



(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)



2-0004027

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

(13) **Y**

(21) 2-2024-00559

(22) 29/12/2021

(67) 1-2021-08434

(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); Đỗ Hoàng Chung (VN); Ngô Thị Hiền (VN); Nguyễn Công Hoan (VN).

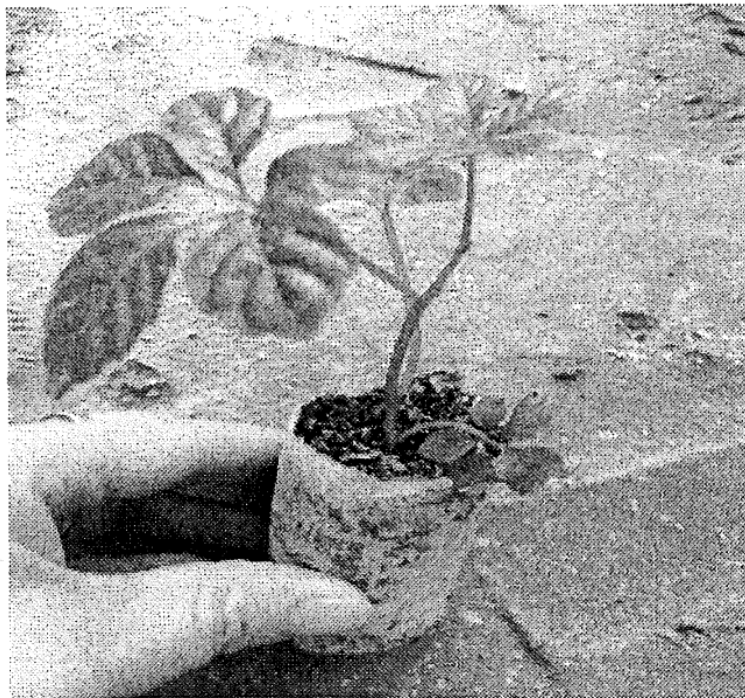
(74) Công ty TNHH SHARETOLINK Việt Nam (VN SHARETOLINK COMPANY LIMITED)

(54) QUY TRÌNH NHÂN GIỐNG QUY MÔ CÔNG NGHIỆP (NHÂN GIỐNG IN-VITRO) CÂY GIẢO CỔ LAM BẢY LÁ (GYNOSTEMMA PUBESCENS GAGNEP.) BẰNG GIÁ THỂ BÀU SIÊU NHẹ

(21) 2-2024-00559

(57) Sáng chế đề cập đến quy trình nhân giống quy mô công nghiệp (nhân giống *in-vitro*) cây giảo cổ lam bảy lá (*Gynostemma pubescens* Gagnep.) bằng giá thể bầu siêu nhẹ, trong đó quy trình này bao gồm các bước: vào mẫu tạo vật liệu khởi đầu, tái sinh chồi, nhân nhanh chồi, tạo rễ và ra ngôi trên giá thể bầu siêu nhẹ. Quy trình nhân giống theo sáng chế tạo ra số lượng lớn cây giống giảo cổ lam bảy lá ở quy mô công nghiệp, cây giống đồng nhất về mặt hình thái, di truyền và hoàn toàn sạch bệnh, không phụ thuộc vào điều kiện khí hậu.

Hình 7



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến quy trình công nghệ nhân giống quy mô công nghiệp (nhân giống *in-vitro*) cây giảo cổ lam bảy lá (*Gynostemma pubescens* Gagnep.) bằng giá thể bầu siêu nhẹ.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Giảo cổ lam bảy lá có tên khoa học là *Gynostemma pubescens* Gagnep. thuộc họ bầu bí (Curcubitaceae). Cây ưa ẩm, ưa bóng phân bố ở các tỉnh Lào Cai, Vĩnh Phúc, Hà Giang, Yên Bái, Điện Biên, Cao Bằng, Bắc Kạn, Lạng Sơn, Hà Giang, Quảng Ninh, Thái Nguyên, Lai Châu, Sơn La, Hòa Bình, Thanh Hóa, Nghệ An, Thừa Thiên - Huế, Kon Tum, Gia Lai. Cây có dạng thân leo quấn. Trong cây chứa nhiều nhóm hợp chất như phenol, alkaloit, flavonoit (flavonol, auron, isoflavol, flavanol, chalcon, v.v.), terpenoit, steroid, saponin. Giảo cổ lam được sử dụng cho người có cholesterol cao, huyết áp cao và cải thiện chức năng tim, tăng cường hệ thống miễn dịch, tăng sức đề kháng, cải thiện trí nhớ, chống lão hóa, giảm căng thẳng, cải thiện giấc ngủ.

Giảo cổ lam là loài dược liệu quý trong y học cổ truyền Việt Nam đã được khai thác quá mức làm nguyên liệu trong sản xuất thuốc và thực phẩm chức năng. Có nhiều cách nhân giống giảo cổ lam như giâm hom, gieo hạt nhưng hệ số nhân thấp và độ đồng đều không cao. Vì vậy, một hướng nghiên cứu mới đã và đang được áp dụng đối với cây giảo cổ lam 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 và hoàn toàn sạch bệnh. Trước thực trạng đó cùng với những lợi ích đã biết của nuôi cấy mô tế bào, những năm gần đây đã có nhiều nghiên cứu về nhân giống *in-vitro* cây giảo cổ lam và có nhiều công bố trên nhiều tạp chí.

Tác giả Nguyễn Thị Thanh Hằng, Lê Ái Vân, Đinh Văn Khiêm, Hoàng Văn Cương, Nguyễn Thị Phụng Hoàng, Phan Xuân Huyền, Viện nghiên cứu khoa học Tây Nguyên, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã tiến hành “nghiên cứu nhân giống *in-vitro* và sự sinh trưởng phát triển cây giảo cổ lam (*Gynostemma pubescens* Gagnep.) trong nhà kính”. Kết quả cho thấy, môi trường MS bổ sung 1mg/l BA, 30g/l sucroza, 8g/l thạch, pH 5,8 là tốt nhất đến sự tái sinh chồi *in-vitro* với chiều cao chồi là 1,84cm, số chồi 10,50 chồi/mẫu. Môi trường MS bổ sung 0,5mg/l TDZ, 30g/l sucroza, 8g/l thạch, pH 5,8 là tốt nhất đến sự tái sinh chồi *in-vitro* với chiều cao chồi là 1,99cm và số chồi là 13,80 chồi/mẫu. Nồng độ IBA từ 0-1mg/l đều thích hợp

đến sự tái sinh rễ của cây giảo cổ lam, với tỷ lệ tái sinh rễ đạt 100%. Vụn xơ dừa là giá thể thích hợp nhất để chuyển cây giảo cổ lam cây mô ra vườn ươm, với tỷ lệ sống đạt 100%, chiều cao cây 9,73cm, chiều dài rễ 6,45cm. Đất mùn là giá thể tốt nhất đến sự sinh trưởng, phát triển của cây, với tỷ lệ sống đạt 100%, chiều cao cây 82,08, chiều dài rễ đạt 36,57cm, khối lượng tươi 57,32g/cây. Tưới 100ml phân Nitrophoska (2g/l) theo định kì mỗi tuần một lần là tốt nhất đến sự sinh trưởng, phát triển của cây, với tỷ lệ sống đạt tươi 59,38g/cây.

