



(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)



2-0002339

(51)⁷ **A01H 4/00**

(13) **Y**

(21) 2-2019-00455

(22) 18/10/2016

(67) 1-2016-03943

(45) 25/06/2020 387

(43) 25/01/2017 346A

(73) Viện Nghiên cứu và Phát triển Lâm nghiệp (VN)

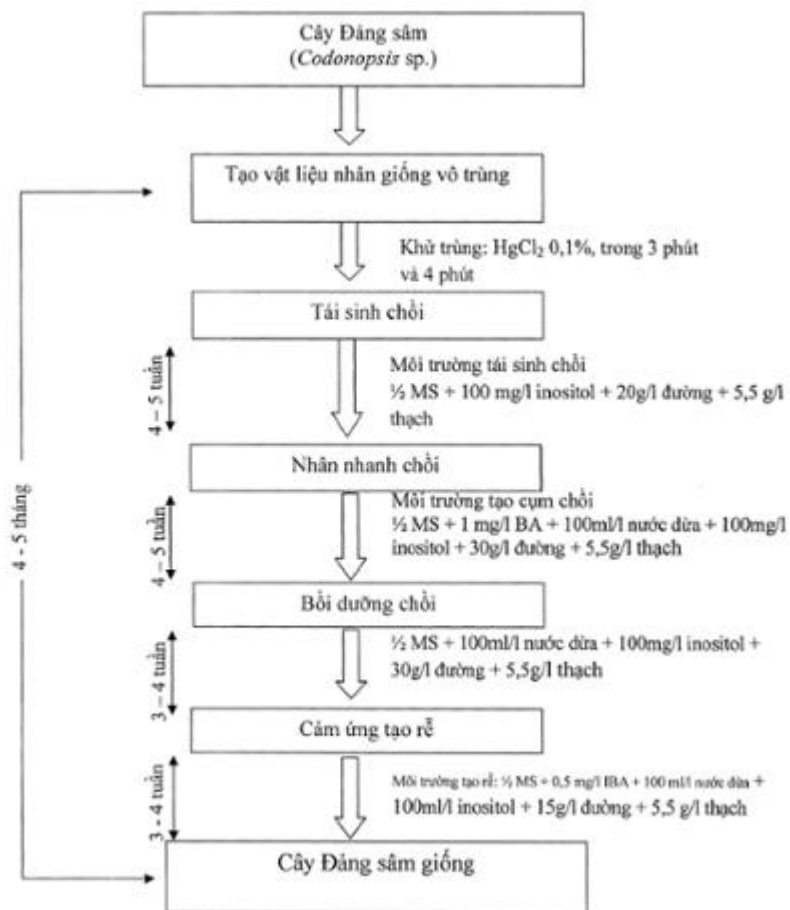
Xã Quyết Thắng, thành phố Thái Nguyên, tỉnh Thái Nguyên

(72) Trần Thị Thu Hà (VN); Bùi Văn Thắng (VN); Phạm Thị Thảo (VN); Đào Thị Bích Thuận (VN).

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

(54) QUY TRÌNH NHÂN GIỐNG CÂY ĐĂNG SÂM (CODONOPSIS SP.) BẰNG NUÔI CÂY MÔ

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình nhân giống cây Đăng sâm (Codonopsis javanica) bằng nuôi cấy mô, trong đó quy trình này bao gồm các bước: a) tạo vật liệu nhân giống vô trùng; b) tái sinh chồi; c) nhân nhanh chồi; d) bồi dưỡng chồi; e) cảm ứng tạo rễ cho chồi Đăng sâm; và f) thu cây Đăng sâm giống. Quy trình cho phép khử trùng mẫu hiệu quả, nhân nhanh cây Đăng sâm trực tiếp từ mắt ngủ của chồi nách và bồi dưỡng chồi hiệu quả mà không cần qua bước phản biệt hóa tế bào, rút ngắn được thời gian nhân giống.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích thuộc lĩnh vực công nghệ sinh học thực vật, cụ thể là giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình nhân giống cây Đảng sâm (*Codonopsis* sp.) bằng nuôi cấy mô.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Cây Đảng sâm (*Codonopsis* sp.) thuộc họ Hoa Chuông (*Campanulaceae*), là loại cây thảo sống nhiều năm, thân leo, dài từ 2 đến 3m, phân nhánh nhiều. Cây Đảng sâm có rễ củ hình trụ dài, phân nhánh, màu vàng nhạt, lá đơn, mọc đối, hình trứng hoặc hình tim. cỡ 2-5 x 2-4.5 cm, mỏng, mềm, màu xanh lá mạ, mặt dưới có lông nhung trắng, mép nguyên hoặc có răng cưa tù, cuống lá dài từ 3 đến 7cm. Hoa mọc đơn độc ở kẽ lá, hình chuông, màu trắng hoặc hơi vàng, họng có vân tím. Đài có 5 thùy, hình mác nhọn, hơi dính nhau ở gốc. Tròng 5 thùy, hình tam giác nhọn, nhị có 5, bầu 5 ô. Quả mọng, 5 cạnh, khi chín màu tím. Hạt nhiều, tròn, nhỏ, màu vàng nâu.

Ở Việt Nam, cây Đảng sâm mọc rải rác từ các tỉnh Lai Châu, Điện Biên đến Kon Tum, Lâm Đồng. Đây là loại cây dược liệu quý, có giá trị cao trong ngành y học cổ truyền ở Việt Nam. Cây Đảng sâm đã được ghi trong Sách Đỏ Việt Nam (1996) với cấp đánh giá "sẽ nguy cấp" (Bậc V) và Danh mục Thực vật rừng, Động vật rừng nguy cấp, quý hiếm (nhóm 2) của Nghị định số 32/2006/NĐ - CP ngày 30/3/2006 của Chính phủ để hạn chế khai thác, sử dụng vì mục đích thương mại.

