



(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)



2-0004020

(51) **A01G 2/00**
2024.01

(13) **Y**

(21) 2-2024-00560

(22) 29/12/2021

(67) 1-2021-08435

(45) 25/03/2025 444

(43) 26/09/2022 414A

(71) Viện Lâm nghiệp và Phát triển Bền vững (VN)

Xã Quyết Thắng, thành phố Thái Nguyên, tỉnh Thái Nguyên

(72) Trần Thị Thu Hà (VN); Phạm Văn Điền (VN); Lê Văn Phúc (VN); Nguyễn Mỹ Hải (VN); Trần Thị Tý (VN).

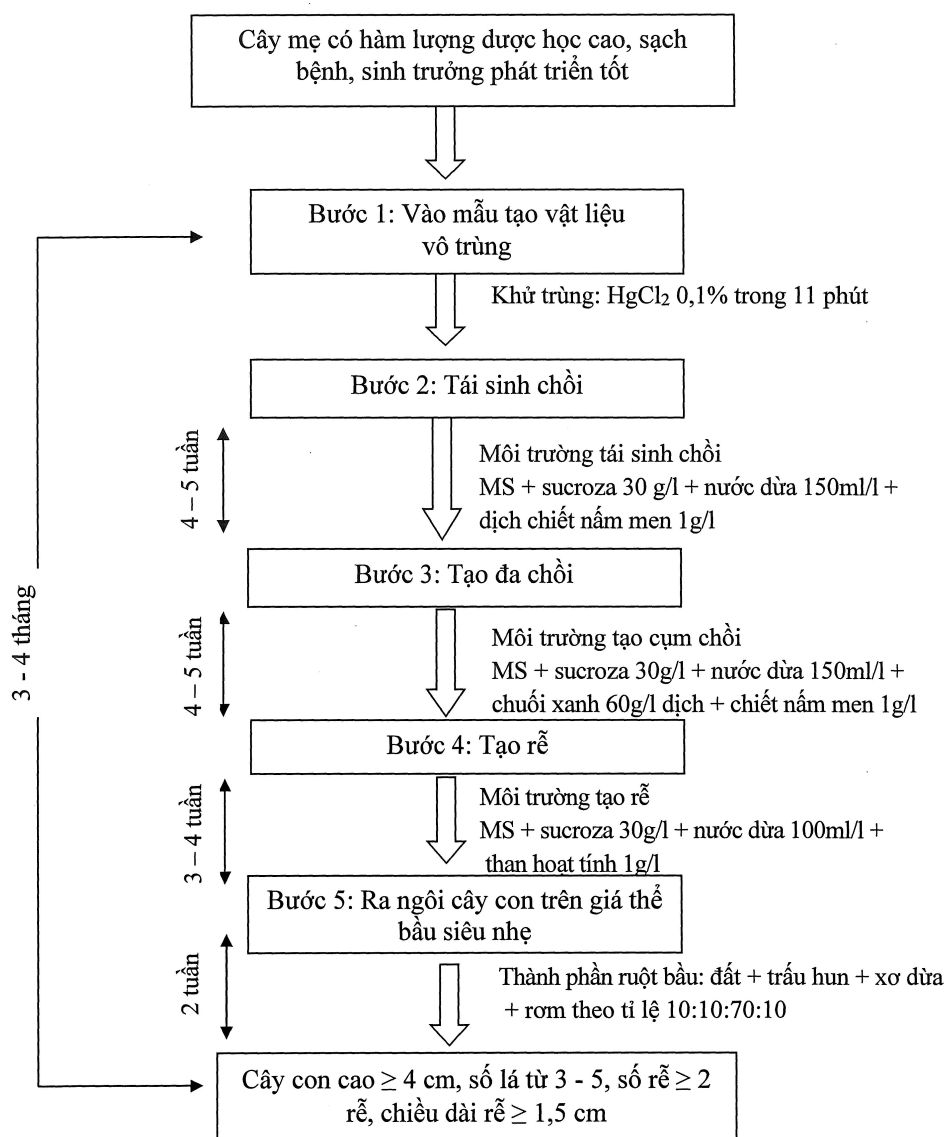
(74) Công ty TNHH SHARETOLINK Việt Nam (VN SHARETOLINK COMPANY LIMITED)

(54) QUY TRÌNH RA NGÔI CÂY LAN KIM TUYẾN (ANOECTOCHILUS SETACEUS BLUME.) TRÊN GIÁ THỂ BÀU SIÊU NHẹ

(21) 2-2024-00560

(57) Sáng chế đề cập đến quy trình ra ngôi cây lan kim tuyến (*Anoectochilus setaceus* Blume.) trên giá thể bầu siêu nhẹ, trong đó quy trình này bao gồm các bước: vào mẫu tạo vật liệu vô trùng, tái sinh chồi, tạo cụm chồi, tạo rễ, ra ngôi cây con trên giá thể bầu siêu nhẹ để giúp cây làm quen với môi trường tự nhiên.

Hình 1



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến quy trình ra ngôi cây lan kim tuyến (*Anoectochilus setaceus* Blume.) trên giá thể bầu siêu nhẹ.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Lan kim tuyến, tên khoa học là *Anoectochilus setaceus* Blume., thuộc họ Orchidaceae. Cây thảo, mọc ở đất, có thân rễ mọc dài trên mặt đất mọc nước và có nhiều lông mềm, mang 2-4 lá mọc xòe sát đất. Lá hình trứng, gần tròn ở gốc, chóp hơi nhọn và có mũi ngắn, cỡ 3-4 x 2 - 3cm, cuống lá dài 2 - 3cm, ở gốc rộng ra thành bẹ ôm lấy thân. Cụm hoa dài 5 - 7 cm, mang 5 - 10 hoa màu hồng khá to (dài cỡ 2,5 cm). Cánh môi dài 15 mm, mang 6 - 8 ria mỗi bên, đầu môi chẻ đôi thành 2 thùy hình thuôn tròn đầu. Bầu dài 13 mm, có lông thưa. Mùa hoa từ tháng 10 đến tháng 12. Tái sinh chủ yếu bằng chồi của thân rễ.

Lan kim tuyến là thảo dược có giá trị cao, chứa axit 4-hydroxycinnamic, β -sitosterol, β -D-glucopyranosit, axit 3-glucosit butanoic, kinsenosit cho mục đích y tế như có tác dụng giảm huyết áp cao điều trị chống viêm, xơ vữa động mạch, tiểu đường, chứng rối loạn gan, lá lách, tim, bệnh phổi bảo vệ gan và sử dụng để chữa bệnh viêm gan, viêm thận, chống khối u, ung thư và tính chống virus. Lan kim tuyến chứa các nguyên tố vi lượng (Fe, Co, Cu, Mn, Zn, Cr) đóng vai trò quan trọng trong nâng cao hiệu quả chống lão hóa, chuỗi polysaccharide nâng cao hiệu quả của miễn dịch trong cơ thể con người. Lan kim tuyến mọc tự nhiên rải rác trong rừng ở nhiều tỉnh miền núi phía Bắc. Tuy nhiên, loài dược liệu quý này đang có nguy cơ bị tuyệt chủng bởi sự khai thác bừa bãi. Mặt khác, khả năng tái sinh của loài này trong tự nhiên rất thấp, đặc biệt là những nơi môi trường sinh thái bị tàn phá.

Theo phương pháp nhân giống cổ truyền, lan kim tuyến được nhân giống bằng cách gieo hạt, tách mầm. Các phương pháp này có nhiều nhược điểm như việc nhân giống mang tính thời vụ, khó tạo ra số lượng lớn theo yêu cầu của sản xuất. Một hướng nhân giống mới đã và đang được áp dụng với cây lan kim tuyến đó là công nghệ nhân giống *in-vitro* để tạo cây trồng ở quy mô lớn, có hệ số nhân giống cao, cây giống đồng nhất về mặt di truyền, cây giống hoàn toàn sạch bệnh. Những năm gần đây có nhiều nghiên cứu về nhân giống *in-vitro* cây lan kim tuyến và đã có nhiều công bố trên nhiều tạp chí.

