



(12) **BẢN MÔ TẢ GIẢI PHÁP HỮU ÍCH THUỘC BẢNG ĐỘC QUYỀN
GIẢI PHÁP HỮU ÍCH**

(19) **Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ**

(11)



2-0002458

(51)⁷ **A01H 4/00; C12N 5/04**

(13) **Y**

(21) 2-2019-00598

(22) 22/01/2018

(67) 1-2018-00302

(45) 26/10/2020 391

(43) 26/03/2018 360A

(73) Viện Di truyền Nông nghiệp (VN)

Km2, đường Phạm Văn Đồng, quận Từ Liêm, thành phố Hà Nội

(72) Nguyễn Văn Đồng (VN); Đinh Thị Thu Ngân (VN); Nguyễn Thị Hòa (VN).

(54) QUY TRÌNH NHÂN NHANH TRONG ống NGHIỆM CÂY KIM NGÂN (*LONICERA JAPONICA* THUNB.) THÔNG QUA GIAI ĐOẠN TẠO MÔ SẴO PHÔI HÓA

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình nhân nhanh trong ống nghiệm cây kim ngân thông qua giai đoạn tạo mô sẵo phôi hóa và tế bào mô sẵo phôi hóa thu được từ quy trình này. Quy trình nhân nhanh cây kim ngân (*Lonicera japonica* Thunb.) thông qua giai đoạn tạo mô sẵo phôi hóa gồm các bước: tạo nguyên liệu sạch; tạo mô sẵo phôi hóa; tái sinh chồi từ mô sẵo phôi hóa; tạo cây hoàn chỉnh; đưa cây ra vườn ươm. Quy trình theo giải pháp hữu ích đã tạo được nguồn cây giống với số lượng lớn, sạch bệnh và đồng nhất về mặt di truyền, rút ngắn được thời gian nuôi cấy và tiết kiệm được chi phí sản xuất.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích này thuộc lĩnh vực công nghệ sinh học thực vật, cụ thể là đề cập đến quy trình nhân giống cây kim ngân (*Lonicera japonica* Thunb.) bằng phương pháp nuôi cấy mô tế bào thông qua giai đoạn tạo mô sẹo phôi hóa (Friable embryogenic callus) để tạo ra được nguồn cây giống với số lượng lớn, sạch bệnh, đồng đều, ổn định về mặt di truyền và đáp ứng nhu cầu của thị trường ngành dược cũng như sản xuất thức ăn chăn nuôi.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Việt Nam được xem là một nước có nguồn dược liệu phong phú và đa dạng với số lượng trên 3800 loài cây làm thuốc trong đó có kim ngân trên tổng số hơn 10600 loài thực vật và là thị trường đầy hứa hẹn khi nhu cầu sử dụng rất lớn không chỉ là thuốc, mỹ phẩm mà còn làm nguyên liệu sản xuất các loại thức ăn chăn nuôi. Việc sử dụng thảo dược - cây kim ngân để sản xuất thức ăn chăn nuôi ở quy mô nhỏ, lần đầu tiên được tác giả Tạ Hùng Đậu nghiên cứu triển khai và đã được Cục Sở hữu trí tuệ Việt Nam cấp Bằng độc quyền Giải pháp hữu ích số 2-0000919 ngày 07 tháng 10 năm 2011. Giải pháp của tác giả Tạ Hùng Đậu tuy đã có nhiều tiến bộ là tạo ra thực phẩm (thịt lợn và gia cầm) sạch có chất lượng cao, đảm bảo an toàn thực phẩm và giảm thiểu ô nhiễm môi trường, song vẫn còn một số hạn chế như nguồn nguyên liệu đầu vào quan trọng là cây kim ngân chỉ được thu thập và nhân giống theo phương pháp thủ công truyền thống, nên rất khó đảm bảo tính đồng đều và ổn định liên tục về chất lượng và số lượng của sản phẩm; quy mô sản xuất chưa lớn, năm 2015 mới đạt 350-400 tấn/năm.

Việt Nam đã và đang trên đà hội nhập sâu rộng với thế giới, trong đó có ngành sản xuất thức ăn chăn nuôi. Để duy trì, phát triển và nâng cao uy tín sản phẩm thức ăn chăn nuôi mang thương hiệu Việt, chúng ta phải đảm bảo được nguồn nguyên liệu dược liệu đầu vào với số lượng lớn, có chất lượng cao, giá cả ổn định cho các doanh nghiệp sản xuất thức ăn hoạt động. So với các giá trị mà các loại cây thảo dược nói chung và cây kim ngân nói riêng mang lại thì việc trồng cây kim ngân hiện nay chưa

được đầu tư đúng mức, thiếu sự quy hoạch tập trung, các phương pháp gieo trồng còn thủ công, lạc hậu. Vì thế, việc đẩy mạnh nghiên cứu nhân giống bằng nuôi cấy mô theo quy mô công nghiệp để có thể nâng cao năng suất và số lượng cây trồng trong thời gian ngắn nhất đáp ứng được nhu cầu tiêu thụ cho thị trường Việt Nam và trên thế giới là điều hết sức cần thiết.

Trên thế giới, đã có một số công trình nghiên cứu về phương pháp nuôi cấy trong ống nghiệm (*in vitro*) cây kim ngân. Năm 2003, Suk Weon Kim và cộng sự đã tiến hành nghiên cứu tái sinh cây kim ngân (loài *Lonicera japonica* Thunb.) thông qua phát sinh phôi soma từ nuôi cấy phôi và nuôi cấy huyền phù tế bào. Từ phôi hợp tử trưởng thành đã tạo được mô sẹo với tần suất cao 46,7% trên môi trường MS cơ bản có bổ sung 4,52 μM 2,4-D. Nuôi cấy huyền phù tế bào trên môi trường MS lỏng có bổ sung 4,52 μM 2,4-D đã phát sinh rất nhiều phôi soma rồi phát triển thành cây con với tần suất 68% (Suk Weon Kim, O.S. Cheol, J.R. Liu (2003). High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration in zygotic embryo cultures of Japanese honeysuckle. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 72: 277-280).

