BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

TRƯỜNG ĐẠI HỌC ĐÀ LẠT

ĐỀ TÀI NGHIÊN CỨU KHOA HỌC SINH VIÊN

BƯỚC ĐẦU KHẢO SÁT KHẢ NĂNG NHÂN GIỐNG *IN VITRO* *BEGONIA MASONIANA* IRMSCH. EX ZIESENH

Giáo viên hướng dẫn: Th.S Trần Thị Nhung

Nhóm sinh viên thực hiện

ĐÀ LẠT, 2022

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC ĐÀ LẠT

BÁO CÁO TỔNG KẾT

ĐỀ TÀI NGHIÊN CỨU KHOA HỌC CỦA SINH VIÊN
THAM GIA XÉT GIẢI THƯỞNG

BƯỚC ĐẦU KHẢO SÁT KHẢ NĂNG NHÂN GIỐNG *IN VITRO* *BEGONIA MASONIANA* IRMSCH. EX ZIESENH

Nhóm ngành khoa học: Khoa học tự nhiên

ĐÀ LẠT, 2022

TRƯỜNG ĐẠI HỌC ĐÀ LẠT

KHOA SINH HỌC

BÁO CÁO TỔNG KẾT

ĐỀ TÀI KHOA HỌC SINH VIÊN NĂM HỌC 2021-2022

BƯỚC ĐẦU KHẢO SÁT KHẢ NĂNG NHÂN GIỐNG *IN VITRO* *BEGONIA MASONIANA* IRMSCH. EX ZIESENH

Nhóm ngành khoa học: Khoa học tự nhiên

Sinh viên thực hiện: Nguyễn Ngọc Thảo Nguyên Nam, nữ: Nữ

Dân tộc: Kinh

Lớp, khoa: CSK43 – Khoa sinh học Năm thứ: 3/Số năm đào tạo: 4

Ngành học: Công nghệ sinh học

Người hướng dẫn: Th.S Trần Thị Nhung

ĐÀ LẠT, 2022

LỜI CẢM ƠN

Trong suốt quá trình thực hiện đề tài, nhóm chúng tôi luôn nhận được sự quan tâm, hướng dẫn và giúp đỡ tận tình của các thầy, cô trong Khoa Sinh học cùng với sự giúp đỡ của anh chị, bạn bè trong phòng thí nghiệm Nuôi cấy mô thực vật và Tài nguyên thực vật.

Lời đầu tiên, chúng tôi xin cảm ơn Ban giám hiệu Trường Đại học Đà Lạt, Ban chủ nhiệm khoa Sinh học đã tận tình giúp đỡ, tạo điều kiện cho chúng tôi thực hiện đề tài này.

Đặc biệt, chúng tôi xin bày lòng biết ơn chân thành sâu sắc tới Th.S Trần Thị Nhung và TS. Hoàng Thị Bình đã trực tiếp giúp đỡ, hướng dẫn chúng tôi hoàn thành đề tài nghiên cứu.

Chúng tôi xin cảm ơn các anh, chị, các bạn thuộc phòng thí nghiệm Nuôi cấy mô thực vật và Tài nguyên thực vật đã trao đổi kinh nghiệm, chia sẻ những niềm vui nỗi buồn trong suốt thời gian làm việc tại phòng thí nghiệm và thực hiện nghiên cứu đề tài này.

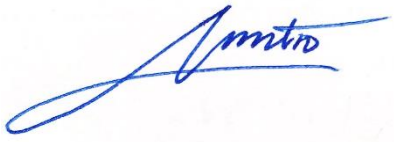
Chúng tôi xin chân thành cảm ơn quý Thầy, Cô khoa Sinh học đã tận tình chỉ dạy và trang bị cho chúng tôi những kiến thức cần thiết trong suốt thời gian còn ngồi trên ghế giảng đường, làm nền tảng để có thể hoàn thành được bài đề tài nghiên cứu này.

Nhân dịp này, tôi xin cảm ơn gia đình đã tin tưởng và tạo điều kiện thuận lợi, luôn bên cạnh động viên tinh thần trong suốt thời gian học tập và hoàn thành đề tài này.

Một lần nữa, chúng tôi xin chân thành cảm ơn thầy/cô – người đã trực tiếp giúp đỡ, quan tâm, hướng dẫn chúng tôi hoàn thành tốt bài báo cáo này trong thời gian qua.

Xin chân thành cảm ơn!

Đà Lạt, tháng 5 năm 2022



LỜI CAM ĐOAN

Chúng tôi xin cam đoan kết quả của đề tài nghiên cứu này là công trình nghiên cứu của riêng chúng tôi, không sao chép của ai và chưa từng được công bố dưới hình thức nào.

Nội dung đề tài có tham khảo và sử dụng một số thông tin, tài liệu được đăng tải trên sách, báo, tạp chí và các trang web theo danh mục tài liệu tham khảo của đề tài.

Đà Lạt, tháng 5 năm 2022

Nhóm sinh viên



MỤC LỤC

LỜI CẢM ƠN i
LỜI CAM ĐOAN ii
MỤC LỤC iii
DANH MỤC HÌNH ẢNH v
DANH MỤC BẢNG vi
DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT vii
MỞ ĐẦU xi
Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU 1
1.1. Giới thiệu về chi *Begonia* L. 1
1.1.1. Khái quát về chi *Begonia* L. 1
1.1.2. Giới thiệu về *B. masoniana* Irmsch. ex ziesenh 2
1.2. Nuôi cấy mô tế bào thực vật 5
1.2.1. Phương pháp nuôi cấy lớp mỏng tế bào (TCL: Thin Cell Layer) 7
1.2.2. Tái sinh cây hoàn chỉnh từ các bộ phận khác của cây bằng cách nuôi cấy chồi bất định 8
1.3. Các nghiên cứu liên quan 10
Chương 2. PHƯƠNG PHÁP THÍ NGHIỆM 17
2.1. Địa điểm, thời gian, mục đích thực hiện nghiên cứu 17
2.1.1. Địa điểm 17
2.1.2. Thời gian 17
2.1.3. Mục đích 17
2.2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu 17
2.2.1. Vật liệu 17
2.2.2. Khử trùng mẫu 18
2.2.3. Môi trường nuôi cấy 18

2.2.4. Dụng cụ 18
2.3. Điều kiện tiến hành thí nghiệm 19
2.4. Tiến hành thí nghiệm 19
2.4.1. Chuẩn bị môi trường 19
2.4.2. Phương pháp bố trí thí nghiệm 19
Chương 3. KẾT QUẢ THÍ NGHIỆM 21
3.1. Khảo sát ảnh hưởng của BA lên khả năng cảm ứng tạo chồi từ mẫu lá và lát mỏng cuống lá 21
3.2. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của BA lên khả năng nhân nhanh chồi 24
Chương 4. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ 27
KẾT LUẬN 27
KIẾN NGHỊ 27
TÀI LIỆU THAM KHẢO xiii
PHỤ LỤC xvii

DANH MỤC HÌNH ẢNH

Hình 1.1. *B. masoniana* Irmsch. ex ziesenh.....2

Hình 1.2. Phương pháp cắt lớp mỏng tế bào từ cuống lá 7

Hình 1.3. Sơ đồ tái sinh cây từ chồi bất định.....8

Hình 2.1. Vật liệu sử dụng trong nghiên cứu.....16

Hình 3.1. Sự phát sinh hình thái từ lớp mỏng cuống lá và phiến lá *B. masoniana* 20

Hình 3.2. Sự nhân nhanh chồi của *B. masoniana* 24

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1. Một số nghiên cứu vi nhân giống *Begonia* L. đã được thực hiện trên thế giới.....11

Bảng 3.1. Ảnh hưởng của BA đến sự phát sinh hình thái từ lớp mỏng cuống và phiến lá *B. masoniana* sau 6 tuần nuôi cấy 21

Bảng 3.2 Ảnh hưởng của BA lên khả năng nhân nhanh chồi *B. masoniana*.....23

DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT

BA	: 6-benzylaminopurine
B. masoniana	: *Begonia masoniana*
IAA	: Indole-3-acetic acid
IBA	: Indole-3-butyric acid
KIN	: Kinetin (N6-furfuryladenine)
lTCL	: Longitudinal thin cell layer
MS	: Murashie và Skoog (1962)
NAA	: α-Naphthalene acetic acid
TCL	: Thin cell layer
tTCL	: Transverse thin cell layer
ZEA	: Zeatin (6-isopentenylaminopurine)

Mẫu 1. Thông tin kết quả nghiên cứu của đề tài

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC ĐÀ LẠT

THÔNG TIN KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU CỦA ĐỀ TÀI

1. Thông tin chung:

- Tên đề tài: Bước đầu khảo sát khả năng nhân giống *in vitro Begonia masoniana* Irmsch. ex ziesenh.
- Sinh viên thực hiện: Nguyễn Ngọc Thảo Nguyên
- Lớp: CSK43 Khoa: 43 Năm thứ: 3 Số năm đào tạo:4
- Người hướng dẫn: Th.S Trần Thị Nhung

2. Mục tiêu đề tài:

Mục tiêu chung: Đa dạng hoá các loài cây trồng trang trí không gian sống.

Mục tiêu cụ thể: Khảo sát khả năng tạo chồi và nhân nhanh *B. masoniana* trong điều kiện *in vitro.*

3. Tính mới và sáng tạo:

- Đề tài lần đầu tiên ứng dụng nhân giống *in vitro* trong việc nhân giống loài B. *masoniana* tại Việt Nam.

4. Kết quả nghiên cứu:

Mẫu cuống lá *ex vitro* cắt lát mỏng có độ dày 0,2-0,3cm cấy trên môi trường MS có bổ sung 0,25mg/l BA cho tỷ lệ cảm ứng cao nhất (71%) sau 6 tuần nuôi cấy.

- Mẫu lá bao gồm cả cuống lá và phiến lá *in vitro* cấy trên môi trường MS có bổ sung 0,4mg/l BA cho tỷ lệ cảm ứng bật chồi (72%) và tạo ra 6,76 chồi/mẫu sau 3 tuần nuôi cấy.

- *B. masoniana* có khả năng nhân giống *in vitro*.

5. Đóng góp về mặt kinh tế - xã hội, giáo dục và đào tạo, an ninh, quốc phòng và khả năng áp dụng của đề tài:

Làm đa dạng hoá thêm các loài thực vật sử dụng làm làm kiểng và tăng giá trị kinh tế cho loài thực vật này.

Góp phần đa dạng hoá sản phẩm kiểng lá, giúp người nông dân thương mại hóa được các sản phẩm từ loài *Begonia masoniana* Irmsch. ex Ziesenh tại Lâm Đồng cũng như tại Việt Nam. Bên cạnh đó góp phần bảo tồn nguồn tài nguyên thực vật cũng như nguồn gen của địa phương.

6. Công bố khoa học của sinh viên từ kết quả nghiên cứu của đề tài *(ghi rõ tên tạp chí nếu có)* hoặc nhận xét, đánh giá của cơ sở đã áp dụng các kết quả nghiên cứu *(nếu có)*:

Ngày 24 tháng 5 năm 2022

Sinh viên chịu trách nhiệm chính thực hiện đề tài

(ký, họ và tên)



Nguyễn Ngọc Thảo Nguyên

Nhận xét của người hướng dẫn về những đóng góp khoa học của sinh viên thực hiện đề tài:

Nhóm sinh viên đã thực hiện tốt các yêu cầu của thuyết minh đề tài đề ra.

