



(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) 
2-0002212

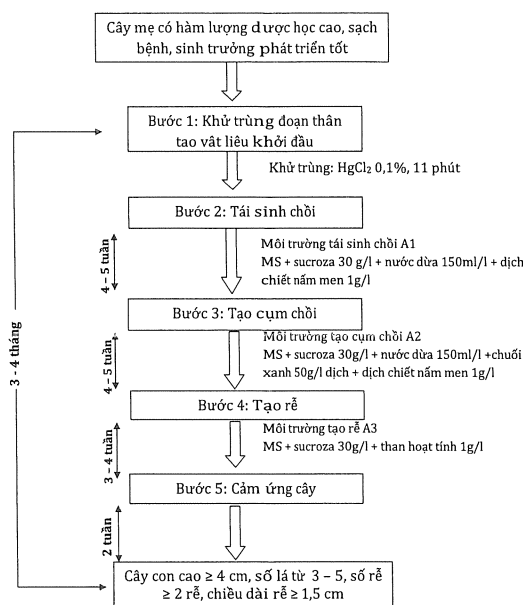
(51)⁷ **A01H 4/00, C12N 5/04**

(13) **Y**

- (21) 2-2019-00260 (22) 16.05.2016
(67) 1-2016-01735
(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), Trần Văn Điền (VN), Phạm Văn Điền (VN), Ngô Xuân Bình (VN), Lý Thị Liễu (VN)**
(74) **Công ty TNHH SHARETOLINK Việt Nam (VN SHARETOLINK COMPANY LIMITED)**

(54) **QUY TRÌNH NHÂN GIỐNG CÂY LAN KIM TUYẾN (ANOECTOCHILUS SETACEUS BLUME) BẰNG NUÔI CẤY MÔ**

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình nhân giống cây lan kim tuyến (*Anoectochilus setaceus* Blume) bằng nuôi cấy mô, trong đó quy trình này bao gồm các bước: lấy mẫu, tái sinh chồi, tạo cụm chồi, tạo rễ và cảm ứng cây con thích nghi với môi trường bên ngoài. Quy trình nhân giống theo giải pháp hữu ích giúp cho việc chủ động về nguồn giống để chuyên canh phục vụ sản xuất và bảo chế dược liệu từ loại cây lan kim tuyến.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình nhân giống cây lan kim tuyến (*Anoectochilus setaceus* Blume) bằng nuôi cấy mô.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Lan kim tuyến, tên khoa học là *Anoectochilus setaceus* Blume, thuộc họ Orchidaceae. Cây thảo, mọc ở đất, có thân rễ mọc dài trên mặt đất mọc nước và có nhiều lông mềm, mang từ 2 đến 4 lá mọc xòe sát đất. Lá hình trứng, gần tròn ở gốc, chóp hơi nhọn và có mũi ngắn, có chiều dài và rộng nằm trong khoảng từ 3-4 x 2-3cm, cuống lá dài từ 2 đến 3cm, ở gốc rộng ra thành bẹ ôm lấy thân. Cụm hoa dài từ 5 đến 7 cm, mang từ 5 đến 10 hoa màu hồng khá to (dài cỡ 2,5 cm). Cánh môi dài 15 mm, có từ 6 đến 8 ria mỗi bên, đầu môi chẻ đôi thành 2 thùy hình thuôn tròn đầu. Bầu dài 13 mm, có lông thưa. Loài cây này ra hoa trong thời gian từ tháng 10 đến tháng 12; cây này tái sinh chủ yếu bằng chồi của thân rễ.

Lan kim tuyến là một loại thảo dược có giá trị cao, chứa axit 4-hydroxycinnamic, β -sitosterol, β -D-glucopyranosit, axit 3-glucosit butanoic, kinsenosit cho mục đích y tế như có tác dụng giảm huyết áp cao điều trị chống viêm, xơ vữa động mạch, tiểu đường, chứng rối loạn gan, lá lách, tim, bệnh phổi, bảo vệ gan và sử dụng để chữa bệnh viêm gan, viêm thận, chống khối u, ung thư và tính chống virus. Lan kim tuyến chứa các nguyên tố vi lượng (Fe, Co, Cu, Mn, Zn, Cr) đóng vai trò quan trọng trong nâng cao hiệu quả chống lão hóa, chuỗi polysacarit nâng cao hiệu lực của miễn dịch trong cơ thể con người.

Lan kim tuyến mọc rải rác trong tự nhiên ở trong rừng ở nhiều tỉnh miền núi phía Bắc. Tuy nhiên, loài dược liệu quý này đang có nguy cơ bị tuyệt chủng bởi sự khai thác bừa bãi. Mặt khác, khả năng tái sinh của loài này trong tự nhiên rất thấp, đặc biệt là những nơi môi trường sinh thái bị tàn phá.

Theo phương pháp nhân giống cổ truyền, lan kim tuyến được nhân giống bằng cách gieo hạt, tách mầm nhưng các phương pháp này có nhiều nhược điểm,

n như việc nhân giống mang tính thời vụ, khó tạo ra số lượng lớn theo yêu cầu của sản xuất. Việc nhân giống loài cây này bằng phương pháp *in vitro* khắc phục được những nhược điểm trên và đưa lại được hiệu quả kinh tế cao và bảo tồn loài được liệu quý.