Đảng sâm có tác dụng bổ ngũ tạng, nâng cao thể lực, tăng sức dẻo dai, tăng cường khả năng miễn dịch cho cơ thể, có tác dụng ích huyết, sinh tân dịch, chống mệt mỏi, giảm stress. Bộ phận dùng làm thuốc duy nhất của Đảng sâm là rễ. Rễ cây Đảng sâm chứa saponin triterpen và steroid. Quan trọng là hợp chất saponin tripterpen có tác dụng chống stress, chống trầm cảm, chống oxy hóa tốt.

Đã có nhiều nghiên cứu tái sinh cây Đảng sâm nhằm đáp ứng nhu cầu về giống cây Đảng sâm ngày càng lớn. Việc cung cấp cây giống bằng phương pháp nhân giống tự nhiên từ hạt 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 một số nghiên cứu về nhân giống *in vitro* cây Đảng sâm và đã có công bố trên nhiều tạp chí.

Tác giả Trương Thị Bích Phượng và cộng sự (2015) đã tiến hành nghiên cứu nhân giống *in vitro* cây Đẳng sâm (*Codonopsis* sp.). Kết quả cho thấy đỉnh chồi và đoạn thân mang chồi ngủ của cây Đẳng sâm được khử trùng bằng HgCl_2 0,1% trong thời gian 3 phút kết hợp với nano bạc 40 ppm trong vòng 20 phút là thích hợp nhất, tỉ lệ sống đạt 73,24%. Môi trường MS có bổ sung kết hợp 0,2 mg/l TDZ với 2,0 mg/l 2,4 D là thích hợp nhất cho tạo callus. Sau 4 tuần nuôi cấy, chồi tái sinh từ callus tốt nhất trên môi trường MS có bổ sung 0,5 mg/l kinetin kết hợp với 0,2 mg/l NAA, số chồi đạt được 18,14 chồi/mẫu. Môi trường thích hợp cho sự nhân nhanh chồi là MS có bổ sung 1,0 mg/l kinetin và 0,2 mg/l NAA, số chồi đạt được là 26,00 chồi/mẫu. Chồi tạo rễ tốt trên môi trường MS có bổ sung 1,5 IBA và đạt 31,00 rễ và rễ dài 1,7 cm sau 4 tuần nuôi cấy.

Y. H. Zhang và cộng sự (2011) đã nghiên cứu cảm ứng tạo đa chồi từ chồi ngủ của cây *Codonopsis pilosula* (Franch.) Nannf. Kết quả thu được 75% chồi ngủ tái sinh trên môi trường MS với 1 mg/l BA, 0,5 mg/l NAA, 30 g/l đường và 7g/l thạch với 15-18 chồi. Những chồi cao 2,5-3 cm được cấy sang môi trường tạo rễ MS với 1,5 mg/l IBA, sau 3 tuần 100% số chồi tạo rễ.

Các công trình nghiên cứu trên có các kết quả công bố là tương đối khác nhau. Nhưng đều có điểm chung là sử dụng môi trường MS kết hợp với việc sử dụng kết hợp 2 chất điều hòa sinh trưởng như: BA + NAA hay kinetin + NAA để phản biệt hóa tế bào sinh dưỡng thành tế bào toàn năng và từ đó biệt hóa thành tế bào sinh trưởng để nâng cao hệ số nhân giống. Tuy nhiên, quá trình phản biệt hóa thường kéo dài và việc kết hợp nhiều phytohormon này trong thời gian dài không chỉ ức chế quá trình phát triển của chồi nuôi cấy dẫn tới hệ số nhân chồi thấp mà còn thu được các cây giống yếu, tỷ lệ sống ngoài vườn ươm thấp.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Giải pháp hữu ích nhằm giải quyết các vấn đề nêu trên, theo đó giải pháp hữu ích đề cập đến Quy trình nhân giống cây Đẳng sâm (*Codonopsis* sp.) bằng nuôi cấy mô, trong đó quy trình theo giải pháp hữu ích điều chỉnh chế độ khử trùng nhằm thu được mẫu có tỷ lệ nhiễm thấp và nhân chồi trực tiếp từ mắt ngủ của chồi nách mà không qua giai đoạn phản biệt hóa tạo mô sẹo. Quy trình cũng kết hợp việc sử dụng hợp chất điều tiết sinh trưởng kết hợp với các hợp chất tự nhiên, cụ thể là nước dừa, từ đó giảm được thời gian nuôi cấy, tăng hệ số nhân và chất lượng cây giống thu được.

Theo đó, quy trình nhân giống cây Đẳng sâm (*Codonopsis* sp.) bằng nuôi cấy mô được đề xuất, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) tạo vật liệu nhân giống vô trùng bằng cách thu nhận các đoạn thân bánh tẻ từ cây Đẳng sâm (*Codonopsis* sp.), rửa sạch bằng nước và ngâm trong dung dịch xà phòng loãng trong 5 phút, sau khi rửa lại bằng nước cất vô trùng, mẫu được lắc bằng dung dịch nước javen 60% trong 5 phút và tráng lại bằng nước cất vô trùng 3 lần; tiếp đó mẫu được cắt thành từng đoạn có từ 1 đến 2 mắt ngủ và dùng cồn 70% khử trùng bề mặt trong 60 giây rồi tráng lại bằng nước cất vô trùng từ 3 đến 5 lần; cuối cùng mẫu được khử trùng bằng HgCl_2 0,1%, lần thứ nhất trong thời gian 3 phút, lần thứ 2 trong thời gian 4 phút rồi tráng sạch thủy ngân bằng nước cất vô trùng 5 lần thu được vật liệu nhân giống vô trùng;

