



(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)



2-0004051

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

(13) **Y**

(21) 2-2024-00805

(22) 29/12/2021

(67) 1-2021-08433

(45) 25/04/2025 445

(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); Trần Ngọc Ngoạn (VN); Nguyễn Thị Trang (VN); Vũ Kỳ Liên (VN).

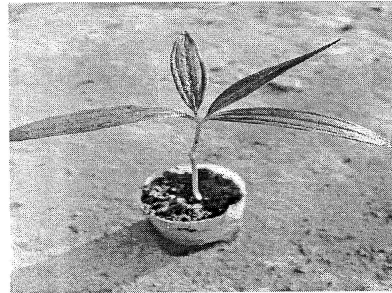
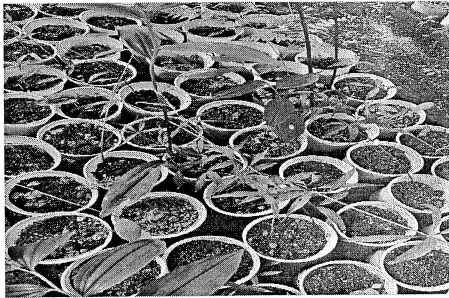
(74) Công ty TNHH SHARETOLINK Việt Nam (VN SHARETOLINK COMPANY LIMITED)

(54) QUY TRÌNH NHÂN GIỐNG QUY MÔ CÔNG NGHIỆP (NHÂN GIỐNG IN-VITRO) CÂY HOÀNG TINH ĐỎ (POLYGONATUM KINGIANUM COLL ET HEMSL) BẰNG GIÁ THỂ BÀU SIÊU NHẹ

(21) 2-2024-00805

(57) Sáng chế đề cập đến quy trình nhân giống quy mô công nghiệp (nhân giống *in-vitro*) cây Hoàng tinh đỏ (*Polygonatum kingianum* Coll et Hemsl) bằng giá thể bầu siêu nhẹ, trong đó quy trình bao gồm các bước: vào mẫu tạo vật liệu vô trùng, tái sinh chồi, nhân nhanh chồi, bước tạo rễ và bước cảm ứng cây, ra ngôi trên giá thể bầu siêu nhẹ để giúp cây làm quen với môi trường tự nhiên.

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*) cây Hoàng tinh đỏ (*Polygonatum kingianum* Coll et Hemsl) bằng giá thể bầu siêu nhẹ.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Hoàng tinh đỏ có tên khoa học là *Polygonatum kingianum* Coll et Hemsl, thuộc họ Hoàng tinh (Convallariaceae). Cây thảo sống lâu năm, cao 1 - 2m, không lông, thân to 1cm, rỗng, thân rễ mập thành củ to, màu trắng ngà, chia đốt. Lá chụm 5 - 10 lá, dài đến 12cm, chóp lá có mũi nhọn dài quấn lại; gân chính 3. Cụm hoa xim ở nách lá, mang 8 - 12 hoa, hồng hay đỏ, mọc rủ xuống; bao hoa có ống dài 15mm; nhị 6, chỉ nhị hẹp, dài bằng bao phấn; bầu hình trứng tam giác. Quả mọng, hình trái xoan hay hình cầu, màu lam tím. Mùa hoa tháng 3 - 5, quả tháng 6 - 8, hạt nhỏ. Cây sinh trưởng mạnh trong mùa xuân hè, phần trên mặt đất tàn lụi vào mùa đông và mọc lại vào mùa xuân năm sau. Hoàng tinh hoa đỏ mọc mỗi năm một lần, cuối đông phần thân lụi, phần gốc rễ phình to lên thành củ, nằm trong đất mùa xuân năm sau thời tiết thuận lợi mọc mầm tiếp (Đỗ Tất Lợi, 2001).

