

ẢNH HƯỞNG CỦA CHITOSAN LÊN SỰ SINH TRƯỞNG CỦA LAN MOKARA NUÔI CÂY MÔ

EFFECTS OF CHITOSAN ON IN VITRO CULTURE OF MOKARA ORCHID

Phạm Thị Minh Thu^{1*}, Nguyễn Ngọc Thiên Trang¹,
Huỳnh Kim Đình¹

Viện Công nghệ sinh học và Môi trường, Trường Đại học Nha Trang
Tác giả liên hệ: Phạm Thị Minh Thu (thuptm@ntu.edu.vn)

Ngày nhận bài: 25/11/2019; Ngày phân biện thông qua: 09/12/2020; Ngày duyệt đăng: 24/12/2020

TÓM TẮT

Mokara là loài lan đẹp, đa dạng về màu sắc, ưa khí hậu nóng, dai sức và dễ trồng. Vì vậy, có những thời điểm mokara được trồng và nhân giống rộng rãi, đặc biệt bằng phương pháp nuôi cấy mô. Tuy nhiên, gần đây cây cấy mô mokara ít được phát triển vì tốc độ phát triển chậm kể cả trong giai đoạn nhân giống in vitro và chăm sóc in vivo. Trong nghiên cứu này, chitosan được thêm vào môi trường nhân giống nhằm cải thiện tốc độ sinh trưởng của chồi lan, từ đó giảm bớt thời gian nuôi cấy mô. Chitosan tách chiết từ vỏ tôm và mai mực với 3 khoảng phân tử lượng ($M_w < 10$, 30-50 và 80-100 kDa, kí hiệu Mw10, Mw30 và Mw80) và 3 độ deacetyl (72-75, 82-85 và 92-95%, kí hiệu D70, D80 và D90) đã được khảo sát với tiêu chí kích thích chồi lan tăng trưởng về chiều cao. Kết quả cho thấy chitosan tôm, Mw30, D80 sử dụng ở nồng độ 20 ppm là phù hợp cho kích thích tạo chồi và kéo dài chồi. Như vậy, nghiên cứu đã minh họa cho tác dụng kích thích sinh trưởng lên thực vật in vitro nói chung của chitosan và mở ra một hướng ứng dụng cho đối tượng lan mokara nói riêng.

Từ khóa: chitosan, lan mokara, sinh trưởng, in vitro

ABSTRACT

Mokara orchid is a tropical species and easy to plant due to its vitality and endurance. The flowers are colorful and long-lasting. Thus, mokara has been intensively planted and propagated by both traditional and tissue culture methods. However, despite the rapid multiplication, the micropropagated mokara shoot and plantlets grow very slowly. In this report, chitosans extracted from shrimp shell and squid pen with 3 molecular weight ranges ($M_w < 10$, 30-50 and 80-100 kDa, coded as Mw10, Mw30 and Mw80; respectively) and 3 deacetylation degrees (72-75, 82-85 and 92-95%, coded as D70, D80 and D90; respectively) were added to the tissue culture medium to examine the ability to promote the tissue growth. As the result, chitosan originated from shrimp shell with Mw30 and D80 was more suitable for the purpose of enhancing shoot development. Applying this type of chitosan with the concentration of 20 ppm was the best for shoot multiplication and elongation. Thus, chitosan could be used as an elicitor for mokara in vitro growth.

Key words: chitosan, mokara orchid, growth, in vitro

I. GIỚI THIỆU

Mokara là chi lan hoàn toàn do con người tạo ra bằng cách lai giữa 3 chi *Arachnis* (lan bò cạp), *Ascocentrum* và *Vanda*, do đó có đặc tính nổi bật từ bố mẹ: hình dáng hoa và màu sắc đẹp từ giống cây *Vanda*, tăng trưởng nhanh từ giống *Ascocentrum* x *Vanda* (Lee, 1994). Mokara là loài đơn thân, dễ trồng,

sinh trưởng và phát triển tốt trong điều kiện khí hậu nóng ẩm như Khánh Hòa. Tại Khánh Hòa, nguồn cung cấp hoa lan trên địa bàn tỉnh còn thấp, chưa có sự đầu tư về mặt số lượng và nguồn giống. Vài năm gần đây, Trung tâm Nông nghiệp Công nghệ cao Khánh Hòa đã trồng thử nghiệm hơn 40.000 cây lan Mokara và cho kết quả tốt. Tuy nhiên số lượng giống

cung cấp bởi Trung tâm vẫn chưa ổn định và chưa đáp ứng được nhu cầu của thị trường. Đặc biệt cơn bão Damrey cuối năm 2017 đã phá huỷ nghiêm trọng hệ thống phòng nuôi cấy mô tại trung tâm khiến cho quá trình sản xuất bị gián đoạn.

