



(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) 
2-0002220

(51)⁷ **A01H 4/00, A61K 36/00**

(13) **Y**

(21) 2-2019-00258

(22) 14.06.2016

(67) 1-2016-02177

(45) 27.01.2020 382

(43) 25.01.2017 346

(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), Phạm Thị Thảo (VN), Nguyễn Quốc Đông (VN), Nguyễn
Thế Hùng (VN), Nguyễn Thị Tình (VN)**

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

(54) **QUY TRÌNH NHÂN GIỐNG CÂY ĐÌNH LĂNG (POLYSCIAS FRUTICOSA
L.HARMS) BẰNG NUÔI CẤY MÔ**

(57) Sáng chế đề cập đến quy trình nhân giống cây đình lăng (*Polyscias fruticosa* L.Harms) bằng nuôi cấy mô, trong đó quy trình này bao gồm các bước chuẩn bị mẫu, tái sinh chồi, tạo cụm 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 đinh lăng (*Polyscias fruticosa* L.Harms) bằng nuôi cấy mô.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Đinh lăng lá nhỏ (*Polyscias fruticosa* L.Harms) thuộc họ ngũ gia bì (Araliaceae) là loại cây gỗ nhỏ, dạng bụi, cao từ 1 đến 1,5m. Thân nhẵn, màu trắng nhạt, hơi xám. Lá kép ba lần lông chim, mọc so le, dài từ 20 đến 40cm. Lá chét có cuống nhỏ, mảnh, dài từ 3 đến 15cm, dạng màng, phiến lá chét có răng cưa không đều, đôi khi chia thùy, gốc và đầu thuôn nhọn, có chóp nhọn. Hoa nhỏ, màu lục nhạt hoặc trắng xám, có 5 cánh hình trứng thuôn dài từ 2 đến 3mm, có 5 nhị, chỉ nhị ngắn và mảnh. Quả dẹt, hình trứng rộng, màu trắng bạc, dài từ 4 đến 5mm, rộng 3mm và dày từ 1,5 đến 2mm, có vôi tồn tại. Hạt hình thận và hình khối 3 cạnh màu trắng, kích thước dài 3mm, rộng 2mm, dày 1mm, vỏ hạt lõi lõm. Rễ hình củ cà rốt, cong queo, dài từ 15 đến 30cm, đường kính từ 0,5 đến 2,5cm, mặt ngoài màu trắng xám, có nhiều nếp nhăn dọc, nhiều lỗ bì nằm ngang, nhiều vết tích của rễ con và các đoạn rễ còn sót lại. Rễ đinh lăng thường hợp thành một bó rễ củ, thể chất cứng giòn, dễ bẻ gãy, mặt bẻ lõm chỏm, mặt cắt ngang màu vàng, phần gỗ chiếm 2/3 bán kính, các tia ruột từ giữa tỏa ra, mùi thơm nhẹ và vị hơi ngọt.

Ngoài ra, cây đinh lăng lá nhỏ là một loại cây dược liệu có giá trị cao trong ngành y học cổ truyền ở Việt Nam và một số nước trên thế giới. Vỏ, rễ và lá đinh lăng chứa saponin, alkaloid, các vitamin B1, B2, B6, C, 20 axit amin, glycosit, phytosterol, tanin, axit hữu cơ, tinh dầu, nhiều nguyên tố khoáng: K, Mn, Ca, Mg, Fe và 21,10% đường. Hai hợp chất chính và quan trọng nhất trong cây đinh lăng lá nhỏ là polyaxetylen và saponin tripterpen. Trong đó, hợp chất polyaxetylen tách chiết được có tính kháng khuẩn rất mạnh và kháng một số bệnh ung thư, còn hợp chất saponin tripterpen có tác dụng chống stress, chống bệnh trầm cảm và chống oxy hóa rất tốt.

Để góp phần đẩy mạnh việc sử dụng có 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 đinh lăng 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. Cụ thể là, với nhiều tác dụng được học nên hiện nay nhu cầu về giống cây đinh lăng ngày càng lớn. Việc cung cấp cây giống bằng phương pháp giâm hom truyền thống không đủ đáp ứng nhu cầu của thị trường. Trước thực trạng đó, cùng với những lợi ích đã biết của nuôi cấy mô tế bào những năm gần đây có nhiều nghiên cứu về nhân giống *in vitro* cây đinh lăng và đã có nhiều công bố trên nhiều tạp chí.

Tác giả Vũ Hoài Sâm và cộng sự (2005) đã tiến hành nghiên cứu thăm dò khả năng nhân giống *in vitro* cây đinh lăng từ ngọn chồi. Kết quả cho thấy: ngọn chồi cây đinh lăng dài từ 1,0 đến 1,5cm được khử trùng và cấy trên môi trường 1,0mg/l BAP và 0,5mg/l IBA. Chồi bật mầm mới và sinh trưởng tốt sau 8 tuần nuôi cấy và tạo 2 – 3 chồi/mẫu sau 4 tuần tiếp theo. Giai đoạn nhân nhanh, cấy chuyển các chồi đơn *in vitro* vào môi trường có bổ sung 2,0mg/l BA và 0,5mg/l IBA cho tỉ lệ tạo cụm chồi đạt cao nhất $8,87 \pm 1,60$ chồi sau 10 tuần nuôi cấy. 100% cây tạo rễ trên môi trường có bổ sung 1,0mg/l IBA và 0,5mg/l BAP chỉ sau 20 ngày nuôi cấy.

