

Các yếu tố ảnh hưởng đến sự phát triển của phôi vô tính cà phê chè TN1 nuôi cấy trong hệ thống Bioreactor - RITA

Nguyễn Văn Thường*, Trần Thị Hoàng Anh, Nguyễn Văn Phương
Nguyễn Thị Mai, Nguyễn Thị Thu Thủy, Chu Thị Phương Loan
Trương Văn Tân, Nguyễn Viết Trụ, Nguyễn Thị Thúy Ngọc

Viện Khoa học Kỹ thuật Nông Lâm nghiệp Tây Nguyên

Ngày nhận bài 3.10.2015, ngày chuyển phản biện 6.10.2015, ngày nhận phản biện 1.11.2015, ngày chấp nhận đăng 9.11.2015

Nghiên cứu nhằm xác định ảnh hưởng của một số yếu tố tới sự phát triển của phôi vô tính cà phê chè giống TN1 (con lai thế hệ F_1 của cặp lai KH_{3-1} x Catimor) khi nuôi cấy trong các bình RITA của hệ thống Bioreactor. 4 nội dung nghiên cứu gồm: 1) Xác định thành phần môi trường thích hợp cho sự phát triển phôi có lá mầm; 2) Xác định ảnh hưởng của chu kỳ sục khí đến phát triển phôi có lá mầm; 3) Xác định thể tích môi trường trong bình RITA thích hợp cho sự phát triển phôi có lá mầm; 4) Xác định pH môi trường tối ưu cho quá trình phát triển phôi có lá mầm. Kết quả nghiên cứu cho thấy, phôi nuôi cấy trong bình RITA với môi trường MS có hàm lượng đường 10 g/l, chu kỳ sục khí mỗi 6 giờ với thời gian sục khí mỗi lần 1 phút, thể tích môi trường trong mỗi bình RITA 300 ml và pH môi trường nuôi cấy 5,8 cho kết quả phát triển phôi có lá mầm tốt nhất.

Từ khóa: Bioreactor, cà phê chè, phôi vô tính.

Chỉ số phân loại 4.6

THE FACTORS INFLUENCING THE DEVELOPMENT OF TN1 ARABICA COFFEE SOMATIC EMBRYOS CULTURED IN BIOREACTOR - RITA SYSTEM

Summary

The research was carried out in order to determine the influences of some factors on the development of TN1 arabica coffee somatic embryos cultured in bioreactor - RITA system. TN1 is the F_1 generation of hybridizing KH_{3-1} x Catimor. Four research contents including: 1) Identify the effect of medium components on growth of cotyledon embryos; 2) Examine the time intervals of air supply affecting cotyledon embryos; 3) Determine the influence of nutrition solution volume on the growth of cotyledon embryos; 4) Identify the optimum pH for the development of cotyledon embryos were carried out on the new cultivar TN1 of Arabica coffee. The result indicated that the RITA system with MS medium added saccharose concentration of 10 g/l, air supplying by aeration in one minute for every 6 hours, medium volume of 300 ml for each RITA unit, and pH 5.8 gave the best performance of cotyledon somatic embryos.

Keywords: arabica coffee, Bioreactor, somatic embryo.

Classification number 4.6

Đặt vấn đề

Giống cà phê chè TN1 là con lai thế hệ F_1 của cặp lai KH_{3-1} x Catimor, có năng suất cao và chất lượng tốt, đã được Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn công nhận giống mới vào năm 2011 và đề nghị đưa vào trồng thay thế các giống cà phê chè cũ năng suất thấp trong các chương trình tái canh cà phê. Tuy nhiên, chi phí sản xuất hạt giống lai rất cao và khó sản xuất khối lượng lớn trong thời gian ngắn. Vì vậy, để nhân nhanh với khối lượng lớn và làm giảm chi phí sản xuất cây giống, TN1 cần được nhân bằng invitro. Theo phương pháp này, khối mô sẹo (callus) được tạo ra từ mẫu lá sẽ tiếp tục được nuôi cấy để tái sinh phôi trước khi tạo thành cây hoàn chỉnh; tế bào mô sẹo có thể phân chia theo cấp số nhân và khi phân hóa thành phôi vô tính sẽ tạo ra số lượng lớn phôi trong thời gian ngắn.

