

# Kết quả khảo sát một số phương pháp kiểm tra đa bội trên sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.)

Phạm Văn Hiếu\*, Nguyễn Thị Kiều Linh,

Trần Thanh Vy và Nguyễn Xuân Dũng

Trung tâm Công nghệ Sinh học Thành phố Hồ Chí Minh

## TÓM TẮT

Sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) là cây dược liệu quý và đặc hữu của Việt Nam. Việc nghiên cứu tạo giống sâm Ngọc Linh đa bội với hàm lượng dược chất và khả năng sinh trưởng gia tăng có ý nghĩa rất quan trọng đối với sản xuất. Tuy nhiên, việc kiểm tra đa bội ở sâm Ngọc Linh hiện vẫn chưa được thống nhất về mặt phương pháp. Nghiên cứu này tiến hành thử nghiệm và đánh giá một số phương pháp kiểm tra đa bội để phục vụ cho việc sàng lọc cây sâm Ngọc Linh đa bội. Mẫu sâm Ngọc Linh (lá, rễ, thân rễ và phiôi) sau khi xử lý đa bội được sử dụng cho kiểm tra thông qua phân tích (1) số lượng lục lạp, kích thước và mật độ khí khổng, (2) số lượng nhiễm sắc thể (NST) tế bào đầu rễ và (3) hàm lượng ADN tế bào. Kết quả cho thấy tất cả các phương pháp phân tích đều có thể xác định được mẫu sâm Ngọc Linh đa bội. Số lượng lục lạp trong tế bào và kích thước khí khổng tăng trong khi mật độ khí khổng giảm ở mẫu tứ bội so với lưỡng bội. Số lượng nhiễm sắc thể đầu rễ ở mẫu tứ bội (48 NST) tăng 2 lần so với mẫu lưỡng bội (24 NST). Sự gia tăng hàm lượng ADN của mẫu tứ bội ( $9.41 \pm 0.05$  pg) so với lưỡng bội ( $4.73 \pm 0.04$  pg) đạt tỷ lệ tương ứng với mức độ đa bội.

**Từ khóa:** sâm Ngọc Linh, đa bội, dòng chảy tế bào, khí khổng, nhiễm sắc thể, lục lạp

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) là cây dược liệu quý, có chứa khoảng 52 hợp chất saponin [1], trong đó thành phần M-R2 (thuộc nhóm ocotillol saponin) chiếm tới 50% tổng hàm lượng saponin [2]. Sâm Ngọc Linh đã được sử dụng trong y học cổ truyền từ rất lâu và hiện đang nhận được sự quan tâm lớn của cả nhà khoa học và cơ quan quản lý. Tuy nhiên, do đặc điểm sinh trưởng chậm, sản lượng sâm Ngọc Linh thu nhận được vẫn còn rất hạn chế. Vì vậy, việc nghiên cứu tạo ra giống sâm Ngọc Linh có những đặc điểm được cải thiện về dược chất và sinh trưởng là vấn đề cấp thiết.

Quá trình đa bội hóa đã và đang diễn ra phổ biến trên thực vật theo con đường tự nhiên và nhân tạo [3]. Các dòng đa bội, có nhiều hơn hai bộ nhiễm sắc thể trong tế bào, xuất hiện phổ biến ở nhiều loài thực vật [4-6], mang lại nhiều lợi ích như cơ hội tiến hóa, khả năng thích nghi và những

tính trạng ưu việt [5, 7, 8]. Kết quả nghiên cứu đa bội hóa trên sâm *Panax ginseng* C.A. Meyer đã cho thấy có sự gia tăng sinh khối và tích lũy ginsenoside ở rễ bất định [9, 10]. Trên đối tượng sâm Ngọc Linh, Diem et al., (2022) cũng đã thực hiện nghiên cứu đa bội và thu được cây sâm Ngọc Linh đa bội với sự thay đổi về kiểu hình. Trong đó, việc xác định đa bội được thực hiện chủ yếu thông qua đếm nhiễm sắc thể đầu rễ và quan sát sự thay đổi khí khổng [11].

Thông thường, mức độ đa bội có thể được xác định gián tiếp qua các thay đổi (kích thước, số lượng lục lạp, mật độ) ở khí khổng [12-14] hay trực tiếp qua số lượng nhiễm sắc thể trong tế bào đầu rễ [15]. Ngoài ra, mức độ đa bội còn có thể được xác định qua việc đo hàm lượng ADN bằng phương pháp dòng chảy tế bào [16]. Tùy thuộc vào điều kiện, đối tượng và mục đích nghiên cứu, nhà nghiên cứu sẽ thử nghiệm và sử dụng

Tác giả liên hệ: Phạm Văn Hiếu

Email: [pvhieu.snn@tphcm.gov.vn](mailto:pvhieu.snn@tphcm.gov.vn)

phương pháp kiểm tra phù hợp cho việc xác định mức độ đa bội. Nghiên cứu này tiến hành khảo sát và đánh giá các phương pháp xác định đa bội dựa trên sự thay đổi về khí khổng, số lượng nhiễm sắc thể và hàm lượng DNA nhằm chọn lọc phương pháp phù hợp cho việc xác định mức độ đa bội phục vụ cho nghiên cứu đa bội hoá Sâm Ngọc Linh.

