

NHÂN GIỐNG *IN VITRO* LAN MOKARA THÔNG QUA PROTOCORM-LIKE BODY TỪ MÔ LÁ

Hà Đăng Chiến^{1*}, Nguyễn Văn Đình¹, La Việt Hồng¹,
Vũ Thu Trang^{1,2}, Đào Thị Xuân^{1,2}, Cao Phi Bằng³

¹Trường Đại học Sư phạm Hà Nội 2,

²Trường Phổ thông dân tộc Nội trú cấp 2-3 Vĩnh Phúc, ³Trường Đại học Hùng Vương

TÓM TẮT

Mokara là giống lan lai có nguồn gốc di truyền từ ba chi khác nhau *Arachnis*, *Ascocentrum* và *Vanda*. Đây là một trong những loại hoa lan cắt cành quan trọng đang được trồng rộng rãi ở nhiều nước như Singapore, Indonesia, Thái Lan... và Việt Nam. Nghiên cứu này hướng đến nhân giống *in vitro* lan Mokara từ mô lá thông qua tạo PLB. Kết quả nghiên cứu cho thấy, môi trường MS có bổ sung 2,0 mg/l 2,4-D thích hợp với việc cảm ứng tạo PLB từ mô lá. Sự tạo cụm chồi tốt nhất ở môi trường MS có bổ sung 10% nước dừa và 2,0 mg/l BAP. Sự tạo rễ lan Mokara thích hợp nhất ở môi trường MS có bổ sung 1,0 mg/l NAA. Kết quả nghiên cứu này bước đầu góp phần xây dựng quy trình nhân giống *in vitro* lan Mokara ứng dụng trong sản xuất giống lan có giá trị này.

Từ khóa: Mokara; *in vitro*; PLBs; tạo chồi; tạo rễ; BAP; 2,4-D; NAA; MS

Ngày nhận bài: 15/4/2020; Ngày hoàn thiện: 08/7/2020; Ngày đăng: 10/7/2020

IN VITRO PROPAGATION OF MOKARA THROUGH PROTOCORM-LIKE BODY FROM LEAF

Ha Dang Chien^{1*}, Nguyen Van Dinh¹, La Viet Hong¹,
Vu Thu Trang^{1,2}, Dao Thi Xuan^{1,2}, Cao Phi Bang³

¹Hanoi Pedagogical University No.2,

²Ethnic Boarding School in Vinh Phuc, ³Hung Vuong University

ABSTRACT

Mokara is a hybrid orchid derived from three genetically different genera *Arachnis*, *Ascocentrum* and *Vanda*. This hybrid orchid is one of the important flower cuttings and is widely grown in many countries such as Singapore, Indonesia, Thailand... and Vietnam. This research aims to micropropagate Mokara orchid from leaf tissue through PLB generation. The results of this study showed that MS medium supplemented with 2.0 mg l⁻¹ 2,4-D was suitable for inducing PLB from leaf tissue. The best shoot formation was observed in MS medium supplemented with 10% coconut water and 2.0 mg l⁻¹ BAP. *In vitro* rooting was best suited on MS medium supplemented with 1.0 mg l⁻¹ NAA. These results could be the basis for building an *in vitro* propagation process for Mokara orchid which could be applied in the production of this valuable orchid variety.

Keywords: Mokara; *in vitro*; PLBs; shoot induction; rooting; BAP; 2,4-D; NAA; MS

Received: 15/4/2020; Revised: 08/7/2020; Published: 10/7/2020

* Corresponding author. Email: hachien.tn@gmail.com

1. Mở đầu

Mokara là dạng lai của ba chi *Arachnis*, *Ascocentrum* và *Vanda* được lai tạo bởi C. Y. Mok. Hoa lan Mokara rất đa dạng về hình dạng và có nhiều màu sắc khác nhau như màu hồng, đỏ, vàng chanh, vàng, cam, tím, trắng... với mỗi màu sắc lại có sự đa dạng tùy thuộc vào từng giống [1]. Với nhiều ưu điểm, lan Mokara đã được trồng rộng rãi nhiều nơi trên thế giới và là loại lan cắt cành chủ lực hiện nay. Vì vậy nhu cầu về giống lan Mokara, đặc biệt giống chất lượng cao ngày càng tăng.

