



(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)



2-0002661

(51)⁷ **A01H 4/00**

(13) **Y**

(21) 2-2019-00141

(22) 07/05/2019

(45) 25/07/2021 400

(43) 25/07/2019 376A

(73) Trung tâm Ươm tạo và Hỗ trợ doanh nghiệp khoa học và công nghệ (VN)
39 Trần Hưng Đạo, phường Hàng Bài, quận Hoàn Kiếm, thành phố Hà Nội

(72) Đinh Xuân Tú (VN); Vũ Duy Dũng (VN).

(54) QUY TRÌNH GIEO HẠT SÂM NGỌC LINH (*PANAX VIETNAMENSIS* HA ET GRUSHV)

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình gieo hạt sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv) bằng kỹ thuật phá ngủ đông và xuân hóa kết hợp xử lý chất kích thích sinh trưởng nhằm rút ngắn thời gian nảy mầm của hạt sâm Ngọc Linh. Quy trình theo giải pháp bao gồm các bước: a) xử lý hạt sâm Ngọc Linh; b) phá ngủ đông hạt sâm Ngọc Linh; c) kích thích nảy mầm hạt sâm Ngọc Linh; và d) gieo hạt sâm Ngọc Linh. Quy trình theo giải pháp cho phép tăng tỷ lệ nảy mầm đồng thời rút ngắn thời gian gieo cho phép chủ động được quá trình gieo hạt sâm Ngọc Linh.

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 gieo hạt sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv) bằng kỹ thuật phá ngủ đông và xuân hóa hạt kết hợp xử lý chất kích thích để điều hòa quá trình sinh trưởng rút ngắn thời gian nảy mầm để chủ động quá trình gieo trồng cây sâm Ngọc Linh bằng phương pháp gieo hạt.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv) thuộc họ Nhân sâm (Araliaceae) và là một loại cây dược liệu quý, đặc hữu của vùng núi Ngọc Linh, tỉnh Kon Tum và huyện Trà My, tỉnh Quảng Nam, Việt Nam. Ngoài tự nhiên, cây sâm này chỉ mọc ở độ cao từ khoảng 1500m đến 2500m so với mặt nước biển và sống dưới tán rừng già, ẩm, nhiều mùn với nhiệt độ ban ngày từ 20°C đến 25°C, ban đêm từ 15°C đến 18°C. Các nghiên cứu định tính và định lượng đã chỉ ra rằng trong rễ cây sâm Ngọc Linh có khoảng 52 loại saponin khác nhau, trong đó có 26 loại saponin mới. Tỷ lệ saponin của sâm Ngọc Linh lớn hơn nhiều loài của chi panax trên thế giới (tỷ lệ saponin toàn phần lên đến 15,75%, Nguyễn Thượng Dong, "Sâm Việt Nam và một số cây thuốc thuộc họ nhân sâm", NXB KHKT, 2007, trang 110) nên đây là một trong những loài sâm quý có tác dụng bổ dưỡng toàn thân, tăng cường sức lực, tăng trí nhớ, tăng cường hưng phấn vỏ đại não, chống stress, bảo vệ gan, điều trị bệnh viêm loét dạ dày, điều hòa hoạt động tim mạch, làm giảm lipid trong máu, ngăn ngừa chứng xơ vữa động mạch, giảm đau, chống viêm. Đặc biệt hoạt chất majonosin-R2 trong sâm Ngọc Linh có tác dụng ức chế giai đoạn đầu của bệnh ung thư biểu mô da.

Cây sâm Ngọc Linh thường phát triển chậm và khi thu hoạch sẽ thu hoạch toàn bộ cây, do đó cây giống luôn là vấn đề đau đầu trong nhiều năm do lượng cây sâm Ngọc Linh ngoài tự nhiên bị cạn kiệt nhanh chóng. Việc nuôi cấy mô có khả năng nhân nhanh một lượng cây giống vô tính từ cây bố mẹ, tuy nhiên, việc này tiềm ẩn nguy cơ thoái hóa giống sâm Ngọc Linh về lâu dài. Đây là phương pháp có thể khôi phục giống sâm Ngọc Linh một cách nhanh chóng. Để phát triển bền vững vùng sâm

Ngọc Linh, đã có nhiều phương pháp nhân giống hữu tính bằng cách cho cây sâm Ngọc Linh vô tính lai chéo với cây ngoài tự nhiên và thu hoạch hạt để gieo tạo ra cây hữu tính để tránh thoái hóa giống.

Theo Nguyễn Thượng Dong, Sâm Việt Nam và một số cây thuốc họ nhân sâm, Nhà xuất bản Khoa học kỹ thuật, trang 92-99, phương pháp gieo hạt đã được nghiên cứu và phát triển sớm trước khi phát triển phương pháp nhân giống *in vitro*. Tuy nhiên, phương pháp này, một phần do thiếu hạt giống, một phần do tỷ lệ nảy mầm thấp, cao nhất chỉ đạt khoảng 60-65% và thời gian gieo kéo dài khoảng từ 10 đến 14 tháng, do đó khó có thể phát triển được vùng nguyên liệu dựa vào phương pháp gieo hạt trong khi thiếu nguồn cung cấp hạt.

Hiện nay, các vùng trồng sâm Ngọc Linh đã có thể cung cấp một lượng hạt giống lớn từ các cây sâm trồng. Đã có nhiều phương pháp gieo hạt cải tiến nhằm nâng tỷ lệ nảy mầm. Thông thường, các nhà làm vườn thu hoạch quả chín và tiến hành gieo trực tiếp trên các luống hoặc bầu được phủ lớp cỏ tranh khô bảo vệ và duy trì ẩm độ trong khoảng thời gian từ 12 đến 14 tháng. Tuy nhiên, phương pháp này khiến nhiều hạt bị thối và không những tỷ lệ nảy mầm thấp, mà còn bị phá hoại bởi kiến, chuột và các loài gặm nhấm khác nên phải sử dụng thuốc bảo vệ thực vật để phòng trừ kiến, mối, tỷ lệ cây giống thu được thực tế chỉ đạt từ 10 đến 20% lượng hạt gieo nên chi phí gieo hạt cao. Phương pháp cải tiến được thực hiện bằng cách hạt được xát, khử trùng bằng nước tôi 10% và đưa đi gieo, phương pháp này cho cây giống thực tế chỉ đạt cao nhất khoảng 30% tổng lượng hạt gieo.

Một vấn đề cần lưu ý đó là thời gian gieo hạt sâm Ngọc Linh thường kéo rất dài, quá trình gieo thường từ tháng 6-7 năm trước tới khoảng tháng 8-9 năm sau và buộc phải trải qua giai đoạn mùa đông, mùa xuân và chỉ áp dụng được đúng với vùng đặc hữu với các điều kiện ẩm độ, nhiệt độ và chu kỳ phát triển tương ứng với chu kỳ ngủ đông và xuân hóa của hạt sâm Ngọc Linh. Do đặc tính của cây sâm Ngọc Linh phát triển rất chậm, quá trình phát triển hạt và cây đều trải qua quá trình ngủ đông và xuân hóa rất dài nên việc phát triển cây giống bằng phương pháp gieo hạt không cạnh tranh được với phương pháp nuôi cấy mô hiện đại.

Tiêu chuẩn cây giống xuất vườn từ nguồn hạt là cây có ít nhất 01 lá kép, lá có màu xanh đến xanh đậm, chiều cao thân khí sinh trung bình từ 10cm trở lên. Đường

kính củ từ 5mm trở lên có từ 2- 3 rễ chính trở lên và sạch bệnh. Do đó, để đạt được chỉ tiêu này thì cây phải phát triển qua ít nhất 2 chu kỳ, nghĩa là hạt phải được gieo đúng vụ trước đó từ 2-3 năm thì mới cho được cây sâm Ngọc Linh giống đạt yêu cầu.

