NGHIÊN CỨU NHÂN GIỐNG *IN VITRO* CÂY CHÈ TÍM (*Camellia sinensis*) NHẬP NỘI

Nguyễn Hồng Chiên[1, *], Nguyễn Thị Thu Hà[1],
Nguyễn Thị Kim Linh[1], Nguyễn Hải Yến[1], Phạm Huy Quang[1]

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. ĐẶT 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. reticulate* đã được thực hiện [4], [15]. Vì vậy, áp dụng công nghệ nuôi cấy mô tế bào sẽ nhân được những cây chè búp tím có sức sống khỏe hơn, đáp ứng được yêu cầu duy trì và phát triển giống chè tím mới, góp phần đa dạng sản phẩm và nâng cao giá trị sản phẩm cây chè.

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

2.1. Đối tượng và vật liệu nghiên cứu

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

Vật liệu nghiên cứu: Các đoạn cành bánh tẻ mang mắt ngủ của cây chè 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. Tỉ lệ mẫu nhiễm (%) được tính bằng số mẫu nhiễm sau một tháng chia cho tổng số mẫu cấy sau khử trùng. Tương tự, tỉ lệ mẫu sạch/mẫu sạch bật chồi (%) được tính bằng số mẫu sạch/số mẫu bật 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, đ 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 cây được đặt ở điều kiện tối trong 10 ngày trước khi chuyển sang điều kiện sáng. Tỉ 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 (tỉ 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 kì tưới 10 ngày/lần.

Điều kiện nuôi cấy *in vitro*: Điều kiện phòng thí nghiệm với nhiệt độ 25 ± 2°C, quang chu kỳ 10 giờ/ngày - 12 giờ/ngày, cường độ chiếu sáng 40 45 µmol.m-2.s-1 - 45 µmol.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.