công thức MT3 (Hình 3.19).

Hình 3.19. Cây sâm Ngọc Linh *in vitro* ở công thức SH1/2

3.3.5. Kết quả khảo sát khả năng thích ứng của cây giống sâm Ngọc Linh in vitro trong vườn ươm có giàn mái che

3.3.5.1. Nghiên cứu ảnh hưởng của giá thể đến khả năng thích ứng của cây giống sâm Ngọc Linh invitro trong vườn ươn có giàn mái che.

Cây con *in vitro* là cây được nuôi cấy và nhân giống hoàn toàn trong môi trường nhân tạo được điều chỉnh điều kiện sống tối ưu nhất cho cây sinh trưởng phát triển. Nên trước khi được đưa ra ngoài tự nhiên, đề tài tiến hành thêm giai đoạn huấn luyện cây để nâng cao khả năng sống sót của cây trong môi trường tự nhiên bằng cách sử dụng một số giá thể thích hợp trồng cây trong vườn ươm trong thời gian 60 ngày. Khảo sát tiến hành trên 4 công thức giá thể khác nhau và thu được kết quả như bảng 3.15, hình 3.20.

Kết quả khảo sát sau 60 ngày tiến hành thí nghiệm cho thấy, cây con phát triển chiều cao tương đối đồng đều ở các công thức thí nghiệm. Tuy nhiên, khả năng sống sót của cây con trong các công thức có sự khác biệt rõ rệt. Cây con có tỉ lệ sống cao nhất ở công thức CT3 (hỗn hợp đất mùn núi, khoáng vermiculite và đá perlite theo tỉ lệ 2:3:1), cây sống sót đạt 86,67% cao hơn kết quả nghiên

cứu trước đó đã công bố về đánh giá khả năng thích nghi của cây sâm Ngọc Linh có nguồn gốc nuôi cấy *invitro* ở các điều kiện nuôi trồng khác nhau, trong đó có điều kiện nhà mái che tại khu vực hồ Tuyền Lâm, thành phố Đà Lạt, tỉnh Lâm Đồng cho tỷ lệ sống sót là 61% (Phan Công Du và cs, 2019) [5]. Ngoài ra, kết quả khảo sát tỷ lệ sống sót và sinh trưởng của cây sâm Ngọc Linh *invitro* tại tại khu vực Cổng Trời, Vườn quốc gia Bidoup Núi Bà Lâm Đồng chỉ đạt 70% sau 6 tháng trồng (Vũ Thu Hiền, 2018) [9]. Tỷ lệ sống sót trên (CT3) sai khác có ý nghĩa thống kê ở mức 0.05 đối với các công thức còn lại (CT1, CT2 và CT4). Trong khi đó, tỷ lệ cây sống sót ở CT1 (giá thể 100% đất mùn núi) có tỉ lệ sống thấp nhất, chỉ đạt 68,89% sau 60 ngày.

Hình 3.20. Cây giống sâm Ngọc Linh *in vitro* trong thí nghiệm

Chiều cao trung bình các cây ban đầu dao động từ 5,0 - 5,2 cm (cây đồng đều). Chiều cao trung bình sau 60 ngày theo dõi dao động từ 5,4 - 5,8 cm, tăng trưởng đạt từ 0,3- 0,6 cm. Cụ thể ở công thức CT3 chiều cao sau theo dõi đạt cao nhất là 5,8cm, chiều cao thấp nhất là CT4 (đạt 5,4 cm). CT1 và CT2 có chiều cao trung bình sau theo dõi như nhau là 5,6 cm. Ở công thức CT2 và CT3 tăng trưởng chiều cao trung bình cây cao nhất, đều đạt 0,6 cm, sai khác có ý nghĩa thống kê ở mức 0.05 đối với công thức CT1 và CT4. Ngoài ra, còn nghiên cứu đặc điểm hình thái của cây, ở công thức CT1 và CT2 cây có đặc điểm cây yếu, có hiện tượng héo thân và chết dần. Ở công thức CT4, cây tuy phát triển bình

thường nhưng vẫn có hiện tượng héo rũ. Cuối cùng ở công thức CT3 cây phát triển khỏe mạnh, lá xanh tốt, phát triển bình thường và bám vào giá thể.

Như vậy, giá thể phù hợp với cây con sâm Ngọc Linh khi đưa ra vườn ươm là CT3 (hỗn hợp đất mùn núi, khoáng vermiculite và đá perlite theo tỉ lệ 2 : 3 :1). Cây con có tỷ lệ sống cao, cây khỏe và sinh trưởng tốt.

Bảng 3.15. Ảnh hưởng của giá thể đến khả năng thích ứng cây giống sâm Ngọc Linh *in vitro* trong điều kiện vườn ươm có giàn mái che

Công thức	Tỷ lệ sống sót (%)	Chiều cao TB ban đầu (cm)	Chiều cao TB sau 60 ngày (cm)	Tăng trưởng chiều cao TB (cm)	Đặc điểm sinh trưởng
CT1	68,89[a]	5,2	5,6	0,40[b]	Cây yếu, có hiện tượng héo thân và chết dần.
CT2	72,22[a]	5,0	5,6	0,6[c]	Cây yếu, có hiện tượng héo thân và chết
CT3	86,67[c]	5,2	5,8	0,6[c]	Cây khỏe, lá phát triển đều và bám vào giá thể
CT4	78,89[b]	5,1	5,4	0,3[a]	Cây bình thường, có hiện tượng héo rũ
$LSD_{0,05}$	5,08	-	-	0,06	-
CV%	3,3	-	-	4,5	-

Ghi chú: CT1 (100% đất mùn núi); CT2 (hỗn hợp đất mùn núi và perlite theo tỉ lệ 1:3); CT3 (hỗn hợp đất mùn núi, khoáng vermiculite và đá perlite theo tỉ lệ 2:3:1); CT4 (hỗn hợp gồm đất mùn núi, phân hữu cơ và bùn rêu (peat moss) trộn theo tỉ lệ 2:1:1; các ký tự khác nhau a,b,c trên cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa ở mức α= 0,05 theo phép thử LSD Multiple Range Test

3.3.5.2. Nghiên cứu ảnh hưởng của tuổi cây đến khả năng thích ứng của cây giống sâm Ngọc Linh in vitro trong vườn ươm có giàn mái che

Sau khi nghiên cứu chọn được giá thể thích hợp cho cây sâm Ngọc Linh sinh trưởng và phát triển tốt trong vườn ươm. Các cây sâm với độ tuổi từ 1- 2 năm tuổi, sinh trưởng tốt được trồng trên cùng một loại giá thể (hỗn hợp đất mùn núi, khoáng vermiculite và đá perlite theo tỉ lệ 2:3:1) để đánh giá độ tuổi phù hợp đưa cây ra vườn ươm. Kết quả nghiên cứu được thể hiện ở bảng 3.16, hình 3.21

Bảng 3.16. Ảnh hưởng của tuổi cây đến khả năng thích ứng của cây giống in vitro trong vườn ươm có giàn mái che

Công thức	Khả năng sống sót (%)	Chiều cao cây TB ban đầu (cm)	Chiều cao cây TB sau 60 ngày (cm)	Tăng trưởng chiều cao TB (cm)	Đặc điểm sinh trưởng
CT1	62,66[a]	4,6	4,9	0,3[a]	Cây phát triển chậm, lá xanh nhạt, viền lá héo
CT2	68,68[b]	5,0	5,5	0,5[b]	Cây ổn định, lá phát triển đều, xanh
CT3	71,73[b]	5,3	5,9	0,6[c]	Cây khỏe, lá phát triển đều xanh
$LSD_{0,05}$	6,6	-	-	0,08	-
CV%	3,9	-	-	3,9	-

Ghi chú: CT1(Cây giống invitro 1 năm tuổi); CT2 (Cây giống invitro1,5 năm tuổi); CT3 (Cây giống invitro 2 năm tuổi); các ký tự khác nhau a,b,c trên cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa ở mức α= 0,05 theo phép thử LSD Multiple Range Test

Kết quả khảo sát sau 60 ngày tiến hành thí nghiệm cho thấy, khả năng sống sót của các công thức đều đạt trên 62 %, trong đó công thức CT1 cho kết quả thấp nhất là 62,66% và CT3 cao nhất đạt 71,73%, sai khác có ý nghĩa thống kê ở mức 0.05 đối với CT1.

Đánh giá chỉ tiêu chiều cao cây, chiều cao trung bình ban đầu ở các cây có độ tuổi khác nhau có sự khác nhau, tăng dần từ công thức CT1(cây 1 năm tuổi) đến công thức CT3 (cây 2 năm tuổi), dao động từ 4,6 - 5,3 cm. Cụ thể ở công thức CT3 (cây 2 năm tuổi) có chiều cao trung bình đạt cao nhất là 5,3cm, thấp nhất là công thức CT1 (cây 1 năm tuổi) có chiều cao trung bình chỉ đạt 4,6 cm và công thức CT2 (cây 1,5 năm tuổi) đạt 5,0 cm. Chiều cao trung bình cây sau 60 ngày theo dõi đã có sự biến động khác nhau dao động từ 4,9- 5,9 cm, tăng trưởng chiều cao trung bình từ 0,3 - 0,6 cm, điều này chứng tỏ cây sâm *in vitro* ở các độ tuổi khác nhau thì khả năng sinh trưởng phát triển chiều cao trong vườn ươm cũng khác nhau. Cụ thể, công thức CT3 có sự tăng trưởng chiều cao trung bình cao nhất, đạt 0,6 cm, sai khác có ý nghĩa thống kê ở mức 0.05 đối với CT1 và CT2.

Ngoài ra, kết quả quan sát và đánh giá đặc điểm hình thái của cây trong các công thức thí nghiệm cho thấy, công thức CT1 (cây 1 năm tuổi) cây phát triển chậm, lá xanh nhạt và viền lá héo. Ở công thức CT2 (cây 1,5 năm tuổi) cây đã có sự sinh trưởng và phát triển ổn định lá, thân phát triển đều xanh tốt. Công thức CT3 cây phát triển khỏe mạnh, lá đều phát triển xanh tốt.

Tổng hợp kết quả thí nghiệm nghiên cứu ảnh hưởng của tuổi cây đến khả năng thích ứng của cây giống *in vitro* trong vườn ươm có giàn mái che cho thấy, độ tuổi thích hợp đưa cây giống ra vườn ươm đảm bảo cây sinh trưởng và phát triển tốt là cây từ 1,5 tuổi trở lên.

Hình 3.21. Cây giống sâm Ngọc Linh *in vitro* tại HTX dược liệu Tu Mơ Rông

Kết luận: Đề tài đã cải tiến và hoàn thiện các biện pháp kỹ thuật trong quá trình sản xuất cây giống sâm Ngọc Linh bằng công nghệ nuôi cấy mô tế bào cụ thể:

Bước 1: Xử lý mẫu: mô củ của sâm Ngọc Linh, xử lý dung dịch streptomycin 500mg/L trong 20 phút. Chồi mầm, xử lý mẫu bằng dung dịch ethanol 70% trong 5 phút. Mô thân và lá, xử lý mẫu bằng dung dịch 0,7% thiophanate methyl trong 40 phút.

Bước 2: Tạo mô sẹo từ mẫu mô sâm Ngọc Linh. Môi trường tạo mô sẹo là MS bổ sung 1,0 mg/L 2,4-D; Môi trường nhanh mô sẹo: MS + 70g/l sucrose + 0,1 mg/L 2,4D.

Bước 3: Tạo phôi: Môi trường tốt nhất để tạo phôi vô tính sâm Ngọc Linh: MS + 1,0mg/l 2,4-D + 1mg/l NAA + 0,5mg/L TDZ + 30g/l sucrose và 7g/l agar.

Bước 4: Nhân phôi và tạo cây con: Môi trường tối ưu cho khả năng tái sinh chồi từ phôi ở mẫu sâm Ngọc Linh: MS + 0,5 mg/L NAA + 1,0 mg/l BA + 30g/l và 7g/l agar. Môi trường tối ưu hình thành cây con có củ micro: MS + 1,0 mg/L BA + 0,5 mg/L NAA+ 30g/l và 7g/l agar.

Bước 5: Tạo rễ và hoàn thiện cây con: Môi trường tối ưu cho sự ra rễ cái tạo cây con hoàn chỉnh: SH + 1,0 mg/L NAA + 0,2 mg/L BA + 0,2 g/L than hoạt tính.

Bước 6: Ra vườn ươm: Môi trường tối ưu cho sự sinh trưởng của cây sâm *in vitro* trước khi đưa ra vườn ươm: SH1/2 + 30g/l sucrose + 1,0 mg/L NAA + 0,2 mg/L BA + 0,2 g/L than hoạt tính.

- Cây giống sâm Ngọc Linh *in vitro* cho tỷ lệ sống cao, cây khỏe và sinh trưởng tốt ở giá thể gồm hỗn hợp đất mùn núi, khoáng vermiculite và đá perlite theo tỉ lệ 2 :3 :1 khi đưa ra vườn ươm.

- Độ tuổi thích hợp đưa cây giống *in vitro* ra vườn ươm đảm bảo cây sinh trưởng tốt là cây từ 1,5 tuổi trở lên.

3.4. Nghiên cứu hoàn thiện biện pháp kỹ thuật sản xuất cây giống hữu tính từ hạt sâm Ngọc Linh

Qua thực tế sản xuất, phương pháp nhân giống từ hạt được sử dụng phổ biến hơn do dễ dàng thực hiện, cây con có sức sống khỏe hơn so với các phương pháp khác. Tuy nhiên, phương pháp gieo hạt của các doanh nghiệp và đồng bào hiện nay là hạt chín sau thu hoạch sẽ được trồng trực tiếp trên luống hoặc trên khay nhựa. Hạt mọc mầm chậm do tình trạng ngủ nghỉ của hạt kéo dài gây trở ngại cho việc nhân giống. Hạt mọc mầm phụ thuộc vào thời tiết khí hậu hàng năm cũng như mư´c độ chăm sóc, do vậy tỷ lệ nảy mầm thường thấp và không ổn định, ảnh hưởng đến tỷ lệ cây giống xuất vườn. Do đó, để nâng cao công suất, chất lượng trong việc sản xuất cây giống từ hạt sâm Ngọc Linh, yếu tố khoa học công nghệ được xem là ưu tiên hàng đầu. Để tăng tỷ lệ

nảy mầm của hạt, tăng khả năng sống sót, cây giống sâm sinh trưởng và phát triển tốt, một số kỹ thuật mới được áp dụng trong việc sản xuất cây giống cây sâm Ngọc Linh từ hạt như: phương pháp bảo quản hạt, tạo nảy mầm trong điều kiện nhân tạo, hạt nảy mầm sẽ được gieo trên giá thể phù hợp cho sinh trưởng và phát triển của cây giống, áp dụng một số biện pháp chính trồng sâm Ngọc Linh gieo dưới giàn mái che..... Hạt đạt tỷ lệ nảy mầm cao, đồng đều, cây giống cho tỷ lệ sống sót cao, sinh trưởng và phát triển tốt, tăng hiệu quả trong sản xuất cây giống sâm Ngọc Linh và tiết kiệm được chi phí.

3.4.1. Kết quả nghiên cứu phương pháp xử lý quả giống/hạt, bảo quản hạt và giá thể gieo hạt đến tỷ lệ nảy mầm, sự sinh trưởng cây giống sâm Ngọc Linh

3.4.1.1. Kết quả nghiên cứu xử lý quả/hạt giống sâm Ngọc Linh trước khi gieo

Quả sâm Ngọc Linh có lớp vỏ thịt dày là đối tượng cho chim và chuột ăn hại. Phương pháp thu hái truyền thống là thu hái cả quả chín và quả xanh nên rất khó để loại sạch vỏ thịt của quả. Sau khi gieo ngoài vườn ươm, các loài chim, chuột ăn quả sâm khiến tỷ lệ hạt mọc mầm thấp hơn so với đãi sạch vỏ trước khi gieo. Tuy nhiên, trong quá trình đãi vỏ, hạt có thể bị để lại những vết thương cơ giới, điều này cũng làm ảnh hưởng đến tỷ lệ nảy mầm của hạt. Kết quả được thể hiện cụ thể ở bảng 3.17 cho thấy: thời gian từ gieo hạt đến mọc mầm ngắn nhất là CT6 là 93 ngày. Thời gian mọc mầm dài nhất là CT1 (110 ngày). Tỷ lệ mọc mầm của các công thức thí nghiệm dao động từ 53,33-81,11%. CT2 đạt tỷ lệ nảy mầm thấp nhất là 53,33%. Chính vì vậy, sau khi thu hoạch, lớp vỏ thịt được đãi sạch, cần cẩn thận khi chà, sát hạt, tránh để lại vết thương trên hạt.

Bảng 3.17. Ảnh hưởng của biện pháp xử lý hạt giống đến thời gian mọc, tỷ lệ mọc và hình thành cây con sâm Ngọc Linh

Công thức	Thời gian từ gieo đến mọc mầm (ngày)	Tỷ lệ mọc mầm (%)	Tỷ lệ hình thành cây con (%)	Tỷ lệ cây xuất vườn (%)
CT 1(Đ/C)	110	56,67[a]	43,33[a]	38,22[a]
CT 2	105	53,33[a]	51,11[a]	46,21[a]
CT 3	102	65,56[b]	63,33[b]	62,08[b]
CT 4	97	72,22[bc]	70,00[bc]	66,96[bc]
CT 5	95	75,56[c]	73,33[bc]	71,43[bc]
CT 6	93	81,11[d]	77,78[c]	76,20[c]
CT 7	95	71,11[bc]	67,78[bc]	64,80[bc]
$LSD_{0,05}$	-	*9,34*	*10,26*	*12,28*
CV (%)	-	*2,8*	*6,4*	*6,7*

Ghi chú: CT: Quả chưa bỏ vỏ thịt gieo ngay (Đ/C); CT2: Quả đã bỏ vỏ thịt lấy hạt gieo ngay; CT3: Quả chưa bỏ vỏ thịt được phơi âm can; CT4: Quả đã bỏ vỏ thịt, hạt được phơi âm can; CT5, CT6 và CT7: Hạt phơi âm can được ngâm trong GA_3 trong vòng 45 phút với giải nồng độ lần lượt là 70 ppm, 100 ppm và 150 ppm; các ký tự khác nhau a,b,c,d, trên cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa ở mức α= 0,05 theo phép thử LSD Multiple Range Test

Kết quả hạt sau khi phơi âm can và sử lý bằng GA_3 ở nồng độ 100ppm cho tỷ lệ nảy mầm hạt cao nhất là CT6, đạt 81,11% và sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 0.05 đối với các công thức CT1,CT2, CT3 và CT7. Các công thức xử lý bằng GA_3 với nồng độ cao hơn hoặc thấp hơn đều cho tỷ lệ nảy mầm giảm.

Tỷ lệ hình thành cây con ở các công thức dao động từ 43,33-77,78%. Công thức có tỷ lệ hình cây con cao nhất là CT6, đạt 77,78% và có sự khác biệt có ý nghĩa ở mức 0.05 đối với CT1, CT2 và CT3. Tỷ lệ cây xuất vườn ở CT6 duy trì ở mức 76,20%, cao nhất trong các công thức gieo hạt theo tiêu chuẩn cây xuất vườn của Công ty TNHH MTV Lâm nghiệp Đắk Tô và Công ty Cổ phần sâm Ngọc Linh (tuổi cây: đạt 12 tháng tuổi; hình thái cây có 01 lá kép, lá có màu xanh đến xanh đậm; Chiều cao thân khí sinh trung bình: Từ 10 cm trở lên; Đường kính củ từ 5 mm trở lên; có từ 2- 3 rễ chính trở lên)

Như vậy, việc phơi âm can hạt giống và xử lý bằng GA_3 với nồng độ100 ppm trong vòng 45 phút đã làm tăng tỷ lệ nảy mầm cao so với hạt không được xử lý (hạt gieo ngay), phù hợp với kết quả nghiên cứu của tác giả Xiao (1987) khi hạt được xử lý bằng GA_3 (Xiao, P. *et al*., 1987) [139].

3.4.1.2. Kết quả xác định ảnh hưởng của phương pháp bảo quản hạt giống (tự nhiên và nhân tạo) đến tỷ lệ mọc mầm, tỷ lệ hình thành cây con và tỷ lệ xuất vườn cây giống sâm Ngọc Linh

Phôi hạt (quả chín đỏ) sâm Ngọc Linh sau thu hoạch vẫn chưa phát triển hoàn toàn, kích thước trung bình đạt 0,81 ± 0,08mm (Đinh Xuân Tú *và* cs.,2021) [46] nếu đem gieo trồng ở ngoài đất theo phương pháp gieo truyền thống (gieo hạt vào tháng 9), do hạt có thời gian ngủ nghỉ dài, phôi phát triển chậm, cũng như chịu ảnh hưởng của nhiệt độ, độ ẩm trong thời gian bảo quản hoặc điều kiện gieo hạt ngoài đất nên hạt giống nằm trong đất và thời gian từ 90 -120 ngày (từ 3 đến 4 tháng). Kết quả này hoàn toàn phù hợp với kết quả nghiên cứu về nhiệt độ bảo quản tối ưu cho hạt nhân sâm *Panax* (Lee JC. *et al*.,1986 [93]; Lee, J.W. *et al*., 2016 [97]; Won JY. *et al*., 1988 [138]). Trong thời gian hạt nằm trong đất sẽ chịu tác động của các điều kiện ngoại cảnh không thuận lợi nên việc nghiên cứu các phương pháp bảo quản hạt giống sâm ngay sau khi thu hoạch quả, đãi vỏ sạch và đưa bảo quản dưới lớp cát sạch, độ

ẩm (75 - 80%), sâu 50 cm hoặc trong điều kiện lạnh 10^0C để đỡ tốn công chăm sóc và kiểm soát được nấm bệnh từ đất và hạt giống, có ý nghĩa trong việc đề xuất một quy trình mới trong bảo quản tươi hạt giống sâm Ngọc Linh.

Kết quả nghiên cứu tại bảng 3.18, cho thấy: tính từ sau khi hạt đã ngủ nghỉ 120 ngày (theo các phương pháp bảo quản khác nhau) tại 2 công thức (CT1 và CT2) hạt giống sau 60 ngày ngủ nghỉ ngoài môi trường đất đã nảy mầm và có tổng thời gian từ khi thu hoạch đến mọc mầm là 180 ngày, trong khi đó tại CT3 hạt giống sau 70 ngày ngủ nghỉ mới nảy mầm; CT4 có thời gian nảy mầm muộn nhất sau 75 ngày ngủ nghỉ phù hợp với kết quả nghiên cứu làm lạnh tối ưu cho sự nảy mầm hạt nhân sâm (*P.ginseng*) (Kwon,W.S *et al*., 2001) [86].

Bảng 3.18. Tỷ lệ mọc mầm, tỷ lệ hình thành cây con và tỷ lệ xuất vườn đối với các phương pháp bảo hạt giống khác nhau

Công thức	Thời gian thu quả (hạt) giống (ngày/tháng)	Thời gian bảo quản (ngày)	Thời gian từ khi thu hoạch đến mọc mầm (ngày)	Tỷ lệ mọc mầm (%)	Tỷ lệ hình thành cây con (%)	Tỷ lệ cây xuất vườn (%)
CT1(Đ/C)	5/9/2018	0	180	57,45	46,63	40,34
CT2	5/9/2018	120	180	76,53	71,22	68,56
CT3	5/9/2018	120	190	64,23	41,57	37,73
CT4	5/9/2018	120	195	71,34	67,23	63,67

Ghi chú: CT1: đã tách vỏ thịt được ủ trong đất rừng tự nhiên (Đ/C); CT2: đã tách vỏ thịt) được ủ trong cát suối (độ ẩm 75 - 80%); CT3: đã tách vỏ thịt được ủ trong giá thể 50% đất rừng: 50% cát (độ ẩm 75 - 80%); CT4:

đã tách vỏ thịt) được ủ trong cát (độ ẩm 75 - 80%), đặt trong điều kiện nhân tạo 10^0C trong 120 ngày

Ở các công CT2, CT4 đều cho tỷ lệ mọc mầm và hình thành cây con cao, đặc biệt ở CT2 ủ trong cát suối, tỷ lệ mọc mầm đạt 76,53% và có tỷ lệ hình thành cây con đạt được 71,22% và cho kết quả thấp hơn so với tỷ lệ hình thành cây con khi hạt giống xử lý bằng GA_3 và phân tầng ở nhiệt độ 15-20 ^0C, độ ẩm 60-70% trong 50 ngày là > 90 % (Đinh Xuân Tú *và* cs., 2021) [46]. Tỷ lệ cây xuất vườn ở công thức này duy trì ở mức 68,56%, cao nhất trong các phương pháp bảo quản. Như vậy, việc bảo quản hạt trong cát ẩm là một phương pháp có hiệu quả rõ rệt trong việc sản xuất cây giống sâm Ngọc Linh.

3.4.1.3. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của giá thể gieo hạt đến khả năng mọc mầm, sinh trưởng của cây giống sâm Ngọc Linh

Gieo hạt đã nứt nanh (tạo nảy mầm trong điều kiện nhân tạo) trên thành phần các giá thể khác nhau với các tính chất lý, hóa khác nhau, độ tơi xốp và dinh dưỡng khác nhau sẽ ảnh hưởng lớn đến thời gian mọc mầm, tỷ lệ mọc mầm và tỷ lệ hình thành cây giống sâm Ngọc Linh. Kết quả được thể hiện ở bảng 3.19.

Kết quả nghiên cứu cho thấy: Tỷ lệ mọc mầm cũng như hình thành cây con ở các công CT3, CT4 đều cho tỷ lệ mọc mầm và hình thành cây con cao nhất, đặc biệt ở CT4 (giá thể 50% mùn núi + 50% đất rừng), tỷ lệ mọc mầm đạt 85,56% và có sự khác biệt ý nghĩa ở mức 0.05 đối với CT1(Đ/C), CT2 và CT5 và có tỷ lệ hình thành cây con đạt được 78,89% và khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 0.05 đối với các công thức còn lại. Như vậy, việc gieo hạt đã nứt nanh gieo trên giá thể 50% mùn núi + 50% đất rừng đã làm tăng tỷ lệ nảy mầm cũng như tỷ lệ hình thành cây con so với hạt chưa xử lý.

Bảng 3.19. Khả năng mọc mầm và tỷ lệ hình thành cây con giống sâm Ngọc Linh trên các loại giá thể khác nhau

Công thức	Tỷ lệ mọc mầm (%)	Tỷ lệ hình thành cây con(%)
CT1 (đ/c)	63,33[a]	55,56[a]
CT2	67,78[ab]	58,89[ab]
CT3	80,00[cd]	67,78[b]
CT4	85,56[d]	78,89[c]
CT5	72,22[bc]	62,22[ab]
LSD0,05	8,72	9,76
CV (%)	6,3	8,0

Ghi chú: CT1: gieo hạt trong đất rừng tự nhiên; CT2: gieo hạt trong giá thể mùn (100% mùn núi); CT3: gieo hạt trong giá thể phân hữu cơ ủ hoai mục (100% phân hữu cơ); CT4: gieo hạt trong giá thể 50% mùn núi + 50% đất rừng; CT5: gieo hạt trong giá thể 50% mùn núi + 50% phân hữu cơ hoai mục; các ký tự khác nhau a,b,c,d, trên cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa ở mức α= 0,05 theo phép thử LSD Multiple Range Test

Để đánh ảnh hưởng của giá thể gieo hạt khác nhau đến khả năng sinh trưởng của cây con ở giai đoạn tiếp theo. Kết quả thể hiện ở bảng 3.20 cho thấy; khi gieo hạt đã nảy nứt nanh trên nền giá thể CT4 (50% mùn núi + 50% đất rừng) và CT5 (50% mùn núi + 50% phân hữu cơ hoai mục) các chỉ tiêu về sinh trưởng như: đường kính thân, số rễ/cây và khối lượng 100 cây giống đều cao hơn CT2, CT3 và CT1 (Đ/C) có ý nghĩa thống kê ở mức 0.05.

Sở dĩ CT4, CT5 có các chỉ tiêu sinh trưởng cao là khi gieo hạt trên giá thể 50% mùn núi + 50% đất rừng và 50% mùn núi + 50% phân hữu cơ hoai

mục, cây con sinh trưởng tốt nhất, phù hợp với yêu cầu sinh thái của cây sâm Ngọc Linh trong tự nhiên do giá thể trên đã được cung cấp đầy đủ dinh dưỡng từ mùn núi và từ phân hữu cơ ủ hoai từ cành, lá cây rừng đem lại. Mặt khác khi phân tích thành phần cơ giới đất rừng cho thấy: tỷ lệ sét cao trên 50%; tỷ lệ đất thịt trên 41%, còn lại là cát dưới 8% nên khả năng giữ ẩm tốt, song lại nghèo dinh dưỡng (hàm lượng hữu cơ nghèo; đạm, lân tổng số nghèo; lân dễ tiêu và kali dễ tiêu nghèo) do quá trình rửa trôi và rễ cây rừng hút dinh dưỡng.

Bảng 3.20. Ảnh hưởng của giá thể gieo hạt đến sinh trưởng cây giống sâm Ngọc Linh (sau khi gieo hạt 10 tháng)

Công thức	H (cm)	D thân (mm)	CRL (cm)	CDL (cm)	S rễ/cây (rễ)	KL 100 cây (g)
CT1 (đ/c)	10,35^{a}	1,64^{a}	1,52^{a}	3,12^{a}	5,10^{a}	91,28^{a}
CT2	10,45^{a}	1,69^{a}	1,78^{b}	3,52^{bc}	5,80^{ab}	93,21^{a}
CT3	10,67^{a}	1,71^{ab}	1,74^{b}	3,36^{b}	5,71^{ab}	95,45^{b}
CT4	10,98^{a}	1,85^{b}	2,01^{c}	3,98^{d}	6,93^{c}	101,32^{c}
CT5	10,78^{a}	1,78^{ab}	1,96^{c}	3,67^{c}	6,11^{b}	99,25^{c}
LSD0,05	*0,44*	*0,17*	*0,18*	*0,17*	*0,79*	*2,18*
CV (%)	*2,2*	*5,2*	*5,4*	*2,6*	*7,2*	*4,7*

Ghi chú: Công thức (CT); Chiều cao cây (H); Đường kính thân (D thân); CRL (Chiều rộng lá); CDL (Chiều dài lá); Số rễ (S rễ); Khối lượng (KL 100 cây); CT1: gieo hạt trong đất rừng tự nhiên; CT2: gieo hạt trong giá thể mùn (100% mùn núi); CT3: gieo hạt trong giá thể phân hữu cơ ủ hoai mục (100% phân hữu cơ); CT4: gieo hạt trong giá thể 50% mùn núi + 50% đất rừng; CT5: gieo hạt trong giá thể 50% mùn núi + 50% phân hữu cơ hoai mục; các ký tự khác nhau a,b,c,d, trên cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa ở mức α= 0,05 theo phép thử LSD Multiple Range Test

Do vậy, khi mở rộng diện tích vùng trồng sâm Ngọc Linh, thì việc gieo hạt, trồng cây giống sâm Ngọc Linh trên giá thể mùn núi tự nhiên hiện nay càng khan hiếm. Do đó, giá thể gieo hạt với thành phần gồm 50% mùn núi + 50% đất rừng và 50% mùn núi + 50% phân hữu cơ vi sinh ủ hoai mục lá, cành và thân cây thảm thực vật như là một giải pháp hữu hiệu ở những vùng sinh thái có lượng mùn núi thấp tạo ra khối lượng phân bón lớn tại chỗ. Đồng thời phân hữu cơ ủ hoai mục có các ưu điểm như không sử dụng hóa chất, nên không ảnh hưởng đến chất lượng của sâm cũng như môi trường sinh thái (Trần Hữu Khánh Tân *và cs*., 2020) [32].

Kết luận

- Đề tài đã hoàn thiện các biện pháp kỹ thuật trong sản xuất cây giống sâm Ngọc Linh từ hạt cụ thể:

Bước 1: Quả đãi vỏ: dùng tay chà xát cho vỏ quả bong ra, lấy hạt trải đều trên nong nia, đặt trong điều kiện phòng râm mát 5 - 7 ngày, phơi âm can đến khi vỏ quả nhăn nheo hoặc se vỏ hạt (độ ẩm 20%).

Bước 2: Hạt được xử lý ngâm trong dung dịch GA_3 100 ppm trong vòng 45 phút có khả năng phá ngủ nghỉ và tăng tỷ lệ nảy mầm.

Bước 3: Hạt đã được xử lý GA_3 có thể đem gieo ngay trên vườn ươm với giá thể 50% mùn núi + 50% đất rừng tự nhiên. Hoặc hạt được ủ trong cát sạch, độ ẩm (75-80%) với điều kiện lạnh 10^0C trong 120 ngày (bảo quản điều kiện nhân tạo) để hạt nứt nanh sẽ gieo trên luống khay nhựa kích thước (20 cm x 30 cm x 40cm).

3.5. Kết quả nghiên cứu một số biện pháp kỹ thuật chính trồng sâm Ngọc Linh dưới giàn mái che

3.5.1. Kết quả ảnh hưởng của khoảng cách trồng đến chiều cao, đường kính thân và đường kính tán sâm Ngọc Linh

Trong thí nghiệm nghiên cứu ảnh hưởng của khoảng cách trồng đến sinh

trưởng cây sâm dưới dàn mái che tại bảng 3.21 cho thấy, chiều cao cây của các công thức năm thứ nhất không có sự khác biệt đáng kể. Năm thứ 2 chiều cao lớn nhất là CT2 đạt 17,67 cm, trong khi đó công thức đối chứng chỉ đạt 15,45 cm. Năm thứ 3 chiều cao dao động từ 27,13 đến 30,45 cm, trong đó CT3 có chiều cao cây cao nhất (đạt 30,45 cm) và khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 0.05 so với các công thức còn lại.

Đường kính thân của các công thức trong năm đầu tiên đều gần bằng 1,7 mm, các năm sau, sự phát triển đường kính thân tăng không đáng kể, do cây sâm là cây thân thảo, đường kính thân khi tăng lên đến một mức nào đó thì dừng lại và ít có sự thay đổi lớn. Năm thứ 3 sau trồng đường kính thân của các công thức dao động từ 2,54-2,74 mm và khác biệt không có ý nghĩa thống kê.

Đường kính tán của cây sâm Ngọc Linh phụ thuộc vào kích thước lá. Do đó kích thước lá tăng dần theo số năm sau trồng nên đường kính tán của các công thức cũng tăng dần. Năm thứ nhất đường kính tán giữa các công thức thí nghiệm không có sự sai khác. Năm thứ 2, CT3 có đường kính tán lớn nhất đạt 21,97 cm và khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 0.05 so với các công thức còn lại. Năm thứ 3, đường kính tán giữa các công thức dao động từ 24,02-31,76 cm, trong đó CT3 có đường kính tán lớn nhất (đạt 31,76 cm) khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 0.05 đối với CT1, CT2 và CT4.

Như vậy, khoảng cách trồng khác nhau đã ảnh hưởng tới sự sinh trưởng của cây sâm Ngọc Linh. Khoảng cách thưa (25 x 30 cm: mật độ 130.000 cây/ha; 30 x30 cm: mật độ 110.000 cây/ha), cây có điều kiện phát triển đường kính tán mạnh. Đối chứng (CT1), khoảng cách hẹp (20 x 20 cm; mật độ: 250.000 cây/ha) cây cạnh tranh về dinh dưỡng và ánh sáng lên đường kính tán thấp nhất.

Bảng 3.21. Ảnh hưởng của khoảng cách trồng đến chiều cao, đường kính và đường kính tán sâm Ngọc Linh

Công thức	(H) (cm)			D thân (mm)			D tán (cm)		
	N1	N2	N3	N1	N2	N3	N1	N2	N3
CT1(đ/c)	10,25[a]	15,45[a]	27,13[a]	1,77[a]	2,25[a]	2,56[a]	8,91[a]	18,05[a]	24,02[a]
CT2	10,23[a]	17,67[b]	28,15[a]	1,76[a]	2,29[a]	2,65[a]	9,02[a]	19,87[b]	27,71[b]
CT3	10,20[a]	16,13[a]	30,45[b]	1,70[a]	2,48[a]	2,74[a]	9,06[a]	21,97[c]	31,76[c]
CT4	10,26[a]	16,23[a]	28,59[a]	1,74[a]	2,34[a]	2,54[a]	9,04[a]	18,65[ab]	28,02[b]
$LSD_{0,05}$	*0,80*	*1,03*	*1,91*	*0,14*	*0,30*	*0,22*	*0,88*	*1,58*	*2,83*
CV (%)	*3,9*	*3,2*	*3,4*	*4,0*	*6,5*	*4,3*	*4,9*	*4,0*	*5,1*

Ghi chú: CT1: 20 x 20 cm (Đ/C); CT2: 20 x 30 cm; CT3: 25 x 30 cm; CT4: 30 x 30 cm ; *CT - Công thức, H - Chiều cao cây, D thân - Đường kính thân chính, D tán- Đường kính tán; N- năm thứ; các ký tự khác nhau a,b,c, trên cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa ở mức α= 0,05 theo phép thử LSD Multiple Range Test*

3.5.2. Kết quả ảnh hưởng của khoảng cách trồng đến chiều dài củ, đường kính củ và năng suất cá thể sâm Ngọc Linh

Chiều dài củ và đường kính củ sâm là hai chỉ tiêu quan trọng quyết định đến năng suất. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của khoảng cách trồng đến chiều dài củ, đường kính củ và năng suất cá thể sâm qua các năm được trình bày ở bảng 3.22.

Chiều dài củ sâm Ngọc Linh năm thứ 1 tăng chậm, không có sự khác biệt giữa các công thức dao động từ 1,61- 1,68 cm, trong đó CT4 có chiều dài củ cao nhất đạt 1,68 cm, thấp nhất là công thức đối chứng (CT1) đạt 1,61cm.

Năm thứ 2 chiều dài củ giữa các công thức thí nghiệm không có sự khác biệt. Năm thứ 3, chiều dài củ của các công thức thí nghiệm dao động từ 3,47-3,89 cm, CT4 có chiều dài củ đạt cao nhất là 3,89 cm, sai khác có ý nghĩa thống kê ở mức 0.05 đối với các công thức còn lại.

Bảng 3.22. Ảnh hưởng của khoảng cách trồng đến chiều dài củ, đường kính củ và năng suất cá thể sâm Ngọc Linh

Công thức	CDC (cm)			D củ (mm)			Năng suất cá thể (g/cây)		
	N1	N2	N3	N1	N2	N3	N1	N2	N3
CT1 đ/c)	1,61^{a}	3,12^{a}	3,47^{a}	1,28^{a}	1,86^{b}	2,11^{a}	8,61^{a}	11,57^{a}	14,10^{a}
CT2	1,63^{a}	3,25^{ab}	3,66^{b}	1,21^{a}	1,89^{b}	2,46^{b}	9,34^{a}	12,21^{a}	20,82^{b}
CT3	1,62^{a}	3,52^{c}	3,70^{b}	1,26^{a}	1,70^{a}	2,60^{b}	9,06^{a}	14,04^{b}	22,74^{c}
CT4	1,68^{a}	3,43^{bc}	3,89^{c}	1,33^{a}	1,78^{ab}	2,51^{b}	9,18^{a}	14,59^{b}	21,09^{b}
$LSD_{0,05}$	*0,14*	*0,28*	*0,22*	0,16	0,19	*0,15*	*0,87*	*1,00*	*1,80*
CV (%)	*4,3*	*4,3*	*3,2*	*3,2*	*5,4*	*3,1*	*4,8*	*3,8*	*4,6*

Ghi chú: CT1: 20 x 20 cm (Đ/C); CT2: 20 x 30 cm; CT3: 25 x 30 cm; CT4: 30 x 30 cm: *CDC - Chiều dài củ; D củ - Đường kính củ; N- năm thứ; các ký tự khác nhau a,b,c, trên cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa ở mức α= 0,05 theo phép thử LSD Multiple Range Test*

Đường kính củ sâm Ngọc Linh cũng tăng lên sau 3 năm trồng. Tuy nhiên, mật độ trồng dày (CT1) là tăng chiều dài củ, nhưng đường kính củ lại giảm và ngược lại. Kết quả cho thấy; đường kính củ lớn nhất CT3 (đạt 2,60 cm), sai khác có ý nghĩa thống kê ở mức 0.05 so với CT1 (đ/c)

Đế cây sâm đạt được hoạt chất cao nhất, vì vậy thí nghiệm của đề tài phải tiếp tục theo dõi, duy trì và trồng đến năm thứ 7 mới thu hoạch. Do đó,

trong khuôn khổ của đề tài mới chỉ theo dõi đến năm thứ 3 để bước đầu tính toán năng suất cá thể của các công thức thí nghiệm. Kết quả về năng suất cá thể được trình bày tại bảng 3.23: năng suất cá thể tăng dần theo năm sinh và đạt cao nhất vào năm thứ 3. Tại cùng một thời điểm, năng suất cá thể chịu ảnh hưởng rõ rệt đến khoảng cách trồng. Năm thứ nhất năng suất cá thể giữa các công thức không có sự khác biệt. Năm thứ 2 năng suất cá thể giữa các công thức dao động từ 11,57-14,59 g/cây khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 0.05. Năm thứ 3 năng suất cá thể giữa các công thức dao động từ 14,10-22,74,59 g/cây, trong đó đạt cao nhất ở CT3 (đạt 22,74 g/cây) khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 0.05 so với các công thức còn lại. Do vậy, mật độ trồng có ảnh hưởng lớn đến sinh trưởng và năng suất của củ sâm Ngọc Linh, trong đó, trồng thưa với khoảng cách 25 × 30 cm hoặc 30 × 30 cm cho kết quả tốt nhất phù hợp với kết quả nghiên cứu về mật độ trồng sâm Lai Châu là 30x 30 cm cho năng suất khá và tiết kiệm quỹ đất (Trần Thị Kim Hương *và* cs., 2019) [17]. Tuy nhiên, kết quả này trồng với khoảng cách thưa hơn so với kết quả nghiên cứu gần đây trên quần thể sâm Ngọc Linh tại Quảng Nam là 20 x 25 cm của tác giả (Nguyễn Bá Hoạt, 2010) [13] hoặc 20 x 30 cm tại Triều Tiên của tác giả (Nguyễn Ngọc Dung, 1995) [4] là do cây giống sâm Ngọc Linh được trồng trên nền đất mùn rất giàu dinh dưỡng (hàm lượng mùn phân tích >30%) với lượng phân bón nền 80 tấn mùn núi + 20 P_2O_5 + 20 K_2O/ha.

