



(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) 
2-0002211

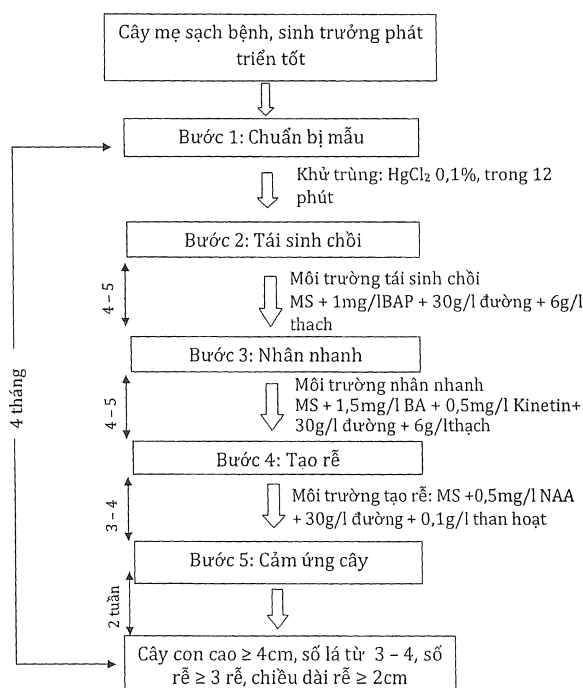
(51)⁷ A01H 4/00, A61K 36/00

(13) Y

- (21) 2-2019-00259 (22) 08.11.2016
(67) 1-2016-04285
(45) 25.12.2019 381 (43) 25.04.2017 349
(73) VIỆN NGHIÊN CỨU VÀ PHÁT TRIỂN LÂM NGHIỆP (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 CÂY KHÔI TÍA (ARDISIA SILVESTRIS PITARD)
BẰNG PHƯƠNG PHÁP NUÔI CẤY MÔ TẾ BÀO**

(57) Sáng chế đề cập đến quy trình nhân giống cây Khôi tía (*Ardisia silvestris* Pitard) bằng phương pháp nuôi cấy mô, trong đó quy trình này bao gồm các bước chuẩn bị mẫu, tái sinh chồi, nhân nhanh chồi, tạo rễ và cảm ứng cây để giúp cây làm quen với môi trường tự nhiên.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến quy trình nhân giống cây Khôi tía (*Ardisia silvestris* Pitard) bằng phương pháp nuôi cây mô tế bào.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Cây Khôi tía (*Ardisia silvestris* Pitard) thuộc loại cây nhỏ, chiều cao khoảng 50cm, không lông, vỏ màu xám. Lá mọc so le, phiến hình giáo ngược hoặc trứng ngược dài 20 – 40cm, 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 chung 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 – 1200m.

Cây Khôi 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 khôi tía có tác dụng ức chế sự phát triển của vi khuẩn HP rất hiệu quả. Tác dụng ức chế này tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình điều trị loét dạ dày tá tràng. Đặc biệt, lá Khôi 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, Khôi 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 cây *in vitro* trong việc nhân giống cây Khôi tía đã được thực hiện và đã 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.

Hiện nay, chỉ mới có một số nghiên cứu nhân giống cây Khôi tía bằng phương pháp giâm hom, chưa có công trình nghiên cứu nào về nhân giống *in vitro* cây Khôi tía.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất giải pháp để giải quyết vấn đề nêu trên. Để đạt được mục đích đó, sáng chế đề cập đến quy trình nhân giống cây Khôi tía (*Ardisia silvestris* Pitard) bằng phương pháp nuôi cấy mô tế bào, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

i) chuẩn bị mẫu: 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; 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, 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: gắp 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 vào môi trường nuôi cấy là môi trường MS có bổ sung 30g/l đường, 1mg/l BAP và 6g/l thạch, theo hướng thẳng đứng, duy trì độ pH của môi trường nuôi cấy nằm 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 lớn hơn hoặc bằng 2cm và 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 có bổ sung 1,5mg/l BA, 0,5mg/l kinetin, 30g/l đường và 6g/l thạch, duy trì độ pH của môi trường nuôi cấy nằm trong khoảng từ 5,6 đến 5,8, thời gian cấy chuyển nằm trong khoảng từ 4 đến 5 tuần (hình 4) với điều kiện cường độ chiếu sáng nằm trong khoảng từ

