

CẢM ỨNG HÌNH THÀNH MÔ SỢ TỪ NHÁNH RONG BẮP SÚ (*KAPPAPHYCUS STRIATUS*) DƯỚI CÁC ĐIỀU KIỆN NUÔI CÂY KHÁC NHAU

Vũ Thị Mơ^{1,2}, Trần Văn Huynh¹, Lê Trọng Nghĩa¹, Hoàng Thanh Tùng³, Nguyễn Ngọc Lâm⁴, Dương Tấn Nhựt^{3,✉}

¹Viện Nghiên cứu Ứng dụng Công nghệ Nha Trang, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

³Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

⁴Viện Hải Dương học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

✉Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: duongtannhut@gmail.com

Ngày nhận bài: 22.01.2018

Ngày nhận đăng: 20.4.2018

TÓM TẮT

Rong bắp sù (*Kappaphycus striatus*) đang được trồng phổ biến ở một số tỉnh ven biển miền Trung để làm nguồn nguyên liệu chiết xuất carrageenan. Rong bắp sù chủ yếu được nhân giống bằng hình thức sinh sản sinh dưỡng và bào tử. Tuy nhiên, phương pháp này vẫn tồn tại một số hạn chế. Hiện nay, chưa có báo cáo nào về nghiên cứu nhân giống loài này thông qua nuôi cấy mô sẹo. Trong nghiên cứu này, mẫu nhánh rong bắp sù 1 tháng tuổi lưu giữ tại phòng thí nghiệm được sử dụng làm vật liệu để nghiên cứu ảnh hưởng của loại và nồng độ chất điều hòa sinh trưởng thực vật (NAA và BAP), cường độ ánh sáng, agar ở các nồng độ khác nhau lên quá trình cảm ứng mô sẹo. Sau 2 tháng nuôi cấy, kết quả ghi nhận được cho thấy mẫu nhánh rong nuôi cấy trên môi trường PES không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng cho tỷ lệ hình thành mô sẹo (75,7%) và tỷ lệ sống (77,3%) cao nhất so với mẫu nhánh rong nuôi cấy trên môi trường bổ sung riêng lẻ hoặc kết hợp các chất điều hòa sinh trưởng thực vật. Tỷ lệ cảm ứng (67%) và tỷ lệ sống của mô sẹo (77,7%) cũng cao hơn khi được nuôi cấy trên môi trường PES dưới cường độ ánh sáng 5 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Ngoài ra, mẫu rong nuôi cấy trên môi trường PES có bổ sung agar ở nồng độ 1,5 – 2,0% có tỷ lệ cảm ứng (66,7 – 67%) và tỷ lệ sống của mô sẹo (63,7 – 64,3%) cao hơn các nồng độ khác. Kết quả nghiên cứu cũng cho thấy ba dạng mô sẹo đã được ghi nhận là mô sẹo dạng sợi màu trắng, mô sẹo dạng sợi màu nâu và mô sẹo cứng. Những mô sẹo có kích thước lớn, dạng sợi có khả năng cảm ứng phát sinh phôi là nguồn vật liệu ban đầu cho những thí nghiệm tiếp theo.

Từ khóa: Agar, ánh sáng, chất điều hòa sinh trưởng, *Kappaphycus striatus*, mô sẹo

ĐẶT VẤN ĐỀ

Rong bắp sù (*Kappaphycus striatus* F. Schmitz Doty ex P.C. Silva, 1996) được du nhập vào nước ta từ những năm 90 của thế kỉ XX. Đây là loài rong đang được trồng phổ biến ở một số tỉnh ven biển miền Trung như Khánh Hòa, Ninh Thuận để làm nguồn nguyên liệu chiết xuất carrageenan. Cho tới nay, rong bắp sù chủ yếu được nhân giống bằng hình thức sinh sản sinh dưỡng và sinh sản bằng bào tử (Bulboa *et al.*, 2007). Tuy nhiên, phương pháp nhân giống bằng hình thức sinh sản sinh dưỡng liên tục và kéo dài đã làm cho rong bị thoái hóa. Theo quá trình khảo sát thực nghiệm ở Việt Nam hiện nay rong *Kappaphycus* chỉ sản xuất theo phương pháp truyền thống và rong giống được giữ vài tháng sau đó được

sử dụng cho mùa vụ tiếp theo, sau 2 – 3 tháng trồng thương phẩm thì thu hoạch; do đó, ngoài tự nhiên chưa ghi nhận được trường hợp nào có bào tử. Vì vậy, việc nghiên cứu nhân giống bằng bào tử rong *Kappaphycus* tại Việt Nam sẽ gặp khó khăn do không có nguồn vật liệu ban đầu. Nhân giống rong biển thông qua nuôi cấy mô sẹo *in vitro* đang được quan tâm, vì phương pháp này có thể làm trẻ hóa tế bào, tạo ra thể hệ mới có tốc độ tăng trưởng cao hơn (1,5 – 1,8 lần) và chất lượng tốt hơn (Reddy *et al.*, 2003). Tạo mô sẹo là một trong những yếu tố ảnh hưởng đến quá trình nhân giống *in vitro*, để tạo vật liệu cho các thí nghiệm tiếp theo. Các yếu tố như cường độ ánh sáng, loại và nồng độ chất điều hòa sinh trưởng thực vật, nồng độ agar trong môi trường nuôi cấy đóng vai trò quan trọng trong quá trình phát

triển của mô sẹo (Reddy *et al.*, 2003; Munoz *et al.*, 2006; Kumar *et al.*, 2007; Sulistiani *et al.*, 2012; Mơ, Reddy, 2016; Hui – Yin *et al.*, 2014). Hiện nay, chưa có báo cáo nào về nghiên cứu nhân giống loài rong bấp sủ thông qua nuôi cấy mô sẹo. Vì vậy, đây là nghiên cứu có tính tiên phong trong việc xác định một số yếu tố ảnh hưởng lên hiệu quả cảm ứng tạo mô sẹo rong bấp sủ nuôi cấy *in vitro*.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Mẫu cây

Rong bấp sủ (*Kappaphycus striatus*) được thu thập tại Vịnh Cam Ranh và Vịnh Vân Phong (Khánh Hòa). Những nhánh rong khỏe, màu sắc tươi sáng được chọn và rửa sạch tại điểm thu mẫu rồi giữ âm; sau đó vận chuyển về Phòng thí nghiệm Vật liệu Hữu cơ từ Tài Nguyên biển (Viện Nghiên cứu và Ứng dụng Công nghệ Nha Trang). Nguồn mẫu được sử dụng trong đề tài này là những nhánh rong *ex vitro* đã được thuần hóa trong phòng thí nghiệm 1 tháng trước khi khử trùng để làm vật liệu nghiên cứu.