Chi lan kim tuyến có 12 loài, trên thế giới đã có nhiều nghiên cứu xây dựng quy trình nhân nhanh *in vitro* các loài lan kim tuyến. Chow và cs. (1982), đã nghiên cứu thành công nhân giống loài lan kim tuyến *Anoectochilus formosannus* từ hạt với công thức môi trường vào mẫu: 1/2MS + 0,2% than hoạt tính + 8% dịch chiết chuối. Môi trường được sử dụng để nhân nhanh chồi là: 1/2MS, 0,2% than hoạt tính, 8% dịch chiết chuối, 2mg/l BAP, 0,5 mg/l NAA. Tsay & cs. (2002) đã cắt các mắt đốt thân lấy từ cây *Anoectochilus formosanus* Hayata 2 năm tuổi cấy vào môi trường MS lỏng dung tích 500 ml, bổ sung 2mg/l BAP, 0,5mg/l NAA, 2% than hoạt tính. Nguyễn Văn Kiệt (2004) cũng đã đưa ra quy trình nhân giống *in vitro* thành công cho loài lan kim tuyến *Anoectochilus formosanus* với vật liệu ban đầu là từ chồi đỉnh tại đại học Chungbuk, Hàn Quốc. Môi trường tạo vật liệu khởi đầu là H3 (Hyponex: 6,5N-4,5P-19K 1g/l + 20N-20P-20K 1g/l) + 2g/l pepton). Môi trường nhân nhanh là: H3 + 1mg/l BAP (hoặc 1-2mg/l TDZ) + 1% than hoạt tính.

Tuy nhiên, việc nhân giống hoàn thiện loài lan kim tuyến *Anoectochilus setaceus* Blume ở Việt Nam chưa được quan tâm và nghiên cứu nhiều. Hiện nay, có công trình: “Nghiên cứu kỹ thuật nhân giống loài lan kim tuyến (*Anoectochilus setaceus* Blume) *in vitro*” của GS.TS Nguyễn Quang Thạch – Trường Đại học Nông Nghiệp Hà Nội đăng trên tạp chí Khoa học và Phát triển 2012 đã chỉ ra cơ quan vào mẫu là thể chồi và mắt đốt ngang thân được khử trùng trong dung dịch chứa 2% hypoclorit 0,01% trong 10 phút và đưa vào các môi trường nền khác nhau (MS, Knud, Knudson). Môi trường thích hợp nhất để thực hiện nhân nhanh *in vitro* lan kim tuyến là: Knud* + 0,5mg/l BA + 0,3 mg/l kinetin + 0,3mg/l NAA + 20g/l sucroza + 0,5g/l than hoạt tính + thạch 7g /l cho hệ số nhân chồi là 6,5 chồi/mẫu. Môi trường thích

hợp nhất cho sự hình thành rễ tạo cây hoàn chỉnh là: Knud* + 0,5-1,0 mg/l IBA hoặc 1,0mg/l NAA + 20g/l sucroza + 5% than hoạt tính + 7g thạch/l. Tỷ lệ ra rễ là 100% và số rễ/chồi (4,21 rễ/chồi) đạt cao nhất trên môi trường có bổ sung 1mg/l α NAA.

Các công trình nghiên cứu trên sử dụng kết hợp các chất điều tiết sinh trưởng tổng hợp nhân tạo: BAP, kinetin, NAA, IBA v.v., để nâng cao hệ số nhân giống và khả năng ra rễ của cây. Tuy nhiên, việc kết hợp nhiều các chất này trong thời gian dài không chỉ làm ức chế quá trình phát triển của mẫu nuôi cấy dẫn tới hệ số nhân chồi thấp mà còn tích lũy trong cây. Với cây lan kim tuyến thời gian thu hoạch từ khi trồng đến khi thu hoạch đem đi chế biến chỉ mất khoảng từ 2 đến 4 tháng. Khoảng thời gian này cây chưa thể đào thải dư lượng chất điều tiết sinh trưởng còn tích tụ trong cây dẫn đến không an toàn cho người sử dụng. Vì vậy, vẫn có nhu cầu tìm kiếm quy trình nhân giống lan kim tuyến (*Anoectochilus setaceus* Blume) nhằm nâng cao hệ số ra chồi, khả năng ra rễ của cây.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Do đó, giải pháp hữu ích đề xuất quy trình nhân giống khắc phục các hạn chế nêu trên. Cụ thể, giải pháp hữu ích đề xuất quy trình nhân giống *in vitro* sử dụng hợp chất hữu cơ (nước dừa, dịch chiết chuối xanh, dịch chiết nấm men) và giảm hàm lượng chất kích thích sinh trưởng nhân tạo xuống còn 1/2-1/3 so với các giải pháp nêu ở phần tình trạng kỹ thuật ở trên, trong đó quy trình nhân giống theo giải pháp hữu ích ở khâu nhân nhanh vẫn cho hệ số nhân chồi từ 15-20 chồi/mẫu.

Quy trình nhân giống theo giải pháp hữu ích, được đặc trưng ở chỗ, ở giai đoạn ra rễ tạo cây hoàn chỉnh, chất điều tiết kích thích sinh trưởng tổng hợp nhân tạo được thay thế bằng các hợp chất hữu cơ có trong tự nhiên vẫn cho tỷ lệ ra rễ đạt 100% chất lượng cây con sinh trưởng tốt đồng thời phương pháp này đem lại tính an toàn cho người sử dụng và hướng tới việc tạo ra nguồn dược liệu sạch.

Cụ thể, giải pháp hữu ích đề xuất quy trình nhân giống cây lan kim tuyến (*Anoectochilus setaceus* Blume) bằng nuôi cấy mô tế bào, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) vào mẫu tạo vật liệu vô trùng: lấy mẫu để nhân giống là những đoạn thân khỏe của lan kim tuyến, không bị sâu bệnh từ những cây mẹ tại vườn giống và khử trùng;

b) tái sinh chồi: cấy từng đoạn thân đã được khử trùng từ bước (a) đặt trên bề mặt giấy thấm, đoạn thân được cấy vào môi trường nuôi cấy thứ nhất A1 theo hướng thẳng đứng gồm môi trường cơ bản MS có bổ sung một lượng tối ưu các thành phần: đường sucroza 30 g/l, nước dừa 150ml/l, dịch chiết nấm men 1g/l, thạch 5,5 g/l, pH nằm trong khoảng 5,6 - 5,8, chiếu sáng trong ngày là 12h/ngày với cường độ chiếu sáng 2000-3000 lux với nhiệt độ phòng nuôi 25-28°C, thời gian giai đoạn tái sinh chồi từ 4 - 5 tuần;

