

## NGHIÊN CỨU SỰ HÌNH THÀNH MÔ SẸO VÀ TẾ BÀO ĐƠN CÂY KIWI (*Actinidia deliciosa*)

Dương Tấn Nhựt\*, Trần Thị Thu Hà, Trịnh Thị Hương,  
Hoàng Văn Cường, Nguyễn Phúc Huy

Viện Sinh học Tây Nguyên, \* duongtannhut@gmail.com

**TÓM TẮT:** Nghiên cứu này được thực hiện nhằm khảo sát quá trình tạo mô sẹo và ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng, pH môi trường, nồng độ đường và thể tích môi trường đến việc nuôi cấy tế bào đơn cây Kiwi *in vitro*. Kết quả nghiên cứu cho thấy, các mẫu lá cây Kiwi *in vitro* có kích thước 1×1 cm cho khối lượng tươi và khối lượng khô mô sẹo tốt nhất khi nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung 0,8 mg/l 2,4-D, mẫu lá đặt úp cho khối lượng tươi (0,99 g/bình) và khối lượng khô (0,067 g/bình) mô sẹo tạo thành nhiều hơn so với mẫu lá đặt ngửa tương ứng là 0,82 g/bình và 0,055 g/bình. Số tế bào đơn thu được cao nhất là 342 tế bào/μl sau 16 ngày nuôi cấy; 0,8 g mô sẹo trong 20 ml môi trường MS lỏng có bổ sung 0,6 mg/l 2,4-D; 60 g/l sucrose và pH môi trường là 6,1. Nghiên cứu này sẽ là tiền đề cho các nghiên cứu về tế bào đơn kiwi sau này.

*Từ khóa:* *Actinidia deliciosa*, huyền phù tế bào, kiwi, mô sẹo, tế bào đơn, 2,4-D.

### MỞ ĐẦU

Nuôi cấy tế bào đơn hay huyền phù tế bào là phương pháp nuôi cấy thường được sử dụng ở nhiều loài thực vật nhằm thu nhận các hợp chất thứ cấp nói chung và alkaloid nói riêng [1]. Bên cạnh đó, việc nuôi cấy tế bào đơn còn được sử dụng với nhiều mục đích khác nhau bởi những thuận lợi như: điều kiện nuôi cấy có thể được kiểm soát, từ đó có thể tối ưu cho việc sản xuất các sản phẩm trao đổi chất thứ cấp; tế bào có thể được chọn lọc và cải thiện bằng cách nhân dòng, gây đột biến hoặc biệt hóa bằng phương pháp hóa học hoặc sinh học; có thể dễ dàng nghiên cứu chuyển hóa các chất trong tế bào và cơ chế của sản phẩm trao đổi chất thứ cấp. Hiện nay, đã có nhiều công bố nghiên cứu về nuôi cấy tế bào đơn ở nhiều loài thực vật khác nhau. Teng (1997) [8] đã tái sinh thành công cây Lan ô rỗng (*Platyserium bifurcatum*) từ huyền phù tế bào lá. Nistri & Somporn (2009) [5] đã tái sinh thành công cây *Vetiveria zizanioides* L. từ huyền phù tế bào thông qua mô sẹo từ nuôi cấy phát hoa.

Kiwi (*Actinidia deliciosa*) là loại quả có nhiều chất dinh dưỡng, giàu vitamin A, vitamin E, vitamin C, chất xơ, kali, đồng, magiê, mangan và axit béo omega-3, phytonutrient; mang lại nhiều lợi ích cho sức khỏe như chống các chứng bệnh béo phì, ung thư, bệnh tim, ngăn ngừa bệnh

tiểu đường và cải thiện bệnh hen suyễn ở trẻ em. Hiện nay, kiwi được trồng rộng rãi và trở thành một loại cây thương mại hóa trên thế giới. Tại Việt Nam, những vùng có khí hậu ôn hòa như Đà Lạt, Sa Pa có thể thích hợp để trồng loại cây này. Tuy nhiên, ở Việt Nam loài cây có giá trị này chưa được trồng phổ biến mà chủ yếu được nhập khẩu nên giá bán trên thị trường rất cao, cũng vì vậy, ở Việt Nam còn ít người biết đến loại quả này. Với mong muốn kiwi trở nên phổ biến ở Việt Nam cũng như giảm giá thành, chúng tôi tiến hành nhân giống cây Kiwi bằng phương pháp vô tính nhằm tạo ra số lượng lớn giống cây này phục vụ cho việc trồng thử ở Việt Nam. Tuy nhiên, các nghiên cứu hiện nay mới chỉ dừng lại ở nhân giống cây Kiwi từ nuôi cấy đỉnh sinh trưởng, nuôi cấy chồi bên của thân non hay các lá non, gieo từ hạt... mà chưa có nghiên cứu nào thực hiện trong việc nhân giống cây Kiwi từ nuôi cấy tế bào đơn, một phương pháp nhân giống cho hệ số nhân cao.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành khảo sát ảnh hưởng của một số yếu tố lên khả năng tạo mô sẹo từ mẫu lá và quá trình nuôi cấy tế bào đơn cây Kiwi *in vitro* nhằm tìm ra một số điều kiện thích hợp cho quá trình nuôi cấy tế bào đơn cũng như tạo tiền đề cho các nghiên cứu tiếp theo trên đối tượng này.

### VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

## Vật liệu

Nguồn mẫu ban đầu là các cây Kiwi (*Actinidia deliciosa*) *in vitro* 8 tuần tuổi có tại phòng Sinh học Phân tử và Chọn tạo giống cây trồng, Viện Sinh học Tây Nguyên.

## Môi trường nuôi cấy

Môi trường nuôi cấy được sử dụng trong nghiên cứu này là môi trường MS [4] có bổ sung 30 g/l sucrose (ngoại trừ thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của sucrose trở về sau), 8 g/l agar (hoặc không bổ sung agar đối với môi trường nuôi cấy lỏng lác) và các chất điều hòa sinh trưởng thực vật (tùy vào mục đích thí nghiệm).