Môi trường nuôi cấy

Môi trường nuôi cấy tạo mô sẹo là môi trường PES (Provasoli enriched seawater) với nồng độ 20 ml/l (Provasoli, 1968) có bổ sung các loại chất điều hòa sinh trưởng và agar ở các nồng độ khác nhau, đặt dưới các cường độ ánh sáng khác nhau tùy thuộc vào mục đích thí nghiệm. Môi trường được pha bằng nước biển, hấp khử trùng với áp suất 1 atm trong thời gian 15 phút ở 121°C.

Ở tất cả các thí nghiệm, mẫu được cấy vào 40 ml môi trường PES có bổ sung nồng độ agar và chất điều hòa sinh trưởng tùy thuộc vào từng thí nghiệm. Thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của cường độ ánh sáng, chất điều hòa sinh trưởng sử dụng nồng độ agar là 1,5%.

Khử trùng mẫu cây

Mẫu rong được lấy từ nhánh rong đã được thuần hóa, những nhánh rong có kích thước khoảng 5 cm, màu sắc tươi sáng, khỏe, không bị trầy xước lần lượt được khử trùng với từng loại chất khử trùng theo ba bước như sau: (1) 1% nước tẩy rửa (Charmy green, Lion Co, Ltd., Tokyo, Nhật Bản) trong thời gian 5 phút, (2) 1% Betadin trong 2 – 3 phút và (3) 1% kháng sinh phổ rộng (pencillin G, streptomycin

sulphate, kanamycin, nystatin, neomycin) trong 1 ngày. Sau mỗi giai đoạn khử trùng, rong đều được rửa sạch bằng nước biển vô trùng với bàn chải mềm, các bước khử trùng đều diễn ra trong điều kiện vô trùng. Trong quá trình khử trùng rong bằng kháng sinh phổ rộng, điều kiện môi trường được duy trì 24 ± 2°C dưới ánh sáng huỳnh quang với cường độ ánh sáng 35 – 55 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, thời gian chiếu sáng 12h/ngày (Reddy *et al.*, 2003; Mơ, Reddy, 2016).

Phương pháp nghiên cứu

Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng thực vật NAA và BAP lên sự cảm ứng hình thành mô sẹo

Mẫu rong (5 mm) đã khử trùng được nuôi cấy trên môi trường PES bổ sung riêng lẻ các chất điều hòa sinh trưởng thực vật ở các nồng độ khác nhau của NAA (0,1 mg/l và 1,0 mg/l) và BAP (0,1 mg/l và 1,0 mg/l BAP) hay kết hợp NAA và BAP (0,1 mg/l NAA + 0,1 mg/l BAP; 1,0 mg/l NAA + 1,0 mg/l BAP; 0,1 mg/l NAA + 1,0 mg/l BAP; 1,0 mg/l NAA + 0,1 mg/l BAP). Đối chứng là không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng thực vật. Các thí nghiệm được đặt dưới ánh sáng đèn huỳnh quang với cường độ 5 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

Ảnh hưởng của cường độ ánh sáng lên quá trình cảm ứng hình thành mô sẹo

Mẫu rong (5 mm) đã khử trùng nuôi cấy trên môi trường PES tối ưu ghi nhận được ở thí nghiệm trên và được đặt dưới ánh sáng huỳnh quang với các cường độ khác nhau (0, 5, 15, 35 và 55 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$).

Ảnh hưởng của nồng độ agar lên quá trình cảm ứng hình thành mô sẹo

Mẫu rong (5 mm) đã khử trùng được nuôi cấy trên môi trường PES đặt dưới ánh sáng huỳnh quang với cường độ tối ưu ở thí nghiệm trên và các nồng độ agar - agar nuôi trồng tảo (Algae culture agar) (HIMEDIA, Ấn Độ) khác nhau (0,5%; 1,0%; 1,5%; 2,0%).

Quan sát quá trình phát triển của mô sẹo

Quan sát quá trình phát triển của mô sẹo được thực hiện đồng thời với thí nghiệm ảnh hưởng của nồng độ agar lên quá trình cảm ứng hình thành mô sẹo. Các mẫu cấy trên đĩa thạch được kiểm tra 2 ngày/lần để ghi nhận những mẫu cấy bị mất màu, nhiễm khuẩn và cảm ứng mô sẹo. Hình dạng, màu sắc, trạng thái mô sẹo được quan sát dưới kính hiển vi soi nổi (SZH10 – OLYMPUS, Nhật Bản) dưới vật kính $\times 10$, $\times 20$ và $\times 40$.

Điều kiện nuôi cấy

Tất cả các mẫu cấy được nuôi ở nhiệt độ $24 \pm 2^\circ\text{C}$, sử dụng ánh sáng đèn huỳnh quang với cường độ chiếu sáng thay đổi ($0 - 55 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) tùy theo mục đích thí nghiệm (rong được thuần hóa trong phòng thí nghiệm với cường độ $35 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), quang chu kỳ 12h chiếu sáng/ngày.

Chỉ tiêu theo dõi và xử lý số liệu

Mẫu sau 1 tháng nuôi cấy, tiến hành đếm các mẫu cấy hình thành mô sẹo và ghi nhận tỷ lệ cảm ứng tạo mô sẹo. Sau 2 tháng, ghi nhận tỷ lệ sống của mô sẹo trước khi mô sẹo được cấy để nhân sinh khối. Tất cả các thí nghiệm được lặp lại 3 lần, số liệu được thể hiện trung bình \pm độ lệch chuẩn (TB \pm SD). Số liệu được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel, so sánh ANOVA 1 yếu tố với phép thử Duncan ($p=0,05$) trên phần mềm SPSS 16.0.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng lên sự cảm ứng hình thành mô sẹo rong bắp sú

Tỷ lệ cảm ứng mô sẹo

Ảnh hưởng của nồng độ chất điều hòa sinh trưởng bổ sung trong môi trường PES dưới ánh sáng đèn huỳnh quang với cường độ $5 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ lên sự hình thành mô sẹo được kiểm tra trong suốt hai tháng nuôi cấy mô. Chất điều hòa sinh trưởng thực vật như NAA và BAP ảnh hưởng không rõ ràng lên tỷ lệ cảm ứng mô sẹo rong bắp sú. Tỷ lệ cảm ứng mô sẹo được ghi nhận cao ở tất cả các nghiệm thức không bổ sung hoặc bổ sung riêng lẻ hoặc kết hợp NAA và BAP. Tuy nhiên, ở nghiệm thức không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng tỷ lệ cảm ứng mô sẹo đạt cao nhất 75,7% (Bảng 1).