Phạm Cao Khải, Trần Văn Minh, Trung tâm nghiên cứu và Phát triển Nông nghiệp công nghệ cao, Khu Nông nghiệp công nghệ cao thành phố Hồ Chí Minh Trường Đại học quốc tế, Đại học Quốc gia thành phố Hồ Chí Minh đã tiến hành nghiên cứu “Vi nhân giống cây giảo cổ lam (lam (*Gynostemma pubescens* Gagnep) bằng kĩ thuật nuôi cấy đốt thân”. Kết quả cho thấy: đốt thân giảo cổ lam được khử trùng bằng dung dịch Javen loãng với nước cất theo tỷ lệ 50% trong 20 phút cho tỷ lệ mẫu cấy vô trùng đạt cao nhất (73,33%). Các chồi đỉnh và khúc cắt thân *in vitro* được cấy trên môi trường MS bổ sung BA (0,1; 0,5; 1; 1,5; 2,0 mg/l) kết hợp NAA (0,1; 0,2; 0,3 mg/l). Sau 6 tuần nuôi cấy, các chồi mới tái sinh và môi trường bổ sung 1,0 mg/l BA và 1,0 mg/l NAA cho số chồi cao nhất (6,8 chồi/mẫu cấy). Môi trường khoáng cho kết quả tốt nhất cho tái sinh chồi là môi trường 1/2MS với chiều cao cây và số lá lần lượt là 5,2cm và 4 lá. Đối với sự tạo rễ, môi trường 1/2MS bổ sung 0,25 mg/l IBA cho chiều dài rễ 7,6cm.

Hồ Lê Diễm Trinh, Nguyễn Thị Tường Vi đã tiến hành nghiên cứu “ quy trình nhân giống *in-vitro* cây giảo cổ lam (*Gynostemma pubescens* Gagnep.)”. Kết quả cho thấy: Mẫu lá non được cắt và nuôi cấy trên môi trường MS (môi trường Murashige và Skoog) với TDZ (thidiazuron) từ 0,1 tới 1mg/L. Cụm chồi giảo cổ lam được tạo thành cao nhất trên môi trường MS + TDZ 0,7 mg/L, với 74,67% mẫu cảm ứng với 12,89 chồi/mẫu sau 10 tuần nuôi cấy. Mẫu đốt thân được nuôi cấy trên môi trường MS với BA (6-benzyl adenin) từ 0,3 tới 1,5 mg/L và IBA (axit indole-3-butyric) 0,5 mg/L). Sau 6 tuần nuôi cấy trên môi trường MS + BA 1 mg/L + IBA 0,5 mg/L, 83,33% mẫu đoạn thân cảm ứng tạo cụm chồi với 7,39 chồi/mẫu. So sánh môi trường đốt thân với sự kết hợp BA (0,3-5 mg/L) và NAA (axit 1-naphthaleneacetic) 0,2 mg/L sau 4 tuần nuôi cấy, hệ số nhân nhanh chồi tốt nhất đạt 3,67 lần trên môi trường MS + BA 1,5 mg/L + NAA 0,2 mg/L khi so với MS + BA 1,0 mg/L + IBA 0,5 mg/L. Môi trường thích hợp để cảm ứng tạo rễ là MS + 0,5 mg/L IBA với tỷ lệ chồi tạo rễ đạt 97,33%, số rễ trung bình đạt 5,29 rễ/chồi sau 4 tuần. Trên giá thể hữu cơ phối trộn 70% xơ dừa và 30% phân bò ủ hoai cho tỷ lệ cây sống cao đạt tới 91,33%, cây sinh trưởng và phát triển tốt trong giai đoạn vườn ươm.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế của chúng tôi đề cập đến quy trình công nghệ nhân giống quy mô công nghiệp (nhân giống *in-vitro*, bầu siêu nhẹ) cây giảo cổ lam bảy lá để có thể sản xuất cây lớn trên quy mô công nghiệp, vận chuyển thuận lợi, đặc biệt cho tỉ lệ cây sống cao, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

i) Vào mẫu tạo vật liệu khởi đầu.

Vật liệu sử dụng cho vào mẫu là đoạn thân bánh tẻ từ cây mẹ trong vườn giống gốc, được lấy vào buổi sáng khi trời nắng cho cho hiệu quả tốt nhất. Vật liệu sau khi cắt được cắm ngay vào bình chứa nước sạch, tránh bị héo.

Làm sạch sơ bộ: Vật liệu sau khi thu từ vườn, loại bỏ toàn bộ phần phiến lá, để lại phần cuống lá dài khoảng 0,5cm. Những đoạn thân sau đó được cắt thành từng đoạn chứa từ 1-2 nách lá và cho vào bình sạch. Đổ nước vào bình, tráng mẫu 1-2 lần để loại bỏ bớt bụi bẩn.

Ngâm mẫu trong nước xà phòng loãng trong 5 phút. Dùng chổi lông mềm cọ sạch tất cả các vị trí trên mẫu, đặc biệt là những nách lá. Sau đó rửa sạch mẫu dưới vòi nước chảy, tráng lại bằng nước cất vô trùng 3 lần.

Khử trùng bề mặt (tiến hành trong tủ cấy vô trùng): mẫu sau khi được rửa sạch sơ bộ bên ngoài sẽ mang vào tủ cấy vô trùng và lắc mẫu với cồn 70% trong thời gian 30 giây sau đó tráng lại bằng nước cất vô trùng 3-5 lần.

Khử trùng tinh (tiến hành trong tủ cấy vô trùng): mẫu sau khi khử trùng bề mặt bằng cồn 70% sẽ tiếp tục lắc với dung dịch HgCl_2 0,1% trong 5 phút. Kết thúc khử trùng tráng mẫu với nước cất vô trùng 4-5 lần.

ii) Tái sinh chồi.

