



(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)



2-0004087

(51) **A01H 4/00**
2022.01

(13) **Y**

(21) 2-2023-00271

(22) 26/05/2023

(45) 26/05/2025 446

(43) 25/08/2023 425A

(73) Sở Khoa học và Công nghệ Thành phố Hồ Chí Minh (VN)

244 Điện Biên Phủ, phường Võ Thị Sáu, quận 3, thành phố Hồ Chí Minh

(72) Đỗ Đăng Giáp (VN).

(54) **QUY TRÌNH NHÂN GIỐNG CÂY BUCEP (BUCEPHALANDRA MOTLEYANA)
BẰNG PHƯƠNG PHÁP NUÔI CẤY MÔ**

(21) 2-2023-00271

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình nhân giống cây Bucep (*Bucephalandra motleyana*) bằng phương pháp nuôi cấy mô. Trong đó mẫu cây Bucep được khử trùng bằng cồn 70% trong 30 giây, dung dịch 0,1% HgCl_2 trong 10 phút để thu mẫu sạch bệnh. Mẫu được nhân trong môi trường thạch MS bổ sung chất kích thích sinh trưởng để tạo chồi và các chồi được nhân nhanh trong môi trường lỏng để tăng hệ số nhân, các chồi đơn được tạo rễ trong môi trường thạch bổ sung IBA để thu cây hoàn chỉnh. Bằng cách nuôi trong môi trường lỏng ở điều kiện lắc, quy trình theo giải pháp hữu ích cho phép tăng hệ số nhân, cho phép nhân nhanh cây Bucep giống phục vụ cho nhu cầu đối với cây thủy sinh.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích thuộc lĩnh vực nuôi cấy mô tế bào thực vật. Cụ thể hơn là đề cập đến quy trình nhân giống cây thủy sinh bucep bằng phương pháp nuôi cấy mô.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Đã biết, cây bucep (*Bucephalandra motleyana*) là một loài thực vật thuộc họ Araceae có khoảng 104 – 114 chi với 3000 – 3750 loài (Mayo và ctv, 1998; Christenhusz và ctv, 2016) và ở Việt Nam có khoảng 30 chi và 130 – 140 loài thuộc họ Ráy. Thực vật thủy sinh được biết đến khi xu hướng sử dụng loài cây này để trang trí cho không gian sống – trong những bể cá đang được quan tâm trong thời gian gần đây. Giá trị xuất khẩu của cá cảnh và cây thủy sinh đạt 1,7 nghìn tỷ Rupiah (khoảng 2,6 nghìn tỷ VNĐ) ở Indonesia ghi nhận qua nghiên cứu của Sholichah năm 2020. Thực vật thủy sinh không chỉ có công dụng trang trí mà còn giúp thanh lọc không khí cho không gian sống, làm việc thêm trong lành. Trong đó *Bucephalandra motleyana* là một loài cây thủy sinh có giá trị và dần được sử dụng trong các bể cá cảnh với những đặc điểm hình thái đặc biệt.

Thông thường, cây bucep có thể được nhân giống bằng phương pháp gieo hạt trên giá thể, tuy nhiên tỉ lệ nảy mầm thấp và có hiện tượng phân li tính trạng. Việc nhân giống bằng phương pháp tách cây con không mang lại tính khả thi vì hệ số nhân giống thấp. Nhân giống *in vitro* cây bucep trong điều kiện vô trùng cùng với việc cung cấp môi trường dinh dưỡng thuận lợi cho sự phát triển, tạo ra một số lượng cây con lớn.

Đã biết, nuôi cấy mô thực vật là phương pháp hiệu quả và đáng tin cậy để sản xuất hàng loạt cây con không bị nhiễm bệnh, ổn định về mặt di truyền và chất lượng đồng đều. Hiện nay việc nhân giống vô tính cây bucep bằng phương pháp nuôi cấy mô thực sự cần thiết để tạo ra được số lượng cây giống lớn đồng nhất về mặt di truyền cũng như nâng cao chất lượng cây giống, đồng thời hạ giá thành cây giống nhằm mang lại hiệu quả kinh tế cho người nông dân. Đó là lý do tại sao nhân giống bằng phương pháp nuôi cấy mô là một lựa chọn ưu việt và thay thế cho nhân giống truyền thống đối với cây bucep.

Như đã biết, việc ứng dụng kỹ thuật nuôi cấy mô tế bào thực vật để nhân giống cây bucep bằng phương pháp nuôi cấy mô đã được thực hiện trên thế giới và hiện tại, ở Việt Nam chưa có nghiên cứu nào về nhân giống loài cây này.

Năm 2017, Nongnuch Laohavisuti và cộng tác viên đã thực hiện nghiên cứu để tìm ra điều kiện tối ưu cho Bucep phát triển. Thí nghiệm đầu tiên xác định loại và nồng độ tối ưu của phương pháp khử trùng bề mặt và kết quả là sử dụng 10% NaOCl trong 20 phút và 0,1% HgCl₂ trong 10 phút là tốt nhất. Thí nghiệm hai xác định nồng độ tối ưu của chất điều hòa sinh trưởng và kết quả môi trường có bổ sung 0,5 mg/l BAP có sự phát sinh chồi cao nhất. Thí nghiệm ba cho kết quả môi trường không có bổ sung NAA có sự hình thành rễ tốt nhất.

