

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU TÁI SINH CÂY CHÈ (*Camellia sinensis*) GIỐNG SHAN CHẤT TIỀN TỪ PHÔI VÔ TÍNH BẰNG NUÔI CẤY MÔ

Nguyễn Văn Thiệp, Nguyễn Thị Thu Hà,
Trịnh Thị Mỹ, Cao Thị Huyền, Nguyễn Quang Duy

SUMMARY

Results of research on regeneration plantlets from somatic embryos of tea plant Shan chat tien (*Camellia sinensis* L.)

Somatic embryo obtained from cotyledon of Shan Chat Tien tea variety has potential of germinating and developing mature tea plants. Using MS medium, supplementing with different concentrations of BAP and IBA in different culture stages created new young teas. Somatic embryo was cut into small explants and then cultured on MS medium adding 8mg/1BAP. As a results, 69,34% of explants produced new bud after 20 days. At the multiplying stage, nodal explants with one shoot were cultured in a medium having 3mg/1BAP and 0,3mg/1IBA. Consequently, the height of young tea plants were 4,82cm with 5,7 leaves and obtained 3,53 times higher of multiplying rate after 60 days. Stem explants, which had 3-4 leaves with 2,5-3,0cm length were cultured in MS medium including 3mg/1IBA. As a result, most of roots occurred and grown well after 3 weeks.

Keywords: *Camellia sinensis*, somatic embryo, cotyledon, explant, medium.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Để nâng cao năng suất, sản lượng, chất lượng chè Việt Nam, ngoài các giải pháp canh tác và công nghệ chế biến, tạo giống mới có ý nghĩa rất quan trọng. Giải pháp của công tác giống chè là chọn lọc, lai tạo, nhập nội những giống chất lượng cao. Ứng dụng công nghệ sinh học trong công tác tạo giống, nhân giống chè sẽ nâng cao hiệu quả công tác giống như rút ngắn thời gian tạo giống, nhân giống chè. Công nghệ nuôi cấy mô có thể tạo ra những cây chè hoàn chỉnh từ số lượng cây mẹ ít ỏi ban đầu và nhân nhanh chóng. Bài báo này trình bày một số kết quả nghiên cứu nhân giống chè bằng phôi vô tính có thể ứng dụng nâng cao hiệu quả chọn tạo giống và nhân giống chè mới.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Vật liệu nghiên cứu

Là phôi vô tính được tạo ra từ lá mầm của hạt chè giống Shan Chất Tiền, môi

trường MS và các chất điều hòa sinh trưởng.

2. Phương pháp nghiên cứu

- Nghiên cứu môi trường tạo chồi từ phôi vô tính chè

Phôi vô tính đã được tạo thành từ lá mầm của hạt chè Shan Chất Tiền, thí nghiệm cấy trên môi trường tạo chồi pH = 5,8, các nồng độ kích thích sinh trưởng khác nhau, bố trí thí nghiệm với 5 công thức sau:

CT1: MS + 2mg/l BAP + 30g đường + 6g aga

CT2: MS + 4mg/l BAP + 30g đường + 6g aga

CT3: MS + 6mg/l BAP + 30g đường + 6g aga

CT4: MS + 8mg/l BAP + 30g đường + 6g aga

CT5: MS + 10mg/l BAP + 30g đường + 6g aga

Quan sát tỷ lệ khối phôi vô tính bất chồi và sinh trưởng của chồi.

- Nghiên cứu nhân nhanh chồi cây chè

Khi chồi phát sinh từ phôi vô tính cao 2,5 - 3,0cm thì cắt và cấy vào môi trường pH = 5,8, có chứa IBA và BAP để nhân nhanh số lượng chồi. Thí nghiệm với 5 công thức:

CT1: MS + 1mg/l BAP + 0,1mg/l IBA + 30g đường + 6g aga

CT2: MS + 2mg/l BAP + 0,2mg/l IBA + 30g đường + 6g aga

CT3: MS + 3mg/l BAP + 0,3mg/l IBA + 30g đường + 6g aga

CT4: MS + 3mg/l BAP + 0,4mg/l IBA + 30g đường + 6g aga.

CT5: MS + 4mg/l BAP + 0,5mg/l IBA + 30g đường + 6g aga

Quan sát sinh trưởng của chồi và hệ số nhân chồi.

