



(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)



2-0004028

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

(13) **Y**

(21) 2-2024-00563

(22) 29/12/2021

(67) 1-2021-08439

(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); Nguyễn Thế Hùng (VN); Trần Ngọc Ngoạn (VN); Trần Văn
Chí (VN).

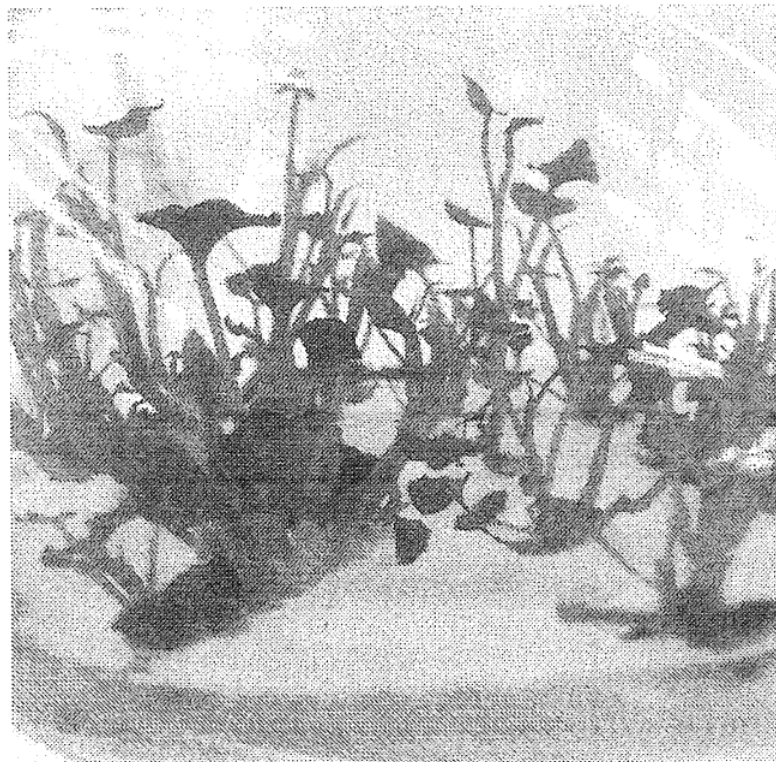
(74) Công ty TNHH SHARETOLINK Việt Nam (VN SHARETOLINK COMPANY
LIMITED)

(54) QUY TRÌNH NHÂN GIỐNG QUY MÔ CÔNG NGHIỆP (NHÂN GIỐNG IN-
VITRO, BÀU SIÊU NHẹ) CÂY HÀ THỦ Ô ĐỎ (FALLOPIA MULTIFLORA
THUNB.)

(21) 2-2024-00563

(57) Sáng chế đề cập đến quy trình nhân giống quy mô công nghiệp (nhân giống *in-vitro*, bầu siêu nhẹ) cây hà thủ ô đỏ (*Fallopia multiflora* Thunb.), trong đó quy trình này bao gồm các bước: vào mẫu tạo vật liệu khởi đầu, tái sinh chồi, nhân nhanh chồi, tạo rễ, ra ngôi cây con trên bầu siêu nhẹ. Quy trình theo sáng chế tạo ra cây giống hà thủ ô đỏ quy mô lớn, sinh trưởng và phát triển tốt trên giá thể bầu siêu nhẹ và hoàn toàn sạch bệnh.

Hình 3



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến quy trình nhân giống quy mô công nghiệp (nhân giống *in-vitro*, bầu siêu nhẹ) cây hà thủ ô đỏ (*Fallopia multiflora* Thunb.).

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Cây hà thủ ô đỏ có tên khoa học là *Fallopia multiflora* Thunb., tên đồng dạng là *Polygonum multiflorum* Thunb He Shou Wu. Tại Việt Nam, cây mọc tự nhiên ở các vùng núi cao các tỉnh Nghệ An, Lai Châu, Sơn La, Lào Cai, Hà Giang, Cao Bằng, Lạng Sơn, Hoà Bình, Lâm Đồng, Đắk Lắk, Phú Yên, Bình Định. Cây hà thủ ô đỏ có thân dạng dây leo, sống nhiều năm, phân bố vùng đồng bằng, thân rễ phình to thành củ. Hà thủ ô đỏ chứa 1,7% antraglucosit trong đó có crysophanol, emodin, rhein, 1,1% protit, 42,2% tinh bột, 3,1% lipit, 4,5% chất vô cơ, 26,4% chất tan trong nước và nhiều chất khác. Bộ phận được dùng làm thuốc là rễ củ phơi hay sấy khô. Hà thủ ô có tác dụng làm đen tóc, bổ máu, chống lão hoá, tư âm dưỡng huyết, bổ thận ích tinh; phù hợp cho người bị chứng can thận bất túc, biểu hiện bằng các dấu hiệu như: choáng đầu, hay quên, ù tai, mất ngủ, rụng tóc, râu tóc bạc sớm, di tinh, liệt dương.

