



(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)



2-0003448

(51) **A01H 4/00; A01H 6/00**
2020.01

(13) **Y**

(21) 2-2020-00313

(22) 08/07/2020

(45) 25/12/2023 429

(43) 25/01/2022 406

(73) Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Nông nghiệp Công nghệ cao (VN)
Áp 1, xã Phạm Văn Cội, huyện Củ Chi

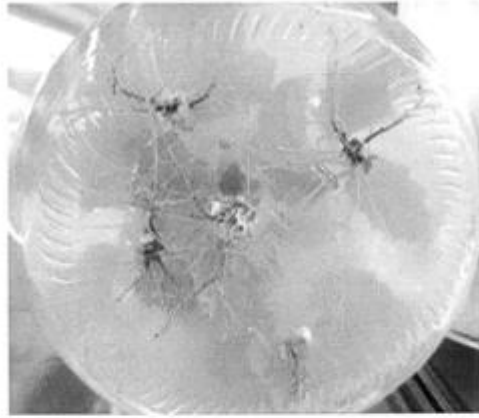
(72) Nguyễn Thị Điệp (VN); Phạm Đình Dũng (VN); Lê Văn Cửa (VN); Nguyễn Thị Huệ (VN); Nguyễn Thanh Hiền (VN); Vương Thị Hồng Loan (VN); Huỳnh Thị Kim (VN); Nguyễn Thị Nguyên Trinh (VN); Lê Thành Hưng (VN); Nguyễn Thùy Trang (VN); Nguyễn Ánh Tuyết (VN); Võ Thanh An (VN); Vũ Thị Quỳnh (VN); Vũ Quang Huy (VN).

(54) **QUY TRÌNH NHÂN GIỐNG IN VITRO CÂY XẠ ĐEN (CELASTRUS HINDSII BENTH.)**

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình nhân giống *in vitro* cây Xạ đen (*Celastrus hindsii* Benth.) bằng phương pháp nuôi cấy mô tế bào gồm các bước: khử trùng mẫu tạo vật liệu nuôi cấy ban đầu, tái sinh chồi từ đốt thân, nhân nhanh chồi, tăng trưởng chồi, tạo rễ tạo cây Xạ đen hoàn chỉnh, huấn luyện cây và đưa cây ra vườn ươm. Quy trình theo giải pháp hữu ích đã tạo ra được nguồn cây giống với số lượng lớn đồng đều phục vụ công tác bảo tồn, phát triển nguồn gen cây dược liệu quý và cung cấp cây giống để phục vụ trồng trọt ở quy mô lớn.







Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích thuộc lĩnh vực nông nghiệp làm vườn, cụ thể là giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình nhân giống cây Xạ đen bằng phương pháp nuôi cấy mô tế bào.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Xạ đen có tên khoa học là *Celastrus hindsii* Benth., là loài cây thảo dược quý mọc tự nhiên ở nước ta, là một cây thuốc nam quý, có giá trị cao trong y dược. Trồng Xạ đen có giá trị kinh tế cao, đem lại thu nhập cho người dân. Cây Xạ đen phân bố ở nhiều nước như Việt Nam, Trung Quốc, Thái Lan. Ở Việt Nam, cây Xạ đen phân bố ở một số tỉnh như Hòa Bình, Hà Nam.

Cây Xạ đen có vị đắng chát, tính hàn, có tác dụng hữu hiệu trong điều trị mụn nhọt, ung thũng, giải độc, giảm tiết dịch trong xơ gan cổ chướng và tăng cường sức đề kháng của cơ thể (Phạm Hoàng Hộ, 1999). Trong Xạ đen có chứa các chất chống oxy hóa có tác dụng phòng chống ung thư, chống nhiễm khuẩn và làm cho tế bào ung thư hóa lỏng dễ tiêu. Ngoài ra, xạ đen còn có một số tác dụng quý khác như trị bệnh mất ngủ; trị cao huyết áp; men gan cao, xơ gan, viêm gan; trị các bệnh viêm nhiễm; phòng và hỗ trợ điều trị bệnh tiểu đường; tiêu hạch, tiêu độc, thanh nhiệt, mát gan, hành thủy, điều hòa hoạt huyết, giảm đau, an thần, tăng cường sức đề kháng cho cơ thể. Bởi vậy, loài cây này đang bị khai thác một cách quá mức, dẫn đến nguy cơ cạn kiệt ngoài tự nhiên. Vì vậy, việc ứng dụng các phương pháp tiên tiến vào nhân giống loài cây này là rất cần thiết hiện nay.

