

QUY TRÌNH NHÂN GIỐNG *IN VITRO* CÂY TRÀ HOA VÀNG (*Camellia* sp.)

**Đặng Quang Bích¹, Nguyễn Thị Phương Thảo², Nguyễn Văn Phú³, Đinh Trường Sơn⁴,
Ninh Thị Thảo⁴, Nguyễn Văn Huân¹, Trần Văn Lin⁵, Nguyễn Thị Thùy Linh^{4*}**

¹*Viện Sinh - Nông, Đại học Hải Phòng*

²*Công ty Đầu tư Phát triển Sản xuất Nông nghiệp VinEco*

³*Khoa Nông học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam*

⁴*Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam*

⁵*K58, Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam*

Email : nttlinh@vnua.edu.vn*

Ngày gửi bài: 29.08.2017

Ngày chấp nhận: 31.01.2018

TÓM TẮT

Trà hoa vàng (*Camellia* sp.) là cây dược liệu quý chứa nhiều hợp chất có hoạt tính dược lý có khả năng chống viêm, phòng và điều trị ung thư. Trà hoa vàng cũng được sử dụng như là cây cảnh do hoa có màu vàng, sáng, đẹp đặc trưng. Nghiên cứu này đã xây dựng thành công quy trình nhân nhanh *in vitro* cây trà hoa vàng được thu thập tại huyện Ba Chẽ, tỉnh Quảng Ninh, Việt Nam. Vật liệu ban đầu tốt nhất được xác định là quả trà hoa vàng. Quả được khử trùng với dung dịch NaOCl 7% trong thời gian 30 phút sau đó được tách lấy hạt và gieo trên môi trường MS bổ sung 1 mg/l BA và 3 mg/l GA₃ để hạt nảy mầm, tạo chồi. Chồi *in vitro* được nhân nhanh trên môi trường MS + 5 mg/l BA + 1 mg/l GA₃ + 300 ml/l nước dừa + 30 g/l sucrose + 7 g/l agar cho hệ số nhân 4,7 lần/chồi, chất lượng chồi tốt. Các chồi sau đó được cấy chuyển lên môi trường 1/4 MS + 0,5 mg/l α - NAA + 2 mg/l IBA + 30 g/l sucrose + 7 g/l agar để tạo cây hoàn chỉnh với tỷ lệ ra rễ 100%. Ở giai đoạn vườn ươm, cây trà hoa vàng *in vitro* được trồng trên giá thể cát đạt tỷ lệ sống 93,75% sau 12 tuần ra cây. Các kết quả nghiên cứu này có thể được áp dụng cho mục đích nhân nhanh và bảo tồn giống trà hoa vàng tại Ba Chẽ - Quảng Ninh.

Từ khoá: *Camellia* sp., nhân nhanh *in vitro*, trà hoa vàng.

Establishment of *In vitro* Propagation Protocol for Golden *Camellia* (*Camellia* sp.)**ABSTRACT**

Golden camellia (*Camellia* sp.) is a medicinal plant containing a wide range of pharmacologically active compounds that can be used in anti-inflammatory, prevention and treatment of cancer. Golden camellia is also used as an ornamental plant because of its bright yellow flowers. This study successfully established *in vitro* multipropagation protocol of *Camellia* sp. collected at Ba Che district, Quang Ninh province, Vietnam. Unopened fruits were identified as the best initial material. Unopened fruits were surface sterilized with 7% NaOCl solution for 30 minutes. Seeds were then placed on MS medium supplemented with 1 mg/l BA and 3 mg/l GA₃ for germination. Shoots were multiplied on MS media containing 5 mg/l BA + 1 mg/l GA₃ + 300 ml/l coconut water + 30 g/l sucrose + 7 g/l agar. The rate of shoot multiplication was 4.7 shoots per explant. The shoots were then transferred onto medium of 1/4 MS + 0.5 mg/l α-NAA + 2 mg/l IBA + 30 g/l sucrose + 7 g/l agar for rooting. At the nursery stage, *in vitro* plants were grown in sand and reached the survival rate of 93.75%. The established protocol can be applied for multipropagation and conservation of the golden camellia.

Keywords: *Camellia* sp., golden camellia, *in vitro* propagation.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trà hoa vàng (*Camellia* sp.) là thực vật hạt kín thuộc họ chè (*Theaceae*). Bên cạnh giá trị làm cây cảnh, trà hoa vàng được đặc biệt quan

tâm do chứa nhiều hợp chất có hoạt tính dược lý có vai trò quan trọng trong phòng chống lão hoá, ung thư (Song *et al.*, 2011; Batra & Sharma, 2013; Lin *et al.*, 2013).

Tại Quảng Ninh, trà hoa vàng (*Camellia* sp.) vốn là loại cây mọc tự nhiên ở Ba Chẽ và Hoàn Bồ. Do là cây dược liệu quý, có giá trị kinh tế cao nên trà hoa vàng bị khai thác gần như cạn kiệt trong khi khả năng tái sinh ngoài tự nhiên kém. Chính vì vậy, cần phải có biện pháp góp phần bảo tồn cũng như phát triển giống trà quý này trở thành sản phẩm mũi nhọn của địa phương.

Các phương pháp nhân giống như giâm cành, ghép cành và ghép cây con đã được sử dụng với mục tiêu nhân nhanh cây giống trà hoa vàng. Tuy nhiên, các phương pháp này có nhiều hạn chế như: hệ số nhân thấp, không có sẵn vật liệu trồng thích hợp, phụ thuộc vào thời vụ, tỉ lệ sống ở vườn ươm thấp, tỷ lệ cành ra rễ thấp, thời gian từ khi giâm cành tới khi ra rễ kéo dài (Klee *et al.*, 1987; Kuhlemeiere *et al.*, 1987; Hooykaas & Schilperoort, 1992; Smith & Hood, 1995; Mondal *et al.*, 2004). Kỹ thuật nhân giống vô tính *in vitro* cho phép nhân nhanh cây giống với hệ số nhân cao, cây giống đồng đều, có thể cung cấp một cách chủ động sẽ khắc phục được những hạn chế của các phương pháp nhân giống kể trên.

