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*.)

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*.)

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ NÔNG NGHIỆP

Chuyên ngành : Khoa học Cây trồng

Mã ngành : 9 62 01 10

Người hướng dẫn khoa học:

1. PGS.TS. Lê Hùng Lĩnh

2. PGS.TS. Nguyễn Văn Nam

ĐẮK LẮK - NĂM 2023

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 Ngọc Linh (*P. vietnamensis*) được phát hiện từ năm 1973. Hiện nay, 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, giá trị kinh tế cao. 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 sẽ đáp ứng yêu cầu phát triển bền vững, cung cấp nguyên liệu dược liệu chất lượng cao. 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.

Hoàn thiện biện pháp kỹ thuật sản xuất cây giống sâm Ngọc Linh (*P.vietnamens*) bằng phương pháp nuôi cấy mô tế bào.

Hoàn thiện biện pháp kỹ thuật sản xuất cây giống sâm Ngọc Linh từ hạt

2.2. Yêu cầu

Thiết kế được 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 hiệu quả; môi trường nuôi cấy thích hợp cho sự hình thành và phát triển phôi vô tính và đặc điểm sinh trưởng của cây con *invitro* sâm Ngọc Linh.

Hoàn thiện biện pháp kỹ thuật nhân giống hữu tính là hạt được xử lý ngủ nghỉ, phương pháp bảo quản; nghiên cứu các thành phần giá thể 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, có độ chính xác và hiệu quả cao.

Sản xuất cây giống sâm Ngọc Linh bằng phương pháp nuôi cấy mô thông qua con đường phát sinh phôi vô tính có điểm vượt trội là hệ số nhân giống cao; phương pháp nhân giống hữu tính từ hạt là xử lý khả năng ngủ nghỉ, tối ưu hóa giá thể gieo hạt.

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.

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.

Nhân giống hữu tính từ hạt 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 sản xuất cây giống số lượng lớn

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: Viện Di truyền Nông nghiệp; 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 được hiện trạng phát triển và sản xuất cây giống sâm Ngọc Linh; điều kiện thời tiết và một số yếu tố hạn chế sản xuất tại vùng trồng sâm Ngọc Linh.

Xây dựng được phương pháp xác định đúng giống sâm Ngọc Linh bằng chỉ thị phân tử DNA mã vạch.

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.

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.

7. Bố cục của luận án

Toàn bộ luận án bao gồm 165 trang, 21 hình, 25 bảng gồm các phần:

- Mở đầu: 5 trang
- Chương 1: Tổng quan tài liệu: 36 trang
- Chương 2: Vật liệu và phương pháp nghiên cứu: 23 trang
- Chương 3: Kết quả nghiên cứu và thảo luận: 74 trang
- Kết luận và kiến nghị: 2 trang.
- Danh mục các công trình khoa học của luận án: 2 trang
- Tài liệu tham khảo: 23 trang

CHƯƠNG I
TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. Nguồn gốc chi *Panax*

1.2. Các loài nhân sâm Việt Nam

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2.1. Vật liệu nghiên cứu

- Các mẫu lá, củ, hạt giống sâm Ngọc Linh (*P. vietnamensis*); sâm Vũ Diệp (*P. bipinatifidus*), tam thất hoang (*P. stipuleanatus*) ;sâm Lai Châu (*P. vietnamensis* var. *fuscidiscus*) và các mẫu sâm Hàn Quốc; hạt giống sâm và cây con giống sâm Ngọc Linh đều đạt các tiêu chuẩn về giống.

- Các vật liệu khác: cát suối; phân bón các loại: Ure: 46% N; Super lân P_2O_5: 17%; Kali clorua: 57% K_2O; đá trân châu; phân hữu cơ khoáng vermiculite; rêu than bùn Peatman và phân hữu cơ (phân vermi)

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.

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 sâm cây giốngNgọc Linh.

Nội dung thu thập: thu thập điều kiện tự nhiên; thực trạng trồng và một số yếu tố hạn chế trồng sâm Ngọc Linh; phương pháp thu thập: thu thập số liệu thứ cấp tại địa bàn, phỏng vấn người dân, doanh nghiệp 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 phục vụ kiểm định cây giống sâm Ngọc Linh gồm 3 bước: Bước 1: Thông tin về hệ gen nhân (*P. ginseng*) 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); Bước 2: Bảng kết quả thu được sẽ thống kê số lượng đoạn SSR; Bước 3: Thiết kế đoạn mồi cho phản ứng PCR

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

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

Thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên (CRD), một yếu tố, gồm 5 công thức, nhắc lại 5 lần, cho chất khử trùng là dung dịch 500mg/L Streptomycin các công thức khác nhau: CT1: 0 phút (Đ/C); CT2: 5 phút; CT3: 10 phút; CT4: 15 phút; CT5: 20 phút.

