

NGHIÊN CỨU NHÂN GIỐNG *IN VITRO* CÂY CHÈ TÍM [*Camellia sinensis*] NHẬP NỘI

Nguyễn Hồng Chiên^{1,*}, Nguyễn Thị Thu Hà¹,
Nguyễn Thị Kim Linh¹, Nguyễn Hải Yến¹, Phạm Huy Quang¹

TÓM TẮT

Cây chè tím là loại cây giàu anthocyanin, là nguyên liệu để sản xuất các loại chè có màu sắc hoặc hương thơm độc đáo và các loại trà có tác dụng dược phẩm. Trong nghiên cứu này, các đoạn cành mang mắt ngủ của cây chè tím nhập nội được sử dụng làm vật liệu ban đầu nhằm xây dựng quy trình nhân nhanh *in vitro*. Kết quả nghiên cứu cho thấy việc lựa chọn chiều dài đoạn cành mang mắt ngủ thích hợp để sử dụng làm vật liệu khử trùng là quan trọng. TDZ không phù hợp khi sử dụng để nhân nhanh các chồi *in vitro* do dẫn đến kích thích sự hình thành mô sẹo nhưng BAP lại có hiệu quả trong việc nhân nhanh các chồi *in vitro*. Môi trường nghèo dinh dưỡng có ảnh hưởng tích cực đến sự hình thành rễ của các chồi chè tím *in vitro*. Ở giai đoạn ra cây ngoài vườn ươm, hỗn hợp giá thể có ảnh hưởng rõ rệt đến tỉ lệ sống của cây con. Các kết quả trong nghiên cứu này có thể được áp dụng cho mục đích nhân nhanh và bảo tồn cây chè tím cũng như các loài *Camellia*.

Từ khóa: *Camellia*, chè tím, môi trường MS, nhân nhanh *in vitro*.

1. BẬT VẤN ĐỀ

Cây chè tím cũng giống như các loại cây giàu anthocyanin, là nguyên liệu để sản xuất các loại chè có màu sắc hoặc hương thơm độc đáo và các loại trà có tác dụng dược phẩm. Bởi vậy, giống chè tím đã được một số nước trên thế giới lai tạo, phát triển và sử dụng như một loại thảo dược vì nó có hàm lượng chất chống ô xy hóa anthocyanin và polyphenol cao hơn chè thông thường.

Chè tím chứa hàm lượng catechin và epigallocatechin gallate (EGCG) đặc biệt cao. Những chất này có liên quan đến việc giảm mỡ cơ thể và chống lại các bệnh như ung thư, tim mạch và đái tháo đường. Chè tím có chứa hàm lượng anthocyanin cao hơn 15 lần so với quả việt quất (1,5% so với 0,1%). Các anthocyanin trong lá chè tím có các chức năng sinh học khác nhau liên quan đến sức khỏe, như chất chống oxy hóa và chất chống vi sinh vật gây hại [7], giảm mỡ máu [19] và ngăn ngừa ung thư đại trực tràng [8], khắc phục tình trạng tắc nghẽn mạch máu não [18]. Ngoài ra, anthocyanin là chất chuyển hóa thứ cấp, cũng góp phần bảo vệ cây chống lại các căng thẳng vô sinh và hữu sinh khác nhau, như stress do lạnh [2], do mặn [5] và do hàm lượng phosphate thấp [11].

Cây chè tím cũng là loại cây trồng có giá trị kinh tế cao. Theo báo cáo của Kenya [16], trồng chè tím có lợi nhuận cao gấp 10 lần so với các giống chè truyền thống. Nông dân ở các vùng trồng chè ở Kenya đang theo đuổi việc trồng giống chè tím vì một số lý do như lợi ích sức khỏe của chè tím đối với người tiêu dùng, giá trị thị trường quốc tế cao và khả năng chịu hạn tốt khi so với các loại chè xanh và đen truyền thống. Với những ưu điểm như vậy, màu tím đã được sử dụng như một thông số chất lượng trong các chương trình chọn giống chè.

Ở Việt Nam, chè Trung Du búp tím được biết đến như một loại chè dược liệu có tác dụng ngăn ngừa, kìm hãm ung thư và có giá trị kinh tế cao. Tuy nhiên, diện tích trồng chè Trung Du búp tím ở Phú Thọ còn lại rất ít, chỉ chiếm chưa đến 1% diện tích chè Trung Du và 0,2%-0,3% diện tích trồng chè nói chung của tỉnh Phú Thọ. Nguyên nhân được cho là chè búp tím chủ yếu được trồng bằng hạt nên năng suất và chất lượng chưa ổn định.

Cây chè tím có nguồn gốc Nhật Bản được thu thập để phục vụ lai tạo giống chè mới từ năm 2013. Cây chè mới đã được nhân giống bằng giâm hom, đến nay vẫn giữ nguyên đặc tính di truyền màu tím vốn có. Tuy nhiên, trong số 10 cây chè tím thu thập được năm 2013, hiện chỉ có 3 cây còn sống, đang sinh trưởng và phát triển khá tốt. Nhân giống bằng giâm hom giống chè tím này rất khó, do tỉ lệ sống, tỉ lệ tạo rễ và phát triển thành cây mới rất thấp nên số

¹ Viện Khoa học Kỹ thuật Nông lâm nghiệp miền núi phía Bắc
*Email: donanvnvn@yahoo.com

lượng cây giống ít. Một phương pháp nhân giống *in vitro* thích hợp sẽ loại bỏ những vấn đề liên quan đến tạo rễ hom thân gỗ. Các nghiên cứu nhân giống *in vitro* một số loài thuộc chi *Camellia* như *Camellia japonica*, *C. sinensis* và *C. reticulata* đã được thực hiện [4], [15]. Vì vậy, áp dụng công nghệ nuôi cấy mô tế bào sẽ nhân được những cây chèn búp tím có sức sống khỏe hơn, đáp ứng được yêu cầu duy trì và phát triển giống chèn tím mới, góp phần đa dạng sản phẩm và nâng cao giá trị sản phẩm cây chèn.