Tác giả Nguyễn Thị Hồng Gấm, Phùng Văn Phê, Hà Văn Huân và Bùi Văn Thắng đã tiến hành nhân giống lan kim tuyến (*anoectochilus setaceus* blume.) bằng kỹ thuật nuôi cấy mô. Kết quả cho thấy môi trường dinh dưỡng (Knops + 100 ml ND + 100 g/l dịch chiết khoai tây + 20 g/l sucroza + 7g/l thạch) bổ sung 0,3 mg/l TDZ + 0,5 mg/l Kinetin + 0,5 mg/l BAP cho tỷ lệ mẫu tạo thể chồi đạt 100% sau 2 tuần nuôi cấy. Môi trường dinh dưỡng bổ sung 0,3 mg/l BAP + 0,3 mg/l NAA cho hệ số nhân nhanh thể chồi đạt 4,54 lần/3 tuần. Môi trường dinh dưỡng bổ sung 0,3 mg/l Kinetin + 0,3 mg/l NAA + 0,2 mg/l IAA cho hệ số nhân nhanh chồi đạt 5,11 lần/4 tuần. Môi trường dinh dưỡng bổ sung 0,3 mg/l Kinetin + 0,3 mg/l BAP cho hiệu quả kích thích tăng trưởng chồi lan kim tuyến cao nhất (chiều dài chồi tăng thêm 0,86 cm/4 tuần và 1,14 cm/6 tuần; chồi xanh, mập và dài). Môi trường dinh dưỡng bổ sung 0,3 mg/l NAA, tỷ lệ chồi ra rễ đạt 98,33/5 ngày; 4,67 rễ/cây; rễ dài 1,5 ÷ 2,5 cm. Cây con hoàn chỉnh được huấn luyện trong 8 ngày, sau đó trồng lên giá thể là rễ cây dương xỉ; chế độ chăm sóc: tưới 2 lần/ngày, 11/m²/lần; che sáng 50%. Sau 6 tuần, tỷ lệ cây sống đạt 99,24%; cây cao 4,5 ÷ 5,2 cm.

Tác giả Trần Thị Hồng Thúy, Đỗ Thị Gấm, Nguyễn Khắc Hưng, Phạm Bích Ngọc, Chu Hoàng Hà (2015), Nghiên cứu nhân giống nhanh *in-vitro* loài lan kim tuyến (*Anoectochilus setaceus* Blume.) thông qua cảm ứng tạo PLBs (protocorm like bodies). Kết quả cho thấy Môi trường Pr4 (bổ sung 0,5 mg/L kinetin) có tỷ lệ hình thành PLBs cao nhất, các cụm PLBs có khối lượng lớn nhất và chất lượng tốt nhất.

Tác giả Nguyễn Quang Thạch, Phí Thị Cẩm Miện Viện sinh học Nông Nghiệp, Khoa Nông học, Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội đã nghiên cứu kỹ thuật nhân giống loài lan kim tuyến (*Anoectochilus setaceus* blume.) *in-vitro* bảo tồn nguồn được liệu quý. Kết quả cho thấy Nghiên cứu được tiến hành nhằm thiết lập quy trình nhân nhanh *in-vitro* hoàn chỉnh loài lan kim tuyến *Anoectochilus setaceus*. Cơ quan vào mẫu phù hợp nhất là thể chồi và mắt đốt ngang thân được khử trùng và đưa vào các môi trường nền khác nhau (MS, Knud, Knudson). Tiếp đó, các chồi và mắt đốt được chuyển sang môi trường nền thích hợp có bổ sung BA, Kinetin, α NAA trong 4 tuần. Môi trường thích hợp nhất để nhân nhanh thể chồi và mắt đốt ngang thân là Knud* + 0,5mg/l BAP + 0,3mg/l Kinetin + 0,3mg/l α NAA + 20g/l sucroza + 0,5g/l than hoạt tính + 7g thạch/l cho hệ số nhân chồi là 6,55 chồi/mẫu. Các chi có chiều cao từ 3-4 cm được sử dụng để ra rễ *in-vitro*. Môi trường thích hợp nhất để ra rễ là Knud* + 0,5-1,0 mg/l IBA hoặc 1,0mg/l NAA + 20g/l sucroza + 100ml/l ND + 5% than hoạt tính + 7g thạch/l. Tỷ lệ ra rễ là 100% và số rễ/chồi (4,21 rễ/chồi) đạt cao nhất trên môi trường có bổ sung 1mg/l α NAA.

Từ các công trình nghiên cứu trên, chúng tôi nhận thấy các kết quả công bố tương đối khác nhau. Nhưng đều có điểm chung là sử dụng kết hợp các chất điều tiết sinh trưởng tổng hợp nhân tạo: BAP, kinetin, NAA, IBA, v.v, để nâng cao hệ số nhân giống và khả năng ra rễ của cây. Tuy nhiên, việc kết hợp các chất này trong thời gian dài làm ức chế quá trình phát triển của mẫu nuôi cấy dẫn tới hệ số nhân chồi thấp.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Do đó, sáng chế được hoàn thành để giải quyết các vấn đề nêu trên. Cụ thể là, sáng chế đề cập đến quy trình ra ngôi cây lan kim tuyến (*Anoectochilus setaceus* Blume.) trên giá thể bầu siêu nhẹ, trong đó quy trình này có bước sử dụng nước dừa và sử dụng chất kích thích sinh trưởng nhân tạo với hàm lượng giảm còn 1/2 -1/3 hàm lượng chất kích thích sinh trưởng nhân tạo đã được bộc lộ trong phần tình trạng kỹ thuật ở giai đoạn nhân nhanh mà vẫn cho hệ số nhân chồi từ 15-20 chồi/mẫu. Theo một khía cạnh khác, quy trình nhân giống theo sáng chế, khác biệt ở chỗ, ở bước ra rễ tạo cây hoàn chỉnh đã kết hợp chất điều tiết kích thích sinh trưởng tổng hợp nhân tạo với hợp chất hữu cơ có trong tự nhiên cho tỷ lệ ra rễ đạt 100% và bước ra ngôi cây con trên giá thể bầu siêu nhẹ cho tỷ lệ cây sống cao, chất lượng cây con sinh trưởng tốt, đồng thời quy trình theo sáng chế có tính an toàn cho người sử dụng và hướng tới việc tạo ra nguồn dược liệu sạch.

Cụ thể, sáng chế đề cập đến quy trình ra ngôi cây lan kim tuyến (*Anoectochilus setaceus* Blume.) trên giá thể bầu siêu nhẹ, trong đó quy trình này gồm các bước:

i) Vào mẫu tạo vật liệu vô trùng:

Cây mẹ được sử dụng lấy mẫu phải là cây sạch bệnh, tốc độ sinh trưởng phát triển tốt, hàm lượng dược học cao (Hình 4).

Lựa chọn mẫu: Lấy mẫu là những đoạn thân khỏe, không bị sâu bệnh từ những cây mẹ tại vườn giống gốc. Cần chọn những đoạn thân ở phần gần ngọn, không chọn những đoạn thân gần mặt đất tránh nguy cơ nhiễm nấm bệnh.

- Thời điểm lấy mẫu: Mẫu được lấy vào buổi sáng khi thời tiết nắng ráo.
- Khử trùng sơ bộ:
 - + Tiến hành cắt bỏ lá và rửa mẫu dưới vòi nước chảy bằng tăm bông.
 - + Đoạn thân sau đó được ngâm trong dung dịch chất tẩy nhẹ (nước rửa chén hoặc xà phòng) trong 5 phút.
 - + Rửa sạch dưới vòi nước chảy, tráng lại bằng nước cất vô trùng 3 lần.

Chú ý: các thao tác phải nhẹ nhàng tránh tổn thương mẫu, do thân cây lan kim tuyến mỏng nước rất dễ bị dập nát.

- Khử trùng bề mặt:

- + Mẫu được cắt thành từng đoạn dài 2 - 3 cm chứa 1 đến 2 đốt thân (Hình 3, Hình 4).
 - + Khử trùng bằng cồn 70% trong thời gian 30 giây, sau đó tráng lại bằng nước cất vô trùng 3 - 5 lần.
 - + Thao tác khử trùng tiến hành hoàn toàn trong tủ cấy vô trùng.
 - Khử trùng tinh:
 - + Mẫu được khử trùng kép bằng HgCl_2 0,1%, lần thứ nhất trong thời gian 6 phút, lần thứ 2 trong thời gian 5 phút.
 - + Mẫu được tráng sạch thủy ngân bằng nước cất vô trùng 3 - 5 lần.
 - + Thao tác khử trùng tiến hành hoàn toàn trong tủ cấy vô trùng.
- Tiêu chuẩn của mẫu sau khi khử trùng: Mẫu sạch nấm bệnh (tỷ lệ mẫu sạch đạt từ 85% trở lên), sức sống của mẫu đảm bảo (tỷ lệ mẫu sống đạt 87% trở lên).

ii) Tái sinh chồi:

- Dùng panh gấp từng đoạn thân đã khử trùng đặt trên bề mặt giấy thấm.
- Thao tác cắt từng đoạn mẫu có ít nhất 1 mắt ngủ. Loại bỏ phần gốc ở từng đoạn thân để hóa chất khử trùng không ngấm sâu vào mẫu vật.
- Mẫu được cấy vào môi trường nuôi cấy theo hướng thẳng đứng.
- Môi trường nuôi cấy: MS + sucroza 20 g/l + BAP 2 mg/l + thạch 5 g/l.
- Giá trị pH của môi trường nuôi cấy là 5,6 - 5,8.
- Thời gian giai đoạn tái sinh chồi từ 3 - 4 tuần (Hình 5).

