



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

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

(11)



2-0002636

(51)⁷ **A01H 5/04**

(13) **Y**

(21) 2-2019-00168

(22) 16/05/2019

(45) 25/06/2021 399

(43) 25/07/2019 376A

(73) Phạm Thị Lý (VN)

Nhà số 63, Cao Lỗ, thôn Phan Xá, huyện Đông Anh, thành phố Hà Nội

(72) Nguyễn Việt Anh (VN); Nguyễn Trung Hiếu (VN).

(54) **QUY TRÌNH NHÂN GIỐNG CÂY GONIOTHALAMUS VIETNAMENSIS BAN BẰNG
KỸ THUẬT NUÔI CẤY MÔ**

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình nhân giống cây *Goniothalamus vietnamensis* Ban bằng phương pháp nuôi cấy mô, trong đó phương pháp này bao gồm các bước: a) chuẩn bị mẫu vô trùng; b) nhân phôi hữu tính; c) phân biệt hóa phôi hữu tính; d) nhân nhanh mô sẹo; e) biệt hóa mô sẹo thành phôi; f) nảy mầm phôi vô tính; g) thu cây *Goniothalamus vietnamensis* Ban nuôi cấy mô; và h) thu cây *Goniothalamus vietnamensis* Ban giống. Quy trình theo giải pháp sử dụng than hoạt tính để hấp thụ sản phẩm trao đổi chất gây ức chế quá trình nhân của *Goniothalamus vietnamensis* Ban để tăng hệ số nhân cho phép nhân giống được cây *Goniothalamus vietnamensis* Ban với hệ số nhân cao.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích thuộc lĩnh vực công nghệ sinh học thực vật, cụ thể là giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình nhân giống cây *Goniothalamus vietnamensis* Ban bằng kỹ thuật nuôi cấy mô.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Cây *Goniothalamus vietnamensis* Ban theo giải pháp hữu ích thuộc họ Na (Annonaceae) là loài cây được xếp vào loại sẽ nguy cấp (VU) trong sách đỏ Việt Nam được nhà thực vật học Nguyễn Tiến Bân mô tả lần đầu vào năm 2000. Đây là một loại cây bụi nhỏ, cao từ 2 đến 3 mét, lá thuôn hình trứng ngược, bản to, rộng từ 7 đến 10 cm, dài từ 20 đến 35 cm, gân bên từ 10 đến 14 cặp. Hoa ở nách lá, thường là hoa đơn, cánh hình mác, nhị hoa có chiều dài cỡ khoảng 1mm, lá noãn từ 15 đến 20 mm, quả đơn, hình trụ cỡ khoảng 3x0,5cm. Cây *Goniothalamus vietnamensis* Ban ra hoa vào tháng 4-6, quả từ 7-10, mọc rải rác trong rừng thứ sinh. Phân bố ở miền Bắc Việt Nam, từ Cao Bằng, Quảng Ninh, Phú Thọ đến Hà Tây. Cây *Goniothalamus vietnamensis* Ban phát triển chậm, không có cành, chỉ có một thân và rễ cọc duy nhất màu đen, mùi thơm, trong rễ chứa nhiều saponin với hàm lượng lên tới 4% có mùi thơm đặc trưng. Do đặc tính một rễ cọc màu đen nên cây *Goniothalamus vietnamensis* Ban còn được gọi là cây Bỏ béo đen, cây sâm Ngọc Bảo, cây sâm một cọc và đã được khai thác, sử dụng làm thuốc.

Trên thế giới, có rất ít nghiên cứu liên quan đến cây *Goniothalamus vietnamensis* Ban, duy nhất chỉ có trong Dược điển Hàn Quốc có đề cập đến cây *Goniothalamus vietnamensis* với thử nghiệm kháng khối u, có tác dụng ức chế tế bào ung thư. Ngoài ra, ngay tại Việt Nam, cây *Goniothalamus vietnamensis* Ban ít được chú ý và thường được xếp sau cả Đinh lăng, tam thất do ít có nghiên cứu liên quan đến loài cây này.

Tuy nhiên, trong các cộng đồng dân tộc vùng cao, cây *Goniothalamus vietnamensis* Ban này đã được sử dụng từ lâu để ngâm rượu với tác dụng như tráng dương, bổ thận, tăng cường sức khỏe, dẻo dai. Được biết đến với nhiều công dụng, nhưng trong các tài liệu Việt Nam, cây *Goniothalamus vietnamensis* Ban chỉ được mô

tả một cách sơ sài và gần đây mới có một số nghiên cứu liên quan đến việc chiết tách hàm lượng saponin có trong cây sâm này và được cộng đồng chú ý.

Với đặc tính sinh trưởng, cây *Goniothalamus vietnamensis* Ban phát triển chậm và đặc biệt chúng chỉ có thể nhân giống thông qua hạt do cây không thể giâm hoặc chiết cành như các loài cây khác vì chúng không phát triển cành. Đồng thời, việc khai thác cây đồng nghĩa với việc phải nhổ để lấy rễ khiến cho cây bị tận diệt. Ngoài ra, với lượng quả ở nách lá thấp, nên hệ số tái sinh của cây này rất thấp. Điều này khiến cây có khả năng đứng trước nguy cơ bị khai thác cạn kiệt.

Hiện đang có một nhu cầu lớn đối với cây *Goniothalamus vietnamensis* Ban giống để có thể phát triển được ngành dược liệu. Tuy nhiên, các tác giả đã nghiên cứu và nhận thấy rằng, đối với cây *Goniothalamus vietnamensis* Ban, việc nhân giống thành công là rất khó và hiện chưa hề có nghiên cứu nào công bố nhân giống thành công cây *Goniothalamus vietnamensis* Ban bằng phương pháp nuôi cấy mô. Đã có một số nhà nghiên cứu đã chỉ ra rằng, ngoài việc khó khăn về lượng mẫu, có một rào cản về mặt kỹ thuật đó là trong quá trình nuôi cấy mô, các mẫu mô nuôi cấy cho hệ số tái sinh rất thấp và chúng thường có xu hướng tự chết không rõ nguyên nhân. Điều này ảnh hưởng lớn đến khả năng phát triển nguồn dược liệu cây *Goniothalamus vietnamensis* Ban.