2. ĐỐI TƯỢNG, VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng và vật liệu nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu: Cây chèn tím (*Camellia sinensis*) có nguồn gốc Nhật Bản.

Vật liệu nghiên cứu: Các đoạn cành bánh tẻ mang mắt ngủ của cây chèn tím thu thập tại vườn ươm Bộ môn Công nghệ sinh học và Bảo vệ thực vật, Viện Khoa học Kỹ thuật Nông lâm nghiệp miền núi phía Bắc.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Khử trùng mẫu: Mẫu cấy được rửa sạch dưới vòi nước, tiếp theo ngâm trong dung dịch xà phòng nồng độ 0,01% trong 30 phút và rửa sạch bằng nước. Các mẫu sau đó được lắc trong hóa chất khử trùng $HgCl_2$ 0,1% trong thời gian từ 10 phút đến 30 phút và cuối cùng được rửa lại bằng nước cất vô trùng 3 lần, mỗi lần 5 phút. Các mẫu cấy đã được khử trùng bề mặt được cắt thành các đoạn có độ dài 1,0 cm, mỗi đoạn đều có chứa một mầm ngủ, sau đó được cấy vào ống nghiệm chứa 15 ml môi trường vào mẫu: MS + 0,5 mg/l BAP + 20 mg/l Ascorbic + 30 g/l đường + 5,5 g/l agar, pH = 5,5. Sau 1 tuần - 2 tuần, những mẫu cấy vô trùng được chuyển sang môi trường tạo chồi MS có bổ sung các chất điều hòa sinh trưởng ở các nồng độ khác nhau. Tỷ lệ mẫu nhiễm (%) được tính bằng số mẫu nhiễm sau một tháng chia cho tổng số mẫu cấy sau khử trùng. Tương tự, tỷ lệ mẫu sạch/mẫu sạch bột chồi (%) được tính bằng số mẫu sạch/số mẫu bột chồi sau một tháng chia cho tổng số mẫu cấy sau khử trùng.

Nhân nhanh chồi *in vitro*: Các chồi có chiều cao từ 2 cm - 2,5 cm được cắt thành các đoạn dài 1 cm - 1,5 cm và có 1 lá - 2 lá, chuyển vào môi trường MS có bổ sung các chất điều hòa sinh trưởng ở các nồng độ khác nhau để nhân nhanh số lượng chồi. Hệ số nhân chồi (lần) được tính bằng cách đếm số chồi quan sát được sau 2 tháng nuôi cấy ở từng mẫu cấy, rồi tính số

chồi trung bình của tất cả mẫu cấy ở mỗi nghiệm thức trong một lô thí nghiệm.

Tạo cây hoàn chỉnh: những chồi đủ tiêu chuẩn có chiều cao từ 2 cm, có từ 2 đến 3 lá được cấy chuyển sang môi trường có thành phần MS thay đổi (MS, ½ MS, ¼ MS), bổ sung α -NAA kết hợp IBA hoặc chỉ bổ sung IBA ở các nồng độ khác nhau để kích thích tạo rễ. Sau khi cấy chuyển các chồi *in vitro* vào môi trường tạo rễ, bình cấy được đặt ở điều kiện tối trong 10 ngày trước khi chuyển sang điều kiện sáng. Tỷ lệ ra rễ (%) được tính bằng số chồi *in vitro* có rễ chia cho tổng số chồi *in vitro* thí nghiệm ở mỗi nghiệm thức trong cùng một lô thí nghiệm.

Ra cây ngoài vườn ươm: Cây *in vitro* hoàn chỉnh, khỏe mạnh, có chiều cao từ 2 cm được rửa sạch agar và trồng trên 4 loại giá thể khác nhau (loại 1 : đất, phân chuồng ủ hoai và cát (tỷ lệ 2 : 1 : 1); loại 2 : đất và đá Vermiculite (1 : 1); loại 3: đất, phân chuồng ủ hoai và đá Vermiculite (1 : 1 : 1); loại 4 : vụn xơ dừa, mùn cưa, phân hữu cơ ủ hoai, đất (3 : 3 : 1 : 2)). Mỗi loại giá thể được đóng vào khay nhựa 50 lỗ có kích thước 54 cm x 28 cm. Cây trồng trong khay nhựa được đặt trong nhà lưới, che phủ bằng nylon và lưới che râm. Tưới nước giữ ẩm (dạng phun mù) cho cây 3 lần/ngày ở tháng đầu và 2 lần/ngày từ tháng thứ 2. Bổ sung dinh dưỡng cho cây bằng dung dịch MS pha loãng, định kỳ tưới 10 ngày/lần.

Điều kiện nuôi cấy *in vitro*: Điều kiện phòng thí nghiệm với nhiệt độ $25 \pm 2^\circ C$, quang chu kỳ 10 giờ/ngày - 12 giờ/ngày, cường độ chiếu sáng 40 45 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ - 45 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ của ánh sáng huỳnh quang và độ ẩm trung bình 60% - 65%.

Xử lý số liệu: Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần, mỗi lần từ 20 mẫu đến 50 mẫu. Tất cả các số liệu sau khi thu thập ứng với từng chỉ tiêu theo dõi, được xử lý bằng Microsoft Excel 2010 và các phân tích thống kê được thực hiện bằng phần mềm R [9]. Để xác định liệu các công thức thí nghiệm có khác nhau về mặt thống kê, so sánh Tukey ($P < 0,05$) được sử dụng để kiểm tra sự khác biệt giữa các giá trị trung bình.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả tạo nguồn vật liệu vô trùng

3.1.1. Ảnh hưởng của hóa chất và thời gian khử trùng đến hiệu quả tạo vật liệu khởi đầu