Lan Mokara có thể nhân giống vô tính bằng phương pháp cắt hom truyền thống nhưng hạn chế về số lượng cây con thu được. Ngoài ra, còn có phương pháp nhân giống bằng hạt nhưng khó kiểm soát chất lượng cây con. Vì vậy, mokara đã được nghiên cứu nhân giống bằng nuôi cấy mô và xây dựng qui trình hoàn thiện (Đặng Xuân Viên, 2011; Tạ Hữu Minh, 2012; Trần Thị Thanh Chi, 2016; Nga và cs., 2017). Tuy nhiên, nhược điểm của phương pháp này là tốc độ phát triển của cây rất chậm. Ngoài ra, chỉ qua sau vài lần cấy chuyển thì chồi mokara đã gặp phải tình trạng thoái hoá giống, biểu hiện ở tốc độ sinh trưởng chậm hơn so với các lần trước, lá dễ bị hoá đen toàn bộ hoặc có các chấm đen trên bề mặt lá (quan sát của nhóm tác giả). Chính vì vậy, mặc dù có hoa đẹp và lâu tàn, mokara hiện nay ít được nhân giống bằng nuôi cấy mô. Hầu như chỉ còn các cơ sở nghiên cứu là còn các mẫu này, tại các cơ sở dịch vụ đều không nuôi cấy mokara.

Chitosan lần đầu tiên được thu nhận từ chitin bởi C. Rouget vào năm 1859 sau khi đun nóng chitin trong dung dịch kiềm đậm đặc. Tuy nhiên, mãi tới năm 1894 thì bản chất deacetyl hoá chitin của chitosan mới được xác nhận bởi F. Hoppe-Seiler và từ đó cái tên chitosan chính thức ra đời (Teng, 2012). Chitosan đã được báo cáo có khả năng kháng virus, vi khuẩn, nấm, và một số loài côn trùng cả ở các nghiên cứu *in vitro* và *in vivo* (Chirkov và cs., 2001; Zhang và cs., 2003; Goy và cs., 2009; Jia và cs., 2015; Long và cs., 2017; Cuong và cs., 2017; Mohammedi, 2017; Trang Sĩ Trung và cs., 2018). Ngoài ra, chitosan còn có hoạt tính chống oxi hoá, kháng viêm, kháng ung thư (Kim, 2018) do đó có tiềm năng rất lớn trong y dược. Đặc biệt, chitosan còn được biết đến có khả năng kích thích phản ứng bảo vệ của thực vật khi bị xâm nhập bởi mầm bệnh.

Một mảng ứng dụng rộng rãi của chitosan là bảo vệ và kích thích sinh trưởng thực vật.

Hiệu quả của chitosan phụ thuộc rất nhiều bản chất chitosan cũng như hệ thống sinh học của cây, mầm bệnh hay cách sử dụng (ví dụ như phun vào đất hay lên lá, dùng một mình chitosan hay có kết hợp các biện pháp khác...) (Hadrami và cs., 2010). Do đó, để xác định chính xác tác dụng của chitosan lên thực vật, hệ thống *in vitro* thường được sử dụng vì các nhân tố được kiểm soát cố định và chỉ thay đổi thông số cần khảo sát. Chitosan đã được bổ sung trên môi trường nuôi cấy *in vitro* các cây như nho (Barka và cs., 2004), khoai tây (Kowalski và cs., 2006; Asghari-Zakaria và cs., 2009), rễ sâm Ngọc Linh (Nguyễn Thị Nhật Linh và cs., 2016). Đặc biệt, đối với các loài sinh trưởng chậm như lan thì mẫu nuôi cấy mô rất thích hợp cho khảo sát khả năng kích thích sinh trưởng của chitosan.

Thông thường, chitosan được sử dụng trong môi trường nuôi cấy mô hoa lan ở nồng độ thấp (5-25 mg/l) có tác dụng kích thích tăng trưởng PLB (protocorm-like body), tái sinh cây con trên môi trường cũng như hình thành rễ (Limpanavech và cs., 2008; Nge và cs., 2006; Pornpienpakdee và cs., 2010; Sopalun và cs., 2010; Lê Hồng Giang và Nguyễn Bảo Toàn, 2012; Vương Thị Hồng Loan và cs., 2016). Ngoài nồng độ, hoạt tính của chitosan lên thực vật phụ thuộc rất nhiều vào các thông số kỹ thuật khác như nguồn gốc, khối lượng phân tử, độ deacetyl (Nge và cs., 2006; Pornpienpakdee và cs., 2010). Đây cũng là nhận xét được rút ra về hoạt tính nói chung của chitosan (Trang Sĩ Trung và cs., 2018).