b) tái sinh chồi bằng thấm hết nước có trên vật liệu nhân giống vô trùng giấy thấm và 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 bao gồm các thành phần: 1/2MS, 20 g/l đường, 100mg/l inositol và 5,5 g/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 nuôi cấy tái sinh chồi từ 3 đến 4 tuần thu được chồi tái sinh;

c) nhân nhanh chồi bằng cách cắt chồi tái sinh thu được ở trên, cắt bớt lá và xiết chồi đỉnh, sau đó cấy chồi theo hướng thẳng đứng vào môi trường nhân nhanh bao gồm các thành phần: 1/2MS, 1 mg/l BA, 100 ml/l nước dừa, 100mg/l inositol, 30g/l đường và 5,5 g/l thạch, duy trì độ pH của môi trường nuôi cấy nằm trong khoảng từ 5,6 đến 5,8, cấy chuyển sang môi trường mới sau khoảng từ 4 đến 5 tuần, cường độ chiếu sáng nằm trong khoảng từ 2000 đến 3000 lux, quang chu kỳ 12 giờ/ngày, nhiệt độ nằm trong khoảng từ 22°C đến 25°C thu được các cụm chồi tái sinh;

d) bồi dưỡng chồi bằng cách tách rời các chồi trong cụm chồi tái sinh và cấy lên môi trường bồi dưỡng chồi bao gồm các thành phần: 1/2MS, 100 ml nước dừa, 100mg/l inositol, 30g/l đường, 5,5 g/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 thu được các chồi Đẳng sâm;

e) cảm ứng tạo rễ cho chồi Đẳng sâm bằng cách cấy các chồi Đẳng sâm đạt chiều cao trên 3 cm, thân thẳng, cứng cáp, có từ 2 đến 3 cặp lá thu ở bước d) vào môi trường tạo rễ bao gồm các thành phần: 1/2MS, 0,5 mg/l IBA, 100 ml/l nước dừa, 100mg/l

Inositol, 15g/l đường và 5,5 g/l thạch, chồi được cấy theo chiều thẳng đứng, duy trì độ pH của môi trường tạo rễ nằm trong khoảng từ 5,6 đến 5,8, sau 3 tuần thu được cây Đảng sâm nuôi cấy mô; và

f) thu cây Đảng sâm giống bằng cách chuyển các bình chứa cây Đảng sâm nuôi cấy mô thu được từ bước e) ra nhà lưới che sáng 50% trong thời gian từ 10 đến 15 ngày, sau đó mở 30% nắp bình nuôi cấy mô cây thích nghi dần với độ ẩm không khí, sau khi rửa sạch môi trường dính bám, trồng cây lên giá thể vô trùng thu được cây Đảng sâm giống có chiều cao khoảng 5 cm, có từ 2 đến 3 cặp lá.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1: Thể hiện sơ đồ quy trình nhân giống *in vitro* cây Đảng sâm.

Hình 2: Ảnh chụp kết quả thu được mẫu giai đoạn tái sinh.

Hình 3: Ảnh chụp kết quả mẫu cây Đảng sâm giai đoạn nhân nhanh chồi.

Hình 4: Ảnh chụp kết quả mẫu cây Đảng sâm giai đoạn tiên ra rễ.

Hình 5: Ảnh chụp kết quả mẫu Đảng sâm tái sinh hoàn chỉnh.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Dưới đây, giải pháp hữu ích sẽ được minh họa bằng các phương án thực hiện cụ thể, tuy nhiên các phương án thực hiện này chỉ nhằm làm rõ bản chất của giải pháp chứ không nhằm giới hạn phạm vi yêu cầu bảo hộ của giải pháp hữu ích.

Các hợp chất phytohormon, ví dụ axit 2,4 – dichlophenoxy acetic (2,4D), benzin adenin (BA), axit indole butyric (IBA), 6-Furfurylaminopurine (kinetin), axit α - Naphlene axetic (NAA) là những chất đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và được sử dụng rộng rãi và đã biết bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các hợp chất này là đã biết và có thể mua trên thị trường.

Các điều kiện nuôi cấy, thao tác cấy và các kỹ thuật liên quan đến việc nuôi cấy mô được thực hiện trong điều kiện vô trùng, các môi trường nuôi cấy đều được khử trùng, ví dụ, bằng phương pháp hấp tiệt trùng trong điều kiện 120°C trong 20 phút để loại bỏ mầm bệnh tạp nhiễm. Các kỹ thuật này là đã biết và có thể thực hiện được bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Vật liệu được sử dụng để làm trong Cây Đảng sâm (*Codonopsis* sp.) thuộc họ Hoa Chuông (*Campanulaceae*), là loại cây thảo sống nhiều năm, thân leo, dài từ 2 đến 3m, phân nhánh nhiều. Vật liệu nhân giống là các đoạn thân bánh tẻ có các mắt ngủ.

Quy trình nhân giống cây Đảng sâm (*Codonopsis* sp.) bằng nuôi cấy mô theo giải pháp hữu ích bao gồm các bước: a) tạo vật liệu nhân giống vô trùng; b) tái sinh chồi; c) nhân nhanh chồi; d) bồi dưỡng chồi; e) cảm ứng tạo rễ cho chồi Đảng sâm; f) thu cây Đảng sâm giống.