## 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu

Cây sâm Ngọc Linh *in vitro* (có lá, thân, rễ) và phôi (lưỡng bội và đa bội) được sử dụng làm mẫu cho xác định đa bội. Lá thu nhận từ cây *in vitro* (2 tuần tuổi, nảy mầm từ hạt) của đậu nành (*Glycine max* (L.) Merr.) và đậu Hà Lan (*Pisum sativum* L.) được sử dụng làm mẫu đối chứng do có hàm lượng ADN đã được xác định với giá trị tương ứng là 2.5 pg [17] và 9.56 pg [18].

Mẫu phôi sâm Ngọc Linh (đã xử lý đa bội bằng colchichin ở các nồng độ 0.025% - 0.4%, trong 48 giờ và nuôi cấy 8 tuần) được sử dụng cho kiểm tra đa bội bằng phương pháp dòng chảy tế bào.

### 2.2. Phương pháp

#### 2.2.1. Xác định số lượng lục lạp, kích thước và mật độ khí khổng

Số lượng lục lạp, kích thước và mật độ khí khổng được xác định theo Ordoñez *et al.* (2017) [15]. Mẫu lá được cắt từ cây sâm Ngọc Linh *in vitro* (lưỡng bội và đa bội) và đặt trên đĩa Petri có lót giấy ẩm. Sử dụng nhíp nhọn, tách biểu bì ở gần gân lá đặt lên lam kính có chứa 1 giọt thuốc nhuộm Lugol, đặt lamên lên trên mẫu và quan sát dưới kính hiển vi quang học tích hợp máy ảnh (Carl Zeiss Primo tích hợp Carl Zeiss Microscopy GmbH -Axicam 105, Đức) ở độ phóng đại 100 và 1000 lần. Số lượng lục lạp và kích thước khí khổng được xác định trên 20 khí khổng trong ba lần lặp lại. Mật độ khí khổng được xác định trong vi trường (FOV) với độ phóng đại 200 lần trên 10 vi trường trong ba lần lặp lại. Mẫu sâm Ngọc Linh được xác định đa bội khi có số lượng lục lạp, kích thước khí khổng tăng và mật độ khí khổng giảm so mẫu lưỡng bội.

#### 2.2.2. Xác định số lượng nhiễm sắc thể tế bào đầu rễ

Đầu rễ (2 cm) từ cây sâm Ngọc Linh *in vitro* được

cô lập và ngâm trong dung dịch 8-Hydroxyquinol 0.002 M ở 4°C trong thời gian 3 - 5 giờ trước khi rửa với nước (3 lần). Sau đó, mẫu được ngâm trong dung dịch Carnoy (3 methanol: 1 acid acetic) trong vòng 24 trước khi loại bỏ Carnoy bằng cách rửa với nước (3 lần). Cuối cùng, mẫu được thủy phân trong dung dịch HCl 1.0 N trong 10 phút ở 60°C, rửa lại với nước (3 lần) và ngâm trong dung dịch cồn 70% để sử dụng cho đếm nhiễm sắc thể [15]. Để chuẩn bị tiêu bản và đếm nhiễm sắc thể, đầu rễ (1-2 mm) được nhuộm với acetocarmine 2% (1 giọt) trên lam kính trong 10 phút trước khi bổ sung thêm acetic acid 45% (1 giọt) và đặt lamên lên. Sau đó, đặt giấy Whatman lên trên lamên, dùng ngón tay cái ép mạnh lên giấy để làm dẹt tế bào và loại bỏ thuốc nhuộm thừa. Quan sát và đếm nhiễm sắc thể trên kính hiển vi quang học tích hợp máy ảnh (Carl Zeiss Primo tích hợp Carl Zeiss Microscopy GmbH - Axicam 105, Đức) dưới vật kính 100X.

#### 2.2.3. Xác định hàm lượng ADN tế bào

Mẫu lá, rễ, thân rễ và phôi *in vitro* của sâm Ngọc Linh, lá đậu nành và lá đậu Hà Lan được cô lập và lưu trữ ở 4°C trong 12 giờ trước khi tiến hành phân tích. Sau đó, cắt mẫu lá (0.5 cm<sup>2</sup>) cho vào đĩa Petri có chứa 500 µL dung dịch Nuclei Extraction Buffer và cắt mẫu trong 15 - 30 giây để làm vỡ tế bào. Hỗn hợp sau khi cắt được lọc qua phin lọc 50 µL (CellTric®filter) vào ống ống 5 mL để loại bỏ mảnh vỡ tế bào. Cho thêm 2 mL dung dịch PI vào tube chứa dịch lọc và đặt ống vào đá lạnh trong 5 phút trước khi sử dụng cho phân tích bằng máy đo dòng chảy tế bào (BD FACS, Mỹ). Mẫu lá đậu nành và đậu Hà Lan được sử dụng làm đối chứng để hiệu chuẩn máy. Hàm lượng DNA được xác định dựa theo công thức trong nghiên cứu của Sharma *et al.*, (2007) [19].

$$\text{Hàm lượng AND (pg)} = (F/F_0) * N_0$$

Trong đó:

F: Giá trị huỳnh quang của mẫu khảo sát

F<sub>0</sub>: Giá trị huỳnh quang của mẫu đối chứng

N<sub>0</sub>: Hàm lượng ADN của mẫu đối chứng

Mức bội thể được xác định dựa trên hàm lượng ADN, trong đó thể tứ bội có hàm lượng ADN gấp đôi thể lưỡng bội, thể khảm khi hàm lượng ADN được thể hiện ở hai giá trị lưỡng bội và tứ bội.