c) tạo cụm chồi: cấy chuyển mô thu được từ bước (b) sang môi trường thứ hai A2 gồm có thành phần môi trường cơ bản là MS bổ sung thêm một lượng hữu hiệu các thành phần sau để tạo cụm chồi: đường sucroza 30 g/l, thạch 5,5 g/l, nước dừa 150ml/l, chuối xanh 50g/l, dịch chiết nấm men 1g/l, trong điều kiện độ pH nằm trong khoảng 5,6 - 5,8, trong thời gian 4 - 5 tuần;

d) tạo rễ: cấy chuyển chồi chưa có rễ thu được từ bước (c) lên môi trường thứ ba A3 để tạo rễ gồm môi trường cơ bản MS có bổ sung đường sucroza 30 g/l, than hoạt tính 1g/l, thạch 5 g/l, giá trị pH của môi trường nuôi cấy là 5,6 - 5,8 trong thời gian từ 3 - 4 tuần tuổi các chồi sẽ ra rễ tạo cây hoàn chỉnh;

e) cảm ứng cây: chuyển lan kim tuyến đã có rễ thu được từ bước (d) ra ngoài ánh sáng tự nhiên trong nhà lưới từ 7-10 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.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1: Thể hiện quy trình nhân giống *in vitro* cây lan kim tuyến.

Hình 2: Thể hiện lan kim tuyến giống gốc.

Hình 3: Thể hiện đoạn thân lan kim tuyến.

Hình 4: Thể hiện hình ảnh lan kim tuyến ở giai đoạn vào mẫu.

Hình 5: Thể hiện hình ảnh mẫu tái sinh sau 2 tuần nuôi cấy.

Hình 6: Thể hiện hình ảnh mẫu tái sinh sau 3 tuần nuôi cấy.

Hình 7: Thể hiện hình ảnh lan kim tuyến giai đoạn tạo đa chồi.

Hình 8: Thể hiện lan kim tuyến giai đoạn cảm ứng ra rễ (30 ngày tuổi).

Hình 9: Thể hiện hình ảnh hệ rễ sau khi cảm ứng ra rễ (sau 30 ngày tuổi).

Hình 10: Thể hiện hình ảnh lan kim tuyến giai đoạn cảm ứng ra ngôi.

Hình 11: Thể hiện thành phần của môi trường MS.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Dưới đây, quy trình nhân giống cây lan kim tuyến *Anoectochilus setaceus* Blume bằng nuôi cấy mô sẽ được mô tả một cách chi tiết, nhưng giải pháp hữu ích không chỉ giới hạn ở các phương án mô tả này.

Cụ thể, quy trình nhân giống *in vitro* cây lan kim tuyến *Anoectochilus setaceus* Blume theo giải pháp hữu ích bao gồm 5 bước, trong các bước này cần có sự can thiệp của các thiết bị, máy móc như: tủ an toàn sinh học (box cấy) để tạo không khí vô trùng trong quá trình làm việc, nồi hấp khử trùng, tủ sấy, cân phân tích, cân kỹ thuật, máy chuẩn độ pH, máy cất nước 2 lần để loại bỏ các ion khoáng, pipet 1 kênh, hệ thống đèn điều chỉnh ánh sáng phù hợp cho thực vật.

Cụ thể, quy trình nhân giống cây lan kim tuyến bằng nuôi cấy mô theo giải pháp hữu ích bao gồm 5 bước (như được thể hiện ở hình 1):

Bước 1: Vào mẫu tạo vật liệu vô trùng

Nguồn mẫu lan kim tuyến là những cây được thu thập từ Vườn Quốc gia Hoàng Liên - Sapa - Lào Cai về trồng khảo nghiệm và chọn lọc tại Viện nghiên cứu và Phát triển Lâm Nghiệp - Trường Đại học Nông Lâm Thái Nguyên. Cây mẹ được sử dụng lấy mẫu phải là cây sạch bệnh, tốc độ sinh trưởng phát triển tốt, hàm lượng dược học cao (hình 2).

- Lựa chọn mẫu: Mẫu lan kim tuyến ban đầu là những đoạn thân khỏe, không bị sâu bệnh từ những cây mẹ tại vườn giống gốc. Khi chọn đoạn thân vào mẫu cần chú ý chọn những đoạn thân ở phần gần ngọn, không chọn những đoạn thân gần mặt đất tránh nguy cơ nhiễm nấm bệnh.

- Thời điểm lấy mẫu: Mẫu được lấy vào buổi sáng khi thời tiết nắng ráo.

- Khử trùng sơ bộ: Gồm các công đoạn sau:

+ Tiến hành cắt bỏ lá và rửa mẫu dưới vòi nước chảy bằng tấm bông.

+ Đoạn thân sau đó được ngâm trong dung dịch chất tẩy nhẹ (nước rửa chén hoặc xà phòng) trong 5 phút.

+ Sau đó rửa sạch dưới vòi nước chảy, tráng lại bằng nước cất vô trùng 3 lần.

Các thao tác được thực hiện trong quá trình này phải nhẹ nhàng tránh tổn thương mẫu, do thân cây lan kim tuyến mỏng nước rất dễ bị dập nát.

- Khử trùng bề mặt:

+ Mẫu được cắt thành từng đoạn dài 2 - 3 cm chứa 1 đến 2 đốt thân (hình 3, 4).

+ Khử trùng bằng cồn 70% trong thời gian 30 giây sau đó tráng lại bằng nước cất vô trùng 3 - 5 lần.

+ Thao tác khử trùng tiến hành hoàn toàn trong box cấy vô trùng.

- Khử trùng tinh:

+ Mẫu được khử trùng kép bằng HgCl_2 0,1%, lần thứ nhất trong thời gian 6 phút, lần thứ 2 trong thời gian 5 phút.

+ Mẫu được tráng sạch thủy ngân bằng nước cất vô trùng 3 - 5 lần.

+ Thao tác khử trùng tiến hành hoàn toàn trong box cấy vô trùng.

