



(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) 
2-0001897

(51)⁷ **A61K 36/00, A01H 4/00**

(13) **Y**

(21) 2-2018-00132

(22) 26.08.2016

(67) 1-2016-03169

(45) 25.12.2018 369

(43) 26.12.2016 345

(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) **Bùi Văn Thắng (VN), Hồ Hải Ninh (VN)**

(54) **QUY TRÌNH SẢN XUẤT CÂY XOAN TA (MELIA AZEDARACH LINN) TAM
BỘI BẰNG PHƯƠNG PHÁP NUÔI CẤY MÔ NỘI NHŨ**

(57) Sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất cây xoan ta (*Melia azedarach* Linn) tam bội bằng phương pháp nuôi cấy mô nội nhũ. Quy trình bao gồm các bước tạo mô sẹo tái sinh chồi, tạo cây xoan ta tam bội hoàn chỉnh và huấn luyện và ra ngôi. Quy trình theo sáng chế giúp cho việc sản xuất được cây giống xoan ta tam bội (3n) sinh trưởng nhanh và thể tích thân lớn phục vụ cho việc trồng rừng sản xuất gỗ lớn với năng suất cao.

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 sản xuất cây xoan ta tam bội bằng phương pháp nuôi cấy mô nội nhũ trong ống nghiệm.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Cây xoan ta có tên khoa học là *Melia azedarach* Linn, thuộc họ Xoan (Meliaceae) hay còn gọi là họ Dải ngựa, bộ Bồ hòn (Sapindales), ngành Ngọc lan (Magnoliophyta). Họ Xoan có khoảng 50 chi và 550 loài, phân bố khắp miền nhiệt đới; một chi (Toona) phát triển tới tận vùng ôn đới phía bắc của Trung Quốc và về phía nam tới đông nam Australia, một chi khác gần như phân bố hầu hết ở các vùng phía bắc.

Xoan ta là cây gỗ lớn, chiều cao có thể đạt tới 30m và đường kính gần 100cm. Thân cây thẳng, tán lá thưa, vỏ màu xám nâu, nứt hoặc rạn dọc, lúc non thường có đốm xếp vòng quanh thân. Lá kép lông chim 2-3 lần và mọc cách. Lá chét mép có răng cưa. Hoa đều, lưỡng tính, màu tím nhạt, hợp thành cụm hình chùy ở nách lá phía đầu cành, có mùi thơm hắc, bầu nhụy có 5-6 ô. Quả hạch dài 1-2cm khi chín quả có màu vàng, qua đông trên cành sang mùa xuân mới rụng, vỏ trong hóa gỗ cứng có 5-6 ô, mỗi ô chứa một hạt. Xoan ta là loài cây đa tác dụng, xoan ta có thể được trồng rừng để lấy gỗ lớn hay trồng để che bóng và phòng hộ. Gỗ xoan ta thuộc nhóm V, có lõi màu hồng hay nâu nhạt, giác xám trắng, gỗ nhẹ mềm. Gỗ xoan ta sau khi ngâm khá bền, không bị mối mọt nên thường được dùng trong xây dựng, đóng đồ gia dụng, trang trí nội thất và điêu khắc. Ngoài ra, lá làm phân xanh và thuốc sát trùng, hạt ép lấy dầu, than củi xoan ta cho nhiệt lượng cao. Đặc biệt loài cây này cũng có chất theraupic diệt côn trùng và một số hợp chất limonoid được sử dụng để sản xuất thuốc ức chế một số loại tế bào ung thư ở người (Itokawa và cộng sự, 1995, Chem Pharm Bull 43(7): 1171-1175); Huang và cộng sự, 1996, Phytochemistry 43: 581-583). Bởi vậy, cây xoan ta được đánh giá là một trong những cây trồng lâm nghiệp ở nước ta. Cây xoan ta có mặt ở 6/9 vùng sinh thái lâm nghiệp, trong đó vùng trung tâm, vùng đồng bằng sông Hồng và vùng Nam Trung Bộ, cây xoan ta đứng đầu trong danh mục các cây trồng rừng được ưu tiên phát triển theo quyết định số 16/2005/QĐ-BNN ngày 15/03/2005 của Bộ trưởng Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn. Tuy nhiên, để mang lại hiệu quả kinh

tế cao đối với việc trồng rừng xoan ta, cần có những giống cây mới sinh trưởng nhanh và thể tích thân lớn.

Trong chọn tạo giống cây trồng, cây tam bội được quan tâm bởi các đặc điểm quý của nó mang lại là tăng sinh khối của các cơ quan sinh dưỡng, sinh trưởng nhanh, tăng khả năng chống chịu với những biến đổi bất lợi của môi trường sống và tăng khả năng kháng sâu bệnh hại.

Để sản xuất được một giống cây trồng tam bội, theo phương pháp truyền thống phải tiến hành qua hai bước bao gồm (1) tạo giống tứ bội ($4n$) bằng phương pháp gây đột biến thực nghiệm; và (2) lai hữu tính giữa giống tứ bội ($4n$) được tạo ra với giống lưỡng bội ($2n$). Phương pháp này tốn rất nhiều thời gian (10 – 12 năm tùy thuộc loài cây) và khó khăn về mặt kỹ thuật (dùng để gây đột biến tạo cây tứ bội, chọn lọc cây tứ bội, trồng cây tứ bội và cây lưỡng bội, lai giữa cây tứ bội và cây lưỡng bội), đặc biệt là đối với một số loài cây gỗ. Cây xoan ta là loài cây gỗ có đời sống dài ngày, chậm ra hoa-kết quả, muốn sản xuất cây xoan ta tam bội cần phải được thực hiện trên quy mô lớn, với sự đầu tư lớn về nhân lực, tài chính và đặc biệt cần thời gian dài. Chính vì vậy, cho đến nay trên thế giới cũng như ở Việt Nam chưa có công trình nào công bố về việc tạo được cây xoan ta tam bội.

Ở thực vật hạt kín, mô nội nhũ là sản phẩm của quá trình thụ tinh kép nên nội nhũ là mô tam bội tự nhiên. Bởi vậy, nuôi cấy trực tiếp mô nội nhũ *in vitro* được sử dụng như là một phương pháp hiệu quả trong sản xuất cây tam bội. Phương pháp sản xuất cây tam bội này cho phép đơn giản hóa quá trình tạo giống cây trồng tam bội, tiết kiệm được nhân lực, kinh phí đầu tư, diện tích đất xây dựng khảo nghiệm giống tứ bội và vườn lai giống; đặc biệt là rút ngắn thời gian tạo giống tam bội ở các loài cây gỗ có đời giống dài ngày một cách đáng kể. Tuy nhiên, tái sinh cây từ mô nội nhũ thường gặp thách thức về mặt kỹ thuật (Thomas and Chaturvedi, 2008, Plant Cell Tissue, 93:1-14). Quy trình tái sinh cây từ nuôi cấy mô nội nhũ lần đầu tiên được công bố từ những năm 1950 (Nostog, 1956, Botanical Gazette 117: 253–259). Các nhà khoa học đã nỗ lực nghiên cứu tái sinh cây từ mô nội nhũ của một số lượng lớn các loài thực vật, nhưng đến nay việc tái sinh chồi thành công từ nuôi cấy mô nội nhũ *in vitro* đã được báo cáo chỉ có 35 loài (Miyashita và cộng sự, 2009, Plant Cell Tissue Organ Cult., 98:291-301; Sun và cộng sự, 2011, Plant Cell Tissue Organ Cult., 104:23-29; Thomas và Chaturvedi, 2008, Plant Cell Tissue Organ Cult., 93:1-14; Liangtao Tian và cộng sự, 2012, Plant Growth Regul., 68:319–324; Razdan Tikur và cộng sự, 2014, Biologia Plantarum, 58: 153-158; Muñoz-concha, 2016, Journal of Horticultural

Science and Biotechnology, 91: 79-86). Điều này cho thấy rằng sản xuất cây tam bội từ nội nhũ là khó khăn đối với nhiều loài thực vật.