2000 đến 3000 lux, duy trì nhiệt độ ở $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ và thời gian chiếu sáng trong ngày là 10h/ngày;

iv) tạo rễ: các chồi Khôi tía đạt chiều cao lớn hơn hoặc bằng 3cm, cây thẳng, cứng cáp, có từ 3 đến 4 lá thu được từ bước iii) chuyển sang môi trường tạo rễ là môi trường MS có bổ sung 0,5mg/l NAA, 30g/l đường, 6g/l thạch và 0,1g/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 nằm 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); và

v) 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 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 ẩm độ không khí; khi cây con đạt các chỉ tiêu chiều cao lớn hơn hoặc bằng 4cm, số lá từ 3 đến 4 lá, số rễ lớn hơn hoặc bằng 3 rễ, chiều dài rễ lớn hơn hoặc bằng 2cm, thu được cây con *in vitro* đạt yêu cầu.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 thể hiện sơ đồ quy trình nhân giống *in vitro* cây Khôi tía.

Hình 2 là ảnh chụp cây Khôi tía mẹ.

Hình 3 là ảnh chụp mẫu giai đoạn tái sinh.

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

Hình 5 là ảnh chụp mẫu Khôi tía giai đoạn ra rễ.

Hình 6 là bảng thể hiện 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 Khôi tía.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến quy trình nhân giống cây Khôi tía (*Ardisia silvestris* Pitard) bằng phương pháp nuôi cấy mô, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

i) Chuẩn bị mẫu

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 Khôi 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 – 6cm 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 (thao tác khử trùng 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: môi trường MS có bổ sung 30g/l đường, 1mg/l BAP, 6g/l thạch (Thành phần môi trường MS xem tại hình 6). Giá trị độ 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 lớn hơn hoặc bằng 2cm 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: môi trường MS có bổ sung 30g/l đường, 1,5mg/l BA, 0,5mg/l kinetin và 6g/l thạch (Thành phần môi trường MS xem tại hình 6). Giá trị độ 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 10h/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 1atm, nhiệt độ 121°C trong 20 phút.

iv) Tạo rễ

Các chồi Khôi tía đạt chiều cao lớn hơn hoặc bằng 3cm, 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 tỉa bớt 1/2 lá. Chồi Khôi tía được cấy theo hướng thẳng đứng vào môi trường tạo rễ. Công thức môi trường tạo rễ: môi trường MS có bổ sung 0,5mg/l NAA, 30g/l đường, 6g/l thạch và 0,1g/l than hoạt tính (Thành phần môi trường MS xem tại hình 6). Giá trị độ 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 lớn hơn hoặc bằng 3 rễ, chiều dài rễ lớn hơn hoặc bằng 2cm, cây con cứng cáp, số lá lớn hơn hoặc bằng 3, chiều cao cây lớn hơn hoặc bằng 4cm.

v) Cảm ứng cây

Đề 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 đến 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 lớn hơn hoặc bằng 4cm, số lá từ 3 – 4, số rễ lớn hơn hoặc bằng 3 rễ, chiều dài rễ lớn hơn hoặc bằng 2cm có thể rửa thạch và ra ngôi cây.