Tiêu chuẩn của mẫu sau tái sinh: Mẫu bật chồi sau nuôi cấy 3 - 4 tuần, chồi khỏe có từ 1 - 2 lá trở lên, không bị nấm khuẩn.

Chú ý: Các thao tác được thực hiện trong tủ cấy vô trùng, các dụng cụ panh dao được khử trùng trước khi sử dụng.

iii) Tạo đa chồi:

- Sau khi mẫu đã bật những chồi bất định, khoảng 4 - 5 tuần nuôi cấy các chồi cao từ 2 - 3 cm, cắt chồi cấy vào môi trường nhân nhanh để tạo được nhiều chồi (Hình 6, Hình 7).
- Công thức môi trường nuôi cấy: MS + Inositol 100 mg/l + sucroza 30 g/l + thạch 6 g/l + BA 0,5 mg/l + kinetin 0,3 mg/l + nước dừa 100ml/l + chuối 60g/l.
- Giá trị pH của môi trường nuôi cấy là 5,6 - 5,8.
- Thời gian cấy chuyển là 3 - 4 tuần. Khi cấy phải loại bỏ mẫu bị nhiễm.
- Tiêu chuẩn chồi sau giai đoạn tạo cụm chồi: Tạo được 8 - 10 chồi/mẫu, các chồi mập, xanh, tốc độ phát triển đồng đều.

Điều kiện nuôi cấy mẫu:

- Số giờ chiếu sáng trong ngày là 12 giờ/ngày.
- Cường độ chiếu sáng 2000 - 3000 lux.
- Nhiệt độ phòng nuôi 25 – 28°C.
- Các dụng cụ sử dụng và môi trường nuôi cấy được hấp trong nồi tiết trùng có áp suất 1atm, nhiệt độ 121°C trong 20 phút.

iv) Tạo rễ:

- Các chồi lan kim tuyến trong môi trường nhân nhanh có chiều cao khoảng 3 cm, 3-4 cặp lá, đồng đều sẽ được cắt và chuyển sang môi trường tạo rễ để tạo cây hoàn chỉnh (Hình 8).
- Dùng dao tách riêng từng chồi, cắt phần gốc già, cắt tỉa bớt lá già.
- Môi trường ra rễ: MS + Inositol 100 mg/l + sucroza 30 g/l + NAA 0,5 mg/l + thạch 5 g/l.
- Giá trị pH của môi trường nuôi cấy là 5,6 - 5,8.
- Sau 3 - 4 tuần tuổi các chồi sẽ ra rễ tạo cây hoàn chỉnh, có thể chuyển xuống nhà lưới để huấn luyện thích nghi.
- Tiêu chuẩn chồi sau giai đoạn ra rễ: Số lượng rễ/cây ≥ 2 rễ, chiều dài rễ ≥ 1 cm, cây con cứng cáp, số lá ≥ 3 , chiều cao cây ≥ 3 .

v) Ra ngôi cây con trên giá thể bầu siêu nhẹ:

Cảm ứng cây:

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

Chuyển bình lan kim tuyến đã có rễ ra ngoài ánh sáng tự nhiên trong nhà lưới từ 7-10 ngày để cây con thích nghi dần với ánh sáng tự nhiên. Nếu thời tiết nắng cần thiết phải che lưới đen với độ che sáng 50% (Hình 9).

Mở 30% nắp bình để cây con thích nghi dần dần với ẩm độ không khí. Sau 2-3 ngày thì mở 100% nắp bình để cây con thích nghi hoàn toàn với nhiệt độ và ẩm độ không khí.

Sau 2 tuần khi cây con đạt các chỉ tiêu: cây con cao ≥ 4 cm, số lá từ 3 - 5, số rễ ≥ 2 rễ, chiều dài rễ $\geq 1,5$ cm có thể rửa thạch và ra ngôi cây.

Chuẩn bị giá thể bầu siêu nhẹ:

Giá thể cho ruột bầu siêu nhẹ được sử dụng để ra ngôi cây con lan kim tuyến là hỗn hợp đất + trấu hun + xơ dừa + rơm theo tỉ lệ 10:10:70:10. Các thành phần trong giá thể cần được xử lý trước khi phối trộn, cụ thể:

+ Đất nghiền nhỏ.

+ Trấu hun: Đốt trấu sống trong điều kiện yếm khí khoảng 4 giờ, sau đó tưới nước, để nguội.

+ Xơ dừa: Ngâm trong nước vôi loãng 6 - 8 ngày, chú ý 2 ngày thay nước vôi 1 lần (thay 2 - 3 lần), lần cuối ngâm trong nước sạch. Sau đó vớt xơ dừa ra phơi khô, nghiền nhỏ.

+ Rơm: Phơi khô, nghiền nhỏ.

Sau khi các thành phần được xử lý, tiến hành phối trộn đúng theo tỷ lệ và đóng vào bầu 7x11 cm (vỏ bầu được làm bằng chất liệu tự phân hủy). Quá trình đóng bầu siêu nhẹ hoàn toàn tự động. Bầu sau đó được xếp vào các luống ươm để chuẩn bị ra cây. Bầu ươm cần được tưới ẩm trước ít nhất 1 tiếng trước khi cấy cây.

Ra ngôi cây con:

Cho nước vào bình cây, lắc sao cho toàn bộ phần thạch rời ra không còn bám trên thành bình. Sau đó đổ ra chậu nước sạch, tiến hành rửa cây sao cho thạch không còn bám trên rễ và thân, lá. Trong quá trình rửa, loại bỏ lá vàng dưới gốc (nếu có). Tiến hành trồng cây vào bầu đã chuẩn bị sẵn, lấp kín rễ và nén nhẹ để cây đứng thẳng, không bị bật gốc khi tưới nước. Lưu ý, cây con lan kim tuyến cần được trồng trong nhà có mái che và được trang bị hệ thống lưới đen có độ che 50% - 70%. Tránh ánh sáng trực tiếp và vườn ươm phải mát mẻ, thoáng gió (Hình 11).

Chế độ tưới nước:

Giá thể của cây khá giữ nước nên khi mới trồng xong chỉ cần phun sương cho ướt lá. Những ngày sau đó tùy độ ẩm thời tiết có chế độ tưới phù hợp. Những ngày trời mưa ẩm không cần tưới, hoặc chỉ tưới ướt lá. Những ngày thời tiết khô phải tưới ngày 2 lần.

Chế độ bón phân:

Sau trồng 7 ngày tiến hành phun dung dịch B1 (1ml/l). Định kỳ phun 7 ngày/lần. Sau 1 tháng có thể phun chế phẩm sinh học phân bón lá và rễ AT cho cây, định kỳ 15 ngày/lần.

Phòng trừ sâu bệnh hại giai đoạn vườn ươm:

Trong giai đoạn vườn ươm, lan kim tuyến thường bị bệnh thối thân do nấm bệnh và bị sâu xám cắn lá.

Bệnh thối thân: Là bệnh thường gặp nhất đối với cây lan kim tuyến sau giai đoạn sau *in-vitro*. Bệnh xuất hiện khi độ ẩm quá cao. Thời gian đầu ngọn cây vẫn xanh tươi, vài ngày sau nấm phát triển mạnh thành cụm dạng sợi bông dẫn đến cây bị chết. Biện pháp phòng trừ: Sau trồng 5 ngày tiến hành phun chế phẩm sinh học (Score 250

EC) phòng trừ bệnh cụ thể: Pha 5ml thuốc với 8 lít nước phun định kỳ lần 2 sau 15 ngày.

Sâu xám: Cây con sau *in-vitro* rất dễ bị sâu xám tấn công. Dùng cám rang thơm trộn với thuốc Vibasu 10G để bẫy sâu. Trộn 2 kg cám với 0,5 kg thuốc, rải cho 1.000 m² trước khi trời tối. Rải thuốc theo hàng hoặc hốc gần gốc cây.