3.5.3. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của liều lượng phân bón hữu cơ vi sinh đến dinh dường đất trồng sâm thí nghiệm

Thí nghiệm được bố trí trên nền đất đỏ đen, tương đối bằng phẳng và đồng đều. Kết quả phân tích các chỉ tiêu hóa học trong đất tại bảng 3.23 cho thấy: giá trị pHkcl trước và sau thí nghiệm có biến động 4,12-4,21 ở mức chua theo thang phân loại của tác giả (Nguyễn Đăng Nghĩa *và cs*., 2005) [24]. Mức pH đất tại ô thí nghiệm cây giống sâm Ngọc Linh khá tương đồng với

kết quả nghiên cứu của tác giả (Hou,J.P, 1978) [71] đã chỉ ra rằng cây nhân sâm thích hợp với giá trị pH từ 4-6, nhưng thấp hơn so với pH đất tối ưu (pH 5,5 - 6,0) đối với sâm Mỹ (Lee M.B.. *et al*., 1981 [91]; Olivier A.N.I. *et al*., 2005 [111]). Khi nghiên cứu các nguyên nhân làm cho đất chua, có rất nhiều yếu tố chi phối, ở đây chỉ xét riêng yếu tố tự nhiên thì phải kể đến là khí hậu và sinh vật. Các đặc trưng của khí hậu vùng trồng sâm ở Kon Tum như nhiệt độ, ẩm độ cao (nhiệt độ trung bình năm >24,1^{0}C, độ ẩm trung bình > 80% (*Trạm khí tượng Đắk Tô- Kon Tum năm 2020*) đặc biệt là lượng mưa ảnh hưởng rất lớn đến quá trình phong hoá đá, sự chuyển hoá và di chuyển vật chất, đồng thời còn ảnh hưởng đến thực bì và hoạt động của sinh vật trong đất (Trần Văn Chính *và cs*., 2010) [2]. Hàm lượng mùn của các công thức sau thí nghiệm ít thay đổi với hàm lượng mùn rất giàu (> 16%), cao gấp hơn 2,0 lần so với yêu cầu đất mùn trồng sâm Mỹ (yêu cầu hàm lượng mùn < 8%) của tác giả (Carroll and Apsley, 2003) [56] và cao hơn so với đất trồng nhân sâm ở một số nơi như Hamyang-gun (Hàn Quốc), hàm lượng mùn là 6,16%, (Kim C. *et al*., 2015*)* [80] và cao hơn rất nhiều đối với kết quả phân tích các mẫu đất (vườn và ruộng) trồng nhân sâm ở Jilin (Trung Quốc), đối với mẫu vườn hàm lượng mùn 8,17- 9,14%; mẫu đất ruộng hàm lượng mùn 2,4 - 3,9% (Yu,H. *et al*., 2019) [146]. Ở điều kiện nhân sâm Triều Tiên và sâm Mỹ, mùn núi đóng một vai trò hết sức quan trọng đối với quá trình sinh trưởng và phát triển của cây sâm "Nếu thiếu mùn núi việc trồng sâm coi như không thể". Mùn núi giữ cho luống sâm thông thoáng đất tơi xốp, không khí có thể tiếp xúc dễ dàng với phần củ và phần rễ. Ngoài ra mùn núi giữ ẩm rất tốt khi khô hạn, điều tiết và thoát nước lúc thừa nước. Kinh nghiệm về trồng sâm Mỹ và nhân sâm cho thấy nếu thiếu mùn núi cây sâm lập tức bị bệnh (Nguyễn Bá Hoạt, 2004) [11].

Hàm lượng N tổng số của các công thức phân bón sau thí nghiệm ít thay đổi với hàm lượng N tổng số rất giàu (>1,08%) theo Phương pháp phân tích

Kjeldahl; hàm lượng đạm dễ tiêu rất giàu Ndt >21 mg/100 g theo phương pháp phân tích của Chiurin- Kononova (>8 mg/100g: đánh giá giàu) cao hơn rất nhiều so với yêu hàm lượng đạm dễ tiêu đối với đất rừng trồng nhân sâm ở Hàn Quốc (mức thích hợp < 5mg/100 g).

Bảng 3.23. Một số chỉ tiêu dinh dưỡng đa lượng trong đất thí nghiệm năm thứ 3

Công thức	pH_{KCl}	Tổng số (%)				Dễ tiêu (mg/100g)			Trao đổi (lđl/100g)	
		HC	N	P_2O_5	K_2O	Ndt	P_2O_5	K_2O	Ca^{2+}	Mg^{2+}
Trước TN	4,12	17,25	1,12	0,33	0,05	21,51	2,25	36,21	7,15	1,68
CT1	4,18	16,58	1,16	0,28	0,04	21,56	2,27	37,56	6,99	1,61
CT2	4,11	17,33	1,15	0,35	0,04	21,08	2,31	36,33	6,98	1,62
CT3	4,13	18,27	1,08	0,31	0,05	21,04	2,28	36,88	7,00	1,65
CT4	4,16	17,91	1,11	0,41	0,05	21,11	2,35	37,01	6,89	1,63
CT5	4,21	18,25	1,14	0,39	0,06	21,14	2,34	36,78	7,21	1,62

Nguồn: Kết quả phân tích của WASI năm 2020

Hàm lượng P_2O_5 tổng số trong đất của các công thức phân bón sau thí nghiệm biến động rất nhỏ giữa các công thức và đều ở mức rất giàu theo phương pháp phân tích Loren; hàm lượng P_2O_5 dễ tiêu giữa các công thức phân bón ở mức rất nghèo theo thang đánh giá của Oniani. Điều này có thể là do đất trước khi bố trí thí nghiệm không được bổ sung thêm lân, ngoài ra trong điều kiện đất có giá trị pH thấp chua do lân bị cố định trong đất. Lân dễ tiêu sau thí nghiệm đạt trung bình > 2mg/100 g ở mức nghèo thấp hơn so với hàm lượng lân dễ tiêu của đất rừng tự nhiên trồng sâm ở Hàn Quốc (2,8 mg/100g). Hầu hết các công thức phân bón sau thí nghiệm hàm lượng K_2O tổng số ở mức từ nghèo đến trung bình. Trong khi đó hàm lượng K_2O dễ tiêu

rất giàu (trung bình > 36 mg/100 g) tạo điều kiện cho củ phát triển là tiền đề cho chất lượng sau này. Ca^{2+} là một chỉ tiêu quan trọng để đánh giá độ phì của đất trước và sau thí nghiệm của các công thức thí nghiệm ở mức trao đổi cao (> 6 ldl/100 g). Hàm lượng Mg^{2+} trao đổi cũng rất cao (>1,6 ldl/100g).

3.5.4. Kết quả ảnh hưởng của liều lượng phân bón hữu cơ vi sinh đến chiều cao, đường kính thân và đường kính tán sâm Ngọc Linh

Qua bảng 3.24 cho thấy: phân bón có ảnh hưởng đến chiều cao cây sâm Ngọc Linh, sự khác biệt giữa các công thức tăng dần theo năm trồng, thể hiện rõ vào năm thứ 2 và thứ 3. Năm thứ 2, chiều cao cây dao động từ 19,39-22,83 cm, đạt kết quả cao nhất là CT4 là 22,83 cm. Năm thứ 3 chiều cao cây của các công thức dao động từ 31,17-38,69 cm. CT4 có chiều cao tốt nhất là 38,69 cm sai khác có ý nghĩa thống kê ở mức 0.05 so với các công thức còn lại.

Bảng 3.24. Ảnh hưởng của liều lượng phân bón hữu cơ vi sinh đến chiều cao, đường kính thân và đường kính tán sâm Ngọc Linh

Công thức	H (cm)			D thân (mm)			D tán (cm)		
	N1	N2	N3	N1	N2	N3	N1	N2	N3
CT1	$10,50^{a}$	$19,39^{a}$	$31,17^{b}$	$1,73^{a}$	$2,52^{b}$	$3,01^{b}$	9,15a	$20,35^{ab}$	$30,15^{ab}$
CT2	$10,80^{a}$	$19,95^{ab}$	$32,02^{b}$	$1,75^{a}$	$2,25^{a}$	$2,96^{b}$	$9,13^{a}$	$19,63^{a}$	$29,33^{a}$
CT3	$10,30^{a}$	$22,38^{cd}$	$29,78^{a}$	$1,74^{a}$	$2,31^{a}$	$3,02^{b}$	$9,15^{a}$	$19,75^{a}$	$29,95^{ab}$
CT4	$10,70^{a}$	$22,83^{d}$	$38,69^{d}$	$1,73^{a}$	$2,71^{c}$	$2,92^{b}$	$9,14^{a}$	$21,10^{b}$	$32,21^{c}$
CT5	$10,20^{a}$	$21,18^{bc}$	$36,78^{c}$	$1,76^{a}$	$2,31^{a}$	$2,71^{a}$	$9,12^{a}$	$20,27^{ab}$	$31,22^{bc}$
$LSD_{0,05}$	*0,95*	*1,63*	*1,38*	*0,12*	*0,20*	*0,21*	*0,74*	*1,07*	*1,60*
CV(%)	*4,8*	*4,1*	*2,2*	*3,8*	*4,5*	*3,8*	*4,3*	*2,8*	*2,8*

Ghi chú: CT - Công thức; CT1: 80 tấn mùn núi (nền)+ 5.000 kg Phân hữu cơ vi sinh ủ hoai +20 N/ha; CT2: 80 tấn mùn núi (nền) + 7.500 kg Phân hữu cơ vi

sinh ủ hoai + 20 P_2O_5 + 20 K_2O/ha; CT3: 80 tấn mùn núi (nền) + 10.000 kg Phân hữu cơ vi sinh ủ hoai+ 20 P_2O_5 + 40 K_2O/ha; CT4: 80 tấn mùn núi (nền) + 12.500 kg Phân hữu cơ vi sinh ủ hoai + 20 P_2O_5 + 60 K_2O/ha; CT5: 80 tấn mùn núi (nền) + 15.000 kg Phân hữu cơ vi sinh ủ hoai+ 20 P_2O_5 + 80 K_2O/ha; H - Chiều cao cây; D thân - Đường kính thân chính, D tán - Đường kính tán: N -năm thứ; các ký tự khác nhau a,b,c,d, trên cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa ở mức α= 0,05 theo phép thử LSD Multiple Range Test

Đường kính thân cây cũng là một chỉ tiêu quan trọng trong sinh trưởng phát triển cây sâm Ngọc Linh. Cây sâm là cây có cấu trúc thân cây rất mềm. Thân cây to thì có thể chống chịu với các tác động cơ học của ngoại cảnh hạn chế được tình trạng gãy thân. Năm thứ 2 đã có sự sai khác về đường kính thân giữa các công thức, CT4 cho kết quả cao nhất 2,71mm. Năm thứ 3 đường kính thân của các công thức dao động từ 2,71-3,02 mm. Công thức cho kết quả cao nhất là CT1 (3,01mm) và CT3 (3,02 mm) và sai khác có ý nghĩa thống kê ở mức 0.05 đối với CT5 (2,71mm).

Đường kính tán: năm thứ 2 các công thức đã có sự thay đổi dao động từ 19,63 -21,10 cm. Công thức 4 có đường kính tán cao nhất là 21,10 cm và khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 0.05 đối với CT2 và CT3. Năm thứ 3 đã có sự khác biệt rõ về đường kính tán giữa các công thức. Đường kính tán dao động từ 29,33-32,21 cm. CT4 cho kết quả cao nhất là 32,21 cm và khác biệt có ý nghĩa đối với CT1, CT2 và CT3.

3.5.5. Kết quả ảnh hưởng của liều lượng phân bón hữu cơ vi sinh đến chiều dài củ, đường kính củ và năng suất cá thể sâm Ngọc Linh

Bộ phận thu hoạch của sâm Ngọc Linh chính là củ. Trong quá trình sinh trưởng, phát triển qua các năm cây cần dinh dưỡng từ đất và bổ sung dinh dưỡng từ phân bón.

Bảng 3.25. Ảnh hưởng của liều lượng phân bón hữu cơ vi sinh đến chiều dài củ, đường kính củ và năng suất cá thể sâm Ngọc Linh

Công thức	CDC (cm)			D củ (mm)			Năng suất cá thể (g/cây)		
	N1	N2	N3	N1	N2	N3	N1	N2	N3
CT1	1,38^{a}	3,23^{ab}	3,36^{ab}	1,36^{a}	2,17^{a}	2,20^{a}	10,05^{a}	15,31^{a}	26,43^{a}
CT2	1,40^{a}	3,33^{b}	3,62^{b}	1,34^{a}	2,08^{a}	2,48^{b}	10,27^{a}	18,61^{b}	30,86^{b}
CT3	1,39^{a}	2,98^{a}	3,13^{a}	1,33^{a}	2,02^{a}	2,62^{bc}	10,14^{a}	15,02^{a}	26,62^{a}
CT4	1,38^{a}	3,72^{c}	4,19^{c}	1,35^{a}	2,61^{b}	2,85^{d}	10,12^{a}	18,48^{b}	31,18^{b}
CT5	1,41^{a}	3,51^{bc}	4,48^{c}	1,36^{a}	2,57^{b}	2,77^{cd}	10,14^{a}	19,13^{b}	32,05^{b}
$LSD_{0,05}$	*0,16*	*0,36*	*0,42*	*0,12*	*0,22*	*0,22*	*1,12*	*1,29*	*2,01*
CV(%)	*6,3*	*5,9*	*6,0*	*5,0*	*5,2*	*4,5*	*5,9*	*4,0*	*3,6*

Ghi chú: CT - Công thức; CT1: 80 tấn mùn núi (nền)+ 5.000 kg Phân hữu cơ vi sinh ủ hoai+ 20 N/ha; CT2: 80 tấn mùn núi (nền) + 7.500 kg Phân hữu cơ vi sinh ủ hoai + 20 P_2O_5 + 20 K_2O/ha; CT3: 80 tấn mùn núi (nền)+ 10.000 kg Phân hữu cơ vi sinh ủ hoai+ 20 P_2O_5 + 40 K_2O/ha; CT4: 80 tấn mùn núi (nền) + 12.500 kg Phân hữu cơ vi sinh ủ hoai + 20 P_2O_5 + 60 K_2O/ha; CT5: 80 tấn mùn núi (nền) + 15.000 kg Phân hữu cơ vi sinh ủ hoai+ 20 P_2O_5 + 80 K_2O/ha ; CDC- Chiều dài củ; D củ - Đường kính thân củ, D: N - năm thứ; các ký tự khác nhau a,b,c, trên cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa ở mức α= 0,05 theo phép thử LSD Multiple Range Test

Theo dõi thí nghiệm trong 3 năm tại bảng 3.25 nhận thấy: năm thứ 1 chiều dài củ dao động từ 1,38-1,41cm. Ở năm thứ 2 chiều dài củ dao động trong khoảng từ 2,98-3,72 cm. CT4 cho kết quả cao nhất đạt 3,72 cm và sai khác có ý nghĩa thống kê ở mức 0.05 đối với CT3 (đạt 2,98cm), CT1 (đạt 3,23 cm) và CT2 (3,33cm). Năm thứ 3, chiều dài củ của các công thức dao động từ

3,13-4,48 cm. CT5 cho kết quả cao nhất đạt 4,48 cm và sai khác có ý nghĩa thống kê ở mức 0.05 đối với CT1 (đạt 3,36 cm); CT2 (đạt 3,62 cm) và CT3 (đạt 3,13 cm).

Bên cạnh chiều dài củ thì đường kính củ cũng là chỉ tiêu quan trọng. Đường kinh củ tại năm thứ 2 dao động từ 2,02-2,61 mm. CT5 và CT4 cho kết quả đường kính củ đạt 2,61mm và 2,57 mm. Ở năm thứ 3 đường kính củ dao động từ 2,20-2,85 cm,CT4 cho kết quả đường kính củ cao nhất là 2,85 mm và có sự sai khác có ý nghĩa thống kê ở mức 0.05 đối với CT1 (2,85 mm), CT2 (2,48mm) và CT3 (2,62 mm).

Để đánh giá ảnh hưởng của phân bón đến năng suất cá thể. Kết quả tại bảng 3.26. Năng suất cá thể năm thứ 2 dao động từ 15,31-19,13 g/cây. Năng suất cá thể cao nhất thu được ở CT5 là 19,13 g/cây và thấp nhất là CT3 là 15,02 g/cây. Năm thứ 3, năng suất cá thể tăng nhanh và dao động từ 26,43-32,05 g/cây, Năng suất cá thể thu được thu được cao nhất là ở CT5 đạt 32,05 g/cây và sai khác có ý nghĩa thống kê ở mức 0.05 đối với CT1 (26,43 g/cây) và CT3 (26,62 g/cây) là do cây giống sâm Ngọc Linh được bổ sung thêm phân hữu cơ vi sinh ủ hoai từ lá, cành cây rừng và thảm thực vật tại chỗ rất giàu dinh dưỡng (hàm lượng hữu cơ>21%; Nts>0,4%; đạm dễ tiêu dạng NH_4: >400 mg/100g, đạm dễ tiêu dạng NO_3: >33,89 mg/100g) với lượng bón 15 tấn/ha trong năm thứ nhất là tiền đề để năm thứ 2 và thứ 3 bổ sung thêm lượng phân khoáng với lượng 80 kg K_2O/ha đã tạo lập năng suất cá thể cao.

Kết luận

- Mật độ, khoảng cách trồng: Khoảng cách 25 x30 cm (ứng với mật độ 130.000 cây/ha) là thích hợp với đối với cây giống sâm Ngọc Linh năm thứ 3.

- Lượng phân bón hữu cơ vi sinh: Liều lượng bón 80 tấn mùn núi (nền)+ 15.000 kg Phân hữu cơ vi sinh ủ hoai + 20 P_2O_5 + 80 K_2O/ha là thích hợp với đối với cây giống sâm Ngọc Linh năm thứ 3.

KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

4.1. Kết luận

1. Hiện trạng phát triển và sản xuất cây giống sâm Ngọc Linh: Diện tích trồng sâm Ngọc Linh hiện nay tại Kon Tum và Quảng Nam là 1.425 ha (chiếm 3% diện tích quy hoạch); sản xuất > 5 triệu cây giống trong thời gian qua và có 5 yếu tố hạn chế trong việc phát triển và sản xuất cây giống sâm Ngọc Linh tại vùng nghiên cứu.

2. Xây dựng bộ chỉ thị đánh giá đúng cây giống sâm Ngọc Linh: Thiết kế 90 chỉ thị phân tử, 78/90 chỉ thị phân tử có khả năng nhân bội DNA sâm Ngọc Linh. Trong đó chỉ thị phân tử M31 là chỉ thị phân tử đặc hiệu có khả năng phân biệt, xác định đúng giống sâm Ngọc Linh.

3. Hoàn thiện các biện pháp kỹ thuật sản xuất cây giống sâm Ngọc Linh bằng phương pháp *in vitro*: môi trường tối ưu tạo phôi là MS + 1,0mg/l 2,4-D + 1mg/l NAA + 0,5mg/L TDZ + 30g/l sucrose và 7g/l agar; nhân phôi và cây con là MS + 1,0 mg/L BA + 0,5 mg/L NAA+ 30g/l và 7g/l agar; tạo rễ và hoàn thiện cây con là SH + 1,0 mg/L NAA + 0,2 mg/L BA + 0,2 g/L than hoạt tính; ra vườn ươm: môi trường tối ưu là SH1/2 + 30g/l sucrose + 1,0 mg/L NAA + 0,2 mg/L BA + 0,2 g/L than hoạt tính; giá thể tối ưu: đất mùn núi, khoáng vermiculite và đá perlite theo tỉ lệ 2 :3 :1; độ tuổi cây thích hợp: cây con > 1,5 tuổi cho tỷ lệ cây giống sâm Ngọc Linh *in vitro* sống đạt trên 86%.

4. Hoàn thiện biện pháp kỹ thuật sản xuất cây giống sâm Ngọc Linh từ hạt. Hạt được xử lý ngâm trong dung dịch GA_3 100 ppm trong vòng 45 phút có khả năng phá ngủ nghỉ và tăng tỷ lệ nảy mầm của hạt.

5. Hoàn thiện một số biện pháp kỹ thuật trồng chính. Mật độ, khoảng cách trồng 25 x 30 cm (ứng với mật độ 130.000 cây/ha); liều lượng phân hữu

cơ vi sinh: bón 80 tấn mùn núi (nền)+ 15.000 kg Phân hữu cơ vi sinh ủ hoai+ 20 P_2O_5 + 80 K_2O/ha là thích hợp đối với cây giống sâm Ngọc Linh năm thứ 3.

4.2. Đề nghị

Tiếp tục trồng cây thử nghiệm trong điều kiện tự nhiên để đánh giá sinh trưởng và phát triển cây giống sâm Ngọc Linh trong điều kiện sản xuất.

Tiếp tục tối ưu hóa giá thể, chế độ dinh dưỡng và hoàn thiện kỹ thuật chăm sóc cây giống nuôi cấy mô ngoài vườn ươm để phục vụ tốt cho sản xuất.

Cần tiếp tục theo dõi các công thức phân bón hữu cơ vi sinh đã đề xuất cho cây sâm Ngọc Linh từ năm thứ 4 đến năm thứ 7 để đánh giá năng suất thực thu và hiệu quả kinh tế giữa các công thức trước khi khuyến cáo trong sản xuất.

DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH KHOA HỌC ĐÃ CÔNG BỐ CÓ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. Khuất Thị Mai Lương, Lê Hà Minh, Đinh Văn Phê, Lê Hùng Lĩnh (2019), "Nghiên cứu lưu giữ các mẫu giống sâm Việt Nam bằng công nghệ nuôi cấy mô tế bào", *Tạp chí Khoa học Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam,* 11(108), tr.158-163.

2. Khuất Thị Mai Lương, Nguyễn Thị Minh Nguyệt, Chu Đức Hà,Trần Thị Hoa Mỹ, Đinh Văn Phê, Lê Hùng Lĩnh (2018), "Thiết kế và xây dựng bộ chỉ thị phân tử phục vụ kiểm định và nghiên cứu di truyền sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis*)", *Tạp chí Khoa học Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam,* 11(96), tr.158-163.

3. Chu Đức Hà, Lê Hùng Lĩnh, Đinh Văn Phê, Lê Thị Ngọc Quỳnh, Hoàng Thanh Tùng, Dương Tấn Nhựt, Đinh Xuân Tú, Phạm Xuân Hội (2019), "Bộ chỉ thị hình thái đặc trưng cho nhận dạng sâm Hàn Quốc (*Panax ginseng C.A.Mey*)", *Tạp chí Khoa học Công nghệ Việt Nam,* 12(729), tr.53-56.

4. Đinh Văn Phê, Lê Thị Cẩm Nhung, Chu Đức Hà, Nguyễn Văn Nam, Lê Hùng Lĩnh (2020), "Tình hình phát triển cây giống sâm Ngọc Linh tại Quảng Nam và Kon Tum", *Tạp chí Khoa học Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam,* 3(112), tr.122-126.

5. Đinh Văn Phê, Nguyễn Viết Trụ, Chu Đức Hà, La Việt Hồng, Nguyễn Văn Nam, Lê Hùng Lĩnh (2021), "Nghiên cứu ảnh hưởng của một số biện pháp kỹ thuật đến khả năng sinh trưởng và phát triển của quần thể cây sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis)* tại Kon Tum*", Tạp chí Khoa học Công nghệ Đại học Thái Nguyên,* 226(14), tr.238-244.

6. Đinh Văn Phê, Chu Đức Hà, Khuất Thị Mai Lương, Lê Thị Ngọc Quỳnh,Phạm Phương Thu, Hà Minh Tâm, Lê Hùng Lĩnh (2021), "Hình thái và hoạt tính sinh học của các giống sâm *Panax ginseng* nổi tiếng ở Hàn Quốc và Việt Nam", *Tạp chí Khoa học Công nghệ Việt Nam*, 8(729), tr.44-47.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tiếng Việt

1 Hoàng Xuân Chiến, Ngô Thanh Tài, Nguyễn Bá Trực, Trần Xuân Tình, Lâm Bích Thảo, Trần Công Luận, Dương Tấn Nhựt (2011), "Nghiên cứu một số yếu tố tạo củ sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha *et* Grushv.) *in vitro* và xác định hàm lượng saponin trong cây tạo từ củ trồng thử nghiệm ở núi Ngọc Linh", *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 9(3), tr.325-339.

2 Trần Văn Chính, Cao Việt Hà, Đỗ Nguyên Hải, Hoàng Văn Mùa, Nguyễn Hữu Thành và Nguyễn Xuân Thành (2010), *Giáo trình Thổ nhưỡng học,Trường Đại học Nông nghiệp I* Hà Nội.

3 Nguyễn Thượng Dong, Trần Công Luận và Nguyễn Thị Thu Hương (2007), *Sâm Việt Nam và một số cây thuốc họ nhân sâm*, Nxb Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội, tr.69-95.

4 Nguyễn Ngọc Dung (1995), *Nhân giống sâm Ngọc Linh (Panax vietnamensis* Ha et Grushv*) bằng con đường sinh học*, Nxb Nông nghiệp, Hà Nội, tr.43-100.

5 Phan Công Du, Nguyễn Lê Quốc Hùng, Hoàng Thanh Tùng, Đỗ Mạnh Cường, Lê Xuân Thám, Dương Tấn Nhựt (2019), "Nghiên cứu điều kiện nuôi trồng cây sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) in vitro ở điều kiện nhà kính và tự nhiên tại Lâm Đồng", *Tạp chí Khoa học Công nghệ Việt Nam*, 61(12),tr.26-31.

6 Vũ Đình Duy, Trần Thị Việt Thanh, Phan Kế Lộc, Nguyễn Minh Tâm, Nguyễn Thị Thanh Hương, NguyễnThị Hiên, Phan Kế Long (2020), "Sử dụng vùng gen ITS-rDNA và Matk để xác định loài thuộc chi *Panax* ở vùng núi Phu XaiLeng, Kỳ Sơn, Nghệ

An”,*Tạp chí Công nghệ Sinh học*,18(1), tr.75-85.

7 Nguyễn Văn Đạt, Trần Thị Phương Anh (2013), “Bước đầu nghiên cứu xây dựng khóa định loại các chi trong họ Ngũ gia bì (*Araliaceae*) ở Việt Nam”. *Hội nghị khoa học toàn quốc về Sinh thái và tài nguyên sinh vật lần thứ 5*, tr.44-51.

8 Đề án phát triển sâm Ngọc Linh và các cây dược liệu trên địa bàn tỉnh Quang Nam giai đoạn 2022-2030.

9 Vũ Thị Hiền (2018), *Nghiên cứu quá trình tái sinh và nhân giống in vitro cây sâm Ngọc Linh (Panax vietnamensis Ha et Grushv.) bằng kỹ thuật nuôi cấy lóp mỏng tế bào*, Luận án tiến sĩ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. TP. Hồ Chí Minh.

10 Trương Thị Hồng Hải, Nguyễn Đình Thành, Nguyễn Thị Kim Cúc, Đặng Thanh Long, Hồ Thị Huyền Trân, Nguyễn Mạnh Tuấn, Trịnh Minh Quý, Võ Văn Tin, Hồ Văn Đoàn (2019), “Nghiên cứu ảnh hưởng của một số nhân tố đến khả năng mọc mầm của hạt giống, sinh trưởng và phát triển cây giống sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.)”, *Tạp chí Nông nghiệp và phát triển nông thôn*, tr.36-43.

11 Nguyễn Bá Hoạt (2004), “Báo cáo tổng kết đề tài” *Nghiên cứu trồng và quy hoạch cây sâm Ngọc Linh tại Kon Tum năm 2001*, Sở KHCN Kon Tum, 48 tr.

12 Nguyễn Bá Hoạt, Nguyễn Duy Thuần, Ngô Quốc Luật, Nguyễn Văn Thuận, Phạm Văn Ý,Nguyễn Thị Tuấn, Nguyễn Thị Minh Thư, Nguyễn Thị Hòa, Lê Khúc Hạo, Phạm Thị Lượt, Trần Toàn, Nguyễn Văn Chiều (2005),Trong sách: “Kỹ thuật trồng, sử dụng và chế biến cây thuốc”, (Chủ biên) Nguyễn Bá Hoạt, Nguyễn

Duy Thuần, Nxb Nông nghiệp, Hà Nội, tr.203 - 211.

13 Nguyễn Bá Hoạt (2010), *Nghiên cứu phát triển sâm Việt Nam (Panax vietnamensis* Ha et Grushv., họ Araliaceae) *nhằm sản xuất nguyên liệu làm thuốc*, Bộ Y tế.

14 Phạm Hoàng Hộ (1970), *Cây cỏ miền Nam Việt Nam*, Trung tâm học liệu thành phố Hồ Chí Minh.

15 Phạm Hoàng Hộ (2000), *Cây cỏ Việt Nam*, tập 2, Nxb Trẻ, Tp. Hồ Chí Minh, tr.515-516.

16 Trịnh Thị Hương, Phạm Bích Ngọc, Chu Hoàng Hà, Dương Tấn Nhựt (2016), "Đánh giá khả năng sinh trưởng và tích lũy saponin của rễ bất định và rễ tơ cây sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.)", *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 14(2), tr.231-236.

17 Trần Thị Kim Hương, Hà Thị Thanh Bình, Nguyễn Mai Thơm, Đào Thu Huế (2019), "Nghiên cứu ảnh hưởng của một số biện pháp kỹ thuật trồng đến khả năng sinh trưởng, phát triển và năng suất của cây sâm Lai Châu (*Panax vietnamensis var fuscidicus* K. Komatsu, S. Zhu & S.Q. Cai) tại Lai Châu", *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*,17(7), tr.588-593.

18 Trần Thị Liên (2011), *Nghiên cứu một số biện pháp kỹ thuật góp phần xây dựng quy trình sản xuất giống và dược liệu cây sâm Việt Nam* (*Panax vietnamensis* Ha *et* Grushv), Luận án tiến sĩ Nông nghiệp, Đại học Nông nghiệp Hà Nội, 176 tr.

19 Lê Hùng Lĩnh, Đinh Xuân Tú (2017a), "Nghiên cứu quá trình phát sinh phôi soma từ mô củ cây sâm Vũ Diệp (*Panax bipinnatifidus Seem.*)", *Tạp chí Khoa học Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam*, 2 (75), tr.72-76.

20 Lê Hùng Lĩnh, Đinh Xuân Tú (2017b), "Nghiên cứu quá trình tạo phôi vô tính từ mô sẹo trong nuôi cấy in vitro sâm Lai Châu (*Panax vietnamensis var. Fuscidiscus*)", *Tạp chí Khoa học Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam*, 2(75), tr.76-80.

21 Phan Kế Long, Trần Thị Việt Thanh, Nguyễn Thiên Tạo, Phan Kế Lộc, Nguyễn Tư Lệnh, Nguyễn Tiến Lâm, Đặng Xuân Minh (2014 a), "Đặc điểmhình thái và phân tử của *Panax sp*. (*Araliaceae*) thu ở núi Phu Xai Lai Leng, tỉnh Nghệ An, Việt Nam", *Tạp chí Sinh học*, 36(4), tr.494-499.

22 Phan Kế Long, Vũ Đình Duy, Phan Kế Lộc, Nguyễn Giang Sơn, Nguyễn Thị Phương Trang, Lê Thị Mai Linh, Lê Thanh Sơn (2014b), "Mối quan hệ di truyền của các mẫu sâm thu ở Lai Châu trên cơ sở phân tích trình tự nucleotide vùng *matK* và ITS - rDNA", *Tạp chí Công nghệ Sinh học,*12(2), tr.327-337.

23 Đỗ Tất Lợi (1999), *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*, Nxb Y học, Hà Nôi, tr.804-810.

24 Nguyễn Đăng Nghĩa, Mai Văn Quyền, Nguyễn Mạnh Chinh (2005), *Đất với cây trồng*, NxbTp.HCM.

25 Dương Tấn Nhựt, Hoàng Xuân Chiến, Nguyễn Bá Trực, Nguyễn Bá Nam, TrầnXuân Tình, Vũ Quốc Luận, Nguyễn Văn Bình, Vũ Thị Hiền, Trịnh Thị Hương, Nguyễn Cửu Thành Nhân, Lê Nữ Minh Thùy, Lý Thị Mỹ Nga, Thái Thương Hiền, Nguyễn Thành Hải (2010), "Nhân giống vô tính cây sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha *et* Grushv.)", *Tạp chí Công nghệ Sinh học,* 8 (3B), tr.1211-1219.

26 Dương Tấn Nhựt, Nguyễn Cửu Thành Nhân, Hoàng Xuân Chiến, Nguyễn Phúc Huy, Nguyễn Bá Nam, Trần Xuân Ninh, Phạm Phong Hải, Vũ

Quốc Luận, Phan Quốc Tâm, Vũ Thị Hiền, Trịnh Thị Hương, Trần Công Luận, Paek Kee Yoeup (2012), "Một số hệ thống nuôi cấy trong nghiên cứu nhân nhanh rễ bất định và rễ thứ cấp cây sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha *et* Grushv.)", *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 10(4A), tr.887-897.

27 Đặng Ngọc Phái, Nguyễn Như Chính, Nguyễn Minh Đức, Trần Thị Vi Cầm, Lê Thế Tùng, Nguyễn Minh Cang (2002), "Tình hình trồng trọt - phát triển cây sâm Việt Nam và một số kết quả nghiên cứu về cây sâm Việt Nam", *Tạp chí Y học TP Hồ Chí Minh*, 6, tr.12-18.

28 Quy hoạch phát triển sâm Ngọc Linh tỉnh Kon Tum giai đoạn 2012-2020, tầm nhìn đến 2025.

29 Sở Nông nghiệp và Phát triển nông thôn tỉnh Kon Tum, 2017. Đề án Đầu tư phát triển và chế biến dược liệu trên địa bàn tỉnh Kon Tum giai đoạn 2017 - 2020 định hướng đến 2030, tr.1-50.

30 Sở Nông nghiệp và Phát triển nông thôn tỉnh Quảng Nam, 2015. Quy hoạch, bảo tồn và phát triển cây sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha *et* Grushv.) trên địa bàn huyện Nam Trà My tỉnh Quảng Nam giai đoan 2014-2020, tr.1-51.

31 Nguyễn Thị Tâm, Nguyễn Phú Tâm, Vũ Thị Hạnh Nguyên, Nguyễn Khắc Hưng, Chu Nhật Huy, Phạm Bích Ngọc, Chu Hoàng Hà, Phí Quyết Tiến (2018), "Phân lập, sang lọc vi khuẩn nội sinh có khả năng sinh tổng hợp β-glucosidase trong cây sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis*)",*Tạp chí Sinh học*, 40(2), tr.153-161.

32 Trần Hữu Khánh Tân, Trần Thị Liên, Hoàng Diệu Linh,Nguyễn Văn Tâm (2020), "Nghiên cứu một số kỹ thuật canh tác để cải thiện chất lượng cây giống sâm Ngọc Linh (*Panax Vietnamensis*)", *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam* 7(116),

tr.146- 151.

33 Hoàng Minh Tấn, Nguyễn Quang Thạch (1996), *Sinh lý thực vật*, Nxb Nông nghiệp, Hà Nội, tr.142 -151.

34 Nguyễn Tập (2005), "Các loài thuộc chi *Panax L.* ở Việt Nam", *Tạp chí dược liệu*, 3(10), tr.71-76.

35 Nguyễn Tập, Phạm Thanh Huyền, Lê Thanh Sơn, Ngô Đức Phương, Võ Văn Trại, Đinh Đoàn Long, Hoàng Thị Hòa (2007), "Sử dụng chỉ thị ADN (RAPD - PCR) trong nghiên cứu đa dạng di truyền và góp phần phân loại một số loài cây thuốc định hướng công tác bảo tồn và tiêu chuẩn hóa dược liệu ở Việt Nam". *Hội nghị Dược liệu toàn quốc lần thứ hai*, tr.288-301.

36 Nguyễn Quang Thạch và Bùi Chí Bửu (2021), *Giáo trình kỹ thuật di truyền nguyên lý và ứng dụng*, Nxb Học viện Nông nghiệp, Hà Nội

37 Nguyễn Thị Phương Trang, Lê Thanh Sơn, Nguyễn Giang Sơn, Phan Kế Long (2011),"Phát hiện về một loài sâm mới *Panax* sp. *(Araliaceae*) ở Việt Nam", *Tạp chí Dược học*, 10, tr.59-63.

38 Nguyễn Thị Phương Trang, Lê Thanh Sơn, Nguyễn Giang Sơn, Phan Kế Long (2011), "Mối quan hệ di truyền của sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha & Grushv., 1985) với các loài trong chi *Panax", Hội thảo quốc gia về Sinh thái và Tài nguyên sinh vật lần thứ 4*, Nxb Nông nghiệp, Hà Nội, tr. 955-959.

39 Vũ Huyền Trang, Hoàng Đăng Hiếu, Chu Hoàng Hà (2013), "Nghiên cứu xây dựng mã vạch DNA cho việc phân loại nhận dạng cây sâm Ngọc Linh *Panax vietnammensis* Ha et Grushv.), *Hội nghị khoa học công nghệ sinh học toàn quốc*, tr.1100-1104.

40 Nguyễn Bảo Triệu, Nguyễn Thanh Tùng, Trương Thị Bích Phượng

(2013), "Nuôi cấy *invitro* sâm Ngọc Linh (*Panax vietnammensis* Ha *et* Grushv.)", *Tạp chí Khoa học* ,Đại học Huế, 79(1), tr.107-115.

41 Mai Trường, Trần Thị Ngọc Hà, Phan Tường Lộc, Lê Tấn Đức, Trần Trọng Tuấn, Đỗ Đăng Giáp, Bùi Đình Thạch, Phạm Đức Trí, Nguyễn Đức Minh Hùng, Nguyễn Thị Thanh, Nguyễn Văn Kết, Trần Công Luận, Nguyễn Hữu Hổ (2013), "Nghiên cứu nuôi cấy mô sẹo có khả năng sinh phôi và mô phôi soma sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha *et* Grushv.)", *Tạp chí Sinh học*, 35 (3SE), tr.145-157.

42 Mai Trường, Trần Thị Ngọc Hà, Trần Trọng Tuấn, Phan Tường Lộc, Đỗ Đăng Giáp, Bùi Đình Thạch, Nguyễn Thị Ngọc Hân, Phạm Đức Trí, Lê Tấn Đức, Nguyễn Đức Minh Hùng, Nguyễn Văn Kết, Nguyễn Hữu Hổ (2014), "Tạo và nhân phôi soma sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha *et* Grushv.) trong môi trường lỏng", *Tạp chí Khoa học và Phát triển*, 7(12), tr.1058-1095.

43 Phạm Quang Tuyến, Nguyễn Bá Triệu và Trần Thị Kim Hương (2016 a), "Kết quả nghiên cứu nhân giống nhằm bảo tồn cây sâm Lai Châu(*Panax vietnamensis var. fuscidiscus*) tại Mường Tè", *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*, 23, tr.108-112.

44 Phạm Quang Tuyến, Nguyễn Minh Đức, Khương Thị Bích, Nguyễn Thái Dương, Nguyễn Trường Khoa, Bùi Thanh Tân, Nguyễn Thị Hoài Anh, Trịnh Ngọc Bon, Trần Thị Kim Hương, Trần Đăng Khánh, Khuất Hữu Trung (2018), "Đánh giá đa dạng di truyền một số mẫu giống sâm thu thập tại Lai Châu", *Tạp chí Khoa học Công nghệ Việt Nam*, 60(2), tr.27-31.

45 Đinh Xuân Tú, Khuất Thị Mai Lương, Nguyễn Hoàng Nam, Lê Hùng Lĩnh (2016), "Nghiên cứu các yếu tố ảnh hưởng đến sự hình

thành mô sẹo trong nuôi cấy in vitro cây sâm Lai Châu (*Panax vietnamensis* var. Fuscidiscus)", *Tạp chí Khoa học Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam*,11(72), tr.87 - 92.

46 Đinh Xuân Tú, Nguyễn Phúc Quân, Vũ Duy Dũng, Nguyễn Minh Lý, Ngô Thị Hoàng Vân (2021), "Đánh giá chất lượng và quá trình nảy mầm của hạt giống sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis)",Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*, 19(2), tr.185-194.

47 Ủy ban nhân dân huyện Tu Mơ Rông, 2016, Đề án bảo tồn và phát triển cây sâm Ngọc Linh và các cây Dược liệu trên địa bàn huyện giai đoạn 2016-2020, định hướng đến năm 2025.

48 Ủy ban nhân dân huyện Nam Trà My, 2013, Kết quả bảo tồn và phát triển sâm Ngọc Linh, giai đoạn 2013-2020.

Tiếng anh

49 Asaka Y., Saito H., Yoshikawa T., Sakamoto K., Furuya T.(1993), *Biotransformation of 18 beta - glycyrrhetinic acid by ginseng hairy root culture*, Phytochemistry, 34, pp.1049 -1052.

50 Baeg IH., So SH (2013),*World market for ginseng and ginseng (Korea)*, J Ginseng Res, 37(1), pp.1-7.

51 Bai D, Brandle J, Reeleder R (1997), *Genetic diversity in North American ginseng (Panax quinquefolius L.) grown in Ontario detected by RAPD analysis*, Genome, 40(1), pp.111-115.

52 Bang, K. H., Chung, J. W., Kim, Y. C., Cho, I. H., Kim, J. U., Shin, M. R. and Kim, H. S. (2013). *Analysis of genetic polymorphism of Korean ginseng cultivars and breeding lines using RAPD markers*, The Journal of the Korean Society of International Agriculture.

