



(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)



2-0004029

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

(13) **Y**

(21) 2-2024-00561

(22) 29/12/2021

(67) 1-2021-08436

(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 Thị Trang (VN); Khuất Hữu Trung (VN); Trần Ngọc
Ngoạn (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 THẠCH HỘC TÍA (DENDROBIUM
OFFICINALE KIMURA ET MIGO)

(21) 2-2024-00561

(57) Sáng chế đề cập quy trình nhân giống quy mô công nghiệp (nhân giống *in-vitro*, bầu siêu nhẹ) cây thạch hộc tía (*Dendrobium officinale* Kimura et Migo), 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. Quy trình theo sáng chế tạo ra cây giống thạch hộc tía sạch bệnh, số lượng lớn, sinh trưởng và phát triển tốt.

Hình 7



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 thạch học tía (*Dendrobium officinale* Kimura et Migo).

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Thạch học tía có tên khoa học là *Dendrobium officinale* Kimura et Migo, thuộc chi thạch học, họ Lan (*Orchidaceae*). Lá có màu tía, mọc so le thành dây đều hai bên thân, thuôn dài, hầu như không cuống, đầu lá hơi cuộn hình móng, có 5 gân dọc, dài 12 cm, rộng 2 - 3 cm. Cụm hoa ở kẽ lá. Hoa to màu vàng, mọc thành chùm trên những cuống dài. Cây phân bố tự nhiên ở một số tỉnh: Hòa Bình, Ninh Bình, Lào Cai, Lai Châu, Hà Giang, vùng rừng có độ cao 1.000 - 3.400 m so với mực nước biển, thường phụ sinh vào cây gỗ hoặc vách đá có mọc rêu dưới tán rừng.

Trong cây thạch học tía có nhiều hoạt chất có hoạt tính sinh học quý, giàu polysacarit, alkaloit, các axit amin như glutamic, asparagic, glucin chiếm tới 35% tổng lượng axit amin, v.v. Ngoài ra, thạch học tía còn có những hợp chất đặc thù như phenanthryn, bibenzyl, keton, este và các chất nhầy, hợp chất amidon. Thạch học tía có tác dụng chống ung thư, chống lão hóa, tăng sức đề kháng của cơ thể, làm dẫn mạch máu và kháng đông máu, được sử dụng rộng rãi trong lâm sàng và làm các bài thuốc. Thạch học tía vừa là cây làm cảnh vừa là cây làm thuốc quý hiếm, đã có lịch sử làm thuốc cách đây trên 2.000 năm, được ghi trong “Thần nông bản thảo” của Trung Quốc. Loài cây này có nguy cơ tuyệt chủng được quốc tế đưa vào Công ước buôn bán quốc tế về động thực vật hoang dã có nguy cơ tuyệt chủng (Dược điển Trung Quốc, 2000).

Để góp phần đẩy mạnh việc sử dụng có hiệu quả nguồn dược liệu trong nước, và khai thác vốn quý của y học dân tộc, một hướng nhân giống mới đã và đang được áp dụng với cây thạch học tía. Đó là công nghệ nhân giống *in-vitro* để tạo cây trồng ở quy mô lớn, có hệ số nhân nhanh cao, cây giống đồng nhất về mặt di truyền và hoàn toàn sạch bệnh. Với nhiều tác dụng dược học nên hiện nay nhu cầu về giống cây thạch học tía ngày càng lớn, việc cung cấp cây giống bằng phương pháp giâm hom truyền thống 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 nhiều nghiên cứu về nhân giống *in-vitro* cây thạch học tía công bố trên nhiều tạp chí.

Tác giả Trịnh Thị Thúy An, Nguyễn Thị Tâm trường Đại học Sư phạm - Đại học Thái Nguyên (2016) đã nghiên cứu nhân giống *in-vitro* thạch học tía. Kết quả nghiên cứu này cho thấy môi trường tốt nhất tạo thể chồi (protocorm) và nhân nhanh chồi là MS cơ bản bổ sung sucroza 30 g/l, thạch 9 g/l, nước dừa 100 ml/l và BAP 0,25 ml/l. Môi trường thích hợp cho khả năng tạo rễ của thạch học tía là MS cơ bản bổ sung sucroza 30 g/l, thạch 9 g/l, nước dừa 100 ml/l và NAA 0,9 mg/l.

Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Nông nghiệp công nghệ cao AHRD đã nghiên cứu đã tiến hành phối trộn các loại giá thể gồm vỏ dừa, mụn dừa, vỏ đậu phộng, dớn cọng, than củi và khảo sát một số loại dinh dưỡng như phân Growmore (30 - 10 - 10), phân hữu cơ Black Earth - Vitamin B. Kết quả cho thấy: Giá thể phù hợp cho sự sinh trưởng của thạch học tía giai đoạn từ 0 - 3 tháng tuổi là 40% mụn dừa + 30% dớn cọng + 30% than củi vụn và sử dụng dinh dưỡng phun phân bón qua lá 2 lần/tuần và xen kẽ việc bón phân vô cơ, phân hữu cơ và kích thích rễ theo công thức 2 lần phân Growmore (30 - 10 - 10) - phân hữu cơ Black Earth - Vitamin B. Sau 3 tháng trồng cây thạch học tía có chiều cao đạt 5,3 cm, chiều dài lá là 3,8 cm, có số chồi là 5,7/ cây và trọng lượng tươi trung bình là 29,2 g/cây.

