



(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)



2-0002913

(51) **A01H 4/00**
2019.01

(13) **Y**

(21) 2-2020-00082

(22) 28/02/2020

(45) 25/06/2022 411

(43) 25/06/2020 387AHI

(73) **VIỆN ỨNG DỤNG CÔNG NGHỆ (VN)**

số 25 Lê Thánh Tông, phường Phan Chu Trinh, quận Hoàn Kiếm, thành phố Hà Nội

(72) Nguyễn Thị Lài (VN); Phạm Hương Sơn (VN).

(74) Công ty TNHH Dịch vụ Sở hữu trí tuệ GREENIP (GREENIP CO., LTD)

(54) **QUY TRÌNH NHÂN GIỐNG IN VITRO CÂY SÂM CAU (CURCULIGO ORCHIOIDES
GAERTN.) SỬ DỤNG ÁNH SÁNG ĐÈN LED**

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình nhân giống *in vitro* cây Sâm cau (*Curculigo orchioides* Gaertn.) sử dụng ánh sáng đèn LED nhằm tạo ra được nguồn cây giống với số lượng lớn trong thời gian ngắn gồm các bước: tạo vật liệu khởi đầu, nhân nhanh cụm chồi, tạo cây *in vitro* hoàn chỉnh và đưa cây ra vườn ươm, trong đó các mẫu nhân giống được nuôi cấy trong điều kiện thời gian chiếu sáng 12-14 giờ/ngày, cường độ chiếu sáng 2000lux, nhiệt độ $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, độ ẩm trung bình khoảng 50% - 60% với ánh sáng đơn sắc đèn LED. Quy trình này đã tạo ra được nguồn cây giống với số lượng lớn, rút ngắn được thời gian nuôi cấy, tiết kiệm năng lượng và giảm chi phí sản xuất.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình nhân giống *in vitro* cây Sâm cau (*Curculigo orchioides* Gaertn.) sử dụng ánh sáng đèn LED nhằm tạo ra được nguồn cây giống với số lượng lớn, rút ngắn thời gian ra rễ, tăng số lượng rễ, tăng tỷ lệ sống của cây ở giai đoạn ngoài vườn ươm và tiết kiệm được năng lượng, giảm chi phí sản xuất, giá cả phù hợp, đáp ứng nhu cầu của thị trường, tạo nguồn nguyên liệu quý cho ngành dược.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Cây Sâm cau (*Curculigo orchioides* Gaertn.) thuộc họ Sâm cau (Hypoxidaceae) là cây thuốc quý trong y học cổ truyền Việt Nam và các nước châu Á khác. Trên thế giới, Sâm cau phân bố ở Úc, Trung Quốc, Nhật Bản, Malaysia, Pakistan, Philipin và Sri Lanka (Pandey *et al.*, 1983). Ở Việt Nam, chúng phân bố chủ yếu ở các vùng như: Lai Châu, Tuyên Quang, Cao Bằng, Sơn La, Hòa Bình, Nghệ An, Đắk Lắk và Kon Tum. Cây Sâm cau là loại cây ưa ẩm, ưa sáng, thường mọc trên đất còn tương đối màu mỡ trong thung lũng, chân núi đá vôi hoặc ven nương rẫy.

Cây Sâm cau là một loài cây giàu curculigin, curculigosit, phenolic, phytosterol, glucoza, saponin, alkaloit, glycosit, lignan, flavon, sesquiterpen, protein caspaza, polysacarit, axit gallic, axit béo, v.v.. Cây sâm cau có tác dụng điều trị bệnh Alzheimer, bệnh thoái hóa thần kinh và rối loạn nhận thức (Brintha S, Rajesh S, Renuka R, Santhanakrishnan VP and Gnanam R, 2017, Phytochemical analysis and bioactivity prediction of compounds in methanolic extracts of *Curculigo orchioides* Gaertn. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry. Vol 6(4). trang 192-197); chống ung thư (Rajagopalan K., Sivarajan V.V., Varier P.R., 1994, “*Curculigo orchioides* Gaertn”, Indian Medicinal Plants, Orient Longman, Madras, trang 245-248); chữa bệnh vàng da, hen suyễn, làm thuốc bổ, ngăn ngừa loãng xương, trị đái tháo đường (Nagesh & Shanthamma, 2016) Nagesh K.S. and Shanthamma C., 2016, “An overview on tissue culture studies of *Curculigo orchioides* Gaertn: an endangered multipotential medicinal herb”, Journal of Medicinal Plants Studies, 4(4), trang 119-123); chữa bệnh huyết trắng (Prajapathi H.A., Mehta S.R., Subramanian R.B., 2004, “*In vitro* regeneration in *Curculigo orchioides* Gaertn. - an endangered medicinal herb”, Phytomorphology, 54,