Tất cả môi trường nuôi cấy được điều chỉnh pH về khoảng 5,7-5,8 (trừ thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của pH trở về sau) trước khi hấp khử trùng ở nhiệt độ 121°C, áp suất 1 atm trong 30 phút.

## Điều kiện nuôi cấy

Tất cả các mẫu thí nghiệm được nuôi cấy trong điều kiện với: thời gian chiếu sáng là 16 giờ/ngày; nhiệt độ là  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ; cường độ chiếu sáng 2.500-3.000 lux và độ ẩm trung bình là 75-80%.

## Phương pháp thí nghiệm

### Hệ thống nuôi cấy lỏng lác

Dung dịch huyền phù tế bào được nuôi trong các bình 250 ml và đặt trên hệ thống máy lắc (Orbital Shaker SO1, Hoa Kỳ) với tốc độ lắc 100 vòng/phút.

### Xác định mật độ tế bào

Pha loãng dung dịch huyền phù tế bào 2 lần hoặc 5 lần tùy theo từng giai đoạn phát triển của tế bào. Sau đó, hút 5 hoặc 10  $\mu\text{l}$  dung dịch huyền phù tế bào đã pha loãng bằng pipette rồi nhỏ lên lam kính. Tiếp theo, đặt lamelle lên giọt huyền phù tế bào. Cuối cùng, quan sát tế bào dưới kính hiển vi và đếm mật độ tế bào ở vật kính  $\times 10$ .

### Xác định khối lượng tươi sinh khối tế bào

Đầu tiên, cân ống eppendorf; sau đó hút 1 ml dịch huyền phù tế bào cho vào mỗi ống eppendorf. Sinh khối huyền phù tế bào được ly tâm với tốc độ 6.000 vòng/phút trong 20 phút bằng máy ly tâm (Hermle Z233 MK-2, Đức).

Nhẹ nhàng hút bỏ dịch nổi, giữ lại phần lắng đã được ly tâm và đem đi cân ống eppendorf có chứa sinh khối tế bào lắng ở đáy ống (hình 6D, E, F, G). Khối lượng tươi sinh khối là độ chênh lệch khối lượng giữa hai lần cân.

### Xác định khối lượng khô sinh khối tế bào

Ống eppendorf có chứa dịch huyền phù tế bào sau khi đã ly tâm và hút dịch nổi ở trên được đem đi cân, sau đó sấy trong tủ sấy (Sanyo, Nhật Bản) ở nhiệt độ 45°C cho đến khi khối lượng eppendorf không đổi và đem đi cân ống eppendorf. Khối lượng khô sinh khối là độ chênh lệch khối lượng giữa ống eppendorf lúc đầu và sau khi sấy.

### Bố trí thí nghiệm

*Khảo sát ảnh hưởng của 2,4-D lên sự hình thành mô sẹo từ mẫu lá cây Kiwi in vitro*

Các mẫu lá cây Kiwi *in vitro* được cắt với kích thước 1×1 cm, sau đó cấy vào môi trường MS có bổ sung 30 g/l sucrose, 8 g/l agar và 2,4-D với các nồng độ khác nhau (0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 và 1,0 mg/l).

*Khảo sát ảnh hưởng của cách đặt mẫu lá lên khả năng tạo mô sẹo từ mẫu lá cây Kiwi in vitro*

Các mẫu lá cây Kiwi *in vitro* được cắt với kích thước 1×1 cm, sau đó đặt úp (mặt gân lá hướng lên trên) hoặc đặt ngửa (mặt gân lá tiếp xúc với bề mặt môi trường) trên môi trường MS có bổ sung 30 g/l sucrose, 8 g/l agar với nồng độ 2,4-D tốt nhất ở thí nghiệm trên.

*Khảo sát ảnh hưởng của 2,4-D lên khả năng sinh trưởng và phát triển của tế bào mô sẹo trong quá trình nuôi cấy lỏng lác*

Cây 0,8 g mô sẹo vào môi trường MS lỏng có bổ sung 30 g/l sucrose và 2,4-D ở các nồng độ khác nhau (0,2; 0,4; 0,6; 0,8 và 1,0 mg/l).

*Khảo sát ảnh hưởng của pH đến khả năng sinh trưởng và phát triển của tế bào mô sẹo trong quá trình nuôi cấy lỏng lác*

Cây 0,8 g mô sẹo vào môi trường MS lỏng có bổ sung 30 g/l sucrose, nồng độ 2,4-D tốt nhất ở thí nghiệm trên và pH môi trường được điều chỉnh về 4,9; 5,2; 5,5; 5,8; 6,1; 6,4 hoặc 6,7.

*Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ sucrose đến khả năng sinh trưởng và phát triển của tế bào mô sẹo trong quá trình nuôi cấy lỏng lác*

Cây 0,8 g mô sẹo vào môi trường MS lỏng có bổ sung nồng độ 2,4-D tốt nhất, pH thích hợp thu được ở thí nghiệm trên và đường sucrose ở các nồng độ khác nhau (20, 30, 40, 50, 60, 70 và 80 g/l).

*Khảo sát ảnh hưởng của thể tích môi trường đến khả năng sinh trưởng và phát triển của tế bào mô sẹo trong quá trình nuôi cấy lỏng lác*

Cây 0,8 g mô sẹo vào môi trường MS lỏng có bổ sung 2,4-D, sucrose, pH tốt nhất thu được ở thí nghiệm trên với các thể tích môi trường nuôi cấy khác nhau (10, 20, 30 và 40 ml). Bình nuôi cấy được sử dụng có thể tích 250 ml.

*Xác định đường cong sinh trưởng của tế bào*

Mô sẹo được cấy vào môi trường MS lỏng có bổ sung 2,4-D, sucrose, pH và thể tích môi trường thích hợp nhất ở các thí nghiệm trên.

## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### Ảnh hưởng của 2,4-D lên sự hình thành mô sẹo từ mẫu lá cây Kiwi *in vitro*

Các chất điều hòa sinh trưởng thực vật là

thành phần quan trọng của môi trường nuôi cấy. Trong số các auxin, 2,4-D sử dụng rất có hiệu quả trong việc tạo mô sẹo ở nhiều loài thực vật.