Đây là loài Thu hải đường mới, chưa có nghiên cứu nào liên quan đến vi nhân giống. Nhóm đã tạo được nguồn mẫu *in vitro*, giúp cho các nghiên cứu về sau để xây dựng đươc quy trình vi nhân giống hoàn chỉnh. Điều này giúp tạo nguồn giống cây *B. masoniana* dồi dào và chất lượng tốt.

Trong quá trình thực hiện, nhóm sinh viên đã học được nhiều kiến thức và kỹ năng về phương pháp nghiên cứu nuôi cấy mô thông qua đọc tài liệu, thực nghiệm và viết báo cáo.

Ngày 24 tháng 5 năm 2022

Xác nhận của trường đại học

(ký tên và đóng dấu)

Người hướng dẫn

(ký, họ và tên)



Trần Thị Nhung

Mẫu 2. Thông tin về sinh viên chịu trách nhiệm chính thực hiện đề tài

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC ĐÀ LẠT

THÔNG TIN VỀ SINH VIÊN
CHỊU TRÁCH NHIỆM CHÍNH THỰC HIỆN ĐỀ TÀI



I. SƠ LƯỢC VỀ SINH VIÊN:

Họ và tên: Nguyễn Ngọc Thảo Nguyên
Sinh ngày: 22 tháng 7 năm 2001
Nơi sinh: Lâm Đồng
Lớp: CSK43 Khóa:43
Khoa: Sinh học
Địa chỉ liên hệ: 31/36 Nam Hồ, phường 11, Đà Lạt, Lâm Đồng
Điện thoại: 0388995435 Email: 1910204@dlu.edu.vn

II. QUÁ TRÌNH HỌC TẬP

*** Năm thứ 1:**

Ngành học: Công nghệ sinh học Khoa: Sinh học
Kết quả xếp loại học tập: Khá
Sơ lược thành tích:
- Tham gia hoạt động tình nguyện (có giấy chứng nhận)

*** Năm thứ 2:**

Ngành học: Công nghệ sinh học Khoa: Sinh học
Kết quả xếp loại học tập: Khá
Sơ lược thành tích:
- Tham gia hoạt động tình nguyện (có giấy chứng nhận)
- Tham gia đề tài nghiên cứu khoa học sinh viên cấp trường 2020-2021: Bước đầu nhân giống sinh dưỡng loài Thu hải đường hoang dại (*Begonia masoniana* Irmsch. ex Ziesenh) bằng phương pháp giâm.
- Uỷ viên Câu lạc bô Sáo Trúc DLU
- Sinh viên 5 tốt năm học 2020-2021

Ngày 24 tháng 5 năm 2022

Xác nhận của trường đại học
(ký tên và đóng dấu)

Sinh viên chịu trách nhiệm chính thực hiện đề tài
(ký, họ và tên)

Nguyễn Ngọc Thảo Nguyên

x

MỞ ĐẦU

Ngày nay, trồng cây cảnh trong nhà hay trong sân vườn là một thú vui đang được nhiều người biết đến và yêu thích. Không những vậy, việc trồng cây cảnh trong nhà giúp tăng thêm giá trị cho ngôi nhà, thư giãn tinh thần, xua tan những mệt mỏi trong công việc, cuộc sống hằng ngày. Cây Thu hải đường đang ngày càng nhận được nhiều sự quan tâm không chỉ vì hoa của loài này có nhiều màu sắc, lá cũng có những nét đặc trưng riêng biệt làm cho cây có giá trị về kiểng hoa lẫn giá trị về mặt làm kiểng lá. Cái tên Thu hải đường còn mang ý nghĩa là viên mãn hạnh phúc, phú quý giàu sang. Thu hải đường *B. masoniana* là loài có khả năng trang trí trong nhà, có giá trị về dược liệu. Tất cả những điều trên càng mang đến cho Thu hải đường những giá trị cao về tinh thần cũng như kinh tế.

Tuy nhiên, hiện nay lượng cây giống thuần bản địa chưa nhiều, đa số giống được nhập từ nước ngoài và những nghiên cứu về khả năng nhân giống của loài này còn hạn chế. *B. masoniana* là một trong những loài Thu hải đường hoang dại đẹp, mang lại giá trị kinh tế cho người trồng. Theo cách nhân giống truyền thống, cây con *B. masoniana* được tạo ra từ những mẫu lá, cuống của cây mẹ. Cách nhân giống này lại có những hạn chế như: cây sinh trưởng chậm, tỷ lệ ra chồi chưa cao, không đồng đều, cây dễ bị bệnh. Trong khi đó, nhân giống *in vitro* có nhiều ưu điểm nổi bật như: tạo được cây con sạch bệnh, thời gian nhân giống ngắn, hệ số nhân giống cao, cây đồng nhất, đáp ứng được nhu cầu cả về số lượng và chất lượng giống. Do đó, việc áp dụng nuôi cấy mô tế bào thực vật là một trong những giải pháp có thể giải quyết vấn đề nhân giống của *B. masoniana*. Để khảo sát khả năng tạo chồi và nhân nhanh *B. masoniana* trong điều kiện *in vitro*, chúng tôi thực hiện đề tài "Bước đầu khảo sát khả năng nhân giống *in vitro Begonia masoniana* Irmsch. ex ziesenh.".

Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. Giới thiệu về chi *Begonia* L.

1.1.1. Khái quát về chi *Begonia* L.

Chi Thu hải đường (*Begonia* L.) họ (Begoniaceae) phân bố hầu hết ở châu Á, châu Mỹ và châu Phi (Hilinske, 2016), ngoại trừ Úc (Hvoslef-Eide và Munster, 2007). *Begonia* là một trong mười chi thực vật lớn nhất (Frodin, 2004), gồm khoảng 2500 loài (Tian và cộng sự, 2018). Thu hải đường được trồng thương mại chủ yếu là giống lai giữa các loài cây hoang dã các loài từ khắp nơi trên thế giới (Hvoslef-Eide và Munster, 2007), là cây trang trí phổ biến. Chúng có thể được trồng ngoài trời, trong chậu, giỏ, và luống vườn (Hvoslef-Eide và Munster, 2006), hoặc trồng làm kiểng trong nhà (Tian và cộng sự, 2012). Hiệp hội Thu hải đường Hoa Kỳ phân chia Thu hải đường thành các nhóm chính:

- Cane begonia
- Shrub-like
- Tuberous
- Rhizomatous
- Semperflorens
- Rex
- Trailing-scandent
- Thick-stemmed

Phần lớn sự phân chia các nhóm này không tương ứng với bất kỳ nhóm phân loại hoặc phát sinh loài theo phân loại chính thức nào, nhiều loài và giống lai có các đặc điểm của nhiều hơn một nhóm hoặc không phù hợp với bất kỳ nhóm nào trong số chúng.

1.1.2. Giới thiệu về *B. masoniana* Irmsch. ex ziesenh

1.1.2.1. Vị trí phân loại

Giới: Plantae

(không phân hạng): Anginospermae

(không phân hạng): Eudicots

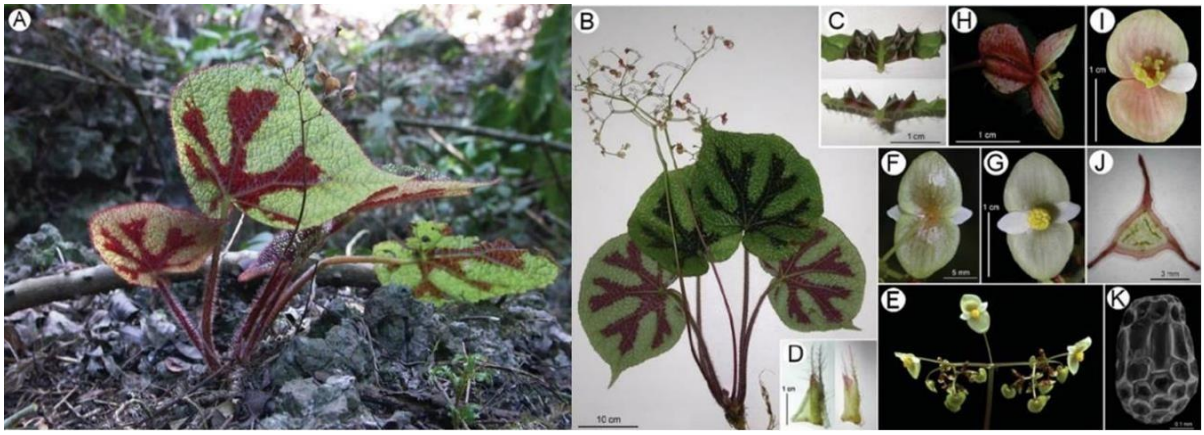
Bộ: Cucurbitales

Họ: Begoniaceae

Chi: *Begonia* L.

Loài: *B. masoniana* Irmsch. ex Ziesenh

Tên thông thường: Begonia Iron cross



Hình 1.1. *B. masoniana* Irmsch. ex Ziesenh (Peng và cộng sự, 2005)

A. Môi trường sống và sự ra quả của cây trên đá vôi; B. Sự phát triển, ra hoa trễ của cây; C. Đặc điểm của lá: phồng lên và có lớp lông ở trên bề mặt lá; D. Lá kèm; E. Sự ra hoa; F. Mặt sau hoa đực; G. Mặt trước hoa đực; H. Mặt bên hoa cái; I. Mặt trước hoa cái; J. Mặt cắt ngang của bầu nhụy; K. Hình dạng hạt

B. masoniana là một loài thực vật thuộc họ Thu hải đường (Begoniaceae), là loài cây có phân bố ở miền nam Trung Quốc và miền bắc Việt Nam (Kiew và cộng sự, 2015). *B. masoniana* (Iron Cross) được Maurice Mason giới thiệu ở Anh vào năm 1952. Đây là một loài kiểng lá phổ biến, thân rễ (rhizomatic begonia), thường xanh sống lâu năm, thích nghi tốt với các vùng có độ cao khác nhau (Krempin, 1993; Kiew, 2005). Loài này

có lá đẹp với lông thô trên bề mặt lá, giống một cái khiên với các vân chữ thập; mặt trên của lá có lông dày, ngược lại mặt dưới lá có lông rải rác và có màu xanh thẫm, cuống lá dài 12-20cm, hoa đơn tính, mọc thành cụm, cuống hoa dài 12-20cm và không đối xứng. Lá của chúng đẹp và rất có tiềm năng dùng để làm cây giống (Siregar và Wahyumi, 2017). Những bông hoa màu trắng hồng hoặc xanh nhạt của chúng xuất hiện theo mùa, nhưng chúng khá nhỏ và thường không được chú ý. Tuy nhiên, khi kết hợp *B. masoniana* với những loại cây kiểng lá khác sẽ tạo nên những chậu kiểng lá hoàn hảo, phù hợp để trang trí trong nhà và sân vườn. Năm 2020, *B. masoniana* đạt giải thưởng Garden Merit của Hiệp hội Làm vườn Hoàng gia.

