

ẢNH HƯỞNG CỦA ABA TRONG MÔI TRƯỜNG NUÔI CẤY LÊN SỰ TÁI SINH CHỒI TRỰC TIẾP TỪ NUÔI CẤY MẪU LÁ CÂY CHÈ [*CAMELLIA SINENSIS* (L.)]

NGUYỄN THANH MAI*
NGUYỄN SĨ TUẤN **

GIỚI THIỆU

Chè là một trong những cây công nghiệp quan trọng và tạo ra nhiều việc làm ở tất cả các vùng trồng chè trên thế giới (Mondal et al. 2004). Bên cạnh vai trò là một loại thức uống phổ biến, chè ngày càng được ưa chuộng bởi đặc tính kháng ung thư và chống lão hóa (Jankul et al. 1997). Để cải thiện năng suất và nâng cao chất lượng cây giống, các phương cách tiếp cận về công nghệ sinh học như thao tác gen sẽ đòi hỏi các hệ thống sinh sản phù hợp và hiệu quả (Bhattacharya và Ahuja, 2003), bên cạnh việc duy trì những dòng cây có năng suất cao đã có được độ tin cậy của thị trường. Vì thế, mục đích của công bố này là khảo sát các nồng độ khác nhau của ABA để phát triển một hệ thống sinh sản nhằm tái sinh cây từ các mô lá giống chè Oo-long. Mặc dù đã có một số công bố về sự tái sinh cây từ các loại mô khác nhau (Kato, 1982, Abraham và Rahman, 1986, Bano et al. 1991, Jha et al. 1992, Mondal et al. 1998, Sandal et al. 2005), cũng chỉ có một công bố về sự phát sinh phôi vô tính trực tiếp từ các mô lá dòng chè Assamica-SRL 73, SBs (Kato, 1996) và sự tái sinh chồi gián tiếp từ lá thông qua rễ bất định có nguồn gốc calli (Sandal et al. 2005). Tuy nhiên, việc lặp lại các công bố của Kato và Sandal đối với các giống chè cao sản đang tiêu

thụ tại Việt Nam, như giống Oo-Long, đã gặp phải nhiều khó khăn.

ABA – một chất điều hòa sinh trưởng thực vật vừa có vai trò ức chế, vừa có vai trò kích thích sự phát triển đối với một quá trình sinh học (Tuấn et al. 2005). Chính vai trò rất đặc biệt này của axit abscisic mà chúng tôi đã nghiên cứu tìm ra cơ chế tương tác thích hợp giữa mô và các giai đoạn phát sinh hình thái nhằm kích thích sự tái sinh chồi từ mô sẹo lá.

Các quy trình vi nhân giống cây chè (*Camellia sinensis*) luôn gặp phải trở ngại ở giai đoạn tạo rễ in vitro (Mondal et al. 2004). Do đó, chúng tôi cũng tiến hành nuôi cấy chè trong những hệ thống vừa mới vừa rễ tiền (hộp nhựa Đại Đồng Tiến) nhằm thu được cây giống có bộ rễ phát triển khỏe mạnh.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Sự khởi đầu nuôi cấy và tái sinh

Quá trình vô trùng mẫu được tiến hành trong erlen 100 ml có bổ sung 20 ml môi trường MS với 8,0 g.l⁻¹ agar, 1,0 mg.l⁻¹ TDZ (Thidiazuron) và 30 g.l⁻¹ đường sucrose. Các đoạn chồi nách được thiết lập từ những cây chè trưởng thành *Camellia sinensis* var., Oo-Long được trồng tại Trung tâm thực nghiệm chè Lâm Đồng. Sau 3 lần cấy truyền cách mỗi 40 ngày, các lá thứ 3 tính từ đỉnh cây xuống được cắt thành mẫu cấy với kích thước (5,0 × 1,0 mm²) được dùng làm vật liệu thí nghiệm.

* Thạc sĩ, Giảng viên cơ hữu Khoa Công nghệ Sinh học, ĐH Mở TP.HCM

** Sinh viên năm thứ tư, Khoa Công nghệ Sinh học, ĐH Mở TP.HCM

Các phản ứng phát sinh hình thái mô được thử nghiệm trên môi trường MS₁ có bổ sung 30 g.l⁻¹ đường succrose và các nồng độ khác nhau của tổ hợp giữa IBA (0,05; 0,1; 0,5 mg.l⁻¹) và BA (0,5; 1,0; 1,5; 2,0 mg.l⁻¹). pH môi trường được điều chỉnh về 5,6 ± 0,2 trước khi hấp khử trùng trong hệ thống autoclave.