53 Baskin, Jerry M. And Baskin, Carol C. (2004), *A classification system for seed dormancy*, Seed science research, 14(1), pp.1-16.

54 Baranov, A. (1966), *Recent advances in our knowledge of the morphology, cultivation and uses of ginseng (Panax ginseng CA Meyer)*, Economic Botany, 20(4), pp.403-406.

55 Bon, T. N. (2019), *Panax sp. in Tuyen Quang, North Vietnam A Potential Plant for Poverty Reduction*, Asian Journal of Research in Botany, pp.1-10.

56 Carroll C. and Apsley D. (2003), *Growing American Ginseng in Ohio Maintenance, Disease Control, and Pest Management*,The Ohio State University.

57 Chang W.C. and Hsing Y.I. (1980), *In vitro flowering of embryoids deriverd from mature root callus of ginseng* (*Panax ginseng*), Nature, 284, pp.341-342.

58 Choi, H. I., Kim, N. H., Kim, J. H., Choi, B. S., Ahn, I. O., Lee, J. S., & Yang, T. J. (2011), *Development of reproducible EST-derived SSR markers and assessment of genetic diversity in Panax ginseng cultivars and related species*, Journal of Ginseng Research, 35(4), pp.399.

59 Choi Y.E. and Soh W.Y.(1994), *Origin of somatic embryo induced from cotyledons of zygotic embryos at various developmental stages of ginseng*, Journal of Plant Biology, 37, pp.365-370.

60 Claire K., Le Gal N., Monteiro M., Dommes J., Gaspar T. (2000), *Somatic embryogenesis of Panax ginseng in liquid cultures: a role for polyamines and their metabolic pathways*, Plant Growth Regulation, 31(3), pp.209-214.

61 Diao, Y., Lin, X. M., Liao, C. L., Tang, C. Z., Chen, Z. J., & Hu, Z. L.

(2009), *Authentication of Panax ginseng from its adulterants by PCR-RFLP and ARMS*, Planta medica, 75(05), pp.557-560.

62 Dussert, S., Verdeil, J. L.and Buffard-Morel, J. (1995), *Specific nutrient uptake during initiation of somatic embryogenesis in coconut calluses*, Plant science, 111(2), pp.229-236.

63 Duc, N. M., Kasai, R., Yamasaki, K., Nham, N. T. and Tanaka, O. (1999), *New dammarane saponins from Vietnamese ginseng*. *In Studies in plant science*, 6, pp.77-82

64 Fabio S. (2000), *Panax Ginseng: standardization and biological activity, Biologically active natural products*: Pharmaceuticals (Eds. Stephen J. And Horace G., CRC Press. London, pp. 209-233.

65 Fernandez-Moriano, C., Gonzalez-Burgos, E., Iglesias, I., Lozano, R. and Gómez-Serranillos, M. P. (2017), *Evaluation of the adaptogenic potential exerted by ginsenosides Rb1 and Rg1 against oxidative stress-mediated neurotoxicity in an in vitro neuronal model*, PLoS One, 12(8), e0182933

66 Fisichella, M., Silvi, E. And Morini, S. (2000), *Regeneration of somatic embryos and roots from quince leaves cultured on media with different macroelement composition.* Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 63(2), pp.101-107.

67 Fushimi, H., Komatsu, K., Isobe, M. And Namba, T. (1997), *Application of PCR-RFLP and MASA analyses on 18S ribosomal RNA gene sequence for the identification of three Ginseng drugs*, Biological and pharmaceutical bulletin, 20(7), pp.765-769.

68 Gorpenchenko T.Y., Kiselev K.V., Bulgakov V.P., Tchernoded G.K., Bragina E.A., Khodakovskaya M.V., Koren O.G., Batygina T.B., Zhuravlev Y.N. (2006), *The Agrobacterium rhizogenes rolC-*

gene-induced somatic embryogenesis and shoot organogenesis in Panax ginseng transformed calluses, Planta, 223, pp. 457-467.

69 Grubbs, H. J.and Case, M. A. (2004). *Allozyme variation in American ginseng (Panax quinquefolius L.):Variation, breeding system, and implications for current conservation practice*,Conservation Genetics, 5(1), pp.13-23.

70 Hovius, MHY (1997), *Spring seeding of American ginseng using temperature and growth regulators to overcome dormancy (Panax quinquefolium)*. [MSc thesis]. Guelph (ON):University of Guelph. 255p.

71 Hou, J.P. (1978), T*he Myth and Truth about Ginseng. A.S.Barnes and Co. Inc*., New York, pp.45-47.

72 Hong C. P., Lee S. J., Park J. Y., Plaha P., Park Y. S., Lee Y. K., Choi J. E., Kim K. Y., Lee J. H., Lee J., Jin H., Choi S. R., Lim Y. P. (2004), *Construction of a BAC library of Korean ginseng and initial analysis of BAC-end sequences*, MolGen Genomics, 271(6), pp.709-716.

73 Ho, V. H. and Pham, Q. T. (2020), *Development of Ngoc Linh ginseng in Nam Tra My district*, In E3S Web of Conferences 175, p. 06001. EDP Sciences

74 H.T. Dung, I.V. Grushvitzky (1985), *A new species of the genus Panax (Araliaceae) from Vietnam*, Botanicheskii zhurnal,70, pp.518-522.

75 Jayakodi, M., Choi, B. S., Lee, S. C., Kim, N. H., Park, J. Y., Jang, W. and Yang, T. J. (2018), *Ginseng Genome Database: an open-access platform for genomics of Panax ginseng*, BMC plant biology, 18(1), pp.1-7.

76 Jo, I. H., Kim, Y. C., Kim, D. H., Kim, K. H., Hyun, T. K., Ryu, H., & Bang, K. H. (2017), *Applications of molecular markers in the discrimination of Panax species and Korean ginseng cultivars (Panax ginseng)*, J Ginseng Res, 41(4), pp.444-449. doi: 10.1016/j.jgr.2016.09.001

77 John, TA. and Dean, Louttit. (1995), *Stratification of American ginseng seed: embryo growth and temperature*, Journal of Ginseng Research,19(2), pp.171-174.

78 Jun Yeon Won, Jae Seong Jo and Hyun Ho Kim (1988), *Studies on the Germination of Korean ginseng (Panax ginseng C.A. Meyer)*,J. Korean Soc. Crop. Sci, 31(1), pp.59-63.

79 Kim, O. T., Bang, K. H., In, D. S., Lee, J. W., Kim, Y. C., Shin, Y. S. and Seong, N. S. (2007), *Molecular authentication of ginseng cultivars by comparison of internal transcribed spacer and 5.8 S rDNA sequences*, Plant Biotechnology Reports, 1(3), pp.163-167..

80 Kim C., Choo G.C., Cho H.S. and Lim J.T. (2015), *Soil properties of cultivation sites for mountain-cultivated ginseng at local level*, Ginseng Res,39(1), pp.76-80.

81 Kim J., Jo B.H., Lee K.L., Yoon E.S., Ryu G.H. and Chung K.W. (2007), *Identification of new microsatellite markers in Panax ginseng*, Molecules and Cells, 24(1), pp.60-68.

82 Kim, N.H., Choi H.I, Ahn. I.O, Yang T.J. (2012b), *EST-SSR Marker Sets for Practical Authentication of All Nine Registered Ginseng Cultivars in Korea*, J.Ginseng Res, 36(3), pp.298-307.

83 Kim N.H., Choi H.I, Kim K.H, Jang W and Yang T.J. (2014), *Evidence of genome duplication revealed by sequence analysis of multi-loci expressed sequence tag-simple sequence repeat bands in Panax*

ginseng Meyer, *J. Ginseng Res*, 38(2), pp.130-135.

84 Kim, Y. H., Ahn, I. O., Khan, A. L., Kamran, M., Waqas, M., Lee, J. S., and Lee, I. J. (2014), *Regulation of endogenous gibberellins and abscisic acid levels during different seed collection periods in Panax ginseng*,Horticulture, Environment, and Biotechnology, 55(3), pp.166-174.

85 Kwon, W. S., Min, B. H., and Lee, J. M. (1998), Separation of cytokinins in ginseng seeds during after-ripening by HPLC, Journal of the Korean Society for Horticultural Science (Korea Republic).

86 Kwon, W. S., Lee, J. H., & Lee, M. G. (2001), *Optimum chilling terms for germination of the dehisced ginseng (Panax ginseng CA Meyer) seed*, J Ginseng Res, 25(4), pp.167-170.

87 Kwon, J. H., Cheon, H. C. and Yang, D. C. (2003), *Production of ginsenoside in callus of ginseng hairy roots*, Journal of Ginseng Research, *27*(2),pp.78-85.

88 Langhansova, L., Marsik, P.and Vanek, T. (2012), *Regulation of tissue differentiation by plant growth regulators on tTCLs of Panax ginseng adventitious roots*, Industrial Crops and Products, 35(1), pp.154-159.

89 Lee, F.C. 1992. Facts about ginseng: *The elixir of life. Hollym Int. Corp*. New Jersey,104p.

90 Lee J.C., Cheon S.K., Kim Y.T. and Jo J.S. (1980), *Studies on the effect of shading materials on the temperature, light intensity, photosynthesis and the root growth of the Korean ginseng (Panax ginseng C.A. Meyer)*, J. Korean Soc. Crop. Sci., 25, pp.91-98.

91 Lee M.B., Lee B.S., Oh M.Y., Hong H.P., Hong S.H. (1981), *Study on*

adaptability of ginseng cultivation in the forest, Res. Rep. Kor. For. Res, 28, pp.227-239.

92 Lee J.C., Choi J.H., Cheon S. K., LeeC.H. and Jo J. S. (1983), *Studies on the optimum light Intensity for growth of Panax ginseng*, J. Korean Soc. Crop. Sci, 28(4), pp. 497-503.

93 Lee JC, Byen JS and Proctor JTA. (1986), *Ginseng seed dormancy is affected by temperature and gibberellic acid*, Korea Journal of Crop Science,3, pp.220-225

94 Lee, J. S., Lee, S. S., Lee, J. H.and Ahn, I. O. (2008), *Effect of seed size and cultivars on the ratio of seed coat dehiscence and seedling performance in Panax ginseng*, Journal of Ginseng Research, 32(3), pp.257-263.

95 Lee, J. G., Seong, E. S., Goh, E. J., Kim, N. Y.and Yu, C. Y. (2009), *Factors involved in masspropagation of ginseng (Panax ginseng CA Meyer) using bioreactor system*, Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry, 52(5), pp.466-471.

96 Lee J.W., Kim Y.C., Jo I.H., Seo A.Y., Lee J.H., Kim O.T., Hyun D.Y., Cha S.W., Bang K.H. and Cho J.H. (2011), *Development of an ISSR-Derived SCAR Marker in Korean Ginseng Cultivars (Panax ginseng C.A. Meyer*), J.Ginseng Res, 35(1), pp.52-59.

97 Lee, J. W., Kim, Y. C., Kim, J. U., Jo, I. H., Kim, K. H., Kim, D. H. (2016), *Effects of gibberellic acid and alternating temperature on breaking seed dormancy of Panax ginseng CA Meyer*, Korean Journal of Medicinal Crop Science, 24(4), pp.284-293.

98 Lee, Y. Y., Kim, S. D., Park, S. C. and Rhee, M. H. (2021), *Panax ginseng: inflammation, platelet aggregation, thrombus formation, and atherosclerosis crosstalk*, Journal of Ginseng Research, 46,

pp.54-61.

99 Li, T.S.C. (1995), *Asian and American ginseng a review*, Hort. Tech, 5(1), pp.27-43.

100 Li, T. S., Bedford, K. E., and Sholberg, P. L. (2000), *Improved germination of American ginseng seeds under controlled environments*, HortTechnology, 10(1), pp.131-135.

101 Li, J., Wang, S., Jing, Y., Wang, L., Zhou, S., (2013), *A modified CTAB Protocol for plants DNA extraction*, Chinese Bull Bot, 48, pp.1-7.

102 Mahady G.B., Gyllenhaal C, Fong H.H.S and Farnsworth N.R.(2000), *Ginseng: a review of safety and efficacy*. Nutr Clin Care,3(2), pp.90-101.

103 Ma, K. H., Dixit, A.; Kim, Y. C., Lee, D. Y,Kim, T. S,Cho, E. G,Park, Y. J (2007), *Development and characterization of new microsatellite markers for ginseng (Panax ginseng CA Meyer)*, Conservation Genetics, 8, pp.1507-1509.

104 Mathur A., Mathur A.K., Sangwan R.S. and Uniyal G.C. (2003) *Differential morphogenetic responses, ginsenoside metabolism and RAPD patterns of three Panax species*, Genetic Resources and Crop Evolution,50, pp.245-252.

105 Morgante, M., Pfeiffer, A., Jurman, I., Paglia. G., Olivieri, A. M., (1998), *PCR analysis of SSR Polymorphisms in plants using agarose gel. In: Karp A, Isaac PG, Ingram. DS (eds) Molecular tools for screening biodiversity*: Plant and animals. *Springer Netherlands*, pp.206-207.

106 Ngan F, Shaw P, But P, Wang J (1999), *Molecular authentication of Panax species*, Phytochemistry,50, pp.787-791.

107 Nguyen, B., Kim, K., Kim, Y. C., Lee, S. C., Shin, J. E., Lee, J. And

Yang, T. J. (2015), *The complete chloroplast genome sequence of Panax vietnamensis Ha et Grushv* (Araliaceae), Mitochondrial DNA Part A, 28(1), pp.85-86.

108 Nhut, D. T., Huy, N. P., Tai, N. T., Nam, N. B., Luan, V. Q., Hien, V. T. and Luan, T. C. (2015), *Light-emitting diodes and their potential in callus growth, plantlet development and saponin accumulation during somatic embryogenesis of Panax vietnamensis Ha et Grushv*, Biotechnology and Biotechnological Equipment, 29(2), pp.299-308.

109 Nhut D.T., Nga L.T.M., Chien H.X., Huy N.P. (2012), *Morphogenesis of in vitro main root transverse thin cell layers of Vietnamese ginseng (Panax vietnamensis Ha et Grushv.*), African Journal of Biotechnology,11(23), pp. 6274-6289.

110 Oh S.H. (2004), *A ginseng saponin metabolite-induced apoptosis in HepG2 cells involves a mitochondria-mediated pathway and its downstream caspase-8 activation and Bid cleavage*, Toxicology and Applied Pharmacology,194 (3), pp. 221-229.

111 Olivier A.N.I., Ouzennou H., Dzaringa J.P. and Bibang G.R. (2005), *Growth of eight-year-old American ginseng in a red maple forest as influenced by lime and organic fertilizer application*, In AFTA Conference Proceedings, pp.1-10.

112 Omokolo, N., Boudjeko, T., and Takadong, J. T. (2003), *In vitro tuberization of Xanthosoma sagittifolium L. Schott: effects of phytohormones, sucrose, nitrogen and photoperiod*, Scientia horticulturae, 98(4), pp.337-345.

113 Parmenter, G., and Littlejohn, R. (2000), *Effect of shade on growth and*

photosynthesis of Panax ginseng, New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science, 28(4), pp.255-269.

114 Persons, W.S., Davis, J.M. (2007), *Growing and marketing ginseng, goldenseal and other woodland medicinals*. Bright Mountain Books, Asheville, N.C.

115 Persons, W.S. (1994), *American ginseng*: green gold, Rev. ed. Ed. Bright Mountain Books, Asheville, N.C

116 Pierik, R. L. M. (1987), *I vitro culture of higher plants as a tool in the propagation of horticultural crops*. In International Symposium on Propagation of Ornamental Plants, 226, pp.25-40.

117 Piao, X. C., Chakrabarty, D., Hahn, E. J. and Paek, K. Y. (2003), *A simple method for mass production of potato microtubers using a bioreactor system*, *Current Science*, 84(8), pp.1129-1132.

118 Poornima, G. N., and Ravishankar, R. V. (2007), *In vitro propagation of wild yams, Dioscorea oppositifolia (Linn) and Dioscorea pentaphylla (Linn)*, African Journal of Biotechnology, 6(20). pp.2348-2352.

119 Proctor, JTA.and Bailey, WG. (1987), *Ginseng: industry, botany, and culture*, Horticultural Reviews, 9, pp.187-236.

120 Rozen, S., Skaletsky, H., (2000), *Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers*, Methods mol Biol, 132, pp.365-386.

121 Sharma, S. K. and Pandit, M. K. (2009), *A new species of panax L.(Araliaceae) from Sikkim himalaya, India*, Systematic botany, 34(2), pp.434-438

122 Shao, A. J., Li, X., Huang, L. Q., Wei, J. H.and Lin, S. F. (2004), *Genetic analysis of cultivated ginseng population with the*

Assistance of RAPD technology, China Journal of Chinese Materia Medica,29, pp.1033-1036.

123 Shim Y.H., Choi J.H., Park C.D., Lim C.J., Cho J.H., and Kim H.J.(2003), *Molecular Differentiation of Panax Species by RAPD Analysis*, Arch Pharm Res, 26(8), pp.601-605.

124 Shoyama, Y., Zhu, X. X., Nakai, R., Shiraishi, S. And Kohda, H. (1997), *Micropropagation of Panax notoginseng bysomatic embryogenesis and RAPD analysis of regeneratedplantlets*, Plant Cell Reports, 16(7), pp.450-453.

125 Smallfield, B.M. (1997), *Ginseng production in Asia. IN: Ginseng: The international industry and prospects for New Zealand*. *NZ Inst.* Crop and Food Res. Hamilton, pp.1213.

126 Sun, H., Wang, H. T., Kwon, W. S., Kim, Y. J., In, J. G. and Yang, D. C. (2011), *A simple and rapid technique for the authentication of the ginseng cultivar, Yunpoong, using an SNP marker in a large sample of ginseng leaves*, Gene, 487(1), pp.75-79.

127 Suh S.O., Kroh M., Kim N.R., Joh Y.G. and Cho M.Y. (2002), *Effects of red ginseng upon postoperative immunity and survival in patients with stage III gastric cancer*, American Journal of Chinese Medicine,30(4), pp.483- 494.

128 Tirajoh A., Kyung T.S. and Punja Z.K.(1998), *Somatic embryogenesis and plantlet regeneration in american ginseng (Panax quinquefolium L.)*, In Vitro Cell. Dev. Biol, 34, pp.203-211.

129 Trang, N. T., Mai, N. T. And Zhuravlev, Y. N. (2017), *Application of DNA barcoding to authentic Panax vietnamensis*, American Academic Scientific Research Journal for Engineering Technology and Sciences, 29(1), pp.60-67.

130 Trieu, L. N., Mien, N. T., Van Tien, T., Van Ket, N. and Van Duy, N. (2016), *Genetic diversity of Panax stipuleanatus Tsai in North Vietnam detected by inter simple sequence repeat (ISSR) markers*, Biotechnology and Biotechnological Equipment, 30(3), pp.506-511.

131 Um, J. Y., Chung, H. S., Kim, M. S., NA, H. J., KWON, H. J., KIM, J. J., and KIM, H. M. (2001), M*olecular authentication of Panax ginseng species by RAPD analysis and PCR-RFLP*, Biological and Pharmaceutical Bulletin, 24(8), pp.872-875.

132 Vacin, E. F.and Went, F. W. (1949), *Some pH changes in nutrient solutions*, Botanical Gazette, 110(4), pp.605-613.

133 Van Duy, N., Le Ngoc, T., Chinh, N. D. and Van Tien, T. (2016), *A new variety of Panax (Araliaceae) from Lam Vien Plateau, Vietnam and its molecular evidence*, Phytotaxa, 277(1), pp.47-58.

134 Van Dan, N., Ramchiary, N., Choi, S. R., Uhm, T. S., Yang, T. J., Ahn, I. O. And Lim, Y. P. (2010), *Development and characterization of new microsatellite markers in Panax ginseng (CA Meyer) from BAC end sequences*, Conservation Genetics, 11(3), pp.1223-1225.

135 Wang, H., Wang J and Li, J. (2016), A simple real-time polymerase chain reaction (PCR)-based assay for authentication of the Chinese *Panax* ginseng cultivar Damaya from a local ginseng population. Genet. Mol. Res. 15 (2): gmr.15028801, pp.1-10. DOI http://dx.doi.org/10.4238/gmr.15028801

136 Wang, H., Sun, H., Kwon, W. S., Jin, H., and Yang, D. C. (2010), *A PCR-based SNP marker for specific authentication of Korean ginseng (Panax ginseng) cultivar "Chunpoong"*, Molecular Biology Reports, 37(2), pp.1053-1057.

137 Wheeler, D. L., Barrett, T., Benson, D. A., Bryant, S. H., Canese, K., Chetvernin, V., Church, D. M., DiCuccio, M., Edgar, R., Federhen, S., Feolo, M., Geer, L. Y., Helmberg, W., Kapustin, Y., Khovayko, O., Landsman, D., Lipman, D. J., Madden, T. L., Maglott, D. R., Miller, V., Ostell, J., Pruitt, K. D., Schuler, G. D., (2008), Database resources of the National Center for Biotechnology Information. Nucleic Acids Res, 36(Database issue), pp.13-21.

138 Won, J. Y., Jo, J. S., & Kim, H. H. (1988), *Studies on the germination of Korean ginseng (Panax ginseng CA Meyer) seed, 2. influences of temperature and seed treatment on embryo growth and germination*, Korean Journal of Crop Science, 33, pp.59-63.

139 Xiao, P., Zhu, Z., Zhang, F., Zhu, W., Chen, J., Zhang, G., Liu, G. (1987), *Ginseng research and cultiva*tion, Beijing, China: Agri. Publ. House.

140 Yamasaki, K., (2000), *Bioactive saponin from Vietnamese ginseng, Panax vietnamensis*, Pharmaceutical Biology, 38, pp.16-24.

141 Yang, D. C., Choi, H. Y., Kim, Y. H. and You, K. Y. (1997), *Effects of light on the pigment production and chloroplast development of ginseng hairy roots*, 21(1), pp.28-34.

142 Yang, D., Cheon, S., Lee, S., Yang, D.,and Kim, H (1982), *The effects of various dehiscence materials, growth regulators and fungicides on the ginseng seed*, Korean J. Ginseng Sci, 6, pp.56-66.

143 Yang Cheng-Jun, Wang Jun, Mu Li-Qiang, Li Shao-Chen, Liu Guan-Jun and Hu Chang-Qun (2008), *Development of an EST-SSR marker in Panax ginseng*, Chinese Journal of Agricultural

Biotechnology, 5(2), pp.175-181.

144 You, X.L.,Tan, X.,Dai, J.L., Li, Y.H., Choi, Y.E. (2012), *Large scale somatic embryogenesis and regeneration of notoginseng*, Plant cell tiss organ cult, 108(2), pp.333-338.

145 Yu, K. W., and Paek, K. Y. (2000), *Production of Adventitious Ginseng Roots Using Biorectors*, Journal of Plant Biotechnology, 27(4), pp.309-315.

146 Yu, H., Zhao, J., You, J., Li, J., Ma, H., Chen, X. (2019), *Factors influencing cultivated ginseng (Panax ginseng CA Meyer) bioactive compounds*, PloS one, 14(10), pp 1-17. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223763

147 Zaerr, J. B and Mapes, M. O, 1982, *Action of growth regulators. In: Bonga JM, Durzan DJ (eds) Tissue culture in forestry. Martinus Nijhoff/ Dr. W. Junk Publishers*, The Hague/Boston/London, pp.231-255.

148 Zhu, S., Fushimi, H., Cai, S., & Komatsu, K. (2003), *Phylogenetic relationship in the genus Panax: inferred from chloroplast trnK gene and nuclear 18S rRNA gene sequences*, Planta medica, 69(07), pp.647-653.

149 Zhang, J. Y., Sun, H. J., Song, I. J., Bae, T. W., Kang, H. G., Ko, S. M., *and Lee, H. Y. (2014). Plant regeneration of Korean wild ginseng (Panax ginseng Meyer) mutant lines induced by γ-irradiation (60Co) of adventitious roots*, Journal of Ginseng Research, 38(3), pp.220-225.

150 Zuo Y., Zhongjian C., Katsuhiko K., Tsuneo F., Jun W., Shiliang Z. (2011), *DNA Barcoding of Panax Species*, Planta Med, 77, pp. 182 -187.

Internet

151 http://archive.gramene. org/db/markers/ssrtool

152 https://www.biodiversitylibrary.org/

153 https://www.biodiversitylibrary.org/

154 http://powo.science.kew.org/

155 http://powo.science.kew.org/

156 https://www.gbif.org/

157 http://powo.science.kew.org/

158 https://www.ipni.org

159 http://powo.science.kew.org/

160 https://www.gbif.org/

161 http://powo.science.kew.org/

162 https://www.ipni.org/

163 http://powo.science.kew.org/

164 http://powo.science.kew.org/

165 http://powo.science.kew.org/

166 http://powo.science.kew.org/

167 http://powo.science.kew.org/

168 https://www.biodiversitylibrary.org/

169 http://powo.science.kew.org

170 https://www.ipni.org

171 http://powo.science.kew.org

172 https://www.gbif.org

173 https://www.ipni.org

174 http://powo.science.kew.org

175 http://powo.science.kew.org

176 https://www.ipni.org

177 https://www.most.gov.vn/vn/tin-tuc/14601/ban-giai-phap-phat-trien--san-xuat-sam-tai-viet-nam.aspx

PHỤ LỤC

Phụ luc 1

Kỹ thuật trồng nhân sâm dưới tán rừng tại TriềuTiên (Fabio S, 2000)

- Chọn đất: đất rừng có độ che phủ từ 50 đến 70%

- Làm đất: phát hết cây bụi, cây nhỏ, đánh gốc cây. Cuốc đất, lên luống cao từ 23 - 33cm.

- Cây giống: cây giống 2-3 tuổi (được gieo từ hạt)

- Thời vụ trồng: vụ thu (vào tháng 9) và mùa xuân (tháng 4, tháng 5)

- Chăm sóc: làm cỏ cho nhân sâm từ 3-4 lần/năm. Phân bón chủ yếu dùng phân lân với kali với tỷ lệ 10 : 1. Bón thúc phân qua lá vào thời điểm cây sắp ra hoa, phun dung dịch phân lân 2% vào lúc hoàng hôn hay sáng sớm.

- Thu hoạch: thời điểm thu hoạch thích hợp là sau từ 6 đến 8 năm trồng, vào tháng 9, tháng 10 (cuối thu đầu đông). Khi thu tránh làm đứt rễ, xây sát củ. Thu xong chế biến ngay không để mất nhựa, làm giảm chất lượng củ. Có thể chế biến hồng sâm, nhân sâm tươi hoặc sâm đường.

Cây sâm Mỹ được trồng tại Columbia, bang Wisconsin của Mỹ và ở miền Bắc Trung Quốc .Trong tự nhiên hạt sẽ chín vào cuối mùa thu, khoảng tháng 8-9 trước khi lá sâm rụng, cây sâm bắt đầu kỳ ngủ đông. Hạt rơi xuống mặt đất và được các lá cây phủ lên làm nhiệm vụ bảo vệ chúng. Hạt sâm Mỹ có thời gian ngủ nghỉ dài, cần từ 20-21 tháng mới mọc.

Phụ luc 2

Kỹ thuật trồng sâm Mỹ dưới tán rừng tại Ohio (Carroll and Apsley, 2003)

(1). Lựa chọn địa điểm trồng sâm. Thông thường, vị trí được lựa chọn là mặt đồi phía Bắc hoặc phía Đông có độ che phủ ít nhất 75%. Tốt nhất là sâm được trồng dưới tán các loài thực vật lá rụng và có rễ ăn sâu như bạch dương hay sồi. Sâm phát triển tốt nhất trên các loại đất có độ ẩm cao và khả năng thoát nước tốt. Cây sâm thường phát triển mạnh bên cạnh các loại cây hòa thảo thân gỗ như dương xỉ. Nếu không có các loại cây hòa thảo ở tầng trên, sâm có thể cũng không phát triển. Một điều kiện cơ bản khác là đất phải có khả năng thoát nước tốt, do vậy, các loại đất đầm lầy hay đất sét không thích hợp.

(2). Sâm cần được che bóng một phần và có dòng không khí lưu thông tự do. Độ che phủ tối ưu là khoảng 70 %. Ánh sáng mặt trời vẫn phải đạt đến tầng đáy rừng (nếu trồng trong rừng) để đảm bảo sự phát triển của sâm, nhưng vẫn phải bảo đảm đủ độ che phủ để hạn chế các cây nhỏ và cây bụi. Có thể sử dụng tay hoặc cào, cuốc đơn giản để chuẩn bị đất, loại bỏ các cây nhỏ và cây bụi có thể cạnh tranh với sâm.

(3). Phương pháp trồng sâm từ hạt. Hạt có thể được gieo từ cuối hè hoặc vào mùa xuân ở độ sâu khoảng 1 - 3 cm và cách nhau 15 - 30 cm. Cần khoảng 70 - 90 kg hạt/ha và diện tích này cần được phủ một lớp dày 5 - 8 cm mùn lá. Dùng hạt giống có nhiều ưu điểm như: rẻ, ít rủi ro về sâu bệnh, cây phát triển sẽ có các đặc tính điển hình của sâm tự nhiên, giá cao hơn. Tuy nhiên, hạt chỉ có thể gieo trong các điều kiện đất ẩm lý tưởng, tỷ lệ nảy mầm thấp và cần đến 2 năm để có thể nảy mầm, do đó có thể mất đến 6 - 10 năm để có sản phẩm thương mại.

(4). Phân bón: Ngoài dinh dưỡng có trong đất, sâm còn cần các loại dinh dưỡng khác; Tuy nhiên lượng phân bón bổ sung phải dựa trên nhu cầu dinh dưỡng của cây. Căn cứ vào đặc điểm đất và nhu cầu dinh dưỡng của sâm Mỹ, các nhà khoa học khuyến cáo cách bón phân như sau. Về cơ bản, bón theo công thức 20 P_2O_5+ 20 K_2O/ha (bón lót) trong năm đầu và 20 N + 20 P_2O_5 + 20 K_2O/ha, bón thúc trong năm sau. Việc bón bổ sung dinh dưỡng cho sâm phụ thuộc vào hàm lượng dinh dưỡng có trong đất.

- Với Lân, tùy vào hàm lượng Lân trong đất (P_2O_5 đất), khuyến cáo cụ thể như sau:

+ Nếu P_2O_5 đất < 20 ppm, bón 67,3 - 89,7kg/ha (27 - 36kg/a);

+ Nếu 20 < P_2O_5 đất < 40 ppm, bón tối đa 0 - 67,3kg/ha (0 - 27kg/a);

+ Nếu P_2O_5 đất > 40 ppm, không cần bón Lân.

- Với Kali, khuyến cáo tương tự là:

+ Nếu K_2O đất < 150 ppm, bón 67,3 - 112,2kg/ha (27- 45kg/a);

+ Nếu 250 < K_2O đất < 350 ppm, bón 44,5 -67,3kg/ha (18 - 27kg/a);

+ Nếu K_2O đất > 350 ppm, không cần bón Kali.

(5). Về sâu bệnh và quản lý sâu bệnh: Trong tự nhiên, sâm ít chịu ảnh hưởng của sâu bệnh, nhưng trồng sâm tạo điều kiện thúc đẩy sâu bệnh. Sâm chịu tác động từ các bệnh chính: nấm (nấm rễ và nấm lá là phổ biến). Cách tốt nhất để phòng trừ sâu bệnh là cải thiện sức khỏe của cây thông qua lựa chọn kỹ vùng đất trồng cây, tưới tiêu hợp lý và thoáng khí. Tuy nhiên, một số loại thuốc bảo vệ thực vật vẫn được khuyến cáo sử dụng ở mức độ thích hợp trong từng trường hợp cần thiết. Nhìn chung, về an toàn thực phẩm và dược phẩm, quá trình canh tác sâm không có tác động gây hại đến môi trường, sản phẩm từ sâm bảo đảm an toàn và vệ sinh thực phẩm.

Phụ lục 3
Quy trình trồng sâm Ngọc Linh dưới tán rừng
(Nguyễn Bá Hoạt *và cs.*, 2006)

- Chọn địa điểm trồng: Chọn đất dưới tán rừng, có độ cao trên 1700 m, độ dốc thấp, thoát nước tốt, lớp mùn dày trên 10 cm, độ ẩm cao, độ che phủ của rừng lớn hơn 75%.

- Lựa chọn quả giống: Quả giống được thu khi quả sâm đã chín có màu đỏ tươi, chấm đen ở trên quả đã định hình và được phân biệt rất rõ, vỏ quả trông rất bóng, sáng, hạt mẩy.

- Làm đất, gieo hạt: Lên luống rộng 1m, dài 5m hoặc hơn, cao 15-20 cm. Hạt được gieo ở độ sâu 5-7 cm trong môi trường mùn núi. Trong giai đoạn này, thường xuyên chăm sóc, kiểm tra đảm bảo cho hạt phát triển tốt. Quá trình chuyển cây giống đi xuống cần chú ý luôn giữ cây trong bầu đất mùn.

- Thời vụ trồng: Chính vụ: Trồng vào tháng 10, trước lúc kết thúc mùa mưa khoảng 15 ngày đến 1 tháng; Vụ muộn: Trồng vào tháng 4 năm sau; thời vụ này chỉ áp dụng cho cây con được khoảng 18-24 tháng hoặc trồng dặm.

- Mật độ trồng: 55.000 - 6.000 cây/ha tương đương với khoảng các trồng là 20 x 30 cm.

- Chế độ phân bón: sử dụng mùn núi với lượng 90 - 100 m^3 và phân vi sinh với lượng 1.500 kg cho 1ha, trộn đều và bón quanh gốc.

- Độ che phủ, chế độ chiếu sáng: chất lượng ánh sáng và thời giàn chiếu sáng rất quan trọng đối với quá trình sinh trưởng và phát triển của cây sâm. Duy trì độ che bóng từ 75 - 90% cho thấy là phù hợp. Nếu độ che bóng thấp (dưới 50%) lá cây sâm sẽ chuyển màu vàng, mỏng lá và cuối cùng là tự khô héo và chết. Chế độ che bóng quá cao, cây không có đủ ánh sáng để thực hiện

quá trình quang hợp, cây sẽ thiếu dinh dưỡng, dễ bị nhiễm bệnh; phần thân khí sinh phát triển nhưng phần dưới mặt đất (rễ và củ) không phát triển cân đối; năng suất thấp.

- Phòng trừ sâu bệnh: Sau khi trồng cần phải giữ ẩm, vệ sinh ruộng sâm và thực hiện các biện pháp phòng trừ sâu bệnh như mốc sương, gỉ sắt và bảo vệ sâm để tránh sự phá hoại của các loại chuột, dúi, nhím...

- Thời điểm thu hoạch: Sâm trồng 6 năm tuổi đạt đến điều kiện thu hoạch. Khi cây đã chuyển sang vàng lá vào khoảng tháng 11 thu hoạch sâm.

- Bảo quản sau khi thu hoạch: Thân, lá, rễ phụ được làm trà thuốc, củ sâm đem sấy khô, bảo quản đưa ra thị trường.

Phụ luc 4

Quy trình trồng sâm Ngọc Linh dưới giàn mái che

(Nguyễn Bá Hoạt *và cs.*, 2010)

- Chọn đất có độ cao trên 1.700 m, khá bằng phẳng, thoát hơi nước tốt. Làm đất và bón phân: cày ải phơi đất 6-12 tháng. Chuẩn bị vào vụ trồng cày bừa đập đất nhỏ, nhặt sạch cỏ dại, phân luống rộng 120-150 cm, luống dài khoảng 8m, vét luống cao 30 -35 cm, mặt luống 90-120 cm, rãnh luống 30 cm. Cuốc hố trên mặt luống thành hàng cách nhau 20 cm, hàng này cách hàng kia 30 cm.

- Làm thành mái che có kích thước theo từng ruộng sản xuất. Khung nhà làm bằng tre và gỗ, mái lợp bằng tranh là tốt nhất, có thể lợp 2 lớp lưới nilon đen. Điều kiện ánh sáng đảm bảo từ 50-75 % ánh sáng.

- Cây giống: là cây con được gieo từ hạt có chiều cao từ 15 - 20 cm, đường kính thân từ 0,2 - 0,3 cm, không bị sâu bệnh. Hạt được gieo trong bầu hoặc trong vườn ươm, lượng hạt cần cho 1ha là 1,0 - 1,8 kg/ha, với khối lượng 1000 hạt là 85 - 95g.

- Thời vụ trồng: Thời vụ chính là tháng 8 hàng năm cho khu vực vùng núi Trà Linh của tỉnh Quảng Nam. Có thể trồng trong khoảng tháng 7 và tháng 8.

- Làm đất, lên luống, cách trồng:

+ Trồng cây trên nền mùn núi đã đổ trong hố, sâu 5 - 7 cm, (không quá 10 cm) ấn chặt gốc, vun một lớp đất mỏng kín hố, không để hố úng đọng nước sẽ gây thối củ. Cây gióng đánh lên khỏi vườn ươm không được làm đứt củ giống, phân loại to nhỏ theo kích thước củ giống để đưa trồng đồng đều theo từng loại. Cây trồng trên hố đã bón lót mùn núi, trồng sâu 2 cm, không quá 3 cm.

- Khoảng cách trồng 20 x 30 cm tức mật độ 165.000 cây/ha (mật độ lý thuyết).

- Phân bón và kỹ thuật bón phân:

+ Lượng phân bón cho 1 ha: Mùn núi 80-100 tấn; Phân vi sinh: 1500kg; Urê: 100kg; Supe lân: 200kg; Kali clorua: 100kg.

+ Kỹ thuật bón phân: Bón lót: Sử dụng toàn bộ lượng mùn núi và phân vi sinh để bón đều vào các hố trồng cây; Bón thúc: Thường tiến hàng bón thúc vào năm thức 2 và thứ 4. Khi cây đó bắt đầu có lá vàng. Tiến hành bón thúc qua đông cho sâm với lượng phân khoáng chia đều cho các năm. Bón đều xung quanh gốc cây, kết hợp với xới đào, làm cỏ.

- Chăm sóc:

+ Cần giữ ẩm cho cây nhưng không để quá ẩm kéo dài gây bệnh hại thối củ. Làm rãnh thoát nước ngoài ruộng, không để nước mưa tràn qua ruộng sâm, sau mưa phải tháo nước triệt để.

+ Nhổ cỏ bằng tay và vét rãnh luống tháng 2-3 cho sâm nhú mầm, tháng 4 tháng 5 tưới ẩm cho ruộng sâm nhất là những ngày nắng hạn kéo dài.

+ Trước mùa mưa tháng 8-9 làm vệ sinh vườn, vét rãnh luống, khơi hệ thống thoát nước và kiểm tra cũng cố nhà mái che. Cuối mùa mua bón phân quanh gốc vét rãnh luống nhặt cỏ dại cho cây sâm ngủ đông.

- Thu hoạch, chế biến bảo quản

+ Sâm trồng từ nguồn cây giống có thời gian trên vườn ươm 24 đến 36 tháng thường chỉ sau bốn năm trồng đã cho thu hoạch củ được. Thời gian thu hoạch tháng 12, tháng 1, cuối mùa mưa, cây sâm đã vào giai đoạn tàn lụi thân khi sinh (ngủ đông) sẽ cho chất lượng dược liệu tốt nhất. Thu hoạch sớm tháng 10-11 đang là tháng có lượng mua cao nhất trong năm, sẽ gây khó khăn cho thu hoạch, phơi, sấy, vận chuyển. Thu sang tháng 2, cây sâm bắt đầu nhú chồi mới nên chất lượng củ không cao.

+ Đào củ rữa sạch phân loại to nhỏ, cắt bỏ rễ con để riêng cho sấy nhẹ trong khoảng 60-70 ^{0}C cho đến khô. Rễ con rữa sạch sấy riêng dùng trong các dạng trà thuốc. Dược liệu bảo quản trong bao 2 lớp để nơi khô thoáng.

Phụ luc 5

Hướng dẫn tạm thời kỹ thuật trồng và chăm sóc cây sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv) dưới tán rừng trên địa bàn tỉnh Quảng Nam (Quyết định số 333/QĐ-SNN&PTNT ngày 29 tháng 6 năm 2016)

I. ĐIỀU KIỆN TRỒNG SÂM NGỌC LINH

Trong tự nhiên, sâm Ngọc Linh là loài đặc hữu hẹp, phân bố trong vùng xuất xứ núi Ngọc Linh. Gây trồng thích hợp trong các điều kiện đặc trưng của vùng xuất xứ, như sau:

1. Khí hậu

- Nhiệt độ thích hợp trung bình trong năm dao động từ 14,0 - 18,0^{0}C (thấp nhất 8 - 11^{0}C, cao nhất 20 - 25^{0}C).

- Độ ẩm trung bình từ 85 - 90%.

- Lượng mưa trung bình từ 2.800 - 3.400 mm/năm và có lượng mưa khá trong các tháng mùa khô (từ tháng 3-7).

2. Đất đai, tài nguyên và địa hình

- Độ cao so với mực nước biển từ 1.500 m trở lên, thuận lợi ở độ cao từ 1.800 m trở lên.

- Đất có đủ ẩm, giàu dinh dưỡng, lượng mùn hữu cơ trong đất cao; còn giữ cấu trúc rừng nguyên sinh và có độ tàn che từ 70-90%.

II. CHUẨN BỊ GIỐNG, ƯƠM CÂY CON

1. *Thu hái và chọn quả*

* Chọn cây giống: Cây lấy hạt giống cần phải có sự chọn lọc kỹ để đảm bảo chất lượng cây giống. Cây phải đạt từ 4 năm tuổi trở lên (đối với cây gieo từ hạt), 2 năm trở lên (đối với cây trồng từ đầu mầm), có biểu hiện đặc trưng của giống, không bị sâu bệnh, tổn thương cơ giới hoặc các tổn thương khác.

* Thời gian thu hái quả: Vào tháng 7 - 9 hàng năm.