Tiêu chuẩn của mẫu sau khi khử trùng: Mẫu sạch nấm bệnh (tỷ lệ mẫu sạch đạt từ 95% trở lên), sức sống của mẫu đảm bảo (tỷ lệ mẫu sống đạt 100%).

Bước 2: Tái sinh chồi

- Dùng panh gấp từng đoạn thân đã khử trùng ở bước 1 đặt trên bề mặt giấy thấm (hình 5).

- Thao tác cắt từng đoạn thân có chiều dài ít nhất 2 cm có chứa ít nhất 1 mắt ngủ. Loại bỏ phần gốc của đoạn thân do hóa chất khử trùng ngấm sâu vào mẫu.

- Mẫu đoạn thân được cấy vào môi trường nuôi cấy theo hướng thẳng đứng (hình 6).

- Công thức môi trường nuôi cấy thứ nhất A1 gồm MS + đường sucroza 30 g/l + nước dừa 150ml/l + dịch chiết nấm men 1g/l + thạch 5,5 g/l. (Thành phần môi trường MS xem hình 11).

- Giá trị pH của môi trường nuôi cấy là 5,6 - 5,8.

- Thời gian giai đoạn tái sinh chồi từ 4 - 5 tuần, chiếu sáng trong ngày 12h/ngày với cường độ chiếu sáng 2000-3000 lux, nhiệt độ phòng nuôi 25-28°C.

Tiêu chuẩn của mẫu sau tái sinh: Mẫu bật chồi sau nuôi cấy 4 - 5 tuần, chồi khỏe có từ 3 lá trở lên, không bị nấm khuẩn. Tỷ lệ tái sinh chồi đạt 100%.

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.

Bước 3: Tạo cụm chồi

- Sau khi mẫu đã bật những chồi bất định, khoảng 4-5 tuần nuôi cấy các chồi cao từ 2-3 cm, cắt chồi cấy thu được ở bước 2 vào môi trường nhân nhanh để tạo được nhiều chồi (hình 7).

- Công thức môi trường nuôi cấy thứ hai A2 gồm MS + đường sucroza 30 g/l + thạch 5,5 g/l + nước dừa 150ml/l + chuối xanh 50g/l + dịch chiết nấm men 1g/l. (Thành phần môi trường MS xem hình 11).

- Giá trị pH của môi trường nuôi cấy là 5,6 - 5,8.

- Thời gian cấy chuyển là 4 - 5 tuần. Khi cấy phải loại bỏ mẫu bị nhiễm.

- Tiêu chuẩn chồi sau giai đoạn tạo cụm chồi: Tạo được 15 – 20 chồi/mẫu, các chồi mập, xanh, tốc độ phát triển đồng đều.

Điều kiện nuôi cấy mẫu:

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

- Cường độ chiếu sáng 2000-3000 lux.

- Nhiệt độ phòng nuôi 25-28⁰C.

- Các dụng cụ sử dụng và môi trường nuôi cấy được hấp trong nồi tiết trùng có áp suất 1 atm, nhiệt độ 121⁰C trong 20 phút.

Bước 4: Tạo rễ

- Các chồi lan kim tuyến trong môi trường nhân nhanh có chiều cao khoảng 3 cm, 3 - 4 cặp lá, đồng đều thu được ở bước 3 sẽ được cắt và chuyển sang môi trường tạo rễ để tạo cây hoàn chỉnh (hình 8, 9).

- Dùng dao tách riêng từng chồi, cắt phần gốc già, cắt tỉa bớt lá già.

- Môi trường ra rễ là môi trường thứ ba A3 gồm MS + đường sucroza 30 g/l + than hoạt tính 1g/l + thạch 5 g/l. (Thành phần môi trường MS xem hình 11).

- Giá trị pH của môi trường nuôi cấy là 5,6 - 5,8.

- Sau 3 - 4 tuần tuổi các chồi sẽ ra rễ tạo cây hoàn chỉnh, có thể chuyển xuống nhà lưới để huấn luyện thích nghi.

- Tiêu chuẩn chồi sau giai đoạn ra rễ: Số lượng rễ/cây ≥ 2 rễ, chiều dài rễ ≥ 1 cm, cây con cứng cáp, số lá ≥ 3 , chiều cao cây ≥ 3 .

Bước 5: Cảm ứng cây

Để chuyển cây con từ trong phòng thí nghiệm ra vườn ươm có tỷ lệ sống cao, sinh trưởng tốt, cần cho cây thích nghi dần với điều kiện tự nhiên như sau:

- Chuyển bình lan kim tuyến đã có rễ thu được ở bước 4 ra ngoài ánh sáng tự nhiên trong nhà lưới từ 7-10 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% (hình 10).

- 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 2 tuần khi cây con đạt các chỉ tiêu: Cây con cao ≥ 4 cm, số lá từ 3 – 5, số rễ ≥ 2 rễ, chiều dài rễ $\geq 1,5$ cm có thể rửa thạch và ra ngôi cây.

Theo một phương án, quy trình nhân giống *in vitro* cây lan kim tuyến theo giải pháp hữu ích, trong đó quy trình này khác biệt ở chỗ, thay thế và giảm 1/2-

1/3 hàm lượng các chất điều tiết sinh trưởng nhân tạo bằng các hợp chất hữu cơ có sẵn trong tự nhiên.

Theo một phương án khác, giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình nhân giống *in vitro* cây lan kim tuyến, khác biệt ở chỗ, trong bước tái sinh chồi sử dụng môi trường cơ bản MS có bổ sung các thành phần gồm: đường sucroza 30 g/l, thạch 6 g/l, 150ml/l nước dừa, 1g/l dịch chiết nấm men, tỉ lệ tái sinh chồi của quy trình theo giải pháp hữu ích đạt 100%, chồi khỏe đạt từ 3 lá trở lên.