Như vậy, chitosan được biết tới như một polymer có hoạt tính sinh học phong phú, ứng dụng trong nhiều lĩnh vực trong đó có kích thích sự phát triển của mẫu thực vật nuôi cấy *in vitro*. Tuy nhiên hiệu quả của chitosan phụ thuộc rất nhiều vào vào các thông số vật lý của phân tử như cấu trúc/ nguồn gốc tách chiết, khối lượng phân tử, độ deacetyl hoá... Do đó, trong nghiên cứu này, chitosan tách chiết từ các nguồn gốc khác nhau, khối lượng phân tử khác nhau và độ deactyl khác nhau đã được thêm vào môi trường để khảo sát khả năng kích thích sinh trưởng của lan mokara nuôi cấy mô.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng nghiên cứu

Giống lan được sử dụng trong nghiên cứu này là *Mokara bangkhuntien* (mokara vàng nền) nuôi cấy trong Phòng thí nghiệm Nuôi cấy tế bào, Trường Đại học Nha Trang, chọn lựa các chồi khỏe, cao từ 1,5-2,0 cm, có từ 2-3 lá, số rễ nhỏ hơn 1 (khi cấy sang môi trường mới thì loại bỏ hoàn toàn các rễ cũ); các chitosan tách chiết từ mực và tôm với các thông số tùy theo thí nghiệm được cung cấp bởi Trung tâm Thí nghiệm thực hành, Trường Đại học Nha Trang.

2. Điều kiện phòng nuôi cấy cây mô

Các mẫu thực vật được nuôi trong điều kiện phòng nuôi cấy như sau: nhiệt độ $25 \pm 2^\circ\text{C}$ (được kiểm soát bởi máy điều hòa nhiệt độ), cường độ chiếu sáng 2000 lux (ánh sáng được cung cấp bởi đèn led ống), quang kì 16 giờ sáng/8 giờ tối.

3. Nội dung nghiên cứu

3.1. Thí nghiệm 1: Ảnh hưởng của trọng lượng phân tử và nguồn gốc tách chiết

Trong thí nghiệm này, môi trường cơ bản là khoáng $1/2\text{MS} + 10\%$ nước dừa + 1 g/l than hoạt tính (ĐC1), đây là môi trường được rút ra từ khảo sát trong quá trình vi nhân giống của nhóm tác giả. ĐC1 được bổ sung 20 ppm acid acetic (ĐC2) hoặc 20 ppm chitosan tách chiết từ mực (M) và tôm (T), độ deacetyl 82-85%, trọng lượng phân tử trong 3 khoảng Mw <10, 30-50 và 80-100 kDa (M10, M30, M80 và T10, T30, T80). Mỗi nghiệm thức được cấy 24 chồi vào 6 bình (mỗi bình 4 mẫu); quan sát sinh trưởng (sự tăng chiều cao chồi, số rễ mới) sau 1 và 2 tháng.

3.2. Thí nghiệm 2: Ảnh hưởng của độ deacetyl

5 nghiệm thức được thiết kế bao gồm: môi trường ĐC1 và ĐC2 giống như Thí nghiệm 1, các nghiệm thức còn lại bổ sung lần lượt 20 ppm chitosan (kể thừa thông số trọng lượng phân tử và nguồn gốc tách chiết từ Thí nghiệm 1) có DD 72-75, 82-85 và 92-95% (D70, D80 và D90). Mỗi nghiệm thức được cấy 24 chồi vào 8 bình (mỗi bình 3 mẫu). Sự phát triển của mẫu (sự tăng chiều cao, sự xuất hiện chồi mới,

rễ mới) được ghi nhận sau những khoảng thời gian cố định.

3.3. Thí nghiệm 3: Ảnh hưởng của nồng độ chitosan

Môi trường sử dụng là môi trường phát sinh chồi (theo quan sát của nhóm tác giả): $1/2\text{MS} + 10\%$ nước dừa + 1 g/l than hoạt tính + 1,5 mg/l BAP + 0,5 mg/l NAA (ĐC1) bổ sung các nồng độ khác nhau (5, 20, 80, 320 ppm; tương ứng C5, C20, C80, C320) của chitosan (kể thừa thông số trọng lượng phân tử và nguồn gốc tách chiết từ Thí nghiệm 1, độ deacetyl từ Thí nghiệm 2) hoặc acid acetic 320 ppm (ĐC2). Mỗi nghiệm thức được cấy 24 chồi vào 8 bình (mỗi bình 3 mẫu). Sự phát triển của mẫu (thời điểm xuất hiện chồi mới và rễ mới, số rễ mới, lá mới, chiều cao chồi) được ghi nhận sau những khoảng thời gian cố định.

4. Thu thập kết quả và xử lý số liệu

Các thông số sinh trưởng được thu thập sau các khoảng thời gian cố định (1 tháng, 2 tháng) và tính theo công thức sau:

Số rễ mới: số rễ sau khoảng thời gian nuôi cấy (do mẫu khi cấy vào môi trường sẽ được cắt hết rễ)

Số chồi mới: số chồi sau – số chồi trước + số chồi chết (nếu có)

Số lá mới: số lá sau – số lá trước + số lá úa/ chết (nếu có)

Sự tăng chiều cao chồi: chiều cao sau – chiều cao đầu, trong đó chiều cao chồi được tính từ điểm tiếp giáp của thân với mặt thạch cho đến điểm cuối cùng của lá dài nhất.

