

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*

Vũ Thị Mơ¹, CRK Reddy²

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

²Trung tâm muối và Viện nghiên cứu Hóa biển, Bhavnagar, Gujarat, India

Ngày nhận bài: 30.9.2015

Ngày nhận đăng: 20.8.2016

TÓM TẮT

Mục đích của nghiên cứu là xác định điều kiện tối ưu lên sự hình thành mô sẹo của rong sụn *Kappaphycus alvarezii* (Doty) trong điều kiện in vitro như: quy trình khử trùng mẫu, ảnh hưởng của cường độ ánh sáng và nồng độ môi trường agar. Kết quả rong được khử trùng với 0,5% - 1% chất tẩy rửa trong thời gian 5 phút, kết hợp với 0,5% - 1% betadine trong thời gian 2 - 3 phút, cuối cùng xử lý với 0,5% - 1% kháng sinh phổ rộng trong thời gian 1 ngày thu được hơn 95 - 98 % mẫu rong vô khuẩn. Hai thí nghiệm độc lập được bố trí với ánh sáng và hàm lượng agar trong môi trường thạch, ở 5 mức ánh sáng (0, 5, 25, 50, 70 $\mu\text{mol photon/m}^2/\text{s}$) và ở 9 mức nồng độ agar (0,5%; 0,75%; 1,0%, 1,25%, 1,5%, 1,75%, 2,0%, 2,5%, 3,0 %). Kết quả tỷ lệ hình thành mô sẹo cao nhất là $(96 \pm 3,5 - 98 \pm 2,1\%)$ ở 5 - 25 $\mu\text{mol photon/m}^2/\text{s}$ và $(87 \pm 5,8\% - 90 \pm 5,0\%)$ ở nồng độ agar 1% - 3% sau 2 tuần cấy mô. Tỷ lệ sống của mô sẹo cao nhất (98%) ở cường độ ánh sáng 25 $\mu\text{mol photon/m}^2/\text{s}$ và ở nồng độ agar 0,75 - 1,5% là $(75 \pm 5,7 - 84 \pm 1,1\%)$ sau 2 tháng cấy mô. Tỷ lệ tái sản xuất mô sẹo cao nhất là 50 - 55% ở cường độ ánh sáng 5 - 25 $\mu\text{mol photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ và 60 - 65% ở nồng độ agar 1 - 1.5%. Không có mô sẹo hình thành ở điều kiện tối (0 $\mu\text{mol photon/m}^2/\text{s}$). Những mô sẹo phát triển tốt, có dạng sợi, cụm mô to sẽ là vật liệu tốt để làm những thí nghiệm tiếp theo ở công đoạn sản xuất phôi mô sẹo và tái sinh cây con từ phôi mô sẹo.

Từ khóa: Nồng độ agar, khử trùng mẫu, *Kappaphycus alvarezii*, cường độ ánh sáng, nuôi cấy mô

GIỚI THIỆU

Kỹ thuật nuôi cấy mô đã được ứng dụng hiệu quả ở thực vật bậc cao từ lâu. Tuy nhiên, kỹ thuật nuôi cấy mô mới bắt đầu được ứng dụng vào rong biển trong những thập niên gần đây (Cocking, 1990; Kloareg *et al.*, 1989). Những thành tựu đạt được trên lĩnh vực nuôi cấy mô rong biển đến nay vẫn còn hạn chế so với nuôi cấy mô ở thực vật bậc cao do sự hiểu biết về mùa vụ thu thập mẫu, chọn mẫu, chuẩn bị mẫu vô trùng và điều kiện nuôi trồng, ảnh hưởng của các yếu tố vật lý như cường độ ánh sáng, nhiệt độ... các yếu tố hóa học như nồng độ dinh dưỡng, agar, chất điều hòa tăng trưởng lên quá trình sản xuất, phát triển của mô sẹo, tái nuôi cấy mô sẹo thành cây mới còn hạn chế (Cheney, 1986; Liu *et al.*, 1990). Trên thế giới đã có những báo cáo nuôi cấy mô thành công ở 19 loài rong đỏ, 13 loài rong nâu như các loài *Kappaphycus alvarezii* (Reddy *et al.*, 2003), *Gelidiella acerosa* (Kuma *et al.*, 2004), *Gracilaria*

corticata, *Sargassum tenerrimum*, *Turbinaria conoides* và *Hypnea musciformis* (Kuma *et al.*, 2007)... Trong đó, đã có những kết luận về ảnh hưởng của các yếu tố ánh sáng, nồng độ agar, chất điều hòa tăng trưởng lên quá trình sản xuất, phát triển của mô sẹo của một số loài. Tuy nhiên, những thông số này còn bị ảnh hưởng bởi đặc điểm sinh lý, nguồn gốc phát triển của loài. Hơn nữa, tại Việt Nam chưa có nghiên cứu nào báo cáo việc sản xuất mô sẹo của loài *K. alvarezii*.