Năm 2009, Xiaoming Wang và cộng sự đã tiến hành nghiên cứu tái sinh cây kim ngân (loài *Lonicera macranthoides* “Jinculei”) thông qua giai đoạn tạo mô sẹo. Trong nghiên cứu này, lá cây được nuôi trên môi trường B5 có bổ sung BA và 2,4-D với các nồng độ khác nhau. Kết quả cho thấy, với nồng độ 4,4 μM BA và 2,26 μM 2,4-D sau 4 tuần lá cây đã phát sinh thành mô sẹo với tần suất 86,7%. Các mô sẹo này tiếp tục được cấy chuyển trên môi trường B5 có bổ sung 0,9 μM kinetin và 5,4 μM NAA. Kết quả thu được sau 8 tuần, 73,4% mô sẹo phát sinh chồi. Các chồi này được cho ra rễ trên môi trường MS/2 bổ sung 14,8 μM IBA, tỷ lệ ra rễ dao động 98 – 100% sau 10 ngày nuôi cấy. Cây con sau khi được đưa ra trồng trong nhà kính tỷ lệ sống sót trên 90 % (Xiaoming Wang, Jianjun Chen, Yongxin Li, Qiying Nie, Junbin Li (2009). An efficient procedure for regeneration from Leaf-derived calluses of *Lonicera macranthoides* “Jinculei”, an important medicinal plant. *Hort Science* 44 (3): 746-750).

Hui và cộng sự (2012) đã thiết lập được quy trình vi nhân giống hiệu quả đối với loài kim ngân Nhật (*Lonicera japonica*) bằng việc sử dụng chồi đỉnh. Kết quả cho thấy có nhiều tổ hợp cho kết quả tốt với hơn 5 chồi tái sinh trên mỗi mô cấy. Đó là sự

kết hợp của NAA ở các nồng độ 2; 6 và 9 mM hoặc IAA tại 9 mM với BAP ở nồng độ 2; 4; 5 và 8,5 mM. Môi trường ra rễ được thực hiện bằng cách bổ sung IAA và IBA với các nồng độ khác nhau (0-5,5 mM IAA kết hợp với 0-3 mM IBA). Tất cả những nồng độ trên đều cho tỷ lệ ra rễ hơn 80%. Các cây con được đưa ra đất có tỷ lệ sống sót 70% (Hui J. X., S.C. Wen, Z. Y. Hua, L. X. Ming (2012). Comparative study on different methods for *Lonicera japonica* Thunb. Micropropagation and acclimatization. Journal of Medicinal Plants Research Vol. 6(27): 4389-4393). Như vậy, đối với các loài kim ngân khác nhau đòi hỏi phải thiết lập một quy trình nhân nhanh *in vitro* hoàn toàn khác nhau.

Ở nước ta, kim ngân phổ biến là loài *Lonicera japonica* Thunb. Các nghiên cứu trong nước về cây kim ngân thường chỉ tập trung vào đánh giá các tác dụng dược lý của các hợp chất có hoạt tính sinh học có trong cây, các nghiên cứu về nhân nhanh cây kim ngân còn rất hạn chế. Năm 2016, Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội đã nghiên cứu nhân nhanh cây kim ngân (*Lonicera japonica* Thunb.) bằng phương pháp tạo mô sẹo. Mô sẹo được hình thành từ mảnh lá non và đỉnh chồi trong môi trường MS có bổ sung 1,5 mg/l BAP trong điều kiện tối hoàn toàn. Sau bốn tuần tỷ lệ hình thành mô sẹo đạt 92,31%, và chiều dài trung bình của chúng đạt 1,8 cm. Sau đó các khối mô sẹo được cấy chuyển sang môi trường MS bổ sung 0,5 mg/l BAP để tăng sinh trong điều kiện sáng. Chồi được tái sinh tốt nhất trong môi trường MS bổ sung 1 mg/l BAP với 100% các khối mô sẹo có khả năng tái sinh chồi, số lượng chồi trên một khối mô sẹo từ 14 đến 20 chồi (Ngo Thi Trang, Nguyen Thanh Luan, Pham Thi Luong Hang (2016). Study on *in vitro* Propagation of Japanese Honeysuckle (*Lonicera japonica* Thunb.) via the callus method. Vol.32: 384-390).

Kết quả nghiên cứu của các tác giả trên cho thấy, các tác giả đã nhân nhanh được giống cây kim ngân bằng cách sử dụng các cấu trúc khác nhau như phôi soma, mô sẹo, chồi đỉnh,... Tuy nhiên khi sử dụng các cấu trúc này trong việc nhân nhanh sẽ gặp phải những nhược điểm như: chồi tái sinh mang các đặc điểm hình thái không bình thường, số lượng chồi tạo ra ít, các cấu trúc mô này không có khả năng phân chia, nhân nhanh, chỉ được duy trì trong thời gian ngắn, khả năng thoái hóa cao. Việc sử dụng mô sẹo phôi hóa sẽ hạn chế được các nhược điểm mà các cấu trúc không phải mô

sẹo phôi hóa mang lại. Hiện nay trên thế giới chưa có nghiên cứu nhân nhanh *in vitro* cây kim ngân thông qua giai đoạn tạo mô sẹo phôi hóa (phôi vô tính) được công bố. Chính vì vậy, giải pháp hữu ích của chúng tôi là công trình đầu tiên có tính đột phá mới trong nghiên cứu nhân giống cây kim ngân. Thông qua giai đoạn tạo mô sẹo phôi hóa (phôi vô tính) số lượng cây tái sinh được từ các phôi vô tính là rất lớn, các cây con được tạo ra sạch bệnh và đồng nhất về mặt di truyền.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Giải pháp hữu ích đề cập đến việc nhân nhanh cây kim ngân thông qua giai đoạn tạo mô sẹo phôi hóa (Friable Embryogenic Callus - FEC). Mô sẹo phôi hóa là một cấu trúc phôi có đặc điểm hình thái ổn định trong một thời gian dài nếu được nuôi cấy trong cùng điều kiện môi trường thích hợp. Cấu trúc này được mô tả như một cụm trứng cá bao gồm nhiều cụm tế bào rời rạc, khá đồng nhất với nhau về mặt hình dạng kích thước và khi tái sinh cho được chồi bình thường với tỷ lệ cao. Nhờ khả năng nhân nhanh của cấu trúc mô sẹo phôi hóa mà trong một thời gian ngắn lượng mô sẹo phôi hóa có thể tạo ra theo cấp số nhân. Điều này rất có ý nghĩa cho việc tái sinh và tạo được lượng lớn các cây *in vitro*.

Mẫu nuôi cấy được đưa vào môi trường dinh dưỡng nhân tạo phù hợp, trong điều kiện vô trùng các tế bào sẽ thực hiện quá trình giải biệt hóa để hình thành mô sẹo. Mô sẹo được nuôi cấy trên môi trường cảm ứng tạo thành các cấu trúc phôi có tổ chức sau đó tạo phôi soma. Nuôi cấy tế bào soma cho đến khi chúng tạo được mô sẹo phôi hóa (FEC), từ mô sẹo phôi hóa (phôi vô tính) sẽ tái sinh thành chồi và cây con khi cấy chuyển chúng sang môi trường dinh dưỡng có bổ sung các chất kích thích sinh trưởng với nồng độ nhất định. Trong nuôi cấy để tạo mô sẹo phôi hóa, số lượng chồi tái sinh thu được sẽ lớn gấp nhiều lần so với phương pháp tạo cơ quan trực tiếp cũng như phương pháp thông qua giai đoạn tạo mô sẹo thông thường. Thực tế thí nghiệm cho thấy, trong một số trường hợp nếu tìm ra được điều kiện nuôi cấy thích hợp (môi trường khoáng, các chất kích thích sinh trưởng,...) có thể tạo ngay được mô sẹo phôi hóa mà không cần qua bước tạo mô sẹo, tạo phôi soma. Điều này có ý nghĩa rất lớn trong việc giảm chi phí cũng như thời gian để tạo được lượng lớn số cây sạch bệnh và đồng nhất về mặt di truyền.