Năm 2020, Rossa Yunita và cộng tác viên đã tiến hành nhân giống *in vitro* cây Bucep thành công. Mục tiêu của nghiên cứu là xác định môi trường có bổ sung chất điều hòa sinh trưởng thích hợp cho cảm ứng tạo chồi, nhân chồi và tạo rễ của *Bucephalandra* sp.. Kết quả cho thấy môi trường tốt nhất để tạo chồi của *Bucephalandra* sp. *in vitro* là môi trường MS bổ sung 2,0 mg/l BA. Môi trường tối ưu để nhân chồi là MS bổ sung 2,0 mg/l BA và 0,1 mg/l TDZ. Môi trường tối ưu để tạo rễ là MS bổ sung 2 mg/l IBA.

Hiện nay đã có nhiều nghiên cứu nhân giống *in vitro* cây thủy sinh, tuy nhiên chưa có nhiều nghiên cứu về nhân giống ở chi *Bucephalandra* và đặc biệt là trên loài *Bucephalandra motleyana*.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Mục đích của giải pháp hữu ích là đề xuất quy trình nhằm nhân nhanh cây Bucep nhằm đáp ứng nhu cầu đối với giống cây thủy sinh, cho phép nhân nhanh, với số lượng lớn cây thủy sinh.

Theo đó, giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình nhân giống cây Bucep (*Bucephalandra motleyana*) bằng phương pháp nuôi cấy mô, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) chuẩn bị mẫu nuôi cấy bằng cách thu nhận chồi cây Bucep (*Bucephalandra motleyana*), ngâm trong dung dịch xà phòng loãng khoảng 5 phút rồi rửa sạch dưới vòi nước chảy khoảng 60 phút, sau đó sát trùng lần lượt bằng cồn 70% trong 30 giây, dung dịch 0,1% HgCl₂ trong 10 phút, sau đó mẫu được cấy lên môi trường thạch MS có bổ

sung 30 g/l sucroza và 8 g/l aga và nuôi cấy trong 7 ngày, sau đó cấy chuyển lên môi trường thạch MS bổ sung 30 g/l sucroza, 8 g/l aga nuôi cấy trong điều kiện cường độ ánh sáng 2000 đến 2500 lux, nhiệt độ khoảng 25°C và độ ẩm từ 60 đến 70%, quang chu kỳ 12 giờ/ngày trong 6 tuần thu được mẫu nuôi cấy;

b) nhân tạo cụm chồi từ mẫu nuôi cấy thu được ở bước a) bằng cách cấy chuyển mẫu lên môi trường thạch MS bổ sung 30g/l sucroza, 8g/l aga và 1,5mg/l BA và 0,05mg/l NAA, nuôi cấy trong điều kiện cường độ ánh sáng 2000 đến 2500 lux, nhiệt độ khoảng 25°C và độ ẩm từ 60 đến 70%, quang chu kỳ 12 giờ/ngày để mẫu phát sinh các cụm chồi;

c) nhân nhanh cụm chồi bằng cách tách các chồi từ cụm chồi thu được ở bước b) và cấy vào môi trường MS lỏng bổ sung bổ sung 30g/l sucroza và 1,5mg/l BA kết hợp với 0,05mg/l NAA, pH= 6,5, tốc độ lắc 60 vòng/phút trong 8 tuần ở điều kiện cường độ ánh sáng 2000 đến 2500 lux, nhiệt độ khoảng 25°C và độ ẩm từ 60 đến 70%, quang chu kỳ 12 giờ/ngày để nhân nhanh các cụm chồi;

d) nuôi dưỡng chồi đơn bằng cách tách các chồi đơn từ cụm chồi thu được ở bước c) và cấy vào môi trường thạch $\frac{1}{2}$ MS bổ sung 30 g/l sucroza, 8 g/l aga, nuôi cấy trong điều kiện cường độ ánh sáng 1000 lux, nhiệt độ khoảng 25°C và độ ẩm từ 60 đến 70%, quang chu kỳ 12 giờ/ngày thu được các chồi có chiều cao khoảng từ 1 đến 2 cm; và

e) tạo cây hoàn chỉnh bằng cách cấy chuyển các chồi thu được ở bước d) vào môi trường thạch $\frac{1}{2}$ MS bổ sung 30 g/l sucroza, 8 g/l aga và 0,5 mg/l IBA, nuôi cấy trong điều kiện cường độ ánh sáng 1000 lux, nhiệt độ khoảng 25°C và độ ẩm từ 60 đến 70%, quang chu kỳ 12 giờ/ngày để chồi phát triển rễ, sau 6 tuần thu được cây Bucep giống hoàn chỉnh.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 là ảnh chụp minh chồi cây Bucep được đưa vào nuôi cấy để thu mẫu nuôi cấy sạch bệnh. (a) ảnh chụp mẫu cây mẹ đưa vào nuôi cấy; (b) mẫu chồi cây Bucep được sử dụng để khử trùng để tạo mẫu nuôi cấy; (c) mẫu chồi cây Bucep được nuôi cấy trên môi trường thạch để khởi tạo mẫu; (d) và (e) mẫu cây Bucep được đưa vào nuôi cấy *in vitro* để thu nhận cụm chồi.

Hình 2 là ảnh chụp mẫu cây Bucep trong giai đoạn nuôi cấy phát sinh cụm chồi đến khi tạo ra cây hoàn chỉnh. (a) cụm chồi cây Bucep được nuôi cấy; (b) chồi đơn cây Bucep chưa phát sinh rễ; (c) cây Bucep *in vitro* hoàn chỉnh; (d) và (e) là ảnh chụp ống nghiệm để nhân nhanh chồi cây Bucep trong môi trường lỏng; (g) là ảnh chụp cây giống Bucep sau khi ươm 2 tháng.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Dưới đây, quy trình nhân giống cây Bucep (*Bucephalandra motleyana*) bằng phương pháp nuôi cấy mô theo giải pháp hữu ích sẽ được bộc lộ một cách chi tiết thông qua các phương án thực hiện giải pháp, tuy nhiên cần hiểu rằng các phương án này không nhằm mục đích giới hạn phạm vi yêu cầu bảo hộ của giải pháp hữu ích.