Nhân giống cà phê bằng công nghệ Bioreactor đã được áp dụng ở quy mô lớn tại nhiều nước như Pháp, Thái Lan

*Tác giả liên hệ: Email: nvthuongvn@yahoo.com.vn

và Indonesia. Chỉ riêng Indonesia hàng năm cung cấp cho thị trường hàng triệu cây giống cả phê nhân bằng công nghệ Bioreactor. Ở Việt Nam, việc nghiên cứu ứng dụng công nghệ Bioreactor để sản xuất cây giống cả phê mới ở giai đoạn đầu.

Ưu điểm của công nghệ Bioreactor là: tăng nhanh sự phát triển của phôi tạo thành cây, vì vậy rút ngắn thời gian nuôi cấy; tăng tỷ lệ phát triển rễ cọc đảm bảo cho cây phát triển tốt, làm tăng hệ số nhân và giúp cây giống sinh trưởng đồng đều. Tuy nhiên, công nghệ Bioreactor trước đây cũng đã bộc lộ những khuyết điểm trong quá trình nuôi cấy như cây con dễ bị hiện tượng thủy tinh thể do mẫu khi nuôi cấy luôn được ngập chìm hoàn toàn, liên tục; và hệ thống cũng khó áp dụng đồng loạt cho nhiều giống khác nhau. Một vấn đề lớn nữa là nuôi cấy trong môi trường lỏng dễ bị nhiễm vi sinh vật như nấm và vi khuẩn... Vì vậy, hiện nay người ta đã có những cải tiến trong nuôi cấy trên môi trường lỏng có cung cấp không khí từ bên ngoài bằng cách sử dụng các bình RITA.

Khả năng thành công khi nuôi cấy trong bình RITA phụ thuộc nhiều yếu tố như: thành phần môi trường, không khí, pH, thời gian ngập mẫu... Vì vậy, để xây dựng được quy trình nhân giống hiệu quả, các yếu tố trên cần phải được nghiên cứu.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

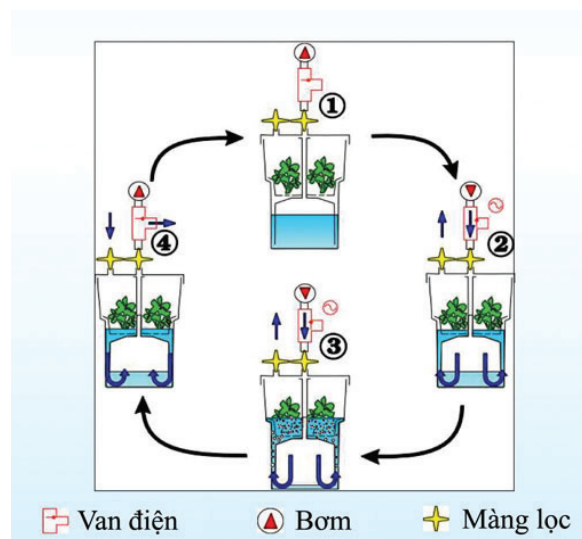
Đối tượng

Đối tượng là phôi cà phê chè ở dạng thủy lôi có kích thước 0,2-0,5 mm được tạo ra từ các mô sẹo của lá trong phòng nuôi cấy mô.

Phương pháp

Phôi cà phê cấy trên môi trường lỏng trong các bình RITA của hệ thống Bioreactor với mật độ 200 phôi/bình. Phòng nuôi cấy có thời gian chiếu sáng 16/24 giờ, cường độ chiếu sáng 2.000 lux, nhiệt độ $24 \pm 2^\circ\text{C}$, độ ẩm phòng $60 \pm 5\%$.

Hệ thống Bioreactor - RITA bao gồm nhiều bình RITA, một thiết bị bơm khí với các ống dẫn khí và các màng lọc vô trùng. Mỗi bình RITA có dung tích 1 lít gồm 2 phần: ngăn phía trên chứa phôi hoặc cây và ngăn phía dưới chứa môi trường. Khi hoạt động, hệ thống cấp khí sẽ cung cấp dòng khí qua van điện gắn màng lọc với áp suất vừa đủ để làm dâng môi trường từ phần dưới lên ngăn chứa phôi (hoặc cây) ở phía trên và làm ngập phôi (hoặc cây) trong dung dịch dinh dưỡng (hình 1).