K. alvarezii đã được di nhập và nuôi trồng tại Việt Nam từ năm 1993, tình hình nuôi trồng rong Sụn ở Việt Nam đã được nhóm tác giả Đào Duy Thu và cộng sự khảo sát cho thấy cả nước hiện nay có khoảng 7 vùng trồng rong Sụn, có tổng diện tích ước tính khoảng 560 ha (Đào Duy Thu *et al.*, 2014). Tuy nhiên, người dân chủ yếu nhân giống bằng phương pháp vô tính, làm chất lượng kappa - carrageenan hiện nay giảm sút và tốc độ tăng trưởng của rong giảm. Vì thế, việc nghiên cứu để tạo ra nguồn giống

tốt và chủ động là việc làm cần thiết. Nuôi cấy mô là một phương pháp nhân giống ít phụ thuộc vào thời tiết, đáp ứng số lượng giống rong lớn so với các phương pháp khác. Trong đó, quy trình khử trùng mẫu vô trùng trước khi cấy mô, các yếu tố như nồng độ môi trường agar, cường độ ánh sáng... ảnh hưởng lên quá trình sản xuất mô sẹo là những bước quan trọng trong quá trình sản xuất cây con bằng phương pháp nuôi cấy mô.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu

Rong *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty (Rhodophyta) được thu thập tại vịnh Cam Ranh, Khánh Hòa, Việt Nam. Những nhánh rong khỏe mạnh được chọn, rửa sạch tại hiện trường rồi giữ ẩm sau đó vận chuyển bằng đường hàng không sang Phòng thí nghiệm Công nghệ Sinh học, Trung tâm muối và Viện nghiên cứu Hóa học biển, Bhavnagar, Gujarat, Ấn Độ.

Thời gian nghiên cứu: 5/2015 - 10/2015.

Phương pháp nghiên cứu

Chuẩn bị vật liệu nghiên cứu - Giai đoạn nuôi thuần hóa rong

Sau khi rong được vận chuyển tới phòng thí nghiệm, tiến hành chọn lọc những nhánh rong khỏe mạnh, không trầy xước, màu sắc tươi sáng, rửa lại với nước biển vô trùng với bàn chải mềm. Rong được giữ trong bể chứa nước biển khử trùng có sục khí, bổ sung PES 20mL/L (Provasoli, 1968) và Ge_2O (10 mg/L) 2 tuần trước khi nuôi cấy mô. Điều kiện môi trường trong phòng thí nghiệm là $22 \pm 1^\circ C$, ánh sáng là 30 - 35 μmol photon/ m^2 / s được tạo bởi đèn huỳnh quang, chu kỳ chiếu sáng 12h/ngày (Kumar et al., 2004).

Thí nghiệm 1: Khảo sát quy trình khử trùng rong

Mẫu rong được lấy từ rong đã được thuần hóa, rong lần lượt được khử trùng với từng loại chất khử trùng riêng biệt hoặc kết hợp cả ba chất như sau: 0,1%, 0,25%, 0,5%, 1% nước tẩy rửa (Charmy green, Lion Co, Ltd., Tokyo, Nhật Bản) trong thời gian 5 phút và 10 phút, 0,1%, 0,5%, 1%, 1,5%, 2%, 3% Betadin trong 1 phút, 2 phút và 3 phút và 1%, 2%, 3%, 4% kháng sinh phổ rộng (Pencillin G, Streptomycin sulphate, Kanamycin, Nystatin, Neomycin) trong 1 ngày và 2 ngày (Polne – Fuller và Gibor, 1984, J. Phycol). Điều kiện môi trường được duy trì $22 \pm 1^\circ C$ dưới ánh sáng trắng với cường độ ánh sáng 35 μmol photon/ m^2 / s, thời gian chiếu sáng

12h/ngày. Kiểm tra sự nhiễm khuẩn bằng cách cấy nước tráng mô cấy sau khi khử trùng vào môi trường agar Zobel trong 1 tuần trong tủ nuôi cấy vi khuẩn.

Tiến hành cấy mô

Rong vô trùng thu được từ thí nghiệm trên, sau đó cắt thành những mô cấy có chiều dài 4 – 5 mm. Trước khi cấy mô vào đĩa thạch thì những mô cấy này được thấm khô bằng giấy vô trùng (Whatman no.1, Maidstone, UK) để loại bỏ nước và chất nhầy nhớt bám trên bề mặt vết cắt.. Cây 10 – 15 mô cấy/1 đĩa thạch. Đĩa Petri mang mô cấy được bọc kín bằng Parafilm nhằm tránh không khí bên ngoài lọt vào. Tùy vào thí nghiệm mà nồng độ agar, cường độ ánh sáng dùng cho nuôi mô cấy khác nhau và sẽ được trình bày cụ thể theo hai thí nghiệm sau:

Thí nghiệm 2: Thí nghiệm ảnh hưởng của ánh sáng lên quá trình hình thành mô sẹo rong *K. alvarezii*

Chuẩn bị đĩa thạch có thể tích 40 ml/ đĩa với nồng độ 1,5% agar nuôi trồng tảo (Algae Culture agar) (HIMEDIA, Ấn Độ) có bổ sung 20 ml/l PES. Những đĩa thạch mang mô cấy được giữ ở những cường độ ánh sáng sau: 0, 5, 25, 50, 70 μmol photon/ m^2 / s. Mỗi cường độ ánh sáng lặp lại 3 lần. Mỗi đĩa thạch mang 15 mô cấy. Nhiệt độ $22 \pm 1^\circ C$ dưới ánh sáng trắng, thời gian chiếu sáng 12 h/ngày.