Dùng panh gấp từng đoạn thân đã khử trùng, đặt trên bề mặt giấy cấy. Thao tác cắt những phần chết ở hai đầu (có màu trắng) do chất khử trùng gây ra. Mẫu sau đó được cấy vào môi trường tái sinh chồi là môi trường MS có bổ sung 30 g/l đường, 0,2 mg/l GA_3 , 5,5 g/l thạch. Giá trị pH của môi trường nuôi cấy là 5,8. Điều kiện nuôi cấy: thời gian chiếu sáng 10-12 giờ/ngày, cường độ chiếu sáng 2000-3000 lux, nhiệt độ phòng nuôi $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$. Các dụng cụ sử dụng và môi trường nuôi cấy được hấp khử trùng ở áp suất 1 atm, nhiệt độ 121°C trong 20 phút. Thời gian giai đoạn tái sinh chồi từ 4 tuần.

iii) Nhân nhanh chồi.

Lựa chọn mầm chồi không bị nhiễm nấm khuẩn sau giai đoạn tái sinh, sau đó cấy chồi theo hướng thẳng đứng vào môi trường nhân nhanh là môi trường MS + 30 g/l đường + 3,0 mg/l BAP + 0,4 mg/l Kinetin + 6 g/l thạch. Giá trị pH của môi trường nuôi

cây là 5,8. Điều kiện nuôi cấy: Thời gian chiếu sáng 10 giờ/ngày, cường độ chiếu sáng 2000-3000 lux, nhiệt độ phòng nuôi $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Các dụng cụ sử dụng và môi trường nuôi cấy được hấp khử trùng ở áp suất 1 atm, nhiệt độ 121°C trong 20 phút. Thời gian giai đoạn tái sinh chồi từ 4 tuần. Tiêu chuẩn sau giai đoạn nhân nhanh: Hệ số nhân chồi đạt 5,4 lần.

iv) Tạo rễ.

Các chồi giảo cổ lam đạt chiều cao ≥ 3 cm, cây thẳng, có từ 2 lá được cắt chuyển sang môi trường tạo rễ.

Dùng kéo cắt riêng từng chồi, cắt phần gốc già. Chú ý cắt chồi sao cho đồng đều về chiều cao. Sau đó cấy chồi trên môi trường 1/2MS có bổ sung 0,5 mg/l NAA + 15g/l đường + 5,5 g/l thạch. Giá trị pH của môi trường nuôi cấy là 5,6 – 5,8. Thời gian xuất hiện rễ từ 7-10 ngày sau khi cấy chuyển. Tuy nhiên sau 15 ngày rễ mới đạt chiều dài, cây cứng cáp mới có thể đưa cây ra cảm ứng dần với điều kiện tự nhiên.

Tiêu chuẩn mẫu sau giai đoạn ra rễ: 100% mẫu tạo rễ, cây con cứng cáp, số lá ≥ 3 lá, chiều cao cây ≥ 4 cm.

v) Ra ngôi cây con trên bầu siêu nhẹ.

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 giảo cổ lam bảy lá đã 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 50% 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 giảo cổ lam bảy lá là hỗn hợp đất + trấu hun + xơ dừa + rơm theo tỉ lệ 20:30:35:15. 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 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 3x4cm (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.

Ra ngôi cây con:

Rửa sạch thạch trên rễ của cây con *in-vitro*. Loại bỏ bớt lá già, lá vàng. Tiến hành trồng cây vào bầu đã chuẩn bị sẵn, lấp kín rễ và nén nhẹ để cây đứng thẳng, cây không bị bật gốc khi tưới nước.

Chế độ tưới nước:

2 tuần đầu: Sau khi cấy cây con vào bầu ươm, tiến hành làm vòm che phủ nylon kín tránh cây bị héo. Trời nắng cần phủ lên 1 lớp lưới đen. Tiến hành tưới nước 2 lần/ngày bằng bình hoặc hệ thống phun sương.

Giai đoạn sau 2-4 tuần: Mở dần 2 đầu vòm nylon cho cây quen dần. Chế độ tưới nước 2 lần/ ngày bằng bình hoặc hệ thống phun sương.

Giai đoạn sau 4 tuần: Lúc này cây đã cứng cáp, hệ rễ phát triển nên có thể tưới bằng hệ thống tưới vòng quay tự động hoặc bằng ô roa, vòi phun. Thực hiện chế độ tưới 1-2 lần ngày tùy thuộc độ ẩm của đất và điều kiện thời tiết. Luôn giữ độ ẩm khoảng 80%, thoáng gió, khi tưới phải để ráo nước ngay trong ngày, tránh đọng nước làm thối rễ, thối cây.

Chế độ bón phân:

Cây con sau trồng 4 tuần có thể tưới phân bón lá AT giúp cây nảy chồi, ra rễ, tăng sức chống chịu, thích nghi với môi trường. Khi cây cứng cáp có thể tưới định kỳ bằng phân NPK nồng độ loãng. Sau đó rửa sạch lá bằng nước sạch

Phòng trừ sâu bệnh hại giai đoạn vườn ươm:

Cây con ở giai đoạn vườn ươm phải được thường xuyên chăm sóc, làm sạch cỏ để tránh sâu, bệnh gây hại. Để ngăn ngừa nấm hại, dùng COC85 (gốc đồng) phun đều lên trên mặt lá với liều lượng phun 20g/16l nước, 1 tháng/1 lần. Khi cây có hiện tượng bị nấm hại phun nồng độ 40g/16l nước. Khi bị sâu hại sử dụng phương pháp bắt giết, nếu gây hại trên diện tích lớn sử dụng các thuốc trừ sâu sinh học (B40 super 2,0EC... phun theo chỉ dẫn của nhà sản xuất.

Tiêu chuẩn cây con xuất vườn:

Cây giáo cổ lam bảy lá trồng tại vườn ươm sau 04 tháng, đạt chiều cao 15-20 cm, có từ 4 lá, sinh trưởng phát triển tốt, không sâu bệnh hại.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 thể hiện sơ đồ quy trình công nghệ nhân giống quy mô công nghiệp (nhân giống *in-vitro*, bầu siêu nhẹ) cây giảo cổ lam bảy lá.

Hình 2 là ảnh chụp vườn giống gốc giảo cổ lam bảy lá.

Hình 3 là ảnh chụp giảo cổ lam bảy lá giai đoạn vào mẫu.

Hình 4 là ảnh chụp giảo cổ lam bảy lá sau 4 tuần tái sinh chồi.

Hình 5 là ảnh chụp giảo cổ lam bảy lá giai đoạn tạo đa chồi sau 3 tuần nuôi cấy.

Hình 6 là ảnh chụp giảo cổ lam bảy lá giai đoạn ra rễ.

Hình 7 là ảnh chụp giảo cổ lam bảy lá ra ngôi trên bầu siêu nhẹ.

Hình 8 là bảng thành phần môi trường MS.