Trong bước tạo vật liệu nhân giống vô trùng, cây Đảng sâm khỏe mạnh được lựa chọn. Tiến hành thu nhận các đoạn thân bánh tẻ từ cây Đảng sâm (*Codonopsis* sp.) không bị sâu bệnh, dập nát, loại bỏ lá và rửa sạch bằng nước bằng chổi lông. Vật liệu sau đó được ngâm trong dung dịch xà phòng loãng trong 5 phút. Mẫu sau khi ngâm được rửa lại bằng nước cất vô trùng. Quá trình rửa tốt nhất được thực hiện 3 lần. Tiếp đó, mẫu được lắc bằng dung dịch nước javen 60% trong 5 phút và tráng lại bằng nước cất vô trùng 3 lần. Các thao tác được thực hiện nhẹ nhàng, tránh tổn thương, dập mẫu. Sau đó mẫu được cắt thành từng đoạn có từ 1 đến 2 mắt ngủ và dùng cồn 70% khử trùng bề mặt trong 60 giây rồi tráng lại bằng nước cất vô trùng từ 3 đến 5 lần. Cuối cùng mẫu được khử trùng bằng HgCl_2 0,1%, lần thứ nhất trong thời gian 3 phút, lần thứ 2 trong thời gian 4 phút rồi tráng sạch thủy ngân bằng nước cất vô trùng 5 lần thu được vật liệu nhân giống vô trùng;

Vật liệu nhân giống sau khi khử trùng có tỷ lệ mẫu sống không bị nhiễm khuẩn đạt 76,12 %.

Trong bước tái sinh chồi, tiến hành bằng thấm hết nước có trên vật liệu nhân giống vô trùng bằng giấy thấm. Sau đó cắt bỏ phần trắng ở từng đoạn thân để hóa chất khử trùng không ngấm sâu vào mẫu vật. Mẫu được cấy vào môi trường nuôi cấy bao gồm các thành phần: 1/2MS, 20 g/l đường, 100mg/l inositol và 5,5 g/l thạch, theo hướng thẳng đứng. Độ pH của môi trường nuôi cấy nằm trong khoảng từ 5,6 đến 5,8, thời gian nuôi cấy tái sinh chồi từ 3 đến 4 tuần thu được chồi tái sinh.

Chồi tái sinh thu được khỏe mạnh, không bị nhiễm nấm, khuẩn, phát triển bình thường trong môi trường nuôi cấy.

Trong bước nhân nhanh chồi, tiến hành cắt chồi sau khi được tái sinh. Tiến hành cắt bớt lá và xiết chồi đỉnh. Tiếp đó cấy chồi theo hướng thẳng đứng vào môi trường nhân nhanh bao gồm các thành phần: 1/2MS, 1 mg/l BA, 100 ml/l nước dừa, 100mg/l inositol, 30g/l đường và 5,5 g/l thạch. Duy trì độ pH của môi trường nuôi cấy nằm trong khoảng từ 5,6 đến 5,8. Mỗi chu kỳ cấy chuyển sang môi trường mới khoảng từ 4 đến 5 tuần. Cường độ chiếu sáng nằm trong khoảng từ 2000 đến 3000 lux. Quang chu

kỳ 12 giờ/ngày và nhiệt độ nuôi cấy nằm trong khoảng từ 22⁰C đến 25⁰C. Kết quả thu được các cụm chồi tái sinh phát triển mập, xanh.

Trong bước bồi dưỡng chồi, tiến hành bằng cách tách rời các chồi trong cụm chồi tái sinh và cấy lên môi trường bồi dưỡng chồi bao gồm các thành phần: 1/2MS, 100 ml nước dừa, 100mg/l inositol, 30g/l đường, 5,5 g/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 thu được các chồi Đẳng sâm. Quá trình này nhằm bồi dưỡng chồi khỏe mạnh, đảm bảo về chiều cao nhằm thu được cây giống đồng đều ở giai đoạn sau.

Trong bước cảm ứng tạo rễ cho chồi Đẳng sâm, tiến hành tách từng chồi Đẳng sâm đạt chiều cao trên 3 cm, thân thẳng, cứng cáp, có từ 2 đến 3 cặp lá. Các chồi này được cấy lên môi trường tạo rễ bao gồm các thành phần: 1/2MS, 0,5 mg/l IBA, 100 ml/l nước dừa, 100mg/l Inositol, 15g/l đường và 5,5 g/l thạch. Chồi được cấy theo chiều thẳng đứng, duy trì độ pH của môi trường tạo rễ nằm trong khoảng từ 5,6 đến 5,8. Thời gian xuất hiện rễ từ 2 tuần sau khi cấy chồi vào môi trường tạo rễ. Sau 3 tuần rễ dài, thu được cây Đẳng sâm nuôi cấy mô cây cứng cáp và có thể đưa cây môi trường thích nghi với điều kiện tự nhiên.

Giai đoạn này thu được cây Đẳng sâm nuôi cấy mô có số lượng rễ/cây khoảng 35,37 rễ, chiều dài rễ khoảng 2 cm, cây con cứng cáp và, chiều cao cây khoảng 5 cm. Cây Đẳng sâm nuôi cấy mô giai đoạn này vẫn nằm trong ống nghiệm,

Trong bước thu cây Đẳng sâm giống, tiến hành chuyển các bình chứa cây Đẳng sâm nuôi cấy mô thu được ở trên ra nhà lưới che sáng 50%. Thời gian thích nghi trong khoảng từ 10 đến 15 ngày. Tiếp đó mở 30% nắp bình nuôi cấy mô để cây thích nghi dần với độ ẩm không khí. Sau khi đưa cây ra khỏi ống nghiệm, tiến hành rửa sạch môi trường dính bám và trồng cây lên giá thể vô trùng. Kết quả thu được cây Đẳng sâm giống có chiều cao khoảng 5 cm, có từ 2 đến 3 cặp lá. Cây phát triển khỏe mạnh trong điều kiện tự nhiên.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

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. Sử dụng 20 ml MSI/lít môi trường MS nuôi cấy.