Nhân giống *in vitro* một số loài thuộc chi *Camellia* như *Camellia japonica*, *C. reticulate*, *C. sinensis* và *C. nitidissima* đã được thực hiện (Lü *et al.*, 2013; Mondal, 2014). Tại Việt Nam, nghiên cứu nhân giống vô tính *in vitro* trà hoa vàng sẽ góp phần cung cấp cây giống phục vụ sản xuất, giảm tình trạng khai thác dược liệu quý này ngoài tự nhiên cũng như góp phần bảo tồn nguồn gen loài trà quý này.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Nghiên cứu này sử dụng các mẫu cây là đoạn cành bánh tẻ mang mắt ngủ, lá, nụ hoa và quả cây trà hoa vàng (*Camellia* sp.) thu thập tại Ba Chẽ, Quảng Ninh. Quả trà thu ở thời kỳ bắt đầu chín, quả chưa mở và hạt đã chuyển hoàn toàn sang màu đen. Các chồi *in vitro* thu được từ giai đoạn vào mẫu, nuôi cấy khởi động sẽ được sử dụng làm vật liệu nghiên cứu cho các thí nghiệm tiếp theo.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Khử trùng mẫu: Mẫu cấy được rửa sạch dưới vòi nước máy, sau đó rửa lại trong nước xà phòng nồng độ 0,01% trong 3 - 4 lần, mỗi lần 5 phút và được tráng lại bằng nước cất vô trùng. Mẫu sau đó được ngâm trong dung dịch KMnO₄ 1% trong 10 phút và tráng 3 - 4 lần bằng nước cất vô trùng. Mẫu sau khi rửa sạch được đưa vào tủ cấy vô trùng, ngâm trong dung dịch ethanol 70% trong 1 phút và được tráng lại bằng nước cất vô trùng 3 - 4 lần (Gorbatyuk *et al.*, 2015). Các mẫu sau đó được lắc trong hoá chất khử trùng HgCl₂ 0,1% hoặc H₂O₂ 15% hoặc NaOCl 7% trong 5 - 30 phút (Bảng 1, 2) và cuối cùng được rửa lại bằng nước cất vô trùng 3 - 4 lần. Đối với mẫu quả trà, sau khi khử trùng, quả trà được tách bỏ vỏ để thu lấy hạt. Mẫu cấy sau khử trùng được cấy trên môi trường MS (Murashige & Skoog, 1962).

Nuôi cấy khởi động: Hạt trà hoa vàng được nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung BA và GA₃ để kích thích quá trình nảy mầm và sinh trưởng của chồi (Bảng 3). Các chồi *in vitro* này sau đó sẽ được sử dụng làm vật liệu cho giai đoạn nhân nhanh chồi.

Nhân nhanh chồi *in vitro*: Chồi có chiều cao từ 2,0 - 2,5 cm và 2 - 3 lá được sử dụng làm vật liệu cho thí nghiệm đánh giá ảnh hưởng của nền môi trường đến hệ số nhân nhanh chồi. Các môi trường nền được sử dụng trong thí nghiệm này là môi trường MS, 1/2 MS (hàm lượng của tất cả các thành phần giảm một nửa so với môi trường MS), môi trường WPM (Lloyd & McCown, 1980), môi trường 1/2 WPM (hàm lượng của tất cả các thành phần giảm một nửa so với môi trường WPM). Các chồi sau đó được nuôi cấy trên môi trường nền tốt nhất có bổ sung các chất điều tiết sinh trưởng và nước dừa với các nồng độ khác nhau (Bảng 5, 6).

Tạo rễ cho chồi *in vitro*: Các chồi có chiều cao 3,5 - 4 cm có từ 3 tới 5 lá, sinh trưởng và phát triển bình thường được cấy chuyển sang môi trường có thành phần MS thay đổi (MS, 1/2 MS, 1/4 MS), có bổ sung 0,5 mg/l α - NAA và 2 mg/l IBA để kích thích tạo rễ.

Môi trường và điều kiện nuôi cấy *in vitro*: Sử dụng môi trường MS hoặc WPM có bổ sung 3% sucrose, các chất điều tiết sinh trưởng, hợp chất hữu cơ khác nhau tùy theo thí nghiệm, pH môi trường 5,8. Các môi trường được khử trùng ở 121°C trong 20 phút. Điều kiện nuôi cấy gồm cường độ ánh sáng 2.000 lux, độ ẩm 60%, nhiệt độ 25 ± 2°C, chu kỳ chiếu sáng 16 h sáng/8 h tối.

Ra cây ngoài vườn ươm: Cây *in vitro* hoàn chỉnh, khỏe mạnh, có chiều cao đạt từ 6 - 8 cm được rửa sạch agar và trồng trên 4 loại giá thể khác nhau. Sử dụng giá thể là đất đồi tầng B lấy tại rừng Hoàn Bồ, Quảng Ninh (Nguyễn Như Hà và cs., 2005), trấu hun, xơ dừa, cát (cát sông Hồng). Giá thể được xử lý bằng KMnO₄ 1 - 2%, sau đó đóng vào chậu nhựa 40 x 70 cm. Cây được đặt trong nhà lưới, che phủ bằng nylon và lưới che râm. Lưới che râm có khả năng cản 70% ánh sáng. Tưới nước giữ ẩm 3 lần/ngày trong tháng đầu tiên và 2 lần/ngày từ tháng thứ 2. Tưới thúc bằng phân bón vi sinh MT được sản xuất bởi Công ty cổ phần Nông nghiệp MTX Việt Nam, với lượng 10 - 15 kg/360 m² rắc đều phân xung quanh gốc tưới nước đủ ẩm cho phân ngấm dần, phân bón qua lá pha 5 - 10 g/8 lít nước phun đều trên lá, thân và sung quanh gốc, phân bón Nano NPK HP 666 của Công ty sản xuất phân bón Hải Phòng, dạng viên được bón đều dưới gốc với lượng 14 túi nhỏ/chậu 40 x 70 cm, sau 15 - 20 ngày chuyển cây ra vườn ươm với nồng độ tăng dần từ 0,4 - 1%, định kỳ 10 ngày/lần.