Mô tả chi tiết các phương án thực hiện sáng chế

Sau đây, quy trình công nghệ nhân giống quy mô công nghiệp (nhân giống *in-vitro*, bầu siêu nhẹ) cây giảo cổ lam bảy lá (*Gynostemma pubescens* Gagnep.) sẽ được mô tả một cách chi tiết.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến quy trình công nghệ nhân giống quy mô công nghiệp (nhân giống *in-vitro*, bầu siêu nhẹ) cây giảo cổ lam bảy lá (*Gynostemma pubescens* Gagnep.), trong đó quy trình này bao gồm các bước:

i) Vào mẫu tạo vật liệu khởi đầu.

Vật liệu sử dụng cho vào mẫu: Đoạn thân bánh tẻ từ cây mẹ trong vườn giống gốc. Vật liệu được lấy vào buổi sáng khi trời nắng cho cho hiệu quả tốt nhất. Vật liệu sau khi cắt được cắm ngay vào bình chứa nước sạch tránh bị héo.

Làm sạch sơ bộ: Vật liệu sau khi thu từ vườn, loại bỏ toàn bộ phần phiến lá, để lại phần cuống lá dài khoảng 0,5cm. Những đoạn thân sau đó được cắt thành từng đoạn chứa từ 1-2 nách lá và cho vào bình sạch. Đổ nước vào bình, tráng mẫu 1-2 lần để loại bỏ bớt bụi bẩn.

Ngâm mẫu trong nước xà phòng loãng trong 5 phút. Dùng chổi lông mềm cọ sạch tất cả các vị trí trên mẫu, đặc biệt là những nách lá. Sau đó rửa sạch mẫu dưới vòi nước chảy, tráng lại bằng nước cất vô trùng 3 lần.

Khử trùng bề mặt (tiến hành trong tủ cấy vô trùng): Mẫu sau khi được rửa sạch sơ bộ bên ngoài sẽ mang vào tủ cấy vô trùng và lắc mẫu với cồn 70% trong thời gian 30 giây sau đó tráng lại bằng nước cất vô trùng 3-5 lần.

Khử trùng tinh (tiến hành trong tủ cấy vô trùng): Mẫu sau khi khử trùng bề mặt bằng cồn 70% sẽ tiếp tục lắc với dung dịch HgCl_2 0,1% trong 5 phút. Kết thúc khử trùng tráng mẫu với nước cất vô trùng 4-5 lần (hình 3)

ii) Tái sinh chồi.

Dùng panh gấp từng đoạn thân đã khử trùng, đặt trên bề mặt giấy cấy. Thao tác cắt những phần chết ở hai đầu (có màu trắng) do chất khử trùng gây ra.

Mẫu sau đó được cấy theo hướng thẳng đứng vào môi trường tái sinh chồi là môi trường MS có bổ sung 30 g/l đường; 0,2 mg/l GA_3 ; 5,5 g/l thạch. Giá trị pH của môi trường nuôi cấy là 5,8 (Thành phần môi trường MS xem tại hình 8). Điều kiện nuôi cấy: Thời gian chiếu sáng 10-12 giờ/ngày, cường độ chiếu sáng 2000-3000 lux, nhiệt độ phòng nuôi $25^{\circ}C \pm 2^{\circ}C$. Các dụng cụ sử dụng và môi trường nuôi cấy được hấp khử trùng ở áp suất 1 atm, nhiệt độ $121^{\circ}C$ trong 20 phút. Thời gian giai đoạn tái sinh chồi từ 4 tuần (hình 4)

Tiêu chuẩn của mẫu sau tái sinh: Mẫu bật chồi sau nuôi cấy 4-5 tuần, chồi khỏe, 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) Nhân nhanh chồi.

Lựa chọn mầm chồi không bị nhiễm nấm khuẩn sau giai đoạn tái sinh. Chồi được cấy theo hướng thẳng đứng vào môi trường nhân nhanh là môi trường MS + 30 g/l đường + 3,0 mg/l BAP + 0,4 mg/l Kinetin + 6 g/l thạch (Thành phần môi trường MS xem tại hình 8). Giá trị pH của môi trường nuôi cấy là 5,8. Điều kiện nuôi cấy: Thời gian chiếu sáng 10 giờ/ngày; cường độ chiếu sáng 2000-3000 lux; nhiệt độ phòng nuôi $25^{\circ}C \pm 2^{\circ}C$. Các dụng cụ sử dụng và môi trường nuôi cấy được hấp khử trùng ở áp suất 1 atm, nhiệt độ $121^{\circ}C$ trong 20 phút. Thời gian giai đoạn tái sinh chồi từ 4 tuần. Tiêu chuẩn sau giai đoạn nhân nhanh: Hệ số nhân chồi đạt 5,4 lần (hình 5).

iv) Tạo rễ.

Các chồi giảo cổ lam đạt chiều cao ≥ 3 cm, cây thẳng, có từ 2 lá được cắt chuyển sang môi trường tạo rễ.

Dùng kéo cắt riêng từng chồi, cắt phần gốc già. Chú ý cắt chồi sao cho đồng đều về chiều cao. Sau đó cấy chồi trên môi trường 1/2MS có bổ sung 0,5 mg/l NAA + 15g/l đường + 5,5 g/l thạch (Thành phần môi trường MS xem tại hình 8). Giá trị pH của môi trường nuôi cấy là 5,6 – 5,8. Thời gian xuất hiện rễ: Từ 7-10 ngày sau khi cấy chuyển. Tuy nhiên sau 15 ngày rễ mới đạt chiều dài, cây cứng cáp mới có thể đưa cây ra cảm ứng dần với điều kiện tự nhiên (hình 6).

Tiêu chuẩn mẫu sau giai đoạn ra rễ: 100% mẫu tạo rễ, cây con cứng cáp, số lá ≥ 3 lá, chiều cao cây ≥ 4 cm.

v) Ra ngôi cây con trên bầu siêu nhẹ.

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 giảo cổ lam bảy lá đã 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 50% 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 giảo cổ lam bảy lá là hỗn hợp Đất + trấu hun + xơ dừa + rơm theo tỉ lệ 20:30:35:15. 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 3x4cm (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.

Ra ngôi cây con:

Rửa sạch thạch trên rễ của cây con *in-vitro*. Loại bỏ bớt lá già, lá vàng. Tiến hành trồng cây vào bầu đã chuẩn bị sẵn, lấp kín rễ và nén nhẹ để cây đứng thẳng, cây không bị bật gốc khi tưới nước.

Chế độ tưới nước.

2 tuần đầu: sau khi cấy cây con vào bầu ươm, tiến hành làm vòm che phủ nilon kín tránh cây bị héo. Trời nắng cần phủ lên 1 lớp lưới đen. Tiến hành tưới nước 2 lần/ngày bằng bình hoặc hệ thống phun sương.

Giai đoạn sau 2 tuần-4 tuần: mở dần 2 đầu vòm nilon cho cây quen dần. Chế độ tưới nước 2 lần/ ngày bằng bình hoặc hệ thống phun sương.