Trong thí nghiệm thứ 2, các mô sẹo được hình thành sau 20 ngày nuôi cấy trên môi trường MS₁ được chuyển sang môi trường MS₂ có bổ sung các nồng độ khác nhau của ABA (0,5; 1,0; 1,5; 2,0 mg.l⁻¹) và tổ hợp của BA và IBA để tái sinh chồi.

Tái sinh rễ *in vitro* và chuyển cây con ra vườn ươm

Trong thí nghiệm thứ 3, các chồi tái sinh từ mô sẹo lá được tách ra và tiến hành nuôi cấy trên các môi trường MS₃ và MS₄ nhằm kích thích cây tạo rễ.

Các chồi cao khoảng 4-5 cm với bộ rễ khỏe mạnh được chuyển ra trồng thử nghiệm ngoài vườn ươm.

Phân tích thống kê

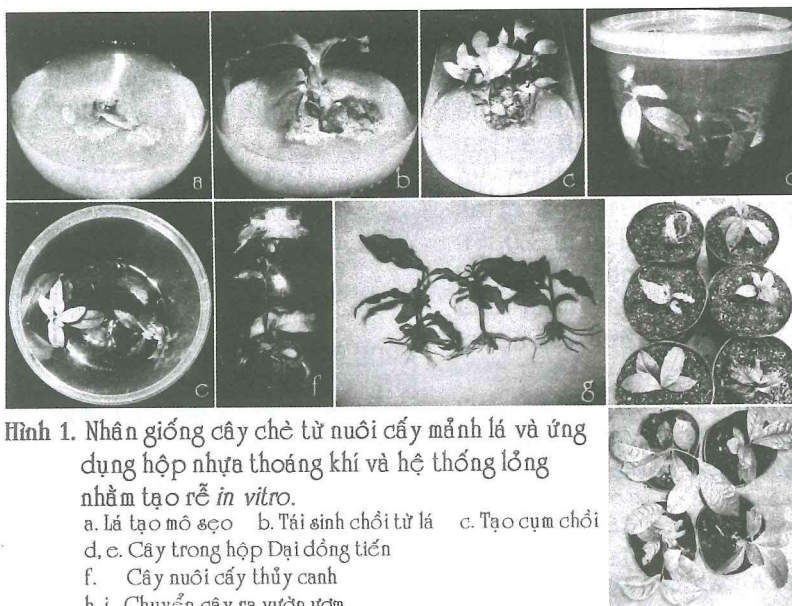
Các thí nghiệm được lặp lại 4 lần, mỗi

lần 40 mẫu. Các số liệu được xử lý thống kê bằng phần mềm MSTATC 2004. Tất cả các quá trình nuôi cấy được duy trì trong điều kiện quang chu kỳ 16h/ngày dưới ánh sáng đèn huỳnh quang cường độ 3000 lux và nhiệt độ phòng 27°C ± 2°C.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Sự hình thành mô sẹo và tái sinh chồi

Mô sẹo được cảm ứng trên lá thứ 3 (tính từ ngọn xuống) với kích thước (5,0 × 1,0 mm²) sau 14 ngày nuôi cấy trên các nồng độ khác nhau của IBA và BA (Hình 1a). Tuy nhiên, mô sẹo đã không cho thấy bất kỳ phản ứng phát sinh hình thái khác trong suốt quá trình nuôi cấy trên cùng môi trường hoặc khi cấy truyền sang môi trường mới có cùng đặc tính. Mặc dù mô sẹo được hình thành ở tất cả các nồng độ trong tổ hợp giữa IBA và BA (mô sẹo phát sinh nhiều nhất ở nghiệm thức L4, 100% mẫu cấy tái sinh mô sẹo), các chồi chỉ phát sinh từ mô sẹo (hình 1b) khi chúng được cấy truyền sang môi trường MS₂ có bổ sung ABA ở nghiệm thức L4. Tần số tái sinh chồi, số chồi trung bình/mẫu và chiều cao chồi đạt tốt nhất ở nghiệm thức L14, bảng 2, lần lượt là 100%, 11,18 chồi và cao 6,26 cm.



