KẾT QUẢ BƯỚC ĐẦU NGHIÊN CỨU NUÔI CẤY PHÔI CHÈ TRONG CHỌN TẠO GIỐNG CHÈ MỚI

Nguyễn Văn Thiệp[1], Nguyễn Thị Thu Hà[1],
Trịnh Thị Kim Mỹ[1], Lã Tuấn Nghĩa[2]

TÓM TẮT

Dựa trên kết quả nghiên cứu về đa dạng di truyền các giống chè, đã lựa chọn những giống chè có khoảng cách di truyền từ 0,5 đến 0,6 để tạo ra những cặp lai trong quá trình lai tạo. Phôi lai của các cặp lai được thu và tiến hành nuôi cấy cứu phôi trong môi trường nuôi cấy *in vitro*. Tỷ lệ hình thành mô sẹo từ phôi lai trong phạm vi: 2,56% đến 33,21% phụ thuộc vào tuổi phôi, kể từ khi lai tạo đến khi thu phôi. Những phôi có tuổi từ 4 -5 tháng được nuôi cấy trong môi trường MS có bổ sung 2 mg GA_3 có thể thu được chồi non trực tiếp từ phôi. Hệ số nhân của cây F1 vào khoảng từ 3,0 – 6,6 lần đối với một thế hệ nhân. Kiểm tra sự phát triển của 11 dòng chè lai F1 trong điều kiện vườn ươm, cho thấy có 02 dòng có chiều cao vượt trội so với các dòng khác và đạt 48,0 cm; đó là TKt-10 và PBt-25 và cả 2 dòng này đều cao hơn giống chè đối chứng được sử dụng trong nghiên cứu là giống Trung du.

Từ khoá: *Đa dạng di truyền, lai hữu tính, nhân giống nhanh.*

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Chè là cây trồng có vai trò quan trọng ở vùng trung du và miền núi của Việt Nam. Những năm gần đây diện tích, sản lượng, kim ngạch xuất khẩu của ngành chè đã tăng lên nhanh chóng. Mặc dù vậy, năng suất và giá trị chè của nước ta còn thấp so với thế giới.

Có nhiều nguyên nhân gây ra hạn chế đó, trong đó, một trong những yếu tố quan trọng là chúng ta chưa có nhiều giống chè tốt đáp ứng yêu cầu sản xuất. Mặt khác, nguồn vật liệu khởi đầu cho công tác giống chè của chúng ta còn ở mức rất khiêm tốn (có khoảng 170 mẫu giống). Để có thể nâng cao năng suất, 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. Lai hữu tính đã lựa chọn trước những tính trạng tốt của bố mẹ tạo ưu thế lai cho con lai là phương pháp truyền thống được áp dụng rộng rãi. Tuy nhiên phương pháp này mất rất nhiều thời gian, quá trình chọn lọc dựa vào các đặc điểm hình thái, chịu nhiều tác động của điều kiện môi trường nên rất khó tạo được giống chè có đặc tính mong muốn với tính ổn định cao. Với sự trợ giúp của công nghệ sinh học, chúng ta hoàn toàn khắc phục được những khó khăn trở ngại khi sử dụng biện pháp truyền thống. Công nghệ nuôi cấy mô có thể tạo ra những cá thể từ phôi lai xa và nhân nhanh chúng, nhờ chỉ thị phân tử chúng ta có thể xác định được khoảng cách di truyền giữa các giống chè phục vụ cho chọn cặp lai và chọn ra những cá thể có kiểu gien mong muốn. Nhờ những kỹ thuật đó mà thời gian tạo giống chè mới sẽ được rút ngắn hơn so với phương pháp truyền thống. Bài viết này giới thiệu một số kết quả bước đầu ứng dụng công nghệ sinh học để nâng cao hiệu quả chọn tạo giống chè mới.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Các giống chè đã trồng ở vườn quỹ gien của Viện Khoa học Kỹ thuật Nông lâm nghiệp miền núi phía Bắc được lực chọn cặp đôi làm bố mẹ để lai trên cơ sở khoảng cách di truyền xa nhau (có mức độ tương đồng di truyền từ 0,5 – 0,6). Lai hữu tính các cặp đã lựa chọn.

Sử dụng phôi non từ các cặp lai, nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung chất điều hòa sinh trưởng là BAP và GA_3, đường kình và aga.

Thí nghiệm môi trường nuôi cấy phôi chè lai:

MT1: MS + 1 mg/l BAP + 0,1 mg/l IBA + 30 g đường + 6 aga.