Để góp phần đẩy mạnh việc sử dụng có hiệu quả nguồn dược liệu trong nước, khai thác vốn quý của y học dân tộc, một hướng nhân giống mới đã và đang được áp dụng với cây hà thủ ô đỏ. Đó là công nghệ nhân giống *in-vitro*, bầu siêu nhẹ 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, dễ vận chuyển.

Cụ thể là, với nhiều tác dụng dược học nên hiện nay nhu cầu về giống cây hà thủ ô đỏ ngày càng lớn. Việc cung cấp cây giống bằng phương pháp nhân giống tự nhiên từ hạt, giâm hom không đủ đáp ứng nhu cầu của thị trường. Trước thực trạng đó, cùng với những lợi ích của nuôi cấy mô tế bào, những năm gần đây đã có một số nghiên cứu về nhân giống *in-vitro* cây hà thủ ô đỏ và có công bố trên nhiều tạp chí.

Trần Thị Liên (2004) đã nghiên cứu nuôi cấy đoạn thân cây hà thủ ô đỏ trên môi trường MS chứa NAA (0,1 mg/l) + BAP (0,5 mg/l), số chồi đạt 7 lần sau 5 tuần nuôi cấy.

Trương Thị Bích Phượng và cs (2008) đã nghiên cứu khả năng tái sinh chồi và cụm chồi trong nuôi cấy *in-vitro* cây hà thủ ô đỏ (*Polygonum multiflorum* Thunb.) sử dụng môi trường có bổ sung BAP 4,0 mg/l và NAA 0,1 mg/l kích thích đoạn thân của chồi *in-vitro* cây hà thủ ô đỏ tái sinh cụm chồi tốt nhất, với trung bình 8,54 chồi trên

một mẫu. Các đoạn thân *in-vitro* này cũng có khả năng tạo cụm chồi tốt trên môi trường có BAP 4,0 mg/l và NAA 0,2 mg/l hoặc BAP 5,0 mg/l và NAA 0,3 mg/l nhưng một số mẫu còn có khả năng phân hóa thành mô sẹo (callus). Chồi đơn tách từ cụm chồi *in-vitro* tạo rễ, sinh trưởng và phát triển tốt trên môi trường MS có bổ sung NAA 0,5 mg/l.

Hoàng Thị Kim Hồng (2011) đã nghiên cứu khả năng tái sinh chồi và cụm chồi trong môi trường MS + BAP 4 mg/l + NAA 0,1 mg/l (hệ số nhân đạt 8,54 lần).

Nguyễn Xuyên Thành Thắng và cs (2012) đã xây dựng thành công quy trình nhân giống *in-vitro* cây hà thủ ô đỏ. Môi trường MS + BA 4mg/l + KIN 1,5 mg/l kích thích đoạn thân của chồi *in-vitro* cây hà thủ ô đỏ tái sinh chồi tốt nhất, tỷ lệ tái sinh chồi là 88,88% và số chồi tái sinh là 3,33 chồi/mẫu. Các đoạn thân *in-vitro* cũng có khả năng tạo cụm chồi tốt trên môi trường MS + BA 4mg/l + NAA 0,5 mg/l.

Bùi Văn Thắng (2017) đã nghiên cứu nhân giống *in-vitro* cây hà thủ ô đỏ (*Polygonum multiflorum* Thunb.) tuyển chọn tại tỉnh Hà Giang kết quả nghiên cứu cho thấy sát khuẩn bề mặt chồi bằng cồn 70% trong 1 phút, khử trùng bằng dung dịch HgCl_2 0,1% trong 6 phút và nuôi mẫu trên môi trường MS bổ sung 0,2 mg/l BAP và 30 g/l sucroza, cho tỉ lệ mẫu sạch nảy chồi 48,53%, chồi vươn cao, thân và lá xanh đậm. Cảm ứng tái sinh tạo cụm chồi trên môi trường MS thêm 1,0 mg/l BAP, 0,3 mg/l Kinetin, 0,2 mg/l NAA và 30 g/l sucroza cho hệ số nhân chồi và tỉ lệ chồi hữu hiệu đạt cao nhất (9,1 chồi/mẫu cấy và 94,4% chồi hữu hiệu) chỉ sau 4 tuần nuôi cấy. Chồi ra rễ 100%, số rễ trung bình 5,58 rễ/cây và chiều dài rễ trung bình 4,68 cm khi nuôi trên môi trường MS bổ sung 0,2 mg/l IBA, 0,1 mg/l NAA và 20 g/l sucroza sau 4 tuần nuôi cấy. Cây con hoàn chỉnh được huấn luyện và chuyển ra trồng trên giá thể 30% trấu toàn tính, 20% bột xơ dừa và 50% đất, cho tỉ lệ cây sống 100%.