Hình 1. Nhân giống cây chè từ nuôi cấy mảnh lá và ứng dụng hộp nhựa thoáng khí và hệ thống lồng nhằm tạo rễ *in vitro*.

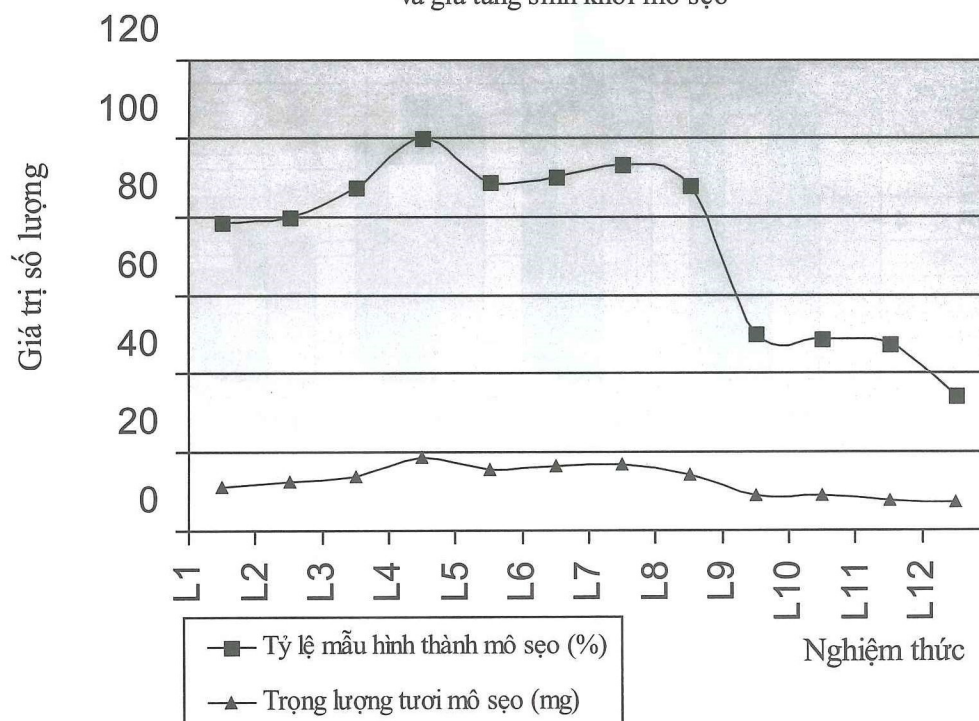
a. Lá tạo mô sẹo b. Tái sinh chồi từ lá c. Tạo cụm chồi
d, e. Cây trong hộp Đại đồng tiến
f. Cây nuôi cấy thủy canh
g, h, i. Chuyển cây ra vườn ươm.

Bảng 1: Ảnh hưởng của các nồng độ IBA và BA lên sự cảm ứng mô sẹo từ nuôi cấy lá

Thí nghiệm thức	Chất điều hoà tăng trưởng (mg/l)			Tỷ lệ mẫu hình thành mô sẹo (%)	Trọng lượng tươi trung bình mô sẹo (mg)
	IBA	BA	ABA		
L ₁	0,05	0,5	0	78,80	11,06 ± 1,48 ^a
L ₂		1,0		80,00	12,33 ± 1,58 ^b
L ₃		1,5		87,67	13,67 ± 0,29 ^b
L ₄		2,0		100,0	18,67 ± 0,45 ^d
L ₅	0,1	0,5		88,90	15,55 ± 0,83 ^{cd}
L ₆		1,0		90,09	16,47 ± 0,78 ^{ac}
L ₇		1,5		93,33	17,05 ± 0,12 ^e
L ₈		2,0		88,00	14,23 ± 0,21 ^{bc}
L ₉	0,5	0,5		50,06	09,09 ± 0,46 ^c
L ₁₀		1,0		49,00	08,67 ± 0,17 ^c
L ₁₁		1,5		47,47	07,45 ± 0,23 ^c
L ₁₂		2,0		34,43	06,99 ± 0,20 ^f

Ghi chú: CV = 0,01 và LSD = 1,556

Biểu đồ 1. Ảnh hưởng của các chất ĐHTTV lên sự hình thành và gia tăng sinh khối mô sẹo

