

Nghiên cứu ảnh hưởng kích thước mẫu cấy tới khả năng tái sinh chồi trực tiếp rong sụn *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Solieriaceae) ở Việt Nam

Lê Thanh Tùng*, Phạm Thị Mát

Phòng Nghiên cứu Công nghệ Sinh học biển, Viện Nghiên cứu Hải sản, 224 Lê Lai, phường Máy Chai, quận Ngô Quyền, TP Hải Phòng, Việt Nam

Ngày nhận bài 12/7/2023; ngày chuyển phân biện 15/7/2023; ngày nhận phân biện 28/7/2023; ngày chấp nhận đăng 3/8/2023

Tóm tắt:

Tái sinh chồi trực tiếp là kỹ thuật sinh học được sử dụng để tạo ra một số lượng lớn cây rong sụn non từ cây mẹ. Trong thí nghiệm này, rong sụn *Kappaphycus alvarezii* có kích thước 0,25-2 cm được nuôi trong môi trường PES, bổ sung 5 mg/l Indole-3-acetic acid (IAA) kết hợp 1 mg/l N6-benzyladenine (BA). Sau 60 ngày thí nghiệm, kích thước mẫu cấy có ảnh hưởng rõ rệt đến khả năng tái sinh của rong sụn. Mẫu có kích thước 0,25 cm cho tỷ lệ sống và tái sinh thấp nhất (13,33±3,34%), lượng chồi trung bình đạt 3,08±0,14 chồi/mẫu với chiều dài chồi trung bình 1,16±0,56 mm. Mẫu có kích thước 0,75 cm cho hiệu quả tái sinh cao với thời gian hình thành chồi sớm nhất (sau 12 ngày nuôi cấy), tỷ lệ hình thành chồi đạt 83,33±3,34%, lượng chồi trung bình đạt 3,77±0,18 chồi/mẫu, chiều dài chồi trung bình 6,37±0,55 mm, tốc độ sinh trưởng đạt cao nhất 1,13±0,02%/ngày. Mẫu có kích thước 1,5 và 2 cm cho lượng chồi lớn nhất (8,05±0,32 ở mẫu 1,5 cm và 11,54±0,25 chồi/mẫu ở mẫu 2 cm), chiều dài chồi trung bình tương ứng đạt 1,45±0,27 và 1,21±0,12 mm, tốc độ sinh trưởng đạt 0,72±0,08% và 0,70±0,04%/ngày. Như vậy, mẫu kích thước 0,75 cm được xem là lựa chọn tốt nhất cho phương pháp nhân giống vô tính rong sụn *K. alvarezii*. Rong sau khi tái sinh chồi được chuyển sang bể ương có mức độ thích nghi tốt với tỷ lệ sống 100% và tốc độ tăng trưởng đạt 1,79±0,32%/ngày.

Từ khóa: *Kappaphycus alvarezii*, kích thước, nhân giống vô tính, rong biển, tái sinh chồi trực tiếp, tốc độ sinh trưởng.

Chỉ số phân loại: 4.6

1. Đặt vấn đề

Rong sụn *K. alvarezii* là đối tượng thủy sản có giá trị kinh tế, mang lại nguồn lợi và sinh kế bền vững cho bà con nghèo cộng đồng ven biển. Hiện nay, nhu cầu về sản lượng rong sụn cho ngành công nghiệp chế biến ngày càng tăng. Trong đó, các nhóm rong biển như *Kappaphycus* và *Eucheuma* chứa hàm lượng cao carrageenan được dùng làm nguyên liệu thô cho các ngành công nghiệp thực phẩm, dược phẩm và mỹ phẩm. Việc nuôi trồng và thương mại hóa nhóm rong biển này đang được phát triển ở nhiều nước thuộc khu vực Đông Nam Á như Philippines, Indonesia, Malaysia, Việt Nam và Campuchia [1].

Theo phương thức truyền thống, rong sụn *K. alvarezii* thường được nhân giống bằng phương pháp sinh dưỡng. Theo cách này, những cây rong bố mẹ được tách thành những bụi rong có khối lượng khoảng 100 g được cột vào dây và cố định vào giàn nuôi. Khi rong tăng trưởng gấp 3-4 lần khối lượng ban đầu thì tiếp tục được tách ra để nhân giống. Quá trình này lặp lại cho đến khi toàn bộ diện tích trồng được phủ bằng rong biển. Phương pháp nhân giống sinh dưỡng thông thường, rong biển được sử dụng dài ngày trên cùng một giống, dẫn đến suy giảm sức sống, giảm giá

trị sản phẩm và ngày càng giảm về năng suất sản lượng. Một số giải pháp khác nhằm cung cấp và phát triển nguồn giống rong biển như nhân giống bằng bào tử [2-4] hay nuôi cấy mô tế bào [5-13] được kỳ vọng mang lại lợi ích và đảm bảo tính bền vững cho ngành rong biển chứa hàm lượng cao carrageenan. Tuy nhiên, các phương pháp này còn tồn tại nhiều hạn chế. Quá trình sản xuất giống *Kappaphycus* và *Eucheuma* từ bào tử thường rất chậm và tốn thời gian do giai đoạn trưởng thành kéo dài [4]. Hơn nữa, phương thức sản xuất bằng bào tử mới dừng ở giai đoạn ban đầu về phát triển công nghệ do sự khó khăn về mùa vụ, khan hiếm cây rong bố mẹ mang bào tử. Các cá thể trưởng thành, cả thể nang và thể tứ bội cũng hiếm khi được tìm thấy trong tự nhiên như các loài rong khác [14]. Nuôi cấy mô tế bào rong biển được kỳ vọng nhiều hơn bởi khả năng tạo ra hàng loạt cây con cho nuôi trồng.