Từ các công trình nghiên cứu trên chúng tôi nhận thấy các kết quả công bố là tương đối khác nhau. Nhưng đều có điểm chung là sử dụng môi trường MS kết hợp với sử dụng 2 chất điều hòa sinh trưởng như BAP + NAA hay kinetin + NAA để nâng cao hệ số nhân giống. Tuy nhiên sau khi ra ngôi đều cấy trên các giá thể thông thường, vận chuyển khó khăn, khó làm trên quy mô công nghiệp.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Do đó, sáng chế được hoàn thành để giải quyết vấn đề nhân giống *in-vitro* ra ngôi trên giá thể bầu siêu nhẹ để có thể sản xuất cây lớn trên quy mô công nghiệp, vận chuyển thuận lợi, đặc biệt cho tỉ lệ cây sống cao. Cụ thể là, sáng chế đề cập đến quy trình công nghệ nhân giống quy mô công nghiệp (nhân giống *in-vitro*, bầu siêu nhẹ) cây hà thủ ô đỏ (*Fallopia multiflora* Thunb.), trong đó quy trình này sử dụng môi trường MS kết hợp với các chất kích thích sinh trưởng BAP, Kinetin, NAA để tái

sinh chồi, tạo cụm chồi, nhân nhanh chồi, ra rễ. Theo một khía cạnh khác, quy trình nhân giống theo sáng chế, khác biệt ở chỗ, có bước tái sinh chồi, làm tiền đề cho bước nhân nhanh chồi. Ở bước ra rễ, sau khi chồi ra rễ đầy đủ, được cảm ứng ngoài tự nhiên sau đó ra ngôi và cấy trên giá thể bầu siêu nhẹ (giá thể bằng các nguyên liệu tự nhiên) cho tỉ lệ cây sống cao, sinh trưởng và phát triển tốt.

Cụ thể, sáng chế đề cập đến quy trình nhân giống quy mô công nghiệp (nhân giống *in-vitro*, bầu siêu nhẹ) cây hà thủ ô đỏ (*Fallopia multiflora* Thunb.), 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 ráo. 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, giữ lại phần cuống và cắt thành từng đoạn chứa từ 1 - 2 nách lá 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 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 nuôi cấy. Môi trường MS có bổ sung 30 g/l đường; 0,8 mg/l BAP; 6 g/l thạch.

Giá trị pH của môi trường nuôi cấy là 5,7. Điều kiện nuôi cấy: Thời gian chiếu sáng 10 - 12 giờ/ngày; cường độ chiếu sáng 2.000 - 3.000 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, cắt chồi và cắt bớt 1/2 lá, xiết 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 + 2,0 mg/l BA + 0,2 mg/l Kinetin + thạch 6 g/l. Giá trị pH của môi trường nuôi cấy là 5,7. Điều kiện nuôi cấy: Thời gian chiếu sáng 10 giờ/ngày; cường độ chiếu sáng 2.000 - 3.000 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 6,27 lần, chồi hình thành rõ ràng.

iv) Tạo rễ:

Các chồi hà thủ ô đạt chiều cao ≥ 3 cm, cây thẳng, có từ 3 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 + 15 g/l đường thạch 5,5 g/l. Giá trị pH của môi trường nuôi cấy là 5,7. Thời gian xuất hiện rễ: Từ 7 - 10 ngày sau khi cấy chuyển. Sau 15 ngày rễ dài, cây cứng cáp có thể đưa cây ra cảm ứng dần với điều kiện tự nhiên.

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

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 hà thủ ô đã đạt tiêu chuẩn của giai đoạn ra rễ để ngoài ánh sáng tự nhiên 10 - 15 ngày. 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 hà thủ ô đỏ là hỗn hợp đất + trấu hun + xơ dừa + rơm theo tỉ lệ 15:10:50:25. 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 3x4 cm (vỏ bầu được làm bằng chất liệu tự phân hủy). Quá trình đóng bầu siêu nhẹ hoàn toàn tự động. Bầu 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 ni lông 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 ni lông 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 thuốc trừ nấm 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 hà thủ ô đỏ trồng tại vườn ươm sau 04 tháng, đạt chiều cao 15 - 20 cm, có từ 5 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 nhân giống quy mô công nghiệp (nhân giống *in-vitro*, bầu siêu nhẹ) cây hà thủ ô đỏ (*Fallopia multiflora* Thunb.)

