

Lê Khả Tường, 2008. Báo cáo kết quả thu thập, đánh giá, khai thác và sử dụng nguồn gen gừng, nghệ góp phần bảo tồn đa dạng cây trồng ở Việt Nam. Liên hiệp các hội khoa học và kỹ thuật Việt Nam.

Aggarwal B. B., Sundaram C., Malani N., Ichikawa H., 2007. "Curcumin: the Indian solid gold". Adv.

Exp. Med. Biol., 595: 1-75. Doi: 10.1007/978 - 0 378 46401 5_1. PMID 17569205.

Hatcher H., Planalp R., Cho J., Torti F.M., Torti S.V., 2008. "Curcumin: from ancient medicine to current clinical trials". Cell. Mol. Life Sci. 65(11): 1631 - 1652. Doi: 10.1007/s00018-008-7452-4. PMID 18324353.

Study on cultivation techniques for tumeric N8 variety

Trinh Thuy Duong, Le Kha Tuong

Abstract

Turmeric variety N8 was a research output of the project "Selection and development of high quality, productivity Ginger and Turmeric varieties for Northern provinces" performed at the Plant Resources Center during the period of 2012 - 2016 and was recognized by the Department of Crop Production - MARD for production testing in Northern provinces from April 2017. The research result showed that optimum growing time is 1 - 10 March; cultivation density is 50,000 clumps/ha and the fertilizer doses of 200 kg N + 120 kg P₂O₅ + 200 kg K₂O + 2000 kg microbial organic fertilizer.

Keywords: Turmeric N8 variety, yellow turmeric, turmeric cultivation technique

Ngày nhận bài: 8/4/2018

Ngày phản biện: 15/4/2018

Người phản biện: TS. Dương Thị Hồng Mai

Ngày duyệt đăng: 10/5/2018

NGHIÊN CỨU KỸ THUẬT NHÂN NUÔI *IN VITRO* TẾ BÀO SÂU KHOANG (*Spodoptera litura*) BƯỚC ĐẦU HƯỚNG TỚI SẢN XUẤT CHẾ PHẨM SINH HỌC TRỪ SÂU QUA CON ĐƯỜNG LÂY NHIỄM VI RÚT

Hà Thị Thu Thủy¹, Lê Văn Trinh¹, Nguyễn Thị Như Quỳnh¹

TÓM TẮT

Sau khi phân lập, các tế bào mô tiền phôi từ buồng trứng trưởng thành sâu khoang được nuôi duy trì liên tục trong môi trường dinh dưỡng. Sử dụng các kỹ thuật cơ bản để phân lập và nhân nuôi *in vitro* tế bào sâu khoang đã phân lập và nhân nuôi thành công dòng tế bào mã hiệu 2.tp., đây là tế bào tăng trưởng bám dính trên bề mặt của bình nuôi cấy. Tế bào sinh trưởng tăng gấp 20 lần số lượng sau khoảng 27 ngày nuôi cấy, hình thái tế bào phân chia đồng đều và sự tăng trưởng của tế bào ổn định ở lần cấy chuyển thứ 25 của nhân nuôi thứ cấp làm chuẩn tế bào. Kỹ thuật bảo quản tế bào ở nhiệt độ - 80°C đảm bảo mật độ tế bào ổn định sau 1 tháng. Sau bảo quản, cần phải đưa ra cấy chuyển phục hồi sức sống và khả năng phát triển sinh khối của tế bào sâu khoang. Môi trường nuôi cấy có vai trò quyết định đến sinh trưởng tế bào sâu khoang, nhiều môi trường được sản xuất đặc biệt dành cho bộ Lepidoptera. Nghiên cứu này cho thấy môi trường nhân nuôi *in vitro* thích hợp nhất với tế bào sâu khoang là môi trường Excell 420-14419C, sau 6 ngày nhân nuôi đạt tới 18,84 × 10⁹ tế bào/ml.