1.1.2.2. Đặc điểm sinh học

B. masoniana là cây thảo hàng năm, có thân rễ, mọc đứng phân cành nhiều; lá có cuống, mọc so le, kèm theo những lá kèm sớm rụng, dù có hình dạng thay đổi nhưng hầu như đều không cân đối; hoa đơn tính cùng gốc, hoa đực có đế hoa lồi mang 2, 4 hay nhiều phiến dạng cánh và nhiều nhị vàng; hoa cái ngược lại, có đế hoa lõm và có bầu thường chia 3 ô vòi nhụy chẻ đôi ở đầu; quả nang có 3 cánh thường không đều, chứa nhiều hạt nhỏ (Chi, 2003).

1.1.2.3. Đặc điểm sinh thái

Phần lớn Thu hải đường có nguồn gốc từ rừng nhiệt đới nên chúng thường phát triển mạnh ở những vùng có khí hậu ấm áp. Trong tự nhiên các loài này thường mọc ở tầng thấp trong rừng, chúng cần có bóng râm và chỉ có một số loài chịu được ánh sáng mạnh, đặc biệt trong các vùng có khí hậu nóng. Nhiều loài Thu hải đường phát triển và ra hoa quanh năm nhưng loài thân củ thường có thời kỳ ngừng phát triển, trong thời gian đó, củ có thể lưu trữ trong khu vực khô và mát mẻ. *Begonia* có thể được trồng từ hạt, giâm cành và một vài loài dạng thân củ có thể được dự trữ cho mùa đông dưới điều kiện lạnh giá. Đối với giâm cành, lá hoặc những phần của lá cũng có thể được sử dụng, chúng ra rễ dễ dàng dưới điều kiện ẩm ướt. Ngoài việc dễ dàng phát triển, chúng thường cho rất nhiều hoa với tất cả các màu từ đỏ, đỏ tươi, hồng, vàng và trắng tạo nên một sự thay đổi màu sắc qua các mùa (Hvoslef- Eide và cộng sự, 2007).

Ngoài ra, Dương và cộng sự (2021), sau 1 năm thử nghiệm nhân giống sinh dưỡng *B. masoniana* ở trường Đại học Đà Lạt, đã nhận thấy các đặc điểm thích hợp cho cây phát triển ở nhiệt độ là 19,2±3°C, cường độ chiếu sáng là 345W/m^2≈236,3lux, 70-85% độ ẩm. Với điều kiện chiếu sáng 345W/m^2 ≈ 236,3lux, điều kiện ánh sáng yếu, là điều kiện vô cùng thích hợp để trồng trong nhà.

1.1.2.4. Giá trị của *Begonia masoniana* Irmsch. ex ziesenh

B. masoniana có giá trị làm kiểng cao, đã trở thành loài kiểng trong nhà và sân vườn nổi tiếng thế giới (Zeng, 1998) và phát triển thành một loại kiểng lá trong những năm gần đây. Vào đầu những năm 1960, Nhật Bản đã đi đầu trong việc giới thiệu *B. masoniana* như một loài thực vật kiểng lá và thực hiện thành công trong việc trồng trọt và nhân giống nhân tạo. Đến những năm 1970, Châu Âu và Hoa Kỳ cũng bắt đầu sử dụng cây này như một loại kiểng lá (Zaiqi, 2008).

Trong nghiên cứu của Bashilov.A (2021) đã phân tích thành phần hóa học và hoạt động chống lại sự tổng hợp gốc tự do của các đại diện Begoniaceae. Trong đó, A.Bashilov đã phát hiện các hợp chất có trong lá của *B. masoniana* bao gồm: Anthocyans, Catechins, Flavonols, Ascorbic acid, Hydrophilic pectin, Protopectin. Các chất này là các chất chống oxi hoá có mặt trong các thực phẩm thiên nhiên và được biết đến như thảo dược và ít gây độc cho người sử dụng.

Tsybulya, N. V. và Fershalova, T. D. (2021) trong khi thực hiện nghiên cứu hoạt động kháng khuẩn theo mùa đối với các chất dễ bay hơi do các đại diện của chi *Begonia* L. (họ Begoniaceae), phát hiện trong *B. masoniana* có khả năng chống lại vi khuẩn *E.coli*.

Theo Halyna Tkachenko và cộng sự (2017) đã cho thấy rằng *B. masoniana* có thể ngăn ngừa sự hình thành methemoglobin và giảm tan máu.

1.2. Nuôi cấy mô tế bào thực vật

Nuôi cấy mô tế bào thực vật là một công cụ đắc lực cho khoa học trong việc nhân nhanh một số lượng lớn cây giống với chất lượng đồng đều và đồng nhất về mặt di truyền, tạo cây sạch bệnh,v.v. phục vụ cho sản xuất và trong công tác nghiên cứu. Với các điều kiện nhân tạo về sinh lý (độ ẩm, ánh sáng, nhiệt độ,v.v.), sinh hóa (nguồn dinh dưỡng,v.v.) và cung cấp một môi trường lý tưởng cho sự sinh trưởng của thực vật (sạch vi sinh, nấm,v.v.) (Murashige và Skoog, 1962).

Ý nghĩa của nuôi cấy mô

- Đưa ra sản phẩm nhanh hơn: Từ một cây ưu việt bất kỳ đều có thể tạo ra một quần thể có độ đồng đều cao với số lượng không hạn chế, phục vụ sản xuất thương mại, dù cây đó là dị hợp về mặt di truyền.

- Nhân nhanh với hệ số nhân giống cao: Trong hầu hết các trường hợp, công nghệ vi nhân giống đáp ứng tốc độ nhân nhanh cao, từ 1 cây trong vòng 1-2 năm có thể tạo thành hàng triệu cây.

- Sản phẩm cây giống đồng nhất: Vi nhân giống về cơ bản là công nghệ nhân dòng. Nó tạo ra quần thể có độ đều cao dù xuất phát từ cây mẹ có kiểu gen dị hợp hay đồng hợp.

- Tiết kiệm không gian: Vì hệ thống sản xuất hoàn toàn trong phòng thí nghiệm, không phụ thuộc vào thời tiết và các vật liệu khởi đầu có kích thước nhỏ. Mật độ cây tạo ra trên một đơn vị diện tích lớn hơn rất nhiều so với sản xuất trên đồng ruộng và trong nhà kính theo phương pháp truyền thống.

- Nâng cao chất lượng cây giống: Nuôi cấy mô là một phương pháp hữu hiệu để loại trừ virus, nấm khuẩn khỏi các cây giống đã nhiễm bệnh. Cây giống sạch bệnh tạo ra bằng cấy mô thường tăng năng suất 15 - 30% so với giống gốc.

- Khả năng tiếp thị sản phẩm tốt hơn và nhanh hơn: Các dạng sản phẩm khác nhau có thể tạo ra từ hệ thống vi nhân giống như cây con *in vitro* (trong ống nghiệm) hoặc trong bầu đất. Các cây giống có thể được bán ở dạng cây, củ bi hay là thân củ.

- Lợi thế về vận chuyển: Các cây con kích thước nhỏ có thể vận chuyển đi xa dễ dàng và thuận lợi, đồng thời cây con tạo ra trong điều kiện vô trùng được xác nhận là sạch bệnh. Do vậy, bảo đảm an toàn, đáp ứng các quy định về vệ sinh thực vật quốc tế.

- Sản xuất quanh năm: Quá trình sản xuất có thể tiến hành vào bất kỳ thời gian nào, không phụ thuộc mùa vụ.

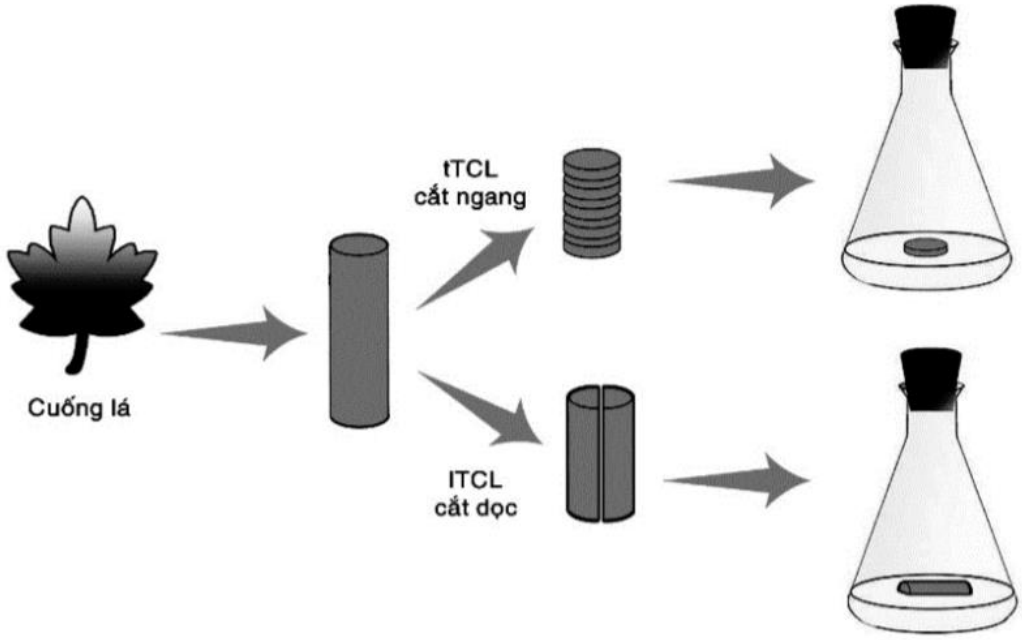
Hạn chế của vi nhân giống

- Hạn chế về chủng loại sản phẩm: Trong điều kiện kỹ thuật hiện nay, không phải tất cả cây trồng đều được nhân giống thương phẩm bằng vi nhân giống. Nhiều cây trồng có giá trị kinh tế hoặc quý hiếm vẫn chưa thể nhân nhanh để đáp ứng nhu cầu thương mại hoặc bảo quản nguồn gen. Nhiều vấn đề lý thuyết liên quan đến nuôi cấy và tái sinh tế bào thực vật *in vitro* vẫn chưa được giải đáp.

- Chi phí sản xuất cao: Vi nhân giống đòi hỏi nhiều lao động có kỹ thuật thành thạo. Do đó, giá thành sản phẩm còn khá cao so với các phương pháp truyền thống như chiết, ghép và nhân giống bằng hạt.

- Hiện tượng sản phẩm bị biến đổi kiểu hình: Cây con nuôi cấy mô có thể sai khác với cây mẹ ban đầu do hiện tượng biến dị tế bào soma. Kết quả là cây con không giữ được các đặc tính quý của cây mẹ. Tỷ lệ biến dị thường thấp ở giai đoạn đầu nhân giống, nhưng sau đó có chiều hướng tăng lên khi nuôi cấy kéo dài và tăng hàm lượng các chất kích thích sinh trưởng. Hiện tượng biến dị này cần được lưu ý khắc phục nhằm đảm bảo sản xuất hàng triệu cây giống đồng nhất về mặt di truyền.