MT2: MS + 2 mg/l 2,4 D + 30g đường + 6g aga

MT3: MS + 3 mg/l BAP + 30g đường + 6g aga

MT4: đ MS + 4 mg/lGA3 +50 đường + 6g aga

MT5: đ MS + 2 mg/l GA3 + 50 đường +6g aga

pH=5,8

Cây chè con F1 hoàn chỉnh tạo ra từ nuôi cấy mô được trồng ra vườn ươm để đánh giá sinh trưởng.

[1]Viện Khoa học kỹ thuật Nông lâm nghiệp miền núi phía Bắc
[2]Viện Di truyền nông nghiệp

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Dựa trên kết quả phân tích đa dạng di truyền bằng chỉ thị phân tử SSR từ các mẫu giống chè năm 2007, đã lựa chọn các giống chè có mức độ tương đồng di truyền từ 0,5 - 0,6 (bản chất di truyền giống nhau 50 - 60%) làm bố mẹ trong các cặp lai. Tiến hành lai hữu tính hoa của các cặp lai, thu hoạch phôi còn non và nuôi cấy trong môi trường MS bổ sung BAP và GA_3. Đã đạt được những kết quả bước đầu có ý nghĩa khoa học và thực tiễn trong công tác giống chè.

1. Tách phôi lai và nuôi cấy cứu phôi

Để nuôi cấy cứu phôi chè thành công, đã tìm hiểu thời gian tách phôi và môi trường nuôi cấy phù hợp. Sau khi lai hoa từ 3-6 ngày thì vòi nhụy sẽ héo, tiến hành tách phôi để nghiên cứu. Thí nghiệm tiến hành tách phôi theo thời gian sau khi thụ phấn 10 ngày đến tháng thứ 5. Một quả chè sau khi thụ tinh có từ 1-10 phôi (quả chè đã chín bình thường có từ 1-3 hạt, phần lớn có 2 hạt).

Hình 1. Sự phát triển của phôi chè sau khi lai hoa.

Bảng 1. Thời gian và sự hình thành phôi chè sau khi lai

Thời gian sau lai hoa	3 ngày	5 ngày	7 ngày	10 ngày	15 ngày	20 ngày	30 ngày
Số quả kiểm tra	22	26	25	30	24	28	26
Quả có phôi	0	0	6	21	20	28	26
Kích thước phôi (mm)	-	-	0,5	0,5	0,8	1,0	1,0
Tỷ lệ (%)	0	0	24,0	70,0	83,3	100	100

Sau khi lai 7 ngày phôi đã hình thành và nhìn thấy bằng mắt thường. Ngày thứ 20 trở đi, hầu hết các hoa đã hình thành phôi, tuy nhiên giai đoạn 20-30 ngày phôi vẫn còn khá nhỏ (1mm), nếu nuôi cấy ở giai đoạn sớm này sẽ rất khó thành công.

Qua thời gian phôi lớn dần, hình thành hạt có nội nhũ và mầm phôi, đã theo dõi sự phát triển của phôi và tuổi phôi ảnh hưởng đến tỷ lệ phôi sống; kết quả thể hiện ở bảng 2.

Bảng 2. Thời gian và sự phát triển của phôi chè sau khi lai và tỷ lệ phôi sống khi cấy

Thời gian (tháng)	1	2	3	4	5	6
Kích thước phôi (mm)	1,0	1,5	2,5	3,5	4,5	5,5
Trạng thái phôi - hạt	Khối phôi	Khối phôi	Khối phôi	có vỏ hạt mềm và nội nhũ lỏng	vỏ hạt trắng, nội nhũ đặc có mầm phôi	vỏ hạt vàng, nội nhũ rắn có mầm phôi
Số phôi cấy	120	116	122	108	120	115
Số phôi sống	8	17	32	36	62	68
Tỷ lệ (%)	6,67	14,65	26,23	33,33	51,66	59,13

Giai đoạn 1-2 tháng tuổi, phôi còn nhỏ, khi cấy trên môi trường nhân tạo tỷ lệ chết khá cao (1 tháng có tỷ lệ sống 6,67%), tỷ lệ chết giảm dần khi phôi lớn hơn (3 tháng có tỷ lệ sống 26,23%). Từ sau 4 tháng trở đi, tỷ lệ sống tăng cao hơn và phôi có khả năng phát triển mạnh hơn. Từ 1 đến 2 tháng sau khi lai hoa, hầu hết bên trong vỏ quả chè là một khối chưa có sự phân hoá riêng rẽ phôi và nội nhũ tạm gọi là "khối phôi", tới tháng thứ 3 bắt đầu hình thành mầm (đúng hơn là hình dạng đầu tiên của mầm) nhưng vẫn gắn liền với "khối phôi". Vì vậy khi nuôi cấy phôi trong giai đoạn 1-3 tháng, đã sử dụng cả khối phôi làm mẫu cấy.

