



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

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

(11) 
2-0001914

(51)⁷ **A01G 1/00, 17/00, A01H 4/00, A61K
36/00**

(13) **Y**

(21) 2-2018-00278

(22) 18.11.2016

(67) 1-2016-04451

(45) 25.12.2018 369

(43) 25.01.2017 346

(73) **VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC LÂM NGHIỆP (VN)**

Trường Đại học Lâm nghiệp, thị trấn Xuân Mai, huyện Chương Mỹ, thành phố Hà Nội

(72) Nguyễn Văn Việt (VN), Bùi Văn Thắng (VN)

(54) **QUY TRÌNH NHÂN GIỐNG CÂY KHÔI TÍA (ARDISIA SYLVESTRIS PITARD)
BẰNG KỸ THUẬT NUÔI CẤY IN VITRO**

(57) Sáng chế đề cập đến quy trình nhân giống cây Khôi tía (*Ardisia sylvestris* Pitard) bằng kỹ thuật nuôi cấy in vitro, trong đó quy trình này bao gồm các bước xử lý mẫu và nuôi cấy khởi động, nhân nhanh chồi, tạo cây Khôi tía hoàn chỉnh và huấn luyện và ra ngôi. Quy trình theo sáng chế giúp cho việc sản xuất cây giống Khôi tía sinh trưởng nhanh, sạch bệnh và không phụ thuộc thời vụ. Điều này giúp tạo ra số lượng lớn cây giống phục vụ công tác bảo tồn và phát triển nguồn gen cây dược liệu quý.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực công nghệ sinh học, cụ thể là sáng chế đề cập đến quy trình nhân giống cây Khôi tía bằng kỹ thuật nuôi cấy *in vitro*.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Cây Khôi tía (*Ardisia sylvestris* Pitard) còn có các tên gọi khác là Com ngội rừng, Độc lực, Đơn tướng quân và Lá Khôi, thuộc họ Đơn nem (Myrsinaceae) bộ Anh thảo (Primunales), ngành Mộc lan (Magnoliophyta).

Cây Khôi tía là cây bụi nhỏ, thân mọc thẳng đứng, cao khoảng 2m, có thân rồng xộp và ít phân nhánh. Lá mọc cách thường màu tím, tập trung ở đầu thân, phiến lá hình bầu dục hoặc trứng, kích thước 20–40 x 6–12cm, đầu nhọn hoặc tù, mép khía răng cưa nhọn, nhỏ, đều nhau, có lông màu nâu trên các gân, nhiều hơn ở mặt dưới; gân bên 28 – 35 đôi, gân cấp 3 hình mạng nổi rõ ở mặt dưới. Cụm hoa chùm tán ở nách lá, dài 5 – 10m, hoa mẫu 5. Lá đài hình tam giác hoặc thuôn, nhọn, hợp, gắn ở gốc, có điểm tuyến và lông mi. Cánh hoa màu hồng, hình mác, dài 3mm, đầu tù hoặc nhọn và có điểm tuyến. Nhị ngắn hơn cánh hoa, bao phấn hình mác nhọn, chỉ nhị rất ngắn. Bầu trên hình trứng. Quả hạch hình cầu, đường kính 7 – 8mm, màu đỏ, có điểm tuyến, 1 hạt, hình cầu và lõm ở gốc (Sách đỏ Việt Nam, 1996, 2007).

Cây Khôi tía phân bố ở Lào Cai (Sapa), Lạng Sơn (Hữu Lũng), Quảng Ninh, Vĩnh Phúc (Tam Đảo), Hà Tây (Ba Vì), Ninh Bình (Cúc Phương), Thanh Hoá (Lang Chánh, Ngọc Lạc và Thạch Thành), Nghệ An (Quỳ Châu), Quảng Trị, Thừa Thiên - Huế (Phú Lộc), Đà Nẵng và Trung Quốc (Hải Nam và Quảng Tây).

Cây Khôi tía là loài dược thảo quý có tên trong Sách đỏ Việt Nam được công bố mức độ đe dọa ở bậc VU A1a,c,d+2d. Tuy phân bố nhiều nơi, nhưng số lượng cá thể không nhiều do tái sinh hạt kém và bị khai thác với số lượng lớn nên mất nguồn hạt để tái sinh. Mặt khác, những nơi có cây con mọc lại bị khai thác phá rừng mạnh nên có thể bị tuyệt chủng vì không còn môi trường sống thích hợp (Sách đỏ Việt Nam, 1996, 2007).

Lá Khôi tía có chứa các thành phần chính là tanin và glucosid, có tác dụng chống viêm, làm se vết loét, làm liền sẹo và giảm sự gia tăng axit dạ dày. Nhờ cơ chế này, lá Khôi tía có hoạt chất đặc hiệu trong điều trị dạ dày tá tràng, làm giảm bớt ợ chua, nóng rát vùng thượng vị, kích thích lên da non và làm lành dạ dày và tá tràng nhanh chóng, giúp người bệnh có cảm giác dễ chịu khoan khoái và nhẹ bụng (The Asia Foundation, 2012).

Các loài cây dược liệu nói chung, cây Khôi tía nói riêng trong tự nhiên đang bị giảm về số lượng và chất lượng bởi sự khai thác quá mức cộng với điều kiện ngày càng bất lợi của môi trường tự nhiên, dẫn đến nhiều loài cây dược liệu quý hiếm bị tuyệt chủng, ảnh hưởng đến nguồn cung cấp dược liệu bền vững cho con người. Bởi vậy, cần phải có giải pháp bảo tồn và phát triển các loài cây dược liệu một cách có hiệu quả. Một trong những phương pháp hữu hiệu trong bảo tồn và phát triển các loài thực vật quý hiếm là ứng dụng kỹ thuật nuôi cấy *in vitro* nhằm lưu giữ nguồn gen và sản xuất hàng loạt cây giống chất lượng cao.

Sự ra đời của kỹ thuật nhân giống *in vitro* đã mang lại ý nghĩa vô cùng to lớn. Điều này đã chứng minh được tính toàn năng của tế bào thực vật. Kỹ thuật nhân giống *in vitro* góp phần giải quyết được vấn đề lý luận và thực tiễn, đặc biệt là lĩnh vực nghiên cứu quá trình phát sinh hình thái ở nhiều thực vật từ mức độ tế bào đến cấu trúc mô. Nhân giống *in vitro* được xem là một trong những giải pháp công nghệ mới có ý nghĩa khoa học trong công nghệ sinh học. Trên các môi trường nhân tạo, từ các mô hay tế bào thực vật phân chia, phân hóa và phát triển thành cây hoàn chỉnh.

