

SỰ PHÁT SINH CƠ QUAN VÀ NHÂN GIỐNG VÔ TÍNH CÂY KIWI (*ACTINIDIA DELICIOSA*) THÔNG QUA NUÔI CÂY MỒ LÁ *IN VITRO*

Dương Tấn Nhứt¹, Hoàng Văn Cương¹, Lê Thị Tuyết¹, Nguyễn Bá Nam¹, Nguyễn Thị Hương¹, Lê Kim Cương¹, Hoàng Xuân Chiến¹, Nguyễn Phúc Huy¹, Nguyễn Hữu Lễ¹, Thái Xuân Du²

¹Viện Nghiên cứu khoa học Tây Nguyên, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Viện Sinh học nhiệt đới, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

TÓM TẮT

Cây Kiwi được biết đến như là một loại cây được hiệu và cây ăn quả với hàm lượng vitamin và khoáng rất cao. Hiện nay, Kiwi đã được trồng và sản xuất ở nhiều quốc gia trên thế giới, tuy nhiên, nó vẫn chưa được trồng phổ biến ở nước ta. Với mục đích tạo ra nguồn giống ban đầu phục vụ cho công tác nhân giống, trong nghiên cứu này, chúng tôi đã thành công trong việc tái sinh cây Kiwi thông qua con đường phát sinh cơ quan từ các mẫu lá nuôi cấy *in vitro*. Kết quả sau 6 tuần nuôi cấy, chúng tôi nhận thấy các mẫu lá được nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung 30 g/l sucrose, 8 g/l agar, 0,02 mg/l NAA và 0,5 mg/l TDZ cho sự tái sinh chồi tốt nhất (13,33 chồi/mẫu). Trong khi đó các mẫu lá chỉ hình thành mô sẹo trên môi trường có kinetin và tái sinh chồi trên môi trường có BA ở nồng độ cao. Số chồi đạt được cao nhất khi được cấy chuyển sang môi trường MS có bổ sung 30 g/l sucrose, 8 g/l agar và 0,01 mg/l TDZ (8,33 chồi/mẫu sau 6 tuần nuôi cấy). Các chồi này được ra rễ và tạo cây hoàn chỉnh trên môi trường MS có bổ sung 30 g/l sucrose, 8 g/l agar và 0,05 mg/l NAA. Các cây Kiwi con hoàn chỉnh có khả năng sống sót tốt khi được trồng trong hệ thống có che phủ nylon (98,5%) và sinh trưởng, phát triển tốt trong điều kiện vườn ươm.

Từ khóa: *Actinidia deliciosa*, cây Kiwi, nhân giống chồi, nuôi cấy, phát sinh cơ quan TDZ

ĐẶT VẤN ĐỀ

Chi *Actinidia* Lindl bao gồm khoảng 60 loài và 2 họ khác nhau. Actinidiaceae là một họ phổ biến ở các vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới của châu Á. Loài được biết nhiều nhất là Kiwi (*Actinidia deliciosa*), phân bố phổ biến ở Trung Quốc và hiện nay được trồng ở nhiều nước khác trên thế giới (Ferguson, 1990). Kiwi được biết đến như một loại được phẩm quan trọng và được dùng để điều trị các bệnh khác nhau. Quả Kiwi đặc trưng bởi hàm lượng vitamin C rất cao cùng như hàm lượng các chất khoáng như kali, magiê... Hiện nay, Kiwi được sử dụng nhiều trong công nghiệp thực phẩm như làm mứt, nước trái cây hay xirô (Rugini, Gutierrez-Pesce, 2003).

Sự phát triển công nghiệp cây Kiwi trên thế giới đòi hỏi cần phải tạo ra một nguồn giống lớn, nhanh chóng. Ở một số nước, phương pháp nhân giống truyền thống như cắt cành, giâm cành và gieo hạt đã dần được thay thế bởi phương pháp nhân giống *in vitro* (Oliveira, Fraser, 2005). Phương pháp nhân giống *in vitro* là phương pháp chủ yếu được sử dụng để nhân giống nhiều loại cây ăn quả khác nhau như Nho (Isikalan *et al.*, 1998; Adiyaman *et al.*, 2004), Hạnh nhân (Isikalan, 2003), Anh đào (Adiyaman,

2003). Phương pháp vi nhân giống cây Kiwi đã được thực hiện đầu tiên bởi Harada (1975) và sau đó được thực hiện bởi nhiều tác giả khác (Wang *et al.*, 1982; Standardi, 1983; Wessels *et al.*, 1984; Monette, 1986...). Trong đó, các kiểu mô khác nhau của cây Kiwi đã được sử dụng làm vật liệu nuôi cấy ban đầu như chồi đỉnh (Revilla *et al.*, 1992), đỉnh sinh trưởng (Standardi, 1981), chồi và đốt thân (Velayandom *et al.*, 1985), hạt (Akbas *et al.*, 2007). Ở nghiên cứu trước, chúng tôi đã đưa ra quy trình vi nhân giống cây Kiwi từ những hạt thu nhận từ quả (Hoàng Văn Cương *et al.*, 2010). Trong nghiên cứu này, với việc sử dụng các mẫu lá cây Kiwi *in vitro* có sẵn trong phòng thí nghiệm, chúng tôi đã tiến hành khảo sát môi trường tốt nhất cho sự tái sinh chồi và sự dụng các chồi này cho quá trình vi nhân giống tiếp theo.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguồn mẫu

Nguồn mẫu sử dụng trong nghiên cứu này là lá của cây Kiwi nuôi cấy *in vitro* (Hoàng Văn Cương *et al.*, 2010).

