

Khảo sát khả năng nhân giống cây Trà my hoa đỏ (*Camellia piquetiana* (Pierre) Sealy) *in vitro*

Nguyễn Văn Kết^{1,*}, Nguyễn Thị Cúc¹, Nguyễn Trung Thành²

¹Khoa Nông Lâm, Đại học Đà Lạt, 01 Phù Đổng Thiên Vương, Đà Lạt, Việt Nam

²Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQGHN, 334 Nguyễn Trãi, Hà Nội, Việt Nam

Nhận ngày 09 tháng 6 năm 2014

Chỉnh sửa ngày 20 tháng 8 năm 2014; Chấp nhận đăng ngày 18 tháng 9 năm 2014

Tóm tắt: Hạt Trà my hoa đỏ ở những độ tuổi khác nhau thu thập tại huyện Đạ Hoai, tỉnh Lâm Đồng được khử trùng bằng dung dịch calcium hypochlorite ($\text{Ca}(\text{OCl})_2$) 7% trong 20 phút, sau đó nuôi cây trên môi trường MS có bổ sung 0,5 mg/l BA, 30g/l sucrose và 1g/l than hoạt tính, sau 60 ngày nuôi cây hạt 30 ngày tuổi có tỷ lệ nảy mầm cao nhất và thời gian nảy mầm là sớm nhất. Các chồi Trà my hoa đỏ *in vitro* được nuôi cây trên 5 loại môi trường khoáng khác nhau để xác định thành phần muối khoáng thích hợp, sau khi có môi trường khoáng thích hợp tiếp tục khảo sát sự bổ sung nồng độ các chất kích thích sinh trưởng BA và TDZ để xác định nồng độ chất kích thích sinh trưởng thích hợp cho việc tạo chồi. Kết quả cho thấy môi trường WPM là môi trường thích hợp nhất cho sự sinh trưởng và phát triển của cây Trà my hoa đỏ. Môi trường WPM có bổ sung 2 mg/l TDZ là môi trường thích hợp nhất cho quá trình hình thành chồi (3,53 chồi mới). Các chồi Trà my hoa đỏ *in vitro* có 3 - 4 đốt và 5 - 6 lá được nuôi cây trên môi trường có sự thay đổi khác nhau của nồng độ IBA (1; 3; 5 và 7mg/l) và NAA (0,1; 0,3; 0,5 và 0,7mg/l), kết quả sau 30 ngày nuôi cây cho thấy môi trường WPM có bổ sung 5mg/l IBA và 0,5mg/l NAA là môi trường thích hợp nhất cho sự tạo rễ (14 rễ/chồi).

Từ khóa: *in vitro*, nhân giống, Trà my hoa đỏ, *Camellia*.

1. Mở đầu

Cây Trà my hoa đỏ là loài đặc hữu hẹp của Việt Nam, chỉ phân bố ở khu vực giáp ranh giữa tỉnh Lâm Đồng và Đồng Nai nơi có hệ sinh thái rừng hỗn giao giữa tre nứa và cây thân gỗ [1, 2]. Cây Trà my hoa đỏ gần đây được nhiều người quan tâm dùng làm cây cảnh nhờ vào vẻ đẹp độc đáo của màu sắc, cấu tạo hoa,

hình dáng và tính quý hiếm của chúng. Ngoài tự nhiên số cá thể loài này còn rất ít và phạm vi phân bố hẹp nên đang đứng trước nguy cơ tuyệt chủng.

Cây Trà my có thể nhân giống bằng nhiều phương pháp như: gieo hạt, giâm cành, chiết cành, ghép cành. Tuy nhiên, những phương pháp này tồn tại một số nhược điểm như: phụ thuộc vào mùa vụ hạt chín, tỷ lệ nảy mầm thấp, hạt phân ly tính trạng, hệ số nhân giống thấp. Nuôi cấy mô tế bào có thể khắc phục các nhược điểm trên, việc áp dụng phương pháp này vào

*Tác giả liên hệ. ĐT.: 84-63.3834051
Email: ketnv@dlu.edu.vn

nhân giống cây Trà my là một giải pháp cần được xem xét, nghiên cứu. Vì vậy chúng tôi thực hiện nghiên cứu: “Khảo sát khả năng nhân giống cây Trà my hoa đỏ (*Camellia piquetiana*) *in vitro*” nhằm bảo tồn và phát triển nguồn gen thực vật quý hiếm.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Mẫu ban đầu là quả Trà my hoa đỏ (*Camellia piquetiana* Sealy) được thu thập tại Di linh, Đambri, Đạ Huoai, Lâm Đồng. Hóa chất dùng khử trùng mẫu là Tween® (Fluka, Đức) và calcium hypochlorite ($\text{Ca}(\text{OCl})_2$) dạng bột nguyên chất 99,9% (Sigma, Mỹ).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Giai đoạn tạo mẫu vô trùng

Quả trà mi sau khi thu về được tách bỏ vỏ lấy hạt và khử trùng bằng dung dịch calcium hypochlorite ($\text{Ca}(\text{OCl})_2$) 7% trong 20 phút, sau đó nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung 0,5 mg/l BA, 30g/l sucrose và 1g/l than hoạt tính để khảo sát khả năng nảy mầm của các hạt Trà my hoa đỏ ở các độ tuổi khác nhau: 10, 20, 30, 60 và 90 ngày.