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 4⁰C. Sử dụng 10 ml MSII/lít môi trường MS nuôi cấy.

Dung dịch MSIII: Muối khoáng vi lượng - Cân lượng muối khoáng như liệt kê dưới đây vào 1lít dung dịch gốc. Sử dụng 10 ml MSIII/lít môi trường MS nuôi cấy.

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 200 ml nước nóng 80⁰C. Sau đó, hòa 2 chất với nhau tới khi xuất hiện màu vàng chanh, bổ sung nước cất lên thể tích 1lít.

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 4⁰c. Dùng 10 ml 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 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 IBA (Indole butyric acid): 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 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 1/2MS: Mỗi mẻ 3 lít

Phần 1: Cân 16,5g thạch vào nồi kim loại, thêm 1 lít nước cất, đặt lên bếp đun cho thạch tan hoàn toàn.

Phần 2: Cân 90g đường vào cốc đong có dung tích 1lít, đong 30 ml dung dịch MSI, 15 ml mỗi loại của các dung dịch từ MSII đến MSV nêu trên (Vì quy trình sử dụng ½ MS nên các dung dịch giảm đi 1 nửa). Dung dịch BA, 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 nhân nhanh (môi trường A2) có công thức 1/2MS + 1 mg/l BA + 100 ml nước dừa + 100mg/l Inositol + 30g/l đường + 5,5 g/l thạch thì đong 3 ml BA và 300 ml 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: Tạo vật liệu nhân giống vô trùng

Mẫu Đảng sâm sử dụng là các đoạn thân bánh tẻ chứa mắt ngủ lấy từ cây mẹ. Mẫu được cắt vào buổi sáng khi thời tiết nắng ráo.

- Khử trùng sơ bộ:

- + Tiến hành bỏ lá và rửa mẫu dưới vòi nước chảy bằng chổi lông.
- + Vật liệu sau đó được ngâm trong dung dịch xà phòng loãng trong 5 phút.
- + Mẫu sau đó được rửa sạch dưới vòi nước chảy, tráng lại bằng nước cất vô trùng 3 lần.

+ Lắc bằng dung dịch javen 60% trong vòng 5 phút, tráng lại bằng nước cất vô trùng 3 lần

- Khử trùng bề mặt bằng cồn:

+ 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 bằng $HgCl_2$:

+ Mẫu được khử trùng kép bằng $HgCl_2$ 0,1%, lần thứ nhất trong thời gian 3 phút, lần thứ 2 trong thời gian 4 phút.

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

Mẫu được cấy vào môi trường nuôi cấy để kiểm tra hiệu quả khử trùng. Kết quả thử nghiệm điều kiện khử trùng đến tỷ lệ mẫu vô trùng thu được của cây Đảng sâm được trình bày trên Bảng 1.

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 Đảng sâm (*Codonopsis javanica*)

Công thức	Thời gian (phút)	Số lượng mẫu	Tỷ lệ mẫu chết (%)	Tỷ lệ mẫu nhiễm (%)	Tỷ lệ mẫu sống không nhiễm (%)
1(Đ/C)	0	60	0	100	0
2	5 (2+3)	60	0	55,67	44,33
3	7 (3+4)	60	2,41	18,44	79,15
4	9 (4+5)	60	20,67	11,95	67,38

Kết quả cho thấy khi khử trùng bằng $HgCl_2$ 0,1% đến hiệu quả vô trùng nuôi cấy chồi Đảng sâm. Qua bảng có thể thấy khi khử trùng kép 3 và 4 phút cho hiệu quả khử trùng là tốt nhất

Ví dụ 3: Tạo cụm chồi từ mẫu nuôi cấy và bồi dưỡng chồi

Những chồi không bị nhiễm nấm khuẩn sau giai đoạn tái sinh sẽ cắt hạ, dùng dao nhọn xiết chồi đỉnh và cấy chuyển sang môi trường tạo cụm chồi gồm MS và chất kích thích sinh trưởng, nước dừa. Bảng 2 dưới đây thể hiện 15 công thức (CT) đã thử nghiệm để nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ chất kích thích sinh trưởng và nồng độ nước dừa đến khả năng tạo cụm chồi của cây Đảng sâm *in vitro*. 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 Đẳng sâm
(*Codonopsis javanica*)

CT	Thành phần cơ bản	Nồng độ chất kích thích sinh trưởng, dịch chiết hữu cơ bổ sung	Tạo cụm chồi
1	MS + 30 g/l đường + 100 mg/l inositol + 5,5 g/l thạch	0 mg/l BA	
2		0,5mg/l BA	+
3		1,0 mg/l BA	++
4		2 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		1mg/l BA + 50 ml nước dừa	+++
13		1mg/l BA + 100 ml nước dừa	++++
14		1mg/l BA +150 ml nước dừa	+++
15		1mg/l BA200 ml nước dừa	+++

*Ghi chú: 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).

Cụm chồi trong môi trường A2 sẽ được tách ra làm 2 phần: phần chồi cao và phần chồi thấp. Phần chồi cao được cấy chuyển sang môi trường bồi dưỡng chồi có công thức $\frac{1}{2}$ MS + 100 ml nước dừa + 100mg/l Inositol + 30g/l đường + 5,5 g/l thạch.