Tuy nhiên, một trong những đặc điểm của cây hoa lan Mokara đó là không tự thụ phấn trong tự nhiên, việc nhân giống tự nhiên là rất khó khăn. Phương pháp nhân giống chủ yếu hiện nay vẫn là giâm hom. Gần đây, nghiên cứu nhân giống *in vitro* lan Mokara từ phát hoa đã được thực hiện [2], [3]. Tuy nhiên, phương pháp này đòi hỏi có thời gian chăm sóc cây mẹ trưởng thành ra hoa để tạo nguồn vật liệu khởi đầu.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi hướng tới nghiên cứu nhân giống *in vitro* lan Mokara thông qua sự hình thành thể tiền chồi (protocorm-like body, PLB) từ mô lá, mở ra một kỹ thuật có thể nhân nhanh số lượng lớn lan Mokara.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Lá *in vitro* lan Mokara đang lưu giữ tại Phòng thí nghiệm Nuôi cấy mô tế bào thực vật, khoa Sinh – Kỹ thuật Nông nghiệp trường Đại học Sư phạm Hà Nội 2 được sử dụng làm vật liệu khởi đầu.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Giai đoạn tạo protocorm – like body (PLB)

Tách lá *in vitro* ra khỏi chồi mẹ và cấy chuyển vào các bình chứa môi trường MS kí hiệu PI1, PI2, PI3, PI4, PI5, PI6 và PI7 có bổ sung 2,4-D ở các nồng độ 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5 và 4,0 mg/l. Mỗi công thức có 3 bình thí nghiệm với 3 lá/bình. Các bình thí nghiệm được đặt ngẫu nhiên hoàn toàn trong bóng tối.

2.2.2. Giai đoạn tạo chồi

Protocorm-like body (PLB) được chuyển sang môi trường MS [4] bổ sung 10% nước dừa và BAP ở các nồng độ từ 0 đến 4,0 mg/l, tương ứng với các công thức SI1-SI8. Mỗi công thức gồm ba lần lặp lại, mỗi lần lặp lại gồm 3 bình thí nghiệm có chứa 3 cụm PLB/bình. Các bình thí nghiệm được đặt ngẫu nhiên hoàn toàn trong môi trường có cường độ chiếu sáng 2000 lux, nhiệt độ $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, thời gian chiếu sáng 10 giờ/ngày.

2.2.3. Giai đoạn tạo cây hoàn chỉnh

Các chồi *in vitro* lan Mokara có kích thước > 2 cm được chuyển sang môi trường tạo rễ MS [4] có bổ sung α -NAA ở các nồng độ từ 0 đến 2,0 mg/l tương ứng với các công thức RI1-RI5. Mỗi công thức gồm ba lần lặp lại, mỗi lần lặp lại gồm 3 bình thí nghiệm có chứa 3 chồi/bình. Các bình thí nghiệm được đặt ngẫu nhiên hoàn toàn trong môi trường có cường độ chiếu sáng 2000 lux, nhiệt độ $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, thời gian chiếu sáng 10 giờ/ngày.

2.2.4. Xử lý số liệu

Số liệu được xử lý thống kê trên phần mềm SPSS. Sự khác biệt giữa các giá trị trung bình được kiểm tra bằng Test Duncan ở $\alpha=0,05$ [5].