Quy trình nhân giống Bucep (*Bucephalandra motleyana*) bằng phương pháp nuôi cấy mô theo giải pháp hữu ích được thực hiện trên cây *Bucephalandra motleyana* giống khỏe mạnh. Cây Bucep bố mẹ thuộc loài *Bucephalandra* thân leo cao từ 2 đến 60 cm. Cây thường sinh trưởng chậm, có lá từ dạng bầu dục, dài đến lượn sóng, lá có màu sắc khác nhau, từ xanh lục đến tím đậm tùy vào điều kiện sinh trưởng. Cây có hoa đơn tính, cụm hoa đơn độc với phần hoa hình thành giọt, không nguyên tính, hình elip, kích thước trung bình. Mẫu được sử dụng để nhân giống là mẫu chồi từ cây *Bucephalandra motleyana* bố mẹ khỏe mạnh.

Các môi trường nuôi cấy, ví dụ môi trường MS (Murashige and Skoog, 1962) là các môi trường nuôi cấy thực vật được sử dụng rộng rãi chứa đầy đủ thành phần khoáng đa lượng, vi lượng và vitamin. Các kỹ thuật nuôi cấy mô có thể tìm, ví dụ trong các tài liệu: Murashige T. và Skoog F. (1992), “A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue culture”, *Physiologia plantarum* 15: 473-497; Nhut D.T., Bui V.L., Nguyen Tri Minh, Jaime T.D.S., Fukai S., Tanaka M. và Tran Thanh Van K. (2002), “Somatic embryogenesis through pseudo-bulblet transverse thin cell layer of *Lilium longiflorum*”, *Plant growth regulation* 37(2): 193-198; Nguyễn Đức Lượng và Lê Thị Thủy Tiên (2006), Công nghệ tế bào; Dương Tấn Nhựt (2009), Công nghệ sinh học thực vật tập 1: Nghiên cứu và ứng dụng, kết hợp với chiếu sáng đèn đơn sắc. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này hoàn toàn có thể căn cứ vào các kỹ thuật nuôi cấy cơ bản để pha chế ra các môi trường này và các môi trường này không thuộc phạm vi yêu cầu bảo hộ của giải pháp hữu ích.

Các chất kích thích sinh trưởng thực vật là các phytohormon được sử dụng để phân biệt hóa và biệt hóa tế bào thực vật. Các chất kích thích sinh trưởng được sử dụng theo sáng chế bao gồm BA (6-benzylaminopurin), NAA (axit naphthaleneacetic), IBA (axit indol-3-butyric). Các hoạt chất này được bán trên thị trường và được cung cấp bởi các nhà cung cấp hóa chất.

Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình nhân giống cây Bucep (*Bucephalandra motleyana*) bằng phương pháp nuôi cấy mô.

Trong bước chuẩn bị mẫu nuôi cấy bằng cách thu nhận chồi cây Bucep (*Bucephalandra motleyana*). Mẫu cây được cắt chồi và ngâm trong dung dịch xà phòng loãng để loại bỏ mầm bệnh, thời gian ngâm khoảng 5 phút. Sau đó rửa sạch dưới vòi nước chảy khoảng 60 phút để loại bỏ xà phòng. Tiếp đó mẫu được sát trùng lần lượt bằng cồn 70% trong 30 giây, dung dịch 0,1% HgCl_2 trong 10 phút để loại bỏ mầm bệnh, thu mẫu sạch bệnh. Mẫu được cấy lên môi trường thạch MS có bổ sung 30 g/l sucroza và 8 g/l aga và nuôi cấy trong 7 ngày. Các mẫu bị nhiễm khuẩn được loại bỏ, thu nhận mẫu sạch mầm bệnh. Các mẫu sạch bệnh được cấy chuyển lên môi trường thạch MS bổ sung 30 g/l sucroza, 8 g/l aga nuôi cấy trong điều kiện cường độ ánh sáng 2000 đến 2500 lux. Các mẫu được nuôi cấy trong điều kiện nhiệt độ khoảng 25°C , tốt nhất là $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Độ ẩm được duy trì từ 60 đến 70%, quang chu kỳ 12 giờ/ngày trong 6 tuần thu được mẫu nuôi cấy. Các mẫu được cấy chuyển sau mỗi 6 tuần nuôi cấy sang môi trường mới để duy trì điều kiện sinh trưởng của mẫu.

Trong bước nhân tạo cụm chồi từ mẫu nuôi cấy, mẫu nuôi cấy sạch bệnh được khởi tạo ở trên được cấy chuyển mẫu lên môi trường thạch MS bổ sung 30g/l sucroza, 8g/l aga và 1,5mg/l BA và 0,05mg/l NAA. Quá trình này nhằm phát sinh chồi. Các chất kích thích sinh trưởng bao gồm BA và NAA với tỷ lệ 1,5mg/l BA và 0,05mg/l cho thấy có hiệu quả trong việc phát sinh cụm chồi. Quá trình này nhằm tạo ra các cụm chồi mà không phải trải qua quá trình biệt hóa tạo mô sẹo. Mẫu được nuôi cấy trong điều kiện cường độ ánh sáng 2000 đến 2500 lux, nhiệt độ khoảng 25°C , tốt nhất là $25 \pm 2^\circ\text{C}$ và độ ẩm từ 60 đến 70%, quang chu kỳ 12 giờ/ngày để mẫu phát sinh các cụm chồi.