Thời gian cấy chuyển các chồi nằm trong khoảng từ 4 đến 5 tuần thu được các chồi Đẳng sâm.

Ví dụ 4: Tạo rễ cho chồi Đẳng sâm

Chồi từ môi trường bồi dưỡng chồi được tách ra làm 2 phần: những cụm chồi thấp, non và những cây chiều cao khoảng 3 cm, 2-3 cặp lá, đồng đều sẽ được cắt và chuyển sang môi trường tạo rễ: $\frac{1}{2}$ MS + 0,5 mg/l IBA + 100 ml nước dừa + 100mg/l Inositol + 15g/l đường + 5,5 g/l thạch để tạo cây hoàn chỉnh, những khối thấp, chồi non được cắt nhỏ và cấy lại vào môi trường tạo cụm chồi để tiếp tục nhân nhanh chồi.

Ví dụ 5: Chăm ứng cây

Chuyển bình Đảng sâm đã có 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. Nhà lưới được chuẩn bị với lưới che nắng 50%. Sau đó mở 30% nắp bình nuôi cây mô cây thích nghi dần với độ ẩm không khí, sau khi rửa sạch môi trường dính bám, trồng cây lên giá thể vô trùng thu được cây Đảng sâm giống có chiều cao khoảng 5 cm, có từ 2 đến 3 cặp lá.

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Quy trình nhân giống cây Đảng sâm bằng nuôi cấy mô theo giải pháp hữu ích có thể nhân nhanh một lượng lớn cây Đảng sâm trong thời gian ngắn chi phép đáp ứng nhu cầu cây giống trên thị trường. Bằng cách thay đổi điều kiện khử trùng, điều kiện nuôi cấy và môi trường nuôi cấy, quy trình theo giải pháp cho phép phát triển chồi Đảng sâm trực tiếp từ mắt ngủ mà không cần qua giai đoạn phản biệt hóa và biệt hóa tế bào mà vẫn giữ được hệ số nhân chồi trong thời gian ngắn.

Quy trình theo giải pháp cho phép phát triển lượng lớn cây giống, tạo tiền đề phát triển các vùng chuyên canh Đảng sâm phục vụ sản xuất và bào chế dược liệu. Quy trình cho phép cung cấp cây giống mà không chịu ảnh hưởng của điều kiện ngoại cảnh tự nhiên. Cây giống thu được từ quy trình theo giải pháp 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 Đảng sâm (*Codonopsis* sp.) bằng nuôi cấy mô, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) tạo vật liệu nhân giống vô trùng bằng cách thu nhận các đoạn thân bánh tẻ từ cây Đảng sâm (*Codonopsis* sp.), rửa sạch bằng nước và ngâm trong dung dịch xà phòng loãng trong 5 phút, sau khi rửa lại bằng nước cất vô trùng, mẫu được lắc bằng dung dịch nước javen 60% trong 5 phút và tráng lại bằng nước cất vô trùng 3 lần; tiếp đó mẫu được cắt thành từng đoạn có từ 1 đến 2 mắt ngủ và dùng cồn 70% khử trùng bề mặt trong 60 giây rồi tráng lại bằng nước cất vô trùng từ 3 đến 5 lần; cuối cùng mẫu được khử trùng bằng HgCl_2 0,1%, lần thứ nhất trong thời gian 3 phút, lần thứ 2 trong thời gian 4 phút rồi tráng sạch thủy ngân bằng nước cất vô trùng 5 lần thu được vật liệu nhân giống vô trùng;

b) tái sinh chồi bằng thấm hết nước có trên vật liệu nhân giống vô trùng giấy thấm và 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 bao gồm các thành phần: 1/2MS, 20 g/l đường, 100mg/l inositol và 5,5 g/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 nuôi cấy tái sinh chồi từ 3 đến 4 tuần thu được chồi tái sinh;

c) nhân nhanh chồi bằng cách cắt chồi tái sinh thu được ở trên, cắt bớt lá và xiết chồi đỉnh, sau đó cấy chồi theo hướng thẳng đứng vào môi trường nhân nhanh bao gồm các thành phần: 1/2MS, 1 mg/l BA, 100 ml/l nước dừa, 100mg/l inositol, 30g/l đường và 5,5 g/l thạch, duy trì độ pH của môi trường nuôi cấy nằm trong khoảng từ 5,6 đến 5,8, cấy chuyển sang môi trường mới sau khoảng từ 4 đến 5 tuần, cường độ chiếu sáng nằm trong khoảng từ 2000 đến 3000 lux, quang chu kỳ 12 giờ/ngày, nhiệt độ nằm trong khoảng từ 22⁰C đến 25⁰C thu được các cụm chồi tái sinh;