trang 85-95); chữa vô sinh, nam giới tinh lạnh, liệt dương, tê thấp, đau lưng, viêm thận mạn tính, viêm khớp, suy nhược cơ thể, loét dạ dày tá tràng, tiêu chảy, huyết áp cao, v.v., (Viện Dược liệu, 2006, Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, tập II, trang 693). Do nhu cầu sử dụng làm dược liệu tăng mạnh những năm gần đây, loài Sâm cau đã bị khai thác ồ ạt, dẫn đến nguồn nguyên liệu đang trở nên cạn kiệt. Mặt khác, do tỷ lệ nảy mầm từ hạt trong tự nhiên rất thấp và vùng phân bố của chúng bị tàn phá nghiêm trọng nên loài cây này lâm vào tình trạng gần như tuyệt chủng.

Trong nuôi cấy mô tế bào thực vật, ánh sáng là nhân tố quan trọng đối với sự sinh trưởng, phát triển của cây trong điều kiện *in vitro*. Hiện nay, đèn huỳnh quang được sử dụng chủ yếu trong nuôi cấy *in vitro* thực vật. Tuy nhiên, ánh sáng trắng tạo ra bởi đèn huỳnh quang là một tổ hợp các ánh sáng có bước sóng khác nhau từ 380 đến 800nm, trong số các bước sóng này có những bước sóng thực vật không có khả năng sử dụng hoặc gây tổn thương đến thực vật. Ngoài ra, đèn huỳnh quang còn có tuổi thọ thấp, tỏa nhiệt nhiều, chi phí duy trì cao. Do đó, đèn LED với nhiều ưu điểm (kích thước nhỏ, tuổi thọ cao, ít tỏa nhiệt, tiết kiệm năng lượng, đặc biệt có thể kiểm soát bước sóng sử dụng) đang được quan tâm nghiên cứu ứng dụng thay thế đèn huỳnh quang trong lĩnh vực vi nhân giống thực vật. Việc sử dụng tỷ lệ ánh sáng vàng, ánh sáng đỏ và xanh thích hợp làm tăng hệ số nhân chồi, rút ngắn được thời gian sinh trưởng và phát triển của cây và tiết kiệm năng lượng và giảm chi phí sản xuất.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Mục đích của giải pháp hữu ích là sử dụng ánh sáng đèn LED trong nhân giống *in vitro* cây Sâm cau (*Curculigo orchioides* Gaertn.) nhằm tăng số lượng chồi, rút ngắn thời gian nuôi cấy, tiết kiệm được năng lượng và giảm chi phí sản xuất.

Để đạt được mục đích nêu trên, giải pháp hữu ích đề xuất quy trình nhân giống *in vitro* cây Sâm cau (*Curculigo orchioides* Gaertn.) sử dụng ánh sáng đèn LED bao gồm các bước:

(1) Tạo vật liệu khởi đầu

Các mẫu cây Sâm cau được rửa sạch bằng nước xà phòng, cắt lấy chồi có kích thước 1-2cm, sau đó khử trùng bằng dung dịch 10% $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ trong 10-15 phút và rửa lại nhiều lần bằng nước cất vô trùng, sau đó bóc tách cắt lấy đỉnh sinh trưởng (0,3-0,5cm), nuôi cấy trên môi trường MS (Murashige & Skoog, 1962) bổ sung 20-30 g/l sucroza, 5,0-5,5 g/l agarr, 150-200 ml/l nước dừa, 0,5-1 g/l than hoạt tính, 2-2,5 mg/l

BA, 30-40 mg/l axit xitric, 40-50 mg/l rifampin, độ pH =5,5, dưới ánh sáng LED tỷ lệ 100% Y (590nm) trong thời gian 20-25 ngày để mẫu bật chồi.