Bảng 1. Ảnh hưởng của nồng độ chất điều hòa sinh trưởng BAP và NAA riêng lẻ hoặc kết hợp lên tỷ lệ cảm ứng, tỷ lệ sống mô sẹo sau 1 tháng nuôi cấy dưới cường độ ánh sáng $5 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

Nồng độ chất điều hòa sinh trưởng (mg/l)	Tỷ lệ cảm ứng (%)	Tỷ lệ sống (%)	Kích thước mô sẹo (mm)	Đặc điểm
0	75,7 ^a \pm 2,5*	77,3 ^a \pm 2,1	2,4 ^a \pm 0,15	Cụm mô sẹo dạng sợi màu trắng đến nâu, cụm mô sẹo to
0,1 NAA	59,7 ^b \pm 4,7	30,3 ^e \pm 4,7	1,6 ^b \pm 0,17	Cụm mô sẹo dạng sợi màu trắng đến nâu, mô sẹo chậm phát triển
1,0 NAA	61,3 ^b \pm 3,8	41,7 ^d \pm 5,7	1,7 ^b \pm 0,10	Cụm mô sẹo dạng sợi màu trắng đến nâu, mô sẹo chậm phát triển
0,1 BAP	58,3 ^{bc} \pm 2,1	25,0 ^e \pm 5,6	1,7 ^b \pm 0,20	Cụm mô sẹo dạng sợi màu trắng đến nâu, mô sẹo chậm phát triển
1,0 BAP	53,7 ^d \pm 2,1	50,3 ^c \pm 4,2	1,6 ^b \pm 0,10	Cụm mô sẹo dạng sợi màu trắng đến nâu, mô sẹo chậm phát triển
0,1 NAA + 0,1 BAP	59,0 ^{bc} \pm 2,0	25,3 ^e \pm 5,0	1,5 ^b \pm 0,15	Cụm mô sẹo dạng sợi màu trắng đến nâu, mô sẹo chậm phát triển
1,0 NAA + 1,0 BAP	63,3 ^b \pm 1,5	61,3 ^b \pm 3,2	1,4 ^b \pm 0,15	Cụm mô sẹo dạng sợi màu trắng đến nâu
0,1 NAA + 1,0 BAP	61,3 ^b \pm 4,5	58,3 ^b \pm 1,5	1,6 ^b \pm 0,06	Cụm mô sẹo dạng sợi màu trắng đến nâu
1,0 NAA + 0,1 BAP	57,7 ^{bc} \pm 2,1	25,0 ^e \pm 5,0	1,7 ^b \pm 0,15	Cụm mô sẹo dạng sợi màu trắng đến nâu, mô sẹo chậm phát triển

Ghi chú: * Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $P < 0,05$.

Tỷ lệ sống của mô sẹo

Kết quả của thí nghiệm ghi nhận được cho thấy, không có sự khác biệt rõ ràng về tỷ lệ cảm ứng mô sẹo khi bổ sung chất điều hòa sinh trưởng vào môi trường nuôi cấy PES; tuy nhiên, tỷ lệ sống của mô sẹo lại có sự khác biệt giữa các nghiệm thức (Bảng 1). Tỷ lệ sống của mô sẹo đạt cao nhất trên môi trường không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng là 77,3%. Ở các nồng độ còn lại, tỷ lệ sống thấp và mô

seo chậm phát triển.

Ảnh hưởng của NAA và BAP lên sự hình thành mô sẹo có sự khác biệt giữa các loài rong biển khác nhau. Dawes và Koch (1991) báo cáo rằng NAA và BAP ảnh hưởng mạnh mẽ lên sự phát triển mô sẹo rong sụn. Tác giả này quan sát được tỷ lệ cảm ứng mô sẹo là 100% khi mô được cấy trên môi trường có 3% agar bổ sung indole-3-butyric acid (IBA) và kinetin. Tương tự, Munoz và đtg. (2006) cũng chỉ ra rằng sự

hình thành mô sẹo cũng chịu ảnh hưởng mạnh mẽ bởi chất điều hòa sinh trưởng. Tỷ lệ cảm ứng mô sẹo ở rong sụn được nuôi ở môi trường có bổ sung NAA và BAP là 100% khi so sánh với đối chứng (Munoz *et al.*, 2006). Nghiên cứu của Bradley và Cheney (1990), Dawes và Knock (1971) cho rằng nhóm chất điều hòa sinh trưởng như auxin và cytokinin kích thích sự phát triển mô sẹo, nhưng ngược lại Davidson (1950) cho rằng chất điều hòa sinh trưởng thực vật không ảnh hưởng lên sự phát triển mô sẹo. Hơn nữa, Reddy và đtg. (2003) chỉ ra rằng tỷ lệ cảm ứng mô sẹo ở rong sụn là 80% ở môi trường PES bổ sung 1,5% agar, nhưng không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng và cũng báo cáo rằng tỷ lệ cảm ứng mô sẹo và kích thước mô sẹo không được nâng cao bởi chất điều hòa sinh trưởng thực vật. Huang và Fujita (1997) cũng báo cáo rằng bổ sung 0,1 mg/l indole – 3 – acetic acid (IAA) kết hợp với 0,05 mg/l BAP vào môi trường ASP 12 NTA (Provasoli, 1963) không ảnh hưởng lên tỷ lệ cảm ứng mô sẹo nhưng ảnh hưởng lên kích cỡ mô sẹo loài rong *Meristotha capapulosa*. Kết quả của nghiên cứu này cho thấy, NAA và BAP ảnh hưởng không rõ ràng lên tỷ lệ cảm ứng mô sẹo nhưng đã ảnh hưởng

tiêu cực lên tỷ lệ sống của mô sẹo rong bắp sù.