Các lá được cắt thành những miếng bằng nhau

có kích thước 1×1 cm và sau đó được cấy lên các môi trường thí nghiệm.

Môi trường và điều kiện nuôi cấy

Môi trường được sử dụng trong tất cả các thí nghiệm là môi trường MS (Murashige, Skoog, 1962) có bổ sung 30 g/l sucrose, 8 g/l agar và các chất điều hòa sinh trưởng khác nhau. Trong môi trường nuôi cấy ban đầu, sử dụng NAA (1-naphthaleneacetic acid) kết hợp với kinetin. BA (6-benzyl aminopurine) hoặc TDZ (thidiazuron) ở các nồng độ khác nhau. Trong giai đoạn nhân nhanh tiếp theo, BA và TDZ được sử dụng nhằm tìm hiểu về ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng lên khả năng nhân nhanh chồi. Các chồi thu từ thí nghiệm trên sẽ được ra rễ và tạo cây hoàn chỉnh trong môi trường có bổ sung NAA. Độ pH của môi trường được điều chỉnh về 5,7 - 5,8 bằng NaOH 1 N và HCl 1 N trước khi hấp khử trùng bằng autoclave ở 121°C , 1 atm trong thời gian 30 phút.

Các mẫu lá được nuôi cấy trong các bình thủy tinh có thể tích 250 ml với 40 ml môi trường, mỗi bình nuôi cấy sẽ được cấy với 2 mẫu lá. Trong giai đoạn nhân nhanh chồi và tạo rễ, các chồi sẽ được nuôi cấy trong bình thủy tinh có thể tích 500 ml với 70 ml môi trường nuôi cấy, mỗi bình nuôi cấy sẽ được cấy với 3 chồi.

Điều kiện nuôi cấy *in vitro*, thời gian chiếu sáng 16 giờ/ngày, cường độ chiếu sáng 2 500 - 3.000 lux, nhiệt độ $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, độ ẩm trung bình khoảng 75 - 80%.

Các cây con *in vitro* được chuyển ra điều kiện ngoài vườn ươm với nhiệt độ 18 - 25°C , độ ẩm trung bình khoảng 80 - 85% và sử dụng ánh sáng tự nhiên.

Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng lên sự phát sinh cơ quan từ mẫu lá Kiwi nuôi cấy *in vitro*

Các mẫu lá sau khi được cắt sẽ được đặt lên môi trường MS có bổ sung 0,02 mg/l NAA kết hợp với lần lượt ba loại chất điều hòa sinh trưởng ở các nồng độ khác nhau: kinetin (1,0, 2,0, 3,0 mg/l), BA (1,0, 2,0, 3,0 mg/l) và TDZ (0,1; 0,5; 1,0 mg/l). Kết quả được thu nhận sau 6 tuần nuôi cấy.

Chỉ tiêu theo dõi: số chồi hình thành trên mỗi mẫu và trọng lượng tươi của chồi.

Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng lên khả năng nhân nhanh chồi từ các chồi Kiwi *in vitro*

Các chồi tốt nhất thu nhận từ môi trường thí

nghiệm trước sẽ được chuyển qua môi trường nhân nhanh chồi là môi trường MS có bổ sung BA (0,1; 0,5; 1,0; 1,5 mg/l) hoặc TDZ (0,01; 0,03; 0,05, 0,07 mg/l). Kết quả được thu nhận sau 6 nuôi cấy.

Chỉ tiêu theo dõi: số lượng chồi, trọng lượng tươi và chiều cao chồi.

Ra rễ, tạo cây hoàn chỉnh và chuyển cây con ra ngoài điều kiện vườn ươm

Các chồi tốt nhất được thu nhận trong quá trình nhân nhanh chồi sẽ được nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung 0,05 mg/l NAA.

Các cây con *in vitro* được chuyển ra ngoài vườn ươm và trồng trên giá thể là đất sạch Dasi (trong các khay nhựa có kích thước 30×70 cm, mỗi khay được trồng với 50 cây và sử dụng hệ thống che bóng nylon, chúng được so sánh với các cây được trồng trong cùng điều kiện nhưng không được che bóng hệ thống nylon. Sau 2 tuần, tiến hành thu nhận tỉ lệ sống sót của các cây con và sau đó quan sát, theo dõi sự sinh trưởng và phát triển của các cây con sau 2 tháng trồng ở vườn ươm.