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

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: CT1: 0 phút (Đ/C); CT2: 1 phút; CT3: 3 phút; CT4: 5 phút; CT5: 10 phút.

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

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: CT1: 0 phút (Đ/C); CT2: 10 phút; CT3: 20 phút; CT4: 30 phút; CT5: 40 phút.

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

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: CT1: 0 phút (Đ/C); CT2: 10 phút; CT3: 20 phút; CT4: 30 phút; CT5: 40 phút

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

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) gồm 4 MT: MT1: MS (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 với 3 lần lặp lại.

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

Thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên (CRD) hai yếu tố, gồm 15 CT với 3 lần lặp lại. Yếu tố 1 (Nồng độ Auxin): 2,4-D (0,5-1,0 mg/L), (Nồng Cytokinin): TDZ (0,1; 0,3; 0,5; 1,0 mg/L).

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

Thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên (CRD) một yếu tố, gồm 8 môi trường với 3 lần lặp lại: MT1: MS -ĐC; 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.

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

Thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên (CRD) 2 yếu tố, yếu tố 1 (nồng độ chất điều tiết sinh trưởng BA và NAA); yếu tố 2 (môi trường dinh dưỡng: MS và SH), 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.

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

Thí nghiệm 10: Ảnh hưởng của nồng độ dinh dưỡng cơ bản trong môi trường tối ưu đến 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. Tổng số cây: 3 CT x 5 cây/CT x 3 lần lặp = 45 cây.

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

Thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên (CRD) một yếu tố, gồm 4 công thức, lặp lại 3 lần. 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.

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

Thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên (CRD) một yếu tố, gồm 3 công thức, lặp lại 3 lần. 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

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

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. 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.

Thí nghiệm 14: 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

Thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên (CRD) một yếu tố, gồm 4 công thức (CT), mỗi công thức 30 hạt và được lặp lại 3 lần. CT1: Hạt giống đem gieo sau khi thu hoạch (đã tách vỏ thịt) được ủ trong mùn núi (Đ/C); CT2: Hạt giống sau khi thu hoạch (đã tách vỏ thịt) được ủ trong cát suối (độ ẩm 75- 80%); 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%); 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 -4^{0}C trong 120 ngày.

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

Thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên một yếu tố (CRD). Gồm 5 công thức (CT), mỗi công thức 30 hạt (đã nứt nanh) và được lặp lại 3 lần. 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. 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). Gồm 4 công thức (CT); 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), lặp lại 3 lần.

Thí nghiệm 17: Ảnh hưởng của liều lượng phân bón đến sinh trưởng, phát triển và năng suất của cây sâm Ngọc Linh

Thí nghiệm được bố trí theo phương pháp khối ngẫu nhiên hoàn toàn (RCBD). Gồm 4 công thức (CT),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

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

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 (theoTCVN 8567: 2010). Vi sinh vật cố định đạm (theo TCVN 6166:2002); vi sinh vật phân giải lân (theo TCVN 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. Tại tỉnh Quảng Nam năm 2013 tại bảng 3.1 cho thấy, 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. 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). Giá trị kinh tế: cây giống 1 năm tuổi từ 250 - 300.000 đồng/cây; giá sâm các loại từ 75 - 100 triệu đồng/kg. Mỗi ha sau 5 năm trồng sẽ thu lợi nhuận từ 30 - 50 tỷ đồng.

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. Tỉnh Kon Tum: tổng diện tích quy hoạch là 31.742 ha. 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 phát triển được 20 ha vườn giống gốc sâm Ngọc Linh. Tại Quảng Nam: 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 (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 giống sâm Ngọc Linh (cây 1-5 tuổi) để phục vụ sản xuất trong vùng quy hoạch.

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**

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**

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**		**5.350.000**

Hiện nay, trên địa bàn tỉnh Kon Tum và Quảng Nam có 5 cơ sở ươm giống cung cấp cây sâm Ngọc Linh từ hạt có nguồn gốc với số lượng sản xuất 5.350.000 cây giống đảm bảo chất lượng xuất vườn tại bảng 3.3.