Tiêu chuẩn cây con xuất vườn:

Cây lan kim tuyến trồng tại vườn ươm sau 02 tháng, cây cao 5 - 8 cm, có từ 4 - 6 lá, hệ rễ phát triển khỏe mạnh là đủ tiêu chuẩn xuất vườn.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 thể hiện sơ đồ quy trình ra ngôi cây lan kim tuyến (*Anoectochilus setaceus* Blume.) trên giá thể bầu siêu nhẹ.

Hình 2 là ảnh chụp cây lan kim tuyến ở vườn giống gốc.

Hình 3 là ảnh chụp mẫu đoạn thân lan kim tuyến.

Hình 4 là ảnh chụp mẫu lan kim tuyến được cấy trên môi trường.

Hình 5 là ảnh chụp lan mẫu lan kim tuyến giai đoạn tái sinh sau 4 tuần nuôi cấy.

Hình 6 là ảnh chụp lan kim tuyến giai đoạn tạo đa chồi sau 2 tuần tuổi.

Hình 7 là ảnh chụp lan kim tuyến giai đoạn tạo đa chồi sau 3 tuần tuổi.

Hình 8 là ảnh chụp cây lan kim tuyến đủ điều kiện ra ngôi.

Hình 9 là ảnh chụp cây lan kim tuyến giai đoạn cảm ứng.

Hình 10 là ảnh chụp rễ cây lan kim tuyến sau cảm ứng 15 ngày.

Hình 11 là ảnh chụp ra ngôi lan kim tuyến trên giá thể bầu siêu nhẹ.

Hình 12 là bảng thành phần môi trường MS.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết các bước thực hiện quy trình nhân giống cây lan kim tuyến.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến quy trình nhân giống cây lan kim tuyến (*Anoectochilus setaceus* Blume.) bằng nuôi cấy mô, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

i) Vào mẫu tạo vật liệu vô trùng:

Cây mẹ được sử dụng lấy mẫu phải là cây sạch bệnh, tốc độ sinh trưởng phát triển tốt, hàm lượng dược học cao (Hình 4).

Lựa chọn mẫu: Mẫu lan kim tuyến ban đầu là những đoạn thân khỏe, không bị sâu bệnh từ những cây mẹ tại vườn giống gốc. Khi chọn đoạn thân vào mẫu cần chú ý,

chọn những đoạn thân ở phần gần ngọn, không chọn những đoạn thân gần mặt đất tránh nguy cơ nhiễm nấm bệnh.

- Thời điểm lấy mẫu: mẫu được lấy vào buổi sáng khi thời tiết nắng ráo.
- Khử trùng sơ bộ: gồm các công đoạn sau:
 - + Tiến hành cắt bỏ lá và rửa mẫu dưới vòi nước chảy bằng tăm bông.
 - + Đoạn thân sau đó được ngâm trong dung dịch chất tẩy nhẹ (nước rửa chén hoặc xà phòng) trong 5 phút.
 - + Sau đó rửa sạch dưới vòi nước chảy, tráng lại bằng nước cất vô trùng 3 lần.

Chú ý: các thao tác phải nhẹ nhàng tránh tổn thương mẫu, do thân cây lan kim tuyến mọng nước rất dễ bị dập nát.

- Khử trùng bề mặt:
 - + Mẫu được cắt thành từng đoạn dài 2-3 cm chứa 1 đến 2 đốt thân (Hình 3, Hình 4).
 - + Khử trùng bằng cồn 70% trong thời gian 30 giây sau đó tráng lại bằng nước cất vô trùng 3 - 5 lần.
 - + Thao tác khử trùng tiến hành hoàn toàn trong tủ cấy vô trùng.
- Khử trùng tinh:
 - + Mẫu được khử trùng kép bằng HgCl_2 0,1%, lần thứ nhất trong thời gian 6 phút, lần thứ 2 trong thời gian 5 phút.
 - + Mẫu được tráng sạch thủy ngân bằng nước cất vô trùng 3 - 5 lần.
 - + Thao tác khử trùng tiến hành hoàn toàn trong tủ cấy vô trùng.

Tiêu chuẩn của mẫu sau khi khử trùng: Mẫu sạch nấm bệnh (tỷ lệ mẫu sạch đạt từ 85% trở lên), sức sống của mẫu đảm bảo (tỷ lệ mẫu sống đạt 87% trở lên).

ii) Tái sinh chồi:

- Dùng panh gấp từng đoạn thân đã khử trùng đặt trên bề mặt giấy thấm.
- Thao tác cắt từng đoạn mẫu có ít nhất 1 mắt ngủ. Loại bỏ phần gốc ở từng đoạn thân để hóa chất khử trùng không ngấm sâu vào mẫu vật.
- Mẫu được cấy vào môi trường nuôi cấy theo hướng thẳng đứng.
- Công thức môi trường nuôi cấy: MS + sucroza 20 g/l + BAP 2 mg/l + thạch 5 g/l.
- Giá trị pH của môi trường nuôi cấy là 5,6 - 5,8.
- Thời gian giai đoạn tái sinh chồi từ 3 - 4 tuần (hình 5)

Tiêu chuẩn của mẫu sau tái sinh: Mẫu bật chồi sau nuôi cấy 2 - 3 tuần, chồi khỏe có từ 1 - 2 lá trở lên, không bị nấm khuẩn.

Chú ý: Các thao tác được thực hiện trong tủ cấy vô trùng, các dụng cụ panh dao được khử trùng trước khi sử dụng.

iii) Tạo đa chồi:

- Sau khi mẫu đã bật những chồi bất định, khoảng 4 - 5 tuần nuôi cấy các chồi cao từ 2 - 3 cm, cắt chồi cấy vào môi trường nhân nhanh để tạo được nhiều chồi (hình 6-7).

- Công thức môi trường nuôi cấy: MS + Inositol 100 mg/l + sucroza 30 g/l + thạch 6 g/l + BA 0,5 mg/l + kinetin 0,3 mg/l + nước dừa 100ml/l + chuối 60g/l.

- Giá trị pH của môi trường nuôi cấy là 5,6 - 5,8.

- Thời gian cấy chuyển là 3 - 4 tuần. Khi cấy phải loại bỏ mẫu bị nhiễm.

- Tiêu chuẩn chồi sau giai đoạn tạo cụm chồi: Tạo được 8 - 10 chồi/mẫu, các chồi mập, xanh, tốc độ phát triển đồng đều.

Điều kiện nuôi cấy mẫu:

- Số giờ chiếu sáng trong ngày là 12 giờ/ngày.

- Cường độ chiếu sáng 2000 - 3000 lux.

- Nhiệt độ phòng nuôi 25°C – 28°C.

- Các dụng cụ sử dụng và môi trường nuôi cấy được hấp trong nồi tiết trùng có áp suất 1atm, nhiệt độ 121°C trong 20 phút.

iv) Tạo rễ:

- Các chồi lan kim tuyến trong môi trường nhân nhanh có chiều cao khoảng 3 cm, 3-4 cặp lá, đồng đều sẽ được cắt và chuyển sang môi trường tạo rễ để tạo cây hoàn chỉnh (Hình 8).

- Dùng dao tách riêng từng chồi, cắt phần gốc già, cắt tia bớt lá già.

- Môi trường ra rễ: MS + Inositol 100 mg/l + đường 30 g/l + NAA 0,5 mg/l + thạch 5 g/l.

- Giá trị pH của môi trường nuôi cấy là 5,6 - 5,8.

- Sau 3 - 4 tuần tuổi các chồi sẽ ra rễ tạo cây hoàn chỉnh, có thể chuyển xuống nhà lưới để huấn luyện thích nghi.

- Tiêu chuẩn chồi sau giai đoạn ra rễ: Số lượng rễ/cây ≥ 2 rễ, chiều dài rễ ≥ 1 cm, cây con cứng cáp, số lá ≥ 3 , chiều cao cây ≥ 3 .

v) Ra ngôi cây con trên bầu siêu nhẹ:

Cảm ứng cây:

Để chuyển cây con từ trong phòng thí nghiệm ra vườn ươm có tỷ lệ sống cao, sinh trưởng tốt. Đầu tiên cần cho cây thích nghi dần với điều kiện tự nhiên như sau: Chuyển bình lan kim tuyến đạt tiêu chuẩn của giai đoạn ra rễ để ngoài ánh sáng tự nhiên 10 - 15 ngày giúp cây con thích nghi dần với ánh sáng tự nhiên. Chú ý tránh ánh sáng trực tiếp, có thể để căng lớp lưới đen có độ che sáng 70% (lan kim tuyến ưa râm mát, không chịu được ánh sáng có cường độ mạnh) trong nhà lưới và để bình cây phía dưới.