Từ khóa: Dòng tế bào côn trùng, *Spodoptera litura*, nuôi cấy tế bào

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Sâu khoang là một loài côn trùng đa thực, gây hại nhiều loại cây trồng lương thực và rau màu. Ở Việt Nam người nông dân vẫn thường sử dụng thuốc hóa học để phòng trừ sâu khoang nhưng hiệu quả không cao. Những năm gần đây, trên thế giới đã ghi nhận được sâu khoang chết hàng loạt do nhiễm vi-rút *Spodoptera litura nucleopolyhedrovirus* (SplNPV), đặc biệt ở những vùng sản xuất rau an toàn hiện tượng này xảy ra nhiều hơn. Vì vậy, việc nhân nuôi tế bào sâu khoang để chủ động sản xuất NPV là có

tiềm năng rất lớn trong quản lý loài sâu hại này. Nhân nuôi *in vitro* tế bào côn trùng là công cụ quan trọng trong nhiều khía cạnh khác của các nghiên cứu liên quan đến vi-rút, bao gồm sự lan truyền của vi-rút và tối ưu hóa cho sự phát triển của thuốc trừ sâu sinh học qua con đường lây nhiễm vi-rút (Nguyễn Văn Cẩm, Hoàng Thị Việt và *ctv.*, 1996) và chẩn đoán nhanh các baculovirus gây bệnh cho động vật (Viện Sinh học nhiệt đới, Viện Nuôi trồng thủy sản II và Viện Hoá sinh hữu cơ Paolo Alto - Mỹ, 1999). Để chủ động phát triển chế phẩm sinh học NPV phòng

¹ Viện Bảo vệ thực vật

trừ sâu khoang thì việc nghiên cứu và hoàn thiện các kỹ thuật nhân nuôi *in vitro* tế bào sâu khoang, bao gồm các kỹ thuật từ phân lập mô bào và nhân nuôi sơ cấp tạo vật liệu khởi đầu, nhân nuôi thứ cấp đến bảo quản lạnh đông tế bào cũng như xác định được loại môi trường nuôi cấy thích hợp nhất là hết sức cần thiết. Bài báo này cung cấp những kết quả đã thu được trong nghiên cứu kỹ thuật nhân nuôi *in vitro* tế bào sâu khoang ở nước ta trong những năm vừa qua.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

- Chọn lọc những cá thể trưởng thành sâu khoang làm nguồn phân lập để thu vật liệu mô bào.

- Các loại môi trường: Excell™ 420 serum free (Sigma), Schneider (Sigma), TC - 100 BML-TC/10 (Sigma), TNM- FH (Sigma). Huyết thanh Fetal bovine serum (FBS) (Gibco), photphatse buffer saline pH 7,2 (1X) (PBS) (Gibco), dimethyl sulfoxide 10% (DMSO) (Gibco), trypan blue 0,4%, trypsin-EDTA 10X (Gibco), v.v... Kháng sinh Gentamicine (50 mg/ml) (Gibco), Streptomycin (1gram), Penicilin (1.000.000 IU), kháng nấm Fungizone (250 µg/ml) (Gibco).

- Bình nuôi cấy tế bào cổ vếch loại 25 cm², 75 cm² nắp thông khí (Corning SPL - Hàn Quốc), ống nghiệm thủy tinh. Ống bảo quản mẫu tế bào 2 ml (Corning SPL - Hàn Quốc). Panh gấp, dao mổ, kéo mổ, kim cầm côn trùng và dao nạo tế bào các loại.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

- Thí nghiệm phân lập mô bào và nhân nuôi sơ cấp được tiến hành theo phương pháp của Pant và cộng tác viên (2000) và theo phương pháp của Sudeep và cộng tác viên (2005) giới thiệu: Sử dụng chày nhựa phá vỡ màng bao liên kết giữa các tế bào làm tế bào phân tán trong môi trường. Sau đó dùng micropipette hút tế bào chuyển vào bình cổ vếch Corning 25 cm² có 4,0 ml môi trường nhân nuôi chứa 10% FBS, 0,5% kháng sinh. Sau đó tiến hành đậy nắp, bịt mếp bình bằng parafilm rồi đưa vào tủ nuôi ổn nhiệt.

- Các thí nghiệm nhân nuôi thứ cấp được tiến hành theo phương pháp của Lynn (1996), Mishuhashi (1976) và sử dụng các môi trường nhân nuôi tế bào theo khuyến cáo của Công ty Invitrogen Life Technologies (2010): Tế bào trong dịch tế bào nhân nuôi sơ cấp được tách bằng phương pháp trypsin hóa: Môi trường được loại ra khỏi bình nuôi cấy 25 cm² và lớp tế bào được rửa bề mặt với 2,0 ml đệm trypsin-EDTA 0,25%.

