



(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)



2-0004042

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

(13) **Y**

(21) 2-2024-00562

(22) 29/12/2021

(67) 1-2021-08437

(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); Khuất Hữu Trung (VN); Trần Đăng Khánh (VN); Nguyễn Minh Đức (VN).

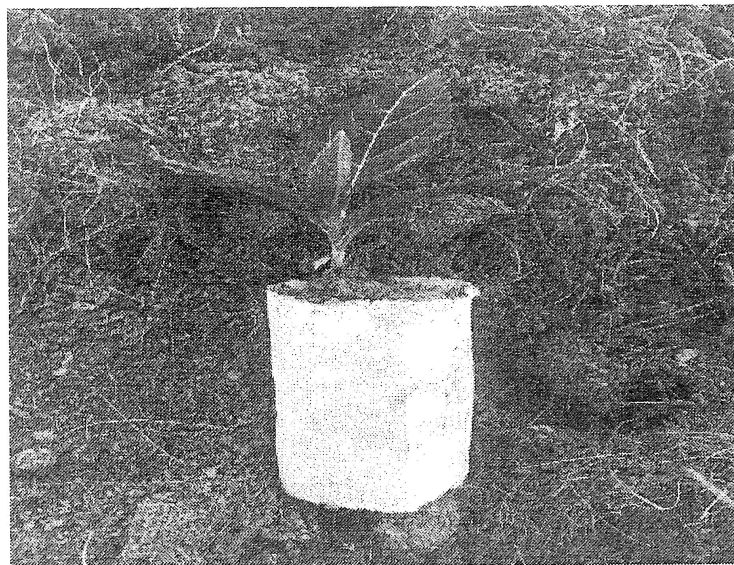
(74) Công ty TNHH SHARETOLINK Việt Nam (VN SHARETOLINK COMPANY LIMITED)

(54) QUY TRÌNH NHÂN GIỐNG QUY MÔ CÔNG NGHIỆP (NHÂN GIỐNG IN-VITRO, BÀU SIÊU NHẹ) CÂY KHÔI TÍA (ARDISIA SYLVESTRIS PITARD)

(21) 2-2024-00562

(57) Sáng chế đề cập đến quy trình nhân giống quy mô công nghiệp (nhân giống *in-vitro*, bầu siêu nhẹ) cây khô tía (*Ardisia sylvestris* Pitard), trong đó quy trình này bao gồm các bước: vào mẫu tạo vật liệu vô trùng, tái sinh chồi, nhân nhanh chồi, tạo rễ và ra ngôi cây con trên giá thể bầu siêu nhẹ. Quy trình theo sáng chế tạo ra số lượng cây giống khô tía ở quy mô công nghiệp không phụ thuộc vào điều kiện khí hậu, cây giống đồng nhất về mặt hình thái, di truyền và hoàn toàn sạch bệnh.

Hình 6



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 khô tía (*Ardisia sylvestris* Pitard):

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Cây khô tía (*Ardisia sylvestris* Pitard) thuộc loại cây nhỏ, chiều cao khoảng 1 - 2 m, không lông, vỏ màu xám. Lá mọc so le, phiến hình giáo ngược hoặc trứng ngược dài 20 - 40 cm, rộng 6 - 12cm, đầu thon và nhọn, màu lục sẫm ở trên, nhạt màu hơn ở dưới hoặc có màu đỏ tím, mép khía răng cưa nhỏ.

Ở Việt Nam cây tập trung ở Lào Cai, Lạng Sơn, Quảng Ninh, Vĩnh Phúc, Hà Tây, Hòa Bình, Ninh Bình, Thanh Hóa, Nghệ An vào tới Quảng Nam và Đà Nẵng. Cây mọc dưới tán rừng rậm ẩm ướt, nơi râm mát, trên đất nhiều mùn trong rừng hay ven rừng nguyên sinh ở độ cao 400 - 1.200 m.

Cây khô tía chứa các thành phần hoá học chính là tanin và glucosit có công dụng trung hòa, chống viêm, làm giảm độ axit của dạ dày, giảm đau, đặc biệt có tác dụng làm se vết loét, kích thích lên da non và làm lành vết thương nên được dùng để trị viêm loét dạ dày, tá tràng. Nước sắc lá khô tía có tác dụng ức chế sự phát triển của vi khuẩn HP rất hiệu quả tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình điều trị loét dạ dày, tá tràng. Đặc biệt, lá khô tía kết hợp với các dược liệu như nghệ vàng, ô tặc cốt, hồi đầu thảo, phục linh, ý dĩ, sa nhân, cam thảo, v.v, có tác dụng hỗ trợ điều trị bệnh viêm loét dạ dày, tá tràng cấp tính và mạn tính; giúp giảm nhanh các triệu chứng như đầy bụng, ợ hơi, ợ chua, nóng rát, đau vùng thượng vị, giúp bổ tỳ vị, tăng cường chức năng hệ tiêu hoá.