Tác giả Hà Thị Bích Hồng (2013) đã bước đầu nghiên cứu xây dựng được quy trình nhân giống cây đinh lăng lá nhỏ bằng phương pháp nuôi cấy mô tế bào. Sử dụng nguồn vật liệu ban đầu là chồi, qua quá trình khử trùng, sau 2 tuần cho tỷ lệ mẫu sạch tái sinh cao nhất là 73,33%. Các mẫu sạch được tái sinh tốt nhất và nhanh nhất trên môi trường MS có bổ sung BAP 2mg/l và IBA 0,5mg/l. Trong môi trường tạo đa chồi (tăng các chất khoáng đa lượng trong môi trường MS lên 1,5 lần và bổ sung 2mg/l BAP), 100% mẫu cấy tạo đa chồi và số chồi trung bình đạt 7,13 chồi/ mẫu, chất lượng chồi tốt sau 6 tuần nuôi cấy. Công bố này mới chỉ đề cập đến khả năng tạo đa chồi và số lượng chồi tạo được trên một mẫu ban đầu, chưa thấy đề cập đến các kết quả nghiên cứu tạo rễ, do vậy chưa đánh giá được hiệu quả của quá trình nhân giống *in vitro*.

Lê Thị Như Thảo (2014) đã công bố kết quả nhân giống đinh lăng lá nhỏ bằng kỹ thuật nuôi cấy chồi đỉnh. Chồi đỉnh lăng được khử trùng bằng nước javen nồng độ 75% trong 15 phút, cho mẫu vô trùng đạt 70,17% và tỷ lệ tạo chồi đạt 55,26%. Môi trường thích hợp cho nhân nhanh chồi *in vitro* là LV có bổ sung BA (0,3mg/l) và sucroza (30g/l) cho hình thành 4,36 chồi/mẫu. Môi trường

LV có bổ sung IBA (0,3mg/l) và sucroza (30g/l) cho nuôi cấy tạo rễ đạt tỷ lệ 50,18%, có số lượng rễ 1,39 rễ/chồi.

Từ các công trình nghiên cứu trên chúng tôi nhận thấy các kết quả công bố là tương đối khác nhau. Nhưng đều có điểm chung là việc 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 các chất này trong cây.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Do đó, mục đích của sáng chế là đề xuất giải pháp để giải quyết các vấn đề nêu trên. Để đạt được mục đích đó, sáng chế đề cập đến quy trình nhân giống cây đinh lăng (*Polyscias fruticosa* L.Harms) bằng nuôi cấy mô, trong đó quy trình này có bước sử dụng nước dừa và sử dụng chất kích thích sinh trưởng nhân tạo với hàm lượng giảm còn 1/2 – 1/3 hàm lượng chất kích thích sinh trưởng nhân tạo đã được bộc lộ trong phần tình trạng kỹ thuật ở giai đoạn nhân nhanh mà vẫn cho hệ số nhân chồi từ 8 đến 10 chồi/mẫu. Theo một khía cạnh khác, quy trình nhân giống theo sáng chế, khác biệt ở chỗ, ở bước ra rễ tạo cây hoàn chỉnh đã kết hợp chất điều tiết kích thích sinh trưởng tổng hợp nhân tạo với hợp chất hữu cơ có trong tự nhiên cho tỷ lệ ra rễ đạt 100%, chất lượng cây con sinh trưởng tốt, đồng thời quy trình theo sáng chế có tính an toàn cho người sử dụng và hướng tới việc tạo ra nguồn dược liệu sạch.

Cụ thể, sáng chế đề cập đến quy trình nhân giống *in vitro* cây đinh lăng (*Polyscias fruticosa* L.Harms) bằng nuôi cấy mô, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

i) chuẩn bị mẫu: lấy mẫu ở các đoạn thân bánh tẻ dài từ 8 đến 10cm từ cây đinh lăng mẹ 6 đến 12 tháng tuổi vào thời điểm buổi sáng khi thời tiết nắng ráo; rửa mẫu dưới vòi nước và ngâm trong dung dịch chất tẩy nhẹ (nước rửa chén hoặc xà phòng) trong 5 phút; rửa sạch dưới vòi nước chảy, tráng lại 3 lần bằng nước cất vô trùng; tiếp đó khử trùng bề mặt mẫu bằng cách cắt mẫu thành từng đoạn dài từ 2 đến 4cm chứa từ 1 – 2 mắt ngủ, và dùng 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 cấy vô trùng; tiếp đó khử trùng kép bằng

HgCl₂ 0,1%, lần thứ nhất trong thời gian 9 phút, lần thứ 2 trong thời gian 7 phút, mẫu được tráng sạch thủy ngân bằng nước cất vô trùng từ 3 đến 5 lần;

ii) tái sinh chồi: gắp từng đoạn thân đã khử trùng thu được ở bước i) đặt trên bề mặt giấy thấm; sau đó cắt từng đoạn mẫu có ít nhất 1 mắt ngủ, loại bỏ phần gốc ở từng đoạn thân để hóa chất khử trùng không ngấm sâu vào mẫu vật, cấy mẫu vào môi trường nuôi cấy là môi trường MS có bổ sung sucroza 20g/l, BA 1mg/l, nước dừa 100ml/l và thạch 5g/l, theo hướng thẳng đứng, duy trì độ pH của môi trường nuôi cấy nằm trong khoảng từ 5,6 đến 5,8, duy trì thời gian giai đoạn tái sinh chồi từ 3 đến 4 tuần (các hình 4 và 5);

iii) tạo cụm chồi: chọn chồi có chiều cao từ 2 đến 3cm sau bước tái sinh ii) ở trên, tiến hành cắt chồi và xiết chồi đỉnh, cấy chồi theo hướng thẳng đứng với mật độ cấy là 1 chồi/bình vào môi trường nhân nhanh để tạo cụm chồi có là môi trường MS có bổ sung sucroza 30g/l, kinetin 0,5mg/l, IAA 0,3mg/l, nước dừa 100ml/l và thạch 5g/l, 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 3 đến 4 tuần (các hình 6 và 7) với điều kiện cường độ chiếu sáng nằm trong khoảng từ 2000 đến 3000 lux, duy trì nhiệt độ nằm trong khoảng từ 25 đến 28°C và thời gian chiếu sáng trong ngày là 12h/ngày;