Sau 5 phút để ở nhiệt độ phòng (khoảng 28°C ± 5°C), dung dịch trypsin được hút ra và để yên bình

nuôi thêm 5 - 10 phút để tế bào tách ra khỏi bề mặt bình nuôi. Môi trường mới được thêm vào tạo thành dịch huyền phù. Chuyển dịch tế bào sang ống ly tâm, ly tâm với tốc độ 1000 vòng/phút trong thời gian 10 phút. Loại bỏ dịch cũ và cho vào 10ml môi trường chứa 20% FBS và dùng pipet hút đầy nhẹ nhàng để phân phối các tế bào đồng đều trong môi trường, sau đó chuyển một nửa đến một bình nuôi cấy 75 cm² mới, bổ sung thêm môi trường, tế bào được cấy lại vào môi trường mới theo tỉ lệ 1 : 2 (tế bào/môi trường), cho đến khi nuôi cấy đạt mật độ đủ (đánh giá bằng kính hiển vi).

- Bảo quản tế bào được tiến hành theo qui trình kỹ thuật do Công ty Invitrogen Life Technologies (2010) và Lynn (2002) hướng dẫn: ly tâm dịch tế bào ở 1000 vòng/phút trong 10 phút ở nhiệt độ phòng. Loại bỏ dịch nổi và thu hồi phần tế bào lắng đọng sau ly tâm. Tái huyền phù tế bào trong môi trường đông lạnh đã chuẩn bị sẵn. Chuyển 2,0 ml tế bào huyền phù vào lọ bảo quản đã làm lạnh (đặt trên đá lạnh) và chuyển vào tủ lạnh sâu -80°C.

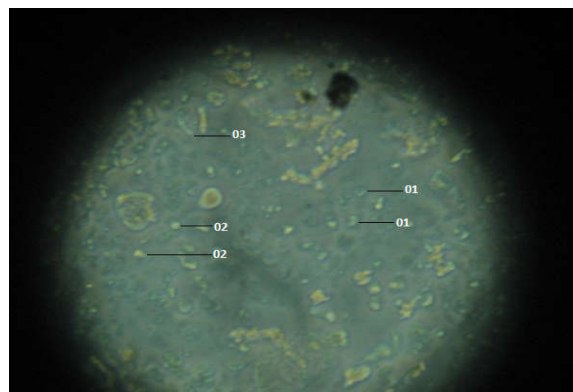
2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện từ năm 2011 - 2012 tại Viện Bảo vệ thực vật.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập mô bào và nhân nuôi sơ cấp tạo vật liệu khởi đầu

Như các nhà khoa học đã chỉ rõ để nhân nuôi tế bào côn trùng thành công đòi hỏi sự hiểu biết cơ bản về sinh lý tế bào côn trùng và cần tuân thủ phương pháp nhân nuôi tế bào (Lynn *et al.*, 2005; Grace *et al.*, 1962). Kết quả phân lập mô bào đã thu nhận được 9 nguồn mô tiền phôi. Trong đó có 3 nguồn mô sau nhân nuôi sơ cấp có hàm lượng tế bào đạt cao nhất là 2.tp, 4.tp và 9.tp.



Hình 1. Hình thái học khác nhau của tế bào sâu khoang nhân nuôi sơ cấp sau 6 ngày

Ghi chú: 01. Tế bào biểu mô; 02. Tế bào dạng hình cầu; 03. Tế bào dạng sợi kéo dài.

Quan sát sự phân chia tế bào của thí nghiệm nhân nuôi cấy sơ cấp sau 6 ngày, các mảnh tế bào bắt đầu co lại dần dần; phát sinh các sợi đa bào trong 10 ngày sau đó và bắt đầu bám vào bề mặt bình nuôi cấy, chúng bắt đầu phát triển chậm về số lượng và có hình thái học khác nhau (Gồm tế bào dạng sợi kéo dài, dạng hình cầu, dạng các bóng nhỏ không tròn đều cấu thành bởi tế bào biểu mô). Sau 18 ngày khi các mảnh tế bào bắt đầu phát triển, môi trường được thay thế hàng tuần với 4,0 ml môi trường mới và tế bào bắt đầu nhân lên theo cấp số nhân.

Sau 21 ngày nuôi cấy, cụm tế bào dạng cấu trúc mạng bao phủ toàn bộ đáy bình nuôi. Sang ngày thứ 27 những tế bào riêng lẻ, nhỏ hơn có nhiều hình thái khác nhau đã xuất hiện bám dính vào các sợi ở bên dưới. Sau 33 ngày nhân nuôi sơ cấp, khi bề mặt bình nuôi cấy được bao phủ hoàn toàn bởi tế bào đã bám dính, một lượng nhỏ tế bào bị trôi nổi trong môi trường. Khi đó tiến hành cấy chuyển sang bình nuôi cấy mới bằng cách dùng dụng cụ dao nạo tế bào cho đến khi một lượng dịch huyền phù tế bào đồng nhất được thu thập thì tiến hành chuyển sang bình nuôi cấy mới để nhân nuôi thứ cấp.