Tháng thứ tư, "khối phôi" đã phân hoá thành vỏ hạt màu trắng bên trong có nước và phôi hạt. Tháng thứ 5 trở đi hạt chuyển màu vàng ngà rồi màu đen, bên trong nội nhũ chuyển dần thành 2 lá mầm, phôi cũng dần thành thục, và hạt chín trong thời gian 9-10

tháng tuổi. Vì vậy từ sau 4-5 tháng đã tiến hành tách phôi ra khỏi nội nhũ và cấy vào môi trường tạo chồi, phần nội nhũ cấy vào môi trường tạo phôi vô tính nhằm tăng nhanh số lượng cây về sau.

Bảng 3. Môi trường nuôi cấy và tỷ lệ hình thành mô sẹo/ mọc chồi của phôi chè sau khi lai (sau cấy 60 ngày) (%)

Loại MT	MT1	MT2	MT3	MT4	MT5
Phôi 1 tháng	-	2,56*	0,16*	-	-
Phôi 2 tháng	0,46*	6,54*	0,84*	-	-
Phôi 3 tháng	2,25*	11,82*	4,32*	-	-
Phôi 4 tháng	4,00*	27,5*	7,55*	1,41**	2,82**
Phôi 5 tháng	8,12*	33,21*	13,12*	2,36**	8,24**
LSD_{05}	0,85	0,85	0,92	0,81	0,81

*Ghi chú: * Hình thành mô sẹo, ** Mọc chồi*

Kết quả là môi trường 1, 2, 3 thúc đẩy phôi hình thành mô sẹo (callus). Phôi chè có tuổi càng lớn thì khả năng tạo thành mô sẹo càng mạnh (là 33,21% ở phôi 5 tháng tuổi trong khi phôi 1 tháng tuổi chỉ có 2,56% hình thành mô sẹo). Việc tạo ra và nhân mô sẹo là tiền đề quan trọng để nhân số lượng lớn cây con về sau.

Môi trường 4 và 5 thúc đẩy phôi tạo chồi. Phôi càng già tỷ lệ tạo chồi càng cao, trong bảng 3 phôi 5 tháng tuổi có tỷ lệ tạo chồi cao nhất.

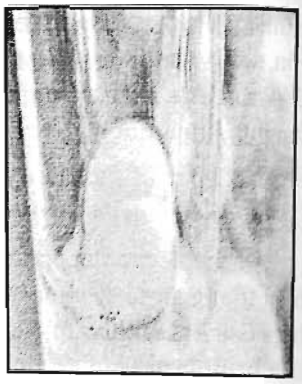
Từ các thí nghiệm trên thấy rằng, lấy phôi từ 4 tháng tuổi trở đi của các cặp lai của cây chè *Camellia sinensis*, đem nuôi cấy in vitro thì khả năng thành công sẽ cao và chắc chắn hơn.

Từ tháng thứ 5 sau khi lai, đã tách riêng phôi và lá mầm, phôi cấy vào môi trường phát triển thành cây, lá mầm cho vào môi trường phát triển thành phôi vô tính.

2. Nuôi cấy nhân nhanh và tạo cây hoàn chỉnh

Năm 2008-2009, đã tiến hành tách phôi từ 465 quả được tổng số 931 phôi; các phôi được nuôi cấy trên môi trường nuôi phôi để tạo cây hoàn chỉnh. Đối với cây chè, thời gian để nhân nhanh một đợt dài hơn các cây trồng khác, khoảng 2 tháng cho một đợt nhân. Kết quả nhân nhanh một số tổ hợp lai được ghi ở bảng 4.