Sáng chế này lần đầu tiên trên thế giới cũng như ở Việt Nam đề cập đến việc sản xuất thành công cây xoan ta tam bội từ nuôi cấy mô nội nhũ dựa trên kỹ thuật tách rời mô nội nhũ non và phôi, nuôi cấy mô nội nhũ non tạo mô sẹo, tái sinh chồi, tạo cây hoàn chỉnh dựa trên các loại môi trường nuôi cấy bổ sung các chất điều hòa sinh trưởng với các nồng độ khác nhau.

Quy trình sản xuất cây xoan ta tam bội từ nuôi cấy mô nội nhũ đạt hiệu quả cao, thời gian của áp dụng của cả quy trình là 5 - 6 tháng.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là sản xuất được cây xoan ta tam bội. Nhằm đạt được mục đích nêu trên, sáng chế đề xuất quy trình sản xuất cây xoan ta tam bội bằng phương pháp nuôi cấy mô nội nhũ, khắc phục được những khó khăn trong sản xuất cây lâm nghiệp tam bội (cụ thể là cây xoan ta) bằng phương pháp truyền thống mà đến nay vẫn chưa sản xuất được.

Quy trình sản xuất cây xoan ta tam bội theo sáng chế, đặc trưng ở chỗ, giai đoạn lấy vật liệu nuôi cấy, tách lấy mô nội nhũ non nuôi cấy và thành phần môi trường nuôi cấy tạo mô sẹo từ mô nội nhũ, tái sinh chồi và tạo cây hoàn chỉnh cho hiệu suất 100% cây tái sinh từ mô nội nhũ là cây tam bội.

Cụ thể, sáng chế đề xuất quy trình sản xuất cây xoan ta (*Melia azedarach* Linn) tam bội bằng phương pháp nuôi cấy mô nội nhũ, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) tạo mô sẹo: khử trùng quả xoan ta non (3-4 tháng tuổi sau khi đậu quả) được lấy từ những cây trội tại rừng giống, dùng dao mổ tách bỏ phần thịt quả và lấy hạt non, sau đó dùng dao mổ tách lấy phần mô nội nhũ loại bỏ phần vỏ hạt và phôi, cấy mô nội nhũ vào môi trường cảm ứng tạo mô sẹo thứ nhất (A1) bao gồm thành phần môi trường cơ bản MS (Murashige and Skoog, 1962) có bổ sung thêm một lượng tối ưu các thành phần: 2,0mg/l NAA, 1,0mg/l BAP, 20g/l sucroza và 7g/l agar, độ pH là 5,8, trong đó điều kiện nuôi cấy là trong 3 tuần đầu, mẫu được nuôi tối hoàn toàn, sau đó đưa ra nuôi sáng với cường độ chiếu sáng 2500 - 3000 lux, thời gian chiếu sáng 14 giờ/ngày, nhiệt độ phòng nuôi $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, thời gian giai đoạn tạo mô sẹo từ 7 – 8 tuần;

b) tái sinh chồi: cấy chuyển mô sẹo thu được từ bước (a) sang môi trường thứ 2 (A2) bao gồm thành phần môi trường cơ bản MS có bổ sung thêm một lượng tối ưu

các thành phần: 0,5mg/l NAA, 1,5mg/l BAP, 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 tạo tái sinh chồi từ 6 – 8 tuần;

c) tạo cây xoan ta tam bội hoàn chỉnh: tách và cấy các chồi thu được từ bước (b) lên môi trường thứ ba (A3) để tạo rễ bao gồm thành phần môi trường cơ bản MS có bổ sung thêm một lượng tối ưu các thành phần: 0,5mg/l IBA hoặc 0,5mg/l NAA, 10g/l sucroza và 7 g/l agar, độ pH là 5,8, trong đó điều kiện nuôi cấy giống như ở bước (a), trong thời gian 4 tuần các chồi sẽ ra rễ tạo cây con hoàn chỉnh; và

d) huấn luyện và ra ngôi: chuyển các bình xoan ta tam bội đã có rễ thu được từ bước (c) ra ngoài điều kiện ánh sáng tự nhiên ở nhà lưới 3 – 5 ngày để cây con thích nghi dần với điều kiện tự nhiên, sau đó lấy cây ra khỏi bình, rửa sạch bằng nước và cấy vào giá thể bao gồm 30% cát và 70% đất, tưới nước 2 lần/ngày, trong 4 tuần đầu nếu trời nắng phải che lưới đen với độ che sáng 50%.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 thể hiện sơ đồ quy trình sản xuất cây xoan ta tam bội.

Hình 2 thể hiện ảnh chụp cây xoan ta trội lấy vật liệu.

Hình 3 thể hiện hình ảnh các giai đoạn khác nhau trong quy trình sản xuất cây xoan ta tam bội. Hình 3A là mô nội nhũ non được tách từ quả xoan ta non; hình 3B, 3C và 3D là mô sẹo được phát triển từ mô nội nhũ non; hình 3E, 3F, 3G và 3H là chồi tái sinh từ mô sẹo; hình 3I là cây xoan ta tam bội hoàn chỉnh; và hình 3J là cây xoan ta tam bội ra ngôi ở vườn ươm.

Hình 4 thể hiện biểu đồ phân tích mức độ đa bội của thể cây xoan ta dựa vào cường độ huỳnh quang tuyến tính (hàm lượng ADN mỗi nhân tế bào) bằng máy đếm tế bào theo dòng chảy (Flow cytometer). Trục Y của mỗi đồ thị là số lượng các hạt nhân đếm được và trục X là cường độ huỳnh quang tuyến tính. Hình 4A là biểu đồ cường độ huỳnh quang tuyến tính của các hạt nhân của cây xoan ta lưỡng bội (2n) cây có giá trị cao nhất là 50. Hình 4B là biểu đồ cường độ huỳnh quang tuyến tính của các hạt nhân của cây xoan ta tam bội (3n) cây có giá trị cao nhất là 73. Hình 4C là biểu đồ cường độ huỳnh quang tuyến tính hỗn hợp của các hạt nhân cây xoan ta lưỡng bội (2n) và xoan ta tam bội (3n) cây có giá trị cao nhất tương ứng là 50 và 77. Máy đếm tế bào theo dòng chảy về cơ bản là một máy đếm hạt huỳnh quang, đo cường độ phát huỳnh quang trong các hạt nhân. Các cường độ huỳnh quang là tỷ lệ thuận với số lượng ADN hạt nhân mà vết huỳnh quang là ràng buộc. Một giá trị đỉnh cao của các cường độ huỳnh

quang phản ánh một ý nghĩa của hàm lượng ADN mỗi hạt nhân, giá trị cao nhất cho hàm lượng ADN hạt nhân từ cây xoan ta lưỡng bội đã được đưa ra giá trị tùy ý của $2n$. Vì vậy, nếu giá trị đỉnh cao của ADN hạt nhân của cây xoan ta tái sinh từ mô nội nhũ gấp 1,5 lần so với cây lưỡng bội thì đó là cây xoan ta tam bội.