3. Kết quả và thảo luận

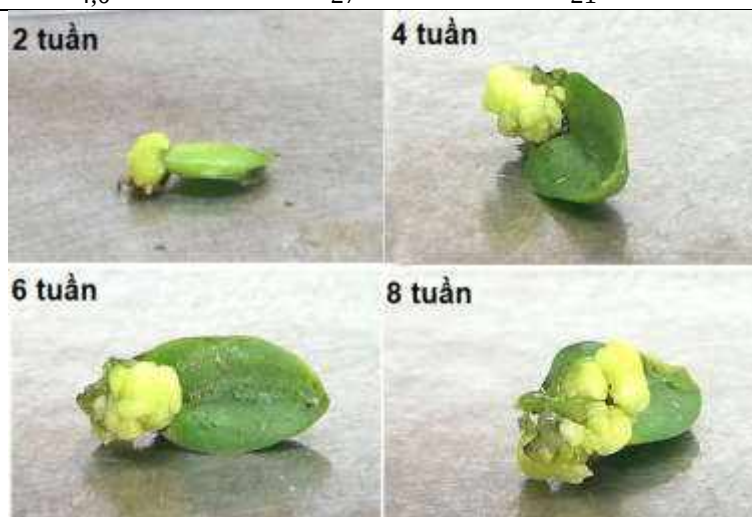
3.1. Kết quả tạo PLB từ lá lan Mokara dưới ảnh hưởng của 2,4-D

Các mảnh lá của chồi *in vitro* được tách và cấy chuyển vào các bình nuôi cấy chứa môi trường MS có bổ sung 2,4-D ở các nồng độ khác nhau, đặt trong môi trường tối để cảm ứng tạo PLB. Kết quả theo dõi sau 8 tuần được trình bày ở bảng 1.

Số liệu trong bảng 1 cho thấy, tỉ lệ tạo PLB ở các công thức không giống nhau. Có 5 công thức với nồng độ 2,4-D từ 2,0 đến 4,0 mg/l cho tỉ lệ tạo PLB lớn hơn 50%. Tỉ lệ tạo PLB cao nhất ở nồng độ 2,4-D 2,0 mg/l, đạt 92,59%. Hình thái PLB của một số công thức thí nghiệm được thể hiện ở hình 1. Các PLB được tạo thành tại vị trí mặt cắt của lá.

Bảng 1. Ảnh hưởng của 2,4-D đến hình thành PLB từ lá lan Mokara sau 8 tuần nuôi cấy

Công thức	Nồng độ 2,4-D (mg/ml)	Tổng số mẫu lá	Số mẫu lá tạo PLB	Tỷ lệ tạo PLB (%)
PI1	1,0	27	12	44,44
PI2	1,5	27	10	37,04
PI3	2,0	27	25	92,59
PI4	2,5	27	16	59,26
PI5	3,0	27	20	74,07
PI6	3,5	27	18	66,67
PI7	4,0	27	21	77,78

**Hình 1.** PLB lan Mokara trong môi trường MS có bổ sung 2,4-D nồng độ 2,0 mg/l sau 8 tuần nuôi cấy

Kết quả nghiên cứu này có sự tương đồng với nghiên cứu tạo PLB từ mảnh lá của lan Vanda sp, tỉ lệ tạo PLB từ mảnh lá của cây lan Vanda sp cũng đạt cao nhất (100%) ở nồng độ 2,4-D 2,0 mg/l [6]. Trong nghiên cứu khác, PLB cũng được cảm ứng hình thành từ mảnh lá lan giống lai (Aranda Wan Chark Kuan ‘Blue’ x Vanda coerulea Griff. ex. Lindl.) nhờ các chất điều hoà sinh trưởng BA, Kn, TDZ và Zeatin [7].

3.2. Kết quả tạo cụm chồi từ PLB lan Mokara dưới ảnh hưởng của BAP

Trong nhân giống *in vitro* thì khâu tạo được cụm chồi từ PLB có hệ số nhân chồi cao, chồi khỏe là rất cần thiết và có quan hệ đến hiệu quả nhân giống *in vitro* các loại cây trồng nói chung và lan Mokara nói riêng. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ BAP đến sự hình thành cụm chồi từ PLB của lan Mokara được trình bày trong bảng 2.