Kết quả thu được cho thấy, tỷ lệ mẫu hình thành mô sẹo ở tất cả các thí nghiệm có bổ sung 2,4-D đều đạt 100%, còn ở môi trường không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng thì không có mẫu nào phát sinh mô sẹo (bảng 1, hình 6A).

Sau 2 tuần nuôi cấy, các mẫu cấy bắt đầu cảm ứng hình thành mô sẹo. Mô sẹo ban đầu phân bố ở vùng gân chính, sau đó là ở gân hai bên rồi hình thành ở xung quanh rìa lá, ngay vết cắt. Ứng với mỗi nồng độ của 2,4-D khác nhau thì khả năng tạo mô sẹo cũng khác nhau. Sau 4 tuần nuôi cấy, giữa các công thức đã có sự chênh lệch về khối lượng tươi, khối lượng khô (bảng 1). Ở nồng độ 0,8 mg/l 2,4-D cho các chỉ tiêu về khối lượng tươi, khối lượng khô là lớn nhất (khối lượng tươi đạt 0,99 g/mẫu; khối lượng khô đạt 0,067 g/mẫu). Khối lượng tươi và khối lượng khô của mô sẹo ở các nồng độ còn lại (0,2; 0,4; 0,6 và 1,0 mg/l 2,4-D) không có sự khác biệt nhau rõ ràng (bảng 1).

*Bảng 1. Ảnh hưởng của 2,4-D lên khả năng tạo mô sẹo từ mẫu lá cây Kiwi nuôi cấy *in vitro* sau 4 tuần nuôi cấy*

Nồng độ 2,4-D (mg/l)	Tỷ lệ mẫu tạo sẹo (%)	Khối lượng tươi (g/bình)	Khối lượng khô (g/bình)	Hình thái mô sẹo
0	0	0,21c	0,019c	Mô sẹo không hình thành
0,2	100a*	0,58b	0,049b	Mô sẹo màu trắng đục, cứng
0,4	100a	0,67b	0,054b	Mô sẹo màu trắng đục, cứng
0,6	100a	0,80b	0,055b	Mô sẹo màu trắng xanh, hơi mềm
0,8	100a	0,99a	0,067a	Mô sẹo màu xanh trong, xốp, mọng nước
1,0	100a	0,53b	0,049b	Mô sẹo màu trắng, cứng

\*Các mẫu tự khác nhau (a, b, c) biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa với  $P = 0,05$  bằng phép thử Duncan.

Ngoài ra, hình thái của các mô sẹo được tạo thành ở các nồng độ cũng có sự khác biệt khá rõ rệt (hình 6A). Mô sẹo hình thành ở nồng độ 0,2; 0,4 và 1,0 mg/l 2,4-D có màu trắng đục, cứng. Mô sẹo hình thành ở nồng độ 0,6 mg/l 2,4-D thì có màu xanh nhạt, trong, mềm. Trong khi đó, các mô sẹo thu được ở nồng độ 0,8 mg/l 2,4-D có màu xanh trong, mềm, xốp, rất thích hợp để làm nguyên liệu cho nuôi cấy lỏng lác [6] (hình 6B). Hình thái này của mô sẹo còn được duy trì

tới khoảng 12 ngày nuôi cấy tiếp theo.

Từ những kết quả thu được ở trên, ta thấy môi trường MS có bổ sung 0,8 mg/l 2,4-D sau 4 tuần nuôi cấy là thích hợp để tạo mô sẹo từ mẫu lá cây Kiwi *in vitro*, vì vậy chúng tôi sử dụng môi trường này cho thí nghiệm tiếp theo.

### Ảnh hưởng của cách đặt mẫu lá lên khả năng tạo mô sẹo

Sau 4 tuần nuôi cấy, các mẫu đặt úp và giữa

đều cho tỷ lệ tạo mô sẹo đạt 100% (bảng 2). Tuy nhiên, các mẫu cây lá đặt úp cho khối lượng tươi và khối lượng khô của mô sẹo hình thành cao hơn so với các mẫu cây được đặt ngửa.

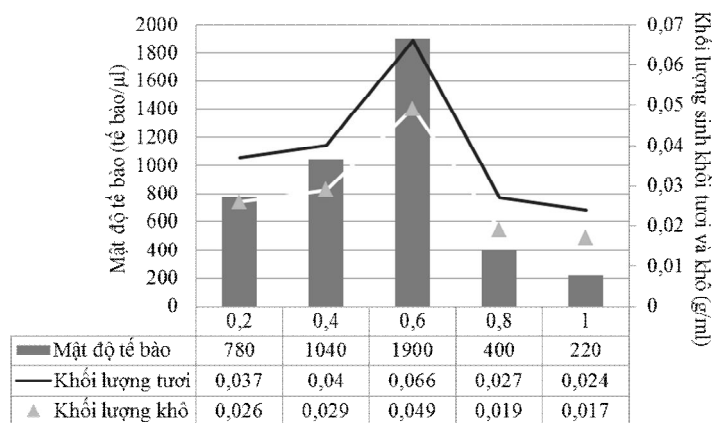
Sau 12 ngày nuôi cấy, các mẫu lá bắt đầu khởi tạo mô sẹo. Đối với mẫu cây đặt úp, các mô sẹo được tạo thành từ gân chính của lá đến các gân phụ rồi dần tới phần còn lại của vết cắt ở lá. Đối với mẫu cây đặt ngửa, quá trình khởi tạo mô sẹo cũng giống với mẫu lá đặt úp, tuy nhiên, đồng thời với quá trình cảm ứng tạo mô sẹo là sự uốn cong của mẫu lá. Hiện tượng này xảy ra có thể là do tính hữu cực của mẫu cây. Bề mặt trên của lá gồm những tế bào thịt lá có dạng hình bầu dục, xếp thẳng đứng sát nhau với chức năng chính là tổng hợp các chất hữu cơ. Trong khi đó, bề mặt dưới gồm các tế bào thịt lá có dạng hình tròn, sắp xếp lộn xộn không sát

nhau, tạo thành nhiều khoang chứa khí với chức năng chính là chứa và trao đổi khí. Việc đặt úp lá trên bề mặt môi trường tạo điều kiện cho sự hấp thụ và chuyển hóa các chất dinh dưỡng ở bề mặt trên và sự vận chuyển nước thông qua lực mao dẫn. Đồng thời bề mặt dưới của lá được tiếp xúc trực tiếp với không khí trong bình nuôi cấy, tạo điều kiện cho quá trình trao đổi khí và thúc đẩy sự vận chuyển chất dinh dưỡng. Khi đặt ngửa, lá sẽ có chiều hướng phát triển theo hướng có lợi nhất cho sự hấp thụ và vận chuyển các chất dinh dưỡng bằng cách hướng bề mặt trên của lá xuống môi trường, điều này gây ra sự bẻ cong của mẫu lá.