Các đoạn cành mang mắt ngủ có độ dài từ 7 cm - 9 cm, có từ 3 lá thật trở lên được khử trùng với $HgCl_2$ ở các nồng độ khác nhau trong các khoảng thời gian thay đổi. Kết quả được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Hiệu quả tạo nguồn vật liệu khởi đầu từ đoạn cành mang mắt ngủ

Hóa chất khử trùng	Thời gian khử trùng (phút)	Tỉ lệ mẫu nhiễm (%)	Tỉ lệ mẫu sạch (%)	Tỉ lệ mẫu sạch bật chồi (%)
HgCl ₂ 0,1%	10	100 ^a ± 0,0	0 ^a	0 ^a
	15	86,8 ^b ± 5,6	13,17 ^b ± 5,6	0 ^a
	20	71,5 ^b ± 7,4	28,5 ^b ± 7,4	0 ^a
	25	49,7 ^c ± 6,1	50,3 ^c ± 6,1	7,67 ^b ± 1,2
	30	58,8 ^{bc} ± 8,2	41,2 ^d ± 8,2	0 ^a

Ghi chú: Số liệu được thu thập sau 1 tháng nuôi cấy. Số liệu là giá trị trung bình của 3 lần lặp lại, mỗi lần 50 mẫu. Sự sai khác giữa các nghiệm thức được biểu diễn dưới dạng các chữ cái khác nhau với độ tin cậy P < 0,05.

Kết quả cho thấy, khử trùng với HgCl₂ ở nồng độ 0,1% trong thời gian 10 phút, tất cả các mẫu đều nhiễm, không thu được mẫu sạch. Tuy nhiên, khi tăng thời gian khử trùng lên 15 phút, 20 phút, 25 phút và 30 phút, tỉ lệ mẫu vô trùng đạt từ 13,17% đến 50,3%. Tỉ lệ mẫu vô trùng đạt cao nhất (50,3%) khi mẫu được khử trùng với HgCl₂ ở nồng độ 0,1% trong thời gian 25 phút, tỉ lệ bật chồi là 7,67%. Trong khi đó, ở các khoảng thời gian khử trùng khác không thu được mẫu sạch bật chồi, kể cả khi khử trùng trong thời gian 30 phút đạt tỉ lệ mẫu sạch là 41,2%. Kết quả này có thể do khi khử trùng ở khoảng thời gian dưới 25 phút, tỉ lệ mẫu vô trùng còn lại quá ít, nên chưa thu được mẫu sạch bật chồi. Đối với nghiệm thức khử trùng trong 30 phút, tỉ lệ mẫu sạch khá cao nhưng không thu được mẫu sạch bật chồi có thể do thời gian khử trùng dài đã ảnh hưởng đến sức sống của mầm ngủ. Kết quả này cũng phù hợp với nghiên

cứu của Jha và Sen (1992) [10] khi cũng sử dụng HgCl₂ 0,1% trong thời gian 25 phút để khử trùng các đoạn cành mang mắt ngủ và thu được kết quả tốt.

Đoạn cành sử dụng trong thí nghiệm trên có thể chưa phù hợp, mầm ngủ còn quá nhỏ, nên giảm khả năng bật chồi sau khi khử trùng. Vì vậy, trong thí nghiệm tiếp theo đã tiến hành nghiên cứu ảnh hưởng của tuổi mẫu (tính theo chiều dài và số lá của đoạn cành) đến hiệu quả tạo chồi.

3.1.2. Ảnh hưởng của tuổi mẫu đến hiệu quả tạo nguồn vật liệu vô trùng

Các đoạn cành có chiều dài khác nhau: (1) đoạn cành dài 7 cm - 9 cm (như thí nghiệm ở bảng 1); (2) đoạn cành dài 12 cm - 15 cm; (3) đoạn cành 17 cm - 19 cm; (4) đoạn cành dài 20 cm - 23 cm được sử dụng làm vật liệu và đều được khử trùng với HgCl₂ trong thời gian 25 phút. Kết quả được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. Hiệu quả tạo nguồn vật liệu khởi đầu từ đoạn cành mang mắt ngủ có độ dài khác nhau

Công thức	Chiều dài đoạn cành (cm)	Tỉ lệ mẫu nhiễm (%)	Tỉ lệ mẫu sạch (%)	Tỉ lệ mẫu sạch bật chồi (%)
CT1	7 - 9	47,7	52,3 ^a ± 1,41	9,4 ^a ± 3,91
CT2	12 - 15	43,1	56,9 ^b ± 1,65	21,3 ^b ± 2,5
CT3	17 - 19	41,1	58,9 ^b ± 1,9	25,5 ^c ± 1,33
CT4	20 - 23	58,9	41,1 ^c ± 1,91	19,3 ^b ± 3,4

Ghi chú: Số liệu được thu thập sau 1 tháng nuôi cấy. Số liệu là giá trị trung bình của 3 lần lặp lại, mỗi lần 50 mẫu. Sự sai khác giữa các nghiệm thức được biểu diễn dưới dạng các chữ cái khác nhau với độ tin cậy P < 0,05.

Kết quả ở bảng 2 cho thấy, tỉ lệ mẫu sạch sau khử trùng ở tất cả các nghiệm thức đều đạt > 40%, cao nhất ở nghiệm thức 3 (chiều dài đoạn cành từ 17 cm - 19 cm) với tỉ lệ mẫu sạch là 58,9%. Trong thí nghiệm này, tỉ lệ bật chồi ở CT1 (chiều dài đoạn cành từ 7 cm - 9 cm) đạt 9,4%, thấp nhất trong 3 nghiệm

thức. Với đoạn cành có chiều dài từ 17 cm - 19 cm, tỉ lệ mẫu sạch bật chồi đạt cao nhất là 25,5%. Kết quả phân tích thống kê cho thấy tỉ lệ mẫu sạch sau khử trùng và tỉ lệ mẫu sạch bật chồi ở các nghiệm thức CT2, CT3 và CT4 đều sai khác có ý nghĩa. Với kết quả này, đoạn cành có chiều dài từ 17 cm - 19 cm

thích hợp nhất để sử dụng làm nguồn vật liệu ban đầu cho khử trùng.