Quả thu hái phải đảm bảo độ chín sinh lý (vỏ quả có màu đỏ tươi và có chấm đen trên đầu, vỏ quả trông sáng bóng, hạt mẩy). Do đặc điểm sinh học mà một cụm quả đạt độ chín tiêu chuẩn phải từ 6 - 10 ngày, do vậy nên thu hái làm nhiều lần (ít nhất 3 lần, mỗi lần cách nhau từ 2- 3 ngày) để đảm bảo quả giống thu vào có chất lượng cao.

* Phân loại quả: Quả sau khi thu về được sàng sảy để loại bỏ quả nhỏ, lép và phân loại như sau:

- Loại 1: Vỏ quả có màu đỏ tươi, nhìn có màu sáng bóng, hạt mẩy.
- Loại 2: Vỏ quả có màu vàng hoặc nâu đỏ.
- Loại 3: Vỏ quả có màu vàng nhạt hoặc hơi nâu.
- Loại 4: Vỏ quả có màu xanh, xanh nõn chuối, hạt nhỏ, lép…(nên loại bỏ).

Đối với quả loại 2 và loại 3 sau thời gian ủ từ 2 đến 3 ngày thì đạt độ chín về hình thái giống như loại 1 và 2. Tuy nhiên, chỉ nên sử dụng hạt từ quả loại 1 và loại 2 để gieo ươm, trong trường hợp thiếu hạt giống có thể sử dụng loại 3.

2. Thời vụ gieo và xử lý hạt giống

- Thời vụ gieo hạt trùng với thời gian thu hái quả khoảng tháng 7 - 9 hằng năm.

- Trước khi gieo hạt có thể thực hiện bằng 1 trong 2 cách:

+ Sau khi thu quả, để nguyên vỏ và đem gieo ngay (nếu quả có 2 hạt thì tách riêng).

+ Sau khi thu quả, ủ khoảng 5 ngày đem chà xát và đãi sạch để loại bỏ phần thịt quả, để ráo; sau đó ngâm trong dung dịch nước tỏi 10 - 15% (1,0 - 1,5 kg tỏi giã nhỏ ngâm với 10 lít nước, lọc lấy nước) trong khoảng 30 - 45 phút để ngừa một số nấm bệnh và tăng sức đề kháng cho cây con, rồi đem gieo.

3. Phương pháp gieo hạt

Sử dụng phương pháp truyền thống, gieo hạt trực tiếp lên luống (phương pháp gieo hạt giống trong khay chuyên dụng và đặt khay cách ly mặt đất trong nhà bảo vệ đang được thử nghiệm, có kết quả tốt, sẽ có hướng dẫn để áp dụng).

- Đất làm vườn ươm phải chọn ở những vùng tương đối bằng phẳng, dưới tán rừng, có độ tàn che của rừng từ 80% trở lên, đất giàu mùn, sạch nguồn bệnh, thoát nước tốt.

- Dọn sạch cỏ dại, lên luống có mặt luống cong hình mu rùa, rộng 0,8 - 1,0 m, cao 0,2 - 0,3 m, dài không quá 10 m theo hướng đường đồng mức để hạn chế xói mòn. Nên bổ sung thêm mùn núi (mùn được phân hủy từ xác bã thực vật) để tăng cường dinh dưỡng cho đất.

- Hạt được gieo trong rãnh sâu 2 - 3 cm, với mật độ khoảng 01lon hạt/2 m^2 đất (1 lon hạt tương đương với 1.000 hạt). Lưu ý, không gieo các hạt dính sát nhau, khoảng cách giữa các hạt phải trên 2 cm.

- Sau khi gieo xong, lấp đất và phủ một lớp lá khô, cỏ tranh trên mặt luống để giữ ẩm, ấm cho hạt, hạn chế cỏ dại và chống xói mòn.

4. Chăm sóc sau khi gieo hạt

- Để đảm bảo cho cây giống trong vườn ươm sinh trưởng phát triển thuận lợi, tốt nhất nên làm nhà che bằng ni lông trắng hay lưới nhằm hạn chế tác động của ngoại cảnh (mưa to, hiện tượng sương lạnh…) đến sinh trưởng phát triển của cây giống trong vườn ươm.

- Thường xuyên theo dõi, sửa chữa rãnh luống và mương thoát nước, không để vườn ươm bị đọng nước, ngập úng khi có mưa.

- Khi cây giống bắt đầu mọc mầm (5 - 10% hạt đã mọc mầm), thu dọn phần lá cây, cỏ tranh chưa hoai mục trên mặt luống để cây giống sinh trưởng phát triển thuận lợi.

- Thường xuyên theo dõi tưới nước cho cây, đảm bảo đất đủ ẩm.

- Làm cỏ thường xuyên, kết hợp với việc bổ sung mùn núi, nhưng chú ý không làm tổn thương đến cây giống.

- Thường xuyên theo dõi, phát hiện kịp thời những đối tượng dịch hại tấn công cây giống trong vườn ươm để có biện pháp quản lý hiệu quả.

- Dùng lưới nilon căng đứng, cao 35 - 40 cm quanh luống hoặc quanh vườn để ngăn chuột, dúi… cắn cây con.

- Khi cây đã mọc đều, nếu có điều kiện nên bứng trồng vào khay và đưa vào chăm sóc trong nhà có mái che, đặt trên giàn đỡ cách ly mặt đất để quản lý, chăm sóc đảm bảo hơn.

5. Tạo cây con từ mầm thân

Ngoài việc tạo cây con từ hạt theo các phương pháp trên, Sâm Ngọc Linh có thể trồng được từ mầm thân (đầu mầm) bằng cách: Khi thu hoạch phần củ, cắt chừa lại phần mầm của thân rễ (đoạn thân có các mắt) để trồng.

III. KỸ THUẬT TRỒNG VÀ CHĂM SÓC

1. Thời vụ

Với tiểu khí hậu vùng Ngọc Linh, có thể trồng sâm quanh năm (trừ các tháng mùa mưa chính) nhưng do phụ thuộc vào điều kiện cây giống đủ tiêu chuẩn nên vụ trồng phổ biến từ tháng 7 - 9 hàng năm khi cây giống đạt 1 năm tuổi; ngoài ra, có thể trồng từ tháng 3-5 với cây giống lưu vườn hơn 1 năm tuổi. Không trồng vào những ngày nắng gắt hay mưa lớn.

2. Thiết kế vườn và chuẩn bị đất trồng

Thực hiện nghiêm ngặt yêu cầu hạn chế tối đa những tác động bất lợi đến môi trường rừng, để vừa bảo vệ rừng, vừa tạo môi trường sống thích hợp cho sâm trồng.Sâm có thể sinh trưởng - phát triển tốt khi mọc sát gốc các cây gỗ, cây tái sinh.Trong thiết kế vườn và chuẩn bị đất trồng, chỉ phát dọn tối thiểu dây leo, bụi rậm; tuyệt đối không được tác động đến cây gỗ và cây tái sinh.

- Lựa chọn đất trồng: Lựa chọn các vùng đất dưới tán rừng tự nhiên ở đai cao từ 1.500 m trở lên, còn giữ kết cấu rừng tự nhiên và có độ che phủ rừng từ 70% trở lên, giàu mùn, đủ ẩm.

- Trong vùng lựa chọn, thiết kế các băng chừa và băng trồng đồng mức, xen kẽ nhau, rộng 8 -10m và chừa lại phần đỉnh trên cùng xuống đến băng trồng ít nhất 50m.

+ Phát dọn dây leo, bụi rậm để tạo các lối đi lại trong vườn sâm: Lối đi lại giữa các băng đồng mức, rộng 0,8 m. Lối đi lại theo hướng dốc, rộng 0,8-1mét, thiết kế zích - zắc và với số lượng tối thiểu để hạn chế xói mòn.

+ Đối với phần đỉnh dốc và băng chừa, giữ nguyên hiện trạng, nghiêm cấm mọi tác động.

+ Đối với băng trồng, chỉ được phát dọn dây leo, bụi rậm.Trong các băng trồng, thiết kế 3-4 luống trồng, mỗi luống rộng 1,6 - 2,0 m để trồng 3-4 hàng sâm. Giữa các luống, phát dọn dây leo, bụi rậm tạo lối đi lại rộng 30-35cm.

- Chuẩn bị đất và trồng sâm: Trên các luống trồng đã được phát dọn dây leo, bụi rậm, giữ nguyên hiện trạng mặt đất (không đánh rãnh lên luống; không thu dọn đá lẫn, gốc cây và thân gỗ chết…; chỉ thu gom thân lá dây leo, cây bụi vừa phát dọn để ủ phân hữu cơ). Đào hố trồng lan theo chiều nghiêng tự nhiên của khu vực trồng, theo quy cách và thẳng hàng để tiện trong việc theo dõi, chăm sóc sau này.

3. Tiêu chuẩn cây giống trước khi trồng

3.1. Cây giống gieo từ hạt

Đối với cây giống 1 tuổi, phải đảm bảo các yêu cầu xuất vườn để trồng như sau:

- Về hình thái: Lá có màu xanh đến xanh đậm;

- Chiều cao thân trung bình: Từ 10 cm trở lên (lúc có 1 lá kép).

- Có đường kính củ từ 0,3 cm trở lên; có từ 2- 3 rễ chính trở lên.

- Cây không bị bệnh hại trên thân, rễ, củ; bệnh trên lá nhỏ hơn 5% diện tích lá.

3.2. Cây trồng từ đầu mầm

Cây giống đầu mầm là phần mầm của thân rễ (đoạn thân có các mắt) dài khoảng 3 - 4 cm (tính từ vị trí tiếp giáp với thân khí sinh), phía trên chừa lại 1 đoạn thân khí sinh dài 5 - 7 cm.

4. Mật độ và cách trồng

- Khoảng cách, mật độ: Hàng cách hàng từ 40-45 cm, cây cách cây từ 30-35 cm; mật độ khoảng 20.000 - 25.000 cây/ha rừng (tính bình quân trên diện tích thiết kế, bao gồm diện tích rừng không tác động).

- Cách trồng: Sử dụng cuốc nhỏ hoặc công cụ cầm tay phù hợp để đào hố tròn có đường kính 8-10 cm, sâu 6-8 cm để trồng.

+ Trồng từ cây con: Bứng nhẹ, tách cây con trên vườn ươm hoặc trong khay, tránh xây xát và đứt rễ để đem đi trồng.

Đặt cây con vào hố và điều chỉnh sao cho thân cây theo phương thẳng đứng, cổ rễ ngang với mặt đất tự nhiên; lấp đất và dùng tay ấn chặt đất xung quanh gốc cây; lấp đất theo hình mâm xôi để tránh cây bị úng khi mưa; nên trồng thẳng hàng để dễ theo dõi và tiện chăm sóc sau này; lưu ý không làm bể bầu, đứt rễ, dập nát cây khi trồng.

+ Trồng bằng đầu mầm: Sau khi chuẩn bị xong đoạn mầm, có thể tiến hành trồng ngay; tương tự như trồng cây con, đào một hốc nhỏ sâu 5 - 7 cm rồi đặt phần thân mầm vào đó, đoạn thân khí sinh hướng lên trên, lấp đất và ấn chặt phần gốc.

- Sau khi trồng, tưới nhẹ để ổn định cây, phủ một lớp lá khô lên mặt đất để giữ ẩm cho đất, hạn chế cỏ dại, đồng thời lá khô sau khi phân hủy sẽ cung cấp một lượng mùn nhất định cho cây sau này.

5. Chăm sóc vườn sâm

- Năm đầu sau khi trồng, thường xuyên theo dõi, trồng dặm lại những cây chết (dặm các cây cùng lứa tuổi).

- Hàng năm,thường xuyên phát dọn các dây leo, bụi rậm tái sinh và nhổ cỏ trong vườn trồng sâm; chỉ cần cắt, nhổ cỏ cục bộ những cây sát gốc sâm; không cắt, nhổ cỏ khi cỏ không ảnh hưởng đến cây sâm. Không làm cỏ trong mùa mưa, nhất là giai đoạn cây ngủ đông để hạn chế rửa trôi, xói mòn đất.

- Kết hợp với việc làm cỏ, bón bổ sung thêm mùn núi cho cây bằng cách phủ lên mặt đất gần gốc cây một lớp mùn dày khoảng 2 cm, để giúp cây sinh trưởng tốt và cho năng suất cao. Có thể sử dụng các chế phẩm vi sinh ủ với lá mục, lá khô tại chỗ…để bón bổ sung cho cây.

- Những năm mưa ít trong các tháng mùa khô, đất trồng bị khô, cần tưới nước bổ sung để giúp cây sinh trưởng được thuận lợi.

- Dọn dẹp cành cây đổ gãy xuống vườn sâm; chăm sóc và khắc phục sớm những trường hợp cây bị tổn thương.

6. Phòng trừ dịch hại

Để phòng trừ dịch hại trên cây sâm Ngọc Linh hiệu quả, phải áp dụng triệt để biện pháp quản lý dịch hại tổng hợp (IPM), chú trọng việc tạo điều kiện tốt nhất cho cây sâm sinh trưởng và phát triển, cụ thể:

- Chọn cây giống phải đạt tiêu chuẩn, khỏe, sạch sâu bệnh.

- Chọn đất tốt để trồng, đất có nhiều mùn, không bị úng nước, có độ tàn che từ 70% trở lên.

- Tăng cường các biện pháp canh tác như: Vệ sinh vườn, thu gom, cách ly cây bệnh… để hạn chế các đối tượng dịch hại gây hại.

- Thường xuyên kiểm tra, phát hiện sớm các đối tượng dịch hại, xử lý kịp thời bằng các biện pháp thủ công như: cắt tỉa lá bị bệnh, nhổ bỏ và xử lý

cây bệnh,…Cần làm bẫy lồng, bẫy kẹp, dụng cụ xua đuổi… hoặc dùng nilon, lưới để ngăn các động vật gây hại vườn sâm.

* Đối với những vườn giữ giống, nhân giống, vườn ươm khi có nguy cơ dịch hại nặng, có thể sử dụng thuốc BVTV (ưu tiên sử dụng các loại thuốc sinh học) theo hướng dẫn của cơ quan chuyên môn để bảo vệ tối đa nguồn giống.

Trồng sâm đúng hướng dẫn kỹ thuật, trồng lan trên mặt đất tự nhiên (không lên luống) để tránh nước mưa tạo thành dòng chảy hay đất trong luống sâm quá ẩm ướt sau mưa nhằm hạn chế bệnh hại sau này, đặc biệt đối với bệnh do vi khuẩn gây hại.

Ngoài ra, quả sâm có các đối tượng như chuột, chim và các động vật khác rất thích ăn. Vì vậy, khi cây kết quả, phải làm túi lưới bọc chùm quả. Túi lưới được gắn vào 1 que chắc chắn (que dài hay ngắn tùy thuộc độ cao của chùm quả), que được cắm chắc xuống đất. Ngoài tác dụng bảo vệ các đối tượng gây hại, cọc túi lưới có tác dụng giữ cho cây không bị gió, mưa lay đổ do chùm quả nặng.

7. Thu hoạch

Sâm Ngọc Linh trồng từ cây giống sau 6 năm có thể thu hoạch được, tuy nhiên năng suất, chất lượng và hiệu quả chưa cao, nên thu hoạch củ khi sâm đạt từ 8 năm tuổi trở lên, thu vào tháng 10 - 12 (khi cây ngủ đông).

Phụ luc 6

Quy trình tạm thời kỹ thuật trồng và chăm sóc cây sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis Ha et Grushv*) trên địa bàn tỉnh Kon Tum (Quyết định số: 649/QĐ-UBND tỉnh Kon Tum, ngày 10 tháng 7 năm 2017)

I. ĐIỀU KIỆN SINH THÁI TRỒNG SÂM NGỌC LINH

- Độ cao thích nghi tốt nhất của cây Sâm Ngọc Linh từ 1.500 - 2.000 m.

- Tổng nhiệt độ năm từ 6.500 - 7.000^{0}C.

- Nhiệt độ bình quân năm trong khu vực 13°C, nhiệt độ cao nhất 20°C, nhiệt độ thấp nhất 5°C.

- Lượng mưa năm từ 2.500 - 3.000 mm/năm.

- Độ ẩm trung bình năm từ 85% - 90%, dư ẩm về mùa mưa, đủ ẩm về mùa khô.

- Tổng số giờ nắng từ 1200 - 1400 giờ trong 01 năm.

- Chọn đất dưới tán rừng, độ dốc thấp (≤ 15 - 20°) có khả năng thoát nước tốt, lớp mùn hữu cơ dày từ 20 - 30 cm, độ tàn che của rừng từ 70 - 90%.

II. Tiêu chuẩn cây giống Sâm Ngọc Linh xuất vườn

- Nguồn gốc hạt giống: Hạt giống trên vườn cây mẹ tại Trung tâm Sâm Ngọc Linh thuộc Công ty TNHH MTV Lâm nghiệp Đăk Tô và Công ty Cổ phần sâm Ngọc Linh Kon Tum và đã được công nhận nguồn giống theo quy định.

- Tuổi cây: Đạt 12 tháng tuổi;

- Hình thái cây: có 01 lá kép, lá có màu xanh đến xanh đậm;

- Chiều cao thân khí sinh trung bình: Từ 10 cm trở lên.

- Đường kính củ từ 5 mm trở lên; có từ 2- 3 rễ chính trở lên.

- Không có dấu hiệu sâu bệnh trên lá, thân, rễ, củ.

Lưu ý: Trong quá trình vận chuyển cây giống đến địa điểm trồng không để cây bị xây sát hoặc bị dập gãy và 1 các vật liệu để giữ ẩm cho cây giống.

III. KỸ THUẬT ƯƠM GIỐNG

1. Thu hái hạt giống

- Tuổi vườn cây thu hái hạt giống: Vườn giống có độ tuổi từ 04 năm trở lên.

- Thời điểm thu hái hạt giống: Thu hái vào tháng 7 đến tháng 9 hàng năm, trên vườn cây đã được chứng nhận nguồn giống theo quy định, có tuổi cây đạt từ 4 năm tuổi trở lên, hái đối với những quả đã chín có màu đỏ tươi, có chấm đen trên đầu, vỏ quả sáng bóng, hạt mẩy.

2. Xử lý hạt giống

- Hạt giống thu hái về được rải mỏng trên nia có lót lớp giấy mỏng, treo ở nơi thoáng mát trong thời gian từ 3 đến 4 ngày để hạt khô ráo.

- Khi phần thịt quả đã chuyển sang mọng nước, dùng tay chà sát hạt trên rổ nhựa hoặc tre nứa để loại bỏ phần thịt quả và thu phần nhân hạt. Phần nhân hạt thu được rải mỏng trên nia có lót lớp giấy mỏng nia khoảng 2 đến 3 ngày là gieo ươm.

- Theo kinh nghiệm, hạt sau khi được loại bỏ phần thịt có thể ngâm trong dung dịch nước tỏi 10-15% *(1,0 - 1,5kg tỏi giã nhỏ ngâm với 10 lít nước, lọc lấy nước)* trong khoảng 30 - 45 phút để ngừa một số nấm bệnh và tăng sức đề kháng cho cây con, sau đó đem gieo.

3. Chuẩn bị đất gieo hạt

Luống để gieo hạt giống bằng phẳng, được phủ lên mặt luống một lớp mùn hữu cơ được phân hủy từ tàn dư thực vật trên núi dày 7-10 cm, được xử lý nguồn bệnh, kiến mối; luống gieo giống thoát nước tốt, bố trí dưới tán rừng có độ tàn che của rừng từ 80% trở lên. Mặt luống cong hình mu rùa, rộng 0,8 - 1,0 m, cao 20 - 30 cm, chiều dài luống tùy theo địa hình núi, nhưng không quá 10 m, thiết kếtheo đường đồng mức để hạn chế xói mòn, có thể làm vòm che luống màng phủ ni lông trắng hay lưới trắng để hạn chế mưa, nhiệt độ thấp và được kè bốn mặt luồng.

4. Gieo giống

- Thời vụ gieo từ tháng 7 đến hết tháng 9 hàng năm, tiến hành cùng với thu hái hạt giống.

- Rạch hàng sâu 2 - 3 cm, hàng cách hàng 5-7 cm, hạt cách hạt trên hàng 3 - 5 cm. Gieo xong dùng chổi xương quét một lượt để cho mùn lấp hạt, sau đó phủ một lớp lá cây rừng hoặc cỏ tranh trên mặt luống để giữ ẩm, giữ ấm cho hạt.

- Rải xung quanh luống thuốc kiến để phòng trừ kiến tha hạt đã gieo.

5. Chăm sóc

- Làm giàn che bằng lưới đen toàn bộ diện tích vườn ươm để tránh ánh nắng và hạn chế được mưa đá và sương muối.

- Xung quanh vườn ươm dùng ni lông trắng, khổ 1,2m rào kín để tránh chim, chuột... *(trong diện tích vườn ươm có thể chia thành từng ô nhỏ để rào nhóm thuận lợi cho việc bắt chuột phá hoại cây giống).*

- Tưới nước: Mùa mưa tưới nhẹ một lần vào lúc 7 giờ sáng để rửa sương; Mùa khô tưới 2 lần, một lần vào lúc 7 giờ sáng và lúc 3 - 4 giờ chiều. Tưới đủ ẩm, không nên tưới đậm. Có thể lắp đặt hệ thống tưới nước bằng phun sương cho toàn bộ diện tích vườn ươm.

- Kiểm tra thoát nước kịp thời khi mưa lớn gây ngập úng.

- Làm cỏ: Nhổ bằng thủ công toàn bộ cỏ dại và cây rừng trên toàn bộ mặt luống Sâm và lối đi theo các đợt: Đợt 1 từ tháng 10 đến tháng 11; đợt 2 từ tháng 01 đến tháng 02 năm sau; đợt 3 từ tháng 5 năm sau.

- Thu gom dần một phần lớp phủ trên mặt luống 5-10% hạt nẩy mầm.

- Bảo vệ: Hạt và cây con mới mọc là nguồn thức ăn cho kiến, chim, chuột,... mặt khác điều kiện khí hậu ở vùng trồng Sâm Ngọc Linh thường xuyên có mưa đá, sương muối, nên trong suốt thời gian gieo ươm từ tháng 7 đến tháng 7 năm sau phải tổ chức lực lượng bảo vệ tại vườn ươm 24/24

để phát hiện xử lý kịp thời. Có thể dùng màng ni lông căng cao 35 - 40 cm quanh luống hoặc quanh vườn để ngăn chuột, dúi,... cắn phá cây con.

IV. KỸ THUẬT TRỒNG VÀ CHĂM SÓC SÂM NGỌC LINH

1. Thời vụ trồng: Thời vụ trồng Sâm Ngọc Linh từ tháng 6 đến tháng 9.

2. Đất trồng:

Công tác chuẩn bị đất trồng Sâm Ngọc Linh được tiến hành từ tháng 4 đến tháng 5 hàng năm, gồm các công việc chính như sau:

- Phát dọn tối thiểu dây leo, cây bụi gom lại để ủ làm phân hữu cơ, tuyệt đối không tác động đến cây gỗ và và cây tái sinh.

- Sau 2 tháng phát dọn cây bụi và dây leo, tiến hành cuốc lật đất. Cuốc lật lại lần 2 sau 1 - 2 tháng, sau đó đánh luống dọc theo đường đồng mức, chiều dài luống 8-10 m *(tùy theo địa hình đất trồng)*để lại dải phân cách giữa 2 luống để làm đường đi *(khoảng 60 cm)*, chiều rộng luống từ 01 - 1,2 m, chiều cao luống từ 15 - 20 cm, các luống được thiết kế theo kiểu "zich zắc" từ trên xuống.

- Xử lý đất, mùn núi bằng các loại thuốc bảo vệ thực vật có nguồn gốc sinh vật để diệt các loại vi khuẩn Erwinia. sp, Erwini.as, Xanthomonas sp và nấm Phytophthora sp có trong đất, mùn núi trước khi trồng.

3. Mật độ và khoảng cách trồng

- Mật độ trồng: Mật độ trồng thích hợp cho 01 ha dưới tán rừng tự nhiên từ 30.000 - 40.000 cây.

- Khoảng cách trồng: Cây cách cây 30 cm, hàng cách hàng 40 cm, khoảng các giữa các luống 60 cm.

4. Kỹ thuật trồng

- Trồng xen dưới tán rừng tự nhiên có độ che phủ rừng từ 70% trở lên.

- Trồng trên nền đất đã tạo luống, cuốc hố kích thước dài 15 cm, rộng 15cm, sâu 15 cm. Hố trồng được bón mùn núi, sau đó đặt cây giống sâu

không quá 4 cm và lấp đất, ấn nhẹ chặt gốc. Sau khi trồng dùng lá rừng phủ quanh gốc và mặt luống để giữ ẩm.

- Đến tháng 4 và tháng 5 kiểm tra tỷ lệ sống để tiến hành trồng dặm.

5. Chăm sóc

5.1. Các đợt chăm sóc

- Năm thứ nhất: 2 đợt/năm.
- Năm thứ 2 đến năm thứ 5: 4 đợt/năm.
- Năm thứ 6 trở đi: 02 đợt/năm.

Các đợt chăm sóc kết hợp làm cỏ, bón phân như sau:

a) Làm cỏ

Làm cỏ trên vườn sâm trồng tương tự như làm cỏ trên vườn ươm theo các đợt. Thao tác nhổ cỏ nhẹ nhàng từ trong gốc ra, sau đó lấy lá cây phủ lên mặt luống để hạn chế mưa xói mòn.

b) Bón phân

- Bón thúc: Phân bón cho sâm Ngọc Linh chủ yếu là mùn núi được phân hủy và hoai mục từ thân, lá cây rừng thu gom trong rừng tự nhiên.

- Bón qua mùa lạnh: Tháng 10 -11 cây đã bắt đầu có lá vàng, khi đã hết mùa thu hạt tiến hành vệ sinh, bón cho cây bằng mùn núi bằng cách phủ lên mặt đất gần gốc cây một lớp mùn dày khoảng 2 cm, sau đó dùng cỏ tranh phủ một lớp mỏng lên bề mặt luống cho cây qua mùa lạnh và giảm mưa xói mặt luống sâm.

5.2. Tưới tiêu

- Mùa mưa tưới nhẹ một lần vào lúc 7h sáng để rửa sương; Mùa khô tưới 2 lần, một lần vào lúc 7 giờ sáng và lúc 3-4 giờ chiều. Tưới đảm bảo độ ẩm không dưới 60%. Có thể lắp đặt hệ thống tưới nước bằng phun sương cho toàn bộ diện tích vườn trồng.

- Đầu mùa mưa khoảng tháng 5 đến tháng 6 kiểm tra, vét rãnh thoát nước quanh vườn sâm kịp thời khi mưa lớn để tránh ngập úng cục bộ trong vườn cây.

5.3. Phòng trừ sâu bệnh hại và bảo vệ

Thường xuyên theo dõi diễn biến sâu bệnh hại và kết quả phòng trừ, đồng thời phối hợp chặt chẽ với Trạm Trồng trọt và bảo vệ thực vật các huyện để phát hiện xử lý kịp thời.

a) Sâu: Thực tế ít gặp sâu phá hoại vườn sâm Ngọc Linh, ở giai đoạn vườn ươm có thể gặp sâu tơ, sâu ăn lá (sâu róm) với mật độ ít nên theo dõi để bắt kịp thời.

b) Bệnh

- Bệnh vàng lá, đốm lá:

+ Triệu chứng: Lá bị vàng và xuất hiện các vết đốm. Nguyên nhân do môi trường trồng thừa ánh sáng, cây sâm tiếp xúc trực tiếp với ánh sáng tạo điều kiện thuận lợi cho nấm Cercospora phát triển, bệnh hại chủ yếu trên lá, lá có các đốm tròn màu nâu nhạt, sau đó chuyển sang màu nâu đỏ hoặc nâu sậm. Trên một lá có nhiều đốm bệnh làm lá mau biến vàng và rụng.

+ Biện pháp phòng trừ: Đảm bảo độ che phủ rừng từ 70% trở lên

- Bệnh gỉ sắt:

+ Triệu chứng: Bệnh xuất hiện rải rác trên lá sâm Ngọc Linh, nhưng thường tỷ lệ nhiễm bệnh thấp, không ảnh hưởng đáng kể đến sinh trưởng, phát triển của cây sâm Ngọc Linh. Nguyên nhân do nấm Hemileia vastatrix B & Br gây ra khi nhiệt độ nhiệt độ không khí đạt 22°C, mưa nhiều và cây được cung cấp đủ nước.

+ Biện pháp phòng trừ: Nhổ bỏ và tiêu hủy ngay các cây bị bệnh gỉ sắt nặng để tránh lây lan.

- Bệnh thối củ:

+ Triệu chứng: Trên đầu củ sâm bị thối nhũn, nếu nặng có thể thối cả củ. Nguyên nhân do vi khuẩn Envinia. sp và vi khuẩn Xanthomonas. sp xâm nhiễm qua vết thương cơ giới trên đầu củ *(Tác động của con người, chuột, dúi, mưa đá, cành cây rơi,...).*

+ Phòng trừ bệnh: Dùng lưới che chắn trên luống Sâm Ngọc Linh để hạn chế vết thương cơ giới do mưa đá, cành cây rơi,...; nhổ bỏ những cây bị thối hoàn toàn đem tiêu hủy sau đó xử lý đất bằng vôi bột hoặc các chế phẩm có chứa nấm Trichoderma; tập trung chăm sóc, bón mùn tự nhiên kết hợp trộn chung với chế phẩm có chứa nấm Trichoderma cho những cây bị thối một phần ở đầu củ và đang mọc chồi mới. Có thể xử lý các cây bị bệnh bằng một trong các chế phẩm sinh học như Kaisin 50WP, 100WP; Goldnova 200WP; Actinovate 1SP.

c) Bảo vệ

- Rào lưới, chắn màng nilon, đặt bẫy xung quanh vườn hoặc từng luống để bảo vệ khỏi chuột, dúi phá hại. Dùng rọ chụp để bảo vệ quả khỏi bị các loài chim ăn.

- Định kỳ 10-15 ngày kiểm tra để nhặt cành khô mục rơi xuống luống sâm.

V. THU HOẠCH

1. Kỹ thuật thu hoạch

- Giai đoạn thu hoạch: Tuổi cây thu hoạch đạt từ 06 năm tuổi trở lên để đảm bảo hàm lượng saponin. Thu hoạch vào tháng 10 đến tháng 11 khi cây chuyển sang giai đoạn ngủ đông.

- Kỹ thuật thu hoạch: Cắt lá để riêng, moi nhẹ đất xung quanh củ tránh gãy củ và đứt rễ, sau đó đào củ, rũ nhẹ đất, xếp vào dụng cụ đựng tránh bị xây sát củ.

2. Sơ chế, bảo quản

Rửa sạch, cắt hết rễ phụ và đem phơi hoặc sấy khô. Củ khô được bảo quản trong túi chống ẩm và để nơi khô ráo.

Phụ lục 7
Hướng dẫn nhân giống sâm Ngọc Linh bằng hạt
(Trương Thị Hồng Hải *và* cs., 2019)

I. CHUẨN BỊ GIEO HẠT SÂM NGỌC LINH

1.1. Lựa chọn hạt giống sâm Ngọc Linh

- Chọn các hạt giống sâm Ngọc Linh thu từ quả của cây mẹ 6 - 8 năm tuổi.

- Quả chín hoàn toàn, khi chín có màu đỏ tươi, thường có chấm đen không đều ở đỉnh quả, quả có hình thận, không sâu bệnh.

- Hạt có màu trắng hay vàng nhạt dài 6 - 8mm; rộng 5 - 6mm, dày 2mm, bề mặt hạt ráp, có nhiều chỗ lồi lõm, hạt thu hoạch từ tháng 8 đến tháng 10 hàng năm, sau khi thu hoạch tiến hành gieo hạt ngay để tăng khả năng nảy mầm của hạt.

1.2. Chuẩn bị giá thể gieo hạt sâm Ngọc Linh

- Nên gieo hạt sâm Ngọc Linh trong giá thể cát suối ẩm hoặc giá thể mùn rừng tự nhiên để có thời gian nảy mầm nhanh và tỷ lệ nảy mầm cao.

- Đối với cát suối ấm sau khi lấy về rửa sạch loại bỏ hết rác bẩn lẫn trong cát.

- Đối với mùn rừng tự nhiên chọn loại tơi xốp, loại bỏ rễ cây và rác bẩn và cỏ dại lẫn trong mùn.

1.3. Ngâm hạt giống sâm Ngọc Linh

- Ngâm hạt trong nước có nhiệt độ 45°C, trong thời gian từ 4 - 8 tiếng trước khi gieo.

- Xử lý hạt giống bằng chế phẩm Trichoderma + Bacillus trong quá trình ngâm hạt để phòng và loại bỏ mầm mống sâu bệnh hại trên hạt giống sâm Ngọc Linh.

II. GIEO HẠT VÀ CHĂM SÓC CÂY SÂM NGỌC LINH TRONG VƯỜN ƯƠM

2.1. Thời gian gieo hạt

- Gieo hạt vào tháng 9 đến tháng 10 hàng năm, ngay sau khi thu hoạch hạt từ cây sâm mẹ.

2.2. Gieo hạt

- Chuẩn bị giá thể cát suối ẩm hoặc mùn rừng tự nhiên có độ ẩm 70 - 80%.

- Bầu gieo hạt có kích thước 10 x 12cm, đục sẵn các lỗ thoát nước ở đáy và thành bầu, sử dụng bầu nilon trắng hoặc đen.

- Cho giá thể vào túi bầu, vỗ và nén chặt giá thể vừa phải, cách miệng bầu từ 1 - 2cm.

- Đục lỗ sâu từ 1- 1,5cm, cho hạt vào và lấp giá thể phủ kín.

2.3. Chăm sóc sau gieo

- Tưới ẩm sau gieo, duy trì độ ẩm giá thể bầu gieo hạt từ 70 - 80% độ ẩm tuyệt đối.

- Sau khi gieo hạt xong tiến hành xếp bầu vào nơi đất rừng tương đối bằng phẳng, che sáng bằng lưới đen hoặc xanh, che sáng từ 70 - 90% ánh sáng, sau khi hạt mọc mầm và lớn dần thì giảm độ che sáng để cây thích nghi với môi trường sống.

- Điểm đặt bầu ươm hạt tốt nhất là gần khu vực trồng sâm.

- Sau khi cây sâm Ngọc Linh nảy mầm tiến hành phun chế phẩm Trichoderma để phòng trừ bệnh hại, cách 15 ngày phun 1 lần.

2.4. Chuyển cây sâm Ngọc Linh con sang giá thể ươm cây con

Sau 1 tháng tính từ thời gian mọc mầm (10% số hạt mọc mầm) tiến hành chuyển cây sâm con sang giá thể bầu ươm cây con.

- Chuẩn bị giá thể bầu ươm cây con: 90% đất mùn tự nhiên + 10% phân hữu cơ hoai mục ủ từ lá cây rừng hoặc đất mùn tự nhiên trong thảm rừng có độ ẩm 70 - 80%.

- Bầu ươm cây con có kích thước 12 x 15cm, đục sẵn các lỗ thoát nước ở đáy và thành bầu, sử dụng bầu nilon trắng hoặc đen.

- Cho giá thể vào túi bầu, vỗ và nén chặt giá thể vừa phải cách miệng bầu từ 1 -2 cm.

- Tạo hốc giữa bầu giá thể ươm cây con, độ sâu của hốc lớn hơn độ dài của bộ rễ từ 0,5 đến 1cm.

- Đặt cây sâm con vào hốc bầu ươm, ép chặt đất kín cổ rễ.

- Tưới ẩm sau khi chuyển bầu, duy trì độ ẩm giá thể bầu ươm cây con từ 70 -80% độ ẩm tuyệt đối.

- Tiến hành phun chế phẩm Trichoderma để phòng trừ bệnh hại, cách 15 ngày phun 1 lần đến khi suất vườn.

- Nhổ và làm sạch cỏ dại mọc trong bầu ươm cây con.

III. TIÊU CHUẨN CÂY CON SUẤT VƯỜN

- Lá xanh đậm hoặc xanh vừa, có từ 2 - 3 lá.

- Chiều cao trung bình 13 - 15cm.

- Chiều dài thân rễ: 1,0 cm trở lên.

- Đường kính thân rễ: 0,8 cm trở lên.

- Thân rễ có từ 1 - 3 rễ chính.

- Cây khỏe mạnh, không sâu bệnh.