Trong bước nhân nhanh cụm chồi, quá trình này quyết định hệ số nhân để thu cây hoàn chỉnh. Để có hệ số nhân cao, các tác giả sử dụng môi trường MS lỏng trong điều kiện nuôi cấy lắc. Theo đó, các chồi từ cụm chồi được tách và cấy vào môi trường MS

lồng bổ sung bổ sung 30g/l sucroza và 1,5mg/l BA kết hợp với 0,05mg/l NAA, pH= 6,5. Quá trình này vừa cho phép tăng trưởng chồi vừa cho phép tăng hệ số nhân để thu được các chồi khỏe mạnh. Điều kiện nuôi cấy được thực hiện ở tốc độ lắc 60 vòng/phút trong 8 tuần ở điều kiện cường độ ánh sáng 2000 đến 2500 lux, nhiệt độ khoảng 25°C và độ ẩm từ 60 đến 70%, quang chu kỳ 12 giờ/ngày để nhân nhanh các cụm chồi. Các mẫu chồi được nuôi cấy chuyển môi trường mới sau mỗi 8 tuần nuôi cấy để tăng hệ số nhân chồi. Quá trình này cho phép lặp lại nhiều lần, cho phép tăng hệ số nhân, tốt nhất không quá 20 lần cấy chuyển để giảm việc đột biến và thủy tinh hóa chồi. Các chồi khỏe mạnh được tách ra để bồi dưỡng các chồi đơn tạo cây nuôi cấy mô hoàn chỉnh.

Trong bước nuôi dưỡng chồi đơn, tiến hành tách các chồi đơn từ cụm chồi và cấy vào môi trường thạch $\frac{1}{2}$ MS bổ sung 30 g/l sucroza, 8 g/l aga. Quá trình bồi dưỡng chồi này không sử dụng chất kích thích sinh trưởng nhằm bồi dưỡng chồi cho phép thu được các chồi mập, khỏe mạnh, từ đó có thể thu được cây nuôi cấy mô đảm bảo sống khi đưa ra vườn ươm. Quá trình nuôi cấy được thực hiện trong điều kiện cường độ ánh sáng 1000 lux, nhiệt độ khoảng 25°C và độ ẩm từ 60 đến 70%, quang chu kỳ 12 giờ/ngày thu được các chồi có chiều cao khoảng từ 1 đến 2 cm.

Trong bước tạo cây hoàn chỉnh, các chồi đơn có chiều cao khoảng từ 1 đến 2 cm được sử dụng để tạo cây. Tiến hành cấy chuyển các chồi thu được vào môi trường thạch $\frac{1}{2}$ MS bổ sung 30 g/l sucroza, 8 g/l aga và 0,5 mg/l IBA. Quá trình này cho phép kích thích tạo rễ. IBA được sử dụng với lượng 0,5 mg/l cho phép các chồi phát sinh rễ hiệu quả. Điều kiện nuôi cấy được thực hiện trong phòng nuôi với cường độ ánh sáng duy trì 1000 lux, nhiệt độ khoảng 25°C và độ ẩm từ 60 đến 70%, quang chu kỳ 12 giờ/ngày để chồi phát triển rễ. Sau 6 tuần thu được cây Bucep giống hoàn chỉnh có từ 6 đến 7 lá, chiều cao đạt khoảng từ 2 đến 2,5 cm. Các cây Bucep giống hoàn chỉnh được chuyển ra ngoài vườn ươm để tạo cây giống hoàn chỉnh.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Ví dụ 1: Đánh giá yếu tố ảnh hưởng đến quá trình nhân giống cây Bucep bằng phương pháp nuôi cấy mô

+ Đánh giá ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đối với sự phát sinh chồi cây Bucep

Các mẫu cây chồi Bucep *in vitro* được sử dụng để nuôi cấy. Mẫu được cấy lên môi trường MS có bổ sung 30g/l sucroza, 8g/l aga và BA ở nồng độ 1,5mg/l kết hợp với NAA ở các nồng độ 0; 0,05; 0,10; 0,15 và 0,2mg/L.

Bảng 1: Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng thực vật lên sự hình thành chồi cây

Bucep *in vitro*

Nồng độ chất điều hòa sinh trưởng thực vật		Số chồi TB (chồi/mẫu)	Số lá TB (lá/mẫu)	Chiều cao chồi TB (mm)	Khối lượng tươi TB (g)
BA (mg/L)	NAA (mg/L)				
1,5	0	3,23 ^{ab} ± 1,38	6,50 ^{ab} ± 1,22	16,80 ^{ab} ± 4,38	1,05 ^a ± 0,14
	0,05	3,60 ^a ± 1,83	7,00 ^a ± 0,91	18,40 ^a ± 4,15	0,96 ^{ab} ± 0,20
	0,10	3,27 ^{ab} ± 1,17	6,20 ^{bc} ± 0,76	18,20 ^a ± 4,24	0,91 ^{ab} ± 0,08
	0,15	2,60 ^{bc} ± 1,04	6,80 ^{ab} ± 0,10	17,40 ^{ab} ± 5,34	0,82 ^b ± 0,15
	0,20	2,20 ^c ± 0,41	5,60 ^c ± 0,81	14,80 ^b ± 2,17	0,57 ^c ± 0,02
ANOVA		**	**	**	**

Trong cùng một nhóm giá trị trung bình, các số có cùng ký tự đi kèm thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê; ns: không khác biệt về mặt thống kê; **: Khác biệt về mặt thống kê ở mức xác suất $P < 0,01$ trong thử nghiệm Tukey

Trong thử nghiệm này, BA với nồng độ được chọn là 1,5mg/l và NAA được sử dụng để bổ sung vào môi trường nuôi cấy có nồng độ khác nhau là 0,05; 0,10; 0,15 và 0,20 mg/l nhằm đánh giá sự phát sinh chồi của cây Bucep. Theo dõi kết quả sau 6 tuần nuôi cấy ở Bảng 1 ở trên cho thấy, khi nuôi cấy chồi Bucep *in vitro* trên môi trường bổ sung 1,5 mg/l BA kết hợp NAA có sự thay đổi về hiệu quả tạo chồi so với khi sử dụng riêng lẻ xytokinin.