Các phương pháp nhân giống bằng phương pháp nuôi cấy mô nói chung đều dựa vào học thuyết về tính toàn vẹn của tế bào, biệt hóa và phản biệt hóa, do đó, với việc nhân giống vô tính cây *Goniothalamus vietnamensis* Ban, việc bắt buộc phải phản biệt hóa tế bào sinh dưỡng trở thành tế bào toàn năng, từ đó biệt hóa để phát triển thành cây hoàn chỉnh. Ngoài ra, đối với kỹ thuật nhân giống cây nói chung, có ba vấn đề ảnh hưởng đến tỷ lệ cây sâm giống thu được. Thứ nhất, đối với hệ số nhân, khi tăng hệ số nhân sẽ tỷ lệ thuận với tỷ lệ đột biến phôi và tỷ lệ nghịch với chất lượng phôi thu được, do đó cần phải tối ưu các hormon thực vật được sử dụng trong quá trình nhân và phụ thuộc vào loài và kinh nghiệm người nhân giống. Thứ hai, đã biết trong phương pháp nuôi cấy rắn, hệ số nhân thấp, nhưng thu được phôi khỏe hơn, ngược lại, nếu nuôi trong môi trường lỏng, hệ số nhân cao hơn, nhưng tỷ lệ thủy tinh hóa phôi lớn và chất lượng phôi thu được kém. Thứ ba, trong quá trình đưa cây ra ngoài vườn ươm, cây thường bị sốc bởi điều kiện ngoại cảnh khác với điều kiện trong phòng thí nghiệm và bị tấn công bởi vi khuẩn do môi trường dinh dưỡng còn trên thân, củ, rễ cây nuôi cấy

là môi trường kích thích vi khuẩn phát triển. Điều này ảnh hưởng trực tiếp đến hiệu suất nhân giống cây.

Do đó, cần có quy trình có khả năng nhân giống cây *Goniothalamus vietnamensis* Ban với hệ số nhân cao, đảm bảo được khả năng tái sinh cây *Goniothalamus vietnamensis* Ban, vừa đảm bảo phát triển được vùng nguyên liệu bền vững vừa góp phần tăng cường chất lượng và nâng cao hiệu quả của ngành dược liệu đáp ứng nhu cầu của người tiêu dùng.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Mục đích của giải pháp hữu ích là nhằm giải quyết các vấn đề nêu trên. Theo đó, giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình nhân giống cây *Goniothalamus vietnamensis* Ban bằng kỹ thuật nuôi cấy mô, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) chuẩn bị mẫu vô trùng bằng cách thu quả cây *Goniothalamus vietnamensis* Ban tươi, tách bỏ lớp vỏ bao và ngâm trong dung dịch NaClO 1% trong 10 phút, sau đó tách lớp vỏ hạt và xử lý bằng dung dịch etanol 70% trong 1 phút, sau khi rửa lại bằng nước cất vô trùng, thu được mẫu hạt cây *Goniothalamus vietnamensis* Ban vô trùng;

b) nhân phôi hữu tính bằng cách tách vỏ hạt thu phôi hữu tính và cấy trên môi trường thạch MS bổ sung 50 g/l đường, 10 ppm GA₃ và nuôi trong khoảng 4 tuần trong điều kiện quang chu kỳ từ 8 đến 10 tiếng/ngày ở 25°C thu được phôi hữu tính;

c) phản biệt hóa phôi hữu tính bằng cách cắt phân lớp theo chiều ngang phôi hữu tính dày khoảng 1mm và cấy lớp mỏng trên bề mặt môi trường thạch MS bổ sung 50 ppm GA₃, 50ppm BA, 30 g/l đường, 100 ml/l nước dừa và 5 g/l than hoạt tính và nuôi cấy trong từ 1 đến 2 tháng, quang chu kỳ từ 8 đến 10 tiếng/ngày ở 25°C để phản biệt hóa phôi thu được mô sẹo;

d) nhân nhanh mô sẹo bằng cách cấy cụm mô sẹo vào trong môi trường SH bổ sung 50 ppm BA, 30 g/l đường, 100 ml/l nước dừa và 5 g/l than hoạt tính và nuôi cấy trong điều kiện lắc với tốc độ 50 vòng/phút, mỗi chu kỳ cấy chuyển 2 tháng, quang chu kỳ từ 8 đến 10 tiếng/ngày ở 25°C để nhân nhanh mô sẹo;

e) biệt hóa mô sẹo thành phôi bằng cách cấy các cụm mô sẹo vào môi trường SH bổ sung 0,3 mg/l Kinetin, 0,2 mg/l TDZ, 30 g/l đường, 10 g/l than hoạt tính, tiến hành

siêu âm trong 15 phút để tách cụm mô sẹo và nuôi cấy trên máy lắc với tốc độ lắc 200 vòng/phút trong 1 tháng, quang chu kỳ 10 tiếng/ngày ở 25°C để biệt hóa mô sẹo thành các phôi vô tính;

f) nảy mầm phôi vô tính bằng cách gieo phôi này vào môi trường thạch MS bổ sung 20 ppm GA₃, 20 ppm BA, 30 g/l đường, 100 ml/l nước dừa và 20 g/l than hoạt tính trong thời gian 2 tháng, quang chu kỳ từ 10 tiếng/ngày ở 25°C thu được phôi nảy mầm và đâm rễ;

g) thu cây *Goniiothalamus vietnamensis* Ban nuôi cấy mô bằng cách cấy phôi đã nảy mầm và đâm rễ lên môi trường thạch SH bổ sung 2 mg/l BA, 0,5 mg/l NAA, 30 g/l đường, 25 g/l than hoạt tính và nuôi trong 2 tháng, quang chu kỳ từ 10 đến 12 tiếng/ngày ở 25°C thu được cây *Goniiothalamus vietnamensis* Ban nuôi cấy mô có đầy đủ chồi và rễ; và

h) thu cây *Goniiothalamus vietnamensis* Ban giống bằng cách cấy chuyển cây *Goniiothalamus vietnamensis* Ban nuôi cấy mô có kích thước khoảng từ 5 đến 7 cm vào môi trường thạch ½ SH bổ sung 150 mg/l KH₂PO₄, 30 g/l than hoạt tính và nuôi cấy trong 2 tháng ở nhiệt độ từ 20 đến 25°C, quang chu kỳ từ 10 đến 12 tiếng/ngày thu được cây *Goniiothalamus vietnamensis* Ban giống.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó quy trình này còn bao gồm bước chuyển cây ra ngoài vườn ươm bằng cách xử lý cây *Goniiothalamus vietnamensis* Ban giống bằng dung dịch NaClO 1% trước khi đưa ra trồng trên giá thể bao gồm mùn/đất sét theo tỷ lệ 1:3 trọng lượng.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó trong đó chu kỳ cấy chuyển để nhân nhanh mô sẹo ở bước nhân nhanh không quá 10 lần.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Sau đây, giải pháp hữu ích mô tả chi tiết các phương án cụ thể, tuy nhiên, các phương án này chỉ nhằm mục đích nhằm bộc lộ giải pháp hữu ích chứ không nhằm mục đích hạn chế phạm vi yêu cầu bảo hộ của giải pháp hữu ích.