Hình 2 là ảnh chụp hà thủ ô giai đoạn tái sinh.

Hình 3 là ảnh chụp hà thủ ô đỏ giai đoạn nhân nhanh chồi.

Hình 4 là ảnh chụp hà thủ ô đỏ giai đoạn ra rễ.

Hình 5 là ảnh chụp ra ngôi hà thủ ô đỏ trên giá thể bầu siêu nhẹ.

Hình 6 là bảng thành phần môi trường MS.

Mô tả chi tiết các phương án thực hiện sáng chế

Sau đây, quy trình nhân giống quy mô công nghiệp (nhân giống *in-vitro*, bầu siêu nhẹ) cây hà thủ ô đỏ (*Fallopia multiflora* Thunb.) sẽ được mô tả một cách chi tiết.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến quy trình nhân giống quy mô công nghiệp (nhân giống *in-vitro*, bầu siêu nhẹ) cây hà thủ ô đỏ (*Fallopia multiflora* Thunb.), trong đó quy trình này bao gồm các bước:

i) Vào mẫu tạo vật liệu khởi đầu:

Nguồn mẫu được thu thập từ Tỉnh Hà Giang về sau khi chọn lọc được trồng làm cây mẹ tại vườn ươm Viện nghiên cứu và Phát triển Lâm Nghiệp - Trường Đại học Nông Lâm Thái Nguyên.

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

Lựa chọn mẫu: Mẫu hà thủ ô đỏ là những đoạn thân bánh tẻ, không bị sâu bệnh.

Thời điểm lấy mẫu: Mẫu được lấy vào buổi sáng các ngày trời nắng.

Làm sạch sơ bộ:

Vật liệu sau khi thu từ vườn, loại bỏ toàn bộ phần phiến lá, giữ lại phần cuống và cắt thành từng đoạn chứa từ 1 - 2 nách lá cho vào bình sạch. Rửa 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 nuôi cấy. Môi trường MS có bổ sung 30 g/l đường; 0,8 mg/l BAP; 6 g/l thạch.

Giá trị pH của môi trường nuôi cấy là 5,7. Điều kiện nuôi cấy: thời gian chiếu sáng 10 - 12 giờ/ngày; cường độ chiếu sáng 2.000 - 3.000 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, cắt chồi và cắt bớt 1/2 lá, xiết 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 + 2,0 mg/l BA + 0,2 mg/l Kinetin + thạch 6 g/l. Giá trị pH của môi trường nuôi cấy là 5,7. Điều kiện nuôi cấy: Thời gian chiếu sáng 10 giờ/ngày; cường độ chiếu sáng 2.000 - 3.000 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 6,27 lần, chồi hình thành rõ ràng.

iv) Tạo rễ:

Các chồi hà thủ ô đạt chiều cao $\geq 3\text{cm}$, cây thẳng, có từ 3 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 + thạch 5,5 g/l. Giá trị pH của môi trường nuôi cấy là 5,7. Thời gian xuất hiện rễ: Từ 7 - 10 ngày sau khi cấy chuyển. Sau 15 ngày rễ dài, cây cứng cáp có thể đưa cây ra cảm ứng dần với điều kiện tự nhiên.

Tiêu chuẩn chồi sau giai đoạn ra rễ: 100% mẫu tạo rễ, cây con cứng cáp, số lá ≥ 3 , chiều cao cây $\geq 4\text{ cm}$, hệ rễ khỏe.

