

THIẾT KẾ VÀ NGHIÊN CỨU HỆ THỐNG BIOREACTOR NGÂM CHÌM ĐỊNH KỲ CHO CÂY DỨA CAYENNE

Nguyễn Bằng Phi

Trường Đại học Thủ Dầu Một

TÓM TẮT

Dứa là cây ăn quả nhiệt đới, là một trong ba loại cây ăn quả được quan tâm hàng đầu của nước ta (chuối, dứa, cam/quýt) dùng để ăn tươi, đặc biệt có thể chế biến xuất khẩu. Để tạo ra các giống cây dứa có chất lượng và thời gian thu hoạch đồng nhất, cần phải tiến hành nhân giống dứa bằng phương pháp nuôi cấy mô. Tuy nhiên, các phương pháp nuôi cấy mô trên môi trường thạch truyền thống cho hiệu quả năng suất không cao. Do vậy, việc áp dụng hệ thống bioreactor để tăng năng suất, giảm chi phí nhân công là vấn đề rất cần thiết. Hiện nay có rất nhiều hệ thống bioreactor, trong đó bioreactor ngâm chìm định kỳ cho kết quả tốt trên đối tượng cây dứa cayenne. Kết quả cho thấy thể tích dung dịch dinh dưỡng 1.5L tốt hơn 1L. Thời gian ngâm 10 phút, định kỳ 2h một lần cho kết quả tốt nhất.

Từ khóa: cây dứa

1. MỞ ĐẦU

Dứa là cây ăn quả rất phổ biến ở khu vực châu Á cũng như ở châu Âu. Cùng với việc dùng làm thức ăn có giá trị dinh dưỡng và tác dụng tốt trên sức khỏe, dứa còn được chiết xuất enzyme bromelin ứng dụng trong các lĩnh vực thuộc da, làm film. Năm 1998, kim ngạch xuất khẩu dứa của Mỹ đạt 3,4 tỷ USD và xu hướng ngày càng tăng. Theo thống kê năm 2001 sản lượng dứa của thế giới đạt 13.739.000 tấn, phân bố theo các châu lục và khu vực: châu Phi 2.229.000 tấn, Bắc Mỹ 1.512.000 tấn, Nam Mỹ 2.556.000 tấn, châu Á 7.275.000 tấn và châu Đại Dương 164.000 tấn. Các nước có sản lượng dứa cao như Thái Lan 2.300 tấn, Philipin 1.572 tấn, Brazil 1.442 tấn, Trung Quốc 1.284 tấn, Nigeria 881 tấn. Ở Việt Nam, tính đến năm 2000 diện tích trồng dứa của miền Bắc là 9.675 ha chiếm 26,48% diện tích trồng dứa cả nước, chủ yếu ở vùng Đông Bắc và đồng bằng sông Hồng và diện tích gieo trồng của miền Nam là 26.866 ha chiếm 73,52% diện tích trồng dứa cả nước, chủ yếu tập trung ở vùng đồng bằng sông Cửu Long. Các tỉnh có diện tích gieo trồng dứa khá lớn là Kiên Giang (9.200 ha), Tiền Giang (7.803 ha), Bạc Liêu (3.625ha), Cần Thơ (1.338 ha), Long An (661 ha), Quảng Nam (2.320 ha), Bình Định (500 ha), Thanh Hóa (2.900 ha), Ninh Bình (1.572 ha), Nghệ An (600 ha), Bắc Giang (657 ha).