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: Nhân giống bằng hạt dựa trên phương pháp kỹ thuật truyền thống: (1) 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; (2). Quả sâm lấy hạt phải đạt độ chín nhất định: quả có màu đỏ tươi và xuất hiện chấm đen ở đầu; (3). Gieo hạt giống: 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; (4). Lựa chọn cây giống: chọn cây giống 1 năm tuổi trở lên; rễ củ hình con quay, chiều cao thân từ 13 - 15 cm, chiều dài củ (>1 cm), đường kính củ (>0,5 cm); lá xanh hoặc xanh đậm, không bị đốm hay bị úa vàng, không có dấu hiệu sâu bệnh. Nhân cây giống bằng phương pháp nuôi cấy mô tế bào: Quy trình sản xuất cây giống sâm bằng phương pháp *invitro* chủ yếu như sau: Phôi được lấy từ các bộ phận của cây khoẻ

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 cây >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 sâm Ngọc Linh

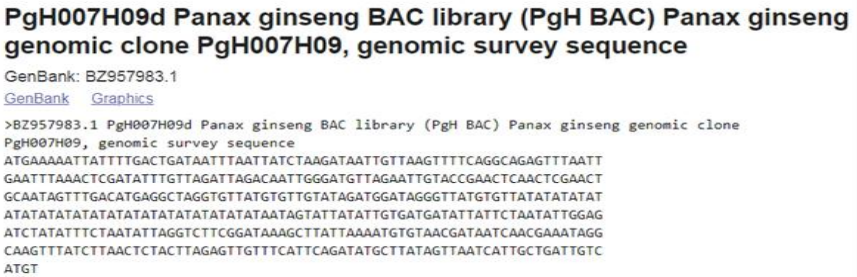
(1). Thiếu vốn và cây giống là hai yếu tố hạn chế lớn nhất của các nông hộ. Vốn lớn để đầu tư vật tư (giống, vật tư khác) và chi phí công chăm sóc (>4,9 tỷ đồng/ha cho trồng mới). Nguồn cây giống ngày càng khan hiếm trong tự nhiên, cho nên giá mua hạt giống từ 100-150.000 đồng/hạt; giá cây giống rất cao, từ 200-300.000 đ/cây (cây 1 năm tuổi); (2). Khả năng tiếp cận thông tin khoa học kỹ thuật (cây giống đạt tiêu chuẩn, kỹ thuật canh tác...) 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; (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, hạn chế về ứng dụng khoa học kỹ thuật vào canh tác; (4). Việc canh tác sâm chỉ được thực hiện ở quy mô nhỏ, chưa có số lượng thành phẩm đủ lớn để chế biến và sản xuất hàng hóa; (5). Hiện nay, vùng trồng sâm Ngọc Linh đang chịu tác động của hiện tượng thời tiết diễn biến cực đoan như lượng mưa ít, ẩm độ không khí thấp; áp lực sâu bệnh hại rất lớn; đặc biệt là bệnh đốm vòng, sương mai, lỡ cổ rễ, thối rễ,..

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

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, đề tài đã khai thác

thông tin về hệ gen nhân của nhân sâm (*P.ginseng*) trên các cơ sở dữ liệu chứa trình tự các đoạn lặp đơn giản (microsatellite), trình tự Genome survey sequence (GSS), Expressed sequence tag (EST) trên ngân hàng gen (NCBI) hình 3.1



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

GenBank: BZ957983.1

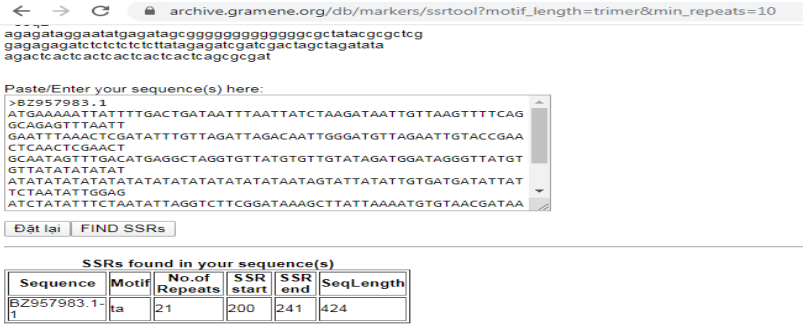
GenBank Graphics

>BZ957983.1 PgH007H09d Panax ginseng BAC library (PgH BAC) Panax ginseng genomic clone PgH007H09, genomic survey sequence