- Nghiên cứu tạo rễ cây chè con

Cắt chồi 2,5 - 3,0cm cấy vào môi trường tạo rễ pH = 5,8 với 4 công thức:

CT1: MS + 1mg/l IBA + 30g đường + 6g aga

CT2: MS + 2mg/l IBA + 30g đường + 6g aga

CT3: MS + 3mg/l IBA + 30g đường + 6g aga

CT4: MS + 4mg/l IBA + 30g đường + 6g aga

Quan sát tỷ lệ chồi hình thành rễ, thời gian sinh trưởng rễ.

Các giai đoạn đều được nuôi trong điều kiện ánh sáng 2000lux, thời gian chiếu sáng 12 giờ và nhiệt độ 25°C. Các thí nghiệm được bố trí theo phương pháp hoàn toàn ngẫu nhiên, với 3 lần nhắc lại. Mỗi công thức thí nghiệm được bố trí trong 03 bình tam giác. Toàn bộ thí nghiệm với 126 bình tam giác.

Phương pháp xử lý số liệu: Xử lý số liệu theo phương pháp thống kê sinh học, xử lý kết quả trên máy tính sử dụng phần mềm IRRISTAT 5.0 for Windows.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Tạo chồi từ phôi vô tính

Hạt chè được chọn để tạo phôi vô tính làm thí nghiệm là hạt của giống chè Shan Chát Tiên ở Viện KHKT nông lâm nghiệp miền núi phía Bắc. Phôi vô tính từ khối phôi ban đầu (hình A) được làm nhỏ thành những hạt nhỏ hơn (hình B) để cấy trên môi trường tạo chồi. Theo dõi thời gian và tỷ lệ nảy chồi của các khối phôi vô tính, kết quả ở bảng 1:

Bảng 1. Ảnh hưởng nồng độ BAP đến tỷ lệ hình thành chồi của phôi vô tính (%)

Công thức	Thời gian sau cấy (ngày)			
	10	12	15	20
1	0,00	0,54	34,62	38,84
2	0,00	1,76	46,55	50,27
3	0,00	2,64	58,82	64,18
4	0,00	5,08	90,22	96,34
5	0,00	2,12	71,15	78,67
LSD _{0,05}				12,34

Mẫu cấy là một mẫu (explant) phôi vô tính nuôi cấy, đó là một khối phôi bao gồm nhiều phôi vô tính trong đó. Sau khi cấy 12 ngày, khối phôi bắt đầu nảy chồi, quan sát thấy đầu tiên mỗi khối phôi mọc một chồi, sau đó có khối mọc thêm 1-2 chồi, Sự nảy chồi tập trung từ ngày thứ 15 đến ngày thứ 20 sau khi cấy.

Tỷ lệ nảy chồi từ phôi vô tính khác nhau ở các nồng độ BAP khác nhau. Khi tăng nồng độ BAP thì tỷ lệ nảy chồi cũng thay đổi. Ở ngày thứ 20 sau khi cấy, nồng độ 4 và 6mg/l BAP có tỷ lệ nảy chồi tương đương nhau. Ở nồng độ 3mg/l BAP (công thức 4) có tỷ lệ nảy chồi cao nhất, hầu như tất cả các khối phôi đều nảy chồi (96,34%). Tuy nhiên, khi tăng nồng độ BAP lên 10mg/l BAP thì sự nảy chồi của phôi vô tính giảm (78,67%).

Kết quả thí nghiệm cho thấy thời gian nảy chồi của phôi vô tính cây chè giống Shan Chất Tiên tập trung từ 15 đến 20 ngày sau khi cấy và môi trường phù hợp nhất là môi trường MS có bổ sung 3mg/l BAP.

2. Nhân nhanh chồi

Chồi non phát triển từ phôi vô tính, khi đạt chiều cao 3-4cm thì cắt thành từng đoạn dài 0,5 - 1,0cm, mỗi đoạn có 1 mắt ngủ ở nách lá cấy vào môi trường nhân chồi, phần gốc chồi được cấy trở lại môi trường tạo chồi để tận dụng tăng số lượng chồi. Mục đích của thí nghiệm này nhằm xác định hệ số nhân chồi và khả năng sinh trưởng của chồi ngọn phát sinh từ phôi vô tính. Sau 30 ngày chồi được cấy chuyển sang môi trường mới.