Do đó, cần có quy trình gieo hạt sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv) vừa có tỷ lệ nảy mầm cao, vừa có khả năng chủ động được thời điểm gieo hạt, tránh phụ thuộc vào điều kiện tự nhiên vừa rút ngắn được thời gian gieo trên thực địa.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Mục đích của giải pháp hữu ích nhằm giải quyết các vấn đề đã nêu ở trên, theo đó, giải pháp hữu ích đề xuất quy trình gieo hạt sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv) bằng kỹ thuật phá ngủ đông và xuân hóa hạt kết hợp xử lý chất kích thích sinh trưởng nhằm rút ngắn thời gian nảy mầm và chủ động quá trình gieo trồng cây sâm Ngọc Linh bằng phương pháp gieo hạt.

Theo đó, giải pháp hữu ích đề xuất quy trình gieo hạt sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv), trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) xử lý hạt sâm Ngọc Linh bằng cách thu hái quả sâm Ngọc Linh chín, sạch bệnh, xát bỏ phần thịt, rửa sạch và ngâm phần hạt trong dung dịch NaClO 2% trong 15 phút rồi rửa sạch lớp vỏ nhớt bằng nước, sau khi để ráo ở 20°C, ngâm hạt trong dung dịch chất kích thích sinh trưởng chứa từ 50 đến 100 ppm GA₃ hoặc BA hoặc hỗn hợp của chúng trong khoảng từ 15 đến 30 giờ ở 25°C, sau đó rửa sạch bằng nước cất và để ráo hạt ở 20°C thu được hạt sâm Ngọc Linh được xử lý;

b) phá ngủ đông hạt sâm Ngọc Linh bằng cách trộn hạt sâm Ngọc Linh được xử lý với cát theo tỷ lệ 1/3 theo thể tích và ủ trong khay chứa cát sạch trong điều kiện nhiệt độ từ 18 đến 20°C, độ ẩm từ 60 đến 65% trong khoảng từ 40 đến 60 ngày để phá ngủ đông hạt sâm Ngọc Linh;

c) kích thích nảy mầm hạt sâm Ngọc Linh bằng cách chuyển hạt sâm Ngọc Linh sau khi phá ngủ đông vào điều kiện nhiệt độ từ 2 đến 4°C, độ ẩm từ 60 đến 65% trong khoảng từ 55 đến 65 ngày thu được hạt sâm Ngọc Linh đã được nứt mầm; và

d) gieo hạt sâm Ngọc Linh bằng cách chuyển hạt sâm Ngọc Linh đã được kích thích tạo mầm vào gieo trong giá thể được khử trùng bao gồm 2/3 mùn và 1/3 cát, giữ nhiệt độ nằm trong khoảng từ 15 đến 18°C, sau khi hạt nảy mầm tiến hành hành phun

thuốc trừ nấm và phân bón theo chu kỳ 1 tháng/lần trong 3 tháng thu được cây sâm Ngọc Linh.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó dung dịch chất kích thích sinh trưởng chứa 100ppm GA3 và thời gian phá ngủ đông là 40 ngày.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó dung dịch chất kích thích sinh trưởng chứa 100ppm GA3 và 50ppm BA và thời gian phá ngủ đông là 60 ngày.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó hạt sâm Ngọc Linh được gieo cách bề mặt giá thể từ 2 đến 3cm, nồng độ thuốc trừ nấm được sử dụng là 2ppm và nồng độ phân bón được sử dụng là 1ppm.

Mô tả chi tiết các hình vẽ

Hình 1 là đồ thị thể hiện tỷ lệ nhiễm và tỷ lệ hạt nứt vỏ sau khi xử lý bằng dung dịch nước tỏi, dung dịch NaClO 2% và dung dịch formalin 0,2% theo Ví dụ 1.

Hình 2 là ảnh chụp thể hiện các hạt sâm Ngọc Linh bị thối hỏng. (A) và (B) là ảnh chụp bên ngoài cho thấy vỏ ngoài hạt bị đổi màu và (C) là hình ảnh cắt cho thấy nội nhũ hạt bị ảnh hưởng bởi vi khuẩn tấn công gây thối.

Hình 3 là biểu đồ thể hiện kết quả xử lý bằng các dung dịch kích thích sinh trưởng đối với thời gian phá ngủ của hạt sâm Ngọc Linh.

Hình 4 là ảnh chụp kết quả xử lý hạt bằng dung dịch kích thích sinh trưởng kết hợp với phá ngủ của hạt. Kết quả cho thấy chồi thành thực, hạt nứt vỏ dễ sẵn sàng nảy mầm chồi. (A) là hình chụp từ mặt trước, cho thấy đầu chồi. (B) là hình chụp từ mặt sau của hạt.

Hình 5 là biểu đồ thể hiện kết quả thử nghiệm ảnh hưởng của điều kiện nhiệt độ tới tỷ lệ nảy mầm của hạt sâm Ngọc Linh sau khi đã được phá ngủ đông và nứt vỏ theo Ví dụ 3.

Hình 6 là ảnh chụp thể hiện quá trình nảy mầm của hạt sâm Ngọc Linh sau khi được phá ngủ đông và được gieo để phát triển thành cây theo giải pháp. Kết quả cho thấy chồi mầm phát triển mạnh, thân mập.

Hình 7 là ảnh chụp thể hiện sự nảy mầm của hạt sâm Ngọc Linh sau khi được phá ngủ đông và được gieo để phát triển thành cây theo giải pháp ngoại thực địa. Kết

quả cho thấy hạt nảy mầm đều, chồi mầm phát triển mạnh, thân mập. (A) là hình chụp sau 1 tháng gieo hạt. (B) là hình chụp sau 3 tháng gieo hạt.

Hình 8 là ảnh chụp thể hiện cây sâm Ngọc Linh giống thu được sau 1 năm gieo trồng bắt đầu từ khi xử lý hạt bằng phương pháp theo giải pháp.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

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

Giải pháp hữu ích đề xuất gieo hạt sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv), trong đó quy trình này bao gồm các bước a) xử lý hạt sâm Ngọc Linh; b) phá ngủ đông hạt sâm Ngọc Linh; c) kích thích nảy mầm hạt sâm Ngọc Linh; và d) gieo hạt sâm Ngọc Linh.

Trong bước xử lý hạt sâm Ngọc Linh, hạt được thu hoạch từ quả sâm Ngọc Linh chín. Tiến hành thu hái quả sâm Ngọc Linh chín đỏ, có chấm đen trên đầu, sạch bệnh, loại bỏ quả lép, quả non. Thông thường cây cho quả và hạt giống phải đạt từ 5 năm tuổi trở lên. Quả được thu hái vào khoảng tháng 7 đến tháng 9 hằng năm. Quả chín mọng thường được rải trên nứa có lót lớp giấy mỏng, treo ở nơi thoáng mát trong khoảng thời gian từ 2 đến 3 ngày để quả khô ráo. Khi phần thịt quả đã chuyển sang mọng nước, tiến hành xát bỏ phần thịt. Sau khi bỏ phần hạt lép nổi trên mặt nước, hạt được rửa sạch. Quá trình này nhằm loại bỏ phần thịt của quả, tránh hạt bị thối hoặc bị vi khuẩn tấn công.