Trong khi sản xuất giống bằng bào tử hay nuôi cấy mô tế bào phát sinh mô sẹo đòi hỏi thời gian dài, chi phí cao và thường được sử dụng nhiều trong cải tạo, chọn lọc giống hơn trong sản xuất, nhân giống vô tính bằng phương pháp tái sinh chồi trực tiếp được xem như một giải pháp thực tế hơn, có thể sử dụng để tiết kiệm chi phí sản xuất [11].

*Tác giả liên hệ: Email: tungtrmf@gmail.com

Study on the effect of explant size on direct shoot regeneration capability of seaweed *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Solieriaceae) in Vietnam

Thanh Tung Lê*, Thi Mat Pham

Department of Marine Biotechnology, Research Institute for Marine Fisheries, 224 Le Lai Street, May Chai Ward, Ngo Quyen District, Hai Phong City, Vietnam

Received 12 July 2023; revised 28 July 2023; accepted 3 August 2023

Abstract:

Direct regeneration is a biological technique used to create a large quantity of seaweed seedlings from mother plants. In this experiment, *Kappaphycus alvarezii*, ranging in size 0.25–2.0 cm, was cultivated in a Provasoli's Enriched Seawater (PES) medium supplemented with 5 mg/l of Indole-3-acetic acid combined with 1 mg/l of N6-benzyladenine. After 60 days of the experiment, the size of the explant significantly affected the direct regenerative capability of *Kappaphycus alvarezii*. The 0.25 cm-sized explants showed the lowest survival and regeneration rates 13.33±3.34%, with an average shoot count of 3.08±0.14 shoots/explant and an average shoot length of 1.16±0.56 mm. The 0.75 cm-sized explants exhibited high regenerative efficiency, with the best shoot formation time (12 days of cultivation), a shoot formation rate of 83.33±3.34%, an average shoot count of 3.77±0.18 shoots/explant, an average shoot length of 6.37±0.55 mm, and the highest growth rate of 1.13±0.02% per day. The 1.5 and 2 cm-sized explants produced the highest shoot count (8.05±0.32 and 11.54±0.25 shoots/explant, respectively), corresponding to an average shoot length of 1.45±0.27 and 1.21±0.12 mm, and growth rates of 0.72±0.08 and 0.70±0.04% per day, respectively. The results indicated that the 0.75 cm-sized explants are considered the best choice for the clonal propagation of *K. alvarezii* seaweed. The regenerated seaweed was then transferred to a nursery tank and showed a good adaptation with a survival rate of 100% and a growth rate of 1.79±0.32%/day.

Keywords: clonal propagation, direct shoot regeneration, growth rate, *Kappaphycus alvarezii*, seaweed, size.

Classification number: 4.6

Nhân giống vô tính bằng phương pháp tái sinh chồi trực tiếp nhằm mục đích tạo ra cây giống có chất lượng tốt, tốc độ sinh trưởng tương đối nhanh, kháng bệnh và thích nghi tốt với điều kiện môi trường không thuận lợi. Đây là mục đích chính trong phát triển ngành công nghiệp rong biển. Quá trình sử dụng môi trường dinh dưỡng và các chất điều hòa sinh trưởng khác nhau được thử nghiệm ở rong biển *Kappaphycus* và *Eucheuma* [5, 6, 8, 9, 11, 15-17].

Việt Nam là một trong những nước đi sau về các công nghệ nuôi cấy mô rong biển. Tuy nhiên, đến nay phương pháp này đã tương đối thành công và được áp dụng trong sản xuất cây rong mầm trên loài rong sụn *K. alvarezii* và rong sủ *K. striatus*. Kỹ thuật nuôi cấy mô sẹo được tiến hành nhân giống thành công ở quy mô phòng thí nghiệm và được ứng dụng thực tế ngoài thực nghiệm. Cây rong nuôi cấy mô cho tốc độ sinh trưởng và khả năng kháng bệnh tốt hơn nhiều so với cây bố mẹ có nguồn gốc di nhập. Rong nuôi thương phẩm cho chất lượng và hàm lượng carrageenan đạt chất lượng làm rong nguyên liệu phục vụ công nghiệp chế biến [18, 19].

Cũng như các nghiên cứu rong biển trên thế giới, hiệu suất quy trình sản xuất cây rong mầm bằng phương pháp nuôi cấy mô tế bào phát sinh mô sẹo ở Việt Nam còn thấp, thời gian và chi phí vận hành cao. Tính ứng dụng của phương pháp này còn gặp nhiều hạn chế. Hiện nay, phương pháp sản xuất giống bằng tái sinh chồi trực tiếp được xem như một giải pháp thay thế, khả thi trong phát triển nguồn giống rong biển. Phương pháp này cho phép nhân giống hàng loạt, đồng bộ và tiết kiệm chi phí, thời gian sản xuất. Bởi vậy, nghiên cứu này được tiến hành nhằm đánh giá ảnh hưởng kích thước mẫu cấy tới hiệu quả tái sinh chồi trực tiếp trên cây rong sụn, từ đó phát triển phương pháp nhân nhanh cây giống rong sụn *in vitro* phục vụ mục tiêu sản xuất.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Thu mẫu và thuần hóa rong sụn