Sáng chế này lần đầu tiên trên thế giới cũng như ở Việt Nam đề cập đến việc sản xuất hàng loạt cây Khôi tía bằng kỹ thuật nuôi cấy *in vitro*. Trong quy trình này, việc khử trùng tạo mẫu sạch, tái sinh chồi, tạo cây hoàn chỉnh dựa trên việc điều chỉnh các công thức thí nghiệm và môi trường nuôi cấy bổ sung các chất điều hòa sinh trưởng thực vật khác nhau.

Quy trình nhân giống cây Khôi tía bằng kỹ thuật nuôi cấy *in vitro* đạt hiệu quả cao, thời gian áp dụng của cả quy trình là 5 – 6 tháng.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là nhân giống thành công cây Khôi tía. Nhằm đạt được mục đích nêu trên, sáng chế đề xuất quy trình nhân giống cây Khôi tía bằng kỹ thuật nuôi cây *in vitro*, khắc phục được những khó khăn trong thực tiễn sản xuất giống cây dược liệu (cụ thể là cây Khôi tía) bằng phương pháp nhân giống truyền thống mà đến nay vẫn chưa đáp ứng được nhu cầu về số lượng và chất lượng, cũng như phụ thuộc lớn vào mùa vụ dẫn đến việc không chủ động được nguồn cây giống. Quy trình nhân giống cây Khôi tía theo sáng chế đã tái sinh được cây con hoàn chỉnh với hiệu suất đạt hơn 90%.

Cụ thể, sáng chế đề xuất quy trình nhân giống cây Khôi tía (*Ardisia sylvestris* Pitard) bằng kỹ thuật nuôi cây *in vitro*, quy trình này bao gồm các bước:

a) xử lý mẫu và nuôi cấy khởi động:

cắt chồi bánh tẻ từ các cây trội ở vườn cây dược liệu (đã được trẻ hóa) và khử trùng tạo mẫu sạch, cắt bớt 1 – 2cm phần ngọn và phần gốc của vật liệu đã được khử trùng để loại bỏ phần mô bị chết do ngấm chất khử trùng, phần còn lại được cắt thành từng đoạn nhỏ kích thước 2 – 3cm và có 1 – 2 chồi ngủ, cấy lên môi trường nuôi cấy khởi động thứ nhất (A1) bao gồm thành phần môi trường khoáng cơ bản MS (Murashige and Skoog, 1962) có bổ sung lượng tối ưu các thành phần: 0,4mg/l 6-Benzylaminopurin (BAP), 30g/l sucroza và 7g/l agar, độ pH là 5,8, trong đó điều kiện nuôi cấy là cường độ chiếu sáng 3000 lux, thời gian chiếu sáng 14 giờ/ngày, nhiệt độ phòng nuôi $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, thời gian theo dõi từ 7 – 8 tuần;

b) nhân nhanh chồi:

cắt và cấy các chồi hữu hiệu đạt kích thước khoảng 2–2,5cm ở bước (a) sang môi trường thứ 2 (A2) bao gồm thành phần môi trường khoáng cơ bản MS có bổ sung thêm một lượng tối ưu các thành phần: 0,4mg/l BAP, 0,2mg/l kinetin, 30g/l sucroza và 7g/l agar, độ pH là 5,8, trong đó điều kiện nuôi cấy giống như ở bước (a), thời gian giai đoạn nhân nhanh chồi từ 6 – 7 tuần;

c) tạo cây Khôi tía hoàn chỉnh:

tách các chồi hữu hiệu từ cụm chồi thu được ở bước (b), cấy chuyển sang môi trường thứ 3 (A3) để tạo rễ bao gồm thành phần môi trường khoáng cơ bản

MS có bổ sung thêm một lượng tối ưu các thành phần: 0,1mg/l axit naphthaleneacetic (NAA), 0,3mg/l axit indole-3-butyric (IBA), 20g/l sucroza và 7g/l agar, độ pH là 5,8, trong đó điều kiện nuôi cấy giống như ở bước (a), thời gian giai đoạn tạo cây hoàn chỉnh *in vitro* từ 5 – 6 tuần;

d) huấn luyện và ra ngoài:

chuyển các bình cây Khôi tía *in vitro* hoàn chỉnh thu được ở bước (c) ra ngoài điều kiện ánh sáng tự nhiên tại nhà lưới với thời gian khoảng 4 – 5 ngày để cây thích nghi dần với điều kiện tự nhiên, sau đó, lấy cây ra khỏi bình, rửa sạch bằng nước và cấy vào giá thể ruột bầu bao gồm đất tầng B, bột xơ dừa và cát sạch với tỷ lệ tương ứng là 2:1:1, tưới nước 2 lần/ngày, trong 4 – 5 tuần đầu, che sáng 50 – 75% bằng lưới màu đen để tránh ánh sáng trực xạ.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 thể hiện sơ đồ quy trình nhân giống cây Khôi tía bằng kỹ thuật nuôi cấy *in vitro*.

Hình 2 thể hiện ảnh chụp cây Khôi tía trồng tại vườn cây thuốc Viện Công nghệ sinh học Lâm nghiệp để lấy vật liệu vào mẫu.

Hình 3 thể hiện ảnh chụp các giai đoạn khác nhau trong quy trình nhân giống cây Khôi tía: hình 3A là giai đoạn tạo mẫu sạch; hình 3B là mẫu tái sinh chồi; hình 3C và 3D là hình ảnh nhân nhanh chồi; hình 3E là cây Khôi tía hoàn chỉnh và hình 3F là cây Khôi tía nuôi cấy *in vitro* trồng ngoài vườn ươm.

Mô tả chi tiết sáng chế

Dưới đây, quy trình nhân giống cây Khôi tía bằng kỹ thuật nuôi cấy *in vitro* sẽ được mô tả chi tiết, nhưng sáng chế không chỉ giới hạn ở các phương án mô tả này.

Cụ thể, quy trình nhân giống cây Khôi tía bằng kỹ thuật nuôi cấy *in vitro* theo sáng chế để thực hiện cần phải sử dụng các thiết bị, máy móc hiện đại như cân kỹ thuật, cân phân tích để cân chính xác hóa chất pha môi trường, máy đo pH để xác định pH môi trường, máy cất nước 1 lần, 2 lần để loại bỏ ion khoáng, pipetman để hút hóa chất, nồi hấp khử trùng, tủ sấy, tủ cấy đạt tiêu chuẩn an toàn sinh học, phòng cấy vô trùng và phòng nuôi với hệ thống giàn đèn điều chỉnh ánh sáng phù hợp cho từng giai đoạn nuôi cấy.