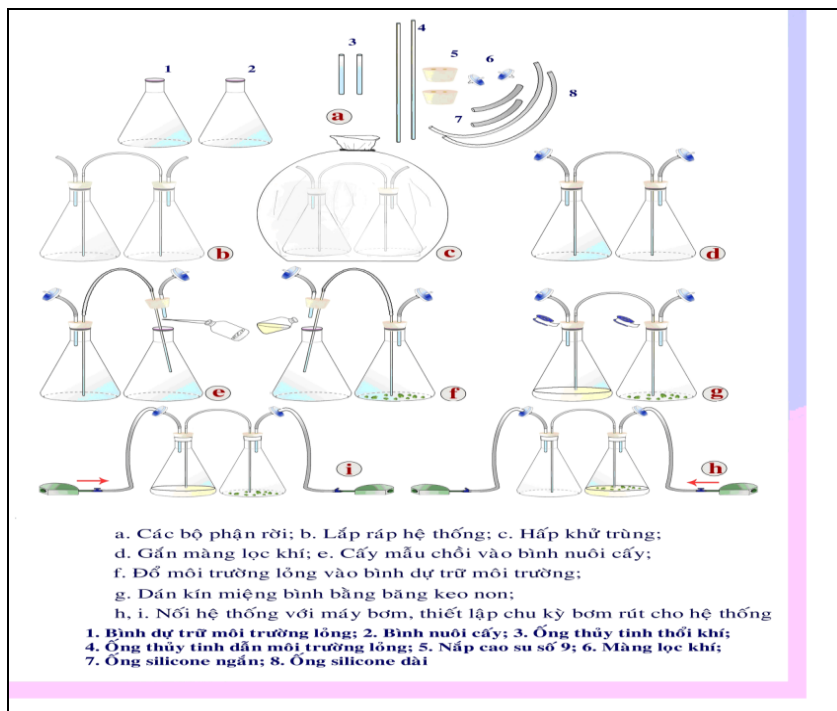
Việc tận dụng lại chồi con của cây dứa từ cây mẹ không mang lại hiệu quả kinh tế do những cây này thường cho quả nhỏ dần trong các mùa vụ sau. Việc cung ứng đủ giống dứa đạt chất lượng và sạch bệnh là vấn đề cấp thiết. Nhân giống vô tính *in vitro* có thể đáp ứng được những yêu cầu về chất lượng đồng đều với số lượng lớn. Tuy nhiên việc nhân chồi dứa bằng phương pháp nuôi cấy mô vì nhân giống tốn nhiều chi phí về lao động, phải cấy từng chai một trong điều kiện vô trùng nghiêm ngặt, và phải cấy chuyển sau khoảng 4-6

tuần do cạn kiệt môi trường dinh dưỡng. Việc sản xuất giống ở quy mô công nghiệp khó có thể thực hiện một cách tự động hóa được. Từ những thực trạng đó, năm 1981 Takayama lần đầu tiên ứng dụng bioreactor để nhân giống với số lượng lớn trên đối tượng cây Begonia. Qua quá trình phát triển, nhiều kiểu bioreactor khác nhau ra đời như: bioreactor sục khí, bioreactor khuấy, bioreactor ngâm chìm định kỳ... Trong đó, bioreactor ngâm chìm định kỳ trong môi trường lỏng đem lại hiệu quả cao hơn phương pháp nhân giống thông thường trên môi trường thạch và phương pháp nuôi cấy trong dịch lỏng có khuấy và sục khí liên tục.

Bioreactor ngâm chìm định kỳ bao gồm 2 bình thông nhau, một bình chứa môi trường dinh dưỡng và một bình chứa mẫu cây invitro. Mẫu cây sẽ được ngâm chìm trong khoảng thời gian nhất định và môi trường được chuyển sang bình môi trường, nhằm tạo sự thoáng khí cho cây. Trên môi trường thạch nuôi cấy mô truyền thống làm trong chai, cây con có sự thoáng khí tốt, tuy nhiên tỷ lệ tiếp xúc với chất dinh dưỡng bị hạn chế, chỉ ở phần rễ. Trên môi trường bioreactor lỏng sục khí, cây con tiếp xúc với chất dinh dưỡng nhiều nhất, tuy nhiên khi tiếp xúc dinh dưỡng lỏng trong thời gian dài làm cho cây invitro có hiện tượng thủy tinh thể (Smith và Spoomer 1995, Aitcken-Christie và cs, 1995). Do vậy, phương pháp ngâm chìm định kỳ giải quyết được các vấn đề trên. Tỷ lệ ra chồi ở bioreactor ngâm định kỳ cho kết quả tốt hơn 300% so với bioreactor ngâm chìm sục khí và 400% so với nuôi cấy mô trên môi trường thạch truyền thống (C.G. Borroto và cs, 1998). Thời gian ngâm chìm định kỳ thông thường 4-6 tuần là tốt nhất, do chất dinh dưỡng cạn kiệt (Maene and Debergh, 1985).