iv) tạo rễ: chọn các chồi đỉnh lã đạt chiều cao lớn hơn hoặc bằng 2cm, cây thẳng, cứng cáp, có từ 3 – 4 lá thu được từ bước iii) chuyển sang môi trường tạo rễ có các thành phần bao gồm IBA 0,5mg/l, nước dừa 100ml/l và thạch 5g/l, trong đó chồi đỉnh lã được cấy theo hướng thẳng đứng vào môi trường tạo rễ với số lượng 15 chồi/ bình (bình trụ thể tích 250ml), duy trì độ pH của môi trường tạo rễ nằm trong khoảng từ 5,6 đến 5,8, sau 3 tuần, cây cứng cáp chuyển cây sang bước cảm ứng cây v) để làm quen với điều kiện tự nhiên (hình 8);

v) cảm ứng cây: chuyển bình đỉnh lã đã ra rễ thu được ở bước iv) ra ngoài ánh sáng tự nhiên trong nhà lưới trong thời gian từ 7 đến 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 9); tiến hành mở 30% nắp bình để cây con thích nghi dần dần với độ ẩm của không khí, sau từ 2 đến 3 ngày thì mở 100% nắp bình để cây con thích nghi hoàn toàn với nhiệt độ và độ ẩm của môi trường (hình 10); khi cây con đạt các chỉ tiêu: cây con cao từ 3 đến 5cm, số lá từ 4 đến 6 lá, số rễ lớn hơn hoặc bằng 7, chiều dài rễ lớn hơn hoặc bằng 3 cm thu được cây con giống đạt yêu cầu.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 thể hiện sơ đồ quy trình nhân giống *in vitro* cây đỉnh lăng.

Hình 2 là ảnh chụp vườn giống gốc đỉnh lăng.

Hình 3 là ảnh chụp mẫu đoạn thân cây đỉnh lăng lá nhỏ.

Hình 4 là ảnh chụp mẫu sau khi khử trùng được cấy trên môi trường vào mẫu.

Hình 5 là ảnh chụp mẫu tái sinh sau 4 tuần nuôi cấy.

Hình 6 là ảnh chụp mẫu đỉnh lăng giai đoạn tạo đa chồi sau 2 tuần tuổi.

Hình 7 là ảnh chụp mẫu đỉnh lăng giai đoạn tạo đa chồi sau 3 tuần tuổi.

Hình 8 là ảnh chụp mẫu cây đỉnh lăng đủ điều kiện ra ngôi.

Hình 9 là ảnh chụp cây đỉnh lăng giai đoạn (cảm ứng ánh sáng, nhiệt độ, hàm ẩm).

Hình 10 là ảnh chụp rễ cây đỉnh lăng sau cảm ứng 15 ngày.

Hình 11 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 đỉnh lăng.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến quy trình nhân giống cây đỉnh lăng (*Polyscias fruticosa* L.Harms) bằng nuôi cấy mô, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

i) Chuẩn bị mẫu

Nguồn mẫu được thu thập tại Vườn quốc gia Tam Đảo, trồng khảo nghiệm và chọn lọc tại Viện nghiên cứu và phát triển Lâm nghiệp – Đại học Nông lâm Thái Nguyên (hình 2).

Cây mẹ sử dụng lấy mẫu phải đạt các chỉ tiêu sinh trưởng phát triển tốt, không bị sâu bệnh, có độ tuổi từ 6 – 12 tháng, hàm lượng dược học cao (hàm lượng của hợp chất polyaxetylen và saponin tripterpen cao).

Lựa chọn mẫu: Mẫu đỉnh lăng sử dụng là các đoạn thân bánh tẻ dài 8 – 10cm lấy từ cây mẹ (6 – 12 tháng tuổi). Thời điểm lấy mẫu: Mẫu được cắt vào buổi sáng khi thời tiết nắng ráo.

Khử trùng sơ bộ:

+ Đoạn thân được cắt bỏ lá già và bóc bẹ để lộ ra phần mắt ngủ. Tiến hành rửa mẫu dưới vòi nước.

+ Mẫu 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.

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

Khử trùng bề mặt:

+ Mẫu được cắt thành từng đoạn dài 2 – 4cm 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.

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

Khử trùng tinh:

+ Mẫu được khử trùng kép bằng HgCl_2 0,1%, lần thứ nhất trong thời gian 9 phút, lần thứ 2 trong thời gian 7 phút.

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

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

Tiêu chuẩn của mẫu sau khi khử trùng (hình 3): Mẫu sạch nấm bệnh (tỷ lệ mẫu sạch đạt từ 87% trở lên), sức sống của mẫu đảm bảo (tỷ lệ mẫu sống đạt 90% trở lên).

ii) Tái sinh chồi

Dùng panh gấp từng đoạn thân đã khử trùng đặt trên bề mặt giấy thấm. Thao tác cắt từng đoạn mẫu có ít nhất 1 mắt ngủ. Loại bỏ phần gốc ở từng đoạn thân để hóa chất khử trùng không ngấm sâu vào mẫu vật. Mẫu được cấy vào môi trường nuôi cấy theo hướng thẳng đứng. Công thức môi trường nuôi cấy: môi trường MS có bổ sung sucroza 20g/l, BA 1mg/l, nước dừa 100ml/l và thạch 5g/l. (Thành phần môi trường MS xem tại Hình 11). Giá trị độ pH của môi trường nuôi cấy là 5,6 – 5,8. Thời gian giai đoạn tái sinh chồi từ 3 – 4 tuần (các hình 4 và 5).