Phụ luc 8

Diễn biến thời tiết của huyện Tu Mơ Rông năm 2018-2020

Tháng (T)	Nhiệt độ (^{0}C)			Độ ẩm (%)			Số giờ nắng (giờ)			Lượng mưa (mm)		
	2018	2019	2020	2018	2019	2020	2018	2019	2020	2018	2019	2020
T1	21,6	21,3	21,6	78,0	71,0	72,0	216,7	256,6	278,9	25,0	0,0	0,4
T2	21,0	24,1	22,2	74,0	66,0	67,0	255,0	262,8	282,0	0,0	0,3	0,0
T3	23,4	25,1	26,2	76,0	69,0	72,0	251,0	230,4	244,6	63,5	151,6	18,5
T4	24,8	25,8	25,5	73,0	74,0	75,0	230,0	238,5	317,5	78,2	151,8	96,1
T5	25,1	25,8	26,5	80,0	78,0	81,0	251,0	182,7	212,1	63,5	280,7	175,0
T6	24,1	25,5	25,5	85,0	81,0	84,0	104,0	160,1	175,7	202,7	137,7	152,6
T7	23,5	24,2	25,2	91,0	85,0	85,0	48,9	95,5	180,7	497,4	252,0	180,4
T8	23,8	24,0	24,6	89,0	88,0	89,0	62,00	67,2	114,1	536,8	267,1	364,9
T9	24,8	23,8	24,9	85,0	82,0	87,0	188,8	141,5	160,7	328,6	246,6	199,7
T10	23,6	23,9	23,2	79,0	77,0	90,0	235,7	203,6	99,8	54,7	51,5	479,0
T11	23,7	22,3	22,4	76,0	76,0	82,0	231,2	200,0	182,2	0,4	30,7	51,6
T12	23,3	20,3	21,8	75,0	74,0	76,0	228,8	276,7	248,2	1,2	0,0	0,0
TB năm	**23,5**	**23,8**	**24,1**	**80,1**	**76,8**	**80,0**	**2303,1**	**2315,6**	**2496,5**	**1852,0**	**1570,0**	**1718,2**

Phụ lục 9

Kết quả thiết kế chỉ thị phân tử dựa trên trình tự hệ gen nhân

STT	Kí hiệu	Kiểu lặp và đơn vị lặp	Nhiệt độ gắn mồi	Kích thước sản phẩm PCR (bp)
1	G1	(TAT)10	59	182
2	G2	(TA)26	60	247
3	G20	(TTAAT)3	57	276
4	G24	(TA)24	59	221
5	G34	(AT)15	58	205
6	G36	(TA)24	60	219
7	G41	(GGAACC)3	58	299
8	G42	(ATTTTTT)3	58	166
9	G43	(TA)27	59	162
10	G46	(CAA)10	60	204
11	G48	(CTGCTGG)4	58	239
12	G50	(AT)22	59	175
13	G51	(AG)17	58	205
14	G52	(TTA)10	58	249
15	G53	(AT)18	58	250
16	G54	(AGCTCT)3	59	319
17	G55	(CT)14	58	168
18	G56	(AT)13	57	250
19	G57	(CT)12	57	152
20	G58	(TA)21	60	230
21	G59	(AT)10	57	244
22	G60	(GA)10	58	176
23	G61	(TA)13	59	225
24	G62	(AT)12	58	238
25	G63	(TA)12	58	228
26	G64	(TA)10	58	289
27	G65	(AT)10	58	250
28	G66	(AGT)7, (AG)5	58	235
29	G67	(AG)10	58	230
30	G68	(GATG)6	59	220
31	G69	(AAAC)3	57	243
32	G70	(AG)10	59	227

STT	Kí hiệu	Kiểu lặp và đơn vị lặp	Nhiệt độ gắn mồi	Kích thước sản phẩm PCR (bp)
33	E1	(TTA)7	52	288
34	E3	(TTTGT)3	59	240
35	E5	(GGGGA)3	59	250
36	E13	(CAAAAT)5	59	179
37	E14	(AT)30, (AC)6	57	224
38	E16	(AT)22	59	237
39	E19	(AT)32	59	191
40	E20	(AT)21	58	212
41	E21	(TCTCAAC)4	59	171
42	E23	(AT)20	57	298
43	E24	(AT)21	58	209
44	E25	(AT)28	59	196
45	E26	(AAG)7	59	235
46	E27	(TAT)6	59	186
47	E28	(AAAAAT)4	59	207
48	E29	(TA)11	59	235
49	E31	(GAAAGA)4	59	246
50	E32	(CACTG)5	58	199
51	E33	(GCCCCT)3	58	173
52	E34	(TCAGCA)3	59	182
53	E35	(GAG)7	59	160
54	E36	(TC)20, (AATT)3	59	246
55	E37	(GGTGAG)5	59	199
56	E38	(TC)10	59	189
57	E39	(CCATCT)5	58	150
58	E40	(AT)12	59	200
59	E41	(TA)14	59	217
60	E42	(TGATGC)3	60	249
61	E44	(GAG)8	59	159
62	M1	(AGAGAGAC)3	58	199
63	M2	(TG)10	60	154
64	M11	(TTTCTCC)4	58	163
65	M12	(AGAT)11	58	142
66	M13	(AAATGG)5	58	153
67	M14	(AATA)7	58	166
68	M15	(GA)15	59	100

STT	Kí hiệu	Kiểu lặp và đơn vị lặp	Nhiệt độ gắn mồi	Kích thước sản phẩm PCR (bp)
69	M16	(TCA)7	59	161
70	M17	(GA)22	59	196
71	M18	(CAA)10	59	199
72	M19	(GA)15	59	223
73	M20	(AGG)7	58	218
74	M22	(TC)14	59	224
75	M23	(CT)9, (GTCG)3	59	213
76	M24	(TGC)4(GA)8	58	154
77	M25	(ATAC)5	58	243
78	M26	(TGAA)5	60	247
79	M27	(ACA)8	59	179
80	M28	(GAA)6	58	150
81	M29	(AACA)5	59	248
82	M30	(AAC)6	59	230
83	M31	(CAG)6	59	175
84	M32	(AGG)6	59	223
85	M33	(AC)9	59	168
86	M34	(CATA)5	59	115
87	M35	(GAA)6	60	104
88	M36	(CAA)6	59	219
89	M38	(GA)9	60	166
90	M40	(AGA)5	59	151

Phụ lục 10

HÌNH ẢNH

MỘT SỐ HÌNH ẢNH THỰC HIỆN ĐỀ TÀI

Hình 1: Trao đổi về kỹ thuật trồng

Hình 2: Trao đổi về tiềm năng phát triển sản phẩm sâm Ngọc Linh

Hình 3: Trao đổi tìm hiểu thông tin với dược sỹ Đào Kim Long tại đỉnh núi Ngọc Linh

Hình 4: Củ sâm Ngọc Linh tại phiên chợ huyện Nam Tra My

Hình 5: Nhà cung cấp củ sâm Ngọc Linh

Hình 6: Tham gia Hội thảo

Hình 7: Chuẩn bị mẫu

Hình 8: Ủ mẫu

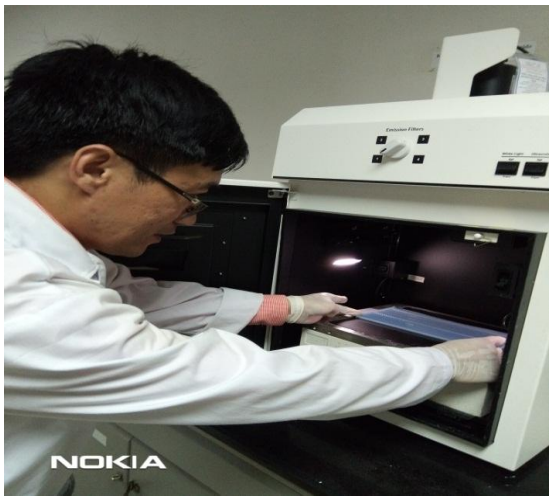
Hình 9: Chuẩn bị chạy ly tâm

Hình 10: Chuẩn bị phản ứng PCR

Hình 11: Phản ứng PCR

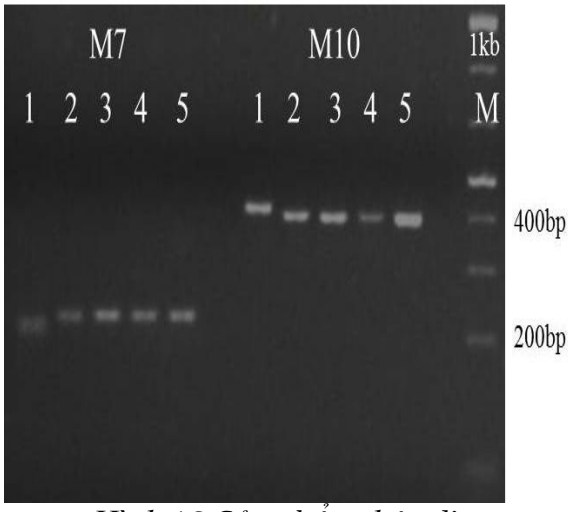
Hình 12: Gel agarose

Hình 13:Giếng điện di



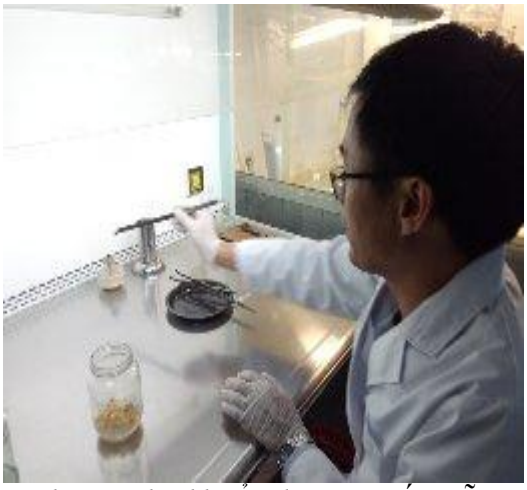
Hình 14: Soi UV và chụp ảnh

Hình 15: Lưu máy tính

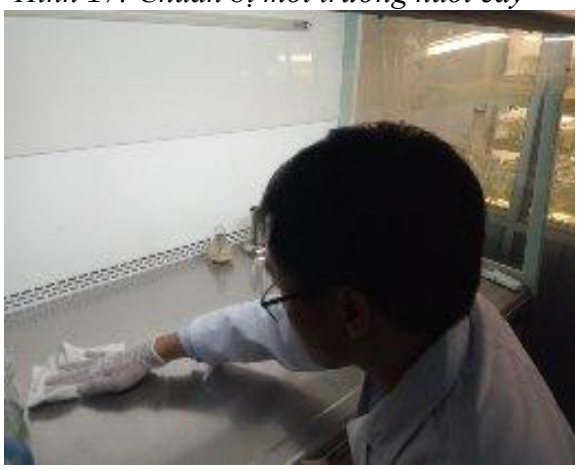


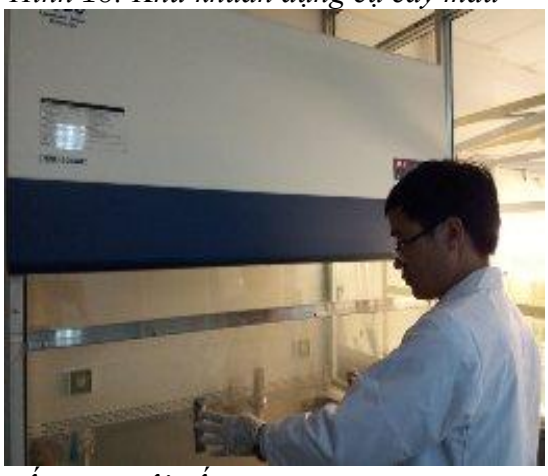
Hình 16:Sản phẩm điện di

Hình 17: Chuẩn bị môi trường nuôi cấy

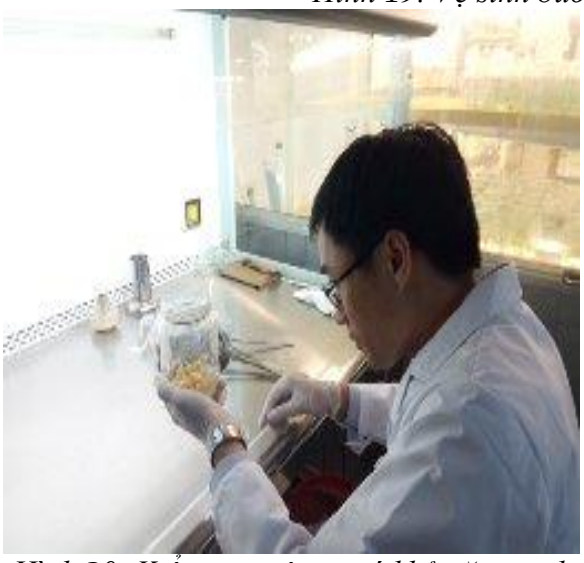


Hình 18: Khử khuẩn dụng cụ cấy mẫu

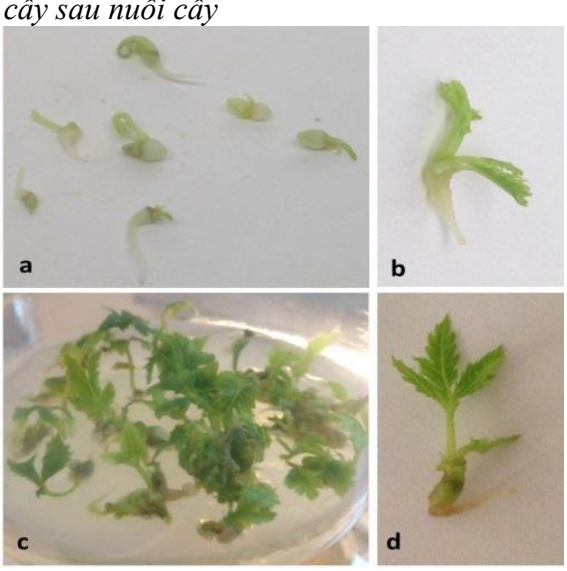




Hình 19: Vệ sinh buồng cấy sau nuôi cấy



Hình 20: Kiểm tra mô sẹo có khả năng sinh phôi



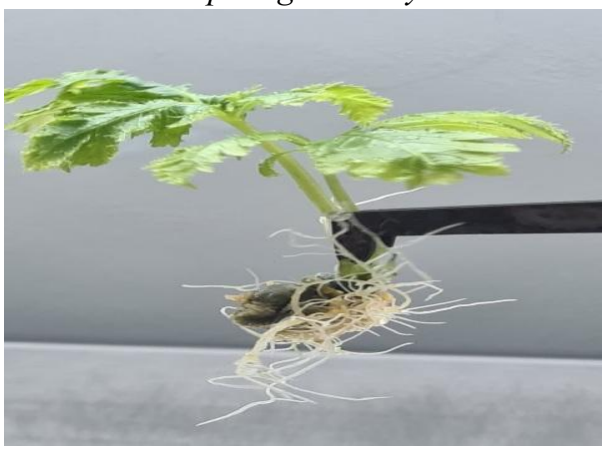
Hình 21: Sự phát nảy mầm của phôi thành cây con với củ micro

Hình 22: Cây con có rễ, củ micro

Hình 23: Cây con hoàn chỉnh với rễ, củ micro, thân lá

Hình 24: GS.TS. Nguyễn Quang Thạch thăm phòng nuôi cấy mô

Hình 25: Phòng nuôi cấy mô



Hình 26: Cây con hoàn chỉnh với rễ, củ micro, thân lá

Hình 27: Trồng cây nuôi cấy mô

Hình 28: Cây nuôi cấy mô sau 2 tháng trồng sinh trưởng tốt

Hình 29: Cấy nuôi cấy mô sau 2 năm ở ngoài vườn ươm

Hình 30: Củ sâm nuôi cấy mô sau 2 năm ở ngoài vườn ươm

Hình 31: Kiểm tra quả sâm giống sâm

Hình 32: Quả sâm đã chín

Hình 33: Hạt sâm

Hình 34: hạt sâm nảy mầm

Hình 35: Gieo hạt trên luống

Hình 36: Máy xay xác bã thực vật để ủ phân vi sinh

Hình 37: Sản phẩm từ xác bã thực vật

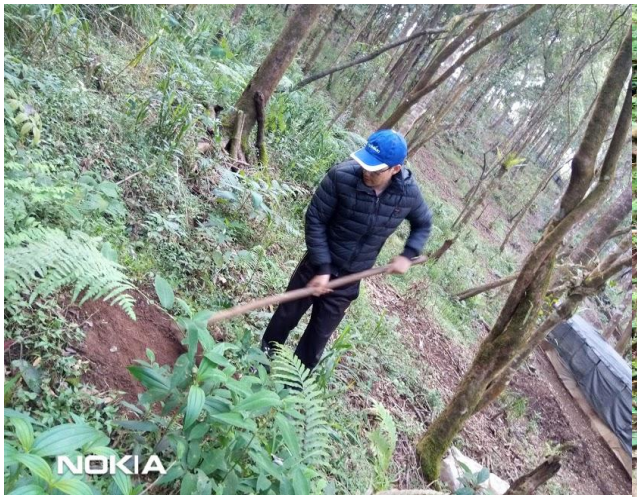
Hình 38: Kiểm tra đống ủ phân hữu cơ

Hình 39: Xàng phân hữu cơ ủ hoai

Hinh 40: Bổ sung chế phẩm sinh học

Hình 41: Vật liệu phân bón

Hình 42: Xắp xếp các khay thí nghiệm



Hình 43: Lấy mẫu đất rừng

Hình 44: Thí nghiệm bảo quản hạt

Hình 45: Thí nghiệm giá thể gieo hạt

Hình 46: Thí nghiệm mật độ trồng

Hình 47: Thí nghiệm phân bón

Hình 48: Các khay thí nghiệm được đặt cách mặt đất

Hình 49: Đô chiều cao cây

Hình 50: Cân khối lượng toàn cây

Hình 51:Hình ảnh củ sâm 3 tuổi

Hình 52: Đo đường kính củ

Hình 53: Cân khối lượng củ sâm

Phục lục 11

KẾT QUẢ XỬ LÝ THỐNG KÊ

Bảng 3.6. Tỷ lệ nhiễm khi vào mẫu từ mô củ cây sâm Ngọc Linh

```
BALANCED ANOVA FOR VARIATE      TLN  FILE TLN1   12/ 4/20 15:26
BALANCED ANOVA FOR VARIATE     XLMC  FILE XLMC   24/12/22  9:55
 ---------------------------------------------------------------- :PAGE   1
 VARIATE V003 XLMC

 LN   SOURCE OF VARIATION            DF  SUMS OF     MEAN     F RATIO PROB  ER
                                         SQUARES     SQUARES               LN
 ==============================================================================
 1 NL                                2 7.04705     3.52353       0.74 0.510  3
 2 CT                                4 15121.2     3780.30     794.71 0.000  3
 * RESIDUAL                          8 38.0545     4.75682
 ------------------------------------------------------------------------------
 * TOTAL (CORRECTED)                14 15166.3     1083.31
 ------------------------------------------------------------------------------
 TABLE OF MEANS FOR FACTORIAL EFFECTS  FILE XLMC   24/12/22  9:55
 ---------------------------------------------------------------- :PAGE   2
 MEANS FOR EFFECT NL
 ------------------------------------------------------------------------------
       NL         NOS         XLMC
 1                  5        50.3140
 2                  5        48.8600
 3                  5        48.8600

 SE(N=   5)                 0.975379
 5%LSD   8DF                 3.18061
 ------------------------------------------------------------------------------
 MEANS FOR EFFECT CT
 ------------------------------------------------------------------------------
       CT         NOS         XLMC
 1                  3        90.0000
 2                  3        70.0567
 3                  3        62.5000
 4                  3        14.1667
 5                  3        10.0000

 SE(N=   3)                  1.25921
 5%LSD   8DF                 4.10615
 ------------------------------------------------------------------------------
 ANALYSIS OF VARIANCE SUMMARY TABLE  FILE XLMC   24/12/22  9:55
 ---------------------------------------------------------------- :PAGE   3
  F-PROBABLIITY VALUES FOR EACH EFFECT IN THE MODEL. SECTION - 1

  VARIATE       GRAND MEAN  STANDARD   DEVIATION  C OF V |NL      |CT      |
                 (N=   15)  -------------------- SD/MEAN |        |        |
               NO.           BASED ON   BASED ON    %    |        |        |
               OBS.          TOTAL SS   RESID SS         |        |        |
     XLMC       15  49.345     32.914     2.1810      4.4 0.5101   0.0000
```

Col_1	*Count*	*Mean*	*Homogeneous Groups*
5	3	10.0	X
4	3	14.1667	X
3	3	62.5	X
2	3	70.0567	X
1	3	90.0	X

Bảng 3.7. Tỷ lệ nhiễm khi vào mẫu từ mô chồi mầm cây sâm Ngọc Linh

```
 BALANCED ANOVA FOR VARIATE     XLMC  FILE XLMC   24/12/22  9:55
---------------------------------------------------------------- :PAGE   1
VARIATE V003 XLMC

LN   SOURCE OF VARIATION            DF  SUMS OF     MEAN     F RATIO PROB  ER
                                        SQUARES     SQUARES               LN
==============================================================================
1 NL                                 2 7.04705     3.52353       0.74 0.510  3
2 CT                                 4 15121.2     3780.30     794.71 0.000  3
* RESIDUAL                           8 38.0545     4.75682
------------------------------------------------------------------------------
* TOTAL (CORRECTED)                 14 15166.3     1083.31
------------------------------------------------------------------------------
TABLE OF MEANS FOR FACTORIAL EFFECTS  FILE XLMC   24/12/22  9:55
---------------------------------------------------------------- :PAGE   2
MEANS FOR EFFECT NL
--------------------------------------------------------------------------------
      NL         NOS         XLMC
1                  5        50.3140
2                  5        48.8600
3                  5        48.8600

SE(N=   5)                 0.975379
5%LSD   8DF                 3.18061
--------------------------------------------------------------------------------
MEANS FOR EFFECT CT
--------------------------------------------------------------------------------

      CT         NOS         XLMC
1                  3        90.0000
2                  3        70.0567
3                  3        62.5000
4                  3        14.1667
5                  3        10.0000

SE(N=   3)                  1.25921
5%LSD   8DF                 4.10615
--------------------------------------------------------------------------------
ANALYSIS OF VARIANCE SUMMARY TABLE  FILE XLMC   24/12/22  9:55
---------------------------------------------------------------- :PAGE   3
 F-PROBABLIITY VALUES FOR EACH EFFECT IN THE MODEL. SECTION - 1

 VARIATE       GRAND MEAN  STANDARD   DEVIATION  C OF V |NL      |CT      |
               (N=   15)   -------------------- SD/MEAN |        |        |
              NO.           BASED ON   BASED ON    %    |        |        |
              OBS.          TOTAL SS   RESID SS         |        |        |
    XLMC       15  49.345     32.914     2.1810      4.4 0.5101   0.0000
```

Method: 95.0 percent LSD

Col_1	*Count*	*Mean*	*Homogeneous Groups*
4	3	5.0	X
3	3	20.0	X
2	3	23.3333	X
5	3	31.6667	X
1	3	90.0	X

Bảng 3.8. Tỷ lệ nhiễm khi vào mẫu từ mô thân cây sâm Ngọc Linh

```
---------------------------------------------------------------- :PAGE   1
VARIATE V003 XLMT

LN   SOURCE OF VARIATION            DF  SUMS OF     MEAN     F RATIO PROB  ER
                                        SQUARES     SQUARES               LN
==============================================================================
1 NL                                 2 33.7120     16.8560       3.17 0.096  3
2 CT                                 4 14792.0     3698.01     694.77 0.000  3
* RESIDUAL                           8 42.5814     5.32268
------------------------------------------------------------------------------
* TOTAL (CORRECTED)                 14 14868.3     1062.02
------------------------------------------------------------------------------
TABLE OF MEANS FOR FACTORIAL EFFECTS  FILE XLMT   24/12/22 10:36
```

```
---------------------------------------------------------------- :PAGE   2
MEANS FOR EFFECT NL
--------------------------------------------------------------------------------

      NL         NOS         XLMT
1                  5        44.0800
2                  5        46.3200
3                  5        42.6800

SE(N=   5)                  1.03176
5%LSD   8DF                 3.36448
--------------------------------------------------------------------------------
MEANS FOR EFFECT CT
--------------------------------------------------------------------------------
      CT         NOS         XLMT
1                  3        90.0000
2                  3        67.8000
3                  3        41.3333
4                  3        18.6667
5                  3        4.00000

SE(N=   3)                  1.33200
5%LSD   8DF                 4.34352
--------------------------------------------------------------------------------
ANALYSIS OF VARIANCE SUMMARY TABLE  FILE XLMT   24/12/22 10:36
---------------------------------------------------------------- :PAGE   3

 F-PROBABLIITY VALUES FOR EACH EFFECT IN THE MODEL. SECTION - 1

 VARIATE       GRAND MEAN  STANDARD   DEVIATION  C OF V |NL      |CT      |
               (N=   15)   -------------------- SD/MEAN |        |        |
              NO.           BASED ON   BASED ON    %    |        |        |
              OBS.          TOTAL SS   RESID SS         |        |        |
             XLMT       15  44.360     32.589     2.3071      5.2 0.0963   0.0000
```

Method: 95.0 percent LSD

Col_1	*Count*	*Mean*	*Homogeneous Groups*
5	3	4.0	X
4	3	18.6667	X
3	3	41.3333	X
2	3	67.8	X
1	3	90.0	X

3.9. Tỷ lệ nhiễm khi vào mẫu từ mô lá cây sâm Ngọc Linh

```
BALANCED ANOVA FOR VARIATE    XLML1  FILE XLML1   24/12/22 23:22
---------------------------------------------------------------- :PAGE   1
VARIATE V003 XLML1

LN   SOURCE OF VARIATION            DF  SUMS OF     MEAN     F RATIO PROB  ER
                                        SQUARES     SQUARES               LN
================================================================================
1 NL                                 2 4.18534     2.09267       0.16 0.858  3
2 CT                                 4 12898.2     3224.55     239.84 0.000  3
* RESIDUAL                           8 107.555     13.4443
--------------------------------------------------------------------------------
* TOTAL (CORRECTED)                 14 13010.0     929.283
--------------------------------------------------------------------------------
TABLE OF MEANS FOR FACTORIAL EFFECTS  FILE XLML1   24/12/22 23:22
---------------------------------------------------------------- :PAGE   2
MEANS FOR EFFECT NL
--------------------------------------------------------------------------------

      NL         NOS        XLML1
1                  5        47.4600
2                  5        48.7000
3                  5        48.4000

SE(N=   5)                  1.63978
5%LSD   8DF                 5.34715
--------------------------------------------------------------------------------
MEANS FOR EFFECT CT
```

```
-------------------------------------------------------------------------------

      CT         NOS        XLML1
1                  3        90.0000
2                  3        68.0667
3                  3        51.4333
4                  3        20.0000
5                  3        11.4333

SE(N=   3)                  2.11694
5%LSD   8DF                 6.90313
-------------------------------------------------------------------------------
ANALYSIS OF VARIANCE SUMMARY TABLE  FILE XLML1   24/12/22 23:22
------------------------------------------------------------------ :PAGE   3

 F-PROBABLIITY VALUES FOR EACH EFFECT IN THE MODEL. SECTION - 1

 VARIATE       GRAND MEAN  STANDARD   DEVIATION  C OF V |NL      |CT      |
               (N=   15)   -------------------- SD/MEAN |        |        |
              NO.           BASED ON   BASED ON    %    |        |        |
              OBS.          TOTAL SS   RESID SS         |        |        |
   XLML1       15  48.187     30.484     3.6667      7.6 0.8585   0.0000
```

Method: 95.0 percent LSD

Col_1	*Count*	*Mean*	*Homogeneous Groups*
5	3	11.4333	X
4	3	20.0	X
3	3	51.4333	X
2	3	68.0667	X
1	3	90.0	X

Bảng 3.10. Ảnh hưởng của chất 2,4-D đến sự tạo thành mô sẹo ở cây sâm Ngọc Linh

a. Tỷ lệ phôi vô tính được tạo thành (%)

```
 BALANCED ANOVA FOR VARIATE    TLPVT  FILE TLPVT   23/12/22 23:30
------------------------------------------------------------------ :PAGE   1
VARIATE V003 TLPVT

LN   SOURCE OF VARIATION            DF  SUMS OF     MEAN     F RATIO PROB  ER
                                        SQUARES     SQUARES                LN
===============================================================================
1 NL                                 2 197.494     98.7471       3.85 0.043  3
2 CT                                 8 11902.8     1487.85      57.97 0.000  3
* RESIDUAL                          16 410.653     25.6658
-------------------------------------------------------------------------------
* TOTAL (CORRECTED)                 26 12510.9     481.189
-------------------------------------------------------------------------------
TABLE OF MEANS FOR FACTORIAL EFFECTS  FILE TLPVT   23/12/22 23:30
------------------------------------------------------------------ :PAGE   2
MEANS FOR EFFECT NL
-------------------------------------------------------------------------------
      NL         NOS        TLPVT
1                  9        50.9189
2                  9        56.8556
3                  9        56.4333

SE(N=   9)                  1.68871
5%LSD  16DF                 5.06279
-------------------------------------------------------------------------------
MEANS FOR EFFECT CT
-------------------------------------------------------------------------------
      CT         NOS        TLPVT
1                  3        45.0000
2                  3        74.5767
3                  3        50.0000
4                  3        20.0000
5                  3        35.0000
6                  3        55.0000
7                  3        79.0100
8                  3        89.0367
```

```
9                  3        45.0000

SE(N=   3)                  2.92494
5%LSD  16DF                 8.76901
--------------------------------------------------------------------------------
ANALYSIS OF VARIANCE SUMMARY TABLE  FILE TLPVT   23/12/22 23:30
------------------------------------------------------------------ :PAGE   3
 F-PROBABLIITY VALUES FOR EACH EFFECT IN THE MODEL. SECTION - 1

 VARIATE       GRAND MEAN  STANDARD   DEVIATION  C OF V |NL      |CT      |
               (N=   27)   -------------------- SD/MEAN |        |        |
              NO.           BASED ON   BASED ON    %    |        |        |
              OBS.          TOTAL SS   RESID SS         |        |        |
   TLPVT       27  54.736     21.936     5.0661      3.3 0.0425   0.0000
```

Method: 95.0 percent LSD

Col_1	*Count*	*Mean*	*Homogeneous Groups*
4	3	20.0	X
5	3	35.0	X
9	3	45.0	X
1	3	45.0	X
3	3	50.0	XX
6	3	55.0	X
2	3	74.5767	X
7	3	79.01	X
8	3	89.0367	X

b. TB số phôi vô tính/mô sẹo

```
 BALANCED ANOVA FOR VARIATE     SPVT  FILE SPVT   25/12/22 11:51
------------------------------------------------------------------ :PAGE   1
VARIATE V003 SPVT

LN   SOURCE OF VARIATION            DF  SUMS OF     MEAN     F RATIO PROB  ER
                                        SQUARES     SQUARES               LN
================================================================================
1 NL                                 2 .622221E-01 .311111E-01   0.33 0.726  3
2 CT                                 8 265.327     33.1658     354.29 0.000  3
* RESIDUAL                          16 1.49778     .936115E-01
--------------------------------------------------------------------------------
* TOTAL (CORRECTED)                 26 266.887     10.2649
--------------------------------------------------------------------------------
TABLE OF MEANS FOR FACTORIAL EFFECTS  FILE SPVT   25/12/22 11:51
------------------------------------------------------------------ :PAGE   2
MEANS FOR EFFECT NL
--------------------------------------------------------------------------------

      NL         NOS         SPVT
1                  9        14.8000
2                  9        14.9111
3                  9        14.8222

SE(N=   9)                 0.101987
5%LSD  16DF                0.305758
--------------------------------------------------------------------------------
MEANS FOR EFFECT CT
--------------------------------------------------------------------------------

      CT         NOS         SPVT
1                  3        12.6000
2                  3        18.5000
3                  3        16.3000
4                  3        12.1000
5                  3        12.2000
6                  3        13.6000
7                  3        17.5000
8                  3        20.1000
9                  3        10.7000

SE(N=   3)                 0.176646
5%LSD  16DF                0.529588
--------------------------------------------------------------------------------
ANALYSIS OF VARIANCE SUMMARY TABLE  FILE SPVT   25/12/22 11:51
```

```
---------------------------------------------------------------- :PAGE   3
 F-PROBABLIITY VALUES FOR EACH EFFECT IN THE MODEL. SECTION - 1

 VARIATE       GRAND MEAN  STANDARD   DEVIATION  C OF V |NL      |CT      |
               (N=   27)   -------------------- SD/MEAN |        |        |
              NO.           BASED ON   BASED ON    %    |        |        |
              OBS.          TOTAL SS   RESID SS         |        |        |
    SPVT       27  14.844     3.2039    0.30596      2.1 0.7259   0.0000
```

Col_1	Count	Mean	Homogeneous Groups
9	3	10.7	X
4	3	12.1	X
5	3	12.2	X
1	3	12.6	X
6	3	13.6	X
3	3	16.3	X
7	3	17.5	X
2	3	18.5	X
8	3	20.1	X

Bảng 3.11. Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến sự nảy mầm của phôi thành cây con in vitro với củ micro sâm Ngọc Linh

```
BALANCED ANOVA FOR VARIATE      PNM  FILE PNM   23/12/22 23:46
 ---------------------------------------------------------------- :PAGE   1
 VARIATE V003 PNM
 LN   SOURCE OF VARIATION            DF  SUMS OF     MEAN     F RATIO PROB  ER
                                         SQUARES     SQUARES                LN
 ==============================================================================
 1 NL                                 2 6.99462     3.49731       8.29 0.004  3
 2 CT                                 7 5968.57     852.653     ****** 0.000  3
 * RESIDUAL                          14 5.90770     .421978
 ------------------------------------------------------------------------------
 * TOTAL (CORRECTED)                 23 5981.48     260.064
 ------------------------------------------------------------------------------
 TABLE OF MEANS FOR FACTORIAL EFFECTS  FILE PNM   23/12/22 23:46
 ---------------------------------------------------------------- :PAGE   2
 MEANS FOR EFFECT NL
 ------------------------------------------------------------------------------
       NL         NOS          PNM
 1                  8        49.9500
 2                  8        48.6450
 3                  8        49.1125

 SE(N=   8)                 0.229668
 5%LSD  14DF                0.696633
 ------------------------------------------------------------------------------
 MEANS FOR EFFECT CT
 ------------------------------------------------------------------------------
       CT         NOS          PNM
 1                  3        26.5000
 2                  3        31.0000
 3                  3        38.5000
 4                  3        51.5000
 5                  3        69.7433
 6                  3        60.5000
 7                  3        45.5000
 8                  3        70.6433
 SE(N=   3)                 0.375046
 5%LSD  14DF                 1.13760
 ------------------------------------------------------------------------------
 ANALYSIS OF VARIANCE SUMMARY TABLE  FILE PNM   23/12/22 23:46
 ---------------------------------------------------------------- :PAGE   3
  F-PROBABLIITY VALUES FOR EACH EFFECT IN THE MODEL. SECTION - 1

 VARIATE       GRAND MEAN  STANDARD   DEVIATION  C OF V |NL      |CT      |
               (N=   24)   -------------------- SD/MEAN |        |        |
              NO.           BASED ON   BASED ON    %    |        |        |
              OBS.          TOTAL SS   RESID SS         |        |        |
     PNM       24  49.236     16.127    0.64960      1.3 0.0043   0.0000
```

Col_1	*Count*	*Mean*	*Homogeneous Groups*
1	3	26.5	X
2	3	31.0	X
3	3	38.5	X
7	3	45.5	X
4	3	51.5	X
6	3	60.5	X
5	3	69.7433	X
8	3	70.6433	X

Bảng 3.12. Ảnh hưởng của môi trường dinh dưỡng và chất điều tiết sinh trưởng đến khả năng ra rễ của cây có củ micro cây sâm Ngọc Linh

a. Số lượng rễ trung bình (cái) cây sâm Ngọc Linh ở môi trường (MS)

```
BALANCED ANOVA FOR VARIATE      SR1  FILE SR1    1/ 6/23 21:28
 ---------------------------------------------------------------- :PAGE   1
 VARIATE V003 SR1

 LN   SOURCE OF VARIATION            DF  SUMS OF     MEAN     F RATIO PROB  ER
                                         SQUARES     SQUARES                LN
 ==============================================================================
 1 NL                                2 .246667E-02 .123333E-02   0.12 0.893  3
 2 CT                                2 .960000     .480000      45.14 0.003  3
 * RESIDUAL                          4 .425331E-01 .106333E-01
 ------------------------------------------------------------------------------
 * TOTAL (CORRECTED)                 8 1.00500     .125625
 ------------------------------------------------------------------------------
 TABLE OF MEANS FOR FACTORIAL EFFECTS  FILE SR1    1/ 6/23 21:28
 ---------------------------------------------------------------- :PAGE   2
 MEANS FOR EFFECT NL
 ------------------------------------------------------------------------------
       NL         NOS          SR1
 1                  3        1.58667
 2                  3        1.59000
 3                  3        1.62333

 SE(N=   3)                 0.595351E-01
 5%LSD   4DF                0.233365
 ------------------------------------------------------------------------------
 MEANS FOR EFFECT CT
 ------------------------------------------------------------------------------

       CT         NOS          SR1
 1                  3        1.20000
 2                  3        1.60000
 3                  3        2.00000

 SE(N=   3)                 0.595351E-01
 5%LSD   4DF                0.233365
 ------------------------------------------------------------------------------
 ANALYSIS OF VARIANCE SUMMARY TABLE  FILE SR1    1/ 6/23 21:28
 ---------------------------------------------------------------- :PAGE   3
  F-PROBABLIITY VALUES FOR EACH EFFECT IN THE MODEL. SECTION - 1

  VARIATE       GRAND MEAN  STANDARD   DEVIATION  C OF V |NL      |CT      |
                 (N=    9)  -------------------- SD/MEAN |        |        |
               NO.           BASED ON   BASED ON    %    |        |        |
               OBS.          TOTAL SS   RESID SS         |        |        |
      SR1        9  1.6000    0.35444    0.10312      6.4 0.8927   0.0031
```

Col_1	*Count*	*Mean*	*Homogeneous Groups*
1	3	1.2	X
2	3	1.6	X
3	3	2.0	X

b. Số lượng rễ trung bình (cái) cây sâm Ngọc Linh ở môi trường (SH)

```
BALANCED ANOVA FOR VARIATE       SR  FILE SRSH   13/ 4/20  0: 4
 ------------------------------------------------------------------ :PAGE   1
 VARIATE V003 SR

 LN   SOURCE OF VARIATION            DF  SUMS OF     MEAN     F RATIO PROB  ER
                                         SQUARES     SQUARES                LN
 ==============================================================================
 1 NL                                2 .206000E-01 .103000E-01   0.32 0.742  3
 2 MT                                2 12.7400     6.37000     200.00 0.001  3
 * RESIDUAL                          4 .127399     .318497E-01
 ------------------------------------------------------------------------------
 * TOTAL (CORRECTED)                 8 12.8880     1.61100
 ------------------------------------------------------------------------------
 TABLE OF MEANS FOR FACTORIAL EFFECTS  FILE SRSH   13/ 4/20  0: 4
 ------------------------------------------------------------------ :PAGE   2
 MEANS FOR EFFECT NL
 ------------------------------------------------------------------------------
       NL         NOS           SR
 1                  3        3.92333
 2                  3        3.94333
 3                  3        4.03333

 SE(N=   3)                 0.103037
 5%LSD   4DF                0.403882
 ------------------------------------------------------------------------------
 MEANS FOR EFFECT MT
 ------------------------------------------------------------------------------

       MT         NOS           SR
 1                  3        2.60000
 2                  3        3.80000
 3                  3        5.50000

 SE(N=   3)                 0.103037
 5%LSD   4DF                0.403882
 ------------------------------------------------------------------------------
 ANALYSIS OF VARIANCE SUMMARY TABLE  FILE SRSH   13/ 4/20  0: 4
 ------------------------------------------------------------------ :PAGE   3

  F-PROBABLIITY VALUES FOR EACH EFFECT IN THE MODEL. SECTION - 1

  VARIATE       GRAND MEAN  STANDARD   DEVIATION  C OF V |NL      |MT      |
                 (N=    9)  -------------------- SD/MEAN |        |        |
               NO.           BASED ON   BASED ON    %    |        |        |
               OBS.          TOTAL SS   RESID SS         |        |        |
       SR        9  3.9667     1.2693    0.17846      4.5 0.7423   0.0005
```

Method: 95.0 percent LSD

Col_1	*Count*	*Mean*	*Homogeneous Groups*
1	3	2.6	X
2	3	3.8	X
3	3	5.5	X

Bảng 3.13. Ảnh hưởng của hàm lượng than hoạt tính đến sự sinh trưởng và ra rễ của cây *in vitro* sâm Ngọc Linh

```
BALANCED ANOVA FOR VARIATE      SRC  FILE SRC    2/ 7/22 16:24
 ------------------------------------------------------------------ :PAGE   1
 VARIATE V003 SRC

 LN   SOURCE OF VARIATION            DF  SUMS OF     MEAN     F RATIO PROB  ER
                                         SQUARES     SQUARES                LN
 ==============================================================================
 1 NL                                2 .365000E-02 .182500E-02   0.44 0.667  3
 2 CT                                3 19.8300     6.61000     ****** 0.000  3
 * RESIDUAL                          6 .249470E-01 .415784E-02
 ------------------------------------------------------------------------------
 * TOTAL (CORRECTED)                11 19.8586     1.80533
```

```
---------------------------------------------------------------------------
TABLE OF MEANS FOR FACTORIAL EFFECTS  FILE SRC    2/ 7/22 16:24
------------------------------------------------------------------ :PAGE   2
MEANS FOR EFFECT NL
---------------------------------------------------------------------------
      NL         NOS          SRC
1                  4        2.97250
2                  4        2.93000
3                  4        2.94750

SE(N=   4)                 0.322406E-01
5%LSD   6DF                0.111526
---------------------------------------------------------------------------
MEANS FOR EFFECT CT
---------------------------------------------------------------------------
      CT         NOS          SRC
1                  3        1.20000
2                  3        2.30000
3                  3        4.50000
4                  3        3.80000

SE(N=   3)                 0.372283E-01
5%LSD   6DF                0.206779
---------------------------------------------------------------------------
ANALYSIS OF VARIANCE SUMMARY TABLE  FILE SRC    2/ 7/22 16:24
------------------------------------------------------------------ :PAGE   3
 F-PROBABLIITY VALUES FOR EACH EFFECT IN THE MODEL. SECTION - 1

 VARIATE       GRAND MEAN  STANDARD   DEVIATION  C OF V |NL      |CT      |
               (N=   12)   -------------------- SD/MEAN |        |        |
              NO.           BASED ON   BASED ON    %    |        |        |
              OBS.          TOTAL SS   RESID SS         |        |        |
     SRC       12  2.9500     1.3436    0.64481E-01  3.3 0.6670   0.0000
```

Method: 95.0 percent LSD

Col_1	*Count*	*Mean*	*Homogeneous Groups*
1	3	1.2	X
2	3	2.3	X
4	3	3.8	X
3	3	4.5	X

Bảng 3.14. Ảnh hưởng của hàm lượng dinh dưỡng cơ bản đến sinh trưởng của cây sâm Ngọc Linh

a. Số rễ/cây

```
BALANCED ANOVA FOR VARIATE      R/C  FILE AHDDCBRC   13/ 4/20 22:21
------------------------------------------------------------------ :PAGE   1
 VARIATE V003 SRSH

 LN   SOURCE OF VARIATION            DF  SUMS OF     MEAN     F RATIO PROB  ER
                                         SQUARES     SQUARES               LN
 ==========================================================================
 1 NL                                2 .319998E-02 .159999E-02   0.74 0.533  3
 2 CT                                2 .860000     .430000     200.00 0.001  3
 * RESIDUAL                          4 .860006E-02 .215002E-02
 --------------------------------------------------------------------------
 * TOTAL (CORRECTED)                 8 .871800     .108975
 --------------------------------------------------------------------------
 TABLE OF MEANS FOR FACTORIAL EFFECTS  FILE SRSH    2/ 7/22 16:50
------------------------------------------------------------------ :PAGE   2
 MEANS FOR EFFECT NL
---------------------------------------------------------------------------
      NL         NOS         SRSH
1                  3        4.65333
2                  3        4.65333
3                  3        4.69333

SE(N=   3)                 0.267707E-01
5%LSD   4DF                0.104935
```

```
-------------------------------------------------------------------------------
MEANS FOR EFFECT CT
-------------------------------------------------------------------------------
      CT         NOS         SRSH
1                  3        4.40000
2                  3        5.10000
3                  3        4.50000

SE(N=   3)                 0.267707E-01
5%LSD   4DF                0.284935
-------------------------------------------------------------------------------
ANALYSIS OF VARIANCE SUMMARY TABLE  FILE SRSH    2/ 7/22 16:50
------------------------------------------------------------------ :PAGE   3
 F-PROBABLIITY VALUES FOR EACH EFFECT IN THE MODEL. SECTION - 1
 VARIATE       GRAND MEAN  STANDARD   DEVIATION  C OF V |NL      |CT      |
               (N=    9)   -------------------- SD/MEAN |        |        |
              NO.           BASED ON   BASED ON    %    |        |        |
              OBS.          TOTAL SS   RESID SS         |        |        |
    SRSH        9  4.6667    0.33011    0.46368E-01  2.5 0.5332   0.0005
```

Method: 95.0 percent LSD

Col_1	*Count*	*Mean*	*Homogeneous Groups*
1	3	4.4	X
3	3	4.5	X
2	3	5.1	X

b. Chiều cao

```
 BALANCED ANOVA FOR VARIATE      CC3  FILE CC3    1/ 6/23 20:29
------------------------------------------------------------------ :PAGE   1
VARIATE V003 CC3

LN   SOURCE OF VARIATION            DF  SUMS OF     MEAN     F RATIO PROB  ER
                                        SQUARES     SQUARES                LN
===============================================================================
1 NL                                2 .780005E-02 .390002E-02   0.10 0.908  3
2 CT                                2 4.34000     2.17000      54.66 0.002  3
* RESIDUAL                          4 .158800     .396999E-01
-------------------------------------------------------------------------------
* TOTAL (CORRECTED)                 8 4.50660     .563325
-------------------------------------------------------------------------------
TABLE OF MEANS FOR FACTORIAL EFFECTS  FILE CC3    1/ 6/23 20:29
------------------------------------------------------------------ :PAGE   2
MEANS FOR EFFECT NL
-------------------------------------------------------------------------------

      NL         NOS          CC3
1                  3        6.17667
2                  3        6.12667
3                  3        6.19667

SE(N=   3)                 0.115036
5%LSD   4DF                0.450917
-------------------------------------------------------------------------------

MEANS FOR EFFECT CT
-------------------------------------------------------------------------------

      CT         NOS          CC3
1                  3        6.50000
2                  3        6.80000
3                  3        5.20000

SE(N=   3)                 0.115036
5%LSD   4DF                0.450917
-------------------------------------------------------------------------------

ANALYSIS OF VARIANCE SUMMARY TABLE  FILE CC3    1/ 6/23 20:29
------------------------------------------------------------------ :PAGE   3

 F-PROBABLIITY VALUES FOR EACH EFFECT IN THE MODEL. SECTION - 1
```

```
 VARIATE       GRAND MEAN  STANDARD   DEVIATION  C OF V |NL      |CT      |
               (N=    9)   -------------------- SD/MEAN |        |        |
              NO.           BASED ON   BASED ON    %    |        |        |
              OBS.          TOTAL SS   RESID SS         |        |        |
     CC3        9  6.1667    0.75055    0.19925      3.2 0.9080   0.0024
```