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 hà thủ ô đỏ đã đạt tiêu chuẩn của giai đoạn ra rễ để ngoài ánh sáng tự nhiên 10 - 15 ngày. 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 hà thủ ô đỏ là hỗn hợp đất + trấu hun + xơ dừa + rơm theo tỉ lệ 15:10:50:25. 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 ni lông 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 ni lông 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 thuốc trừ nấm COC85 (gốc đồng) phun đều lên trên mặt lá với liều lượng phun 20 g/16l nước, 1 tháng/1 lần. Khi cây có hiện tượng bị nấm hại phun nồng độ 40 g/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 hà thủ ô đỏ trồng tại vườn ươm sau 04 tháng, đạt chiều cao 15 - 20 cm, có từ 5 lá, sinh trưởng phát triển tốt, không sâu bệnh hại.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến quy trình nhân giống quy mô công nghiệp (nhân giống *in-vitro*, bầu siêu nhẹ) cây hà thủ ô đỏ (*Fallopia multiflora* Thunb.) trong đó có sự khác biệt ở chỗ, quy trình có thêm bước tái sinh chồi làm tái sinh các chồi sau khi vô trùng và bước ra rễ môi trường MS giảm đi một nửa làm giảm các chất kích thích sinh trưởng tích tụ trong cây giúp cho cây dễ dàng thích nghi với môi trường ra rễ. Các cây con sau khi cảm ứng được trồng trên giá thể bầu siêu nhẹ cho tỉ lệ sống cao, dễ vận chuyển có thể áp dụng trên quy mô công nghiệp.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế đề cập đến quy trình nhân giống quy mô công nghiệp (nhân giống *in-vitro*, bầu siêu nhẹ) cây hà thủ ô đỏ (*Fallopia multiflora* Thunb.) 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
Pyridoxin.HCl	50
Axit nicotinic	50
Glyxin	200

Dung dịch BA (Benzinadenin): Cân 50mg BA 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 50 ml ở 4°C.

Dung dịch IBA (axit Indol butyric): Cân 50 mg 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: Nước dừa thu trực tiếp từ quả dừa khô, kiểm tra từng quả để tránh những quả nước bị ủng thối. Có thể đong thành từng phần, mỗi phần 200 ml và bảo quản trong tủ đá.

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

Phần 1: Cân 16,5g 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 30 ml dung dịch MSI, 15 ml mỗi loại của các dung dịch từ MSII đến MSV nêu trên (Vì quy trình sử dụng $\frac{1}{2}$ MS nên các dung dịch giảm đi 1 nửa). Dung dịch BA, 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 nhân nhanh (môi trường A2) có công thức $\frac{1}{2}MS + 1 \text{ mg/l BA} + 100 \text{ ml nước dừa} + 100 \text{ mg/l Inositol} + 30 \text{ g/l đường} + 5,5 \text{ g/l thạch}$ thì đong 3 ml BA và 300 ml nước dừa. 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 hà thủ ô đồ sử dụng là các đoạn thân bánh tẻ chứa mắt ngủ lấy từ cây mẹ. Mẫu được cất vào buổi sáng khi thời tiết nắng ráo.

- Khử trùng sơ bộ.
- + Tiến hành bỏ lá và rửa mẫu dưới vòi nước chảy bằng chổi lông.
- + Vật liệu được ngâm trong dung dịch chất tẩy nhẹ (xà phòng loãng) trong 5 phút.
- + Mẫu được rửa sạch dưới vòi nước, tráng lại bằng nước cất vô trùng 3 lần.
- + Lắc bằng dung dịch javen 60% trong 5 phút, tráng lại bằng nước cất vô trùng 3 lần.

Chú ý: Các thao tác phải nhẹ nhàng tránh tổn thương tới mẫu

- Khử trùng bề mặt (thao tác khử trùng tiến hành hoàn toàn trong box cấy vô trùng):

- + Mẫu được cắt thành từng đoạn chứa từ 1 - 2 mắt ngủ.
- + Khử trùng bằng cồn 70% trong thời gian 60 giây sau đó tráng lại bằng nước cất vô trùng 3 - 5 lần.

- Khử trùng tinh (thao tác khử trùng tiến hành hoàn toàn trong box cấy vô trùng).

- + Mẫu được khử trùng kép bằng HgCl_2 0,1%, lần thứ nhất trong thời gian 3 phút, lần thứ 2 trong thời gian 4 phút.

- + Mẫu được tráng sạch thủy ngân bằng nước cất vô trùng 5 lần.

Bảng 1 trình bày 4 công thức: Nghiên cứu ảnh hưởng của thời gian khử trùng bằng HgCl_2 0,1% đến hiệu quả vô trùng nuôi cấy chồi hà thủ ô đỏ. Qua bảng có thể thấy ở công thức số 7 cho hiệu quả khử trùng là tốt nhất. Từ những kết quả nghiên cứu chúng tôi chọn công thức số 7 cho mục đích khử trùng của quy trình.