Theo giải pháp hữu ích, các môi trường nhân giống được đề cập, ví dụ môi trường MS, môi trường SH được sử dụng là môi trường chuẩn đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và có thể tìm thấy trong các tài liệu chuyên ngành. Các chất điều hòa sinh

trường thực vật, ví dụ, kinetin, axit gibberlic (GA3), thidiazuron (TDZ), 6-Benzylaminopurine (BA), axit 1-naphthaleneacetic (NAA) được sử dụng theo giải pháp đều là những chất điều hòa sinh trưởng thực vật đã biết và được sử dụng rộng rãi trong công nghệ nuôi cấy mô tế bào thực vật, ví dụ, xem “Giáo trình nuôi cấy mô tế bào thực vật”, trường Đại học Nông nghiệp. Ngoài ra, môi trường thạch MS, môi trường thạch SH được sử dụng đề cập đến môi trường tương ứng có bổ sung từ 7 đến 10 g thạch để tạo ra môi trường đặc để sử dụng trong nuôi cấy mô.

Cây *Goniothalamus vietnamensis* Ban được nhân giống theo giải pháp hữu ích thuộc họ Na (Annonaceae) là loài cây được xếp vào loại sẽ nguy cấp (VU) trong sách đỏ Việt Nam. Đây là một loại cây bụi nhỏ, cao từ 2 đến 3 mét, lá thuôn hình trứng ngược, bản to, rộng từ 7 đến 10 cm, dài từ 20 đến 35 cm, gân bên từ 10 đến 14 cặp. Hoa ở nách lá, thường là hoa đơn, cánh hình mác, nhị hoa có chiều dài cỡ khoảng 1mm, lá noãn từ 15 đến 20 mm, quả đơn, hình trụ cỡ khoảng 3x0,5cm. Cây *Goniothalamus vietnamensis* Ban ra hoa vào tháng 4-6, quả từ 7-10, mọc rải rác trong rừng thứ sinh. Phân bố ở miền Bắc Việt Nam, từ Cao Bằng, Quảng Ninh, Phú Thọ đến Hà Tây. Cây *Goniothalamus vietnamensis* Ban phát triển chậm, không có cành, chỉ có một thân và rễ cọc duy nhất màu đen, mùi thơm, trong rễ chứa nhiều saponin với hàm lượng lên tới 4% có mùi thơm đặc trưng. Do đặc tính một rễ cọc màu đen nên cây *Goniothalamus vietnamensis* Ban còn được gọi là cây Bồ bèo đen, cây sâm Một cọc và đã được khai thác, sử dụng làm thuốc.

Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình nhân giống cây *Goniothalamus vietnamensis* Ban bằng kỹ thuật nuôi cấy mô, trong đó quy trình này bao gồm các bước: a) chuẩn bị mẫu vô trùng; b) nhân phôi hữu tính; c) phản biệt hóa phôi hữu tính; d) nhân nhanh mô sẹo; e) biệt hóa mô sẹo; f) nảy mầm phôi vô tính; g) thu cây *Goniothalamus vietnamensis* Ban nuôi cấy mô; và h) thu cây *Goniothalamus vietnamensis* Ban giống.

Trong bước chuẩn bị mẫu vô trùng, vật liệu được sử dụng để nhân giống là quả tươi của cây *Goniothalamus vietnamensis* Ban. Để thuận lợi cho quá trình nhân, tốt nhất hạt tươi là hạt thu được từ quả chưa chín, nghĩa là mẫu phôi chưa thành thực. Đây là quá trình quyết định đến toàn bộ quá trình nhân giống vì nếu không thu được mẫu khởi đầu sẽ không thực hiện được các bước tiếp theo. Theo đó quả tươi chưa chín được thu hái tách bỏ lớp bao ngoài và ngâm trong dung dịch NaClO 1% trong 10 phút.

Tiếp đó, tách lớp vỏ hạt và xử lý bằng dung dịch etanol 70% trong 1 phút. Sau khi rửa sạch lại bằng nước cất vô trùng thu được mẫu vô trùng. Mẫu này được sử dụng để làm vật liệu khởi đầu nuôi cấy.

Trong bước nhân phôi hữu tính, mẫu hạt sau khi được vô trùng được tách vỏ hạt thu lấy phần phôi hữu tính. Phôi được cấy trên môi trường thạch MS bổ sung 50 g/l đường, 10ppm GA₃. Trong quá trình nuôi cấy, giữ nhiệt độ ổn định ở 25°C và nuôi trong khoảng từ 4 tuần. Thời gian chiếu sáng từ 8 đến 10 tiếng/ngày. Sau khi nuôi cấy, phôi hữu tính ban đầu được nảy mầm phát triển thành cụm phôi. Cụm phôi hữu tính này được sử dụng như vật liệu thứ cấp để nhân thành số lượng nhiều phôi đơn lẻ.

Trong bước phản biệt hóa phôi hữu tính, vật liệu phôi hữu tính được cắt phân lớp theo chiều ngang với chiều dày khoảng 1mm và cấy lớp mỏng trên bề mặt môi trường thạch MS bổ sung 50 ppm GA₃, 50 ppm BA, 30 g/l đường, 100 ml/l nước dừa và 5 g/l than hoạt tính. Các tác giả đã nghiên cứu và phát hiện ra rằng, trong quá trình sinh trưởng, mẫu thực vật tiết ra chất ức chế ngược quá trình phát triển, khiến mẫu không phát triển và chết dần. Việc sử dụng các hormon thực vật cho thấy, để phản biệt hóa phôi, sử dụng phức hợp GA₃ và BA sẽ giúp quá trình phản biệt hóa xảy ra nhanh. Theo đó, để biệt hóa, các tác giả đã sử dụng than hoạt tính và phức hợp GA₃ và BA để nuôi cấy mẫu trong từ 1 đến 2 tháng. Điều kiện nuôi cấy ở quang chu kỳ từ 8 đến 10 tiếng/ngày ở 25°C. Kết quả, sau khi phản biệt hóa phôi thu được mô sẹo để làm nguyên liệu nhân nhanh giống.

Trong bước nhân nhanh mô sẹo, các tác giả đã đưa ra phương pháp nuôi cấy mô sẹo trong môi trường lỏng kết hợp lắc rung kèm than hoạt tính. Theo đó, các cụm mô sẹo phôi hữu tính được chuyển vào môi trường nuôi cấy lỏng bao gồm SH bổ sung 50 ppm BA, 30 g/l đường, 100 ml/l nước dừa và 5 g/l than hoạt tính. Tiếp đó môi trường này được đưa lên máy lắc rung với tốc độ 50 vòng/phút. Trong quá trình lắc tốt nhất kết hợp rung với tần số từ 200 đến 300 hz. Mỗi chu kỳ nuôi cấy, tiến hành cấy chuyển mẫu sang môi trường mới để nhân mô sẹo. Điều kiện nuôi cấy quang chu kỳ từ 8 đến 10 tiếng/ngày ở 25°C để nhân nhanh mô sẹo.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó trong đó chu kỳ cấy chuyển để nhân nhanh mô sẹo ở bước nhân nhanh không quá 10 lần. Cụ thể, khi cấy chuyển quá 10 lần, mô

sẹo thu được bắt đầu có hiện tượng bị thủy tinh hóa, đột biến, khiến hiệu suất nhân bị giảm sút và chất lượng cây sau khi nhân giống thu được kém.