Giai đoạn nhân chồi

Chồi cây Trà my hoa đỏ *in vitro* 3 tháng tuổi được cấy trên 5 loại môi trường khác nhau: MS, ½ MS (ĐL), ½ MS (ĐL + VL), WPM, ½ WPM (ĐL) để xác định thành phần muối khoáng thích hợp cho sự sinh trưởng và phát triển của Trà my hoa đỏ *in vitro*, sau đó tiếp tục cấy trên môi trường có bổ sung BA và TDZ với các nồng độ khác nhau để khảo sát môi trường nhân chồi thích hợp.

Giai đoạn tạo rễ

Chồi Trà my hoa đỏ *in vitro* có 3-4 đốt với 4-5 lá được cấy trên môi trường có bổ sung tổ hợp IBA (1; 3; 5 và 7mg/l) và NAA (0,1; 0,3; 0,5 và 1,0 mg/l) để khảo sát môi trường ra rễ.

Chỉ tiêu theo dõi

Số lượng lá (lá/chồi), số lượng rễ (rễ/chồi), tỷ lệ ra rễ (%), số lượng chồi (chồi/ mẫu cấy), số lượng đốt (đốt/chồi), chiều cao chồi (cm), chiều dài rễ (cm), khối lượng tươi (mg), thời gian nảy mầm (ngày), tỷ lệ nảy mầm (%).

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Giai đoạn tạo mẫu vô trùng

Ảnh hưởng của tuổi hạt lên quá trình nảy mầm hạt Trà my hoa đỏ in vitro

Kết quả nghiên cứu về ảnh hưởng của độ tuổi hạt lên tỷ lệ nảy mầm, thời gian nảy mầm, số đốt, số lá được trình bày tóm tắt trong Bảng 1.

Bảng 1. Tỷ lệ nảy mầm, thời gian nảy mầm, số đốt, số lá của hạt Trà my hoa đỏ ở những độ tuổi khác nhau sau 60 ngày nuôi cấy

Tuổi hạt	Tỷ lệ nảy mầm (%)	Thời gian nảy mầm (ngày)	Số đốt thân/cây	Số lá/ Cây
10 ngày	33,3 ^{d*}	36,7ab	1,7cd	0,7b
20 ngày	93,3 ^a	23,3bc	3,0bc	4,3a
30 ngày	100,0 ^a	13,3c	5,0bc	5,0a
60 ngày	73,3 ^{bc}	30,0b	2,3a	3,0ab
90 ngày	33,3 ^d	46,7a	2,0cd	2,0ab

Chú thích: *: trong mỗi cột có một ký tự giống nhau thì sự khác biệt giữa các nghiệm thức không có ý nghĩa bởi sự phân hạng của LSD ở mức $p \leq 0,05$.

Kết quả trình bày trong Bảng 1 và Hình 1b cho thấy, tỷ lệ nảy mầm, thời gian nảy mầm, số đốt thân, số lá phụ thuộc vào tuổi hạt. Tuổi của hạt trong thí nghiệm này được tính từ khi hoa thụ phấn đến khi thu hái mẫu.

Tỷ lệ nảy mầm, số đốt thân, số lá tăng dần từ hạt trà my có độ tuổi từ 10 đến 30 ngày tuổi và đạt cao nhất ở hạt 30 ngày tuổi, sau đó, giảm dần ở hạt 60, 90 ngày tuổi. Điều này có thể giải thích ở những hạt 10 ngày tuổi, 20 ngày tuổi mặc dù đã xuất hiện cấu trúc phôi nhưng chưa hoàn chỉnh và sự tích lũy các hợp chất hữu cơ trong nội nhũ chưa đầy đủ cho sự nảy mầm. Hạt 30 ngày tuổi cấu trúc phôi đã hoàn chỉnh, sự tích lũy dinh dưỡng dự trữ cần thiết trong nội nhũ đầy đủ cho hạt nảy mầm. Ở những hạt 60 ngày tuổi và 90 ngày tuổi tuy đã trưởng thành

và tích lũy đầy đủ chất dinh dưỡng cần thiết nhưng do chúng tích lũy một số lượng lớn các chất ức chế sinh trưởng như ABA và các hợp chất phenol, trong khi đó giảm hàm lượng các chất kích thích sinh trưởng như auxin, GA₃ và cytokinin làm cho sự cân bằng hormone (chủ yếu là sự cân bằng ABA/GA₃) lệch về phía tích lũy nhiều ABA. Chính sự có mặt ở hàm lượng cao của ABA đã ức chế tổng hợp enzyme thủy phân cần cho sự nảy mầm, cây ở trạng thái ngủ. Do đó, hạt cần một thời gian nhất định để giảm hàm lượng ABA xuống mức tối thiểu [3]. Vì vậy, hạt cần một thời gian dài để giảm hàm lượng ABA nội sinh, tăng hàm lượng GA₃ trong chúng và chuyển từ trạng thái ngủ sang trạng thái hoạt động.