Bên cạnh mẫu lá, rễ, thân rễ và phôi (đã biết trước đa bội), việc xác định hàm lượng DNA cũng được thực hiện trên 30 mẫu phôi sâm Ngọc Linh đã được xử lý đa bội bằng colchicin (chưa biết mức bội thể, được mô tả phần vật liệu).

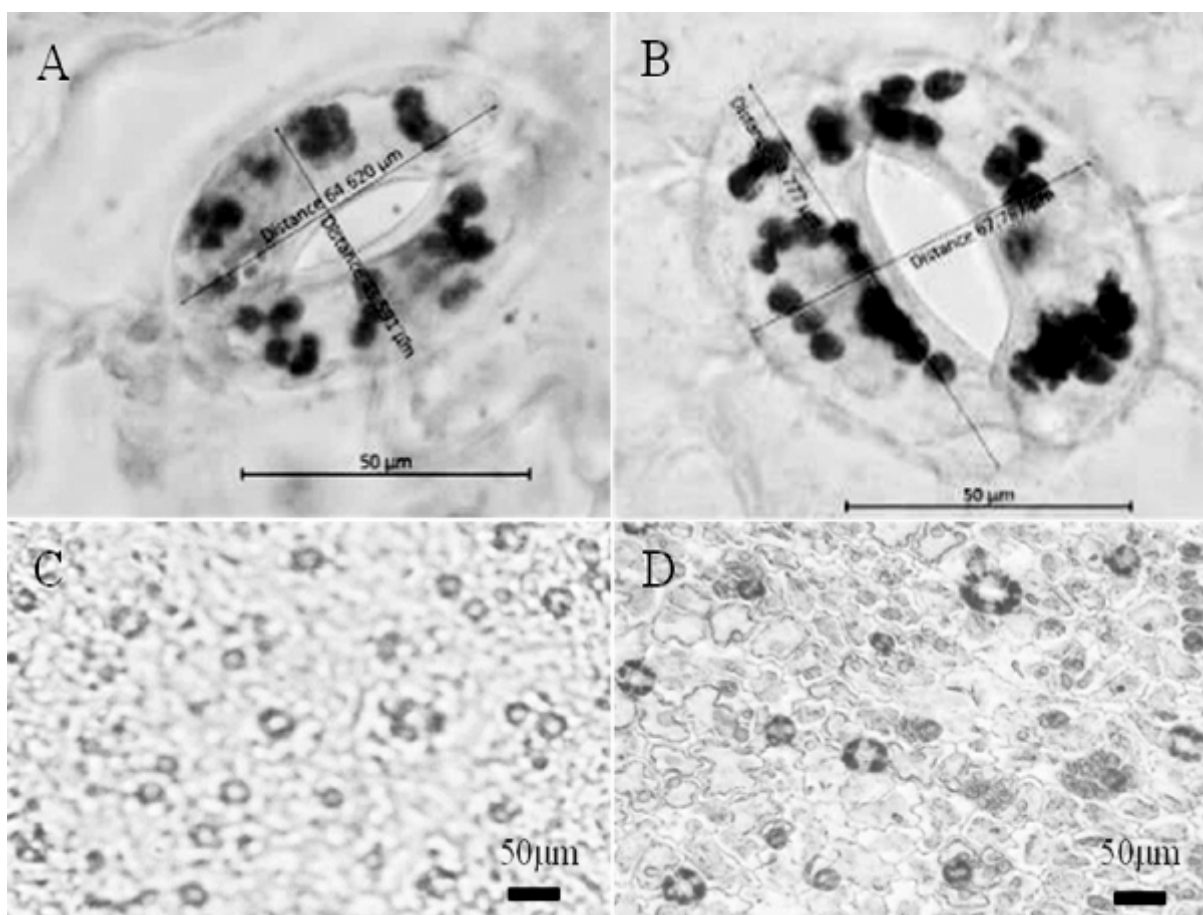
Tất cả dữ liệu được phân tích ANOVA một chiều và phân hạng Turkey's test ( $p < 0.05$ ) bằng phần mềm GraphPad Prism 5.0.

### 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Xác định số lượng lục lạp, kích thước và mật độ khí khổng

Kết quả quan sát cho thấy có sự thay đổi rõ rệt về số lục lạp trong tế bào khí khổng, kích thước và mật độ khí khổng giữa mẫu sâm Ngọc Linh tứ bội và lưỡng bội (Hình 1). Trong đó, mẫu tứ bội có số lượng lục lạp và kích thước khí khổng tăng trong khi mật độ khí khổng giảm so với mẫu lưỡng bội (Bảng 1). Phù hợp với kết quả này, kết quả nghiên cứu trên khoai tây (*Solanum tuberosum*

L.) [20] và hạ khô thảo (*Prunella vulgaris for. albiflora* Nakai) [21] cũng cho thấy có sự thay đổi rõ ràng số lục lạp tế bào khí khổng giữa cây lưỡng bội và tứ bội. Ngoài ra, nghiên cứu Khrolenko et al., 2012 đã xác định số lục lạp 35-52 trong tế bào [22]. Xác định mức độ bội thể dựa vào số lượng lục lạp trong tế bào khí khổng đã trở thành phương pháp được sử dụng phổ biến ở khoai tây [20, 23] và bắt đầu triển khai trên nhân sâm (*Panax ginseng*) [22]. Nghiên cứu của Diem et al. (2002) trên sâm Ngọc Linh cũng ghi nhận có sự tăng số lượng lục lạp, kích thước tế bào và giảm mật độ khí khổng của mẫu tứ bội so với lưỡng bội. Những kết quả này cho thấy có thể sử dụng phương pháp kiểm tra sự thay đổi về khí khổng để xác định mức độ bội thể của sâm Ngọc Linh, tuy nhiên cần cân nhắc khi áp dụng vì những hạn chế về mẫu lá (cây *in vitro* tăng trưởng chậm nên có lá ít và nhỏ) sử dụng cho phân tích khí khổng.