Trong bước biệt hóa mô sẹo thành phôi, tiến hành cấy các cụm mô sẹo vào môi trường SH bổ sung 0,3 mg/l Kinetin, 0,2 mg/l TDZ, 30 g/l đường, 10 g/l than hoạt tính. Trước khi nuôi, tiến hành siêu âm trong 15 phút để tách cụm mô sẹo và nuôi cấy trên máy lắc với tốc độ lắc 200 vòng/phút trong 1 tháng. Điều kiện nuôi với quang chu kỳ 10 tiếng/ngày ở 25°C để biệt hóa mô sẹo thành các phôi vô tính.

Trong bước nảy mầm phôi vô tính, tiến hành gieo phôi này vào môi trường thạch MS bổ sung 20 ppm GA₃, 20 ppm BA, 30 g/l đường, 100 ml/l nước dừa và 20 g/l than hoạt tính. Thời gian nuôi trong 2 tháng, quang chu kỳ từ 10 tiếng/ngày ở 25°C thu được phôi nảy mầm và đâm rễ.

Trong bước thu cây *Goniiothalamus vietnamensis* Ban nuôi cấy mô, tiến hành cấy phôi đã nảy mầm và đâm rễ lên môi trường thạch SH bổ sung 2 mg/l BA, 0,5 mg/l NAA, 30 g/l đường, 25 g/l than hoạt tính. Quá trình nảy mầm được thực hiện trong 2 tháng, quang chu kỳ từ 10 đến 12 tiếng/ngày ở 25°C để thu được cây *Goniiothalamus vietnamensis* Ban nuôi cấy mô có đầy đủ chồi và rễ.

Trong bước thu cây *Goniiothalamus vietnamensis* Ban giống, tiến hành cấy chuyển cây *Goniiothalamus vietnamensis* Ban nuôi cấy mô có kích thước khoảng từ 5 đến 7 cm vào môi trường thạch ½ SH bổ sung 150 mg/l KH₂PO₄, 30 g/l than hoạt tính. Tiến hành nuôi cấy trong 2 tháng ở nhiệt độ từ 20 đến 25°C, quang chu kỳ từ 10 đến 12 tiếng/ngày thu được cây *Goniiothalamus vietnamensis* Ban giống. Trong quá trình này, lưu ý khi cấy chuyển, cần cấy cây theo hướng thẳng đứng, tránh làm tổn thương rễ và ngọn cây, yếu tố để cây phát triển khỏe mạnh.

Đối với cây *Goniiothalamus vietnamensis* Ban, có một yếu tố thuận lợi là bộ rễ của cây phát triển là rễ cọc, thẳng đứng, do đó quá trình chuyển cây ra ngoài vườn ươm, cây ít bị vi khuẩn tấn công, tuy nhiên, cần lưu ý rằng, nếu để tổn thương rễ, cây sẽ bị chết và không phát triển bộ rễ mới. Trong quá trình chuyển cây *Goniiothalamus vietnamensis* Ban từ trong ống nghiệm ra ngoài vườn ươm cây thường bị sốc một phần do thay đổi điều kiện phát triển, một phần do sự tấn công của vi khuẩn trực tiếp lên các mô. Ngoài ra, trong các nghiên cứu đã chỉ ra rằng, một yếu tố tác động lớn đến việc chuyển cây từ trong ống nghiệm ra ngoài vườn ươm là do sự mất nước vì trong quá

trình nuôi cấy, cây luôn được giữ trong môi trường có độ ẩm cao, khi chuyển cây ra ngoài vườn ươm, cây dễ bị héo, do đó tỷ lệ chết thường cao.

Theo giải pháp hữu ích, để chuyển cây ra ngoài vườn ươm, cây được xử lý bằng dung dịch NaClO 1% trước khi đưa ra trồng trên giá thể bao gồm mùn/đất sét theo tỷ lệ 1:3 trọng lượng.

Các tác giả đã nghiên cứu, tìm hiểu và nhận ra rằng, giá thể trồng cây *Goniothalamus vietnamensis* Ban ảnh hưởng rất lớn đến quá trình sinh trưởng của cây, một phần đặc tính của cây thích hợp trong rừng thứ sinh, trên nền đất ẩm, một phần cây có một rễ cọc đâm thẳng xuống nên cần rất cẩn thận với bộ rễ cây, một khi rễ cây sâu bị tổn thương thì cây sẽ dễ bị chết.

Ngoài ra, bằng việc xử lý cây *Goniothalamus vietnamensis* Ban nuôi cấy mô bằng dung dịch NaClO 1% trước khi đưa ra trồng trên giá thể bao gồm mùn/đất sét theo tỷ lệ 1:3 trọng lượng sẽ cho tỷ lệ sống cao, lên tới 90%. Theo đó, cây *Goniothalamus vietnamensis* Ban nuôi cấy mô sau khi rửa sạch môi trường thạch bám trên cây giống, được xử lý bằng dung dịch NaClO 1% trong 3 phút trước khi trồng trên giá thể mùn/đất sét.

Theo đó, giải pháp hữu ích đã thành công trong việc nhân nhanh cây giống *Goniothalamus vietnamensis* Ban với hiệu suất cao, có khả năng đáp ứng được với yêu cầu cần một lượng lớn sâm con để phát triển vùng nguyên liệu. Bằng kỹ thuật sử dụng than hoạt tính hấp thụ các chất ức chế sinh trưởng phát sinh trong quá trình nuôi cấy, giải pháp đã cho phép tái sinh thành công cây *Goniothalamus vietnamensis* Ban để có thể phát triển nguồn dược liệu.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Ví dụ 1. Xác định thời gian khử trùng đến tỷ lệ nhiễm mẫu

Để xác định khả năng khử trùng mẫu, tiến hành thử nghiệm với mẫu là quả cây *Goniothalamus vietnamensis* Ban tươi. Sau khi thu hái, tách bỏ lớp vỏ và rửa sạch hạt bằng nước cất nhiều lần. Tiến hành thử nghiệm với dung dịch 1% NaClO với thời gian xử lý khác nhau. Tiếp đó các mẫu đều được xử lý bằng dung dịch ethanol 70% trong 1 phút theo các phương pháp thông thường. Các công thức bên dưới, mỗi công thức được thực hiện lặp lại 3 lần với mỗi lần 20 mẫu, kết quả được đánh giá với theo thống kê Duncan.