Thống kê và xử lý số liệu

Số liệu được xử lý và phân tích bằng phép thử Duncan (Duncan, 1995) với $P = 0,05$.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng lên sự phát sinh cơ quan từ mẫu lá Kiwi nuôi cấy *in vitro*

Sau 6 tuần nuôi cấy, ảnh hưởng của các chất điều hòa sinh trưởng lên sự phát sinh cơ quan từ các mẫu lá Kiwi *in vitro* được thể hiện trong bảng 1.

Kết quả cho thấy các mẫu lá được nuôi cấy trên môi trường MS với sự bổ sung của các cytokinin khác nhau thì sự đáp ứng cũng như quá trình phát sinh của mẫu lá khác nhau rõ rệt. Sau 6 tuần nuôi cấy, các mẫu lá được nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung 0,5 mg/l TDZ cho sự tái sinh chồi tốt nhất với số lượng chồi trên mỗi mẫu lá cao nhất (13,33 chồi) (Bảng 1; Hình 1b). Trong khi đó, ở môi trường MS bổ sung BA với nồng độ thấp (1,0 và 2,0 mg/l) lại không cho sự tái sinh chồi mà các mẫu này chỉ hình thành mô sẹo, nhưng ở nồng độ BA cao (3,0 mg/l) lại cho sự tái sinh chồi nhưng với số lượng không cao (2,33 chồi/mẫu) (Bảng 1). Trên môi trường MS bổ sung kinetin, các mẫu lá chỉ phát sinh mô sẹo mà không có sự xuất hiện của chồi (Hình 1a).

Mẫu lá bắt đầu phồng lên và dày ra sau 2 tuần nuôi cấy, sau đó xuất hiện các mắt sẹo nhỏ ở các gân lá và chồi được hình thành. Trong 3 loại cytokinin (kinetin, BA và TDZ) được sử dụng thì TDZ có số

lượng chồi hình thành cao nhất. BA và kinetin thì không biểu hiện sự hình thành chồi. Tuy nhiên, về chiều cao chồi và sự phát triển của chồi thì BA lại có hiệu quả nhất (số liệu không thể hiện).

Bảng 1. Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng lên sự phát sinh cơ quan từ mẫu lá *Kiwi* nuôi cấy *in vitro*

Chất DHTT (mg/l)	Trọng lượng tươi (g)	Số chồi
Đối chứng	0,0	-
	1,0	-
	2,0	-
	3,0	-
Kinetin	1,0	-
	2,0	-
	3,0	0,97a [*]
	1,0	2,33bc
BA	0,1	4,00b
	0,5	13,33a
	1,0	1,33c
	1,0	1,33c

Chú thích: * Những ký tự khác nhau (a,b,c) trong cột thể hiện sự sai khác có ý nghĩa với độ tin cậy $P = 0,05$ trong phép phân tích Duncan. Các mẫu lá không hình thành chồi, chỉ hình thành mô sẹo

Kết quả cho thấy cytokinin có vai trò quan trọng trong sự hình thành chồi bắt đầu từ mẫu lá *Kiwi in vitro*. Tuy nhiên, ảnh hưởng của cytokinin vào sự nuôi cấy mô và cơ quan còn phụ thuộc vào loại, nồng độ cytokinin sử dụng, kiểu mẫu cấy và loài cây được sử dụng. Chẳng hạn như BA kích thích sự tăng sinh chồi bên của *Castanea* trong khi kinetin lại không có ảnh hưởng (Vieitez, Vieitez, 1980). Trong thí nghiệm này, sử dụng cùng mẫu cây lá *Kiwi in vitro*, kết quả sau 6 tuần lại cho thấy kinetin có hoạt tính yếu, BA, TDZ có hoạt tính mạnh hơn trong quá trình kích thích tạo chồi.

TDZ là một chất điều hòa sinh trưởng mạnh được xếp vào nhóm cytokinin, nhưng được nhận thấy là có khả năng thay thế đồng thời cytokinin và auxin để kích thích quá trình phát sinh hình thái trong nuôi cấy mô (Chen *et al.*, 1995; Te-Chato, Lim, 1999; Murthy, Saxena, 1998). Trong thời gian gần đây, TDZ được sử dụng rộng rãi trong nuôi cấy mô do hoạt tính auxin và cytokinin cao hơn hẳn so với các auxin và cytokinin thông thường. Ở thí nghiệm này, khi sử dụng TDZ ở nồng độ thấp (0,1 mg/l) trong môi trường nuôi cấy đã tạo ra số lượng chồi thấp (4,00 chồi/mẫu), nhưng khi gia tăng nồng độ TDZ lên 0,5 mg/l, số lượng chồi trên mỗi mẫu tăng lên và đạt số lượng chồi cao nhất (Bảng 1); tuy nhiên, khi gia tăng nồng độ TDZ lên đến 1,0 mg/l đã ức chế sự phát

sinh chồi và thể hiện là số lượng chồi trên mỗi mẫu giảm. Như vậy, TDZ ở nồng độ cao đã gây ức chế quá trình tái sinh chồi từ mẫu lá cây *Kiwi in vitro*. Kharwar (2003) đã thu được một số lượng lớn chồi bắt đầu khi nuôi cấy các mẫu khác nhau của giống *Lens culinaris* Medik. trên môi trường có bổ sung TDZ và kết quả cho thấy rằng nồng độ TDZ ở nồng độ thấp sẽ kích thích quá trình tái sinh chồi tốt hơn ở nồng độ cao.