Cây đặc biệt ưa ẩm, ưa bóng và ưa vùng có khí hậu quanh năm ẩm mát. Chúng thường mọc thành khóm trên đất ẩm nhiều mùn hay trên các hốc đá, dọc hành lang ven suối, dưới tán rừng kín thường xanh ẩm ở độ cao 1300 - 1700 m (Acharya *et al.*, 2005). Cây phân bố ở Lai Châu, Điện Biên, Lào Cai, Sơn La, Hà Giang, Yên Bái, Cao Bằng, Nghệ An. Cây mọc mỗi năm một lần, cuối đông phần thân lụi, phần gốc rễ phình to lên thành củ, nằm trong đất mùa xuân năm sau thời tiết thuận lợi mọc mầm tiếp. Cây phân bố ở Lai Châu, Điện Biên, Lào Cai, Sơn La, Hà Giang, Yên Bái, Cao Bằng, Nghệ An. Trong củ Hoàng tinh có chứa đường, tinh bột, axit amin, alkaloid, flavonoid, sterol, chất béo, chất nhầy, iridoid glycozid, alkaloid, 17 axit amin trong đó có nhiều axit amin cần thiết cho cơ thể. Hoàng tinh đỏ có tác dụng bổ, làm hạ đường huyết, làm săn da và làm dịu viêm, chữa các chứng hư tổn, suy nhược, chứng mệt mỏi, tăng huyết áp, chống lão suy, tăng cường chức năng miễn dịch, tăng lưu lượng máu qua động mạch vành tim, chống xơ vữa mạch máu, hạ đường huyết, kháng viêm.

Để góp phần đẩy mạnh việc sử dụng 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 Hoàng tinh đỏ đó là công nghệ nhân giống *in vitro* để tạo cây trồng ở quy mô

lớn, có hệ số nhân giống cao, cây giống đồng nhất về mặt di truyền, cây giống hoàn toàn sạch bệnh.

Hoàng tinh đỏ đang được xếp vào Sách đỏ ở nhiều nước do môi trường sống ngày càng thu hẹp (Winkel, 2006). Vì vậy, bảo tồn và phát triển nguồn gen loài cây này rất được quan tâm ở nhiều nước. Tuy vậy, đến nay chúng tôi chưa tìm thấy công trình nghiên cứu nào về nhân giống *in vitro* loài Hoàng tinh đỏ trên thế giới.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế được hoàn thành để giải quyết nhu cầu về nguồn giống và bảo tồn, phát triển cây Hoàng tinh đỏ. Cụ thể là, sáng chế đề cập đến quy trình nhân giống *in vitro* cây Hoàng tinh đỏ, trong đó quy trình này gồm 05 bước. Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến quy trình nhân giống quy mô công nghiệp (nhân giống *in-vitro*) cây Hoàng tinh đỏ (*Polygonatum kingianum* Coll et Hemsl) bằng giá thể bầu siêu nhẹ, trong đó quy trình gồm các bước:

i) Vào mẫu tạo vật liệu khởi đầu.

Vật liệu sử dụng cho vào mẫu: Vào tháng 2 - 3 thu củ từ cây mẹ. Tiến hành ủ cát sạch cho củ lên mầm mới. Sau đó tiến hành dùng dao tách lấy phần mầm mới này để khử trùng tạo vật liệu ban đầu.

- Làm sạch sơ bộ:

Mầm củ sau khi tách, tiến hành rửa và bóc bỏ lá ôm dưới vòi nước chảy cho sạch bụi bẩn. Rửa xuôi theo chiều từ gốc đến ngọn.

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 các mắt củ. 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 mẫu với 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 sau khi khử trùng bề mặt bằng cồn 70% sẽ tiếp tục lắc với dung dịch HgCl₂ 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 mầm củ đã khử trùng, đặt trên bề mặt giấy cấy. Thao tác dùng dao cắt một lớp mỏng phần gốc. Mầm sau đó được cấy vào môi trường tái sinh chồi.

Môi trường MS có bổ sung 30 g/l đường; 1,0 mg/l BA; 6 g/l agar. Giá trị pH của môi trường nuôi cấy là 5,8. Điều kiện nuôi cấy: thời gian chiếu sáng 10 - 12 giờ/ngày; cường độ chiếu sáng 2000 - 3000 lux; nhiệt độ phòng nuôi $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Các dụng cụ sử dụng và môi trường nuôi cấy được hấp khử trùng ở áp suất 1 atm, nhiệt độ 121°C trong 20 phút. Thời gian giai đoạn tái sinh chồi từ 4 tuần - 5 tuần. (Hình 3)

iii) Nhân nhanh chồi.