3.2. Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến tỉ lệ tạo chồi chèn

Kết quả theo dõi ảnh hưởng của tổ hợp chất điều hòa sinh trưởng đến tỉ lệ tạo chồi được trình bày ở bảng 3.

Bảng 3. Ảnh hưởng của tổ hợp các chất điều hòa sinh trưởng đến tỉ lệ tạo chồi

Chất điều hòa sinh trưởng (mg/l)				Đoạn cành mang mắt ngủ		
BAP	NAA	IAA	TDZ	Tỉ lệ mầm tạo chồi (%)	Chiều dài chồi (cm)	Số ngày hình thành chồi (ngày)
1,0	0,1			19,3 ^a ± 3,45	0,7 ^a ± 0,12	30-35
1,0	0,5			24,6 ^b ± 2,87	0,8 ^{ab} ± 0,1	30-35
1,0	1,0			26,4 ^b ± 2,23	0,8 ^{ab} ± 0,12	30-32
1,0	1,5			37,2 ^c ± 2,48	0,9 ^b ± 0,03	30-32
1,0	2,0			34,1 ^c ± 1,83	0,9 ^b ± 0,06	29-32
1,0		0,01		26,8 ^a ± 3,16	1,0 ^a ± 0,1	30-35
1,0		0,05		37,6 ^b ± 2,83	1,2 ^b ± 0,1	30-35
1,0		0,1		42,5 ^b ± 4,44	1,5 ^c ± 0,1	28-32
1,0		0,5		31,2 ^c ± 1,17	1,0 ^a ± 0,13	30-32
1,0		1,0		29,1 ^c ± 0,9	1,0 ^a ± 0,1	29-32
		0,1	0,25	21,6 ^a ± 2,73	0,91 ^a ± 0,17	30-35
		0,1	0,5	27,2 ^b ± 1,72	0,97 ^a ± 0,03	30-35
		0,1	1,0	28,7 ^{bc} ± 2,1	0,94 ^a ± 0,13	30-35
		0,1	1,5	31,5 ^c ± 2,91	1,06 ^a ± 0,31	30-32
		0,1	2,0	23,2 ^a ± 2,48	1,04 ^a ± 0,16	30-35
		0,1	2,5	23,6 ^a ± 1,94	1,14 ^a ± 0,11	32-35
		0,1	3,0	24,6 ^a ± 2,89	1,31 ^c ± 0,09	32-35

Ghi chú: Số liệu về tỉ lệ mầm bật chồi được thu thập sau 30 ngày nuôi cấy. Các số liệu là giá trị trung bình của 3 lần lặp lại, mỗi lần 30 mẫu. Sự sai khác giữa các nghiệm thức trong cùng một lô thí nghiệm được biểu diễn dưới dạng các chữ cái khác nhau với độ tin cậy P<0,05.

Kết quả ở bảng 3 cho thấy tỉ lệ mầm bật chồi ở các nghiệm thức có bổ sung BAP và NAA dao động từ 19,3% đến 37,2%, cao nhất ở nghiệm thức bổ sung 1,0 mg/l BAP và 1,5 mg/l NAA (37,2%). Thời gian cần thiết để hình thành chồi ở tất cả các nghiệm thức từ 30 ngày đến 35 ngày. Chiều dài chồi dao động từ 0,7 cm đến 0,9 cm. Đối với các nghiệm thức bổ sung tổ hợp chất điều hòa sinh trưởng BAP và IAA, tỉ lệ tạo chồi ở các nghiệm thức dao động từ 26,8% đến 42,5%. Tỉ lệ mầm tạo chồi đạt cao nhất ở nghiệm thức bổ sung 1,0 mg/l BAP và 0,1 mg/l IAA (42,5%). Số ngày cần thiết để hình thành chồi cũng khác nhau ở các nghiệm thức, tối thiểu là 28 ngày. Chiều dài chồi dao động từ 1,0 cm - 1,5 cm.

Tổ hợp chất điều hòa sinh trưởng IAA và TDZ cũng ảnh hưởng đến tỉ lệ tạo chồi. Tỉ lệ tạo chồi khác nhau ở các nghiệm thức có bổ sung hàm lượng TDZ khác nhau, dao động từ 21,6% đến 31,5%. Tỉ lệ mầm

tạo chồi đạt cao nhất ở nghiệm thức bổ sung 1,5 mg/l TDZ và 0,1 mg/l IAA (31,5%). Số ngày cần thiết để hình thành chồi cũng khác nhau ở các nghiệm thức, tối thiểu là từ 30 ngày - 32 ngày. Chiều dài chồi dao động từ 0,91 cm - 1,31 cm.

Như vậy, trong số các tổ hợp chất điều hòa sinh trưởng đã thí nghiệm, nghiệm thức có bổ sung BAA (1 mg/l) và IAA (0,1 mg/l) cho tỉ lệ tạo chồi cao nhất, đạt 42,5%, với số ngày cần thiết để hình thành chồi thấp nhất (28 ngày - 32 ngày) và chồi có chiều dài dài nhất (1,5 cm).

3.3. Nghiên cứu nuôi cấy nhân nhanh các chồi *in vitro*

Các chồi có chiều cao từ 2 cm - 2,5 cm được cắt thành các đoạn dài 1 cm - 1,5 cm, mỗi đoạn đều chứa ít nhất một mắt ngủ hoặc có đỉnh sinh trưởng rồi chuyển sang môi trường có bổ sung BAP ở các nồng độ khác nhau. Kết quả được trình bày ở bảng 4.