Mục đích của thí nghiệm này là tìm ra môi trường tốt nhất cho sự tái sinh chồi, vì vậy môi trường MS có bổ sung 0,5 mg/l TDZ sẽ được lựa chọn.

Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng lên khả năng nhân nhanh chồi từ các chồi *Kiwi in vitro*

Trong nghiên cứu của Hoàng Văn Cường và đồng tác giả (2010), các chồi thu nhận từ hạt nảy mầm đã được nuôi cấy trên môi trường có bổ sung BA nhằm tìm ra môi trường tối ưu cho sự nhân nhanh chồi. Trong thí nghiệm này, các chồi thu nhận từ mẫu lá đã được nuôi cấy trên môi trường có bổ sung BA và TDZ nhằm so sánh khả năng nhân nhanh chồi của hai loại cytokinin này.

Sau 6 tuần nuôi cấy, số lượng chồi cao nhất thu được trên môi trường MS có bổ sung 0,01 mg/l TDZ với 8,33 chồi/mẫu; tuy nhiên, khi nồng độ TDZ cao hơn thì số lượng chồi và chiều cao chồi giảm (Bảng

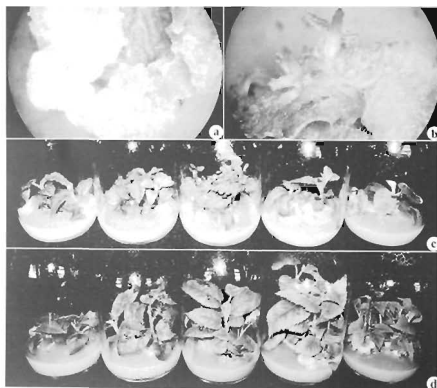
2). Khi các chồi được nuôi cấy trên môi trường MS có BA ở các nồng độ khác nhau thì ở nghiệm thức bổ sung 1,5 mg/l cho sự nhân nhanh chồi tốt hơn các nghiệm thức khác, với 6.33 chồi/mẫu (Bảng 2; Hình 1d). Khi BA tăng từ 0,1 -1,5 mg/l thì số lượng chồi tạo ra tăng lên. Điều này cho thấy TDZ kích

thích sự nhân nhanh chồi ở nồng độ thấp, trong khi đó, BA lại kích thích sự nhân nhanh chồi ở nồng độ cao. Ở nghiệm thức đối chứng, môi trường không có bổ sung cytokinin đã không thể hiện khả năng kích thích sự nhân nhanh chồi và các chồi tạo ra rất ít.

Bảng 2. Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng lên khả năng nhân nhanh chồi *Kiwifruit* *in vitro* sau 6 tuần nuôi cấy.

Chất DHTT (mg/l)	Trọng lượng tươi (g)	Số chồi	Chiều cao chồi (cm)
Đối chứng	0,0	1,65c	3,05cd
BA	0,1	1,94c	3,57bc
	0,5	2,16c	3,53bc
	1,0	3,70ab	5,67a
	1,5	3,06b	4,33b
TDZ	0,01	3,10b	3,27bc
	0,03	3,07b	3,07cd
	0,05	3,89a	2,03d
	0,07	2,10c	2,10d

Chú thích: Những ký tự khác nhau (a,b,c,d) trong cột thể hiện sự sai khác có ý nghĩa với độ tin cậy $P = 0,05$ trong phép phân tích Duncan



Hình 1. Sự phát sinh cơ quan từ mẫu lá và sự nhân nhanh các chồi *Kiwifruit* nuôi cấy *in vitro*. a. Mẫu lá hình thành mô sẹo; b. Mẫu lá tái sinh chồi; c. Các chồi được nhân nhanh trong môi trường có TDZ sau 6 tuần nuôi cấy (từ trái qua phải tương ứng với nồng độ 0, 0,01, 0,05, 0,07 mg/l); d. Các chồi được nhân nhanh trong môi trường có BA sau 6 tuần nuôi cấy (từ trái qua phải tương ứng với nồng độ 0, 0,1, 0,5, 1,0, 1,5 mg/l).

Có sự giống nhau giữa hình dạng các lá của các chồi Kiwi khi nuôi cấy trên môi trường MS có TDZ là các lá có hình dạng bất thường, các chồi tạo ra thường nhỏ và yếu ớt (Hình 1c). Ở một số loài, việc sử dụng TDZ cũng gây ra một số bất lợi như: gây hiện tượng thủy tinh thể ở chồi tái sinh (Cousineu, Donnelly, 1991; Briggs *et al.*, 1988), kiểu hình bất thường của lá (Van Nieuwerkerk *et al.*, 1986; Cambededes *et al.*, 1991), chồi ngắn và gây khó khăn trong việc kéo dài chồi và ra rễ đối với chồi bất định (Meyer, van Staden, 1988). Trong khi đó, lá của các chồi khi nuôi cấy trong môi trường MS có bổ sung BA ở nồng độ cao lại có màu sắc và đồng tác giả (Hình 1d). Kết quả này cũng được Akbas và đồng tác giả (2007) đưa ra. Đây có thể là do BA đã tác động đến khả năng tổng hợp lục lạp trên bề mặt lá của các chồi Kiwi nuôi cấy *in vitro*; khi nồng độ BA càng cao thì khả năng tổng hợp lục lạp càng giảm đi.