Thí nghiệm được tiến hành từ tháng 8/2022 đến tháng 2/2023. Mẫu rong sụn khỏe mạnh, có màu nâu sẫm, không bị bệnh và không có tảo bám, ký sinh được thu thập từ vùng biển Cà Ná, tỉnh Ninh Thuận và được chuyển về Phòng Thí nghiệm Công nghệ Sinh học biển, Viện Nghiên cứu Hải sản nhằm lưu giữ và cung cấp vật liệu cho các nghiên cứu nhân giống. Các bước lưu giữ rong được tiến hành theo nghiên cứu của E. Sulistiani và cs (2012) [10]. Cụ thể, rong sau khi rửa sạch được thuần hóa trong bể kính có dung tích 50 l với hệ thống lọc nước tuần hoàn và sục khí liên tục. Các bể kính được đặt dưới ánh sáng trắng đèn huỳnh quang với cường độ ánh sáng 35 $\mu\text{mol photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, chu kỳ chiếu

sáng L:D là 12:12 giờ, nhiệt độ được duy trì trong phòng điều hòa $25 \pm 1^\circ\text{C}$, môi trường nuôi được duy trì với độ mặn nước $30 \pm 2\text{‰}$. Nước biển được thay và bổ sung dinh dưỡng (PES 2%) hàng tuần.

2.2. Khử trùng vật liệu

Sau khoảng 2 tuần nuôi thuần hóa, các mẫu rong khỏe mạnh, không có tế bào biểu sinh được cắt (phân đoạn 3-5 cm) và sử dụng làm mẫu cấy. Các đoạn mẫu được làm sạch và khử trùng bề mặt bằng chất tẩy rửa lô hội (Earth choice Aloe Fresh, Úc) 0,5% và povidone iodine 2% trong thời gian 3 phút, sau đó rửa lại 3 lần bằng nước biển đã được hấp tiệt trùng để cung cấp các mẫu cấy sạch, khỏe mạnh và không có tảo ký sinh.

2.3. Thí nghiệm chiều dài mẫu cấy

Chiều dài mẫu cấy được thử nghiệm với các kích thước khác nhau: 0,25; 0,50; 0,75; 1,00; 1,50 và 2,00 cm để lựa chọn kích thước tối ưu. Các mẫu cấy được cắt đồng nhất từ phần nhánh thân thứ cấp (phần nhánh từ sau thân chính và dưới chồi đỉnh) với 30 mẫu cắt phân đoạn trong một bình cầu đáy bằng 500 ml, chứa 300 ml nước biển đã vô trùng. Môi trường nuôi được bổ sung PES với nồng độ 2% và 5 mg/l Indole-3-acetic acid (IAA, Sigma Aldrich) kết hợp 1,0 mg/l N6-benzyladenine (BA, Sigma Aldrich) [9], sục khí liên tục. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần cho mỗi nhóm kích thước. Các bình thí nghiệm được thay nước một lần một tuần và bổ sung dinh dưỡng sau khi thay nước. Quan sát và theo dõi thí nghiệm 7 ngày một lần trong khoảng thời gian 60 ngày. Đặc điểm phát sinh hình thái, tỷ lệ mẫu tái sinh chồi trực tiếp (%), thời gian hình thành chồi, số chồi/mẫu và khối lượng mẫu (g) được theo dõi để đánh giá hiệu quả quá trình tái sinh chồi trực tiếp.

Điều kiện nuôi trồng được duy trì ổn định: ánh sáng trắng đèn huỳnh quang ở cường độ ánh sáng $35 \mu\text{mol photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ với chu kỳ sáng tối L:D là 12:12 giờ, nhiệt độ $25 \pm 1^\circ\text{C}$, sục khí liên tục. Độ mặn nước biển nuôi rong duy trì $30 \pm 2\text{‰}$.

2.4. Ươm nuôi cây con trong bể kính

Sau khi hình thành chồi trong thời gian nuôi 60 ngày, mẫu cấy được chuyển sang ươm nuôi trong bể kính có thể tích 50 l. Điều kiện phòng thí nghiệm được duy trì ổn định: ánh sáng trắng đèn huỳnh quang với cường độ ánh sáng $35 \mu\text{mol photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, chu kỳ sáng tối L:D là 12:12, nhiệt độ $25 \pm 1^\circ\text{C}$, sục khí liên tục. Độ mặn nước biển nuôi rong duy trì $30 \pm 2\text{‰}$. Thay nước hàng tuần và bổ sung môi trường nuôi (PES 2%) sau khi thay nước. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần trong thời gian 30 ngày. Tỷ lệ sống (%) và tốc độ tăng trưởng (%/ngày) được theo dõi để đánh giá hiệu quả của quá trình ươm giống.

Tốc độ tăng trưởng ngày và tỷ lệ sống áp dụng công thức tính của M.R.J. Luhan và cs (2010) [4].

$$\text{Tốc độ tăng trưởng ngày: GR} = (\ln W_t - \ln W_i) \times 100/t$$

trong đó, GR: tỷ lệ tăng trưởng ngày (%/ngày); W_i : trọng lượng tươi lúc bắt đầu nuôi (g); W_t : trọng lượng tươi sau t ngày nuôi thử nghiệm (g).

$$\text{Tỷ lệ sống: S} = (N_1/N_0) \times 100$$

trong đó: S: tỷ lệ sống (%); N_1 : số mẫu rong thu hoạch; N_0 : số mẫu rong ban đầu.