Sau khi hạt đã được làm sạch, tiến hành ngâm phần hạt trong dung dịch NaClO 2% trong 15 phút. Quá trình nhằm mục đích khử trùng và loại mầm bệnh bám trên lớp vỏ nhầy của hạt. Theo các tài liệu hướng dẫn, quá trình này có thể được thực hiện bằng cách ngâm với nước tôi 10% trong khoảng từ 30 đến 45 phút. Tuy nhiên, các tác giả nhận thấy rằng, việc khử trùng bằng NaClO cho thấy không chỉ tỷ lệ nhiễm bệnh giảm mà còn cho thấy tỷ lệ nứt vỏ của hạt sâm Ngọc Linh gieo tăng hơn so với việc khử trùng bằng nước tôi. Điều này có thể là do việc khử trùng bằng nước tôi kéo dài và không loại bỏ hết phần chất nhầy trên bề mặt nên ảnh hưởng đến tỷ lệ nảy mầm.

Sau khi xử lý bằng NaClO, hạt được rửa sạch bằng nước để loại bỏ lớp vỏ nhờn.

Sau khi để ráo ở 20°C, tiến hành ngâm hạt trong dung dịch chất kích thích sinh trưởng (các phytohormon). Dung dịch chất kích thích sinh trưởng chứa từ 50 đến 100 ppm GA₃ hoặc BA hoặc hỗn hợp của chúng. Theo các phương án ưu tiên, nồng độ chất kích thích sinh trưởng GA₃ được sử dụng là 50, 60, 70, 80, 90 hoặc 100 ppm hoặc giá trị bất kỳ trong khoảng đó. Theo các phương án ưu tiên, nồng độ chất kích thích sinh trưởng được sử dụng là BA với nồng độ 50, 60, 70, 80, 90 hoặc 100 ppm hoặc giá trị bất kỳ trong khoảng đó. Theo các phương án ưu tiên, nồng độ chất kích thích sinh trưởng có thể sử dụng hỗn hợp của GA₃ với BA với nồng độ bất kỳ trong khoảng nồng độ nêu trên.

Các phytohormon này đóng vai trò quan trọng trong quá trình phát triển của thực vật, nó đóng vai trò điều hòa quá trình phát triển tế bào. Theo giải pháp hữu ích, việc xử lý hạt bằng các dung dịch chất kích thích sinh trưởng này kết hợp với việc xử lý phân tầng ẩm, phân tầng lạnh để phá ngủ đông và xuân hóa chồi hạt sâm Ngọc Linh nhằm rút ngắn quá trình ngủ đông của hạt.

Theo đó, hạt được ngâm trong các dung dịch kích thích sinh trưởng là GA₃ hoặc BA trong thời gian từ 15 đến 30 giờ ở 25°C. Sau đó rửa sạch hạt bằng nước cất và để ráo hạt ở 20°C thu được hạt sâm Ngọc Linh được xử lý.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó dung dịch chất kích thích sinh trưởng được sử dụng chứa 100ppm GA₃ và thời gian phá ngủ đông là 40 ngày.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó dung dịch chất kích thích sinh trưởng được sử dụng chứa 100ppm GA₃ và 50ppm BA và thời gian phá ngủ đông là 60 ngày.

Trong bước phá ngủ đông hạt sâm Ngọc Linh hay còn gọi là phân tầng ẩm, để hạt sâm Ngọc Linh phá bỏ chu kỳ ngủ đông, sau khi sử dụng chất kích thích sinh trưởng buộc phải chuyển hạt qua giai đoạn phân tầng ẩm để kích thích phôi và nội nhũ phát triển. Quá trình này nhằm mục đích kích thích hạt trương nở và phát triển phôi, tự phá vỡ lớp vỏ cứng của hạt sâm. Tiến hành trộn hạt sâm Ngọc Linh được xử lý với cát theo tỷ lệ 1/3 theo thể tích và ủ trong khay chứa cát sạch trong điều kiện nhiệt độ từ 18 đến 20°C, độ ẩm từ 60 đến 65%. Việc sử dụng cát để dễ dàng giữ được độ ẩm cần thiết và việc sử dụng khay cho phép có thể tiến hành phá ngủ đông trong tủ nuôi cây cho phép điều khiển nhiệt độ và độ ẩm trực tiếp mà không bị phụ thuộc vào điều kiện ngoại cảnh. Quá trình này còn cho phép đảm bảo lượng hạt gieo không bị mất bởi

kiến, chuột, chim và các động vật khác. Quá trình phá ngủ đông này kết hợp với việc xử lý bằng các chất kích thích sinh trưởng cho phép hạt cây sâm Ngọc Linh phá bỏ được quá trình ngủ đông kéo dài khoảng 5 tháng. Thời gian phá ngủ đông theo giải pháp hữu ích nằm trong khoảng từ 40 đến 60 ngày để hạt sâm Ngọc Linh trở về trạng thái sẵn sàng nảy mầm. Sau khi xử lý, những hạt sâm Ngọc Linh được phá ngủ đông có vỏ nứt vỡ để sẵn sàng phát triển thành mầm.

Tuy nhiên, các tác giả nhận thấy rằng, nếu chỉ phá vỡ ngủ đông bằng cách phân tầng ẩm, nghĩa là chuyển hạt vào điều kiện nhiệt độ ẩm, tỷ lệ hạt nảy mầm thấp, thời gian nảy mầm kéo dài và đặc biệt phôi thu được yếu, cây phát triển không đồng đều. Điều này có thể giải thích được rằng quá trình nảy mầm cây cần sử dụng các chất dinh dưỡng có trong hạt, tuy nhiên, việc kích thích phân tầng ẩm để phá ngủ đông chỉ kích thích phôi chứ chưa chuyển hóa các thành phần có trong nội nhũ nên cây phát triển kém, còi cọc.

Theo đó, các tác giả đã nhận thấy rằng, nếu chuyển hạt sang giai đoạn phân tầng lạnh để kích thích hạt nảy mầm, nghĩa là để hạt nảy mầm trong điều kiện lạnh thì sẽ tăng được chất lượng chồi lên rất cao, chất lượng cây sâm Ngọc Linh con thu được tốt hơn hẳn. Đây là một điều bất ngờ do không có tài liệu nào đề cập đến việc để hạt sâm Ngọc Linh nảy mầm trong điều kiện lạnh.

Trong bước kích thích nảy mầm hạt sâm Ngọc Linh, các tác giả tiến hành đồng thời với quá trình phân tầng lạnh, nghĩa là bằng cách chuyển hạt sâm Ngọc Linh sau khi phá ngủ đông ở điều kiện nhiệt độ từ 18 đến 20°C vào điều kiện nhiệt độ từ 2 đến 4°C để tiến hành kích thích nảy mầm. Quá trình nảy mầm này được tiến hành đồng thời với quá trình phân tầng lạnh, nghĩa là kích thích các chất dinh dưỡng có trong nội nhũ chuyển hóa thành dạng năng lượng cung cấp cho chồi cây. Theo đó hạt sâm Ngọc Linh sau khi phá ngủ đông được đưa vào khay cát ẩm với nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2 đến 4°C, độ ẩm từ 60 đến 65% trong khoảng từ 55 đến 65 ngày thu được hạt sâm Ngọc Linh đã được nảy mầm.

Cần lưu ý, tốt nhất giai đoạn phá ngủ đông được thực hiện trong điều kiện tối và giai đoạn kích thích nảy mầm hạt này được thực hiện trong điều kiện quang chu kỳ 8 giờ/ngày với cường độ yếu từ 200-400 lux trên bề mặt lớp cát. Sau quá trình kích thích nảy mầm, hạt sâm Ngọc Linh bắt đầu nhú các phôi mầm ra khỏi lớp vỏ cứng.