Ảnh hưởng của cường độ ánh sáng lên quá trình cảm ứng hình thành mô sẹo rong bắp sù

Sự phát triển của mô sẹo

Sự phát triển của mô sẹo không giống nhau dưới các cường độ ánh sáng khác nhau. Mô sẹo có cụm lớn (2,5 – 2,6 mm), dạng sợi, có màu hơi nâu được tìm thấy ở cường độ ánh sáng thấp (5 – 15 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), những cụm mô sẹo này là nguồn nguyên liệu tốt cho các thí nghiệm tiếp theo. Ở cường độ ánh sáng cao hơn mô sẹo phát triển kém, bị tẩy trắng sau 1 tuần nuôi cấy và dẫn đến mẫu cấy bị chết và mô sẹo chết theo.

Tỷ lệ cảm ứng mô sẹo

Sau 1 tháng nuôi cấy, ở điều kiện tối không có mô sẹo nào được hình thành. Ngược lại, ở cường độ ánh sáng 5 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ tỷ lệ cảm ứng mô sẹo cao nhất (67%) và đạt 55,3 – 56,7% ở 15 – 35 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, tiếp theo ở cường độ ánh sáng từ 55 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ thì có tỷ lệ cảm ứng mô sẹo là 33% (Bảng 2).

Bảng 2. Ảnh hưởng của cường độ ánh sáng lên tỷ lệ cảm ứng, tỷ lệ sống mô sẹo sau 1 tháng nuôi cấy trên môi trường PES không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng.

Cường độ ánh sáng ($\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)	Tỷ lệ cảm ứng (%)	Tỷ lệ sống (%)	Kích thước mô sẹo (mm)	Đặc điểm
0	0 ^d ± 0,0*	0 ^d ± 0,0	0,0 ^c ± 0,00	Mẫu rong không cảm ứng mô sẹo, mẫu bị mất màu nâu đặc trưng của rong
5	67,0 ^a ± 4,6	77,7 ^a ± 3,5	2,6 ^a ± 0,10	Cụm mô sẹo dạng sợi màu trắng đến nâu, cụm mô sẹo to
15	56,7 ^b ± 3,3	79,0 ^a ± 4,6	2,5 ^a ± 0,15	Cụm mô sẹo dạng sợi màu trắng đến nâu, cụm mô sẹo to
35	55,3 ^b ± 1,5	64,7 ^b ± 3,8	1,3 ^b ± 0,20	Cụm mô sẹo dạng sợi màu trắng đến nâu, cụm mô sẹo nhỏ
55	33,1 ^c ± 4,0	40,0 ^c ± 3,5	0,0 ^c ± 0,00	Cụm mô sẹo dạng sợi màu trắng đến nâu, sau hai tháng cụm mô sẹo bị chết

Ghi chú: * Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $P < 0,05$.

Tỷ lệ sống của mô sẹo

Kết quả ghi nhận cho thấy mô sẹo có tỷ lệ sống thấp (40 – 64,7%) ở cường độ ánh sáng quá cao (35 – 55 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), so với cường độ ánh sáng thấp từ 5 – 15 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (77,7 – 79,0%) (Bảng 2).

Như vậy, cường độ ánh sáng từ 5 – 55 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ đã ảnh hưởng tới tỷ lệ cảm ứng mô sẹo, tỷ lệ sống và sự phát triển cũng như hình thái của mô sẹo, cường độ ánh sáng 5 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ là tốt nhất cho sự hình thành mô sẹo, mô sẹo có sự phát triển tốt, tỷ lệ cảm ứng (67%) và tỷ lệ sống của mô sẹo cao (79,0%).

Nhu cầu về cường độ ánh sáng để hình thành mô sẹo khác nhau ở các loài rong khác nhau nhưng có đặc điểm chung là ở tất cả các loài đều cần ánh sáng ở cường độ thấp để mô sẹo có thể hình thành và phát triển (Reddy *et al.*, 2003; Kumar *et al.*, 2004).

Ở nghiên cứu này, tỷ lệ cảm ứng mô sẹo thấp hơn rất nhiều so với các báo cáo trước đây trên loài rong sụn. Tỷ lệ cảm ứng mô sẹo cao nhất là 67% ở 5 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ thấp hơn so với kết quả trên loài rong sụn là 96 – 98% ở 5 – 25 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (Mơ, Reddy, 2016) và 80% ở 5 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (Reddy *et al.*, 2003). Tuy nhiên, tỷ lệ cảm ứng mô sẹo ở thí nghiệm này

cao hơn so với loài *Hypnea tenerrimum* là 10% ở 5 – 30 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, loài *Gracilaria corticata* (40%), *Sargassum tenerrimum* (10%) và *Turbinaria conoides* (40%) ở 30 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (Kumar *et al.*, 2004).

Tỷ lệ mẫu sống sau 2 tháng nuôi cấy giảm đáng kể khi nuôi ở cường độ ánh sáng cao, mẫu cấy mang mô sẹo bị tẩy trắng và chết khi chưa thu được mô sẹo. Kết quả này tương tự với kết quả của Reddy và đtg. (2003), Mơ và đtg. (2016). Ánh sáng không ảnh hưởng tới tỷ lệ hình thành mô sẹo của rong sụn. Tuy nhiên, nếu mẫu rong tiếp tục được giữ ở cường độ ánh sáng cao ($70 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) trong thời gian dài thì chúng bị tẩy trắng. Ở điều kiện tối không ghi nhận được sự hình thành mô sẹo ở rong sụn (Reddy *et al.*, 2003), rong *Grateloupia doryphora* (Robaina *et al.*, 1990). Các loài rong *Hypnea tenerrimum*, *Gracilaria corticata*, *Sargassum tenerrimum*, *Turbinaria conoides* cũng có tỷ lệ cảm ứng mô sẹo cao nhất ở cường độ ánh sáng 5 – 30 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

Kết quả nghiên cứu cho thấy khi mô sẹo đã được hình thành ở các cường độ ánh sáng khác nhau (5 – 55 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) cần cung cấp cường độ ánh sáng từ

5 đến 15 $\mu\text{mol photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ để tỷ lệ sống đạt cao nhất và có sự phát triển của mô là tốt nhất sau 1 tháng nuôi cấy. Đối với nghiên cứu này, mẫu rong nuôi cấy dưới các cường độ ánh sáng từ 5 – 55 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ đều cảm ứng mô sẹo và có tỷ lệ sống khác nhau. Tỷ lệ sống cao cho phép thu được sinh khối mô sẹo cao, hiệu quả kinh tế cao hơn. Kết quả cho thấy cường độ ánh sáng 5 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ cho tỷ lệ cảm ứng và tỷ lệ sống mô sẹo cao nhất.