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

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến quy trình nhân giống cây cây Khôi tía (*Ardisia silvestris* Pitard) bằng phương pháp nuôi cấy mô, khác biệt ở chỗ, quy trình này sử dụng môi trường nuôi cấy mô phổ biến MS và các chất điều tiết sinh trưởng có nồng độ thích hợp để nâng cao hệ số nhân giống và chất lượng cây 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 nhân giống *in vitro* cây Khôi tía (*Ardisia silvestris* Pitard), khác biệt ở chỗ, môi

trường nhân nhanh là môi trường MS có bổ sung 1,5mg/l BA, 0,5mg/l kinetin, 6g/l thạch, 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 cây Khôi tía (*Ardisia silvestris* Pitard), khác biệt ở chỗ, trong bước tạo rễ có môi trường tạo rễ là môi trường MS có bổ sung 0,5mg/l NAA, 30g/l đường, 6g/l thạch và 0,1g/l than hoạt tính, trong đó quy trình này giúp cho bước nuôi cây tạo rễ với tỷ lệ mẫu tạo rễ đạt 85,55%, số lượng rễ/cây lớn hơn hoặc bằng 3 rễ, chiều dài rễ lớn hơn hoặc bằng 2cm, cây chất lượng tốt.

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* Khôi 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.

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

BA	: Benzin adenin
Cồn	: C ₂ H ₅ OH
CT	: Công thức
HgCl ₂	: Thủy ngân clorua (Mereurric chloride)
Kinetin	: 6-Furfurylaminopurin
MS	: Murashige and Skoog's
NAA	: Axit α - naphlen axetic (α - Naphlene axetic acid)
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: bao 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 20ml 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 44g muối CaCl₂.2H₂O hòa tan trong 500ml nước cất, sau đó bổ sung nước cất lên thể tích 1 lít. Bảo quản ở 4°C. Khi dùng đóng 10ml 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 10ml dung dịch MSIII cho 1 lít môi trường.

Thành phần	Trọng lượng (mg)
H ₃ BO ₃	620
MnSO ₄ .H ₂ O	1690
CoCl ₂ .6H ₂ O	2,5
CuSO ₄ .7H ₂ O	2,5
ZnSO ₄ .7H ₂ O	860
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	25
KI	83

– Dung dịch MSIV: Thành phần sắt – Cân lượng muối nêu dưới đây. Pha riêng từng chất trong 200ml 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 10ml cho mỗi lít môi trường.

Thành phần	Trọng lượng (mg)
Myo-inositol	10000
Thiamine.HCl	10
Pyridoxine.HCl	50
Axit nicotinic	50
Glyxin	200

– Dung dịch BA (Benzinadenin): Cân 50mg 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 50ml. Bảo quản dung dịch trong lọ nút mài 50ml ở 4°C.

– Dung dịch Kinetin: Cân 50mg kinetin 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 50ml. Bảo quản dung dịch trong lọ nút mài 50ml ở 4°C.

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

Tiến hành pha chế môi trường: Mỗi mẻ 3 lít

Phần 1: Cân 18g 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 đựng có dung tích 1 lít, đóng 60ml dung dịch MSI, 30ml 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 bổ sung 30g/l đường, 1,5mg/l BA, 0,5mg/l kinetin và 6g/l thạch thì đóng 4,5ml BA và 1,5mg/l kinetin. Khuấy tan đều các thành phần, dùng dung dịch NaOH 1N điều chỉnh độ pH = 5,8.

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

Ví dụ 2: Khử trùng đoạn thân tạo vật liệu khởi đầu

- Khử trùng sơ bộ

+ Tiến hành cắt các đoạn thân dài từ 4 – 6cm 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 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.

Bảng 1 trình bày 5 công thức: nghiên cứu ảnh hưởng của thời gian khử trùng bằng HgCl_2 0,1% đến hiệu quả vô trùng nuôi cấy Khôi tía. Qua bảng có thể thấy ở công thức số 4 cho hiệu quả khử trùng là tốt nhất. Từ những kết quả nghiên cứu 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 silvestris* 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 bao gồm môi trường 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 đến khả năng tạo cụm chồi của cây Khôi tía (*Ardisia silvestris* Pitard). Qua bảng này, có thể thấy ở công thức số 13 có tác dụng kích thích phát sinh cụm chồi thích hợp nhất cho mục đích tạo cụm chồi của quy trình.