Bảng 4. Ảnh hưởng của BAP đến hệ số nhân chồi *in vitro*

Công thức	BAP (mg/l)	Chiều dài chồi sau 2 tháng (cm)	Hệ số nhân
Đối chứng	0	0,82 ^a ± 0,12	0,67 ^a ± 0,4
CT1	1,0	1,12 ^a ± 0,16	0,9 ^a ± 0,4
CT2	1,5	1,29 ^a ± 0,08	1,16 ^a ± 0,06
CT3	2,0	1,36 ^a ± 0,09	1,29 ^a ± 0,16
CT4	2,5	1,65 ^b ± 0,18	1,54 ^b ± 0,16
CT5	3,0	1,78 ^b ± 0,15	1,68 ^b ± 0,1
CT6	3,5	2,25 ^c ± 0,23	2,39 ^c ± 0,17
CT7	4,0	2,02 ^c ± 0,19	2,0 ^c ± 0,12

Ghi chú: Số liệu về chiều dài chồi được thu thập sau 60 ngày nuôi cấy. Sự sai khác giữa các nghiệm thức được biểu diễn dưới dạng các chữ cái khác nhau với độ tin cậy P < 0,05.

Kết quả ở bảng 4 cho thấy, khi tăng nồng độ BAP từ 1,0 mg/l lên 4,0 mg/l thì chiều dài chồi cũng tăng sau 2 tháng nuôi cấy. Chiều dài chồi đạt cao

nhất ở nghiệm thức bổ sung 3,5 mg/l BAP (chiều dài chồi đạt 2,25 cm sau hai tháng nuôi cấy và hệ số nhân chồi đạt 2,39 lần), thấp nhất ở nghiệm thức bổ sung 1,0 mg/l BAP (chiều dài chồi đạt 1,12 cm sau hai tháng nuôi cấy và hệ số nhân chồi đạt 0,9 lần). Khi tăng hàm lượng BAP lên 4,0 mg/l, chiều dài chồi và hệ số nhân chồi đều giảm so với nghiệm thức bổ sung 3,5 mg/l. Như vậy, khi tăng hàm lượng BAP dẫn đến những thay đổi về chiều dài chồi và hệ số nhân chồi. Tuy nhiên, bổ sung BAP ở mức 3,5 mg/l cho kết quả tốt nhất, với hệ số nhân chồi đạt cao nhất. Với kết quả này đã sử dụng môi trường MS bổ sung 3,5 mg/l BAP để nhân nhanh các chồi *in vitro*.

3.4. Nghiên cứu tạo cây hoàn chỉnh

Các chồi *in vitro* có chiều dài từ 2 cm được tách ra và cấy chuyển vào môi trường MS đầy đủ, 1/2 MS hoặc 1/4 MS có bổ sung chỉ IBA hoặc tổ hợp NAA và IBA ở các nồng độ khác nhau để kích thích sự phát triển của bộ rễ nhằm tạo cây hoàn chỉnh. Kết quả thí nghiệm được trình bày ở bảng 5.

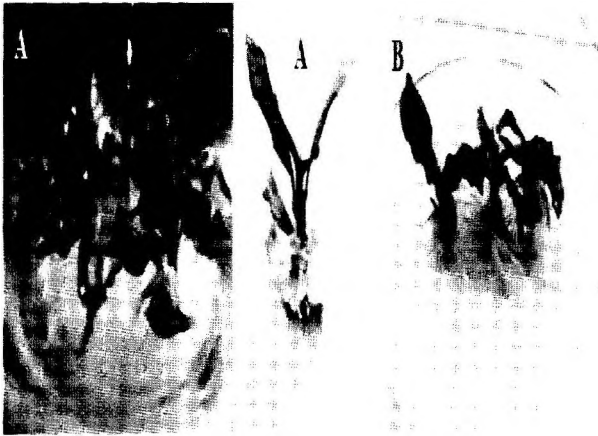
Bảng 5. Ảnh hưởng của môi trường đến khả năng ra rễ của chồi chèn tím *in vitro*

Công thức	Môi trường	Chất điều hòa sinh trưởng	Tỉ lệ ra rễ (%)	Số rễ (cái)	Chiều dài rễ (cm)
CT1	MS	0,5 mg/l α - NAA + 2,5 mg/l IBA	0 ^a	0	0
CT2	1/2 MS		44,5 ^{*b} ± 3,85	3,73 [*] ± 0,25	1,38 [*] ± 0,13
CT3	1/4 MS		40 ^{*b} ± 3,3	3,67 [*] ± 0,61	1,27 [*] ± 0,18
CT1	MS	0,8 mg/l α - NAA + 4,0 mg/l IBA	0 ^a	0	0
CT4	1/2 MS		71,1 ^{*c} ± 1,9	5,28 [*] ± 0,3	1,82 [*] ± 0,18
CT5	1/4 MS		53,3 ^{*d} ± 3,3	4,2 [*] ± 0,26	1,63 [*] ± 0,15
CT1	MS	5,0 mg/l IBA	0 ^a	0	0
CT6	1/2 MS		33,3 ^{*b} ± 5,7	15,43 [*] ± 2,14	1,73 [*] ± 0,35
CT7	1/4 MS		31,7 ^{*b} ± 2,8	8,17 [*] ± 1,26	1,67 [*] ± 0,15

*Ghi chú: Số liệu về tỉ lệ ra rễ được thu thập sau 60 ngày nuôi cấy. Sự sai khác giữa các nghiệm thức ở cùng một lô thí nghiệm được biểu diễn dưới dạng dấu * với độ tin cậy P < 0,05. Các chữ cái khác nhau thể hiện sự khác nhau có ý nghĩa về tỉ lệ ra rễ giữa các nghiệm thức trong cả ba lô thí nghiệm với độ tin cậy P < 0,05.*

Kết quả ở bảng 5 cho thấy, chồi chèn tím *in vitro* khi cấy trên môi trường MS không có sự phát sinh hình thành rễ. Quan sát hình thái cho thấy các chồi phát triển bình thường nhưng không phát sinh rễ. Khi giảm nồng độ môi trường MS xuống còn 1/2 và 1/4 lượng dinh dưỡng khoáng và vitamin so với môi trường MS tiêu chuẩn thì các chồi chèn tím *in vitro* đã phát sinh rễ. Tỉ lệ ra rễ đạt cao hơn ở môi trường 1/2 MS so với môi trường 1/4 MS. Cụ thể, tỉ lệ ra rễ đạt

cao nhất (71,1%) ở nghiệm thức 1/2 MS bổ sung 0,8 mg/l α-NAA và 4,0 mg/l IBA, số rễ và chiều dài rễ cũng đạt cao nhất trên môi trường này. Tuy nhiên, cũng với tổ hợp NAA và IBA ở cùng nồng độ trên môi trường 1/4 MS, tỉ lệ ra rễ đạt thấp hơn, với 53,3%. Kết quả ở bảng 5 cũng cho thấy, môi trường có bổ sung tổ hợp NAA và IBA thì tỉ lệ ra rễ đạt cao hơn so với môi trường chỉ bổ sung IBA.