1.2.1. Phương pháp nuôi cấy lớp mỏng tế bào (TCL: Thin Cell Layer)



Hình 1.2. Phương pháp cắt lớp mỏng tế bào từ cuống lá (Dương Tấn Nhựt, 2011)

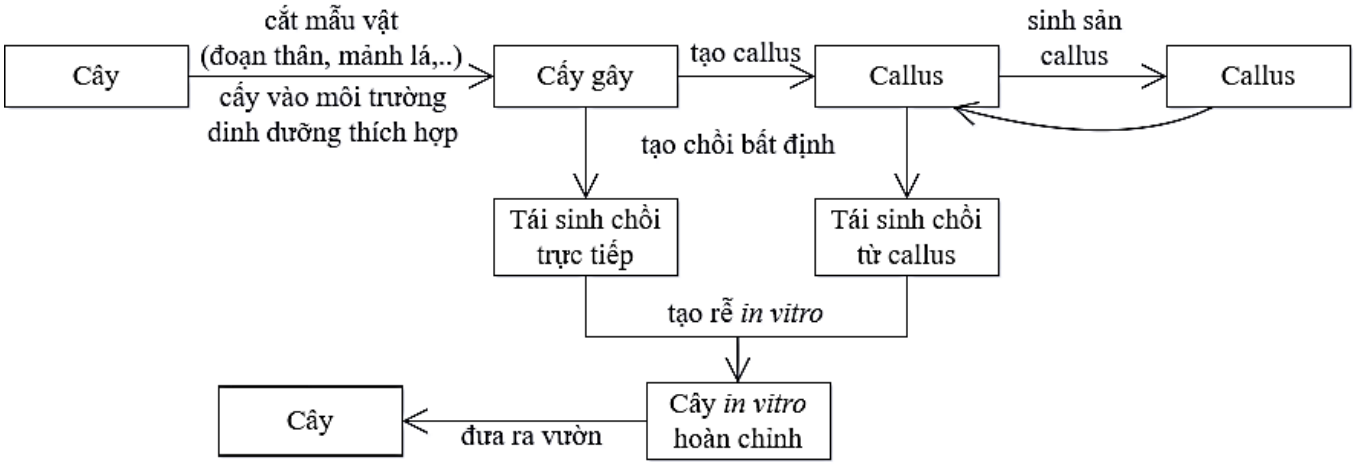
1.2.1.1. Giới thiệu phương pháp nuôi cấy lớp mỏng tế bào

Sau đó khi nghiên cứu về hệ thống ức chế, GS. Trần Thanh Vân nghĩ đến khái niệm về hệ thống lớp mỏng tế bào (Trần Thanh Vân, 1980). Sử dụng hệ thống này, GS. Trần Thanh Vân cố gắng phân tách một hoặc một vài lớp trong những tế bào đã biệt hóa từ một hệ thống cơ quan, mô, hoặc tế bào và cố gắng phản biệt hoá chúng trong nuôi cấy *in vitro*. Điều này cho phép các nhà nghiên cứu có thể truy xuất lại những thời điểm bắt đầu. Không phải như trường hợp chuyển nhân của một tế bào sinh dưỡng vào một tế bào trứng không nhân như trường hợp sinh sản vô tính của cừu Dolly, những tế bào trong hệ thống lớp mỏng tế bào vẫn giữ trạng thái nguyên phân của nó trong tế bào chất và vẫn được biệt hoá lại một cách đồng loạt để biểu hiện tất cả các trường hợp có thể có của quá trình biệt hóa, mà không chỉ có phôi mới làm được điều đó. Tất cả các quá trình biệt hóa đó được kiểm soát một cách riêng biệt hoặc phản biệt hóa theo trình tự thời gian hoặc không gian tùy theo người nghiên cứu và không bị áp đặt bởi quá trình phát triển cá thể.

Một đặc tính phổ biến của lTCL và tTCL là tính mỏng, có nghĩa là mảnh cấy có số lượng tế bào càng ít càng tốt. Đặc tính "mỏng" đóng vai trò cực kỳ quan trọng bởi những phân tử chỉ thị xác định cho sự biệt hóa có thể được xác định ngay trong những tế bào đích (hay tế bào đáp ứng). Sự xác định vị trí như vậy cho phép giới hạn những tế bào đáp ứng. (Dương Tấn Nhựt, 2011).

Kỹ thuật TCL sau đó được áp dụng thành công trong phát sinh phôi vô tính và tái sinh chồi ở nhiều loài cây hai lá mầm và cây một lá mầm, bao gồm một vài giống Lan và các giống cây trồng khác như *Dendrobium aqueum* (Parthibhan et al., 2018), cây sâm Ngọc Linh (Vu Thi Hien et al., 2016). Nó cũng được ứng dụng thành công trong tái sinh một số cây thân gỗ bao gồm cọ dầu, táo (ScherwinskiPereira và cộng sự, 2010; DobrÁnszki, Teixeira da Silva, 2013).

1.2.2. Tái sinh cây hoàn chỉnh từ các bộ phận khác của cây bằng cách nuôi cấy chồi bất định



Hình 1.3. Sơ đồ tái sinh cây từ chồi bất định

Đỉnh chồi bất định mới có thể phát triển trực tiếp trên mẫu vật hoặc gián tiếp từ mô sẹo, mà mô sẹo này hình thành trên bề mặt vết cắt của mẫu vật. Một số loại mẫu vật được dùng như sau:

- Đoạn thân: thuốc lá, cam, chanh, cà chua, bắp cải,v.v.

- Mảnh lá: thuốc lá, cà chua, bắp cải, cà phê, ca cao,v.v.

- Cuống lá: thủy tiên,v.v.

- Các bộ phận của hoa: súp lơ, lúa mỳ, thuốc lá,v.v.

- Nhánh củ: họ hành, họ lay ơn, họ thủy tiên,v.v.

- Đoạn mầm: măng tây.

Sự phát sinh chồi bất định trực tiếp bắt đầu bằng các tế bào nhu mô nằm ở trong biểu bì hoặc ngay phía dưới bề mặt của thân; một số tế bào này trở thành mô phân sinh và các túi nhỏ gọi là thể phân sinh phát triển. Các thể phân sinh này rõ ràng có nguồn gốc từ các tế bào đơn. Tuy nhiên, chiều hướng phản ứng của thực vật cũng tùy thuộc vào nồng độ phytohormone. Nghiên cứu sự tạo chồi ở mô nuôi cấy của cây linh sam Douglas cho thấy cytokinin (BAP 5μM) cần thiết cho sự phát sinh chồi bất định, nhưng có ba kiểu phản ứng khác nhau có kết quả tùy thuộc vào nồng độ của auxin được cung cấp. Nồng độ auxin thấp (NAA < 5μM) chỉ có chồi phát triển. Khi nồng độ auxin cao hơn (NAA > 5μM) lá mầm tạo ra cả mô sẹo và nhiều chồi. Khi cung cấp chỉ riêng auxin (NAA = 5μM) thì chỉ có mô sẹo được tạo thành. Sự phát triển các chồi bất định gián tiếp đầu tiên qua giai đoạn hình thành mô sẹo cơ sở từ các chồi được tách trong nuôi cấy. Các chồi sau đó phát triển từ ngoại vi mô sẹo và không có quan hệ ban đầu với các mô có mạch dẫn của mẫu vật.

1.3. Các nghiên cứu liên quan

Begonia là một chi gồm khoảng 2500 loài (Tian và cộng sự, 2018). Sự đa dạng về loài của chi *Begonia* có sự phân bố không đều giữa các hệ sinh thái khác nhau, người ta phát hiện nhiều loài ở vùng nhiệt đới hơn so với các vùng khác trên thế giới. Độ phong phú của loài này minh họa lịch sử tiến hóa phức tạp của đa dạng sinh học trên toàn cầu (Mittelbach và cộng sự, 2007). *Begonia* phân bố tương đối nhiều ở Mỹ và châu Á (600 loài) nhưng lại tương đối ít ở Châu Phi (160 loài) và không có sự xuất hiện ở Úc (Goodall- Copestake và cộng sự, 2010).

Begonia có thể dễ dàng nhận ra bởi các đặc điểm hình dạng đặc trưng như lá không đối xứng, hoa đơn tính, nhụy xoắn (Doorenbos, 1998). Tuy nhiên vẫn có các trường hợp ngoại lệ có hình thái khác với hình thái đặc trưng. Chúng có khả năng thích nghi với nhiều dạng sinh thái khác nhau (Hughes và cộng sự, 2008).

Qua bảng 1.1, có thể thấy, hiện nay chưa có nhiều nghiên cứu về nhân giống đối tượng này. Mặt khác, chưa có nghiên cứu nào được thực hiện tại Việt Nam. Thông qua đó, nghiên cứu này có thể góp phần khảo sát một số yếu tố lên khả năng nhân giống *in vitro* loài *B. masoniana*, làm nền tảng cho các nghiên cứu khác sâu hơn trong tương lai.

Bảng 1.1. Một số nghiên cứu vi nhân giống *Begonia* L. đã được thực hiện trên thế giới

STT	Tên tài liệu	Loài	Nguồn mẫu	Môi trường	Kết quả	Tài liệu tham khảo
1	Bước đầu nghiên cứu khả năng nhân giống sinh dưỡng loài thu hải đường hoang dại (*Begonia masoniana* Irmsch. ex ziesenh.) bằng phương pháp giâm	*Begonia maso -niana*	Lá và cuống lá	Giá thể: sơ dừa, đất đen tribat và bã cà phê.	Cuống lá không có khả năng tái sinh trên 3 loại giá thể khảo sát là đất đen tribat, bã cà phê, xơ dừa. Phiến lá có khả năng tái sinh trên giá thể xơ dừa, đạt tỷ lệ cao với 94%. Giá thể xơ dừa phù hợp với nhân giống sinh dưỡng *Begonia masoniana* Irmsch. ex ziesenh.	(Đỗ Văn Dương và cộng sự, 2021).

STT	Tên tài liệu	Loài	Nguồn mẫu	Môi trường	Kết quả	Tài liệu tham khảo
2	Nhân nhanh giống hoa thu hải đường *(Begonia tuberous)* bằng phương pháp nuôi cấy mô lá và kỹ thuật trồng, chăm sóc hoa thương phẩm	*Begonia tuberous*	Lá	Tạo chồi: - ½ MS bổ sung 0,00; 0,30; 0,70; 1,00mg/l BA + 0,01; 0,03; 0,05; 0,07; 0,10mg/l NAA. - MS bổ sung 0,00; 0,30; 0,50; 0,70; 1,00mg/l BA.	½ MS bổ sung 0,70mg/l BA + 0,03mg/l NAA cho tỷ lệ cảm ứng 85%.	(Đinh Văn Khiêm, 2004).
				Nhân nhanh chồi: - ½ MS bổ sung 0,50; 1,00; 1,50mg/l BA. - MS bổ sung 0,50; 1,00; 1,50mg/l BA. - MS bổ sung 1,00mg/l BA + 0,10; 0,30; 0,50; 0,70mg/l NAA. - MS bổ sung 1,00mg/l BA + 0,10; 0,30; 0,50; 0,70mg/l IBA.	MS bổ sung 1,00mg/l BA chiều cao trung bình chồi đạt cao nhất 2,9cm. MS bổ sung 1,00mg/l BA với 0,30mg/l NAA cho số chồi cao nhất (25 chồi/bình).	
				Tạo rễ: ½ MS bổ sung: - 0,00; 0,10; 0,30; 0,50; 0,70; 1,00mg/l NAA. - 0,00; 0,10; 0,30; 0,50; 0,70; 1,00mg/l IBA. - 0,30mg/l NAA + 0,50; 0,70mg/l IBA. - 0,30mg/l IBA + 0,50; 0,70mg/l NAA.	½ MS bổ sung 0,30mg/l IBA và 0,50mg/l NAA với tỷ lệ tạo rễ 100%.	