ĐC: Rửa hạt bằng nước cất

CT1: Rửa bằng dung dịch 1% NaClO trong 5 phút

CT2: Rửa bằng dung dịch 1% NaClO trong 10 phút

CT3: Rửa bằng dung dịch 1% NaClO trong 15 phút

CT4: Rửa bằng dung dịch 1% NaClO trong 20 phút

Các công thức được thực hiện trong tủ cấy vô trùng, sau khi xử lý bằng NaClO, mẫu được rửa sạch bằng nước cất và xử lý bằng dung dịch ethanol 70% trong 1 phút và rửa sạch lại bằng nước cất. Sau đó mẫu được tách bỏ vỏ hạt và lựa chọn phần phôi hữu tính cấy vào các môi trường khảo sát. Kết quả thử nghiệm được nêu trong Bảng 1.

Bảng 1. Ảnh hưởng của thời gian khử trùng đến tỷ lệ nhiễm mẫu

Công thức thử nghiệm	Tỷ lệ nhiễm trung bình	Độ lệch chuẩn	Thử nghiệm Duncan
ĐC	100,00	0,00	a
CT1	23,33	12,58	b
CT2	7,33	5,41	c
CT3	5,33	3,82	d
CT4	5,33	3,82	d

Kết quả thử nghiệm cho thấy, khi mẫu được xử lý chỉ bằng etanol 70% trong 1 phút sẽ bị nhiễm mẫu 100%, ngược lại, khi tiền xử lý bằng dung dịch 1% NaClO cho thấy khả năng khử khuẩn hiệu quả, đặc biệt với dung dịch 1% NaClO xử lý từ 10 đến 20 phút, hiệu quả vô trùng là tốt nhất.

Các thử nghiệm với dung dịch NaClO nồng độ cao hơn hoặc kéo dài thời gian xử lý (từ 15 đến 20 phút) đều cho thấy tỷ lệ khử trùng tốt, tuy nhiên lại gây tác động lên phôi mầm, ảnh hưởng đến chất lượng nhân phôi (dữ liệu không thể hiện).

Ví dụ 2. Thử nghiệm tạo cụm phôi hữu tính cây *Goniothalamus vietnamensis* Ban

Thông thường, mỗi phôi hữu tính chỉ phát sinh thành một cây, do đó cần nhân các phôi hữu tính này thành nhiều phôi để có thể nâng cao hệ số nhân giống. Thử nghiệm tiến hành trên hai môi trường nuôi cấy là môi trường MS và môi trường SH. Các công thức bên dưới, mỗi công thức được thực hiện lặp lại 3 lần với mỗi lần 20 mẫu, kết quả được đánh giá với theo thống kê Duncan.

CT1: ½ SH bổ sung 50 g/l đường sucroza

CT2: ½ MS bổ sung 50 g/l đường sucroza

CT3: SH bổ sung 50 g/l đường sucroza + 10 ppm GA₃

CT4: MS bổ sung 50 g/l đường sucroza + 10 ppm GA₃

CT5: ½ MS + 0,2 mg/L 2,4-D + 50g/l sucroza

CT6: ½ MS + 0,5 mg/L 2,4-D + 50g/l sucroza

CT7: ½ SH + 0,2 mg/L TDZ + 50g/l sucroza

CT8: ½ SH + 0,5 mg/L TDZ + 50g/l sucroza

CT9: SH + 1 mg/L NAA + 50g/l sucroza

CT10: MS + 3 mg/L IBA + 50g/l sucroza

Hạt vô trùng được tách bỏ phần vỏ và lựa chọn phần nội nhũ chứa phôi hữu tính cấy vào các môi trường nêu trên. Kết quả thử nghiệm cho thấy, quá trình phát sinh phôi trực tiếp từ phôi hạt diễn ra tương đối nhanh, khoảng 4 tuần. Kết quả được thể hiện trên Bảng 2.

Bảng 2. Kết quả thử nghiệm phát sinh phôi

Mẫu	Tỉ lệ tạo phôi trung bình	Độ lệch chuẩn	Thử nghiệm Duncan
CT1	17,43	8,41	a
CT2	11,65	5,27	a
CT3	13,33	5,58	ab
CT4	53,73	8,77	c
CT5	23,33	3,29	ab
CT6	25,00	7,64	a
CT7	11,67	3,89	b
CT8	12,00	4,00	a
CT9	20,00	7,67	ab
CT10	18,67	6,65	ab

Đặc biệt là ở môi trường nuôi cấy bao gồm MS + 50g/l sucroza 10 ppm GA₃ có khả năng phát sinh phôi vô tính trực tiếp sau 4 tuần với tỷ lệ mẫu cảm ứng tạo phôi cao nhất đạt 53,73%. Điều này cho thấy rằng, đối với cây *Goniothalamus vietnamensis* Ban, việc phát triển phôi là khá dễ dàng và có khả năng phát triển trên cả môi trường không có chất điều hòa sinh trưởng.

Ví dụ 3. Thử nghiệm phân biệt hóa phôi hữu tính thành mô sẹo

Do mẫu phôi từ hạt quá nhỏ để có thể thu được lượng lớn mô sẹo nên quá trình nảy mầm nhằm tạo ra lượng mẫu có khả năng biệt hóa thành mô sẹo lớn. Tuy nhiên, để tạo ra được cây nuôi cấy mô với lượng lớn, buộc phải phản biệt hóa mầm thành các mô sẹo (callus) để thu được lượng mẫu lớn nhằm tăng hệ số nhân. Đây là một yếu tố then chốt của quá trình nuôi cấy mô tế bào thực vật.

Để thử nghiệm điều kiện phản biệt hóa, tiến hành thử nghiệm trên môi trường thạch với các công thức khác nhau. Các công thức bên dưới, mỗi công thức được thực hiện lặp lại 3 lần với mỗi lần 20 mẫu, kết quả được đánh giá với theo thống kê Duncan.

Trong bước phản biệt hóa phôi hữu tính, vật liệu phôi hữu tính được cắt phân lớp theo chiều ngang với chiều dày khoảng 1mm và cấy lớp mỏng trên bề mặt môi trường thạch MS bổ sung 50 ppm GA₃, 50 ppm BA, 30 g/l đường, 100 ml/l nước dừa và 5 g/l than hoạt tính. Các tác giả đã nghiên cứu và phát hiện ra rằng, trong quá trình sinh trưởng, mẫu thực vật tiết ra chất ức chế ngược quá trình phát triển, khiến mẫu không phát triển và chết dần. Việc sử dụng các hormone thực vật cho thấy, để phản biệt hóa phôi, sử dụng phức hợp GA₃ và BA sẽ giúp quá trình phản biệt hóa xảy ra nhanh. Theo đó, để biệt hóa, các tác giả đã sử dụng than hoạt tính và phức hợp GA₃ và BA để nuôi cấy mẫu trong từ 1 đến 2 tháng. Điều kiện nuôi cấy ở quang chu kỳ từ 8 đến 10 tiếng/ngày ở 25°C. Kết quả, sau khi phản biệt hóa phôi thu được mô sẹo để làm nguyên liệu nhân nhanh giống.