Trước đây, đã có nhiều nghiên cứu về ảnh hưởng của cytokinin đến nuôi cấy cây Kiwi *in vitro*. Moncaleon và đồng tác giả (1999) cho rằng cần bổ sung cytokinin vào môi trường nuôi cấy cây Kiwi *in vitro*. Rugini và đồng tác giả (1991) lại cho rằng zeatin cho sự tái sinh chồi từ mô sẹo là tốt nhất, trong khi đó BA lại tốt nhất cho sự nhân nhanh chồi của cây Kiwi. Akbas và đồng tác giả (2007) cũng đã chứng minh rằng việc sử dụng BA tốt hơn so với sử dụng kinetin cho quá trình nhân nhanh chồi. Tuy nhiên, chưa có nhiều nghiên cứu về tác động của TDZ đối với quá trình nhân nhanh chồi. Kết quả thu được trong thí nghiệm này cho thấy TDZ có khả năng nhân nhanh chồi cây Kiwi tốt hơn so với BA.

TDZ là một phenylurea tổng hợp, được coi như là một cytokinin hoạt động mạnh nhất cho sự tái sinh chồi trong nuôi cấy mô (Huetteman, Preece, 1993). Báo cáo trước đây cũng cho rằng TDZ cho sự tái sinh chồi tốt hơn các cytokinin khác (Thomas, 2003; Thomas, Puthur, 2004; Husain *et al.*, 2007). Hemant và đồng tác giả (2008) nghiên cứu trên đối tượng cây *C. sativa* cho thấy TDZ có khả năng nhân nhanh chồi tốt hơn BA và kinetin. Hare và Staden (1994) cho rằng TDZ có khả năng ức chế hoạt động của enzyme oxidase cytokinin, làm thay đổi sự gia tăng nồng độ cytokinin nội sinh. Tuy nhiên, ở nồng độ cao hơn nó lại ức chế sự kéo dài chồi. Cytokinin thường kích thích sự nhân nhanh chồi và hạn chế sự kéo dài chồi. Vì vậy, sự ức chế kéo dài chồi của TDZ có thể phù hợp với hoạt động của cytokinin ở nồng độ cao (Huetteman, Preece, 1993).

Như vậy, sau 6 tuần nuôi cấy, môi trường MS có

bổ sung 0,01 mg/l TDZ là môi trường tốt nhất cho sự nhân nhanh chồi.

Ra rễ, tạo cây hoàn chỉnh và chuyển cây con ra ngoài điều kiện vườn ươm

Các chồi tốt nhất thu nhận từ môi trường nhân nhanh chồi đã được chuyển sang môi trường tạo rễ là môi trường MS có bổ sung 0,05 mg/l NAA (Hoàng Văn Cường *et al.*, 2010). Các cây Kiwi con sẽ được thu nhận sau 4 tuần nuôi cấy (Hình 2a). Qua quan sát chúng tôi nhận thấy có sự xuất hiện của khối mô sẹo ở phần gốc của cây Kiwi khi các chồi nuôi cấy trong môi trường tạo rễ.

Tất cả các cây Kiwi con đã tạo rễ được chuyển ra ngoài vườn ươm và tiến hành theo dõi khả năng thích ứng của cây con dưới hai phương pháp trồng khác nhau

Cây được trồng trong giá thể là đất sạch Dasi trong các khay nhựa có kích thước 30 × 70 cm, mỗi khay được trồng với 50 cây (Hình 2b). Tiến hành trồng với hai phương pháp khác nhau là có và không có che phủ bởi hệ thống nylon. Các cây được che phủ bởi hệ thống nylon hoàn toàn trong 1 tuần đầu. Kết quả thu nhận cho thấy rằng khi các cây được trồng trong khay nhựa có che phủ nylon cho tỉ lệ sống sót cao (khoảng 98,5%) trong khi đó các cây con được trồng trong khay nhựa mà không được che phủ nylon cho tỉ lệ sống sót thấp hơn nhiều (khoảng 62%).