Để đạt được mục đích nêu trên, quy trình nhân giống bao gồm các bước: chọn nguyên liệu và khử trùng mẫu, tạo mô sẹo và mô sẹo phôi hóa, nhân nhanh mô sẹo phôi hóa, tái sinh chồi từ mô sẹo phôi hóa, tạo cây hoàn chỉnh, đưa cây ra vườn ươm.

Các bước này được thực hiện như sau:

- Chọn nguyên liệu và khử trùng mẫu: Cây mẹ được lựa chọn là những cây sạch bệnh, khỏe, đang trong thời kỳ sinh trưởng. Bộ phận lấy mẫu: chồi đỉnh hoặc đoạn (đốt) thân non kim ngân có chiều dài 3 - 5 cm chứa mắt ngủ. Sau khi rửa sạch mẫu dưới vòi nước chảy trong thời gian 5 - 7 phút, khử trùng mẫu với dung dịch HgCl_2 (thủy ngân clorua) 0,1% trong 5 - 10 phút, rửa lại bằng nước cất vô trùng 3 - 5 lần, mỗi lần 3 - 5 phút. Các mẫu sống sau khi khử trùng xong được nuôi cấy trên môi trường cơ bản MS (Murashige & Skoog, 1962) có bổ sung nước dừa 100 mg/l, đường 20 g/l, thạch 7g/l (pH = 5,8). Yêu cầu của giai đoạn này là hạn chế được sự tổn thương cho mẫu vật và mang lại tỷ lệ mẫu sống cao, giữ được sự ổn định về mặt di truyền, không ức chế sự phát triển của mẫu vật sau khử trùng và mang lại hiệu quả kinh tế.

- Tạo mô sẹo và mô sẹo phôi hóa: Quá trình hình thành mô sẹo từ việc nuôi cấy mô và cơ quan tách rời có thể coi là quá trình giải biệt hóa, đưa các mẫu đã biệt hóa trở về trạng thái phôi sinh. Về nguyên tắc thì tất cả các bộ phận sống của cây đều có thể được nuôi cấy để tạo mô sẹo, tuy nhiên với khả năng thích ứng và chuyển hóa nhanh, sự ổn định về mặt di truyền của tế bào thì các mô và cơ quan được lựa chọn là các bộ phận non của cây như chồi, lá non,... Các mẫu sạch được đưa vào môi trường có bổ sung hàm lượng auxin và cytokinin ở nồng độ thích hợp sẽ kích thích sự hình thành mô sẹo. Ở đây chúng tôi sử dụng mẫu lá, thân, chồi đỉnh/ chồi nách của cây *in vitro* thu được sau 4 tuần nuôi cấy. Môi trường sử dụng là môi trường MS có bổ sung nước dừa 100 mg/l, đường 20 g/l, picloram 9 -13 mg/l, thạch 7g/l. Mô sẹo phôi hóa hình thành sẽ tạo ra các quần thể tế bào khá đồng nhất về mặt hình dạng và kích thước.

- Nhân nhanh mô sẹo phôi hóa: Mô sẹo phôi hóa được nuôi cấy trên môi trường nhân nhanh để tạo được số lượng lớn mô sẹo phôi hóa.

- Tái sinh chồi từ mô sẹo phôi hóa: Sau khi kết thúc giai đoạn nhân nhanh mô sẹo phôi hóa, các khối mô sẹo phôi hóa này được đưa vào môi trường có bổ sung các chất kích thích sinh trưởng phù hợp nhằm biệt hóa tế bào. Hiệu quả của giai đoạn này phụ thuộc nhiều yếu tố như đặc tính di truyền, cơ quan sử dụng, các chất kích thích

sinh trưởng,... Ở đây chúng tôi sử dụng kinetin và NAA (axit naphthalene axetic) nồng độ 1,0 – 1,5 mg/l bổ sung vào môi trường MS có chứa nước dừa 100 mg/l, đường 20 g/l, , thạch 7g/l.

- Tạo cây hoàn chỉnh: Trong giai đoạn nhân nhanh, các chồi thường chưa có rễ. Để tạo cây hoàn chỉnh, các chồi có kích thước đảm bảo phải được cấy chuyển vào môi trường ra rễ. Môi trường sử dụng là môi trường MS bổ sung NAA nồng độ 0,2 -0,4 mg/l, nước dừa 100 mg/l, đường 20 g/l, , thạch 7g/l. Các mẫu được nuôi cấy trong điều kiện môi trường với chu kỳ quang 16 giờ/ ngày, cường độ ánh sáng 2000 lux và nhiệt độ $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

- Đưa cây ra vườn ươm: Đây là giai đoạn cây được chuyển từ điều kiện vô trùng của phòng thí nghiệm ra ngoài tự nhiên. Do cây con vẫn còn hết sức non nớt, trạng thái sinh lý vốn thích hợp với điều kiện phòng thí nghiệm nên khi đưa ra ngoài tự nhiên cây rất dễ bị mất nước nhanh, nhiễm khuẩn và nấm bệnh. Chính sự thay đổi đột ngột của điều kiện sống nên đã gây không ít khó khăn trong việc đưa cây *in vitro* ra ngoài đất. Do vậy, trước khi đưa cây từ bình cây mẫu ra vườn ươm chúng tôi đã mang những bình này ra khỏi phòng nuôi cấy trước đó khoảng từ 5 – 7 ngày sau đó mới tiến hành lấy cây ra khỏi bình, rửa sạch lớp thạch bám vào rễ rồi đưa cây trồng trong bầu đất. Giá thể sử dụng có tỷ lệ đất: cát là 2: 1.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 thể hiện hình ảnh đoạn thân non cây kim ngân được khử trùng bằng HgCl_2 0,1 % trong 5 - 10 phút sau 2 tuần nuôi cấy

Hình 2 thể hiện hình ảnh mô sẹo và mô sẹo phôi hóa kim ngân (A. Mô sẹo, B. Mô sẹo phôi hóa)

Hình 3 thể hiện hình ảnh nhân nhanh mô sẹo kim ngân (A. Sau 1 tuần nuôi cấy, B. Sau 3 tuần nuôi cấy)