Thí nghiệm 3: Thí nghiệm ảnh hưởng của nồng độ agar lên quá trình hình thành mô sẹo *K. alvarezii*

Các nồng độ agar - agar nuôi trồng tảo (Algae culture agar) (HIMEDIA, Ấn Độ) 0,5%, 0,75%, 1,0%, 1,25%, 1,5%, 1,75%, 2,0%, 2,5%, 3,0% có bổ sung 20 ml/l PES. Mỗi nồng độ agar được lặp lại 3 lần. Mỗi đĩa thạch mang 15 mô cấy. Các đĩa thạch mang mô cấy được giữ ở điều kiện nhiệt độ $22 \pm 1^\circ C$ dưới ánh sáng trắng, cường độ ánh sáng 25 - 35 μmol photon/ m^2 / s, thời gian chiếu sáng 12 h/ngày.

Thu thập và xử lý số liệu

Kiểm tra các đĩa thạch mang mô cấy 2 ngày/ 1 lần để ghi nhận những mô bị mất màu, sự nhiễm khuẩn và sự hình thành mô sẹo dưới kính hiển vi nhìn nổi (SZH10 – OLYMPUS, Nhật Bản). Sau khi cấy mô 1 tháng, đếm các mô cấy mang mô sẹo và xác định tỷ lệ hình thành mô sẹo. Sau 2 tháng cấy mô, xác định tỷ lệ sống của mô sẹo trước khi mô sẹo được cắt để nhân sinh khối. Sau khi cắt mô sẹo, những mô cấy đã bị cắt mô sẹo được cấy chuyển sang đĩa thạch mới và nuôi ở điều kiện tương tự, sau 2 tuần xác định tỷ lệ tái sản xuất mô sẹo.

Số liệu được mã hóa và xử lý bằng phần mềm Excel, SPSS 16.0.

$$\text{Tỷ lệ hình thành mô sẹo (\%)} = \frac{\text{Tổng mô cấy mang mô sẹo}}{\text{Tổng số mô được cấy}} \times 100$$

$$\text{Tỷ lệ sống của mô sẹo (\%)} = \frac{\text{Tổng mô cấy mang mô sẹo còn sống}}{\text{Tổng số mô cấy mang mô sẹo}} \times 100$$

$$\text{Tỷ lệ tái sản xuất mô sẹo (\%)} = \frac{\text{Tổng mô cấy mang mô sẹo sau khi cấy chuyển}}{\text{Tổng số mô cấy chuyển}} \times 100$$

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Khảo sát quy trình xử lý mẫu

Qua nghiên cứu khảo sát quy trình xử lý mẫu thấy rằng, rong được xử lý với 0,5% - 1% chất tẩy rửa trong thời gian 5 phút, kết hợp với 0,5% - 1% betadine trong thời gian 2 - 3 phút, cuối cùng xử lý với 0,5% - 1% kháng sinh phổ rộng trong thời gian 1 ngày cho 95 - 98% mẫu rong sạch vi khuẩn và mẫu rong khỏe mạnh có thể dùng làm nguyên liệu để nuôi cấy mô (Hình 1A). Tuy nhiên, nếu xử lý rong với nồng độ cao hơn và với thời gian dài hơn thì rong sẽ bị tẩy trắng và chết sau 1 - 7 ngày nuôi cấy mô (Hình 1B). Ngược lại, xử lý rong với nồng độ thấp hơn và với thời gian ngắn thì rong không được khử trùng hoàn toàn (Hình 1C), số mẫu bị nhiễm khuẩn cao (Hình 1D), chỉ có khoảng 5 - 10 % mẫu vô khuẩn khi được xử lý với 0,25% chất tẩy rửa với thời gian 5 phút kết hợp với 0,25% betadine trong thời gian 1 phút. Khi rong được xử lý đơn với chất tẩy rửa hoặc betadine hoặc kháng sinh phổ rộng thì hiệu quả vô trùng cũng không cao (0 - 15%).

Thí nghiệm ảnh hưởng của ánh sáng lên quá trình hình thành mô sẹo rong *K. alvarezii*

Sự phát triển của mô sẹo

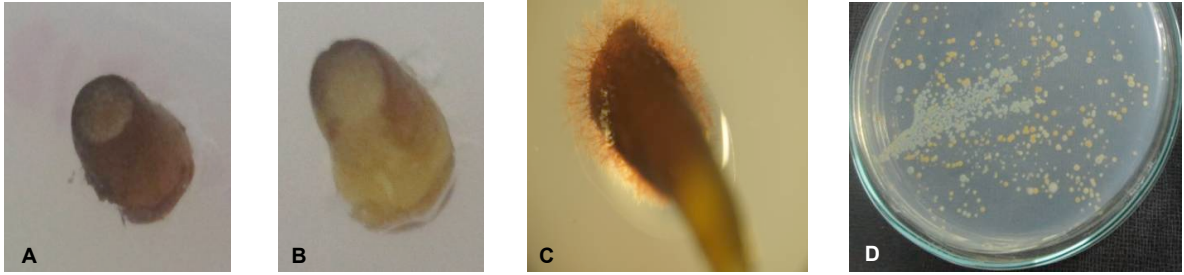
Sau khi cấy mô vào đĩa thạch, kiểm tra mô cấy dưới kính hiển vi nhìn nổi 2 ngày/ 1 lần để xác định thời điểm xuất hiện mô sẹo. Những tế bào mô sẹo đầu tiên đã xuất hiện ở mô cấy giữ ở cường độ ánh sáng 5 - 70 $\mu\text{mol photon/ m}^2/\text{s}$ sau 5 - 7 ngày cấy mô. Sau 3 tuần

cấy mô, hầu hết mô cấy còn sống đã có những tế bào mô sẹo đầu tiên. Những tế bào này phân chia và tăng sinh khối nhanh, giai đoạn đầu, những tế bào mô sẹo có màu trắng như tinh thể. Nhưng sau 2 tháng cấy mô, cụm mô sẹo có màu hơi nâu. Quan sát dưới kính hiển vi, có thể nhìn thấy những tế bào xếp thành một dãy tạo nên dạng sợi (Hình 2B).