Trong bước gieo hạt sâm Ngọc Linh, hạt sâm Ngọc Linh sau khi được nảy mầm trong các giá gieo chứa cát được gieo vào giá thể trên luống hoặc trong các bầu. Giá thể bao gồm giá thể được khử trùng, hoặc tốt nhất là giá thể đã được xử lý sạch mầm bệnh. Giá thể được chuẩn bị để gieo hạt sâm Ngọc Linh bao gồm 2/3 đất mùn rừng và 1/3 cát. Hạt sâm Ngọc Linh được gieo cách bề mặt giá thể, tốt hơn là từ 2 đến 3 cm. tốt nhất là khoảng 3 cm. Điều này rất quan trọng cho quá trình nảy mầm hạt do nếu trồng sâu hơn, cây không phát triển, chồi sẽ bị chết. Nhiệt độ phát triển được giữ nằm trong khoảng từ 15 đến 18°C, sau khi hạt nảy mầm tiến hành phun thuốc trừ nấm và phân bón theo chu kỳ 1 tháng/lần trong 3 tháng thu được cây sâm Ngọc Linh.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó hạt sâm Ngọc Linh được gieo cách bề mặt giá thể từ 2 đến 3cm, nồng độ thuốc trừ nấm được sử dụng là 2ppm và nồng độ phân bón được sử dụng là 1ppm.

Bằng phương pháp gieo hạt theo giải pháp hữu ích, quá trình để từ hạt mà thành cây sâm Ngọc Linh ngoài thực địa, chỉ cần từ 40 đến 60 ngày. Cây sâm Ngọc Linh con phát triển mạnh, chồi mầm mập. Sau 3 tháng chăm sóc ngoài vườn ươm, cây sâm con đạt tiêu chuẩn cây sâm thành phẩm về mặt hình thái. Theo đó, tổng thời gian để thu hoạch, xử lý hạt và gieo hạt sâm Ngọc Linh đến khi thu được cây sâm con đủ tiêu chuẩn chỉ mất khoảng từ 9 đến 12 tháng. Chu kỳ bắt đầu gieo hạt sau khi đã phá ngủ đông và kích thích hạt nảy mầm trên thực địa có thể thực hiện từ tháng 1-2 hàng năm, đến khoảng tháng 7-9 thì đã có thể thu được cây giống mà không bị trải qua thời gian mùa đông, cây ngừng phát triển. Đây là một điều rất có lợi đối với người trực tiếp gieo trồng cây sâm Ngọc Linh vì có thể chủ động, rút ngắn được thời gian gieo hạt.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Ví dụ 1: Thử nghiệm các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình xử lý hạt sâm Ngọc Linh

Để đánh giá hiệu quả xử lý của dung dịch NaClO trong việc khử trùng và tỷ lệ nứt vỏ hạt sâm Ngọc Linh, tiến hành thử nghiệm đánh giá độc lập với các dung dịch khử trùng khác nhau. Theo đó, quả sâm Ngọc Linh chín được thu hoạch, để 1 tuần cho quả chín mềm, xát bỏ phần thịt rửa sạch và thử nghiệm khả năng khử trùng bằng dung dịch tảo 10%, NaClO và formalin độc lập. Các công thức thử nghiệm được thực hiện với 500 hạt, lặp lại 3 lần, hạt sau khi xử lý được vùi trong cát ẩm trong 90 ngày, tiến hành đánh giá tỷ lệ nhiễm bệnh và tỷ lệ nứt vỏ. Các công thức được bố trí như sau:

ĐC: Rửa hạt bằng nước cất.

CT1: Ngâm hạt trong dung dịch tỏi 10% trong 10 phút.

CT2: Ngâm hạt trong dung dịch tỏi 10% trong 15 phút.

CT3: Ngâm hạt trong dung dịch tỏi 10% trong 20 phút.

CT4: Ngâm hạt trong dung dịch NaClO 2% trong 10 phút.

CT5: Ngâm hạt trong dung dịch NaClO 2% trong 15 phút.

CT6: Ngâm hạt trong dung dịch NaClO 2% trong 20 phút.

CT7: Ngâm hạt trong dung dịch formalin 0,2% trong 10 phút.

CT8: Ngâm hạt trong dung dịch formalin 0,2% trong 15 phút.

CT9: Ngâm hạt trong dung dịch formalin 0,2% trong 20 phút.

Kết quả thử nghiệm được xử lý bằng phần mềm IRRISTART, kết quả đánh giá được thể hiện trên Bảng 1 và Hình 1.

Bảng 1. Ảnh hưởng của dung dịch và thời gian khử trùng đến tỷ lệ nhiễm bệnh và tỷ lệ nứt vỏ hạt sâm Ngọc Linh.

Thử nghiệm	Tỷ lệ nhiễm bệnh (%)	Độ lệch chuẩn	Tỷ lệ nứt vỏ (%)	Độ lệch chuẩn
ĐC	28,67	5,03	45,33	5,03
CT1	20,00	4,00	57,33	5,03
CT2	15,33	4,16	60,00	4,00
CT3	17,33	2,31	61,33	5,03
CT4	10,67	3,06	66,67	4,62
CT5	5,33	1,15	74,67	5,03
CT6	12,67	3,06	69,33	4,16
CT7	20,67	2,31	62,67	1,15
CT8	16,67	3,06	63,33	6,11
CT9	6,00	2,00	61,33	3,06

Theo kết quả được thể hiện trên Bảng 1 cho thấy, đối với công thức thử nghiệm CT5 cho tỷ lệ nhiễm bệnh thấp nhất và tỷ lệ hạt nứt vỏ sau 90 ngày ủ cao nhất. Kết quả quan sát cho thấy, tỷ lệ nhiễm bệnh đối với hạt sâm Ngọc Linh không chỉ bị tấn công bên ngoài mà có thể bị vi khuẩn tấn công trong nội nhũ. Điều này cho thấy tỷ lệ khử trùng không đảm bảo được 100%. Các tác giả đã thử nghiệm với các nồng độ khử trùng cao hơn cho thấy, nếu sử dụng các dung dịch sát khuẩn mạnh không những ảnh hưởng đến tỷ lệ nảy mầm do tác động trực tiếp đến phôi mà còn có thể gây ra các tổn

thương trên lớp vỏ khiến cho quá trình ủ (lên tới 90 ngày) là điều kiện tốt để vi khuẩn xâm nhập và làm hỏng hạt (Hình 2).

Ví dụ 2: Thử nghiệm tác động của chất điều hòa sinh trưởng đến quá trình phá ngủ của hạt

Để đánh giá hiệu quả xử lý các hợp chất sinh trưởng tác động đến quá trình ngủ đông của hạt sâm Ngọc Linh, tiến hành thử nghiệm đánh giá độc lập với các dung dịch kích thích sinh trưởng bao gồm Kinetin, GA₃, NAA và BA. Theo đó, quả sâm Ngọc Linh chín được thu hoạch, để 1 tuần cho quả chín mềm, xát bỏ phần thịt rửa sạch xử lý bằng dung dịch NaClO 2% trong 15 phút như trong Ví dụ 1. Tiếp đó hạt được xử lý bằng các dung dịch thử nghiệm khác nhau trong 24 giờ ở 25°C, các thử nghiệm được thực hiện với 500 hạt, lặp lại 3 lần. Các tác giả đã thử nghiệm và xác định được nhiệt độ tối ưu của quá trình này nằm trong khoảng từ 18-20°C (số liệu không thể hiện), nên nhiệt độ tối ưu được sử dụng là nhiệt độ 20°C. Hạt sau khi xử lý được vùi trong cát ẩm trong 90 ngày ở 20°C, ẩm độ 60%, tiến hành đánh giá tỷ lệ nứt vỏ. Các công thức được bố trí như sau:

ĐC: Xử lý bằng nước cất.