Các phôi hữu tính được cắt phân lớp theo chiều ngang của phôi và cấy trên bề mặt môi trường thạch. Các công thức thử nghiệm bao gồm:

CT1: MS+ 100 ppm GA₃, 30 g/l đường

CT2: MS+ 100 ppm BA, 30 g/l đường, 100 ml/l nước dừa

CT3: MS+ 50 ppm GA₃, 50 ppm BA, 30 g/l đường, 100 ml/l nước dừa và 5 g/l than hoạt tính

CT4: SH+ 50 ppm GA₃, 50 ppm BA, 30 g/l đường, 100 ml/l nước dừa và 5 g/l than hoạt tính

Các môi trường được hấp tiệt trùng ở 121°C trong 20 phút có bổ sung 7 g/l thạch để tạo môi trường rắn. Kết quả thử nghiệm được thể hiện trên các bảng 3.

Bảng 3. Kết quả thử nghiệm tỷ lệ tạo mô sẹo trên môi trường thạch rắn

Mẫu	Tỉ lệ tạo mô sẹo	Độ lệch chuẩn	Thử nghiệm Duncan
CT1	7,41	3,41	a
CT2	5,62	2,27	ab
CT3	80,38	5,58	c
CT4	50,76	6,77	ab

Theo kết quả thu được cho thấy, việc sử dụng than hoạt tính hấp thụ thành phần hoạt chất có khả năng ức chế quá trình sinh trưởng của mô. Các tác giả nhận thấy rằng, mặc dù các mẫu CT1 và CT2 đều có khả năng phát triển thành mô sẹo, nhưng lượng phát sinh rất thấp do mẫu bị chết. Đây cũng là một vấn đề giải thích tại sao việc nhân giống cây *Goniothalamus vietnamensis* Ban rất khó. Điều này có thể giải thích lý thuyết rằng quá trình nuôi cấy, bản thân mẫu tiết ra các chất có tác dụng ức chế quá trình sinh trưởng của mẫu. Việc này có khả năng ảnh hưởng trực tiếp đến quá trình sinh tổng hợp của mẫu. Khi môi trường bổ sung than hoạt tính, với cơ chế hấp thụ than hoạt tính đóng vai trò như thành phần hấp thụ các chất ức chế từ mẫu sinh ra hoặc có khả năng hóa giải các hợp chất này khiến cho mẫu có khả năng phát triển. Theo đó cho thấy CT4: SH+ 50 ppm GA₃, 50 ppm BA, 30 g/l đường, 100 ml/l nước dừa và 5 g/l than hoạt tính có khả năng phát triển thành mô sẹo cao nhất.

Ví dụ 4. Thử nghiệm nhân nhanh mô sẹo

Trong phương pháp nuôi cấy mô tế bào thực vật, việc nhân nhanh mô sẹo cho phép tăng hệ số nhân. Đây là quá trình ảnh hưởng trực tiếp đến hiệu suất nhân giống. Trong thử nghiệm này, nhằm tìm ra điều kiện tối ưu để nhân nhanh mô sẹo đồng thời thu được mô sẹo có chất lượng đảm bảo được khả năng tái sinh thành cây con khỏe mạnh. Các cụm mô sẹo được cắt phân lớp và cấy trên bề mặt môi trường thạch. Các công thức thử nghiệm bao gồm:

CT1: MS+ 100 ppm GA₃, 30 g/l đường

CT2: MS+ 100 ppm BA, 30 g/l đường, 100 ml/l nước dừa

CT3: MS+ 50 ppm GA₃, 50 ppm BA, 30 g/l đường, 100 ml/l nước dừa và 5 g/l than hoạt tính

CT4: SH+ 50 ppm GA₃, 50 ppm BA, 30 g/l đường, 100 ml/l nước dừa và 5 g/l than hoạt tính

CT5: SH+ 50 ppm BA, 30 g/l đường, 100 ml/l nước dừa và 5 g/l than hoạt tính

CT6: MS+ 100 ppm GA₃, 30 g/l đường + 7g/l thạch

CT7: MS+ 100 ppm BA, 30 g/l đường, 100 ml/l nước dừa + 7g/l thạch

CT8: MS+ 50 ppm GA₃, 50 ppm BA, 30 g/l đường, 100 ml/l nước dừa và 5 g/l than hoạt tính + 7g/l thạch

CT9: SH+ 50 ppm GA₃, 50 ppm BA, 30 g/l đường, 100 ml/l nước dừa và 5 g/l than hoạt tính + 7g/l thạch

CT10: SH+ 50 ppm BA, 30 g/l đường, 100 ml/l nước dừa và 5 g/l than hoạt tính + 7g/l thạch

Các môi trường được hấp tiệt trùng ở 121°C trong 20 phút. Điều kiện nhân nhanh mô sẹo được thực hiện với 2 công thức rắn và lỏng trong 2 tháng. Phương pháp nuôi cấy mô bằng phương pháp rắn được thực hiện theo phương pháp cấy bề mặt. Phương pháp nuôi cấy mô bằng phương pháp lỏng được thực hiện trong điều kiện lắc, tốc độ 50 vòng/phút. Các phương pháp được thực hiện, phương pháp quang chu kỳ từ 8 đến 10 tiếng/ngày ở 25°C để nhân nhanh mô sẹo.

Bảng 4. Kết quả thử nghiệm hệ số nhân trên mô sẹo trên môi trường nuôi cấy

Mẫu	Hệ số nhân	Độ lệch chuẩn	Thử nghiệm Duncan
CT1: lỏng	7,45	3,41	a
CT2: lỏng	8,62	3,27	a
CT3: lỏng	20,35	4,90	ab
CT4: lỏng	22,71	4,77	c
CT5: lỏng	16,38	3,23	ab
CT6: rắn	3,45	2,44	a
CT7: rắn	5,65	3,15	a
CT8: rắn	11,38	4,20	ab
CT9: rắn	15,46	3,78	c
CT10: rắn	12,32	3,13	ab

Theo kết quả thu được cho thấy, đối với môi trường lỏng, hệ số nhân mô sẹo hiệu quả hơn so với môi trường rắn, tuy nhiên, chất lượng mô sẹo thu từ việc nuôi cấy trên

môi trường rắn tốt hơn, cụ thể là mô phát triển đồng đều, bóng đẹp, trong khi nuôi cấy trong môi trường lỏng, mô nhỏ hơn. Ngoài ra, theo kết quả trên bảng cho thấy, đối với những môi trường không bổ sung than hoạt tính, hệ số nhân phôi kém sẹo phát triển. Cụ thể là CT1, CT2, CT6, CT7 đều có hệ số nhân thấp hơn hẳn so với các môi trường tương ứng. Điều này cho thấy rằng, than hoạt tính có tác dụng tích cực đối với sự phát triển của tế bào nuôi cấy. CT4 có hệ số nhân mô sẹo lớn nhất, đạt tới 22,71 lần sau 2 tháng nuôi cấy.