STT	Tên tài liệu	Loài	Nguồn mẫu	Môi trường	Kết quả	Tài liệu tham khảo
3	Effect of explant type and growth regulators on *in vitro* micropropagation of *Begonia rex*	*Begonia rex*	Lá, cuống lá	Tạo chồi: MS bổ sung - 0,20; 0,50; 1,00mg/l BA + 0,10; 0,50mg/l IBA. - 0,20; 0,50; 1,00mg/l BA + 0,05; 0,20mg/l NAA.	1,00mg/l BA + 0,50mg/l IBA với số lượng chồi trung bình 41,6 (chồi/ mẫu).	(Sara, K., Yousef và cộng sự, 2012).
				Nhân nhanh chồi: MS bổ sung - 0,05; 0,20mg/l GA3. - 0,05; 0,20mg/l GA3 + 0,20mg/l IBA.	0,20mg/l GA3 là môi trường thích hợp để nhân chồi với chiều cao là 2,4cm.	
				Tạo rễ: ½ MS bổ sung - 0,00; 0,20; 0,50; 0,75; 1,00mg/l IBA. - 0,00; 0,20; 0,50; 0,75; 1,00mg/l NAA.	Môi trường ½ MS không có hormone chuyển thành công vào đất với tỉ lệ sống 95%.	

STT	Tên tài liệu	Loài	Nguồn mẫu	Môi trường	Kết quả	Tài liệu tham khảo
4	Micropropagation of *Begonia rex* Putz, by 6-benzyladenine and α-naphthalene acetic acid	*Begonia rex* Putz.	Lá	Tạo chồi và rễ: MS bổ sung 0,50; 0,60mg/l BA + 0,00; 0,10; 0,25; 0,50mg/l NAA.	MS bổ sung 0,50mg/l BA + 0,10mg/l NAA với số lượng chồi 46,24 ± 7,76 (chồi/mẫu) và số lượng rễ 11,42 ± 5,17 (rễ/ mẫu).	(Behzad Kaviani, Davood Hashemabadi và cộng sự, 2015).
5	Investigation into the effects of 6-Benzylaminopurine and 1-Naphthaleneacetic Acid concentrations on 3 micropropagated *Begonia rex* 'Fedor' explants	*Begonia rex* 'Fedor'	Lá, cuống lá	Tạo rễ: MS bổ sung 0,60; 0,98; 0,26; 0,49µM BA + 0,70; 0,55; 0,20; 0,28µM NAA.	MS bổ sung 0,49µM BA + 0,28µM NAA là môi trường tốt nhất cho sự ra rễ.	(Opal Rowe and Gallone, 2016).

STT	Tên tài liệu	Loài	Nguồn mẫu	Môi trường	Kết quả	Tài liệu tham khảo
6	Micropropagation Shortens the Time to Blooming of *Begonia montaniformis* × *Begonia ningmingensis var bella* F1 Progeny	*Begonia montani-formis, Begonia ningmi-gensis var. bella*	Lá cây con F1	Tạo chồi: ½ MS bổ sung - 0,00; 2,00; 4,00; 8,00µM BA + 0,00; 0,80µM NAA. - 0,00; 2,00; 4,00; 8,00µM Zeatin +0,00; 0,80µM NAA. - 0,00;2,00;4,00;8,00µM N6 - purin: + 0,00; 0,8µM NAA.	½ MS bổ sung 2,00; 4,00; 8,00µM BA+ 0,80µM NAA tạo chồi với tỉ lệ 98%.	(Lai, Lin và cộng sự, 2018).
				Tạo rễ: ½ MS bổ sung 0,00; 2,69; 5,38µM NAA.	½ MS bổ sung 0,00µM NAA tạo rễ với tỉ lệ 93,33%.	
7	Micropropagation and Genetic Fidelity of *in vitro* Grown Plantlets of *Begonia malabarica* Lam.	*Begonia malabar-ica* Lam.	Lá	Tạo chồi: MS bổ sung - 0,10; 0,30; 0,50; 0,90; 1,00mg/l 2,4-D. - 0,10; 0,30; 0,50; 0,90; 1,00mg/l 2,4-D + 0,50mg/l BA.	0,30mg/l 2,4-D + 0,50mg/l BA là tốt nhất với tỉ lệ cảm ứng 89,5 ± 1,2% và số lượng chồi 11,5 (chồi/mẫu).	(Aswathy, 2019).

STT	Tên tài liệu	Loài	Nguồn mẫu	Môi trường	Kết quả	Tài liệu tham khảo
8	Effect of kind and plant growth regulator composition on micropropagation of three begonia species	*Begonia elatior*, *Beginia soli-mutata*, *Begonia tiger*	Cuống lá	Tạo chồi: MS bổ sung - 0,20; 1,00; 2,00mg/l KIN + 0,00; 0,20mg/l NAA. - 0,20; 1,00; 2,00mg/l TDZ + 0,00; 0,20mg/l NAA.	MS bổ sung *Begonia elatior* tái sinh chồi với tỷ lệ là 100% trong môi trường 1,00mg/l hay 2,00mg/l TDZ và 0,20mg/l NAA. *Beginia soli-mutata* tái sinh chồi với tỷ lệ 100 % trong môi trường 1,00mg/l hay 2,00mg/l KIN và 0,20mg/l NAA. *Begonia tiger* tái sinh chồi với tỷ lệ 100 % trong môi trường 2,00mg/l TDZ hay KIN và 0,20mg/l NAA.	(Hosseini, F., và cộng sự, 2021).

Chương 2. PHƯƠNG PHÁP THÍ NGHIỆM

2.1. Địa điểm, thời gian, mục đích thực hiện nghiên cứu

2.1.1. Địa điểm

Đề tài nghiên cứu được tiến hành tại phòng thí nghiệm nuôi cấy mô Khoa Sinh học - Trường Đại học Đà Lạt.

2.1.2. Thời gian

Thực hiện từ tháng 11 năm 2021 đến tháng 5 năm 2022.

2.1.3. Mục đích

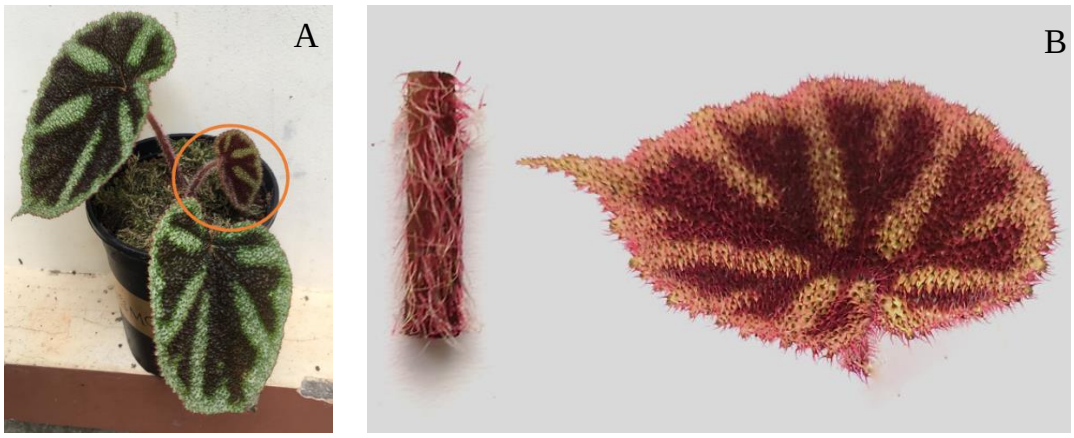
Mục tiêu chung: Đa dạng hoá các loài cây trồng trang trí không gian sống.

Mục tiêu cụ thể: Khảo sát khả năng tạo chồi và nhân nhanh *B. masoniana* trong điều kiện *in vitro*.

2.2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Vật liệu

Giống *B. masoniana* trong bộ sưu tập Thu hải đường hoang dại được thu tại Hà Giang. Sau một thời gian thuần với khí hậu Đà Lạt, chọn những cây sinh trưởng và phát triển tốt, có mức độ đồng đều giữa các lá cao. Tiến hành cắt lá non màu đỏ, chưa chuyển hẳn sang xanh, lông mềm, thành hai phần: cuống lá và phiến lá để làm thí nghiệm.



Hình 2.1. Vật liệu sử dụng trong nghiên cứu

A. Mẫu lá non; B. Mẫu lá được cắt thành hai phần cuống lá và phiến lá

2.2.2. Khử trùng mẫu

Mẫu sử dụng trong thí nghiệm này là phần lá và cuống của lá non.

Rửa sạch bề mặt mẫu bằng xà phòng sau đó để dưới vòi nước chảy của nước máy trong 30 phút.

Tiếp theo, mẫu được khử trùng trong cồn 70^o trong 1 phút.

Sau đó, khử trùng bề mặt bằng Calci hypochlorid 9% trong 15 phút, và được rửa lại bằng nước vô trùng 3 lần.

Các mẫu cuống được cắt theo phương pháp lớp mỏng tế bào theo chiều ngang (0,2-0,3cm) và cấy vào môi trường MS có bổ sung chất điều hòa sinh trưởng. Các mẫu lá (1,2×1,2cm) và cấy vào môi trường MS có bổ sung chất điều hòa sinh trưởng.

2.2.3. Môi trường nuôi cấy

Tất cả các mẫu cấy của thí nghiệm được cấy vào môi trường MS (Murashige và Skoog). Tùy theo từng thí nghiệm mà sử dụng chất kích thích sinh trưởng BA.

2.2.4. Dụng cụ

Dụng cụ thủy tinh và vật dụng nhỏ:

- Bịch nylon (6x12cm; 12x20cm).

- Pipet (1ml, 2ml, 5ml,10ml).

- Bình tam giác (250ml, 500ml, 1000ml).

- Ống đong thủy tinh (50ml, 100ml, 250ml, 500ml, 1000ml).

- Cốc thủy tinh (100ml, 500ml, 1000ml).

- Máy tiệt trùng dụng cụ cấy mẫu, dao mổ, pank và các dụng cụ khác.

Dụng cụ lớn:

- Tủ lạnh.

- Tủ cấy vô trùng.

- Nồi hấp autoclave (Tomy SS – 325).

- Máy đo pH.

- Cân (phân tích, kỹ thuật).

2.3. Điều kiện tiến hành thí nghiệm

- Cường độ chiếu sáng : 40µmol/m^2s^1

- Thời gian chiếu sáng : 16h/ngày

- Nhiệt độ : 25°C±2

- Độ ẩm : 75-85 %

2.4. Tiến hành thí nghiệm

2.4.1. Chuẩn bị môi trường

Môi trường MS có bổ sung các chất điều hòa sinh trưởng thực vật BA với những nồng độ khác nhau tùy vào từng thí nghiệm.