Bảng 2. Ảnh hưởng của nồng độ BAP đến sự hình thành cụm chồi từ PLB lan Mokara sau 8 tuần nuôi cấy

Công thức	Nồng độ BAP (mg/ml)	Số chồi/mẫu	Số lá/chồi	Chiều cao chồi (cm)	Đặc điểm chồi
SI1	0,0	12,57 ^e	2,00 ^a	0,71 ^d	Nhỏ, yếu, xanh nhạt
SI2	1,0	15,74 ^e	2,43 ^a	0,86 ^{cd}	Nhỏ, yếu, xanh nhạt
SI3	1,5	17,57 ^{de}	2,14 ^a	1,43 ^{bc}	Mập, yếu, xanh nhạt
SI4	2,0	32,43^a	2,14^a	2,14^a	Mập, xanh đậm, sinh trưởng tốt
SI5	2,5	22,43 ^{cd}	2,29 ^a	1,57 ^b	Mập, yếu, xanh nhạt
SI6	3,0	29,86 ^b	2,00 ^a	1,14 ^{bcd}	Nhỏ, yếu, xanh nhạt
SI7	3,5	30,23 ^b	2,00 ^a	1,29 ^{bcd}	Nhỏ, yếu, xanh nhạt
SI8	4,0	25,10 ^{bc}	2,29 ^a	1,29 ^{bcd}	Nhỏ, yếu, xanh nhạt

Ghi chú: Giá trị thể hiện trong bảng là trung bình của 3 lần nhắc lại. Trong cùng một cột, ký tự theo sau khác nhau thể hiện sự sai khác ở $\alpha=0,05$.

Số liệu trong bảng 2 cho thấy, cụm chồi có thể hình thành từ PLB ở tất cả các công thức thí nghiệm có hoặc không bổ sung BAP với hệ số tạo chồi khác nhau. Số chồi/mẫu được quan sát ở các công thức thí nghiệm SI1-SI9 lần lượt bằng 12,57; 15,74; 17,57; 32,43; 22,43; 29,86; 30,23 và 25,10 chồi/mẫu. Như vậy, khả năng tạo chồi tốt nhất từ PLB của lan Mokara được quan sát ở công thức SI4, với môi trường MS có bổ sung 10% nước dừa và BAP 2,0 mg/l. Việc bổ sung BAP 2,0 đến 4,0 mg/l có hiệu ứng tạo chồi cao hơn so với không bổ sung BAP.



Hình 2. Mẫu cụm chồi phát sinh từ PLB lan Mokara (sau 8 tuần nuôi cấy trong môi trường MS có bổ sung 10% nước dừa và BAP 2,0 mg/l)

Bên cạnh đó, hình thái cụm chồi cũng được quan sát (bảng 2 và hình 2). Số lá trung bình/chồi ở các công thức thí nghiệm dao động trong khoảng từ 2,00 đến 2,43. Tuy nhiên, không có sự sai khác có ý nghĩa thống

kê giữa các công thức thí nghiệm ở mức ý nghĩa 0,95. Chiều cao chồi ở các công thức thí nghiệm SI1-SI9 nằm trong khoảng 0,71 đến 2,14 cm. Trong đó, chiều cao chồi thấp nhất ở công thức SI1 (0,71 cm) và lớn nhất ở công thức SI4 (2,14 cm). Hình thái cụm chồi nhỏ, yếu và xanh nhạt được quan sát ở các công thức SI1, SI2, SI6, SI7 và SI8. Hình thái mập, yếu, xanh nhạt được quan sát ở các công thức SI3 và SI5. Chỉ có ở công thức SI4 cho cụm chồi mập, sinh trưởng tốt và xanh đậm.

Như vậy, việc bổ sung BAP có tác động tích cực với sự tạo cụm chồi của lan Mokara. Trong đó, nồng độ BAP thích hợp nhất với việc tạo cụm chồi từ PLB là 2,0 mg/l. Trong nghiên cứu trước, BAP ở nồng độ 1,5 và 2,0 mg/l được chứng minh có hiệu ứng tạo chồi từ PLB lan Mokara mạnh nhất với số chồi/cụm chồi lên tới 67,66 (1,5 mg BAP/l) và 55,66 chồi/cụm chồi (2,0 mg/l) [3].