**Hình 1.** Sự thay đổi số lượng lục lạp, kích thước và mật độ khí khổng giữa sâm Ngọc Linh lưỡng bội (A, C) và tứ bội (B, D)

**Bảng 1.** Số lượng lục lạp, kích thước và mật độ khí khổng của sâm Ngọc Linh lưỡng bội và tứ bội

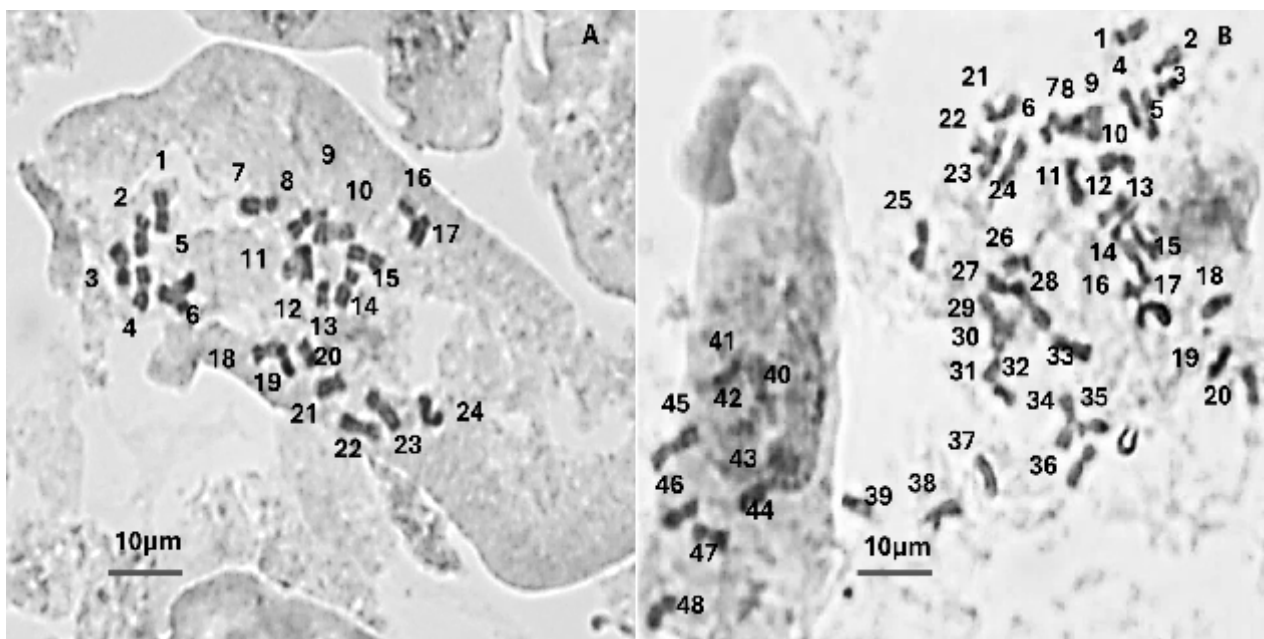
Mức đa bội	Số lượng lục lạp	Chiều dài khí khổng ( $\mu\text{m}$ )	Chiều rộng khí khổng ( $\mu\text{m}$ )	Mật độ khí khổng/ FOV
Lưỡng bội	19.06 $\pm$ 0.17	56.56 $\pm$ 0.29	49.49 $\pm$ 0.46	189.4 $\pm$ 1.1
Tứ bội	32.52 $\pm$ 0.28***	83.01 $\pm$ 0.44***	65.27 $\pm$ 0.07***	121.4 $\pm$ 0.4***

Số liệu có \*\*\* kèm theo biểu hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức  $p < 0.05$

### 3.2. Xác định số lượng nhiễm sắc thể tế bào đầu rễ

Kết quả chuẩn bị tiêu bản và quan sát đã ghi nhận được hình ảnh nhiễm sắc thể tương đối rõ ràng, thể hiện được sự khác biệt ở hai trường hợp mẫu lưỡng bội và tứ bội (Hình 2). Trong đó, mẫu tứ bội có 48 nhiễm sắc thể, gấp hai lần số nhiễm sắc thể (24) của mẫu lưỡng bội. Số lượng nhiễm sắc thể của sâm Ngọc Linh lưỡng bội và tứ bội xác định được trong trường hợp này cũng phù hợp với kết quả được công bố bởi Diem *et al.* (2022) [11] và Shi *et al.*, 2015 [24]. Mặc dù được

xem là phương pháp chính xác nhất để kiểm tra trực tiếp mức độ đa bội, tuy nhiên việc xác định số lượng nhiễm sắc thể của tế bào đầu rễ thường bị giới hạn về thời gian và lượng mẫu rễ cần cho phân tích đối với các loại cây tăng trưởng chậm và khó tạo rễ như sâm Ngọc Linh. Ngoài ra, việc đếm nhiễm sắc thể tế bào đầu rễ cũng sẽ không khả thi khi cần sàng lọc nhanh mức độ đa bội trên một lượng lớn các loại mô, cơ quan khác mô rễ. Do đó, việc thử nghiệm thêm phương pháp thay thế trong những trường hợp này là điều có ý nghĩa quan trọng và thật sự cần thiết.