Tiêu chuẩn của mẫu sau tái sinh: Mẫu bật chồi sau nuôi cấy 2 – 3 tuần, chồi khỏe có từ 1 – 2 lá trở lên, tỷ lệ mẫu tái sinh đạt 95%, 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) Tạo cụm chồi

Lựa chọn chồi có chiều cao 2 – 3cm sau giai đoạn tái sinh, cắt chồi và xiết chồi đỉnh sau đó cấy vào môi trường nhân nhanh tạo cụm chồi.

Chồi được cấy thẳng đứng, cấy 1 chồi/bình (bình thể tích 250ml).

Công thức môi trường nhân nhanh là môi trường MS có bổ sung sucroza 30g/l, Kinetin 0,5mg/l, IAA 0,3mg/l, nước dừa 100ml/l và thạch 5 g/l (Thành phần môi trường MS xem tại Hình 11). Giá trị độ pH của môi trường nuôi cấy là 5,6 – 5,8. Thời gian cấy chuyển là 3 – 4 tuần (các hình 6 và 7). Tiêu chuẩn chồi sau giai đoạn tạo cụm chồi: tạo được 8 – 10 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 25-28°C.

- Các dụng cụ sử dụng và môi trường nuôi cấy được hấp trong nồi khử trùng có áp suất 1atm, nhiệt độ 121°C trong 20 phút.

iv) Tạo rễ

Các chồi đỉnh lăng đạt chiều cao $\geq 2\text{cm}$, cây thẳng, cứng cáp, có từ 3 – 4 lá được chuyển sang môi trường tạo rễ. Dùng dao tách riêng từng chồi, cắt tỉa bớt lá già, lá vàng. Chồi đỉnh lăng được cấy theo hướng thẳng đứng vào môi trường tạo rễ với số lượng 15 chồi/ bình (bình trụ thể tích 250ml). Công thức môi trường tạo rễ là môi trường MS có bổ sung IBA 0,5mg/l, nước dừa 100ml/l và thạch 5 g/l (Thành phần môi trường MS xem tại Hình 11). Giá trị độ pH của môi trường nuôi cấy là 5,6 – 5,8. Thời gian xuất hiện rễ từ 2 – 3 tuần sau khi cấy chồi vào môi trường tạo rễ. Sau 3 tuần rễ dài, cây cứng cáp có thể đưa cây ra cảm ứng dần với điều kiện tự nhiên (hình 8).

Tiêu chuẩn chồi sau giai đoạn ra rễ: Số lượng rễ/cây ≥ 4 rễ, chiều dài rễ $\geq 2\text{cm}$, cây con cứng cáp.

v) 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 đỉnh lăng đã ra rễ 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 9). 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 10). Sau 2 tuần khi cây con đạt các chỉ tiêu: Cây con cao 3 – 5cm, số lá từ 4 – 6 lá, số rễ ≥ 7 rễ, chiều dài rễ ≥ 3 cm có thể ra ngôi cây.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến quy trình nhân giống *in vitro* cây đình lăng, khác biệt ở chỗ, quy trình này bao gồm bước sử dụng môi trường MS nuôi cấy, đồng thời 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 như nước dừa có tác động đến kích thích sự phân bào. Do trong nước dừa có các hợp chất dinh dưỡng như đường, vitamin và chất thích sinh trưởng đặc biệt là có chứa Zeatin. Zeatin có trong nước dừa hoạt tính cao hơn kinetin tổng hợp nhân tạo từ 10 – 100 lần.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến quy trình nhân giống *in vitro* cây đình lăng, khác biệt ở chỗ, trong bước tái sinh chồi sử dụng môi trường có các thành phần là môi trường MS có bổ sung 20g/l sucroza, 1mg/l BA, 100ml/l nước dừa và 5g/l thạch, trong đó tỉ lệ tái sinh chồi thu được theo quy trình của sáng chế đạt 95%, cao hơn công trình công bố của tác giả Hà Thị Bích Hồng (mẫu tái sinh đạt 73,33%) khi sử dụng môi trường chỉ bổ sung chất kích thích sinh trưởng nhân tạo có các thành phần bao gồm môi trường MS có bổ sung 2mg/l BAP, 0,5mg/l IBA, 30g/l đường, và cao hơn công bố của tác giả Lê Thị Như Thảo (mẫu tái sinh đạt 52,26%) khi sử dụng môi trường có các thành phần bao gồm môi trường LV có bổ sung 0,3mg/l BA và 30g/l sucroza.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến quy trình nhân giống *in vitro* cây đình lăng, khác biệt ở chỗ, trong bước tạo cụm chồi sử dụng môi trường có các thành phần bao gồm môi trường MS có bổ sung 30g/l sucroza, 0,5mg/l kinetin, 100ml/l nước dừa, 0,3mg/l IAA và 5g/l thạch, trong đó quy trình này đã nâng cao hệ số nhân chồi lên 8 – 10 chồi/mẫu, tương đương với hệ số nhân chồi trong công bố của tác giả Vũ Hoài Sâm và cộng sự ($8,87 + 1,6$ chồi) khi sử dụng môi trường có các thành phần bao gồm môi trường MS có bổ sung 2mg/l BA, 0,5mg /l IBA và 30g/l sucroza. Tức là, cao hơn gấp hơn 2 lần công trình công bố của tác giả Lê Thị Như Thảo khi sử dụng môi trường có các thành phần bao gồm môi trường LV có bổ sung 0,3mg/l BA và đường 30g/l. Cao hơn hệ số nhân chồi của tác giả Hà Thị Bích Hồng (7,13 chồi/mẫu) khi sử dụng môi trường bao gồm môi trường MS có bổ sung 2mg/l BAP.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến quy trình nhân giống *in vitro* cây đình lăng, khác biệt ở chỗ, trong bước tạo rễ sử dụng môi trường có

các thành phần bao gồm môi trường MS có bổ sung 30g/l sucroza, 0,5mg/l IBA, 100ml/l nước dừa và 5g/l thạch, trong đó tỉ lệ ra rễ đạt 100% tương đương với công trình nghiên cứu của Vũ Hoài Sâm và cộng sự khi sử dụng môi trường có các thành phần bao gồm môi trường MS có bổ sung 1,0 mg/l IBA và 0,5mg/l BAP. Như vậy, lượng chất kích thích sinh trưởng cần dùng đã giảm 1 nửa và được thay thế bằng hợp chất hữu cơ tự nhiên mà vẫn thu được hiệu quả mong muốn. Ngoài ra, tỉ lệ ra rễ của cây giống theo quy trình của sáng chế cao gấp đôi công trình nghiên cứu của Lê Thị Như Thảo khi sử dụng môi trường có các thành phần bao gồm môi trường LV có bổ sung 0,3mg/l IBA và 30g/l đường.