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 hà thủ ô đỏ (*Codonopsis javanica*)

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	0	100	0
	2	5 (2+3)	60	0	55,67	44,33
	3	7 (3+4)	60	2,41	18,44	79,15
	4	9 (4+5)	60	20,67	11,95	67,38

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

Những chồi không bị nhiễm nấm khuẩn sau giai đoạn tái sinh sẽ cắt hạ, dùng dao nhọn xiết chồi đỉnh và cấy chuyển sang môi trường tạo cụm chồi gồm MS và chất kích thích sinh trưởng, nước dừa. Bảng 2 dưới đây thể hiện 15 công thức (CT) đã thử nghiệm để nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ chất kích thích sinh trưởng và nồng độ nước dừa đến khả năng tạo cụm chồi của cây hà thủ ô đỏ *in vitro*. Qua bảng này, có thể thấy ở công thức số 13 có tác dụng kích thích phát sinh cụm chồi thích hợp nhất cho mục đích tạo cụm chồi của quy trình.

Bảng 2: Kết quả tạo cụm chồi từ mảnh mô nuôi cấy *in-vitro* của cây hà thủ ô đỏ (*Codonopsis javanica*)

CT	Thành phần cơ bản	Nồng độ chất kích thích sinh trưởng, dịch chiết hữu cơ bổ sung	Tạo cụm chồi
1	MS + 30 g/l đường + 100 mg/l inositol + 5,5 g/l thạch	0 mg/l BA	
2		0,5mg/l BA	+
3		1,0 mg/l BA	++
4		2 mg/l BA	+
7		0 mg/l kinetin	
8		0,5mg/l kinetin	+
9		1mg/l kinetin	+
10		1,5 mg/l kinetin	+
11		2 mg/l kinetin	+
12		1mg/l BA + 50 ml nước dừa	+++
13		1mg/l BA + 100 ml nước dừa	++++
14		1mg/l BA + 150 ml nước dừa	+++
15		1mg/l BA + 200 ml nước dừa	+++

Số lượng dấu + càng nhiều mức độ kích thích càng cao

Từ kết quả thu được trên đây chúng tôi chọn loại môi trường số 13 cho mục đích nhân cụm chồi (sau đây môi trường này ký hiệu là A2).

Ví dụ 4:

Cụm chồi trong môi trường A2 sẽ được tách ra làm 2 phần: Phần chồi cao và phần chồi thấp. Sau đó cấy chuyển sang môi trường tiền ra rễ (ký hiệu là A3) có công thức $\frac{1}{2}$ MS + 100 ml nước dừa + 100 mg/l Inositol + 30 g/l đường + 5,5 g/l thạch để xuất hiện nhiều cây, chất lượng cây tốt hơn.

Ví dụ 5: Tạo rễ *in-vitro*.

Chồi từ môi trường A3 được tách ra làm 2 phần: Những cụm chồi thấp, non và những cây chiều cao khoảng 3 cm, 2-3 cặp lá, đồng đều sẽ được cắt và chuyển sang môi trường tạo rễ. Môi trường tạo rễ: 1/2MS + 0,5 mg/l IBA + 100 ml nước dừa + 100 mg/l Inositol + 15 g/l đường + 5,5 g/l thạch để tạo cây hoàn chỉnh, những khối thấp, chồi non được cắt nhỏ và cấy lại vào môi trường A2 để xoay vòng nhân nhanh.

Ví dụ 6: Cảm ứng cây.

Chuyển bình hà thủ ô đỏ đã có rễ ra ngoài ánh sáng tự nhiên trong nhà lưới từ 10 - 15 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%.

Sau 2 tuần khi cây con đạt các chỉ tiêu: cây con cao ≥ 5 cm, có từ 2 - 3 cặp lá, hệ rễ khỏe mạnh có thể trồng ra bầu ươm.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Quy trình nhân giống quy mô công nghiệp (nhân giống *in-vitro*, bầu siêu nhẹ) cây hà thủ ô đỏ (*Fallopia multiflora* Thunb.) theo sáng chế tạo ra hàng trăm triệu cây con. Đáp ứng nhu cầu cây giống hà thủ ô đỏ trên thị trường và là tiền đề để tạo ra các vùng trồng hà thủ ô đỏ chuyên canh phục vụ sản xuất và bào chế dược liệu cũng như xuất khẩu. Việc áp dụng quy trình sẽ tạo ra được cây giống ở quy mô lớn 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*, bầu siêu nhẹ) cây hà thủ ô đỏ (*Fallopia multiflora* Thunb.), 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 trong nước xà phòng loãng khoảng 5 phút, 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, sau đó 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, tráng mẫu với nước cất vô trùng 4 - 5 lần;

ii) tái sinh chồi: dùng panh gấp đoạn thân đã khử trùng, cấy vào môi trường tái sinh là môi trường MS có bổ sung 30g/l đường, 0,8 mg/l BAP, 6 g/l thạch, độ pH của môi trường là 5,7; điều kiện thời gian chiếu sáng 10 - 12 giờ/ngày, cường độ chiếu sáng 2.000 - 3.000 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;