Theo phương pháp nhân giống cổ truyền, khô tía được nhân giống bằng cách giâm hom nhưng phương pháp này có nhiều nhược điểm như: việc nhân giống mang tính thời vụ, khó tạo ra số lượng lớn theo yêu cầu của sản xuất. Trong thời gian vừa qua, việc ứng dụng phương pháp nuôi cấy *in-vitro* trong việc nhân giống cây khô tía đã được thực hiện và tạo ra cây trồng sạch bệnh, có chất lượng tốt, độ đồng đều cao, hệ số nhân lớn và giữ được tính di truyền của cây mẹ.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Do đó, sáng chế đề cập đến quy trình nhân giống quy mô công nghiệp (nhân giống *in-vitro*, bầu siêu nhẹ) cây khô tía (*Ardisia sylvestris* Pitard) để giải quyết vấn đề nêu trên, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

i) Vào mẫu tạo vật liệu vô trùng: Lấy mẫu ở các đỉnh sinh trưởng hoặc đoạn thân bánh tẻ từ cây khôi tía mẹ vào thời điểm buổi sáng khi thời tiết nắng ráo; sau đó rửa mẫu dưới vòi nước và ngâm trong dung dịch chất tẩy nhẹ (xà phòng loãng) trong 5 phút; rửa sạch dưới vòi nước chảy, tráng lại 3 lần bằng nước cất vô trùng; tiếp đó ngâm trong dung dịch ridomin gold 3% trong 3 phút, tráng lại bằng nước cất vô trùng 3 lần; khử trùng bề mặt mẫu bằng cách cắt mẫu thành từng đoạn chứa từ 1 - 2 mắt ngủ và lắc với cồn 70% trong thời gian 60 giây, sau đó tráng lại bằng nước cất vô trùng từ 3 đến 5 lần, các thao tác khử trùng được tiến hành hoàn toàn trong môi trường vô trùng; tiếp đó khử trùng bằng HgCl_2 0,1%, lần thứ nhất trong thời gian 7 phút, lần thứ 2 trong thời gian 5 phút, sau đó mẫu được tráng sạch thủy ngân bằng nước cất vô trùng 5 lần;

ii) Tái sinh chồi: Gấp từng đoạn thân đã khử trùng thu được ở bước i) đặt trên bề mặt giấy thấm, loại bỏ phần trắng ở từng đoạn thân để hóa chất khử trùng không ngấm sâu vào mẫu vật, sau đó cấy mẫu theo hướng thẳng đứng vào môi trường nuôi cấy bao gồm thành phần: MS, 30 g/l đường, 1 mg/l BAP và 6 g/l thạch, duy trì độ pH của môi trường nuôi cấy trong khoảng từ 5,6 đến 5,8, thời gian giai đoạn tái sinh chồi từ 4 đến 5 tuần (hình 3);

iii) Nhân nhanh chồi: Chọn mầm chồi có chiều cao ≥ 2 cm, không bị nhiễm nấm khuẩn sau giai đoạn tái sinh ii) ở trên, tiến hành cắt chồi, cắt 1/2 lá và xiết chồi đỉnh, sau đó cấy chồi theo hướng thẳng đứng vào môi trường nhân nhanh để tạo cụm chồi là môi trường MS 1,5 mg/l BA, 0,5 mg/l kinetin, 30g/l đường và 6 g/l thạch, duy trì độ pH của môi trường nuôi cấy trong khoảng từ 5,6 đến 5,8, thời gian cấy chuyển trong khoảng từ 4 đến 5 tuần (hình 4) với điều kiện cường độ chiếu sáng nằm trong khoảng từ 2.000 đến 3.000 lux, duy trì nhiệt độ ở $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ và thời gian chiếu sáng trong ngày là 10 giờ/ngày;

iv) Tạo rễ: Các chồi khôi tía đạt chiều cao ≥ 3 cm, cây thẳng, cứng cáp, có từ 3 - 4 lá thu được từ bước iii) chuyển sang môi trường tạo rễ có các thành phần MS, 0,5 mg/l NAA, 30 g/l đường, 6 g/l thạch và 0,1 g/l than hoạt tính. Trong đó chồi khôi tía được cấy theo hướng thẳng đứng vào môi trường tạo rễ, duy trì độ pH của môi trường tạo rễ trong khoảng từ 5,6 đến 5,8, sau 4 tuần, cây cứng cáp chuyển cây sang bước cảm ứng cây v) để làm quen với điều kiện tự nhiên (hình 5);

v) Ra ngôi cây con trên bầu siêu nhẹ:

Cảm ứng cây: chuyển bình khôi tía đã ra rễ thu được ở bước iv) ra ngoài ánh sáng tự nhiên trong nhà lưới trong thời gian từ 10 - 15 ngày để cây con thích nghi dần với ánh sáng tự nhiên. Nếu thời tiết nắng cần thiết phải che lưới đen với độ che sáng 50%, 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. Khi cây con đạt các chỉ tiêu: Cao ≥ 4 cm, số lá từ 3 - 4, số rễ ≥ 3 rễ, chiều dài rễ ≥ 2 cm, thu được cây con *in vitro* đạt yêu cầu.