Hình 4 thể hiện hình ảnh chồi tái sinh từ mô sẹo phôi hóa kim ngân (A. Chồi thu được sau 4 tuần, B. Chồi thu được sau 6 tuần)

Hình 5 thể hiện hình ảnh rễ *in vitro* cây kim ngân (A. Rễ thu được sau 4 tuần, B. Rễ thu được sau 6 tuần)

Hình 6 thể hiện hình ảnh cây kim ngân *in vitro* sinh trưởng ngoài đất

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Quy trình nhân giống cây kim ngân thông qua giai đoạn tạo mô sẹo phôi hóa bao gồm các bước: chọn nguyên liệu và khử trùng mẫu, tạo mô sẹo và mô sẹo phôi hóa, nhân nhanh mô sẹo phôi hóa, tái sinh chồi từ mô sẹo phôi hóa, tạo cây hoàn chỉnh

và cuối cùng là đưa cây ra vườn ươm. Cụ thể, quy trình nhân giống cây kim ngân được thực hiện như sau:

- Chọn nguyên liệu và khử trùng mẫu: Cây mẹ được lựa chọn là những cây sạch bệnh, khỏe, đang trong thời kỳ sinh trưởng. Bộ phận lấy mẫu: chồi đỉnh hoặc đoạn (đốt) thân non kim ngân có chiều dài 3 - 5 cm chứa mắt ngủ. Sau khi rửa sạch mẫu dưới vòi nước chảy trong thời gian 5 - 7 phút, khử trùng mẫu với dung dịch HgCl_2 (thủy ngân clorua) 0,1% trong 5 - 10 phút, rửa lại bằng nước cất vô trùng 3 - 5 lần, mỗi lần 3 - 5 phút. Các mẫu sống sau khi khử trùng xong được nuôi cấy trên môi trường cơ bản MS (Murashige & Skoog, 1962) có bổ sung nước dừa 100 mg/l, đường 20 g/l, thạch 7g/l (pH = 5,8). Yêu cầu của giai đoạn này là hạn chế được sự tổn thương cho mẫu vật và mang lại tỷ lệ mẫu sống cao, giữ được sự ổn định về mặt di truyền, không ức chế sự phát triển của mẫu vật sau khử trùng và mang lại hiệu quả kinh tế.

- Tạo mô sẹo và mô sẹo phôi hóa: Quá trình hình thành mô sẹo từ việc nuôi cấy mô và cơ quan tách rời có thể coi là quá trình giải biệt hóa, đưa các mẫu đã biệt hóa trở về trạng thái phôi sinh. Về nguyên tắc thì tất cả các bộ phận sống của cây đều có thể được nuôi cấy để tạo mô sẹo, tuy nhiên với khả năng thích ứng và chuyển hóa nhanh, sự ổn định về mặt di truyền của tế bào thì các mô và cơ quan được lựa chọn là các bộ phận non của cây như chồi, lá non,... Các mẫu sạch được đưa vào môi trường có bổ sung hàm lượng auxin và cytokinin ở nồng độ thích hợp sẽ kích thích sự hình thành mô sẹo. Ở đây chúng tôi sử dụng mẫu lá, thân, chồi đỉnh/ chồi nách của cây *in vitro* thu được sau 4 tuần nuôi cấy. Môi trường sử dụng là môi trường MS có bổ sung nước dừa 100 mg/l, đường 20 g/l, picloram 9 -13 mg/l, thạch 7g/l. Mô sẹo phôi hóa hình thành sẽ tạo ra các quần thể tế bào khá đồng nhất về mặt hình dạng và kích thước.

- Nhân nhanh mô sẹo phôi hóa: Mô sẹo phôi hóa được nuôi cấy trên môi trường nhân nhanh để tạo được số lượng lớn mô sẹo phôi hóa.

- Tái sinh chồi từ mô sẹo phôi hóa: Sau khi kết thúc giai đoạn nhân nhanh mô sẹo phôi hóa, các khối mô sẹo phôi hóa này được đưa vào môi trường có bổ sung các chất kích thích sinh trưởng phù hợp nhằm biệt hóa tế bào. Hiệu quả của giai đoạn này phụ thuộc nhiều yếu tố như đặc tính di truyền, cơ quan sử dụng, các chất kích thích sinh trưởng,... Ở đây chúng tôi sử dụng kinetin và NAA nồng độ 1,0 - 1,5 mg/l bổ sung vào môi trường MS có chứa nước dừa 100 mg/l, đường 20 g/l, , thạch 7g/l.

- Tạo cây hoàn chỉnh: Trong giai đoạn nhân nhanh, các chồi thường chưa có rễ. Để tạo cây hoàn chỉnh, các chồi có kích thước đảm bảo phải được cấy chuyển vào môi trường ra rễ. Môi trường sử dụng là môi trường MS bổ sung NAA nồng độ 0,2 -0,4 mg/l, nước dừa 100 mg/l, đường 20 g/l, , thạch 7g/l. Các mẫu được nuôi cấy trong điều kiện môi trường với chu kỳ quang 16 giờ/ ngày, cường độ ánh sáng 2000 lux và nhiệt độ $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

- Đưa cây ra vườn ươm: Đây là giai đoạn cây được chuyển từ điều kiện vô trùng của phòng thí nghiệm ra ngoài tự nhiên. Do cây con vẫn còn hết sức non nớt, trạng thái sinh lý vốn thích hợp với điều kiện phòng thí nghiệm nên khi đưa ra ngoài tự nhiên cây rất dễ bị mất nước nhanh, nhiễm khuẩn và nấm bệnh. Chính sự thay đổi đột ngột của điều kiện sống nên đã gây không ít khó khăn trong việc đưa cây *in vitro* ra ngoài đất. Do vậy, trước khi đưa cây từ bình cây mẫu ra vườn ươm chúng tôi đã mang những bình này ra khỏi phòng nuôi cấy trước đó khoảng từ 5 – 7 ngày sau đó mới tiến hành lấy cây ra khỏi bình, rửa sạch lớp thạch bám vào rễ rồi đưa cây trồng trong bầu đất. Giá thể sử dụng có tỷ lệ đất: cát là 2: 1.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Ví dụ 1: Xác định điều kiện khử trùng thích hợp cho việc khử trùng mẫu cây kim ngân

Chọn nguyên liệu và khử trùng mẫu là giai đoạn đầu tiên hết sức quan trọng của tiến trình nhân giống *in vitro*. Giai đoạn khử trùng mẫu cần phải đạt các yêu cầu sau: tỷ lệ mẫu nhiễm thấp, mẫu sống cao, mô sinh trưởng tốt tạo nguồn mẫu ban đầu cho nghiên cứu tiếp theo. Cây mẹ được lựa chọn là những cây sạch bệnh, khỏe, đang trong thời kỳ sinh trưởng. Bộ phận lấy mẫu: chồi đỉnh hoặc đoạn (đốt) thân non kim ngân có chiều dài 3 - 5 cm chứa mắt ngủ. Sau khi rửa sạch mẫu dưới vòi nước chảy 5 – 7 phút, khử trùng mẫu với các dung dịch NaOCl (natri hypoclorit), $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ (canxi hypoclorit), HgCl_2 (clorua thủy ngân) trong 5 – 10 phút, rửa lại bằng nước cất vô trùng 3 – 5 lần, mỗi lần 3 – 5 phút.