Hình 1. (A) Cây chè tím *in vitro* sau 35 đến 40 ngày nuôi cấy trên môi trường 1/2 MS bổ sung 0,8 mg/l α -NAA + 4,0 mg/l IBA; (B) Cây chè tím *in vitro* sau 60 ngày nuôi cấy trên môi trường 1/2 MS bổ sung 5,0 mg/l IBA

Ảnh hưởng tích cực của môi trường nghèo dinh dưỡng đến sự hình thành rễ của các chồi chè tím *in vitro* trong nghiên cứu này là phù hợp với nhiều công bố về môi trường tạo rễ cho các chồi *in vitro* của các loài thuộc chi *Camellia*. Các kết quả nghiên cứu trước đây cho thấy, nền môi trường phổ biến được sử dụng là 1/2 MS hoặc 1/2 WPM có hoặc không có bổ sung thêm chất điều hòa sinh trưởng [13], [14]. Mặc dù vậy, một số nghiên cứu trên *Camellia* vẫn sử dụng môi trường đầy đủ dinh dưỡng ở giai đoạn ra rễ như MS hoặc WPM. Tuy nhiên, các chồi *in vitro* này đều đã được xử lý với dung dịch IBA nồng độ cao (300 mg/l - 1.000 mg/l) trong thời gian 10 phút - 50 phút trước khi cấy chuyển vào môi trường MS, 1/2 MS có bổ sung hoặc không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng. Tỷ lệ ra rễ của chồi *in vitro* *Camellia sinensis* cv. Iran 100 đạt 72,3% khi chồi được nhúng trong dung dịch IBA 300 mg/l trong thời gian 30 phút, sau đó chuyển sang môi trường 1/2 MS không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng [6]. Kết quả nghiên cứu của Jha và Sen (1992) [10] cho biết trên môi trường MS hoặc 1/2 MS không bổ sung hoặc có bổ sung IBA (1 mg/l - 4 mg/l) thì chồi *in vitro* *C. sinensis* cv. T - 78 không ra rễ. Tuy nhiên, khi nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung 100 mg/l IBA trong 10 ngày, sau đó chuyển sang môi trường MS không có chất điều hòa sinh trưởng thì tỷ lệ ra rễ đạt 80 - 90%. Trong một nghiên cứu khác, Đặng Quang Bích và cs (2017) [1] cho thấy, tỷ lệ ra rễ của chồi chè hoa vàng Ba Chẽ *in vitro* đạt 100% khi nuôi cấy trên môi trường 1/4 MS

bổ sung 0,5 mg/l NAA và 2,0 mg/l IBA. Nhưng trên môi trường 1/2 MS có bổ sung cùng nồng độ NAA và IBA cho tỷ lệ ra rễ đạt 62,5%.

Trong nghiên cứu này, ngoài các thí nghiệm tạo rễ đã trình bày ở trên, các thí nghiệm khảo sát với nồng độ IBA cao cũng đã được tiến hành. Theo đó, các chồi chè tím *in vitro* được cấy trên môi trường MS bổ sung 100 mg/l IBA trong 10 ngày hoặc nhúng vào dung dịch IBA 300 mg/l trong 30 phút rồi chuyển sang môi trường MS không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng nhưng các chồi đều không ra rễ (số liệu không được trình bày). Ngoài ra, trái với kết quả nghiên cứu của Nguyễn Quang Bích và cs (2017) [1], tỷ lệ ra rễ ở các môi trường 1/4 MS thấp hơn hoặc tương đương môi trường 1/2 MS dù bổ sung cùng loại và nồng độ chất điều hòa sinh trưởng. Sự khác nhau về tỷ lệ ra rễ khi sử dụng cùng loại môi trường và điều kiện nuôi cấy ở các nghiên cứu khác nhau có thể do sự khác nhau về đối tượng nghiên cứu. Mỗi giống chè sẽ có phản ứng khác nhau trên cùng một loại môi trường và điều kiện nuôi cấy.

Đối với các chồi chè tím *in vitro*, khi khảo sát điều kiện nuôi cấy ở thí nghiệm tạo rễ, các lô thí nghiệm đặt bình nuôi trong điều kiện tối 10 ngày rồi mới chuyển sang điều kiện sáng cho tỷ lệ tạo rễ cao hơn rất nhiều so với lô thí nghiệm đặt ngay bình nuôi trong điều kiện sáng (số liệu không được trình bày). Quang kỳ là một yếu tố khác có ảnh hưởng đến quá trình ra rễ và ảnh hưởng của điều kiện tối đến sự tạo rễ *in vitro* cũng đã được báo cáo [3]. Cảm biến quang là tác nhân quan trọng nhất tạo ra tác động tích cực của bóng tối đến sự tạo rễ. Phytochrome là cảm biến quang thực vật kiểm soát sự tạo rễ *in vitro*. Điều kiện tối ức chế hoạt động của phytochrome và trong điều kiện này sự hiện diện của các auxin như IBA có thể gây ra sự phân chia tế bào và làm tăng tỷ lệ tạo rễ [12].