Lựa chọn mầm chồi không bị nhiễm nấm khuẩn sau giai đoạn tái sinh, cắt lớp mỏng phía dưới mầm củ, cắt phần lá để lại đoạn dài 1 cm. 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 + 4,0 mg/l BA + 0,2 kinetin + agar 5,5 g/l + 30 ml/l nước dừa. 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 2000 - 3000 lux; nhiệt độ phòng nuôi $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Các dụng cụ sử dụng và môi trường nuôi cấy được hấp khử trùng ở áp suất 1 atm, nhiệt độ 121°C trong 20 phút. Thời gian giai đoạn nhân nhanh chồi từ 6 tuần. (Hình 4)

Tiêu chuẩn sau giai đoạn nhân nhanh: Hệ số nhân chồi đạt 4,27 lần

iv) Tạo rễ.

Các chồi đạt chiều cao ≥ 4 cm, cây thẳng, cứng cáp, có từ 2 lá được chuyển sang môi trường tạo rễ. Dùng dao tách từng chồi, cắt bỏ phần đen ở phần gốc và các lá già. Sau đó cấy chồi trên môi trường MS có bổ sung 1,5 mg/l NAA + 20g/l đường + agar 5,5 g/l. 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 2 lá, hệ rễ khỏe mạnh có thể ra ngôi cây (Hình 5).

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 Hoàng tinh đỏ đạt tiêu chuẩn của giai đoạn ra rễ để ngoài ánh sáng tự nhiên 10 - 15 ngày giúp cây con thích nghi dần với ánh sáng tự nhiên. Chú ý tránh ánh sáng trực tiếp, có thể để căng lớp lưới đen có độ che sáng 50% trong nhà lưới và để bình cây phía dưới.

Chuẩn bị giá thể bầu siêu nhẹ:

Giá thể cho ruột bầu siêu nhẹ được sử dụng để ra ngôi cây con Hoàng tinh đỏ là hỗn hợp Đất + trấu hun + xơ dừa + rơm theo tỉ lệ 20:30:30:20. 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 8x12 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:

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

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

Giai đoạn sau 4 tuần: Lúc này cây đã cứng cáp, hệ rễ phát triển có thể bỏ hoàn toàn nilon. 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 Cốc85 (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.

Tiêu chuẩn cây con xuất vườn:

Cây Hoàng tinh đỏ trồng tại vườn ươm sau 05 tháng, đạt chiều cao 20 - 25 cm, có từ 4 vòng 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 *in vitro* cây Hoàng tinh đỏ.

Hình 2 là ảnh chụp cây mẹ Hoàng tinh đỏ.

Hình 3 là ảnh chụp mẫu giai đoạn tái sinh.

Hình 4 là ảnh chụp mẫu Hoàng tinh đỏ giai đoạn nhân nhanh chồi.

Hình 5 là ảnh chụp mẫu Hoàng tinh đỏ giai đoạn tiền ra rễ.

Hình 6 là ảnh chụp mẫu Hoàng tinh đỏ giai đoạn ra rễ.

Hình 7 là bảng thành phần môi trường MS.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết các bước thực hiện quy trình nhân giống cây Hoàng tinh đỏ.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến quy trình nhân giống quy mô công nghiệp (nhân giống *in-vitro*) cây Hoàng tinh đỏ (*Polygonatum kingianum* Coll et Hemsl) bằng giá thể bầu siêu nhẹ, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

i) Vào mẫu tạo vật liệu vô trùng.

Nguồn mẫu được thu thập từ Thái Nguyên và Hà Giang và được trồng làm cây mẹ tại Khu A Viện Nghiên cứu và Phát triển Lâm Nghiệp, Đại học Nông lâm Thái Nguyên và TT Vĩ Xuyên - Hà Giang (Hình 2).

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: Lựa chọn những củ bánh tẻ, mập, không sâu bệnh làm vật liệu nhân giống.