Bảng 1. Hàm lượng tế bào sau nhân nuôi sơ cấp mô tiền phôi

Nguồn thực liệu	Mật độ tế bào ($\times 10^9$ tế bào/ml) sau các ngày nhân nuôi					
	Ban đầu	10 ngày	18 ngày	21 ngày	27 ngày	33 ngày
2.tp (Mô tiền phôi)	1,00	6,03 ^a	6,00 ^a	7,12 ^a	20,50 ^a	14,04 ^a
4.tp (Mô tiền phôi)	1,00	3,29 ^b	2,42 ^b	6,79 ^{ab}	18,33 ^a	9,83 ^b
9.tp (Mô tiền phôi)	1,00	3,33 ^b	3,00 ^b	5,37 ^b	10,66 ^b	6,62 ^c

Ghi chú: Các số trong cùng một cột có chữ giống nhau thì không sai khác có ý nghĩa thống kê ở mức 95%.

Kết quả đếm số lượng tế bào trong nhân nuôi sơ cấp được thể hiện qua bảng 1. Tế bào mang mã hiệu 2.tp phân lập từ mô tiền phôi có khả năng phát triển sinh khối cao nhất, sau 10 ngày nhân nuôi đạt $6,03 \times 10^9$ tế bào/ml, sau 21 ngày đạt $7,12 \times 10^9$ tế bào/ml và đến 27 ngày nhân nuôi đạt tới $20,50 \times 10^9$ tế bào/ml. Tuy nhiên, đến 33 ngày sau nhân nuôi thì sinh khối tế bào có xu hướng phát triển chậm và hàm lượng tế bào chỉ đạt $14,04 \times 10^9$ tế bào/ml.

Qua kết quả thí nghiệm trên cho thấy có thể lựa chọn mô tiền phôi 2.tp để nhân nuôi và tiến hành các thí nghiệm nghiên cứu sự phát triển của tế bào *in vitro*.

3.2. Nhân nuôi thứ cấp

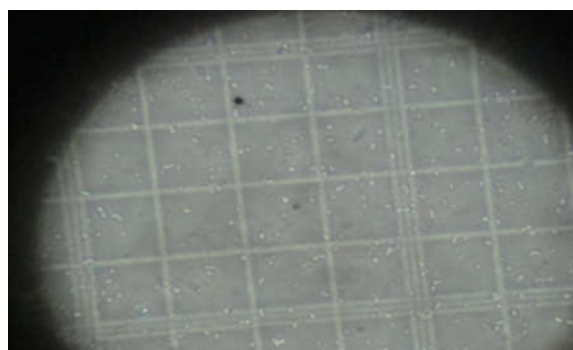
Ở ngày thứ 27 sau nhân nuôi sơ cấp, tế bào được chuyển sang bề mặt bình nuôi cấy sang môi trường mới chứa 10% FBS bằng phương pháp trypsin hóa. Vài lớp đơn tế bào có dạng sợi chiếm ưu thế trong lần cấy chuyển đầu tiên. Trong những lần cấy chuyển sau tế bào có hình dạng đồng nhất hơn, loại tế bào biểu mô chiếm ưu thế (Hình 2).

Tế bào tăng sinh khối theo cấp số nhân trong nuôi cấy thứ cấp. Khi các tế bào bám dính chiếm tất cả các bề mặt của bình nuôi cấy, để giữ sinh khối tế bào ở mật độ tối ưu cho sự tăng trưởng tiếp tục và kích thích phát triển sinh khối hơn nữa, tế bào được chia vào các bình nuôi cấy mới và cung cấp môi trường nuôi cấy mới. Vì vậy, trong suốt 4 tuần nuôi cấy thứ cấp đầu tiên, cứ 6 ngày bổ sung 2,0 ml môi trường.

Trong giai đoạn cấy chuyển tiếp theo, tế bào duy trì trong cùng điều kiện không có sự thay đổi hình thái. Ở giai đoạn cấy chuyển 18, các tế bào ở trạng thái ổn định, hình thái tế bào trong quá trình phân chia đồng đều hơn và sự tăng trưởng của tế bào ổn định hơn (Hình 3).