Ví dụ 1.1: Khử trùng mẫu bằng NaOCl trong 5-10 phút

Ví dụ 1.2: Khử trùng mẫu bằng dung dịch $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ nồng độ 1- 5 % trong 5-10 phút

Ví dụ 1.3: Khử trùng mẫu bằng dung dịch HgCl_2 nồng độ 0,05 - 0,2% trong 5-10 phút

Các mẫu sống sau khi khử trùng xong được nuôi cấy trên môi trường cơ bản MS (Murashige & Skoog, 1962) có bổ sung nước dừa 100 mg/l, đường 20 g/l, thạch

7g/l (pH = 5,8), chiếu sáng 2000 lux bằng đèn huỳnh quang theo chu kỳ 16 giờ sáng/ngày.

Thành phần môi trường cơ bản MS (Murashige & Skoog, 1962):

<u>Các nguyên tố vi lượng</u>	mg/l
Coban clorua ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0,025
Đồng sulfat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	0,025
Natri etylenđiamintetraaxetat (Na_2EDTA)	37,27
Sắt sulfat (FeSO_4)	27,8
Axit boric (H_3BO_3)	6,2
Kali iodua (KI)	0,83
Mangan sulfat (MnSO_4)	16,9
Natri molipdat (Na_2MoO_4)	0,25
Kẽm sulfat ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	8,6
<u>Các nguyên tố đa lượng</u>	mg/l
Canxi clorua (CaCl_2)	332,02
Kali nitrat (KNO_3)	192,2
Magiê sulfat (MgSO_4)	180,54
Amoni nitrat (NH_4NO_3)	166,2
<u>Vitamin</u>	mg/l
Glyxin	2
Myoinositol	100
Axit nicotinic	0,5
Piridoxin HCl	0,5
Thiamin HCl	0,1

Kết quả thu được sau 2 tuần nuôi cấy được trình bày ở bảng sau:

Hóa chất khử trùng	Số mẫu sử dụng	Số mẫu sống	Số mẫu nhiễm	Tỷ lệ mẫu sống (%)	Tỷ lệ mẫu nhiễm (%)
NaOCl	90	25	53	27,78	58,89
$\text{Ca}(\text{OCl})_2$	90	33	42	36,67	46,67
HgCl_2	90	76	11	84,44	12,22

Trong 3 loại hóa chất khử trùng chúng tôi nhận thấy khi sử dụng HgCl_2 nồng độ 0,05% - 0,2% trong 5 - 10 phút cho tỷ lệ mẫu sống cao, tỷ lệ mẫu nhiễm và tỷ lệ mẫu chết giảm. HgCl_2 ở nồng độ 0,1 % trong 5 - 10 phút cho hiệu quả khử trùng tốt nhất đồng thời khả năng nảy chồi và sinh trưởng của chồi *in vitro* là tốt nhất. Điều này được thể hiện trong hình 1.

Ví dụ 2: Ảnh hưởng của chất kích thích sinh trưởng đến khả năng tạo mô sẹo/ mô sẹo phôi hóa cây kim ngân

So với phương thức nhân nhanh trực tiếp, nhân nhanh gián tiếp thông qua giai đoạn tạo mô sẹo/ mô sẹo phôi hóa mang lại hệ số nhân rất lớn. Trong nghiên cứu này chúng tôi sử dụng lá, thân, chồi đỉnh/ chồi nách của cây *in vitro* thu được sau 4 tuần nuôi cấy để khảo sát khả năng tạo mô sẹo/ mô sẹo phôi hóa.

Ví dụ 2.1: Tạo mô sẹo/ mô sẹo phôi hóa bằng cách bổ sung vào môi trường MS chất kích thích sinh trưởng 2,4 D với nồng độ 0,25 – 1,0 mg/l

Ví dụ 2.2: Tạo mô sẹo/ mô sẹo phôi hóa bằng cách bổ sung vào môi trường MS chất kích thích sinh trưởng picloram với nồng độ 5,0 - 15,0 mg/l

Ví dụ 2.3: Tạo mô sẹo/ mô sẹo phôi hóa bằng cách bổ sung vào môi trường MS chất kích thích sinh trưởng NAA với nồng độ 0,25 – 1,0 mg/l

Đây là 3 ví dụ điển hình nhất từ 25 ví dụ đã thử để khảo sát khả năng tạo mô sẹo/mô sẹo phôi hóa kim ngân. Trong đó: 2,4-D (2,4 diclophenoxyaxetic axit), picloram, NAA (Naphtylaxetic acid) thuộc nhóm auxin, có tác dụng kích thích tế bào thực vật đã phân hóa trở lại trạng thái phản phân hóa, phân chia nhanh và không có tổ chức để hình thành khối mô sẹo. Các mẫu được nuôi trong tối hoàn toàn. Sau 4 tuần nuôi cấy kết quả được trình bày ở bảng sau:

Chất kích thích sinh trưởng	Số mẫu mô sống	Số mẫu tạo mô sẹo	Số mẫu tạo mô sẹo phôi hóa	Tỷ lệ tạo mô sẹo (%)	Tỷ lệ tạo mô sẹo phôi hóa (%)
2,4 D	90	22	0	24,24	0
picloram	90	87	76	96,67	84,97
NAA	90	22	0	24,46	0

Kết quả thí nghiệm cho thấy, khi sử dụng picloram với nồng độ từ 1,0 đến 15,0 mg/l cho tỷ lệ tạo mô sẹo cao hơn khi sử dụng 2,4D và NAA, và đặc biệt là đã tạo

được luôn mô sẹo phôi hóa. Điều này có ý nghĩa rất lớn trong việc giảm chi phí cũng như thời gian để tạo được lượng lớn số cây sạch bệnh và đồng nhất về mặt di truyền. Với các nồng độ picloram 10 mg/l, 11 mg/l, 12 mg/l, 13 mg/l cho tỷ lệ tạo mô sẹo phôi hóa cao nhất (Hình 2). Đây là tính mới trong sáng chế vì thông thường để tạo được mô sẹo phôi hóa, mẫu nuôi cấy phải trải qua giai đoạn tạo mô sẹo, mẫu mô sẹo này được nuôi cấy trên môi trường cảm ứng tạo thành các cấu trúc phôi có tổ chức sau đó tạo phôi soma. Nuôi cấy phôi soma cho đến khi phôi này tạo được mô sẹo phôi hóa. Cả quá trình tạo mô sẹo phôi hóa thường kéo dài khoảng 4 – 5 tháng, trong khi đó khi sử dụng picloram với nồng độ thích hợp có thể hình thành luôn mô sẹo phôi hóa trong thời gian 4 tuần. Mô sẹo phôi hóa là cấu trúc duy nhất trong các cấu trúc mô đích có khả năng phân chia, nhân nhanh và duy trì trong một thời gian dài mà không bị thoái hóa.