Bảng 2. Ảnh hưởng của nồng độ chất kích thích đến sinh trưởng chồi sau khi cấy 60 ngày

Công thức	1	2	3	4	5	LSD _{0,05}
Chiều cao (cm)	1,24	2,58	4,82	4,34	2,74	1,36
Số lá (lá)	1,64	2,84	5,71	5,38	3,28	1,18

Kết quả bảng 2 cho thấy sinh trưởng của cây chè con, giống Shan Chất Tiên ở các công thức nuôi cấy có sự khác nhau. Với các nồng độ BAP 1mg/l và 2mg/l và IBA 0,1mg/l và 0,2mg/l mầm sinh trưởng chậm, chiều cao trung bình từ 1,24 - 2,58cm, có từ 1 đến 3 lá. Khi tăng nồng độ BAP lên 3mg/l thì cây sinh trưởng tốt hơn (cao 4,34cm và có 5,38 lá). Tuy nhiên khi tăng nồng độ BAP lên 4mg/l và IBA

0,4mg/l, sinh trưởng cây chè con cũng không thay đổi. tiếp tục tăng lên 5mg/l thì sinh trưởng chậm lại.

Một yếu tố quan trọng trong nhân giống là hệ số nhân, nghiên cứu chi tiêu này đối với các mẫu cấy là các đoạn thân có 1 mầm nách, cấy lên môi trường nhân chồi. Mỗi bình thí nghiệm cấy 10 chồi nách. Kết quả được trình bày ở bảng 3.

Bảng 3. Ảnh hưởng của nồng độ chất kích thích sinh trưởng đến hệ số nhân chồi cây chè sau khi cấy 60 ngày

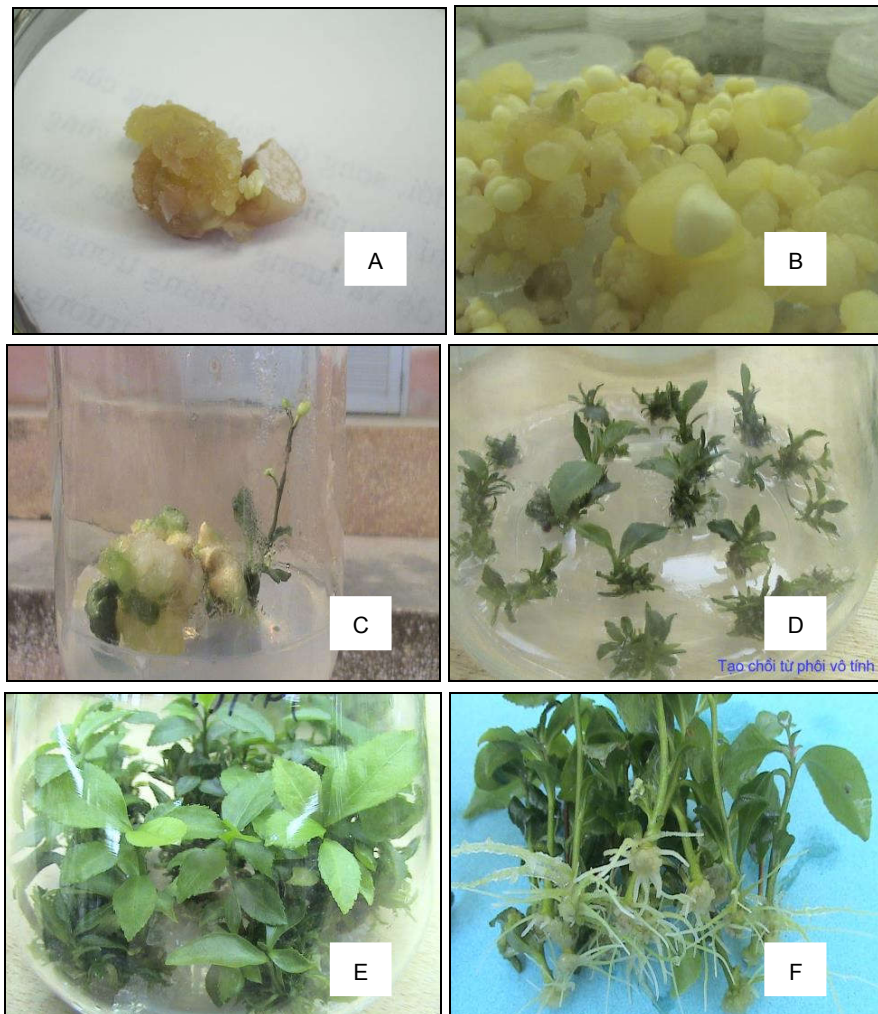
Công thức	1	2	3	4	5	LSD _{0,05}
Số cây ban đầu (cây)	30	30	30	30	30	
Số cây tạo thêm (cây)	52	64	106	95	81	