Hình 1. a. Quả Trà my hoa đỏ ngoài tự nhiên, b. hạt Trà my hoa đỏ ở các độ tuổi khác nhau sau 60 ngày nuôi cấy

3.2. Giai đoạn nhân chồi

Ảnh hưởng của môi trường khoáng lên sự sinh trưởng và phát triển cây Trà my hoa đỏ in vitro

Bảng 2. Các chỉ tiêu sinh trưởng của Trà my hoa đỏ trên các môi trường khoáng khác nhau sau 90 ngày nuôi cấy

Môi trường	Số lá/ chồi	Số đốt/ chồi	Chiều cao chồi (cm)
1/2WPM (ĐL)	1,90 ^{b*}	2,00 ^b	1,32 ^{cd}
WPM	3,60 ^a	3,10 ^a	1,69 ^a
MS	1,90 ^b	1,90 ^{bc}	1,41 ^{bc}
1/2MS (ĐL)	2,60 ^b	2,40 ^{ab}	1,52 ^{ab}
½ MS (ĐL + VL)	2,00 ^b	1,20 ^c	1,16 ^d

Chú thích: *: trong mỗi cột có một ký tự giống nhau thì sự khác biệt giữa các nghiệm thức không có ý nghĩa bởi sự phân hạng của Duncan's Multiple Range Test ở mức $p \leq 0,05$.

Kết quả nghiên cứu được trình bày trong Bảng 2 và Hình 2a cho thấy các chỉ tiêu sinh trưởng như số lá, số đốt, và chiều cao cây phụ thuộc rất lớn vào môi trường nuôi cấy. Trên môi trường ½ MS đa lượng và vi lượng sự sinh trưởng của chồi thấp nhất, chồi chỉ đạt chiều cao 1,16 cm, số đốt và số lá tăng không đáng kể. Trên môi trường MS chồi sinh trưởng tốt trong tháng đầu tiên, bắt đầu từ tháng thứ hai trở đi chồi sinh trưởng chậm dần và ngừng hẳn, có hiện tượng khô héo ở đỉnh chồi. Riêng chồi ở môi trường ½ MS đa lượng có gia tăng số đốt, số lá và chiều cao nhưng chồi không to khỏe. Sự sinh trưởng của chồi đáng chú ý là ở môi trường WPM, chồi có sự sinh trưởng và phát triển tốt nhất, ở những chỉ tiêu như số lá (3,6 lá), số đốt thân (3,1 đốt) và chiều cao chồi (1,7 cm) đều vượt trội hơn so với các môi trường khác.

Trên môi trường WPM hàm lượng khoáng đa lượng thấp nhưng hàm lượng vitamin thiamin (B1) cao hơn gấp 10 lần so với môi trường MS nên có tác dụng tốt cho quá trình trao đổi chất, giúp cho mô nuôi cấy có thể hấp

thụ trực tiếp các loại vitamin trong môi trường nuôi cấy, đặc biệt là ở giai đoạn nhân chồi hoặc tạo chồi. Vì ở giai đoạn này, các chồi non chưa hình thành lá nên khả năng quang hợp tự tạo ra các chất hữu cơ là rất nhỏ vì thế sự phát triển của chồi phụ thuộc vào các chất hữu cơ trong môi trường nuôi cấy. Vitamin có vai trò xúc tác các quá trình trao đổi chất diễn ra trong tế bào, cho nên muốn đạt được sinh trưởng mạnh cho các mô nuôi cấy các nhà nghiên cứu đã thêm vào môi trường một số vitamin thông thường như: nicotinic acid, pyridoxine, thiamin, glycine. Trong số đó, vitamin B1 được coi là vitamin thiết yếu cho sự sinh trưởng và biến dưỡng của tế bào thực vật. Sự phosphoryl hóa biến thiamin thành thiamin-pyrophosphat, chất này là cocarboxilase tương ứng với sự khử carboxyl của các acid ceton [4, 5].

Ảnh hưởng của BA lên quá trình tạo chồi Trà my hoa đỏ

Môi trường sử dụng trong thí nghiệm này là môi trường WPM có bổ sung 3% sucrose và BA với nồng độ từ 0 - 7mg/l. Kết quả thu được sau 90 ngày nuôi cấy được trình bày trong Bảng 3.

Bảng 3. Các chỉ tiêu sinh trưởng của Trà my hoa đỏ trên môi trường có bổ sung BA ở các nồng độ khác nhau

BA (mg/l)	Số lá/ mẫu cấy	Số đốt/ mẫu cấy	Số chồi/ mẫu	Chiều cao chồi (cm)	Trọng lượng tươi (mg)
0	5,60 ^{c*}	5,67 ^b	1,13 ^c	1,68 ^d	22,13 ^c
1	6,19 ^b	5,25 ^c	1,50 ^d	1,90 ^c	31,56 ^d
3	7,07 ^a	6,14 ^a	2,86 ^a	2,66 ^a	51,07 ^a
5	3,87 ^d	3,27 ^d	2,40 ^b	2,26 ^b	41,87 ^b
7	3,47 ^e	2,80 ^e	1,80 ^c	1,67 ^d	32,87 ^c

Chú thích: *: trong mỗi cột có một ký tự giống nhau thì sự khác biệt giữa các nghiệm thức không có ý nghĩa bởi sự phân hạng của Duncan's Mutiple Range Test ở mức $p \leq 0,05$

Sau 90 ngày nuôi cấy, số chồi ở môi trường đối chứng là thấp nhất sau đó tăng lên khi môi trường nuôi cấy có bổ sung 1mg/l BA. Số chồi tiếp tục tăng đến mức cực đại ở môi trường có bổ sung 3mg/l BA (2,86 chồi), nếu tiếp tục tăng lên 5mg/l thì số chồi giảm dần và thấp nhất khi

nồng độ tăng 7mg/l. Nguyên nhân là do nồng độ chất kích thích sinh trưởng quá cao không những không gây tạo nhiều chồi mà còn ức chế sự sinh trưởng và phát triển của mô cấy. Các nghiên cứu của [6] trên cây nho đã ghi nhận khi nồng độ BA bổ sung vượt ngưỡng tối ưu sẽ làm

giảm số lượng cũng như chất lượng chồi hình thành, thậm chí có thể dẫn đến sự bất thường về hình thái của một số loại cây. Nhận định trên phù hợp với kết quả thu được của thí nghiệm này.