Giai đoạn sau 4 tuần: lúc này cây đã cứng cáp, hệ rễ phát triển nên có thể tưới bằng hệ thống tưới vòng quay tự động hoặc bằng ô roa, vòi phun. Thực hiện chế độ tưới 1-2 lần ngày tùy thuộc độ ẩm của đất và điều kiện thời tiết. Luôn giữ độ ẩm khoảng

80%, thoáng gió, khi tưới phải để ráo nước ngay trong ngày, tránh đọng nước làm thối rễ, thối cây.

Chế độ bón phân:

Cây con sau trồng 4 tuần có thể tưới phân bón lá AT giúp cây nảy chồi, ra rễ, tăng sức chống chịu, thích nghi với môi trường. Khi cây cứng cáp có thể tưới định kỳ bằng phân NPK nồng độ loãng. Sau đó rửa sạch lá bằng nước sạch

Phòng trừ sâu bệnh hại giai đoạn vườn ươm:

Cây con ở giai đoạn vườn ươm phải được thường xuyên chăm sóc, làm sạch cỏ để tránh sâu, bệnh gây hại. Để ngăn ngừa nấm hại, dùng COC85 (gốc đồng) phun đều lên trên mặt lá với liều lượng phun 20g/16l nước, 1 tháng/1 lần. Khi cây có hiện tượng bị nấm hại phun nồng độ 40g/16l nước. Khi bị sâu hại sử dụng phương pháp bắt giết, nếu gây hại trên diện tích lớn sử dụng các thuốc trừ sâu sinh học (B40 super 2,0EC...) phun theo chỉ dẫn của nhà sản xuất.

Tiêu chuẩn cây con xuất vườn:

Cây giáo cổ lam bảy lá trồng tại vườn ươm sau 04 tháng, đạt chiều cao 15-20 cm, có từ 4 lá, sinh trưởng phát triển tốt, không sâu bệnh hại (hình 7).

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến quy trình nhân giống *in vitro* cây giáo cổ lam bảy lá, trong đó quy trình này tạo ra hàng loạt cây con giống nhau về hình thái và đặc điểm di truyền góp phần bảo tồn và phát triển nguồn gen quý đang có nguy cơ mất dần trong tự nhiên.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến quy trình công nghệ nhân giống quy mô công nghiệp (nhân giống *in-vitro*, bầu siêu nhẹ) cây giáo cổ lam bảy lá (*Gynostemma pubescens* Gagnep.) bằng nuôi cấy mô, khác biệt ở chỗ, quy trình này sử dụng môi trường nuôi cấy mô phổ biến MS và các chất điều tiết sinh trưởng có nồng độ thích hợp để nâng cao hệ số nhân giống và chất lượng cây giáo cổ lam bảy lá. Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến quy trình nhân giống cây giáo cổ lam bảy lá bằng phương pháp *in-vitro*, khác biệt ở chỗ khử trùng mẫu bằng HgCl_2 0,1% trong 5 phút làm hiệu quả khử trùng tốt hơn.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến quy trình công nghệ nhân giống quy mô công nghiệp (nhân giống *in-vitro*, bầu siêu nhẹ) cây giáo cổ lam bảy lá (*Gynostemma pubescens* Gagnep.), khác biệt ở chỗ, môi trường nhân nhanh bao gồm các thành phần: MS; 3,0 mg/l BAP; 0,4 mg/l kinetin, thạch 6 g/l. giúp cho hệ số nhân đạt 5,4 lần.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến quy trình nhân giống cây giảo cổ lam bảy lá (*Gynostemma pubescens* Gagnep.), khác biệt ở chỗ, trong bước tạo rễ có môi trường tạo rễ có các thành phần gồm: 1/2MS, 0,5 mg/l NAA, 15g/l đường, 5,5 g/l thạch, trong đó quy trình này giúp cho bước nuôi cấy tạo rễ với tỷ lệ mẫu tạo rễ đạt 100%, cây chất lượng tốt.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Quy trình nhân giống *in-vitro* giảo cổ lam bảy lá 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.

Một số từ viết tắt dùng trong bản mô tả này được liệt kê sau đây:

BAP	: Benzin adenin
Cồn	: C ₂ H ₅ OH
CT	: Công thức
HgCl ₂	: Thủy ngân clorua (Mereurric chloride)
Kinetin	: 6-Furfurylaminopurin
MS	: Murashige and Skoog's
NAA	: axit α - Naphlen axetic
NaOH	: Natri hydroxit

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 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ hòa tan trong 500 ml nước cất, sau đó bổ sung nước cất lên thể tích 1 lít. Bảo quản ở 40°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_3BO_3	620
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1690
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	2,5
$\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2,5
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	860
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	25
KI	83

Dung dịch MSIV: Thành phần sắt và muối. 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_2EDTA	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 GA_3 (axit Gibberellic): Cân 50mg GA_3 cho vào cốc đựng sạch, nhỏ từ từ từng giọt NaOH 1N khuấy đều cho tới khi tan hoàn toàn. Dùng nước cất để pha đến thể tích 50 ml. Bảo quản dung dịch trong lọ nút mài 50ml ở 4°C .

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

Dung dịch BAP (Benzinadenin): Cân 50mg BAP 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.

Dung dịch Kinetin: Cân 50mg Kinetin 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.

Tiến hành pha chế môi trường: Mỗi mẻ 3 lít

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

Phần 2: cân 90g đường 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. Dung dịch BAP, GA₃, kinetin tùy theo nồng độ 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+ 30g/l đường + 0,2 mg/l GA₃ + 5,5 g/g thạch, pH môi trường là 5,8 thì sẽ đong 90g đường + 0,6 ml GA₃ + 16,5g thạch. Khuấy tan đều các thành phần, dùng dung dịch NaOH 1N điều chỉnh độ pH = 5,8.

Trộn hai phần 1 và 2 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, 1 atm. 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 giảo cổ lam dùng vào mẫu là đoạn thân bánh tẻ từ cây mẹ trong vườn giống gốc. Vật liệu được lấy vào buổi sáng khi trời nắng cho hiệu quả tốt nhất. Vật liệu sau khi cắt được cắm ngay vào bình chứa nước sạch tránh bị héo.

Làm sạch sơ bộ:

Vật liệu khi thu từ vườn giống gốc về loại bỏ toàn bộ phần phiến lá, để lại phần cuống lá dài khoảng 0,5cm. Dùng tay rửa đoạn vật liệu dưới vòi nước chảy để loại bỏ bụi bẩn bên ngoài. Rửa xuôi theo chiều từ gốc đến ngọn. Những đoạn thân sau đó được cắt thành từng đoạn dài 3-4 cm, chứa 1 mắt ngủ và cho vào bình sạch.