2.5. Xử lý số liệu

Số liệu được nhập trên Microsoft Excel 2010 và phân tích bằng phần mềm SPSS Statistics 20. Sự khác biệt về sự sinh trưởng bao gồm thời gian hình thành chồi, tỷ lệ hình thành chồi, số lượng chồi trung bình cũng như tốc độ tăng trưởng ở các lô thí nghiệm được kiểm tra mối tương quan với hệ số tương quan LSD, phân tích với độ tin cậy 95% ($p < 0,05$).

3. Kết quả

3.1. Ảnh hưởng của kích thước mẫu đến sự hình thành chồi ở các mẫu cấy

3.1.1. Ảnh hưởng tới thời gian và đặc điểm hình thành chồi

Mẫu cấy sinh dưỡng kích thước khác nhau có thời gian hình thành chồi và đặc điểm phát triển khác nhau (bảng 1). Thời gian hình thành chồi sớm nhất là thời gian ghi nhận sự phát sinh chồi đầu tiên trong một lô thí nghiệm. Mẫu có thời gian hình thành chồi sớm nhất được ghi nhận ở lô mẫu kích thước 0,75 cm vào ngày thứ 12. Mẫu có thời gian hình thành chồi muộn nhất ghi nhận ở lô mẫu kích thước 0,25 cm vào ngày thứ 20. Tương tự, thời gian hình thành chồi trung bình được tính theo giá trị trung bình chung cho từng lô thí nghiệm. Ngoại trừ lô thí nghiệm có kích thước 0,25 cm cho thời gian hình thành chồi trung bình thấp, dao động khoảng $26,95 \pm 0,93$ ngày. Các lô thí nghiệm với các nhóm kích thước lớn hơn cho thời gian hình thành chồi không khác biệt có nghĩa về mặt thống kê ($p > 0,05$) và dao động trong khoảng $21,22 \pm 0,19$ đến $21,70 \pm 0,32$ ngày. Có sự khác biệt rõ rệt về đặc điểm hình thành chồi giữa các lô mẫu cấy kích thước khác nhau. Mẫu có kích thước dưới 1,0 cm hình thành chồi với số lượng thấp và chiều dài trung bình chồi ngắn, trong khi nhóm mẫu có kích thước trên 1,0 cm cho số lượng chồi nhiều hơn. Mẫu cấy có kích thước 0,75 cm có số lượng chồi không nhiều nhưng cho chiều dài chồi lớn, chồi to, mập và có màu nâu sẫm đặc trưng. Ngược lại, mẫu cấy có kích thước 1,0 và 1,5 cm có số lượng chồi nhiều nhưng chủ yếu chồi ngắn và nhỏ.

Bảng 1. Thời gian và đặc điểm hình thành chồi ở các nhóm kích thước mẫu cắt khác nhau sau 60 ngày nuôi cấy.

Kích thước mẫu (cm)	Thời gian hình thành chồi sớm nhất (ngày)	Thời gian hình thành chồi trung bình (n=30, ngày)	Mô tả đặc điểm hình thành chồi
0,25	20	26,95±0,93 ^a	Chồi ngắn, màu nâu đặc trưng và số lượng thấp
0,5	15	21,70±0,32 ^b	Chồi ngắn, màu nâu đặc trưng và số lượng thấp
0,75	12	21,09±0,16 ^b	Chồi to, mập, kích thước dài nhất, màu nâu đặc trưng và số lượng thấp
1,0	16	21,29±0,18 ^b	Chồi nhỏ, ngắn, màu nâu đặc trưng và số lượng thấp
1,5	16	21,22±0,19 ^b	Chồi nhỏ, ngắn, có màu nâu đặc trưng và số lượng nhiều
2,0	17	21,22±0,20 ^b	Chồi nhỏ, ngắn, có màu nâu đặc trưng và số lượng nhiều nhất

Các giá trị trung bình có các chữ cái khác nhau thể hiện sai khác có ý nghĩa (p<0,05), trung bình ± độ lệch chuẩn (SD).

3.1.2. Ảnh hưởng tới tỷ lệ và số lượng chồi hình thành

Kết quả thí nghiệm cho thấy, các đoạn mẫu cắt có kích thước khác nhau cho tỷ lệ hình thành chồi, số lượng chồi và chiều dài chồi trung bình khác nhau rõ rệt (bảng 2). Về tỷ lệ mẫu hình thành chồi, mẫu cắt kích thước 0,75-1,00 cm cho tỷ lệ hình thành chồi tốt nhất đạt 83,33±3,34 và 82,22±5,09%. Với các mẫu cắt kích thước 0,50 và 1,50 cm, tỷ lệ mẫu hình thành chồi đạt thấp hơn, lần lượt là 76,67±6,67 và 74,44±5,09%. Khi mẫu cắt có kích thước quá lớn hay quá nhỏ, tỷ lệ hình thành chồi càng thấp, chỉ đạt 68,89±6,94% ở nghiệm thức 2,00 cm, thấp nhất là 13,33±3,34% ở nghiệm thức 0,25 cm.

Bảng 2. Tỷ lệ mẫu hình thành chồi và số lượng chồi trung bình ở các kích thước mẫu khác nhau sau 60 ngày nuôi cấy.