Chuẩn bị giá thể bầu siêu nhẹ

Giá thể cho ruột bầu siêu nhẹ được sử dụng để ra ngôi cây con khô tía là hỗn hợp đất + trấu hun + xơ dừa + rơm theo tỉ lệ 15:20:25:40. 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 8x13 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:

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.

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.

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.

Sau 4 tuần: Lúc này cây đã cứng cáp, hệ rễ phát triển có thể bỏ hoàn toàn ni lông. 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 ngay khi trồng và sau đó 1 tháng/1 lần.

Khi cây có hiện tượng bị nấm bệnh phun nồng độ đặc 40 g/16l nước. Nếu sâu xanh, sâu xám hại sử dụng phương pháp bắt giết, 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.

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 khô tía (*Ardisia sylvestris* Pitard).

Hình 2 là ảnh chụp cây khô tía mẹ ở vườn giống gốc.

Hình 3 là ảnh chụp khô tía giai đoạn tái sinh.

Hình 4 là ảnh chụp khô tía giai đoạn nhân nhanh chồi.

Hình 5 là ảnh chụp khô tía giai đoạn ra rễ.

Hình 6 là ảnh chụp ra ngôi khô tía trên giá thể bầu siêu nhẹ.

Hình 7 là bảng thành phần môi trường MS.

Mô tả chi tiết các phương án thực hiện sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết các bước thực hiện quy trình nhân giống quy mô công nghiệp (nhân giống *in-vitro*, bầu siêu nhẹ) cây khô tía (*Ardisia sylvestris* Pitard).

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 khô tía (*Ardisia sylvestris* Pitard), trong đó quy trình này bao gồm các bước:

i) Vào mẫu tạo vật liệu vô trùng:

Nguồn mẫu được thu thập từ huyện Võ Nhai - tỉnh Thái Nguyên trồng làm cây mẹ tại Viện nghiên cứu và Phát triển Lâm Nghiệp - Trường Đại học Nông Lâm Thái Nguyên (Hình 2).

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

Lựa chọn mẫu: Mẫu khô tía sử dụng là đỉnh sinh trưởng hoặc những đoạn thân bánh tẻ không bị sâu bệnh.

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

Khử trùng sơ bộ:

+ Tiến hành cắt các đoạn thân dài từ 4 - 6 cm và rửa mẫu dưới vòi nước chảy bằng chổi lông mềm. Rửa kỹ ở các nách lá.

+ Vật liệu sau đó được ngâm trong dung dịch chất tẩy nhẹ (xà phòng loãng) trong 5 phút. Dùng chổi lông mềm cọ sạch tất cả các vị trí trên mẫu vật, đặc biệt là những nách lá. Sau đó rửa sạch mẫu dưới vòi nước chảy, tráng lại bằng nước cất vô trùng 3 lần.

+ Ngâm mẫu trong dung dịch ridomin gold 3% trong 3 phút để trừ nấm. Sau đó tráng sạch bằng nước cất vô trùng 5 lần.

Chú ý: Các thao tác phải nhẹ nhàng tránh tổn thương tới mắt đoạn thân, vì đây là vị trí cho chồi nảy mầm.

Khử trùng tinh (tiến hành hoàn toàn trong hộp cấy vô trùng):

+ Mẫu được khử trùng kép bằng HgCl_2 0,1%, lần thứ nhất trong thời gian 7 phút, lần thứ 2 trong thời gian 5 phút.

+ Mẫu được tráng sạch thủy ngân bằng 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. Thao tác cắt những phần chết ở hai đầu (có màu trắng) do chất khử trùng gây ra, để tránh chất khử trùng ngấm sâu vào mẫu.

Mẫu sau đó được cấy vào môi trường nuôi cấy theo hướng thẳng đứng. Công thức môi trường nuôi cấy: MS + 30 g/l đường + 1 mg/l BAP + 6 g/l thạch (thành phần môi trường MS xem tại hình 6). Giá trị pH của môi trường nuôi cấy là 5,6-5,8. Thời gian giai đoạn tái sinh chồi từ 4 - 5 tuần (Hình 3).

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 có chiều cao ≥ 2 cm và 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. Công thức môi trường nhân nhanh: MS + 30 g/l đường + 1,5 mg/l BA + 0,5 mg/l kinetin + thạch 6 g/l. (Thành phần môi trường MS xem tại Hình 6). Giá

trị pH của môi trường nuôi cấy là 5,6-5,8. Thời gian cấy chuyển là 4 - 5 tuần. Tiêu chuẩn chồi sau giai đoạn tạo cụm chồi: Tạo được 2 - 4 chồi/mẫu, các chồi mập, xanh (Hình 4).