Bảng 2: Kết quả tạo cụm chồi từ mảnh mô nuôi cấy *in vitro* của cây 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 + 30g/l đường l + 6g/l thạch	0 mg/l BA	
2		0,5mg/l BA	+
3		1,5mg/l BA	++
4		2mg/l BA	+
7		2,5mg/l BA	
8		3mg/l BA	+
9		1,5mg/l BA + 0,1mg/l kinetin	++
10		1,5mg/l BA + 0,2mg/l kinetin	++
11		1,5mg/l BA + 0,3mg/l kinetin	++
12		1,5mg/l BA + 0,4mg/l kinetin	+++
13		1,5mg/l BA + 0,5mg/l kinetin	++++

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

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

Ví dụ 4: Tạo rễ *in vitro*

Cụm chồi được tách ra làm 2 phần : Loại cây chiều cao lớn hơn hoặc bằng 3cm, 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 0,5mg/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 : Cảm ứng cây

Chuyển bình Khôi tía đã có rễ ra ngoài ánh sáng tự nhiên từ 10 – 15 ngày để cây con thích nghi dần.

Sau 15 ngày mở 30% nắp bình để cây con thích nghi dần dần với ẩm độ không khí. Sau 15 ngày thì mở hoàn toàn nắp bình.

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

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Quy trình nhân giống *in vitro* cây Khôi tía (*Ardisia silvestris* Pitard) bằng phương pháp 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 được 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 cây Khôi tía (*Ardisia silvestris* Pitard) bằng phương pháp nuôi cấy mô, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

i) chuẩn bị mẫu: 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; 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: gắp 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 vào môi trường nuôi cấy là môi trường MS có bổ sung 30g/l đường, 1mg/l BAP và 6g/l thạch, theo hướng thẳng đứng, duy trì độ pH của môi trường nuôi cấy nằm trong khoảng từ 5,6 đến 5,8, thời gian giai đoạn tái sinh chồi từ 4 đến 5 tuần ;