ATGAAAAATTATTTTGACTGATAATTTAATTATCTAAGATAATTGTTAAGTTTTCAGGCAGAGTTTAATT
GAATTTAAACTCGATATTTGTTAGATTAGACAATTGGGATGTTAGAATTGTACCGAACTCAACTCGAACT
GCAATAGTTTGACATGAGGCTAGGTGTTATGTGTTGTATAGATGGATAGGGTTATGTGTTATATATATAT
ATATATATATATATATATATATATATATATAATAGTATTATATTGTGATGATATTATTCTAATATTGGAG
ATCTATATTTCTAATATTAGGTCTTCGGATAAAGCTTATTAAAATGTGTAACGATAATCAACGAAATAGG
CAAGTTTATCTTAACTCTACTTAGAGTTGTTTCATTCAGATATGCTTATAGTTAATCATTGCTGATTGTC
ATGT

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

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



archive.gramene.org/db/markers/ssrtool?motif_length=trimer&min_repeats=10

agagataggaatatgagatagcgggggggggggcgctatacgcgctcg
gagagagatctctctctcttatagagatcgatcgactagctagatata
agactcactcactcactcactcagcgcgat

Paste/Enter your sequence(s) here:

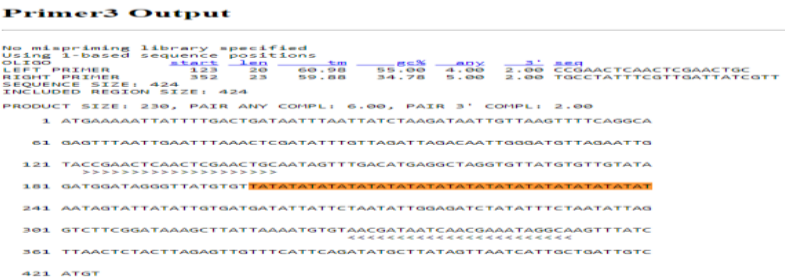
>BZ957983.1
ATGAAAAATTATTTTGACTGATAATTTAATTATCTAAGATAATTGTTAAGTTTTCAG
GCAGAGTTTAATT
GAATTTAAACTCGATATTTGTTAGATTAGACAATTGGGATGTTAGAATTGTACCGAA
CTCAACTCGAACT
GCAATAGTTTGACATGAGGCTAGGTGTTATGTGTTGTATAGATGGATAGGGTTATGT
GTTATATATATAT
ATATATATATATATATATATATATATATAATAGTATTATATTGTGATGATATTAT
TCTAATATTGGAG
ATCTATATTTCTAATATTAGGTCTTCGGATAAAGCTTATTAAAATGTGTAACGATAA

Đặt lại | FIND SSRs

SSRs found in your sequence(s)

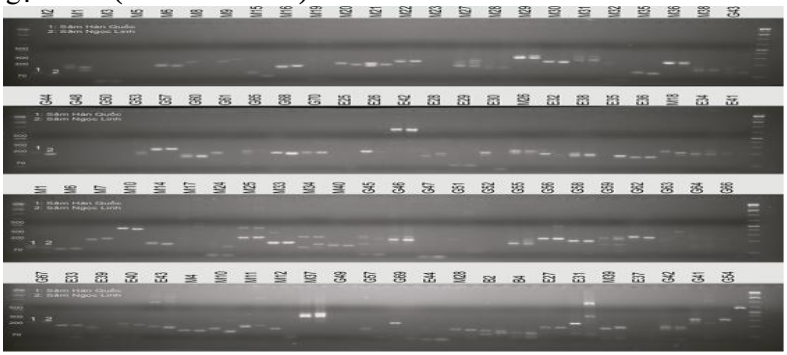
Sequence	Motif	No.of Repeats	SSR start	SSR end	SeqLength
BZ957983.1-1	ta	21	200	241	424

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



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

Kết quả tại hình 3.3 cho thấy: chỉ thị phân tử đã thiết kế 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. Đề tài sử dụng 2000 đoạn trình tự và đã thiết kế được 90 chỉ thị phân tử. 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 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 nhân sâm (*P. ginseng*) để thiết kế chỉ thị phân tử phục vụ kiểm định sâm Ngọc Linh (*P. vietnamensis*).