CT1: Xử lý bằng dung dịch chứa 100 ppm GA₃.

CT2: Xử lý bằng dung dịch chứa 50 ppm Kinetin.

CT3: Xử lý bằng dung dịch chứa 100ppm GA₃ + 50 ppm Kinetin.

CT4: Xử lý bằng dung dịch chứa 100ppm GA₃ + 25 ppm BA.

CT5: Xử lý bằng dung dịch chứa 100ppm GA₃ + 50 ppm BA.

CT6: Xử lý bằng dung dịch chứa 100ppm GA₃ + 100 ppm BA.

CT7: Xử lý bằng dung dịch chứa 100ppm GA₃ + 25 ppm NAA.

CT8: Xử lý bằng dung dịch chứa 100ppm GA₃ + 50 ppm NAA.

CT9: Xử lý bằng dung dịch chứa 100ppm GA₃ + 100 ppm NAA.

Kết quả thử nghiệm được xử lý bằng phần mềm IRRISTART, kết quả đánh giá được thể hiện trên Bảng 2 và Hình 3.

Bảng 2: Ảnh hưởng của phương pháp xử lý hạt đến thời gian và tỉ lệ nứt vỏ của hạt sâm Ngọc Linh

Thử nghiệm	Thời gian xử lý (ngày)					Tỉ lệ nứt vỏ	Tỉ lệ hạt hỏng
	40	50	60	70	80		
ĐC		18	39,33	9,33	7,33	73,99	26,01
CT1	87,33	6,66	0	0	0	93,99	6,01
CT2	0	42,66	25,33	7,33	0	75,32	24,68
CT3	64,66	8,66	9,33	1,33	0	83,98	16,02
CT4	25,33	33,33	21,33	1,33	0	81,32	18,68
CT5	18,66	25,33	49,99	0	0	93,98	6,02
CT6	2,66	15,33	14,66	45,33	3,33	81,31	18,69
CT7	0	39,33	22	16,66	0	77,99	22,01
CT8	0	21,33	34,66	17,33	6	79,32	20,68
CT9	0	18,66	44	17,33	6	85,99	14,01

Kết quả cho thấy, sau 30 ngày xử lý phân tầng ẩm phá ngủ đông hạt sâm Ngọc Linh, đối với CT2 (100 ppm GA₃) đã thấy hạt bắt đầu trương nở, xuất hiện các rãnh dọc theo bề mặt hạt. Sau 35 ngày vỏ hạt bắt đầu mở, sau 40 ngày thu được hạt tách vỏ hoàn toàn quan sát được đầu chồi bên trong (Hình 4). Sau 90 ngày xử lý cho thấy tỷ lệ trương nở hạt trong CT1 (GA₃ 100ppm) đạt 93,99% và CT5 (GA₃ 100ppm + BA 50ppm đạt) 93,98 trong khi mẫu đối chứng ngâm nước cất chỉ đạt 73,99%. Tuy nhiên xử lý hạt bằng GA₃ hạt có thời gian nứt vỏ ngắn và đồng đều hơn, chỉ trong 50 ngày hoàn bộ hạt đã nứt vỏ là nhanh hơn so với hạt trong thử nghiệm GA₃ 100ppm + BA 50ppm hạt nứt vỏ hoàn toàn sau 60 ngày.

Ở các thử nghiệm khác kết hợp GA₃ với với các auxin và cytokinin khác nhận thấy hạt có tỉ lệ nứt vỏ cao hơn mẫu đối chứng, nhưng vẫn thấp hơn so với CT1 và CT5 cho thấy các chất điều hòa sinh trưởng khác như NAA và BA ko tác động tới hoặc có tác động không tốt tới khả năng phân tầng của hạt sâm Ngọc Linh. Đối với CT 2, (50 ppm Kinetin) nhận thấy tỉ lệ nứt vỏ có tăng nhưng không đáng kể, nhưng khi kết hợp Kin và GA₃ nhận thấy lại có tỉ lệ nứt vỏ lại chỉ đạt 83,98% thấp hơn so với việc chỉ sử dụng riêng lẻ GA₃.

Ngoài ra xử lý hạt bằng GA₃ cho tỉ lệ nứt hạt sớm và đồng đều hơn, sau 40 ngày 87,33% hạt đã nứt vỏ trong khi các nghiệm thức còn lại có hạt nứt vỏ không đồng loạt

trải dài suốt 20-30 ngày.

Ví dụ 3: Thử nghiệm tác động của nhiệt độ tới tỷ lệ nảy mầm của hạt đã nứt vỏ

Việc gieo trực tiếp hạt đã nảy mầm cho chất lượng chồi kém, kết quả cây sâm giống còi cọc trong nhiều năm dẫn đến chất lượng củ nhỏ. Để đánh giá hiệu quả của quá trình phân tầng lạnh, các tác giả tiến hành thử nghiệm ủ hạt để phát triển phôi trong điều kiện lạnh. Các thử nghiệm được thực hiện với 100 hạt tách vỏ thu được từ Ví dụ 2, lặp lại 3 lần, hạt sau khi xử lý được vùi trong cát ẩm trong 90 ngày ở các nhiệt độ từ -3°C đến 5°C, ẩm độ được duy trì tối ưu 60% để đánh giá tỷ lệ nảy mầm hạt. Các công thức được bố trí như sau: CT1: Ủ ở -3°C, CT2: ủ ở 0°C, CT3 ủ ở 3°C, CT4 ủ ở 5°C. Tất cả các công thức được tiến hành trong 60 ngày để xác định tỷ lệ nảy mầm hạt. Kết quả thử nghiệm được xử lý bằng phần mềm IRRISTART, kết quả đánh giá được thể hiện trên Bảng 3 và Hình 5.

Bảng 3: Ảnh hưởng của nhiệt độ tới tỷ lệ nảy mầm của của hạt sâm Ngọc Linh

Thử nghiệm	Số hạt ban đầu	Số hạt nảy mầm			Tỉ lệ nảy mầm (%)	Độ lệch chuẩn
		Lần 1	Lần 2	Lần 3		
CT 1	500	0	0	0	0	0
CT2	500	150	230	180	79,33	4,62
CT3	500	500	480	500	93,33	3,06
CT4	500	260	280	310	71,33	7,02
CT5	500	150	170	140	26,67	5,03

Kết quả cho thấy dưới -3°C hạt không thể nảy mầm, trong khoảng -3 đến 3°C nhiệt độ tăng tỉ lệ nảy mầm tăng, tuy nhiên sau khoảng 3°C nhiệt độ tăng tỉ lệ nảy mầm giảm. Nhiệt độ quá thấp và quá cao đều làm tổn thương hạt trong quá trình nảy mầm. Điều này chứng tỏ hạt sâm Ngọc Linh sau khi nứt vỏ không thể nảy mầm ở nhiệt độ thấp dưới -3°C. Hạt sau khi gieo trên thực địa cho thấy cây sâm con có chất lượng phát triển tốt (Hình 6).