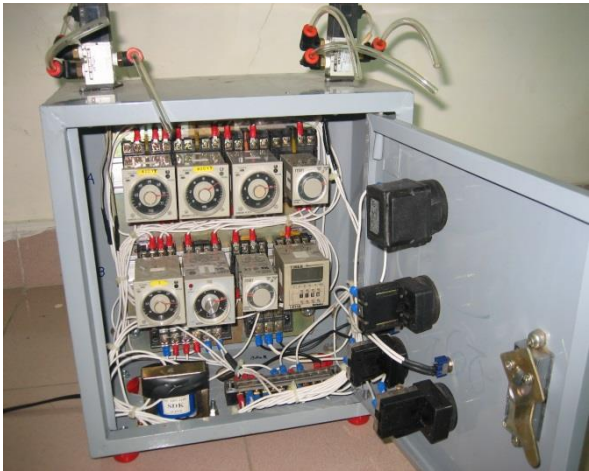
2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Thiết kế hệ thống bioreactor ngâm chìm định kỳ

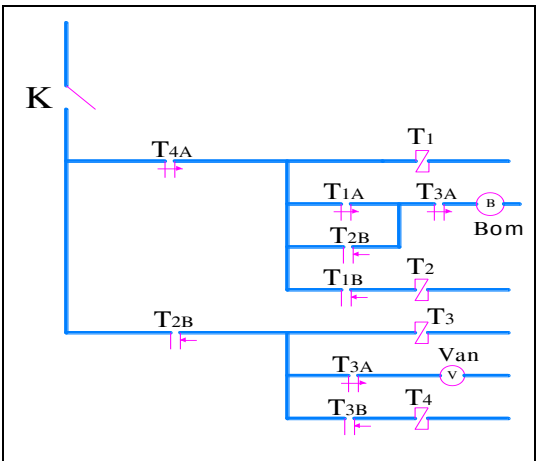


Hình 1. Sơ đồ lắp ráp hệ thống bioreactor ngâm chìm định kỳ (Dương Tấn Nhựt và cs, 2005)

Hệ thống được thiết kế gồm 2 bình thông nhau, môi trường dinh dưỡng được di chuyển qua lại một cách tự động. Toàn bộ hệ thống phải đảm bảo vô trùng. Việc vận chuyển chất dinh dưỡng qua lại giữa 2 bình được thực hiện nhờ sự thay đổi áp suất một cách tự động nhờ hệ thống điều khiển timer trên bơm khí nén.



Hình 2. Hệ thống timer điều khiển bơm khí nén (Nguyễn Bằng Phi, 2006)



★ **Thí nghiệm 1:** Khảo sát hiệu quả nhân chồi dựa bằng bioreactor sục khí.

Thí nghiệm 1a: Ảnh hưởng của thể tích môi trường đến khả năng nhân chồi dựa bằng bioreactor sục khí liên tục

Bảng 1. Bố trí nghiệm thức của thí nghiệm 1a

Nghiệm thức	Thể tích môi trường (lít)
1	1
2	1,5

Thí nghiệm 1b: Ảnh hưởng của thể tích môi trường đến khả năng nhân chồi dựa bằng bioreactor sục khí gián đoạn (10phút/1chu kỳ)

Bảng 2. Bố trí nghiệm thức của thí nghiệm 1b

Nghiệm thức	Thể tích môi trường (lít)
1	1
2	1,5

★ **Thí nghiệm 2:** Khảo sát thời gian ngâm chìm định kỳ thích hợp cho việc nhân chồi cây dừa.

Bảng 3. Bố trí nghiệm thức của thí nghiệm 2

Nghiệm thức	Thời gian ngâm chìm (phút/giờ)
1	10 phút/1giờ
2	10 phút/2giờ

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Thí nghiệm 1a: Ảnh hưởng của thể tích môi trường đến khả năng nhân chồi dựa bằng bioreactor sục khí liên tục.

Kết quả nhận được cho thấy với cùng một mẫu cây dừa như nhau khi xử lý với thể tích khác nhau cho kết quả tăng chồi trung bình khác nhau. Khi phân tích trên thống kê cho thấy có sự khác biệt có ý nghĩa giữa 2 phương pháp. Mẫu chồi dừa trong bình thể tích 1,5 lít có số chồi tăng hơn so với thể tích 1 lít. Giải thích điều này là do trong thể tích 1,5 lít lượng chất dinh dưỡng cần thiết cho việc nhân chồi nhiều hơn so với thể tích 1 lít.