Hình 2. Tế bào biểu mô chiếm ưu thế



Hình 3. Quần thể tế bào $2,0 \times 10^{10}$ tế bào/ml đã thu được trong 27 ngày từ khi cấy vào bình nuôi $1,0 \times 10^9$ tế bào/ml. Sử dụng buồng đếm hồng cầu để đếm mật độ tế bào

Nuôi cấy thứ cấp tế bào mô tiền phôi sâu khoang qua 25 lần cấy chuyển, sau đó được làm đông lạnh và bảo quản ở -80°C .

Kết quả đếm số lượng tế bào trong nhân nuôi thứ cấp được thể hiện qua bảng 2 cho thấy, hàm lượng tế bào của nguồn thực liệu tế bào 2.tp từ mô tiền phôi

tăng dần từ lần cấy chuyển 1 đã đạt $14,04 \times 10^9$ tế bào/ml, đến lần thứ 6 đạt $16,87 \times 10^9$ tế bào/ml, lần thứ 12 đạt $22,66 \times 10^9$ tế bào/ml. Nhưng đến lần cấy chuyển thứ 18 bắt đầu thể hiện xu thế giảm xuống còn $21,70 \times 10^9$ tế bào/ml và đến lần thứ 25 thì chỉ còn $9,04 \times 10^9$ tế bào/ml.

Bảng 2. Hàm lượng tế bào của các nguồn thực liệu qua các chu kỳ nhân nuôi thứ cấp

Nguồn thực liệu	Nguồn mô tế bào	Mật độ tế bào ($\times 10^9$ tế bào/ml) qua các lần cấy chuyển				
		Lần 1	Lần 6	Lần 12	Lần 18	Lần 25
2.tp	Mô tiền phôi	14,04 ^b	16,87 ^a	22,66 ^a	21,70 ^a	9,04 ^a

Ghi chú: Các chữ cái a, b thể hiện sự sai khác có ý nghĩa ở mức 95%.

3.3. Kỹ thuật bảo quản lạnh đông tế bào ở nhiệt độ -80°C

DMSO là chất có tác dụng khử nước tự do trong nội bào và tế bào giúp bảo quản tế bào nguyên vẹn trong điều kiện lạnh. Trong quá trình nghiên cứu nhân nuôi tế bào côn trùng của nhiều nhà côn trùng học đã đưa ra nhiều kỹ thuật bảo quản đông tế bào côn trùng khác nhau, trong đó sử dụng các mức DMSO khác nhau.

Tiến hành thí nghiệm với mỗi ống bảo quản chứa $5,0 \times 10^9$ tế bào/ml. Kết quả thí nghiệm (Bảng 3) cho thấy sau 1 tháng bảo quản mật độ tế bào ở các mẫu bảo quản sử dụng mức DMSO khác nhau vẫn duy trì khả năng sống và phân chia với tốc độ khác nhau, cao nhất là ở mẫu bảo quản sử dụng 10% DMSO đạt $10,13 \times 10^{10}$ tế bào/ml. Tuy nhiên, khả năng sống và phân chia tế bào chỉ duy trì trong thời gian 1 tháng đầu bảo quản.

Bảng 3. Hàm lượng tế bào sau khi nhân nuôi trở lại qua các tháng bảo quản của mẫu tế bào 2.tp khi sử dụng các mức DMSO trong bảo quản khác nhau

Tỷ lệ DMSO (dimethyl sulfoxide) (%)	Mật độ tế bào ($\times 10^9$ tế bào/ml) sau các tháng bảo quản				
	Trước bảo quản	1 tháng	2 tháng	3 tháng	4 tháng
5,0	5,0	8,43 ^a	7,37 ^b	6,30 ^a	2,35 ^a
7,5	5,0	9,05 ^a	7,99 ^{ab}	6,55 ^a	2,57 ^a
10	5,0	10,13 ^a	9,50 ^a	8,16 ^a	2,74 ^a

Ghi chú: Các số trong cùng một cột có chữ giống nhau thì không sai khác có ý nghĩa thống kê ở mức 95%.

Điều này có thể do tế bào vẫn duy trì khả năng phân chia phát triển sinh khối nhất định khi nhân trở lại sau khi đưa vào bảo quản ở nhiệt độ -80°C , nhưng có xu hướng giảm dần theo thời gian bảo quản và do ở nhiệt độ thấp thì hoạt động của tế bào

bị giảm thấp tới mức tối thiểu theo hướng duy trì sự tồn tại của tế bào. Đồng thời, cũng có một bộ phận tế bào bị chết nên hàm lượng tế bào bắt đầu giảm dần từ sau 2 tháng bảo quản ở cả 3 công thức có bổ sung môi trường DMSO để duy trì sự tồn tại của tế bào. Sau 4 tháng bảo quản thì khả năng phát triển sinh khối của tế bào giảm đi khá rõ rệt và còn ở mức hàm lượng tế bào thấp nhất, chỉ còn đạt 2,35 - 2,74 $\times 10^{10}$ tế bào/ml.