Môi trường sau khi pha xong, điều chỉnh pH về 5,8 bằng dung dịch NaOH 1N và HCl 1N trước khi hấp khử trùng ở 121°C, 1atm trong 20 phút.

Môi trường sau khi được hấp khử trùng được đổ vào bịch nylon (vô trùng) có kích thước 6x12cm, các thao tác được thực hiện trong tủ cấy vô trùng.

2.4.2. Phương pháp bố trí thí nghiệm

2.4.2.1. Thí nghiệm 1: Khảo sát ảnh hưởng của BA lên khả năng cảm ứng tạo chồi từ mẫu lá và lát mỏng cuống lá

Sau 1 tuần khử trùng, các mẫu lá và cuống lá (Hình 2.1) không bị nhiễm được sử dụng làm mẫu cho thí nghiệm này. Cấy vào môi trường MS có bổ sung 30g/l sucrose, 7g/l agar, pH=5,8 và chất điều hòa sinh trưởng 0,00; 0,25; 0,50; 0,75; 1,00mg/l BA với ký hiệu tương ứng từ A_0 → A_4.

Kết quả thu nhận sau 6 tuần nuôi cấy, lặp lại 4 lần.

Chỉ tiêu theo dõi: Tỷ lệ bật chồi (%) trên mẫu cuống và lá *ex vitro.*

2.4.2.2. Thí nghiệm 2: Khảo sát ảnh hưởng của BA lên khả năng nhân nhanh chồi

Các cụm chồi hình thành tốt nhất ở thí nghiệm trước, được cắt thành những cụm nhỏ cấy vào môi trường MS không chứa chất kích thích sinh trưởng để tăng sinh về kích thước. Sau 3 tuần, các mẫu này đã tăng sinh về kích thước, lá phát triển to hơn. Tiến hành cắt lá (có cả cuống và phiến lá) đặt trong môi trường MS có bổ sung 30g/l sucrose; 7g/l agar; pH=5,8 với 0,00; 0,10; 0,20; 0,30; 0,40; 0,50mg/l BA và ký hiệu lần lượt từ B_0 → B_5.

Kết quả thu nhận sau 3 tuần nuôi cấy, lặp lại 3 lần.

Chỉ tiêu theo dõi: số chồi trung bình/mẫu, tỷ lệ mẫu tái sinh (%).

2.4.2.3. Phương pháp xử lý số liệu

Các số liệu thu được xử lý theo phương pháp thống kê, sử dụng phần mềm Microsoft Excel 2016 và SPSS20.

Chương 3. KẾT QUẢ THÍ NGHIỆM

3.1. Khảo sát ảnh hưởng của BA lên khả năng cảm ứng tạo chồi từ mẫu lá và lát mỏng cuống lá

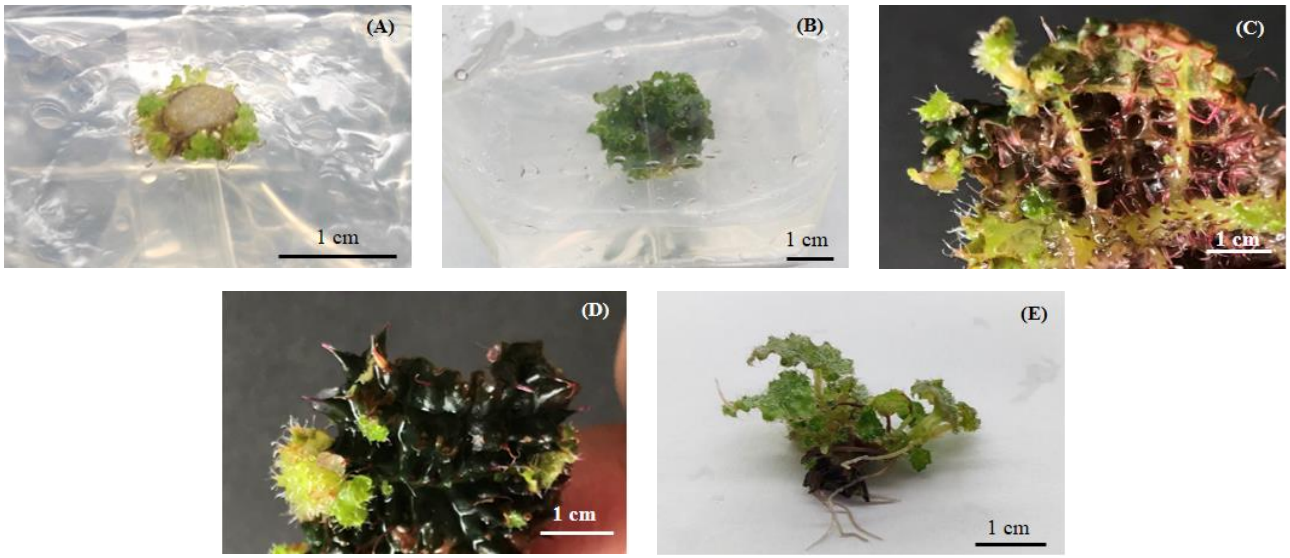
Do lá và cuống lá của *B. masoniana* có rất nhiều lông (Hình 2.1), đây là một bất lợi cho việc vào mẫu. Chúng tôi đã khử mẫu với Calci hypoclorid 9% trong vòng 15 phút, cấy trên môi trường MS trong 1 tuần để loại các mẫu nhiễm. Tỷ lệ nhiễm khá cao, có những đợt nhiễm gần như 100%. Điều này dẫn tới mỗi đợt bố trí thí nghiệm, số mẫu không được nhiều (khoảng 5 – 10 mẫu). Các mẫu không nhiễm sau 1 tuần nuôi cấy được cấy chuyền qua môi trường để bố trí nghiệm thức. Số liệu được theo dõi sau mỗi tuần để quan sát sự cảm ứng của mẫu và thời gian bắt đầu tạo chồi. Theo quan sát, chúng tôi nhận thấy trên tất cả các nghiệm thức có bổ sung BA, sau 3 tuần mẫu lá và cuống lá bắt đầu phản ứng, có hiện tượng phồng xung quanh cuống và phiến lá cong lên, gia tăng diện tích bề mặt lá. Sau 4 tuần, các mẫu cấy bắt đầu nhú chồi. Như vậy, các cấu trúc chồi được tạo thành trực tiếp trên bề mặt xung quanh lớp vỏ mẫu cấy mà không qua giai đoạn tạo mô sẹo.

Kết quả thu được trên môi trường MS bổ sung BA với các nồng độ khác nhau được thể hiện qua bảng 3.1.

Bảng 3.1. Ảnh hưởng của BA đến sự phát sinh hình thái từ lớp mỏng cuống lá và phiến lá *B. masoniana* sau 6 tuần nuôi cấy

Nghiệm thức	BA(mg/l)	Tỷ lệ mẫu cảm ứng tạo chồi (%)	
		Cuống lá	Phiến lá
A_0	0	0^{c}	0^{b}
A_1	**0.25**	**71^{a}**	**3^{b}**
A_2	0.5	50^{a}	43^{a}
A_3	0.75	37^{ab}	13^{ab}
A_4	1	53^{a}	8^{ab}

(*) Những chữ cái khác nhau (a,b,c,d) được nêu trong các cột biểu diễn sự khác nhau có ý nghĩa với P = 0,05 trong Duncan's test.



Hình 3.1. Sự phát sinh hình thái từ lớp mỏng cuống lá và phiến lá *B. masoniana*

A. Lát mỏng thân cảm ứng tạo chồi sau 6 tuần; B. Lát mỏng thân cảm ứng tạo chồi sau 8 tuần; C. Chồi được hình thành ở mặt dưới của lá sau 6 tuần; D. Chồi được hình thành ở mặt trên của lá sau 6 tuần; E. Cụm chồi cấy trên môi trường MS sau 18 ngày.

Trong môi trường A_0 là môi trường MS không bổ sung BA, sau một thời gian nuôi cấy mẫu hoá nâu và chết. Điều này chứng tỏ trên môi trường không có chất điều hoà sinh trưởng thì không thể kích thích mẫu lá bật chồi.

Nhìn vào bảng số liệu cho thấy, môi trường MS có bổ sung BA đều có thể kích thích tạo chồi trên cả lát mỏng cuống lá và phiến lá.

Đối với mẫu cuống lá:

- Tỷ lệ mẫu cảm ứng tạo chồi không có sự khác biệt mang ý nghĩa thống kê giữa các nghiệm thức. Tuy số liệu cho thấy là ở nghiệm thức A_1 (0,25mg/l BA) là tỷ lệ cảm ứng tạo chồi lên tới 71% và nghiệm thức A_3 (0,75mg/l BA) chỉ có 35% nhưng do biến động giữa các lần bố trí thí nghiệm chênh lệch dẫn đến sai số lớn. Điều này có thể giải thích do loài *B. masoniana* có khả năng tự tái sinh bằng cách giâm lá ở điều kiện *ex vitro* (Đỗ Văn Dương, 2021), chứng tỏ trong lá và cuống lá có chứa phytohormone kích thích quá trình phản biệt hóa tạo chồi. Mỗi lá và cuống lá sẽ có lượng phytohormone khác nhau, dẫn tới sự

kích thích tạo chồi từ mẫu *ex vitro* sẽ bị biến động sau mỗi lần bố trí thí nghiệm. Mặt khác, do mẫu sau khi nhiễm bị hao hụt rất nhiều, nên các lần bố trí có số lượng khác nhau.

- Nghiệm thức A_1 cho tỷ lệ bật chồi khá đồng đều giữa các lần bố trí thí nghiệm, tỷ lệ phát sinh chồi cao. Đây là nghiệm thức bổ sung 0,25mg/l BA nên giảm được chi phí khi tiến hành thực hiện. Kết quả cho thấy lát mỏng cuống khi cấy trên môi trường MS bổ sung 0,25mg/l BA là tốt nhất trong thí nghiệm này.

- Chồi được hình thành ngay lớp biểu bì của cuống (Hình 3.1A) số lượng chồi khá nhiều. Tuy nhiên, chúng tôi không đếm số chồi vì ảnh hưởng đến các thí nghiệm tiếp theo.

Đối với mẫu phiến lá:

- Số liệu cho thấy nghiệm thức A_2 (0,5mg/l BA), A_3 (0,75mg/l BA) và A_4 (1,00mg/l BA) cho tỷ lệ bật chồi không có sự khác biệt mang ý nghĩa thống kê. Điều này có thể giải thích do phiến lá nhiều lông nên tỷ lệ nhiễm rất cao, làm cho số mẫu bố trí nghiệm thức khá thấp. Tuy nhiên, nghiệm thức A_1 có tỷ lệ rất thấp, cho thấy để kích thích tạo chồi ở lá thì cần nồng độ BA cao hơn ở phiến lá. Đây là bước đầu giải thích cho sự chênh lệch hàm lượng phytohormone trong cuống và lá. Kết quả thí nghiệm trên phiến lá, nghiệm thức A_2 có sự đồng đều hơn 2 nghiệm thức còn lại. Chồi hình thành trên cả gân và thịt lá; cả mặt dưới và mặt trên của lá (Hình 3.1C, D).