Method: 95.0 percent LSD

Col_1	*Count*	*Mean*	*Homogeneous Groups*
3	3	5.2	X
1	3	6.5	X
2	3	6.8	X

Bảng 3.15. Ảnh hưởng của giá thể đến khả năng thích ứng cây giống sâm Ngọc Linh *in vitro* trong điều kiện nhân tạo khi đưa ra vườn ươm có gián mái che

a. Tỷ lệ sống sót

```
 N   SOURCE OF VARIATION            DF  SUMS OF     MEAN     F RATIO PROB  ER
                                      SQUARES     SQUARES               LN
==============================================================================
1 NL                                2 5.56112     2.78056       0.43 0.673  3
2 CT                                3 555.578     185.193      28.59 0.001  3
* RESIDUAL                          6 38.8610     6.47683
------------------------------------------------------------------------------
* TOTAL (CORRECTED)                11 600.000     54.5455
------------------------------------------------------------------------------
TABLE OF MEANS FOR FACTORIAL EFFECTS  FILE TLSX3   27/ 6/22 11:29
-------------------------------------------------------------------- :PAGE   2
MEANS FOR EFFECT NL
-------------------------------------------------------------------------------
     NL         NOS         TLSX
1                  4        77.5000
2                  4        76.6675
3                  4        75.8325

SE(N=   4)                  1.27248
5%LSD   6DF                 4.40171
-------------------------------------------------------------------------------
MEANS FOR EFFECT CT
-------------------------------------------------------------------------------
     CT         NOS         TLSX
1                  3        68.8900
2                  3        72.2200
3                  3        86.6667
4                  3        78.8900

SE(N=   3)                  1.46933
5%LSD   6DF                 5.08266
-------------------------------------------------------------------------------
ANALYSIS OF VARIANCE SUMMARY TABLE  FILE TLSX3   27/ 6/22 11:29
-------------------------------------------------------------------- :PAGE   3
 F-PROBABLIITY VALUES FOR EACH EFFECT IN THE MODEL. SECTION - 1

 VARIATE       GRAND MEAN  STANDARD   DEVIATION  C OF V |NL      |CT      |
               (N=   12)   -------------------- SD/MEAN |        |        |
              NO.           BASED ON   BASED ON    %    |        |        |
```

```
                OBS.          TOTAL SS   RESID SS          |         |         |
     TLSX        12  76.667     7.3855     2.5450      3.3 0.6726   0
```

Method: 95.0 percent LSD

Col_1	*Count*	*Mean*	*Homogeneous Groups*
1	3	68.89	X
2	3	72.22	X
4	3	78.89	X
3	3	86.6667	X

b. Tăng trưởng trung bình chiều cao cây

```
BALANCED ANOVA FOR VARIATE      TCC  FILE TCC   27/ 6/22  9:38
------------------------------------------------------------------ :PAGE   1
VARIATE V003 TCC
LN   SOURCE OF VARIATION            DF  SUMS OF     MEAN     F RATIO PROB  ER
                                        SQUARES     SQUARES               LN
==============================================================================
1 NL                                 2 .500000E-02 .250000E-02   0.20 0.825  3
2 CT                                 3 .202500     .675000E-01   5.40 0.039  3
* RESIDUAL                           6 .750000E-01 .125000E-01
------------------------------------------------------------------------------
* TOTAL (CORRECTED)                 11 .282500     .256818E-01
------------------------------------------------------------------------------
TABLE OF MEANS FOR FACTORIAL EFFECTS  FILE TCC   27/ 6/22  9:38
------------------------------------------------------------------ :PAGE   2
MEANS FOR EFFECT NL
------------------------------------------------------------------------------
      NL         NOS          TCC
1                  4       0.500000
2                  4       0.450000
3                  4       0.475000
SE(N=   4)                 0.559017E-01
5%LSD   6DF                0.193373
--------------------------------------------------------------------------------
MEANS FOR EFFECT CT
--------------------------------------------------------------------------------
      CT         NOS          TCC
1                  3       0.400000
2                  3       0.600000
3                  3       0.600000
4                  3       0.300000

SE(N=   3)                 0.645497E-01
5%LSD   6DF                0.0623288
--------------------------------------------------------------------------------
ANALYSIS OF VARIANCE SUMMARY TABLE  FILE TCC   27/ 6/22  9:38
------------------------------------------------------------------ :PAGE   3
 F-PROBABLIITY VALUES FOR EACH EFFECT IN THE MODEL. SECTION - 1
 VARIATE       GRAND MEAN  STANDARD   DEVIATION  C OF V |NL      |CT      |
               (N=   12)   -------------------- SD/MEAN |        |        |
              NO.           BASED ON   BASED ON    %    |        |        |
              OBS.          TOTAL SS   RESID SS         |        |        |
     TCC       12 0.47500    0.16026    0.11180     4.5 0.8245   0.0392
```

Method: 95.0 percent LSD

Col_1	*Count*	*Mean*	*Homogeneous Groups*
4	3	.3	X
1	3	.4	X
3	3	.6	X
2	3	.6	X

Bảng 3.16. Ảnh hưởng của tuổi cây đến khả năng thích ứng của cây giống *in vitro* trong vườn ươm có giàn mái che.

a. Tỷ lệ sống sót

```
 BALANCED ANOVA FOR VARIATE   TLSXTC  FILE TLSXTC   24/12/22  0:25
------------------------------------------------------------------ :PAGE   1
```

```
VARIATE V003 TLSXTC
LN   SOURCE OF VARIATION            DF  SUMS OF     MEAN     F RATIO PROB  ER
                                        SQUARES     SQUARES               LN
==============================================================================
1 NL                                2 12.3034     6.15168       0.87 0.486  3
2 CT                                2 127.848     63.9238       9.07 0.034  3
* RESIDUAL                          4 28.1931     7.04827
------------------------------------------------------------------------------
* TOTAL (CORRECTED)                 8 168.344     21.0430
------------------------------------------------------------------------------
TABLE OF MEANS FOR FACTORIAL EFFECTS  FILE TLSXTC   24/12/22  0:25
------------------------------------------------------------------ :PAGE   2
MEANS FOR EFFECT NL
--------------------------------------------------------------------------------
      NL         NOS       TLSXTC
1                  3        68.8567
2                  3        68.1267
3                  3        66.0933

SE(N=   3)                  1.53278
5%LSD   4DF                 6.00818
--------------------------------------------------------------------------------

MEANS FOR EFFECT CT
--------------------------------------------------------------------------------

      CT         NOS       TLSXTC
1                  3        62.6600
2                  3        68.6867
3                  3        71.7300

SE(N=   3)                  1.53278
5%LSD   4DF                 6.60818
--------------------------------------------------------------------------------
ANALYSIS OF VARIANCE SUMMARY TABLE  FILE TLSXTC   24/12/22  0:25
------------------------------------------------------------------ :PAGE   3

 F-PROBABLIITY VALUES FOR EACH EFFECT IN THE MODEL. SECTION - 1

 VARIATE       GRAND MEAN  STANDARD   DEVIATION  C OF V |NL      |CT      |
               (N=    9)   -------------------- SD/MEAN |        |        |
              NO.           BASED ON   BASED ON    %    |        |        |
              OBS.          TOTAL SS   RESID SS         |        |        |
  TLSXTC        9  67.692     4.5873     2.6549      3.9 0.4864   0.0344
```

Method: 95.0 percent LSD

Col_1	*Count*	*Mean*	*Homogeneous Groups*
1	3	62.66	X
2	3	68.6867	X
3	3	71.73	X

b. Tăng trưởng chiều cao cây trung bình

```
BALANCED ANOVA FOR VARIATE     TTCC  FILE TCC5   27/ 6/22 14: 4
 ------------------------------------------------------------------ :PAGE   1
 VARIATE V003 TTCC
 LN   SOURCE OF VARIATION            DF  SUMS OF     MEAN     F RATIO PROB  ER
                                         SQUARES     SQUARES               LN
 ==============================================================================
 1 NL                                2 .186667E-02 .933333E-03   2.80 0.174  3
 2 CT                                2 .140000     .700000E-01 210.00 0.001  3
 * RESIDUAL                          4 .133332E-02 .333330E-03
 ------------------------------------------------------------------------------
 * TOTAL (CORRECTED)                 8 .143200     .179000E-01
 ------------------------------------------------------------------------------
 TABLE OF MEANS FOR FACTORIAL EFFECTS  FILE TCC5   27/ 6/22 14: 4
 ------------------------------------------------------------------ :PAGE   2
```

```
MEANS FOR EFFECT NL
-------------------------------------------------------------------------------
      NL         NOS         TTCC
1                  3       0.446667
2                  3       0.473333
3                  3       0.480000
SE(N=   3)                 0.105409E-01
5%LSD   4DF                0.413180E-01
-------------------------------------------------------------------------------
MEANS FOR EFFECT CT
-------------------------------------------------------------------------------
      CT         NOS         TTCC
1                  3       0.300000
2                  3       0.500000
3                  3       0.600000
SE(N=   3)                 0.105409E-01
5%LSD   4DF                0.413180E-01
-------------------------------------------------------------------------------
ANALYSIS OF VARIANCE SUMMARY TABLE  FILE TCC5   27/ 6/22 14: 4
------------------------------------------------------------------ :PAGE   3
 F-PROBABLIITY VALUES FOR EACH EFFECT IN THE MODEL. SECTION - 1

 VARIATE       GRAND MEAN  STANDARD   DEVIATION  C OF V |NL      |CT      |
               (N=    9)   -------------------- SD/MEAN |        |        |
              NO.           BASED ON   BASED ON    %    |        |        |
              OBS.          TOTAL SS   RESID SS         |        |        |
    TTCC        9 0.46667    0.13379    0.18257E-01  3.9 0.1737   0.0005
```

Method: 95.0 percent LSD

Col_1	*Count*	*Mean*	*Homogeneous Groups*
1	3	.3	X
2	3	.5	X
3	3	.6	X

Bảng 3.17. Ảnh hưởng của biện pháp xử lý hạt giống đến thời gian mọc, tỷ lệ mọc và hình thành cây con sâm Ngọc Linh

a. Tỷ lệ mọc mầm (%)

```
BALANCED ANOVA FOR VARIATE     TLNM  FILE TLNM1   25/ 6/22 18:31
 ------------------------------------------------------------------ :PAGE   1
 VARIATE V003 TLNM
 LN   SOURCE OF VARIATION            DF  SUMS OF     MEAN     F RATIO PROB  ER
                                         SQUARES     SQUARES               LN
 ==============================================================================
 1 NL                                 2 350.262     175.131      49.71 0.000  3
 2 CT                                 6 1818.27     303.045      86.01 0.000  3
 * RESIDUAL                          12 42.2786     3.52322
 ------------------------------------------------------------------------------
 * TOTAL (CORRECTED)                 20 2210.81     110.541
 ------------------------------------------------------------------------------
 TABLE OF MEANS FOR FACTORIAL EFFECTS  FILE TLNM1   25/ 6/22 18:31
 ------------------------------------------------------------------ :PAGE   2
 MEANS FOR EFFECT NL
 -------------------------------------------------------------------------------
       NL         NOS         TLNM
 1                  7        68.0957
 2                  7        62.8586
```

```
3                  7        72.8586
SE(N=   7)                 0.709448
5%LSD  12DF                 2.18605
--------------------------------------------------------------------------------
MEANS FOR EFFECT CT
--------------------------------------------------------------------------------
      CT         NOS         TLNM
1                  3        56.6667
2                  3        53.3333
3                  3        65.5567
4                  3        72.2233
5                  3        75.5567
6                  3        81.1133
7                  3        71.1133
SE(N=   3)                  1.08370
5%LSD  12DF                 3.33925
--------------------------------------------------------------------------------
ANALYSIS OF VARIANCE SUMMARY TABLE  FILE TLNM1   25/ 6/22 18:31
------------------------------------------------------------------ :PAGE   3
 F-PROBABLIITY VALUES FOR EACH EFFECT IN THE MODEL. SECTION - 1
 VARIATE       GRAND MEAN  STANDARD   DEVIATION  C OF V |NL      |CT      |
               (N=   21)   -------------------- SD/MEAN |        |        |
              NO.           BASED ON   BASED ON    %    |        |        |
              OBS.          TOTAL SS   RESID SS         |        |        |
   TLNM       21  67.938     10.514     1.8770      2.8 0.0000   0.0000
```

Method: 95.0 percent LSD

Col_1	*Count*	*Mean*	*Homogeneous Groups*
2	3	53.3333	X
1	3	56.6667	X
3	3	65.5567	X
7	3	71.1133	XX
4	3	72.2233	XX
5	3	75.5567	X
6	3	88.1133	X

b. Tỷ lệ hình thành cây con (%)

```
BALANCED ANOVA FOR VARIATE     HTCC  FILE HTCC1    7/ 7/22 10:34
 ------------------------------------------------------------------ :PAGE   1
 VARIATE V003 HTCC
 LN   SOURCE OF VARIATION            DF  SUMS OF     MEAN     F RATIO PROB  ER
                                         SQUARES     SQUARES                LN
 ==============================================================================
 1 NL                                 2 355.530     177.765      10.67 0.002  3
 2 CT                                 6 2761.82     460.303      27.62 0.000  3
 * RESIDUAL                          12 199.981     16.6651
 ------------------------------------------------------------------------------
 * TOTAL (CORRECTED)                 20 3317.33     165.867
 ------------------------------------------------------------------------------
 TABLE OF MEANS FOR FACTORIAL EFFECTS  FILE HTCC1    7/ 7/22 10:34
 ------------------------------------------------------------------ :PAGE   2
 MEANS FOR EFFECT NL
--------------------------------------------------------------------------------
      NL         NOS         HTCC
1                  7        60.0000
2                  7        61.9071
3                  7        69.5243

SE(N=   7)                  1.54296
```

```
5%LSD  12DF                 4.75439
--------------------------------------------------------------------------------
MEANS FOR EFFECT CT
--------------------------------------------------------------------------------
      CT         NOS         HTCC
1                  3        43.3333
2                  3        51.1133
3                  3        63.3333
4                  3        70.0033
5                  3        73.3333
6                  3        77.7767
7                  3        67.7800

SE(N=   3)                  2.35691
5%LSD  12DF                 7.26245
 ANALYSIS OF VARIANCE SUMMARY TABLE  FILE HTCC1    7/ 7/22 10:34
------------------------------------------------------------------ :PAGE   3
 F-PROBABLIITY VALUES FOR EACH EFFECT IN THE MODEL. SECTION - 1

 VARIATE       GRAND MEAN  STANDARD   DEVIATION  C OF V |NL      |CT      |
               (N=   21)   -------------------- SD/MEAN |        |        |
              NO.           BASED ON   BASED ON    %    |        |        |
              OBS.          TOTAL SS   RESID SS         |        |        |
    HTCC       21  63.810     12.879     4.0823      6.4 0.0023   0.0000
```

Method: 95.0 percent LSD

Col_1	*Count*	*Mean*	*Homogeneous Groups*
1	3	43.3333	X
2	3	51.1133	X
3	3	63.3333	X
7	3	67.78	XX
4	3	70.0033	XX
5	3	73.3333	XX
6	3	77.7767	X

c. Tỷ lệ cây xuất vườn (%)

```
 BALANCED ANOVA FOR VARIATE     TLXV  FILE TLXV1   25/ 6/22 23:25
------------------------------------------------------------------ :PAGE   1
VARIATE V003 TLXV
LN   SOURCE OF VARIATION            DF  SUMS OF     MEAN     F RATIO PROB  ER
                                        SQUARES     SQUARES                LN
==============================================================================
1 NL                                 2 566.450     283.225      16.91 0.000  3
2 CT                                 6 3386.23     564.372      33.69 0.000  3
* RESIDUAL                          12 201.039     16.7532
------------------------------------------------------------------------------
* TOTAL (CORRECTED)                 20 4153.72     207.686
------------------------------------------------------------------------------
TABLE OF MEANS FOR FACTORIAL EFFECTS  FILE TLXV1   25/ 6/22 23:25
------------------------------------------------------------------ :PAGE   2
MEANS FOR EFFECT NL
--------------------------------------------------------------------------------
      NL         NOS         TLXV
1                  7        62.8929
2                  7        65.9243
3                  7        53.7086

SE(N=   7)                  1.54704
5%LSD  12DF                 4.76694
--------------------------------------------------------------------------------
MEANS FOR EFFECT CT
--------------------------------------------------------------------------------
     CT         NOS         TLXV
1                  3        38.2167
2                  3        46.2067
3                  3        62.0833
4                  3        66.9567
5                  3        71.4300
```

```
 6                  3        76.2033
 7                  3        64.7967
 SE(N=   3)                  2.36314
 5%LSD  12DF                 7.28162
 ---------------------------------------------------------------------------
 ANALYSIS OF VARIANCE SUMMARY TABLE  FILE TLXV1   25/ 6/22 23:25
 ------------------------------------------------------------------ :PAGE   3
  F-PROBABLIITY VALUES FOR EACH EFFECT IN THE MODEL. SECTION - 1

  VARIATE       GRAND MEAN  STANDARD   DEVIATION  C OF V |NL      |CT      |
                 (N=   21)  -------------------- SD/MEAN |        |        |
               NO.           BASED ON   BASED ON    %    |        |        |
               OBS.          TOTAL SS   RESID SS         |        |        |
     TLXV       21  60.842     14.411     4.0931      6.7 0.0004   0.0000
```

Method: 95.0 percent LSD

Col_1	*Count*	*Mean*	*Homogeneous Groups*
1	3	38.2333	X
2	3	46.2	X
3	3	62.0667	X
7	3	64.8	XX
4	3	66.9667	XX
5	3	71.4333	XX
6	3	76.2333	X

Bảng 3.19. Khả năng mọc mầm và tỷ lệ hình thành cây con giống sâm Ngọc Linh trên các loại giá thể khác nhau

a. Tỷ lệ mọc mầm (%)

```
BALANCED ANOVA FOR VARIATE     TLMM  FILE TLMM1   25/ 6/22 21:31
 ------------------------------------------------------------------ :PAGE   1
 VARIATE V003 TLMM

 LN   SOURCE OF VARIATION            DF  SUMS OF     MEAN     F RATIO PROB  ER
                                         SQUARES     SQUARES                LN
 ==========================================================================
 1 NL                                2 28.1186     14.0593       0.65 0.549  3
 2 CT                                4 974.923     243.731      11.35 0.003  3
 * RESIDUAL                          8 171.837     21.4796
 ---------------------------------------------------------------------------
 * TOTAL (CORRECTED)                14 1174.88     83.9199
 ---------------------------------------------------------------------------- TABLE OF
MEANS FOR FACTORIAL EFFECTS  FILE TLMM1   25/ 6/22 21:31
 ------------------------------------------------------------------ :PAGE   2
 MEANS FOR EFFECT NL
 ---------------------------------------------------------------------------
       NL         NOS         TLMM
 1                  5        73.9980
 2                  5        72.0020
 3                  5        75.3340

 SE(N=   5)                  2.07266
 5%LSD   8DF                 6.75874
 ---------------------------------------------------------------------------
 MEANS FOR EFFECT CT
 ---------------------------------------------------------------------------
       CT         NOS         TLMM
 1                  3        63.3333
 2                  3        67.7767
 3                  3        80.0000
 4                  3        85.5567
 5                  3        72.2233

 SE(N=   3)                  2.67579
 5%LSD   8DF                 8.72550
 ---------------------------------------------------------------------------
 ANALYSIS OF VARIANCE SUMMARY TABLE  FILE TLMM1   25/ 6/22 21:31
```

```
---------------------------------------------------------------- :PAGE   3
 F-PROBABLIITY VALUES FOR EACH EFFECT IN THE MODEL. SECTION - 1

 VARIATE       GRAND MEAN  STANDARD   DEVIATION  C OF V |NL      |CT      |
               (N=   15)   -------------------- SD/MEAN |        |        |
              NO.           BASED ON   BASED ON    %    |        |        |
              OBS.          TOTAL SS   RESID SS         |        |        |
    TLMM       15  73.778     9.1608     4.6346      6.3 0.5490   0.0025
```

Method: 95.0 percent LSD

Col_1	*Count*	*Mean*	*Homogeneous Groups*
1	3	63.3333	X
2	3	67.7767	XX
5	3	72.2233	XX
3	3	80.0	XX
4	3	85.5567	X

b. Tỷ lệ hình thành cây con(%)

```
BALANCED ANOVA FOR VARIATE     HTCC  FILE HTCC   25/ 6/22 23:49
 ---------------------------------------------------------------- :PAGE   1
 VARIATE V003 HTCC
 LN   SOURCE OF VARIATION            DF  SUMS OF     MEAN     F RATIO PROB  ER
                                         SQUARES     SQUARES                LN
 ==============================================================================
 1 NL                                 2 111.156     55.5778       2.07 0.188  3
 2 CT                                 4 1003.09     250.771       9.33 0.005  3
 * RESIDUAL                           8 214.963     26.8704
 ------------------------------------------------------------------------------
 * TOTAL (CORRECTED)                 14 1329.20     94.9432
 ------------------------------------------------------------------------------
 TABLE OF MEANS FOR FACTORIAL EFFECTS  FILE HTCC   25/ 6/22 23:49
 ---------------------------------------------------------------- :PAGE   2
 MEANS FOR EFFECT NL
 ------------------------------------------------------------------------------
       NL         NOS         HTCC
 1                  5        68.0000
 2                  5        64.6660
 3                  5        61.3320

 SE(N=   5)                  2.31820
 5%LSD   8DF                 7.55943
 ------------------------------------------------------------------------------
 MEANS FOR EFFECT CT
 ------------------------------------------------------------------------------
       CT         NOS         HTCC
 1                  3        55.5567
 2                  3        58.8867
 3                  3        67.7767
 4                  3        78.8900
 5                  3        62.2200

 SE(N=   3)                  2.99279
 5%LSD   8DF                 9.75918
 ------------------------------------------------------------------------------
 ANALYSIS OF VARIANCE SUMMARY TABLE  FILE HTCC   25/ 6/22 23:49
 ---------------------------------------------------------------- :PAGE   3
  F-PROBABLIITY VALUES FOR EACH EFFECT IN THE MODEL. SECTION - 1
  VARIATE       GRAND MEAN  STANDARD   DEVIATION  C OF V |NL      |CT      |
                (N=   15)   -------------------- SD/MEAN |        |        |
               NO.           BASED ON   BASED ON    %    |        |        |
               OBS.          TOTAL SS   RESID SS         |        |        |
     HTCC       15  64.666     9.7439     5.1837      8.0 0.1880   0.0046
```

Method: 95.0 percent LSD

Col_1	*Count*	*Mean*	*Homogeneous Groups*
1	3	55.5567	X
2	3	58.8867	XX
5	3	62.22	XX
3	3	67.7767	X
4	3	78.89	X

Bảng 3.20. Ảnh hưởng của giá thể gieo hạt đến sinh trưởng cây giống sâm Ngọc Linh (sau khi gieo hạt 10 tháng)

a. Chiều cao cây

```
BALANCED ANOVA FOR VARIATE     CCGT  FILE CCGT1    2/ 7/22 18:26
 ---------------------------------------------------------------- :PAGE   1
 VARIATE V003 CCGT

 LN   SOURCE OF VARIATION            DF  SUMS OF     MEAN     F RATIO PROB  ER
                                         SQUARES     SQUARES                LN
 ==============================================================================
 1 NL                                2 .149613     .748066E-01   1.37 0.308  3
 2 CT                                4 .367027     .917567E-01   1.68 0.246  3
 * RESIDUAL                          8 .436053     .545066E-01
 ------------------------------------------------------------------------------
 * TOTAL (CORRECTED)                14 .952693     .680495E-01
 ------------------------------------------------------------------------------
 TABLE OF MEANS FOR FACTORIAL EFFECTS  FILE CCGT1    2/ 7/22 18:26
 ---------------------------------------------------------------- :PAGE   2
 MEANS FOR EFFECT NL
 ------------------------------------------------------------------------------
       NL         NOS         CCGT
 1                  5        10.6000
 2                  5        10.6900
 3                  5        10.4480

 SE(N=   5)                 0.104409
 5%LSD   8DF                0.340469
 ------------------------------------------------------------------------------
 MEANS FOR EFFECT CT
 ------------------------------------------------------------------------------
       CT         NOS         CCGT
 1                  3        10.3500
 2                  3        10.4500
 3                  3        10.6700
 4                  3        10.6467
 5                  3        10.7800

 SE(N=   3)                 0.134792
 5%LSD   8DF                0.439543
 ------------------------------------------------------------------------------
 ANALYSIS OF VARIANCE SUMMARY TABLE  FILE CCGT1    2/ 7/22 18:26
 ---------------------------------------------------------------- :PAGE   3
  F-PROBABLIITY VALUES FOR EACH EFFECT IN THE MODEL. SECTION - 1

  VARIATE       GRAND MEAN  STANDARD   DEVIATION  C OF V |NL      |CT      |
                 (N=   15)  -------------------- SD/MEAN |        |        |
               NO.           BASED ON   BASED ON    %    |        |        |
               OBS.          TOTAL SS   RESID SS         |        |        |
     CCGT       15  10.579    0.26086    0.23347      2.2 0.3077   0.2455
```

Method: 95.0 percent LSD

Col_1	*Count*	*Mean*	*Homogeneous Groups*
1	3	10.35	X
2	3	10.45	X
4	3	10.6467	X
3	3	10.67	X
5	3	10.78	X

b. Đường kính thân

```
BALANCED ANOVA FOR VARIATE   DKTHAN  FILE DKTHAN1    2/ 7/22 18:32
 ---------------------------------------------------------------- :PAGE   1
 VARIATE V003 DKTHAN

 LN   SOURCE OF VARIATION            DF  SUMS OF     MEAN     F RATIO PROB  ER
                                         SQUARES     SQUARES                LN
 ==============================================================================
```

```
 1 NL                              2 .532001E-02 .266000E-02   0.32 0.734  3
 2 CT                              4 .807600E-01 .201900E-01   2.47 0.129  3
 * RESIDUAL                        8 .654800E-01 .818500E-02
 ---------------------------------------------------------------------------
 * TOTAL (CORRECTED)               14 .151560     .108257E-01
 ---------------------------------------------------------------------------
 TABLE OF MEANS FOR FACTORIAL EFFECTS  FILE DKTHAN1    2/ 7/22 18:32
 ------------------------------------------------------------------ :PAGE   2
 MEANS FOR EFFECT NL
 ---------------------------------------------------------------------------
       NL         NOS       DKTHAN
 1                  5        1.71200
 2                  5        1.73200
 3                  5        1.75800

 SE(N=   5)                 0.404599E-01
 5%LSD   8DF                0.131935
 ---------------------------------------------------------------------------
 MEANS FOR EFFECT CT
 ---------------------------------------------------------------------------
       CT         NOS       DKTHAN
 1                  3        1.64000
 2                  3        1.69000
 3                  3        1.71000
 4                  3        1.85000
 5                  3        1.78000

 SE(N=   3)                 0.522334E-01
 5%LSD   8DF                0.170328
 ---------------------------------------------------------------------------
ANALYSIS OF VARIANCE SUMMARY TABLE  FILE DKTHAN1    2/ 7/22 18:32
 ------------------------------------------------------------------ :PAGE   3

  F-PROBABLIITY VALUES FOR EACH EFFECT IN THE MODEL. SECTION - 1

  VARIATE       GRAND MEAN  STANDARD   DEVIATION  C OF V |NL      |CT      |
                 (N=   15)  -------------------- SD/MEAN |        |        |
               NO.           BASED ON   BASED ON    %    |        |        |
               OBS.          TOTAL SS   RESID SS         |        |        |
   DKTHAN       15  1.7340    0.10405    0.90471E-01  5.2 0.7345   0.1287
```

Method: 95.0 percent LSD

Col_1	*Count*	*Mean*	*Homogeneous Groups*
1	3	1.64	X
2	3	1.69	X
3	3	1.71	XX
5	3	1.78	XX
4	3	1.85	X

c. Chiều rộng lá

```
BALANCED ANOVA FOR VARIATE       CRL  FILE CRL2    2/ 7/22 18:39
 ------------------------------------------------------------------ :PAGE   1
 VARIATE V003 CRL

 LN   SOURCE OF VARIATION            DF  SUMS OF     MEAN     F RATIO PROB  ER
                                         SQUARES     SQUARES                LN
 ===========================================================================
 1 NL                              2 .208000E-02 .104000E-02   0.11 0.897  3
 2 CT                              4 .456240     .114060      12.02 0.002  3
 * RESIDUAL                        8 .759201E-01 .949001E-02
 ---------------------------------------------------------------------------
 * TOTAL (CORRECTED)               14 .534240     .381600E-01
 ---------------------------------------------------------------------------
 TABLE OF MEANS FOR FACTORIAL EFFECTS  FILE CRL2    2/ 7/22 18:39
 ------------------------------------------------------------------ :PAGE   2
 MEANS FOR EFFECT NL
 ---------------------------------------------------------------------------
       NL         NOS          CRL
 1                  5        1.81800
 2                  5        1.79000
```

```
3                  5        1.79800

SE(N=   5)                 0.435661E-01
5%LSD   8DF                0.142065
-------------------------------------------------------------------------------
MEANS FOR EFFECT CT
-------------------------------------------------------------------------------
      CT         NOS          CRL
1                  3        1.52000
2                  3        1.78000
3                  3        1.74000
4                  3        2.01000
5                  3        1.96000

SE(N=   3)                 0.562435E-01
5%LSD   8DF                0.183405
-------------------------------------------------------------------------------
ANALYSIS OF VARIANCE SUMMARY TABLE  FILE CRL2    2/ 7/22 18:39
------------------------------------------------------------------ :PAGE   3

 F-PROBABLIITY VALUES FOR EACH EFFECT IN THE MODEL. SECTION - 1

 VARIATE       GRAND MEAN  STANDARD   DEVIATION  C OF V |NL      |CT      |
               (N=   15)   -------------------- SD/MEAN |        |        |
              NO.           BASED ON   BASED ON    %    |        |        |
              OBS.          TOTAL SS   RESID SS         |        |        |
     CRL       15  1.8020    0.19535    0.97417E-01  5.4 0.8970   0.0021
```

Method: 95.0 percent LSD

Col_1	*Count*	*Mean*	*Homogeneous Groups*
1	3	1.52	X
3	3	1.74	X
2	3	1.78	X
5	3	1.96	X
4	3	2.01	X

d. Chiều dài lá

```
 BALANCED ANOVA FOR VARIATE      CDL  FILE CDL1    2/ 7/22 18:51
------------------------------------------------------------------ :PAGE   1
VARIATE V003 CDL

LN   SOURCE OF VARIATION            DF  SUMS OF     MEAN     F RATIO PROB  ER
                                        SQUARES     SQUARES                LN
===============================================================================
1 NL                                 2 .241600E-01 .120800E-01   1.44 0.293  3
2 CT                                 4 1.20456     .301140      35.83 0.000  3
* RESIDUAL                           8 .672401E-01 .840501E-02
-------------------------------------------------------------------------------
* TOTAL (CORRECTED)                 14 1.29596     .925686E-01
-------------------------------------------------------------------------------
TABLE OF MEANS FOR FACTORIAL EFFECTS  FILE CDL1    2/ 7/22 18:51
------------------------------------------------------------------ :PAGE   2
MEANS FOR EFFECT NL
-------------------------------------------------------------------------------
      NL         NOS          CDL
1                  5        3.49000
2                  5        3.50600
3                  5        3.58200

SE(N=   5)                 0.410000E-01
5%LSD   8DF                0.133697
-------------------------------------------------------------------------------
MEANS FOR EFFECT CT
-------------------------------------------------------------------------------

      CT         NOS          CDL
1                  3        3.12000
2                  3        3.52000
3                  3        3.36000
4                  3        3.96000
5                  3        3.67000
```

```
SE(N=   3)                  0.529308E-01
5%LSD   8DF                 0.172602
-------------------------------------------------------------------------------
ANALYSIS OF VARIANCE SUMMARY TABLE  FILE CDL1    2/ 7/22 18:51
------------------------------------------------------------------ :PAGE   3
 F-PROBABLIITY VALUES FOR EACH EFFECT IN THE MODEL. SECTION - 1

 VARIATE       GRAND MEAN  STANDARD   DEVIATION  C OF V |NL      |CT      |
               (N=   15)   -------------------- SD/MEAN |        |        |
              NO.           BASED ON   BASED ON    %    |        |        |
              OBS.          TOTAL SS   RESID SS         |        |        |
     CDL       15  3.5260    0.30425    0.91679E-01  2.6 0.2932   0.0001
ANALYSIS OF VARIANCE SUMMARY TABLE  FILE DKTHAN1    2/ 7/22 18:32
------------------------------------------------------------------ :PAGE   3

 F-PROBABLIITY VALUES FOR EACH EFFECT IN THE MODEL. SECTION - 1

 VARIATE       GRAND MEAN  STANDARD   DEVIATION  C OF V |NL      |CT      |
               (N=   15)   -------------------- SD/MEAN |        |        |
              NO.           BASED ON   BASED ON    %    |        |        |
              OBS.          TOTAL SS   RESID SS         |        |        |
  DKTHAN       15  1.7340    0.10405    0.90471E-01  5.2 0.7345   0.1287
```

Method: 95.0 percent LSD

Col_1	*Count*	*Mean*	*Homogeneous Groups*
1	3	3.12	X
3	3	3.36	X
2	3	3.52	XX
5	3	3.67	X
4	3	3.96	X

e. Số rễ/cây

```
  BALANCED ANOVA FOR VARIATE       SR  FILE SR1    2/ 7/22 19:35
------------------------------------------------------------------ :PAGE   1
VARIATE V003 SR

LN   SOURCE OF VARIATION            DF  SUMS OF     MEAN     F RATIO PROB  ER
                                        SQUARES     SQUARES                LN
==============================================================================
1 NL                                 2 .579240     .289620       1.61 0.259  3
2 CT                                 4 5.64756     1.41189       7.84 0.008  3
* RESIDUAL                           8 1.44136     .180170
------------------------------------------------------------------------------
* TOTAL (CORRECTED)                 14 7.66816     .547726
------------------------------------------------------------------------------
TABLE OF MEANS FOR FACTORIAL EFFECTS  FILE SR1    2/ 7/22 19:35
------------------------------------------------------------------ :PAGE   2
MEANS FOR EFFECT NL
-------------------------------------------------------------------------------
      NL         NOS           SR
1                  5        5.61600
2                  5        6.07800
3                  5        5.96400

SE(N=   5)                  0.189826
5%LSD   8DF                 0.619004
-------------------------------------------------------------------------------
MEANS FOR EFFECT CT
-------------------------------------------------------------------------------
      CT         NOS           SR
1                  3        5.10000
2                  3        5.58000
3                  3        5.71000
4                  3        6.93000
5                  3        6.11000

SE(N=   3)                  0.245065
5%LSD   8DF                 0.799131
-------------------------------------------------------------------------------
ANALYSIS OF VARIANCE SUMMARY TABLE  FILE SR1    2/ 7/22 19:35
------------------------------------------------------------------ :PAGE   3
```

```
 F-PROBABLIITY VALUES FOR EACH EFFECT IN THE MODEL. SECTION - 1

 VARIATE       GRAND MEAN  STANDARD   DEVIATION  C OF V |NL      |CT      |
               (N=   15)   -------------------- SD/MEAN |        |        |
              NO.           BASED ON   BASED ON    %    |        |        |
              OBS.          TOTAL SS   RESID SS         |        |        |
      SR       15  5.8860    0.74008    0.42446      7.2 0.2588   0.0076
```

Col_1	Count	Mean	Homogeneous Groups
1	3	5.1	X
2	3	5.58	XX
3	3	5.71	XX
5	3	6.11	X
4	3	6.93	X

f. Khối lượng 100 cây

```
BALANCED ANOVA FOR VARIATE    KL100  FILE KLGT    2/ 7/22 19:40
 ------------------------------------------------------------------ :PAGE   1
 VARIATE V003 KL100

 LN   SOURCE OF VARIATION            DF  SUMS OF     MEAN     F RATIO PROB  ER
                                         SQUARES     SQUARES                LN
 ==================================================================================
 1 NL                                 2 2.22205     1.11102       0.83 0.474  3
 2 CT                                 4 206.331     51.5827      38.38 0.000  3
 * RESIDUAL                           8 10.7522     1.34402
 ---------------------------------------------------------------------------------
 * TOTAL (CORRECTED)                 14 219.305     15.6646
 ---------------------------------------------------------------------------------
 TABLE OF MEANS FOR FACTORIAL EFFECTS  FILE KLGT    2/ 7/22 19:40
 ------------------------------------------------------------------ :PAGE   2
 MEANS FOR EFFECT NL
 -------------------------------------------------------------------------------------
       NL         NOS        KL100
 1                  5        95.6560
 2                  5        96.0940
 3                  5        96.5980

 SE(N=   5)                 0.518463
 5%LSD   8DF                 1.69066
 -------------------------------------------------------------------------------------
 MEANS FOR EFFECT CT
 -------------------------------------------------------------------------------------

       CT         NOS        KL100
 1                  3        91.2800
 2                  3        93.2800
 3                  3        95.4500
 4                  3        101.320
 5                  3        99.2500

 SE(N=   3)                 0.669333
 5%LSD   8DF                 2.18263
 -------------------------------------------------------------------------------------
 ANALYSIS OF VARIANCE SUMMARY TABLE  FILE KLGT    2/ 7/22 19:40
 ------------------------------------------------------------------ :PAGE   3
  F-PROBABLIITY VALUES FOR EACH EFFECT IN THE MODEL. SECTION - 1

 VARIATE       GRAND MEAN  STANDARD   DEVIATION  C OF V |NL      |CT      |
               (N=   15)   -------------------- SD/MEAN |        |        |
              NO.           BASED ON   BASED ON    %    |        |        |
              OBS.          TOTAL SS   RESID SS         |        |        |
   KL100       15  96.116     3.9579     1.1593      4.7 0.4745   0.0001
```

Method: 95.0 percent LSD

Col_1	Count	Mean	Homogeneous Groups
1	3	91.28	X
2	3	93.28	X
3	3	95.45	X
5	3	99.25	X
4	3	101.32	X

Bảng 3.21: Ảnh hưởng của khoảng cách trồng đến chiều cao, đường kính và đường kính tán sâm Ngọc Linh

a. Chiều cao cây năm thứ 1

```
  BALANCED ANOVA FOR VARIATE     MDGT  FILE MDGT    2/ 7/22 19:50
---------------------------------------------------------------- :PAGE   1
VARIATE V003 MDGT

LN   SOURCE OF VARIATION            DF  SUMS OF     MEAN     F RATIO PROB  ER
                                        SQUARES     SQUARES               LN
==============================================================================
1 NL                                 2 .906499E-01 .453249E-01   0.28 0.768  3
2 CT                                 3 .630003E-02 .210001E-02   0.01 0.998  3
* RESIDUAL                           6 .975550     .162592
------------------------------------------------------------------------------
* TOTAL (CORRECTED)                 11 1.07250     .975000E-01
------------------------------------------------------------------------------ TABLE OF MEANS
FOR FACTORIAL EFFECTS  FILE MDGT    2/ 7/22 19:50
---------------------------------------------------------------- :PAGE   2
MEANS FOR EFFECT NL
------------------------------------------------------------------------------
      NL         NOS         MDGT
1                  4        10.1250
2                  4        10.2425
3                  4        10.3375
SE(N=   4)                 0.201613
5%LSD   6DF                0.697413
------------------------------------------------------------------------------
MEANS FOR EFFECT CT
------------------------------------------------------------------------------
      CT         NOS         MDGT
1                  3        10.2500
2                  3        10.2300
3                  3        10.2000
4                  3        10.2600

SE(N=   3)                 0.232803
5%LSD   6DF                0.805303
------------------------------------------------------------------------------
ANALYSIS OF VARIANCE SUMMARY TABLE  FILE MDGT    2/ 7/22 19:50
---------------------------------------------------------------- :PAGE   3
 F-PROBABLIITY VALUES FOR EACH EFFECT IN THE MODEL. SECTION - 1

 VARIATE       GRAND MEAN  STANDARD   DEVIATION  C OF V |NL      |CT      |
               (N=   12)   -------------------- SD/MEAN |        |        |
              NO.           BASED ON   BASED ON    %    |        |        |
              OBS.          TOTAL SS   RESID SS         |        |        |
    MDGT       12  10.235    0.31225    0.40323      3.9 0.7677   0.9978
```

Method: 95.0 percent LSD

Col_1	*Count*	*Mean*	*Homogeneous Groups*
3	3	10.2	X
2	3	10.23	X
1	3	10.25	X
4	3	10.26	X

b. Chiều cao năm thứ 2

```
 BALANCED ANOVA FOR VARIATE     CCMD  FILE CCMD1    2/ 7/22 19:55
---------------------------------------------------------------- :PAGE   1
VARIATE V003 CCMD

LN   SOURCE OF VARIATION            DF  SUMS OF     MEAN     F RATIO PROB  ER
                                        SQUARES     SQUARES               LN
==============================================================================
1 NL                                 2 .113150     .565750E-01   0.21 0.817  3
2 CT                                 3 7.84080     2.61360       9.68 0.011  3
* RESIDUAL                           6 1.61945     .269909
------------------------------------------------------------------------------
* TOTAL (CORRECTED)                 11 9.57340     .870309
```

```
---------------------------------------------------------------------------
TABLE OF MEANS FOR FACTORIAL EFFECTS  FILE CCMD1    2/ 7/22 19:55
------------------------------------------------------------------ :PAGE   2
MEANS FOR EFFECT NL
-----------------------------------------------------------------------------
      NL         NOS         CCMD
1                  4        16.4925
2                  4        16.2550
3                  4        16.3625

SE(N=   4)                 0.259764
5%LSD   6DF                0.898564
-----------------------------------------------------------------------------
MEANS FOR EFFECT CT
-----------------------------------------------------------------------------
      CT         NOS         CCMD
1                  3        15.4500
2                  3        17.6700
3                  3        16.1300
4                  3        16.2300

SE(N=   3)                 0.299949
5%LSD   6DF                 1.03757

ANALYSIS OF VARIANCE SUMMARY TABLE  FILE CCMD1    2/ 7/22 19:55
------------------------------------------------------------------ :PAGE   3

 F-PROBABLIITY VALUES FOR EACH EFFECT IN THE MODEL. SECTION - 1

 VARIATE       GRAND MEAN  STANDARD   DEVIATION  C OF V |NL      |CT      |
               (N=   12)   -------------------- SD/MEAN |        |        |
              NO.           BASED ON   BASED ON    %    |        |        |
              OBS.          TOTAL SS   RESID SS         |        |        |
    CCMD       12  16.370    0.93290    0.51953      3.2 0.8173   0.0111
```