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* đỉnh lã lá nhỏ (*Polyscias fruticosa* L. Harms) 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 tóm tắt ở dưới đây.

BA	: Benzin adenin
BAP	: 6-Benzylaminopurin
Cồn	: C ₂ H ₅ OH
CT	: Công thức
HgCl ₂	: Thủy ngân clorua (Mereurric chloride)
IAA	: Axit indol-3-axetic (Indole-3-acetic acid)
IBA	: Axit indol butyric (Indole butyric acid)
Kinetin	: 6-Furfurylaminopurin
LV	: Lilvay
MS	: Murashige and Skoog's
NAA	: Axit α - naphlen axetic (α - Naphlene axetic acid)
NaOH	: Natri hydroxit
NaOCl	: Natri hypoclorua (Natri hypochloride)

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 và 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
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 nguấy 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 đong sạch, nhỏ từ từ từng giọt NaOH 1N nguấy 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 IAA: Cân 50mg IAA cho vào cốc đong sạch, nhỏ từ từ từng giọt NaOH 1N nguấy 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 IBA: Cân 50mg IBA cho vào cốc đong sạch, nhỏ từ từ từng giọt NaOH 1N nguấy 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.

– 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 200ml và bảo quản trong tủ đá.

Tiến hành pha chế môi trường: Mỗi mẻ 3 lít

Phần 1: Cân 15g 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 1 lít, đong 60ml dung dịch MSI, 30ml mỗi loại của các dung dịch từ MSII đến MSV nêu trên. Các dung dịch BA, kinetin, IAA và IBA tùy theo nồng độ của từng loại môi trường mà đong lượng dung dịch thích ứng. Ví dụ khi pha 3 lít môi trường tạo cụm chồi (môi trường A2) có công thức MS + sucroza 30g/l + Kinetin 0,5mg/l + IAA 0,3mg/l + nước dừa 100ml/l + thạch 5g/l thì đong 1,5ml/l kinetin và 0,9

ml/l IAA, 300ml/l nước dừa. 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: Khử trùng đoạn thân tạo vật liệu khởi đầu

- Mẫu định lăng sử dụng là các đoạn thân bánh tẻ dài 8 – 10cm được lấy từ cây mẹ tại vườn giống gốc. Mẫu được cắt vào buổi sáng khi thời tiết nắng ráo.

- Khử trùng sơ bộ:

- + Đoạn thân được cắt bỏ lá già và bóc bỏ để lộ ra phần mắt ngủ. Tiến hành rửa mẫu dưới vòi nước.

- + Mẫu sau đó được ngâm trong dung dịch chất tẩy nhẹ 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 – 4cm 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.

- + Thao tác khử trùng bề mặt tiến hành hoàn toàn trong điều kiện cấy vô trùng

- Khử trùng tinh: Thao tác khử trùng tiến hành hoàn toàn trong môi trường cấy vô trùng.

- + Mẫu được khử trùng kép bằng HgCl_2 0,1%, lần thứ nhất trong thời gian 9 phút, lần thứ 2 trong thời gian 7 phút.

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

Bảng 1 trình bày 8 công thức: nghiên cứu ảnh hưởng của thời gian khử trùng bằng 2 hợp chất NaClO 1%, HgCl_2 0,1% đến hiệu quả vô trùng nuôi cấy chồi định lăng. Qua bảng có thể thấy ở công thức số 7 cho hiệu quả khử trùng là 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 NaClO 1%, HgCl₂ 0,1% đến hiệu quả vô trùng vật liệu nuôi cấy chồi đỉnh lãng (*Polyscias fruticosa* L. Harms)

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 (%)
NaClO (1%)	1(Đ/C)	0	60	0	100	0
	2	5	60	0	81,67	18,33
	3	10	60	0	38,33	61,67
	4	9+7	60	6,8	29,4	63,8
HgCl ₂ (0,1%)	5	0	60	0	100	0
	6	5	60	3,5	21,67	74,83
	7	9+7	60	9,8	12,9	77,3
	8	12	60	81,67	0	18,33

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

Những chồi cao từ 2 – 3cm sau giai đoạn tái sinh sẽ cắt hạ, dùng dao nhọn xiết chồi đỉnh và cấy chuyển sang môi trường tạo cụm chồi bao gồm môi trường MS và chất kích thích sinh trưởng và nước dừa. Bảng 2 dưới đây thể hiện 22 công thức (CT) đã thử nghiệm để nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ chất kích thích sinh trưởng và dịch chiết hữu cơ đến khả năng tạo cụm chồi của cây đỉnh lãng. Qua bảng này, có thể thấy ở công thức số 19 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 đinh lăng lá nhỏ (*Polyscias fruticosa* L. Harms)