Theo một phương án khác, quy trình nhân giống *in vitro* cây lan kim tuyến theo giải pháp hữu ích, khác biệt ở chỗ, trong bước tạo cụm chồi sử dụng môi trường MS có bổ sung các thành phần gồm: đường sucroza 30 g/l, 150 ml/l nước dừa, 150g/l chuối xanh, 1g/l dịch chiết nấm men, giúp cho việc nâng cao hệ số nhân chồi lên 15-20 chồi/mẫu, cao hơn gấp hơn 3 lần công trình công bố của GS.TS Nguyễn Quang Thạch khi sử dụng môi trường Knud* có bổ sung các thành phần gồm: 0,5mg/l BA, 0,3mg/l kinetin, 0,3mg/l NAA, 20g/l đường sucroza, 0,5g/l than hoạt tính, 7g thạch/l cho hệ số nhân chồi là 6,5 chồi/mẫu.

Theo một phương án khác, giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình nhân giống *in vitro* cây lan kim tuyến, khác biệt ở chỗ, ở bước tạo rễ sử dụng môi trường MS có bổ sung các thành phần gồm: than hoạt tính 1g/l, 30g/l đường sucroza, 5g/l thạch. Tỉ lệ ra rễ đạt 100% tương đương với công trình nghiên cứu của GS.TS Nguyễn Quang Thạch khi sử dụng môi trường Knud* có bổ sung thành phần gồm 0,5-1,0 mg/l IBA hoặc 1,0mg/l NAA, 20g/l Sucroza, 5% than hoạt tính, 7g thạch/l mà không cần sử dụng chất điều tiết sinh trưởng nhân tạo giá thành cao, ảnh hưởng cho người sử dụng và người tiêu dùng.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Quy trình nhân giống cây lan kim tuyến (*Anoectochilus setaceus* Blume.) bằng nuôi cấy mô theo giải pháp hữu ích được minh họa bằng các ví dụ thực hiện sau đây:

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 cân (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 với các thành phần như được nêu 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 cân (mg)
H ₃ BO ₃	620
MnSO ₄ .16H 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 có thành phần 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 cân (g)
FeSO ₄	2,78
Na ₂ EDTA	3,73

Dung dịch MSV: Thành phần hữu cơ và vitamin. Cân lượng các chất có thành phần như nêu 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 cân (mg)
Myo-Inositol	10000
Thiamine.HCl	10
Pyridoxine.HCl	50
Axit nicotinic	50
Glyxin	200

Tiến hành pha chế môi trường: Mỗi mẻ 3 lít

Phần 1: Cân 16,5 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 sucroza vào cốc đong có dung tích 1lít, đong 60 ml dung dịch MSI, 30 ml mỗi loại của các dung dịch từ MSII đến MSV. Các dịch chiết hữu cơ tùy theo nồng độ của từng loại môi trường mà đong lượng dung dịch thích ứng. Ví dụ đối với môi trường A2 thì đong 150 ml/l nước dừa, 50g/l chuối xanh, 1g/l dịch chiết nấm men. Khuấy tan đều các thành phần, dùng dung dịch NaOH 1N điều chỉnh độ pH = 5,8.

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

Ví dụ 2: Vào mẫu tạo vật liệu vô trùng

- Đoạn thân chứa mắt ngủ của cây trưởng thành tại vườn vật liệu được thu về và khử trùng.

- Thời điểm lấy mẫu: Mẫu được lấy vào buổi sáng khi thời tiết nắng ráo.

- Khử trùng sơ bộ: Gồm các công đoạn sau:

+ Tiến hành cắt bỏ lá và rửa mẫu dưới vòi nước chảy bằng tấm bông.

+ Đoạn thân sau đó được ngâm trong dung dịch chất tẩy rửa nhẹ (nước rửa chén hoặc xà phòng) trong 5 phút.

+ Sau đó rửa sạch dưới vòi nước chảy, tráng lại bằng nước cất vô trùng 3 lần.

- Khử trùng bề mặt:

+ Mẫu được cắt thành từng đoạn dài 2 - 3 cm chứa 1 đến 2 đốt thân

+ Khử trùng bằng cồn 70% trong thời gian 30 giây sau đó tráng lại bằng nước cất vô trùng 3 - 5 lần.

+ Thao tác khử trùng tiến hành hoàn toàn trong hộp cấy vô trùng.

- Khử trùng tinh:

+ Mẫu được khử trùng kép bằng dung dịch HgCl_2 0,1%, lần thứ nhất trong thời gian 6 phút, lần thứ 2 trong thời gian 5 phút.

+ Mẫu được tráng sạch thủy ngân bằng nước cất vô trùng 3 - 5 lần.

Mẫu sau khi được khử trùng cấy lên môi trường nuôi cấy thứ nhất A1 gồm môi trường cơ bản MS có bổ sung một lượng tối ưu các thành phần: đường sucroza 30 g/l, nước dừa 150ml/l, dịch chiết nấm men 1g/l, thạch 5,5 g/l. Trong Bảng 1 dưới đây thể hiện 12 công thức với nồng độ và thời gian khử trùng khác nhau. Trong đó công thức 5 cho tỉ lệ mẫu sống không nhiễm là cao nhất. Từ đó tác giả giải pháp hữu ích chọn dung dịch HgCl_2 0,1% trong thời gian 11 phút là điều kiện khử trùng mẫu cho quy trình này.

Bảng 1. Kết quả ảnh hưởng của hàm lượng, thời gian khử trùng bằng HgCl_2 0,1% đến hiệu quả vô trùng chồi lan kim tuyến

Hóa chất	Công thức (CT)	Thời gian (phút)	Tổng số mẫu (mẫu)	Các chỉ tiêu đánh giá		
				Tỷ lệ mẫu sống (%)	Tỷ lệ mẫu nhiễm (%)	Tỷ lệ mẫu chết (%)
H_2O	CT1(Đ/C)	5	30	0	100	0

Cắt vô trùng	CT2(Đ/C)	10	30	0	100	0
	CT3(Đ/C)	12	30	3,33	90	6,67
HgCl ₂ 0,1%	CT 4	5	30	20	80	0
	CT 5	11	30	80	16,67	3,33
	CT 6	12	30	30	10	70
HgCl ₂ 0,15%	CT 7	5	30	36,67	60	3,33
	CT 8	10	30	70	10	20
	CT 9	12	30	20	3,33	76,67
HgCl ₂ 0,2%	CT 10	5	30	43,33	40	16,67
	CT 11	10	30	60	6,67	33,33
	CT 12	12	30	10	0	90

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

Mẫu sau khi tái sinh từ 4-5 tuần nuôi cấy, sẽ cắt hạ và chuyển sang môi trường tạo cụm chồi gồm MS và nồng độ nước dừa, chuối xanh với nồng độ khác nhau. Bảng 2 và bảng 3 trình bày 10 công thức đã thử nghiệm.