Method: 95.0 percent LSD

Col_1	*Count*	*Mean*	*Homogeneous Groups*
1	3	15.45	X
3	3	16.13	X
4	3	16.23	X
2	3	17.67	X

c. Chiều cao năm thứ 3

```
 BALANCED ANOVA FOR VARIATE    CCMD3  FILE CCMD3    2/ 7/22 20: 1
------------------------------------------------------------------ :PAGE   1
VARIATE V003 CCMD3
LN   SOURCE OF VARIATION            DF  SUMS OF     MEAN     F RATIO PROB  ER
                                        SQUARES     SQUARES                LN
=============================================================================
1 NL                                 2 .233599     .116799       0.13 0.882  3
2 CT                                 3 17.3532     5.78440       6.30 0.028  3
* RESIDUAL                           6 5.50720     .917866
---------------------------------------------------------------------------
* TOTAL (CORRECTED)                 11 23.0940     2.09945
---------------------------------------------------------------------------
TABLE OF MEANS FOR FACTORIAL EFFECTS  FILE CCMD3    2/ 7/22 20: 1
------------------------------------------------------------------ :PAGE   2
MEANS FOR EFFECT NL
-----------------------------------------------------------------------------
      NL         NOS        CCMD3
1                  4        28.7400
2                  4        28.6000
3                  4        28.4000

SE(N=   4)                 0.479027
5%LSD   6DF                 1.65703
-----------------------------------------------------------------------------
MEANS FOR EFFECT CT
-----------------------------------------------------------------------------
      CT         NOS        CCMD3
1                  3        27.1300
```

```
2                  3        28.1500
3                  3        30.4500
4                  3        28.5900
SE(N=   3)                 0.553132
5%LSD   6DF                 1.91337
--------------------------------------------------------------------------------
ANALYSIS OF VARIANCE SUMMARY TABLE  FILE CCMD3    2/ 7/22 20: 1
------------------------------------------------------------------ :PAGE   3
 F-PROBABLIITY VALUES FOR EACH EFFECT IN THE MODEL. SECTION - 1
 VARIATE       GRAND MEAN  STANDARD   DEVIATION  C OF V |NL      |CT      |
               (N=   12)   -------------------- SD/MEAN |        |        |
              NO.           BASED ON   BASED ON    %    |        |        |
              OBS.          TOTAL SS   RESID SS         |        |        |
   CCMD3       12  28.580     1.4489    0.95805      3.4 0.8824   0.0284
```

Method: 95.0 percent LSD

Col_1	*Count*	*Mean*	*Homogeneous Groups*
1	3	27.13	X
2	3	28.15	X
4	3	28.59	X
3	3	30.45	X

d. Đường kính cây năm 1

```
BALANCED ANOVA FOR VARIATE     DKTH  FILE DKTH1    2/ 7/22 20: 4
 ------------------------------------------------------------------ :PAGE   1
 VARIATE V003 DKTH
 LN   SOURCE OF VARIATION            DF  SUMS OF     MEAN     F RATIO PROB  ER
                                         SQUARES     SQUARES                LN
 ================================================================================
 1 NL                                 2 .165500E-01 .827500E-02   1.66 0.266  3
 2 CT                                 3 .862501E-02 .287500E-02   0.58 0.652  3
 * RESIDUAL                           6 .298500E-01 .497500E-02
 ------------------------------------------------------------------------------
 * TOTAL (CORRECTED)                 11 .550250E-01 .500227E-02
 ------------------------------------------------------------------------------
 TABLE OF MEANS FOR FACTORIAL EFFECTS  FILE DKTH1    2/ 7/22 20: 4
 ------------------------------------------------------------------ :PAGE   2
 MEANS FOR EFFECT NL
 --------------------------------------------------------------------------------
       NL         NOS         DKTH
 1                  4        1.76750
 2                  4        1.69000
 3                  4        1.77000
 SE(N=   4)                 0.352668E-01
 5%LSD   6DF                0.121994
 --------------------------------------------------------------------------------
 MEANS FOR EFFECT CT
 --------------------------------------------------------------------------------
       CT         NOS         DKTH
 1                  3        1.77000
 2                  3        1.76000
 3                  3        1.70000
 4                  3        1.74000
 SE(N=   3)                 0.407226E-01
 5%LSD   6DF                0.140866
 --------------------------------------------------------------------------------
 ANALYSIS OF VARIANCE SUMMARY TABLE  FILE DKTH1    2/ 7/22 20: 4
 ------------------------------------------------------------------ :PAGE   3
  F-PROBABLIITY VALUES FOR EACH EFFECT IN THE MODEL. SECTION - 1
  VARIATE       GRAND MEAN  STANDARD   DEVIATION  C OF V |NL      |CT      |
                (N=   12)   -------------------- SD/MEAN |        |        |
               NO.           BASED ON   BASED ON    %    |        |        |
               OBS.          TOTAL SS   RESID SS         |        |        |
     DKTH       12  1.7425    0.70727E-010.70534E-01  4.0 0.2663   0.6525
```

Method: 95.0 percent LSD

Col_1	*Count*	*Mean*	*Homogeneous Groups*
3	3	1.7	X
4	3	1.74	X
2	3	1.76	X
1	3	1.77	X

e. Đường kính thân năm thứ 2

```
BALANCED ANOVA FOR VARIATE     DKTH  FILE DKTH2    2/ 7/22 20: 7
 ---------------------------------------------------------------- :PAGE   1
 VARIATE V003 DKTH

 LN   SOURCE OF VARIATION            DF  SUMS OF     MEAN     F RATIO PROB  ER
                                         SQUARES     SQUARES               LN
 ==============================================================================
 1 NL                                2 .271500E-01 .135750E-01   0.59 0.586  3
 2 CT                                3 .906001E-01 .302000E-01   1.32 0.353  3
 * RESIDUAL                          6 .137650     .229417E-01
 ------------------------------------------------------------------------------
 * TOTAL (CORRECTED)                11 .255400     .232182E-01
 ------------------------------------------------------------------------------
 TABLE OF MEANS FOR FACTORIAL EFFECTS  FILE DKTH2    2/ 7/22 20: 7
 ---------------------------------------------------------------- :PAGE   2
 MEANS FOR EFFECT NL
 ------------------------------------------------------------------------------
       NL         NOS         DKTH
 1                  4        2.32250
 2                  4        2.40500
 3                  4        2.29250

 SE(N=   4)                 0.757325E-01
 5%LSD   6DF                0.261971
 ------------------------------------------------------------------------------
 MEANS FOR EFFECT CT
 ------------------------------------------------------------------------------
       CT         NOS         DKTH
 1                  3        2.25000
 2                  3        2.29000
 3                  3        2.48000
 4                  3        2.34000

 SE(N=   3)                 0.874484E-01
 5%LSD   6DF                0.302498
 ------------------------------------------------------------------------------
 ANALYSIS OF VARIANCE SUMMARY TABLE  FILE DKTH2    2/ 7/22 20: 7
 ---------------------------------------------------------------- :PAGE   3
  F-PROBABLIITY VALUES FOR EACH EFFECT IN THE MODEL. SECTION - 1

  VARIATE       GRAND MEAN  STANDARD   DEVIATION  C OF V |NL      |CT      |
                 (N=   12)  -------------------- SD/MEAN |        |        |
               NO.           BASED ON   BASED ON    %    |        |        |
               OBS.          TOTAL SS   RESID SS         |        |        |
     DKTH       12  2.3400    0.15238    0.15147      6.5 0.5860   0.3535
```

Method: 95.0 percent LSD

Col_1	*Count*	*Mean*	*Homogeneous Groups*
1	3	2.25	X
2	3	2.29	X
4	3	2.34	X
3	3	2.48	X

f. Đường kính thân năm thứ 3

```
 BALANCED ANOVA FOR VARIATE    DKTH3  FILE DKTH3    2/ 7/22 20:11
 ---------------------------------------------------------------- :PAGE   1
 VARIATE V003 DKTH3

 LN   SOURCE OF VARIATION            DF  SUMS OF     MEAN     F RATIO PROB  ER
                                         SQUARES     SQUARES               LN
 ==============================================================================
 1 NL                                2 .216500E-01 .108250E-01   0.85 0.477  3
 2 CT                                3 .758250E-01 .252750E-01   1.98 0.219  3
 * RESIDUAL                          6 .767500E-01 .127917E-01
 ------------------------------------------------------------------------------
 * TOTAL (CORRECTED)                11 .174225     .158386E-01
 ------------------------------------------------------------------------------
 TABLE OF MEANS FOR FACTORIAL EFFECTS  FILE DKTH3    2/ 7/22 20:11
 ---------------------------------------------------------------- :PAGE   2
 MEANS FOR EFFECT NL
 ------------------------------------------------------------------------------
```

```
      NL         NOS        DKTH3
1                  4        2.65000
2                  4        2.56250
3                  4        2.65500

SE(N=   4)                 0.565501E-01
5%LSD   6DF                0.195616
--------------------------------------------------------------------------------
MEANS FOR EFFECT CT
--------------------------------------------------------------------------------
      CT         NOS        DKTH3
1                  3        2.56000
2                  3        2.65000
3                  3        2.54000
4                  3        2.74000

SE(N=   3)                 0.652985E-01
5%LSD   6DF                0.225878
--------------------------------------------------------------------------------
ANALYSIS OF VARIANCE SUMMARY TABLE  FILE DKTH3    2/ 7/22 20:11
------------------------------------------------------------------ :PAGE   3
 F-PROBABLIITY VALUES FOR EACH EFFECT IN THE MODEL. SECTION - 1
 VARIATE       GRAND MEAN  STANDARD   DEVIATION  C OF V |NL      |CT      |
               (N=   12)   -------------------- SD/MEAN |        |        |
              NO.           BASED ON   BASED ON    %    |        |        |
              OBS.          TOTAL SS   RESID SS         |        |        |
   DKTH3       12  2.6225    0.12585    0.11310      4.3 0.4770   0.2188
```

Method: 95.0 percent LSD

Col_1	*Count*	*Mean*	*Homogeneous Groups*
3	3	2.54	X
1	3	2.56	X
2	3	2.65	X
4	3	2.74	X

g. Đường kính tán năm thứ 1

```
BALANCED ANOVA FOR VARIATE  DKTANN2  FILE DKTANN1   16/ 2/22 14:42
------------------------------------------------------------------ :PAGE   1
VARIATE V003 DKTANN2
LN   SOURCE OF VARIATION            DF  SUMS OF     MEAN     F RATIO PROB  ER
                                        SQUARES     SQUARES                LN
================================================================================
1 NL                                2 1.53095     .765475       1.23 0.359  3
2 CT                                3 26.9697     8.98990      14.40 0.004  3
* RESIDUAL                          6 3.74685     .624475
--------------------------------------------------------------------------------
* TOTAL (CORRECTED)                11 32.2475     2.93159
--------------------------------------------------------------------------------
TABLE OF MEANS FOR FACTORIAL EFFECTS  FILE DKTANN1   16/ 2/22 14:42
------------------------------------------------------------------ :PAGE   2
MEANS FOR EFFECT NL
--------------------------------------------------------------------------------
      NL         NOS      DKTANN2
1                  4        19.3725
2                  4        20.1400
3                  4        19.3925

SE(N=   4)                 0.395119
5%LSD   6DF                 1.36678
--------------------------------------------------------------------------------
MEANS FOR EFFECT CT
--------------------------------------------------------------------------------
      CT         NOS      DKTANN2
1                  3        18.0500
2                  3        19.8700
3                  3        21.9700
4                  3        18.6500
SE(N=   3)                 0.456244
5%LSD   6DF                 1.57822
--------------------------------------------------------------------------------
ANALYSIS OF VARIANCE SUMMARY TABLE  FILE DKTANN1   16/ 2/22 14:42
------------------------------------------------------------------ :PAGE   3
 F-PROBABLIITY VALUES FOR EACH EFFECT IN THE MODEL. SECTION - 1
```

```
 VARIATE       GRAND MEAN  STANDARD   DEVIATION  C OF V |NL      |CT      |
               (N=   12)   -------------------- SD/MEAN |        |        |
              NO.           BASED ON   BASED ON    %    |        |        |
              OBS.          TOTAL SS   RESID SS         |        |        |
 DKTANN2       12  19.635     1.7122    0.79024      4.0 0.3588   0.0044
```

Method: 95.0 percent LSD

Col_1	*Count*	*Mean*	*Homogeneous Groups*
1	3	8.91	X
2	3	9.02	X
4	3	9.04	X
3	3	9.06	X

h. Đường kính tán năm thứ 2

```
 BALANCED ANOVA FOR VARIATE   DKTAN2  FILE DKTAN2    2/ 7/22 20:22
------------------------------------------------------------------ :PAGE   1
VARIATE V003 DKTAN2
LN   SOURCE OF VARIATION            DF  SUMS OF     MEAN     F RATIO PROB  ER
                                        SQUARES     SQUARES                LN
==============================================================================
1 NL                                 2 1.53095     .765475       1.23 0.359  3
2 CT                                 3 26.9697     8.98990      14.40 0.004  3
* RESIDUAL                           6 3.74685     .624475
------------------------------------------------------------------------------
* TOTAL (CORRECTED)                 11 32.2475     2.93159
------------------------------------------------------------------------------
TABLE OF MEANS FOR FACTORIAL EFFECTS  FILE DKTAN2    2/ 7/22 20:22
------------------------------------------------------------------ :PAGE   2
MEANS FOR EFFECT NL
------------------------------------------------------------------------------
      NL         NOS       DKTAN2
1                  4        19.3725
2                  4        20.1400
3                  4        19.3925
SE(N=   4)                 0.395119
5%LSD   6DF                 1.36678
------------------------------------------------------------------------------

MEANS FOR EFFECT CT
------------------------------------------------------------------------------
      CT         NOS       DKTAN2
1                  3        18.0500
2                  3        19.8700
3                  3        21.9700
4                  3        18.6500

SE(N=   3)                 0.456244
5%LSD   6DF                 1.57822
------------------------------------------------------------------------------
ANALYSIS OF VARIANCE SUMMARY TABLE  FILE DKTAN2    2/ 7/22 20:22
------------------------------------------------------------------ :PAGE   3
 F-PROBABLIITY VALUES FOR EACH EFFECT IN THE MODEL. SECTION - 1
 VARIATE       GRAND MEAN  STANDARD   DEVIATION  C OF V |NL      |CT      |
               (N=   12)   -------------------- SD/MEAN |        |        |
              NO.           BASED ON   BASED ON    %    |        |        |
              OBS.          TOTAL SS   RESID SS         |        |        |
  DKTAN2       12  19.635     1.7122    0.79024      4.0 0.3588   0.0044
```

Method: 95.0 percent LSD

Col_1	*Count*	*Mean*	*Homogeneous Groups*
1	3	18.05	X
4	3	18.65	XX
2	3	19.87	X
3	3	21.97	X

i. Đường kính tán năm thứ 3

```
 BALANCED ANOVA FOR VARIATE  DKTANN3  FILE DKTANN3   16/ 2/22 14:49
------------------------------------------------------------------ :PAGE   1
VARIATE V003 DKTANN3

LN   SOURCE OF VARIATION            DF  SUMS OF     MEAN     F RATIO PROB  ER
                                        SQUARES     SQUARES                LN
```

```
==============================================================================
1 NL                                2 .228150     .114075       0.06 0.946  3
2 CT                                3 90.0074     30.0025      14.86 0.004  3
* RESIDUAL                          6 12.1150     2.01917
------------------------------------------------------------------------------
* TOTAL (CORRECTED)                11 102.351     9.30460
------------------------------------------------------------------------------
TABLE OF MEANS FOR FACTORIAL EFFECTS  FILE DKTANN3   16/ 2/22 14:49
------------------------------------------------------------------ :PAGE   2
MEANS FOR EFFECT NL
--------------------------------------------------------------------------------
      NL         NOS      DKTANN3
1                  4        27.7800
2                  4        27.7800
3                  4        28.0725

SE(N=   4)                 0.710488
5%LSD   6DF                 2.45769
--------------------------------------------------------------------------------
MEANS FOR EFFECT CT
--------------------------------------------------------------------------------
      CT         NOS      DKTANN3
1                  3        24.0200
2                  3        27.7100
3                  3        31.7600
4                  3        28.0200
SE(N=   3)                 0.820401
5%LSD   6DF                 2.83790
--------------------------------------------------------------------------------
ANALYSIS OF VARIANCE SUMMARY TABLE  FILE DKTANN3   16/ 2/22 14:49
------------------------------------------------------------------ :PAGE   3
 F-PROBABLIITY VALUES FOR EACH EFFECT IN THE MODEL. SECTION - 1
 VARIATE       GRAND MEAN  STANDARD   DEVIATION  C OF V |NL      |CT      |
               (N=   12)   -------------------- SD/MEAN |        |        |
              NO.           BASED ON   BASED ON    %    |        |        |
              OBS.          TOTAL SS   RESID SS         |        |        |
 DKTANN3       12  27.877     3.0503     1.4210      5.1 0.9455   0.0041
```

Method: 95.0 percent LSD

Col_1	*Count*	*Mean*	*Homogeneous Groups*
1	3	24.02	X
2	3	27.71	X
4	3	28.02	X
3	3	31.76	X

Bảng 3.22: Ảnh hưởng của khoảng cách trồng đến chiều dài củ, đường kính củ và năng suất cá thể sâm Ngọc Linh

a. Chiều dài củ

```
BALANCED ANOVA FOR VARIATE  CDCMDN1  FILE CDCMDN1   16/ 2/22 15:26
------------------------------------------------------------------ :PAGE   1
VARIATE V003 CDCMDN1

LN   SOURCE OF VARIATION            DF  SUMS OF     MEAN     F RATIO PROB  ER
                                        SQUARES     SQUARES                LN
==============================================================================
1 NL                                2 .485000E-02 .242500E-02   0.44 0.667  3
2 CT                                3 .870000E-02 .290000E-02   0.52 0.683  3
* RESIDUAL                          6 .331500E-01 .552501E-02
------------------------------------------------------------------------------
* TOTAL (CORRECTED)                11 .467000E-01 .424546E-02
------------------------------------------------------------------------------
TABLE OF MEANS FOR FACTORIAL EFFECTS  FILE CDCMDN1   16/ 2/22 15:26
------------------------------------------------------------------ :PAGE   2
MEANS FOR EFFECT NL
--------------------------------------------------------------------------------
      NL         NOS      CDCMDN1
1                  4        1.62750
2                  4        1.61500
3                  4        1.66250
```

```
SE(N=   4)                  0.371652E-01
5%LSD   6DF                 0.128560
-------------------------------------------------------------------------------
MEANS FOR EFFECT CT
-------------------------------------------------------------------------------
      CT         NOS      CDCMDN1
1                  3        1.61000
2                  3        1.63000
3                  3        1.62000
4                  3        1.68000
SE(N=   3)                  0.429147E-01
5%LSD   6DF                 0.148449
-------------------------------------------------------------------------------
ANALYSIS OF VARIANCE SUMMARY TABLE  FILE CDCMDN1   16/ 2/22 15:26
------------------------------------------------------------------ :PAGE   3
 F-PROBABLIITY VALUES FOR EACH EFFECT IN THE MODEL. SECTION - 1
 VARIATE       GRAND MEAN  STANDARD   DEVIATION  C OF V |NL      |CT      |
               (N=   12)   -------------------- SD/MEAN |        |        |
              NO.           BASED ON   BASED ON    %    |        |        |
              OBS.          TOTAL SS   RESID SS         |        |        |
 CDCMDN1       12  1.6350    0.65157E-010.74330E-01  4.3 0.6670   0.6830
```

Method: 95.0 percent LSD

Col_1	*Count*	*Mean*	*Homogeneous Groups*
1	3	1.61	X
3	3	1.62	X
2	3	1.63	X
4	3	1.68	X

b. Chiều dài củ năm thứ 2

```
BALANCED ANOVA FOR VARIATE  CDCMDN2  FILE CDCMDN2   16/ 2/22 15:31
------------------------------------------------------------------ :PAGE   1
VARIATE V003 CDCMDN2
LN   SOURCE OF VARIATION            DF  SUMS OF     MEAN     F RATIO PROB  ER
                                        SQUARES     SQUARES               LN
===============================================================================
1 NL                                 2 .979998E-02 .489999E-02   0.24 0.794  3
2 CT                                 3 .289800     .966000E-01   4.76 0.050  3
* RESIDUAL                           6 .121800     .203000E-01
-------------------------------------------------------------------------------
* TOTAL (CORRECTED)                 11 .421400     .383091E-01
-------------------------------------------------------------------------------
TABLE OF MEANS FOR FACTORIAL EFFECTS  FILE CDCMDN2   16/ 2/22 15:31
------------------------------------------------------------------ :PAGE   2
MEANS FOR EFFECT NL
-------------------------------------------------------------------------------
      NL         NOS      CDCMDN2
1                  4        3.33000
2                  4        3.36500
3                  4        3.29500

SE(N=   4)                  0.712390E-01
5%LSD   6DF                 0.246427
-------------------------------------------------------------------------------
MEANS FOR EFFECT CT
-------------------------------------------------------------------------------
      CT         NOS      CDCMDN2
1                  3        3.12000
2                  3        3.25000
3                  3        3.52000
4                  3        3.43000

SE(N=   3)                  0.822597E-01
5%LSD   6DF                 0.284550
-------------------------------------------------------------------------------
ANALYSIS OF VARIANCE SUMMARY TABLE  FILE CDCMDN2   16/ 2/22 15:31
------------------------------------------------------------------ :PAGE   3
 F-PROBABLIITY VALUES FOR EACH EFFECT IN THE MODEL. SECTION - 1

 VARIATE       GRAND MEAN  STANDARD   DEVIATION  C OF V |NL      |CT      |
               (N=   12)   -------------------- SD/MEAN |        |        |
              NO.           BASED ON   BASED ON    %    |        |        |
```

```
                OBS.          TOTAL SS   RESID SS         |        |        |
 CDCMDN2         12  3.3300    0.19573    0.14248      4.3 0.7940   0.0505
```

Method: 95.0 percent LSD

Col_1	*Count*	*Mean*	*Homogeneous Groups*
1	3	3.12	X
2	3	3.25	XX
4	3	3.43	XX
3	3	3.52	X

c. Chiều dài củ năm thứ 3

```
BALANCED ANOVA FOR VARIATE  CDCMDN3  FILE CDCMDN3   16/ 2/22 15:34
 ---------------------------------------------------------------- :PAGE   1
 VARIATE V003 CDCMDN3

 LN   SOURCE OF VARIATION            DF  SUMS OF     MEAN     F RATIO PROB  ER
                                         SQUARES     SQUARES               LN
 ==============================================================================
 1 NL                                2 .195000E-02 .975000E-03   0.07 0.929  3
 2 CT                                3 .267000     .890000E-01   6.79 0.024  3
 * RESIDUAL                          6 .786500E-01 .131083E-01
 ------------------------------------------------------------------------------
 * TOTAL (CORRECTED)                11 .347600     .316000E-01
 ------------------------------------------------------------------------------
 TABLE OF MEANS FOR FACTORIAL EFFECTS  FILE CDCMDN3   16/ 2/22 15:34
 ---------------------------------------------------------------- :PAGE   2
 MEANS FOR EFFECT NL
 ------------------------------------------------------------------------------
       NL         NOS      CDCMDN3
 1                  4        3.69250
 2                  4        3.66250
 3                  4        3.68500
 SE(N=   4)                 0.572458E-01
 5%LSD   6DF                0.198022
 ------------------------------------------------------------------------------
 MEANS FOR EFFECT CT
 ------------------------------------------------------------------------------
       CT         NOS      CDCMDN3
 1                  3        3.47000
 2                  3        3.66000
 3                  3        3.70000
 4                  3        3.89000

 SE(N=   3)                 0.661018E-01
 5%LSD   6DF                0.228657
 ------------------------------------------------------------------------------
 ANALYSIS OF VARIANCE SUMMARY TABLE  FILE CDCMDN3   16/ 2/22 15:34
 ---------------------------------------------------------------- :PAGE   3
  F-PROBABLIITY VALUES FOR EACH EFFECT IN THE MODEL. SECTION - 1
  VARIATE       GRAND MEAN  STANDARD   DEVIATION  C OF V |NL      |CT      |
                 (N=   12)   -------------------- SD/MEAN |        |        |
                NO.           BASED ON   BASED ON    %    |        |        |
                OBS.          TOTAL SS   RESID SS         |        |        |
  CDCMDN3        12  3.6800    0.17776    0.11449      3.1 0.9288   0.0242
```

Method: 95.0 percent LSD

Col_1	*Count*	*Mean*	*Homogeneous Groups*
1	3	3.47	X
2	3	3.66	X
3	3	3.7	X
4	3	3.89	X

d. Đường kính củ

```
 BALANCED ANOVA FOR VARIATE  DKCMDN1  FILE DKCMDN1   16/ 2/22 15:39
 ---------------------------------------------------------------- :PAGE   1
 VARIATE V003 DKCMDN1

 LN   SOURCE OF VARIATION            DF  SUMS OF     MEAN     F RATIO PROB  ER
                                         SQUARES     SQUARES               LN
 ==============================================================================
 1 NL                                2 .296000E-01 .148000E-01   2.41 0.170  3
```

```
2 CT                                3 .447225     .149075      24.31 0.001  3
* RESIDUAL                          6 .368000E-01 .613334E-02
-------------------------------------------------------------------------------
* TOTAL (CORRECTED)                11 .513625     .466932E-01
-------------------------------------------------------------------------------
TABLE OF MEANS FOR FACTORIAL EFFECTS  FILE DKCMDN1   16/ 2/22 15:39
------------------------------------------------------------------ :PAGE   2
MEANS FOR EFFECT NL
-------------------------------------------------------------------------------
      NL         NOS      DKCMDN1
1                  4        2.46250
2                  4        2.36250
3                  4        2.47250

SE(N=   4)                 0.391578E-01
5%LSD   6DF                0.135453
-------------------------------------------------------------------------------
MEANS FOR EFFECT CT
-------------------------------------------------------------------------------
      CT         NOS      DKCMDN1
1                  3        2.11000
2                  3        2.46000
3                  3        2.56000
4                  3        2.60000

SE(N=   3)                 0.452155E-01
5%LSD   6DF                0.156408
-------------------------------------------------------------------------------
ANALYSIS OF VARIANCE SUMMARY TABLE  FILE DKCMDN1   16/ 2/22 15:39
------------------------------------------------------------------ :PAGE   3
 F-PROBABLIITY VALUES FOR EACH EFFECT IN THE MODEL. SECTION - 1
 VARIATE       GRAND MEAN  STANDARD   DEVIATION  C OF V |NL      |CT      |
               (N=   12)   -------------------- SD/MEAN |        |        |
              NO.           BASED ON   BASED ON    %    |        |        |
              OBS.          TOTAL SS   RESID SS         |        |        |
 DKCMDN1       12  2.4325    0.21609    0.78316E-01  3.2 0.1697   0.0013
```

Method: 95.0 percent LSD

Col_1	*Count*	*Mean*	*Homogeneous Groups*
2	3	1.21	X
3	3	1.26	X
1	3	1.28	X
4	3	1.33	X

c. Đường kính củ năm thứ 2

```
 BALANCED ANOVA FOR VARIATE  DKCMDN2  FILE DKCMDN2   16/ 2/22 15:43
------------------------------------------------------------------ :PAGE   1
VARIATE V003 DKCMDN2
LN   SOURCE OF VARIATION            DF  SUMS OF     MEAN     F RATIO PROB  ER
                                        SQUARES     SQUARES               LN
===============================================================================
1 NL                                2 .125000E-02 .625000E-03   0.07 0.936  3
2 CT                                3 .656250E-01 .218750E-01   2.33 0.174  3
* RESIDUAL                          6 .563500E-01 .939166E-02
-------------------------------------------------------------------------------
* TOTAL (CORRECTED)                11 .123225     .112023E-01
-------------------------------------------------------------------------------
TABLE OF MEANS FOR FACTORIAL EFFECTS  FILE DKCMDN2   16/ 2/22 15:43
------------------------------------------------------------------ :PAGE   2
MEANS FOR EFFECT NL
-------------------------------------------------------------------------------
      NL         NOS      DKCMDN2
1                  4        1.82000
2                  4        1.80750
3                  4        1.79500
SE(N=   4)                 0.484553E-01
5%LSD   6DF                0.167615
-------------------------------------------------------------------------------
MEANS FOR EFFECT CT
-------------------------------------------------------------------------------
```

```
      CT         NOS      DKCMDN2
1                  3        1.86000
2                  3        1.89000
3                  3        1.70000
4                  3        1.78000
SE(N=   3)                 0.559514E-01
5%LSD   6DF                0.193545
--------------------------------------------------------------------------------
ANALYSIS OF VARIANCE SUMMARY TABLE  FILE DKCMDN2   16/ 2/22 15:43
------------------------------------------------------------------ :PAGE   3
 F-PROBABLIITY VALUES FOR EACH EFFECT IN THE MODEL. SECTION - 1
 VARIATE       GRAND MEAN  STANDARD   DEVIATION  C OF V |NL      |CT      |
               (N=   12)   -------------------- SD/MEAN |        |        |
              NO.           BASED ON   BASED ON    %    |        |        |
              OBS.          TOTAL SS   RESID SS         |        |        |
 DKCMDN2       12  1.8075    0.10584    0.96911E-01  5.4 0.9360   0.1737
```

Method: 95.0 percent LSD

Col_1	*Count*	*Mean*	*Homogeneous Groups*
3	3	1.7	X
4	3	1.78	XX
1	3	1.86	X
2	3	1.89	X

d. Đường kính củ năm thứ 3

```
BALANCED ANOVA FOR VARIATE  DKCMDN3  FILE DKCMDN3   16/ 2/22 15:49
 ------------------------------------------------------------------ :PAGE   1
 VARIATE V003 DKCMDN3
 LN   SOURCE OF VARIATION            DF  SUMS OF     MEAN     F RATIO PROB  ER
                                         SQUARES     SQUARES                LN
 ==============================================================================
 1 NL                                2 .396500E-01 .198250E-01   3.50 0.098  3
 2 CT                                3 .414600     .138200      24.42 0.001  3
 * RESIDUAL                          6 .339500E-01 .565833E-02
 ------------------------------------------------------------------------------
 * TOTAL (CORRECTED)                11 .488200     .443818E-01
 ------------------------------------------------------------------------------
 TABLE OF MEANS FOR FACTORIAL EFFECTS  FILE DKCMDN3   16/ 2/22 15:49
 ------------------------------------------------------------------ :PAGE   2
 MEANS FOR EFFECT NL
 ------------------------------------------------------------------------------
       NL         NOS      DKCMDN3
1                  4        2.44750
2                  4        2.34000
3                  4        2.47250

SE(N=   4)                 0.376109E-01
5%LSD   6DF                0.130102
--------------------------------------------------------------------------------
MEANS FOR EFFECT CT
--------------------------------------------------------------------------------
      CT         NOS      DKCMDN3
1                  3        2.11000
2                  3        2.46000
3                  3        2.60000
4                  3        2.51000

SE(N=   3)                 0.434294E-01
5%LSD   6DF                0.150229
--------------------------------------------------------------------------------
ANALYSIS OF VARIANCE SUMMARY TABLE  FILE DKCMDN3   16/ 2/22 15:49
------------------------------------------------------------------ :PAGE   3
 F-PROBABLIITY VALUES FOR EACH EFFECT IN THE MODEL. SECTION - 1

 VARIATE       GRAND MEAN  STANDARD   DEVIATION  C OF V |NL      |CT      |
               (N=   12)   -------------------- SD/MEAN |        |        |
              NO.           BASED ON   BASED ON    %    |        |        |
              OBS.          TOTAL SS   RESID SS         |        |        |
 DKCMDN3       12  2.4200    0.21067    0.75222E-01  3.1 0.0978   0.0013
```

Method: 95.0 percent LSD

Col_1	*Count*	*Mean*	*Homogeneous Groups*
1	3	2.11	X
2	3	2.46	X
4	3	2.51	X
3	3	2.6	X

e. Năng suất cá thể năm thứ 1

```
 BALANCED ANOVA FOR VARIATE   NSCTN1  FILE NSCTN1   16/ 2/22 15:59
------------------------------------------------------------------ :PAGE   1
VARIATE V003 NSCTN1

LN   SOURCE OF VARIATION            DF  SUMS OF     MEAN     F RATIO PROB  ER
                                        SQUARES     SQUARES                LN
==============================================================================
1 NL                                2 .531050     .265525       1.39 0.319  3
2 CT                                3 .884026     .294675       1.54 0.297  3
* RESIDUAL                          6 1.14535     .190892
------------------------------------------------------------------------------
* TOTAL (CORRECTED)                11 2.56042     .232766
------------------------------------------------------------------------------
TABLE OF MEANS FOR FACTORIAL EFFECTS  FILE NSCTN1   16/ 2/22 15:59
------------------------------------------------------------------ :PAGE   2
MEANS FOR EFFECT NL
--------------------------------------------------------------------------------

      NL         NOS       NSCTN1
1                  4        9.34500
2                  4        8.90000
3                  4        8.89750

SE(N=   4)                 0.218456
5%LSD   6DF                0.755673
--------------------------------------------------------------------------------
MEANS FOR EFFECT CT
--------------------------------------------------------------------------------

      CT         NOS       NSCTN1
1                  3        8.61000
2                  3        9.34000
3                  3        9.06000
4                  3        9.18000
SE(N=   3)                 0.252251
5%LSD   6DF                0.872576
--------------------------------------------------------------------------------
ANALYSIS OF VARIANCE SUMMARY TABLE  FILE NSCTN1   16/ 2/22 15:59
------------------------------------------------------------------ :PAGE   3
 F-PROBABLIITY VALUES FOR EACH EFFECT IN THE MODEL. SECTION - 1
 VARIATE       GRAND MEAN  STANDARD   DEVIATION  C OF V |NL      |CT      |
               (N=   12)   -------------------- SD/MEAN |        |        |
              NO.           BASED ON   BASED ON    %    |        |        |
              OBS.          TOTAL SS   RESID SS         |        |        |
  NSCTN1       12  9.0475    0.48246    0.43691      4.8 0.3195   0.2974
```

Method: 95.0 percent LSD

Col_1	*Count*	*Mean*	*Homogeneous Groups*
1	3	8.61	X
3	3	9.06	X
4	3	9.18	X
2	3	9.34	X

f. Năng suất cá thể năm thứ 2

```
BALANCED ANOVA FOR VARIATE   NSCTN2  FILE NSCTN2    2/ 7/22 20:42
------------------------------------------------------------------ :PAGE   1
VARIATE V003 NSCTN2
LN   SOURCE OF VARIATION            DF  SUMS OF     MEAN     F RATIO PROB  ER
                                        SQUARES     SQUARES                LN
==============================================================================
1 NL                                2 .196816     .984082E-01   0.39 0.696  3
2 CT                                3 18.6794     6.22647      24.69 0.001  3
* RESIDUAL                          6 1.51325     .252208
------------------------------------------------------------------------------
```

```
* TOTAL (CORRECTED)                11 20.3895     1.85359
-------------------------------------------------------------------------------
TABLE OF MEANS FOR FACTORIAL EFFECTS  FILE NSCTN2    2/ 7/22 20:42
---------------------------------------------------------------- :PAGE   2
MEANS FOR EFFECT NL
-------------------------------------------------------------------------------
      NL         NOS       NSCTN2
1                  4        12.9225
2                  4        13.1850
3                  4        13.2025

SE(N=   4)                 0.251102
5%LSD   6DF                0.868601
-------------------------------------------------------------------------------
MEANS FOR EFFECT CT
-------------------------------------------------------------------------------
      CT         NOS       NSCTN2
1                  3        11.5733
2                  3        12.2100
3                  3        14.0400
4                  3        14.5900

SE(N=   3)                 0.289947
5%LSD   6DF                 1.00297
-------------------------------------------------------------------------------
ANALYSIS OF VARIANCE SUMMARY TABLE  FILE NSCTN2    2/ 7/22 20:42
---------------------------------------------------------------- :PAGE   3
 F-PROBABLIITY VALUES FOR EACH EFFECT IN THE MODEL. SECTION - 1

 VARIATE       GRAND MEAN  STANDARD   DEVIATION  C OF V |NL      |CT      |
               (N=   12)   -------------------- SD/MEAN |        |        |
              NO.           BASED ON   BASED ON    %    |        |        |
              OBS.          TOTAL SS   RESID SS         |        |        |
  NSCTN2       12  13.103     1.3615    0.50220      3.8 0.6958   0.0013
```

Method: 95.0 percent LSD

Col_1	*Count*	*Mean*	*Homogeneous Groups*
1	3	11.5733	X
2	3	12.21	X
3	3	14.04	X
4	3	14.59	X

g. Năng suất cá thể năm thứ 3

```
 BALANCED ANOVA FOR VARIATE   NSCTN3  FILE NSCTN3    2/ 7/22 20:46
---------------------------------------------------------------- :PAGE   1
VARIATE V003 NSCTN3

LN   SOURCE OF VARIATION            DF  SUMS OF     MEAN     F RATIO PROB  ER
                                        SQUARES     SQUARES                LN
===============================================================================
1 NL                                 2 .409550     .204775       0.25 0.787  3
2 CT                                 3 131.362     43.7875      53.61 0.000  3
* RESIDUAL                           6 4.90105     .816841
-------------------------------------------------------------------------------
* TOTAL (CORRECTED)                 11 136.673     12.4248
-------------------------------------------------------------------------------
TABLE OF MEANS FOR FACTORIAL EFFECTS  FILE NSCTN3    2/ 7/22 20:46
---------------------------------------------------------------- :PAGE   2
MEANS FOR EFFECT NL
-------------------------------------------------------------------------------
      NL         NOS       NSCTN3
1                  4        19.6900
2                  4        19.4600
3                  4        19.9125

SE(N=   4)                 0.451896
5%LSD   6DF                 1.56318
-------------------------------------------------------------------------------
MEANS FOR EFFECT CT
-------------------------------------------------------------------------------
      CT         NOS       NSCTN3
```

```
1                  3        14.1000
2                  3        20.8200
3                  3        22.7400
4                  3        21.0900

SE(N=   3)                 0.521805
5%LSD   6DF                 1.80501
--------------------------------------------------------------------------------
ANALYSIS OF VARIANCE SUMMARY TABLE  FILE NSCTN3    2/ 7/22 20:46
------------------------------------------------------------------ :PAGE   3

 F-PROBABLIITY VALUES FOR EACH EFFECT IN THE MODEL. SECTION - 1

 VARIATE       GRAND MEAN  STANDARD   DEVIATION  C OF V |NL      |CT      |
               (N=   12)   -------------------- SD/MEAN |        |        |
              NO.           BASED ON   BASED ON    %    |        |        |
              OBS.          TOTAL SS   RESID SS         |        |        |
  NSCTN3       12  19.688     3.5249    0.90379      4.6 0.7874   0.0002
```

Method: 95.0 percent LSD

Col_1	*Count*	*Mean*	*Homogeneous Groups*
1	3	14.1	X
2	3	20.82	X
4	3	21.09	X
3	3	22.74	X

Bảng 3.24: Ảnh hưởng của liều lượng phân bón hữu cơ vi sinh đến chiều cao, đường kính thân và đường kính tán sâm Ngọc Linh

a. Chiều cao cây năm thứ 1

```
123  BALANCED ANOVA FOR VARIATE     PBCC  FILE PBCCN1   26/ 6/21 17:19
 ------------------------------------------------------------------ :PAGE   1
 VARIATE V003 PBCC

 LN   SOURCE OF VARIATION            DF  SUMS OF     MEAN     F RATIO PROB  ER
                                         SQUARES     SQUARES                LN
 ==============================================================================
 1 NL                                 2 .774400E-01 .387200E-01   0.15 0.862  3
 2 CT                                 4 .780001     .195000       0.76 0.579  3
 * RESIDUAL                           8 2.04316     .255395
 ----------------------------------------------------------------------------
 * TOTAL (CORRECTED)                 14 2.90060     .207186
 ----------------------------------------------------------------------------
 TABLE OF MEANS FOR FACTORIAL EFFECTS  FILE PBCCN1   26/ 6/21 17:19
 ------------------------------------------------------------------ :PAGE   2
 MEANS FOR EFFECT NL
 --------------------------------------------------------------------------------
       NL         NOS         PBCC
 1                  5        10.5000
 2                  5        10.5880
 3                  5        10.4120

 SE(N=   5)                 0.226007
 5%LSD   8DF                0.736985
 --------------------------------------------------------------------------------
 MEANS FOR EFFECT CT
 --------------------------------------------------------------------------------
       CT         NOS         PBCC
 1                  3        10.5000
 2                  3        10.8000
 3                  3        10.3000
 4                  3        10.7000
 5                  3        10.2000

 SE(N=   3)                 0.291773
 5%LSD   8DF                0.951443
 --------------------------------------------------------------------------------
 ANALYSIS OF VARIANCE SUMMARY TABLE  FILE PBCCN1   26/ 6/21 17:19
 ------------------------------------------------------------------ :PAGE   3
  F-PROBABLIITY VALUES FOR EACH EFFECT IN THE MODEL. SECTION - 1
```

```
 VARIATE       GRAND MEAN  STANDARD   DEVIATION  C OF V |NL      |CT      |
               (N=   15)   -------------------- SD/MEAN |        |        |
              NO.           BASED ON   BASED ON    %    |        |        |
              OBS.          TOTAL SS   RESID SS         |        |        |
    PBCC       15  10.500    0.45518    0.50537      4.8 0.8617   0.5789
```