Mô tả chi tiết sáng chế

Dưới đây, quy trình sản xuất cây xoan ta tam bội bằng phương pháp nuôi cấy mô nội nhũ sẽ được mô tả một cách chi tiết, nhưng sáng chế không chỉ giới hạn ở các phương án mô tả này.

Cụ thể, quy trình sản xuất cây xoan ta tam bội 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 chế môi trường, máy chuẩn độ pH để xác định độ pH của môi trường nuôi cấy, máy cất nước một lần, hai lần để loại bỏ ion khoáng, pipetman để hút hóa chất, nồi hấp khử trùng, tủ sấy, tủ an toàn sinh học, phòng cấy vô trùng và phòng nuôi cấy với hệ thống đèn điều chỉnh ánh sáng phù hợp cho từng giai đoạn nuôi cấy.

Quy trình sản xuất cây xoan ta tam bội theo sáng chế bao gồm 4 bước (hình 1):

a) Tạo mô sẹo

Quả xoan ta non (3-4 tháng tuổi sau khi đậu quả) được lấy từ những cây trội tại rừng giống và khử trùng, dùng dao mổ tách bỏ phần thịt quả và lấy hạt non, sau đó dùng dao mổ tách lấy phần mô nội nhũ loại bỏ phần vỏ hạt và phôi, cấy mô nội nhũ vào môi trường cảm ứng tạo mô sẹo thứ nhất (A1) bao gồm thành phần môi trường cơ bản MS (Murashige and Skoog, 1962) có bổ sung thêm một lượng tối ưu các thành phần: 2,0mg/l NAA, 1,0mg/l BAP, 20g/l sucroza và 7g/l agar, độ pH là 5,8. Nuôi cấy ở điều kiện trong 3 tuần đầu, mẫu được nuôi tối hoàn toàn, sau đó đưa ra nuôi sáng với cường độ chiếu sáng 2500 - 3000 lux, thời gian chiếu sáng 14 giờ/ngày, nhiệt độ phòng nuôi $25 \pm 2^\circ\text{C}$, thời gian giai đoạn tạo mô sẹo từ 7 – 8 tuần.

Phương án cụ thể:

- Chọn cây lấy mẫu: Cây mẹ dùng để lấy quả xoan ta non là những cây trội sinh trưởng nhanh, thân thẳng, tròn đều, không khuyết tật – sâu bệnh và tán lá cân đối, được tuyển chọn từ lâm phần xoan ta tại Triệu Sơn – Thanh Hóa (hình 2).
- Lấy mẫu quả xoan ta non: chọn những quả xoan ta non (3-4 tháng tuổi sau khi đậu quả) to đều không bị sâu bệnh.

- Thời điểm lấy mẫu: tháng 4-5 trong năm, mẫu được lấy vào buổi sáng khi thời tiết nắng ráo.

- Khử trùng sơ bộ mẫu: Rửa quả xoan ta non trong nước máy sạch 2 – 3 lần. Quả xoan ta non được ngâm trong dung dịch chất tẩy nhẹ (nước xà phòng loãng) trong 5 – 10 phút. Tiếp theo, quả xoan ta non được rửa sạch dưới vòi nước máy, tráng lại bằng nước cất vô trùng.

- Khử trùng bề mặt: Thao tác khử trùng tiến hành hoàn toàn trong tủ cấy vô trùng. Quả xoan ta được đựng trong bình nút vặn (500ml), bổ sung còn 70% ngập 2/3 mẫu, lắc mạnh trong 2 phút, sau đó tráng lại bằng nước cất vô trùng 4-5 lần. Sau đó, thấm khô quả xoan ta đã khử trùng bề mặt bằng giấy thấm vô trùng.

- Tách lấy hạt non: Dùng panh y tế kẹp quả theo chiều ngang, dùng dao mổ cắt dọc quả (cắt chính giữa quả). Dùng mũi dao mổ tách từng hạt xoan ta ra khỏi phần thịt quả, khi tách cần chú ý tránh làm đứt hạt.

- Tách lấy mô nội nhũ: Hạt xoan ta non sau khi tách được đặt lên giấy thấm ướt vô trùng; dùng mũi dao mổ nhọn tách bỏ phần vỏ hạt và lớp màng ngoài; sau đó dùng mũi dao mổ ấn nhẹ loại bỏ phần phôi hạt có màu xanh khỏi mô nội nhũ có màu trắng, chú ý tránh làm đứt mô nội nhũ (hình 3A).

- Nuôi cấy nội nhũ tạo mô sẹo:

+ Mô nội nhũ sau khi tách, dùng panh lấy từng nội nhũ cấy ngay lên môi trường cảm ứng tạo mô sẹo.

+ Số lượng 10 mô nội nhũ/bình tam giác 250ml.

+ Công thức môi trường nuôi cấy: Môi trường cơ bản MS bổ sung thêm 2,0mg/l NAA, 1,0mg/l BAP, 20g/l sucroza và 7g/l agar, và giá trị độ pH của môi trường nuôi cấy được chuẩn độ đến 5,8.

+ Điều kiện nuôi cấy: trong 3 tuần đầu, mẫu được nuôi tối hoàn toàn trong tủ tối, sau đó đưa ra nuôi sáng với cường độ chiếu sáng 2500 - 3000 lux, thời gian chiếu sáng 14 giờ/ngày, nhiệt độ phòng nuôi cấy là $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

+ Thời gian cho giai đoạn nuôi cấy mô nội nhũ tạo mô sẹo từ 7 – 8 tuần.

- Tiêu chuẩn mô sẹo được cảm ứng tạo ra từ nội nhũ: mô sẹo có màu trắng ngà hoặc màu vàng hoặc màu vàng – xanh (hình 3B), không bị nhiễm nấm -khuẩn. Tỷ lệ nội nhũ tạo mô sẹo đạt 55,86%. Chú ý các mô nội nhũ không tạo được mô sẹo sẽ có màu thâm đen (mô nội nhũ bị chết).