Dựa vào kết quả cho thấy khi bổ sung nồng độ NAA nồng độ dưới 0,1 mg/l hiệu quả tạo chồi có sự gia tăng so với khi không có NAA. Khi nồng độ NAA càng tăng lên thì số chồi hình thành có xu hướng giảm dần. Trong môi trường có sự kết hợp giữa BA nồng độ 1,5 mg/l và NAA nồng độ 0,05 mg/l đạt số chồi trung bình hình thành cao nhất 3,6 chồi/mẫu. Ngược lại, khi tăng nồng độ NAA lên 0,20 mg/l thì số chồi trung bình hình thành đã giảm chỉ còn 2,2 chồi/mẫu. Ở các chỉ tiêu theo dõi về số lá, chiều cao,

khối lượng tươi thì ở nghiệm thức có bổ sung 1,5 mg/l BA và 0,05 mg/l NAA cũng cho kết quả tốt hơn các nghiệm thức còn lại.

Như vậy, trong thử nghiệm khảo sát NAA ở nồng độ khác nhau 0,0; 0,05; 0,10; 0,15; 0,20 mg/l kết hợp với BA nồng độ 1,5 mg/l để cảm ứng tạo chồi thì sau 6 tuần nuôi cấy thấy được môi trường bổ sung NAA nồng độ 0,05 mg/l kết hợp 1,5 mg/l BA là thích hợp nhất cho sự nhân chồi đối với cây Bucep.

+ Đánh giá điều kiện nuôi cấy trong môi trường lỏng để tăng hệ số nhân chồi *in vitro*

Trong thử nghiệm này, việc khảo sát khối lượng mẫu cây ban đầu nhằm tìm ra tỷ lệ mẫu cấy và thể tích môi trường sử dụng hiệu quả trong giai đoạn nhân chồi. Đây cũng là cơ sở cho việc lựa chọn tỷ lệ mẫu và thể tích sử dụng môi trường tối ưu cho nuôi cấy ở quy mô lớn. Môi trường nhân chồi tốt nhất kế thừa từ các thí nghiệm trước được sử dụng với thể tích 50 ml/bình nuôi cấy và khối lượng mẫu ban đầu thay đổi lần lượt là 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0g cho mỗi bình nuôi cấy. Kết quả thử nghiệm được theo dõi và ghi nhận sau 8 tuần nuôi cấy ở Bảng 2.

Bảng 2. Ảnh hưởng của khối lượng mẫu ban đầu lên sự nhân chồi của cây Bucep *in vitro* trong điều kiện nuôi cấy lỏng lắc sau 8 tuần nuôi cấy

Khối lượng mẫu ban đầu (g/bình)	Số chồi TB (chồi/mẫu)	Số lá TB (lá/mẫu)	Số rễ TB (rễ/mẫu)	Chiều cao TB (mm)	Khối lượng tươi TB (g)
1,0	10,47 ^b ± 6,06	6,97 ^b ± 1,03	3,30 ^c ± 3,33	24,17 ^b ± 5,82	3,47 ^c ± 0,53
2,0	13,30 ^{ab} ± 4,04	8,17 ^a ± 1,78	7,57 ^a ± 2,56	22,70 ^b ± 8,44	7,13 ^b ± 0,72
3,0	13,13 ^{ab} ± 5,40	7,60 ^{ab} ± 1,13	6,63 ^{ab} ± 1,73	24,13 ^b ± 8,14	9,66 ^b ± 2,24
4,0	15,70 ^a ± 6,18	6,80 ^b ± 1,13	5,37 ^b ± 1,43	30,50 ^a ± 10,68	14,37 ^a ± 3,42
5,0	15,40 ^a ± 4,99	6,77 ^b ± 1,65	5,77 ^b ± 2,19	33,63 ^a ± 9,60	13,85 ^a ± 2,18
<i>P - value</i>	**	**	**	**	**

Các giá trị trong cùng một cột có cùng chữ cái giống nhau thì không khác biệt về mặt thống kê $P \leq 0,05$.

Từ kết quả thống kê ở Bảng 2 thấy được khối lượng mẫu ban đầu có ảnh hưởng đến sự nhân nhanh chồi cây Bucep. Số chồi hình thành tăng dần từ khối lượng mẫu ban đầu là 1,0 g đến 4,0 g và giảm khi khối lượng mẫu là 5,0 g. Số chồi hình thành đạt trung bình cao nhất 15,7 chồi/mẫu ở nghiệm thức có khối lượng mẫu ban đầu 4,0 g và giảm

còn trung bình 15,4 chồi/mẫu khi tăng khối lượng mẫu ban đầu lên 5,0 g. Đây cũng là hai nghiệm thức cho kết quả tối ưu nhất về sự hình thành chồi, tuy nhiên, không có sự khác biệt ý nghĩa về mặt thống kê. So sánh giữa hai nghiệm thức này ở những chỉ tiêu còn lại là số rễ, chiều cao và khối lượng tươi cũng ghi nhận được kết quả tương tự không có sự khác biệt ý nghĩa về mặt thống kê.