Kích thước mẫu (cm)	Tỷ lệ mẫu hình thành chồi (%)	Số lượng chồi trung bình (chồi)	Chiều dài chồi trung bình (mm)
0,25	13,33±3,34 ^d	3,08±0,14 ^c	1,16±0,56 ^c
0,5	76,67±6,67 ^b	3,35±0,31 ^c	2,21±0,23 ^b
0,75	83,33±3,34 ^a	3,77±0,18 ^c	6,37±0,55 ^a
1,0	82,22±5,09 ^a	3,37±0,09 ^c	1,98±0,42 ^b
1,5	74,44±5,09 ^b	8,05±0,32 ^b	1,45±0,27 ^c
2,0	68,89±6,94 ^c	11,54±0,25 ^a	1,21±0,12 ^c

Các giá trị trung bình có ký tự viết lên khác nhau trên cùng một cột thể hiện sai khác có ý nghĩa (p<0,05), trung bình ± độ lệch chuẩn (SD).

Khác biệt với tỷ lệ hình thành chồi, số lượng chồi trung bình ở các nhóm mẫu cắt có xu hướng đạt tỷ lệ cao nhất ở nhóm mẫu có kích thước lớn nhất 2 cm (11,54±0,25 chồi/mẫu) và 1,5 cm (8,05±0,32 chồi/mẫu). Các nhóm mẫu có kích thước bé hơn 1,0 cm cho số lượng chồi thấp và khác biệt không có ý nghĩa thống kê giữa các nhóm kết quả, dao động quanh ngưỡng trung bình 3-4 chồi/mẫu. Nhóm mẫu có kích thước

lớn từ 1,5 và 2 cm cho số lượng chồi nhiều, chiều dài chồi nhỏ, trung bình dao động 1,21-1,45 mm. Chiều dài chồi tốt nhất đạt kích thước trung bình 6,37 mm ở mẫu cắt 0,75 cm, cao gấp 3-4 lần so với chiều dài chồi của các nhóm còn lại.

3.1.3. Ảnh hưởng đến tốc độ sinh trưởng

Kết quả nghiên cứu cho thấy, kích thước mẫu cắt khác nhau cho tốc độ sinh trưởng khác nhau rõ rệt với mức ý nghĩa thống kê (p<0,05). Với mẫu có kích thước nhỏ nhất 0,25 cm có tốc độ sinh trưởng thấp nhất và mẫu bị chết nhiều trong quá trình nuôi cấy. Nhóm mẫu có kích thước lớn 1,5-2,0 cm cho tốc độ tăng trưởng chậm, tương ứng 0,72±0,08%/ngày và 0,70±0,04%/ngày. Nhóm mẫu có kích thước 0,5 cm không có nhiều khác biệt về tốc độ sinh trưởng (0,71±0,17%/ngày) so với nhóm mẫu có kích thước lớn 1,5 cm. Mẫu có tốc độ sinh trưởng tốt nhất thuộc về nhóm có kích thước từ 0,75 và 1,0 cm. Tốc độ sinh trưởng hai mẫu này không khác biệt về mặt thống kê. Tuy nhiên, mẫu cắt có kích thước 0,75 cm cho tốc độ tăng trưởng trung bình cao nhất đạt 1,13±0,02%/ngày.

Như vậy, kết quả nghiên cứu các chỉ tiêu phát sinh hình thái của mẫu rong sụn được nhân giống vô tính bằng phương pháp tái sinh chồi trực tiếp cho thấy, kích thước mẫu có ảnh hưởng rõ rệt đến quá trình hình thành chồi. Nhóm mẫu có kích thước 0,75 cm cho hiệu quả cao nhất với thời gian hình thành chồi nhanh nhất, chỉ sau 12 ngày nuôi cấy. Tỷ lệ hình thành chồi đạt 83,33±3,34%, lượng chồi trung bình đạt 3,77±0,18 chồi/mẫu, chiều dài chồi trung bình 6,37±0,55 mm và tốc độ sinh trưởng cũng đạt ngưỡng cao nhất với 1,13±0,02%/ngày ở mẫu cắt này.

3.2. Kết quả thử nghiệm nuôi thích nghi cây con trong bể ương

Toàn bộ rong sụn thí nghiệm sau quá trình hình thành chồi, được chuyển qua giai đoạn nuôi thích nghi trong bể ương. Sau 30 ngày ương nuôi trong bể, toàn bộ mẫu rong sụn giống đều sống, đạt tỷ lệ 100%. Kết quả này cho thấy, rong sụn giống từ phương pháp nhân giống vô tính bằng phương pháp tái sinh trực tiếp cho sức sống và mức độ thích nghi cao (hình 3). Rong sụn giống có khả năng sinh trưởng, phát triển tốt, cây rong non có màu nâu sẫm, bóng đặc trưng. Tốc độ sinh trưởng đạt 1,79%/ngày. Số lượng chồi và chiều dài chồi tăng trung bình cao, lần lượt đạt 2,03 và 4,01 mm sau 30 ngày quan sát. Kết quả thử nghiệm nuôi cây con trong bể ương được trình bày trong bảng ở bảng 3 và hình 1.

Bảng 3. Sự phát triển của cây rong sụn non trong bể ương sau 30 ngày.