Hình 1: cấu tạo và nguyên lý hoạt động của bình RITA

Trong thời gian làm ngập môi trường ngăn trên, dòng môi trường nuôi cấy chuyển động xoay ốc từ dưới lên với tốc độ chậm làm cho mẫu cây xoay trở và các mặt đều được tiếp xúc với môi trường, lượng không khí sau đó được thoát ra bên ngoài thông qua ống thoát có màng lọc không khí. Dinh dưỡng trong bình được duy trì trong suốt thời gian nuôi cấy mà không cần thay mới môi trường, điều này làm giảm mức độ nhiễm nấm, vi khuẩn của các phôi và tế bào trong bình, giảm được công cấy chuyển và tăng tỷ lệ phát sinh lá mầm, rễ và sinh khối của cây.

Xác định thành phần môi trường thích hợp cho phát triển phôi có lá mầm: 1) Xác định ảnh hưởng của thành phần môi trường và đường đến phát triển phôi: thí nghiệm 2 yếu tố bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên. Yếu tố môi trường: MS, MS1/2 có bổ sung BA (0,15 mg/l). Yếu tố hàm lượng đường: 0, 10 và 20 g/l. Tổng số 6 nghiệm thức, 3 lần lặp, mỗi nghiệm thức gồm 3 bình. Thời gian khảo sát là 10 tuần kể từ khi nuôi cấy; 2) Xác định ảnh hưởng của thành phần môi trường và than hoạt tính đến phát triển phôi: thí nghiệm 2 yếu tố bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên. Yếu tố môi trường: MS, MS1/2 có bổ sung BA (0,15 mg/l); yếu tố than hoạt tính: 1, 2 và 3 g/l. Tổng số 6 nghiệm thức, 3 lần lặp, mỗi nghiệm thức gồm 3 bình. Thời gian khảo sát: 10 tuần từ khi nuôi cấy.

Xác định ảnh hưởng của chu kỳ sục khí đến phát triển phôi: môi trường MS có bổ sung BA (0,15 mg/l). Thí nghiệm thời gian sục khí mỗi chu kỳ 1 phút với 5 chu kỳ sục khí: 5, 6, 7, 8 và 9 giờ (tương ứng 5 nghiệm thức); lặp lại 3 lần. Thời gian khảo sát: 10 tuần từ khi nuôi cấy.

Xác định thể tích môi trường thích hợp cho sự phát triển phôi có lá mầm: môi trường MS có bổ sung BA (0,15 mg/l). Thí nghiệm áp dụng chu kỳ sục khí cho kết quả tốt nhất rút ra từ thí nghiệm trên, gồm 4 nghiệm thức tương ứng thể tích môi trường lỏng trong bình RITA là 200, 300, 400 và 500 ml; lặp lại 3 lần. Thời gian khảo sát: 10 tuần từ khi nuôi cấy.

Xác định pH môi trường tối ưu cho quá trình phát triển phôi: môi trường MS có bổ sung BA (0,15 mg/l). Thí nghiệm với 4 nghiệm thức tương ứng các độ pH là 5,2; 5,5; 5,8 và 6,1; lặp lại 3 lần. Thời gian khảo sát: 10 tuần từ khi nuôi cấy.

Chỉ tiêu theo dõi cho các thí nghiệm: chiều cao cây (mm), trọng lượng cây (mg), chiều dài rễ (mm), số rễ/cây và tỷ lệ cây thủy tinh hoá (%).

Số liệu được xử lý bằng các phần mềm thống kê MSTATC. Giá trị trung bình của các nghiệm thức được so sánh bằng trắc nghiệm Duncan ở mức xác suất $p \geq 95\%$. Xử lý số liệu theo nguyên tắc chuyển đổi số liệu [1]. Trong bảng số liệu, các số trung bình trên cùng một cột theo sau bởi các chữ cái giống nhau thì khác nhau không có ý nghĩa thống kê.