Thời điểm lấy mẫu: Vào tháng 2 - 3 thu củ từ cây mẹ. Tiến hành ủ cát sạch cho củ lên mầm mới. Sau đó tiến hành dùng dao tách lấy phần mầm mới này để khử trùng tạo vật liệu ban đầu. Lấy mẫu vào buổi sáng các ngày trời nắng.

Khử trùng sơ bộ: Mầm củ sau khi tách, tiến hành rửa và bóc bỏ lá ôm dưới vòi nước chảy cho sạch bụi bẩn. Rửa xuôi theo chiều từ gốc đến ngọn.

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 các mắt củ. 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.

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

Khử trùng bề mặt (Thao tác khử trùng tiến hành hoàn toàn trong hộp 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 60 giây sau đó tráng lại bằng nước cất vô trùng 3 - 5 lần.

ii) Tái sinh chồi.

Dùng panh gấp từng mầm củ đã khử trùng, đặt trên bề mặt giấy cấy. Thao tác dùng dao cắt một lớp mỏng phần gốc. Mẫu sau đó được cấy vào môi trường tái sinh chồi.

Môi trường MS có bổ sung 30 g/l đường; 1,0 mg/l BA; 6 g/l agar. Giá trị pH của môi trường nuôi cấy là 5,8. Điều kiện nuôi cấy: thời gian chiếu sáng 10-12 giờ/ngày; cường độ chiếu sáng 2000 - 3000 lux; nhiệt độ phòng nuôi $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Các dụng cụ sử dụng và môi trường nuôi cấy được hấp khử trùng ở áp suất 1 atm, nhiệt độ 121°C trong 20 phút. Thời gian giai đoạn tái sinh chồi từ 4 tuần - 5 tuần (Hình 3).

Tiêu chuẩn của mẫu sau tái sinh: Chồi khỏe, không bị nhiễm nấm khuẩn.

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

iii) Nhân nhanh chồi.

Lựa chọn mầm chồi không bị nhiễm nấm khuẩn sau giai đoạn tái sinh, cắt lớp mỏng phía dưới mầm củ, cắt phần lá để lại đoạn dài 1 cm. 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 + 4,0 mg/l BA + 0,2 kinetin + agar 5,5 g/l + 30 ml/l nước. 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 2000 - 3000 lux; nhiệt độ phòng nuôi $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Các dụng cụ sử dụng và môi trường nuôi cấy được hấp khử trùng ở

áp suất 1 atm, nhiệt độ 121°C trong 20 phút. Thời gian giai đoạn nhân nhanh chồi từ 6 tuần.

Tiêu chuẩn sau giai đoạn nhân nhanh: Hệ số nhân chồi đạt 4,27 lần (Hình 4).

Điều kiện nuôi cấy mẫu:

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

Cường độ chiếu sáng 2000 - 3000 lux.

Nhiệt độ phòng nuôi 22 °C - 25°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 đạt chiều cao ≥ 4 cm, cây thẳng, cứng cáp, có từ 2 lá được chuyển sang môi trường tạo rễ. Dùng dao tách từng chồi, cắt bỏ phần đen ở phần gốc và các lá già. Sau đó cấy chồi trên môi trường MS có bổ sung 1,5 mg/l NAA + 20g/l đường agar 5,5 g/l. 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 2 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 Hoàng tinh đỏ đạt tiêu chuẩn của giai đoạn ra rễ để ngoài ánh sáng tự nhiên 10 - 15 ngày giúp cây con thích nghi dần với ánh sáng tự nhiên. Chú ý tránh ánh sáng trực tiếp, có thể để căng lớp lưới đen có độ che sáng 50% trong nhà lưới và để bình cây phía dưới.

Chuẩn bị giá thể bầu siêu nhẹ:

Giá thể cho ruột bầu siêu nhẹ được sử dụng để ra ngôi cây con Hoàng tinh đỏ là hỗn hợp Đất + trấu hun + xơ dừa + rơm theo tỉ lệ 20:30:30:20. Các thành phần trong giá thể cần được xử lý trước khi phối trộn, cụ thể:

+ Đất nghiền nhỏ.