Như vậy, các mẫu cây lá non được nuôi cấy đặt úp trên bề mặt môi trường cho lượng mô sẹo tạo thành cao hơn so với các mẫu cây được đặt ngửa bề mặt lá.

Bảng 2. Ảnh hưởng của cách đặt mẫu lá lên khả năng tạo mô sẹo sau 4 tuần nuôi cấy

Cách đặt mẫu	Tỷ lệ mẫu hình thành sẹo (%)	Khối lượng tươi (g/bình)	Khối lượng khô (g/bình)	Hình thái mô sẹo
Ngửa	100	0,82	0,055	Trắng, mọng nước
Úp	100	0,99	0,067	Trắng, mọng nước



Hình 1. Ảnh hưởng của các nồng độ 2,4-D khác nhau lên mật độ tế bào (N), khối lượng tươi (FW) và khối lượng khô (DW) của sinh khối tế bào kiwi trong môi trường MS lỏng lắc sau 21 ngày nuôi cấy

**Ảnh hưởng của 2,4-D lên khả năng sinh trưởng và phát triển của tế bào mô sẹo trong quá trình nuôi cấy lỏng lắc**

Sau 21 ngày nuôi cấy, khả năng sinh trưởng của tế bào ở công thức có bổ sung 0,6 mg/l 2,4-D cao hơn hẳn so với các công thức khác (hình 1).

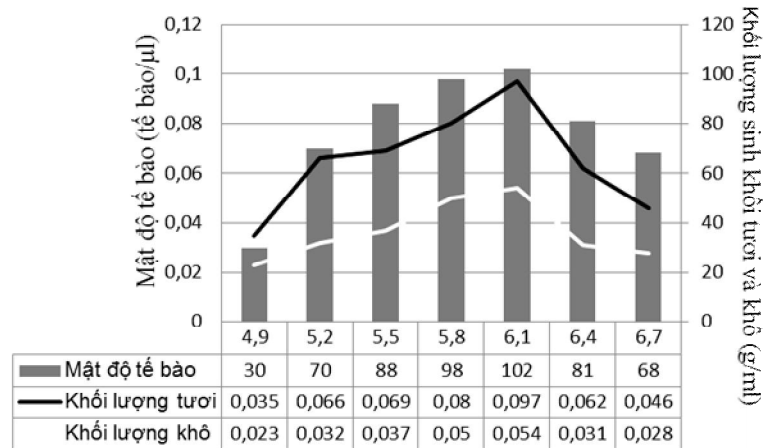
Khi tăng nồng độ của 2,4-D lên từ 0,2 đến 0,6 mg/l, mật độ tế bào, khối lượng tươi, khối lượng khô sinh khối tế bào thu được cũng tăng dần và các tế bào tồn tại đa số ở dạng cụm tế bào (5-10 tế bào). Điều này có thể giải thích là do tế bào tăng sinh quá nhanh trong khi tốc độ tách rời các tế bào do chuyển động lắc của môi trường

không theo kịp sự tăng sinh của tế bào dẫn đến tế bào kết tụ thành từng cụm ngày càng nhiều. Tuy nhiên, khi nồng độ 2,4-D vượt quá 0,6 mg/l, sự sinh trưởng, phát triển của tế bào lại giảm xuống. Hình thái của các tế bào giữa các công thức là giống nhau. Tế bào đa số có hình cầu, một số ít có hình bầu dục. Kích thước của các tế bào giữa các công thức cũng tương đồng nhau. Do đó, nồng độ 2,4-D thích hợp nhất cho nuôi cấy lỏng lác tế bào kiwi là 0,6 mg/l.

### Ảnh hưởng của pH lên khả năng sinh trưởng và phát triển của tế bào mô sẹo trong quá trình nuôi cấy lỏng lác

Độ pH ảnh hưởng đến sự di chuyển của các ion, sự hấp thụ chất dinh dưỡng giữa mô tế bào thực vật với môi trường. Dougall (1980) [2] đã thông qua các tài liệu liên quan đến sự thay đổi pH *in vitro* và tác giả cho rằng, sự thay đổi này

là do sự hấp thụ amoni và nitrate từ môi trường nuôi cấy. Dougall đã chứng minh rằng pH ban đầu của môi trường có thể ảnh hưởng đến pH môi trường sau khi cấy do ảnh hưởng đến tốc độ hấp thụ nitrate và amoni. Khi tế bào thực vật hấp thụ amoni, một ion  $H^+$  được giải phóng làm cho pH môi trường giảm xuống. Sự thay đổi pH của môi trường lỏng và môi trường rắn là khác nhau. Trong nghiên cứu của Skirvin et al. (1986) [7], môi trường MS rắn và MS lỏng có pH ở 5,7 thì sau khi hấp 1 tuần, pH có giá trị lần lượt là 4,6 và 4,4. Sau 6 tuần, pH giảm xuống là 4,4 đối với môi trường rắn và 4,1 đối với môi trường lỏng. Như vậy, sau khi hấp, giá trị pH thay đổi nhiều hơn trong môi trường lỏng, môi trường trở nên axit hơn. Vì vậy, pH tối ưu cho mô tế bào thực vật trên môi trường lỏng và rắn không giống nhau.