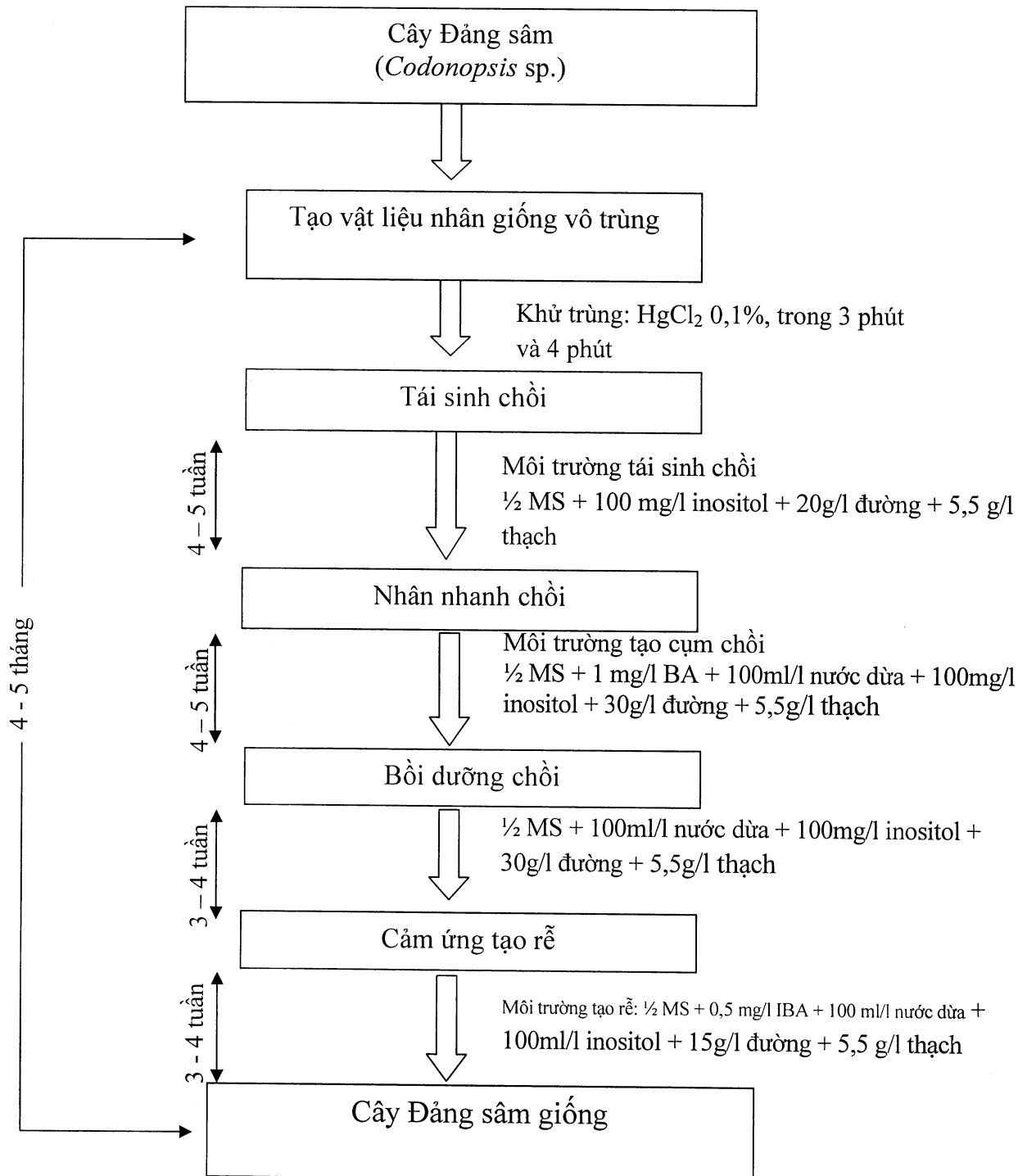
d) bồi dưỡng chồi bằng cách tách rời các chồi trong cụm chồi tái sinh và cấy lên môi trường bồi dưỡng chồi bao gồm các thành phần: 1/2MS, 100 ml nước dừa, 100mg/l inositol, 30g/l đường, 5,5 g/l thạch, duy trì độ pH của môi trường nuôi cấy nằm trong khoảng từ 5,6 đến 5,8, thời gian cấy chuyển nằm trong khoảng từ 4 đến 5 tuần thu được các chồi Đảng sâm;

e) cảm ứng tạo rễ cho chồi Đảng sâm bằng cách cấy các chồi Đảng sâm đạt chiều cao trên 3 cm. thân thẳng, cứng cáp, có từ 2 đến 3 cặp lá thu ở bước d) vào môi trường tạo

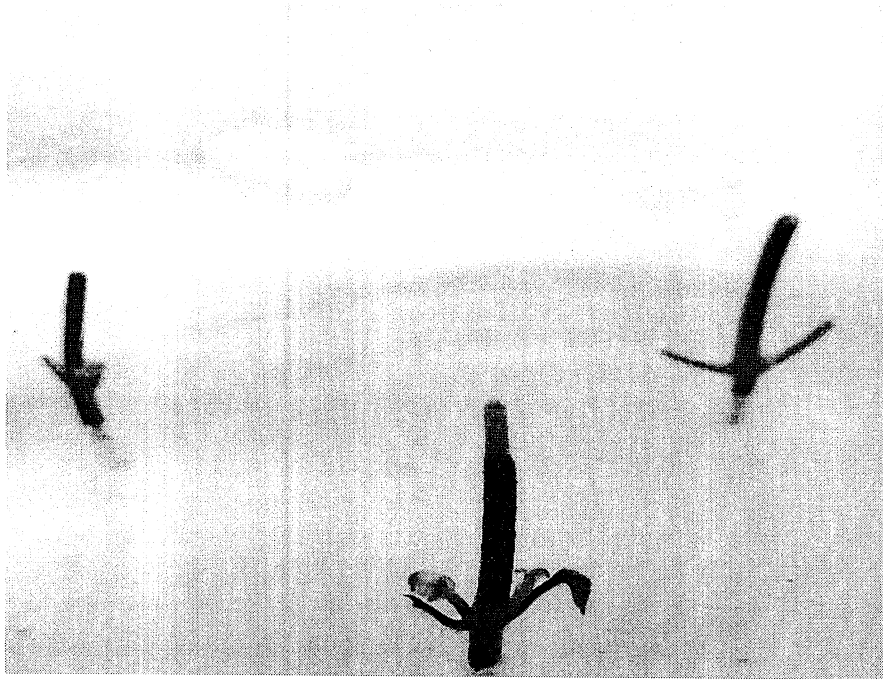
rễ bao gồm các thành phần: 1/2MS, 0,5 mg/l IBA, 100 ml/l nước dừa, 100mg/l Inositol, 15g/l đường và 5,5 g/l thạch, chồi được cấy theo chiều thẳng đứng, duy trì độ pH của môi trường tạo rễ nằm trong khoảng từ 5,6 đến 5,8, sau 3 tuần thu được cây Đẳng sâm nuôi cấy mô; và