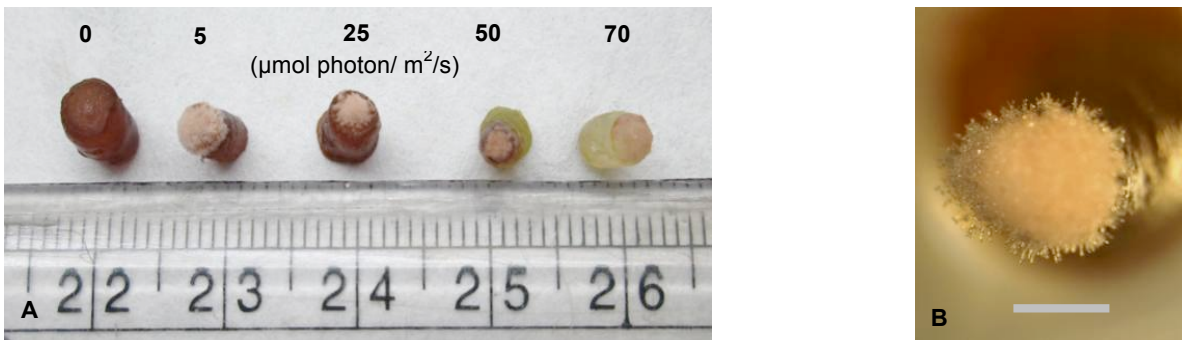
Tuy nhiên, sự phát triển của mô sẹo không giống nhau ở các cường độ ánh sáng. Mô sẹo có cụm mô to, dạng sợi, có màu hơi nâu được tìm thấy ở cường độ ánh sáng thấp (5 - 25 $\mu\text{mol photon/ m}^2/\text{s}$), những cụm mô sẹo này là nguyên liệu tốt để làm các thí nghiệm tiếp theo. Ở cường độ ánh sáng cao hơn mô sẹo phát triển kém, thậm chí khi mô cấy bị chết và mô sẹo chết theo. Ở điều kiện tối (0 $\mu\text{mol photon/ m}^2/\text{s}$) mặc dù sau thời gian 2 tháng cấy mô, mô cấy không bị mất màu nhưng không có mô sẹo được hình thành (Hình 2A).

Tỷ lệ sản xuất mô sẹo

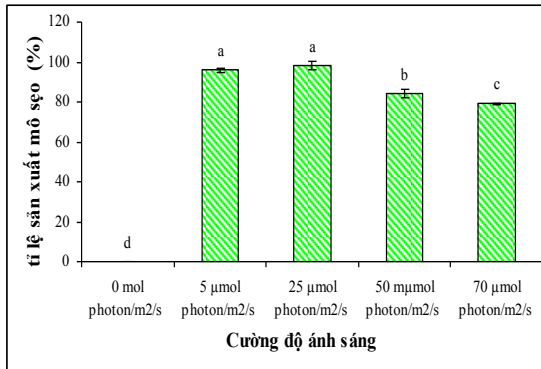
Ánh sáng đã ảnh hưởng lên tỷ lệ sản xuất mô sẹo rong *K. alvarezii* ở các cường độ ánh sáng khác nhau. Sau 1 tháng cấy mô vào đĩa thạch, ở điều kiện tối 0 $\mu\text{mol photon/ m}^2/\text{s}$ không có mô sẹo nào được hình thành. Ngược lại, có sự khác nhau có ý nghĩa khi so sánh với tỷ lệ sản xuất mô sẹo ở các cường độ ánh sáng còn lại. Tỷ lệ hình thành mô sẹo rất cao (96 \pm 3,5 - 98 \pm 2,1%) ở cường độ ánh sáng từ 5 - 25 $\mu\text{mol photon/ m}^2/\text{s}$, tiếp theo ở cường độ ánh sáng từ 50 $\mu\text{mol photon/ m}^2/\text{s}$ thì có tỷ lệ sản xuất mô sẹo là 84 \pm 2,1% cuối cùng là 79 \pm 1% ở 70 $\mu\text{mol photon/ m}^2/\text{s}$ (Hình 3).



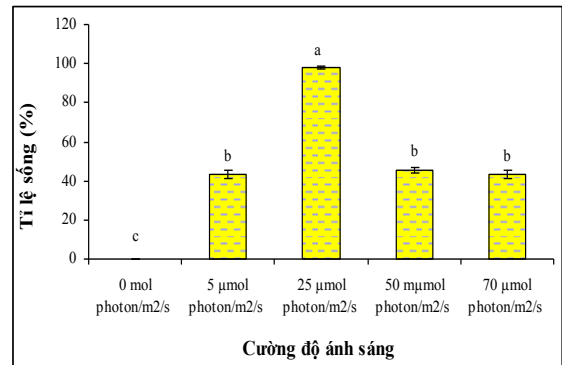
Hình 1. Tình trạng sức khỏe mẫu mô cây trong thời gian thí nghiệm: (scale bar = 500 μm). A. Mô cây được khử trùng hoàn toàn và khỏe mạnh. B. Mô cây bị tẩy trắng sau 2 ngày cấy. C. Mô cây bị nhiễm khuẩn. D. Khuẩn lạc phát triển sau 7 ngày cấy mô.