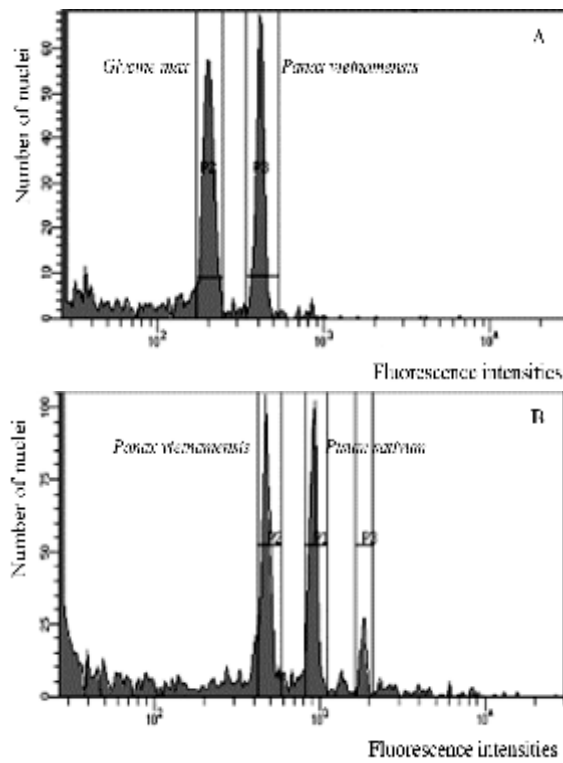
**Hình 2.** Nhiễm sắc thể sâm Ngọc Linh

A. Sâm Ngọc Linh lưỡng bội ( $2n = 24$ ), B. Sâm Ngọc Linh tứ bội ( $4n = 48$ )

### 3.3. Xác định hàm lượng ADN tế bào

Biểu đồ tương quan hàm lượng ADN và cường độ huỳnh quang thu được khi phân tích mẫu sâm Ngọc Linh lưỡng bội cho thấy các mẫu đối chứng đậu nành, đậu Hà Lan, và mẫu sâm Ngọc Linh có cường độ huỳnh quang rõ ràng tập trung tại một vị trí, tín hiệu nhiễu rất thấp. Trong đó, giá trị huỳnh quang của mẫu sâm Ngọc Linh đạt mức 450 (so với đối

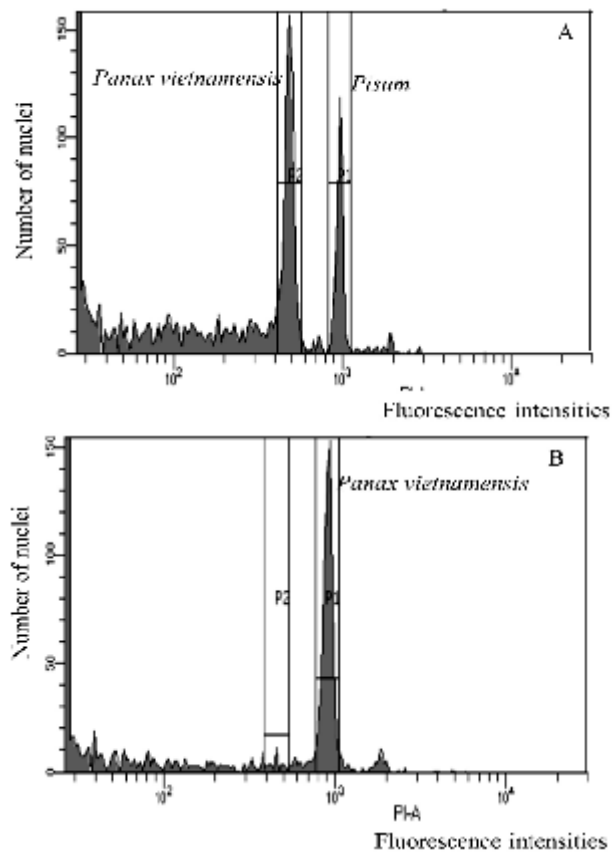
chứng đậu nành - 230) và 480 (so với đối chứng đậu Hà Lan-950) (Hình 3). Kết quả tính toán dựa trên giá trị huỳnh quang thu được cho thấy hàm lượng ADN của mẫu sâm Ngọc Linh lưỡng bội gần như không thay đổi giữa hai trường hợp sử dụng đối chứng khác nhau. Cụ thể, hàm lượng ADN đạt mức  $4.87 \pm 0.25$  pg và  $4.85 \pm 0.11$  pg tương ứng cho hai trường hợp sử dụng đối chứng đậu nành và đậu Hà Lan.