Bảng 2. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của nước dừa đến khả năng nhân chồi cây lan kim tuyến

Công thức	Nồng độ nước dừa (ml/l)	Số chồi nuôi cấy/CT (chồi)	Hệ số nhân (lần)	Chất lượng chồi
CT1 (Đ/C)	0	30	2,37	Mập, xanh nhạt
CT2	50	30	9,5	Mập, xanh đậm
CT3	100	30	10,6	Mập, xanh đậm
CT4	150	30	12,5	Mập, xanh đậm
CT5	200	30	11,6	Mập, xanh nhạt

Sau khi tìm được nồng độ thích hợp của nước dừa, các tác giả giải pháp hữu ích sử dụng nồng độ nước dừa cho hệ số nhân tốt nhất bổ sung thêm dịch chiết chuối xanh để nâng cao hệ số nhân chồi cây lan kim tuyến.

Bảng 3. Kết quả thí nghiệm nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ dịch chiết chuối xanh đến khả năng nhân chồi lan kim tuyến

Công thức	Nồng độ dịch chiết chuối xanh (g/l)	Số chồi nuôi cấy/CT (chồi)	Hệ số nhân (lần)	Chất lượng chồi
CT1(Đ/C)	0	30	14,5	Mập, xanh
CT2	10	30	15,6	Mập, xanh
CT3	50	30	18,4	Mập, xanh
CT4	100	30	15,6	Nhỏ, xanh

Từ các kết quả nêu trên cho thấy, nước dừa sử dụng với nồng độ là 150ml/l kết hợp 50g/l chuối xanh và 1g/l dịch chiết nấm men cho hệ số nhân chồi cao nhất. Môi trường này được ký hiệu là A2 gồm đường sucroza 30 g/l , nước dừa 150ml/l, dịch chiết nấm men 1g/l, chuối xanh 50g/l và thạch 5,5 g/l.

Ví dụ 4: Tạo rễ in vitro

Cụm chồi được tách ra làm 2 phần: Loại cây chiều cao khoảng 3 cm, có từ 3 - 4 cặp lá, đồng đều sẽ được cắt và chuyển sang môi trường tạo rễ là môi trường A3 gồm MS, đường sucroza 30 g/l, than hoạt tính 1g/l, thạch 5g/l giá trị pH của môi trường 5,6-5,8 trong thời gian 3-4 tuần để tạo cây hoàn chỉnh. Đối với loại không có rễ và những khối chồi non thì được cắt nhỏ và cấy lại vào môi trường A2 để xoay vòng nhân nhanh.

Ví dụ 5: Cắm ươm cây

Để chuyển cây con từ trong phòng thí nghiệm ra vườn ươm có tỷ lệ sống cao, sinh trưởng tốt, cần cho cây thích nghi dần với điều kiện tự nhiên như sau:

- Chuyển bình lan kim tuyến đã có rễ ra ngoài ánh sáng tự nhiên từ 7-10 ngày để cây con thích nghi dần. 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 2 tuần khi cây con đạt các chỉ tiêu: Cây con cao ≥ 4 cm, số lá từ 3 – 5, số rễ ≥ 2 rễ, chiều dài rễ $\geq 1,5$ cm có thể rửa thạch và ra ngôi cây.

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Quy trình nhân giống *in vitro* cây lan kim tuyến theo giải pháp hữu ích mỗi năm có thể cho hàng trăm triệu cây con. Đáp ứng nhu cầu cây giống lan kim tuyến trên thị trường và là tiền đề để tạo ra các vùng trồng lan kim tuyến chuyên canh phục vụ sản xuất và bảo chế dược liệu cũng như xuất khẩu sang các nước lân cận. Việc áp dụng quy trình sẽ tạo ra được cây giống ở quy mô lớn không phụ thuộc vào điều kiện khí hậu, cây giống đồng nhất về mặt hình thái và di truyền, đồng thời hoàn toàn sạch bệnh, an toàn cho người sử dụng.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình nhân giống cây lan kim tuyến (*Anoectochilus setaceus* Blume) bằng nuôi cấy mô, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) vào mẫu tạo vật liệu vô trùng: lấy mẫu để nhân giống là những đoạn thân khỏe của lan kim tuyến, không bị sâu bệnh từ những cây mẹ tại vườn giống và khử trùng chúng;