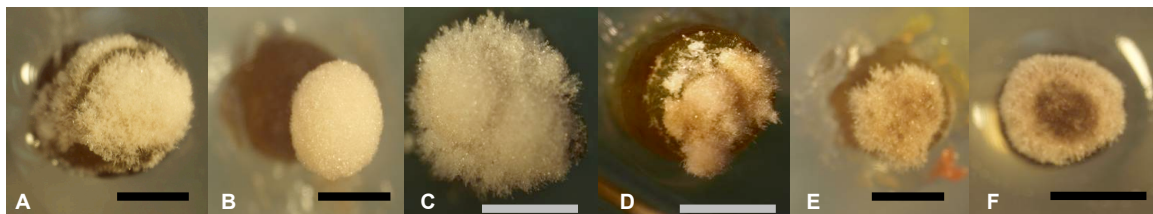
Hình 2. (A) Ảnh hưởng của cường độ ánh sáng lên sự phát triển mô sẹo rong *K. alvarezii*. (B) Mô sẹo được quan sát dưới kính hiển vi nhìn nổi (scale bar = 500 μm).



Hình 3. Ảnh hưởng của ánh sáng lên tỷ lệ hình thành mô sẹo rong *K. alvarezii*.



Hình 4. Ảnh hưởng của ánh sáng lên tỷ lệ sống của mô sẹo rong *K. alvarezii*.



Hình 5. Hình thái mô sẹo rong *K. alvarezii* sau hai tháng cấy mô ở các nồng độ agar khác nhau (scale bar = 500 μm). A. Nồng độ agar 0,5%, B, nồng độ agar 1 %, C, nồng độ 1,5%, D, nồng độ 2%, E, nồng độ 2,5%, F, nồng độ 3 %.

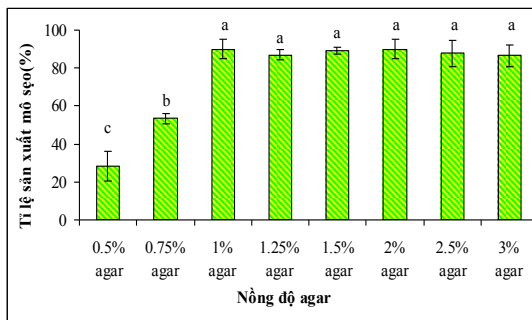
Tỷ lệ sống của mô sẹo

Các mô cấy mang mô sẹo tiếp tục được giữ ở những điều kiện ánh sáng như trên và sau 2 tháng cấy mô, những mô sẹo còn sống đã được ghi nhận. Kết quả tỷ lệ sống cho thấy có sự khác nhau ở các cường độ ánh sáng khác nhau. Ở cường độ ánh sáng quá cao (50 – 70 $\mu\text{mol photon/ m}^2/\text{s}$) hoặc quá thấp (5 $\mu\text{mol photon/ m}^2/\text{s}$) thì tỷ lệ sống thấp (43 – 45 %) so với cường độ ánh sáng 25 $\mu\text{mol photon/ m}^2/\text{s}$ (98%) (Hình 4).

Tái sản xuất mô sẹo

Sau 2 tháng cấy mô, tiến hành thu hoạch mô sẹo để làm tiếp những thí nghiệm tiếp theo, mô cấy bị cắt mô sẹo được cấy chuyển sang môi trường agar như trên và được nuôi ở các điều kiện ánh sáng khác nhau. Kết quả tỷ lệ tái sản xuất mô sẹo cũng khác nhau ở các cường độ ánh sáng khác nhau. Ở cường độ ánh sáng cao, mô cấy chết hoàn toàn khi được cấy chuyển sau 2 tuần. Ở cường độ ánh sáng 5 – 25 $\mu\text{mol photon/ m}^2/\text{s}$ có tỷ lệ tái sản xuất mô sẹo từ 50 – 55%. Những mô sẹo này phát triển rất nhanh và có thể thu hoạch sau 3 tuần cấy chuyển.

Như vậy, cường độ ánh sáng từ 5 – 70 $\mu\text{mol photon/ m}^2/\text{s}$ đã ảnh hưởng tới tỷ lệ sản xuất mô sẹo,



Hình 6. Ảnh hưởng của nồng độ agar lên tỷ lệ sản xuất mô sẹo rong *K. alvarezii*.