Bố trí thí nghiệm và xử lý số liệu: Các thí nghiệm trong phòng thí nghiệm được bố trí theo kiểu ngẫu nhiên hoàn toàn, mỗi công thức nhắc lại 3 lần, mỗi lần 10 mẫu. Các thí nghiệm ngoài vườn ươm được bố trí theo khối ngẫu nhiên đầy đủ, mỗi công thức nhắc lại 3 lần, mỗi lần 100 mẫu, theo dõi sau 12 tuần ra cây. Số liệu được xử lý thống kê theo chương trình Excel và IRRISTART 5.0.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Tạo vật liệu khởi đầu

Khi tiến hành nghiên cứu một quy trình nhân nhanh của bất kì đối tượng cây trồng nào

cũng cần phải có một số lượng lớn mẫu khởi đầu với chất lượng đồng đều. Do vậy, việc xác định loại mẫu cây và chế độ khử trùng phù hợp có vai trò quan trọng trong việc tạo được các vật liệu ban đầu cho nghiên cứu. Các vật liệu này phải đảm bảo sạch vi sinh vật và có khả năng phát sinh hình thái như tạo chồi, callus hay phôi. Trong nghiên cứu này, các vật liệu và chế độ khử trùng khác nhau đã được khảo sát nhằm tìm ra vật liệu và điều kiện khử trùng cho tỉ lệ bật chồi cao và chồi hình thành sớm.

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

Đoạn cành mang mắt ngủ được sử dụng phổ biến trong giai đoạn tạo vật liệu khởi đầu trong nuôi cấy mô tế bào thực vật. Trong nghiên cứu này, kết quả xử lý đoạn cành mang mắt ngủ với các hoá chất với thời gian khử trùng khác nhau cho thấy tỉ lệ mẫu bị nhiễm nấm khá cao (Bảng 1). Khi thời gian khử trùng tăng lên thì mẫu bị nhiễm cũng giảm xuống nhưng vẫn còn khá cao, khoảng 60 - 65% với mẫu đã được xử lý trong 30 phút. Tỉ lệ nhiễm nấm cao này có thể do trong thân cây trà hoa vàng trong tự nhiên có nấm nội sinh và cộng sinh giống như cây trà *C. japonica* (Osono, 2008). Do vậy, khi tăng thời gian xử lý, hoá chất khử trùng có thể thẩm thấu vào bên trong mẫu, làm giảm tỉ lệ nhiễm nấm xuống nhưng vẫn không thể tiêu diệt được hoàn toàn nấm nội sinh và cộng sinh bên trong. Tuy nhiên, việc tăng thời gian khử trùng có thể làm giảm tỉ lệ sống của mẫu (Danso *et al.*, 2011). Trong nghiên cứu này, khi thời gian khử trùng tăng lên cũng khiến tỉ lệ mẫu sống giảm xuống và các mẫu sạch thu được cũng không có mẫu nào có khả năng bật được chồi.

Kết quả thí nghiệm tổng hợp bảng 1 cho thấy, tất cả mẫu cây sau khử trùng bằng ba chất khử trùng khác nhau đều chưa tái sinh tạo chồi. Mặc dù vậy, mẫu cây sau khi khử trùng bằng NaOCl có biểu hiện khỏe mạnh, có sức sống hơn các chất khử trùng khác như H₂O₂ 15% và HgCl₂ 0,1%. Như vậy, mặc dù đã sử dụng tối đa tác nhân khử trùng và 5 thời gian khử trùng khác nhau, việc tạo nguồn vật liệu ban đầu sạch vi sinh vật (đặc biệt là

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

Chất khử trùng	Thời gian khử trùng (phút)	Tỉ lệ mẫu nhiễm (%)	Tỉ lệ mẫu sống (%)	Tỉ lệ mẫu sạch vi sinh vật tái sinh tạo chồi (%)
NaOCl 7%	10	100	95	0
	15	100	85	0
	20	90	65	0
	25	80	35	0
	30	60	15	0
H ₂ O ₂ 15%	10	100	90	0
	15	100	80	0
	20	80	55	0
	25	70	45	0
	30	65	20	0
HgCl ₂ 0,1%	10	100	85	0
	15	100	75	0
	20	80	55	0
	25	75	35	0
	30	60	15	0

Ghi chú: Bảng kết quả dựa trên số liệu được thu thập sau 8 tuần nuôi cấy



Hình 1. Đoạn cành mang mắt ngủ được khử trùng bằng NaOCl 7% bị nhiễm nấm sau 1 tuần nuôi cấy

nấm) từ đoạn cành mang mắt ngủ của cây trà hoa vàng là không có tính khả thi.

3.1.2. Khảo sát sự tái sinh của các loại vật liệu nuôi cấy tới hiệu quả tạo nguồn vật liệu ban đầu

Sau khi tạo vật liệu khởi đầu từ đoạn cành không thành công, các loại mẫu cấy khác gồm lá, nụ hoa và hạt được tiếp tục thử nghiệm. Khảo sát ban đầu cho thấy, so với H₂O₂ 15% và HgCl₂ 0,1% thì NaOCl 7% cho tỉ lệ mẫu sống cao hơn. Khử trùng đoạn cành với H₂O₂ 15% và HgCl₂ 0,1% làm mẫu cấy bị hoá nâu (kết quả không được trình bày). Chính vì vậy, ở thí

nghiệm này NaOCl 7% được sử dụng để khử trùng vật liệu.