Mặt khác, tình hình nuôi trồng cây Xạ đen ở Việt Nam hiện nay, ở nhiều nơi cây Xạ đen trong tự nhiên bị chặt phá, khai thác rất bừa bãi bởi người dân tại các địa phương. Hầu hết Xạ đen hiện nay trồng vẫn rất manh mún, nhỏ lẻ mà

chưa có một sự quy hoạch rõ ràng. Nhiều người trồng xạ đen dưới dạng tận dụng đất đai như trồng ở bờ ao, bờ rào, bờ kênh, bên đường đi.

Như vậy, vấn đề trồng và quy hoạch vùng trồng cây Xạ đen với mục đích kinh doanh đã bắt đầu được thực hiện. Song vẫn còn nhiều diện tích mà chúng ta có thể trồng Xạ đen cần được quy hoạch để đem lại hiệu quả kinh tế. Cách nhân giống cây Xạ đen có thể là bằng cách giâm cành, gieo hạt hoặc sử dụng phương pháp nuôi cấy mô tế bào thực vật. Trên thực tế, phương pháp giâm cành được sử dụng để nhân giống cho cây Xạ đen là phổ biến nhất, tuy rằng cho tỷ lệ cây sống sót cao, cây khỏe mạnh, thu hoạch sớm hơn so với khi sử dụng phương pháp gieo hạt, thế nhưng phương pháp này cho hệ số nhân giống rất thấp, không thể cung cấp đủ số lượng cây trong một thời gian ngắn để phục vụ trồng trọt với quy mô lớn. Vì vậy, áp dụng phương pháp nhân giống *in vitro* cây Xạ đen đang dần được nhiều người quan tâm.

Cho đến nay, các nghiên cứu về nhân giống *in vitro* cây Xạ đen (*Celastrus hindsii* Benth.) trong và ngoài nước còn rất hạn chế, chưa thấy có công bố kết quả trên các tạp chí khoa học. Hơn nữa, các nghiên cứu này có hệ số nhân giống *in vitro* cây Xạ đen còn thấp (2 – 4 chồi/mẫu). Cho nên việc nghiên cứu khảo sát các yếu tố nhằm cải thiện quá trình nhân chồi của cây Xạ đen để tạo ra số lượng chồi nhiều chất lượng tốt đồng đều về mặt di truyền, đồng thời nghiên cứu tạo rễ cây Xạ đen *in vitro* giúp cây có bộ rễ khỏe tăng tỉ lệ sống và thích nghi ngoài vườn ươm là hướng nghiên cứu thật sự cần thiết, phù hợp với nhu cầu thị trường, cung cấp cơ sở lý luận khoa học cho việc nghiên cứu nhân giống cây Xạ đen để sản xuất cây giống trở nên hiệu quả.

Nhằm mục tiêu đó, phương pháp nhân giống *in vitro* cây Xạ đen cần được thực hiện để tạo ra được số lượng cây giống lớn trong thời gian ngắn, ổn định về mặt di truyền, giá cả phù hợp, đáp ứng nhu cầu của thị trường và tạo nguồn nguyên liệu quý cho ngành dược.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Mục đích của giải pháp hữu ích là khắc phục những vấn đề trong việc nhân giống cây Xạ đen, tạo ra số số lượng cây con nhiều hơn so với các phương pháp nhân giống trước đó, cây con khỏe mạnh, đồng đều về mặt di truyền, đáp ứng đầy đủ cả về số lượng lẫn chất lượng. Để đạt mục đích này, giải pháp hữu ích đề xuất quy trình nhân giống cây Xạ đen (*Celastrus hindsii* Benth.) bằng kỹ thuật *in vitro*. Quy trình gồm các bước:

a) Tạo vật liệu nuôi cấy ban đầu

Chọn những cây xạ đen 1 năm tuổi khỏe mạnh, cắt đoạn thân non lấy đốt thân có chồi ngủ của cây xạ đen, sau đó tiến hành rửa dưới vòi nước 15 phút để loại sạch bụi bẩn và đất cát bám ở mặt ngoài, lắc với dung dịch xà phòng loãng trong 15 phút. Tiếp theo lắc mẫu với cồn 70⁰ trong 1 phút và HgCl₂ 0,1% trong 5 phút, bổ sung 2 giọt Tween 20. Các đốt thân sẽ được cắt bỏ phần mẫu bị hư và cấy vào môi trường MS bổ sung 30 g/l sucroza, 8 g/l thạch aga. Sau 1 tuần nuôi cấy, loại bỏ mẫu nhiễm, những mẫu sạch nảy chồi được sử dụng để tái sinh chồi.

b) Tái sinh chồi từ đốt thân

Đốt thân sạch nảy chồi tạo ra ở giai đoạn tạo vật liệu nuôi cấy ban đầu được nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung 0,25 mg/l BA, 30 g/l sucroza, 8 g/l thạch aga và 0,5 g/l than hoạt tính. Sau 3 tuần nuôi cấy, chồi tạo thành được sử dụng cho giai đoạn nhân chồi.

c) Nhân nhanh chồi

Từ chồi cây xạ đen *in vitro* bị hủy đỉnh sinh trưởng được nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung 2 mg/l BA, 30 g/l sucroza, 8 g/l thạch aga và 0,5 g/l than hoạt tính. Sau 5 tuần nuôi cấy, chồi được sử dụng cho giai đoạn tăng trưởng chồi.

d) Tăng trưởng chồi

Chồi có kích thước đồng đều từ 1,5 – 2,0 cm được nuôi cấy trên môi trường WPM bổ sung 30 g/l sucroza, 8 g/l thạch aga và 0,5 g/l than hoạt tính. Sau 6 tuần nuôi cấy, chồi được sử dụng cho giai đoạn tạo rễ.

e) Tạo rễ tạo cây Xạ đen hoàn chỉnh

Chồi cao khoảng 2,5 - 3 cm nuôi cấy trên môi trường WPM bổ sung 0,5 mg/l IBA, 30 g/l sucroza, 8 g/l thạch aga và 0,5 g/l than hoạt tính. Sau 30 ngày nuôi cấy thu được cây xạ đen *in vitro* hoàn chỉnh.

f) Huấn luyện cây và đưa cây ra vườn ươm

Cây con đạt tiêu chuẩn về chiều cao, số lá, số rễ sẽ được đưa ra khỏi phòng nuôi và bắt đầu giai đoạn huấn luyện thích nghi. Chuyển các bình cây Xạ đen *in vitro* hoàn chỉnh ra ngoài khu huấn luyện, thời gian của giai đoạn này khoảng 2 tuần.

Sau đó tiến hành gấp cây ra khỏi bình một cách nhẹ nhàng, tránh làm tổn thương cây, rửa sạch thạch aga, trải cây ra lớp lưới khoảng 30 phút để hút hết nước trên bề mặt cây. Tiến hành bó cây bằng vỏ xơ dừa đã qua xử lý, trồng trong vườn ươm có che mưa. Điều kiện trồng tại vườn ươm đạt ánh sáng 20 - 25% và ẩm độ 60 - 65%. Trong tuần lễ đầu, ngày tưới 2 lần vào các thời điểm 8h30 và 15h, mỗi lần tưới trong khoảng 2 phút, 0,5 lít/m², tuần kế tiếp kết hợp phun B1 2 lần /tuần. Ở tuần tiếp theo sẽ sử dụng phân bón NPK 30 - 10 - 10, tiến hành phun 2 lần/ tuần.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1: là ảnh chụp cây xạ đen dùng để đưa vào tạo vật liệu nuôi cấy ban đầu.