3.3. Kết quả tạo rễ lan Mokara từ chồi dưới ảnh hưởng của NAA

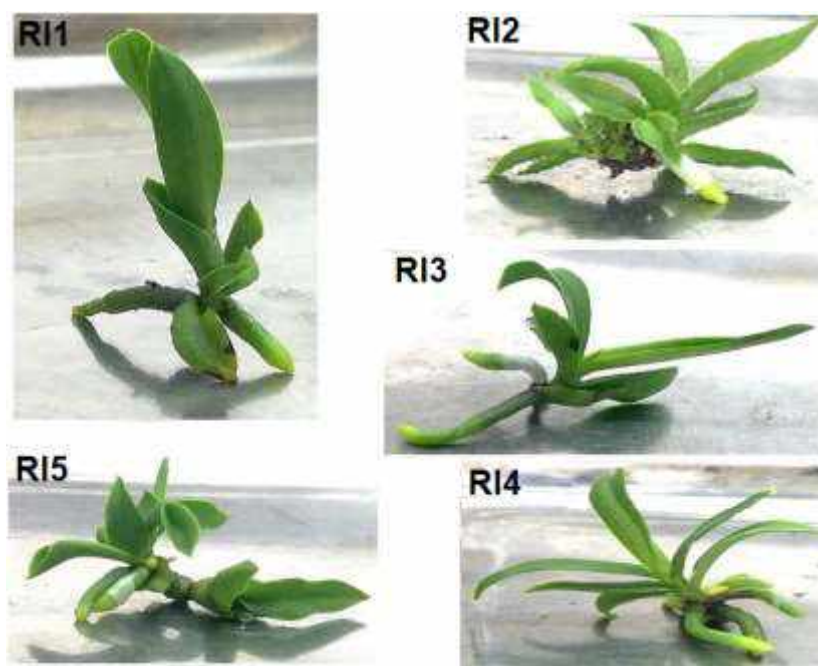
Với mục tiêu tạo cây lan Mokara hoàn chỉnh đưa vào sản xuất thì chồi *in vitro* cần được nuôi dưỡng trong môi trường phù hợp để tạo rễ. Trong nghiên cứu này, các chồi lan Mokara được chuyển sang các môi trường MS có bổ sung NAA với các nồng độ khác nhau nhằm xác định nồng độ phù hợp để ra rễ, tạo cây hoàn chỉnh (bảng 3 và hình 3).

Số liệu trong bảng 3 cho thấy, ở tất cả các công thức thí nghiệm (có hoặc không bổ sung NAA) rễ đều được hình thành từ chồi lan Mokara nhưng với hiệu quả khác nhau.

Bảng 3. Ảnh hưởng của NAA trong môi trường nuôi cấy đến khả năng tạo rễ lan Mokara *in vitro* sau 4 tuần nuôi cấy

Công thức	Nồng độ NAA (mg/l)	Số rễ/chồi	Chiều dài rễ (cm)	Số lá mới hình thành/chồi
RI1	0,0	1,86 ^c	0,57 ^d	1,57 ^b
RI2	0,5	2,29 ^{bc}	1,00 ^b	1,29 ^c
RI3	1,0	3,14^a	1,71^a	2,71^a
RI4	1,5	2,57 ^{ab}	0,86 ^b	1,43 ^b
RI5	2,0	2,57 ^{ab}	0,71 ^c	1,43 ^b

Ghi chú: Trong các cột kí tự khác nhau thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê tại $\alpha = 0,05$



Hình 3. Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến khả năng ra rễ, chiều dài rễ, số lá mới/chồi lan Mokara *in vitro* sau 4 tuần nuôi cấy

- Việc bổ sung NAA trong môi trường nuôi cấy đều làm tăng khả năng ra rễ chồi *in vitro* so với công thức không bổ sung NAA. Số rễ/chồi cao nhất (3,14 rễ/chồi) được quan sát ở công thức RI3. Số rễ/chồi ở các công thức được xếp theo thứ tự RI3 > RI4 = RI5 > RI2 > RI1.