Nguyễn Thị Hồng Thắm, Đào Thị Sen và Lê Thị Thủy Khoa Sinh học, Trường Đại học Sư phạm Hà Nội đã nghiên cứu ảnh hưởng của các loại giá thể, dung dịch dinh dưỡng, phân bón khác nhau đến sinh trưởng cây thạch học tía ở vườn ươm. Kết quả thu được cho thấy, thạch học tía *in-vitro* trồng trên giá thể sinh trưởng tốt hơn khi trồng trong dung dịch dinh dưỡng. Trong đó, giá thể xơ dừa-rêu (tỉ lệ 2:1) cho tỉ lệ sống của lan *in-vitro* ở vườn ươm cao nhất, đạt 95,88%. Chế độ tưới 3ml nước/chậu/ngày giúp thạch học tía sinh trưởng tốt, sau 2 tháng, chiều cao cây tăng trung bình 2,63 cm, cây xuất hiện thêm 2,30 lá mới và 2,23 rễ mới. So sánh hiệu quả của 3 loại phân bón gồm đầu trâu MK 501, HVP vitamin B1 và Growmore nhận thấy, phân bón lá Growmore (20 - 20 - 20) là thích hợp cho tăng trưởng của cây thạch học tía *in-vitro* ở giai đoạn vườn ươm với việc phun định kỳ 7 ngày/lần.

Nhóm giảng viên và sinh viên khoa Kỹ thuật hóa học và Môi trường (đại học Lạc Hồng) đã thực hiện nghiên cứu xây dựng quy trình nuôi cấy *in-vitro* cây thạch học tía bằng môi trường hữu cơ chứa phân trùn quế kết hợp bột sắn dây, kích thích sự tái sinh chồi và tạo rễ cho cây. Kết quả cho thấy, hàm lượng phân trùn quế thích hợp làm môi trường nền cơ bản là 5 %/l TQ + 8 g/l thạch + 20 g/l glucozo sẽ thu được khối lượng tươi thể chồi là 0,58 g/l bình cấy. Môi trường thích hợp để nhân nhanh thể chồi là 5 %/l TQ + 10 g/l SD + 8 g/l thạch + 20 g/l glucozo, sẽ cho hệ số nhân chồi là 2,67

chồi/mẫu, chiều cao chồi trung bình 0,93cm/chồi. Ở thí nghiệm ra rễ, chiều dài của rễ lan đạt 3,78 cm/mẫu và số rễ hình thành là 5,33 rễ/mẫu, đạt cao nhất trên môi trường 5 %/l TQ + 5 g/l SD + 8 g/l thạch + 20 g/l glucozo sau 8 tuần nuôi cấy.

Các công trình nghiên cứu trên đề cập đến việc nhân giống cây thạch học tía trên những môi trường và giá thể khác nhau. Kết quả đều cho hệ số nhân nhanh và tỷ lệ sống cao.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế:

Sáng chế được hoàn thành để giải quyết vấn đề nhân giống *in-vitro* sau đó 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. Sáng chế đề cập đến quy trình nhân giống quy mô công nghiệp (nhân giống *in-vitro*, bầu siêu nhẹ) cây thạch học tía (*Dendrobium officinale* Kimura et Migo), trong đó quy trình này gồm các bước:

i) Tạo vật liệu vô trùng: lựa chọn những đoạn thân thòng không bị sâu bệnh từ cây mẹ trong vườn giống gốc. Mỗi cây mẹ chỉ nên lấy 2 - 3 thân để cây có thể phát triển bình thường, cắt để lại phần gốc dài khoảng 1 - 2 cm. Nên lấy mẫu vào buổi sáng khi trời nắng sẽ cho hiệu quả tốt nhất.