Quy trình nhân giống cây Khôi tía bằng kỹ thuật nuôi cấy *in vitro* bao gồm 4 bước (hình 1):

a) Xử lý mẫu và nuôi cấy khởi động

Vật liệu nuôi cấy là chồi bánh tẻ được thu từ các cây mẹ trồng tại vườn cây thuốc Viện Công nghệ sinh học Lâm nghiệp, tiến hành khử trùng tạo mẫu sạch, cắt bớt phần ngọn và gốc chồi của phần vật liệu đã được khử trùng để loại bỏ phần mô bị chết do ngấm chất khử trùng. Phần còn lại được cắt thành từng đoạn nhỏ kích thước 2–3cm và có 1–2 chồi ngủ, cấy lên môi trường nuôi cấy khởi động thứ nhất (A1) bao gồm thành phần môi trường khoáng cơ bản MS (Murashige and Skoog, 1962) có bổ sung lượng tối ưu các thành phần: 0,4mg/l BAP, 30g/l sucroza và 7g/l agar, độ pH là 5,8. Nuôi cấy trong điều kiện cường độ chiếu sáng 3000 lux, thời gian chiếu sáng 14 giờ/ngày, nhiệt độ phòng nuôi $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, thời gian tái sinh chồi từ 7 – 8 tuần.

Phương án cụ thể:

- Chọn cây lấy mẫu: Cây mẹ dùng để lấy vật liệu nuôi cấy là cây tốt tại vườn cây thuốc Viện Công nghệ sinh học Lâm nghiệp, có khả năng sinh trưởng tốt, thân thẳng, không khuyết tật, không sâu bệnh và có số lượng lá nhiều. Các cây mẹ có nguồn gốc từ vườn quốc gia Ba Vì, thành phố Hà Nội được di thực và trồng tại vườn cây thuốc của Viện Công nghệ sinh học Lâm nghiệp – Trường Đại học Lâm nghiệp (hình 2).

- Thu thập vật liệu nuôi cấy: chọn chồi bánh tẻ từ các cây mẹ đã được trẻ hóa làm vật liệu nuôi cấy, thu hái bằng cách dùng dao sắc cắt chồi tại vị trí sát thân cây, cắt bớt các lá trên chồi sau đó bọc kín bằng túi ni lông màu tối và đưa về phòng thí nghiệm triển khai các bước tiếp theo.

- Khử trùng sơ bộ mẫu: Vật liệu là chồi của cây Khôi tía được cắt bớt lá và các phần phụ không cần thiết, sau đó tiến hành rửa bằng nước máy sạch 2 – 3 lần. Tiếp theo, ngâm mẫu trong dung dịch chất tẩy nhẹ (dung dịch xà phòng loãng) trong thời gian 5 – 10 phút. Tiếp theo, mẫu được rửa dưới vòi nước máy đến khi hết dung dịch xà phòng và tráng lại bằng nước cất vô trùng từ 2 – 3 lần.

- Khử trùng bề mặt: Thao tác khử trùng được tiến hành hoàn toàn trong tủ cấy vô trùng. Mẫu chồi của cây Khôi tía được đựng trong bình nút vắn (0,5 – 1L), bỏ

sung còn 70% ngập 2/3 mẫu, lắc mạnh trong 1 phút, sau đó tráng lại bằng nước cất vô trùng 3 – 4 lần. Tiếp theo, tiến hành khử trùng mẫu bằng dung dịch HgCl_2 0,1% với thời gian là 7 phút chia thành 2 lần (lần 1 là 4 phút và lần 2 là 3 phút) và sau mỗi lần phải rửa sạch mẫu bằng nước cất vô trùng. Sau đó thấm khô bề mặt mẫu vật đã khử trùng bằng giấy thấm vô trùng.

– Cắt mẫu: Dùng panh y tế kẹp ngang chồi của cây Khôi tía, dùng dao mổ sắc cắt bớt phần nhỏ phía hai đầu chồi (phần bị thấm chất khử trùng, có thể bị chết). Chú ý khi cắt không được dập nát hoặc trầy xước lát cắt. Phần còn lại, tùy theo kích thước của đoạn chồi, tiếp tục dùng dao sắc cắt nhỏ thành từng đoạn có kích thước 2 – 3cm (có ít nhất 1 – 2 chồi ngủ).

– Nuôi cấy khởi động: Mẫu sau khi cắt đúng tiêu chuẩn, nhanh chóng dùng panh y tế gấp từng mẫu cấy trên môi trường nuôi cấy khởi động theo chiều thẳng đứng, phần gốc chồi tiếp xúc với môi trường khoảng 0,5cm. Số lượng 3 mẫu/bình nuôi cấy hình trụ 200ml hoặc 5 mẫu/bình tam giác 250ml. Công thức của môi trường nuôi cấy: môi trường khoáng cơ bản MS có bổ sung 0,4mg/l BAP, 30g/l sucroza và 7g/l agar. Môi trường nuôi cấy được điều chỉnh độ pH là 5,8. Điều kiện nuôi cấy là cường độ chiếu sáng 3000 lux; thời gian chiếu sáng 14 giờ/ngày; nhiệt độ phòng nuôi $25 \pm 2^\circ\text{C}$; thời gian cho giai đoạn nuôi cấy khởi động và tái sinh chồi từ 7 – 8 tuần.

– Tiêu chuẩn mẫu nuôi cấy khởi động: Mẫu nuôi cấy phải tươi, có màu xanh – tía tự nhiên, không bị thâm – đen (hình 3A), không bị nhiễm khuẩn và nấm, sau đó có biểu hiện tái sinh chồi (hình 3B). Tỷ lệ mẫu sạch đạt 66,67%, tỷ lệ tái sinh chồi 60%.