Chỉ tiêu theo dõi	Giá trị
Tỷ lệ mẫu sống (%)	100
Tốc độ sinh trưởng (%/ngày)	1,79±0,32
Số lượng chồi tăng trung bình	2,03±0,68
Chiều dài chồi tăng trung bình (mm)	4,01±0,91

Giá trị trình bày trong bảng là giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn SD.



Hình 1. Hình thái của cây con trong bể ươm sau thời gian 15 ngày (A) và 30 ngày trong bể ươm (B). Thước đo 2 cm.

4. Bàn luận

Trong nghiên cứu sản xuất giống rong biển, mọi nỗ lực đều hướng tới mục tiêu thiết lập quy trình cho sự phát triển và tăng trưởng. Các nghiên cứu cơ bản đều cố gắng tìm kiếm các điều kiện tối ưu và kinh tế nhất để thương mại hóa nguồn giống và mở rộng quy mô công nghiệp. Phương pháp nhân giống vô tính bằng tái sinh chồi trực tiếp được áp dụng trên cây rong sụn *K. alvarezii* tại Việt Nam nhằm xác định nhóm kích thước phù hợp, tiết kiệm chi phí trong sản xuất hàng loạt cây giống rong sụn. Kết quả ghi nhận về thời gian, đặc điểm hình thành chồi, tỷ lệ và số lượng hình thành chồi, tốc độ sinh trưởng của cây rong sụn non được theo dõi nhằm đánh giá hiệu quả quá trình này.

Kết quả nghiên cứu về chiều dài mẫu cấy cho thấy, nhân vô tính bằng tái sinh chồi trực tiếp là một phương pháp hiệu quả. Kích thước mẫu ban đầu có ảnh hưởng rõ rệt đến đặc điểm quá trình hình thành chồi ở rong sụn. Mẫu rong sụn với kích thước 0,75 cm cho tỷ lệ và chiều dài trung bình chồi tốt nhất trong số các nhóm kích thước mẫu cấy. Ở mẫu cấy này, thời gian bắt đầu xuất hiện chồi khá sớm, so với các nhóm kích thước còn lại. Mẫu rong này cũng cho tốc độ tăng trưởng và chiều dài chồi trung bình tốt nhất, tương ứng $1,13 \pm 0,02\%$ /ngày, $6,37 \pm 0,55$ mm. Ngược lại, nhóm mẫu có kích thước nhỏ 0,25 cm có tỷ lệ sống thấp ($13,33 \pm 3,34\%$) và hoàn toàn không phù hợp để sản xuất hàng loạt mẫu giống rong vô tính. Nhóm mẫu có kích thước lớn (1-2 cm) cho số lượng chồi tốt nhưng tỷ lệ hình thành chồi và tốc độ sinh trưởng không cao. Trong quá trình thích nghi, rong giống tạo ra từ phương thức tái sinh chồi trực tiếp có mức độ thích nghi cao và cho tốc độ sinh trưởng tốt, đạt $1,79 \pm 0,32\%$ /ngày ở bể ươm.

Nghiên cứu tái sinh chồi trực tiếp ở rong biển từng được nghiên cứu bởi các nhóm tác giả khác nhau. Thời gian bắt đầu hình thành chồi phụ thuộc nhiều vào nhiều yếu tố như: môi trường dinh dưỡng, chủng rong gốc được sử dụng làm nguyên liệu nhân giống và mật độ mẫu cấy... Theo D.A.T. Yunque và cs (2011) [17], mật độ mẫu cấy không ảnh hưởng đến tốc độ hình thành chồi nhưng có ảnh hưởng đến số lượng trung bình chồi được tạo ra từ mẫu cấy. Theo các tác giả này, chủng rong nâu (*K. alvarezii* adik-adik) được ươm trong môi trường AMPES (Acadian marine plant extract powder) + PGR (Plant growth regulators) có thời gian hình thành chồi sớm nhất sau 17 ngày, các chủng còn lại đều có thời gian

đâm chồi từ sau 21 ngày nuôi cấy [17]. So với AMPES, sử dụng môi trường PES + PGR trong giai đoạn nhân nhanh của nghiên cứu này có thời gian đâm chồi sớm hơn (12 ngày) và thời gian hình thành chồi trung bình ở các nhóm kích thước mẫu (16-17 ngày) cũng nhanh hơn nhiều. Sự ưu thế của PES so với các môi trường dinh dưỡng khác cũng được khẳng định trong nghiên cứu tối ưu hóa môi trường dinh dưỡng trong tái sinh trực tiếp giống rong biển rong sụn [11].