Hình 2: là ảnh chụp mẫu đốt thân xạ đen tái sinh chồi.

Hình 3: là ảnh chụp các cụm chồi xạ đen ở giai đoạn nhân nhanh chồi.

Hình 4: là ảnh chụp chồi xạ đen ở giai đoạn tăng trưởng.

Hình 5: là ảnh chụp cây xạ đen phát triển rễ trong điều kiện *in vitro*.

Hình 6: là ảnh chụp cây xạ đen sinh trưởng phát triển sau 4 tuần trồng ngoài vườn ươm.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Mẫu cây xạ đen có nguồn gốc ở tỉnh Hòa Bình, được di thực và trồng tại vườn ươm Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Nông nghiệp Công nghệ cao. Các cành non được sử dụng để khử trùng mẫu.

Thiết bị sử dụng cho giải pháp hữu ích cần có là tủ cấy vô trùng, máy cất nước, nồi hấp vô trùng, máy đo pH, cân phân tích 4 số lẻ, cân kỹ thuật, máy đo nhiệt độ, độ ẩm, máy đo cường độ ánh sáng, phòng cấy vô trùng và phòng sáng với hệ thống đèn điều chỉnh ánh sáng phù hợp với từng giai đoạn nuôi cấy.

Môi trường sử dụng cho nuôi cấy là môi trường MS và môi trường WPM với các thành phần khoáng đa lượng, vi lượng và vitamin đầy đủ theo tiêu chuẩn. Các môi trường sẽ được bổ sung thêm các chất điều hòa sinh trưởng như BA, IBA, than hoạt tính, sucroza và thạch aga để hỗ trợ cho quá trình phát triển của cây, với pH được điều chỉnh từ 5.7 – 5.8, hấp khử trùng ở nhiệt độ 121°C trong 20 phút, áp suất 1 atm.

Giải pháp hữu ích đề xuất quy trình nhân giống *in vitro* cây xạ đen (*Celastrus hindsii* Benth.) gồm các bước: a. Tạo vật liệu nuôi cấy ban đầu, b. Tái sinh chồi từ đốt thân, c. Nhân nhanh chồi, d. Tăng trưởng chồi và e. Tạo rễ và tạo cây hoàn chỉnh, f. Huân luyện cây và đưa cây ra ngoài vườn ươm. Cụ thể:

a) Tạo vật liệu nuôi cấy ban đầu: Đây là giai đoạn quan trọng nhất, có thời gian thực hiện từ 2 – 3 tháng. Chọn những cây xạ đen khỏe mạnh, cắt đoạn thân non lấy đốt thân có chồi ngủ, đoạn đốt thân có chiều dài khoảng 3 cm cắt bớt lá để tiến hành quy trình khử trùng mẫu.

Khử trùng sơ bộ mẫu: Mẫu sau khi cắt thành đoạn 3 cm cắt bớt lá, được rửa dưới vòi nước 15 phút để loại sạch bụi bẩn và đất cát bám ở mặt ngoài, sau đó lắc với dung dịch xà phòng loãng trong 15 phút. Tiếp theo, mẫu được rửa lại với nước cất vô trùng 4 - 5 lần, mỗi lần lắc mẫu trong 1 phút.

Khử trùng trong tủ cấy vô trùng: Tiếp theo mẫu được đưa vào tủ cấy vô trùng và tiến hành khử trùng. Đầu tiên, ngâm mẫu với cồn 70° trong 1 phút, sau đó rửa sạch mẫu với nước cất vô trùng 4 – 5 lần, mỗi lần lắc mẫu trong 1 phút. Khử trùng mẫu bằng HgCl₂ 0,1% có bổ sung 2 giọt Tween 20 trong 5 phút, sau

đó tiến hành rửa sạch mẫu với nước cất vô trùng 5 – 7 lần, mỗi lần lắc mẫu trong 1 phút.