Khi xét hệ số tăng trưởng khối lượng thì ở nghiệm thức có khối lượng mẫu ban đầu 4,0 g đạt hệ số là 3,59 cao hơn so với nghiệm thức có khối lượng mẫu ban đầu 5,0 g chỉ đạt 2,77. Từ các số liệu trên cho thấy mẫu cấy chồi *Bucep in vitro* có nhu cầu sử dụng dinh dưỡng thấp nên sau 8 tuần nuôi cấy ở điều kiện lỏng lác có thể sử dụng lượng mẫu cấy ban đầu lớn từ 4 đến 5 g mẫu với 50 mL môi trường tạo chồi. Điều này rất có ý nghĩa trong việc đánh giá hiệu quả tạo chồi vì tiết kiệm chi phí cho môi trường nuôi cấy. Từ các số liệu ghi nhận, trong các nghiệm thức khảo sát thì cho thấy nghiệm thức bổ sung 4g mẫu ban đầu có số chồi hình thành trung bình là 15,70 chồi/mẫu và hệ số nhân về khối lượng sau 8 tuần nuôi cấy là cao nhất so với các nghiệm thức còn lại.

Như vậy, trong thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của khối lượng mẫu ban đầu lên sự nhân nhanh chồi cây *bucep in vitro* trong điều kiện nuôi cấy lỏng lác với các khối lượng mẫu ban đầu lần lượt là 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0g thì nghiệm thức có khối lượng mẫu 4,0g là thích hợp cho sự nhân nhanh chồi cây *bucep in vitro* sau 8 tuần nuôi cấy ở điều kiện nuôi cấy lỏng lác.

+ Đánh giá ảnh hưởng của auxin đối với sự hình thành rễ từ chồi của cây *Bucep* nuôi cấy

Trong thử nghiệm này, các chồi cây *Bucep in vitro* có độ dài khoảng 1,0 cm được nuôi cấy trên môi trường $\frac{1}{2}$ MS có bổ sung 30 g/l sucroza, 8g/l aga, NAA và IBA riêng lẻ ở các nồng độ khác nhau là 0,0; 0,5; 1,0; 1,5 và 2,0 mg/l. Sau 6 tuần nuôi cấy, kết quả theo dõi được ghi nhận và trình bày ở Bảng 3.

Bảng 3. Ảnh hưởng của auxin lên sự hình thành rễ từ chồi của cây *Bucep in vitro* sau 6 tuần nuôi cấy

Nồng độ chất điều hòa sinh trưởng thực vật		Số rễ TB (rễ/mẫu)	Chiều dài rễ TB (mm/mẫu)	Số chồi TB (chồi/mẫu)	Số lá TB (lá/mẫu)	Chiều cao TB (mm/mẫu)	Khối lượng tươi TB (g/mẫu)
NAA (mg/L)	IBA (mg/L)						

0,0	-	3,47ab	7,76a	1,07ab	6,87a	19,60a	0,64
0,5	-	4,20a	7,31ab	1,13a	6,87a	19,67a	0,55
1,0	-	3,67ab	5,56b	1,07ab	6,53a	18,00a	0,64
1,5	-	3,47ab	6,79ab	1,00b	6,73a	19,80a	0,54
2,0	-	3,00b	7,64a	1,00b	6,87a	17,80a	0,76
-	0,5	0,47c	1,33c	1,00b	5,00b	13,40b	0,43
-	1,0	0,67c	1,66c	1,00b	3,93c	12,87b	0,57
-	1,5	0,87c	0,72c	1,00b	4,33bc	13,13b	0,57
-	2,0	1,07c	2,22c	1,00b	3,80c	11,00b	0,51
ANOVA		**	**	*	**	**	ns

Trong cùng một nhóm giá trị trung bình, các số có cùng ký tự đi kèm thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê. ns: Không có sự khác biệt về mặt thống kê; *: Khác biệt về mặt thống kê ở mức xác suất $P < 0,05$; **: Khác biệt về mặt thống kê ở mức xác suất $P < 0,01$.

Kết quả ở bảng 3 cho thấy, chồi cây *Bucep in vitro* khi nuôi cấy trong các điều kiện bổ sung auxin khác nhau có ảnh hưởng khác nhau lên sự hình thành rễ của cây *Bucep in vitro*. Các nghiệm thức bổ sung IBA cho hiệu quả tạo rễ tốt hơn so với các nghiệm thức bổ sung NAA và nghiệm thức đối chứng (không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng thực vật).

Nghiệm thức bổ sung 0,5 mg/l IBA cho kết quả tốt nhất ở hầu hết các chỉ tiêu theo dõi và có sự khác biệt về mặt thống kê so với các nghiệm thức còn lại. Cụ thể ở nghiệm thức này có số rễ là 4,20 rễ/mẫu, chiều dài rễ 7,31 mm/rễ, số lá hình thành 6,87 lá/mẫu và chiều cao cây là 19,67mm/mẫu. Khi tăng nồng độ IBA từ 1,0 đến 2,0mg/l thì số rễ, chiều dài rễ, số lá, chiều cao và số chồi của mẫu có sự giảm dần và không có khác biệt về mặt thống kê so với nghiệm thức đối chứng. Khi bổ sung NAA vào môi trường nuôi cấy, ở hầu hết các chỉ tiêu theo dõi của mẫu cấy đều có sự giảm đi so với nghiệm thức đối chứng. Số liệu này cho thấy đối với cây bucep thì việc bổ sung NAA vào môi trường nuôi cấy giai đoạn tạo rễ làm ức chế sự sinh trưởng của mẫu cấy.