Ví dụ 5. Thử nghiệm khả năng nảy mầm phôi vô tính

Để thử nghiệm khả năng nảy mầm phôi vô tính, tiến hành biệt hóa mô sẹo thành phôi vô tính trong điều kiện môi trường SH bổ sung 0,3 mg/l Kinetin, 0,2 mg/l TDZ, 30 g/l đường, 10 g/l than hoạt tính. Chọn các phôi hoàn chỉnh để tiến hành nảy mầm phôi.

Để đánh giá ảnh hưởng của điều kiện nuôi cấy lên thời gian nảy mầm của phôi cây *Goniothalamus vietnamensis* Ban, các công thức được bố trí như sau:

CT1: MS+ 100 ppm GA₃, 30 g/l đường

CT2: MS+ 100 ppm BA, 30 g/l đường, 100 ml/l nước dừa

CT3: MS bổ sung 20 ppm GA₃, 20 ppm BA, 30 g/l đường, 100 ml/l nước dừa và 20 g/l than hoạt tính

CT4: SH+ 50 ppm GA₃, 50 ppm BA, 30 g/l đường, 100 ml/l nước dừa và 5 g/l than hoạt tính

Chỉ tiêu theo dõi bao gồm tỷ lệ nảy mầm (%), chiều dài chồi (cm), tỷ lệ phôi chết (%). Kết quả sau 2 tháng nuôi cấy được thể hiện trên Bảng 5.

Bảng 5. Ảnh hưởng của điều kiện nuôi cấy đến khả năng nảy mầm phôi cây

Goniothalamus vietnamensis Ban

Thử nghiệm	Tỷ lệ nảy mầm (%)	Chiều dài chồi (cm)	Tỷ lệ phôi chết (%)
CT 1	61,67±6,65	2,13±0,11	38,33±3
CT 2	63,56±8,83	2,33±0,18	36,44±2
CT3	95,11±8,35	4,53±0,42	5±2
CT4	92,00±8,32	3,49±0,39	8±2

Kết quả quan sát cho thấy, sau 2 tuần nuôi cấy phôi bắt đầu hình thành chồi, tuy nhiên, sau 2 tuần, một lượng lớn phôi của CT1 và CT2 bị teo dần và chết, tỷ lệ này lên tới trên 35% sau 2 tháng. Tuy nhiên, đối với môi trường có bổ sung than hoạt tính, tỷ lệ nảy mầm lên tới trên 90%. Điều này cho thấy, việc bổ sung than hoạt tính có tác dụng kiểm chế các chất ức chế nội sinh sản sinh trong quá trình phát triển của cây sâm Bảo Ngọc. Theo đó, môi trường thạch MS bổ sung 20 ppm GA₃, 20 ppm BA, 30 g/l đường, 100 ml/l nước dừa và 20 g/l than hoạt tính cho tỷ lệ nảy mầm cao và cây con phát triển toàn diện.

Ví dụ 6. Xác định điều kiện phát triển cây *Goniothalamus vietnamensis* Ban

Để thử nghiệm điều kiện phát triển cây *Goniothalamus vietnamensis* Ban giống, tiến hành thử nghiệm với các môi trường SH và MS với lượng N:K khả dụng khác nhau. Theo đó, các cây *Goniothalamus vietnamensis* Ban nuôi cấy có kích thước toàn bộ gồm cả rễ và lá đạt khoảng 5 cm được cấy vào các môi trường bên dưới có bổ sung 30 g/l than hoạt tính và nuôi cấy trong 2 tháng ở nhiệt độ 25°C, quang chu kỳ từ 10 đến 12 tiếng/ngày. Kết quả được thể hiện trên Bảng 6.

Bảng 6: Ảnh hưởng của môi trường đến sự thích nghi của cây

Công thức	Môi trường	Tỉ lệ sống (%)	Trung bình số lá /cây	Chiều cao tổng (cm)	Đặc điểm sinh trưởng
CT1	SH	30	2,2	6,5	-Sinh trưởng chậm, rễ ngắn
CT2	½ SH	35	3,5	7,7	
CT3	MS	40	1,5	7,5	
CT4	½ MS	45	2,8	7,6	-Lá xanh đậm, thân cứng cáp
CT5	½ SH + 150mg/l KH ₂ PO ₄ + 10 g/l đường	100	5,1	8,6	- Sinh trưởng khỏe, lá xanh đậm, rễ phát triển mạnh
CT6	½ MS + 150mg/l KH ₂ PO ₄ + 10 g/l đường	100	4,8	8,8	

Theo kết quả trên cho thấy, trong cùng một điều kiện nuôi cấy, chỉ khác hàm lượng dinh dưỡng cơ bản (SH, MS) đã có sự khác nhau về sự sinh trưởng và phát triển của cây *Goniothalamus vietnamensis* Ban *in vitro*. Điều này cho thấy khi sử dụng môi trường nghèo N khoáng đa lượng, giàu P hơn kích thích bộ rễ cây phát triển và cây

cứng cáp hơn, có khả năng thích nghi tốt với môi trường khi chuyển ra ngoài vườn ươm.

Ví dụ 7. Xác định điều kiện đưa cây *Goniiothalamus vietnamensis* Ban giống ra ngoài vườn ươm

Để xử lý cây trước khi đưa ra vườn ươm, các thử nghiệm được tiến hành đối với cây được xử lý bằng dung dịch NaClO 1% và không được xử lý bằng dung dịch NaClO 1%. Theo đó, cây giống *Goniiothalamus vietnamensis* Ban hoàn chỉnh thu được từ ví dụ 6 được xử lý bằng dung dịch bằng dung dịch NaClO 1% hoặc không trước khi trồng trên giá thể bao gồm CT1: đất sét, CT2: 2/3 mùn rừng + 1/3 đất sét, CT3: 1/3 mùn rừng + 2/3 đất sét và CT4: 1/5 mùn rừng + 4/5 đất sét.

Kết quả cho thấy, đối với nhóm không được xử lý bằng chitosan, tỷ lệ nhiễm bệnh (thối nhũn) cao, lên tới 90%. Ngược lại đối với nhóm được xử lý bằng dung dịch NaClO 1%, tỷ lệ sống cao, đạt 75 đến 90%.