Hệ số nhân (lần)	1,73	2,13	3,53	3,16	2,70	0,42
------------------	------	------	------	------	------	------

Sau khi nuôi cấy, cây chè con luôn có xu hướng mọc thêm chồi mới từ đốt thân sát mặt môi trường nuôi cấy, số chồi mới mọc càng nhiều, càng có lợi cho nhân giống. Số chồi hình thành nhiều ít phụ thuộc sự tác động của chất kích thích sinh trưởng trong môi trường nuôi cấy. Sau 2 tháng nuôi cấy, công thức 1 và 2 (nồng độ BAP 1 và 2mg/l) cho hệ số nhân giống

tương đương nhau (từ 1,73 - 2,13 lần). Hệ số nhân chồi ở công thức 3 và 4 cao nhất (3,16-3,53 lần). Tuy nhiên khi tăng nồng độ BAP lên 5mg/l và IBA 0,5mg/l thì hệ số nhân giảm xuống còn 2,7 lần.

Như vậy, môi trường nuôi cấy có thêm 3mg/l BAP và 0,3mg/l IBA phù hợp nhất để nhân nhanh chồi phát triển từ phôi vô tính giống chè Shan Chát Tiên.



Hình 1. Tạo cây chè con từ phôi vô tính

Ghi chú:

- A - Phôi vô tính chèn tạo thành từ lá mầm B - Phôi vô tính đã làm nhỏ để tạo chồi
 C - Chồi phát triển từ phôi vô tính D - Chồi tách ra để nhân nhanh
 E - Giai đoạn nhân nhanh chồi F - Tạo rễ, cây chèn hoàn chỉnh

3. Tạo rễ cây chèn con

Bảng 4. Ảnh hưởng của chất KTST đến sự hình thành rễ của chồi chèn nuôi cấy mô (%)

Thời gian \ Công thức	CT1	CT2	CT3	CT4	LSD _{0,05}
Sau cấy 10 ngày	0,00	0,00	0,00	0,00	
Sau cấy 13 ngày	0,00	1,38	4,22	0,00	
Sau cấy 16 ngày	3,84	31,82	50,37	3,27	
Sau cấy 19 ngày	16,02	60,71	71,06	16,66	
Sau cấy 22 ngày	21,11	68,27	82,54	19,38	14,26

Khi nhân nhanh đủ số lượng cây cần thiết, cắt chồi dài 2,5 - 3,0cm cấy vào môi trường tạo rễ, là môi trường MS được cho thêm IBA. Kết quả bảng 4 cho thấy từ ngày thứ 13 sau khi cấy lên môi trường, rễ bắt đầu xuất hiện, sự phát triển rễ tập trung trong thời gian từ ngày thứ 16 đến ngày thứ 19 sau khi cấy. Một tuần sau khi xuất hiện, rễ chèn thí nghiệm sinh trưởng dài thêm từ 1-3cm. Công thức 3, nồng độ IBA 3mg/l có tỷ

lệ chồi ra rễ cao nhất (82,54% sau 22 ngày); tỷ lệ chồi ra rễ thấp hơn ở nồng độ IBA 2mg/l (68,27%); nồng độ IBA cao hoặc thấp hơn đều cho kết quả ra rễ ít hơn (Công thức 1 và 4).

Nồng độ IBA không chỉ ảnh hưởng đến tỷ lệ chồi ra rễ mà còn tác động đến sinh trưởng của rễ chèn. Bảng 5 là kết quả thí nghiệm sinh trưởng rễ chèn ở các nồng độ hormone khác nhau.

Bảng 5. Ảnh hưởng của nồng độ IBA đến sinh trưởng của rễ chèn

Chỉ tiêu \ Công thức	CT1	CT2	CT3	CT4	LSD _{0,05}
Số lượng rễ (cái)	2,00	4,86	7,50	2,10	0,64
Dài rễ (cm)	1,05	2,67	3,24	1,22	0,18

Kết quả thí nghiệm cho thấy công thức 3 chồi ra nhiều rễ nhất và rễ cũng phát triển tốt nhất, trung bình có 7,5 rễ/chồi và rễ dài 3,24cm. Công thức 1 và 4 tương đương nhau và có kết quả thấp nhất. Chứng tỏ nồng độ 3mg/l IBA là phù hợp cho môi trường ra rễ chèn giống Shan Chát Tiên nuôi cấy mô.