3.5. Ảnh hưởng của giá thể đến tỷ lệ sống của cây *in vitro* ngoài vườn ươm

Những cây con hoàn chỉnh được chuyển ra trồng trong các khay nhựa có chứa các loại giá thể khác nhau. Kết quả theo dõi tỷ lệ sống của cây *in vitro* được trình bày ở bảng 6.

Bảng 6. Ảnh hưởng của giá thể đến tỉ lệ sống của cây *in vitro* ngoài vườn ươm

Công thức	Giá thể	Tỉ lệ sống (%)	Chiều cao cây (cm)	Số lá mới (lá)
CT1	Đất, phân chuồng ủ hoai và cát (tỉ lệ 2 : 1 : 1)	46,67 ^a ± 2,89	3,17 ^a ± 0,29	1,33 ^a ± 0,15
CT2	Đất và đá Vermiculite (1 : 1)	35,0 ^b ± 5,0	2,93 ^a ± 0,4	1,32 ^a ± 0,03
CT3	Đất, phân chuồng ủ hoai và đá Vermiculite (1 : 1 : 1)	63,3 ^c ± 2,9	3,77 ^b ± 0,25	1,65 ^b ± 0,09
CT4	Vụn xơ dừa, mùn cưa, phân chuồng ủ hoai, đất (3 : 3 : 1 : 2)	61,7 ^c ± 2,9	3,9 ^b ± 0,36	1,7 ^b ± 0,05

Ghi chú: Số liệu về tỉ lệ sống của cây con được thu thập sau 60 ngày trồng ngoài vườn ươm. Sự sai khác giữa các nghiệm thức ở cùng một chỉ tiêu theo dõi được biểu diễn bằng các chữ cái khác nhau với độ tin cậy P<0,05.

Kết quả ở bảng 6 cho thấy, tỉ lệ sống của cây con đạt từ 35% đến 63,3% trên 4 loại giá thể, trong đó giá thể đất và đá vermiculite (CT2) cho tỉ lệ sống thấp nhất; ngược lại, giá thể đất, phân chuồng ủ hoai và đá vermiculite (CT3) cho tỉ lệ sống cao nhất, các chỉ tiêu sinh trưởng của cây tốt. Ở CT4, giá thể kết hợp giữa vụn xơ dừa, mùn cưa, phân chuồng ủ hoai, đất (tỉ lệ 3 : 3 : 1 : 2), tỉ lệ sống của cây con đạt 61,7%, thấp hơn tỉ lệ sống của cây con ở CT3, nhưng sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê. Ở CT4, các chỉ tiêu sinh trưởng của cây tốt nhất, với chiều cao cây đạt 3,9 cm và số lá mới trung bình đạt 1,7 lá sau 60 ngày trồng ngoài vườn ươm.

Tỉ lệ sống của cây *in vitro* ngoài vườn ươm không chỉ chịu ảnh hưởng của loại giá thể mà còn bị ảnh hưởng bởi các yếu tố khác như chất lượng cây con *in vitro*, đặc tính của giống/loài, điều kiện nhà lưới và chế độ chăm sóc. Trong nghiên cứu này, tỉ lệ sống của cây con *in vitro* ngoài vườn ươm đạt cao nhất 63,3% trên giá thể đất, phân chuồng ủ hoai và đá vermiculite, tương đương với kết quả của Gonbad và cs (2014) [6] khi nghiên cứu trên cây chè *C. sinensis* (dòng Iran 100) với tỉ lệ sống là 65% sau 60 ngày trồng trong nhà kính. Tỉ lệ sống của cây *in vitro* trong nghiên cứu này cao hơn so với kết quả nghiên cứu của Begum và cs (2015) [4] với tỉ lệ sống của cây chè *C. sinensis* (giống BT2) ngoài vườn ươm chỉ đạt 32%, nhưng thấp hơn so với kết quả đạt được ở nghiên cứu của Rajasekaran và cs (1996) [17] trên cây *Camellia* sp. với tỉ lệ sống khi trồng trên giá thể đất là 97%. Sự khác nhau về tỉ lệ sống của cây chè *in vitro* ngoài vườn ươm ở các nghiên cứu này có thể do

các giống/dòng chè khác nhau được sử dụng làm vật liệu nghiên cứu.

4. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

Nghiên cứu này đã xây dựng thành công quy trình nhân nhanh *in vitro* cây chè tím nhập nội từ vật liệu ban đầu là đoạn cành mang mắt ngủ. Đoạn cành có chiều dài từ 17 cm - 19 cm thích hợp nhất để sử dụng làm nguồn vật liệu ban đầu cho khử trùng. Khử trùng với HgCl₂ ở nồng độ 0,1% trong thời gian 25 phút, tỉ lệ mẫu vô trùng là 58,9%. Môi trường có bổ sung BAP (1 mg/l) và IAA (0,1 mg/l) cho tỉ lệ tạo chồi cao nhất, đạt 42,5%, với số ngày cần thiết để hình thành chồi thấp nhất (28 ngày - 32 ngày) và chồi có chiều dài dài nhất (1,5 cm). Các chồi *in vitro* được nhân nhanh trên môi trường MS + 3,5 mg/l BAP + 30 g/l sucrose + 6 g/l agar cho hệ số nhân 2,39 lần/chồi. Các chồi sau đó được cấy chuyển sang môi trường 1/2 MS + 0,8 mg/l α-NAA + 4,0 mg/l IBA + 30 g/l sucrose + 6 g/l agar để tạo cây hoàn chỉnh với tỉ lệ ra rễ đạt 71,1% sau 35-40 ngày nuôi cấy. Tỉ lệ sống của cây con đạt cao nhất 63,3% trên giá thể đất, phân chuồng ủ hoai và đá vermiculite (tỉ lệ 1 : 1 : 1).

Cần tiếp tục nghiên cứu cải tiến quy trình nhân cây chè tím *in vitro* từ đoạn cành mang mắt ngủ để cho hệ số nhân cao hơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Đặng Quang Bích, Nguyễn Thị Phương Thảo, Nguyễn Văn Phú, Đinh Trường Sơn, Ninh Thị Thảo, Nguyễn Văn Huân, Trần Văn Lin, Nguyễn Thị Thùy Linh (2017). Quy trình nhân giống *in vitro* cây trà hoa vàng (*Camellia* sp.). *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*, 15 (12): 1664 - 1678.