Chú ý: Các thao tác với mẫu mô là chồi bánh tẻ của cây Khôi tía được thực hiện trong tủ cấy vô trùng, môi trường nuôi cấy, dụng cụ nuôi cấy (đĩa cấy, panh, kéo, dao mổ và giấy thấm) được khử trùng trước khi sử dụng trong nồi hấp với áp suất 1atm, nhiệt độ 121°C trong 20 phút. Trong quá trình nuôi cấy phải thường xuyên (hàng ngày) theo dõi và quan sát để loại bỏ các mẫu bị nhiễm.

b) Nhân nhanh chồi

Chồi được tái sinh từ các mẫu sạch ở bước (a), được gấp ra đặt trên đĩa cấy, dùng dao hoặc kéo sắc cắt các chồi hữu hiệu đạt kích thước 2–2,5cm, cấy chuyển

sang môi trường thứ 2 (A2) bao gồm thành phần môi trường khoáng cơ bản MS có bổ sung thêm một lượng tối ưu các thành phần: 0,4mg/l BAP, 0,2mg/l kinetin, 30g/l sucroza và 7g/l agar, độ pH là 5,8. Điều kiện nuôi cấy giống như ở bước (a), thời gian giai đoạn nhân nhanh chồi 7 - 8 tuần.

Phương án cụ thể:

- Chồi được tái sinh từ mẫu cấy ban đầu, sau 7 – 8 tuần nuôi cấy ở bước a, chọn các chồi đạt tiêu chuẩn, có chiều cao khoảng 2 – 2,5cm, không bị nhiễm nấm – khuẩn, có màu xanh – tím tự nhiên, dùng panh gấp từng mẫu ở bình nuôi cấy khởi động, đặt mẫu trên đĩa cấy.

- Dùng panh kẹp giữ mẫu, kết hợp dùng dao sắc (hoặc kéo sắc) cắt chồi đúng tiêu chuẩn (chiều cao chồi khoảng 2 – 2,5cm) cấy chuyển sang môi trường nhân nhanh chồi.

- Cấy chồi lên môi trường theo chiều thẳng đứng, phần gốc chồi tiếp xúc với môi trường khoảng 0,5cm. Số lượng mẫu cấy 3 chồi/bình nuôi cấy hình trụ có dung tích 200ml hoặc 5 chồi/bình tam giác có dung tích 250ml. Công thức của môi trường nuôi cấy: môi trường khoáng cơ bản MS có bổ sung thêm 0,4mg/l BAP, 0,2mg/l kinetin, 30g/l sucroza và 7g/l agar. Môi trường nuôi cấy được điều chỉnh độ pH là 5,8. Điều kiện nuôi cấy là cường độ chiếu sáng 3000 lux; thời gian chiếu sáng 14 giờ/ngày; nhiệt độ phòng nuôi $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$; thời gian giai đoạn nuôi cấy nhân nhanh chồi từ 6 - 7 tuần.

- Tiêu chuẩn chồi tái sinh từ môi trường nhân nhanh có chiều cao từ 2 – 3cm, có 2 – 4 lá và có màu xanh – tím tự nhiên (hình 3C, D). Tỷ lệ tái sinh chồi đạt 100%, số chồi trung bình đạt 3,66 chồi/mẫu cấy và chiều cao trung bình của chồi đạt 2,95cm.

Chú ý: Các thao tác được thực hiện trong tủ cấy vô trùng, môi trường nuôi cấy, dụng cụ nuôi cấy (đĩa cấy, panh, kéo, dao mổ, giấy thấm) được khử trùng trước khi sử dụng giống bước (a). Trong quá trình nuôi cấy phải thường xuyên (hàng ngày) theo dõi, quan sát để loại bỏ các mẫu bị nhiễm nấm khuẩn.

c) Tạo cây Khôi tía hoàn chỉnh

Tách các chồi hữu hiệu thu được từ bước (b) cấy chuyển sang môi trường thứ 3 (A3) để tạo rễ bao gồm thành phần môi trường khoáng cơ bản MS có bổ sung thêm một lượng tối ưu các thành phần: 0,1mg/l NAA, 0,3mg/l IBA, 20g/l sucroza và 7g/l agar, độ pH là 5,8. Điều kiện nuôi cấy giống như bước (b), thời gian giai đoạn tạo cây Khôi tía hoàn chỉnh từ 5 – 6 tuần.

Phương án cụ thể:

– Dùng panh y tế gấp từng cụm chồi đặt lên đĩa cấy đã lót giấy thấm ướt. Dùng lưỡi dao mổ hoặc kéo sắc tách riêng từng chồi ra khỏi cụm chồi thu được ở bước (b), chú ý tránh dập nát phần gốc chồi ảnh hưởng đến khả năng ra rễ. Dùng panh gấp từng chồi cấy lên môi trường cảm ứng ra rễ tạo cây hoàn chỉnh.

– Cấy chồi lên môi trường theo chiều thẳng đứng, phần gốc chồi tiếp xúc với môi trường khoảng 0,5cm. Số lượng chồi cấy từ 10 chồi/bình 500ml. Công thức của môi trường nuôi cấy: môi trường khoáng cơ bản MS có bổ sung 0,1mg/l NAA, 0,3mg/l IBA, 20g/l sucroza và 7g/l agar. Môi trường nuôi cấy được điều chỉnh độ pH là 5,8. Điều kiện nuôi cấy là cường độ chiếu sáng 3000 lux; thời gian chiếu sáng 14 giờ/ngày; nhiệt độ phòng nuôi $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$; thời gian ra rễ tạo cây Khôi tía *in vitro* hoàn chỉnh từ 5 – 6 tuần.

– Tiêu chuẩn cây Khôi tía *in vitro* hoàn chỉnh: Chiều cao cây $\geq 3\text{cm}$, có 4 – 6 lá thật, bộ rễ phát triển trung bình khoảng 4 - 5 rễ/cây, không bị mô sẹo ở phần gốc, thân có màu hơi tía (hình 3E). Tỷ lệ chồi ra rễ tạo cây hoàn chỉnh đạt khoảng 73 – 93% đối với các công thức môi trường bổ sung các chất điều hòa sinh trưởng thực vật khác nhau.

Chú ý: Các thao tác được thực hiện trong tủ cấy vô trùng, môi trường nuôi cấy, dụng cụ nuôi cấy (đĩa cấy, panh, kéo, dao mổ, giấy thấm) được khử trùng trước khi sử dụng giống bước (a).

d) Huấn luyện và ra ngôi

Chuyển các bình cây Khôi tía hoàn chỉnh thu được từ bước (c) ra ngoài điều kiện ánh sáng tự nhiên tại nhà lưới với thời gian khoảng 4 – 5 ngày để cây thích nghi dần với điều kiện tự nhiên. Sau đó, cây được lấy ra khỏi bình, rửa sạch

bằng nước và cấy vào giá thể ruột bầu bao gồm đất tầng B, bột xơ dừa và cát sạch với tỷ lệ tương ứng là 2:1:1, tưới nước 2 lần/ngày. Trong 4 – 5 tuần đầu che sáng 50 – 75% bằng lưới màu đen để tránh ánh sáng trực xạ.