Nghiên cứu mô tả quá trình tái sinh trực tiếp từ mô phân sinh trong môi trường lỏng với rong mẫu có kích thước 2-3 cm [11] hoặc kích thước 0,5 cm [13] cho tốc độ tăng trưởng khá tốt. Một số nghiên cứu khác sử dụng kích thước mẫu cấy 0,5 cm [8] nhưng trên môi trường thạch rắn và phải mất nhiều thời gian hơn để tạo ra trụ mầm trong môi trường này cho tới khi đạt đến giai đoạn nuôi cấy vườn ươm trên biển. Trong nghiên cứu của M.R.J. Luhan và cs (2017) [13], rong biển *K. alvarezii* var. *tambalang* được chọn lọc tại vùng Libertad, Antique, Philippines có tỷ lệ sống và phát sinh chồi đạt 100%. Rong mẫu có kích thước 0,5 cm đạt tốc độ sinh trưởng cao nhất đến $1,6 \pm 0,06\%$ /ngày, là nhóm kích thước phù hợp để sản xuất hàng loạt các dòng vô tính. Theo nghiên cứu này, tốc độ sinh trưởng giữa nhóm mẫu có kích thước 0,3 và 0,5 cm không có sự khác biệt mang ý nghĩa về mặt thống kê. Tuy nhiên, nhóm kích thước 1,0 cm cho tốc độ tăng trưởng thấp hơn rõ rệt so với nhóm kích thước 0,5 cm [13]. Cũng bằng phương thức nhân giống vô tính bằng tái sinh chồi trực tiếp, nghiên cứu của W. Yong và cs (2014) [11] cho thấy tốc độ sinh trưởng lớn hơn rất nhiều lần. Theo đó, rong sụn *K. alvarezii* từ Semporna, Sabah, Malaysia được tiến hành nhân giống và tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy trong môi trường PES cho kết quả tối ưu nhất khi cho tốc độ tăng trưởng ($4,9 \pm 0,8\%$ /ngày) cao gấp 5 lần so với môi trường VS và F/2 (tương ứng $1,0 \pm 0,7$ và $0,9 \pm 0,3\%$ /ngày) [11]. Một số nghiên cứu khác cũng cho thấy khả năng phát sinh chồi khi nuôi trên các môi trường thạch rắn khác nhau [6, 8]. Tuy nhiên, mức độ phát triển của chồi trên thạch rắn mất nhiều thời gian hơn so với môi trường dịch lỏng, tính tới khi có thể sử dụng cây non cho công đoạn ươm trên biển.

Quá trình tái sinh chồi trực tiếp của rong sụn thông qua nhân giống vô tính thường phụ thuộc nhiều vào chủng giống, môi trường dinh dưỡng, tỷ lệ chất kích thích sinh trưởng và các điều kiện hóa lý [9, 20]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành xác định sự ảnh hưởng của các kích thước mẫu cấy đến khả năng tái sinh trực tiếp rong sụn *K. alvarezii* (Việt Nam) trong điều kiện phòng thí nghiệm. Kết quả nghiên cứu cho thấy tính khả quan của phương pháp nhân giống này thông qua các hệ số phát sinh chồi, tỷ lệ mẫu hình thành chồi và đặc biệt là tốc độ tăng trưởng. Đặc biệt, mẫu có kích thước 0,75 cm cho tốc độ tăng trưởng đạt $1,13 \pm 0,02\%$ /ngày, tỷ lệ mẫu sống khoảng $83,33 \pm 3,34\%$, tốt hơn nhiều so với các nhóm mẫu còn lại.

Nhìn chung, việc thử nghiệm nhân giống vô tính bằng phương pháp tái sinh chồi trực tiếp được chứng minh thành công đối với rong sụn *K. alvarezii* ở Việt Nam. Môi trường dinh dưỡng (PES) và chất điều hòa sinh trưởng thực vật (IAA:BA với tỷ lệ 5:1) được sử dụng trong nghiên cứu có thể áp dụng như các cơ chất tiêu chuẩn dùng trong nghiên cứu nuôi cấy mô và vi nhân giống rong biển. Kết quả nghiên cứu này có thể được sử dụng trong sản xuất và nhân giống rong biển theo hướng thương mại.