Hình 2. Ảnh hưởng của pH lên mật độ tế bào (N), khối lượng tươi (FW) và khối lượng khô (DW) của sinh khối tế bào trong môi trường MS lỏng lác sau 21 ngày nuôi cấy

Kết quả thu được sau 21 ngày nuôi cấy cho thấy, khi tăng pH môi trường từ 4,9 đến 6,1, mật độ tế bào, khối lượng tươi và khối lượng khô sinh khối tế bào thu được tăng dần (hình 2). Sự thay đổi pH cũng có khả năng gây ra sự xâm nhập tự do của ion  $H^+$  vào thành tế bào, tạo ra pH tối ưu cho hoạt động của enzyme nối lỏng thành tế bào [7]. Ion  $H^+$  trong môi trường sẽ xâm nhập vào thành tế bào, hoạt hóa enzyme phân hủy các polysacarit liên kết giữa các sợi cellulose làm cho chúng lỏng lẻo và tạo điều kiện cho thành tế bào giãn dưới tác dụng của áp suất thẩm thấu của không bào trung tâm, kích

thích sự sinh trưởng của tế bào. Khi pH môi trường cao hơn 6,1, mật độ tế bào, khối lượng tươi và khối lượng khô của sinh khối tế bào giảm xuống. Điều này là do pH môi trường quá thấp hoặc quá cao làm giảm khả năng hấp thụ chất dinh dưỡng của tế bào từ môi trường, dẫn tới tế bào tăng sinh chậm. Như vậy, pH môi trường thích hợp nhất cho nuôi cấy lỏng lác của tế bào kiwi là 6,1.

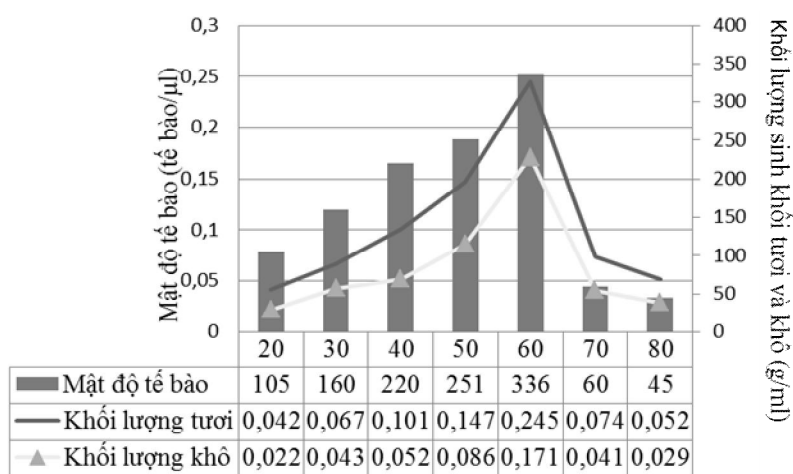
### Ảnh hưởng của nồng độ đường lên khả năng sinh trưởng và phát triển của tế bào mô sẹo trong quá trình nuôi cấy lỏng lác

Huyền phù tế bào hình thành từ mô sẹo có chứa các tế bào đơn và cụm tế bào nhỏ riêng lẻ trong môi trường lỏng lác. Khả năng sinh tổng hợp của các tế bào đơn và cụm tế bào nhỏ này có thể kém hơn so với các tế bào trong khối mô sẹo, chúng cũng yếu hơn về mặt cơ học, dễ chết hay bị vỡ, do đó nhu cầu dinh dưỡng của huyền phù tế bào khác so với nhu cầu dinh dưỡng của mô sẹo trong cùng một dòng. Vì vậy, một môi trường giàu nguồn năng lượng (đường) sẽ giúp tế bào phân chia và tăng trưởng tốt hơn. Đặc biệt, trong pha tăng trưởng tuyến tính, tế bào thực vật sẽ tổng hợp vách tế bào và tinh bột từ các nguồn đường có sẵn trong môi trường.

Kết quả thu được cho thấy, khi tăng nồng độ sucrose từ 20 đến 60 g/l, mật độ tế bào, khối lượng tươi và khối lượng khô sinh khối của tế bào thu được tăng dần. Khi nồng độ đường vượt quá 60 g/l, mật độ tế bào, khối lượng khô, khối lượng tươi sinh khối giảm (hình 3). Sự phân chia và tách rời các tế bào diễn ra trong quá trình nuôi cấy lỏng lác mô sẹo cây Kiwi rất cần

nguồn đường để tổng hợp các vật liệu mới cho vách tế bào và tích lũy tinh bột. Tuy nhiên, nồng độ đường quá cao có khả năng làm giảm hay thay đổi cân bằng các chất điều hòa tăng trưởng nội sinh trong cây. Mặc dù các tế bào đơn và cụm tế bào nhỏ chưa phải là cơ thể hoàn chỉnh song cũng chịu ảnh hưởng lớn bởi nồng độ đường quá cao. Nồng độ đường sucrose 60 g/l là thích hợp nhất cho sự phân chia và tăng trưởng của tế bào. Nếu nồng độ đường thấp hơn sẽ không đủ cung cấp nguồn hydratcarbon cho sự phân chia và tổng hợp vách tế bào. Mặt khác, ngoài vai trò làm nguồn hydratcarbon, đường còn là một nhân tố gây nên áp suất thẩm thấu [3]. Do đó, nồng độ sucrose cao hơn 60 g/l gây nên một áp suất thẩm thấu bất lợi cho sự tăng trưởng của tế bào huyền phù cây Kiwi, vì thế lượng tế bào huyền phù thu được kém hơn so với nồng độ 60 g/l.

Như vậy, nồng độ đường sucrose thích hợp nhất cho nuôi cấy lỏng lác tế bào là 60 g/l.