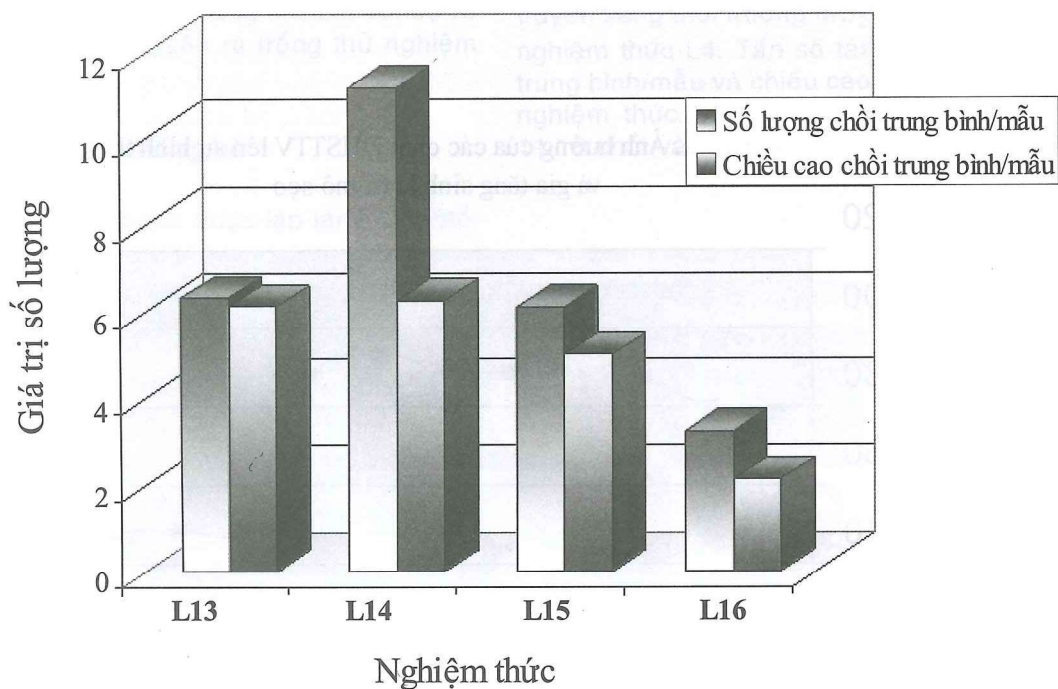


Bảng 2. Ảnh hưởng của ABA lên sự tái sinh chồi từ mô sẹo lá

Thí nghiệm	Chất liệu hoa tăng trưởng (mg.l ⁻¹)			Tỷ lệ mẫu hình thành chồi (%)	Số lượng chồi trung bình (chồi/mẫu)	Chiều cao trung bình của chồi(cm)
	IBA	BA	ABA			
L ₁₃	0,05	2,0	0,5	100	6,322 ± 6,32 ^b	6,12 ± 0,31 ^a
L ₁₄			1,0		11,184 ± 11,18 ^a	6,26 ± 0,94 ^a
L ₁₅			1,5		6,099 ± 6,1 ^b	5,00 ± 0,19 ^a
L ₁₆			2,0		3,228 ± 3,23 ^c	2,12 ± 1,69 ^b

Ghi chú: CV = 0,01 và LSD = 1,456

Biểu đồ 2. Ảnh hưởng của tổ hợp IBA, BA và các nồng độ ABA lên sự tái sinh chồi từ mô sẹo có nguồn gốc lá



Dựa vào kết quả phân tích ANOVA cho thấy sự khác biệt giữa các thí nghiệm rất có ý nghĩa ở mức độ 0,01 cho thấy: Giữa các thí nghiệm L13 và L15 không có sự khác biệt b. Thí nghiệm L14 có sự khác biệt có ý nghĩa với tất cả các thí nghiệm còn lại. Đánh giá

kết quả thí nghiệm: thí nghiệm L14 của thí nghiệm cho kết quả số chồi/mô đạt cao nhất (hình 1b). Thí nghiệm L14 có sự khác biệt có ý nghĩa ở mức 0,01 nên ta nhận thấy rằng nên khuyến cáo áp dụng L14 thì sẽ có hiệu quả kinh tế nhất. Kết quả thí nghiệm ở bảng 2 cho