Số liệu bảng 2 cho thấy, việc khử trùng bằng dung dịch NaOCl 7% trong thời gian từ 5 phút đến 30 phút không mang lại hiệu quả tốt với vật liệu lá và nụ hoa. Khi được xử lý trong thời gian ngắn từ 5 - 10 phút, các mẫu lá và nụ hoa vẫn còn xanh, tươi nhưng lại bị nhiễm nấm. Tuy nhiên, khi tăng thời gian khử trùng lên thì tỉ lệ mẫu có hiện tượng thâm đen, héo khô, và chết tăng lên. Sau 2 ngày nuôi cấy, nhiều mẫu bắt đầu xuất hiện hệ sợi nấm màu trắng. Toàn bộ vật liệu lá và nụ hoa sau khử trùng không có khả năng phát sinh tạo chồi.

Bảng 2. Ảnh hưởng của vật liệu nuôi cấy tới hiệu quả tạo nguồn vật liệu ban đầu

Vật liệu khử trùng	Thời gian khử trùng (phút)	Tỉ lệ mẫu nhiễm (%)	Tỉ lệ mẫu sống (%)	Tỉ lệ mẫu sạch vi sinh vật tái sinh tạo chồi (%)
Lá	5	100	100	0
	10	100	80	0
	15	85	75	0
	20	65	45	0
	25	40	10	0
Nụ hoa	5	100	100	0
	10	100	85	0
	15	70	65	0
	20	65	40	0
	25	50	20	0
Hạt	10	66,7	100	33,3
	15	53,3	100	46,7
	20	20,0	100	80,0
	25	6,7	100	93,3
	30	0,0	100	100

Ghi chú: Bảng kết quả dựa trên số liệu thu thập sau 8 tuần nuôi cấy

Bảng 2 cũng cho thấy, trong khi việc khử trùng mẫu lá và nụ hoa gặp nhiều khó khăn thì việc sử dụng hạt trà hoa vàng lại cho kết quả khả quan. Tỉ lệ hạt sạch vi sinh vật đạt thấp nhất là 66,7% với tỉ lệ nảy mầm 33,3% khi quả được khử trùng trong 10 phút. Khi tăng thời gian khử trùng thì tỉ lệ nhiễm giảm, tỉ lệ mẫu sạch nảy mầm cũng tăng lên. Hạt thu từ quả đã được khử trùng với NaOCl 7% trong 30 phút cho tỉ lệ nhiễm là 0% với 100% mẫu sống và nảy mầm sau 8 tuần nuôi cấy. Trong nhân giống *in vitro* các loài thuộc chi *Camellia*, nhiều nghiên

cứu cũng đã sử dụng hạt làm vật liệu cho nuôi cấy khởi động, chẳng hạn như nhân nhanh *in vitro* *C. sinensis* (Mondal *et al.*, 1998) hay *C. piquetiana* (Nguyễn Văn Kết và *cs.*, 2014). Trong nghiên cứu của nhóm tác giả Mondal *et al.* (1998), hạt *C. sinensis* được khử trùng bằng NaClO 4% trong 10 phút. Trong khi đó, Nguyễn Văn Kết và *cs.* (2014) đã khử trùng hạt *C. piquetiana* bằng Ca(OCl)₂ 7% trong 20 phút. Thời gian khử trùng ở cả hai công bố trên đều ngắn hơn so với công thức tốt nhất ở nghiên cứu này (30 phút), tuy nhiên, các công bố này lại



Hình 2. Cây nảy mầm từ hạt trà hoa vàng được khử trùng bằng NaOCl 7% sau 12 tuần nuôi cấy

không đề cập đến tỉ lệ nhiễm của mẫu. Nguyễn Văn Kết và cs. (....) đã xác định tỉ lệ nảy mầm của hạt *C. piquetiana* 30 ngày tuổi đạt 100% sau 60 ngày nuôi cấy. Tỉ lệ này tương đương với tỉ lệ nảy mầm của công thức tốt nhất ở nuôi cấy này. Từ các kết quả trên, có thể kết luận rằng vật liệu tốt nhất cho nuôi cấy khởi động là hạt được thu từ quả trà hoa vàng chưa mở, được khử trùng với NaClO 7% trong 30 phút.