CT	Thành phần cơ bản	Nồng độ chất kích thích sinh trưởng, dịch chiết hữu cơ bổ sung	Tạo cụm chồi
1	MS + sucroza 30g/l + thạch 5g/l	0 mg/l BA	
2		1mg/l BA	+
3		1,5 mg/l BA	+
4		2 mg/l BA	+
5		2,5 mg/l BA	++
6		3 mg/l BA	++
7		0 mg/l kinetin	
8		0,5mg/l kinetin	++
9		1mg/l kinetin	+
10		1,5 mg/l kinetin	+
11		2 mg/l kinetin	+
12		2,5 mg/l kinetin	+
13		3 mg/l kinetin	+
14		0,5mg/l kinetin+ 0,1 mg/l IAA	+
15		0,5mg/l kinetin + 0,2 mg/l IAA	++
16		0,5mg/l kinetin+0,3 mg/l IAA	++
17		0,5mg/l kinetin+ 0,4mg/l IAA	++
18		0,5mg/l kinetin+ 0,5 mg/l IAA	+
19		0,5mg/l kinetin + 0,3 IAA + 100 ml/l nước dừa	+++
20		0,5mg/l kinetin+ 0,3 IAA + 100g/l chuối xanh	+
21		0,5 mg/l kinetin + 0,3 IAA + 100g/l cà rốt	+
22		0,5mg/l kinetin + 0,3 IAA + 100 g/l khoai tây	++

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 19 cho mục đích nhân cụm chồi (sau đây môi trường này ký hiệu là A2).

Ví dụ 4: Tạo rễ *in vitro*

Cụm chồi từ môi trường A2 được tách ra làm 2 phần: Loại cây chiều cao khoảng 3cm, 3 – 4 cặp lá, đồng đều sẽ được cắt và chuyển sang môi trường tạo rễ MS + 30g/l đường + 0,5mg/l IBA + 100ml/l nước dừa để tạo cây hoàn chỉnh, loại không có rễ và những khối chồi non được cắt nhỏ và cấy lại vào môi trường A2 để xoay vòng nhân nhanh.

Ví dụ 5: Cảm ứng cây

Chuyển bình đỉnh lã đã có rễ 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 phải che lưới đen với độ che sáng 50%.

Tiến hành, 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 3 – 5cm, số lá từ 4 – 6 lá, số rễ ≥ 7 rễ, chiều dài rễ ≥ 3 cm có thể ra ngôi cây.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Quy trình nhân giống *in vitro* cây đỉnh lã theo sáng chế có thể tạo ra hàng trăm triệu cây con. Đáp ứng nhu cầu cây giống đỉnh lã trên thị trường và là tiền đề để tạo ra các vùng trồng đỉnh lã 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 đinh lăng (*Polyscias fruticosa* L.Harms) bằng nuôi cấy mô, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

i) chuẩn bị mẫu: lấy mẫu ở các đoạn thân bánh tẻ dài từ 8 đến 10cm từ cây đinh lăng mẹ 6 đến 12 tháng tuổi vào thời điểm buổi sáng khi thời tiết nắng ráo; rửa mẫu dưới vòi nước và ngâm trong dung dịch chất tẩy nhẹ (nước rửa chén hoặc xà phòng) trong 5 phút; rửa sạch dưới vòi nước chảy, tráng lại 3 lần bằng nước cất vô trùng; tiếp đó khử trùng bề mặt mẫu bằng cách cắt mẫu thành từng đoạn dài từ 2 đến 4cm chứa từ 1 – 2 mắt ngủ, và dùng 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 cấy vô trùng; tiếp đó khử trùng kép bằng HgCl_2 0,1%, lần thứ nhất trong thời gian 9 phút, lần thứ 2 trong thời gian 7 phút, sau đó mẫu được tráng sạch thủy ngân bằng nước cất vô trùng từ 3 đến 5 lần;

ii) tái sinh chồi: gắp từng đoạn thân đã khử trùng thu được ở bước i) đặt trên bề mặt giấy thấm; sau đó cắt từng đoạn mẫu có ít nhất 1 mắt ngủ, loại bỏ phần gốc ở từng đoạn thân để hóa chất khử trùng không ngấm sâu vào mẫu vật, cấy mẫu vào môi trường nuôi cấy là môi trường MS có bổ sung sucroza 20g/l, BA 1mg/l, nước dừa 100ml/l và thạch 5g/l, theo hướng thẳng đứng, duy trì độ pH của môi trường nuôi cấy nằm trong khoảng từ 5,6 đến 5,8, duy trì thời gian giai đoạn tái sinh chồi từ 3 đến 4 tuần;