Phương án cụ thể:

Để chuyển cây con *in vitro* từ phòng thí nghiệm ra vườn ươm có tỷ lệ sống cao và sinh trưởng tốt, cần huấn luyện cho cây thích nghi dần với môi trường tự nhiên, cụ thể như sau:

- Từ các bình cây *in vitro* hoàn chỉnh tạo ra ở bước (c), chọn những bình có cây đạt tiêu chuẩn về cây hoàn chỉnh như đã nêu ở bước (c), không bị nhiễm nấm – khuẩn, chuyển ra nhà lưới huấn luyện.

- Nhà lưới huấn luyện có mái che, tránh ánh sáng trực xạ của mặt trời chiếu vào, có quạt thông gió để lưu thông không khí, làm mát, đảm bảo nhiệt độ khoảng 25 – 35°C.

- Bình cây được để trong nhà lưới huấn luyện 4 – 5 ngày để cây *in vitro* thích nghi với điều kiện tự nhiên.

- Ra ngôi: Giá thể ruột bầu bao gồm đất tầng B, bột xơ dừa và cát sạch với tỷ lệ tương ứng là 2:1:1. Chậu trồng cây là chậu nhỏ có đường kính 12 – 15cm hoặc túi bầu PE màu đen có kích thước 12 x 17cm, có đục lỗ phía dưới. Cho giá thể ruột bầu vào chậu và xử lý giá thể bằng thuốc diệt nấm trước khi trồng 7 ngày. Các cây Khôi tía sau khi được huấn luyện, được lấy ra khỏi bình bằng panh và rửa sạch loại bỏ agar dưới vòi nước máy. Cấy từng cây vào chậu (1 cây/chậu hoặc 1 cây/bầu), chú ý tránh làm hỏng rễ. Trong 4 – 5 tuần đầu nếu trời nắng phải che sáng 50–70% bằng lưới đen. Tưới nước 2 lần/ngày, đảm bảo độ ẩm > 90%. Sau 4 – 5 tuần, bón phân NPK 1g/chậu cây bằng cách hòa tan và tưới đều lên mặt chậu.

- Tiêu chuẩn cây đem trồng: Cây Khôi tía khi ra ngôi 8 tuần tuổi, đạt chiều cao khoảng 15 – 20cm, thân cây cứng cáp có thể đem trồng.

Các bước trong quy trình nhân giống cây Khôi tía cung cấp cũng bao gồm một số các yếu tố có thể thay đổi. Ví dụ như thành phần môi trường nuôi cấy, chẳng hạn như hàm lượng chất điều hòa sinh trưởng thực vật, hàm lượng đường có

thể thay đổi trong các môi trường nuôi cấy tái sinh chồi, nhân nhanh chồi và tạo cây hoàn chỉnh.

Trong một số phương án, môi trường nuôi cấy khởi động bổ sung hàm lượng chất điều hòa sinh trưởng thực vật BAP là 0,4mg/l.

Trong một số phương án, môi trường nuôi cấy nhân nhanh chồi bổ sung hàm lượng chất điều hòa sinh trưởng thực vật BAP từ 0,2mg/l đến 0,8mg/l và kinetin từ 0,2mg/l đến 0,5mg/l.

Trong một số phương án, môi trường nuôi cấy tạo cây hoàn chỉnh bổ sung hàm lượng chất điều hòa sinh trưởng thực vật NAA từ 0,1mg/l đến 0,7mg/l và IBA từ 0,1mg/l đến 0,5mg/l.

Quy trình được cung cấp để nhân giống cây Khôi tía chất lượng cao, bao gồm các phương án cụ thể: Phương pháp xử lý mẫu và nuôi cấy trên môi trường khởi động trong khoảng thời gian hiệu quả để tái sinh chồi, nuôi cấy nhân nhanh chồi trên môi trường cảm ứng tạo cụm chồi trong thời gian hiệu quả để nhân nhanh chồi, nuôi cấy chồi trên môi trường cảm ứng ra rễ trong thời gian hiệu quả để chồi ra rễ tạo cây Khôi tía hoàn chỉnh; và huấn luyện và ra ngôi cây Khôi tía *in vitro* trước khi đưa ra trồng ngoài tự nhiên. Nuôi cấy khởi động, tái sinh chồi, nhân nhanh chồi và ra rễ trên các môi trường bổ sung các chất điều hòa sinh trưởng thực vật khác nhau như là BAP, kinetin, NAA, IBA và tổ hợp các chất trên.

Trong phương án cụ thể: Môi trường nuôi cấy khởi động có bổ sung BAP; môi trường nuôi cấy nhân nhanh chồi có bổ sung BAP hoặc kết hợp BAP và kinetin; môi trường nuôi cấy chồi để cảm ứng ra rễ tạo cây hoàn chỉnh có bổ sung NAA hoặc kết hợp NAA với IBA.

Theo phương án, sáng chế đề cập lần đầu tiên đến quy trình nhân giống cây Khôi tía bằng kỹ thuật nuôi cấy *in vitro* trên các môi trường và điều kiện nuôi cấy thích hợp, cho hệ số nhân chồi cao, tạo được nhiều cây giống có chất lượng tốt, sinh trưởng nhanh và đồng đều.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Quy trình nhân giống cây Khôi tía (*Ardisia sylvestris* Pitard) bằng kỹ thuật nuôi cấy *in vitro* được minh họa bằng các ví dụ thực hiện sau đây:

Ví dụ 1: Chuẩn bị vật liệu và môi trường nuôi cấy

– Vật liệu thực vật: Cây mẹ dùng để lấy vật liệu nuôi cấy là cây tốt được trồng ở vườn cây thuốc Viện Công nghệ sinh học lâm nghiệp, có khả năng sinh trưởng tốt, thân thẳng, không khuyết tật, không sâu bệnh, có số lượng lá nhiều được tuyển chọn từ Vườn quốc gia Ba Vì, thành phố Hà Nội. Vật liệu nuôi cấy là chồi bánh tẻ.

– Môi trường nuôi cấy:

+ Môi trường nuôi cấy khởi động: Thành phần môi trường dinh dưỡng cơ bản MS bổ sung chất điều hòa sinh trưởng thực vật BAP 0,4mg/l, 30g/l sucroza và 7g/l agar.