Hình 3. Ảnh hưởng của các nồng độ đường khác nhau lên mật độ tế bào (N), khối lượng tươi (FW) và khối lượng khô (DW) của sinh khối tế bào trong môi trường MS lỏng lác sau 21 ngày nuôi cấy

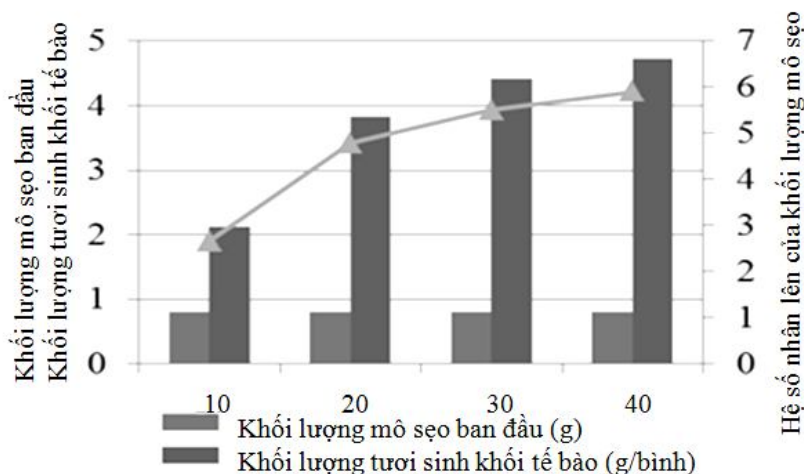
### Ảnh hưởng của thể tích môi trường lên khả năng sinh trưởng và phát triển của tế bào mô sẹo trong quá trình nuôi cấy lỏng lác

Sau 21 ngày nuôi cấy, sự tăng trưởng của tế bào trong môi trường lỏng lác được xác định qua hệ số nhân của khối lượng tế bào mô sẹo được thể hiện ở hình 4.

Kết quả cho thấy, càng tăng thể tích môi trường nuôi cấy thì khối lượng tươi sinh khối tế bào thu được càng tăng. Điều này có thể giải thích là do khi tăng thể tích môi trường, mật độ tế bào giảm dần, môi trường cung cấp đầy đủ hơn chất dinh dưỡng cho sự sinh trưởng và phát triển của tế bào, đồng thời khi tăng thể tích môi

trường, sản phẩm tiết ra từ quá trình trao đổi chất của tế bào tích lũy trong môi trường giảm, do đó, sự ức chế quá trình sinh trưởng và phát triển của tế bào gây ra bởi các chất này cũng

giảm dần, tốc độ phân chia của tế bào tăng lên, vì vậy, khối lượng tươi sinh khối tế bào thu được ngày càng tăng.



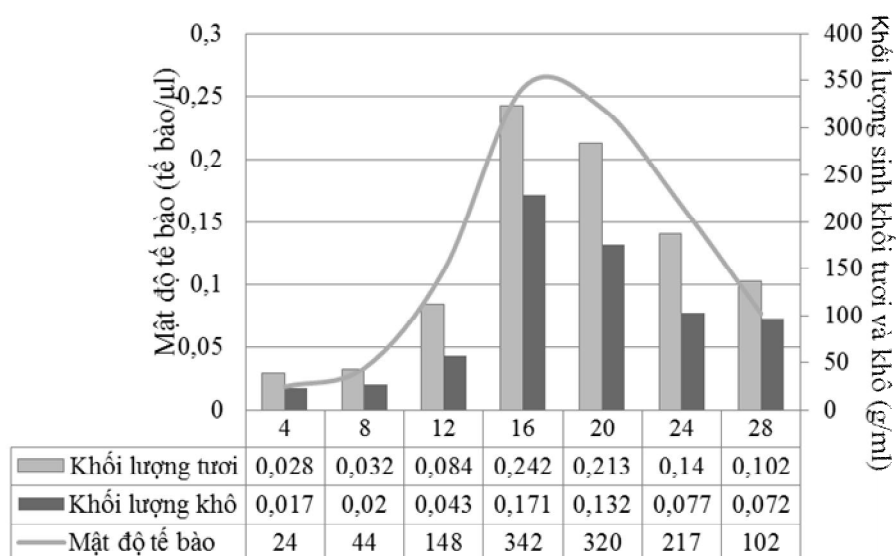
Hình 4. Ảnh hưởng của thể tích môi trường lên sự sinh trưởng và phát triển của tế bào mô sẹo trong quá trình nuôi cấy lỏng lác sau 21 ngày nuôi cấy

Hệ số nhân của sinh khối tế bào đạt cao nhất khi tăng thể tích môi trường nuôi cấy từ 10 ml lên 20 ml (2,65 lần ở môi trường có thể tích 10 ml tăng lên 4,78 ở môi trường có thể tích 20 ml). Khi tăng thể tích môi trường từ 20 ml lên 40 ml, khối lượng tươi sinh khối tế bào vẫn tiếp tục tăng nhưng tốc độ tăng chậm hơn nhiều so với khi tăng thể tích trong khoảng từ 10 ml lên 20 ml (chênh lệch về hệ số nhân giữa thể tích 10 ml và thể tích 20 ml là 2,13; chênh lệch về số nhân giữa thể tích 20 ml và thể tích 30 ml là 0,73; chênh lệch về hệ số nhân giữa thể tích 30 ml và thể tích 40 ml là 0,39) (hình 4). Mặt khác, nếu càng tăng thể tích môi trường thì càng tiêu tốn nhiều hơn về chi phí môi trường nuôi cấy, đồng thời khả năng bị tạp nhiễm vi sinh vật của môi trường càng cao do trong quá trình lác, môi trường dễ bị dính lên miệng bình. Vì vậy, để tiết kiệm chi phí cho môi trường nuôi cấy và giảm khả năng tạp nhiễm vi sinh vật, nên chọn môi trường có thể tích là 20 ml cho nuôi cấy 0,8 g mô sẹo trong bình nuôi có thể tích là 250 ml.

Tóm lại, với bình nuôi có thể tích 250 ml, thì thể tích môi trường tối ưu cho 0,8 g mô sẹo sinh trưởng và phát triển trong môi trường lỏng lác là 20 ml.

#### Xác định đường cong sinh trưởng của tế bào nuôi cấy *in vitro*

Trong thí nghiệm này, mô sẹo cây Kiwi được cấy sang môi trường có bổ sung 0,6 mg/l 2,4-D, 60 g/l sucrose, pH môi trường được điều chỉnh về 6,1 và thể tích môi trường trong bình là 20 ml (hình 6C<sub>1</sub>). Sau 28 ngày nuôi cấy, đường cong sinh trưởng của tế bào được thể hiện ở hình 5. Trong quá trình phát triển trong môi trường lỏng, tế bào đơn của thực vật thường trải qua bốn giai đoạn: thích nghi, tăng trưởng, cân bằng và suy tàn. Hình 5 cho thấy, ở 4 ngày nuôi cấy đầu tiên, tế bào đang trong giai đoạn thích nghi. Tế bào mô sẹo cây Kiwi khi chuyển từ môi trường rắn sang môi trường lỏng sẽ chịu một số xáo trộn nhất định, vì vậy, cần thời gian để thích nghi với môi trường như điều kiện nuôi cấy, áp suất thẩm thấu, chất điều hòa sinh trưởng...