Làm sạch sơ bộ:

Vật liệu khi thu từ vườn giống gốc về loại bỏ toàn bộ phần phiến lá. Tiến hành xả nước chảy, sau đó rửa và bóc bỏ toàn bộ phần màng do bẹ lá để lại trên thân. Dùng tay nhẹ nhàng để loại bỏ bụi bẩn bên ngoài. Những đoạn thân sau đó được cắt thành từng đoạn dài 2 - 3 cm, chứa ít nhất 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 1 lần. Chú ý khi rửa mẫu chỉ theo một chiều, tránh cọ lên rồi cọ xuống gây tổn thương mẫu. Ngâm mẫu với dung dịch thuốc trừ nấm Ridomin gold nồng độ 3g/l nước trong 3 phút. Sau đó lắc 4 - 5 lần nước vô trùng cho hết thuốc trên 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 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 cây. Thao tác dùng dao cắt một lớp mỏng 2 đầu của mẫu. Mẫu sau đó được cấy vào môi trường tái sinh chồi là môi trường MS có bổ sung 20 g/l đường; 0,8 mg/l BA; 5,5 g/l thạch. Giá trị pH của môi trường nuôi cấy là 5,6. 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°C $\pm$ 2°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 2 đầu đoạn thân cũ 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 + 1,0 mg/l BA + 0,1 mg/l Kinetin + thạch 5,5 g/l + nước dừa 100 ml/l + chuối xanh 60 g/l. Giá trị pH của môi trường nuôi cấy là 5,6. 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°C $\pm$ 2°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 nhân nhanh chồi từ 4 tuần.

Tiêu chuẩn sau giai đoạn nhân nhanh: Hệ số nhân chồi đạt 10,63 lần.

iv) Tạo rễ: Các cụm chồi đạt chiều cao $\geq$ 4 cm, cây thẳng, cứng cáp, có từ 3 lá được chuyển sang môi trường tạo rễ. Dùng dao tách từng cụm chồi (mỗi cụm có 2 - 4 chồi), loại bỏ các lá già. Sau đó cấy cụm chồi trên môi trường 1/2MS có bổ sung 0,5 mg/l NAA + 15 g/l đường + 5,5 g/l thạch + 0,2 g/l than hoạt tính. Giá trị pH của môi trường nuôi cấy là 5,6. Sau 30 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 cao $\geq$ 4 cm, có từ 3 lá, hệ rễ khỏe mạnh có thể ra ngôi cây.

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 thạch học tia 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% - 70% 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 thạch học tia là hỗn hợp vỏ thông + xơ dừa + than củi theo tỉ lệ 80:10:10. Các thành phần trong giá thể cần được xử lý trước khi phối trộn, cụ thể:

+ Vỏ Thông: Rửa sạch, khử trùng và phơi khô. Nghiền nhỏ (đường kính khoảng 3-6 mm).

+ Than củi: Ngâm nước vôi trong hoặc ngâm nước đến khi nào than ngâm nước có hiện tượng chìm là được. Vớt ra xả nước sạch, để ráo, đập nhỏ tương tự vỏ thông.

+ 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.

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.

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.

Chế độ tưới nước.

Đối với cây thạch học tia phải thường xuyên tưới ẩm bằng cách phun sương. Kiểm tra độ ẩm giá thể thường xuyên chỉ cần mát tay là được không nên ẩm quá dẫn đến thối gốc. Ngày tưới 2 lần vào buổi sáng và chiều mát.

Chế độ bón phân:

Cây con sau trồng 2 tuần có thể phun kết hợp B1 (1 ml/l nước) và N3M (1 g/l nước). Định kỳ 10 ngày/lần.

Phòng trừ sâu bệnh hại giai đoạn vườn ươm:

Sau trồng cần phun phòng bệnh ngay bằng COC85 (20 g/bình 16l). Thường xuyên kiểm tra khu vực trồng, cây thường bị ốc sên cắn lá cần phát hiện sớm bắt giết. Các bệnh thường gặp trên cây: Thối nâu, thối mềm, thối đen ngọn, vàng lá, đốm lá. Có thể dùng chế phẩm ViFarm (nồng độ theo chỉ dẫn của nhà sản xuất)

Tiêu chuẩn cây con xuất vườn:

Cây thạch hộc tía trồng tại vườn ươm sau 06 tháng, đạt chiều cao 5-10 cm, 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 cây thạch hộc tía (*Dendrobium officinale* Kimura et Migo).

Hình 2 là ảnh chụp vườn giống gốc thạch hộc tía.

Hình 3 là ảnh chụp mẫu thạch hộc tía sau 4 tuần tái sinh chồi.

Hình 4 là ảnh chụp mẫu thạch hộc tía tạo đa chồi sau 3 tuần nuôi cấy.

Hình 5 là ảnh chụp mẫu thạch hộc tía tạo đa chồi sau 5 tuần nuôi cấy.

Hình 6 là ảnh chụp thạch hộc tía giai đoạn tạo cây hoàn chỉnh.

Hình 7 là ảnh chụp thạch hộc tía 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 nhân giống quy mô công nghiệp (nhân giống *in-vitro*, bầu siêu nhẹ) cây thạch hộc tía (*Dendrobium officinale* Kimura et Migo) 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 thạch hộc tía (*Dendrobium officinale* Kimura et Migo), trong đó quy trình này bao gồm các bước:

i) Tạo vật liệu vô trùng: Vật liệu sử dụng cho vào mẫu: Lựa chọn những đoạn thân thông không bị sâu bệnh từ cây mẹ trong vườn giống gốc. Mỗi cây mẹ chỉ nên lấy 2 - 3 thân để cây có thể phát triển bình thường, cắt để lại phần gốc dài khoảng 1 - 2 cm. Nên lấy mẫu vào buổi sáng khi trời nắng sẽ cho hiệu quả tốt nhất.