Tất cả các số liệu sau khi thu thập ứng với từng chỉ tiêu theo dõi được thống kê và biểu diễn dưới dạng: Trung bình mẫu \pm sai số chuẩn (TB \pm SE); các nghiệm thức được so sánh bằng phép toán Duncan ($p < 0,05$) thực hiện với phần mềm xử lý số liệu SPSS 20.0.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Ảnh hưởng của chitosan có trọng lượng phân tử và nguồn gốc tách chiết khác nhau lên sự phát triển mẫu lan in vitro

Sự bổ sung chitosan vào môi trường trong thời gian 1 tháng chưa thể hiện được ảnh hưởng rõ rệt về chiều cao chồi nhưng lại có xu hướng ức chế sự hình thành rễ. Tuy nhiên, sau

2 tháng thì đã có nghiệm thức bổ sung chitosan (T30) cho sự tăng chồi tốt hơn và sự ức chế hình thành rễ được xoá bỏ (Bảng 1). Nếu chỉ xét 2 nhóm nghiệm thức bổ sung chitosan là nhóm I (chitosan mai mực) và II (chitosan vỏ tôm) có thể thấy ở cả thời điểm 1 tháng và 2 tháng, nghiệm thức cho sự tăng chồi tốt nhất đều thuộc nhóm II. Như vậy, nhìn chung sự bổ sung chitosan từ vỏ tôm kích thích tăng chiều cao chồi tốt hơn chitosan từ mai mực. Cụ thể tại thời điểm 2 tháng sau khi cấy, chitosan có nguồn gốc từ tôm khối lượng phân tử 30-50 kDa thể hiện sự kéo dài chồi tốt hơn các chitosan khác và tốt hơn 2 đối chứng (Bảng 1).

Sự khác nhau về hoạt tính sinh học của chitosan có cùng khối lượng phân tử và độ deacetyl nhưng khác cấu trúc (α , β hay γ) đã được báo cáo ở các nghiên cứu trước đây trên cả đối tượng thực vật (Nge và cs., 2006) và vi sinh vật (Jung và Zhao, 2013). Chitosan có nguồn gốc từ tôm cua có cấu trúc α , từ mai mực có cấu trúc β . Cấu trúc α , do được cấu

tạo bởi các lớp ngược chiều nhau nên rắn chắc hơn các dạng còn lại. Ngược lại dạng β thì mềm dẻo, dễ hoà tan hơn trong nước và dung môi (Berezina, 2016). Tuy nhiên, chính tính chất này khiến cho dạng β dễ bị ảnh hưởng bởi các hoá chất khác trong môi trường. Môi trường nuôi cấy mô gồm rất nhiều thành phần dinh dưỡng (khoáng, vitamin, đường, nước dừa, than hoạt tính) nên chitosan có thể đã liên kết với các thành phần này, đặc biệt là thành phần than hoạt tính có tác dụng hấp phụ các chất trong môi trường. Do đó, khi thêm chitosan vào môi trường thì chitosan có thể bị hấp thu một phần vào bề mặt than hoạt tính, chính tính chất này đã được sử dụng để tạo ra phức hợp hấp phụ chitosan-than hoạt tính (Soni và cs., 2015) và dạng β có thể bị hấp phụ nhiều hơn α do đó làm giảm hoạt tính hơn dạng α . Đây có thể là nguyên nhân khiến cho NT bổ sung chitosan tách chiết từ mai mực (dạng β) không kích thích chồi tăng chiều cao như NT bổ sung chitosan từ vỏ tôm (dạng α).

Bảng 1. Ảnh hưởng của chitosan có nguồn gốc và khối lượng phân tử khác nhau lên chồi mokara

Nhóm	Nghiệm thức	Sự tăng chiều cao (mm)		Số rễ mới	
		1 tháng	2 tháng	1 tháng	2 tháng
Đối chứng	ĐC1	9,06 ^{ab} 0,64	15,69 ^b 0,60	1,31^b 0,15	1,75 ^{ab} 0,21
	ĐC2	8,04 ^a 0,46	16,42 ^b 0,44	1,29^b 0,20	1,63 ^{ab} 0,16
Mai mực (I)	M10	8,05 ^a 0,53	14,40 ^{ab} 0,62	1,05 ^{ab} 0,18	1,90 ^b 0,25
	M30	7,40 ^a 0,58	13,19 ^a 0,93	0,75 ^a 0,14	1,88 ^b 0,29
	M80	8,17 ^a 0,58	14,75 ^{ab} 0,83	1,17 ^{ab} 0,10	1,88 ^b 0,16
Vỏ tôm (II)	T10	7,80 ^a 0,61	14,90 ^{ab} 0,70	0,85 ^{ab} 0,18	1,70 ^{ab} 0,16
	T30	8,50 ^{ab} 0,90	18,00^c 0,75	0,92 ^{ab} 0,15	1,17 ^a 0,11
	T80	10,6^b 0,63	12,90 ^a 0,60	0,7 ^a 0,11	1,30 ^{ab} 0,13

Giá trị = TB SE, các chữ cái khác nhau trong cùng 1 cột biểu thị sự khác nhau về mặt thống kê ($\alpha = 0,05$; phép thử Duncan).