3.1.3. Ảnh hưởng của tổ hợp BA và GA₃ tới quá trình nảy mầm của hạt trà hoa vàng

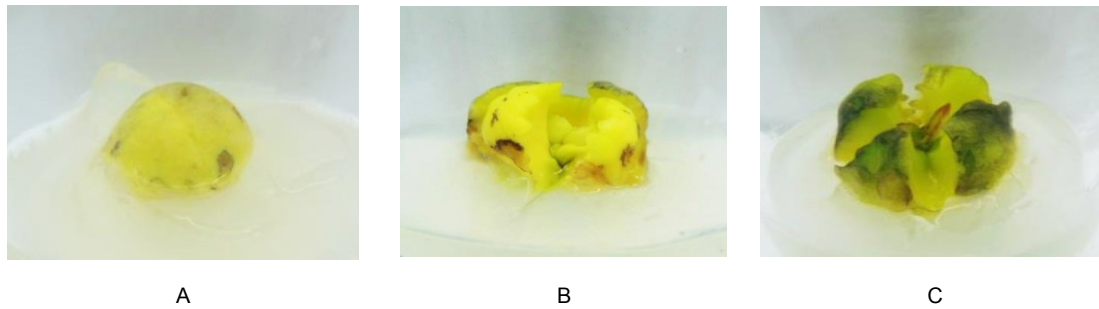
Thí nghiệm trên đã chỉ ra hạt là vật liệu tốt nhất cho nuôi cấy khởi động. Chế độ khử trùng tốt nhất cho hạt cũng đã được xác định. Tuy nhiên, thời gian nảy mầm và tốc độ phát triển của chồi còn tương đối dài. Việc bổ sung chất điều tiết sinh trưởng để kích thích nảy mầm của hạt và sinh trưởng của chồi trong nuôi cấy mô là khá phổ biến. Trong nghiên cứu nhân nhanh cây *C. nitidissima*, Huang *et al.* (2016) đã tiến hành đánh giá ảnh hưởng riêng rẽ của BA và GA₃ lên sự nảy mầm của hạt. Nhóm tác giả trên đã sử dụng môi trường MS có bổ sung BA với nồng độ 1,0 và 3,0 mg/l và GA₃ với nồng độ 0,5 và 1,0 mg/l. Tỉ lệ nảy mầm của hạt trên môi trường tương ứng là 40,7%, 61,5%, 52,8% và 82,4%. Chiều cao trung bình của chồi trên môi trường bổ sung 1,0 mg/l GA₃ là 1,53 cm sau 60 ngày nuôi cấy. Dựa vào kết quả của công bố trên, nghiên cứu này đã tiến hành đánh giá ảnh hưởng của tổ hợp BA và GA₃ đến sự nảy mầm của hạt trà hoa vàng.

Kết quả bảng 3 cho thấy, tỉ lệ hạt trà hoa vàng nảy mầm trên tất cả các công thức là 100%, chiều cao và số lá/chồi tỉ lệ thuận với nồng độ GA₃ được bổ sung vào môi trường. Trên nền môi trường MS + 1 mg/l BA, không bổ sung GA₃ cho chiều cao chồi trung bình đạt 0,6 cm và số lá/chồi là 3,4 lá, trong khi đó, các công thức có bổ sung GA₃ vào môi trường đều làm tăng chiều cao chồi, số lá/chồi. Môi trường MS + 1 mg/l BA + 3 mg/l GA₃ cho chồi sinh trưởng phát triển tốt nhất, chiều cao trung bình đạt 2,5 cm, 4,6 lá/chồi, lá có bản to đẹp, gân lá rõ ràng, mép lá hình răng cưa, lá mọc cách với khoảng đều nhau. Khi hạt được gieo trên môi trường được bổ sung 1 mg/l BA và 5 mg/l GA₃ thì chồi xuất hiện biến dạng, thân và lá phình to, lá mỏng, mép lá nhẵn, không có gân lá. Bên cạnh đó, việc bổ sung thêm GA₃ giúp rút ngắn thời gian nảy mầm của hạt, chỉ còn 15 - 21 ngày so với 30 ngày trên môi trường chỉ chứa 1 mg/l BA. Thời gian nảy mầm của hạt được nuôi cấy trên môi trường có bổ sung 1 mg/l BA và 3 mg/l GA₃ tương đương với hạt được nuôi cấy trên môi trường có bổ sung 1 mg/l BA và 5 mg/l GA₃. Như vậy, so sánh về các chỉ tiêu được đề cập trên bảng 3 thì môi trường có bổ sung 1 mg/l BA kết hợp 3 mg/l GA₃ và môi trường bổ sung tổ hợp 1 mg/l BA và 5 mg/l GA₃ cho hiệu quả tương đương, ngoại trừ chỉ tiêu chiều cao chồi. Tuy nhiên, do chồi trên môi trường bổ sung 1 mg/l BA và 5 mg/l GA₃ có kiểu hình dị dạng nên MS + 1 mg/l BA + 3 mg/l GA₃ được lựa chọn là công thức tốt nhất ở thí nghiệm này.

Bảng 3. Ảnh hưởng của tổ hợp BA và GA₃ tới sự nảy mầm của hạt trà hoa vàng

Công thức	BA (mg/l)	GA ₃ (mg/l)	Thời gian nảy mầm (ngày)	Tỉ lệ nảy mầm (%)	Chiều cao chồi (cm)	Số lá/chồi
Đc	1	0	30	100	0,6	3,4
1	1	1	21	100	1,9	3,6
2	1	3	15	100	2,5	4,6
3	1	5	15	100	3,3	4,7
LSD _{0,05}					0,14	0,15
CV%					3,4	1,9

Ghi chú: Bảng kết quả dựa trên số liệu được thu thập sau 8 tuần nuôi cấy.



Hình 3. Ảnh hưởng của tổ hợp BA và GA₃ tới quá trình nảy mầm của hạt trà hoa vàng

Ghi chú: A. Phôi hạt trên môi trường bổ sung 1 mg/l BA; B. Phôi hạt trên môi trường bổ sung 1 mg/l BA + 1 mg/l GA₃; C. Phôi hạt trên môi trường bổ sung 1 mg/l BA + 3 mg/l GA₃

3.2. Nhân nhanh chồi

3.2.1. Ảnh hưởng của nền môi trường tới quá trình sinh trưởng của chồi *in vitro* cây trà hoa vàng

Mỗi loài, giống và loại vật liệu có nhu cầu dinh dưỡng khác nhau, chính vì vậy, thí nghiệm này được thực hiện nhằm tìm ra môi trường nền phù hợp cho nuôi cấy *in vitro* trà hoa vàng Ba Chẽ. Sau 8 tuần nuôi cấy trên môi trường 1/2 WPM, chồi sinh trưởng thấp nhất, chỉ đạt chiều cao trung bình là 2,1 cm, số lá trung bình là 1,3 lá/chồi, chồi mảnh, lá nhỏ, dài, hệ số nhân chỉ đạt 1,0 lần. Trên nền môi trường WPM, hệ số nhân chồi và các chỉ tiêu chiều cao, số lá có tăng so với môi trường 1/2 WPM nhưng chồi vẫn nhỏ, mảnh, lá nhỏ, dài và xoắn. Chồi được cấy trên môi trường 1/2 MS có chất lượng tốt hơn môi trường WPM, có kích thước trung bình, lá bình thường, không xoắn, tuy nhiên chiều cao cũng như số lá thấp hơn môi trường MS. Trên môi trường MS, chồi sinh trưởng và phát triển tốt nhất và cho các chỉ tiêu theo dõi đều vượt trội so

với 3 môi trường khác. Cụ thể, hệ số nhân đạt 1,2 lần, số lá trung bình đạt 3,3 lá/chồi, chiều cao trung bình chồi đạt 3,1 cm/chồi.