Kết quả

Thành phần môi trường ảnh hưởng đến phát triển phôi

Bảng 1: ảnh hưởng của môi trường MS và hàm lượng đường đến phát triển phôi

Môi trường	Hàm lượng đường (g/l)	Tỷ lệ phôi có lá mầm (%)	Chiều cao cây (cm)	Tỷ lệ cây bị thủy tinh thể (%)
MS1/2	0	5,00 d	0,25 c	0,45
MS1/2	10	72,67 b	1,22 a	0,11
MS1/2	20	0,50 f	0,09 d	0,09
MS	0	13,00 c	0,41 b	0,11
MS	10	95,56 a	1,25 a	0,33
MS	20	2,33 e	0,4 b	0,22

Ghi chú: số liệu trong cột 3 và cột 4 được chuyển đổi theo công thức $\text{Arcsin} \sqrt{x}$ trước khi xử lý thống kê theo trắc nghiệm Duncan

Kết quả ở bảng 1 cho thấy, môi trường MS và hàm lượng đường 10 g/l là thích hợp nhất cho việc tái sinh phôi có lá mầm trong Bioreactor và nguồn carbon có ảnh hưởng đặc biệt quan trọng trong tái sinh cây *in vitro*. Nói chung, đường là nguồn carbohydrat được lựa chọn, bởi vì nó là carbon phổ biến nhất trong vỏ cây [2], do đó, hàm lượng đường ở các công thức khác nhau đã ảnh hưởng đến tỷ lệ tái sinh phôi có lá mầm. Ở môi trường MS không bổ sung đường, tỷ lệ phôi tái sinh lá mầm rất thấp (chiếm 13%), trong khi

đó có bổ sung đường với nồng độ thích hợp (10 g/l) tỷ lệ tái sinh lá mầm cao nhất (đạt 95,56%) và bổ sung hàm lượng đường cao quá (20 g/l) đã hạn chế tỷ lệ nảy mầm phôi.

Đối với phôi cà phê được nuôi cấy ở môi trường MS và MS1/2 có bổ sung 10 g/l đường đã giúp cho phôi sinh trưởng và phát triển tốt, chiều cao cây đạt 1,22-1,25 cm. Các môi trường còn lại không thích hợp cho phôi phát triển, trọng lượng và chiều cao cây thấp hơn. Chỉ tiêu tỷ lệ bị thủy tinh thể trên môi trường có bổ sung đường có tỷ lệ rất thấp, gần như không đáng kể (0,11-0,33%).

Môi trường nuôi cấy có bổ sung than hoạt tính là không thích hợp cho sinh trưởng và phát triển của phôi có lá mầm (bảng 2). Tỷ lệ phôi phát triển có lá mầm rất thấp, chưa đạt đến 1% (cho tất cả các công thức). Chiều cao cây cao nhất chỉ đạt 0,8 cm ở môi trường MS1/2 có bổ sung than hoạt tính với tỷ lệ 3‰. Than không có tác dụng thúc đẩy tỷ lệ nảy mầm và sinh trưởng phát triển của cây nhưng có tác dụng giảm được thủy tinh thể, do hấp thụ các chất độc và các chất ức chế sinh trưởng thực vật như các phenolic, dịch rỉ nâu sinh ra từ mẫu môi trường nuôi cấy [3].

Bảng 2: ảnh hưởng của môi trường MS và tỷ lệ than hoạt tính đến phát triển phôi

Môi trường	Tỷ lệ than hoạt tính (%)	Tỷ lệ phôi có lá mầm (%)	Chiều cao cây (cm)	Tỷ lệ cây bị thủy tinh thể (%)
MS1/2	1	0,44	0,49c	0,11
MS1/2	2	0,67	0,71b	0
MS1/2	3	0,89	0,80a	0,11
MS	1	0,56	0,70b	0,22
MS	2	0,67	0,79a	0,22
MS	3	0,78	0,67b	0

Ghi chú: số liệu trong cột 4 được chuyển đổi theo công thức $\sqrt{x+0,5}$ trước khi xử lý thống kê theo trắc nghiệm Duncan

Ngoài ra, than hoạt tính cũng có thể hấp thụ các vitamin, cytokinin và auxin, làm thay đổi tỷ lệ thành phần các chất có trong môi trường nuôi cấy cũng như pH môi trường, do đó làm cho phôi không đủ nội sinh để phát triển thành cây hoàn chỉnh. Như vậy, ở giai đoạn tái sinh phôi lá mầm cho cây cà phê không nên sử dụng than hoạt tính.