Làm sạch sơ bộ:

Vật liệu khi thu từ vườn giống gốc về loại bỏ toàn bộ phần phiến lá. Tiến hành xả nước chảy, sau đó rửa và bóc bỏ toàn bộ phần màng do bẹ lá để lại trên thân. Dùng tay nhẹ nhàng 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 2 - 3 cm, chứa ít nhất 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 1 lần. Chú ý khi rửa mẫu chỉ theo 1 chiều, tránh cọ lên rồi cọ xuống gây tổn thương mẫu. Ngâm mẫu với dung dịch

thuốc trừ nấm Ridomin gold nồng độ 3g/l nước trong 3 phút. Sau đó lắc 4 - 5 lần nước vô trùng cho hết thuốc trên 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 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 dùng dao cắt một lớp mỏng 2 đầu của mẫu. Mẫu sau cấy vào môi trường tái sinh chồi là môi trường MS có bổ sung 20 g/l đường; 0,8 mg/l BA; 5,5 g/l thạch. Giá trị pH của môi trường nuôi cấy là 5,6. 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 2 đầu đoạn thân cũ sau đó cấy theo hướng thẳng đứng vào môi trường nhân nhanh là môi trường MS + 30 g/l đường + 1,0 mg/l BA + 0,1 mg/l Kinetin + 5,5 g/l thạch + 100 ml/l nước dừa + 60g/l chuối xanh. Giá trị pH của môi trường nuôi cấy là 5,6. 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 nhân nhanh chồi từ 4 tuần.

Tiêu chuẩn sau giai đoạn nhân nhanh: Hệ số nhân chồi đạt 10,63 lần.

iv) Tạo rễ:

Các cụm chồi đạt chiều cao ≥ 4 cm, cây thẳng, cứng cáp, có từ 3 lá được chuyển sang môi trường tạo rễ. Dùng dao tách từng cụm chồi (mỗi cụm có 2 - 4 chồi), loại bỏ các lá già. Sau đó cấy cụm chồi trên môi trường 1/2MS có bổ sung 0,5 mg/l NAA + 15 g/l đường + 5,5 g/l thạch + 0,2 g/l than hoạt tính. Giá trị pH của môi trường nuôi cấy là 5,6. Sau 30 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 cao ≥ 4 cm, có từ 3 lá, hệ rễ khỏe mạnh có thể ra ngôi cây.

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 thạch học tía 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%-70% 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 thạch học tía là hỗn hợp vỏ thông + xơ dừa + than củi theo tỉ lệ 80:10:10. Các thành phần trong giá thể cần được xử lý trước khi phối trộn, cụ thể:

+ Vỏ thông: Rửa sạch, khử trùng và phơi khô. Nghiền nhỏ (đường kính khoảng 3-6 mm).

+ Than củi: Ngâm nước vôi trong hoặc ngâm nước đến khi nào than ngâm nước có hiện tượng chìm là được. Vớt ra xả nước sạch, để ráo, đập nhỏ tương tự vỏ thông.

+ 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.

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.

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.

Chế độ tưới nước.

Đối với cây thạch học tía phải thường xuyên tưới ẩm bằng cách phun sương. Kiểm tra độ ẩm giá thể thường xuyên chỉ cần mát tay là được không nên ẩm quá dẫn đến thối gốc. Ngày tưới 2 lần vào buổi sáng và chiều mát.

Chế độ bón phân:

Cây con sau trồng 2 tuần có thể phun kết hợp B1 (1 ml/1l nước) và N3M (1 g/1l nước). Định kỳ 10 ngày/lần.

Phòng trừ sâu bệnh hại giai đoạn vườn ươm:

Sau trồng cần phun phòng bệnh ngay bằng COC85 (20 g/bình 16l). Thường xuyên kiểm tra khu vực trồng, cây thường bị ốc sên cắn lá cần phát hiện sớm bắt giết. Các bệnh thường gặp trên cây: Thối nâu, thối mềm, thối đen ngọn, vàng lá, đốm lá. Có thể dùng chế phẩm ViFarm (nồng độ theo chỉ dẫn của nhà sản xuất).

Tiêu chuẩn cây con xuất vườn:

Cây thạch hộc tía trồng tại vườn ươm sau 06 tháng, đạt chiều cao 5-10 cm, sinh trưởng phát triển tốt, không sâu bệnh hại.