Ngâm mẫu trong nước xà phòng loãng trong 5 phút. Dùng chổi lông mềm cọ sạch tất cả các vị trí trên mẫu, đặc biệt là những nách lá. Sau đó rửa sạch mẫu dưới vòi

nước chảy, tráng lại bằng nước cất vô trùng 3 lần. Chú ý khi rửa mẫu chỉ theo 1 chiều, tránh cọ lên rồi cọ xuống gây tổn thương mẫu.

Khử trùng bề mặt (tiến hành trong tủ cấy vô trùng):

Mẫu sau khi được rửa sạch sơ bộ bên ngoài sẽ mang vào tủ cấy vô trùng và lắc mẫu với cồn 70% trong thời gian 30 giây sau đó tráng lại bằng nước cất vô trùng 3-5 lần.

Khử trùng tinh (tiến hành trong tủ cấy vô trùng):

Mẫu sau khi khử trùng bề mặt bằng cồn 70% sẽ tiếp tục lắc với dung dịch HgCl_2 0,1% trong 5 phút. Kết thúc khử trùng tráng mẫu với nước cất vô trùng 4-5 lần.

Bảng 1. Kết quả ảnh hưởng của thời gian khử trùng bằng HgCl_2 0,1% đến hiệu quả vô trùng vật liệu nuôi cấy chồi cây giảo cổ lam bảy lá (sau 10 tuần nuôi cấy)

Hóa chất	Công thức	Thời gian (phút)	Số mẫu đưa vào	Tỷ lệ mẫu chết (%)	Tỷ lệ mẫu nhiễm (%)	Tỷ lệ mẫu sống không nhiễm (%)
HgCl_2 (0,1%)	1(Đ/C)	0	60	48,33	51,67	0
	2	5	60	1,02	10,31	88,67
	3	10	60	14,33	17,34	68,33
	4	15	60	86,33	5,00	8,67

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

Lựa chọn mầm chồi không bị nhiễm nấm khuẩn sau giai đoạn tái sinh, cắt chồi và cắt phần lá, để lại phần cuống lá, cắt chồi đỉnh sau đó cấy vào môi trường nhân nhanh tạo cụm chồi. Chồi được cấy theo hướng thẳng đứng. Công thức môi trường nhân nhanh: MS + 30 g/l đường + 3,0 mg/l BA + 0,4 mg/l Kinetin + 6 g/l thạch. Giá trị pH của môi trường nuôi cấy là 5,8. Điều kiện nuôi cấy: thời gian chiếu sáng 10 giờ/ngày, cường độ chiếu sáng 2000-3000 lux, nhiệt độ phòng nuôi $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$. Các dụng cụ sử dụng và môi trường nuôi cấy được hấp khử trùng ở áp suất 1 atm, nhiệt độ 121°C trong 20 phút. Thời gian giai đoạn tái sinh chồi từ 4 tuần. Tiêu chuẩn sau giai đoạn nhân nhanh: Hệ số nhân chồi đạt 5,4 lần.

Bảng 2. Kết quả ảnh hưởng của nồng độ BAP kết hợp với Kinetin đến khả năng nhân nhanh chồi cây giảo cổ lam bảy lá (sau 04 tuần nuôi cấy)

Công thức	Nồng độ BAP mg/l	Nồng độ Kinetin mg/l	Số mẫu nuôi cấy (mẫu)	Tổng chồi (chồi)	Hệ số nhân (lần)	Chất lượng chồi
CT1	3	0	30	132	4,4	Chồi tốt
CT2	3	0,1	30	123	4,1	Chồi tốt
CT3	3	0,2	30	126	4,2	Chồi tốt
CT4	3	0,4	30	162	5,4	Chồi tốt
CT5	3	0,6	30	141	4,7	Chồi tốt
CT6	3	0,8	30	108	3,6	Chồi tốt
CT7	3	1,0	30	96	3,2	Chồi kém

Từ kết quả thu được trên đây chúng tôi chọn loại môi trường số 4 cho mục đích nhân cụm chồi (sau đây môi trường này ký hiệu là A2).

Ví dụ 4: Tạo rễ

Các chồi giảo cổ lam từ môi trường A2 chọn những chồi có chiều cao ≥ 3 cm, cây thẳng, có từ 2 lá được cắt chuyển sang môi trường tạo rễ. Dùng kéo cắt riêng từng chồi, cắt phần gốc già. Chú ý cắt chồi sao cho đồng đều về chiều cao. Sau đó cấy chồi trên môi trường 1/2MS có bổ sung 0,5 mg/l NAA + 15g/l đường + 5,5 g/l thạch. Giá trị pH của môi trường nuôi cấy là 5,6 – 5,8. Thời gian xuất hiện rễ: từ 7-10 ngày sau khi cấy chuyển. Tuy nhiên sau 15 ngày rễ mới đạt chiều dài, cây cứng cáp mới có thể đưa cây ra cảm ứng dần với điều kiện tự nhiên.

Bảng 3. Kết quả ảnh hưởng của NAA đến khả năng ra rễ cây giảo cổ lam bảy lá

Công thức	Nồng độ NAA (mg/l)	Số mẫu nuôi cấy (mẫu)	Tổng số chồi ra rễ (chồi)		Tổng số rễ	Tỷ lệ mẫu ra rễ (%)	Số rễ trung bình	Hình thái rễ
CT 1 (Đ/c)	0,0	90	16		23	17,78	1,44	Rễ nhỏ, dài
CT 2	0,5	90	90		383	100	4,26	Rễ nhỏ, dài
CT 3	1,0	90	69		210	76,66	76,66	Rễ nhỏ, dài
CT 4	1,5	90	56		156	62,22	62,22	Rễ nhỏ, dài
CT 5	2,0	90	22		47	24,44	24,44	Rễ nhỏ, dài

Tiêu chuẩn mẫu sau giai đoạn ra rễ: 100% mẫu tạo rễ, cây con cứng cáp, số lá ≥ 3 lá, chiều cao cây ≥ 4 cm.