Khối lượng tươi của chồi là yếu tố quan trọng biểu hiện sự sinh trưởng của chồi là sự

tổng hợp của các chỉ tiêu thành phần như số đốt, số lá, số chồi và chiều cao chồi. Hầu như tất cả các môi trường có bổ sung BA đều có sự tăng trưởng tốt hơn so với môi trường đối chứng không bổ sung BA.

Ảnh hưởng của TDZ lên quá trình tạo chồi Trà my hoa đỏ

Bảng 4. Các chỉ tiêu sinh trưởng của Trà my hoa đỏ trên các môi trường có bổ sung TDZ ở các nồng độ khác nhau

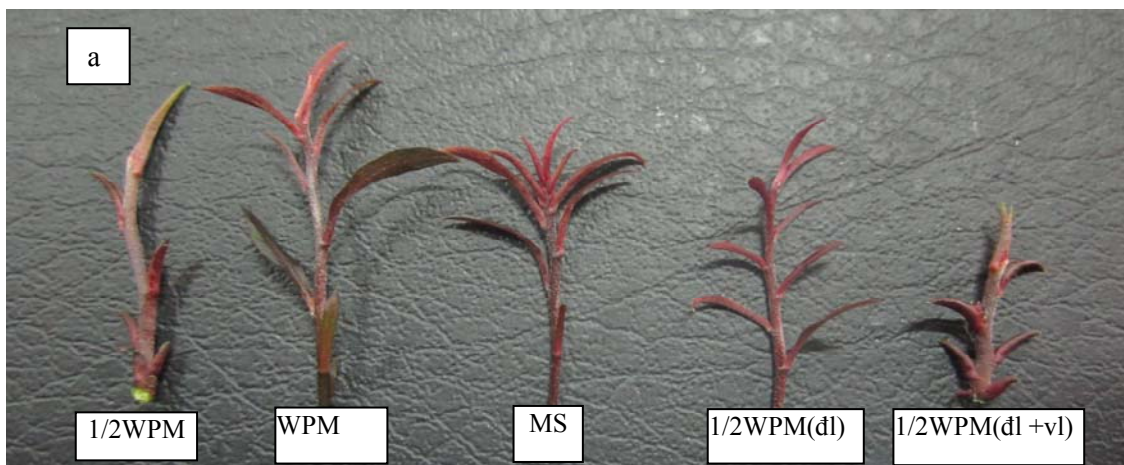
TDZ (mg/l)	Số lá/ mẫu cây	Số đốt/ mẫu cây	Số chồi/ mẫu cây	Chiều cao chồi (cm)	Trọng lượng tươi (mg)
0,0	5,60 ^{f*}	5,67 ^d	1,13 ^f	1,68 ^c	22,13 ^f
0,5	6,40 ^e	4,67 ^f	1,60 ^e	1,47 ^d	24,67 ^e
1,0	6,93 ^d	5,40 ^e	2,40 ^d	1,71 ^c	27,53 ^d
1,5	8,33 ^b	7,00 ^c	2,80 ^c	1,84 ^b	29,60 ^c
2,0	9,07 ^a	7,80 ^a	3,53 ^a	2,25 ^a	39,00 ^a
3,0	8,13 ^c	7,20 ^b	3,20 ^b	1,71 ^c	32,53 ^b