Phôi chè 2 tháng tuổi



Phôi chè 3 tháng tuổi

Tạo chồi từ phôi lai

Nhân nhanh và tạo cây hoàn chỉnh

Hình 2. Quá trình tạo cây hoàn chỉnh

Bảng 4. Hệ số nhân của con lai F1 từ các cặp lai năm 2008 (lần)

TT	Con lai F1		Nuôi cấy phôi trực tiếp		
	Cặp lai	Ký hiệu dòng	Số cây ban đầu	Sau 2 tháng	Hệ số nhân
1	PH1 x Phúc Vân Tiên	PPv-1	3	9	3,0
	PH1 x Bát Tiên	PBt-4	14	56	4,0
	PH1 x PT95	PPt-6	11	55	5,0
	Shan Chất Tiền x Đại Bạch Trà	SĐb-1	1	6	6,0

5	PH1 x Tứ Quý Xuân	PTq-10	13	68	5,2
6	PH1 x Saemidori	PSa-20	35	148	4,2
7	Trung Du x Kim Tuyên	TKt-10	10	42	4,2
8	Trung Du x Hồ Nam	THn-18	34	226	6,6
9	PH1xTriết Giang 1	PTr-9	15	56	3,7
10	PH1 x Phúc An	PPh- 1	3	11	3,6
11	PH1 x Bát Tiên	PBt-25	4	18	4,5
LSD_{05} = 0,26.			143*	695*	4,8**

*Ghi chú: * Tổng số cây, ** Hệ số nhân trung bình*

Khi nuôi cấy nhân nhanh cây phát sinh từ phôi trực tiếp (phôi đã tách khỏi lá mầm), các con lai F1 từ các cặp lai khác nhau có hệ số nhân vô tính khác nhau. Hệ số nhân cao nhất là con lai từ cặp bố mẹ là Trung Du x Hồ Nam (6,6 lần), tiếp theo là Shan Chất Tiền và Đại Bạch Trà (6,0 lần), thấp nhất ở cặp PH1 x Phúc Vân Tiên (3,0 lần), hệ số nhân trung bình là 4,8 lần.

Năm 2009 đã tiến hành nhân nhanh cây chè lai F1 của các tổ hợp lai (50 tổ hợp), đã trồng ra vườn ươm 3600 cây, các cây sống và phát triển tốt.

Hình 3. Cây chè lai F1 sau 3 tháng trồng ngoài vườn ươm

3. Tuyển chọn các dòng chè có triển vọng

Đánh giá cây chè từ các cặp lai trong điều kiện vườn ươm (Lai hoa tháng 12 năm 2007, nuôi cấy phôi bắt đầu từ tháng 4 năm 2008, trồng ra vườn ươm tháng 3 năm 2009). Các cây lai F1 được đánh giá sơ bộ về một số chỉ tiêu sinh trưởng trong vườn ươm; kết quả thể hiện ở bảng 5.

Trong 11 dòng theo dõi, 4 dòng có chiều cao cây > 40 cm là PPv-1, SĐb-1, TKt-10 và PBt-25, hai dòng có chiều cao lớn nhất (TKt-10 cao 45,6 cm và dòng PBt-25 cao 48,0 cm). Về trọng lượng búp, 3 dòng có trọng lượng búp 1 tôm + 2 lá > 0,4 g, đó là các dòng PPv-1, TKt-10 và PBt-25, các dòng này có chiều cao cây và trọng lượng búp cao hơn giống chè Trung du đối chứng.

Bảng 5. Đánh giá một số chỉ tiêu liên quan đến năng suất các dòng chè lai trong điều kiện vườn ươm năm 2009

Tên dòng	Cao cây (cm)	Đường kính gốc (cm)	Trọng lượng búp (g/búp)
PPv-1	*41,5*	0,35	*0,41*
PBt-4	33,4	0,33	0,33
PPt-6	36,8	0,33	0,37
SĐb-1	*41,7*	0,31	0,39
PTq-10	29,5	0,29	0,38
PSa-20	38,4	0,30	0,39
TKt-10	*45,6*	0,40	*0,47*
THn-18	28,2	0,34	0,39
PTr-9	28,5	0,25	0,33
PPh- 1	31,8	0,29	0,36
PBt-25	*48,0*	0,40	*0,42*
Trung du	*36,2*	0,34	*0,36*
LSD_{05}	3,22	0,11	0,04

Ghi chú: búp chè hái gồm 1 tôm và 2 lá

Tuy nhiên đây là những đánh giá bước đầu của cây chè 1 năm tuổi và trong điều kiện vườn ươm. Các dòng này đang được tiếp tục đánh giá đầy đủ các chỉ tiêu trong vườn ươm và trên đồng ruộng.

IV. KẾT LUẬN

Hoa chè ở điều kiện Phú Thọ, sau khi lai 7 ngày có 24% số hoa hình thành phôi, sau 20 ngày 100% hoa có phôi. Thời gian thu phôi sau khi lai hoa để nuôi cấy in vitro càng dài thì tỷ lệ phôi sống càng cao, sau 1 tháng phôi sống 6,67%, sau 6 tháng phôi sống 59,13%.