Chú ý: Các thao tác với mẫu được thực hiện trong tủ cấy vô trùng, môi trường và các dụng cụ panh, dao mổ, đĩa cấy và giấy thấm được khử trùng trước khi sử dụng trong nồi khử trùng với áp suất 1atm, 121°C trong 20 phút.

b) Tái sinh chồi

Cây chuyển mô sẹo thu được từ bước (a) sang môi trường thứ 2 (A2) bao gồm thành phần môi trường cơ bản MS có bổ sung thêm một lượng tối ưu các thành phần: 0,5mg/l NAA, 1,5mg/l BAP, 30g/l sucroza và 7g/l agar, độ pH là 5,8. Nuôi cấy ở điều kiện giống như ở bước (a), thời gian giai đoạn tạo tái sinh chồi từ 6 – 8 tuần.

Phương án cụ thể:

- Khối mô sẹo được tạo ra từ mô nội nhũ sau 7 – 8 tuần nuôi cấy ở bước 1, chọn mô sẹo không bị nhiễm nấm – khuẩn, có màu trắng ngà hoặc màu vàng hoặc màu vàng – xanh (xem hình 3B), dùng panh gấp từng khối mô sẹo cấy chuyển sang môi trường cảm ứng tái sinh chồi để tạo chồi.
- Số lượng mẫu cấy 5 khối mô sẹo/bình tam giác 250ml hoặc 1 khối mô sẹo/ống nghiệm.
- Công thức môi trường nuôi cấy: Môi trường cơ bản MS bổ sung thêm 0,5mg/l NAA, 1,5mg/l BAP, 30g/l sucroza và 7g/l agar, và giá trị độ pH của môi trường nuôi cấy được chuẩn độ đến 5,8.
- Điều kiện nuôi cấy: Cường độ chiếu sáng 2500 - 3000 lux, thời gian chiếu sáng 14h/ngày và nhiệt độ phòng nuôi cấy là $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Thời gian cho giai đoạn nuôi cấy mô sẹo cảm ứng tái sinh chồi từ 6 – 8 tuần.
- Trong quá trình nuôi cấy phải quan sát hàng ngày để loại bỏ các mẫu bị nhiễm.
- Tiêu chuẩn chồi tái sinh trực tiếp từ mô sẹo: Các chồi tái sinh trực tiếp từ mô sẹo có chiều cao > 1cm, có 2 -3 lá và có màu xanh đậm (xem hình 3C). Tỷ lệ mô sẹo tái sinh chồi đạt 98,5% và trung bình 16,8 chồi/mô sẹo.

Chú ý các thao tác với mẫu được thực hiện trong tủ cấy vô trùng, môi trường và các dụng cụ panh, đĩa cấy được khử trùng trước khi sử dụng như ở bước (a).

c) Tạo cây xoan ta tam bội hoàn chỉnh

Tách và cấy các chồi thu được từ bước (b) lên môi trường thứ ba (A3) để tạo rễ bao gồm thành phần môi trường cơ bản MS có bổ sung thêm một lượng tối ưu các thành phần: 0,5mg/l IBA hoặc 0,5mg/l NAA, 10g/l sucroza và 7 g/l agar, độ pH là 5,8.

Nuôi cấy ở điều kiện giống như ở bước (a), trong thời gian 4 tuần các chồi sẽ ra rễ tạo cây con hoàn chỉnh.

Phương án cụ thể:

- Dùng panh gấp từng cụm chồi ra đĩa cấy đã đặt giấy thấm ướt.
- Dùng lưỡi dao mổ tách riêng từng chồi ra khỏi cụm chồi thu được ở bước 2, 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 để ra rễ tạo cây con hoàn chỉnh.
- Cấy chồi lên trên môi trường theo chiều thẳng đứng, phần gốc chồi tiếp xúc với môi trường khoảng 3 – 5mm.
- Số lượng chồi cấy từ 5 - 10 chồi/bình tam giác 250ml.
- Công thức môi trường nuôi cấy: Môi trường cơ bản MS bổ sung thêm 0,5mg/l IBA hoặc 0,5mg/l NAA, 10g/l sucroza và 7g/l agar, và giá trị độ pH của môi trường nuôi cấy được chuẩn độ đến 5,8.
- Điều kiện nuôi cấy: Cường độ chiếu sáng 2500 - 3000 lux, thời gian chiếu sáng 14 giờ/ngày, nhiệt độ phòng nuôi cấy là $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Thời gian cho giai đoạn nuôi cấy tạo cây hoàn chỉnh từ 4 tuần.
- Tiêu chuẩn cây xoan ta tam bội hoàn chỉnh: Cây có chiều cao $\geq 3\text{cm}$, có 4 - 5 lá thật, bộ rễ phát triển trung bình 4 rễ/cây, không bị mô sẹo ở phần gốc, thân có màu xanh đậm (xem hình 3D). Phân tích mức độ đa bội thể bằng máy Flow cytometer giá trị đỉnh cao của ADN hạt nhân của cây xoan ta tái sinh từ mô nội nhũ gấp 1,5 lần so với cây lưỡng bội thì đó là cây xoan ta tam bội (xem hình 4C). Tỷ lệ chồi ra rễ tạo cây hoàn chỉnh đạt từ 94 -97%.

Chú ý các thao tác với mẫu được thực hiện trong tủ cấy vô trùng, môi trường và các dụng cụ panh, dao mổ, đĩa cấy, giấy thấm được khử trùng trước khi sử dụng như bước (a).

d) Huấn luyện và ra ngôi

Chuyển các bình xoan ta tam bội đã có rễ thu được từ bước (c) ra ngoài điều kiện ánh sáng tự nhiên ở nhà lưới 3 – 5 ngày để cây con 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 bao gồm 30% cát và 70% đất, tưới nước 2 lần/ngày. Trong 4 tuần đầu nếu trời nắng phải che lưới đen với độ che sáng 50%.

Phương án cụ thể:

- Huấn luyện: Để chuyển cây con từ trong phòng thí nghiệm ra vườn ươm có tỷ lệ sống cao, sinh trưởng tốt, cần huấn luyện cây thích nghi dần dần với điều kiện tự nhiên, như cụ thể sau đây:

+ Các bình cây hoàn chỉnh được 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 nấm – khuẩn chuyển ra nhà lưới huấn luyện.

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

+ Bình cây được để trong nhà lưới huấn luyện 3 – 5 ngày để cây con thích nghi dần với điều kiện tự nhiên.

- Ra ngôi:

+ Giá thể ruột bầu bao gồm thành phần: 30% cát và 70% đất.

+ Chậu trồng cây là chậu nhỏ có đường kính 10cm, cao 15cm hoặc túi bầu 8x12cm.

+ Cho giá thể ruột bầu vào chậu và xử lý giá thể bằng thuốc diệt nấm trước khi trồng 7 ngày.

+ Các cây xoan ta tam bội sau 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), chú ý tránh làm đứt rễ.

+ Trong 4 tuần đầu nếu trời nắng phải treo lưới đen với độ che sáng 50%.

+ Tưới nước 2 lần/ngày, đảm bảo độ ẩm >90%.

+ Sau 4 tuần, bón phân NPK 2g/chậu cây.

- Tiêu chuẩn cây đem trồng: Cây xoan ta sau khi ra ngôi 8 – 12 tuần tuổi đạt chiều cao 40 - 50cm, thân cứng cáp có thể đem trồng rừng.