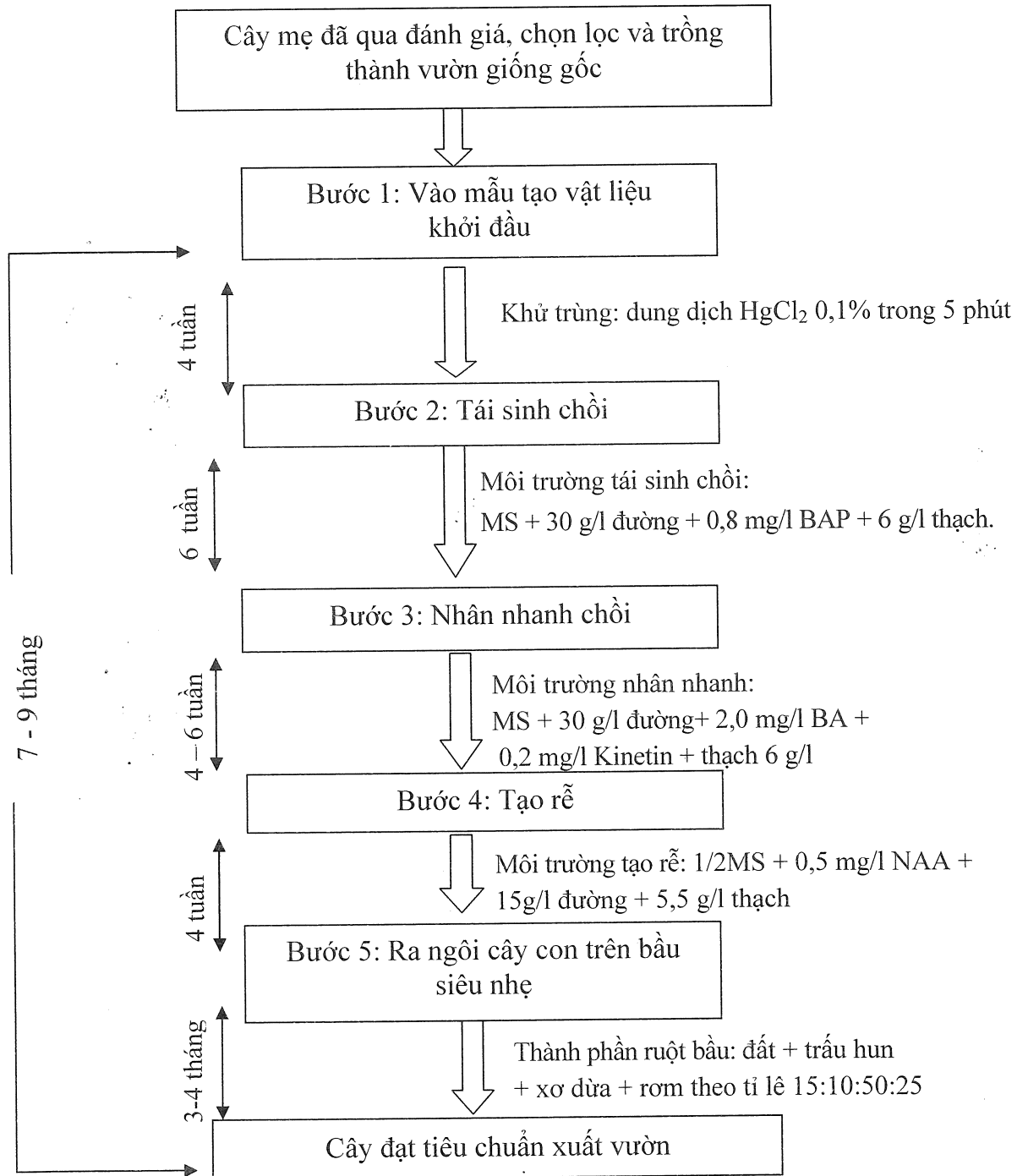
iii) nhân nhanh chồi: lựa chọn mầm chồi không bị nhiễm nấm khuẩn sau giai đoạn tái sinh, cấy vào môi trường nhân nhanh là môi trường MS + 30 g/l đường + 2,0 mg/l BA + 0,2 mg/l kinetin + 6 g/l thạch; độ pH của môi trường là 5,7; điều kiện thời gian chiếu sáng 10 giờ/ngày, cường độ chiếu sáng 2.000 - 3.000 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 6,27 lần, chồi hình thành rõ ràng;