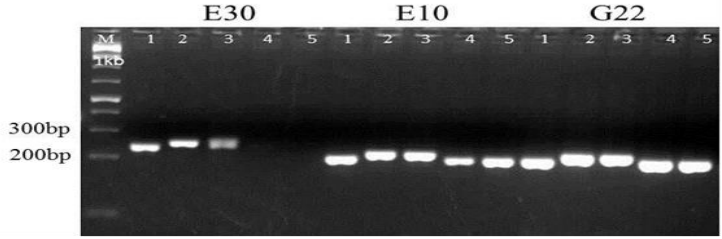
Hình 3.4. Kết quả khảo sát chỉ thị phân tử trên gel agarose 2,5%

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

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).

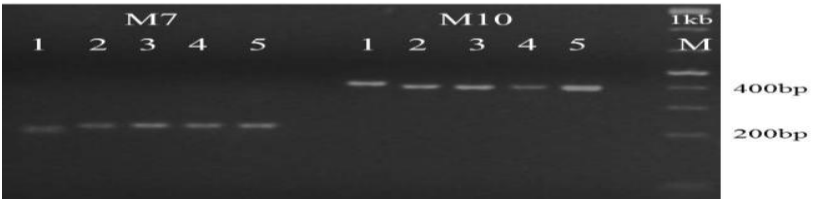


Hình 3.5. Kết quả điện di sản phẩm PCR bằng chỉ thị E30, E10 và G22 phân biệt sâm Ngọc Linh với một số loài sâm khác

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 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 (< 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

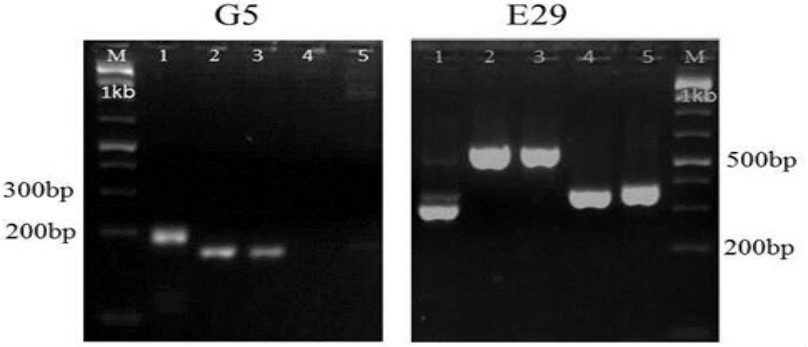
băng ADN mẫu sâm Vũ Diệp và tam thất hoang tương đồng, khoảng 175bp. Kết quả điện di sản phẩm PCR với chỉ thị M7 và M10 cho thấy, cả 2 chỉ thị đặc hiệu riêng cho sâm Hàn Quốc và chưa thể phân biệt được sâm Ngọc Linh với các loài sâm còn lại (Hình 3.6).



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	-	-	-
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	-	-	-

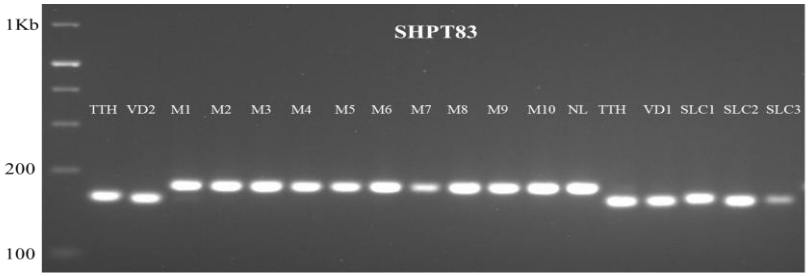
20	G58	230	B	B	-	-	-
21	G59	244	C	B	B	-	A
22	G60	176	A	A	-	-	-
23	G61	225	A	A	-	-	-
24	G62	238	C	B	B	A	A
25	G63	228	A	B	B	-	-
26	G64	289	-	A	-	-	-
27	G65	250	A	A	-	-	-
28	G66	235	-	A	-	-	-
29	G67	230	A	A	-	-	-
30	G68	220	B	A	A	C	C
31	G69	243	AC	A	A	B	B
32	G70	227	A	A	-	-	-
33	E1	288	A	A	-	-	-
34	E3	240	A	A	-	-	-
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	-	-	-
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	-	-
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	-	-
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

Ghi chú: 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).