(2) Nhân nhanh cụm chồi

Các mẫu sau khi bật chồi được chuyển sang cấy trên môi trường MS bổ sung 20-30 g/l sucroza, 5,0-5,5 g/l agar, 150-200 ml/l nước dừa, 0,5-1 g/l than hoạt tính, 2,0-2,5 mg/l BA, 0,5-1,0 mg/l α NAA, 30-40 mg/l axit xitric, 40-50g/l dịch chuối, 50-100 mg/l tảo *Spirulina*, độ pH =5,5, nuôi cấy trong điều kiện thời gian chiếu sáng 12-14 giờ/ngày, cường độ chiếu sáng 2000lux, nhiệt độ $25 \pm 2^\circ\text{C}$, độ ẩm trung bình khoảng 50%-60% với ánh sáng đơn sắc đèn LED tỷ lệ 40%B (460nm) : 60%R (630nm) hoặc 50%B (460nm) : 50%R (630nm), trong thời gian 40 ngày để thu được các cụm chồi.

(3) Tạo cây *in vitro* hoàn chỉnh

Các cụm chồi sau khi thu được ở giai đoạn nhân nhanh có kích thước 2-3cm được cấy vào môi trường MS bổ sung 20-30 g/l sucroza, 5,0-5,5 g/l agar, 150-200 ml/l nước dừa, 0,5-1 g/l than hoạt tính, 0,5-1,0 mg/l α NAA, độ pH =5,5, nuôi cấy trong điều kiện thời gian chiếu sáng 12-14 giờ/ngày, cường độ chiếu sáng 2000lux, nhiệt độ $25 \pm 2^\circ\text{C}$, độ ẩm trung bình khoảng 50%-60% với ánh sáng đơn sắc đèn LED tỷ lệ 70%B (460nm) : 30%R (630nm) hoặc 80%B (460nm) : 20%R (630nm) trong thời gian 25-30 ngày để thu được cây con có chiều cao 9-11cm, số lá 6-7 lá/cây, số rễ 8-9 rễ/cây, chiều dài rễ 5-6cm.

(4) Đưa cây ra vườn ươm

Cho bình cây thu được ở bước (3) ra ngoài vườn ươm trong 5 ngày, sau đó tiến hành ra cây bằng cách rửa sạch môi trường bám ở cây và đưa ra trồng ngoài vườn ươm trên đất mùn, bón phân Japon 3.5.3 (1 g/l) trong thời gian 60 ngày để thu được cây Sâm cau giống.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 là hình ảnh thể hiện cây Sâm cau đưa vào nuôi cấy mô.

Hình 2 là hình ảnh thể hiện bước nhân nhanh cụm chồi.

Hình 3 là hình ảnh thể hiện bước tạo cây *in vitro* hoàn chỉnh.

Hình 4 là hình ảnh thể hiện cây Sâm cau được trồng ngoài vườn ươm.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Cây Sâm cau nuôi cấy mô theo giải pháp hữu ích là cây Sâm cau được tái sinh bằng kỹ thuật nuôi cấy mô từ đỉnh sinh trưởng của cây Sâm cau tự nhiên theo các quy trình

nuôi cấy mô chuẩn đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Cây Sâm cau nuôi cấy mô ban đầu được đưa vào nuôi cấy mô là cây Sâm cau sạch bệnh khỏe mạnh, được cắt bỏ lá và rễ rồi rửa sạch, cắt chồi 1-2cm, khử trùng, sau đó bóc tách cắt lấy đỉnh sinh trưởng khoảng (0,3-0,5cm).

Phương pháp khử trùng có thể thực hiện như sau: các mẫu sau khi được thu hái về cắt bỏ lá và rễ được rửa sạch dưới vòi nước chảy trong thời gian 5-7 phút. Tiếp theo, cắt chồi 1-2cm, khử trùng mẫu với dung dịch 10% $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ trong 10-15 phút, sau đó rửa lại bằng nước cất vô trùng 3-5 lần mỗi lần 3-5 phút.

Các môi trường và kỹ thuật nuôi cấy mô tế bào là các môi trường chuẩn và đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ như: môi trường MS (Murashige and Skoog, 1962) là môi trường nuôi cấy mô tiêu chuẩn bao gồm các thành phần khoáng đa lượng và vi lượng, chất kích thích sinh trưởng đã được sử dụng rộng rãi trong nuôi cấy mô tế bào thực vật.

Dung dịch rifampin là chất kháng sinh có tác dụng kháng khuẩn phổ rộng giúp cho mẫu giảm tỷ lệ nhiễm khuẩn và nấm.