Các đốt thân sau khi đã khử trùng xong sẽ được cắt bỏ phần mẫu bị tổn thương và cấy vào môi trường MS bổ sung 30 g/l sucroza, 8 g/l thạch aga. Điều kiện để nuôi cấy với phòng sáng có nhiệt độ là $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$, cường độ ánh sáng 2000 lux, ẩm độ là $60 \pm 5\%$, thời gian chiếu sáng là 12 h/ngày. Sau 1 tuần nuôi cấy, loại bỏ mẫu nhiễm với tỷ lệ mẫu sạch thu được sau quá trình khử trùng đốt thân cây xạ đen là 80%, tỷ lệ mẫu nảy chồi là 95%.

b) Tái sinh chồi từ đốt thân: Những mẫu đốt thân sạch và nảy chồi nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung 0 – 1 mg/l BA, 30 g/l sucroza, 8 g/l thạch aga và 0,5 g/l than hoạt tính. Điều kiện để nuôi cấy với phòng sáng có nhiệt độ là $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$, cường độ ánh sáng 2000 lux, ẩm độ là $60 \pm 5\%$, thời gian chiếu sáng là 12 h/ngày. Sau 3 tuần nuôi cấy trên môi trường có bổ sung 0,25 mg/l BA, thu được số chồi cao nhất 1,27 chồi/mẫu, chồi to khỏe, lá to màu xanh đậm.

c) Nhân nhanh chồi: Những mẫu chồi đơn của cây xạ đen được lấy từ giai đoạn tái sinh chồi từ đốt thân sẽ bị hủy đi đỉnh sinh trưởng, các đoạn thân có chiều dài khoảng 1 cm và mang 1 lá và được nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung từ 0 – 3 mg/l BA, 0 – 3 mg/l kinetin, 30 g/l sucroza, 8 g/l thạch aga và 0,5 g/l than hoạt tính. Điều kiện để nuôi cấy với phòng sáng có nhiệt độ là $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$, cường độ ánh sáng 2000 lux, ẩm độ là $60 \pm 5\%$, thời gian chiếu sáng là 12 h/ngày. Sau 5 tuần nuôi cấy trên môi trường có 2 mg/l BA, thu được số chồi mới cao nhất là 5,57 chồi/mẫu, chồi phát triển khỏe, chồi to, lá nhỏ, có sẹo ở gốc.

d) Tăng trưởng chồi: Mẫu cây xạ đen sử dụng cho giai đoạn này là các chồi đơn có kích thước đồng đều từ 1,5 – 2,0 cm lấy từ giai đoạn nhân nhanh chồi. Mẫu được nuôi cấy trên các môi trường MS (Murashige và Skoog), $\frac{1}{2}$ MS (giảm 1/2 đa lượng), SH (Schenk và Hilderbrant), $\frac{1}{2}$ SH (giảm 1/2 đa lượng) và WPM, $\frac{1}{2}$ WPM (giảm 1/2 đa lượng). Tất cả các môi trường đều có bổ sung 30 g/l sucroza, 8 g/l thạch aga và 0,5 g/l than hoạt tính. Điều kiện để nuôi cấy với phòng sáng có nhiệt độ là $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$, cường độ ánh sáng 2000 lux, ẩm độ là $60 \pm 5\%$, thời gian chiếu sáng là 12 h/ngày. Sau 6 tuần nuôi cấy trên môi trường

WPM, chồi phát triển to khỏe, lá to màu xanh đậm, cây tăng trưởng tốt về chiều cao. Các chồi sau đó được tiếp tục được sử dụng cho giai đoạn tạo rễ.