Ví dụ 5: Cắm ứng cây và ra ngôi trên giá thể bầu siêu nhẹ:

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 giảo cổ lam bảy lá đã 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 50% 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 giảo cổ lam bảy lá là hỗn hợp Đất + trấu hun + xơ dừa + rơm theo tỉ lệ 20:30:35:15. 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 giá thể được xử lý, tiến hành phối trộn đúng theo tỷ lệ và đóng vào bầu kích thước 7x11cm (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.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Quy trình công nghệ nhân giống quy mô công nghiệp (nhân giống *in-vitro*, bầu siêu nhẹ) cây giảo cổ lam bảy lá theo sáng chế có thể tạo ra hàng trăm triệu cây giống. Đáp ứng nhu cầu cây giống giảo cổ lam bảy lá trên thị trường và là tiền đề để tạo ra các vùng trồng giảo cổ lam chuyên canh phục vụ sản xuất và chế biến dược liệu cũng như xuất khẩu. Việc áp dụng quy trình sẽ tạo ra được số lượng lớn cây giống ở quy mô công nghiệp không phụ thuộc vào điều kiện khí hậu, cây giống đồng nhất về mặt hình thái và di truyền, đồng thời hoàn toàn sạch bệnh, an toàn cho người sử dụng.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình nhân giống quy mô công nghiệp (nhân giống *in-vitro*) cây giảo cổ lam bảy lá (*Gynostemma pubescens* Gagnep.) bằng giá thể bầu siêu nhẹ, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

i) vào mẫu tạo vật liệu khởi đầu: lấy mẫu là đoạn thân bánh tẻ cắt thành từng đoạn chứa từ 1 – 2 nách lá được lấy từ cây mẹ trong vườn giống gốc, lấy vào thời điểm buổi sáng khi thời tiết nắng ráo; cắt toàn bộ phần lá để lại phần cuống lá dài khoảng 0,5cm và ngâm mẫu trong nước xà phòng loãng 5 phút, sau đó rửa sạch mẫu bằng nước cất vô trùng 3 lần; khử trùng bề mặt trong tủ cấy vô trùng bằng cách lắc mẫu với cồn 70% trong thời gian 30 giây, tráng lại bằng nước cất vô trùng 3-5 lần; tiếp đó khử trùng tinh trong tủ cấy vô trùng bằng cách lắc mẫu với dung dịch HgCl_2 0,1% trong 5 phút, kết thúc khử trùng tráng mẫu với nước cất vô trùng 4 - 5 lần;

ii) tái sinh chồi: dùng panh gấp từng đoạn thân đã khử trùng, đặt trên bề mặt giấy thấm, loại bỏ phần trắng ở từng đoạn thân để hóa chất khử trùng không ngấm sâu vào mẫu; sau đó cấy mẫu vào môi trường tái sinh chồi là môi trường MS có bổ sung 30 g/l đường, 0,2 mg/l GA_3 , 5,5 g/l thạch, độ pH của môi trường nuôi cấy là 5,8; thời gian chiếu sáng 10-12 giờ/ngày, cường độ chiếu sáng 2000-3000 lux, nhiệt độ phòng nuôi $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$; các dụng cụ sử dụng và môi trường nuôi cấy được hấp khử trùng ở áp suất 1amt, nhiệt độ 121°C trong 20 phút; thời gian giai đoạn tái sinh chồi từ 4 tuần;

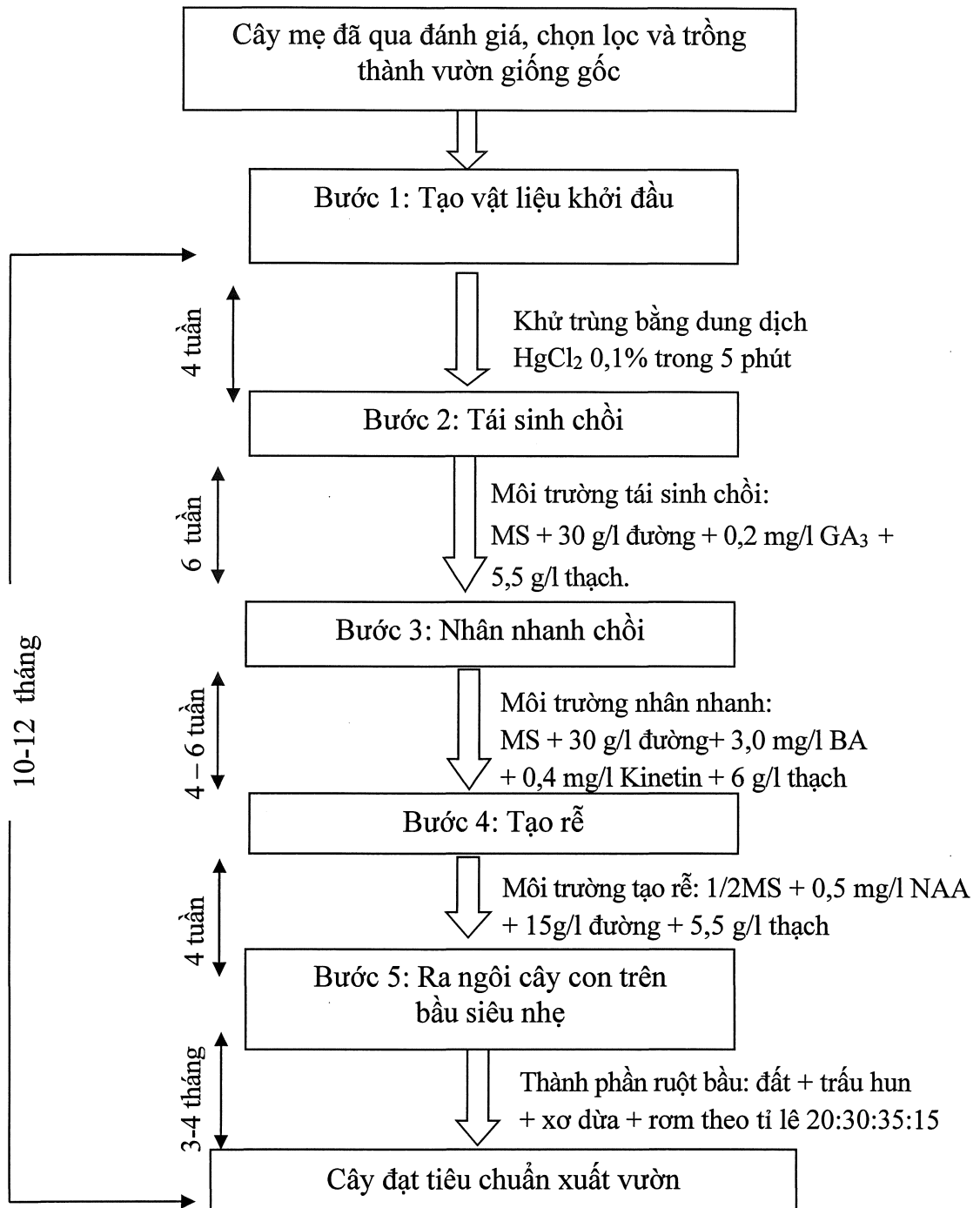
iii) nhân nhanh chồi: lựa chọn mầm chồi không bị nhiễm nấm khuẩn sau giai đoạn tái sinh, cấy chồi theo hướng thẳng đứng vào môi trường nhân nhanh là môi trường MS + 30 g/l đường + 3,0 mg/l BAP + 0,4 mg/l kinetin + 6 g/l thạch; độ pH của môi trường nuôi cấy là 5,8; thời gian chiếu sáng 10 giờ/ngày, cường độ chiếu sáng 2000 đến 3000 lux, nhiệt độ phòng nuôi $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$; các dụng cụ sử dụng và môi trường nuôi cấy được hấp khử trùng ở áp suất 1 atm, nhiệt độ 121°C trong 20 phút; thời gian giai đoạn tái sinh chồi từ 4 tuần; tiêu chuẩn hệ số nhân chồi đạt 5,4 lần;