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

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

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

Phân tích kết quả thống kê số mẫu bị nhiễm sau 4 tuần nuôi tại ở bảng 3.5 cho thấy: 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 đối đối với các công thức còn lại. Đối với nuôi cấy mô chồi mầm tại bảng 3.6 cho thấy: tỷ lệ nhiễm giảm dần, đạt cực tiểu khi thời gian xử lý mẫu bằng ethanol 70% là 5 phút, CT4 cho kết quả số mẫu nhiễm ít nhất là 5,0%, sai khác có ý nghĩa thông kê ở mức 0.05 đối với các công thức còn lại.

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

Đối với mẫu từ mô thân kết quả tại bảng 3.7 chỉ ra rằng: Công thức vô trùng mẫu CT5 cho kết quả số mẫu nhiễm ít nhất là 4,0%, sai

khác có ý nghĩa đối thống kê ở mức 0.05 đối với các công thức còn lại. Kết quả tại bảng 3.8 cho thấy: Công thức vô trùng mẫu lá CT5 cho kết quả số mẫu nhiễm ít nhất là 11,4 % (CT5), sai khác có ý nghĩa ở mức 0.05 đối với các công thức còn lại.

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]
LSD0,05	-	-	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

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]
LSD0,05	-	-	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

3.3.1.2. Kết quả nghiên cứu cảm ứng tạo mô sẹo

Kết quả trong nghiên cứu này tại bảng 3.9 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% (MT3), sai khác có ý nghĩa thống kê ở mức 0.05 đối với các công thức còn lại. Trong khi đó tỷ lệ tạo thành mô sẹo từ chồi mầm đạt cao nhất là 90% (MT2) sai khác có ý nghĩa thống kê ở mức 0.05 đối với các công thức còn lại. Điều này cho thấy tế bào ở các mô càng trẻ hóa thì càng dễ cảm ứng tạo thành mô sẹo.

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]	
LSD0,05	-	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

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

Kết quả ở bảng 3.10 cho thấy; tỷ lệ phôi vô tính được tạo thành lại khác biệt giữa các môi trường nuôi cấy. Đối với môi trường nuôi cấy chỉ bổ sung 1 mg/L 2,4-D và 1,0 mg/L NAA thì lệ phôi vô tính được tạo thành đạt 35,0% và số lượng phôi trung bình trên một mẫu cấy đạt 12,2 phôi/mẫu (CT3). Trong khi đó, ở môi trường có bổ sung TDZ 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 (CT12) có tỷ lệ phát sinh phôi cao nhất, đạt 89,0% và số lượng phôi trung bình trên một mẫu cấy đạt 20,1 phôi/mẫu sai khác có ý nghĩa thống kê ở mức 0.05 đối với các công thức còn lại.

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/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

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

Kết quả tại bảng 3.11 cho thấy: 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. 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, 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 70,6% sai khác có ý nghĩa thống kê ở mức 0.05 ở hầu hết các môi trường (MT) còn lại loại trừ MT5 (MS + 5,0 mg/L GA_3).

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

MT	**Môi trường**	**Tỷ lệ phôi nảy mầm thành cây con *in vitro* sau 6 tuần nuôi cấy (%)**	**Đặc điểm của cây con *invitro***
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
LSD0,05		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

3.3.3. Kết quả nghiên cứu kỹ thuật nhân và nuôi dưỡng củ cây 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. 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. 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.

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

Kết quả tại bảng 3.12 cho thấy, môi trường SH thể hiện ưu thế vượt trội về số lượng rễ tạo thành so với môi trường MS. Trung bình số lượng rễ của một cây cao nhất trên môi trường SH là 4,0 rễ, còn ở môi trường MS cao nhất chỉ đạt 1,6 rễ là do 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. 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.

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

Tại bảng 3.13. cho thấy: Ở nồng độ than hoạt tính thích hợp là 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 đạt số rễ nhiều nhất (4,5 rễ) sai khác có ý nghĩa thống kê ở mức 0.05 đối với các công thức còn lại.

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

Kết quả tại bảng 3.14 cho thấy; môi trường MT2 cho số lượng rễ cây nhiều nhất, trung bình đạt 5,1 rễ/cây, sai khác có ý nghĩa thống kê ở mức 0.05 đối với các công thức còn lại. 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 6,8 cm sai khác có ý nghĩa thống kê ở mức 0.05 đối với MT3.

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	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	0,37	-
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

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

Kết quả nghiên cứu tại bảng 3.15 cho thấy. Cây con *in vitro* có tỉ lệ sống sót cao nhất ở công thức CT3, đạt 86,67%, sai khác có ý nghĩa thống kê ở mức 0.05 đối với các công thức còn lại. Chiều cao trung bình sau theo dõi (60 ngày) dao động từ 5,4 - 5,8 cm. 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 CT1 và CT4.