f) thu cây Đẳng sâm giống bằng cách chuyển các bình chứa cây Đẳng sâm nuôi cấy mô thu được từ bước e) ra nhà lưới che sáng 50% trong thời gian từ 10 đến 15 ngày, sau đó mở 30% nắp bình nuôi cấy mô cây thích nghi dần với độ ẩm không khí, sau khi rửa sạch môi trường dính bám, trồng cây lên giá thể vô trùng thu được cây Đẳng sâm giống có chiều cao khoảng 5 cm, có từ 2 đến 3 cặp lá.

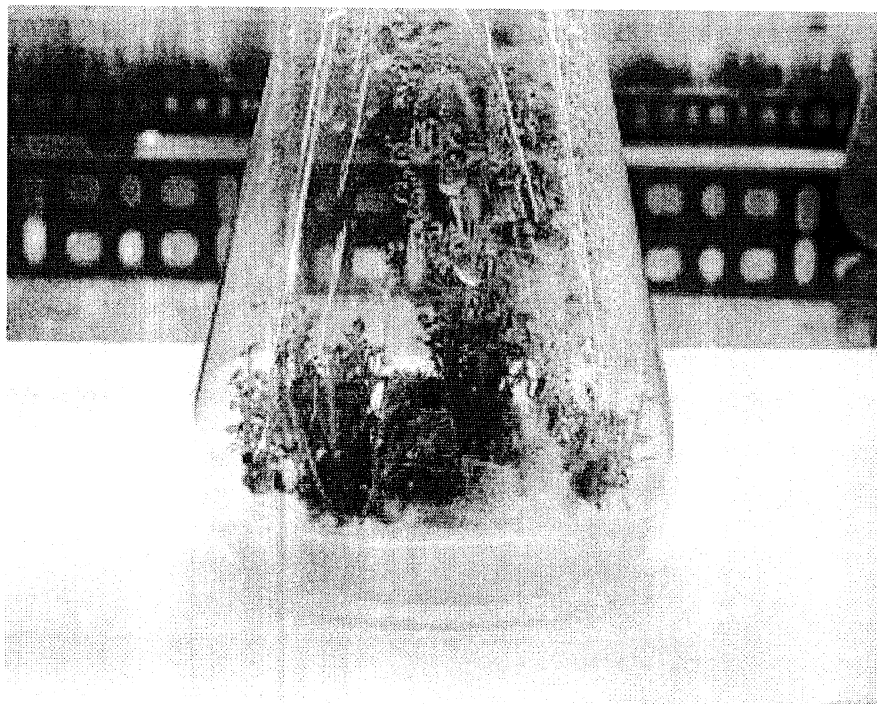
HÌNH 1



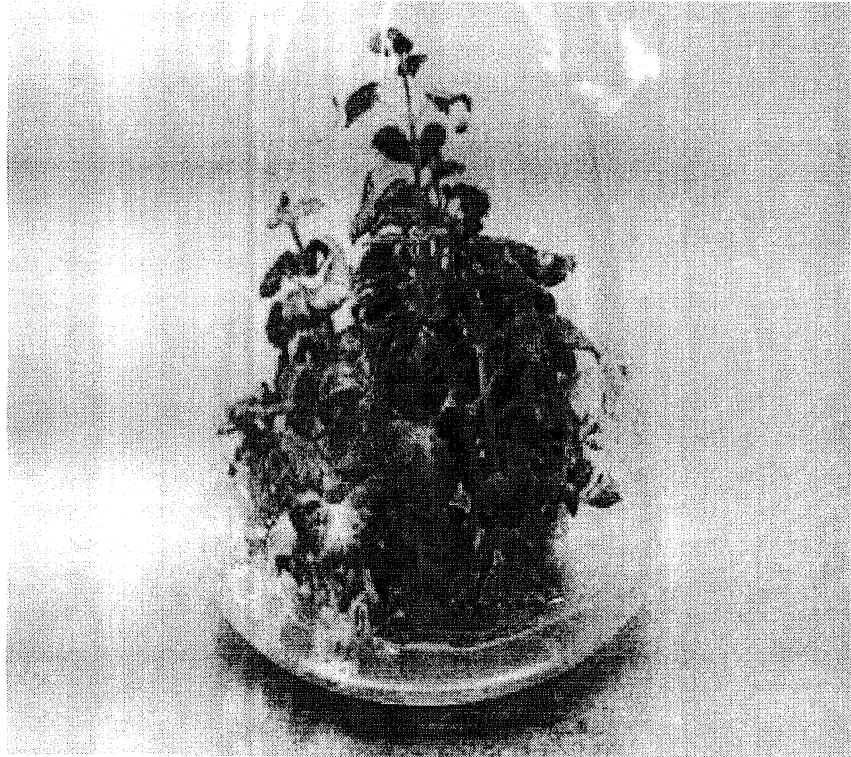
HÌNH 2



HÌNH 3



HÌNH 4



HÌNH 5