Bảng 4. Các chỉ tiêu theo dõi của thí nghiệm 1a

Nghiem thuc	MT lỏng sục khí liên tục 1L	MT lỏng sục khí liên tục 1,5L
Trọng lượng tươi trung bình(g)	3,12	3,75
Trọng lượng khô trung bình(g)	0,3	0,35
Hệ số nhân chồi	12,5	13,5
Chiều cao chồi(cm)	2,15	2,32
Đặc điểm hình thái	Lá bị đen, cứng, dòn tích nhiều nước, không có hiện tượng thủy tinh thể	Lá bị đen, cứng, dòn tích nhiều nước, không có hiện tượng thủy tinh thể

Bảng 5. Ảnh hưởng của yếu tố thể tích đến hệ số nhân chồi của cây dứa Cayenne trong bình bioreactor sục khí liên tục

Nghiem thuc	Hệ số nhân chồi
SỤC LIÊN TỤC THỂ TÍCH 1L	10,97 ^a
SỤC LIÊN TỤC THỂ TÍCH 1,5L	14,10 ^b

3.2. Thí nghiệm 1b: Ảnh hưởng của thể tích môi trường đến khả năng nhân chồi dứa bằng bioreactor sục khí gián đoạn (10phút/1chu kỳ)

Trong phương pháp sục khí gián đoạn lượng oxy cung cấp cho mẫu cây dứa không đủ. Do vậy, bình 1,5L có thể tích lớn hơn nên lượng oxy trung bình cung cấp cho mẫu dứa không bằng lượng oxy trung bình cung cấp cho bình 1L. Kết quả là mẫu cây dứa không thể phát triển cũng như sử dụng chất dinh dưỡng một cách hiệu quả.

Oxygen chỉ hòa tan một phần trong nước (0,25 mmol l-1 ở 25°C, 1 atm, oxygen chiếm 21% thể tích không khí) nên để đáp ứng nhu cầu oxygen cho sự phát triển của mô thực vật, một lượng lớn oxygen cần được khuếch tán vào môi trường nuôi cấy.

Bảng 6. Kết quả nhân chồi trong bioreactor sục khí gián đoạn với thể tích 1lít và 1.5 lít

Nghiem thuc	Hệ số nhân chồi
SỤC KHÍ GIÁN ĐOẠN 1L	11,13 ^a
SỤC KHÍ GIÁN ĐOẠN 1,5L	7,24 ^b

3.3. Thí nghiệm 2: Ảnh hưởng của thời gian ngâm chìm định kỳ đến khả năng nhân chồi dứa bằng TIB

Bảng 7. Kết quả các chỉ tiêu theo dõi của thí nghiệm 2

Nghiem thuc	MT lỏng ngâm chìm định kỳ 10'/1h	MT lỏng ngâm chìm định kỳ 10'/2h
Trọng lượng tươi trung bình(g)	2,07	4,73
Trọng lượng khô trung bình(g)	0,15	0,287
Hệ số nhân chồi	14,83	21,25
Chiều cao chồi (cm)	2,27	2,76
Đặc điểm hình thái	Cây con phát triển tốt, lá xanh ,mềm,không tích nước, không có hiện tượng thủy tinh thể	Cây con phát triển tốt, lá xanh ,mềm,không tích nước, không có hiện tượng thủy tinh thể