Cụ thể, theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến quy trình nhân giống quy mô công nghiệp (nhân giống *in-vitro*, bầu siêu nhẹ) cây thạch hộc tía khác biệt ở chỗ, môi trường tái sinh là MS + 20 g/l đường + 0,8 mg/l BA + 5,5 g/l thạch. Môi trường nhân nhanh là MS + 30 g/l đường + 1,0 mg/l BA + 0,1 mg/l Kinetin + 5,5 g/l thạch + 100 ml/l nước dừa + 60 g/l chuối xanh. Cây sau giai đoạn ra rễ được ra ngôi trên giá thể bầu siêu nhẹ gồm: Vỏ thông + Xơ dừa + Than củi theo tỉ lệ 80:10:10.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Quy trình nhân giống quy mô công nghiệp (nhân giống *in-vitro*, bầu siêu nhẹ) cây thạch hộc tía 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_3BO_3	620
$MnSO_4.H_2O$	1690
$CoCl_2.6H_2O$	2,5
$CuSO_4.7H_2O$	2,5
$ZnSO_4.7H_2O$	860
$Na_2MoO_4.2H_2O$	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_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	10.000
Thiamin.HCl	10
Pyridoxin.HCl	50
Axit nicotinic	50
Glyxin	200

Dung dịch BA (Benzinadenin): Cân 50 mg BA cho vào cốc đựng 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 Kinetin: Cân 50 mg 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 50 ml ở 4°C.

Dung dịch IAA (axit Indol-3-acetic): Cân 50 mg IAA 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 50 ml 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 đông 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 15 g thạch vào nồi kim loại, thêm 1 lít nước cất, đặt lên bếp đun cho thạch tan hoàn toàn.

Phần 2: Cân 90 g đường sucroza vào cốc đong có dung tích 1 lít, đong 60 ml dung dịch MSI, 30 ml 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 tạo cụm chồi (môi trường A2) có công thức MS + sucroza 20 g/l + 0,8 mg/l BA + 5,5 g/l thạch, pH môi trường là 5,6 thì sẽ đong 60 g sucroza + 2,4 ml BA + 16,5 g thạch. Khuấy tan đều các thành phần, dùng dung dịch NaOH 1N điều chỉnh độ pH = 5,6.

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 250 ml 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 thạch học tía sử dụng là các đoạn thân thông không bị sâu bệnh từ cây mẹ trong vườn giống gốc. Mẫu được cắt vào buổi sáng khi thời tiết nắng ráo.

- Khử trùng sơ bộ:

+ Vật liệu khi thu từ vườn giống gốc về loại bỏ toàn bộ phần phiến lá. Tiến hành xả nước chảy, sau đó rửa và bóc bỏ toàn bộ phần màng do bẹ lá để lại trên thân. Dùng tay nhẹ nhàng 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 2 - 3 cm, chứa ít nhất 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 1 lần. Chú ý khi rửa mẫu chỉ theo 1 chiều, tránh cọ lên rồi cọ xuống gây tổn thương mẫu. Ngâm mẫu với dung dịch thuốc trừ nấm Ridomin gold nồng độ 3 g/l nước trong 3 phút. Sau đó lắc 4 - 5 lần nước vô trùng cho hết thuốc trên 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 thạch học tía (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	0	100	0
	2	5	60	0	21,67	78,33
	3	10	60	71,67	0	28,33
	4	15	60	81,67	0	18,33
LSD.05				2,82	1,31	3,11
CV%				7,7	4,5	10,4

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 2 đầu đoạn thân cũ sau đó cấy chồi theo hướng thẳng đứng vào môi trường nhân nhanh là MS và các chất kích thích sinh trưởng, nước dừa và chuối xanh. Bảng 2 thể hiện 7 công thức nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ BAP kết hợp với Kinetin đến khả năng nhân nhanh chồi cây thạch học tía.

Bảng 2. Kết quả ảnh hưởng của nồng độ BAP kết hợp với Kinetin đến khả năng nhân nhanh chồi cây thạch học tía (sau 04 tuần nuôi cấy).

Công thức	Nồng độ BA mg/l	Nồng độ Kinetin mg/l	Số mẫu nuôi cấy (mẫu)	Tổng chồi (chồi)	Hệ số nhân (lần)	Chất lượng chồi
CT1	1	0	30	202	6,73	Chồi trung bình
CT2	1	0,1	30	319	10,63	Chồi tốt
CT3	1	0,2	30	299	9,97	Chồi tốt
CT4	1	0,4	30	268	8,93	Chồi tốt
CT5	1	0,6	30	206	6,87	Chồi trung bình
CT6	1	0,8	30	192	6,4	Chồi trung bình
CT7	1	1,0	30	167	5,57	Chồi kém
LSD _{.05}					0,88	
CV%					2,9	

Qua bảng trên có thể thấy công thức 2 có tác dụng kích thích phát sinh cụm chồi thích hợp nhất cho mục đích tạo cụm chồi. (Sau đây kí hiệu là môi trường A2).

Ví dụ 4: Tạo rễ *in-vitro*.