e) Sự tạo rễ và tạo cây hoàn chỉnh: Khi các chồi lấy ở giai đoạn tăng trưởng chồi đạt chiều cao từ 2,5 - 3 cm sẽ được chuyển sang nuôi cấy trên môi trường WPM bổ sung 0 – 3 mg/l IBA, 0 – 3 mg/l IAA, 0 – 3 mg/l NAA, 30 g/l sucroza, 8 g/l thạch aga và 0,5 g/l than hoạt tính. Điều kiện để nuôi cấy với phòng sáng có nhiệt độ là $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$, cường độ ánh sáng 2000 lux, ẩm độ là $60 \pm 5\%$, thời gian chiếu sáng là 12 h/ngày. Tỷ lệ mẫu ra rễ là 100% trên môi trường có bổ sung 0,5 mg/l IBA, thời gian mẫu bắt đầu ra rễ là 7 ngày sau nuôi cấy, cho số lượng rễ là 8,43 rễ/cây, rễ dài và có phân nhánh nhiều. Sau 30 ngày nuôi cấy thu được cây xạ đen *in vitro* hoàn chỉnh.

f) Huấn luyện cây và trồng cây ra ngoài vườn ươm

Các cây *in vitro* có chiều cao trung bình từ 5 – 6 cm, 3 rễ trở lên, 6 – 8 lá được sử dụng để trồng khảo sát tỷ lệ sống và sự sinh trưởng của cây ở giai đoạn vườn ươm sau 30 ngày trồng nhằm xây dựng quy trình nhân giống *in vitro* hoàn chỉnh, phục vụ cho công tác sản xuất cây giống xạ đen cấy mô. Các bình cây *in vitro* đủ tiêu chuẩn ra vườn ươm được đưa ra ngoài phòng nuôi, huấn luyện thích nghi ở điều kiện nhiệt độ và ánh sáng tự nhiên (hành lang thoáng gió, ánh sáng khuếch tán) trong 2 tuần. Mục đích là giúp cây làm quen từ từ với điều kiện bên ngoài khi không còn được nuôi trong điều kiện phòng thí nghiệm tránh cho cây bị sốc, tăng tỷ lệ sống ngoài vườn ươm. Khi cây phát triển hoàn chỉnh trong các bình nuôi cây sẽ được chuyển tới khu huấn luyện thích nghi được thiết kế đón ánh sáng tự nhiên và thoáng gió.

Sau đó cây được gấp nhẹ nhàng ra khỏi bình, rửa cây trong 2 lần nước sạch, trải cây ra bề mặt thoáng và để cây ráo hết lớp nước bám trên bề mặt cây. Tiến hành bó cây bằng vỏ xơ dừa đã qua xử lý, trồng trong vườn ươm có che mưa. Điều kiện trồng tại vườn ươm đạt ánh sáng 20 - 25% và ẩm độ 60 - 65%. Trong tuần lễ đầu, ngày tưới 2 lần vào các thời điểm 8h30 và 15h, mỗi lần tưới trong khoảng 2 phút, 0,5 lít/m², tuần kế tiếp kết hợp phun B1 2 lần /tuần. Ở tuần tiếp theo sẽ sử dụng phân bón NPK 30 - 10 - 10, tiến hành phun 2 lần/ tuần. Sau

4 tuần trồng tại vườn ươm, tỷ lệ sống đạt 95%, cây con xạ đen phát triển tốt, tất cả đều ra lá mới, hình dạng cây và sự sinh trưởng của cây bình thường, hình thái cây bình thường.

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Quy trình theo giải pháp hữu ích đã nuôi cấy thành công cây xạ đen bằng phương pháp nuôi cấy *in vitro*. Đặc biệt, sử dụng quy trình theo giải pháp hữu ích này khắc phục được những hạn chế của nuôi cấy *in vitro* cây xạ đen mà các nghiên cứu trước đây chưa làm được với số chồi mới tạo ra ở giai đoạn nhân nhanh chồi là 5,57 chồi/mẫu. Bên cạnh đó, so với các phương pháp nhân giống cây xạ đen bằng hạt hoặc giâm cành thì phương pháp nuôi cấy mô tạo ra số lượng cây giống nhanh hơn, tiết kiệm được thời gian và không gian vì vật liệu đưa vào quy trình là mẫu mô nhỏ, cây giống tạo ra đồng đều về mặt di truyền, sạch bệnh, đạt tiêu chuẩn cả về số lượng lẫn chất lượng.