Chuẩn bị giá thể bầu siêu nhẹ:

Giá thể cho ruột bầu siêu nhẹ được sử dụng để ra ngôi cây con lan kim tuyến là hỗn hợp Đất + trấu hun + xơ dừa + rom theo tỉ lệ 10:10:70:10. Các thành phần trong giá thể cần được xử lý trước khi phối trộn, cụ thể:

+ Đất nghiền nhỏ.

+ Trấu hun: Đốt trấu sống trong điều kiện yếm khí khoảng 4 giờ, sau đó tưới nước, để nguội.

+ Xơ dừa: Ngâm trong nước vôi loãng 6 - 8 ngày, chú ý 2 ngày thay nước vôi 1 lần (thay 2 - 3 lần), lần cuối ngâm trong nước sạch. Sau đó vớt xơ dừa ra phơi khô, nghiền nhỏ.

+ Rom: Phơi khô, nghiền nhỏ.

Sau khi các thành phần được xử lý, tiến hành phối trộn đúng theo tỷ lệ và đóng vào bầu 3x4 cm (vỏ bầu được làm bằng chất liệu tự phân hủy). Quá trình đóng bầu siêu nhẹ hoàn toàn tự động. Bầu sau đó được xếp vào các luống ươm để chuẩn bị ra cây. Bầu ươm cần được tưới ẩm trước ít nhất 1 tiếng trước khi cấy cây.

Ra ngôi cây con:

Cho nước vào bình cây, lắc sao cho toàn bộ phần thạch rời ra không còn bám trên thành bình. Sau đó đổ ra chậu nước sạch, tiến hành rửa cây sao cho thạch không còn bám trên rễ và thân, lá. Trong quá trình rửa, loại bỏ lá vàng dưới gốc (nếu có). Tiến hành trồng cây vào bầu đã chuẩn bị sẵn, lấp kín rễ và nén nhẹ để cây đứng thẳng, không bị bật gốc khi tưới nước. Lưu ý, cây con lan kim tuyến cần được trồng trong nhà có mái che và được trang bị hệ thống lưới đen có độ che 50% - 70%. Tránh ánh sáng trực tiếp và vườn ươm phải mát mẻ, thoáng gió.

Chế độ tưới nước:

Chế độ tưới nước rất quan trọng đối với cây lan kim tuyến. Giá thể của cây khá giữ nước nên khi mới trồng xong chỉ cần phun sương cho ướt lá. Những ngày sau đó tùy độ ẩm thời tiết mà có chế độ tưới phù hợp. Những ngày trời mưa ẩm không cần

tươi, hoặc chỉ tưới ướt lá. Những ngày thời tiết khô phải tưới ngày 2 lần. Kiểm tra giá thể sao cho mát tay là được.

Chế độ bón phân:

Sau trồng 7 ngày tiến hành phun dung dịch B1 (1ml/l). Định kỳ phun 7 ngày/lần. Sau 1 tháng có thể phun chế phẩm sinh học phân bón lá và rễ AT cho cây, định kỳ 15 ngày/lần.

Phòng trừ sâu bệnh hại giai đoạn vườn ươm:

Trong giai đoạn vườn ươm, lan kim tuyến thường bị bệnh thối thân do nấm bệnh và bị sâu xám cắn lá.

Bệnh thối thân: Là bệnh thường gặp nhất đối với cây lan kim tuyến sau giai đoạn sau *in-vitro*. Bệnh xuất hiện khi độ ẩm quá cao. Thời gian đầu ngọn cây vẫn xanh tươi, vài ngày sau nấm phát triển mạnh thành cụm dạng sợi bông dẫn đến cây bị chết. Biện pháp phòng trừ: Sau trồng 5 ngày tiến hành phun chế phẩm sinh học (Score 250 EC) phòng trừ bệnh cụ thể: Pha 5ml thuốc với 8 lít nước phun định kỳ lần 2 sau 15 ngày.

Sâu xám: Cây con sau *in-vitro* rất dễ bị sâu xám tấn công. Dùng cám rang thơm trộn với thuốc Vibasu 10G để bẫy sâu. Trộn 2 kg cám với 0,5 kg thuốc, rải cho 1.000 m² trước khi trời tối. Rải thuốc theo hàng hoặc hốc gần gốc cây.

Tiêu chuẩn cây con xuất vườn:

Cây lan kim tuyến trồng tại vườn ươm sau 02 tháng, cây cao 5-8 cm, có từ 4-6 lá, hệ rễ phát triển khỏe mạnh là đủ tiêu chuẩn xuất vườn.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến quy trình nhân giống *in-vitro* cây lan kim tuyến, khác biệt ở chỗ, quy trình này bao gồm bước sử dụng môi trường MS nuôi cấy, đồng thời thay thế và giảm 1/2 - 1/3 hàm lượng các chất điều tiết sinh trưởng nhân tạo bằng các hợp chất hữu cơ có sẵn trong tự nhiên như dịch chiết chuối, dịch chiết nấm men, nước dừa có tác động đến sự kích thích phân bào. Do trong nước dừa có các hợp chất dinh dưỡng như đường, vitamin và chất thích sinh trưởng đặc biệt là có chứa Zeatin. Zeatin có trong nước dừa hoạt tính cao hơn kinetin tổng hợp nhân tạo từ 10 - 100 lần. Trong dịch chiết cao nấm men rất giàu vitamin, đặc biệt là các vitamin nhóm B, axit amin và các yếu tố tăng trưởng.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến quy trình nhân giống *in-vitro* cây lan kim tuyến, khác biệt ở chỗ, trong bước tái sinh chồi sử dụng môi trường có các thành phần gồm: MS + sucroza 30 g/l + nước dừa 150ml/l + dịch chiết nấm men 1g/l + thạch 5,5 g/l, trong đó tỉ lệ tái sinh chồi thu được theo quy trình của sáng chế đạt 100%.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến quy trình nhân giống *in-vitro* cây lan kim tuyến, khác biệt ở chỗ, trong bước tạo rễ sử dụng môi trường có các thành phần gồm: MS + đường sucroza 30 g/l + than hoạt tính 1g/l + thạch 5 g/l, trong đó tỉ lệ ra rễ đạt 100% tương đương với công trình nghiên cứu của Nguyễn Quang Thạch sử dụng các thành phần như: Knud* + 0,5 - 1,0 mg/l IBA hoặc 1,0mg/l NAA + 20g/l Sucroza + 100ml/l ND + 5% than hoạt tính + 7g thạch/l. Như vậy, lượng chất kích thích sinh trưởng cần dùng đã giảm 1 nửa và được thay thế bằng hợp chất hữu cơ tự nhiên mà vẫn thu được hiệu quả mong muốn.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Quy trình ra ngôi cây lan kim tuyến (*Anoectochilus setaceus* Blume.) trên giá thể bầu siêu nhẹ được minh họa bằng các ví dụ thực hiện sau đây, tuy nhiên phạm vi bảo hộ của sáng chế không chỉ bị giới hạn bởi các ví dụ này.

Ví dụ 1: Chuẩn bị môi trường nuôi cấy

Các thành phần dinh dưỡng dùng trong pha chế môi trường nuôi cấy được pha thành 5 dung dịch mẹ như sau:

Dung dịch MSI: Gồm các muối đa lượng, cân lượng muối như bảng dưới đây pha vào 1 lít nước cất, bảo quản ở 4°C. Khi dùng đóng 20 ml dung dịch MSI cho 1 lít môi trường.

Thành phần	Trọng lượng (g)
KNO ₃	95
KH ₂ PO ₄	17
NH ₄ NO ₃	82,5
MgSO ₄	18,5

Dung dịch MSII: Cân 44 g muối CaCl₂.2H₂O hòa tan trong 500 ml nước cất, sau đó bổ sung nước cất lên thể tích 1 lít. Bảo quản ở 4°C. Khi dùng đóng 10 ml dung dịch này cho 1 lít môi trường.

Dung dịch MSIII: Muối khoáng vi lượng - Cân lượng muối khoáng như liệt kê dưới đây vào 1 lít dung dịch gốc. Khi dùng đóng 10 ml dung dịch MSIII cho 1 lít môi trường.