Ảnh hưởng của nồng độ agar lên cảm ứng hình thành mô sẹo rong bắp sù

Tỷ lệ cảm ứng mô sẹo

Nồng độ agar trong môi trường nuôi cấy ảnh hưởng lên tỷ lệ cảm ứng mô sẹo rong bắp sù. Sau một tháng nuôi cấy tỷ lệ cảm ứng mô sẹo được xác định. Ở nồng độ agar thấp, tỷ lệ cảm ứng mô sẹo thấp hơn so với nồng độ cao. Nồng độ agar 0,5% có tỷ lệ cảm ứng mô sẹo thấp nhất (50,3%). Nồng độ agar 1 – 2% có tỷ lệ cảm ứng mô sẹo cao và không khác nhau giữa các nồng độ này (65,3 – 67,0%) (Bảng 3).

Bảng 3. Ảnh hưởng của nồng độ agar lên tỷ lệ cảm ứng, tỷ lệ sống mô sẹo sau 2 tháng nuôi cấy.

Nồng độ agar (%)	Tỷ lệ cảm ứng (%)	Tỷ lệ sống (%)	Kích thước mô sẹo (mm)	Đặc điểm
0,5	50,3 ^b ± 3,1*	45,0 ^c ± 2,0	2,5 ^b ± 0,23	Cụm mô sẹo dạng sợi màu trắng, cụm mô sẹo to, mô sẹo cảm ứng cả phần vỏ của mô cấy, xuất hiện chồi
1,0	65,3 ^a ± 2,1	54,0 ^b ± 2,6	3,1 ^a ± 0,10	Cụm mô sẹo dạng sợi màu trắng đến nâu, cụm mô sẹo to, dạng búp
1,5	67,0 ^a ± 2,6	64,3 ^a ± 1,5	2,6 ^b ± 0,15	Cụm mô sẹo dạng sợi màu trắng, to
2,0	66,7 ^a ± 4,9	63,7 ^a ± 4,5	1,4 ^c ± 0,15	Cụm mô sẹo dạng sợi màu trắng đến nâu, mô sẹo căn cổ, xuất hiện chồi

Ghi chú: * Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $P < 0,05$.

Tỷ lệ sống của mô sẹo

Sau 2 tháng nuôi cấy, kết quả cho thấy nồng độ agar trong môi trường nuôi cấy cũng ảnh hưởng lên tỷ lệ sống của mô sẹo, nồng độ agar từ 0,5 – 1,0% có tỷ lệ sống (45 – 54%) thấp hơn khi so sánh với nồng độ agar cao (1,0 – 2,0%) là 63,7 – 64,3% (Bảng 3). Tỷ lệ cảm ứng mô sẹo không khác biệt giữa các nồng độ agar từ 1 – 2% tương tự với kết quả của Reddy và đtg. (2003), cho thấy rong sụn cảm ứng mô sẹo ảnh hưởng bởi nồng độ Bacto agar từ (0,8% – 2,5%), và kết quả tỷ lệ cảm ứng mô sẹo cao nhất ở 1,5% Bacto agar (82%), cao hơn so với 3% agar (64%) (Reddy *et al.*, 2003). Thí nghiệm này agar được dùng là agar nuôi trồng tảo và nồng độ

agar thấp ở mức 0,5% thì tỷ lệ cảm ứng mô sẹo rất thấp. Nồng độ agar thấp thì độ đông của môi trường không cao, nhưng mô cấy sau khi cấy vào môi trường có nồng độ agar thấp dễ bị rời khỏi vị trí, mô cấy bị ngập chìm vì thế mô sẹo khó hình thành. Ở nồng độ agar 0,5% sau khi cấy khoảng 2 tuần, agar bắt đầu tan ra thành dạng bán lỏng, những mô cấy này rất khó có thể giữ nguyên vị trí ban đầu. Đối với loài rong *G. Acerosa*, thấy rằng nồng độ agar 1,5% cho tỷ lệ hình thành mô sẹo cao nhất (Kumar *et al.*, 2004).

Tỷ lệ cảm ứng mô sẹo của loài rong sụn chỉ đạt 31,18% – 36,47% ở nồng độ agar thấp (0,8% Bacto agar) trong môi trường Conwy/CW (Liao *et al.*,

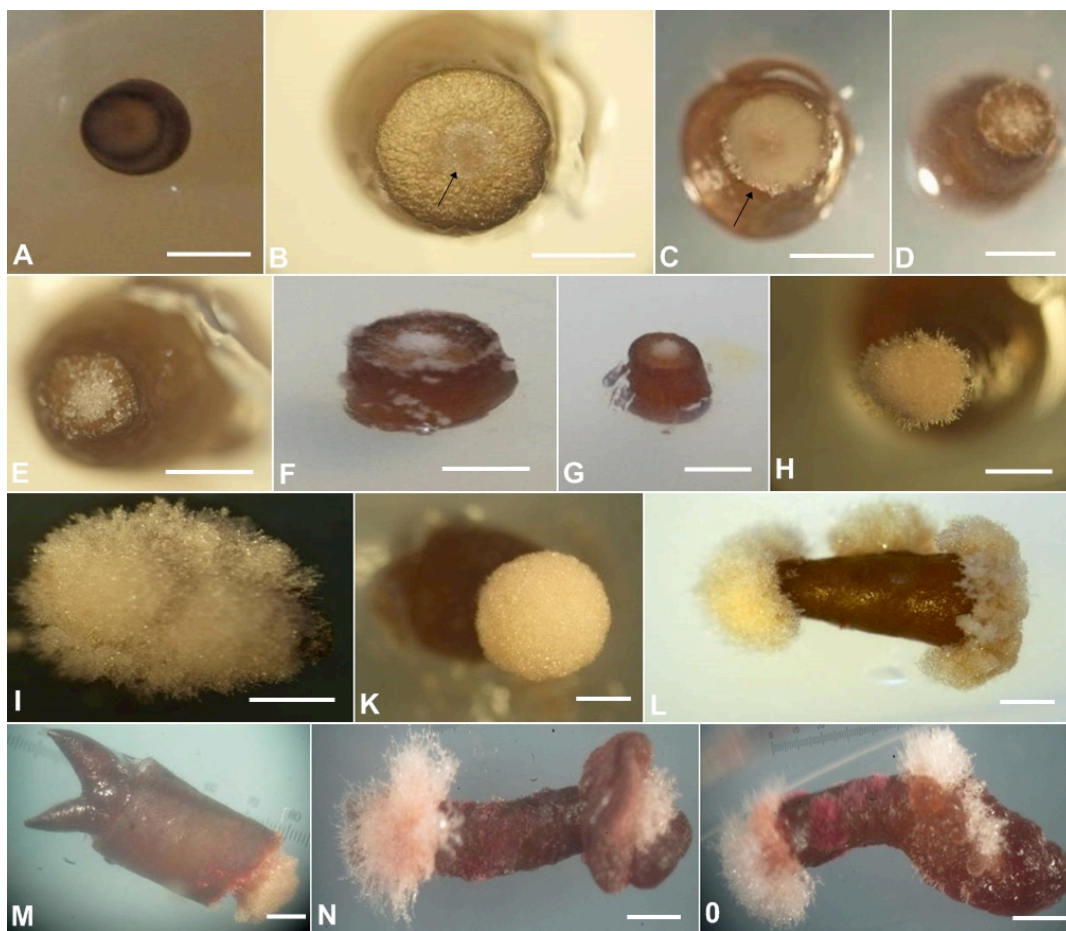
1983) và PES kết hợp với chất điều hòa sinh trưởng (Sulistiani *et al.*, 2012). Trong môi trường lỏng, mô cấy rong *Gracilaria changii* có xu hướng phát sinh chồi trực tiếp cao hơn so với môi trường rắn (Hui – Yin *et al.*, 2014).