Qua nghiên cứu các tài liệu liên quan tới vi nhân giống của các loài *Begonia* L., môi trường MS có bổ sung BA kết hợp với NAA hoặc TDZ thích hợp với việc kích thích tạo chồi từ lá và cuống lá. Cùng với kết quả thí nghiệm này, chúng tôi nhận thấy BA là loại hormone thích hợp để kích thích tạo chồi trực tiếp từ mẫu *ex vitro* của loài *B. masoniana*.

So với Dương và cộng sự (2021), khi nhân giống sinh dưỡng *B. masoniana*, cần đến 91 ngày (14 tuần) để mẫu có thể bật chồi. Trong khi đó, kết quả của chúng tôi cho thấy, chỉ cần 6 tuần để mẫu bật chồi. Điều này cho thấy, nhân giống *in vitro* là hiệu quả hơn.

3.2. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của BA lên khả năng nhân nhanh chồi

Để tiến hành thí nghiệm 2, chúng tôi đã tách cụm tốt nhất ở thí nghiệm 1 (MS bổ sung 0,25mg/l BA) và cấy vào môi trường MS trong 3 tuần (Hình 3.1E) để tăng kích thước của chồi. Sau đó, tách cuống và lá để tiến hành thí nghiệm 2. Phần cuống cấy trên môi trường có BA nhưng yếu, dễ chết nên chúng tôi không thu số liệu. Lá và cuống lá là những phần thường không sử dụng sau mỗi lần cấy chuyền. Tuy nhiên, khả năng cảm ứng của mẫu này rất tốt. Điều này là lý do để chúng tôi quyết định sử dụng mẫu này làm vật liệu nuôi cấy cho thí nghiệm 2. Tuần thứ 3 bắt đầu xuất hiện chồi rải rác ở dọc cuống lá và bề mặt lá. Sau 4 tuần quan sát thu được kết quả như bảng 3.2.

Bảng 3.2. Ảnh hưởng của BA lên khả năng nhân nhanh chồi *B. masoniana*

Nghiệm thức	Nồng độ BA (mg/l)	Tỷ lệ mẫu phát sinh chồi (%)	Tỷ lệ mẫu chưa phát sinh chồi (%)	Số chồi/mẫu
B_0	0,0	56 ^{b}	44 ^{a}	2,88 ^{b}
B_1	0.1	93 ^{a}	7 ^{a}	2,94 ^{b}
B_2	0.2	67 ^{ab}	33 ^{a}	3,74 ^{b}
B_3	0.3	87 ^{ab}	13 ^{a}	3,00 ^{b}
B_4	**0.4**	**72 ^{ab}**	**28 ^{a}**	**6,76^{a}**
B_5	0.5	75 ^{ab}	25 ^{a}	3,83 ^{b}

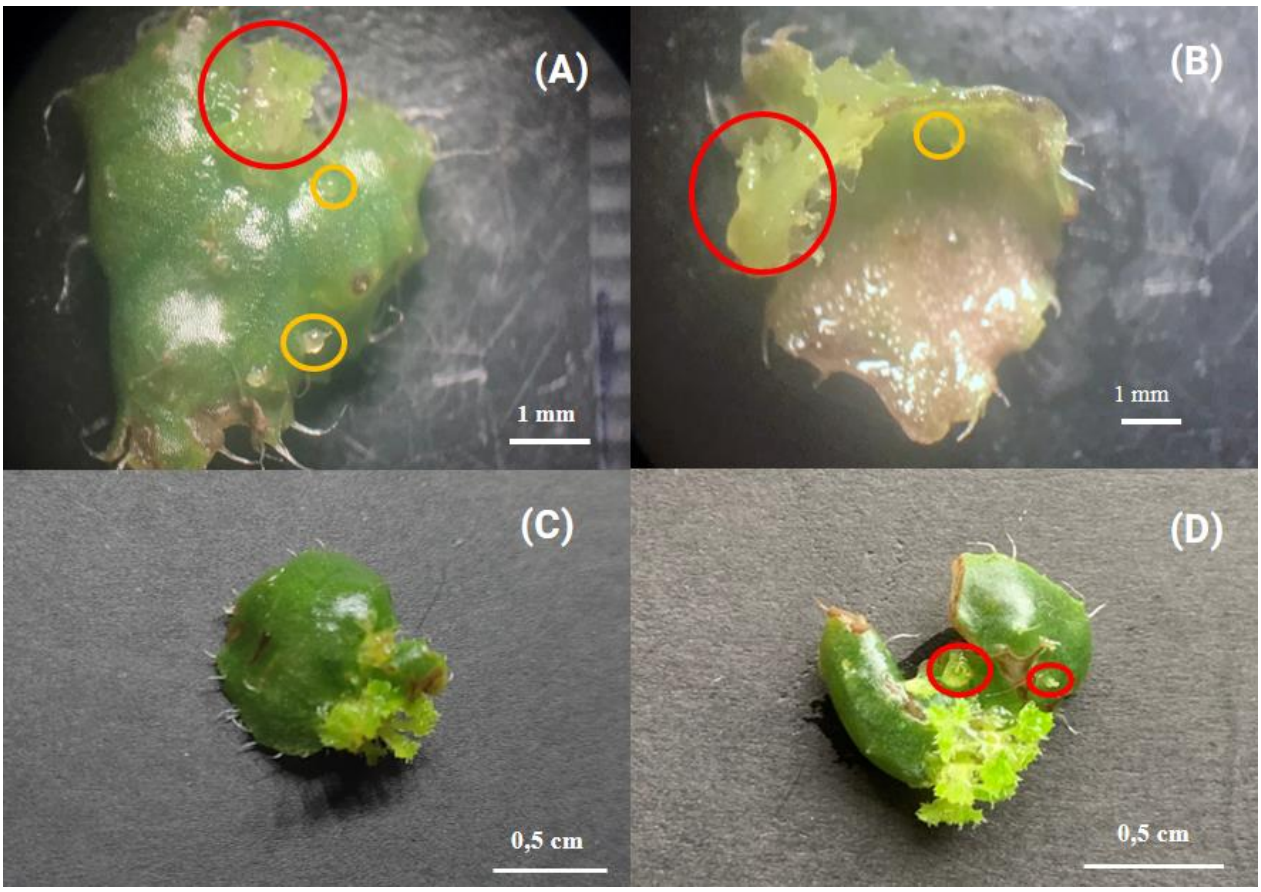
(*) Những chữ cái khác nhau (a, b, c, d) được nêu trong các cột biểu diễn sự khác nhau có ý nghĩa với P = 0,05 trong Duncan's test.

Lá và cuống lá *in vitro* khá nhỏ nên không tách riêng ra mà cấy nguyên mẫu trên môi trường có bổ sung BA. Nhóm đã tiến hành quan sát, sau 1 tuần nuôi cấy đã thấy có dấu hiệu cảm ứng (lá cong lên, lá và cuống lá dày lên) ở rất nhiều mẫu, sau 2 tuần thấy ở một số điểm trên cuống lá và bề mặt trên và dưới lá có phồng lên giống mô sẹo hoặc phôi (Hình 3.2A), đặc biệt là điểm giao nhau giữa cuống lá và lá các tế bào sùi lên rất nhiều giống như tạo mô sẹo.

Tỷ lệ phát sinh chồi không có sự khác biệt mang tính thống kê giữa các nghiệm thức có bổ sung BA. Điều này khẳng định là BA có một vai trò quan trọng trong việc cảm ứng bật chồi trực tiếp từ lá và cuống lá của loài *B. masoniana*. Tỷ lệ này có sai số lớn do chỉ lặp lại 3 lần.

Qua quá trình thực nghiệm, chúng tôi thấy rằng sau một thời gian nuôi cấy, nghiệm thức đối chứng B_0 vẫn có thể cảm ứng bật chồi từ lá *in vitro* và cho tỷ lệ chồi/mẫu thấp, tỷ lệ phát sinh chồi thấp nhất (2,88 và 56%). Ngoài ra, trong quá trình thí nghiệm, chúng tôi thấy rằng nghiệm thức B_0 mặc dù tạo chồi ít nhưng chồi to, khoẻ và có nhiều mẫu ra rễ. Như vậy, nhận thấy đây là loài dễ hình thành rễ trong môi trường *in vitro*.

Ở các mẫu chưa cảm ứng, phôi xuất hiện nhiều trên cả mặt trên và mặt dưới bề mặt lá (Hình 3.2 A, B). Nếu tăng thời gian thí nghiệm thì tỷ lệ mẫu tạo chồi và số lượng chồi trên mẫu sẽ tăng.



Hình 3.2. Mẫu lá *in vitro* hình thành chồi sau 3 tuần nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung BA

A. Cụm chồi và cụm phôi đang hình thành ở mặt trên lá; B. Cụm chồi và cụm phôi đang hình thành ở cuống lá và mặt dưới lá; C,D. Cụm chồi hình thành chủ yếu tại điểm giao nhau giữa lá và cuống lá.

Số chồi trung bình tại nghiệm thức B_4 (0,4mg/l BA) cho tỷ lệ tạo chồi tốt nhất (6,76 chồi/mẫu). Các nghiệm thức còn lại kể cả nghiệm thức đối chứng, số lượng chồi trung bình không có sự khác biệt mang ý nghĩa thống kê. Chồi hình thành ở dọc cuống lá, mặt trên và mặt dưới lá (không kể thịt và gân lá), đặc biệt tập trung nhiều ở phần giao nhau giữa cuống lá và lá (Hình 3.2 C,D). Số lượng chồi đếm được là những chồi đã nhô lên xuất hiện cuống và lá nhỏ. Số chồi trung bình được tính trên các mẫu có xuất hiện chồi.

Chồi cảm ứng mẫu lá và cuống lá *in vitro* nhanh hơn ở mẫu *ex vitro*. Lượng mẫu *in vitro* nhiều hơn do không bị ảnh hưởng của quá trình khử mẫu. Đây là phương thức nhân nhanh được khuyến cáo để sử dụng cho loài này.

Như vậy, mẫu lá *in vitro* cấy trên môi trường MS có bổ sung 0,4mg/l BA cho tỷ lệ nhân chồi tốt nhất sau 3 tuần nuôi cấy.

Chương 4. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

KẾT LUẬN

Từ kết quả thu được từ thí nghiệm chúng tôi đưa ra một số kết luận sau:

- Mẫu cuống lá *ex vitro* cắt lát mỏng có độ dày 0,2-0,3cm cấy trên môi trường MS có bổ sung 0,25mg/l BA cho tỷ lệ cảm ứng cao nhất (71%) sau 6 tuần nuôi cấy.

- Mẫu lá bao gồm cả cuống lá và phiến lá *in vitro* cấy trên môi trường MS có bổ sung 0,4mg/l BA cho tỷ lệ cảm ứng bật chồi (72%) và tạo ra 6,76 chồi/mẫu sau 3 tuần nuôi cấy.

- *B. masoniana* có khả năng nhân giống *in vitro*.