1/ Nồng độ BAP 8mg/l thêm vào môi trường MS thích hợp nhất để kích thích phôi vô tính phát sinh thành chồi cây chèn mới. Ở môi trường này, sau khi cấy 20 ngày có 96,34% khối phôi vô tính đã phát sinh chồi mới.

2/ Giai đoạn nhân chồi, để chồi đạt chiều cao 4-6cm cần thời gian 2 tháng. Nồng độ BAP 3mg/l và IBA 0,3mg/l trong môi trường MS là môi trường thích hợp nhất để nhân nhanh *in vitro* cây chèn, hệ số nhân đạt 3,53 lần/đợt cấy chuyên.

IV. KẾT LUẬN

Nghiên cứu tái sinh cây chèn từ phôi vô tính, giống chèn Shan Chát Tiên có những kết luận sau:

3/ Sau khi cấy lên môi trường 13 ngày thì chồi bắt đầu phát sinh rễ, sự ra rễ tập trung từ ngày thứ 16 đến ngày thứ 22 sau khi cấy. Môi trường MS bổ sung 3mg/l IBA phù hợp nhất đối với sự sinh trưởng và phát triển rễ từ chồi cây chè nuôi cấy mô. Ở nồng độ này 82,54% số chồi phát sinh rễ.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Akula A., W.A. Dodd (1998), *Direct somatic embryogenesis in a selected tea clone, "TRI-2025" (Camellia sinensis (L.) O. Kuntze from nodal explants.* Plant cell reports 17: 804-809.
2. Das suresh Chandra, Dutta Ranjan Kumar, Bordoloi Biswaiyoti (2005), *Tea somaclones with high yield and quality potential.* The 2005 international symposium on innovation in tea science and sustainable development in tea dustury. Nov. 11-15 Hangzhou China.
3. Kato Michyo (1985), *Regeneration of plantlets from tea stem callus.* Japan, Breed 35: 317-322.
4. Kazumi Furukawa, Junichi Tanaka. Makura-Ck (2004), *A tea strain with a high somatic embryogenesis.* NIVTS, J. 6 (2004), p.109-115.
5. M. Kato (1996), *Somatic embryogenesis from immature leaves of in vitro grown tea shoots.* Plant cell report, Yamaguchi University, p.920-923.
6. Satoru matsumoto, Masae kwada and Sadaaki Kondo (1993), *Rooting of tea (Camellia sinensis) plants from in vitro culture for Acclimation.* Japan, J. Breed 6: 1-10.

Ngày nhận bài: 18/4/2012

Người phản biện: TS. Nguyễn Văn Tạo,
ngày 25/4/2012

Ngày duyệt đăng: 4/9/2012

KẾT QUẢ ĐIỀU TRA, TUYỂN CHỌN CÂY CHÈ SHAN ƯU TÚ TẠI XÃ MỒ SÌ SAN, HUYỆN PHONG THO, TỈNH LAI CHÂU

Đặng Văn Thư, Đỗ Văn Ngọc, Nguyễn Hữu Phong

SUMMARY

The survey results, selection of Shan tea plants have good characteristics in Mo Si San, Phong Tho, Lai Chau

The population of secular Shan tea trees of Mo Si San widely scattered in an area of 70 hectares with 3,000 trees. Tea trees interspersed with areas of young forest, jungle and recovery forest. Shan tea material of Mo Si San processing green tea, yellow tea for high quality. From secular Shan population has selected 10 promising trees, with the following main characteristics: Color dark green leaves, serrated level of moderate-to-many, bud and young leaves without hair, Tea tree height of 15 meters, body circumference > 60cm, weight of shoot (1 bud and 2 young leaves) varied from 0.86 to 1.17 gram. The yield of spring season varied from 1.65 to 2.41kg/tree. Tannin content varied from 30.65 to 35.41%, amino acid composition from 1.60 to 2.04%, content of extracts from 39.31 to 44.24%.

Keywords: Shan tea, Mo Si San, Phong Tho, Lai Chau

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Xã Mồ Sỉ San, huyện Phong Thổ, tỉnh Lai Châu có tập đoàn cây chè Shan cổ thụ tương đối tập trung, phân bố tại các vùng

núi có độ cao trên 2.000m so với mực nước biển, mọc xen lẫn với cây rừng tự nhiên, nhiều cây có chu vi thân trên 1m, chứng tỏ cây chè Shan đã xuất hiện ở đây từ rất lâu. Kết quả chế biến chè xanh từ nguyên liệu