+ Môi trường nuôi cấy nhân nhanh chồi: Thành phần môi trường dinh dưỡng cơ bản MS bổ sung chất điều hòa sinh trưởng thực vật BAP từ 0,2mg/l đến 0,8mg/l, kinetin từ 0,1mg/l đến 0,5mg/l, 30g/l sucroza và 7g/l agar.

+ Môi trường nuôi cấy tạo cây hoàn chỉnh: Thành phần môi trường dinh dưỡng cơ bản MS bổ sung chất điều hòa sinh trưởng thực vật NAA từ 0,1mg/l đến 0,7mg/l, IBA từ 0,1mg/l đến 0,5mg/l, 20g/l sucroza và 7g/l agar.

Tiến hành pha chế môi trường: Mỗi công thức môi trường 1 lít.

Bước 1: Lấy các thành phần của 1 lít môi trường cơ bản MS cho vào cốc định mức, bổ sung chất điều hòa sinh trưởng thực vật, đường sucroza và agar (ví dụ đối với môi trường nuôi cấy khởi động cân 30g đường sucroza, 7g agar và hút 0,4ml BAP nồng độ 1mg/ml cho vào cốc), bổ sung nước cất đến thể tích 1 lít. Khuấy tan đều các thành phần, dùng dung dịch NaOH 1N, HCl 1N điều chỉnh độ pH là 5,8.

Bước 2: Đun sôi môi trường bằng bếp từ đến khi agar tan hoàn toàn, tiếp theo dùng ống định mức chia môi trường vào các bình nuôi cấy (ví dụ đóng 40ml môi trường cho vào bình trụ 200ml, đóng 50ml môi trường cho vào bình tam giác 250ml, đóng 100ml môi trường cho vào bình 500ml). Đậy nắp và khử trùng môi trường trong nồi khử trùng với nhiệt độ 121°C, áp suất 1atm trong thời gian 20 phút. Tiếp theo, bảo quản môi trường trong phòng nuôi vô trùng, nhiệt độ $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, lưu giữ môi trường tối đa trong 2 tuần.

Ví dụ 2: Xử lý mẫu và nuôi cấy khởi động

Vật liệu nuôi cấy là chồi bánh tẻ từ các cây trội tại vườn cây thuốc, mẫu của cây Khôi tía được tiến hành rửa bằng nước máy, ngâm mẫu trong dung dịch chất tẩy nhẹ (dung dịch xà phòng loãng) trong thời gian 5 – 10 phút, mẫu được rửa lại dưới vòi nước máy đến khi hết dung dịch xà phòng, tráng lại bằng nước cất vô trùng 2 – 3 lần. Sau đó, khử trùng bề mặt trong tủ cấy vô trùng bằng cồn 70% trong 1 phút, sau đó tráng lại bằng nước cất vô trùng 3 – 4 lần. Tiếp theo, tiến hành khử trùng mẫu bằng HgCl_2 0,1% với thời gian là 7 phút chia thành 2 lần (lần 1 là 4 phút và lần 2 là 3 phút) và sau mỗi lần phải rửa sạch mẫu bằng nước cất vô trùng. Cắt mẫu và cấy vào môi trường nuôi cấy khởi động.

Mẫu được nuôi cấy trên môi trường A1 bao gồm môi trường khoáng cơ bản MS có bổ sung 0,4mg/l BAP, 30g/l sucroza và 7g/l agar.

Mỗi công thức được bố trí 30 mẫu (cấy 3 mẫu mô/bình 200ml) và được lặp lại 3 lần. Nuôi cấy mô của cây Khôi tía trong điều kiện: cường độ chiếu sáng 3000 lux, thời gian chiếu sáng 14 giờ/ngày, nhiệt độ phòng nuôi $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Số chồi tái sinh được thống kê ở tuần thứ 8, số chồi tái sinh được tính là giá trị trung bình của kết quả 3 lần lặp lại cho mỗi công thức. Tỷ lệ mẫu tái sinh chồi được tính bằng công thức: Tỷ lệ mẫu tái sinh (%) = số mẫu tái sinh chồi/số mẫu cấy ban đầu x 100, giá trị trung bình được tính trên kết quả của 3 lần lặp lại cho mỗi công thức.

Mẫu chồi của cây Khôi tía được tiến hành khử trùng thông qua 6 công thức với thời gian xử lý chất khử trùng khác nhau. Sau đó được cấy trên môi trường nuôi cấy khởi động (A1), theo dõi chồi tái sinh từ các mẫu nuôi cấy. Sau 8 tuần theo dõi, kết quả được trình bày ở bảng 1. Công thức môi trường M-S₄ cho tỷ lệ tái sinh chồi tốt nhất.

Bảng 1. Ảnh hưởng của thời gian khử trùng đến tỷ lệ mẫu sạch và khả năng tái sinh chồi

CTTN	Thời gian khử trùng (phút)		Tỷ lệ mẫu sạch (%)	Tỷ lệ mẫu tái sinh (%)
	Lần 1	Lần 2		
M-S ₁	3	9	86,67	33,33
M-S ₂	3	7	80,00	46,67
M-S ₃	4	5	76,67	53,33
M-S ₄	4	3	66,67	60,00
M-S ₅	5	1	56,67	53,33
M-S ₆	5	0	53,33	50,00

Ví dụ 3: Nhân nhanh chồi

Sau 7 tuần nuôi cấy, các chồi được tái sinh trên môi trường nuôi cấy khởi động được cấy chuyển sang môi trường nhân nhanh chồi (A2) bổ sung chất điều hòa sinh trưởng BAP và kinetin với các nồng độ khác nhau (xem bảng 2), gồm có 4 công thức có hàm lượng BAP (0,2 – 0,5mg/l), 5 công thức có kết hợp với kinetin (0,1 – 0,5mg/l), 01 công thức đối chứng không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng thực vật. Mỗi công thức nuôi cấy được bố trí với 30 mẫu (3 chồi/bình trụ 200ml) và được lặp lại 3 lần. Nuôi cấy 6 – 7 tuần dưới ánh sáng gián đoạn. Thống kê số lượng cụm chồi và chồi tái sinh tại tuần thứ 7 nuôi cấy. Tỷ lệ mẫu tạo cụm chồi ở mỗi công thức thí nghiệm được tính: Tỷ lệ tạo cụm chồi (%) = số mẫu tạo cụm chồi/số mẫu cấy ban đầu x 100.