Hình 5. Sự sinh trưởng và phát triển của sinh khối tế bào cây Kiwi trong môi trường MS lỏng sau các khoảng thời gian nuôi cấy khác nhau [N: Mật độ tế bào (tế bào/ $\mu$ l), FW: Khối lượng tươi sinh khối (g/ml), DW: Khối lượng khô sinh khối (g/ml)]

Từ ngày nuôi cấy thứ 8 tới ngày nuôi cấy thứ 16, tế bào bước vào giai đoạn tăng trưởng. Dưới tác dụng của auxin, tế bào phân chia mạnh, mật độ của tế bào ngày càng tăng, cao nhất là vào ngày thứ 16 (342 tế bào/ $\mu$ l) (hình 5). Trong 4 ngày tiếp theo, tế bào bước vào giai đoạn cân bằng, số tế bào sinh ra và chết đi bằng nhau. Sau ngày nuôi cấy thứ 20, số lượng tế bào bắt đầu giảm. Điều đó có thể giải thích là do chất dinh dưỡng trong tế bào bắt đầu cạn kiệt dần, đồng thời các chất thải tích lũy trong môi trường ngày càng nhiều ức chế sự sinh trưởng và phát triển của tế bào. Quan sát dưới kính hiển vi cũng cho thấy các tế bào đang ở trong các giai đoạn phân chia khác nhau (hình 6H, I, J, K).

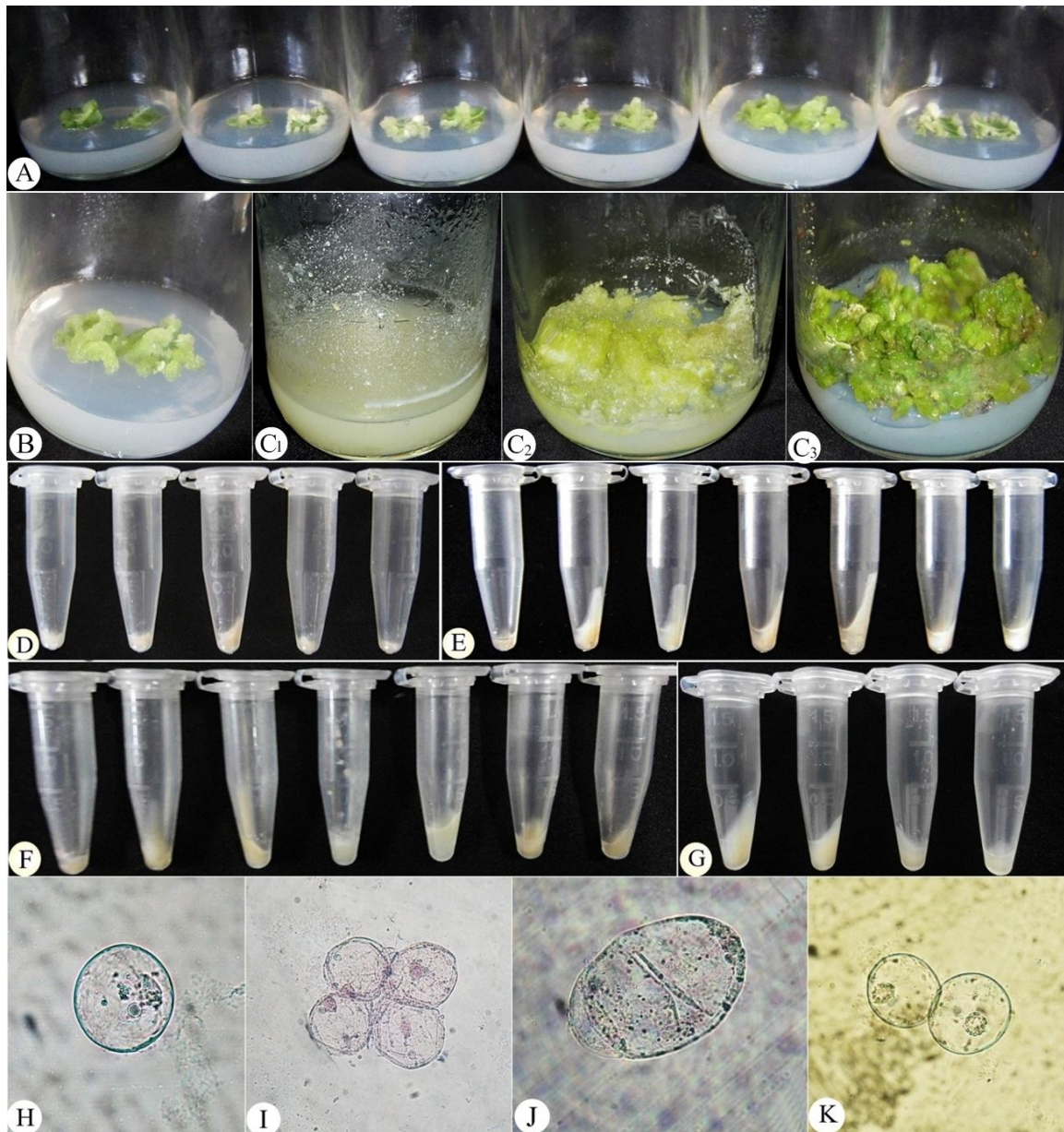
Huyền phù tế bào được duy trì bằng cách cấy chuyền vào đầu pha ổn định, thời điểm này sức tăng trưởng của huyền phù tế bào là mạnh nhất. Như vậy, dựa vào đường cong sinh trưởng của tế bào, chúng tôi nhận thấy rằng thời điểm cấy chuyền thích hợp nhất của tế bào cây Kiwi là vào ngày nuôi cấy thứ 16.