Method: 95.0 percent LSD

Col_1	*Count*	*Mean*	*Homogeneous Groups*
5	3	10.2	X
3	3	10.3	X
1	3	10.5	X
4	3	10.7	X
2	3	10.8	X

b. Chiều cao năm thứ 2

```
 BALANCED ANOVA FOR VARIATE     PBCC  FILE PBCCN3   26/ 6/21 17:43
------------------------------------------------------------------ :PAGE   1
VARIATE V003 PBCC

LN   SOURCE OF VARIATION            DF  SUMS OF     MEAN     F RATIO PROB  ER
                                        SQUARES     SQUARES                LN
==============================================================================
1 NL                                 2 .858282     .429141       0.57 0.593  3
2 CT                                 4 26.6212     6.65529       8.78 0.005  3
* RESIDUAL                           8 6.06172     .757715
------------------------------------------------------------------------------
* TOTAL (CORRECTED)                 14 33.5412     2.39580
------------------------------------------------------------------------------
TABLE OF MEANS FOR FACTORIAL EFFECTS  FILE PBCCN3   26/ 6/21 17:43
------------------------------------------------------------------ :PAGE   2
MEANS FOR EFFECT NL
------------------------------------------------------------------------------
      NL         NOS         PBCC
1                  5        20.8320
2                  5        21.4120
3                  5        21.1940
SE(N=   5)                 0.389285
5%LSD   8DF                 1.26942
------------------------------------------------------------------------------
MEANS FOR EFFECT CT
------------------------------------------------------------------------------
      CT         NOS         PBCC
1                  3        19.3900
2                  3        19.9500
3                  3        22.3800
4                  3        22.8300
5                  3        21.1800
SE(N=   3)                 0.502565
5%LSD   8DF                 1.63881
------------------------------------------------------------------------------
ANALYSIS OF VARIANCE SUMMARY TABLE  FILE PBCCN3   26/ 6/21 17:43
------------------------------------------------------------------ :PAGE   3

 F-PROBABLIITY VALUES FOR EACH EFFECT IN THE MODEL. SECTION - 1

 VARIATE       GRAND MEAN  STANDARD   DEVIATION  C OF V |NL      |CT      |
               (N=   15)   -------------------- SD/MEAN |        |        |
              NO.           BASED ON   BASED ON    %    |        |        |
              OBS.          TOTAL SS   RESID SS         |        |        |
    PBCC       15  21.146     1.5478    0.87047      4.1 0.5926   0.0054
```

Method: 95.0 percent LSD

Method: 95.0 percent LSD

Col_1	*Count*	*Mean*	*Homogeneous Groups*
1	3	19.39	X
2	3	19.95	XX
5	3	21.18	XX
3	3	22.38	XX
4	3	22.83	X

c. Chiều cao cây năm thứ 3

```
 BALANCED ANOVA FOR VARIATE     PBCC  FILE PBCCN8   26/ 6/21 19:42
---------------------------------------------------------------- :PAGE   1
VARIATE V003 PBCC
LN   SOURCE OF VARIATION            DF  SUMS OF     MEAN     F RATIO PROB  ER
                                        SQUARES     SQUARES                LN
==============================================================================
1 NL                                 2 1.06032     .530159       1.08 0.385  3
2 CT                                 4 177.528     44.3819      90.76 0.000  3
* RESIDUAL                           8 3.91188     .488986
------------------------------------------------------------------------------
* TOTAL (CORRECTED)                 14 182.500     13.0357
------------------------------------------------------------------------------
TABLE OF MEANS FOR FACTORIAL EFFECTS  FILE PBCCN8   26/ 6/21 19:42
---------------------------------------------------------------- :PAGE   2
MEANS FOR EFFECT NL
------------------------------------------------------------------------------
      NL         NOS         PBCC
1                  5        33.5040
2                  5        34.0680
3                  5        33.5040

SE(N=   5)                 0.312725
5%LSD   8DF                 1.01977
------------------------------------------------------------------------------
MEANS FOR EFFECT CT
------------------------------------------------------------------------------
      CT         NOS         PBCC
1                  3        31.1700
2                  3        32.0200
3                  3        29.7800
4                  3        38.7100
5                  3        36.7800
SE(N=   3)                 0
.403727
5%LSD   8DF                 1.38651
------------------------------------------------------------------------------
ANALYSIS OF VARIANCE SUMMARY TABLE  FILE PBCCN8   26/ 6/21 19:42
---------------------------------------------------------------- :PAGE   3

 F-PROBABLIITY VALUES FOR EACH EFFECT IN THE MODEL. SECTION - 1

 VARIATE       GRAND MEAN  STANDARD   DEVIATION  C OF V |NL      |CT      |
               (N=   15)   -------------------- SD/MEAN |        |        |
              NO.           BASED ON   BASED ON    %    |        |        |
              OBS.          TOTAL SS   RESID SS         |        |        |
    PBCC       15  33.692     3.6105    0.69928      2.2 0.3847   0.0000
```

Method: 95.0 percent LSD

Col_1	*Count*	*Mean*	*Homogeneous Groups*
3	3	29.78	X
1	3	31.17	X
2	3	32.02	X
5	3	36.78	X
4	3	38.69	X

d. Đường kính thân năm thứ 1

```
 BALANCED ANOVA FOR VARIATE      DKT  FILE PBDKTN9   27/ 6/21  0:24
---------------------------------------------------------------- :PAGE   1
VARIATE V003 DKT
LN   SOURCE OF VARIATION            DF  SUMS OF     MEAN     F RATIO PROB  ER
                                        SQUARES     SQUARES                LN
==============================================================================
1 NL                                 2 .324000E-02 .162000E-02   0.36 0.709  3
2 CT                                 4 .204000E-02 .509999E-03   0.11 0.971  3
* RESIDUAL                           8 .355600E-01 .444500E-02
------------------------------------------------------------------------------
* TOTAL (CORRECTED)                 14 .408400E-01 .291714E-02
------------------------------------------------------------------------------
TABLE OF MEANS FOR FACTORIAL EFFECTS  FILE PBDKTN9   27/ 6/21  0:24
---------------------------------------------------------------- :PAGE   2
MEANS FOR EFFECT NL
```

```
--------------------------------------------------------------------------------
      NL         NOS          DKT
1                  5        1.72400
2                  5        1.74200
3                  5        1.76000

SE(N=   5)                 0.298161E-01
5%LSD   8DF                0.972273E-01
--------------------------------------------------------------------------------
MEANS FOR EFFECT CT
--------------------------------------------------------------------------------
      CT         NOS          DKT
1                  3        1.73000
2                  3        1.75000
3                  3        1.74000
4                  3        1.73000
5                  3        1.76000

SE(N=   3)                 0.384924E-01
5%LSD   8DF                0.125520
--------------------------------------------------------------------------------

ANALYSIS OF VARIANCE SUMMARY TABLE  FILE PBDKTN9   27/ 6/21  0:24
------------------------------------------------------------------ :PAGE   3
 F-PROBABLIITY VALUES FOR EACH EFFECT IN THE MODEL. SECTION - 1
 VARIATE       GRAND MEAN  STANDARD   DEVIATION  C OF V |NL      |CT      |
               (N=   15)   -------------------- SD/MEAN |        |        |
              NO.           BASED ON   BASED ON    %    |        |        |
              OBS.          TOTAL SS   RESID SS         |        |        |
     DKT       15  1.7420    0.54011E-010.66671E-01  3.8 0.7088   0.9709
```

Method: 95.0 percent LSD

Col_1	*Count*	*Mean*	*Homogeneous Groups*
1	3	1.73	X
4	3	1.73	X
3	3	1.74	X
2	3	1.75	X
5	3	1.76	X

e. Đường kính thân năm thứ 2

```
 BALANCED ANOVA FOR VARIATE    PBDKT  FILE PBDKTN5   26/ 6/21 20: 8
------------------------------------------------------------------ :PAGE   1
VARIATE V003 PBDKT
LN   SOURCE OF VARIATION            DF  SUMS OF     MEAN     F RATIO PROB  ER
                                        SQUARES     SQUARES                LN
================================================================================
1 NL                                2 .268000E-02 .134000E-02   0.11 0.893  3
2 CT                                4 .441600     .110400       9.38 0.004  3
* RESIDUAL                          8 .941201E-01 .117650E-01
--------------------------------------------------------------------------------
* TOTAL (CORRECTED)                14 .538400     .384571E-01
--------------------------------------------------------------------------------
TABLE OF MEANS FOR FACTORIAL EFFECTS  FILE PBDKTN5   26/ 6/21 20: 8
------------------------------------------------------------------ :PAGE   2
MEANS FOR EFFECT NL
--------------------------------------------------------------------------------
      NL         NOS        PBDKT
1                  5        2.41600
2                  5        2.40600
3                  5        2.43800

SE(N=   5)                 0.485078E-01
5%LSD   8DF                0.158179
--------------------------------------------------------------------------------
MEANS FOR EFFECT CT
--------------------------------------------------------------------------------
      CT         NOS        PBDKT
1                  3        2.52000
2                  3        2.25000
3                  3        2.31000
4                  3        2.71000
```

```
5                  3        2.31000

SE(N=   3)                 0.626232E-01
5%LSD   8DF                0.204208
-------------------------------------------------------------------------------
ANALYSIS OF VARIANCE SUMMARY TABLE  FILE PBDKTN5   26/ 6/21 20: 8
------------------------------------------------------------------ :PAGE   3

 F-PROBABLIITY VALUES FOR EACH EFFECT IN THE MODEL. SECTION - 1

 VARIATE       GRAND MEAN  STANDARD   DEVIATION  C OF V |NL      |CT      |
               (N=   15)   -------------------- SD/MEAN |        |        |
              NO.           BASED ON   BASED ON    %    |        |        |
              OBS.          TOTAL SS   RESID SS         |        |        |
   PBDKT       15  2.4200    0.19610    0.10847      4.5 0.8933   0.0045
```

Method: 95.0 percent LSD

Col_1	*Count*	*Mean*	*Homogeneous Groups*
2	3	2.25	X
3	3	2.31	X
5	3	2.31	X
1	3	2.52	X
4	3	2.71	X

f. Đường kính thân năm thứ 3

```
 BALANCED ANOVA FOR VARIATE    PBDKT  FILE PBDKTN6   26/ 6/21 20:15
------------------------------------------------------------------ :PAGE   1
VARIATE V003 PBDKT

LN   SOURCE OF VARIATION            DF  SUMS OF     MEAN     F RATIO PROB  ER
                                        SQUARES     SQUARES                LN
==============================================================================
1 NL                                2 .875998E-02 .437999E-02   0.35 0.717  3
2 CT                                4 .191160     .477900E-01   3.84 0.050  3
* RESIDUAL                          8 .996399E-01 .124550E-01
------------------------------------------------------------------------------
* TOTAL (CORRECTED)                14 .299560     .213971E-01
------------------------------------------------------------------------------
TABLE OF MEANS FOR FACTORIAL EFFECTS  FILE PBDKTN6   26/ 6/21 20:15
------------------------------------------------------------------ :PAGE   2
MEANS FOR EFFECT NL
-------------------------------------------------------------------------------

      NL         NOS        PBDKT
1                  5        2.89000
2                  5        2.93800
3                  5        2.94400

SE(N=   5)                 0.499099E-01
5%LSD   8DF                0.162751
-------------------------------------------------------------------------------
MEANS FOR EFFECT CT
-------------------------------------------------------------------------------

      CT         NOS        PBDKT
1                  3        3.01000
2                  3        2.96000
3                  3        3.02000
4                  3        2.92000
5                  3        2.71000

SE(N=   3)                 0.644334E-01
5%LSD   8DF                0.210111
-------------------------------------------------------------------------------
ANALYSIS OF VARIANCE SUMMARY TABLE  FILE PBDKTN6   26/ 6/21 20:15
------------------------------------------------------------------ :PAGE   3
 F-PROBABLIITY VALUES FOR EACH EFFECT IN THE MODEL. SECTION - 1

 VARIATE       GRAND MEAN  STANDARD   DEVIATION  C OF V |NL      |CT      |
               (N=   15)   -------------------- SD/MEAN |        |        |
              NO.           BASED ON   BASED ON    %    |        |        |
```

```
                OBS.          TOTAL SS   RESID SS         |        |        |
   PBDKT         15  2.9240    0.14628    0.11160      3.8 0.7170   0.0502
```

Col_1	Count	Mean	Homogeneous Groups
5	3	2.71	X
4	3	2.92	X
2	3	2.96	X
1	3	3.01	X
3	3	3.02	X

g. Đường kính tán năm thứ 1

```
 BALANCED ANOVA FOR VARIATE    DKTAN  FILE PBDKTAN9   26/ 6/21 21:31
------------------------------------------------------------------ :PAGE   1
VARIATE V003 DKTAN

LN   SOURCE OF VARIATION            DF  SUMS OF     MEAN     F RATIO PROB  ER
                                        SQUARES     SQUARES                LN
==============================================================================
1 NL                                2 .308680     .154340       0.98 0.418  3
2 CT                                4 .204000E-02 .510000E-03   0.00 1.000  3
* RESIDUAL                          8 1.25972     .157465
------------------------------------------------------------------------------
* TOTAL (CORRECTED)                14 1.57044     .112174
------------------------------------------------------------------------------
TABLE OF MEANS FOR FACTORIAL EFFECTS  FILE PBDKTAN9   26/ 6/21 21:31
------------------------------------------------------------------ :PAGE   2
MEANS FOR EFFECT NL
------------------------------------------------------------------------------

      NL         NOS        DKTAN
1                  5        9.32200
2                  5        8.97200
3                  5        9.12000

SE(N=   5)                 0.177463
5%LSD   8DF                0.578688
------------------------------------------------------------------------------

MEANS FOR EFFECT CT
------------------------------------------------------------------------------

      CT         NOS        DKTAN
1                  3        9.15000
2                  3        9.13000
3                  3        9.15000
4                  3        9.14000
5                  3        9.12000

SE(N=   3)                 0.229103
5%LSD   8DF                0.747083
------------------------------------------------------------------------------
ANALYSIS OF VARIANCE SUMMARY TABLE  FILE PBDKTAN9   26/ 6/21 21:31
------------------------------------------------------------------ :PAGE   3

 F-PROBABLIITY VALUES FOR EACH EFFECT IN THE MODEL. SECTION - 1

 VARIATE       GRAND MEAN  STANDARD   DEVIATION  C OF V |NL      |CT      |
               (N=   15)   -------------------- SD/MEAN |        |        |
               NO.          BASED ON   BASED ON    %    |        |        |
               OBS.         TOTAL SS   RESID SS         |        |        |
   DKTAN        15  9.1380    0.33492    0.39682      4.3 0.4182   0.9996
```

Method: 95.0 percent LSD

Col_1	Count	Mean	Homogeneous Groups
5	3	9.12	X
2	3	9.13	X
4	3	9.14	X
3	3	9.15	X
1	3	9.15	X

h. Đường kính tán năm thứ 2

```
 BALANCED ANOVA FOR VARIATE    DKTAN  FILE PBDKTAN3   26/ 6/21 20:59
---------------------------------------------------------------- :PAGE   1
VARIATE V003 DKTAN

LN   SOURCE OF VARIATION            DF  SUMS OF     MEAN     F RATIO PROB  ER
                                        SQUARES     SQUARES                LN
==============================================================================
1 NL                                2 .476640     .238320       0.73 0.516  3
2 CT                                4 4.08840     1.02210       3.12 0.080  3
* RESIDUAL                          8 2.62176     .327720
------------------------------------------------------------------------------
* TOTAL (CORRECTED)                14 7.18680     .513343
------------------------------------------------------------------------------
TABLE OF MEANS FOR FACTORIAL EFFECTS  FILE PBDKTAN3   26/ 6/21 20:59
---------------------------------------------------------------- :PAGE   2
MEANS FOR EFFECT NL
------------------------------------------------------------------------------

      NL         NOS        DKTAN
1                  5        20.4720
2                  5        20.1000
3                  5        20.0880

SE(N=   5)                 0.256016
5%LSD   8DF                0.834841
------------------------------------------------------------------------------

MEANS FOR EFFECT CT
------------------------------------------------------------------------------

      CT         NOS        DKTAN
1                  3        20.3500
2                  3        19.6300
3                  3        19.7500
4                  3        21.1000
5                  3        20.2700

SE(N=   3)                 0.330515
5%LSD   8DF                 1.07777
------------------------------------------------------------------------------
ANALYSIS OF VARIANCE SUMMARY TABLE  FILE PBDKTAN3   26/ 6/21 20:59
---------------------------------------------------------------- :PAGE   3

 F-PROBABLIITY VALUES FOR EACH EFFECT IN THE MODEL. SECTION - 1

 VARIATE       GRAND MEAN  STANDARD   DEVIATION  C OF V |NL      |CT      |
               (N=   15)   -------------------- SD/MEAN |        |        |
              NO.           BASED ON   BASED ON    %    |        |        |
              OBS.          TOTAL SS   RESID SS         |        |        |
   DKTAN       15  20.220    0.71648    0.57247      2.8 0.5159   0.0801
```

Method: 95.0 percent LSD

Col_1	*Count*	*Mean*	*Homogeneous Groups*
2	3	19.63	X
3	3	19.75	X
5	3	20.27	XX
1	3	20.35	XX
4	3	21.1	X

i. Đường kính tán năm thứ 3

```
 BALANCED ANOVA FOR VARIATE    DKTAN  FILE PBDKTAN5   26/ 6/21 21:19
---------------------------------------------------------------- :PAGE   1
VARIATE V003 DKTAN

LN   SOURCE OF VARIATION            DF  SUMS OF     MEAN     F RATIO PROB  ER
                                        SQUARES     SQUARES                LN
==============================================================================
1 NL                                2 2.58496     1.29248       2.43 0.149  3
2 CT                                4 15.6314     3.90786       7.36 0.009  3
```

```
* RESIDUAL                          8 4.24843     .531054
-------------------------------------------------------------------------------
* TOTAL (CORRECTED)                14 22.4648     1.60463
-------------------------------------------------------------------------------
TABLE OF MEANS FOR FACTORIAL EFFECTS  FILE PBDKTAN5   26/ 6/21 21:19
---------------------------------------------------------------- :PAGE   2
MEANS FOR EFFECT NL
-------------------------------------------------------------------------------

      NL         NOS        DKTAN
1                  5        30.5480
2                  5        30.0760
3                  5        31.0920

SE(N=   5)                 0.325900
5%LSD   8DF                 1.06273
-------------------------------------------------------------------------------
MEANS FOR EFFECT CT
-------------------------------------------------------------------------------
      CT         NOS        DKTAN
1                  3        30.1500
2                  3        29.3300
3                  3        29.9500
4                  3        32.2100
5                  3        31.2200

SE(N=   3)                 0.420735
5%LSD   8DF                 1.37197
-------------------------------------------------------------------------------
ANALYSIS OF VARIANCE SUMMARY TABLE  FILE PBDKTAN5   26/ 6/21 21:19
---------------------------------------------------------------- :PAGE   3
 F-PROBABLIITY VALUES FOR EACH EFFECT IN THE MODEL. SECTION - 1

 VARIATE       GRAND MEAN  STANDARD   DEVIATION  C OF V |NL      |CT      |
               (N=   15)   -------------------- SD/MEAN |        |        |
              NO.           BASED ON   BASED ON    %    |        |        |
              OBS.          TOTAL SS   RESID SS         |        |        |
   DKTAN       15  30.572     1.2667    0.72873      2.4 0.1485   0.0091
```

Method: 95.0 percent LSD

Col_1	*Count*	*Mean*	*Homogeneous Groups*
2	3	29.33	X
3	3	29.95	XX
1	3	30.15	XX
5	3	31.22	XX
4	3	32.21	X

Bảng 3.25: Ảnh hưởng của liều lượng phân bón hữu cơ vi sinh đến chiều dài củ, đường kính củ và năng suất cá thể sâm Ngọc Linh

a. Chiều dài củ năm 1

```
BALANCED ANOVA FOR VARIATE      CDC  FILE PBCDCN21   27/ 6/21  0:10
---------------------------------------------------------------- :PAGE   1
VARIATE V003 CDC

LN   SOURCE OF VARIATION            DF  SUMS OF     MEAN     F RATIO PROB  ER
                                        SQUARES     SQUARES                LN
===============================================================================
1 NL                                 2 .227999E-02 .114000E-02   0.15 0.865  3
2 CT                                 4 .204000E-02 .510000E-03   0.07 0.988  3
* RESIDUAL                           8 .617200E-01 .771500E-02
-------------------------------------------------------------------------------
* TOTAL (CORRECTED)                 14 .660400E-01 .471714E-02
-------------------------------------------------------------------------------
TABLE OF MEANS FOR FACTORIAL EFFECTS  FILE PBCDCN21   27/ 6/21  0:10
---------------------------------------------------------------- :PAGE   2
MEANS FOR EFFECT NL
-------------------------------------------------------------------------------
```

```
      NL         NOS          CDC
1                  5        1.37600
2                  5        1.39400
3                  5        1.40600

SE(N=   5)                 0.392810E-01
5%LSD   8DF                0.128092
--------------------------------------------------------------------------------

MEANS FOR EFFECT CT
--------------------------------------------------------------------------------

      CT         NOS          CDC
1                  3        1.38000
2                  3        1.40000
3                  3        1.39000
4                  3        1.38000
5                  3        1.41000

SE(N=   3)                 0.507116E-01
5%LSD   8DF                0.165365
--------------------------------------------------------------------------------
ANALYSIS OF VARIANCE SUMMARY TABLE  FILE PBCDCN21   27/ 6/21  0:10
------------------------------------------------------------------ :PAGE   3

 F-PROBABLIITY VALUES FOR EACH EFFECT IN THE MODEL. SECTION - 1

 VARIATE       GRAND MEAN  STANDARD   DEVIATION  C OF V |NL      |CT      |
               (N=   15)   -------------------- SD/MEAN |        |        |
              NO.           BASED ON   BASED ON    %    |        |        |
              OBS.          TOTAL SS   RESID SS         |        |        |
     CDC       15  1.3920    0.68681E-010.87835E-01  6.3 0.8649   0.9877
```

Method: 95.0 percent LSD

Col_1	*Count*	*Mean*	*Homogeneous Groups*
4	3	1.38	X
1	3	1.38	X
3	3	1.39	X
2	3	1.4	X
5	3	1.41	X

b. Chiều dài củ năm 2

```
 BALANCED ANOVA FOR VARIATE      CDC  FILE PBCDCN20   26/ 6/21 23:55
------------------------------------------------------------------ :PAGE   1
VARIATE V003 CDC

LN   SOURCE OF VARIATION            DF  SUMS OF     MEAN     F RATIO PROB  ER
                                        SQUARES     SQUARES               LN
==============================================================================
1 NL                                 2 .241600E-01 .120800E-01   0.31 0.742  3
2 CT                                 4 .942360     .235590       6.12 0.015  3
* RESIDUAL                           8 .308040     .385050E-01
------------------------------------------------------------------------------
* TOTAL (CORRECTED)                 14 1.27456     .910400E-01
------------------------------------------------------------------------------
TABLE OF MEANS FOR FACTORIAL EFFECTS  FILE PBCDCN20   26/ 6/21 23:55
------------------------------------------------------------------ :PAGE   2
MEANS FOR EFFECT NL
--------------------------------------------------------------------------------

      NL         NOS          CDC
1                  5        3.41000
2                  5        3.31800
3                  5        3.33400

SE(N=   5)                 0.877554E-01
5%LSD   8DF                0.286161
--------------------------------------------------------------------------------
MEANS FOR EFFECT CT
--------------------------------------------------------------------------------

      CT         NOS          CDC
```

```
1                  3        3.23000
2                  3        3.33000
3                  3        2.98000
4                  3        3.72000
5                  3        3.51000

SE(N=   3)                 0.113292
5%LSD   8DF                0.369433
--------------------------------------------------------------------------------
ANALYSIS OF VARIANCE SUMMARY TABLE  FILE PBCDCN20   26/ 6/21 23:55
------------------------------------------------------------------ :PAGE   3
 F-PROBABLIITY VALUES FOR EACH EFFECT IN THE MODEL. SECTION - 1

 VARIATE       GRAND MEAN  STANDARD   DEVIATION  C OF V |NL      |CT      |
               (N=   15)   -------------------- SD/MEAN |        |        |
              NO.           BASED ON   BASED ON    %    |        |        |
              OBS.          TOTAL SS   RESID SS         |        |        |
     CDC       15  3.3540    0.30173    0.19623      5.9 0.7420   0.0152
```

Method: 95.0 percent LSD

Col_1	*Count*	*Mean*	*Homogeneous Groups*
3	3	2.98	X
1	3	3.23	XX
2	3	3.33	X
5	3	3.51	XX
4	3	3.72	X

c. Chiều dài củ năm 3

```
 BALANCED ANOVA FOR VARIATE      CDC  FILE PBCDCN16   26/ 6/21 23:28
------------------------------------------------------------------ :PAGE   1
VARIATE V003 CDC

LN   SOURCE OF VARIATION            DF  SUMS OF     MEAN     F RATIO PROB  ER
                                        SQUARES     SQUARES               LN
================================================================================
1 NL                                 2 .217560     .108780       2.13 0.180  3
2 CT                                 4 3.83916     .959790      18.83 0.001  3
* RESIDUAL                           8 .407840     .509800E-01
--------------------------------------------------------------------------------
* TOTAL (CORRECTED)                 14 4.46456     .318897
--------------------------------------------------------------------------------
TABLE OF MEANS FOR FACTORIAL EFFECTS  FILE PBCDCN16   26/ 6/21 23:28
------------------------------------------------------------------ :PAGE   2
MEANS FOR EFFECT NL
--------------------------------------------------------------------------------
      NL         NOS          CDC
1                  5        3.60200
2                  5        3.77000
3                  5        3.89600

SE(N=   5)                 0.100975
5%LSD   8DF                0.329270
--------------------------------------------------------------------------------
MEANS FOR EFFECT CT
--------------------------------------------------------------------------------
      CT         NOS          CDC
1                  3        3.36000
2                  3        3.62000
3                  3        3.13000
4                  3        4.19000
5                  3        4.48000

SE(N=   3)                 0.130358
5%LSD   8DF                0.425086
--------------------------------------------------------------------------------
ANALYSIS OF VARIANCE SUMMARY TABLE  FILE PBCDCN16   26/ 6/21 23:28
------------------------------------------------------------------ :PAGE   3

 F-PROBABLIITY VALUES FOR EACH EFFECT IN THE MODEL. SECTION - 1

 VARIATE       GRAND MEAN  STANDARD   DEVIATION  C OF V |NL      |CT      |
               (N=   15)   -------------------- SD/MEAN |        |        |
```

```
                NO.           BASED ON   BASED ON    %    |         |         |
                OBS.          TOTAL SS   RESID SS         |         |         |
      CDC        15  3.7560    0.56471    0.22579      6.0 0.1801   0.0005
```

Method: 95.0 percent LSD

Col_1	*Count*	*Mean*	*Homogeneous Groups*
3	3	3.13	X
1	3	3.36	XX
2	3	3.62	X
4	3	4.19	X
5	3	4.48	X

d. Đường kính củ năm 1

```
BALANCED ANOVA FOR VARIATE      DKC  FILE PBDKCN2   27/ 6/21  0:29
 ------------------------------------------------------------------ :PAGE   1
 VARIATE V003 DKC

 LN   SOURCE OF VARIATION            DF  SUMS OF     MEAN     F RATIO PROB  ER
                                         SQUARES     SQUARES                LN
 ==============================================================================
 1 NL                                 2 .892000E-02 .446000E-02   0.99 0.413  3
 2 CT                                 4 .204000E-02 .510000E-03   0.11 0.971  3
 * RESIDUAL                           8 .358800E-01 .448500E-02
 ------------------------------------------------------------------------------
 * TOTAL (CORRECTED)                 14 .468400E-01 .334571E-02
 ------------------------------------------------------------------------------
 TABLE OF MEANS FOR FACTORIAL EFFECTS  FILE PBDKCN2   27/ 6/21  0:29
 ------------------------------------------------------------------ :PAGE   2
 MEANS FOR EFFECT NL
 ---------------------------------------------------------------------------------
       NL         NOS          DKC
 1                  5        1.31400
 2                  5        1.37000
 3                  5        1.36000

 SE(N=   5)                 0.299500E-01
 5%LSD   8DF                0.976638E-01
 ---------------------------------------------------------------------------------

 MEANS FOR EFFECT CT
 ---------------------------------------------------------------------------------

       CT         NOS          DKC
 1                  3        1.36000
 2                  3        1.34000
 3                  3        1.33000
 4                  3        1.35000
 5                  3        1.36000

 SE(N=   3)                 0.386652E-01
 5%LSD   8DF                0.126083
 ---------------------------------------------------------------------------------
 ANALYSIS OF VARIANCE SUMMARY TABLE  FILE PBDKCN2   27/ 6/21  0:29
 ------------------------------------------------------------------ :PAGE   3
  F-PROBABLIITY VALUES FOR EACH EFFECT IN THE MODEL. SECTION - 1

  VARIATE       GRAND MEAN  STANDARD   DEVIATION  C OF V |NL      |CT      |
                 (N=   15)   -------------------- SD/MEAN |         |         |
                NO.           BASED ON   BASED ON    %    |         |         |
                OBS.          TOTAL SS   RESID SS         |         |         |
      DKC        15  1.3480    0.57842E-010.66970E-01  5.0 0.4134   0.9713
```

Method: 95.0 percent LSD

Col_1	*Count*	*Mean*	*Homogeneous Groups*
3	3	1.33	X
2	3	1.34	X
4	3	1.35	X
5	3	1.36	X
1	3	1.36	X

e. Đường kính củ năm thứ 2

```
 BALANCED ANOVA FOR VARIATE      DKC  FILE PBDKCN5   27/ 6/21  0:51
---------------------------------------------------------------- :PAGE   1
VARIATE V003 DKC

LN   SOURCE OF VARIATION            DF  SUMS OF     MEAN     F RATIO PROB  ER
                                        SQUARES     SQUARES               LN
==============================================================================
1 NL                                 2 .145600E-01 .727999E-02   0.51 0.622  3
2 CT                                 4 .936600     .234150      16.45 0.001  3
* RESIDUAL                           8 .113840     .142300E-01
------------------------------------------------------------------------------
* TOTAL (CORRECTED)                 14 1.06500     .760714E-01
------------------------------------------------------------------------------
TABLE OF MEANS FOR FACTORIAL EFFECTS  FILE PBDKCN5   27/ 6/21  0:51
---------------------------------------------------------------- :PAGE   2
MEANS FOR EFFECT NL
--------------------------------------------------------------------------------

      NL         NOS          DKC
1                  5        2.25000
2                  5        2.32600
3                  5        2.29400

SE(N=   5)                 0.533479E-01
5%LSD   8DF                0.173962
--------------------------------------------------------------------------------
MEANS FOR EFFECT CT
--------------------------------------------------------------------------------

      CT         NOS          DKC
1                  3        2.17000
2                  3        2.08000
3                  3        2.02000
4                  3        2.61000
5                  3        2.57000

SE(N=   3)                 0.688719E-01
5%LSD   8DF                0.224584
--------------------------------------------------------------------------------
ANALYSIS OF VARIANCE SUMMARY TABLE  FILE PBDKCN5   27/ 6/21  0:51
---------------------------------------------------------------- :PAGE   3

 F-PROBABLIITY VALUES FOR EACH EFFECT IN THE MODEL. SECTION - 1

 VARIATE       GRAND MEAN  STANDARD   DEVIATION  C OF V |NL      |CT      |
               (N=   15)   -------------------- SD/MEAN |        |        |
              NO.           BASED ON   BASED ON    %    |        |        |
              OBS.          TOTAL SS   RESID SS         |        |        |
     DKC       15  2.2900    0.27581    0.11929      5.2 0.6218   0.0008
```

Method: 95.0 percent LSD

Col_1	*Count*	*Mean*	*Homogeneous Groups*
3	3	2.02	X
2	3	2.08	X
1	3	2.17	X
5	3	2.57	X
4	3	2.61	X

f. Đường kính củ năm thứ 3

```
 BALANCED ANOVA FOR VARIATE      DKC  FILE PBDKCN7   27/ 6/21  1:10
---------------------------------------------------------------- :PAGE   1
VARIATE V003 DKC

LN   SOURCE OF VARIATION            DF  SUMS OF     MEAN     F RATIO PROB  ER
                                        SQUARES     SQUARES               LN
==============================================================================
1 NL                                 2 .218800E-01 .109400E-01   0.79 0.487  3
2 CT                                 4 .794760     .198690      14.43 0.001  3
* RESIDUAL                           8 .110120     .137650E-01
------------------------------------------------------------------------------
* TOTAL (CORRECTED)                 14 .926760     .661971E-01
```

```
---------------------------------------------------------------------------
TABLE OF MEANS FOR FACTORIAL EFFECTS  FILE PBDKCN7   27/ 6/21  1:10
------------------------------------------------------------------ :PAGE   2
MEANS FOR EFFECT NL
-----------------------------------------------------------------------------

      NL         NOS          DKC
1                  5        2.53000
2                  5        2.61200
3                  5        2.61000

SE(N=   5)                 0.524690E-01
5%LSD   8DF                0.171096
-----------------------------------------------------------------------------
MEANS FOR EFFECT CT
-----------------------------------------------------------------------------
      CT         NOS          DKC
1                  3        2.20000
2                  3        2.48000
3                  3        2.62000
4                  3        2.85000
5                  3        2.77000

SE(N=   3)                 0.677372E-01
5%LSD   8DF                0.220884
-----------------------------------------------------------------------------
ANALYSIS OF VARIANCE SUMMARY TABLE  FILE PBDKCN7   27/ 6/21  1:10
------------------------------------------------------------------ :PAGE   3
 F-PROBABLIITY VALUES FOR EACH EFFECT IN THE MODEL. SECTION - 1

 VARIATE       GRAND MEAN  STANDARD   DEVIATION  C OF V |NL      |CT      |
               (N=   15)   -------------------- SD/MEAN |        |        |
              NO.           BASED ON   BASED ON    %    |        |        |
              OBS.          TOTAL SS   RESID SS         |        |        |
     DKC       15  2.5840    0.25729    0.11732      4.5 0.4873   0.0012
```

Method: 95.0 percent LSD

Col_1	*Count*	*Mean*	*Homogeneous Groups*
1	3	2.2	X
2	3	2.48	X
3	3	2.62	XX
5	3	2.77	XX
4	3	2.85	X

g. Năng suất cá thể năm thứ 1

```
BALANCED ANOVA FOR VARIATE     NSCT  FILE PBNSCT1   27/ 6/21 10:39
------------------------------------------------------------------ :PAGE   1
VARIATE V003 NSCT

LN   SOURCE OF VARIATION            DF  SUMS OF     MEAN     F RATIO PROB  ER
                                        SQUARES     SQUARES               LN
=============================================================================
1 NL                                 2 1.10236     .551180       1.54 0.272  3
2 CT                                 4 .759601E-01 .189900E-01   0.05 0.991  3
* RESIDUAL                           8 2.86124     .357655
-----------------------------------------------------------------------------
* TOTAL (CORRECTED)                 14 4.03956     .288540
-----------------------------------------------------------------------------
TABLE OF MEANS FOR FACTORIAL EFFECTS  FILE PBNSCT1   27/ 6/21 10:39
------------------------------------------------------------------ :PAGE   2
MEANS FOR EFFECT NL
-----------------------------------------------------------------------------
      NL         NOS         NSCT
1                  5        9.82800
2                  5        10.1140
3                  5        10.4900

SE(N=   5)                 0.267453
5%LSD   8DF                0.872136
-----------------------------------------------------------------------------
MEANS FOR EFFECT CT
-----------------------------------------------------------------------------
```

```
      CT         NOS         NSCT
1                  3        10.0500
2                  3        10.2700
3                  3        10.1400
4                  3        10.1200
5                  3        10.1400

SE(N=   3)                 0.345280
5%LSD   8DF                 1.12592
--------------------------------------------------------------------------------
ANALYSIS OF VARIANCE SUMMARY TABLE  FILE PBNSCT1   27/ 6/21 10:39
------------------------------------------------------------------ :PAGE   3
 F-PROBABLIITY VALUES FOR EACH EFFECT IN THE MODEL. SECTION - 1

 VARIATE       GRAND MEAN  STANDARD   DEVIATION  C OF V |NL      |CT      |
               (N=   15)   -------------------- SD/MEAN |        |        |
              NO.           BASED ON   BASED ON    %    |        |        |
              OBS.          TOTAL SS   RESID SS         |        |        |
    NSCT       15  10.144    0.53716    0.59804      5.9 0.2715   0.9912
```

Method: 95.0 percent LSD

Col_1	*Count*	*Mean*	*Homogeneous Groups*
1	3	10.05	X
4	3	10.12	X
3	3	10.14	X
5	3	10.14	X
2	3	10.27	X

h. Năng suất cá thể năm thứ 2

```
BALANCED ANOVA FOR VARIATE     NSCT  FILE PBNSCT2   27/ 6/21 11: 0
 ------------------------------------------------------------------ :PAGE   1
 VARIATE V003 NSCT

 LN   SOURCE OF VARIATION            DF  SUMS OF     MEAN     F RATIO PROB  ER
                                         SQUARES     SQUARES                LN
 ==============================================================================
 1 NL                                2 .347199E-01 .173599E-01   0.04 0.965  3
 2 CT                                4 46.8462     11.7115      24.64 0.000  3
 * RESIDUAL                          8 3.80268     .475336
 ------------------------------------------------------------------------------
 * TOTAL (CORRECTED)                14 50.6836     3.62026
 ------------------------------------------------------------------------------
 TABLE OF MEANS FOR FACTORIAL EFFECTS  FILE PBNSCT2   27/ 6/21 11: 0
 ------------------------------------------------------------------ :PAGE   2
 MEANS FOR EFFECT NL
 --------------------------------------------------------------------------------
       NL         NOS         NSCT
1                  5        17.2740
2                  5        17.2780
3                  5        17.3780

SE(N=   5)                 0.308330
5%LSD   8DF                 1.00543
--------------------------------------------------------------------------------
MEANS FOR EFFECT CT
--------------------------------------------------------------------------------
      CT         NOS         NSCT
1                  3        15.3100
2                  3        18.6100
3                  3        15.0200
4                  3        18.4800
5                  3        19.1300

SE(N=   3)                 0.398052
5%LSD   8DF                 1.29801
--------------------------------------------------------------------------------
ANALYSIS OF VARIANCE SUMMARY TABLE  FILE PBNSCT2   27/ 6/21 11: 0
------------------------------------------------------------------ :PAGE   3
 F-PROBABLIITY VALUES FOR EACH EFFECT IN THE MODEL. SECTION - 1

 VARIATE       GRAND MEAN  STANDARD   DEVIATION  C OF V |NL      |CT      |
```

```
                (N=   15)   -------------------- SD/MEAN |         |         |
               NO.           BASED ON   BASED ON    %    |         |         |
               OBS.          TOTAL SS   RESID SS         |         |         |
    NSCT        15  17.310     1.9027    0.68945      4.0 0.9647   0.0002
```

Method: 95.0 percent LSD

Col_1	*Count*	*Mean*	*Homogeneous Groups*
3	3	15.02	X
1	3	15.31	X
4	3	18.48	X
2	3	18.61	X
5	3	19.13	X

i. Năng suất cá thể năm thứ 3

```
 BALANCED ANOVA FOR VARIATE     NSCT  FILE PBNSCT6   27/ 6/21 11:12
 ------------------------------------------------------------------ :PAGE   1
 VARIATE V003 NSCT

 LN   SOURCE OF VARIATION            DF  SUMS OF     MEAN     F RATIO PROB  ER
                                         SQUARES     SQUARES                LN
 ==============================================================================
 1 NL                                 2 .535681     .267841       0.23 0.798  3
 2 CT                                 4 86.6036     21.6509      18.92 0.001  3
 * RESIDUAL                           8 9.15693     1.14462
 ------------------------------------------------------------------------------
 * TOTAL (CORRECTED)                 14 96.2962     6.87830
 ------------------------------------------------------------------------------
 TABLE OF MEANS FOR FACTORIAL EFFECTS  FILE PBNSCT6   27/ 6/21 11:12
 ------------------------------------------------------------------ :PAGE   2
 MEANS FOR EFFECT NL
 ------------------------------------------------------------------------------
       NL         NOS         NSCT
 1                  5        29.1640
 2                  5        29.5960
 3                  5        29.5240

 SE(N=   5)                 0.478459
 5%LSD   8DF                 1.56021
 ------------------------------------------------------------------------------
 MEANS FOR EFFECT CT
 ------------------------------------------------------------------------------
       CT         NOS         NSCT
 1                  3        26.4300
 2                  3        30.8600
 3                  3        26.6200
 4                  3        31.1800
 5                  3        32.0500

 SE(N=   3)                 0.617688
 5%LSD   8DF                 2.01422
 ------------------------------------------------------------------------------
 ANALYSIS OF VARIANCE SUMMARY TABLE  FILE PBNSCT6   27/ 6/21 11:12
 ------------------------------------------------------------------ :PAGE   3
  F-PROBABLIITY VALUES FOR EACH EFFECT IN THE MODEL. SECTION - 1

  VARIATE       GRAND MEAN  STANDARD   DEVIATION  C OF V |NL      |CT      |
                (N=   15)   -------------------- SD/MEAN |         |         |
               NO.           BASED ON   BASED ON    %    |         |         |
               OBS.          TOTAL SS   RESID SS         |         |         |
    NSCT        15  29.428     2.6227     1.0699      3.6 0.7981   0.0005
```

Method: 95.0 percent LSD

Col_1	*Count*	*Mean*	*Homogeneous Groups*
1	3	26.43	X
3	3	26.62	X
2	3	30.86	X
4	3	31.18	X
5	3	32.05	X