Nhiều nghiên cứu trên các đối tượng khác nhau thuộc chi *Camellia* đã chỉ ra rằng môi trường MS là phù hợp cho sự sinh trưởng của chồi. Cụ thể, Nakamura (1987) đã kết luận rằng môi trường MS là tốt nhất cho sự nhân nhanh chồi *C. sinensis* khi so sánh với các môi trường nền khác bao gồm môi trường B5 (Gamborg *et al.*, 1968) và môi trường Nitsch & Nitsch (1969). Trước đó, Carlisi & Torres (1986) cũng chỉ ra rằng môi trường MS và 1/2 MS là môi trường tốt nhất cho nuôi cấy *C. japonica*. Tuy nhiên, theo nghiên cứu của Vieitez *et al.* (1989), *C. japonica* cv. Alba Plena lại có khả năng tái sinh kém trên môi trường MS. Nguyễn Văn Kết và cs. (2014) cũng đã tiến hành nghiên cứu về sự sinh trưởng của chồi *C. piquetiana* trên 5 loại nền môi trường khác nhau MS, 1/2 MS (đa lượng), 1/2 MS (đa lượng + vi lượng), WPM, 1/2 WPM. Kết quả cho thấy nền môi trường WPM là thích hợp nhất cho sự sinh trưởng và phát

Bảng 4. Ảnh hưởng của môi trường nền tới sự sinh trưởng của chồi trà hoa vàng

Công thức	Nền môi trường	Hệ số nhân chồi (lần)	Chiều cao chồi (cm)	Số lá/chồi (lá)
1	MS	1,2	3,1	3,3
2	1/2 MS	1,0	2,2	2,1
3	WPM	1,1	2,9	2,2
4	1/2 WPM	1,0	2,1	1,3
LSD _{0,05}		0,1	0,2	0,19
CV%		4,5	3,8	4,2

Ghi chú: Bảng kết quả dựa trên số liệu được thu thập sau 8 tuần nuôi cấy

triển của chồi. Bên cạnh đó, San - Josee & Vieitez (1990) cũng đã tiến hành nghiên cứu ảnh hưởng của nền môi trường tới sự sinh trưởng và phát triển của cây *C. reticulata in vitro* và cũng kết luận nền môi trường WPM là phù hợp cho sự phát triển của cây chè này. Các kết quả nghiên cứu trên chứng tỏ các loài thuộc chi *Camellia* thích hợp với nền môi trường nuôi cấy khác nhau và việc nghiên cứu tìm ra nền môi trường phù hợp cho từng đối tượng cây trồng là cần thiết.

3.2.2. Ảnh hưởng của tổ hợp GA₃ với BA, kinetin và zeatin tới khả năng nhân nhanh chồi *in vitro* cây trà hoa vàng

BA, kinetin và zeatin là các chất điều tiết sinh trưởng thuộc nhóm cytokinin được biết đến với tác dụng kích thích sự phân chia tế bào, ảnh hưởng đến sự hình thành và phân hóa cơ quan của thực vật, đặc biệt là sự phân hóa chồi. Do vậy, các chất điều tiết sinh trưởng này được sử dụng khá phổ biến trong nhân nhanh *in vitro*

nói chung và các loài thuộc chi *Camellia* nói riêng (Mondal, 2011; 2014). Bên cạnh đó, GA₃ cũng thường được bổ sung vào môi trường nuôi cấy nhằm nâng cao hệ số nhân chồi và chất lượng của chồi. Nồng độ GA₃ được sử dụng phổ biến là 1 mg/l (Mondal, 2011; 2014). Chính vì vậy, ở thí nghiệm này 1 mg/l GA₃ đã được bổ sung vào môi trường cùng với BA hoặc kinetin hoặc zeatin ở các nồng độ khác nhau nhằm xác định sự ảnh hưởng của các tổ hợp chất điều tiết sinh trưởng này đến khả năng nhân nhanh chồi *in vitro* cây trà hoa vàng.

Khả năng nhân nhanh *in vitro* chồi cây trà hoa vàng trên môi trường bổ sung 1 mg/l GA₃ (đối chứng) là rất thấp, với hệ số nhân chỉ đạt 1,2 lần và chiều cao chồi đạt 3,1 cm, sau 8 tuần nuôi cấy (Bảng 5). Kết hợp giữa 1 mg/l GA₃ với BA đã làm tăng đáng kể hệ số nhân chồi và chiều cao chồi. Khi bổ sung 1 mg/l GA₃ và 2,5 mg/l BA thì hệ số nhân nhanh đã đạt 2,7 lần, chiều cao chồi cũng tăng rõ rệt, trung bình đạt 3,9 cm. Trên nền môi trường MS + 1 mg/l GA₃, càng tăng

Bảng 5. Ảnh hưởng của tổ hợp các chất điều tiết sinh trưởng tới khả năng nhân nhanh chồi *in vitro* cây trà hoa vàng