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
LSD0,05	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

Kết quả nghiên cứu tại bảng 3.16 cho thấy: CT3 (cây 2 năm tuổi) cây con có khả năng sống sót cao nhất đạt 71,73% và sai khác có ý nghĩa thống kê ở mức 0.05 đối với CT1 (cây 1 năm tuổi). CT3 có sự tăng trưởng chiều cao trung bình cao nhất đạt 0,6 cm, sai khác có ý nghĩa thống kê đối với CT1 và CT2.

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
LSD0,05	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 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 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

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

Bảng 3.17. Ảnh hưởng của biện pháp xử lý quả/hạt giống sâm Ngọc Linh trước khi gieo

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	$56,67^{ab}$	$43,33^{a}$	$38,22^{a}$
CT 2	105	$53,33^{a}$	$51,11^{a}$	$46,21^{a}$
CT 3	102	$65,56^{bc}$	$63,33^{b}$	$62,08^{b}$
CT 4	97	$72,22^{cde}$	$70,00^{bc}$	$66,96^{bc}$
CT 5	95	$75,56^{de}$	$73,33^{bc}$	$71,43^{bc}$
CT 6	93	$81,11^{e}$	$77,78^{c}$	$76,20^{c}$
CT 7	95	$71,11^{cd}$	$67,78^{bc}$	$64,80^{bc}$
$LSD_{0,05}$	-	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 nghiên cứu xử lý quả/hạt giống sâm Ngọc Linh trước khi gieo tại bảng 3.17 cho thấy: thời gian từ gieo hạt đến mọc mầm

ngắn nhất là CT6 là 93 ngày.Tỷ lệ mọc mầm cao nhất là CT6 đạt 81,11%, khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 0.05 đối với công thức CT1, CT2, CT3 và CT7. Tỷ lệ hình thành cây con cao nhất là CT6 đạt 77,78%, khác biệt có ý nghĩa thống kê đối với CT1, CT2 và CT3. Tỷ lệ cây xuất vườn ở CT6 duy trì ở mức 76,20%, sai khác có ý nghĩa thống kê đối với CT1, CT2 và CT3. 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).

3.4.2. 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

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 giống (ngày/tháng)	Thời gian bảo quản (ngày)	Thời gian 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

Kết quả nghiên cứu bảo quản hạt tại bảng 3.18 cho thấy: 2 công thức (CT1 và CT2) hạt giống sau 60 ngày ngủ nghỉ ngoài môi trường đất đã nảy mầm. 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%. 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.

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

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

Kết quả nghiên cứu giá thể gieo hạt (hạt nứt nanh) tại bảng 3.19 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, 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.

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; 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 chính trồng 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

Kết quả nghiên cứu tại bảng 3.21 cho thấy, chiều cao cây năm thứ 3, đường kính thân năm thứ 3 sau trồng không có sự khác biệt. Đường kính tán năm thứ 3, CT3 có đường kính tán lớn nhất (đạt 31,76 cm), sai khác có ý nghĩa thống kê ở mức 0.05 đối với CT1 và CT2. Khoảng cách thưa (25 x 30 cm) cây có điều kiện phát triển đường kính tán mạnh. Đối chứng (CT1), khoảng cách hẹp (20 x 20 cm) 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 năm thứ 3

CT	(H) (cm)	D thân (mm)	D tán (cm)
CT1(đ/c)	27,13[a]	2,56[a]	24,02[a]
CT2	28,15[a]	2,65[a]	27,71[b]
CT3	30,45[b]	2,74[a]	31,76[c]
CT4	28,59[a]	2,54[a]	28,02[b]
$LSD_{0,05}$	1,91	0,22	2,83
CV (%)	3,4	4,3	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

Tại bảng 3.22 cho thấy: chiều dài củ sâm Ngọc Linh năm thứ 3, CT4 có chiều dài củ đạt cao nhất là 3,89 cm, sai khác có ý nghĩa ở mức 0.05 đối với các công thức còn lại. Đường kính củ năm thứ 3, CT3 có đường kính củ lớn nhất đạt 2,60 cm, sai khác có ý nghĩa thống kê ở mức 0.05 đối với CT1 (Đ/C). Năm thứ 3 năng suất cá thể đạt cao nhất là CT3 (đạt 22,74 g/cây), sai khác có ý nghĩa thống kê ở mức 0.05 so với công thức đối chứng (CT1) và CT2. 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 của một số tác giả trong nước.