LED đỏ (R) với bước sóng 630nm, điện áp (2V) (sản phẩm của Super Bright LEDs Inc., St. Louis Missouri, Mỹ); công suất mỗi bóng LED là 0,1W; điện trở 330 Ω (sản phẩm của Công ty Cổ phần TQCOM - Hà Nội). Bộ nguồn tạo dòng điện 12V với điện áp 5A (nguồn AXT 450 - Hãng Golden Field).

LED xanh (B) với bước sóng 460nm, điện áp (3V), điện trở 220 Ω (sản phẩm của Công ty Cổ phần TQCOM - Hà Nội) và bộ nguồn tạo dòng điện 12V với điện áp 5A (nguồn AXT 450 - Hãng Golden Field).

LED trắng (W) với bước sóng 450nm, điện áp (3V), điện trở 220 Ω (sản phẩm của Công ty Cổ phần TQCOM - Hà Nội) và bộ nguồn tạo dòng điện 12V với điện áp 5A (nguồn AXT 450 - Hãng Golden Field).

LED vàng (Y) với bước sóng 590nm, điện áp (3V), điện trở 220 Ω (sản phẩm của Công ty Cổ phần TQCOM - Hà Nội) và bộ nguồn tạo dòng điện 12V với điện áp 5A (nguồn AXT 450 - Hãng Golden Field).

Quy trình theo giải pháp hữu ích đã đưa mẫu nuôi cấy vào thành công, đặc biệt là việc bổ sung 50 mg/l rifampin, 40 mg/l axit xitric vào môi trường nuôi cấy và mẫu được nuôi cấy dưới ánh sáng đèn LED tỷ lệ 100% Y (590nm) có tác dụng làm giảm mẫu hóa nâu, giảm tỷ lệ mẫu nhiễm, tỷ lệ mẫu sống và vô trùng đạt 86% ở nồng độ 10% $\text{Ca}(\text{ClO})_2$

trong 10 phút.

Theo giải pháp hữu ích, khi bổ sung axit xitric, dịch chuối, tảo *Spirulina* vào môi trường nuôi cấy và mẫu được nuôi cấy dưới ánh sáng đèn LED tỷ lệ 40%B (460nm) : 60%R (630nm) hoặc 50% B (460nm) : 50% R (630nm) có tác dụng rất hiệu quả cho việc thúc đẩy tăng nhanh hệ số nhân chồi và tăng trưởng số lá, chiều cao cây. Hệ số nhân giống tăng lên đến 19-23 lần.

Các chồi có chiều cao 2-3cm, chưa có rễ được cấy trên môi trường MS bổ sung 20-30 g/l sucroza, 5,0-5,5 g/l agar, 150-200 ml/l nước dừa, 0,5-1 g/l than hoạt tính, 0,5-1,0 mg/l α NAA, độ pH = 5,5. Các mẫu được nuôi cấy dưới ánh sáng đèn LED tỷ lệ 70% B (460nm) : 30% R (630nm) hoặc 80%B (460nm) : 20%R và nuôi cấy trong điều kiện chiếu sáng 12 giờ/ngày cường độ chiếu sáng 2000lux, nhiệt độ $25 \pm 2^\circ\text{C}$, độ ẩm trung bình khoảng 50% - 60%. Sau 30 ngày nuôi cấy, thu được cây Sâm cau nuôi cấy mô với chiều dài khoảng từ 8 - 10cm, số lá đạt 6-7 lá/cây, số rễ đạt 8-9 rễ/cây, chiều dài rễ đạt 5-6cm, màu sắc cây Sâm cau xanh đậm thì tiến hành đưa cây ra vườn ươm.