Áp dụng quy trình nhân giống *in vitro* cây xạ đen giúp phát triển mở rộng diện tích trồng xạ đen không những nhằm đáp ứng nhu cầu của thị trường cung cấp dược liệu quý mà còn giảm bớt nạn khai thác, chặt phá bừa bãi cây xạ đen ở các địa phương, bảo tồn phát huy được nguồn gen cây thuốc nam quý, đem lại hiệu quả kinh tế, đem lại thu nhập, xóa đói giảm nghèo cho bà con nông dân các địa phương.

Yêu cầu bảo hộ

1. Quy trình nhân giống *in vitro* cây xạ đen (*Celastrus hindsii* Benth.), quy trình này bao gồm các bước:

a) tạo vật liệu nuôi cấy ban đầu (2 – 3 tháng):

chọn những cây xạ đen 1 năm tuổi khỏe mạnh, cắt đoạn thân non lấy đốt thân có chồi ngủ của cây xạ đen, sau đó tiến hành khử trùng mẫu;

mẫu được rửa dưới vòi nước 15 phút để loại sạch bụi bẩn và đất cát bám ở mặt ngoài, sau đó lắc với dung dịch xà phòng loãng trong 15 phút, rồi rửa lại với nước cất vô trùng 4 - 5 lần;

tiếp theo đưa các mẫu vào tủ cấy vô trùng và tiến hành khử trùng, lắc mẫu với cồn 70⁰ trong 1 phút, rửa sạch mẫu với nước cất vô trùng 4 – 5 lần;

khử trùng bằng HgCl₂ 0,1%, bổ sung 2 giọt Tween 20, sau 5 phút khử trùng tiến hành rửa sạch mẫu với nước cất vô trùng 5 – 7 lần;

các đốt thân sẽ được cắt bỏ phần mẫu bị hư và cấy vào môi trường MS bổ sung 30 g/l sucroza, 8 g/l thạch aga;

sau 1 tuần nuôi cấy, loại bỏ mẫu nhiễm, những mẫu sạch nảy chồi được sử dụng để tái sinh chồi;

b) tái sinh chồi từ đốt thân:

đốt thân sạch nảy chồi được nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung 0,25 mg/l BA, 30 g/l sucroza, 8 g/l thạch aga và 0,5 g/l than hoạt tính;

sau 3 tuần nuôi cấy, chồi tạo thành được sử dụng cho giai đoạn nhân chồi;

c) nhân nhanh chồi:

từ chồi cây xạ đen *in vitro* bị hủy đỉnh sinh trưởng được nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung 2 mg/l BA, 30 g/l sucroza, 8 g/l thạch aga và 0,5 g/l than hoạt tính;

sau 5 tuần nuôi cấy, chồi được sử dụng cho giai đoạn tăng trưởng chồi;

d) tăng trưởng chồi:

chồi có kích thước đồng đều từ 1,5 – 2,0 cm được nuôi cấy trên môi trường WPM bổ sung 30 g/l sucroza, 8 g/l thạch aga và 0,5 g/l than hoạt tính;

sau 6 tuần nuôi cấy, chồi được sử dụng cho giai đoạn tạo rễ;

e) tạo rễ và tạo cây hoàn chỉnh:

chồi cao khoảng 2,5 - 3 cm nuôi cấy trên môi trường WPM bổ sung 0,5 mg/l IBA, 30 g/l sucroza, 8 g/l thạch aga và 0,5 g/l than hoạt tính;

sau 30 ngày nuôi cấy thu được cây xạ đen *in vitro* hoàn chỉnh;

f) huấn luyện và trồng cây ra ngoài vườn ươm:

cây con đạt tiêu chuẩn về chiều cao từ 5 – 6 cm, 3 rễ trở lên, 6 – 8 lá sẽ được đưa ra khỏi phòng nuôi và bắt đầu giai đoạn huấn luyện thích nghi;

chuyển các bình cây Xạ đen *in vitro* hoàn chỉnh ra ngoài khu huấn luyện, thời gian của giai đoạn này khoảng 2 tuần;

sau đó tiến hành gắp cây ra khỏi bình một cách nhẹ nhàng, tránh làm tổn thương cây, rửa sạch thạch aga, trải cây ra lớp lưới khoảng 30 phút để hút hết nước trên bề mặt cây;

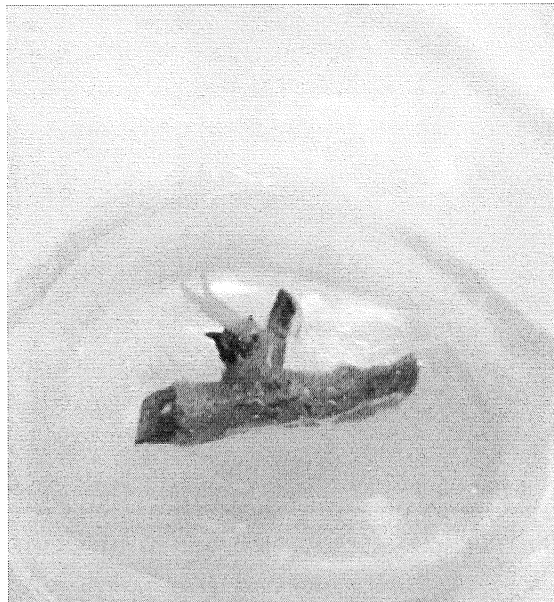
tiến hành bó cây bằng vỏ xơ dừa đã qua xử lý, trồng trong vườn ươm có che mưa, điều kiện trồng tại vườn ươm đạt ánh sáng 20 - 25% và ẩm độ 60 - 65%;

trong tuần lễ đầu, ngày tưới 2 lần vào các thời điểm 8h30 và 15h, mỗi lần tưới trong khoảng 2 phút, 0,5 lít/m², tuần kế tiếp kết hợp phun B1 2 lần /tuần; ở tuần tiếp theo sẽ sử dụng phân bón NPK 30 - 10 – 10, tiến hành phun 2 lần/ tuần.

1/3



Hình 1



Hình 2

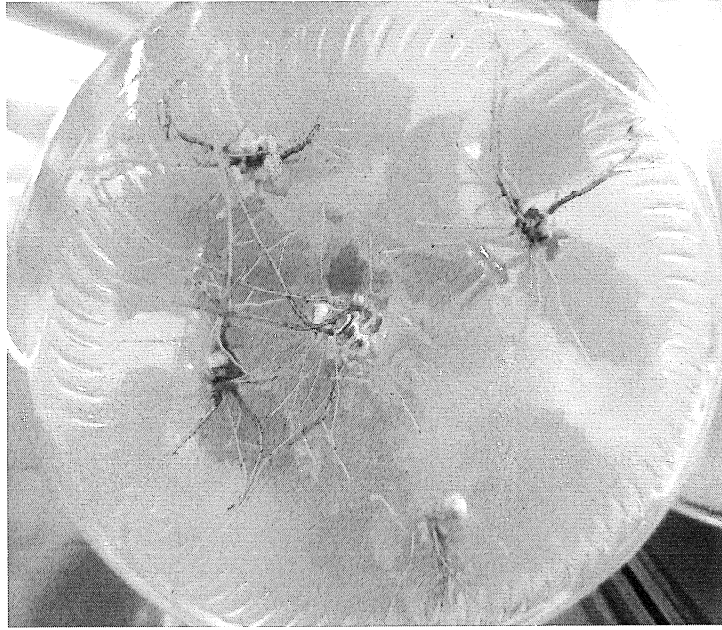
2/3



Hình 3



Hình 4



Hình 5



Hình 6