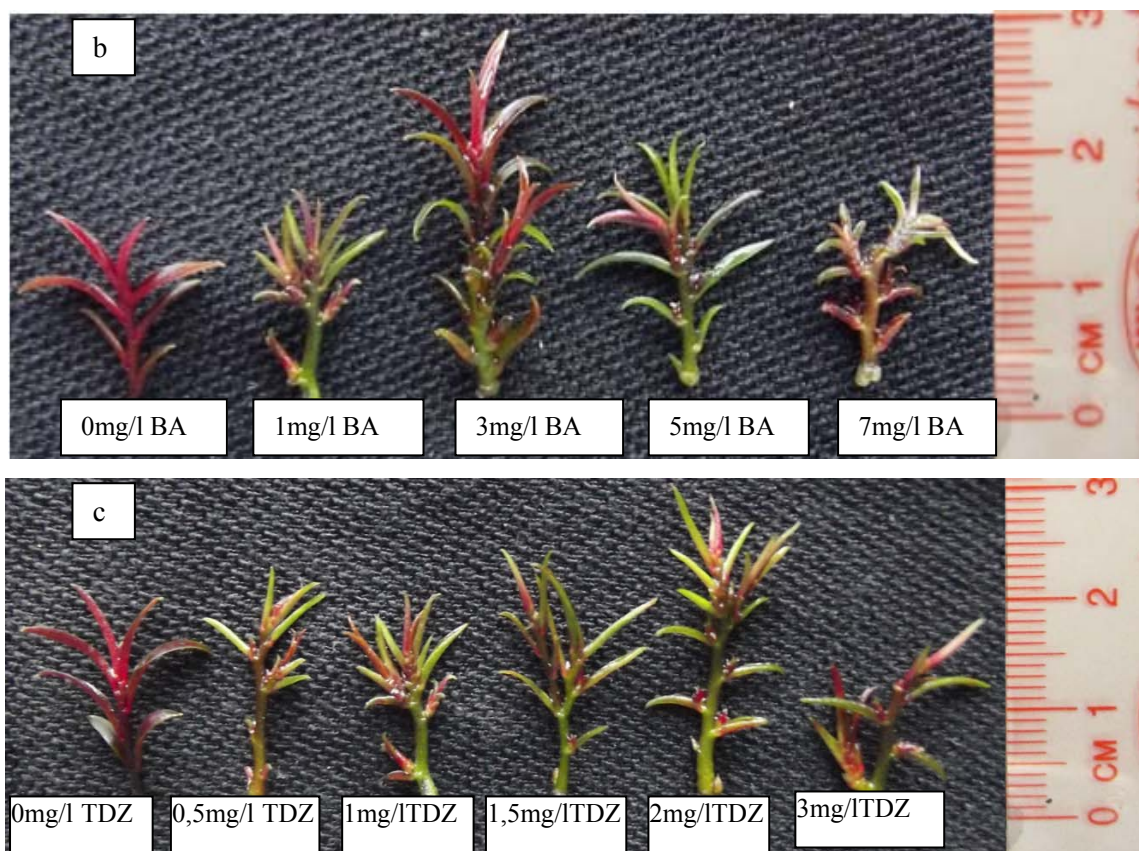
Chú thích: *: trong mỗi cột có một ký tự giống nhau thì sự khác biệt giữa các nghiệm thức không có ý nghĩa bởi sự phân hạng của Duncan's Multiple Range Test ở mức $p \leq 0,05$

Sự bổ sung TDZ vào môi trường nuôi cấy có ảnh hưởng rất lớn đến sự sinh trưởng và phát triển của chồi cây. Tất cả các nghiệm thức có bổ sung TDZ đều khác biệt so với đối chứng, sự bổ sung TDZ ảnh hưởng rất lớn đến sự hình thành chồi. Sự hình thành chồi tăng dần tương ứng với nồng độ từ 0,5 - 2mg/l TDZ, số chồi đạt tối ưu ở nồng độ 2mg/l TDZ đạt 3,53 chồi, sau đó nếu tiếp tục tăng nồng độ TDZ lên 3mg/l số chồi giảm xuống còn 3,20 chồi. Kết quả trên cho

thấy, việc bổ sung nồng độ TDZ quá cao vào môi trường nuôi cấy không những không có lợi cho việc thúc đẩy sự hình thành chồi mới mà còn gây lãng phí hóa chất và không mang lại hiệu quả kinh tế cao. Nồng độ 2mg/l TDZ thích hợp nhất cho sự hình thành chồi, nếu nồng độ vượt lên cao hơn nữa thì số chồi giảm.

Môi trường WPM có bổ sung 2mg/l TDZ thích hợp nhất cho quá trình nhân chồi Trà my hoa đỏ.





Hình 2. Sự sinh trưởng và phát triển của chồi Trà my hoa đỏ trên các môi trường khác nhau sau 90 ngày nuôi cấy, A. trên các môi trường khoáng khác nhau, B. trên môi trường bổ sung BA ở các nồng độ khác nhau, C. trên môi trường có bổ sung TDZ ở các nồng độ khác nhau.

3.3. Giai đoạn tạo rễ

Ảnh hưởng của IBA và NAA lên quá trình tạo rễ cây Trà my hoa đỏ

Bảng 5. Các chỉ tiêu sinh trưởng của cây Trà my hoa đỏ trên môi trường có bổ sung IBA và NAA ở các nồng độ khác nhau sau 30 ngày nuôi cấy

Nghiệm thức	Tỉ lệ ra rễ (%)	Số lá/mẫu cây	Số rễ/mẫu cây	Số đốt/mẫu cây	Chiều cao cây (cm)	Chiều dài rễ (cm)	Trọng lượng tươi (mg)
0mg/l IBA+0mg/l NAA	0 ^b	6,6 ^f	0,0 ⁱ	5,4 ^g	3,37 ⁱ	0 ^g	51,04 ⁱ
1mg/l IBA+0,1mg/l NAA	0 ^b	6,8 ^f	0,0 ⁱ	5,67 ^{fg}	3,51 ^{gh}	0 ^g	88,05 ^{de}
3mg/l IBA+0,1mg/l NAA	100 ^a	8,07 ^e	8,30 ^{ef}	6,13 ^{cdef}	3,73 ^{cd}	1,30 ^f	73,64 ^h
5mg/l IBA+0,1mg/l NAA	100 ^a	9,27 ^{abc}	6,70 ^f	5,93 ^{defg}	3,47 ^h	1,91 ^b	76,49 ^{gh}
7mg/l IBA+0,1mg/l NAA	100 ^a	8,6 ^{cde}	9,80 ^{de}	6,4 ^{abcde}	3,63 ^{ef}	1,36 ^{ef}	77,36 ^{fgh}
1mg/l IBA+0,3mg/l NAA	0 ^b	6,87 ^f	0,0 ⁱ	5,87 ^{efg}	3,52 ^{gh}	0 ^g	77,47 ^{fgh}