Các tế bào đơn thu được trong nuôi cấy lỏng lắc được rải lên trên môi trường thạch là môi trường MS không bổ sung các chất điều hòa tăng trưởng nhằm quan sát sự tái sinh của tế bào đơn. Sau 30 ngày và sau 60 ngày nuôi cấy, các tế bào đơn tiếp tục phát triển và hình thành những khối mô sẹo (hình 6C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>).

## KẾT LUẬN

Từ các kết quả thu được ở trên cho thấy, môi trường MS có bổ sung 30 g/l sucrose, 8 g/l agar và 0,8 mg/l 2,4-D với mẫu lá đặt úp là thích hợp nhất cho sự hình thành mô sẹo từ mẫu lá cây Kiwi *in vitro*. Môi trường MS lỏng có bổ sung 0,6 mg/l 2,4-D, 60 g/l sucrose với pH được điều chỉnh về 6,1 là môi trường tối ưu nhất cho sự sinh trưởng và phát triển của tế bào mô sẹo trong quá trình nuôi cấy lỏng lắc. Thể tích môi trường lỏng 20 ml (đối với bình nuôi có thể tích 250 ml) và cứ sau mỗi 16 ngày thì cấy chuyền là tối ưu nhất cho nuôi cấy 0,8 g mô sẹo cây Kiwi để thu huyền phù tế bào.





Hình 6. Sự hình thành mô sẹo và nuôi cấy tế bào đơn cây Kiwi

A. Ảnh hưởng của 2,4-D (0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 và 1,0 mg/l theo thứ tự từ trái qua phải) lên khả năng tạo mô sẹo từ mẫu lá cây Kiwi nuôi cấy *in vitro* sau 25 ngày; B. Mô sẹo tạo thành từ mẫu lá cây Kiwi nuôi cấy đặt úp trên môi trường MS có bổ sung 0,8 mg/l 2,4-D được sử dụng để nuôi cấy tế bào đơn; C<sub>1</sub>. Bình nuôi cấy tế bào đơn; C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>. Sự phát triển của tế bào đơn trên môi trường thạch sau 30 ngày và sau 60 ngày nuôi cấy; D, E, F, G. Sinh khối tươi tế bào thu được sau khi ly tâm từ dịch huyền phù tế bào trong môi trường MS lỏng bổ sung 2,4-D ở các nồng độ khác nhau (0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 mg/l), điều chỉnh pH ở các giá trị khác nhau (4,9; 5,2; 5,5; 5,8; 6,1; 6,4; 6,7), bổ sung đường ở các nồng độ khác nhau (20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 g/l), thể tích môi trường nuôi cấy khác nhau (10; 20; 30; 40 ml/bình); H. Tế bào đơn cây Kiwi; I. Cụm 4 tế bào; J. Tế bào đang phân chia; K. Tế bào vừa phân chia xong.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Dougall D. K., 1980. Nutrition and metabolism. In: Staba E. J. (ed) Plant tissue culture as a source of biochemical, Chemical Rubber Company Press, Boca Raton, Florida pp. 21-58.
2. Fischer R., Emans N., Schuster F., Hellwig S. and Drossard J., 1999. Towards molecular farming in the future: using plant cell suspension cultures as bioreactors. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 30: 109-112.
3. Bùi Văn Lê và Nguyễn Ngọc Hồng, 2006. Ảnh hưởng của chất điều hòa tăng trưởng thực vật và đường saccharose lên dịch nuôi cấy huyền phù tế bào Dừa cạn (*Catharanthus Roseus*). *Tạp chí Phát triển Khoa học và Công nghệ*, 9: 59-66.
4. Murashige T. and Skoog F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with Tobacco tissue cultures. *Plant Physiol.*, 15: 473-479.
5. Nistri S. and Somporn P., 2009. Regeneration and application: From suspension cultured-derived inflorescences of *Vetiveria zizanioides* (L.) Nash to selection of herbicide-resistant cell. *Assumption Uni. J. Tech.*, 12: 135-148.
6. Saifullah and Saifullah K., 2011. Callus induction and cell suspension culture production of *Catharanthus Roseus* for biotransformation studies of caryophyllene oxide. *Pakistan J. Bot.*, 43: 467-473.
7. Skirvin R. M, Chu M. C., Mary L., Heather Y. and Thomas F., 1986. Stability of tissue culture medium pH as a function of autoclaving, time and cultured plant material. *Plant Cell Rep.*, 4: 292-294.
8. Teng, 1997. Activated charcoal affects morphogenesis and enhances sporophyte regeneration during leaf cell suspension culture of *Platycerium bifurcatum*. *Plant Cell Rep.*, 17: 77-83.

**STUDY THE FORMATION OF CALLUS AND SINGLE CELL OF KIWI  
(*Actinidia deliciosa*)**

**Duong Tan Nhut, Tran Thi Thu Ha, Trinh Thi Huong, Hoang Van Cuong, Nguyen Phuc Huy**

Tay Nguyen Institute of Biology, VAST

**SUMMARY**

This study was conducted to study the callus induction and the effect of plant growth regulators, pH of medium, sugar concentration and medium volume on single cell culture of Kiwi *in vitro*. Results showed that *in vitro* Kiwi leaf explant size of 1×1 cm gave the best callus induction on MS medium with 0.8 mg/l 2,4-D. Leaf explant placed with the abaxial surface down on the medium induced more callus formation than that placed with the adaxial surface down on the medium (0.99 g fresh weight and 0.067 g dry weight with the abaxial surface down; 0.82 g fresh weight and 0.055 g dry weight with the adaxial surface down). Number of single cells were the highest (342 cells/μl) in 250 ml culture vessel with 20 ml liquid MS medium with 0.6 mg/l 2,4-D, 60 g/l sucrose and pH at 6.1. In addition, the most appropriate intervals of callus subculture in shaking liquid culture is 16 days. This research is a prerequisite for further studies of single cell of Kiwi.

*Keywords:* *Actinidia deliciosa*, callus, single cell, suspension cell, 2,4-D.

*Ngày nhận bài:* 3-7-2012