Công thức	Nồng độ (mg/l)	Nồng độ GA ₃ (mg/l)	Hệ số nhân chồi (lần)	Chiều cao chồi (cm)	Số lá/chồi (lá)
Đc	0	1	1,2	3,1	3,3
BA	1,0	1	1,6	3,9	4,1
	2,5	1	2,7	3,9	4,1
	5,0	1	3,2	3,7	6,0
	7,5	1	2,2	2,8	4,2
	10,0	1	2,0	2,4	3,3
Kinitin	1,0	1	1,4	3,3	3,5
	2,5	1	1,9	3,6	4,1
	5,0	1	2,6	3,3	5,3
	7,5	1	2,0	2,6	4,0
	10,0	1	1,8	2,5	3,1
Zeatin	1,0	1	1,3	3,4	3,3
	2,5	1	2,1	4,2	4,9
	5,0	1	2,1	3,8	4,1
	7,5	1	1,9	3,1	4,0
	10,0	1	1,6	2,7	3,0
LSD _{0,05}			0,1	0,18	0,14
CV%			3,1	3,3	2,0

Ghi chú: Bảng kết quả dựa trên số liệu được thu thập sau 8 tuần nuôi cấy

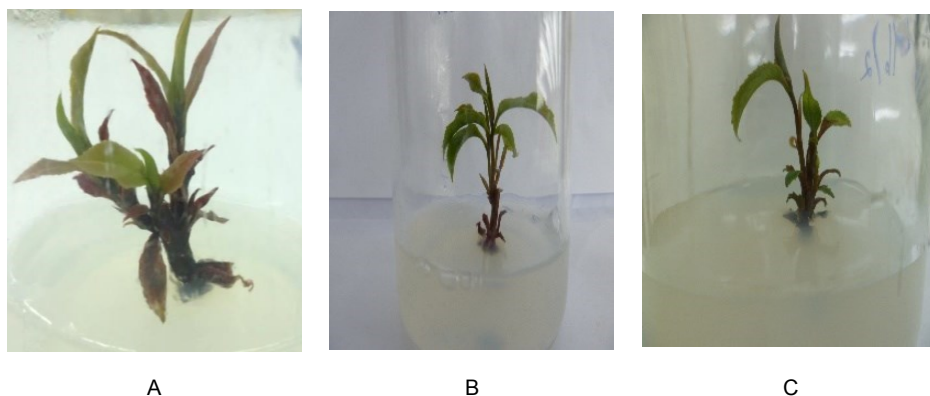
tăng nồng độ BA lên thì hệ số nhân chồi càng tăng, nhưng đồng thời chiều cao trung bình chồi lại giảm dần. Quan sát về hình thái chồi cho thấy, ở các môi trường đối chứng và môi trường có bổ sung thêm BA với nồng độ dưới 7,5 mg/l thì chồi phát triển bình thường, lá dạng bản dẹp, dài, gân lá rõ ràng, mép lá dạng răng cưa. Trong khi đó, trên môi trường MS + 1 mg/l GA₃ có bổ sung thêm 7,5 và 10 mg/l BA thì có sự thay đổi về hình dạng chồi và lá, chồi nhỏ kém phát triển, lá cuộn tròn, xoắn không mở ra được. Như vậy, trong các môi trường thử nghiệm nhằm đánh giá ảnh hưởng của tổ hợp BA và GA₃ đến nhân nhanh chồi *in vitro* trà hoa vàng, môi trường nuôi cấy thích hợp để nhân nhanh chồi trà hoa vàng là MS + 1 mg/l GA₃ + 5 mg/l BA.

Các môi trường nhân nhanh *in vitro* cây trà hoa vàng có chứa tổ hợp 1 mg/l GA₃ và kinetin cho kết quả khá tốt, nhưng không cao bằng môi trường có bổ sung GA₃ và BA tối ưu. Môi trường bổ sung kinetin đã làm tăng đáng kể hệ số nhân chồi từ 1,4 - 2,6 lần và làm tăng chiều cao chồi cũng như số lá. Khi nồng độ kinetin tăng lên thì có xu hướng tăng hệ số nhân chồi. Môi trường MS + 1 mg/l GA₃ + 5 mg/l kinetin cho hệ số nhân chồi đạt cao nhất là 2,6 lần nhưng chiều cao chồi trung bình lại có xu hướng giảm còn 3,3 cm.

Bổ sung zeatin cùng với 1 mg/l GA₃ đã làm tăng hệ số nhân, chiều cao chồi trung bình và số lá trung bình cao so với đối chứng chỉ bổ sung 1

mg/l GA₃. Hệ số nhân chồi đạt cao nhất là 2,1 lần và chiều cao chồi trung bình đạt 4,2 cm trên môi trường MS + 1 mg/l GA₃ + 2,5 mg/l zeatin. Khi tăng nồng độ zeatin lên 5 mg/l, 7,5 mg/l và 10 mg/l thì hệ số nhân giảm dần và chiều cao chồi trung bình cũng giảm dần. Kết quả thí nghiệm cho thấy tổ hợp zeatin với GA₃ cho hiệu quả nhân chồi *in vitro* cây trà hoa vàng là thấp hơn so với tổ hợp GA₃ với BA hoặc kinetin.

Các kết quả trên cho thấy, ở thí nghiệm này, môi trường nuôi cấy MS + 5 mg/l BA + 1 mg/l GA₃ là phù hợp nhất, cho hệ số nhân và cho chất lượng chồi trà hoa vàng Ba Chẽ tốt nhất. Chúng loại và nồng độ chất điều tiết sinh trưởng phù hợp với các đối tượng cây trồng khác nhau là khác nhau. Tổ hợp chất điều tiết sinh trưởng BA và GA₃ trên nền môi trường MS cũng đã được lựa chọn để tiến hành nhân nhanh một số giống chè *C. sinensis*. Nakamura (1987) đã phát hiện môi trường thích hợp nhất cho nhân nhanh chồi *C. sinensis* cv. Yabukita là MS + 1 mg/l BA + 1 mg/l GA₃. Gonbad *et al.* (2014) nghiên cứu trên *C. sinensis* (L.) O. Kuntze (Clone Iran 100) đã kết luận môi trường MS + 3 mg/l BA + 0,5 mg/l GA₃ là môi trường tốt nhất cho giai đoạn nhân nhanh. Trong khi đó, San - Jose & Vieitez (1990) lại cho rằng môi trường WPM + 2 mg/l BA + 2 mg/l zeatin + 2 mg/l 2 - iP + 0,01 mg/l IBA là môi trường phù hợp cho nhân nhanh *in vitro* cây *C. reticulate* cv. 'Captain Rawes'.