Ví dụ 3: Ảnh hưởng của chất kích thích sinh trưởng đến khả năng tạo chồi từ mô sẹo phôi hóa

Kết thúc giai đoạn tạo mô sẹo phôi hóa, chúng tôi tiến hành nghiên cứu nhân nhanh mô sẹo phôi hóa kim ngân trước khi cấy chuyển sang môi trường tạo chồi. Thực tế thí nghiệm cho thấy, khi nhân mô sẹo phôi hóa trên môi trường tạo mô sẹo (môi trường MS có bổ sung picloram nồng độ 10 – 13 mg/l) mô sẹo phôi hóa phát triển rất tốt, do đó chúng tôi sử dụng luôn môi trường này để nhân nhanh mô sẹo phôi hóa (Hình 3).

Mô sẹo phôi hóa sau khi nhân nhanh sẽ được chuyển sang môi trường tạo chồi. Mục đích của giai đoạn này là tìm môi trường phù hợp cho tạo chồi với tỷ lệ cao và chất lượng chồi đảm bảo. Trong thí nghiệm này chúng tôi sử dụng môi trường MS với các chất kích thích sinh trưởng như sau:

Ví dụ 3.1: Tạo chồi từ mô sẹo phôi hóa bằng cách bổ sung chất kích thích sinh trưởng BAP nồng độ 0,5 - 1,5mg/l

Ví dụ 3.2: Tạo chồi từ mô sẹo phôi hóa bằng cách bổ sung chất kích thích sinh trưởng kinetin nồng độ 0,5 - 1,5mg/l

Ví dụ 3.3: Tạo chồi từ mô sẹo phôi hóa bằng cách bổ sung tổ hợp chất kích thích sinh trưởng kinetin và NAA nồng độ 0,5 - 1,5mg/l

Đây là 3 ví dụ điển hình nhất từ 18 ví dụ đã thử để khảo sát khả năng tạo chồi từ mô sẹo phôi hóa kim ngân. Trong đó: BAP (6-Benzyl amino purin) và kinetin thuộc nhóm cytokinin, là nhóm chất điều hòa sinh trưởng có liên quan chặt chẽ đến phân bào, duy trì sự trẻ hóa cơ quan, đặc biệt kích thích sự phân hóa chồi... Trong môi trường cân bằng động giữa kinetin và NAA, tổ hợp này cho phép giữ cho khối mô nuôi cấy phát triển theo một dạng nhất định, chẳng hạn như dạng cụm chồi non hoàn toàn hay cụm chồi cho nhiều chồi già.

Sau 4 tuần nuôi cấy trong điều kiện chiếu sáng 2000 lux bằng đèn huỳnh quang có chu kỳ chiếu sáng 16 giờ/ ngày, kết quả thu được ở bảng sau:

Chất KTST	Số mẫu mô sẹo phôi hóa thí nghiệm	Số mẫu mô sẹo phôi hóa tạo chồi	Tỷ lệ tạo chồi (%)	Số chồi TB/ cụm mô sẹo phôi hóa
BAP	90	33	36,27	2,53
kinetin	90	67	74,58	5,68
kinetin + NAA	90	90	100	22,23

Kết quả nghiên cứu cho thấy, việc kết hợp kinetin và NAA cho kết quả tái sinh chồi từ mô sẹo phôi hóa rất cao, số chồi trung bình/ cụm mô sẹo phôi hóa rất lớn. Đối với tổ hợp kinetin và NAA ở các nồng độ 1,0 mg/l; 1,25 mg/l; 1,5 mg/l, tỷ lệ tái sinh chồi từ mô sẹo phôi hóa đạt 100%, số chồi trung bình/ cụm mô sẹo phôi hóa đạt 22,23 chồi. Do đó chúng tôi sử dụng tổ hợp này cho việc tái sinh chồi từ mô sẹo phôi hóa kim ngân (Hình 4).

Ví dụ 4: Ảnh hưởng của chất kích thích sinh trưởng đến khả năng tạo rễ in vitro cây kim ngân

Ví dụ 4.1: Tạo rễ *in vitro* cây kim ngân bằng cách bổ sung vào môi trường MS chất kích thích sinh trưởng IBA với nồng độ 0,1 – 0,5 mg/l

Ví dụ 4.2: Tạo rễ *in vitro* cây kim ngân bằng cách bổ sung vào môi trường MS chất kích thích sinh trưởng NAA với nồng độ 0,1 – 0,5 mg/l

Ví dụ 4.3: Tạo rễ *in vitro* cây kim ngân bằng cách bổ sung vào môi trường MS tổ hợp chất kích thích sinh trưởng IBA + NAA với nồng độ 0,1 – 0,5 mg/l.

Trong các thí nghiệm khảo sát khả năng tạo rễ *in vitro* cây kim ngân thì đây là 3 ví dụ điển hình. IBA (axit indolylbutyric) và NAA đều thuộc nhóm auxin, có tác dụng

kích thích quá trình hình thành rễ ở mô nuôi cấy. IBA, NAA ở nồng độ thích hợp kích thích sự hình thành bộ rễ hoàn chỉnh cho cây trước khi chuyển ra ngoài tự nhiên. Mẫu nuôi cấy trong điều kiện chiếu sáng 2000 lux bằng đèn huỳnh quang theo chu kỳ 16 giờ sáng/ ngày, kết quả thu được trình bày ở bảng sau:

Chất KTST	Số cây thí nghiệm	Số cây ra rễ		Tỷ lệ tạo rễ (%)	
		Sau 4 tuần	Sau 6 tuần	Sau 4 tuần	Sau 6 tuần
IBA	90	0	42	0	46,67
NAA	90	90	90	100	100
IBA + NAA	90	73	90	81,11	100

Kết quả cho thấy, NAA kích thích hình thành rễ *in vitro* mạnh hơn IBA và tổ hợp IBA + NAA, thể hiện qua thời gian cảm ứng hình thành rễ và tỷ lệ mẫu hình thành rễ. Trên môi trường cơ bản MS bổ sung NAA nồng độ 0,1 - 0,5 mg/l thì sự hình thành rễ chỉ sau 4 tuần (đạt 100% tỷ lệ mẫu ra rễ ở các nồng độ NAA 0,2 mg/l; 0,25 mg/l; 0,3 mg/l; 0,35 mg/l; 0,4 mg/l). Điều này được thể hiện ở Hình 5.