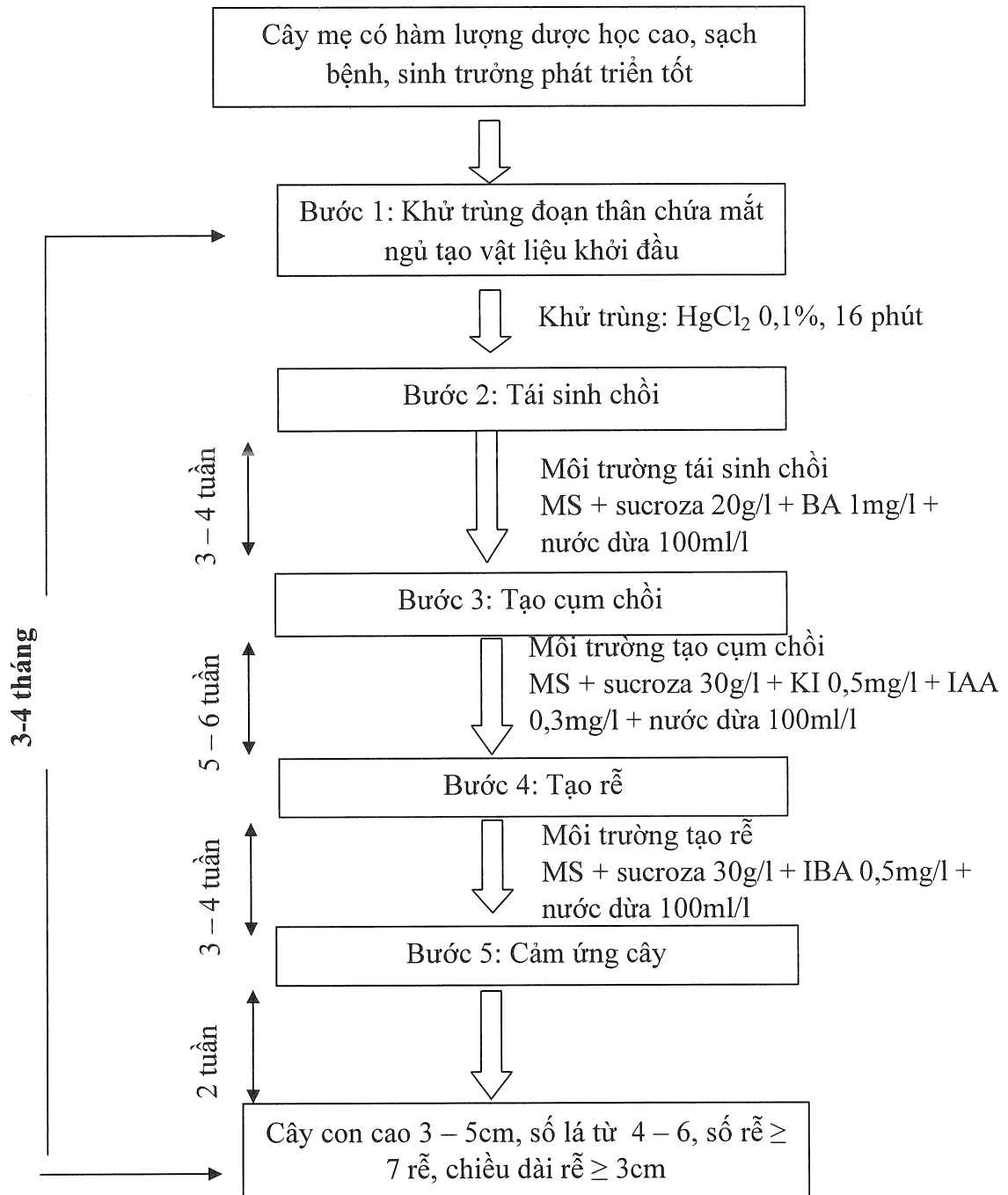
iii) tạo cụm chồi: chọn chồi có chiều cao từ 2 đến 3cm thu được từ bước tái sinh ii) ở trên, tiến hành cắt chồi và xiết chồi đỉnh, cấy chồi theo hướng thẳng đứng với mật độ cấy là 1 chồi/bình vào môi trường nhân nhanh để tạo cụm chồi là môi trường MS có bổ sung sucroza 30g/l, kinetin 0,5mg/l, IAA 0,3mg/l, nước dừa 100ml/l và thạch 5g/l, 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 3 đến 4 tuần với điều kiện cường độ chiếu sáng nằm trong khoảng từ 2000 đến 3000 lux, duy trì nhiệt độ nằm trong khoảng từ 25 đến 28°C và thời gian chiếu sáng trong ngày là 12h/ngày;

iv) tạo rễ: chọn các chồi đinh lăng đạt chiều cao lớn hơn hoặc bằng 2cm, cây thẳng, cứng cáp, có từ 3 – 4 lá thu được từ bước iii) chuyển sang môi trường tạo rễ là môi trường MS có bổ sung IBA 0,5mg/l, nước dừa 100ml/l và thạch 5g/l, trong đó chồi đinh lăng được cấy theo hướng thẳng đứng vào môi trường tạo rễ

với số lượng 15 chồi/ bình (bình trụ thể tích 250ml), duy trì độ pH của môi trường tạo rễ nằm trong khoảng từ 5,6 đến 5,8, sau 3 tuần, cây cứng cáp chuyển cây sang bước cảm ứng cây v) để làm quen dần với điều kiện tự nhiên;

v) cảm ứng cây: chuyển bình định lăng đã ra rễ thu được ở bước iv) ra ngoài ánh sáng tự nhiên trong nhà lưới trong thời gian từ 7 đến 10 ngày để cây con thích nghi dần với điều kiện tự nhiên, nếu thời tiết nắng cần thiết phải che lưới đen với độ che sáng 50% ; tiến hành mở 30% nắp bình để cây con thích nghi dần dần với độ ẩm của không khí, sau từ 2 đến 3 ngày thì mở 100% nắp bình để cây con thích nghi hoàn toàn với nhiệt độ và độ ẩm của môi trường; khi cây con đạt các chỉ tiêu: cây con cao từ 3 đến 5cm, số lá từ 4 đến 6 lá, số rễ lớn hơn hoặc bằng 7, chiều dài rễ lớn hơn hoặc bằng 3cm thu được cây con giống đạt yêu cầu.