+ Trấu hun: đốt chấu 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 8x12 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:

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

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

Giai đoạn sau 4 tuần: Lúc này cây đã cứng cáp, hệ rễ phát triển có thể bỏ hoàn toàn nilon. 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 Cốc 85 (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

Dưới đây, sáng chế sẽ được minh họa bằng các ví dụ, cụ thể quy trình nhân giống *in vitro* Hoàng tinh đỏ 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	1.690
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	10.000
Thiamin.HCl	10
Pyridoxyn.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 50ml ở 4°C.

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

Nước dừa: 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 18g agar vào nồi kim loại, thêm 1 lít nước cất, đặt lên bếp đun cho agar tan hoàn toàn.

Phần 2: Cân 90g đường vào cốc đong có dung tích 1 lít, đong 60ml dung dịch MSI, 30ml mỗi loại các dung dịch từ MSI đến MSV nêu trên. Dung dịch BA, NAA 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 MS + 4 mg/l BA + 100ml/l nước dừa + 100mg/l Inositol + 30g/l đường + 6g/l agar thì đong 12ml BA và đong 300ml nước dừa. Khuấy tan đều các thành phần, dùng dung dịch NaOH 1N điều chỉnh độ PH = 5,8.

Trộn phần 1 và phần 2 với nhau bổ sung thêm nước cất cho đủ 3 lít. Dùng ống đong chia môi trường vào các bình tam giác loại dung tích 250ml mỗi bình 35ml môi trường. Đậy bằng nút bông hoặc túi bóng kính và khử trùng 20 phút ở 121°C 1 atm. Bảo quản ở nơi khô và mát tối đa 6 tuần - 8 tuần.

Ví dụ 2: Khử trùng củ tạo vật liệu khởi đầu:

Mẫu Hoàng tinh được sử dụng là những mầm củ mới được cắt từ củ mẹ đã được ủ cát sạch cho lên mầm. Mẫu được cắt vào những hôm trời nắng ráo.

- Khử trùng sơ bộ.

+ Mầm củ sau khi tách, tiến hành rửa và bóc bỏ lá ôm dưới vòi nước chảy cho sạch bụi bẩn. Rửa xuôi theo chiều từ gốc đến ngọn.

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

Chú ý: Các thao tác phải nhẹ nhàng tránh tổn thương tới 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 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 Hoàng tinh đỏ. Qua bảng có thể thấy công thức 2 cho hiệu quả khử trùng 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 cây Hoàng tinh đỏ (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	20,67	79,33
	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 lớp mỏng phía dưới mầm củ, cắt phần lá để lại đoạn dài 1 cm. 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 + 30g/l đường + 4mg/l BA + 0,2 mg/l kinetin + 6g/l agar + 30ml/l nước dừa.

Ví dụ 4: Tạo rễ *in vitro*.

Chồi từ môi trường A2 được tách ra thành 2 loại: những cụm chồi thấp, non và những cây có chiều cao ≥ 4 cm, cây thẳng, cứng cáp, có từ 2 lá được chuyển sang môi trường tạo rễ. Dùng dao tách từng chồi, cắt bỏ phần đen ở phần gốc và các lá già. Sau đó cấy chồi trên môi trường MS có bổ sung 1,5mg/l NAA + 20g/l đường + 5,5g/l agar. Giá trị pH của môi trường nuôi cấy là 5,6. Sau 30 ngày ra 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 ≥ 4 cm, có từ 2 lá, hệ rễ khỏe mạnh có thể ra ngôi cây.

Ví dụ 5: 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 Hoàng tinh đỏ đạt tiêu chuẩn của giai đoạn ra rễ để ngoài ánh sáng tự nhiên 10 - 15 ngày giúp cây con thích nghi dần với ánh sáng tự nhiên. Chú ý tránh ánh sáng trực tiếp, có thể để căng lớp lưới đen có độ che sáng 50% trong nhà lưới và để bình cây phía dưới.

Chuẩn bị giá thể bầu siêu nhẹ:

Giá thể cho ruột bầu siêu nhẹ được sử dụng để ra ngôi cây con Hoàng tinh đỏ là hỗn hợp Đất + trấu hun + xơ dừa + rom theo tỉ lệ 20:30:30:20. Các thành phần trong giá thể cần được xử lý trước khi phối trộn, cụ thể:

+ Đất nghiền nhỏ.