Thành phần	Trọng lượng (mg)
H ₃ BO ₃	620
MnSO ₄ .H ₂ O	1690

CoCl ₂ .6H ₂ O	2,5
CuSO ₄ .7H ₂ O	2,5
ZnSO ₄ .7H ₂ O	860
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	25
KI	83

Dung dịch MSIV: Thành phần sắt - Cân lượng muối nêu dưới đây. Pha riêng từng chất trong 200 ml nước nóng 80°C. Sau đó, hòa 2 chất với nhau tới khi xuất hiện màu vàng chanh, bổ sung nước cất lên thể tích 1 lít.

Thành phần	Trọng lượng (g)
FeSO ₄	2,78
Na ₂ EDTA	3,73

Dung dịch MSV: Thành phần hữu cơ và vitamin. Cân lượng các chất như trong bảng dưới đây. Pha trong nước cất hai lần thành 1 lít. Bảo quản ở 4°C. Dùng 10 ml cho mỗi lít môi trường.

Thành phần	Trọng lượng (mg)
Myo-Inositol	10000
Thiamin.HCl	10
Pyridoxyn.HCl	50
Axit nicotinic	50
Glyxin	200

Dung dịch BA (Benzinadenin): Cân 50mg BA cho vào cốc đựng sạch, nhỏ từ từ từng giọt NaOH 1N nguấy đều cho tới khi tan hoàn toàn. Dùng nước cất để lên thể tích 50 ml. Bảo quản dung dịch trong lọ nút mài 50ml ở 4°C.

Dung dịch Kinetin: Cân 50mg Kinetin cho vào cốc đựng sạch, nhỏ từ từ từng giọt NaOH 1N nguấy đều cho tới khi tan hoàn toàn. Dùng nước cất để lên thể tích 50 ml. Bảo quản dung dịch trong lọ nút mài 50ml ở 4°C.

Dung dịch IAA (axit Indole-3-acetic): Cân 50mg IAA cho vào cốc đựng sạch, nhỏ từ từ từng giọt NaOH 1N nguấy đều cho tới khi tan hoàn toàn. Dùng nước cất để lên thể tích 50 ml. Bảo quản dung dịch trong lọ nút mài 50ml ở 4°C.

Dung dịch IBA (axit Indole butyric): Cân 50mg IBA cho vào cốc đong sạch, nhỏ từ từ từng giọt NaOH 1N khuấy đều cho tới khi tan hoàn toàn. Dùng nước cất để lên thể tích 50 ml. Bảo quản dung dịch trong lọ nút mài 50ml ở 4°C.

Nước dừa: lấy trực tiếp từ quả dừa khô, kiểm tra từng quả để tránh nước bị ủng thối. Có thể đông thành từng phần, mỗi phần 200 ml và bảo quản trong tủ đá.

Chuối xanh: Bóc vỏ, rửa sạch, xay nhuyễn.

Tiến hành pha chế môi trường: Mỗi mẻ 3 lít.

Phần 1: Cân 15g thạch vào nồi kim loại, thêm 1 lít nước cất, đặt lên bếp đun cho thạch tan hoàn toàn.

Phần 2: Cân 90g đường sucroza vào cốc đong có dung tích 1 lít, đong 60ml dung dịch MSI, 30ml mỗi loại của các dung dịch từ MSII đến MSV nêu trên. Các dung dịch BA, kinetin, IAA, IBA tùy theo nồng độ của từng loại môi trường mà đong lượng dung dịch thích ứng. Ví dụ khi pha 3 lít môi trường tái sinh chồi có công thức MS + sucroza 20 g/l + BAP 2 mg/l + thạch 5 g/l, thì đong 60g sucroza, 6mg BAP, 15g thạch. Khuấy tan đều các thành phần, dùng dung dịch NaOH 1N điều chỉnh độ pH = 5,8.

Trộn hai phần với nhau bổ sung thêm nước cất cho đủ 3 lít. Dùng ống đong chia môi trường vào các bình tam giác loại dung tích 250ml mỗi bình 35ml môi trường, đậy bằng nút bông hoặc túi bóng kính và khử trùng 20 phút ở 121°C, 1atm. Bảo quản ở nơi khô và mát tối đa 6 - 8 tuần.

Ví dụ 2: Khử trùng đoạn thân tạo vật liệu khởi đầu.

- Mẫu lan kim tuyến ban đầu là những đoạn thân khỏe, không bị sâu bệnh từ những cây mẹ tại vườn giống gốc. Khi chọn đoạn thân vào mẫu cần chú ý, chọn những đoạn thân ở phần gần ngọn, không chọn những đoạn thân gần mặt đất tránh nguy cơ nhiễm nấm bệnh.

- Thời điểm lấy mẫu: Mẫu được lấy vào buổi sáng khi thời tiết nắng ráo.

- Khử trùng sơ bộ: Gồm các công đoạn sau:

+ Tiến hành cắt bỏ lá và rửa mẫu dưới vòi nước chảy bằng tấm bông.

+ Đoạn thân sau đó được ngâm trong dung dịch chất tẩy nhẹ (nước rửa chén hoặc xà phòng) trong 5 phút.

+ Sau đó rửa sạch dưới vòi nước chảy, tráng lại bằng nước cất vô trùng 3 lần.

Chú ý: Các thao tác phải nhẹ nhàng tránh tổn thương mẫu, do thân cây lan kim tuyến mỏng nước rất dễ bị dập nát.

- Khử trùng bề mặt:

- + Mẫu được cắt thành từng đoạn dài 2-3 cm chứa 1 đến 2 đốt thân (Hình 3, Hình 4).
- + Khử trùng bằng cồn 70% trong thời gian 30 giây sau đó tráng lại bằng nước cất vô trùng 3 - 5 lần.
- + Thao tác khử trùng tiến hành hoàn toàn trong tủ cấy vô trùng.
- Khử trùng tinh:
 - + Mẫu được khử trùng kép bằng HgCl_2 0,1%, lần thứ nhất trong thời gian 6 phút, lần thứ 2 trong thời gian 5 phút.
 - + Mẫu được tráng sạch thủy ngân bằng nước cất vô trùng 3 - 5 lần.
 - + Thao tác khử trùng tiến hành hoàn toàn trong tủ cấy vô trùng.

Tiêu chuẩn của mẫu sau khi khử trùng: Mẫu sạch nấm bệnh (tỷ lệ mẫu sạch đạt từ 95% trở lên), sức sống của mẫu đảm bảo (tỷ lệ mẫu sống đạt 100%).

Ví dụ 3: Tạo cụm chồi từ mảnh mô nuôi cấy.

- Sau khi mẫu đã bật những chồi bất định, khoảng 3 - 4 tuần nuôi cấy các chồi cao từ 2-3 cm, cắt chồi cấy vào môi trường nhân nhanh để tạo được nhiều chồi .
- Công thức môi trường nuôi cấy: MS + đường sucroza 30 g/l + thạch 6 g/l + nước dừa 100ml/l + chuối xanh 60g/l + kinetin 0,3mg/l + BA 0,5mg/l .
- Giá trị pH của môi trường nuôi cấy là 5,6-5,8.
- Thời gian cấy chuyển là 3 - 4 tuần. Khi cấy phải loại bỏ mẫu bị nhiễm.
- Tiêu chuẩn chồi sau giai đoạn tạo cụm chồi: Tạo được 15-20 chồi/mẫu, các chồi mập, xanh, tốc độ phát triển đồng đều.

Điều kiện nuôi cấy mẫu:

- Số giờ chiếu sáng trong ngày là 12 giờ/ngày.
- Cường độ chiếu sáng 2000-3000 lux.
- Nhiệt độ phòng nuôi 25 – 28°C.
- Các dụng cụ sử dụng và môi trường nuôi cấy được hấp trong nồi tiết trùng có áp suất 1 atm, nhiệt độ 121°C trong 20 phút.

Ví dụ 4: Tạo rễ *in-vitro*

- Các chồi lan kim tuyến trong môi trường nhân nhanh có chiều cao khoảng 3 cm, 3 - 4 cặp lá, đồng đều sẽ được cắt và chuyển sang môi trường tạo rễ để tạo cây hoàn chỉnh.
- Dùng dao tách riêng từng chồi, cắt phần gốc già, cắt tỉa bớt lá già.
- Môi trường ra rễ: MS + Inositol 100 mg/l + sucroza 30 g/l + NAA 0,5 mg/l + thạch 5 g/l.

- Loại cây không có rễ và những mầm nhỏ cấy lại vào môi trường nhân nhanh để xoay vòng.

Ví dụ 5: Cảm ứng cây.