Điều kiện nuôi cấy mẫu:

- Số giờ chiếu sáng trong ngày là 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 trong nồi tiết trùng có áp suất 1 atm, nhiệt độ 121°C trong 20 phút.

iv) Tạo rễ:

Các chồi khô tía đạt chiều cao ≥ 3 cm, cây thẳng, cứng cáp, có từ 3 - 4 lá được chuyển sang môi trường tạo rễ. Dùng dao tách riêng từng chồi, cắt phần gốc già, cắt tía bớt 1/2 lá. Chồi khô tía được cấy theo hướng thẳng đứng vào môi trường tạo rễ. Công thức môi trường tạo rễ: MS + 0,5 mg/l NAA + 30g/l đường thạch 6 g/l + 0,1 g/l than hoạt tính. (Thành phần môi trường MS xem tại hình 6). Giá trị pH của môi trường nuôi cấy là 5,6-5,8. Thời gian xuất hiện rễ từ 3 - 4 tuần sau khi cấy chồi vào môi trường tạo rễ. Sau 4 tuần 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: 85,55 % mẫu tạo rễ, số lượng rễ/cây ≥ 3 rễ, chiều dài rễ ≥ 2 cm, cây con cứng cáp, số lá ≥ 3 , chiều cao cây ≥ 4 .

v) Ràng cây con trên bầu siêu nhẹ

Cảm ứng cây: Để cây con sau giai đoạn *in-vitro* tại vườn ươm có tỷ lệ sống cao, sinh trưởng và phát triển tốt, cần cảm ứng cây trước ra ngôi như sau:

- Chuyển bình khô tía đã ra 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 thiết phải che lưới đen với độ che sáng 50%.

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

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

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 khô tía (*Ardisia sylvestris* Pitard), 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 quy trình nhân giống quy mô công nghiệp (nhân giống *in-vitro*, bầu siêu nhẹ) cây khôi tía (*Ardisia sylvestris* Pitard), 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 khôi tía. Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến quy trình nhân giống cây khôi tía bằng phương pháp *in-vitro*, khác biệt ở chỗ, trong bước xử lý qua dung dịch ridomin gold 3% trong 3 phút và khử trùng kép mẫu bằng HgCl_2 0,1% trong 7 và 5 phút làm hiệu quả khử trùng tốt hơn.

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 khôi tía (*Ardisia sylvestris* Pitard), khác biệt ở chỗ, môi trường nhân nhanh bao gồm các thành phần: MS, 1,5 mg/l BA, 0,5 mg/l kinetin, thạch 6 g/l. giúp cho hệ số nhân chồi tăng lên từ 2 - 4 chồi/mẫu.

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 khôi tía (*Ardisia sylvestris* Pitard), khác biệt ở chỗ, trong bước tạo rễ có môi trường tạo rễ có các thành phần gồm: MS, 0,5 mg/l NAA, 30g/l đường thạch 6 g/l, 0,1 g/l than hoạt tính, trong đó quy trình này giúp cho bước nuôi cấy tạo rễ với tỷ lệ mẫu tạo rễ đạt 85,55%, số lượng rễ/cây ≥ 3 rễ, chiều dài rễ ≥ 2 cm, cây chất lượng tốt.

Chuẩn bị giá thể bầu siêu nhẹ: Giá thể cho ruột bầu siêu nhẹ được sử dụng để ra ngôi cây con khôi tía là hỗn hợp đất + trấu hun + xơ dừa + rơm theo tỉ lệ 15:20:25:40. 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 8 x 13 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:

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:

2 tuần đầu: 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 một 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 có thể bỏ hoàn toàn ni lông. 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 ngay khi trồng và sau đó 1 tháng/1 lần.

Khi cây có hiện tượng bị nấm bệnh phun nồng độ đặc 40g/16l nước. Nếu sâu xanh, sâu xám hại sử dụng phương pháp bắt giết, 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.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Quy trình nhân giống quy mô công nghiệp (nhân giống *in-vitro*, bầu siêu nhẹ) cây khô tía (*Ardisia sylvestris* Pitard) 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.

Các từ viết tắt được dùng trong bản mô tả này được liệt kê dưới đây:

BA	: Benzin adenin
Cồn	: C_2H_5OH
CT	: Công thức
$HgCl_2$	: Thủy ngân clorua (Mereurric chloride)
Kinetin	: 6-Furfurylaminopurin
MS	: Murashige and Skoog's
NAA	: axit α -naphthalen 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_2PO_4	17
NH_4NO_3	82,5
$MgSO_4$	18,5

Dung dịch MSII: Cân 44 g muối $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 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
$MnSO_4 \cdot H_2O$	1690
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	2,5
$CuSO_4 \cdot 7H_2O$	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 50 mg 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 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 50 ml ở 4°C.