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

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

+ Rom: Phơi khô, nghiền nhỏ.

Sau khi các thành phần được xử lý, tiến hành phối trộn đúng theo tỷ lệ và đóng vào bầu 3x4 cm (vỏ bầu được làm bằng chất liệu tự phân hủy). Quá trình đóng bầu

siêu nhẹ hoàn toàn tự động. Bầu sau đó được xếp vào các luống ươm để chuẩn bị ra cây.

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.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Quy trình nhân giống *in vitro* cây Hoàng tinh đỏ (*Polygonatum kingianum* Coll et Hemsl) bằng nuôi cấy mô theo sáng chế giúp tiết kiệm chi phí sản xuất nâng cao hiệu quả đầu tư với hệ số nhân giống cao đã tiết kiệm được chi phí sản xuất giống mà cây giống vẫn đảm bảo đồng nhất về mặt hình thái và di truyền đồng thời sạch bệnh, chất lượng cao phục vụ trồng dược liệu trên quy mô lớn. Ngoài ra, quy trình theo sáng chế giúp cho việc chủ động trong việc sản xuất cây giống và không phụ thuộc vào điều kiện khí hậu vì việc nhân giống *in vitro* hoàn toàn được điều chỉnh theo nhu cầu của thực vật.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình nhân giống quy mô công nghiệp (nhân giống *in-vitro*) cây Hoàng tinh đỏ (*Polygonatum kingianum* Coll et Hemsl) bằng giá thể bầu siêu nhẹ, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

i) vào mẫu tạo vật liệu vô trùng: lấy mẫu mầm ở củ bánh tẻ từ cây mẹ Hoàng tinh đỏ vào thời điểm buổi sáng khi thời tiết nắng ráo; sau đó rửa và bóc bỏ lá ôm dưới vôi nước chảy cho sạch bụi bẩn; rửa xuôi theo chiều từ gốc đến ngọn; 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 các mắt củ, sau đó rửa sạch mẫu dưới vôi 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; rửa sạch mẫu sơ bộ bên ngoài rồi mang vào tủ cấy vô trùng và lắc mẫu với cồn 70% trong thời gian 60 giây sau đó tráng lại bằng nước cất vô trùng 3 - 5 lần; mẫu sau khi khử trùng bề mặt bằng cồn 70% sẽ tiếp tục lắc với dung dịch HgCl_2 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 mầm củ đã khử trùng, đặt trên bề mặt giấy cấy; thao tác dùng dao cắt một lớp mỏng phần gốc, sau đó cấy mẫu vào môi trường tái sinh chồi; trong đó môi trường tái sinh chồi là môi trường MS có bổ sung 30 g/l đường; 1,0 mg/l BA; 6 g/l agar; giá trị pH của môi trường nuôi cấy là 5,8; điều kiện nuôi cấy: thời gian chiếu sáng 10 - 12 giờ/ngày; cường độ chiếu sáng 2000 - 3000 lux; nhiệt độ phòng nuôi $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$; các dụng cụ sử dụng và môi trường nuôi cấy được hấp khử trùng ở áp suất 1 atm, nhiệt độ 121°C trong 20 phút; thời gian giai đoạn tái sinh chồi từ 4 tuần - 5 tuần;

iii) nhân nhanh chồi: lựa chọn mầm chồi không bị nhiễm nấm khuẩn sau giai đoạn tái sinh, cắt lớp mỏng phía dưới mầm củ, cắt phần lá để lại đoạn dài 1 cm; sau đó cấy vào môi trường nhân nhanh tạo cụm chồi theo hướng thẳng đứng; trong đó công thức môi trường nhân nhanh bao gồm môi trường MS + 30 g/l đường + 4,0 mg/l BA + 0,2 kinetin + agar 5,5 g/l + 30 ml/l nước dừa; 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 2000-3000 lux; nhiệt độ phòng nuôi $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$; các dụng cụ sử dụng và môi trường nuôi cấy được hấp khử trùng ở áp suất 1 atm, nhiệt độ 121°C trong 20 phút; thời gian giai đoạn nhân nhanh chồi từ 6 tuần;