Các bước trong quy trình sản xuất cây xoan ta tam bội cung cấp cũng bao gồm một số các yếu tố có thể thay đổi. Ví dụ: thành phần môi trường nuôi cấy, chẳng hạn như hàm lượng chất điều hòa sinh trưởng thực vật có thể thay đổi trong các môi trường tạo mô sẹo, tái sinh chồi và tạo cây hoàn chỉnh.

Theo một số phương án, môi trường nuôi cấy cảm ứng tạo mô sẹo bổ sung hàm lượng chất điều hòa sinh trưởng NAA từ 0,5mg/l đến 3,0mg/l, BAP từ 1,0mg/l đến 3,0mg/l.

Theo một số phương án, môi trường nuôi cấy tái sinh chồi bổ sung hàm lượng chất điều hòa sinh trưởng BAP từ 0,5mg/l đến 2,0mg/l và NAA từ 0,2mg/l đến 0,5mg/l.

Theo một số phương án, môi trường nuôi cấy tạo cây con hoàn chỉnh bổ sung hàm lượng chất điều hòa sinh trưởng IBA từ 0,5mg/l đến 2,0mg/l hoặc NAA từ 0,5mg/l đến 2,0mg/l.

Quy trình được cung cấp để sản xuất cây xoan ta tam bội, bao gồm các phương án cụ thể: phương pháp tách được mô nội nhũ xoan ta từ hạt non và nuôi mô nội nhũ xoan ta trên môi trường cảm ứng mô sẹo trong một khoảng thời gian hiệu quả để mô nội nhũ hình thành mô sẹo; nuôi cấy mô sẹo trên môi trường cảm ứng chồi trong một khoảng thời gian hiệu quả để tạo mô sẹo hình thành chồi; nuôi cấy chồi trên môi trường cảm ứng ra rễ trong một khoảng thời gian hiệu quả để chồi ra rễ tạo thành cây xoan ta tam bội hoàn chỉnh; và huấn luyện và ra ngôi cây xoan ta tam bội. Nuôi cấy tạo mô sẹo, tái sinh chồi và ra rễ của chồi trên các môi trường bổ sung các chất điều hòa sinh trưởng thực vật khác nhau như là axit α -naphthaleneacetic (NAA), axit indol-3-butyric (IBA) và 6-benzyl amino purin (BAP) và tổ hợp của các chất này.

Theo phương án cụ thể, môi trường nuôi cấy để nội nhũ cảm ứng tạo mô sẹo bổ sung NAA và BAP; môi trường nuôi cấy cảm ứng mô sẹo tái sinh chồi bổ sung BAP và Kinetin; và môi trường nuôi cấy để chồi cảm ứng ra rễ bổ sung IBA hoặc IBA kết hợp với NAA.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Quy trình sản xuất cây xoan ta (*Melia azedarach* Linn) tam bội bằng phương pháp nuôi cấy mô nội nhũ 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 quả xoan ta non là những cây trội sinh trưởng nhanh, thân thẳng, tròn đều, không khuyết tật – sâu bệnh và tán lá cân đối, được tuyển chọn từ lâm phần xoan ta tại Triệu Sơn – Thanh Hóa. Chọn những quả xoan ta non (3-4 tháng tuổi sau khi đậu quả) to đều không bị sâu bệnh.

– Môi trường và điều kiện nuôi cấy:

+ Môi trường nuôi cấy nội nhũ tạo mô sẹo bao gồm môi trường dinh dưỡng cơ bản MS bổ sung thêm chất điều hòa sinh trưởng NAA từ 0,5mg/l đến 3,0mg/l, BAP từ 1,0mg/l đến 3,0mg/l, 20g/l sucroza và 7g/l agar.

+ Môi trường nuôi cấy tái sinh chồi từ mô sẹo bao gồm môi trường dinh dưỡng cơ bản MS bổ sung thêm chất điều hòa sinh trưởng BAP từ 0,5mg/l đến 2,0mg/l, NAA từ 0,2mg/l đến 0,5mg/l, 30 g/l sucroza và 7g/l agar.

+ Môi trường nuôi cấy tạo cây hoàn chỉnh bao gồm môi trường dinh dưỡng cơ bản MS bổ sung thêm chất điều hòa sinh trưởng IBA từ 0,5mg/l đến 2,0mg/l hoặc NAA từ 0,5mg/l đến 2,0mg/l, 10 g/l sucroza và 7 g/l agar.

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

Bước 1: Lấy các thành phần của 1 lít môi trường cơ bản MS cho vào cốc đong định mức, cân đường sucroza (ví dụ đối với môi trường tạo mô sẹo thì cân 20g đường sucroza), 7 g/l agar cho vào cốc. Khuấy tan đều các thành phần, dùng dung dịch NaOH 1N điều chỉnh độ pH là 5,8. Khử trùng môi trường, bình tam giác có nút bông trong nồi khử trùng 20 phút ở 121°C và 1atm.

Bước 2: Pha các chất điều hòa sinh trưởng NAA, BAP, IBA, 2,4D và Kinetin ở hàm lượng 1,0mg/l và lọc qua màng lọc khuẩn. Môi trường sau khi khử trùng đặt vào tủ cấy vô trùng để nguội 60 – 70°C thì bổ sung chất điều hòa sinh trưởng thích ứng với từng công thức môi trường. Ví dụ môi trường A1 thì hút bổ sung 2,0mg/l NAA, 1,0mg/l BAP. Lắc đều và chia môi trường ra các bình tam giác 50ml dịch môi trường/bình tam giác 250ml. Bảo môi trường ở phòng nuôi vô trùng, nhiệt độ 25 ± 2°C, tối đa 2 tuần.

Ví dụ 2: Tạo mô sẹo

Quả xoan ta non (3-4 tháng tuổi, sau khi đậu quả) được rửa sạch bề mặt bằng nước máy, ngâm trong dung dịch chất tẩy nhẹ (nước xà phòng loãng) trong 5 – 10 phút, rửa lại bằng nước cất vô trùng. Sau đó khử trùng bề mặt quả trong tủ cấy vô trùng bằng cồn 70% trong 2 phút, tráng lại bằng nước cất vô trùng 4-5 lần. Bỏ quả xoan ta bằng dao đã được xử lý vô trùng. Lấy hạt non để tách bỏ hoàn toàn phôi, vỏ hạt lấy riêng nội nhũ và cấy trên môi trường tạo mô sẹo.

Nội nhũ được nuôi cấy trên môi trường A1 bao gồm MS + 20g/l sucroza + 7g/l agar, bổ sung thêm các chất điều hòa sinh trưởng (2,4-D, NAA, BAP và Kinetin) có hàm lượng khác nhau, trong bảng 1 dưới đây thể hiện 12 công thức với hàm lượng chất điều hòa sinh trưởng khác nhau và 1 công thức đối chứng không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng.