Như vậy, môi trường $\frac{1}{2}$ MS có bổ sung 30 g/l sucroza, 8 g/l aga và 0,5 mg/l IBA cho hiệu quả nuôi cấy tốt nhất đối với cây *Bucep in vitro* với số rễ hình thành 4,20 rễ/cây; chiều dài rễ 7,31mm/rễ; 1,13 chồi/mẫu; chiều cao cây 19,67mm/mẫu; số lá hình thành 6,87 lá/mẫu sau 6 tuần nuôi cấy.

Ví dụ 2: Nhân giống cây *Bucep* bằng phương pháp nuôi cấy mô

Cắt các chồi từ cây mẹ, sau đó ngâm trong dung dịch xà phòng loãng khoảng 5 phút, rửa sạch dưới vòi nước chảy nhẹ khoảng 60 phút và sát trùng tuần tự bằng cồn 70% trong 30 giây; dung dịch khử trùng 0,1% HgCl_2 trong 10 phút. Mẫu được cấy vào bình nuôi cấy có chứa môi trường MS có bổ sung 30g/L sucroza và 8g/L aga. Sau 7 ngày nuôi cấy, những mẫu sống, không bị nhiễm sẽ được cấy vào các bình môi trường MS có bổ sung 30g/L sucroza, 8g/L aga. Mẫu sẽ được cấy chuyển sau 6 tuần nuôi cấy. Các bình mẫu được đặt trong phòng nuôi có cường độ ánh sáng duy trì $40\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, nhiệt độ 25°C và độ ẩm 65%, quang chu kỳ 12 giờ/ngày. Kết quả thử nghiệm được mô tả trên Hình 1. Hình 1 là ảnh chụp minh chồi cây Bucep được đưa vào nuôi cấy để thu mẫu nuôi cấy sạch bệnh. (a) ảnh chụp mẫu cây mẹ đưa vào nuôi cấy; (b) mẫu chồi cây Bucep được sử dụng để khử trùng để tạo mẫu nuôi cấy; (c) mẫu chồi cây Bucep được nuôi cấy trên môi trường thạch để khởi tạo mẫu.

Cấy mẫu thu được ở trên vào môi trường MS có bổ sung 30 g/l sucroza, 8 g/l aga và 1,5 mg/l BA kết hợp với 0,05 mg/l NAA, cấy chuyển mẫu sau 6 tuần nuôi cấy để thu được các cụm chồi được chứa trong các bình mẫu được đặt trong phòng nuôi có cường độ ánh sáng $40\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, nhiệt độ 25°C và độ ẩm 65%, quang chu kỳ 12 giờ/ngày như được minh họa cụ thể trong ảnh d, e của Hình 1; Hình 1d và 1e là ảnh chụp mẫu cây Bucep được đưa vào nuôi cấy *in vitro* để thu nhận cụm chồi.

Tiến hành tách các cụm chồi thành các mẫu chồi đơn. Sau đó cấy 4,0g mẫu này vào các bình môi trường MS 200 ml có bổ sung 30 g/l sucroza và 1,5 mg/l BA kết hợp với 0,05 mg/l NAA; pH= 6,5 và tốc độ lắc 60vòng/phút. Cấy chuyển mẫu sau 8 tuần nuôi cấy để thu được các cụm chồi được chứa trong các bình mẫu được đặt trong phòng nuôi có cường độ ánh sáng $40\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, nhiệt độ 25°C và độ ẩm 65%, quang chu kỳ 12 giờ/ngày. Kết quả được minh họa trong Hình 2 a, d, e. Hình 2 là ảnh chụp mẫu cây Bucep trong giai đoạn nuôi cấy phát sinh cụm chồi đến khi tạo ra cây hoàn chỉnh. (a) cụm chồi cây Bucep được nuôi cấy; (b) chồi đơn cây Bucep chưa phát sinh rễ; (c) cây Bucep *in vitro* hoàn chỉnh; (d) và (e) là ảnh chụp ống nghiệm để nhân nhanh chồi cây Bucep trong môi trường lỏng.

Tách riêng các cụm chồi thu được thành các chồi đơn và nuôi cấy trên môi trường $\frac{1}{2}$ MS có bổ sung 30 g/l sucroza, 8 g/l aga, cấy chuyển mẫu sau 6 tuần nuôi cấy, đặt các bình mẫu trong phòng nuôi có cường độ ánh sáng 1000lux, nhiệt độ 25°C và độ ẩm 65%,

quang chu kỳ 12 giờ/ngày đến khi các chồi đạt chiều cao khoảng 1,5cm như được minh họa cụ thể trong ảnh b của Hình 2.

Cấy các chồi Bucep *in vitro* có chiều cao khoảng $1,5 \pm 0,5$ cm thu được ở trên lên môi trường $\frac{1}{2}$ MS có bổ sung 30g/l sucroza, 8g/l aga và 0,5 mg/l IBA; đặt các bình mẫu trong phòng nuôi có cường độ ánh sáng 1000lux, nhiệt độ 25°C và độ ẩm 65%, thời gian chiếu sáng 12 giờ/ngày, sau 6 tuần nuôi cấy, cây đạt chiều cao khoảng 2 cm và có từ 6 đến 7 lá sẽ được chuyển ra vườn ươm. Kết quả như được minh họa trên ảnh c, g của Hình 2.