Chồi dừa sau 4 ngày nuôi

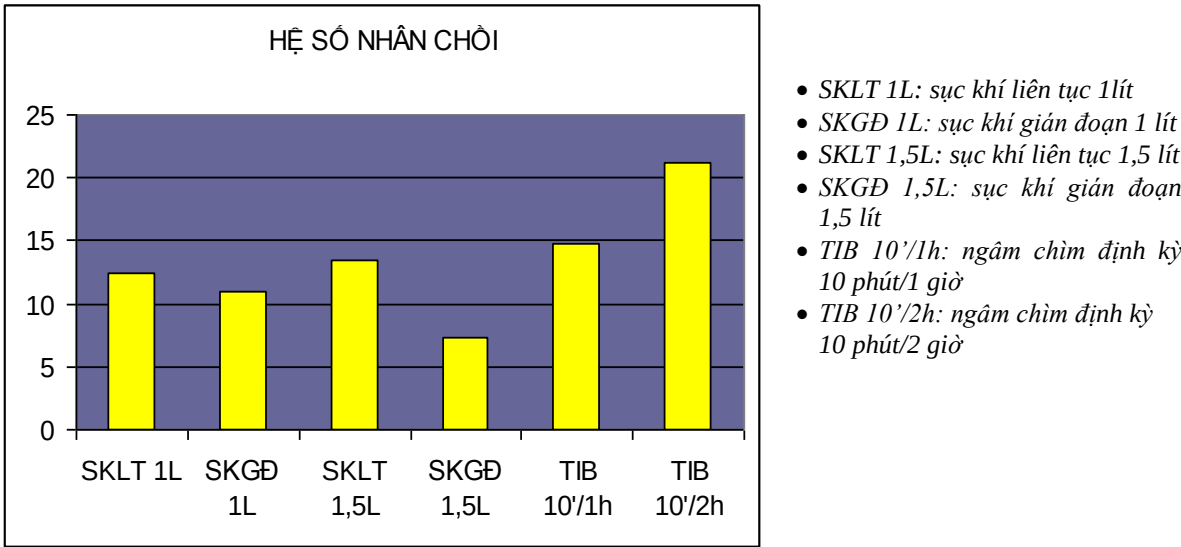
Chồi dừa sau 4 tuần nuôi

Hình 3. Chồi dừa sau 4 tuần nuôi cấy trong bình TIB 10’/2h

Bảng 8. Ảnh hưởng của yếu tố thời gian ngâm chìm đến hệ số nhân chồi của cây dừa Cayenne trong bình bioreactor TIB

Nghiệm thức	Hệ số nhân chồi
TIB 10’/1H	14,78 ^a
TIB 10’/2H	21.32 ^b

Hiệu quả nhân chồi ở 2 nghiệm thức là khác nhau. Hệ số nhân chồi trung bình của nghiệm thức 10’/2h (10 phút trong chu kỳ 1h) có kết quả vượt trội so với nghiệm thức 10’/1h. Kết quả trên cũng là một điều hợp lý. Vì cây dừa vốn là loại thực vật thích hợp với điều kiện khô ráo thoáng khí. Do vậy khi ngâm chìm với tần số 10’/1h làm cho cây dừa phát triển không tốt, hiệu quả nhân chồi không cao. Thí nghiệm cho thấy cây dừa thích hợp với điều kiện ngâm chìm 10phút/2giờ hơn so với 10phút/1h.



Hình 4. Biểu đồ so sánh hệ số nhân chồi giữa các kiểu bioreactor

Biểu đồ trên cho thấy phương pháp nuôi cấy ngâm chìm định kỳ (TIB) cho hiệu quả nhân chồi cao hơn hẳn so với phương pháp nuôi cấy sục khí. Đặc biệt, tần số ngâm chìm định kỳ 10'/2h cho hiệu quả cao nhất.

4. KẾT LUẬN

Bioreactor sau khi thiết kế đã hoạt động tốt. Hình thức nuôi cấy cây dứa bằng bioreactor sục khí là không phù hợp cho sự phát triển của cây dứa. Thể tích môi trường 1,5L cho kết quả khả quan hơn so với thể tích 1L khi nuôi cấy bằng bioreactor sục khí liên tục. Bioreactor sục khí liên tục giúp cho cây dứa phát triển tốt hơn so với bioreactor sục khí gián đoạn. Bioreactor ngâm chìm định kỳ là loại bioreactor phù hợp cho sự phát triển của cây dứa. Thời gian ngâm chìm định kỳ 10 phút/2h là thích hợp hơn cho cây dứa. Cây con ở bioreactor ngâm chìm định kỳ có hình thái đẹp (lá xanh non, không bị đen) hơn so với bioreactor sục khí.