Trong quá trình thích ứng, cây sẽ mất nước rất nhanh do cây chưa có khả năng quang hợp mạnh, các lỗ khí không có khả năng mở to nhưng không thể đóng trở lại, bên cạnh đó việc hút nước từ rễ vào cây bị hạn chế và có thể chưa xảy ra, thủy lực giữa rễ và gốc cây thấp. Chính vì vậy mà cây mất nước nhưng lại không được cung cấp nước nên cây nhanh bị héo và chết nếu như không có biện pháp bảo vệ và hạn chế. Điều này đã được Fila và đồng tác giả (1998) chứng minh

Một điều nữa mà chúng tôi nhận thấy trong thí nghiệm này đó là từ những chồi Kiwi chưa có rễ lấy từ nuôi cấy *in vitro* được trồng trong khay nhựa và đặt kín bằng túi nylon thì sau 1 tuần, rễ đã xuất hiện và cây vẫn khỏe mạnh. Điều này cho thấy rằng nếu chồi *in vitro* được phát triển trong điều kiện có độ ẩm thích hợp thì chồi vẫn có khả năng sống sót, là vẫn có khả năng quang hợp, chồi tổng hợp được các auxin nội sinh và từ đó cảm ứng cho sự hình thành rễ.

Trong nghiên cứu này, việc đưa cây Kiwi con nuôi cấy *in vitro* ra điều kiện vườn ươm đã được thực hiện thành công. Phương pháp này được tiến hành đơn giản, tiết kiệm chi phí và diện tích. Với khay nhựa, chúng tôi đã có thể tạo ra một số lượng lớn cây con ngoài vườn ươm, phương pháp này hiệu quả và tiết kiệm hơn so với phương pháp trồng cây trong các chậu nhựa trước đây. Kết quả này cũng đưa ra giải pháp nhằm tạo một số lượng cây Kiwi con đủ lớn phục vụ cho nhu cầu trồng cây Kiwi trên một diện tích lớn.

Các cây Kiwi đã thích nghi với điều kiện vườn ươm, sau 2 tuần trồng trong các khay nhựa, tiến hành chuyển các cây này sang trồng trong các chậu nhựa giúp cho các cây sinh trưởng tốt hơn (Hình 2c). Sau 2 tháng trồng ở điều kiện vườn ươm, các cây con

được trồng trong hệ thống có che phủ nylon từ trước sinh trưởng tốt hơn so với các cây mà trước đây không được che phủ nylon. Kết quả về chiều cao cây và số lá được thể hiện ở bảng 3.

Sau 2 tháng trồng trong điều kiện vườn ươm, tiến hành chuyển các cây này vào trong các chậu lớn hơn (Hình 2d). Sau 1 năm, các cây Kiwi sinh trưởng và phát triển tốt (Hình 2e). Các lá của cây Kiwi bắt đầu rụng vào đầu mùa đông (tháng 10) khi các cây bước vào trạng thái ngủ đông sau đó chúng bắt đầu mọc lá khi nhiệt độ đã ấm lên (vào khoảng tháng 3). Sau khi mọc lá và chồi, các cây sinh trưởng và phát triển rất nhanh. Điều này cho thấy rằng cây Kiwi khi trồng trong điều kiện vườn ươm vẫn trải qua các giai đoạn sinh trưởng và phát triển như các cây trồng ở các nước cạnh tác loài cây này.



Hình 2. Sự sinh trưởng và phát triển của cây Kiwi trong điều kiện vườn ươm. a. Các cây Kiwi *in vitro* hoàn chỉnh trước khi đưa ra vườn ươm, b. Cây Kiwi được trồng trong khay nhựa có che phủ bởi hệ thống nylon, c. Cây Kiwi sau 2 tuần trồng trong khay nhựa, d. Cây Kiwi sau 2 tháng trồng ở vườn ươm, e. Cây Kiwi 1 năm tuổi tại vườn ươm.

Bảng 3. So sánh cây con Kiwi khi đưa ra điều kiện ngoài vườn ươm với hai phương pháp trồng khác nhau sau 2 tháng trồng ngoài vườn ươm.

Phương pháp	Tỉ lệ sống sót (%)	Chiều cao cây (cm)	Số lá
Cỏ che nylon	98,5 ^a	17,22a ^a	9,33a ^a
Không che nylon	62	10,33b	5,00b

Chú thích: 'Những ký tự khác nhau (a,b) trong cột thể hiện sự sai khác có ý nghĩa với đồ lín cây P = 0,05 trong phép phân tích Duncan.' Các cây được che nylon hoàn toàn trong 1 tuần đầu, sau đó kiểm tra tỉ lệ sống sót: 'Các cây sau khi sống sót được chuyển qua các chậu nhựa và theo dõi sự sinh trưởng sau 2 tháng

KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, một lượng chồi lớn đã được tạo ra thông qua con đường phát sinh cơ quan bằng việc sử dụng các mẫu lá Kiwi nuôi cấy *in vitro*.

Sau 6 tuần nuôi cấy, môi trường tốt nhất cho sự tái sinh chồi từ mẫu lá là môi trường MS có bổ sung 0,5 mg/l TDZ và 0,02 NAA. Môi trường MS có bổ sung BA cho số lượng chồi thấp và các mẫu lá chỉ phát sinh mô sẹo trên môi trường MS có bổ sung kinetin.

Môi trường MS có bổ sung 0,01 mg/l TDZ là môi trường tốt nhất cho sự nhân nhanh chồi sau 6 tuần nuôi cấy.

Các cây con đạt tỉ lệ sống sót cao (98,5%) khi chúng được trồng trong khay nhựa và được che phủ bởi hệ thống nylon.