Sự phát triển của mô sẹo và sự nhiễm khuẩn

Sự phát triển của mô sẹo

Sự cảm ứng tạo mô sẹo được quan sát trong suốt quá trình thí nghiệm dưới kính hiển vi soi nổi. Sau 4 – 5 ngày nuôi cấy, những tế bào mô sẹo hình thành màu trắng đầu tiên được quan sát từ một vài đỉnh

nhánh (10%). Sau khoảng 1 tuần, mô sẹo bắt đầu xuất hiện ở những mẫu được cắt ra từ đoạn kế đỉnh nhánh. Khoảng 60% mẫu cảm ứng mô sẹo sau 2 tháng nuôi cấy. Những tế bào mô sẹo xuất hiện ở đỉnh nhánh và mẫu cắt từ nhánh có đường kính nhỏ thì sớm hơn so với những đoạn mẫu khác của cùng một nhánh, và nhánh có đường kính lớn. Sau 1 tuần nuôi cấy, những tinh thể hình sợi (tế bào mô sẹo) xuất hiện ở trung tâm vết cắt (phần ruột của mẫu) (Hình 1B), hoặc xung quanh vết cắt (phần vỏ) của mô cấy (Hình 1C) hoặc đồng thời cả hai (phần ruột và vỏ) (Hình 1D).



Hình 1. Quá trình phát triển mô sẹo rong *K. striatus*. Mô cấy ban đầu (A), những tế bào mô sẹo mọc ở phần ruột (B), phần vỏ (C), cả phần ruột và vỏ (D) sau 5 ngày nuôi cấy, mô sẹo sau 2 tuần nuôi cấy (E, F, G), mô sẹo sau 4 tuần nuôi cấy (H), mô sẹo sau 2 tháng nuôi cấy (K, L, M), mô cấy mang cả chồi và mô sẹo sau 2 tháng nuôi cấy (M), mô cấy có một đầu mang mô sẹo màu nâu, một đầu mang mô sẹo dạng sợi có một phần mô sẹo cứng (N), mô cấy có một đầu mang mô sẹo dạng sợi màu trắng, một đầu mô sẹo cứng (O). Bar: 1 mm.

Mô sẹo có hình dạng cụm tế bào bắt đầu sau 2 tuần, cụm mô sẹo có cấu trúc hình cầu gồm những chuỗi tế bào dài xếp lại tạo thành sợi. Mỗi sợi mô sẹo

có nhiều tế bào kéo dài kích thước dài từ 25 – 200 μm , rộng 10 – 25 μm , không có sắc tố, hầu hết không có nhánh và chỉ có phần đầu tiếp tục phát triển. Những cấu

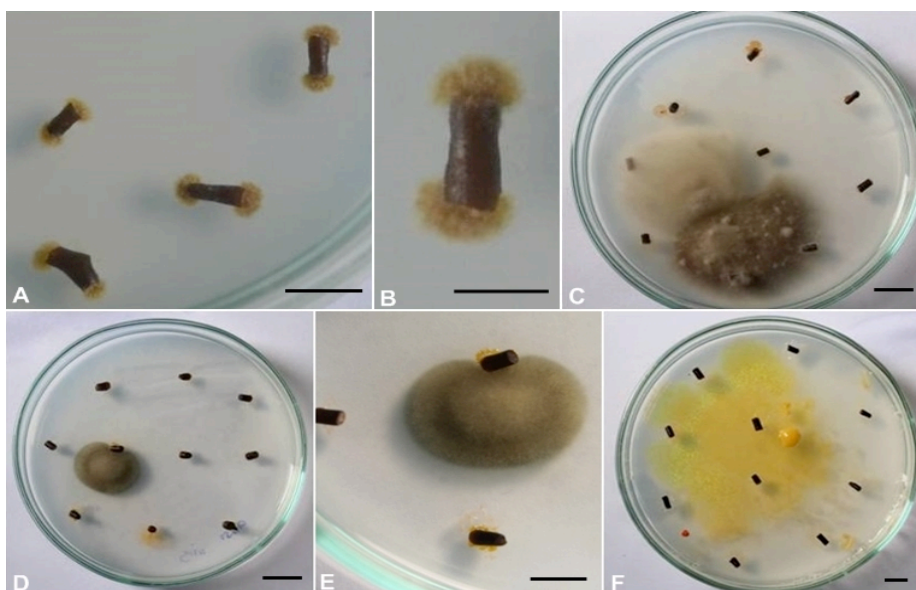
trúc này phát triển nhanh chóng, sau 8 tuần đạt kích thước 2,2 – 2,5 mm. Những cụm mô sẹo dạng sợi này nhô lên và phủ lên toàn bộ vết cắt, có màu trắng sáng sau 8 tuần (Hình 1I, K). Khi mô cây được đặt nằm ngang trên bề mặt agar, mô cây cảm ứng mô sẹo ở cả hai đầu vết cắt (Hình 1L). Mặc dù mô sẹo trắng dạng sợi được tìm thấy là phổ biến, nhưng mô sẹo màu nâu cũng quan sát được (Hình 1M, N). Trong một vài trường hợp, mẫu cây xuất hiện cả chồi và mô sẹo dạng sợi (Hình 1 M) hay là mô sẹo cứng (Hình 1O). Sau 8 tuần nuôi cấy, hình thái mô sẹo có sự thay đổi. Mô sẹo màu trắng dạng sợi, hơi nâu, những sợi mô sẹo này là một khối tế bào không có tổ chức.