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

- Chuyển bình lan kim tuyến đã có rễ ra ngoài ánh sáng tự nhiên trong nhà lưới từ 7-10 ngày để cây con thích nghi dần với ánh sáng tự nhiên. Nếu thời tiết nắng cần thiết phải che lưới đen với độ che sáng 50% (Hình 9).

- Mở 30% nắp bình để cây con thích nghi dần dần với ẩm độ không khí. Sau 2 - 3 ngày thì mở 100% nắp bình để cây con thích nghi hoàn toàn với nhiệt độ và ẩm độ không khí.

- Sau 2 tuần khi cây con đạt các chỉ tiêu: Cây con cao ≥ 4 cm, số lá từ 3 - 5, số rễ ≥ 2 rễ, chiều dài rễ $\geq 1,5$ cm có thể rửa thạch và ra ngôi cây.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Quy trình ra ngôi cây lan kim tuyến theo sáng chế có thể tạo ra hàng trăm triệu cây con. Đáp ứng nhu cầu cây giống Lan kim tuyến trên thị trường và là tiền đề để tạo ra các vùng trồng chuyên canh phục sản xuất và bảo chế dược liệu cũng như xuất khẩu sang các nước lân cận. Việc áp dụng quy trình sẽ cho hiệu quả ra ngôi cây giống lan kim tuyến đạt tỉ lệ sống cao, sinh trưởng và phát triển tốt trên giá thể bầu siêu nhẹ.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình ra ngôi cây lan kim tuyến (*Anoectochilus setaceus* Blume.) trên giá thể siêu nhẹ, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

i) vào mẫu tạo vật liệu vô trùng: lấy mẫu là các đoạn thân khỏe ở phần ngọn, không bị sâu bệnh từ những cây mẹ tại vườn giống gốc, lấy vào buổi sáng khi thời tiết nắng ráo; ngâm mẫu trong dung dịch chất tẩy nhẹ (nước rửa chén hoặc xà phòng) khoảng 5 phút, rửa sạch bằng nước cất vô trùng 3 lần; mẫu được cắt thành từng đoạn dài 2 - 3 cm chứa 1 đến 2 đốt thân; khử trùng bằng cồn 70% trong thời gian 30 giây, sau đó tráng lại bằng nước cất vô trùng 3 - 5 lần; tiếp đó khử trùng kép bằng HgCl_2 0,1%, lần thứ nhất trong thời gian 6 phút, lần thứ 2 trong thời gian 5 phút, tráng sạch bằng nước cất vô trùng 3 - 5 lần;

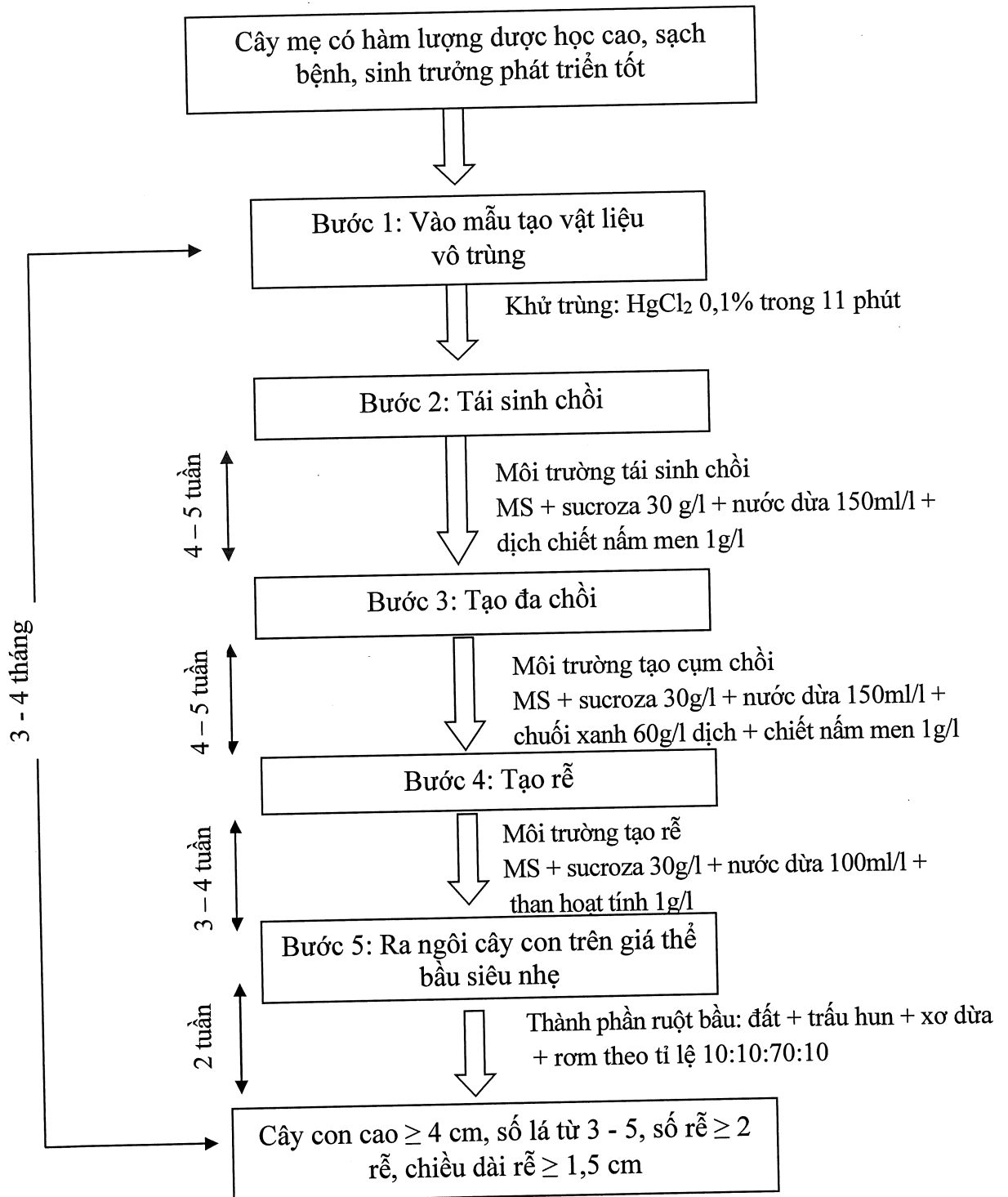
ii) tái sinh chồi: gắp từng đoạn thân đã khử trùng ở bước i) đặt trên bề mặt giấy thấm, cắt loại bỏ bớt phần gốc và cấy vào môi trường MS + sucroza 20 g/l + BAP 2 mg/l + thạch 5 g/l; duy trì độ pH của môi trường nuôi cấy khoảng từ 5,6 đến 5,8; thời gian giai đoạn tái sinh chồi từ 3 - 4 tuần;

iii) tạo cụm chồi: cắt các chồi cao từ 2 - 3 cm thu được từ bước tái sinh ii) cấy vào môi trường nhân nhanh là môi trường MS + Inositol 100 mg/l + sucroza 30 g/l + thạch 6 g/l + BA 0,5 mg/l + kinetin 0,3 mg/l + nước dừa 100ml/l + chuối 60g/l; duy trì độ pH của môi trường trong khoảng từ 5,6 đến 5,8; thời gian cấy chuyển từ 3 - 4 tuần với điều kiện cường độ chiếu sáng từ 2000 - 3000 lux, nhiệt độ từ 25°C – 28°C và thời gian chiếu sáng trong ngày là 12 giờ/ngày;