Dùng dao tách từng cụm chồi từ môi trường A2 loại bỏ các thể chồi ở phần gốc và các lá già. Sau đó cấy cụm chồi trên môi trường 1/2MS có bổ sung 0,5 mg/l NAA + 15 g/l đường thạch 5,5 g/l + 0,2 g/l than hoạt tính để tạo cây hoàn chỉnh. Những cây nhỏ được tách ra và cấy lại vào môi trường A2 để xoay vòng nhân nhanh.

Ví dụ 5: Chăm ứng cây.

Chuyển bình thạch học tía 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%-70% trong nhà lưới và để bình cây phía dưới.

Tiến hành 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.

Ví dụ 6: Ra ngôi trên giá thể bầu siêu nhẹ.

- Chuẩn bị giá thể bầu siêu nhẹ.

Giá thể cho ruột bầu siêu nhẹ được sử dụng để ra ngôi cây con thạch học tía là hỗn hợp Vỏ thông + Xơ dừa + Than củi theo tỉ lệ 80:10:10. Các thành phần trong giá thể cần được xử lý trước khi phối trộn, cụ thể:

+ Vỏ Thông: Khi mua về rửa sạch, hấp khử trùng và phơi khô. Nghiền nhỏ (đường kính khoảng 3 - 6 mm).

+ Than củi: Mua về tiến hành ngâm nước vôi trong hoặc ngâm nước đến khi nào than ngâm nước có hiện tượng chìm là được. Vớt ra xả nước sạch, để ráo, đập nhỏ tương tự vỏ thông.

+ 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.

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.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Quy trình nhân giống quy mô công nghiệp (nhân giống *in-vitro*, bầu siêu nhẹ) cây thạch học tía (*Dendrobium officinale* Kimura et Migo) theo sáng chế có thể tạo ra hàng trăm triệu cây con. Đáp ứng nhu cầu cây thạch học tía trên thị trường và là tiền đề tạo ra các vùng trồng thạch học tía chuyên canh phục vụ sản xuất và bảo chế dược liệu cũng như xuất khẩu sang các nước lân cận. 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 thạch hộc tía (*Dendrobium officinale* Kimura et Migo), trong đó quy trình này bao gồm các bước:

i) vào mẫu tạo vật liệu vô trùng: lấy mẫu là đoạn thân không bị sâu bệnh từ cây mẹ trong vườn giống gốc, loại bỏ toàn bộ phần phiến lá và màng do bẹ lá để lại trên thân; đoạn thân được cắt thành từng đoạn nhỏ dài 2-3 cm, chứa ít nhất 1 mắt ngủ; ngâm mẫu trong nước xà phòng loãng 5 phút, tráng lại bằng nước cất vô trùng 1 lần; ngâm mẫu với dung dịch thuốc trừ nấm Ridomin gold nồng độ 3 g/l trong 3 phút, lắc 4-5 lần nước vô trùng cho hết thuốc trên mẫu; khử trùng bề mặt trong tủ cấy vô trùng bằng cách lắc mẫu với cồn 70% trong 30 giây, tráng lại bằng nước cất vô trùng 3-5 lần; tiếp tục lắc với dung dịch HgCl_2 0,1% trong 5 phút, tráng mẫu với nước cất vô trùng 4-5 lần;