Theo nghiên cứu này, có ba loại mô sẹo đã được quan sát đó là mô sẹo trắng dạng sợi (Hình 1L), mô sẹo màu nâu dạng sợi (Hình 1M, N) và mô sẹo cứng (Hình 1O). Mô sẹo trắng dạng sợi phổ biến hơn mô sẹo cứng. Mô sẹo dạng sợi và mô sẹo cứng cũng được ghi nhận bởi nghiên cứu của Polne và đtg. (1987), Robaina và đtg. (1990), Kaczyna và Megnet

(1993) trên đối tượng rong sụn. Mô sẹo dạng sợi hoặc cấu trúc giống mô sẹo được quan sát bởi Robaina và đtg. (1990), Yokoya và đtg. (1993) và mô sẹo có cấu trúc gồm những tế bào sắp xếp không có trật tự (Robaina *et al.*, 1990; Kaczyna, Megnet, 1993). Ngoài ra mô sẹo trên rong sụn còn có dạng búp và có sắc tố (Munoz *et al.*, 2006). Mô sẹo dạng sợi được quan sát trên cả phần ruột và phần vỏ của mô cây (Reddy *et al.*, 2003). Trong khi Polne *et al.*, (1987) báo cáo mô sẹo cảm ứng trên phần vỏ của nhánh rong sụn và rong *Eucheuma uncinatum* và chỉ phần ruột của mô cây rong sụn (Munoz *et al.*, 2006).

Sự nhiễm khuẩn của mẫu cây

Sau 2 – 7 ngày nuôi cấy, kết quả ghi nhận được cho thấy mức độ nhiễm khuẩn thấp. Tuy nhiên, sau 10 ngày nuôi cấy, vi khuẩn, nấm bắt đầu phát triển mạnh và khuẩn lạc có kích thước lớn sau 2 tuần nuôi cấy, lan rộng chiếm hết đĩa petri sau 1 tháng nuôi cấy (Hình 3C - F).



Hình 3. Tình trạng nhiễm vi khuẩn, nấm trong quá trình nuôi cấy mô sẹo. Mẫu mô mang mô sẹo sạch nấm, khuẩn (A, B), đĩa nhiễm nấm mốc sau 10 ngày nuôi cấy (C, D, E), đĩa nhiễm khuẩn sau 15 ngày nuôi cấy (F). Bar 1 cm.

Phần lớn nấm và vi khuẩn phát triển bên ngoài mẫu cây, điều này có thể dự đoán rằng, mô cây đã được khử trùng cẩn thận, sạch khuẩn. Nấm mốc và vi khuẩn bị lây nhiễm trong quá trình thao tác hoặc có thể lây nhiễm trong phòng nuôi.

Trong nuôi cấy mô thực vật nói chung và nuôi cấy mô rong biển nói riêng, bước xử lý mẫu đặc biệt quan

trọng. Nếu mẫu không được vô trùng thì sau vài ngày nuôi cấy, các khuẩn lạc phát triển nhanh chóng và sử dụng dinh dưỡng trong môi trường, gây ảnh hưởng mẫu cấy, thậm chí gây chết mẫu, nhưng nếu mẫu xử lý với nồng độ cao và với thời gian dài thì rong bị tẩy trắng và chết. Các tác giả luôn chú trọng tới quy trình xử lý mẫu trước khi tiến hành nuôi cấy.

Ngoài ảnh hưởng của chất khử trùng thì thao tác kỹ thuật và điều kiện phòng thí nghiệm cũng đóng một phần quan trọng trong hiệu quả khử trùng. Ngoài ra, trong nuôi cấy mô thực vật bậc cao, một số tác giả đã bổ sung trong môi trường nuôi cấy một số chất ức chế nấm và vi khuẩn trong suốt quá trình nuôi. Vì vậy, đã kiểm soát được sự phát triển của nấm và vi khuẩn (Gholamreza *et al.*, 2008).

Ở nghiên cứu này, mẫu rong bấp sú được khử trùng theo quy trình của Mơ và Reddy (2016); Reddy và đtg. (2003). Kết quả cho thấy, mẫu rong cho tỷ lệ sạch khuẩn cao, tuy nhiên sau một thời gian nuôi, nấm và vi khuẩn phát triển nhanh chóng. Vì vậy, cần đặt ra vấn đề kiểm soát môi trường nuôi để nâng cao tỷ lệ sạch khuẩn cho tới lúc thu mô sẹo để thực hiện các thí nghiệm tiếp theo.

KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, mẫu cấy có nguồn gốc từ nhánh rong bấp sú nuôi cấy trên môi trường PES có bổ sung 1,5 – 2,0% agar và không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng thực vật đặt dưới ánh sáng huỳnh quang có cường độ $5 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ cho sự cảm ứng mô sẹo tốt nhất. Mô sẹo dạng sợi màu trắng được quan sát chủ yếu, ngoài ra còn có mô sẹo dạng sợi màu nâu và mô sẹo cứng. Mô sẹo cảm ứng trên phần ruột, vỏ vết cắt, cụm mô sẹo đạt kích thước 2,2 – 2,5 mm sau 8 tuần nuôi cấy.

Lời cảm ơn: Để hoàn thành nghiên cứu này, nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn Viện Hàn Lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã tài trợ kinh phí của đề tài cấp VAST “Nghiên cứu quy trình tạo rong giống loài bấp sú – *Kappaphycus striatus* (F. Schmitz) Doty ex P. C. Silva, 1996 bằng phương pháp nuôi cấy mô sẹo”, Mã số VAST. ĐLT, 09/17 – 18 và Phòng thí nghiệm Sinh học phân tử và Chọn tạo giống cây trồng, Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên đã giúp đỡ trong suốt quá trình thí nghiệm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Bulboa CRB, Paula EJ, Chow F (2007) Laboratory germination and sea out-planting of tetraspore progeny from *Kappaphycus striatum* (Rhodophyta) in subtropical waters of Brazil. *J Appl Phycol* 19: 357–363.