thấy nghiệm thức L14 cho kết quả tái sinh chồi tốt nhất, đạt $11,184 \pm 11,18$ chồi/mô. Sự tái sinh chồi bất định thông qua mô sẹo từ nuôi cấy mô lá in vitro được báo cáo lần đầu tiên và duy nhất cho đến nay bởi Sandal và cộng sự, 2005. Trong nghiên cứu đó, Sandal và cộng sự đã sử dụng 2,4-D là chất ĐHSTTV duy nhất trong quá trình nuôi cấy và thiết lập được quy trình tái sinh chồi bất định từ lá đạt kết quả tối ưu là $14 \pm 1,6$ chồi/mẫu cấy sau 24 tuần nuôi cấy. Tuy nhiên, quy trình nuôi cấy này sử dụng nồng độ 2,4-D rất cao (7,5 – 10 mg/l 2,4-D) trong thời gian khá dài (hơn 5 tháng) đã khiến tốc độ phát triển của chồi tái sinh bị giảm mạnh. Chính tác giả đã nghiên cứu và đưa ra kết luận nêu trên. Hơn nữa, quy trình của Sandal và cộng sự trải qua gián tiếp 2 lần mô bất định (lá tạo rễ bất định, rễ bất định phát sinh mô sẹo, mô sẹo hình thành chồi bất định) có thể sẽ khiến tỉ lệ cây bị đột biến gia tăng. Trước tình hình này, chúng tôi nỗ lực nghiên cứu nhằm đưa ra 1 quy trình hiệu quả và ổn định hơn nhiều. Trong nghiên cứu này, chúng tôi thiết lập được quy trình tái sinh chồi bất định từ nuôi cấy lá thông qua mô sẹo với tần số tái

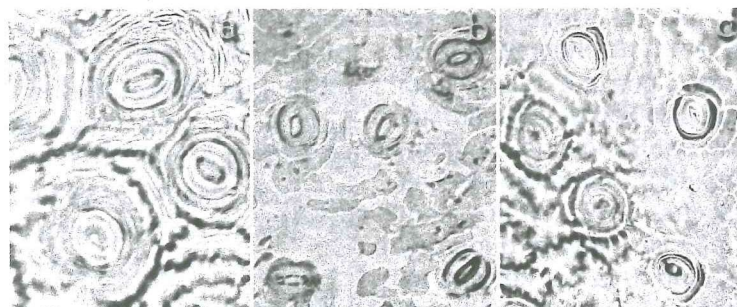
sinh đạt 100% (vấn đề này không thấy đề cập trong nghiên cứu của Sandal và cộng sự, 2005). Mặc dù kết quả tốt nhất chúng tôi thu được là $11,184 \pm 11,18$ chồi/mô (thấp hơn so với $14 \pm 1,6$ chồi/mô) nhưng thời gian nuôi cấy ngắn hơn nhiều (sau 10 tuần nuôi cấy) và nồng độ các chất điều hòa sinh trưởng thực vật được sử dụng ở nồng độ thấp hơn nhiều (0,05 mg.l⁻¹ IBA + 2,0 mg.l⁻¹ BA + 1,0 mg.l⁻¹ ABA). Có rất nhiều những nghiên cứu đề cập vai trò của ABA trong việc tăng cường khả năng tái sinh chồi từ mô sẹo (Liu và cộng sự, 1997, Modal và cộng sự, 2004, Peterson và Smith, 2004, ...).

Trong nghiên cứu này, có lẽ ABA đã ức chế sự tăng sinh khối mô sẹo khi được bổ sung vào môi trường nuôi cấy nhưng đồng thời cũng kích thích sự phát triển các phát thể chồi từ mô sẹo. Việc nghiên cứu sâu hơn nữa về mặt sinh trắc nghiệm mô sẽ đưa ra những kết luận thú vị.

Sự tái sinh rễ in vitro và chuyển cây ra vườn ươm

Bảng 3. Các môi trường dùng khảo sát sự tái sinh rễ

Nghiệm thức	Chất kích thích tạo rễ (mg/l)	Điều kiện nuôi cấy				Than (1 g/l)	Tỷ lệ mẫu hình thành rễ (%)
		Sáng	Tối	Rắn	Lỏng		
R ₁	1	x	-	x	-	x	36,04
	3						66,67
	5						50
	7						0
R ₂	1	x	-	-	x	x	0
	3						0
	5						22,16
	7						11,3
R ₃	1	-	x	x	-	-	0
	3						
	5						
	7						
R ₄	1	-	x	-	x	-	0
	3						0
	5						37
	7						19,05



Hình 2. Hình thái khí khẩu ở cây chè quan sát dưới KHV ở độ phóng đại 600 lần.