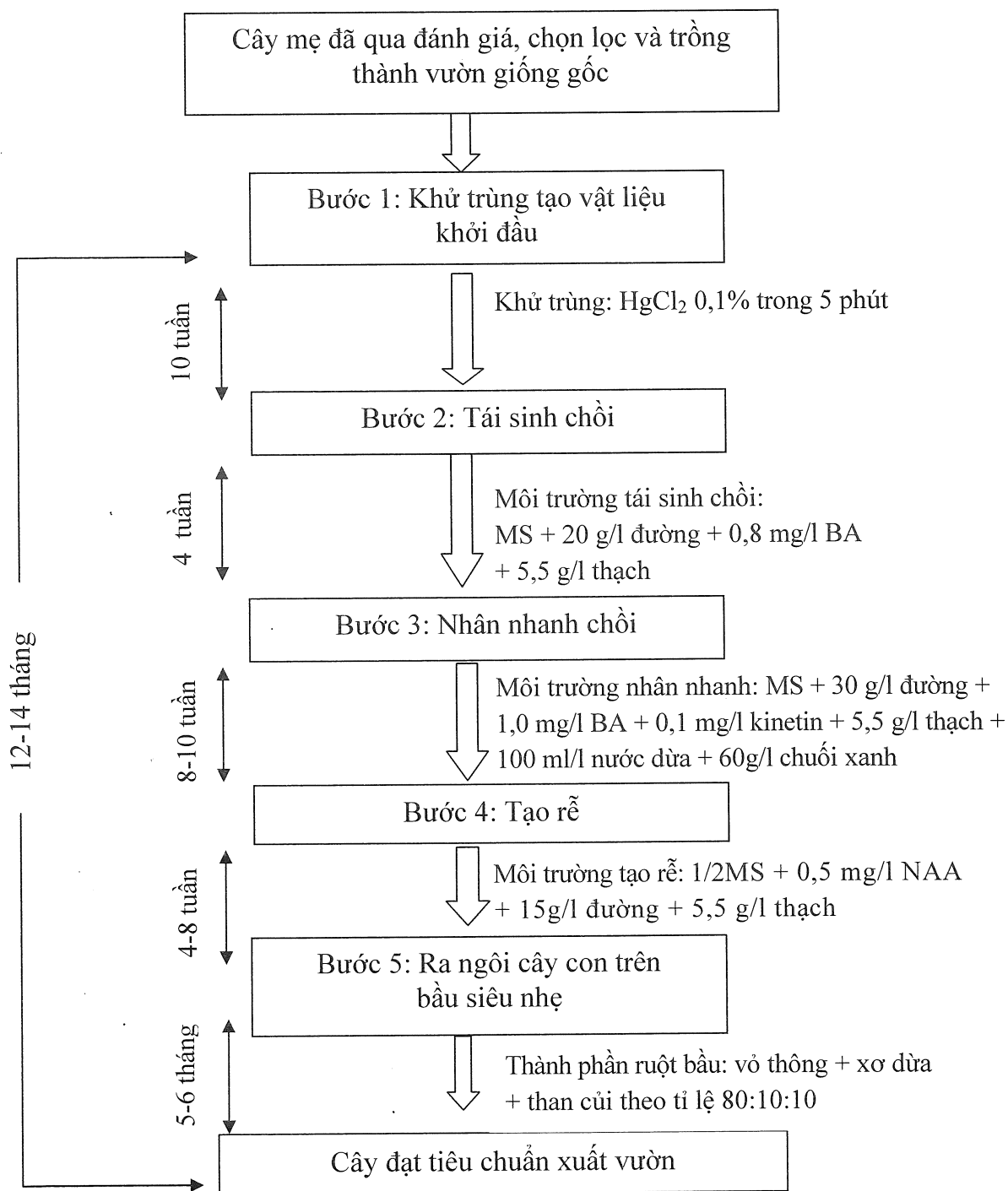
ii) tái sinh chồi: dùng panh gấp từng đoạn thân đã khử trùng đặt trên bề mặt giấy thấm, dùng dao cắt một lớp mỏng 2 đầu của mẫu; mẫu được cấy vào môi trường MS có bổ sung 20 g/l đường, 0,8 mg/l BA, 5,5 g/l thạch; độ pH của môi trường nuôi cấy là 5,6; thời gian chiếu sáng 10 - 12 giờ/ngày, cường độ chiếu 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) tạo cụm chồi: lựa chọn mầm chồi không bị nhiễm nấm khuẩn sau giai đoạn tái sinh, cắt 2 đầu đoạn thân cũ sau đó cấy vào môi trường nhân nhanh là môi trường MS + 30 g/l đường + 1,0 mg/l BA + 0,1 mg/l kinetin + 5,5 g/l thạch + 100 ml/l nước dừa + 60 g/l chuối xanh; độ pH của môi trường nuôi cấy là 5,6; 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 nhân nhanh chồi từ 4 tuần; tiêu chuẩn hệ số nhân chồi đạt 10,63 lần;

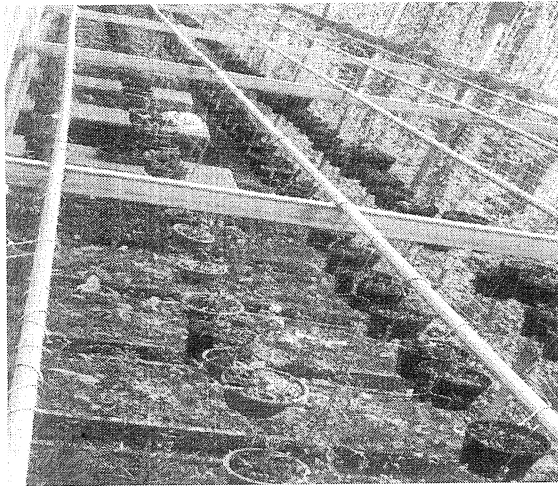
iv) tạo rễ: các cụm chồi đạt chiều cao ≥ 4 cm, cây thẳng, cứng cáp, có từ 3 lá được chuyển sang môi trường tạo rễ là môi trường 1/2MS có bổ sung 0,5 mg/l NAA + 15 g/l đường + 5,5 g/l thạch + 0,2 g/l than hoạt tính; độ pH của môi trường nuôi cấy là 5,6; sau 30 ngày rễ dài, cây cứng cáp, đưa cây ra cảm ứng dần với điều kiện tự nhiên; tiêu chuẩn chồi sau giai đoạn ra rễ là 100% mẫu tạo rễ, cây con cao ≥ 4 cm, có từ 3 lá, hệ rễ khỏe mạnh có thể ra ngôi cây;