Tỷ lệ sản xuất mô sẹo

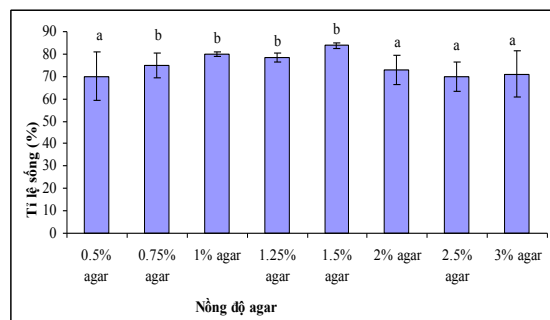
Nồng độ agar đã ảnh hưởng lên tỷ lệ sản xuất mô sẹo rong *K. alvarezii*. Sau một tháng cấy mô tỷ lệ sản xuất mô sẹo được xác định. Ở nồng độ agar thấp tỷ lệ sản xuất mô sẹo thấp hơn so với nồng độ cao ($p < 0.05$). Nồng độ agar 0,5% có tỷ lệ sản xuất mô sẹo thấp nhất $28 \pm 7,6\%$, tiếp theo là nồng độ agar 0,75% là $53 \pm 2,9\%$. Từ nồng độ agar 1 – 3% có tỷ lệ mô sẹo cao và không khác nhau giữa các nồng độ này ($87 \pm 5,8\% - 90 \pm 5,0\%$) (Hình 6).

tỷ lệ sống và sự phát triển hình thái của mô sẹo. Ở cường độ ánh sáng 25 $\mu\text{mol photon/ m}^2/\text{s}$ là tốt nhất, mô sẹo có sự phát triển tốt, tỷ lệ sản xuất (98%) và tỷ lệ sống của mô sẹo cao (98%), tỷ lệ tái sản xuất mô sẹo cao 55%.

Thí nghiệm ảnh hưởng của nồng độ agar lên quá trình hình thành mô sẹo rong *K. alvarezii*

Sự phát triển của mô sẹo

Tương tự ở thí nghiệm ảnh hưởng của cường độ ánh sáng. Mô cấy cũng được quan sát dưới kính hiển vi nhìn nổi trong suốt thời gian cấy mô. Mô cấy đã xuất hiện những tế bào mô sẹo đầu tiên ở tất cả các nồng độ agar sau 1 tuần cấy. Sau hai tháng cấy mô, cụm mô sẹo phát triển khác nhau ở những nồng độ agar khác nhau. Những tế bào mô sẹo mọc hầu hết ở bề mặt vết cắt, tuy nhiên ở nồng độ agar 0,5% ghi nhận có trường hợp mọc ở cả vết cắt và phần vỏ của mô (Hình 5A). Hầu hết các cụm mô sẹo to ở tất cả các nồng độ agar, tuy nhiên ở nồng độ agar từ 0,75 – 1,5% thì cụm mô sẹo to hơn hẳn (Hình 5B, C, D). Ở nồng độ 2-3% agar cụm mô sẹo phát triển kém hơn và sau hai tháng nuôi cụm mô sẹo có xu hướng bị cần cỗi, chết (Hình 5 E, F).



Hình 7. Ảnh hưởng của nồng độ agar lên tỷ lệ sống mô sẹo rong *K. alvarezii*.

Tỷ lệ sống của mô sẹo

Sau 2 tháng cấy mô, xác định tỷ lệ sống của mô sẹo thấy rằng, nồng độ agar cũng ảnh hưởng lên tỷ lệ sống của mô sẹo, ở nồng độ agar (0,75 – 1,5%) thì có tỷ lệ sống là ($75 \pm 5,7 - 84 \pm 1,1\%$) cao hơn khi so với nồng độ agar thấp (0,5 %) là ($70 \pm 10,8\%$) và nồng độ agar cao (2 – 3%) là ($71 \pm 10,4 - 73 \pm 6,4\%$) ($p < 0.05$) (Hình 7).

Tái nuôi cấy mô sẹo

Mô sẹo khoảng 2 tháng tuổi được cắt để tiếp tục

nhân sinh khối mô sẹo. Mô cây sau khi cắt mô sẹo một lần nữa được cấy chuyển vào đĩa thạch mới có nồng độ agar giống nồng độ agar ban đầu, sau 2 tuần xác định tỷ lệ tái sản xuất mô sẹo. Kết quả nhận thấy rằng tỷ lệ sản xuất mô sẹo rất thấp ở nồng độ agar cao từ 2 – 3% (10%). Ở nồng độ agar thấp 0,5% hầu như không có mô cây nào tái sản xuất mô sẹo. Cao nhất là từ nồng độ 1 - 1,5% có tỷ lệ tái sản xuất mô sẹo là 60 – 65%.