Bước thích nghi cây Sâm cau nuôi cấy mô với môi trường là bước để cho cây Sâm cau con thích nghi với điều kiện ngoại cảnh, hạn chế cây bị sốc khi đưa từ môi trường tối ưu, đầy đủ chất dinh dưỡng ra môi trường tự dưỡng, cây phải tự tổng hợp chất dinh dưỡng ngoài tự nhiên và sinh trưởng. Các bình nuôi cấy có cây Sâm cau nuôi cấy mô đã được chuẩn hóa, đủ tiêu chuẩn đưa ra trồng được ngoài vườn ươm có nhiệt độ nằm trong khoảng từ 25 đến 30°C , trong thời gian khoảng từ 5 ngày. Các bình nuôi cấy này được giữ khô, tránh nước mưa gây nhiễm khuẩn cây. Cây Sâm cau con sau khi đã được thích nghi với môi trường được đưa ra khỏi bình nuôi cấy và cẩn thận lấy cây ra khỏi bình, dùng nước sạch rửa sạch môi trường bám quanh cây, tránh cây bị dập nát, tránh không làm đứt rễ cây. Thời gian rửa cây Sâm cau không quá 3 phút, tránh gây tổn thương cho cây Sâm cau và rễ cây. Sau khi cây con đã được rửa sạch, đưa cây con ra trồng ngoài vườn ươm trên đất mùn, bón phân Japon 3.5.3 (1 g/l) giúp cải tạo đất và làm tơi xốp đất, cho rễ cây phát triển mạnh, làm cho đất thông thoáng, làm tăng tỷ lệ sống cho cây ở giai đoạn vườn ươm. Trong quá trình trồng, loại bỏ những cây bị chết do thối để tránh lây nhiễm sang vườn ươm. Tỷ lệ cây sống sau 60 ngày đạt 98%.

Theo giải pháp hữu ích, môi trường nhân nhanh MS được bổ sung 30 g/l sucroza, 5,5 g/l agar, 200 ml/l nước dừa, 1 g/l than hoạt tính, 2,0 mg/l BA, 0,5 mg/l α NAA, 40 mg/l axit xitric, 50g/l dịch chuối, 50 mg/l tảo *Spirulina*, độ pH = 5,5. Các mẫu được nuôi

cây dưới ánh sáng LED tỷ lệ 50% B (460nm) : 50% R (630nm), cho hệ số nhân chồi cao nhất sau 40 ngày nuôi cấy đạt 23,2 lần. Tỷ lệ chồi ra rễ cao nhất, chất lượng bộ rễ tốt nhất đã đạt được trong môi trường MS được bổ sung 30 g/l sucroza, 5,5 g/l agar, 200 ml/l nước dừa, 1 g/l than hoạt tính, 0,5 mg/l α NAA, độ pH = 5,5 khi đặt mẫu dưới ánh sáng đơn sắc đèn LED tỷ lệ 70%B (460nm) : 30%R (630nm).

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Ví dụ 1: Quy trình nhân giống *in vitro* cây Sâm cau (*Curculigo orchioides* Gaertn.) sử dụng ánh sáng đèn LED tỷ lệ 100% Y (590nm).

Cây Sâm cau được thu thập ở Sơn La, mẫu được rửa sạch bằng nước xà phòng, sau đó cắt chồi 1-2cm, khử trùng bằng dung dịch 10% Ca (ClO)₂ trong 10 phút và rửa lại nhiều lần bằng nước cất vô trùng. Mẫu được bóc tách cắt lấy đỉnh sinh trưởng khoảng 0,3-0,5cm, và được nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung 30 g/l sucroza, 5,5 g/l agar, 200 ml/l nước dừa, 1 g/l than hoạt tính, 2 mg/l BA, 40 mg/l axit xitric, độ pH = 5,5.

Mẫu được nuôi cấy trong điều kiện thời gian chiếu sáng 12 giờ/ngày, cường độ chiếu sáng 2000lux, nhiệt độ $25 \pm 2^\circ\text{C}$, độ ẩm trung bình khoảng 50% - 60% với ánh sáng đơn sắc đèn LED tỷ lệ 100% Y (590nm), sau thời gian 20 ngày, tỷ lệ mẫu sống và vô trùng đạt 76%.

Các mẫu sau khi bật chồi được chuyển sang cấy trên môi trường MS được bổ sung 30 g/l sucroza, 5,5 g/l agar, 200 ml/l nước dừa, 1 g/l than hoạt tính, 2,0 mg/l BA, 0,5 mg/l α NAA, 40 mg/l axit xitric, 50g/l dịch chuối, độ pH = 5,5.

Mẫu được nuôi cấy trong điều kiện thời gian chiếu sáng 12 giờ/ngày, cường độ chiếu sáng 2000lux, nhiệt độ $25 \pm 2^\circ\text{C}$, độ ẩm trung bình khoảng 50% - 60% với ánh sáng đơn sắc đèn LED tỷ lệ 100% Y (590nm). Hệ số nhân sau 40 ngày nuôi cấy là 19,0 lần.