Ví dụ 3: Xác định chế độ dinh dưỡng đối với cây sâm Ngọc Linh

Để xác định điều kiện trồng cây sâm Ngọc Linh sau khi gieo, tiến hành thử nghiệm đối với cây con sâm Ngọc Linh 3 tháng tuổi có chiều cao đồng đều, đầy đủ lá, không sâu bệnh. Thử nghiệm tiến hành với các phân bón như MK501, BioHumic,

NanoBio, OZERI NPK. Phân bón được ủ qua đêm với 1 lít nước với nồng độ khác nhau, tưới hoặc phun cho cây. Mỗi công thức được pha chế thành 4 lít nước tưới đều mỗi cây 100 ml dung dịch cách gốc khoảng 3 cm hoặc bón trực tiếp phun qua lá. Mỗi nghiệm thức bố trí 30 cây, lặp lại 3 lần. Kết quả thử nghiệm được thể hiện trên Bảng 5.

Bảng 4: Ảnh hưởng của giá thể và dinh dưỡng đến sự phát triển của cây con sâm Ngọc Linh

Giá thể	CTTN	Phương pháp bổ sung dinh dưỡng	Chỉ tiêu sinh trưởng phát triển					
			Chiều cao cây (cm)	Đường kính thân (mm)	Chiều dài lá (cm)	Chiều rộng lá (cm)	Số rễ chính	Đường kính củ
Mùn núi	CT1	Nước (đ/c)	7,86	1,74	4,86	1,97	4,83	1,35
	CT2	MK501 + BioHumic	9,46	1,85	4,87	1,86	5,5	1,42
	CT3	MK 501 + NanoBio	9,82	1,71	4,58	1,66	5,16	1,37
	CT4	OZERI NPK	9,32	1,78	4,61	2,15	4,95	1,44
2/3 Mùn núi + 1/3 đất rừng	CT1	Nước (đ/c)	9,83	1,79	4,9	2,19	5,31	1,66
	CT2	MK501 + BioHumic	10,28	1,89	5,41	2,19	5,73	1,76
	CT3	MK 501 + NanoBio	9,82	1,82	5,26	2,05	5,49	1,52
	CT4	OZERI NPK	10,02	1,82	5,3	2,17	5,38	1,58
½ Mùn núi + ½ cát sông	CT1	Nước (đ/c)	9,63	1,68	4,88	2,09	5,15	1,51
	CT2	MK501 + BioHumic	9,87	1,72	5,52	2,08	5,67	1,63
	CT3	MK 501 + NanoBio	9,92	1,87	5	2,05	5,05	1,48
	CT4	OZERI NPK	9,52	1,78	4,93	1,97	5,11	1,48

Theo kết quả thể hiện trên Bảng 5 cho thấy, giá thể cát:mùn tỉ lệ 2/3 Mùn núi + 1/3 đất rừng là thích hợp nhất cho cây giống sâm Ngọc Linh phát triển thể hiện ở chiều cao cây đạt được sau 1 năm lên đến $11,82 \pm 1,41$ cm cao hơn các nghiệm thức còn lại, khác nhau có ý nghĩa thống kê ở $p < 0,01$. Ở tỉ lệ này giá thể có độ thoáng khí cũng như độ ẩm thích hợp nhất cho cây sâm Ngọc Linh, khi lượng đất cao rễ cây sẽ hô hấp khó khăn, còn khi tỉ lệ cát lớn quá trình thoát hơi nước từ giá thể diễn ra rất nhanh làm giá thể khô.

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Quy trình gieo hạt sâm ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv) bằng kỹ thuật phá ngủ đông và xuân hóa hạt kết hợp xử lý chất kích thích để điều hòa quá trình sinh trưởng rút ngắn thời gian nảy mầm cho phép rút ngắn quá trình gieo, chủ động được quá trình trồng cây đáp ứng mùa vụ trồng cây ngoài thực địa.

Quy trình theo giải pháp hữu ích cho phép kiểm soát được quá trình phát triển của hạt sâm Ngọc Linh, kiểm soát được các yếu tố bệnh hại, chống thất thoát hạt giống do côn trùng, chuột, kiến và chim phá hoại ngoài thực địa, Quá trình phá ngủ đông đặc biệt hữu ích trong việc chủ động được mùa vụ trồng cây và giảm được thời gian gieo để nhân giống hữu tính của cây sâm.

Ngoài việc phát triển bền vững vùng trồng sâm Ngọc Linh, góp phần giảm thiểu tác động thoái hóa do nhân giống vô tính, quy trình gieo hạt theo giải pháp vừa rút ngắn được thời gian, vừa tăng được tỷ lệ nảy mầm tạo cây giống con, lên tới trên 90%, góp phần hoàn thiện quy trình nhân giống sâm đặc hữu của Việt Nam.

Quy trình đặc biệt hữu ích do có thể chủ động trong việc sản xuất cây giống chất lượng cao, với việc có nguồn hạt giống dồi dào, đây là một hướng giúp người dân bản địa có thể tự phát triển bền vững nguồn cây giống, không bị phụ thuộc vào các nhà nhân giống sâm bằng phương pháp nuôi cấy mô vô tính góp phần nâng cao giá trị sản xuất cho người dân bản địa.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình gieo hạt sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv), trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) xử lý hạt sâm Ngọc Linh bằng cách thu hái quả sâm Ngọc Linh chín, sạch bệnh, xát bỏ phần thịt, rửa sạch và ngâm phần hạt trong dung dịch NaClO 2% trong 20 phút rồi rửa sạch lớp vỏ nhòn bằng nước, sau khi để ráo ở 20°C, ngâm hạt trong dung dịch chất kích thích sinh trưởng chứa từ 50 đến 100 ppm GA₃ hoặc BA hoặc hỗn hợp của chúng trong khoảng từ 15 đến 30 giờ ở 25°C, sau đó rửa sạch bằng nước cất và để ráo hạt ở 20°C thu được hạt sâm Ngọc Linh được xử lý;

b) phá ngủ đông hạt sâm Ngọc Linh bằng cách trộn hạt sâm Ngọc Linh được xử lý với cát theo tỷ lệ 1/3 theo thể tích và ủ trong khay chứa cát sạch trong điều kiện nhiệt độ từ 18 đến 20°C, độ ẩm từ 60 đến 65% trong khoảng từ 40 đến 60 ngày để phá ngủ đông hạt sâm Ngọc Linh;