- Bổ sung NAA vào môi trường nuôi cấy ở các nồng độ từ 0,5 đến 2,0 mg/l đều làm tăng chiều dài rễ của chồi *in vitro* so với công thức không bổ sung NAA. Chiều dài rễ lớn nhất ở RI3 (1,71). Chiều dài rễ của cây lan Mokara ở các công thức được xếp theo thứ tự giảm dần RI3 > RI2 = RI4 > RI5 > RI1.

- Các công thức thí nghiệm chồi *in vitro* lan Mokara đều hình thành lá mới, điều này chứng tỏ các cây hoàn chỉnh đều có khả năng sinh trưởng tốt. Thứ tự khả năng hình thành lá mới ở các công thức thí nghiệm được xếp theo thứ tự: RI3 > RI1 = RI4 = RI5 > RI2. Khả năng hình thành lá tốt nhất ở công thức RI3 (2,71 lá/chồi).

Như vậy, công thức RI3 với môi trường MS có bổ sung 1,0 mg/l NAA phù hợp để kích thích ra rễ từ chồi *in vitro* lan Mokara để tạo cây hoàn chỉnh. Theo một nghiên cứu đã công

bố trước đây cho thấy IAA cũng có khả năng cảm ứng tạo rễ ở cây lan Mokara, nồng độ IAA thích hợp nhất là 0,5 mg/l [3]. Trong một nghiên cứu khác về khả năng ra rễ của giống lan lai Aranda Wan Chark Kuan 'Blue' x Vanda coerulea Griffth. ex. Lindl., Gantait và Sinniah (2012) đã tìm hiểu ảnh hưởng của các chất điều hòa sinh trưởng BA, IBA và ADS, kết quả cho thấy sự ra rễ tốt nhất được quan sát ở công thức thí nghiệm có bổ sung 1 mg/l BA, 0,5 mg/l IBA và 60 mg/l ADS [7].

4. Kết luận

Trong nghiên cứu này, quá trình nhân giống *in vitro* lan Mokara từ mô lá thông qua tạo PLB đã được tìm hiểu. Môi trường thích hợp cho việc cảm ứng hình thành PLB là môi trường MS + 2,0 mg/l 2,4-D. Môi trường thích hợp để tạo chồi từ PLB là MS + 2,0 mg/l BAP + 10% nước dừa 10%. Môi trường thích hợp để tạo rễ là MS + 1,0 mg/l NAA.

Lời cảm ơn

Đề tài này được tài trợ kinh phí từ Quỹ hoạt động khoa học và công nghệ của Trường ĐHTN Hà Nội 2, Mã số: C.2018-18-07.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1]. D. H. Xo, *Mokara orchid growing techniques*. Ho Chi Minh City: Agriculture Publishing house, 2011.
- [2]. T. W. Yam, and J. Arditti, *Micropropagation of orchids*. West Sussex, UK: John Wiley & Sons, 2017, p. 2316.
- [3]. H. T. Nga, B. T. Hoa, and T. V. Minh, "Micropropagation of tropical Mokara by flower-stalk culture technique," *International Journal of Current Research*, vol. 9, no. 04, pp. 49135-49138, 2017.
- [4]. T. Murashige, and F. Skoog, "A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures," *Physiologia Plantarum*, vol. 15, no. 3, pp. 473-497, 1962.
- [5]. V. M. Nguyen, V. H. La, and X. P. Ong, *Methods in plant physiology*. Hanoi: Vietnam National University Press, Hanoi, 2013, p. 223.
- [6]. I. Budisantoso, N. Amalia, and K. Kamsinah, "In Vitro Callus Induction from Leaf Explants of Vanda sp Stimulated by 2, 4-D," *Biosaintifika: Journal of Biology & Biology Education*, vol. 9, no. 3, pp. 492-497, 2017.
- [7]. S. Gantait, and U. R. Sinniah, "Rapid micropropagation of monopodial orchid hybrid (Aranda Wan Chark Kuan 'Blue' × Vanda coerulea Griffth. ex. Lindl.) through direct induction of protocorm-like bodies from leaf segments," *Plant Growth Regulation*, vol. 68, no. 2, pp. 129-140, 2012/11/01 2012.