THẢO LUẬN

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 cấy mô, các khuẩn lạc phát triển nhanh chóng và lấy đi dinh dưỡng trong môi trường agar, sau vài ngày cấy phải hủy bỏ thí nghiệm, nhưng nếu mẫu xử lý với nồng độ cao và với thời gian dài thì rong bị tẩy trắng và chết. Vì vậy, các tác giả luôn chú trọng tới quy trình xử lý mẫu trước khi tiến hành nuôi cấy. Thí nghiệm đã khảo sát quy trình từ xử lý đơn từng chất đến kết hợp cả ba loại. Kết quả tương tự với báo cáo trước đây của Reddy và đồng tác giả (2003) là phải xử lý đồng thời ba bước với các chất khử trùng nêu trên. Tuy nhiên, ở báo cáo này hiệu quả khử trùng ở nồng độ thấp hơn với thời gian ngắn hơn khi so với thí nghiệm của Reddy và đồng tác giả trên cùng loài rong *K. alvarezii* được xử lý với 0,5% chất tẩy rửa trong 10 phút, sau đó khử trùng với 2% Betadin trong thời gian 3 phút và cuối cùng rong được xử lý với 3% kháng sinh phổ rộng trong thời gian hai ngày cho 90 – 95% mẫu rong vô trùng và mô cấy phát triển tốt (Reddy et al., 2003). Nồng độ cao Iodine (2 – 3%) và thời gian khử trùng lâu (2 – 3 phút) đã khử trùng hoàn toàn nhưng làm tổn thương lớp biểu bì của rong và Iodine thâm thấu vào thân rong thông qua những vết cắt và cuối cùng rong bị tẩy trắng và chết sau vài ngày cấy mô vào đĩa thạch. Tương tự, đối với loài *Gelidiella acerosa* được khử trùng sạch đến 90 % khi xử lý với 0,1% chất tẩy rửa trong 10 phút, 2% betadine trong 5 phút và cuối cùng xử lý với 3,5% kháng sinh phổ rộng trong 2 ngày (Kumar et al., 2004). Điều này có thể giải thích, sức chịu đựng với các chất khử trùng của rong phụ thuộc vào nguồn gốc và sinh lý của từng loài rong (Aguirre ML et al., 1995) và chất có hoạt tính bề mặt như chất tẩy rửa đã làm giảm sức căng bề mặt của rong và vi khuẩn, vì thế hạn chế sự dính chặt của vi khuẩn lên bề mặt rong (Pelczar et al., 1993). Ở thí nghiệm ảnh hưởng của cường độ ánh sáng của chúng tôi, tỷ lệ sống sau 2 tháng cấy mô giảm đáng

kể khi nuôi ở cường độ ánh sáng cao, mẫu mô cây 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 đồng tác giả (2003) ánh sáng không ảnh hưởng tới tỷ lệ hình thành mô sẹo của *K. alvarezii*. Tuy nhiên, nếu mẫu rong tiếp tục được giữ ở cường độ ánh sáng cao (70 $\mu\text{mol photon/ m}^2/\text{s}$) trong thời gian dài thì chúng bị tẩy trắng (Reddy et al., 2003). Ở điều kiện tối (0 $\mu\text{mol photon/ m}^2/\text{s}$) cũng không có mô sẹo được ghi nhận ở *K. alvarezii* (Reddy et al., 2003), *Grateloupia doryphora* (Robaina et al., 1990a). Các loài rong *Hypnea tenerrimum*, *Gracilaria corticata*, *Sargassum tenerrimum*, *Turbinaria conoides* cũng có tỷ lệ sản xuất mô sẹo cao nhất ở cường độ ánh sáng 5 – 30 $\mu\text{mol photon/ m}^2/\text{s}$. Tuy nhiên, tỷ lệ sản xuất mô sẹo ở thí nghiệm này cao hơn so với loài *Hypnea tenerrimum* là 10% ở 5 - 30 $\mu\text{mol photon/ m}^2/\text{s}$, loài *Gracilaria corticata* (40%), *Sargassum tenerrimum* đạt 10% và *Turbinaria conoides* 40% ở 30 $\mu\text{mol photon/ m}^2/\text{s}$ (Kumar et al., 2007). Loài *G. acerosa* có tỷ lệ sản xuất mô sẹo là 90% ở 5 $\mu\text{mol photon/ m}^2/\text{s}$ (Kumar et al., 2004). Theo kết quả như trên, ta thấy rằng khi mô sẹo đã hình thành ở tất cả các cường độ ánh sáng 5 – 70 $\mu\text{mol photon/ m}^2/\text{s}$, sau 1 tháng cấy mô cần cung cấp cường độ ánh sáng là 25 $\mu\text{mol photon/ m}^2/\text{s}$ để có tỷ lệ sống cao và sự phát triển của mô tốt nhất. Trong các thí nghiệm của các tác giả trước đây, hầu hết các tác giả quan tâm đến tỷ lệ sản xuất mô sẹo mà không đề cập đến tỷ lệ sống của mô. Đối với nghiên cứu này, thấy rằng ở các cường độ ánh sáng từ 5 – 70 $\mu\text{mol photon/ m}^2/\text{s}$ đều cho tỷ lệ sản xuất mô sẹo cao nhưng tỷ lệ sống lại khác nhau ở các cường độ ánh sáng. Tỷ lệ sống cao cho phép thu được sinh khối mô sẹo cao, hiệu quả kinh tế cao hơn. Kết quả chỉ ở cường độ ánh sáng 25 $\mu\text{mol photon/ m}^2/\text{s}$ tỷ lệ sống mô sẹo cao nhất.

Tỷ lệ sản xuất mô sẹo không khác nhau giữa các nồng độ agar từ 1 – 3% tương tự với kết quả của Reddy và đồng tác giả (2003) cho thấy rong *K. alvarezii* sản xuất mô sẹo không ảnh hưởng bởi nồng độ Bacto agar từ (0,8% - 2,5%), và kết quả tỷ lệ sản xuất mô sẹo cao nhất ở 1,5% Bacto agar (82%), cao hơn so với 3% agar (64%) (Reddy, 2003). Tỷ lệ sản xuất mô sẹo loài *K. alvarezii* chỉ đạt 31,18% - 36,47% ở nồng độ agar thấp 0,8% Bacto agar có bổ sung môi trường Conwy/CW (Liao, 1983) và PES kết hợp với chất điều hòa tăng trưởng (Sulistiani et al, 2012). Thí nghiệm này agar được dùng là agar nuôi trồng tảo (Algae culture agar) và nồng độ agar thấp ở mức 0,5% - 0,75% thì tỷ lệ sản xuất mô sẹo rất thấp (28 – 53%). Nồng độ agar thấp thì độ đông đặc không cao, những mô cấy sau khi cấy vào môi

trường agar thấp dễ bị rời khỏi vị trí, vết cắt dễ bị ướt và không được khô trong suốt quá trình nuôi, 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 ở nồng độ agar 1,5% cho tỷ lệ sản xuất mô sẹo cao nhất (Kumar *et al.*, 2004).