**Hình 3.** Tương quan hàm lượng ADN và cường độ huỳnh quang của mẫu sâm Ngọc Linh lưỡng bội và mẫu đối chứng. A. Đối chứng đậu nành (*Glycine max*), B. Đối chứng đậu Hà Lan (*Pisum sativum*)

Kết quả phân tích trên mẫu sâm Ngọc Linh tứ bội (sử dụng đối chứng đậu Hà Lan) thu được hàm lượng ADN đạt mức

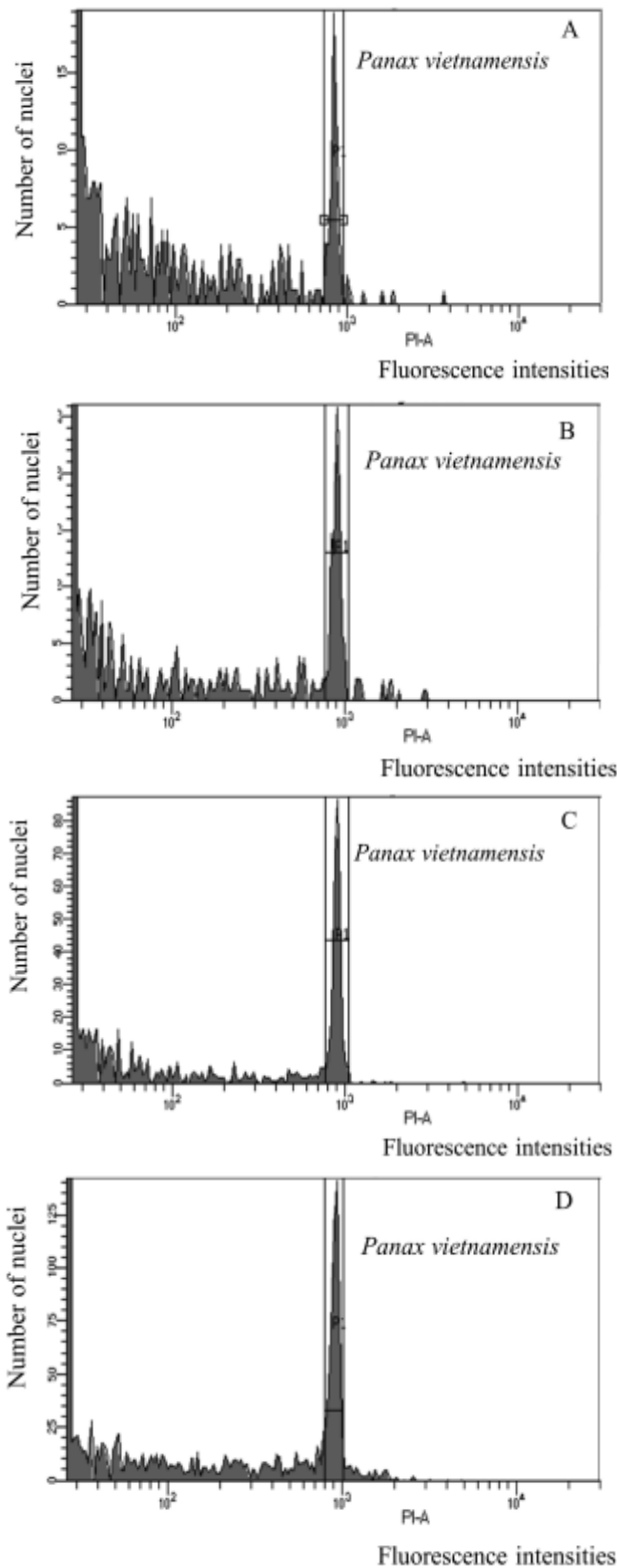
$9.41 \pm 0.05$  pg, gấp đôi hàm lượng ADN (đạt mức  $4.73 \pm 0.04$  pg) của mẫu sâm Ngọc Linh lưỡng bội (Hình 4-A, B).



**Hình 4.** Tương quan hàm lượng ADN và cường độ huỳnh quang của Sâm Ngọc Linh A.Sâm lưỡng bội và đậu Hà Lan, B. Sâm tứ bội

Việc phân tích trên các nguồn mẫu khác nhau (phôi, thân rễ, rễ và lá) đều thu được kết quả tương tự nhau (Hình 5-A, B, C, D). Điều này cho thấy

phương pháp dòng chảy tế bào có thể giúp xác định mức độ bội thể trên nhiều loại mô khác nhau của Sâm Ngọc Linh.



**Hình 5.** Tương quan hàm lượng ADN và cường độ huỳnh quang của các loại mẫu sâm Ngọc Linh khác nhau. A. Phôi, B. Thân rễ, C. Rễ, D. Lá

Kết quả áp dụng phương pháp đo dòng chảy tế bào trên các mẫu sâm Ngọc Linh được xử lý đa bội với colchicine đã xác định được 12 mẫu tứ bội (hàm lượng ADN dao động từ  $9.45 \pm 0.09$  pg đến  $9.98 \pm 0.12$  pg) trong tổng số 30 mẫu được kiểm tra (Bảng 2).