Như vậy, nếu đưa vào bảo quản ở nhiệt độ -80°C thì tốt nhất chỉ nên giữ trong khoảng thời gian 1 tháng, sau đó cần phải đưa ra cấy chuyển phục hồi sức sống và khả năng phát triển sinh khối của tế bào sâu khoang.

3.4. Khả năng phát triển *in vitro* của tế bào sâu khoang trong các môi trường nhân nuôi khác nhau

Môi trường nhân nuôi là thành phần quan trọng nhất trong nuôi cấy tế bào côn trùng vì nó cung cấp các chất dinh dưỡng cần thiết, yếu tố tăng trưởng và hoocmon kích thích tăng trưởng tế bào, cũng như việc điều chỉnh độ pH và áp suất thẩm thấu của môi trường.

Mặc dù những thí nghiệm nuôi cấy tế bào côn trùng thời gian đầu đã được thực hiện bằng cách sử dụng môi trường tự nhiên thu được từ việc chiết xuất dinh dưỡng từ các mô và dịch cơ thể của chính côn trùng đó nhưng nhu cầu tăng dần về tiêu chuẩn, chất lượng môi trường của các thí nghiệm nuôi cấy tế bào côn trùng khác nhau dẫn đến sự phát triển của các loại môi trường đã được nghiên cứu xác định.

Môi trường truyền thống là TNM-FH và TC-100, tuy nhiên có nhiều môi trường được cải biến từ môi trường Grace cũng được sử dụng.

Thí nghiệm được tiến hành với mật độ tế bào ban đầu cấy vào là $10,0 \times 10^9$ tế bào/ml, môi trường không được thay thế hoặc bổ sung, sau 2 ngày, 6 và 10 ngày tiến hành lấy mẫu đếm số lượng tế bào.

Bảng 4. Mật độ tế bào khi nhân nuôi ở môi trường khác nhau

Môi trường nhân nuôi	Mật độ tế bào ($\times 10^9$ tế bào/ml) ở các ngày sau nhân nuôi		
	2 ngày	6 ngày	10 ngày
Excell 420- 14419C	13,94 ^a	18,84 ^a	16,30 ^a
Schneider S9895	11,30 ^a	10,66 ^b	11,71 ^a
TNM-FH T3285	10,83 ^a	14,14 ^{ab}	11,31 ^a
TC-100 T3160	11,27 ^a	11,62 ^b	11,52 ^a

Ghi chú: Các số trong cùng một cột có chữ giống nhau thì không sai khác có ý nghĩa thống kê ở mức 95%.

Kết quả thí nghiệm trình bày trong bảng 4 cho thấy đến 6 ngày sau nhân nuôi thì có 2 môi trường đều cho sinh khối có mật độ tế bào cao là Excell 420-14419C và TNM-FH T3285 với mật độ tế bào xác định được tương ứng là $18,84 \times 10^9$ và $14,14 \times 10^9$ tế bào/ml. Đặc biệt là môi trường Excell 420-14419C đạt $18,84 \times 10^9$ tế bào/ml; nhưng đều giảm sau 10 ngày nhân nuôi, chỉ còn đạt tương ứng là $16,30 \times 10^{10}$ và $11,31 \times 10^{10}$ tế bào/ml.

Như vậy, qua thí nghiệm cho thấy môi trường Excell 420-14419C là thích hợp nhất để nhân nuôi. Còn nếu sử dụng môi trường cơ bản TNM-FH thì tốt nhất vào sau 6 ngày nhân nuôi.

IV. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

4.1. Kết luận

- Đã phân lập và tách thành công 9 mẫu tế bào từ mô tiền phôi. Qua nhân nuôi sơ cấp đã lựa chọn được mẫu tế bào tiền phôi có tiềm năng là 2.tp, tế bào sinh trưởng bám dính và có khả năng phát triển sinh khối cao nhất sau 27 ngày nhân nuôi sơ cấp gấp 20,5 lần ban đầu đạt tới $20,5 \times 10^9$ tế bào/ml.