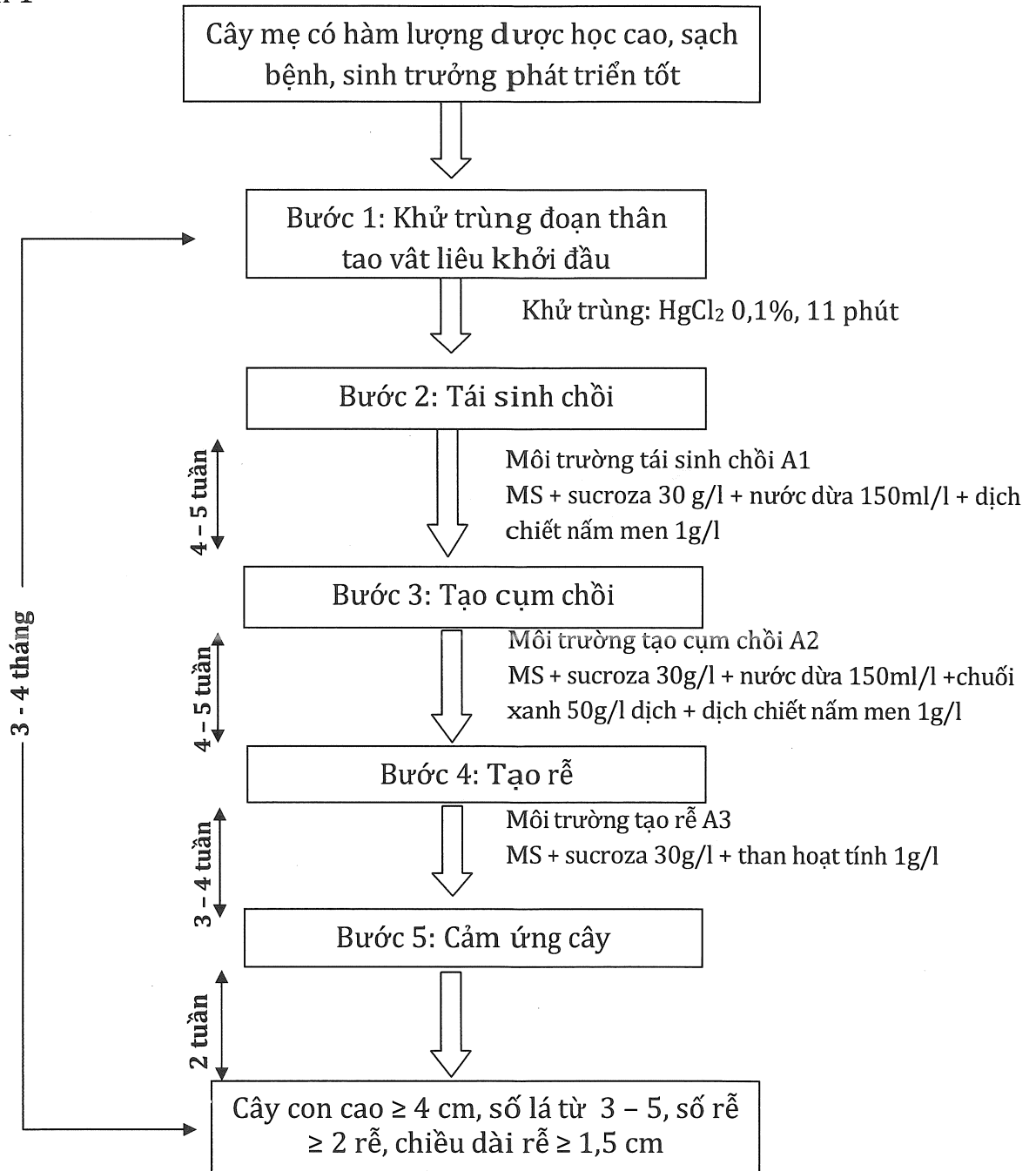
b) tái sinh chồi: cấy từng đoạn thân đã khử trùng từ bước (a) đặt trên bề mặt giấy thấm, đoạn thân được cấy vào môi trường nuôi cấy thứ nhất A1 theo hướng thẳng đứng gồm môi trường cơ bản MS có bổ sung một lượng tối ưu các thành phần: sucroza 30 g/l, nước dừa 150ml/l, dịch chiết nấm men 1g/l, thạch 5,5 g/l, pH nằm trong khoảng 5,6 - 5,8, chiếu sáng trong ngày là 12h/ngày với cường độ chiếu sáng 2000-3000 lux với nhiệt độ phòng nuôi 25-28⁰C, thời gian giai đoạn tái sinh chồi từ 4 - 5 tuần;

c) tạo cụm chồi: cấy chuyển mô thu được từ bước (b) sang môi trường thứ hai A2 gồm có thành phần môi trường cơ bản là MS bổ sung thêm một lượng hữu hiệu các thành phần sau để tạo cụm chồi: đường sucroza 30 g/l, thạch 5,5 g/l, nước dừa 150ml/l, chuối xanh 50g/l, dịch chiết nấm men 1g/l, trong điều kiện độ pH giống như ở bước (b) trong thời gian 4 - 5 tuần;

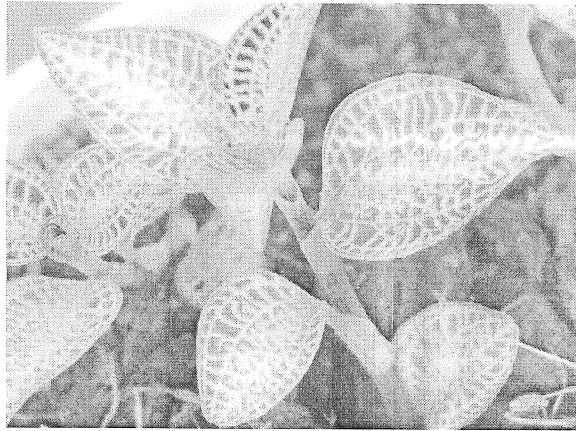
d) tạo rễ: cấy chuyển chồi chưa có rễ thu được từ bước (c) lên môi trường thứ ba A3 để tạo rễ gồm môi trường cơ bản MS có bổ sung đường sucroza 30 g/l, than hoạt tính 1g/l, thạch 5 g/l, giá trị pH của môi trường nuôi cấy là 5,6 - 5,8 trong thời gian từ 3 - 4 tuần tuổi các chồi sẽ ra rễ tạo cây hoàn chỉnh;

e) cảm ứng cây: chuyển lan kim tuyến đã có rễ thu được từ bước (d) ra ngoài ánh sáng tự nhiên trong nhà lưới từ 7-10 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.