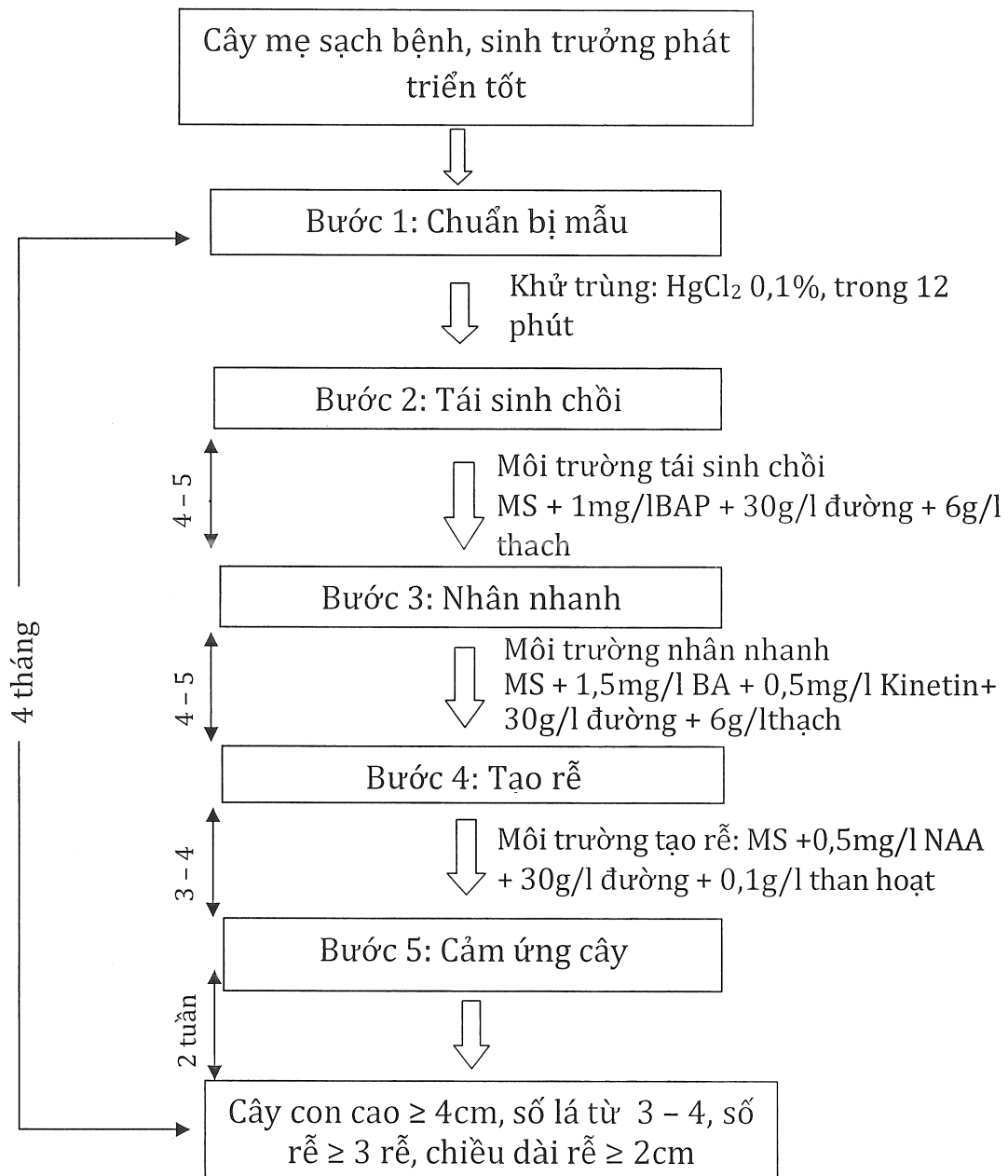
iii) nhân nhanh chồi: chọn mầm chồi có chiều cao lớn hơn hoặc bằng 2cm và không bị nhiễm nấm khuẩn sau giai đoạn tái sinh ii) ở trên, tiến hành cắt chồi, cắt 1/2 lá và xiết chồi đỉnh, sau đó cấy chồi theo hướng thẳng đứng vào môi trường nhân nhanh để tạo cụm chồi là môi trường MS có bổ sung 1,5mg/l BA, 0,5mg/l kinetin, 30g/l đường và 6g/l thạch, duy trì độ pH của môi trường nuôi cấy nằm trong khoảng từ 5,6 đến 5,8, thời gian cấy chuyển nằm trong khoảng từ 4 đến 5 tuần với điều kiện cường độ chiếu sáng nằm trong khoảng từ 2000 đến 3000 lux, duy trì nhiệt độ ở $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ và thời gian chiếu sáng trong ngày là 10h/ngày;

iv) tạo rễ: các chồi Khôi tía đạt chiều cao lớn hơn hoặc bằng 3cm, cây thẳng, cứng cáp, có từ 3 đến 4 lá thu được từ bước iii) chuyển sang môi trường tạo rễ là môi trường MS có bổ sung 0,5mg/l NAA, 30g/l đường, 6g/l thạch và 0,1g/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 nằm 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; và

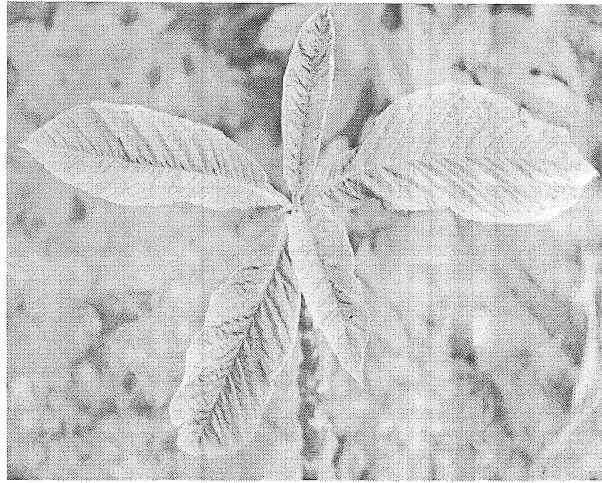
v) cảm ứng cây: chuyển bình Khôi tía đã ra rễ thu được ở bước iv) ra ngoài ánh sáng tự nhiên trong nhà lưới trong thời gian từ 10 đến 15 ngày để cây con thích nghi dần với ánh sáng tự nhiên, nếu thời tiết nắng cần thiết phải che lưới đen với độ che sáng 50%; mở 30% nắp bình để cây con thích nghi dần 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 ẩm độ không khí; khi cây con đạt các chỉ tiêu cao hơn hoặc bằng 4cm, số lá từ 3 đến 4 lá, số rễ lớn hơn hoặc bằng 3 rễ, chiều dài rễ lớn hơn hoặc bằng 2cm thu được cây con *in vitro* đạt yêu cầu.