Các chồi sau khi thu được ở giai đoạn nhân nhanh có kích thước 2-3cm và cấy vào môi trường MS có bổ sung 30 g/l sucroza, 5,5 g/l agar, 200 ml/l nước dừa, 1 g/l than hoạt tính, 0,5 mg/l α NAA. Mẫu được nuôi cấy trong điều kiện thời gian chiếu sáng 12 giờ/ngày, cường độ chiếu sáng 2000lux, nhiệt độ $25 \pm 2^\circ\text{C}$, độ ẩm trung bình khoảng 50% - 60% với ánh sáng đơn sắc đèn LED tỷ lệ 100% Y (590nm). Sau 30 ngày thu được cây Sâm cau nuôi cấy mô có chiều cao cây khoảng từ 8 đến 9cm, có 5-6 lá, 4-5 rễ.

Ví dụ 2: Quy trình nhân giống *in vitro* cây Sâm cau (*Curculigo orchioides* Gaertn.) sử

dụng ánh sáng đèn LED vàng Y (590nm), xanh B (460nm) và đỏ R (630nm)

Cây Sâm cau được thu thập ở Sơn La, mẫu được rửa sạch bằng nước xà phòng, sau đó cắt chồi 1-2cm, khử trùng bằng dung dịch 10% $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ trong 10 phút và rửa lại nhiều lần bằng nước cất vô trùng. Mẫu được bóc tách cắt lấy đỉnh sinh trưởng khoảng (0,3-0,5cm), thời gian cho tỷ lệ mẫu bật chồi sau 20 ngày nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung 30 g/l sucroza, 5,5 g/l agar, 200 ml/l nước dừa, 1 g/l than hoạt tính, 2 mg/l BA, 40 mg/l axit xitric, 50 mg/l rifampin, độ pH =5,5. Mẫu được nuôi cấy dưới ánh sáng LED tỷ lệ 100% Y (590nm), tỷ lệ mẫu sống và vô trùng đạt 86%.

Các mẫu sau khi bật chồi được chuyển sang cấy trên môi trường MS được bổ sung 30 g/l sucroza, 5,5 g/l agar, 200 ml/l nước dừa, 1 g/l than hoạt tính, 2,0 mg/l BA, 0,5 mg/l αNAA , 40 mg/l axit xitric, 50g/l dịch chuối, 50 mg/l tảo *Spirulina*, độ pH =5,5. Các mẫu được nuôi cấy dưới ánh sáng LED tỷ lệ 50% B (460nm) : 50% R (630nm). Hệ số nhân chồi cao nhất đạt 23,2 lần sau 40 ngày nuôi cấy.

Các chồi sau khi thu được ở giai đoạn nhân nhanh có kích thước 2-3cm và cấy vào môi trường MS có bổ sung 30 g/l sucroza, 5,5 g/l agar, 200 ml/l nước dừa, 1 g/l than hoạt tính, 0,5 mg/l αNAA . Mẫu được nuôi cấy trong điều kiện thời gian chiếu sáng 12 giờ/ngày, cường độ chiếu sáng 2000lux, nhiệt độ $25 \pm 2^\circ\text{C}$, độ ẩm trung bình khoảng 50% - 60% với ánh sáng đơn sắc đèn LED tỷ lệ (70%B : 30%R). Sau 30 ngày nuôi cấy thu được cây Sâm cau nuôi cấy mô có chiều cao cây khoảng từ 9 - 11cm, số lá đạt 6-7 lá/cây, số rễ đạt 8-9 rễ/cây, chiều dài rễ đạt 5-6cm.

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Quy trình nhân giống *in vitro* cây Sâm cau (*Curculigo orchioides* Gaertn.) sử dụng ánh sáng đơn sắc đèn LED theo giải pháp hữu ích đã tạo ra được số lượng cây giống lớn trong thời gian ngắn, tiết kiệm năng lượng, giảm chi phí sản xuất, đáp ứng nhu cầu của thị trường và đã mở ra một tiềm năng phát triển vùng nguyên liệu trồng Sâm cau ngoài các vùng núi Hòa Bình, Sơn La, v.v..

Quy trình theo giải pháp hữu ích đã đưa mẫu vào nuôi cấy thành công, có thể áp dụng để chuyển giao công nghệ cho các đơn vị khác hoặc trực tiếp tổ chức sản xuất.