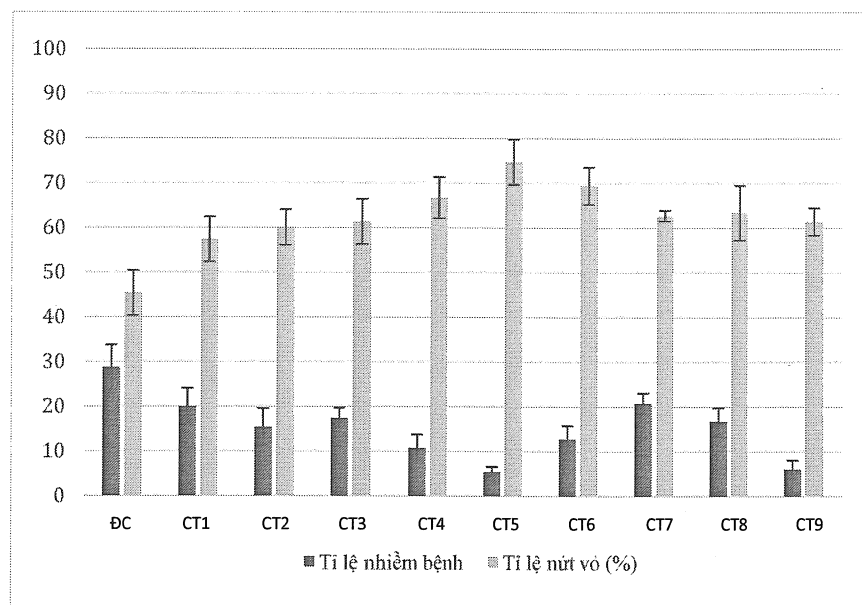
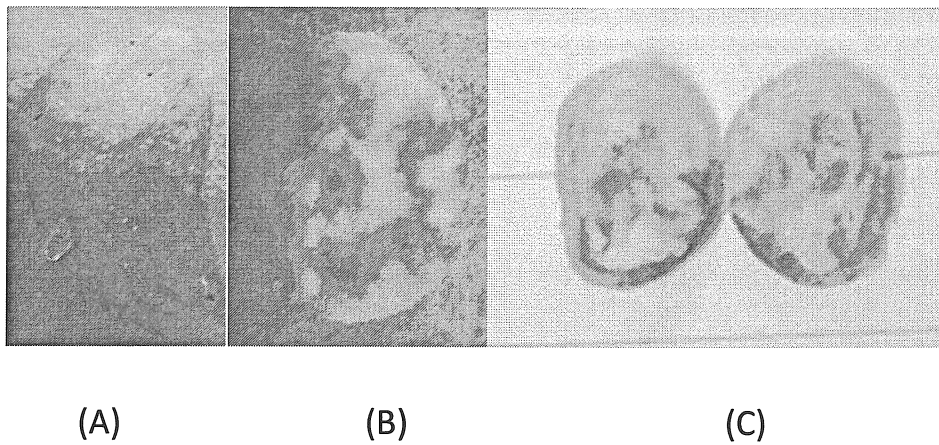
c) kích thích nảy mầm hạt sâm Ngọc Linh bằng cách chuyển hạt sâm Ngọc Linh sau khi phá ngủ đông vào điều kiện nhiệt độ từ 2 đến 4°C, độ ẩm từ 60 đến 65% trong khoảng từ 55 đến 65 ngày thu được hạt sâm Ngọc Linh đã được nứt mầm; và

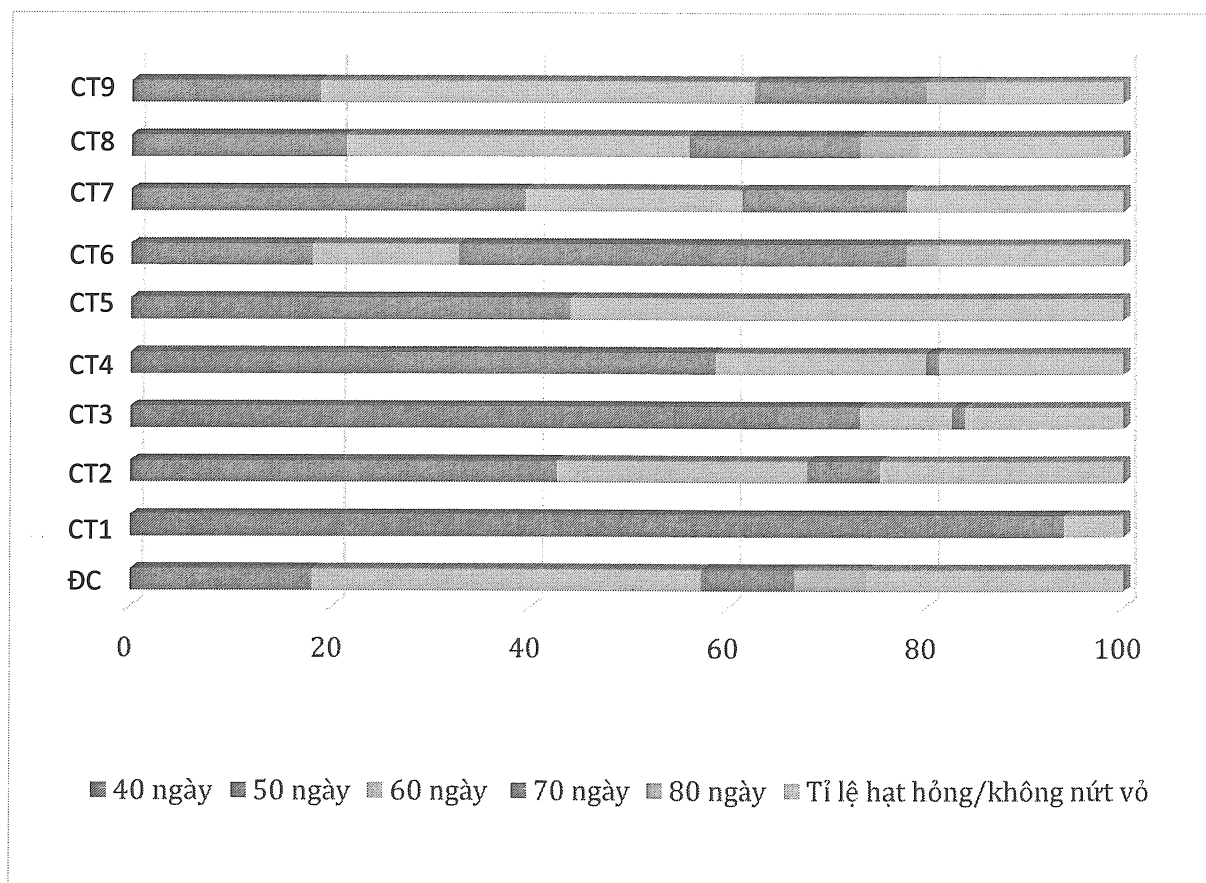
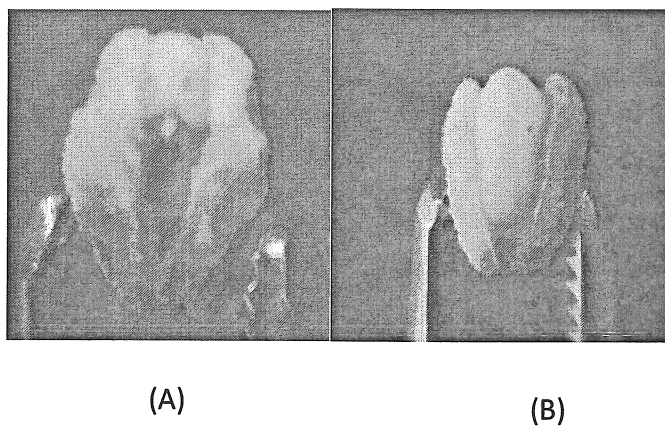
d) gieo hạt sâm Ngọc Linh bằng cách chuyển hạt sâm Ngọc Linh đã được kích thích tạo mầm vào gieo trong giá thể được khử trùng bao gồm 2/3 mùn và 1/3 cát, giữ nhiệt độ nằm trong khoảng từ 15 đến 18°C, sau khi hạt nảy mầm tiến hành hành phun thuốc trừ nấm và phân bón theo chu kỳ 1 tháng/lần trong 3 tháng thu được cây sâm Ngọc Linh.