Ngoài ảnh hưởng của nguồn gốc/ cấu trúc, các nghiên cứu sử dụng chitosan có các dải Mặt khác nhau trên thực vật cũng đã được báo cáo nhưng kết quả đạt được rất đa dạng. Có nghiên cứu chỉ ra rằng chitosan khối lượng phân tử nhỏ thì tốt hơn (Nge và cs., 2006; Pornpienpakdee và cs., 2010) nhưng cũng có báo cáo chỉ ra ưu thế của chitosan khối lượng phân tử trung bình và cao (Salachna và Zawadzińska, 2014). Điều này có thể giải thích do khác biệt trong kiểu gen, giai đoạn phát triển của thực vật, trạng thái mẫu. Ngoài ra, chitosan là một polymer sinh học rất nhạy cảm với các yếu tố vật lí, hoá chất tách chiết và rất khó để kiểm soát các thông số, tính chất của nó (Szymańska và Winnicka, 2015). Báo cáo này cũng chưa tìm được xu hướng/qui

luật chung trong việc tăng/giảm khối lượng phân tử của chitosan ảnh hưởng như thế nào lên mẫu cấy.

3.2. Ảnh hưởng của chitosan có độ deacetyl khác nhau lên sự phát triển mẫu lan in vitro

Chitosan đã được chứng minh là một phân tử tự nhiên gây ra nhiều phản ứng sinh học ở thực vật, phụ thuộc vào cấu trúc và nồng độ, loài và giai đoạn phát triển của cây. Ngoài ra, tính chất của chitosan phụ thuộc rất lớn vào độ deacetyl hóa (Trang Sĩ Trung và cs., 2018). Kết quả trong Bảng 2 cho thấy bổ sung chitosan có các độ deacetyl khác nhau (từ 70% trở lên) vào môi trường nuôi cấy không làm tăng chiều cao chồi. Tuy nhiên, ở các NT bổ sung chitosan D80 và D90 đều có sự xuất hiện chồi mới đạt tỉ lệ 67% tại thời điểm 2 tháng sau khi nuôi cấy (Bảng 2).

Bảng 2. Ảnh hưởng của chitosan có độ deacetyl khác nhau lên sự sinh trưởng của chồi lan

NT	Sự tăng chiều cao chồi (mm)	Số rễ mới	Số chồi mới phát sinh (%)
ĐC1	12,00 ^{ab} ± 2,45	1,80 ^a ± 0,20	0
ĐC2	10,67 ^{ab} ± 3,00	2,00 ^a ± 0,52	0
D70	8,00 ^a ± 1,15	2,17 ^a ± 0,31	0
D80	14,33^b ± 0,61	1,50 ^a ± 0,22	66,67
D90	10,40 ^{ab} ± 1,17	2,20 ^a ± 0,37	66,67

Giá trị = TB SE, các chữ cái khác nhau trong cùng 1 cột biểu thị sự khác nhau về mặt thống kê ($\alpha = 0,05$; phép thử Duncan). Số liệu được lấy sau 2 tháng nuôi cấy.



Hình 1. Ảnh hưởng của chitosan có độ deacetyl khác nhau lên hình thái chồi lan mokara
 Từ trái sang phải lần lượt là các nghiệm thức tương ứng ĐC1, ĐC2, D70, D80 và D90.
 Số liệu được lấy sau 2 tháng nuôi cấy.

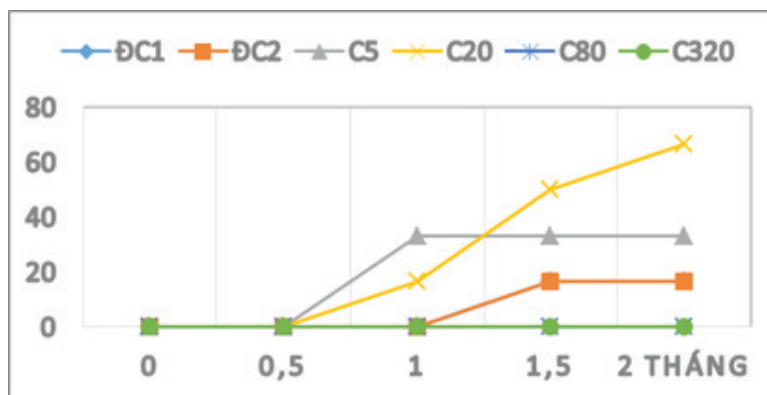
Trong một nghiên cứu sử dụng cả oligomer (30-110 kDa) và polymer (400-530 kDa) chitosan tách từ vỏ gẹ có độ deacetyl 75-80, 80-90 và trên 90% (tương ứng O-70, O-80, O-90 và P-70, P-80, P-90) thì cả O-80 và P-80 đều cho tác dụng tốt nhất lên sự phát triển chồi cũng như hình thành cây con. Ngược lại, với mục đích nhân PLB thì lại cần sử dụng P70 hoặc P90 (Pornpienpakdee và cs., 2010). Cũng loại chitosan O-80 trước đó đã được báo cáo kích thích ra hoa nhiều và sớm ở lan *Dendrobium Eiskul* (Limpanavech, 2008) trong dải nồng độ từ 1-100ppm. Trong khi nếu sử dụng chitosan có độ deacetyl 70, 90% thì còn phụ thuộc nồng độ và dạng chitosan (O hay P). Như vậy, chitosan khối lượng phân tử trung bình và độ deacetyl 80% thích hợp cho thực vật ở trạng thái chồi và cây. Trong nghiên cứu này, cả D80 và D90 đều thể hiện sự phát sinh chồi mới tốt nhưng chỉ có D80 là cho tăng chiều cao nhỉnh hơn, vì vậy mẫu này đã được lựa chọn để khảo sát trong các thí nghiệm tiếp theo.