iv) tạo rễ: các chồi hà thủ ô đạt chiều cao $\geq 3\text{cm}$, cây thẳng, có từ 3 lá được cắt chuyển sang môi trường tạo rễ là môi trường 1/2 MS có bổ sung 0,5 mg/l NAA + 15g/l đường + thạch 5,5 g/l; độ pH của môi trường nuôi cấy là 5,7; thời gian xuất hiện rễ từ 7 - 10 ngày sau khi cấy chuyển; sau 15 ngày đưa cây ra cảm ứng với điều kiện tự nhiên; tiêu chuẩn chồi sau giai đoạn ra rễ là 100% mẫu tạo rễ, cây con cứng cáp, số lá ≥ 3 , chiều cao cây $\geq 4\text{ cm}$, hệ rễ khỏe;

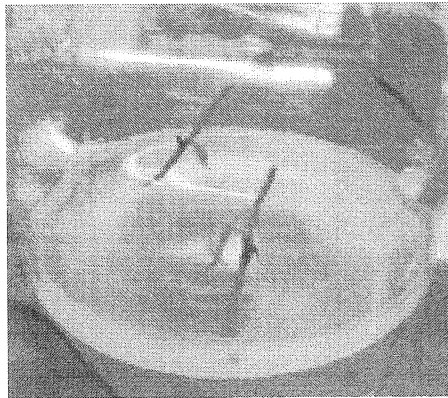
v) ra ngôi cây con trên bầu siêu nhẹ: chuyển bình hà thủ ô đạt tiêu chuẩn ra ngoài ánh sáng tự nhiên 10 - 15 ngày, chú ý tránh ánh sáng trực tiếp, có thể căng lớp lưới đen có độ che sáng 50% trong nhà lưới; giá thể bầu siêu nhẹ được sử dụng là hỗn

hợp đất + trấu hun + xơ dừa + rơm theo tỉ lệ 15:10:50:25, các thành phần trong giá thể cần được xử lý trước khi phối trộn; tiêu chuẩn cây con hà thủ ô xuất vườn là cây trồng tại vườn ươm sau 04 tháng đạt chiều cao 15-20 cm, có từ 5 lá, sinh trưởng phát triển tốt, không sâu bệnh hại.

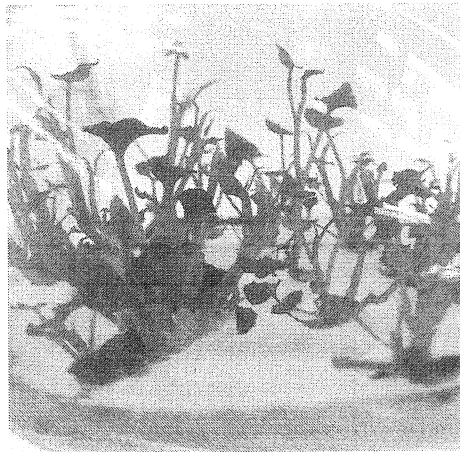
Hình 1



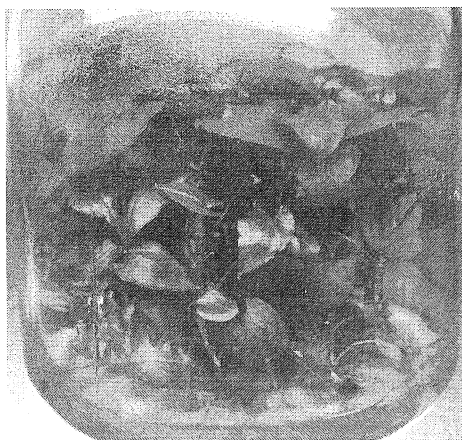
Hình 2



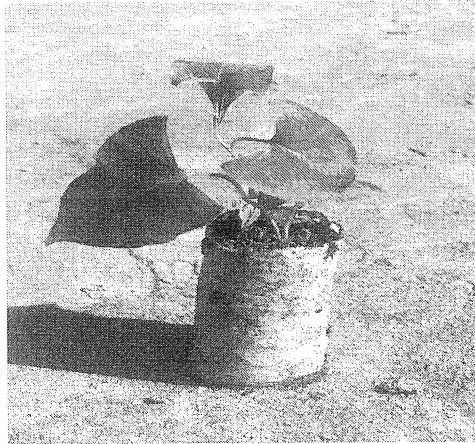
Hình 3



Hình 4



Hình 5



Hình 6

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 Glyxin	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.