Lời cảm ơn: Các tác giả xin chân thành cảm ơn Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã hỗ trợ kinh phí cho chúng tôi hoàn thành nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Adiyaman AF (2003) The studies on the micropropagation of Pecan (*Carya illinoensis*) and Kiwifruit (*Actinidia deliciosa*). PhD Thesis. Department of Biology, Art and Science Faculty, Dicle University, Diyarbakir, Turkey

Adiyaman AF, Işıkalan Ç, Kara Y, Başaran D (2004) The companion on the proliferation of lateral buds of *Vitis vinifera* L. cv. Perle de Csaba during different periods of the year in *in vitro* conditions. *Int J Agr Biol* 6: 328-330

Alkhas FA, Iscalan C, Naniş S (2007) Micropropagation of Kiwifruit (*Actinidia deliciosa*). *Int J Agr Biol* 9(3): 489-493

Briggs BA, McCulloch SM, Edick LA (1988) Micropropagation of Azaleas using thidiazuron. *Acta Horti* 226: 205-208.

Cambeceades J, Duron M, Decourtye L (1991) Adventitious bud regeneration from leaf explants of the shrubby ornamental honeysuckle, *Lonicera nitida* Wils cv.

'Maigrün': effects of thidiazuron and 2,3,5-triiodobenzoic acid. *Plant Cell Rep* 10(9): 471-474.

Chen Z, Tsay J, Chung J (1995) Shoot regeneration from internode and petiole of plantlets multiplied from mature *Eucalyptus grandis* × *urophylla* Bull. *Taiwan for Res Inst* 10(1): 1-7

Cousineau JC, Donnelly DJ (1991) Adventitious shoot regeneration from leaf explants of tissue cultured and greenhouse-grown Raspberry. *Plant Cell Tiss Org Cult* 27: 249

Duncan DB (1995) Multiple range and multiple F test. *Biometrics* 11: 1-42

Ferguson AR (1990) *The genus Actinidia*. In Warrington JJ, Weston GC, eds. *Kiwifruit science and management*. Ray Richards Publisher, Auckland. 15-35

Fila G, Ghoshghare J, Cornic G (1998) Photosynthesis, leaf conductance and water relations of *in vitro* cultured grapevine rootstock in relation to acclimatization. *Physiol Plant* 102: 411-418

Harada H (1975) *In vitro* organ culture of *Actinidia chinensis* Pl. as a technique for vegetative multiplication. *J Hort Sci* 50: 81-83.

Hare PD, Staden JV (1994) Inhibitory effect of thidiazuron on the activity of cytokinin oxidase isolated from Soybean callus. *Plant Cell Physiol* 35: 1121-1125

Hemant L, Suman C, Ikhtas K, Mahmoud AE (2008) Thidiazuron-induced high-frequency direct shoot organogenesis of *Cannabis sativa* L. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* (2009) 45: 12-19.

Hoàng Văn Cường, Lê Kim Cường, Đặng Xuân Thành, Nguyễn Bá Nam, Hoàng Xuân Chiên, Nguyễn Hai Sơn, Dương Tân Nhật (2010) Vi nhân giống cây Kiwi (*Actinidia deliciosa*). *Tap chí Công nghệ Sinh học* 8(3B): 1325-1332.

Huetteman CA, Preece JE (1993) Thidiazuron a potent cytokinin for woody plant tissue culture. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 33: 105-119.

Husain MK, Anis M, Shahzad A (2007) *In vitro* propagation of Indian Kino (*Pterocarpus marsapum* Roxb.) using thidiazuron. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 43: 59-64.