Bảng 3.22. Ảnh hưởng của khoảng cách trồng đến chiều dài củ, đường kính củ và năng suất cá thể năm thứ 3

CT	CDC (cm)	D củ (mm)	Năng suất cá thể (g/cây)
CT1 đ/c)	3,47[a]	2,11[a]	14,10[a]
CT2	3,66[b]	2,46[b]	20,82[b]
CT3	3,70[b]	2,60[b]	22,74[c]
CT4	3,89[c]	2,51[b]	21,09[bc]
$LSD_{0,05}$	0,22	0,15	1,80
CV (%)	3,2	3,1	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*

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

Kết quả tại bảng 3.23 cho thấy: giá trị pHkcl trước và sau thí nghiệm của các công thức phân bón có biến động 4,12-4,21 nhỏ ở mức chua; hàm lượng mùn sau thí nghiệm của các công thức ít thay đổi với hàm lượng mùn rất giàu (> 19%), cao gấp 2,4 lần so với yêu cầu đất mùn trồng sâm Mỹ; 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%). Hàm lượng P_2O_5 tổng số trong đất sau thí nghiệm biến động rất nhỏ giữa các công thức và đều ở mức rất giàu; hàm lượng P_2O_5 dễ tiêu giữa các công thức phân bón ở mức rất nghèo. Hầu hết các công thức phân bón sau thí nghiệm hàm lượng K_2O tổng số ở mức từ nghèo đến trung bình; hàm lượng K_2O dễ tiêu rất giàu (trung

bình > 36 mg/100 g). Canxi trao đổi cao (> 6 ldl/100 g). Mg^{2+} trao đổi cũng rất cao (>1,6 ldl/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 (ldl/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

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

Bảng 3.24. Ảnh hưởng của liều lượng phân bón hữu cơ vi sinh đến chiều cao, đường kính thân và đường kính tán năm thứ 3

CT	H (cm)	D thân (mm)	D tán (cm)
CT1	$31,17^{b}$	$3,01^{b}$	$30,15^{ab}$
CT2	$32,02^{b}$	$2,96^{b}$	$29,33^{a}$
CT3	$29,78^{a}$	$3,02^{b}$	$29,95^{ab}$
CT4	$38,69^{d}$	$2,92^{b}$	$32,21^{c}$
CT5	$36,78^{c}$	$2,71^{a}$	$31,22^{bc}$
$LSD_{0,05}$	1,38	0,21	1,60
CV(%)	2,2	3,8	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

Qua bảng 3.24 cho thấy: chiều cao cây năm thứ 3, CT4 cho kết quả 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. Đường kính thân năm thứ 3,CT3 cho kết quả cao nhất là 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 3, Công thức cho kết quả cao nhất là CT4 (32,21cm), sai khác có ý nghĩa ở mức 0.05 đối với CT1 (30,15 cm), CT2 (29,33 cm) và CT3 (29,95 cm).

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

Tại bảng 3.25 nhận thấy: Chiều dài củ năm thứ 3, CT5 cho kết quả cao nhất đạt 4,48 cm và sai khác có ý nghĩa ở mức 0.05 đối với CT1, CT2 và CT3. Đường kinh củ năm thứ 3, 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, CT2 và CT3. Năng suất cá thể năm thứ 3, 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.

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 năm thứ 3

CT	CDC (cm)	D củ (mm)	Năng suất cá thể (g/cây)
CT1	$3,36^{ab}$	$2,20^{a}$	$26,43^{a}$
CT2	$3,62^{b}$	$2,48^{b}$	$30,86^{b}$
CT3	$3,13^{a}$	$2,62^{bc}$	$26,62^{a}$
CT4	$4,19^{c}$	$2,85^{d}$	$31,18^{b}$
CT5	$4,48^{c}$	$2,77^{cd}$	$32,05^{b}$
LSD0,05	0,42	0,22	2,01
CV(%)	6,0	4,5	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

KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

4.1. Kết luận

1. Diện tích trồng sâm 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

2. 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. 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. 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. Mật độ, khoảng cách trồng 25 x 30 cm (ứng với mật độ 130.000 cây/ha); liều lượng phân hữu cơ vi 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

4.2. Đề nghị

Tiếp tục trồng thử nghiệm, tối ưu hóa chế độ dinh dưỡng cây nuôi cây mô trong điều kiện 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.

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.