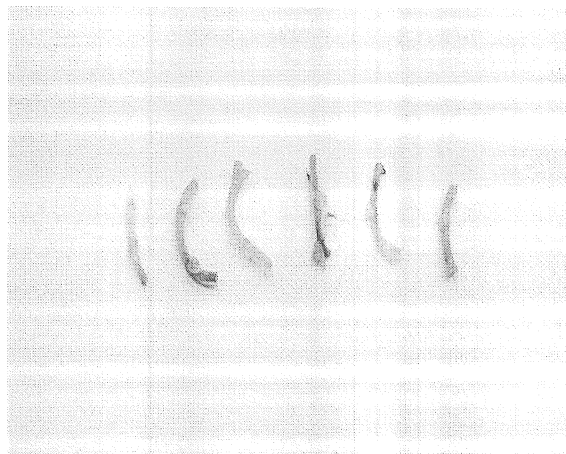
Hình 1



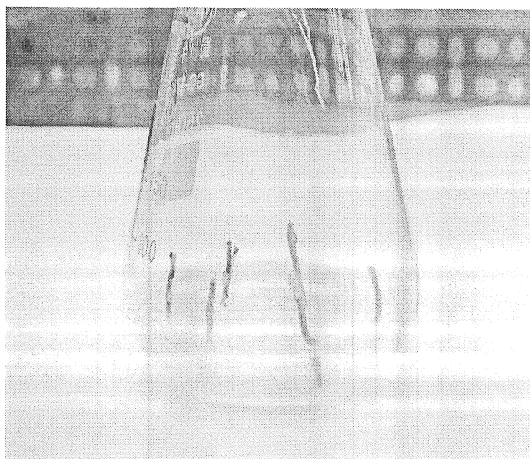
Hình 2



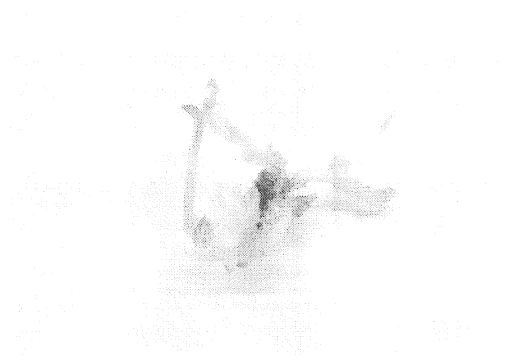
Hình 3



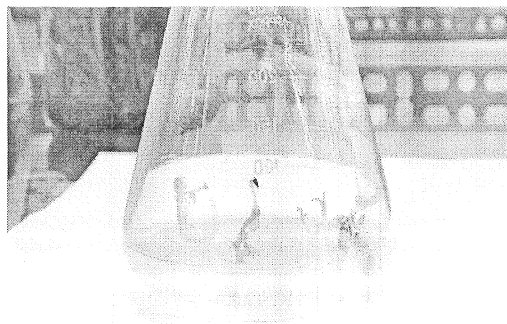
Hình 4



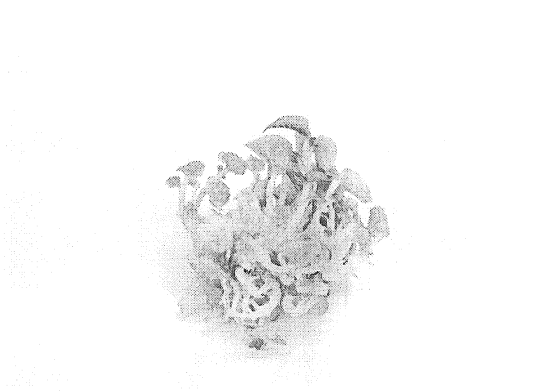
Hình 5



Hình 6



Hình 7

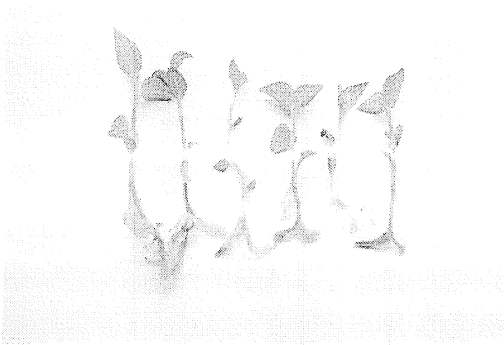


2212

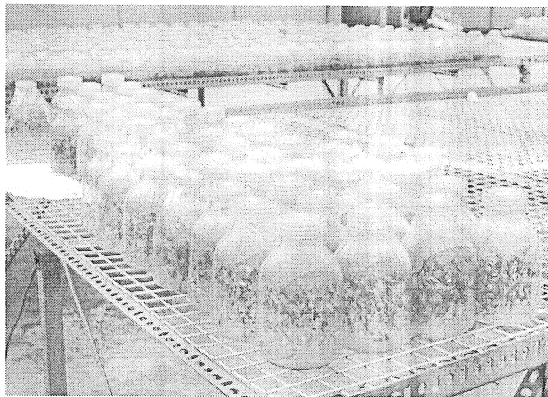
Hình 8



Hình 9



Hình 10



Hình 11

Dung dịch mẹ	Nồng độ (mg/l)	Nồng độ trong dung dịch mẹ (g/200 ml)	Dung tích dùng cho 1 lít môi trường
MSI: KNO ₃	1900	(x10) { 19 1,7 16,5 3,7	{20 ml
KH ₂ PO ₄	170		
NH ₄ NO ₃	1650		
MgSO ₄	370		
MSII: CaCl ₂ .2H ₂ O	440	(x 20) { 6,64	{10 ml
MSIII : H ₃ BO ₃	6,2	0,124	{10 ml
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3	0,338	
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	0,5 { mg	
CuSO ₄ .7H ₂ O	0,025	(x20) { 0,5 mg	
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6	{ 0,213	
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25	5 { mg	
KI	0,83	16,6 mg	
MSIV: FeSO ₄	27,8	0,556	{10 ml
Na ₂ EDTA	37,3	(x20) { 0,746	
MSV: Myo-Inositol	100	2 {	{10 ml
Thiamin.HCl	0,1	2 { mg	
Pyridoxine.HCl	0,5	(x20) { 10 mg	
Axit nicotic	0,5	10 { mg	
Glyxin	2	40 mg	