v) ra ngôi cây con trên giá thể bầu siêu nhẹ: chuyển bình thạch hộc tía ra rễ ở bước iv) ra ngoài ánh sáng tự nhiên trong nhà lưới với thời gian từ 7-10 ngày để cây con thích nghi với điều kiện tự nhiên, chú ý tránh ánh sáng trực tiếp, có thể căng lớp lưới đen có độ che sáng 50%-70% trong nhà lưới và để bình cây phía dưới; giá thể bầu siêu nhẹ được sử dụng là hỗn hợp vỏ thông + xơ dừa + than củi theo tỉ lệ 80:10:10; các thành phần trong giá thể cần được xử lý trước khi tiến hành phối trộn theo đúng tỷ lệ, sau đó được đóng vào bầu có kích thước 7x11 cm; quá trình đóng bầu siêu nhẹ hoàn toàn tự động, bầu sau đó được xếp vào các luống ươm để chuẩn bị ra cây.

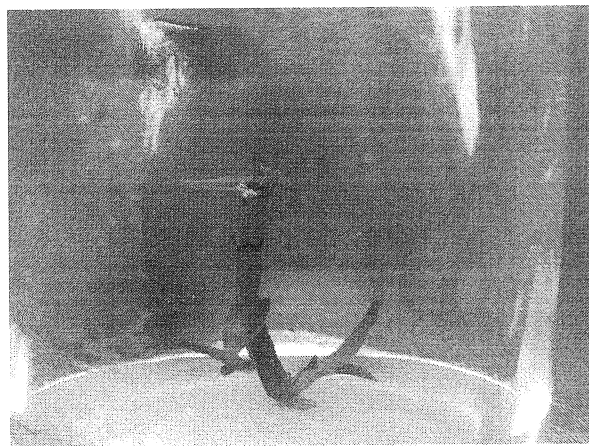
Hình 1



Hình 2



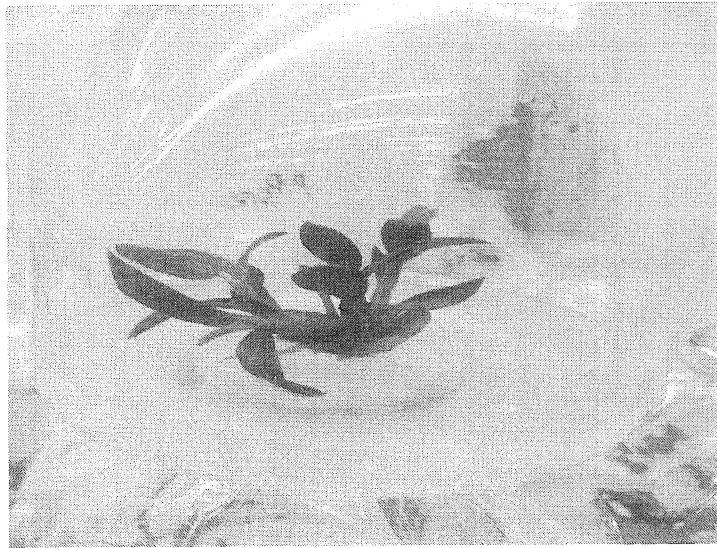
Hình 3



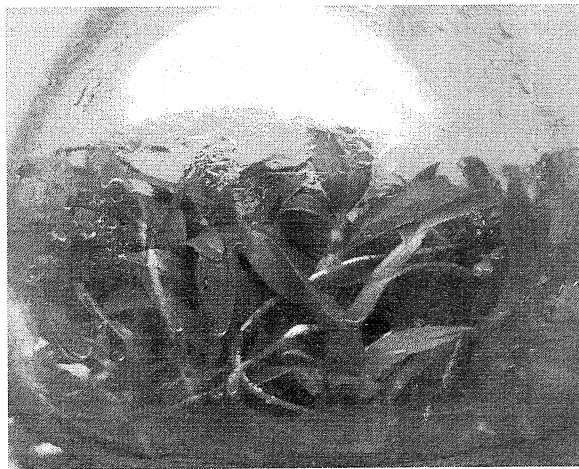
Hình 4



Hình 5



Hình 6



Hình 7



Hình 8

Thành phần	Môi trường MS (mg/l)	Môi trường LV (mg/l)
KNO ₃	1900	1900
KH ₂ PO ₄	170	340
NH ₄ NO ₃	1650	1650
MgSO ₄	370	1850
CaCl ₂ .2H ₂ O	440	22
H ₃ BO ₃	6,2	31
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3	27,7
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	0,125
CuSO ₄ .7H ₂ O	0,025	0,5
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6	43
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25	1,25
KI	0,83	4,15
FeSO ₄	27,8	27,8
Na ₂ EDTA	37,3	37,3
Myo-Inositol	100	100
Thiamin.HCl	0,1	0,1
Pyridoxin.HCl	0,5	0,1
Axit nicotic	0,5	0,5
Glyxin	2	0