iv) tạo rễ: các chồi đạt chiều cao ≥ 4 cm, cây thẳng, cứng cáp, có từ 2 lá được chuyển sang môi trường tạo rễ; dùng dao tách từng chồi, cắt bỏ phần đen ở phần gốc

và các lá già, sau đó cấy chồi trên môi trường MS có bổ sung 1,5 mg/l NAA + 20g/l đường + agar 5,5 g/l, 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 2 lá, hệ rễ khỏe mạnh có thể ra ngôi cây; và

v) ra ngôi cây con trên bầu siêu nhẹ: giá thể cho ruột bầu siêu nhẹ được sử dụng để ra ngôi cây con Hoàng tinh đỏ là hỗn hợp Đất + trấu hun + xơ dừa + rơm theo tỉ lệ 20:30:30:20; các thành phần trong giá thể cần được xử lý trước khi phối trộn, cụ thể:

+ đất nghiền nhỏ;

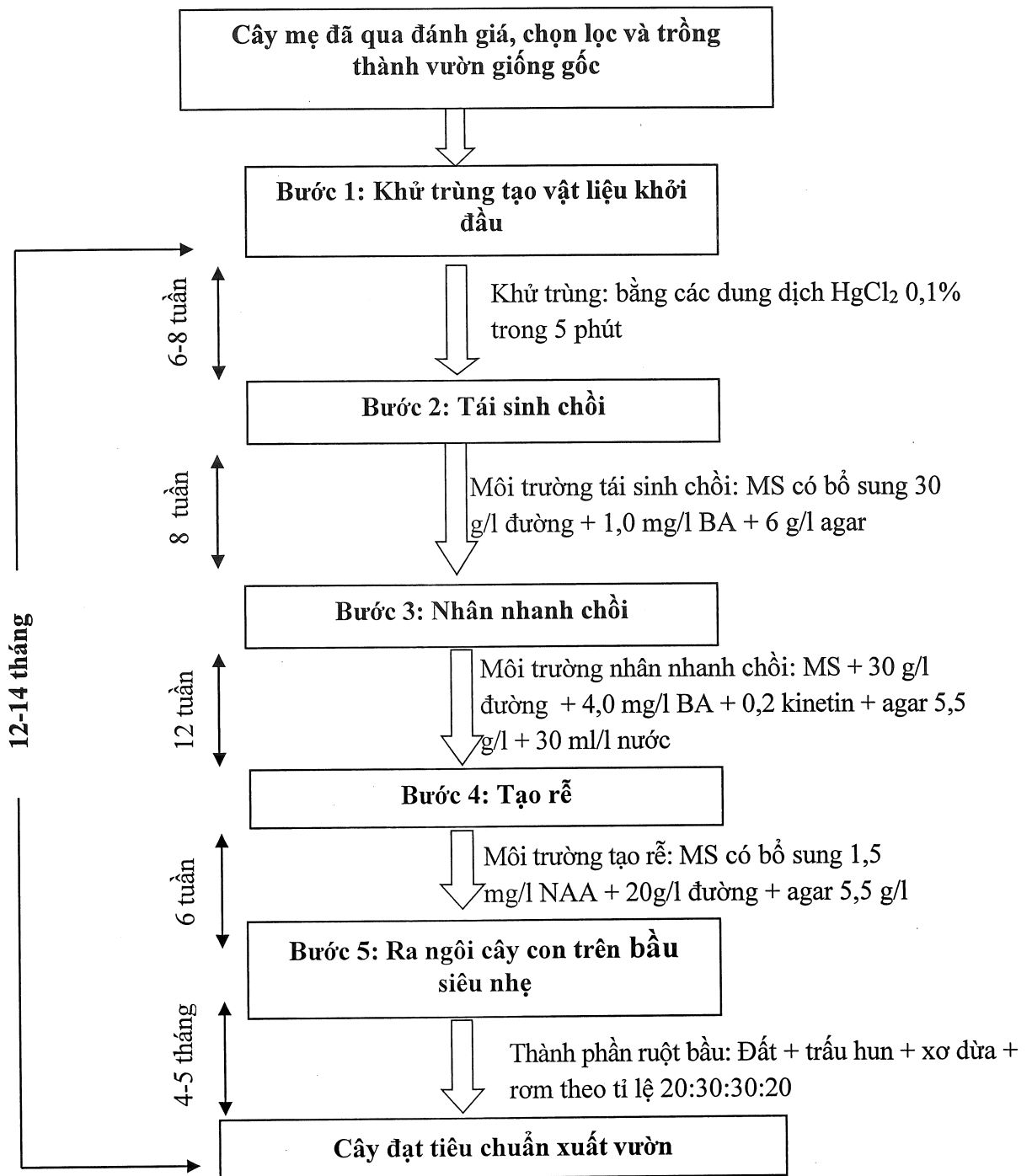
+ trấu hun: đốt chấu sống trong điều kiện yếm khí khoảng 4 giờ, sau đó tưới nước, để nguội;