**Bảng 2.** Hàm lượng DNA (pg) trên mẫu lá sâm Ngọc Linh tái sinh sau khi xử lý colchicine

TT	Mẫu	Hàm lượng DNA (pg)	Mức đa bội	TT	Mẫu	Hàm lượng DNA (pg)	Mức đa bội
1	S0.025-2N-1	$9.73 \pm 0.16$	4n	16	S0.1-2N-1	$4.72 \pm 0.03$	4n
2	S0.025-2N-2	$4.67 \pm 0.11$	2n	17	S0.1-2N-2	$4.80 \pm 0.05$	2n
3	S0.025-2N-3	$4.73 \pm 0.08$	2n	18	S0.1-2N-3	$9.56 \pm 0.12$	4n
4	S0.025-2N-4	$4.53 \pm 0.04$	2n	19	S0.1-2N-4	$9.36 \pm 0.02$	4n
5	S0.025-2N-5	$4.68 \pm 0.27$	2n	20	S0.1-2N-5	$9.45 \pm 0.25$	4n
6	S0.05-2N-1	$4.63 \pm 0.09$	2n	21	S0.2-2N-1	$4.91 \pm 0.16$	2n
7	S0.05-2N-2	$9.64 \pm 0.07$	4n	22	S0.2-2N-2	$4.64 \pm 0.07$	2n
8	S0.05-2N-3	$4.67 \pm 0.10$	2n	23	S0.2-2N-3	$4.74 \pm 0.04$	2n
9	S0.05-2N-4	$9.45 \pm 0.09$	4n	24	S0.2-2N-4	$9.82 \pm 0.08$	4n
10	S0.05-2N-5	$9.50 \pm 0.19$	4n	25	S0.2-2N-5	$4.90 \pm 0.05$	2n
11	S0.075-2N-1	$4.71 \pm 0.10$	2n	26	S0.4-2N-1	$9.93 \pm 0.17$	4n
12	S0.075-2N-2	$4.73 \pm 0.07$	2n	27	S0.4-2N-2	$9.98 \pm 0.12$	4n
13	S0.075-2N-3	$4.60 \pm 0.14$	2n	28	S0.4-2N-3	$9.91 \pm 0.11$	4n
14	S0.075-2N-4	$4.72 \pm 0.05$	2n	39	S0.4-2N-4	$4.62 \pm 0.08$	2n
15	S0.075-2N-5	$4.84 \pm 0.07$	2n	30	S0.4-2N-5	$4.60 \pm 0.21$	2n

Xác định đa bội thông qua đo dòng chảy tế bào được đánh giá là một phương pháp hiệu quả và đáng tin cậy [16]. Phương pháp này cần lượng mẫu rất ít ( $0.5 \text{ cm}^2$ ), khả thi với nhiều loại mô khác nhau của cây như rễ, thân, lá hay thậm chí là phôi. Trái lại, các phương pháp khác như quan sát khí khổng hay đếm nhiễm sắc thể thường khá phức tạp vì phải có nguồn mẫu phù hợp như lá hoàn chỉnh với số lượng lớn cho quan sát khí khổng hay đầu rễ với tế bào đang ở kỳ giữa phân bào cho đếm nhiễm sắc thể. Mặt dù, phương pháp dòng chảy tế bào khó phân biệt trường hợp dị bội ( $2n + 1$ ,  $2n - 1$ ), trường hợp này

khó xảy ra khi xử lý đa bội trong quá trình nguyên phân. Những yếu tố này cho thấy đo dòng chảy tế bào là phương pháp phù hợp, có thể áp dụng cho việc phân tích mức độ đa bội trên sâm Ngọc Linh.

**4. KẾT LUẬN**

Các phương pháp phân tích đa bội được thử nghiệm trong nghiên cứu này đều có thể xác định được mức độ đa bội ở sâm Ngọc Linh. Trong đó, phương pháp đo dòng chảy tế bào là phương pháp hiệu quả nhất vì có tính linh hoạt về nguồn vật liệu và thời gian nghiên cứu.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] D.T. Nhut, N.P. Huy, H.X. Chien, "In vitro culture of petiole longitudinal thin cell layer explants of Vietnamese ginseng (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) and preliminary analysis of saponin content," *International Journal of Applied Biology*, 3(3), p. 178, 2012.
- [2] H.V. Cương, N.B. Nam, T.C. Luận, B.T. Vinh, D.T. Nhựt, "Nhựt Ảnh hưởng của ánh sáng đơn sắc lên sự sinh trưởng và khả năng tích lũy hoạt chất saponin thông qua nuôi cấy mô sẹo và cây sâm ngọc linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) in vitro," *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*, 50(4), p. 475-490, 2012.
- [3] M. Niazian, A.M. Nalouisi, "Artificial polyploidy induction for improvement of ornamental and medicinal plants," *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 142, p. 447-469, 2020.
- [4] D. E. Soltis, V.A. Albert, J. Leebens-Mack, C.D. Bell, A.H. Paterson, C. Zheng, D. Sankoff, C.W. de Pamphilis, P. Kerr Wall, P. S. Soltis, "Polyploidy and angiosperm diversification," *American Journal of Botany*, 96, p. 336-348, 2009.
- [5] Hieu, P.V., "Polyploid Gene Expression and Regulation in Polysomic Polyploids," *American Journal of Plant Science*, 10(8), p. 1409-1443, 2019.
- [6] Hieu, P.V., "Evolutionary Fixed Potential Agronomic Traits in Polysomic Polyploidy Plants with Special Reference to Potato," *American Journal of Plant Sciences*, 14, p. 793-811, 2023.
- [7] Comai, L., "The advantages and disadvantages of being polyploid," *Nature Reviews Genetic*, 6, p. 836-846, 2005.
- [8] M.C. Sattler, C.R. Carvalho, W.R. Clarindo, "The polyploidy and its key role in plant breeding," *Planta*, 243, p. 281-296, 2016.
- [9] Y.S. Kim, E.J. Hahn, H.N. Murthy, K.Y. Paek, "Effect of polyploidy induction on biomass and ginsenoside accumulations in adventitious roots of ginseng," *Journal of Plant Biology*, 47, p. 356-360, 2004.
- [10] J.H. Lee, Y.J. Kim, D Jung, J.S. Shim, I. H. Kim and D.C. Yang, "In vitro Induction of Tetraploid Roots by Various Pretreatments from Anther of *Panax ginseng* C. A. Meyer," *Journal of Ginseng Research*, 33(1), p. 65-71, 2009.
- [11] L. T. Diem, T. H. Phong, H. T. Tung, H. D. Khai, T. T. L. Anh, N. T. N. Mai, V. Q. Luan, T. Que, H. T. N. Phuong, B. V. T. Vinh, D. T. Nhut, "Tetraploid induction through somatic embryogenesis in *Panax vietnamensis* Ha et Grushv. by colchicine treatment," *Scientia Horticulturae*, 303, p. e111254, 2022.
- [12] B. Ahmadi, H. Ebrahimzadeh, "In vitro androgenesis: spontaneous vs. artificial genome doubling and characterization of regenerants," *Plant Cell Report*, 39, p. 299-316, 2020.
- [13] V. Stanys, A. Weckman, G. Staniene, P. Duchovskis, "In vitro induction of polyploidy in Japanese quince (*Chaenomeles japonica*)," *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 84, p. 263-268, 2006.
- [14] E. Dhooghe, K. Van Laere, T. Eeckhaut, L. Leus, J. Van Huylenbroeck, "Mitotic chromosome doubling of plant tissues in vitro," *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 104, p. 359-373, 2011.
- [15] B. Ordoñez, M. Orrillo and M. Bonierbale, Technical Manual Potato reproductive and cytological biology, 2017.
- [16] J. P. T. Valkonen, K. N. Watanabe, E. Pehu, "Analysis of correlation between nuclear DNA content, chromosome number, and flowering capacity of asymmetric somatic hybrids of diploid *Solanum brevidens* and (di)haploid *S. tuberosum*," *The Japanese Journal of Genetics*, 69, p. 525-536, 1994.