- Nuôi cấy thứ cấp tế bào mô tiền phôi sâu khoang qua 25 lần cấy chuyển, sau đó được làm đông lạnh và bảo quản ở -80°C . Qua nhân nuôi thứ cấp, hàm lượng tế bào của nguồn thực liệu mã số 2.tp đạt cao nhất ở lần cấy chuyển thứ 12 đạt $22,66 \times 10^9$ tế bào/ml.

- Bảo quản tế bào ở nhiệt độ -80°C thì tốt nhất chỉ nên giữ trong khoảng thời gian 1 tháng, sau đó cần phải đưa ra cấy chuyển phục hồi sức sống và khả năng phát triển sinh khối của tế bào sâu khoang.

- Khả năng phát triển *in vitro* của tế bào sâu khoang thích hợp khi nhân nuôi tế bào sâu khoang trong môi trường Excell 420-14419C, sau 6 ngày nhân nuôi đạt tới $1,884 \times 10^{10}$ tế bào/ml.

4.2. Đề nghị

Ứng dụng các kết quả nghiên cứu đã thu được để nhân nuôi tế bào sâu khoang phục vụ sản xuất chế phẩm sinh học bảo vệ thực vật vi-rút NPV. Đồng thời, tiếp tục nghiên cứu khả năng phát triển *in vitro* tế bào côn trùng nhằm nghiên cứu và chẩn đoán nhanh các baculovirus gây bệnh cho động vật và sản xuất vacxin cho động vật nuôi nhanh hơn, giá thành rẻ hơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Nguyễn Văn Cẩm, Hoàng Thị Việt, Huger A.M.**, 1996. Một số Baculovirus gây bệnh trên sâu hại thuộc Bộ Lepidoptera ở Việt Nam. Tuyển tập công trình nghiên cứu biện pháp sinh học phòng trừ dịch hại cây trồng (1990- 1995). NXB Nông nghiệp. Trang 17-23.
- Viện Sinh học nhiệt đới, Viện Nuôi trồng thủy sản II và Viện Hoá sinh hữu cơ Paolo Alto - Mỹ**, 1999. Sử dụng tế bào côn trùng SF9 để nghiên cứu và chẩn đoán nhanh các Baculovirus gây bệnh cho tôm. *Tạp chí sinh học* T9/99.
- Grace, T. D. C.**, 1962. Establishment of four strains of cells from insect tissues grown *in vitro*. *Nature* (London) 195: pp.788-789.
- Invitrogen Life Technologies**, 2010. *Insect cell lines: Growth and Maintenance of insect cell lines*. Books for Technical manual Service. Version K. 2002. 34 pgs.
- Lynn D. E., C. Goodman, G. Caputo**, 2005. *Technique for the development of new insect cell lines*. Report in *In vitro* biology annual meeting 2005. Society for *in vitro* Biology. Murhammer Press. Totowa. New York.
- Lynn D.E.**, 2002. *Routine maintained storage of Lepidopteran insect cell lines and Baculoviruses*. Methods in Molecular Biology: Baculovirus and insect cell expression protocol. Ed. by D.W. Murhammer. Murhammer Press. Totowa. New York. Vol. 338. Pgs. 187- 208.
- Lynn D.E.**, 1996. Development and Characterization Of Insect Cell Lines. *Kluwer Academic Publishers. Cytotechnology*. No.20, pp. 3-11.
- Mishuhashi J.**, 1976. Primary cultures of the cells from ovaries of the Cabbage Armyworm, *Mamestra brassicae* L. (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Development, Growth and Differentiation*. Volume 18. No. 2. Page 163- 166.
- Pant U., Athavale S.S., Vipat V.C.**, 2000. A new continuous cell line from larval hemocytes of *Spodoptera litura* (F.). *Indian Journal Exp. Biology*. Vol.38. pp.1201-1206.
- Sudeep A.B., Mourya D.T and Mishra A.C.**, 2005. Insect cell culture in research: Indian scenario. *Indian Journal of Medicin Research*, No. 121, 2005. Pp. 725-738.

Study on *in vitro* culture of *Spodoptera litura* cells for bio-pesticide production by infected virus

Ha Thi Thu Thuy, Le Van Trinh, Nguyen Thi Nhu Quynh

Abstract

Embryonic cells from mature ovaries are maintained continuously in the nutrient medium. The success of *Spodoptera litura* cell culture by 2.1p established embryonic tissue cells. In primary culture, at the twenty seven days of culture, cell adhered on the surface of the culture vessel and the number was folded up to 20 times. In subculture, the morphology of cells from embryo was rather stable at the 25th culturing transfer. The new cells should be stored at - 80°C for up to one month. After storing, the cells need to be recovered by culturing and appropriate medium for culturing was Excell 420-14419C. In this medium, the density of cells was 18.84×10^9 cells/ml.