iv) tạo rễ: các chồi giảo cổ lam đạt chiều cao ≥ 3 cm, cây thẳng, có từ 2 lá được cắt chuyển sang môi trường tạo rễ là môi trường 1/2MS có bổ sung 0,5 mg/l NAA + 15g/l đường+ 5,5 g/l thạch; duy trì độ pH của môi trường nuôi cấy trong khoảng 5,6 đến 5,8; thời gian xuất hiện rễ từ 7-10 ngày; sau 15 ngày đưa cây ra cảm ứng với điều kiện tự nhiên; tiêu chuẩn mẫu sau giai đoạn ra rễ là 100% mẫu tạo rễ, cây con cứng cáp, số lá ≥ 3 lá, chiều cao cây ≥ 4 cm;

v) ra ngôi cây con trên bầu siêu nhẹ: chuyển bình giảo cổ lam bảy lá đã 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; giá thể bầu siêu nhẹ

được sử dụng là hỗn hợp đất + trấu hun + xơ dừa + rơm theo tỉ lệ 20:30:35:15, các thành phần trong giá thể được xử lý trước khi tiến hành phối trộn; tiêu chuẩn cây con giảo cổ lam bảy lá trồng tại vườn ươm sau 04 tháng đạt chiều cao 15-20 cm, có từ 4 lá, sinh trưởng phát triển tốt, không sâu bệnh hại.

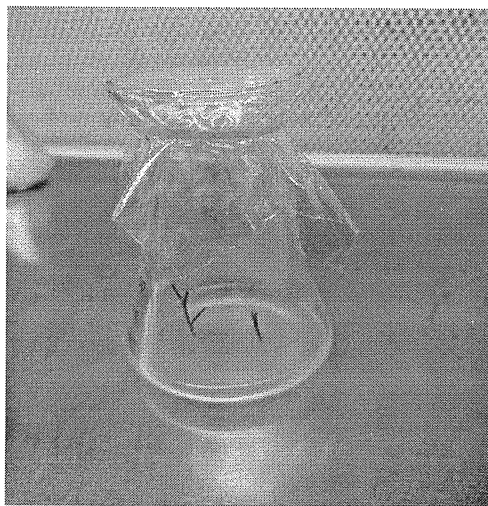
Hình 1



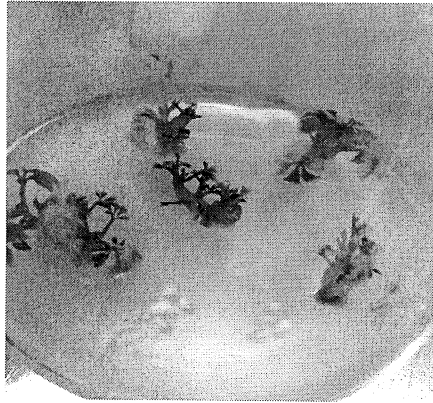
Hình 2



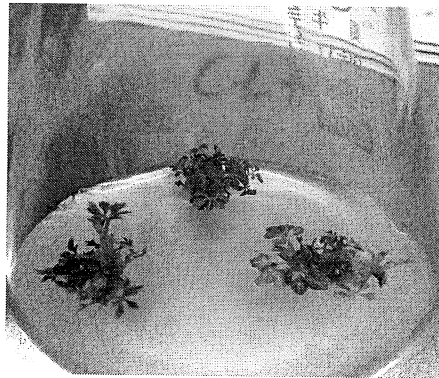
Hình 3



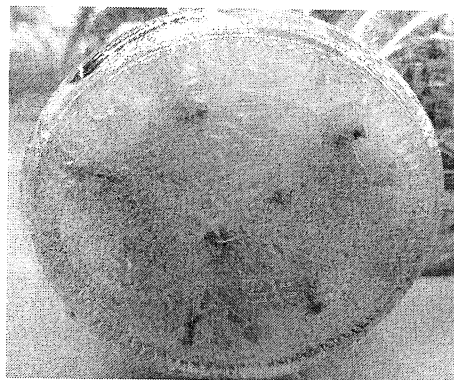
Hình 4



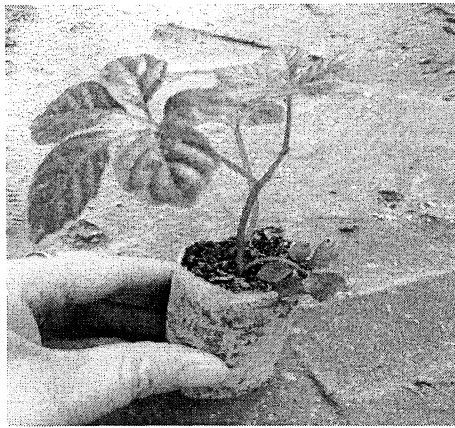
Hình 5



Hình 6



Hình 7



Hình 8

Dung dịch mẹ	Nồng độ (mg/l)	Nồng độ trong dung dịch mẹ (g/200 ml)	Dung tích dùng cho 1 lít môi trường
MS1: KNO ₃ KH ₂ PO ₄ NH ₄ NO ₃ MgSO ₄	1900 170 1650 370	(x10) { 19 1,7 16,5 3,7	{20 ml
MS2: CaCl ₂ .2H ₂ O	440	(x 20) { 6,64	{10 ml
MS3 : H ₃ BO ₃ MnSO ₄ .4H ₂ O CoCl ₂ .6H ₂ O CuSO ₄ .7H ₂ O ZnSO ₄ .7H ₂ O Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O KI	6,2 22,3 0,025 0,025 8,6 0,25 0,83	(x20) { 0,124 0,338 0,5 mg 0,5 mg 0,213 5 mg 16,6 mg	{10 ml
MS4: FeSO ₄ Na ₂ EDTA	27,8 37,3	(x20) { 0,556 0,746	{10 ml
MS5: Myo-Inositol Thiamin.HCl Pyridoxin.HCl Axit nicotic Glycin	100 0,1 0,5 0,5 2	(x20) { 2 2 mg 10 mg 10 mg 40 mg	{10 ml
Ghi chú: Môi trường ½ MS là các chất trong môi trường MS đều giảm đi 1 nửa			