Mô nội nhũ cũng được nuôi cấy trên môi trường MS không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng làm đối chứng. Mỗi công thức nuôi cấy được bố trí với 30 mô nội nhũ (cấy 10 mô nội nhũ/bình) và thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Nuôi mẫu cấy ở điều kiện: trong 3 tuần đầu, mẫu được nuôi tối hoàn toàn trong tủ tối, sau đó đưa ra nuôi sáng với cường độ chiếu sáng 2500 - 3000 lux, thời gian chiếu sáng 14 giờ/ngày, nhiệt độ phòng nuôi cấy là $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Số mô sẹo được hình thành được thống kê ở tuần thứ 8; số mô nội nhũ cảm ứng tạo mô sẹo được tính giá trị trung bình của kết quả 3 lần lặp lại cho mỗi công thức; tỷ lệ mô nội nhũ cảm ứng tạo mô sẹo được tính bằng số mô nội nhũ cảm ứng tạo mô sẹo/số mô nội nhũ nuôi cấy ban đầu, giá trị trung bình được tính dựa trên kết quả 3 lần lặp lại cho mỗi công thức.

Sau 8 tuần nuôi cấy mô nội nhũ trên 12 công thức với hàm lượng chất điều hòa sinh trưởng khác nhau và 1 công thức đối chứng không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng. Trong đó công thức môi trường EX9 cho tỉ lệ nội nhũ tạo mô sẹo là cao nhất.

Bảng 1. Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng tạo mô sẹo từ nội nhũ chưa trưởng thành ở hạt xoan ta non.

Công thức	Hàm lượng (mg/l)				Tỉ lệ nội nhũ tạo mô sẹo (%)
	2,4-D	NAA	BAP	Kinetin	
EX1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,00
EX2	1,0	0,5	-	-	10,12
EX3	1,5	1,0	-	-	15,04
EX4	3,0	1,5	-	-	17,96
EX5	1,0	-	1,5	-	13,33
EX6	1,5	-	2,0	-	17,04
EX7	3,0	-	3,0	-	18,85
EX8	-	1,0	0,5	-	23,75
EX9	-	2,0	1,0	-	55,86
EX10	-	3,0	1,5	-	38,05
EX11	-	1,0	-	0,5	16,00
EX12	-	2,0	-	1,0	24,54
EX13	-	3,0	-	1,5	25,32

Trên tất cả các công thức môi trường bổ sung chất điều hòa sinh trưởng thực vật NAA, BAP, 2,4-D và Kinetin đều cho kết quả mô nội nhũ cảm ứng tạo mô sẹo. Chất điều hòa sinh trưởng thực vật là rất cần thiết cho mô nội nhũ tách từ hạt xoan ta non cảm ứng tạo mô sẹo. Mô nội nhũ không cảm ứng hình thành mô sẹo khi nuôi cấy trên môi trường MS không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng thực vật. Sự hình thành mô

sẹo được quan sát thấy trên bề mặt của một số mô nội nhũ sau 3 - 4 tuần nuôi cấy trên các môi trường có NAA và BAP hoặc 7-8 tuần nuôi cấy trên các môi trường có NAA, 2,4-D và Kinetin. Sau 8 tuần nuôi cấy, tỷ lệ mô nội nhũ cảm ứng tạo mô sẹo có sự khác biệt ý nghĩa ở các môi trường nuôi cấy có thành phần, hàm lượng chất điều hòa sinh trưởng thực vật khác nhau (bảng 1). 2,4-D và NAA là chất điều hòa sinh trưởng thực vật thuộc nhóm auxin, nhưng 2,4-D có hiệu quả thấp hơn trong việc cảm ứng mô nội nhũ xoan ta tạo mô sẹo so với NAA khi được sử dụng kết hợp với BAP. Tỷ lệ mô nội nhũ xoan ta cảm ứng tạo mô sẹo cao nhất (55,86%) thu được trên môi trường MS bổ sung 2,0mg/l NAA và 1,0mg/l BAP, và thấp nhất (10,12%) thu được trên môi trường MS bổ sung 1,0mg/l 2,4-D và 0,5mg/l NAA. Từ đó tác giả sáng chế chọn môi trường MS bổ sung 2,00mg/l NAA và 1,0mg/l BAP là môi trường thích hợp cho nuôi cấy nội nhũ xoan ta tạo mô sẹo trong quy trình này.

Ví dụ 3: Tái sinh chồi

Sau 8 tuần nuôi cấy, các khối mô sẹo được hình thành trên môi trường cảm ứng mô sẹo được cấy chuyển sang môi trường cảm ứng tái sinh chồi bổ sung chất điều hòa sinh trưởng thực vật BAP và NAA với các hàm lượng khác nhau (xem bảng 2), gồm 4 công thức có hàm lượng BAP (0,5 mg/l – 2,0 mg/l), 6 công thức kết hợp có hàm lượng BAP (1,0 mg/l – 2,0 mg/l) và NAA (0,2 mg/l – 0,5 mg/l), 1 công thức đối chứng không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng thực vật. Các khối mô sẹo cũng được nuôi cấy trên môi trường MS không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng thực vật làm công thức đối chứng. Mỗi công thức nuôi cấy được bố trí với 30 mô sẹo (5 mô sẹo/bình tam giác 250ml) và thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Nuôi cấy 6-8 tuần dưới ánh sáng đèn đèn. Thống kê số lượng mô sẹo tái sinh chồi tại tuần thứ 8 nuôi cấy. Tỷ lệ mô sẹo tái sinh chồi được tính bằng số lượng mô sẹo tái sinh chồi chia cho số lượng mô sẹo nuôi cấy ban đầu ở mỗi công thức nuôi cấy.

Sau 8 tuần nuôi cấy trên các công thức môi trường cảm ứng tái sinh chồi, ở tất cả công thức môi trường có bổ sung chất điều hòa sinh trưởng thực vật hàm lượng khác nhau đều có mô sẹo tái sinh chồi nhưng với tỷ lệ khác nhau có ý nghĩa. Tỷ lệ mô sẹo tái sinh chồi lớn nhất thu được trên công thức môi trường bổ sung 1,5mg/l BAP và 0,5mg/l NAA (98,5% mô sẹo tái sinh chồi) với trung bình 16,8 chồi/mô sẹo (xem bảng 2). Mô sẹo nuôi cấy trên môi trường MS không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng thực vật không có khả năng tái sinh chồi.

Từ kết quả thí nghiệm thu được, tác giả sáng chế chọn môi trường MS bổ sung 1,5mg/l BAP và 0,5mg/l NAA là môi trường thích hợp cho nuôi cấy mô sẹo có nguồn gốc từ nội nhũ tái sinh chồi trong quy trình này.