Bảng 7. Ảnh hưởng của giá thể đến khả năng phát triển của cây *Goniiothalamus vietnamensis* Ban

Công thức	Số lượng lá trung bình	Chiều dài rễ (cm)	Tỷ lệ sống (%)	Màu sắc lá
Mùn rừng	1,34	4,52	75,56	Lá màu xanh nhạt, mép bị vàng nhiều
2/3 mùn rừng + 1/3 đất sét	3,33	6,04	81,11	Lá màu xanh, mép bị vàng ít
1/3 mùn rừng + 2/3 đất sét	4,67	5,89	91,11	Lá màu xanh đậm
1/5 mùn rừng + 4/5 đất sét	3,67	4,81	84,44	Lá màu xanh, mép ít bị vàng,

Theo đó, thấy rằng, để cây *Goniiothalamus vietnamensis* Ban nuôi cấy mô chuyển ra ngoài vườn ươm có tỷ lệ sống cao trên môi trường mùn rừng, điều kiện tốt nhất là xử lý cây giống *Goniiothalamus vietnamensis* Ban hoàn chỉnh bằng dung dịch NaClO 1% trước khi đưa ra trồng trên giá thể bao gồm mùn/đất sét theo tỷ lệ 1:3 trọng lượng.

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Quy trình nhân giống cây *Goniiothalamus vietnamensis* Ban theo giải pháp cho phép phát triển được nguồn cây *Goniiothalamus vietnamensis* Ban từ mẫu hạt chưa thành thực với hệ số nhân cao. Bằng kỹ thuật nuôi cấy mô thực vật, quy trình cho phép

phát triển được quy trình nhân giống sâm, nhằm đảm bảo được nguồn cây giống, cũng như tránh được nạn khai thác triệt để nguồn dược liệu quý.. Điều này giúp phát triển bền vững ngành dược phẩm.

Bằng cách tối ưu hóa các điều kiện, kết hợp với kỹ thuật hấp phụ bằng than hoạt tính, giải pháp giải quyết được vấn đề khó nhân giống cây *Goniothalamus vietnamensis* Ban, quy trình cho phép nhân nhanh giống sâm, tăng hệ số nhân, giảm được tỷ lệ chết, hỏng mẫu. Quy trình cho phép nhân vô tính cây thu được cân bằng nhằm thu được cây giống cây *Goniothalamus vietnamensis* Ban khỏe mạnh, có sức sống cao trước khi đưa ra ngoài vườn ươm.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình nhân giống cây *Goniothalamus vietnamensis* Ban bằng kỹ thuật nuôi cấy mô, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

- a) chuẩn bị mẫu vô trùng bằng cách thu quả cây *Goniothalamus vietnamensis* Ban tươi, tách bỏ lớp vỏ bao và ngâm trong dung dịch NaClO 1% trong 10 phút, sau đó tách lớp vỏ hạt và xử lý bằng dung dịch etanol 70% trong 1 phút, sau khi rửa lại bằng nước cất vô trùng, thu được mẫu hạt cây *Goniothalamus vietnamensis* Ban vô trùng;
- b) nhân phôi hữu tính bằng cách tách vỏ hạt thu phôi hữu tính và cấy trên môi trường thạch MS bổ sung 50 g/l đường, 10ppm GA₃ và nuôi trong khoảng 4 tuần trong điều kiện quang chu kỳ từ 8 đến 10 tiếng/ngày ở 25°C thu được phôi hữu tính;
- c) phản biệt hóa phôi hữu tính bằng cách cắt phân lớp theo chiều ngang phôi hữu tính dày khoảng 1mm và cấy lớp mỏng trên bề mặt môi trường thạch MS bổ sung 50 ppm GA₃, 50ppm BA, 30 g/l đường, 100 ml/l nước dừa và 5 g/l than hoạt tính và nuôi cấy trong từ 1 đến 2 tháng, quang chu kỳ từ 8 đến 10 tiếng/ngày ở 25°C để phản biệt hóa phôi thu được mô sẹo;
- d) nhân nhanh mô sẹo bằng cách cấy cụm mô sẹo vào trong môi trường SH bổ sung 50 ppm BA, 30 g/l đường, 100 ml/l nước dừa và 5 g/l than hoạt tính và nuôi cấy trong điều kiện lắc với tốc độ 50 vòng/phút, mỗi chu kỳ cấy chuyển 2 tháng, quang chu kỳ từ 8 đến 10 tiếng/ngày ở 25°C để nhân nhanh mô sẹo;
- e) biệt hóa mô sẹo thành phôi bằng cách cấy các cụm mô sẹo vào môi trường SH bổ sung 0,3 mg/l Kinetin, 0,2 mg/l TDZ, 30 g/l đường, 10 g/l than hoạt tính, tiến hành siêu âm trong 15 phút để tách cụm mô sẹo và nuôi cấy trên máy lắc với tốc độ lắc 200 vòng/phút trong 1 tháng, quang chu kỳ 10 tiếng/ngày ở 25°C để biệt hóa mô sẹo thành các phôi vô tính;
- f) nảy mầm phôi vô tính bằng cách gieo phôi này vào môi trường thạch MS bổ sung 20 ppm GA₃, 20 ppm BA, 30 g/l đường, 100 ml/l nước dừa và 20 g/l than hoạt tính trong thời gian 2 tháng, quang chu kỳ từ 10 tiếng/ngày ở 25°C thu được phôi nảy mầm và đâm rễ;
- g) thu cây *Goniothalamus vietnamensis* Ban nuôi cấy mô bằng cách cấy phôi đã nảy mầm và đâm rễ lên môi trường thạch SH bổ sung 2 mg/l BA, 0,5 mg/l NAA, 30 g/l đường, 25 g/l than hoạt tính và nuôi trong 2 tháng, quang chu kỳ từ 10 đến 12

tiếng/ngày ở 25°C thu được cây *Goniothalamus vietnamensis* Ban nuôi cấy mô có đầy đủ chồi và rễ; và

h) thu cây *Goniothalamus vietnamensis* Ban giống bằng cách cấy chuyển cây *Goniothalamus vietnamensis* Ban nuôi cấy mô có kích thước khoảng từ 5 đến 7 cm vào môi trường thạch ½ SH bổ sung 150 mg/l KH_2PO_4 , 30 g/l than hoạt tính và nuôi cấy trong 2 tháng ở nhiệt độ từ 20 đến 25°C, quang chu kỳ từ 10 đến 12 tiếng/ngày thu được cây *Goniothalamus vietnamensis* Ban giống.

2. Quy trình theo điểm 1, trong đó quy trình này còn bao gồm bước chuyển cây ra ngoài vườn ươm bằng cách xử lý cây *Goniothalamus vietnamensis* Ban giống bằng dung dịch NaClO 1% trước khi đưa ra trồng trên giá thể bao gồm mùn/đất sét theo tỷ lệ 1:3 trọng lượng.