Phôi sau 4 tháng tuổi cấy trên môi trường nhân tạo có thể trực tiếp hình thành chồi mà không cần tạo mô sẹo. Môi trường đ MS + 2 GA3 + 50 đường +6 g aga tạo chồi tốt cho phôi chè lai. Trong giai đoạn nhân nhanh, các con lai F1 có hệ số nhân khác nhau, từ 3,0 đến 6,6 lần.

Có hai dòng sinh trưởng chiều cao trội là TKt-10 (cây cao 45,6 cm) và dòng PBt-25 (cây cao 48,0 cm) và đều cao hơn giống Trung du đối chứng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Hữu La (1998). Thu thập, bảo quản, đánh giá tập đoàn giống chè ở Phú Hộ. Tuyển tập các công trình nghiên cứu về chè 1988-1997. NXB Nông nghiệp, tr.191-207.

2. Nguyễn Văn Toàn, Nguyễn Thị Phương (2006). Phương pháp lai tạo trong chọn giống chè ở Việt Nam. Kết quả nghiên cứu khoa học và chuyển giao công nghệ giai đoạn 2001-2005. Viện KHKT Nông lâm nghiệp miền núi phía Bắc. NXB Nông nghiệp, tr.65-73.

3. Viện Công nghệ Sinh học (2002). Đánh giá tính đa hình một số giống chè bằng kỹ thuật RAPD. Báo cáo khoa học năm 2002.

4. Akiko Matsunaga (2008). The collection and use of tea genetic resources in Japan. Proceedings of The 1st Japan-Korea Tea Breeding symposium, 2008, p. 4-7.

5. 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.

6. Banerjee, B. (1992). Botanical classification of tea. In the Tea cultivation to consumption, edited by Willson & Clifford, Chapman & Hall, p.25-51.

7. Banerjee, B. (1992). Selection and breeding of tea. In the Tea cultivation to consumption, edited by Willson & Clifford, Chapman & Hall, p.53-86.

8. Chen Liang, Zhi Xiu Zhou, Ya Jun Yang (2007). Genetic improvement and breeding of tea plant *(Camellia sinensis)* in China: From invidual selection to hybridization and molecular breeding. Euphytica, 154, p. 239-248.

9. Kazumi Furukawa, Junichi Tanaka (2004). Makura-Ck2: A tea strain with a hight somatic embryogeneis. NIVTS, J. 6 (2004), p.109-115.

10. Shin-ichi Nishimoto, Keiichi Shimizu and et all (2003). Inter specific hybrids of *camellia chrysantha x C. japonica* by Ovule culture. Japan Soc. Hort. Sci. : 236-242, 2003.

11. Shinsaku Nadamitsu, Yoshiaki Andoh, et al. (1986). Interspecific Hybrids between *Camellia vietnamnsis and C. chrysantha* by Cotylendon culture. J. Breed. 36 (1986), p. 309-313.

12. Tapan Kumar Mondal, Amita Bhattacharya, Madhu Sharma and Paramvir singh Ahuja (2001). Induction of in vivo somatic embryos from tea *(Camellia sinensis)* cotylendons. Current science, vol. 81, no. 3, p.297-300.

RESEARCH ON EMBRYO RESCUE AIMING AT THE NEW TEA BREEDING FOR THE HIGH YIELD AND GOOD QUALITY

Nguyen Van Thiep, Nguyen Thi Thu Ha
Trinh Thi Kim My, La Tuan Nghia

Summary

Based on result of identified genetic distance, tea varieties with genetic similarity levels from 0.5 to 0.6 as parents of hybrid pairs have been selected. Then sexual hybridization were conducted. The resulted immature embryos were collected for *in vitro* culture using MS medium added with 2 mg/l of 2.4 D. The highest rate of callus formation from embryo is from 2.56 to 33.21% depending on the time of embryo collection after sexual hybridization. Culture of embryos at 4-5-month age in the MS medium added with 2 mg/l of GA3 resulted in direct development of buds from embryos. The coefficient of rapid propagation of F1 hybrids *in vitro*, ranged from 3.0 to 6.6 times/one generation. Estimate of the growth of 11 F1 hybrids in the nursery conditions showed that there were two lines that had highest stem height; they are TKT-10 (45.6 cm high) and PBT - 25 (48.0 cm high). Both of them are higher than the local check (Trung Du variety).

Key words: *Genetic diversity, sexual hybridization, rapid propagation.*

Người phản biện: TS. Nguyễn Văn Tạo