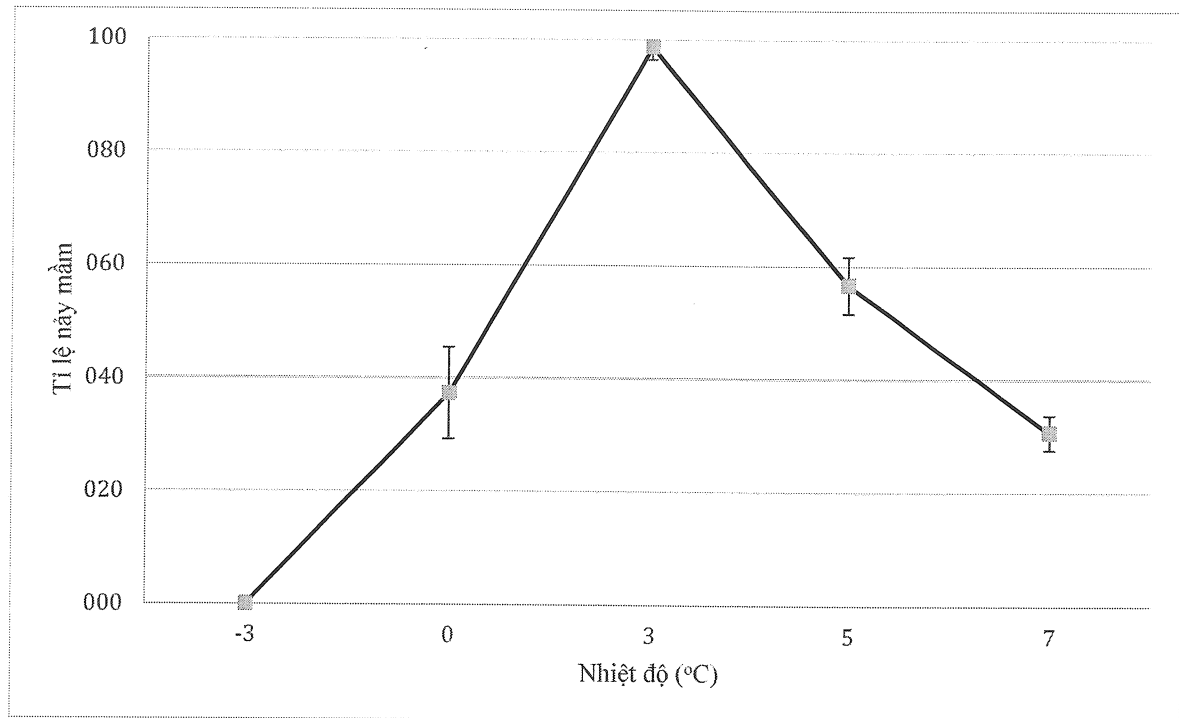
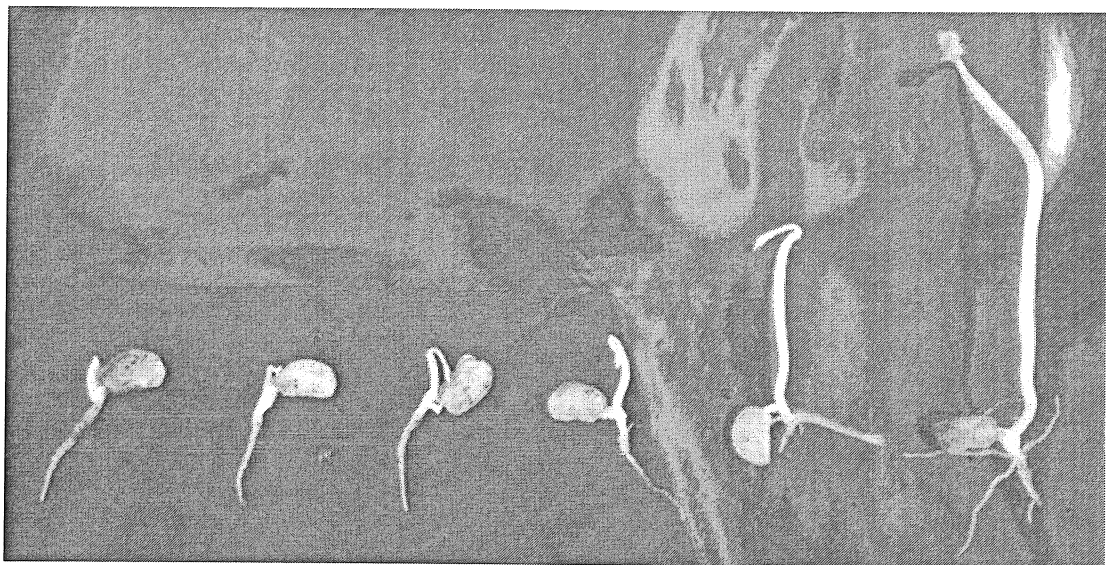
2. Quy trình theo điểm 1, trong đó dung dịch chất kích thích sinh trưởng chứa 100 ppm GA₃ và thời gian phá ngủ đông là 40 ngày.

3. Quy trình theo điểm 1, trong đó dung dịch chất kích thích sinh trưởng chứa 100ppm GA₃ và 50ppm BA và thời gian phá ngủ đông là 60 ngày.

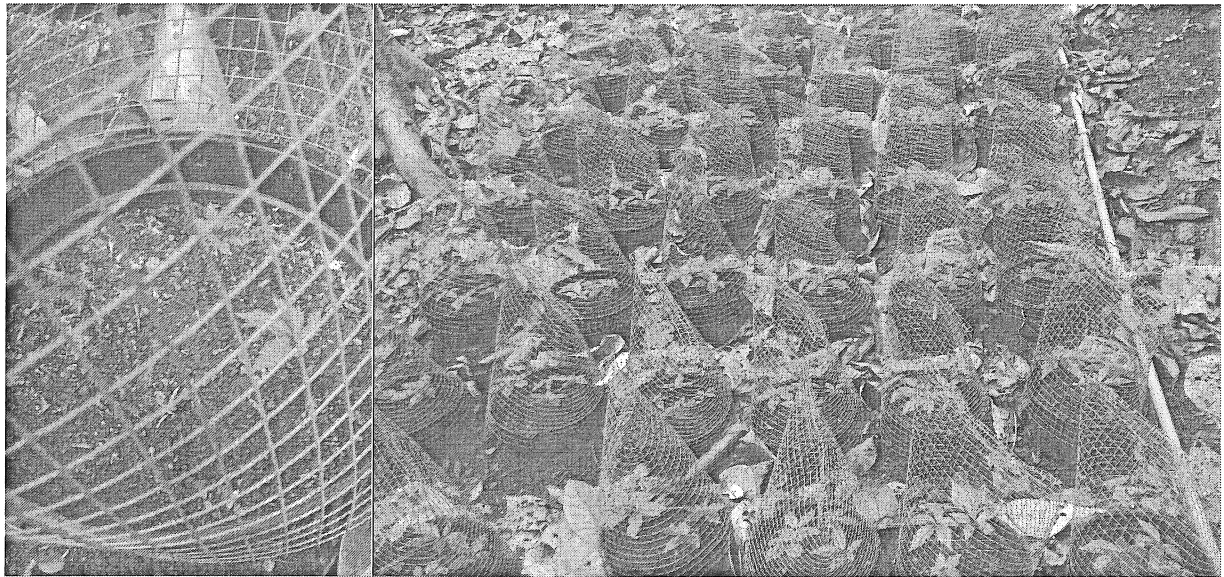
4. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó hạt sâm Ngọc Linh được gieo cách bề mặt giá thể từ 2 đến 3cm, nồng độ thuốc trừ nấm được sử dụng là 2ppm và nồng độ phân bón được sử dụng là 1ppm.

HÌNH 1**HÌNH 2**

HÌNH 3**HÌNH 4**

HÌNH 5**HÌNH 6**

HÌNH 7



(A)

(B)

HÌNH 8