Ảnh hưởng của chu kỳ sục khí đến phát triển phôi

Các công thức có chu kỳ sục khí 5 và 6 giờ ảnh hưởng đến quá trình phát sinh lá mầm của phôi thủy lôi tốt hơn chu kỳ 7, 8 và 9 giờ (bảng 3). Sau 8 tuần nuôi cấy ngập chìm trong hệ thống RITA, phôi thủy lôi bắt

đầu phát sinh lá mầm. Phôi thủy lồi ở chu kỳ 8 và 9 giờ xuất hiện lá mầm chậm (sau 10 tuần nuôi cấy), trong khi tỷ lệ phôi phát sinh lá mầm ở chu kỳ 6 giờ đạt cao nhất 87,3% (sau 8 tuần nuôi cấy).

Bên cạnh đó, hiện tượng thủy tinh thể trong nuôi cấy lỏng thường xuyên xảy ra, mặc dù môi trường lỏng giúp cho sự hấp thu chất dinh dưỡng dễ dàng hơn. Nhưng trong chu kỳ 5 giờ thì tỷ lệ phôi bị thủy tinh thể cao nhất 0,2% và ở 2 công thức 8 và 9 giờ phôi không bị thủy tinh thể. Điều này nói lên chu kỳ sục khí càng ngắn (trong cùng thời gian làm ngập) thì hiện tượng thủy tinh thể càng dễ xảy ra hơn. Nguyên nhân có thể là cây thừa nước, dẫn đến tỷ lệ cây bị thủy tinh thể cao.

Bảng 3: ảnh hưởng chu kỳ sục khí đến phát triển phôi

Chu kỳ sục khí (giờ)	Thời gian phôi phát sinh lá mầm (tuần)	Tỷ lệ phôi có lá mầm (%)	Tỷ lệ cây thủy tinh thể (%)	Chiều cao cây (cm)	Số rễ/cây
5	8	60,6 b	0,2	1,40 b	1
6	8	87,3 a	0,1	1,94 a	2
7	8	46,0 c	0,1	1,07 d	1
8	10	45,3 c	0	1,19 c	1
9	10	29,6 d	0	0,96 d	1

Ghi chú: số liệu trong cột 3 và 5 được chuyển đổi theo công thức

$Arcsin \sqrt{x}$ trước khi xử lý thống kê theo trắc nghiệm Duncan

Chu kỳ sục khí 6 giờ có tỷ lệ phát sinh lá mầm cao nhất và sự sinh trưởng phát triển của phôi lá mầm cũng tốt nhất trong các chu kỳ khảo sát. Sau 8 tuần nuôi cấy, chu kỳ 6 giờ có chiều cao cây đạt lớn nhất (1,94 cm). Chu kỳ 9 giờ cho chiều cao phôi lá mầm kém nhất trong các công thức khảo sát (0,96 cm) sau 10 tuần nuôi cấy. Phôi lá mầm ở tất cả các chu kỳ sục khí đều ra rễ đều nhau, trung bình 1-2 rễ. Như vậy, sử dụng Bioreactor nuôi cấy phôi có lá mầm với thời gian sục khí 1 phút chu kỳ mỗi 6 giờ là thích hợp cho phát triển phôi lá mầm của cà phê chè.

Thể tích môi trường trong bình RITA và sự phát triển phôi

Bảng 4: ảnh hưởng thể tích môi trường nuôi cấy đến phát triển phôi

Thể tích (ml)	Tỷ lệ phôi phát sinh lá mầm (%)	Tỷ lệ nhiễm nấm, khuẩn (%)	Tỷ lệ phôi thủy tinh thể (%)	Chiều cao cây (mm)
100	42,0 d	0,00	0,00	11,5 d
200	50,4 c	3,64	0,01	15,9 b
300	88,6 a	4,10	0,01	19,3 a
400	80,7 b	11,57	0,02	13,6 c

Ghi chú: số liệu cột 2 và cột 5 được chuyển đổi theo công thức $Arcsin \sqrt{x}$ trước khi xử lý thống kê theo trắc nghiệm Duncan

Kết quả bảng 4 cho thấy, ở thể tích 100-200 ml, lượng dinh dưỡng cung cấp cho phôi ít nên ảnh hưởng xấu đến tỷ lệ phát triển thành phôi có lá mầm và chiều

cao phôi; tuy tỷ lệ nhiễm nấm, khuẩn thấp (0-3,64%) và tỷ lệ phôi bị thủy tinh thể thấp (0-0,01%).