KẾT LUẬN

Xử lý mẫu rong với 0,5% - 1% chất tẩy rửa trong thời gian 5 phút, kết hợp với 0,5% - 1% betadine trong thời gian 2 - 3 phút, cuối cùng xử lý với 0,5% - 1% kháng sinh phổ rộng trong thời gian 1 ngày và nuôi mô cấy ở 5 - 25 $\mu\text{mol photon/ m}^2/\text{s}$ trong môi trường agar 1- 1,5% có bổ sung PES cho cụm mô sẹo to và có tỷ lệ sản xuất mô sẹo cao (87 - 98%), tỷ lệ sống (75 - 98%), tỷ lệ tái sản xuất mô sẹo là 50 - 65%.

Lời cảm ơn: Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn ban lãnh đạo Trung tâm Muối và Viện Nghiên cứu Hóa học biển, Bhavnarga, Gujarat, Ấn Độ đã tạo điều kiện trang thiết bị và hóa chất để nhóm tôi có thể thực hiện thí nghiệm. Đồng cảm ơn sâu sắc tới chương trình học bổng của NAM S&T Centre, Ấn Độ đã tài trợ kinh phí để nhóm tôi có thể làm tốt thí nghiệm này.

INVESTIGATION OF EXPLANTS STERILIZATION PROCESS, EFFECT OF LIGHT INTENSITY AND CONCENTRATION OF AGAR FOR CALLUS INDUCTION OF *KAPPAPHYCUS ALVAREZII* (DOTY) DOTY (RHODOPHYTA) *IN VITRO*

Vu Thi Mo^{1,✉}, CRK Reddy²

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

²Central Salt and Marine Chemical Research Institute, Bhavnagar, Gujarat, India

SUMMARY

Objective of this study was to ascertain the optimum condition for callus induction of *K. alvarezii* (Doty) *in vitro* such as to determine the explants sterilization process, the effect of intensity of light and the concentration of agar. Fresh thalli treated with 0.5% - 1% detergent for 5 mins followed by 0.5% - 1% betadine for 2 - 3 mins and incubated with 0.5% - 1% broad spectrum antibiotic mixture in PES medium for 1 day produced 95 - 98% bacteria free healthy explants. Two independent experiments with light intensity and agar concentration of the environment were carried out at 5 different levels of 0, 5, 25, 50, 70 $\mu\text{mol photon.m}^2.\text{s}^{-1}$ and 9 agar concentrations of 0.5%, 0.75%; 1.0%, 1.25%, 1.5%, 1.75%, 2.0%, 2.5%, 3.0%. The highest callus induction rate was (96 \pm 3.5 - 98 \pm 2.1%) at 5 - 25 $\mu\text{mol photon.m}^2.\text{s}^{-1}$ and (87 \pm 5.8% - 90 \pm 5.0%) in 1% - 3% agar concentration after 2 weeks of explants. The highest callus living rate was 98% at the light intensity of 25 $\mu\text{mol photon.m}^2.\text{s}^{-1}$ and (75 \pm 5.7 - 84 \pm 1.1%) in 0.75 - 1.5% agar concentration after 2 months of explants. The highest callus re-induction rate was 50 - 55% at the light intensity of 5 - 25 $\mu\text{mol photon.m}^2.\text{s}^{-1}$

✉ Author for correspondence: Tel: +84-987644723; E-mail: thaonguyenxanh1607@gmail.com

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Aguirre ML, Estrada RFJ and Evans VL (1995) Facts, Proplems and needs in seaweed tissue culture: An appraisal. *J Phycol* 31: 677-688.

Kuma GR, Reddy CRK, Ganesan M, Thirupathi S, Dipakkore S, Eswaran K, Rao PVS and Jha B (2004) Tissue culture and regeneration of thallus from callus of *Gelidiella acerosa* (Gelidiales, Rhodophyta). *Phycologia* 43 53: 596-602.

Kuma GR, Reddy CRK, Jha B (2007) Callus induction and thallus regeneration from callus of phycocolloid yielding seaweeds from the Indian coast. *J Appl Phycol* 19: 15-25.

Đào Duy Thu, Nguyễn Văn Nguyên, Trần Mai Đức (2014) Hiện trạng nghề trồng rong Sụn *Kappaphycus alvarezii*, Doty ở Việt Nam. *Tap chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*: 221-227.

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.

Reddy CRK, Kuma GR, 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.

and 60 – 65% in 1 – 1.5% agar concentration. Callus was not observed in dark condition ($0 \mu\text{mol photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). These calluses, that were strong, 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 concentrations, explants sterilization, Kappaphycus alvarezii, light of intensity, tissue culture*