- a. Lá ngoài tự nhiên
- b. Lá *in vitro*, môi trường rắn
- c. Lá *in vitro*, môi trường lỏng

Sau 2 tháng nuôi cấy, tần số tái sinh rễ cao nhất thu được ở nghiệm thức R1 (3 mg/l IBA + 1 g/l than hoạt tính, môi trường đặc và nuôi cấy có chiếu sáng), đạt tần số 66,67% (Hình 1d, e). Các nghiệm thức R2 và R4 (môi trường lỏng) (Hình 1f) cũng cho thấy chồi có khả năng phát sinh rễ nhưng với tần số thấp hơn so với khi nuôi cấy trên môi trường đặc. Tần số tái sinh rễ khác nhau giữa môi trường lỏng và đặc có lẽ liên quan đến pH môi trường nuôi cấy và điều kiện nuôi cấy thoáng khí trong hộp nhựa Đại Đồng Tiến. Ngoài ra, khi có sự hiện diện của auxin ngoại sinh kết hợp với auxin nội sinh tạo nên một sự cân bằng giữa các hormone mới nghiêng về phía auxin và từ đó kích thích sự ra rễ. Kết quả này phù hợp với kết luận của Mondal và cộng sự (2004): sự hình thành rễ *in vitro* phụ thuộc vào nồng độ auxin và các điều kiện sinh lý trong quá trình nuôi cấy.

Nghiên cứu cơ quan khí khẩu

Khi tiến hành nghiên cứu khí khẩu theo phương pháp của Molotkovski (Grodzinski và

Grodzinski, 1891, Dịch: Tân và Huyền), cho thấy các lá *ex vitro* có số lượng khí khẩu ít nhất (Hình 2a), tiếp theo là lá *in vitro* nuôi cấy trên môi trường rắn (Hình 2b) và lá *in vitro* nuôi cấy lỏng (Hình 2c) có số khí khẩu nhiều nhất. Những lá *ex vitro* có lớp biểu bì sấp bên ngoài nên phát triển tốt hơn trong khi các lá *in vitro* mọc nước thì không có lớp biểu bì sấp bên ngoài (Paek và Hahn, 2000). Những lá mọc nước cũng đã biểu hiện sự phát triển kém của các tế bào bảo vệ và khí khẩu bị đóng lại khi so sánh với những lá bình thường. Khí khẩu đóng ở những lá mọc nước do cấu trúc khác thường của chúng gây ra bởi áp suất hơi nước bão hòa trong bình nuôi cấy (Han et al. 1992, Preece và Sutter, 1991).

Chuyển cây con ra vườn ươm

Các chồi có chiều cao khoảng 5 cm với bộ rễ khỏe mạnh (Hình 1g) được đưa ra trồng thử nghiệm ngoài vườn ươm. Cây có sự sinh trưởng và phát triển bình thường sau 2 tháng (Hình 1h) và sau 4 tháng (Hình 1i).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

(1) Abraham GC and Rahman K (1986) Somatic embryogenesis in tissue culture of immature cotyledons of tea (*Camellia* spp.). In: Somers DA, Gengenbach BG, Biesboer DD, Hackett WP and Green CE (eds), Abstr. 6th International Congress of Plant Tissue and Cell Culture. University of Minnesota, Minneapolis 294 pp.

(2) Bano Z, Rajarathnam S, Mohanty BD (1991) Somatic embryogenesis in cotyledon culture of tea (*Thea sinensis* L.). J. Hort. Sci. 66: 465–470.