Bảng 2: Ảnh hưởng của tổ hợp chất điều hoà sinh trưởng BAP và NAA đến khả năng tái sinh chồi từ mô sẹo nguồn gốc nội nhũ

Công thức	BAP (mg/l)	NAA (mg/l)	Tỉ lệ mô sẹo tái sinh chồi (%)	Số chồi/mẫu cấy
ĐC	-	-	0,00	-
EC1	0,5	-	34,29	5,2
EC2	1,0	-	73,57	6,5
EC3	1,5	-	65,33	5,8
EC4	2,0	-	56,33	4,0
EC5	1,0	0,2	77,57	9,5
EC6	1,5	0,2	90,33	10,5
EC7	2,0	0,2	87,43	10,8
EC8	1,0	0,5	92,00	12,2
EC9	1,5	0,5	98,50	16,8
EC10	2,0	0,5	85,33	16,5

Ví dụ 4: Tạo cây xoan ta tam bội hoàn chỉnh

Các chồi xoan ta tái sinh từ mô sẹo trên môi trường cảm ứng tái sinh chồi, sau 8 tuần nuôi cấy có kích thước khoảng 1,5 - 2,0cm được cấy chuyển sang môi trường cảm ứng ra rễ MS bổ sung chất điều hòa sinh trưởng thực vật IBA hoặc NAA với hàm lượng khác nhau (xem bảng 3). Mỗi công thức nuôi cấy được bố trí với 30 chồi (5 chồi/bình tam giác 250ml) và thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Quan sát thấy tại thời điểm 3 tuần nuôi cấy, trên tất cả công thức có chất điều hòa sinh trưởng thực vật đều có chồi ra rễ nhưng với tỷ lệ khác nhau, công thức đối chứng không có chồi ra rễ. Tỷ lệ chồi ra rễ cao nhất ở công thức môi trường có 0,5mg/l IBA là 97,06 %, trung bình 5,8 rễ/cây, rễ có nhiều lông hút sau 4 tuần nuôi. Từ đó tác giả sáng chế chọn môi trường MS bổ sung 0,5mg/l IBA là môi trường thích hợp cho nuôi cấy chồi xoan ta ra rễ tạo cây hoàn chỉnh.

Bảng 3: Ảnh hưởng của chất điều hoà sinh trưởng NAA/IBA đến khả năng ra rễ của chồi xoan ta có nguồn gốc mô nội nhũ.

Công thức	NAA (mg/l)	IBA (mg/l)	Tỉ lệ chồi ra rễ (%)	Số rễ / cây	Mô sẹo ở gốc
ĐC	-	-	0,00	-	
ER1	0,5	-	94,45	4,5	không
ER2	1,0	-	83,55	2,5	nhỏ
ER3	1,5	-	45,48	2,2	to
ER4	2,0	-	35,33	1,8	to
ER5		0,5	97,06	5,8	không
ER6		1,0	92,35	5,0	không
ER7		1,5	78,33	3,0	to
ER8		2,0	62,00	2,3	to

Ví dụ 5: Xác định cây xoan ta tam bội

Mức độ bội thể của các cây xoan ta được xác định bằng kỹ thuật nhuộm nhân và phát hiện huỳnh quang bằng máy đếm tế bào theo dòng chảy. Mức độ bội thể được xác định dựa trên ADN tổng số có trong mỗi nhân tế bào. ADN nhân được tách chiết bằng bộ kit Partec Cystain PI absolute theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Lấy 50mg lá non của cây xoan ta có nguồn gốc tái sinh từ mô nội nhũ hoặc phôi hữu tính, lá được cắt nhỏ và đặt trong đĩa petri nhỏ chứa 500µl dung dịch tách nhân. Các chất chiết xuất được lọc qua màng lọc Partec 30mm CellTrics, sau đó nhuộm với 2ml dung dịch đệm DAPI. Mẫu lá non của cây xoan ta tái sinh có nguồn gốc từ phôi hữu tính được sử dụng làm mẫu đối chứng cây lưỡng bội (2n). Mẫu cây xoan ta tam bội (3n) được xác định bằng cách so sánh bởi đường cường độ tuyến tính huỳnh quang của chúng (ADN chứa trong mỗi nhân) với mẫu xoan ta lưỡng bội (2n) làm đối chứng. Nếu mẫu lá của cây xoan ta tái sinh có nguồn gốc từ mô nội nhũ có hơn 50% ADN trong nhân tế bào so với mẫu lá của cây tái sinh có nguồn gốc từ phôi hữu tính (2n), thì cây này được đánh giá là cây tam bội (3n).

Khi xác định được cây xoan ta tam bội, để tránh sai sót trong thí nghiệm xác định mức độ đa bội thể, mô lá của cây xoan ta lưỡng bội (2n) và cây xoan ta tam bội (3n) được trộn lại với nhau để phân tích. Nếu biểu đồ cường độ huỳnh quang có hai đỉnh khác nhau với tỷ lệ 1:1,5 thì khẳng định cây xoan tam bội là chính xác.

Lấy ngẫu nhiên 30 dòng xoan ta tái sinh độc lập có nguồn gốc từ mô nội nhũ và 5 cây xoan ta tái sinh độc lập có nguồn gốc từ phôi hữu tính để xác định mức độ bội

thể theo phương pháp mô tả ở trên. Tất cả 5 cây xoan ta tái sinh độc lập có nguồn gốc từ phôi hữu tính đều là cây lưỡng bội ($2n$) thể hiện phổ như hình 4A. Trong khi đó, tất cả 30 dòng cây xoan ta tái sinh độc lập có nguồn gốc từ mô nội nhũ đều là cây tam bội ($3n$) thể hiện phổ như hình 4B. Hình 4C là phổ của cây xoan ta lưỡng bội ($2n$) và tam bội ($3n$), giá trị cường độ huỳnh quang đỉnh ADN của nhân xoan ta tam bội bằng 1,5 lần so với ADN của nhân xoan ta lưỡng bội.

Ví dụ 6: Huấn luyện và trồng cây xoan tam bội ở nhà lưới

Các cây xoan ta tam bội và lưỡng bội ra rễ trên môi trường cảm ứng ra rễ sau 4 tuần nuôi, được huấn luyện trong nhà lưới 3-5 ngày để cây thích nghi dần với điều kiện tự nhiên trước khi lấy ra khỏi bình. Sau thời gian huấn luyện, cây được rửa sạch, loại bỏ agar dưới vòi nước chảy và được cấy vào chậu đã chuẩn bị giá thể ruột bầu. Đặt chậu cây trong nhà lưới có mái che bằng lưới đen tránh ánh sáng mặt trời chiếu trực xạ, tưới nước 2 lần/ngày đảm bảo độ ẩm $>90\%$. Sau 4 tuần trồng bón phân NPK 2g/chậu.

Lấy 50 cây xoan ta tam bội trồng trong chậu đất như phương pháp mô tả ở trên. Tất cả 50 cây xoan ta tam bội đều sống sót và cây sinh trưởng bình thường, ra 4 – 5 cặp lá mới sau 5 tuần tuổi.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Việc áp dụng quy trình sản xuất cây xoan ta tam bội theo sáng chế đã rút ngắn được thời gian tạo giống cây tam bội theo phương pháp truyền thống khoảng 10 – 12 năm. Quy trình sản xuất cây xoan ta tam bội theo sáng chế có thể áp dụng để sản xuất được hàng loạt các dòng cây xoan ta tam bội sinh trưởng nhanh và có thể tích thân lớn phục vụ trồng rừng cung cấp gỗ lớn hiệu quả cao. Việc gây trồng rừng bằng cây xoan ta tam bội sẽ nâng cao được năng suất của rừng trồng, rút ngắn chu kỳ sản xuất của loài cây gỗ lớn này. Đặc biệt, cây xoan ta tam bội sẽ có kích thước thân lớn, chống chịu tốt hơn với các điều kiện bất lợi của môi trường nên có thể gây trồng được trên các điều kiện lập địa khó khăn, từ đó mở rộng được diện tích trồng rừng. Dự báo trồng rừng từ các dòng xoan ta tam bội năng suất rừng trồng sẽ tăng ít nhất 30% so với trồng cây từ hạt (cây lưỡng bội) và rút ngắn được chu kỳ kinh doanh xuống 2-3 năm.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình sản xuất cây xoan ta (*Melia azedarach* Linn) tam bội bằng phương pháp nuôi cấy mô nội nhũ bao gồm các bước:

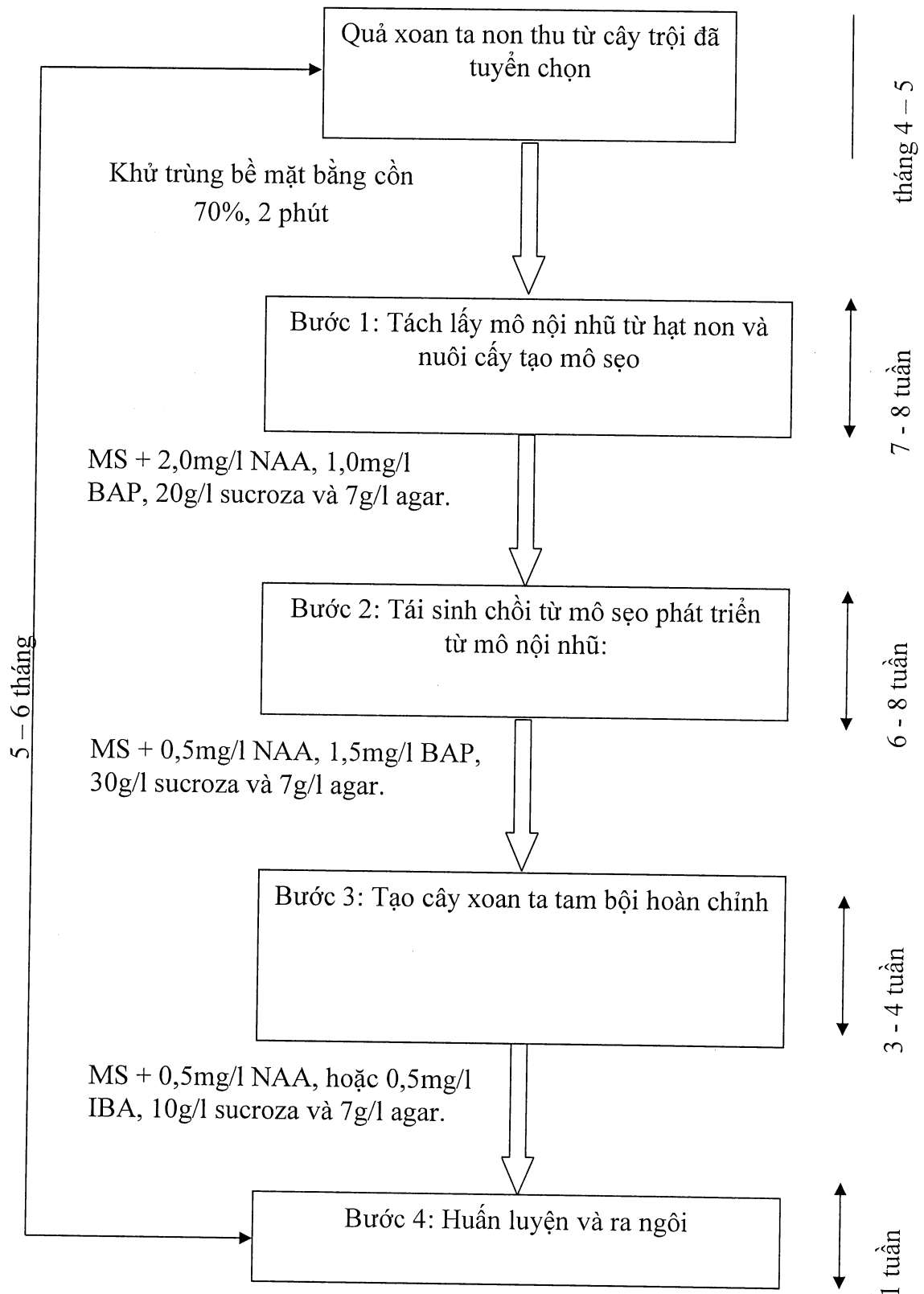
a) tạo mô sẹo: khử trùng quả xoan ta non (3-4 tháng tuổi sau khi đậu quả) được lấy từ những cây trội tại rừng giống, dùng dao mổ tách bỏ phần thịt quả và lấy hạt non, sau đó dùng dao mổ tách lấy phần mô nội nhũ loại bỏ phần vỏ hạt và phôi, cấy mô nội nhũ vào môi trường cảm ứng tạo mô sẹo thứ nhất (A1) bao gồm thành phần môi trường cơ bản MS có bổ sung thêm một lượng tối ưu các thành phần 2,0mg/l NAA, 1,0mg/l BAP, 20g/l sucroza và 7g/l agar, độ pH là 5,8, nuôi cấy ở điều kiện 3 tuần đầu, mẫu được nuôi tối hoàn toàn, sau đó đưa ra nuôi sáng với cường độ chiếu sáng 2500 - 3000 lux, thời gian chiếu sáng 14 giờ/ngày, nhiệt độ phòng nuôi cấy là $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, thời gian giai đoạn tạo mô sẹo từ 7 – 8 tuần;

b) tái sinh chồi: cấy chuyển mô sẹo thu được từ bước (a) sang môi trường thứ 2 (A2) bao gồm thành phần môi trường cơ bản MS có bổ sung thêm một lượng tối ưu các thành phần 0,5mg/l NAA, 1,5mg/l BAP, 30g/l sucroza và 7g/l agar, độ pH là 5,8, nuôi cấy ở điều kiện giống như ở bước (a), thời gian giai đoạn tạo tái sinh chồi từ 6 – 8 tuần;

c) tạo cây xoan ta tam bội hoàn chỉnh: tách và cấy các chồi thu được từ bước (b) lên môi trường thứ ba (A3) để tạo rễ bao gồm thành phần môi trường cơ bản MS có bổ sung thêm một lượng tối ưu các thành phần 0,5mg/l IBA hoặc 0,5mg/l NAA, 10g/l sucroza và 7 g/l agar, độ pH là 5,8, nuôi cấy ở điều kiện giống như ở bước (a), trong thời gian 4 tuần các chồi sẽ ra rễ tạo cây hoàn chỉnh; và

d) huấn luyện và ra ngôi: chuyển các bình xoan ta tam bội đã có rễ thu được từ bước (c) ra ngoài điều kiện ánh sáng tự nhiên ở nhà lưới 3 - 5 ngày để cây con thích nghi dần với điều kiện tự nhiên, sau đó lấy cây ra khỏi bình, rửa sạch bằng nước và cấy vào giá thể bao gồm 30% cát và 70% đất, tưới nước 2 lần/ngày, trong 4 tuần đầu nếu trời nắng phải che lưới đen với độ che sáng 50%.

Hình 1



1897

Hình 2