Bradley PM, Cheney DP (1990) Some effects of plant growth regulators on tissue cultures of the marine red alga *Agardhiella subulata* (Gigartinales, Rhodophyta). *Hydrobiologia* 204/205: 353–360.

Davidson FF (1950) The effect of auxins on the growth of

marine algae. *J Bot* 37: 501–510.

Dawes CJ, Knoch EW (1991) Branch, micropropagule and tissue culture of the red algae *Euchema denticulatum* and *Kappaphycus alvarezii* in the Philippines. *J Appl Phycol* 6: 21–24.

Gholamreza A, Hassan S, Morteza Khosh-Khui (2008) Nano silver: a novel nanomaterial for removal of bacterial contaminants in valerian (*Valeriana officinalis* L.) tissue culture. *Acta Physiol Plant* 30(5): 709–714.

Huang W, Fujita Y (1997) Callus induction thallus regeneration of the red alga *Meristotheca papulosa* (Rhodophyta, Gigartinales). *Bot Mar* 40: 55–61.

Hui – Yin Y, Siew – Moi P, Reddy CRK (2014) Production of clonal planting materials from *Gracilaria changii* and *Kappaphycus alvarezii* through tissue culture and culture of *G. changii* explants in airlift photobioreactors. *J Appl Phycol* 26: 729–746.

Kaczyna F, Megnet R (1993) The effects of glycerol and plant growth regulators on *Gracilaria verrucosa* (Gigartinales, Rhodophyceae). *Hydrobiologia* 268: 57.

Kumar GR, Reddy CRK, Thirupathi GM, Dipakkore S, Eswaran K, Rao PVS, Jha B (2004) Tissue culture and regeneration of thallus from callus of *Gelidiella acerosa* (Gelidiales, Rhodophyta). *Phycologia* 43 (5): 596–602.

Liao IC, Su HM, Lin JH (1983) *Larval foods for penaeid prawn*. In: Mc Vey JP (ed). *CRC Handbook of Mariculture volume 1: Crustacean Aquaculture*. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida: 29–60.

Mơ VT, Reddy CRK (2016) Khảo sát quy trình khử trùng mẫu, ảnh hưởng của cường độ ánh sáng, nồng độ môi trường agar lên sự hình thành mô sẹo rong *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty (Rhodophyta) trong điều kiện *in vitro*. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 14(3): 515–522.

Munoz J, Armando C, Lópe C, Patino R, Robledo D (2006) Use of plant growth regulator in micropropagation of *Kappaphycus alvarezii* (Doty) in airlift bioreactors. *J Appl Phycol* 18: 209.

Provasoli L (1963) *Growing marine seaweeds*. In: De Virville D, Feldmann J (eds). *Proc the 4th Inter Seaweed Sym* 9–17.

Provasoli L (1968) *Media and Prospects for the Cultivation of Marine Algae*. In: Watanabe A, Hatori A (Eds). *Culutes and Algae*. *Proc the US–Jap Conf, Jap Soc Plant Physiol* 63–75.

Polne – Fuller M, Saga N, Gibor A (1987) Callus and callus – like growth in seaweeds: Induction and culture. *Hydrobiologia* 151/152: 131–138.

Reddy CRK, Kumar GRK, Siddhanta AK, Tewari A (2003) *In vitro* somatic embryogenesis and regeneration of somatic

embryos from pigmented callus of *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty (Rhodophyta, Gigartinales). *J Phycol* 39: 610–616.

Robaina RR, Garcia G, Luque A (1990) The effect of the physical characteristics of the culture medium on the development of the red seaweeds in tissue culture. *Hydrobiologia* 204: 137–142.

Sulistiani E, Soelistyowati DT, Alimuddin, Yani AA (2012)

Callus induction and filaments regeneration from callus of cottonii seaweed (Doty) collected from Natuna islands, Riau islands province. *Biotropia* 19(2): 103–114.

Yokoya NS, Guimarães SMPB, Handro W (1993) Development of callus-like structures and plant regeneration in thallus segments of *Grateloupia filiformis* Kützinger (Rhodophyta). *Hydrobiologia* 260/261: 407–413.

CALLUS INDUCTION FROM BRANCHES OF *KAPPAPHYCUS STRIATUS* UNDER DIFFERENT CULTURE CONDITIONS

Vu Thi Mo^{1,2}, Tran Van Huynh¹, Le Trong Nghia¹, Hoang Thanh Tung³, Nguyen Ngoc Lam⁴, Duong Tan Nhut³

¹*Nhatrang Institute of Technology Research and Application, Vietnam Academy of Science and Technology*

²*Graduate University of Science and Technology, Vietnam Academy of Science and Technology*

³*Tay Nguyen Institute for Scientific Research, Vietnam Academy of Science and Technology*

⁴*Institute of Oceanography, Vietnam Academy of Science and Technology*

SUMMARY

Kappaphycus striatus is growing in some central coastal provinces as a source of carrageenan extract. It is mainly propagated in the form of vegetative reproduction and sporulation. However, this method still has some limitations. At present, there is no report on the micropropagation of this species through callus induction. In this study, effect of plant growth regulators (PGRs) (Naphthalene acetic acid [NAA] and 6-benzyl amino purine [BAP]), intensity of light and concentration of agar on callus induction derived from branches of *Kappaphycus striatus* maintained in laboratory for 1 month were tested. After 2 month culture, the results showed that branches of *Kappaphycus striatus* cultured on PES (Provasoli enriched seawater) medium (without PGRs) gave the best callus induction rate (75.7%) and survival rate (77.3%) compared to those on PES medium supplemented PGRs. The optimal conditions for callus induction were PES solidified medium supplemented with 1.5 – 2.0% agar in 5 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ of light intensities. Callus induction rates (66.7% – 67%), survival rate (63.7% – 64.3%) of explants from branches incubating on PES medium with 1.5 – 2.0% agar were higher than different agar concentrations. Callus induction rates (67%), survival rate (77.7%) of explants from branches incubating on PES medium under 5 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ were higher than different light intensities. The results showed that there were three different types of calluses observed namely white filamentous callus, brown filamentous callus and compact callus. These calli that were big and had filamentous type, will be a good material for the next production stage of embryonic callus production and seedling regeneration from micropropagules.

Keywords: Agar, callus, *Kappaphycus striatus*, light, PGRs