- (3) Bhattacharya A and Ahuja PS (2003) Prospects of transgenics in tea crop improvement. In: Singh R.P. and Jaiwal P.K. (eds), Plant Genetic Engineering. Improvement of Commercial Plants -I. Scientific Technology Publishers, LLC, USA, pp. 115–130.
- (4) Han BH, Paek KY, Choi JK (1992) Structural characteristics of vitrified and glaucous plantlets in *ypsophila paniculata* L. in vitro. J. Korean Soc. Hort. Sci. 33: 177-189.
- (5) Preece JE, Sutter EG (1991) Acclimatization of micropropagated plants to greenhouse and field. Debergh PC, Zimmerman RH. Micropropagation: Technology and application. Dordrecht. The Netherlands Kluwers. 71-93.
- (6) Jankun J, Selman SH, Swiercz R, Skrzypczak-Jankun E (1997) Why drinking green tea could prevent cancer? Nature 387: 561.
- (7) Jha TB, Jha S and Sen SK (1992) Somatic embryogenesis from immature cotyledons of an elite Darjeeling tea clone. Plant Sci. 84: 209–213.
- (8) Kato M (1982) Result of organ culture on *Camellia japonica* and *C. sinensis*. Jpn. J. Breed. 2 (Supplement 2): 267–277.
- (9) Kato M (1996) Somatic embryogenesis from immature leaves of in vitro grown tea shoots. Plant Cell Rep. 15: 920-923
- (10) Mondal TK, Bhattacharya A, Sood A, Ahuja PS (1998) Micropropagation of tea using thidiazuran. Plant Growth Reg. 26: 57-61.
- (11) Mondal TK, Bhattacharya A, Laxmikumaran M, Ahuja PS (2004) Recent advances of tea (*Camelia sinensis*) biotechnology. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 76: 195-254.
- (12) Paek KY, Hahn EJ (2000) Cytokinins, auxins and activated charcoal affect organogenesis and anatomical characteristics of shoot-tip cultures of *Lisianthus* [*Eustoma grandiflorum* (RAF.) SHINN]. In vitro cell. Dev. Biol. Plant. 36. 128-132.
- (13) Sandal I, Kumar A, Bhattacharya A, Sharma M, Shanker M, Ahuja PS (2005) Gradual depletion of 2,4-D in the culture medium for indirect shoot regeneration from leaf explants of *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze. Plant Growth Reg. 47:121-127.
- (14) Tuan NS, Mai NT, Thuy DDT, Uyen NV and Nhut DT (2005) Shoot regeneration and plant formation derived from in vitro root culture of sweet potato (*Ipomoea batatas* L.). In: TUYEN BC, GIANG TT, MIEN BV, HIEN PP, HAY N, TRI BM (Eds.) Proc. Vietnam-Korea Int. Sym. Biotech. Bio-system Eng. pp. 174-180.

TÓM TẮT

Sự tái sinh chồi bất định thông qua mô sẹo từ mô lá in vitro được công bố lần đầu tiên ở cây chè. Mô sẹo được hình thành trên môi trường MS (Murashige và Skoog, 1962) có bổ sung các nồng độ khác nhau của BA, IBA. Các phát thể chồi bất định phát triển từ mô giai đoạn nuôi cấy kéo dài trong 8 tuần trên môi trường có bổ sung 0,05 mg.l⁻¹ IBA, 2,0 mg.l⁻¹ BA và 1,0 mg.l⁻¹ ABA. Các phát thể chồi phát triển từ mô sẹo, chỉ khi ABA được thêm vào môi trường nuôi cấy nhằm gây ức chế và chuyển hóa. Các chồi tái sinh được cấy truyền sang môi trường MS3 có bổ

sung 3,0 mg.l-1 IBA và 1,0 g.l-1 than hoạt tính và môi trường MS4 có bổ sung 5,0 mg.l-1 IBA và không có agar. Sau 4 tuần nuôi cấy, các rễ bất định được hình thành. Cây con sinh trưởng và phát triển bình thường ngoài vườn ươm.

SUMMARY

Adventitious shoot regeneration via callus phase from in vitro leaf explants is reported for the first time in tea. Callus was obtained on Murashige and Skoog (MS, 1962) medium supplemented with varied concentrations of BA, IBA. Adventitious shoot buds developed indirectly on leaf explants after prolonged culture for 8 weeks on medium supplemented with 0.05 mg.l-1 IBA, 2.0 mg.l-1 and 1.0 mg.l-1 ABA. Shoot buds developed on calli, only when ABA added in the medium culture probably due to inhibit and metabolism. Shoot buds regeneration were subcultured on MS3 medium supplemented with 3.0 mg.l-1 IBA and 1.0 g.l-1 activated charcoal and MS4 medium supplemented with 5.0mg.l-1 IBA and non-agar. Then 4 weeks, adventitious roots were formed. Plantlets grew and developed normally in the greenhouse.