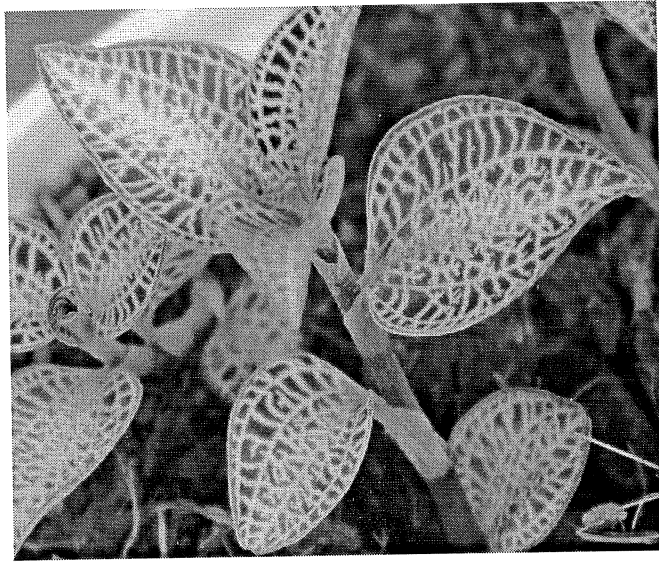
iv) tạo rễ: các chồi có chiều cao khoảng 3 cm, có 3 - 4 cặp lá sẽ được cắt và chuyển sang môi trường tạo rễ là môi trường MS + Inositol 100 mg/l + sucroza 30 g/l + NAA 0,5 mg/l + thạch 5 g/l; duy trì độ pH của môi trường trong khoảng từ 5,6 đến 5,8; sau 3 - 4 tuần các chồi sẽ ra rễ tạo cây hoàn chỉnh, có thể chuyển xuống nhà lưới để huấn luyện thích nghi;

v) ra ngôi cây con trên giá thể bầu siêu nhẹ: chuyển bình lan kim tuyến đã có rễ thu được ở bước iv) ra nhà lưới được che sáng 50% từ 7 - 10 ngày để cây con thích nghi dần với ánh sáng tự nhiên; nếu thời tiết nắng cần phải che lưới đen với độ che sáng 50%, mở 30% nắp bình để cây con thích nghi với độ ẩm không khí; sau 2-3 ngày mở 100% nắp bình để cây con thích nghi hoàn toàn với nhiệt độ và độ ẩm môi trường; sau 2 tuần khi cây con đạt chỉ tiêu cây con cao ≥ 4 cm, số lá từ 3 - 5, số rễ ≥ 2 rễ, chiều dài rễ $\geq 1,5$ cm có thể rửa thạch và ra ngôi cây; giá thể bầu siêu nhẹ gồm hỗn hợp đất + trấu hun + xơ dừa + rơm theo tỉ lệ 10:10:70:10, các thành phần trong giá thể cần được xử lý trước khi tiến hành phối trộn.

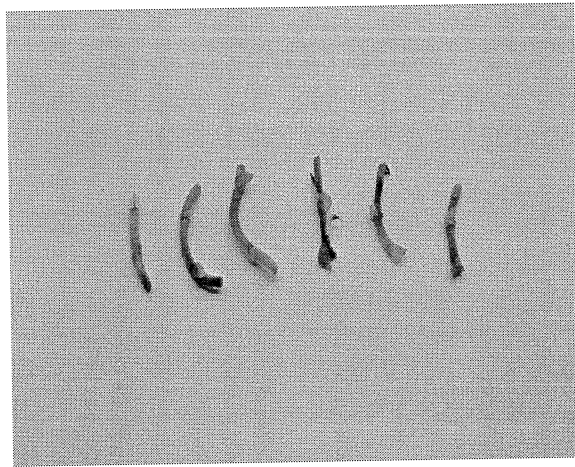
Hình 1



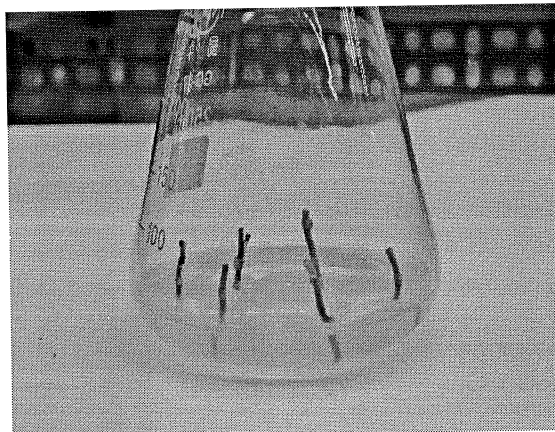
Hình 2



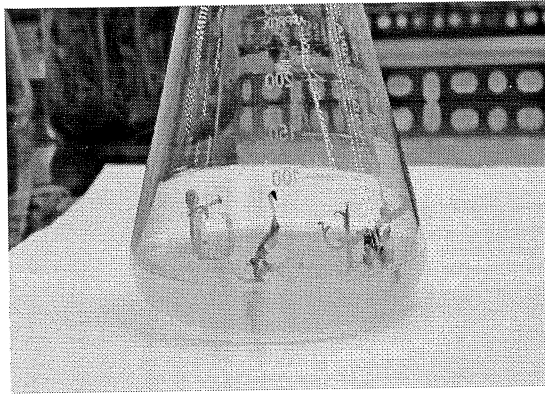
Hình 3



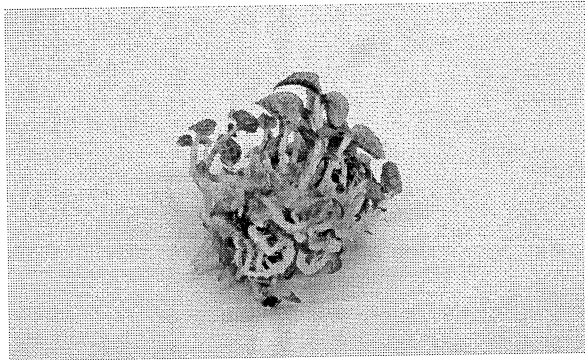
Hình 4



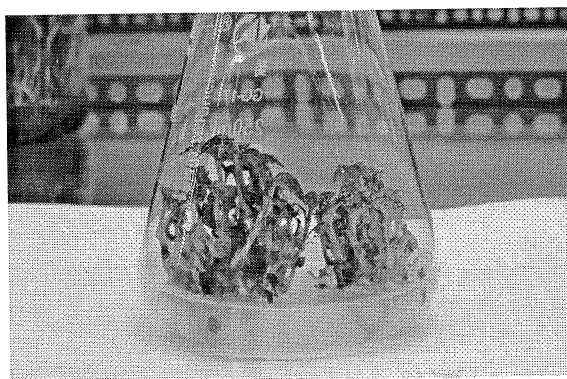
Hình 5



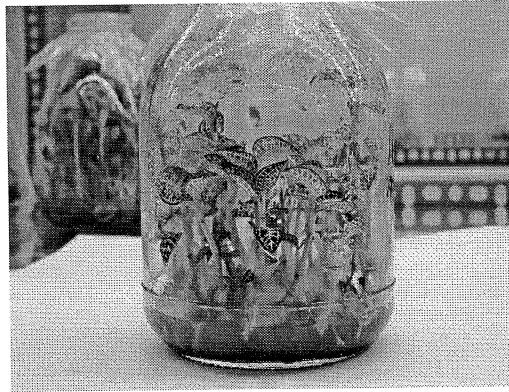
Hình 6



Hình 7



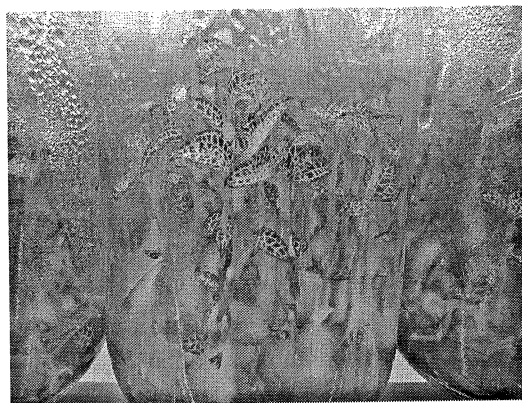
Hình 8



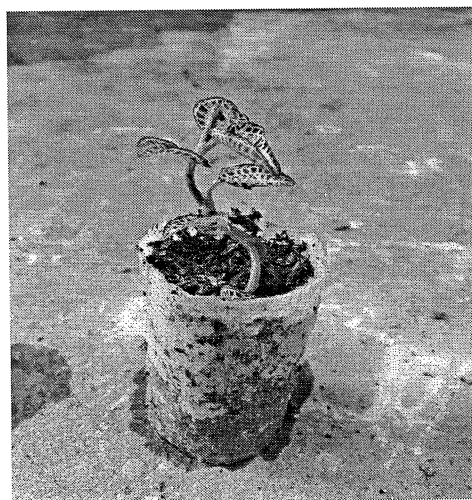
Hình 9



Hình 10



Hình 11



Hình 12

Thành phần	Môi trường MS (mg/l)
KNO ₃	1900
KH ₂ PO ₄	170
NH ₄ NO ₃	1650
MgSO ₄	370
CaCl ₂ .2H ₂ O	440
H ₃ BO ₃	6,2
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025
CuSO ₄ .7H ₂ O	0,025
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25
KI	0,83
FeSO ₄	27,8
Na ₂ EDTA	37,3
Myo-Inositol	100
Thiamin.HCl	0,1
Pyridoxin.HCl	0,5
Axit nicotic	0,5
Glycin	2