Với thể tích dung dịch 300-400 ml, tỷ lệ phôi phát sinh lá mầm > 80%, nhưng ở thể tích 400 ml có tỷ lệ nhiễm nấm và khuẩn cao (11,57%), đồng thời tỷ lệ phôi bị thủy tinh thể cũng cao hơn. Do thể tích lớn nên khi máy sục khí làm nước dâng lên miệng bình, làm nấm và vi khuẩn dễ xâm nhập vào bình. Như vậy, thể tích môi trường trong bình RITA thích hợp để nuôi cấy phôi có lá mầm đạt tỷ lệ cao sinh trưởng tốt là 300 ml.

Độ pH tối ưu cho quá trình phát triển phôi

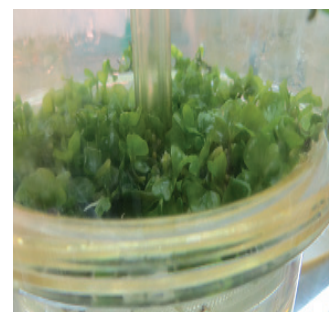
Độ pH có tác động rất lớn đến sinh trưởng và phát triển của cây do ảnh hưởng đến sự hoạt động của các nguyên tố đa, vi lượng trong môi trường nuôi cấy. Kết quả ở bảng 5 cho thấy, phôi không phát triển trong môi trường có pH = 5,2-5,5, do pH dưới 5,5 thì khả năng hoạt động của P, K, Ca, Mg và Mo giảm đi rất nhanh, đồng thời mô thực vật sẽ bị ức chế một cách rõ rệt [4]. pH = 5,8 là thuận lợi nhất cho sự hòa tan và khả năng hấp thụ các ion khoáng ở tế bào thực vật, do vậy phôi phát triển tốt, đạt chiều cao 19,5 mm.

Bảng 5: ảnh hưởng của pH lên khả năng phát triển của phôi

pH	Thời gian phôi phát triển cây lá mầm (tuần)	Chiều cao cây lá mầm (mm)	Tỷ lệ cây lá mầm biến dị (%)	Tỷ lệ cây bị thủy tinh thể (%)
5,2	-	-	-	-
5,5	-	-	-	-
5,8	4	19,5	-	0,01
6,1	4	9,8	-	0,01



Phôi ở tuần 1



Cây con sau tuần 8

Kết luận

Trong các bình RITA của hệ thống Bioreactor, môi trường MS được bổ sung đường với hàm lượng 10 g/l, thời gian sục khí 1 phút sau mỗi chu kỳ 6 giờ, thể tích môi trường trong mỗi bình 300 ml và pH môi trường nuôi cấy 5,8 là những điều kiện thích hợp nhất cho quá trình tái sinh phôi và phát triển của cây con.

Trong thời gian tới, đề nghị áp dụng kết quả nghiên cứu của đề tài vào quy trình nhân giống cà phê chè để nhân nhanh giống, đáp ứng nhu cầu của thị trường.

Lời cảm ơn

Bài báo là một trong những nội dung của đề tài “Nghiên cứu xây dựng hệ thống nhân giống cây cà phê chè (*Arabica*) bằng công nghệ Bioreactor” thuộc Chương trình khoa học và công nghệ trọng điểm cấp nhà nước “Nghiên cứu ứng dụng và phát triển công nghệ sinh học” (KC04/11-15) giai đoạn 2011-2015. Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn Bộ Khoa học và Công nghệ đã tạo điều kiện thuận lợi cho việc thực hiện đề tài này và cảm ơn sự tham gia đóng góp của các cán bộ nghiên cứu thuộc Viện Khoa học Kỹ thuật Nông Lâm nghiệp Tây Nguyên.

Tài liệu tham khảo

- [1] Kwanchai A Gomez, Arturo A Gomez (1984), *Statistical Procedures for Agricultural Research*.
- [2] Rybczynski, Borkowska, et al (2007), “Effect of sucrose concentration on photosynthetic activity of in vitro cultures gentiana kurroo (royle) germlings”, *Acta physiologiae plantarum*, **29(5)**, pp.445-453.
- [3] Afreen, et al (2002), “Photo autotrophic culture of Coffea arabusta somatic embryos: photosynthetic ability and growth of different stage embryos”, *Ann. Bot.*, **90**, pp.11-19.
- [4] Lazzeri P.A, Hildebrand D.E, Collin G.B (1987), “Soybean somatic embryogenesis: effect of nutritional, physical and chemical factors”, *Plant cell Tiss Org Cult*, **10**, pp.209-220.