3.3. Ảnh hưởng của chitosan lên khả năng tăng chiều cao và phát sinh chồi của mẫu *in vitro*

Chitosan được thêm vào môi trường cấy chuyên chồi nhằm khảo sát khả năng kích thích tăng chiều cao và hình thành chồi mới trong quá trình cấy chuyên các chồi nhỏ. Sau 2 tháng theo dõi cho thấy ưu thế của NT bổ sung 5 và 20 ppm khi chồi mới hình thành sớm và nhiều (Hình 2). Mặt khác, nếu xét về hình thái của chồi thì nồng độ 5 ppm có chiều cao chồi nhỉnh hơn một chút so với 2 ĐC, số lá mới thì tương đương (Bảng 3, Hình 3). Còn 20 ppm thể hiện

rõ ưu thế trong việc kích thích chồi tăng chiều cao nhanh nhất và chồi có nhiều lá mới nhất (chỉ tính riêng chồi chính). Các nghiệm thức 80 và 320ppm không phát sinh chồi mới nhưng chồi cũ cũng không được cải thiện về chỉ số chiều cao hay số lá mới (Bảng 3). Về chỉ tiêu của rễ thì NT ĐC1 có thời điểm xuất hiện rễ sớm nhất, tuy nhiên số rễ không nhiều hơn các NT còn lại tại thời điểm 2 tháng.

Nồng độ tương tự cũng đã được ghi nhận trong các nghiên cứu trên các đối tượng lan khác, mặc dù chitosan sử dụng là khác nhau. Nồng độ 10-20 mg/l đã được báo cáo là kích thích tăng trưởng tốt PLB (protocorm-like body) và tái sinh cây con lan *Dendrobium* (Limpanavech và cs., 2003; Nge và cs., 2006; Pornpienpakdee và cs., 2010). Đối với lan *Grammatophyllum* thì nồng độ 15 mg/l trong môi trường lỏng, 25 mg/l trên môi trường thạch làm tăng tốc độ phát triển của mẫu PLB đáng kể (7 lần và 4 lần; tương ứng) (Sopalun và cs., 2010). Đối với lan hồ điệp, bổ sung chitosan 5-25 mg/l có hiệu quả cho sự tăng sinh PLB và sinh trưởng của cụm chồi với số chồi, chiều cao chồi gia tăng tương đối. Ngoài ra, nồng độ chitosan 15-25 mg/l cải thiện đáng kể chiều cao và sự hình thành rễ mới của cây con ở thời điểm 70 ngày sau khi cấy (Lê Hồng Giang và Nguyễn Bảo Toàn, 2012; Vương Thị Hồng Loan và cs., 2016). Trong nghiên cứu này, cho tới thời điểm 2 tháng sau khi cấy, chitosan được bổ sung với nồng độ 20 ppm cho tỉ lệ phát sinh chồi nhiều nhất cũng như kích thích chồi chính tăng trưởng về chiều cao và phát sinh lá mới tốt hơn các nghiệm thức còn lại (Hình 2, Bảng 3).



Hình 2. Tỷ lệ hình thành chồi mới theo thời gian nuôi cấy trên môi trường bổ sung chitosan

Bảng 3. Ảnh hưởng của chitosan lên chiều cao và lá mới của chồi lan mokara

	Số lá mới (chồi chính)	Sự tăng chiều cao chồi chính (mm)	Ngày phát sinh rễ mới	Số rễ
ĐC1	5,50 ^{bc} ± 0,65	12,50 ^{ab} ± 1,26	6,50^a ± 0,29	1,75 ^{ab} ± 0,25
ĐC2	4,00 ^{ab} ± 1,50	11,67 ^{ab} ± 1,67	10,33 ^b ± 0,67	1,00 ^a ± 0,00
C5	5,50 ^{bc} ± 0,50	14,50 ^{bc} ± 0,50	10,25 ^b ± 1,49	2,25 ^b ± 0,48
C20	5,80^c ± 0,58	17,20^c ± 0,80	8,80 ^{ab} ± 0,97	2,00 ^{ab} ± 0,45
C80	3,67 ^a ± 0,33	9,67 ^a ± 1,74	9,83 ^b ± 0,48	1,17 ^a ± 0,17
C320	4,40 ^{abc} ± 0,24	14,20 ^{bc} ± 0,92	8,00 ^{ab} ± 1,05	1,20 ^a ± 0,20