DESIGN AND RESEARCH THE BIOREACTOR IMMERSION SYSTEM FOR CAYENNE PINEAPPLE

Nguyen Bang Phi

ABSTRACT

Pineapple is a tropical fruit tree, the one of three important fruits in Vietnam (within banana, pineapple and citrus) for cosmetic demand, particularly for export demand. For producing pineapples which will be having quality and harvesting time identically, we must using micropropagation by tissue culture method. However, conventional tissue culture on agar medium in the bottle, which is costly and low productivity. Therefore, the application of bioreactor system to increase productivity, reduce labor costs is essential problem. Now, many bioreactor system are applied for micropropagation, in which temporary immersion bioreactor (TIB) is most suitable for Cayennepineapple. The results showed that the volume of nutrient solution 1.5 liter is better than 1 liter and time to soak for 10 minutes, periodically 2 hour per once for the best result.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Dương Công Kiên (2002), *Nuôi cấy mô thực vật*, NXB Đại học Quốc gia TP.HCM.
- [2] Dương Tấn Nhựt và cs (2004), *Nuôi cấy lỏng và nuôi cấy thoáng khí trong việc gia tăng sinh khối và năng cao chất lượng cây hoa lily (Lilium longiflorum)*, Tạp chí Công nghệ Sinh học, 2(4), 487 – 499
- [3] Nguyễn Thành Hải (2005), *Nghiên cứu chế tạo bioreactor mô hình phục vụ công tác nhân giống nhanh cây hoa Thu hải đường (Begonia tuberosa) – một loài hoa có giá trị kinh tế cao*, khóa luận cử nhân khoa học, Trường Đại học Khoa học Tự Nhiên TP.HCM
- [4] Nguyễn Đức Lượng và Lê Hồng Thủy Tiên (2002), *Công nghệ tế bào*, NXB Đại học Quốc gia TP.HCM.
- [5] Tôn Bảo Linh (2005), *Nghiên cứu tạo cây dứa Cayenne in vitro sạch virus gây bệnh héo đỏ đầu lá (PMWaV- Pineapple mealybug wilt associated virus)*, khóa luận cử nhân khoa học, Trường Đại học Nông Lâm TP.HCM.

- [6] Aitken-Christie J., (1991), *Automation*. In: Debergh P.C. & Zimmerman R.J.(eds). *Micropropagation: Technology and Application*. Kluwer Academic.
- [7] Alvard D., Cote F.&Teisson C. (1993), *Comparison of methods of liquid medium cultures for banana micropropagation. Effects of temporary immersion of explants*. Plant Cell Tiss. Org. Cult., 32, 55 – 60.
- [8] Debergh P. (1988), *Improving mass propagation of in vitro plantlets*. In: Proceedings of the International Symposium on High Technology in Protected Cultivation, Tokyo, 45 – 57.
- [9] Escalona M. và csv (1999), *Pineapple (Ananas comosus L. Merr) micropropagation in temporary immersion systems*.(Plant Cell R ep)
- [10] E. Firoozabady · N. Gutterson (2003), *Cost-effective in vitro propagation methods for pineapple* (Plant Cell Rep).
- [11] Gawel N.J & Robacker C.D. (1990), *Gossypium hirsutum* genotypes in semi-solid versus liquid proliferation media. Plant Cell Tiss. Org. Cult., 23, 201 – 204.
- [12] Hammerschlag F. (1982), *Factors affecting establishment and growth of peach shoots in vitro*. HortSci., 17, 85 – 86
- [13] Jones A.M. & Petolino J.F. (1988), *Effects of support medium on embryo and plant production from cultured anthers of soft-red winter wheat*. Plant Cell Tiss. Org. Cult., 12, 243 – 261.
- [14] Lian M.L., Chkrabarty D. & Peak K.Y. (2002), *Growth and the uptake of sucrose and mineral ions by Lilium bulblets during bioreactor culture*. L. Hortic. Sci. Biotechnol, 77, 253 – 257.
- [15] Leathers R.R., Smith M.A.L. & Christie J.A. (1995), *Automation of the bioreactor process for mass propagation and secondary metabolism*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, TheNetherlands, 187 – 214
- [16] Maene L. & Debergh P. (1985), *Liquid medium additions to established tissue cultures to improve elongation and rooting in vivo*. Plant Cell Tiss. Org. Cult., 5, 23–33.
- [17] Nhut D.T. (2002), *In vitro growth and physiological aspects of some horticultural plantlets cultured under red and blue light – emitting diodes (LEDs)*. Doctoral thesis, Kagawa University, Japan.
- [18] Peak K.Y., Chkrabarty D. & Hahn E.J. (2005), *Application of bioreactor systems for large scale production of horticultural and medicinal plants*. Plant Cell Tiss. Org. Cult., 81, 287 – 300.
- [19] Takayama S. (1991), *Mass propagation of plants through shake and bioreactor culture techniques*. Biotechnology in Agriculture and Forestry
- [20] Teisson C. & Alvard D. (1999), *In vitro production of potato microtubers in liquid medium using temporary immersion*. Potato Res., 42, 499 – 504.

• Ngày nhận bài: 17/8/2016

• Chấp nhận đăng: 23/9/2016

Liên hệ: **Nguyễn Bằng Phi**

Trường Đại học Thủ Dầu Một

Email: bangphibdu@gmail.com