Dung dịch NAA (axit α -naphthalen axetic): 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 50 ml ở 4°C.

Tiến hành pha chế môi trường: Mỗi mẻ 3 lít

Phần 1: Cân 18 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 60 ml dung dịch MSI, 30 ml mỗi loại của các dung dịch từ MSII đến MSV nêu trên. Dung dịch BA,

kinetin tùy theo nồng độ của từng loại môi trường mà đóng lượng dung dịch thích ứng. Ví dụ khi pha 3 lít môi trường nhân nhanh (môi trường A2) có công thức MS + 30 g/l đường + 1,5 mg/l BA + 0,5 mg/l kinetin + thạch 6 g/l thì đóng 4,5 ml BA và 1,5 mg/l kinetin. Khuấy tan đều các thành phần, dùng NaOH 1N điều chỉnh độ pH = 5,8.

Trộn hai phần với nhau bổ sung thêm nước cất cho đủ 3 lít. Dùng ống đóng chia môi trường vào các bình tam giác loại dung tích 250 ml mỗi bình 35ml môi trường, đầy 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.

- Khử trùng sơ bộ.
- + Tiến hành cắt các đoạn thân dài từ 4 - 6 cm và rửa mẫu dưới vòi nước chảy bằng chổi lông mềm. Rửa kỹ ở các nách lá.
- + Vật liệu sau đó được ngâm trong dung dịch chất tẩy nhẹ (xà phòng loãng) trong 5 phút. Dùng chổi lông mềm cọ sạch tất cả các vị trí trên mẫu vật, đặc biệt là những nách lá. Sau đó rửa sạch mẫu dưới vòi nước chảy, tráng lại bằng nước cất vô trùng 3 lần.
- + Ngâm mẫu trong dung dịch Ridomin gold 3% trong 3 phút để trừ nấm. Sau đó tráng sạch bằng nước cất vô trùng 5 lần.

Chú ý: Các thao tác phải nhẹ nhàng tránh tổn thương tới mắt đoạn thân, vì đây là vị trí cho chồi nảy mầm.

- Khử trùng bề mặt (tiến hành trong tủ 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 (tiến hành trong tủ cấy vô trùng):
- + Mẫu được khử trùng kép bằng HgCl₂ 0,1%, lần thứ nhất trong thời gian 7 phút, lần thứ 2 trong thời gian 5 phút.
- + Mẫu được tráng sạch thủy ngân bằng nước cất vô trùng 4 - 5 lần.

Bảng 1 trình bày 5 công thức: Nghiên cứu ảnh hưởng của thời gian khử trùng bằng HgCl₂ 0,1% đến hiệu quả vô trùng nuôi cấy khô tía. Qua bảng có thể thấy ở công thức số 4 cho hiệu quả khử trùng là tốt nhất và chúng tôi chọn công thức số 4 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 cây khôi tía (*Ardisia sylvestris* Pitard).

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	30	0	100	0
	2	8 (5+3)	30	0	55,67	44,33
	3	10 (6+4)	30	9,54	29,44	61,02
	4	12 (7+5)	30	12,04	19,95	68,01
	5	14 (8 + 6)	30	30,67	11,98	57,35

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, cắt bớt 1/2 lá và cấy chuyển sang môi trường tạo cụm chồi gồm MS và chất kích thích sinh trưởng. Bảng 2 dưới đây thể hiện 13 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 khôi tía (*Ardisia sylvestris* Pitard). Qua bảng này, có thể thấy 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 khôi tía.

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 + 6 g/l thạch	0 mg/l BA	
2		0,5mg/l BA	+
3		1,5 mg/l BA	++
4		2 mg/l BA	+
7		2,5 mg/l BA	
8		3 mg/l BA	+
9		1,5 mg/l BA + 0,1 mg/l kinetin	++
10		1,5 mg/l BA + 0,2 mg/l kinetin	++
11		1,5 mg/l BA + 0,3 mg/l kinetin	++
12		1,5 mg/l BA + 0,4 mg/l kinetin dừa	+++
13		1,5 mg/l BA + 0,5 mg/l kinetin	++++

Số lượng dẫu + 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: Tạo rễ *in-vitro*.

Cụm chồi được tách ra làm 2 phần: Loại cây chiều cao ≥ 3 cm, cây thẳng, cứng cáp, có từ 3 - 4 lá được chuyển sang môi trường tạo rễ A3. Bảng 3 trình bày 5 công thức nghiên cứu ảnh hưởng nồng độ khác nhau của chất NAA đến khả năng ra rễ cây khôi tía. Trong đó công thức số 2 cho tỉ lệ mẫu ra rễ cao nhất. Từ đó chúng tôi chọn nồng độ NAA 0,5 mg/l cho quy trình theo sáng chế. Những khối chồi non thì được cắt nhỏ và cấy lại vào môi trường A2 để xoay vòng nhân nhanh.