Giá trị = TB SE, các chữ cái khác nhau trong cùng 1 cột biểu thị sự khác nhau về mặt thống kê ($\alpha = 0,05$; phép thử Duncan). Số liệu được lấy sau 2 tháng nuôi cấy.



Hình 3. Ảnh hưởng của nồng độ chitosan lên hình thái chồi lan mokara

Từ trái sang phải: ĐC1 (môi trường nền, không bổ sung acid và chitosan), ĐC2 (bổ sung 320 ppm acid acetic), C5, C20, C80 và C320 (môi trường có bổ sung chitosan nồng độ 5, 20, 80 và 320 ppm).

Hình ảnh được chụp sau 2 tháng nuôi cấy.

KẾT LUẬN

Chitosan tách chiết từ tôm, có khối lượng phân tử trong khoảng 30-50KDa, độ deacetyl 82-85% thích hợp để kích thích kéo dài chồi lan mokara nuôi cấy mô với nồng độ bổ sung là 20 ppm. Đây là cơ sở để ứng dụng chitosan trong nuôi cấy mô thực vật nói chung và lan mokara nói riêng. Để ứng dụng hiệu quả, cần khảo sát thêm ảnh hưởng chitosan lên các giai đoạn khác nhau của qui trình vi nhân giống

cũng như quan sát kết quả trong thời gian dài hơn (trên 2 tháng) cho đến khi thu nhận được cây con đủ tiêu chuẩn đưa ra vườn ươm.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được thực hiện dưới sự tài trợ kinh phí từ đề tài cấp Trường mã số TR2018-13-09. Ngoài ra, nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn nhóm nghiên cứu Chitin-Chitosan (Trường Đại học Nha Trang) đã cung cấp chitosan cho các thí nghiệm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tiếng Việt

- Đặng Xuân Viên (2011) Nhân nhanh *in vitro* hoa lan Mokara. *Luận văn tốt nghiệp*, Trường Đại học Nông Lâm TP Hồ Chí Minh
- Lê Hồng Giang và Nguyễn Bảo Toàn (2012) Hiệu quả của chitosan lên sự sinh trưởng của cụm chồi và cây con lan hồ điệp (*Phalaenopsis* sp.) *in vitro*. *Tạp chí Khoa học* 24a: 88-95

3. Nguyễn Thị Nhật Linh, Hoàng Thanh Tùng, Nguyễn Hoàng Lộc, Dương Tấn Nhựt (2016) Ảnh hưởng của các elicitor sinh học và phi sinh học đến sinh khối rễ thứ cấp và hàm lượng saponin trong nuôi cấy lỏng lắc rễ bất định Sâm Ngọc Linh. *Tạp chí Công nghệ sinh học* 15(2): 285-291
4. Tạ Hữu Minh (2012), Khảo sát ảnh hưởng của indole-3 Butyric Acid (IBA) và N6-Benzylaminopurine (BAP) lên quá trình tạo chồi lan Mokara *in vitro*. *Đồ án tốt nghiệp đại học ngành Công nghệ sinh học* Trường Đại học Nha Trang
5. Trần Thị Thanh Chi (2016) Nghiên cứu hoàn thiện qui trình nhân giống *in vitro* cây lan mokara. *Đồ án tốt nghiệp đại học ngành Công nghệ sinh học*, Trường Đại học Nha Trang
6. Trang Sĩ Trung, Trần Thị Luyến, Nguyễn Anh Tuấn, Nguyễn Thị Hằng Phương (2018) Chitin - Chitosan từ phế liệu thủy sản và ứng dụng. *NXB Khoa học và Kỹ thuật*, Hà Nội
7. Vương Thị Hồng Loan, Nguyễn Thị Điệp, Kha Nữ Tú Uyên, Huỳnh Thị Kim (2016) Ảnh hưởng của chitosan lên sự nhân nhanh chồi và tăng trưởng của lan hồ điệp *Phalaenopsis amabilis in vitro*. *Kỷ yếu Hội nghị CNSH toàn quốc khu vực phía Nam*, TP HCM, 37