Hình 4. Ảnh hưởng của các tổ hợp chất điều tiết sinh trưởng đến khả năng nhân nhanh chồi *in vitro* trà hoa vàng

Ghi chú: A. Chồi *in vitro* trên môi trường MS + 5 mg/l BA + 1 mg/l GA₃; B. Chồi *in vitro* trên môi trường MS + 5 mg/l kinetin + 1 mg/l GA₃; C. Chồi *in vitro* trên môi trường MS + 2,5 mg/l zeatin + 1 mg/l GA₃

3.2.3. Ảnh hưởng của nước dừa tới khả năng nhân nhanh chồi *in vitro* cây trà hoa vàng

Nước dừa là một loại dịch chiết hữu cơ có chứa các axit amin, axit hữu cơ, đường, ARN, ADN. Đặc biệt trong nước dừa có chứa những hợp chất quan trọng cho nuôi cấy *in vitro* là myo - inositol, các hợp chất có hoạt tính auxin, các glucozit của cytokinin. Nghiên cứu của Shantz & Steward (1952) chỉ ra rằng việc bổ sung nước dừa có tác dụng kích thích quá trình nhân nhanh tế bào và mô. Trong môi trường gieo hạt và môi trường nhân nhanh *in vitro* *C. sinensis* cv. TV - 1 và *C. sinensis* cv. T - 78 Agarwal *et al.* (1992) và Jha & Sen (1992) đã bổ sung thêm 10% nước dừa cùng một số chất điều tiết sinh trưởng. Thí nghiệm này được thực hiện nhằm đánh giá việc bổ sung thêm nước dừa vào môi trường nhân nhanh tốt nhất thu được từ thí nghiệm trên (MS + 5 mg/l BA + 1 mg/l GA₃) có tác dụng tích cực đến hiệu quả nhân nhanh chồi *in vitro* trà hoa vàng Ba Chẽ hay không. Kết quả được trình bày ở bảng 6.

Kết quả số liệu trên bảng 6 cho thấy, trên công thức đối chứng (MS + 5 mg/l BA + 1 mg/l GA₃, không bổ sung nước dừa), chồi có kích thước trung bình, lá bình thường, không xoắn, hệ số nhân chồi đạt 3,2 lần, chiều cao trung bình và số lá lần lượt là 3,7 cm và 6,0 lá/chồi. Khi bổ sung nước dừa với nồng độ tăng dần theo từng công thức thì hệ số nhân và chiều cao chồi trung bình tăng dần đồng thời chất lượng chồi

cũng được cải thiện, chồi to hơn, mập và lá xanh non hơn. Hệ số nhân và chiều cao chồi trung bình vượt trội hơn hẳn so với các công thức khác khi môi trường được bổ sung 300 ml/l nước dừa ở công thức này cho hệ số nhân đạt 4,7 lần và chiều cao chồi trung bình đạt 3,4 cm. Trong công thức này, chất lượng chồi cũng tốt hơn, chồi to, khỏe, lá to, màu xanh đậm hơn. Khi bổ sung vào môi trường với hàm lượng nước dừa lớn hơn đã dẫn tới hệ số nhân và chiều cao chồi trung bình giảm, lá nhanh vàng, cây sinh trưởng và phát triển chậm hơn các công thức thí nghiệm khác. Như vậy, việc bổ sung nước dừa vào môi trường nuôi cấy có ảnh hưởng tích cực đến hệ số nhân chồi cũng như chất lượng của chồi *in vitro*. Môi trường tốt nhất cho giai đoạn nhân nhanh chồi ở nghiên cứu này là MS + 5 mg/l BA + 1 mg/l GA₃ + 300 ml/l nước dừa.

3.3. Giai đoạn tạo cây hoàn chỉnh

3.3.1. Ảnh hưởng của hàm lượng môi trường đến khả năng ra rễ của chồi *in vitro* cây trà hoa vàng

Giai đoạn tạo cây hoàn chỉnh là giai đoạn cuối cùng của quá trình nhân giống trong phòng thí nghiệm. Mục đích của giai đoạn này là kích thích sự phát triển bộ rễ, tạo cây hoàn chỉnh trước khi đưa ra vườn ươm. Các chất điều tiết sinh trưởng thuộc nhóm auxin như α - NAA, IBA và thành phần môi trường dinh dưỡng gồm muối đa lượng, vi lượng và vitamin đóng vai trò quan trọng trong giai đoạn này. α - NAA và IBA

Bảng 6. Ảnh hưởng của nước dừa tới khả năng nhân nhanh chồi *in vitro* cây trà hoa vàng

Công thức	Nước dừa (ml/l)	Hệ số nhân chồi (chồi)	Chiều cao chồi (cm/chồi)	Số lá (lá/chồi)
Đc	0	3,2	3,7	6,0
1	50	3,3	4,0	6,2
2	100	3,8	4,0	6,5
3	200	4,0	3,6	6,9
4	300	4,7	3,4	7,2
5	400	3,3	2,6	4,7
LS _{5%}		0,11	0,16	0,35
CV%		1,7	2,4	3,1

Ghi chú: Môi trường nền: MS + 5 mg/l BA + 1 mg/l GA₃. Bảng kết quả dựa trên số liệu sau 8 tuần nuôi cấy