Ngoài ra, quy trình theo giải pháp hữu ích góp phần bảo tồn và phát triển nguồn dược liệu quý hiếm đang có nguy cơ bị tuyệt chủng, góp phần nâng cao đời sống và giải quyết công ăn việc làm, giúp bà con vùng núi xóa đói giảm nghèo, ổn định cuộc sống và không chặt phá rừng.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình nhân giống *in vitro* cây Sâm cau (*Curculigo orchioides* Gaertn.) sử dụng ánh sáng đèn LED bao gồm các bước:

(1) tạo vật liệu khởi đầu

các mẫu cây Sâm cau được rửa sạch bằng nước xà phòng, cắt lấy chồi có kích thước 1-2cm, sau đó khử trùng bằng dung dịch 10% $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ trong 10-15 phút và rửa lại nhiều lần bằng nước cất vô trùng, sau đó bóc tách cắt lấy đỉnh sinh trưởng (0,3-0,5cm), nuôi cấy trên môi trường MS (Murashige & Skoog, 1962) bổ sung 20-30 g/l sucroza, 5,0-5,5 g/l agar, 150-200 ml/l nước dừa, 0,5-1 g/l than hoạt tính, 2-2,5 mg/l BA, 30-40 mg/l axit xitric, 40-50 mg/l rifampin, độ pH = 5,5, dưới ánh sáng LED tỷ lệ 100% Y (590nm) trong thời gian 20-25 ngày để mẫu bật chồi;

(2) nhân nhanh cụm chồi

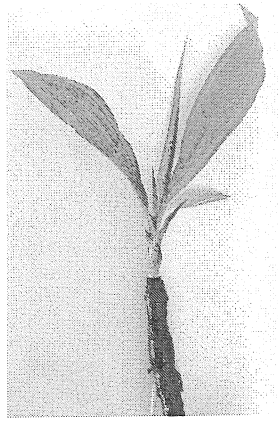
các mẫu sau khi bật chồi được chuyển sang cấy trên môi trường MS bổ sung 20-30 g/l sucroza, 5,0-5,5 g/l agar, 150-200 ml/l nước dừa, 0,5-1 g/l than hoạt tính, 2,0-2,5 mg/l BA, 0,5-1,0 mg/l αNAA , 30-40 mg/l axit xitric, 40-50 g/l dịch chuối, 50-100 mg/l tảo *Spirulina*, độ pH = 5,5, nuôi cấy trong điều kiện thời gian chiếu sáng 12-14 giờ/ngày, cường độ chiếu sáng 2000lux, nhiệt độ $25 \pm 2^\circ\text{C}$, độ ẩm trung bình khoảng 50%-60% với ánh sáng đơn sắc đèn LED tỷ lệ 40%B (460nm) : 60%R (630nm) hoặc 50%B (460nm) : 50%R (630nm), trong thời gian 40 ngày để thu được các cụm chồi;

(3) tạo cây *in vitro* hoàn chỉnh

các cụm chồi sau khi thu được ở giai đoạn nhân nhanh có kích thước 2-3cm được cấy vào môi trường MS bổ sung 20-30 g/l sucroza, 5,0-5,5 g/l agar, 150-200 ml/l nước dừa, 0,5-1 g/l than hoạt tính, 0,5-1,0 mg/l αNAA , độ pH = 5,5, nuôi cấy trong điều kiện thời gian chiếu sáng 12-14 giờ/ngày, cường độ chiếu sáng 2000lux, nhiệt độ $25 \pm 2^\circ\text{C}$, độ ẩm trung bình khoảng 50% - 60% với ánh sáng đơn sắc đèn LED tỷ lệ 70%B (460nm) : 30%R (630nm) hoặc 80%B (460nm) : 20%R (630nm) trong thời gian 25-30 ngày để thu được cây con có chiều cao 9-11cm, số lá 6-7 lá/cây, số rễ 8-9 rễ/cây, chiều dài rễ 5-6cm; và

(4) đưa cây ra vườn ươm

cho bình cây thu được ở bước (3) ra ngoài vườn ươm trong 5 ngày, sau đó tiến hành ra cây bằng cách rửa sạch môi trường bám ở cây và đưa ra trồng ngoài vườn ươm trên đất mùn, bón phân Japon 3.5.3 (1g/l) trong thời gian 60 ngày để thu được cây Sâm cau giống.



Hình 1



Hình 2



Hình 3



Hình 4