- Işikalan Ç. (2003) The studies on the micropropagation of Almond (*Amygdalus communis* L.cv Nonpareil). PhD Thesis, Department of Biology, Art and Science Faculty, Dicle University, Diyarbakir, Turkey.
- Işikalan Ç., Adıyaman F., Başaran D. (1998) The comparison studies on the proliferation of lateral buds, *Vitis vinifera* L. cv. Alphonse during different periods of the year at *in vitro* conditions. *Biochem Arch* 14: 319-325.
- Khawar KM (2003) Effects of thidiazuron on shoot regeneration from different explants of Lentil (*Lens culinaris* Medik) via organogenesis. *Turk J Bot* 28: 421-426.
- Meyer HJ, van Staden J (1988) *In vitro* multiplication of *Isia flexuosa* Hort Sci 26: 772
- Moncaleon P, Cañal MJ, Feito I, Rodriguez A, Fernandez B (1999) Cytokinins and mineral nutrition in *Actinidia deliciosa* (Kiwi) shoots cultured *in vitro*. *J Plant Physiol* 155: 606-612
- Monette PL (1986) Micropropagation of Kiwifruit using non-axenic shoot tips. *Plant Cell Tiss Org Cult* 6: 73-82
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-479
- Murthy BNS, Saxena PK (1998) Somatic embryogenesis and plant regeneration of Neem (*Azadirachta indica* A. Juss). *Plant Cell Rep* 17: 469-475
- Oliveira MM, Fraser LG (2005) *Actinidia* spp. *Kiwifruit*. In: Lutz RE, ed. *Biotechnology of fruit and nut crops*. CAB International, 1-27
- Revilla MA, Rey MA, Gonzalez-Rio F, Gonzalez MV, Diaz-Sala C, Rodriguez R (1992) *Micropropagation of Kiwi (Actinidia spp.)*. In: Bajaj YPS, ed. *Biotechnology in agriculture and forestry*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg 18: 399-423
- Rugini E, Gutierrez-Pesce P (2003) *Micropropagation of Kiwifruit (Actinidia spp.)*. In: Jain SM, Ishii K, eds. *Micropropagation of woody trees and fruits*. Kluwer Academic Publishers, Netherlands. 647-669
- Rugini E, Pellegrineschi A, Mencuccini M, Manotti D (1991) Increase of rooting ability in the woody species Kiwi (*Actinidia deliciosa* A. Chev.) by transformation with *Agrobacterium rhizogenes* rol genes. *Plant Cell Rep* 10(6): 291-295.
- Standardi A (1981) Micropropagazione dell' *Actinidia chinensis* Planch. Mediante cultura 'in vitro' di apici meristematici. *Frutticoltura* 43: 23-27.
- Standardi A (1983) La 'Micropropagazione' nella moltiplicazione dell' *Actinidia*. *Frutticoltura* 45: 17-22.
- Te-Chato S, Lim M (1999) Plant regeneration of Mangosteen via nodular callus formation. *Plant Cell Tiss Org Cult* 59: 89-93.
- Thomas TD (2003) Thidiazuron induced multiple shoot induction and plant regeneration from cotyledonary explants of Mulberry. *Biol Plant* 46: 529-533.
- Thomas TD, Puthur JT (2004) Thidiazuron induced high frequency shoot organogenesis in callus from *Kagela pinnata* L. *Bot Bull Acad Sin* 45: 307-313.
- Van Nieuwkerk JP, Zimmennan RH, Fordham I (1986) Thidiazuron stimulation of Apple shoot proliferation *in vitro*. *Hort Sci* 21(3): 516-518.
- Velayandom L, Hirsch AM, Fortune D (1985) Tissue culture of nodal stem segments of *Actinidia chinensis* (L.) Planchon, as a method of micropropagation. *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences III-Sciences de la Vie Life Sciences* 301: 598-600
- Vietez AM, Vietez ML (1980) Culture of chestnut shoots from buds *in vitro*. *J Hortie Sci* 55: 83-86.
- Wang JX, Li SZ, Li BW, Ren EY (1982) Propagation of *Actinidia chinensis* by tissue culture. *Liaoning Agric Sci* 32-34
- Wessels E, Nel DD, Von Staden DFA (1984) *In vitro* propagation of *Actinidia chinensis* PI. cultivar Hayward. *Deciduous Fruit Grower* 34: 453-457.

ORGANOGENESIS AND MICROPROPAGATION OF KIWI (*ACTINIDIA DELICIOSA*) VIA *IN VITRO* LEAF CULTURE

Dương Tân Nhứt^{1, *}, Hoàng Văn Cuong¹, Lê Thị Tuyet¹, Nguyễn Bá Nam¹, Nguyễn Thị Hương¹, Lê Kim Cuong¹, Hoàng Xuân Chiến¹, Nguyễn Phúc Huy¹, Nguyễn Hữu Lê¹, Thái Xuân Du²

¹Tay Nguyen Institute for Scientific Research, Vietnam Academy of Science and Technology

²Tropical Institute of Biology, Vietnam Academy of Science and Technology

SUMMARY

Kiwi (*Actinidia deliciosa*) is known as a kind of medicinal plant, as well as fruit with high content of

* Author for correspondence. Tel +84-63-3831056; Fax +84-63-3831028, E-mail: duongtannhut@gmail.com

vitamins and minerals. Currently, Kiwi has been grown and produced in many countries around the world; however, it has not been grown popularly in Vietnam. In order to create the initial source for the propagation, in this study, we have successfully regenerated Kiwi via organogenesis from *in vitro* leaf culture. After 6 weeks, we found that leaf samples were cultured on MS medium supplemented with 30 g/l sucrose, 8 g/l agar, 0.02 mg/l NAA and 0.5 mg/l TDZ offered the highest number of shoots (13.33 shoots/sample), callus induction from leaf sample can be observed only on MS medium supplemented with kinetin and shoot formation on MS medium with high concentration of BA. The highest shoot formation number was achieved when they were subcultured on MS medium culture supplemented with 30 g/l sucrose, 8 g/l agar and 0.01 mg/l TDZ (8.33 shoots/sample after 6 weeks of culture). The shoots then were rooted on MS medium supplemented with 30 g/l sucrose, 8 g/l agar and 0.05 mg/l NAA. The Kiwi plantlets were able to survive well when grown in the system covered with nylon (98.5%), to grow and to develop well in the nursery.

Keywords: *Actinidia delictosa*, Kiwi, multiplication, nylon, organogenesis, TDZ