KIẾN NGHỊ

Do kiến thức còn hạn chế, trong một thời gian ngắn và bước đầu làm quen với công tác nghiên cứu khoa học, đề tài nghiên cứu này khó tránh khỏi nhiều thiếu sót. Chúng tôi rất mong nhận được sự đóng góp ý kiến của quý thầy cô, bạn bè và những ai quan tâm đến lĩnh vực này. Nghiên cứu này chỉ mới đưa ra sơ bộ môi trường của một số giai đoạn vi nhân giống *B. masoniana*, để có thể tạo được quy trình nhân giống hoàn chỉnh cây *B. masoniana* chúng tôi đưa ra một số kiến nghị sau:

- Cần tăng thời gian lên 6 tuần để khảo sát tỷ lệ cảm ứng và đếm số chồi trung bình phát sinh ở thí nghiệm nhân nhanh.

- Nghiên cứu giai đoạn cấy chuyền qua MS để đánh giá hệ số nhân.

- Nghiên cứu môi trường phù hợp cho việc ra rễ *in vitro* và ra vườn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tài liệu tham khảo Tiếng Việt:

Dương Tấn Nhựt, Công nghệ sinh học thực vật: Nghiên cứu cơ bản và ứng dụng, NXB. Nông Nghiệp, Thành phố Hồ Chí Minh, 2011.

Đỗ Văn Dương và cộng sự (2021) Bước đầu nghiên cứu khả năng nhân giống sinh dưỡng loài Thu hải đường hoang dại (*B. masoniana* Irmsch. ex ziesenh.) bằng phương pháp giâm. Đề tài khoa học sinh viên khoa Sinh học, trường Đại học Đà Lạt.

Hiền, V. T., Luận, V. Q., Huy, N. P., Nam, N. B., Loan, N. T. K., Sang, N. T., v.v. & Nhựt, D. T. (2015). Sử dụng kỹ thuật nuôi cấy lớp mỏng tế bào trong nghiên cứu quá trình phát sinh hình thái của cây Sâm Ngọc Linh. J. Sci, 13(*4*), 657-664.

Hoàng Đắc Khải (2020) Nghiên cứu sự phát sinh hình thái của mẫu uống lá cây hoa Thu hải đường (*Begonia tuberous*) nuôi cấy *in vitro* trong điều kiện mô phỏng không trọng lực. Khoá luận tốt nghiệp Đại học khoá 40, ngành Công nghệ Sinh học, trường Đại học Đà Lạt.

Khiêm, Đ. V., Nhựt, D. T., & Lan, L. T. N. (2004). Nhân nhanh giống hoa thu hải đường (*Begonia tuberous*) bằng phương pháp nuôi cấy mô lá và kỹ thuật trồng, chăm sóc hoa thương phẩm. Tạp chí Sinh học 26(*3*): 56-63.

Khiêm, Đ. V., & Hậu, N. T. T. (2018). Ảnh hưởng của các chất kích thích sinh trưởng thực vật lên quá trình hình thành mô sẹo cây thu hải đường bà tài (*Begonia bataiensis*). Tạp chí Khoa học Đại học Đà Lạt, 8(*3*), 69-76.

Nguyễn Quang Thạch, Hoàng Thị Nga (2000). Nghiên cứu ứng dụng nuôi cấy lát mỏng trong nhân nhanh các giống *Vanda*, *Cattleya* và *Phaleanopsis*. Tạp chí Nông nghiệp - Công nghiệp thực phẩm (*12*): 546-548.

Nguyễn Quang Thạch, Đình Trường Sơn, Nguyễn Thị Hương (2004). Nhân nhanh giống dứa Đài nông 4 bằng kỹ thuật nuôi cấy mô. Tạp chí Khoa học kỹ thuật Nông nghiệp, số 3/2004: 185-90.

Nguyễn Thanh Tùng, Lê Văn Điệp, Nguyễn Minh Trung, Trương Thị Bích Phượng (2010). Áp dụng phương pháp nuôi cấy lát mỏng tế bào trong nhân giống *in vitro* cây lan Hoàng thảo thân gẫy (*Dendrobium aducum*). Tạp chí Công nghệ sinh học, 8(*3*): 361-367

Nguyễn Văn Kết, Nguyễn Văn Vinh (2010). Nghiên cứu khả năng nhân giống loài Lan Hoàng Thảo Sáp (*Dendrobium crepidatum* Lindl. & Paxt.) *in vitro*. Tạp chí Khoa học và Công nghệ, 48 (*5*): 89-95.

Tài liệu tham khảo nước ngoài:

Aswathy, J. M., Murugan,K. (2019). "Micropropagation and Genetic Fidelity of *In Vitro* Grown Plantlets of *Begonia malabarica* Lam." Tropical Life Sciences Research 30(*3*): 37-58.

Bashilov, A. (2021). Screening of biochemical composition and integral antiradical activity of begoniaceae representatives. Веснік Палескага дзяржаўнага універсітэта. Серыя прыродазнаўчых навук, (*1*), 3-10.

Behzad Kaviani, et al. (2015). Micropropagation of *Begonia rex* Putz. by 6-benzyladenine (BA) and α-naphthalene acetic acid (NAA). International Journal of Biosciences (IJB) 6(*5*): 8-15.

Da Silva J.A.T. (2003). Thin cell layer technology in ornamental plant micropropagation and biotechnology. Afr J Biotechnol 2 (*12*): 683-691.

Frei, B., Heinrich, M., Bork, P. M., Herrmann, D., Jaki, B., Kato, T., v.v. & Sticher, O. (1998). Multiple screening of medicinal plants from Oaxaca, Mexico: ethnobotany and bioassays as a basis for phytochemical investigation. Phytomedicine, 5(*3*), 177186.

Guan, K.Y., Yamaguchi, H., Li, J.X., Li, H.Z., Ma, H., (2007). Traditional uses of Begonias (Begoniaceae) in China. Acta Botanica Yunnanica, 29(*1*): 58-66.

Halyna Tkachenko, et al. (2017). Hemolysis of equine erythrocytes from exposure to leaf extracts obtained from various *Begonia* L. species: 229-246.

Hilinske, J., (2016). The root of it all: Plant of the year 2016. In: The Journal Times accessed on May 16,2017.

Hoang, T. S., & Lin, C. W. (2021). Two new species of Begonia (sect. Platycentrum, Begoniaceae) from the Central Highlands of Vietnam: *B. villosula* and *B. lophura*. Phytotaxa, 510(*3*), 263-274.

Hosseini, F., Moshtaghi, N., Sharifi, A., Bagheri, A., Marashi, H., & Keykha Akhar, F. (2021). Effect of kind and plant growth regulator composition on micropropagation of three begonia species. Journal of Plant Productions, 44(*1*), 25-36.

K. Tran Thanh Van, Control of morphogenesis by inherent and exogenously applied factors in thin cell layers, International Review of Cytology, 1980, 32, 291-311.

Khai, H. D., Vinh, N. Q., Dung, D. M., Dai Nghiep, N., Mai, N. T. N., Tung, H. T., v.v. & Nhut, D. T. (2021). Alterations in endogenous hormone levels and energy metabolism promoted the induction, differentiation and maturation of Begonia somatic embryos under clinorotation. Plant Science, 111045.

Kiew, R. (2005). Begonias of peninsular Malaysia. Kota Kinabalu, Sabah: Natural History Publications (Borneo) in association with Singapore Botanic Gardens and National Parks Board, 2005.

Kiew, R. (2007). Notes on Vietnamese Begonia (Begoniaceae), including three new species. Adansonia, 29(*2*), 229-238.

Krempin, J. L. (1993). Know Your Begonias. Krempin Books.

Lai, I. L., et al. (2018). Micropropagation Shortens the Time to Blooming of *Begonia montaniformis*, *Begonia ningmingensis var. bella* F1 Progeny. HortScience 53(*12*): 1855-1861.

Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia plantarum, 15(*3*), 473-497.

Nhut D.T. Le B.V, Minh N.T, de Silva J.T, Fukai S., Tanaka M., Van T.T.K. (2002). Somatic embryogenesis through pseudo-bulblet transverse thin cell layer of *Lilium longiflorum*. Plant Growth Regu 37(*2*): 193-198.

Nhut D.T., Bui V.L., Teixeira da Silva J.A.. Aswth C.R. (2001). Thin cell layer culture system in Lilium: regeneration and transfomation perspectives. *In vitro* Cell Dey Biol, (*37*): 516-523.

Opal Rowe and A. Gallone (2016). Investigation into the effects of 6-Benzylaminopurine and 1-Naphthaleneacetic Acid concentrations on 3 micropropagated

Begonia rex ‘Fedor’ explants. International Forum – Agriculture, Biologyf, and Life Science (IFABL) (2412-3455): 5-7.

Peng, Ching-I & Ku, Shin-Ming & Leong, Wai-Chao. (2005). *Begonia liuyanii* (sect. Coelocentrum, Begoniaceae), a new species from limestone areas in Guangxi, China. Botanical Bulletin- Academia Sinica Taipei. 46.

Sara, K., Yousef, G., Ghorbanali, N., Roghayeh, A., Behzad, S. K., & Mohammad, Y. (2012). Effect of explant type and growth regulators on *in vitro* micropropagation of Begonia rex. International Research Journal of Applied and Basic Sciences 3(*4*): 896-901.

Singh S.K., Rai M.K., Asthana P, Sahoo L. (2009). An improved micropropagation of *Spilanthes acmella* L. through transverse thin cell layer culture. Acta Physiol Plant 31(*4*): 693-698.

Siregar, H. M., & Wahyuni, S. (2017). A New Hybrid from Interspecific Hybridization *B. masoniana* Irmsch. ex ziesenhx Begonia kui C.-I Peng. Plan and people in harmony, 18, 74.

Tian, D., Xiao, Y., Tong, Y., Fu, N., Liu, Q., & Li, C. (2018). Diversity and conservation of Chinese wild Begonias. Plant diversity, 40(*3*), 75-90.

Tsybulya, N. V., & Fershalova, T. D. (2021). Seasonal antimicrobial activity of volatile substances emitted by the representatives of *Begonia* L. genus (Begoniaceae). Samara Journal of Science, 10(*1*), 167-172.

PHỤ LỤC

Thành phần môi trường MS – Murashige & Skoog (Murashige, Skoog,1962)

ĐA LƯỢNG	
Muối khoáng	**Nồng độ (mg/l)**
Potassium nitrate (KNO_3)	1.900
Ammonium nitrate (NH_4NO_3)	1.650
Calcium chloride ($CaCl_2.H_2O$)	440
Magnesium sulfate ($MgSO_4.7H_2O$)	370
Potassium phosphate (KH_2PO_4)	170
Potassium Iodine (KI)	0,83
Sodium molybdate ($Na_2MoO_4.2H_2O$)	0,25
Zinc Sulfate ($ZnSO_4.7H_2O$)	8,6
$Na_2EDTA.2H_2O$	37,2
VI LƯỢNG	
Manganese sulfate ($MnSO_4.\ 4H_2O$)	22,3
Boric Acid (H_3BO_3)	6,2
Cobalt chloride ($CoCl_2.6H_2O$)	0,025
Cupric Sulfate ($CuSO_4.5H_2O$)	0,025
Ferrous sulfate ($FeSO_4.7H_2O$)	27,8
VITAMINE	
Myo-inositol	100
Pyridoxine HCl	0,5
Glycine(recrystallized)	2,0
Nicotinic Acid	0,5
Thiamine HCl	0,1