2. Ahmed N., Park J. I., Jung H. J., Hur Y. and Nou I. S. (2015). Anthocyanin biosynthesis for cold and freezing stress tolerance and desirable color in *Brassica rapa*. *Funct. Integr. Genom.* 16, 383 -394.
3. Antonopoulou C., Dimassi K., Terios I. & Chatzissavvidis C. (2004). The influence of radiation quality on the *in vitro* rooting and nutrient concentrations of peach rootstock. *Biol. Plant.* 48, 549 -553.
4. Begum A., Ahmad I., Prodhan S. H., Azad A. K., Sikder M. B. H. and Ara M. R. (2015). Study on *in vitro* propagation of tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) through different explants. *Journal of Global Biosciences*. Vol. 4 (7): 2878 - 2887.
5. Garriga M., Retamales J. B., Romero-Bravo S., Caligari P. D. S. and Lobos G. A. (2014). Chlorophyll, anthocyanin, and gas exchange changes assessed by spectroradiometry in *Fragaria chiloensis* under salt stress. *J. Integr. Plant Biol.* 56, 505 - 515.
6. Gonbad R. A., Sinniah U. R., Aziz M. A. and Mohamad R. (2014). Influence of cytokinins in combination with GA₃ on shoot multiplication and elongation of tea Clone Iran 100 (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze). *The Scientific World Journal*, pp. 1 - 9.
7. Hribar U. and Ulrih N. P. (2014). The metabolism of Anthocyanins. *Curr. Drug. Metab.* 15, 3 - 13.
8. Hsu C. P., Shih Y. T., Lin B. R., Chiu C. F. and Lin C. C. (2012). Inhibitory effect and mechanisms of an anthocyanins- and anthocyanidin-rich extract from purple-shoot tea on colorectal carcinoma cell proliferation. *J. Agric. Food Chem.* 60, 3686 - 3692.
9. Ihaka R., Gentleman R. (1996). R: A language for data analysis and graphics. *Journal of Computational and Graphical Statistics*, 5: 299 - 314.
10. Jha T. and Sen S. (1992). Micropropagation of an elite Darjeeling tea clone. *Plant Cell Reports*, 11(2): 101-104.
11. Kovinich N., Kayanja G., Chanoca A., Riedl K., Otegui M. S., Grotewold E. (2014). Not all anthocyanins are born equal: distinct patterns induced by stress in *Arabidopsis*. *Planta*, 240, 931 - 940.
12. Mencuccini M. (2003). Effect of medium darkening on *in vitro* rooting capability and rooting seasonality of olive (*Olea europaea* L.) cultivars. *Sci Hort.* 97, 129 - 139.
13. Mondal T. K. (2011). *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources*, Kole C. (ed.). DOI 10.1007/978-3-642-21201-7_2, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
14. Mondal T. K. (2014). *Micropropagation. Breeding and biotechnology of tea and its wild species*. New Delhi, India, Springer, pp. 35 - 52.
15. Mukhopadhyay M., Mondal T. K., Chand P. K. (2016). Biotechnological advances in tea (*Camellia sinensis* [L.] O. Kuntze): a review. *Plant Cell Rep.* 35 (2): 255 - 287.
16. Nyangena J., Wang'ombe H. and Muluvi A. (2017) Promoting Purple Tea to Enhance Diversification in Kenya's Tea industry. *KIPPRA Policy Brief*, No. 3/2017-2018, pp. 1 - 2.
17. Rajasekaran P. (1996). An *in vitro* and *ex vitro* rooting of micropropagated shoots of tea (*Camellia* spp.). *Sri Lanka Journal of Tea Science*, 64: 12 - 20.
18. Rashid K., Wachira F. N., Nyabuga J. N., Wanyonyi B., Murilla G., Isaac A. O. (2014). Kenyan purple tea anthocyanins ability to cross the blood brain barrier and reinforce brain antioxidant capacity in mice. *Nutritional Neuroscience*. Vol. 17, No. 4: 178 - 185.
19. Wang Q. P., Peng C. X., Gao B. and Gong J. S. (2012). Influence of large molecular polymeric pigments isolated from fermented Zijuan tea on the activity of key enzymes involved in lipid metabolism in rat. *Exp. Gerontol.* 47, 672 - 679.

RESEARCH ON *IN VITRO* PROPAGATION OF IMPORTED PURPLE TEA (*Camellia sinensis*)

Nguyen Hong Chien¹*, Nguyen Thi Thu Ha¹,

Nguyen Thi Kim Linh¹, Nguyen Hai Yen¹, Pham Huy Quang¹

¹*Northern Mountainous Agriculture and Forestry Science Institute*

*Email: donanvnm@yahoo.com

Summary

Purple tea is rich in anthocyanins, which is a valuable raw material for the production of teas with unique color or aroma, and for the production of teas with medicinal effects. In this study, nodal segments collected from the imported purple tea tree were used as materials to establish a suitable protocol for micro propagation. The research results show that choosing the appropriate length of the nodal segments which is used as materials is important. TDZ is not suitable for micro propagation of shoots due to the stimulation of callus formation, but BAP is effective. Nutrient-poor medium has a positive effect on root formation of *in vitro* purple tea shoots. At the nursery stage, type of mixture effected significantly on the percentage of plant survival of tea. The results in this study can be applied for the purpose of *in vitro* multiplication and conservation of purple tea plants as well as *Camellia* species.

Keywords: *Camellia*, purple tea, MS medium, *in vitro* multiplication.

Người phản biện: PGS.TS. Nguyễn Văn Đồng

Ngày nhận bài: 13/8/2021

Ngày thông qua phản biện: 13/9/2021

Ngày duyệt đăng: 20/9/2021