Ví dụ 5: Ảnh hưởng của giá thể đến khả năng sống sót và sinh trưởng của cây in vitro khi đưa ra ngoài tự nhiên

Trước khi đưa cây ra vườn ươm, các bình chứa cây hoàn chỉnh được đưa ra khỏi phòng nuôi cấy từ 5 – 7 ngày sau đó mới tiến hành lấy cây ra khỏi bình, rửa sạch lớp thạch bám vào rễ rồi đưa cây trồng trong bầu đất. Đây được coi là giai đoạn có ý nghĩa quyết định cuối cùng nhằm bảo vệ thành quả của toàn bộ tiến trình nuôi cấy cây *in vitro* và đưa chúng vào thực tiễn sản xuất. Để đảm bảo điều này, tất cả những yếu tố liên quan đến tỷ lệ sống và phát triển của cây con trong điều kiện tự nhiên cần phải được thử nghiệm và nghiên cứu kỹ, một trong những yếu tố quan trọng đó là giá thể.

Ví dụ 5.1: Giá thể sử dụng khi đưa cây *in vitro* ra ngoài tự nhiên có tỷ lệ đất : cát là 1:0

Ví dụ 5.2: Giá thể sử dụng khi đưa cây *in vitro* ra ngoài tự nhiên có tỷ lệ đất : cát là 1:1

Ví dụ 5.3: Giá thể sử dụng khi đưa cây *in vitro* ra ngoài tự nhiên có tỷ lệ đất : cát là 2:1

Ví dụ 5.4: Giá thể sử dụng khi đưa cây *in vitro* ra ngoài tự nhiên có tỷ lệ đất : cát là 1:2

Ví dụ 5.5: Giá thể sử dụng khi đưa cây *in vitro* ra ngoài tự nhiên có tỷ lệ đất : cát là 0:1

Vườn ươm có độ che phủ của ánh sáng tự nhiên từ 80 – 90 %. Kết quả thí nghiệm sau 4 tuần khi đưa ra ngoài vườn ươm được trình bày ở bảng sau:

Giá thể đất : cát	Số cây ra đất	Số cây sống sót	Tỷ lệ sống (%)	Chiều cao TB cây (cm)
1:0	90	46	51,11	10,14
1:1	90	59	65,56	11,87
2:1	90	88	97,78	15,06
1:2	90	63	70,00	12,62
0:1	90	35	38,89	8,86

Sau 4 tuần đưa cây ra bầu đất, kết quả cho thấy, trên các giá thể khác nhau, tỷ lệ sống sót, khả năng sinh trưởng, phát triển của cây cũng rất khác nhau. Tỷ lệ sống sót và khả năng sinh trưởng tốt nhất của cây con đạt được là ở giá thể có tỷ lệ đất : cát là 2:1. Ở giá thể này, cây thích ứng rất nhanh, chỉ sau khoảng 7 – 10 ngày trồng cây đã có biểu hiện sinh trưởng rõ rệt và cuối cùng cho tỷ lệ sống đạt được rất cao 97,78 % với chiều cao cây là 15,06 cm (Hình 6).

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình nhân nhanh trong ống nghiệm (*in vitro*) cây kim ngân (*Lonicera japonica* Thunb.) thông qua giai đoạn tạo mô sẹo phôi hóa gồm các bước sau:

(a) lấy mẫu để nhân giống là chồi đỉnh hoặc đoạn (đốt) thân non kim ngân có chiều dài 3 - 5 cm chứa mắt ngủ, được khử trùng bằng HgCl_2 0,1% trong 5 – 10 phút, sau đó mẫu được nuôi cấy trên môi trường cơ bản MS có bổ sung một lượng tối ưu nước dừa, đường, thạch, pH 5,8, chiếu sáng 2000 lux bằng đèn huỳnh quang theo chu kỳ 16 giờ sáng/ngày, thời gian nuôi cấy 4 tuần để thu chồi *in vitro*;

(b) lá, thân, chồi đỉnh/chồi nách của cây *in vitro* thu được từ công đoạn (a) được cấy chuyển sang môi trường cơ bản MS có bổ sung một lượng hữu hiệu các thành phần sau để tạo mô sẹo phôi hóa: picloram, nước dừa, đường, thạch, pH 5,8, nuôi trong hoàn toàn trong 4 tuần;

(c) cấy chuyển mô sẹo phôi hóa thu được từ công đoạn (b) sang môi trường cơ bản MS có bổ sung một lượng tối ưu các thành phần sau để tái sinh chồi từ mô sẹo phôi hóa: tổ hợp kinetin và NAA, nước dừa, đường, thạch, pH 5,8 trong điều kiện ánh sáng như ở công đoạn (a) trong 4 tuần;

(d) cấy chuyển chồi chưa có rễ thu được từ công đoạn (c) lên môi trường để tạo rễ là môi trường MS có bổ sung thêm NAA, nước dừa, đường, thạch, pH 5,8 trong điều kiện ánh sáng như ở công đoạn (a) trong 4 tuần;

(e) để bình chứa cây hoàn chỉnh thu được từ công đoạn (d) ra ngoài vườn ươm trong 5 - 7 ngày, sau đó tiến hành ra cây bằng cách rửa sạch môi trường bám ở cây sau đó trồng trên giá thể bao gồm đất và cát với tỷ lệ tối ưu, vườn ươm có độ che phủ của ánh sáng tự nhiên từ 80 – 90 %, thời gian trồng khoảng 4 - 6 tuần để thu được cây kim ngân giống.