5. Kết luận

Rong sụn *K. alvarezii* đối tượng nuôi trồng thủy sản có giá trị kinh tế. Việc nhân giống và nuôi trồng loài rong sụn này đang nhận được nhiều sự quan tâm và nghiên cứu, đặc biệt là ứng dụng các phương pháp nhân giống kỹ thuật cao. Kết quả nghiên cứu cho thấy, kích thước mẫu có ảnh hưởng đáng kể đến khả năng tái sinh chồi trực tiếp của rong sụn trong môi trường phòng thí nghiệm. Dựa trên các tiêu chí đánh giá, mẫu có kích thước 0,75 cm cho hiệu quả tái sinh cao nhất. Sau 12 ngày nuôi cấy, mẫu này đạt tỷ lệ hình thành chồi 83,33±3,34%, lượng chồi trung bình đạt 3,77±0,18 chồi/mẫu, chiều dài chồi trung bình 6,37±0,55 mm và tốc độ sinh trưởng cao nhất 1,13±0,02%/ngày. Vì vậy, chúng tôi khuyến nghị lựa chọn mẫu có kích thước 0,75 cm cho phương pháp nhân giống bằng tái sinh chồi trực tiếp trên rong sụn *K. alvarezii*. Cây rong giống được tạo ra từ phương pháp này có tỷ lệ sống 100% và khả năng phát triển tốt trong bể ương thích nghi. Kết quả của nghiên cứu này cũng có thể là cơ sở khoa học áp dụng cho các loài rong tương tự và đóng góp vào việc nâng cao hiệu quả sản xuất, bảo đảm nguồn cung ổn định rong giống chất lượng cho nuôi trồng thủy sản.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] L. Hayashi, R.P. Reis, A.A.D. Santos, et al. (2017), "The cultivation of *Kappaphycus* and *Eucheuma* in tropical and sub-tropical waters", *Tropical Seaweed Farming Trends, Problems and Opportunities*, Springer, pp.55-90.
- [2] R.V. Azanza, T.T. Aliaza (1999), "In vitro carpospore release and germination in *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty from Tawi-Tawi, Philippines", *Botanica Marina*, **42**, pp.281-284, DOI: 10.1515/BOT.1999.031.
- [3] R. Azanza, E. Ask, A. Chapman, et al. (2003), "*Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty carposporeling growth and development in the laboratory", *Proceedings of The XVII International Seaweed Symposium*, Oxford University Press, pp.95-99.
- [4] M.R.J. Luhan, H. Sollesta (2010), "Growing the reproductive cells (carpospores) of the seaweed, *Kappaphycus striatum*, in the laboratory until out-planting in the field and maturation to tetrasporophyte", *Journal of Applied Phycology*, **22**, pp.579-585, DOI: 10.1007/s10811-009-9497-7.
- [5] C.J. Dawes, E. Koch (1991), "Branch, micropropagule and tissue culture of the red algae *Eucheuma denticulatum* and *Kappaphycus alvarezii* farmed in the Philippines", *Journal of Applied Phycology*, **3**, pp.247-257.
- [6] C.J. Dawes, G.C. Trono, A.O. Lluisma (1993), "Clonal propagation of *Eucheuma denticulatum* and *Kappaphycus alvarezii* for Philippine seaweed farms", *Hydrobiologia*, **260**, pp.379-383.
- [7] A.Q. Hurtado, D.P. Cheney (2003), "Propagule production of *Eucheuma denticulatum* (Burman) Collins et Hervey by tissue culture", *Botanica Marina*, **46**(4), pp.338-341, DOI: 10.1515/BOT.2003.031.
- [8] C.R.K. Reddy, G.R.K. Kumar, A.K. Siddhanta, et al. (2003), "In vitro somatic embryogenesis and regeneration of somatic embryos from pigmented callus of *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty (Rhodophyta, Gigartinales)", *Journal of Phycology*, **39**(3), pp.610-616, DOI: 10.1046/j.1529-8817.2003.02092.x.
- [9] L. Hayashi, N.S. Yokoya, D.M. Kikuchi, et al. (2008), "Callus induction and micropropagation improved by colchicine and phytohormones in *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Solieriaceae)", *Journal of Applied Phycology*, **20**, pp.653-659, DOI: 10.1007/s10811-007-9234-z.
- [10] E. Sulistiani, D.T. Soelistyowati, Alimuddin (2012), "Callus induction and filaments regeneration from callus of cottonii seaweed *Kappaphycus alvarezii* (Doty) collected from Natuna Islands, Riau Islands Province", *Biotropia*, **19**(2), pp.103-114, DOI: 10.11598/btb.2012.19.2.254.
- [11] W. Yong, S. Ting, Y. Yong, et al. (2014), "Optimisation of culture conditions for the direct regeneration of *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Solieriaceae)", *Journal of Applied Phycology*, **26**, pp.1597-1606, DOI: 10.1007/s10811-013-0191-4.
- [12] F.A.S. Neves, C. Simioni, Z.L. Bouzon, et al. (2015), "Effects of spindle inhibitors and phytohormones on the micropropagation of *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales)", *Journal of Applied Phycology*, **27**, pp.437-445, DOI: 10.1007/s10811-014-0309-3.
- [13] M.R.J. Luhan, J.P. Mateo (2017), "Clonal production of *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty in vitro", *Journal of Applied Phycology*, **29**, pp.2339-2344, DOI: 10.1007/s10811-017-1105-7.
- [14] M.R.J. Luhan (1996), "Biomass and reproductive states of *Gracilaria heteroclada* Zhang et Xia collected from Jaro, Central Philippines", *Botanica Marina*, **93**(1-6), pp.207-211, DOI: 10.1515/botm.1996.39.1-6.207.
- [15] J. Muñoz, A.C.C. López, R. Patiño, et al. (2006), "Use of plant growth regulators in micropropagation of *Kappaphycus alvarezii* (Doty) in airlift bioreactors", *Journal of Applied Phycology*, **18**, pp.209-218, DOI: 10.1007/s10811-006-9105-z.
- [16] A.Q. Hurtado, D.A. Yunque, K. Tibubos, et al. (2009), "Use of Acadian marine plant extract powder from *Ascophyllum nodosum* in tissue culture of *Kappaphycus* varieties", *Journal of Applied Phycology*, **21**(6), pp.633-639, DOI: 10.1007/s10811-008-9395-4.
- [17] D.A.T. Yunque, K.R. Tibubos, A.Q. Hurtado, et al. (2011), "Optimisation of culture conditions for tissue culture production of young plantlets of carrageenophyte *Kappaphycus*", *Journal of Applied Phycology*, **23**, pp.433-438, DOI: 10.1007/s10811-010-9594-7.
- [18] V.T. Mo, T.V. Huynh, L.T. Nghia, et al. (2018) "Callus induction from branches of *Kappaphycus striatus* under different culture conditions", *Journal of Biotechnology*, **16**(2), pp.301-309 (in Vietnamese).
- [19] P.T. Mat, D.D. Thu, N.V. Nguyen (2019), "Research of tissue culture of cottonii seaweed *Kappaphycus alvarezii*", *Science and Technology Journal of Agriculture and Rural Development*, **12**, pp.124-131 (in Vietnamese).
- [20] P. Baweja, D. Sahoo, P.G. Jimenez, et al. (2009), "Seaweed tissue culture as applied to biotechnology: Problems, achievements and prospects", *Phycol. Res.*, **57**(1), pp.45-58, DOI: 10.1111/j.1440-1835.2008.00520.x.