+ 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 8x12 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.

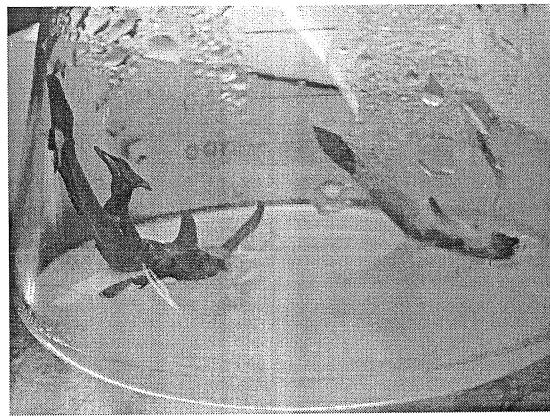
Hình 1



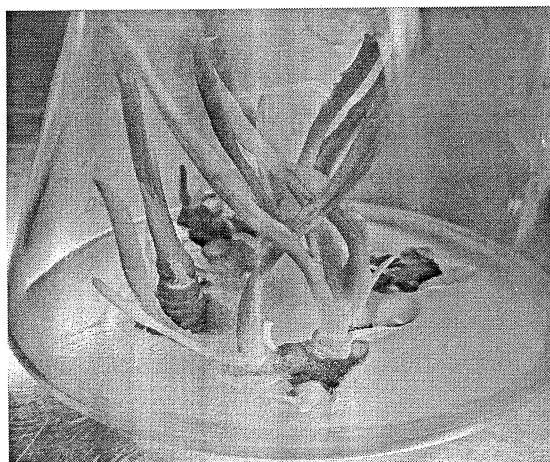
Hình 2



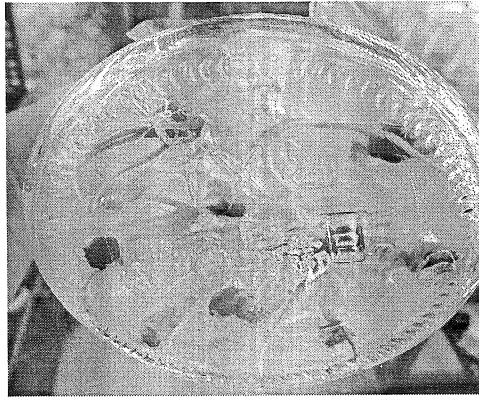
Hình 3



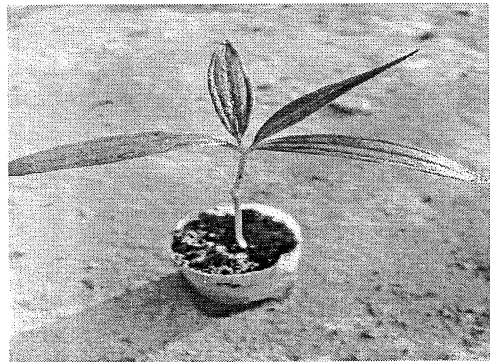
Hình 4



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	mg { 0,124 0,338 0,5 mg (x20) 0,5 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 Thiamine.HCl Pyridoxin.HCl Axit nicotic Glycine	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.