3mg/l IBA+0,3mg/l NAA	100 ^a	8,2 ^{de}	11,30 ^{bcd}	6,20 ^{bcdef}	3,77 ^{bc}	1,33 ^{ef}	86,67 ^{de}
5mg/l IBA+0,3mg/l NAA	100 ^a	9,73 ^a	12,30 ^{abc}	6,27 ^{abcd}	3,73 ^{de}	1,94 ^{ab}	110,70 ^b
7mg/l IBA+0,3mg/l NAA	100 ^a	8,87 ^{bcd}	8,20 ^{ef}	6,73 ^{ab}	3,85 ^b	1,45 ^d	51,60 ⁱ
1mg/l IBA+0,5mg/l NAA	0 ^b	6,87 ^f	12,70 ^{ab}	5,93 ^{defg}	3,55 ^{fgh}	0 ^g	101,29 ^c
3mg/l IBA+0,5mg/l NAA	100 ^a	8,27 ^{de}	10,40 ^d	6,4 ^{abcde}	3,73 ^{cd}	1,39 ^{de}	90,54 ^d
5mg/l IBA+0,5mg/l NAA	100 ^a	9,53 ^{ab}	14,00 ^a	6,6 ^{abc}	3,96 ^a	2,01 ^a	132,03 ^a
7mg/l IBA+0,5mg/l NAA	100 ^a	8,67 ^{cde}	6,50 ^f	6,6 ^{abc}	3,75 ^{cd}	1,38 ^{def}	70,00 ^h
1mg/l IBA+1mg/l NAA	0 ^b	7,0 ^f	0,0 ⁱ	6,0 ^{def}	3,66 ^{de}	0 ^g	82,33 ^{efg}
3mg/l IBA+1mg/l NAA	100 ^a	10,4 ^{de}	11,60 ^{bcd}	8,8 ^a	3,66 ^{de}	1,57 ^c	84,50 ^{def}
5mg/l IBA+1mg/l NAA	100 ^a	10,4 ^{de}	11,30 ^{bcd}	8,47 ^{abcd}	3,66 ^{de}	1,46 ^d	84,38 ^{def}
7mg/l IBA+1mg/l NAA	100 ^a	10,4 ^{de}	7,70 ^g	8,2 ^{bcdef}	3,59 ^{efg}	1,33 ^{ef}	70,81 ^h

Chú thích: *: trong mỗi cột có ít nhất một ký tự giống nhau thì sự khác biệt giữa các nghiệm thức không có ý nghĩa bởi sự phân hạng của Duncan's Mutiple Range Test ở mức $p \leq 0,05$

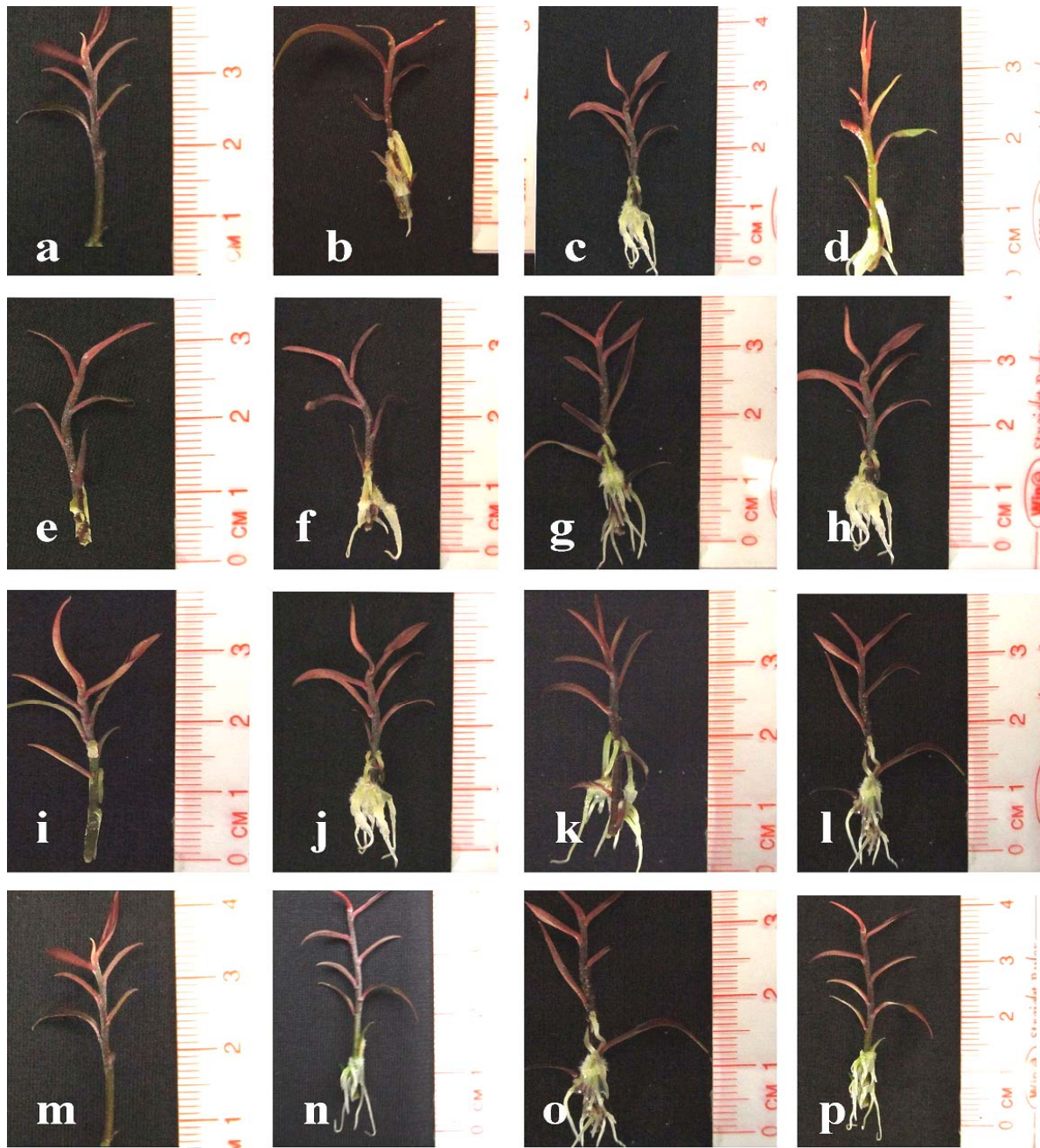
Kết quả trình bày trong Bảng 5 và Hình 3 cho thấy sự bổ sung IBA và NAA ở các nồng độ khác nhau có ảnh hưởng lớn đến sự hình thành số lá, số rễ, số đốt, chiều cao cây, chiều dài rễ khối lượng tươi và tỷ lệ ra rễ của cây Trà my hoa đỏ.