Sau 7 tuần nuôi cấy trên các công thức môi trường cảm ứng tạo cụm chồi, ở tất cả các công thức môi trường có bổ sung chất điều hòa sinh trưởng thực vật hàm lượng khác nhau đều tái sinh chồi, nhưng với tỷ lệ khác nhau có ý nghĩa. Tỷ lệ tái sinh cụm chồi lớn nhất thu được trên công thức môi trường bổ sung 0,4mg/l BAP và 0,2mg/l kinetin (100% mẫu tái sinh chồi) với 3,66 chồi/mẫu (bảng 2), mẫu cấy trên môi trường không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng thực vật có khả năng tái sinh chồi kém.

Từ kết quả thí nghiệm thu được, tác giả sáng chế chọn môi trường khoáng cơ bản MS có bổ sung 0,4mg/l BAP, 0,2mg/l kinetin, 30g/l sucroza và 7g/l agar là môi trường thích hợp cho nuôi cấy nhân nhanh chồi của cây Khôi tía trong quy trình này.

Bảng 2. Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng BAP và kinetin đến khả năng nhân nhanh chồi

CTTN	Chất ĐHST (mg/l)		Tỷ lệ mẫu tái sinh (%)	Số chồi TB/mẫu	Chiều cao TB/chồi (cm)
	BAP	Kinetin			
ĐC	0	0	43,33	1,34	2,12
M-N ₁	0,8	0	80,00	2,45	2,54
M-N ₂	0,6	0,1	83,33	3,21	2,76
M-N ₃	0,4	0,2	100	3,66	2,95
M-N ₄	0,2	0,3	80,00	3,47	2,64
M-N ₅	0	0,4	73,33	2,08	2,58
M-N ₆	0	0,5	76,67	1,79	2,53

Ví dụ 4: tạo cây Khôi tía hoàn chỉnh

Các chồi hữu hiệu được tạo ra trên môi trường nuôi cấy nhân nhanh chồi, sau 7 tuần nuôi cấy có kích thước đạt 2 – 2,5cm được cấy chuyển sang môi trường cảm ứng tạo rễ bao gồm môi trường khoáng cơ bản MS có bổ sung chất điều hòa sinh trưởng thực vật NAA và IBA với hàm lượng khác nhau (xem bảng 3). Mỗi công thức nuôi cấy được bố trí với 30 chồi (3 chồi/bình trụ 200ml) và được lặp lại 3 lần. Quan sát thấy tại thời điểm 6 tuần nuôi cấy, trên tất cả các công thức nghiệm có bổ sung chất điều hòa sinh trưởng thực vật đều có chồi ra rễ với tỷ lệ khác nhau, công thức đối chứng tỷ lệ ra rễ tương đối thấp, tỷ lệ chồi ra rễ cao nhất ở công thức môi trường M-R₃, bổ sung 0,1mg/l NAA và 0,3mg/l IBA. Tỷ lệ ra chồi đạt 93,33%, số rễ trung bình đạt 4,14 rễ/cây, có nhiều rễ thứ cấp sau khoảng 4 tuần nuôi cấy. Từ đó tác giả sáng chế chọn môi trường khoáng cơ bản MS có bổ sung 0,1mg/l NAA và 0,3mg/l IBA là môi trường thích hợp cho nuôi cấy chồi của cây Khôi tía ra rễ tạo cây hoàn chỉnh.

Bảng 3. Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng NAA và IBA đến khả năng ra rễ

CTMT	Chất ĐHST (mg/l)		Tỷ lệ chồi ra rễ (%)	Số rễ TB/chồi	Chiều dài rễ TB (cm)	Chất lượng rễ
	NAA	IBA				
ĐC	0	0	50,00	2,23	2,31	xấu
M-R ₁	0	0,5	83,33	3,57	2,77	TB
M-R ₂	0	0,4	86,67	3,62	2,95	tốt
M-R ₃	0,1	0,3	93,33	4,14	3,05	tốt
M-R ₄	0,3	0,2	86,67	3,43	2,89	tốt
M-R ₅	0,5	0,1	83,33	3,32	2,77	TB
M-R ₆	0,7	0	73,33	3,25	2,82	TB

Ví dụ 5: Huấn luyện và ra ngôi cây Khôi tía ở nhà lưới

Các cây Khôi tía *in vitro* được tạo ra trên môi trường cảm ứng ra rễ sau 6 tuần nuôi cấy được huấn luyện trong nhà lưới 4 – 5 ngày để cây thích nghi với điều kiện tự nhiên trước khi lấy ra khỏi bình. Sau thời gian huấn luyện cây được lấy ra và rửa sạch loại bỏ agar dưới vòi nước chảy và cây được cấy vào chậu đã chuẩn bị giá thể ruột bầu. Đặt chậu cây trong nhà lưới có mái che, nếu trời nắng cần che bớt ánh sáng bằng lưới đen để tránh ánh sáng trực xạ, tưới nước 2 lần/ngày đảm bảo độ ẩm >90%. Sau 4 tuần, bón phân NPK 1g/chậu cây bằng cách hòa tan và tưới đều lên mặt chậu.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Việc áp dụng quy trình nhân giống cây Khôi tía theo sáng chế đã rút ngắn được thời gian nhân giống so với phương pháp truyền thống tới 2 tháng. Quy trình nhân giống cây Khôi tía có thể áp dụng để sản xuất được hàng loạt các cây Khôi tía sinh trưởng nhanh, sạch bệnh, đồng nhất về mặt di truyền, đặc biệt không phụ thuộc mùa vụ, không gian sản xuất nhỏ nhưng số lượng cây con tạo ra rất lớn phục vụ kịp thời cho việc bảo tồn và phát triển cây dược liệu nói chung và cây Khôi tía nói riêng. Cây Khôi tía được sản xuất bằng kỹ thuật nuôi cấy *in vitro* tạo ra hàng loạt cây non trẻ có sức sống cao, sinh trưởng tốt đặc trưng của cây Khôi tía chủ yếu dùng vật liệu là lá và thân, sự thành công của quy trình nhân giống này phần nào đã đáp ứng được nhu cầu của xã hội về nguồn cây giống phục vụ cho sản xuất, đáp ứng nhu cầu về vật liệu làm thuốc từ cây Khôi tía.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình nhân giống cây Khôi tía (*Ardisia sylvestris* Pitard) bằng kỹ thuật nuôi cấy *in vitro*, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) xử lý mẫu và nuôi cấy khởi động