Keywords: Insect cell strain, *S. litura*, cell culture

Ngày nhận bài: 15/4/2018

Ngày phản biện: 19/4/2018

Người phản biện: TS. Nguyễn Văn Liêm

Ngày duyệt đăng: 10/5/2018

NGHIÊN CỨU CẢI TIẾN HỆ THỐNG CHIA MẪU CỦA MÁY SẮC KÝ KHÍ TRONG QUÁ TRÌNH PHÂN TÍCH KHÍ NHÀ KÍNH (CH_4 , N_2O , CO_2) NHẪM HẠ THẤP GIỚI HẠN PHÁT HIỆN VÀ GIỚI HẠN ĐỊNH LƯỢNG

Phạm Thị Bưởi¹, Nguyễn Phương Linh¹, Phạm Thị Toan¹, Nguyễn Thị Thanh Hương¹, Trần Thị Thơm¹, Nguyễn Anh Vũ¹

TÓM TẮT

Phương pháp phân tích sắc ký khí là một phương pháp phân tích hiện đại đã được ứng dụng trong phân tích các khí nhà kính. Hiện nay, Trung tâm Phân tích và Chuyển giao Công nghệ môi trường, Viện Môi trường Nông nghiệp đã cải tiến và ứng dụng phương pháp phân tích sắc ký khí cho phân tích đồng thời ba khí nhà kính CH_4 , N_2O và CO_2 . Kết quả xác định được giới hạn phát hiện của CH_4 , N_2O và CO_2 lần lượt là 0,051 mg/L; 0,011 mg/L và 4,806 mg/L với độ thu hồi của phép phân tích lần lượt là 98%, 101% và 98%. Phương pháp này có thể ứng dụng để phân tích khí CH_4 , N_2O , CO_2 trong không khí, khí từ hệ thống Biogas, khí từ bãi rác và trong một số nguồn khí thải khác.

Từ khóa: Khí nhà kính, sắc ký khí, khí Biogas

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Khí nhà kính là những khí có khả năng hấp thụ các bức xạ sóng dài (hồng ngoại) được phản xạ từ bề mặt trái đất khi được chiếu sáng bằng ánh sáng mặt trời, sau đó phân tán nhiệt lại cho trái đất, gây nên hiệu ứng nhà kính. Các khí nhà kính chỉ chiếm khoảng 1% khí quyển, trong đó CO_2 chiếm 76%, CH_4 chiếm 16%, N_2O chiếm 6% tổng lượng phát thải khí nhà kính toàn cầu; riêng trong cơ cấu phát thải theo ngành, phát thải khí nhà kính từ nông nghiệp chiếm khoảng 26% (Anna Kijewska, Anna Bluszcz, 2016). Theo Bộ Tài nguyên và Môi trường (báo cáo năm 2014), đến năm 2005, lượng khí nhà kính phát thải trong lĩnh vực nông nghiệp là 80,58 triệu tấn CO_2 tương đương, chiếm 49,37% tổng lượng khí nhà kính phát thải của cả nước. Nồng độ khí nhà kính tăng lên góp phần gây nên hiện tượng nóng lên toàn

cầu, khiến băng ở hai cực tan ra làm tăng mực nước biển, điều này gây ra lũ lụt, hạn hán ảnh hưởng đến khí hậu, thời tiết và cuộc sống của con người. Do đó việc phân tích các khí nhà kính có ý nghĩa quan trọng, nó giúp đo đếm chính xác lượng phát thải của các nguồn thải nhằm tính toán tổng lượng phát thải từ đó có hướng cho các nghiên cứu nhằm giảm phát thải khí nhà kính.

Có rất nhiều phương pháp phân tích CH_4 , N_2O , CO_2 đã và đang được sử dụng. CO_2 có thể được phân tích bằng phương pháp hấp thụ hồng ngoại, phương pháp tạo kết tủa với dung dịch bari hydroxit, phương pháp chuẩn độ, phương pháp thử ống đầu dò với chỉ thị hydrazin và tím tinh thể, phương pháp thử độ axit với chỉ thị metyl da cam... Với phân tích N_2O , có thể sử dụng phương pháp so màu huỳnh quang, phương pháp hồng ngoại không phân tán. Nhìn

¹ Viện Môi trường Nông nghiệp