Hình 1

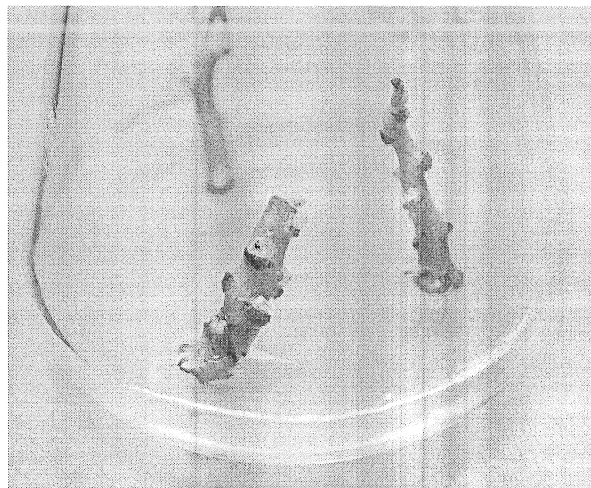


2211

Hình 2

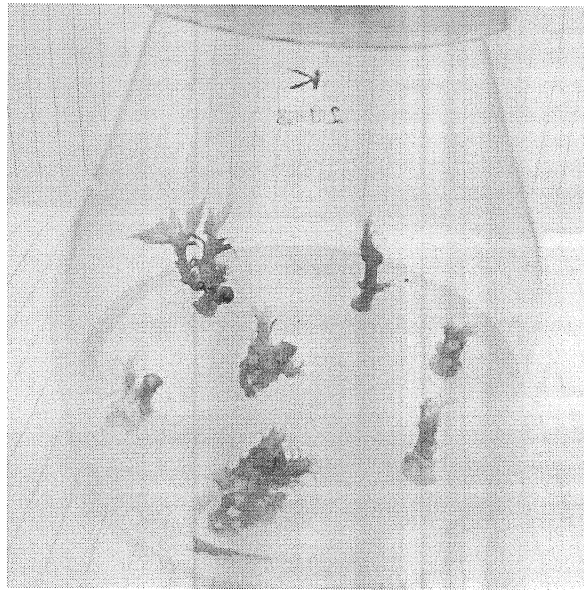


Hình 3



2211

Hình 4



Hình 5



Hình 6

Dung dịch mẹ	Nồng độ (mg/l)	Nồng độ trong dung dịch mẹ (g/200ml)	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	20ml
MS2: CaCl ₂ .2H ₂ O	440	(x 20) { 6,64	10ml
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 x 10 ⁻³ 0,5 x 10 ⁻³ 0,213 5 x 10 ⁻³ 16,6 x 10 ⁻³	10ml
MS4: FeSO ₄ Na ₂ EDTA	27,8 37,3	(x20) { 0,556 0,746	10ml
MS5: Myo-Inositol Thiamine.HCl Pyridoxine.HCl Axit nicotic Glycin	100 0,1 0,5 0,5 2	(x20) { 2 2 x 10 ⁻³ 10 x 10 ⁻³ 10 x 10 ³ 40 x 10 ⁻³	10ml

Ghi chú: Môi trường ½ MS là các chất trong môi trường MS đều giảm đi 1 nửa.