Tiếng Anh

8. Asghari-Zakaria R, Maleki-Zanjani B, Sedghi E (2009) Effect of *in vitro* chitosan application on growth and minituber yield of *Solarium tuberosum* L. *Plant Soil Environ* 55(6): 252-256
9. Barka EA, Eullaffroy P, Clement C, Vernet G (2004) Chitosan improves development and protects *Vitis vinifera* L. against *Botrytis cinerea*. *Plant Cell Reports* 22, 608-614
10. Berezina N (2016) Production and application of chitin. *Physic Sci Rev* 1: 1-8
11. Chirkov SN, Il'ina AV, Surgucheva NA, Letunova EV, Varitsev YA, Tatarinova NY, Varlamo VP (2001) Effect of chitosan on systemic viral infection and some defense responses in potato plants. *Russ J Plant Physiol*, 48(6): 774-779
12. Cuong HN, Tung HT, Minh NC, Hoa NV, Phuong PTD, Trung TS (2017) Antibacterial activity of chitosan from squid pens (*Loligo chensis*) against *Erwinia carotovora* from soft rot postharvest tomato fruit. *J Pol Mat* 34(1): 319-330
13. Goy RC, De Britto D, Assis OBG (2009) A review of the antimicrobial activity of chitosan. *Polimeros* 19(3): 241-247
14. Hadrami AE, Adam LR, Hadrami IE, Daayf F (2010) Chitosan in plant protection. *Mar Drugs* 8: 968-987, doi:103390/md8040968
15. Jia X, Meng Q, Zeng H, Wang W, Yin H (2015) Chitosan oligosaccharide induces resistance to Tobacco mosaic virus in Arabidopsis via the salicylic acid-mediated signalling pathway. *Sci Rep* 6: 26144
16. Jung J, Zhao Y (2013) Impact of the structural differences between α - and β -chitosan on their depolymerizing reaction and antibacterial activity. *J Agri Food Chem* 61: 8793-8789
17. Kim S (2018) Competitive Biological Activities of Chitosan and Its Derivatives: Antimicrobial, Antioxidant, Anticancer, and Anti-Inflammatory Activities. *Int J Pol Sci* 2018, Article ID 1708172, 13 pages
18. Kowalski B, Terry FK, Herrera L, Peñalver DA (2006) Application of soluble chitosan *in vitro* and in the greenhouse to increase yield and seed quality of potato minitubers. *Potato Res* 49: 167-176
19. Lee YH (1994) Genomic and meiotic analysis of Mokara orchids. *J Heredity* 85(1): 39-43
20. Limpanavech P, Chaiyasuta S, Vongpromek R, Pichyangkura R, Khunwasi C, Chadchawan S, Lotrakul P, Bunjongrat R, Chaidee A, Bangyeek-hun T (2008) Chitosan effects on floral production, gene expression, and anatomical changes in the *Dendrobium* orchid. *Sci Hortic* 116(1): 65-72
21. Long LT, Tan LV, Boi VN, Trung TS (2017), Antifungal activity of water-soluble chitosan against *Colletotrichum capsici* in postharvest chili pepper. *J Food Process Preserv* 2017: e13339
22. Mohammedi Z (2017) Chitosan and chitosan oligosaccharides: applications in medicine, agriculture and biotechnology. *Int J Bioorg Chemi* 2(3): 102-106

23. Nga HT, Hoa BT, Minh TV (2017) Micropropagation of tropical mokara by flower-stalk culture technique. *Int J Curr Res* 9: 49135-49138
24. Nge KL, Nwe N, Chandkrachang S, Stevens WF (2006) Chitosan as a growth stimulator in orchid tissue culture. *Plant Sci* 170: 1185-1190
25. Pornpienpakdee P, Singhasurasak R, Chaiyasap P, Pichyangkura R, Bunjongrat R, Chadchawan S, Limpanavech P (2010) Improving the micropropagation efficiency of hybrid *Dendrobium* orchids with chitosan. *Sci Hort* 124(4): 490-499
26. Salachna P, Zawadzińska A (2014) Effect of chitosan on plant growth, flowering and corms yield of potted freesia. *J Eco Eng* 15(3): 97-102
27. Soni U, Bajpai J, Bajpai AK (2015) Chitosan-activated carbon nanocomposites as potential biosorbent for removal of nitrophenol from aqueous solutions. *Int J Nanomat Biostruct* 5(4): 53-61
28. Sopalun K, Thammasiri K, Ishikawa K (2010) Effects of chitosan as the growth stimulator for *Grammatophyllum speciosum* in vitro culture. *World Academy of Science, Engineering and Technology - Internat J Bioen Life Sci* 4: 2010828-830
29. Szymańska E, Winnicka K (2015) Stability of chitosan - a challenge for pharmaceutical and biomedical applications. *Mar Drugs* 13(4): 1819-1846, doi: 103390/md13041819
30. Teng D (2012) From chitin to chitosan. In: Yao C, Li J, Yao F, Jin J (eds) Chitosan-based hydrogels: Functions and applications, CRC Press, Boca Raton
31. Zhang M, Tan T, Yuan H, Rui C (2003) Insecticidal and Fungicidal Activities of Chitosan and Oligo-chitosan. *J Bioact Compat Pol* 18: 391-400