Bảng 3. Kết quả ảnh hưởng của NAA đến khả năng ra rễ của cây khôi tía

Công thức	Nồng độ NAA (mg/l)	Số mẫu nuôi cấy (mẫu)	Tỷ lệ mẫu ra rễ (%)	Chất lượng rễ
CT 1 (Đ/c)	0,0	30	0,00	
CT 2	0,5	30	85,55	Rễ tốt
CT 3	1,0	30	73,33	Rễ tốt
CT 4	1,5	30	71,15	Rễ trung bình
CT 5	2,0	30	62,34	Rễ trung bình

Ví dụ 5: Ra ngôi cây con trên bầu siêu nhẹ.

Cảm ứng cây: Để cây con sau giai đoạn *in vitro* tại vườn ươm có tỷ lệ sống cao, sinh trưởng và phát triển tốt, cần cảm ứng cây trước ra ngôi như sau:

- Chuyển bình khôi tía đã ra 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 thiết phải che lưới đen với độ che sáng 50%.

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

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

Chuẩn bị giá thể bầu siêu nhẹ:

Giá thể cho ruột bầu siêu nhẹ được sử dụng để ra ngôi cây con khôi tía là hỗn hợp đất + trấu hun + xơ dừa + rơm theo tỉ lệ 15:20:25:40. 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 8x13 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.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Quy trình nhân giống quy mô công nghiệp (nhân giống *in-vitro*, bầu siêu nhẹ) cây khôi tía (*Ardisia sylvestris* Pitard) theo sáng chế có thể tạo ra hàng trăm triệu cây giống. Đáp ứng nhu cầu cây giống khôi tía trên thị trường và là tiền đề để tạo ra các vùng trồng khôi tía 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 khôi tía 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.

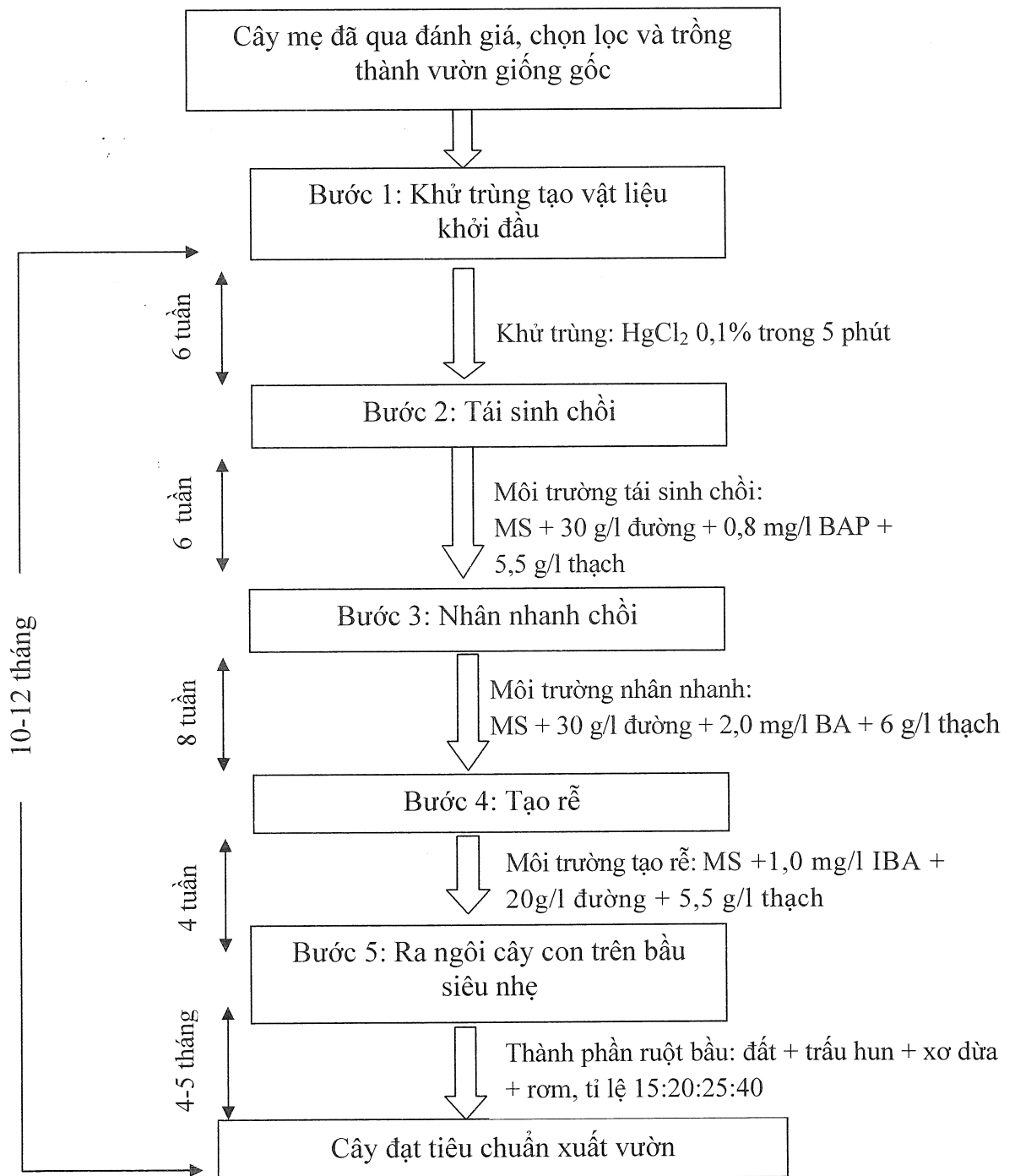
YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình nhân giống quy mô công nghiệp (nhân giống *in-vitro*, bầu siêu nhẹ) cây khôi tía (*Ardisia sylvestris* Pitard), trong đó quy trình này bao gồm các bước:

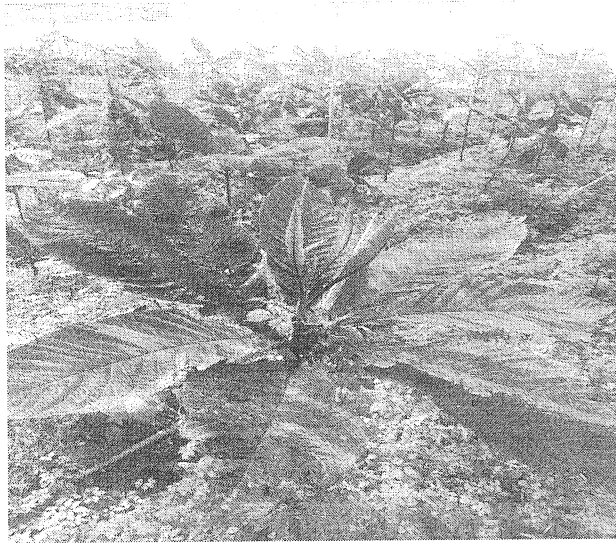
- i) vào mẫu tạo vật liệu vô trùng: lấy mẫu ở các đỉnh sinh trưởng hoặc đoạn thân bánh tẻ từ cây khôi tía mẹ vào thời điểm buổi sáng khi thời tiết nắng ráo; ngâm mẫu trong dung dịch chất tẩy nhẹ (xà phòng loãng) trong 5 phút, tráng lại bằng nước cất vô trùng 3 lần; tiếp đó ngâm trong dung dịch Ridomin gold 3% trong 3 phút, tráng lại bằng nước cất vô trùng 3 lần; khử trùng bề mặt mẫu trong môi trường vô trùng bằng cách cắt mẫu thành từng đoạn chứa từ 1 - 2 mắt ngủ, lắc với cồn 70% trong thời gian 60 giây, tráng lại bằng nước cất vô trùng từ 3 - 5 lần; tiếp đó khử trùng bằng HgCl_2 0,1%, lần thứ nhất trong thời gian 7 phút, lần thứ 2 trong thời gian 5 phút, sau đó tráng sạch bằng nước cất vô trùng 5 lần;
- ii) tái sinh chồi: gắp từng đoạn thân đã khử trùng ở bước i) đặt trên bề mặt giấy thấm, loại bỏ phần trắng ở từng đoạn thân để hóa chất khử trùng không ngấm sâu vào mẫu, cấy mẫu vào môi trường tái sinh là môi trường MS có bổ sung 30 g/l đường, 1 mg/l BAP và 6 g/l thạch; độ pH của môi trường cấy trong khoảng từ 5,6 đến 5,8; thời gian giai đoạn tái sinh chồi từ 4 đến 5 tuần;
- iii) nhân nhanh chồi: chọn mầm chồi có chiều cao ≥ 2 cm và không bị nhiễm nấm khuẩn sau giai đoạn tái sinh ii) ở trên, cắt chồi và cấy vào môi trường nhân nhanh là môi trường MS + 1,5 mg/l BA + 0,5 mg/l kinetin + 30g/l đường + 6g/l thạch; duy trì độ pH của môi trường trong khoảng từ 5,6 đến 5,8; thời gian cấy chuyển từ 4 - 5 tuần với điều kiện cường độ chiếu sáng từ 2.000 đến 3.000 lux, duy trì nhiệt độ ở $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, thời gian chiếu sáng 10 giờ/ngày;
- iv) tạo rễ: các chồi khôi tía đạt chiều cao ≥ 3 cm, cây thẳng, cứng cáp, có từ 3 - 4 lá ở bước iii) chuyển sang môi trường tạo rễ là môi trường MS có bổ sung 0,5 mg/l NAA, 30 g/l đường, 6 g/l thạch và 0,1 g/l than hoạt tính; duy trì độ pH của môi trường từ 5,6 đến 5,8; sau 4 tuần cây cứng cáp và ra rễ đều, chuyển cây sang bước cảm ứng cây v) để làm quen với điều kiện tự nhiên;
- v) ra ngôi cây con trên giá thể bầu siêu nhẹ: chuyển bình khôi tía đã ra rễ ở bước iv) ra ngoài ánh sáng tự nhiên trong nhà lưới với thời gian từ 10 đến 15