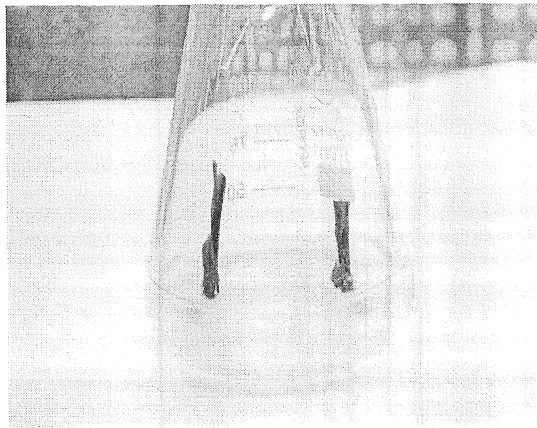
Hình 1



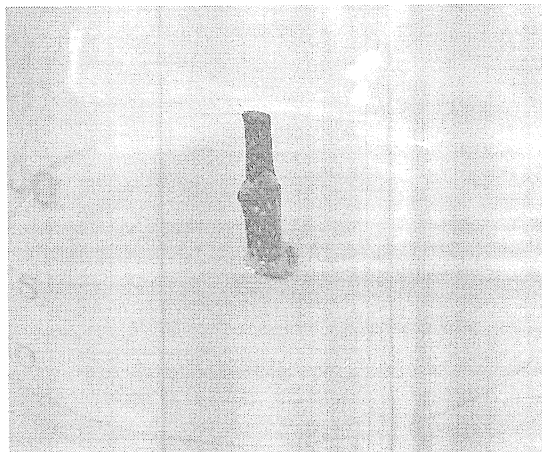
Hình 2



Hình 3



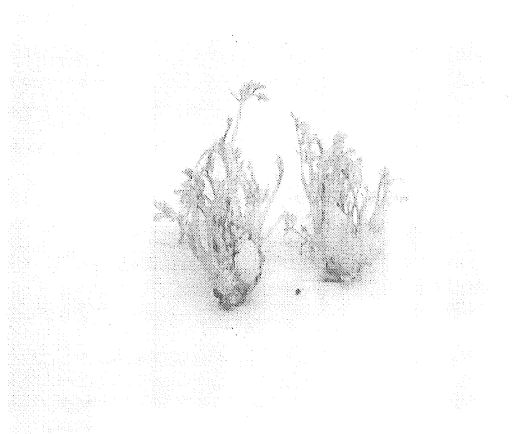
Hình 4



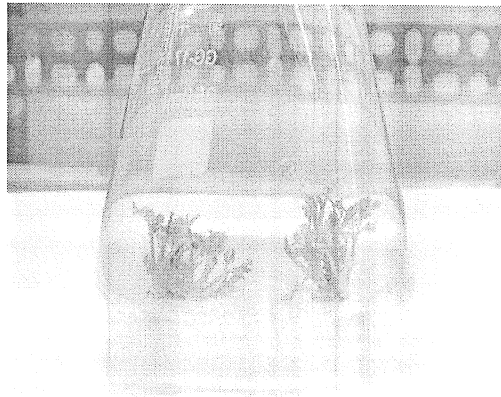
Hình 5



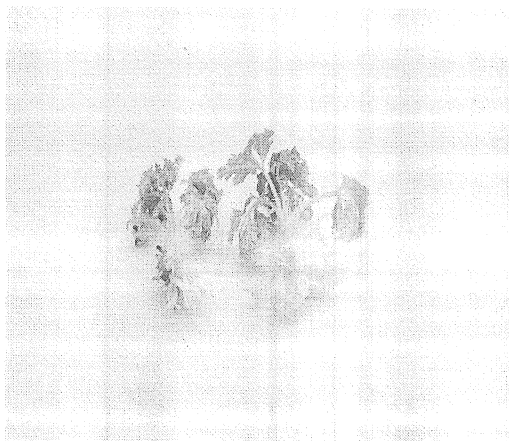
Hình 6



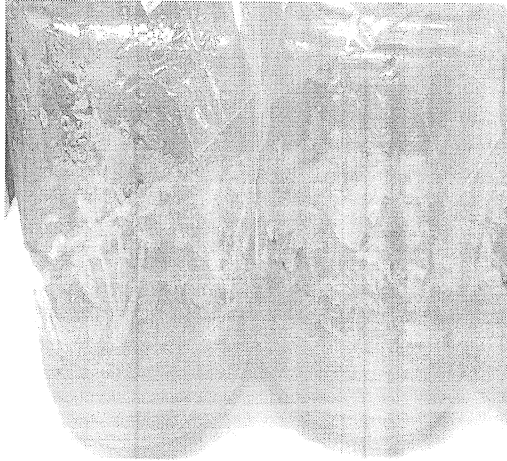
Hình 7



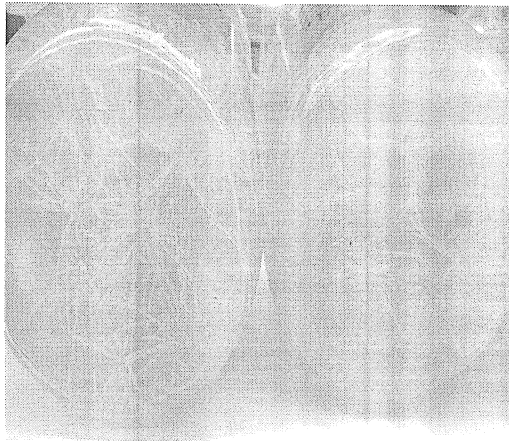
Hình 8



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
MS1: KNO ₃ KH ₂ PO ₄ NH ₄ NO ₃ MgSO ₄	1900 170 1650 370	(x10) $\left\{ \begin{array}{l} 19 \\ 1,7 \\ 16,5 \\ 3,7 \end{array} \right.$	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) $\left\{ \begin{array}{l} 0,124 \\ 0,338 \\ 0,5 \times 10^{-3} \\ 0,5 \times 10^{-3} \\ 0,213 \\ 5 \times 10^{-3} \\ 16,6 \times 10^{-3} \end{array} \right.$	10ml
MS4: FeSO ₄ Na ₂ EDTA	27,8 37,3	(x20) $\left\{ \begin{array}{l} 0,556 \\ 0,746 \end{array} \right.$	10ml
MS5: Myo-Inositol Thiamine.HCl Pyridoxine.HCl Acid nicotic Glycine	100 0,1 0,5 0,5 2	(x20) $\left\{ \begin{array}{l} 2 \\ 2 \times 10^{-3} \\ 10 \times 10^{-3} \\ 10 \times 10^{-3} \\ 40 \times 10^{-3} \end{array} \right.$	10ml