cắt chồi bánh tẻ từ các cây tốt tại vườn cây thuốc của Viện Công nghệ sinh học Lâm nghiệp, Trường Đại học Lâm nghiệp; khử trùng tạo mẫu sạch; dùng dao sắc cắt phần đầu và gốc chồi của vật liệu đã khử trùng để loại bỏ một phần mô bị chết; phần còn lại được cắt thành từng đoạn nhỏ kích thước 2 – 3cm và có 1 – 2 chồi ngủ; cấy trên môi trường nuôi cấy khởi động thứ nhất (A1) bao gồm thành phần môi trường khoáng cơ bản MS (Murashige and Skoog, 1962) có bổ sung lượng tối ưu các thành phần 0,4mg/l BAP, 30g/l sucroza và 7g/l agar, độ pH là 5,8, trong đó điều kiện nuôi cấy là cường độ chiếu sáng 3000 lux, thời gian chiếu sáng 14 giờ/ngày, nhiệt độ phòng nuôi $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, thời gian theo dõi từ 7 – 8 tuần;

b) nhân nhanh chồi

cắt chồi hữu hiệu mà đạt kích thước 2–2,5cm tái sinh từ các mẫu sạch ở bước (a) cấy sang môi trường thứ 2 (A2) bao gồm thành phần môi trường khoáng cơ bản MS có bổ sung lượng tối ưu các thành phần 0,4mg/l BAP, 0,2mg/l kinetin, 30g/l sucroza và 7g/l agar, độ pH là 5,8, trong đó điều kiện nuôi cấy giống như ở bước (a), thời gian giai đoạn nhân nhanh chồi từ 6 – 7 tuần;

c) tạo cây Khôi tía hoàn chỉnh

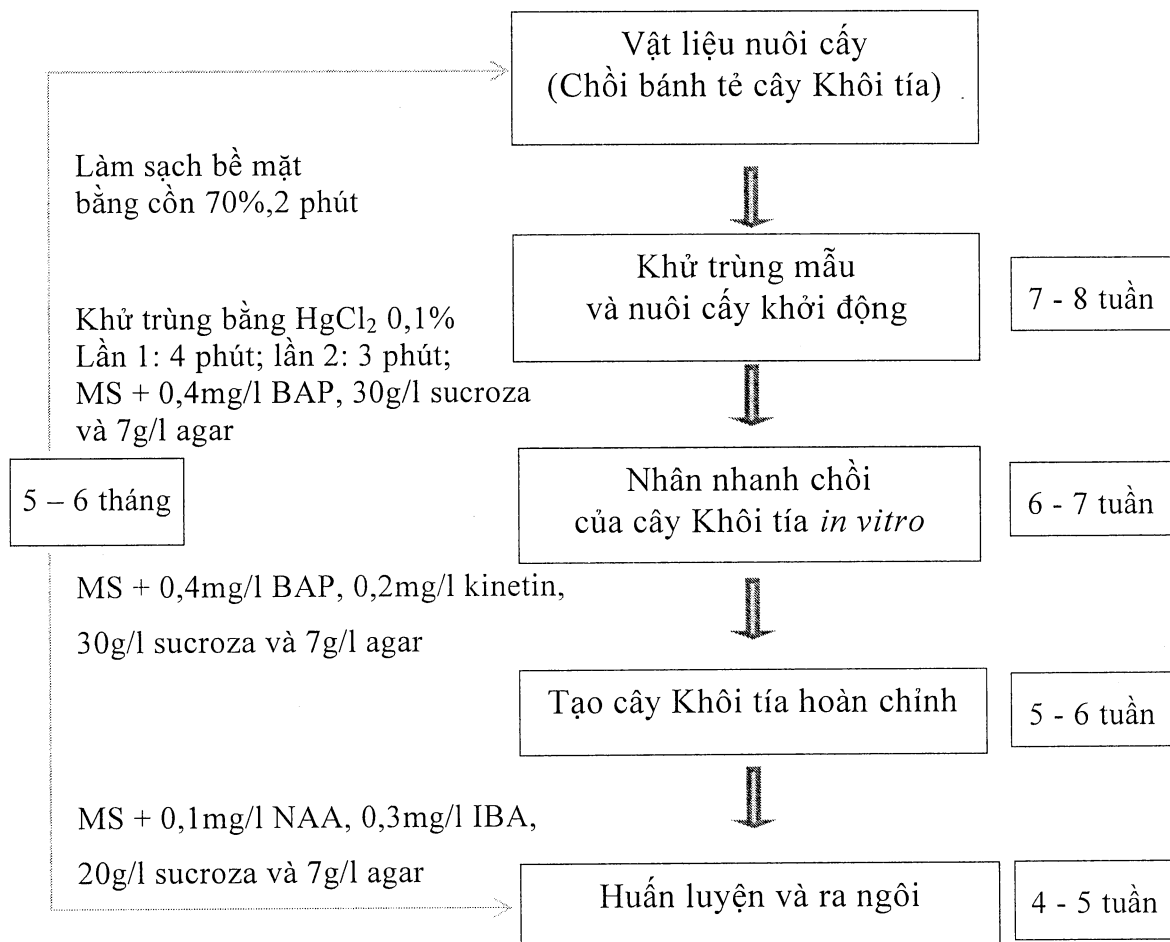
tách các chồi hữu hiệu thu được ở bước (b) chuyển sang môi trường thứ 3 (A3) để tạo rễ bao gồm thành phần môi trường khoáng cơ bản MS có bổ sung lượng tối ưu các thành phần 0,1mg/l NAA, 0,3mg/l IBA, 20g/l sucroza và 7g/l agar, độ pH là 5,8, trong đó điều kiện nuôi cấy giống như ở bước (a), thời gian giai đoạn tạo cây hoàn chỉnh *in vitro* từ 5 – 6 tuần; và

d) huấn luyện và ra ngôi

chuyển các bình cây Khôi tía *in vitro* hoàn chỉnh thu được ở bước (c) ra ngoài điều kiện ánh sáng tự nhiên tại nhà lưới với thời gian huấn luyện 4 – 5 ngày để cây thích nghi dần với điều kiện tự nhiên, sau đó, lấy cây ra khỏi bình, rửa sạch agar, cấy cây vào giá thể ruột bầu bao gồm đất tầng B, trấu hun và cát sạch với tỷ

lệ tương ứng là 2:1:1; tưới nước 2 lần/ngày, trong 4 – 5 tuần đầu che sáng bằng lưới đen từ 50–75% ánh sáng trực xạ.

Hình 1





Hình 3