2. Quy trình theo điểm 1, trong đó:

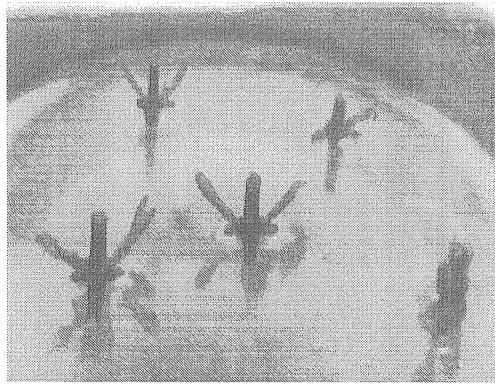
bước (a) sử dụng 100 mg/l nước dừa, 20 g/l đường, 7 g/l thạch trong môi trường MS;

bước (b) sử dụng 10 - 13 mg/l picloram, tốt hơn là 10 mg/l hoặc 11 mg/l, 12 mg/l hoặc 13 mg/l, 100 mg/l nước dừa, 20 g/l đường, 7 g/l thạch trong môi trường MS;

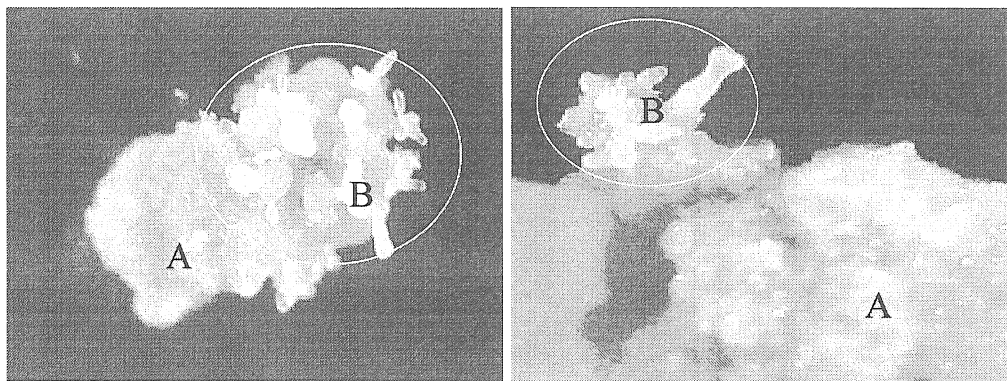
bước (c) sử dụng 1,0 - 1,5 mg/l tổ hợp kinetin và NAA, tốt hơn là 1,0 mg/l hoặc 1,25 mg/l hoặc 1,5 mg/l, 100 mg/l nước dừa, 20 g/l đường, 7 g/l thạch trong môi trường MS;

bước (d) sử dụng 0,2 – 0,4 mg/l NAA, tốt hơn là 0,2 mg/l hoặc 0,25 mg/l hoặc 0,3 mg/l hoặc 0,35 mg/l hoặc 0,4 mg/l, 100 mg/l nước dừa, 20 g/l đường, 7 g/l thạch trong môi trường MS; và

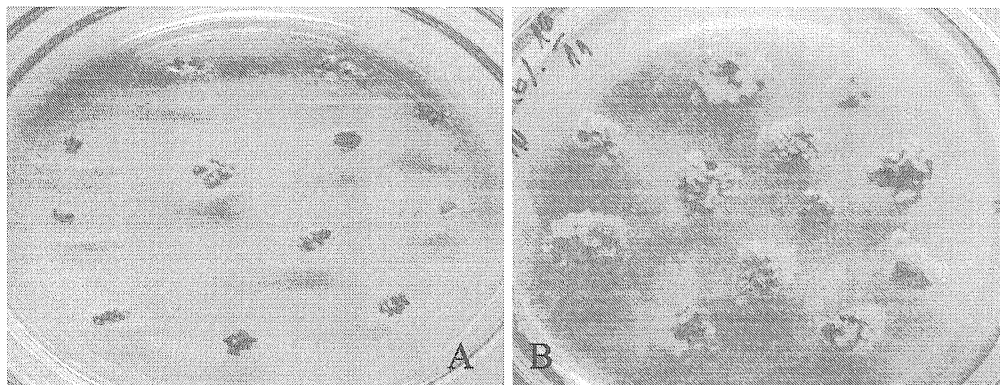
bước (e) sử dụng tỷ lệ đất: cát là 2:1.



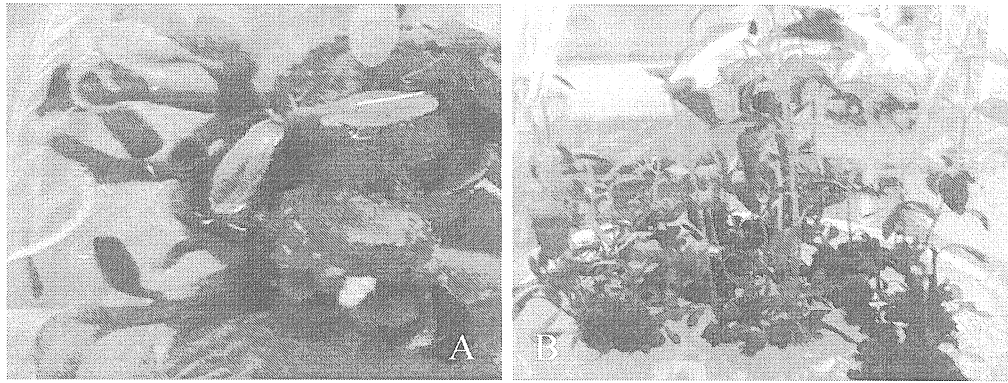
Hình 1



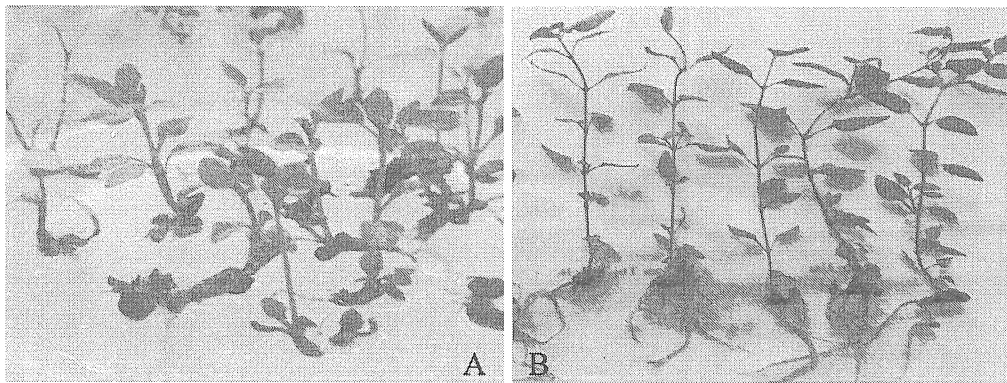
Hình 2



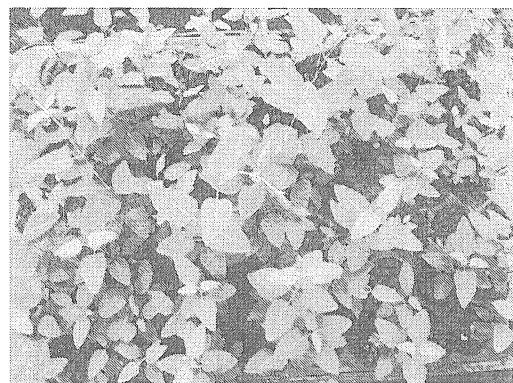
Hình 3



Hình 4



Hình 5



Hình 6