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Quy trình nhân giống cây Bucep bằng phương pháp nuôi cấy mô có thể đáp ứng cho việc sản xuất hàng loạt cây Bucep, đáp ứng nhu cầu cây thủy sinh phục vụ cho ngành công nghiệp thủy sinh, giảm sự phụ thuộc vào nguồn cây ngoài môi trường. Quy trình cho phép tạo ra lượng lớn cây Bucep, đáp ứng nhu cầu về cây giống tốt cho nông dân phục vụ cho ngành sản kinh doanh cá cảnh.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình nhân giống cây Bucep (*Bucephalandra motleyana*) bằng phương pháp nuôi cấy mô, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) chuẩn bị mẫu nuôi cấy bằng cách thu nhận chồi cây Bucep (*Bucephalandra motleyana*), ngâm trong dung dịch xà phòng loãng khoảng 5 phút rồi rửa sạch dưới vòi nước chảy khoảng 60 phút, sau đó sát trùng lần lượt bằng cồn 70% trong 30 giây, dung dịch 0,1% HgCl_2 trong 10 phút, sau đó mẫu được cấy lên môi trường thạch MS có bổ sung 30 g/l sucroza và 8 g/l aga và nuôi cấy trong 7 ngày, sau đó cấy chuyển lên môi trường thạch MS bổ sung 30 g/l sucroza, 8 g/l aga nuôi cấy trong điều kiện cường độ ánh sáng 2000 đến 2500 lux, nhiệt độ khoảng 25°C và độ ẩm từ 60 đến 70%, quang chu kỳ 12 giờ/ngày trong 6 tuần thu được mẫu nuôi cấy;

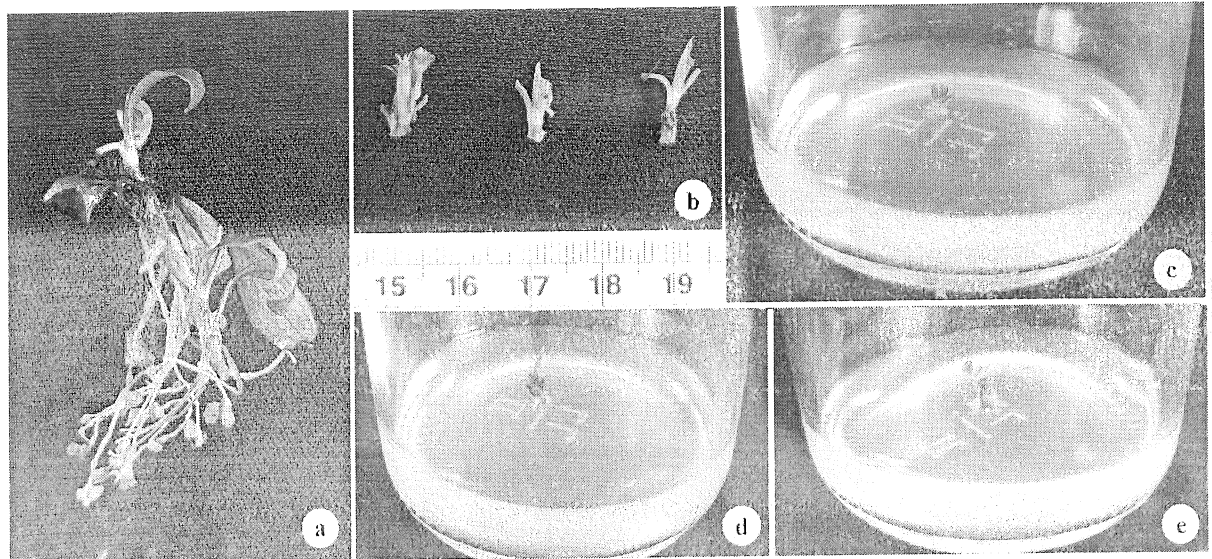
b) nhân tạo cụm chồi từ mẫu nuôi cấy thu được ở bước a) bằng cách cấy chuyển mẫu lên môi trường thạch MS bổ sung 30g/l sucroza, 8g/l aga và 1,5mg/l BA và 0,05mg/l NAA, nuôi cấy trong điều kiện cường độ ánh sáng 2000 đến 2500 lux, nhiệt độ khoảng 25°C và độ ẩm từ 60 đến 70%, quang chu kỳ 12 giờ/ngày để mẫu phát sinh các cụm chồi;

c) nhân nhanh cụm chồi bằng cách tách các chồi từ cụm chồi thu được ở bước b) và cấy vào môi trường MS lỏng bổ sung bổ sung 30g/l sucroza và 1,5mg/l BA kết hợp với 0,05mg/l NAA, pH= 6,5, tốc độ lắc 60 vòng/phút trong 8 tuần ở điều kiện cường độ ánh sáng 2000 đến 2500 lux, nhiệt độ khoảng 25°C và độ ẩm từ 60 đến 70%, quang chu kỳ 12 giờ/ngày để nhân nhanh các cụm chồi;

d) nuôi dưỡng chồi đơn bằng cách tách các chồi đơn từ cụm chồi thu được ở bước c) và cấy vào môi trường thạch $\frac{1}{2}$ MS bổ sung 30 g/l sucroza, 8 g/l aga, nuôi cấy trong điều kiện cường độ ánh sáng 1000 lux, nhiệt độ khoảng 25°C và độ ẩm từ 60 đến 70%, quang chu kỳ 12 giờ/ngày thu được các chồi có chiều cao khoảng từ 1 đến 2 cm; và

e) tạo cây hoàn chỉnh bằng cách cấy chuyển các chồi thu được ở bước d) vào môi trường thạch $\frac{1}{2}$ MS bổ sung 30 g/l sucroza, 8 g/l aga và 0,5 mg/l IBA, nuôi cấy trong điều kiện cường độ ánh sáng 1000 lux, nhiệt độ khoảng 25°C và độ ẩm từ 60 đến 70%, quang chu kỳ 12 giờ/ngày để chồi phát triển rễ, sau 6 tuần thu được cây Bucep giống hoàn chỉnh.

HÌNH 1



HÌNH 2