Sự bổ sung IBA và NAA vào môi trường nuôi cấy có tác động rất lớn đến sự hình thành số rễ trong mẫu cấy. NAA và IBA có sự tương tác và cùng tác động lên quá trình hình thành rễ. Tất cả các môi trường có bổ sung nồng độ 3mg/l IBA trở lên đều kích thích sự hình thành rễ bất định từ chồi, các rễ trắng, khỏe mạnh, lông hút phát triển tốt so với môi trường đối chứng không bổ sung IBA và NAA thì hầu như không có mẫu nào tạo rễ. Môi trường có bổ sung 5mg/l IBA và 0,5mg/l NAA là môi trường tạo rễ nhiều nhất, các rễ khỏe mạnh, có màu trắng và có hệ thống lông hút phát triển. Trong cùng điều kiện và nồng độ NAA thì sự bổ sung các nồng độ IBA khác nhau có ảnh hưởng lớn đến số rễ trên chồi. Ở nồng độ 5mg/l IBA là thích hợp nhất cho sự hình thành số lượng rễ trên mẫu. Tuy nhiên, căn cứ vào quá trình quan sát và lấy số liệu cho thấy ở nồng độ 7mg/l IBA các mẫu có dấu hiệu hình thành nhiều mầm rễ ngay cả trên đoạn thân. Hiện tượng này cho thấy nồng độ 7mg/l IBA là quá cao cho sự hình

thành rễ. Trong khi đó, môi trường sử dụng 5mg/l IBA cây sinh trưởng và phát triển bình thường, nếu dùng nồng độ IBA lớn hơn 5mg/l là không hiệu quả và gây lãng phí. Ở nồng độ IBA cao rễ có khuynh hướng ngừng lại và có xu hướng hình thành mô sẹo.

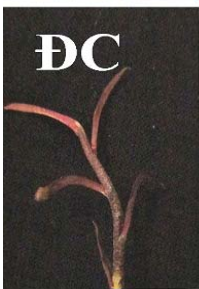
Kết quả này cũng tương tự như một số nghiên cứu khác trên cây trà my như: cây *Camellia sinensis* ra rễ trên môi trường 1/2 MS lỏng, lắc 70 vòng/phút có bổ sung 3mg/l IBA cho tần số tái sinh rễ 63,2%, có 13,8 trên mỗi chồi và chiều dài rễ đạt 0,5-1,5cm [7]. Hay trên cây *Camellia nitidissima* Chi ra rễ trên môi trường WPM bổ sung 5mg/l IBA và 0,05mg/l NAA cho 80% số chồi ra rễ, mỗi mẫu có 10,3 rễ [7]. Nghiên cứu của các tác giả trên cho thấy khi sử dụng nồng độ IBA cao cây có khuynh hướng tạo mô sẹo ở gốc, sự kết hợp giữa IBA và NAA làm gia tăng hiệu quả hình thành rễ của cây, việc sử dụng từng loại auxin riêng rẽ không phát huy tác dụng mạnh lên sự hình thành rễ bằng sự phối kết hợp các loại auxin khác nhau, trong thí nghiệm này sự phối hợp IBA và NAA cho kết quả tốt.

Từ những kết quả trên cho thấy, môi trường WPM có bổ sung 5mg/l IBA và 0,5mg/l NAA là thích hợp nhất cho quá trình ra rễ cây Trà my hoa đỏ (*Camellia piquetiana* (Pierre) Selly).



Hình 3. Sự hình thành rễ Trà my hoa đỏ trên môi trường có bổ sung các nồng độ IBA và NAA khác nhau.