- [17] J. Čížková, E. Hřibová, P. Christelová, M. Häkkinen, N. Roux, R. Swennen and J. Doležel., "Molecular and Cytogenetic Characterization of Wild *Musa* Species," *PLOS ONE*, 10(8), e0134096, 2015.
- [18] J. S. Johnston, M. D. Bennett. A. L. Rayburn, D. W. Galbraith and H. J. Price , "Reference Standards For Determination Of DNA Content Of Plant Nuclei.," *American Journal of Botany* , 86(5), p. 609–613, 199.
- [19] S. K. Sharma, G. J. Bryan, M. O. Winfield, S. Millam, "Stability of potato (*Solanum tuberosum* L.) plants regenerated via somatic embryos, axillary bud proliferated shoots, microtubes and true potato seeds: a comparative phenotypic, cytogenetic and molecular assessment," *Planta*, 226, p. 1449-1458, 2007.
- [20] M. Alsahlany, D. Zarka, J. Coombs, D. S. Douches, "Comparison of Methods to Distinguish Diploid and Tetraploid Potato in Applied Diploid Breeding," *American Journal of Potato Research*, 96, p. 244-254, 2019.
- [21] S. J. Kwon, S. K. Roy, K. Y. Cho, Y. J. Moon, S. H. Woo, H. H. Kim, "Tetraploid induction approach induced by colchicine of *Prunella vulgaris* for. *albiflora* Nakai," *International Journal of Scientific and Research Publications*, 4, p.1-7, 2014.
- [22] Y. Khrolenko, O. Burundukova, E. Burkovskaya, and Y. Zhuravlev, "Mesophyll Structure And Chloroplast Density In *Panax Ginseng* Leaves From The Sikhote-Alin Mts," *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* 54(2), p. 54-60, 2012.
- [23] L. J. Kramer, J. Bamberg, "Comparing Methods of Ploidy Estimation in Potato (*Solanum*) Species," *American Journal of Potato Research*, 96, p. 419-426, 2019.
- [24] F. X. Shi, M. R. Li, Y. L. Li, P. Jiang, C. Zhang, Y. Z. Pan, B. Liu, H. X. Xiao, L. F. Li, "The impacts of polyploidy, geographic and ecological isolations on the diversification of *Panax* (Araliaceae)," *BMC Plant Biology*, 15, p. 297, 2015.

## Surveying results of some polyploid testing methods on Ngoc Linh Ginseng (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.)

Pham Van Hieu, Nguyen Thi Kieu Linh,  
Tran Thanh Vy and Nguyen Xuan Dung

### ABSTRACT

*Ngoc Linh ginseng (Panax vietnamensis Ha et Grushv.) is a precious and endemic medicinal plant in Vietnam. Polyploidization of Ngoc Linh Ginseng aims to increase both medicinal content and growth ability is very important for production. However, the screening of Ngoc Linh ginseng polyploidized has not been unified in terms of methodology. This study tested and evaluated various polyploid testing methods on Ngoc Linh ginseng to serve the screening of Ngoc Linh ginseng polyploidized. The samples of Ngoc Linh Ginseng (leaves, roots, rhizomes and embryos) after polyploid treatment were used for testing through analysis of (1) the number of chloroplasts, stomatal size and density, (2) chromosome number on the root tip and (3) DNA content. The results show that all analytical methods can identify polyploid Ngoc Linh Ginseng samples. The number of chloroplasts and stomatal size increased while stomatal density decreased in tetraploid samples compared to diploid ones. The number of chromosomes on the root tip in tetraploid ginseng (48 chromosomes) increased twice compared to diploid one (24 chromosomes). The DNA content*

*increased proportionally to the levels of ploidy between tetraploid ( $9.41 \pm 0.05$  pg) and diploid samples ( $4.73 \pm 0.04$  pg).*

**Keywords:** *Ngoc Linh ginseng, polyploidization, flow cytometry, stomata, chromosome, chloroplast*

---

Received: 12/02/2024

Revised: 01/03/2024

Accepted for publication: 06/03/2024