ngày để cây con thích nghi dần với ánh sáng tự nhiên, nếu thời tiết nắng cần thiết phải che lưới đen với độ che sáng 50%; mở 30% nắp bình để cây con thích nghi dần dần với ẩm độ không khí, sau 2 đến 3 ngày thì mở 100% nắp bình để cây con thích nghi hoàn toàn với nhiệt độ và độ ẩm không khí; tiêu chuẩn cây con đạt yêu cầu là cao ≥ 4 cm, số lá từ 3 - 4, số rễ ≥ 3 rễ, chiều dài rễ ≥ 2 cm; giá thể bầu siêu nhẹ được sử dụng là hỗn hợp đất + trấu hun + xơ dừa + rơm theo tỉ lệ 15:20:25:40, 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 8x13 cm.

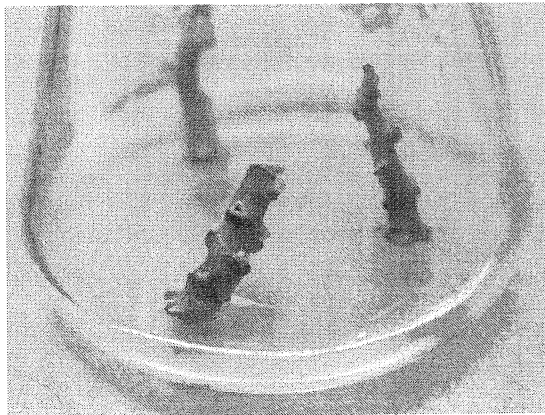
Hình 1



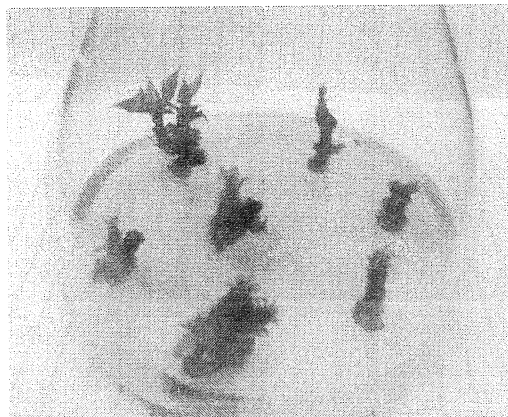
Hình 2



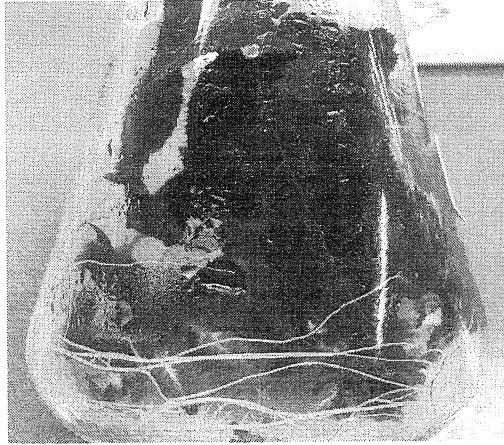
Hình 3



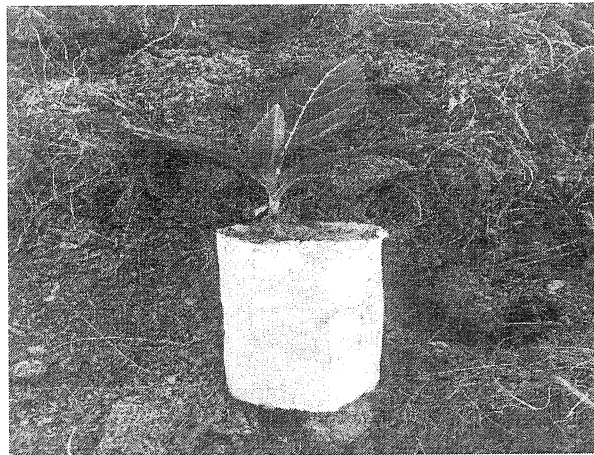
Hình 4



Hình 5



Hình 6



Hình 7

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.