Ghi chú: a:1mg/l IBA + 0,1 mg/l NAA; b: 3mg/l IBA + 0,1 mg/l NAA; c: 5mg/l IBA + 0,1 mg/l NAA; d: 7mg/l IBA + 0,1 mg/l NAA; e: 1mg/l IBA + 0,5 mg/l NAA; f: 3mg/l IBA + 0,5 mg/l NAA; g: 5mg/l IBA + 0,5 mg/l NAA; h: 7mg/l IBA + 0,5 mg/l NAA; i: 1mg/l IBA + 1 mg/l NAA; j: 3mg/l IBA + 1 mg/l NAA; k: 5mg/l IBA + 1 mg/l NAA; l: 7mg/l IBA + 1 mg/l NAA. m: 1mg/l IBA + 1 mg/l NAA; n: 3mg/l IBA + 1mg/l NAA; o: 5mg/l IBA + 1 mg/l NAA; p: 7mg/l IBA + 1mg/l NAA



4. Kết luận

Tỷ lệ nảy mầm của hạt Trà my hoa đỏ đạt cao nhất ở độ tuổi 30 ngày.

Môi trường khoáng thích hợp nhất cho sự sinh trưởng và phát triển các chồi cây Trà my hoa đỏ *in vitro* là môi trường WPM có bổ sung 30g/l sucrose, 8g/l agar, 1g/l than hoạt tính.

Môi trường thích hợp nhất cho giai đoạn nhân nhanh chồi Trà my hoa đỏ *in vitro* là môi trường WPM có bổ sung 2mg/l TDZ.

Môi trường thích hợp nhất cho giai đoạn tạo rễ cây Trà my hoa đỏ *in vitro* là môi trường WPM có bổ sung 5mg/l IBA và 0,5 NAA.

Tài liệu tham khảo

- [1] Phạm Hoàng Hộ (1993). *Cây cỏ Việt Nam*. Nhà xuất bản trẻ.
- [2] Nguyễn Văn Kết, Lương Văn Dũng, Võ Duẩn (2013). Đa dạng các loài Trà mi (*Camellia*) ở Lâm Đồng. *Hội thảo quốc tế, Khoa học và Công nghệ*

- phục vụ phát triển sản xuất nông nghiệp công nghệ cao tỉnh Lâm Đồng. 93-96.
- [3] Vũ Văn Vụ (2000). *Sinh lý thực vật*. Nhà xuất bản Giáo dục.
 - Gerald, C., Marie, k., Kelly C., Pullman, R., (2006), Loblolly pine (*Pinus taeda* L.) somatic embryogenesis: Improvements in embryogenic tissue initiation by supplementation of medium with organic acids, Vitamins B12 and E, *Plant Science*, Vol. 170, Issue 3, Pages 648-658.
 - [4] ShuoHao Huang, HaiBin Zeng, JianYun Zhang, Shu Wei, LongQuan Huang (2011) Interconversions of different forms of vitamin B6 in tobacco plants. *Phytoch.*, Vol. 72, Issue 17, Pages 2124 -2129.
 - [5] Võ Thị Thu Hà (2004). Nghiên cứu qui trình nhân giống các dòng *Camellia sinensis* (L) O. Kuntze năng suất cao ở lâm đồng bằng kỹ thuật nuôi cấy mô *in vitro*. *Luận văn thạc sỹ - Sinh học Thực nghiệm*, Đại học Đà Lạt.
 - [6] Jinfeng Lü, Rong Chen, Muhan Zhang, Jaime A. Teixeira da Silva, Guohua Ma (2013), Plant regeneration via somatic embryogenesis and shoot ^{esis} *nitidissima* Chi, *J. of Plant Physiol.*, Vol. 170, Pages 120-121.
 - [7] Kowallik W. (1982). Blue light effects on respiration. *Annu. Rev. Plant physiol.* 33:51-72.

Propagation of *Camellia piquetiana* (Pierre) Sealy *in vitro*

Nguyễn Văn Kết¹, Nguyễn Thị Cúc¹, Nguyễn Trung Thành²

¹Dalat University, 01 Phù Đổng Thiên Vương, Đà Lạt, Vietnam

²Faculty of Biology, VNU University of Science, 334 Nguyễn Trãi, Hanoi, Vietnam

Abstract: Seeds of *Camellia piquetiana* Sealy in different ages were collected at Đa Hoai district, Lâm Đồng province disinfected with a solution of calcium hypochlorite (Ca(OCl)₂) 7% and 6% in 20 minutes, followed by culturing on MS media supplemented with 0.5 mg/l BA, 30 g/l sucrose and 1g/l activated charcoal, after 60 days of culture, 30-day-old seeds the rate of germination of seed germination are the highest and germination time is the earliest. The shoots were cultured on 5 different types of minerals medium to determine the mineral composition suitable, after appropriate minerals medium continue examining additional levels of plant growth regulator stimulants BA and TDZ to determine the concentration of growth stimulants suitable for creating shoots. This result showed that WPM environment is most suitable medium for the growth and development of *Camellia piquetiana* Sealy. WPM media supplemented with 2 mg/l TDZ was the most suitable medium for the formation of shoots (3.53 shoots/explant). The shoots were cultured on medium change different concentrations of IBA (1, 3, 5 and 7 mg/l) and NAA (0.1; 0.3; 0.5 and 1 mg/l), the results after 30 days of culture showed that WPM media supplemented with 5 mg/l IBA + 0,5 mg/l NAA is the most optimal medium for rooting (14 roots/shoot).

Keywords: *in vitro*, Propagation, *Camellia*.